(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114096262 A
(43)申请公布日 2022.02.25

(21)申请号 202080043264.9

(22)申请日 2020.06.11

(30)优先权数据
62/860029 2019.06.11 US
62/860049 2019.06.11 US
62/979545 2020.02.21 US
62/991767 2020.03.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/037201 2020.06.11

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/252144 EN 2020.12.17

(71)申请人 伊夫罗生物科学公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·巴洛克 M·博德默 B·波斯 S·M·R·卡尔顿 T·A·科尔麦克 C·J·H·达维特 L·弗兰西斯科-安德森 B·古德曼 A·伊塔诺 N·奥肯 H·波尼奇特拉 E·B·特洛伊 F·B·罗马诺-切尔纳奇 M·西佐瓦

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志强 彭昶

(51)Int.Cl.
A61K 35/744(2015.01)
A61K 35/745(2015.01)
A61K 35/74(2015.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书221页 附图31页

(54)发明名称

分泌的微生物胞外囊泡

(57)摘要

本文提供了与可用作治疗剂的分泌的微生物胞外囊泡(smEV)相关的方法和药物组合物。

CN 114096262 A

1.一种药物组合物,所述药物组合物包含分离的分泌的微生物胞外囊泡(smEV)。

2.如权利要求1所述的药物组合物,其中所述药物组合物的微生物衍生的含量的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%是smEV。

3.如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物,用于经由免疫抑制治疗疾病。

4.如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物,用于经由免疫活化治疗疾病。

5.如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物,用于经由活化或增强受试者的一种或多种免疫应答来治疗疾病。

6.如权利要求1或权利要求2所述的药物组合物,用于经由促进受试者的免疫抑制来治疗疾病。

7.如权利要求2至6中任一项所述的药物组合物,菌群失调,其中所述疾病是癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调或代谢性疾病。

8.如权利要求1至7中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物包含治疗有效量的smEV。

9.如权利要求1至8中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物活化先天抗原呈递细胞。

10.如权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其中当口服施用时,所述组合物在胃肠道外具有一种或多种有益的免疫效果。

11.如权利要求1至10中任一项所述的药物组合物,其中当口服施用时,所述组合物调节受试者的胃肠道外的免疫效应。

12.如权利要求1至11中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物包含来自一种细菌菌株的smEV。

13.如权利要求1至12中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV是冻干的(例如,冻干产物还包含药学上可接受的赋形剂)。

14.如权利要求1至13中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV被γ照射。

15.如权利要求1至14中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV被UV照射。

16.如权利要求1至15中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV被热灭活。

17.如权利要求16所述的药物组合物,其中所述smEV在约50℃下热灭活两小时或在约90℃下热灭活两小时。

18.如权利要求1至17中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV被酸处理。

19.如权利要求1至18中任一项所述的药物组合物,其中所述smEV被喷氧。

20.如权利要求19所述的药物组合物,其中所述smEV被以约0.1vvm喷氧至少两小时。

21.如权利要求1至20中任一项所述的药物组合物,其中smEV的剂量为约$2x10^{6}$至约$2x10^{16}$个颗粒。

22.如权利要求1至21中任一项所述的药物组合物,其中smEV的剂量为约5mg至约900mg的总蛋白。

23.如权利要求1至22中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是固体剂型。

24.如权利要求23所述的药物组合物,其中所述固体剂型包括片剂、微型片剂、胶囊、丸剂或粉末,或前述的组合。

25.如权利要求23或24所述的药物组合物,其中所述固体剂型还包含药学上可接受的

赋形剂。

26.如权利要求23至25中任一项所述的药物组合物，其中所述固体剂型包含肠溶包衣。

27.如权利要求23至26中任一项所述的药物组合物，其中所述固体剂型被配制成用于口服施用。

28.如权利要求1至22中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合物呈悬浮液形式。

29.如权利要求28所述的药物组合物，其中所述悬浮液被配制成用于口服施用。

30.如权利要求29所述的药物组合物，其中所述悬浮液包含PBS，和任选的蔗糖或葡萄糖。

31.如权利要求28所述的药物组合物，其中所述悬浮液被配制成用于静脉内、腹膜内或瘤内施用。

32.如权利要求31所述的药物组合物，其中所述悬浮液包含PBS。

33.如权利要求28至32中任一项所述的药物组合物，其中所述悬浮液还包含药学上可接受的赋形剂或缓冲液。

34.如权利要求1至33中任一项所述的药物组合物，其中所述smEV来自革兰氏阳性细菌。

35.如权利要求1至33中任一项所述的药物组合物，其中所述smEV来自革兰氏阴性细菌。

36.如权利要求35所述的药物组合物，其中所述革兰氏阴性细菌属于Negativicutes纲。

37.如权利要求1至36中任一项所述的药物组合物，其中所述smEV来自需氧细菌、厌氧细菌、嗜酸细菌、嗜碱细菌、嗜中性细菌、难养细菌、非难养细菌，或其组合。

38.如权利要求1至37中任一项所述的药物组合物，其中所述smEV来自表1、表2或表3中列出的一种或多种细菌菌株。

39.如权利要求1至38中任一项所述的药物组合物，其中所述组合物还包含一种或多种另外的治疗剂。

40.如权利要求1至39中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

41.如权利要求49所述的用途，其中所述疾病是癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调和/或代谢性疾病。

42.一种治疗受试者的方法，所述方法包括向所述受试者施用如权利要求1至41中任一项所述的药物组合物。

43.如权利要求42所述的方法，其中所述smEV来自已经被γ照射、UV照射、热灭活、酸处理、喷氧、或其组合的细菌。

44.如权利要求42所述的方法，其中所述smEV来自活细菌。

45.如权利要求42至44中任一项所述的方法，其中所述组合物活化或增强所述受试者的一种或多种免疫应答。

46.如权利要求45所述的方法，其中所述一种或多种免疫应答包括全身免疫应答。

47.如权利要求42至44中任一项所述的方法，其中所述组合物抑制所述受试者的免疫

应答。

48.如权利要求42至44中任一项所述的方法,其中所述组合物促进所述受试者的免疫活化。

49.如权利要求42至48中任一项所述的方法,其中包含所述smEV的所述药物组合物与包含来自从其产生所述smEV的同一细菌菌株的完整微生物的药物组合物相比具有相当的效力或增加的效力。

50.如权利要求42至48中任一项所述的方法,其中包含所述smEV的所述药物组合物与包含从其产生所述smEV的完整微生物的药物组合物相比具有更多治疗活性的微生物材料。

51.如权利要求42至50中任一项所述的方法,其中所述受试者需要治疗癌症。

52.如权利要求42至50中任一项所述的方法,其中所述受试者需要治疗自身免疫性疾病和/或炎性疾病。

53.如权利要求42至50中任一项所述的方法,其中所述受试者需要治疗菌群失调。

54.如权利要求42至50中任一项所述的方法,其中所述受试者需要治疗代谢性疾病。

55.如权利要求42至50中任一项所述的方法,其中所述药物组合物与另外的治疗剂组合施用。

56.如权利要求42至55中任一项所述的方法,其中所述组合物包含来自一种细菌菌株的smEV。

57.如权利要求42至56中任一项所述的方法,其中所述smEV被冻干。

58.如权利要求42至57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是口服施用。

59.如权利要求42至57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是静脉内施用。

60.如权利要求42至57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是瘤内施用。

61.如权利要求42至57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物是瘤下施用。

62.如权利要求42至57中任一项所述的方法,其中所述药物组合物通过注射施用。

63.一种制备呈悬浮液的包含smEV的药物组合物的方法,所述方法包括:将smEV与药学上可接受的缓冲液组合,从而制备所述药物组合物。

64.如权利要求63所述的方法,其中所述药学上可接受的缓冲液包含PBS。

65.如权利要求63或64所述的方法,其中所述悬浮液还包含蔗糖或葡萄糖。

66.如权利要求63至65中任一项所述的方法,其中所述smEV包含约$2x10^{6}$至约$2x10^{16}$个smEV颗粒。

67.如权利要求63至66中任一项所述的方法,其中所述smEV包含约5mg至约900mg的总蛋白。

68.一种通过如权利要求62至67中任一项所述的方法制备的药物组合物。

69.一种制备包含呈固体剂型的smEV(例如,其治疗有效量)的药物组合物固体剂型的方法,所述方法包括:

a)将smEV与药学上可接受的赋形剂组合;以及

b)压缩所述组合的smEV和药学上可接受的赋形剂;从而制备药物组合物固体剂型。

70.如权利要求69所述的方法,所述方法还包括对所述固体剂型进行肠溶包衣。

71.如权利要求69或70所述的方法,其中所述固体剂型包括片剂或微型片剂。

72.如权利要求69至71中任一项所述的方法,其中所述组合物包含来自一种细菌菌株

的smEV。

73.如权利要求69至72中任一项所述的方法,其中所述smEV被冻干。

74.如权利要求69至73中任一项所述的方法,其中所述smEV包含约$2x10^{6}$至约$2x10^{16}$个颗粒。

75.如权利要求69至74中任一项所述的方法,其中所述smEV包含约5mg至约900mg的总蛋白。

76.一种通过如权利要求69至75中任一项所述的方法制备的药物组合物。

分泌的微生物胞外囊泡

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下的权益:于2019年6月11日提交的美国临时专利申请号62/860,029;2019年6月11日提交的美国临时专利申请号62/860,049;2020年2月21日提交的美国临时专利申请号62/979,545;以及于2020年3月19日提交的美国临时专利申请号62/991,767,其中每个的全文通过引用结合于此。

发明内容

[0003] 如本文所公开的,某些类型的微生物胞外囊泡(mEV),例如从微生物(例如细菌)获得的分泌的微生物胞外囊泡(smEV)具有治疗效果,并且可用于治疗和/或预防疾病和/或健康障碍。

[0004] 在一些实施例中,本文提供的药物组合物可包含来自一种或多种微生物源,例如一种或多种细菌菌株的mEV(例如smEV)。在一些实施例中,本文提供的药物组合物可以包含来自一种微生物源,例如一种细菌菌株的mEV。可基于细菌的特性(例如,生长特征、产量、在测定或受试者中调节免疫应答的能力)来选择用作mEV来源的细菌菌株。包含mEV的药物组合物可以包含smEV。所述药物组合物可包含药学上可接受的赋形剂。

[0005] 在一些实施例中,本文提供的包含mEV(例如smEV)的药物组合物可例如在受试者(例如人)中用于治疗或预防疾病和/或健康障碍。

[0006] 在一些实施例中,本文提供的包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以制备为粉末(例如用于再悬浮)或固体剂型,例如片剂、微型片剂、胶囊、丸剂或粉末;或这些形式的组合(例如,包含在胶囊中的微型片剂)。固体剂型可以包括包衣(例如肠溶包衣)。

[0007] 在一些实施例中,本文提供的药物组合物可包含冻干的mEV(例如smEV)。冻干的mEV(如smEV)可配制成固体剂型,如片剂、微型片剂、胶囊、丸剂或粉末;也可以在溶液中重新悬浮。

[0008] 在一些实施例中,本文提供的药物组合物可包含γ照射的mEV(例如smEV)。经γ照射mEV(如smEV)可制成固体剂型,如片剂、微型片剂、胶囊、丸剂或粉末;也可以在溶液中重新悬浮。

[0009] 在一些实施例中,本文提供的包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以口服施用。

[0010] 在一些实施例中,本文提供的包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以静脉内施用。

[0011] 在一些实施例中,本文提供的包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以瘤内或瘤下地例如施用给患有肿瘤的受试者。

[0012] 在某些方面,本文提供了包含用于治疗和/或预防疾病或健康障碍(例如,不利的健康障碍)(例如癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调或代谢性疾病)的mEV(例如smEV)的药物组合物,以及制备和/或鉴定此类mEV的方法,和使用此类药物组合物的方法(例如,单独或与其他治疗剂组合用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调或代谢性疾病)。在一些实施例中,药物组合物包含mEV和从其获得mEV的完整微生物,例如细菌(例如,活细菌、被杀死的细菌、减毒细菌)。在一些实施例中,药物组合物在不存在从其获得

mEV的微生物(例如细菌)的情况下包含mEV(例如,药物组合物的微生物源含量的约95%以上(或约99%以上)包含mEV)。

[0013] 在一些实施例中,药物组合物包含来自表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株或物种中的一种或多种的mEV。

[0014] 在一些实施例中,药物组合物包含分离的mEV(例如,来自一种或多种细菌菌株(例如,目的细菌)(例如,其治疗有效量)。例如,其中药物组合物的至少50%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的含量是分离的mEV的细菌(例如目的细菌)。

[0015] 在一些实施例中,药物组合物包含分离的mEV(例如,来自一种细菌菌株(例如,目的细菌)(例如,其治疗有效量)。例如,其中药物组合物的至少50%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%的含量是分离的mEV的细菌(例如目的细菌)。

[0016] 在一些实施例中,药物组合物包含分泌的mEV(smEV)。

[0017] 在一些实施例中,药物组合物包含mEV,并且mEV来自一种细菌菌株。

[0018] 在一些实施例中,药物组合物包含mEV,并且mEV来自一种细菌菌株。

[0019] 在一些实施例中,mEV被冻干(例如,冻干的产物进一步包含药学上可接受的赋形剂)。

[0020] 在一些实施例中,mEV被γ照射。

[0021] 在一些实施例中,mEV被UV照射。

[0022] 在一些实施例中,mEV被热灭活(例如,在50℃下两小时或在90℃下两小时)。

[0023] 在一些实施例中,mEV被酸处理。

[0024] 在一些实施例中,mEV被喷氧(例如,以0.1vvm持续两小时)。

[0025] 在一些实施例中,mEV来自革兰氏阳性细菌。

[0026] 在一些实施例中,mEV来自革兰氏阴性细菌。

[0027] 在一些实施例中,mEV来自需氧细菌。

[0028] 在一些实施例中,mEV来自厌氧细菌。

[0029] 在一些实施例中,mEV来自嗜酸细菌。

[0030] 在一些实施例中,mEV来自嗜碱细菌。

[0031] 在一些实施例中,mEV来自嗜中性细菌。

[0032] 在一些实施例中,mEV来自难养细菌。

[0033] 在一些实施例中,mEV来自非难养细菌。

[0034] 在一些实施例中,mEV来自表1、表2或表3中列出的细菌菌株。

[0035] 在一些实施例中,革兰氏阴性细菌属于Negativicutes纲。

[0036] 在一些实施例中,革兰氏阴性细菌属于韦荣氏球菌科(Veillonellaceae)、月形单孢菌科(Selenomonadaceae)、氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)或Sporomusaceae。

[0037] 在一些实施例中,mEV来自以下属的细菌:巨球型菌属(Megasphaera)、月形单胞菌属(Selenomonas)、Propionospora、或氨基酸球菌属(Acidaminococcus)。

[0038] 在一些实施例中,mEV是巨球型菌属物种(Megasphaera sp.)、菲利克斯新月形单胞菌(Selenomonas felix)、肠氨基酸球菌(Acidaminococcus intestine)、或Propionospora属物种细菌。

[0039] 在一些实施例中,mEV来自乳球菌属、普雷沃菌属、双歧杆菌属、或韦荣氏球菌属的细菌。

[0040] 在一些实施例中,mEV来自乳酸乳球菌乳脂亚种细菌。

[0041] 在一些实施例中,mEV来自栖组织普雷沃菌(Prevotella histicola)细菌。

[0042] 在一些实施例中,mEV来自动物双歧杆菌细菌。

[0043] 在一些实施例中,mEV来自小韦荣氏球菌细菌。

[0044] 在一些实施例中,mEV来自乳酸乳球菌乳脂亚种细菌。在一些实施例中,所述乳酸乳球菌乳脂亚种细菌来自与乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A(ATCC指定编号PTA-125368)的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述乳球菌属细菌来自与乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A(ATCC指定编号PTA-125368)的核苷酸序列具有至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述乳球菌属细菌来自乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A(ATCC指定编号PTA-125368)。

[0045] 在一些实施例中,mEV来自普雷沃菌属细菌。在一些实施例中,所述普雷沃菌属细菌来自包含与该普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登录号B 50329)的核苷酸序列有至少90%(或至少97%)基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述普雷沃菌属细菌来自包含与该普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登录号B 50329)的核苷酸序列有至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述普雷沃菌属细菌来自普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登录号B 50329)。

[0046] 在一些实施例中,mEV来自双歧杆菌细菌。在一些实施例中,所述双歧杆菌属细菌来自与双歧杆菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125097)的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述双歧杆菌属细菌来自与双歧杆菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125097)的核苷酸序列具有至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述双歧杆菌属细菌来自双歧杆菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125097)。

[0047] 在一些实施例中,mEV来自韦荣氏球菌属细菌。在一些实施例中,所述韦荣氏球菌属细菌来自与韦荣氏球菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125691)的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述韦荣氏球菌属细菌来自与韦荣氏球菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125691)的核苷酸序列具有至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述韦荣氏球菌属细菌来自韦荣氏球菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125691)。

[0048] 在一些实施例中,mEV来自活泼瘤胃球菌细菌。在一些实施例中,所述活泼瘤胃球菌细菌来自与活泼瘤胃球菌细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126695)的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述活泼瘤胃球菌细菌来自与活泼瘤胃球菌细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126695)的核苷酸序列具有至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述活泼瘤胃球菌细菌来自活泼瘤胃球菌细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126695)。

[0049] 在一些实施例中,mEV来自巨型球菌属物种细菌。在一些实施例中,所述巨型球菌属物种细菌来自与巨型球菌属物种细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126770)的核苷酸序列具有至少90%或至少97%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所

述巨型球菌属物种细菌来自与巨型球菌属物种细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126770)的核苷酸序列具有至少99％基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述巨型球菌属物种细菌来自巨型球菌属物种细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126770)。

[0050] 在一些实施例中,mEV来自Fournierella massiliensis细菌。在一些实施例中,所述Fournierella massiliensis细菌来自与Fournierella massiliensis细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126694)的核苷酸序列具有至少90％或至少97％基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述Fournierella massiliensis细菌来自与Fournierella massiliensis细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126694)的核苷酸序列具有至少99％基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述Fournierella massiliensis细菌来自Fournierella massiliensis细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126694)。

[0051] 在一些实施例中,mEV来自Harryflintia acetispora细菌。在一些实施例中,所述Harryflintia acetispora细菌来自与Harryflintia acetispora细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126696)的核苷酸序列具有至少90％或至少97％基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述Harryflintia acetispora细菌来自与Harryflintia acetispora细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126696)的核苷酸序列具有至少99％基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,所述Harryflintia acetispora细菌来自Harryflintia acetispora细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-126696)。

[0052] 在一些实施例中,mEV来自以下属的细菌:阿克曼氏菌属、克里斯滕森氏菌属、布劳特氏菌属、肠球菌属、真杆菌属、拜瑞氏菌属、拟杆菌属、副拟杆菌属或Erysipelatoclostridium。

[0053] 在一些实施例中,mEV来自产氢营养型布劳特氏菌、排泄物布劳特氏菌、韦氏布劳特氏菌、粪真杆菌、扭曲真杆菌、直肠真杆菌、粪肠球菌、耐久肠球菌、Enterococcus villorum、鹑鸡肠球菌;乳酸双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、动物双歧杆菌或短双歧杆菌细菌。

[0054] 在一些实施例中,mEV来自BCG(卡介苗),副拟杆菌属、布劳特氏菌属、韦荣氏球菌属、唾液乳杆菌、阿加萨杆菌属(Agathobaculum)、活泼瘤胃球菌、解苯副梭菌、Turicibacter sanguinus、伯克霍尔德菌属、类肺炎克雷白氏菌拟肺炎亚种、催产克雷白氏菌、纳西利斯泰泽菌(Tyzerella nexilis)或奈瑟菌属细菌。

[0055] 在一些实施例中,mEV来自产氢营养型布劳特氏菌(Blautia hydrogenotrophica)细菌。

[0056] 在一些实施例中,mEV来自排泄物布劳特氏菌(Blautia stercoris)细菌。

[0057] 在一些实施例中,mEV来自韦氏布劳特氏菌(Blautia wexlerae)细菌。

[0058] 在一些实施例中,mEV来自鹑鸡肠球菌(Enterococcus gallinarum)细菌。

[0059] 在一些实施例中,mEV来自屎肠球菌(Enterococcus faecium)细菌。

[0060] 在一些实施例中,mEV来自两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidium)细菌。

[0061] 在一些实施例中,mEV来自短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)细菌。

[0062] 在一些实施例中,mEV来自长双歧杆菌(Bifidobacterium longum)细菌。

[0063] 在一些实施例中,mEV来自人罗斯拜瑞氏菌(Roseburia hominis)细菌。

[0064] 在一些实施例中,mEV来自多形拟杆菌(Bacteroides thetaiotaomicron)细菌。

[0065] 在一些实施例中,mEV来自粪居拟杆菌(Bacteroides coprocola)细菌。

[0066] 在一些实施例中,mEV来自Erysipelatoclostridium ramosum细菌。

[0067] 在一些实施例中,mEV来自马赛巨型球菌(Megasphera massiliensis)细菌。

[0068] 在一些实施例中,mEV来自真杆菌属(Eubacterium)细菌。

[0069] 在一些实施例中,mEV来自狄氏副拟杆菌(Parabacteroides distasonis)细菌。

[0070] 在某些方面,mEV(如smEV)是从已经基于某些所需特性选择的细菌中获得的,所述特性是降低的毒性和不利影响(例如,通过去除或缺失脂多糖(LPS)),增强的口服递送(例如通过改善酸抗性、粘膜黏附性和/或渗透性和/或针对胆汁酸的抗性、针对抗微生物肽和/或抗体中和的抗性),靶向所希望的细胞类型(例如M细胞、杯状细胞、肠上皮细胞、树突细胞、巨噬细胞)全身性的或在适当生态位中的改善的生物利用度(例如肠系膜淋巴结、派伊尔结、固有层、肿瘤引流淋巴结和/或血液),增强的免疫调节和/或治疗作用(例如,单独或与另一种治疗剂组合),增强的免疫活化和/或制造属性(例如,生长特征、产率、更高的稳定性,改善的冻融耐受性,更短的生成时间)。

[0071] 在某些方面中,mEV来自工程改造的细菌,所述工程改造的细菌经修饰以增强某些所需性质。在一些实施例中,对工程改造的细菌进行修饰,使得由其产生的mEV(例如smEV)将具有降低的毒性和不利影响(例如,通过去除或缺失脂多糖(LPS)),增强的口服递送(例如通过改善酸抗性、粘膜黏附性和/或渗透性和/或针对胆汁酸的抗性、针对抗微生物肽和/或抗体中和的抗性),靶向所希望的细胞类型(例如M细胞、杯状细胞、肠上皮细胞、树突细胞、巨噬细胞)全身性的或在适当生态位中的改善的生物利用度(例如肠系膜淋巴结、派伊尔结、固有层、肿瘤引流淋巴结和/或血液),增强的免疫调节和/或治疗作用(例如,单独或与另一种治疗剂组合),增强的免疫活化和/或制造属性(例如,生长特征、产率、更高的稳定性,改善的冻融耐受性,更短的生成时间)。在一些实施例中,本文提供制造此mEV(例如smEV)的方法。

[0072] 在某些方面,本文提供了包含用于治疗和/或预防疾病或健康障碍(例如癌症,自身免疫性疾病,炎性疾病或代谢性疾病)的mEV(例如smEV)的药物组合物,以及制备和/或鉴定此类mEV的方法,和单独或与一种或多种其他治疗剂组合地使用此类药物组合物的方法(例如,用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病或代谢性疾病)。

[0073] 含有mEV(如smEV)的药物组合物可提供与含有从其获得mEV的完整微生物的药物组合物相当或更大的效力。例如,在相同剂量的mEV(例如,基于颗粒计数或蛋白质含量)下,含有mEV的药物组合物可提供与含有从其获得mEV的同一细菌菌株的完整微生物的可比药物组合物相当或更大的效力。这样的含有mEV的药物组合物可以允许更高剂量的施用,并引起与含有从其获得mEV的同一细菌菌株的完整微生物的可比药物组合物所观察到的相当或更大(例如,更有效)的应答。

[0074] 作为另一个实例,在相同剂量下(例如,基于颗粒计数或蛋白质含量),与含有从其获得mEV的同一细菌菌株的完整微生物的药物组合物相比,包含mEV的药物组合物可以包含更少的微生物衍生材料(基于颗粒计数或蛋白质含量),同时为接受这种药物组合物的受试者提供相当或更大的治疗益处。

[0075] 作为另一个例子,mEV可以以例如约$1x10^{7}$-约$1x10^{15}$个颗粒的剂量施用,例如由NTA

测量。

[0076] 作为另一个实例,mEV可以以例如约5mg至约900mg总蛋白的剂量施用,例如通过布拉德福德(Bradford)测定测量。作为另一个实例,mEV可以以例如约5mg至约900mg总蛋白的剂量施用,例如通过BCA测定测量。

[0077] 在某些实施例中,本文提供治疗患有癌症的受试者的方法,这些方法包括向所述受试者施用本文描述的药物组合物。在某些实施例中,本文提供治疗患有免疫障碍(例如,自身免疫性疾病、炎性疾病、过敏)的受试者,这些方法包括向所述受试者施用本文描述的药物组合物。在某些实施例中,本文提供治疗患有代谢性疾病的受试者的方法,这些方法包括向所述受试者施用本文描述的药物组合物。在某些实施例中,本文提供治疗患有神经疾病的受试者的方法,这些方法包括向所述受试者施用本文描述的药物组合物。

[0078] 在一些实施例中,所述方法进一步包括向受试者施用抗生素。在一些实施例中,所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种其他癌症治疗(例如,手术移除肿瘤、施用化学治疗剂、施用放射疗法和/或施用癌症免疫疗法,诸如免疫检查点抑制剂、癌症特异性抗体、癌症疫苗、经引发的抗原呈现细胞(primed antigen presenting cell)、癌症特异性T细胞、癌症特异性嵌合抗原受体(CAR)T细胞、免疫活化蛋白和/或佐剂)。在一些实施例中,所述方法还包括施用另一种治疗性细菌和/或来自一种或多种其他细菌菌株(例如,治疗性细菌)的mEV(例如smEV)。在一些实施例中,所述方法还包括施用免疫抑制剂和/或抗炎剂。在一些实施例中,所述方法进一步包括施用代谢性疾病治疗剂。

[0079] 在某些方面,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于单独或与一种或多种其他治疗剂组合治疗和/或预防疾病(例如癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调或代谢性疾病)或健康障碍。

[0080] 在某些实施例中,本文提供包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的癌症。所述药物组合物可以单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合用于治疗癌症。在某些实施例中,本文提供包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的免疫障碍(例如自身免疫性疾病、炎性疾病、过敏)。所述药物组合物可以单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合用于治疗免疫障碍。在某些实施例中,本文提供包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的菌群失调。所述药物组合物可以单独使用或与治疗剂组合用于治疗菌群失调。在某些实施例中,本文提供包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的代谢性疾病。所述药物组合物可以单独使用或与治疗剂组合用于治疗代谢性疾病。在某些实施例中,本文提供包含mEV(例如smEV)的药物组合物,用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的神经疾病。所述药物组合物可以单独使用或与一种或多种其他治疗剂组合用于治疗神经障碍。

[0081] 在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与抗生素组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可用于与一种或多种其他癌症疗法(例如,手术移除肿瘤、使用化学治疗剂、使用放射疗法和/或使用癌症免疫疗法,诸如免疫检查点抑制剂、癌症特异性抗体、癌症疫苗、经引发的抗原呈现细胞(primed antigen presenting cell)、癌症特异性T细胞、癌症特异性嵌合抗原受体(CAR)T细胞、免疫活化蛋白和/或佐剂)组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与另一种治疗性细菌和/或从一种或多种其他细菌菌株(例

如治疗性细菌)获得的mEV组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与一种或多种免疫抑制剂和/或抗炎剂组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与一种或多种其他代谢性疾病治疗剂组合使用。

[0082] 在某些方面,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物用于制备药物的用途,所述药物用于单独地或与另一种治疗剂组合地治疗和/或预防疾病(例如癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病、菌群失调或代谢性疾病)。在一些实施例中,所述用途与另一种治疗性细菌和/或从一种或多种其他细菌菌株(例如,治疗性细菌)获得的mEV组合使用。

[0083] 在某些实施例中,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物用于制备用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的癌症的药物的用途。对于癌症,所述药物组合物可以单独使用或与另一种治疗剂组合使用。在某些实施例中,本文提供了包含mEV的药物组合物的用途(用于制备用于治疗和/或预防受试者(例如,人)中的免疫障碍(例如,自身免疫性疾病、炎性疾病、过敏)的药物)。对于免疫障碍,所述药物组合物可以单独使用或与另一种治疗剂组合使用。在某些实施例中,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物用于制备用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的菌群失调的药物的用途。对于菌群失调,所述药物组合物可以单独使用或与另一种治疗剂组合使用。在某些实施例中,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物用于制备用于治疗和/或预防受试者(例如人)中的代谢性疾病的药物的用途。对于代谢性疾病,所述药物组合物可以单独使用或与另一种治疗剂组合使用。在某些实施例中,本文提供了包含mEV(例如smEV)的药物组合物用于制备用于治疗和或预防受试者(例如人)中的神经疾病的药物的用途。对于神经障碍,所述药物组合物可以单独使用或与另一种治疗剂组合使用。

[0084] 在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与抗生素组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可用于与一种或多种其他癌症疗法(例如,手术移除肿瘤、使用化学治疗剂、使用放射疗法和/或使用癌症免疫疗法,诸如免疫检查点抑制剂、癌症特异性抗体、癌症疫苗、经引发的抗原呈现细胞(primed antigen presenting cell)、癌症特异性T细胞、癌症特异性嵌合抗原受体(CAR)T细胞、免疫活化蛋白和/或佐剂)组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与另一种治疗性细菌和/或从一种或多种其他细菌菌株(例如治疗性细菌)获得的mEV组合使用。在一些实施例中,包含mEV的药物组合物可与一种或多种其他免疫抑制剂和/或抗炎剂组合使用。在一些实施例中,所述药物组合物可与一种或多种其他代谢性疾病治疗剂组合使用。

[0085] 如本文所述,包含mEV(例如smEV)的药物组合物可向受试者例如人提供治疗有效量的mEV。

[0086] 如本文所述,包含mEV(例如smEV)的药物组合物可向受试者例如人提供非天然量的治疗有效成分(例如存在于mEV(例如smEV)中)。

[0087] 如本文所述,包含mEV(例如smEV)的药物组合物可向受试者例如人提供非天然量的治疗有效成分(例如存在于mEV(例如smEV)中)。

[0088] 如本文所述,包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以给受试者(例如人)带来一种或多种改变,以治疗或预防疾病或健康障碍。

[0089] 如本文所述,包含mEV(例如smEV)的药物组合物具有潜在的显著效用,例如影响受试者(例如人),例如治疗或预防疾病或健康障碍。

附图说明

[0090] 图1显示了第11天在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自动物双歧杆菌乳酸亚种的经加工的微生物胞外囊泡(pmEV)的功效。

[0091] 图2显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自丁酸厌氧棒杆菌的pmEV的功效。

[0092] 图3显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自酿脓链球菌的pmEV的功效。

[0093] 图4显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自解苯副梭菌的pmEV的功效。

[0094] 图5显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自Hungatella属物种的pmEV的功效。

[0095] 图6显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自金黄色葡萄球菌的pmEV的功效。

[0096] 图7显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自泼瘤胃球菌的pmEV的功效。

[0097] 图8显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自动物双歧杆菌乳酸亚种和马赛巨型球菌的pmEV的功效。

[0098] 图9显示在第9天,在小鼠结直肠癌模型中,与腹膜内(i.p.)施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自泼瘤胃球菌的pmEV的功效。

[0099] 图10显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自泼瘤胃球菌的pmEV的功效。

[0100] 图11显示在第9天,在小鼠结直肠癌模型中,与抗PD-1(单独)或媒剂相比,i.v.施用单独的来自动物双歧杆菌乳酸亚种的pmEV或与抗PD-1组合的功效。

[0101] 图12显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与抗PD-1(单独)或媒剂相比,i.v.施用单独的来自动物双歧杆菌乳酸亚种的pmEV或与抗PD-1组合的功效。

[0102] 图13显示在第9天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自狄氏副拟杆菌的pmEV的功效。

[0103] 图14显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自狄氏副拟杆菌的pmEV的功效。

[0104] 图15显示了与地塞米松相比,经口强饲来自狄氏副拟杆菌的pmEV的功效。来自狄氏副拟杆菌的pmEV在低(6.0E+07)、中(6.0E+09)和高(6.0E+11)剂量下进行测试。

[0105] 图16显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自小韦荣氏球菌的smEV的功效。

[0106] 图17显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自小韦荣氏球菌的smEV的功效。来自小韦荣氏球菌的smEV以2ug/剂量、5ug/剂量和10ug/剂量进行测试。

[0107] 图18显示在第11天,在小鼠结直肠癌模型中,与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比,i.v.施用来自非典型韦荣氏球菌的smEV的功效。来自非典型韦荣氏球菌的smEV以2.0e+11PC、7.0e+10PC和1.5e+10PC进行测试。

[0108] 图19显示在第11天，在小鼠结直肠癌模型中，与i.p.施用的抗PD-1或媒剂相比，i.v.施用来自当别町韦荣氏球菌(Veillonella tobetsuensis)的smEV的功效。来自当别町韦荣氏球菌的smEV以2ug/剂量、5ug/剂量和10ug/剂量进行测试。

[0109] 图20显示了在基于KLH的迟发型超敏反应模型中在抗原激发后，与媒剂(阴性对照)和地塞米松(阳性对照)相比，口服施用的高(6.0e+11颗粒计数)、中(6.0e+9颗粒计数)和低(6.0e+7颗粒计数)浓度的来自栖组织普雷沃菌的smEV和冻干smEV在24小时处减少抗原特异性耳肿胀(耳厚度)方面的功效。

[0110] 图21显示在DTH模型中，在24小时时间点处，来自栖组织普雷沃菌(Prevotella histicola，P.histicola)菌株的pmEV和冻干pmEV的三种剂量(低、中和高)与来自相同栖组织普雷沃菌菌株的粉末的功效相比，在减少耳朵厚度方面的功效(通过24小时耳部测量确定)。地塞米松用作阳性对照。

[0111] 图22显示在DTH模型中，在24小时时间点处，来自小韦荣氏球菌(Veillonella parvula，V.parvula)菌株的smEV以及来自相同小韦荣氏球菌菌株的pmEV和γ辐照(GI)的pmEV的三种剂量(低、中和高)与来自相同小韦荣氏球菌菌株的γ照射(GI)的粉末的功效相比，在减少耳朵厚度方面的功效(通过24小时耳部测量确定)。地塞米松用作阳性对照。

[0112] 图23显示了来自巨型球菌属物种菌株A的两种剂量(低剂量和高剂量)的smEV的效力(如通过24小时耳部测量确定)。

[0113] 图24显示了来自巨型球菌属物种菌株B的两种剂量(低剂量和高剂量)的smEV的效力(如通过24小时耳部测量确定)。

[0114] 图25显示了来自菲利克斯新月形单胞菌的两种剂量(低剂量和高剂量)的smEV的效力(如通过24小时耳部测量确定)。

[0115] 图26显示了来自巨型球菌属物种菌株A的smEV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。用$1x10^{6}$-$1x10^{9}$浓度的smEV以及TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂对照处理U937细胞24小时，并且测量细胞因子的产生。“空白”表示培养基对照。

[0116] 图27A和27B显示了巨型球菌属物种菌株A smEV(2e11)与阴性对照(载剂PBS)和阳性对照(抗PD-1)比较的第22天肿瘤体积汇总(图27A)和肿瘤体积曲线(图27B)。

[0117] 图28A和28B显示了巨型球菌属物种菌株A smEV(以3个剂量(2e11、2e9和2e7))BID以及巨型球菌属物种smEV(2e11)QD与阴性对照(载剂PBS)和阳性对照(抗PD-1)比较的第23天肿瘤体积汇总(图28A)和肿瘤体积曲线(图28B)。

[0118] 图29显示了d10肿瘤用来自鹑鸡肠球菌菌株A和B的pmEV每天给药一次，持续14天后的肿瘤体积。

[0119] 图30显示了来自巨型球菌属物种菌株A的EV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示培养基对照。

[0120] 图31显示了来自巨型球菌属物种菌株B的EV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示培养基对照。

[0121] 图32显示了来自菲利克斯新月形单胞菌的EV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示

培养基对照。

[0122] 图33显示了来自肠氨基酸球菌的EV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示培养基对照。

[0123] 图34显示了来自Propionospora属物种的EV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示培养基对照。

具体实施方式

[0124] 定义

[0125] “佐剂”或“辅助疗法”在广义上是指影响患者或受试者(例如人)中的免疫学或生理学反应的药剂。例如,佐剂可增加抗原随时间或在目的区域(如肿瘤)中的存在,帮助吸收抗原呈递细胞抗原,活化巨噬细胞及淋巴细胞并且支持细胞因子的产生。通过改变免疫应答,佐剂可允许使用较小剂量的免疫相互作用剂以增加特定剂量的免疫相互作用剂的有效性或安全性。例如,佐剂可预防T细胞耗竭且由此增加特定免疫相互作用剂的有效性或安全性。

[0126] “施用”广义上是指将组合物(例如,药物组合物)施用给受试者的途径。施用途径的实例包含口服施用、直肠施用、局部施用、吸入(经鼻)或注射。注射施用包含静脉内(IV)、肌内(IM)、肿瘤内(IT)及皮下(SC)施用。本文描述的药物组合物可以任何形式通过任何有效途径施用,包括(但不限于)瘤内、经口、非经肠、肠内、静脉内、腹膜内、局部、经皮(例如,使用任何标准贴剂)、皮内、经眼、经鼻(鼻内)、局部、非经口(诸如喷雾)、吸入、皮下、肌内、颊、舌下、(经)直肠、阴道、动脉内及鞘内、经黏膜(例如,舌下、经舌、(经)颊、(经)尿道、阴道(例如,经阴道及阴道周围)、植入、膀胱内、肺内、十二指肠内、胃内及支气管内。在优选的实施例中,通过以下形式施用本文所述的药物组合物:经口、经直肠、经肿瘤内、经局部、经膀胱内、通过注射至引流淋巴结中或毗邻引流淋巴结处、经静脉内、通过吸入或气溶胶或经皮下。在另一个优选实施例中,本文所述的药物组合物口服、瘤内或静脉内施用。

[0127] 如本文中所使用,术语“抗体”可指完整抗体及其抗原结合片段二者。完整抗体是包含由二硫键相互连接的至少两条重(H)链及两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为V_H)及重链恒定区。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为V_L)及轻链恒定区。V_H及V_L区可进一步细分成超变区(称为互补决定区(CDR))及更保守区(称为框架区(FR)),二者散布排列。每个V_H及V_L由三个CDR及四个FR构成,其自氨基-末端至羧基-末端按下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语“抗体”包含(例如)单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单链抗体及抗原结合抗体片段。

[0128] 如本文中所使用,术语抗体的“抗原结合片段”及“抗原结合部分”是指抗体中保留结合抗原的能力的一个或多个片段。术语抗体的“抗原结合片段”内所涵盖结合片段的实例包含Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv、scFv、二硫化物连接的Fv、Fd、双抗体、单链抗体、NANOBODIES®、经分离CDRH3及其他保留完整抗体的至少一部分可变区的抗体片段。这些抗体片段可使用常规重组和/或酶促技术来获得且可以与完整抗体相同的方式针对抗

原结合进行筛选。

[0129] “癌症”在广义上是指宿主自有细胞的不受控、异常生长，其会侵袭宿主中的环绕组织及潜在地远离异常细胞生长初始位点的组织。主要种类包含是上皮组织(例如皮肤、鳞状细胞)癌症的癌瘤；是结缔组织(例如骨、软骨、脂肪、肌肉、血管等)癌症的肉瘤；是血液形成组织(例如骨髓组织)癌症的白血病；是免疫细胞癌症的淋巴瘤及骨髓瘤；及包含脑及脊柱组织癌症的中枢神经系统癌症。“一种或多种癌症”和“一种或多种赘瘤”在本文中可互换使用。如本文中所使用，“癌症”是指所有类型的新或复发癌症或赘瘤或恶性肿瘤，包含白血病、上皮癌及肉瘤。癌症的具体实例是：上皮癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及混合型肿瘤。癌症的非限制性实例是以下新或复发癌症：脑癌、黑色素瘤、膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宫癌及髓母细胞瘤。在一些实施例中，癌症包括实体瘤。在一些实施例中，癌症包括转移。

[0130] “碳水化合物”是指糖或糖聚合物。术语“糖”、“多糖”、“碳水化合物”及“寡糖”可互换使用。大部分碳水化合物是具有许多羟基的醛或酮，通常在分子的每一碳原子上具有一个羟基。碳水化合物通常具有分子式$C_nH_{2n}O_n$。碳水化合物可为单糖、二糖、三糖、寡糖或多糖。最基本的碳水化合物是单糖，例如葡萄糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖及果糖。二糖是两个接合的单糖。示例性二糖包含蔗糖、麦芽糖、纤维二糖及乳糖。通常，寡糖包含3至6个单糖单元(例如棉子糖、水苏糖)，且多糖包含6个或更多个单糖单元。示例性多糖包含淀粉、糖原及纤维素。碳水化合物可含有经修饰糖单元，例如2’-脱氧核糖，其中去除羟基，2’-氟核糖，其中羟基经氟代替；或N-乙酰基葡萄糖胺，其为葡萄糖的含氮形式(例如2’-氟核糖、脱氧核糖及己糖)。碳水化合物可以许多不同形式存在，例如构象异构体、环状形式、非环状形式、立体异构体、互变异构体、端基差向异构体及异构体。

[0131] “细胞增强”广泛地指细胞的流入或细胞在环境中的扩增，这些细胞在施用组合物之前大体上不存在于该环境中且不存在于所述组合物本身中。增强环境的细胞包括免疫细胞、基质细胞、细菌及真菌细胞。特别受关注的环境是其中癌细胞驻留或定位的微环境。在一些实例中，所述微环境是肿瘤微环境或肿瘤引流淋巴结。在其他实例中，所述微环境是癌前组织位点或组合物的局部施用位点或其中所述组合物在远程施用后将积聚的位点。

[0132] “进化枝”指系统发育树的OTU或成员，它们是系统发育树中的统计有效节点的下游。进化枝包含系统发育树中的一组末端叶，其是不同的单系进化单元且在某种程度上共享序列相似性。

[0133] 来自两个或更多个微生物菌株的mEV(例如smEV)的“组合”包括从其获得mEV(例如smEV)的微生物在同一材料或产品中或在物理相连的产品中物理共存，以及来自两个菌株的mEV(例如smEV)在时间上共同施用或共同定位。

[0134] “菌群失调”是指肠道或其它身体区域的微生物群或微生物组的状态，包括，例如，黏膜或皮肤表面(或任何其它微生物组生态位)，在该状态下宿主肠道微生物组生态网络“微生物组”的正常的多样性和/或功能被破坏。菌群失调可能导致疾病状态，或者仅在某些条件下或仅长期存在时可能是不健康的。菌群失调可能是由于多种因素引起的，包括环境因素、传染原、宿主基因型、宿主饮食和/或压力。菌群失调可能导致：一个或多个细菌类型(例如，厌氧菌)、物种和/或菌株的普遍度发生变化(例如，增加或减少)，宿主微生物组群体组成的多样性发生变化(例如，增加或减少)；导致一个或多个有益效应减少或丧失的一个

或多个共生生物群体的变化(例如,增加或减少);一个或多个病原体(例如,病原细菌)群体的过度生长;和/或仅在某些情况下引起疾病的共生生物的存在、和/或过度生长。

[0135] 术语“降低”或“消耗”意指变化,从而取决于治疗后状态与治疗前状态相比的差异为至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1/100、1/1000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000或不可检测。可能降低的特性包括免疫细胞、细菌细胞、基质细胞、髓样来源的抑制细胞、成纤维细胞、代谢物的数量;细胞因子的水平;或其他物理参数(例如耳厚度(例如,在DTH动物模型中)或肿瘤的大小(例如,在动物肿瘤模型中))。

[0136] 术语“生态聚生体(ecological consortium)”是交换代谢物且彼此正性共调控的一组细菌,这与经由活化互补宿主通路来诱导宿主协同作用以改进功效的两种细菌形成对比。

[0137] 如本文中所使用,“工程改造的细菌”是通过人为活动已在遗传上自天然状态改变的任何细菌及任何这类细菌的继代。工程改造的细菌包括(例如)靶向遗传修饰的产物、随机诱变筛选的产物及定向演化的产物。

[0138] 术语“表位”意指可特异性结合至抗体或T细胞受体的蛋白质决定子。表位通常由如氨基酸或糖侧链等分子的化学活性表面分组组成。某些表位可通过抗体能够结合的氨基酸的特定序列来定义。

[0139] 术语“基因”在广义上用于指与生物功能有关的任一核酸。术语“基因”适用于特定基因组序列以及由该基因组序列编码的cDNA或mRNA。

[0140] 两种核酸分子的核酸序列之间“同一性”可使用已知计算机算法(例如“FASTA”程序)使用(例如)如Pearson等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444中的预设参数测定为同一性百分比(其他程序包含GCG程序包(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research[核酸研究]12(I):387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA Atschul,S.F.等人,J Molec Biol[分子生物学杂志]215:403(1990);Guide to Huge Computers[巨型计算机指南],Mrtin J.Bishop编辑,Academic Press[学术出版社],San Diego[圣地亚哥],1994及Carillo等人(1988)SIAM J Applied Math[工业和应用数学学会应用数学杂志]48:1073)。例如,可使用国家生物技术信息中心数据库(National Center for Biotechnology Information database)的BLAST功能来测定同一性。其他可商业或公开获得的程序包含DNAStar“MegAlign”程序(威斯康星州麦迪逊市(Madison,Wis.))及威斯康星大学遗传学计算机集团(University of Wisconsin Genetics Computer Group)(UWG)“Gap”程序(威斯康星州麦迪逊市(Madison,Wis.))。

[0141] 如本文中所使用,术语“免疫障碍”是指由免疫系统的活动引起的任何疾病、障碍或疾病症状,包括自身免疫性疾病、炎性疾病及过敏。免疫障碍包括(但不限于)自身免疫性疾病(例如,银屑病、特应性皮炎、狼疮、硬皮病、溶血性贫血、血管炎、一型糖尿病、格雷夫病(Grave’s disease)、类风湿性关节炎、多发性硬化、古德帕斯雷综合征(Goodpasture’s syndrome)、恶性贫血和/或肌病)、炎性疾病(例如,寻常型痤疮、哮喘、乳糜泻、慢性前列腺炎、肾小球性肾炎、炎性肠病、盆腔炎、再灌注损伤、类风湿性关节炎、肉状瘤病、移植排斥、血管炎和/或间质性膀胱炎),和/或过敏(例如,食物过敏、药物过敏和/或环境过敏)。

[0142] “免疫疗法”是使用受试者的免疫系统以治疗疾病(例如,免疫疾病、炎性疾病、代谢性疾病、癌症)的治疗且包括(例如)检查点抑制剂、癌症疫苗、细胞因子、细胞疗法、CAR-T

细胞及树突细胞疗法。

[0143] 术语“增加”意指变化，从而取决于治疗后状态大于治疗前状态至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、2倍、4倍、10倍、100倍、10^3倍、10^4倍、10^5倍、10^6倍和/或10^7倍的差别。可能增加的特性包括免疫细胞、细菌细胞、基质细胞、髓样来源的抑制细胞、成纤维细胞、代谢物的数量；细胞因子的水平；或其他物理参数(例如耳厚度(例如，在DTH动物模型中)或肿瘤的大小(例如，在动物肿瘤模型中))。

[0144] “先天免疫激动剂”或“免疫佐剂”是特异性靶向先天免疫受体(包括Toll样受体(TLR)、NOD受体、RLR、C型凝集素受体、STING-cGAS通路组分、发炎体复合物)的小分子、蛋白质或其他药剂。例如，LPS是细菌源的或合成的TLR-4激动剂且可使用铝作为免疫刺激佐剂。免疫佐剂是特定种类的较宽泛佐剂或辅助疗法。STING激动剂的实例包括(但不限于)2’3’-cGAMP、3’3’-cGAMP、c-di-AMP、c-di-GMP、2’2’-cGAMP及2’3’-cGAM(PS)2(Rp/Sp)(2’3’-cGAMP的双硫代磷酸酯类似物的Rp、Sp异构物)。TLR激动剂的实例包括(但不限于)TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10及TLRI l。NOD激动剂的实例包括(但不限于)：N-乙酰基胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异谷氨酰胺(胞壁酰二肽(MDP))、γ-D-谷氨酰基-内消旋-二氨基庚二酸(iE-DAP)及去胞壁酰肽(desmuramylpeptide；DMP)。

[0145] “内转录间隔区”或“ITS”是位于通常用于识别真核物种(特别地，真菌)的共同前体转录本上的结构核糖体RNA(rRNA)之间的一段非功能性RNA。形成核糖体的核的真菌的rRNA经转录为信号基因且由8S、5.8S及28S区域及分别在8S与5.8S之间及5.8S与28S区域之间的ITS4及5组成。如先前描述，在18S与5.8S之间及5.8S与28S区域之间的这类两个双译基因嵌段(intercistronic segment)通过剪接移除且出于条形码的目的在物种之间含有显著变化(Schoch等人，Nuclear ribosomal internal transcribed spacer(ITS)region as a universal DNA barcode marker for Fungi.[核糖体内转录间隔区(ITS)是真菌的通用DNA条形码标记]PNAS[美国国家科学院院刊]109:6241-6246.2012)。18S rDNA传统上用于系统发育重建，然而ITS可发挥此功能，因为其通常是高度保守的，但含有高变区，这些高变区具有足够的核苷酸多样性来区分大多数真菌的属及物种。

[0146] 术语“分离的”或“富集的”涵盖具有以下特征的微生物、mEV(例如smEV)或其他实体或物质：(1)与在最初产生(不论在自然界中或在实验环境中)时与其缔合的至少一些组分分离，和/或(2)人工产生、制备、纯化和/或制造。分离的微生物或mEV可与至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或更多的其最初关联的其他组分分离。在一些实施例中，分离的微生物或mEV是大于约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％或大于约99％纯的，例如基本上不含其他组分。术语“纯化(purify)”、“进行纯化(purifying)”及“纯化的(purified)”是指已与在最初产生或生成(例如不论在自然界中或在实验环境中)时或在其初始产生之后的任一时间期间与其缔合的至少一些组分分离的微生物或mEV或其他材料。如果在产生时或在产生之后(例如)自含有微生物或微生物群体或mEV的材料或环境分离，则该微生物或微生物群体或mEV可视为纯化的，且纯化的微生物或微生物群体或mEV群体可含有最高约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％或高于约90％的其他材料且仍视为“分离的”。在一些实施例中，经纯化微生物或mEV或微生物群体是大于约80％、约85％、约90％、约91％、约92％、约93％、约94％、约95％、约96％、约97％、约98％、约

99％或大于约99％纯的。在本文所提供微生物组合物的情况下，存在于所述组合物中的一种或多种微生物类型可与独立于一种或多种产生和/或存在于含有该微生物类型的材料或环境中的其他微生物来纯化。微生物组合物及其微生物组分(例如或mEV)通常纯化自残余生境产物。

[0147] 如本文中所使用，“脂质”包括脂肪、油、三酸甘油酯、胆固醇、磷脂质、任何形式的脂肪酸(包括游离脂肪酸)。脂肪、油及脂肪酸可为饱和、不饱和(顺式或反式)或部分不饱和(顺式或反式)。

[0148] 术语“LPS突变体或脂多糖突变体”广泛地指包含LPS丧失的选定细菌。LPS丧失可能是由于与脂质A生物合成相关的基因如lpxA、lpxC和lpxD的突变或破坏所致。包含LPS突变体的细菌可对氨基糖苷类和多粘菌素(多粘菌素B和粘菌素)是抗性的。

[0149] 如本文中所使用的“代谢物”是指在任何细胞或微生物代谢反应中用作底物或作为产物化合物、组合物、分子、离子、辅助因子、催化剂或营养素产生自任何细胞或微生物代谢反应的任何及所有分子化合物、组合物、分子、离子、辅助因子、催化剂或营养素。

[0150] “微生物”是指表征为古生物、寄生虫、细菌、真菌、微观藻类、原生动物及与该生物体相关的发育阶段或生命周期阶段(例如，植物、孢子(包括孢子形成、休眠及萌发)、潜伏、生物膜)的任何天然或经改造的生物体。肠道微生物的实例包括：葛氏放线菌(Actinomyces graevenitzii)、龋齿放线菌(Actinomyces odontolyticus)、嗜黏蛋白阿克曼氏菌(Akkermansia muciniphila)、粪拟杆菌(Bacteroides caccae)、脆弱拟杆菌(Bacteroides fragilis)、腐败拟杆菌(Bacteroides putredinis)、多形拟杆菌(Bacteroides thetaiotaomicron)、普通拟杆菌(Bacteroides vultagus)、青春双歧杆菌(Bifidobacterium adolescentis)、两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)、对沃氏嗜胆菌(Bilophila wadsworthia)、布劳特氏菌属(Blautia)、丁酸弧菌属(Butyrivibrio)、纤细弯曲杆菌(Campylobacter gracilis)、梭菌群III(Clostridia cluster III)、梭菌群IV(Clostridia cluster IV)、梭菌群IX(Clostridia cluster IX)(氨基酸球菌科群(Acidaminococcaceae group))、梭菌群XI(Clostridia cluster XI)、梭菌群XIII(Clostridia cluster XIII)(消化链球菌群(Peptostreptococcus group))、梭菌群XIV(Clostridia cluster XIV)、梭菌群XV(Clostridia cluster XV)、产气柯林斯菌(Collinsella aerofaciens)、粪球菌属(Coprococcus)、桑氏棒状杆菌(Corynebacterium sunsvallense)、猪脱硫单胞菌(Desulfomonas pigra)、产甲酸多尔氏菌(Dorea formicigenerans)、长链多尔氏菌(Dorea longicatena)、大肠杆菌(Escherichia coli)、庞大真杆菌(Eubacterium hadrum)、直肠真杆菌(Eubacterium rectale)、普拉梭菌(Faecalibacteria prausnitzii)、孪生球菌属(Gemella)、乳球菌属(Lactococcus)、兰氏螺菌属(Lanchnospira)、柔膜细菌群XVI(Mollicutes cluster XVI)、柔膜细菌群XVIII(Mollicutes cluster XVIII)、普雷沃菌属(Prevotella)、黏滑罗氏菌(Rothia mucilaginosa)、伶俐瘤胃球菌(Ruminococcus callidus)、活泼瘤胃球菌(Ruminococcus gnavus)、扭链瘤胃球菌(Ruminococcus torques)及链球菌属(Streptococcus)。

[0151] “微生物胞外囊泡”(mEV)可从微生物如细菌、古生菌、真菌、微藻、原生动物和寄生虫获得。在一些实施例中，mEV从细菌获得。mEV包括分泌型微生物胞外囊泡(smEV)和经加工的微生物胞外囊泡(pmEV)。“分泌型微生物胞外囊泡”(smEV)是来源于微生物的自然产生的

囊泡。smEV由微生物脂质和/或微生物蛋白质和/或微生物核酸和/或微生物碳水化合物部分构成，并从培养上清液中分离。这些囊泡的自然产生可以通过操纵细菌细胞正在培养的环境(例如，通过培养基或温度改变)来人为地增强(例如，增加)或减少。此外，smEV组合物可以被修饰以减少，增加，添加或去除微生物成分或外来物质，以改变功效、免疫刺激、稳定性、免疫刺激能力、稳定性、器官靶向性(例如，淋巴结)、吸收(例如，胃肠道)和/或产率(例如，由此改变功效)。如本文所用，术语“纯化的smEV组合物”或“smEV组合物”是指smEV的制剂，其已经从源材料中发现的至少一种相关联物质(例如，从至少一种其他微生物组分分离)或用于制备所述制剂的任何方法中与smEV相关联的任何材料分离。也可指针对特定组分已显著富集的组合物。“经加工的微生物胞外囊泡”(pmEV)是从人工裂解的微生物(例如，细菌)纯化的微生物膜组分(例如，已与其他胞内微生物细胞组分分离的微生物膜组分)的非天然存在的集合，并且其可包含根据纯化方法而具有变化的或选定的尺寸范围的颗粒。通过化学破坏(例如，通过溶菌酶和/或溶葡萄球菌素)和/或物理破坏(例如，通过机械力)微生物细胞并通过离心和/或超速离心或其他方法将微生物膜组分与胞内组分分离来获得pmEV池。所得pmEV混合物含有富集的微生物膜及其组分(例如，外周缔合的或完整的膜蛋白、脂质、聚糖、多糖、碳水化合物、其他聚合物)，使得相对于完整微生物，微生物膜组分的浓度增加，并且胞内内容物的浓度降低(例如，稀释)。对于革兰氏阳性细菌，pmEV可以包括细胞膜或细胞质膜。对于革兰氏阴性细菌，pmEV可以包括内膜和外膜。革兰氏阴性菌可能属于阴性菌类。pmEV可以被修饰以增加纯度，调节组合物中颗粒的尺寸，和/或被修饰以减少、增加、添加或去除微生物组分或外来物质，以改变功效、免疫刺激、稳定性、免疫刺激能力、稳定性、器官靶向性(例如淋巴结)、吸收(例如胃肠道)和/或产率(例如由此改变功效)。pmEV可以通过添加、去除、富集或稀释特定组分(包括来自相同或其他微生物的细胞内组分)被修饰。如本文所用，术语“纯化的pmEV组合物”或“pmEV组合物”是指pmEV的制剂，其已经从源材料中发现的至少一种相关联物质(例如，从至少一种其他微生物组分分离)或用于制备所述制剂的任何方法中与pmEV相关联的任何材料分离。也可指针对特定组分已显著富集的组合物。

[0152] “微生物组”广泛地指栖居于受试者或患者的身体部位上或中的微生物。微生物组中的微生物可包括细菌、病毒、真核微生物和/或病毒。微生物组中的个别微生物可以是代谢活性、休眠、潜伏或作为孢子存在，可以浮游形式存在或存在于生物膜中，或可以可持续或短暂的方式存在于该微生物组中。该微生物组可以是共生或健康状态微生物组或疾病状态微生物组。该微生物组对受试者或患者而言可以是天然的，或该微生物组的组分可因健康状态(例如，癌前状态或癌状态)或处理条件(例如，抗生素治疗、暴露于不同微生物)的变化而经调整、引入或消耗。在一些方面中，该微生物组出现于黏膜表面。在一些方面中，该微生物组是肠道微生物组。在一些方面中，该微生物组是肿瘤微生物组。

[0153] 组织或样品的“微生物组谱(microbiome profile)”或“微生物组特征(microbiome signature)”是指微生物组的细菌组成的至少部分表征。在一些实施例中，微生物组谱指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个细菌菌株存在于微生物组中或不存在于微生物组中。在一些实施例中，微生物组谱指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个癌症相关细菌菌株存在于样品中。在一些实施例

中，微生物组谱指示样品中检测的各细菌菌株的相对量或绝对量。在一些实施例中，微生物组谱是癌症相关微生物组谱。癌症相关微生物组谱是以比一般群体更大的频率出现于患有癌症的受试者中的微生物组谱。在一些实施例中，相较于正常存在于取自未患癌症的个体的在其他方面当量的组织或样品的微生物组中的细菌，所述癌症相关微生物组谱包含更大数量或量的癌症相关细菌。

[0154] 关于细菌的“经修饰的”广泛地指自野生型形式已经变化的细菌。细菌修饰可以产生自工程菌。细菌修饰的实例包括遗传修饰、基因表达修饰、表型修饰、配制修饰、化学修饰及剂量或浓度。经改善的性质的实例描述于整个说明书中且包括(例如)减毒、营养缺陷、归巢或抗原性。表型修饰可包括(以实例说明的)细菌于修饰细菌的表型的培养基中生长使得其增加或降低毒力。

[0155] 如本文中所使用的“肿瘤生物群系(oncobiome)”包含致瘤和/或癌症相关微生物区，其中该微生物区包含病毒、细菌、真菌、原生生物、寄生虫或其他微生物中的一种或多种。

[0156] “肿瘤营养性(Oncotrophic)”或“嗜肿瘤(oncophilic)”微生物及细菌是与癌症微环境高度相关联的微生物或存在于癌症微环境中的微生物。它们可被优先选择用于该环境中，优先在癌症微环境中生长或适应该环境。

[0157] “运算分类单元”及“OTU”是指系统发生树中的末端叶且通过核酸序列(例如整个基因组或特定基因序列及所有与此核酸序列在物种层面共享序列同一性的序列)来定义。在一些实施例中，特定基因序列可为16S序列或16S序列的一部分。在其他实施例中，对两种实体的整个基因组进行测序并进行比较。在另一个实施例中，可以基因方式比较所选区域(例如多基因座序列标签(MLST)、特定基因或基因集)。对于16S而言，整个16S或一些16S可变区中共有≥97％平均核苷酸同一性的OTU可视为相同OTU。参见，例如Claesson MJ,Wang Q,O'Sullivan O,Greene-Diniz R,Cole JR,Ross RP,和O'Toole PW.2010.Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions[使用串联可变16S rRNA基因区解析高度复杂的微生物群组成的两种下一代测序技术的比较].Nucleic Acids Res[核酸研究]38:e200.Konstantinidis KT,Ramette A及Tiedje JM.2006.The bacterial species definition in the genomic era[基因组时代的细菌种类定义].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci[伦敦皇家学会B辑:生物科学哲学学报]361:1929-1940。对于完整基因组、MLST、特定基因(除16S外)或基因集而言，共有≥95％平均核苷酸同一性的OTU可视为相同OTU。例如参见Achtman M及Wagner M.2008.Microbial diversity and the genetic nature of microbial species[微生物多样性和微生物物种的遗传性质].Nat.Rev.Microbiol.[微生物自然评论]6:431-440.Konstantinidis KT,Ramette A及Tiedje JM.2006.The bacterial species definition in the genomic era[基因组时代的细菌种类定义].Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci[伦敦皇家学会B辑:生物科学哲学学报]361:1929-1940。通常通过比较生物体之间的序列来定义OTU。通常，具有小于95％序列同一性的序列并不视为形成相同OTU的一部分。还可通过核苷酸标志或基因、尤其高度保守基因(例如“管家”基因)或其组合的任一组合来表征OTU。本文提供可分配(例如)属、物种及系统发育进化枝的运算分类单元(OTU)。

[0158] 如本文中所使用,如果基因在至少一些条件下在工程改造的细菌中的表达程度高于相同物种的野生型细菌在相同条件下的表达程度,则该基因在细菌中“过度表达”。类似地,如果基因在至少一些条件下在工程改造的细菌中的表达程度低于相同物种的野生型细菌在相同条件下的表达程度,则该基因在细菌中“表达不足”。

[0159] 术语“多核苷酸”及“核酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合形式(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,且可实施任何功能。多核苷酸的非限制性实例如下:基因或基因片段的编码或非编码区域、定义自连锁分析的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、微小RNA(miRNA)、沉默RNA(siRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的经分离的DNA、任何序列的经分离的RNA、核酸探针及引子。多核苷酸可包括经修饰核苷酸,例如甲基化核苷酸及核苷酸类似物。如果存在,则可在组装聚合物之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。多核苷酸可通过(例如)与标记组分缀合而经进一步修饰。在本文提供的所有核酸序列中,U核苷酸可与T核苷酸互换。

[0160] 如本文中所使用,物质基本上不含其他组分时是“纯的”。术语“纯化(purify)”或“进行纯化(purifying)”及“纯化的(purified)”是指mEV(例如smEV)制剂或其他材料已与最初产生或形成(例如,无论在自然中或在实验环境中)时或在初始产生后的任何时间期间与的相关联的至少一些组分分离。若如果mEV(例如smEV)制剂或组合物在产生时或产生后与(诸如)一种或多种其他细菌组分分离,则所述mEV(例如smEV)制剂或组合物可被视为纯化的,并且纯化的微生物或微生物群体可含有其他材料多达约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或超过约90%且仍被视为“纯化的”。在一些实施例中,纯化的mEV(例如smEV)超过约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或超过约99%纯。mEV(例如smEV)组合物(或制剂)例如从残余生境产物纯化。

[0161] 如本文中所使用,术语“纯化的EV组合物”或“EV组合物”是指如下的制剂:其包括已与源材料或在用以产生该制剂的任何方法中与mEV(例如smEV)相关联的任何材料中发现的至少一种相关联物质分离(例如,与至少一种其他细菌组分分离)的mEV(例如smEV)。它还指已经显著富集或浓缩的组合物。在一些实施例中,mEV(例如smEV)被浓缩2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10,000倍或超过10,000倍。

[0162] “残余生境产物”是指自受试者内或受试者上的微生物群生境衍生的材料。例如,微生物的发酵培养物可以含有污染物,例如其他微生物菌株或形式(例如细菌、病毒、支原体和/或真菌)。例如,微生物生存于胃肠道的粪便中、皮肤本身上、唾液中、呼吸道的黏液中或泌尿生殖道的分泌物中(即,与微生物群落相关联的生物物质)。大体上不含残余生境产物意指该微生物组合物不再含有与培养物或人或动物受试者上或人或动物受试者中的微生物环境相关联的生物物质且是100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含与该微生物群落相关联的任何污染生物物质。残余生境产物可包括非生物材料(包括未经消化的食物)或其可包括非所需的微生物。大体上不含残余生境产物亦可意指该微生物组合物不含有来自培养物污染物或人或动物的可检测细胞且意指仅微生物细胞是可检测的。在一项实施例中,大体上不含残余生境产物亦可意指该微生物组合物不含有可检测的病毒(包括细菌、病毒(例如,噬菌体))、真菌、支原体污染物。在另一个实施例中,这

意味着与微生物细胞相比，微生物组合物中少于$1x10^{-2}$%、$1x10^{-3}$%、$1x10^{-4}$%、$1x10^{-5}$%、$1x10^{-6}$%、$1x10^{-7}$%、$1x10^{-8}$%的活细胞是人或动物。达到此纯度的方法有很多，这些方法中无任何一者是限制性的。因此，污染物可经由通过在固体培养基上对单菌落进行多个画线步骤，直至来自系列性单菌落的复制(诸如但不限于两个)画线已显示仅单一菌落形态来分离所需成分而减少。可替代地，污染物的减少可通过多轮连续稀释至单一所需细胞(例如，10^{-8}或10^{-9}的稀释)，诸如通过多个10倍连续稀释完成。此可通过显示多个经分离的菌落具有相似细胞形状及革兰氏染色行为进一步证实。用于证实足够的纯度的其他方法包括遗传分析(例如，PCR、DNA测序)、血清学及抗原分析、酶及代谢分析及使用仪器的方法，诸如使用自污染物区分所需成分的试剂的流式细胞术。

[0163] 如本文中所使用，“特异性结合”是指抗体能够结合至预定抗原或多肽能够结合至其预定结合配偶体。通常，抗体或多肽以对应于约10^{-7}M或更小K_D的亲和力特异性结合至其预定抗原或结合配偶体，且以相对于结合至非特异性及不相关抗原/结合配偶体(例如BSA、酪蛋白)小至少10倍、小至少100倍或小至少1000倍的其亲和力的亲和力(如通过K_D所表示)结合至预定抗原/结合配偶体。可替代地，特异性结合更广泛地适用于二组分系统，其中一种组分是蛋白质、脂质或碳水化合物或其组合且与是蛋白质、脂质、碳水化合物或其组合的第二组分以特定方式接合。

[0164] “菌株”是指具有基因印记的细菌物种的成员，从而其可与相同细菌物种的密切相关成员区分开来。基因特征可为不存在至少一种基因的全部或一部分、不存在至少一个调控区(例如启动子、终止子、核糖开关、核糖体结合位点)的全部或一部分、不存在(“消除”)至少一种天然质粒、存在至少一种重组基因、存在至少一种突变基因、存在至少一种外来基因(衍生自另一物种的基因)、存在至少一种突变调控区(例如启动子、终止子、核糖开关、核糖体结合位点)、存在至少一种非天然质粒、存在至少一种抗生素抗性盒或其组合。可通过PCR扩增且任选地随后进行一个或多个目的基因组区域或全基因组的DNA测序来鉴别不同菌株之间的基因特征。如果一种菌株(与相同物种的另一种菌株相比)已获得或失去抗生素抗性或获得或失去生物合成能力(例如营养缺陷型菌株)，则可通过选择或反选择分别使用抗生素或营养物/代谢物来区分菌株。

[0165] 术语“受试者”或“患者”是指任何哺乳动物。描述为“有需要”的受试者或患者是指需要治疗(或预防)疾病的人。哺乳动物(即哺乳类动物)包括人、实验室动物(例如灵长类动物、大鼠、小鼠)、家畜(例如牛、绵羊、山羊、猪)及家庭宠物(例如狗、猫、啮齿类动物)。受试者可以是人。受试者可为非人哺乳动物，包括但不限于：狗、猫、牛、马、猪、驴、山羊、骆驼、小鼠、大鼠、天竺鼠、绵羊、骆马、猴、大猩猩或黑猩猩。受试者可为健康的，或可患有任一发展阶段的癌症，其中任一阶段由癌症相关或致病病原体引起或伺机性地支持该病原体，或受试者可处于发生癌症或向其他受试者传播癌症相关或癌症致病病原体的风险中。在一些实施例中，受试者患有肺癌、膀胱癌、前列腺癌、浆细胞瘤、结直肠癌、直肠癌、默克尔细胞癌、唾液腺癌、卵巢癌和/或黑色素瘤。受试者可以具有肿瘤。受试者可以具有展示增强的大型胞饮作用的肿瘤，其中此过程的潜在基因组学包含Ras活化。在其他实施例中，受试者患有另一种癌症。在一些实施例中，受试者已经接受癌症疗法。

[0166] 如本文中所使用，术语“治疗”受试者疾病或“治疗”患有或怀疑患有疾病的受试者是指对受试者施用医药治疗(例如施用一种或多种药剂)，从而降低至少一种疾病症状或预

防其恶化。因此，在一个实施例中，“治疗”尤其是指延迟进展、促进缓解、诱导缓解、增大缓解、加速恢复、增加功效或降低替代治疗的抗性，或其组合。如本文所用，术语“预防”受试者中的疾病是指对受试者施用药物治疗，例如，施用一种或多种药剂，使得疾病的至少一个症状的发作被延迟或预防。

[0167] 细菌

[0168] 在某些方面，本文提供了包含从细菌获得的mEV(例如smEV)的药物组合物。

[0169] 在一些实施例中，对获得mEV(如smEV)的细菌进行修饰以降低毒性或其他不利影响；提高mEV(如smEV)的递送(例如口服递送)(例如，通过改良耐酸性、黏液黏着性和/或渗透性和/或对胆汁酸、消化酶的抗性、对抗微生物肽的抗性和/或抗体中和)；靶向所需细胞类型(例如，M细胞、杯状细胞、肠上皮细胞、树突细胞、巨噬细胞)；增强mEV(如smEV)的免疫调节和/或治疗效果(例如单独或与另一治疗剂组合)；和/或通过mEV(如smEV)(例如通过修饰地产生多糖、纤毛、伞毛、黏附素)增强免疫活化或抑制。在一些实施例中，本文描述的工程改造的细菌被修饰以改善mEV(例如smEV)制造(例如，更高的耐氧性、稳定性、改善的冻融耐受性、较短的产生时间)。例如，在一些实施例中，本文描述的工程改造的细菌包括具有一种或多种遗传改变的细菌，此改变包含于细菌染色体或内源性质粒和/或一或多个外源性质粒上的一或多个核苷酸的插入、删除、易位或取代，或其任何组合，其中该遗传改变可导致一或多个基因的过表达和/或低表达。工程改造的细菌可使用本领域中已知的任何技术产生，包括(但不限于)定点诱变、转座子诱变、敲除、敲入、聚合酶链反应诱变、化学诱变、紫外线诱变、转形(化学或通过电穿孔)、噬菌体转导、定向演化或其任何组合。

[0170] 可用作本文描述的mEV(例如smEV)来源的细菌物种和/或菌株的实例在表1、表2和/或表3和整个说明书的其他地方提供。在一些实施例中，细菌菌株是具有与表1、表2和/或表3中列举的菌株具有至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.1％、99.2％、99.3％、99.4％、99.5％、99.6％、99.7％、99.8％或99.9％序列同一性的基因组的细菌菌株。在一些实施例中，mEV来自肿瘤营养性细菌。在一些实施例中，mEV来自免疫刺激性细菌。在一些实施例中，mEV来自免疫抑制性细菌。在一些实施例中，mEV来自免疫调节性细菌。在某些实施例中，mEV产生自本文提供的细菌菌株的组合。在一些实施例中，所述组合是至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50个细菌菌株的组合。在一些实施例中，所述组合包括来自以下的mEV：表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株和/或具有与表1、表2和/或表3中列举的菌株具有至少80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.1％、99.2％、99.3％、99.4％、99.5％、99.6％、99.7％、99.8％或99.9％序列同一性的基因组的细菌菌株。

[0171] 在一些实施例中，mEV从革兰氏阴性细菌获得。

[0172] 在一些实施例中，革兰氏阴性细菌属于Negativicutes纲。Negativicutes代表微生物的独特纲，因为它们是厚壁菌门中唯一的双膜(diderm)成员。这些厌氧生物可以在环境中发现，并且是人口腔和胃肠道的正常共生体。由于这些生物体具有外膜，因此对该纲的smEV产率进行了研究。发现在以每个细胞为基础，这些微生物产生大量的囊泡(10-150EV/细胞)。来自这些生物的smEV在体外测定中具有广泛的刺激性和高效力。对其在几种肿瘤学和炎症体内模型中治疗性应用的研究显示了其治疗性潜力。Negativicutes纲包括以下科：韦荣氏球菌科，月形单孢菌科，氨基酸球菌科和Sporomusaceae。Negativicutes包括巨型球

菌属、月形单胞菌属、Propionospora属和氨基酸球菌属。示例性Negativicutes物种包括但不限于巨型球菌属物种、菲利克斯新月形单胞菌、肠氨基酸球菌、和Propionospora属物种。

[0173] 在一些实施例中,mEV从革兰氏阳性细菌获得。

[0174] 在一些实施例中,mEV从需氧细菌获得。

[0175] 在一些实施例中,mEV从厌氧细菌获得。

[0176] 在一些实施例中,mEV从嗜酸细菌获得。

[0177] 在一些实施例中,mEV从嗜碱细菌获得。

[0178] 在一些实施例中,mEV从嗜中性细菌获得。

[0179] 在一些实施例中,mEV从难养细菌获得。

[0180] 在一些实施例中,mEV从非难养细菌获得。

[0181] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被冻干。

[0182] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被γ照射(例如,在17.5或25kGy下)。

[0183] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被UV照射。

[0184] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被热灭活(例如,在50℃下两小时或在90℃下两小时)。

[0185] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被酸处理。

[0186] 在一些实施例中,从其获得mEV的细菌被喷氧(例如,在0.1vm下持续两小时)。

[0187] 在一些实施例中,冻干mEV。

[0188] 在一些实施例中,mEV被γ照射(例如,在17.5或25kGy下)。

[0189] 在一些实施例中,mEV被UV照射。

[0190] 在一些实施例中,mEV被热灭活(例如,在50℃下两小时或在90℃下两小时)。

[0191] 在一些实施例中,mEV被酸处理。

[0192] 在一些实施例中,mEV被喷氧(例如,以0.1vvm持续两小时)。

[0193] 生长阶段会影响细菌和/或细菌产生的smEV的数量或性质。例如,在本文提供的smEV制备方法中,可以例如在对数生长期开始时、在对数生长期的中间时、和/或一旦达到稳定生长期时从培养物中分离smEV。

[0194] 表1:示例性细菌菌株

[0195]

OTU	公开 DB 登录号
缺陷乏养菌	ACIN02000016
副毗邻乏养菌	AB022027
乏养菌属口腔克隆 P4PA_155 P1	AY207063
延长厌氧醋菌	NR_042930
解纤维醋弧菌	NR_025917
产乙醇醋弧菌	FR749897
醋化醋酸杆菌	NR_026121
可可豆醋酸杆菌	NR_042678
罗旺醋酸杆菌	NR_040832
苹果醋酸杆菌	NR_025513
东方醋酸杆菌	NR_028625
巴氏醋酸杆菌	NR_026107
果实醋杆菌	NR_042112
蒲桃醋酸杆菌	NR_040868
热带醋酸杆菌	NR_036881
醋酸杆菌科细菌 AT_5844	AGEZ01000040

[0196]

莱氏无胆霉浆菌	NR_074448
反硝化无色杆菌	NR_042021
皮氏无色杆菌	ADMS01000149
木糖氧化无色杆菌	ACRC01000072
发酵氨基酸球菌	CP001859
肠氨基酸球菌	CP003058
氨基酸球菌属 D21	ACGB01000071
食糖酸叶菌	AY350586
食铁嗜酸硫杆菌	NR_074660
食酸菌属 98_63833	AY258065
鲍曼氏不动杆菌	ACYQ01000014
乙酸钙不动杆菌	AM157426
不动杆菌属复合群 C1	AY278636
溶血性不动杆菌	ADMT01000017
约氏不动杆菌	ACPL01000162
琼氏不动杆菌	ACPM01000135
鲁氏不动杆菌	ACPN01000204
小不动杆菌	AIEB01000124
抗辐射不动杆菌	ACVR01000010
申氏不动杆菌	NR_025412
不动杆菌属 56A1	GQ178049
不动杆菌属 CIP 101934	JQ638573
不动杆菌属物种 CIP 102143	JQ638578
不动杆菌属物种 CIP 53.82	JQ638584
不动杆菌属物种 M16_22	HM366447
不动杆菌属物种 RUH2624	ACQF01000094
不动杆菌属物种 SH024	ADCH01000068
伴放线放线杆菌	AY362885
小放线杆菌	ACFT01000025
胸膜肺炎放线杆菌	NR_074857
产琥珀酸放线杆菌	CP000746

[0197]

脲放线杆菌	AEVG01000167
马西里氏放线棒菌	AF487679
夏氏放线棒菌	AY957507
放线棒菌属 BM#101342	AY282578
放线棒菌属 P2P_19 P1	AY207066
加地夫放线菌	GU470888
欧洲放线菌	NR_026363
芬氏放线菌	HQ906497
放线菌属复合群 C1	AY278610
放线菌属复合群 C2	AY278611
放线菌属复合群 P1 口腔克隆 MB6_C03	DQ003632
乔氏放线菌	GU561319
以色列放线菌	AF479270
马赛放线菌	AB545934
迈耶放线菌	GU561321
纳士放线菌	X81062
鼻放线菌	AJ508455
纽氏放线菌	X71862
龋齿放线菌	ACYT01000123
山地放线菌	NR_025559
人口腔放线菌	AJ575186
口腔放线菌	BABV01000070
放线菌属物种 7400942	EU484334
放线菌属物种 c109	AB167239
放线菌属物种 CCUG 37290	AJ234058
放线菌属物种 ChDC B197	AF543275
放线菌属物种 GEJ15	GU561313
放线菌属物种 HKU31	HQ335393
放线菌属物种 ICM34	HQ616391
放线菌属物种 ICM41	HQ616392
放线菌属物种 ICM47	HQ616395

放线菌属物种 ICM54	HQ616398
放线菌属物种 M2231_94_1	AJ234063
放线菌属物种口腔克隆 GU009	AY349361
放线菌属物种口腔克隆 GU067	AY349362
放线菌属物种口腔克隆 IO076	AY349363
放线菌属物种口腔克隆 IO077	AY349364
放线菌属物种口腔克隆 IP073	AY349365
放线菌属物种口腔克隆 IP081	AY349366
放线菌属物种口腔克隆 JA063	AY349367
放线菌属物种口腔分类群 170	AFBL01000010
放线菌属物种口腔分类群 171	AECW01000034
放线菌属物种口腔分类群 178	AEUH01000060
放线菌属物种口腔分类群 180	AEPP01000041
放线菌属物种口腔分类群 848	ACUY01000072
放线菌属物种口腔分类群 C55	HM099646
放线菌属物种 TeJ5	GU561315
泌尿生殖放线菌	ACFH01000038
黏性放线菌	ACRE01000096
产雌马酚阿德勒氏菌	AB306661
栖血气球菌	AY837833
脲气球菌	CP002512
马脲气球菌	NR_043443
绿色气球菌	ADNT01000041
海洋气微菌	NR_025681
气微菌属 JC14	JF824798
异常嗜糖气单胞菌	S39232
肠棕气单胞菌	X71121
嗜水气单胞菌	NC_008570
简氏气单胞菌	X60413
杀鲑气单胞菌	NC_009348
易损气单胞菌	X60415

[0198]

维罗氏气单胞菌	NR_044845
阿菲波菌属复合群4	EU117385
伴放线凝聚杆菌	CP001733
嗜沫凝聚杆菌	CP001607
惰性凝聚杆菌	AEPS01000017
放射形土壤杆菌	CP000628
根癌土壤杆菌	AJ389893
耶纳脓球菌	NR_026275
嗜黏蛋白阿克曼氏菌	CP001071
粪产碱杆菌	AB680368
产碱杆菌属CO14	DQ643040
产碱杆菌属物种S3	HQ262549
酸热脂环酸芽孢杆菌	NR_074721
酸土脂环酸芽孢杆菌	NR_040844
污染脂环酸芽孢杆菌	NR_041475
产环庚酸性脂环酸芽孢杆菌	NR_024754
草脂环酸芽孢杆菌	NR_024753
果实脂环酸芽孢杆菌	NR_024801
脂环酸芽孢杆菌属CCUG 53762	HE613268
芬戈尔德氏另枝菌	NR_043064
不明显另枝菌	AB490804
奥登多克氏另枝菌	NR_043318
腐败另枝菌	ABFK02000017
沙氏另枝菌	FP929032
另枝菌属HGB5	AENZ01000082
另枝菌属物种JC50	JF824804
另枝菌属RMA 9912	GQ140629
金属还原嗜碱菌	AY137848
奥伦兰氏嗜碱菌	NR_043674
广栖别样斯卡多维氏菌	NR_042583
别样斯卡多维氏菌属OB7196	AB425070

[0199]

[0200]

产氢厌氧菌	ACJX02000009
产琥珀酸厌氧螺菌	NR_026075
托马斯厌氧螺菌	AJ420985
氢化厌氧球菌	ABXA01000039
解乳厌氧球菌	ABYO01000217
八迭厌氧球菌	NR_026360
普氏厌氧球菌	CP001708
厌氧球菌属 8404299	HM587318
厌氧球菌属物种 8405254	HM587319
厌氧球菌属物种 9401487	HM587322
厌氧球菌属物种 9403502	HM587325
厌氧球菌属 gpac104	AM176528
厌氧球菌属物种 gpac126	AM176530
厌氧球菌属物种 gpac155	AM176536
厌氧球菌属物种 gpac199	AM176539
厌氧球菌属物种 gpac215	AM176540
四联厌氧球菌	ACGC01000107
阴道厌氧球菌	ACXU01000016
人粪厌氧棒形菌	ABIL02000005
孪生厌氧球形菌	AGCJ01000054
运动厌氧孢杆菌	NR_042953
粪厌氧棒状菌	ABAX03000023
厌氧棒状菌属 3_2_56FAA	ACWB01000002
黑罗特克斯欧里何米尼斯菌	ABGD02000021
边缘边虫	ABOR01000019
嗜吞噬细胞边虫	NC_007797
解硫胺素硫胺素芽孢杆菌	AB101592
丹麦解硫胺素芽孢杆菌	NR_028657
米氏解硫胺素芽孢杆菌	NR_036799
嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌	NR_042271
嗜热气解硫胺素芽孢杆菌	NR_029303

污染厌氧芽孢杆菌	NR_029006
黄色嗜热厌氧芽孢杆菌	NR_074667
溶血隐秘杆菌	NR_025347
化脓隐秘杆菌	GU585578
布氏弓形杆菌	AEPT01000071
嗜低温弓形杆菌	NR_025905
运动节杆菌	NR_026198
阿氏节杆菌	NR_074608
贝热尔氏节杆菌	NR_025612
球形节杆菌	NR_026187
烟草节杆菌	NR_026190
微小奇异菌	HM007583
极小奇异菌	CP001721
龈裂奇异菌	ACFE01000007
奇异菌属 BS2	HQ616367
[0201] *奇异菌属物种 F0209*	EU592966
奇异菌属物种 ICM42b10	HQ616393
奇异菌属物种 ICM57	HQ616400
阴道奇异菌	AEDQ01000024
杀珊瑚橙色单胞菌	AY065627
阿尔塔米拉洞橙色单胞菌	FN658986
Auritibacter ignavus	FN554542
达尔豪斯艾弗里菌	DQ481464
风化芽孢杆菌	NR_025557
嗜气芽孢杆菌	NR_042339
艾氏芽孢杆菌	GQ980243
嗜碱芽孢杆菌	X76436
解淀粉芽孢杆菌	NR_075005
炭疽芽孢杆菌	AAEN01000020
萎缩芽孢杆菌	NR_075016
栗褐芽孢杆菌	NR_036893

蜡样芽孢杆菌	ABDJ01000015
环状芽孢杆菌	AB271747
克劳氏芽孢杆菌	FN397477
凝结芽孢杆菌	DQ297928
坚韧芽孢杆菌	NR_025842
弯曲芽孢杆菌	NR_024691
福氏芽孢杆菌	NR_025786
明胶芽孢杆菌	NR_025595
盐沼芽孢杆菌	NR_026144
耐盐芽孢杆菌	AY144582
黑布施泰因芽孢杆菌	NR_042286
霍尔氏芽孢杆菌	NR_036860
病研所芽孢杆菌	NR_043268
迟缓芽孢杆菌	NR_040792
地衣芽孢杆菌	NC_006270
巨大芽孢杆菌	GU252124
尼氏芽孢杆菌	NR_044546
农研所芽孢杆菌	NR_043334
烟酸芽孢杆菌	NR_024695
抱川芽孢杆菌	NR_041377
短小芽孢杆菌	NR_074977
沙福芽孢杆菌	JQ624766
单纯芽孢杆菌	NR_042136
索诺氏芽孢杆菌	NR_025130
芽孢杆菌属 10403023 MM10403188	CAET01000089
芽孢杆菌属 2_A_57_CT2	ACWD01000095
芽孢杆菌属 2008724126	GU252108
芽孢杆菌属物种 2008724139	GU252111
芽孢杆菌属物种 7_16AIA	FN397518
芽孢杆菌属物种 9_3AIA	FN397519
芽孢杆菌属物种 AP8	JX101689

[0202]

[0203]

芽孢杆菌属 B27（2008）	EU362173
芽孢杆菌属物种 BT1B_CT2	ACWC01000034
芽孢杆菌属物种 GB1.1	FJ897765
芽孢杆菌属物种 GB9	FJ897766
芽孢杆菌属物种 HU19.1	FJ897769
芽孢杆菌属物种 HU29	FJ897771
芽孢杆菌属物种 HU33.1	FJ897772
芽孢杆菌属物种 JC6	JF824800
芽孢杆菌属口腔分类群 F26	HM099642
芽孢杆菌属口腔分类群 F28	HM099650
芽孢杆菌属口腔分类群 F79	HM099654
芽孢杆菌属物种 SRC_DSF1	GU797283
芽孢杆菌属物种 SRC_DSF10	GU797292
芽孢杆菌属物种 SRC_DSF2	GU797284
芽孢杆菌属物种 SRC_DSF6	GU797288
芽孢杆菌属物种 tc09	HQ844242
芽孢杆菌属物种 zh168	FJ851424
球形芽孢杆菌	DQ286318
产孢芽孢杆菌	NR_026010
枯草芽孢杆菌	EU627588
嗜热淀粉芽孢杆菌	NR_029151
苏云金芽孢杆菌	NC_008600
魏氏芽孢杆菌	NR_074926
拟杆菌目细菌 ph8	JN837494
拟杆菌属复合群 P1	AY341819
拟杆菌属复合群 P2 口腔克隆 MB1_G13	DQ003613
拟杆菌属复合群 P3 口腔克隆 MB1_G34	DQ003615
拟杆菌属复合群 P4 口腔克隆 MB2_G17	DQ003617
拟杆菌属复合群 P5 口腔克隆 MB2_P04	DQ003619
拟杆菌属复合群 P6 口腔克隆 MB3_C19	DQ003634
拟杆菌属复合群 P7 口腔克隆 MB3_P19	DQ003623

拟杆菌属复合群P8 口腔克隆MB4_G15	DQ003626
生酸拟杆菌	NR_028607
巴氏杆菌拟杆菌	NR_041446
人粪拟杆菌	EU136686
解纤维素拟杆菌	ACCH01000108
克拉氏拟杆菌	AFBM01000011
凝固拟杆菌	AB547639
粪居拟杆菌	ABIY02000050
嗜粪拟杆菌	ACBW01000012
多里氏拟杆菌	ABWZ01000093
埃氏拟杆菌	ACWG01000065
粪便拟杆菌	GQ496624
芬戈尔德氏拟杆菌	AB222699
曲霉拟杆菌	AFBN01000029
脆弱拟杆菌	AP006841
[0204] *半乳糖醛酸拟杆菌*	DQ497994
溃疡拟杆菌	CP002352
解肝素拟杆菌	JN867284
肠拟杆菌	ABJL02000006
马赛拟杆菌	AB200226
诺德拟杆菌	NR_043017
拟南芥拟杆菌（Bacteroides oleiciplenus）	AB547644
卵形拟杆菌	ACWH01000036
果胶拟杆菌	ABVQ01000036
平常拟杆菌	AB200218
化脓性拟杆菌	NR_041280
Bacteroides salanitronis	CP002530
萨利尔斯氏拟杆菌（Bacteroides salyersiae）	EU136690
拟杆菌属1_1_14	ACRP01000155
拟杆菌属1_1_30	ADCL01000128
拟杆菌属1_1_6	ACIC01000215

[0205]

拟杆菌属 2_1_22	ACPQ01000117
拟杆菌属 2_1_56FAA	ACWI01000065
拟杆菌属 2_2_4	ABZZ01000168
拟杆菌属 20_3	ACRQ01000064
拟杆菌属 3_1_19	ADCJ01000062
拟杆菌属 3_1_23	ACRS01000081
拟杆菌属物种 3_1_33FAA	ACPS01000085
拟杆菌属物种 3_1_40A	ACRT01000136
拟杆菌属 3_2_5	ACIB01000079
拟杆菌属 315_5	FJ848547
拟杆菌属物种 31SF15	AJ583248
拟杆菌属物种 31SF18	AJ583249
拟杆菌属物种 35AE31	AJ583244
拟杆菌属物种 35AE37	AJ583245
拟杆菌属物种 35BE34	AJ583246
拟杆菌属物种 35BE35	AJ583247
拟杆菌属 4_1_36	ACTC01000133
拟杆菌属物种 4_3_47FAA	ACDR02000029
拟杆菌属物种 9_1_42FAA	ACAA01000096
拟杆菌属物种 AR20	AF139524
拟杆菌属物种 AR29	AF139525
拟杆菌属物种 B2	EU722733
拟杆菌属物种 D1	ACAB02000030
拟杆菌属物种 D2	ACGA01000077
拟杆菌属物种 D20	ACPT01000052
拟杆菌属物种 D22	ADCK01000151
拟杆菌属物种 F_4	AB470322
拟杆菌属物种 NB_8	AB117565
拟杆菌属物种 WH2	AY895180
拟杆菌属物种 XB12B	AM230648
拟杆菌属物种 XB44A	AM230649

[0206]

排泄物拟杆菌	ABFZ02000022
多形拟杆菌	NR_074277
单形拟杆菌	AB050110
解尿素拟杆菌	GQ167666
普通拟杆菌	CP000139
木聚糖酶拟杆菌	ADKP01000087
拟杆菌门细菌口腔分类群 D27	HM099638
拟杆菌门细菌口腔分类群 F31	HM099643
拟杆菌门细菌口腔分类群 F44	HM099649
肠道巴氏杆菌	AB370251
肠居巴氏杆菌	NR_041508
杆菌状巴尔通氏体	NC_008783
格氏巴尔通氏体	CP001562
汉氏巴尔通氏体	NC_005956
五日热巴尔通氏体	BX897700
塔米尔巴尔通氏体	EF672728
华氏巴尔通氏体	FJ719017
布德楼弧菌属 MPA	AY294215
双歧杆菌属复合群 C1	AY278612
青春双歧杆菌	AAXD02000018
角双歧杆菌	ABYS02000004
动物双歧杆菌	CP001606
两歧双歧杆菌	ABQP01000027
短双歧杆菌	CP002743
链状双歧杆菌	ABXY01000019
牙双歧杆菌	CP001750
没食子双歧杆菌	ABXB03000004
婴儿双歧杆菌	AY151398
卡氏双歧杆菌	AB491757
长双歧杆菌	ABQQ01000041
假链状双歧杆菌	ABXX02000002

伪长双歧杆菌	NR_043442
斯氏双歧杆菌	AJ307005
双歧杆菌属 HM2	AB425276
双歧杆菌属物种 HMLN12	JF519685
双歧杆菌属物种 M45	HM626176
双歧杆菌属物种 MSX5B	HQ616382
双歧杆菌属物种 TM_7	AB218972
嗜热双歧杆菌	DQ340557
尿双歧杆菌	AJ278695
对沃氏嗜胆菌	ADCP01000166
比斯加德分类群	AY683487
比斯加德分类群	AY683489
比斯加德分类群	AY683491
比斯加德分类群	AY683492
泳池芽单胞菌	NR_040824
球形布劳特氏菌	AB571656
格鲁氏布劳特氏菌（Blautia glucerasea）	AB588023
格鲁斯布劳特氏菌（Blautia glucerasei）	AB439724
汉森布劳特氏菌	ABYU02000037
产氢营养型布劳特氏菌	ACBZ01000217
卢氏布劳特氏菌	AB691576
生产性布劳特氏菌	AB600998
申克布劳特氏菌	NR_026312
布劳特氏菌属 M25	HM626178
排泄物布劳特氏菌	HM626177
韦氏布劳特氏菌	EF036467
支气管炎鲍特氏菌	NR_025949
霍尔氏鲍特氏菌	AB683187
副百日咳鲍特氏菌	NR_025950
百日咳鲍特氏菌	BX640418
阿氏螺旋体	ABCU01000001

[0207]

[0208]

伯氏螺旋体	ABGI01000001
麝鼠勺螺旋体	DQ057990
达顿螺旋体	NC_011229
伽氏螺旋体	ABJV01000001
赫氏螺旋体	AY597657
西班牙螺旋体	DQ057988
伊朗包柔氏螺旋体	HM161645
回归热包柔氏螺旋体	AF107367
螺旋体属 NE49	AJ224142
斯皮尔曼螺旋体	ABKB01000002
墨西哥包柔氏螺旋体	NC_008710
法雷斯螺旋体	ABCY01000002
食物短杆菌	NR_026269
凝聚短杆菌	AB537169
奶酪发酵短杆菌	NR_026272
阿尔博氏短螺菌	FM178386
毛肠短螺菌	NR_075069
短螺菌属 HIS3	FM178387
短螺菌属物种 HIS4	FM178388
短螺菌属物种 HIS5	FM178389
土壤短杆菌	NR_040983
短短杆菌	NR_041524
中孢短杆菌	NR_043414
桥石短杆菌	NR_040980
短杆菌污染短杆菌	NR_041836
侧孢短杆菌	NR_037005
类短短杆菌	NR_040981
罗伊氏短杆菌	NR_040982
短杆菌属 phR	JN837488
嗜热短杆菌	NR_026514
橙黄短杆菌	NR_044854

[0209]

奶酪短杆菌	JF951998
表皮短杆菌	NR_029262
冷藏短杆菌	NR_042639
亚麻短杆菌	AJ315491
麦克布瑞德氏短杆菌	ADNU01000076
少食短杆菌	EU086796
血短杆菌	NR_028016
短杆菌属 H15	AB177640
短杆菌属物种 JC43	JF824806
近弧状短波单胞菌	CP002102
流产布氏杆菌	ACBJ01000075
犬布氏杆菌	NR_044652
鲸种布氏杆菌	ACJD01000006
地中海热布氏杆菌	AE009462
田鼠布氏杆菌	NR_042549
绵羊布氏杆菌	NC_009504
布氏杆菌属 83_13	ACBQ01000040
布氏杆菌属 BO1	EU053207
猪布氏杆菌	ACBK01000034
需甲酸盐布瑞特氏菌	ACCL02000018
蚜虫初级内共生菌	NR_074609
缓慢布雷德菌	ADFR01000011
须芒草伯克霍尔德菌	AAUZ01000009
新洋葱伯克霍尔德菌	AAHI01000060
洋葱伯克霍尔德菌	NR_041719
鼻疽伯克霍尔德菌	CP000547
多食伯克霍尔德菌	NC_010086
俄克拉何马伯克霍尔德菌	DQ108388
类鼻疽伯克霍尔德菌	CP001408
产根霉素伯克霍尔德菌	HQ005410
伯克霍尔德菌属 383	CP000151

食异生素伯克霍尔德菌	U86373
伯克霍尔德菌细菌 1_1_47	ADCQ01000066
普利卡柯伦丁酸球菌	HH793440
维罗萨丁酸单胞菌	AB443949
穗状丁酸弧菌	ABWN01000012
溶纤维丁酸弧菌	U41172
锰氧化暖单胞菌	NR_040787
生孢卡米尼希拉菌	NR_025485
结肠弯曲杆菌	AAFL01000004
简要弯曲杆菌	CP000792
曲形弯曲杆菌	NC_009715
胎儿弯曲杆菌	ACLG01001177
纤细弯曲杆菌	ACYG01000026
人弯曲杆菌	NC_009714
空肠弯曲杆菌	AL139074
红嘴鸥弯曲杆菌	CP000932
直肠弯曲杆菌	ACFU01000050
昭和弯曲杆菌	ACVQ01000030
弯曲杆菌属 FOBRC14	HQ616379
弯曲杆菌属物种 FOBRC15	HQ616380
弯曲杆菌属口腔克隆 BB120	AY005038
生痰弯曲杆菌	NR_044839
乌普萨拉弯曲杆菌	AEPU01000040
分节丝状菌属 SFB_小鼠_Yit	NR_074460
叶蝉内共生菌	CP002163
犬咬嗜二氧化碳噬纤细菌	CP002113
嗜二氧化碳噬纤细菌属复合群 C1	AY278613
牙龈嗜二氧化碳噬纤细菌	ACLQ01000011
颗粒嗜二氧化碳噬纤细菌	X97248
黄褐嗜二氧化碳噬纤细菌	AEOH01000054
嗜二氧化碳噬纤细菌属 GEJ8	GU561335

[0210]

嗜二氧化碳噬纤细菌属口腔克隆 AH015	AY005074
嗜二氧化碳噬纤细菌属物种口腔克隆 ASCH05	AY923149
嗜二氧化碳噬纤细菌属物种口腔克隆 ID062	AY349368
嗜二氧化碳噬纤细菌属口腔菌株 A47ROY	AY005077
嗜二氧化碳噬纤细菌属物种口腔菌株 S3	AY005073
嗜二氧化碳噬纤细菌属口腔分类群 338	AEXX01000050
嗜二氧化碳噬纤细菌属物种 S1b	U42009
生痰嗜二氧化碳噬纤细菌	ABZV01000054
人心杆菌	ACKY01000036
瓣膜心杆菌	NR_028847
广布肉杆菌	NR_044706
产乳酸菌素肉杆菌	NC_019425
香港海鸥菌	AB671763
光冈链型杆菌	AB030224
卡托氏菌属复合群 P1 口腔克隆 MB5_P12	DQ003629
[0211] *痰卡托氏菌*	ACIL02000016
卡托氏菌属口腔克隆 FL037	AY349369
戴氏西地西菌	AF493976
芬氏纤维菌	AY501364
索拉鲸杆菌	AJ438155
鼠衣原体	AE002160
鹦鹉热衣原体	NR_036864
沙眼衣原体	U68443
衣原体目细菌 NS11	JN606074
衣原体目细菌 NS13	JN606075
衣原体目细菌 NS16	JN606076
兽类衣原体	D88317
肺炎衣原体	NC_002179
鹦鹉热嗜性衣原体	D85712
绿弯菌属复合群 P1	AY331414
小克里斯滕森氏菌	AB490809

[0212]

紫色色杆菌	NC_005085
人金黄色杆菌	AM982793
黏金黄色杆菌	ACKQ02000003
人型金黄色杆菌	NR_042517
无丙二酸柠檬酸杆菌	FR870441
布氏柠檬酸杆菌	NR_028687
法氏柠檬酸杆菌	AF025371
弗氏柠檬酸杆菌	NR_028894
吉利柠檬酸杆菌	AF025367
柯氏柠檬酸杆菌	NC_009792
莫林柠檬酸杆菌	AF025369
鼠柠檬酸杆菌	NR_074903
塞氏柠檬酸杆菌	AF025364
柠檬酸杆菌属 30_2	ACDJ01000053
柠檬酸杆菌属 KMSI_3	GQ468398
沃克曼柠檬酸杆菌	AF025373
杨氏柠檬酸杆菌	ABWL02000011
埃夫里杆菌	GQ258966
梭菌科细菌 END_2	EF451053
梭菌科细菌 JC13	JF824807
梭菌属细菌 1_7_47FAA	ABQR01000074
梭菌属细菌 9400853	HM587320
梭菌属细菌 9403326	HM587324
梭菌属细菌口腔克隆 P4PA_66 P1	AY207065
梭菌属细菌口腔分类群 093	GQ422712
梭菌属细菌口腔分类群 F32	HM099644
梭菌属细菌 ph2	JN837487
梭菌属细菌 SY8519	AB477431
梭菌属复合群 BVAB3	CP001850
梭菌属 SM4_1	FP929060
梭菌属物种 SS3_4	AY305316

梭菌属物种SSC_2	FP929061
丙酮丁醇梭酸	NR_074511
耐氧梭酸	X76163
阿尔登氏梭菌	NR_043680
奥德里奇氏梭菌	NR_026099
藻状梭菌	NR_041746
解藻木聚糖梭菌	NR_028726
胺基戊酸梭菌	NR_029245
苦杏仁梭菌	AY353957
阿根廷梭菌	NR_029232
天门冬形梭菌	ACCJ01000522
巴氏梭菌	NR_029229
巴特氏梭菌	ABEZ02000012
拜氏梭菌	NR_074434
双酵素梭菌	X73437
鲍氏梭菌	ABCC02000039
肉毒梭菌	NC_010723
丁酸梭菌	ABDT01000017
尸毒梭菌	AB542932
食氧化碳梭菌	FR733710
肉梭菌	NR_044716
隐藏梭菌	X77844
速生梭菌	JQ246092
纤维素梭菌	NR_044624
肖沃氏梭菌	EU106372
香茅梭菌	ADLJ01000059
澄清梭菌	NR_041235
梭状梭菌	M59089
梭形梭菌	NR_044715
球形梭菌	EF025906
匙形梭菌	NR_044717

[0213]

[0214]

耳蜗形梭菌	NR_026495
犬肠梭菌	FJ957863
鹪鹩梭菌	NR_026151
难辨梭菌	NC_013315
双孢梭菌	NR_026491
酯化梭菌	NR_042153
福氏梭菌	NR_044714
Clostridium favososporum	X76749
费新尼亚梭菌	AF270502
寒冷梭菌	NR_024919
产气梭菌	NR_024945
戈氏梭菌	AB542933
乙二醇梭菌	FJ384385
人粪梭菌	AB233029
溶血梭菌	NR_024749
哈氏梭菌	AY552788
平野氏梭菌	AB023970
溶组织梭菌	HF558362
海氏梭菌	AB023973
吲哚梭菌	AF028351
无害梭菌	M23732
不规则梭菌	NR_029249
板蓝根梭菌	NR_026347
克氏梭菌	NR_074165
发酵乳糖梭菌	NR_025651
拉瓦勒塞梭菌	EF564277
柔嫩梭菌	AJ305238
泥渣梭菌	FR870444
大梭菌	X77835
恶名梭菌	FR749893
马约贝梭菌	FR733682

甲基戊糖梭菌	ACEC01000059
系结梭菌	X73443
诺维氏梭菌	NR_074343
酪酸梭菌	Y18187
乳清酸梭菌	FR749922
副腐败梭菌	AB536771
产气荚膜梭菌	ABDW01000023
植物发酵梭菌	NR_074652
毛发状梭菌	D14639
腐败梭菌	NR_024995
奎尼梭菌	NR_026149
多枝梭菌	M23731
直肠梭菌	NR_029271
噬糖梭菌	DQ100445
化糖梭菌	CP002109
撒丁岛梭菌	NR_041006
煎盘梭菌	NR_026490
裂解梭菌	AF262238
败血梭菌	NR_026020
索氏梭菌	AB448946
梭菌属 7_2_43FAA	ACDK01000101
梭菌属物种 D5	ADBG01000142
梭菌属物种 HGF2	AENW01000022
梭菌属物种 HPB_46	AY862516
梭菌属物种 JC122	CAEV01000127
梭菌属物种 L2_50	AAYW02000018
梭菌属 LMG 16094	X95274
梭菌属物种 M62_1	ACFX02000046
梭菌属物种 MLG055	AF304435
梭菌属 MT4 E	FJ159523
梭菌属物种 NMBHI_1	JN093130

[0215]

[0216]

梭菌属 NML 04A032	EU815224
梭菌属物种 SS2_1	ABGC03000041
梭菌属物种 SY8519	AP012212
梭菌属物种 TM_40	AB249652
梭菌属物种 YIT 12069	AB491207
梭菌属物种 YIT 12070	AB491208
楔样梭菌	X73449
螺状梭菌	X73441
生孢梭菌	ABKW02000003
球孢梭菌	NR_044835
粪堆梭菌	NR_025100
斯蒂克兰德氏梭菌	L04167
斯特拉文斯梭菌	NR_024829
近端梭菌	NR_041795
产硫梭菌	NR_044161
共生梭菌	ADLQ01000114
第三梭菌	Y18174
破伤风梭菌	NC_004557
嗜热纤维梭菌	NR_074629
酪丁酸梭菌	NR_044718
绿色梭菌	NR_026204
解木聚糖梭菌	NR_037068
产气柯林斯菌	AAVN02000007
肠柯林斯菌	ABXH02000037
排泄物柯林斯菌	ABXJ01000150
田中氏柯林斯菌	AB490807
丛毛单胞菌科细菌 NML000135	JN585335
丛毛单胞菌科细菌 NML790751	JN585331
丛毛单胞菌科细菌 NML910035	JN585332
丛毛单胞菌科细菌 NML910036	JN585333
丛毛单胞菌科细菌口腔分类群 F47	HM099651

丛毛单胞菌属 NSP5	AB076850
奎尼氏康曲奉菌	NR_041821
链型粪芽孢菌	AB030218
粪芽孢菌属 29_1	ADKX01000057
粪芽孢菌属 D7	ACDT01000199
灵巧粪球菌	EU266552
陪伴粪球菌	ABVR01000038
一致粪球菌	EF031543
粪球菌属 ART55_1	AY350746
红蝽菌科细菌 BV3Ac1	JN809768
红蝽菌科细菌 JC110	CAEM01000062
红蝽菌科细菌 phI	JN837493
拥挤棒状杆菌	ACGD01000048
产氨棒状杆菌	ADNS01000011
无枝菌酸棒状杆菌	ABZU01000033
[0217] *阑尾棒状杆菌*	NR_028951
银色棒状杆菌	EF463055
Corynebacterium atypicum	NR_025540
金色黏液棒状杆菌	ACLH01000041
牛棒状杆菌	AF537590
犬棒状杆菌	GQ871934
奶酪棒状杆菌	NR_025101
混杂棒状杆菌	Y15886
科伊尔棒状杆菌	X96497
白喉棒状杆菌	NC_002935
硬棒状杆菌	Z97069
高效棒状杆菌	ACLI01000121
福氏棒状杆菌	Y13024
微黄棒状杆菌	NR_037040
生殖器棒状杆菌	ACLJ01000031
灰棒状杆菌	NR_028971

[0218]

解葡萄糖苷棒状杆菌	ABYP01000081
麸胺酸棒状杆菌	BA000036
汉森棒状杆菌	AM946639
模仿棒状杆菌	AF537597
杰氏棒状杆菌	ACYW01000001
克罗彭施泰特氏棒状杆菌	NR_026380
黄色嗜脂棒状杆菌	ACHJ01000075
麦氏棒状杆菌	AB359393
乳腺炎棒状杆菌	AB359395
马氏棒状杆菌	ACSH02000003
微细棒状杆菌	X82064
产黏棒状杆菌	NR_026396
丙酸棒状杆菌	NR_037038
假白喉棒状杆菌	X84258
假生殖道棒状杆菌	ABYQ01000237
假结核棒状杆菌	NR_037070
产丙酮酸棒状杆菌	FJ185225
肾棒状杆菌	NR_037069
抗棒状杆菌	ADGN01000058
里氏棒状杆菌	EU848548
模拟棒状杆菌	AF537604
单侧棒状杆菌	NR_026394
棒状杆菌属 1 ex 绵羊	Y13427
棒状杆菌属 L_2012475	HE575405
棒状杆菌属 NML 93_0481	GU238409
棒状杆菌属 NML 97_0186	GU238411
棒状杆菌属 NML 99_0018	GU238413
纹带棒状杆菌	ACGE01000001
桑氏棒状杆菌	Y09655
结核硬脂酸棒状杆菌	ACVP01000009
托氏杆菌棒状杆菌	AY677186

溃疡棒状杆菌	NR_074467
解脲棒状杆菌	X81913
快快餐尿棒状杆菌	AM397636
可变棒状杆菌	NR_025314
干燥棒状杆菌	FN179330
贝纳特氏立克次体	CP000890
丙二酸盐克罗诺杆菌	GU122174
阪崎克罗诺杆菌	NC_009778
图列茨克罗诺杆菌	FN543093
锉隐小杆菌	GQ422741
耐金属贪铜菌	GU230889
解木聚糖噬细胞菌	FR733683
脱铁杆菌属口腔克隆 JV001	AY349370
脱铁杆菌属物种口腔克隆 JV006	AY349371
脱铁杆菌属物种口腔克隆 JV023	AY349372
[0219] *耐辐射异常球菌*	AE000513
异常球菌属 R_43890	FR682752
食酸代尔夫特菌	CP000884
人皮肤杆菌	FJ263375
皮生球菌属 Ellin185	AEIQ01000090
活跃链孢子菌	AM940019
链孢菌子属 8437	AFHT01000143
弗氏脱硫杆菌	AJ276701
哈氏脱硫杆菌	NR_074996
脱硫球茎菌属口腔克隆 CH031	AY005036
致黑脱硫肠状菌	NR_044832
脱硫脱硫弧菌	DQ092636
费尔韦德脱硫弧菌	U42221
Desulfovibrio piger	AF192152
脱硫弧菌属 3_1_syn3	ADDR01000239
寻常型脱硫弧菌	NR_074897

浑浊戴阿利斯特菌	ACIM02000001
微好气戴阿利斯特菌	AFBB01000028
微嗜气戴阿利斯特菌	AENT01000008
侵肺戴阿利斯特菌	HM596297
产丙酸戴阿利斯特菌	NR_043231
戴阿利斯特菌属口腔分类群 502	GQ422739
嗜琥珀酸戴阿利斯特菌	AB370249
碱湖迪茨氏菌	GQ870426
迪茨氏菌属 BBDP51	DQ337512
迪茨氏菌属物种 CA149	GQ870422
帝汶迪茨氏菌	GQ870424
产甲酸多尔氏菌	AAXA02000006
长链多尔氏菌	AJ132842
嘉德营发酵单胞菌	ADLV01000001
莫斯氏营发酵单胞菌	ADLW01000023
迟钝爱德华菌	CP002154
迟缓埃格特菌	AF292375
中华埃格特菌	AY321958
埃格特菌属 1_3_56FAA	ACWN01000099
埃格特菌属物种 HGA1	AEXR01000021
埃格特菌属物种 YY7918	AP012211
查菲艾利希体	AAIF01000035
啮蚀艾肯氏菌	ACEA01000028
气囊栖水菌	ACYI01000081
产气肠杆菌	AJ251468
阿氏肠杆菌	NR_024640
生癌肠杆菌	Z96078
阴沟肠杆菌	FP929040
考氏肠杆菌	NR_025566
霍氏肠杆菌	AFHR01000079
肠杆菌属 247BMC	HQ122932

[0220]

[0221]

肠杆菌属 638	NR_074777
肠杆菌属物种 JC163	JN657217
肠杆菌属 SCSS	HM007811
肠杆菌属物种 TSE38	HM156134
肠杆菌科细菌 9_2_54FAA	ADCU01000033
肠杆菌科细菌 CF01Ent_1	AJ489826
肠杆菌科细菌 Smarlab 3302238	AY538694
鸟肠球菌	AF133535
人粪肠球菌	AY943820
酪黄肠球菌	AEWT01000047
耐久肠球菌	AJ276354
粪肠球菌	AE016830
屎肠球菌	AM157434
鹑鸡肠球菌	AB269767
灰黄肠球菌	AY033814
夏威夷肠球菌	AY321377
希氏肠球菌	AF061011
意大利肠球菌	AEPV01000109
蒙氏肠球菌	NR_024906
棉子糖肠球菌	FN600541
肠球菌属 BV2CASA2	JN809766
肠球菌属物种 CCRI_16620	GU457263
肠球菌属物种 F95	FJ463817
肠球菌属物种 RfL6	AJ133478
泰国肠球菌	AY321376
阴道孤独球菌	AENN01000008
意外丹毒丝菌	NR_025594
猪红斑丹毒丝菌	ACLK01000021
扁桃体丹毒丝菌	NR_040871
丹毒丝菌科细菌 3_1_53	ACTJ01000113
丹毒丝菌科细菌 5_2_54FAA	ACZW01000054

艾伯氏大肠杆菌	ABKX01000012
大肠杆菌	NC_008563
弗格森氏大肠杆菌	CU928158
赫尔曼氏大肠杆菌	HQ407266
大肠杆菌属 1_1_43	ACID01000033
大肠杆菌属 4_1_40B	ACDM02000056
大肠杆菌属物种 B4	EU722735
伤口埃希菌	NR_041927
哈尔滨产乙醇杆菌	AY675965
真杆菌科细菌 P4P_50 P4	AY207060
巴克氏真杆菌	NR_044661
两形真杆菌	ABYT01000002
短真杆菌	U13038
布氏真杆菌	NR_024682
卡氏真杆菌	NR_026330
溶纤维素真杆菌	AY178842
扭曲真杆菌	FR749946
产粪甾醇真杆菌	HM037995
圆柱状真杆菌	FP929041
链状真杆菌	NR_044644
细长真杆菌	L34682
挑剔真杆菌	CP001104
断链真杆菌	FR749935
庞大真杆菌	FR749933
霍氏真杆菌	L34621
娇弱真杆菌	U13039
淤泥真杆菌	CP002273
串珠状真杆菌	HF558373
多形真杆菌	NR_024683
产亚硝酸真杆菌	NR_024684
纠缠真杆菌	U13041

[0222]

[0223]

细枝真杆菌	AJ011522
直肠真杆菌	FP929042
反刍真杆菌	NR_024661
口臭真杆菌	AB525414
隐枝真杆菌	NR_026031
惰性真杆菌	ABCA03000054
真杆菌属 3_1_31	ACTL01000045
真杆菌属 AS15b	HQ616364
真杆菌属物种 OBRC9	HQ616354
真杆菌属口腔克隆 GI038	AY349374
真杆菌属物种口腔克隆 IR009	AY349376
真杆菌属物种口腔克隆 JH012	AY349373
真杆菌属物种口腔克隆 JI012	AY349379
真杆菌属物种口腔克隆 JN088	AY349377
真杆菌属物种口腔克隆 JS001	AY349378
真杆菌属物种口腔克隆 OH3A	AY947497
真杆菌属 WAL 14571	FJ687606
纤细真杆菌	M59118
多曲真杆菌	NR_044648
凸腹真杆菌	L34421
嗜木聚糖真杆菌	L34628
尤氏真杆菌	AEES01000073
美洲爱文氏菌	JN175329
乙酰微小杆菌	FJ970034
人费克蓝姆菌	Y10772
普氏粪杆菌	ACOP02000011
龈沟产线菌	CP002390
绒毛产线菌	NR_041928
大芬戈尔德菌	ACHM02000001
黄杆菌科基因属 C1	AY278614
黄杆菌属 NF2_1	FJ195988

[0224]

普氏梭杆菌	AY724678
拉氏弯螺菌	AY126479
红海湾揉杆菌	NR_074881
新凶手弗朗西斯菌	ABSS01000002
蜃楼弗朗西斯氏菌	AY928394
土拉弗朗西斯氏菌	ABAZ01000082
黄腐病菌属 NML 060897	EF589680
犬猫科梭杆菌	AY162222
梭杆菌属复合群 C1	AY278616
梭杆菌属复合群 C2	AY278617
微生子梭杆菌	ACET01000043
死亡梭杆菌	ACDB02000034
舟形梭杆菌	HQ223106
坏疽梭杆菌	X55408
坏死梭杆菌	AM905356
核粒梭杆菌	ADVK01000034
牙周梭杆菌	ACJY01000002
拉氏梭杆菌	NR_044687
梭杆菌属 1_1_41FAA	ADGG01000053
梭杆菌属 11_3_2	ACUO01000052
梭杆菌属物种 12_1B	AGWJ01000070
梭杆菌属 2_1_31	ACDC02000018
梭杆菌属 3_1_27	ADGF01000045
梭杆菌属 3_1_33	ACQE01000178
梭杆菌属物种 3_1_36A2	ACPU01000044
梭杆菌属物种 3_1_5R	ACDD01000078
梭杆菌属物种 AC18	HQ616357
梭杆菌属物种 ACB2	HQ616358
梭杆菌属物种 AS2	HQ616361
梭杆菌属物种 CM1	HQ616371
梭杆菌属物种 CM21	HQ616375

梭杆菌属物种 CM22	HQ616376
梭杆菌属物种 D12	ACDG02000036
梭杆菌属口腔克隆 ASCF06	AY923141
梭杆菌属物种口腔克隆 ASCF11	AY953256
溃疡梭杆菌	ACDH01000090
变形梭杆菌	ACIE01000009
阴道加德纳菌	CP001849
溶血孪生球菌	ACDZ02000012
麻疹孪生球菌	NR_025904
麻疹孪生球菌	ACRX01000010
血孪生球菌	ACRY01000057
孪生球菌属口腔克隆 ASCE02	AY923133
孪生球菌属物种口腔克隆 ASCF04	AY923139
孪生球菌属物种口腔克隆 ASCF12	AY923143
孪生球菌属 WAL 1945J	EU427463
甲酸芽殖菌	GU562446
地杆菌嗜热地杆菌	NR_074989
地杆菌属 E263	DQ647387
地杆菌属物种 WCH70	CP001638
嗜热脂肪地杆菌	NR_040794
热链型地杆菌	NR_043020
热反硝化地杆菌	NR_074976
热葡萄糖苷地杆菌	NR_043022
食热油地杆菌	NR_074931
贝米吉格地杆菌	CP001124
无类囊体蓝藻	NR_074282
固氮葡糖醋杆菌	NR_028767
内生固氮葡糖醋杆菌	NR_074292
恩氏葡糖醋杆菌	NR_028909
欧洲葡糖醋杆菌	NR_026513
汉森葡糖醋杆菌	NR_026133

[0225]

约翰尼葡糖醋杆菌	NR_024959
温驯葡糖醋杆菌	NR_041295
木糖葡糖醋杆菌	NR_074338
支气管戈登氏菌	NR_027594
食聚异戊二烯戈登氏菌	DQ385609
戈登氏菌属 KTR9	DQ068383
痰液戈登氏菌	FJ536304
土地戈登氏菌	GQ848239
帕梅拉戈登氏杆菌	AM886059
帕梅拉戈登氏杆菌	FP929047
耐热纤细杆菌	NR_043559
福塞蒂黄杆菌	NR_074707
毗邻颗粒链菌	ACKZ01000002
苛养颗粒链菌	AB252689
副毗邻颗粒链菌	AY879298
颗粒链菌属 M658_99_3	AJ271861
颗粒链菌属口腔克隆 ASC02	AY923126
颗粒链菌属物种口腔克隆 ASCA05	DQ341469
颗粒链菌属物种口腔克隆 ASCB09	AY953251
颗粒链菌属物种口腔克隆 ASCG05	AY923146
霍利斯格里蒙菌	ADAQ01000013
血球杆菌属 BC14248	GU396991
埃及嗜血杆菌	AFBC01000053
杜克雷氏嗜血杆菌	AE017143
嗜血杆菌属复合群 P2 口腔克隆 MB3_C24	DQ003621
嗜血杆菌属复合群 P3 口腔克隆 MB3_C38	DQ003635
溶血性嗜血杆菌	JN175335
流感嗜血杆菌	AADP01000001
副溶血嗜血杆菌	GU561425
副流感嗜血杆菌	AEWU01000024
副溶血性嗜沫嗜血杆菌	M75076

[0226]

副猪嗜血杆菌	GU226366
睡眠嗜血杆菌	NC_008309
嗜血杆菌属 70334	HQ680854
嗜血杆菌属 HK445	FJ685624
嗜血杆菌属口腔克隆 ASCA07	AY923117
嗜血杆菌属物种口腔克隆 ASCG06	AY923147
嗜血杆菌属物种口腔克隆 BJ021	AY005034
嗜血杆菌属物种口腔克隆 BJ095	AY005033
嗜血杆菌属物种口腔克隆 JM053	AY349380
嗜血杆菌属口腔分类群 851	AGRK01000004
唾液嗜血杆菌	AFNK01000005
蜂房哈佛尼亚菌	DQ412565
细长盐单胞菌	NR_074782
约翰逊盐单胞菌	FR775979
解脂盐红菌	AB477978
胆型螺杆菌	ACDN01000023
加拿大螺杆菌	ABQS01000108
同性恋螺杆菌	ABQT01000054
幼禽螺杆菌	ABQU01000097
幽门螺杆菌	CP000012
螺杆菌属物种 None	U44756
温哈门螺杆菌	ACDO01000013
嗜中温日光杆菌	NR_074517
固氮内生草螺菌	CP002039
草螺菌属 JC206	JN657219
睡眠嗜组织菌	AF549387
纤维状霍尔德菌	Y11466
食糖厌氧产氢杆菌	NR_044425
丁酸高温热菌	CP000493
食磺酸生丝微菌	AY468372
海王生丝单胞菌	NR_074092

[0227]

[0228]

印度型依格纳季氏菌	HQ823562
依格纳季氏菌属 NML 95_0260	HQ823559
冰岛燃球菌	X99562
淤泥固氮螺菌	NR_029046
淤泥两面神菌	NR_026362
甜瓜两面神菌	EF063716
细长杆菌属 SY12	EF455530
懒惰约翰森菌（Johnsonella ignava）	X87152
Jonquetella anthropi	ACOO02000004
猪腿克斯特氏菌	NR_025669
脱氮金氏杆菌	AEWV01000047
金氏杆菌属复合群 P1 口腔克隆 MB2_C20	DQ003616
金蝶金氏杆菌	AFHS01000073
口金氏杆菌	ACJW02000005
金氏杆菌属口腔克隆 ID059	AY349381
催产克雷白氏菌	AY292871
肺炎克雷白氏菌	CP000647
克雷白氏菌属 AS10	HQ616362
克雷白氏菌属物种 Co9935	DQ068764
克雷白氏菌属富集培养克隆 SRC_DSD25	HM195210
克雷白氏菌属物种 OBRC7	HQ616353
克雷白氏菌属 SP_BA	FJ999767
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD1	GU797254
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD11	GU797263
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD12	GU797264
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD15	GU797267
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD2	GU797253
克雷白氏菌属物种 SRC_DSD6	GU797258
变异克雷白氏菌	CP001891
抗坏血酸克吕沃尔菌	NR_028677
栖冷克吕沃尔菌	NR_028803

[0229]

海考克氏菌	GQ260086
沼泽考克氏菌	EU333884
嗜根考克氏菌	AY030315
玫瑰色考克氏菌	X87756
变异考克氏菌	AF542074
牛毛杆菌	GU324407
多产毛螺菌	FR733699
裂果胶毛螺菌	L14675
毛螺菌科细菌 1_1_57FAA	ACTM01000065
毛螺菌科细菌 1_4_56FAA	ACTN01000028
毛螺菌科细菌 2_1_46FAA	ADLB01000035
毛螺菌科细菌 2_1_58FAA	ACTO01000052
毛螺菌科细菌 3_1_57FAA_CT1	ACTP01000124
毛螺菌科细菌 4_1_37FAA	ADCR01000030
毛螺菌科细菌 5_1_57FAA	ACTR01000020
毛螺菌科细菌 5_1_63FAA	ACTS01000081
毛螺菌科细菌 6_1_63FAA	ACTV01000014
毛螺菌科细菌 8_1_57FAA	ACWQ01000079
毛螺菌科细菌 9_1_43BFAA	ACTX01000023
毛螺菌科细菌 A4	DQ789118
毛螺菌科细菌 DJF VP30	EU728771
毛螺菌科细菌 ICM62	HQ616401
毛螺菌科细菌 MSX33	HQ616384
毛螺菌科细菌口腔分类群 107	ADDS01000069
毛螺菌科细菌口腔分类群 F15	HM099641
毛螺菌科复合群 C1	AY278618
酸鱼乳杆菌	NR_024718
嗜酸乳杆菌	CP000033
食品乳杆菌	NR_044701
解淀粉乳杆菌	ADNY01000006
噬淀粉乳杆菌	CP002338

胃窦乳杆菌	ACLL01000037
短乳杆菌	EU194349
布赫内氏乳杆菌	ACGH01000101
干酪乳杆菌	CP000423
链状乳杆菌	M23729
人阴道乳杆菌	ACOH01000030
棒状乳杆菌	NR_044705
卷曲乳杆菌	ACOG01000151
弯曲乳杆菌	NR_042437
戴耳布吕克氏乳杆菌	CP002341
糊精乳杆菌	NR_036861
香肠乳杆菌	NR_044707
发酵乳杆菌	CP002033
加氏乳杆菌	ACOZ01000018
胃乳杆菌	AICN01000060
乳杆菌属复合群C1	AY278619
乳杆菌属复合群C2	AY278620
瑞士乳杆菌	ACLM01000202
希氏乳杆菌	ACGP01000200
人乳杆菌	FR681902
惰性乳杆菌	AEKJ01000002
詹氏乳杆菌	ACQD01000066
约氏乳杆菌	AE017198
卡里乳杆菌	NR_029083
马乳酒样乳杆菌	NR_042440
高加索乳杆菌	NR_042230
泡菜乳杆菌	NR_025045
莱希曼氏乳杆菌	JX986966
黏膜乳杆菌	FR693800
鼠乳杆菌	NR_042231
诺登西丝乳杆菌	NR_041629

[0230]

酒类乳杆菌	NR_043095
口乳杆菌	AEKL01000077
类短乳杆菌	NR_042456
类布氏乳杆菌	NR_041294
副干酪乳杆菌	ABQV01000067
类高加索乳杆菌	NR_029039
戊糖乳杆菌	JN813103
恶味乳杆菌	NR_029360
植物乳杆菌	ACGZ02000033
脑桥乳杆菌	HM218420
罗伊乳杆菌	ACGW02000012
鼠李糖乳杆菌	ABWJ01000068
罗氏乳杆菌	GU269544
瘤胃乳杆菌	ACGS02000043
清酒乳杆菌	DQ989236
唾液乳杆菌	AEBA01000145
健男乳杆菌（Lactobacillus saniviri）	AB602569
老年乳杆菌	AB602570
乳杆菌属 66c	FR681900
乳杆菌属物种 BT6	HQ616370
乳杆菌属 KLDS 1.0701	EU600905
乳杆菌属物种 KLDS 1.0702	EU600906
乳杆菌属物种 KLDS 1.0703	EU600907
乳杆菌属物种 KLDS 1.0704	EU600908
乳杆菌属物种 KLDS 1.0705	EU600909
乳杆菌属物种 KLDS 1.0707	EU600911
乳杆菌属物种 KLDS 1.0709	EU600913
乳杆菌属物种 KLDS 1.0711	EU600915
乳杆菌属物种 KLDS 1.0712	EU600916
乳杆菌属物种 KLDS 1.0713	EU600917
乳杆菌属物种 KLDS 1.0716	EU600921

[0231]

乳杆菌属物种 KLDS 1.0718	EU600922
乳杆菌属物种 KLDS 1.0719	EU600923
乳杆菌属口腔克隆 HT002	AY349382
乳杆菌属物种口腔克隆 HT070	AY349383
乳杆菌属口腔分类群 052	GQ422710
腊肠乳杆菌	NR_042194
乌兰乳杆菌	ACGU01000081
阴道乳杆菌	ACGV01000168
酒乳杆菌	NR_042196
犊乳杆菌	NR_041305
玉米乳杆菌	NR_037122
格氏乳球菌	AF061005
乳酸乳球菌	CP002365
棉子糖乳球菌	NR_044359
长卵形内酯杆菌	DQ100449
香港海鸥型菌	CP001154
奇异劳特罗普氏菌	AEQP01000026
劳特罗普氏菌属口腔克隆 AP009	AY005030
哈开里军团菌	M36028
长滩军团菌	M36029
嗜肺军团菌	NC_002942
军团菌属 D3923	JN380999
军团菌属物种 D4088	JN381012
军团菌属物种 H63	JF831047
军团菌属 NML 93L054	GU062706
斯蒂氏军团菌	HQ398202
格氏勒米诺菌	AJ233421
理氏勒米诺菌	HF558368
博氏钩端螺旋体	NC_008508
布鲁氏钩端螺旋体	NR_043200
问号钩端螺旋体	NC_005823

[0232]

黎氏钩端螺旋体	EF612284
颊纤发菌	CP001685
纤发菌属复合群 C1	AY278621
古氏纤发菌	ADAD01000110
霍夫氏纤发菌	ACVB02000032
沙氏纤发菌	AY029806
纤发菌属中性粒细胞减少症患者物种	AF189244
纤发菌属口腔克隆 GT018	AY349384
纤发菌属物种口腔克隆 GT020	AY349385
纤发菌属物种口腔克隆 HE012	AY349386
纤发菌属物种口腔克隆 IK040	AY349387
纤发菌属口腔克隆 P2PB_51 P1	AY207053
纤发菌属口腔分类群 223	GU408547
肉明串珠菌	NR_040811
嗜柠檬酸明串珠菌	AM157444
伴气明串珠菌	FN822744
仁荷明串珠菌	NR_025204
泡菜明串珠菌	NR_075014
乳酸明串珠菌	NR_040823
肠膜明串珠菌	ACKV01000113
假肠膜明串珠菌	NR_040814
格雷氏李斯特氏菌	ACCR02000003
无毒李斯特氏菌	JF967625
伊氏李斯特氏菌	X56151
单核球增多性李斯特氏菌	CP002003
威氏李斯特氏菌	AM263198
血黄球菌	NR_025507
嗜热污泥孢菌	NR_041236
梭形离胺酸杆菌	FN397522
球形离胺酸杆菌	NR_074883
溶酪大球菌	NR_074941

[0233]

[0234]

溶血曼海姆菌	ACZX01000102
需钾酸盐马文布莱恩特氏菌	AJ505973
马赛菌属 CCUG 43427A	FR773700
漏斗巨单胞菌	AB300988
超巨巨单胞菌	AJ420107
埃氏巨球型菌	AY038996
巨球型菌属复合群 C1	AY278622
巨球型菌属复合群类型_1	ADGP01000010
微核巨球形菌	AECS01000020
巨球型菌属 BLPYG_07	HM990964
巨球型菌属 UPII 199_6	AFIJ01000040
勤奋金属球菌	D26491
甲酸甲烷杆菌	NR_025028
抗酸甲烷短杆菌	NR_028779
嗜树木甲烷短杆菌	NR_042783
弯曲甲烷短杆菌	NR_044796
表皮甲烷短杆菌	NR_044776
丝状甲烷短杆菌	NR_044801
哥特甲烷短杆菌	NR_044789
米氏甲烷短杆菌	NR_042785
奥利亚甲烷短杆菌	NR_043024
口腔甲烷杆菌	HE654003
反刍动物甲烷短杆菌	NR_042784
史密斯甲烷短杆菌	ABYV02000002
索氏甲烷短杆菌	NR_044787
韦氏甲烷短杆菌	NR_044788
沃尔氏甲烷短杆菌	NR_044790
斯氏甲烷球形菌	AY196684
扭脱甲基杆菌	NC_010172
足甲基杆菌	AY468363
耐辐射甲基杆菌	GU294320

甲基杆菌属 1sub	AY468371
甲基杆菌属物种 MM4	AY468370
森林甲基细胞菌	NR_074237
嗜甲基菌属 ECd5	AY436794
巧克力微杆菌	NR_037045
黄色微杆菌	EU714363
古本微杆菌	NR_025098
乳酸微杆菌	EU714351
食油微杆菌	EU714381
氧化微杆菌	EU714348
副氧化微杆菌	AJ491806
叶球形微杆菌	EU714359
雪菜微杆菌	NR_044936
微杆菌属 768	EU714378
微杆菌属口腔菌株 C24KA	AF287752
砖红色微杆菌	EU714365
南极微球菌	NR_025285
藤黄微球菌	NR_075062
里拉微球菌	NR_026200
微球菌属 185	EU714334
铜绿微囊藻	NC_010296
贾氏光冈菌	NR_028840
多酸光冈菌	ABWK02000005
光冈菌属口腔分类群 521	GU413658
光冈菌属口腔分类群 G68	GU432166
柯氏动弯杆菌	AEPZ01000013
羞怯动弯杆菌	ACKW01000035
威斯康辛米勒氏菌	JN175344
分生艰难杆菌	NR_027191
难养艰难杆菌	NR_027203
短小艰难杆菌	NR_028608

[0235]

胆怯艰难杆菌	Z36296
柔膜细菌 pACH93	AY297808
热醋穆尔氏菌	NR_075001
卡他莫拉菌	CP002005
林肯莫拉菌	FR822735
奥斯陆莫拉菌	JN175341
莫拉菌属 16285	JF682466
莫拉菌属 GM2	JF837191
摩根摩根氏菌	AJ301681
摩根氏菌属 JB_T16	AJ781005
脑桑椹状球菌	JN175352
莫亚拉产吲哚菌	AF527773
脓肿分枝杆菌	AGQU01000002
非洲分枝杆菌	AF480605
Mycobacterium alsiensis	AJ938169
鸟分枝杆菌	CP000479
龟分枝杆菌	AB548610
哥伦比亚分枝杆菌	AM062764
象皮病分枝杆菌	AF385898
戈登分枝杆菌	GU142930
胞内分枝杆菌	GQ153276
堪萨斯分枝杆菌	AF480601
拉克丝分枝杆菌	NR_025175
麻风分枝杆菌	FM211192
弥漫型麻风分枝杆菌	EU203590
麦氏分枝杆菌	FR798914
曼氏分枝杆菌	FJ042897
海分枝杆菌	NC_010612
田鼠分枝杆菌	NR_025234
新金分枝杆菌	AF268445
副瘰疬分枝杆菌	ADNV01000350

[0236]

[0237]

副土分枝杆菌	EU919229
草分枝杆菌	GU142920
耻垢分枝杆菌	DQ536403
包皮垢分枝杆菌	CP000480
分枝杆菌属 1761	EU703150
分枝杆菌属物种 1776	EU703152
分枝杆菌属物种 1781	EU703147
分枝杆菌属物种 1791	EU703148
分枝杆菌属物种 1797	EU703149
分枝杆菌属 AQ1GA4	HM210417
分枝杆菌属物种 B10_07.09.0206	HQ174245
分枝杆菌属物种 GN_10546	FJ497243
分枝杆菌属物种 GN_10827	FJ497247
分枝杆菌属物种 GN_11124	FJ652846
分枝杆菌属物种 GN_9188	FJ497240
分枝杆菌属物种 GR_2007_210	FJ555538
分枝杆菌属物种 HE5	AJ012738
分枝杆菌属物种 NLA001000736	HM627011
分枝杆菌属 W	DQ437715
结核分枝杆菌	CP001658
溃疡分枝杆菌	AB548725
脆弱分枝杆菌	EU834055
无乳支原体	AF010477
两形支原体	AY531656
关节炎支原体	NC_011025
牛眼支原体	NR_025987
咽支原体	NR_024983
发酵支原体	CP002458
絮状支原体	X62699
生殖器支原体	L43967
人型支原体	AF443616

口腔支原体	AY796060
绵羊肺炎支原体	NR_025989
穿透支原体	NC_004432
肺炎支原体	NC_000912
腐败支原体	U26055
唾液支原体	M24661
支原体科复合群 P1 口腔克隆 MB1_G23	DQ003614
香味类香菌	NR_042354
类香味菌属 MY15	GU253339
杆状奈瑟菌	AFAY01000058
灰色奈瑟菌	ACDY01000037
长形奈瑟菌	ADBF01000003
浅黄奈瑟菌	ACQV01000025
奈瑟菌属复合群 P2 口腔克隆 MB5_P15	DQ003630
淋病奈瑟菌	CP002440
乳糖奈瑟菌	ACEQ01000095
猕猴奈瑟菌	AFQE01000146
脑膜炎奈瑟菌	NC_003112
黏膜奈瑟菌	ACDX01000110
咽奈瑟菌	AJ239281
多糖奈瑟菌	ADBE01000137
干燥奈瑟菌	ACKO02000016
奈瑟菌属 KEM232	GQ203291
奈瑟菌属口腔克隆 AP132	AY005027
奈瑟菌属物种口腔克隆 JC012	AY349388
奈瑟菌属口腔菌株 B33KA	AY005028
奈瑟菌属口腔分类群 014	ADEA01000039
奈瑟菌属物种 SMC_A9199	FJ763637
奈瑟菌属物种 TM10_1	DQ279352
淡黄色奈瑟菌	ACEO01000067
里氏新立克次氏体	CP001431

[0238]

[0239]

腺热新立克次氏体	NC_007798
巴西诺卡菌	AIHV01000038
盖尔森基兴诺卡菌	HQ009486
皮疽诺卡菌	NC_006361
脓性诺卡菌	NR_028994
诺卡菌属 01_Je_025	GU574059
达松维尔类诺卡菌	CP002041
食芳烃新鞘氨醇菌	AAAV03000008
卡尼海洋杆菌	NR_041533
海洋杆菌属 Ndiop	CAER01000083
人苍白杆菌	NC_009667
中间苍白杆菌	ACQA01000001
假中间苍白杆菌	DQ365921
纹臭杆菌	AB490805
内脏臭杆菌	CP002544
奥卡德拉胃球菌	HQ699465
解脲寡源杆菌	NR_041998
尿道寡源杆菌	NR_041753
奥尔森菌属复合群 C1	AY278623
普惠生奥尔森菌	FN178466
奥尔森菌属 F0004	EU592964
奥尔森菌属口腔分类群 809	ACVE01000002
乌氏奥尔森菌	CP002106
土丰佑菌	NR_074978
鼻窦口腔杆菌	ACKX01000142
口腔杆菌属 ACB1	HM120210
口腔杆菌属物种 ACB7	HM120211
口腔杆菌属物种 CM12	HQ616374
口腔杆菌属物种 ICM51	HQ616397
口腔杆菌属物种 OBRC12	HQ616355
口腔杆菌属口腔分类群 078	ACIQ02000009

口腔杆菌属物种口腔分类群 102	GQ422713
口腔杆菌属物种口腔分类群 108	AFIH01000001
恙虫病东方体	AP008981
巴伐利亚鸟胺酸杆菌	NR_044923
鸟胺酸杆菌属 7_10AIA	FN397526
颤杆菌属 G2	HM626173
产戊酸颤杆菌	NR_074793
克鲁斯颤螺菌	AB040495
产甲酸草酸杆菌	ACDQ01000020
巴塞罗那类芽孢杆菌	NR_042272
巴伦葛兹类芽孢杆菌	NR_042756
千叶类芽孢杆菌	NR_040885
库氏类芽孢杆菌	NR_025372
坚韧类芽孢杆菌	NR_037017
解葡聚糖类芽孢杆菌	D78470
[0240] *乳酸类芽孢杆菌*	NR_025739
灿烂类芽孢杆菌	NR_040882
饲料类芽孢杆菌	NR_040853
多黏类芽孢杆菌	NR_037006
金龟子类芽孢杆菌	NR_040888
类芽孢杆菌属 CIP 101062	HM212646
类芽孢杆菌属 HGF5	AEXS01000095
类芽孢杆菌属物种 HGF7	AFDH01000147
类芽孢杆菌属物种 JC66	JF824808
类芽孢杆菌属口腔分类群 F45	HM099647
类芽孢杆菌属物种 R_27413	HE586333
类芽孢杆菌属物种 R_27422	HE586338
蒂蒙氏类芽孢杆菌	NR_042844
成团泛菌	AY335552
菠萝泛菌	CP001875
布氏泛菌	EU216735

柠檬泛菌	EF688008
不平常泛菌	EU216737
败血泛菌	EU216734
食肉桂酸乳头杆菌	NR_025025
狄氏副拟杆菌	CP000140
古氏副拟杆菌	AY974070
戈登氏副拟杆菌	AB470344
约氏副拟杆菌	ABYH01000014
屎副拟杆菌	EU136685
副拟杆菌属 D13	ACPW01000017
副拟杆菌属物种 NS31_3	JN029805
副衣原体属 UWE25	BX908798
反硝化副球菌	CP000490
马氏副球菌	NR_044922
克拉副普雷沃菌	AFFY01000068
嗜木聚糖副普雷沃菌	AFBR01000011
居齿副斯卡尔维氏菌	ADEB01000020
人排泄物副萨特氏菌	AFBP01000029
次要副萨特氏菌	AB491209
微小微单胞菌	AB729072
微单胞菌属口腔分类群 110	AFII01000002
贝氏巴氏杆菌	L06088
咬伤巴氏杆菌	ACZR01000003
多杀性巴氏杆菌	NC_002663
乳酸片球菌	ACXB01000026
戊糖片球菌	NR_075052
黑色消化球菌	NR_029221
消化球菌属口腔克隆 JM048	AY349389
消化球菌属口腔分类群 167	GQ422727
不解糖嗜胨菌	D14145
杜尔丹尼氏嗜胨菌	EU526290

[0241]

海氏嗜胨菌	NR_026358
吲哚嗜胨菌	AY153431
艾弗嗜胨菌	Y07840
洱腺嗜胨菌	ADDO01000050
嗜胨菌属 gpac007	AM176517
嗜胨菌属物种 gpac018A	AM176519
嗜胨菌属物种 gpac077	AM176527
嗜胨菌属物种 gpac148	AM176535
嗜胨菌属物种 JC140	JF824803
嗜胨菌属口腔分类群 386	ADCS01000031
嗜胨菌属物种口腔分类群 836	AEAA01000090
消化链球菌科细菌 ph1	JN837495
厌氧消化链球菌	AY326462
微小消化链球菌	AM176538
消化链球菌属 9succ1	X90471
[0242] *消化链球菌属口腔克隆 AP24*	AB175072
消化链球菌属物种口腔克隆 FJ023	AY349390
消化链球菌属 P4P_31 P3	AY207059
口炎消化链球菌	ADGQ01000048
屎考拉杆菌	NR_026111
考拉杆菌属 YIT 12068	AB490812
琥珀酸考拉杆菌	AB490811
Phenylobacterium zucineum	AY628697
非共生光杆菌	Z76752
Pigmentiphaga daeguensi	JN585327
韩国游动微菌	NR_025011
类志贺毗邻单胞菌	X60418
卟啉单胞菌科细菌 NML 060648	EF184292
不解糖卟啉单胞菌	AENO01000048
牙髓卟啉单胞菌	ACNN01000021
牙龈卟啉单胞菌	AE015924

利氏卟啉单胞菌	NR_025907
猕猴卟啉单胞菌	NR_025908
索拉卟啉单胞菌	AB547667
卟啉单胞菌属口腔克隆 BB134	AY005068
卟啉单胞菌属物种口腔克隆 F016	AY005069
卟啉单胞菌属口腔克隆 P2PB_52 P1	AY207054
卟啉单胞菌属物种口腔克隆 P4GB_100 P2	AY207057
卟啉单胞菌属 UQD 301	EU012301
上野卟啉单胞菌	ACLR01000152
阿尔伯斯普雷沃菌	NR_025300
安氏普雷沃菌	AB547670
伯氏普雷沃菌	ACKS01000100
二路普雷沃菌	ADFO01000096
短雷沃菌	NR_041954
颊普雷沃菌	ACRB01000001
口颊普雷沃菌	JN867261
粪便普雷沃菌	ACBX02000014
人体普雷沃菌	L16465
牙普雷沃菌	AB547678
栖牙普雷沃菌	CP002589
解糖胨普雷沃菌	AEDO01000026
普雷沃菌属复合群 C1	AY278624
普雷沃菌属复合群 C2	AY278625
普雷沃菌属复合群 P7 口腔克隆 MB2_P31	DQ003620
普雷沃菌属复合群 P8 口腔克隆 MB3_P13	DQ003622
普雷沃菌属复合群 P9 口腔克隆 MB7_G16	DQ003633
解肝素普雷沃菌	GQ422742
栖组织普雷沃菌	JN867315
中间普雷沃菌	AF414829
洛氏普雷沃菌	JN867231
斑状普雷沃菌	AGEK01000035

[0243]

马氏普雷沃菌	AEEI01000070
产黑色素普雷沃菌	CP002122
彩虹普雷沃菌	AGWK01000061
多形普雷沃菌	AEWX01000054
食多糖普雷沃菌	AFJE01000016
南锡普雷沃菌	JN867228
变黑普雷沃菌	AFPX01000069
口腔普雷沃菌	AEPE01000021
口普雷沃菌	ADDV01000091
龈炎普雷沃菌	L16472
苍白普雷沃菌	AFPY01000135
栖瘤胃普雷沃菌	CP002006
唾液普雷沃菌	AB108826
普雷沃菌属 BI_42	AJ581354
普雷沃菌属物种 CM38	HQ610181
普雷沃菌属物种 ICM1	HQ616385
普雷沃菌属物种 ICM55	HQ616399
普雷沃菌属 JCM 6330	AB547699
普雷沃菌属口腔克隆 AA020	AY005057
普雷沃菌属物种口腔克隆 ASCG10	AY923148
普雷沃菌属物种口腔克隆 ASCG12	DQ272511
普雷沃菌属物种口腔克隆 AU069	AY005062
普雷沃菌属物种口腔克隆 CY006	AY005063
普雷沃菌属物种口腔克隆 DA058	AY005065
普雷沃菌属物种口腔克隆 FL019	AY349392
普雷沃菌属物种口腔克隆 FU048	AY349393
普雷沃菌属物种口腔克隆 FW035	AY349394
普雷沃菌属物种口腔克隆 GI030	AY349395
普雷沃菌属物种口腔克隆 GI032	AY349396
普雷沃菌属物种口腔克隆 GI059	AY349397
普雷沃菌属物种口腔克隆 GU027	AY349398

[0244]

普雷沃菌属物种口腔克隆 HF050	AY349399
普雷沃菌属物种口腔克隆 ID019	AY349400
普雷沃菌属物种口腔克隆 IDR_CEC_0055	AY550997
普雷沃菌属物种口腔克隆 IK053	AY349401
普雷沃菌属物种口腔克隆 IK062	AY349402
普雷沃菌属口腔克隆 P4PB_83 P2	AY207050
普雷沃菌属口腔分类群 292	GQ422735
普雷沃菌属物种口腔分类群 299	ACWZ01000026
普雷沃菌属物种口腔分类群 300	GU409549
普雷沃菌属物种口腔分类群 302	ACZK01000043
普雷沃菌属物种口腔分类群 310	GQ422737
普雷沃菌属物种口腔分类群 317	ACQH01000158
普雷沃菌属物种口腔分类群 472	ACZS01000106
普雷沃菌属物种口腔分类群 781	GQ422744
普雷沃菌属物种口腔分类群 782	GQ422745
普雷沃菌属口腔分类群 F68	HM099652
普雷沃菌属物种口腔分类群 G60	GU432133
普雷沃菌属物种口腔分类群 G70	GU432179
普雷沃菌属物种口腔分类群 G71	GU432180
普雷沃菌属物种 SEQ053	JN867222
普雷沃菌属物种 SEQ065	JN867234
普雷沃菌属物种 SEQ072	JN867238
普雷沃菌属物种 SEQ116	JN867246
普雷沃菌属物种 SG12	GU561343
普雷沃菌属物种 sp24	AB003384
普雷沃菌属物种 sp34	AB003385
粪普雷沃菌	AB244774
谭氏普雷沃菌	ACIJ02000018
蒂蒙斯普雷沃菌	ADEF01000012
真口普雷沃菌	ACVA01000027
空肠普雷沃菌、桔红色普雷沃菌、巴洛尼亚普	

[0245]

[0246]

雷沃菌、科罗讷普雷沃菌、人体普雷沃菌、齿状普雷沃菌、埃诺普雷沃菌、福氏普雷沃菌、深黑色普雷沃菌、解肝素普雷沃菌、洛氏普雷沃菌、食多糖普雷沃菌、南锡普雷沃菌、米普雷沃菌、帕拉迪普雷沃菌、胸膜炎普雷沃菌、栖瘤胃普雷沃菌、解糖普雷沃菌、靶心普雷沃菌、沙氏普雷沃菌、动胶普雷沃菌	
普雷沃菌科细菌 P4P_62 P1	AY207061
海洋原绿球藻	CP000551
丙酸杆菌科细菌 NML 02_0265	EF599122
产丙酸丙酸杆菌	NC_019395
痤疮丙酸杆菌	ADJM01000010
贪婪丙酸杆菌	AJ003055
费氏丙酸杆菌	NR_036972
颗粒丙酸杆菌	FJ785716
约翰逊丙酸杆菌	NR_042269
丙酸丙酸杆菌	NR_025277
丙酸杆菌属 434_HC2	AFIL01000035
丙酸杆菌属物种 H456	AB177643
丙酸杆菌属 LG	AY354921
丙酸杆菌属口腔分类群 192	GQ422728
丙酸杆菌属物种 S555a	AB264622
特恩氏丙酸杆菌	NR_042270
奇异变形杆菌	ACLE01000013
羽状变形杆菌	ABVP01000020
变形杆菌属 HS7514	DQ512963
普通变形杆菌	AJ233425
产碱普罗威登斯菌	ABXW01000071
雷氏普罗威登斯菌	AM040492
拉氏普罗威登斯菌	AM040489
斯氏普罗威登斯菌	AF008581

帝蒙氏假棍状菌	FJ375951
假毛藓菌	AY136666
铜绿假单胞菌	AABQ07000001
荧光假单胞菌	AY622220
盖氏假单胞菌	FJ943496
门多萨假单胞菌	AAUL01000021
蒙氏假单胞菌	NR_024910
草假单胞菌	GU188951
类产碱假单胞菌	NR_037000
恶臭假单胞菌	AF094741
假单胞菌属 2_1_26	ACWU01000257
假单胞菌属 G1229	DQ910482
假单胞菌属物种 NP522b	EU723211
施氏假单胞菌	AM905854
托拉假单胞菌	AF320988
绿黄假单胞菌	NR_042764
非解乳糖假枝杆菌	AB036759
北极嗜冷杆菌	CP000082
养料嗜冷杆菌	HQ698586
盐晶嗜冷杆菌	CP000323
粪嗜冷杆菌	HQ698566
海雪嗜冷杆菌	HQ698587
肺炎嗜冷杆菌	HQ698582
嗜冷杆菌属 13983	HM212668
鱼腥味锥形杆菌（Pyramidobacter piscolens）	AY207056
皮氏罗尔斯通氏菌	NC_010682
罗尔斯通氏菌属 5_7_47FAA	ACUF01000076
解鸟胺酸拉乌尔菌	AB364958
植生拉乌尔菌	AF129443
土生拉乌尔菌	NR_037085
红杆菌属口腔分类群 C30	HM099648

[0247]

[0248]

球形红杆菌	CP000144
类棒状红球菌属	X80615
马红球菌	ADNW01000058
红串红球菌	ACNO01000030
聚集红球菌	NR_037021
沼泽红假单胞菌	CP000301
小蛛立克次氏体	CP000847
康氏立克次氏体	AE008647
普氏立克次氏体	M21789
立克氏立克次氏体	NC_010263
斯洛伐克立克次氏体	L36224
地方性斑疹伤寒立克次氏体	AE017197
Robinsoniella peoriensis	AF445258
盲肠罗斯拜瑞氏菌	GU233441
粪罗斯拜瑞氏菌	AY804149
粪便罗斯拜瑞氏菌	AY305310
人罗斯拜瑞氏菌	AJ270482
肠道罗斯拜瑞氏菌	FP929050
食菊糖罗斯拜瑞氏菌	AJ270473
罗斯拜瑞氏菌属 11SE37	FM954975
罗斯拜瑞氏菌属物种 11SE38	FM954976
光合玫瑰菌	CP000804
颈玫瑰单胞菌	ADVL01000363
黏膜玫瑰单胞菌	NR_028857
玫瑰单胞菌属 NML94_0193	AF533357
玫瑰单胞菌属物种 NML97_0121	AF533359
玫瑰单胞菌属物种 NML98_0009	AF533358
玫瑰单胞菌属物种 NML98_0157	AF533360
天空罗氏菌	DQ673320
龋齿罗氏菌	ADDW01000024
黏滑罗氏菌	ACVO01000020

[0249]

鼠鼻罗氏菌	NR_025310
罗氏菌属口腔分类群 188	GU470892
嗜淀粉反刍杆菌	NR_026450
瘤胃球菌科细菌 D16	ADDX01000083
白色瘤胃球菌	AY445600
布氏瘤胃球菌	EU266549
伶俐瘤胃球菌	NR_029160
Ruminococcus champanellensis	FP929052
生黄瘤胃球菌	NR_025931
活泼瘤胃球菌	X94967
汉森瘤胃球菌	M59114
乳酸瘤胃球菌	ABOU02000049
卵瘤胃球菌	AY169419
瘤胃球菌属 18P13	AJ515913
瘤胃球菌属物种 5_1_39BFAA	ACII01000172
瘤胃球菌属物种 9SE51	FM954974
瘤胃球菌属物种 ID8	AY960564
瘤胃球菌属物种 K_1	AB222208
扭链瘤胃球菌	AAVP02000002
绿色糖单胞菌	X54286
邦戈尔沙门氏菌	NR_041699
肠炎沙门氏菌	NC_011149
肠炎沙门氏菌	NC_011205
肠炎沙门氏菌	DQ344532
肠炎沙门氏菌	ABEH02000004
肠炎沙门氏菌	ABAK02000001
肠炎沙门氏菌	NC_011080
肠炎沙门氏菌	EU118094
肠炎沙门氏菌	NC_011094
肠炎沙门氏菌	AE014613
肠炎沙门氏菌	ABFH02000001

肠炎沙门氏菌	ABEM01000001
肠炎沙门氏菌	ABAM02000001
鼠伤寒沙门氏菌	DQ344533
鼠伤寒沙门氏菌	AF170176
胃八迭球菌	NR_026146
罕见斯卡多维氏菌	AB029087
韦格斯卡多维氏菌	AY278626
圆形慢反应脂肪酸菌	CP001958
褶皱慢反应脂肪酸菌	ACZI01000025
蛛形月形单胞菌	HM596274
鱼月形单胞菌	GQ422719
福氏月形单胞菌	AF287803
月形单胞菌属复合群C1	AY278627
月形单胞菌属复合群C2	AY278628
月形单胞菌属复合群P5	AY341820
[0250] *月形单胞菌属复合群P6 口腔克隆MB3_C41*	DQ003636
月形单胞菌属复合群P7 口腔克隆MB5_C08	DQ003627
月形单胞菌属复合群P8 口腔克隆MB5_P06	DQ003628
损伤新月形单胞菌	AF287802
有害月形单胞菌	GU470909
反刍动物月形单胞菌	NR_075026
月形单胞菌属FOBRC9	HQ616378
月形单胞菌属口腔克隆FT050	AY349403
月形单胞菌属物种口腔克隆GI064	AY349404
月形单胞菌属物种口腔克隆GT010	AY349405
月形单胞菌属物种口腔克隆HU051	AY349406
月形单胞菌属物种口腔克隆IK004	AY349407
月形单胞菌属物种口腔克隆IQ048	AY349408
月形单胞菌属物种口腔克隆JI021	AY349409
月形单胞菌属物种口腔克隆JS031	AY349410
月形单胞菌属物种口腔克隆OH4A	AY947498

月形单胞菌属口腔克隆 P2PA_80 P4	AY207052
月形单胞菌属口腔分类群 137	AENV01000007
月形单胞菌属物种口腔分类群 149	AEEJ01000007
生痰月形单胞菌	ACKP02000033
居泉沙雷菌	NR_025339
液化沙雷菌	NR_042062
黏质沙雷菌	GU826157
臭味沙雷菌	ADBY01000001
变形班沙雷菌	AAUN01000015
腐败希瓦菌	CP002457
波伊德氏志贺氏菌	AAKA01000007
痢疾志贺氏菌	NC_007606
福氏志贺氏菌	AE005674
宋内志贺氏菌	NC_007384
卫星肖特沃思氏菌	ACIP02000004
肖特沃思氏菌属 MSX8B	HQ616383
肖特沃思氏菌属口腔分类群 G69	GU432167
米氏西蒙斯菌	ADCY01000105
产雌马酚斯奈克氏菌	EU377663
弱生斯奈克氏菌	ACUX01000029
犬粪斯奈克氏菌	NR_042220
还原天芥菜碱斯奈克氏菌	NR_074439
异黄酮化合物斯奈克氏菌	AB566418
梨形斯奈克氏菌	AB490806
斯奈克氏菌属 NATTS	AB505075
莫氏细小杆菌	AECQ01000039
粪鞘胺醇杆菌	NR_025537
水氏鞘胺醇杆菌	JF708889
多食鞘胺醇杆菌	NR_040953
食神鞘胺醇杆菌	ACHA02000013
刺状鞘胺醇单胞菌	NR_024700

[0251]

鞘胺醇单胞菌属口腔克隆 FI012	AY349411
鞘胺醇单胞菌属物种口腔克隆 FZ016	AY349412
鞘胺醇单胞菌属口腔分类群 A09	HM099639
鞘胺醇单胞菌属物种口腔分类群 F71	HM099645
阿拉斯加鞘胺醇盒菌	CP000356
异常螺原体属	NR_025705
白蚁生孢菌	NR_044972
菊糖芽孢乳杆菌	NR_040962
中山芽孢杆菌	NR_042247
新约克芽孢八迭球菌	AFPZ01000142
芽孢八迭球菌属 2681	GU994081
葡萄球菌科细菌 NML 92_0017	AY841362
金黄色葡萄球菌	CP002643
耳葡萄球菌	JQ624774
头状葡萄球菌	ACFR01000029
[0252] 山羊葡萄球菌	ACRH01000033
肉葡萄球菌	NR_075003
科氏葡萄球菌	JN175375
香料葡萄球菌	NR_029345
表皮葡萄球菌	ACHE01000056
马胃葡萄球菌	NR_027520
弗氏葡萄球菌	NR_041326
溶血性葡萄球菌	NC_007168
人葡萄球菌	AM157418
路邓葡萄球菌	AEQA01000024
巴氏葡萄球菌	FJ189773
假中间葡萄球菌	CP002439
解糖葡萄球菌	NR_029158
腐生性葡萄球菌	NC_007350
松鼠葡萄球菌	NR_025520
葡萄球菌属克隆 bottae7	AF467424

葡萄球菌属 H292	AB177642
葡萄球菌属物种 H780	AB177644
琥珀酸葡萄球菌	NR_028667
小牛葡萄球菌	NR_024670
瓦氏葡萄球菌	ACPZ01000009
木糖葡萄球菌	AY395016
嗜麦芽寡养单胞菌	AAVZ01000005
寡养单胞菌属 FG_6	EF017810
念珠状链杆菌	NR_027615
无乳链球菌	AAJO01000130
非解乳链球菌	NR_041781
咽峡炎链球菌	AECT01000011
澳大利亚链球菌	AEQR01000024
牛链球菌	AEEL01000030
犬链球菌	AJ413203
星座链球菌	AY277942
脊链球菌	AEVC01000028
道恩链球菌	AEKN01000002
停乳链球菌	AP010935
马链球菌	CP001129
马肠链球菌	AEVB01000043
解没食子酸链球菌	FR824043
链球菌属复合群 C1	AY278629
链球菌属复合群 C2	AY278630
链球菌属复合群 C3	AY278631
链球菌属复合群 C4	AY278632
链球菌属复合群 C5	AY278633
链球菌属复合群 C6	AY278634
链球菌属复合群 C7	AY278635
链球菌属复合群 C8	AY278609
戈登氏链球菌	NC_009785

[0253]

[0254]

小儿链球菌	ABJK02000017
婴儿链球菌	AFNN01000024
中间链球菌	NR_028736
巴黎链球菌	NR_037096
马赛链球菌	AY769997
米勒链球菌	X81023
缓症链球菌	AM157420
突变链球菌	AP010655
寡发酵链球菌	AY099095
口腔链球菌	ADMV01000001
副血链球菌	AEKM01000012
巴氏链球菌	AP012054
泛口腔链球菌	AEVF01000016
肺炎链球菌	AE008537
豕链球菌	EF121439
假性肺炎链球菌	FJ827123
假豕链球菌	AENS01000003
酿脓链球菌	AE006496
鼠链球菌	X58304
唾液链球菌	AGBV01000001
血链球菌	NR_074974
中华链球菌	AF432857
链球菌属 16362	JN590019
链球菌属 2_1_36FAA	ACOI01000028
链球菌属 2285_97	AJ131965
链球菌属物种 69130	X78825
链球菌属物种 AC15	HQ616356
链球菌属物种 ACS2	HQ616360
链球菌属物种 AS20	HQ616366
链球菌属物种 BS35a	HQ616369
链球菌属物种 C150	ACRI01000045

链球菌属物种 CM6	HQ616372
链球菌属物种 CM7	HQ616373
链球菌属物种 ICM10	HQ616389
链球菌属物种 ICM12	HQ616390
链球菌属物种 ICM2	HQ616386
链球菌属物种 ICM4	HQ616387
链球菌属物种 ICM45	HQ616394
链球菌属物种 M143	ACRK01000025
链球菌属物种 M334	ACRL01000052
链球菌属物种 OBRC6	HQ616352
链球菌属物种口腔克隆 ASB02	AY923121
链球菌属物种口腔克隆 ASCA03	DQ272504
链球菌属物种口腔克隆 ASCA04	AY923116
链球菌属物种口腔克隆 ASCA09	AY923119
链球菌属物种口腔克隆 ASCB04	AY923123
链球菌属物种口腔克隆 ASCB06	AY923124
链球菌属物种口腔克隆 ASCC04	AY923127
链球菌属物种口腔克隆 ASCC05	AY923128
链球菌属物种口腔克隆 ASCC12	DQ272507
链球菌属物种口腔克隆 ASCD01	AY923129
链球菌属物种口腔克隆 ASCD09	AY923130
链球菌属物种口腔克隆 ASCD10	DQ272509
链球菌属物种口腔克隆 ASCE03	AY923134
链球菌属物种口腔克隆 ASCE04	AY953253
链球菌属物种口腔克隆 ASCE05	DQ272510
链球菌属物种口腔克隆 ASCE06	AY923135
链球菌属物种口腔克隆 ASCE09	AY923136
链球菌属物种口腔克隆 ASCE10	AY923137
链球菌属物种口腔克隆 ASCE12	AY923138
链球菌属物种口腔克隆 ASCF05	AY923140
链球菌属物种口腔克隆 ASCF07	AY953255

[0255]

[0256]

链球菌属物种口腔克隆 ASCF09	AY923142
链球菌属物种口腔克隆 ASCG04	AY923145
链球菌属物种口腔克隆 BW009	AY005042
链球菌属物种口腔克隆 CH016	AY005044
链球菌属物种口腔克隆 GK051	AY349413
链球菌属物种口腔克隆 GM006	AY349414
链球菌属口腔克隆 P2PA_41 P2	AY207051
链球菌属物种口腔克隆 P4PA_30 P4	AY207064
链球菌属口腔分类群 071	AEEP01000019
链球菌属口腔分类群 G59	GU432132
链球菌属物种口腔分类群 G62	GU432146
链球菌属物种口腔分类群 G63	GU432150
链球菌属物种 SHV515	Y07601
猪链球菌	FM252032
嗜热链球菌	CP000419
乳房链球菌	HQ391900
尿链球菌	DQ303194
前庭链球菌	AEKO01000008
绿色链球菌	AF076036
白色链霉菌	AJ697941
灰链霉菌	NR_074787
链霉菌属 1 AIP_2009	FJ176782
链霉菌属 SD 511	EU544231
链霉菌属物种 SD 524	EU544234
链霉菌属物种 SD 528	EU544233
链霉菌属物种 SD 534	EU544232
嗜热链霉菌	NR_027616
变异罕见小球菌	AJ518869
希佩氏琥铂酸单胞菌	AEVO01000027
莫比利尼萨特菌	AJ832129
帕维鲁布拉柴维尔特菌	AB300989

血根萨特菌	AJ748647
萨特菌属 YIT 12072	AB491210
犬粪萨特菌	NR_025600
华德萨特菌	ADMF01000048
互养菌属复合群 C1	AY278615
互养菌属 RMA 14551	DQ412722
互养菌门细菌 ADV897	GQ258968
互养菌门细菌 LBVCM1157	GQ258969
互养菌门细菌口腔分类群 362	GU410752
互养菌门细菌口腔分类群 D48	GU430992
蔗糖互营链球菌	NR_036869
互营单胞菌科复合群 P1	AY341821
福赛斯坦纳菌	CP003191
坦纳菌属 6_1_58FAA_CT1	ACWX01000068
麦克达德埃特洛克菌	M36032
痰塔特姆氏菌	NR_025342
四球菌属口腔分类群 F04	HM099640
嗜盐四联球菌	NR_075020
韩国四联球菌	NR_043113
假乙醇热厌氧杆菌	CP000924
嗜热放线菌	NC_007333
花葵中慢升根瘤菌	X14835
水栖热菌	NR_025900
极尖泰氏菌	NR_044860
关岛特布尔西菌	AY373830
牙密螺旋体	ADEC01000002
密螺旋体复合群 P1	AY341822
密螺旋体复合群 P4 口腔克隆 MB2_G19	DQ003618
密螺旋体复合群 P5 口腔克隆 MB3_P23	DQ003624
密螺旋体复合群 P6 口腔克隆 MB4_G11	DQ003625
解卵磷脂密螺旋体	NR_026247

[0257]

[0258]

梅毒螺旋体	CP001752
微小密螺旋体	AF302937
溃蚀齿密螺旋体	AEFH01000172
恶臭密螺旋体	AJ543428
曲折密螺旋体	AF426101
索氏密螺旋体	NR_024868
密螺旋体属 6: H: D15A_4	AY005083
密螺旋体属克隆 DDKL_4	Y08894
密螺旋体属口腔克隆 JU025	AY349417
密螺旋体属物种口腔克隆 JU031	AY349416
密螺旋体属口腔克隆 P2PB_53 P3	AY207055
密螺旋体属口腔分类群 228	GU408580
密螺旋体属物种口腔分类群 230	GU408603
密螺旋体属物种口腔分类群 231	GU408631
密螺旋体属物种口腔分类群 232	GU408646
密螺旋体属物种口腔分类群 235	GU408673
密螺旋体属物种口腔分类群 239	GU408738
密螺旋体属物种口腔分类群 247	GU408748
密螺旋体属物种口腔分类群 250	GU408776
密螺旋体属物种口腔分类群 251	GU408781
密螺旋体属物种口腔分类群 254	GU408803
密螺旋体属物种口腔分类群 265	GU408850
密螺旋体属物种口腔分类群 270	GQ422733
密螺旋体属物种口腔分类群 271	GU408871
密螺旋体属物种口腔分类群 508	GU413616
密螺旋体属物种口腔分类群 518	GU413640
密螺旋体属口腔分类群 G85	GU432215
密螺旋体属绵羊腐蹄病	AJ010951
奋森氏密螺旋体	ACYH01000036
惠普普利菌	BX251412
化脓隐秘菌	NR_044858

[0259]

微变豕村氏菌	X80628
耐酪胺酸豕村氏菌	AB478958
Turicibacter sanguinis	AF349724
微小脲原体	AE002127
解脲脲原体	AAYN01000002
复杂脲芽孢杆菌	NR_043746
苏云脲芽孢杆菌	NR_043232
特伦斯脲芽孢杆菌	NR_025394
嗜热性脲芽孢杆菌	NR_043747
嗜热球形脲芽孢杆菌	NR_040961
河流漫游球菌	NR_026489
非典型韦荣氏球菌	AEDS01000059
殊异韦荣氏球菌	ACIK02000021
韦荣氏球菌属复合群 P1 口腔克隆 MB5_P17	DQ003631
蒙皮立韦荣氏球菌	AF473836
小韦荣氏球菌	ADFU01000009
韦荣氏球菌属 3_1_44	ADCV01000019
韦荣氏球菌属 6_1_27	ADCW01000016
韦荣氏球菌属 ACP1	HQ616359
韦荣氏球菌属物种 AS16	HQ616365
韦荣氏球菌属物种 BS32b	HQ616368
韦荣氏球菌属物种 ICM51a	HQ616396
韦荣氏球菌属物种 MSA12	HQ616381
韦荣氏球菌属 NVG 100cf	EF108443
韦荣氏球菌属物种 OK11	JN695650
韦荣氏球菌属口腔克隆 ASCA08	AY923118
韦荣氏球菌属物种口腔克隆 ASCB03	AY923122
韦荣氏球菌属物种口腔克隆 ASCG01	AY923144
韦荣氏球菌属物种口腔克隆 ASCG02	AY953257
韦荣氏球菌属物种口腔克隆 OH1A	AY947495
韦荣氏球菌属口腔分类群 158	AENU01000007

韦荣氏球菌科细菌口腔分类群 131	GU402916
韦荣氏球菌科细菌口腔分类群 155	GU470897
霍乱弧菌	AAUR01000095
河流弧菌	X76335
弗氏弧菌	CP002377
拟态弧菌	ADAF01000001
副溶血性弧菌	AAWQ01000116
弧菌属 RC341	ACZT01000024
创伤弧菌	AE016796
食物谷菌科细菌 NML 080035	FJ394915
瓦达食谷菌	ABDE02000010
普罗米维杆菌	NR_025308
贝尼氏魏斯氏菌	EU439435
食窦魏斯氏菌	NR_036924
混淆魏斯氏菌	NR_040816
[0260] *赫伦魏斯氏菌*	AB680902
坎氏魏斯氏菌	NR_044659
韩国魏斯氏菌	NR_075058
类肠膜魏斯氏菌	ACKU01000017
魏斯氏菌属 KLDS 7.0701	EU600924
产琥珀酸沃林氏菌	BX571657
黄单胞菌科细菌 NML 03_0222	EU313791
野油菜黄单胞菌	EF101975
黄单胞菌属 kmd_489	EU723184
Xenophilus aerolatus	JN585329
阿氏耶尔森氏菌	AJ871363
阿里克谢耶尔森氏菌	AJ627597
贝氏耶尔森氏菌	AF366377
小肠结肠炎耶尔森菌	FR729477
弗氏耶尔森氏菌	AF366379
中间耶尔森氏菌	AF366380

[0261]

克里斯滕耶尔森氏菌	ACCA01000078
莫氏耶尔森氏菌	NR_027546
鼠疫耶尔森氏菌	AE013632
假结核耶尔森氏菌	NC_009708
罗氏耶尔森氏菌	ACCD01000071
雷金斯堡约克氏菌	AB273739
二歧齐默尔曼氏菌	AB012592
运动发酵单胞菌	NR_074274

[0262] 表2:示例性嗜肿瘤细菌

[0263]

属	物种	肿瘤相关
支原体	*猪鼻支原体*	胃癌
丙酸杆菌	*痤疮丙酸杆菌*	前列腺癌
支原体	*生殖器支原体*	前列腺癌
嗜甲基菌属	*物种*	前列腺癌
衣原体	*沙眼衣原体*	前列腺癌
螺杆菌	*幽门螺杆菌*	胃 MALT
李斯特氏菌	*威氏李斯特氏菌*	肾癌
链球菌	*肺炎链球菌*	淋巴瘤及白血病
嗜血杆菌	*流感嗜血杆菌*	淋巴瘤及白血病
葡萄球菌	*金黄色葡萄球菌*	乳腺癌
李斯特氏菌	*单核球增多性李斯特氏菌*	乳腺癌
甲基杆菌	*耐辐射甲基杆菌*	乳腺癌
鞘胺醇单胞菌	*矢野鞘胺醇单胞菌*	乳腺癌
梭杆菌属	*物种*	喉癌
普罗维特利斯（Provetelis）属	*物种*	喉癌

[0264]

链球菌	肺炎链球菌	喉癌
孪生球菌属	物种	喉癌
鲍特氏菌	百日咳鲍特氏菌	喉癌
棒状杆菌	结核硬脂酸棒状杆菌	口腔鳞状细胞癌
微球菌	藤黄微球菌	口腔鳞状细胞癌
普雷沃菌	产黑色素普雷沃菌	口腔鳞状细胞癌
微小杆菌	耐氧化微小杆菌	口腔鳞状细胞癌
梭杆菌	舟形梭杆菌	口腔鳞状细胞癌
韦荣氏球菌	小韦荣氏球菌	口腔鳞状细胞癌
链球菌	唾液链球菌	口腔鳞状细胞癌
链球菌	缓症/口腔链球菌	口腔鳞状细胞癌
韦荣氏球菌	殊异韦荣氏球菌	口腔鳞状细胞癌
消化链球菌	口炎消化链球菌	口腔鳞状细胞癌
链球菌	戈登氏链球菌	口腔鳞状细胞癌
孪生球菌	溶血孪生球菌	口腔鳞状细胞癌
孪生球菌	麻疹孪生球菌	口腔鳞状细胞癌
Johnsonella	*ignava*	口腔鳞状细胞癌
链球菌	副血链球菌	口腔鳞状细胞癌
颗粒链菌	毗邻颗粒链菌	口腔鳞状细胞癌
分枝杆菌	海分枝杆菌	肺感染
弯曲杆菌	简要弯曲杆菌	巴雷特氏食道症
弯曲杆菌	直肠弯曲杆菌	巴雷特氏食道症
口腔杆菌属	物种	食道腺癌
卡托氏菌属	物种	食道腺癌
消化链球菌属	物种	食道腺癌
真杆菌属	物种	食道腺癌

[0265]

戴阿利斯特菌属	物种	食道腺癌
韦荣氏球菌属	物种	食道腺癌
厌氧球形菌属	物种	食道腺癌
巨球型菌属	物种	食道腺癌
奇异菌属	物种	食道腺癌
细小杆菌属	物种	食道腺癌
罗氏菌属	物种	食道腺癌
放线菌属	物种	食道腺癌
梭杆菌属	物种	食道腺癌
纤毛菌属	物种	食道腺癌
纤发菌属	物种	食道腺癌
嗜二氧化碳噬纤细菌属	物种	食道腺癌
普雷沃菌属	物种	食道腺癌
卟啉单胞菌属	物种	食道腺癌
弯曲杆菌属	物种	食道腺癌
嗜血杆菌属	物种	食道腺癌
奈瑟菌属	物种	食道腺癌
TM7	物种	食道腺癌
颗粒链菌属	物种	食道腺癌
贪噬菌属	物种	腹膜假性黏液瘤
大肠杆菌属	志贺氏菌属	腹膜假性黏液瘤
假单胞菌属	物种	腹膜假性黏液瘤
四球菌属	物种	腹膜假性黏液瘤
不动杆菌属	物种	腹膜假性黏液瘤
螺杆菌	肝螺杆菌	乳腺癌

[0266]

衣原体	*鹦鹉热衣原体*	MALT 淋巴瘤
螺旋体	*伯氏螺旋体*	B 细胞淋巴瘤皮肤
大肠杆菌	*大肠杆菌 NC101*	结直肠癌
沙门氏菌	*鼠伤寒沙门氏菌*	粪便
肠球菌	*粪肠球菌*	血液
链球菌	*缓症链球菌*	血液
链球菌	*血链球菌*	血液
链球菌	*咽峡炎链球菌*	血液
链球菌	*唾液链球菌*	血液
葡萄球菌	*表皮葡萄球菌*	血液
链球菌	*解没食子酸链球菌*	结直肠癌
弯曲杆菌	*昭曲弯曲杆菌 CC57C*	结直肠癌
纤发菌属	*物种*	结直肠癌

[0267] 在某些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)从专性厌氧细菌获得。专性厌氧细菌的实例包括革兰氏阴性杆菌(包括拟杆菌、普雷沃菌、卟啉单胞菌、梭杆菌、嗜胆菌及萨特氏菌属物种的属)、革兰氏阳性球菌(主要为消化链球菌属)、革兰氏阳性孢子形成菌(梭菌属)、非孢子形成杆菌(放线菌、丙酸杆菌、真杆菌、乳杆菌及双歧杆菌属)及革兰氏阴性球菌(主要为韦荣氏球菌属)。在一些实施例中，这些专性厌氧细菌是选自由以下组成的组的属的细菌:阿加萨杆菌属、奇异菌属(Atopobium)、布劳特氏菌属(Blautia)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、迪尔莫菌属(Dielma)、长链菌属(Longicatena)、副梭菌属(Paraclostridium)、苏黎世杆菌属(Turicibacter)及泰泽菌属(Tyzzerella)。

[0268] 在一些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)获得自选自由以下组成的组的属的细菌:埃希氏杆菌属、克雷白氏菌属、乳杆菌属、志贺氏菌属及葡萄球菌属。

[0269] 在一些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)获得自选自由以下组成的组的物种:马赛布劳特氏菌(Blautia massiliensis)、解苯副梭菌(Paraclostridium benzoelyticum)、苛求迪尔莫菌(Dielma fastidiosa)、Longicatena caecimuris、乳酸乳球菌乳脂亚种(Lactococcus lactis cremoris)、纳西利斯泰泽菌(Tyzerella nexilis)、Hungatella effluvia、类肺炎克雷白氏菌拟肺炎亚种(Klebsiella quasipneumoniae subsp.Similipneumoniae)、催产克雷白氏菌(Klebsiella oxytoca)、和当别町韦荣氏球菌(Veillonella tobetsuensis)。

[0270] 在一些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)获得自普雷沃菌属细菌，所述普雷沃菌属细菌选自由以下组成的组:阿尔伯普雷沃菌、羊水普雷沃菌、卑尔根普雷沃菌、二路普雷沃菌、短普雷沃菌、布氏普雷沃菌、颊普雷沃菌、口颊普雷沃菌、粪便普雷沃菌、牙普雷沃菌、栖牙普雷沃菌、解糖胨普雷沃菌、栖组织普雷沃菌、中间普雷沃菌、小斑点普雷沃菌、马

斯普雷沃菌、产黑普雷沃菌、彩虹普雷沃菌、多形普雷沃菌、变黑普雷沃菌、口腔普雷沃菌、口普雷沃菌、龈炎普雷沃菌、苍白普雷沃菌、唾液普雷沃菌、斯特塞拉普雷沃菌、坦纳普雷沃菌、蒂莫普雷沃菌、空肠普雷沃菌、橙色普雷沃菌、保氏普雷沃菌、着色普雷沃菌、人体普雷沃菌、丹塔普雷沃菌、栖居普雷沃菌、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、南锡普雷沃菌、稻普雷沃菌、沼泽普雷沃菌、胸膜炎普雷沃菌、栖瘤胃普雷沃菌、解糖普雷沃菌、靶心普雷沃菌、赛赫普雷沃菌、动胶普雷沃菌和真空腔普雷沃菌。

[0271] 在一些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)获得自细菌菌株，所述细菌菌株包含基因组序列，所述基因组序列与表3中提供的以ATCC保藏号保藏的细菌菌株的基因组序列具有至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性(例如至少99.5％序列同一性、至少99.6％序列同一性、至少99.7％序列同一性、至少99.8％序列同一性、至少99.9％序列同一性)。在一些实施例中，本文描述的mEV(例如smEV)获得自细菌菌株，所述细菌菌株包含16S序列，所述16S序列与表3中提供的16S序列具有至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％或至少99％序列同一性(例如，至少99.5％序列同一性、至少99.6％序列同一性、至少99.7％序列同一性、至少99.8％序列同一性、至少99.9％序列同一性)。

[0272] 表3示例性细菌菌株

[0273]

SEQ ID No.	菌株	保藏号	16S序列
	古氏副拟杆菌菌株A		
	动物双歧杆菌乳酸亚种菌株A	PTA-125097	
	动物双歧杆菌乳酸亚种菌株B		
	动物双歧杆菌乳酸亚种菌株C		
	马赛布劳特氏菌菌株A	PTA-125134	
	普雷沃菌属菌株B	NRRL登录号B 50329	
	栖组织普雷沃菌菌株A		
	产黑色素普雷沃菌菌株A		
	布劳特氏菌菌株A	PTA-125346	

[0274]

	乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A	PTA-125368	
	乳酸乳球菌乳脂亚种菌株B		
	活泼瘤胃球菌菌株	PTA-125706	
	纳西利斯泰泽菌菌株	PTA-125707	
	共生梭菌 S10-19		>S10-19-重叠群 CAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTC GGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAA ATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG GGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTA AAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAA GTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGACTGC TTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGAGAG GTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAAT GCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGA AGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGTTGA GGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG AATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCG GTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCT GGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAA GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGA GCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACGGG GGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAG AAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC GAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGT TCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCAGGG ATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACACA CGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGAAGCA AGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAAAATA ACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCG CCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGC GAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGG

[0275]

			AGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCAAC CGCAAGG
	共生梭菌 S6-202		>S6-202-重叠群 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTA TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGAA GCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAAA ATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAAC TCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC GCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCC CGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG GGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCCA ACCGCAAGGAGGG
	共生梭菌 S10-257		>共有序列 TGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA

[0276]

			ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGT GTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGC AAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTAC GTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGG TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGG GAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTAC AATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCG AGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCA GTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA ATGTCGC GGTGAATACGTTCCC
	共生梭菌 S10-552		>10-552 共有 序列CGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGC GATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGGCGA GTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGACGTTAT TTTTGAGATTTGCTCCACCTCGCGGTCTTGCTT CTCTTTGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGATCATAAGGGGCATGATGATTTGAC GTCATCCCCACCTTCCTCCAGGTTATCCCTGG CAGTCTCCCAAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTG GCTACTTAGAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG ACGACAACCATGCACCACCTGTCTTCTCCGCC CCGAAGGGAAGGGGACGTTACTCCCCCGTCG GATCGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT CATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATA CTTACTGCGTTTGCGACGGCACCGAAGAGCTT TGCTCCCCAACACCTAGTATTCATCGTTTACG GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG CTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTA

[0277]

			TCGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT CCTCCTAATATCTACGCATTTCACCGCTACAC TAGGAATTCCACTTACCTCTCCGACACTCCAG TTAAACAGTTTCCAAAGCAGTCCCGCAGTTGA GCCGCGGGCTTTCACTTCAGACTTGCTTTACC GTCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGG ATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAGT
	共生梭菌 S10-551		>10-511_共有_序列2读段 从10至511 ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTA TCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGC GGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTT TAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATT CCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTA GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTACT GGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCG TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTT GGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAA CGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTC GCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC TTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCC CCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGT GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATG TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT ATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAAC TCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG AAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATG GCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGT GGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTC GGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAG CTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATG TCGCGGTGAATACGTTCCC
	共生梭菌 S10-530		>10- 530GAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACT GGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG

[0278]

			GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTAT TCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATC CGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGA
[0278]	共生梭菌 S10-533		>10-533_共有_序列2读段 从10至 533GAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGC GATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGGCGA GTTGCAGCCTGCAGTCCGAACTGAGACGTTAT TTTTGAGATTTGCTCCACCTCGCGGTCTTGCTT CTCTTTGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGATCATAAGGGGCATGATGATTTGAC GTCATCCCCACCTTCCTCCAGGTTATCCCTGG CAGTCTCCCAAGAGTTCCCGGCCGAACCGCTG GCTACTTAGAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG ACGACAACCATGCACCACCTGTCTTCTCCGCC CCGAAGGGAAGGGGACGTTACTCCCCCGTCG GATCGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC GTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT CATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATA CTTACTGCGTTTGCGACGGCACCGAAGAGCTT TGCTCCCCAACACCTAGTATTCATCGTTTACG GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG CTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTA TCGTCCAGTAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTT CCTCCTAATATCTACGCATTTCACCGCTACAC TAGGAATTCCACTTACCTCTCCGACACTCCAG TTAAACAGTTTCCAAAGCAGTCCCGCAGTTGA GCCGCGGGCTTTCACTTCAGACTTGCTTTACC GTCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGG ATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCT GCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAG
	共生梭菌		>10-537_共有_序列2读段 从10至

[0279]

	S10-537		537ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGA ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT TAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTA CTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG TAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGT GTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGC AAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTAC GTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAAC GTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGG TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA CCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGG GAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTG GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT GCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTAC AATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCG AGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCA GTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACG AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA ATGTCGCGGTGAATACGTT
	共生梭菌 S10-544		>10- 544ATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGC TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT AGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA

[0280]

			AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCA GGGATAACCTG
	共生梭菌 S10-547		>10- 547GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGA AGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT TTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAA AGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAA CTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGG AGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGAT AACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAG CAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGT AAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAG AATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC ATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCC CTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGG TTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTA AGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTC
	共生梭菌 S10-548		>10-548_共有_序列2读段 从10至 548AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTAT CCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGCG GCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACTGTTT AACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAGTGGAATTC CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAG GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTACTG GACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGT GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTG

[0281]

			GGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAAC GCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCG CAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCGATCCGACGGGGGAGTAACGTCCCC TTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAGGTGGTGC ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTT GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTA TTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGAACTC TTGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT ATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC GTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTG GAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCG GACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGC TGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGT CGCGGTGAATACGTT
	梭菌属 （Clostridium） 物种S7-203		>S7-203-357F TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGT ATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAA GAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCG GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC GTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGG GTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGT CTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGG ACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCG GAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCC ACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGA CGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCG GAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAG CTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAG CGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCC AGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACG

[0282]

			TCAAATCATCATGCCCCT
	梭菌属物种 36A7-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGA AACTGTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAG TGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG ACTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACT AGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCG TCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGA GTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAG TAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGAC AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTC
	梭菌属物种 S4-31		>4-31-重叠群 GCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGA AGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCC CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA TACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACT GGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGT CGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTAT TCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATC

[0283]

			CGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGA CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGC TACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGA GAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCA AAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTG CAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAG TAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATAC GTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACA CCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTG ACCCAACCGCAAGGAGGGAGCTG
	梭菌属物种 S210-133		>210-133-重叠群 TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTC GGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCCGACG GGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGG AGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCCAGC GGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGGATGACG TCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTA CACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGAGA AGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTCAAA AATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCA

[0284]

			ACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGT TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACC ATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC CCA
	共生梭菌 S10-534		>10-534_共有_序列2读段 从10至 534ACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGT TATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGT AGACGGTAAAGCAAGTCTGAAGTGAAAGCCC GCGGCTCAACTGCGGGACTGCTTTGGAAACT GTTTAACTGGAGTGTCGGAGAGGTAAAGTGG AATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT ATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT TACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAA AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAG GTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGTCG CAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTA CGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGA CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AGGTCTTGACATCGATCCGACGGGGGAGTAA CGTCCCCTTCCCTTCGGGGCGGAGAAGACAG GTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTCTAAGTAGCCAGCGGTTCGGCCG GGAACTCTTGGGAGACTGCCAGGGATAACCT GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCA TGCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGCGTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGC GAGGTGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTC AGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAC GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG AATGTCGCGGTGAATACGTTCC
	梭菌属物种 S4-44		>4-44-重叠群 CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAG TAGTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGG AAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCC CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACT GGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTAAAGCAA GTCTGAAGTGAAAGCCCGCGGCTCAACTGCG GGACTGCTTTGGAAACTGTTTAACTGGAGTGT

[0285]

			CGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCG GTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGACTTACTGGACGATAACTG ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAG CTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTAT TCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATC CGACGGGGGAGTAACGTCCCCTTCCCTTCGGG GCGGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTATTCTAAGTAGCC AGCGGTTCGGCCGGGAACTCTTGGGAGACTG CCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGGATG ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAG AGAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAATCTC AAAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCT GCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATA CGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGT GACCCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCCGA
	Hungatella hathewayi或[Clostridium] hathewayi 34D2-1004		GAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTTTAG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC CCGGTACTGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAG TGCAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAA CTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC GTAAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGGGCA AAGCCCTTCGGTGCCGCCGCAAACGCAATAA GTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAAT GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC AACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATC

[0286]

	Hungatella hathewayi或[0Clostridium] hathewayi 34H6-1004		TTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGTTTAGCAAGTCT GAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTAC TGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT GAATACTAGGTGTCGGGGGGCAAAGCCCTTC GGTGCCGCCGCAAACGCAATAAGTATTCCAC CTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA GAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCA
	Hungatella effluvia 36B10-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAAAATCATTTA ACCG
	Hungatella effluvia 36C4-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA

[0287]

			GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAAAA
	Hungatella effluvii 36F7-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGTTAAGCAAGTCTGAAGTGAAA GCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCTTTGGAA ACTGTTTGACTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTA GGTGTCGGGGGACAAAGTCCTTCGGTGCCGC CGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAG TACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA CCAAGTCTTGACATCCCATTGAA
	毛螺菌科物种或奇特龙梭菌（[Clostridium] Citroniae）39A7-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAA GGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGT GAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTT TGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGGCTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT GCTAGGTGTTGGGGGG

[0288]

	毛螺菌科物种或奇特龙梭菌（[Clostridium] citroniae）39A8-1014		GACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG GGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAA GGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGT GAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTT TGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGT AAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG GCGGCTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGG CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT GCTAGGTGTTGGGGGG
	毛螺菌科物种或奇特龙梭菌（[Clostridium] citroniae）36A6-1014		GCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGT AAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAACTGACGG TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAA GCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA GCGTAGACGGCGAAGCAAGTCTGGAGTGAAA ACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCTTTGGA AACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGAGAGGTAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CTTACTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTA GGTGTTGGGGGGCAAAGCCCTTC
	毛螺菌科物种或[梭菌属]物种36C9-1014		GAAGTATTTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCA GGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAG CCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCAGTG CAAGTCTGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACC CCGGGACTGCTTTGGAAACTGTGCAGCTAGA GTGTCGGAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATG ACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGACTACTAGGTGTCGGGGAGC AAAGCTCTTCGGTGCCGCAGCCAACGCAATA AGTAGTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGA ATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA GCAACGCGAAGAACCTTACCTGCTCTTGACAT

[0289]

			CCCTCTGACCG
	鲍氏梭菌（[Clostridium] bolteae）S10-21		>S10-121-重叠群 GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTA TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAG AAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGT GTAAAGGGAGCGTAGACGGCGAAGCAAGTCT GAAGTGAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGAC TGCTTTGGAAACTGTTTTGCTAGAGTGTCGGA GAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG CGAAGGCGGCTTACTGGACGATAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA TGAATGCTAGGTGTTGGGGGGCAAAGCCCTT CGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGCATTCCA CCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTC AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGT GGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA AGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCTCTTGAC CGGCGTGTAACGGCGCCTTCCCTTCGGGGCAG GAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTAGCCAGCA GGTAAAGCTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCA GGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT CAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTAC ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAA GCAAGACAGTGATGTGGAGCAAATCCCAAAA ATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAAC CCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTC CCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT GGGAGTCAGCAACGCCCGAAGTCAGTGACCC AACTCGCAAGAGAGGG
	活泼瘤胃球菌菌株A	PTA-126695	CCTTAGCGGTTGGGTCACTGACTTCGGGCGTT ACTGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA CAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGACATT CTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCA TGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACTG AGACGTTATTTTTGGGATTTGCTCCCCCTCGC GGGCTCGCTTCCCTTTGTTTACGCCATTGTAG CACGTGTGTAGCCCTGGTCATAAGGGGCATG

[0290]

			ATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGG TTATCCCTGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCATC CTAAATGCTGGCTACTAAAGATAGGGGTTGC GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG TCTCCTCTGTCCCGAAGGAAAGCTCCGATTAA AGAGCGGTCAGAGGGATGTCAAGACCAGGTA AGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA TGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATT CCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCC CAGGTGGAATACTTATTGCGTTTGCTGCGGCA CCGAATGGCTTTGCCACCCGACACCTAGTATT CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTC AACGTCAGTCATCGTCCAGAAAGCCGCCTTCG CCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTT CACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTTCCTCTC CGACACTCTAGCCTGACAGTTCCAAATGCAGT
	纳西利斯泰泽菌菌株A		>纳西利斯泰泽菌S10-231共有序列 GGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGG GTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTTGTGTAAGT CTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGG ACTGCATTGGAAACTATGTAACTAGAGTGTCG GAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGT GGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATCACTGAC GTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC GATGACTACTAGGTGTCGGGGAGCAAAGCTC TTCGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTAGTC CACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCG GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCCTCTG ACCGCTCTTTAATCGGAGTTTTCCTTCGGGAC AGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATCTTCAGTAGCCA GCATTTAAGGTGGGCACTCTGGAGAGACTGC CAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGAC GTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCAGGGCT ACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG AAGCGAACCTGTGAGGGGAAGCAAATCTCAA

[0291]

			AAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCA ACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA ATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTT CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTC
	当别町韦荣氏球菌		>S11-19-357F AGCAACGCCGCGTGAGTGATGACGGCCTTCG GGTTGTAAAGCTCTGTTAATCGGGACGAAAG GCCTTCTTGCGAATAGTTAGAAGGATTGACGG TACCGGAATAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC GCGCAGGCGGATCGGTCAGTCTGTCTTAAAA GTTCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGATGGAA ACTGCTGATCTAGAGTATCGGAGAGGAAAGT GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGA CTTTCTGGACGAAAACTGACGCTGAGGCGCG AAAGCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGGTACT AGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCG GAGTTAACGCAATAAGTACCCCGCCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATG TGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA CCAGGTCTTGACATTGATGGACAGAACTAGA GATAGTTCCTCTTCTTCGGAAGCCAGAAAACA GGTGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCCTATCTTATGTTGCCAGCACTTCGGGT GGGAACTCAT
	小韦荣氏球菌		>S14-201重叠群 GAGTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCT GTTAATCGGGACGAAAGGCCTTCTTGCGAAT AGTGAGAAGGATTGACGGTACCGGAATAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGATA GGTCAGTCTGTCTTAAAAGTTCGGGGCTTAAC CCCGTGATGGGATGGAAACTGCCAATCTAGA GTATCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGAAA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGC GAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGC

[0292]

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

[0293]

			TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTAT GTTGCCAGCACTTTGGGTGGGGACTCATGAG AGACTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGCGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGAC CTGGGCTACACACGTACTACAATGGGAGTTA ATAGACGGAAGCGAGATCGCGAGATGGAGCA AACCCGAGAAACACTCTCTCAGTTCGGATCGT AGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGTCGGAAT CGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC GTCACACCACGAAAGTCGGAAGTGCCCAAAG CCGGTG
	非典型韦荣氏球菌菌株A	PTA-125709	
	非典型韦荣氏球菌菌株B	PTA-125711	
	殊异韦荣氏球菌		
	小韦荣氏球菌菌株A	PTA-125691	
	小韦荣氏球菌菌株B	PTA-125711	
	当别町韦荣氏球菌菌株A	PTA-125708	
	当别町韦荣氏球菌菌株B		
	唾液乳杆菌菌株A		ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTC TTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGA ACACGAGTGAGAGTAACTGTTCATTCGATGA CGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGG GAACGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAA AGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGA AACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCG GCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGTTCG

[0294]

			AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCT AGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCG CAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGA GATTAGGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACA GGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTGTTGTCAGTTGCCAGCATTAAGTTG GGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACC GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCA TGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTA CAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAGACCGC GAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCA GTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAA CACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAG CCAGCCG
	阿加萨杆菌（Agathobaculum）菌株A		CCGCGTGATTGAAGAAGGCCTNTCGGGTTGT AAAGATCTTTAATTCGGGACGAAAAATGACG GTACCGAAAGAATAAGCTCCGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGCA AGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGC GCGCAGGCGGGCTGGCAAGTTGGAAGTGAAA TCTAGGGGCTTAACCCCTAAACTGCTTTCAAA ACTGCTGGTCTTGAGTGATGGAGAGGCAGGC GGAATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATACGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGG CCTGCTGGACATTAACTGACGCTGAGGCGCG AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACT AGGTGTGGGAGGTATTGACCCCTTCCGTGCCG CAGTTAACACAATAAGTATCCCACCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGCCTTGACATCCCGATGACCGGTCTAG AGATAGACCTTCTCTTCGGAGCATCGGTGACA GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT

[0295]

			GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCTTACGGTTAGTTGATACGCAAGATCAC TCTAGCCGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGG AAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCC CTTATGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATG GCAGTCATACAGAGGGAAGCAAAGCTGTGAG GCGGAGCAAATCCCTAAAAGCTGTCCCAGTT CAGATTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCATGAA GTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTCACACCATGAGAGCCGTCAAT ACCCGAAGTCCGTAGCCTAACCGCAAG
	解苯副梭菌（Paraclostridium benzoelyticum）菌株A		GAATTACTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGG TTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTACGGCTC AACCGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTT GAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCTAGT GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA ATACCAGTAGCGAAGGCGGCTCTCTGGACTG TAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGA GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC GCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGG TTACCCCCCTCGGTGCCGCAGCTAACGCATTA AGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGA GTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC ACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACA TCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAGATTTCC CTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATG GTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTT TAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGAG GGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGCT TAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTA CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTA ATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTA GGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTT ACTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTG AATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG TCACACCATGGAAGTTGGGGGCGCCCGAAGC CGGTTAGCTAACCTTTTAGGAAGCGGCCGT
	Turicibacter sanguinis菌株A		ATGGCTAGAGTGTGACGGTACCTTATGAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAA

[0296]

			TTATTGGGCGTAAAGAGCGCGCAGGTGGTTG ATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTTAAC CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGTCAACTTG AGTGCAGAAGAGGGAAGTGGAATTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGGGTC GAACCTCAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGC ACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACA AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATAC CAGTGACCGTCCTAGAGATAGGATTTTCCCT TCGGGGACAATGGATACAGGTGGTGCATGGT TGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCGTT AGTTGCCAGCATTCAGTTGGGGACTCTAACGA GACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACC TGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACA AAGAGAAGCGAAGCGGTGACGTGGAGCAAA CCTCATAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGTAG GCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGC TAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAA TACGTT
	类鼻疽伯克霍尔德菌		
	类肺炎克雷白氏菌拟肺炎亚种		
	催产克雷白氏菌菌株A		
	巨球型菌属物种菌株A	PTA-126770	TATCAATTCGAGTGGCAAACGGGTGA GTAACGCGTAAGCAACCTGCCCTTCA GATGGGGACAACAGCTGGAAACGGCT GCTAATACCGAATACGTTCTTTCCGCC GCATGACGGGATGAAGAAAGGGAGG

[0297]

			CCTTCGGGCTTTCGCTGGAGGAGGGG
			CTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGG
			GGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATC
			AGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGG
			CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
			GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG
			AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTG
			ACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
			CGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTA
			TATGGGACGAACAGGATAGCGGTCAA
			TACCCGTTATCCCTGACGGTACCGTAA
			GAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
			AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
			AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGT
			AAAGGGCGCGCAGGCGGCATCGCAA
			GTCGGTCTTAAAAGTGCGGGGCTTAA
			CCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAA
			GCTCGAGTGTCGGAGAGGAAAGCGGA
			ATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT
			AGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCG
			AAAGCGGCTTTCTGGACGACAACTGA
			CGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAG
			CAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGT
			CCTGGCCGTAAACGATGGATACTAGG
			TGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGC
			CGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGC
			CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAA
			ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
			ACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAT
			TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA
			AGCCTTGACATTGATTGCTACGGAAA
			GAGATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGAC
			AAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTC
			GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
			TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCC
			TATCTTCTGTTGCCAGCACTAAGGGTG
			GGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGAC

				AATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACG TCAAGTCATCATGCCCCTTATGGCTTG GGCTACACACGTACTACAATGGCTCT TAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGAT CCGGAGCAAACCCCAAAAACAGAGTC CCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTC GCCTGCATGAAGCAGGAATCGCTAGT AATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC GCCCGTCACACCACGAAAGTCATTCA CACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCA AGGAACCAGCCGTCGAAGGTGGGGGC GATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGG ATCACCTCCTTT
[0298]		巨球型菌属物种菌株B		ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA CGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACA TGCAAGTCGAACGAGAAGAGATGAG AAGCTTGCTTCTTATCAATTCGAGTGG CAAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAA CCTGCCCTTCAGATGGGGACAACAGC TGGAAACGGCTGCTAATACCGAATAC GTTCTTTCCGCCGCATGACGGGATGA AGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTTTCGC TGGAGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAG CTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCACCA AGGCGACGATCAGTAGCCGGTCTGAG AGGATGAACGGCCACATTGGGACTGA GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG CAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGC GTGAACGATGACGGCCTTCGGGTTGT AAAGTTCTGTTATATGGGACGAACAG GATAGCGGTCAATACCCGTTATCCCT GACGGTACCGTAAGAGAAAGCCACGG CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA

[0299]

			ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGG
			AATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAG
			GCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAG
			TGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGAC
			CGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTCGGA
			GAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGC
			GGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA
			ACACCAGTGGCGAAAGCGGCTTTCTG
			GACGACAACTGACGCTGAGGCGCGAA
			AGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGAT
			ACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGA
			TGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGA
			CTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAAT
			AAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCC
			GCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGA
			CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTA
			TGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAA
			GAACCTTACCAAGCCTTGACATTGATT
			GCTACGGAAAGAGATTTCCGGTTCTT
			CTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGT
			GCACGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
			GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG
			AGCGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAG
			CACTAAGGGTGGGGACTCAGAAGAGA
			CTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGC
			GGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCC
			CTTATGGCTTGGGCTACACACGTACTA
			CAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGA
			AGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAA
			AACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGG
			CTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGA
			ATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATA
			CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
			GTACACACCGCCCGTCACACCACGAA
			AGTCATTCACACCCGAAGCCGGTGAG
			GCAACCGCAAGGAACCAGCCGTCGAA
			GGTGGGGGCGATGATTGGGGTGAAGT

			CGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG TGCGGCTGGATCACCTCCTTT
[0300]	菲利克斯新月形单胞菌		GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGG CGACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGG ATGAACGGCCACATTGGGACTGAGAC ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGGCG CAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG AGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAA GCTCTGTTGACGGGGACGAACGTGCG GAGTGCGAATAGCGCTTTGTAATGAC GGTACCTGTCGAGGAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAAT CATTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCG GGCCGGTAAGTCTTACTTAAAAGTGC GGGGCTCAACCCCGTGATGGGAGAGA AACTATCGGTCTTGAGTACAGGAGAG GAAAGCGGAATTCCCAGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGAC TGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGC CAGGGGAGCGAACGGGATTAGATACC CCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGG ATACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCC CTACCGTGCCGGAGTTAACGCAATAA GTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC AAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATG TGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGCCTTGACATTGACTG AAAGCACTAGAGATAGTGCCCTCTCT TCGGAGACAGGAAAACAGGTGGTGCA TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCCTGTTCTTTGTTGCCATCAG

				GTAAAGCTGGGCACTCAAAGGAGACT GCCGCGGAGAACGCGGAGGAAGGCG GGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCC TTATGGCCTGGGCTACACACGTACTA CAATGGAACGGACAGAGAGCAGCGA ACCCGCGAGGGCAAGCGAACCTCAAA AACCGTTTCCCAGTTCGGATTGCAGG CTGCAACCCGCCTGCATGAAGTCGGA ATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATA CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTG TACACACCGCCCGTCACACCACGGAA GTCATTCACACCCGAAGCCGGCGCAG CCGTCTAAGGTGGGGAAGGTGACTGG GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA TCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCC TTT
[0301]		鹑鸡肠球菌菌株A		CTGACCGAGCACGCCGCGTGAGTGAA GAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTG TTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAG TAAAACGTTCATCCCTTGACGGTATCT AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTT AAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTC AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGG GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATATGGAGGAACACCAGTG GCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGG AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTA AGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT GCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCC GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG

[0302]

			AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCC GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCT AGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGGC AAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGG GCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACA AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG GCTACACACGTGCTACAATGGGAAGT ACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCT AAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAG TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCG CGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACG TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT CACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG AAGTCGGTGAGGTAACCTTT
	鹑鸡肠球菌菌株B		CGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGAT CGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA CAAGGATGAGAGTAGAACGTTCATCC CTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCA CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTC CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGT CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC AGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTG TAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTC TCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTC GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT

[0303]

			AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGT TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAAC GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTA CGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC GCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACA TCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCT TCCCCTTCGGGGGCAAAGTGACAGGT GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA CGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCC ATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT ACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGA AGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTA AAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGC TGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAA TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCACGAGA GTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGG TAACCTTTTNGGAGCCAGCCGC
Fournierella massiliensis	PTA-126694		Fournierella massiliensis
Harryflintia acetispora	PTA-126696		Harryflintia acetispora

[0304] 在一些实施例中,mEV来自以下细菌中的一种或多种:

[0305] o阿克曼氏菌属、克里斯滕森氏菌属、布劳特氏菌属、肠球菌属、真杆菌属、拜瑞氏菌属、拟杆菌属、副拟杆菌属或Erysipelatoclostridium

[0306] o产氢营养型布劳特氏菌、排泄物布劳特氏菌、韦氏布劳特氏菌、粪真杆菌、扭曲真杆菌、直肠真杆菌、粪肠球菌、耐久肠球菌、Enterococcus villorum、鹑鸡肠球菌;乳酸双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、动物双歧杆菌或短双歧杆菌

[0307] o BCG、副拟杆菌属、布劳特氏菌属、韦荣氏球菌属、唾液乳杆菌、阿加萨杆菌属、活泼瘤胃球菌、解苯副梭菌、Turicibacter sanguinus、伯克霍尔德菌属、类肺炎克雷白氏菌拟肺炎亚种、催产克雷白氏菌、纳西利斯泰泽菌或奈瑟菌属

[0308] o产氢营养型布劳特氏菌

[0309] o排泄物布劳特氏菌

[0310] o韦氏布劳特氏菌

[0311] o鹑鸡肠球菌

[0312] o屎肠球菌

[0313] o两歧双歧杆菌

[0314] o短双歧杆菌

[0315] o长双歧杆菌

[0316] o人罗斯拜瑞氏菌

[0317] o多形拟杆菌

[0318] o粪居拟杆菌

[0319] oErysipelatoclostridium ramosum

[0320] o巨型球菌属,包括马赛巨型球菌(Megasphera massiliensis)

[0321] o狄氏副拟杆菌

[0322] o扭曲真杆菌

[0323] o霍氏真杆菌

[0324] oIntestimonas butyriciproducens

[0325] o澳大利亚链球菌

[0326] o挑剔真杆菌

[0327] o普氏粪杆菌

[0328] o粪厌氧棒状菌

[0329] o丹毒丝菌科

[0330] o理研菌科

[0331] o乳球菌属、普雷沃菌属、双歧杆菌属、韦荣氏球菌属

[0332] o乳酸乳球菌乳脂亚种

[0333] o栖组织普雷沃菌

[0334] o动物双歧杆菌乳酸亚种

[0335] o小韦荣氏球菌

[0336] 在一些实施例中,mEV来自乳酸乳球菌乳脂亚种细菌,例如来自与乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A(ATCC指定编号PTA-125368)的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,mEV来自乳球菌属细菌,例如来自ATCC指定编号PTA-125368的乳酸乳球菌乳脂亚种菌株A。

[0337] 在一些实施例中,mEV来自普雷沃菌属细菌,例如来自包含与该普雷沃菌菌株B 50329(NRRL登录号B 50329)的核苷酸序列有至少90%或至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,mEV来自普雷沃菌属细菌,例如来自NRRL登录号B 50329的普雷沃菌菌株B 50329。

[0338] 在一些实施例中,mEV来自双歧杆菌属细菌,例如来自与双歧杆菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125097)的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,mEV来自双歧杆菌属细菌,例如来自保藏为ATCC指定编号PTA-125097的双歧杆菌属细菌。

[0339] 在一些实施例中,mEV来自韦荣球氏菌属细菌,例如来自与韦荣球氏菌属细菌(保藏为ATCC指定编号PTA-125691)的核苷酸序列具有至少90%或至少99%基因组、16S和/或CRISPR序列同一性的菌株。在一些实施例中,mEV来自韦荣氏球菌属细菌,例如来自保藏为ATCC指定编号PTA-125691的韦荣氏球菌属细菌。

[0340] 经修饰mEV

[0341] 在一些方面,本文描述的mEV(例如smEV)被修饰,使得它们包含、连接至和/或结合治疗性部分。

[0342] 在一些实施例中,所述治疗性部分是癌症特异性部分。在一些实施例中,所述癌症特异性部分对癌细胞具有结合特异性(例如对癌症特异性抗原具有结合特异性)。在一些实施例中,所述癌症特异性部分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,所述癌症特异性部分包含T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施例中,所述癌症特异性部分包含表达于癌细胞表面上受体的配体或其受体结合片段。在一些实施例中,所述癌症特异性部分是二分(bipartite)融合蛋白,其具有两个部分:结合至和/或连接至细菌的第一部分及可结合至癌细胞(例如通过对癌症特异性抗原具有结合特异性)的第二部分。在一些实施例中,该第一部分是全长肽聚糖识别蛋白(诸如PGRP)的片段或全长肽聚糖识别蛋白。在一些实施例中,该第一部分对mEV具有结合特异性(例如通过对细菌抗原具有结合特异性)。在一些实施例中,该第一和/或第二部分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该第一和/或第二部分包含T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施例中,该第一和/或第二部分包含表达于癌细胞表面上受体的配体或其受体结合片段。在某些实施例中,癌症特异性部分及mEV的共施用(组合施用或分开施用)增加mEV靶向癌细胞。

[0343] 在一些实施例中,本文描述的mEV经修饰使得它们包含、连接至和/或结合磁性和/或顺磁性部分(例如磁珠)。在一些实施例中,该磁性和/或顺磁性部分包含细菌和/或直接连接至细菌。在一些实施例中,该磁性和/或顺磁性部分连接至结合至mEV的mEV结合部分的一部分和/或为结合至mEV的mEV结合部分的一部分。在一些实施例中,该mEV结合部分是全长肽聚糖识别蛋白(诸如PGRP)的片段或全长肽聚糖识别蛋白。在一些实施例中,该mEV结合部分具有对mEV的结合特异性(例如通过对细菌抗原具有结合特异性)。在一些实施例中,该mEV结合部分包含抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该mEV结合部分包含T细胞受体或嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施例中,该mEV结合部分包含表达于癌细胞表面上受体的配体或其受体结合片段。在某些实施例中,磁性和/或顺磁性部分及mEV的共施用(一起施用或分开施用)可用以增加mEV靶向例如癌症细胞和/或受试者存在癌细胞的一部分。

[0344] 分泌型微生物胞外囊泡(smEV)的产生

[0345] 在某些方面,本文描述的smEV可以使用本领域已知的任何方法制备。

[0346] 在一些实施例中,在没有smEV纯化步骤的情况下制备smEV。例如,在一些实施例中,本文描述的细菌通过使用让smEV保持完整的方法被杀死且将所得的细菌组分(包括smEV)用于本文描述的方法及组合物中。在一些实施例中,这些细菌通过使用抗生素(例如,

使用本文描述的抗生素)被杀死。在一些实施例中,这些细菌通过使用UV照射被杀死。在一些实施例中,细菌被热杀死。

[0347] 在一些实施例中,本文所述的smEV纯化自一种或多种其他细菌组分。用于自细菌纯化smEV的方法为本领域中已知。在一些实施例中,smEV通过使用S.Bin Park等人,PLoS ONE.6(3):e17629(2011)或G.Norheim等人,PLoS ONE.[公共科学图书馆·综合]10(9):e0134353(2015)或Jeppesen等人Cell[细胞]177:428(2019)中描述的方法制备自细菌培养物,这些文献的各者以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,这些细菌经培养至高光密度及然后经离心以使细菌沉淀(例如,在4℃下以10,000x g离心30min,在4℃下以15,500x g离心15min)。在一些实施例中,然后使培养上清液通过过滤器以排除完整细菌细胞(例如,0.22μm过滤器)。在一些实施例中,然后对上清液进行切向流过滤,在此过程中,将上清液浓缩,除去小于100kDa的物质,并用PBS对培养基进行部分交换。在一些实施例中,经过滤的上清液经离心以使细菌smEV沉淀(例如,在4℃下以100,000至150,000x g离心1至3小时,在4℃下以200,000x g离心1至3小时)。在一些实施例中,这些smEV通过重新悬浮所得smEV沉淀物(例如,于PBS中),并将重新悬浮的smEV施用至Optiprep(碘克沙醇)梯度或梯度(例如30%至60%不连续的梯度、0-45%不连续的梯度),接着离心(例如,在4℃下以200,000x g离心4至20小时)加以进一步纯化。可以收集smEV带,用PBS稀释并离心以使smEV沉淀(例如,在4℃下以150,000x g离心3小时,在4℃下以200,000x g离心1小时)。纯化的smEV可经储存(例如,在-80℃或-20℃下)直至使用。在一些实施例中,这些smEV通过用DNA酶和/或蛋白酶K处理加以进一步纯化。

[0348] 例如,在一些实施例中,细菌的培养物可在4℃下以11,000x g离心20至40分钟以使细菌沉淀。可使培养上清液通过0.22μm过滤器以排除完整细菌细胞。然后可使用可包括但不限于硫酸铵沉淀、超离心或过滤的方法浓缩经过滤的上清液。例如,就硫酸铵沉淀而言,可将1.5-3M硫酸铵缓慢添加至经过滤的上清液,同时在4℃下搅拌。可在4℃下将沉淀培养8至48小时及然后在4℃下以11,000x g离心20至40分钟。所得沉淀物含有细菌smEV及其他碎片。可使用超离心,经过滤的上清液在4℃下以100,000至200,000x g离心1至16小时。此离心的沉淀物含有细菌smEV和其他碎片(例如大蛋白复合物)。在一些实施例中,使用过滤技术,如通过使用Amicon超自旋过滤器或通过切向流过滤,上清液可经过滤以便于保留分子量>50或100kDa的物质。

[0349] 可替代地,例如通过将生物反应器连接至细胞培养交替切向流(ATF)系统(例如来自Repligen的XCell ATF),可在生长期间或在生长期间的选定时间点,从细菌培养物连续获得smEV。该ATF系统保留完整细胞(>0.22um)于生物反应器中,及容许较小组分(例如,smEV、游离蛋白质)通过过滤器以供收集。例如,该系统可经结构设计使得<0.22um滤液然后通过100kDa的第二过滤器,容许收集如在0.22μm与100kDa之间的smEV的物质,并将小于100kDa的种类泵送回生物反应器中。可替代地,该系统可经结构设计以容许生物反应器中的培养基在培养物的生长期间得到补充和/或修饰。通过此方法收集的smEV可通过如上文描述用于经过滤的上清液的超离心或过滤进行进一步纯化和/或浓缩。

[0350] 通过本文提供的方法获得的smEV可通过基于尺寸的柱色谱法、通过亲和色谱法、通过离子交换色谱法及通过梯度超离心,使用可包括但不限于使用蔗糖梯度或Optiprep梯度的方法加以进一步纯化。简言之,在使用蔗糖梯度方法时,如果使用硫酸铵沉淀或超离心

来浓缩经过滤上清液,将沉淀物重新悬浮于60％蔗糖、30mM pH 8.0Tris中。如果使用过滤来浓缩经过滤上清液,则使用Amicon Ultra柱将浓缩物缓冲液交换至60％蔗糖、30mM pH 8.0Tris中。将样品施加至35％-60％不连续蔗糖梯度中并在4℃下以200,000×g离心持续3-24小时。简而言之,在使用Optiprep梯度方法时,如果使用硫酸铵沉淀或超离心来浓缩经过滤上清液,则将沉淀物悬浮于PBS中并向样品中添加3体积的60％Optiprep。在一些实施例中,如果使用过滤来浓缩经过滤上清液,则使用60％Optiprep将浓缩物稀释至最终浓度为35％Optiprep。将样品施加至0-45％不连续的Optiprep梯度,并在4℃下以200,000x g离心3至24小时,例如,在4℃下离心4至24小时。

[0351] 在一些实施例中,为证实smEV制剂的无菌性及分离,将smEV连续稀释至琼脂培养基(其用于测试中的细菌的例行培养)上,并使用例行条件进行培养。使未经灭菌的制剂通过0.22um过滤器以去除完整细胞。为进一步增加纯度,分离的smEV可用DNA酶或蛋白酶K处理。

[0352] 在一些实施例中,为制备用于体内注射的smEV,纯化的smEV如先前描述进行处理(G.Norheim等人,PLoS ONE.[公共科学图书馆·综合]10(9):e0134353(2015))。简而言之,在蔗糖梯度离心后,将含有smEV的带于含有3％蔗糖的溶液中或本领域技术人员已知的适用于体内注射的其他溶液中重新悬浮至50μg/mL的终浓度。此溶液还可含有浓度为0-0.5％(w/v)的佐剂(例如氢氧化铝)。在一些实施例中,为了制备用于体内注射的smEV,将PBS中的smEV无菌过滤至<0.22um。

[0353] 在某些实施例中,为制备与其他测试(例如用以在TEM成像或体外分析之前去除蔗糖)兼容的样品,使用过滤(例如Amicon Ultra柱)将样品进行缓冲液交换至PBS或30mM pH 8.0Tris中,透析,或超离心(200,000×g,≥3小时,4℃)并再悬浮。

[0354] 在一些实施例中,smEV制剂的无菌性可通过将一部分smEV接种至琼脂培养基(其用于用以产生smEV的细菌的标准培养)上及使用标准条件进行培养加以证实。

[0355] 在一些实施例中,通过色谱法及smEV上的结合表面部分来分离所选smEV并富集。在其他实施例中,所选smEV通过荧光细胞分选通过使用亲和试剂、化学染料、重组蛋白的方法或本领域技术人员已知的其他方法分离和/或富集。

[0356] 可以对smEV进行分析,例如,如Jeppesen等人Cell[细胞]177:428(2019)所述。

[0357] 在一些实施例中,冻干smEV。

[0358] 在一些实施例中,smEV被γ照射(例如,在17.5或25kGy下)。

[0359] 在一些实施例中,smEV被UV照射。

[0360] 在一些实施例中,smEV被热灭活(例如,在50℃下两小时或在90℃下两小时)。

[0361] 在一些实施例中,smEV被酸处理。

[0362] 在一些实施例中,smEV被喷氧(例如,以0.1vvm持续两小时)。

[0363] 生长阶段会影响细菌和/或细菌产生的smEV的数量或性质。例如,在本文提供的smEV制备方法中,可以例如在对数生长期开始时、在对数生长期的中间时、和/或一旦达到稳定生长期时从培养物中分离smEV。

[0364] 生长环境(如培养条件)可影响细菌产生smEV的量。例如,smEV诱导因子可以增加smEV的产率,如表4所示。

[0365] 表4:增加smEV产率的培养技术

[0366]

smEV 诱导	smEV 诱导因子	作用于
温度		
	加热	应激应答
	RT 至 37°C 温度变化	模拟感染
	37°C 至 40°C 温度变化	热性感染
ROS		
	白花丹素	氧化应激应答
	氢过氧化物异丙苯	氧化应激应答
	过氧化氢	氧化应激应答
抗生素		
	环丙沙星	细菌 SOS 应答
	庆大霉素	蛋白质合成
	多粘菌素 B	外膜
	D-环丝氨酸	细胞壁
渗压剂		
	NaCl	渗透应激
金属离子应激		
	铁螯合	铁水平
	EDTA	去除二价阳离子
	低氯化血红素	铁水平
培养基添加剂或去除		
	乳酸盐	生长
	氨基酸剥夺	应激
	十六烷	应激
	葡萄糖	生长
	碳酸氢钠	ToxT 诱导

[0367]

其他机制		水泡剂（vesiculator）（来自细菌）
	PQS	膜锚定（仅 negativicutes）
	二胺+DFMO	增强的生长
	高营养素	
	低营养素	
	氧	厌氧生物中的氧应激
	无半胱氨酸	厌氧生物中的氧应激
	诱导生物膜或絮凝	
	两阶段生长	
	噬菌体	
	尿素	

[0368] 在本文提供的制备smEV的方法中，所述方法可任选地包括在从细菌培养物中分离smEV之前，将细菌培养物暴露于smEV诱导因子。细菌培养物可以在对数生长期开始时、在对数生长期的中间时、和/或一旦达到稳定生长期时暴露于smEV诱导因子。

[0369] 药物组合物

[0370] 在某些实施例中，本文提供包含mEV（例如smEV）的药物组合物（例如，mEV组合物（例如，smEV组合物））。在一些实施例中，mEV组合物包含mEV（例如smEV）和/或本文所述的mEV（例如smEV）和药学上可接受的载剂的组合。在一些实施例中，smEV组合物包含smEV和/或本文描述的smEV和药学上可接受的载剂的组合。

[0371] 在一些实施例中，药物组合物包含基本上或完全不含完整细菌（例如活细菌，被杀死的细菌，减毒细菌）的mEV（例如smEV）。在一些实施例中，药物组合物包含mEV及完整细菌（例如，活细菌、被杀死的细菌、减毒细菌）。在一些实施例中，药物组合物包含来自表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株或物种中的一种或多种（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多种）的mEV。在一些实施例中，药物组合物包含来自表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株或物种中的一种的mEV。在一些实施例中，药物组合物包含冻干的mEV（例如smEV）。在一些实施例中，药物组合物包含γ照射的mEV（例如smEV）。mEV（例如smEV）可以在mEV被分离（如制备）之后进行γ照射。

[0372] 在一些实施例中，为定量细菌样品中存在的mEV（例如smEV）和/或细菌的数量，可使用电子显微术（例如，超薄冷冻切片的EM）以观测mEV（例如smEV）和/或细菌并计数它们的相对数量。可替代地，可使用纳米颗粒跟踪分析（NTA）、库尔特计数或动态光散射（DLS）或这类技术的组合。NTA及库尔特计数器计数颗粒并显示它们的尺寸。DLS给出颗粒的粒度分布，而非浓度。细菌通常具有1至2um（微米）的直径。完整范围是0.2至20um。来自库尔特计数及NTA的组合结果可揭示给定样品中的细菌和/或mEV（如smEV）数量。库尔特计数揭示具有0.7至10um的直径的颗粒的数量。对于大多数细菌和/或mEV（如smEV）样品，仅库尔特计数器就可以显示样品中细菌和/或mEV（如smEV）的数量。对于NTA，可以从马尔文泛分析公司（Malvern Pananlytical）获得Nanosight仪器。例如，NS300可以在10-2000nm范围内可视化

和测量悬浮液中的颗粒。NTA允许计数例如直径为50-1000nm的颗粒的数目。DLS揭示具有于1nm至3um的近似范围内的不同直径的颗粒的分布。

[0373] mEV可以通过本领域已知的分析方法(例如Jeppesen等人Cell[细胞]177:428(2019))来表征。

[0374] 在一些实施例中,可以基于颗粒计数来量化mEV。例如,可以使用NTA测量mEV制剂的总蛋白含量。

[0375] 在一些实施例中,可以基于蛋白质、脂质或碳水化合物的量来定量mEV。例如,mEV制剂的总蛋白含量可以使用布拉德福德测定进行测量。

[0376] 在一些实施例中,mEV与源细菌的一种或多种其他细菌组分分离。在一些实施例中,该药物组合物进一步包含其他细菌组分。

[0377] 在某些实施例中,从源细菌获得的mEV制剂可基于亚群的物理特性(例如,大小、密度、蛋白含量、结合亲和力)被分级成亚群。然后可以将mEV亚群中的一个或多个并入到本发明的药物组合物中。

[0378] 在某些方面,本文提供了包含用于治疗和/或预防疾病(例如癌症,自身免疫性疾病,炎性疾病或代谢性疾病)的mEV(例如smEV)的药物组合物,以及制备和/或鉴定此类mEV的方法,和使用此类药物组合物的方法(例如,单独或与其他治疗剂组合用于治疗癌症、自身免疫性疾病、炎性疾病或代谢性疾病)。在一些实施例中,药物组合物包含mEV(例如smEV)及完整细菌(例如,活细菌、被杀死的细菌、减毒细菌)。在一些实施例中,药物组合物包含在不存在细菌的情况下的mEV(例如smEV)。在一些实施例中,这些药物组合物包含来自表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株或物种中的一种或多种的mEV(例如smEV)和/或细菌。在一些实施例中,药物组合物包含来自表1、表2和/或表3中列举的细菌菌株或物种中的一种的mEV(例如smEV)和/或细菌。

[0379] 在某些方面中,本文提供用于向受试者(例如人受试者)施用的药物组合物。在一些实施例中,这些药物组合物与另外的活性和/或非活性材料组合以产生最终产品,其可呈单剂量单位或以多剂量形式。在一些实施例中,药物组合物与佐剂如免疫佐剂(例如STING激动剂、TLR激动剂或NOD激动剂)组合。

[0380] 在一些实施例中,药物组合物包含至少一种碳水化合物。

[0381] 在一些实施例中,药物组合物包含至少一种脂质。在一些实施例中,脂质包括至少一种选自以下的脂肪酸:月桂酸(12:0)、肉豆蔻酸(14:0)、棕榈酸(16:0)、棕榈油酸(16:1)、珍珠酸(17:0)、十七碳烯酸(17:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亚油酸(18:2)、亚麻酸(18:3)、十八碳四烯酸(18:4)、花生酸(20:0)、二十碳烯酸(20:1)、二十碳二烯酸(20:2)、二十碳四烯酸(20:4)、二十碳五烯酸(20:5)(EPA)、二十二烷酸(22:0)、二十二碳烯酸(22:1)、二十二碳五烯酸(22:5)、二十二碳六烯酸(22:6)(DHA)及二十四烷酸(24:0)。

[0382] 在一些实施例中,药物组合物包括至少一种补充矿物质或矿物质源。矿物质的实例包括但不限于:氯化物、钠、钙、铁、铬、铜、碘、锌、镁、锰、钼、磷、钾及硒。任一前述矿物质的合适形式包含可溶性矿物质盐、微溶性矿物质盐、不溶性矿物质盐、螯合矿物质、矿物质复合物、非反应性矿物质(例如羰基矿物质及经还原矿物质)及其组合。

[0383] 在一些实施例中,药物组合物包括至少一种补充维生素。至少一种维生素可为脂肪可溶性或水可溶性维生素。合适维生素包括但不限于维生素C、维生素A、维生素E、维生素

B12、维生素K、核黄素、烟酸(niacin)、维生素D、维生素B6、叶酸、吡哆醇(pyridoxine)、硫胺素、泛酸及生物素。任一前述物质的合适形式是维生素盐、维生素衍生物、与维生素具有相同或类似活性的化合物及维生素代谢物。

[0384] 在一些实施例中,药物组合物包含赋形剂。合适赋形剂的非限制性实例包含缓冲剂、防腐剂、稳定剂、粘合剂、压实剂、润滑剂、分散增强剂、崩解剂、矫味剂、甜味剂及着色剂。

[0385] 在一些实施例中,赋形剂是缓冲剂。合适缓冲剂的非限制性实例包含柠檬酸钠、碳酸镁、碳酸氢镁、碳酸钙及碳酸氢钙。

[0386] 在一些实施例中,赋形剂包括防腐剂。合适防腐剂的非限制性实例包含抗氧化剂(例如α-生育酚及抗坏血酸盐)及抗微生物剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇及苯酚)。

[0387] 在一些实施例中,药物组合物包含作为赋形剂的粘合剂。合适粘合剂的非限制性实例包含淀粉、预胶凝淀粉、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、聚丙烯酰胺、聚乙烯基噁唑烷酮、聚乙烯醇、C_{12}-C_{18}脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、糖、寡糖及其组合。

[0388] 在一些实施例中,药物组合物包含作为赋形剂的润滑剂。合适润滑剂的非限制性实例包含硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、氢化植物油、sterotex(氢化蓖麻油)、聚氧乙烯单硬脂酸酯、滑石粉、聚乙二醇、苯甲酸钠、月桂基硫酸钠、月桂基硫酸镁及轻质矿物油。

[0389] 在一些实施例中,药物组合物包含作为赋形剂的分散增强剂。合适分散剂的非限制性实例包含淀粉、海藻酸、聚乙烯基吡咯烷酮、瓜尔胶、高岭土、膨润土、经纯化木质纤维素、羟乙酸淀粉钠、异非晶形硅酸盐及微晶纤维素(作为高HLB乳化剂表面活性剂)。

[0390] 在一些实施例中,药物组合物包含作为赋形剂的崩解剂。在一些实施例中,崩解剂是非泡腾崩解剂。合适非泡腾崩解剂的非限制性实例包含淀粉(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、其预胶凝及改性淀粉)、甜味剂、黏土(例如膨润土)、微晶纤维素、海藻酸盐、羟乙酸淀粉钠、树胶(例如琼脂、瓜尔胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶及黄蓍胶)。在一些实施例中,崩解剂是泡腾崩解剂。合适泡腾崩解剂的非限制性实例包含碳酸氢钠与柠檬酸的组合,以及碳酸氢钠与酒石酸的组合。

[0391] 在一些实施例中,药物组合物是食物产品(例如食物或饮料),例如健康食物或饮料、婴儿用食物或饮料、用于孕妇、运动员、老年人或其他特定人群的食物或饮料、功能食物、饮料、用于指定健康应用的食物或饮料、膳食补充剂、患者用食物或饮料或动物饲料。食物及饮料的具体实例包含多种饮料,例如果汁、清凉饮料、茶饮料、饮料制剂、果冻饮料及功能饮料;酒精性饮料,例如啤酒;含有碳水化合物的食物,例如粳米食物产品、面条、面包及面团;膏产品,例如鱼火腿、香肠、海鲜膏产品;蒸煮袋产品,例如咖喱、敷有厚淀粉酱的食品及中国炖汤;汤;乳制产品,例如乳液、乳制饮料、冰激凌、奶酪及酸乳;发酵产品,例如发酵豆瓣酱膏、酸乳、发酵饮料及泡菜;豆产品;多种糖果产品,包含饼干、曲奇等;冰糖、口香糖、软糖;冷甜点,包含果胶、焦糖布丁及速冻点心;速熟食物,例如速溶汤料及速溶大豆汤料;可微波食物;等等。另外,实例还包含以粉剂、粒剂、锭剂、胶囊、液体、膏及果胶的形式制得的健康食物及饮料。

[0392] 在一些实施例中,药物组合物是用于动物(包括人)的食物产品。除人外的动物无特定限制,且所述组合物可用于各种牲畜、家禽、宠物、实验动物,及类似物。动物的具体实

例包括猪、牛、马、绵羊、山羊、鸡、野鸭、鸵鸟、家鸭、狗、猫、兔、仓鼠、小鼠、大鼠、猴，及类似物，但这些动物不限于此。

[0393] 剂型

[0394] 包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以配制为固体剂型，例如用于口服施用。固体剂型可包含一种或多种赋形剂，例如药学上可接受的赋形剂。固体剂型中的mEV可以是分离的mEV。任选地，固体剂型中的mEV可以被冻干。任选地，固体剂型中的mEV被γ照射。固体剂型可以包括片剂、微型片剂、胶囊、丸剂或粉末;或这些形式的组合(例如，包含在胶囊中的微型片剂)。

[0395] 固体剂型可以包括片剂(例如，>4mm)。

[0396] 固体剂型可以包括微型片剂(例如，1-4mm大小的微型片剂，例如，2mm微型片剂或3mm微型片剂)。

[0397] 固体剂型可以包括胶囊，例如大小00、大小0、大小1、大小2、大小3、大小4或大小5的胶囊;例如大小0的胶囊。

[0398] 固体剂型可以包括包衣。固体剂型可以包括单层包衣，例如肠溶包衣，例如基于Eudragit的包衣，例如EUDRAGIT L30 D-55、柠檬酸三乙酯和滑石。固体剂型可以包括两层包衣。例如，内包衣可以包括例如EUDRAGIT L30 D-55、柠檬酸三乙酯、滑石、无水柠檬酸和氢氧化钠，并且外包衣可以包括例如EUDRAGIT L30 D-55、柠檬酸三乙酯和滑石。EUDRAGIT是各种各样聚甲基丙烯酸酯基共聚物的品牌名称。它包括基于甲基丙烯酸和甲基丙烯酸/丙烯酸酯或其衍生物的阴离子、阳离子和中性共聚物。Eudragit是玻璃化转变温度在9℃至>150℃之间的无定形聚合物。Eudragit是不可生物降解的、不可吸收的、并且无毒的。阴离子型Eudragit L在pH>6时溶解，并且用于肠溶包衣，而在pH>7时溶解的Eudragit S用于结肠靶向。具有季铵基团的Eudragit RL和RS是水不溶性的，但可溶胀/可渗透的聚合物，其适用于缓释薄膜包衣应用。阳离子型Eudragit E(在pH≥5时不溶解)能阻止药物在唾液中的释放。

[0399] 固体剂型(例如胶囊)可以包括单层包衣，例如非肠溶包衣，例如HPMC(羟基丙基甲基纤维素)或明胶。

[0400] 包含mEV(例如smEV)的药物组合物可以配制为悬浮液，例如用于口服施用或用于注射。注射施用包含静脉内(IV)、肌内(IM)、肿瘤内(IT)及皮下(SC)施用。对于悬浮液，mEV可以在缓冲液中，例如药学上可接受的缓冲液，例如生理盐水或PBS。悬浮液可以包含一种或多种赋形剂，例如药学上可接受的赋形剂。悬浮液可以包含例如蔗糖或葡萄糖。悬浮液中的mEV可以是分离的mEV。任选地，悬浮液中的mEV可以被冻干。任选地，悬浮液中的mEV可以被γ照射。

[0401] 剂量

[0402] 对于人受试者的口服施用，mEV(例如smEV)的剂量可以是例如约$2x10^{6}$-约$2x10^{16}$个颗粒。剂量可以是例如约$1x10^{7}$-约$1x10^{15}$、约$1x10^{8}$-约$1x10^{14}$、约$1x10^{9}$-约$1x10^{13}$、约$1x10^{10}$-约$1x10^{14}$、或约$1x10^{8}$-约$1x10^{12}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{6}$、约$2x10^{7}$、约$2x10^{8}$、约$2x10^{9}$、约$1x10^{10}$、约$2x10^{10}$、约$2x10^{11}$、约$2x10^{12}$、约$2x10^{13}$、约$2x10^{14}$或约$1x10^{15}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{14}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{12}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{10}$个颗粒。剂量可以是例如约$1x10^{10}$个颗粒。颗粒计数可以例如通过NTA来确定。

[0403] 对于人受试者的口服施用，mEV(例如smEV)的剂量可以例如基于总蛋白。剂量可以是例如约5mg至约900mg总蛋白。剂量可以是例如约20mg至约800mg、约50mg至约700mg、约75mg至约600mg、约100mg至约500mg、约250mg至约750mg、或约200mg至约500mg总蛋白。剂量可以是例如约10mg、约25mg、约50mg、约75mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg或约750mg总蛋白。总蛋白可以例如通过布拉德福德测定来确定。

[0404] 对于通过注射(例如，静脉内施用)施用给人受试者，mEV(例如smEV)的剂量可以是例如约$1x10^{6}$-约$1x10^{16}$个颗粒。剂量可以是例如约$1x10^{7}$-约$1x10^{15}$、约$1x10^{8}$-约$1x10^{14}$、约$1x10^{9}$-约$1x10^{13}$、约$1x10^{10}$-约$1x10^{14}$、或约$1x10^{8}$-约$1x10^{12}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{6}$、约$2x10^{7}$、约$2x10^{8}$、约$2x10^{9}$、约$1x10^{10}$、约$2x10^{10}$、约$2x10^{11}$、约$2x10^{12}$、约$2x10^{13}$、约$2x10^{14}$或约$1x10^{15}$个颗粒。剂量可以是例如约$1x10^{15}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{14}$个颗粒。剂量可以是例如约$2x10^{13}$个颗粒。颗粒计数可以例如通过NTA来确定。

[0405] 对于注射施用(例如静脉内施用)，mEV(例如smEV)的剂量可以是例如约5mg至约900mg总蛋白。剂量可以是例如约20mg至约800mg、约50mg至约700mg、约75mg至约600mg、约100mg至约500mg、约250mg至约750mg、或约200mg至约500mg总蛋白。剂量可以是例如约10mg、约25mg、约50mg、约75mg、约100mg、约150mg、约200mg、约250mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg或约750mg总蛋白。剂量可以是例如约700mg总蛋白。剂量可以是例如约350mg总蛋白。剂量可以是例如约175mg总蛋白。总蛋白可以例如通过布拉德福德测定来确定。

[0406] γ照射

[0407] 粉末(例如mEV(如smEV)的粉末)可以在环境温度下以17.5Gy照射单位进行γ照射。

[0408] 冰冻生物量(例如mEV(如smEV)的冰冻生物量)可以在干冰存在的情况下以25kGy照射单位进行γ照射。

[0409] 另外的治疗剂

[0410] 在某些方面，本文提供的方法包括向受试者单独地或与另外的治疗剂组合地施用本文所述的药物组合物。在一些实施例中，另外的治疗剂是免疫抑制剂、抗炎剂、类固醇和/或癌症治疗剂。

[0411] 在一些实施例中，在施用另外的治疗剂之前(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时之前或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之前)向受试者施用包含mEV(例如smEV)的药物组合物。在一些实施例中，在施用另外的治疗剂之后(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时之后或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之后)向受试者施用包含mEV(例如smEV)的药物组合物。在一些实施例中，包含mEV(例如smEV)的药物组合物和另外的治疗剂同时或几乎同时施用给受试者(例如施用彼此在一小时内发生)。

[0412] 在一些实施例中，在将包含mEV(例如smEV)的药物组合物施用给受试者之前(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时之前或

至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之前)给受试者施用抗生素。在一些实施例中,在将包含mEV(例如smEV)的药物组合物施用给受试者之后(例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时之后或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之后)给受试者施用抗生素。在一些实施例中,包含mEV(例如smEV)的药物组合物和抗生素同时或几乎同时施用给受试者(例如施用彼此在一小时内发生)。

[0413] 在一些实施例中,另外的治疗剂是癌症治疗剂。在一些实施例中,癌症治疗剂是化学治疗剂。这些化学治疗剂的实例包含(但不限于)烷基化剂,例如噻替哌(thiotepa)及环磷酰胺(cyclosphosphamide);磺酸烷基酯,例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,例如苯并多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、米得哌(meturedopa)及乌得哌(uredopa);乙撑亚胺及甲基密胺,包含六甲密胺(altretamine)、三乙撑密胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫化磷酰胺及三羟甲基密胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包含合成类似物托泊替康(topotecan));苔藓虫素(bryostatin);卡利抑制素(callystatin);CC-1065(包含其合成类似物阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)及比折来新(bizelesin));念珠藻素(cryptophycin)(尤其念珠藻素1及念珠藻素8);多拉司他汀(dolastatin);多卡米星(duocarmycin)(包含合成类似物KW-2189及CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥(nitrogen mustard),例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯乙酸氮芥胆甾醇酯(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfmaide)、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimnustine);抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin),尤其卡奇霉素γ1I及卡奇霉素Ω11;达内霉素(dynemicin),包含达内霉素A;双膦酸盐类,例如氯膦酸盐(clodronate);埃斯培拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素发色团(neocarzinostatin chromophore)及相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomysin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、氮杂丝氨酸、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉霉素(carabicin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(doxorubicin)(包含吗啉基-多柔比星、氰吗啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(例如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素

(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,例如氨甲蝶呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸(denopterin)、氨甲喋呤、蝶罗呤(pteropterin)、曲美沙特(trimetrexate);嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-阿扎尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脱氧尿苷、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素,例如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯酮(testolactone);抗肾上腺素,例如胺鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,例如亚叶酸;乙酰葡醛酸内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);百思布什(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吖醌(diaziquone);依氟鸟氨酸(eflornithine);依利乙铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;蘑菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);类美坦辛(maytansinoid),例如美坦辛(maytansine)及柄型菌素(ansamitocin);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);尼群克林(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);蛋胺氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecene)(尤其T-2毒素、疣疱菌素(verrucarin)A、杆孢菌素(roridin)A及蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达喀尔巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);噶萨托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷(taxoid),例如太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多西紫杉醇(doxetaxel);苯丁酸氮芥;吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲喋呤;铂配位错合物,例如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)及卡铂(carboplatin);长春花碱(vinblastine);铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺安托(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙;道诺霉素(daunomycin);氨蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(例如CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醇,例如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0414] 在一些实施例中,癌症治疗剂是癌症免疫疗法药剂。免疫疗法是指使用受试者的免疫系统来治疗癌症的治疗,例如检查点抑制剂、癌症疫苗、细胞因子、细胞疗法、CAR-T细

胞及树突细胞疗法。检查点抑制剂免疫疗法的非限制性实例包含尼沃鲁单抗(Nivolumab)(BMS,抗PD-1)、派姆单抗(Pembrolizumab)(Merck,抗PD-1)、伊匹单抗(Ipilimumab)(BMS,抗CTLA-4)、MEDI4736(阿斯利康公司(AstraZeneca),抗PD-L1)及MPDL3280A(罗氏公司(Roche),抗PD-L1)。其他免疫疗法可为肿瘤疫苗,例如Gardail、Cervarix、BCG、西普赛尔-T(sipulencel-T)、Gp100:209-217、AGS-003、DCVax-L、阿尔土赛尔-L(Algenpantucel-L)、特尔土赛尔-L(Tergenpantucel-L)、TG4010、ProstAtak、Prostvac-V/R-TRICOM、林多穆尔(Rindopepimul)、E75乙酸肽、IMA901、POL-103A、贝拉土赛尔-L(Belagenpumatucel-L)、GSK1572932A、MDX-1279、GV1001及替西泰德(Tecemotide)。免疫疗法药剂可经由注射(例如经静脉内、经肿瘤内、经皮下或注射至淋巴结中)来施用,但还可经口、经局部或经由气溶胶来施用。免疫疗法可包括佐剂(例如细胞因子)。

[0415] 在一些实施例中,免疫疗法药剂是免疫检查点抑制剂。免疫检查点抑制在广义上是指抑制癌细胞可产生的检查点以预防或下调免疫应答。免疫检查点蛋白的实例包括但不限于CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、KIR、LAG3、TIM-3或VISTA。免疫检查点抑制剂可为结合至并抑制免疫检查点蛋白的抗体或其抗原结合片段。免疫检查点抑制剂的实例包括但不限于尼沃鲁单抗、派姆单抗、匹利珠单抗(pidilizumab)、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0010718C(阿维鲁单抗)、AUR-012及STI-A1010。

[0416] 在一些实施例中,本文提供的方法包括施用本文描述的药物组合物与一种或多种另外的治疗剂的组合。在一些实施例中,本文揭示的方法包括施用两种免疫疗法药剂(例如,免疫检查点抑制剂)。例如,本文提供的方法包括将本文描述的药物组合物与PD-1抑制剂(例如派姆单抗或尼沃鲁单抗或匹利珠单抗)或CLTA-4抑制剂(例如伊匹单抗)或PD-L1抑制剂(例如阿维鲁单抗)组合施用。

[0417] 在一些实施例中,免疫疗法药剂是(例如)结合至癌症相关抗原的抗体或其抗原结合片段。癌症相关抗原的实例包括但不限于亲脂素(adipophilin)、AIM-2、ALDH1A1、α-辅肌动蛋白-4、α-胎蛋白(“AFP”)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCR-ABL融合蛋白b3a2、β-链蛋白、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、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延长因子2、ENAH(hMena)、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮肿瘤抗原(“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、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、海普森(Hepsin)、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13Rα2、肠羧基酯酶、K-ras、激肽释放素4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1(又称为CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、莱格西因(Lengsin)、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、苹果酸酶、乳腺珠蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、I类肌凝蛋白、N-raw、NA88-A、新-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RARα融合蛋白、多态上皮黏蛋白(“PEM”)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、

RNF43、RU2AS、SAGE、分离蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活蛋白、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF-βRII、TPBG、TRAG-3、磷酸丙糖异构酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪氨酸酶、酪氨酸酶(“TYR”)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些实施例中,抗原是新抗原。

[0418] 在一些实施例中,免疫疗法药剂是癌症疫苗和/或癌症疫苗的组分(例如抗原性肽和/或蛋白质)。癌症疫苗可为蛋白质疫苗、核酸疫苗或其组合。例如,在一些实施例中,癌症疫苗包括含有癌症相关抗原的表位的多肽。在一些实施例中,癌症疫苗包括编码癌症相关抗原的表位的核酸(例如DNA或RNA(例如mRNA))。癌症相关抗原的实例包括但不限于亲脂素(adipophilin)、AIM-2、ALDH1A1、α-辅肌动蛋白-4、α-胎蛋白(“AFP”)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCR-ABL融合蛋白b3a2、β-链蛋白、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、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延长因子2、ENAH(hMena)、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮肿瘤抗原(“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、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、海普森(Hepsin)、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13Rα2、肠羧基酯酶、K-ras、激肽释放素4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1(又称为CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基转移酶AS融合蛋白、莱格西因(Lengsin)、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、苹果酸酶、乳腺珠蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、I类肌凝蛋白、N-raw、NA88-A、新-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RARα融合蛋白、多态上皮黏蛋白(“PEM”)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、分离蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活蛋白、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF-βRII、TPBG、TRAG-3、磷酸丙糖异构酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪氨酸酶、酪氨酸酶(“TYR”)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些实施例中,抗原是新抗原。在一些实施例中,将癌症疫苗与佐剂一起施用。佐剂的实例包括但不限于免疫调节蛋白、佐剂65、α-GalCer、磷酸铝、氢氧化铝、磷酸钙、β-葡聚糖肽、CpG ODN DNA、GPI-0100、脂质A、脂多糖、利波夫(Lipovant)、蒙塔尼(Montanide)、N-乙酰基-胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异谷氨酰胺、Pam3CSK4、quil A、霍乱毒素(CT)及来自肠毒性大肠杆菌(Escherichia coli)的不耐热毒素(LT),包括这类的衍生物(CTB、mmCT、CTA1-DD、LTB、LTK63、LTR72、dmLT)及海藻糖二霉菌酸酯。

[0419] 在一些实施例中,免疫疗法药剂是用于受试者的免疫调节蛋白。在一些实施例中,该免疫调节蛋白是细胞因子或趋化因子。免疫调节蛋白的实例包括但不限于B淋巴细胞化学引诱物(“BLC”)、C-C基序趋化因子11(“嗜酸性粒细胞趋化因子(Eotaxin)-1”)、嗜酸性粒细胞趋化蛋白2(“嗜酸性粒细胞趋化因子-2”)、粒细胞群落刺激因子(“G-CSF”)、粒细胞巨噬细胞群落刺激因子(“GM-CSF”)、1-309、细胞间黏附分子1(“ICAM-1”)、干扰素α(“IFN-α”)、干扰素β(“IFN-β”)、干扰素γ(“IFN-γ”)、白细胞介素-1α(“IL-1α”)、白细胞介素-1β

(“IL-1β”)、白细胞介素1受体拮抗剂(“IL-1ra”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-4(“IL-4”)、白细胞介素-5(“IL-5”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、白细胞介素-6可溶性受体(“IL-6sR”)、白细胞介素-7(“IL-7”)、白细胞介素-8(“IL-8”)、白细胞介素-10(“IL-10”)、白细胞介素-11(“IL-11”)、白细胞介素-12的亚基β(“IL-12p40”或“IL-12p70”)、白细胞介素-13(“IL-13”)、白细胞介素-15(“IL-15”)、白细胞介素-16(“IL-16”)、白细胞介素17A-F(“IL-17A-F”)、白细胞介素-18(“IL-18”)、白细胞介素-21(“IL-21”)、白细胞介素-22(“IL-22”)、白细胞介素-23(“IL-23”)、白细胞介素-33(“IL-33”)、趋化因子(C-C基序)配体2(“MCP-1”)、巨噬细胞群落刺激因子(“M-CSF”)、由γ干扰素诱导的单核因子(“MIG”)、趋化因子(C-C基序)配体2(“MIP-1α”)、趋化因子(C-C基序)配体4(“MIP-1β”)、巨噬细胞炎症蛋白-1-δ(“MIP-1δ”)、血小板源生长因子亚基B(“PDGF-BB”)、趋化因子(C-C基序)配体5、调控活化正常T细胞表达及分泌蛋白(“RANTES”)、TIMP金属肽酶抑制剂1(“TIMP-1”)、TIMP金属肽酶抑制剂2(“TIMP-2”)、肿瘤坏死因子、淋巴毒素-α(“TNFα”)、肿瘤坏死因子、淋巴毒素-β(“TNFβ”)、1型可溶性TNF受体(“sTNFRI”)、sTNFRIIAR、脑源神经营养因子(“BDNF”)、碱性成纤维细胞生长因子(“bFGF”)、骨成形性蛋白4(“BMP-4”)、骨成形性蛋白5(“BMP-5”)、骨成形性蛋白7(“BMP-7”)、神经生长因子(“b-NGF”)、表皮生长因子(“EGF”)、表皮生长因子受体(“EGFR”)、内分泌腺源血管内皮生长因子(“EG-VEGF”)、成纤维细胞生长因子4(“FGF-4”)、角质细胞生长因子(“FGF-7”)、生长分化因子15(“GDF-15”)、神经胶细胞源神经营养因子(“GDNF”)、生长激素、结合肝素的EGF样生长因子(“HB-EGF”)、肝细胞生长因子(“HGF”)、胰岛素样生长因子结合蛋白1(“IGFBP-1”)、胰岛素样生长因子结合蛋白2(“IGFBP-2”)、胰岛素样生长因子结合蛋白3(“IGFBP-3”)、胰岛素样生长因子结合蛋白4(“IGFBP-4”)、胰岛素样生长因子结合蛋白6(“IGFBP-6”)、胰岛素样生长因子1(“IGF-1”)、胰岛素、巨噬细胞群落刺激因子(“M-CSF R”)、神经生长因子受体(“NGF R”)、神经营养因子-3(“NT-3”)、神经营养因子-4(“NT-4”)、破骨细胞发生抑制因子(“护骨素(Osteoprotegerin)”)、血小板源生长因子受体(“PDGF-AA”)、磷脂酰肌醇-聚糖生物合成蛋白(“PIGF”)、Skp、Cullin、含有F-盒的复合物(“SCF”)、干细胞因子受体(“SCF R”)、转形生长因子α(“TGFα”)、转形生长因子β-1(“TGFβ1”)、转形生长因子β-3(“TGFβ3”)、血管内皮生长因子(“VEGF”)、血管内皮生长因子受体2(“VEGFR2”)、血管内皮生长因子受体3(“VEGFR3”)、VEGF-D 6Ckine、酪氨酸蛋白激酶受体UFO(“Axl”)、β细胞素(Betacellulin)(“BTC”)、黏膜相关上皮趋化因子(“CCL28”)、趋化因子(C-C基序)配体27(“CTACK”)、趋化因子(C-X-C基序)配体16(“CXCL16”)、C-X-C基序趋化因子5(“ENA-78”)、趋化因子(C-C基序)配体26(“嗜酸性粒细胞趋化因子-3”)、粒细胞趋化蛋白2(“GCP-2”)、GRO、趋化因子(C-C基序)配体14(“HCC-1”)、趋化因子(C-C基序)配体16(“HCC-4”)、白细胞介素-9(“IL-9”)、白细胞介素-17F(“IL-17F”)、白细胞介素-18结合蛋白(“IL-18BPa”)、白细胞介素-28A(“IL-28A”)、白细胞介素29(“IL-29”)、白细胞介素31(“IL-31”)、C-X-C基序趋化因子10(“IP-10”)、趋化因子受体CXCR3(“I-TAC”)、白血病抑制因子(“LIF”)、Light、趋化因子(C基序)配体(“淋巴细胞趋化因子(Lymphotactin)”)、单核细胞化学吸引蛋白2(“MCP-2”)、单核细胞化学吸引蛋白3(“MCP-3”)、单核细胞化学吸引蛋白4(“MCP-4”)、巨噬细胞源趋化因子(“MDC”)、巨噬细胞迁移抑制因子(“MIF”)、趋化因子(C-C基序)配体20(“MIP-3α”)、C-C基序趋化因子19(“MIP-3β”)、趋化因子(C-C基序)配体23(“MPIF-1”)、巨噬细胞刺激蛋白α链(“MSPα”)、核小体组装蛋白1样4(“NAP-2”)、分泌磷蛋白

1(“骨桥蛋白(Osteopontin)”)、肺及活化调控细胞因子(“PARC”)、血小板因子4(“PF4”)、基质细胞源因子-1α(“SDF-1α”)、趋化因子(C-C基序)配体17(“TARC”)、胸腺表达的趋化因子(“TECK”)、胸腺基质淋巴生成素(“TSLP 4-IBB”)、CD 166抗原(“ALCAM”)、分化簇80(“B7-1”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员17(“BCMA”)、分化簇14(“CD14”)、分化簇30(“CD30”)、分化簇40(“CD40配体”)、癌胚抗原相关细胞黏附分子1(胆管糖蛋白)(“CEACAM-1”)、死亡受体6(“DR6”)、脱氧胸苷激酶(“Dtk”)、1型膜糖蛋白(“内皮糖蛋白(Endoglin)”)、受体酪氨酸蛋白激酶erbB-3(“ErbB3”)、内皮-白血球黏附分子1(“E-选择素(Selectin)”)、细胞凋亡抗原1(“Fas”)、Fms样酪氨酸激酶3(“Flt-3L”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员1(“GITR”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员14(“HVEM”)、细胞间黏附分子3(“ICAM-3”)、IL-1R4、IL-1RI、IL-10Rβ、IL-17R、IL-2Rγ、IL-21R、溶酶体膜蛋白2(“LIMPII”)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(“脂质运载蛋白-2”)、CD62L(“L-选择素”)、淋巴内皮(“LYVE-1”)、I类MHC多肽相关序列A(“MICA”)、I类MHC多肽相关序列B(“MICB”)、NRG1-β1、β-型血小板源生长因子受体(“PDGF Rβ”)、血小板内皮细胞黏附分子(“PECAM-1”)、RAGE、A型肝炎病毒细胞受体1(“TIM-1”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员IOC(“TRAIL R3”)、特拉平(Trappin)蛋白转谷氨酰胺酶结合结构域(“特拉平-2”)、尿激酶受体(“uPAR”)、血管细胞黏附蛋白1(“VCAM-1”)、XEDAR活化素A、野鼠色相关蛋白(“AgRP”)、核糖核酸酶5(“血管生成素(Angiogenin)”)、血管生成素(Angiopoietin)1、血管抑素(Angiostatin)、卡色谱因(Catheprin)S、CD40、隐藏家族蛋白IB(“Cripto-1”)、DAN、Dickkopf相关蛋白1(“DKK-1”)、E-钙黏蛋白、上皮细胞黏附分子(“EpCAM”)、Fas配体(FasL或CD95L)、Fcg RIIB/C、卵泡抑素、半乳糖凝集素-7、细胞间黏附分子2(“ICAM-2”)、IL-13Rl、IL-13R2、IL-17B、IL-2Ra、IL-2Rb、IL-23、LAP、神经元细胞黏附分子(“NrCAM”)、纤维蛋白溶酶原活化抑制剂-1(“PAI-1”)、血小板源生长因子受体(“PDGF-AB”)、抵抗素(Resistin)、基质细胞源因子1(“SDF-1β”)、sgpl30、分泌型卷曲相关蛋白2(“ShhN”)、唾液酸结合免疫球蛋白型凝集素(“Siglec-5”)、ST2、转形生长因子-β2(“TGFβ2”)、Tie-2、血小板生成素(“TPO”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10D(“TRAIL R4”)、表达于骨髓性细胞上的触发受体1(“TREM-1”)、血管内皮生长因子C(“VEGF-C”)、VEGFR1脂联素、脂素(Adipsin)(“AND”)、α-胎蛋白(“AFP”)、血管生成素样4(“ANGPTL4”)、β-2-微球蛋白(“B2M”)、基底细胞黏附分子(“BCAM”)、碳水化合物抗原125(“CA125”)、癌症抗原15-3(“CA15-3”)、癌胚抗原(“CEA”)、cAMP受体蛋白(“CRP”)、人表皮生长因子受体2(“ErbB2”)、滤泡抑素、滤泡刺激素(“FSH”)、趋化因子(C-X-C基序)配体1(“GROα”)、人绒毛膜促性腺激素(“βHCG”)、胰岛素样生长因子1受体(“IGF-1sR”)、IL-1sRII、IL-3、IL-18Rb、IL-21、瘦素(Leptin)、基质金属蛋白酶-1(“MMP-1”)、基质金属蛋白酶-2(“MMP-2”)、基质金属蛋白酶-3(“MMP-3”)、基质金属蛋白酶-8(“MMP-8”)、基质金属蛋白酶-9(“MMP-9”)、基质金属蛋白酶-10(“MMP-10”)、基质金属蛋白酶-13(“MMP-13”)、神经细胞黏附分子(“NCAM-1”)、巢蛋白(Entactin)(“巢蛋白(Nidogen)-1”)、神经元特异性烯醇酶(“NSE”)、抑瘤素(Oncostatin)M(“OSM”)、原降钙素(Procalcitonin)、泌乳素(Prolactin)、前列腺特异性抗原(“PSA”)、结合唾液酸的Ig样凝集素9(“Siglec-9”)、ADAM 17内肽酶(“TACE”)、甲状腺球蛋白(Thyroglobulin)、金属蛋白酶抑制剂4(“TIMP-4”)、TSH2B4、含有去整合素(Disintegrin)及金属蛋白酶结构域的蛋白质9(“ADAM-9”)、血管生成素2、肿瘤坏死因子配体超家族成员13/富酸性白氨酸核磷蛋白32家族成员B(“APRIL”)、骨成形性蛋白2(“BMP-2”)、骨成形性蛋

白9(“BMP-9”)、补体组分5a(“C5a”)、细胞自溶酶L、CD200、CD97、趋化素(Chemerin)、肿瘤坏死因子受体超家族成员6B(“DcR3”)、脂肪酸结合蛋白2(“FABP2”)、成纤维细胞活化蛋白、α(“FAP”)、成纤维细胞生长因子19(“FGF-19”)、半乳糖凝集素-3、肝细胞生长因子受体(“HGFR”)、IFN-γα/βR2、胰岛素样生长因子2(“IGF-2”)、胰岛素样生长因子2受体(“IGF-2R”)、白细胞介素-1受体6(“IL-1R6”)、白细胞介素24(“IL-24”)、白细胞介素33(“IL-33”)、激肽释放素(Kallikrein)14、天门冬酰胺酰基内肽酶(“天门冬酰胺内肽酶(Legumain)”)、氧化型低密度脂蛋白受体1(“LOX-1”)、甘露糖结合凝集素(“MBL”)、脑啡肽酶(Neprilysin)(“NEP”)、Notch同系物1、易位相关(果蝇(Drosophila))(“Notch-1”)、肾胚细胞瘤过度表达的蛋白(“NOV”)、骨活化素(Osteoactivin)、程序化细胞死亡蛋白1(“PD-1”)、N-乙酰基胞壁酰基--L-丙氨酸酰胺酶(“PGRP-5”)、丝氨酸蛋白酶抑制剂(Serpin)A4、分泌型卷曲相关蛋白3(“sFRP-3”)、血栓调节蛋白(Thrombomodulin)、Toll样受体2(“TLR2”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员10A(“TRAIL R1”)、运铁蛋白(“TRF”)、WIF-1ACE-2、白蛋白、AMICA、血管生成素4、B细胞活化因子(“BAFF”)、碳水化合物抗原19-9(“CA19-9”)、CD 163、丛生蛋白(Clusterin)、CRT AM、趋化因子(C-X-C基序)配体14(“CXCL14”)、胱抑素(Cystatin)C、核心蛋白聚糖(Decorin)(“DCN”)、Dickkopf相关蛋白3(“Dkk-3”)、δ样蛋白质1(“DLL1”)、胎球蛋白(Fetuin)A、肝素结合生长因子1(“aFGF”)、叶酸受体α(“FOLR1”)、弗林蛋白酶(Furin)、GPCR相关分选蛋白1(“GASP-1”)、GPCR相关分选蛋白2(“GASP-2”)、粒细胞群落刺激因子受体(“GCSF R”)、丝氨酸蛋白酶海普森(“HAI-2”)、白细胞介素-17B受体(“IL-17B R”)、白细胞介素27(“IL-27”)、淋巴细胞活化基因3(“LAG-3”)、缺脂脂蛋白A-V(“LDL R”)、胃蛋白酶原I、视黄醇结合蛋白4(“RBP4”)、SOST、类肝素硫酸蛋白聚糖(“共结合蛋白聚糖-1(Syndecan-1)”)、肿瘤坏死因子受体超家族成员13B(“TACI”)、组织因子通路抑制剂(“TFPI”)、TSP-1、肿瘤坏死因子受体超家族成员10b(“TRAIL R2”)、TRANCE、肌钙蛋白I(Troponin I)、尿激酶纤维蛋白溶酶原活化剂(“uPA”)、钙黏蛋白5、2型或VE-钙黏蛋白(血管内皮)(还称为CD144,“VE-钙黏蛋白”)、WNT1可诱导型信号传导通路蛋白1(“WISP-1”)及核因子κB的受体活化剂(“RANK”)。

[0420] 在一些实施例中,癌症治疗剂是抗癌症化合物。示例性抗癌症化合物包括但不限于阿仑单抗(Campath®)、阿利维A酸(Panretin®)、阿那曲唑(Arimidex®)、贝伐单抗(Avastin®)、贝沙罗汀(Targretin®)、硼替佐米(Velcade®)、博舒替尼(Bosulif®)、本妥昔单抗(Adcetris®)、卡巴坦尼(Cometriq®)、卡菲佐米(Kyprolis®)、西妥昔单抗(Erbitux®)、克里唑蒂尼(Xalkori®)、达沙替尼(Sprycel®)、地尼介白素(Ontak®)、盐酸埃罗替尼(Tarceva®)、依维莫司(Afinitor®)、依西美坦(Aromasin®)、氟维司群(Faslodex®)、吉非替尼(Iressa®)、替坦异贝莫单抗(Zevalin®)、甲磺酸伊马替尼(Gleevec®)、伊匹单抗(Yervoy®)、二对甲苯磺酸拉帕替尼(Tykerb®)、来曲唑(Femara®)、尼洛替尼(Tasigna®)、奥法木单抗(Arzerra®)、帕尼单抗(Vectibix®)、盐酸帕唑帕尼(Votrient®)、帕妥珠单抗(Perjeta®)、普拉曲沙

(Folotyn®)、瑞戈非尼(Stivarga®)、利妥昔单抗(Rituxan®)、罗米地辛(Istodax®)、甲苯磺酸索拉非尼(Nexavar®)、苹果酸舒尼替尼(Sutent®)、他莫昔芬、西罗莫司(Torisel®)、托瑞米芬(Fareston®)、托西莫单抗及131I-托西莫单抗(Bexxar®)、曲妥珠单抗(Herceptin®)、维甲酸(Vesanoid®)、凡德他尼(Caprelsa®)、威罗菲尼(Zelboraf®)、伏立诺他(Zolinza®)及阿柏西普(Zaltrap®)。

[0421] 修饰调节基因表达及其他细胞功能的蛋白质的功能的示例性抗癌症化合物(例如,HDAC抑制剂,类视黄醇受体配体)是伏立诺他(Zolinza®)、贝沙罗汀(Targretin®)及罗米地辛(Istodax®)、阿利维A酸(Panretin®)及维甲酸(Vesanoid®)。

[0422] 诱导细胞凋亡的示例性抗癌症化合物(例如,蛋白酶体抑制剂,叶酸拮抗剂)是硼替佐米(Velcade®)、卡菲佐米(Kyprolis™)及普拉曲沙(Folotyn®)。

[0423] 增加抗肿瘤免疫应答的示例性抗癌化合物(例如抗CD20、抗CD52;抗细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4)为利妥昔单抗(Rituxan®)、阿仑单抗(Campath®)、奥法木单抗(Arzerra®)及伊匹单抗(Yervoy™)。

[0424] 将毒剂递送至癌细胞的示例性抗癌症化合物(例如,抗CD20-放射性核素融合物;IL-2-白喉毒素融合物;抗CD30-单甲基澳瑞他汀E(MMAE)-融合物)是托西莫单抗及131I-托西莫单抗(Bexxar®)及替坦异贝莫单抗(Zevalin®)、地尼介白素(Ontak®)及本妥昔单抗(Adcetris®)。

[0425] 其他示例性抗癌症化合物是小分子抑制剂及其结合物,例如,Janus激酶、ALK、Bcl-2、PARP、PI3K、VEGF受体、Braf、MEK、CDK及HSP90。

[0426] 示例性基于铂的抗癌症化合物包括(例如)顺铂、卡铂、奥沙利铂、赛特铂、吡铂、奈达铂、三铂(Triplatin)及脂铂(Lipoplatin)。适用于治疗的其他基于金属的药物包括但不限于基于钌的化合物、二茂铁衍生物、基于钛的化合物及基于镓的化合物。

[0427] 在一些实施例中,癌症治疗剂是包括放射性核素的放射性部分。示例性放射性核素包括但不限于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。

[0428] 在一些实施例中,癌症治疗剂是抗生素。例如,如果根据本文提供的方法来检测癌症相关细菌和/或癌症相关微生物组特征的存在,则可施用抗生素以从受试者消除癌症相关细菌。“抗生素”在广义上是指能够抑制或预防细菌感染的化合物。抗生素可以诸多方式(包含根据其用于特定感染的用途、其作用机制、其生物可用性或其靶微生物范围(例如革

兰氏阴性细菌对革兰氏阳性细菌、好氧细菌对厌氧细菌等))进行分类且可使用这些方式来杀死宿主的特定区域(“生态位”)中的特定细菌(Leekha等人,2011.General Principles of Antimicrobial Therapy[抗微生物疗法的一般原则].Mayo Clin Proc.[梅欧医院院刊]86(2):156-167)。在某些实施例中,可使用抗生素来选择性靶向特定生态位的细菌。在一些实施例中,可使用已知治疗包含癌症生态位的特定感染的抗生素来靶向癌症相关微生物(包含该生态位中非癌症相关细菌)。在其他实施例中,在包含mEV(例如smEV)的药物组合物之后施用抗生素。在一些实施例中,在包含mEV(例如smEV)的药物组合物之前施用抗生素。

[0429] 在一些方面,可基于杀细菌或细菌抑制性质来选择抗生素。杀细菌抗生素包含破坏细胞壁(例如β-内酰胺)、细胞膜(例如达托霉素(daptomycin))或细菌DNA(例如氟喹诺酮(fluoroquinolone))的作用机制。细菌抑制剂抑制细菌复制且包含磺酰胺、四环素(tetracycline)及巨环内酯并通过抑制蛋白质合成来发挥作用。另外,尽管一些药物可在某些生物体中具有杀细菌性且在其他生物体中具有细菌抑制性,但知晓靶生物体使得本领域技术人员可选择具有适当性质的抗生素。在某些治疗条件中,细菌抑制抗生素抑制杀细菌抗生素的活性。因此,在某些实施例中,并不组合杀细菌抗生素及细菌抑制抗生素。

[0430] 抗生素包括但不限于氨基糖苷、安莎霉素(ansamycin)、碳头孢烯(carbacephem)、碳青霉烯(carbapenem)、头孢菌素(cephalosporin)、糖肽、林可酰胺(lincosamide)、脂肽、巨环内酯、单酰胺菌素(monobactam)、硝基呋喃、噁唑烷酮、青霉素(penicillin)、多肽抗生素、喹诺酮(quinolone)、氟喹诺酮、磺酰胺、四环素及抗分枝杆菌化合物及其组合。

[0431] 氨基糖苷包括但不限于阿米卡星(Amikacin)、庆大霉素(Gentamicin)、卡那霉素(Kanamycin)、新霉素(Neomycin)、奈替米星(Netilmicin)、妥布霉素(Tobramycin)、巴龙霉素(Paromomycin)及大观霉素(Spectinomycin)。氨基糖苷可有效抵抗(例如)革兰氏阴性细菌(例如大肠杆菌、克雷伯氏菌(Klebsiella)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)及土伦病弗朗西斯氏菌(Francisella tularensis))且抵抗某些好氧细菌,但对于专性/兼性厌氧菌具有较小有效性。据信,氨基糖苷结合至细菌30S或50S核糖体亚基,由此抑制细菌蛋白合成。

[0432] 安莎霉素包括但不限于格尔德霉素(Geldanamycin)、除莠霉素(Herbimycin)、利福霉素(Rifamycin)及曲张链菌素(Streptovaricin)。据信,格尔德霉素及除莠霉素抑制或改变热休克蛋白90的功能。

[0433] 碳头孢烯包括但不限于氯碳头孢(Loracarbef)。据信,碳头孢烯抑制细菌细胞壁合成。

[0434] 碳青霉烯包括但不限于厄他培南(Ertapenem)、多尼培南(Doripenem)、亚胺培南(Imipenem)/西司他丁(Cilastatin)及美罗培南(Meropenem)。碳青霉烯作为宽谱抗生素对革兰氏阳性细菌及革兰氏阴性细菌均具有杀细菌性。据信,碳青霉烯抑制细菌细胞壁合成。

[0435] 头孢菌素包括但不限于头孢羟氨苄(Cefadroxil)、头孢唑啉(Cefazolin)、头孢噻吩(Cefalotin)、头孢金素(Cefalothin)、头孢氨苄(Cefalexin)、头孢克洛(Cefaclor)、头孢孟多(Cefamandole)、头孢西丁(Cefoxitin)、头孢丙烯(Cefprozil)、头孢呋辛(Cefuroxime)、头孢克肟(Cefixime)、头孢地尼(Cefdinir)、头孢托仑(Cefditoren)、头孢哌酮(Cefoperazone)、头孢噻肟(Cefotaxime)、头孢泊肟(Cefpodoxime)、头孢他啶

(Ceftazidime)、头孢布烯(Ceftibuten)、头孢唑肟(Ceftizoxime)、头孢曲松(Ceftriaxone)、头孢吡肟(Cefepime)、头孢他洛林酯(Ceftaroline fosamil)及头孢比普(Ceftobiprole)。所选头孢菌素可效抵抗(例如)革兰氏阴性细菌及革兰氏阳性细菌(包含假单胞菌(Pseudomonas)),某些头孢菌素可有效抵抗甲氧西林(methicillin)抗性金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)(MRSA)。据信,头孢菌素通过破坏细菌细胞壁的肽聚糖层的合成来抑制细菌细胞壁合成。

[0436] 糖肽包括但不限于替考拉宁(Teicoplanin)、万古霉素(Vancomycin)及特拉万星(Telavancin)。糖肽可有效抵抗(例如)好氧及厌氧革兰氏阳性细菌(包含MRSA及艰难梭菌(Clostridium difficile))。据信,糖肽通过破坏细菌细胞壁的肽聚糖层的合成来抑制细菌细胞壁合成。

[0437] 林可酰胺包括但不限于克林达霉素(Clindamycin)及林可霉素(Lincomycin)。林可酰胺可有效抵抗(例如)厌氧细菌以及葡萄球菌属(Staphylococcus)及链球菌属(Streptococcus)。据信,林可酰胺结合至细菌50S核糖体亚基,由此抑制细菌蛋白合成。

[0438] 脂肽包括但不限于达托霉素。脂肽可有效抵抗(例如)革兰氏阳性细菌。据信,脂肽结合至细菌膜并引起快速去极化。

[0439] 巨环内酯包括但不限于阿奇霉素(Azithromycin)、克拉霉素(Clarithromycin)、地红霉素(Dirithromycin)、红霉素(Erythromycin)、罗红霉素(Roxithromycin)、醋竹桃霉素(Troleandomycin)、泰利霉素(Telithromycin)及螺旋霉素(Spiramycin)。巨环内酯可有效抵抗(例如)链球菌及支原体(Mycoplasma)。据信,巨环内酯结合至细菌或50S核糖体亚基,由此抑制细菌蛋白合成。

[0440] 单酰胺菌素包括但不限于胺曲南(Aztreonam)。单酰胺菌素可有效抵抗(例如)革兰氏阴性细菌。据信,单酰胺菌素通过破坏细菌细胞壁的肽聚糖层的合成来抑制细菌细胞壁合成。

[0441] 硝基呋喃包括但不限于呋喃唑酮(Furazolidone)及呋喃妥因(Nitrofurantoin)。

[0442] 噁唑烷酮包括但不限于利奈唑胺(Linezolid)、泼斯唑来(Posizolid)、雷得唑来(Radezolid)及特地唑胺(Torezolid)。据信,噁唑烷酮是蛋白质合成抑制剂。

[0443] 青霉素包括但不限于阿莫西林(Amoxicillin)、氨苄西林(Ampicillin)、阿洛西林(Azlocillin)、羧苄青霉素(Carbenicillin)、氯噻青霉素(Cloxacillin)、二氯噻青霉素(Dicloxacillin)、氟氯西林(Flucloxacillin)、美洛西林(Mezlocillin)、甲氧西林、萘夫西林(Nafcillin)、苯唑西林(Oxacillin)、青霉素G、青霉素V、哌拉西林(Piperacillin)、替莫西林(Temocillin)及替卡西林(Ticarcillin)。青霉素可有效抵抗(例如)革兰氏阳性细菌、兼性厌氧菌(例如链球菌、疏螺旋体(Borrelia)及密螺旋体(Treponema))。据信,青霉素通过破坏细菌细胞壁的肽聚糖层的合成来抑制细菌细胞壁合成。

[0444] 青霉素组合包括但不限于阿莫西林/克拉维酸盐(clavulanate)、氨苄西林/舒巴坦(sulbactam)、哌拉西林/三唑巴坦(tazobactam)及替卡西林/克拉维酸盐。

[0445] 多肽抗生素包括但不限于杆菌肽(Bacitracin)、黏菌素(Colistin)及多黏菌素(Polymyxin)B及E。多肽抗生素可有效抵抗(例如)革兰氏阴性细菌。据信,某些多肽抗生素抑制涉及细菌细胞壁的肽聚糖层的合成的焦磷酸异戊二烯基酯,而其他多肽抗生素通过置换细菌相对离子来去稳定细菌外膜。

[0446] 喹诺酮及氟喹诺酮包括但不限于环丙沙星(Ciprofloxacin)、依诺沙星(Enoxacin)、加替沙星(Gatifloxacin)、吉米沙星(Gemifloxacin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)、洛美沙星(Lomefloxacin)、莫西沙星(Moxifloxacin)、萘啶酮酸(Nalidixic acid)、诺氟沙星(Norfloxacin)、氧氟沙星(Ofloxacin)、曲伐沙星(Trovafloxacin)、格帕沙星(Grepafloxacin)、司帕沙星(Sparfloxacin)及替马沙星(Temafloxacin)。喹诺酮/氟喹诺酮可有效抵抗(例如)链球菌属及奈瑟菌属(Neisseria)。据信,喹诺酮/氟喹诺酮抑制细菌DNA旋转酶或拓扑异构酶IV,由此抑制DNA复制及转录。

[0447] 磺酰胺包括但不限于磺胺米隆(Mafenide)、磺胺醋酰(Sulfacetamide)、磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺嘧啶银、磺胺地索辛(Sulfadimethoxine)、磺胺甲噻二唑(Sulfamethizole)、磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole)、磺胺亚胺基(Sulfanilimide)、柳氮磺胺吡啶(Sulfasalazine)、磺胺异噁唑(Sulfisoxazole)、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(Trimethoprim-Sulfamethoxazole)(复方磺胺甲噁唑(Co-trimoxazole))及磺酰胺基柯衣汀(Sulfonamidochrysoidine)。据信,磺酰胺通过竞争性抑制二氢蝶酸合成酶来抑制叶酸合成,由此抑制核酸合成。

[0448] 四环素类包括但不限于地美环素(Demeclocycline)、强力霉素(Doxycycline)、米诺环素(Minocycline)、土霉素(Oxytetracycline)及四环素。四环素类可有效抵抗(例如)革兰氏阴性细菌。据信,四环素结合至细菌30S核糖体亚基,由此抑制细菌蛋白合成。

[0449] 抗分枝杆菌化合物包括但不限于氯法齐明(Clofazimine)、胺苯砜(Dapsone)、卷曲霉素(Capreomycin)、环丝氨酸(Cycloserine)、乙胺丁醇(Ethambutol)、乙硫异烟酰胺(Ethionamide)、异烟酸肼(Isoniazid)、吡嗪酰胺(Pyrazinamide)、利福平(Rifampicin)、利福布汀(Rifabutin)、利福喷丁(Rifapentine)及链霉素(Streptomycin)。

[0450] 合适的抗生素还包含胂凡纳明(arsphenamine)、氯霉素(chloramphenicol)、磷霉素(fosfomycin)、夫西地酸(fusidic acid)、甲硝唑(metronidazole)、莫匹罗星(mupirocin)、平板霉素(platensimycin)、奎奴普汀(quinupristin)/达福普汀(dalfopristin)、替吉环素(tigecycline)、替硝唑(tinidazole)、甲氧苄啶-阿莫西林(trimethoprim amoxicillin)/克拉维酸盐、氨苄西林/舒巴坦、安福霉素-利托菌素(amphomycin ristocetin)、阿奇霉素、杆菌肽、卜福林(buforin)II、卡波霉素(carbomycin)、杀菌肽(cecropin)P1、克拉霉素、红霉素、呋喃唑酮、夫西地酸、夫西地钠、短杆菌素(gramicidin)、亚胺培南、吲哚菌素(indolicidin)、交沙霉素(josamycin)、马盖纳尼(magainan)II、甲硝唑(metronidazole)、硝基咪唑、米卡霉素(mikamycin)、变链素(mutacin)B-Ny266、变链素B-JH1 140、变链素J-T8、乳链球菌素(nisin)、乳链球菌素A、新生霉素(novobiocin)、竹桃霉素(oleandomycin)、奥斯立星(ostreogrycin)、哌拉西林/三唑巴坦、普那霉素(pristinamycin)、雷莫拉宁(ramoplanin)、牛蛙皮肤抗菌肽(ranalexin)、罗伊氏素(reuterin)、利福昔明(rifaximin)、蔷薇霉素(rosamicin)、罗沙米星(rosaramicin)、大观霉素、螺旋霉素、葡萄霉素(staphylomycin)、链霉杀阳素(streptogramin)、链霉杀阳素A、协同菌素(synergistin)、牛磺罗定(taurolidine)、替考拉宁、泰利霉素、替卡西林/克拉维酸(clavulanic acid)、三乙酰基竹桃霉素(triacetyloleandomycin)、泰洛星(tylosin)、短杆菌酪肽(tyrocidin)、短杆菌素(tyrothricin)、万古霉素、维马霉素(vemamycin)及维吉霉素(virginiamycin)。

[0451] 在一些实施例中，另外的治疗剂是免疫抑制剂、DMARD、止痛药、类固醇、非类固醇抗炎药(NSAID)或细胞因子拮抗剂，及其组合。代表性药剂包括但不限于环孢菌素、类视黄醇、皮质类固醇、丙酸衍生物、乙酸衍生物、烯醇酸衍生物、芬那酸衍生物、Cox-2抑制剂、鲁美昔布(lumiracoxib)、布洛芬(ibuprophen)、水杨酸胆碱镁(cholin magnesium salicylate)、非诺洛芬(fenoprofen)、双水杨酯(salsalate)、二氟苯水杨酸(difunisal)、托美汀(tolmetin)、酮洛芬(ketoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、奥沙普秦(oxaprozin)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸(sulindac)、依托度酸(etodolac)、酮咯酸(ketorolac)、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、伐地考昔(valdecoxib)、依托考昔(etoricoxib)、MK0966;罗非昔布(rofecoxib)、对乙酰胺基酚(acetominophen)、塞来昔布(Celecoxib)、双氯芬酸(Diclofenac)、曲马多(tramadol)、吡罗昔康(piroxicam)、美洛昔康(meloxicam)、替诺昔康(tenoxicam)、屈昔康(droxicam)、氯诺昔康(lornoxicam)、伊索昔康(isoxicam)、甲芬那酸(mefanamic acid)、甲氯芬那酸(meclofenamic acid)、氟芬那酸(flufenamic acid)、托芬那酸(tolfenamic)、伐地考昔(valdecoxib)、帕瑞昔布(parecoxib)、依托度酸(etodolac)、吲哚美辛(indomethacin)、阿司匹林(aspirin)、布洛芬(ibuprophen)、非罗考昔(firocoxib)、氨甲喋呤(methotrexate(MTX))、抗疟疾药物(例如，羟基氯喹(hydroxychloroquine)及氯喹(chloroquine))、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、来氟米特(Leflunomide)、硫唑嘌呤(azathioprine)、环孢菌素(cyclosporin)、金盐(gold salt)、米诺环素(minocycline)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、D-青霉胺(D-penicillamine)、米诺环素(minocycline)、金诺芬(auranofin)、他克莫司(tacrolimus)、硫代苯酸金钠(myocrisin)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、TNFα拮抗剂(例如，TNFα拮抗剂或TNFα受体拮抗剂)，例如，阿达木单抗(Humira®)、依那西普(Enbrel®)、英夫利昔单抗(Remicade®;TA-650)、聚乙二醇赛妥珠单抗(Cimzia®;CDP870)、戈利木单抗(Simpom®;CNTO 148)、阿那白滞素(Kineret®)、利妥昔单抗(Rituxan®;MabThera®)、阿巴西普(Orencia®)、托珠单抗(RoActemra/Actemra®)、整合素拮抗剂(TYSABRI®(那他珠单抗))、IL-1拮抗剂(ACZ885(Ilaris))、阿那白滞素(Kineret®))、CD4拮抗剂、IL-23拮抗剂、IL-20拮抗剂、IL-6拮抗剂、BLyS拮抗剂(例如，阿塞西普、Benlysta®/ LymphoStat-B®(贝利木单抗))、p38抑制剂、CD20拮抗剂(奥瑞珠单抗(Ocrelizumab)、奥法木单抗(Arzerra®))、干扰素γ拮抗剂(芳妥珠单抗(Fontolizumab))、泼尼松龙(prednisolone)、强的松(Prednisone)、地塞米松(dexamethasone)、皮质醇(Cortisol)、可的松(cortisone)、氢化可的松(hydrocortisone)、甲基泼尼松龙(methylprednisolone)、倍他米松(betamethasone)、曲安奈德(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasome)、氟氢可的松(fludrocortisone)、脱氧皮质酮(deoxycorticosterone)、醛固酮(aldosterone)、强力霉素(Doxycycline)、万古霉素(vancomycin)、吡格列酮(pioglitazone)、SBI-087、SCIO-469、Cura-100、Oncoxin+ Viusid、TwHF、甲氧沙林(Methoxsalen)、维生素D-麦角钙化醇(Vitamin D-ergocalciferol)、米那普仑(Milnacipran)、紫杉醇(Paclitaxel)、罗西格塔松(rosigtazone)、他克莫司(Tacrolimus)(Prograf®)、RADOO1、拉帕蒙(rapamune)、雷帕霉素

(rapamycin)、福斯马替尼(fostamatinib)、芬太尼(Fentanyl)、XOMA 052、福斯马替尼二钠(Fostamatinib disodium)、罗格列酮(rosightazone)、姜黄素(Curcumin)(Longvida™)、瑞舒伐他汀(Rosuvastatin)、马拉韦罗(Maraviroc)、雷米普利(ramipnl)、米那普仑(Milnacipran)、考前列酮(Cobiprostone)、生长激素(somatropin)、tgAAC94基因治疗媒剂、MK0359、GW856553、埃索美拉唑(esomeprazole)、依维莫司(everolimus)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、JAK1及JAK2抑制剂、泛JAK抑制剂,例如,四环吡啶酮6(P6)、325、PF-956980、狄诺塞麦(denosumab)、IL-6拮抗剂、CD20拮抗剂、CTLA4拮抗剂、IL-8拮抗剂、IL-21拮抗剂、IL-22拮抗剂、整合素拮抗剂(Tysarbri®(那他珠单抗))、VGEF拮抗剂、CXCL拮抗剂、MMP拮抗剂、防御素拮抗剂、IL-1拮抗剂(包括IL-1β拮抗剂),及IL-23拮抗剂(例如,受体诱捕物、拮抗性抗体等)。

[0452] 在一些实施例中,另外的治疗剂是免疫抑制剂。免疫抑制剂的实例包括但不限于皮质类固醇激素、美色拉嗪(mesalazine)、美色拉明(mesalamine)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、柳氮磺胺吡啶衍生物、免疫抑制药物、环孢菌素A、巯基嘌呤、硫唑嘌呤(azathiopurine)、强的松、氨甲喋呤、抗组胺药、糖皮质激素、肾上腺素、茶碱、色甘酸钠、抗白三烯、用于鼻炎的抗胆碱能药物、TLR拮抗剂、发炎体抑制剂、抗胆碱能解充血剂、肥大细胞稳定剂、单克隆抗IgE抗体、疫苗(例如,用于其中使过敏原的量逐渐增加的接种疫苗的疫苗)、细胞因子抑制剂(如抗IL-6抗体)、TNF抑制剂(如英夫利昔单抗、阿达木单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、戈利木单抗或依那西普及其组合)。

[0453] 施用

[0454] 在某些方面中,本文提供向受试者递送本文描述的药物组合物(例如,包含mEV(例如smEV)的药物组合物)的方法。在本文所提供方法的一些实施例中,施用药物组合物且联合施用另外的治疗剂。在一些实施例中,药物组合物包含与另外的治疗剂共配制的mEV(例如smEV)。在一些实施例中,包含mEV(例如smEV)的药物组合物与另外的治疗剂共同施用。在一些实施例中,另外的治疗剂在施用包含mEV(例如smEV)的药物组合物之前(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分钟之前,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时之前,或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之前)向受试者施用。在一些实施例中,另外的治疗剂在施用包含mEV(例如smEV)的药物组合物之后(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分钟之后,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小时之后,或约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之后)向受试者施用。在一些实施例中,相同的递送模式用于递送包含mEV(例如smEV)的药物组合物和另外的治疗剂两者。在一些实施例中,使用不同递送模式以施用包含mEV(例如smEV)的药物组合物及另外的治疗剂。例如,在一些实施例中,包含mEV(例如smEV)的药物组合物经口施用,而另外的治疗剂经由注射施用(例如,静脉内、肌内和/或瘤内注射)。

[0455] 在一些实施例中,本文所述的药物组合物每天施用一次。在一些实施例中,本文所述的药物组合物每天施用两次。在一些实施例中,本文所述的药物组合物被配制成每日剂量。在一些实施例中,本文所述的药物组合物配制为每天两次剂量,其中每次剂量为每日剂量的一半。

[0456] 在某些实施例中,本文所述的药物组合物及剂型可与任一其他常规抗癌治疗(例

如放射疗法及肿瘤手术切除术)联合施用。这些治疗可在需要和/或指示时施加且可发生于施用包含本文所述的mEV(例如smEV)及剂型的药物组合物之前、同时或之后。

[0457] 剂量方案可为各种方法及量中的任一者,且可通过本领域技术人员根据已知临床因素来确定。如医学技术中已知,任一患者的剂量可取决于许多因素,包含受试者物种、大小、体表面积、年龄、性别、免疫活性及总体健康状况、有待施用的特定微生物、持续时间及施用途径、疾病种类及阶段(例如肿瘤大小)及其他化合物(例如同时或近乎同时施用的药物)。除上述因素外,这些水平可受微生物感染性及微生物性质影响,如可由本领域技术人员所测定。在本发明的方法中,微生物的适当最小剂量程度可为足够使微生物存活、生长及复制的程度。可根据剂型、施用途径、靶疾病的程度或阶段等来适当地设定或调节包含本文所述的mEV(例如smEV)的药物组合物的剂量。例如,药剂的一般有效剂量范围可为0.01mg/kg体重/天至1000mg/kg体重/天、0.1mg/kg体重/天至1000mg/kg体重/天、0.5mg/kg体重/天至500mg/kg体重/天、1mg/kg体重/天至100mg/kg体重/天或5mg/kg体重/天至50mg/kg体重/天。有效剂量可为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1000mg/kg体重/天或更高,但剂量并不限于此。

[0458] 在一些实施例中,向受试者施用的剂量足以预防疾病(例如,自身免疫病、炎性疾病、代谢性疾病或癌症)、延迟其发作或减缓或停止其进展,或减轻疾病的一个或多个症状。本领域技术人员将认识到,剂量将取决于多种因素,包含所采用特定药剂(例如治疗剂)的强度以及受试者的年龄、物种、病症及体重。还根据以下因素来确定剂量大小:施用途径、时机及频率以及可伴随施用特定治疗剂的任何不良副作用的存在、性质及程度及期望的生理学效果。

[0459] 可通过本领域技术人员已知的常规范围探测技术来确定合适的剂量及剂量方案。通常,以较小剂量开始治疗,该剂量小于化合物的最佳剂量。然后,以小增量增加剂量直至达到该状况下的最佳效果为止。有效剂量及治疗方案可通过常规及常规方式来确定,例如,其中在实验室动物中以低剂量开始且然后增加剂量,同时监测效果,且还系统地改变剂量方案。通常使用动物研究来测定每公斤重量的生物活性药剂的最大可耐受剂量("MTD")。本领域技术人员通常在其他物种(包含人)中外推剂量以达到功效,同时避免毒性。

[0460] 根据上文,在治疗应用中,与影响所选剂量的其他因素相比,用于本发明的治疗剂的剂量尤其取决于以下因素有所变化:活性剂、年龄、体重及接受患者的临床状况及施用疗法的临床医师或从业人员的经历及判断。例如,对于癌症治疗,剂量应足以导致减缓肿瘤的生长,优选地使肿瘤的生长消退,并且最优选地导致癌症的完全消退,或者转移的大小或数目的减小。作为另一个实例,剂量应足以导致减缓受试者正在治疗的疾病的进展,优选地改善受试者正在治疗的疾病的一个或多个症状。

[0461] 分开施用可包括任何数量的两次或更多次施用,包括二、三、四、五或六次施用。本领域技术人员可容易地根据本领域中已知的用于监测治疗方法的方法及本文提供的其他监测方法确定进行施用的次数或进行一或多次额外施用的期望。因此,本文提供的方法包括向受试者提供药物组合物的一或多次施用的方法,其中施用次数可通过监测受试者确定,且基于监测的结果,判定是否需提供一或多次另外施用。可基于各种监测结果决定是否需提供一或多次另外施用。

[0462] 施用间的时间段可为各个时间段中的任一者。施用间的时间段可随各种因素中的

任一者而变化，包括监测步骤(如关于施用数量所描述)、受试者建立免疫应答的时间段。在一个实例中，时间段可随受试者建立免疫应答的时间段而变化；例如，时间段可大于受试者建立免疫应答的时间段，例如大于约一周、大于约10天、大于约两周或大于约一个月；在另一个实例中，时间段可小于受试者建立免疫应答的时间段，例如小于约一周、小于约10天、小于约两周或小于约一个月。

[0463] 在一些实施例中，另外的治疗剂与本文描述的药物组合物的组合的递送减少另外的治疗剂的不良反应和/或改善另外的治疗剂的功效。

[0464] 本文所述的另外的治疗剂的有效剂量是针对特定受试者、组合物及施用模式有效达成所需治疗剂反应且对受试者的毒性最小的另外的治疗剂的量。可使用本文所述的方法来鉴别有效剂量水平且将取决于多种药物动力学因素，包含所施用特定组合物或药剂的活性、施用途径、施用时间、所采用特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所采用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗受试者的年龄、性别、体重、病症、总体健康状况及先前医学史以及医学技术中熟知的类似因素。一般而言，另外的治疗剂的有效剂量将是所述另外的治疗剂的量，其为有效产生治疗效应的最低剂量。通常这样的有效剂量将取决于上文所述的这些因素。

[0465] 另外的治疗剂的毒性是受试者在治疗期间及治疗之后经受的不利效应的程度。与另外的治疗剂毒性相关的不良事件可以包括但不限于：腹痛、酸消化不良、酸回流、过敏反应、秃发、全身性过敏反应、贫血、焦虑、食欲不振、关节痛、乏力、运动失调、氮质血症、失去平衡、骨痛、出血、血凝块、低血压、血压升高、呼吸困难、支气管炎、淤血、白血球计数降低、红血球计数降低、血小板计数降低、心脏毒性、膀胱炎、出血性膀胱炎、心律不整、心瓣膜疾病、心肌病、冠状动脉疾病、白内障、中枢神经毒性、认知障碍、意识模糊、结膜炎、便秘、咳嗽、痉挛、膀胱炎、深层静脉栓塞、脱水、抑郁、腹泻、眩晕、口干、皮肤干燥、消化不良、呼吸困难(dyspnea)、水肿、电解质不平衡、食道炎、疲乏、生育力丧失、发烧、胃肠积气、面红、胃逆流、胃食道逆流病、生殖器疼痛、粒细胞减少症、男子女乳症、青光眼、脱发、手足综合征、头痛、听觉损失、心脏衰竭、心悸、胃灼热、血肿、出血性膀胱炎、肝毒性、高淀粉酶血症、高钙血症、高氯血症、高糖血症、高钾血症、高脂血症、高镁血症、高钠血症、高磷酸盐血症、色素过多、高三酸甘油酯血症、高尿酸血症、低白蛋白血症、低钙血症、低氯血症、低血糖症、低钾血症、低镁血症、低钠血症、低磷酸盐血症、阳萎、感染、注射部位反应、失眠、缺铁、瘙痒、关节痛、肾衰竭、白细胞减少症、肝功能障碍、失忆、闭经、口疮、黏膜炎、肌肉痛、肌痛、骨髓抑制、心肌炎、嗜中性白血球减少性发烧、恶心、肾毒性、嗜中性白血球减少症、流鼻血、麻木、耳毒性、疼痛、手足综合征(palmar-plantar erythrodysesthesia)、全部血球减少症、心包炎、周边神经病变、咽炎、畏光、光敏感、肺炎(pneumonia)、局限性肺炎(pneumonitis)、蛋白尿、肺血栓、肺性纤维化、肺毒性、皮疹、心跳加快、直肠出血、坐立不安、鼻炎、癫痫、呼吸短促、鼻窦炎、血小板减少症、耳鸣、泌尿道感染、阴道出血、阴道干燥、眩晕、水滞留(water retention)、无力、体重减轻、体重增加及口干症(xerostomia)。一般而言，如果经由疗法所达到的受试者益处胜过受试者因疗法所经历的不良事件，则毒性是可接受的。

[0466] 免疫障碍

[0467] 在一些实施例中，本文所述的方法及药物组合物涉及治疗或预防与病理学免疫应答相关的疾病或障碍(如自身免疫性疾病、过敏反应和/或炎性疾病)。在一些实施例中，疾

病或障碍是炎性肠病(例如,克罗恩病或溃疡性结肠炎)。在一些实施例中,疾病或障碍是银屑病。在一些实施例中,疾病或障碍是特应性皮炎。

[0468] 本文所述的方法可用以治疗有需要的任何受试者。如本文中所使用,"有需要的受试者"包括患有与病理学免疫应答相关的疾病或障碍(例如,炎性肠病)的任何受试者,及具有增加获得此疾病或障碍的可能性的任何受试者。

[0469] 本文所述的药物组合物可(例如)用作预防或治疗(部分或完全减少以下疾病的不利影响)自身免疫性疾病,如慢性炎性肠病、系统性红斑狼疮、银屑病、穆-韦二氏综合征、类风湿性关节炎、多发性硬化或桥本病(Hashimoto's disease);过敏性疾病,如食物过敏、花粉热或哮喘;传染性疾病,如艰难梭菌感染;炎性疾病,如TNF介导的炎性疾病(例如,胃肠道炎性疾病,如结肠袋炎(pouchitis);心血管炎性疾病,如动脉粥样硬化;或炎性肺病,如慢性阻塞性肺疾病)的药物组合物;用作用于抑制器官移植中的排斥或其中可能发生组织排斥的其他情况的药物组合物;用作用于改善免疫功能的补充物、食物或饮料;或用作用于抑制免疫细胞的增殖或功能的试剂。

[0470] 在一些实施例中,本文提供的方法适用于治疗炎症。在某些实施例中,身体的任何组织及器官的炎症,包括肌肉骨骼炎症、血管炎症、神经炎症、消化系统炎症、眼部炎症、生殖系统炎症及其他炎症,如下文讨论。

[0471] 肌肉骨骼系统的免疫障碍包括但不限于那些影响骨骼关节(包括手、手腕、肘部、肩部、下巴、脊柱、颈部、臀部、膝盖、踝部及足部的关节)的病症,及影响将肌肉连接至骨头的组织(如肌腱)的病症。可用本文所述的方法及组合物治疗的这类免疫障碍的实例包括但不限于关节炎(包括,例如,骨关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、急性及慢性感染性关节炎、与痛风和假痛风相关的关节炎及幼年特发性关节炎)、肌腱炎、滑膜炎、腱鞘炎、滑囊炎、纤维组织炎(纤维肌痛)、上髁炎、肌炎及骨炎(包括,例如,佩吉特氏病(Paget's disease)、耻骨炎及囊性纤维性骨炎)。

[0472] 眼部免疫障碍是指影响眼睛的任何结构(包括眼睑)的免疫障碍。可用本文所述的方法及组合物治疗的眼部免疫障碍的实例包括但不限于睑缘炎、眼睑皮肤松垂症、结膜炎、泪腺炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎(干眼症)、巩膜炎、倒睫及葡萄膜炎。

[0473] 可用本文所述的方法及组合物治疗的神经系统免疫障碍的实例包括但不限于脑炎、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、脑膜炎、神经性肌强直、发作性睡病、多发性硬化、脊髓炎及精神分裂症。可用本文所述的方法及组合物治疗的脉管系统或淋巴系统炎症的实例包括但不限于关节硬化、关节炎、静脉炎、血管炎及淋巴管炎。

[0474] 可用本文所述的方法及药物组合物治疗的消化系统免疫障碍的实例包括但不限于胆管炎、胆囊炎、肠炎、小肠结肠炎、胃炎、肠胃炎、炎性肠病、回肠炎及直肠炎。炎性肠病包括(例如)一组相关病症的某些本领域公认的形式。已知炎性肠病的几种主要形式,这类障碍中最常见的为克罗恩病(区域性肠病,例如,非活性及活性形式)及溃疡性结肠炎(例如,非活性及活性形式)。另外,炎性肠病涵盖肠易激综合征、显微镜下结肠炎、淋巴细胞性-浆细胞性肠炎、乳糜泻、胶原性结肠炎、淋巴细胞性结肠炎及嗜酸性小肠结肠炎。IBD的其他不常见形式包括不确定性结肠炎、假膜性结肠炎(坏死性结肠炎)、缺血性炎性肠病、白塞氏病(Behcet's disease)、结节病、硬皮病、IBD相关性发育不良、与发育不良相关的肿块或病变及原发性硬化性胆管炎。

[0475] 可用本文所述的方法及药物组合物治疗的生殖系统免疫障碍的实例包括但不限于子宫颈炎、绒毛膜羊膜炎、子宫内膜炎、附睾炎、脐炎、卵巢炎、睾丸炎、输卵管炎、输卵管卵巢脓肿、尿道炎、阴道炎、外阴炎及外阴痛。

[0476] 本文所述的方法及药物组合物可用以治疗具有发炎成分的自身免疫性疾病。此病症包括但不限于全身性急性播散性秃头症、白塞氏病、恰加斯氏病(Chagas'disease)、慢性疲劳综合征、自主神经失调、脑脊髓炎、强直性脊柱炎、再生障碍性贫血、化脓性汗腺炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎、乳糜泻、克罗恩病、1型糖尿病、巨细胞动脉炎、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯病、格林-巴利综合征、桥本病、亨诺-许兰二氏紫斑症(Henoch-Schonlein purpura)、川崎病(Kawasaki's disease)、红斑狼疮、显微镜下结肠炎、显微镜下多动脉炎、混合结缔组织病、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome)、多发性硬化、重症肌无力、眼阵挛肌阵挛综合征、视神经炎、奥德氏甲状腺炎、天疱疮、结节性多动脉炎、多肌痛、类风湿性关节炎、莱特尔氏综合征(Reiter's syndrome)、休格伦氏综合征(Sjogren'ssyndrome)、颞动脉炎、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、温热自身免疫性溶血性贫血、间质性膀胱炎、莱姆病(Lyme disease)、局限性硬皮病、银屑病、结节病、硬皮病、溃疡性结肠炎及白癜风。

[0477] 本文所述的方法及药物组合物可用以治疗具有发炎成分的T细胞介导的超敏性疾病。此类病症包括但不限于接触性超敏反应、接触性皮炎(包括由于毒葛引起的接触性皮炎)、荨麻疹、皮肤过敏、呼吸道过敏(花粉热、过敏性鼻炎、屋尘螨过敏)及麸胶敏感性肠病(乳糜泻)。

[0478] 可用本发明的方法及药物组合物治疗的其他免疫障碍包括(例如)阑尾炎、皮炎、皮肌炎、心内膜炎、纤维组织炎、齿龈炎、舌炎、肝炎、化脓性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、肾炎、耳炎、胰脏炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎(peritonoitis)、咽炎、胸膜炎、局限性肺炎、前列腺增生症(prostatistis)、肾盂肾炎及口炎(stomatisi)、移植排斥(涉及如肾、肝、心脏、肺、胰脏(例如,胰岛细胞)、骨髓、角膜、小肠的器官,同种异体皮肤移植、皮肤同种移植物及心脏瓣膜异种移植、血清病及移植物抗宿主病)、急性胰脏炎、慢性胰脏炎、急性呼吸窘迫综合征、西扎利氏综合征(Sexary's syndrome)、先天性肾上腺增生、非化脓性甲状腺炎、高钙血症相关癌症、天疱疮、大疱性疱疹样皮炎、重度多形红斑、剥脱性皮炎、脂溢性皮炎、季节性或常年性过敏性鼻炎、支气管哮喘、接触性皮炎、特应性皮炎、药物超敏反应、过敏性结膜炎、角膜炎、眼带状疱疹、虹膜炎及虹膜睫状体炎、脉络膜视网膜炎、视神经炎、结节病性结节病、暴发性或散播性肺结核化学疗法、成人特发性血小板减少性紫癜、成人继发性血小板减少症、获得性(自身免疫性)溶血性贫血症、成人白血病及淋巴瘤、儿童急性白血病、局限性肠炎、自身免疫性血管炎、多发性硬化、慢性阻塞性肺疾病、实体器官移植排斥反应、败血症。优选治疗包括以下的治疗:移植排斥、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多发性硬化、1型糖尿病、哮喘、炎性肠病、系统性红斑狼疮、银屑病、慢性阻塞性肺疾病及伴随感染病症的炎症(例如,败血症)。

[0479] 代谢障碍

[0480] 在一些实施例中,本文所述的方法和药物组合物涉及治疗或预防代谢性疾病或障碍,例如II型糖尿病、糖耐量受损、胰岛素抵抗、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、高胆固醇血症、高血压、高脂蛋白血症、高脂血症、高甘油三酯血症、酮酸

中毒、低血糖、血栓性疾病、血脂异常、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或相关疾病。在一些实施例中，相关疾病是心血管疾病、动脉粥样硬化、肾脏疾病、肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、性功能障碍、皮肤病、消化不良或水肿。在一些实施例中，本文所述的方法和药物组合物涉及非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的治疗。

[0481] 本文所述的方法可用以治疗有需要的任何受试者。如本文所使用的，“有需要的受试者”包括具有代谢性疾病或障碍的任何受试者，以及具有获得这种疾病或障碍的增加的可能性的任何受试者。

[0482] 本文所述的药物组合物可用于例如预防或治疗代谢性疾病(部分或完全地减少代谢性疾病的不利影响)，所述代谢性疾病是例如II型糖尿病、糖耐量受损、胰岛素抵抗、肥胖、高血糖、高胰岛素血症、脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、高胆固醇血症、高血压、高脂蛋白血症、高脂血症、高甘油三酯血症、酮酸中毒、低血糖、血栓性疾病、血脂异常、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)或相关疾病。在一些实施例中，相关疾病是心血管疾病、动脉粥样硬化、肾脏疾病、肾病、糖尿病性神经病、糖尿病性视网膜病变、性功能障碍、皮肤病、消化不良或水肿。

[0483] 癌症

[0484] 在一些实施例中，本文所述的方法及药物组合物涉及癌症治疗。在一些实施例中，任何癌症可使用本文所述的方法治疗。可通过本文所述的方法及药物组合物治疗的癌症的实例包括但不限于来自以下的癌细胞：膀胱、血液、骨头、骨髓、脑、乳房、结肠、食道、胃肠、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫。另外，所述癌症可特定地是下列组织学类型，但其不限于这类类型：赘瘤，恶性；癌；癌，未分化；巨大及梭细胞癌；小细胞癌；乳头状癌；鳞状细胞癌；淋巴上皮癌；基底细胞癌(basal cell carcinoma)；毛发基质(pilomatrix)癌；移行细胞癌；乳头状移行细胞癌；腺癌；胃泌素瘤，恶性；胆管癌；肝细胞癌；肝细胞癌合并胆管癌；小梁腺癌；腺样囊性癌；腺瘤息肉的腺癌；腺癌，家族性结肠息肉；实体癌；类癌瘤，恶性；细支气管肺泡(branchiolo-alveolar)腺癌；乳头状腺癌；嫌色细胞癌；嗜酸性细胞癌；嗜酸性腺癌；嗜碱性粒细胞癌；透明细胞腺癌；颗粒细胞癌；滤泡性腺癌；乳头状及滤泡性腺癌；非包膜性硬化性癌；肾上腺皮质癌；子宫内膜样癌；皮肤附器癌；顶浆(apocrine)腺癌；皮脂腺癌；耵聍(ceruminous)腺癌；黏液表皮样癌；囊腺癌；乳头状囊腺癌；乳头状浆液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏液性腺癌；戒环细胞癌；浸润性管状癌；髓样癌；小叶癌；发炎癌；佩吉特氏病，乳房；腺泡细胞癌；腺鳞癌；腺癌与鳞状转移瘤(adenocarcinoma w/squamous metaplasia)；胸腺瘤，恶性；卵巢间质瘤，恶性；卵泡膜细胞瘤(thecoma)，恶性；粒层细胞瘤，恶性；及成釉细胞瘤，恶性；赛特利氏(sertoli)细胞癌；睾丸间质细胞(leydig cell)瘤，恶性；脂质细胞瘤，恶性；副神经节瘤，恶性；乳房外副神经节瘤，恶性；嗜铬细胞瘤；血管球肉瘤(glomangiosarcoma)；恶性黑色素瘤；无色素性黑色素瘤；浅表扩散黑色素瘤；巨大色素痣中的恶性黑色素瘤；上皮样细胞黑色素瘤；蓝痣，恶性；肉瘤；纤维肉瘤；纤维组织细胞瘤，恶性；黏液肉瘤；脂肉瘤(liposarcoma)；平滑肌肉瘤；横纹肌肉瘤；胚胎性横纹肌肉瘤；肺泡横纹肌肉瘤；基质肉瘤；混合瘤，恶性；苗勒氏混合瘤(mullerian mixed tumor)；肾母细胞瘤；肝母细胞瘤；癌肉瘤；间质瘤，恶性；布伦纳瘤(brenner tumor)，恶性；叶状瘤，恶性；滑膜肉瘤；间皮瘤，恶性；无性细胞瘤；胚胎性癌；畸

胎瘤，恶性；卵巢甲状腺瘤，恶性；绒毛膜癌；中肾瘤，恶性；血管肉瘤；血管内皮瘤，恶性；卡波西肉瘤(kaposi's sarcoma)；血管外皮细胞瘤，恶性；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；近皮质骨肉瘤；软骨肉瘤；软骨胚细胞瘤，恶性；间叶细胞软骨肉瘤；骨巨细胞瘤；尤因肉瘤(ewing's sarcoma)；齿源性肿瘤，恶性；釉质母细胞齿源性瘤；釉质母细胞瘤，恶性；釉质母细胞纤维肉瘤；松果体瘤，恶性；脊索瘤；神经胶质瘤，恶性；室管膜瘤；星形细胞瘤；原浆性星形细胞瘤；纤维性星形细胞瘤；星形母细胞瘤；胶质母细胞瘤；少突神经胶质瘤；少突胶质母细胞瘤；原始神经外胚叶肿瘤；小脑肉瘤；节细胞母细胞瘤；神经母细胞瘤；视网膜母细胞瘤；嗅神经源性肿瘤；脑膜瘤，恶性；神经纤维肉瘤；神经鞘瘤，恶性；颗粒细胞瘤，恶性；恶性淋巴瘤；霍奇金病(Hodgkin's Disease)；霍奇金淋巴瘤；副肉芽肿；小淋巴细胞性恶性淋巴瘤；弥漫性大细胞恶性淋巴瘤；滤泡型恶性淋巴瘤；蕈样真菌病；其他指定非霍奇金淋巴瘤；恶性组织细胞增生症；多发性骨髓瘤；肥大细胞肉瘤；免疫增殖性小肠病；白血病；淋巴样白血病；浆细胞白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；髓样白血病；嗜碱性白血病；嗜酸性粒细胞白血病；单核细胞白血病；肥大细胞白血病；巨核细胞性白血病；髓样肉瘤；及毛细胞白血病。

[0485] 在一些实施例中，本文提供的方法及药物组合物涉及白血病的治疗。术语“白血病”在广义上包括造血器官/系统的进展性、恶性疾病且其特征通常在于白血球及其前体在血液及骨髓中的异常增殖及发育。白血病疾病的非限制性实例包含急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性前骨髓细胞性白血病、成人T细胞白血病、非白血性白血病、白血球增多性白血病、嗜碱粒细胞白血病、胚细胞白血病、牛白血病、慢性骨髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚细胞性白血病、嗜酸性粒细胞性白血病、格罗斯氏白血病(Gross'leukemia)、里德尔细胞白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、干细胞白血病、亚白血病性白血病、未分化细胞白血病、毛细胞白血病、成血细胞性白血病(hemoblastic leukemia)、成血胚细胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白血球减少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴源性白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、小骨髓母细胞性白血病、单核细胞性白血病、骨髓母细胞性白血病、骨髓细胞性白血病、骨髓性粒细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、内格利白血病(Naegeli leukemia)、浆细胞白血病、浆细胞性白血病及前骨髓细胞性白血病。

[0486] 在一些实施例中，本文提供的方法及药物组合物涉及癌治疗。术语“癌”是指上皮细胞的恶性生长，这些上皮细胞往往浸润环绕组织和/或抑制生理学及非生理学细胞死亡信号并产生转移。癌的非限制性示例性类型包含腺泡癌、腺泡样癌、腺囊样癌、腺样囊性癌、腺癌(carcinoma adenomatosum)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、基底细胞癌(carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌、基底鳞状细胞癌、支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、脑状癌、胆管细胞癌、绒毛膜癌、胶状癌、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、导管癌、硬癌(carcinoma durum)、胚胎性癌、脑状癌(encephaloid carcinoma)、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外植癌、溃疡性癌、纤维癌、胶状癌(gelatiniform carcinoma)、胶样癌(gelatinous carcinoma)、巨细胞癌(giant cell carcinoma)、印戒细胞癌(signet-ring cell carcinoma)、单纯癌、

小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、梭形细胞癌、髓状癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、绳捆癌(string carcinoma)、毛细管扩张癌(carcinoma telangiectaticum)、毛细管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌、块状癌、结节性皮癌、疣状癌、绒毛状癌、巨细胞癌(carcinoma gigantocellulare)、腺体癌(glandular carcinoma)、粒层细胞癌、毛基质细胞癌(hair-matrix carcinoma)、血样癌、肝细胞癌、许特耳细胞癌(Hurthle cell carcinoma)、玻质状癌、肾上腺样癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克罗姆佩柯赫尔氏肿瘤(Krompecher's carcinoma)、库尔契茨基氏细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆样癌(carcinoma lenticulare)、脂瘤样癌、淋巴上皮癌、髓样癌、髓质癌、黑色素癌、软癌、黏液性癌(mucinous carcinoma)、黏液癌(carcinoma muciparum)、黏液细胞癌(carcinoma mucocellulare)、黏液表皮样癌、黏膜癌(carcinoma mucosum)、黏膜性癌(mucous carcinoma)、黏液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦状细胞癌、骨化性癌、骨质癌(osteoid carcinoma)、乳头状癌、门静脉周癌、浸润前癌、棘细胞癌、糜烂性癌、肾脏的肾细胞癌、储备细胞癌、肉瘤样癌、施奈德氏癌(schneiderian carcinoma)、硬性癌(scirrhous carcinoma)及阴囊癌(carcinoma scroti)。

[0487] 在一些实施例中,本文提供的方法及药物组合物涉及肉瘤的治疗。术语"肉瘤"通常是指如胚胎结缔组织等物质组成的肿瘤且通常由包埋于原纤维、异质或均质物质中的紧密堆积细胞构成。肉瘤包括但不限于软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、黏液肉瘤、骨肉瘤、子宫内膜肉瘤、基质肉瘤、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤、成纤维细胞性肉瘤、巨细胞肉瘤、艾伯内西氏肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肪肉瘤、脂肉瘤、软组织腺泡状肉瘤、釉质母细胞肉瘤、葡萄形肉瘤、绿色肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤、维尔姆斯氏肿瘤肉瘤(Wilms'tumor sarcoma)、粒细胞肉瘤、何杰金氏肉瘤(Hodgkin's sarcoma)、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤、B细胞免疫母细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞免疫母细胞肉瘤、晏森氏肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、库普弗细胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间叶瘤肉瘤、骨周肉瘤、网状细胞肉瘤、劳斯肉瘤(Rous sarcoma)、浆液囊性肉瘤、滑膜肉瘤及毛细血管扩张性肉瘤。

[0488] 可使用本文描述的方法及药物组合物治疗的另外的示例性肿瘤包括霍奇金病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺肿瘤、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰脏胰岛素瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌、浆细胞瘤、结直肠癌、直肠癌及肾上腺皮质癌。

[0489] 在一些实施例中,所治疗的癌症是黑色素瘤。术语"黑色素瘤"意指源自皮肤及其他器官的黑色素细胞系统的肿瘤。黑色素瘤的非限制性实例是哈-巴二氏黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年型黑色素瘤、恶性小痣性痣黑色素瘤、恶性黑色素瘤、肢端小痣性黑色素瘤、无黑色素性黑色素瘤、良性幼年型黑色素瘤、克劳德曼氏黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、结节性黑色素瘤甲下黑色素瘤及浅表扩展性黑色素瘤。

[0490] 在一些实施例中,癌症包括乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)。

[0491] 在一些实施例中，癌症包括结直肠癌(例如，微卫星稳定(MSS)结直肠癌)。

[0492] 在一些实施例中，癌症包括肾细胞癌。

[0493] 在一些实施例中，癌症包括肺癌(例如，非小细胞肺癌)。

[0494] 在一些实施例中，癌症包括膀胱癌。

[0495] 在一些实施例中，癌症包括胃食管癌。

[0496] 可使用本文所述的方法及药物组合物治疗的肿瘤的特定类别包括淋巴组织增生性疾病、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、骨癌、肝癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、头颈癌、中枢神经系统的癌症、外周神经系统的癌症、皮肤癌、肾癌、及所有上述的转移。特定类型的肿瘤包含肝细胞癌、肝细胞瘤、肝母细胞瘤、横纹肌肉瘤、食管癌、甲状腺癌、恶性神经节瘤、纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌内皮肉瘤、侵袭性导管癌、乳头状腺癌、黑色素瘤、肺鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌(充分分化、中等分化、分化不良或未分化)、支气管肺泡癌、肾细胞癌、肾上腺样瘤、肾上腺样腺癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、睾丸肿瘤、肺癌(包含小细胞肺癌、非小细胞肺癌及大细胞肺癌)、膀胱癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤、结肠癌、直肠癌、血液系统恶性肿瘤(包含所有类型的白血病及淋巴瘤，包含：急性髓性白血病、急性髓细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、肥大细胞白血病、多发性骨髓瘤、髓样淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、浆细胞瘤、结直肠癌及直肠癌。

[0497] 某些实施例中所治疗的癌症还包含癌症前期病灶，例如光化性角化病(日旋光性角化病)、莫耳痣(发育异常痣)、光化性唇炎(农夫唇)、皮角、巴瑞特氏食管症(Barrett's esophagus)、萎缩性胃炎、先天性角化不良、缺铁性咽下困难、扁平苔藓、口腔黏膜下纤维化、光化性(日旋光性)弹性组织变性及子宫颈发育不良。

[0498] 一些实施例中所治疗的癌症包含非癌性或良性肿瘤，例如内胚层、外胚层或间质起源的肿瘤，包括但不限于胆管瘤、结肠息肉、腺瘤、乳头瘤、囊腺瘤、肝细胞腺瘤、葡萄胎、肾小管腺瘤、鳞状细胞乳头瘤、胃息肉、血管瘤、骨瘤、软骨瘤、脂肪瘤、纤维瘤、淋巴管瘤、平滑肌瘤、横纹肌瘤、星形细胞瘤、痣、脑膜瘤及神经节瘤。

[0499] 其他疾病及障碍

[0500] 在一些实施例中，本文描述的方法及药物组合物涉及肝疾病的治疗。此疾病包括(但不限于)阿拉吉尔综合征(Alagille Syndrome)、酒精相关肝病、α-1抗胰蛋白酶缺乏症、自体免疫性肝炎、良性肝肿瘤、胆管闭锁、肝硬化、半乳糖血症、吉尔伯特综合征、血色素沉着病、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝性脑病、妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)、溶酶体酸脂肪酶缺乏症(LAL-D)、肝囊肿、肝癌、新生儿黄疸、原发性胆汁性胆管炎(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)、雷氏综合征(Reye Syndrome)、I型糖原贮积病及威尔森病(Wilson Disease)。

[0501] 本文所述的方法及药物组合物可用以治疗神经退化性及神经性疾病。在某些实施例中，神经退化性和/或神经性疾病是帕金森病、阿尔兹海默症、普里昂疾病、亨廷顿病、运动神经元疾病(MND)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩症、肌张力障碍、特发性颅内高压、癫痫、神经系统疾病、中枢神经系统疾病、运动障碍、多发性硬化、脑病、周围神经病变或术后认知功能障碍。

[0502] 菌群失调

[0503] 肠道微生物组(也称为“肠道微生物群”)可通过微生物对宿主的免疫细胞和其它细胞的活性以及影响(局部和/或远端)对个体健康产生显著影响(Walker,W.A.,Dysbiosis[菌群失调].The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology[胃肠道病理生理学中的微生物.]第二十五章.2017;Weiss和Thierry,Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis[肠道菌群失调的机制和后果].Cellular and Molecular Life Sciences[细胞与分子生命科学].(2017)74(16):2959-2977.Zurich Open Repository and Archive[苏黎世开放存储库和档案馆],doi:https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x))。

[0504] 健康的宿主肠道微生物组稳态有时被称为“生态平衡”或“正常微生物”,而宿主微生物组的组成和/或其多样性的有害变化可能导致微生物组的不健康失衡,或“菌群失调”(Hooks和O'Malley.Dysbiosis and its discontents[菌群失调及其不满].American Society for Microbiology[美国微生物学会].2017年10月.第8卷.第5期.mBio 8:e01492-17.https://doi.org/10.1128/mBio.01492-17)。当微生物组稳态丧失或减弱时,可能会发生菌群失调以及相关的局部或远端宿主发炎或免疫效应,从而导致:对病原体的敏感性增加;宿主细菌代谢活性改变;诱导宿主促炎活性和/或降低宿主抗炎活性。此类效应部分地由宿主免疫细胞(例如,T细胞、树突细胞、肥大细胞、NK细胞、肠上皮淋巴细胞(IEC)、巨噬细胞和吞噬细胞)和细胞因子,以及由此类细胞和其它宿主细胞释放的其他物质之间的相互作用介导。

[0505] 菌群失调可能发生在胃肠道内(“胃肠道菌群失调”或“肠道菌群失调”),或者可能发生在胃肠道内腔外(“远端菌群失调”)。胃肠菌群失调通常与肠上皮屏障完整性降低、紧密连接完整性降低和肠通透性增加有关。Citi,S.Intestinal Barriers protect against disease[肠屏障可预防疾病],Science[科学]359:1098-99(2018);Srinivasan等人.,TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems[用于体外屏障模型系统的TEER测量技术].J.Lab.Autom.[实验室自动化杂志]20:107-126(2015)。胃肠道菌群失调可以在胃肠道内外产生生理和免疫作用。

[0506] 菌群失调的存在可与多种疾病和病症相关,包括:感染,癌症,自身免疫性疾病(例如系统性红斑狼疮(SLE))或炎性疾病(例如功能性胃肠疾病如炎症性肠病(IBD),溃疡性结肠炎和克罗恩病),神经炎性疾病(例如多发性硬化症),移植性疾病(例如移植物抗宿主病),脂肪性肝病,I型糖尿病,类风湿性关节炎,干燥综合征,乳糜泻,囊性纤维化,慢性阻塞性肺疾病(COPD)和其他与免疫功能障碍相关的疾病和条件。Lynch等人,The Human Microbiome in Health and Disease[健康与疾病中的人微生物组],N.Engl.J.Med.375:2369-79(2016),Carding等人,Dysbiosis of the gut microbiota in disease[疾病中肠道微生物的菌群失调].Microb.Ecol.Health Dis.[微生物生态与健康疾病](2015);26:10:3402/mehd.v26.2619;Levy等人,Dysbiosis and the Immune System[菌群失调和免疫系统],Nature Reviews Immunology[自然评论免疫学]17:219(2017年4月)。

[0507] 在某些实施例中,本文所公开的示例性药物组合物可以通过修饰存在于菌群失调部位的免疫活性来治疗菌群失调及其影响。如本文所述,此类组合物可通过对宿主免疫细胞的作用(导致例如抗炎细胞因子的分泌增加和/或促炎细胞因子的分泌减少,从而减轻受

试接受者的炎症)或通过代谢产物生产的变化来修饰菌群失调。

[0508] 本文公开的可用于治疗与菌群失调相关的障碍的示例性药物组合物包含一种或多种类型的衍生自免疫调节细菌(例如抗炎细菌)的mEV(微生物胞外囊泡)。这样的组合物能够影响接受者宿主在胃肠道中的免疫功能,和/或在受试者胃肠道外的远端部位产生全身性效应。

[0509] 本文公开的可用于治疗与菌群失调相关的失调症的示例性药物组合物包含单一细菌物种(例如,单一菌株)的免疫调节细菌(例如,抗炎细菌)的群体和/或衍生自单一细菌物种(例如,单一菌株)的免疫调节细菌(例如,抗炎细菌)的mEV群体。这样的组合物能够影响接受者宿主在胃肠道中的免疫功能,和/或在受试者胃肠道外的远端部位产生全身性效应。

[0510] 在一个实施例中,将包含经分离的衍生自免疫调节细菌(例如抗炎细菌细胞)的mEV群体的药物组合物以有效治疗哺乳动物接受者的菌群失调和其一种或多种影响的量施用(例如口服)给该接受者。该菌群失调可以是胃肠道菌群失调或远端菌群失调。

[0511] 在另一个实施例中,本发明的药物组合物可以治疗胃肠道菌群失调及其对宿主免疫细胞的一种或多种影响,导致抗炎细胞因子的分泌增加和/或促炎细胞因子的分泌减少,从而减轻受试接受者的炎症。

[0512] 在另一个实施例中,药物组合物可以通过以下来治疗胃肠道菌群失调及其一种或多种影响:经由细胞和细胞因子调节来调节接受者的免疫应答,以通过增加肠上皮屏障的完整性来降低肠道通透性。

[0513] 在另一个实施例中,药物组合物可以通过以下来治疗远端菌群失调及其一种或多种影响:经由调节宿主免疫细胞来调节菌群失调部位的接受者免疫应答。

[0514] 其他示例性药物组合物可用于治疗与菌群失调有关的失调症,这些组合物包含一种或多种类型的细菌或mEV,这些细菌或mEV能够改变接受者中的宿主免疫细胞亚群(例如T细胞、免疫淋巴样细胞、树突细胞、NK细胞和其他免疫细胞的亚群)相对比例或其功能。

[0515] 其他示例性药物组合物可用于治疗与菌群失调有关的障碍,这些组合物包含单一免疫调节细菌(例如抗炎细菌细胞)物种(例如单一菌株)的mEV群体,其能够改变接受者中免疫细胞亚群(例如T细胞亚群、免疫淋巴样细胞、NK细胞和其他免疫细胞)的相对比例或其功能。

[0516] 在一个实施例中,本发明提供了通过以下来治疗胃肠道菌群失调及其一种或多种影响的方法:向有需要的受试者口服施用药物组合物,该药物组合物改变存在于菌群失调部位的微生物组群体。药物组合物可包含一种或多种类型的来自免疫调节细菌的mEV或单一免疫调节细菌物种(例如抗炎细菌细胞)(例如单一菌株)的mEV群体。

[0517] 在一个实施例中,本发明提供了通过以下来治疗远端菌群失调及其一种或多种影响的方法:向有需要的受试者口服施用药物组合物,该药物组合物改变受试者的胃肠道外的免疫应答。药物组合物可包含一种或多种类型的来自免疫调节细菌(例如,抗炎细菌细胞)的mEV或单一免疫调节细菌(例如抗炎细菌细胞)物种(例如单一菌株)的mEV群体。

[0518] 在示例性实施例中,可用于治疗与菌群失调有关的失调症的药物组合物刺激宿主免疫细胞分泌一种或多种抗炎细胞因子。抗炎细胞因子包括但不限于IL-10、IL-13、IL-9、IL-4、IL-5、TGFβ及其组合。在其他示例性实施例中,可用于治疗与菌群失调有关的失调症

的药物组合物减少(例如抑制)宿主免疫细胞分泌一种或多种促炎细胞因子。促炎细胞因子包括但不限于IFNγ、IL-12p70、IL-1α、IL-6、IL-8、MCP1、MIP1α、MIP1β、TNFα及其组合。其他示例性细胞因子是本领域已知的并且在本文中描述。

[0519] 另一方面,本发明提供了在有需要的受试者中治疗或预防与菌群失调有关的障碍的方法,所述方法包括向受试者施用(例如口服施用)益生菌食品或医疗食品形式的治疗组合物,所述治疗组合物包含的细菌或mEV的数量足以改变菌群失调部位的微生物组,从而治疗与菌群失调有关的障碍。

[0520] 在另一个实施例中,益生菌食品或医疗食品形式的本发明的治疗组合物可用于预防或延迟处于发展为菌群失调风险的受试者中菌群失调的发作。

[0521] 制造增强的细菌的方法

[0522] 在某些方面中,本文提供制造用于产生本文描述的mEV(例如smEV)的工程改造的细菌的方法。在一些实施例中,这些工程改造的细菌经修饰以增强某些所需性质。例如,在一些实施例中,对工程改造的细菌进行修饰以增强mEV(例如smEV)的免疫调节作用和/或治疗作用(例如,单独或与另一种治疗剂组合),以降低毒性和/或改善细菌和/或细菌和/或mEV(例如smEV)制造(例如更高的耐氧性,更高的抗冻融性,更短的产生时间)。工程改造的细菌可使用本领域中已知的任何技术产生,包括(但不限于)定点诱变、转座子诱变、敲除、敲入、聚合酶链反应诱变、化学诱变、紫外线诱变、转形(化学或通过电穿孔)、噬菌体转导、定向演化、CRISPR/Cas9或其任何组合。

[0523] 在本文提供的方法的一些实施例中,细菌通过定向演化进行修饰。在一些实施例中,该定向演化包含将细菌暴露于环境条件并选择在环境条件下具有经改善的存活和/或生长的细菌。在一些实施例中,所述方法包括使用识别增强的细菌的分析筛选诱变细菌。在一些实施例中,所述方法还包括诱变细菌(例如,通过暴露于化学诱变剂和/或UV辐射),或将它们暴露于治疗剂(例如抗生素),接着进行分析以检测具有所需表型的细菌(例如,体内分析、离体分析或体外分析)。

[0524] 实例

[0525] 实例1:从细菌中纯化和制备膜以获得经加工的微生物胞外囊泡(pmEV)

[0526] 纯化

[0527] 使用本领域技术人员已知的方法从细菌培养物(例如表1、表2和/或表3中列出的细菌)中纯化和制备经加工的微生物胞外囊泡(pmEV)(Thein等人,2010.Efficient subfractionation of gram-negative bacteria for proteomics studies.[用于蛋白质组学研究的革兰氏阴性菌的高效亚分级]J.Proteome Res.[蛋白质组研究杂志]2010年12月3日;9(12):6135-47.Doi:10.1021/pr1002438.2010年10月28日电子公布;Sandrini等人2014.Fractionation by Ultracentrifugation of Gram negative cytoplasmic and membrane proteins.[用超速离心法分级革兰氏阴性细胞质和膜蛋白]Bio-Protocol.[生物方案]卷4(21)Doi:10.21769/BioProtoc.1287)。

[0528] 可替代地,pmEV可以通过Thein等人的方法进行纯化。例如,细菌培养物在10,000-15,500x g下在室温或4℃下离心10-30分钟。丢弃上清液,并将细胞沉淀物在-80℃冷冻。细胞沉淀物在冰上解冻并在pH 7.5的100mM Tris-HCl中重新悬浮,并且可以补充1mg/mL DNA酶I和/或100mM NaCl。将解冻的细胞在500ug/ml溶菌酶、40ug/ml溶葡萄球菌素

(lyostaphin)和/或1mg/ml DNA酶I中孵育40分钟以促进细胞裂解。可以使用其他酶来促进裂解过程(例如,EDTA(5mM),PMSF(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich))和/或苯甲脒(西格玛奥德里奇公司)。然后在制造商建议的条件下使用Emulsiflex C-3(奥维斯丁公司(Avestin,Inc.))裂解细胞。另外,也可以在-80℃冷冻沉淀物并在裂解之前再次解冻。碎片和未裂解细胞在4℃下以10,000-12,500x g离心15分钟沉淀。然后将上清液在4℃下以120,000x g离心1小时。将沉淀物重新悬浮在冰冷的100mM碳酸钠,pH 11中,在4℃下搅拌孵育1小时。可替代地,将沉淀物在再悬浮后立即在碳酸钠中以120,000x g在4℃离心1小时。将沉淀物重新悬浮在补充有100mM NaCl的pH 7.5的100mM Tris-HCl中,在4℃下以120,000x g再离心20分钟,然后重新悬浮在补充有多达或约100mM NaCl的pH 7.5的100mM Tris-HCl或重新悬浮在PBS中。样品储存在-20℃。为了在冷冻/解冻步骤期间保护pmEV制剂,可向最终制剂中添加250mM蔗糖和多达500mM NaCl以稳定pmEV制剂中的囊泡。

[0529] 可替代地,pmEV是通过改编自Sandrini等人(2014年)的方法获得的。然后,细菌培养物在室温或4℃下以10,000-15,500x g离心10-15分钟,细胞沉淀物在-80℃冷冻,并且弃去上清液。然后,将细胞沉淀物在冰上解冻,并重悬于10mM Tris-HCl(pH 8.0)、补充有0.1mg/mL溶菌酶的1mM EDTA中。然后将样品在室温或37℃下混合孵育30分钟。在一个任选步骤中,将样品在-80℃下重新冷冻,然后再次在冰上解冻。添加DNA酶I至终浓度为1.6mg/mL,并添加MgCl2至终浓度为100mM。使用QSonica Q500超声仪以30秒开启和30秒关闭的7个循环对样品进行超声处理。通过在4℃下以10,000x g离心15分钟来沉淀碎片和未裂解的细胞。然后将上清液在4℃下以110,000x g离心15分钟。将沉淀物重新悬浮在10mM Tris-HCl(pH 8.0)中,并在室温下混合孵育30-60分钟。将样品在4℃下以110,000x g离心15分钟。将沉淀物重悬于PBS中并储存在-20℃。

[0530] 任选地,pmEV可以使用本领域已知的方法与其他细菌组分和碎片分离。尺寸排阻色谱法(FPLC)或快速蛋白液相色谱法可用于pmEV纯化。可以使用的其他分离方法包括场流分级、微流过滤、无接触分选和/或免疫亲和富集色谱。可替代地,高分辨率密度梯度分级可用于基于密度分离pmEV颗粒。

[0531] 制备

[0532] 细菌培养物在10,000-15,500x g下在室温或4℃下离心10-30分钟。弃去上清液,并且将细胞沉淀物在-80℃冷冻。将细胞沉淀物在冰上解冻并在以下中重新悬浮:100mM Tris-HCl(pH7.5)、100mM NaCl、500ug/ml溶菌酶和/或40ug/ml溶葡萄球菌素(以促进细胞裂解);多达0.5mg/ml DNA酶I(以减小基因组DNA大小)、EDTA(5mM)、PMSF(1mM,西格玛奥德里奇公司)和苯甲脒(1mM,西格玛奥德里奇公司)(以抑制蛋白酶)。然后在制造商建议的条件下使用Emulsiflex C-3(奥维斯丁公司(Avestin,Inc.))裂解细胞。另外,也可以在-80℃冷冻沉淀物并在裂解之前再次解冻。碎片和未裂解物通过以10,000-12,500x g在4℃下离心15分钟沉淀。使用FPLC仪器(AKTA Pure 150,通用健康医疗集团(GE Healthcare))(其中使用PBS和补充有多达0.3M NaCl的运行缓冲液)对上清液进行尺寸排阻层析(Sepharose 4FF,通用健康医疗集团)。将纯pmEV收集到柱空隙体积中,浓缩并保存在-20℃。浓缩可以通过多种方法进行。例如,可以使用超离心(140l x g,1小时,4℃,然后在小体积PBS中再悬浮)。为了在冷冻-解冻步骤期间保护pmEV制剂,可向最终制剂中添加250mM蔗糖和多达500mM NaCl以稳定pmEV制剂中的囊泡。可以使用的其他分离方法包括场流分级、微流过滤、

无接触分选和/或免疫亲和富集色谱。使用本领域已知的方法可以采用的其他技术包括鞭打膜蒸发(Whipped Film Evaporation)、分子蒸馏、短程蒸馏和/或切向流过滤。

[0533] 在某些情况下,对pmEV进行称重,并以不同的剂量(以ug/ml)施用。任选地,使用本领域已知的方法,使用纳米颗粒跟踪分析(NTA)来评估pmEV的颗粒计数和尺寸分布。例如,Malvern NS300仪器可以根据制造商的说明或如Bachurski等人2019.Journal of Extracellular Vesicles.[胞外囊泡杂志]卷8(1)所描述的那样使用。可替代地,对于pmEV,可以使用Bio-rad测定法(Cat#5000205)测量总蛋白(按照制造商的说明执行)并基于蛋白含量/剂量以不同剂量施用。

[0534] 对于以下所述的所有研究,pmEV可以在施用之前被照射、加热和/或冻干(如实例49所述)。

[0535] 实例2:结直肠癌模型

[0536] 为了研究pmEV在肿瘤模型中的功效,可以根据本领域已知的啮齿动物肿瘤模型使用许多癌细胞系中的一种。

[0537] 例如,从泰康利公司(Taconic)(日耳曼敦(Germantown),纽约州))或其他供应商获得雌性6-8周龄Balb/c小鼠。将100,000个CT-26结直肠肿瘤细胞(ATCC CRL-2638)重新悬浮于无菌PBS中并在50%基质胶(Matrigel)存在下接种。将CT-26肿瘤细胞经皮下注射至每只小鼠的一个后侧腹中。当肿瘤体积达到平均100mm^3时(肿瘤细胞接种后约10-12天),将动物分配到各种治疗组(例如,媒剂;韦荣氏球菌属pmEV,双歧杆菌属pmEV,具有或不具有抗PD-1抗体)。起始自第1天,每隔四天将抗体以200μg/小鼠(最终体积为100μl)通过腹膜内(i.p.)施用一次,共3次(Q4D x 3),并且pmEV口服或静脉内并且以不同剂量和时间施用。例如,起始自第1天,每隔三天将pmEV(5μg)静脉内(i.v.)注射一次,共4次(Q3D x 4),并对小鼠进行肿瘤生长评估。

[0538] 可替代地,在肿瘤体积平均达到100mm^3时(在肿瘤细胞接种后大约10-12天),将动物分配至下列各组中:1)媒剂;2)分离自Bexsero®疫苗的脑膜炎奈瑟菌pmEV;及3)抗PD-1抗体。起始自第1天,每隔四天,以200ug/小鼠(100ul最终体积)腹膜内(i.p.)施用抗体,及起始自第1天直至研究结束,腹膜内(i.p.)每天施用脑膜炎奈瑟菌pmEV。

[0539] 在肿瘤体积平均达到100mm^3时(在肿瘤细胞接种后大约10-12天),将动物分配至下列各组中:1)媒剂;2)抗PD-1抗体;3)pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种(7.0e+10颗粒计数);4)pmEV丁酸厌氧棒杆菌(7.0e+10颗粒计数);5)pmEV酿脓链球菌(3.0e+10颗粒计数);6)pmEV解苯副梭菌(3.0e+10颗粒计数);7)pmEV Hungatella属物种(7.0e+10颗粒计数);8)pmEV金黄色葡萄球菌(7.0e+10颗粒计数);和9)pmEV活泼瘤胃球菌(7.0e+10颗粒计数)。起始自第1天,每隔四天,以200μg/小鼠(100μl最终体积)腹膜内(i.p.)施用抗体,并且起始自第1天直至研究结束,静脉内(i.v.)每天注射pmEV并测量肿瘤生长。在第11天,所有pmEV组显示肿瘤生长抑制(图1-7)。pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种(图1)、pmEV丁酸厌氧棒杆菌(图2)、pmEV酿脓链球菌(图3)、pmEV解苯副梭菌(图4)和pmEV Hungatella属物种(图5)组均显示出与抗PD-1组相当的肿瘤生长抑制,而pmEV金黄色葡萄球菌和pmEV活泼瘤胃球菌组显示出比抗PD-1组更好的肿瘤生长抑制(图6和7)。在一项类似的剂量-应答研究中,pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种的最高剂量显示出最大的功效,尽管pmEV马赛巨型球菌在较低剂量下显示出显著的功效(图8)。针对治疗组相比于媒剂组进行韦尔奇(Welch)检验。

[0540] 另一项研究显示,pmEV早于第11天有显著功效。pmEV活泼瘤胃球菌7.0E+10(图9和图10)、pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种2.0E+11(图11和图12)和pmEV狄氏副拟杆菌组7.0E+10(图13和图14)早在第9天就显示出功效。

[0541] 实例3:施用pmEV组合物治疗小鼠肿瘤模型

[0542] 如实例2所述,癌症的小鼠模型是通过皮下注射肿瘤细胞系或患者衍生的肿瘤样品并容许将其移植至健康小鼠内而产生。本文提供的方法可以使用几种不同的肿瘤细胞系中的一种进行,所述肿瘤细胞系包括但不限于:B16-F10或B16-F10-SIY细胞(作为黑色素瘤的原位模型)、Panc02细胞(作为胰腺癌的原位模型)(Maletzki等人,2008,Gut[肠道]57:483-491)、LLC1细胞(作为肺癌的原位模型)、以及RM-1(作为前列腺癌的原位模型)。作为实例,而非限制,本文深入提供了用于研究B16-F10模型中pmEV的功效的方法。

[0543] 使用具有极高转移频率的自发性黑色素瘤的同基因小鼠模型以测试细菌减少肿瘤生长及转移的扩散的能力。经选择用于此分析的pmEV可以是显示增强活化免疫细胞亚群并刺激增强杀死体外肿瘤细胞的组合物。小鼠黑色素瘤细胞系B16-F10获得自ATCC。将细胞作为单层在37℃及5%CO2/空气的气氛下体外培养于RPMI培养基中,该RPMI培养基用10%热灭活的胎牛血清及1%青霉素/链霉素补充。指数生长的肿瘤细胞是通过胰蛋白酶化获取,用冷1x PBS清洗三次,并制备5E6个细胞/ml的悬浮液用于施用。此实验使用雌性C57BL/6小鼠。这些小鼠是6至8周龄且重约16至20g。就肿瘤发展而言,于各小鼠的胁腹内皮下注射100μl的B16-F10细胞悬浮液。这些小鼠是在细胞移植之前通过克他命(ketamine)及甲苯噻嗪麻醉。实验中使用的动物可经由自第2天至第5天滴注卡那霉素(0.4mg/ml)、庆大霉素(0.035mg/ml)、黏菌素(850U/ml)、甲硝唑(0.215mg/ml)及万古霉素(0.045mg/ml)于饮用水中的混合物,并在肿瘤注射后第7天腹膜内注射克林霉素(10mg/kg)而开始抗生素治疗。

[0544] 原发性胁腹肿瘤的尺寸是用卡尺每隔2至3天量测及肿瘤体积是使用下式计算:肿瘤体积=肿瘤宽度×肿瘤长度×0.5。在原发性肿瘤达到约100mm3后,基于动物的体重将它们分选成数组。然后,自各组随机挑选小鼠并分配至治疗组。如前所述制备pmEV组合物。用大约7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒强饲给小鼠口服接种。可替代地,静脉内施用pmEV。每天、每周、每两周、每月、每两个月或在整个治疗周期的任何其他给药时间表小鼠接受pmEV。小鼠可以经IV于尾静脉中注射pmEV或直接注射于肿瘤内。小鼠可以注射pmEV(具有或不具有活细菌,具有或不具有灭活/减弱或被杀死的细菌)。小鼠可每周或每月一次注射或经口强饲。小鼠可接受纯化的pmEV及活细菌的组合以最大化肿瘤杀死潜力。所有小鼠是在无特定病原体的条件下遵循经批准的方案饲养。每隔3至4天监测肿瘤尺寸、小鼠体重及体温并在B16-F10小鼠黑色素瘤细胞注射后6周内或当原发性肿瘤体积达到1000mm3时人道处死这些小鼠。每周抽血并在方案终止时在无菌条件下进行完全尸检。

[0545] 可在小鼠B16-F10黑色素瘤模型中轻易地观测到癌细胞,因为其产生黑色素。遵循标准方案,收集来自淋巴结的组织样品及来自颈部及胸部区域的器官且使用下列分类规则分析微转移及巨转移的存在。若在每个淋巴结或器官中发现至少两个微转移及一个巨转移病变,则将器官归类为转移阳性。微转移是通过用苏木精-曙红遵循本领域技术人员已知的标准方案染色石蜡包埋的淋巴组织切片进行检测。转移的总数量是与原发性肿瘤的体积相关且发现肿瘤体积与肿瘤生长时间及淋巴结及内脏器官中巨转移及微转移的数量及亦与所有可见转移的总数显著相关。如先前所述鉴别出二十五个不同转移部位(Bobek V.等人,

Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma[表达绿色荧光蛋白的Lewis肺癌的同基因淋巴结靶向模型],Clin.Exp.Metastasis[临床与实验转移],2004;21(8):705-8)。

[0546] 进一步分析肿瘤组织样品的肿瘤浸润性淋巴细胞。可通过FACS分离CD8+细胞毒性T细胞,且可随后使用定制p/MHC I类微数组对这些细胞进行进一步分析以展现其抗原特异性(参见例如,Deviren G.等人,Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays[在p/MHC微阵列上检测抗原特异性T细胞],J.Mol.Recognit.[分子识别杂志],2007年1月至2月;20(1):32-8)。CD4+T细胞可使用定制p/MHC II类微阵列进行分析。

[0547] 在各种时间点下,将小鼠处死且可移除肿瘤、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体流式细胞术分析。例如,使用Miltenyi肿瘤解离酶混合剂根据制造商说明书来解离肿瘤。记录肿瘤重量且将肿瘤短切,然后置于含有酶混合剂的15ml管中并置于冰上。然后将样品置于37℃轻微振荡器上保持45分钟并使用最多15ml完整RPMI骤冷。经由70μm过滤器将每一细胞悬浮液过滤至50ml falcon管中并在1000rpm下离心10分钟。将细胞重新悬浮于FACS缓冲液中并洗涤以去除剩余碎片。视需要,经由第二70μm过滤器将样品再次过滤至新管中。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志包含pan-免疫细胞标志CD45、T细胞标志(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rorγt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/骨髓性标志(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或在离体获得的经纯化的CD45+肿瘤-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对肿瘤切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0548] 对多发性肺黑色素瘤转移的小鼠模型亦进行相同实验。小鼠黑色素瘤细胞系B16-BL6获得自ATCC且细胞是如上文描述体外培养。此实验使用雌性C57BL/6小鼠。这些小鼠是6至8周龄且重约16至20g。就肿瘤发展而言,将100μl的2E6个细胞/ml B16-BL6细胞悬浮液注射于各小鼠的尾静脉中。IV注射后植入的肿瘤细胞最终进入肺中。

[0549] 9天后将小鼠人道杀死。将肺称重并分析肺表面上的肺结节的存在。经提取的肺是用费可特溶液(Fekete's solution)漂白,该溶液因为B16细胞中的黑色素而不漂白肿瘤结节,虽然一小部分结节是无黑色素的(即,白色)。仔细计数肿瘤结节的数量以确定小鼠中的肿瘤负荷。通常,在对照组小鼠(即,PBS强饲)的肺上发现200至250个肺结节。

[0550] 针对三个治疗组计算肿瘤负荷百分比。将肿瘤负荷百分比定义为属于治疗组的小鼠的肺表面上的肺结节的平均数量除以对照组小鼠的肺表面上的肺结节的平均数量。

[0551] 通过LCMS技术或本领域已知的其他方法提交肿瘤活检和血液样品用于代谢分析。测试组之间的氨基酸、糖、乳酸盐及其他代谢物的不同浓度证实微生物组合物破坏肿瘤代谢状态的能力。

[0552] RNA测序以确定作用机制

[0553] 树突细胞纯化自肿瘤、伊尔氏斑(Peyers patch)及肠系膜淋巴结。进行RNAseq分

析并根据本领域技术人员已知的标准技术进行分析(Z.Hou.Scientific Reports.[科技报告]5(9570):doi:10.1038/srep09570(2015))。在该分析中,特别关注先天性发炎通路基因,它们包括TLR、CLR、NLR及STING、细胞因子、趋化因子、抗原处理及呈递通路、交叉呈递及T细胞共刺激。

[0554] 一些小鼠可未处死,而是使用注射至对侧的侧腹(或其他区域)中的肿瘤细胞再攻击以测定免疫系统的记忆反应对肿瘤生长的影响。

[0555] 实例4:施用pmEV与PD-1或PD-L1抑制的组合以治疗小鼠肿瘤模型

[0556] 为了确定pmEV与PD-1或PD-L1抑制组合在肿瘤小鼠模型中的功效,可以如上所述使用小鼠肿瘤模型。

[0557] 针对小鼠肿瘤模型中单独或与完整细菌细胞组合的pmEV且在存在或不存在抗PD-1或抗PD-L1下的功效对其进行测试。在不同时间点且以不同剂量施用pmEV、细菌细胞和/或抗PD-1或抗PD-L1。例如,在肿瘤注射之后第10天或肿瘤体积达至100mm^3之后,用单独或与抗PD-1或抗PD-L1组合的pmEV处理小鼠。

[0558] 小鼠可以口服、静脉内或瘤内施用pmEV。例如,一些小鼠静脉内注射7.0e+09至3.0e+12之间的pmEV颗粒。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0559] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^4至5x10^9个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。一些组的小鼠亦可注射有效剂量的检查点抑制剂。例如,小鼠接受于100μl PBS中的100μg抗PD-L1 mAB(克隆10f.9g2,欣博盛公司(BioXCell))或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB,及一些小鼠接受媒剂和/或其他适当的对照(例如,对照抗体)。在初始注射后的第3、6及9天,对小鼠注射mAB。为评估检查点抑制及pmEV免疫疗法是否具有额外的抗肿瘤效应,将接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB的对照小鼠计入标准对照组。评估原发性(肿瘤尺寸)及继发性(肿瘤浸润性淋巴细胞及细胞因子分析)端点,及一些组的小鼠可以是经后续肿瘤细胞接种再激发以评估治疗对记忆反应的影响。

[0560] 实例5:迟发型超敏反应(DTH)的小鼠模型中的pmEV

[0561] 迟发型超敏反应(DTH)为异位性皮肤炎(或过敏性接触性皮炎)的动物模式,如Petersen等人综述(In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery.[银屑病和特应性皮炎的体内药理疾病模型在药物开发中的应用]Basic&Clinical Pharm&Toxicology.[基础临床药理学和毒理学]2006.99(2):104-115;还参见Irving C.Allen(编)Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型:方法和实验室手册],Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],2013.,第1031卷,DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13)。已使用DTH模型的几种变化且它们为本领域中熟知(Irving C.Allen(编).Mouse

models of Innate Immunity:Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型:方法和实验室手册],Methods in Molecular Biology.[分子生物学方法],第1031卷,DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13,Springer Science+Business Media,LLC[施普林格科学与商业媒体公司]2013)。

[0562] DTH可使用各种半抗原或抗原(例如,用佐剂乳化的抗原)在各种小鼠及大鼠品系中诱导。DTH的特征在于敏化作用及抗原特异性T细胞介导的反应,其导致红斑、浮肿及细胞浸润®尤其抗原呈现细胞(APC)、嗜酸性粒细胞、经活化的CD4+T细胞及表达细胞因子的Th2细胞的浸润。

[0563] 通常,小鼠是用在佐剂(例如,完全弗氏佐剂)的情况下施用的抗原诱发以诱导通过肿胀及抗原特异性抗体滴度衡量的继发(或记忆)免疫应答。

[0564] 地塞米松(皮质类固醇)是已知抗炎剂,其改善小鼠中的DTH反应,并充当阳性对照用于在此模型中抑制炎症(Taube及Carlsten,Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice.[地塞米松在抑制SCID小鼠迟发型超敏反应中的作用]Inflamm Res.[炎症研究]2000.49(10):548-52)。就阳性对照组而言,在第0天通过将6.8mg地塞米松稀释于400μL 96%乙醇中制备17mg/mL地塞米松的储备溶液。就给药的每天而言,通过将储备溶液100x稀释于无菌PBS中以在隔膜小瓶中获得0.17mg/mL的最终浓度制备用于腹膜内给药的工作溶液。经地塞米松治疗的小鼠i.p.接受100μL地塞米松(5mL/kg的0.17mg/mL溶液)。冷冻蔗糖充当阴性对照(媒剂)。在下面描述的研究中,每天给予媒剂、地塞米松(阳性对照)和pmEV。

[0565] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在DTH的小鼠模型中的效力。例如,6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自泰康利公司(日耳曼敦,纽约州)或其他供货商。对各组小鼠背部四个位置(上方及下方)四次皮下(s.c.)注射有效剂量(例如每个位置50ul总体积)的抗原(例如,卵白蛋白(OVA)或匙孔血蓝蛋白(KLH))。就DTH应答而言,在克他命/甲苯噻嗪麻醉下(分别约50mg/kg及5mg/kg),对动物耳朵进行皮内(i.d.)注射。一些小鼠充当对照动物。第8天,一些组的小鼠以每只耳朵10ul(左耳媒剂对照(0.01%DMSO于生理盐水中)及右耳抗原(21.2ug(12nmol))激发。为量测耳炎,使用Mitutoyo千分尺量测人工限制的动物的耳厚度。耳厚度是在皮内激发之前作为各个别动物的基线水平进行量测。接着,耳厚度是在皮内激发后,在约24小时及48小时(即,第9天及第10天)时量测两次。

[0566] pmEV治疗是在一些时间点(在引发的时间附近或在DTH激发的时间附近)下开始。例如,pmEV可在皮下注射(第0天)的同时施用,或可将它们在皮内注射之前或皮内注射后施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠将通过i.v.注射接受pmEV,但另一些小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲、局部施用、皮内(i.d.)注射或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第0天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0567] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个

细菌细胞。如与pmEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0568] 就pmEV而言，总蛋白质是使用遵循制造商的使用说明进行的伯乐公司(Bio-rad)测定(目录号5000205)进行量测。

[0569] 匙孔血蓝蛋白(KLH)及完全弗氏佐剂(CFA)的乳化液是在免疫当天(第0天)新鲜制备。为此，将8mg KLH粉末称重并完全重新悬浮于16mL生理盐水中。乳化液是通过使用注射器及鲁尔锁连接器(luer lock connector)混合KLH/生理盐水及等体积的CFA溶液(例如，10mL KLH/生理盐水+10mL CFA溶液)进行制备。将KLH及CFA用力混合几分钟以形成白色乳化液以获得最大稳定性。进行跌落试验以检查是否获得均质乳化液。

[0570] 在第0天，C57Bl/6J雌性小鼠(约7周龄)是用含于CFA中的KLH抗原通过皮下免疫(4个位置，每个位置50μL)引发。经口强饲的狄氏副拟杆菌pmEV在低(6.0E+07)、中(6.0E+09)和高(6.0E+11)剂量下进行测试。

[0571] 在第8天，用含于生理盐水(以10μL的体积)中的10μg KLH皮内(i.d.)激发小鼠的左耳。耳廓厚度是在抗原激发后的24小时进行量测(图15)。如耳厚度确定的，狄氏副拟杆菌pmEV在抑制炎症方面有效。

[0572] 对于进一步的炎症研究，一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用抗炎剂(例如，抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗)，和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0573] 在各种时间点下，可以采集血清样品。可以将其他组的小鼠处死且可移除淋巴结、脾脏、肠系膜淋巴结(MLN)、小肠、结肠及其他组织用以使用本领域中已知的方法进行组织学研究、离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。一些小鼠是在O2/CO2麻醉下自眼血管丛抽血并进行ELISA分析。

[0574] 组织可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rory-γ-t、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNγ、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的CD45+浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0575] 自经处死的小鼠移除耳朵并放置于冷无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(罗氏公司(Roche))中。使用珠破坏将耳朵均质化并通过Luminex试剂盒(EMD密理博公司(EMD Millipore))遵循制造商的使用说明分析上清液中的各种细胞因子。另外，颈部淋巴结是通过细胞过滤器解离，清洗，并针对FoxP3(PE-FJK-16s)及CD25(FITC-PC61.5)使用本领域中已知的方法进行染色。

[0576] 为了检验DTH保护的影响和寿命，一些小鼠可以在稍后用激发抗原再次激发而不

是处死,并分析小鼠对DTH的敏感性和应答的严重程度。

[0577] 实例6:实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的小鼠模型中的pmEV

[0578] EAE是经充分研究的多发性硬化动物模型,如由Constantinescu等人评审(Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)as a model for multiple sclerosis(MS).[实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)作为多发性硬化(MS)的模型]Br J Pharmacol.[英国药理学杂志]2011年10月;164(4):1079-1106)。其可使用不同髓磷脂相关肽,通过经活化的致脑炎T细胞的过继转移,或使用易受EAE影响的TCR转基因小鼠在各种小鼠及大鼠品系中诱导,如于Mangalam等人(Two discreet subsets of CD8+T cells modulate PLP_{91-110} induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice[CD8+T细胞的两个离散亚群调节HLA-DR3转基因小鼠中PLP_{91-110}诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎].J Autoimmun.[自身免疫性杂志]2012年6月;38(4):344-353)中讨论。

[0579] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在EAE的啮齿动物模型中的功效。此外,pmEV可以口服施用或静脉内施用。例如,雌性6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自Taconic(日耳曼敦,纽约州)。对各组小鼠的背部两个位置(上方及下方)施用两次皮下(s.c.)注射0.1ml髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白35-55(MOG35-55;每次注射100ug;每只小鼠200ug(每只小鼠总计0.2ml)),其乳化于完全弗氏佐剂中(CFA;2-5mg经杀灭的结核分枝杆菌H37Ra/ml乳剂)。在上文发生后约1至2小时,对小鼠腹膜内(i.p.)注射含于0.1ml PBS(2ug/ml)中的200ng百日咳毒素(PTx)。PTx的另外IP注射是在第2天施用。可替代地,使用适当量的代替髓磷脂肽(例如,蛋白脂质蛋白(PLP))以诱导EAE。一些动物充当未经治疗的对照(naïve control)。评估EAE严重程度并自第4天开始根据本领域中已知的方法每天分配残疾分数(Mangalam等人,2012)。

[0580] pmEV治疗是在一些时间点(在免疫的时间附近或在EAE免疫之后)下开始。例如,pmEV可在免疫(第1天)的同时施用,或可将它们在出现残疾的第一迹象(例如,跛尾)后施用,或在严重的EAE期间施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至$1-1x10^{12}$:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0581] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0582] 一些组的小鼠可在各种时间点及有效剂量下,用额外抗炎剂或EAE治疗剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)、维生素D、类固醇、抗炎剂或其他一种或多种治疗)和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0583] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0584] 在各种时间点下,将小鼠处死并可移除发炎的位置(例如,脑及脊髓)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或在离体获得的经纯化的CD45+中枢神经系统(CNS)-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0585] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物(例如,经活化的致脑炎T细胞或EAE诱导肽的回注)再激发。分析小鼠在再激发后对疾病及EAE严重程度的易感性。

[0586] 实例7:胶原诱导的关节炎(CIA)的小鼠模型中的pmEV

[0587] 胶原诱导的关节炎(CIA)为研究类风湿性关节炎(RA)常用的动物模型,如Caplazi等人(Mouse models of rheumatoid arthritis.[类风湿关节炎的小鼠模型]Veterinary Pathology.[兽医病理学]2015年9月1日.52(5):819-826)所述(还参见Brand等人Collagen-induced arthritis.[胶原诱导的关节炎]Nature Protocols.[自然实验手册]2007.2:1269-1275;Pietrosimone等人Collagen-induced arthritis:a model for murine autoimmune arthritis.[胶原诱导的关节炎:小鼠自身免疫性关节炎的模型]Bio Protoc.[生物实验手册]2015年10月20日;5(20):e1626)。

[0588] 在CIA啮齿动物模型的其他版本中,一种模型涉及用小鸡II型胶原使HLA-DQ8 Tg小鼠免疫,如由Taneja等人,(J.Immunology.[免疫学杂志]2007.56:69-78;亦参见Taneja等人,J.Immunology[免疫学杂志]2008.181:2869-2877;及Taneja等人,Arthritis Rheum.[关节炎与风湿病],2007.56:69-78)描述。小鸡CII的纯化已由Taneja等人,(Arthritis Rheum.[关节炎与风湿病],2007.56:69-78)所述。监测小鼠在免疫后的CIA疾病发作及进展,及评估疾病的严重程度并如由Wooley,J.Exp.Med.[实验医学杂志]1981.154:688-700描述进行“评级”。

[0589] 针对CIA诱导使小鼠免疫并将小鼠分为各种治疗组。测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在CIA中的功效。

[0590] pmEV治疗是在用胶原免疫的时间附近或在免疫之后开始。例如,在一些组中,pmEV可在免疫(第1天)的同时施用,或pmEV可在出现疾病的第一迹象后施用,或在严重症状发作后施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受

7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0591] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0592] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用额外一种或多种抗炎剂或一种或多种CIA治疗剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)、维生素D、一种或多种类固醇、一种或多种抗炎剂和/或其他治疗),和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0593] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0594] 在各种时间点下,获得血清样品以使用标准ELISA评估抗小鸡及抗小鼠CII IgG抗体的浓度(Batsalova等人,Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains.[两种B10小鼠品系胶原诱导的关节炎发展过程中II型胶原特异性免疫反应的比较分析]Arthritis Res Ther.[关节炎研究与治疗]2012.14(6):R237)。同样地,将一些小鼠处死且可移除发炎的位置(例如,滑膜)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。使用本领域中已知的技术分析滑膜及滑液中的浆细胞浸润及抗体的存在。另外,使用解离酶根据制造商的使用说明解离组织以检查细胞浸润物谱。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+滑膜-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0595] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物(例如,CIA诱导的肽的活化回注)再激发。分析小鼠在再激发后对疾病及CIA严重程度的易感性。

[0596] 实例8:结肠炎的小鼠模型中的pmEV

[0597] 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎是经充分研究的结肠炎动物模型,如由

Randhawa等人综述(A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.[化学诱导的啮齿类动物炎性肠病模型综述]Korean J Physiol Pharmacol.[韩国生理学和药理学杂志]2014.18(4):279-288;还参见Chassaing等人,Dextran sulfate sodium(DSS)-induced colitis in mice.[硫酸葡聚糖钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎]Curr Protoc Immunol.[免疫学实验指南]2014年2月4日;104:15.25单元)。

[0598] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎剂)在DSS诱导的结肠炎的小鼠模型中的功效。

[0599] 如本领域中已知,各组小鼠是用DSS处理以诱导结肠炎(Randhawa等人,2014;Chassaing等人,2014;还参见Kim等人,Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD.[在DSS诱导的IBD模型中调查肠道炎症]J Vis Exp.[可视实验杂志]2012.60:3678)。例如,雄性6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自查尔斯河实验室(Charles River Labs),泰康利公司或其他供货商。结肠炎是通过将3%DSS(MP生物化学公司(MP Biomedicals),目录号0260110)添加至饮用水来诱导。一些小鼠不接受含于饮用水中的DSS且充当天然对照。一些小鼠接受水,历时五(5)天。一些小鼠可接受DSS,历时较短的持续时间或长于五(5)天。监测小鼠并使用本领域中已知的残疾活动指数基于重量损失进行评分(例如,无体重减轻(0分);1%至5%体重减轻(1分);5%至10%体重减轻(2分));粪便稠度(例如,正常(0分);大便稀溏(2分);腹泻(4分))及出血(例如,未出血(0分)、潜血阳性(1分);潜血阳性及视神经沉淀出血(2分);肛门周围的血液,大出血(4分)。

[0600] pmEV治疗是在一些时间点(在DSS施用的第1天,或在之后的某一时刻)下开始。例如,pmEV可在DSS开始(第1天)时同时施用,或可将它们在出现疾病的第一迹象(例如,体重减轻或腹泻)后施用,或在严重的结肠炎的整个阶段期间施用。每天观察小鼠的重量、发病率、存活、腹泻和/或血便的存在。

[0601] pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之间的pmEV颗粒。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至$1\text{-}1x10^{12}$:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0602] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0603] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用额外的抗炎剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗),和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0604] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些小鼠接受DSS而未预先接受抗生素。

[0605] 在各种时间点下,使用小动物内窥镜(卡尔史托斯公司(Karl Storz Endoskipe)德国)在异氟烷麻醉下使小鼠经历视讯内窥镜检查。记录静止影像及视讯以评估结肠炎的程度及对治疗的反应。使用本领域中已知的标准对结肠炎进行评分。收集粪便材料用于研究。

[0606] 在各种时间点下,将小鼠处死并收集结肠、小肠、脾脏及淋巴结(例如,肠系膜淋巴结)。另外,将血液收集至血清分离管内。组织损伤是通过组织学研究评估,这些组织学研究评估(但不限于)隐窝结构、发炎细胞浸润程度及杯状细胞消耗。

[0607] 可移除胃肠(GI)道、淋巴结和/或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,获取组织且可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+GI道-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0608] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发。分析小鼠在再激发后对结肠炎的易感性。

[0609] 实例9:1型糖尿病(T1D)的小鼠模型中的pmEV

[0610] 1型糖尿病(T1D)是一种自身免疫性疾病,其中免疫系统靶向胰脏的胰岛,藉此破坏身体产生胰岛素的能力。

[0611] 存在T1D的动物模型的不同模型,如Belle等人综述(Mouse models for type 1diabetes.[1型糖尿病的小鼠模型]Drug Discov Today Dis Models.[今日药物发现:疾病模型]2009;6(2):41-45;还参见Aileen JF King.The use of animal models in diabetes research.[动物模型在糖尿病研究中的应用]Br J Pharmacol.[英国药理学杂志]2012年6月;166(3):877-894。存在用于化学诱导的T1D、病原体诱导的T1D的模型及其中小鼠自发发展T1D的模型。

[0612] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在T1D的小鼠模型中的效力。

[0613] 取决于T1D诱导的方法和/或T1D发展是否为自发性的,pmEV治疗是在一些时间点(在诱导的时间附近或在诱导后,或在自发出现T1D发作之前(或发作后))下开始。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可

给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如，所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0614] 可替代地，一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与pmEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0615] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用额外的治疗和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0616] 另外，在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如，将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中，且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0617] 血糖是在实验开始前两周一次进行监测。在此后的各种时间点下，量测非空腹血糖。在各种时间点下，将小鼠处死且可移除胰脏、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如，组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的组织-浸润性免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。抗体产生亦可通过ELISA进行评估。

[0618] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发，或针对复发的易感性进行评估。分析小鼠在再激发(或自发出现复发)对糖尿病发作及严重程度的易感性。

[0619] 实例10:原发性硬化性胆管炎(PSC)的小鼠模型中的pmEV

[0620] 原发性硬化性胆管炎(PSC)是缓慢损害胆管并导致末期肝硬化的慢性肝疾病。它与炎性肠病(IBD)相关。

[0621] 存在用于PSC的各种动物模型，如由Fickert等人，(Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014年6月60(6):1290-1303;还参见Pollheimer及Fickert.Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.[原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎的动物模型]Clin Rev Allergy Immunol.[过敏与免疫学临床评论]2015年6月48(2-3):207-17)。PSC模型中疾病的诱导包括化学诱导(例如，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(DDC)诱导的胆管炎)、病原体诱导(例如，小球隐孢子虫)、实验性胆管梗阻(例如，胆总管结扎术(CBDL))及抗原驱动的胆管损伤的转基因小鼠模型(例如，Ova-Bil转基因小鼠)。例如，胆管结扎术是如由

Georgiev等人,(Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation.[实验性胆管结扎后与时间相关的变化]Br J Surg.[英国外科学杂志]2008.95(5):646-56)描述进行,或疾病是通过DCC暴露如由Fickert等人,(A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis.[一种新的异种生物诱导的硬化性胆管炎和胆汁纤维化小鼠模型]Am J Path.[美国病理学杂志],第171(2)卷:525-536描述诱导。

[0622] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加一些其他治疗剂)在PSC的小鼠模型中的功效。

[0623] DCC诱导的胆管炎

[0624] 例如,6至8周龄C57bl/6小鼠获得自Taconic或其他供货商。给小鼠喂食0.1%DCC补充饮食,持续各种持续时间。一些组接受DCC补充食物,历时1周,其他历时4周,其他历时8周。一些组的小鼠可在一段时间内接受DCC补充饮食及然后容许恢复,此后接受正常饮食。可研究这类小鼠自疾病恢复的能力和/或它们的一经后续暴露于DCC则复发的易感性。使用pmEV的治疗是在某一时间点(在DCC喂养的时间附近或在开始暴露于DCC之后)开始。例如,pmEV可在第1天施用,或可将它们在此后的某一时刻施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之间的pmEV颗粒。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-$1x10^{12}$:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0625] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0626] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用另外的药剂和/或适当的对照(例如,媒剂或抗体)进行处理。

[0627] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。在各种时间点下,分析血清样品中的ALT、AP、胆红素及血清胆汁酸(BA)浓度。

[0628] 在各种时间点下,将小鼠处死,记录体重及肝重量,且移除发炎的位置(例如,肝、小肠及大肠、脾脏)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织形态学表征、细胞因子和/或流式细胞术分析(参见,Fickert等人,Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC)).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014.60(6):1290-1303)。例如,针对ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表达染色胆管。一些组织是经染色用于组织学检查,而其他组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术

进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80),及黏附分子表达(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。

[0629] 制备肝组织以用于组织学分析,例如,使用天狼星红染色,接着对纤维化区域定量。在治疗结束时,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,及用以测定胆红素浓度。羟脯胺酸的肝含量可使用预定方案量测。炎症及纤维化标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于MCP-1、α-SMA、Colla1及TIMP。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定代谢组学方法进行。最后,对肝切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0630] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可稍后用DCC再激发。分析小鼠在再激发后对胆管炎及胆管炎严重程度的易感性。

[0631] BDL诱导的胆管炎

[0632] 可替代地,测试pmEV在BDL诱导的胆管炎中的功效。例如,6至8周龄C57Bl/6J小鼠获得自泰康利公司或其他供货商。在适应期后,使这些小鼠经受手术程序以进行胆管结扎术(BDL)。一些对照动物接受假手术。BDL程序在7至21天内导致肝损伤、炎症及纤维化。

[0633] 使用pmEV的治疗是在某一时间点(在手术的时间附近或在手术后的某一时刻)下开始。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0634] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0635] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用另外的药剂和/或适当的对照(例如,媒剂或抗体)进行处理。

[0636] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。在各种时间点下,分

析血清样品中的ALT、AP、胆红素及血清胆汁酸(BA)浓度。

[0637] 在各种时间点下,将小鼠处死,记录体重及肝重量,且移除发炎的位置(例如,肝、小肠及大肠、脾脏)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织形态学表征、细胞因子和/或流式细胞术分析(参见,Fickert等人,Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC)).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014.60(6):1290-1303)。例如,针对ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表达染色胆管。一些组织是经染色用于组织学检查,而其他组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80),及黏附分子表达(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。

[0638] 制备肝组织以用于组织学分析,例如,使用天狼星红染色,接着对纤维化区域定量。在治疗结束时,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,及用以测定胆红素浓度。羟脯胺酸的肝含量可使用预定方案量测。炎症及纤维化标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于MCP-1、α-SMA、Coll1a1及TIMP。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定代谢组学方法进行。最后,对肝切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0639] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可针对恢复进行分析。

[0640] 实例11:非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的小鼠模型中的pmEV

[0641] 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的严重形式,其中肝脂肪(脂肪变性)及炎症的逐步发展导致肝损伤及肝细胞细胞死亡(鼓胀)。

[0642] 存在不同NASH动物模型,如Ibrahim等人综述(Animal models of Nonalcoholic steatohepatitis:Eat,Delete,and Inflame.[非酒精性脂肪性肝炎的动物模型:进食,删除和发炎]Dig Dis Sci.[消化疾病与科学]2016年5月.61(5):1325-1336;还参见Lau等人,Animal models of non-alcoholic fatty liver disease:current perspectives and recent advances[非酒精性脂肪肝疾病的动物模型:当前观点和最新进展]2017年1月241(1):36-44)。

[0643] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加另一治疗剂)在NASH的小鼠模型中的效力。例如,将8至10周龄C57Bl/6J小鼠(获得自Taconic(纽约州日耳曼敦(Germantown,NY))或其他供货商)放置于缺乏甲硫胺酸胆碱(MCD)的饮食上,历时4至8周的周期,在此期间NASH特征发展,包括脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化。

[0644] 测试栖组织普雷沃菌pmEV(单独或彼此结合,以不同比例,添加或未添加另一治疗剂)在NASH的小鼠模型中的功效。例如,使8周龄C57Bl/6J小鼠(获得自查尔斯河(Charles

River)(法国)或其他供货商)适应5天的周期,基于体重随机分为10只小鼠的组,并放置于缺乏甲硫胺酸胆碱(MCD)的饮食上,例如来自研究用饮食公司(Research Diets)(USA)的A02082002B,历时4周的周期,在此期间NASH特征发展,包括脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化。给对照食物小鼠喂养正常食物饮食,例如,来自SDS饮食公司(SDS Diets)(英国)的RM1(E)801492。随意提供对照食物、MCD饮食及水。

[0645] 使用自Kleiner等人,(Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.[非酒精性脂肪肝疾病组织学评分系统的设计和验证]Hepatology.[肝脏病学]2005年6月41(6):1313-1321)调适的NAS评分系统以确定脂肪变性的程度(0至3分)、小叶炎症(0至3分)、肝细胞鼓胀(0至3分)及纤维化(0至4分)。个别小鼠NAS分数是通过针对脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化的分数(0至13分)求和进行计算。另外,血浆AST及ALT的浓度是使用来自堀场公司(Horiba)(美国)的Pentra 400仪器,根据制造商的使用说明进行测定。肝总胆固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙氨酸氨基转移酶及天冬氨酸氨基转移酶的浓度也是使用本领域中已知的方法进行测定。

[0646] 在其他研究中,炎症、纤维化、脂肪变性、ER应激或氧化应激标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括(但不限于)IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。

[0647] 在其他研究中,炎症、纤维化、脂肪变性、ER应激或氧化应激标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括(但不限于)IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。

[0648] pmEV治疗是在一些时间点(在饮食开始时,或在饮食开始后的某一时刻(例如,一周后))下开始。例如,pmEV可在开始MCD饮食的同一天施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0649] 可替代地,一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与pmEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0650] 一些组的小鼠可在各种时间点及有效剂量下,用一种或多种另外的NASH治疗剂(例如,FXR激动剂、PPAR激动剂、CCR2/5拮抗剂或其他治疗)和/或适当的对照进行处理。

[0651] 在各种时间点下和/或在治疗结束时,将小鼠处死并可移除肝、肠、血液、排泄物或其他组织用于使用本领域中已知的方法进行离体组织学、生物化学、分子或细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,称重并制备肝组织用于组织学分析,其可包含用H&E、天狼星红染色,及测定NASH活动分数(NAS)。在各种时间点下,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,使用标准分析。另外,胆固醇、三酸甘油酯或脂肪酸的肝含量可使用预定方案进行

量测。炎症、纤维化、脂肪变性、ER应激或氧化应激标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于IL-6、MCP-1、α-SMA、Col11a1、CHOP及NRF2。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定的基于生物化学及质谱的代谢组学方法进行。可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对肝或肠切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0652] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可针对恢复进行分析。

[0653] 实例12:银屑病的小鼠模型中的pmEV

[0654] 银屑病是T细胞介导的慢性炎症皮肤疾病。所谓的“斑块型”银屑病是银屑病的最常见形式且特征是干鳞、红色斑块、及皮肤因免疫细胞浸润至真皮及表皮内而增厚。数种动物模型有助于了解此疾病，如由Gudjonsson等人，(Mouse models of psoriasis.[银屑病的小鼠模型]J Invest Derm.[皮肤病学研究杂志]2007.127:1292-1308;还参见van der Fits等人，Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17axis.[咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症是通过IL-23/IL-17轴介导的]J.Immunol.[免疫学杂志]2009年5月1日.182(9):5836-45)。

[0655] 银屑病可于各种小鼠模型中诱导，包括那些使用转基因、敲除或异种移植模型，并局部施用咪喹莫特(IMQ)(一种TLR7/8配体)模型。

[0656] 测试pmEV(单独或与完整细菌细胞组合，添加或未添加其他抗炎治疗)在银屑病的小鼠模型中的效力。例如，6至8周龄C57Bl/6或Balb/c小鼠获得自Taconic(日耳曼敦，纽约州)或其他供货商。将小鼠的背部及右耳剃光。各组小鼠接受每天62.5mg局部剂量的市售IMQ乳膏(5%)(咪喹莫特(Aldara);3M药物公司(3M Pharmaceuticals))。将该剂量施用至经剃毛的区域，历时连续5或6天。每隔一定时间，对小鼠的红斑、结垢及增厚按自0至4的标度进行评分，如由der Fits等人，(2009)描述。使用Mitutoyo千分尺监测小鼠的耳厚度。

[0657] 使用pmEV的治疗是在某一时间点(在第一次施用IMQ的时间附近，或之后的某一时刻)开始。例如，pmEV可在皮下注射(第0天)的同时施用，或可将它们在施用之前或在施用后施用。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如，一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受pmEV，但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天(例如，起始自第0天)接受pmEV，而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如，所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至$1-1x10^{12}$:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0658] 可替代地，一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与pmEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0659] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用抗炎剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗),和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0660] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0661] 在各种时间点下,采集来自背部及耳朵皮肤的样品用于使用本领域中已知的方法进行冰冻切片染色分析。将其他组的小鼠处死且可移除淋巴结、脾脏、肠系膜淋巴结(MLN)、小肠、结肠及其他组织用以使用本领域中已知的方法进行组织学研究、离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。一些组织可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。冰冻切片样品、组织样品或离体获得的细胞是经染色用于通过流式细胞术使用本领域中已知的技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+皮肤-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0662] 为检查银屑病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可经研究以评估恢复,或可将它们用IMQ再激发。分析经再激发的小鼠对银屑病及反应的严重程度的易感性。

[0663] 实例13:肥胖症(DIO)的小鼠模型中的pmEV

[0664] 存在多种DIO的动物模型,如Tschop等人(A guide to analysis of mouse energy metabolism[小鼠能量代谢分析指南].Nat.Methods.[自然方法]2012;9(1):57-63)和Ayala等人(Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice[描述和执行小鼠葡萄糖体内稳态代谢测试的标准操作程序].Disease Models and Mechanisms.[疾病模型和机制]2010;3:525-534)所综述的并且由Physiogenex公司提供。

[0665] 测试pmEV(单独或与其他完整细菌细胞(活的、被杀死的、被照射的和/或灭活的等)组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在DIO的小鼠模型中的效力。

[0666] 取决于DIO诱导的方法和/或DIO发展是否为自发性的,pmEV治疗是在一些时间点(在诱导的时间附近或在诱导后,或在自发出现T1D发作之前(或发作后))下开始。pmEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射pmEV。其他小鼠可接受25、50或100mg pmEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12pmEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受pmEV,但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受pmEV。一些小鼠可每天接受pmEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受pmEV。可给小鼠组施用包含pmEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(pmEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(pmEV:细菌细胞)的pmEV颗粒和完整细菌。

[0667] 可替代地，一些组的小鼠可以与pmEV施用分开或组合的施用接受$1x10^4$至$5x10^9$个细菌细胞。如与pmEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用pmEV之前经照射或热灭活。

[0668] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用额外的治疗和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0669] 另外，在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如，将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中，且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0670] 血糖是在实验开始前两周一次进行监测。在此后的各种时间点下，量测非空腹血糖。在各种时间点下，将小鼠处死且可移除胰脏、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如，组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的组织-浸润性免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。抗体产生亦可通过ELISA进行评估。

[0671] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发，或针对复发的易感性进行评估。分析小鼠在再激发(或自发出现复发)对糖尿病发作及严重程度的易感性。

[0672] 实例14:标记细菌的pmEV

[0673] pmEV可以被标记，以便跟踪其在体内的生物分布，并在各种制剂和用哺乳动物细胞进行的测定中定量和跟踪细胞定位。例如，pmEV可以是放射性标记的、与染料一起孵育、荧光标记的、发光标记的或用包含金属和金属同位素的缀合物标记的。

[0674] 例如，pmEV可以与缀合至官能团(如NHS-酯、点击化学基团、链霉亲和素或生物素)的染料一起孵育。标记反应可以在多种温度下进行数分钟或数小时，并且可以进行或不进行搅拌或旋转。然后可以根据方案通过添加试剂(例如牛血清白蛋白(BSA)或类似试剂)来终止反应，并通过超速离心、过滤、离心过滤、柱亲和纯化或透析除去游离或未结合的染料分子。可以采用包含洗涤缓冲液和涡旋或搅拌的另外洗涤步骤以确保完全去除游离染料分子，例如在Su Chul Jang等人，Small.11，第4期，456-461(2017)中所述。

[0675] 任选地，pmEV可浓缩至5.0E12个颗粒/ml(300ug)，并使用2X浓缩的PBS缓冲液(pH 8.2)稀释至1.8mo，并使用台式超速离心机在4℃下以165,000x g离心沉淀。将沉淀重新悬浮在300ul 2X PBS(pH 8.2)中，从10mM染料母液(溶解于DMSO中)以0.2mM的终浓度添加NHS-酯荧光染料。样品在24℃温和搅拌1.5小时，然后在4℃孵育过夜。通过上述稀释/沉淀

的2个重复步骤去除游离的未反应染料，使用1X PBS缓冲液，并在300ul最终体积中重新悬浮。

[0676] 通过共聚焦显微镜、纳米颗粒跟踪分析、流式细胞仪、荧光激活细胞分选(FAC)或荧光成像系统(例如Odyssey CLx LICOR)，在细胞或器官中，或在体外和/或离体样品中检测荧光标记的pmEV(参见例如Wiklander等人2015.J.Extracellular Vesicles[胞外囊泡杂志].4:10.3402/jev.v4.26316)。另外，使用仪器，诸如H-I.Choi等人Experimental& Molecular Medicine[实验与分子医学].49:e330(2017)中的IVIS光谱CT(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))或Pearl Imager在完整动物和/或经剥离的器官及组织中检测经荧光标记的pmEV。

[0677] 也可以使用上述方案用含有金属和金属同位素的缀合物标记pmEV。金属缀合的pmEV可以体内给动物施用。然后可以在不同的时间点从器官中获取细胞，并进行离体分析。可替代地，来源于动物、人或永生化细胞系的细胞可以用金属标记的pmEV在体外处理，并且细胞随后用金属缀合的抗体标记并使用飞行时间流式细胞术(CyTOF)仪器(例如Helios CyTOF(富鲁达公司(Fluidigm)))进行表型分析或使用成像质量细胞术仪器(例如Hyperion成像系统(富鲁达公司))进行成像和分析。另外，pmEV可以用放射性同位素标记以跟踪pmEV的生物分布(参见，例如，Miller等人，Nanoscale[纳米尺度].2014年5月7日;6(9):4928-35)。

[0678] 实例15:透射电子显微镜以可视化细菌pmEV

[0679] pmEV是从细菌分批培养中制备的。透射电子显微镜(TEM)可用于可视化纯化的细菌pmEV(S.Bin Park等人PLoS ONE[公共科学图书馆·综合].6(3):e17629(2011))。将pmEV加载于300-或400-目-尺寸碳涂覆铜网(电子显微科学公司(Electron Microscopy Sciences)，美国)上历时2分钟并用去离子水清洗。pmEV使用2％(w/v)乙酸铀酰负染色20秒至1分钟。铜网用无菌水清洗并干燥。影像使用透射电子显微镜以100至120kV加速电压获取。经染色的pmEV在直径20nm-600nm之间出现且为电子致密的。对各网筛选10至50个视野。

[0680] 实例16:图谱分析pmEV组成及内容物

[0681] pmEV可通过包括(但不限于)以下的各种方法中的任一者来表征:NanoSight表征、SDS-PAGE凝胶电泳、蛋白质印迹、ELISA、液相色谱-质谱法及质谱、动态光散射、脂质水平、总蛋白、脂质与蛋白质比、核酸分析和/或ζ电位。

[0682] pmEV的NanoSight表征

[0683] 纳米颗粒跟踪分析(NTA)用以表征经纯化的细菌pmEV的粒度分布。于NanoSight机器(马尔文仪器公司(Malvern Instruments))上运行纯化的pmEV制剂以评估pmEV尺寸及浓度。

[0684] SDS-PAGE凝胶电泳

[0685] 为了鉴定纯化的pmEV的蛋白质组分，将样品使用标准技术在凝胶上运行，例如Bolt Bis-Tris Plus 4-12％凝胶(赛默飞世尔科技公司(Thermo-Fisher Scientific))。将样品于1x SDS样品缓冲液中煮沸10分钟，冷却至4℃，及然后在16,000x g下离心1分钟。然后，将样品于SDS-PAGE凝胶上运行并使用几种标准技术(例如，银染色、考马斯蓝、凝胶代码蓝)中的任何一者进行染色以使条带可视化。

[0686] 蛋白质印迹分析

[0687] 为鉴定及定量纯化的pmEV的特定蛋白质组分，pmEV蛋白通过如上文描述的SDS-PAGE分离及经受蛋白质印迹分析(Cvjetkovic等人，Sci.Rep.[科学报告]6,36338(2016))并经由ELISA定量。

[0688] pmEV蛋白质组学与液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)及质谱法(MS)

[0689] 存在于pmEV中的蛋白质通过质谱法技术鉴定及定量。可以使用标准技术制备pmEV蛋白用于LC-MS/MS，所述标准技术包括使用二硫苏糖醇溶液(DTT)进行蛋白还原以及使用酶(例如LysC和胰蛋白酶)进行蛋白消化(如在Erickson等人，2017(Molecular Cell[分子细胞]，第65卷，第2期，第361-370页，2017年1月19日)中所述)。另一方面，肽是如Liu等人.2010(JOURNAL OF BACTERIOLOGY[细菌学杂志]，2010年6月，第2852-2860页第192卷，第11期)，Kieselbach和Oscarsson 2017(Data Brief[数据摘要].2017年2月;0:426-431.)，Vildhede等人，2018(Drug Metabolism and Disposition[药物代谢与处置]2018年2月8日)中所述制备。消化后，直接在液相色谱和质谱仪上运行肽制剂，用于在单个样品中鉴定蛋白质。为了相对定量样品之间的蛋白质，使用iTRAQ试剂-8plex多重试剂盒(应用生物系统公司(Applied Biosystems)，福斯特城，加利福尼亚州)或TMT 10plex和11plex标记试剂(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fischer Scientific)，圣何塞，加利福尼亚州，USA)将来源于不同样品的肽消化物用同量异位素标签进行标记。每个肽消化物都用不同的同量异位素标签标记，然后将经标记的消化物合组合进入一个样品混合物。通过LC-MS/MS分析组合的肽混合物，以进行鉴定和定量。使用LC-MS/MS数据进行数据库搜索，以鉴定经标记的肽和相应的蛋白质。在同量异位素标记的情况下，附着标签的片段产生低分子量的报告离子，该离子用于获得每个pmEV中存在的肽和蛋白质的相对定量。

[0690] 另外，代谢内容物使用液体色谱法与质谱法的组合进行确定。存在测定各种样品的代谢内容物且为本领域技术人员已知的各种技术，这些技术涉及溶剂萃取、层析分离及耦合至质量测定的各种电离技术(Roberts等人，2012 Targeted Metabolomics.[靶向代谢组学]Curr Protoc Mol Biol.[当代分子生物学方案]30:1-24;Dettmer等人，2007,Mass spectrometry-based metabolomics.[基于质谱的代谢组学]Mass Spectrom Rev.[质谱综述]26(1):51-78)。作为一项非限制性实例，LC-MS系统包括与1100系列泵(安捷伦公司(Agilent))及HTS PAL自动进样器(Leap科技公司(Leap Technologies))组合的4000QTRAP三重四级杆质谱仪(AB SCIEX)。培养基样品或其他复杂代谢混合物(约10μL)是使用九体积的含有稳定的同位素标记内标物(缬胺酸-d8，Isotec;及苯丙胺酸-d8，剑桥同位素实验室(Cambridge Isotope Laboratories))的74.9:24.9:0.2(v/v/v)乙腈/甲醇/甲酸进行萃取。标准物可取决于受关注的代谢物进行调整或修饰。样品是经离心(10分钟，9,000g，4℃)，及上清液(10μL)是通过将溶液注射于HILIC管柱(150×2.1mm，3μm粒度)上而呈递至LCMS。管柱通过使5％流动相[10mM甲酸铵，0.1％甲酸于水中]以250uL/分钟的速率流动1分钟，接着线性梯度历时10分钟至40％流动相的溶液[具有0.1％甲酸的乙腈]进行洗脱。将离子喷雾电压设定至4.5kV及源温度是450℃。

[0691] 数据是使用市售软件(诸如来自AB SCIEX的Multiquant 1.2)进行分析以用于质谱峰积分。受关注的峰应手动控制并与标准进行比较来证实该峰的同一性。用适当的标准物进行定量以确定在细菌调节(bacterial conditioning)后及在肿瘤细胞生长后，初始培养基中存在的代谢物的量。也可以使用代谢物数据库(例如但不限于NIST数据库)将非靶向

代谢组学方法用于峰鉴定。

[0692] 动态光散射(DLS)

[0693] DLS量测(包括不同尺寸的颗粒在不同pmEV制剂中的分布)是使用仪器诸如DynaPro NanoStar(怀雅特技术公司(Wyatt Technology))及Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司(Malvern Instruments))进行。

[0694] 脂质水平

[0695] 脂质水平是使用FM4-64(生命科技公司(Life Technologies)),通过类似于那些由A.J.McBroom等人,J Bacteriol[细菌学杂志]188:5385-5392.及A.Frias等人,Microb Ecol.[微生物生态学]59:476-486(2010)描述者的方法进行定量。样品是用FM4-64培养(3.3μg/mL于PBS中,在37℃下在黑暗中培养10分钟)。在515nm下激发后,在635nm下的发射是使用Spectramax M5平板阅读器(分子仪器公司(Molecular Devices))量测。绝对浓度是通过将未知样品与已知浓度的标准物(诸如棕榈酰油酸磷脂酰甘油(POPG)囊泡)进行比较而测定。脂质组学可用于鉴定pmEV中存在的脂质。

[0696] 总蛋白质

[0697] 蛋白质水平是通过标准分析(诸如布拉德福德及BCA分析)定量。这些布拉德福德分析是使用Quick Start布拉德福德1x染料试剂(伯乐公司(Bio-Rad)),根据制造商的方案运行。BCA分析是使用Pierce BCA蛋白质分析试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo-Fisher Scientific))运行。绝对浓度是通过与产生自已知浓度的BSA的标准曲线进行比较而测定。可替代地,蛋白质浓度可以使用比尔-朗伯(Beer-Lambert)方程使用如在纳米滴分光光度计(赛默飞世尔科技公司)上测量的样品在280nm(A280)处的吸光度来计算。此外,蛋白质组学可以用于鉴定样品中的蛋白质。

[0698] 脂质:蛋白质比率

[0699] 脂质:蛋白质比率是通过脂质浓度除以蛋白质浓度产生。相较于各制剂中的游离蛋白质,这类提供囊泡的纯度的量度。

[0700] 核酸分析

[0701] 核酸提取自pmEV并使用Qubit荧光计定量。粒度分布是使用生物分析仪评估并将材料测序。

[0702] ζ电位

[0703] 不同制剂的ζ电位是使用诸如Zetasizer ZS(Malvern Instruments)的仪器量测。

[0704] 实例17:体外筛选用于增强活化树突细胞的pmEV

[0705] 体外免疫应答被认为是模拟体内诱导免疫应答(例如对癌症微环境的应答)的机制。简而言之,PBMC是通过梯度离心使用淋巴细胞分离剂(奈科明公司(Nycomed),奥斯陆,挪威)分离自来自健康供体的肝素化静脉血或使用基于磁珠的人血树突细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech),坎布里奇,马萨诸塞州)分离自小鼠脾脏或骨髓。使用抗人CD14 mAb,单核细胞是通过Moflo纯化并在cRPMI中以5e5个细胞/ml的细胞密度于96孔板(科斯塔公司(Costar Corp))中在37℃下培养7天。就树突细胞的成熟而言,培养物以0.2ng/mL IL-4及1000U/ml GM-CSF在37℃下刺激一周。可替代地,通过与重组GM-CSF孵育一周或使用本领域已知的其他方法实现成熟。小鼠DC可使用珠富集直接获取自脾脏或分化自造血干细胞。简而言之,骨髓可以获得自小鼠的股骨。回收细胞并裂解红细胞。

干细胞在细胞培养基在20ng/ml小鼠GMCSF中培养4天。添加含有20ng/ml小鼠GM-CSF的另外培养基。在第6天，将培养基及非黏附细胞移除并用含有20ng/ml GMCSF的新鲜细胞培养基置换。具有20ng/ml GM-CSF的细胞培养基的最终添加是在第7天添加。在第10天，获取非黏附细胞并接种于细胞培养板中过夜并视需要进行刺激。然后用不同剂量的pmEV(用或不用抗生素)处理树突细胞。例如，25-75ug/mL pmEV与抗生素24小时。测试的pmEV组合物可包括来自单一细菌物种或菌株的pmEV，或来自一个或多个属、1个或多个物种、或1个或多个菌株(例如，一个物种内的一个或多个菌株)的pmEV的混合物。包括作为阴性对照的PBS并且来自双歧杆菌属物种的LPS、抗CD40抗体用作阳性对照。在培养后，DC是用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCI及MHCII染色，及通过流式细胞术分析。相较于阴性对照在CD40、CD80、CD83及CD86中显著增加的DC被视为由相关细菌pmEV组合物活化。这些实验最少重复三次。

[0706] 为筛选经pmEV活化的上皮细胞刺激DC的能力，上述方案是以添加24小时上皮细胞pmEV共培养物且接着用DC培养进行。在用pmEV培养后，清洗上皮细胞及然后在缺乏pmEV的情况下与DC共培养24小时，然后如上文进行处理。上皮细胞系可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

[0707] 作为DC活化的另外量测，在用pmEV或经pmEV处理的上皮细胞将DC培养24小时后，自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD密理博公司(EMD Millipore)，达姆施塔特市，德国)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之，这些孔用缓冲液预湿，并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后，用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后，用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后，将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0708] 标准物容许细胞因子(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-22IL-23、IL-25、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外，亦评估细胞因子mRNA以解决应答于pmEV组合物的细胞因子释放。

[0709] 此DC刺激方案可使用纯化的pmEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0710] 实例18:当用肿瘤细胞培养时，体外筛选用于增强CD8+T细胞杀死活化的pmEV

[0711] 本文描述用于筛选可活化CD8+T细胞杀死肿瘤细胞的pmEV的体外方法。简言之，使用本领域已知的技术从人PBMC或小鼠脾脏分离DC，并与单一菌株pmEV、pmEV的混合物和/或适当的对照在体外孵育。另外，CD8+T细胞是使用本领域已知的技术，例如基于磁珠的小鼠CD8a+T细胞分离试剂盒及基于磁珠的人CD8+T细胞分离试剂盒(两者均来自美天旎生物技

术公司(Miltenyi Biotech),坎布里奇,马萨诸塞州)获得自人PBMC或小鼠脾脏。在DC与pmEV孵育一段时间(例如,24小时)后,或DC与pmEV刺激的上皮细胞孵育后,用PBS洗涤从细胞培养物中去除pmEV,并向每个孔中添加100ul含有抗生素的新鲜培养基,并且向96孔板中的每个实验孔中添加200,000个T细胞。抗CD3抗体是以2ug/ml的最终浓度添加。然后,容许在37℃下在正常氧条件下将共培养物培养96小时。

[0712] 例如,在共培养孵育大约72小时后,用本领域已知的技术将肿瘤细胞接种以用于测定。例如,以50,000个肿瘤细胞/孔接种于新96孔板中的各孔中。所用的小鼠肿瘤细胞系可包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配,且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在96小时共培养完成后,将100μl的CD8+T细胞及DC混合物转移至含有肿瘤细胞的孔。在37℃下在正常氧条件下将板培养24小时。星形孢菌素可以用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0713] 在此培养后,使用流式细胞术以量测肿瘤细胞死亡及表征免疫细胞表型。简而言之,肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。细胞毒性CD8+T细胞表型可通过下列方法表征:a)上清液颗粒酶B、IFNγ及TNFa于培养上清液中的浓度,如下文描述;b)活化标志物(诸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δTCR、Foxp3、T-bet、颗粒酶B)的CD8+T细胞表面表达;c)IFNγ、颗粒酶B、TNFa于CD8+T细胞中的胞内细胞因子染色。除上清液细胞因子浓度(包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趋化因子等)外,亦可通过胞内细胞因子染色评估CD4+T细胞表型。

[0714] 作为CD8+T细胞活化的额外测量,在用DC将T细胞培养96小时后,自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD Millipore,Darmstadt,Germany)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之,这些孔用缓冲液预湿,并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后,用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后,用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后,将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0715] 标准物容许细胞因子(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12(p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外,亦评估细胞因子mRNA以解决应答于pmEV组合物的细胞因子释放。宿主细胞中的这类变化刺激与癌症微环境中的体内应答类似的免疫应答。

[0716] 此CD8+T刺激方案可使用经纯化的pmEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0717] 实例19:通过PBMC体外筛选用于增强肿瘤细胞杀死的pmEV

[0718] 各种方法可用于针对刺激PBMC的能力来筛选pmEV,PBMC反过来活化CD8+T细胞以杀死肿瘤细胞。例如,PBMC是通过用于小鼠或人血液的菲可-帕克(ficoll-paque)梯度离心分离自来自健康人供体的肝素化静脉血或用淋巴细胞分离培养基(Cedarlane实验室(Cedarlane Labs),安大略,加拿大)分离自小鼠血液。PBMC与单一菌株pmEV、pmEV的混合物和适当的对照孵育。另外,CD8+T细胞获得自人PBMC或小鼠脾脏。在PBMC与pmEV孵育24小时后,使用PBS洗涤将pmEV从细胞中去除。向每个孔中添加100ul带有抗生素的新鲜培养基。在96孔板的每个实验孔中添加适当数量的T细胞(例如200,000个T细胞)。抗CD3抗体是以2ug/ml的最终浓度添加。然后,容许在37℃下在正常氧条件下将共培养物培养96小时。

[0719] 例如,进入共培养物培养72小时后,以50,000个肿瘤细胞/孔接种于新96孔板中的各孔中。所用的小鼠肿瘤细胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配,且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在96小时共培养完成后,将100μl的CD8+T细胞及PBMC混合物转移至含有肿瘤细胞的孔。在37℃下在正常氧条件下将板培养24小时。星形孢菌素用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0720] 在此培养后,使用流式细胞术以量测肿瘤细胞死亡及表征免疫细胞表型。简而言之,肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。细胞毒性CD8+T细胞表型可通过下列方法表征:a)上清液颗粒酶B、IFNγ及TNFa于培养上清液中的浓度,如下文描述;b)活化标志物(诸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δTCR、Foxp3、T-bet、颗粒酶B)的CD8+T细胞表面表达;c)IFNγ、颗粒酶B、TNFa于CD8+T细胞中的胞内细胞因子染色。除上清液细胞因子浓度(包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趋化因子等)外,亦可通过胞内细胞因子染色评估CD4+T细胞表型。

[0721] 作为CD8+T细胞活化的额外测量,在用DC将T细胞培养96小时后,自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD Millipore,Darmstadt,Germany)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之,这些孔用缓冲液预湿,并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后,用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后,用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后,将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0722] 标准物容许细胞因子(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12(p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外,亦评估细胞因子mRNA以解决应答于pmEV组合物的细胞因子释放。宿主细胞中的这类变化刺激与癌症微环境中的体内应答类似的免疫应答。

[0723] 此PBMC刺激方案可使用纯化的pmEV(具有或不具有活的,死的或灭活的/减弱的细

菌菌株的组合)重复以最大化免疫刺激潜力。

[0724] 实例20:体外检测抗原呈递细胞中的pmEV

[0725] 固有层中的树突细胞通过延伸它们的树突穿过肠上皮以不断地在肠腔中取样活细菌、死细菌及微生物产物,这是由细菌在肠腔中产生的pmEV可直接刺激树突细胞的一种方法。下列方法表示一种评估抗原呈递细胞差异摄取pmEV的方法。视需要,这类方法可用以评估向患者施用的pmEV的免疫调节行为。

[0726] 树突细胞(DC)是根据标准方法或套组方案(例如,Inaba K、Swiggard WJ、Steinman RM、Romani N、Schuler G,2001.Isolation of dendritic cells.[树突细胞的分离]Current Protocols in Immunology[当代免疫学实验手册],第3章:单元3.7)。

[0727] 为评估pmEV进入和/或存在于DC中,将250,000个DC接种于圆形盖玻片上的完全RPMI-1640培养基中及然后以不同比率与来自单一细菌菌株的pmEV或组合pmEV进行孵育。纯化的pmEV可以用荧光色素或荧光蛋白标记。孵育不同时间点(例如1小时,2小时)后,用冰冷PBS洗涤细胞两次,并用胰蛋白酶从板上分离细胞。使细胞保持完整或裂解。然后处理样品以用于流式细胞术。自裂解的样品定量总内化pmEV,及通过计数荧光细胞量测摄取pmEV的细胞的百分率。上文描述的方法亦可使用巨噬细胞或上皮细胞系(获得自ATCC)代替DC以大体上相同方式进行。

[0728] 实例21:体外筛选当与靶细胞孵育时具有活化NK细胞杀死的增强的能力的pmEV

[0729] 为了证明所选pmEV组合物引起对肿瘤细胞的有效NK细胞细胞毒性的能力,使用以下体外测定。简而言之,自健康人供体获得来自肝素化血液的单核细胞。视需要,如先前描述般进行增加NK细胞的数量的扩增步骤(例如,参见Somanschi等人,J Vis Exp.[视觉实验杂志]2011;(48):2540)。可以将细胞调整至在含有5%人血清的RPMI-1640培养基中的细胞/ml浓度。然后,用适当的抗体标记PMNC细胞及通过FACS将NK细胞分离为CD3-/CD56+细胞且准备用于后续的细胞毒性分析。可替代地,NK细胞是使用autoMACs仪器及NK细胞分离试剂盒遵循制造商的使用说明(美天旎生物技术公司(Miltenyl Biotec))进行分离。

[0730] 将NK细胞进行计数并以96孔格式以20,000个或更多个细胞/孔接种,并与单一菌株pmEV(在添加或不添加以下各项的情况下:抗原呈递细胞(例如衍生自同一供体的单核细胞)、来自细菌菌株混合物的pmEV和适当对照)孵育。用pmEV培养NK细胞5至24小时后,用PBS清洗将pmEV自细胞移除,将NK细胞重新悬浮于具有抗生素的10mL新鲜培养基中,并添加至含有20,000个靶肿瘤细胞/孔的96孔板。所用的小鼠肿瘤细胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配,且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在37℃下在正常氧条件下将板培养2-24小时。星形孢菌素用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0731] 在此孵育之后,使用本领域已知的方法使用流式细胞术来测量肿瘤细胞死亡。简而言之,肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。

[0732] 此NK刺激方案可使用纯化的pmEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0733] 实例22:使用体外免疫活化测定以预测pmEV组合物的体内癌症免疫疗法功效

[0734] 体外免疫活化测定鉴定可刺激树突细胞(其进一步活化CD8+T细胞杀死)的pmEV。

因此,上文描述的体外分析是用作针对潜在免疫治疗活性的大量候选pmEV的预测、筛选。优先选择显示增强刺激树突细胞、增强刺激CD8+T细胞杀死、增强刺激PBMC杀死和/或增强刺激NK细胞杀死的pmEV以供体内癌症免疫疗法功效研究。

[0735] 实例23:确定当经口递送至小鼠时pmEV的生物分布

[0736] 用受关注的pmEV组合物经口接种野生型小鼠(例如,C57BL/6或BALB/c)以确定经纯化的pmEV的体内生物分布谱。pmEV被标记以有助于下游分析。可替代地,可以研究荷瘤小鼠或患有某些免疫障碍(例如系统性红斑狼疮、实验性自身免疫性脑脊髓炎、NASH)的小鼠在给定时间过程中pmEV的体内分布。

[0737] 小鼠可在规定时间过程内接受单一剂量的pmEV(例如,25-100μg)或数个剂量(25-100μg)。可替代地,pmEV剂量可基于颗粒计数(例如,7e+08至6e+11个颗粒)施用。遵循经批准的方案将小鼠饲养在无特定病原体的条件下。可替代地,可将小鼠饲养并保持在消毒、无菌条件下。血液、大便和其他组织样品可在适当的时间点下采集。

[0738] 在施用pmEV组合物后的各个时间点(即,小时至天)下将小鼠人道处死并在无菌条件下进行完全尸检。遵循标准方案,获取淋巴结、肾上腺、肝、结肠、小肠、盲肠、胃、脾脏、肾、膀胱、胰脏、心脏、皮肤、肺、脑及受关注的其他组织及直接使用或快速冻结用于进一步测试。遵循本领域技术人员已知的标准方案将这些组织样品解剖并均质化以制备单细胞悬浮液。然后,通过流式细胞术定量在样品中存在的pmEV数量。定量亦可在适当处理完整小鼠组织后利用荧光显微术进行(Vankelecom H.,Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization[固定和石蜡包埋的小鼠组织用于GFP可视化],Cold Spring Harb.Protoc.[冷泉港实验手册],2009)。可替代地,动物可使用活体成像根据pmEV标记技术进行分析。

[0739] 可在癌症小鼠模型(例如但不限于CT-26和B16(参见例如Kim等人,Nature Communications[自然通讯]第8卷,第626期(2017)))或自身免疫小鼠模型(例如但不限于EAE和DTH(参见例如Turjeman等人,PLoS One[公共科学图书馆·综合]10(7):e0130442(20105)))中进行生物分布。

[0740] 实例24:来自细菌的分泌型微生物胞外囊泡(smEV)的纯化与制备

[0741] 纯化

[0742] 使用本领域技术人员已知的方法从细菌培养物(例如来自表1、表2和/或表3中的细菌)中纯化和制备分泌型微生物胞外囊泡(smEV)(S.Bin Park,等人PLoS ONE.[公共科学图书馆·综合]6(3):e17629(2011))。

[0743] 例如,细菌培养物在4℃或室温下以10,000-15,500x g离心10-40分钟,使细菌沉淀。然后过滤培养上清液,以包括≤0.22μm的物质(例如,经由0.22μm或0.45μm过滤器)并排除完整的细菌细胞。使用可包括(但不限于)硫酸铵沉淀、超离心或过滤的方法浓缩经过滤的上清液。简而言之,就硫酸铵沉淀而言,将1.5至3M硫酸铵缓慢添加至经过滤的上清液,同时在4℃下搅拌。在4℃下将沉淀培养8至48小时及然后在4℃下以11,000x g离心20至40分钟。沉淀含有smEV及其他碎片。简而言之,使用超离心,将经过滤的上清液在4℃下以100,000至200,000x g离心1至16小时。此离心的沉淀含有smEV及其他碎片。简言之,使用过滤技术,使用Amicon超自旋过滤器或通过切向流过滤,过滤上清液以便于保留分子量>50、100、300或500kDa的物质。

[0744] 可替代地,smEV在生长期间(或在生长期间的在所选时间点下)连续获得自细菌培养物,通过根据制造商的说明书将生物反应器连接至交变切向流(ATF)系统(例如,来自Repligen的XCell ATF)。该ATF系统保留完整细胞(>0.22um)于生物反应器中,及容许较小组分(例如,smEV、游离蛋白质)通过过滤器以供收集。例如,该系统可经结构设计使得<0.22um滤液然后通过100kDa的第二过滤器,容许收集如在0.22um与100kDa之间的smEV的物质,并将小于100kDa的物种泵送回生物反应器中。可替代地,该系统可经结构设计以容许生物反应器中的培养基在培养物的生长期间得到补充和/或修饰。通过此方法收集的smEV可通过如上文描述用于经过滤的上清液的超离心或过滤进行进一步纯化和/或浓缩。

[0745] 通过上文描述的方法获得的smEV可通过梯度超离心,使用可包括(但不限于)使用蔗糖梯度或Optiprep梯度的方法进行进一步纯化。简言之,在使用蔗糖梯度方法时,如果使用硫酸铵沉淀或超离心来浓缩经过滤上清液,将沉淀物重新悬浮于60%蔗糖、30mM pH 8.0Tris中。如果使用过滤来浓缩经过滤上清液,则使用Amicon Ultra柱将浓缩物缓冲液交换至60%蔗糖、30mM pH 8.0Tris中。将样品施加至35%-60%不连续蔗糖梯度中并在4℃下以200,000×g离心持续3-24小时。简言之,在使用Optiprep梯度方法时,如果使用硫酸铵沉淀或超离心来浓缩经过滤上清液,则将沉淀物悬浮于PBS中的45%Optiprep中。如果使用过滤以浓缩经过滤的上清液,则浓缩物通过使用60%Optiprep稀释至45%Optiprep的最终浓度。将样品施加至0%-45%不连续蔗糖梯度中并在4℃下以200,000×g离心持续3-24小时。可替代地,高分辨率密度梯度分级可用于基于密度分离smEV颗粒。

[0746] 制备

[0747] 为证实smEV制剂的无菌性及分离,将smEV连续稀释至琼脂培养基(其用于测试中的细菌的例行培养)上,并使用例行条件进行培养。使未经灭菌的制剂通过0.22um过滤器以去除完整细胞。为进一步增加纯度,分离的smEV可用DNA酶或蛋白酶K处理。

[0748] 可替代地,为制备用于体内注射的smEV,将纯化的smEV如先前描述进行处理(G.Norheim等人,PLoS ONE.[公共科学图书馆·综合]10(9):e0134353(2015))。简而言之,在蔗糖梯度离心后,将含有smEV的带于含有3%蔗糖的溶液中或本领域技术人员已知的适用于体内注射的其他溶液中重新悬浮至50μg/mL的终浓度。此溶液还可含有浓度为0-0.5%(w/v)的佐剂(例如氢氧化铝)。

[0749] 为制备与其他测试(例如用以在TEM成像或体外分析之前去除蔗糖)兼容的样品,使用以下将样品进行缓冲液交换至PBS或30mM pH 8.0Tris中:过滤(例如Amicon Ultra柱),透析,或超离心(在用PBS稀释15倍或以上之后,200,000x g,1-3小时,4℃)并再悬浮于PBS中。

[0750] 对于所有这些研究,smEV可以在施用之前加热、照射和/或冻干(如实例49所述)。

[0751] 实例25:通过应激操作细菌以产生各种量的smEV和/或改变smEV的内容物

[0752] 应激及特别地包膜应激已显示增加一些细菌菌株产生smEV(I.MacDonald,M.Kuehn.J Bacteriol[细菌学杂志]195(13):doi:10/1128/JB.02267-12)。为改变细菌产生smEV,细菌是使用各种方法施加应激。

[0753] 细菌可经受单一应激源或应激源组合。不同应激源对不同细菌的影响是通过改变应激条件及测定IC50值(抑制50%细胞生长所需的条件)来经验性地确定。发生smEV纯化、定量及表征。smEV产生是(1)在细菌及smEV的复杂样品中通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)或透

射电子显微镜(TEM);或(2)在smEV纯化后,通过NTA、脂质定量或蛋白质定量进行定量。smEV内容物是纯化后通过上文描述的方法进行评估。

[0754] 抗生素应激

[0755] 细菌是在标准生长条件下以添加亚致死浓度的抗生素进行培养。这可包括0.1至1μg/mL氯霉素,或0.1至0.3μg/mL庆大霉素,或类似浓度的其他抗生素(例如,安比西林、多黏菌素B)。宿主抗菌产物(诸如溶菌酶、防御素及Reg蛋白)可代替抗生素使用。亦可使用由细菌产生的抗微生物肽(包括细菌素及小菌素)。

[0756] 温度应激

[0757] 细菌是在标准生长条件下,但在比通常用于它们生长的温度更高或更低的温度下进行培养。可替代地,细菌是在标准条件下生长,及然后分别通过在低温或高温下短期间培养而经受冷休克或热休克。例如,在37℃下生长的细菌是在4℃至18℃下培养1小时用于冷休克或在42℃至50℃下培养1小时用于热休克。

[0758] 饥饿及营养物限制

[0759] 为诱导营养应激,细菌是在其中一种或多种营养素受限的条件下培养。细菌可在整个生长期间经受营养应激或自富培养基转移至贫培养基。受限的培养基组分的一些实例是碳、氮、铁及硫。一项实例培养基是M9最小培养基(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)),其含有低葡萄糖作为唯一碳源。特别对于普雷沃菌属,铁可用性是通过改变培养基中氯化血红素的浓度和/或通过改变培养基中存在的卟啉或其他铁载剂的类型改变,因为发现在低氯化血红素条件中生长的细胞产生更多smEV(S.Stubbs等人,Letters in Applied Microbiology.[应用微生物学快报]29:31-36(1999)。培养基组分亦通过添加螯合剂(诸如EDTA及去铁胺)进行操作。

[0760] 饱和度

[0761] 使细菌生长至饱和及在饱和点后培养各种时间周期。可替代地,使用条件培养基以在指数生长期间模拟饱和环境。条件培养基是通过离心及过滤自饱和培养物移除完整细胞制备,及条件培养基可经进一步处理以浓缩或移除特定组分。

[0762] 盐应激

[0763] 细菌是在含有NaCl、胆汁盐或其他盐的培养基中培养或短暂暴露于含有NaCl、胆汁盐或其他盐的培养基。

[0764] UV应激

[0765] UV应激是通过在UV灯下培养细菌或通过将细菌暴露于UV使用诸如Stratalinker(安捷伦公司(Agilent))的仪器达成。UV可在整个培养周期期间,在短爆发期内或生长后的单一定义周期内施用。

[0766] 反应性氧应激

[0767] 细菌是在亚致死浓度的过氧化氢(250至1,000μM)的存在下培养以诱导反应性氧物质形式的应激。厌氧细菌是在对它们有毒的浓度的氧中培养或暴露于对它们有毒的浓度的氧。

[0768] 洗涤剂应激

[0769] 细菌是在洗涤剂中培养或暴露于洗涤剂,诸如月桂基硫酸钠(SDS)或脱氧胆酸盐。

[0770] pH应激

[0771] 细菌是在不同pH培养基中培养有限时间或暴露于不同pH培养基有限时间。

[0772] 实例26:无smEV的细菌的制备

[0773] 制备含有最少量smEV的细菌样品。smEV产生是(1)在细菌及胞外组分的复杂样品中通过NTA或TEM;或(2)在从细菌样品纯化smEV后,通过NTA、脂质定量或蛋白质定量进行定量。

[0774] a.离心及清洗:将细菌培养物在11,000x g下离心以自上清液(包括游离蛋白质及囊泡)分离完整细胞。沉淀物用缓冲液(诸如PBS)清洗并以稳定方式储存(例如,与甘油混合,快速冷冻并在-80℃下储存)。

[0775] b.ATF:通过将生物反应器连接至ATF系统分离细菌及smEV。将不含smEV的细菌保留在生物反应器中且可通过如上文所述的离心及洗涤进一步与残余smEV分离。

[0776] c.使细菌在发现限制smEV的产生的条件下生长。可以变化的条件。

[0777] 实例27:结直肠癌模型

[0778] 为了研究smEV在肿瘤模型中的功效,可以根据本领域已知的啮齿动物肿瘤模型使用许多癌细胞系中的一种。smEV可以从若干个细菌物种中的任何一种(例如小韦荣氏球菌或非典型韦荣氏球菌)产生。

[0779] 例如,从泰康利公司(Taconic)(日耳曼敦(Germantown),纽约州))或其他供应商获得雌性6-8周龄Balb/c小鼠。将100,000个CT-26结直肠肿瘤细胞(ATCC CRL-2638)重新悬浮于无菌PBS中并在50%基质胶(Matrigel)存在下接种。将CT-26肿瘤细胞经皮下注射至每只小鼠的一个后侧腹中。当肿瘤体积达到平均100mm^3时(肿瘤细胞接种后约10-12天),将动物分配到各种治疗组(例如,媒剂;韦荣氏球菌属smEV,双歧杆菌属smEV,具有或不具有抗PD-1抗体)。起始自第1天,每隔四天将抗体以200μg/小鼠(最终体积为100μl)通过腹膜内(i.p.)施用一次,共3次(Q4D x 3),并且smEV口服或静脉内并且以不同剂量和时间施用。例如,起始自第1天,每隔三天将smEV(5μg)静脉内(i.v.)注射一次,共4次(Q3D x 4),并对小鼠进行肿瘤生长评估。一些小鼠可静脉内注射10、15或20ug smEV/小鼠的smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。

[0780] 可替代地,在肿瘤体积平均达到100mm^3时(在肿瘤细胞接种后大约10-12天),将动物分配至下列各组中:1)媒剂;2)分离自Bexsero®疫苗的脑膜炎奈瑟菌smEV;及3)抗PD-1抗体。起始自第1天,每隔四天,以200ug/小鼠(100ul最终体积)腹膜内(i.p.)施用抗体,及起始自第1天直至研究结束,腹膜内(i.p.)每天施用脑膜炎奈瑟菌smEV。

[0781] 在肿瘤体积平均达到100mm^3时(在肿瘤细胞接种后大约10-12天),将动物分配至下列各组中:1)媒剂;2)抗PD-1抗体;及3)smEV小韦荣氏球菌(7.0e+10个颗粒计数)。起始自第1天,每隔四天,以200μg/小鼠(100μl最终体积)腹膜内(i.p.)施用抗体,并且起始自第1天直至研究结束,静脉内(i.v.)每天注射smEV并测量肿瘤生长。第11天,smEV小韦荣氏球菌组显示出明显优于抗PD-1组的肿瘤生长抑制(图16)。针对处理组相比于媒剂组进行韦尔奇(Welch)检验。在一项观察从小韦荣氏球菌和非典型韦荣氏球菌纯化的smEV的剂量-应答的研究中,最高剂量的smEV显示出最大的功效(图17和18),尽管在一项针对来自当别町韦荣氏球菌的smEV的研究中,更高的剂量并不一定对应更高的功效(图19)。

[0782] 实例28:施用smEV组合物治疗小鼠肿瘤模型

[0783] 如实例27所述，癌症的小鼠模型是通过皮下注射肿瘤细胞系或患者衍生的肿瘤样品并容许将其移植至健康小鼠内而产生。本文提供的方法可以使用几种不同的肿瘤细胞系中的一种进行，所述肿瘤细胞系包括但不限于：B16-F10或B16-F10-SIY细胞(作为黑色素瘤的原位模型)、Panc02细胞(作为胰腺癌的原位模型)(Maletzki等人，2008，Gut[肠道]57:483-491)、LLC1细胞(作为肺癌的原位模型)、以及RM-1(作为前列腺癌的原位模型)。作为实例，而非限制，本文深入提供了用于研究B16-F10模型中smEV的功效的方法。

[0784] 使用具有极高转移频率的自发性黑色素瘤的同基因小鼠模型以测试细菌减少肿瘤生长及转移的扩散的能力。经选择用于此分析的smEV可以是显示增强活化免疫细胞亚群并刺激增强杀死体外肿瘤细胞的组合物。小鼠黑色素瘤细胞系B16-F10获得自ATCC。将细胞作为单层在37℃及5％CO2/空气的气氛下体外培养于RPMI培养基中，该RPMI培养基用10％热灭活的胎牛血清及1％青霉素/链霉素补充。指数生长的肿瘤细胞是通过胰蛋白酶化获取，用冷1x PBS清洗三次，并制备5E6个细胞/ml的悬浮液用于施用。此实验使用雌性C57BL/6小鼠。这些小鼠是6至8周龄且重约16至20g。就肿瘤发展而言，于各小鼠的胁腹内皮下注射100μl的B16-F10细胞悬浮液。这些小鼠是在细胞移植之前通过克他命(ketamine)及甲苯噻嗪麻醉。实验中使用的动物可经由自第2天至第5天滴注卡那霉素(0.4mg/ml)、庆大霉素(0.035mg/ml)、黏菌素(850U/ml)、甲硝唑(0.215mg/ml)及万古霉素(0.045mg/ml)于饮用水中的混合物，并在肿瘤注射后第7天腹膜内注射克林霉素(10mg/kg)而开始抗生素治疗。

[0785] 原发性胁腹肿瘤的尺寸是用卡尺每隔2至3天量测及肿瘤体积是使用下式计算：肿瘤体积＝肿瘤宽度×肿瘤长度×0.5。在原发性肿瘤达到约100mm3后，基于动物的体重将它们分选成数组。然后，自各组随机挑选小鼠并分配至治疗组。如前所述制备smEV组合物。用大约7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒强饲给小鼠口服接种。可替代地，静脉内施用smEV。每天、每周、每两周、每月、每两个月或在整个治疗周期的任何其他给药时间表小鼠接受smEV。小鼠可以经IV于尾静脉中注射smEV或直接注射于肿瘤内。小鼠可以注射smEV(具有或不具有活细菌)和/或smEV(具有或不具有灭活/减弱或被杀死的细菌)。小鼠可每周或每月一次注射或经口强饲。小鼠可接受纯化的smEV及活细菌的组合以最大化肿瘤杀死潜力。所有小鼠是在无特定病原体的条件下遵循经批准的方案饲养。每隔3至4天监测肿瘤尺寸、小鼠体重及体温并在B16-F10小鼠黑色素瘤细胞注射后6周内或当原发性肿瘤体积达到1000mm3时人道处死这些小鼠。每周抽血并在方案终止时在无菌条件下进行完全尸检。

[0786] 可在小鼠B16-F10黑色素瘤模型中轻易地观测到癌细胞，因为其产生黑色素。遵循标准方案，收集来自淋巴结的组织样品及来自颈部及胸部区域的器官且使用下列分类规则分析微转移及巨转移的存在。若在每个淋巴结或器官中发现至少两个微转移及一个巨转移病变，则将器官归类为转移阳性。微转移是通过用苏木精-曙红遵循本领域技术人员已知的标准方案染色石蜡包埋的淋巴组织切片进行检测。转移的总数量是与原发性肿瘤的体积相关且发现肿瘤体积与肿瘤生长时间及淋巴结及内脏器官中巨转移及微转移的数量及亦与所有可见转移的总数显著相关。如先前所述鉴别出二十五个不同转移部位(Bobek V.等人，Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma[表达绿色荧光蛋白的Lewis肺癌的同基因淋巴结靶向模型]，Clin.Exp.Metastasis[临床与实验转移]，2004;21(8):705-8)。

[0787] 进一步分析肿瘤组织样品的肿瘤浸润性淋巴细胞。可通过FACS分离CD8+细胞毒性

T细胞,且可随后使用定制p/MHC I类微数组对这些细胞进行进一步分析以展现其抗原特异性(参见例如,Deviren G.等人,Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays[在p/MHC微阵列上检测抗原特异性T细胞],J.Mol.Recognit.[分子识别杂志],2007年1月至2月;20(1):32-8)。CD4+T细胞可使用定制p/MHC II类微阵列进行分析。

[0788] 在各种时间点下,将小鼠处死且可移除肿瘤、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体流式细胞术分析。例如,使用Miltenyi肿瘤解离酶混合剂根据制造商说明书来解离肿瘤。记录肿瘤重量且将肿瘤短切,然后置于含有酶混合剂的15ml管中并置于冰上。然后将样品置于37℃轻微振荡器上保持45分钟并使用最多15ml完整RPMI骤冷。经由70μm过滤器将每一细胞悬浮液过滤至50ml falcon管中并在1000rpm下离心10分钟。将细胞重新悬浮于FACS缓冲液中并洗涤以去除剩余碎片。视需要,经由第二70μm过滤器将样品再次过滤至新管中。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志包含pan-免疫细胞标志CD45、T细胞标志(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Ror γ t、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/骨髓性标志(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或在离体获得的经纯化的CD45+肿瘤-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对肿瘤切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0789] 对多发性肺黑色素瘤转移的小鼠模型亦进行相同实验。小鼠黑色素瘤细胞系B16-BL6获得自ATCC且细胞是如上文描述体外培养。此实验使用雌性C57BL/6小鼠。这些小鼠是6至8周龄且重约16至20g。就肿瘤发展而言,将100μl的2E6个细胞/ml B16-BL6细胞悬浮液注射于各小鼠的尾静脉中。IV注射后植入的肿瘤细胞最终进入肺中。

[0790] 9天后将小鼠人道杀死。将肺称重并分析肺表面上的肺结节的存在。经提取的肺是用费可特溶液(Fekete's solution)漂白,该溶液因为B16细胞中的黑色素而不漂白肿瘤结节,虽然一小部分结节是无黑色素的(即,白色)。仔细计数肿瘤结节的数量以确定小鼠中的肿瘤负荷。通常,在对照组小鼠(即,PBS强饲)的肺上发现200至250个肺结节。

[0791] 针对不同治疗组计算肿瘤负荷百分比。将肿瘤负荷百分比定义为属于治疗组的小鼠的肺表面上的肺结节的平均数量除以对照组小鼠的肺表面上的肺结节的平均数量。

[0792] 通过LCMS技术或本领域已知的其他方法提交肿瘤活检和血液样品用于代谢分析。测试组之间的氨基酸、糖、乳酸盐及其他代谢物的不同浓度证实微生物组合物破坏肿瘤代谢状态的能力。

[0793] RNA测序以确定作用机制

[0794] 树突细胞纯化自肿瘤、伊尔氏斑(Peyers patch)及肠系膜淋巴结。进行RNAseq分析并根据本领域技术人员已知的标准技术进行分析(Z.Hou.Scientific Reports.[科技报告]5(9570):doi:10.1038/srep09570(2015))。在该分析中,特别关注先天性发炎通路基因,它们包括TLR、CLR、NLR及STING、细胞因子、趋化因子、抗原处理及呈递通路、交叉呈递及T细胞共刺激。

[0795] 一些小鼠可未处死,而是使用注射至对侧的侧腹(或其他区域)中的肿瘤细胞再攻击以测定免疫系统的记忆反应对肿瘤生长的影响。

[0796] 实例29:施用smEV与PD-1或PD-L1抑制的组合以治疗小鼠肿瘤模型

[0797] 为了确定smEV与PD-1或PD-L1抑制组合在肿瘤小鼠模型中的功效,可以如上所述使用小鼠肿瘤模型。

[0798] 针对小鼠肿瘤模型中单独或与完整细菌细胞组合的smEV且在存在或不存在抗PD-1或抗PD-L1下的功效对其进行测试。在不同时间点且以不同剂量施用smEV、细菌细胞和/或抗PD-1或抗PD-L1。例如,在肿瘤注射之后第10天或肿瘤体积达至100mm^3之后,用单独或与抗PD-1或抗PD-L1组合的smEV处理小鼠。

[0799] 小鼠可以口服、静脉内或瘤内施用smEV。例如,一些小鼠静脉内注射7.0e+09至3.0e+12之间的smEV颗粒。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受smEV,但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0800] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^4至5x10^9个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0801] 一些组的小鼠亦可注射有效剂量的检查点抑制剂。例如,小鼠接受于100μl PBS中的100μg抗PD-L1 mAB(克隆10f.9g2,欣博盛公司(BioXCell))或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB,及一些小鼠接受媒剂和/或其他适当的对照(例如,对照抗体)。在初始注射后的第3、6及9天,对小鼠注射mAB。为评估检查点抑制及smEV免疫疗法是否具有额外的抗肿瘤效应,将接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB的对照小鼠计入标准对照组。评估原发性(肿瘤尺寸)及继发性(肿瘤浸润性淋巴细胞及细胞因子分析)端点,及一些组的小鼠可以是经后续肿瘤细胞接种再激发以评估治疗对记忆反应的影响。

[0802] 实例30:迟发型超敏反应(DTH)的小鼠模型中的smEV

[0803] 迟发型超敏反应(DTH)为异位性皮肤炎(或过敏性接触性皮炎)的动物模式,如Petersen等人综述(In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery.[银屑病和特应性皮炎的体内药理疾病模型在药物开发中的应用]Basic&Clinical Pharm&Toxicology.[基础临床药理学和毒理学]2006.99(2):104-115;还参见Irving C.Allen(编)Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型:方法和实验室手册],Methods in Molecular Biology[分子生物学方法],2013.,第1031卷,DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13)。已使用DTH模型的几种变化且它们为本领域中熟知(Irving C.Allen(编).Mouse models of Innate Immunity:Methods and Protocols[先天免疫的小鼠模型:方法和实验室手册],Methods in Molecular Biology.[分子生物学方法],第1031卷,DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13,Springer Science+Business Media,LLC[施普林格科学与商业媒

体公司]2013)。

[0804] DTH可使用各种半抗原或抗原(例如,用佐剂乳化的抗原)在各种小鼠及大鼠品系中诱导。DTH的特征在于敏化作用及抗原特异性T细胞介导的反应,其导致红斑、浮肿及细胞浸润®尤其抗原呈现细胞(APC)、嗜酸性粒细胞、经活化的CD4+T细胞及表达细胞因子的Th2细胞的浸润。

[0805] 通常,小鼠是用在佐剂(例如,完全弗氏佐剂)的情况下施用的抗原诱发以诱导通过肿胀及抗原特异性抗体滴度衡量的继发(或记忆)免疫应答。

[0806] 地塞米松(皮质类固醇)是已知抗炎剂,其改善小鼠中的DTH反应,并充当阳性对照用于在此模型中抑制炎症(Taube及Carlsten,Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice.[地塞米松在抑制SCID小鼠迟发型超敏反应中的作用]Inflamm Res.[炎症研究]2000.49(10):548-52)。就阳性对照组而言,在第0天通过将6.8mg地塞米松稀释于400μL 96%乙醇中制备17mg/mL地塞米松的储备溶液。就给药的每天而言,通过将储备溶液100x稀释于无菌PBS中以在隔膜小瓶中获得0.17mg/mL的最终浓度制备用于腹膜内给药的工作溶液。经地塞米松治疗的小鼠i.p.接受100μL地塞米松(5mL/kg的0.17mg/mL溶液)。冷冻蔗糖充当阴性对照(媒剂)。在下面描述的研究中,每天给予媒剂、地塞米松(阳性对照)和smEV。

[0807] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在DTH的小鼠模型中的效力。例如,6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自泰康利公司(日耳曼敦,纽约州)或其他供货商。对各组小鼠背部四个位置(上方及下方)四次皮下(s.c.)注射有效剂量(例如每个位置50ul总体积)的抗原(例如,卵白蛋白(OVA)或匙孔血蓝蛋白(KLH))。就DTH应答而言,在克他命/甲苯噻嗪麻醉下(分别约50mg/kg及5mg/kg),对动物耳朵进行皮内(i.d.)注射。一些小鼠充当对照动物。第8天,一些组的小鼠以每只耳朵10ul(左耳媒剂对照(0.01%DMSO于生理盐水中)及右耳抗原(21.2ug(12nmol))激发。为量测耳炎,使用Mitutoyo千分尺量测人工限制的动物的耳厚度。耳厚度是在皮内激发之前作为各个别动物的基线水平进行量测。接着,耳厚度是在皮内激发后,在约24小时及48小时(即,第9天及第10天)时量测两次。

[0808] smEV治疗是在一些时间点(在引发的时间附近或在DTH激发的时间附近)下开始。例如,smEV可在皮下注射(第0天)的同时施用,或可将它们在皮内注射之前或皮内注射后施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。

[0809] 虽然一些小鼠将通过i.v.注射接受smEV,但另一些小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲、局部施用、皮内(i.d.)注射或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第0天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至$1\text{-}1x10^{12}$:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0810] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可

将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0811] 就smEV而言，总蛋白质是使用遵循制造商的使用说明进行的伯乐公司测定(目录号5000205)进行量测。

[0812] 匙孔血蓝蛋白(KLH)及完全弗氏佐剂(CFA)的乳化液是在免疫当天(第0天)新鲜制备。为此，将8mg KLH粉末称重并完全重新悬浮于16mL生理盐水中。乳化液是通过使用注射器及鲁尔锁连接器(luer lock connector)混合KLH/生理盐水及等体积的CFA溶液(例如，10mL KLH/生理盐水+10mL CFA溶液)进行制备。将KLH及CFA用力混合几分钟以形成白色乳化液以获得最大稳定性。进行跌落试验以检查是否获得均质乳化液。

[0813] 在第0天，C57Bl/6J雌性小鼠(约7周龄)是用含于CFA中的KLH抗原通过皮下免疫(4个位置，每个位置50μL)引发。栖组织普雷沃菌smEV和冻干的栖组织普雷沃菌smEV通过在低(6.0E+07)、中(6.0E+09)和高(6.0E+11)剂量下经口强饲进行测试。

[0814] 在第8天，用含于生理盐水(以10μL的体积)中的10μg KLH皮内(i.d.)激发小鼠的左耳。耳廓厚度是在抗原激发后的24小时进行量测(图20)。如通过耳厚度确定的，栖组织普雷沃菌smEV以其非冻干和冻干形式都有效抑制炎症。

[0815] 对于进一步的炎症研究，一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用抗炎剂(例如，抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗)，和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0816] 在各种时间点下，可以采集血清样品。可以将其他组的小鼠处死且可移除淋巴结、脾脏、肠系膜淋巴结(MLN)、小肠、结肠及其他组织用以使用本领域中已知的方法进行组织学研究、离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。一些小鼠是在O2/CO2麻醉下自眼血管丛抽血并进行ELISA分析。

[0817] 组织可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Rory-γ-t、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的CD45+浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0818] 自经处死的小鼠移除耳朵并放置于冷无EDTA的蛋白酶抑制剂混合物(罗氏公司(Roche))中。使用珠破坏将耳朵均质化并通过Luminex试剂盒(EMD密理博公司(EMD Millipore))遵循制造商的使用说明分析上清液中的各种细胞因子。另外，颈部淋巴结是通过细胞过滤器解离，清洗，并针对FoxP3(PE-FJK-16s)及CD25(FITC-PC61.5)使用本领域中已知的方法进行染色。

[0819] 为了检验DTH保护的影响和寿命，一些小鼠可以在稍后用激发抗原再次激发而不是处死，并分析小鼠对DTH的敏感性和应答的严重程度。

[0820] 实例31:实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的小鼠模型中的smEV

[0821] EAE是经充分研究的多发性硬化动物模型，如由Constantinescu等人评审(Experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)as a model for multiple sclerosis(MS).[实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)作为多发性硬化(MS)的模型]Br J Pharmacol.[英国药理学杂志]2011年10月;164(4):1079-1106)。其可使用不同髓磷脂相关肽，通过经活化的致脑炎T细胞的过继转移，或使用易受EAE影响的TCR转基因小鼠在各种小鼠及大鼠品系中诱导，如于Mangalam等人(Two discreet subsets of CD8+T cells modulate PLP_{91-110} induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice[CD8+T细胞的两个离散亚群调节HLA-DR3转基因小鼠中PLP_{91-110}诱导的实验性自身免疫性脑脊髓炎].J Autoimmun.[自身免疫性杂志]2012年6月;38(4):344-353)中讨论。

[0822] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合，添加或未添加其他抗炎治疗)在EAE的啮齿动物模型中的功效。此外，smEV可以口服施用或静脉内施用。例如，雌性6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自Taconic(日耳曼敦，纽约州)。对各组小鼠的背部两个位置(上方及下方)施用两次皮下(s.c.)注射0.1ml髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白35-55(MOG35-55;每次注射100ug;每只小鼠200ug(每只小鼠总计0.2ml))，其乳化于完全弗氏佐剂中(CFA;2-5mg经杀灭的结核分枝杆菌H37Ra/ml乳剂)。在上文发生后约1至2小时，对小鼠腹膜内(i.p.)注射含于0.1ml PBS(2ug/ml)中的200ng百日咳毒素(PTx)。PTx的另外IP注射是在第2天施用。可替代地，使用适当量的代替髓磷脂肽(例如，蛋白脂质蛋白(PLP))以诱导EAE。一些动物充当未经治疗的对照(naïve control)。评估EAE严重程度并自第4天开始根据本领域中已知的方法每天分配残疾分数(Mangalam等人，2012)。

[0823] smEV治疗是在一些时间点(在免疫的时间附近或在EAE免疫之后)下开始。例如，smEV可在免疫(第1天)的同时施用，或可将它们在出现残疾的第一迹象(例如，跛尾)后施用，或在严重的EAE期间施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如，一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受smEV，但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受smEV，而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如，所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至$1-1x10^{12}$:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0824] 可替代地，一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与smEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0825] 一些组的小鼠可在各种时间点及有效剂量下，用额外抗炎剂或EAE治疗剂(例如，抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)、维生素D、类固醇、抗炎剂或其他一种或多种治疗)和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0826] 另外，在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如，将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中，且在治疗时或在治

疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0827] 在各种时间点下,将小鼠处死并可移除发炎的位置(例如,脑及脊髓)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或在离体获得的经纯化的CD45+中枢神经系统(CNS)-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0828] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物(例如,经活化的致脑炎T细胞或EAE诱导肽的回注)再激发。分析小鼠在再激发后对疾病及EAE严重程度的易感性。

[0829] 实例32:胶原诱导的关节炎(CIA)的小鼠模型中的smEV

[0830] 胶原诱导的关节炎(CIA)为研究类风湿性关节炎(RA)常用的动物模型,如Caplazi等人(Mouse models of rheumatoid arthritis.[类风湿关节炎的小鼠模型]Veterinary Pathology.[兽医病理学]2015年9月1日.52(5):819-826)所述(还参见Brand等人Collagen-induced arthritis.[胶原诱导的关节炎]Nature Protocols.[自然实验手册]2007.2:1269-1275;Pietrosimone等人Collagen-induced arthritis:a model for murine autoimmune arthritis.[胶原诱导的关节炎:小鼠自身免疫性关节炎的模型]Bio Protoc.[生物实验手册]2015年10月20日;5(20):e1626)。

[0831] 在CIA啮齿动物模型的其他版本中,一种模型涉及用小鸡II型胶原使HLA-DQ8 Tg小鼠免疫,如由Taneja等人,(J.Immunology.[免疫学杂志]2007.56:69-78;亦参见Taneja等人,J.Immunology[免疫学杂志]2008.181:2869-2877;及Taneja等人,Arthritis Rheum.[关节炎与风湿病],2007.56:69-78)描述。小鸡CII的纯化已由Taneja等人,(Arthritis Rheum.[关节炎与风湿病],2007.56:69-78)所述。监测小鼠在免疫后的CIA疾病发作及进展,及评估疾病的严重程度并如由Wooley,J.Exp.Med.[实验医学杂志]1981.154:688-700描述进行“评级”。

[0832] 针对CIA诱导使小鼠免疫并将小鼠分为各种治疗组。测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在CIA中的功效。

[0833] smEV治疗是在用胶原免疫的时间附近或在免疫之后开始。例如,在一些组中,smEV可在免疫(第1天)的同时施用,或smEV可在出现疾病的第一迹象后施用,或在严重症状发作后施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受

smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0834] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0835] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用额外一种或多种抗炎剂或一种或多种CIA治疗剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)、维生素D、一种或多种类固醇、一种或多种抗炎剂和/或其他治疗),和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0836] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0837] 在各种时间点下,获得血清样品以使用标准ELISA评估抗小鸡及抗小鼠CII IgG抗体的浓度(Batsalova等人,Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains.[两种B10小鼠品系胶原诱导的关节炎发展过程中II型胶原特异性免疫反应的比较分析]Arthritis Res Ther.[关节炎研究与治疗]2012.14(6):R237)。同样地,将一些小鼠处死且可移除发炎的位置(例如,滑膜)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。使用本领域中已知的技术分析滑膜及滑液中的浆细胞浸润及抗体的存在。另外,使用解离酶根据制造商的使用说明解离组织以检查细胞浸润物谱。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+滑膜-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0838] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物(例如,CIA诱导的肽的活化回注)再激发。分析小鼠在再激发后对疾病及CIA严重程度的易感性。

[0839] 实例33:结肠炎的小鼠模型中的smEV

[0840] 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎是经充分研究的结肠炎动物模型,如由Randhawa等人综述(A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.[化学诱导的啮齿类动物炎性肠病模型综述]Korean J Physiol

Pharmacol.[韩国生理学和药理学杂志]2014.18(4):279-288;还参见Chassaing等人,Dextran sulfate sodium(DSS)-induced colitis in mice.[硫酸葡聚糖钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎]Curr Protoc Immunol.[免疫学实验指南]2014年2月4日;104:15.25单元)。

[0841] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加其他抗炎剂)在DSS诱导的结肠炎的小鼠模型中的功效。

[0842] 如本领域中已知,各组小鼠是用DSS处理以诱导结肠炎(Randhawa等人,2014;Chassaing等人,2014;还参见Kim等人,Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD.[在DSS诱导的IBD模型中调查肠道炎症]J Vis Exp.[可视实验杂志]2012.60:3678)。例如,雄性6至8周龄C57Bl/6小鼠获得自查尔斯河实验室(Charles River Labs),泰康利公司或其他供货商。结肠炎是通过将3%DSS(pmEV生物化学公司(pmEV Biomedicals),目录号0260110)添加至饮用水来诱导。一些小鼠不接受含于饮用水中的DSS且充当天然对照。一些小鼠接受水,历时五(5)天。一些小鼠可接受DSS,历时较短的持续时间或长于五(5)天。监测小鼠并使用本领域中已知的残疾活动指数基于重量损失进行评分(例如,无体重减轻(0分);1%至5%体重减轻(1分);5%至10%体重减轻(2分));粪便稠度(例如,正常(0分);大便稀溏(2分);腹泻(4分))及出血(例如,未出血(0分)、潜血阳性(1分);潜血阳性及视神经沉淀出血(2分);肛门周围的血液,大出血(4分)。

[0843] smEV治疗是在一些时间点(在DSS施用的第1天,或在之后的某一时刻)下开始。例如,smEV可在DSS开始(第1天)时同时施用,或可将它们在出现疾病的第一迹象(例如,体重减轻或腹泻)后施用,或在严重的结肠炎的整个阶段期间施用。每天观察小鼠的重量、发病率、存活、腹泻和/或血便的存在。

[0844] smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之间的smEV颗粒。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至$1\text{-}1x10^{12}$:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0845] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0846] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用额外的抗炎剂(例如,抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗),和/或适当的对照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0847] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些小鼠接受DSS而未预先接受抗生素。

[0848] 在各种时间点下,使用小动物内窥镜(卡尔史托斯公司(Karl Storz Endoskipe)德国)在异氟烷麻醉下使小鼠经历视讯内窥镜检查。记录静止影像及视讯以评估结肠炎的

程度及对治疗的反应。使用本领域中已知的标准对结肠炎进行评分。收集粪便材料用于研究。

[0849] 在各种时间点下，将小鼠处死并收集结肠、小肠、脾脏及淋巴结(例如，肠系膜淋巴结)。另外，将血液收集至血清分离管内。组织损伤是通过组织学研究评估，这些组织学研究评估(但不限于)隐窝结构、发炎细胞浸润程度及杯状细胞消耗。

[0850] 可移除胃肠(GI)道、淋巴结和/或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如，获取组织且可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的CD45+GI道-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0851] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发。分析小鼠在再激发后对结肠炎的易感性。

[0852] 实例34:1型糖尿病(T1D)的小鼠模型中的smEV

[0853] 1型糖尿病(T1D)是一种自身免疫性疾病，其中免疫系统靶向胰脏的胰岛，藉此破坏身体产生胰岛素的能力。

[0854] 存在T1D的动物模型的不同模型，如Belle等人综述(Mouse models for type 1diabetes.[1型糖尿病的小鼠模型]Drug Discov Today Dis Models.[今日药物发现:疾病模型]2009;6(2):41-45;还参见Aileen JF King.The use of animal models in diabetes research.[动物模型在糖尿病研究中的应用]Br J Pharmacol.[英国药理学杂志]2012年6月;166(3):877-894。存在用于化学诱导的T1D、病原体诱导的T1D的模型及其中小鼠自发发展T1D的模型。

[0855] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合，添加或未添加其他抗炎治疗)在T1D的小鼠模型中的效力。

[0856] 取决于T1D诱导的方法和/或T1D发展是否为自发性的，smEV治疗是在一些时间点(在诱导的时间附近或在诱导后，或在自发出现T1D发作之前(或发作后))下开始。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如，一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天接受smEV，而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如，所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至$1\text{-}1x10^{12}$:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0857] 可替代地，一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受$1x10^4$至$5x10^9$个细菌细胞。如与smEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0858] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用额外的治疗和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0859] 另外，在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如，将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中，且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0860] 血糖是在实验开始前两周一次进行监测。在此后的各种时间点下，量测非空腹血糖。在各种时间点下，将小鼠处死且可移除胰脏、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如，组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，还可以分析血清细胞因子，它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的组织-浸润性免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。抗体产生亦可通过ELISA进行评估。

[0861] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发，或针对复发的易感性进行评估。分析小鼠在再激发(或自发出现复发)对糖尿病发作及严重程度的易感性。

[0862] 实例35:原发性硬化性胆管炎(PSC)的小鼠模型中的smEV

[0863] 原发性硬化性胆管炎(PSC)是缓慢损害胆管并导致末期肝硬化的慢性肝疾病。它与炎性肠病(IBD)相关。

[0864] 存在用于PSC的各种动物模型，如由Fickert等人，(Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014年6月60(6):1290-1303;还参见Pollheimer及Fickert.Animal models in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis.[原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎的动物模型]Clin Rev Allergy Immunol.[过敏与免疫学临床评论]2015年6月48(2-3):207-17)。PSC模型中疾病的诱导包括化学诱导(例如，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢可力丁(DDC)诱导的胆管炎)、病原体诱导(例如，小球隐孢子虫)、实验性胆管梗阻(例如，胆总管结扎术(CBDL))及抗原驱动的胆管损伤的转基因小鼠模型(例如，Ova-Bil转基因小鼠)。例如，胆管结扎术是如由Georgiev等人，(Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation.[实验性胆管结扎后与时间相关的变化]Br J Surg.[英国外科学杂

志]2008.95(5):646-56)描述进行,或疾病是通过DCC暴露如由Fickert等人,(A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis.[一种新的异种生物诱导的硬化性胆管炎和胆汁纤维化小鼠模型]Am J Path.[美国病理学杂志],第171(2)卷:525-536描述诱导。

[0865] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加一些其他治疗剂)在PSC的小鼠模型中的功效。

[0866] DCC诱导的胆管炎

[0867] 例如,6至8周龄C57bl/6小鼠获得自Taconic或其他供货商。给小鼠喂食0.1%DCC补充饮食,持续各种持续时间。一些组接受DCC补充食物,历时1周,其他历时4周,其他历时8周。一些组的小鼠可在一段时间内接受DCC补充饮食及然后容许恢复,此后接受正常饮食。可研究这类小鼠自疾病恢复的能力和/或它们的一经后续暴露于DCC则复发的易感性。使用smEV的治疗是在某一时间点(在DCC喂养的时间附近或在开始暴露于DCC之后)开始。例如,smEV可在第1天施用,或可将它们在此后的某一时刻施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09和3.0e+12之间的smEV颗粒。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0868] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0869] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用另外的药剂和/或适当的对照(例如,媒剂或抗体)进行处理。

[0870] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。在各种时间点下,分析血清样品中的ALT、AP、胆红素及血清胆汁酸(BA)浓度。

[0871] 在各种时间点下,将小鼠处死,记录体重及肝重量,且移除发炎的位置(例如,肝、小肠及大肠、脾脏)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织形态学表征、细胞因子和/或流式细胞术分析(参见,Fickert等人,Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC)).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014.60(6):1290-1303)。例如,针对ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表达染色胆管。一些组织是经染色用于组织学检查,而其他组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、

CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80),及黏附分子表达(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。

[0872] 制备肝组织以用于组织学分析,例如,使用天狼星红染色,接着对纤维化区域定量。在治疗结束时,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,及用以测定胆红素浓度。羟脯胺酸的肝含量可使用预定方案量测。炎症及纤维化标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于MCP-1、α-SMA、Colllal及TIMP-。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定代谢组学方法进行。最后,对肝切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0873] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可稍后用DCC再激发。分析小鼠在再激发后对胆管炎及胆管炎严重程度的易感性。

[0874] BDL诱导的胆管炎

[0875] 可替代地,测试smEV在BDL诱导的胆管炎中的功效。例如,6至8周龄C57Bl/6J小鼠获得自泰康利公司或其他供货商。在适应期后,使这些小鼠经受手术程序以进行胆管结扎术(BDL)。一些对照动物接受假手术。BDL程序在7至21天内导致肝损伤、炎症及纤维化。

[0876] 使用smEV的治疗是在某一时间点(在手术的时间附近或在手术后的某一时刻)下开始。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0877] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0878] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用另外的药剂和/或适当的对照(例如,媒剂或抗体)进行处理。

[0879] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。在各种时间点下,分析血清样品中的ALT、AP、胆红素及血清胆汁酸(BA)浓度。

[0880] 在各种时间点下,将小鼠处死,记录体重及肝重量,且移除发炎的位置(例如,肝、

小肠及大肠、脾脏)、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织形态学表征、细胞因子和/或流式细胞术分析(参见,Fickert等人,Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis(PSC)).[原发性硬化性胆管炎(PSC)动物模型的表征]J Hepatol.[肝病学杂志]2014.60(6):1290-1303)。例如,针对ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1的表达染色胆管。一些组织是经染色用于组织学检查,而其他组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80),及黏附分子表达(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。

[0881] 制备肝组织以用于组织学分析,例如,使用天狼星红染色,接着对纤维化区域定量。在治疗结束时,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,及用以测定胆红素浓度。羟脯胺酸的肝含量可使用预定方案量测。炎症及纤维化标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于MCP-1、α-SMA、Coll1a1及TIMP。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定代谢组学方法进行。最后,对肝切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0882] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可针对恢复进行分析。

[0883] 实例36:非酒精性脂肪性肝炎(NASH)的小鼠模型中的smEV

[0884] 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的严重形式,其中肝脂肪(脂肪变性)及炎症的逐步发展导致肝损伤及肝细胞细胞死亡(鼓胀)。

[0885] 存在不同NASH动物模型,如Ibrahim等人综述(Animal models of Nonalcoholic steatohepatitis:Eat,Delete,and Inflame.[非酒精性脂肪性肝炎的动物模型:进食,删除和发炎]Dig Dis Sci.[消化疾病与科学]2016年5月.61(5):1325-1336;还参见Lau等人,Animal models of non-alcoholic fatty liver disease:current perspectives and recent advances[非酒精性脂肪肝疾病的动物模型:当前观点和最新进展]2017年1月241(1):36-44)。

[0886] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合,添加或未添加另一治疗剂)在NASH的小鼠模型中的效力。例如,将8至10周龄C57Bl/6J小鼠(获得自Taconic(纽约州日耳曼敦(Germantown,NY))或其他供货商)放置于缺乏甲硫胺酸胆碱(MCD)的饮食上,历时4至8周的周期,在此期间NASH特征发展,包括脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化。

[0887] 测试栖组织普雷沃菌衍生的smEV(单独或彼此结合,以不同比例,添加或未添加另一治疗剂)在NASH的小鼠模型中的功效。例如,使8周龄C57Bl/6J小鼠(获得自查尔斯河(Charles River)(法国)或其他供货商)适应5天的周期,基于体重随机分为10只小鼠的组,并放置于缺乏甲硫胺酸胆碱(MCD)的饮食上,例如来自研究用饮食公司(Research Diets)

(USA)的A02082002B,历时4周的周期,在此期间NASH特征发展,包括脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化。给对照食物小鼠喂养正常食物饮食,例如,来自SDS饮食公司(SDS Diets)(英国)的RM1(E)801492。随意提供对照食物、MCD饮食及水。

[0888] 使用自Kleiner等人,(Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease.[非酒精性脂肪肝疾病组织学评分系统的设计和验证]Hepatology.[肝脏病学]2005年6月41(6):1313-1321)调适的NAS评分系统以确定脂肪变性的程度(0至3分)、小叶炎症(0至3分)、肝细胞鼓胀(0至3分)及纤维化(0至4分)。个别小鼠NAS分数是通过针对脂肪变性、炎症、鼓胀及纤维化的分数(0至13分)求和进行计算。另外,血浆AST及ALT的浓度是使用来自堀场公司(Horiba)(美国)的Pentra 400仪器,根据制造商的使用说明进行测定。肝总胆固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙氨酸氨基转移酶及天冬氨酸氨基转移酶的浓度也是使用本领域中已知的方法进行测定。

[0889] 在其他研究中,炎症、纤维化、脂肪变性、ER应激或氧化应激标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括(但不限于)IL-1β、TNF-α、MCP-1、α-SMA、Col11a1、CHOP及NRF2。

[0890] smEV治疗是在一些时间点(在饮食开始时,或在饮食开始后的某一时刻(例如,一周后))下开始。例如,smEV可在开始MCD饮食的同一天施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV,但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如,起始自第1天)接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0891] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0892] 一些组的小鼠可在各种时间点及有效剂量下,用一种或多种另外的NASH治疗剂(例如,FXR激动剂、PPAR激动剂、CCR2/5拮抗剂或其他治疗)和/或适当的对照进行处理。

[0893] 在各种时间点下和/或在治疗结束时,将小鼠处死并可移除肝、肠、血液、排泄物或其他组织用于使用本领域中已知的方法进行离体组织学、生物化学、分子或细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,称重并制备肝组织用于组织学分析,其可包含用H&E、天狼星红染色,及测定NASH活动分数(NAS)。在各种时间点下,收集血液用于肝酶(例如,AST或ALT)的血浆分析,使用标准分析。另外,胆固醇、三酸甘油酯或脂肪酸的肝含量可使用预定方案进行量测。炎症、纤维化、脂肪变性、ER应激或氧化应激标志物的肝基因表达分析可通过qRT-PCR使用经验证的引子进行。这类标志物可包括但不限于IL-6、MCP-1、α-SMA、Col11a1、CHOP及NRF2。血浆、组织及粪便样品中的代谢物量测可使用预定的基于生物化学及质谱的代谢组学方法进行。可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞，和/或离体获得的经纯化的CD45+胆管-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后，对肝或肠切片进行免疫组织化学以量测中性粒细胞、T细胞、巨噬细胞、树突细胞或其他免疫细胞浸润物。

[0894] 为检查疾病保护的影响及寿命，一些小鼠不被处死而是可针对恢复进行分析。

[0895] 实例37:银屑病的小鼠模型中的smEV

[0896] 银屑病是T细胞介导的慢性炎症皮肤疾病。所谓的“斑块型”银屑病是银屑病的最常见形式且特征是干鳞、红色斑块、及皮肤因免疫细胞浸润至真皮及表皮内而增厚。数种动物模型有助于了解此疾病，如由Gudjonsson等人，(Mouse models of psoriasis.[银屑病的小鼠模型]J Invest Derm.[皮肤病学研究杂志]2007.127:1292-1308;还参见van der Fits等人，Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17axis.[咪喹莫特诱导的小鼠银屑病样皮肤炎症是通过IL-23/IL-17轴介导的]J.Immunol.[免疫学杂志]2009年5月1日.182(9):5836-45)。

[0897] 银屑病可于各种小鼠模型中诱导，包括那些使用转基因、敲除或异种移植模型，并局部施用咪喹莫特(IMQ)(一种TLR7/8配体)模型。

[0898] 测试smEV(单独或与完整细菌细胞组合，添加或未添加其他抗炎治疗)在银屑病的小鼠模型中的效力。例如，6至8周龄C57Bl/6或Balb/c小鼠获得自Taconic(日耳曼敦，纽约州)或其他供货商。将小鼠的背部及右耳剃光。各组小鼠接受每天62.5mg局部剂量的市售IMQ乳膏(5%)(咪喹莫特(Aldara);3M药物公司(3MPharmaceuticals))。将该剂量施用至经剃毛的区域，历时连续5或6天。每隔一定时间，对小鼠的红斑、结垢及增厚按自0至4的标度进行评分，如由der Fits等人，(2009)描述。使用Mitutoyo千分尺监测小鼠的耳厚度。

[0899] 使用smEV的治疗是在某一时间点(在第一次施用IMQ的时间附近，或之后的某一时刻)开始。例如，smEV可在皮下注射(第0天)的同时施用，或可将它们在施用之前或在施用后施用。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如，一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地，一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过经口强饲或i.v.注射接受smEV，但其他小鼠组可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天(例如，起始自第0天)接受smEV，而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如，所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至$1\text{-}1x10^{12}$:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0900] 可替代地，一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受$1x10^{4}$至$5x10^{9}$个细菌细胞。如与smEV一起施用，则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取，及施用，或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0901] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下，用抗炎剂(例如，抗CD154(TNF家族的成员的阻滞剂)或其他治疗)，和/或适当的对照(例如，媒剂或对照抗体)进行处理。

[0902] 另外，在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如，将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中，且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0903] 在各种时间点下,采集来自背部及耳朵皮肤的样品用于使用本领域中已知的方法进行冰冻切片染色分析。将其他组的小鼠处死且可移除淋巴结、脾脏、肠系膜淋巴结(MLN)、小肠、结肠及其他组织用以使用本领域中已知的方法进行组织学研究、离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。一些组织可使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。冰冻切片样品、组织样品或离体获得的细胞是经染色用于通过流式细胞术使用本领域中已知的技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的CD45+皮肤-浸润的免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。

[0904] 为检查银屑病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可经研究以评估恢复,或可将它们用IMQ再激发。分析经再激发的小鼠对银屑病及反应的严重程度的易感性。

[0905] 实例38:肥胖症(DIO)的小鼠模型中的smEV

[0906] 存在多种DIO的动物模型,如Tschop等人(A guide to analysis of mouse energy metabolism[小鼠能量代谢分析指南].Nat.Methods.[自然方法]2012;9(1):57-63)和Ayala等人(Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice[描述和执行小鼠葡萄糖体内稳态代谢测试的标准操作程序].Disease Models and Mechanisms.[疾病模型和机制]2010;3:525-534)所综述的并且由Physiogenex公司提供。

[0907] 测试smEV(单独或与其他完整细菌细胞(活的、被杀死的、被照射的和/或灭活的等)组合,添加或未添加其他抗炎治疗)在DIO的小鼠模型中的效力。

[0908] 取决于DIO诱导的方法和/或DIO发展是否为自发性的,smEV治疗是在一些时间点(在诱导的时间附近或在诱导后,或在自发出现T1D发作之前(或发作后))下开始。smEV是在不同剂量下及在规定时间间隔下施用。例如,一些小鼠是以10、15或20ug/小鼠静脉内注射smEV。其他小鼠可接受25、50或100mg smEV/小鼠。可替代地,一些小鼠接受7.0e+09至3.0e+12smEV颗粒/剂量。虽然一些小鼠通过i.v.注射接受smEV,但其他小鼠可通过腹膜内(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途径施用、经口强饲或其他施用方式接受smEV。一些小鼠可每天接受smEV,而其他小鼠可在交替时间间隔下(例如,每隔一天或每三天一次)接受smEV。可给小鼠组施用包含smEV和细菌细胞的混合物的本发明的药物组合物。例如,所述组合物可包含比例为1:1(smEV:细菌细胞)至1-1x10^{12}:1(smEV:细菌细胞)的smEV颗粒和完整细菌。

[0909] 可替代地,一些组的小鼠可以与smEV施用分开或组合的施用接受1x10^{4}至5x10^{9}个细菌细胞。如与smEV一起施用,则细菌细胞施用可通过施用途径、剂量及给药方案改变。这些细菌细胞可以是活的、死的或减弱的。这些细菌细胞可新鲜(或冷冻)获取,及施用,或可将它们在施用smEV之前经照射或热灭活。

[0910] 一些组的小鼠可在各种时间点下及在有效剂量下,用额外的治疗和/或适当的对

照(例如,媒剂或对照抗体)进行处理。

[0911] 另外,在治疗之前使用抗生素治疗一些小鼠。例如,将万古霉素(0.5g/L)、氨苄西林(1.0g/L)、庆大霉素(1.0g/L)及两性霉素B(0.2g/L)添加至饮用水中,且在治疗时或在治疗之前数天停止抗生素治疗。一些免疫小鼠是经治疗而不接受抗生素。

[0912] 血糖是在实验开始前两周一次进行监测。在此后的各种时间点下,量测非空腹血糖。在各种时间点下,将小鼠处死且可移除胰脏、淋巴结或其他组织以使用本领域中已知的方法进行离体组织学、细胞因子和/或流式细胞术分析。例如,组织是使用解离酶根据制造商的使用说明进行解离。将细胞染色以通过流式细胞术使用本领域内已知技术进行分析。染色抗体可包含抗CD11c(树突细胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析的其他标志物包括泛免疫细胞标志物CD45、T细胞标志物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、颗粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬细胞/髓样标志物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外,还可以分析血清细胞因子,它们包括但不限于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。可对获得自淋巴结或其他组织的免疫细胞,和/或离体获得的经纯化的组织-浸润性免疫细胞进行细胞因子分析。最后,对各种组织切片进行免疫组织化学以量测T细胞、巨噬细胞、树突细胞及检查点分子蛋白表达。抗体产生亦可通过ELISA进行评估。

[0913] 为检查疾病保护的影响及寿命,一些小鼠不被处死而是可用疾病触发物再激发,或针对复发的易感性进行评估。分析小鼠在再激发(或自发出现复发)对糖尿病发作及严重程度的易感性。

[0914] 实例39:标记细菌的smEV

[0915] smEV可以被标记,以便跟踪其在体内的生物分布,并在各种制剂和用哺乳动物细胞进行的测定中定量和跟踪细胞定位。例如,smEV可以是放射性标记的、与染料一起孵育、荧光标记的、发光标记的或用包含金属和金属同位素的缀合物标记的。

[0916] 例如,smEV可以与缀合至官能团(如NHS-酯、点击化学基团、链霉亲和素或生物素)的染料一起孵育。标记反应可以在多种温度下进行数分钟或数小时,并且可以进行或不进行搅拌或旋转。然后可以根据方案通过添加试剂(例如牛血清白蛋白(BSA)或类似试剂)来终止反应,并通过超速离心、过滤、离心过滤、柱亲和纯化或透析除去游离或未结合的染料分子。可以采用包含洗涤缓冲液和涡旋或搅拌的另外洗涤步骤以确保完全去除游离染料分子,例如在Su Chul Jang等人,Small.11,第4期,456-461(2017)中所述。

[0917] 通过共聚焦显微镜、纳米颗粒跟踪分析、流式细胞仪、荧光激活细胞分选(FAC)或荧光成像系统(例如Odyssey CLx LICOR),在细胞或器官中,或在体外和/或离体样品中检测荧光标记的smEV(参见例如Wiklander等人2015.J.Extracellular Vesicles[胞外囊泡杂志].4:10.3402/jev.v4.26316)。另外,使用仪器,诸如H-I.Choi等人Experimental& Molecular Medicine[实验与分子医学].49:e330(2017)中的IVIS光谱CT(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))或Pearl Imager在完整动物和/或经剥离的器官及组织中检测经荧光标记的smEV。

[0918] 也可以使用上述方案用含有金属和金属同位素的缀合物标记smEV。金属缀合的smEV可以体内给动物施用。然后可以在不同的时间点从器官中获取细胞,并进行离体分析。

可替代地,来源于动物、人或永生化细胞系的细胞可以用金属标记的smEV在体外处理,并且细胞随后用金属缀合的抗体标记并使用飞行时间流式细胞术(CyTOF)仪器(例如Helios CyTOF(富鲁达公司))进行表型分析或使用成像质量细胞术仪器(例如Hyperion成像系统(富鲁达公司))进行成像和分析。另外,smEV可以用放射性同位素标记以跟踪smEV的生物分布(参见,例如,Miller等人,Nanoscale[纳米尺度].2014年5月7日;6(9):4928-35)。

[0919] 实例40:透射电子显微镜以使纯化的细菌smEV可视化

[0920] smEV是从细菌分批培养中纯化的。透射电子显微镜(TEM)可用于可视化纯化的细菌smEV(S.Bin Park等人PLoS ONE[公共科学图书馆·综合].6(3):e17629(2011))。将smEV加载于300-或400-目-尺寸碳涂覆铜网(电子显微科学公司(Electron Microscopy Sciences),美国)上历时2分钟并用去离子水清洗。smEV使用2%(w/v)乙酸铀酰负染色20秒至1分钟。铜网用无菌水清洗并干燥。影像使用透射电子显微镜以100至120kV加速电压获取。经染色的smEV在直径20nm-600nm之间出现且为电子致密的。对各网筛选10至50个视野。

[0921] 实例41:图谱分析smEV组成及内容物

[0922] smEV可通过包括(但不限于)以下的各种方法中的任一者来表征:NanoSight表征、SDS-PAGE凝胶电泳、蛋白质印迹、ELISA、液相色谱-质谱法及质谱、动态光散射、脂质水平、总蛋白、脂质与蛋白质比、核酸分析和/或ζ电位。

[0923] smEV的NanoSight表征

[0924] 纳米颗粒跟踪分析(NTA)用以表征经纯化的smEV的粒度分布。于NanoSight机器(马尔文仪器公司(Malvern Instruments))上运行纯化的smEV制剂以评估smEV尺寸及浓度。

[0925] SDS-PAGE凝胶电泳

[0926] 为了鉴定纯化的smEV的蛋白质组分,将样品使用标准技术在凝胶上运行,例如Bolt Bis-Tris Plus 4-12%凝胶(赛默飞世尔科技公司(Thermo-Fisher Scientific))。将样品于1x SDS样品缓冲液中煮沸10分钟,冷却至4℃,及然后在16,000x g下离心1分钟。然后,将样品于SDS-PAGE凝胶上运行并使用几种标准技术(例如,银染色、考马斯蓝、凝胶代码蓝)中的任何一者进行染色以使条带可视化。

[0927] 蛋白质印迹分析

[0928] 为鉴定及定量纯化的smEV的特定蛋白质组分,smEV蛋白通过如上文描述的SDS-PAGE分离及经受蛋白质印迹分析(Cvjetkovic等人,Sci.Rep.[科学报告]6,36338(2016))并经由ELISA定量。

[0929] smEV蛋白质组学与液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)及质谱法(MS)

[0930] 存在于smEV中的蛋白质通过质谱法技术鉴定及定量。可以使用标准技术制备smEV蛋白用于LC-MS/MS,所述标准技术包括使用二硫苏糖醇溶液(DTT)进行蛋白还原以及使用酶(例如LysC和胰蛋白酶)进行蛋白消化(如在Erickson等人,2017(Molecular Cell[分子细胞],第65卷,第2期,第361-370页,2017年1月19日)中所述)。另一方面,肽是如Liu等人.2010(JOURNAL OF BACTERIOLOGY[细菌学杂志],2010年6月,第2852-2860页第192卷,第11期),Kieselbach和Oscarsson 2017(Data Brief[数据摘要].2017年2月;10:426-431.),Vildhede等人,(Drug Metabolism and Disposition[药物代谢与处置]2018年2月8日)中所述制备。消化后,直接在液相色谱和质谱仪上运行肽制剂,用于在单个样品中鉴定蛋白

质。为了相对定量样品之间的蛋白质,使用iTRAQ试剂-8plex多重试剂盒(应用生物系统公司(Applied Biosystems),福斯特城,加利福尼亚州)或TMT 10plex和11plex标记试剂(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fischer Scientific),圣何塞,加利福尼亚州,USA)将来源于不同样品的肽消化物用同量异位素标签进行标记。每个肽消化物都用不同的同量异位素标签标记,然后将经标记的消化物合组合进入一个样品混合物。通过LC-MS/MS分析组合的肽混合物,以进行鉴定和定量。使用LC-MS/MS数据进行数据库搜索,以鉴定经标记的肽和相应的蛋白质。在同量异位素标记的情况下,附着标签的片段产生低分子量的报告离子,该离子用于获得每个smEV中存在的肽和蛋白质的相对定量。

[0931] 另外,代谢内容物使用液体色谱法与质谱法的组合进行确定。存在测定各种样品的代谢内容物且为本领域技术人员已知的各种技术,这些技术涉及溶剂萃取、层析分离及耦合至质量测定的各种电离技术(Roberts等人,2012Targeted Metabolomics.[靶向代谢组学]Curr Protoc Mol Biol.[当代分子生物学方案]30:1-24;Dettmer等人,2007,Mass spectrometry-based metabolomics.[基于质谱的代谢组学]Mass Spectrom Rev.[质谱综述]26(1):51-78)。作为一项非限制性实例,LC-MS系统包括与1100系列泵(安捷伦公司(Agilent))及HTS PAL自动进样器(Leap科技公司(Leap Technologies))组合的4000QTRAP三重四级杆质谱仪(AB SCIEX)。培养基样品或其他复杂代谢混合物(约10μL)是使用九体积的含有稳定的同位素标记内标物(缬胺酸-d8,Isotec;及苯丙胺酸-d8,剑桥同位素实验室(Cambridge Isotope Laboratories))的74.9:24.9:0.2(v/v/v)乙腈/甲醇/甲酸进行萃取。标准物可取决于受关注的代谢物进行调整或修饰。样品是经离心(10分钟,9,000g,4℃),及上清液(10μL)是通过将溶液注射于HILIC管柱(150×2.1mm,3μm粒度)上而呈递至LCMS。管柱通过使5%流动相[10mM甲酸铵,0.1%甲酸于水中]以250uL/分钟的速率流动1分钟,接着线性梯度历时10分钟至40%流动相的溶液[具有0.1%甲酸的乙腈]进行洗脱。将离子喷雾电压设定至4.5kV及源温度是450℃。

[0932] 数据是使用市售软件(诸如来自AB SCIEX的Multiquant 1.2)进行分析以用于质谱峰积分。受关注的峰应手动控制并与标准进行比较来证实该峰的同一性。用适当的标准物进行定量以确定在细菌调节(bacterial conditioning)后及在肿瘤细胞生长后,初始培养基中存在的代谢物的量。也可以使用代谢物数据库(例如但不限于NIST数据库)将非靶向代谢组学方法用于峰鉴定。

[0933] 动态光散射(DLS)

[0934] DLS量测(包括不同尺寸的颗粒在不同smEV制剂中的分布)是使用仪器诸如DynaPro NanoStar(怀雅特技术公司(Wyatt Technology))及Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司(Malvern Instruments))进行。

[0935] 脂质水平

[0936] 脂质水平是使用FM4-64(生命科技公司(Life Technologies)),通过类似于那些由A.J.McBroom等人,J Bacteriol[细菌学杂志]188:5385-5392.及A.Frias等人,Microb Ecol.[微生物生态学]59:476-486(2010)描述者的方法进行定量。样品是用FM4-64培养(3.3μg/mL于PBS中,在37℃下在黑暗中培养10分钟)。在515nm下激发后,在635nm下的发射是使用Spectramax M5平板阅读器(分子仪器公司(Molecular Devices))量测。绝对浓度是通过将未知样品与已知浓度的标准物(诸如棕榈酰油酸磷脂酰甘油(POPG)囊泡)进行比较

而测定。脂质组学可用于鉴定smEV中存在的脂质。

[0937] 总蛋白质

[0938] 蛋白质水平是通过标准分析(诸如布拉德福德及BCA分析)定量。这些布拉德福德分析是使用Quick Start布拉德福德1x染料试剂(伯乐公司(Bio-Rad)),根据制造商的方案运行。BCA分析是使用Pierce BCA蛋白质分析试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo-Fisher Scientific))运行。绝对浓度是通过与产生自已知浓度的BSA的标准曲线进行比较而测定。可替代地,蛋白质浓度可以使用比尔-朗伯(Beer-Lambert)方程使用如在纳米滴分光光度计(赛默飞世尔科技公司)上测量的样品在280nm(A280)处的吸光度来计算。此外,蛋白质组学可以用于鉴定样品中的蛋白质。

[0939] 脂质:蛋白质比率

[0940] 脂质:蛋白质比率是通过脂质浓度除以蛋白质浓度产生。相较于各制剂中的游离蛋白质,这类提供囊泡的纯度的量度。

[0941] 核酸分析

[0942] 核酸提取自smEV并使用Qubit荧光计定量。粒度分布是使用生物分析仪评估并将材料测序。

[0943] ζ电位

[0944] 不同制剂的ζ电位是使用诸如Zetasizer ZS(Malvern Instruments)的仪器量测。

[0945] 实例42:体外筛选用于增强活化树突细胞的smEV

[0946] 体外免疫应答被认为是模拟体内诱导免疫应答(例如对癌症微环境的应答)的机制。简而言之,PBMC是通过梯度离心使用淋巴细胞分离剂(奈科明公司(Nycomed),奥斯陆,挪威)分离自来自健康供体的肝素化静脉血或使用基于磁珠的人血树突细胞分离试剂盒(美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech),坎布里奇,马萨诸塞州)分离自小鼠脾脏或骨髓。使用抗人CD14 mAb,单核细胞是通过Moflo纯化并在cRPMI中以5e5个细胞/ml的细胞密度于96孔板(科斯塔公司(Costar Corp))中在37℃下培养7天。就树突细胞的成熟而言,培养物以0.2ng/mL IL-4及1000U/ml GM-CSF在37℃下刺激一周。可替代地,通过与重组GM-CSF孵育一周或使用本领域已知的其他方法实现成熟。小鼠DC可使用珠富集直接获取自脾脏或分化自造血干细胞。简而言之,骨髓可以获得自小鼠的股骨。回收细胞并裂解红细胞。干细胞在细胞培养基在20ng/ml小鼠GMCSF中培养4天。添加含有20ng/ml小鼠GM-CSF的另外培养基。在第6天,将培养基及非黏附细胞移除并用含有20ng/ml GMCSF的新鲜细胞培养基置换。具有20ng/ml GM-CSF的细胞培养基的最终添加是在第7天添加。在第10天,获取非黏附细胞并接种于细胞培养板中过夜并视需要进行刺激。然后用不同剂量的smEV(用或不用抗生素)处理树突细胞。例如,25-75ug/mL smEV与抗生素24小时。测试的smEV组合物可包括来自单一细菌物种或菌株的smEV,或来自一个或多个属、1个或多个物种、或1个或多个菌株(例如,一个物种内的一个或多个菌株)的smEV的混合物。包括作为阴性对照的PBS并且来自双歧杆菌属物种的LPS、抗CD40抗体和/或smEV用作阳性对照。在培养后,DC是用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCI及MHCII染色,及通过流式细胞术分析。相较于阴性对照在CD40、CD80、CD83及CD86中显著增加的DC被视为由相关细菌smEV组合物活化。这些实验最少重复三次。

[0947] 为筛选经smEV活化的上皮细胞刺激DC的能力,上述方案是以添加24小时上皮细胞

smEV共培养物且接着用DC培养进行。在用smEV培养后，清洗上皮细胞及然后在缺乏smEV的情况下与DC共培养24小时，然后如上文进行处理。上皮细胞系可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

[0948] 作为DC活化的另外量测，在用smEV或经smEV处理的上皮细胞将DC培养24小时后，自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD密理博公司(EMD Millipore)，达姆施塔特市，德国)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之，这些孔用缓冲液预湿，并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后，用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后，用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后，将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0949] 标准物容许细胞因子(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-22IL-23、IL-25、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外，亦评估细胞因子mRNA以解决应答于smEV组合物的细胞因子释放。

[0950] 此DC刺激方案可使用纯化的smEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0951] 实例43:当用肿瘤细胞培养时，体外筛选用于增强CD8+T细胞杀死活化的smEV

[0952] 本文描述用于筛选可活化肿瘤细胞的CD8+T细胞杀死的smEV的体外方法。简言之，使用本领域已知的技术从人PBMC或小鼠脾脏分离DC，并与单一菌株smEV、smEV的混合物和/或适当的对照在体外孵育。另外，CD8+T细胞是使用本领域已知的技术，例如基于磁珠的小鼠CD8a+T细胞分离试剂盒及基于磁珠的人CD8+T细胞分离试剂盒(两者均来自美天旎生物技术公司(Miltenyi Biotech)，坎布里奇，马萨诸塞州)获得自人PBMC或小鼠脾脏。在DC与smEV孵育一段时间(例如，24小时)后，或DC与smEV刺激的上皮细胞孵育后，用PBS洗涤从细胞培养物中去除smEV，并向每个孔中添加100ul含有抗生素的新鲜培养基，并且向96孔板中的每个实验孔中添加200,000个T细胞。抗CD3抗体是以2ug/ml的最终浓度添加。然后，容许在37℃下在正常氧条件下将共培养物培养96小时。

[0953] 例如，在共培养孵育大约72小时后，用本领域已知的技术将肿瘤细胞接种以用于测定。例如，以50,000个肿瘤细胞/孔接种于新96孔板中的各孔中。所用的小鼠肿瘤细胞系可包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在96小时共培养完成后，将100μl的CD8+T细胞及DC混合物转移至含有肿瘤细胞的孔。在37℃下在正常氧条件下将板培养24小时。星形孢菌素可以用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0954] 在此培养后，使用流式细胞术以量测肿瘤细胞死亡及表征免疫细胞表型。简而言

之,肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。细胞毒性CD8+T细胞表型可通过下列方法表征:a)上清液颗粒酶B、IFNγ及TNFa于培养上清液中的浓度,如下文描述;b)活化标志物(诸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δTCR、Foxp3、T-bet、颗粒酶B)的CD8+T细胞表面表达;c)IFNγ、颗粒酶B、TNFa于CD8+T细胞中的胞内细胞因子染色。除上清液细胞因子浓度(包括INFγ、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趋化因子等)外,亦可通过胞内细胞因子染色评估CD4+T细胞表型。

[0955] 作为CD8+T细胞活化的额外测量,在用DC将T细胞培养96小时后,自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD Millipore,Darmstadt,Germany)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之,这些孔用缓冲液预湿,并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后,用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后,用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后,将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0956] 标准物容许细胞因子(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12(p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外,亦评估细胞因子mRNA以解决应答于smEV组合物的细胞因子释放。宿主细胞中的这类变化刺激与癌症微环境中的体内应答类似的免疫应答。

[0957] 此CD8+T刺激方案可使用经纯化的smEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0958] 实例44:通过PBMC体外筛选用于增强肿瘤细胞杀死的smEV

[0959] 各种方法可用于针对刺激PBMC的能力来筛选smEV,PBMC反过来活化CD8+T细胞以杀死肿瘤细胞。例如,PBMC是通过用于小鼠或人血液的菲可-帕克(ficoll-paque)梯度离心分离自来自健康人供体的肝素化静脉血或用淋巴细胞分离培养基(Cedarlane实验室(Cedarlane Labs),安大略,加拿大)分离自小鼠血液。PBMC与单一菌株smEV、smEV的混合物和适当的对照孵育。另外,CD8+T细胞获得自人PBMC或小鼠脾脏。在PBMC与smEV孵育24小时后,使用PBS洗涤将smEV从细胞中去除。向每个孔中添加100ul带有抗生素的新鲜培养基。在96孔板的每个实验孔中添加适当数量的T细胞(例如200,000个T细胞)。抗CD3抗体是以2ug/ml的最终浓度添加。然后,容许在37℃下在正常氧条件下将共培养物培养96小时。

[0960] 例如,进入共培养物培养72小时后,以50,000个肿瘤细胞/孔接种于新96孔板中的各孔中。所用的小鼠肿瘤细胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配,且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在96小时共培养完成后,将100μl的CD8+T细胞及PBMC混合物转移至含有肿瘤细胞的孔。在37℃下在正常氧条件下将板

培养24小时。星形孢菌素用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0961] 在此培养后，使用流式细胞术以量测肿瘤细胞死亡及表征免疫细胞表型。简而言之，肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。细胞毒性CD8+T细胞表型可通过下列方法表征:a)上清液颗粒酶B、IFNy及TNFa于培养上清液中的浓度，如下文描述;b)活化标志物(诸如DC69、CD25、CD154、PD-1、γ/δTCR、Foxp3、T-bet、颗粒酶B)的CD8+T细胞表面表达;c)IFNy、颗粒酶B、TNFa于CD8+T细胞中的胞内细胞因子染色。除上清液细胞因子浓度(包括INFy、TNFa、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趋化因子等)外，亦可通过胞内细胞因子染色评估CD4+T细胞表型。

[0962] 作为CD8+T细胞活化的额外测量，在用DC将T细胞培养96小时后，自孔移除100μl培养上清液并使用Luminex Magpix.多任务试剂盒(EMD Millipore,Darmstadt,Germany)分析分泌的细胞因子、趋化因子及生长因子。简而言之，这些孔用缓冲液预湿，并添加25μl的1x经抗体涂覆的磁珠且2x 200μl清洗缓冲液是在每个孔中使用磁珠进行。添加50μl培养缓冲液、50μl稀释剂及50μl样品并经由在室温下在黑暗中振荡2小时进行混合。然后，用200μl清洗缓冲液清洗这些珠两次。添加100μl的1X生物素化检测抗体并及黑暗中伴随振荡培养悬浮液1小时。然后，用清洗缓冲液进行两次200μl清洗。将100μl的1x SAV-RPE试剂添加至各孔并在室温下在黑暗中培养30分钟。进行三次200μl清洗并添加125μl清洗缓冲液及进行2至3分钟振荡。然后，将这些孔呈递至Luminex xMAP系统中用于分析。

[0963] 标准物容许细胞因子(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12(p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)的仔细定量。评估小鼠及人起源两者的样品中的这类细胞因子。经细菌处理的样品中的这类细胞因子的增加指示宿主增强产生蛋白质及细胞因子。检查特定细胞类型释放细胞因子的能力的此分析的其他变化是经由通过分选方法获取这类细胞进行评估并为本领域中的一般技术者知晓。此外，亦评估细胞因子mRNA以解决应答于smEV组合物的细胞因子释放。宿主细胞中的这类变化刺激与癌症微环境中的体内应答类似的免疫应答。

[0964] 此PBMC刺激方案可使用纯化的smEV(具有或不具有活的，死的或灭活的/减弱的细菌菌株的组合)重复以最大化免疫刺激潜力。

[0965] 实例45:体外检测抗原呈递细胞中的smEV

[0966] 固有层中的树突细胞通过延伸它们的树突穿过肠上皮以不断地在肠腔中取样活细菌、死细菌及微生物产物，这是由细菌在肠腔中产生的smEV可直接刺激树突细胞的一种方法。下列方法表示一种评估抗原呈递细胞差异摄取smEV的方法。视需要，这类方法可用以评估向患者施用的smEV的免疫调节行为。

[0967] 树突细胞(DC)是根据标准方法或套组方案(例如，Inaba K、Swiggard WJ、Steinman RM、Romani N、Schuler G,2001.Isolation of dendritic cells.[树突细胞的分离]Current Protocols in Immunology[当代免疫学实验手册]，第3章:单元3.7)。

[0968] 为评估smEV进入和/或存在于DC中，将250,000个DC接种于圆形盖玻片上的完全RPMI-1640培养基中及然后以不同比率与来自单一细菌菌株的smEV或组合smEV进行孵育。纯化的smEV可以用荧光色素或荧光蛋白标记。孵育不同时间点(例如1小时，2小时)后，用冰

冷PBS洗涤细胞两次，并用胰蛋白酶从板上分离细胞。使细胞保持完整或裂解。然后处理样品以用于流式细胞术。自裂解的样品定量总内化smEV，及通过计数荧光细胞量测摄取smEV的细胞的百分率。上文描述的方法亦可使用巨噬细胞或上皮细胞系(获得自ATCC)代替DC以大体上相同方式进行。

[0969] 实例46:体外筛选当与靶细胞孵育时具有活化NK细胞杀死的增强的能力的smEV

[0970] 为了证明所选smEV组合物引起对肿瘤细胞的有效NK细胞细胞毒性的能力，使用以下体外测定。简而言之，自健康人供体获得来自肝素化血液的单核细胞。视需要，如先前描述般进行增加NK细胞的数量的扩增步骤(例如，参见Somanschi等人，J Vis Exp.[视觉实验杂志]2011;(48):2540)。可以将细胞调整至在含有5％人血清的RPMI-1640培养基中的细胞/ml浓度。然后，用适当的抗体标记PMNC细胞及通过FACS将NK细胞分离为CD3-/CD56+细胞且准备用于后续的细胞毒性分析。可替代地，NK细胞是使用autoMACs仪器及NK细胞分离试剂盒遵循制造商的使用说明(美天旎生物技术公司(Miltenyl Biotec))进行分离。

[0971] 将NK细胞进行计数并以96孔格式以20,000个或更多个细胞/孔接种，并与单一菌株smEV(在添加或不添加以下各项的情况下:抗原呈递细胞(例如衍生自同一供体的单核细胞)、来自细菌菌株混合物的smEV和适当对照)孵育。用smEV培养NK细胞5至24小时后，用PBS清洗将smEV自细胞移除，将NK细胞重新悬浮于具有抗生素的10mL新鲜培养基中，并添加至含有20,000个靶肿瘤细胞/孔的96孔板。所用的小鼠肿瘤细胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人肿瘤细胞系是与供体HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA细胞系。在37℃下在正常氧条件下将板培养2-24小时。星形孢菌素用作阴性对照以解释细胞死亡。

[0972] 在此孵育之后，使用本领域已知的方法使用流式细胞术来测量肿瘤细胞死亡。简而言之，肿瘤细胞用活性染料染色。使用FACS分析以对肿瘤细胞特异性门控并量测死(被杀死)肿瘤细胞的百分率。数据亦显示为每孔死肿瘤细胞的绝对数量。

[0973] 此NK刺激方案可使用纯化的smEV及活细菌菌株的组合重复以最大化免疫刺激潜力。

[0974] 实例47:使用体外免疫活化测定以预测smEV组合物的体内癌症免疫疗法功效

[0975] 体外免疫活化测定鉴定可刺激树突细胞(其进一步活化CD8+T细胞杀死)的smEV。因此，上文描述的体外分析是用作针对潜在免疫治疗活性的大量候选smEV的预测、筛选。优先选择显示增强刺激树突细胞、增强刺激CD8+T细胞杀死、增强刺激PBMC杀死和/或增强刺激NK细胞杀死的smEV以供体内癌症免疫疗法功效研究。

[0976] 实例48:确定当经口递送至小鼠时smEV的生物分布

[0977] 用受关注的smEV组合物经口接种野生型小鼠(例如，C57BL/6或BALB/c)以确定经纯化的smEV的体内生物分布谱。smEV被标记以有助于下游分析。可替代地，可以研究荷瘤小鼠或患有某些免疫障碍(例如系统性红斑狼疮、实验性自身免疫性脑脊髓炎、NASH)的小鼠在给定时间过程中smEV的体内分布。

[0978] 小鼠可在规定时间过程内接受单一剂量的smEV(例如，25-100μg)或数个剂量(25-100μg)。可替代地，smEV剂量可基于颗粒计数(例如，7e+08至6e+11个颗粒)施用。遵循经批准的方案将小鼠饲养在无特定病原体的条件下。可替代地，可将小鼠饲养并保持在消毒、无菌条件下。血液、大便和其他组织样品可在适当的时间点下采集。

[0979] 在施用smEV组合物后的各个时间点(即,小时至天)下将小鼠人道处死并在无菌条件下进行完全尸检。遵循标准方案,获取淋巴结、肾上腺、肝、结肠、小肠、盲肠、胃、脾脏、肾、膀胱、胰脏、心脏、皮肤、肺、脑及受关注的其他组织及直接使用或快速冻结用于进一步测试。遵循本领域技术人员已知的标准方案将这些组织样品解剖并均质化以制备单细胞悬浮液。然后,通过流式细胞术定量在样品中存在的smEV数量。定量亦可在适当处理完整小鼠组织后利用荧光显微术进行(Vankelecom H.,Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization[固定和石蜡包埋的小鼠组织用于GFP可视化],Cold Spring Harb.Protoc.[冷泉港实验手册],2009)。可替代地,动物可使用活体成像根据smEV标记技术进行分析。

[0980] 可在癌症小鼠模型(例如但不限于CT-26和B16(参见例如Kim等人,Nature Communications[自然通讯]第8卷,第626期(2017)))或自身免疫小鼠模型(例如但不限于EAE和DTH(参见例如Turjeman等人,PLoS One[公共科学图书馆·综合]10(7):e0130442(20105)))中进行生物分布。

[0981] 实例49:制造条件

[0982] 富集培养基用于生长和制备用于体外和体内使用、并最终用于pmEV和smEV制剂的细菌。例如,培养基可含有糖、酵母提取物、基于植物的蛋白胨、缓冲液、盐、微量元素、表面活性剂、消泡剂及维生素。复杂组分(如酵母提取物及蛋白胨)的组成可未经定义或经部分定义(包括氨基酸、糖等的近似浓度)。微生物代谢可取决于资源(如碳及氮)的可用性。可测试各种糖或其他碳源。可替代地,可制备培养基并使所选细菌生长,如由Saarela等人,J.Applied Microbiology.[应用微生物学杂志]2005.99:1330-1339显示,其以引用的方式并入本文中。发酵时间、冷冻保护剂及细胞浓缩物的中和对冷冻干燥存活、储存稳定性及无基于牛奶的成分所产生的所选细菌的酸及胆汁暴露的影响。

[0983] 对培养基大规模灭菌。灭菌可以通过超高温(UHT)处理来完成。在极高温下实施短时间段的UHT处理。UHT范围可为135℃-180℃。例如,可在135℃下将培养基灭菌10至30秒。

[0984] 可在烧瓶或较小生物反应器中制备接种物且监测生长。例如,接种物大小可为总生物反应器体积的大约0.5%至3%。取决于应用及材料需要,生物反应器体积可为至少2L、10L、80L、100L、250L、1000L、2500L、5000L、10,000L。

[0985] 在接种之前,生物反应器为使用培养基在所需的pH、温度及氧浓度下进行制备。培养基的初始pH可不同于制程设定点。pH应激在低细胞浓度下可以是不利的;初始pH可在pH 7.5与处理设定点之间。例如,pH可设定于4.5与8.0之间。在发酵期间,pH可通过使用氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铵进行控制。温度可控制于25℃至45℃,例如在37℃下。通过将培养液中的氧含量从约8mg/L降低至0mg/L来产生厌氧条件。例如,可使用氮或气体混合物(N2、CO2及H2)来确立厌氧条件。可替代地,不使用气体且通过消耗来自培养基的剩余氧的细胞来确立厌氧条件。取决于菌株及接种物大小,生物反应器发酵时间可有所变化。例如,发酵时间可从大约5小时至48小时有所变化。

[0986] 自冷冻状态恢复微生物可需具体考虑。产生培养基可在解冻后对细胞产生应激;可能需要特定解冻培养基以自始至终地自经解冻的材料开始菌种培养。出于增加菌种体积或维持微生物生长状态的目的,种材料至新鲜培养基的转移或传代的动力学可受微生物的当前状态(例如,指数生长、静止生长、无应激、受应激)影响。

[0987] 产生发酵器的接种可影响生长动力学及细胞活性。生物反应器系统的初始状态必须经优化以促进成功且始终如一的产生。种培养物相对于总培养基的分率(例如,百分率)对生长动力学有显著影响。范围可以是发酵器工作体积的1％至5％。培养基的初始pH可不同于处理设定点。pH应激在低细胞浓度下可以是不利的;初始pH可在pH 7.5与处理设定点之间。在接种期间,搅动及气体流入系统内可不同于处理设定点。在低细胞浓度下,物理及化学应激因两个条件而可以是不利的。

[0988] 处理条件及对照设定可影响微生物生长及细胞活性的动力学。处理条件的变化可改变膜组成、代谢物的产生、生长速率、细胞应激等。用于生长的优化温度范围可随菌株改变。该范围可以是20℃至40℃。用于细胞生长及下游活性表现的最佳pH可随菌株改变。该范围可以是pH 5至8。溶解于培养基中的气体可被细胞用于代谢。可能需要在整个过程期间调节O2、CO2及N_2浓度。营养素的可用性可改变细胞生长。当可获得过量的营养素时,微生物可具有替代动力学。

[0989] 微生物在发酵结束时及在获取期间的状态可影响细胞存活及活性。微生物可在获取前不久进行预处理以更好地制备它们用于涉及分离及下游处理的物理及化学应激。当自发酵器移除时,温度的变化(通常减小至20℃至5℃)可减少细胞代谢、减缓生长(和/或死亡)及生理变化。离心浓度的有效性可受培养pH影响。pH上升1至2点可改善浓度的有效性但对细胞也可以是不利的。微生物可通过增加盐和/或糖在培养基中的浓度而在获取前不久即受应激。以此方式受应激的细胞可在下游期间更好地在冷冻及冻干中存活。

[0990] 分离方法及技术可影响自培养基分离微生物的效率。固体可使用离心技术移除。离心浓度的有效性可受培养pH或由利用絮凝剂影响。pH上升1至2点可改善浓度的有效性但对细胞也可以是不利的。微生物可通过增加盐和/或糖在培养基中的浓度而在获取前不久即受应激。以此方式受应激的细胞可在下游期间更好地在冷冻及冻干中存活。另外,微生物也可经由过滤进行分离。若细胞需过量的g分钟以成功离心,则就纯化而言,过滤优于离心技术。可在分离之前之后添加赋形剂。可添加赋形剂以用于冷冻保护或用于冻干期间的保护。赋形剂可包括但不限于蔗糖、海藻糖或乳糖,且可替代地这些赋形剂可与缓冲剂及抗氧化剂混合。在冻干之前,将与赋形剂混合的细胞沉淀物液滴浸没于液氮中。

[0991] 可通过连续离心实施收获。产品可用各种赋形剂重新悬浮至所需的最终浓度。可添加赋形剂以用于冷冻保护或用于冻干期间的保护。赋形剂可包括但不限于蔗糖、海藻糖或乳糖,且可替代地这些赋形剂可与缓冲剂及抗氧化剂混合。在冻干之前,将与赋形剂混合的细胞沉淀物液滴浸没于液氮中。

[0992] 材料(包括活细菌、囊泡或其他细菌衍生物)的冻干包括冷冻、一级干燥和二级干燥阶段。冻干从冷冻开始。在冷冻阶段之前,产品材料可以与冻干保护剂或稳定剂混合,也可以不与冻干保护剂或稳定剂混合。产品可以在冻干机装载之前冷冻,或者在冻干机的架上在受控的条件下冷冻。在下一阶段,即一级干燥阶段,通过升华除去冰。这里,产生真空,并向材料提供适量的热量。冰将升华,同时保持产物温度低于冰点,并低于材料的临界温度(T_c)。装载材料的架的温度和腔室的真空度可以被操纵以达到所需的产物温度。在二级干燥期期间,去除结合产物的水分子。在此处,将温度通常升至高于一级干燥期以裂解已在水分子与产物材料之间形成的任何物理-化学相互作用物。在冷冻干燥处理完成之后,可使用惰性气体(例如氮)填充室。产物可以在干燥条件下密封在冷冻干燥器内,在玻璃瓶或其他

类似容器中，以防止暴露于大气水和污染物。

[0993] 实例50：口服栖组织普雷沃菌和小韦荣氏球菌smEV和pmEV：DTH研究

[0994] I.从泰康利生物科学公司购买了5周大的雌性C57BL/6小鼠，并在饲养箱中适应了一周。在第0天通过皮下免疫用KLH和CFA(1:1)乳剂对小鼠进行初免。从第1-8天开始，小鼠每天用指定菌株的pmEV或完整微生物粉末经口强饲或以1mg/kg剂量的地塞米松腹腔内给药。在第8天给药后，用异氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺测量左耳的基础测量值，并在左耳中用含KLH的生理盐水(10μl)皮内激发小鼠，并且在24小时测量耳厚度。

[0995] 24小时耳部测量结果显示在图21中。与相同剂量的冻干活栖组织普雷沃菌pmEV和10mg粉末(总细胞数3.13E+09)相比，测试了三种剂量(高：6.0E+11，中：6.0E+09和低：6.0E+07)的活栖组织普雷沃菌pmEV的功效。结果表明，高剂量的pmEV表现出与10mg剂量的粉末相当的功效。栖组织普雷沃菌pmEV的功效不受冻干的影响。

[0996] II.从泰康利生物科学公司购买了5周大的雌性C57BL/6小鼠，并在饲养箱中适应了一周。在第0天通过皮下免疫用KLH和CFA(1:1)乳剂对小鼠进行初免。从第1-8天开始，小鼠每天用指定菌株的smEV、pmEV、γ照射(GI)的pmEV、或γ照射(GI)的粉末(完整微生物)经口强饲或以1mg/kg剂量的地塞米松腹腔内给药。在第8天给药后，用异氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺测量左耳的基础测量值，并在左耳中用含KLH的生理盐水(10μl)皮内激发小鼠，并且在24小时测量耳厚度。

[0997] 24小时耳部测量结果显示在图22中。以三种剂量(高：3.0E+11，中：3.0E+09和低：3.0E+07)头对头测试了小韦荣氏球菌smEV、pmEV和γ照射(GI)的pmEV的功效。每组的最高剂量之间没有显著差异。小韦荣氏球菌pmEV(γ照射的和非γ照射的)与smEV一样有效。

[0998] 实例51：smEV和pmEV制备

[0999] 对于实例50中所述的研究，smEV和pmEV的制备如下。

[1000] smEV：生物反应器收获后，立即开始了smEV的下游加工。以20,000g离心以从液体培养基中除去细胞。使用0.22μm过滤器澄清所得的上清液。将smEV浓缩，并使用切向流过滤(TFF)和具有100kDa分子量截留值(MWCO)的平板式盒式超滤(UF)膜进行清洗。渗滤(DF)用于使用5个体积的磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗脱小分子和小蛋白。将来自TFF的渗余物在超速离心机中以200,000g离心1小时，以形成富含smEV的沉淀物，称为高速沉淀物(HSP)。将沉淀物用最少的PBS重悬，并用optiprep™密度梯度培养基制备梯度，并以200,000g超速离心16小时。在所得级分中，有2个中间条带包含smEV。用15倍的PBS洗涤级分，并将smEV以200,000g离心1小时以产生分级的HSP或fHSP。随后将其用最少的PBS重悬，合并，并分析颗粒数/mL和蛋白质含量。由颗粒数/mL计数制备剂量以达到所需浓度。使用马尔文帕纳科公司(Malvern Panalytical)的NanoSight NS300在532nm激光的散射模式下表征smEV。

[1001] 栖组织普雷沃菌pmEV：

[1002] 从冰柜中取出细胞沉淀物并放在冰上。记录沉淀物重量。

[1003] 将冷的100mM Tris-HCl pH 7.5添加到冷冻的沉淀物中，并将沉淀物在4℃下解冻旋转。

[1004] 将10mg/ml DNA酶储备液添加到解冻的沉淀物中，使其最终浓度为1mg/mL。

[1005] 将沉淀物在RT(室温)下在倒转器上孵育40分钟。

[1006] 在运行通过Emulsiflex之前，将样品在70um细胞筛中过滤。

[1007] 使用Emulsiflex在22,000psi下以8个离散循环裂解样品。

[1008] 为了从裂解的样品中去除细胞碎片,以12,500x g、15分钟、4℃离心样品。

[1009] 将样品以12,500x g、15分钟、4℃再离心两次,每次将上清液移至新的试管中。

[1010] 为沉淀膜蛋白,将样品以120,000x g、1小时、4℃离心。

[1011] 将沉淀物重悬于10mL冰冷的0.1M碳酸钠pH 11中。将样品在4℃的倒转器上孵育1小时。

[1012] 将样品以120,000x g、1小时、4℃离心。

[1013] 将10mL 100mM Tris-HCl pH 7.5添加到沉淀物中,并在4℃下孵育O/N(过夜)。

[1014] 将沉淀物重新悬浮,并将样品在4℃下以120,000xg离心1小时。

[1015] 弃去上清液,将沉淀重新悬浮在最小体积的PBS中。

[1016] 小韦荣氏球菌pmEV:

[1017] 实例50的研究中使用的小韦荣氏球菌pmEV来自三种不同的分离(分离1、2和3)。方案中有小的变化。

[1018] 从冰柜中取出细胞沉淀物并放在冰上。记录沉淀物重量。

[1019] 将冷的MP缓冲液(100mM Tris-HCl pH 7.5)添加到冷冻的沉淀物中,并将沉淀物在RT下解冻旋转。

[1020] 将10mg/ml DNA酶储备液添加到来自分离1和2的解冻的沉淀中,使其最终浓度为1mg/mL,并且进行孵育。将沉淀物在倒转器上再孵育40'。

[1021] 使用Emulsiflex在20,000-30,000psi下以8个离散循环裂解样品。

[1022] 对于分离1和2,在运行通过Emulsiflex之前将样品在70um细胞筛中过滤以除去团块。

[1023] 对于分离3,在通过Emulsiflex之前立即添加1mM PMSF(苯甲基磺酰氟,西格玛公司)和1mM苄脒(西格玛公司),并且首先将样品在15,000psi下连续循环通过Emulsiflex 1.5分钟,以破碎团块。

[1024] 为了从细胞裂解物中去除细胞碎片,将样品以12,500x g、15分钟、4℃离心。

[1025] 将来自分离3的上清液再离心一次,而将来自分离物1和2的上清液以12,500x g、15分钟、4℃再循环两次。每次离心后,将上清液移至新管中。

[1026] 将最终的上清液以120,000x g、1小时、4℃离心。

[1027] 将膜沉淀物重悬于10mL冰冷的0.1M碳酸钠pH 11中。对于分离1和2,在高速旋转之前,将样品在碳酸钠中孵育1小时。

[1028] 将样品以120,000x g、1小时、4℃旋转。

[1029] 将10mL 100mM Tris-HCl pH 7.5添加到沉淀物中,并将沉淀物重新悬浮。

[1030] 将样品在4℃下以120,000x g离心1小时。

[1031] 弃去上清液,并且将沉淀物置于最小体积的PBS中(分离1和2)或含有250mM蔗糖的PBS中(分离3)。

[1032] pmEV的剂量基于如根据制造商的说明使用NanoSight NS300(马尔文帕纳科公司)通过纳米颗粒跟踪分析(NTA)评估的颗粒计数。每个样品的计数均基于至少三个每个持续30秒的视频,每帧计数40-140个颗粒。

[1033] γ照射:对于γ辐照,小韦荣氏球菌pmEV以冷冻形式制备,并以25kGy的照射剂量

在干冰上进行γ照射;在环境温度下以17.5kGy的照射剂量对小韦荣氏球菌完整微生物冻干粉末进行γ照射。

[1034] 冻干:将样品置于冻干设备中,并在-45℃冷冻。冻干循环包括在-45℃下保持10分钟的步骤。开始真空并将其设置为100mTorr,并将样品在-45℃下再保持10分钟。一级干燥开始于经300分钟温度斜升至-25℃,并在此温度下保持4630分钟。二级干燥开始于经200分钟温度斜升至20℃,同时真空降至20mTorr。将其在该温度和压力下保持1200分钟。最后一步将温度从20℃升高到25℃,并在20mTorr的真空下保持10分钟。

[1035] 实例52:smEV的分离和计数

[1036] smEV分离中使用的设备包括带有SLA-3000转子的索维尔公司(Sorvall)RC-5C离心机;贝克曼库尔特公司(Beckman-Coulter)45Ti转子的Optima XE-90超速离心机;赛默飞世尔科技公司的Sorvall wX+Ultra系列离心机;和斐波利特公司(Fiberlite)F37L-8x100转子。

[1037] 微生物上清液收集与过滤

[1038] 为了回收smEV而不是微生物,必须将微生物沉淀并从上清液中过滤掉。

[1039] 通过使用具有SLA-3000转子的索维尔公司RC-5C离心机并且在至少7,000rpm的转速下离心培养至少15min,生成沉淀微生物培养物。然后将上清液倾入新的无菌容器中。

[1040] 上清液通过0.2um过滤器过滤。对于过滤性较差的上清液(小于300ml的上清液通过过滤器),在0.2um真空过滤器之前附加0.45um胶囊过滤器。过滤的上清液保存在4℃。然后可以使用TFF浓缩过滤的上清液。

[1041] 使用超速离心分离smEV

[1042] 浓缩的上清液在超速离心机中离心,使smEV沉淀,并从较小的生物分子中分离smEV。速度为200,000g,时间为1小时,温度为4℃。当转子停止时,从超速离心机中取出管,轻轻地倒出上清液。添加更多的上清液,再次离心管。所有浓缩的上清液离心后,生成的沉淀物称为“粗”smEV沉淀物。将无菌1x PBS添加到放在容器中的沉淀物中。将容器置于转速为70的摇床上,在4℃冰箱中过夜或更长时间。用另外的无菌1x PBS重新悬浮smEV沉淀物。重新悬浮的EV粗样品保存在4℃或-80℃下。

[1043] 使用密度梯度法纯化smEV

[1044] 密度梯度用于smEV纯化。在超速离心过程中,样品中的颗粒将根据其“浮力”密度在梯度密度介质中移动和分离。通过这种方式,smEV与样品中的其他颗粒(如糖、脂质或其他蛋白质)分离。

[1045] 对于smEV纯化,使用四种不同百分比的密度介质(60%Optiprep):45%层、35%层、25%层和15%层。这将创建分级层。在顶部添加一个0%层,由无菌的1x PBS组成。45%梯度层应包含粗smEV样品。将5ml样品添加到15ml Optiprep中。如果粗smEV样品少于5ml,则使用无菌1x PBS使其达到体积。

[1046] 使用血清学移液管,上下移液45%梯度混合物用以混合。然后将样品移液进入经标记的清洁无菌的超速离心管中。接下来,用10ml血清学移液管缓慢添加13ml 35%梯度混合物。接着添加13ml 25%梯度混合物,接着添加13ml 15%混合物,最后添加6ml无菌1xPBS。超速离心管用无菌1x PBS平衡。梯度小心地放置在转子中,并且超速离心机设置为200,000g和4℃。梯度离心至少16小时。

[1047] 使用清洁移液管除去一种或多种目的级分，将其加入15ml锥形管中。这些“纯化”的smEV样品保存在4℃。

[1048] 为了清洁和去除smEV中残留的optiprep，向纯化的smEV中加入10x体积的PBS。超速离心机设定为200,000g和4℃。离心并且旋转1小时。管小心地从超速离心机中取出，并倾析上清液。洗涤纯化的EV，直到所有样品都被沉淀。将1xPBS添加到放在容器中的纯化的沉淀物中。将容器置于转速为70的摇床上，在4℃冰箱中过夜或更长时间。用另外的无菌1x PBS重新悬浮“纯化的”smEV沉淀物。重新悬浮的纯化的smEV样品储存在4℃或-80℃下。

[1049] 实例53:KLH DTH研究

[1050] 从泰康利生物科学公司购买了5周大的雌性C57BL/6小鼠，并在饲养箱中适应了一周。在第0天通过皮下免疫用KLH和CFA(1:1)乳剂对小鼠进行初免。从第1-8天开始，小鼠每天用smEV经口强饲或以1mg/kg剂量的地塞米松腹腔内给药。在第8天给药后，用异氟烷麻醉小鼠，用Fowler卡尺测量左耳的基础测量值，并在左耳中用含KLH的生理盐水(10μl)皮内激发小鼠，并且在24小时测量耳厚度。通过NTA颗粒计数确定剂量。

[1051] 24小时耳部测量结果显示在图23中。从巨球型菌属物种菌株A制备的smEV在两个剂量2E+11和2E+07(基于颗粒/剂量)处进行比较。smEV是有效的，在激发后24小时显示耳朵炎症减少。

[1052] 24小时耳部测量结果显示在图24中。从巨球型菌属物种菌株B制备的smEV在两个剂量2E+11和2E+07(基于颗粒/剂量)处进行比较。smEV是有效的，在激发后24小时显示耳朵炎症减少。

[1053] 24小时耳部测量结果显示在图25中。从菲利克斯新月形单胞菌制备的smEV在两个剂量2E+11和2E+07(基于颗粒/剂量)处进行比较。smEV是有效的，在激发后24小时显示耳朵炎症减少。

[1054] 实例54:smEV和γ照射的完整细菌U937测试方案

[1055] 细胞系制备:U937单核细胞系(ATCC)在添加FBS HEPES、丙酮酸钠和抗生素的RPMI培养基中在37℃下在5％CO_2下增殖。用活/死染色的细胞计数仪计数细胞以确定活力。接着，在RPMI培养基中用20nM佛波醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)稀释细胞至$5x10^5$个细胞/ml的浓度，以将单核细胞分化为巨噬细胞样细胞。接着，将200微升细胞悬浮液体积到96孔板的每个孔中，并在37℃与5％CO_2孵育72小时。将贴壁、分化的细胞洗涤并在不含PMA的新鲜培养基中孵育24小时。

[1056] 实验设置:smEV在不含抗生素的RPMI培养基中稀释至适当浓度(典型为$1x10^5$-$1x10^{10}$)。还制备了未处理和TLR2和4激动剂对照样品。用不含抗生素的新鲜培养基洗涤含有分化的U937细胞的96孔板，以去除残留的抗生素。接下来，将smEV的悬浮液提交到经洗涤的板中。将板在37℃在5％CO_2孵育24小时。

[1057] 实验终点:共孵育24小时后，将上清液从U937细胞中移至单独的96孔板中。观察细胞在孔中是否有明显的裂解(斑块)。两个未处理孔不去除上清液，并且将裂解缓冲液添加到孔中并在37℃孵育30分钟以裂解细胞(最大裂解对照)。将50微升的每个上清液或最大裂解对照添加到新的96孔板中，并根据制造商说明测定细胞裂解(CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定，普洛麦格公司(Promega))。使用U-plex MSD板(中尺度发现公司(Meso Scale Discovery))按照制造商的说明从上清液中测量细胞因子。

[1058] 结果如图26所示。来自巨型球菌属物种菌株A的smEV诱导PMA分化的U937细胞产生细胞因子。用1x10^6-1x10^{9}浓度的smEV以及TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂对照处理U937细胞24小时,并且测量细胞因子的产生。“空白”表示培养基对照。

[1059] 实例55:在CT26肿瘤研究中口服递送巨型球菌属物种smEV,第一代表性肿瘤学研究

[1060] 从泰康利生物科学公司获得8周龄雌性BALB/c小鼠,并允许其在饲养箱中驯化3周。第0天,用异氟醚麻醉小鼠,并在左侧皮下接种1.0e5 CT-26细胞(0.1mL),所述细胞在PBS和康宁公司(Corning)(GFR)无酚红基质胶(Matrigel)(1:1)中制备。小鼠在CT-26接种后休息9天,以允许形成可触及的肿瘤。在第9天,使用滑动数字卡尺测量肿瘤,收集长度和宽度量度(以毫米),以计算估计的肿瘤体积((L x W x W)/2)=TVmm3))。将小鼠随机分为不同的治疗组,每组共9只或10只小鼠。进行随机化以平衡所有治疗组,允许每组以相似的平均肿瘤体积和标准差开始治疗。第10天开始施用,并且第22天结束,连续施用13天。小鼠口服巨型球菌属物种菌株A smEV(BID给药),或腹膜内给予200ug抗小鼠PD-1抗体(Q4D)。体重和肿瘤测量按MWF(周一-周三-周五)时间表收集。通过NTA颗粒计数确定smEV的剂量。来自巨型球菌属物种smEV组的两只小鼠由于剂量伤害导致死亡而被排除在研究之外。

[1061] 结果显示在图27A和27B中。第22天肿瘤体积总结将巨型球菌属物种smEV(2e11)与阴性对照(媒剂PBS)和阳性对照(抗PD-1)进行比较。巨型球菌属物种smEV(2e11)与媒剂PBS相比显示出统计学上显著的功效,并且与抗PD-1无显著差异。肿瘤体积曲线显示出相似的生长趋势巨型球菌属物种smEV和抗PD-1,以及治疗13天后的持续功效。

[1062] 实例56:在CT26肿瘤研究中口服递送巨型球菌属物种smEV,第二代表性肿瘤学研究

[1063] 从泰康利生物科学公司获得8周龄雌性BALB/c小鼠,并允许其在饲养箱中驯化1周。第0天,用异氟醚麻醉小鼠,并在左侧皮下接种1.0e5 CT-26细胞(0.1mL),所述细胞在PBS和康宁公司(Corning)(GFR)无酚红基质胶(Matrigel)(1:1)中制备。小鼠在CT-26接种后休息9天,以允许形成可触及的肿瘤。在第9天,使用滑动数字卡尺测量肿瘤,收集长度和宽度量度(以毫米),以计算估计的肿瘤体积((L x W x W)/2)=TVmm3))。将小鼠随机分为不同的治疗组,每组共9只小鼠。进行随机化以平衡所有治疗组,允许每组以相似的平均肿瘤体积和标准差开始治疗。第10天开始施用,并且第23天结束,连续施用14天。小鼠口服巨型球菌属物种菌株A smEV(BID和QD给药),或腹膜内给予200ug抗小鼠PD-1抗体(Q4D)。体重和肿瘤测量按MWF时间表收集。通过NTA颗粒计数确定smEV的剂量。

[1064] 结果显示在图28A和28B中。第23天肿瘤体积总结比较了3个剂量(2e11,2e9和2e7)BID的巨型球菌属物种smEV,以及巨型球菌属物种smEV(2e11)QD比阴性对照(媒剂PBS)和阳性对照(抗PD-1)。所有巨型球菌属物种smEV治疗组与媒剂PBS相比显示出相比于媒剂(PBS)的统计学上显著的功效。所测试的所有巨型球菌属物种smEV剂量与抗PD-1没有显著差异。肿瘤生长曲线显示巨型球菌属物种smEV治疗组在14天的治疗中的类似于抗PD-1的持续功效。

[1065] 实例57:从鹑鸡肠球菌菌株分离pmEV

[1066] 从两种鹑鸡肠球菌菌株如下制备pmEV:将冷MP缓冲液(50mM Tris-HCl pH 7.5,具有100mM NaCl)添加到冷冻的细胞沉淀物中,并在RT(室温)或4℃下旋转解冻沉淀物。细胞

在Emulsiflex上裂解。在24,000psi下用4个离散的通道将样品在Emulsiflex上裂解。紧接在裂解之前,将蛋白酶抑制剂、苯甲基磺酰氟(PMSF)和苯甲脒添加到样品中,至最终浓度各为1mM。碎片和未裂解的细胞被沉淀:6,000x g,30分钟,40C。

[1067] 通过FPLC从低速上清液(LSS)中分离纯化pmEV:Captocore 700填充的大柱(GE XK 26/70)用以纯化pmEV:70%乙醇用于灭菌;0.1X PBS用于运行缓冲液;Milli-Q水用于洗涤;20%EtOH(具有0.1M NaOH)用于清洁和储存。将Benzonase添加到LSS样品中,并在RT下孵育30分钟,同时旋转(最终浓度为100U/ml Benzonase和1mM MgCl)。将来自细菌裂解的LSS保存在冰上和4C直到准备装入超环(Superloop)中。

[1068] 进行FPLC纯化:流速设定为5ml/min,δ柱压力设定为0.25psi。在整个纯化过程中,监测UV吸光度、压力和流速。启动运行,并手动加载样品(超环)。当样品在色谱图上变得可见时(约50mAU),级分收集器接合。收集整个样品峰。

[1069] 将最终pmEV样品浓缩:将最终pmEV级分添加到清洁超速离心管中并进行平衡。管在120,000x g在40C下旋转1小时。弃去上清液,并且重新悬浮于最小体积的无菌PBS中。

[1070] 实例58:用pmEV产生的体内数据

[1071] 允许8周龄雌性BALB/c小鼠在饲养箱中驯化1周。第0天,用异氟醚麻醉小鼠,并在左侧皮下接种$1x10^5$个CT-26细胞(0.1mL),所述细胞在PBS和康宁公司(GFR)无酚红基质胶(1:1)中制备。小鼠在CT-26接种后休息9天,以允许形成可触及的肿瘤。在第9天,使用滑动数字卡尺测量肿瘤,收集长度和宽度量度(以毫米),以计算估计的肿瘤体积((L x W x W)/2)=TVmm3))。将小鼠随机分为不同的治疗组,每组共(9)只小鼠。进行随机化以平衡所有治疗组,允许每组以相似的平均肿瘤体积和标准差开始治疗。第10天开始施用,并且第23天结束,连续施用14天。小鼠每天口服一次鹑鸡肠球菌pmEV,或Q4D腹膜内给予200μg抗小鼠PD-1。体重和肿瘤测量按MWF时间表收集。

[1072] 从两个鹑鸡肠球菌菌株制备pmEV。一个菌株从JAX小鼠获得;一个菌株从人来源获得的。pmEV的剂量颗粒计数为$2x10^{11}$。通过NTA颗粒计数确定剂量。

[1073] 图29显示了d10肿瘤用来自鹑鸡肠球菌菌株A的pmEV每天给药一次,持续14天后的肿瘤体积。

[1074] 实例59:Negativicutes U937结果

[1075] 为了证明Negativicutes作为一个纲的治疗效用,从表5中的每个科中选择代表,并从培养上清液中收获EV。将EV添加到PMA分化的U937细胞中,并且孵育24小时。通过MSD ELISA测量细胞因子释放。

[1076] 结果示出于图30-34中。每个菌株的EV所表现出的广泛的稳健刺激在菌株之间遵循相似的谱。TLR2(FSL)和TLR4(LPS)激动剂作为对照。空白表示培养基对照。

[1077] 表5

[1078]

菌株名称	Negativicutes纲内的科
巨型球菌属物种菌株A	韦荣氏球菌科
巨型球菌属物种菌株B	韦荣氏球菌科
菲利克斯新月形单胞菌	月形单孢菌科
肠氨基酸球菌	氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)
Propionospora属物种	Sporomusaceae

[1079] 通过引用并入

[1080] 在本文中提及的所有出版物、专利申请都通过引用以其全文特此并入，如同各个单独的出版物或专利申请被确切地并且单独地指明为通过引用并入。如果出现冲突，则以本申请(包含本文的任何定义)为准。

[1081] 等效形式

[1082] 本领域技术人员仅使用常规实验将认识到或能确定本文所述本发明的具体实施例的许多等效形式。此类等效形式旨在为下列权利要求所涵盖。

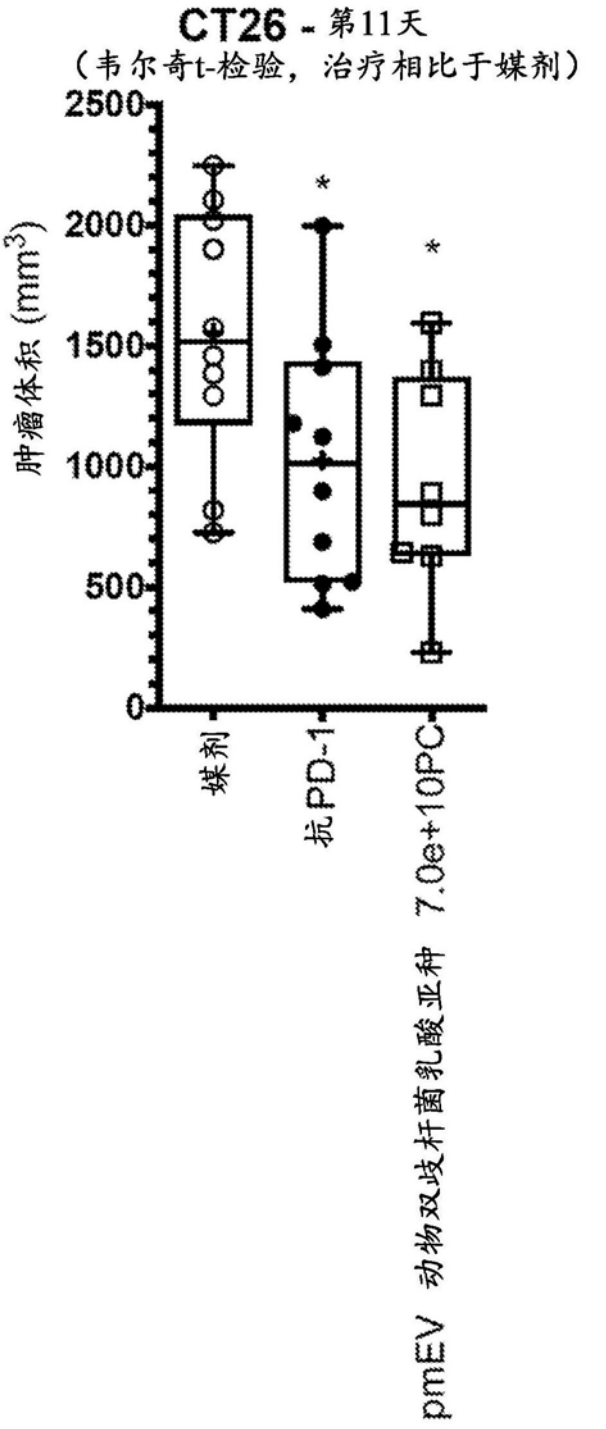

CT26 - 第11天
（韦尔奇t-检验，治疗相比于媒剂）
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
媒剂
抗PD-1
pmEV 动物双歧杆菌乳酸亚种 7.0e+10PC

图1

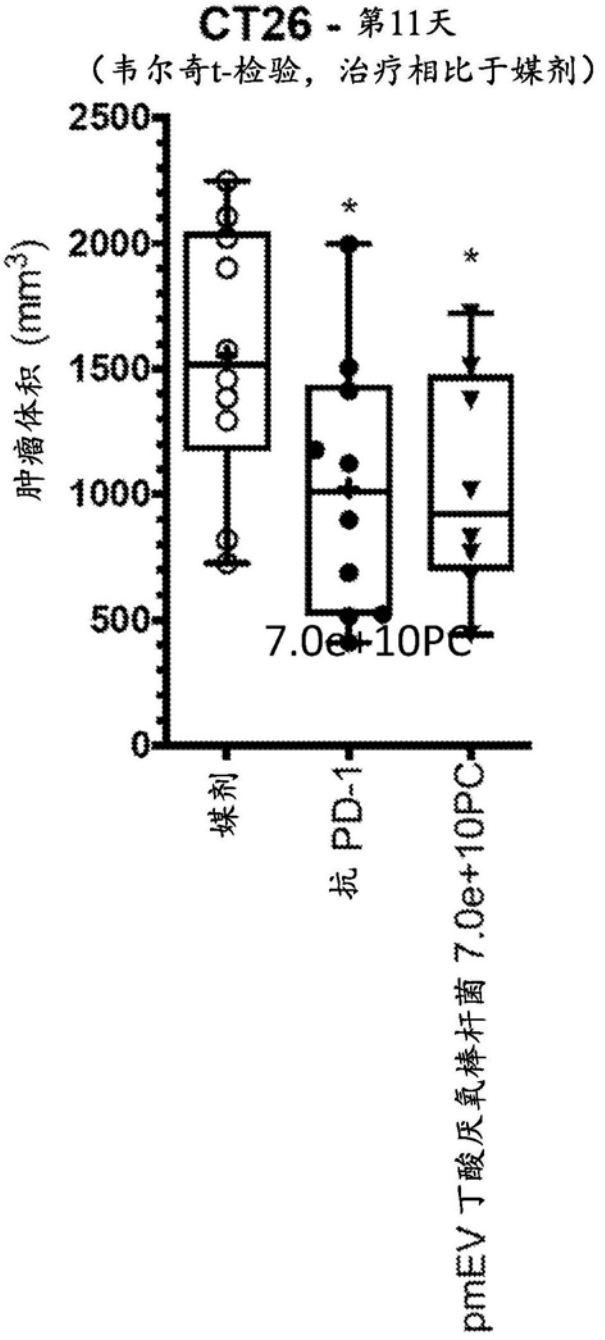

CT26 - 第11天
（韦尔奇t-检验，治疗相比于媒剂）
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
*
7.0e+10PC
媒剂
抗 PD-1
pmEV 丁酸厌氧棒杆菌 7.0e+10PC

图2

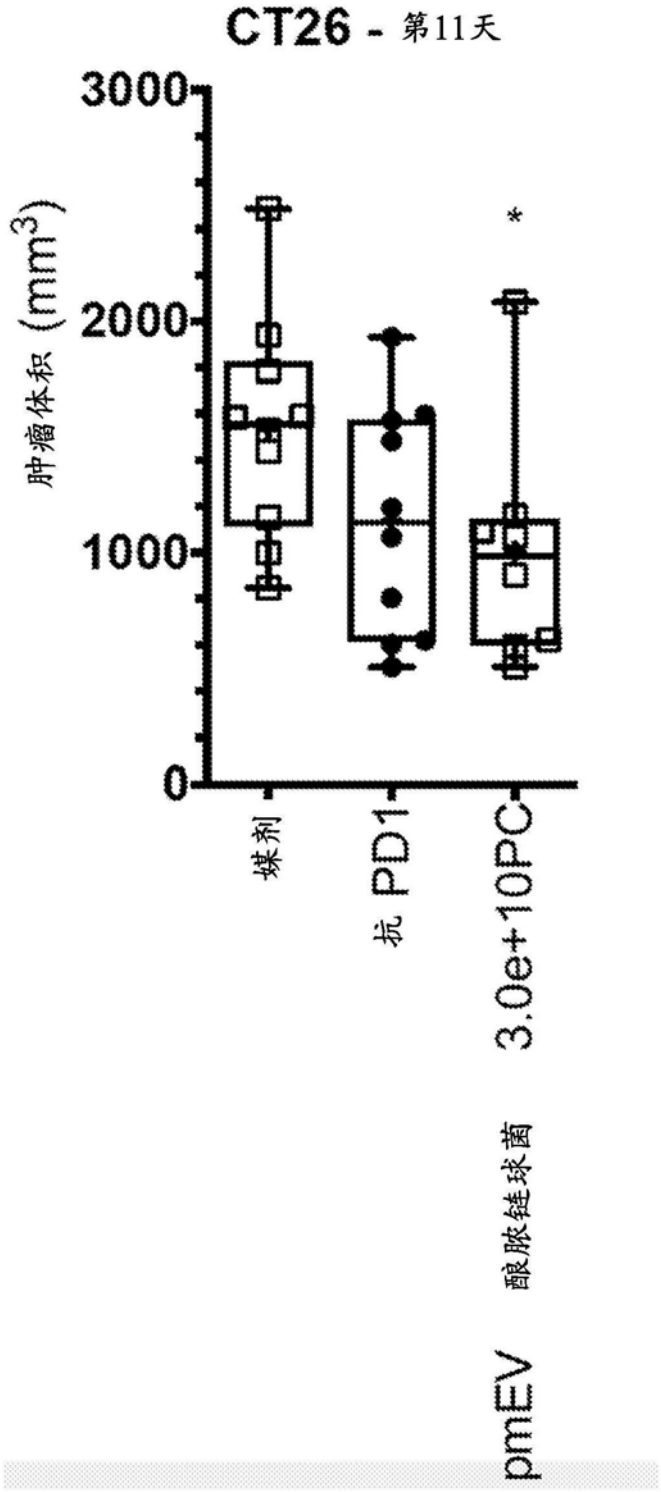

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm3)
3000
2000
1000
0
*
媒剂
抗 PD1
3.0e+10PC
pmEV
酿脓链球菌

图3

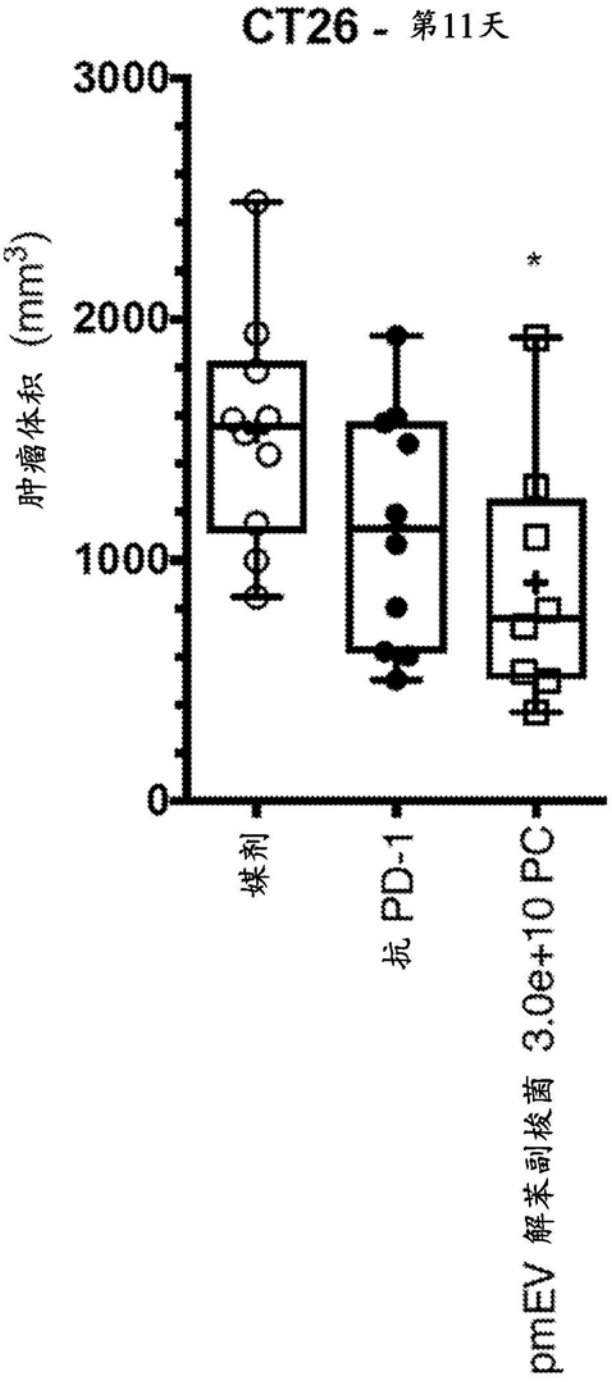

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm^3)
3000
2000
1000
0
*
媒剂
抗 PD-1
pmEV 解苯副梭菌 3.0e+10 PC

图4

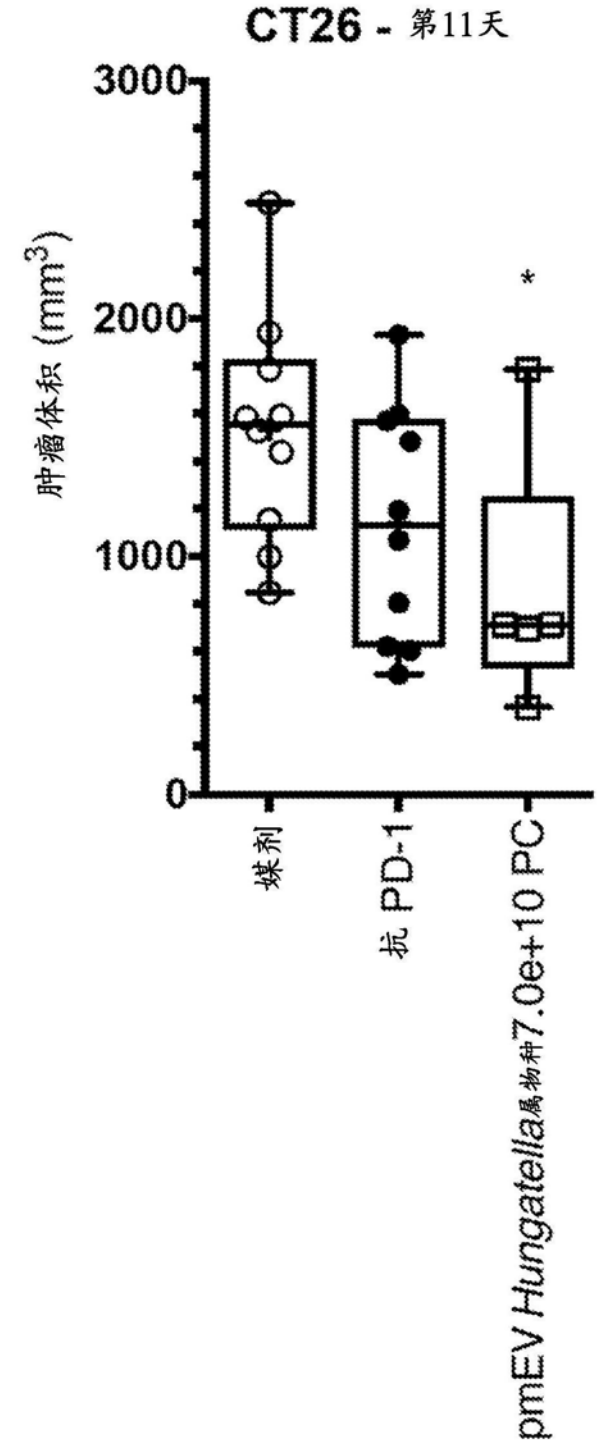

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm^3)
3000
2000
1000
0
*
媒剂
抗 PD-1
pmEV Hungatella属物种7.0e+10 PC

图5

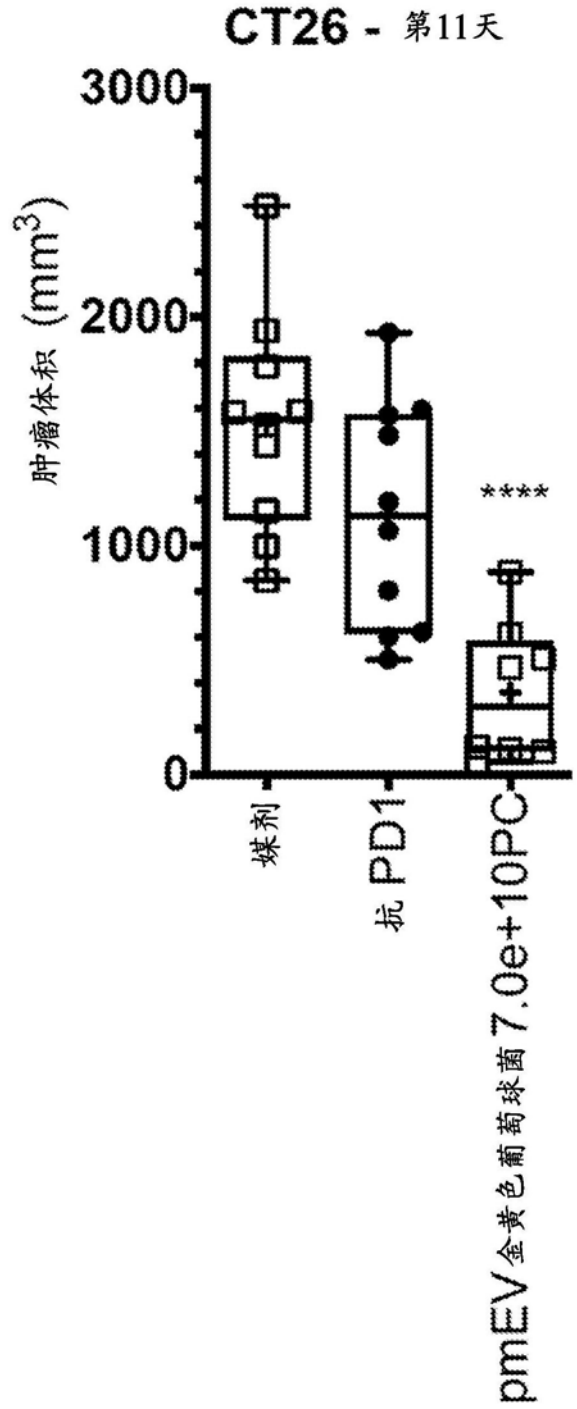

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm3)
3000
2000
1000
0
****
媒剂
抗 PD1
pmEV金黄色葡萄球菌 7.0e+10PC

图6

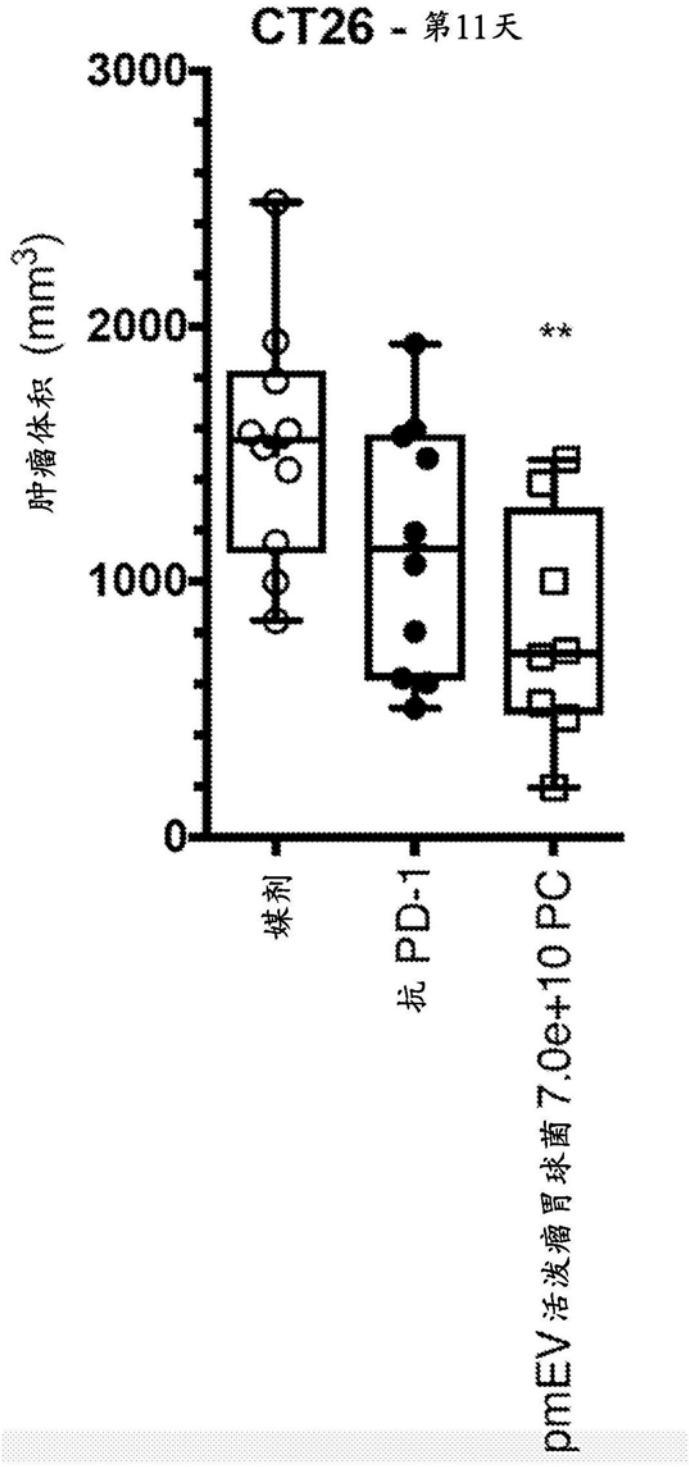

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm3)
3000
2000
1000
0
**
媒剂
抗 PD-1
pmEV 活泼瘤胃球菌 7.0e+10 PC

图7

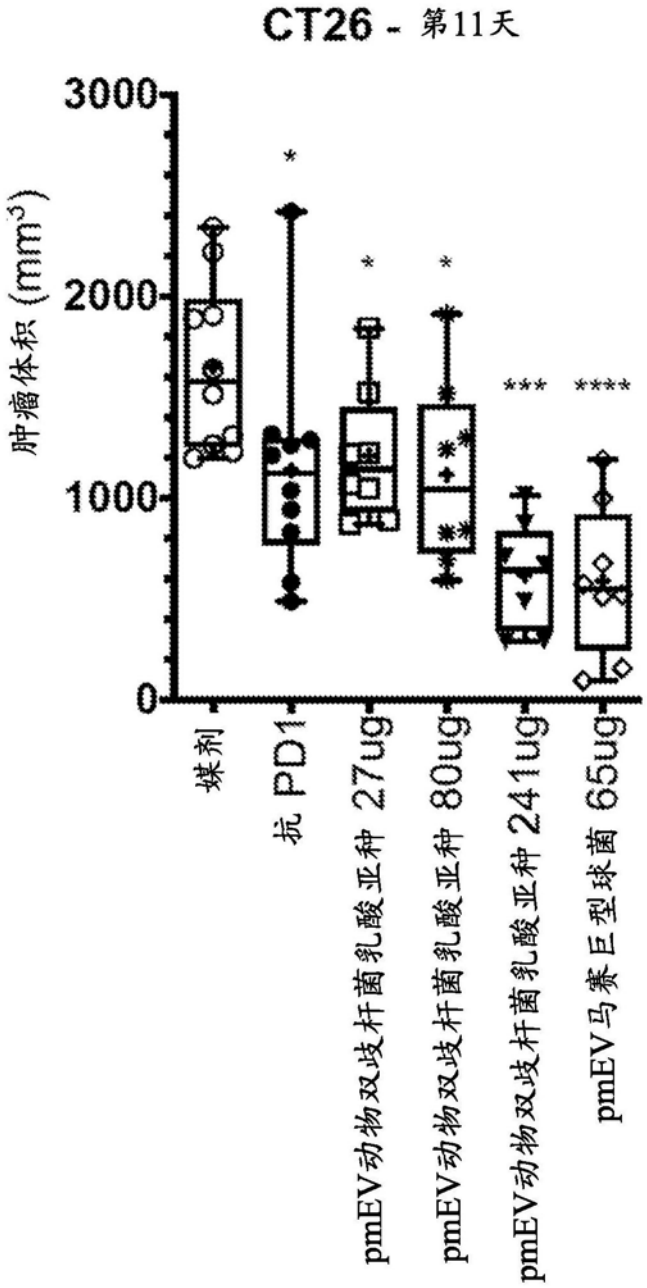

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm^3)
3000
2000
1000
0
媒剂
抗 PD1
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种 27ug
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种 80ug
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种 241ug
pmEV马赛巨型球菌 65ug

图8

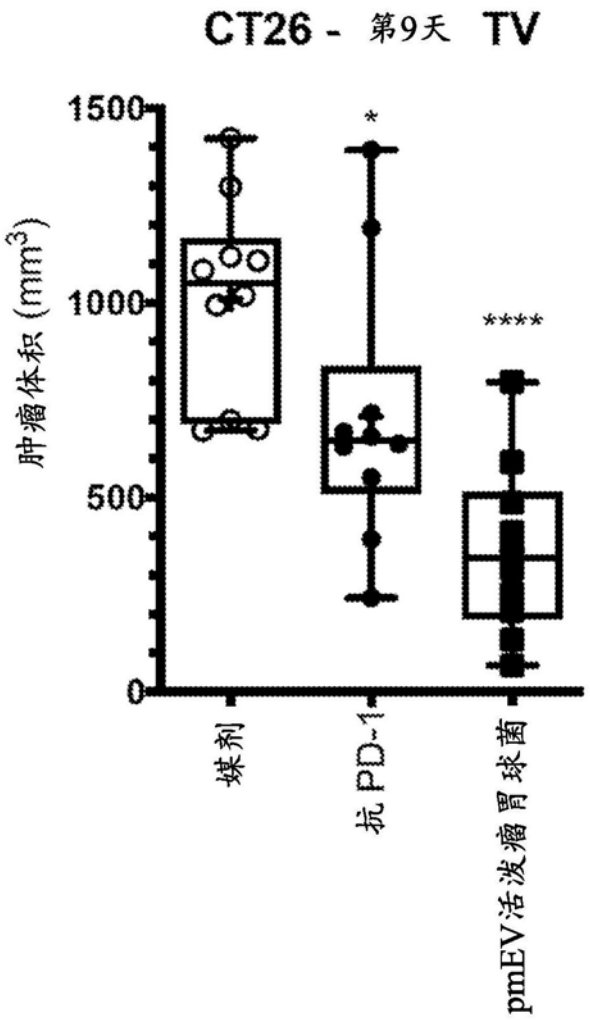


图9

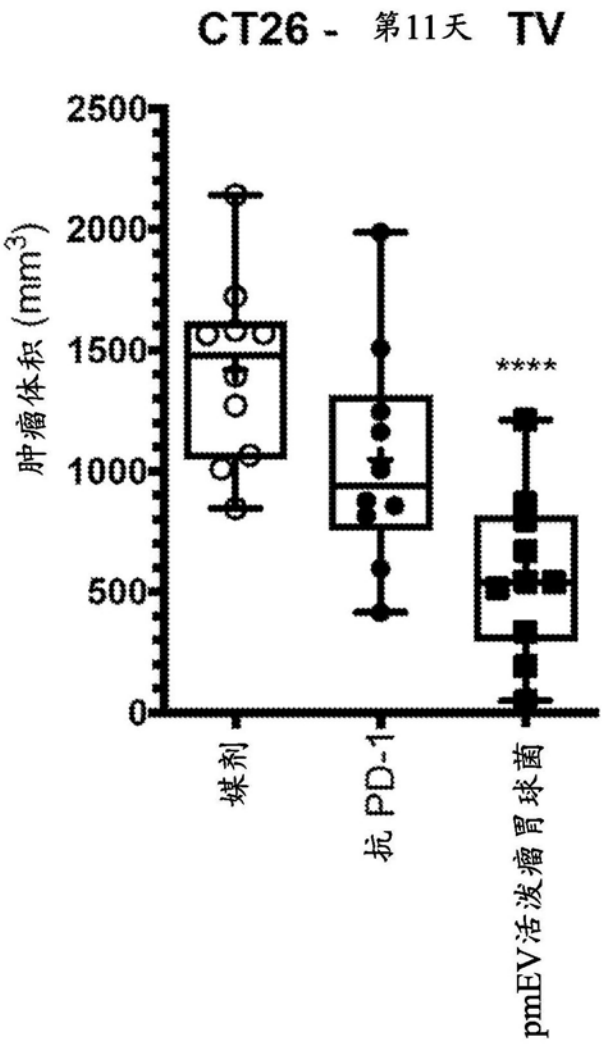

CT26 - 第11天 TV
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
****
媒剂
抗 PD-1
pmEV活泼瘤胃球菌

图10

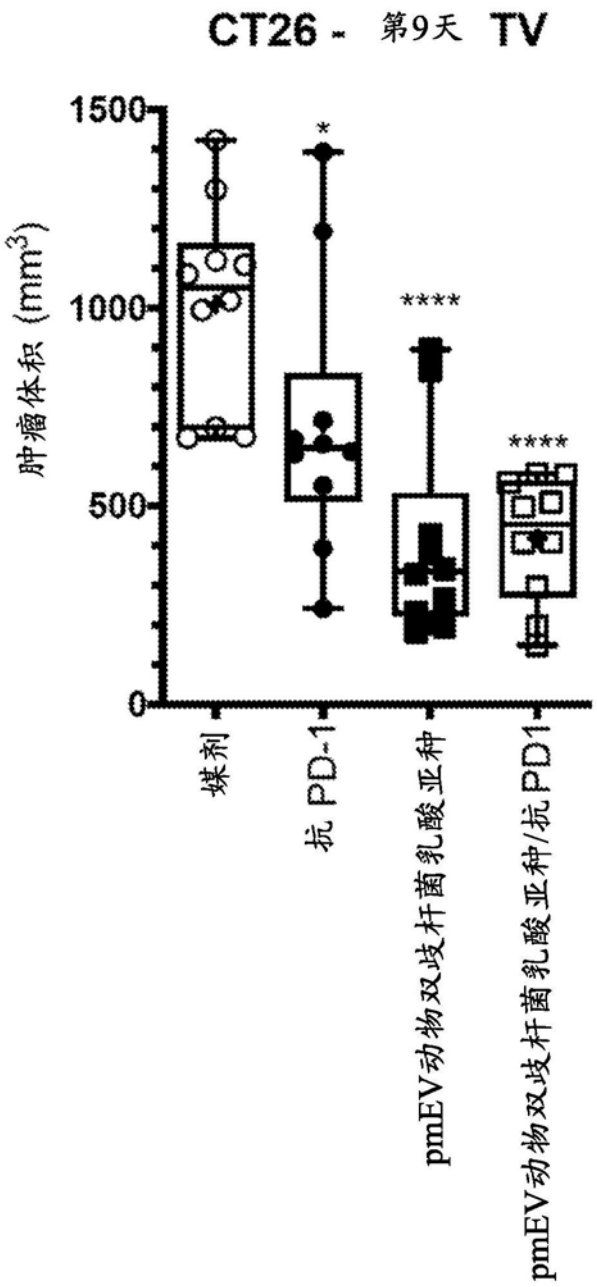

CT26 - 第9天 TV
肿瘤体积 (mm3)
1500
1000
500
0
*
****
****
媒剂
抗 PD-1
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种/抗 PD1

图11

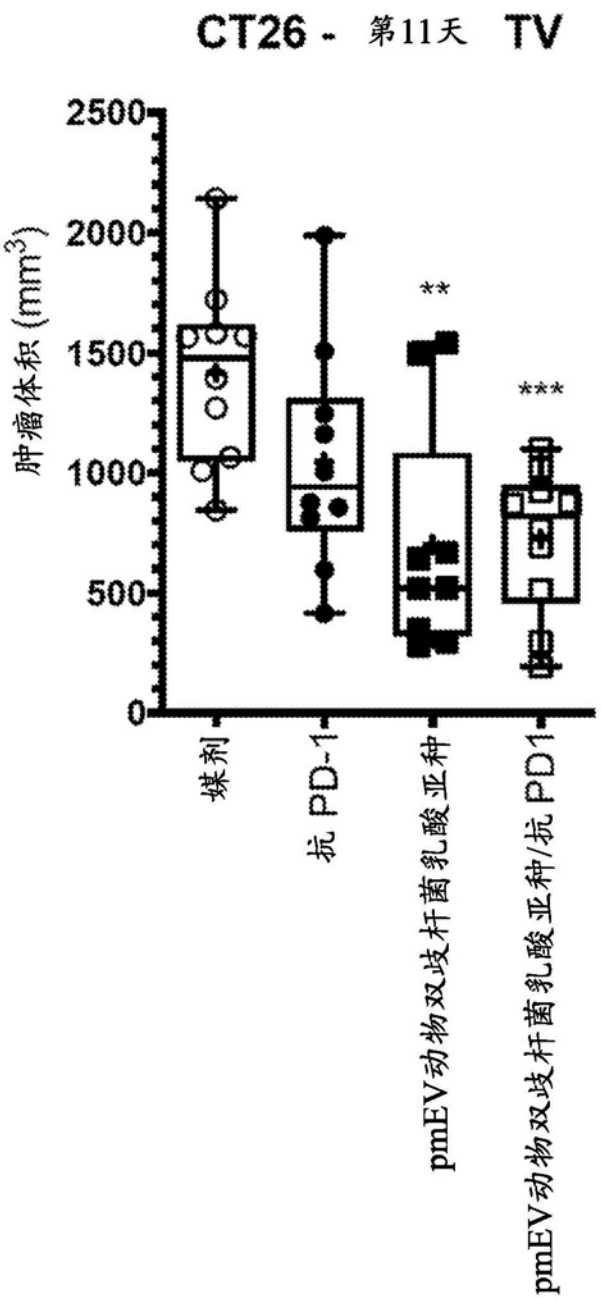

CT26 - 第11天 TV
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
***
媒剂
抗 PD-1
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种
pmEV动物双歧杆菌乳酸亚种/抗 PD1

图12

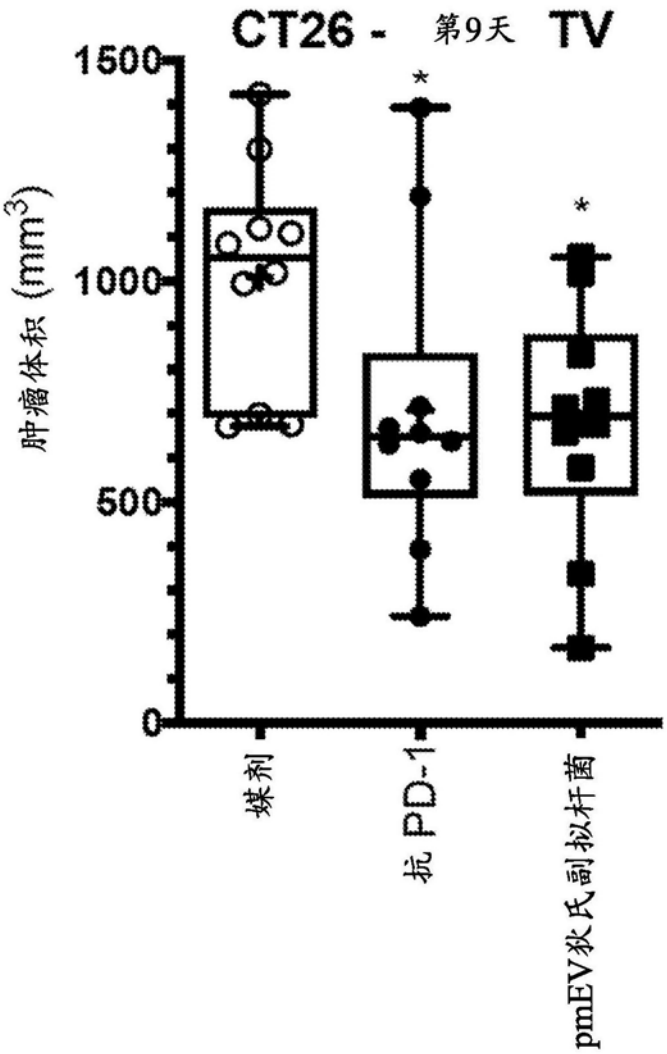


图13

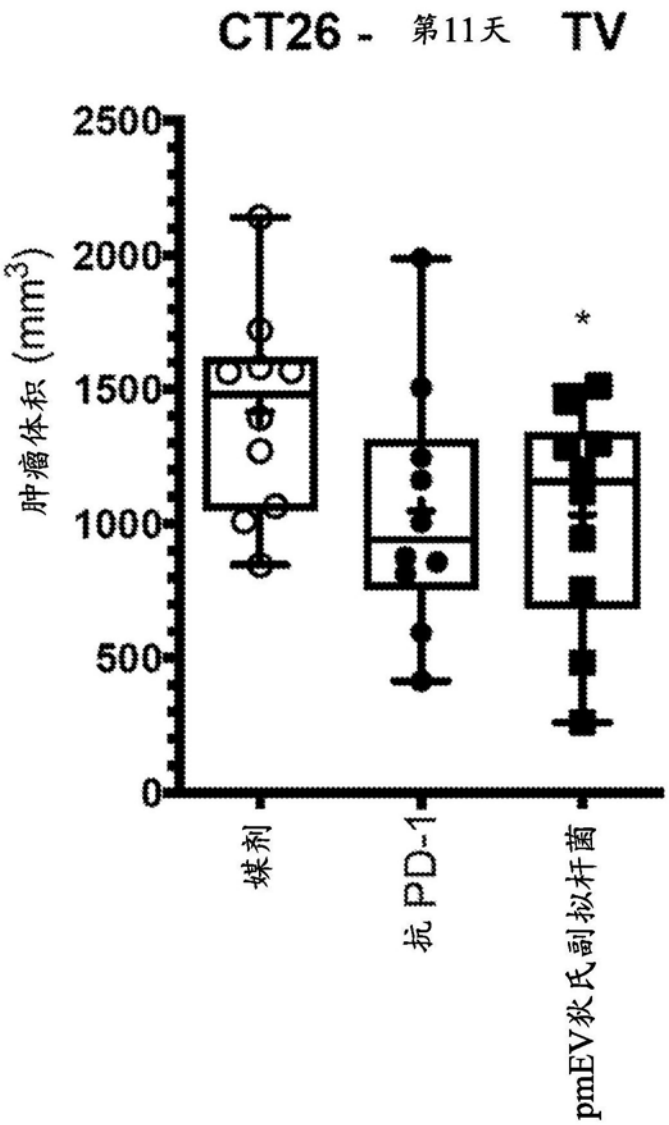

CT26 - 第11天 TV
肿瘤体积 (mm^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
媒剂
抗 PD-1
pmEV狄氏副拟杆菌

图14

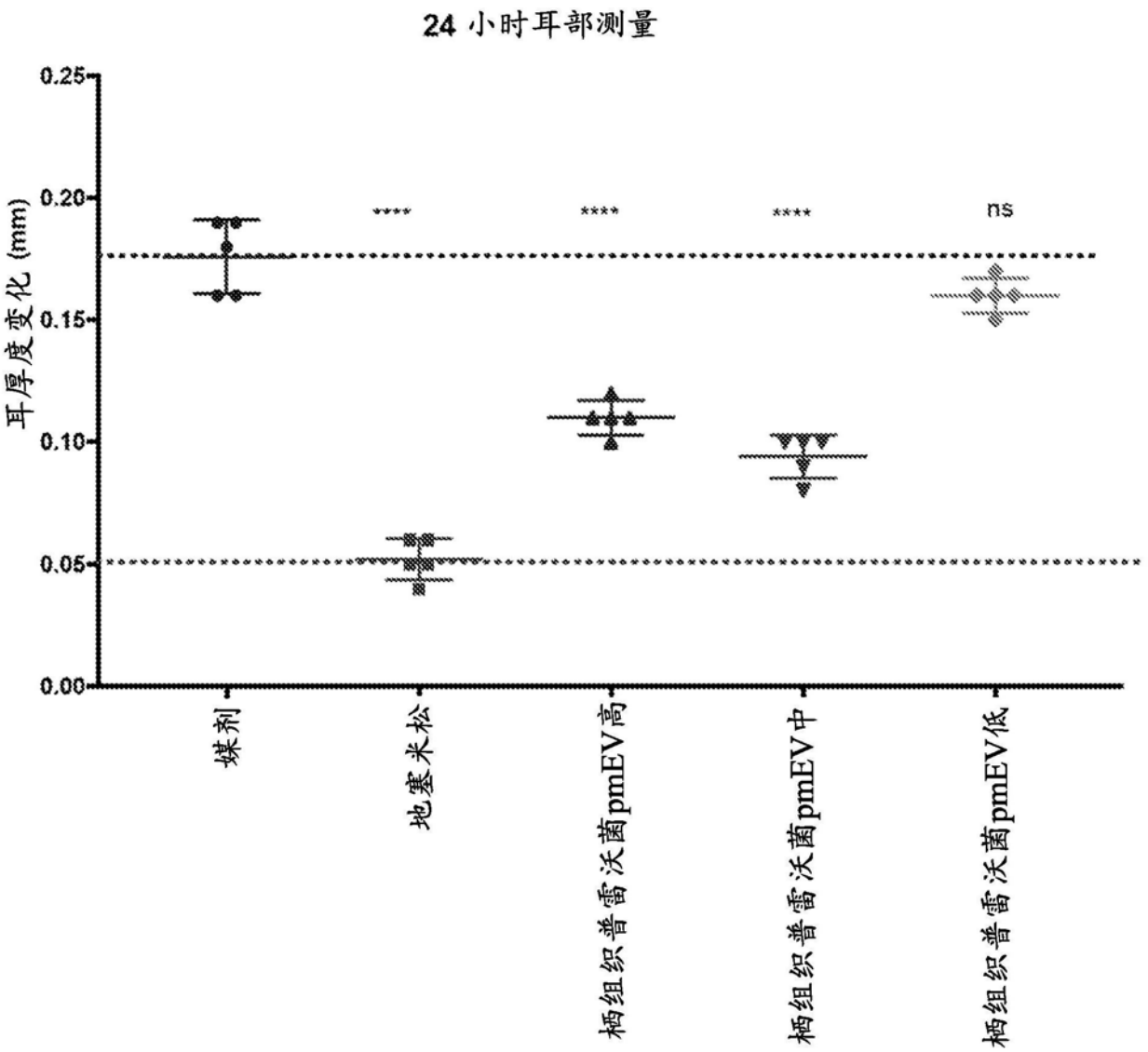

24 小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
ns
媒剂
地塞米松
柄组织普雷沃菌pmEV高
柄组织普雷沃菌pmEV中
柄组织普雷沃菌pmEV低

图15

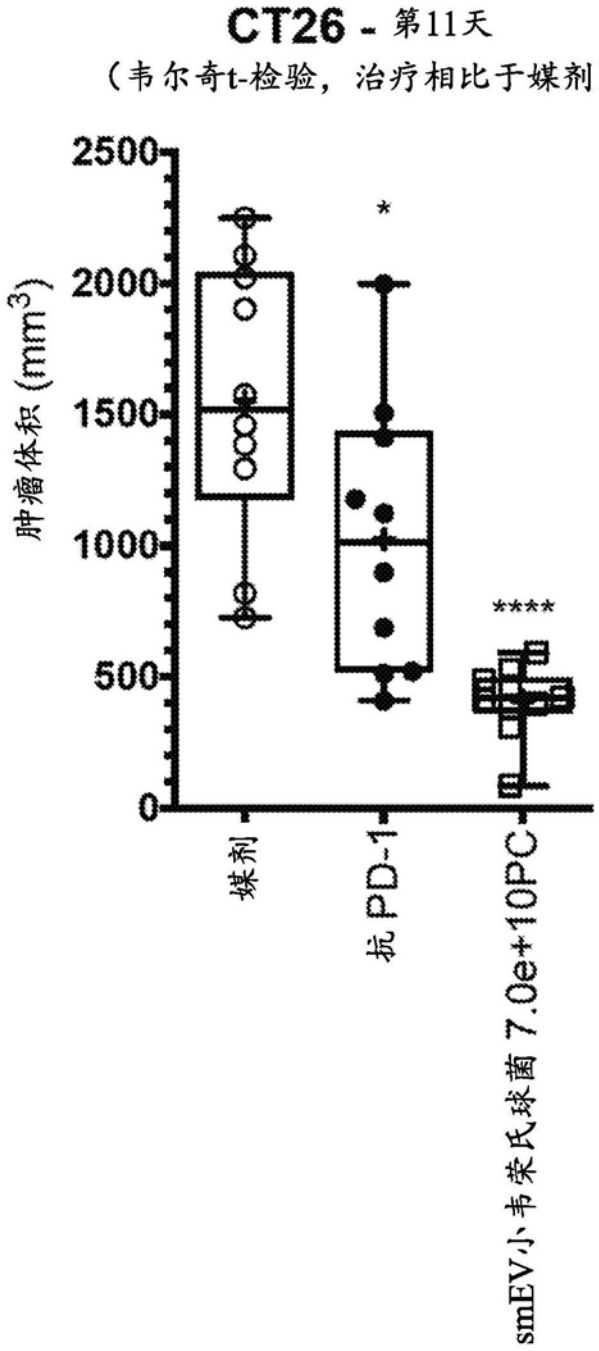

CT26 - 第11天
（韦尔奇t-检验，治疗相比于媒剂）
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
*
****
媒剂
抗 PD-1
smEV小韦荣氏球菌 7.0e+10PC

图16

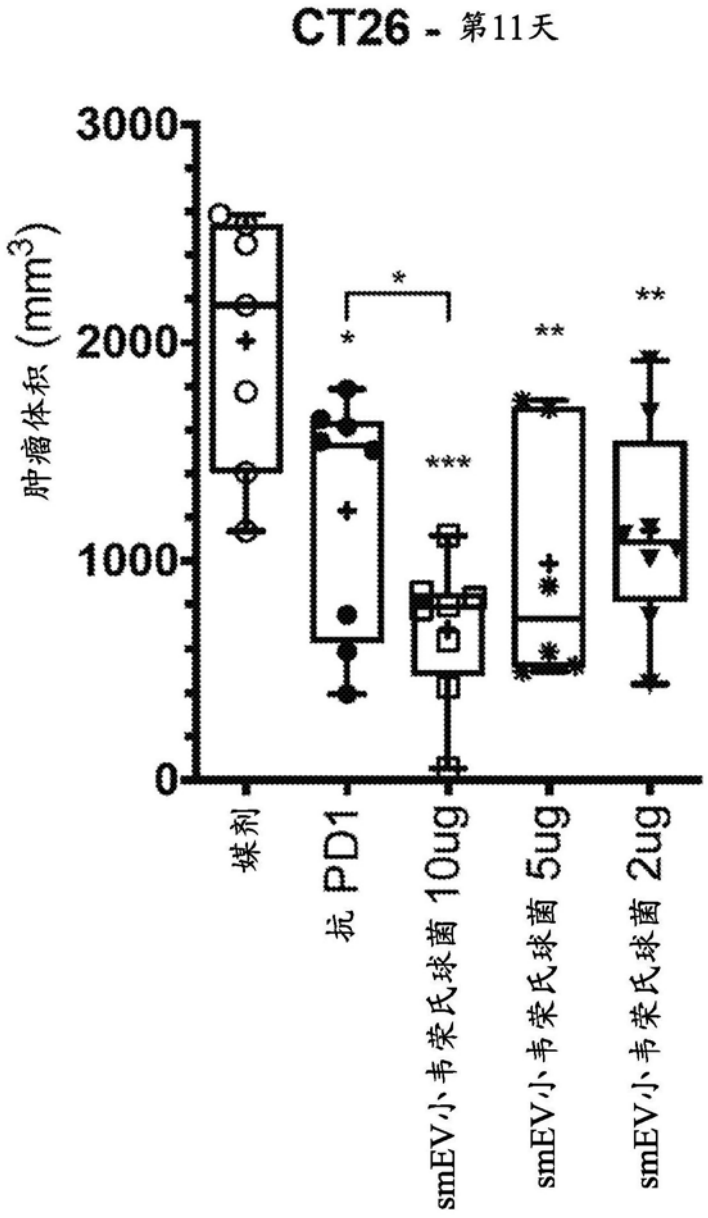

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm3)
3000
2000
1000
0
媒剂
抗 PD1
smEV小韦荣氏球菌 10ug
smEV小韦荣氏球菌 5ug
smEV小韦荣氏球菌 2ug
*
*
***
**
**

图17

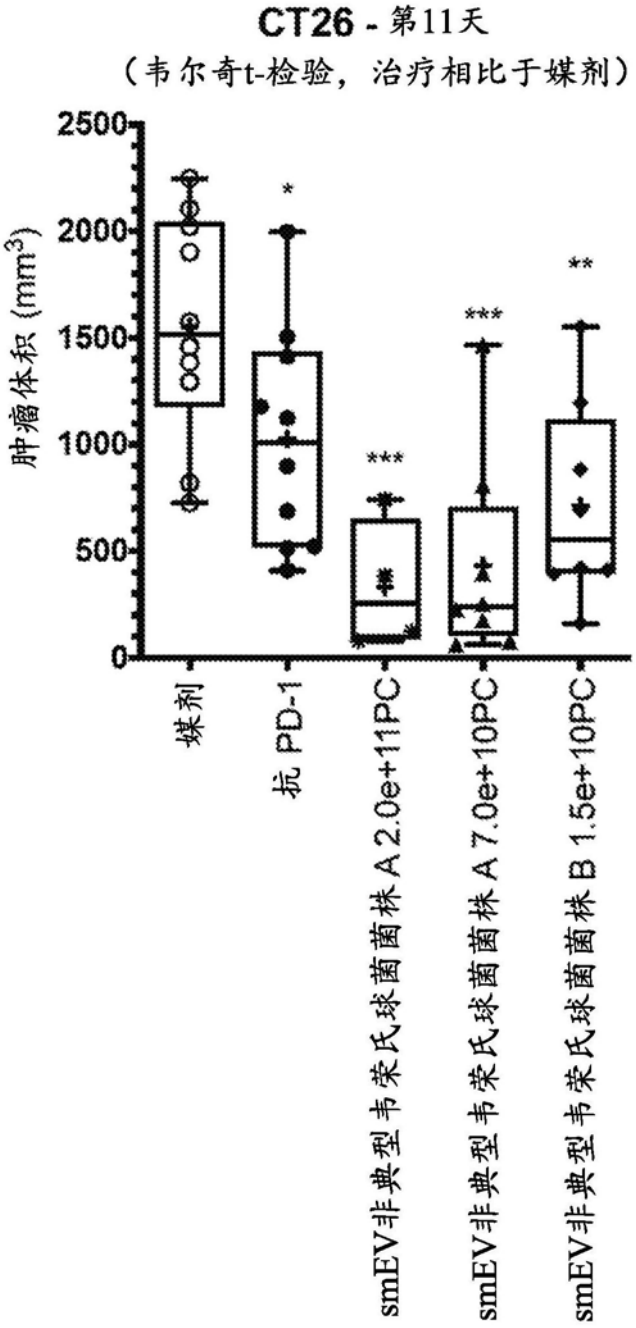

CT26 - 第11天
（韦尔奇t-检验，治疗相比于媒剂）
肿瘤体积 (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
媒剂
抗 PD-1
smEV非典型韦荣氏球菌菌株 A 2.0e+11PC
smEV非典型韦荣氏球菌菌株 A 7.0e+10PC
smEV非典型韦荣氏球菌菌株 B 1.5e+10PC

图18

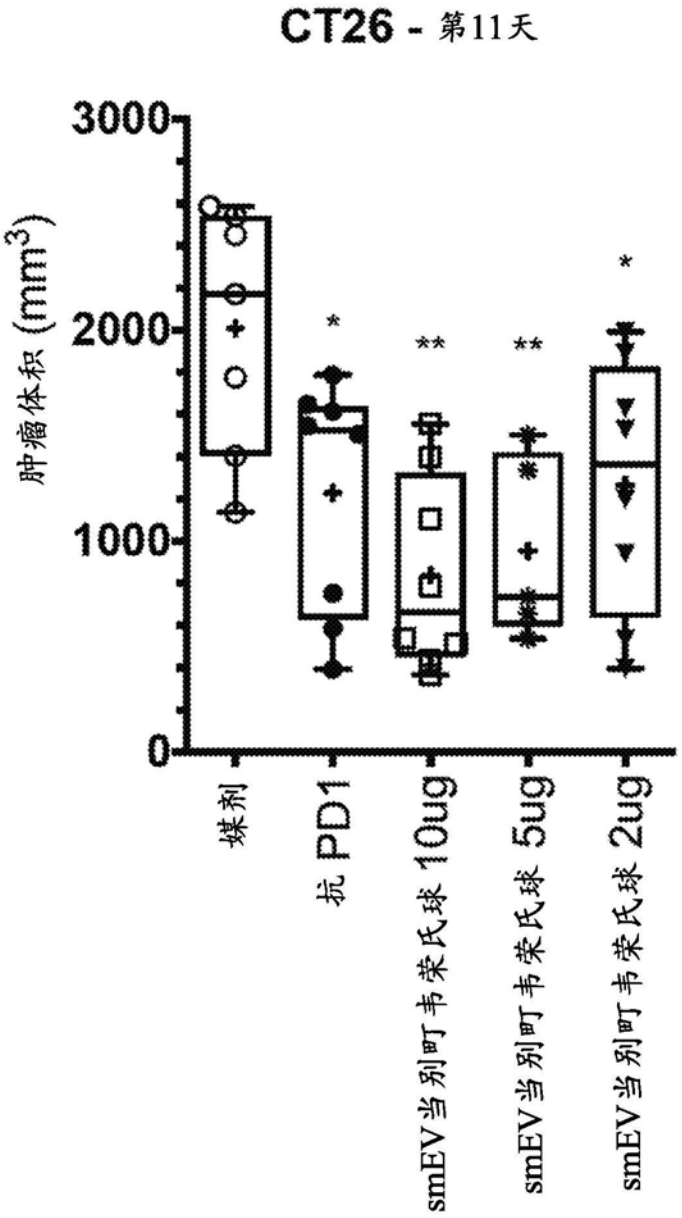

CT26 - 第11天
肿瘤体积 (mm3)
3000
2000
1000
0
媒剂
抗 PD1
smEV当别町韦荣氏球 10ug
smEV当别町韦荣氏球 5ug
smEV当别町韦荣氏球 2ug
*
**
**
*

图19

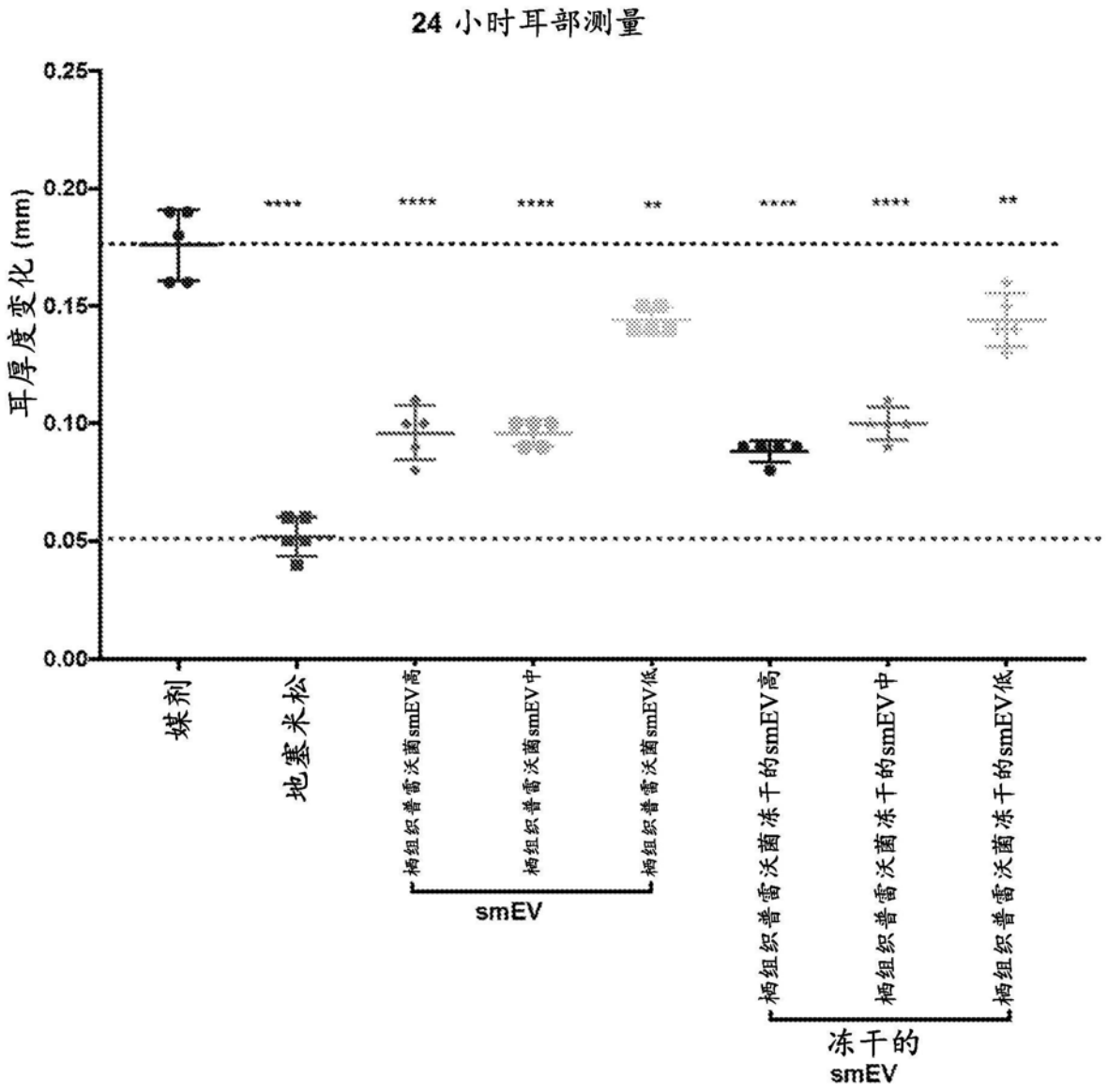

24 小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
**
****
****
**
媒剂
地塞米松
桦组织普雷沃菌smEV高
桦组织普雷沃菌smEV中
桦组织普雷沃菌smEV低
smEV
桦组织普雷沃菌冻干的smEV高
桦组织普雷沃菌冻干的smEV中
桦组织普雷沃菌冻干的smEV低
冻干的
smEV

图20

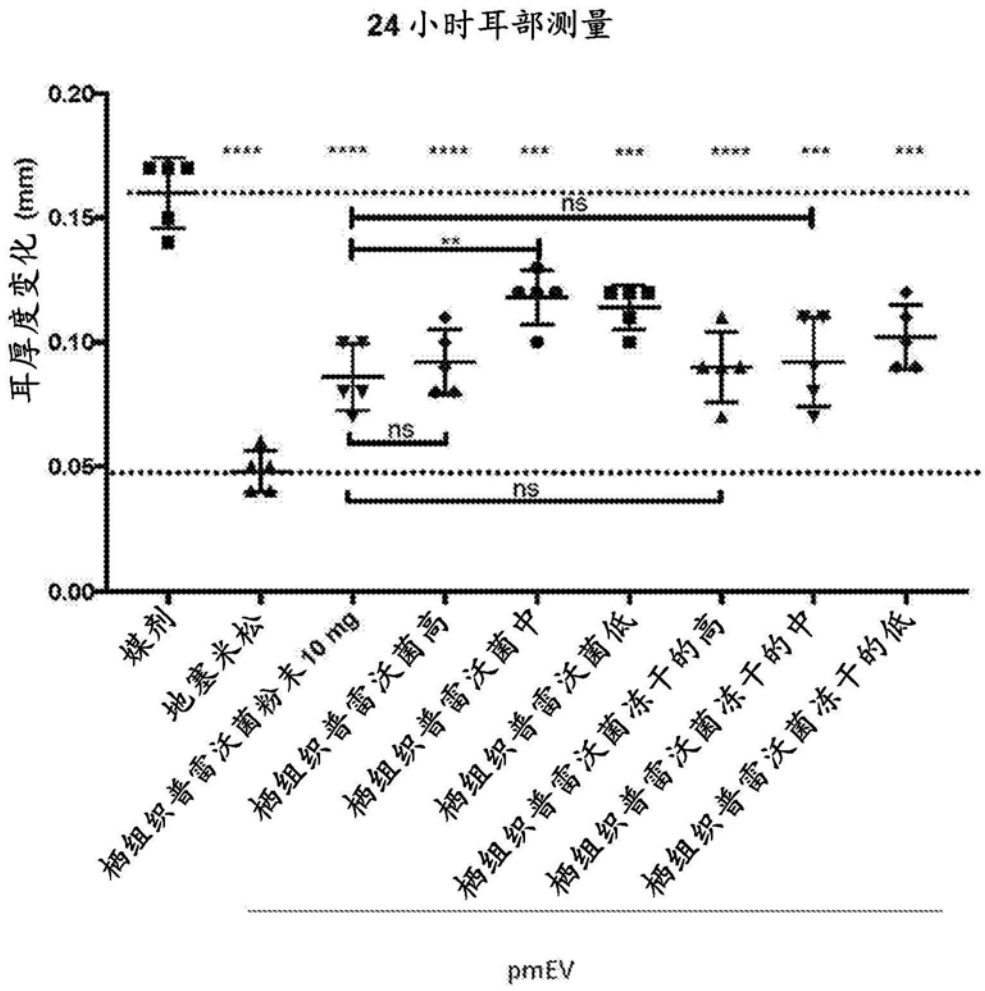

24小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
***
***
****
***
***
ns
**
ns
ns
媒剂
地塞米松
栖组织普雷沃菌粉末10 mg
栖组织普雷沃菌高
栖组织普雷沃菌中
栖组织普雷沃菌低
栖组织普雷沃菌冻干的高
栖组织普雷沃菌冻干的中
栖组织普雷沃菌冻干的低
pmEV

图21

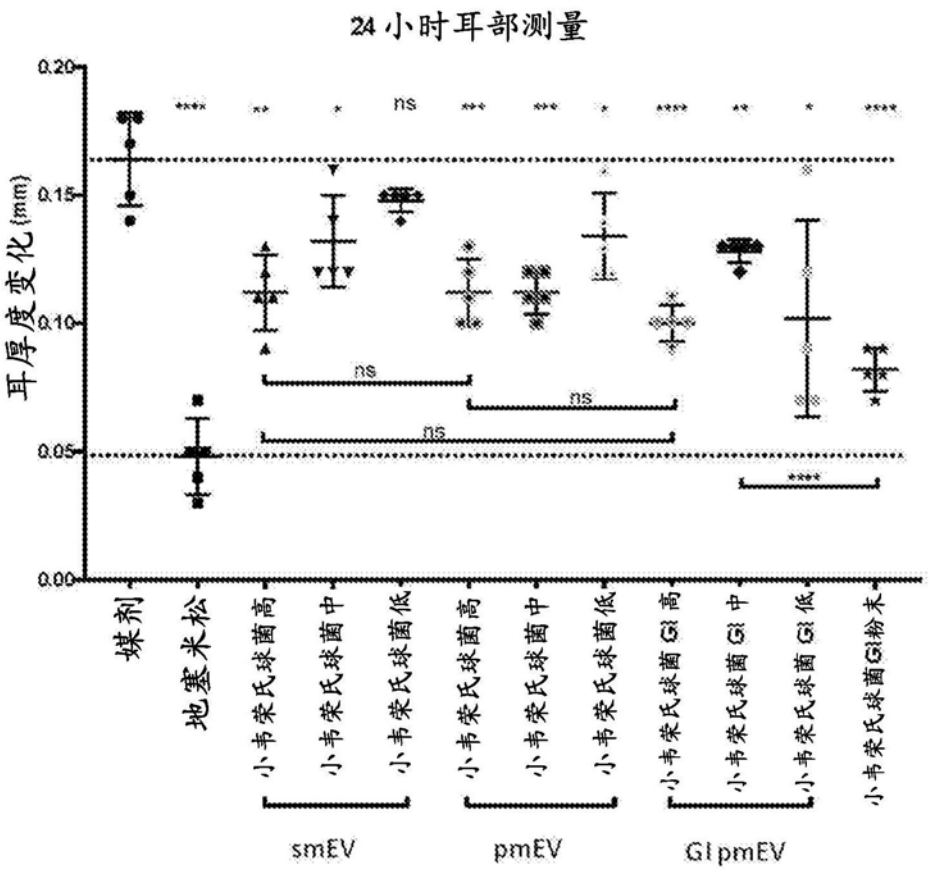

24小时耳部测量
耳厚度变化(mm)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
ns
媒剂
地塞米松
小韦荣氏球菌高
小韦荣氏球菌中
小韦荣氏球菌低
小韦荣氏球菌高
小韦荣氏球菌中
小韦荣氏球菌低
小韦荣氏球菌GI高
小韦荣氏球菌GI中
小韦荣氏球菌GI低
小韦荣氏球菌GI粉末
smEV
pmEV
GIpmEV

图22

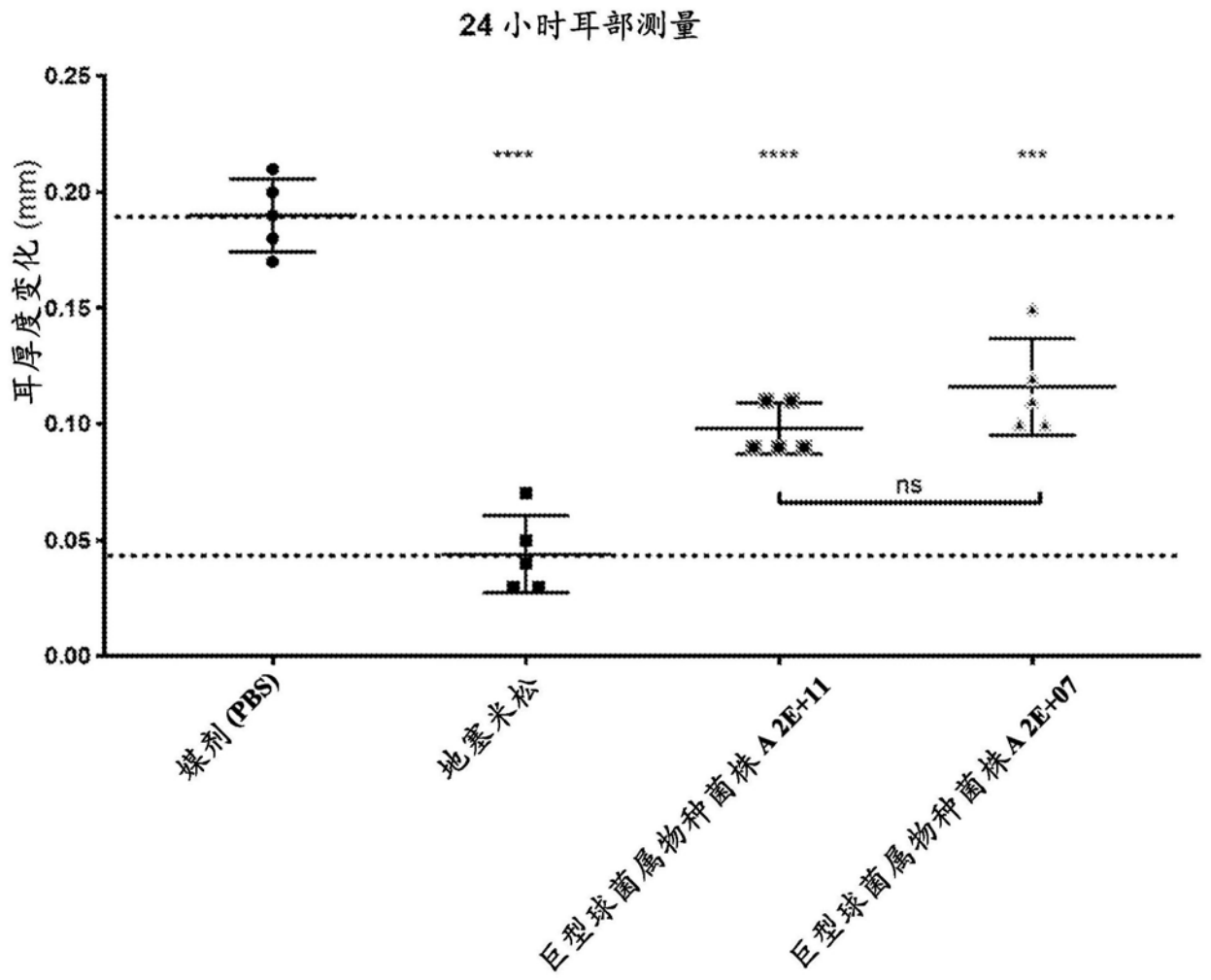

24 小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
***
ns
媒剂 (PBS)
地塞米松
巨型球菌属物种菌株 A 2E+11
巨型球菌属物种菌株 A 2E+07

图23

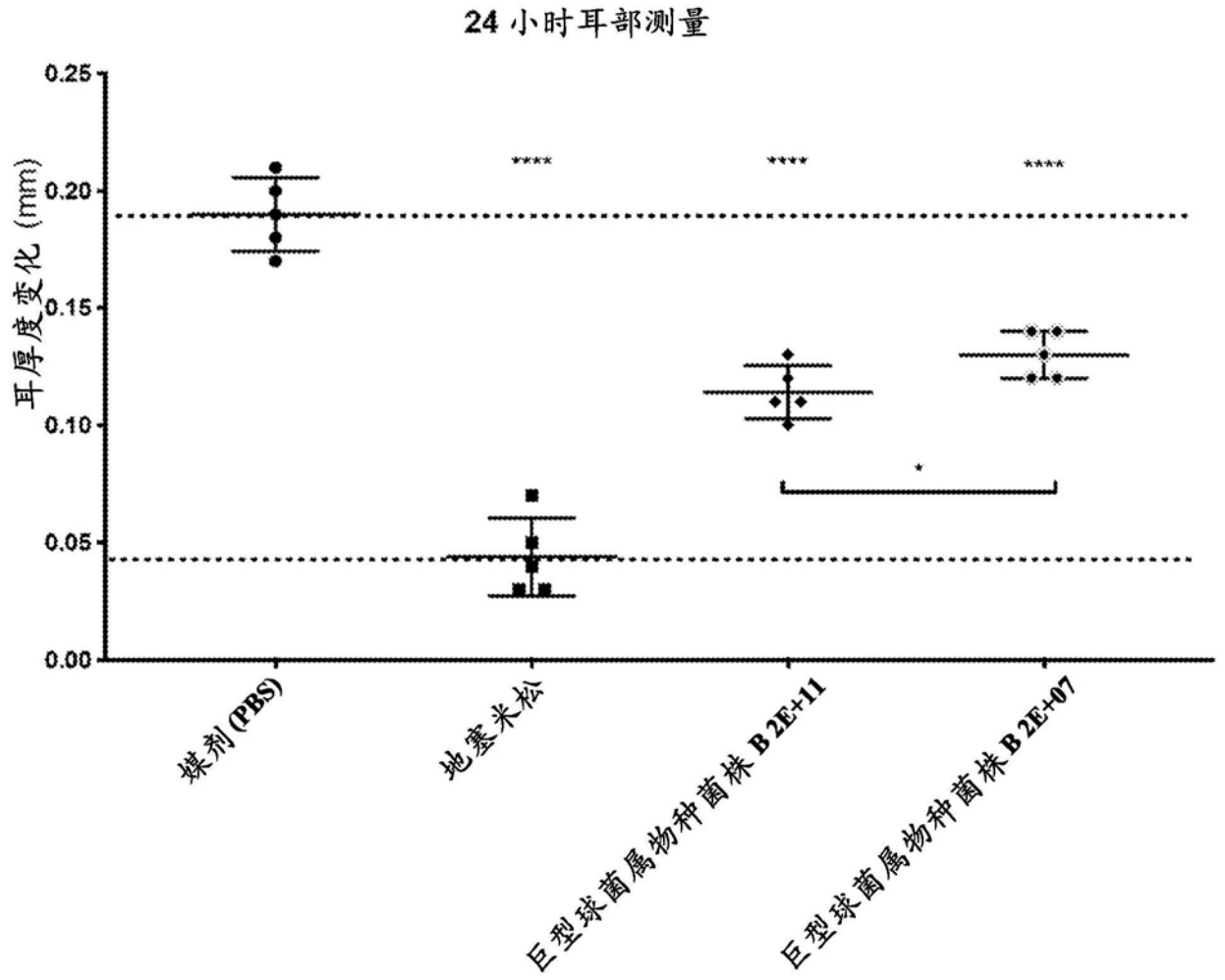

24 小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
****
****
*
媒剂 (PBS)
地塞米松
巨型球菌属物种菌株 B 2E+11
巨型球菌属物种菌株 B 2E+07

图24

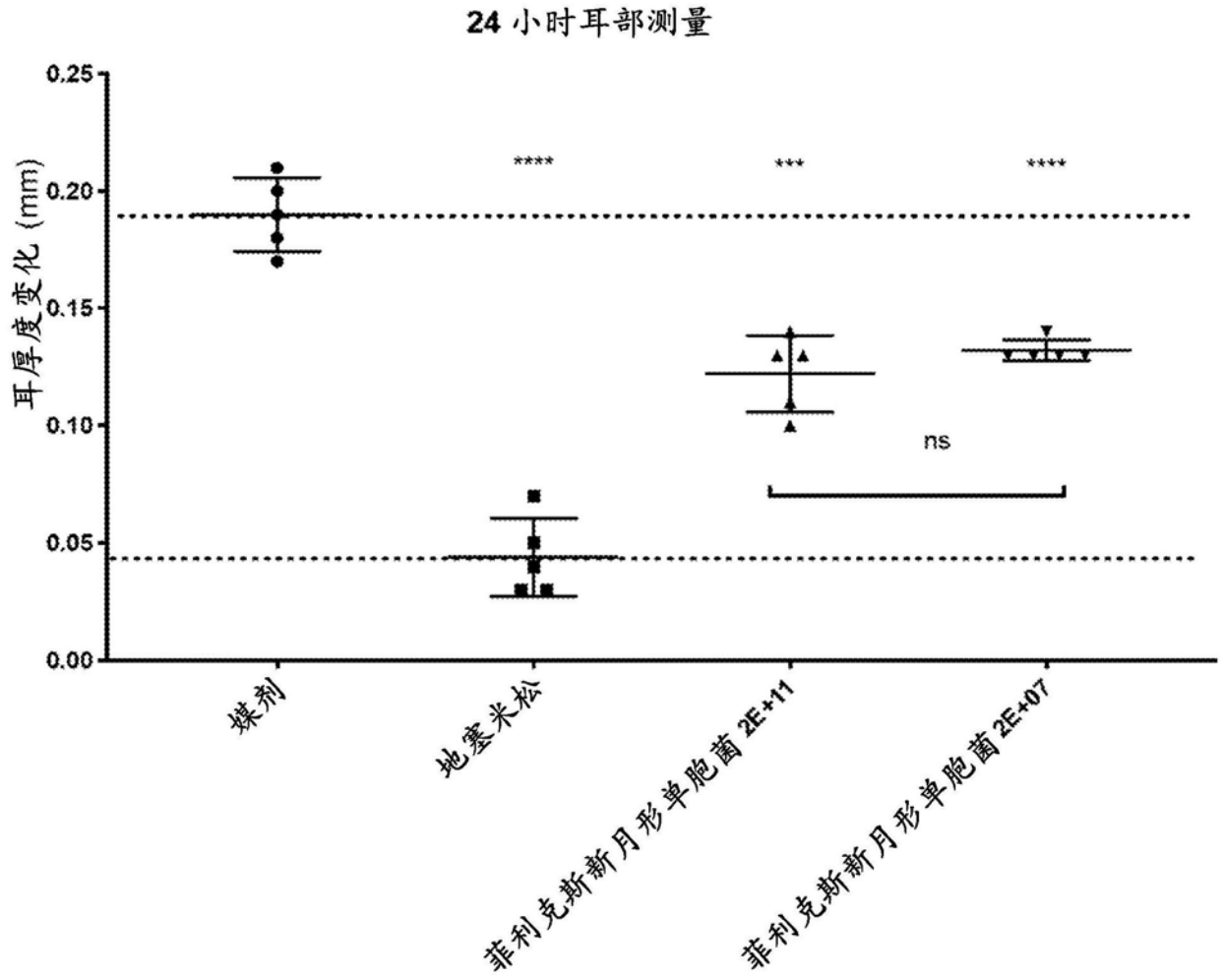

24 小时耳部测量
耳厚度变化 (mm)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
****
***
****
ns
媒剂
地塞米松
菲利克斯新月形单胞菌 2E+11
菲利克斯新月形单胞菌 2E+07

图25

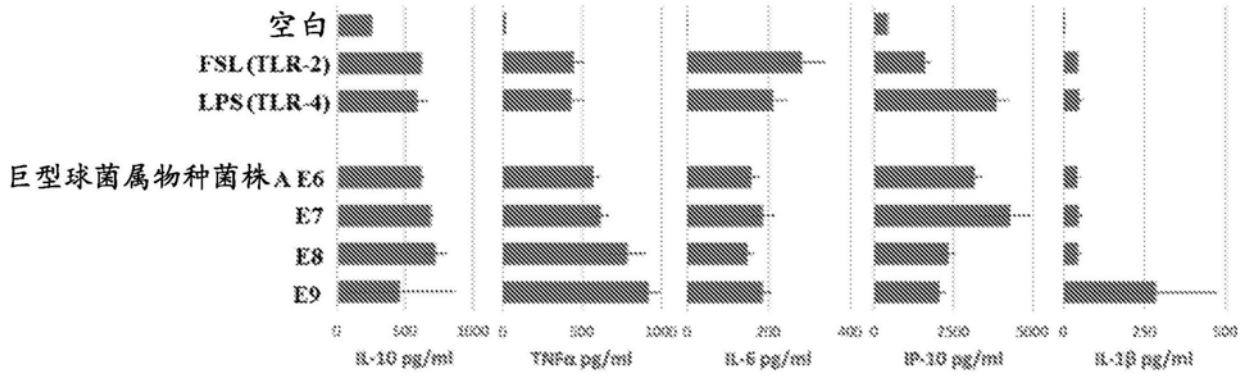

空白
FSL(TLR-2)
LPS(TLR-4)
巨型球菌属物种菌株A E6
E7
E8
E9
IL-10 pg/ml
TNFα pg/ml
IL-6 pg/ml
IP-10 pg/ml
IL-1β pg/ml

图26

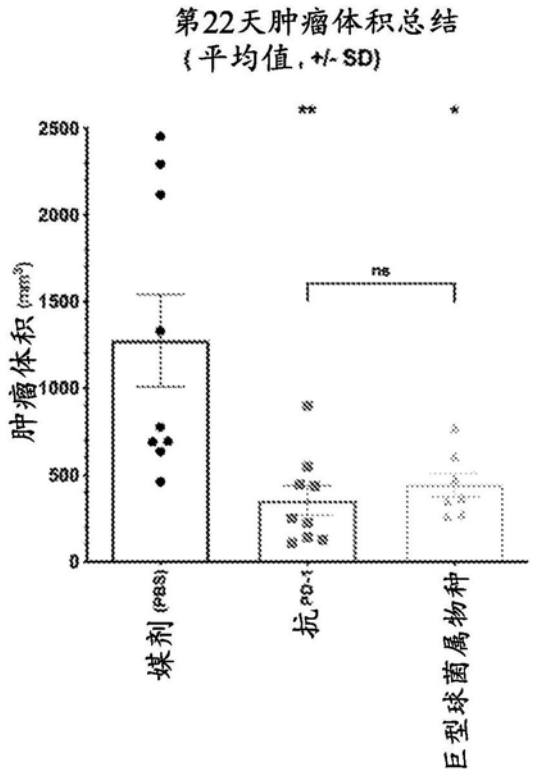

第22天肿瘤体积总结
(平均值, +/- SD)
肿瘤体积 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
ns
媒剂 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌属物种

图27A

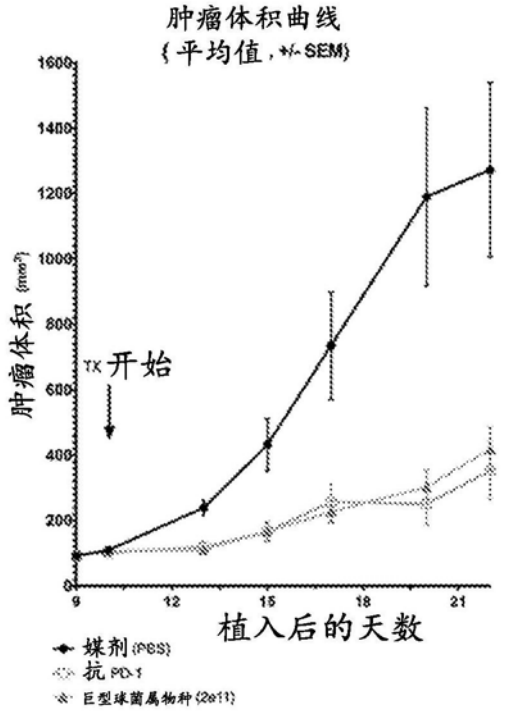

肿瘤体积曲线
(平均值, +/- SEM)
肿瘤体积 (mm³)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
TX 开始
9
12
15
18
21
植入后的天数
媒剂 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌属物种 (2a11)

图27B

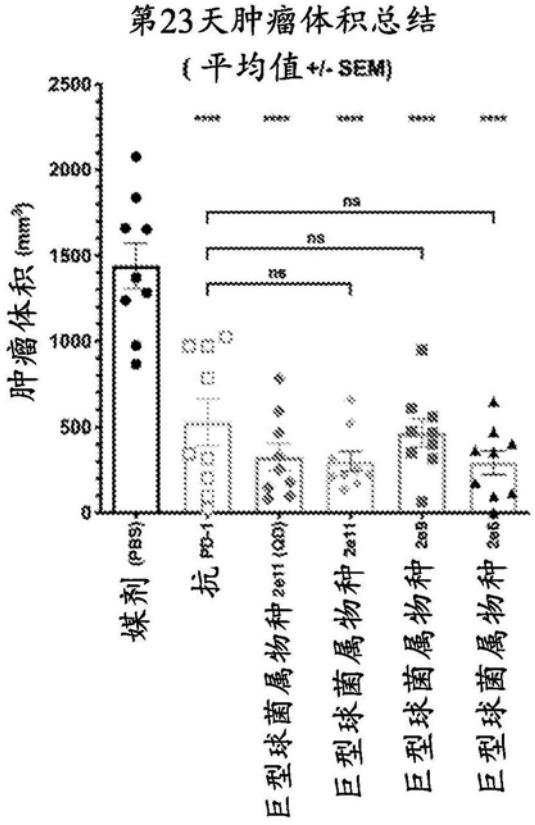

第23天肿瘤体积总结
(平均值+/-SEM)
肿瘤体积 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
****
ns
媒剂 (PBS)
抗 PD-1
巨型球菌属物种 2e11 (QD)
巨型球菌属物种 2e11
巨型球菌属物种 2e9
巨型球菌属物种 2e8

图28A

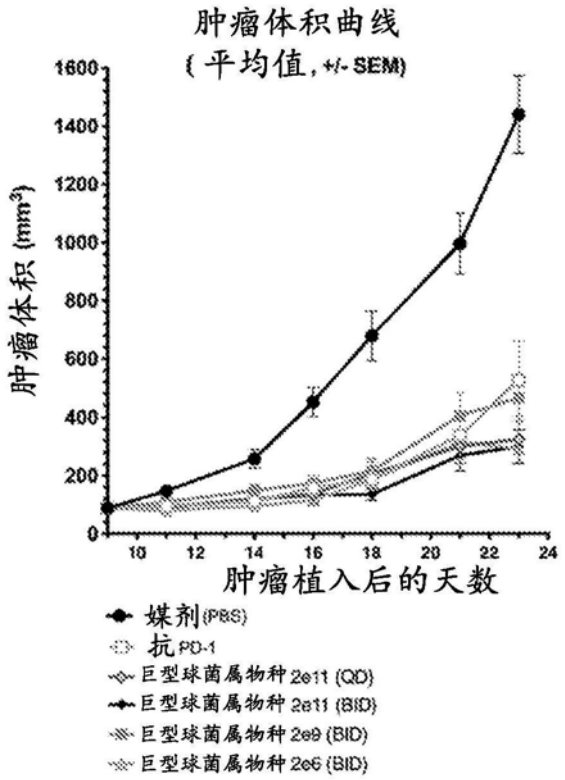

肿瘤体积曲线
(平均值, +/- SEM)
肿瘤体积 (mm³)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
10
12
14
16
18
20
22
24
肿瘤植入后的天数
媒剂(PBS)
抗PD-1
巨型球菌属物种2e11 (QD)
巨型球菌属物种2e11 (BID)
巨型球菌属物种2e9 (BID)
巨型球菌属物种2e6 (BID)

图28B

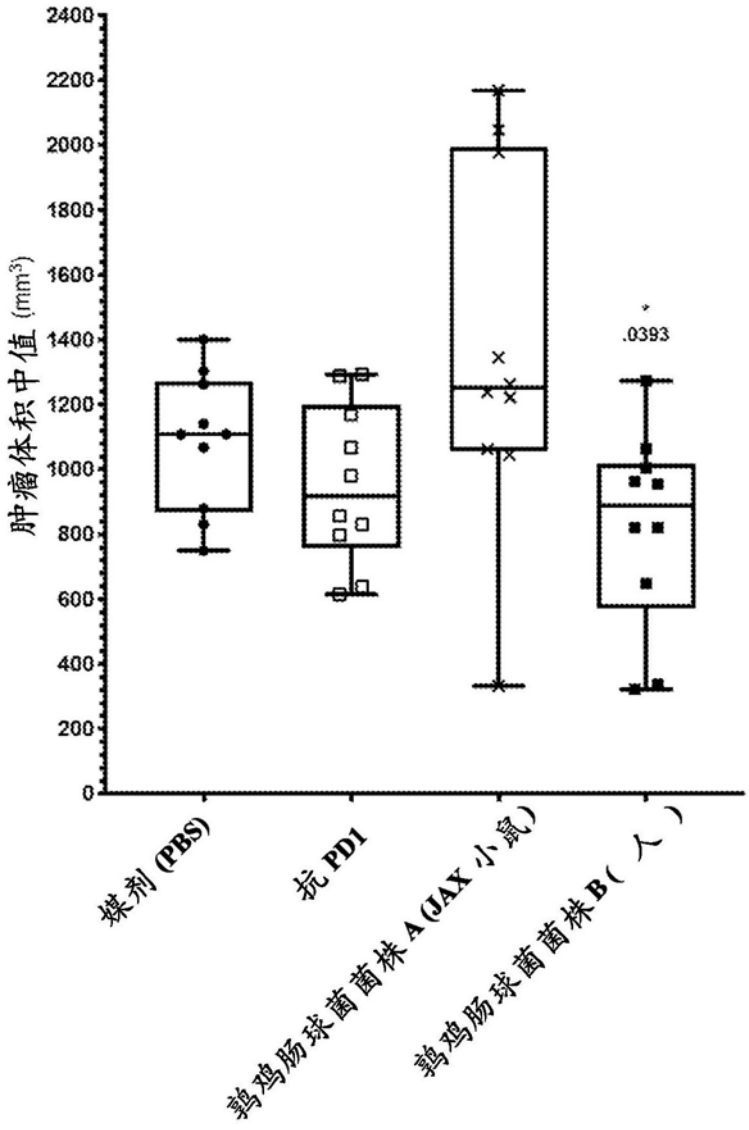

肿瘤体积中值 (mm³)
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
.0393
媒剂 (PBS)
抗 PD1
鹑鸡肠球菌菌株 A (JAX 小鼠)
鹑鸡肠球菌菌株 B (人)

图29

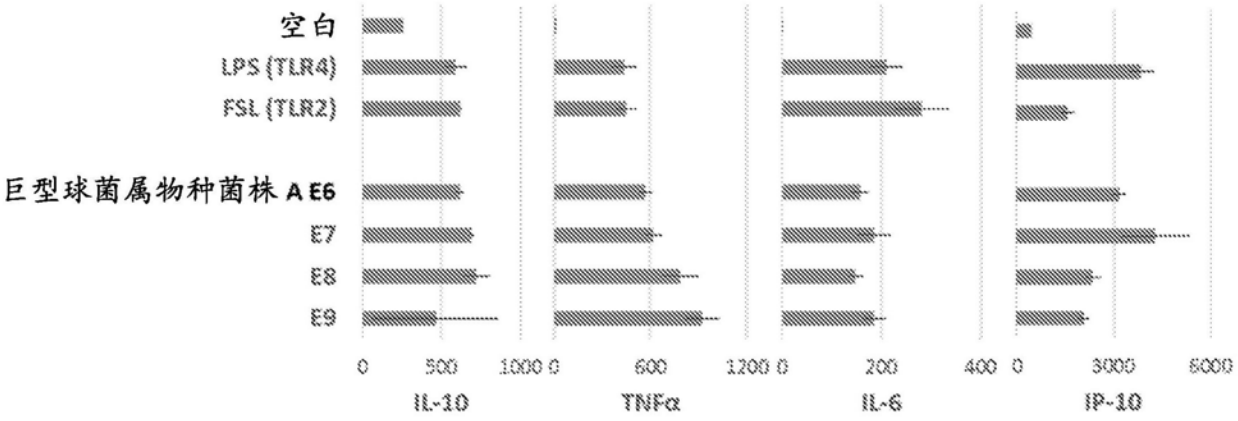

空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
巨型球菌属物种菌株 A E6
E7
E8
E9
0 500 1000
IL-10
0 600 1200
TNFα
0 200 400
IL-6
0 3000 6000
IP-10

图30

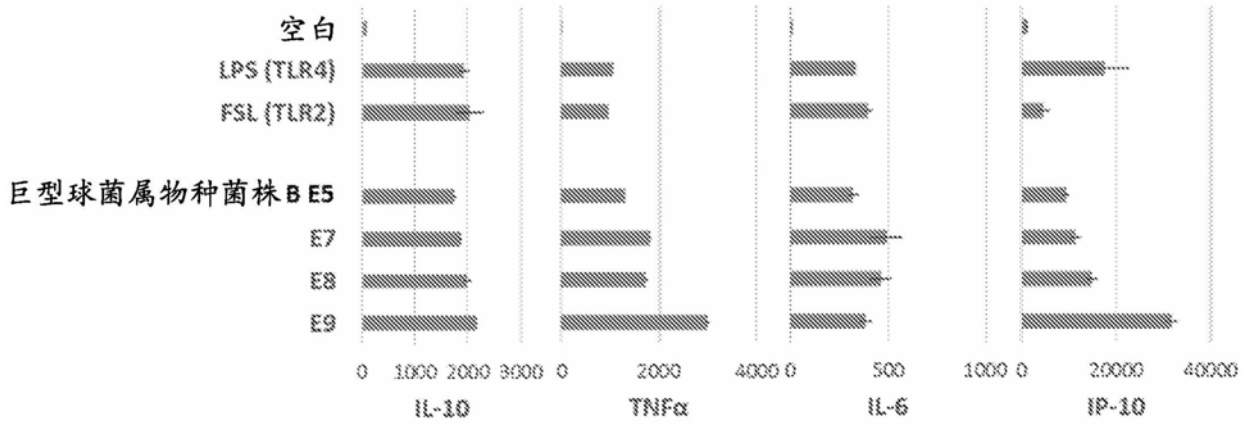

空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
巨型球菌属物种菌株B E5
E7
E8
E9
0 1000 2000 3000
IL-10
0 2000 4000
TNFα
0 500 1000
IL-6
0 20000 40000
IP-10

图31

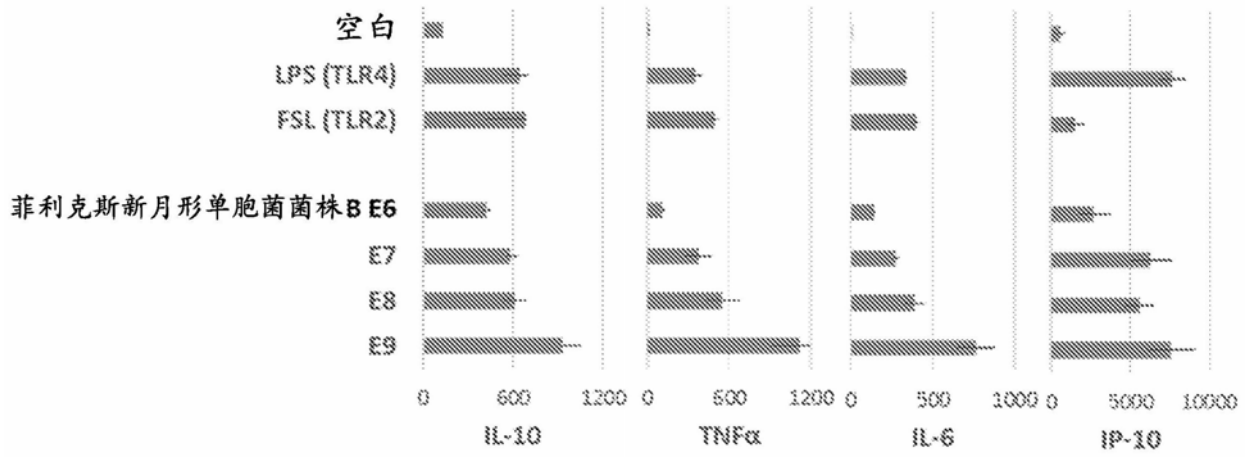

空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
菲利克斯新月形单胞菌菌株B E6
E7
E8
E9
0 600 1200
IL-10
0 600 1200
TNFα
0 500 1000
IL-6
0 5000 10000
IP-10

图32

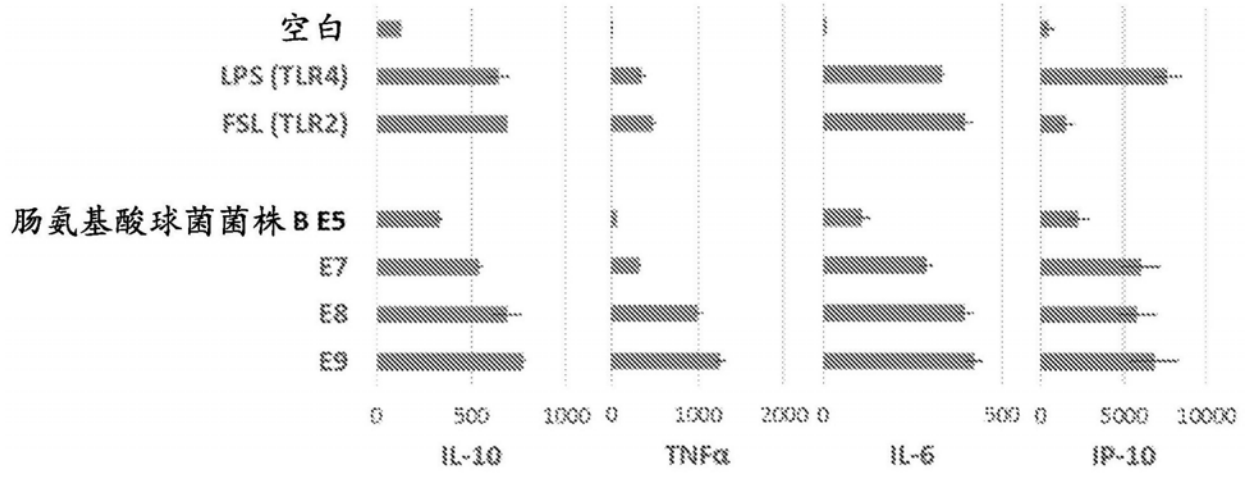

空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
肠氨基酸球菌菌株B E5
E7
E8
E9
0 500 1000
IL-10
0 1000 2000
TNFα
0 500
IL-6
0 5000 10000
IP-10

图33

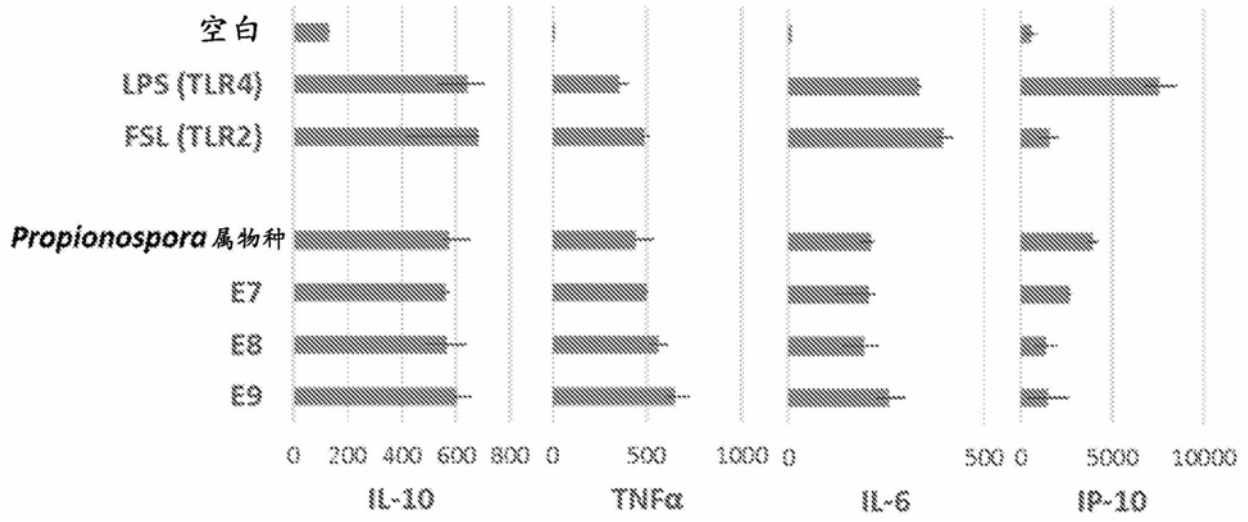

空白
LPS (TLR4)
FSL (TLR2)
Propionospora 属物种
E7
E8
E9
0 200 400 600 800
IL-10
0 500 1000
TNFα
0 500 1000
IL-6
0 5000 10000
IP-10

图34