



(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 201920652 A

(43)公開日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：107131781

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 10 日

(51)Int. Cl.：

*C12N1/21 (2006.01)**A61K35/74 (2015.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**A61P37/02 (2006.01)*

(30)優先權：2017/09/08

美國

62/556,020

2018/02/20

美國

62/632,859

2018/05/08

美國

62/668,556

(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：古德曼 布萊恩 GOODMAN, BRIAN (US)；包斯 邦多納 BOSE, BAUNDAUNA (US)；大衛特 克里斯 J H DAVITT, CHRIS J. H. (IE)；卡爾頓 蘇菲亞 CARLTON, SOFIA (PT)；凱佛瑞 威爾 CAFFRY, WILL (US)；吳 漢克 WU, HANK (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：181 項 圖式數：9 共 252 頁

(54)名稱

源自普雷沃菌(PREVOTELLA)之胞外囊泡

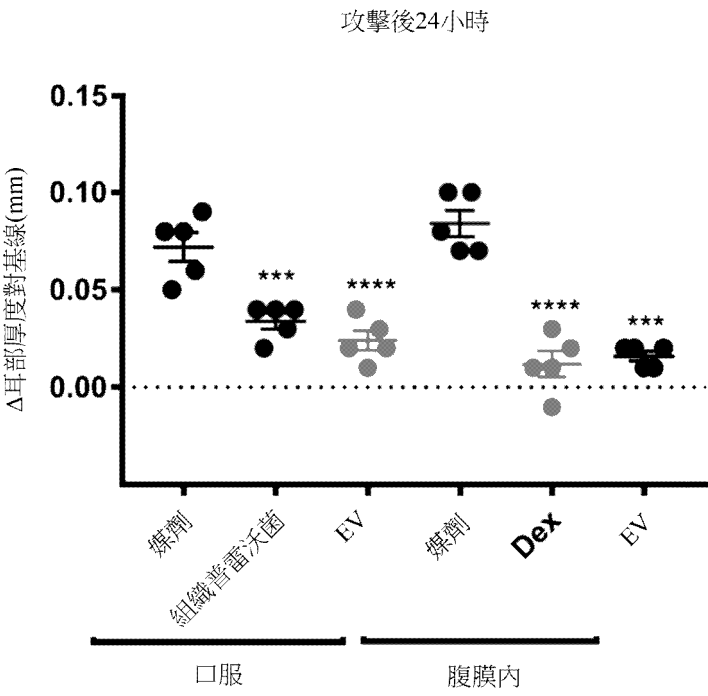
EXTRACELLULAR VESICLES FROM PREVOTELLA

(57)摘要

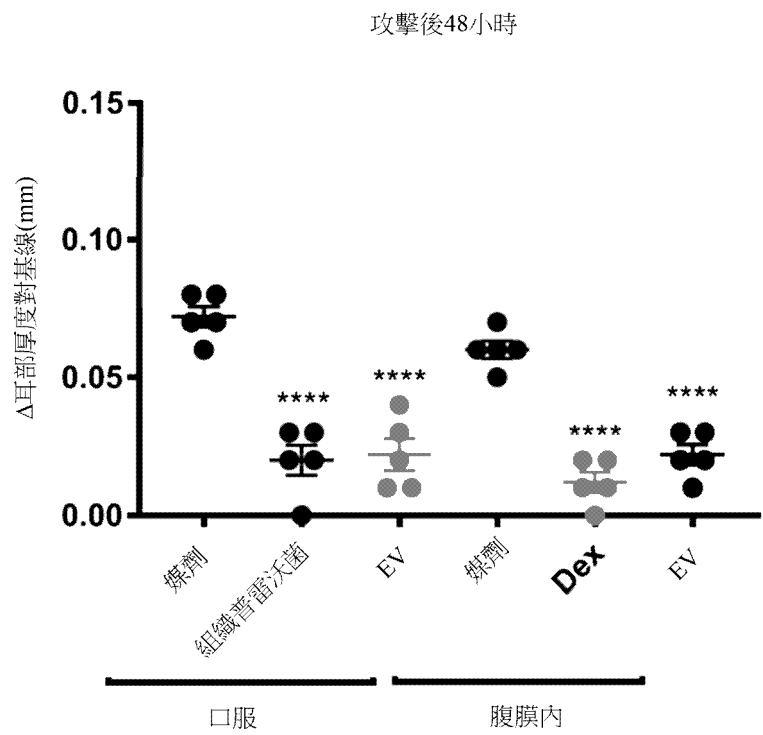
本文提供與適用作治療劑之普雷沃菌 EV 相關的方法及組合物。

Provided herein are methods and compositions related to Prevotella EVs useful as therapeutic agents.

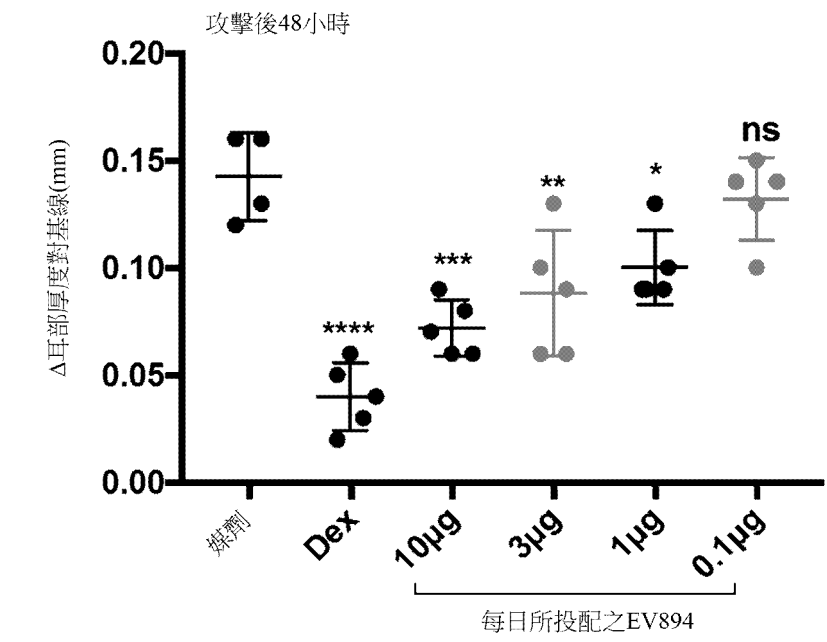
指定代表圖：



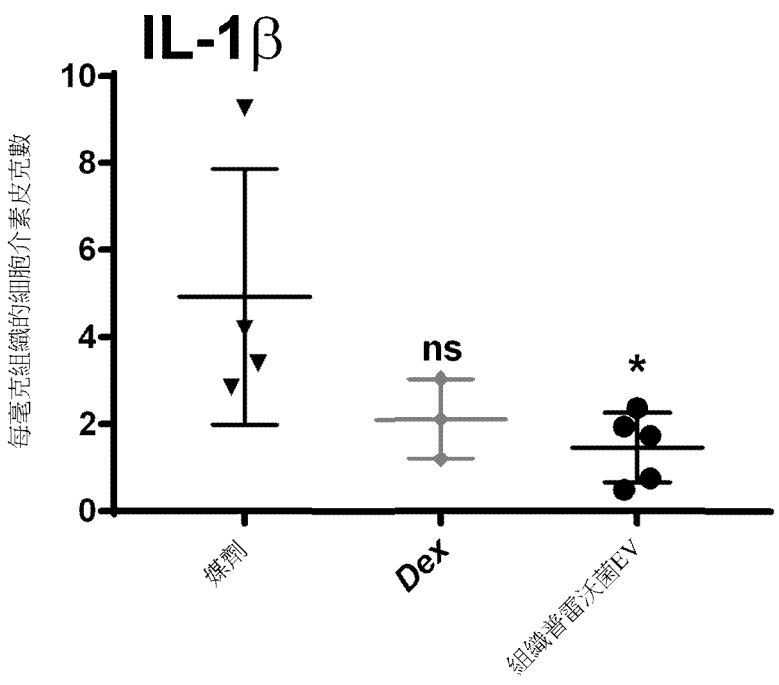
【圖1A】



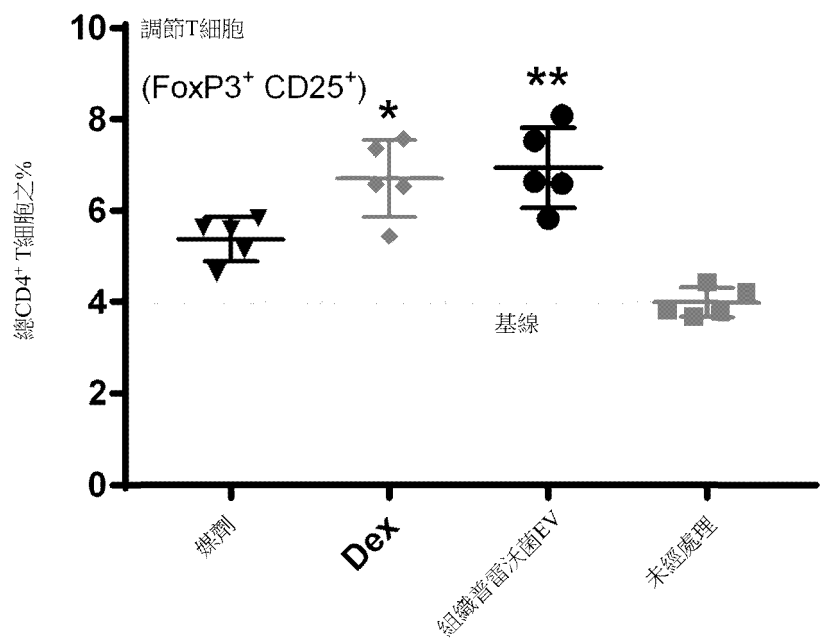
【圖1B】



【圖1C】



【圖1D】



【圖1E】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

源自普雷沃菌(PREVOTELLA)之胞外囊泡

【英文發明名稱】

EXTRACELLULAR VESICLES FROM PREVOTELLA

【技術領域】

【先前技術】

【發明內容】

【0001】 在某些態樣中，本文提供適用於治療及/或預防疾病(例如癌症、自體免疫疾病、發炎疾病、代謝疾病)的包含普雷沃菌(*Prevotella*)胞外囊泡(EV) (亦即由普雷沃菌屬的細菌產生或自其分離之EV)之醫藥組合物，以及製造及/或鑑別此類EV之方法及使用此類醫藥組合物(單獨或與其他治療劑組合例如用於治療癌症、自體免疫疾病、發炎疾病、代謝疾病)之方法。在一些實施例中，醫藥組合物包含普雷沃菌EV及完整普雷沃菌(例如活細菌、經殺滅細菌、經滅毒細菌)兩者。在某些實施例中，本文提供包含在不存在普雷沃菌EV下的普雷沃菌之醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物包含在不存在普雷沃菌下的普雷沃菌EV。在一些實施例中，醫藥組合物包含以下物種之普雷沃菌EV及/或普雷沃菌：阿爾伯普雷沃菌(*Prevotella albensis*)、羊水普雷沃菌(*Prevotella amnii*)、卑爾根普雷沃菌(*Prevotella bergensis*)、二路普雷沃菌(*Prevotella bivia*)、短普雷沃菌(*Prevotella brevis*)、布氏普雷沃菌(*Prevotella bryantii*)、頰普雷沃菌(*Prevotella buccae*)、口頰普雷沃菌(*Prevotella buccalis*)、糞便普雷沃菌(*Prevotella copri*)、牙普雷沃菌(*Prevotella dentalis*)、棲牙普雷沃菌

(*Prevotella denticola*)、解糖腴普雷沃菌(*Prevotella disiens*)、組織普雷沃菌(*Prevotella histicola*)、中間普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、小斑點普雷沃菌(*Prevotella maculosa*)、馬斯普雷沃菌(*Prevotella marshii*)、產黑普雷沃菌(*Prevotella melaninogenica*)、彩虹普雷沃菌(*Prevotella micans*)、多形普雷沃菌(*Prevotella multiformis*)、變黑普雷沃菌(*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃菌(*Prevotella oralis*)、口普雷沃菌(*Prevotella oris*)、齦炎普雷沃菌(*Prevotella oulorum*)、蒼白普雷沃菌(*Prevotella pallens*)、唾液普雷沃菌(*Prevotella salivae*)、斯特塞拉普雷沃菌(*Prevotella stercorea*)、坦納普雷沃菌(*Prevotella tanneriae*)、蒂莫普雷沃菌(*Prevotella timonensis*)、空腸普雷沃菌(*Prevotella jejuni*)、橙色普雷沃菌(*Prevotella aurantiaca*)、保氏普雷沃菌(*Prevotella baroniae*)、著色普雷沃菌(*Prevotella colorans*)、人體普雷沃菌(*Prevotella corporis*)、丹塔普雷沃菌(*Prevotella dentasini*)、棲居普雷沃菌(*Prevotella enoeca*)、斐氏普雷沃菌(*Prevotella falsenii*)、深黑色普雷沃菌(*Prevotella fusca*)、解肝素普雷沃菌(*Prevotella heparinolytica*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、嗜糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)、南錫普雷沃菌(*Prevotella nanceiensis*)、稻普雷沃菌(*Prevotella oryzae*)、沼澤普雷沃菌(*Prevotella paludivivens*)、胸膜炎普雷沃菌(*Prevotella pleuritidis*)、棲瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*)、解糖普雷沃菌(*Prevotella saccharolytica*)、靶心普雷沃菌(*Prevotella scopos*)、賽赫普雷沃菌(*Prevotella shahii*)、動膠普雷沃菌(*Prevotella zoogloformans*)或真空腔普雷沃菌(*Prevotella veroralis*)。在一些實施例中，本文提供包含此類細菌之生物反應器。

【0002】 在一些實施例中，普雷沃菌為普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。在一些實施例中，普雷沃菌菌株為包含與普雷沃菌菌株B 50329之核苷酸序列(例如基因組序列、16S序列、CRISPR序列)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%序列一致性(例如至少99.5 %序列一致性、至少99.6%序列一致性、至少99.7%序列一致性、至少99.8%序列一致性、至少99.9%序列一致性)的菌株。

【0003】 在一些實施例中，普雷沃菌為包含表1中所列之蛋白質及/或編碼表1中所列之蛋白質的基因的普雷沃菌之菌株。在一些實施例中，普雷沃菌為不含或實質上不含表2中所列之蛋白質及/或編碼表2中所列之蛋白質的基因的普雷沃菌之菌株。

【0004】 在某些實施例中，醫藥組合物包含特定比率之普雷沃菌與普雷沃菌EV粒子。舉例而言，在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、

61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、
 76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、
 91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、
 350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、
 950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、
 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、
 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、
 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、
 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、
 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含至
 少1個普雷沃菌。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、
 1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、
 2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、
 4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、
 5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、
 6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、
 8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、
 9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、
 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、

33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、
 48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、
 63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、
 78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、
 93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、
 400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、
 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含約1
 個普雷沃菌。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、
 1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、
 2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、
 4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、
 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、
 6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、
 8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、

9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、
 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、
 34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、
 49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、
 64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、
 79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、
 94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、
 450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、
 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含不
 超過1個普雷沃菌。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、
 1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、
 2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、
 4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、
 5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、

6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、
 8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、
 9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、
 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、
 33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、
 48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、
 63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、
 78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、
 93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、
 400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、
 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含至少1個普
 雷沃菌EV粒子。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、
 1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、
 2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、

4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、
 5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、
 6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、
 8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、
 9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、
 18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、
 33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、
 48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、
 63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、
 78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、
 93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、
 400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、
 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含約1個普雷
 沃菌EV粒子。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、

1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、
 2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、
 4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、
 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、
 6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、
 8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、
 9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、
 19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、
 34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、
 49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、
 64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、
 79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、
 94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、
 450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、
 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、

6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含不超過1個普雷沃菌EV粒子。

【0005】 在某些態樣中，普雷沃菌EV來自經工程改造之普雷沃菌，其經修飾以增強某些期望特性。舉例而言，在一些實施例中，經工程改造之普雷沃菌經修飾以增加普雷沃菌EV的產生。在一些實施例中，經工程改造之普雷沃菌經修飾以產生具有經提高口服遞送之普雷沃菌EV(例如，藉由改良耐酸性、黏液黏著性及/或滲透性及/或對膽汁酸之抗性、對抗微生物肽之抗性及/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、樹突狀細胞、巨噬細胞)以系統地或在合適生態棲位(例如腸系膜淋巴結、派氏集合淋巴結(Peyer's patch)、固有層、腫瘤引流淋巴結及/或血液)改良生物利用率；增強所產生之普雷沃菌EV的免疫調節及/或治療效果(例如單獨或與另一治療劑組合)；藉由所產生之普雷沃菌EV增強免疫活化及/或改良普雷沃菌細菌性及/或普雷沃菌EV製造(例如較高穩定性、經改良之耐凍融性、較短生成時間)。在一些實施例中，本文提供製造此類普雷沃菌EV及普雷沃菌之方法。在一些實施例中，投與本文所揭示之普雷沃菌EV對於治療受試者(例如患有癌症、免疫病症及/或代謝疾病之受試者)要比投與與衍生普雷沃菌EV的細菌相同的菌株之完整普雷沃菌更有效。

【0006】 在某些實施例中，本文提供治療患有癌症之受試者的方法，其包含向受試者投與本文所述之醫藥組合物。在某些實施例中，本文提供治療患有免疫病症(例如自體免疫疾病、發炎疾病、過敏)之受試者的方法，其包含向受試者投與本文所述之醫藥組合物。在某些實施例中，本文提供治療患有代謝疾病之受試者的方法，其包含向受試者投與本文所述

之醫藥組合物。

【0007】 在一些實施例中，該方法進一步包含向受試者投與抗生素。在一些實施例中，該方法進一步包含向受試者投與一或多種其他癌症療法(例如腫瘤之手術去除、投與化學治療劑、投與放射療法及/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、預致敏抗原呈現細胞、癌症特異性T細胞、癌症特異性嵌合抗原受體(CAR)T細胞、免疫活化蛋白及/或佐劑)。在一些實施例中，該方法進一步包含投與另一治療細菌及/或EV。在一些實施例中，該方法進一步包含投與免疫抑制劑及/或消炎劑。在一些實施例中，該方法進一步包含投與代謝疾病治療劑。

【圖式簡單說明】

【0008】 圖1A顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後24小時，口服或腹膜內投與組織普雷沃菌菌株A及組織普雷沃菌菌株A衍生之EV在降低抗原特異性耳部腫脹(耳部厚度)方面之功效。口服及腹膜內投藥組兩者中均看到功效。

【0009】 圖1B顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後48小時，口服或腹膜內投與組織普雷沃菌菌株A及組織普雷沃菌菌株A衍生之EV在降低抗原特異性耳部腫脹(耳部厚度)方面之功效。

【0010】 圖1C顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後48小時，以所指定之劑量(10 μ g、3 μ g、1 μ g及0.1 μ g)腹膜內投與組織普雷沃菌菌株A衍生之EV在降低抗原特異性耳部腫脹(耳部厚度)方面之功效。

【0011】 圖1D顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗

原攻擊之後48小時，腹膜內投與的組織普雷沃菌菌株A衍生之EV在減少IL-1 β 表現方面之能力。

【0012】 圖1E顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後48小時，腹膜內投與的組織普雷沃菌菌株A衍生之EV在增加頸椎淋巴結中的調節T細胞之積聚方面的能力。

【0013】 圖2顯示組織普雷沃菌菌株B-50329在接受甲硫胺酸膽鹼缺乏(MCD)飲食，引發NASH症狀之小鼠中在降低NASH活動度評分(NAS)方面為有效的。

【0014】 圖3A顯示組織普雷沃菌菌株B-50329減少了餵食MCD飲食之小鼠中的脂肪變性。

【0015】 圖3B及圖3C顯示組織普雷沃菌菌株B-50329減少了餵食MCD飲食之小鼠中的發炎。

【0016】 圖3D顯示組織普雷沃菌菌株B-50329減少了餵食MCD飲食之小鼠中的氣脹。

【0017】 圖4顯示組織普雷沃菌菌株B-50329減少了餵食MCD飲食之小鼠中的肝總膽固醇。

【0018】 圖5A及圖5B顯示組織普雷沃菌菌株B-50329減少了餵食MCD飲食之小鼠中的纖維化評分。

【0019】 圖6A顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後24小時，投與組織普雷沃菌菌株A、米拉諾普雷沃菌(*P. melanogenica*)、組織普雷沃菌菌株A衍生之EV、米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV在減少抗原特異性耳部膨脹(耳部厚度)方面之功效。米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV要比米拉諾普雷沃菌更有效。

【0020】 圖6B顯示在基於KLH的遲發型超敏反應小鼠模型中進行抗原攻擊之後48小時，投與組織普雷沃菌菌株A、米拉諾普雷沃菌、組織普雷沃菌菌株A衍生之EV、米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV在減少抗原特异性耳部膨脹(耳部厚度)方面之功效。米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV要比米拉諾普雷沃菌更有效。

【0021】 圖7A顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對了餵食MCD飲食之小鼠中的肝游離脂肪酸之影響。

【0022】 圖7B顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對餵食MCD飲食之小鼠中的肝總膽固醇之影響。

【0023】 圖7C顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對餵食MCD飲食之小鼠中的肝三酸甘油酯之影響。

【0024】 圖7D顯示組織普雷沃菌及米拉諾普雷沃菌對餵食MCD飲食之小鼠中的丙胺酸轉胺酶之影響。

【0025】 圖7E顯示組織普雷沃菌及米拉諾普雷沃菌對餵食MCD飲食之小鼠中的天冬胺酸轉胺酶之影響。

【0026】 圖8A顯示組織普雷沃菌在接受甲硫胺酸膽鹼缺乏(MCD)飲食，引發NASH症狀之小鼠中在降低NASH活動度評分(NAS)方面為有效的。

【0027】 圖8B顯示組織普雷沃菌菌株B、米拉諾普雷沃菌菌株A、組織普雷沃菌菌株A、組織普雷沃菌菌株B與OCD之組合在接受甲硫胺酸膽鹼缺乏(MCD)飲食，引發NASH症狀之小鼠中在降低NASH活動度評分(NAS)方面。

【0028】 圖9顯示相較於對照處理，組織普雷沃菌粉末在EAE模型

中為有效的。

【實施方式】

相關申請案

【0029】本申請案主張2017年9月8日申請的序號為62/556,020、2018年2月2日申請的序號為62/632,859及2018年5月8日申請的序號為62/668,556之美國臨時專利申請案的優先權，該等申請案中之每一者的內容在此以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0030】「佐劑」或「佐劑療法」廣義上係指影響患者或受試者之免疫或生理學反應的藥劑。舉例而言，佐劑可增加抗原隨時間推移之存在，或對於所關注區域(如腫瘤)，有助於吸收抗原呈現細胞抗原，活化巨噬細胞及淋巴球且支持細胞介素之產生。藉由改變免疫反應，佐劑可准許較小劑量之免疫相互作用藥劑增加特定劑量之免疫相互作用藥劑的有效性或安全性。舉例而言，佐劑可防止T細胞耗竭，且因此增加特定免疫相互作用藥劑之有效性或安全性。

【0031】「投與」廣義上係指向受試者投與組合物之途徑。投與途徑之實例包括口服、直腸投與、表面投與、吸入(經鼻)或注射。藉由注射之投與包括靜脈內(IV)、肌肉內(IM)、瘤內(IT)及皮下(SC)投與。本文所述之醫藥組合物可藉由任何有效途徑以任何形式來投與，該途徑包括(但不限於)：瘤內、口服、非經腸、經腸、靜脈內、腹膜內、表面、經皮(例如使用任何標準貼片)、皮內、經眼、經鼻(鼻內)、局部、非經口(諸如氣霧劑)、吸入、皮下、肌肉內、頰內、舌下、直腸(經直腸)、陰道、動脈內及鞘內，經黏膜(例如舌下、經舌、頰內(經頰)、尿道(經尿道)、陰道

(例如經陰道及陰道周)、植入、膀胱內、肺內、十二指腸內、胃內及支氣管內。在較佳實施例中，本文所述之醫藥組合物係經口、經直腸、瘤內、表面、膀胱內、藉由注射進入或鄰近於引流淋巴結、靜脈內、藉由吸入或氣霧劑或皮下投與。

【0032】 如本文所用，術語「抗體」可指完整抗體及其抗原結合片段兩者。完整抗體為包括藉由二硫鍵互連之至少兩個重(H)鏈及兩條輕(L)鏈的糖蛋白。各重鏈包括重鏈可變區(本文中縮寫為V_H)及重鏈恆定區。各輕鏈包括輕鏈可變區(本文中縮寫為V_L)及輕鏈恆定區。V_H及V_L區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插有稱為構架區(FR)之較保守區。各V_H及V_L係由自胺基末端至羧基末端按以下順序排列之三個CDR及四個FR構成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。術語「抗體」包括例如單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、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。

【0033】 如本文所用，術語抗體之「抗原結合片段」或「抗原結合部分」係指抗體之保留與抗原結合之能力之一或多個片段。涵蓋在術語抗體之「抗原結合片段」中之結合片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、二硫鍵連接的Fv、Fd、雙功能抗體、單鏈抗體、NANOBODIES®、經分離CDRH3及保留完整抗體之可變區的至少一部分的其他抗體片段。此等抗體片段可使用習知重組及/或酶促技術來獲得，且可以與完整抗體相同的方式篩選抗原結合。

【0034】 「癌症」廣義上係指宿主自身細胞之不受控制的異常生長，其使得外圍組織侵入，且組織末梢可能侵入主體中異常細胞生長的初

始位點。主要類別包括：呈上皮組織(例如皮膚、鱗狀細胞)之癌症的癌瘤；呈結締組織(例如骨骼、軟骨、脂肪、肌肉、血管等)之癌症的肉瘤；呈血液形成組織(例如骨髓組織)之癌症的白血病；呈免疫細胞之癌症的淋巴瘤及骨髓瘤；及包括大腦及脊椎組織之癌症的中樞神經系統癌症。「癌症」、「贅瘤」及「腫瘤」在本文中可互換所用。如本文所用，「癌症」係指所有類型之癌症或贅瘤或惡性腫瘤，包括白血病、癌瘤及肉瘤，不論新的或復發的。癌症之具體實例為：癌瘤、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及混合型腫瘤。癌症之非限制性實例為以下之新的或復發癌症：腦癌、黑色素瘤、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、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、子宮癌及神經管胚細胞瘤。

【0035】「細胞擴充」廣義上係指環境中的投與組合物之前實質上不存在於環境中且不存在於組合物本身中的細胞之流入或細胞之擴增。擴充環境之細胞包括免疫細胞、基質細胞、細菌細胞及真菌細胞。尤其受關注之環境為其中癌細胞駐留或定位之微環境。在一些情況下，微環境為腫瘤微環境或腫瘤引流淋巴結。在其他情況下，微環境為癌前組織位點或局部投與組合物之位點或距離投藥很長時間之後組合物將積聚之位點。

【0036】「演化支(clade)」係指系統樹之OTU或成員，其在系統樹中的統計學上有效之節點的下游。演化支在系統樹中包含一組末端葉(terminal leaf)，其為獨特的單源演化單元且各末端葉共有一定程度的序列相似性。「操作分類單元」、「OTU」係指系統樹中之末端葉，且由核酸序列，例如整個基因組，或特異性基因序列及在物種層級上，與此核酸序列共有序列一致性之所有序列定義。在一些實施例中，特異性基因序列可

為16S序列或16S序列之一部分。在其他實施例中，對兩個實體之整個基因組進行定序，且進行比較。在另一實施例中，可對選擇區域，諸如多位點序列標籤(MLST)、特異性基因或數組基因，進行基因比較。在16S實施例中，整個16S或16S之某一可變區中共有 $\geq 97\%$ 平均核苷酸一致性之OTU視為相同OTU (參見例如，Claesson M J, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole J R, Ros R P及O'Toole P W. 2010. 用於使用串聯可變16S rRNA基因區來解析高度複雜之微生物相組合物的兩種新一代定序技術之比較(Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions). *Nucleic Acids Res* 38: e200. Konstantinidis K T, Ramette A及Tiedje J M. 2006. 基因組時代的細菌物種定義(The bacterial species definition in the genomic era). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.)。在涉及完整基因組、MLST、特異性基因或數組基因之實施例中，共有 $\geq 95\%$ 平均核苷酸一致性之OTU視為相同OTU(參見例如，Achtman M及Wagner M. 2008. 微生物多樣性及微生物物種之遺傳性質(Microbial diversity and the genetic nature of microbial species). *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440. Konstantinidis K T, Ramette A及Tiedje J M. 2006. 基因組時代的細菌物種定義(The bacterial species definition in the genomic era). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.)。OTU通常藉由比較生物體之間的序列來限定。一般而言，具有小於95%序列一致性之序列不視為形成相同OTU之一部分。OTU亦可藉由核苷酸標記或基因，尤其高度保守基因(例如「管家」基因)或其組合之任何組合來表徵。此類表徵採用例

如WGS資料或整個基因組序列。

【0037】 來自兩種或超過兩種微生物菌株的EV之「組合」包括處於同一物質或產物或處於物理連接之產物中的物理共存的兩種EV，以及共顯投與或共定位的來自兩種菌株之EV。

【0038】 術語「降低」或「消耗」意謂，使得當相較於處理前狀態時，處理之後的差異(視情況而定)呈以下變化：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或不可偵測的。

【0039】 如本文所使用，術語「菌群失調」係指微生物與腫瘤之間的協同作用受到破壞所處之狀態，諸如微生物不再支持成核、維持、進展或擴散或腫瘤之癌轉移。

【0040】 術語「抗原決定基」意謂能夠特異性結合於抗體或T細胞受體之蛋白質決定子。抗原決定基通常由諸如胺基酸或糖側鏈的分子之化學活性表面分組組成。某些抗原決定基可由特定胺基酸序列定義，抗體能夠結合於該等胺基酸。

【0041】 如本文所用，「經工程改造之細菌」為已藉由人工干預由其天然狀態遺傳改變之任何細菌及任何此類細菌之後代。經工程改造之細菌包括例如靶向基因修飾之產物、隨機誘變篩選之產物及定向演化之產物。

【0042】 術語「基因」廣義上用於指與生物功能相關之任何核酸。術語「基因」適用於特定的基因組序列以及由該基因組序列編碼的cDNA或mRNA。

【0043】 兩個核酸分子之核酸序列之間的「一致性」，可使用已知

電腦演算法(諸如「FASTA」程式)，使用例如如Pearson等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444(其他程式包括GCG程式包(Devereux, J.等人, Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA Atschul, S. F.等人, J Molec Biol 215:403 (1990)；Guide to Huge Computers, Mrtin J. Bishop編, Academic Press, San Diego, 1994, 及 Carillo等人 (1988) SIAM J Applied Math 48:1073)中之預設參數，測定為一致性之百分比。舉例而言，可使用國家生物技術資訊資料庫中心(National Center for Biotechnology Information database)之BLAST功能來測定一致性。其他商業或公開可用的程式包括DNASar 「MegAlign」程式(Madison, Wis.)及威斯康星大學(University of Wisconsin)遺傳學電腦小組(Genetics Computer Group；UWG)「Gap」程式(Madison Wis.)。

【0044】如本文所用，術語「免疫病症」係指由免疫系統之活性所引起的任何疾病、病症或疾病症狀，其包括自體免疫疾病、發炎疾病及過敏。免疫病症包括(但不限於)：自體免疫疾病(例如狼瘡、硬皮病、溶血性貧血、血管炎、1型糖尿病、格雷氏病(Grave's disease)、類風濕性關節炎、多發性硬化、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、惡性貧血及/或肌病)、發炎疾病(例如尋常痤瘡、哮喘、乳糜瀉、慢性前列腺炎、絲球體腎炎、發炎性腸病、骨盆發炎疾病、再灌注損傷、類風濕性關節炎、類肉瘤病、移植排斥、血管炎及/或間質性膀胱炎)、及/或過敏(例如食物過敏、藥物過敏及/或環境過敏)。

【0045】「免疫療法」為使用受試者免疫系統治療疾病(例如免疫疾病、發炎疾病、代謝疾病、癌症)之治療，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細胞及樹突狀細胞療法。

【0046】術語「增加」意謂，使得當相較於處理前狀態時，處理之後的差異(視情況而定)呈以下變化：高至少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 倍及/或 10^7 倍。可增加之特性包括免疫細胞、細菌細胞、基質細胞、骨髓衍生之抑制細胞、纖維母細胞、代謝物及細胞介素。

【0047】「先天免疫促效劑」或「免疫佐劑」為特異性地靶向先天免疫受體之小分子、蛋白質或其他試劑，該等受體包括鐸樣受體(TLR)、NOD受體、RLR、C型凝集素受體、STING-cGAS路徑組分、炎性體複合物。舉例而言，LPS為細菌衍生或合成的TLR-4促效劑，且鋁可用作免疫刺激佐劑。免疫佐劑為較廣佐劑或佐劑療法之特異性類別。STING促效劑之實例包括(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之雙硫代磷酸酯類似物的Rp, Sp-異構體)。TLR促效劑之實例包括(但不限於)：TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10及TLR11。NOD促效劑之實例包括(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-麩胺醯基-內消旋二胺基庚二酸(iE-DAP)及去胞壁醯肽(desmuramylpeptide；DMP)。

【0048】「內部轉錄間隔子」或「ITS」為位於常用於鑑別真核物種，尤其真菌的常用前驅體轉錄物上的結構性核糖體RNA (rRNA)之間的一段非功能性RNA。形成核糖體核心的真菌之rRNA轉錄為信號基因，且由8S、5.8S及28S區以及分別處於8S與5.8S區之間及5.8S與28S區之間的ITS4及5組成。18S與5.8S及28S區之間的此等兩個順反子間鏈段藉由剪接

來移除且如先前所述出於條形碼(barcoding)目的在物種之間含有顯著差異 (Schoch等人 Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109:6241-6246. 2012)。18S rDNA傳統上用於系統重構，然而ITS亦可提供此功能，因為其一般高度保守但含有具有足夠核苷酸多樣性以區分大多數真菌之屬及物種的高變區。

【0049】術語「經分離」或「富集」涵蓋已進行以下的微生物、EV或其他實體或物質：(1)與至少一些其當最初生產(不論在自然界中還是在實驗環境中)時結合之組分分離，及/或(2)由人工產生、製備、純化及/或製造。經分離微生物可與其最初結合之其他組分之至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或高於90%進行分離。在一些實施例中，經分離之微生物之純度超過約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%。如本文所用，若物質實質上不含其他組分，則該物質為「純的」。術語「純化(purify/purifying/purified)」係指，微生物或其他物質已與至少一些其當最初產生或生成(例如不論在自然界中還是在實驗環境中)時或在其最初產生後之任何時間期間結合之組分分離。若微生物或微生物群在產生時或其之後諸如與含有該微生物或微生物群之物質或環境分離，則該微生物或微生物群可視為經純化的，且經純化之微生物或微生物群可含有至多約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或高於約90%的其他物質，且仍視為「經分離的」。在一些實施例中，經純化之微生物或微生物群之純度超過約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%。在本文所提供之微生物組合物之情況下，存在於組合物中之一或多種微生物類型可獨立地自含有微生物類型之物質或環境中所產生及/或所存在之一或多種其他微生物純化。微生物組合物及其微生物組分一般自殘餘環境產物純化。

【0050】 如本文所用，「代謝物」係指用作任何細胞或微生物代謝反應中之底物或產生為來自任何細胞或微生物代謝反應的產物化合物、組合物、分子、離子、輔因子、催化劑或營養物質的任何及所有分子化合物、組合物、分子、離子、輔因子、催化劑或營養物質。

【0051】 「微生物」係指任何天然或經工程改造之生物體，其表徵為細菌、真菌、微觀藻類、原蟲及與該生物體相關的發育階段或生命週期階段(例如營養期、孢子期(包括孢子形成、休眠及出芽)、潛伏期、生物膜期)。

【0052】 「微生物群落」廣義上係指駐留在受試者或患者之身體部位上或其中的微生物。微生物群落中之微生物可包括細菌、病毒、真核微生物體及/或病毒。微生物群落中之獨立微生物可為代謝活性的、休眠的、潛伏的或以孢子形式存在，可以浮游生物形式或以生物膜形式存在或可以可持續或暫時性方式存在於微生物群落中。微生物群落可為共生的或健康態之微生物群落或病態微生物群落。微生物群落對於受試者或患者可為天然的，或微生物群落之組分可由於健康狀態(例如癌變前或癌狀態)或治療條件(例如抗生素治療，暴露於不同微生物)之變化而加以調節、引入或消耗。在一些態樣中，微生物群落出現在黏膜表面處。在一些態樣中，微生物群落為腸道微生物群落。在一些態樣中，微生物群落為腫瘤微生物

群落。

【0053】組織或樣本之「微生物群落分佈」或「微生物群落標誌」係指微生物群落之細菌組成的至少部分特徵。在一些實施例中，微生物群落分佈指示是否有至少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或多於100種菌株存在或不存在於微生物群落中。在一些實施例中，微生物群落分佈指示是否有至少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或多於100種癌症相關之菌株存在於樣本中。在一些實施例中，微生物群落分佈指示樣本中偵測到的各菌株之相對或絕對量。在一些實施例中，微生物群落分佈式癌症相關之微生物群落分佈。癌症相關之微生物群落分佈為以比在普通人群中要高的頻率出現在患有癌症之受試者中的微生物群落分佈。在一些實施例中，癌症相關之微生物群落分佈包含數目或量比通常存在於取自未患有癌症之個體的另外的等效組織或樣本之微生物群落中要高的癌症相關之細菌。

【0054】關於細菌之「經修飾」廣義上係指已經歷自其野生型形式進行之變化的細菌。細菌修飾之實例包括基因修飾、基因表現、表型修飾、調配、化學修飾及投配或濃縮。經改良之特性之實例描述於本說明書通篇中且包括例如減毒作用、營養缺陷性、導向或抗原性。表型修飾可包括例如細菌在修飾細菌之表型的培養基中之生長，所述生長增加或降低毒性。

【0055】如本文所用，若基因在經工程改造之細菌中在至少一些條件下以比其由相同物種之野生型細菌在相同條件下表現之水準要高的水準

表現，則該基因在細菌中「過度表現」。類似地，若基因在經工程改造之細菌中在至少一些條件下以比其由相同物種之野生型細菌在相同條件下表現之水準要低的水準表現，則該基因在細菌中「表現不足」。

【0056】 術語「聚核苷酸」及「核酸」可互換使用。其指任何長度之核苷酸(去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合形式或其類似物。聚核苷酸可具有任何三維結構且可執行任何功能。以下係聚核苷酸之非限制性實例：基因或基因片斷之編碼或非編碼區、自連鎖分析限定之基因座、外顯子、內含子、信使RNA(mRNA)、微RNA(miRNA)、靜默RNA(siRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、核糖核酸酶、cDNA、重組聚核苷酸、分支聚核苷酸、質體、載體、任何序列之分離DNA、任何序列之分離RNA、核酸探針及引子。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及核苷酸類似物。若存在，可在聚合物組裝之前或之後賦予核苷酸結構之修飾。可諸如藉由與標記組分結合進一步修飾聚核苷酸。在本文中所提供之所有核酸序列中，U核苷酸可與T核苷酸互換。

【0057】 如本文所用，「致癌生物群落(oncobiome)」包含病原性、致瘤及/或癌症相關之微生物群，其中微生物群包含以下中之一或多者：病毒、細菌、真菌、原生生物、寄生物或另一種微生物。

【0058】 「親瘤(oncotrophic)」或「親癌(oncophilic)」微生物及細菌為與癌症微環境高度相關或存在於癌症微環境中的微生物。可針對處於環境中、優先在癌症微環境中生長或傾向於該環境對其進行優先選擇。

【0059】 「操作分類單元」及「OTU」係指系統樹中之末端葉，且由核酸序列，例如整個基因組，或特異性基因序列及在物種層級上，與此核酸序列共有序列一致性之所有序列定義。在一些實施例中，特異性基因

序列可為16S序列或16S序列之一部分。在其他實施例中，對兩個實體之整個基因組進行定序，且進行比較。在另一實施例中，可對選擇區域，諸如多位點序列標籤(MLST)、特異性基因或數組基因，進行基因比較。對於16S，整個16S或16S之某一可變區中共有 $\geq 97\%$ 平均核苷酸一致性之OTU視為相同OTU。參見例如，Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ros RP及O'Toole PW. 2010. 用於使用串聯可變16S rRNA基因區來解析高度複雜之微生物相組合物的兩種新一代定序技術之比較. *Nucleic Acids Res* 38: e200. Konstantinidis KT, Ramette A及Tiedje JM. 2006. 基因組時代的細菌物種定義. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940。對於完整基因組、MLST、除16S以外之特異性基因或數組基因，共有 $\geq 95\%$ 平均核苷酸一致性之OTU視為相同OTU。參見例如，Achtman M及Wagner M. 2008. 微生物多樣性及微生物物種之遺傳性質. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440. Konstantinidis KT, Ramette A及Tiedje JM. 2006. 基因組時代的細菌物種定義. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940。OTU通常藉由比較生物體之間的序列來限定。一般而言，具有小於95%序列一致性之序列不視為形成相同OTU之一部分。OTU亦可藉由核苷酸標記或基因，尤其高度保守基因(例如「管家」基因)或其組合之任何組合來表徵。本文提供對例如屬、物種及系統演化支進行分類分配的操作分類單元(OTU)。

【0060】 如本文所用，術語「胞外囊泡」或「EV」係指衍生自細菌的組合物，其包含細菌脂質及細菌蛋白及/或細菌核酸及/或奈米粒子中所含有之碳水化合物部分。此等EV可含有1、2、3、4、5、10或多於10種不同脂質物種。EV可含有1、2、3、4、5、10或多於10種不同蛋白質物

種。EV可含有1、2、3、4、5、10或多於10種不同核酸物種。EV可含有1、2、3、4、5、10或多於10種不同碳水化合物物種。

【0061】 如本文所用，若物質實質上不含其他組分，則該物質為「純的」。術語「純化」係指，EV或其他物質已與至少一些其當最初產生或生成(例如不論在自然界中還是在實驗環境中)時或在其最初產生後之任何時間期間結合之組分分離。若EV在產生時或其之後諸如與一或多種其他細菌組分分離，則該EV可視為經純化的，且經純化之微生物或微生物群可含有至多約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或高於約90%的其他物質，且仍視為「經純化的」。在一些實施例中，經純化之EV之純度超過約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%。EV組合物及其微生物組分例如自殘餘環境產物純化。

【0062】 如本文所用，術語「經純化之EV組合物」或「EV組合物」係指以下之製備物：其包括已與源物質中存在之至少一種相關物質分離(例如，與至少一種其他細菌組分分離)或已與與用於產生該製備物之任何方法中的EV相關之任何物質分離的EV。其亦指已明顯經富集或濃縮之組合物。在一些實施例中，EV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。

【0063】 「殘餘環境產物」係指衍生自受試者中或其上的微生物群之環境的物質。舉例而言，微生物存活於胃腸道中之糞便中；皮膚本身上；唾液、呼吸道之黏液或泌尿生殖道之分泌物中(亦即與微生物群落相關之生物物質)。實質上不含殘餘環境產物意謂微生物組合物不再含有與

人類或動物受試者上或其中之微生物環境相關的生物物質，且100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含與微生物群落相關之任何污染生物物質。殘餘環境產物可包括非生物物質(包括未消化之食物)或其可包括不合需要之微生物體。實質上不含殘餘環境產物亦可意謂微生物組合物不含可自人類或動物偵測之細胞且僅可偵測到微生物細胞。在一個實施例中，實質上不含殘餘環境產物亦可意謂微生物組合物不含可偵測之病毒(包括微生物病毒(例如噬菌體))、真菌、支原體污染物。在另一實施例中，其意謂相較於微生物細胞，微生物組合物中小於 $1 \times 10^{-2}\%$ 、 $1 \times 10^{-3}\%$ 、 $1 \times 10^{-4}\%$ 、 $1 \times 10^{-5}\%$ 、 $1 \times 10^{-6}\%$ 、 $1 \times 10^{-7}\%$ 、 $1 \times 10^{-8}\%$ 活細胞為人類或動物的。存在多種方式來實現此純度，其中無一者為限制性的。因此，可經由多個劃線分離(streak)步驟將所需成分分離至固體培養基上之單一菌落，直至來自連續單一菌落之重複(諸如(但不限於)兩條)劃線僅顯示單一菌落形態來減少污染物。可替代地，可藉由進行多輪連續稀釋，稀釋成單一所需細胞(例如 10^{-8} 或 10^{-9} 之稀釋度)，諸如經由多次10倍連續稀釋來實現污染物之減少。此可進一步藉由顯示多個分離菌落具有類似細胞形狀及革蘭氏染色特性(Gram staining behavior)來確認。用於確定適當純度之其他方法包括遺傳分析(例如PCR、DNA定序)、血清學及抗原分析、酶促及代謝分析以及利用辨別所需成分與污染物之試劑的使用儀器之方法，諸如流動式細胞量測術。

【0064】 如本文所用，「特異性結合」係指抗體與預定抗原結合之能力或多肽與其預定結合搭配物結合之能力。典型地，抗體或多肽以對應於約 10^{-7} M或小於 10^{-7} M之 K_D 的親和力與其預定抗原或結合搭配物特異性結合，且以比其與非特異性及不相關抗原/結合搭配物(例如BSA、酪蛋白)

結合之親和力小至少10倍、至少100倍或至少1000倍之親和力(如由 K_D 表示)與預定抗原/結合搭配物結合。或者，特異性結合更廣泛地應用於雙組分系統，其中一種組分為蛋白質、脂質或碳水化合物或其組合，且以特異性方式與第二組分接合，該第二組分為蛋白質、脂質、碳水化合物或其組合。

【0065】 術語「受試者」或「患者」係指任何動物。描述為「有需要之」受試者或患者係指需要治療疾病的受試者或患者。哺乳動物(mammal/mammalian animal)包括人類、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)及家養寵物(例如狗、貓、嚙齒動物)。

【0066】 「菌株」係指具有基因特徵之細菌物種成員，該基因特徵使得該細菌物種成員可與相同細菌物種之緊密相關成員區別開。基因標誌可為不存在至少一個基因之全部或部分、不存在至少一個調節區(例如啟動子、終止子、核糖開關、核糖體結合位點)之全部或部分、不存在(「固化」)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、存在至少一種外源基因(來源於另一物種之基因)、存在至少一個突變調節區(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、存在至少一個抗生素抗性卡匣或其組合。可藉由PCR擴增，視情況接著對相關基因組區或整個基因組進行DNA定序，來鑑別不同菌株之間的基因標誌。在一個菌株(相較於相同物種之另一菌株)已獲得或失去抗生素抗性、或獲得或失去生物合成能力(諸如營養缺陷型菌株)之情況下，菌株可藉由分別使用抗生素或營養物質/代謝物進行選擇或反向選擇來區別開。

【0067】如本文中所用，術語「治療」受試者之疾病或「治療」患有或疑似患有疾病之受試者，係指對受試者進行醫藥治療，例如，投與一或多種藥劑，以使得疾病之至少一個症狀減小或預防惡化。因此，在一個實施例中，「治療」尤其係指延遲進展、加速緩解、誘導緩解、加強緩解、加速恢復、增加替代治療法之功效或降低對替代性療法之耐藥性或其組合。

細菌

【0068】在某些態樣中，本文提供包含普雷沃菌及/或由細菌製得之普雷沃菌EV的醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物包含以下物種之普雷沃菌EV及/或普雷沃菌：阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑爾根普雷沃菌、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、解糖腺普雷沃菌、組織普雷沃菌、米拉諾普雷沃菌、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、動膠普雷沃菌或真空腔普雷沃菌。

【0069】在一些實施例中，普雷沃菌為普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。在一些實施例中，普雷沃菌菌株為包含與普雷

沃菌菌株B 50329之核苷酸序列(例如基因組序列、16S序列、CRISPR序列)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%序列一致性(例如至少99.5 %序列一致性、至少99.6%序列一致性、至少99.7%序列一致性、至少99.8%序列一致性、至少99.9%序列一致性)的菌株。在一些實施例中，普雷沃菌為包含一或多種(例如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、30、31、32、33、34、35或大於35種)表1中所列之蛋白質及/或一或多種(例如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、30、31、32、33、34、35或大於35種)編碼表1中所列之蛋白質的基因的普雷沃菌之菌株。在一些實施例中，普雷沃菌包含表1中所列之所有蛋白質及/或編碼表1中所列之蛋白質的所有基因。

表1：例示性普雷沃菌蛋白

Seq. ID. No.	名稱	Uniprot ID	胺基酸序列
1	叢集：未表徵之蛋白質	G6ADE1	MNLKTFTKTVLCFALFAVSAITAKAADHLAIVGE AVWGGWDLVKATAMVKSPNNPDVFMATVHLN AGKGFKFLTEREWGKLEYRSGASDVVLKSGIRYK LYASIGASEDGKFKVSESANYEIICDLARKTVEVK KVAYQAKEIRYAALWMIGDATAAGDWDYNNGL LSQDSGNPTCYTATVELKEGEFKFTTNKQWGYD HSVYIFRDVNDQNKIVFGGEDNKWRITEDGMYN VTVDVPTKTISIKQIDDPAGHKPQFGNDVILVGDA TIAGWNLDNAIYLEHTGQAGR VFKTTTYLEAGKG FKFLSMLS YDDIDYRPANNTVLNPGVPGTFVPSLP SSTDTKFSVERSGNYDIVCNMNNRTVVVTLSENQ VLVNYPALWLIGSATSAGWNP GKAVELKRSEAD PAVYTARVQLKKGEFKILTSKNVGFDQPTY YRDS TNEHRIVFGVDGDEVAKKDCKWTLSENAEGTYD VTVDIEAMTIFCDKVNMDPSVESTDKELILIGDA TYSAWDLPKSIVMTPVGPTTFKAVTHLEAGKEFK FLTELA WKRYEYRAESLRKELQEGSMSMLVPYR YTNDKDDKDHDFKFVVKESGNYEIVCDLYIPALII RKVRYQDTPVTYSSLWIVGSATPGGWTIERGIKM

			TQDENYPTKFTAKANLVPGELKFATNKFADFTQD FFFRGKDDYTAVLGNDNKWNITEAGTYSVTIDV ASKRVTITKPARNAPTGISTVDSSDEAPAEIFTLN GIKVTTTPSSGIYIKRQGGRTTKVVMK
2	菸鹼鹽胺_核糖 苷_轉運子 _PnuC	P24520	MDTYQILDIIIGCIVGLIYIYQEYKASIWLWMTGIIM PVIYMFVYYEAGLYADFGMQIYYTLAAIYGYLEY WKLGGKKGTEDKEIPITHFPRRYIIPAIIVFFVLWIA LYYILICFTNSTVPVLDSFGNALSFIGNLWALAKKY LEQWWIWIVVDAELSALYIYKGIPTAMLYALYT VIAVAGYFKWRRYIKQQK
3	果膠酸_三醣-解 離酶	Q8GCB2	MRVRLYKNILLFLFLWVNTLACVSADTSRTVESQ PIENGLIITESKGWLETIYAKWKPVAEADGYVYVY VKGGQYADYSKVDSSELIRVYNGYVRVDIPGLKA GTYSCLKIVAVKGGKETQSSEVTGLKVLNLYVREGF AHKNYSGVGAYNDDGTLKSGAVVIYVNKDNAK TVSAHLGKTTFIGLQAILNAYQKGNITTPLSVRILG LLRNGDTDTFGSSTEGIQIKGKQADSEMNIIEGIG EDASIYGFGLVRNAKSVEFRNLGIMRAMDDGVS LDTNNSNIWIHMDLFGYKASGGDHKGDGSIDV KTDSKYVTIDNCHFWDTGKTSMCGMKKETGPNY ITYHHNWFHDSDSRHARVRTMSVHLWNNYYDG CAKYGIGATMGCSVFSENNYFRATKNPILISKQGS DAKGTGKFSGEPGGMVKEYGSLFTEKGAESTYTP ISYADNSSFDFYHAISRNEKVPASVKTLNNGNIY NNFDTDAALMYSYTPDATAALVPSQVTGFYAGR LNHGSLQFKFNNAVEDTNSTPIPALEALIDAYS GK
4	糖基轉移酶 _GtfI	Q9AET5	MKYNIAYCIEGFYNHGGMERILSVCANLLSDIYSI TIIVANQRGREHAYNLAQNVNVVDLGVSCKNYK EEYKKSLTRYLQDHQFSVVISLAGLELFFLPQIKD GSKKVMWFHFAFDVSKMFLSERFHGWKLNLLYY IHTIRRIYFAKKFDTIVVLSKSDCDSWSRFCNNVK YIYNPITIDRKVISNLSESVIAVGRLGWQKGFDFL IDSWVLVDDKHPDWHLDFGEGPDRLELQHQRIDR KGLHDKVRLCGVTKQIEEYGGKHSIYVMSSRAEG FPLALLEASSCGLPMISFNCHQGPNEIIQEGENGFL VDKVGDIYTLSDRICKLIEDNNLRNMMGKKALDS SFRFEGEVIKKDWISLLKQLI
5	叢集：蛋白 TonB	A0A096B7 59	MKRLFFMFLFLGTITMNSLAQEEKPIKYETKNFSL PDKMPLYPGGDGALRAFLSLNLHYPEKAQAFGVE GRSLMKFCVSSDGSIKDISAVDCKITNYNRTEFNK LPLSKQESLKKECAKAFAKEAARVIRLMPKWEP ELNGKKMNVYYSLPFTFKLR
6	叢集：未表徵 之蛋白質	G6AEN6	MNYPLFIARKIYNGGDRTRKVS KPAIRIATIGVAIG LAVMIISVG VVLGFKHTIRNKVVGFGSDITVANFL TLQSSEQYPIQITDSL VKSLQITPGIKHVQRYDYTQ GILKTDNDFLGVLLKGVGPDFDSTFIHENMVEGSL PHFHDNESQQKIVISKTIADKLN LKVGQRIFAYFIN KQGVTRTKFTITGIYATNMKQFDSQICFTDIYTTN KLN GWEPDQYSGAELQVDNFSQLTPISMRVLNKV KNTVDHYGGTYSSENIIEQNPQIFSWDLMDMN VWILALMISVAGVTMISGLLIILERTQMIGILKALG SRNRQIRHIFLWFATFIIGKGLLWGNII GLGCILFQS WTGLVKLDPQTYYYVNTVPVEINIPLI ALNMV TML VCLVILIAPSYLISHIHPAKSMHYE

7	雙官能 _ (p)ppGpp_合成 酶/水解酶_RelA	P9WHG9	MEDKFIYTDKERKLSYQILDELKDTLDSFLENDL PMLQVQLKDSVAKNTIHRNVFGLNPILCSLQTA AVKDIGLKRDSVIAILLHQSVQDGYITLEDIDNRF GKSVAKIIHGLIRIQTLYQKNPIIESENFNLLLSFA EDMRVILIMIADRVNLMRQIRDAEDKEAQHKVAE EASYLYAPLAHKLGLYQLKRELEDLSLKYLEHDA YYLIKDKLNATKASRDAYINQFIAPVRERLTAGGL RFHIKGRTKSIHSIWQKMKKQKCGFEGIYDLFAIRI ILDAPLEKEKIQCWQAYSIVTDMYQPNPKRLRDW LSVPKSNNGYECLHITVLGPEKKWVEVQIRTERMD EIAEHGLAAHWRYKGIKEEGGLDDWLASIRA AGDNLEVMDQFKSDLYEKEIYVFTPKGDLLKFPK GATILDFAYHIHSKVGNQCVGGKINAKNVSLRTE LHSGDTVEILTSATQKPKAEWLKIVKSSRAKAKIR LALKETQIKDGLYAKELLERRFKNKKIEIEESTMG HLLRKLGFKEVSEFYKQVADEKLDPNYIIIEYQK VYNHDHNLNQPKETESAENFEFENPTNEFLKKND DVLVIDKNLKGDLDFSLAKCCHPIYGDVFGFVTV NGGIKIHRTPCPNAPEMRKRFGYRIVKARWSGKG SSQYAITLRVIGNDDIGIVSNITNVISKDEKIVMR NIDSHDGLFSGNLVLLDDNSKLNMLIKKLRTVK GVKQVTRI
8	維生素_B12_輸 入_系統_透過 酶_蛋白_BtuC	P06609	MKRRIFLVALSVSIVILFGLNLIIGSVHIPLSDIL LSGSFTGKESWRFIIWDSRLPQALTAMLCGSSLAV CGLMLQTAFRNPLAGPDVFGISSGASLGVALVML LLGGTVETSMFTASGFLAILIVAFAGAILVTAFILF LSSVVRNSVLLLIVGIMVGYVASSAVTLLNFFSSE DGVKGYIVWGMGNFVGVSMSHIPLFAFLCLAGII ASFLLVKPLNILLGPPQYAESLGISIRIRNILLVVV GILTAVTAFCGPISFIGLAAPHVARLLFRTENHQB LLPGTLLVGTVVALLCNLICFLPRESGMIPLNAV TPLIGAPIIIYVIMKRH
9	NADH-醌_氧化 還原酶_次單元 _C/D	P33599	MKLENKEFGFDSFATEMARLKNEKHFDYLVTVV GEDFGTEEGLGCIYILENTSTHERCSVKQLAKKVG EEFVIPSIVIKLWADADLLEREVYDFYGIKFLGHPD MRRLFLRNDFKGYPLRKDYDMDPAKNMYTTED DVELDTTTEWNLDKNGELVGTQHALFTDDNFVV NIGPQHPSTHGVRLRLQTVLDGETVTNIYPHLGYIH RGIEKLCEQFTYPQTLALTDRMNYLSAMMNRHA LVGVIEEGMGIELSERILYIRTIMDELQRIDNHL LYTACCAQDLGALTAFLYGMRDREHVLNVMEETT GGRLIQNYRIGGLQADIDPNFVSNVKELCKYLRP MIQEYVDVFGDNVITHQRFEGVGVMDEKDCISYG VTGPAGRASGWKNDVRKYHPYAMYDKVNFEET LTNGDSMDRYFCHIKEYQSLNIIQLIDNIPEG EFYIKQKPIIKVPEGQWYFSVEGASGEFGAYLDS RGDKTAYRLKFRPMGLTLVGAMDKMLRGQKIAD LVTTGAALDFVIPDIDR
10	FKBP型_肽基- 脯胺醯基_順-反 _異構酶	P45523	MRTSTQSKDMGKKQEYKLRNEEFLHNISKKDSIK TLPHGIFYEIIKEGSGEGTVQPRSIVICNYRGS LISGQVFDSDWQKPTPEAFRLNELITGLQIALC AMHKGDSWRIYIPYQEGYGSKRNADIPAFSTLIF DIELINIA
11	推定_乙醯乳酸 _合成酶_小_次	P9WKJ3	MADNKAIESVKREVIAGERLYTLLVYSENVAGV LNQIAAVFTRRQVNIESLNVSSASSIEGIHKYTI TAW

	單元		SDAATIEKITKQVEKKIDVIKADYYEDSDLFIHEV GLYKIATPILLENAEVSRAIRKRNARMMEVNPTYS TVLLAGMTDEV TALYHDLKNFDCLLQYSRSGRV AVTRGFSEPVSDFLKSEEESVL
12	絲胺酸/蘇胺酸_轉運子_SstT	P0AGE4	MKKKVKIGLLPRVIIAILLGIFFGYFMPTPLARVFL TFNGIFSQFLGFMIPLIIIGLVTPAIADIGKGAGKLL LVTVIIAYVDTV VAGGLAYGTGLCLFPSMIAS TGG AMPHIDKATELAPYFSINIPAMADVMSGLVFSFML GLGIAYGGLTATKNIFNEFKYVIEKVIAKAIPLLPL YIFGVFLNMAHNGQAQQILLVFSQIIIVILVLHV FIL VYQFCIAGAIIRRNPFRL LWNMMPAYLTALGTSSS AATIPVTLEQTMKNGVGKEIAGFVVPLCATIHLSG SAMKITACALTICLLVGLPHDPALFIYFILMLSIM VAAPGVPGGAIMAALAPLASILGFNSEAQALMIA LYIAMDSFGTACNVTGDGAIALV VNMFMFGKKER
13	叢集：未表徵之蛋白質	G6AJ07	MKKLLLLVCAAVMSLSASAQAGDKALGAQLVFG SETNSLGFGVKGQYYFTDHIRGEGSFDYFLKNKGI SMWDINANVHYLFDVADKFKVYPLAGLGYTNW SYKYEYAGAPVVEGSDGRLAVNLGGGVEYELTK NLNVNAEAKYQIISNYNQLVLGVGVAYKF
114	異形細胞_分化_ATP-結合_蛋白	P22638	MHFYCTKSSLDTMSERYVKRMIAKLASQGKTVIS IAHRFSTIMDAKHILLAKGKVVAEGTHQELLKTS EDYRKLWSDQNDEID
15	UDP-2,3-二鹽基葡萄糖胺_水解酶	Q9I2V0	MKNVYFLSDAHLGSLAIAHRRTQERRLVRFLDSI KHKASAVYLLGDMFDFWDEYKYVVPKGFT RFLG KVSEL TDMGVEVHFFTGNHDLWTYGYLEECEGV ILHRKPVTMEIYGKVFYLAHGDGLGDPDPMFQFL RKVFHNRCQRLLNFFHPWWGMQLGLNWAKKS RLKRADGKEMPYLGEDKEYLVRYTKDYMRSHK DIDYYIYGHRHIELDLT LSGKVRMLILGDWIWQFT YAVFDGEHMFLEEYIEGESKP
16	厭氧_甘油-3-磷酸_去氫酶	P0A9C0	MNSKQNDNYDVIIIGGGITGAGTARDCALRGLKV LLVEKFDFTNGATGRNHGLLHSGARYAVTDPESA TECIKENMVLRRIAKHCIETDGLFITLPEDDINYQ KTFVEACARAGISANIISPEEALRLDPSVNPDLLGA VRVPDASVDPFHLTTANVLDARQH GADVLTYHE VVAILTSNGRVEGVRLRNNHTGEEIEKHAVLVIN AAGIWGHDIAKMADIKINMFPAGKGTLLVFGHRVN KMVINRCRKPANADILVPDDAVCVIGTTSDRVPY DTVDNLKITSEEVDTLIREGEKLAPSLATTRILRAY AGVRPLVAADNDPTGRSISRGIVCLDHEKRDGLT GMITITGGKMMTYRLMAEQATDLACKKL GINKT CETATTPPGTAGKSDSNPHHTYSTAHKAAKGRQ GNRVKEIDERTEDDRALICECEEVS VGEAKYAIEE LHVHDLLNLRRTTRVGMGTCQGELCACRAAGV MCENGVKVDKAMTDLT KFINERWKGMRPVAVG STLDEAQLTTIYQGLCGLGI
17	厭氧_甘油-3-磷酸_去氫酶	P13033	MRYDTIIIGGGLSGLTAGITLAKAGQKVCIVSAGQ SSLHFHSGSFDLLGYDADGEVVTHPLQAIADLKA EHPYSKIGISNIEHLASQAKTLLCEAGISVMGNYE QNHYRVTPLGTLKPAWL TTEGYAMIDDPEILPWK KVELLNIQGFMDFPTQFIAENLRMMGVECQIKTFT TDELSTARQSPTEMRATNIAKVLANKDALSKVSE

			RINAISGDPDALLLPVAVLGFSNAESLDEMKGWIKK PVQYIATLPPSVSGVRTTILLKRLFAQAGGTLLIGD SATTGQFSGNHLVSITTDHLPDEKLYADHFILASG SFMSHGIRSNYAGVYEPVFKLDVDAAEKRDDWS VTNAFEAQPYMEFGVHTDKDFHATKDGNENL YAIGSVLSGHNSIKHADGTGVSLLTALYVAKKITG KG
18	厭氧_甘油-3-磷酸_去氫酶	P0A996	MAEGIQLKNISGNNLEQCLKCSICTAYCPVSAVEP KYPGPKQSGPDQERYRLKDSKFFDEALKMCLNC KRCEVACPSGVRIADIHQASRITYSTHRPIPRDIMLA NTDFVGTMANMVAPIVNATLGLKPVKAVLHGV MGIDKHRTFPAYSSQKFETWYKRMAAKKQDSYS KHVSYPFHGCVVNYNFPQLGKDLVKIMNAVGYGV HLEKEKCCGVALIANGLSGQARRQGKVNIRSIR KAAEQNRIVLTTSSTCTFTMRDEYEHLDDIKTDDV RENITLATRFLYRLIEKGDIKLAFRKDFKMRTAYH SACHMEKMGWIIYSTEELKMIPGLELIMLDSQCC GIAGTYGFKKENYQRSQEIGELFKQIKELNPDCV STDCETCKWQIEMSTGYEVKNPISILADALDVEET IKLNQ
19	甘油_攝取_輔助_蛋白	P18156	MMIKNIVLSIPISLIYLNHLIMEYSMTTQFLMELIG TLILVLFGDGVCACVTLNKSQKQKAGWVVITIAW GLAVCMGVLVAGPYTGAHLNPAVSIGLAVAGMF PWSSVPYYIVAQMIGGFLGGLLVWFFYKDHYDA TDDEAAKLGTFTCTSPAIRNYKMNFLSEVIATLVLV FIIISFSVDGNTGDAEHFKFGLAALGPIPVTLIIAL GMSLGTTGYAMNPARDLSPRLAHAVCMKGDN DWSYSWIPVLGPIIGAIAGFCGAALLLV
20	絲胺酸/蘇胺酸-蛋白_激酶_StkP	Q97PA9	MSEKIIPSNPAQAASEPIKASYTEYTVIPSQGYCQ FVKCKKGDQPVVLKGLKEAYRERVLLRNALKRE FKQCQRLNHPGIVRYQGLVDVEGYGLCIEEYVD GRTLQAYLKESHTDDEKITIVNQIADALRYAHQQ GV AHRNLKPSNILITKQGDHVKLIDFNVLSLDDVK PTADTTRFMAPELKDDETMTADGTADIYSLGTIMK VMGLTLAYSEVIKRCCAFKRSDRYSDIDEFLADFN HDGSSFSMPKIGKGTVVIGFIAVVVIALAALAYNY GGALVDQVGKIDVTSIFKSDAETAPEDSAMVKS EQNNNDVVADEAPATGKLAFMNTMKPALYKDLD RLFAKHSDRAKLNRAIKVYYRGLIQANDTLNE QRAELDRVFGNYVKQKKAALK
21	叢集：D-丙胺鹽基-D-丙胺酸二肽酶	G6AHI1	MLVAQLFVGVLQAQKPVQNRQAVGQSMERQG LVNVKAVVPSIKVALMYARTDNFCHRMALS
22	厭氧_C4-二甲酸_轉運子_DcuA	P0ABN5	MITGLVIIQLLIVLALIFIGARVGGIGLGIYGMIGVFI LVYGFGLAPGSAPIDVMMIIVAVITAASALQASGG LEYLVGVAACKFLQKHPDHITYFGPITCWLFCVVA GTAHTSYSMPHIAEIAQTNKIRPERPLSLSVIAASL GITCSPVSAATAALISQDLLGAKGIELGTVLMICIP TAFISILVAAFVENHIGKELEDDPEYKRRVAAGLI NPEAACEEVQKAENEHDPSAKHAVWAFLFGVAL VILFGFLPQLRPEGVSMSQTIEMIMMSDAALILLV GKGKVGDAVNGNIFKAGMNAVVAIFGIAWMGN TFYVGNEKILDAALSSMISSTPILFAVALFLLSIMLF SQAATVTTLYPVGIALGINPLLLIAMFPACNGYFF

			LPNYPTEVA AIDFDRTGTTRVGKYVINHSFQIPGFI TTIVSILLGVL MVQFFR
23	L-天冬醯胺酶_2	P00805	MRILKITFVTVLALVMSTVVFAQKPKIRIIATGGTI AGVSASATSSAYGAGQVGVQTLIDAVPQIKDIAD VSGEQLVNIGSQDMNDEVWLKLAKRINDLLNKE GYDGV LITHGTD TMEETAYFLSLTVHTDKPVVM VGSMRPST AISADGPANLYNGICTLVDPSSKGHG VMVCMNNELFEAKSVIKTHTTDVSTFKGGLYGE MGYVYNGKPYFLHKPVAKQGLTSEFNVDNLTSL PKVGIVYGYANCSPLPIQAFVNAKFDGIVLAGVG DGNFYKDVFDVALKAQNSGIQIVRSSRVPFGPTNL NGEVDDAKYHFVASLNLNPQKARVLLMLALT KT KDWQKIQQYFNEY
24	海藻糖_合成酶/ 澱粉酶_TreS	P9WQ19	MALACAMTMSASAQMGTNPKWLGD AIFYQIYPS SYM DTDGNGIGDLPGITQKLDYIKSLGVNAIWL N PVFESGWFDGGYDVIDFYKIDPRFGTNTDMVNLV KEAHKRGIKVCLDLVAGHTSTKCPWFKESANGD RNSRYSDYFIWTD SISEADKKEIAERHKEANPASS THGRYVEMNAKRGKYEKNFFECQPALNYGFAK PDPNQPWEQPV TAPGPQAVRREM RNIMAFWFDK GVDGFRVDMASSLVKNDWGKKEVSKLWNEMRE WKDKNYPECVLISEWSDPAVAIPAGFNIDFMIHFG IKGYPSLFFDRNTPWGKPWPGQDISKDYKFCYFD KAGKGEVKEFVDNFSEAYNATKNLG YIAIPSA NH DYQRPNIGTRNTPEQLKVAMTFFLTMPGV PFIYY GDEIGMKYQMDLPSKEGSNERAGTRTPMQWTSG PTAGFSTCNPSQLYFPVDTEKGKLTVEAQQNDPR SLLNYTRELTRLRHSQPALRGNGEWILVSKESQPY PMVYKRTSGGETVVVA INPSDKKVSANIAHLGKA KSLIMTGKASYKTGKTEDAVELNGVSAAVFKIAE
25	核糖醇-5-磷酸_ 胞苷醯轉移酶	Q720Y7	MNIAVIFAGGSGLRMHTKSRPKQFLDLNGKPIIYT LELFDNHPGIDAIVVACIESWIPFLEKQLRKFEINK VVKIVPGGESGQASIYNGLCAA EAYIKSKNVASE DTTVLIHDGVRPLITEETITDNINKVAEVGSCITCIP ATETLVVKQHDGSLEIPSRADSLIARAPQSFLSDI LTAHRR AIDEKKNDFIDSCTMMSHYGYRLGTIIGP MENIKITPTDFFVLRAMVKVHEDQQIFGL
26	UDP-Glc:α-D- GlcNAc-二磷酸 十一萆醇	B5L3F2	MTEKKSVSIVLCTYNGTKYLQEQLDSILAQTYPLH EIIIQDDGSTDNTWQILEKYEEKYPLIH YHNEGTH GVNANFLSAMHRTTGDFIAIADQDDIWETDKIAN QMTTIGNKLLCSGLTRPFSSDGSFAYFDNRPRNV S IFRMMFLGLPGHTMLFRRELLRMPPVTHSFFNV SLYDAALSILAASHDSIAFCNKVLVNFRRHADATT YNDYSRSLPSWQNGLYELLWGLRHYHQARSIALP IYRGKLALMEGITTNYHDFIEAKAIMRLETQKGL WAFRLRLQYLLTKNHQRLFQTSGGSFIKMIRAWLY PVMQLYMYHHALRRCK
27	UDP-N-乙醯葡 糖胺	P33038	MESFIIIEGGHRLSGTIAPQGAKNEALEVICATLLTT EEVIIRNIPNILDVNNLIKLLQDIGVKVKKLGANDF SFQADEVKLDYLESIDFVKKCSSLRGSVLMIGPLL GRFGKATIAKPGGDKIGRRRLDTHFLGFKNLGAR FVRIEDRDVYEIQADKLVDGYMLLDEASVTGTAN IIMSAVMAEGTTTIYNAACEPYIQQLCHLLNAMG AKITGIASNLITIEGVTSLHGAEHRILPDMIEVGSFI

			GMAAMVGDGVRIKDVSI PN LGLLD TFRRLGVQII EDED L IIP RQDHYVIDSFIDGTIMTISDAPWPGLT PDLISVLLVVATQAQGSVLFHQKMFESRLFFVDK LIDMGAQIILCDPHRAVVVGHDHAKKLRAGR MSS PDIRAGIALLIAALTAEGTSRIDNIAQIDRGYENIEG RLNALGAKVQRVEIC
28	感測_蛋白 _EvgS	P30855	MERSGNFYKAIRLGYILISILIGCMAYNSLYEWQEI EAELELG NKKIDELRKEINNINI QMIKFSLLGETILE WNDKDIEHYHARRMAMDSMLCRFKATYPAERID SVRHLL EDKERQMCQIVQILEQQQAINDKITSQVP VIVQKSVQE QPKKSKRK GFLGIFGKKEEAKPTVTT TMHRSFN RNM RTEQQAQSRRLSVHADSLAARNA ELNRQLQGLVVQIDGKVQTDLQKREAEITAMRER SFIQIGGLTG FVILLVISYIIHRNANRIKRYKQETA DLIERLQQMAKRNEALITSRKKAVHTITHELRTPL TAITGYAGLIQKNFNADKTGMYIRNIQSSDRMR EMLNTLLSFFRLDDGKEQPNFSTCRISSIAHTLESE FMPIAINKGLALTVTNHTDAVVLTDKERILQIGNN LLSNAIKFTENGAVSLTMGYDNGMLKLIVKDTGS GMT EEEQQRVFGAFERLSNAAAKDGFGLGLSIVQ RIVTMLGGTIQLKSEKGKGSRFTVEIPMQSAEELP ERINKTQIHHNRTLHDIV AIDNDKVLLMLKEMY AQEGIHCDTCTNAAELMEMIRRKEYSLLLTDLNM PDINGFELLELLRTSNVGN SRIPIIVTTASGSCNRE ELLERGFSDCLLKPFSELMEVSDKCAMKGKQN EKPDFSSLLSYGNESVMLDKLIAETEKEMQSVRD GEQRKDFQELDALTHHLRSSWEILRADQPLRELY KQLHGSAPDYEALNNAVTA VL DKGSEIIRLAKE ERRKYENG
29	磷酸結合_蛋白 _PstS	Q7A5Q2	MKRSRFYITVGLILSLTLLMSACGQKKAKDGRTD TPTSGTIKFASDESFSPIVEELLQNYQFRYPQAHLL PIYTDDNTGMKLLLDQKVNLFITSHAMTKGEDAI LRGKGPIPEVFP IGYDGI AFIVNRSNPDSCITVDDV KKILQGKIAKWNQLNPKNNRGSIEVVFDNKASAT LHYV VDSILGGKNIKSENIVAAKNSKSVIDYVNKT PNAIGVIGSNWLNDHRD TTNTTFKKDVTVASISK ATV ASPSNWQPYQAYLLDGRYPFVRTIYALLAD PHKALPYAFANYIANPIGQM IIFKAGLLPYRGNNI REVEVKNQ
30	雙官能_嘌呤_ 生物合成_蛋白 _PurH	P9WHM7	MAGTKRIKTALISVFHKDGLDDLK KLDEEGVQF LSTGGTQQFIESLG YECQKVEDVTSYPSILGGRVK TLHPKIFGGILARRDNEEDQKQMVEYTIPAI DLVIV DLYPFEQTVASGASAQDIIEKIDIGGISLRAGAKN FKDVVIVPSKAEYPVLLQLLNTKGAETEIEDRKMF AERAFGVSSH YDTAIHSWFAAE
31	多藥_流出_泵 次單元_AcrA	P0AE06	MEE EKGGRIGQRPYILKIITERNYIIIDMKKAKILL FVTALVAVLTSCGGGQKGLPTSDEYPVITIGASNA QLKTTYPATIKGVQDVEVRPKVSGFITKLNIHEGE YVHAGQVLFVIDNSTYQAAVRQAQAQVNSAQSA VAQAKANVVQANASLNSANAQAATSRLTYNNSQ NLYNNK VIGDYELQSAKNTYETAQASVRQAQSGI ASAQA AVKQAEAGVRQAQAMLSTAKDNLGFCY VKSPASGYVGS LPFKEDALVSASSAQPVTTISNTS TIEVYFSMTEADV LKLSRTDDGLSNAIKKFP AVSL LLADGSTYNHEGAIVKTSGMIDATTGTINVIARFP

			NPEHLLKSGGSGKIVIAKNNNRALLIPQEAVTQVQ NKMfVYKVDAKDKVHYSEITVDPQNDGINYIVTS GLKMGERIVSKGVSSLEDGAKIKALTPAEYEEAIK KAeKLGEnQSSASGFLKTMKGDSK
32	細胞_分裂_蛋 白_FtsX	Q81X30	MAKRRNKARSHHSLQVVTLCISTAMVLILIGMVV LTVFTSRNLSSYVKENLTVTMILQPDMSTEEAAL CQRIRSLHYINSLNFISKEQALKEGTRELGANPAEF AGQNPFTGEIELQLKANYANNDsIKNIERELRTYR GVSDITYPQNLVESVNHTLGKISLVLLVIAILLTIVS FSLMNNTIRLSIYARRFSIHTMKLVGASWGFIRAPF LRRAVMEGLVSALLAIAVLGVGLCLLYDYEPDIT KVLSDVVLVITAGVMLAFGVLIATFCSWLSVNKF LRMKAGDLYKI
33	Fe(2+)_轉運子 _FeoB	Q9PMQ9	MKLSDLKTGETGVIVKVLGHGGFRKRIEMGFIQG KQVEVLLNAPLRDPVKYKIMGYEVSLRHSEADQI EVISAEEARQLEQAKADNEPQQGALSNNIPDESDH ALTPFELTDAANRKSVINVALVGNPNCGKTSLF NFASGAHERVGNYSGVTVDKAVGRANYEGYEFH LVDLPGTYSLSAYSPEELYVRKQLVEKTPDVVINV IDASNLERNLYLTTQLIDMHVRMVCALNMFDETE QRGDNIDYQKISELFGIPMVPTVFTNGRGVKELFH QVIAVYEGKEDETSQFRHIHINHGHELEGGIKNIQ EHLRAYPDICQRYSTRYLAIKLLEHDKDVEELIKP LKDSDEIFKHRDIAAQRVKEETGNESETAIMDAK YGFHIGALEEADYSTGQKKDITYQTTHFIDQILTNK YFGFPIFFLILFIMFTATFVIGQYPMDWIDGGVSWL GDFISSNMPDGPVKDMLVDGIIGGVGAVIVFLPQI LILYFFISYMEDSGYMARAAFIMDKLMHKMGLH GKSFIPLIMGFGCNVPAVMATRTIESRRSRLVTMLI LPLMSCSARLPIYVMITGSFFALKYRSLAMLSLYV IGILMSVIMSRVFSRFLVKGEDTPFVMELPPYRFPT WKAIGRHTWEKGKQYLKKMGGILVASIIVWALG YFPLPKPDMGQQRQEHSFIGIGHAVEPVFRPQ GFNWKLDVGLLAGVGAKIVASTMGVLYSNDDS FKDDNSFSSEGGKYVKLHKQITQDVANLHGVSYN EAEPIATLTAFcFLLFVLLYFPCiATIAAIKGETGS WGWALFAAGYTTLLAWVVSaIVFQVGMLFIG
34	肺炎鏈球菌溶 血素	Q04IN8	MKKNLLKAVLPASLALFAVTFGSCSQDQQLTGTK EDTGERVLDNTREIQNYLRTLPLAPMMSRASDPV PSDDGTTVPVDEGTskTEEKGVlNGIPGSWVKTT RRYKMTQAFDESFLFDPTSDIVYPGCVLKGGTIAN GTyAIITSHETGDVTFsINLSPANPQeARETSATVH NIRKSEYQEVWNKWANMQWKESpITTIESVEKIN SQEELATKLGVAVNspVANGSLNFGFNfNKKKNH ILARLIQKYFSVSTDAPKKGNIFESIDKEALDGYQP VYISNINYGRIIYLSVESDEDEKVVDEAINFAMNQI KGVDVSVSADQSLHYRKVLANCDIRITVLGGGQT IQKEVLKGDIDSfQRFLNADIPMEQMSPIFSRLRYA VDNSQARVVTsNEFTVTQRDFVPEfKKVRMQLQ VLGFSGTNTGPFpNLDREAGLWGSISLSLNGQDNE LVKISQSNPFFFNyREKKETMHPiGFGGIVTVEFD KDPNESLEDFVDHQKMTFVSDLHSTRSIYNYNFG RTTfTHTLGTLYTKYKGDDPIfVLESNNKNVKIHT YVKVLDmkFFN

35	叢集：未表徵之蛋白質	G6AG77	MTKFIYAMSLFLLAAISIKAQPIQKTSGCLLHGSV VSSTDATAIAGATVRLYQLKKLVGGTVSDASGNF DVKCPSSGSLQLRITAVGFKEVDTTLNVPTVTPLSI YMRAGKHAMDEVTVTASEKRGMTSTTVIGQTA MEHLQPSSFADLLALLPGGMTKIPALGSANVITLR EAGPPSSQYATSSLGTFKVIDGQAIGTDANMQYIA GSFQGDADNSRNHVSYGVDMREIPTDNIEKVEVV RGIPSVKYGELTSGLINITRKRSQSPLLLRLKADEY GKLVSVGKGFLLSGKWNLNVDGGLLDARKEPRN RFETYRRLTFSARLRRKWNLGERYVLEWSGATD YSLNIDNVKTDPEIQIHREDSYRSSYLKMGMNHR LLRRKALVGLQSVSLAYSASLASDRIHQTEAVA LQRDYVVPLAYEGGEYDGLFLPMQYLCDYRVEG KPFYSTLRGETEWLARTSFISHHITAGGEFLNKN YGRGQIFDITKPLHASTARRPRSYKDIPATDILSFY AEDKATMPIGKHQLTVMAGLRTTQMLNIPASYA VHGKLTFTDRVNVQWDFPSFLGFKSFVSGGLGM MTKMPTVLDLYPDYVYKDITEMNYWDIRPAYKR IHIRTYKLNQVNPDLRPARNKKWEIRLGMDKGAH HFSVTYFHEDMKDGFRSTTTMRPFIYKRYDTSVIN PSALTGPSSLASLPVVTDTLLDGYGRTENGSRITK QGIEFYSSPRIPVIQTRITVNGAWFRTL YENSIPLF RSAPNVVVGTVAIADRYAGYYMSTDKYDKQIFTS NFIFDSYVDKLGILSATAECFWMSNTRKRPATSST PMGYMDITGTVHPYVEADQSDPYLRWL VLTGTA GQDMDYRERSYMLVNFKATKRFRHL SLSFFAD RVFYVAPDYE VNGFIVRRTFSPYFGMEIGLKI
36	細胞_分裂 _ATP-結合_蛋 白_FtsE	P0A9R7	MLIDFKKVNIYQDERLILKDIDFQATEGEFIYLIGR VGSGKSSLLKTFYGELDIDQEDAEKAEVLGESVL DIKQKRIPALRRQMGIIFQDFQLLHDSVAKNLKF VLQATGWKDKEKIKQRIKEVLEQVGMIDKAAKM PSELSGGEQQRIAIARAFLNNPKIILADEPTGNLDP ETASNIVSILKDTCKNGTTVIMSTHNINLLSQFPGK VYRCMEQALVPVTNEAQTKDLEEDSTSVEPLIEP VLEEEAQAEDSKE
37	二肽/三肽_轉運 子	P0C2U3	MFENQPKALYALALANTGERFGYYTMIAVFALFL RANFGLEPGTAGLIYSIFLGLVYFLPLIGGIMADKF GYGKMVTIGIIVMFAGYLFLSVPLGGGTVAFGAM LAALLISFGTGLFKGNLQVMVGNLYDTPELASK RDSAFSIFYMAINIGALFAPTA AAVKIKEWAETSLG YAGNDAYHFSFAVACVSLIVSMGIYYAFRSTFKH VEGGTKKTEKAAAAAVEELTPQQTKERIVALCLV FAVVIFFWMAFHQNGLTLT YFADEFVSPTSTGVQ SMAFDVVNLVMIVFIVYSIMALFQSKTTKAKGIAC AVILAAIAVLAYKYMNVNGQVEVSAPIFQQFNPF YVVALTPISMAIFGSLAAKGKEPSAPRKIAYGMIV AGCAYLLMVLASQGLLTPHEQKLAKAAGETVPF ASANWLIGTYLVLTFGELLLSPMGISFVSKVAPPK YKGAMMGGW FVATAIGNILVSVGGYLWGDLSLT VVWTVFIVLCLVSASF MFLMMKRLEKVA
38	鈣轉運_ATP酶	Q47910	MKKILIFVAGLCMSLAASAQIQRPKL VVGLVVDQ MRWDYLYYYYNEYGTDGLRRLVDNGFSFENTHI NYAPT VTAIGHSSVYTGSVPAITGIAGNYFFQDDK NVYCCEDPNVKS VGSDSKEGQMSPHRLLASTIGD ELQISNDFRSKVIGVALKDRASILPAGHAADAAY

			WWDTSAGHFVTSTFYTDHLPQWVIDFNEKNHTA PNFNIKTSTQGVMTMFKMAEAALKNENLGKGKET DMLAVSISSTDAIGHVYSTRGKENHDVYMQLDK DLAHFLKTLDEQVGKGNLFLTLADHGAAHNYN YMKEHRIPAGGWDYRQSVKDLNGYLQGKFGIAP VMAEDDYQFFLNDSLIAASGLKKQQIIDESVEYLK KDPYRLYVFDEERISEVTMPQWIKERMINGYFRG RSGEIGVVTRPQVFGAKDSPTYKGTQHGQPFYPYD THIPFLLYGWNVKHGATTQQTIVDIAPTVCAML HIQMPNGCIGTARNMALGN
39	聚-β-1,6-N-乙醯 基-D-葡糖胺_合 成酶	Q5HKQ0	MDRQVFQTDSDRQRWNRFKWTLRLVITIAILLGVV FVAMFALEGSPQMPFRHDYRSVVSASEPLLKDNK RAEVYKSFRDFFKEQKMHSNYAKVAARQHRFVG HTDNVTQKYIKEWTDPRMGIRSAWYVNWDKHA YISLKNLKNLNMVLPEWYFINPKTDRIEARIDQR ALKLMRRAHIPVLPMLTNNYNNSAFRPEAIGRIMR DSTKRMGMINELVAACKHNGFAGINLDLEELNIN DNALLVTLVKDFARVFHANGLYVTQAVAPFNED YDMQELAKYDDYLFLMAYDEYNAGSQAGPVSS QRWVEKATDWAACKNVPNDKIVLGMATYGYNW AQGGGTTMSFDQTMATALNAGAKVNFNDDTY NLNFSYQDEDDGTLHQVFFPDAVTTFNIMRFGAT YHLAGFGLWRLGTEDSRIWKYYGKDLSWESAAR MPIAKIMQLSGTDDVNFVGSSEVLNVTSEPHAGRI GIVLDKDNQLIIEERYLSLPATYTVQRLGKCCEKQ LVLTFFDDGPDSDRWTPKVLSTLKHVKVPAFFMVG LQIEKNIPVKDVFNQGCTIGNHTFTHHNMIENS RRSFAELKLTRMLIESITGQSTILFRAPYNADADPT DHEEIWPMIIASRRNYLFVGESIDPNDWQQGVTA DQIYKRVLGVDGVHQEYGHILLHDAGGDTREPTVT ALPRIETLQREGYQFISLEKYLGMSTRQTLMPPIKK GKEYYAMQANLSLAELIYHISDFLTALFLVFLVLG FMRLVFMVYVLMIREKRAENRRNYAPIDPLTAPAV SIIVPAYNEEVNIVRTISNLKEQDYPSTLKIYLVDDG SKDNTLQRVREVFENDDKVVIISKKNNGKASALN YGIAACSTDYIVCVDADTQLYKDAVSKLMKHFIA DKTGKLGAVAGNVKVGNGQRNMLTYWQAIEYTT SQNFDRMAYSNINAITVIPGAIGAFRQDVLEAVGG FTTDTLAEDCDLTMSINEHGYLIENENYAVAMTE APESLRQFIKQIRWCFGVMQTFWKHRASLFAPS KGGFGMWAMPNMLIFQYIPTFSPIADVLMFLGLF SGNASQIFIYYLIFLLVDASVSIMAYIFEHESLWVL LWIIPQRFFYRWIMYYVLFKSYLKAIKGELQTWG VLKRTGHVKGAQTIS
40	ATP_合成酶_次 單元_β_鈉_離 子_特異性	P29707	MSQINGRISQIIGPVIDVYFDTKGENPEKVLPNIYD ALRVKKADGQDLIIEVQQQIGEDTVRCVAMDNTD GLQRGLEVPTGSPVMPAGEQIKGRMMNVIGQPI DGMSALQMEGAYPIHREAPKFEDLSTHKEMLQT GIKVIDLLEPYMKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELI NNAKGHNGYSVFAGVGERTREGNDLIRDMLESG VIRYGEKFRKAMDEGKWDLSLVDSEELQKSQAT LVYGMNEPPGARASVALSGLTVAEEFRDHGGK NGEAADIMFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMPSAV GYQPTLASEMGAMQERITSTKHGSITSVQAVYVP ADDLTDPAATTFTHLDATTELSRKITELGIYPAV

			DPLGSTRILDPLIVGKEHYDCAQRVKQLLQKYN ELQDIIAILGMDELSDDDKLVVNRARRVQRFLSQP FTVAEQFTGVKGVMPVEETIKGFNAILNGEVDDL PEQAFLNVGTIEDVKEKAKQLEATKA
41	叢集：未表徵 之蛋白質	G6AGX5	MNPIYKIITSILFCVLSINTMAQDLTGHVTSKADDK PIAYATVTLKENRLYAFTDEKGNYSIKNVPKGKY TVVFSCMGYASQTVVVMVNAGGATQNVRLAED NLQLDEVQVVAHRKKDEITTSYTIDRKTLDNQQI MTLSDIAQLLPGGKSVNPSLMNDSKLTLSRGTLER GNASFGTAVEVDGIRLSNNAAMGETAGVSTRSVS ASNIESVEVVPGLASVEYGDLTNGVVVKVKTTRGSS PFIVEGSINQHTRQIALHKGVDLGGNVGLLNFSIE HARSFLDAASPYTAYQRNVLSLRVMNVFMKKSL PLTLEVGLNGSIGGYNSKADPDRSLDDYNKVVDN NVGGNIHLGWLLNKRWITNVDLTAAFTYADRLS ESYTNESNATQPYIHTLTEGYNIAEDYDRNPSAN IILGPTGYWYLRGFNDKPLNYSKMKANWSKAF GKFRNRLLVGGEWTSSMNRGRGTYYADMRYAPS WREYRYDALPSLNNAIYAEDKLSMDVNERQNAE LTAGIRETITSIPGSEYGSVGSFSPRMNARYVFRFG QNSWLNMTLHAGWGRSVKIPSFQVLYPSPSYRD MLAFASSTADNRSYYAYTYPSMARYNANLK WQRADQWDLGVWRTKIADVLSFFRSKVSNPY MATDVYTPFTYKYTSPAMLQRSGLAVADRRFSID PQTGIVTVSDASGVKSPVTLGYEERNTYVTNTRY VNADALQRYGLEWIVDFKQIKTLRTQVRLDGKY YHYKAQDETLFADVPGVGLNTRQSDGRLYQYVGY YRGAATTTNYTANASASNGSVSGQVDLNATITT HIPKIRLIVALRLESSLYAFSRATSSRGYVVSSGNE YFGVPYDDKTENQTVIVYPEYYSTWDAPDVLIPF AEKLRWAETNDRGLFNDLAQLVVRTNYPYTLNP NRLSAYWSANLSVTKEIGRHVSVSFYANNFFNTL SQVHSTQTGLETSFGSGYVPSFYGLSLRLKI

【0070】 在一些實施例中，普雷沃菌是不含或實質上不含一或多種(例如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或大於25種)表2中所列之蛋白質及/或一或多種(例如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或大於25種)編碼表2中所列之蛋白質的基因的普雷沃菌之菌株。在一些實施例中，普雷沃菌不含表2中所列之所有蛋白質及/或編碼表2中所列之蛋白質的所有基因。

表2：其他普雷沃菌蛋白

Seq. ID. No.	名稱	Uniprot ID	胺基酸序列
42	UDP-Gal:α-D-GlcNAc-二磷酸十一萆醇	Q03084	MERIDISVLMNAVYKKDNPAFLRESLESIFSQTVEA AEVVLLLEDGPLTDALYDVIKSYEAIYSTLKVVSY ENRGLGKTLNDGLLLCKYNLVARMDADDICKPN RLEMEYNWLKSHEDYDVIGSWVDEFTDNKTRVK SIRKVPEAYDEIKNYAQYRCPINHPTAMYRKA LAVGGYLTEYFPEDYFLWLRMLNNGSKFYNIQES LLWFRYSEETVAKRGGWAYACDEVRLVRMLKM GYIPFHVFCQSVVIRFTTRVMPLPIRQLYNLIRKT
43	ATP_合成酶_次單元_β	A1B8P0	MSQINGRISQIIGPVIDVYFDTKGENPEKVLPKIHD ALRVKCRANGQDLIEVQQHIGEDTVRCVAMDNTD GLQRNLEVPTGSPVMPAGDQIKGRMMNVIGQP IDGMEALSMEGAYPIHREAPKFEDLSTHKEMLT GIKVIDLLEPYMKGGKIGLFGGAGVGKTVLIMELI NNIAKGHNGYSVFAGVGERTREGNDLIRDMLESG VIRYGEKFRKAMDEGKWDLSLVDQEELQKSQAT LVYGMNEPPGARASVALSGLTVAEEFRDHGGK NGEAADIMFFIDNIFRFTQAGSEVSALLGRMP SAVGYQPTLASEMGTMQERITSTKHGSITSVQAVYVP ADDLTDPAPATTFTHLDATTELSRKITELGIYPAV DPLGSTSRILDPLIVGKDHYECAQRVKQLLQHYN ELQDIIAILGMDELSDEDKLVVNRARRVQRFLSQP FTVAEQFTGVKGVMPVPIETIKGFNAILNGEVDDL PEQAFLNVGTIEDVKEKAKRLLLEATK
44	細胞_分裂_ATP-結合_蛋白_FtsE	O05779	MPIGNGQKYQLTIINHTIIMLIDYKKVNIYQDERL ILKDVDFQAETGEFIYLIGRVSGSKSLLKTIY GELDIDSEDAEKAVVLDESMPNKRSRIPALRKQ MGHIFQDFQLLHDSVAKNLKFVLQATGWT SKQKIERRIEVLAQVGMTDKKNKMPSEL SGGEQQRIAIALALNTPKIIIADEPTGNLDP ETAANIVSILKDSCQAGTTVIMSTHNINLID QFPGKVYRCHEGELHQLTDKKEVSELA EETAPVETIDEPEQND
45	氯化血紅素_轉運_系統_透過酶_蛋白_HmuU	Q56992	MKRNILLFICLATSILLFLGLNLTTGSVQIPFADILD ILCGRFIGKESWEYIILENRLPQTLTAILCGASL SVCGLMLQTAFRNPLAGPDVFGISSGAGLGV ALVMLLLGGTVSTSIPTVSGFLAILTAA FVGAIATLILFLSTLVRNSVLLLIVGIMVGYV SSSAVSLLNFFASEEGVKSVMVWGMGNF GAVSMNHIPLFSILCLIGIIASFLLVKPLN ILLGPQYAESLGISTRQIRNILLVVVGL LTAITTAFCGPISFIGLAIPHIARLLFR TENHQILLPGIVLSGAAIALLCNFICYLP GESGIIPLNAVTPPLIGAPIIYVVIQRR
46	己糖醛酸_轉運子	O34456	MKKYYPWVLVALLWFVALLNYMDRQMLSTMQ EAMKVDIAELNHAEAFGALMAVFLWIYGIV SPFAGIIADRVNRKWLTVGSIFVWSAVTYL MGYAESFDQLYWLRAFMGISEALYIPAAL SLIADWHEGKSRSALGIIHMTGLYVGQAV GGFGATLAAMFSWHA AFHWFGIIGIVYSLVLLLFLKENPKH GQKSVLQGETKPSKNPFRGLSIVFSTWAF WVILFYFAVPSLPGWATKNWLPTLFAN SLDIPMSSAGPMSTITIAVSSFIGVIM GGVISDRWVQRNLRGRVYTS AIGLGLTVPALMLLGF GHSLVSVVGAGLCFGIGYGMFDANNMPILCQF

			ISSKYRSTAYGIMNMTGVFAGAAVTQVLGKWD GGNLGNFAILGGIVVLALVLQLSCLKPTTDNME
47	1,4- α -葡聚糖_分 枝_酶_GlgB	P9WN45	MVTKKTTTKKAPVKKTSAKTTKVKEPSHIGLVKN DAYLAPYEDAIRGRHEHALWKMNQLTQNGKLT SDFANGHNYYGLHQTADGWVFREWAPNATEIYL VGDFNGWNEQEA YQCHRIEGTGNWELTLPDAM QHGQYYKMRVHWEGGEGERIPAWTQRVVQDEA SKIFSAQVWAPAEPYVWEKKTFKPQTSPLLIYEC IGMAQDEEKVGTYNEFREKVLPRIKDGYNAIQIM AIQEHPIYYGSFGYHVSSFFAASSRFGTPEELKALID EAHKNGIAVIMDIVHSHAVKNEVEGLGNLAGDPN QYFYPPGERHEHPAWDSLCFDYGKDEVHLFLLSNC KYWLEEEYHFDGFRFDGVTSMLYYSHGLGEAFCN YADYFNGHQDDNAICYLTLANCLIHEVNKNAVTI AEEVSGMPGLAAKFKDGGYGFDYRMAMNIPDY WIKTIKELPDEAWKPSSIFWEIKNRRSDEKTISYCE SHDQALVGDKTIIFRLVDADMYWHFRKGDETEM THRGIALHKMIRLATIAAINGGYLNFMGNEFGHPE WIDFPREGNGWSHKYARRQWNLVDNEELCYHLL GDFDRKMLEVITSEKKFNETPIQEIWHNDGDQILA FSRGELVFVNFSPSHSYSDYGFLVPEGSYNVVLN TDAREFGGFGFADDTVEHFTNSDPLYEKDHKGW LKLYIPARSAVVLRKK
48	叢集：YihY家 族蛋白質	D9RW24	MKIDIERIKYFLTVGMFMKTEHSSKRRNMLIRQFQ KFYLTVKFFFVRDHAASTAQLSFSTIMAIVPIASMI FAIANGFGFGQFLEKQFREMLSAQPEAATWLLKL TQSYLVHAKTGLFIGIGLMIMLYSVFSLIRTVETTF DNIWQVKDSRPISRIVIDYTALMFLVPISIIILSGLSI YFYSFVENLNGLRFLGTIASFSLRYLVPWAILTLM FIVLYVFMPNAKVKITKTVPAMIASIAMLCCLQA VYIHGQIFLTSYNAIYGSFAALPLFMLWILASWYI CLFCAELCYFNQNLEYECLIDTEDICHNDLLILC ATVLSHICQRFANDQKPQTALQIKTETHIPIRVMT DILYRLKEVNLISENFSPTSDEVITYPTHTDNNITV GEMARLESTPASDFALLGFSPKKAWNHDYDRV GSIREIYLNELKSINIKELISYSEN
49	莢膜_生物合成 _蛋白_CapA	P19579	MMKRPSIARVVKVIICLLTPILLSFSGIGDNDIDKK KSTSKEVDDTLRIVITGDLLLDRGVRQKIDMAGV DALFSPTIDSLFHSSNYVIANLECPVTKIRERVFKR FIFRGEPEWLPTLRRHGITHLNLANNHSIDQGRNG LLDTQEQIKKAGMPIGAGKNMEEAAEPVLISTSP RHVWVISSLRLPLENFLYLPQKPCVSQESIDSLIMR VKRLRATDKNCYILLILHWGWEHHFRATPQQRED AHKLIDAGADAIVGHHSHTLQTIETYRGKPIYYGI GNFIFDQRKPMNSRACLVELSITA EKCKAKALPIEI KNCTPYLSK
50	肽聚醣_脫乙醯 基酶	B5ZA76	MILLSFDTEEFDVPREHGVDFSLEEGMKVSIEGTN RILDILKANNVCATFFCTGNFAELAPEVMERIKNE GHEVACHGVDPHWQPKPEDVFRSKEIIEVRTGVKV AGYRQPRMFVPSDEDIEKAGYLYNSSLNPAFIPGR YMHLTTSRTWFMQKGKVMQIPASVSPHLRIPLFWL SMHNFPEWFYLRQVLRHDGYFVTYFHPWEF YDLKSHPEFKMPFIKNHSGHELEQRLDRFIKAMK ADKQEFITYVDFVNRQKK

51	反丁烯二酸_還原酶_鐵-硫_次單元	P0AC47	MAKNISFTIKYWKQNGPQDQGHFDTHEMKNIPD DTSFLEMLDILNEELIAAGDEPFVFDHDCREGICG MCSLYINGTPHKGKTERGATTTCQLYMRRFNDGDVI TVEPWRSAGFPVIKDCMVDRTAFDKIIQAGGYTTI RTGQAQDANAILISKDNADEAMDCATCIGCGACV AACKNGSAMLVSSKVSQ LALLPQ GKPEAAKRA KAMVAKMDEVGFGNCTNTRACEAVCPKNEKIAN IARLNREFIKAKFAD
52	絲胺酸/蘇胺酸-蛋白_激酶_PknH	P9WI71	MSENKLSTNEQAQTADAPVKASYTEYKVIPSQGY CMIVKCRKGDQTVVLKTLKEEYRERVLLRNALK REFKQCQRLNHSGIVRYQGLVEVDGYGLCIEEY VEGRTLQAYLKENHTDDEKIAIINQIADALRYAHQ QGVIHRLKPSNVLVTTQGDYVKLIDFSVLSPEDV KPTAETTRFMAPEMKDETLTADATADIYSLGTIM KVMGLTLAYSEVIKRCCAFKRSDRYSNVDELLAD LNNEGSSFSMPKIGKGT VVLGLIIVVIGIGALLYN YGGALIDQVGKIDVSSVFSSDAETAPEDTVKVNT AEQSDSLSTEAEAPAIGKLAFMNMKPKALYKDLD NIFEKNSADKAKLTKAIKTYRGLIQANDTLDNE QRAEVDRVFGDYVKQKKAALN
53	羧基-末端_加工_蛋白酶_CtpA	O34666	MRKYICLLLFYLFTFLPLSAQQGNDSPLRKLQLAE MAIKNFYVDSVNEQKLVEDGIRGMLEKLDPHSTY TDAKETKAMNEPLQGDFEGIGVQFNMIEDTLVVI QPVVNGPSQKV GILAGDRIVSVNDSTIAGVKMARI DIMKMLRGKKGT KVKLG VVRGVKGVLT FVVTR AKIPVHTINASYMIRPNVGYIRIESFGMKTHDEFM SAVDSLKKKG MKTLLLDLQDNGGGYLQSAVQIS NEFLKNNDMIVYTEGRRARRQNFKAIGNGRLQD VKVYVLVNELSASAAEIVTGAIQDNDRGTVVGRR TFGKGLVQRPFDLPDGSMIRLTIAHYTPSGRCIQ KPYTKGDLKDYEMDIEKRFKHGELTNPDSIQFSDS LKYYTIRKHRV VYGGGGIMPDNFVPLDTTKFTRY HRMLAAKSIINAYLKYADANRQALKAQYSSFDA FNKGYVVPQSLLDEIVAEGKKEKIEPKDAAELKA TLPNIALQIKALTARDIWD MNEYFRVWNTQSDIV NKAVALATGK
54	叢集：未表徵之蛋白質	D9RRG3	MKLTEQRSSMLHGVLLITLFAAAFYIGDMGWV KALSLSPMVVG IILGMLYANSLRNNLPDTWVPGI AFCGKRVLRFGIILYGFRLTFQDVVAVGFPAIIVD AIIVSGTILLGVLVGRLLKMDRSIALLTACGSGICG AAAVLGVDGAIRPKPYKTAVAVATVVI FGTL SMF LYPILYRAGIFDLSPDAMGIFAGSTIHEVAHV VGA GNAMGAAVSNSAIIVKMIRVMMLVPVLLVIAFFV AKNVAERDDEAGGSRKINIPWFAILFLV VIGFNSL NLLPKELVDFINTLDTFLLTMAMSALGAETSIDKF KKAGFKPFLLAAILWCWLIGGGYCLAKYLV PVLG VAC
55	叢集：Cna蛋白B型域蛋白	X6Q2J4	MNKQFLLAALWLSPLGLYAHKANGIGAVTWKNE APKERMIRGIDEDKTHQRFTLSGYVKDRNGEPLIN ATIYDLTTRQGTMTNAYGHFSLTLGEGQHEIRCS YVGYKTLIETIDLSANQNHD IILQNEAQLDEVVVT TDLNSPLLKTQTGKLSLSQDKI TEYALLSSPDVIK TLQRTSGVADGMELASGLYVHGGNGDENLFLLD GTPLYHTNHSLGLFSSFNADV VKNVDFYKSGFPA

			RYGGRLSSVIDVRTADGDLYKTHGSYRIGLLDGA FHIGGPIRKGKTSYNFGLRRSWMDLLTRPAFAIMN HKSDNEDKLSMSYFFHDLNFKLTNIFNERSRMSLS VYSGEDRLDAKDEWHSNNSSGYNDVDIYVNRFH WGNFNAALDWNYQFSPKLFANFTAVYTHNRSTV SSSDEWRFTRPGEKEQLTLTSHGYRSSIDDIGYRA AFDFRPSPRHHIRFGQDYTYHRFQPQTYNRFDN QTNSEAKADTIATHSYNKNVAHQLTIFYAEDEMTL NEKWSLNGGVNADVVFHISGKTFATLSPRLSMKFQ PTERLSLKASYTLMSQFVHKIANSFLDLPTDYWVP TTARLHPMRSWQVAAGAYMKPNKHWLLSLEAY YKRSSHILQYSSWAGLEPPAANWDYVMMEGDGR SYGVELDADYNVSNLTLHGSYTLTQKKFDDF YDGWYYDKFDNRHKLTLTGRWNITKKIAFAAW TFRTGNRMTIPTQYIGLPDVPAQEQQGLTFNSSDD NTLNFAYEKPNNVILPAYHRLDIGFDFHHTTKKG HERIWNLSFYNAAYCHLNSLWVRVKIDSNNQMKIR NIAFIPVIPSFSYTFKF
56	聚-β-1,6-N-乙醯 基-D-葡糖胺_合 成酶	P75905	MSKQVFQTDNRQRWSYFKWTLRVILTILSLLGIVF LAMFALEGSPQMPFRHDYRNAVTAASPYTKDNK TAKLYKSFRDFFKEKKMHNNYAKATIKKQRFIGK ADSVTQKYFREWDDPRIGVRS AWYVNWDKHAYI SLKNNIKHLNMVLPWFFFINPKTDKVEYRIDKQA LRLMRRTGIPVLPMLTNNYNSDFHPEAIGRIMRDE KKRMALINEMVRTCRHYGFAGINLDLEELNIQDN DLLVELLKDFSRVFHANGLYVTQAVAPFNEDYN MQELAKYNDYLFMAYDEHNIESQPGAVSSQRW VEKATDWAACKNVPNDKIVLGMATYGYDWANGE GGTTVSFDQTMAIAQDADAKVKFDDDTYNVNF YQNTDDGKIHHVFFTDAAATTFNIMRFGAEYHLA YGLWRLGTEDKRIWRIFYGKDMSWENVARMSVA KLMQLNGTDDVNFVGSGEVLEVTTTEPHPGDISIRI DKDNRLISEEYYRALPSTYTIQRLGKCKDKQLVIT FDDGPDSRWTPVLSTLKKYNVPAAFFMVGLQM EKNLPLVKQVYEDGHTIGNHTFTHHNMIENSRR SYAELKLTRMLIESVTGHSTILFRAPYNADADPTE HEEIWPMIVASRRNYLFVGESIDPNDWEPNVTSD QIYQRVIDGVHHEDGHIILLHDAGGSSRKPTLDAL PRIETLQHEGYQFISLEQYLGMGKQTLMPKINKG KAYYAMQTNLWLAEMIYHVSDFLTALFLVFLAL GMMRLIFMYVLMIREKRAENRRNYAPIDAATAPA VSIIVPGYNEEVNIVRTITTLKQQDYPNLHIYFVDD GSKDHTLERVHEAFDNDTDTILAKKNGGKASAL NYGIAACRSEYVVCIDADTQLKNDASRLMKHFI ADTEKRVGAVAGNVKVGNGQRNMLTYWQAIEYT SSQNFDRMAYSNINAITVPGAIGAFRKEVIEAVG GFTTDLAEDCDLTMSINEHGYIENENY AVALTE APETLRQFVKQRIRWCFGVMQAFWKHRSSLFAPS KKGFGFLWAMPNMLIFQYIIPTFSPADVLMLIGLF TGNALQIFFYYLIFLVIDASVSIMAYIFEGERLWVL LWVIPQRFFYRWIMYYVLFKSYLKAIKGELQTWG VLKRTGHVKG
57	細胞_分裂_蛋 白_FtsX	O34876	MAKKRNKARSRSLQVVTLCISTAMVLMMLIGIVV LTGFTSRNLSSYVKENLTITMILQPDMNTEESAAL CERIRTLHYINSLNFISKEQALKDGTKELGANPAEF

			AGENPFTGEIEVQLKANYANNDSSIRNIVQQLRTYR GVSDITYPQSLVESVNQTLGKISLVLLVIAVLLTIIS FSLINNTIRLSIY AHRFSIHTMKLVGGSSWSFIRAPFL RRAVLEGLVSALLAIAVLGIGICLLYEKEPEITKLL SWDALIITAIVMLAFGVIIATFCAWLSVNKFLRMK AGDLYKI
58	UDP-2,3-二鹽基 葡糖胺_水解酶	P44046	MKNIYFLSDAHLGSLAIDHRRTHERRLVRF LDSIK HKAAAVYLLGDMFDFWNEYKYVVPKGFT RFLG KISELTDMGVEVHFFTGNHDLWTYGYLEKECGVI LHRKPITTEIYDKVFYLAHG DGLGDPDP MFRFLRK VFHNRF CQRLNFFHPWWGMQLGLN WAKRSRL KRKDGKEVPYLGEDKEYLVQYTKEYMSTHKDID YYIYGHRHIELDLTLSRKARLLILGDWIWQFTYAV FDGEHMFLEEYVEGESKP
59	聚-β-1,6-N-乙鹽基-D-葡糖胺_合成酶	P75905	MVGLDVL CYFIHAKGREKECYFERI IYQITCHSRT KCYLCNIMKYSIIVPVFNRPDEVEELLESLLSQUEEK DFEVVIVEDGSQIPCKEVC DKYADKLDLHYYSKE NSGPGQSRNYGAERAKGEYLLILDS DVVLPKGYI CAVSEELKREPADA FG GPDCAHESFTDTQKAISYS MTSFFT TGGIRGGKKKLDKFYPRSFNMGIRRDVY QELGGFSKMRFGEDIDFSIRIFKAGKRCRLFPEAW VWHKRRTDFRKFWKQVYNSGIARINLYKKYPESL KLVHLLPMVFTVGTALLVLMILFGLFLQLFP IINVF GSVFIMMGLMPLVLYSVIICVDSTMQNNSL NIGLL SIEAAFIQLTGYGCGFISAWWKRCVC GMDEFAAY EKNFYK
60	烯醇酶	Q8DTS9	MKIEKVHAREIMDSRGNPTVEVEVTLENGVMGR ASVPSGASTGENEALELRDGDKNRFLGKGVLKAV ENVNNLIAPALKGDCVLNQRAIDYKMLELDGTPT KSKLGANAILGVSLAVAQAAAKALNIPLYRYIGG ANTYVLPVPMMNIIINGGAHSDAPIAFQEFMIRPVG APSEKEGIRMGAEVFHALAKLLKKRGLSTAVGDE GGFAPKFDGIEDALDSIIQAIKDAGYEPGKDV KIA MDCAASEFAVCEDGKWFYDYRQLKNGMPKDPN GKKLSADEQIAYLEHLITKYPIDSIEDGLDENDWE NWKLTSAIGDRCQLVGDDLFVTNVKFLEKGIK MGAANSILIKVNQIGSLTETLEAIEMAHRHGYTTV TSHRSGETEDTTIADIAVATNSGQIKTGSM SRTDR MAKYNQLIRIEEELGACAKYGYAKLK
61	外_膜_溢出_蛋 白_BepC	Q8G0Y6	MKKLF TIAMLLGVTLGIHAQEVYSLQKCRELALQ NNRQLKVS RMTVDVAENTRKA AKTKYLPRVDAL AGYQHFSREISLLSDDQKNAFSNLGTNTFGQLGG QIGQNLTSLAQQGILSPQMAQQLGQLFSNVATPLT QVGNNIGQSINDAFRSNTKNVYAGGIVVNQPIYM GGAIKAANDMAAIGEQAQNNISLKRQLVLYGV DNAYWLAI SLKKKEALAIRYRDLAQKL NEDVKK MIREGVATRADGLKVEVA VNTADMQIARIQSGVS LAKMALCELCGLELNGDIPLSDEGDADLPPTSTQ FDNYTVSSSDTTGLNEARPELRL LQNAVDLSIQNT KLIRSLYMPHVLLTAGYSVSNPNLFNGFQKRFTDL WNIGITVQVPVWNWGENKYKVRASKTATTIAQL EMDDVRKKIDLEIEQNRLRLKDANKQLATSQKN MAAAEENLR CANVG FKEGVM TVTEVMAAQ TAW QTSRMAIIDAEISVKLAQTGLQKALGGL

62	磷酸乙醇胺_轉移酶_CptA	Q7CPC0	MKRTFVTKMVKPIEENSLFFMFMLLVGAFTNVSH RNVFGYIELIADVYIICFLLSLCQRTIRQGLVIMLSS VIYVVAIIDTCCCKTLFDTPTPTMLLLAQETTGREA TEFFLQYLNKLFFSAADIILFLAFCHIVMAVKKM KFSTSYLKQPFVAFVLMFTIFVGMALSIYDKVQLY TVKNLSGLEVAVTNGFAHLYHPVERIVYGLYSNH LIAKQVDGVIMANQQIKVSDSCSFTSPTIVLVIGESA NRHHSQLYGYPLPTTPYQLAMKNGKDSLAVFTN VVSPWNLTskvfkQIFSLQSVDEKGDWSKYVLFp AVFKKAGYHVSFLSNQFPYGINYTPDWTNNLVG GFFLNHPQLNKQMFDYRNVTIHNYDEDLLNDYK EIISYKKPQLIIFHLLGQHFQYSLRCKSNMKKFGIK DYKRMDLTDKEKQTIADYDNATLYNDFVLNKIV EQFRNKDAIIVYLSDHGEDCYGKDVNMAGRlTE VEQINLKKYHEEFEIPFWIWCSPIYKQRHRKIFTET LMARNNKFMtDDLPHLLYLAGIKTKDYCEERN VISPSFNNNRRLVLKTIDYDKALYQ
63	二肽_及_三肽_透過酶_B	P36837	MFKNHPKGLLQAAFSNMGERFGYYIMNAVLALF LCSKFGLSDETSGLIASLFLAAIYVMSLVGGVIAD RTQNYQRTIESGLVVMALGYVALSIPVLATPENNS YLLAFTIFALVLIavgnglFKGNLQAIVGQMYDD FETEAakVSPERLkWAQgQRDAGfQIFyVFINLG ALAAPFIAPVLRswWlGRngLTyDAALPQLCHK YINGTIGDNLGNLQELATKVGGNSADLASFCPHY LDVFNTGVHYSFIASVVTMLISLIIFMSSKKLFMP GKKEQIVNVEYTDEEKASMAKEIKQRMYALFAV LGISVFFWFSFHQNGQSLSFARDFVNTDSVAPEI WQAVNPFFVISLTPLIMWVFAYFTKKGKPISTPRK IAYGMGIAGFAYLFLMGFSLVHNYPsAEQFTSLEP AVRATMKAGPMILILTYFFLTVAELFISPLGLSFVS KVAPKNLQGLCQGLWLGATAVGNGLWIGPLMY NKWSIWTCWLVAIVCFISMVVMFGMVKWLERV TKS
64	C4-二羧酸_轉運_蛋白_2	Q9I4F5	MQKKIKIGLLPRVIIAILLGLFLGYYPDPAVRVFL TFNSIFSQFLGFMIPLIIGLVTPAIGIGKGAGKLLL ATVAIAIYVDTIVAGGLSYGTGTWLFPSMIASSTGG AIPHIDKATELTPYFTINIPAMVDVMSSLVFSFIAG LGIAYGGLRTMENLNFNEFKTVIEKVIEKAIPLPL YIFGVFLSMTHNGQARQVLLVFSQIIIVILVLHVLI LIYEFCIAGAIVKHNPFRLLWNMLPAYLTALGTSS SAATIPVTLKQTVKNGVSEEVAGFVVPLCATIHLS GSAMKITACALTICMLTDLPHDPGLFIYFILMLAII MVAAPGVPGGAIMAALAPLSSILGFNEEAQALMI ALYIAMDSFGTACNVTGDGAIALAVNKFFGKKKE TSILS
65	內_膜_蛋白_YnbA	P76090	MISVYSIKPQFQRVLTPILELLHRAKVTANQITLW ACVLSLVIGILFWFAGDVGTLWYLCPLVGLLIRM ALNALDGMMArrYNQITRKGELLNEVGdVVSdT IIYFPLLKYHPESLYFIVAFIALSIINEYAGVMGKVL SAERRYDGPMGKSDRAfVLGLYGVVCLFGINLSG YSVYIFGVIDLLLVLSTWIRIKKTLKVTNRNSQTPE
66	2',3'-環-核苷酸	P08331	MKLSTILLSIMLGLSSSTMAQQKDVTIKLIETTDV HGSFFPYDFITRKPKSGSMARVYTLVEELRKKDG KDNVYLLDNGDILQGQPISYYNYVAPEKTNIAA

			SVLNYMGYDVATVGNHDIETGHKVYDKWFKEL KFPILGANIIDTKTNKPYILPYITIKKNGIKVCVIG MLTPAIPNWLKESIWSGLRFEEMVSCAKRTMAEV KTQEKPDVIVGLFHSGWDGGIKTPEYDEDASKKV AKEVPGFDIVFFGHDHTPHSSIEKNIVGKDVICLDP ANNAQRVAIATLTLRPKTVKGKRQYTVTKATGEL VDVKELKADDAFIQHFQPEIDAVKAWSQVIGRF ENTIYSKDSYFGNSAFNDLILNLELEITKADIAFNA PLLFNASIKAGPITVADMFNLYKYENNLCMTMRLT GKEIRKHLEMSYDLWCNTMKSPEDHLLLSSTQN DAQRLGFKNFSFNFDASAAGIDYEVDVTKPDGQKV RILRMSNGEPFDENKWYTVAVNSYRANGGGGELL TKGAGIPRDSLKSRIIWESPKDQRHYLMEEIKKAG VMNPQPNHNWKFIPETWTVPAAADRKLFLFGE
67	Fe(2+)_轉運子 _FeoB	P33650	MKLSELKTGETGVIVKVS GHGGFRKRRIEMGFIKG KTVEVLLNAPLQDPVKYKIMGYEVSLRHSEADQI EVLSDVKTHSVGNEEEQEDNQLEMDSTTYDSTDK ELTPEKQSDAVRRKNHTINVALVGNPNCGKTSLF NFASGAHERVGNYSGVTVDKVGRAEFDGYVFN LVDLPGTYSLSAYSPEELYVRKQLVDKTPDVVIN VIDSSNLERNLYLTTQLIDMHIRMVCALNMFDETE QRGDHIDAQKLSELFVPMIPTVFTNGRGVKELFR QIIAVYEGKEDESLQFRHIHINHGHEIENGIKEMQE HLKKYPELCHRYSTRYLAIKLLEHDKDVEQLVSP LGDSIEIFNHRDTAAARVKEETGNDSETAIMDAK YGFINGALKEANFSTGDKKDTYQTTHVIDHVLTN KYFGFPIFFLVLLVMFTATFVIGQYPMDWIEAGVG WLGEFISKNPAGPVKDMIVDGIIGGVGAVIVFLP QILILYFFISYMEDCGYMSRAAFIMDRLMHKMGL HGKSFIPIMGFGCNVPAVMATRRIESRRSLITML ILPLMSCSARLPYVMITGSFFALKYRSLAMLSLYII GVLMAVAMSRLFSAFVVKGEDTPFVMELPPYRFP TWKAIGRHTWEKGKQYLKKMGGIILVASIIVWAL GYFPLPDDPNMDNQARQEQSYIGRIGKA VEPVFR PQGFNWKLDVGLLSGMGAKEIVASTMGVLYSND GSFSDDNGYSSETGKYSKLHNLITKD VATMHHS YEEAEPIATLTAFSFLLFVLLYFPCVATIAAIKGET GSWG WALFAAGYTTALAWIVSAVVVFQVGMLFM
68	UDP-N-乙醯葡 糖胺	P9WJM1	MESFIIEGGHQLSGTIAPQGAKNEALEVICATLLTS EEVIIRNVDPILDVNNLIKLLQDIGVKVKKLAPNEF SFQADEVNLDYLESSDFVKKCSSLRGSVLMIGPLL GRFGKATIAKPGGDKIGRRRLDTHFLGFKNLGAH FGRVEDRDVYEIQADKLVGTYMLLDEASITGTAN IIMAAVLAEGTTTIYNAACEPYIQQLCKMLNAMG AKISGIASNLITIEGVKELHSADHRILPDMIEVGSFI GIAAMIGDGVRIKDVSVPNLGLILDTFHRLGVQIIV DNDDLIPRQDHYVIDSFIDGTIMTISDAPWPGLTP DLISVLLVVATQAQGSVLFHQKMFESRLFFVDKLI DMGAQIILCDPHRAVVVGHDNAKKLRAGRMS SP DIRAGIALLIAALTAQGTSRIDNIVQIDRGYENIEG RLNALGAKIQRAEVC
69	核糖醇-5-磷酸_ 胞苷醯轉移酶	Q8RKI9	MNIAVIFAGGSGLRMHTKSRPKQFLDLNGKPIIYT LELFDNHPNIDAIVVACIESWIPFLEKQLRKFEINK VVKIIPGGKSGQESIYKGLCAAEEYAQSKGVSNEE TTVLIHDGVRPLITEETITDNIKKVEEVGSCITCIPA

			TETLIVKQADDALEIPSRADSFARAPQSFRLLDIIT AHRRLAEGKADFIDSCTMMSHYGYKLGTHIGPM ENIKITPTDFFVLRAMVKVHEDQQIFGL
--	--	--	---

【0071】 在一些實施例中，普雷沃菌EV及普雷沃菌係來自包含表1中所列之蛋白質中之一或多者且不含或實質上不含表2中所列之一或多種蛋白質的普雷沃菌之菌株。在一些實施例中，普雷沃菌EV及普雷沃菌係來自包含表1中所列之所有蛋白質及/或編碼表1中所列之蛋白質的所有基因，且不含表2中所列之所有蛋白質及/或編碼表2中所列之蛋白質的所有基因的普雷沃菌之菌株。

【0072】 在一些實施例中，對獲得EV之普雷沃菌進行修飾以提高EV產量；提高所產生之EV的口服遞送(例如，藉由改良耐酸性、黏液黏著性及/或滲透性及/或對膽汁酸、消化酶之抗性、對抗微生物肽之抗性及/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、樹突狀細胞、巨噬細胞)；增強所產生之EV的免疫調節及/或治療效果(例如單獨或與另一治療劑組合)；及/或藉由所產生之EV (例如經由多醣、菌毛、繖毛、黏附素之經修飾製造)增強免疫活化或抑制。在一些實施例中，本文所述之經工程改造之普雷沃菌經修飾以改良普雷沃菌細菌性及/或EV製造(例如較高耐氧性、穩定性、經改良之耐凍融性、較短生成時間)。舉例而言，在一些實施例中，所述經工程改造之普雷沃菌包括攜帶一或多種遺傳變化之細菌，此類變化為細菌染色體或內源質體及/或一或多種外來質體上所含的一或多種核苷酸之插入、缺失、移位或取代或其任何組合，其中遺傳變化可能會引起一或多種基因過度表現及/或表現不足。可使用此項技術中已知的任何技術產生經工程改造之微生物，該技術包括(但不限於)定點誘變、轉座子誘變、基因剔除、基因嵌入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外光誘變、轉化(化學或藉由電致孔)、噬菌體轉

導、定向演化或其任何組合。

【0073】 在一些實施例中，本文所述之普雷沃菌EV及/或普雷沃菌經修飾以使得其包含、連接至及/或結合於治療部分。在一些實施例中，治療部分為癌症特異性部分。在一些實施例中，癌症特異性部分具有針對癌細胞之結合特異性(例如具有針對癌症特異性抗原之結合特異性)。在一些實施例中，癌症特異性部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，癌症特異性部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，癌症特異性部分包含表現於癌細胞之表面上的受體或其受體結合片段之配位體。在一些實施例中，癌症特異性部分為具有兩部分之二分融合蛋白：結合於及/或連接至普雷沃菌之第一部分；及能夠結合於癌細胞(例如藉由具有針對癌症特異性抗原之結合特異性)之第二部分。在一些實施例中，第一部分為全長肽聚糖識別蛋白，諸如PGRP之或片段。在一些實施例中，第一部分具有針對普雷沃菌EV之結合特異性(例如藉由具有針對普雷沃菌細菌抗原之結合特異性)。在一些實施例中，第一及/或第二部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，第一及/或第二部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，第一及/或第二部分包含表現於癌細胞之表面上的受體或其受體結合片段之配位體。在某些實施例中，共投與癌症特異性部分與普雷沃菌EV (以組合形式或單獨投與)提高普雷沃菌EV對癌細胞之靶向。

【0074】 在一些實施例中，本文所述之普雷沃菌EV經修飾以使得其包含、連接至及/或結合於磁性及/或順磁部分(例如磁珠)。在一些實施例中，磁性及/或順磁部分包含及/或直接連接至普雷沃菌。在一些實施例中，磁性及/或順磁部分連接至及/或為結合於EV的EV結合部分之一部

分。在一些實施例中，EV結合部分為全長肽聚糖識別蛋白，諸如PGRP之或片段。在一些實施例中，EV結合部分具有針對EV之結合特異性(例如藉由具有針對普雷沃菌細菌抗原之結合特異性)。在一些實施例中，EV結合部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，EV結合部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，EV結合部分包含表現於癌細胞之表面上的受體或其受體結合片段之配位體。在某些實施例中，共投與磁性及/或順磁部分與EV (一起或單獨投與)可用於提高EV對癌細胞及/或存在癌細胞之受試者之部位的靶向。

普雷沃菌EV之產生

【0075】 在某些態樣中，本文所述之普雷沃菌EV可使用此項技術中已知的任何方法製備。

【0076】 在一些實施例中，無須EV純化步驟即可製備普雷沃菌EV。舉例而言，在一些實施例中，使用使普雷沃菌細菌EV完整之方法殺滅包含本文所述之EV的普雷沃菌，且將所得細菌組分(包括EV)用於本文所述之方法及組合物中。在一些實施例中，使用抗生素(例如使用本文所述之抗生素)殺滅普雷沃菌。在一些實施例中，使用UV照射殺滅普雷沃菌。

【0077】 在一些實施例中，自一或多種其他細菌組分純化本文所述之EV。用於自細菌純化EV之方法為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用S. Bin Park等人 PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011)或G. Norheim等人 PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015)中所述之方法從細菌培養物製備EV，該等文獻中之每一者以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，將細菌培養至混濁度為高光學密度，且隨後加以離心以集結細菌(例

如在4℃下，以10,000× g，持續30分鐘)。在一些實施例中，隨後使培養上清液通過過濾器(例如0.22 μm過濾器)以排除掉完整細菌細胞。在一些實施例中，將過濾上清液進行離心以集結細菌EV(例如在4℃下，以100,000至150,000× g，持續1至3小時)。在一些實施例中，藉由再懸浮所得EV集結粒(例如於PBS中)，且將經再懸浮之EV施加至蔗糖梯度(例如30%至60%非連續蔗糖梯度)，之後加以離心(例如在4℃下，以200,000× g，持續20小時)來進一步純化EV。收集EV帶，(例如用PBS)洗滌，且進行離心以集結EV (例如在4℃下，以150,000× g，持續3小時)。可在使用之前將經純化之EV儲存在例如-80℃下。在一些實施例中，藉由用DNA酶及/或蛋白酶K處理來進一步純化EV。

【0078】 舉例而言，在一些實施例中，可在4℃下以11,000× g離心本文所揭示之普雷沃菌之培養物持續20至40分鐘以集結細菌。可使培養上清液通過0.22 μm過濾器以排除掉完整細菌細胞。可隨後使用可包括(但不限於)硫酸銨沈澱、超速離心或過濾之方法濃縮過濾上清液。舉例而言，對於硫酸銨沈澱，可將1.5至3 M硫酸銨緩慢添加至過濾上清液，同時在4℃下進行攪拌。可在4℃下培育沈澱物8至48小時，且隨後在4℃下以11,000× g離心持續20至40分鐘。所得集結粒含有普雷沃菌細菌EV及其他碎片。使用超速離心，可在4℃下以100,000至200,000× g離心過濾上清液持續1至16小時。此離心之集結粒含有普雷沃菌細菌EV及其他碎片。在一些實施例中，使用過濾技術，諸如經由使用Amicon Ultra自旋過濾器或藉由切向流過濾，可過濾上清液以保留分子量>50或100 kDa之物種。

【0079】 替代性地，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之XCell ATF)，可在生長期間或在生長期間

之選定時間點，從普雷沃菌細菌培養物連續獲得EV。ATF系統會將完整細胞(>0.22 μm)留滯在生物反應器中，且使較小組分(例如EV、游離蛋白)通過過濾器以供收集。舉例而言，系統可經配置以使得<0.22 μm 過濾物隨後通過100 kDa之第二過濾器，使得收集到0.22 μm 與100 kDa之間的物種(諸如EV)，而小於100 kDa之物種則泵送回生物反應器中。可替代地，系統可經配置以使得在培養物生長期間生物反應器中之培養基得到補給及/或修飾。此方法所收集之EV可藉由如上文關於過濾上清液所述之超速離心或過濾得到進一步純化及/或濃縮。

【0080】 由本文中提供之方法獲得的EV可藉由基於尺寸之管柱層析法、藉由親和性層析法且藉由梯度超速離心，使用可包括(但不限於)使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法來進一步純化。簡言之，若使用硫酸銨沈澱或超速離心來濃縮過濾上清液，則使用蔗糖梯度法，將集結粒再懸浮於60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0中。若使用過濾來濃縮過濾上清液，則使用Amicon Ultra管柱將濃縮物緩衝液更換為60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0。將樣本施加至35%至60%非連續蔗糖梯度且在4°C下以200,000× g離心持續3至24小時。簡言之，若使用硫酸銨沈澱或超速離心來濃縮過濾上清液，則使用Optiprep梯度法，將集結粒再懸浮於於PBS中之35% Optiprep中。在一些實施例中，若使用過濾來濃縮過濾上清液，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35%至60%非連續蔗糖梯度且在4°C下以200,000× g離心持續3至24小時。

【0081】 在一些實施例中，為了證實EV製備物之無菌性及分離，將EV連續稀釋於用於常規培養所測試之細菌的洋菜培養基上，且使用常規條件進行培育。使非無菌製備物通過0.22 μm 過濾器以排除完整細胞。為

了進一步增加純度，經分離之EV可經DNA酶或蛋白酶K處理。

【0082】 在一些實施例中，對於用於活體內注射之EV之製備，如先前所述處理經純化之EV (Norheim等人 PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015))。簡言之，在蔗糖梯度離心之後，將含有EV之帶再懸浮於含有3%蔗糖之溶液或熟習此項技術者已知的適用於活體內注射之其他溶液中至最終濃度為50 µg/mL。此溶液亦可含有佐劑，例如濃度為0至0.5% (重量體積比)之氫氧化鋁。

【0083】 在某些實施例中，為了使樣本與進一步測試相容(例如，在TEM成像或活體外分析之前移除蔗糖)，使用過濾(例如，Amicon Ultra管柱)、透析或超速離心(200,000× g，≥3小時，4°C)及再懸浮將樣本緩衝液更換為PBS或30 mM Tris，pH 8.0。

【0084】 在一些實施例中，EV製備物之無菌性可藉由將EV之一部分塗鋪於用於EV之生成中所用之細菌的標準培養的洋菜培養基上且使用標準條件培育來確認。

【0085】 在一些實施例中，藉由層析及EV上之結合表面部分分離及富集所選EV。在其他實施例中，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習此項技術者已知的其他方法來分離及/或富集所選EV。

醫藥組合物

【0086】 在某些實施例中，本文所提供之方法為包含本文中提供之普雷沃菌EV及/或普雷沃菌的醫藥組合物(例如EV組合物)。在一些實施例中，EV組合物包含EV及/或本文所述之EV之組合及醫藥學上可接受之載劑。

【0087】 在一些實施例中，醫藥組合物包含實質上或完全不含細菌之普雷沃菌EV。在一些實施例中，醫藥組合物包含普雷沃菌EV及完整普雷沃菌(例如活細菌、經殺滅細菌、經減毒細菌)兩者。在某些實施例中，醫藥組合物包含實質上或完全不含EV之普雷沃菌。

【0088】 在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、

1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含至少1個普雷沃菌。

【0089】 在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、

1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含約1
 個普雷沃菌。

【0090】 在某些實施例中，醫藥組合物包含特定比率之普雷沃菌粒子與普雷沃菌EV粒子。普雷沃菌粒子之數目可基於實際粒子數或(若細菌為活的) CFU數目。粒子數可藉由將一定數量的純化普雷沃菌EV與一定數量的純化普雷沃菌組合、藉由調整培養普雷沃菌之生長條件或藉由修飾普雷沃菌本身以產生較多或較少普雷沃菌EV來確認。

【0091】 在一些實施例中，為了對細菌樣本中所存在的普雷沃菌EV及/或普雷沃菌之數目進行定量，可使用電子顯微法(例如超薄冷凍切片之EM)來目測囊泡及細菌且對其相對數目進行計數。可替代地，可使用奈米粒子追蹤分析(NTA)、庫爾特計數(Coulter counting)及動態光散射(DLS)或此等技術之組合的組合。NTA及庫爾特計數器對粒子進行計數且顯示其尺寸。DLS給出粒子之尺寸分佈但並未給出濃度。細菌直徑通常為1至2 μm 。全範圍為0.2至20 μm 。來自庫爾特計數及NTA之組合結果可顯示給定樣本中之細菌數。庫爾特計數顯示直徑為0.7至10 μm 的粒子數。NTA

顯示直徑為50至1400 nm的粒子數。對於大多數細菌樣本而言，單獨的庫爾特計數器可顯示樣本中之細菌數。EV直徑為20至250 nm。NTA將使得可對直徑為50至250 nm之粒子數進行計數。DLS顯示具有在1 nm至3 μm之大致範圍內的不同直徑的粒子之分佈。

【0092】 在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、

1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、
 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌EV粒子包含不
超過1個普雷沃菌。

【0093】 在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、
1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、
2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、
4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、
5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、
6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、
8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、
9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、
19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、
34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、
49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、
64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、
79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、
94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、
450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、
 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、

1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、
 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、
 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、
 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、
 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、
 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、
 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、
 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、
 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含至少1個普雷沃菌EV粒子。

【0094】 在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、

94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含約1個普雷沃菌EV粒子。在一些實施例中，醫藥組合物每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、

62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、
 77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、
 92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、
 350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、
 950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、
 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、
 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、
 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、
 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、
 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、
 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、
 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、
 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、
 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個普雷沃菌包含不超過1個
 普雷沃菌EV粒子。

【0095】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、
 38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、
 49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、
 60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、
 71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌EV。

【0096】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌。

【0097】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌EV。

【0098】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌。

【0099】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌EV。

【0100】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、

40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%粒子為普雷沃菌。

【0101】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌EV蛋白。

【0102】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、

71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌蛋白。

【0103】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌EV蛋白。

【0104】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌蛋白。

【0105】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌EV蛋白。

【0106】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%蛋白質為普雷沃菌蛋白。

【0107】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌EV脂質。

【0108】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌脂質。

【0109】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、

60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌EV脂質。

【0110】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌脂質。

【0111】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌EV脂質。

【0112】 在一些實施例中，約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%脂質為普雷沃菌脂質。

【0113】 在一些實施例中，自一或多種其他細菌組分純化醫藥組合物中之普雷沃菌EV。在一些實施例中，醫藥組合物進一步包含其他細菌組分。在一些實施例中，醫藥組合物包含細菌細胞。

【0114】 在某些態樣中，提供用於投與受試者之醫藥組合物。在一些實施例中，將醫藥組合物與額外活性及/或非活性物質合併以產生最終產物，其可呈單一劑量單位或多劑量形式。在一些實施例中，將醫藥組合物與佐劑，諸如免疫佐劑(例如STING促效劑、TLR促效劑、NOD促效劑)合併。

【0115】 在一些實施例中，組合物包含至少一種碳水化合物。「碳水化合物」係指糖或糖聚合物。術語「醣」、「多醣」、「碳水化合物」及「寡醣」可互換使用。大多數碳水化合物為具有多個羥基(分子之各碳原子上通常有一個)之醛或酮。碳水化合物一般具有分子式 $C_nH_{2n}O_n$ 。碳水化

合物可為單醣、雙醣、三醣、寡醣或多醣。大多數基礎碳水化合物為單醣，諸如葡萄糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖及果糖。雙醣為兩個經連接之單醣。例示性雙醣包括蔗糖、麥芽糖、纖維二糖及乳糖。通常，寡醣包括三個與六個之間的單醣單元(例如棉子糖、水蘇糖)，且多醣包括六個或多於六個單醣單元。例示性多醣包括澱粉、肝醣及纖維素。碳水化合物可含有經修飾之醣單元，諸如2'-去氧核糖，其中羟基經移除；2'-氟核糖，其中羟基用氟置換；或N-乙醯葡萄糖胺，一種葡萄糖之含氮形式(例如2'-氟核糖、去氧核糖及己醣)。碳水化合物可以多種不同形式存在，例如構象異構體、環狀形式、非環狀形式、立體異構體、互變異構體、端基異構體及異構體。

【0116】 在一些實施例中，組合物包含至少一種脂質。如本文所用，「脂質」包括脂肪、油、三酸甘油酯、膽固醇、磷脂、呈任何形式之脂肪酸(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)的。在一些實施例中，脂質包含選自以下之至少一種脂肪酸：月桂酸(12:0)、肉豆蔻酸(14:0)、棕櫚酸(16:0)、棕櫚油酸(16:1)、十七烷酸(17:0)、十七碳烯酸(17:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亞麻油酸(18:2)、次亞麻油酸(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)。在一些實施例中，組合物包含至少一種經修飾脂質，例如已藉由蒸煮來修飾之脂質。

【0117】 在一些實施例中，組合物包含至少一種補充礦物質或礦物

質源。礦物質之實例包括(但不限於)：氯、鈉、鈣、鐵、鉻、銅、碘、鋅、鎂、錳、鋁、磷、鉀及硒。前述礦物質中之任一者之適合形式包括可溶礦物鹽、微溶礦物鹽、不溶性礦物鹽、螯合礦物質、礦物質錯合物、非反應性礦物質(諸如羰基礦物質)及還原礦物質以及其組合。

【0118】 在一些實施例中，組合物包含至少一種補充維生素。該至少一種維生素可為脂溶性或水溶性維生素。適合維生素包括(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、維生素D、維生素B6、葉酸、吡哆醇、硫胺素、泛酸及生物素。前述中之任一者之適合形式為維生素之鹽、維生素之衍生物、具有維生素之相同或類似活性之化合物及維生素之代謝物。

【0119】 在一些實施例中，組合物包含賦形劑。適合賦形劑之非限制性實例包括緩衝劑、防腐劑、穩定劑、黏合劑、壓緊劑、潤滑劑、分散增強劑、崩解劑、調味劑、甜味劑及著色劑。

【0120】 在一些實施例中，賦形劑為緩衝劑。適合緩衝劑之非限制性實例包括檸檬酸鈉、碳酸鎂、碳酸氫鎂、碳酸鈣及碳酸氫鈣。

【0121】 在一些實施例中，賦形劑包含防腐劑。適合防腐劑之非限制性實例包括抗氧化劑，諸如 α -生育酚及抗壞血酸酯；及抗微生物劑，諸如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇及苯酚。

【0122】 在一些實施例中，組合物包含黏合劑作為賦形劑。適合黏合劑之非限制性實例包括澱粉、預膠凝澱粉、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、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、聚乙烯唑烷酮(polyvinylloxazolidone)、聚乙烯醇、C₁₂-C₁₈脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、醚、寡糖及其組合。

【0123】 在一些實施例中，組合物包含潤滑劑作為賦形劑。適合潤滑劑之非限制性實例包括硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋅、氫化植物油、sterotex、聚氧乙烯單硬脂酸酯、滑石、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。

【0124】 在一些實施例中，組合物包含分散增強劑作為賦形劑。適合分散劑之非限制性實例包括澱粉、褐藻酸、聚乙烯吡咯啉酮、瓜爾豆膠、高嶺土、膨潤土、純化木漿纖維素、羥基乙酸澱粉鈉、異非晶形矽酸鹽及微晶纖維素作為高HLB乳化劑界面活性劑。

【0125】 在一些實施例中，組合物包含崩解劑作為賦形劑。在一些實施例中，崩解劑為非發泡崩解劑。適合非發泡崩解劑之非限制性實例包括澱粉，諸如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、預膠凝及其經改性澱粉；甜味劑；黏土，諸如膨潤土；微晶纖維素；海藻酸鹽；羥基乙酸澱粉鈉；樹膠，諸如瓊脂、瓜爾豆膠、刺槐豆膠、加拉亞膠(karaya)、果膠及黃蓍膠。在一些實施例中，崩解劑為發泡崩解劑。適合發泡崩解劑之非限制性實例包括碳酸氫鈉與檸檬酸的組合及碳酸氫鈉與酒石酸的組合。

【0126】 在一些實施例中，組合物為食品(例如食物或飲料)，諸如：健康食物或飲料；嬰兒食物或飲料；妊娠期婦女、運動員、老年人或其他指定群體之食物或飲料；功能性食物、飲料；指定健康用途之食物或飲料；膳食補充品；患者用食物或飲料或動物飼料。食品及飲料之具體實例包括：各種飲料，諸如果汁、提神飲料、茶飲料、飲用製劑、果凍飲料及功能性飲料；酒精性飲料，諸如啤酒；含碳水化合物食物，諸如稻米食品、麵條、麵包及意大利麵；膏狀品，諸如魚腸、香腸、海產食品之膏狀品；殺菌袋裝品，諸如咖喱、用濃厚澱粉調味醬調味的食物及中式湯；

湯；乳製品，諸如牛奶、乳飲料、冰淇淋、乾酪及優格；發酵品，諸如發酵豆醬、優格、發酵飲料及醃菜；豆製品；各種糖果產品，包括餅乾、甜餅及其類似物、糖果、口香糖、膠質糖、冷甜點(包括果凍)、焦糖奶油及冷凍甜點；速食食品，諸如速食湯及速食大豆湯；微波食品；及類似物。此外，實例亦包括以粉末、顆粒、錠劑、膠囊、液體、膏體及果凍形式製備之健康食品及飲料。

【0127】 在一些實施例中，組合物為供動物，包括人類用之食品。除人類外，動物不受特別限制，且組合物可用於各種家畜、家禽、寵物、實驗動物及其類似者。動物之具體實例包括豬、牛、馬、綿羊、山羊、雞、野鴨、鴝鳥、家鴨、狗、貓、兔、倉鼠、小鼠、大鼠、猴及其類似者、但動物並不限於此。

治療劑

【0128】 在某些態樣中，本文所提供之方法包括投與受試者單獨或與額外治療劑組合的本文所述之醫藥組合物。在一些實施例中，額外治療劑為免疫抑制劑、類固醇、癌症治療劑。

【0129】 在一些實施例中，在投與治療劑之前(例如之前至少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小時或之前至少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)向受試者投與普雷沃菌EV。在一些實施例中，在投與治療劑之後(例如之後至少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小時或之後至少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)向受試者投與普雷沃菌EV。在一些實施例中，向受試者同時或幾乎同時(例如投與在彼此一小時內進行)投與普雷沃菌EV及治療劑。在一些實施例中，在向受試者投與普雷沃菌EV之前(例如之前至少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小時或之前至少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)向受試者投與抗生素。在一些實施例中，在向受試者投與普雷沃菌EV之後(例如之前至少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小時或之後至少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)向受試者投與抗生素。在一些實施例中，向受試者同時或幾乎同時(例如投與在彼此一小時內進行)投與普雷沃菌EV及抗生素。

【0130】 在一些實施例中，額外治療劑為癌症治療劑。在一些實施例中，癌症治療劑為化學治療劑。此類化學治療劑之實例包括(但不限於)烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；乙烯亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺、曲他胺(triethylenemelamine)、三仲乙基磷醯胺、三仲乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)；乙醯精寧(acetogenin) (尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓

朴替康(topotecan))；苔蘚抑素(bryostatin)；海洋抑素(callystatin)；CC-1065（包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)（包括合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1）；艾榴素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥，諸如氯芥苯丁酸(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、鹽酸氧二氯甲基二乙胺、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)及尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(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(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如，卡奇黴素(calicheamicin)，尤其卡奇黴素 γ II 及卡奇黴素 ω II)；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素 A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；埃斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌蛋白(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放射菌素(actinomycin)、奧納黴素(authrarnycin)、偶氮絲胺酸、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素D、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)（包括

嗎啉基-小紅莓、氰基嗎啉基-小紅莓、2-吡咯啉基-小紅莓及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycins)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalarubicin)、橄欖黴素(olivomycins)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(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，諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤(methotrexate)、蝶羅呤(pterapterin)、曲美沙特(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫米嘌呤(thiamiprine)及硫烏嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，諸如卡魯甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiothane)及甾內酯；抗腎上腺素，諸如胺格魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)及曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如亞葉酸；醋葡醛內酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝斯布西(bestabucil)；比生群(bisantrene)；依達曲沙(edatraxate)；地磷醯胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醌(diaziqune)；艾福米辛(elformithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；埃博黴素(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；

硝酸鎂；羥基脲；蘑菇多醣(lentinan)；氯尼達明(lonidainine)；類美登素，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；莫哌達醇(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK 多醣複合物；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；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、弗納庫林A (verracurin A)、桿孢菌素A (roridin A)及蛇形菌素(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露氮芥(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴衛矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；甲托辛(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；類紫杉醇，例如，太平洋紫杉醇及多西他賽(doxetaxel)；氯芥苯丁酸；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫代鳥嘌呤；巯基嘌呤；鉑配位錯合物，諸如順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春鹼；鉑；依託泊苷(etoposide) (VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼；長春瑞濱(vinorelbine)；諾凡特龍(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；柔紅黴素(daunomycin)；胺基嘌呤；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)；類視黃素，諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)及以上任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0131】 在一些實施例中，癌症治療劑為癌症免疫療法藥劑。免疫療法係指使用受試者免疫系統來治療癌症之治療，例如檢查點抑制劑、癌症疫苗、細胞介素、細胞療法、CAR-T細胞及樹突狀細胞療法。免疫療法之非限制性實例為檢查點抑制劑，包括納武單抗(Nivolumab) (BMS，抗PD-1)、派立珠單抗(Pembrolizumab) (Merck，抗PD-1)、伊匹單抗(Ipilimumab) (BMS，抗CTLA-4)、MEDI4736 (AstraZeneca，抗PD-L1) 及MPDL3280A (Roche，抗PD-L1)。其他免疫療法可為腫瘤疫苗，諸如Gardail、Cervarix、BCG、sipulencel-T、Gp100:209-217、AGS-003、DCVax-L、Algenpantucel-L、Tergenpantucel-L、TG4010、ProstAtak、Prostvac-V/R-TRICOM、Rindopepimul、乙酸E75肽、IMA901、POL-103A、Belagenpumatucel-L、GSK1572932A、MDX-1279、GV1001及Tecemotide。免疫療法可經由注射(例如靜脈內、瘤內、皮下或至淋巴結中)投與，但亦可口服、表面或經由氣霧劑投與。免疫療法可包含佐劑，諸如細胞介素。

【0132】 在一些實施例中，免疫療法藥劑為免疫檢查點抑制劑。免疫檢查點抑制廣義上係指抑制癌細胞可產生以預防或下調免疫反應的檢查點。免疫檢查點蛋白之實例包括(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與免疫檢查點蛋白結合且抑制免疫檢查點蛋白之抗體或其抗原結合片段。免疫檢查點抑制劑之實例包括(但不限於)：納武單抗、派立珠單抗、皮立珠單抗(pidilizumab)、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0020718C、AUR-012及STI-A1010。

【0133】 在一些實施例中，免疫療法藥劑為例如與癌症相關抗原結合之抗體或其抗原結合片段。癌症相關抗原之實例包括(但不限於)親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、

PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施例中，抗原為新抗原。

【0134】 在一些實施例中，免疫療法藥劑為癌症疫苗及/或癌症疫苗之組分(例如抗原肽及/或蛋白質)。癌症疫苗可為蛋白質疫苗、核酸疫苗或其組合。舉例而言，在一些實施例中，癌症疫苗包含含有癌症相關抗原之抗原決定基之多肽。在一些實施例中，癌症疫苗包含編碼癌症相關抗原之抗原決定基的核酸(例如DNA或RNA，諸如mRNA)。癌症相關抗原之實例包括(但不限於)親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-ras、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β R2、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施例中，抗原為新抗原。在一些實施例中，投與癌症疫苗與佐劑。佐劑之實例包括(但不限於)免疫調節蛋白、佐劑65、 α -半乳糖苷基神經醯胺(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、脂多醣、Lipovant、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之熱不穩定毒素(LT) (包括此等之衍生物(CTB、mmCT、CTA1-DD、LTB、LTK63、LTR72、dmLT))及海藻糖二黴菌酸酯。

【0135】 在一些實施例中，免疫療法藥劑為向受試者之免疫調節蛋白。在一些實施例中，免疫調節蛋白為細胞介素或趨化因子。免疫調節蛋白之實例包括(但不限於)：B淋巴細胞化學引誘劑(「BLC」)、C-C基元趨化因子11(「伊紅趨素-1」)、嗜伊紅血球趨化性蛋白2(「伊紅趨素-2」)、顆粒球群落刺激因子(「G-CSF」)、顆粒球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 」)、介白素-1 α (「IL-1 α 」)、介白素-1 β (「IL-1 β 」)、介白素1受體拮抗劑(「IL-1ra」)、介白素-2(「IL-2」)、介白素-4(「IL-4」)、介白素-5(「IL-5」)、介白素-6(「IL-6」)、介白素-6可溶性受體(「IL-6sR」)、介白素-7(「IL-7」)、介白素-8(「IL-8」)、介白素-10(「IL-10」)、介白素-11(「IL-11」)、介白素-12之 β 次單元(「IL-12 p40」或「IL-12 p70」)、介白素-13(「IL-13」)、介白素-15(「IL-15」)、介白素-16(「IL-16」)、介白素-17A-F(「IL-17A-F」)、介白素-18(「IL-18」)、介白素-21(「IL-21」)、介白素-22(「IL-22」)、介白素-23(「IL-23」)、介白素-33(「IL-33」)、趨化因子(C-C基元)配位體2(「MCP-1」)、巨噬細胞群落刺激因子(「M-CSF」)、由 γ 干擾素誘導之單核球激素(「MIG」)、趨化因子(C-C基元)配位體2(「MIP-1 α 」)、趨化因子(C-C基元)配位體4(「MIP-1 β 」)、巨噬細胞發炎蛋白-1- δ (「MIP-1 δ 」)、血小板衍生生長因子次單元B(「PDGF-BB」)、趨化因子(C-C基元)配位體5、調節活化

正常T細胞表現及分泌(「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 (「TNF α 」)、腫瘤壞死因子，淋巴毒素- β (「TNF β 」)、可溶性TNF受體1型(「sTNFRI」)、sTNFRIIAR、腦衍生神經營養因子(「BDNF」)、鹼性纖維母細胞生長因子(「bFGF」)、骨形態生成蛋白4(「BMP-4」)、骨形態生成蛋白5(「BMP-5」)、骨形態生成蛋白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」)、內分泌腺衍生血管內皮生長因子(「EG-VEGF」)、纖維母細胞生長因子4(「FGF-4」)、角質細胞生長因子(「FGF-7」)、生長分化因子15(「GDF-15」)、膠細胞衍生神經營養因子(「GDNF」)、生長激素、肝素結合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」)、神經營養蛋白-3(「NT-3」)、神經營養蛋白-4(「NT-4」)、破骨細胞生成抑制因子(「骨保護素」)、血小板衍生生長因子受體(「PDGF-AA」)、磷脂醯肌醇-聚糖生物合成(「PIGF」)、含有Skp、Cullin、F盒之複合體(「SCF」)、幹細胞因子受體(「SCFR」)、轉型生長因子 α (「TGF α 」)、轉型生長因子 β -1(「TGF β 1」)、轉型生長因子 β -3(「TGF β 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 (「Ax1」)、 β 細胞調節素 (「BTC」)、黏膜相關上皮趨化因子(「CCL28」)、趨化因子(C-C基元)配位體27 (「CTACK」)、趨化因子(C-X-C基元)配位體16 (「CXCL16」)、C-X-C基元趨化因子5 (「ENA-78」)、趨化因子(C-C基元)配位體26 (「伊紅趨素-3」)、顆粒球趨化蛋白2 (「GCP-2」)、GRO、趨化因子(C-C基元)配位體14 (「HCC-1」)、趨化因子(C-C基元)配位體16 (「HCC-4」)、介白素-9 (「IL-9」)、介白素-17F (「IL-17F」)、介白素-18-結合蛋白(「IL-18 BPa」)、介白素-28 A (「IL-28A」)、介白素29 (「IL-29」)、介白素31 (「IL-31」)、C-X-C基元趨化因子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基元)配位體(「淋巴細胞趨化因子」)、單核球化學引誘劑蛋白2 (「MCP-2」)、單核球化學引誘劑蛋白3 (「MCP-3」)、單核球化學引誘劑蛋白4 (「MCP-4」)、巨噬細胞衍生趨化因子(「MDC」)、巨噬細胞遷移抑制因子(「MIF」)、趨化因子(C-C基元)配位體20 (「MIP-3 α 」)、C-C基序趨化因子19 (「MIP-3 β 」)、趨化因子(C-C基元)配位體23 (「MPIF-1」)、巨噬細胞刺激蛋白 α 鏈(「MSP α 」)、核小體裝配蛋白1樣4 (「NAP-2」)、分泌型磷蛋白1 (「骨橋蛋白」)、肺及活化調節細胞介素 (「PARC」)、血小板因子4 (「PF4」)、基質細胞衍生因子-1 α (「SDF-1 α 」)、趨化因子(C-C基元)配位體17 (「TARC」)、胸腺表現趨化因子 (「TECK」)、胸腺基質淋巴生成素(「TSLP 4- IBB」)、CD 166抗原 (「ALCAM」)、分化叢集80 (「B7-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員17 (「BCMA」)、分化叢集14 (「CD14」)、分化叢集30 (「CD30」)、分化叢集40 (「CD40配位體」)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (膽糖蛋

白) (「CEACAM-1」)、死亡受體6 (「DR6」)、去氧胸苷激酶 (「Dtk」)、1型膜糖蛋白(「內皮因子」)、受體酪胺酸-蛋白激酶erbB-3 (「ErbB3」)、內皮細胞-白細胞黏附分子1 (「E-選擇蛋白」)、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 R β 、IL-17R、IL-2R γ 、IL-21R、溶酶體膜蛋白2 (「LIMPII」)、嗜中性白血球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」)、MHC I類多肽相關序列A (「MICA」)、MHC I類多肽相關序列B (「MICB」)、NRG1- β 1、 β 型血小板源生長因子受體 (「PDGF R β 」)、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」)、Trappin蛋白轉羧醯胺酸酶結合域(「Trappin-2」)、尿激酶受體(「uPAR」)、血管細胞黏附蛋白1 (「VCAM-1」)、XEDARActivin A、Agouti相關蛋白(「AgRP」)、核糖核酸酶5 (「血管生成素」)、血管生成素1、血管生長抑素、Catheprin S、CD40、隱性家族蛋白IB (「Cripto-1」)、DAN、Dickkopf相關蛋白1 (「DKK-1」)、E-鈣黏素、上皮細胞黏附分子(「EpCAM」)、Fas配體 (FasL或CD95L)、Fc γ RIIB/C、FoUistatin、半乳糖凝集素-7、細胞間黏附分子2 (「ICAM-2」)、IL-13 R1、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因子抑制劑-1 (「PAI-1」)、血小板衍生生長因子受體(「PDGF-AB」)、抵抗素、基質細胞衍生因子1 (「SDF-1 β 」)、sgp130、分泌性捲

曲相關蛋白2 (「ShhN」)、唾液酸結合免疫球蛋白型凝集素(「Siglec-5」)、ST2、轉型生長因子- β 2 (「TGF β 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」)、骨髓細胞上表現之觸發受體1 (「TREM-1」)、血管內皮生長因子C (「VEGF-C」)、VEGFR1A脂聯素、脂肪酶(「AND」)、 α -胎蛋白(「AFP」)、血管生成素樣4 (「ANGPTL4」)、 β -2-微球蛋白(「B2M」)、基細胞黏附分子(「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」)、人類表皮生長因子受體2 (「ErbB2」)、卵泡抑素、促卵泡激素(「FSH」)、趨化因子(C-X-C基元)配位體1 (「GRO α 」)、人絨毛膜促性腺激素(「 β HCG」)、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、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(「Nidogen-1」)、神經元特異性烯醇酶(「NSE」)、抑瘤素M (「OSM」)、降鈣素原、催乳素、前列腺特異性抗原(「PSA」)、唾液酸結合Ig樣凝集素9 (「Siglec-9」)、ADAM 17內肽酶(「TACE」)、甲狀球蛋白、金屬蛋白酶抑制劑4 (「TIMP-4」)、TSH2B4、解整合素及含金屬蛋白酶域之蛋白9 (「ADAM-9」)、血管生成素2、腫瘤壞死因子配位體超家族成員13/酸性富白胺酸細胞核磷蛋白32家族成員B (「APRIL」)、骨形態生成蛋白2 (「BMP-2」)、骨形態生成蛋白9 (「BMP-9」)、互補組分5a (「C5a」)、組織蛋白酶L、CD200、

CD97、趨化素、腫瘤壞死因子受體超家族成員6B (「DcR3」)、脂肪酸結合蛋白2 (「FABP2」)、纖維母細胞活化蛋白 α (「FAP」)、纖維母細胞生長因子19 (「FGF-19」)、半乳糖凝集素-3、肝細胞生長因子受體 (「HGF R」)、IFN- γ α/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」)、介白素-1受體6 (「IL-1R6」)、介白素24 (「IL-24」)、介白素33 (「IL-33」)、激肽釋放素14、天冬醯胺醯基內肽酶 (「豆莢蛋白」)、經氧化低密度脂蛋白受體1 (「LOX-1」)、甘露糖結合凝集素 (「MBL」)、腦啡肽酶 (「NEP」)、易位相關(果蠅)之Notch同源物1 (「Notch-1」)、腎母細胞瘤過度表現 (「NOV」)、骨活素、計劃性細胞死亡蛋白1 (「PD-1」)、N-乙醯胞壁醯-L-丙胺酸醯胺酶 (「PGRP-5」)、絲胺酸蛋白酶抑因子A4、分泌性捲曲相關蛋白3 (「sFRP-3」)、凝血調節蛋白、鐸樣受體2 (「TLR2」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員10A (「TRAIL R1」)、轉鐵蛋白 (「TRF」)、WIF-1ACE-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基元)配體14 (「CXCL14」)、胱抑素C、核心蛋白聚糖 (「DCN」)、Dickkopf相關蛋白3 (「Dkk-3」)、 δ 樣蛋白1 (「DLL1」)、胎球蛋白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」)、顆粒球群落刺激因子受體 (「GCSF R」)、絲胺酸蛋白酶第二型穿膜絲胺酸蛋白酶 (「HAI-2」)、介白素-17B受體 (「IL-17B R」)、介白素27 (「IL-27」)、淋巴球活化基因3 (「LAG-3」)、脂蛋白元A-V (「LDL R」)、胃蛋白酶原I、視黃醇結合

蛋白4 (「RBP4」)、SOST、硫酸乙醯肝素蛋白聚糖(「多配體蛋白聚糖-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員13B (「TACI」)、組織因子路徑抑制劑(「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、尿激酶纖維蛋白溶酶原活化物(「uPA」)、鈣黏素5、2型或VE鈣黏素(血管內皮)(亦稱為CD144 (「VE-鈣黏素」))、WNT1誘導性信號傳導路徑蛋白1 (「WISP-1」)及核因子κB之受體活化物(「RANK」)。

【0136】 在一些實施例中，癌症治療劑為抗癌化合物。例示性抗癌化合物包括(但不限於)：阿侖單抗(Alemtuzumab) (Campath®)、亞利崔托寧(Alitretinoin) (Panretin®)、阿那曲唑(Anastrozole) (Arimidex®)、貝伐單抗(Bevacizumab) (Avastin®)、貝瑟羅汀(Bexarotene) (Targretin®)、硼替佐米(Bortezomib) (Velcade®)、伯舒替尼(Bosutinib) (Bosulif®)、貝倫妥單抗維多汀(Brentuximab vedotin) (Adcetris®)、卡博替尼(Cabozantinib) (Cometriq™)、卡非佐米(Carfilzomib) (Kyprolis™)、西妥昔單抗(Cetuximab) (Erbix®)、克唑替尼(Crizotinib) (Xalkori®)、達沙替尼(Dasatinib) (Sprycel®)、地尼介白素迪夫托斯(Denileukin diftitox) (Ontak®)、鹽酸埃羅替尼(Erlotinib hydrochloride) (Tarceva®)、依維莫司(Everolimus) (Afinitor®)、依西美坦(Exemestane) (Aromasin®)、氟維司群(Fulvestrant) (Faslodex®)、吉非替尼(Gefitinib) (Iressa®)、替坦替伊莫單抗(Ibritumomab tiuxetan) (Zevalin®)、甲磺酸伊馬替尼(Imatinib mesylate) (Gleevec®)、伊匹單抗(Yervoy™)、二甲苯磺酸拉帕替尼(Lapatinib ditosylate) (Tykerb®)、來曲唑(Letrozole) (Femara®)、尼羅替尼(Nilotinib) (Tasigna®)、奧伐木單

抗(Ofatumumab) (Arzerra®)、帕尼單抗(Panitumumab) (Vectibix®)、鹽酸帕唑帕尼(Pazopanib hydrochloride) (Votrient®)、帕妥珠單抗(Pertuzumab) (Perjeta™)、普拉曲沙(Pralatrexate) (Folotyn®)、瑞戈非尼(Regorafenib) (Stivarga®)、利妥昔單抗(Rituximab) (Rituxan®)、羅米地辛(Romidepsin) (Istodax®)、甲苯磺酸索拉非尼(Sorafenib tosylate) (Nexavar®)、蘋果酸舒尼替尼(Sunitinib malate) (Sutent®)、他莫昔芬(Tamoxifen)、替西羅莫司(Temsirolimus) (Torisel®)、托瑞米芬(Toremifene) (Fareston®)、托西莫單抗(Tositumomab)及¹³¹I-托西莫單抗(Bexxar®)、曲妥珠單抗(Trastuzumab) (Herceptin®)、維甲酸(Tretinoin) (Vesanoid®)、凡德他尼(Vandetanib) (Caprelsa®)、維羅非尼(Vemurafenib) (Zelboraf®)、伏立諾他(Vorinostat) (Zolinza®)及Ziv-阿柏西普(Ziv-aflibercept) (Zaltrap®)。

【0137】 調整調節基因表現之蛋白質之功能及其他細胞功能的例示性抗癌化合物(例如HDAC抑制劑、類視黃素受體配位體)為伏立諾他(Zolinza®)、貝瑟羅汀(Targretin®)及羅米地辛(Istodax®)、亞利崔托寧(Panretin®)及維甲酸(Vesanoid®)。

【0138】 誘導細胞凋亡之例示性抗癌化合物(例如蛋白酶體抑制劑、抗葉酸劑)為硼替佐米(Velcade®)、卡非佐米(Kyprolis™)及普拉曲沙(Folotyn®)。

【0139】 增加抗腫瘤免疫反應之例示性抗癌化合物(例如抗CD20、抗CD52；抗細胞毒性T淋巴球相關抗原-4)為利妥昔單抗(Rituxan®)、阿倫單抗(Campath®)、奧伐木單抗(Arzerra®)及伊匹單抗(Yervoy™)。

【0140】 將毒性劑遞送至癌細胞之例示性抗癌化合物(例如抗CD20

放射性核種融合物；IL-2白喉毒素融合物；抗CD30單甲基阿瑞他汀E (MMAE)融合物)為托西莫單抗及¹³¹I-托西莫單抗(Bexxar®)及替伊莫單抗(Zevalin®)、地尼介白素迪夫托斯(Ontak®)及貝倫妥單抗維多汀(Adcetris®)。

【0141】 其他例示性抗癌化合物為小分子抑制劑及其結合物，例如兩面激酶(Janus kinase)、ALK、Bcl-2、PARP、PI3K、VEGF受體、Braf、MEK、CDK及HSP90。

【0142】 例示性鉑基抗癌化合物包括例如順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、賽特鉑、吡鉑、奈達鉑、特瑞鉑及利普鉑。適用於治療之其他金屬基藥物包括(但不限於)釷基化合物、二茂鐵衍生物、鈦基化合物及鎵基化合物。

【0143】 在一些實施例中，癌症治療為包含放射性核種之放射性部分。例示性放射性核種包括(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。

【0144】 在一些實施例中，癌症治療為抗生素。舉例而言，若根據本文所提供之方法偵測到癌症相關細菌之存在及/或癌症相關微生物群落分佈，則可投與抗生素以自受試者消除癌症相關細菌。「抗生素」廣義上

係指能夠抑制或預防細菌性感染之化合物。抗生素可以多種方式分類，包括其針對特異性感染之用途、其作用機制、其生物可用性或其靶微生物譜(例如革蘭氏陰性細菌對革蘭氏陽性細菌、好氧性細菌對厭氧性細菌等)，且此等抗生素可用於在宿主之特定區域(「生態棲位」)中殺滅特定細菌(Leekha等人 2011. *General Principles of Antimicrobial Therapy*. Mayo Clin Proc. 86(2): 156-167)。在某些實施例中，抗生素可用於選擇性地靶向特定生態棲位之細菌。在一些實施例中，已知治療特定感染(包括癌症生態棲位)之抗生素可用於靶向癌症相關微生物，包括該生態棲位之癌症相關細菌。在其他實施例中，在細菌治療之後，投與抗生素。在一些實施例中，在細菌治療之後，投與抗生素以移除移植。

【0145】 在一些態樣中，可基於抗生素之殺菌或抑菌特性來選擇抗生素。殺菌抗生素包括破壞細胞壁(例如 β -內醯胺)、細胞膜(例如達托黴素(daptomycin))或細菌DNA(例如氟喹諾酮(fluoroquinolone))之作用機制。抑菌藥劑抑制細菌複製，且包括磺醯胺、四環素及巨環內酯，且藉由抑制蛋白質合成而起作用。此外，儘管一些藥物在某些生物體中可為殺菌的而在其他生物體中為抑菌的，但應知曉，靶生物體允許熟習此項技術者選擇具有適當特性之抗生素。在某些治療條件下，抑菌抗生素抑制殺菌抗生素之活性。因此，在某些實施例中，不將殺菌及抑菌抗生素組合。

【0146】 抗生素包括(但不限於)：胺基糖苷、安莎黴素(ansamycin)、碳頭孢烯、碳青黴烯、頭孢菌素、醣肽、林可醯胺類、脂肽、巨環內酯、單環 β -內醯胺類、硝基呋喃、唑烷酮、青黴素、多肽抗生素、喹諾酮、氟喹諾酮、磺醯胺、四環素及抗分枝桿菌化合物及其組合。

【0147】 胺基糖苷包括(但不限於)：阿米卡星(Amikacin)、慶大黴

素 (Gentamicin) 、 卡 那 黴 素 (Kanamycin) 、 新 黴 素 、 奈 替 黴 素 (Netilmicin) 、 托 普 黴 素 (Tobramycin) 、 巴 龍 黴 素 (Paromomycin) 及 觀 黴 素 (Spectinomycin) 。 胺 基 糖 苷 對 於 例 如 革 蘭 氏 陰 性 細 菌 ， 諸 如 大 腸 桿 菌 、 克 雷 伯 氏 菌 (Klebsiella) 、 綠 膿 桿 菌 (Pseudomonas aeruginosa) 及 土 拉 文 氏 桿 菌 (Francisella tularensis) 為 有 效 的 ； 且 對 於 某 些 好 氧 性 細 菌 有 效 但 對 於 專 性 / 兼 性 厭 氧 菌 不 太 有 效 。 咸 信 胺 基 糖 苷 與 細 菌 30S 或 50S 核 糖 體 次 單 元 結 合 ， 從 而 抑 制 細 菌 蛋 白 合 成 。

【0148】 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 絲 菌 素 (Streptovaricin) 。 咸 信 格 爾 德 黴 素 及 除 莠 黴 素 會 抑 制 或 改 變 熱 休 克 蛋 白 90 之 功 能 。

【0149】 碳 頭 孢 烯 包 括 (但 不 限 於) 氯 碳 頭 孢 。 咸 信 碳 頭 孢 烯 會 抑 制 細 菌 細 胞 壁 合 成 。

【0150】 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 汀 (Cilastatin) 及 美 羅 培 南 (Meropenem) 。 碳 青 黴 烯 作 為 廣 效 抗 生 素 對 於 革 蘭 氏 陽 性 細 菌 及 革 蘭 氏 陰 性 細 菌 兩 者 均 具 有 殺 菌 性 。 咸 信 碳 青 黴 烯 會 抑 制 細 菌 細 胞 壁 合 成 。

【0151】 頭 孢 菌 素 包 括 (但 不 限 於) ： 頭 孢 羥 胺 苄 (Cefadroxil) 、 頭 孢 唑 林 (Cefazolin) 、 頭 孢 噻 吩 (Cefalotin) 、 先 鋒 黴 素 (Cefalothin) 、 頭 孢 胺 苄 (Cefalexin) 、 頭 孢 克 洛 (Cefaclor) 、 頭 孢 孟 多 (Cefamandole) 、 頭 孢 西 丁 (Cefoxitin) 、 頭 孢 羅 齊 (Cefprozil) 、 頭 孢 呋 辛 (Cefuroxime) 、 頭 孢 克 肱 (Cefixime) 、 頭 孢 地 尼 (Cefdinir) 、 頭 孢 托 侖 (Cefditoren) 、 頭 孢 哌 酮 (Cefoperazone) 、 頭 孢 噻 肱 (Cefotaxime) 、 頭 孢 泊 肱 (Cefpodoxime) 、 頭 孢

他啉(Ceftazidime)、頭孢布坦(Ceftibuten)、頭孢唑肟(Ceftizoxime)、頭孢曲松(Ceftriaxone)、頭孢吡肟(Cefepime)、頭孢洛林酯(Ceftaroline fosamil)及頭孢吡普(Ceftobiprole)。所選頭孢菌素例如對於革蘭氏陰性細菌及對於革蘭氏陽性細菌(包括假單胞菌(*Pseudomonas*))有效，某些頭孢菌素對於抗甲氧西林金黃色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)有效。咸信頭孢菌素藉由干擾細菌細胞壁之肽聚糖層之合成而抑制細菌細胞壁合成。

【0152】 醣肽包括(但不限於)替考拉寧(Teicoplanin)、萬古黴素(Vancomycin)及特拉萬星(Telavancin)。醣肽例如對於好氧性及厭氧性革蘭氏陽性細菌(包括MRSA及艱難梭菌(*Clostridium difficile*))有效。咸信醣肽藉由干擾細菌細胞壁之肽聚糖層之合成而抑制細菌細胞壁合成。

【0153】 林可醯胺類包括(但不限於)克林達黴素(Clindamycin)及林可黴素(Lincomycin)。林可醯胺類例如對於厭氧性細菌以及葡萄球菌及鏈球菌有效。咸信林可醯胺類與細菌50S核糖體次單元結合，從而抑制細菌蛋白合成。

【0154】 脂肽包括(但不限於)達托黴素(Daptomycin)。脂肽例如對於革蘭氏陽性細菌有效。咸信脂肽與細菌膜結合，且引起快速去極化。

【0155】 大環內酯包括(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)。大環內酯例如對於鏈球菌及黴漿菌有效。咸信大環內酯與細菌或50S核糖體次單元結合，從而抑制細菌蛋白合成。

【0156】 單環 β -內醯胺類包括(但不限於)安曲南(Aztreonam)。單環 β -內醯胺類例如對於革蘭氏陰性細菌有效。咸信單環 β -內醯胺類藉由干擾細菌細胞壁之肽聚糖層之合成而抑制細菌細胞壁合成。

【0157】 硝基呋喃包括(但不限於)呋喃唑酮(Furazolidone)及呋喃妥因(Nitrofurantoin)。

【0158】 唑烷酮包括(但不限於)利奈唑胺(Linezolid)、泊斯唑胺(Posizolid)、雷德唑胺(Radezolid)及特地佐利(Torezolid)。咸信唑烷酮為蛋白質合成抑制劑。

【0159】 青黴素包括(但不限於)：阿莫西林(Amoxicillin)、安比西林(Ampicillin)、阿洛西林(Azlocillin)、卡本西林(Carbenicillin)、氯唑西林(Cloxacillin)、雙氯西林(Dicloxacillin)、氟氯西林(Flucloxacillin)、美洛西林(Mezlocillin)、二甲氧苯青黴素(Methicillin)、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)及替卡西林(Ticarcillin)。青黴素例如對於革蘭氏陽性細菌、兼性厭氧菌(例如鏈球菌、疏螺旋體屬(*Borrelia*)及密螺旋體屬(*Treponema*))有效。咸信青黴素藉由干擾細菌細胞壁之肽聚糖層之合成而抑制細菌細胞壁合成。

【0160】 青黴素組合包括(但不限於)：阿莫西林/棒酸鹽、安比西林/舒巴坦(sulbactam)、哌拉西林/他唑巴坦(tazobactam)及替卡西林/棒酸鹽。

【0161】 多肽抗生素包括(但不限於)：桿菌肽(Bacitracin)、可利斯汀(Colistin)及多黏菌素(Polymyxin) B及E。多肽抗生素例如對於革蘭氏陰性細菌有效。咸信某些多肽抗生素抑制涉及細菌細胞壁之肽聚糖層之合

成的焦磷酸異戊二烯酯，而其他多肽抗生素藉由位移細菌相對離子而使細菌外膜不穩定。

【0162】喹諾酮及氟喹諾酮包括(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)。喹諾酮/氟喹諾酮例如對於鏈球菌及奈瑟氏菌(Neisseria)有效。氟喹諾酮/氟喹諾酮抑制細菌DNA旋轉酶或拓撲異構酶IV，從而抑制DNA複製及轉錄。

【0163】磺胺包括(但不限於)：磺胺米隆(Mafenide)、磺胺醋醯胺(Sulfacetamide)、磺胺嘧啶、磺胺嘧啶銀、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲二唑、磺胺甲基異噁唑、胺苯磺胺、柳氮磺胺吡啶、磺胺異噁唑、甲氧苄啶-磺胺甲基異噁唑(增效磺胺甲基異噁唑)及磺胺基柯衣定(Sulfonamidochrysoidine)。氟磺胺藉由競爭性抑制二氫葉酸合成酶而抑制葉酸合成，從而抑制核酸合成。

【0164】四環素包括(但不限於)：地美環素(Demeclocycline)、多西環素(Doxycycline)、二甲胺四環素(Minocycline)、土黴素(Oxytetracycline)及四環素。四環素例如對於革蘭氏陰性細菌有效。氟四環素與細菌30S核糖體次單元結合，從而抑制細菌蛋白合成。

【0165】抗分枝桿菌化合物包括(但不限於)：氯法齊明(Clofazimine)、胺苯砒(Dapsone)、卷黴黴素(Capreomycin)、環絲胺酸、

乙胺丁醇、乙硫異菸胺、異菸肼、吡嗪醯胺、立復黴素(Rifampicin)、利福布汀(Rifabutin)、利福噴丁(Rifapentine)及鏈黴素。

【0166】適合抗生素亦包括：阿斯凡納明(arsphenamine)、氯黴素(chloramphenicol)、磷黴素(fosfomicin)、梭鏈孢酸(fusidic acid)、甲硝噻唑(metronidazole)、莫匹羅星(mupirocin)、平板黴素(platensimycin)、奎奴普丁(quinupristin)/達福普汀(dalfopristin)、泰格環黴素(tigecycline)、磺甲硝咪唑(tinidazole)、甲氧苄啶阿莫西林(trimethoprim amoxicillin)/棒酸鹽、安比西林/舒巴坦、安福黴素(amphotericin)、瑞斯特黴素(ristocetin)、阿奇黴素(azithromycin)、桿菌肽、蟾蜍素II、嘉寶黴素(carbomycin)、殺菌肽PI、克拉黴素(clarithromycin)、紅黴素、呋喃唑酮、梭鏈孢酸、褐酶酸鈉(Na fusidate)、短桿菌素(gramicidin)、亞胺培南(imipenem)、肽抗生素、交沙黴素(josamycin)、馬加寧(magainin) II、甲硝噻唑、硝基咪唑、蜜柑黴素(mikamycin)、誘變素B-Ny266、誘變素B-JH1 140、誘變素J-T8、乳酸鏈球菌素、乳酸鏈球菌素A、新生黴素、竹桃黴素、牡蠣菌素、哌拉西林/他唑巴坦、普那黴素(pristinamycin)、雷莫拉寧(ramoplanin)、蘭那雷辛(ranalexin)、無蛋白菌質(reuterin)、利福昔明(rifaximin)、薔薇黴素(rosamicin)、羅沙米星(rosaramicin)、觀黴素、螺旋黴素、抗金葡黴素(staphylomycin)、鏈黴殺陽素(streptogramin)、鏈黴殺陽素A、協同素(synergistin)、滔羅定(taurolidine)、替考拉寧(teicoplanin)、泰利黴素(telithromycin)、替卡西林/克拉維酸(clavulanic acid)、三乙醯竹桃黴素(triacetyloleandomycin)、泰黴素(tylosin)、短桿菌酪肽(tyrocidin)、短桿菌素(tyrothricin)、萬古黴素、維莫黴素(vemamycin)及維吉黴素

(virginiamycin)。

【0167】 在一些實施例中，額外治療劑為免疫抑制劑、DMARD、疼痛控制藥物、類固醇、非類固醇消炎藥(NSAID)或細胞介素拮抗劑及其組合。代表性劑包括(但不限於)：環孢素、類視黃素、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、盧米羅可(lumiracoxib)、布洛芬、水楊酸膽鹼鎂、非諾洛芬(fenoprofen)、雙水楊酸酯、二氟尼柳(difunisal)、托美丁(tolmetin)、酮洛芬(ketoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、奧沙普嗪(oxaprozin)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸、依託度酸(etodolac)、酮咯酸、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、伐地昔布(valdecoxib)、依他昔布(etoricoxib)、MK0966；羅非昔布(rofecoxib)、乙醯胺苯酚、塞內昔布(Celecoxib)、雙氯芬酸、曲馬多(tramadol)、吡羅昔康(piroxicam)、美洛昔康(meloxicam)、替諾昔康(tenoxicam)、屈噁昔康(droxicam)、氯諾昔康(lornoxicam)、伊索昔康(isoxicam)、甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、托芬那酸、伐地昔布(valdecoxib)、帕瑞昔布(parecoxib)、依託度酸、吲哚美辛、阿司匹林、布洛芬、非羅昔布(firocoxib)、甲胺喋呤(MTX)、抗瘧疾藥物(例如羥基氯奎及氯奎)、柳氮磺胺吡啶、來氟米特(Leflunomide)、硫唑嘌呤、環孢素、金鹽、二甲胺四環素、環磷醯胺、D-青黴胺、二甲胺四環素、金諾芬(auranofin)、他克莫司(tacrolimus)、硫代苯酸金鈉(myocrisin)、氯芥苯丁酸、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®)、英利昔單抗(Remicade®；TA-650)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(Cimzia®；CDP870)、戈利木單抗(Simpom®；CNT0148)、阿那白滯素

(ANAKINRA) (Kineret®)、利妥昔單抗(Rituxan®; MabThera®)、阿巴西普 (ABATACEPT) (Orencia®)、托西利單抗 (TOCILIZUMAB) (RoActemra/Actemra®)、整合素拮抗劑(TYSABRI® (那他珠單抗(natalizumab)))、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(Atacicept)、Benlysta®/LymphoStat-B® (貝利單抗(belimumab)))、p38抑制劑、CD20拮抗劑(奧克珠單抗(奧克珠單抗)、奧伐木單抗(Ofatumumab) (Arzerra®))、干擾素 γ 拮抗劑(芳妥珠單抗(Fontolizumab))、潑尼龍、強的松、地塞米松、皮質醇、皮質酮、氫皮質酮、甲基潑尼龍、倍他米松(betamethasone)、曲安西龍(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasone)、氟氫可的松(fludrocortisone)、去氧皮質固酮、醛固酮、多西環素、萬古黴素、吡格列酮(pioglitazone)、SBI-087、SCIO-469、Cura-100、Oncoxin+Viusid、TwHF、甲氧沙林、維生素D-麥角鈣化醇、米那普侖(Milnacipran)、太平洋紫杉醇、羅格他酮(rosiglitazone)、他克莫司(Tacrolimus) (Prograf®)、RADO01、雷帕鳴(rapamune)、雷帕黴素(rapamycin)、福他替尼(fostamatinib)、芬太尼(Fentanyl)、XOMA 052、福他替尼二鈉、羅格列酮(rosiglitazone)、薑黃素(Longvida™)、羅素他汀(Rosuvastatin)、馬拉維若(Maraviroc)、雷米普利(ramipril)、米那普侖、考比前列酮(Cobiprostone)、索馬托品(somatropin)、tgAAC94基因療法載體、MK0359、GW856553、埃索美拉唑(esomeprazole)、依維莫司(everolimus)、曲妥珠單抗、JAK1及JAK2抑制劑、泛JAK抑制劑，例如四環吡啶酮6 (P6)、325、PF-956980、德諾單抗(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(例如受體誘餌、拮抗性抗體等)。

【0168】 在一些實施例中，該藥劑為免疫抑制劑。免疫抑制劑之實例包括(但不限於)：皮質類固醇、美沙拉嗪(mesalazine)、美塞拉明(mesalamine)、柳氮磺胺吡啶、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、潑尼松、甲胺喋呤、抗組織胺、糖皮質激素、腎上腺素、茶鹼、色甘酸鈉、抗白三烯、用於鼻炎之抗膽鹼激導性藥物、TLR拮抗劑、炎性體抑制劑、抗膽鹼激導性解充血劑、肥大細胞穩定劑、單株抗IgE抗體、疫苗(例如用於其中過敏原之量逐漸增加的疫苗接種的疫苗)、細胞介素抑制劑(諸如抗IL-6抗體)、TNF抑制劑(諸如英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol)、戈利木單抗(golimumab)或依那西普(etanercept))及其組合。

投藥

【0169】 在某些態樣中，本文提供一種向受試者遞送本文所述之醫藥組合物的方法。在本文所提供之方法之一些實施例中，結合投與額外治療劑來投與醫藥組合物。在一些實施例中，醫藥組合物包含與額外治療劑共調配之普雷沃菌EV及/或普雷沃菌。在一些實施例中，醫藥組合物與額外治療劑共投與。在一些實施例中，在投與醫藥組合物之前向受試者投與額外治療劑(例如之前約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小時或之前約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)。在一些實施例中，在投與醫藥組合物之後向受試者投與額外治療劑(例如之後約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小時或之後約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天)。在一些實施例中，使用相同遞送方式來遞送醫藥組合物與額外治療劑兩者。在一些實施例中，使用不同遞送方式來投與醫藥組合物與額外治療劑兩者。舉例而言，在一些實施例中，口服投與醫藥組合物，而經由注射(例如靜脈內、肌肉內及/或瘤內注射)投與額外治療劑。

【0170】 在某些實施例中，可結合任何其他習知抗癌治療，諸如放射療法及手術切除腫瘤，來投與本文所述之醫藥組合物、劑型及套組。此等治療可視需要及/或如所指示施加，且可在投與本文所述之醫藥組合物、劑型及套組之前、同時或之後進行。

【0171】 給藥方案可為各種方法及量中之任一者，且可藉由熟習此項技術者根據已知臨床因素來測定。如醫學技術中所知，任一患者之劑量可視多種因素而定，其包括受試者之物種、身材、身體表面積、年齡、性別、免疫能力及一般健康、待投與之特定微生物、投與持續時間及途徑、疾病之種類及階段(例如腫瘤大小)，及諸如同時投與之藥物的其他化合物。除以上因素以外，此類水準可受微生物之感染性及微生物之性質影響，該等感染性及性質如可由熟習此項技術者來測定。在本發明方法中，微生物之適當最小劑量水準可為微生物足以存活、生長及複製的水準。本

文所述之醫藥組合物之劑量可根據劑型、投藥途徑、靶向疾病之程度或階段及其類似者來適當設定或調整。舉例而言，藥劑之一般有效劑量可介於每天每公斤體重0.01 mg與每天每公斤體重1000 mg之間、每天每公斤體重0.1 mg與每天每公斤體重1000 mg之間、每天每公斤體重0.5 mg與每天每公斤體重500 mg之間、每天每公斤體重1 mg與每天每公斤體重100 mg之間，或每天每公斤體重5 mg與每天每公斤體重50 mg之間。有效劑量可為每天每公斤體重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或大於1000 mg，但劑量不限於此。

【0172】 在一些實施例中，向受試者投與之劑量足以預防疾病(例如自體免疫疾病、發炎疾病、代謝疾病、癌症)、延遲其發作、或減緩或終止其進展。熟習此項技術者應認識到，劑量將視各種因素而定，包括所採用之特定化合物之強度，以及受試者之年齡、物種、病狀及體重。劑量之大小亦將藉由以下來測定：投與之途徑、時序及頻率，以及可伴隨特定化合物之投藥之任何不良副作用的存在、性質及程度，以及所需生理學作用。

【0173】 適合劑量及給藥方案可藉由一般熟習此項技術者已知的習知範圍探求技術判定。一般而言，治療係以小於化合物之最佳劑量之較小劑量開始。其後，劑量以小增量增加，直至達至在該等情況下之最佳效應。有效劑量及治療方案可藉由常規及習知手段判定，開始例如在實驗動物中使用低劑量，且隨後增加劑量，同時監測效應，且同樣系統地改變給藥方案。常用動物研究以測定每公斤重量的生物活性劑之最大耐受劑量(MTD)。熟習此項技術者通常推知其他物種(包括人類)中之功效劑量，同

時避免毒性。

【0174】 根據上文，在治療性應用中，根據本發明使用之活性劑的劑量視以下而變化：活性劑；接受者患者的年齡、體重及臨床病狀；及投與療法的臨床醫生或醫師的經驗及判斷；以及影響所選劑量之其他因素。一般而言，劑量應足以引起減緩腫瘤之生長，且較佳地使腫瘤消退，且最佳地引起癌症完全消退。

【0175】 獨立投與可包括任何數目之兩次或多於兩次投與，包括兩次、三次、四次、五次或六次投與。熟習此項技術者可根據此項技術中已知的用於監測治療方法之方法及本文所提供之其他監測方法，容易地測定進行投與的次數或進行一或多次額外投與的客觀需要。因此，本文所提供之方法包括向受試者提供一或多次醫藥組合物投與之方法，其中投與次數可藉由監測受試者來測定且基於監測結果，判定是否提供一或多次額外投與。關於是否提供一或多次額外投與之決定可基於多種監測結果。

【0176】 各投與之間的時段可為各種時段中之任一者。各投與之間的時段可取決於各種因素中之任一者，包括如關於投與次數中所述之監測步驟、受試者建立免疫反應之時段及/或受試者自正常組織清除EV之時段。在一個實例中，時段可取決於受試者建立免疫反應之時段；舉例而言，時段可超過受試者建立免疫反應之時段，諸如超過約一週、超過約十天、超過約兩週或超過約一個月；在另一實例中，時段可少於受試者建立免疫反應之時段，諸如少於約一週、少於約十天、少於約兩週或少於約一個月。在另一實例中，時段可取決於受試者自正常組織清除EV之時段；舉例而言，時段可超過受試者自正常組織清除EV之時段，諸如超過約一天、超過約兩天、超過約三天、超過約五天、或超過約一週。

【0177】 在一些實施例中，結合本文所述之醫藥組合物遞送額外治療劑會降低該額外治療劑之不良作用及/或改良其功效。

【0178】 本文所述之額外治療劑之有效劑量為治療劑有效達成特定患者、組合物及投藥方式之所需治療反應，同時對於患者具有最小毒性的量。有效劑量水準可使用本文所述之方法來鑑別，且將視多種藥物動力學因素而定，該等因素包括：所投與之特定組合物的活性；投與途徑；投與時間；所採用之特定化合物之排泄速率；治療持續時間；與所採用之特定組合物組合使用的其他藥物、化合物及/或物質；所治療患者之年齡、性別、體重、病狀、一般健康狀況及先前病史；及醫學技術中熟知之類似因素。一般而言，額外療法之有效劑量將為治療劑有效產生治療效果之最低劑量的量。此類有效劑量將一般視上文所述之因素而定。

【0179】 額外療法之毒性為受試者在治療期間及之後經歷之不良作用的水準。與額外療法毒性相關之不良事件包括(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、食慾不振、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、手足症候群、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、白細胞減少症、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、手足症候群(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)、侷限性肺炎(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，若經由療法達成之對於受試者之益處勝過受試者歸因於療法所經歷之不良事件，則毒性為可接受的。

免疫病症

【0180】 在一些實施例中，本文所述之方法及組合物係關於治療或預防與病理性免疫反應相關之疾病或病症，諸如自體免疫疾病、過敏反應及/或發炎疾病。在一些實施例中，疾病或病症為發炎性腸病(例如克羅恩氏病(Crohn's disease)或潰瘍性結腸炎)。

【0181】 本文所述之方法可用於治療任何有需要之受試者。如本文所用，「有需要之受試者」包括患有與病理性免疫反應相關之疾病或病症

(例如發炎性腸病)的任何受試者，以及具有增加的罹患此類疾病或病症之可能性的任何受試者。

【0182】 本文所述之組合物可用作例如用於預防或治療以下(部分或完全降低以下之不利影響)的醫藥組合物：自體免疫疾病，諸如慢性發炎性腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、穆-韋二氏症候群(muckle-wells syndrome)、類風濕性關節炎、多發性硬化或橋本氏病(Hashimoto's disease)；過敏性疾病，諸如食物過敏、花粉症或哮喘；感染性疾病，諸如艱難梭菌感染；發炎疾病，諸如TNF介導之發炎疾病(例如，胃腸道之發炎疾病，諸如儲袋炎(pouchitis)；心血管發炎性病狀，諸如動脈粥樣硬化；或發炎肺病，諸如慢性阻塞性肺病)；用作用於遏制器官移植或可能發生組織排斥之其他情況中的排斥的醫藥組合物；用於改善免疫功能之補充劑、食物或飲料；或用於遏制免疫細胞增殖或功能之試劑。

【0183】 在一些實施例中，本文所提供之方法適用於治療發炎。在某些實施例中，身體之任何組織及器官之發炎，包括肌肉骨骼發炎、血管發炎、神經發炎、消化系統發炎、眼部發炎、生殖系統發炎及其他發炎，如下文所論述。

【0184】 肌肉骨骼系統之免疫病症包括(但不限於)影響骨骼關節，包括手部、手腕、肘部、肩部、頷、脊椎、頸部、髕部、膝蓋、踝部及足部之關節之病狀，及影響連接肌肉與骨骼之組織，諸如肌腱的病狀。可用本文所述之方法及組合物治療的此類免疫病症之實例包括(但不限於)關節炎(包括例如骨關節炎、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、僵直性脊椎炎、急性及慢性感染性關節炎、與痛風及假性痛風相關之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(肌肉纖維

疼痛)、上髌炎、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)。

【0185】 眼部免疫病症係指影響眼部之任何結構，包括眼瞼之免疫病症。可用本文所述之方法及組合物治療的眼部免疫病症之實例包括(但不限於)瞼炎、眼瞼鬆弛、結膜炎、淚腺炎、角膜炎、乾燥性角膜結膜炎(乾眼)、鞏膜炎、倒睫及葡萄膜炎。

【0186】 可用本文所述之方法及組合物治療的神經系統免疫病症之實例包括(但不限於)腦炎、格-巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)、腦膜炎、神經肌強直、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合物治療的血管結構或淋巴系統之發炎之實例包括(但不限於)關節硬化、關節炎、靜脈炎、血管炎及淋巴管炎。

【0187】 可用本文所述之方法及組合物治療的消化系統免疫病症之實例包括(但不限於)膽管炎、膽囊炎、腸炎、小腸結腸炎、胃炎、胃腸炎、發炎性腸病、迴腸炎及直腸炎。發炎性腸病包括例如一組相關病狀之某些此項技術中公認的形式。已知發炎性腸病之若干嚴重形式，其中克羅恩氏病(侷限性腸病，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)為此等病症中最常見的。此外，發炎性腸病涵蓋大腸急躁症、顯微性結腸炎、淋巴球性-漿細胞腸炎、腹腔病、膠原性結腸炎、淋巴球性結腸炎及嗜酸性小腸結腸炎。IBD之其他較不常見形式包括不確定性結腸炎、偽膜性結腸炎(壞死性結腸炎)、缺血性發炎性腸病、白塞氏病(Behcet's disease)、類肉瘤病、硬皮病、IBD相關發育不良、發育不良相關腫塊或病變及原發性硬化性膽管炎。

【0188】 可用本文所述之方法及組合物治療的生殖系統免疫病症之

實例包括(但不限於)子宮頸炎、絨膜羊膜炎、子宮內膜炎、附睪炎、臍帶炎、卵巢炎、睪丸炎、輸卵管炎、輸卵管卵巢膿腫、尿道炎、陰道炎、外陰炎及外陰疼痛。

【0189】 本文所述之方法及組合物可用於治療具有發炎組分之自體免疫病狀。此類病狀包括(但不限於)急性散播性一般禿頭症、白塞氏病、卻格司病(Chagas' disease)、慢性疲勞症候群、自主神經障礙、腦脊髓炎、僵直性脊椎炎、再生不全性貧血、化膿性汗腺炎、自體免疫肝炎、自體免疫卵巢炎、乳糜瀉、克羅恩氏病、糖尿病1型、巨大細胞動脈炎、古巴士德氏症候群(good pasture's syndrome)、格雷氏病(Grave's disease)、格-巴二氏症候群、橋本氏病、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、紅斑狼瘡、顯微性結腸炎、顯微性多動脈炎、混合性結締組織病、穆-韋二氏症候群(Muckle-Wells syndrome)、多發性硬化、重症肌無力、斜視眼陣攣肌陣攣症候群、視神經炎、奧德氏甲狀腺炎(ord's thyroiditis)、天疱瘡、結節性多動脈炎、多肌痛、類風濕性關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、顱動脈炎、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、溫式自體免疫溶血性貧血、間質性膀胱炎、萊姆病(Lyme disease)、硬斑病、牛皮癬、類肉瘤病、硬皮病、潰瘍性結腸炎及白斑病。

【0190】 本文所述之方法及組合物可用於治療具有發炎組分之T細胞介導之過敏性疾病。此類病狀包括(但不限於)接觸性過敏、接觸性皮膚炎(包括由於野葛(poison ivy)所致)、蕁麻疹、皮膚過敏、呼吸道過敏(花粉熱、過敏性鼻炎、室內塵蟎過敏)及麩質敏感性腸病(乳糜瀉)。

【0191】 可用本文所述之方法及組合物治療的其他免疫病症包括例如：闌尾炎、皮膚炎、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、乳房炎、心肌炎、腎炎、耳炎、胰臟炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、肺炎、前列腺炎、腎盂腎炎及口炎、移植排斥(涉及器官，諸如腎臟、肝臟、心臟、肺、胰臟(例如胰島細胞)、骨髓、角膜、小腸、皮膚同種異體移植物、皮膚同種移植物及心瓣膜異種移植物；血清病及移植物抗宿主疾病)、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、急性呼吸窘迫症候群、塞紮萊症候群(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、天疱瘡、大皰性疱疹樣皮膚炎、嚴重多形性紅斑、剝脫性皮膚炎、皮脂溢性皮膚炎、季節性或常年性過敏性鼻炎、支氣管哮喘、接觸性皮膚炎、異位性皮膚炎、藥物超敏反應、過敏性結膜炎、角膜炎、眼帶狀疱疹、虹膜炎及虹膜睫狀體炎、脈絡膜視網膜炎、視神經炎、症狀性類肉瘤病、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、後天性(自體免疫)溶血性貧血、成人白血病及淋巴瘤、兒童急性白血病、侷限性腸炎、自體免疫血管炎、多發性硬化、慢性阻塞性肺病、實體器官移植排斥、敗血症。較佳治療包括移植排斥、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、多發性硬化、1型糖尿病、哮喘、發炎性腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、慢性阻塞性肺病及伴有感染性病狀(例如敗血症)之發炎的治療。

代謝障礙

【0192】 本文中所述之方法及組合物可用於治療代謝障礙及代謝症候群。此類病狀包括(但不限於)II型糖尿病、腦病、泰-薩克斯病(Tay-

Sachs disease)、克拉培氏病(Krabbe disease)、半乳糖血症、苯酮尿症(PKU)及楓糖漿尿病。因此，在某些實施例中，本文提供治療代謝疾病之方法，其包含向受試者投與本文所提供之組合物。在一些實施例中，代謝疾病為II型糖尿病、腦病、泰-薩克斯病、克拉培氏病、半乳糖血症、苯酮尿症(PKU)或楓糖漿尿病。

癌症

【0193】 在一些實施例中，本文所述之方法及組合物係關於癌症之治療。在一些實施例中，可使用本文所述之方法治療任何癌症。可由本文所述之方法及組合物治療的癌症之實例包括(但不限於)來自以下之癌細胞：膀胱、血液、骨、骨髓、腦、乳房、結腸、食道、胃腸、齒齦、頭、腎臟、肝臟、肺、鼻咽、頸、卵巢、前列腺、皮膚、胃、睪丸、舌或子宮。此外，癌症可特定具有以下組織學類型、但其不限於此等：惡性贅瘤；癌瘤；未分化癌瘤；巨大及梭狀細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌瘤；基底細胞癌；毛母質癌；移行細胞癌；乳頭狀移行細胞癌；腺癌；惡性胃泌素瘤；膽管上皮癌；肝細胞癌；組合之肝細胞癌及膽管上皮癌；小樑腺癌；腺樣囊性癌；腺瘤息肉中之腺癌；家族性息肉病大腸桿菌腺癌；實體癌瘤；惡性類癌瘤；細支氣管肺泡腺癌；乳頭狀腺癌；嫌色細胞癌；嗜酸性癌；嗜氧性腺癌；嗜鹼性球癌；透明細胞腺癌；粒狀細胞癌；濾泡性腺癌；乳頭狀及濾泡性腺癌；無包膜硬化性癌瘤；腎上腺皮質癌；子宮內膜樣癌；皮膚附屬器癌；頂泌腺癌；皮脂腺癌；耵聍腺癌；黏液表皮樣癌瘤；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；浸潤導管癌；髓性癌；小葉癌；發炎癌瘤；乳腺佩吉特氏病；腺泡細胞癌瘤；腺鱗癌瘤；含

鱗狀化生腺癌；惡性胸腺瘤；惡性卵巢基質腫瘤；惡性泡膜細胞瘤；惡性粒層細胞腫瘤；及惡性母細胞瘤；塞特利氏細胞癌(sertoli cell carcinoma)；惡性雷迪格細胞腫瘤(leydig cell tumor)；惡性脂質細胞腫瘤；惡性副神經節瘤；惡性乳腺外副神經節瘤；嗜鉻細胞瘤；血管球肉瘤；惡性黑素瘤；無黑色素性黑素瘤；淺表擴散性黑素瘤；巨大色素痣內惡性黑素瘤；上皮狀細胞黑素瘤；惡性藍痣；肉瘤；纖維肉瘤；惡性纖維性組織細胞瘤；黏液肉瘤；脂肪肉瘤；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；惡性混合腫瘤；苗勒氏管混合腫瘤(mullerian mixed tumor)；腎母細胞瘤；肝胚細胞瘤；癌肉瘤；惡性間質瘤；惡性布倫納氏瘤(brenner tumor)；惡性葉狀腫瘤；滑膜肉瘤；惡性間皮瘤；無性細胞瘤；胚胎性瘤；惡性畸胎瘤；惡性甲狀腺腫樣卵巢瘤；絨膜癌；惡性中腎瘤；血管肉瘤；惡性血管內皮瘤；卡堡氏肉瘤；惡性血管外皮瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；皮質旁骨肉瘤；軟骨肉瘤；惡性軟骨母細胞瘤；間充質軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤文氏肉瘤；惡性牙源性腫瘤；成釉細胞牙肉瘤；惡性成釉細胞瘤；成釉細胞纖維肉瘤；惡性松果體瘤；脊索瘤；惡性神經膠質瘤；室管膜瘤；星形細胞瘤；原生質星形細胞瘤；肌原纖維性星形細胞瘤；星形母細胞瘤；神經膠母細胞瘤；少突神經膠質瘤；成少突神經膠質細胞瘤；原始神經外胚層；小腦肉瘤；成神經節細胞瘤；神經母細胞瘤；視網膜母細胞瘤；嗅覺神經性腫瘤；惡性腦膜瘤；神經纖維肉瘤；惡性神經鞘瘤；惡性粒狀細胞腫瘤；惡性淋巴瘤；霍奇金氏病；霍奇金氏淋巴瘤；類肉芽腫；小淋巴球性惡性淋巴瘤；彌漫性大細胞惡性淋巴瘤；濾泡性惡性淋巴瘤、；蕈樣黴菌病；其他特定非霍奇金氏淋巴瘤；惡性組織細胞增多病；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫

增殖性小腸疾病；白血病；淋巴白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；骨髓性白血病；嗜鹼性白血病；嗜酸性白血病；單核細胞性白血病；肥大細胞白血病；巨核母細胞白血病；骨髓肉瘤；及毛細胞白血病。

【0194】 在一些實施例中，本文所提供之方法及組合物係關於白血病之治療。術語「白血病」廣義上意謂造血器官/系統之進行性惡性疾病，且一般特徵為血液及骨髓中之白血球及其前驅體之畸變增殖及發展。白血病疾病之非限制性實例包括：急性非淋巴球性白血病、慢性淋巴球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前髓細胞性白血病、成人T細胞白血病、白血球缺乏性白血病、白血球性白血病、嗜鹼性白血病、母細胞性白血病、牛白血病、慢性骨髓細胞性白血病、皮膚白血病、胚胎性白血病、嗜酸性白血病、格羅斯白血病(Gross' leukemia)、里德爾細胞白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、幹細胞性白血病、亞白血性白血病、未分化細胞白血病、毛細胞白血病、血母細胞性白血病(hemoblastic leukemia)、成血細胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、組織細胞白血病、幹細胞性白血病、急性單核球性白血病、白血球減少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母細胞白血病、淋巴球性白血病、淋巴生成白血病、淋巴細胞性白血病、淋巴肉瘤細胞白血病、肥大細胞白血病、巨核細胞白血病、小骨髓母細胞性白血病、單核球性白血病、骨髓母細胞性白血病、骨髓細胞性白血病、骨髓顆粒球性白血病、骨髓單核球性白血病、內格利白血病(Naegeli leukemia)、漿細胞白血病、漿球性白血病及前髓細胞性白血病。

【0195】 在一些實施例中，本文所提供之方法及組合物係關於癌瘤

之治療。術語「癌瘤」係指由上皮細胞構成之惡性生長，傾向於浸潤周圍組織及/或抵抗生理學及非生理學細胞死亡信號且引起癌轉移。癌瘤之非限制性例示性類型包括：腺泡癌、腺泡狀癌瘤、腺囊癌、腺樣囊性癌症、腺瘤癌、腎上腺皮質癌、肺泡癌、肺泡細胞癌、基底細胞癌、基底樣細胞癌、基底樣癌瘤、基底鱗狀細胞癌、細支氣管肺泡癌、細支氣管癌、支氣管癌、腦癌、膽管細胞癌、絨毛膜癌、膠樣癌、粉刺癌、子宮體癌、篩骨狀癌、鎧甲狀癌、皮狀癌、柱狀癌、柱狀細胞癌、導管癌、硬癌、胚胎性瘤、腦狀癌瘤、表皮樣癌、腺狀上皮癌、外生性癌、潰瘍性癌、纖維癌、膠體癌、膠狀癌、巨細胞癌、印戒細胞癌、單純癌、小細胞癌、馬鈴薯狀癌、球狀細胞癌、梭細胞癌、髓狀癌、鱗狀癌、鱗狀細胞癌、繩捆癌、毛細管擴張癌(carcinoma telangiectaticum)、血管擴張性癌(carcinoma telangiectodes)、移行細胞癌、塊狀癌、結節性癌、疣狀癌、絨毛狀癌、巨細胞癌、腺癌、粒層細胞癌、毛髮基質癌、血樣癌、肝細胞癌、何氏細胞癌(Hurthle cell carcinoma)、透明細胞癌、腎上腺樣癌、嬰兒胚胎性瘤、原位癌、表皮內癌瘤、上皮內癌瘤、侵蝕性潰瘍(Krompecher's carcinoma)、庫爾契茨基細胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、豆狀癌(lenticular carcinoma)、豆狀癌瘤(carcinoma lenticulare)、脂肪瘤樣癌、淋巴上皮癌、髓樣癌(carcinoma medullare)、髓性癌、黑色素癌、髓樣癌(carcinoma molle)、黏液性癌、黏液癌、黏液細胞癌、黏液表皮樣癌、黏膜癌、黏液癌瘤、黏液瘤樣癌、鼻咽癌、燕麥細胞癌、骨化性癌、骨樣癌、乳頭狀癌、門脈周性癌、原位癌(preinvasive carcinoma)、棘細胞癌、腦樣癌、腎臟之腎細胞癌、儲備細胞癌、肉瘤樣癌、施耐德癌(schneiderian carcinoma)、硬癌(scirrhou carcinoma)及陰囊癌。

【0196】 在一些實施例中，本文所提供之方法及組合物係關於肉瘤之治療。術語「肉瘤」一般係指由如胚胎結締組織之物質構成且一般由包埋於纖維狀異質或同質物質中的緊實細胞構成的腫瘤。肉瘤包括(但不限於)：軟骨肉瘤、纖維肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、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、纖維母細胞肉瘤、巨細胞肉瘤、艾伯內西式肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肉瘤、脂肪肉瘤、軟組織肺泡狀肉瘤、成釉細胞肉瘤、葡萄樣肉瘤、綠色瘤、絨膜癌、胚胎肉瘤、威耳姆士腫瘤(Wilms' tumor sarcoma)、顆粒球性肉瘤、霍奇金氏肉瘤(Hodgkin's sarcoma)、特發性多發性色素性出血性肉瘤、B細胞之免疫母細胞肉瘤、淋巴瘤、T細胞之免疫母細胞肉瘤、詹恩遜氏肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡堡氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、庫普弗細胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血病性肉瘤、惡性間質瘤、骨膜外肉瘤、網狀細胞肉瘤、勞斯肉瘤(Rous sarcoma)、漿液囊性肉瘤、滑膜肉瘤及毛細管擴張性肉瘤。

【0197】 可使用本文所述之方法及組合物治療之額外例示性贅瘤包括：霍奇金氏疾病、非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、乳癌、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、原發性腦瘤、胃癌、結腸癌、惡性胰島瘤、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、子宮頸癌、子宮內膜癌、漿細胞瘤、結腸直腸癌、直腸癌、梅克爾細胞癌(Merkel Cell carcinoma)、唾液腺癌及腎上腺皮質癌。

【0198】 在一些實施例中，所治療癌症為黑素瘤。術語「黑素瘤」

用於意謂由皮膚及其他器官之黑色素細胞系統產生之腫瘤。黑素瘤之非限制性實例為：哈帕二氏黑素瘤(Harding-Passey melanoma)、青少年黑素瘤、惡性雀斑樣痣黑素瘤、惡性黑素瘤、肢端雀斑黑素瘤、無黑色素性黑素瘤、良性青少年黑素瘤、克勞德曼黑素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑素瘤、結節性黑素瘤、陰囊黑素瘤及淺表擴散性黑素瘤。

【0199】 可使用本文所述之方法及組合物治療的腫瘤之特定類別包括：淋巴增生病症、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、骨癌、肝癌、胃癌、結腸癌、胰臟癌、甲狀腺癌、頭頸癌、中樞神經系統癌、周邊神經系統癌、皮膚癌、腎癌以及所有以上之癌轉移。腫瘤之特定類型包括：肝細胞癌、肝癌、肝母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、食道癌、甲狀腺癌、神經節母細胞瘤、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、尤文氏腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、侵襲性乳腺管癌、乳頭狀腺癌、黑素瘤、肺鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌(高分化、中分化、低分化或未分化)、細支氣管肺泡癌、腎細胞癌、腎上腺樣瘤、腎上腺樣腺癌、膽管癌、絨膜癌、精細胞癌、胚胎性瘤、威耳姆士腫瘤、睪丸腫瘤、肺癌瘤(包括小細胞、非小細胞及大細胞肺癌瘤)、膀胱癌、神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、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、結腸癌、直腸癌、造血性惡性病(包括所有類型之白血病及淋巴瘤，包括：急性骨髓性白血病、急性骨髓細胞性白血病、急性淋巴球性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴球性白血病、肥大細胞白血病、多發性骨髓瘤、骨髓淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、漿細胞瘤、結腸直腸癌、直腸癌、梅克爾細胞癌、唾液腺癌、非霍奇金氏淋巴瘤)。

【0200】 在某些實施例中，所治療之癌症亦包括癌變前病變，例如光化性角化症(日光性角化症)、痣(發育異常痣)、光化性唇炎(農民唇(farmer's lip))、皮角(cutaneous horn)、巴雷斯特氏食道症(Barrett's esophagus)、萎縮性胃炎、先天性角化不良、缺鐵性吞咽困難、扁平苔癬、口腔黏膜下纖維化、光化性(日光性)彈性組織變性及頸椎發育不良。

【0201】 在一些實施例中，所治療之癌症包括例如內胚層、外胚層或間葉細胞源之非癌性或良性腫瘤，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、水囊狀胎塊、腎源性小管性腺瘤、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、斑痣、腦膜瘤及神經節細胞瘤。

其他疾病及病症

【0202】 在一些實施例中，本文所述之方法及組合物係關於非酒精性脂肪肝病(NAFLD)、原發性硬化性膽管炎(PSC)及非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)之治療。在一些實施例中，本文所述之方法及組合物係關於肝臟疾病之治療。此類病狀包括(但不限於)阿拉吉歐症候群(Alagille Syndrome)、酒精相關肝臟疾病、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症、自體免疫肝炎、良性肝臟腫瘤、膽道閉鎖、肝硬化、半乳糖血症、吉爾伯特氏症候群(Gilbert Syndrome)、血色素沈著症、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝腦病、妊娠之肝內膽汁鬱積(ICP)、溶酶體酸脂肪酶缺乏症(LAL-D)、肝臟囊腫、肝癌、新生兒黃疸、非酒精性脂肪肝病、原發性膽汁膽管炎(PBC)、原發性硬化性膽管炎(PSC)、雷氏症候群(Reye Syndrome)、I型肝糖貯積病及威爾遜病(Wilson Disease)。

【0203】 本文所述之方法及組合物可用於治療神經退化性及神經疾病。在某些實施例中，神經退化性及/或神經疾病為帕金森病、阿茲海默氏病、朊病毒病、亨廷頓氏病(Huntington's disease)、運動神經元疾病(MND)、脊髓小腦失調、脊髓性肌萎縮、肌張力障礙、特發性顱內高血壓、癲癇症、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、周邊神經病變及術後認知功能障礙。

製造增強型普雷沃菌之方法

【0204】 在某些態樣中，本文提供製造用於產生本文所述之EV的經工程改造之普雷沃菌之方法。在一些實施例中，經工程改造之普雷沃菌經修飾以增強某些期望特性。舉例而言，在一些實施例中，經工程改造之普雷沃菌經修飾以增加由普雷沃菌產生之EV。在一些實施例中，經工程改造之普雷沃菌經修飾以產生具有經提高口服遞送之EV（例如，藉由改良耐酸性及/或對膽汁酸之抗性）；增強所產生之EV的免疫調節及/或治療效果（例如單獨或與另一治療劑組合）；藉由所產生之EV增強免疫活化及/或改良普雷沃菌細菌性及/或EV製造（例如較高耐氧性、經改良之耐凍融性、較短生成時間）。可使用此項技術中已知的任何技術產生經工程改造之普雷沃菌，該技術包括（但不限於）定點誘變、轉座子誘變、基因剔除、基因嵌入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外光誘變、轉化（化學或藉由電致孔）、噬菌體轉導、定向演化、CRISPR/Cas9或其任何組合。

【0205】 在本文所提供之方法之一些實施例中，普雷沃菌係藉由定向演化修飾。在一些實施例中，定向演化包含將普雷沃菌暴露於環境條件，且選擇在該環境條件下具有經改良存活期及/或生長之普雷沃菌。在一些實施例中，該方法包含使用鑑別增強型普雷沃菌之分析篩選經誘變之

普雷沃菌。在一些實施例中，該方法進一步包含使普雷沃菌誘變(例如藉由暴露於化學誘變劑及/或UV輻射)，之後進行偵測具有所需表型之普雷沃菌的分析(例如活體內分析、離體分析或活體外分析)。

【0206】 在一些實施例中，本文所提供之普雷沃菌係藉由暴露於應激誘導環境(例如誘導包膜應激之環境)來修飾。在一些實施例中，此類生長條件下之生長增加由普雷沃菌產生之EV。舉例而言，在一些實施例中，普雷沃菌在次抑制濃度之本文所述之抗生素(例如0.1至1 $\mu\text{g/mL}$ 氯黴素或0.1至0.3 $\mu\text{g/mL}$ 慶大黴素)存在下生長。在一些實施例中，使用宿主抗微生物肽(例如溶菌酶、預防素及Reg蛋白)代替抗生素或與其組合。在一些實施例中，使用普雷沃菌產生之抗微生物肽(例如普雷沃菌細菌素及小菌素)。在一些實施例中，應激為溫度應激(例如在37°C至50°C下生長)。在一些實施例中，應激為碳限制應激(例如在包含受限碳源之培養基，諸如具有限定小於1% (w/v)之碳源的培養基中生長)。在一些實施例中，應激為鹽應激(例如在含有0.5M NaCl之培養基中生長)。在一些實施例中，應激為UV應激(例如在UV燈下在整個培養期或僅在培養期之一部分期間生長)。在一些實施例中，應激為反應性氧應激(例如在含有次抑制濃度之過氧化氫，諸如250至1,000 μM 過氧化氫之培養基中生長)。在一些實施例中，將本文所揭示之應激之組合施加至普雷沃菌。

實例

實例1：由普雷沃菌進行之EV之製備及純化。

【0207】 使用熟習此項技術者已知的方法(S. Bin Park等人 PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011))由普雷沃菌細菌培養物製備胞外囊泡(EV)。

【0208】 舉例而言，在4°C下以11,000× g離心普雷沃菌細菌培養物

持續20至40分鐘以集結細菌。隨後使培養上清液通過0.22 μm 過濾器以排除完整細菌細胞。使用可包括(但不限於)硫酸銨沈澱、超速離心或過濾之方法濃縮過濾上清液。簡言之，對於硫酸銨沈澱，將1.5至3 M硫酸銨緩慢添加至過濾上清液，同時在4°C下進行攪拌。在4°C下培育沈澱物8至48小時，且隨後在4°C下以11,000 $\times$ g離心持續20至40分鐘。集結粒含有細菌EV及其他碎片。簡言之，使用超速離心，在4°C下以100,000至200,000 $\times$ g離心過濾上清液持續1至16小時。此離心之集結粒含有細菌EV及其他碎片。簡言之，使用過濾技術、使用Amicon Ultra自旋過濾器或藉由切向流過濾，上清液經過濾以保留分子量> 50或100 kDa之物種。

【0209】可替代地，根據製造商之說明書，在生長期間或在生長期間之選定時間點藉由使生物反應器與交替切向流(ATF)系統(例如來自Repligen之XCell ATF)連接，由普雷沃菌細菌培養物連續獲得EV。ATF系統保留生物反應器中之完整細胞(>0.22 μm)，且使較小組分(例如EV、游離蛋白)通過過濾器以供收集。舉例而言，系統可經配置以使得<0.22 μm 過濾物隨後通過100 kDa之第二過濾器，使得在0.22 μm 與100 kDa之間的物種，諸如EV得到收集，且小於100 kDa之物種泵送回生物反應器中。可替代地，系統可經配置以使得在培養物生長期間生物反應器中之培養基得到補給及/或修飾。此方法所收集之EV可藉由如上文關於過濾上清液所述之超速離心或過濾得到進一步純化及/或濃縮。

【0210】由上文所述之方法獲得的EV可藉由梯度超速離心，使用可包括(但不限於)使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法進一步純化。簡言之，若使用硫酸銨沈澱或超速離心來濃縮過濾上清液，則使用蔗糖梯度法，將集結粒再懸浮於60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0中。若使用過濾來

濃縮過濾上清液，則使用Amicon Ultra管柱將濃縮物緩衝液更換為60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0。將樣本施加至35%至60%非連續蔗糖梯度且在4°C下以200,000× g離心持續3至24小時。簡言之，若使用硫酸銨沈澱或超速離心來濃縮過濾上清液，則使用Optiprep梯度法，將集結粒再懸浮於於PBS中之35% Optiprep中。若使用過濾來濃縮過濾上清液，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35%至60%非連續蔗糖梯度且在4°C下以200,000× g離心持續3至24小時。

【0211】 為了證實EV製備物之無菌性及分離，將EV連續稀釋於用於常規培養所測試之普雷沃菌的洋菜培養基上，且使用常規條件進行培育。使非無菌製備物通過0.22 μm過濾器以排除完整細胞。為了進一步增加純度，經分離之EV可經DNA酶或蛋白酶K處理。

【0212】 可替代地，對於用於活體內注射之EV之製備，如先前所述處理經純化之EV (G. Norheim 等人 PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015))。簡言之，在蔗糖梯度離心之後，將含有EV之帶再懸浮於含有3%蔗糖之溶液或熟習此項技術者已知的適用於活體內注射之其他溶液中至最終濃度為50 μg/mL。此溶液亦可含有佐劑，例如濃度為0至0.5% (w/v)之氫氧化鋁。

【0213】 為了使樣本與進一步測試相容(例如，在TEM成像或活體外分析之前移除蔗糖)，使用過濾(例如，Amicon Ultra管柱)、透析或超速離心(200,000× g，≥3小時，4°C)及再懸浮將樣本緩衝液更換為PBS或30 mM Tris，pH 8.0。

實例2：標記細菌EV

【0214】 為了在不同製備物中且在用哺乳動物細胞進行之分析中追

蹤EV活體內生物分佈且活體外對其進行定量及定位，如先前所述標記EV (N. Kesty等人 EMBO Journal. 23: 4538-4549 (2004))。

【0215】 舉例而言，在25℃下將經純化之EV與螢光異硫氰酸鹽(FITC) (美國Sigma-Aldrich)、Cy7或適用於流動式細胞量測術之任何其他螢光染料一起培育(1:1)持續1小時。培育步驟在4℃下可延長隔夜。為了移除額外螢光染料，隨後將EV (1)藉由以200,000× g離心持續3小時至隔夜，加以洗滌且再懸浮於PBS或用於後續應用之另一種合適緩衝液中；或(2)藉由透析或藉由過濾(例如使用Amicon Ultra管柱)緩衝液更換為PBS或用於後續應用之另一種合適緩衝液。

【0216】 可替代地，EV係從含有0.8 mM 3-疊氮基-D-丙胺酸或HADA之培養基中所培養之普雷沃菌獲得。若伴隨3-疊氮基-D-丙胺酸生長，則將EV再懸浮於或緩衝液更換為PBS且一部分用於1%BSA/PBS中之10 μm二苯并-氮雜-環辛炔(DIBAC)-螢光染料(染料包括Cy5、TAMRA、若丹明綠(Rhodamine-green)及Cy7)進一步標記。如上文所述，藉由(1)超速離心，洗滌及再懸浮；或(2)藉由透析或過濾進行緩衝液更換來移除未併入之染料。

【0217】 經標記之EV亦可從表現綠色螢光蛋白(GFP)或任何其他螢光蛋白之普雷沃菌產生。

【0218】 量子點可用於標記用於無創活體內成像研究之EV (K. Kikushima等人 Scientific Reports. 3(1913) (2013))。量子點與經確認存在於EV膜中之抗體結合。將經分離之EV與量子點結合物一起培育，且如上文所述，藉由(1)超速離心，洗滌及再懸浮；或(2)藉由透析或過濾進行緩衝液更換來移除額外結合物。

【0219】藉由共焦顯微鏡、奈米粒子追蹤分析及/或流動式細胞量測術在活體外及離體樣本中偵測經螢光標記之EV。另外，使用儀器，諸如H-I. Choi等人 *Experimental & Molecular Medicine*. 49: e330 (2017)中之IVIS光譜CT (Perkin Elmer)在完整動物及/或經剝離之器官及組織中偵測經螢光標記之EV。

【0220】另外，可如先前所述放射性標記EV (Z. Varga等人, *Cancer Biother Radiopharm*. 2016年6月;31(5):168-73)。

【0221】舉例而言，用^{99m}Tc-三羰基錯合物[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺，使用商用套組(Isolink®；Mallinckrodt Medical B.V.)，根據製造商說明書放射性標記經純化之EV。

實例3：進行穿透式電子顯微鏡術以觀測EV及經純化之細菌EV之細菌性製造

【0222】在細菌產生EV或經純化之細菌EV時使用穿透式電子顯微鏡術(TEM)來對其進行觀測(S. Bin Park等人 *PLoS ONE*. 6(3):e17629 (2011))。如實例1中所述，從細菌分批培養製備EV。將EV裝載至300或400目大小的經碳塗佈之銅網(美國Electron Microscopy Sciences)上持續2分鐘且用去離子水洗滌。使用2% (重量體積比)醋酸鈾鹽對EV進行負染色持續20秒至1分鐘。用無菌水洗滌銅網且加以乾燥。使用穿透式電子顯微鏡用100至120 kV加速電壓獲取影像。經染色之EV呈現直徑在20至250 nm之間且為電子緻密的。各網格篩選出10至50個域。

實例4：剖析EV組成及含量

【0223】EV可藉由包括(但不限於)以下之各種方法中之任一者來表徵：NanoSight表徵、SDS-PAGE凝膠電泳、西方墨點法、ELISA、液相

層析-質譜法及質譜、動態光散射、脂質水準、總蛋白、脂質與蛋白質比、核酸分析及 ζ 電位。

【0224】 EV之NanoSight 表徵

【0225】 使用奈米粒子追蹤分析(NTA)來表徵經純化之細菌EV之尺寸分佈。在NanoSight機器(Malvern Instruments)上運作經純化之EV製備物以評定EV大小及濃度。

【0226】 SDS-PAGE 凝膠電泳

【0227】 為了鑑別經純化之EV (實例1)之蛋白質組分，使用標準技術將樣本運作於 Bolt Bis-Tris Plus 4-12% 凝膠(Thermo-Fisher Scientific)上。將樣本在1× SDS樣本緩衝液中煮沸10分鐘，冷卻至4℃，且隨後以16,000× g離心持續1分鐘。隨後將樣本運作於SDS-PAGE凝膠上且使用若干標準技術(例如銀染色、庫馬斯藍(Coomassie Blue)、Gel Code藍)中之一者染色以用於對帶進行觀測。

【0228】 西方墨點分析

【0229】 為了對經純化之EV之特定蛋白質組分進行鑑別及定量，藉由如上文所述之SDS-PAGE分離EV蛋白質且對其進行西方墨點分析(Cvjetkovic等人, Sci. Rep. 6, 36338 (2016))，且經由ELISA定量。

【0230】 液相層析-質譜分析(LC-MS/MS)及質譜分析(MS)

【0231】 針對質譜分析技術分析來自SDS-PAGE凝膠之分解物。另外，使用液相層析技術與質譜分析之組合測定代謝含量。存在多種技術來測定不同樣本之代謝體學含量且該等技術為熟習此項技術者已知的，其涉及溶劑萃取、層析分離及與質量測定結合之多種離子化技術(Roberts等人 2012 Targeted Metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 30: 1-24 ; Dettmer

等人 2007, Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev. 26(1):51-78)。作為非限制性實例，LC-MS系統包括與1110 Series 泵 (Agilent) 及 HTS PAL 自動取樣器 (Leap Technologies) 組合之 04000 QTRAP三重四極質譜儀(AB SCIEX)。使用含有穩定的同位素標記之內標物 (纈胺酸 -d8 ， Isotec ； 及 苯丙胺酸 -d8 ， Cambridge Isotope Laboratories)的九倍體積之74.9:24.9:0.2 (體積比)乙腈/甲醇/甲酸萃取培養基樣本或其他複合代謝混合物(約10 μ L)。可視相關代謝物而調整或調節標準物。對樣本進行離心(10分鐘，9,000 g，4°C)，且藉由將溶液注入至HILIC管柱(150 $\times$ 2.1 mm，3 μ m粒度)上來對上清液(10 μ L)進行LCMS。藉由以250 μ L/min之速率流動持續1分鐘，之後經由10分鐘利用一定線性梯度來使5%流動相[10 mM甲酸銨、0.1%甲酸水溶液]流至40%流動相[乙腈及0.1%甲酸]之溶液來溶離管柱。離子噴霧電壓設定成4.5 kV且源溫度為450°C。

【0232】 使用可在市面上購得之軟體，如來自 AB SCIEX 之 Multiquant 1.2來分析資料以用於質譜峰值積分。應手繪相關峰且與標準進行比較以確認峰之一致性。細菌調節之後及腫瘤細胞生長之後，利用合適標準物進行定量以測定初始培養基中存在的代謝物之數量。

【0233】 動態光散射(DLS)

【0234】 使用儀器，諸如DynaPro NanoStar (Wyatt Technology)及 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)進行DLS量測，包括不同EV製備物中不同大小之粒子的分佈。

【0235】 脂質水準

【0236】 使用 FM4-64 (Life Technologies)，藉由類似於由 A.J.

McBroom等人 J Bacteriol 188:5385-5392.及A. Frias等人 Microb Ecol. 59:476-486 (2010)所述之方法的彼等方法對脂質水準進行定量。將樣本與FM4-64 (3.3 $\mu\text{g/mL}$ ，於PBS中，在37°C下在暗處持續10分鐘)一起培育。在515 nm下激發之後，使用Spectramax M5板讀取器(Molecular Devices)來量測635 nm下之發射。藉由對未知樣本與已知濃度之標準物(諸如軟脂醯油醯磷脂醯甘油(POPG)囊泡)進行比較來測定絕對濃度。

【0237】 總蛋白

【0238】 藉由標準分析，諸如Bradford及BCA分析來對蛋白質水準進行定量。根據製造商方案，使用Quick Start Bradford 1 $\times$ 染料試劑(Bio-Rad)運作Bradford分析。使用Pierce BCA蛋白質分析套組(Thermo-Fisher Scientific)運作BCA分析。藉由與由已知濃度之BSA產生的標準曲線進行比較來測定絕對濃度。

【0239】 脂質:蛋白質比

【0240】 脂質:蛋白質比係由脂質濃度除以蛋白質濃度產生。此等提供與各製備物中之游離蛋白質相比的囊泡之純度的量度。

【0241】 核酸分析

【0242】 自EV萃取核酸且使用Qubit螢光計對核酸進行定量。使用生物分析儀評定尺寸分佈且對物質進行定序。

【0243】 ζ 電位

【0244】 使用諸如Zetasizer ZS (Malvern Instruments)之儀器來量測不同製備物之 ζ 電位。

實例5：經由應激操控細菌以產生不同量之EV及/或改變EV之含量

【0245】 已顯示應激，且尤其外膜應激會增加由一些菌株產生之EV

(I. MacDonald, M. Kuehn. J Bacteriol 195(13): doi: 10/1128/JB.02267-12)。為了改變由細菌進行的EV之製造，使用不同方法使細菌受激。

【0246】 細菌可經歷單一應激源或呈組合形式之應激源。藉由改變應激條件且測定IC50值(抑制細胞生長50%所需之條件)來憑經驗測定不同應激源對不同細菌之影響。如實例1至實例4中所詳述進行EV純化、定量及表徵。以以下方式：(1)藉由奈米粒子追蹤分析(NTA)或穿透式電子顯微鏡術(TEM)在細菌與EV之複合樣本中；或(2)在EV純化之後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量來對EV產量進行定量。純化之後藉由上文所述之方法評定EV含量。

【0247】 *抗生素應激*

【0248】 在伴隨添加次抑制濃度之抗生素的標準生長條件下培養細菌。此可包括0.1至1 µg/mL氯黴素或0.1至0.3 µg/mL慶大黴素或其他抗生素(例如安比西林、多黏菌素B)之類似濃度。可使用宿主抗微生物產物，諸如溶菌酶、預防素及Reg蛋白來代替抗生素。亦可使用細菌產生之抗微生物肽，包括細菌素及小菌素。

【0249】 *溫度應激*

【0250】 在標準生長條件下，但在高於或低於典型地供細菌生長之溫度的溫度下培養細菌。可替代地，細菌在標準條件下生長，且隨後藉由分別在低溫或高溫下培育較短時段而使其經歷冷休克或熱休克。舉例而言，將在37°C下生長之細菌在4°C至18°C下培育1小時以冷休克，或在42°C至50°C下培育1小時以熱休克。

【0251】 *饑餓及營養限制*

【0252】 為了誘導營養應激，在一或多種營養物質受限之條件下培

養細菌。細菌可在整個生長中經歷營養應激或自富營養培養基轉移至貧營養培養基。受限的培養基組分之一些實例為碳、氮、鐵及硫。實例培養基為M9基本培養基(Sigma-Aldrich)，其含有較低葡萄糖作為唯一碳源。尤其對於普雷沃菌屬，鐵利用率係藉由改變培養基中之氯化血紅素之濃度及/或藉由改變培養基中所存在之卟啉或其他鐵載體之類型來改變，因為發現低氯化血紅素條件下生長之細胞會產生較高數量之EV (S. Stubbs等人 Letters in Applied Microbiology. 29:31-36 (1999))。亦藉由添加螯合劑，諸如EDTA及去鐵胺來操控培養基組分。

【0253】 飽和

【0254】 細菌生長至飽和且經培育超過飽和點持續不同時段。可替代地，使用經調節之培養基來模仿指數生長期間之飽和環境。藉由利用如實例1中所述之離心及過濾自飽和培養物去除完整細胞來製備經調節之培養基，且可進一步處理經調節之培養基以濃縮或移除特定組分。

【0255】 鹽應激

【0256】 在含有NaCl、膽汁鹽或其他鹽之培養基中培養細菌或將細菌暴露於該培養基持續短暫時段。

【0257】 UV應激

【0258】 藉由在UV燈下培養細菌或藉由使用諸如 Stratalinker (Agilent)之儀器將細菌暴露於UV來達成UV應激。可在整個培養期間以短脈衝形式施加UV，或在生長之後持續單一限定時段。

【0259】 反應性氧應激

【0260】 在次抑制濃度之過氧化氫(250至1,000 μM)存在下培養細菌以誘導呈反應性氧物種形式之應激。在對厭氧細菌具有毒性之氧之濃度

下培養厭氧細菌或將其暴露於該等濃度。

【0261】 清潔劑應激

【0262】 在清潔劑，諸如十二烷基硫酸鈉(SDS)或去氧膽酸鈉中培養細菌或將其暴露於該清潔劑。

【0263】 pH應激

【0264】 在不同pH之培養基中培養細菌或將其暴露於該等培養基持續受限時間。

實例6：不含EV之細菌的製備

【0265】 製備含有極少量之EV的細菌樣本。以以下方式：(1)藉由NTA或TEM在細菌與胞外組分之複合樣本中；或(2)在自細菌樣本進行EV純化之後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量來對EV產量進行定量。

【0266】 a. 離心及洗滌：以11,000× g離心細菌培養物以使完整細胞與上清液(包括游離蛋白質及囊泡)分離。用緩衝液，諸如PBS洗滌集結粒，且以穩定方式(例如與甘油混合、急速冷凍且儲存在-80°C下)對其進行儲存。

【0267】 b. ATF：藉由使生物反應器與ATF系統連接來分離細菌與EV。將不含EV之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EV分離。

【0268】 c. 使細菌在經發現會限制EV產生之條件下生長。可改變之條件包括實例5所列之彼等條件。

實例7：針對樹突狀細胞之經增強之活化的EV之活體外篩選

【0269】 經由上皮細胞間接活化樹突狀細胞的霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*) EV之能力為一種非限制性機制，藉由該機制，霍亂弧菌EV會刺

激哺乳動物宿主中之免疫反應(D. Chatterjee, K. Chadhuri. J Biol Chem. 288(6):4299-309. (2013))。由於此EV活動有可能與活體內刺激促炎性級聯之其他細菌共有，因此本文揭示分析藉由細菌EV活化DC之活體外方法。簡言之，藉由梯度離心使用Lymphoprep (挪威奧斯陸(Oslo)之Nycomed)自來自CM之肝素化靜脈血液，或使用基於磁珠之人類血液樹突狀細胞分離套組(Miltenyi Biotech, Cambridge, MA)自小鼠脾臟或骨髓分離PBMC。使用抗人類CD14 mAb，藉由Moflo純化單核細胞，且在37°C下以5e5個細胞/毫升之細胞密度將其培養於96孔板(Costar公司)中之cRPMI中持續7天。對於樹突狀細胞之成熟，在37°C下用0.2 ng/mL IL-4及1000 U/ml GM-CSF刺激培養物持續一週。可替代地，經由與單獨重組GM-CSF一起培育一週來達成成熟。可使用磁珠富集自脾臟直接收集小鼠DC或使其與造血幹細胞區分開。簡言之，由小鼠之股骨獲得骨髓。回收細胞且使紅血球裂解。將幹細胞與20 ng/ml小鼠GMCSF一起培養於細胞培養物培養基中持續4天。添加含有20 ng/ml小鼠GM-CSF之額外培養基。在第6天，移除培養基及非黏附細胞，且用含有20 ng/ml GMCSF之新製細胞培養基替代。在第7天最後添加具有20 ng/ml GM-CSF之細胞培養基。在第10天，收集非黏附細胞且接種於細胞培養板中隔夜且根據需要加以刺激。隨後用25至75 µg/mL EV用抗生素處理樹突狀細胞24小時。所測試之EV組合物可包括來自單一細菌物種或菌株之EV。所測試之EV組合物亦可包括來自細菌屬之EV、屬內之物種或物種內之菌株的混合物。PBS及來自乳酸桿菌之EV作為陰性對照包括在內，且LPS、抗CD40抗體及來自普雷沃菌屬之EV用作陽性對照。培育之後，用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHC I及

MHCII染色且藉由流動式細胞量測術分析DC。相較於陰性對照，CD40、CD80、CD83及CD86中明顯增加之DC視為經相關細菌EV組合物活化。此等實驗最少重複三次。

【0270】 為了篩選經EV活化之上皮細胞刺激DC之能力，遵照以上方案，同時在與DC一起培育之前，添加24小時上皮細胞EV共培養物。與EV一起培育之後洗滌上皮細胞，且隨後在EV不存在下將其與DC共培養24小時，之後如上所述進行處理。上皮細胞株可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

【0271】 作為DC活化之額外量測，在DC與EV或經EV處理之上皮細胞培育24小時之後，自孔移除100 μ l培養上清液，且使用多工Luminex Magpix.套組(德國達姆施塔特市(Darmstadt)之EMD Millipore)針對經分泌之細胞介素、趨化因子及生長因子對培養上清液進行分析。簡言之，用緩衝液預潤濕各孔，且添加25 μ l之1 $\times$ 抗體塗佈之磁珠，且使用磁體在每孔中施加2 $\times$ 200 μ l洗滌緩衝液。添加50 μ l培育緩衝液、50 μ l稀釋劑及50 μ l樣本且在室溫下在暗處經由震盪混合2小時。隨後用200 μ l洗滌緩衝液洗滌磁珠兩次。添加100 μ l之1 $\times$ 經生物素標記之偵測抗體且在暗處伴隨震盪培育懸浮液1小時。隨後用洗滌緩衝液進行兩次200 μ l洗滌。將100 μ l之1 $\times$ SAV-RPE試劑添加至各孔中且在室溫下在暗處培育30分鐘。進行三次200 μ l洗滌，且添加125 μ l洗滌緩衝液，伴隨進行2至3分鐘震盪。隨後在Luminex xMAP系統中對各孔進行分析。

【0272】 標準允許對包括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之細胞介素進行仔細定量。在小鼠及人源之樣本中評定此等細胞介素。經細菌性處理之樣本中的此等細胞介素之增加表明來自宿主的蛋白質及細胞介素之產量提高。關於檢查釋放細胞介素之特定細胞類型能力的此分析之其他變化係藉由經由分選方法獲取此等細胞來評定且由一般熟習此項技術者識別。此外，亦評定細胞介素mRNA以突顯響應於EV組合物之細胞介素釋放。宿主之細胞中的此等變化刺激類似於癌症微環境中之活體內反應的免疫反應。

【0273】 可使用經純化之EV與活菌株之組合重複此DC刺激方案以使免疫刺激潛力達至最大。

實例8：針對當與腫瘤細胞一起培育時CD8+ T細胞殺滅之經增強之活化的EV之活體外篩選

【0274】 描述用於篩選可活化腫瘤細胞之CD8+ T細胞殺滅的EV之活體外方法。簡言之，自人類PBMC或小鼠脾臟分離DC，且將其與如實例12中所述之單菌株EV、EV之混合物及合適對照一起培育。此外，使用基於磁珠之小鼠CD8a+ T細胞分離套組及基於磁珠之人類CD8+ T細胞分離套組(兩者均來自馬薩諸塞州劍橋之Miltenyi Biotech)，由人類PBMC或小鼠脾臟獲得CD8+ T細胞。在DC與EV，或DC與經EV刺激之上皮細胞(實例12中詳述)培育24小時之後，用PBS洗滌自細胞移除EV，將100 μ l具有抗生素之新製培養基添加至各孔中，且將200,000個T細胞添加至96孔板中之各實驗孔中。以2 μ g/ml之最終濃度添加抗CD3抗體。隨後使共培養物在37°C下在正常氧條件下培育96小時。

【0275】 以50,000個腫瘤細胞/孔塗鋪新96孔板中之每孔，進行72小時共培養物培育。所用小鼠腫瘤細胞株包括B16.F10、SIY+ B16.F10及

其他。人類腫瘤細胞株經HLA匹配至供體，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及海拉細胞(HELA cell)株。完成96小時共培養後，將100 μ l之CD8+ T細胞及DC混合物轉移至含有腫瘤細胞之孔。在37℃下在正常氧條件下培育各板24小時。使用星形孢菌素作為陰性對照以考慮細胞死亡。

【0276】 在此培育之後，使用流動式細胞量測術來量測腫瘤細胞死亡且表徵免疫細胞表型。簡言之，用細胞存活染料對腫瘤細胞進行染色。FACS分析用於對腫瘤細胞進行特定門控且量測死亡(殺滅)腫瘤細胞之百分比。亦顯示呈每孔死亡腫瘤細胞之絕對數目形式的資料。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由以下方法表徵：a)如下文所述的培養上清液中之上清液顆粒酶B、IFN γ 及TNFa的濃度；b)活化標記，諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、 γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B之CD8+ T細胞表面表現；c) CD8+ T細胞中之IFN γ 、顆粒酶B、TNFa之胞內細胞介素染色。除了包括IFN γ 、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等之上清液細胞介素濃度之外，亦可藉由胞內細胞介素染色來評定CD4+ T細胞表型。

【0277】 作為CD8+ T細胞活化之額外量測，在T細胞與DC培育96小時之後，自孔移除100 μ l培養上清液，且使用多工Luminex Magpix.套組(德國達姆施塔特市之EMD Millipore)針對經分泌之細胞介素、趨化因子及生長因子對培養上清液進行分析。簡言之，用緩衝液預潤濕各孔，且添加25 μ l之1 $\times$ 抗體塗佈之磁珠，且使用磁體在每孔中施加2 $\times$ 200 μ l洗滌緩衝液。添加50 μ l培育緩衝液、50 μ l稀釋劑及50 μ l樣本且在室溫下在暗處經由震盪混合2小時。隨後用200 μ l洗滌緩衝液洗滌磁珠兩次。添加100

μl 之 $1\times$ 經生物素標記之偵測抗體且在暗處伴隨震盪培育懸浮液1小時。隨後用洗滌緩衝液進行兩次200 μl 洗滌。將100 μl 之 $1\times$ SAV-RPE試劑添加至各孔中且在室溫下在暗處培育30分鐘。進行三次200 μl 洗滌，且添加125 μl 洗滌緩衝液，伴隨進行2至3分鐘震盪。隨後在Luminex xMAP系統中對各孔進行分析。

【0278】 標準允許對包括GM-CSF、IFN- γ 、IFN- α 、IFN- β 、IL-1 α 、IL-1 β 、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、MIP1 α 、TNF α 及VEGF之細胞介素進行仔細定量。在小鼠及人源之樣本中評定此等細胞介素。經細菌性處理之樣本中的此等細胞介素之增加表明來自宿主的蛋白質及細胞介素之產量提高。關於檢查釋放細胞介素之特定細胞類型能力的此分析之其他變化係藉由經由分選方法獲取此等細胞來評定且由一般熟習此項技術者識別。此外，亦評定細胞介素mRNA以突顯響應於EV組合物之細胞介素釋放。宿主之細胞中的此等變化刺激類似於癌症微環境中之活體內反應的免疫反應。

【0279】 可使用經純化之EV與活菌株之組合重複此CD8 $^{+}$ T細胞刺激方案以使免疫刺激潛力達至最大。

實例9：針對藉由PBMC增強之腫瘤細胞殺滅的EV之活體外篩選

【0280】 針對刺激PBMC之能力篩選EV之方法包括在內，該等PBMC反過來會活化CD8 $^{+}$ T細胞以殺死腫瘤細胞。對於小鼠或人類血液，藉由ficoll-paque梯度離心自來自CM之肝素化靜脈血液分離PBMC，或用Lympholyte細胞分離培養基(加拿大安大略(Ontario)之Cedarlane Labs)自小鼠血液分離PBMC。將PBMC與如實例12中所述之單菌株EV、

EV之混合物及合適對照一起培育。此外，由如實例12中之人類PBMC或小鼠脾臟獲得CD8⁺ T細胞。在PBMC與EV培育24小時之後，用PBS洗滌自細胞移除EV，將100 μ l具有抗生素之新製培養基添加至各孔中，且將200,000個T細胞添加至96孔板中之各實驗孔中。以2 μ g/ml之最終濃度添加抗CD3抗體。隨後使共培養物在37°C下在正常氧條件下培育96小時。

【0281】 以50,000個腫瘤細胞/孔塗鋪新96孔板中之每孔，進行72小時共培養物培育。所用小鼠腫瘤細胞株包括B16.F10、SIY+ B16.F10及其他。人類腫瘤細胞株經HLA匹配至供體，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及海拉細胞株。完成96小時共培養後，將100 μ l之CD8⁺ T細胞及PBMC混合物轉移至含有腫瘤細胞之孔。在37°C下在正常氧條件下培育各板24小時。使用星形孢菌素作為陰性對照以考慮細胞死亡。

【0282】 在此培育之後，使用流動式細胞量測術來量測腫瘤細胞死亡且表徵免疫細胞表型。簡言之，用細胞存活染料對腫瘤細胞進行染色。FACS分析用於對腫瘤細胞進行特定門控且量測死亡(殺滅)腫瘤細胞之百分比。亦顯示呈每孔死亡腫瘤細胞之絕對數目形式的資料。細胞毒性CD8⁺ T細胞表型可藉由以下方法表徵：a)如下文所述的培養上清液中之上清液顆粒酶B、IFN γ 及TNF α 的濃度；b)活化標記，諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、 γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B之CD8⁺ T細胞表面表現；c)CD8⁺ T細胞中之IFN γ 、顆粒酶B、TNF α 之胞內細胞介素染色。除了包括IFN γ 、TNF α 、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化因子等之上清液細胞介素濃度之外，亦可藉由胞內細胞介素染色來評定CD4⁺ T細胞表型。

【0283】 作為CD8⁺ T細胞活化之額外量測，在T細胞與DC培育96

小時之後，自孔移除100 μ l培養上清液，且使用多工Luminex Magpix.套組(德國達姆施塔特市之EMD Millipore)針對經分泌之細胞介素、趨化因子及生長因子對培養上清液進行分析。簡言之，用緩衝液預潤濕各孔，且添加25 μ l之1 $\times$ 抗體塗佈之磁珠，且使用磁體在每孔中施加2 $\times$ 200 μ l洗滌緩衝液。添加50 μ l培育緩衝液、50 μ l稀釋劑及50 μ l樣本且在室溫下在暗處經由震盪混合2小時。隨後用200 μ l洗滌緩衝液洗滌磁珠兩次。添加100 μ l之1 $\times$ 經生物素標記之偵測抗體且在暗處伴隨震盪培育懸浮液1小時。隨後用洗滌緩衝液進行兩次200 μ l洗滌。將100 μ l之1 $\times$ SAV-RPE試劑添加至各孔中且在室溫下在暗處培育30分鐘。進行三次200 μ l洗滌，且添加125 μ l洗滌緩衝液，伴隨進行2至3分鐘震盪。隨後在Luminex xMAP系統中對各孔進行分析。

【0284】 標準允許對包括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之細胞介素進行仔細定量。在小鼠及人源之樣本中評定此等細胞介素。經細菌性處理之樣本中的此等細胞介素之增加表明來自宿主的蛋白質及細胞介素之產量提高。關於檢查釋放細胞介素之特定細胞類型能力的此分析之其他變化係藉由經由分選方法獲取此等細胞來評定且由一般熟習此項技術者識別。此外，亦評定細胞介素mRNA以突顯響應於EV組合物之細胞介素釋放。宿主之細胞中的此等變化刺激類似於癌症微環境中之活體內反應的免疫反應。

【0285】 可使用經純化之EV與活菌株之組合重複此PBMC刺激方案以使免疫刺激潛力達至最大。

實例10. 抗原呈遞細胞中EV之活體外偵測

【0286】藉由將固有層中之樹突狀細胞之樹突延伸穿過腸道上皮而使其恆定地取樣自腸腔中之活細菌、死亡細菌及微生物產物，其為藉由腸腔中之細菌產生的EV可直接刺激樹突狀細胞之一種方式。以下方法代表一種評定EV經抗原呈現細胞之不同攝取的方式。視情況地，此等方法可適用於評定向患者投與之EV的免疫調節特性。

【0287】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. *Current Protocols in Immunology*. 第3章:單元3.7)且如實例12中所論述，自人類或小鼠骨髓、血液或脾臟分離樹突狀細胞(DC)。

【0288】為了評估EV進入及/或存在於DC中，將250,000個DC接種於完整的RPMI-1640培養基中之圓形蓋玻片上，且隨後與來自單一菌株之EV或組合EV以1:1與1:10之間的感染倍率(MOI)一起培育。經純化之EV已用如實例2中所述之螢光染料或螢光蛋白質標記。培育1小時之後，細胞用冰冷PBS洗滌兩次且使用胰蛋白酶自板分離。使細胞保持完整或裂解。隨後處理樣本以用於流動式細胞量測術。自經裂解之樣本對總內化EV進行定量，且藉由對螢光細胞進行計數來量測攝取EV之細胞的百分比。上文所述之方法亦可使用巨噬細胞或上皮細胞株(由ATCC獲得)代替DC以實質上相同之方式進行。

實例11：針對當與靶細胞一起培育時經增強之活化NK細胞殺滅之能力的EV之活體外篩選

【0289】為了證明當與腫瘤細胞一起培育時，所選EV組合物引起對腫瘤細胞之強效NK細胞細胞毒性之能力，使用以下活體外分析。簡言

之，由健康人類供體獲得來自肝素化血液之單核細胞。視情況地，如先前所述(例如，參見Somanschi等人 2011 J Vis Exp.)進行增加NK細胞之數量的擴增步驟。將其調整至在含有5%人類血清之RPMI-1640培養基中濃度為 1×10^6 個細胞/毫升。隨後用合適抗體標記PMNC細胞，且經由FACS將NK細胞分離為CD3-/CD56+細胞且備用於後續細胞毒性分析。可替代地，根據製造商之說明書(Miltenyl Biotec)，使用autoMACs儀器及NK細胞分離套組來分離NK細胞。

【0290】 對NK細胞進行計數，且以每孔5000個細胞塗鋪於96孔形式中，且與如實例12中所述的單菌株EV、來自菌株之混合物的EV及合適對照一起培育。作為額外陰性對照，用來自具核梭桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)之EV運作此分析。已知具核梭桿菌對於NK細胞活性具有抑制性(參見例如，Gur等人 2005 Immunity 42:1-12)。NK細胞與EV培育5至24小時之後，用PBS洗滌自細胞移除EV，將NK細胞再懸浮於具有抗生素之10新製培養基中，且添加至含有50,000個靶腫瘤細胞/孔之96孔板中。所用小鼠腫瘤細胞株包括B16.F10、SIY+ B16.F10及其他。人類腫瘤細胞株經HLA匹配至供體，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及海拉細胞株。在37°C下在正常氧條件下培育各板24小時。使用星形孢菌素作為陰性對照以考慮細胞死亡。

【0291】 在此培育之後，使用流動式細胞量測術來量測腫瘤細胞死亡。簡言之，用細胞存活染料對腫瘤細胞進行染色。FACS分析用於對腫瘤細胞進行特定門控且量測死亡(殺滅)腫瘤細胞之百分比。亦顯示呈每孔死亡腫瘤細胞之絕對數目形式的資料。

【0292】 可使用經純化之EV與活菌株之組合重複此NK細胞刺激方

案以使免疫刺激潛力達到最大。

實例12：使用活體外免疫活化分析來預測EV組合物之活體內癌症免疫療法功效

【0293】 活體外免疫活化分析會鑑別出能夠刺激樹突狀細胞之EV，其反過來活化CD8+ T細胞殺滅。A. Sivan等人, *Science* 350(6264): 1084-1089 (2015)之著作表明藉由響應於普雷沃菌屬之口服攝取增強CD8+ T細胞殺滅腫瘤細胞為小鼠中之有效癌症免疫療法。因此，使用上文所述之活體外分析作為大量候選EV針對潛在免疫療法活性之預測性快速篩選。優先選擇顯示樹突狀細胞之刺激增強、CD8+ T細胞殺滅之刺激增強、PBMC殺滅之刺激增強及/或NK細胞殺滅之刺激增強的EV用於活體內癌症免疫療法功效研究。

實例13：測定當口服遞送至小鼠時EV之生物分佈

【0294】 用相關EV組合物口服接種野生型小鼠(例如C57BL/6或BALB/c)以測定經純化之EV (實例1)之活體內生物分佈概況。如實例2中標記EV以在後續分析中有所輔助。

【0295】 小鼠可接受單一劑量之EV (25至100 μ g)或經由限定時程接受若干劑量(25至100 μ g)。根據經批准之方案在不合特異性病原體之條件下圈養小鼠。可替代地，可在無菌、無微生物條件下培育小鼠且將其維持在該等條件下。可在合適時間點獲得血液及糞便樣本。

【0296】 在用組合物接種後不同時間點(亦即數小時至數天)以人道方式處死小鼠且在無菌條件下進行完全屍檢。根據標準方案，收集淋巴結、腎上腺、肝臟、結腸、小腸、盲腸、胃、脾臟、腎臟、膀胱、胰臟、心臟、皮膚、肺、大腦及其他相關組織且直接用於或速凍用於進一步測

試。剝離組織樣本且均質化以根據熟習此項技術者已知的標準方案製備單細胞懸浮液。隨後經由流動式細胞量測術(實例17)對樣本中所存在之EV之數量進行定量。亦可在對完整小鼠組織進行適當處理之後使用螢光顯微術來繼續進行定量(Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization, Cold Spring Harb. Protoc., 2009)。可替代地，可根據EV標記技術使用活體成像對動物進行分析。

實例14：活體外投與具有經增強之免疫活化的EV組合物以處理同基因型小鼠腫瘤模型

【0297】 小鼠癌症模型係由皮下注射腫瘤細胞株或源於患者之腫瘤樣本且使其移植於年齡為6-8週齡之C57BL/6雌性小鼠中而產生。使用若干腫瘤細胞株重複本文所提供之方法，該等腫瘤細胞株包括：作為黑素瘤之正位模型的B16-F10或B16-F10-SIY細胞；作為胰臟癌之正位模型的Panc02細胞，其以 1×10^6 個細胞之濃度注射於右側腹處(Maletzki等人2008. Gut 57: 483-491)；作為肺癌之正位模型的LLC1細胞；作為結腸直腸癌之正位模型的CT-26；及作為前列腺癌之正位模型的RM-1。作為實例，本文深入提供針對B16-F10模型之方法。

【0298】 使用具有極高轉移頻率之自發性黑素瘤之同基因型小鼠模型來測試細菌降低腫瘤生長及轉移瘤擴散之能力。針對此分析選擇之EV為顯示免疫細胞子群之活化增強且刺激活體外腫瘤細胞之殺滅增強的組合物(實例12至實例16)。小鼠黑素瘤細胞株B16-F10係由ATCC獲得。在37℃下在含5% CO₂之空氣氛圍中在補充有10%熱不活化胎牛血清及1%青黴素/鏈黴素之RPMI培養基中以單層形式活體外培養細胞。藉由胰蛋白酶消化收集指數增長之腫瘤細胞，用低溫1× PBS洗滌三次，且製備5E6個細胞

/毫升之懸浮液以供投與。將雌性C57BL/6小鼠用於此實驗。小鼠為6至8週齡且體重呈大約16至20 g。對於腫瘤罹患，將100 μ l B16-F10細胞懸浮液SC注射於各小鼠之側腹處。在細胞移植之前，藉由氯胺酮及甲苯噻嗪對小鼠進行麻醉。實驗中所用之動物可以抗生素處理開始，其係經由在腫瘤注射之後第2天至第5天在飲用水中滴注卡那黴素(0.4 mg/ml)、慶大黴素(0.035 mg/ml)、可利斯汀(850 U/ml)、甲硝噻唑(0.215 mg/ml)及萬古黴素(0.045 mg/ml)之混合液且在第7天腹膜內注射克林達黴素(10 mg/kg)來進行。

【0299】 用測徑規每2至3天量測原發側腹腫瘤之尺寸且使用下式計算腫瘤體積：腫瘤體積=腫瘤寬度²×腫瘤長度×0.5。原發腫瘤達至大約100 mm³之後，基於其體重將動物分選至若干組中。隨後自各組隨機抽取小鼠且分派到處理組。EV組合物係如實例1中所述製備。用25至100 μ g待測試之EV、25至100 μ g來自乳酸桿菌之EV(陰性對照)、PBS或25至100 μ g來自普雷沃菌屬之EV(陽性對照)藉由管飼對小鼠進行口服接種。在整個治療期間用相同量之EV每日一次、每週一次、每兩週一次、每月一次、每兩月一次或以任何其他給藥時程口服管飼小鼠。在尾部靜脈處對小鼠進行IV注射或直接注射至腫瘤中。可用10 ng至1 μ g EV、細菌與EV或不活化細菌與EV注射小鼠。可每週一次或每月一次注射小鼠。小鼠亦可接受經純化之EV與活細菌之組合以使腫瘤殺滅潛力達至最大。根據經批准之方案在不含特異性病原體之條件下圈養所有小鼠。每3至4天監測一次腫瘤尺寸、小鼠重量及體溫，且在B16-F10小鼠黑素瘤細胞注射之後6週或當原發腫瘤之體積達至1000 mm³時以人道方式處死小鼠。每週進行一次抽血且在方案結束時在無菌條件下進行完全屍檢。

【0300】 由於其產生黑色素，癌細胞可在小鼠B16-F10黑素瘤模型中輕易觀測到。根據標準方案，收集來自淋巴結之組織樣本及來自頸部及胸部區域之器官，且使用以下分類規則分析微型轉移瘤及大型轉移瘤之存在。若每個淋巴結或器官發現至少兩種微型轉移病變及一個大型轉移病變，則器官歸類為對於癌轉移呈陽性。根據熟習此項技術者已知的標準方案，藉由用蘇木精-伊紅對經石蠟包埋之淋巴組織切片進行染色來偵測微型轉移瘤。轉移瘤之總數目係與原發腫瘤之體積相關，且發現，腫瘤體積與腫瘤生長時間及淋巴結及內臟器官中之大型及微型轉移瘤之數目以及所有觀測到之轉移瘤之總和明顯相關。如先前所述鑑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, Clin. Exp. Metastasis, 2004;21(8):705-8)。

【0301】 針對腫瘤浸潤性淋巴細胞進一步分析腫瘤組織樣本。可藉由FACS (參見實例17)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, J. Mol. Recognit., 2007年1月至2月;20(1):32-8)。可使用定製p/MHC II類微陣列分析CD4+ T細胞。

【0302】 亦用多發性肺黑素瘤轉移瘤之小鼠模型進行相同實驗。小鼠黑素瘤細胞株B16-BL6係由ATCC獲得且如上文所述活體外培養細胞。將雌性C57BL/6小鼠用於此實驗。小鼠為6至8週齡且體重呈大約16至20 g。對於腫瘤罹患，將100 μ l之2E6個細胞/毫升之B16-BL6細胞懸浮液注射至各小鼠之尾部靜脈處。在肺中結束IV注射之後，移植腫瘤細胞。

【0303】 9天之後以人道方式殺死小鼠。對肺進行稱重且針對肺表面上存在肺結節進行分析。用費克特溶液(Fekete's solution)漂白經提取之肺，儘管結節之一小部分為無黑色素性的(亦即白色)，但由於B16細胞中之黑色素，該溶液並未漂白腫瘤結節。對腫瘤結節之數目進行仔細計數以測定小鼠中之腫瘤負荷。典型地，在對照組小鼠(亦即PBS管飼)之肺上發現200至250個肺結節。

【0304】 計算三個處理組之腫瘤負荷百分比。此量度界定為屬於治療組的小鼠之肺表面上的肺結節之平均數目除以對照組小鼠之肺表面上的肺結節之平均數目。

【0305】 用¹H-NMR測定代謝含量

【0306】 在細菌調節之後且在腫瘤生長之後使用 Sartorius Centrisart I過濾器(截止值10 kDa)使培養基及廢培養基樣本之三個生物複份去蛋白化。在使用之前，藉由水之離心洗滌過濾器兩次以移除甘油，且將小體積(20 µl)之20.2 mM三甲基矽烷基-2,2,3,3-四氫丙酸(TSP，鈉鹽)之D₂O溶液添加至700 µl超濾液中，提供化學位移參考(0.00 ppm)及氣鎖信號。650 µl樣本置放於5 mm NMR管中。在Bruker DMX-500光譜儀或如先前所述(Engelke等人 2006 NMR spectroscopic studies on the late onset form of 3-methylglutaconic aciduria type I and other defects in leucine metabolism NMR Biomed. 19: 271-278)之類似儀器上獲得單一脈衝¹H-NMR光譜(500 MHz)。手動校正相與基線。針對TSP按比例調整所有光譜且用洛倫茲線型(Lorentzian line shape)以半自動方式擬合代謝物信號。相對於標準培養基中之已知濃度計算廢培養基中之代謝物濃度且相應地以單位mM表示。由對應1.04 ppm下的纈胺酸二重峰之面積或合適標

準物的峰之面積計算特定代謝物之濃度。

【0307】 用LCMS測定代謝含量

【0308】 使用液相層析技術與質譜之組合確定樣本之代謝含量。存在多種技術來確定不同樣本之代謝體學含量且該等技術為熟習此項技術者已知的，其涉及溶劑萃取、層析分離及與質量測定結合之多種離子化技術 (Roberts等人 2012 Targeted Metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 30: 1-24 ; Dettmer等人 2007, Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev. 26(1):51-78)。作為非限制性實例，LC-MS系統包括與110 Series 泵 (Agilent) 及 HTS PAL 自動取樣器 (Leap Technologies) 組合之 04000 QTRAP 三重四極質譜儀 (AB SCIEX)。使用含有穩定的同位素標記之內標物 (纈胺酸-d8，Isotec；及苯丙胺酸-d8，Cambridge Isotope Laboratories) 的九倍體積之 74.9:24.9:0.2 (v/v/v) 乙腈/甲醇/甲酸萃取培養基樣本或其他複合代謝混合物 (約 10 μ L)。可視相關代謝物而調整或調節標準物。對樣本進行離心 (10分鐘，9,000 g，4°C)，且藉由將溶液注入至 HILIC 管柱 (150 $\times$ 2.1 mm，3 μ m 粒度) 上來對上清液 (10 μ L) 進行 LCMS。藉由以 250 μ L/min 之速率流動持續 1 分鐘，之後經由 10 分鐘利用一定線性梯度來使 5% 流動相 [10 mM 甲酸銨、0.1% 甲酸水溶液] 流至 40% 流動相 [乙腈及 0.1% 甲酸] 之溶液來溶離管柱。離子噴霧電壓設定成 4.5 kV 且源溫度為 450°C。

【0309】 使用可在市面上購得之軟體，諸如來自 AB SCIEX 之 Multiquant 1.2 來分析資料以用於質譜峰值積分。手繪相關峰且與標準物進行比較以確認峰之一致性。細菌調節之後及腫瘤細胞生長之後，利用合適標準物進行定量以測定初始培養基中存在的代謝物之量。

【0310】經由本文所述之LCMS技術對腫瘤生物檢體及血液樣本進行代謝分析。測試組之間不用水準之胺基酸、糖、乳酸以及其他代謝物證明微生物組合物中斷腫瘤代謝狀態之能力。

【0311】 *測定作用機制之RNA定序*

【0312】如實例12中所述自腫瘤、派氏集合淋巴結及腸系膜淋巴結純化樹突狀細胞。根據熟習此項技術者已知的標準技術(Z. Hou. Scientific Reports. 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015))進行且分析RNA定序。在分析中，注意力側重在先天性發炎路徑基因(包括TLR、CLR、NLR及STING)、細胞介素、趨化因子、抗原加工及表現路徑、交叉呈現及T細胞共刺激。

實例15：活體外投與具有經增強之免疫活化的EV以與PD-1或PD-L1抑制組合治療同基因型小鼠腫瘤模型

【0313】為了測定EV在同基因型腫瘤小鼠模型中之功效，使用結腸直腸癌(CT-26)或其他癌症模型。簡言之，在37°C下在含5% CO₂之空氣氛圍中在補充有10%熱不活化胎牛血清之RPMI-1640或DMEM中以單層形式活體外培養CT-26 (目錄號CRL-2638)腫瘤細胞。收集指數生長之細胞且在腫瘤接種之前進行計數。將6至8週齡雌性BALB/c小鼠用於此實驗。對於腫瘤罹患，在一個或兩個背側腹處用於0.1 ml 1× PBS中之5×10⁵個CT-26腫瘤細胞對各小鼠進行皮下注射。一些小鼠可接受抗生素預處理。每週至少三次在非連續日監測腫瘤尺寸及小鼠重量。

【0314】針對小鼠腫瘤模型中單獨或與完整細菌細胞組合之EV且在存在或不存在抗PD-1或抗PD-L1下之功效對其進行測試。在不同時間點且以不同劑量投與EV、細菌細胞及/或抗PD-1或抗PD-L1。舉例而言，在腫

瘤注射之後第10天或腫瘤體積達至100 mm³之後，用單獨或與抗PD-1或抗PD-L1組合之EV處理小鼠。

【0315】 舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 µg之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑注射。一些小鼠組亦用有效劑量之檢查點抑制劑注射。舉例而言，小鼠接受於100 µl PBS中之100 µg 抗PD-L1 mAB (純系10f.9g2, BioXCell)或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB，且一些小鼠接受媒劑及/或其他合適對照(例如，對照抗體)。在初始注射之後3、6及9天用mAB注射小鼠。為了評定檢查點抑制及EV免疫療法是否具有附加的抗腫瘤作用，將接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB之對照小鼠包括至標準對照小組。評定主要(腫瘤尺寸)及次要(腫瘤浸潤性淋巴細胞及細胞介素分析)終點，且用後續腫瘤細胞接種對一些小鼠組進行再攻擊以評定處理對記憶反應之作用。

實例16：實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)之小鼠模型中之EV

【0316】 EAE為已充分研究的多發性硬化之動物模型，如

Constantinescu等人(Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). Br J Pharmacol. 2011年10月; 164(4): 1079-1106)所綜述。可在多種小鼠及大鼠菌株中使用不同髓鞘相關肽，藉由活化引起腦炎之T細胞之授受性轉移或使用易患EAE之TCR轉殖基因小鼠來誘導EAE，如Mangalam等人 (Two discreet subsets of CD8+ T cells modulate PLP₉₁₋₁₁₀ induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. J Autoimmun. 2012年6月; 38(4): 344-353) 中所論述。

【0317】 單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入其他消炎處理下測試EV在EAE之嚙齒動物模型中之功效。舉例而言，由Taconic (紐約州日耳曼敦)獲得雌性6至8週齡C57BL/6小鼠。在背部上的兩個部位處(上部及下部)向小鼠組投與兩個0.1 ml髓鞘少樹突神經膠細胞糖蛋白35-55 (MOG35-55；每個注射液100 µg；每隻小鼠200 µg (每隻小鼠總0.2 ml)，乳化於完全弗氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant；CFA；每毫升乳液2至5 mg殺滅結核分枝桿菌H37Ra)皮下(s.c.)注射液。在上述之後大約1至2小時，用於0.1 ml PBS中之200 ng百日咳毒素(PTx) (2 µg/ml)腹膜內(i.p.)注射小鼠。在第2天投與額外PTx之IP注射液。可替代地，使用適量之替代髓鞘肽(例如，蛋白脂質蛋白(PLP))來誘導EAE。一些動物充當未經處理之對照。評定EAE嚴重程度且根據此項技術中已知的方法(Mangalam等人 2012)自第4天開始每日指配失能評分。

【0318】 在一些時間點，接近免疫接種時間或EAE免疫接種之後開始用EV處理。舉例而言，可與免疫接種同時(第1天)投與EV，或可在第一次出現失能體徵(例如，尾部疲軟)後或在嚴重EAE期間投與EV。以不同

劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μg 之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg 之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0319】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射、皮下(s.c.)注射或經鼻途徑投藥。

【0320】 一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外消炎劑或EAE治療劑(例如，抗CD154、TNF家族之成員之阻斷、維生素D或其他處理)及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。

【0321】 此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。

【0322】 在不同時間點，處死小鼠且可使用此項技術中已知的方法移除發炎部位(例如，腦及脊髓)、淋巴結或其他組織以用於離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。舉例而言，根據製造商之說明書使用解離酶來分離組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉

由流動式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+中樞神經系統(CNS)浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。

【0323】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可用疾病觸發劑(例如，經活化之引起腦炎之T細胞或EAE誘導肽之再注射液)來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死。再攻擊之後，分析小鼠之疾病易感性及EAE嚴重程度。

實例17：膠原蛋白誘導之關節炎(CIA)之小鼠模型中之EV

【0324】 膠原蛋白誘導之關節炎(CIA)為研究類風濕性關節炎(RA)常用之動物模型，如Caplazi等人(Mouse models of rheumatoid arthritis. Veterinary Pathology. 2015年9月1日. 52(5): 819-826)所述(亦參見Brand等人 Collagen-induced arthritis. Nature Protocols. 2007. 2: 1269-1275；Pietrosimone 等人 Collagen-induced arthritis: a model for murine

autoimmune arthritis. *Bio Protoc.* 2015年10月20日; 5(20): e1626)。

【0325】 在CIA齧齒動物模型之其他形式中，一種模型涉及用雞II型膠原蛋白對HLA-DQ8 Tg小鼠進行免疫接種，如Taneja等人所述(*J. Immunology*. 2007. 56: 69-78；亦參見Taneja等人 *J. Immunology* 2008. 181: 2869-2877；及Taneja 等人 *Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78)。雞CII之純化已由Taneja等人描述(*Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78)。免疫接種之後針對CIA疾病發作及進展監測小鼠，且對疾病之嚴重程度進行評估及「分級」，如Wooley, J. *Exp. Med.* 1981. 154: 688-700所述。

【0326】 針對CIA誘導對小鼠進行免疫接種且分成不同處理組。單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入其他消炎處理下測試EV在CIA中之功效。

【0327】 在接近用膠原蛋白免疫接種之時間或免疫接種後開始用EV處理。舉例而言，在一些組中，可與免疫接種同時(第1天)投與EV，或可在第一次出現疾病體徵後或在嚴重症狀出現後投與EV。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。

【0328】 舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μ g之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠組可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0329】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射、皮下(s.c.)注射、皮內(i.d.)注射或經鼻途徑投藥。

【0330】 一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外消炎劑或CIA治療劑(例如，抗CD154、TNF家族之成員之阻斷、維生素D或其他處理)及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。

【0331】 此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。

【0332】 在不同時間點，獲得血清樣本以使用標準ELISA評定抗雞及抗小鼠CII IgG抗體之水準(Batsalova等人 Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains. Arthritis Res Ther. 2012. 14(6): R237)。此外，處死一些小鼠且可使用此項技術中已知的方法移除發炎部位(例如滑膜)、淋巴結或其他組織以用於離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。使用此項技術中已知的技術針對漿細胞浸潤及抗體之存在分析滑膜及滑液。此外，根據製造商之說明書使用解離酶來分離組織以檢查細胞浸潤物之概況。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流動式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記

CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+滑膜浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。

【0333】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可用疾病觸發劑(例如，經活化之具有EAE誘導肽之再注射液)來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死。再攻擊之後，分析小鼠之疾病易感性及CIA嚴重程度。

實例18：結腸炎之小鼠模型中之EV

【0334】 葡聚糖硫酸鈉(DSS)誘導之結腸炎為已充分研究的結腸炎之動物模型，如Randhawa等人綜述(A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. Korean J Physiol Pharmacol. 2014. 18(4): 279-288；亦參見Chassaing等人 Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 2014年2月4日; 104: 單元15.25)。

【0335】 單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入其他消炎劑下測試EV在DSS誘導之結腸炎之小鼠模型中之功效。

【0336】 如此項技術中已知用DSS處理小鼠組以誘導結腸炎

(Randhawa 等人 2014 ; Chassaing 等人 2014 ; 亦參見 Kim 等人 Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. J Vis Exp. 2012. 60: 3678)。舉例而言，由Charles River Labs、Taconic或其他供應商獲得雄性6至8週齡C57BL/6小鼠。藉由將3% DSS (MP Biomedicals，登錄號0260110)添加至飲用水中來誘導結腸炎。一些小鼠不接受飲用水中之DSS且充當未經處理之對照。一些小鼠接受水持續五(5)天。一些小鼠可接受DSS持續較短持續時間或長於五(5)天。監測小鼠且使用此項技術中已知的失能活動指數基於以下對其進行評分：體重減輕(例如，體重未減輕(0分)；體重減輕1至5% (1分)；體重減輕5至10% (2分))；大便堅實度(例如，正常(0分)；軟便(2分)；腹瀉(4分))；及出血(例如，無血(0分)；潛血檢測試紙陽性(1分)；潛血檢測試紙陽性及可見集結粒出血(2分)；肛門周圍有血、大出血(4分))。

【0337】 在一些時間點，DSS投藥之第1天或有時在其後開始用EV處理。舉例而言，可與開始DSS同時(第1天)投與EV，或可在第一次出現疾病體徵(例如，體重減輕或腹瀉)後或在嚴重結腸炎期期間投與EV。針對重量、罹病率、存活期、腹瀉及/或血便之存在對小鼠進行每日觀測。

【0338】 以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μ g之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或

經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0339】舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑投藥。

【0340】一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外消炎劑(例如，抗CD154、TNF家族之成員之阻斷或其他處理)及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。

【0341】此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些小鼠在預先不接受抗生素之情況下接受DSS。

【0342】在不同時間點，使用小型動物內窺鏡(德國Karl Storz Endoskope)使小鼠在異氟醚麻醉下經歷視訊內窺鏡檢查。記錄靜止影像及視訊以評估結腸炎程度及對處理之反應。使用此項技術中已知的標準對結腸炎進行評分。收集排泄物用於研究。

【0343】在不同時間點，處死小鼠且收集結腸、小腸、脾臟及淋巴結(例如，腸系膜淋巴結)。另外，將血液收集於血清分離試管中。經由評估(但不限於)隱窩架構、炎性細胞浸潤程度及杯狀細胞消滅之組織學研究來評定組織損傷。

【0344】可使用此項技術中已知的方法移除胃腸道(GI)、淋巴結及/或其他組織以用於離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。舉

例而言，收集組織且可根據製造商說明書使用解離酶分離組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流動式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、Tbet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+胃腸道浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。

【0345】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可用疾病觸發劑來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死。再攻擊之後，分析小鼠之結腸炎易感性、嚴重程度。

實例19：遲發型過敏(DTH)之小鼠模型中之組織普雷沃菌菌株A及/或EV

【0346】 遲發型過敏(DTH)為異位性皮膚炎(或過敏性接觸性皮膚炎)之動物模式，如Petersen等人綜述(In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. Basic & Clinical Pharm & Toxicology. 2006. 99(2): 104-115；亦參見Irving C. Allen (編) Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols,

Methods in Molecular Biology, 2013. 第1031卷, DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13)。可在多種小鼠及大鼠菌株中使用不同半抗原或抗原，例如用完全弗氏佐劑(CFA)或其他佐劑乳化之抗原來誘導DTH。DTH的特徵在於敏感以及抗原特異性T細胞介導之反應，其引起紅斑、水腫及細胞浸潤，尤其抗原呈現細胞(APC)、嗜伊紅血球、活化CD4+ T細胞及細胞介素表現之Th2細胞之浸潤。

【0347】 通常，用在佐劑(例如，完全弗氏佐劑)之情形下投與之抗原對小鼠進行預致敏以便誘導繼發性(或記憶)免疫反應，其係藉由腫脹及抗原特異性抗體力價量測。

【0348】 單獨或以組合形式，在伴隨或不伴隨加入其他消炎處理下測試組織普雷沃菌菌株A及/或EV在DTH之小鼠模型中之功效。舉例而言，由Taconic (紐約州日耳曼敦)或其他供應商獲得6至8週齡C57BL/6小鼠。在背部上的四個部位處(上部及下部)以有效劑量(每個部位50 μ l總體積)向小鼠組投與四個抗原(例如匙孔螺血氫蛋白(KLH)或卵白蛋白(OVA))之皮下(s.c.)注射液。對於DTH反應，可使用此項技術中已知的方法皮內(i.d.)注射於動物耳部中。一些小鼠充當對照動物。可在第8天在左耳中以每隻耳10 μ l (媒劑對照(0.01% DMSO之生理鹽水溶液)且在右耳中用抗原(大約21.2 μ g (12 nmol))攻擊一些小鼠組。為了量測耳部發炎，可使用Mitutoyo測微計來量測人工受約束之動物的耳部厚度。可在皮內攻擊之前量測耳部厚度作為各獨立動物之基線水準。隨後，可在皮內攻擊之後大約24小時及48小時(亦即第9天及第10天)量測耳部厚度兩次。皮質類固醇、地塞米松可用於陽性對照。

【0349】 在一些時間點，接近預致敏之時間或接近DTH攻擊之時間

開始用EV處理。舉例而言，可與皮下注射同時(第0天)投與EV，或可在皮內注射之前或之後投與EV。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μg 之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg 之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼、局部投藥、皮內(i.d.)注射或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第0天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0350】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼靜脈內注射、腹膜內注射、皮內注射、局部投藥或經鼻途徑投藥。

【0351】 在沿背部之4個位置處用KLH及CFA (每隻小鼠50 μg KLH與每個部位50 μl 總體積之CFA以1:1比率製備)皮內注射小鼠。如下投配小鼠9天；1)口服厭氧PBS (媒劑)；2)口服10 mg 組織普雷沃菌菌株A；3)口服100 μg 組織普雷沃菌菌株A衍生之EV；4)腹膜內投與PBS；5)腹膜內投與地塞米松(陽性對照)及6)腹膜內投與10 μg 菌株A衍生之EV。對於EV，使用根據製造商說明書進行的Bio-rad分析(目錄號5000205)來量測總蛋白。在用10 μg KLH (10 μl 體積)攻擊後24及48小時，口服組及腹膜內投藥組兩者中接受菌株A (活細胞)或菌株A衍生之EV之組展現出比媒劑組要少的發炎(圖1A及圖1B)。觀測到以10 μg 、3 μg 、1 μg 及0.1 μg 腹膜內注射

菌株A衍生之EV之後的劑量依賴性DTH反應會在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中抗原攻擊之後48小時，降低抗原特異性耳部腫脹(耳部厚度)(圖1C)。

【0352】 在沿背部之4個位置處用KLH及CFA (每隻小鼠50 μ g KLH與每個部位50 μ l總體積之CFA以1:1比率製備)皮內注射小鼠。如下投配小鼠9天；1)口服厭氧PBS (媒劑)；2)口服10 mg組織普雷沃菌菌株A；3)口服 1×10^9 CFU組織普雷沃菌菌株A生質；4)口服 2.09×10^8 CFU米拉諾普雷沃菌菌株A生質；5)口服100 μ g組織普雷沃菌菌株A衍生之EV；6)口服100 μ g米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV；及7)腹膜內投與地塞米松(陽性對照)。對於EV，使用根據製造商說明書進行的Bio-rad分析(目錄號5000205)來量測總蛋白。在用10 μ g KLH (10 μ l體積)攻擊後24及48小時，接受組織普雷沃菌菌株A (活細胞)或組織普雷沃菌菌株A衍生之EV之組展現出比媒劑組要少的發炎(圖6A及圖6B)。在用10 μ g KLH (10 μ l體積)攻擊後24及48小時，接受米拉諾普雷沃菌菌株A衍生之EV之組展現出比媒劑組及接受米拉諾普雷沃菌菌株A (活細胞)之組要少的發炎(圖6A及圖6B)。

【0353】 在其他實驗中，一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用消炎劑(例如，抗CD154、TNF家族之成員之阻斷或其他處理)及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。此外，在處理之前可用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。

【0354】 在不同時間點獲得血清樣本。處死其他小鼠組且可使用此項技術中已知的方法移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結(MLN)、小腸、結腸及其他組織其他組織以用於組織學研究、離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。在O₂/CO₂麻醉下自眼血管叢對一些小鼠進行放血且進行ELISA分析。

【0355】 可根據製造商之說明書使用解離酶來分離組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流動式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、Tbet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。

【0356】 如上文所述對小鼠進行預致敏及攻擊，且在48小時量測耳部腫脹之後，處死小鼠。

【0357】 自處死後之動物移除耳部，且置放於低溫EDTA-游離蛋白酶抑制劑混合液(Roche)中。使用珠粒破碎均質化耳部，且根據製造商說

明書藉由Luminex套組(EMD Millipore)針對IL-1 β 分析上清液。用10 μ g組織普雷沃菌EV處理(腹膜內)之小鼠顯示出與地塞米松組(陽性對照)中看到之IL-1 β 水準相當的IL-1 β 水準(圖1D)。菌株A衍生之組織普雷沃菌EV能夠遏制促炎性細胞介素。

【0358】 此外，經由細胞過濾器分離頸椎淋巴結，洗滌且使用此項技術中已知的方法進行FoxP3 (PE-FJK-16s)及CD25 (FITC-PC61.5)染色(圖1E)。用10 μ g組織普雷沃菌EV處理(腹膜內)之小鼠顯示出頸椎淋巴結中之調節T細胞相對於未經處理之小鼠(陰性對照)增加，且與地塞米松組(陽性對照)相當。菌株A衍生之組織普雷沃菌EV能夠誘導經攻擊之小鼠之引流淋巴結中之調節T細胞。

【0359】 為了檢查DTH保護之影響及長久性，可用攻擊抗原來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死。在不同時間點針對DTH易感性及反應嚴重程度對小鼠進行分析。

實例20：1型糖尿病(T1D)之小鼠模型中之EV

【0360】 1型糖尿病(T1D)為其中免疫系統靶向胰臟之胰島，由此破壞人體製造胰島素之能力的自體免疫疾病。

【0361】 存在T1D之動物模型之不同模型，如Belle等人綜述(Mouse models for type 1 diabetes. Drug Discov Today Dis Models. 2009; 6(2): 41-45；亦參見Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012年6月; 166(3): 877-894)。存在化學誘導之T1D、病原體誘導之T1D的模型以及其中小鼠自發罹患T1D之模型。

【0362】 單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入其他消

炎治療下測試EV在T1D之小鼠模型中之功效。

【0363】 取決於T1D誘導方法及/或罹患T1D是否為自發的，在一些時間點，接近誘導時間或誘導之後或自發出現之T1D出現之前(或出現後)開始用EV處理。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μ g之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0364】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑投藥。

【0365】 一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外處理及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。

【0366】 此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。

【0367】 實驗開始之前每兩週監測血糖一次。在其後不同時間點量測非空腹血糖。在不同時間點，處死小鼠且可使用此項技術中已知的方法

移除部位胰臟、淋巴結或其他組織以用於離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。舉例而言，根據製造商之說明書使用解離酶來分離組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流動式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化組織浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。亦可藉由ELISA評定抗體產生。

【0368】為了檢查疾病保護之影響及長久性，可用疾病觸發劑來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死，或評定復發易感性。分析再攻擊(或自發出現之復發)之後小鼠之糖尿病發病易感性及嚴重程度。

實例21：原發性硬化性膽管炎(PSC)之小鼠模型中之EV

【0369】原發性硬化性膽管炎(PSC)為緩慢破壞膽管且導致末期肝硬化之慢性肝病。其與發炎性腸病(IBD)相關。

【0370】存在不同PSC動物模型，如Fickert等人綜述(Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis

(PSC). J Hepatol. 2014年6月. 60(6): 1290-1303 ; 亦參見Pollheimer及Fickert. Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2015年6月 48(2-3): 207-17) 。PSC模型中之疾病之誘導包括化學誘導(例如，3,5-二乙氧羰基-1,4-二氫可力丁(3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine ; DDC)誘導之膽管炎)、病原體誘導(例如，小球隱孢子蟲)、實驗性膽道阻塞(例如，總膽管結紮(CBDL))及抗原驅動膽道損傷之基因轉殖小鼠模型(例如，Ova-Bil轉殖基因小鼠)。舉例而言，如Georgiev等人所述進行膽管結紮(Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg. 2008. 95(5): 646-56)，或如Fickert等人所述，經DCC暴露誘導疾病(A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. Am J Path. 第171卷(2): 525-536)。

【0371】 單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入一些其他治療劑下測試EV在PSC之小鼠模型中之功效。

DCC誘導之膽管炎

【0372】 舉例而言，由Taconic或其他供應商獲得6至8週齡C57bl/6小鼠。向小鼠餵食經0.1% DCC補充之飲食持續不同持續時間。一些組接受DCC補充食物持續1週，其他一些持續4週，其他一些持續8週。一些小鼠組可接受DCC補充飲食持續一定時長，且隨後使其恢復，其後接受正常飲食。可研究此等小鼠自疾病恢復之能力及/或其後續暴露於DCC後的復發之易感性。在一些時間點，接近DCC進給之時間或在初始暴露於DCC之後開始用EV處理。舉例而言，可在第1天投與EV或可有時在其後投與EV。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、

20或15 μg 之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50、100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑投藥。一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外藥劑及/或合適對照(例如，媒劑或抗體)處理。

【0373】 此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。在不同時間點，針對ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸(BA)水準分析血清樣本。

【0374】 在不同時間點，處死小鼠，記錄體重及肝臟重量，且可使用此項技術中已知的方法移除發炎部位(例如，肝臟、小腸及大腸、脾臟)、淋巴結或其他組織以用於離體組織形態學表徵、細胞介素及/或流動式細胞量測分析(參見Fickert等人 Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). J Hepatol. 2014. 60(6): 1290-1303)。舉例而言，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1之表現對膽管

進行染色。將一些組織染色以用於組織學檢查，而根據製造商說明書使用解離酶分離其他組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)以及黏附分子表現(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+膽管浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。

【0375】 肝臟組織製備用於例如使用天狼星紅(Sirius-red)染色，之後對纖維化區域定量來進行組織學分析。在處理結束時，收集血液以用於進行肝酶，例如AST或ALT之血漿分析，且測定膽紅素水準。可使用現有方案量測肝羥脯胺酸含量。可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子來進行發炎及纖維化標記之肝基因表現分析。此等標記可包括(但不限於)MCP-1、 α -SMA、Coll1a1及TIMP-。可使用現有代謝體學方法在血漿、組織及糞便樣本中進行代謝物量測。最後，對肝臟切片進行免疫組織化學以量測嗜中性白血球、T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0376】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可在稍後的時間用

DCC來再攻擊一些小鼠，而不是將其處死。再攻擊之後，分析小鼠之膽管炎易感性及膽管炎嚴重程度。

BDL誘導之膽管炎

【0377】可替代地，測試EV在BDL誘導之膽管炎中之功效。舉例而言，由Taconic或其他供應商獲得6至8週齡C57BL/6J小鼠。環境適應期之後，對小鼠進行外科手術以實施膽管結紮(BDL)。一些對照動物接受假手術。BDL手術在7至21天內引起肝臟損傷、發炎及纖維化。

【0378】在一些時間點，接近手術時間或手術之後一定時間開始用EV處理。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μg 之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑投藥。一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外藥劑及/或合適對照(例如，媒劑或抗體)處理。

【0379】此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B

(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。在不同時間點，針對ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸(BA)水準分析血清樣本。

【0380】 在不同時間點，處死小鼠，記錄體重及肝臟重量，且可使用此項技術中已知的方法移除發炎部位(例如，肝臟、小腸及大腸、脾臟)、淋巴結或其他組織以用於離體組織形態學表徵、細胞介素及/或流動式細胞量測分析(參見Fickert等人 Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). J Hepatol. 2014. 60(6): 1290-1303)。舉例而言，針對ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1之表現對膽管進行染色。將一些組織染色以用於組織學檢查，而根據製造商說明書使用解離酶分離其他組織。使用此項技術中已知的技術，對細胞進行染色以藉由流式細胞量測術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)以及黏附分子表現(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(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。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+膽管浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。

【0381】 肝臟組織製備用於例如使用天狼星紅染色，之後對纖維化區域定量來進行組織學分析。在處理結束時，收集血液以用於進行肝酶，例如AST或ALT之血漿分析，且測定膽紅素水準。可使用現有方案量測肝經脯胺酸含量。可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子來進行發炎及纖維化標記之肝基因表現分析。此等標記可包括(但不限於)MCP-1、 α -SMA、Coll1a1及TIMP-。可使用現有代謝體學方法在血漿、組織及糞便樣本中進行代謝物量測。最後，對肝臟切片進行免疫組織化學以量測嗜中性白血球、T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0382】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可針對恢復率分析小鼠，而不是將其處死。

實例22：非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)之小鼠模型中之普雷沃菌及/或普雷沃菌EV

【0383】 非酒精性脂肪變性肝炎(NASH)為非酒精性脂肪肝病(NAFLD)之嚴重形式，其中肝脂肪堆積(脂肪變性)及發炎引起肝臟損傷及肝細胞發生細胞死亡(氣脹)。

【0384】 存在不同NASH動物模型，如Ibrahim等人綜述(Animal models of Nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. Dig Dis Sci. 2016年5月. 61(5): 1325-1336；亦參見Lau等人 Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances 2017年1月 241(1): 36-44)。

【0385】 單獨或彼此組合，以不同比例，在伴隨或不伴隨加入另一治療劑下測試組織普雷沃菌細菌細胞及組織普雷沃菌衍生之EV在NASH之小鼠模型中之功效。舉例而言，使由Charles River (法國)或其他供應商

獲得的8週齡C57BL/6J小鼠適應5天之時段，基於體重隨機分成10隻小鼠之組，且餵食甲硫胺酸膽鹼缺乏(MCD)飲食，例如來自Research Diets (美國)之A02082002B持續4週時段，在此期間，出現NASH特徵，包括脂肪變性、發炎、氣脹及纖維化。對照普通食物小鼠餵食以正常飲食，例如來自SDS Diets (英國)之RM1 (E) 801492。隨意提供對照普通食物、MCD飲食及水。

【0386】對於一些小鼠，在MCD飲食之第1天開始用冷凍、活組織普雷沃菌(B-50329)處理且持續28個連續日。經由每日經口管飼含有 1.47×10^9 個細菌細胞之100 μ l懸浮液向一些MCD飲食小鼠投與細菌細胞。對照普通食物及一些MCD飲食小鼠保持未處理，同時經由每日經口管飼向一些MCD飲食小鼠每日投與媒劑溶液持續28天。以30 mg/kg之劑量，經由每日經口管飼向一些MCD飲食小鼠投與參考化合物及FXR促效劑、奧貝膽酸(OCA；陽性對照)持續28天。在處理結束(第28天)時，處死小鼠且使用此項技術中已知的方法移除肝臟、小腸、腔內含物、血液及糞便以用於離體組織學、生物化學、分子或細胞介素及/或流式細胞量測術分析。舉例而言，將0.5 cm³肝臟樣本儲存在福馬林中24小時，且隨後在4℃下儲存在乙醇中，之後進行蘇木精/伊紅(H&E)及天狼星紅染色，且測定NASH活動度評分(NAS)。在Histalim (法國蒙彼利埃(Montpellier))以盲法方式進行組織學分析及評分。使用NanoZoomer對含有H&E或天狼星紅染色的一個肝葉切片之載片進行數位化且使用NDP檢視器觀測，兩種儀器均來自Hamamatsu (日本)。對各切片進行獨立地評估及評分。使用根據Kleiner等人(Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 2005年6月. 41(6): 1313-

1321)調適之NAS評分系統來測定脂肪變性(0至3分)、小葉發炎(0至3分)、肝細胞氣脹(0至3分)及纖維化(0至4分)之程度。藉由對脂肪變性、發炎、氣脹及纖維化之評分求和來單獨小鼠NAS評分(0至13分)。此外，使用來自Horiba (美國)之Pentra 400儀器，根據製造商說明書測定血漿AST及ALT之水準。亦使用此項技術中已知的方法測定肝總膽固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙胺酸轉胺酶及天冬胺酸轉胺酶之水準。

【0387】 與媒劑及未處理組(陰性對照)相比，在接受MCD (經NASH誘導)飲食之小鼠中，口服投與組織普雷沃菌有效降低NAS評分(圖2)。組織普雷沃菌減少脂肪變性(圖3A)、發炎(圖3B)及氣脹(圖3D)以及肝總膽固醇(圖4)。在經處理之小鼠中，組織普雷沃菌亦降低纖維化評分(圖5A及圖5B)。

【0388】 圖7A顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對餵食MCD飲食之小鼠中的肝游離脂肪酸之影響，圖7B顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對餵食MCD飲食之小鼠中的肝總膽固醇之影響，圖7C顯示組織普雷沃菌菌株B-50329對餵食MCD飲食之小鼠中的肝三酸甘油酯之影響，圖7D顯示組織普雷沃菌及米拉諾普雷沃菌對餵食MCD飲食之小鼠中的丙胺酸轉胺酶之影響，圖7E顯示組織普雷沃菌及米拉諾普雷沃菌對餵食MCD飲食之小鼠中的天冬胺酸轉胺酶之影響。

【0389】 與媒劑及未處理組(陰性對照)相比，在接受MCD (經NASH誘導)飲食之小鼠中，口服投與組織普雷沃菌及米拉諾普雷沃菌有效降低NAS評分(圖8A及圖8B)。

【0390】 在其他研究中，可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子來進行發炎、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標記之肝基因表現分析。

此等標記可包括(但不限於)IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1、 α -SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。

【0391】 在其他研究中，在一些時間點，飲食開始時或飲食開始之後的一些時間點(例如之後一週)開始用EV處理。例如，可在與開始MCD飲食之同一天開始投與EV。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μ g之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第1天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0392】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射或經鼻途徑投藥。一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用額外NASH治療劑(例如FXR促效劑、PPAR促效劑、CCR2/5拮抗劑或其他處理)及/或合適對照處理。

【0393】 在不同時間點及/或處理結束時，處死小鼠且使用此項技術中已知的方法移除肝臟、腸、血液、糞便或其他組織以用於離體組織學、生物化學、分子或細胞介素及/或流式細胞量測術分析。舉例而言，對肝臟組織稱重且製備用於組織學分析，其可包含用H&E、天狼星紅染色及

測定NASH活動度評分(NAS)。在不同時間點，收集血液以使用標準分析進行肝酶，例如AST或ALT之血漿分析。此外，可使用現有方案量測膽固醇之肝含量、三酸甘油酯或脂肪酸。可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子進行發炎、纖維化、脂肪變性、ER應激或氧化應激標記之肝基因表現分析。此等標記可包括(但不限於) IL-6、MCP-1、 α -SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。可使用現有生物化學及基於質譜分析之代謝體學方法在血漿、組織及糞便樣本中進行代謝物量測。分析血清細胞介素，其包括(但不限於)TNF α 、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+膽管浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對肝臟或腸切片進行免疫組織化學以量測嗜中性白血球、T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0394】 為了檢查疾病保護之影響及長久性，可針對恢復率分析小鼠，而不是將其處死。

實例23：牛皮癬之小鼠模型中之EV

【0395】 牛皮癬為T細胞介導之慢性發炎性皮膚病。所謂的「斑塊型」牛皮癬為牛皮癬之最常見形式且典型特徵為乾鱗屑(dry scale)、紅斑及由於免疫細胞浸潤至真皮及表皮中導致之皮膚增厚。若干動物模型已促進對此疾病之理解，如Gudjonsson等人綜述(Mouse models of psoriasis. J Invest Derm. 2007. 127: 1292-1308；亦參見 van der Fits 等人 Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. J. Immunol. 2009年5月1日. 182(9): 5836-45)。

【0396】 可在多種小鼠模型，包括使用轉殖基因、基因剔除或異種移植模型以及局部施用咪喹莫特(imiquimod；IMQ)、TLR7/8配位體之模型中誘導牛皮癬。

【0397】 單獨或與完整細菌細胞組合，在伴隨或不伴隨加入其他消炎治療下測試EV在牛皮癬之小鼠模型中之功效。舉例而言，由Taconic (紐約州日耳曼敦)或其他供應商獲得6至8週齡C57Bl/6或Balb/c小鼠。對小鼠背部及右耳進行刮毛。使小鼠組接受62.5 mg之局部日劑量之可在市面上購得的IMQ乳膏(5%) (Aldara；3M Pharmaceuticals)。將劑量施加至刮毛區持續5或6個連續日。每隔一定間隔，針對紅斑、脫屑及增厚以0至4之分對小鼠進行評分，如van der Fits等人(2009)所述。使用Mitutoyo測微計監測小鼠耳部厚度。

【0398】 在一些時間點，接近第一次施用IMQ之時間或其後一定時間開始用EV處理。舉例而言，可與皮下注射同時(第0天)投與EV，或可在施用之前或之後投與EV。以不同劑量且以限定時間間隔投與EV。舉例而言，以每隻小鼠15、20或15 μ g之EV靜脈內注射一些小鼠。其他小鼠可接受每隻小鼠25、50或100 mg之EV。儘管一些小鼠經由靜脈內注射接受EV，但其他小鼠可經由腹膜內(i.p.)注射、經鼻途徑投藥、經口管飼、局部投藥、皮內(i.d.)注射、皮下(s.c.)注射或其他投藥手段接受EV。一些小鼠可每日(例如，自第0天開始)接受EV，而其他小鼠可以交替時間間隔(例如，隔日或每三天一次)接受EV。額外小鼠組可接受一定比率之細菌細胞與EV。細菌細胞可為活的、經殺滅的或經減毒的。細菌細胞可經新鮮(或冷凍)收集且投與，或其在投與之前可經照射或熱殺滅。

【0399】 舉例而言，一些小鼠組在與EV投藥分離或與其共混的投藥

中可接受在 1×10^4 與 5×10^9 個之間的細菌細胞。如同EV一樣，細菌細胞投藥可因給藥途徑、劑量及排程而有所改變。此可包括經口管飼、靜脈內注射、腹膜內注射、皮內注射、皮下注射、局部投藥或經鼻途徑投藥。

【0400】 一些小鼠組可在不同時間點且以有效劑量用消炎劑(例如，抗CD154、TNF家族之成員之阻斷或其他處理)及/或合適對照(例如，媒劑或對照抗體)處理。

【0401】 此外，在處理之前用抗生素處理一些小鼠。舉例而言，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B(0.2 g/L)添加至飲用水中，且在處理時或處理之前幾天停止抗生素處理。一些經免疫接種之小鼠在不接受抗生素之情況下進行處理。

【0402】 在不同時間點，自背部及耳部皮膚獲得樣本以用於使用此項技術中已知的方法進行冷凍切片染色分析。處死其他小鼠組且可使用此項技術中已知的方法移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結(MLN)、小腸、結腸及其他組織其他組織以用於組織學研究、離體組織學、細胞介素及/或流動式細胞量測分析。可根據製造商之說明書使用解離酶來分離一些組織。對冷凍切片樣本、組織樣本或離體獲得之細胞染色以用於使用此項技術中已知的技術進行流式細胞量測術。染色抗體可包括抗CD11c (樹突狀細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可經分析之其他標記包括泛免疫細胞標記CD45、T細胞標記(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/骨髓標記(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除了免疫表型分型之外，亦分析血清細胞介素，其包括(但不限於)TNFa、IL-17、IL-13、IL-

12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTE及MCP-1。可對由淋巴結或其他組織獲得的免疫細胞，及/或對離體獲得的純化CD45+皮膚浸潤免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對不同組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突狀細胞及檢查點分子蛋白質表現。

【0403】 為了檢查牛皮癬保護之影響及長久性，可研究一些小鼠以評定恢復率或可用IMQ再攻擊該等小鼠，而不是將其處死。針對牛皮癬易感性及反應之嚴重程度分析經再攻擊之小鼠組。

實例24：製造條件

【0404】 使用富集培養基來生長，且針對活體外及活體內用途製備細菌。舉例而言，培養基可含有糖、酵母提取物、植物類蛋白腴、緩衝劑、鹽、微量元素、界面活性劑、消泡劑及維生素。複合組分，諸如酵母提取物及蛋白腴之組合物可不限定或經部分限定(包括胺基酸、糖等之合適濃度)。微生物代謝可與資源，諸如碳及氮之利用率相關。可測試不同糖或其他碳源。可替代地，可如以下所示製備培養基且生長所選細菌：Saarela等人, J. Applied Microbiology. 2005. 99: 1330-1339，所述文獻以引用之方式併入本文中。醱酵時間、低溫保護劑及細胞之中和之影響集中於冷凍-乾燥存活、儲存穩定性，且在不含牛奶類成分的情況下產生所選細菌之酸及膽液暴露。

【0405】 在大規模下，培養基為無菌的。可藉由超高溫(UHT)處理來滅菌。在極高溫下進行UHT處理持續較短時段。UHT範圍可為135℃至180℃。舉例而言，培養基可在135℃下滅菌10至30秒。

【0406】 可在燒瓶中或在較小生物反應器中製備接種液，且監測生長。舉例而言，接種液大小可在總生物反應器體積之約0.5%與3%之間。視應用及材料之需求而定，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。

【0407】 在接種之前，製備具有在所需pH、溫度及氧濃度下之培養基的生物反應器。培養基之初始pH可與方法設定點不同。pH應激在低細胞濃度下可能為不利的；初始pH可在pH 7.5與方法設定點之間。舉例而言，pH可設定在4.5與8.0之間。在醱酵期間，可經由使用氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化銨來控制pH。溫度可控制在25℃至45℃，例如在37℃下。藉由將培養液中之氧水準自約8 mg/L降低至0 mg/L，來產生厭氧條件。舉例而言，可使用氮氣或氣體混合物(N₂、CO₂及H₂)，以建立厭氧條件。或者，不使用氣體，且藉由細胞消耗來自培養基之殘餘氧氣來建立厭氧條件。視菌株及接種液大小而定，生物反應器醱酵時間可有所變化。舉例而言，醱酵時間可在約5小時至48小時之間變化。

【0408】 使微生物自冷凍狀態恢復可能需要特殊考慮因素。生產培養基可在融化之後使細胞受激；可能需要特定融化培養基來不斷地自融化物質開始種子培養。出於增加種子體積或維持微生物生長狀態的目的的將種子物質轉移或傳遞至新製培養基之動力學可能會受微生物之當前狀態(指數生長、穩態生長、未應激、受應激)影響。

【0409】 製造醱酵器之接種可影響生長動力學及細胞活性。生物反應器系統之初始狀態必須經最佳化以促進成功及恆定製造。種子培養物相對於總培養基之分率(例如，百分比)對生長動力學具有顯著影響。範圍可為醱酵器工作體積之1%至5%。培養基之初始pH可與方法設定點不同。

pH應激在低細胞濃度下可能為不利的；初始pH可在pH 7.5與方法設定點之間。接種期間系統中之攪拌及氣流可與方法設定點不同。由兩種條件所致的物理及化學應激在低細胞濃度下可能為不利的。

【0410】 方法條件及控制設定可能會影響微生物生長之動力學及細胞活性。方法條件之變化可能會改變膜組成、代謝物之產量、生長速率、細胞應激等。生長之最佳溫度範圍可隨菌株而變化。範圍可為20℃至40℃。細胞生長之最佳pH及後續活動之效能可隨菌株變化。範圍可為pH 5至pH 8。溶解於培養基中之氣體可由細胞使用以供代謝。可能需要在整個方法中調整O₂、CO₂及N₂之濃度。營養物質之可利用率可改變細胞生長。當可使用過量營養物質時，微生物可具有替代性動力學。

【0411】 醱酵結束時及收集期間的微生物狀態可影響細胞存活及活性。可在收集之前即預處理微生物以針對參與分離及後續處理之物理及化學應激更好地製備其。溫度變化(通常降低至20℃至5℃)可降低細胞代謝、減緩生長(及/或死亡)及自醱酵器移除時之生理學變化。離心濃度之有效性可受培養pH影響。藉由提高pH 1至2個點可改良濃度之有效性但亦可能對細胞不利。可在收集之前即刻藉由增加培養基中之鹽及/或糖之濃度來使微生物受激。以此方式受激之細胞可較好地在後續期間經受住冷凍及凍乾。

【0412】 分離方法及技術可影響微生物與培養基高效分離之程度。可使用離心技術移除固體。離心濃度之有效性可能受培養pH或絮凝劑之使用影響。藉由提高pH 1至2個點可改良濃度之有效性但亦可能對細胞不利。可在收集之前即刻藉由增加培養基中之鹽及/或糖之濃度來使微生物受激。以此方式受激之細胞可較好地在後續期間經受住冷凍及凍乾。另

外，亦可經由過濾分離微生物。對於純化，若細胞需要過量的克數-分鐘數才能成功地離心，則過濾要優於離心技術。可在分離前後添加賦形劑。可添加賦形劑以用於低溫保護或用於在凍乾期間進行保護。賦形劑可包括(但不限於)蔗糖、海藻糖或乳糖，且可替代地，此等賦形劑可與緩衝劑及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將數滴與賦形劑混合之細胞集結粒浸沒在液氮中。

【0413】 可藉由連續離心來進行收集。可用各種賦形劑，將產物再懸浮至所需最終濃度。可添加賦形劑以用於低溫保護或用於在凍乾期間進行保護。賦形劑可包括(但不限於)蔗糖、海藻糖或乳糖，且或者此等可與緩衝液及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將數滴與賦形劑混合之細胞集結粒浸沒在液氮中。

【0414】 物質(包括活細菌)之凍乾，以初級乾燥開始。在初級乾燥階段期間，移除冰。此處，產生真空，且向物質供應適量熱以使冰昇華。在二級乾燥階段期間，移除結合水分子之產物。此處，使溫度升高高於初級乾燥階段，以破壞水分子與產物物質之間已形成的任何物理-化學相互作用。亦可降低壓力，以進一步增強此階段期間之解吸附。在完成冷凍乾燥過程之後，腔室可用惰性氣體(諸如氮氣)填充。可在乾燥條件下，將產物密封在冷凍乾燥器內，從而防止暴露於大氣水及污染物。

實例25：實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)之小鼠模型中之組織普雷沃菌

【0415】 如上文實例16中所論述，EAE為已充分研究的多發性硬化之動物模式。

【0416】 測試普雷沃菌粉末在EAE之齧齒動物模型中之功效。自Taconic (紐約州日耳曼敦)獲得雌性6-8週齡C57B1/6小鼠。在背部上的兩

個部位處(上部及下部)向小鼠組投與兩個0.1 ml髓鞘少樹突神經膠細胞糖蛋白35-55 (MOG35-55；每個注射液100 µg；每隻小鼠200 µg (每隻小鼠總0.2 ml)，乳化於完全弗氏佐劑(CFA；每毫升乳液2至5 mg殺滅結核分枝桿菌H37Ra)皮下(s.c.)注射液。在上述之後大約1至2小時，用於0.1 ml PBS中之200 ng百日咳毒素(PTx) (2 µg/ml)腹膜內(i.p.)注射小鼠。在第2天投與額外PTx之IP注射液。一些動物將充當未經處理之對照。評定EAE嚴重程度且根據表3中所示之評分表自第4天開始每日指配失能評分。

【0417】

表3：EAE評分表.

評分	描述
0	正常 ：當經尾部拎起時，尾部具有張力且為直立的。後腿通常伸展開。當小鼠行走時，不存在步態或頭部傾斜。
1	尾部疲軟 ：當經尾部拎起小鼠時，整個尾部懸在爪上方而不是直立的。
2	尾部疲軟且後腿無力 ：當經尾部拎起小鼠時，腿部未伸展開，但保持較靠近在一起。當在行走時觀測小鼠時，其行走明顯搖晃。可替代地，一隻腿可完全麻痺，而另一隻腿保持為移動的-小鼠將在行走時拖動麻痺腿部。
3	尾部疲軟且後腿完全麻痺(最常見) -或- 尾部疲軟，伴隨一隻前腿及一隻後腿麻痺 -或- 所有以下：頭部嚴重傾斜、僅沿籠邊緣行走、抵靠籠壁推移、當經尾部拎起時自旋。
4	尾部疲軟、後腿完全麻痺及部分前腿麻痺 ：小鼠圍繞籠最低限度地移動且呈現警覺且餵食。若連續2天觀測到4分，則將動物安樂死。若此發生，評分視為5。
5	後腿及前腿完全麻痺，沒有圍繞籠子之移動 -或- 小鼠在籠中自發地翻滾 -或- 發現小鼠死亡或瀕死 發現具有5分的存活小鼠將立即安樂死。

【0418】 經由經口管飼(PO)給予處理。用蔗糖媒劑/0.5% MC、組

織普雷沃菌/0.5% MC或潑尼龍投配經處理之動物。第1組中之動物充當未

經處理之對照。第2組中之動物充當未處理患病對照。第3組中之動物用蔗糖媒劑自第7天至第30天每2天投配一次且自第3天至第30天用0.5% MC每天投配一次。第4組中之動物用組織普雷沃菌粉末(10 mg)自第7天至第30天每2天投配一次且自第3天至第30天用0.5% MC每天投配一次。第5組中之動物用潑尼龍(1 mg/kg)自第0天至第30天每天投配一次。

【0419】 如圖9中所示，與對照處理相比，組織普雷沃菌在EAE模型中有效。

參考文獻之併入

【0420】 本文提及之所有公開案及專利申請案均以全文引用之方式併入本文中，如同各個別公開案或專利申請案特定地且獨立地以引用之方式併入本文中一般。在有衝突的情況下，以本申請案(包括本文中之任何定義)為準。

等效方案

【0421】 熟習此項技術者將認識到或能夠僅使用常規實驗確定本文所述的本發明之具體實施例之許多等效方案。此類等效方案意欲由以下申請專利範圍涵蓋。



201920652

【發明摘要】

【中文發明名稱】

源自普雷沃菌(PREVOTELLA)之胞外囊泡

【英文發明名稱】

EXTRACELLULAR VESICLES FROM PREVOTELLA

【中文】

本文提供與適用作治療劑之普雷沃菌EV相關的方法及組合物。

【英文】

Provided herein are methods and compositions related to Prevotella EVs useful as therapeutic agents.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種醫藥組合物，其包含經分離之普雷沃菌(*Prevotella*)細菌性胞外囊泡(EV)。

【第2項】

一種醫藥組合物，其包含普雷沃菌細菌性胞外囊泡(EV)及普雷沃菌。

【第3項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及普雷沃菌粒子之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌EV：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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第4項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及細菌粒子之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌：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%、30%、31%、32%、33%、34%、
35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、
46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、
57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、
68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、
79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、
90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第5項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及細菌粒子之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌EV蛋白：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%、30%、31%、32%、33%、34%、
35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、
46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、
57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、
68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、
79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、
90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第6項】

在一些實施例中，該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及普雷沃菌蛋白之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌蛋白：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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、
36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、
47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、
58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、
69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、
80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、
91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第7項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及細菌脂質之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌EV脂質：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%、30%、31%、32%、33%、34%、
35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、
46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、
57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、
68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、
79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、
90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第8項】

如請求項2之醫藥組合物，其中該醫藥組合物中總普雷沃菌EV及普

雷沃菌脂質之至少以下數量、約以下數量或不超過以下數量為普雷沃菌脂質：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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

【第9項】

一種醫藥組合物，其包含分離自EV之普雷沃菌。

【第10項】

如請求項1至9中任一項之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV及該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含一或多種表1中所列之蛋白質。

【第11項】

如請求項1至9中任一項之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV及該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第12項】

如請求項1至9中任一項之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV及該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含表1中所列之蛋白質中之一

或多者且不含或實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第13項】

如請求項2至12中任一項之醫藥組合物，其中該組合物包含活細菌、經殺滅細菌或經減毒細菌。

【第14項】

如請求項1至13中任一項之醫藥組合物，其中該等EV及/或細菌係來自：阿爾伯普雷沃菌(*Prevotella albensis*)、羊水普雷沃菌(*Prevotella amnii*)、卑爾根普雷沃菌(*Prevotella bergensis*)、二路普雷沃菌(*Prevotella bivia*)、短普雷沃菌(*Prevotella brevis*)、布氏普雷沃菌(*Prevotella bryantii*)、頰普雷沃菌(*Prevotella buccae*)、口頰普雷沃菌(*Prevotella buccalis*)、糞便普雷沃菌(*Prevotella copri*)、牙普雷沃菌(*Prevotella dentalis*)、棲牙普雷沃菌(*Prevotella denticola*)、解糖腺普雷沃菌(*Prevotella disiens*)、組織普雷沃菌(*Prevotella histicola*)、中間普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、小斑點普雷沃菌(*Prevotella maculosa*)、馬斯普雷沃菌(*Prevotella marshii*)、產黑普雷沃菌(*Prevotella melaninogenica*)、彩虹普雷沃菌(*Prevotella micans*)、多形普雷沃菌(*Prevotella multiformis*)、變黑普雷沃菌(*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃菌(*Prevotella oralis*)、口普雷沃菌(*Prevotella oris*)、齦炎普雷沃菌(*Prevotella oulorum*)、蒼白普雷沃菌(*Prevotella pallens*)、唾液普雷沃菌(*Prevotella salivae*)、斯特塞拉普雷沃菌(*Prevotella stercorea*)、坦納普雷沃菌(*Prevotella tannerae*)、蒂莫普雷沃菌(*Prevotella timonensis*)、空腸普雷沃菌(*Prevotella jejuni*)、橙色普雷沃菌(*Prevotella aurantiaca*)、保氏普雷沃菌(*Prevotella baroniae*)、著色普雷沃菌(*Prevotella*

colorans)、人體普雷沃菌(*Prevotella corporis*)、丹塔普雷沃菌(*Prevotella dentasini*)、棲居普雷沃菌(*Prevotella enoea*)、斐氏普雷沃菌(*Prevotella falsenii*)、深黑色普雷沃菌(*Prevotella fusca*)、解肝素普雷沃菌(*Prevotella heparinolytica*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、嗜糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)、南錫普雷沃菌(*Prevotella nanceiensis*)、稻普雷沃菌(*Prevotella oryzae*)、沼澤普雷沃菌(*Prevotella paludivivens*)、胸膜炎普雷沃菌(*Prevotella pleuritidis*)、棲瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*)、解糖普雷沃菌(*Prevotella saccharolytica*)、靶心普雷沃菌(*Prevotella scopos*)、賽赫普雷沃菌(*Prevotella shahii*)、動膠普雷沃菌(*Prevotella zoogloformans*)或真空腔普雷沃菌(*Prevotella veroralis*)。

【第15項】

如請求項2至14中任一項之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV及該等普雷沃菌係來自相同物種或菌株。

【第16項】

如請求項2至14中任一項之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV及該等普雷沃菌係來自不同物種或菌株。

【第17項】

如請求項14之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第18項】

如請求項14之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與該普

雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第19項】

如請求項14之醫藥組合物，其中該等普雷沃菌EV係來自普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。

【第20項】

如請求項1至19中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調配用於口服遞送。

【第21項】

如請求項1至20中任一項之醫藥組合物，其中該組合物進一步包含額外治療劑。

【第22項】

如請求項21之醫藥組合物，其中該額外治療劑為癌症治療劑。

【第23項】

如請求項22之醫藥組合物，其中該癌症治療劑包含化學治療劑。

【第24項】

如請求項23之醫藥組合物，其中該化學治療劑係選自由以下組成之群：噻替派 (thiotepa)、環磷醯胺、白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan)、哌泊舒凡 (piposulfan)、苯唑多巴 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、米特多巴 (meturedopa)、尤利多巴 (uredopa)、六甲蜜胺、曲他胺 (triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺、三羥甲基三聚氰胺、布拉他辛 (bullatacin)、布拉他辛酮 (bullatacinone)、喜樹鹼、拓朴替康 (topotecan)、苔蘚抑素 (bryostatin)、海洋抑素

(callystatin)、CC-1065、念珠藻環肽(cryptophycin) 1、念珠藻環肽8、海兔毒素(dolastatin)、倍癌黴素(duocarmycin)、艾榴素(eleutherobin)、水鬼蕉鹼(pancratistatin)、匍枝珊瑚醇(sarcodictyin)、海綿抑素(spongistatin)、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、鹽酸氧二氯甲基二乙胺、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、芬司特瑞(phenesterine)、潑尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、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)、雷莫司汀(ranimustine)、卡奇黴素(calicheamicin)、達內黴素(dynemicin)、氯屈磷酸鹽(clodronate)、埃斯培拉黴素(esperamicin)；新抑癌蛋白(neocarzinostatin)發色團、阿克拉黴素(aclacinomysins)、放射菌素(actinomycin)、奧納黴素(authrarnycin)、偶氮絲胺酸、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素C、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、放線菌素D、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、小紅莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、艾達黴素(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)、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)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(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)、甲胺喋呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate)、氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤、安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二去氧尿苷、去氧氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷、卡魯翠酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、羰內酯、胺格魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)、亞葉酸、醋葡醛內酯、醛磷醯胺糖苷、胺基乙醯丙酸、恩尿嘧啶(eniluracil)、安吡啶(amsacrine)、貝斯布西(bestrabucil)、比生群(bisantrene)、依達曲沙(edatraxate)、地磷醯胺(defofamine)、秋水仙胺(demecolcine)、地吡醌(diaziquone)、艾福米辛(elformithine)、依利醋鉍(elliptinium acetate)、埃坡黴素(epothilone)、依託格魯(etoglucid)、硝酸鎂、羥基脲、蘑菇多醣(lentinan)、氯尼達明(lonidainine)、美登素(maytansine)、安絲菌素(ansamitocins)、米托胍脲(mitoguazone)、米托蒽醌(mitoxantrone)、莫哌達醇(mopidanmol)、硝拉維林(nitraerine)、噴司他汀(pentostatin)、凡那明(phenamet)、吡柔比星(pirarubicin)、洛索蒽醌(losoxantrone)、鬼臼酸、2-乙基醯肼、丙卡巴肼、PSK多醣複合物、雷佐生(razoxane)、根瘤菌素(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)、T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)、蛇形菌素

(anguidine)、烏拉坦(urethane)、長春地辛(vindesine)、達卡巴嗪(dacarbazine)、甘露氮芥(mannomustine)、二溴甘露醇(mitobronitol)、二溴衛矛醇(mitolactol)、哌泊溴烷(pipobroman)、甲托辛(gacytosine)、阿拉伯糖苷、環磷醯胺、噻替派、太平洋紫杉醇、多西他賽(doxetaxel)、氯芥苯丁酸、吉西他濱(gemcitabine)、6-硫代鳥嘌呤、巰基嘌呤、甲胺嘌呤、順鉑(cisplatin)、奧沙利鉑(oxaliplatin)、卡鉑(carboplatin)、長春鹼、鉑、依託泊苷(etoposide)、異環磷醯胺、米托蒽醌(mitoxantrone)、長春新鹼、長春瑞濱(vinorelbine)、諾凡特龍(novantrone)、替尼泊苷(teniposide)、依達曲沙(edatrexate)、柔紅黴素(daunomycin)、胺基嘌呤、希羅達(xeloda)、伊班膦酸鹽(ibandronate)、伊立替康(irinotecan)、RFS 2000、二氟甲基鳥胺酸、視黃酸及卡培他濱(capecitabine)。

【第25項】

如請求項22至24中任一項之醫藥組合物，其中該癌症治療劑包含癌症免疫療法藥劑。

【第26項】

如請求項25之醫藥組合物，其中該癌症免疫療法藥劑包含免疫檢查點抑制劑。

【第27項】

如請求項26之醫藥組合物，其中該免疫檢查點抑制劑為特異性結合至免疫檢查點蛋白之抗體或其抗原結合片段。

【第28項】

如請求項27之醫藥組合物，其中該免疫檢查點蛋白係選自由以下組成之群：CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、

BTLA、KIR、LAG3、TIM-3或VISTA。

【第29項】

如請求項26之醫藥組合物，其中該免疫檢查點抑制劑係選自由以下組成之群：納武單抗、派立珠單抗、皮立珠單抗(pidilizumab)、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0020718C、AUR-012及STI-A1010。

【第30項】

如請求項25至29中任一項之醫藥組合物，其中該癌症免疫療法藥劑包含癌症特異性抗體或其抗原結合片段。

【第31項】

如請求項30之醫藥組合物，其中該癌症特異性抗體或其抗原結合片段特異性結合至癌症相關抗原。

【第32項】

如請求項31之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第33項】

如請求項32之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原為新抗原。

【第34項】

如請求項25至33中任一項之醫藥組合物，其中該癌症免疫療法藥劑包含癌症疫苗。

【第35項】

如請求項34之醫藥組合物，其中該癌症疫苗包含含有癌症相關抗原之抗原決定基之多肽。

【第36項】

如請求項35之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-rav、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第37項】

如請求項35之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原為新抗原。

【第38項】

如請求項35至37中任一項之醫藥組合物，其中該多肽為融合蛋白。

【第39項】

如請求項34之醫藥組合物，其中該癌症疫苗包含編碼癌症相關抗原之抗原決定基之核酸。

【第40項】

如請求項39之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β R II、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第41項】

如請求項39之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原為新抗原。

【第42項】

如請求項39至41中任一項之醫藥組合物，其中該核酸為DNA。

【第43項】

如請求項39至41中任一項之醫藥組合物，其中該核酸為RNA。

【第44項】

如請求項43之醫藥組合物，其中該RNA為mRNA。

【第45項】

如請求項42至44中任一項之醫藥組合物，其中該核酸係在載體中。

【第46項】

如請求項45之醫藥組合物，其中該載體為細菌載體。

【第47項】

如請求項46之醫藥組合物，其中該細菌載體係選自由以下組成之群：牛分枝桿菌(*Mycobacterium bovis*；BCG)、鼠傷寒沙門氏菌亞種(*Salmonella Typhimurium* ssp.)、傷寒沙門氏菌亞種(*Salmonella Typhi* ssp.)、梭菌屬孢子(*Clostridium* sp.spore)、大腸桿菌(*Escherichia coli*) Nissle 1917、大腸桿菌 K-12/LLO、單核球增多性李氏菌(*Listeria*

monocytogenes)及弗氏志賀菌(*Shigella flexneri*)。

【第48項】

如請求項45之醫藥組合物，其中該載體為病毒載體。

【第49項】

如請求項48之醫藥組合物，其中該病毒載體係選自由以下組成之群：牛痘、腺病毒、RNA病毒及複製缺陷型鳥痘、複製缺陷型禽痘、複製缺陷型金絲雀痘、複製缺陷型MVA及複製缺陷型腺病毒。

【第50項】

如請求項25至49中任一項之醫藥組合物，其中該免疫療法藥劑包含經以癌症特異性抗原預致敏之抗原呈現細胞(APC)。

【第51項】

如請求項50之醫藥組合物，其中該APC為樹突狀細胞、巨噬細胞或B細胞。

【第52項】

如請求項50或51之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-ras、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β R2、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第53項】

如請求項50或51之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原為新抗原。

【第54項】

如請求項25至53中任一項之醫藥組合物，其中該免疫療法藥劑包含癌症特異性嵌合抗原受體(CAR)。

【第55項】

如請求項54之醫藥組合物，其中該CAR投與在T細胞之表面上。

【第56項】

如請求項54或55之醫藥組合物，其中該CAR特異性結合至癌症相關抗原。

【第57項】

如請求項56之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、

KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第58項】

如請求項55之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原為新抗原。

【第59項】

如請求項25至58中任一項之醫藥組合物，其中該免疫療法藥劑包含癌症特異性T細胞。

【第60項】

如請求項59之醫藥組合物，其中該T細胞為CD4⁺ T細胞。

【第61項】

如請求項60之醫藥組合物，其中該CD4⁺ T細胞為T_H1 T細胞、T_H2 T細胞或T_H17 T細胞。

【第62項】

如請求項59至62中任一項之醫藥組合物，其中該T細胞表現對癌症相關抗原具有特異性之T細胞受體。

【第63項】

如請求項62之醫藥組合物，其中該癌症相關抗原係選自由以下組成之群：親脂素、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 -連環蛋白、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、細胞週期素D1、細胞週期素-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、第二型穿膜絲胺酸蛋白酶、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放酶4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1 (亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、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、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、黑色素-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、肌凝蛋白I類、N-rav、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「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、存活素、SYT-SSX1或SYT-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β RII、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1及XAGE-1b/GAGED2a。

【第64項】

如請求項25至63中任一項之醫藥組合物，其中該免疫療法藥劑包含免疫活化蛋白。

【第65項】

如請求項64之醫藥組合物，其中該免疫活化蛋白為細胞介素或趨化因子。

【第66項】

如請求項65之醫藥組合物，其中該免疫活化蛋白係選自由以下組成之群：B淋巴細胞化學引誘劑(「BLC」)、C-C基元趨化因子11(「伊紅

趨素-1」)、嗜伊紅血球趨化性蛋白2 (「伊紅趨素-2」)、顆粒球群落刺激因子(「G-CSF」)、顆粒球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 」)、介白素-1 α (「IL-1 α 」)、介白素-1 β (「IL-1 β 」)、介白素1受體拮抗劑(「IL-1ra」)、介白素-2 (「IL-2」)、介白素-4 (「IL-4」)、介白素-5 (「IL-5」)、介白素-6 (「IL-6」)、介白素-6可溶性受體(「IL-6sR」)、介白素-7 (「IL-7」)、介白素-8 (「IL-8」)、介白素-10 (「IL-10」)、介白素-11 (「IL-11」)、介白素-12之 β 次單元(「IL-12 p40」或「IL-12 p70」)、介白素-13 (「IL-13」)、介白素-15 (「IL-15」)、介白素-16 (「IL-16」)、介白素-17A-F (「IL-17A-F」)、介白素-18 (「IL-18」)、介白素-21 (「IL-21」)、介白素-22 (「IL-22」)、介白素-23 (「IL-23」)、介白素-33 (「IL-33」)、趨化因子(C-C基元)配位體2 (「MCP-1」)、巨噬細胞群落刺激因子(「M-CSF」)、由 γ 干擾素誘導之單核球激素(「MIG」)、趨化因子(C-C基元)配位體2 (「MIP-1 α 」)、趨化因子(C-C基元)配位體4 (「MIP-1 β 」)、巨噬細胞發炎蛋白-1- δ (「MIP-1 δ 」)、血小板衍生生長因子次單元B (「PDGF-BB」)、趨化因子(C-C基元)配位體5、調節活化正常T細胞表現及分泌(「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 (「TNF α 」)、腫瘤壞死因子，淋巴毒素- β (「TNF β 」)、可溶性TNF受體1型 (「sTNFRI」)、sTNFRIIAR、腦衍生神經營養因子(「BDNF」)、鹼性纖維母細胞生長因子(「bFGF」)、骨形態生成蛋白4 (「BMP-4」)、骨形態生成蛋白5 (「BMP-5」)、骨形態生成蛋白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」)、內分泌腺衍生血管內皮生長因子(「EG-VEGF」)、纖維母細胞生長因子4(「FGF-4」)、角質細胞生長因子(「FGF-7」)、生長分化因子15(「GDF-15」)、膠細胞衍生神經營養因子(「GDNF」)、生長激素、肝素結合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」)、神經營養蛋白-3(「NT-3」)、神經營養蛋白-4(「NT-4」)、破骨細胞生成抑制因子(「骨保護素」)、血小板衍生生長因子受體(「PDGF-AA」)、磷脂酰肌醇-聚糖生物合成(「PIGF」)、含有Skp、Cullin、F盒之複合體(「SCF」)、幹細胞因子受體(「SCFR」)、轉型生長因子 α (「TGF α 」)、轉型生長因子 β -1(「TGF β 1」)、轉型生長因子 β -3(「TGF β 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 (「Ax1」)、 β 細胞調節素(「BTC」)、黏膜相關上皮趨化因子(「CCL28」)、趨化因子(C-C基元)配位體27(「CTACK」)、趨化因子(C-X-C基元)配位體16(「CXCL16」)、C-X-C基元趨化因子5(「ENA-78」)、趨化因子(C-C基元)配位體26(「伊紅趨素-3」)、顆粒球趨化蛋白2(「GCP-2」)、GRO、趨化因子(C-C基元)配位體14(「HCC-1」)、趨化因子(C-C基元)配位體16(「HCC-

4」)、介白素-9 (「IL-9」)、介白素-17F (「IL-17F」)、介白素-18-結合蛋白(「IL-18 BPα」)、介白素-28 A (「IL-28A」)、介白素29 (「IL-29」)、介白素31 (「IL-31」)、C-X-C基元趨化因子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基元)配位體(「淋巴細胞趨化因子」)、單核球化學引誘劑蛋白2 (「MCP-2」)、單核球化學引誘劑蛋白3 (「MCP-3」)、單核球化學引誘劑蛋白4 (「MCP-4」)、巨噬細胞衍生趨化因子(「MDC」)、巨噬細胞遷移抑制因子(「MIF」)、趨化因子(C-C基元)配位體20 (「MIP-3 α」)、C-C基序趨化因子19 (「MIP-3 β」)、趨化因子(C-C基元)配位體23 (「MPIF-1」)、巨噬細胞刺激蛋白α鏈(「MSPα」)、核小體裝配蛋白1樣4 (「NAP-2」)、分泌型磷蛋白1 (「骨橋蛋白」)、肺及活化調節細胞介素 (「PARC」)、血小板因子4 (「PF4」)、基質細胞衍生因子-1α (「SDF-1 α」)、趨化因子(C-C基元)配位體17 (「TARC」)、胸腺表現趨化因子 (「TECK」)、胸腺基質淋巴生成素(「TSLP 4- IBB」)、CD 166抗原 (「ALCAM」)、分化叢集80 (「B7-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員17 (「BCMA」)、分化叢集14 (「CD14」)、分化叢集30 (「CD30」)、分化叢集40 (「CD40配位體」)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1 (膽糖蛋白) (「CEACAM-1」)、死亡受體6 (「DR6」)、去氧胸苷激酶 (「Dtk」)、1型膜糖蛋白(「內皮因子」)、受體酪胺酸-蛋白激酶erbB-3(「ErbB3」)、內皮細胞-白細胞黏附分子1 (「E-選擇蛋白」)、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 R β 、IL-17R、IL-2R γ 、IL-21R、溶酶體膜蛋白2 (「LIMPII」)、嗜中性白血球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」)、MHC I類多肽相關序列A (「MICA」)、MHC I類多肽相關序列B (「MICB」)、NRG1- β 1、 β 型血小板源生長因子受體(「PDGF R β 」)、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」)、Trappin蛋白轉麩醯胺酸酶結合域(「Trappin-2」)、尿激酶受體(「uPAR」)、血管細胞黏附蛋白1 (「VCAM-1」)、XEDARActivin A、Agouti相關蛋白(「AgRP」)、核糖核酸酶5 (「血管生成素」)、血管生成素1、血管生長抑素、Catheprin S、CD40、隱性家族蛋白IB (「Cripto-1」)、DAN、Dickkopf相關蛋白1 (「DKK-1」)、E-鈣黏素、上皮細胞黏附分子(「EpCAM」)、Fas配體(FasL或CD95L)、Fc γ RIIB/C、FoUistatin、半乳糖凝集素-7、細胞間黏附分子2 (「ICAM-2」)、IL-13 R1、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因子抑制劑-1 (「PAI-1」)、血小板衍生生長因子受體(「PDGF-AB」)、抵抗素、基質細胞衍生因子1 (「SDF-1 β 」)、sgp130、分泌性捲曲相關蛋白2 (「ShhN」)、唾液酸結合免疫球蛋白型凝集素(「Siglec-5」)、ST2、轉型生長因子- β 2 (「TGF β 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」)、骨髓細胞上表現之觸發受體1 (「TREM-1」)、血管內皮生長因子C (「VEGF-C」)、VEGFR1A脂聯素、脂肪酶(「AND」)、 α -胎蛋白(「AFP」)、血管生成素樣4 (「ANGPTL4」)、 β -2-微球蛋白(「B2M」)、基細胞黏附分子

(「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」)、人類表皮生長因子受體2(「ErbB2」)、卵泡抑素、促卵泡激素(「FSH」)、趨化因子(C-X-C基元)配位體1(「GRO α 」)、人絨毛膜促性腺激素(「 β HCG」)、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、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(「Nidogen-1」)、神經元特異性烯醇酶(「NSE」)、抑瘤素M(「OSM」)、降鈣素原、催乳素、前列腺特異性抗原(「PSA」)、唾液酸結合Ig樣凝集素9(「Siglec-9」)、ADAM 17內肽酶(「TACE」)、甲狀球蛋白、金屬蛋白酶抑制劑4(「TIMP-4」)、TSH2B4、解整合素及含金屬蛋白酶域之蛋白9(「ADAM-9」)、血管生成素2、腫瘤壞死因子配位體超家族成員13/酸性富白胺酸細胞核磷蛋白32家族成員B(「APRIL」)、骨形態生成蛋白2(「BMP-2」)、骨形態生成蛋白9(「BMP-9」)、互補組分5a(「C5a」)、組織蛋白酶L、CD200、CD97、趨化素、腫瘤壞死因子受體超家族成員6B(「DcR3」)、脂肪酸結合蛋白2(「FABP2」)、纖維母細胞活化蛋白 α (「FAP」)、纖維母細胞生長因子19(「FGF-19」)、半乳糖凝集素-3、肝細胞生長因子受體(「HGF R」)、IFN- γ α/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」)、介白素-1受體6(「IL-1R6」)、介白素24(「IL-24」)、介白素33(「IL-33」)、激肽釋放素14、天冬醯胺醯基

內肽酶(「豆莢蛋白」)、經氧化低密度脂蛋白受體1(「LOX-1」)、甘露糖結合凝集素(「MBL」)、腦啡肽酶(「NEP」)、易位相關(果蠅)之Notch同源物1(「Notch-1」)、腎母細胞瘤過度表現(「NOV」)、骨活素、計劃性細胞死亡蛋白1(「PD-1」)、N-乙醯胞壁醯-L-丙胺酸醯胺酶(「PGRP-5」)、絲胺酸蛋白酶抑因子A4、分泌性捲曲相關蛋白3(「sFRP-3」)、凝血調節蛋白、鐸樣受體2(「TLR2」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員10A(「TRAIL R1」)、轉鐵蛋白(「TRF」)、WIF-1ACE-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基元)配體14(「CXCL14」)、胱抑素C、核心蛋白聚糖(「DCN」)、Dickkopf相關蛋白3(「Dkk-3」)、 δ 樣蛋白1(「DLL1」)、胎球蛋白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」)、顆粒球群落刺激因子受體(「GCSF R」)、絲胺酸蛋白酶第二型穿膜絲胺酸蛋白酶(「HAI-2」)、介白素-17B受體(「IL-17B R」)、介白素27(「IL-27」)、淋巴球活化基因3(「LAG-3」)、脂蛋白元A-V(「LDL R」)、胃蛋白酶原I、視黃醇結合蛋白4(「RBP4」)、SOST、硫酸乙醯肝素蛋白聚糖(「多配體蛋白聚糖-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員13B(「TACI」)、組織因子路徑抑制劑(「TFPI」)、TSP-1、腫瘤壞死因子受體超家族成員10b(「TRAIL R2」)、TRANSE、肌鈣蛋白I、尿激酶纖維蛋白溶酶原活化物(「uPA」)、鈣黏素5、2型或VE鈣黏素(血管內皮)(亦稱為CD144(「VE-鈣黏素」))、WNT1誘導性信號傳導路徑蛋白1(「WISP-1」)及核因子 κ B

之受體活化物(「RANK」)。

【第67項】

如請求項25至66中任一項之醫藥組合物，其中該免疫療法藥劑包含佐劑。

【第68項】

如請求項67之醫藥組合物，其中該佐劑係選自由以下組成之群：免疫調節蛋白、佐劑65、 α -半乳糖苷基神經醯胺(α -GalCer)、磷酸鋁、氫氧化鋁、磷酸鈣、 β -葡聚糖肽、CpG DNA、GPI-0100、脂質A、脂多糖、Lipovant、Montanide、N-乙醯基-胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸、Pam3CSK4、quil A及海藻糖二黴菌酸酯。

【第69項】

如請求項22至68中任一項之醫藥組合物，其中該癌症治療劑包含血管生成抑制劑。

【第70項】

如請求項69之醫藥組合物，其中該血管生成抑制劑係選自由以下組成之群：貝伐單抗(Bevacizumab) (Avastin®)、Ziv-阿柏西普(Ziv-aflibercept) (Zaltrap®)、索拉非尼(Sorafenib) (Nexavar®)、舒尼替尼(Sunitinib) (Sutent®)、帕唑帕尼(Pazopanib) (Votrient®)、瑞戈非尼(Regorafenib) (Stivarga®)及卡博替尼(Cabozantinib) (Cometriq™)。

【第71項】

如請求項22至70中任一項之醫藥組合物，其中該癌症治療劑包含抗生素。

【第72項】

如請求項71之醫藥組合物，其中該抗生素係選自由以下組成之群：
胺基糖苷、安莎黴素(ansamycin)、碳頭孢烯、碳青黴烯、頭孢菌素、醣肽、林可醯胺類、脂肽、巨環內酯、單環 β -內醯胺類、硝基呋喃、唑烷酮、青黴素、多肽抗生素、喹諾酮、氟喹諾酮、磺醯胺、四環素、抗分枝桿菌化合物及其組合。

【第73項】

如請求項22至72中任一項之醫藥組合物，其中該癌症治療劑包含治療性細菌。

【第74項】

如請求項73之醫藥組合物，其中該組合物進一步包含益菌助生質。

【第75項】

如請求項74之醫藥組合物，其中該益菌助生質為果寡醣、半乳寡醣、反式半乳寡醣、木寡醣、殼寡醣、大豆寡醣、龍膽寡醣、異麥芽糖寡醣、甘露寡醣、麥芽糖寡醣、甘露寡醣、乳酮糖、乳果糖、巴拉金糖(palatinose)、糖基蔗糖、瓜爾豆膠、阿拉伯膠、塔格糖(tagalose)、直鏈澱粉、支鏈澱粉、果膠、木聚糖或環糊精。

【第76項】

如請求項21之醫藥組合物，其中該額外治療劑包含抗生素。

【第77項】

如請求項76之醫藥組合物，其中該抗生素係選自由以下組成之群：
胺基糖苷、安莎黴素、碳頭孢烯、碳青黴烯、頭孢菌素、醣肽、林可醯胺類、脂肽、巨環內酯、單環 β -內醯胺類、硝基呋喃、唑烷酮、青黴素、多肽抗生素、喹諾酮、氟喹諾酮、磺醯胺、四環素、抗分枝桿菌化合物及其

組合。

【第78項】

如請求項76或77中任一項之醫藥組合物，其中該額外治療劑包含治療性細菌。

【第79項】

如請求項21之醫藥組合物，其中該額外治療劑包含免疫抑制劑、DMARD、疼痛控制藥物、類固醇、非類固醇消炎藥(NSAID)或細胞介素拮抗劑及其組合。

【第80項】

如請求項80之醫藥組合物，其中該額外治療劑係選自由以下組成之群：環孢素、類視黃素、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、盧米羅可(lumiracoxib)、布洛芬、水楊酸膽鹼鎂、非諾洛芬(fenoprofen)、雙水楊酸酯、二氟尼柳(difunisal)、托美丁(tolmetin)、酮洛芬(ketoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、奧沙普嗪(oxaprozin)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸、依託度酸(etodolac)、酮咯酸、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、伐地昔布(valdecoxib)、依他昔布(etoricoxib)、MK0966；羅非昔布(rofecoxib)、乙醯胺苯酚、塞內昔布(Celecoxib)、雙氯芬酸、曲馬多(tramadol)、吡羅昔康(piroxicam)、美洛昔康(meloxicam)、替諾昔康(tenoxicam)、屈噁昔康(droxicam)、氯諾昔康(lornoxicam)、伊索昔康(isoxicam)、甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟芬那酸、托芬那酸、伐地昔布(valdecoxib)、帕瑞昔布(parecoxib)、依託度酸、吲哚美辛、阿司匹林、布洛芬、非羅昔布(firocoxib)、甲胺喋呤(MTX)、抗瘧疾藥物(例如

經基氯奎及氯奎)、柳氮磺胺吡啶、來氟米特(Leflunomide)、硫唑嘌呤、環孢素、金鹽、二甲胺四環素、環磷醯胺、D-青黴胺、二甲胺四環素、金諾芬(auranofin)、他克莫司(tacrolimus)、硫代苯酸金鈉(myocrisin)、氯芥苯丁酸、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®)、英利昔單抗(Remicade®；TA-650)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(Cimzia®；CDP870)、戈利木單抗(Simpom®；CNT0148)、阿那白滯素(ANAKINRA) (Kineret®)、利妥昔單抗(Rituxan®；MabThera®)、阿巴西普(ABATACEPT) (Orencia®)、托西利單抗(TOCILIZUMAB) (RoActemra/Actemra®)、整合素拮抗劑(TYSABRI® (那他珠單抗(natalizumab)))、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(Atacicept)、Benlysta®/LymphoStat-B® (貝利單抗(belimumab)))、p38抑制劑、CD20拮抗劑(奧克珠單抗(奧克珠單抗)、奧伐木單抗(Ofatumumab) (Arzerra®))、干擾素 γ 拮抗劑(芳妥珠單抗(Fontolizumab))、潑尼龍、強的松、地塞米松、皮質醇、皮質酮、氫皮質酮、甲基潑尼龍、倍他米松(betamethasone)、曲安西龍(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasone)、氟氫可的松(fludrocortisone)、去氧皮質固酮、醛固酮、多西環素、萬古黴素、吡格列酮(pioglitazone)、SBI-087、SCIO-469、Cura-100、Oncoxin+Viusid、TwHF、甲氧沙林、維生素D-麥角鈣化醇、米那普侖(Milnacipran)、太平洋紫杉醇、羅格他酮(rosiglitazone)、他克莫司(Tacrolimus) (Prograf®)、RADO01、雷帕鳴(rapamune)、雷帕黴素(rapamycin)、福他替尼(fostamatinib)、芬太尼

(Fentanyl)、XOMA 052、福他替尼二鈉、羅格列酮(rosiglitazone)、薑黃素(Longvida™)、羅素他汀(Rosuvastatin)、馬拉維若(Maraviroc)、雷米普利(ramipril)、米那普侖、考比前列酮(Cobiprostone)、索馬托品(somatropin)、tgAAC94基因療法載體、MK0359、GW856553、埃索美拉唑(esomeprazole)、依維莫司(everolimus)、曲妥珠單抗、JAK1及JAK2抑制劑、泛JAK抑制劑，例如四環吡啶酮6 (P6)、325、PF-956980、德諾單抗(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(例如受體誘餌、拮抗性抗體)。

【第81項】

如請求項80之醫藥組合物，其中該免疫抑制劑為皮質類固醇、美沙拉嗪(mesalazine)、美塞拉明(mesalamine)、柳氮磺胺吡啶、柳氮磺胺吡啶衍生物、免疫抑制藥物、環孢素A、巰基嘌呤、硫唑嘌呤、潑尼松、甲胺喋呤、抗組織胺、糖皮質激素、腎上腺素、茶鹼、色甘酸鈉、抗白三烯、用於鼻炎之抗膽鹼激導性藥物、TLR拮抗劑、炎性體抑制劑、抗膽鹼激導性解充血劑、肥大細胞穩定劑、單株抗IgE抗體、疫苗(例如用於其中過敏原之量逐漸增加的疫苗接種的疫苗)、細胞介素抑制劑(諸如抗IL-6抗體)、TNF抑制劑(諸如英利昔單抗(infliximab)、阿達木單抗(adalimumab)、聚乙二醇化賽妥珠單抗(certolizumab pegol)、戈利木單抗(golimumab)或依那西普(etanercept))及其組合。

【第82項】

一種治療受試者中疾病之方法，其包含向該受試者投與如請求項1至

20中任一項之醫藥組合物。

【第83項】

如請求項76之方法，其中該疾病為自體免疫疾病、發炎疾病、代謝疾病或癌症。

【第84項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第85項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第86項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。

【第87項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株，其限制條件為該疾病非為多發性硬化或類風濕性關節炎。

【第88項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、

16S及/或CRISPR序列一致性的菌株，其限制條件為該疾病非為多發性硬化或類風濕性關節炎。

【第89項】

如請求項82或83之方法，其中該等普雷沃菌為普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號 B 50329)，其限制條件為該疾病非為多發性硬化或類風濕性關節炎。

【第90項】

如請求項82至89中任一項之方法，其中該疾病為非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、原發性硬化性膽管炎 (PSC) 或非酒精性脂肪變性肝炎 (NASH)。

【第91項】

一種治療受試者中癌症之方法，其包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物。

【第92項】

如請求項91之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第93項】

如請求項91之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第94項】

如請求項91之方法，其中該等普雷沃菌為普雷沃菌菌株B 50329

(NRRL登錄號 B 50329)。

【第95項】

一種擴充患有癌症之受試者中微生物群落之方法，該方法包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第96項】

一種耗盡受試者中癌症相關細菌之腫瘤之方法，該方法包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第97項】

一種改變受試者中腫瘤微生物群落之方法，該方法包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第98項】

一種改變受試者中腸系膜淋巴結微生物群落之方法，該方法包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第99項】

一種藉由樹突狀細胞改變受試者中抗原呈現之方法，該方法包含向該受試者投與如請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第100項】

一種活化受試者中上皮細胞之方法，該方法包含向該受試者投與如

請求項1至81中任一項之醫藥組合物，以使得該等普雷沃菌EV及/或普雷沃菌添加至該受試者中之生態棲位。

【第101項】

如請求項95至100中任一項之方法，其中該生態棲位係在該受試者之胃腸道中。

【第102項】

如請求項95至100中任一項之方法，其中該生態棲位係在該受試者之泌尿生殖道中。

【第103項】

如請求項95至100中任一項之方法，其中該生態棲位係在該受試者之呼吸道中。

【第104項】

如請求項95至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經口服投與。

【第105項】

如請求項82至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經靜脈內投與。

【第106項】

如請求項82至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經瘤內投與。

【第107項】

如請求項82至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經腫瘤下投與。

【第108項】

如請求項82至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係藉由皮下、皮內或腹膜內注射投與。

【第109項】

如請求項82至103中任一項之方法，其中該醫藥組合物係用控制釋放之基質瘤內投與。

【第110項】

如請求項82至109中任一項之方法，其中投與該醫藥組合物治療該癌症。

【第111項】

如請求項82至110中任一項之方法，其中投與該醫藥組合物誘導抗腫瘤免疫反應。

【第112項】

如請求項82至111中任一項之方法，其中該癌症療法包含放射療法。

【第113項】

如請求項82至112中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該受試者投與抗生素。

【第114項】

如請求項113之方法，其中該抗生素係選自由以下組成之群：胺基糖苷、安莎黴素、碳頭孢烯、碳青黴烯、頭孢菌素、醣肽、林可醯胺類、脂肽、巨環內酯、單環 β -內醯胺類、硝基呋喃、唑烷酮、青黴素、多肽抗生素、喹諾酮、氟喹諾酮、磺醯胺、四環素、抗分枝桿菌化合物及其組合。

【第115項】

如請求項82至114中任一項之方法，其中該癌症療法包含向該受試者投與治療性細菌。

【第116項】

一種治療受試者中免疫病症之方法，其包含向該受試者投與如請求項1至20及76至81中任一項之醫藥組合物。

【第117項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第118項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第119項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌EV係來自普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。

【第120項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第121項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌係來自包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S

及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第122項】

如請求項116之方法，其中該等普雷沃菌為普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號 B 50329)。

【第123項】

如請求項116至122中任一項之方法，其中該免疫病症係選自由以下組成之群：急性散播性一般禿頭症、白塞氏病(Behcet's disease)、卻格司病(Chagas' disease)、慢性疲勞症候群、自主神經障礙、腦脊髓炎、僵直性脊椎炎、再生不全性貧血、化膿性汗腺炎、自體免疫肝炎、自體免疫卵巢炎、乳糜瀉、克羅恩氏病(Crohn's disease)、糖尿病1型、巨大細胞動脈炎、古巴士德氏症候群(goodpasture's syndrome)、格雷氏病(Grave's disease)、格-巴二氏症候群(Guillain-Barre syndrome)、橋本氏病(Hashimoto's disease)、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、紅斑狼瘡、顯微性結腸炎、顯微性多動脈炎、混合性結締組織病、穆-韋二氏症候群(Muckle-Wells syndrome)、多發性硬化、重症肌無力、斜視眼陣攣肌陣攣症候群、視神經炎、奧德氏甲狀腺炎(ord's thyroiditis)、天疱瘡、結節性多動脈炎、多肌痛、類風濕性關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、休格連氏症候群(Sjogren's syndrome)、顱動脈炎、韋格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、溫式自體免疫溶血性貧血、間質性膀胱炎、萊姆病(Lyme disease)、硬斑病、牛皮癬、類肉瘤病、硬皮病、潰瘍性結腸炎、白斑病、接觸性過敏、接觸性皮膚炎(包括由於野葛(poison ivy)所致)、蕁麻疹、皮膚過敏、呼吸道過敏(花粉熱、過敏性鼻炎、室內塵蟎過敏)及麩

質敏感性腸病(乳糜瀉)、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、乳房炎、心肌炎、腎炎、耳炎、胰臟炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、肺炎、前列腺炎、腎盂腎炎及口炎、移植排斥(涉及器官，諸如腎臟、肝臟、心臟、肺、胰臟(例如胰島細胞)、骨髓、角膜、小腸、皮膚同種異體移植物、皮膚同種移植物及心瓣膜異種移植物；血清病及移植物抗宿主疾病)、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、急性呼吸窘迫症候群、塞紮萊症候群(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、天疱瘡、大皰性疱疹樣皮炎、嚴重多形性紅斑、剝脫性皮炎、皮脂溢性皮炎、季節性或常年性過敏性鼻炎、支氣管哮喘、接觸性皮炎、異位性皮炎、藥物超敏反應、過敏性結膜炎、角膜炎、眼帶狀疱疹、虹膜炎及虹膜睫狀體炎、脈絡膜視網膜炎、視神經炎、症狀性類肉瘤病、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、後天性(自體免疫)溶血性貧血、成人白血病及淋巴瘤、兒童急性白血病、侷限性腸炎、自體免疫血管炎、多發性硬化、慢性阻塞性肺病、實體器官移植排斥、敗血症。較佳治療包括移植排斥、類風濕性關節炎、牛皮癬性關節炎、多發性硬化、1型糖尿病、哮喘、發炎性腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、慢性阻塞性肺病及伴有感染性病狀(例如敗血症)之發炎的治療。

【第124項】

如請求項116至122中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經口服投與。

【第125項】

如請求項116至122中任一項之方法，其中該醫藥組合物係經靜脈內投與。

【第126項】

如請求項116至122中任一項之方法，其中該醫藥組合物係藉由皮下、皮內或腹膜內注射投與。

【第127項】

如請求項82至132中任一項之方法，其中該方法進一步包含向該受試者投與益菌助生質。

【第128項】

如請求項127之方法，其中該益菌助生質為果寡醣、半乳寡醣、反式半乳寡醣、木寡醣、殼寡醣、大豆寡醣、龍膽寡醣、異麥芽糖寡醣、甘露寡醣、麥芽糖寡醣、甘露寡醣、乳酮糖、乳果糖、巴拉金糖、糖基蔗糖、瓜爾豆膠、阿拉伯膠、塔格糖、直鏈澱粉、支鏈澱粉、果膠、木聚糖或環糊精。

【第129項】

如請求項82至128中任一項之方法，其中該受試者為人類。

【第130項】

如請求項82至128中任一項之方法，其中該受試者為非人類哺乳動物。

【第131項】

如請求項130之方法，其中該哺乳動物係選自由以下組成之群：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。

【第132項】

一種產生經工程改造之普雷沃菌之方法，其包含將引起EV之產量增加的修飾引入至該普雷沃菌中。

【第133項】

如請求項132之方法，其中該普雷沃菌為阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑爾根普雷沃菌、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、解糖腺普雷沃菌、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、動膠普雷沃菌或真空腔普雷沃菌。

【第134項】

如請求項132之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含一或多種表1中所列之蛋白質。

【第135項】

如請求項132或134之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株不含或實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第136項】

如請求項132至135中任一項之方法，其中該細菌係藉由定向演化進行修飾。

【第137項】

如請求項136之方法，其中該定向演化包含將該細菌暴露於經改良之EV製造改良細菌存活期所處之環境條件。

【第138項】

如請求項137之方法，其中該環境條件需要該EV在小於或等於4之pH下之穩定性。

【第139項】

如請求項132至138中任一項之方法，其中該方法包含利用偵測增加EV產量的分析法來篩選出經誘變之細菌。

【第140項】

如請求項139之方法，其中該方法進一步包含誘變該等細菌。

【第141項】

如請求項139或140之方法，其中該等細菌係藉由暴露於化學誘變劑或UV輻射進行誘變。

【第142項】

一種產生經工程改造之普雷沃菌之方法，其包含將修飾引入至該普雷沃菌，該修飾造成由該普雷沃菌產生具有經改良之治療特性的EV。

【第143項】

如請求項142之方法，其中該經改良之治療特性包含經改良之口服遞送。

【第144項】

如請求項142之方法，其中該經改良之治療特性包含在小於或等於4之pH下之穩定性。

【第145項】

如請求項142之方法，其中該經改良之治療特性包含在0.2%與2%之間的膽汁酸濃度下之穩定性。

【第146項】

如請求項142至145中任一項之方法，其中該經改良之治療特性包含增加之免疫活化。

【第147項】

如請求項142至146中任一項之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含一或多種表1中所列之蛋白質。

【第148項】

如請求項142至147中任一項之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株不含或實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第149項】

如請求項142至148中任一項之方法，其中該普雷沃菌為阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑爾根普雷沃菌、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、解糖腺普雷沃菌、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、動膠普雷沃菌或真空腔普雷沃菌。

【第150項】

如請求項142至149中任一項之方法，其中該普雷沃菌係藉由定向演化進行修飾。

【第151項】

如請求項150之方法，其中該定向演化包含將該普雷沃菌暴露於小於或等於4之pH下的EV之穩定性改良細菌存活期所處的環境條件。

【第152項】

如請求項141至151中任一項之方法，其中該方法包含利用偵測增加免疫反應之活化的分析法來篩選經誘變之普雷沃菌。

【第153項】

如請求項152之方法，其中該方法進一步包含誘變該等普雷沃菌。

【第154項】

如請求項152或153之方法，其中該等細菌係藉由暴露於化學誘變劑或UV輻射進行誘變。

【第155項】

如請求項152至154中任一項之方法，其中該分析為活體內分析、離體分析或活體外分析。

【第156項】

如請求項152至154中任一項之方法，其中該分析為活體內免疫反應

分析。

【第157項】

如請求項156之方法，其中在小鼠中進行活體內腫瘤殺滅分析。

【第158項】

如請求項152至154中任一項之方法，其中該分析為活體外免疫反應分析。

【第159項】

一種經修飾之普雷沃菌，其係根據如請求項142至158中任一項之方法產生。

【第160項】

一種針對經改良之EV製造來培養普雷沃菌之方法，該方法包含使該等普雷沃菌在應激誘導生長條件下生長。

【第161項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在次抑制濃度之抗生素存在下生長。

【第162項】

如請求項161之方法，其中該抗生素係選自由以下組成之群：胺基糖苷、安莎黴素、碳頭孢烯、碳青黴烯、頭孢菌素、醣肽、林可醯胺類、脂肽、巨環內酯、單環 β -內醯胺類、硝基呋喃、唑烷酮、青黴素、多肽抗生素、喹諾酮、氟喹諾酮、磺醯胺、四環素、抗分枝桿菌化合物及其組合。

【第163項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在次抑制濃度之宿主抗微生物肽存在下生長。

【第164項】

如請求項163之方法，其中該宿主抗微生物肽為溶菌酶、防禦素或Reg蛋白。

【第165項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在次抑制濃度之細菌所產生之抗微生物肽存在下生長。

【第166項】

如請求項165之方法，其中該細菌產生之抗微生物肽為細菌素或小菌素。

【第167項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在溫度應激下生長。

【第168項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在碳限制條件下生長。

【第169項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在次抑制濃度之鹽存在下生長。

【第170項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在UV光存在下生長。

【第171項】

如請求項160之方法，其中該等應激誘導生長條件包含在過氧化氫存

在下生長。

【第172項】

如請求項160至171中任一項之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含一或多種表1中所列之蛋白質。

【第173項】

如請求項160至172中任一項之方法，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株不含或實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第174項】

如請求項160至173中任一項之方法，其中該普雷沃菌為阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑爾根普雷沃菌、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、解糖腺普雷沃菌、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、動膠普雷沃菌或真空腔普雷沃菌。

【第175項】

一種生物反應器，其包含普雷沃菌。

【第176項】

如請求項175之生物反應器，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株包含一或多種表1中所列之蛋白質。

【第177項】

如請求項175或176之生物反應器，其中該等普雷沃菌係來自普雷沃菌之菌株，該菌株不含或實質上不含表2中所列之蛋白質。

【第178項】

如請求項175之生物反應器，其中該等細菌係來自阿爾伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑爾根普雷沃菌、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、解糖腴普雷沃菌、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、動膠普雷沃菌或真空腔普雷沃菌。

【第179項】

如請求項175之生物反應器，其中該等細菌為包含與該普雷沃菌菌株 B 50329(NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少90%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第180項】

如請求項175之生物反應器，其中該等細菌為包含與該普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)之核苷酸序列有至少99%基因組、16S及/或CRISPR序列一致性的菌株。

【第181項】

如請求項175之生物反應器，其中該等細菌為普雷沃菌菌株B 50329 (NRRL登錄號B 50329)。

