202023590

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202023590 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：108129383　(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 16 日

(51)Int. Cl.：*A61K35/745 (2015.01)*　*A61P37/04 (2006.01)*

A61P31/04 (2006.01)　*A61K9/19 (2006.01)*

(30)優先權：2018/08/17　歐洲專利局　18189521.0

2018/10/29　英國　1817648.7

2019/01/10　英國　1900335.9

2019/01/29　英國　1901203.8

(71)申請人：英商 4 D 製藥研究有限公司 (英國) 4D PHARMA RESEARCH LIMITED　(GB) 英國

(72)發明人：慕得　映姆科　伊莉莎白 MULDER, IMKE ELISABETH (NL)；亞德里安尼　馬斯里歐 ADRIANI, MARSILIO (IT)；赫特　艾咪　貝絲 HOLT, AMY BETH (GB)；克里斯托夫　瑪莉亞 CHRISTOFI, MARIA (CY)；科威　菲力浦 COWIE, PHILIP (GB)；拉法蒂斯　艾瑪 RAFTIS, EMMA (IE)；羅特　卡利　達芬　路易斯　克勞黛 LAUTE-CALY, DELPHINE LOUISE CLAUDETTE (FR)；軒尼詩　艾瑪　伊莉莎白　克萊爾 HENNESSY, EMMA ELIZABETH CLARE (IE)；亞曼德　蘇艾德 AHMED, SUAAD (NL)；艾托爾　安娜 ETTORRE, ANNA (IT)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：30 項　圖式數：31　共 152 頁

(54)名稱

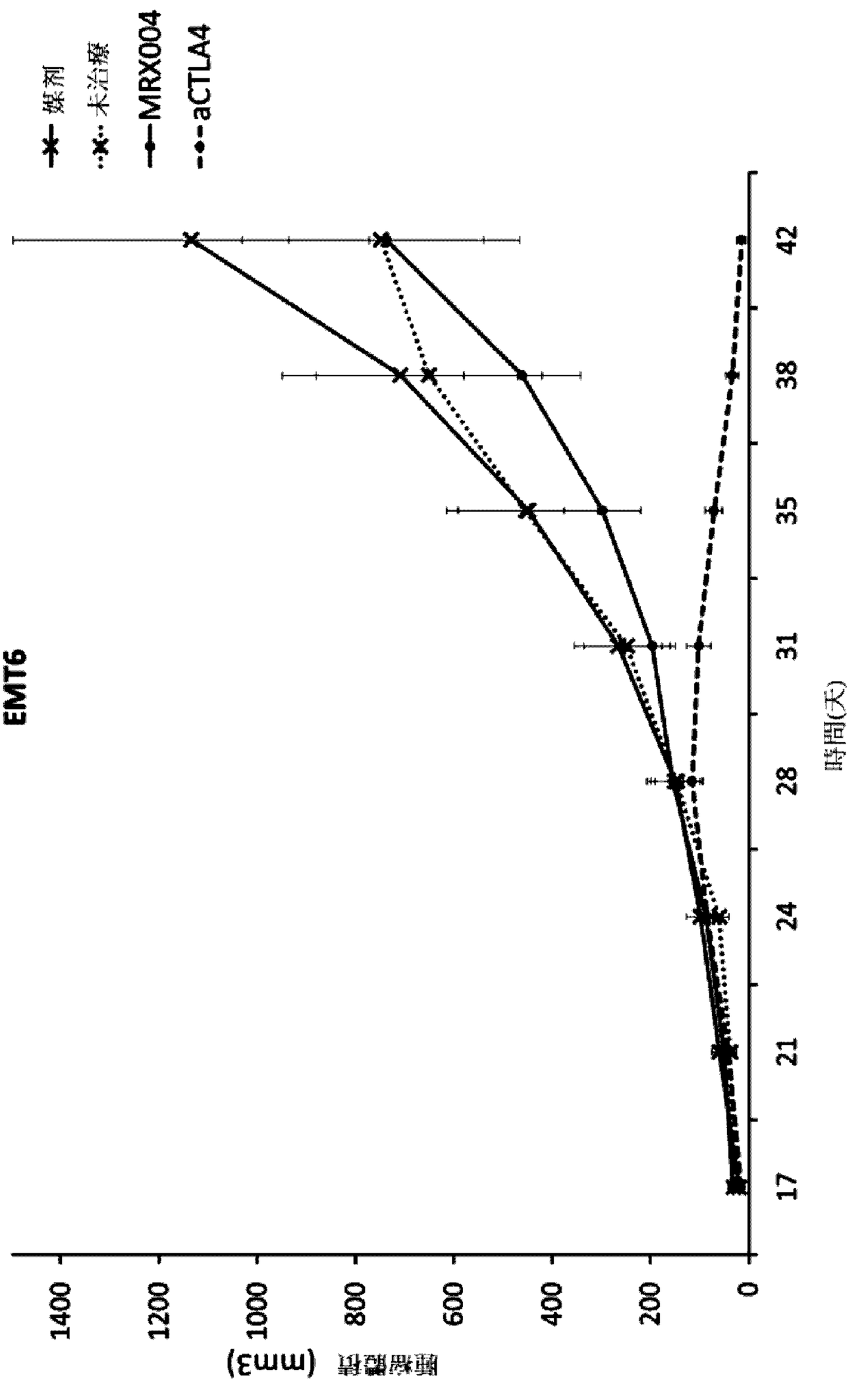
包含細菌菌株之組合物

(57)摘要

本發明提供一種包含細菌菌株之組合物，其用於刺激個體之免疫系統。

The invention provides a composition comprising a bacterial strain for use in stimulating the immune system in a subject.

指定代表圖：


媒劑
未治療
MRX004
aCTLA4
EMT6
腫瘤體積 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
17
21
24
28
31
35
38
42
時間(天)

【圖 1】

202023590

【發明摘要】

【中文發明名稱】包含細菌菌株之組合物

【英文發明名稱】COMPOSITIONS COMPRISING BACTERIAL STRAINS

【中文】

本發明提供一種包含細菌菌株之組合物，其用於刺激個體之免疫系統。

【英文】

The invention provides a composition comprising a bacterial strain for use in stimulating the immune system in a subject.

【指定代表圖】圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】包含細菌菌株之組合物

【英文發明名稱】COMPOSITIONS COMPRISING BACTERIAL STRAINS

【技術領域】

【0001】　本發明屬於包含自哺乳動物消化道分離之細菌菌株的組合物及此等組合物用於治療疾病、尤其在疾病治療中刺激免疫系統之用途的領域。

【先前技術】

【0002】　雖然認為人類腸道在子宮內係無菌的，但在出生後其立即暴露於大量的各種母體及環境微生物。此後，出現微生物定殖及演替之變動期，其受諸如分娩模式、環境、飲食及宿主基因型之因素影響，所有因素皆影響腸微生物區(microbiota)之組成，尤其是在生命早期期間。隨後，微生物區穩定化且變為成體樣[1]。人類腸微生物區含有超過 500-1000 個基本上屬於兩大細菌門擬桿菌門(Bacteroidetes)及厚壁菌門(Firmicutes)之不同演化型(phylotype)[2]。由人類腸之細菌定殖產生的成功共生關係產生多種代謝、結構、保護及其他有益功能。定殖腸部之增強代謝活性確保原本無法消化之飲食組分降解，同時釋放副產物，為宿主提供重要營養物來源。類似地，充分認識到腸微生物區之免疫學重要性，且在免疫系統減弱之無菌動物中予以例示，該免疫系統在引入共生細菌後在功能上復原[3-5]。

【0003】　微生物區組成之顯著變化已在諸如發炎腸病(IBD)之胃腸病症中予以證明。舉例而言，在 IBD 患者中梭菌屬(*Clostridium*) XIVa 簇細菌之水準降低，而大腸桿菌(*E. coli*)數目增加，此表明腸內共生體與病原性共生體(pathobiont)之平衡的變化[6-9]。有趣地，此微生物生態失調亦與效應 T 細胞群體之不平衡相關。

【0004】　認識到某些細菌菌株對動物腸可能具有之潛在積極作用，已提出將各種菌株用於治療各種疾病(參見例如[10-13])。亦已提出將某些菌株(包括大部分乳桿菌屬(*Lactobacillus*)及雙歧桿菌屬(*Bifidobacterium*)菌株)用於例如藉助抗炎機制治療不直接與腸相關聯之各種發炎及自體免疫性疾病(綜述參見[14]及[15])。已提出某些鏈球菌(*Streptococcus*)及範永氏球菌屬(*Veillonella*)菌株以及較小程度之腸球菌屬(*Enterococcus*)及乳桿菌屬(*Lactobaccillus*)菌株具有免疫調節作用，對活體外不同細胞介素具有不同作用。然而，不同疾病與不同細菌菌株之間的關係以及特定細菌菌株對腸及在系統層面上以及對任何特定類型疾病之準確作用尚未充分表徵。

【0005】　最近，已研究各種雙歧桿菌屬物種之抗炎性質，且若干人類試驗已證實雙歧桿菌之治療性質可成功地自實驗室轉移至臨床，尤其用於發炎及自體免疫性病症。舉例而言，長雙歧桿菌(*B. longum*) CECT 7347 及嬰兒雙歧桿菌(*B. infantis*) NLS 二者皆在乳糜瀉患者中引發保護作用[16、17])。研究亦已證實雙歧桿菌能夠調節腸道以外之疾病。由長雙歧桿菌 BB536、嬰兒雙歧桿菌 M-63 及短雙歧桿菌 M-16V 構成之三菌株調配物減輕與兒童過敏性鼻炎及輕度間歇性氣喘相關之症狀[18]。此外，向患有潰瘍性結腸炎、牛皮癬及慢性疲勞症候群之患者投與長雙歧桿菌 35624 使所有三種病症中 C-反應蛋白質之血漿含量降低[19]，表明此菌株可能能夠調節全身免疫。

【0006】　已在例如[20]及[21]中提出來自短雙歧桿菌物種之生物體因代謝亞麻油酸而用於製備免疫刺激補充劑。然而，此等文獻中並無任何內容表明此等生物體在投與個體時可引發免疫刺激反應。

【0007】　參考文獻[22]提示包含 β-半乳寡糖 A 及 B 之營養組合物可引發免疫刺激作用。據稱包含彼等糖之組合物可另外包含各種其他包括短雙歧桿菌之組

分，但並未提示短雙歧桿菌生物體有助於或增強 β-半乳寡糖之任何免疫刺激性質。

【0008】 [23]中提出了來自短雙歧桿菌物種之生物體之治療用途。然而，並未提示其中揭示之細菌菌株具有免疫刺激作用。

【0009】 關於研究雙歧桿菌屬菌株對經口霍亂疫苗免疫原性之潛在作用的研究報導於[24]中。然而，該研究之結果尚無定論；該論文中報導測試菌株雖然耐受良好，但並未展現出明顯的疫苗接種後免疫刺激作用。

【0010】 此項技術中需要治療疾病之新方法。亦需要表徵腸細菌之潛在作用，以便可研發出使用腸細菌之新療法。

【發明內容】

【0011】 本發明者已研發包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之新組合物，其可用於刺激個體之免疫系統以及治療及預防個體之疾病。本發明者已鑒別短雙歧桿菌物種之菌株可有效地活化免疫系統。

【0012】 因此，本發明提供包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物，其用於刺激個體之免疫系統。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於刺激免疫系統。

【0013】 另外，本發明提供刺激免疫系統之方法，其包括向個體投與包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物。此外，本發明提供包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株的組合物用於製造用於刺激個體之免疫系統之藥物的用途。

【0014】 在其他態樣中，本發明提供包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物，其用作疫苗佐劑。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用作疫苗佐劑。

【0015】 在其他態樣中，本發明提供包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合

物，其用於治療、預防或延遲免疫衰老。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0016】　在其他態樣中，本發明提供包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株之組合物，其用於增強細胞療法，諸如 CAR-T。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於增強細胞療法，諸如 CAR-T。

【0017】　本發明者亦已表徵尤其有效刺激免疫系統之短雙歧桿菌菌株且已鑒別出其效力可由其胞外多糖(EPS)介導。因此，本發明較佳地使用包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物，其用於刺激個體之免疫系統，該細菌菌株包含完整 EPS 基因座及/或在其表面上表現 EPS。

【0018】　較佳地，用於本發明中之細菌係以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株。

【0019】　在較佳實施例中，本發明提供一種組合物，其用於在疾病之治療或預防中增加 IL-12p70、IL-12p70、IFNγ、IL-4 及/或 TNF-α 之表現水準及/或活性，如在實例中所證實。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型的組合物，其用於在疾病之治療或預防中增加 IL-12p70、IL-12p70、IFNγ、IL-4 及/或 TNF-α 之表現水準及/或活性。

【0020】　在較佳實施例中，本發明提供一種組合物，其用於在疾病之治療或預防中增加 IL-12p70、IL-12p70、IFNγ、IL-4、TNF-α 及/或 TNF-17α 之表現水準及/或活性，如在實例中所證實。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型的組合物，其用於在疾病之治療或預防中增加 IL-12p70、IL-12p70、IFNγ、IL-4、TNF-α 及/或 IL-17α 之表現水準及/

或活性。

【0021】　在較佳實施例中，本發明提供用於刺激 TLR2 之組合物。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於刺激 TLR2。

【0022】　在較佳實施例中，本發明提供用於刺激 NFκB 之組合物。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於刺激 NFκB。

【0023】　在較佳實施例中，本發明之細菌菌株表現支鏈澱粉酶，其在實例中顯示為由有效之短雙歧桿菌菌株高度表現且可能參與黏附。

【0024】　在其他態樣中，本發明提供包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株的組合物，其用於製造用於治療或預防個體之細菌感染之藥物。實例證實短雙歧桿菌且尤其本發明之短雙歧桿菌菌株具有有效之抗微生物活性。另外，本發明提供治療或預防個體之細菌感染之方法，其包括投與短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物。此外，本發明提供包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株的組合物用於製造用於治療或預防個體之細菌感染之藥物的用途。

【0025】　在較佳實施例中，感染係胃腸感染。在較佳實施例中，感染係革蘭氏(Gram)陰性細菌感染。在較佳實施例中，本發明之組合物用於治療或預防胃腸大腸桿菌感染。在較佳實施例中，本發明之組合物用於治療或預防胃腸道沙門氏桿菌(*S. enterica*)感染。在一些實施例中，本發明之組合物用於在細菌感染之治療中降低細菌活力。本發明之細菌可用於將病原細菌之水準恢復至無症狀水準或自個體中完全消除病原細菌，從而治療細菌感染，以及減輕與細菌水準升高相關之症狀。

【0026】　預期與實例中測試之短雙歧桿菌菌株密切相關之菌株尤其有效刺激

免疫系統。在較佳實施例中，本發明提供一種組合物，其中細菌菌株具有與 SEQ ID NO:1 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%一致之 16s rRNA 基因序列，或其中細菌菌株具有由 SEQ ID NO:1 表示之 16s rRNA 基因序列。

【0027】 在某些實施例中，本發明之組合物用於經口投與。本發明之菌株之經口投與可有效刺激免疫系統。此外，經口投與對於患者及從業人員而言係方便的且允許遞送至腸部及/或部分或全部定殖腸部。

【0028】 在某些實施例中，本發明之組合物包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或載劑。

【0029】 在某些實施例中，本發明之組合物包含已凍乾之細菌菌株。本發明之組合物亦可包含短雙歧桿菌物種之凍乾細菌菌株。凍乾係用於製備允許遞送細菌之穩定組合物的有效且方便之技術。

【0030】 在某些實施例中，本發明提供包含如上所述之組合物之食品。本發明亦提供包含如本文所述之短雙歧桿菌物種之細菌菌株之食品。

【0031】 在某些實施例中，本發明提供包含如上所述之細菌菌株之疫苗組合物。本發明亦提供包含根據本發明之組合物之疫苗組合物。

【0032】 另外，本發明提供治療或預防與免疫刺激降低相關之疾病或病狀的方法，其包括向有需要之患者投與包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株的組合物。

【圖式簡單說明】

【0033】 **圖 1**：小鼠乳癌模型-腫瘤體積。

【0034】 **圖 2**：小鼠肺癌模型-腫瘤體積。

【0035】 **圖 3**：小鼠肝癌模型-肝臟重量。

【0036】 **圖 4**：單獨 MRX004 之 Rapid ID 32 A 譜(A)及與短雙歧桿菌型菌株之 Rapid ID 32 A 譜(B)之比較。白色=陰性反應(無顏色變化)、向下交叉影線=中間

陽性反應(弱顏色變化)及黑色=陽性反應(適當之強顏色變化)。

【0037】 **圖 5**：MRX004 之 API® 50 CH 分析。向上交叉影線=陰性反應(無顏色變化)、向下交叉影線=中間陽性反應(弱顏色變化)、黑色=陽性反應(適當之強顏色變化)及白色=可疑反應(意外顏色變化)。

【0038】 **圖 6**：MRX004 及短雙歧桿菌型菌株與人類細胞之附著。

【0039】 **圖 7：藉由 MRx0004 處理刺激 NFκB 及 TLR2。**用活 MRx0004 ($MRx0004_{LV}$)、MRx0004 培養上清液 ($MRx0004_{SN}$) 及熱滅活 MRx0004 ($MRx0004_{HK}$)之處理物以 MOI 100:1 將 THP-1-NFκB **(A)**及 HEK-TLR2 **(B)**報告細胞株處理 22 小時。數據代表三個生物學重複。使用常規單因子變異數分析 (one-way ANOVA)及 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。統計學上顯著之差異呈現為*p<0.05、***p<0.001 及****p<0.0001。

【0040】 **圖 8：MRx0004 在活體外及因應 IEC 之轉錄反應。**在對數後期生長中之培養物及與 IEC 接觸(3 小時)後之培養物之間分析且比較十個 MRx0004 基因之表現。數據呈現為在命名條件之間計算且相對於 *groEL* 正規化之變化倍數 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)值，且代表三個獨立生物學重複。使用常規單因子變異數分析及 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001。

【0041】 **圖 9：MRx0004 及相關菌株之 EPS 基因座內之序列多樣性**

【0042】 **圖 10：MRx0004 之 EPS 陰性衍生菌株之表型性質。**對 MRx0004 **(A)** 及其 EPS 陰性菌株(EPS^{neg}) **(B)**實施穿透式電子顯微術(TEM)。**(C)**在將 HT29-MTX 細胞及細菌菌株以 MOI 100:1 共培育 3 小時後，分析細菌與 IEC 之黏附。呈現之數據係來自初始接種物之黏附 CFU 百分比之三個生物學重複的平均值。使用常規單因子變異數分析及 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，**p<0.01。

【0043】 **圖 11：EPS 耗盡對 MRx0004 表面蛋白質偵測之影響。**顯示在**(A)** MRx0004 刮取(shave)及脫落(shed)之蛋白質級分、**(B)** EPS^{neg} 刮取及脫落之蛋白質級分以及**(C)** MRx0004 及 EPS^{neg} 刮取之蛋白質級分中鑒別之蛋白質數目的文氏圖(Venn diagram)。

【0044】 **圖 12. 藉由 MRx0004 闡明 EPS 在免疫調節中之作用。**將活處理物($_{LV}$)及培養上清液($_{SN}$)以 100:1 之 MOI 添加至 HEK-TLR2 報告細胞**(A)**及 THP-1-NFκB 報告細胞**(B)**中，且培育 22 小時。先前已在圖 7 中呈現針對 $MRx0004_{LV}$ 及 $MRx0004_{SN}$ 所呈現之數據。數據代表三個獨立重複。**(C)**將 HT29-MTX 細胞與活細菌共培育 3 小時，接著以 10 ng/ml 之濃度引入 TNFα 且保持 24 小時。使用 ELISA 分析共培養上清液中之 IL-8 水準。數據代表五個生物學重複。使用常規單因子變異數分析及 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，**p<0.01，***p<0.001，****p<0.0001。

【0045】 **圖 13：藉由流式細胞術鑒別免疫細胞子集。**將來自六個健康供體之 PBMC 與以下處理物中之一者培育 72 小時；單獨 RPMI 培養基、$MRx0004_{HK}$ 或 $EPS^{neg}{}_{HK}$。顯示盒須圖，其最小值及最大值由豎直須線(whisker)表示。細胞活化標記物 CD25 之表現顯示為 $CD8^+$細胞及 $CD4^+$細胞之百分比**(A-B)**。Treg ($CD25^+$ (高)/$CD127^-$ (低))顯示為 $CD4^+$細胞之百分比**(C)**。自各供體計算獨立 Treg/$CD8^+$ 比率**(D)**且將 B 細胞($CD19^+$)計算為 $CD3^-$細胞之百分比**(E)**，並且使用常規單因子變異數分析，接著使用 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，**p<0.01 ***p<0.001 ****p<0.0001。

【0046】 **圖 14：由周邊血單核細胞(PBMC)產生之細胞介素譜。**將細胞與以下處理物中之一者培育 72 小時；單獨 RPMI 培養基、$MRx0004_{HK}$ 或 $EPS^{neg}{}_{HK}$。顯示盒須圖，其最小值及最大值由豎直須線表示。自 6 個健康供體獲得 PBMC，

且使用多重分析確定細胞介素濃度(**A-G**)。自各供體計算獨立 IL-12p70/IL-4 比率、IL-10/IL1p70 比率及 IL-1β/IL12p70 比率(**H-J**)，且使用常規單因子變異數分析，接著使用 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，**p<0.01 ***p<0.001 ****p<0.0001。

【0047】 **圖 15**：利用 InteractiVenn 產生之文氏圖，其顯示在 MRx0004 刮取及脫落之蛋白質級分中鑒別的蛋白質數目(列於表 2 中)。

【0048】 **圖 16**：**(A)**藉由插入誘變產生 MRx0004 之 EPS 陰性菌株。**(B)** MRx0004 及其衍生菌株 EPS^{neg}、EPS^{vec} 及 EPS^{comp} 之自動聚集。

【0049】 **圖 17**：比較 MRx0004SN 及 EPSnegSN 中鑒別之蛋白質數目的文氏圖。

【0050】 **圖 18**：**用於七色板(seven colour panel)流式細胞術實驗之圈選(Gating)策略。**使用活細胞群體以 1×10^5 個事件(event)設定採集臨限值。顯示來自未處理樣品之人類周邊血單核細胞(PBMC)之代表性偽彩圖。在 FloJo 中使用同型對照及 FMO 設定門。使用正向散射及側向散射鑒別淋巴球，接著圈選出雙峰群體且利用活力染料排除死細胞。利用 CD19 對 $CD3^-$細胞進行次圈選(sub-gated)以鑒別 B 細胞，而 $CD3^+$細胞群體用於進一步區分 $CD4^+$細胞及 $CD8^+$細胞二者。接著使用 CD25 來觀察活化細胞之百分比，且在 $CD4^+$群體之情況下，其亦與 CD127 結合用於鑒別 Treg ($CD25^+/CD127^-$)。

【0051】 **圖 19**：**藉由流式細胞術鑒別免疫細胞子集。**將來自六個健康供體之 PBMC 與以下處理物中之一者培育 72 小時；單獨 RPMI 培養基、$MRx0004_{HK}$ 或 $EPS^{neg}{}_{HK}$。顯示盒須圖，其最小值及最大值由豎直須線表示。$CD8^+$及 $CD4^+$細胞顯示為 $CD3^+$之百分比(**A-B**)且活化 B 細胞顯示為 $CD19^+$之百分比(**C**)。使用常規單因子變異數分析，接著使用 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。*p<0.05，

$^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ $^{****}p<0.0001$。

【0052】 **圖 20：藉由流式細胞術鑒別免疫細胞子集。**將來自六個健康供體之 PBMC 與以下處理物中之一者培育 72 小時：$MRx0004_{HK}$、$EPS^{neg}{}_{HK}$、$EPS^{vec}{}_{HK}$ 或 $EPS^{comp}{}_{HK}$。顯示散佈圖，其標準偏差由豎直條表示。$CD8^+$及 $CD4^+$細胞之表現顯示為 $CD3^+$細胞之百分比(**A**、**C**)。細胞活化標記物 CD25 之表現顯示為 $CD4^+$及 $CD8^+$細胞之百分比(**B**、**D**)。Treg ($CD25^+$ (高)/$CD127^-$ (低))顯示為 $CD4^+$細胞之百分比(**E**)，且 B 細胞($CD19^+$)顯示為 $CD3^-$細胞之百分比(**F**)且活化 B 細胞顯示為 $CD19^+$之百分比(**G**)。自各供體計算獨立 Treg/$CD8^+$比率(**H**)，且使用常規單因子變異數分析，接著使用 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。$^{*}p<0.05$，$^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ $^{****}p<0.0001$。

【0053】 **圖 21：由周邊血單核細胞(PBMC)產生之細胞介素譜。**將細胞與以下處理物中之一者培育 72 小時：$MRx0004_{HK}$、$EPS^{neg}{}_{HK}$、$EPS^{vec}{}_{HK}$ 或 $EPS^{comp}{}_{HK}$。顯示盒須圖，其最小值及最大值由豎直須線表示。自 6 個健康供體獲得 PBMC，且使用多重分析確定細胞介素濃度(**A-G**)。自各供體計算獨立 IL-12p70/IL-4 比率、IL-10/IL1p70 比率及 IL-1β/IL12p70 比率(**H-J**)。使用常規單因子變異數分析，接著使用 Tukey 多重比較檢定實施統計分析。$^{*}p<0.05$，$^{**}p<0.01$ $^{***}p<0.001$ $^{****}p<0.0001$。

【0054】 **圖 22：共培養抗微生物板分析之實例**。顯示指示菌株、測試菌株及抑制區。

【0055】 **圖 23：測試菌株及參考短雙歧桿菌菌株之 API 32A 測試結果。**白色=陰性反應(無顏色變化)、星形=中間陽性反應(弱顏色變化)及黑色=陽性反應(適當之強顏色變化)。

【0056】 **圖 24：測試菌株及參考短雙歧桿菌菌株之 PFGE SpeI 消化。**

【0057】 **圖 25**：SpeI 消化之 1% PFGE 凝膠，其在 0.5% TBE 中運行，18 小時，6 V/cm，1-15 秒 ST。黑色箭頭指示 DNA 大小標準品。將泳道 1 及 2 與來自同一凝膠之不同部分之泳道 3-7 分為一組。泳道 1=λ，泳道 2=MRx0004，泳道 3=短雙歧桿菌 REF 7，泳道 4=短雙歧桿菌 REF6，泳道 5=短雙歧桿菌 REF1，泳道 6=短雙歧桿菌 REF2，泳道 7=λ

【0058】 **圖 26**：基於此研究中包括之短雙歧桿菌之 PFGE 圖譜之 UPGMA 樹狀圖(A)。自圖 B 代表之 PFGE 條帶圖譜產生之相似性矩陣。

【0059】 **圖 27**：在不添加細胞介素(無細胞介素)之情況下，使用熱殺死之 MRx0004 (HK 4)、來自 MRx0004 培養物之上清液(SP 4)或 RPMI 培養基在 T 輔助細胞群體中誘導 T 細胞分化。**=p≤0.01。

【0060】 **圖 28**：在不添加細胞介素(無細胞介素)之情況下，使用熱殺死之 MRx0004 (HK 4)、來自 MRx0004 培養物之上清液(SP 4)或 RPMI 培養基在細胞毒性 T 淋巴球(CTL)群體中誘導 T 細胞分化。*=p≤0.05；***=p≤0.001；****=p≤0.0001。

【0061】 **圖 29**：脾細胞之活力。

【0062】 **圖 30**：脾細胞在用 MRx004 處理後產生之細胞介素譜。

【0063】 **圖 31：脾臟中 CD8+IFNγ+及 CD4+IFNγ+細胞之頻率及每細胞 IFNγ 之產生。**

【實施方式】

細菌菌株

【0064】 本發明之組合物包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株。實例證實此等細菌菌株可用於刺激免疫系統。本發明之較佳細菌菌株係以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌。

【0065】 以登錄號 NCIMB 42380 寄存之短雙歧桿菌細菌在實例中進行了測試，且在本文中亦稱為菌株 751、MRX004 或 MRx0004。測試之 MRX004 菌株的部分 16S rRNA 序列提供於 SEQ ID NO:1 中。短雙歧桿菌菌株 MRX004 由 GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)於 2015 年 3 月 12 日以識別編號(identification reference) 751 寄存在國際寄存當局 NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)且被指定登錄號 NCIMB 42380。GT Biologics Ltd.隨後更其名為 4D Pharma Research Limited。此等寄存物公佈於 WO2016/203223 中。

【0066】 菌株 NCIMB 42380 之基因體序列提供於 WO2016/203223 之 SEQ ID NO:2 中。

【0067】 亦預期與實例中測試之菌株密切相關之細菌菌株有效刺激免疫系統。在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株具有與 SEQ ID NO:1 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%一致之 16s rRNA 序列。較佳地，細菌菌株具有由 SEQ ID NO:1 表示之 16s rRNA 序列。最佳地，細菌菌株係以登錄號 NCIMB 42380 寄存之短雙歧桿菌菌株。

【0068】 在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株具有與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO：2 具有序列一致性之基因體。在較佳實施例中，用於本發明中之細菌菌株具有在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO:2 之至少 60% (例如至少 65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%)內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO:2 具有至少 90%序列一致性(例如至少 92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列一致性)的基因體。舉例而言，用於本發明中之細菌菌株可具有如下基因體：該基因體在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 70%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 90%序列一致性，或在

WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 80%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 90%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 90%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 90%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 100%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 90%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 70%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 95%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 80%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 95%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 90%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 95%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 100%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 95%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 70%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 98%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 80%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 98%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 90%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 98%序列一致性，或在 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 之 100%內與 WO2016/203223 之 SEQ ID NO: 2 具有至少 98%序列一致性。

【0069】　在較佳實施例中，本發明之組合物包含活細菌。在較佳實施例中，本發明之組合物包含呈活性狀態、較佳凍乾之活細菌。實例證實，活細菌之投與比熱殺死之細菌或上清液更有效。

【0070】　在較佳實施例中，本發明之細菌活化 TLR2，例如在如實例中所述之 HEK-TLR2 報告分析中。在其他實施例中，本發明之細菌不活化 TLR4、TLR5 或 TLR9。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 TLR2 之細菌，且用作

疫苗佐劑。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 TLR2 之細菌，且用於增強細胞療法。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 TLR2 之細菌，且用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0071】　在較佳實施例中，本發明之細菌活化 NFκB，例如在如實例中所述之 THP-1-NFκB 報告分析中。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 NFκB 之細菌，且用作疫苗佐劑。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 NFκB 之細菌，且用於增強細胞療法。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含活化 NFκB 之細菌，且用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0072】　在某些實施例中，本發明之細菌與對數後期相比在靜止期以更高水準表現一或多種選自由以下組成之群之基因：*oppA*、*支鏈澱粉酶*、*絲胺酸蛋白酶抑制劑*(*serpin*)及 *tadA*，例如，當在液體培養中生長時，如實例中所示。實例證實此等基因可介導有用之治療作用。

【0073】　在某些實施例中，本發明之細菌與靜止期相比在對數後期以更高水準表現一或多種選自由以下組成之群之基因：*eftU*、*烯醇酶*及 *pGTF*，例如，當在液體培養中生長時，如實例中所示。實例證實此等基因可介導有用之治療作用。

【0074】　在某些實施例中，本發明之細菌與對數後期相比在與腸上皮細胞接觸後以更高水準表現一或多種選自由以下組成之群之基因：*烯醇酶*、*pGTF*、*oppA*、*絲胺酸蛋白酶抑制劑*及*轉醛醇酶*，例如，當在液體培養中生長時，如實例中所示。實例證實此等基因可介導有用之治療作用。

【0075】　在某些實施例中，本發明之細菌表現支鏈澱粉酶、NlpC/P60 家族蛋白質、FtsI、轉醛醇酶、GAPDH、DnaK、GroEL 及烯醇酶中之一或多種並將其分泌至培養上清液中。在某些實施例中，本發明之細菌表現表 2 中之蛋白質中

之一或多種(諸如 2 種、3 種、5 種、10 種、15 種或全部)並將其分泌至培養上清液中。實例證實此等蛋白質可介導有用之治療作用。

【0076】　在某些實施例中，本發明之細菌在其細胞表面上表現以下中之一或多種：支鏈澱粉酶、I 型聚酮化合物合成酶、轉醛醇酶、GAPDH、DnaK、GroEL、烯醇酶及 EfTu。在某些實施例中，本發明之細菌表現表 3 中之蛋白質中之一或多種(諸如 2 種、3 種、5 種、6 種、8 種或全部)並將其分泌至培養上清液中。實例證實此等蛋白質可介導有用之治療作用。

【0077】　在某些實施例中，本發明之細菌表現支鏈澱粉酶。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含表現支鏈澱粉酶之細菌，且用作疫苗佐劑。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含表現支鏈澱粉酶之細菌，且用於增強細胞療法。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含表現支鏈澱粉酶之細菌，且用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0078】　在較佳實施例中，本發明之細菌包含完整之 EPS 基因座。實例證實完整 EPS 基因座可能有助於增加治療效力。在此等實施例中，EPS 基因座包含引發(priming)糖基轉移酶、一或多種額外糖基轉移酶、焦磷酸噻胺結合蛋白質、跨膜蛋白質、翻轉酶及鏈長決定子。在較佳實施例中，EPS 基因座之大小超過 30 Kb (包括側接假設蛋白質)。實例證實此一 EPS 基因座對於免疫刺激功能足夠。在較佳實施例中，EPS 基因座之大小為 25-60 Kb、30-50 Kb、30-40 Kb、30-35 Kb 或 30-32 Kb。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含具有完整 EPS 基因座之細菌，且用作疫苗佐劑。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含具有完整 EPS 基因座之細菌，且用於增強細胞療法。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含具有完整 EPS 基因座之細菌，且用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0079】　在較佳實施例中，本發明之細菌具有 EPS 基因座，該 EPS 基因座與

菌株 MRX004 之 EPS 基因座具有高水準之核苷酸一致性，諸如至少 90%、92%、94%、96%、98%、99%或 99.5%之核苷酸一致性，例如如實例中所確定。實例證實菌株 MRX004 之 EPS 基因座在遺傳上不同於其他短雙歧桿菌菌株，且可能有助於效力及治療效用。

【0080】 在較佳實施例中，本發明之細菌在其表面上帶有 EPS。實例證實 EPS 調節細胞表面上蛋白質之暴露。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含在表面上帶有 EPS 之細菌，且用作疫苗佐劑。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含在表面上帶有 EPS 之細菌，且用於增強細胞療法。在一較佳實施例中，本發明之組合物包含在表面上帶有 EPS 之細菌，且用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【0081】 較佳地，用於本發明中之細菌能夠使棉子糖發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時。實例表明，最有效之短雙歧桿菌菌株能夠使棉子糖發酵，且其參與 EPS 產生。在進一步較佳實施例中，用於本發明中之細菌能夠使以下中之一或多種(諸如 2 種、3 種、4 種、5 種、6 種或全部 7 種)發酵：α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶及 β-葡萄糖苷酶、α-阿拉伯糖、甘露糖及棉子糖，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時。在其他較佳實施例中，用於本發明中之細菌能夠使以下中之一或多種(諸如 2 種、3 種、4 種、5 種、6 種或全部 7 種)發酵：精胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、甘胺酸及組胺酸。可使用此項技術中已知之任何合適之分析來評估細菌使碳水化合物源或胺基酸發酵之能力。較佳地，使用 Rapid ID 32A 分析(較佳使用來自 bioMérieux 之 Rapid ID 32A 系統)。

【0082】 較佳地，用於本發明中之細菌展現出 β-葡萄糖苷酶之中間發酵或 α-

阿拉伯糖之中間發酵，或更佳 β-葡萄糖苷酶之中間發酵及 α-阿拉伯糖之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 3 二者皆具有有用之活性，且二者皆展現出 β-葡萄糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。在尤佳實施例中，用於本發明中之細菌展現出 β-葡萄糖苷酶之中間發酵、α-阿拉伯糖之中間發酵及阿拉伯糖之陽性發酵。

【0083】　較佳地，用於本發明中之細菌未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。細菌可能僅展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之中間發酵或不發酵。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 2 二者皆具有有用之活性，且二者皆未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵。在尤佳實施例中，用於本發明中之細菌未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵，且確實展現出阿拉伯糖之陽性發酵。

【0084】　較佳地，用於本發明中之細菌展現出 α-半乳糖苷酶之中間發酵或 α-阿拉伯糖之中間發酵，或更佳 α-半乳糖苷酶之中間發酵及 α-阿拉伯糖之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 8 二者皆具有有用之活性，且二者皆展現出 α-半乳糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。在尤佳實施例中，用於本發明中之細菌展現出 α-半乳糖苷酶之中間發酵及 α-阿拉伯糖之中間發酵，以及阿拉伯糖之陽性發酵。

【0085】　在替代實施例中，用於本發明中之細菌使絲胺酸芳基醯胺酶發酵，而不使白胺醯基甘胺酸芳基醯胺酶發酵，且不使丙胺酸芳基醯胺酶發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37°C下培養 4 小時時，及例如

當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株測試 11 及測試 12 二者皆具有有用之活性，且二者皆使絲胺酸芳基醯胺酶發酵，而不使白胺醯基甘胺酸芳基醯胺酶發酵，且不使丙胺酸芳基醯胺酶發酵。在尤佳實施例中，用於本發明中之細菌亦使阿拉伯糖發酵。

【0086】　在替代實施例中，用於本發明中之細菌展現出絲胺酸芳基醯胺酶之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株測試 3 及測試 7 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆展現出絲胺酸芳基醯胺酶之中間發酵。在尤佳實施例中，用於本發明中之細菌亦使阿拉伯糖發酵。

【0087】　可使用此項技術中已知之任何合適之分析來評估細菌使碳水化合物源或胺基酸發酵之能力。較佳地，使用 Rapid ID 32A 分析(較佳使用來自 bioMérieux 之 Rapid ID 32A 系統)。

【0088】　較佳地，當經歷使用標準條件(諸如用於實例 10 中之標準條件)之脈衝場凝膠電泳時，用於本發明中之細菌產生圖 24 或圖 25 中針對 MRX004 所示之圖譜。

【0089】　在替代性較佳實施例中，用於本發明中之細菌能夠使以下中之一或多種(諸如 2 種、3 種、4 種、5 種、10 種、15 種、20 種、25 種或全部)發酵：阿米酮(amidon) (澱粉)、苦杏仁苷、熊果苷、纖維二糖、七葉苷、半乳糖、龍膽二糖、葡萄糖、糖原、果糖、岩藻糖、乳糖、麥芽糖、甘露糖、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、甲基 α-D-葡萄吡喃糖苷、N-乙醯胺基葡萄糖、核糖、蔗糖(saccharose, sucrose)、柳苷、山梨糖醇、海藻糖、松二糖及木糖醇。在此等實施例中，可使用此項技術中已知之任何合適之分析來評估細菌使碳水化合物源發酵之能力。較佳地，使用來自 bioMérieux 之 API 50 CH 分析。

【0090】　在某些實施例中，本發明之組合物包含一種短雙歧桿菌菌株，該菌株展現出對人類細胞之附著減少，尤其當在 YCFA 培養基中測試時，尤其在實例 5 的條件下。

【0091】　在某些實施例中，本發明之組合物包含以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之生物型。亦預期作為以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之生物型的細菌菌株有效刺激免疫系統。生物型將具有與原始 NCIMB 42380 菌株相當之免疫調節活性。生物型為具有相同或極類似之生理及生物化學特性的密切相關菌株。

【0092】　生物型將引發與實例中所示作用相當的對免疫系統之作用，其可藉由使用實例中所述之培養及投與方案來鑒別。特定而言，生物型將引發與 NCIMB 42380 相當的對 T 細胞及細胞介素之作用。

【0093】　作為以登錄號 NCIMB 42380 寄存且適用於本發明中之細菌之生物型的菌株可藉由對以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之其他核苷酸序列進行測序來鑒別。舉例而言，實質上全基因體可進行測序，且用於本發明中之生物型菌株可在其全基因體之至少 80%內(例如在至少 85%、90%、95%或 99%內或在其全基因體內)具有至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%序列一致性。舉例而言，在一些實施例中，生物型菌株在其基因體之至少 98%內具有至少 98%序列一致性，或在其基因體之 99%內具有至少 99%序列一致性。用於鑒別生物型菌株之其他合適序列可包括 hsp60 或重複序列，諸如 BOX、ERIC、$(GTG)_5$ 或 REP [25]。

【0094】　生物型菌株可具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之對應序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%序列一致性的此等序列。在一些實施例中，生物型菌株可具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之對

應序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%序列一致性的 16S rRNA 序列。在一些實施例中，生物型菌株可包含與 SEQ ID NO：1 至少 99%一致(例如至少 99.5%或至少 99.9%一致)之 16S rRNA 序列。在一些實施例中，生物型菌株具有 SEQ ID NO：1 之 16S rRNA 序列。

【0095】 或者，作為以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之生物型且適用於本發明中的菌株可藉由使用登錄號 NCIMB 42380 寄存物以及限制片段分析及/或 PCR 分析，例如藉由使用螢光擴增片段長度多型性(fluorescent amplified fragment length polymorphism，FAFLP)及重複 DNA 元件(rep)-PCR 指紋或蛋白質剖析(profiling)或部分 16S 或 23s rDNA 測序來鑒別。在較佳實施例中，此等技術可用於鑒別其他短雙岐桿菌菌株。

【0096】 在某些實施例中，作為以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之生物型且適用於本發明中之菌株係當藉由擴增核糖體 DNA 限制分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis，ARDRA)分析時，例如當使用 Sau3AI 限制酶(關於例示例性方法及指導參見例如[26])時提供與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌相同之模式的菌株。或者，將生物型菌株鑒別為具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌相同之碳水化合物發酵模式的菌株。

【0097】 可用於本發明之組合物及方法的其他短雙岐桿菌菌株(諸如以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之生物型)可使用任何適當方法或策略(包括實例中所述之分析)鑒別。特定而言，具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌類似之生長模式、代謝類型及/或表面抗原的細菌菌株可用於本發明中。

【0098】 在某些實施例中，本發明之組合物包含以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌之衍生物。以登錄號 NCIMB 42380 寄存之菌株之衍生物可為子代菌株(後代)或自原始培養(次選殖)之菌株。本發明菌株之衍生物可例如在基因層面下修

飾，而不消除生物活性。特定而言，本發明之衍生菌株有治療活性。衍生菌株將具有與原始 NCIMB 42380 菌株相當之免疫調節活性。衍生菌株將具有與原始 NCIMB 42380 菌株相當之微生物區調節活性。因此，衍生菌株將有效刺激免疫系統。

【0099】 衍生菌株將引發與實例中所示作用相當的對癌症模型之作用，其可藉由使用實例中所述之培養及投與方案來鑒別。特定而言，衍生菌株將引發與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌相當的對細胞介素及基因表現之作用。特定而言，衍生菌株將引發與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌相當的對免疫刺激之作用。NCIMB 42380 菌株之衍生物一般將為 NCIMB 42380 菌株之生物型。

【0100】 細菌菌株亦可為具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之菌株相同之安全性及治療功效特性之菌株，且本發明涵蓋此等細胞。因此，該組合物可包含短雙歧桿菌菌株，該短雙歧桿菌菌株並非以登錄號 NCIMB 42380 寄存之菌株，但具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之菌株相同之安全性及治療功效特性。可例如藉由測試菌株對抗生素之抗性(例如區分對抗生素之固有抗性及可傳遞抗性)來確定菌株之安全性特徵。亦可藉由評價活體外菌株之病原性質(例如毒素產生水準)來確定菌株之安全性特性。其他安全性測試包括測試大鼠及小鼠模型中細菌菌株之急性或慢性毒性。可藉由使用相關模型在活體外及活體內對細菌菌株進行功能表征來確定菌株之治療功效。

【0101】 在較佳實施例中，本發明組合物中之細菌菌株能存活且能夠部分或全部定殖腸部。

【0102】 在一較佳實施例中，用於本發明中之細菌菌株既與一或多種於圖 9 中列示之短雙歧桿菌菌株相比，在 YCFA 中對人類腸上皮細胞、尤其 Caco-2 細胞之黏附性更低(諸如黏附性小於總培養物之 1%，諸如較佳小於 0.5%或小於

0.3%)，且亦與一或多種於圖 9 中列示之短雙歧桿菌菌株相比，產生更多結合之表面胞外多糖。

【0103】　在某些較佳實施例中，用於本發明中之細菌菌株能夠使多糖棉子糖發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時。

【0104】　在某些實施例中，與雙歧桿菌、尤其短雙歧桿菌相比，用於本發明中之細菌菌株使 α-葡萄糖苷酶及/或 β-葡萄糖苷酶發酵之能力降低，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時。

【0105】　在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種於 WO2016/203223 (其以引用方式併入本文中)之表 1 中列示之基因，諸如 5 種、10 種、20 種、50 種或所有於 WO2016/203223 之表 1 中之基因。在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種於 WO2016/203223 之表 1 中列示之以單底線突出顯示的基因，諸如預測 ECF 運輸蛋白之激勵模組(energizing module)之跨膜組分 BL0694 及/或預測 ECF 運輸蛋白之激勵模組之複製 ATP 酶組分 BL0693。在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種於 WO2016/203223 之表 1 中列示之以雙底線且以粗體突出顯示的基因，諸如 1 種、2 種、3 種、4 種或 5 種選自以下之基因：麥芽糊精葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)、推定半乳糖苷酶、纖維素合成酶(形成 UDP) (EC 2.4.1.12)、幾丁質酶(EC 3.2.1.14)及感受盒/GGDEF 家族蛋白質。在某些實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種於 WO2016/203223 之表 1 中列示之以斜體突出顯示的基因，諸如 1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種或 9 種選自以下之基因：ω-3 多不飽和脂肪酸合成酶次單元 PfaA、I 型聚酮合成酶、未知功能之推定糖基水解酶(DUF1680)、生物素 ECF 運輸蛋白之激勵模組之 ATP 酶組分 BioM、運輸陽離子之 ATP 酶 E1-E2

家族、核糖 ABC 運輸系統通透酶蛋白質 RbsC (TC 3.A.1.2.1)、核糖 ABC 運輸系統 ATP 結合蛋白質 RbsA (TC 3.A.1.2.1)、3'-5'寡聚核糖核酸酶(orn)、與放線桿菌屬(Actinobacillus)蛋白質相關之膜蛋白質(1944168)。

【0106】　在較佳實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種(諸如 5 種、10 種、15 種、20 種、25 種、30 種、40 種、45 種、50 種或所有)選自以下之基因：2-琥珀醯基-5-烯醇丙酮醯基-6-羥基-3-環己烯-1-羧酸合成酶(EC 2.2.1.9)；3'-5'寡聚核糖核酸酶(orn)；α-半乳糖苷酶(EC 3.2.1.22)；ECF 運輸蛋白之通用激勵模組之 ATP 酶組分；Q 核苷(queuosine)調控之 ECF 運輸蛋白之激勵模組的 ATP 酶組分 STY3233；ATP 依賴性 DNA 解旋酶 recG (EC 3.6.1.-)；β-葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.21)；纖維素合成酶(形成 UDP) (EC 2.4.1.12)；幾丁質酶(EC 3.2.1.14)；COG1309：轉錄調控子；D-丙胺醯基-D-丙胺酸羧肽酶(EC 3.4.16.4)；預測 ECF 運輸蛋白之激勵模組之複製 ATP 酶組分 BL0693；果糖激酶(EC 2.7.1.4)；葡萄糖/甘露糖:H+同向運輸蛋白 GlcP；糖基轉移酶(EC 2.4.1.-)；GMP 合成酶[水解麩醯胺酸] (EC 6.3.5.2)；與靛玉苷(indigoidine)合成酶 indA、PfkB 家族激酶成簇之假設糖激酶；偏好肌苷-尿苷之核苷水解酶(EC 3.2.2.1)；LSU 核糖體蛋白質 L31p / LSU 核糖體蛋白質 L31p，不依賴於鋅；LSU 核糖體蛋白質 L33p / LSU 核糖體蛋白質 L33p，不依賴於鋅；麥芽糊精葡萄糖苷酶(EC 3.2.1.20)；與放線桿菌屬蛋白質有關之膜蛋白質(1944168)；膜結合裂解性胞壁質轉糖苷酶 D 前驅物(EC 3.2.1.-)；甲基轉移酶(EC 2.1.1.-)；NADH 依賴性丁醇去氫酶 A (EC 1.1.1.-)；磷酸乙醇酸磷酸酶(EC 3.1.3.18)；磷酸核糖基鄰胺基苯甲酸異構酶(EC 5.3.1.24)；未知功能之假定糖基水解酶(DUF1680)；含鼠李糖之多糖易位通透酶；核糖激酶(EC 2.7.1.15)；核糖 ABC 運輸系統 ATP 結合蛋白質 RbsA (TC 3.A.1.2.1)；核糖 ABC 運輸系統 ATP 結合蛋白質 RbsA (TC 3.A.1.2.1)；核糖 ABC 運輸系統高親和性通透酶 RbsD

(TC 3.A.1.2.1)；核糖 ABC 運輸系統周質核糖結合蛋白質 RbsB (TC 3.A.1.2.1)；核糖 ABC 運輸系統通透酶蛋白質 RbsC (TC 3.A.1.2.1)；核糖 ABC 運輸系統通透酶蛋白質 RbsC (TC 3.A.1.2.1)；山梨糖醇去氫酶(EC 1.1.1.14)；SSU 核糖體蛋白質 S14p (S29e) / SSU 核糖體蛋白質 S14p (S29e)，不依賴於鋅；Q 核苷調控之 ECF 運輸蛋白之受質特異性組分 STY3230；蔗糖-6-磷酸水解酶(EC 3.2.1.B3)；磷壁酸輸出 ATP 結合蛋白質 TagH (EC 3.6.3.40)；預測 ECF 運輸蛋白之激勵模組之跨膜組分 BL0694；Q 核苷調控之 ECF 運輸蛋白之激勵模組的跨膜組分 STY3231；與 HrtAB 運輸蛋白共定位之雙組分反應調控物；I 型限制修飾系統 DNA-甲基轉移酶次單元 M (EC 2.1.1.72)；I 型限制修飾系統限制性次單元 R (EC 3.1.21.3)；I 型限制修飾系統特異性次單元 S (EC 3.1.21.3)；I 型限制修飾系統特異性次單元 S (EC 3.1.21.3)；I 型限制修飾系統特異性次單元 S (EC 3.1.21.3)；木糖醇去氫酶(EC 1.1.1.9)；及木糖 ABC 運輸蛋白周質木糖結合蛋白質 XylF。在較佳實施例中，用於本發明中之細菌菌株包含一或多種(諸如 5 種、10 種、15 種、20 種、25 種、30 種或 35 種或所有)於前一句中列示且未在 WO2016/203223 之表 1 中突出顯示之基因。

治療用途

刺激免疫系統

【0107】　實例顯示本發明之組合物之投與可引起免疫刺激。由於本發明之組合物之投與顯示具有免疫刺激作用，因此本發明之組合物可用於治療疾病、尤其特徵在於免疫活化降低之疾病及可藉由增加免疫反應加以治療之疾病。在某些實施例中，本發明之組合物用於刺激免疫系統。在某些實施例中，本發明之組合物因刺激免疫系統而用於治療疾病。在某些實施例中，本發明之組合物用於促進免疫反應。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌

株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0108】　免疫缺乏係指患者之免疫系統受損或完全缺失之狀態。免疫缺乏疾病係特徵在於免疫活化降低之疾病之實例，且其中刺激患者之免疫系統以治療疾病將為有利的。在一些實施例中，本發明之組合物用於治療或預防免疫缺乏疾病。

【0109】　存在兩種類型之免疫缺乏疾病。原發性免疫缺乏疾病係由遺傳突變引起之遺傳性免疫病症，該等遺傳突變通常在出生時存在且在兒童期診斷。繼發性免疫缺乏疾病係由疾病或環境來源(諸如有毒化學品)引起之後天免疫性缺乏。在一些實施例中，本發明之組合物用於治療或預防原發性免疫缺乏疾病或繼發性免疫缺乏疾病。

【0110】　原發性免疫缺乏病症及實例包括 X 性聯無 γ 球蛋白血症(XLA)、慢性肉芽腫病(CGD)、常見可變性免疫缺乏(CVID)及重症聯合免疫缺乏(SCID) (亦稱為淋巴細胞缺乏或「氣泡中之男孩(boy in a bubble)」疾病)。繼發性免疫缺乏病症可由例如重度燒傷、化療、輻射、糖尿病、營養不良引起。繼發性免疫缺乏病症之實例包括 AIDS，免疫系統之癌症，諸如白血病，免疫複合體性疾病，諸如病毒性肝炎多發性骨髓瘤[27]。干擾素-γ 係經批準用於免疫缺乏疾病 CGD 之療法[28]。實例證實本發明之組合物可增加 IFN-γ 之產生，因此本發明之組合物可尤其有效地治療免疫缺乏疾病，包括原發性及繼發性免疫缺乏疾病。

【0111】　在較佳實施例中，本發明之組合物因刺激 TLR2 而用於刺激免疫系統。在某些實施例中，本發明之組合物用於在疾病之治療中刺激 TLR2。在某些實施例中，本發明之組合物用於治療與 TLR2 活性降低相關之疾病，或用於治療鑒別為具有降低之 TLR2 活性之患者。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0112】　在某些實施例中，用本發明之組合物治療驅動 Th1 細胞反應。在某些實施例中，本發明之組合物用於在疾病之治療中驅動 Th1 細胞反應。在某些實施例中，本發明之組合物用於治療與 Th1 細胞活性降低相關之疾病，或用於治療鑒別為具有降低之 Th1 細胞活性之患者。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0113】　在較佳實施例中，本發明之組合物因活化 NFκB 而用於刺激免疫系統。在某些實施例中，本發明之組合物用於在疾病之治療中刺激 NFκB。在某些實施例中，本發明之組合物用於治療與 NFκB 活性降低相關之疾病，或用於治療鑒別為具有降低之 NFκB 活性之患者。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0114】　本發明之組合物可用於治療特徵在於活化 $CD8^+$細胞之水準降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 $CD8^+$細胞之數目或水準而用於刺激免疫反應。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 $CD8^+$細胞之活性或水準而用於治療疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因活化 $CD8^+$細胞而用於刺激免疫反應。

【0115】　本發明之組合物可用於治療特徵在於 B 細胞之水準降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 B 細胞之數目或水準而用於刺激免疫反應。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 B 細胞之活性或水準而用於治療疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因活化 B 細胞而用於刺激免疫反應。

【0116】　本發明之組合物可用於治療特徵在於活化 $CD8^+CD25^+$細胞之水準降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 $CD8^+CD25^+$細胞之數目或水準而用於刺激免疫反應。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 $CD8^+CD25^+$

細胞之活性或水準而用於治療疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因活化 $CD8^+CD25^+$細胞而用於刺激免疫反應。

【0117】　本發明之組合物可用於治療特徵在於 B 細胞之數目或百分比降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 B 細胞之數目或百分比下降的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加細胞群體中 B 細胞之數目或百分比而用於治療或預防疾病，其中 B 細胞之數目或百分比增加引起免疫刺激。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 B 細胞之數目或百分比而用於刺激免疫反應。

【0118】　實例顯示本發明之組合物之投與可引起諸如促炎性細胞介素之促炎性分子之表現增加。在投與本發明之組合物後顯示表現水準增加之促炎性分子之實例包括 IL-12p70、TNF-α、IL-4、IFNγ 及 IL-17α。由於本發明之組合物之投與顯示增加促炎性分子之表現，因此本發明之組合物可用於治療特徵在於諸如促炎性細胞介素之促炎性分子之表現降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於促炎性分子之表現及/或活性降低之疾病、尤其征在於促炎性細胞介素之表現及/或活性降低之疾病。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-12p70、TNF-α、IL-4 及/或 IFNγ 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70、TNF-α、IL-4 及/或 IFNγ 之表現及/或活性而用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70、TNF-α、IL-4 及/或 IFNγ 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-17α IL-12p70、TNF-α、IL-4、IFNγ 及/或 IL-17α 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70、TNF-α、IL-4 IFNγ 及/或 IL-17α 之表現及/或活性而用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明

之組合物因增加 IL-12p70、TNF-α、IL-4 IFNγ 及/或 IL-17α 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。

【0119】　實例亦顯示本發明之組合物之投與可引起 IL-1β 之表現之增加。IL-1β 係促炎性細胞介素[29]。IL-1β 之產生及分泌由發炎體調控，發炎體係與炎性反應之活化相關的蛋白質複合物[30]。由於本發明之組合物之投與顯示增加 IL-1β 之表現，因此本發明之組合物可用於治療特徵在於 IL-1β 之表現降低的疾病。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-1β 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-1β 之表現及/或活性而用於治療或預防疾病。

【0120】　實例顯示本發明之組合物之投與可引起腫瘤壞死因子α(TNF-α)之表現增加。TNF-α 係一種促炎性細胞介素，已知其參與促進細胞死亡之各種信號傳導路徑。TNF-α 藉由結合至其同源受體 TNFR-1 而起始細胞凋亡，此引起細胞凋亡路徑中切割事件之級聯[31]。TNF-α 亦可經由 RIP 激酶依賴性機制引起壞死[32]。由於本發明之組合物之投與顯示增加 TNF-α 之表現，因此本發明之組合物可用於治療疾病、尤其用於治療或預防特徵在於 TNF-α 之表現降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療特徵在於 TNF-α 之表現降低之疾病。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 TNF-α 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 TNF-α 之表現及/或活性而可用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 TNF-α 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。

【0121】　由於本發明之組合物之投與顯示增加 IL-4 之表現，因此本發明之組合物可用於治療疾病、尤其用於治療或預防特徵在於 IL-4 之表現降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療特徵在於 IL-4 之表現降低的疾病。

在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-4 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-4 之表現及/或活性而可用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-4 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。

【0122】　由於本發明之組合物之投與顯示增加 IL-17α 之表現，因此本發明之組合物可用於治療疾病、尤其用於治療或預防特徵在於 IL-17α 之表現降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療特徵在於 IL-17α 之表現降低的疾病。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-17α 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-17α 之表現及/或活性而可用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-17α 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。

【0123】　由於本發明之組合物之投與顯示增加 IL-12p70 之表現，因此本發明之組合物可用於治療疾病、尤其用於治療或預防特徵在於 IL-12p70 之表現降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療特徵在於 IL-12p70 之表現降低的疾病。在一特定實施例中，本發明之組合物用於治療或預防特徵在於 IL-12p70 之表現及/或活性降低的疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70 之表現及/或活性而可用於治療或預防疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70 之表現及/或活性而用於促進免疫反應。

【0124】　在某些實施例中，欲藉由本發明之組合物治療之疾病不為癌症。

【0125】　在某些實施例中，欲藉由本發明之組合物治療之疾病不由 IL-17 或 Th17 路徑介導。在某些實施例中，本發明之組合物增加 IL-17 及/或 Th17 路徑之表現或活性。

【0126】　在本發明之較佳實施例中，投與本發明組合物之個體不正在服用亞

麻油酸補充劑及/或無富含亞麻油酸之飲食。另外或可替代地，本發明之組合物不包含亞麻油酸。

【0127】　在實施例中，本發明之組合物不包含 β-半乳寡糖 A 及/或 B。

【0128】　需要免疫刺激之患者可能處於細菌感染風險之下。實例證實本發明之組合物具有抗微生物活性。因此，在某些實施例中，本發明之組合物用於刺激免疫系統及治療或預防細菌感染。在某些實施例中，本發明之組合物因刺激免疫系統及抑制細菌感染之生長而用於治療細菌感染。在某些實施例中，本發明之組合物用於促進針對病原細菌的免疫反應及抑制細菌生長。較佳地，細菌感染係胃腸道細菌感染。較佳地，細菌感染係革蘭氏陰性細菌感染。

【0129】　實施例亦證實本發明之組合物促進 T 輔助細胞及細胞毒性 T 淋巴球之分化。因此，在某些實施例中，本發明之組合物用於刺激 T-輔助細胞及/或細胞毒性 T 淋巴球。

作為疫苗佐劑之用途

【0130】　實例顯示本發明之組合物之投與刺激免疫系統且可引起腫瘤壞死因子α(TNF-α)之表現及 TLR2 之活化增加。已知 TNF-α 對疫苗反應而言係重要的。舉例而言，已證明 TNF-α 係老年群體之流感疫苗接種中之高效疫苗反應所需的[33]。類似地，TLR2 係疫苗佐劑改良反應之重要靶標[34]。由於本發明之組合物之投與顯示增加 TNF-α 表現及 TLR2 活性，因此本發明之組合物可用作疫苗佐劑。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 TNF-α 之水準及/或活性而用作疫苗佐劑。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 TLR2 之水準及/或活性而用作疫苗佐劑。在一個實施例中，本發明之組合物用作疫苗佐劑。在一個實施例中，本發明之組合物在流感療法中用作疫苗佐劑。在某些實施例中，本發明之組合物用於增強針對抗原之免疫反應。在某些實施例中，本發明提供一種組合

物，其與抗原組合投與。在某些實施例中，本發明之組合物用於在即將接種疫苗時或在接種疫苗之後立即投與患者。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於作為疫苗佐劑之任何此用途。

【0131】　實例證實本發明之細菌活化 TLR2。TLR 促效劑尤其在老年群體中作為一系列抗原類型內之疫苗佐劑處於研發中[35]。因此，本發明之組合物可用作疫苗佐劑，尤其用於投與可能有免疫系統活性降低之老年患者(例如，年齡超過 40 歲、50 歲、60 歲、70 歲或 80 歲)之疫苗。TLR2 信號傳導亦在年齡相關之先天免疫反應中起關鍵作用[36]。在某些實施例中，組合物用於增強先天免疫反應。儘管 TLR2 促效劑作為疫苗佐劑正處於研發中，但其皆來自已知病原體及/或係合成的。相比之下，本發明之組合物包含共生細菌。

【0132】　實例亦顯示本發明之組合物之投與可引起 IL-1β 之表現之增加。Li 等人[37]證明佐劑氫氧化鋁活化 IL-1β 之分泌，且提出 IL-1β 可充當佐劑。由於本發明之組合物之投與顯示增加 IL-1β 表現，因此本發明之組合物可用作疫苗佐劑。

【0133】　實例證實本發明之組合物可增加 IFNγ 水準並促進 Th1 細胞反應，此二者皆與針對抗原之抗體反應增加相關[38]。在某些實施例中，本發明之組合物用於促進針對抗原、尤其病原性或癌症抗原之抗體反應。此外，其係接受研究之瘧疾疫苗之志願者中經疫苗誘導之 T 細胞反應的 IFN-γ 量度[39]。在某些實施例中，本發明之組合物用於促進針對抗原、尤其病原性或癌症抗原之 T 細胞反應。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IFN-γ 之水準及/或活性而用作疫苗佐劑。在某些實施例中，組合物用於防止瘧疾。

【0134】　實例亦顯示本發明之組合物之投與可引起 IL-12p70 之表現或水準之

增加。此作用已與疫苗佐劑效率相關聯，且已提出將 IL-12 作為佐劑本身[40]，此表明本發明之組合物將作為佐劑有效。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 IL-12p70 之水準及/或活性而用作疫苗佐劑。

【0135】　在一些實施例中，當用作疫苗佐劑時，本發明之組合物將獨自投與以向分開投與患者之抗原提供佐劑作用。在某些實施例中，本發明之組合物係經口投與，而抗原係非經腸注射。

【0136】　本發明之組合物可用於增強對任一有用抗原之免疫反應。用於本發明之例示性抗原包括：病毒抗原，諸如病毒表面蛋白質；細菌抗原，諸如蛋白質及/或糖抗原；真菌抗原；寄生蟲抗原；及腫瘤抗原。本發明尤其可用於針對以下之疫苗：流感病毒、HIV、鉤蟲、B 型肝炎病毒、單純皰疹病毒、狂犬病、呼吸道融合細胞病毒、細胞巨大病毒、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、披衣菌屬(chlamydia)、SARS 冠狀病毒、水痘帶狀皰疹病毒、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、腦膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitidis*)、結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein Barr virus)、人類乳頭狀瘤病毒等。用於本發明之其他抗原包括糖蛋白及脂聚糖抗原、古細菌抗原、黑色素瘤抗原 E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)、威爾姆氏腫瘤基因(Wilms tumour gene)(WT1)、CA-125、前列腺特異性抗原(PSA)、艾伯斯坦-巴爾病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、β-澱粉狀蛋白、τ 蛋白、PCSK9 及成癮物質，例如菸鹼、濺精或鴉片劑。

【0137】　用於本發明之較佳抗原包括病原體抗原及腫瘤抗原。抗原將引發對抗原特異之免疫反應，此將有效防止病原體感染或攻擊腫瘤。抗原可為例如肽或多糖。

【0138】　本發明亦提供以下各者在製造用於提高患者之免疫反應之藥物中的用途：(i)抗原之水性製劑；及(ii)包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株之組合物。較佳地，細菌菌株係以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型。

【0139】　藉由此等方法及用途提高之免疫反應一般包括抗體反應，較佳保護性抗體反應。

【0140】　在一些實施例中，短雙岐桿菌物種之細菌菌株經工程改造以呈遞抗原。在本發明之細菌菌株上呈遞抗原可最大化免疫刺激活性且進一步增強針對該抗原產生之保護性免疫反應。此外，以此方式製造及遞送包含抗原及本發明之細菌之治療劑可比抗原及包含細菌菌株之組合物中每一者分開製造及投與時更高效及有效。因此，在一些實施例中，本發明提供包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株之組合物，該細菌菌株在例如其細胞表面上呈遞抗原。在一些實施例中，包含呈遞抗原之細菌菌株的組合物用作疫苗抗原。在一些實施例中，抗原來源於 HIV、鉤蟲、B 型肝炎病毒、單純皰疹病毒、狂犬病、呼吸道融合細胞病毒、細胞巨大病毒、金黃色葡萄球菌、披衣菌屬、SARS 冠狀病毒、水痘帶狀皰疹病毒、肺炎鏈球菌、腦膜炎奈瑟氏球菌、結核分枝桿菌、炭疽芽孢桿菌、艾伯斯坦-巴爾病毒或人類乳頭狀瘤病毒。在一些實施例中，抗原為糖蛋白抗原、脂聚糖抗原、古細菌抗原、黑色素瘤抗原 E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)、威爾姆氏腫瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特異性抗原(PSA)、艾伯斯坦-巴爾病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、β-澱粉狀蛋白、τ 蛋白、PCSK9 或成癮物質，諸如灑精或鴉片劑及諸如此類。

【0141】　在一些實施例中，本發明之細菌表現一或多種抗原。一般地，抗原將係重組表現且對於本發明之細菌而言將為異源的。因此，本發明提供表現異源抗原之短雙岐桿菌物種之細菌菌株。抗原可為與細菌同源之一或多種多肽一

起表現的融合多肽之一部分。在一些實施例中，細菌將抗原表現為非融合多肽。在一些實施例中，本發明提供包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株之細胞的組合物，其中該細胞表現異源抗原。在一些實施例中，組合物用作疫苗。在一些實施例中，本發明提供短雙岐桿菌物種之細菌菌株之細胞，其中該細胞表現異源抗原。在一些實施例中，細胞用作疫苗。

【0142】　用於本發明之例示性抗原包括：病毒抗原，諸如病毒表面蛋白質；細菌抗原，諸如蛋白質及/或糖抗原；真菌抗原；寄生蟲抗原；及腫瘤抗原。用於在短雙岐桿菌物種之細菌菌株中表現之其他抗原包括糖蛋白及脂聚糖抗原、古細菌抗原、黑色素瘤抗原 E (MAGE)、癌胚抗原(CEA)、MUC-1、HER2、唾液酸基-Tn (STn)、人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)、威爾姆氏腫瘤基因(WT1)、CA-125、前列腺特異性抗原(PSA)、艾伯斯坦-巴爾病毒抗原、新抗原、致癌蛋白、β-澱粉狀蛋白、τ蛋白、PCSK9 及成癮物質，例如菸鹼、濯精、鴉片劑或其類似物。

【0143】　本發明亦可用於增強對針對諸如阿茲海默氏病(Alzheimer’s Disease)及其他神經退化性病症之非傳染性疾病之疫苗的反應，在此情況下用於本發明之抗原可為 β-澱粉狀蛋白或 τ 蛋白。非傳染性疾病之其他此等抗原包括 PCSK9 (用於治療升高之膽固醇)。

【0144】　本發明亦可用於增強對針對例如菸鹼、濯精或鴉片劑之成癮物質之疫苗的反應。

【0145】　實例亦證實本發明之組合物具有抗微生物活性。因此，本發明之組合物可尤其有效地用於針對細菌感染、尤其革蘭氏陰性細菌感染之疫苗。本發明之組合物可發揮抗細菌感染之抗微生物作用，同時亦刺激免疫系統以應對感染。因此，在某些實施例中，本發明之組合物治療細菌感染及預防將來之細菌

感染。

細胞療法

嵌合抗原受體 T 細胞(CAR-T)療法

【0146】　實例亦證明本發明之組合物之投與可引起 TLR2 之活化之增加。TLR2刺激增強CAR-T療法之功效[41]。因此，本發明之組合物可用於細胞療法、尤其 CAR-T 細胞療法中。在一個實施例中，本發明之組合物用於細胞療法中。在一個實施例中，本發明之組合物用於 CAR-T 細胞療法中。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療慢性淋巴球性白血病。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0147】　實例亦證明本發明之組合物之投與可引起 NFκB 之活化之增加。NFκB 活化可提高 CAR-T 療法之效力[42]。因此，本發明之組合物可用於細胞療法、尤其 CAR-T 細胞療法中。

【0148】　在某些實施例中，在 CAR-T 療法期間 T 細胞授受性轉移之前，將本發明之組合物投與患者。

【0149】　在某些實施例中，在 CAR-T 療法期間 T 細胞授受性轉移之後，將本發明之組合物投與患者。

【0150】　因此，本發明之組合物可用於細胞療法，尤其用於增強對細胞療法之反應。

間質幹細胞(MSC)療法

【0151】　已報導間質幹細胞(MSC)療法具有免疫刺激性質。當 MSC 用 LPS 處理時，其上調促炎性細胞介素 IL-8，此引起 B 細胞增殖增加[43]。因此，由於本發明之組合物顯示增加 B 細胞增殖之表現，因此其可與 MSC 細胞療法組合使

用。

幹細胞移植療法

【0152】　已報導，代替在幹細胞移植療法中使用未分化幹細胞，在移植前使幹細胞在某種程度上分化可能有益。舉例而言，Heng 等人[44]報導幹細胞之心肌源性分化因具有較高植入效率、增強之肌細胞再生及增加之心臟功能恢復而可能有益。此外，研究已證明，用某些共生細菌菌株進行胃腸道定殖可改良同種異體造血細胞移植後之存活[45]。由於本發明之組合物之投與刺激細胞，因此本發明之組合物可用於幹細胞移植療法中之幹細胞分化。

免疫衰老

【0153】　Fulop 等人[46]確定 Treg 細胞數目增加及 B 細胞數目降低與適應性免疫系統之衰老相關。因此，本發明之組合物可用於預防或延遲免疫衰老。在一個實施例中，本發明之組合物用於預防免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物用於延遲特徵在於 Treg 細胞數目增加之免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物用於延遲特徵在於B 細胞數目降低之免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物用於延遲特徵在於 Treg 細胞數目增加及 B 細胞數目降低之免疫衰老。在一個實施例中，本發明之組合物因降低 Treg 細胞數目而用於延遲免疫衰老。在一個實施例中，本發明之組合物因增加 B 細胞數目而用於延遲免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物因降低 Treg 細胞數目及增加 B 細胞數目而用於延遲免疫衰老。在一個實施例中，本發明之組合物用於治療由免疫衰老引起之疾病。在一個實施例中，本發明之組合物因延遲及/或預防免疫衰老而用於治療衰老相關之疾病。較佳地，本發明提供包含以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株、或其衍生物或生物型之組合物，其用於任何此用途。

【0154】　此外，已提出疫苗佐劑可克服免疫衰老[47]。由於本發明之組合物適

合用作疫苗佐劑，因此本發明之組合物可用於預防或延遲免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物作為疫苗佐劑用於延遲及/或預防免疫衰老。在另一實施例中，本發明之組合物用作疫苗佐劑，其中該等組合物延遲及/或預防免疫衰老。

【0155】　與免疫衰老相關之疾病包括心血管疾病、神經退化性疾病(諸如阿茲海默氏病及帕金森氏病(Parkinson's disease)、癌症、2 型糖尿病[48]及自體免疫性病症[49]。

【0156】　罹患免疫衰老之個體可能易受細菌感染。實例顯示本發明之組合物具有抗微生物活性。因此，在某些實施例中，本發明之組合物用於治療或預防展現出免疫衰老之患者(諸如老年患者、或年齡超過 50 歲、55 歲、60 歲、65 歲、70 歲或 75 歲之患者)之細菌感染。

治療及預防細菌感染

【0157】　實例證實短雙歧桿菌且尤其本發明之短雙歧桿菌菌株具有有效之抗微生物活性。因此，在某些實施例中，本發明之組合物用於治療或預防細菌感染。

【0158】　在較佳實施例中，感染係胃腸感染。已顯示短雙歧桿菌菌株、尤其本發明之短雙歧桿菌菌株在投與於胃腸道時具有有效作用(參見實例及WO2016/2032)。在較佳實施例中，感染係革蘭氏(Gram)陰性細菌感染。在尤佳實施例中，感染係革蘭氏陰性胃腸感染，諸如幽門螺旋桿菌(Helicobacter pylori)、腸炎沙門氏桿菌、傷寒沙門氏桿菌(Salmonella typhi)或大腸桿菌感染。通常，細菌感染係病原性細菌感染。在較佳實施例中，本發明之組合物用於治療或預防胃腸大腸桿菌感染。在其他較佳實施例中，本發明之組合物用於治療或預防胃腸道沙門氏桿菌感染。

【0159】　在一些實施例中，細菌感染屬於選自由以下組成之清單之屬：大腸桿菌屬(*Escherichia*)、克留氏菌屬(*Klebsiella*)、沙門氏桿菌屬(*Salmonella*)及芽孢桿菌屬(*Bacillus*)。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為大腸桿菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為克留氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係鼠傷寒沙門氏桿菌(*S.* Typhimurium)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)感染。本發明之組合物顯示對此等細菌具有有效之抗微生物活性。

【0160】　在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係銅綠假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為鼠疫耶氏桿菌(*Yersinia pestis*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為腦膜炎奈瑟氏球菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染為嗜肺性退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係銅綠假單胞菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係奇異變形桿菌(Proteus mirabilis)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係陰溝腸桿菌(*Enterobacter cloacae*)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係黏質沙雷氏菌(Serratia marcescens)感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係幽門螺旋桿菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係腸

炎沙門氏桿菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係傷寒沙門氏桿菌感染。在一些實施例中，用於治療或預防之細菌感染係副傷寒沙門氏桿菌(*Salmonella* paratyphi)感染。此等細菌為革蘭氏陰性，因此可能對本發明之組合物敏感，如實例中所示。

【0161】 在一些實施例中，本發明之組合物用於在細菌感染之治療中降低細菌活力。本發明之細菌可用於將病原細菌之水準恢復至無症狀水準或自個體中完全消除病原細菌，從而治療細菌感染，以及減輕與細菌水準升高相關之症狀。在一些實施例中，本發明之組合物用於在細菌感染之預防治療中抑制細菌之生長。換言之，組合物可對引起感染之細菌具有細胞生長抑制活性。

【0162】 在某些實施例中，組合物延遲復發性感染之發作或預防復發性感染。在某些實施例中，欲治療之個體處於發展為細菌感染之風險下，諸如為無症狀帶菌者。在其他實施例中，本發明之組合物用於治療展現出細菌感染症狀之患者。

【0163】 較佳地，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌能夠使棉子糖發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時。

【0164】 較佳地，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌展現出 β-葡萄糖苷酶之中間發酵或 α-阿拉伯糖之中間發酵，或更佳 β-葡萄糖苷酶之中間發酵及 α-阿拉伯糖之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 3 二者皆具有有用之活性，且二者皆展現出 β-葡萄糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。

【0165】 較佳地，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養

基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。細菌可能僅展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之中間發酵或不發酵。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 2 二者皆具有有用之活性，且二者皆未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵。

【0166】　較佳地，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌展現出 α-半乳糖苷酶之中間發酵或 α-阿拉伯糖之中間發酵，或更佳 α-半乳糖苷酶之中間發酵及 α-阿拉伯糖之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株 MRX004 及測試 8 二者皆具有有用之活性，且二者皆展現出 α-半乳糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。

【0167】　在替代實施例中，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌使絲胺酸芳基醯胺酶發酵，而不使白胺醯基甘胺酸芳基醯胺酶發酵，且不使丙胺酸芳基醯胺酶發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株測試 11 及測試 12 二者皆具有有用之活性，且二者皆使絲胺酸芳基醯胺酶發酵，而不使白胺醯基甘胺酸芳基醯胺酶發酵，且不使丙胺酸芳基醯胺酶發酵。

【0168】　在替代實施例中，本發明中用於治療或預防細菌感染之細菌展現出絲胺酸芳基醯胺酶之中間發酵，例如當在適當懸浮培養基(諸如 API 懸浮培養基)中於 37℃下培養 4 小時時，及例如當經歷 Rapid ID 32A 分析時。實例證實短雙歧桿菌菌株測試 3 及測試 7 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆展現出絲胺酸芳基醯胺酶之中間發酵。

【0169】　可使用此項技術中已知之任何合適之分析來評估細菌使碳水化合物源或胺基酸發酵之能力。較佳地，使用 Rapid ID 32A 分析(較佳使用來自

bioMérieux 之 Rapid ID 32A 系統)。

投與模式

【0170】　較佳地，本發明之組合物經調配以投與胃腸道，以便使得能夠遞送至腸部及/或使本發明之細菌菌株能夠部分或全部定殖腸部。在一些實施例中，術語「腸之完全定殖」意指細菌已定殖在腸之所有部分(即小腸、大腸及直腸)。在本發明之其他實施例中，術語「完全定殖」或「部分定殖」意指細菌分別永久或暫時保留在腸中。一般地，雖然本發明之組合物係經口投與，但其可經直腸、經鼻內或經由頰或舌下途徑投與。

【0171】　在某些實施例中，本發明之組合物可呈泡沫、噴霧或凝膠形式投與。

【0172】　在某些實施例中，本發明之組合物可呈栓劑，諸如直腸栓劑，例如呈可哥豆油(可哥脂)、合成硬脂(例如 suppocire、witepsol)、甘油基-明膠、聚乙二醇或肥皂甘油組合物之形式投與。

【0173】　在某些實施例中，本發明之組合物經由管(諸如鼻胃管、口胃管、胃管、空腸造瘺管(J 型管)、經皮內視鏡胃造瘺術(percutaneous endoscopic gastrostomy, PEG))或口(port) (諸如提供出入胃、空腸之胸壁口及其他合適出入口)投與胃腸道。

【0174】　本發明之組合物可投與一次，或其可作為治療方案之一部分依序投與。在某些實施例中，本發明之組合物將每日投與(一次或若干次)。

【0175】　在本發明之某些實施例中，根據本發明之治療伴隨有患者腸微生物區之評估。若未達成本發明之菌株之遞送及/或部分或全部定殖而使得未觀測到功效，則可重複治療，或者若遞送及/或部分或全部定殖成功且觀測到功效，則可停止治療。

【0176】　在某些實施例中，本發明之組合物可投與懷孕動物，例如哺乳動物，

諸如人類，以降低其子代在子宮內及/或其子代在出生後發生疾病之可能性。

【0177】　本發明之組合物可投與已診斷患有由免疫活性降低介導之疾病或病狀或已鑒別為處於由免疫活性降低介導之疾病或病狀風險下的患者。組合物亦可作為預防措施投與以預防健康患者中由免疫活性降低介導之疾病或病狀的發生。

【0178】　本發明之組合物可投與已診斷有免疫活性缺乏或已鑒別為處於免疫活性缺乏風險下之患者。舉例而言，患者可具有減少或缺乏之短雙歧桿菌定殖。

【0179】　本發明之組合物可作為食品，諸如營養補充劑投與。

【0180】　一般地，本發明之組合物用於治療人類，但其可用於治療動物，包括單胃哺乳動物，諸如家禽、豬、貓、犬、馬或兔。本發明之組合物可用於增強動物之生長及效能。若投與動物，則可使用經口胃管灌食。

組合物

【0181】　一般地，本發明之組合物包含細菌。在本發明之較佳實施例中，組合物係以凍乾形式調配。舉例而言，本發明之組合物可包含含有本發明之細菌菌株的顆粒或明膠膠囊，例如硬明膠膠囊。

【0182】　較佳地，本發明之組合物包含凍乾細菌。細菌凍乾為公知程式且相關指導可於例如參考文獻[50-52]中獲得。實例證實凍乾組合物尤其有效。

【0183】　或者，本發明之組合物可包含活的活性細菌培養物。

【0184】　在較佳實施例中，本發明之組合物經囊封以使得能夠將細菌菌株遞送至腸。囊封保護組合物免於降解，直至藉助例如用可藉由 pH 值變化引起之化學或物理刺激(諸如壓力、酶促活性或物理崩解)破裂而在目標位置遞送。可使用任何適當之囊封法。例示例性囊封技術包括截留在多孔基質內、附著或吸附在固體載體表面上、藉由絮凝或利用交聯劑而自我聚集以及機械容納在微孔膜或

微膠囊後。關於可用於製備本發明之組合物之囊封的指導可於例如參考文獻[53]及[54]中獲得。

【0185】　組合物可經口投與且可呈錠劑、膠囊或粉劑之形式。囊封產品較佳，此乃因短雙歧桿菌為厭氧菌。其他成分(諸如維生素 C)可作為除氧劑及益生元基質包括以改良活體內遞送及/或部分或全部定殖及存活。或者，本發明之益生菌組合物可作為食品或營養產品，諸如基於牛乳或乳清之發酵乳製品，或作為醫藥產品經口投與。

【0186】　在一些實施例中，組合物不包含水解牛乳清。

【0187】　本發明之組合物包括治療有效量之本發明之細菌菌株。治療有效量之細菌菌株足以對患者發揮有益作用。治療有效量之細菌菌株可足以使得遞送至患者腸部及/或部分或全部定殖患者腸部。

【0188】　例如適於成年人之細菌日劑量可為約 1×10^{3} 至約 1×10^{11} 菌落形成單位(colony forming unit，CFU)；例如約 1×10^{7} 至約 1×10^{10} CFU；在另一實例中，約 1×10^{6} 至約 1×10^{10} CFU；在另一實例中，約 1×10^{7} 至約 1×10^{11} CFU；在另一實例中，約 1×10^{8} 至約 1×10^{10} CFU；在另一實例中，約 1×10^{8} 至約 1×10^{11} CFU。

【0189】　在某些實施例中，細菌之劑量為每日至少 10^{9} 個細胞，諸如每日至少 10^{10} 個、至少 10^{11} 個或至少 10^{12} 個細胞。

【0190】　在某些實施例中，組合物含有相對於組合物之重量，約 1×10^{6} 至約 1×10^{11} CFU/g，例如約 1×10^{8} 至約 1×10^{10} CFU/g 之量的細菌菌株。劑量可為例如 1 g、3 g、5 g 及 10 g。

【0191】　組合物之劑量可包含相對於組合物之重量約 1×10^{6} 至約 1×10^{11} 菌落形成單位(CFU)/g 之細菌菌株。劑量可適於成年人。例如，組合物可包含如下量之細菌菌株：約 1×10^{3} 至約 1×10^{11} CFU/g；例如約 1×10^{7} 至約 1×10^{10} CFU/g；在

另一實例中，約 1×10^{6} 至約 1×10^{10} CFU/g；在另一實例中，約 1×10^{7} 至約 1×10^{11} CFU/g；在另一實例中，約 1×10^{8} 至約 1×10^{10} CFU/g；在另一實例中，約 1×10^{8} 至約 1×10^{11} CFU/g。該劑量可為例如 1 g、3 g、5 g 及 10 g。

【0192】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中細菌菌株之量為相對於組合物之重量每克約 1×10^{3} 至約 1×10^{11} 菌落形成單位。

【0193】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該組合物係以 500 mg 與 1000 mg 之間、600 mg 與 900 mg 之間、700 mg 與 800 mg 之間、500 mg 與 750 mg 之間或 750 mg 與 1000 mg 之間的劑量投與。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該醫藥組合物中之凍乾細菌係以 500 mg 與 1000 mg 之間、600 mg 與 900 mg 之間、700 mg 與 800 mg 之間、500 mg 與 750 mg 之間或 750 mg 與 1000 mg 之間的劑量投與。

【0194】　組合物可調配為益生菌。益生菌由 FAO/WHO 定義為當以足夠量投與時，賦予宿主健康益處之活微生物。

【0195】　通常，視情況將益生菌(諸如本發明之組合物)與至少一種合適之益生元化合物組合。益生元化合物通常為在上消化道中不降解或吸收之不易消化之碳水化合物，諸如寡糖或多糖，或糖醇。已知益生元包括商業產品，諸如菊糖及反式半乳寡糖。

【0196】　在某些實施例中，本發明之益生菌組合物包括相對於組合物總重量，約 1 至約 30 重量% (例如 5 重量%至 20 重量%)之量的益生元化合物。碳水化合物可選自由以下組成之群：果寡糖(或 FOS)、短鏈果寡糖、菊糖、異麥芽寡糖、果膠、木寡糖(或 XOS)、幾丁寡糖(或 COS)、β-葡聚糖、阿拉伯膠改性及抗性澱粉、聚右旋糖、D-塔格糖、阿拉伯膠纖維、角豆膠(carob)、燕麥及柑橘纖維。在一個態樣中，益生元為短鏈果糖-寡糖(下文中為簡單起見而顯示為 FOSs-c.c)；

該 FOSs-c.c 為不可消化之碳水化合物，一般由甜菜糖轉變獲得且包括三個葡萄糖分子鍵結之蔗糖分子。

【0197】　本發明之組合物可包含醫藥學上可接受之賦形劑或載劑。此等合適賦形劑之實例可見於參考文獻[55]中。用於治療用途之可接受之載劑或稀釋劑為醫藥技術中所習知且闡述於例如參考文獻[56]中。合適載劑之實例包括乳糖、澱粉、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、甘露糖醇、山梨糖醇及諸如此類。合適稀釋劑之實例包括乙醇、甘油及水。醫藥載劑、賦形劑或稀釋劑之選擇可針對意欲投與途徑及標準醫藥實踐來選擇。醫藥組合物可包含任何合適的黏合劑、潤滑劑、懸浮劑、包被劑、增溶劑作為載劑、賦形劑或稀釋劑，或除載劑、賦形劑或稀釋劑之外亦可包含任何合適的黏合劑、潤滑劑、懸浮劑、包被劑、增溶劑。合適黏合劑之實例包括澱粉、明膠、天然糖(諸如葡萄糖、無水乳糖、自由流動乳糖、β-乳糖、玉米甜味劑)、天然及合成膠(例如阿拉伯膠、黃蓍膠)或海藻酸鈉、羧甲基纖維素及聚乙二醇。合適潤滑劑之實例包括油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、乙酸鈉、氯化鈉及諸如此類。防腐劑、穩定劑、染料及甚至矯味劑可提供於醫藥組合物中。防腐劑之實例包括苯甲酸鈉、山梨酸及對羥基苯甲酸酯。亦可使用抗氧化劑及懸浮劑。

【0198】　本發明之組合物可調配為食品。舉例而言，除本發明之治療作用之外，食品亦可提供營養益處，諸如在營養補充劑中。類似地，可將食品調配成增強本發明組合物之口味，或藉由使其更類似於常見食品而非醫藥組合物，使得組合物食用起來更具吸引力。在某些實施例中，將本發明之組合物調配為基於乳之產品。術語「基於乳之產品」意指具有變化脂肪含量之任何基於乳或乳清之液體或半固體產品。基於乳之產品可為例如牛乳、山羊乳、綿羊乳、脫脂乳、全乳、無任何加工下由乳粉與乳清重組之乳或加工產品，諸如酸乳酪、凝

乳、凝塊、酸乳、酸全乳、酪乳及其他酸乳產品。另一重要群包括乳飲料，諸如乳清飲料、發酵乳、煉乳、嬰兒或嬰孩乳；增香乳、霜淇淋；含乳食品，諸如甜食。

【0199】　在某些實施例中，本發明之組合物含有單一細菌菌株或物種且不含有任何其他細菌菌株或物種。在某些實施例中，本發明之組合物含有單一細菌物種且不含有任何其他細菌物種。在某些實施例中，本發明之組合物含有單一細菌菌株且不含有任何其他細菌菌株。舉例而言，本發明之組合物可僅包含短雙岐桿菌物種之細菌。此等組合物可僅包含最低限度量或生物學上不相干量之其他細菌菌株或物種。此等組合物可為實質上不含其他生物體物種之培養物。在一些實施例中，此等組合物可為實質上不含其他生物體物種之凍乾物。

【0200】　在一些實施例中，本發明之組合物包含超過一種細菌菌株或物種。舉例而言，在一些實施例中，本發明之組合物包含超過一種來自同一物種內之菌株(例如超過 1 種、2 種、3 種、4 種、5 種、6 種、7 種、8 種、9 種、10 種、15 種、20 種、25 種、30 種、35 種、40 種或 45 種菌株)，且視情況不含來自任何其他物種之細菌。在一些實施例中，本發明之組合物包含小於 50 種來自同一物種內之菌株(例如小於 45 種、40 種、35 種、30 種、25 種、20 種、15 種、12 種、10 種、9 種、8 種、7 種、6 種、5 種、4 種或 3 種菌株)，且視情況不含來自任何其他物種之細菌。在一些實施例中，本發明之組合物包含 1-40 種、1-30 種、1-20 種、1-19 種、1-18 種、1-15 種、1-10 種、1-9 種、1-8 種、1-7 種、1-6 種、1-5 種、1-4 種、1-3 種、1-2 種、2-50 種、2-40 種、2-30 種、2-20 種、2-15 種、2-10 種、2-5 種、6-30 種、6-15 種、16-25 種或 31-50 種來自同一物種內之菌株，且視情況不含來自任何其他物種之細菌。在一些實施例中，本發明之組合物包含超過一個來自同一屬內之物種(例如超過 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、

7 個、8 個、9 個、10 個、12 個、15 個、17 個、20 個、23 個、25 個、30 個、35 個或 40 個物種)，且視情況不含來自任何其他屬之細菌。在一些實施例中，本發明之組合物包含小於 50 個來自同一屬內之物種(例如小於 50 個、45 個、40 個、35 個、30 個、25 個、20 個、15 個、12 個、10 個、8 個、7 個、6 個、5 個、4 個或 3 個物種)，且視情況不含來自任何其他屬之細菌。在一些實施例中，本發明之組合物包含 1-50 個、1-40 個、1-30 個、1-20 個、1-15 個、1-10 個、1-9 個、1-8 個、1-7 個、1-6 個、1-5 個、1-4 個、1-3 個、1-2 個、2-50 個、2-40 個、2-30 個、2-20 個、2-15 個、2-10 個、2-5 個、6-30 個、6-15 個、16-25 個或 31-50 個來自同一屬內之物種，且視情況不含來自任何其他屬之細菌。本發明包含前述之任何組合。

【0201】　在一些實施例中，組合物包含微生物共生物種(consortium)。舉例而言，在一些實施例中，組合物包含短雙歧桿菌細菌菌株作為微生物共生物種之一部分。舉例而言，在一些實施例中，短雙歧桿菌細菌菌株與一或多種(例如至少 2 種、3 種、4 種、5 種、10 種、15 種或 20 種)來自布勞特氏菌屬(*Blautia*)及/或其他屬之其他細菌菌株組合存在，該短雙歧桿菌細菌菌株可與其他屬在活體內腸內共生生活。舉例而言，在一些實施例中，組合物包含短雙歧桿菌之細菌菌株與來自不同屬之細菌菌株之組合。在另一實例中，組合物包含短雙歧桿菌之細菌菌株與來自雙歧桿菌屬之細菌菌株之組合，或組合物包含短雙歧桿菌之細菌菌株與來自雙歧桿菌屬之細菌菌株及來自不同屬之細菌菌株之組合。在一些實施例中，微生物共生物種包含兩種或更多種自單一生物體(例如人類)之糞便樣品獲得之細菌菌株。在一些實施例中，發現微生物共生物種在自然界中不一起存在。舉例而言，在一些實施例中，微生物共生物種包含自至少兩種不同生物體之糞便樣品獲得之細菌菌株。在一些實施例中，兩種不同生物體來自同一

物種，例如兩種不同人類。在一些實施例中，兩種不同生物體係人類嬰兒及成年人。在一些實施例中，兩種不同生物體係人類及非人類哺乳動物。

【0202】　在一些實施例中，本發明之組合物另外包含一種細菌菌株，該細菌菌株具有與以登錄號 NCIMB 42380 寄存之短雙歧桿菌菌株相同之安全性及治療功效特性，但其並非以登錄號 NCIMB 42380 寄存之短雙歧桿菌菌株。

【0203】　在本發明之組合物包含超過一種細菌菌株、物種或屬之一些實施例中，個別細菌菌株、物種或屬可用於分開、同時或依序投與。舉例而言，組合物可包含所有超過一種之細菌菌株、物種或屬，或細菌菌株、物種或屬可分開儲存且可分開、同時或依序投與。在一些實施例中，將超過一種細菌菌株、物種或屬分開儲存，但在使用前混合在一起。

【0204】　在一些實施例中，用於本發明中之細菌菌株獲自人類成體糞便。在本發明之組合物包含超過一種細菌菌株之一些實施例中，所有細菌菌株皆獲自人類成體糞便，或者若存在其他細菌菌株，則其僅以最低量存在。細菌可能已在自人類成體糞便中獲得且用於本發明之組合物中之後進行培養。

【0205】　在一些實施例中，一或多種短雙歧桿菌細菌菌株係本發明之組合物中之唯一治療活性劑。在一些實施例中，組合物中之細菌菌株係本發明之組合物中之唯一治療活性劑。

【0206】　根據本發明使用之組合物可能需要或可能無需上市許可。

【0207】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經噴霧乾燥。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾或噴霧乾燥且其中其為活的。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾或噴霧乾燥且其中其能存活。在某些實施例中，本發明

提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾或噴霧乾燥且其中其能夠部分或全部定殖腸部。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾或噴霧乾燥且其中其能存活且能夠部分或全部定殖腸部。

【0208】　在一些情況下，使凍乾或噴霧乾燥之細菌菌株在投與之前復原。在一些情況下，復原係藉由使用本文中所述之稀釋劑達成。

【0209】　本發明之組合物可包含醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑。

【0210】　在某些實施例中，本發明提供醫藥組合物，其包含：本發明之細菌菌株；及醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑；其中在投與有需要之個體時，該細菌菌株之量足以治療病症。

【0211】　在某些實施例中，本發明提供醫藥組合物，其包含：本發明之細菌菌株；及醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑；其中該細菌菌株之量足以治療或預防疾病或病狀。

【0212】　在某些實施例中，本發明提供醫藥組合物，其包含：本發明之細菌菌株；及醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑；其中該細菌菌株之量足以治療或預防疾病或病狀。

【0213】　在某些實施例中，本發明提供醫藥組合物，其包含：本發明之細菌菌株；及醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑；其中該細菌菌株之量足以治療或預防疾病或病狀。

【0214】　在某些實施例中，本發明提供醫藥組合物，其包含：本發明之細菌菌株；及醫藥學上可接受之賦形劑、載劑或稀釋劑；其中該細菌菌株之量足以治療或預防由降低之免疫反應介導之疾病或病狀。

【0215】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中細菌菌株之量為相對於組合物之重量每克約 1×10^{3} 至約 1×10^{11} 菌落形成單位。

【0216】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該組合物係以 1 g、3 g、5 g 或 10 g 之劑量投與。

【0217】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該組合物係藉由選自由口腔、直腸、皮下、鼻、頰及舌下組成之群的方法投與。

【0218】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其包含選自由乳糖、澱粉、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、甘露糖醇及山梨糖醇組成之群的載劑。

【0219】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其包含選自由乙醇、甘油及水組成之群的稀釋劑。

【0220】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其包含選自由以下組成之群的賦形劑：澱粉、明膠、葡萄糖、無水乳糖、自由流動乳糖、β-乳糖、玉米甜味劑、阿拉伯膠、黃蓍膠、海藻酸鈉、羧甲基纖維素、聚乙二醇、油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、乙酸鈉及氯化鈉。

【0221】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其進一步包含防腐劑、抗氧化劑及穩定劑中之至少一者。

【0222】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其包含選自由苯甲酸鈉、山梨酸及對羥基苯甲酸酯組成之群的防腐劑。

【0223】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中該細菌菌株經凍乾。

【0224】　在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組合物，其中當將組合物在密封容器中於約 4℃或約 25℃下儲存且將容器置於具有 50%相對濕度之氛圍中時，在至少約 1 個月、3 個月、6 個月、1 年、1.5 年、2 年、2.5 年或 3 年時期後，至少 80%如以菌落形成單位量測之細菌菌株保留。

【0225】　在一些實施例中，本發明之組合物提供於包含如本文所述組合物之

密封容器中。在一些實施例中，密封容器係藥囊或瓶。在一些實施例中，本發明之組合物提供於包含如本文所述組合物之注射器中。

【0226】　在一些實施例中，本發明之組合物可作為醫藥調配物提供。舉例而言，組合物可作為錠劑或膠囊提供。在一些實施例中，膠囊係明膠膠囊(「gel-cap」)。膠囊可為硬膠囊或軟膠囊。在一些實施例中，調配物係軟膠囊。軟膠囊係如下膠囊：其由於添加存在於膠囊殼中之軟化劑(諸如甘油、山梨糖醇、麥芽糖醇及聚乙二醇)而可具有一定彈性及柔軟性。軟膠囊可例如基於明膠或澱粉來生產。基於明膠之軟膠囊可自各種供應商購得。端視投與方法，諸如經口或經直腸投與，軟膠囊可具有各種形狀，其可為例如圓形、橢圓形、長橢圓形或魚雷形。軟膠囊可藉由慣用製程產生，諸如藉由 Scherer 製程、Accogel 製程或微滴或吹製製程。

【0227】　在一些實施例中，本發明之組合物係經口投與。經口投與可能涉及吞咽，使化合物進入胃腸道。

【0228】　適於經口投與之醫藥調配物包括固體栓(solid plug)、固體微粒、半固體及液體系統(包括多相或分散系統)，諸如錠劑；含有多顆粒或納米顆粒之軟或硬膠囊、液體(例如水溶液)、乳液或粉劑；菱形錠劑(包括充液型)；嚼錠(chew)；凝膠；快速分散劑型；膜劑；珠形劑(ovule)；噴霧劑；及經頰/黏膜黏著貼片。

【0229】　在一些實施例中，醫藥調配物係腸溶調配物，即適於藉由經口投與將本發明之組合物遞送至腸之耐胃調配物(例如，耐胃 pH)。當細菌或組合物之另一組分對酸敏感(例如在胃條件下易於降解)時，腸溶調配物可能尤其有用。

【0230】　在一些實施例中，腸溶調配物包含腸溶包衣。在一些實施例中，調配物係腸溶包衣劑型。舉例而言，調配物可為腸溶包衣錠劑或腸溶包衣膠囊或諸如此類。腸溶包衣可為慣用腸溶包衣，例如，用於經口遞送之錠劑、膠囊或

諸如此類之慣用包衣。調配物可包含膜包衣，例如腸溶聚合物之薄膜層，例如酸不溶性聚合物。

【0231】　在一些實施例中，腸溶調配物係本質上腸溶性的，例如耐胃的，而無需腸溶包衣。因此，在一些實施例中，調配物係不包含腸溶包衣之腸溶調配物。在一些實施例中，調配物係由熱膠凝材料製成之膠囊。在一些實施例中，熱膠凝材料係纖維素材料，諸如甲基纖維素、羥甲基纖維素或羥丙基甲基纖維素(HPMC)。在一些實施例中，膠囊包含不含任何成膜聚合物之殼。在一些實施例中，膠囊包含殼，且殼包含羥丙基甲基纖維素，且不包含任何成膜聚合物(例如參見[57])。在一些實施例中，調配物係本質上腸溶性之膠囊(例如，來自Capsugel之Vcaps®)。

培養方法

【0232】　用於本發明之細菌菌株可使用如例如參考文獻[58-60]中詳述之標準微生物學技術來培養。

【0233】　用於培養之固體或液體培養基可為 YCFA 瓊脂或 YCFA 培養基。YCFA 培養基可包括(每 100 ml，近似值)：酪胨(1.0 g)、酵母提取物(0.25 g)、$NaHCO_3$ (0.4 g)、半胱胺酸(0.1 g)、K_2HPO_4 (0.045 g)、KH_2PO_4 (0.045 g)、NaCl (0.09 g)、$(NH_4)_2SO_4$ (0.09 g)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.009 g)、$CaCl_2$ (0.009 g)、刃天青(0.1 mg)、氯化血紅素(1 mg)、生物素(1 μg)、鈷胺素(1 μg)、對胺基苯甲酸(3 μg)、葉酸(5 μg)及吡哆胺(15 μg)。

用於疫苗組合物中之細菌菌株

【0234】　本發明者已確定本發明之細菌菌株可用於治療或預防與免疫活性降低相關之疾病或病狀。此可能為本發明之細菌菌株對宿主免疫系統所具有的作用之結果。因此，當作為疫苗組合物投與時，本發明之組合物亦可用於預防疾

病或病狀。在某些此等實施例中，本發明之細菌菌株可經殺死、滅活或減毒。在某些此等實施例中，組合物可包含疫苗佐劑。在某些實施例中，組合物用於經由注射，諸如經由皮下注射投與。

通則

【0235】　除非另外指明，否則本發明之實施將採用在本領域技術內之習知化學、生物化學、分子生物學、免疫學及藥理學方法。此等技術在文獻中有充分解釋。參見例如參考文獻[61]及[62-68]等。

【0236】　術語「包含」涵蓋「包括」以及「由.....組成」，例如「包含」X之組合物可排他性地由X組成，或可包括其他某物，例如X + Y。

【0237】　關於數值 x 之術語「約」為視情況存在的且意指例如 x±10%。

【0238】　詞語「實質上」不排除「完全」，例如「實質上不含」Y 之組合物可完全不含 Y。必要時，本發明之定義中可省略詞語「實質上」。

【0239】　提及兩個核苷酸序列之間的序列一致性百分比意指在比對時，在比較該兩個序列時該百分比之核苷酸相同。此比對及同源性或序列一致性百分比可使用此項技術中已知之軟體程式，例如參考文獻[69]之部分 7.7.18 中所述之軟體程式來測定。較佳比對藉由 Smith-Waterman 同源性搜索演算法使用仿射空位搜索(其中開放空位罰分為12且空位延伸罰分為2、BLOSUM矩陣為62)來確定。Smith-Waterman 同源性搜索演算法揭示於參考文獻[70]中。

【0240】　除非特別陳述，否則包括多個步驟之製程或方法可在方法開始或結束包括其他步驟，或可包括其他插入步驟。此外，適當時可組合，省略或以替代次序進行。

【0241】　本文中闡述本發明之各個實施例。應瞭解各實施例中說明之特徵均可與其他所說明之特徵組合以提供其他實施例。特定而言，本文中強調為合適、

典型或較佳之實施例可彼此組合(除非其互斥時)。

【0242】　本說明書中引用之所有專利及參考文獻皆特此以全文引用之方式併入。

【0243】　任何對治療方法之提及(包括向患者投與劑)亦涵蓋用於該治療方法中之該劑，以及該劑在該治療方法中之用途，以及該劑在製造藥物中之用途。

【0244】　以下實例僅出於說明目的而提供，且並不意欲以任何方式限制本發明之範疇。

實施本發明之模式

實例1

概述

【0245】　此研究之目的係表徵 MRx0004 之活體外免疫調節性質。此外，基因體學、轉錄體學及蛋白質體學之組合用於鑒別可能負責介導宿主對 MRx0004 之反應之潛在關鍵效應物。

材料與方法

細菌菌株、質體及引子

【0246】　用於產生此研究中之菌株之所有細菌菌株及質體及引子皆列於表 1 中。除非另有說明，否則在厭氧操作臺(workstation) (Don Whitley Scientific, Shipley, UK)中在酵母提取物-酪蛋白水解產物-脂肪酸(YCFA)肉湯(E&O Labs, Bonnybridge, UK)中在 37°C下常規培養短芽孢桿菌菌株。在 37°C下將大腸桿菌菌株在 Luria Bertani (LB)肉湯[71]中在攪動下常規培養。適當時，生長培養基補充有四環素(tetracycline) (10 μg/ml)、氯黴素(對於大腸桿菌為 10 μg/ml 或對於短雙歧桿菌為 3 μg/ml)、紅黴素(對於大腸桿菌為 100 μg/ml 或對於短雙歧桿菌為 1 μg/ml)、奇黴素(100-300 μg/ml)或康黴素(kanamycin) (50 μg/ml) (所有抗生素皆來

自 Sigma-Aldrich，Gillingham，UK)。在補充有 40 μg/ml X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-吡喃半乳糖苷)及 0.1 M IPTG (異丙基-β-D-半乳吡喃糖苷) (二者皆由 Sigma-Aldrich 供應)之 LB 瓊脂上選擇含有 pORI19 或 pWSK29 之重組大腸桿菌細胞。

永生化細胞之常規培養

【0247】 在補充有 10% (v/v)胎牛血清(FBS)、4 mM L-麩醯胺酸、1X 非必需胺基酸溶液及 1X 抗生素抗真菌溶液之經高葡萄糖改良的達爾伯克氏最低伊格爾氏培養基 (Dulbecco's Minimal Eagle's Medium) (DMEM) 中常規培養 HT29-MTX-E12 細胞(Public Health England, Salisbury, UK)。將細胞接種至分析容器中且培養 9 天，接著將其用漢克氏(Hank's)平衡鹽水溶液洗滌兩次且置於共培養基(補充有 4 mM L-麩醯胺酸、1X 非必需胺基酸溶液、5 μg/ml 脫鐵運鐵蛋白(apo-transferrin)及 200 ng/ml 亞硒酸鈉之 DMEM)中，之後開始處理。

用於共培養分析之細菌處理物之製備

【0248】 對於共培養實驗，培養細菌直至其達到對數期。藉由離心分離活細菌細胞及上清液，接著用 PBS (Sigma-Aldrich)將活細菌(命名為 $_{LV}$)洗滌一次，且再懸浮於適當細胞培養基中用於下游使用。使上清液(命名為 $_{SN}$)通過 0.22 μm 過濾器且在共培養基中適當稀釋。藉由在 80°C培育 30 分鐘，接著用 PBS 洗滌且再懸浮於適當細胞培養基中來製備熱滅活細菌(命名為 $_{HK}$)。藉由塗鋪確認活菌計數。

報告分析

【0249】 使 HEK-Blue™-hTLR2 及 THP1-Blue™ NF-κB 細胞生長至 90%密度，用 PBS 洗滌一次，且分別以 280,000 個細胞/ml 及 500,000 個細胞/ml 之密度再懸浮於不含抗生素之培養基中 。將細菌處理物(活的、熱殺死的及上清液)以 100:1

之感染複數(MOI)添加至細胞中。陽性分析對照、PamCS3K4 (Invivogen)及熱殺死之單核球增多性李氏菌(*L. monocytogenes*) (HKLM) (Invivogen)分別以 10 ng/ml 濃度及 200:1 之 MOI 使用。製備陰性對照、培養基及媒劑以提供每處理之等效物。接著將細胞在 37°C及 5% CO_2 下培育 22 h。將來自共培養物之培養基在 QUANTI-Blue™ (Invivogen)中稀釋 10 倍，且培育 1 小時(NFκB)或 2 小時(TLR2)並且記錄 655 nm 處之光密度。

與 HT29-MTX 細胞之大規模共培養物

【0250】 如先前所述，在 10 cm 直徑之 Transwells® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)之上室中培養 HT29-MTX 細胞。如先前所述將細菌培養至對數後期，洗滌且再懸浮。將細菌以 100:1 之 MOI 添加至細胞中，且將共培養物在厭氧條件下在 37°C下培育 3 小時。自 transwell 之上室收集含有細菌之培養基，且以 5000xg 離心 5-10 分鐘以收集細菌細胞用於下游應用。

細菌 qPCR 分析

【0251】 收集細菌用於在對數後期及靜止生長期以及在與 HT29-MTX 大規模共培養後自活體外培養物中分離 RNA。依照製造商之說明書(QIAGEN, Hilden, Germany)，使用 RNAProtect 細菌試劑收集且儲存細菌。藉由以下方式來裂解細菌細胞：將其與溶菌酶(15 mg/ml) (Sigma-Aldrich)及蛋白酶 K (6 mAU) (QIAGEN)在 37°C下培育 30 分鐘，隨後使用 FastPrep 24 儀器(6 m/s 持續 20 s，2 個循環)及裂解基質(Lysing Matrix) B (皆來自 MP Biomedicals，Santa Ana，CA，USA)進行均質化。使用 RNeasy 微型套組(Mini Kit) (QIAGEN)分離總 RNA，且使用無 RNA 酶之 DNA 酶(RNase-Free DNase)在柱上消化(on-column digest) (QIAGEN)中去除基因體 DNA，兩者皆依照製造商之說明書進行。依照製造商之說明書，使用 Superscript IV 套組(Thermo Fisher Scientific)合成 cDNA。使用 Primer3Plus 軟體

設計引子[72]。依照製造商之建議在 Power SYBR™ 綠色 PCR 主混合物(Green PCR Master Mix) (Thermo Fisher Scientific)中設立 qPCR 反應，且使用以下循環在 7500 快速即時 PCR 系統(Fast Real-time PCR System) (Thermo Fisher Scientific)上實施分析：95°C 10 分鐘，接著進行 95°C 15 秒、60°C 1 分鐘的 40 個循環。使用雙 ΔCt 分析對數據實施分析，且相對於持家 *groEL* 將測試基因之表現正規化。

細菌細胞刮取

【0252】 視情況在對數後期生長期中或在與 HT29-MTX 接觸(詳情參見上文共培養部分)後藉由離心收穫細菌細胞。接著洗滌細胞並以 1/20 稀釋度將其再懸浮於 50 mM TEAB 緩衝液(pH 8.5) (Sigma-Aldrich)中。藉由將細胞與測序級經修飾之胰蛋白酶(Promega, Madison, WI, USA)在 37°C下在補充有 1 mM DTT (Sigma-Aldrich)之 50 mM TEAB 緩衝液中培育 30 分鐘來產生經刮取蛋白質級分。對於各樣品，平行培育不含胰蛋白酶之管，作為脫落蛋白質之對照(脫落蛋白質級分)。藉由在 4°C下以 4000xg 離心 15 分鐘收穫經刮取及脫落之蛋白質級分，且藉助 Millex-GV 0.22 μm 之低蛋白質結合膜(Millipore)進行注射器式過濾。根據製造商之說明書使用 Pierce™ BCA 蛋白質分析套組(Thermo Fisher Scientific)量測總蛋白質濃度，且藉由 SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)評估樣品品質。在胰蛋白酶處理之前及之後，藉由在 YCFA 瓊脂上塗鋪，進行存活細胞計數。對於各分析，接著藉由奈米 LC-MS/MS 分析來自三個生物學重複之樣品。

藉由 LC-MS/MS 鑒別蛋白質

【0253】 簡言之，將培養上清液濃縮至 0.5 ml 並用超純水洗滌，使用 ReadyPrep 2-D 純化套組(Cleanup Kit) (Bio-Rad)使蛋白質沈澱，且將其再懸浮於 100 μl 50 mM 碳酸氫銨中。接著將樣品與豬胰蛋白酶(Promega)在 37°C下培育 16 h，且藉由真空離心將所得上清液乾燥並溶解於 0.1%三氟乙酸中。使用 μ-C18 ZipTips

(Merck, Keniloworth, NJ, USA)將肽進一步去鹽且溶析至 96 孔微量滴定板中，藉由真空離心乾燥且溶解於 10 μl LC-MS 載入溶劑(2%乙腈、0.1%甲酸)中。藉由奈米 LC-MS/MS (Q 精確混合四極-軌道阱 MS 系統，Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap MS system) (Thermo Fisher Scientific)使用 15-cm PepMap 柱、60 分鐘 LC-MS 採集方法及 5 μl 之注射體積分離且鑒別肽。對於刮取及脫落之蛋白質級分，將 70 μl 50 mM 碳酸氫銨直接添加 30 μl 樣品中。接著將樣品與豬胰蛋白酶(Promega)在 37°C下培育隔夜，且將所得上清液在-70°C下冷凍，藉由真空離心乾燥且溶解於 20 μL LC-MS 載入溶劑中。藉由奈米 LC-MS/MS (Q 精確混合四極-軌道阱 MS 系統，Thermo Scientific)使用 25-cm PepMap 柱、60 分鐘 LC-MS 採集方法及 2 μl 之注射體積分離且鑒別肽。利用 Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific)進行數據分析。Mascot Server 用作具有以下參數之搜尋引擎：酶=胰蛋白酶，最大混合切割位點=2，前驅物質量允差=10 ppm，動態修飾=氧化(M)，靜態修飾=脲甲基(C)。將鑒別之肽與基於短雙歧桿菌 MRx0004 之測序基因體構築的菌株特異性蛋白質序列資料庫(2,047 個序列)相匹配。當在所有三個生物學重複中鑒別出至少五種肽時，認為蛋白質鑒別有效。

短雙歧桿菌 MRx0004-EPS^{neg} 之互補

【0254】 藉由使用 Q5 高保真度聚合酶(High-Fidelity Polymerase) (New England BioLabs, Herefordshire, United Kingdom)及引子對(pGTFcompF 及 pGTFcompR)自短雙歧桿菌 MRx0004 染色體 DNA 進行 PCR 擴增，產生涵蓋編碼主要糖基轉移酶之基因 *pGTF* 及其假定啟動子之 DNA 片段。用 HinDIII 及 XbaI (二者皆來自 New England Biolabs，Ipswich，MA，USA)消化所得片段，且將其連接至類似消化之 pBC1.2。藉由電轉型將連接混合物引入大腸桿菌 EC101 中，接著基於 Cm 抗性選擇轉型體。藉由限制性分析篩選許多 Cm 抗性轉型體之質體

含量。藉由測序確認選殖插入物在許多重組質體中之完整性，然後將其引入大腸桿菌 EC101 pWSK29-MRX-M+S 中，以促進甲基化。藉由電穿孔與在補充有 Tet 及 Cm 之強化梭菌瓊脂(Reinforced Clostridial Agar) (RCA; Thermo Fisher Scientific)進行選擇將甲基化pBC1.2或pBC1.2-pGTF轉型至MRx0004-EPS^{neg}中。使用質體 DNA 之菌落 PCR 限制分析檢查轉型體之質體含量，且藉由測序進行驗證。將所得菌株分別命名為短雙歧桿菌 MRx0004-EPS^{-}-pBC1.2 及 MRx0004-EPS^{-}-pBC1.2-pGTF。

來自 HT29-MTX 細胞之細胞介素分析

【0255】 將活細菌(如先前所述製備)與HT29-MTX細胞在24孔板中在37°C及5% CO_2下以 100:1 之 MOI 共培育 3 小時。接著將人類重組 TNFα (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)以 10 ng/ml 添加至細胞中，接著將共培養物再培養 24 小時，隨後收集上清液且在 4°C下以 12000xg 離心 3 分鐘以去除細胞碎屑。依照製造商之推薦，使用人類 IL-8 (CXCL8)標準 ABTS ELISA 顯色套組(Development Kit) (PeproTech)分析上清液中之 IL-8 含量。

與 PBMC 之共培養

【0256】 健康冷凍之人周邊血單核細胞(PBMC)購自 STEMCELL Technologies (Cambridge, UK)。將細胞解凍且在具有 10% FBS、2 mM L 麩醯胺酸及 100 U/ml 青黴素(penicillin)、100 μg/ml 鏈黴素(streptomycin)之完全生長培養基 RPMI 1640 中在 37°C及 5% CO_2 下靜置隔夜(所有試劑皆來自 Sigma-Aldrich)。如先前所述製備細菌處理物。對於共培育，將細胞以 750,000 個細胞/孔之密度塗鋪在 48 孔板中，且與熱滅活之細菌及 MOI 為 10:1 之細菌上清液共培養，使用適當媒劑及 5 ug/ml PHA (Sigma-Aldrich)作為對照。將共培養物在 37°C及 5% CO_2 下培育 72 小時，接著收集細胞且在 4°C下以 10000xg 離心 3 分鐘。收集無

細胞上清液且將其儲存在-80°C下用於細胞介素分析。將細胞沈澱洗滌一次，接著在冰上再懸浮於 PBS 中。

流式細胞術

【0257】 彙集處理孔，每組得到 1.5×10^6 個 PBMC，將其再懸浮於 150 µl PBS 中且轉移至準備用於染色之 96 V 型底板中。首先在室溫下在黑暗中用 Viobility 405/520 可固定染料(Fixable Dye) (Miltenyi Biotec Ltd.，Bergisch Gladbach，Germany)將細胞染色 10 分鐘，以區分活細胞及死細胞。接著將其與 CD3、CD4、CD8、CD25、CD127 及 CD19 之抗體混合物一起染色以確定細胞表型(Miltenyi REA 抗體)且在室溫下再培育 10 分鐘。接著洗滌細胞且將其再懸浮於 PBS 中，且立即經由流式細胞術分析進行分析。同型用於第一實驗期間之所有抗體以幫助設定門(gate)，且在所有實驗中皆包括 FMO 對照。使用 BD FACS Aria II 進行所有實驗，其中使用 FACSDiva 軟體(BD Biosciences, Reading, UK)在「活」門中對 100,000 個細胞設定用於採集之停止門(stopping gate)。該分析係使用 Flowjo 10.4.2 版軟體(FlowJo LLC, Oregon, USA)進行，且係基於用活力染料鑒別之活細胞。

細胞介素分析

【0258】 依照製造商之推薦，使用定制之 ProcartaPlex 多重免疫分析(Thermo Fisher Scientific)，在來自 PBMC 共培養物之無細胞上清液中實施細胞介素定量。簡言之，使用 MAGPIX® MILLIPLEX®系統(Merck)，利用 xPONENT 軟體(Luminex, Austin, TX, USA)處理 50 µl 上清液。使用 MILLIPLEX®分析軟體(Merck)，利用 5 參數邏輯曲線及背景扣除將平均螢光強度(MFI)轉換成 pg/ml 值來分析數據。

數據分析

【0259】 使用用於 Windows，GraphPad Software，La Jolla CA USA 之 GraphPad Prism 7.00 版實施統計分析。使用單因子變異數分析及 Tukey 多重比較檢定分析數據。使用 Interactivenn 產生文氏圖[73]。

結果

MRx0004 刺激 NFκB 及 TLR2 報告細胞

【0260】 由於促炎轉錄因子 NFκB 在先天性免疫之調控中之必要作用，因此採用 THP-1-NFκB 報告細胞株來檢查 MRx0004 對促炎轉錄因子 NFκB 活化之影響。熱殺死之單核球增多性李氏菌(HKLM) (InvivoGen)用作此分析之陽性對照。為了鑒別此菌株之有效級分，將 THP-1-NFκB 細胞與活細菌($MRx0004_{LV}$)、細菌培養上清液($MRx0004_{SN}$)及熱滅活細菌($MRx0004_{HK}$)之處理物共培養。與未處理細胞及細菌生長培養基(YCFA)之陰性對照相比，所有三種細菌處理物皆顯著活化 NFκB (對於所有比較，$p<0.0001$) (圖 7A)。$MRx0004_{LV}$ 係最有效之處理，且比 $MRx0004_{SN}$ 及 $MRx0004_{HK}$ 顯著更具刺激性(對於兩種比較，$p<0.0001$)。$MRx0004_{HK}$ 之活性進而顯著高於 $MRx0004_{SN}$ ($p=0.006$)。

【0261】 由於 MRx0004 顯示活化 NFκB，因此研究 MRx0004 刺激上游受體 TLR2、TLR4、TLR5 及 TLR9 之能力。初步資料表明 MRx0004 不活化 TLR4、TLR5 及 TLR9 (資料未顯示)。用陽性對照 Pam3CSK4 以及與上文所述相同之 MRx0004 處理物及陰性對照處理 HEK-TLR2 報告分析(圖 7B)。與陰性對照相比，所有 MRx0004 處理皆刺激 TLR2 (對於所有比較，$p<0.0001$)。與 $MRx0004_{SN}$ ($p<0.0001$)及 $MRx0004_{HK}$ ($p<0.0001$)相比，$MRx0004_{LV}$ 係最具刺激性之處理，後者 $MRx0004_{HK}$ 係有效性最低之處理。基於此等資料，MRx0004 能夠以 TLR2 相關方式有效刺激先天免疫反應。

MRx0004 之轉錄及蛋白質體剖析揭示潛在宿主反應效應物

【0262】　為了在 MRx0004 中鑒別宿主反應之潛在效應物，採用了三種方法。採用靶向轉錄分析來分析 10 個作為雙歧桿菌-宿主相互作用之已知效應物的具有預測一致性之 MRx0004 基因(資料未顯示)。此等基因包括編碼預測之黏附素及兼職(moonlighting)蛋白質(*oppA*、*烯醇酶*、*轉醛醇酶*、*tadA*、*eftU*、*支鏈澱粉酶*)之基因(廣泛綜述於[74]中)，以及在定殖及免疫調節中具有推定作用之基因(MRx0004 EPS 基因座之主要糖基轉移酶(*pGTF*)[75]、*luxS*[76]及絲胺酸蛋白酶抑制劑[77])及具有推定治療作用之基因(*pks*[78])。在自 MRx0004 分離之 RNA 中分析此等基因之表現，該 MRx0004 在液體培養中生長至對數後期及靜止期，以及已與大規模 transwell 中培養之 HT29-MTX 細胞接觸 3 h。qPCR 分析(圖 8)證實，與靜止期相比，*eftU*、*烯醇酶*及 *pGTF* 在對數後期顯著上調，而 *oppA*、*支鏈澱粉酶*、*絲胺酸蛋白酶抑制劑*及 *tadA* 在靜止期之表現顯著高於對數後期。六種基因(*eftU*、*烯醇酶*、*pGTF*、*oppA*、*絲胺酸蛋白酶抑制劑*及*轉醛醇酶*)相對於對數後期，因應腸上皮細胞(*IEC*)而顯著上調。自此分析顯而易見，MRx0004 之基因表現藉由與 IEC 之接觸而改變，推斷上調基因在 MRx0004-宿主相互作用中之潛在作用。此 qPCR 分析中大多數顯著上調之基因已預測在與 IEC 之黏附中之作用，此表明此可能為 MRx0004 之重要功能性質。

【0263】　藉由鑒別培養上清液中和細胞表面上存在之蛋白質，進一步表徵 MRx0004 對其他宿主-反應效應物之表現。奈米 LC-MS/MS 分析在 $MRx0004_{SN}$ 中鑒別出 64 種蛋白質(表 2)。用最高匹配肽數目(PSM)鑒別之蛋白質係支鏈澱粉酶(351.33±33.62)、兩種 NlpC/P60 家族蛋白質(82±15.62 及 71.67±13.61)、ABC 運輸蛋白系統之溶質結合蛋白質(56±7)及細胞分裂蛋白質 FtsI (56±4.36)。鑒別若干參與短雙歧桿菌及其他細菌物種中之宿主相互作用之兼職蛋白質，其包括轉醛醇酶(32.67±3.79)、GAPDH (30±3.61)、DnaK (17.67±3.21)、GroEL (12.67±0.58)

及烯醇酶(5.67±0.58)[66、79-84]。

【0264】　使用酶促細胞刮取方法進行 MRx0004 細胞表面上存在之蛋白質之鑒別。使用胰蛋白酶刮取細菌細胞，且使用 LC-MS/MS 鑒別經切割之表面相關蛋白質(經刮取蛋白質級分)。亦收集來自非胰蛋白酶對照之蛋白質且藉由 LC-MS/MS 分析，允許鑒別鬆散地結合至表面之蛋白質(脫落蛋白質級分)。鑒別出總共 106 種經刮取蛋白質，其中 44 種經預測錨定在細胞壁中(即存在於經刮取蛋白質級分中且不存在於經脫落蛋白質級分中) (表 3，圖 15)。如對 $MRx0004_{SN}$ 所觀測到的，所鑒別之最豐富之經刮取蛋白質係支鏈澱粉酶(136.67±17.47)，其亦在經脫落蛋白質級分(79±10.54)中偵測到。有趣地，亦在兩種細胞刮取級分中鑒別出 I 型聚酮化合物合成酶，儘管在經刮取蛋白質級分中比在經脫落蛋白質級分中鑒別出更多匹配之肽(分別為 54.67±10.69 及 11.67±6.43)。亦在 MRx0004 細胞刮取級分中偵測到所有在 $MRx0004_{SN}$ 中存在且在上文列示的兼職蛋白質(表 3)。此外，在經刮取蛋白質級分及經脫落蛋白質級分二者中皆鑒別出 EfTu (PSM 分別=32±5 及 24.33±8.39)。亦在細胞刮取及上清液資料集中之一者或二者中偵測到五種藉由 qPCR 分析之基因(*eftU*、*烯醇酶*、*luxS*、*支鏈澱粉酶*及*轉醛醇酶*)，從而確認此等基因之轉譯。來自轉錄及蛋白質體資料集之資料共同使吾人能夠識別 MRx0004 中之潛在相關新穎效應物。

【0265】　有趣地，澱粉分解酶支鏈澱粉酶(細胞刮取資料集中最豐富之蛋白質)係兼職蛋白質，已報導其可能參與釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)與糖蛋白及宿主細胞之活體外黏附[85、86]。此外，已報導來自動物雙歧桿菌乳酸亞種(*B. animalis* subsp. *lactis*)之 DnaK 及烯醇酶[74、75]及來自長雙歧桿菌之 EfTu [87]活體外黏附至胞漿素原。此外，兩叉雙歧桿菌(*B. bifidum*) A8 之糖酵解酶轉醛醇酶在乳酸乳球菌(*L. lactis*)中之重組表現增加該菌株對黏蛋白之黏附性[76]。

MRx0004 生產此等兼職蛋白質表明其可能在 MRx0004 之黏附能力中起作用，從而促進與宿主細胞表面之相互作用。尚未闡述雙歧桿菌兼職蛋白質對特定宿主細胞受體及信號傳導途徑之作用，且此等可能代表 MRx0004 之新穎調控路徑，MRx0004 藉助該等新穎調控路徑與宿主相互作用。

研究 MRx0004 調節先天免疫反應之特徵

【0266】 進行進一步實驗以表徵宿主對 MRx0004 之反應。

【0267】 為了輔助此研究，構築一種菌株(EPS^{neg})，其中 EPS 基因座之 *pGTF* 基因藉助插入誘變而失活(圖 16A)。藉由利用[88]中所述之方法而非操縱 II 型限制-修飾(RM)系統來構築此菌株，使來自 MRx0004 I 型 RM 系統之甲基化酶及特異性次單元表現且用於使質體 DNA 甲基化，接著進行轉型。亦產生互補 EPS^{neg} 菌株(EPS^{comp})及 EPS^{neg} 空載體菌株(EPS^{vec})作為對照。

【0268】 藉由將 HEK-TLR2 及 THP-1-NFκB 報告細胞與 MRx0004、EPS^{neg}、EPS^{vec} 及 EPS^{comp} 之活的上清液處理物共培育來評估 EPS 對 TLR2 及 NFκB 活化之影響。所有活細菌處理皆以相當之程度活化 TLR2 (圖 12A)。相比之下，$MRx0004_{LV}$ 對 NFκB 之活化顯著低於 $EPS^{neg}{}_{LV}$ (p= 0.003)及 $EPS^{vec}{}_{LV}$ (p= 0.009)，但不低於 $EPS^{comp}{}_{LV}$ (圖 12B)。$MRx0004_{SN}$ 及 $EPS^{comp}{}_{SN}$ 之間之 TLR2 及 NFκB 活化沒有差異，證實在此情況下野生型及互補型展示出相似之表型。$EPS^{neg}{}_{SN}$ 及 $EPS^{vec}{}_{SN}$ 對於 TLR2 (對於兩者，p<0.0001)及 NFκB (分別為 p=0.002 及 0.0013)之刺激性顯著高於 $MRx0004_{SN}$。此等資料表明 MRx0004 對 TLR2 之活化並非藉助其 EPS 直接介導。相比之下，在不存在 EPS 之情況下，因應於 MRx0004 細胞表面之暴露，NFκB 之活化增加。此等資料表明 MRx0004 之有效免疫調節最佳使用整個完整細胞來達成，且 TLR2 之 MRx0004 配位體主要為細胞表面相關的，但亦可脫落或分泌。

【0269】　亦研究了 MRx0004 及其衍生菌株對活體外 IEC 發炎模型之影響。用 MRx0004 及其衍生物將 HT29-MTX 細胞引發 3 小時，接著將 TNFα 作為發炎刺激劑添加至孔中且再持續 24 小時。使用此模型，與無細菌對照相比，MRx0004 不降低 TNFα 介導之 IL-8 分泌(圖 12C)。然而，與基線對照相比，MRx0004 處理使非 TNFα 刺激之細胞中之 IL-8 分泌降低。與 MRx0004 之處理相比，EPS^{neg} 處理使 TNFα 誘導之 IL-8 分泌顯著降低(p<0.0001)。EPS^{vec} 處理細胞及 EPS^{comp} 處理細胞中之 IL-8 分泌亦顯著低於對 MRx0004 之反應(對於兩種比較，p<0.0001)。有趣地，與報告分析中由 EPS^{neg} 所證實之作用不同，表面相關抗原之未遮罩似乎對 IEC 具有抗炎作用。

MRx0004 對適應性免疫反應之影響

【0270】　為了檢查 MRx0004 對適應性免疫系統之作用，使用來自健康人類供體之周邊血單核細胞(PBMC)來表徵細胞群體及細胞介素分泌譜。PHA 在此分析中用作陽性對照(資料未顯示)。將 PBMC 與來自 MRx0004 及其衍生菌株之熱滅活細菌細胞及無細胞培養上清液共培育 72 小時。藉由流式細胞術分析 T 細胞($CD3^+CD4^+$及 $CD3^+CD8^+$)、Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^-$)及 B 細胞($CD3^-CD19^+$)表面標記物(連同活化標記物 CD25)之表現(圈選策略參照圖 18)。在此模型中使用熱滅活細菌而並非活細菌作為處理物，此乃因在 72 小時培育期間活細菌可能生長且在營養物競爭方面超過人類細胞。細胞表面標記物及細胞介素因應於來自所有測試菌株之細菌上清液之表現與因應於媒劑(YCFA)觀測到之表現相比並無顯著不同(資料未顯示)。EPS^{vec} 及 EPS^{comp} 之資料示於圖 20 及圖 21 中。

【0271】　與未處理之對照相比，$MRx0004_{HK}$ 處理使活化 $CD8^+CD25^+$子集顯著增加(p=0.0038，圖 13A)，而與對照相比，$EPS^{neg}{}_{HK}$ 並未顯著增加活化 $CD8^+CD25^+$ 細胞之百分比。與對照相比，$MRx0004_{HK}$ 及 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 均未顯著增加 $CD8^+$、$CD4^+$

或 $CD4^+CD25^+$T 細胞群體之百分比(圖 19A 及 19B、圖 13B)。與未處理細胞相比，$MRx0004_{HK}$ 及 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 以相似之統計學顯著程度增加 B 細胞群體(分別為 p=0.001 及 0.0013，圖 13E)。B 細胞活化($CD19^+CD25^+$)未受到任何施加之處理之顯著影響(圖 19-C)。在 $CD4^+$細胞群體內，使用 $CD25^+CD127^-$表面標記物分析 Treg 細胞之比例。當與未處理之細胞相比時，在 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 處理之 PBMC 中而並非 $MRx0004_{HK}$ PBMC 中觀察到 Treg 之相對百分比之增加(p=0.0014，圖 13C)。$EPS^{neg}{}_{HK}$ 相對於 $MRx0004_{HK}$ 增加 Treg (p=0.0196)。與未處理之細胞相比，對於 $MRx0004_{HK}$ 處理觀測到 Treg/$CD8^+$比率向調控性 T 細胞反應之偏斜(skew) (p=0.0008，圖 13D。此外，增加之因應 $MRx0004_{HK}$ 之 $CD8^+$正偏斜顯著高於向 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 之偏斜(p=0.0272，圖 13D)。總之，此等資料確認 MRx0004 之免疫刺激作用，且表明 EPS 之喪失可導致增加之 Treg 刺激及 Treg/$CD8^+$比率以及降低之免疫刺激作用。雖然 EPS 可能在 $CD8^+$細胞之活化中起作用，但它似乎不參與顯著調節 B 細胞群體。

【0272】　藉由對主要與 Th1 (IL-12p70、IFNγ、TNFα)、Th2 (IL-4)、Th17 (IL-17α、IL-1β)及 Treg (IL-10)群體相關之細胞介素進行定量，亦確定用 $MRx0004_{HK}$ 及 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 處理之 PBMC 的分泌細胞介素特徵(signature)。與未處理細胞相比，$MRx0004_{HK}$ 處理顯著增加 TNFα、IL-12p70、IFNγ、IL-4 及 IL-17α (分別為 p=0.0038、0.0025、0.0036、0.027 及 0.0316，圖 14A-D)。用 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 處理誘導 TNFα、IFNγ、IL-1β、IL-10 及 IL-17α 之顯著反應(分別為 p=0.0001、0.0267、<0.0001、0.0004 及 0.0103，圖 14A、圖 14C、圖 14E-G)。與 $MRx0004_{HK}$ 不同，與未處理細胞相比，$EPS^{neg}{}_{HK}$ 並未顯著增加 IL-12p70 或 IL-4 之分泌。與 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 相比，$MRx0004_{HK}$ 亦顯著增加 IL-12p70 (p=0.0118，圖 14B)，而相反，發現 $EPS^{neg}{}_{HK}$ 處理比 $MRx0004_{HK}$ 產生更高濃度之 IL-1β 及 IL-10 (分別為 p=0.0008 及 0.014，圖 14E-F)。

【0273】　使用由各個別 T 輔助細胞次型產生之細胞介素作為指標分析細胞介素比率以推斷細菌處理是否使 T 輔助細胞反應向特定次型偏斜(Th1 或 Th2；IL-12p70/IL-4，Treg；IL-10/IL1p70、Th17；IL-1β/IL12p70，圖 14H-J)。與未處理細胞相比，$MRx0004_{HK}$處理似乎使免疫反應顯著向 Th1 表型偏斜(p=0.0172，圖 14H)，而與未處理細胞相比，$EPS^{neg}{}_{HK}$處理似乎誘導向 Treg 反應及 Th17 反應兩者之偏斜(p=0.0312 及 0.0005，圖 14I-J)。與 $MRx0004_{HK}$相比，$EPS^{neg}{}_{HK}$Treg 及 Th17 偏斜亦顯著增加(p=0.0423 及 0.0008，圖 14J)。在 $MRx0004_{HK}$與 $EPS^{neg}{}_{HK}$處理之間觀測到其驅動不同 T 細胞反應子集之能力之明顯區別。

【0274】　總之，此研究中之觀測結果證實 MRx0004 調控先天性及適應性免疫反應之促炎小組(arm)。因此，MRx0004 及其他短雙歧桿菌菌株可用於刺激免疫系統及治療與免疫活性降低相關之疾病。

實例 2-表徵 MRx0004 eps 基因座對效力的作用

概述

【0275】　本研究之目的係表徵 MRx0004 胞外多糖(EPS)在 MRx0004 之免疫刺激及治療性質中之作用。

材料與方法

【0276】　如實例 1 中所述進行實驗，其他程序如下文所述。

永生化細胞之常規培養

【0277】　使 HEK-Blue™-hTLR2 細胞(InvivoGen, San Diego, CA, USA)在補充有 10% (v/v) FBS、4 mM L-麩醯胺酸、4.5 mg/ml 葡萄糖、100 U/ml 青黴素、100 μg/ml 鏈黴素、100 μg/ml Normocin ™ (InvivoGen)、30 μg/ml 滅瘟素(blastocydin)及 100 μg/ml 吉歐黴素(zeocin)之 DMEM 中生長至 90%密度。使 THP1-Blue™ NF-kB 細胞(InvivoGen)在補充有 10% (v/v)熱滅活 FBS、2 mM L-麩醯胺酸、100

U/ml 青黴素、100 μg/ml 鏈黴素、25 mM HEPES、100 μg/ml Normocin™、10 μg/ml 滅瘟素(cRPMI)之 RPMI 1640 中生長。在 37°C及 5% CO_2 下培養細胞株。除非另有說明，否則所有試劑皆由 Sigma-Aldrich 供應。

MRx0004 EPS 基因座與相關短雙歧桿菌菌株之比較分析

【0278】 在 GenBank 資料庫中可獲得之雙歧桿菌屬菌株基因體，其用於來自雙歧桿菌屬菌株之推定胞外多糖基因簇之 EPS 簇及物理圖譜的電腦分析

MRx0004 EPS 基因座之差異表現分析

【0279】 根據略作修改之製造商方案，利用 RNAprotect (Qiagen)及 RNeasy 微型套組(Qiagen)對菌株 MRx0004 之對數後期培養物提取總 RNA。使用裂解基質 B 及振盪設定為 6 m/s 之 MP Fast-Prep-24 組織及細胞均質器(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)進行機械細胞裂解。將細胞破碎兩個 20 s 循環，在循環之間在冰上靜置 1 分鐘。利用 Agilent RNA Screentape (Agilent Technologies)在 Tapestation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)上檢查 RNA 品質。檢查到 RNA 降解之缺失，且所有樣品皆具有≥9 之最小 RNA 完整性數(Integrity Number)。MICROBExpress 套組(Thermo Fisher Scientific)用於耗盡 rRNA 種類。使用 Agilent RNA RNA Screentape (Agilent Technologies)在 Agilent 生物分析儀(Bioanalyzer)上檢查評估 16S 及 23S rRNA 種類之缺失。將耗盡 rRNA 之 RNA 樣品送至 GATC Biotech 進行股特異性文庫製備，且在 Illumina 測序上測序以產生 150 bp 之單端讀段(read)。獲得每個 RNA-Seq 文庫平均 22,3878,08 個(對數後期樣品)及 18627178.6 個(靜止期樣品)原始讀段，總計分別超過 10.07 Gbp 及 8.38 Gbp。使用 Trimmomatic 修剪原始讀段 (1)且使用 Bowtie 相對於 MRx0004 基因體進行品質過濾(98.36%對數後期樣品及 98.26% (靜止期樣品)讀段通過 QC 且係經比對 99.11% (LL)及 98.72% (SP)之經作圖有效讀段(clean reads mapped)) (2)。

使用 XX 及 DeSeq2 v X (Love 等人，2014)計算 MRx0004 EPS 基因座中各基因之各生長期的重複樣品之表現水準，隨後使用 Geneious R11 (Biomatters, Auckland, New Zealand)顯現。呈現兩個生長期之間之差異表現。兩個樣品之間之正規化值之比率的以 2 為底之對數，且當一個樣品沒有或有非常低之表現時，log2 比率之上限為+/-1,000,000。

穿透式電子顯微術(TEM)

【0280】 將細菌在固定溶液(於 0.1 M 磷酸鈉緩衝液中之 0.5 M 蔗糖、2%多聚甲醛及 0.16%戊二醛)中以 1:5 稀釋，且在室溫下固定 2 小時。此後，使 Formvar-碳塗覆之銅格網在 100 µl 短雙歧桿菌懸浮液微滴上漂浮 1 小時，用 PBS 中之 0.02 M 甘胺酸洗滌三次。用 1.0%鉬酸銨對細胞進行負染色。使用 JEM-1400 穿透式電子顯微鏡(JEOL Ltd.，Tokyo，Japan)檢查格網，且使顯微照片顯現。

細菌黏附分析

【0281】 將活細菌(如先前所述製備且再懸浮於共培養基中)以 100:1 之 MOI 施加至 24 孔板中之 HT29-MTX 細胞，且在厭氧條件下在 37°C下共培育 3 小時。用 PBS 將細胞洗滌兩次以去除未結合之細菌，且用 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich)裂解。將裂解物塗鋪，且使用恢復之菌落形成單位(CFU)之數目來確定黏附百分比。

結果

【0282】 *MRx0004 之 eps 基因座在遺傳上不同於其他短雙歧桿菌菌株，且在對數後期生長期間高度表現。*

【0283】 菌株 MRx0004 之基因體測序表明其含有 28 Kb EPS 基因座，發現該基因座編碼 27 個基因，代表了預測在短雙歧桿菌中 EPS 生物合成所需之完整全套功能。此區域包括：引發糖基轉移酶、四種額外糖基轉移酶、在跨膜蛋白質

下游編碼之焦磷酸噻胺結合蛋白質、翻轉酶及鏈長決定子(圖 9)。大多數短雙歧桿菌 EPS 基因座(包括菌株 MRx0004 之 EPS 基因座)側接假設蛋白質(將 MRx0004 區域延伸至 31.5 Kb)，該等假設蛋白質已被排除在圖 9 中所呈現之短雙歧桿菌 EPS 基因座之代表之外。大多數(16/19)於圖 9 中所示之菌株係嬰兒分離物，其基因體在公共資料庫中過度呈現。認為超過 50 Kb 之短雙歧桿菌 EPS 區域代表編碼所有產生 EPS 陽性表型所需功能的完整基因座[89]。相比之下，當此等區域<30 Kb 時，認為其代表不完整或殘留之基因座[81]。

【0284】 比較分析將 EPS 基因座鑒別為菌株 MRx0004 (資料未顯示)與其他短雙歧桿菌菌株之基因體之間之遺傳差異的主要區域。將 MRx0004 EPS 基因座與可公開獲得之短雙歧桿菌基因體進行比較。EPS 基因座展示與菌株 MRx0004 之高水準之序列一致性(ID)及基因同線性的短雙歧桿菌菌株示於圖 9 中，且根據其與 MRx0004 之相似性(在操縱子之長度上之平均 nt ID%)排序。短雙歧桿菌 NRBB51 (嬰兒(母乳餵養)分離物)與菌株 MRx0004 在兩個基因座之整個長度上共有最高水準之核苷酸一致性(ID) (91.5%)。編碼兩種菌株中預測轉位酶之中心 1.3 Kb 區域代表菌株 MRx0004 與 NRBB51 之間之多樣性的主要區域。在 MRx0004 基因座之起點及終點編碼之基因展示出與其他短雙歧桿菌分離物之最高水準的序列保守性(圖 9)。對於主要 EPS 生物合成步驟必不可少的 MRx0004 之 *pGTF* 與比較菌株中之同源物共有 92.2%配對 ID (aa)。涵蓋鏈長調控物之 4 Kb 區域以及編碼假設蛋白質及跨膜蛋白質之基因在所檢查之菌株中共有 98.3% nt ID。編碼假設蛋白質及轉座酶之基因代表菌株 MRx0004 與十個最密切相關之 EPS 基因座之間的序列多樣性之主要區域(圖 9)。相比之下，發現與菌株 MRx0004 之 EPS 基因座較不相似之短雙歧桿菌 EPS 基因座(圖 9 中之底部 9 個菌株)展示出對 EPS 產生至關重要之基因(包括 *gtf*、聚合酶及乙醯基轉移酶基因)之數目及順

序的變異(圖 9)。

【0285】　為了確定MRx0004之EPS基因座是否在對數後期或靜止期生長期間更高轉錄，對在 YCFA 中生長之菌株 MRx0004 之單培養物實施差異表現分析。(圖 9B)。大多數預測主要負責 MRx0004 EPS 合成(如上所述)之基因在對數後期生長期間上調。MRx0004 EPS 基因座編碼 10 種假設蛋白質及 5 種轉座酶，其代表在 MRx0004 靜止期生長期間上調之唯一基因類別(圖 9)。假設蛋白質在 MRx0004 EPS 合成中之作用仍然未知。

MRx0004 之 EPS 陰性菌株之產生

【0286】　研究 MRx004 EPS 在宿主-微生物相互作用及免疫調節中之作用，且如上文所述構築一種菌株(EPS^{neg})，其中 EPS 基因座之 *pGTF* 基因藉助插入誘變而失活(圖 16A)。藉由利用[80]中所述之方法而非操縱 II 型限制-修飾(RM)系統來構築此菌株，使來自 MRx0004 I 型 RM 系統之甲基化酶及特異性次單元表現且用於使質體 DNA 甲基化，之後進行轉型。亦產生互補 EPS^{neg} 菌株(EPS^{comp})及 EPS^{neg} 空載體菌株(EPS^{vec})作為對照。與 MRx0004 相比，EPS^{neg} 及 EPS^{vec} 展示出增加之自動聚集表型(圖 16B)。EPS^{comp} 之聚集性低於 EPS^{neg} 及 EPS^{vec}，但其自動聚集似乎與 MRx0004 相比有所增加，表明此菌株可能未完全恢復至野生型 EPS 表型。

【0287】　使用穿透式電子顯微術(TEM)研究 MRx0004 及 EPS^{neg} 之 EPS 表型。與 MRx0004 相比在 EPS^{neg} 菌株不存在 EPS 示於圖 10A 及圖 10B 中。使用活體外 IEC 模型分析野生型 MRx0004 及其衍生菌株之黏附能力。EPS^{neg} 與 IEC 之黏附性為 MRx0004 之兩倍以上(分別為 47.5%黏附性相對於 18.7%，p=0.006) (圖 10C)，表明 EPS 之缺失增加 EPS^{neg} 之黏附能力。用 EPS^{vec} 維持在 EPS^{neg} 中所見增加之黏附表型(40.1%黏附，相對於 MRx0004，p=0.03)，但當與任何其他菌株

比較時，EPS^{comp} 之黏附(34.1%)並無顯著不同，進一步暗示 EPS^{comp} 逆轉為野生型表型係不完全的。

MRx0004 中之 EPS 耗盡暴露參與宿主刺激之表面蛋白質

【0288】 EPS^{neg} 對 IEC 之黏附增加表明 EPS 之耗盡可能導致表面相關蛋白質之暴露增加或「未遮罩」。在 MRx0004 及 EPS^{neg} 表面相關蛋白質與 IEC 接觸後分析其組成。在與 HT29-MTX 細胞接觸 3 h 後，如先前所述用胰蛋白酶刮取細菌細胞，且藉由 LC-MS/MS 分析所得之刮取及脫落之蛋白質級分。與 IEC 接觸後之 MRx0004 細胞刮取產生 55 種刮取蛋白質(預測其中 34 種為表面錨定)及 24 種脫落蛋白質(圖 11A)。與 IEC 接觸後，EPS^{neg} 細胞之刮取含有比 MRx0004 多得多的蛋白質，刮取蛋白質級分中有 101 種蛋白質，且脫落蛋白質級分中有 45 種蛋白質(圖 11B)。除了三種在 MRx0004 脫落蛋白質級分中鑒別出之蛋白質(參與碳水化合物、脂質及蛋白質代謝之酶)之外，所有鑒別之蛋白質皆存在於兩種菌株之刮取蛋白質級分中。

【0289】 MRx0004 及 EPS^{neg} 刮取蛋白質級分之比較鑒別出 54 種存在於兩個樣品中之蛋白質及 47 種對 EPS^{neg} 菌株特異之蛋白質(圖 11C)。在 MRx0004 刮取蛋白質資料集中獨特鑒別之唯一蛋白質係 NlpC/P60 家族蛋白質。對於 EPS^{neg} 菌株，藉由細胞刮取收穫之蛋白質之數目高於 MRx0004，推斷 EPS 耗盡促進更好地獲取用於胰蛋白酶切割之表面蛋白質。另外，已知參與雙歧桿菌及其他屬中宿主相互作用之蛋白質在 EPS^{neg} 刮取蛋白質級分中比在 MRx0004 之刮取蛋白質級分中更豐富(如藉由所鑒別肽之數目/μg 總蛋白質所評估) (表 4)。此等結果進一步增加 EPS 耗盡導致未遮罩效應，從而暴露表面蛋白質及原本被 MRx0004 EPS 遮蔽之潛在 MRx0004 免疫原之假設之可信度。

【0290】 亦藉由 LC-MS/MS 分析 EPS^{neg} 培養上清液之蛋白質含量，且確認 EPS

之缺乏導致 EPS^{neg} 菌株在細胞外環境中可能脫落及分泌之蛋白質數目增加(圖17)。在 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中鑒別出總共 146 種蛋白質，相比之下，在 $MRx0004_{SN}$ 中僅鑒別出 64 種蛋白質，其中 87 種僅在 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中偵測到，而 59 種在兩個樣品中皆偵測到。除 GAPDH 之外，在 $MRx0004_{SN}$ 中鑒別及上面討論之兼職蛋白質皆在 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中以較高豐度偵測到，該 GAPDH 在兩個樣品之間相當($MRx0004_{SN}$ 及 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中為 30±3.61 及 28.33±0.58)。有趣地，在 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中排他性地偵測到已顯示在乳酸乳球菌及長雙歧桿菌中之人類胞漿素原結合中起作用的膽醯甘胺酸(choloylglycine)水解酶(膽鹽水解酶)及 EfTu [72、79]。膽鹽水解酶亦可保護共生物種免受腸中之環境應力[90]。與 $MRx0004_{SN}$ 相比，在 $EPS^{neg}{}_{SN}$ 中之蛋白質之偵測增加表明，在缺失 EPS 之情況下未遮罩可導致 MRx0004 表面相關蛋白質之脫落或分泌增加。

結論

【0291】 比較基因體分析證實，MRx0004 中負責 EPS 合成之基因座在遺傳上不同於其他短雙歧桿菌菌株。在此區域中觀測到之遺傳變異數可能有助於增強 MRx0004 及相關菌株之效力及治療效用。

【0292】 EPS 作為 MRx0004:宿主相互作用之介質及作為免疫反應之效應物的潛在重要性受到其與*IEC*接觸後其*pGTF*表現之相對增加之支持。除*pGTF*外，qPCR 分析中大多數其他顯著上調之基因亦已預測在與 IEC 之黏附中之作用，此暗示此可能為 MRx0004 之重要功能性質。MRx0004 之 IV 型菌毛相關基因 *tadA* 在活體外培養中表現，由於先前觀測到短雙歧桿菌 UCC2003 之 Tad 菌毛不在活體外條件下產生，因此此係有趣的[91]。絲胺酸蛋白酶抑制劑之表現亦因應於 IEC 而顯著增加。最近已報導來自長雙歧桿菌 NCC2705 之絲胺酸蛋白酶抑制劑減少活體內腹腔疾病模型之小腸內上皮內淋巴球之浸潤[92]，從而誘導免疫刺激及保

護作用，此表明短雙歧桿菌、尤其 MRx0004 之絲胺酸蛋白酶抑制劑可能具有相似之免疫調節作用。

【0293】　上清液及細胞刮取物之蛋白質體學分析偵測到大量在碳水化合物代謝中具有預測作用之蛋白質。有趣地，澱粉分解酶支鏈澱粉酶(細胞刮取資料集中最豐富之蛋白質)係兼職蛋白質，已報導其可能參與釀膿鏈球菌與糖蛋白及宿主細胞之活體外黏附[77、78]。此外，已報導來自動物雙歧桿菌乳酸亞種之 DnaK 及烯醇酶[74、75]及來自長雙歧桿菌之 EfTu [79]活體外黏附至胞漿素原。此外，兩叉雙歧桿菌 A8 之糖酵解酶轉醛醇酶在乳酸乳球菌中之重組表現增加該菌株對黏蛋白之黏附性[76]。MRx0004 生產此等兼職蛋白質表明其可能在 MRx0004 之黏附能力中起作用，從而促進與宿主細胞表面之相互作用。此等雙歧桿菌兼職蛋白質可能對介導 MRx0004 對免疫系統之增強作用的特定宿主細胞受體及信號傳導路徑具有特定作用。

【0294】　MRx0004 誘導活化 $CD8^+$子集之顯著增加，此似乎與 EPS 之存在部分地相關。

【0295】　與 MRx0004 相比，EPS^{neg} 處理顯著增加 Treg。此表明 EPS 之去除暴露了另一種能夠與宿主細胞相互作用且促進 Treg 反應之細菌表面組分。CD8+群體及 Treg 群體二者中之波動皆很明顯。EPS^{neg} 誘導向 Treg 反應之顯著偏斜，如藉由與基線相比顯著增加之 Treg/CD8 比率所示。此暗示 EPS^{neg} 中細胞表面之未遮罩引起抗炎作用，且 MRx0004 中存在 EPS 支持其免疫刺激效力。

【0296】　發現 MRx0004 之 EPS 直接參與 IL-12p70 之分泌。此外，所有三種測試之 Th1 細胞介素(IL-12p70、IFNγ、TNFα)之分泌皆被 $MRx0004_{HK}$ 顯著上調，表明此菌株誘導向 Th1 反應之偏斜，該 Th1 反應部分地藉助 $MRx0004_{HK}$ 之 EPS 介導。$MRx0004_{HK}$ 亦顯著誘導 Th2 細胞介素 IL-4，且上調 IL-10、IL-1β 及 IL-17α，

但不顯著，從而推斷此菌株可誘導 T 輔助細胞微環境之轉變。Th1 之誘導可改良活體內腸障壁穩定性且有益於維持免疫穩態。

【0297】　MRx0004 之 EPS 可具有特異性免疫調控作用，即調控 CD8+、Treg 及 Th1 反應，且此等作用可提供增強之效力及治療功效。

實例 3-細菌接種物在小鼠癌症模型中之功效

概述

【0298】　如前述實例中所述，本發明者已鑒別出短雙歧桿菌、尤其 MRX004 菌株之新的免疫刺激作用。鑒於上文所呈現之新資料，包含短雙歧桿菌、尤其 MRX004 菌株之組合物預期有效刺激免疫系統且治療與免疫系統活性降低或受益於免疫系統活性增加相關之疾病。

【0299】　癌症係可受益於攻擊腫瘤之免疫系統活性增加之疾病。與上文所呈現之新資料及 MRX004 之新免疫刺激作用一致，MRX004 在下面之研究中顯示有效降低小鼠腫瘤模型中之腫瘤體積，此證實投與 MRX004 有效治療疾病。

【0300】　此研究在四種腫瘤模型中測試包含根據本發明之細菌菌株之組合物之功效，且與抗-CTLA 抗體比較了功效。

材料

【0301】　**測試物質**-細菌菌株編號 MRX004 短雙歧桿菌。

【0302】　**參考物質**-抗-CTLA-4 抗體(純系：9H10，目錄：BE0131，同型：敘利亞倉鼠(Syrian Hamster) IgG1，Bioxcell)。

【0303】　**測試及參考物質媒劑**-細菌培養基(酵母提取物-酪腖-脂肪酸培養基(YCFA))。每天注射給小鼠，用 PBS 稀釋抗體(參考：BE14-516F，Lonza，France)。

【0304】　**處理劑量**-細菌：200 μL 中 2×10^8 個。以 10 mg/kg/注射來注射抗-CTLA-4。根據小鼠最近體重，以 10 mL/kg/投與之劑量體積投與抗-CTLA-4 (即，

對於一隻稱重為 20 g 之小鼠，將投與 200 μL 測試物質)。

【0305】 **投與途徑**-藉由經口胃管灌食(經口，PO)經由插管投與細菌接種物。每天將插管除污。將抗-CTLA-4 注射至小鼠之腹膜腔中(腹膜內，IP)。

【0306】 **細菌菌株之培養條件**-細菌菌株之培養條件如下：

- 移取 10 mL YCFA (自製備之 10 mL E&O 實驗室瓶中)至 Hungate 管中
- 將管密封且使用注射器輸入及排氣系統用 CO_2 沖洗
- 對 Hungate 管進行高壓滅菌
- 在冷卻時，用 1 mL 甘油儲備液接種 Hungate 管
- 將管置於 37°C靜態培育箱中且保持約 16 小時。
- 次日，取 1 mL 此繼代培養物且接種 10 mL YCFA (再次預熱沖洗之 Hungate 管，全部一式兩份)
- 將其於 37°C之靜態培育箱中放置 5 至 6 h

癌細胞株及培養條件-

【0307】 所用細胞株詳述於下表中：

細胞株	類型	小鼠品系	來源
EMT-6	乳癌	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	肺癌	C57BL/6	ATCC CRL1642
Hepa1-6	肝細胞癌	C57BL/6	IPSEN INNOVATION

【0308】 由可移植鼠類乳癌建立 EMT-6 細胞株，在 BALB/cCRGL 小鼠中植入增生性乳腺小泡結節後出現該鼠類乳癌[93]。

【0309】 由 C57BL 小鼠之帶有腫瘤之肺建立 LL/2 (LLC1)細胞株，該腫瘤係由原發性 Lewis 肺癌之植入引起[94]。

【0310】 Hepa 1-6 細胞株係在 C57/L 小鼠中產生之 BW7756 小鼠肝瘤之衍生物[95]。

【0311】 **細胞培養條件**-所有細胞株皆在 37°C下在加濕氛圍(5% CO_2、95%空

氣)中作為單層生長。培養基及補充劑示於下表中：

細胞株	培養基	補充劑
EMT6	含有 2 mM L-麩醯胺酸之 RPMI 1640 (參考：BE12-702F，Lonza)	10% 胎牛血清 (參考：編號 3302，Lonza)
LL/2 (LLC1)	含有 2 mM L-麩醯胺酸之 RPMI 1640 (參考：BE12-702F，Lonza)	10% 胎牛血清 (參考：編號 3302，Lonza)
Hepa1-6	DMEM (參考：11960-044，Gibco)	10% 胎牛血清 (參考：編號 3302，Lonza) 2 mM L-麩醯胺酸 青黴素-鏈黴素(Sigma G-6784)

【0312】 對於實驗使用，藉由在不含鈣或鎂且藉由添加完全培養基中和之漢克氏培養基(參考：BE10-543F，Lonza)中用胰蛋白酶-維耳新(versene) (參考：BE17-161E，Lonza)處理 5 分鐘，自培養瓶中分離黏附腫瘤細胞。在血球計中對細胞進行計數且藉由 0.25%台盼藍排除分析(trypan blue exclusion assay)評估其活力。

動物使用-

【0313】 自 CHARLES RIVER (L'Arbresles)獲得匹配重量及年齡之健康雌性 Balb/C (BALB/cByJ)小鼠用於 EMT6 模型實驗。

【0314】 自 CHARLES RIVER (L'Arbresles)獲得匹配重量及年齡之健康雌性 C57BL/6 (C57BLl6J)小鼠用於 LL/2(LLC1)及 Hepa1-6 模型實驗。

【0315】 根據 FELASA 導則，使動物維持 SPF 健康狀態，且遵循根據法國及歐洲法規(French and European Regulations)之動物飼養及實驗程序以及 NRC 實驗動物照護及使用指南(Care and Use of Laboratory Animals)[96、97]。將動物維持在飼養室中受控環境條件下：溫度：22±2°C，濕度 55±10%，光週期(12 h 光照/12 h 黑暗)，HEPA 過濾空氣，每小時 15 次空氣交換，無再循環。動物圍欄(Animal enclosure)設有無菌且足夠之空間，該空間有如所述之墊鋪材料、食物及水、環境及社群豐富化(成群飼養)：通風架中的 900 cm^2 籠(參考：綠色，Tecniplast)、

Epicea 墊料(SAFE)、10 kGy 輻照飲食(A04-10, SAFE)、用於免疫活性齧齒類動物之完整食品-R/M-H 擠出物、來自水瓶之水。

實驗設計及治療

抗腫瘤活性，EMT6 模型

【0316】 治療時間表-首次給藥之開始視為 D0。在 D0，使用 Vivo manager® 軟體(Biosystemes, Couternon, France)將未植入小鼠根據其個體體重隨機分組，每組 9 隻或 8 隻。在 D0，小鼠接受媒劑(培養基)或細菌菌株。在 D14，如下文所述，向所有小鼠植入 EMT-6 腫瘤細胞。在 D24，來自陽性對照組之小鼠接受抗-CTLA-4 抗體治療。

【0317】 治療時間表匯總於下表中：

組	動物數目	治療	劑量	途徑	治療時間表
1	8	未治療	-	-	-
2	8	媒劑(培養基)	-	PO	Q1Dx42
3	9	細菌菌株 1 號 (MRX004)	2×10^8 個細菌	PO	Q1Dx42
4	8	抗 CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

【0318】 如下文所述進行動物監測。

【0319】 在動物中誘導 EMT6 腫瘤-在 D14，藉由將 1×10^6 個於 200 μL RPMI 1640 中之 EMT-6 細胞皮下注射至小鼠之右側腹中來誘導腫瘤。

【0320】 安樂死-當每隻小鼠達到如下文所述之人道終點時，或在開始給藥後最多 6 週後，對每隻小鼠實施安樂死。

抗腫瘤活性，LL/2 (LLC1)模型

【0321】 治療時間表-首次給藥之開始視為 D0。在 D0，使用 Vivo manager® 軟體(Biosystemes, Couternon, France)將未植入小鼠根據其個體體重隨機分成 7 組，每組 9 隻或 8 隻。在 D0，小鼠將接受媒劑(培養基)或細菌菌株。在 D14，如下

文所述，向所有小鼠植入 LL/2 腫瘤細胞。在 D27，來自陽性對照組之小鼠接受抗-CTLA-4 抗體治療。

【0322】　治療時間表匯總於下表中：

組	動物數目	治療	劑量	途徑	治療時間表
1	8	未治療	-	-	-
2	9	媒劑(培養基)	-	PO	Q1Dx42
3	9	細菌菌株 1 號 (MRX004)	2×10^8 個細菌	PO	Q1Dx42
4	8	抗 CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

【0323】　如下文所述進行動物監測。

【0324】　在動物中誘導 LL/2 (LLC1)腫瘤-在 D14，藉由將 1×10^6 個於 200 μL RPMI 1640 中之 LL/2 (LLC1)細胞皮下注射至小鼠之右側腹中來誘導腫瘤。

【0325】　安樂死-當每隻小鼠達到如下文所述之人道終點時，或在開始給藥後最多 6 週後，對每隻小鼠實施安樂死。

抗腫瘤活性，Hepa1-6 模型

【0326】　治療時間表-首次給藥之開始視為 D0。在 D0，使用 Vivo manager® 軟體(Biosystemes, Couternon, France)將未植入小鼠根據其個體體重隨機分成 7 組，每組 9 隻。在 D0，小鼠接受媒劑(培養基)或細菌菌株。在 D14，如下文所述，向所有小鼠植入 Hepa1-6 腫瘤細胞。在 D16，來自陽性對照組之小鼠接受抗-CTLA-4 抗體治療。

【0327】　治療時間表匯總於下表中：

組	動物數目	治療	劑量	途徑	治療時間表
1	9	未治療	-	-	-
2	9	媒劑(培養基)	-	PO	Q1Dx42
4	9	細菌菌株 2 號 (MRX004)	2×10^8 個細菌	PO	Q1Dx42
7	9	抗 CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

【0328】　如下文所述進行動物監測。

【0329】　藉由脾內注射在動物中原位誘導 Hepa 1-6 腫瘤細胞-在 D14，經由脾內注射將一百萬(1×10^6)個於 50 μL RPMI 1640 培養基中之 Hepa 1-6 腫瘤細胞移植至小鼠中。簡言之，製成左肋下側腹小切口且自腹內取出脾臟。將脾臟暴露在無菌紗布墊上，且在視覺控制下用 27 號針頭注射細胞懸浮液。在細胞接種後，切除脾臟。

【0330】　安樂死-當每隻小鼠達到如以下部分中所述之人道終點時，或在開始給藥後最多 6 週後，對每隻小鼠實施安樂死。

【0331】　評價安樂死時之腫瘤負荷-在終止時，收集肝臟並稱重。

動物監測

【0332】　臨床監測-每週兩次用卡尺量測腫瘤之長度及寬度，且藉由下式估計腫瘤之體積[98]：

$$\text{腫瘤體積} = \frac{\text{寬度}^2\times\text{長度}}{2}$$

【0333】　人道終點[99]：疼痛、痛苦或困苦之徵象：疼痛姿勢、疼痛面罩、行為；超過正常體重之 10%、但不超過 2000 mm^3 之腫瘤；干擾行走或營養之腫瘤；潰瘍性腫瘤或組織侵蝕；連續 3 天保持體重減輕 20%；身體狀況差、消瘦、惡病體質、脫水；長期缺乏對外部刺激之自主性反應；呼吸急促困難(Rapid laboured breathing)、貧血、大量出血；神經系統徵象：環狀運動、抽搐、麻痺；體溫持續下降；腹脹。

【0334】　麻醉-異氟醚氣體麻醉用於所有程式：手術或腫瘤接種、靜脈內注射、血液採集。氯胺酮及甲苯噻嗪麻醉用於立體定向(stereotaxia)外科手術。

【0335】　止痛 - 卡普洛芬 (carprofen) 或多模式卡普洛芬 / 丁基原啡因

(buprenorphine)止痛方案適應於外科手術之嚴重程度。為所有疼痛性程序提供非藥理學照護。另外，在主治獸醫之建議下，提供不干擾研究之藥理學照護(主題治療)。

【0336】　安樂死-藉由過劑量氣體麻醉(異氟醚)、接著進行頸椎脫位或放血進行動物安樂死。

結果

抗腫瘤活性，EMT6 模型

【0337】　結果示於圖 1 中。用本發明之細菌菌株處理使得腫瘤體積相對於兩種陰性對照明顯減小。如所預期，已知活化免疫系統之陽性對照亦使得腫瘤體積減小

抗腫瘤活性，LL/2 (LLC1)模型

【0338】　結果示於圖 2 中。陰性對照及陽性對照表現不如所預期的，此乃因用陽性對照治療之小鼠之腫瘤體積大於陰性對照組。然而，用本發明之細菌菌株治療之小鼠中之腫瘤體積與陽性對照組相當，此與有用之治療及免疫刺激作用一致。

抗腫瘤活性，Hepa1-6 模型

【0339】　結果示於圖 3 中。未治療陰性對照表現不如所預期的，此乃因此組中之肝臟重量低於其他組。然而，媒劑陰性對照組及陽性對照組二者皆表現為如所預期的，此乃因單獨用媒劑治療之小鼠比用抗 CTLA4 抗體治療之小鼠具有更大之肝臟，反映了媒劑陰性對照組中更大之腫瘤負荷。用本發明之細菌菌株治療使得肝重量(及因此腫瘤負荷)相對於媒劑陰性對照組中之小鼠明顯降低。

【0340】　此等資料證實 MRX004 有效治療癌症，且鑒於實例 1 及 2 中之資料，此等資料支持菌株 MRX004 可用於治療或預防與免疫系統活性降低相關之其他

疾病。

實例4-酶促活性之表徵

【0341】　分析概況指數(Analytical Profile Index) (API®)測試系統由含有分析細菌物種中之酶促活性之小型化生化測試的條帶組成。使用兩種 API 測試系統對 MRX004 (以登錄號 NCIMB 42380 寄存之細菌)進行表徵：Rapid ID 32A-此系統專門設計用於厭氧物種，且涵蓋用於碳水化合物、胺基酸及硝酸鹽代謝以及鹼性磷酸酶活性之測試；及 API® 50 CH-此系統測試 49 種碳水化合物源之發酵，且可與 API® CHL Medium 結合用於分析厭氧物種。

【0342】　依照製造商之說明書對細菌菌落實施 Rapid ID 32A 測試。簡言之，將細菌在厭氧操作臺中在 37°C下在 YCFA 瓊脂上培養 24 小時。使用無菌之 5 µl 接種環自板移出菌落，且將其再懸浮於 2 ml 之 API®懸浮培養基安瓿中，直到達到與 McFarland 標準 4 號之密度大致相當之密度。向 Rapid ID 32A 條帶上之各杯狀凹(cupule)中添加 55 微升細菌懸浮液，且用兩滴礦物油覆蓋尿素酶測試物。用塑膠蓋覆蓋條帶且在 37°C下有氧培育 4 小時，接著使用以下試劑使底列杯狀凹顯色：NIT：NIT1 及 NIT2 各 1 滴；IND：1 滴詹姆斯試劑(James reagent)；所有剩餘之杯狀凹：1 滴堅牢藍(FastBlue)試劑。將條帶在室溫下培育 5 分鐘，接著記錄各杯狀凹之顏色並指定陰性值、中間陽性值或陽性值。

【0343】　Rapid ID 32A 分析結果示於圖 4 中。MRX004 對幾種碳水化合物源(即 α-半乳糖苷酶及 β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶及 β-葡萄糖苷酶、α-阿拉伯糖、甘露糖及棉子糖)、以及胺基酸(精胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、甘胺酸及組胺酸)之發酵測試呈陽性。

【0344】　在 MRX004 及四種短雙歧桿菌型菌株之間實施比較 Rapid ID 32A 分析，該四種菌株在圖 4B 中注釋為 Bif Ref 1 (DSM 20091)、Bif Ref 2 (DSM 20213)、

Bif Ref 6 (JCM 7017)及 Bif Ref 7 (UCC2003)。此分析證實，MRX004 係經測試使多糖棉子糖發酵之唯一菌株，此可能有重大意義，此乃因棉子糖參與諸如胞外多糖之細胞組分之產生，且據報導棉子糖發酵亦可對宿主產生諸如以下之作用：增加盲腸丁酸鹽、增加胃腸道增殖及減輕體重。

【0345】　實施 API® 50 CH 測試以進一步檢查 MRX004 中之碳水化合物代謝。依照製造商之說明書，將細菌在厭氧操作臺中在 37°C下在 10 ml YCFA 肉湯中培養 16-18 小時。將此培養物在 10 ml API® CHL Medium 中稀釋，以達到與 McFarland 標準 2 號大致相當之密度，且將 110 µl 此混合物用於接種一組 API® 50 CH 測試條上之各杯狀凹。將測試條在厭氧操作臺中在加濕培育箱中在 37°C下培育 48 小時，接著記錄各杯狀凹之顏色並指定陰性值、中間陽性值、陽性值或可疑值。

【0346】　使用 API® 50，MRX004 對於以下碳水化合物源之利用測試呈陽性：阿米酮(澱粉)、苦杏仁苷、熊果苷、纖維二糖、七葉苷、半乳糖、龍膽二糖、葡萄糖、糖原、果糖、岩藻糖、乳糖、麥芽糖、甘露糖、甘露糖醇、蜜二糖、松三糖、甲基 α-D-葡萄吡喃糖苷、N-乙醯胺基葡萄糖、核糖、蔗糖、柳苷、山梨糖醇、海藻糖、松二糖及木糖醇(圖 5)。此等結果與針對 Rapid ID 32A 測試獲得之結果相關，此乃因 MRX004 在兩種測試系統中皆表現出對半乳糖、葡萄糖、甘露糖及棉子糖之發酵。

實例 5-在 YCFA 培養基中與人類細胞的附著

概述

【0347】　在 YCFA 培養基中之 3 個不同時間點確定菌株 MRX004 及多個其他短雙歧桿菌菌株與人類細胞之結合水準。將附著至人類細胞之細菌再懸浮於培養基中，且接著分析培養基之光密度-光密度愈高，細菌細胞數愈高，因此細菌

細胞與人類細胞之結合水準愈高。發現 MRX004 菌株與短雙歧桿菌參考菌株相比，展示出對人類細胞之附著降低。

結果及分析

【0348】 實驗結果示於圖 6 中。

【0349】 如圖 6 中所示，參考短雙歧桿菌菌株在所有時間點皆顯示出對人類細胞之高水準附著。另一方面，MRX004 菌株對人類細胞之附著水準顯著降低。因此，菌株 MRX004 對人類細胞之低黏附性可增加本發明組合物對免疫系統之有益作用。

實例 6-穩定性測試

【0350】 將含有至少一種本文中所述之細菌菌株的本文中所述之組合物儲存在密封容器中 25℃或 4℃下且將容器置於具有 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或 95%相對濕度之氛圍中。在 1 個月、2 個月、3 個月、6 個月、1 年、1.5 年、2 年、2.5 年或 3 年之後，至少 50%、60%、70%、80%或 90%之細菌菌株應殘留，如以藉由標準方案測定之菌落形成單位量測。

實例 7-抗微生物活性

引言

【0351】 此實驗之目的係測試幾種來源於人類嬰兒之短雙歧桿菌菌株針對各種指示菌株之抗微生物活性潛力，及評估其是否在活體外產生細菌素。

方法

【0352】 選擇一組菌株作為指示菌株(表 5)，其包括密切相關之革蘭氏陽性細菌、其他革蘭氏陽性細菌及革蘭氏陰性細菌，先前已顯示此等細菌受雙歧桿菌屬物種抑制[93]。

共培養分析

【0353】　使菌株在 37℃ (對於枯草芽孢桿菌，為 30℃)下在厭氧條件(對於大腸桿菌、枯草芽孢桿菌及金黃色葡萄球菌，為好氧條件)下，自研究細胞庫(Research Cell Bank) (對於短雙歧桿菌測試及參考菌株)或自珠粒儲備液(對於指示菌株)生長 16 h。在 YCFA 板(E&O Labs, UK)上製得指示菌株菌苔(lawn)，使其乾燥，且將 10 µl 測試菌株培養物點漬於菌苔頂部上。將板在厭氧條件下於 37℃下培育 48 h (對於大腸桿菌、枯草芽孢桿菌及金黃色葡萄球菌，在厭氧條件下在 37℃下培育 24 h，接著在好氧條件下於 37℃下培育 24 h)。以一式三份進行各分析(除了以下為一式兩份：枯草芽孢桿菌 NCIMB8045 與 MRx0004、測試 1、測試 2、測試 3、測試 4、測試 5、測試 6、測試 7 及測試 8，以及短雙歧桿菌 DSM20213、胚芽乳桿菌(*Lactobacillus plantarum*) NCIMB8826、產芽孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) ATCC3584 及金黃色葡萄球菌 NCIMB9518 與所有短雙歧桿菌菌株)。

【0354】　藉由量測觀測到之抑制區之寬度來評估抗微生物活性，該抑制區係測試菌株斑點周圍之透明區(圖 22)。對於各生物學重複，對各菌株給出 0 至 3 之間之評分。

培養上清液

【0355】　使用瓊脂擴散法來測試培養上清液之抗微生物潛力。簡言之，將 100 µl 經過濾無細胞上清液點漬於預先接種指示菌株菌苔(如上所述)之 YCFA 瓊脂上，至穿孔至瓊脂中之孔中。將板靜置 1 h 以使其擴散，接著在厭氧條件(對於大腸桿菌、枯草芽孢桿菌及金黃色葡萄球菌為好氧條件)下於 37℃下培育 48 h。進行三個生物學重複。

結果

共培養

【0356】　多數測試之短雙歧桿菌菌株展現出針對大腸桿菌、克留氏肺炎桿菌、鼠傷寒沙門氏桿菌及枯草芽孢桿菌之拮抗活性(表 6)。短雙歧桿菌 DSM 20091 係抑制短雙歧桿菌 DSM20213 生長之唯一測試菌株。MRx0004 及其他測試短雙歧桿菌菌株展示出針對大腸桿菌、克留氏肺炎桿菌、鼠傷寒沙門氏桿菌及枯草芽孢桿菌之抗微生物活性(表 6)，所觀測到之總體抑制活性高於短雙歧桿菌參考菌株。MRx0004、測試 1、測試 2、測試 3、測試 7、測試 8、測試 11 及測試 12 展現出尤其有效之抗微生物活性。在測試條件下未偵測到針對金黃色葡萄球菌、產芽孢梭菌及胚芽乳桿菌之拮抗活性。

【0357】　此等資料表明 MRX0004 及相關測試菌株可用於治療細菌感染。

培養上清液

【0358】　針對同一組指示菌株測試無細胞上清液之抗微生物活性。對於所有針對任何指示菌株測試之短雙歧桿菌菌株皆未觀測到抑制(資料未顯示，n=3)。此表明在共培養分析中觀測到之抑制並非歸因於抗微生物分子之分泌。

實例 8-酶促活性之進一步表徵

【0359】　實例 4 中所述之 API 32A 測試系統用於表徵實例 7 中測試之短雙歧桿菌菌株。依照製造商之說明書對細菌菌落實施 Rapid ID 32A 測試。簡言之，將細菌在厭氧操作臺中在 37°C下在 YCFA 瓊脂上培養 24 小時。使用無菌之 5 µl 接種環自板移出菌落，且將其再懸浮於 2 ml 之 API®懸浮培養基安瓿中，直到達到與 McFarland 標準 4 號之密度大致相當之密度。向 Rapid ID 32A 條帶上之各杯狀凹(cupule)中添加 55 微升細菌懸浮液，且用兩滴礦物油覆蓋尿素酶測試物。用塑膠蓋覆蓋條帶且在 37°C下有氧培育 4 小時，接著使用以下試劑使底列杯狀凹顯色：NIT：NIT1 及 NIT2 各 1 滴；IND：1 滴詹姆斯試劑；所有剩餘之杯狀凹：1 滴堅牢藍試劑。將條帶在室溫下培育 5 分鐘，接著記錄各杯狀凹之顏色並指定

陰性值、中間陽性值或陽性值。

【0360】　Rapid ID 32A 分析結果示於圖 23 中。如實例 4 中所見，MRX004 對幾種碳水化合物源(即 α-半乳糖苷酶及 β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶及 β-葡萄糖苷酶、α-阿拉伯糖、甘露糖及棉子糖)、以及胺基酸(精胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、白胺酸、酪胺酸、甘胺酸及組胺酸)之發酵測試呈陽性。

【0361】　亦對在實例 7 中研究之其他測試短雙歧桿菌菌株(測試 1-測試 12)及短雙歧桿菌參考菌株(DSM 20091、DSM 20213、JCM 7017 及 NCIMB 8807/UCC2003)進行了 Rapid ID 32A 分析。測試菌株通常顯示出比參考菌株更大之抗微生物活性，且顯示出與 MRX004 相似之代謝模式。

【0362】　有趣地，MRX004 及測試菌株使多糖棉子糖發酵，而四種參考菌株則不會。如上所述，棉子糖參與諸如胞外多糖之細菌組分之產生。

【0363】　此外，MRX004 及測試 3 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆展現出 β-葡萄糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。

【0364】　MRX004 及測試 2 皆具有有效之抗微生物活性，且皆未展現出 N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶之陽性發酵。

【0365】　MRX004 及測試 8 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆展現出 α-半乳糖苷酶及 α-阿拉伯糖之中間發酵。

【0366】　測試 11 及測試 12 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆使絲胺酸芳基醯胺酶發酵，而不使白胺醯基甘胺酸芳基醯胺酶發酵，且不使丙胺酸芳基醯胺酶發酵。

【0367】　測試 3 及測試 7 二者皆具有有效之抗微生物活性，且二者皆展現出絲胺酸芳基醯胺酶之中間發酵。

實例 9-脈衝場凝膠電泳

【0368】　脈衝場凝膠電泳(PFGE)用於表徵實例 7 中測試之短雙歧桿菌菌株。結果示於圖 24 中。發現展現出大於參考短雙歧桿菌菌株之抗微生物活性的測試短雙歧桿菌菌株以相似之模式分組在一起且可與參考菌株區分開。

實例 10-脈衝場凝膠電泳

【0369】　對 MRx004 及參考短雙歧桿菌菌株進行進一步之脈衝場凝膠電泳(PFGE)研究。PFGE 常規地用作用於臨床實驗室中菌株分型之「金標準」[100]，且據報導係區分人類糞便雙歧桿菌分離物之有效方法[101]。實際上，許多研究已使用 PFGE 拆分之用 XbaI 或 SpeI 限制酶消化之基因體 DNA 片段的指紋分析探索了雙歧桿菌屬分離物之關係[102、103]。已證明 SpeI 尤其用於短雙歧桿菌之質體剖析及種內基因分型[104、105]。

PFGE 栓之製備

【0370】　根據公佈之方案[106]製備用於 PFGE 之高分子量 DNA 之瓊脂糖凝膠栓。

PFGE 栓之限制

【0371】　在室溫下，在 1 ml 10 mM Tris.Cl、0.1 mM EDTA (pH 8.0)中將單一切片(2 mm×2 mm)洗滌三次，保持 15 分鐘。將各切片與 250 µl 推薦用於酶之限制緩衝液在 4°C下預培育 30 分鐘，接著用 250 µl 含有 20 單位限制酶 SmaI 之新鮮緩衝液替換。根據供應商(New England Biolabs(UK) Ltd)之建議，在 25°C下實施隔夜限制性消化。

PFGE

【0372】　在以下條件下檢查經處理(限制酶)及未處理之基因體 DNA (gDNA)栓。將 λ 梯(ladder)在 45°C下加熱，接著將其載入至凝膠中。運行條件係在 14°C下在 0.5×TBE 緩衝液中以 6.0 V/cm 持續 20 h，脈衝時間自 1 s 斜升至 20 s。使用

λDNA 梯(Bio-Rad)作為大小標記物。將栓置於用 0.5xTBE (1 M Tris-硼酸鹽，0.5 M EDTA，pH 8.5)製成之 1.0%瓊脂糖凝膠(Bio-Rad)之孔中，用相同瓊脂糖密封。使用 CHEF-DR III 脈衝場系統(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)將 DNA 片段在維持在 14℃之 0.5×TBE 運行緩衝液中以 6 V/cm 拆分 18 h。選擇線性斜坡脈衝時間。採用 1s-15s 之線性斜坡脈衝時間來分離片段。在光限制條件下，將凝膠在含有 0.5 μg/ml 溴化乙菲錠之蒸餾水中染色 120 分鐘。

PFGE 條帶圖譜分析

【0373】 使用[107]概述之導則手動評估條帶圖譜。在 BioNumerics 7.6 (Applied Maths)中處理 PFGE 影像以產生各菌株之條帶指紋。使用 Jaccard 相似性係數(推薦用於指紋型分析)及有算術平均值之未加權成組配對法(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)實施對指紋之集群分析(Cluster analysis)。

結果

【0374】 先前已顯示用於此研究中之 DNA 消化及電泳條件有效用於對短雙歧桿菌物種進行次分型[98]，且發現提供足夠解析度(超過 10 個可觀測帶)以在亞種水準下區分短雙歧桿菌菌株。4/5 菌株之限制片段係不同的且經充分拆分(圖 25)。集群分析(圖 26)表明，與此研究中分析之其他短雙歧桿菌株相比，菌株 MRx0004 之基因型與短雙歧桿菌 REF7 之基因型更密切相關。

實例 11-T 細胞分化

【0375】 在周邊血單核細胞(PBMC，Stemcell，目錄號：70025)上活體外探索 MRx0004 誘導 T 細胞分化之能力。簡言之，將 PBMC 以每孔 50 μl cRPMI 培養基中 400,000 個/孔接種在塗鋪有抗-CD3 (Ebioscience，CD3 單株抗體(OKT3 純系)，功能級，目錄號 16-0037-81)之 96 孔板中(cRPMI 含有 RPMI 1640 (+L-Glut,

21875-034) 2 mM 最終濃度儲備液 200 mM；10% HI FBS (Gibco life technologies, 10082-147)；50 μm 巰基乙醇(Gibco life technologies, 21985-023)；及 1%青黴素/鏈黴素(P4333, 10 mg/ml))。接著將熱殺死之 MRx0004 (藉由以下方式製備：在 80°C下培育 30 分鐘，接著將培養物用 PBS 洗滌且再懸浮於適當細胞培養基中且藉由塗鋪確認活菌計數)以每孔於 100 μl 中之 4,000,000 個添加至各孔中。在 37°C 培育箱中 3 天后，移出細胞且將其再懸浮於含有 PMA- (Sigma，目錄號 P8139)、離子黴素(Ionomycin) (Sigma，目錄號 I3909)及 GolgiSTOP (BD，目錄號 554724)之培養基中保持 5 小時。PMA 儲備液為在 DMSO 中 1 mg/ml，其進一步以 100 ug/ml 稀釋(各樣品需要於 cRPMI 中 50 ng/ml)，離子黴素儲備液為在 DMSO 中 1 mM (使用在 cRPMI 中 1 μM)，且 GolgiStop 濃度以 4 μl/6 ml 使用。使上清液通過 0.22 μm 過濾器且在共培養基中適當稀釋。

【0376】　接著使細胞經歷流式細胞術染色：

【0377】　在洗滌後，在室溫下在黑暗中將細胞與活力染料(來自 Miltenyi biotec 之活力 405/520 可固定染料，1 μl/樣品)+於 PBS 中之人類 Fc 阻斷劑(block) (目錄號 564219) (1 μl/樣品)培育 10 分鐘。接著將表面抗體(各 2 μl)-CD3-APC-Vio 770 (Miltenyi，目錄號 130-113-136)、CD4-VioBlue (Miltenyi，目錄號 130-114-534)及 CD25-VioBright FITC (Miltenyi，目錄號 130-113-283)直接添加至孔中在室溫下在黑暗中保持 10 分鐘。接著將細胞在 PBS 中洗滌兩次且以 300 g/5 分鐘/RT 旋轉沉降。

【0378】　接著使用 eBioscience FoxP3 轉錄因子染色緩衝液來固定及透化細胞(目錄號 00-5523 號)。遵循 eBioscience 方案，使用 1×濃縮物及 3 份稀釋劑製備透化/固定緩衝液。將細胞在 RT 下固定 1 h，接著在 1× Perm 洗滌液中洗滌 2 次，且以 300 g/5 分鐘/RT 旋轉沉降。將以下細胞內染色或轉錄因子抗體添加至於

perm 洗滌液(1×)中之樣品中保持 45 mis/暗/RT 或於冰箱中之樣品中隔夜(至多 18 h)，接著使用 Perm 洗滌液(300 µl)將抗體洗滌 2 次且再懸浮於 PBS (250 µl)中以在細胞計數器上獲得：

細胞內標記物	轉錄因子
2 ul IL10-PE	5.5 ul FoxP3-PE-Cy7
2 ul IFNy-PE Vio770	9 ul Tbet-APC
10 ul IL17a-APC	9 ul RoRyt-PE

- 抗 IFNγ-PE Vio770 人類抗體(Miltenyi，目錄號 130-114-025)
- 抗 IL10-PE 人類抗體(Miltenyi，目錄號 130-112-728)
- 抗 IL17a-APC 人類抗體(Miltenyi，目錄號 130-099-202)
- 抗 RoRyt-PE 人類抗體(Miltenyi，目錄號 130-103-837)
- 抗 Tbet-APC 人類抗體(Miltenyi，目錄號 130-098-655
- Foxp3 單株抗體(236A/E7)，Pe cy7 (ebioscience)目錄號 25-4777-41

【0379】 自圖 27 及圖 28 中可以看出，MRx0004 (SP 4)及熱殺死之 MRx0004 (HK 4)之上清液二者皆能夠分別誘導 T 輔助細胞及細胞毒性 T 細胞之分化，即使在缺失誘導分化之細胞介素(無細胞介素)下亦如此。

表

【0380】 *表 1. 用於此研究中之菌株、質體及引子*

菌株	說明	參考
***短雙歧桿菌*菌株**		
MRx0004	短雙歧桿菌人類分離物	此研究
MRx0004 *pGTF*::pORI19	MRx0004 pGTF 插入突變體	此研究
MRx0004 *pGTF*::pORI19 pBC1.2	含有空 pBC1.2 載體之 MRx0004 pGTF 插入突變體	此研究
MRx0004 *pGTF*::pORI19 *pGTF*-pBC1.2	互補 MRx0004 pGTF 插入突變體	此研究
***大腸桿菌*菌株**		
X11 Blue	選殖宿主，tet^r	Stratgene, La Jolla, CA, USA

EC101	選殖宿主，repA$^+$ km^r	[108]
EC101 pWSK29-MRx-M+S	用於藉由 MRx0004 I 型甲基化酶進行活體外甲基化之大腸桿菌菌株	此研究

質體

pORI19	乳球菌 ORI$^+$ RepA$^-$表現載體	[92]
pWSK29	Amp^r，低拷貝數大腸桿菌選殖質體	[109]
pNZ8048	Cm^r，乳酸鏈球菌素誘導型轉譯融合因子	[110]
pAM5	pBC1-pUC19-Tc^r	[111]
pPKCM	含有 rep pCIBA089 之 pblueCm	[112]
pSKEM	含有 rep pCIBA089 之 pblueEm	[96]
pNZEM	EM^r，乳酸鏈球菌素誘導型	Margolles，未公開
pDM1	含有奇黴素抗性盒之 pAM5 衍生物	[113]
pDM2	含有奇黴素抗性盒之 pDG7 衍生物	[97]

引子

引子名稱	序列(5'-3')	參考
PWSK_MRxM+SFxbaI	CGTCCGTCTAGAATAAGGAGG CACTCACCATGAATAAGCAGC AGCTTGC (SEQ ID NO:2)	此研究
PWSK_MRxM+SFxhoI	GCTCTACTCGAGGCGATATGA GGCGAGCTTCACG (SEQ ID NO:3)	此研究
TetWconfirm F2	CAGGCATTGAAGGAATCG (SEQ ID NO:4)	此研究
TetWconfirm F2 +MRx-pGTF-comp	CTGGCTAAGCTTGTGCATGGGC TCAGTCCTTC (SEQ ID NO:5)	此研究

【0381】 *表2. 如藉由奈米LC-MS/MS鑒別之在MRx0004對數後期培養上清液中鑒別的20種具有最高肽譜匹配(PSM)值之蛋白質之列表。*

【0382】 此表列示了在三個生物學重複中鑒別的 PSM 值≥5 之所有蛋白質。

注釋	**正規化 PSM 值[a]**		**功能類別[b]**	**預測定位(評分)[c]**	**MW (kDa)[d]**	**pI[d]**
	平均值	**SD**				
支鏈澱粉酶	351.33	33.62	碳水化合物	E (9.98)	181.9	4.77
NlpC/P60 家族蛋白質	82.00	15.62	n.a.	E (9.72)	33.5	8.18
NlpC/P60 家族蛋白質	71.67	13.61	n.a.	n.d.(3.33)	24.9	6.18
ABC 運輸蛋白系統之可能溶質結合蛋白質	56.00	7.00	n.a.	n.d.(3.33)	32.8	4.69
細胞分裂蛋白質 FtsI	56.00	4.36	細胞分裂及細胞週	CM (9.68)	63.4	5.39

			期			
多重糖 ABC 運輸蛋白，受質結合蛋白質	54.67	4.16	碳水化合物	n.d.(3.33)	49.3	5.01
木酮糖-5-磷酸磷酸酮醇酶	45.33	7.02	n.a.	n.d.(2.5)	92.3	5.26
甲硫胺酸 ABC 運輸蛋白受質結合蛋白質	38.67	2.08	胺基酸及衍生物	CM (9.51)	35.2	5.17
假設蛋白質	35.67	8.33	n.a.	n.d.(2.5)	34.6	7.47
轉醛醇酶	32.67	3.79	碳水化合物	C (7.5)	39.7	4.97
麥芽糖/麥芽糊精 ABC 運輸蛋白	30.00	6.08	碳水化合物	n.d.(3.33)	43.9	4.48
NAD 依賴性甘油醛-3-磷酸去氫酶	30.00	3.61	碳水化合物	C (9.97)	37.8	5.44
假設蛋白質	29.67	4.93	n.a.	CW (9.21)	47.1	5.48
用於肽之 ABC 運輸蛋白系統之溶質結合蛋白質	26.67	1.15	n.a.	CW (9.2)	58.7	5.45
結合二肽之 ABC 運輸蛋白，周質受質結合組分	24.00	4.58	膜運輸	n.d.(5.13)	59.1	5.31
NlpC/P60 家族蛋白質	21.00	1.00	n.a.	E (9.73)	24.5	6.30
FKBP 型肽基-脯胺醯基順反異構酶 FkpA 前驅物	20.00	2.65	鉀代謝	n.d.(5.15)	33.4	5.83
葡萄糖-6-磷酸異構酶	18.67	3.21	碳水化合物	C (9.97)	62.9	4.97
多模式轉肽酶-轉糖苷酶	18.00	2.65	細胞壁及莢膜(Capsule)	CM (10)	81.9	5.72
伴護蛋白質 DnaK	17.67	3.21	蛋白質代謝	C (9.97)	66.9	4.87

【0383】 [a]來自 3 個生物學重複之相對於 1×10^9 cfu 正規化之平均肽譜匹配值及相應標準偏差值。

【0384】 [b]如由 RAST 注釋之子系統類別分配[114、115]。n.a.未指定。

【0385】 [c]如使用 PSORTb v3.0 預測之細胞定位(Yu 等人，2010a)。C：細胞質，CM：細胞質膜，CW：細胞壁，E：細胞外，n.d.：未確定。

【0386】 [d]由 Proteome Discoverer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)計算之參數。MW：分子量，pI：等電點。

【0387】 *表 3. 如藉由奈米 LC-MS/MS 鑒別之在 MRx0004 細胞刮取物中鑒別的*

前 20 種具有最高肽譜匹配(PSM)值之蛋白質之列表。

【0388】　此表列示了 62 種在 MRx0004 刮取及脫落蛋白質級分兩者中鑒別之蛋白質以及 44 種排他性地在 MRx0004 刮取蛋白質級分中鑒別之蛋白質。在 PSM 值≥5 下及三個生物學重複中偵測到列示之蛋白質。

注釋	經刮取蛋白質		脫落蛋白質		功能類別 [b]	預測定位(評分)[c]
	平均 PSM[a]	SD	平均 PSM[a]	SD		
支鏈澱粉酶	136.67	17.47	79.00	10.54	碳水化合物	*E (9.98)*
I 型聚酮合成酶	54.67	10.69	11.67	6.43	未指定	*CM (9.78)*
木酮糖-5-磷酸磷酸酮醇酶	49.67	2.89	52.00	9.17	未指定	*n.a.(2.5)*
細胞分裂蛋白質 FtsI	34.33	9.24	33.00	10.00	細胞分裂及細胞週期	*CM (9.68)*
葡萄糖-6-磷酸異構酶	32.33	2.31	30.33	5.86	碳水化合物	*C (9.97)*
轉譯延伸因子 Tu	32.00	5.00	24.33	8.39	蛋白質代謝	*C (9.97)*
麥芽糖/麥芽糊精 ABC 運輸蛋白，受質結合周質蛋白質 MalE	32.00	7.94	18.67	5.13	碳水化合物	*n.a.(3.33)*
糖原磷酸化酶	31.00	3.00	34.33	5.69	碳水化合物	*C (7.5)*
轉醛醇酶	31.00	2.65	33.33	2.08	碳水化合物	*C (7.5)*
多重糖 ABC 運輸蛋白，受質結合蛋白質	30.00	6.93	36.00	11.79	碳水化合物	*n.a.(3.33)*
丙酮酸甲酸裂解酶	26.67	8.33	21.67	7.77	碳水化合物	*C (9.97)*
用於肽之 ABC 運輸蛋白系統之溶質結合蛋白質	26.00	0.00	12.67	2.89	未指定	*CW (9.2)*
轉酮醇酶	24.00	6.08	23.67	3.79	碳水化合物	*C (7.5)*
甲硫胺酸 ABC 運輸蛋白受質結合蛋白質	23.33	2.52	22.33	4.04	胺基酸及衍生物	*CM (9.51)*
轉譯延伸因子 G	23.00	13.89	15.67	8.02	蛋白質代謝	*C (9.97)*
聚核糖核苷酸核苷酸轉移酶	22.67	5.03	12.33	5.69	未指定	*C (9.97)*
PTS 系統，β-葡萄糖苷特異性 IIB 組分	21.67	4.62	6.67	2.89	未指定	*CM (10)*
FKBP 型肽基-脯胺醯基順反異構酶 FkpA 前驅物	21.33	5.86	7.67	3.06	鉀代謝	*n.a.(5.15)*
伴護蛋白質 DnaK	21.00	6.24	10.00	3.61	蛋白質代謝	*C (9.97)*
ABC 運輸蛋白系統之可能溶質結合蛋白質	20.33	4.04	19.67	2.08	未指定	*n.a.(3.33)*

【0389】 [a]來自 3 個生物學重複之平均肽譜匹配值及相應標準偏差值。n.d.：未偵測到。

【0390】 [b]如由 RAST 注釋之子系統類別分配[116、98]。n.a.未指定。

【0391】 [c]如使用 PSORTb v3.0 預測之細胞定位[117]。C：細胞質，CM：細胞質膜，CW：細胞壁，E：細胞外，n.a.：未指定。

【0392】 *表4. 在MRx0004及EPS^{neg}菌株刮取蛋白質級分中鑒別之宿主相互作用蛋白質的比較。*

【0393】 此表列示了藉由奈米 LC-MS/MS 在經刮取蛋白質級分中在三個生物學重複中且 PSM 值≥5 的情況下鑒別的所選蛋白質。

	MRx0004[a]		**EPS^{neg} [a]**		
說明	**平均正規化 PSM**	**SD**	**平均正規化 PSM**	**SD**	**功能類別 [b]**
I 型聚酮合成酶	28.04	4.47	57.06	2.17	n.a.
轉醛醇酶	17.33	1.44	24.70	0.60	碳水化合物
轉酮醇酶	14.18	2.50	25.40	0.60	碳水化合物
轉譯延伸因子 Tu	13.23	1.64	26.10	4.55	蛋白質代謝
伴護蛋白質 DnaK	12.29	4.33	21.92	2.09	蛋白質代謝
NAD 依賴性甘油醛-3-磷酸去氫酶	11.97	3.32	16.35	1.59	碳水化合物
熱休克蛋白質 60 家族伴護蛋白 GroEL	11.66	6.29	13.92	2.17	蛋白質代謝
烯醇酶	5.04	3.04	8.70	1.59	碳水化合物
磷酸甘油酸變位酶	n.d.	n.d.	5.22	1.04	碳水化合物

【0394】 [a]來自 3 個生物學重複之每 μg 總蛋白質正規化之平均肽譜匹配值及相應標準偏差值(SD)。n.d.：未偵測到肽。

【0395】 [b]如由 RAST 注釋之子系統類別分配[100、98]。n.a.未指定子類別。

【0396】 *表 5. 用於實例 7 中之指示菌株列表*

菌株名稱	**革蘭氏染色**	**說明**
***大腸桿菌* ATCC 11775**	陰性	人類腸道共生
***克留氏肺炎桿菌* NCIMB 10197**	陰性	人類腸道共生之肺病原體
***鼠傷寒沙門氏桿菌* NCIMB**	陰性	人類腸道共生之伺機性病原體

10248		
***胚芽乳桿菌*NCIMB 8826**	陽性	人類腸道共生之密切相關之細菌
***產芽孢梭菌* ATCC 3584**	陽性	遍在之人類腸道共生
***枯草芽孢桿菌*NCIMB 8045**	陽性	人類腸道共生
***金黃色葡萄球菌*NCIMB 9518**	陽性	人類共生之伺機性病原體
***短雙岐桿菌*DSM20213**	陽性	短雙歧桿菌型菌株

【0397】 *表 6. 測試菌株及參考短雙歧桿菌菌株針對一組指示菌株之抗微生物活性(n=3)*

菌株	*大腸桿菌 ATCC 11775*	*克留氏肺炎桿菌 NCIMB 10197*	*鼠傷寒沙門氏桿菌 NCIMB 10248*	*枯草芽孢桿菌 NCIMB 8045*	*短雙岐桿菌 DSM 20213**	*金黃色葡萄球菌 NCIBM 9518**	*產芽孢梭菌 ATCC 3584**	*胚芽乳桿菌 NCIMB 8826**
MRx0004	3	2	2	2*	0	0	0	0
測試 1	1	2	1	2*	0	0	0	0
測試 2	2	2	2	2*	0	0	0	0
測試 3	2	2	2	2*	0	0	0	0
測試 4	1	2	0	1*	0	0	0	0
測試 5	1	1	1	1*	0	0	0	0
測試 6	1	1	1	1*	0	0	0	0
測試 7	2	2	2	1*	0	0	0	0
測試 8	2	1	1	2*	0	0	0	0
測試 9	1	1	1	1	0	0	0	0
測試 10	1	1	1	1	0	0	0	0
測試 11	2	2	2	2	0	0	0	0
測試 12	2	2	2	2	0	0	0	0
短雙岐桿菌 REF1 (DSM 20091)	1	1	1	1	1	0	0	0
短雙岐桿菌 REF2 (DSM 20213)	1	1	0	1	0	0	0	0
短雙岐桿菌 REF6 (JCM 7017)	1	1	1	2	0	0	0	0
短雙岐桿菌 REF7 (NCIMB 8807/UCC 2003)	0	0	0	2	0	0	0	0

實例 12-MRx004 在脾中具有免疫刺激作用。

概述

【0398】　此研究之目的係表徵 MRx0004 在脾中之活體外免疫刺激性質。

材料與方法

【0399】　處理：未處理、10% YCFA 和 10%短雙岐桿菌菌株 MRx0004。

脾細胞之製備

【0400】　自 6 至 8 週齡之雌性 C57BL/6 小鼠分離之脾新製備脾細胞。簡言之，將脾細胞於具有 10% FBS、2 mM L-麩醯胺酸及 100 U/ml 青黴素、100 μg/ml 鏈黴素、55 μM β-巰基乙醇之 RPMI 1640 中以 900,000 個細胞/孔平鋪於 96 孔板中，靜置或用 10%細菌培養基 YCFA+(空白培養基)或用來自靜止 MRx0518 培養物之 10%無細胞細菌上清液刺激，接著在 CO_2 培育箱中於 37°C下培育 72 h。此後收集無細胞上清液，在 4°C下以 500 g 旋轉沉降(spun down) 5 分鐘。接著將樣品收集且儲存在-80°C下用於細胞介素分析。

MTT 分析

【0401】　MTT 分析套組購自 Merck Millipore (目錄號 CT01)。在培育 72 小時後，向各孔中添加 10 μl MTT 溶液，將細胞在 CO_2 培育箱中培育 4 h。此後向各孔中添加 100 μl 異丙醇/0.04 M HCL 溶液且在 560 nm 波長及 655 nm 參考波長下量測吸光度。

細胞介素分析

【0402】　依照製造商建議，使用 26 重小鼠 ProcartaPlex 多重免疫分析(Thermo Fischer Scientific)，進行細胞介素定量。簡言之，將 50 μl 無細胞之共培養上清液用於使用 MAGPIX® MILLIPLEX®系統(Merck)，利用 xPONENT 軟體(Luminex, Austin, TX, USA)進行細胞介素定量。使用 MILLIPLEX®分析軟體(Merck)，利用 5 參數邏輯曲線及背景扣除將平均螢光強度轉換成 pg/ml 值來分析數據。

流式細胞術

【0403】 首先在室溫下在黑暗中用 Viobility 405/520 可固定染料(Miltenyi Biotec Ltd.，Bergisch Gladbach，Germany)將細胞染色 10 分鐘，以區分活細胞及死細胞。接著將其用 CD3、CD4、CD8 及 IFN-γ 之抗體混合物染色以確定細胞表型(Miltenyi REA 抗體)且在室溫下再培育 10 分鐘。接著洗滌細胞且將其再懸浮於 PBS 中，且立即經由流式細胞術分析進行分析。同型用於第一實驗期間之所有抗體以幫助設定門(gate)，且在所有實驗中皆包括 FMO 對照。使用 BD FACS Aria II 進行所有實驗，其中使用 FACSDiva 軟體(BD Biosciences, Reading, UK)在「活」門中對 100,000 個細胞設定用於採集之停止門(stopping gate)。該分析係使用 Flowjo 10.4.2 版軟體(FlowJo LLC, Oregon, USA)進行，且基於用活力染料鑒別之活細胞。

結果

【0404】 使用量測代謝活性之 MTT 分析來評估脾細胞在處理後之活力。圖 29 顯示脾細胞在用 MRx0004 處理後係可存活的。

【0405】 圖 30 顯示用 MRx0004 處理導致脾中多種促炎細胞介素(包括 IL-6、IL-17a IL-22、TNF-α、RANTES、IFN-γ、CCL3、CCL4 及 CXCL2)之增加。此等資料表明活短雙歧桿菌對免疫系統具有刺激作用。MRx0004 活化 CD8+及 CD4+ T 細胞以產生 IFNγ 之能力示於圖 31 中。

【0406】 與實例 2 及 11 中討論之 PBMC 資料組合，此等資料支持來自短雙歧桿菌物種之細菌菌株藉由活化 T 細胞及增加促炎細胞介素之水準在多種組織中刺激免疫系統之能力。

序列

SEQ ID NO：1 (以登錄號 NCIMB 42380 寄存之短雙歧桿菌菌株之一致 16S rRNA 序列)

GGGACAGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTC

GAACGGGATCCATCGGGCTTTGCCTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTG

AGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACG

GGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTTGGGAAAGCC

TTTGCGGCATGGGATGGGGTCGCGTCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAAC

GGCCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCA

CATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG

AATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA

TGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTGTTAGGGAGCAAGGCACTTTG

TGTTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC

GCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGG

GCTCGTAGGCGGTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGT

GGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGA

ATTCCCGGTGTAACGGTGGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATG

GCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG

GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGG

ATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGT

TAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAA

TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCA

ACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGAT

GGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGC

TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCC

CCGTGTTGCCAGCGGATTGTGCCGGGAACTCACGGGGGACCGCCGGGGTT

AACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCCTTACGTCC

AGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGCGC

GAGCTGGAGCGGATCCCTGAAAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGC

AACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAGCAACG

TCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGTCATG

AAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTGCGGGAGGGAGC

CKC

SEQ ID NO:2-5-參見表 1

參考文獻

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[10] WO 2013/050792

[11] WO 03/046580

[12] WO 2013/008039

[13] WO 2014/167338

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

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

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

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

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

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

[20] KR20100135612

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

[22] WO2010/143940

[23] WO2017/209156

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

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

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

[27]

https://www.immunology.org/policy-and-public-affairs/briefings-and-position-statements/immunodeficiency

[28] Marciano and Holland (2017) Review article, Front. Immunol., https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00937

[29] Ren and Torres (2009) *Brain Res Rev.*;60(1):57-64

[30] Martinon *et al.*(2002) *Mol Cell.*;10(2):417-26.

[31] Gaur and Aggarwal (2003).*Biochem Pharmacol.*;66(8):1403-8.

[32] Wang and Lin (2008) *Acta Pharmacol Sin.*; 29(11): 1275–1288.

[33] Bloch *et al.*(2016) *Eur Cytokine Netw.*;27(3):63-67

[34] Dowling and Mansell (2016) *Clin Transl Immunology*.2016 May; 5(5): e85.

[35] Weinberger (2018) *Curr Opin Pharmacol,* 41, 34-41.

[36] Lim (2015)*Aging Cell* 14, 907–915

[37] Li *et al*, (2007) *J Immunol,* 178(8), 5271–5276

[38] Park *et al.,* (2002) *J Immunol*, 169(3), 1433-1443

[39] Berthoud *et al.*(2009) *J Immunol Methods* 340(1) 33-41

[40] Mori *et al.*(2012), *Eur J Immunol* 42, 2709-2719

[41] Lai *et al.*(2018) *Leukemia*, 32(3):801-808.

[42] Barnes *et al.*(2015) *J Immunother Cancer.2015; 3: 1.*.

[43] Glenn and Whartenby (2014) *World J Stem Cells*.; 6(5): 526–539.

[44] Heng *et al.*(2004) *Cardiovasc Res*. 2004 Apr 1;62(1):34-42.

[45] Rashidi *et al.*(2018) *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 24, Issue 6, Pages 1260–1263

[46] Fulop *et al* (2013) *Crit Rev Oncog*.2013;18(6):489-513.

[47] Bektas *et al.*(2017) *J Leukoc Biol.*;102(4):977-988.

[48] Fulop et al (2016) Rev Invest Clin.;68(2):84-91.

[49] Fulop et al.(2018) *Front Immunol*.;8:1960.

[50] Miyamoto-Shinohara *et al.*(2008) *J. Gen. Appl.Microbiol.*, 54, 9–24.

[51] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.

[52] Leslie *et al*.(1995) *Appl.Environ.Microbiol.* 61, 3592–3597.

[53] Mitropoulou *et al.*(2013) *J Nutr Metab*.(2013) 716861.

[54] Kailasapathy *et al.*(2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.

[55] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller

[56] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.(A. R. Gennaro edit.1985)

[57] US 2016/0067188

[58] *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.

[59] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[71] Sambrook *et al.*, 1989

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[81] Kinoshita *et al.*, (2008) *J Appl Microbiol* 104(6), 1667-1674. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03679.x.

[82] Candela *et al.*, (2009) *Microbiology* 155(Pt 10), 3294-3303. doi: 10.1099/mic.0.028795-0.

[83] Candela *et al.*, (2010) *Microbiology* 156(6), 1609-1618.

[84] Gonzalez-Rodriguez *et al.*, (2012) *Appl Environ Microbiol* 78(11), 3992-3998. doi: 10.1128/AEM.08024-11.

[85] Hytönen *et al.*, (2003) *Infection and Immunity* 71(2), 784-793.

[86] Hytönen *et al.,* (2006) *BMC Microbiol* 6, 18. doi: 10.1186/1471-2180-6-18

[87] Wei *et al.*, (2014) *J Proteomics* 108, 89-98. doi: 10.1016/j.jprot.2014.04.038.

[88] O'Connell Motherway *et al.*, (2009) *Microbial Biotechnology* 2(3), 321-332. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00071.

[89] Bottacini *et al.*, (2018) *Scientific Reports* 8(1), 10633. doi: 10.1038/s41598-018-28919-4

[90] Begley *et al.*, (2006) *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 1729-1738.

[91] O'Connell Motherway *et al.*, (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(27), 11217-11222.

[92] McCarville *et al.*, (2017) *Applied and Environmental Microbiology* 83(19), e01323-01317.

[93] Rockwell *et al.*, (1972) *J Natl Cancer Inst*.49:735–49.

[94] Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett*. 11:63–73.

[95] Darlington (1987) *Meth Enzymol*.151:19–38.

[96] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décrêt n°2013-118 1st February 2013.

[97] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition.The National Academies Press; 2011

[98] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep*. 54:143–74.

[99] Workman *et al.*(2010) *Br. J. Cancer*.102:1555–77.

[100] Goering (2010) *Infect Genet Evol* 10, 866–875.

[101] McCartney *et al*., (1996) *Appl Environ Microbiol* 62, 4608–4613.

[102] Roy (1996) *Int J Food Microbiol* 29, 11–29.

[103] Simpson, *et al.*, (2003) *J Clin Microbiol* 33, 2233–2239.

[104] Bourget *et al*., (1993) *FEMS Microbiol Lett* 110, 11–20.

[105] Bottacini *et al*., (2015) *Appl Environ Microbiol* 81, 166–176

[106] Li *et al*.(2007) *J Bacteriol* 189, 6128–6139

[107] Tenover *et al*.(1995) *J Clin Microbiol* 33, 2233–2239

[108] Law *et al.*, (1995) *Journal of Bacteriology* 177(24), 7011-7018.

[109] Wang and Kushner, (1991) *Gene* 100, 195-199.

[110] de Ruyter *et al.*, (1996) *Applied and Environmental Microbiology* 62(10), 3662-3667.

[111] Álvarez-Martín *et al.*, (2007) *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(6), 1395.

[112] Cronin *et al.*, (2007) *Applied and Environmental Microbiology* 73(24), 7858-7866.

[113] O'Connell Motherway *et al*., (2013) *MicrobialBiotechnology* 6(1), 67-79.

[114] Aziz *et al*., 2008 *BMC Genomics* 9, 75. doi: 10.1186/1471-2164-9-75.

[115] Zheng *et al.*, (2014) *PLoS One* 9(5), e95441. doi: 10.1371/journal.pone.0095441.

[116] Overbeek *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(17), 5691-5702.

[117] Yu *et al.*, (2010) *Bioinformatics* 26(13), 1608-1615.

【生物材料寄存】

國外寄存

GB 英國；National Collections of Industria, Food and Marine Bacteria (NCIMB)；2015/03/12；NCIMB 42380

國內寄存

食品工業發展研究所；105 年 9 月 20 日；BCRC 910742

【序列表】

<110> 4D製藥研究有限公司(4D PHARMA RESEARCH LIMITED)

<120> 包含細菌菌株之組合物

<140> 108129383
<141> 2019-08-19

<150> EP18189521.0
<151> 2018-08-17

<150> GB1817648.7
<151> 2018-10-29

<150> GB1900335.9
<151> 2019-01-10

<150> GB1901203.8
<151> 2019-01-29

<160> 5

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1
<211> 1439
<212> DNA
<213> 短雙歧桿菌(Bifidobacterium breve)

<400> 1
gggacaggct caggatgaac gccggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgggatcc 60
atcgggcttt gcctggtggt gagagtggcg aacgggtgag taatgcgtga ccgacctgcc 120
ccatgcaccg gaatagctcc tggaaacggg tggtaatgcc ggatgctcca tcacaccgca 180
tggtgtgttg ggaaagcctt tgcggcatgg gatggggtcg cgtcctatca gcttgatggc 240
ggggtaacgg cccaccatgg cttcgacggg tagccggcct gagagggcga ccggccacat 300
tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg 360
ggcgcaagcc tgatgcagcg acgccgcgtg agggatggag gccttcgggt tgtaaacctc 420
ttttgttagg gagcaaggca ctttgtgttg agtgtacctt tcgaataagc accggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattgggcgt 540
aaagggctcg taggcggttc gtcgcgtccg gtgtgaaagt ccatcgctta acggtggatc 600
cgcgccgggt acgggcgggc ttgagtgcgg taggggagac tggaattccc ggtgtaacgg 660
tggaatgtgt agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggtctctg ggccgttact 720
gacgctgagg agcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc 780
gtaaacggtg gatgctggat gtggggcccg ttccacgggt tccgtgtcgg agctaacgcg 840
ttaagcatcc cgcctgggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg 900
cccgcacaag cggcggagca tgcggattaa ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctggg 960
cttgacatgt tcccgacgat cccagagatg gggtttccct tcggggcggg ttcacaggtg 1020
gtgcatggtc gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca 1080

accctcgccc cgtgttgcca gcggattgtg ccgggaactc acgggggacc gccggggtta 1140
actcggagga aggtggggat gacgtcagat catcatgccc cttacgtcca gggcttcacg 1200
catgctacaa tggccggtac aacgggatgc gacagcgcga gctggagcgg atccctgaaa 1260
accggtctca gttcggatcg cagtctgcaa ctcgactgcg tgaaggcgga gtcgctagta 1320
atcgcgaatc agcaacgtcg cggtgaatgc gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca 1380
agtcatgaaa gtgggcagca cccgaagccg gtggcctaac ccctgcggga gggagcckc 1439

<210> 2
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 引子

<400> 2
cgtccgtcta gaataaggag gcactcacca tgaataagca gcagcttgc 49

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 引子

<400> 3
gctctactcg aggcgatatg aggcgagctt cacg 34

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 引子

<400> 4
caggcattga aggaatcg 18

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> 引子

<400> 5
ctggctaagc ttgtgcatgg gctcagtcct tc 32

【發明申請專利範圍】

【第 1 項】一種包含短雙歧桿菌(*Bifidobacterium breve*)物種之細菌菌株的組合物之用途，其用於製備刺激個體之免疫系統之藥物。

【第 2 項】如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該組合物係用於治療個體之免疫缺乏疾病。

【第 3 項】如申請專利範圍第 2 項之用途，其中該免疫缺乏疾病係原發性免疫缺乏疾病或繼發性免疫缺乏疾病。

【第 4 項】如申請專利範圍第 3 項之用途，其中該原發性免疫缺乏疾病係選自 X 性聯無 γ 球蛋白血症(XLA)、慢性肉芽腫病(CGD)、常見可變性免疫缺乏(CVID)及重症聯合免疫缺乏(SCID)。

【第 5 項】如申請專利範圍第 3 項之用途，其中該繼發性免疫缺乏疾病係選自 AIDS、免疫系統之癌症諸如白血病、免疫複合體性疾病諸如病毒性肝炎多發性骨髓瘤。

【第 6 項】如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該組合物係用作疫苗佐劑。

【第 7 項】如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該組合物係用於治療、預防或延遲免疫衰老。

【第 8 項】如申請專利範圍第 1 項之用途，其中該組合物係用於增強細胞療法，諸如 CAR-T。

【第 9 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該組合物係用於增加 IL-12p70、IFNγ、IL-4、TNF-α 及/或 IL-17α 之表現水準及/或活性。

【第 10 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該組合物係用於刺激 TLR2。

【第 11 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該組合物係用於刺激 NFκB。

【第 12 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株包含完整胞外多醣基因座。

【第 13 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株表現支鏈澱粉酶。

【第 14 項】一種包含短雙歧桿菌物種之細菌菌株的組合物之用途，其用於製備治療或預防細菌感染之藥物。

【第 15 項】如申請專利範圍第 14 項之用途，其中該組合物係用於治療或預防胃腸道細菌感染。

【第 16 項】如申請專利範圍第 14 項或第 15 項之用途，其中該組合物係用於治療或預防革蘭氏(Gram)陰性細菌感染。

【第 17 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株具有與 SEQ ID NO:1 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或 99.9%一致的 16s rRNA 基因序列，或其中該細菌菌株具有由 SEQ ID NO:1 表示之 16s rRNA 基因序列。

【第 18 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株能夠使棉子糖發酵。

【第 19 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株能夠使以下中之一或多種諸如 2 種、3 種、4 種、5 種、6 種或全部 7 種發酵：α-半乳糖苷酶、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶及 β-葡萄糖苷酶、α-阿拉伯糖、甘露糖及棉子糖。

【第 20 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株係以登錄號 42380 寄存在 NCIMB 之菌株；其食品工業發展研究所寄存編號係 BCRC 910742。

【第 21 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該藥物係用於經口投與。

【第 22 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該藥物包含一或多種醫藥學上可接受之賦形劑或載劑。

【第 23 項】如前述申請專利範圍中任一項之用途，其中該細菌菌株係凍乾的。

【第 24 項】一種包含短雙岐桿菌物種之細菌菌株的組合物之用途，其用於製備治療或預防與免疫刺激降低相關之疾病或病狀的藥物。

【第 25 項】一種包含如申請專利範圍第 1 項至第 19 項中任一項定義之細菌菌株之細胞的組合物，其中該細胞表現一或多種異源抗原。

【第 26 項】如申請專利範圍第 25 項之組合物，其中該細胞呈現該一或多種異源抗原。

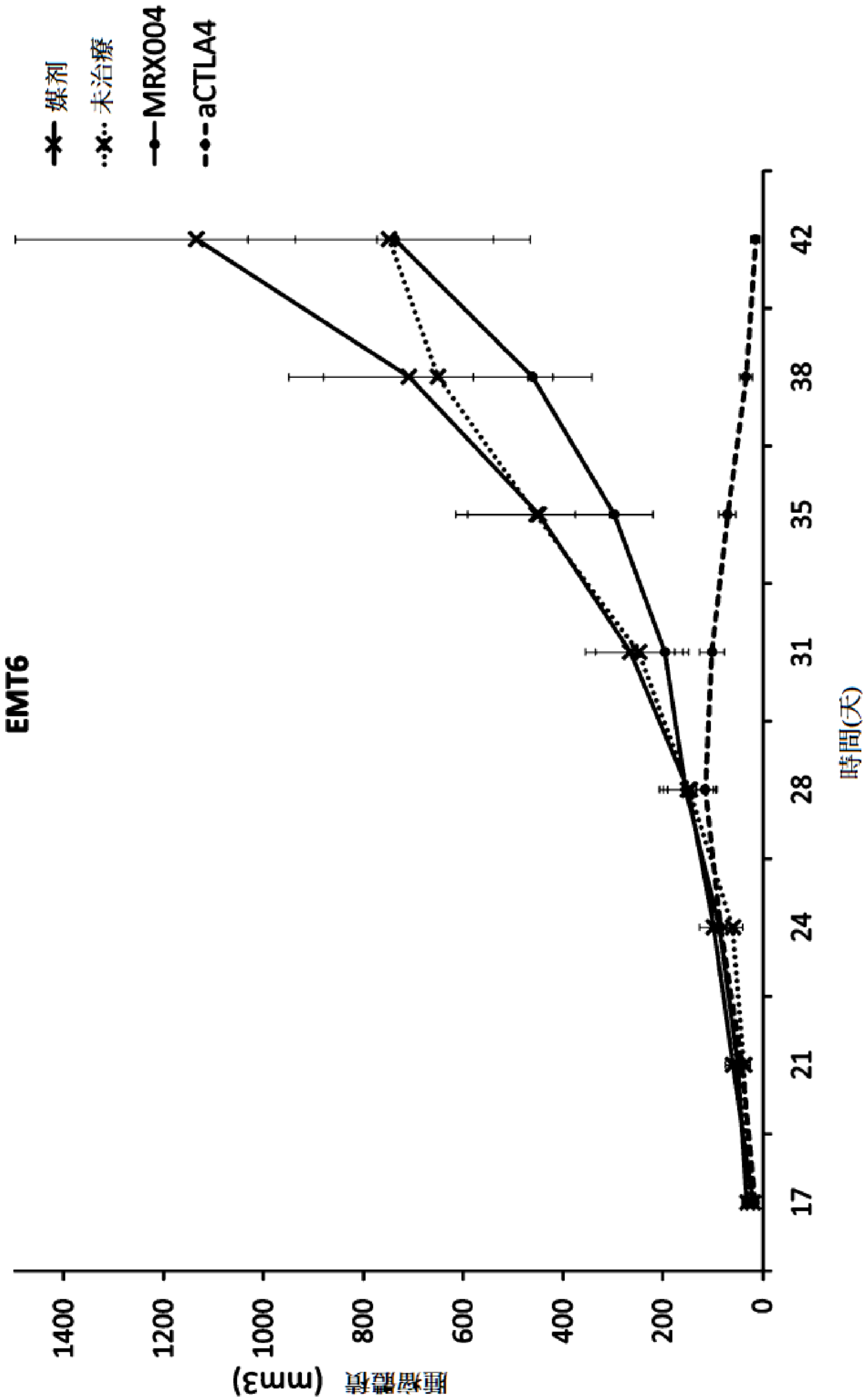
【第 27 項】如申請專利範圍第 25 項或第 26 項之組合物，其用作疫苗。

【第 28 項】一種如申請專利範圍第 1 項至第 23 項中任一項定義之細菌菌株的細胞，其中該細胞表現一或多種異源抗原。

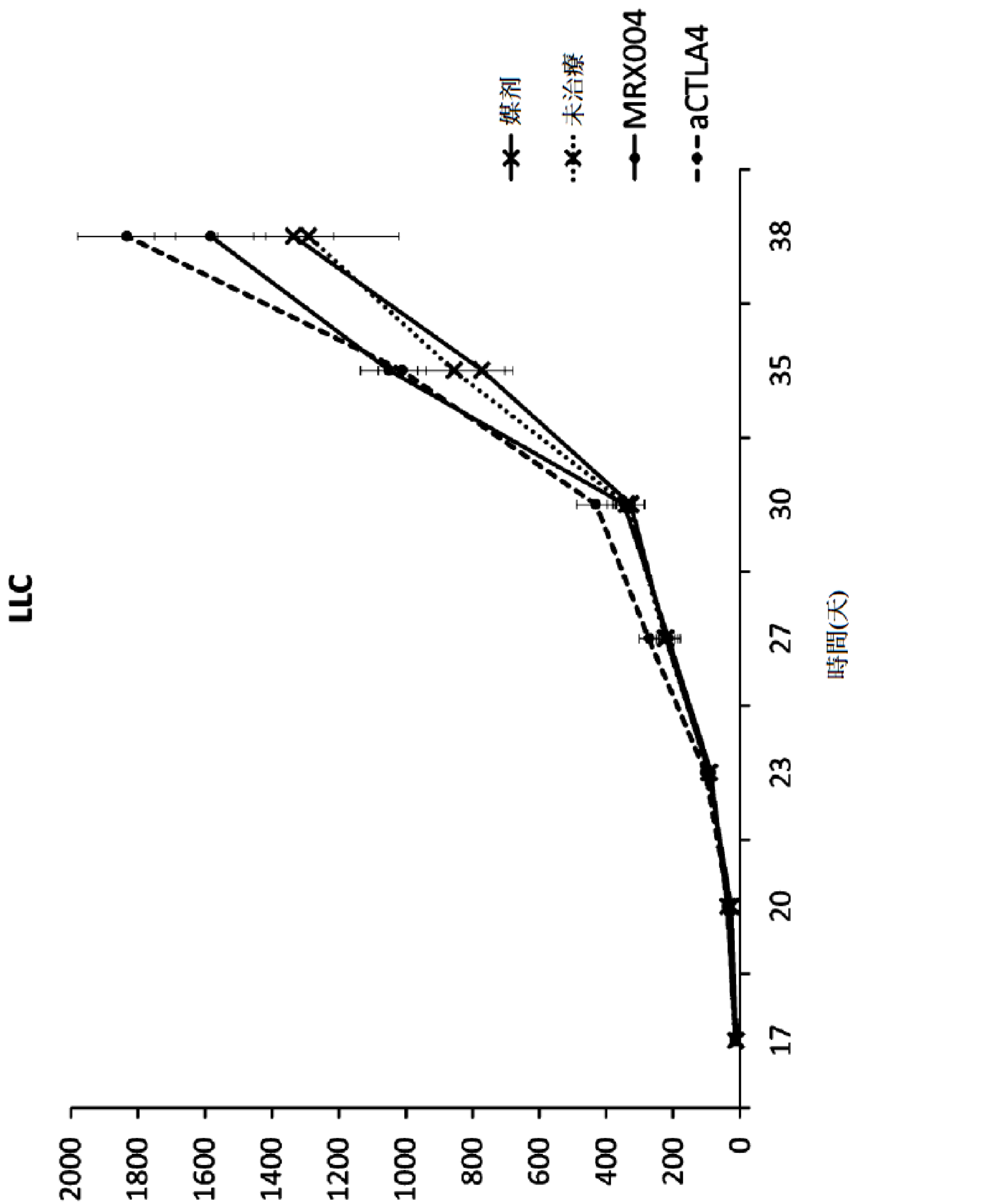
【第 29 項】如申請專利範圍第 28 項之細胞，其中該細胞呈現該一或多種異源抗原。

【第 30 項】如申請專利範圍第 28 項或第 29 項之細胞，其用作疫苗。

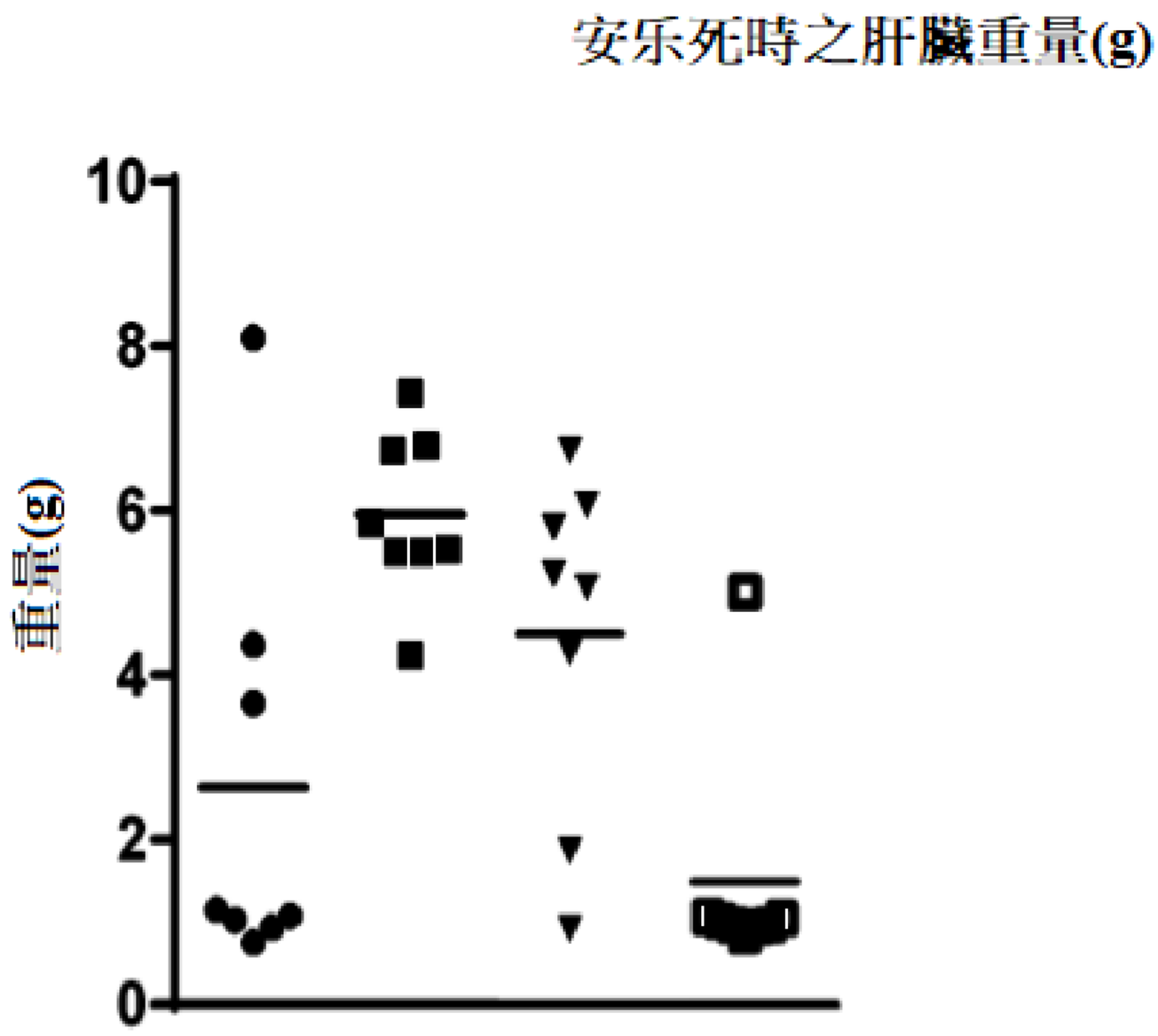
【發明圖式】


媒剂
未治療
MRX004
aCTLA4
EMT6
腫瘤體積 (mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
17
21
24
28
31
35
38
42
時間(天)

【圖 1】


媒剂
未治療
MRX004
aCTLA4
LLC
時間(天)
腫瘤體積 (mm3)
17
20
23
27
30
35
38
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000

【圖 2】



● G1未治療

■ G2媒劑(培養基) PO Q1Dx42

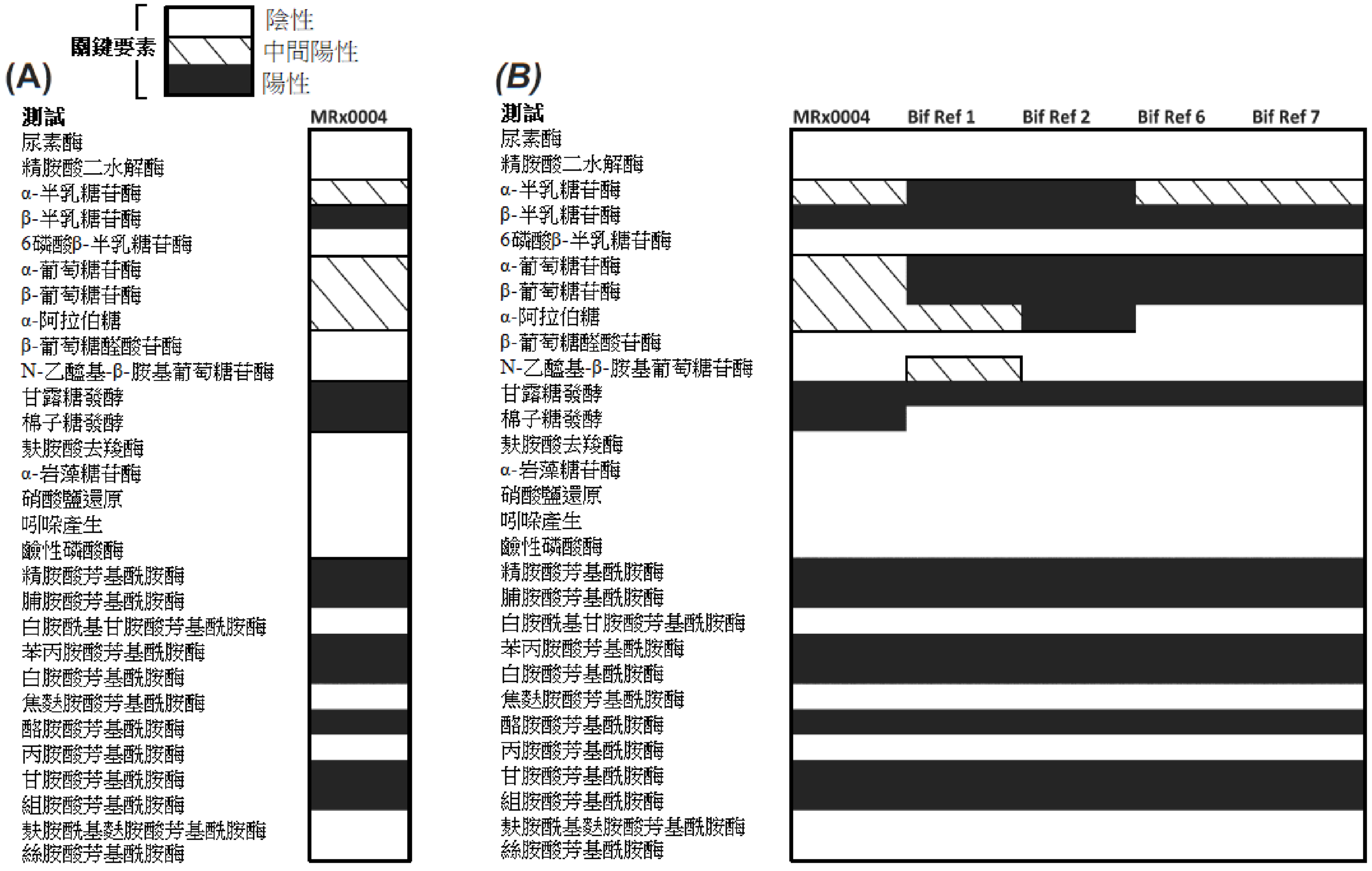
▼ G4 細菌菌株2號 (MRX004) 2×10e8個細菌PO Q1Dx42

◘ G7 抗-CTLA4 10 mg/kg IP TWx2

【圖 3】

【圖 4】

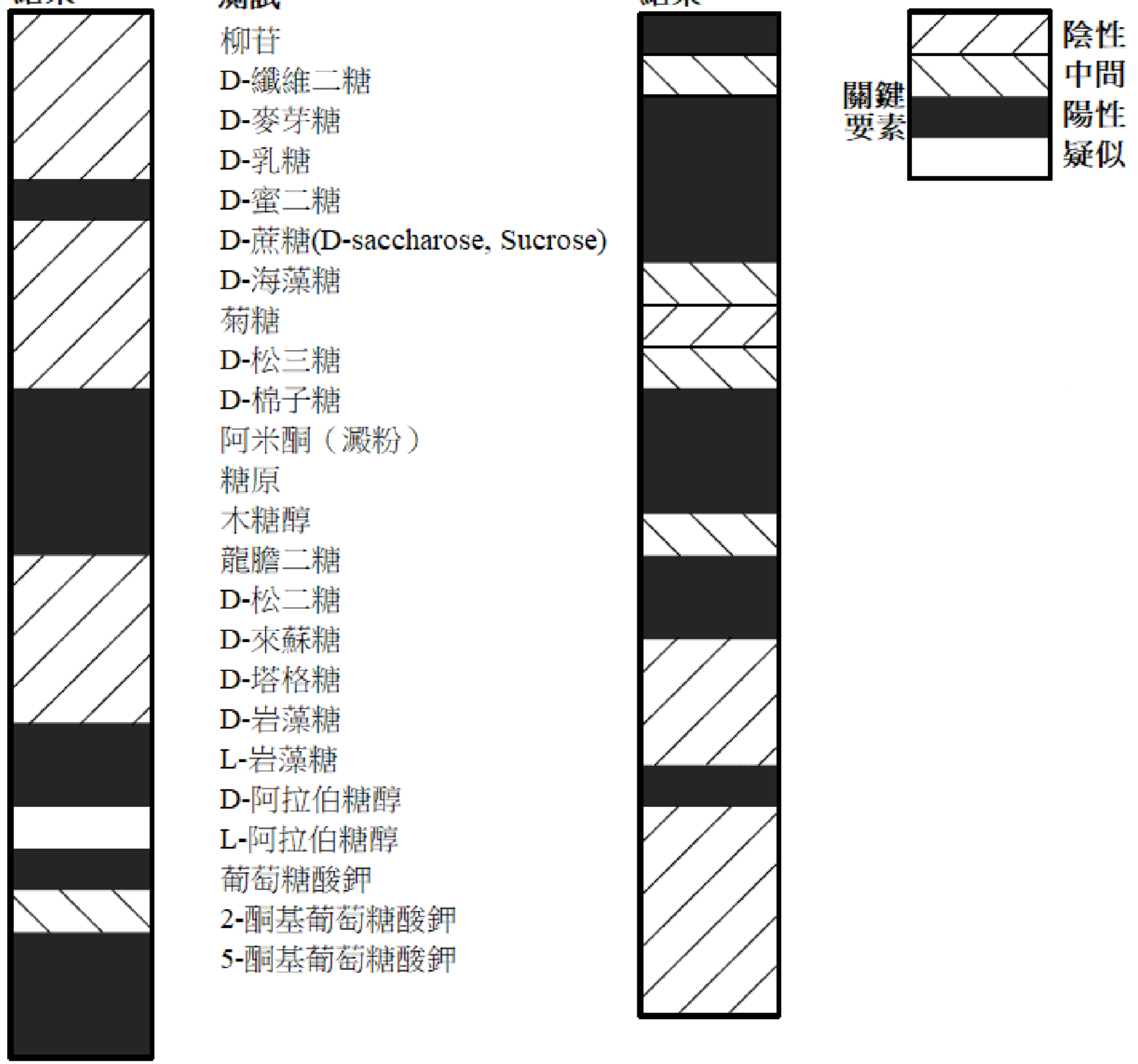
MRX004 相對於短雙歧桿菌型菌株之Rapid ID 32 A谱



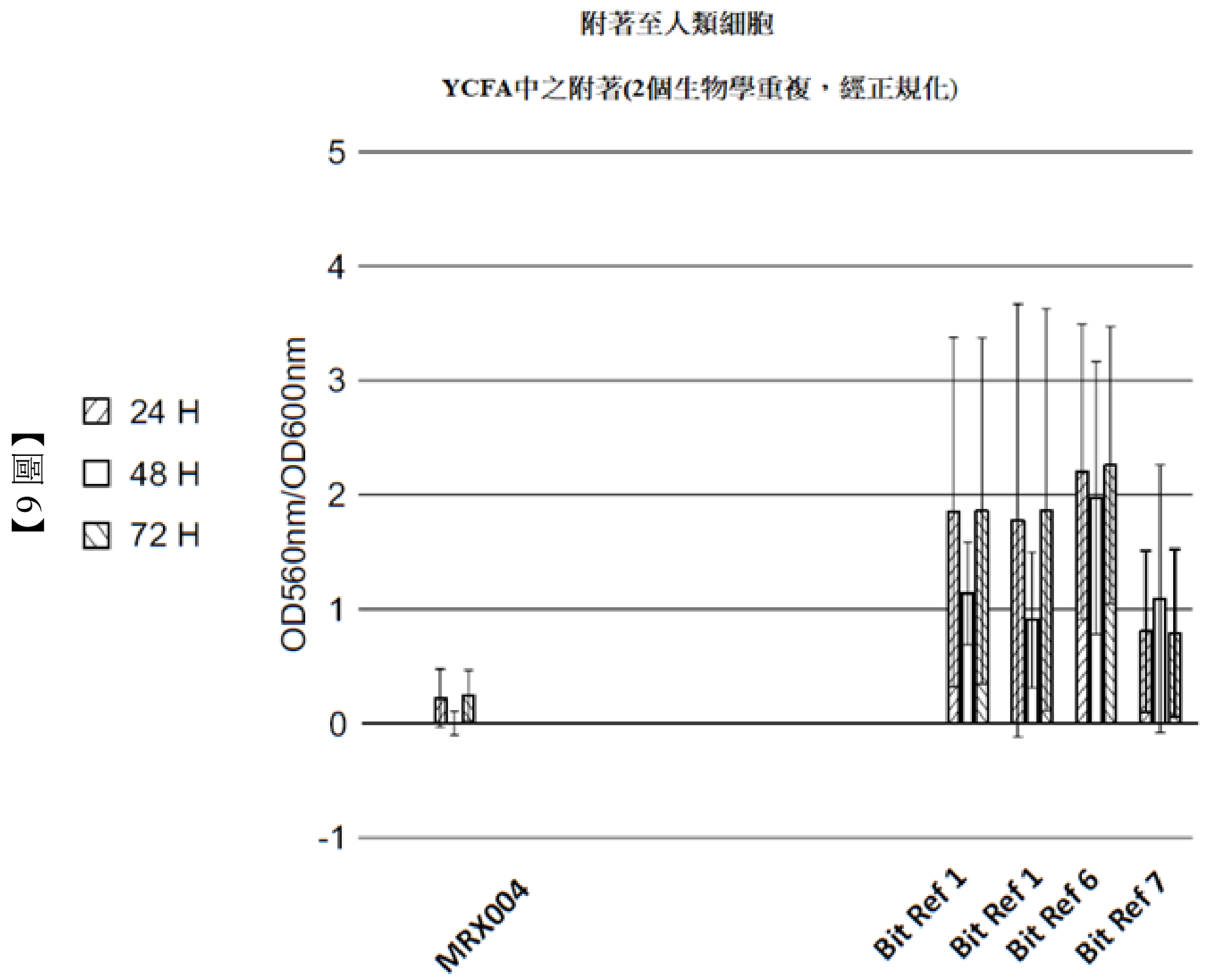
【圖 5】

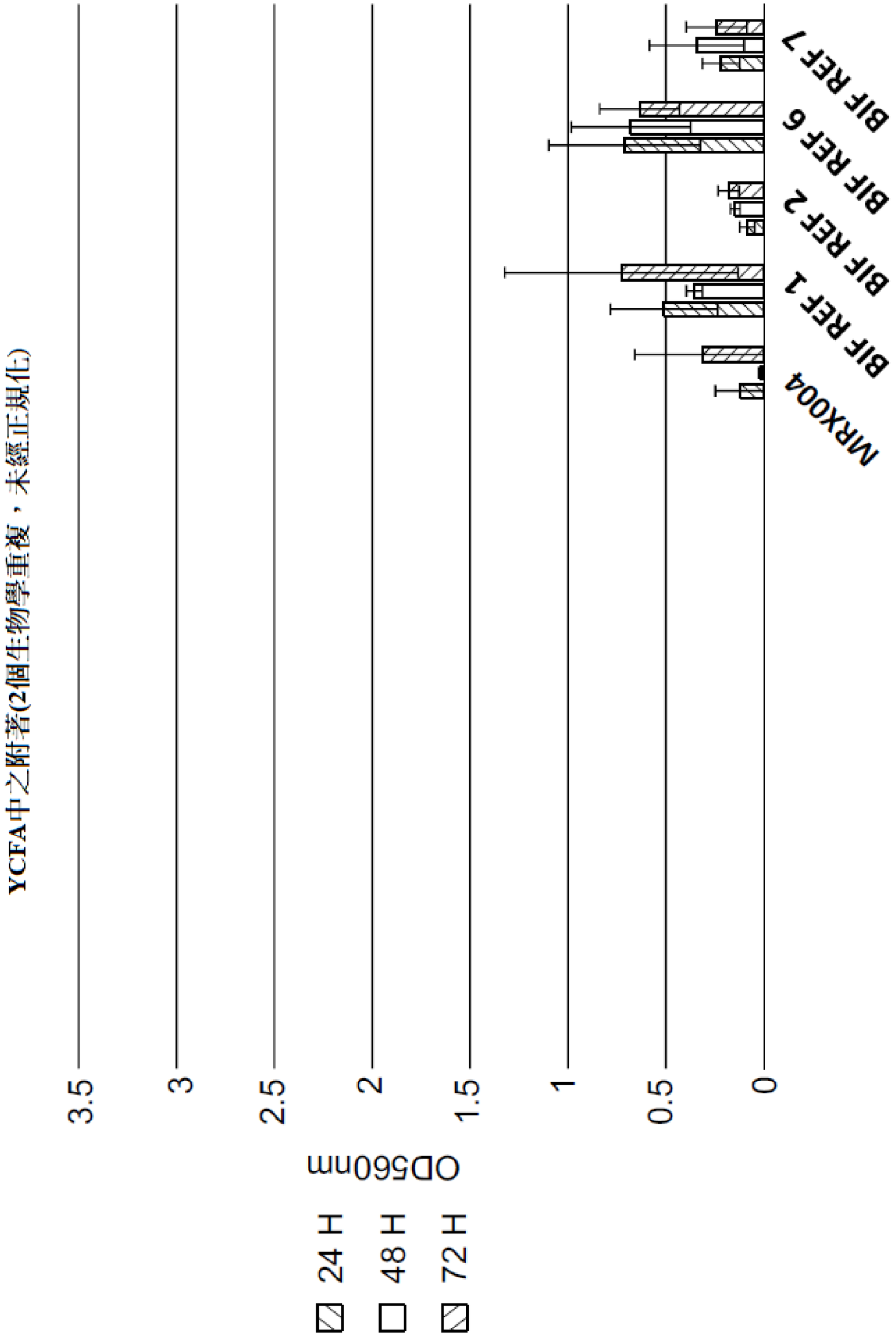
MRX004之API® 50 CH分析

測試	結果
甘油	
赤蘚糖醇	
D-阿拉伯糖	
L-阿拉伯糖	
D-核糖	
D-木糖	
L-木糖	
D-福壽草醇	
甲基β-D-木吡喃糖苷	
D-半乳糖	
D-葡萄糖	
D-果糖	
D-甘露糖	
L-山梨糖	
L-鼠李糖	
甜醇	
肌醇	
D-甘露糖醇	
D-山梨糖醇	
甲基α-D-甘露吡喃糖苷	
甲基α-D-葡萄吡喃糖苷	
N-乙酰基葡萄糖胺	
苦杏仁苷	
熊果苷	
七葉苷	
柳苷	
D-纖維二糖	
D-麥芽糖	
D-乳糖	
D-蜜二糖	
D-蔗糖(D-saccharose, Sucrose)	
D-海藻糖	
菊糖	
D-松三糖	
D-棉子糖	
阿米酮（澱粉）	
糖原	
木糖醇	
龍膽二糖	
D-松二糖	
D-來蘇糖	
D-塔格糖	
D-岩藻糖	
L-岩藻糖	
D-阿拉伯糖醇	
L-阿拉伯糖醇	
葡萄糖酸鉀	
2-酮基葡萄糖酸鉀	
5-酮基葡萄糖酸鉀	

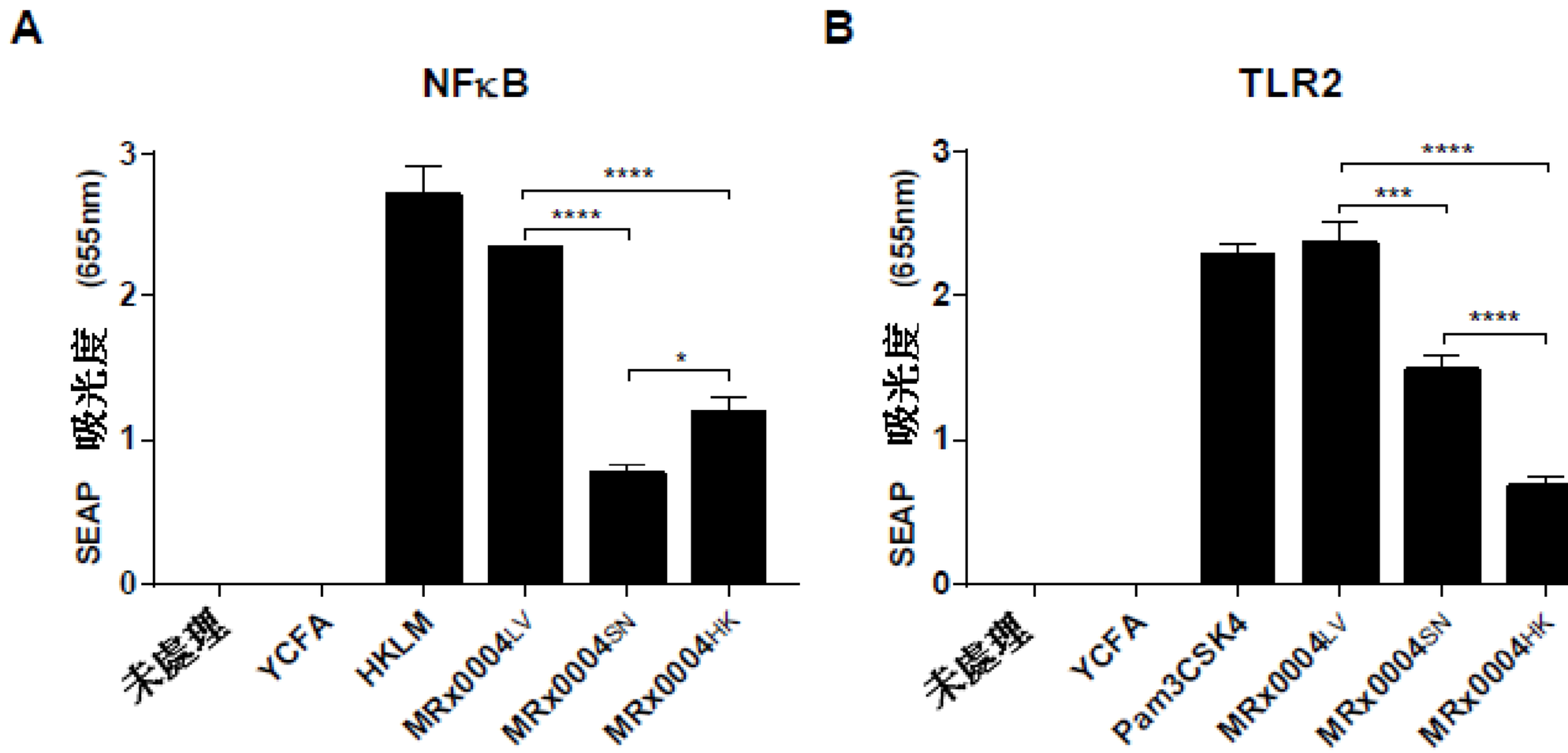


【圖6】

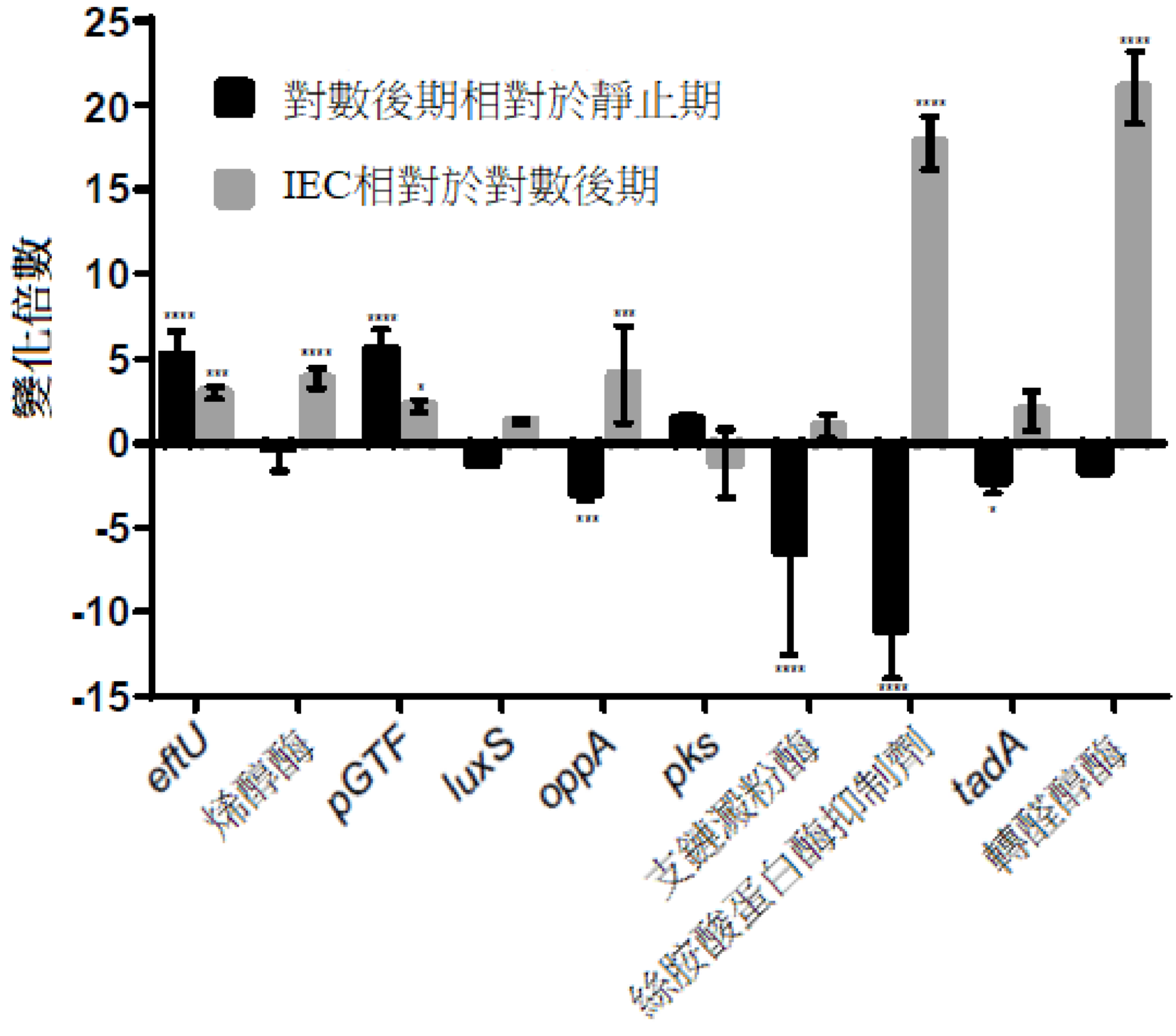

附著至人類細胞
YCFA中之附著(2個生物學重複，經正規化)
24 H
48 H
72 H
OD560nm/OD600nm
5
4
3
2
1
0
-1
MRX004
Bit Ref 1
Bit Ref 1
Bit Ref 6
Bit Ref 7


附著至人類細胞
YCFA中之附著(2個生物學重複，未經正規化)
OD560nm
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
24 H
48 H
72 H
MRX004
BIF REF 1
BIF REF 2
BIF REF 6
BIF REF 7

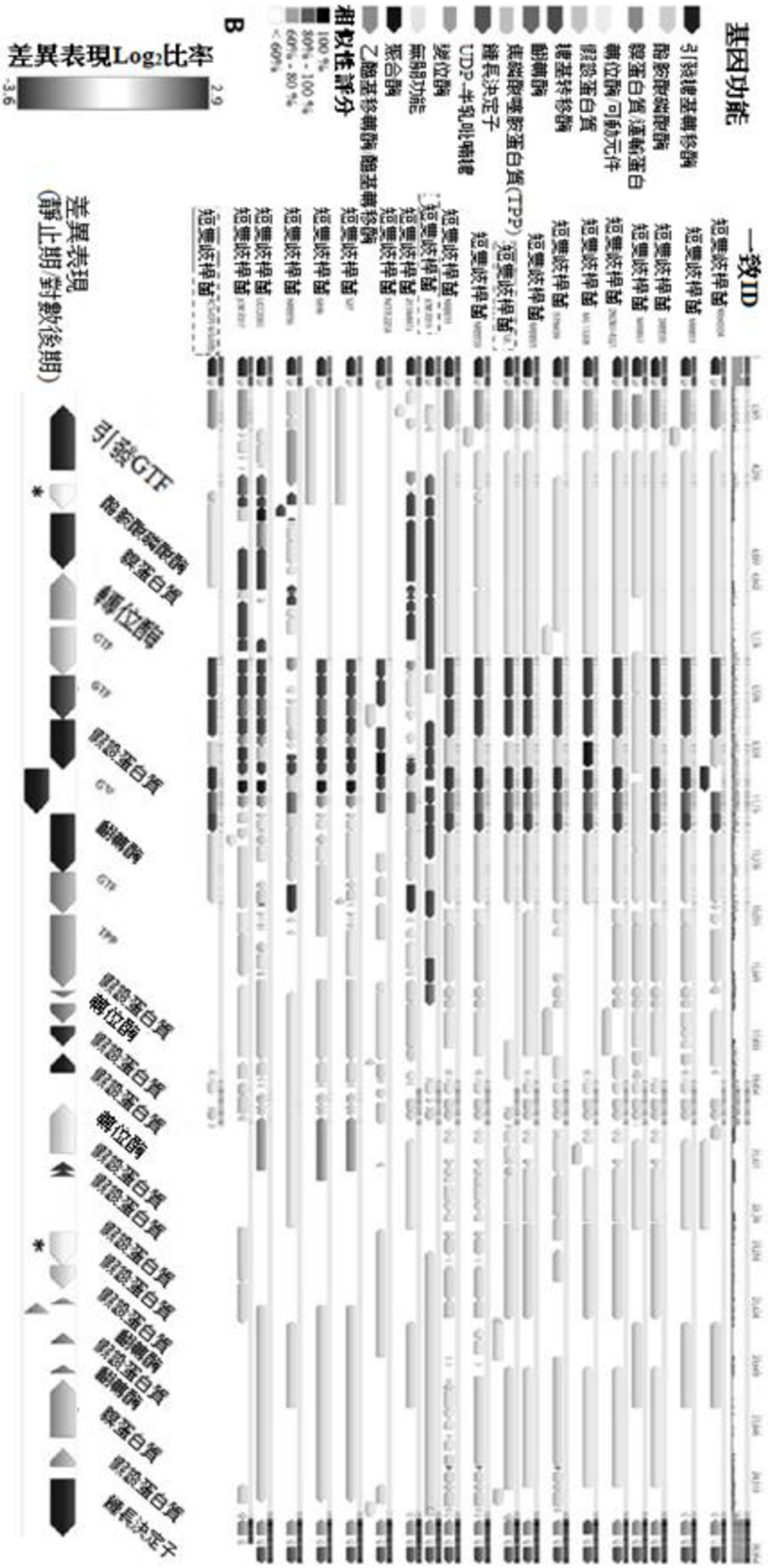
【圖 6(續)】


A
NFκB
SEAP 吸光度 (655nm)
0
1
2
3
****
****
*
未處理
YCFA
HKLM
MRx0004LV
MRx0004SN
MRx0004HK
B
TLR2
SEAP 吸光度 (655nm)
0
1
2
3
****
***
****
未處理
YCFA
Pam3CSK4
MRx0004LV
MRx0004SN
MRx0004HK

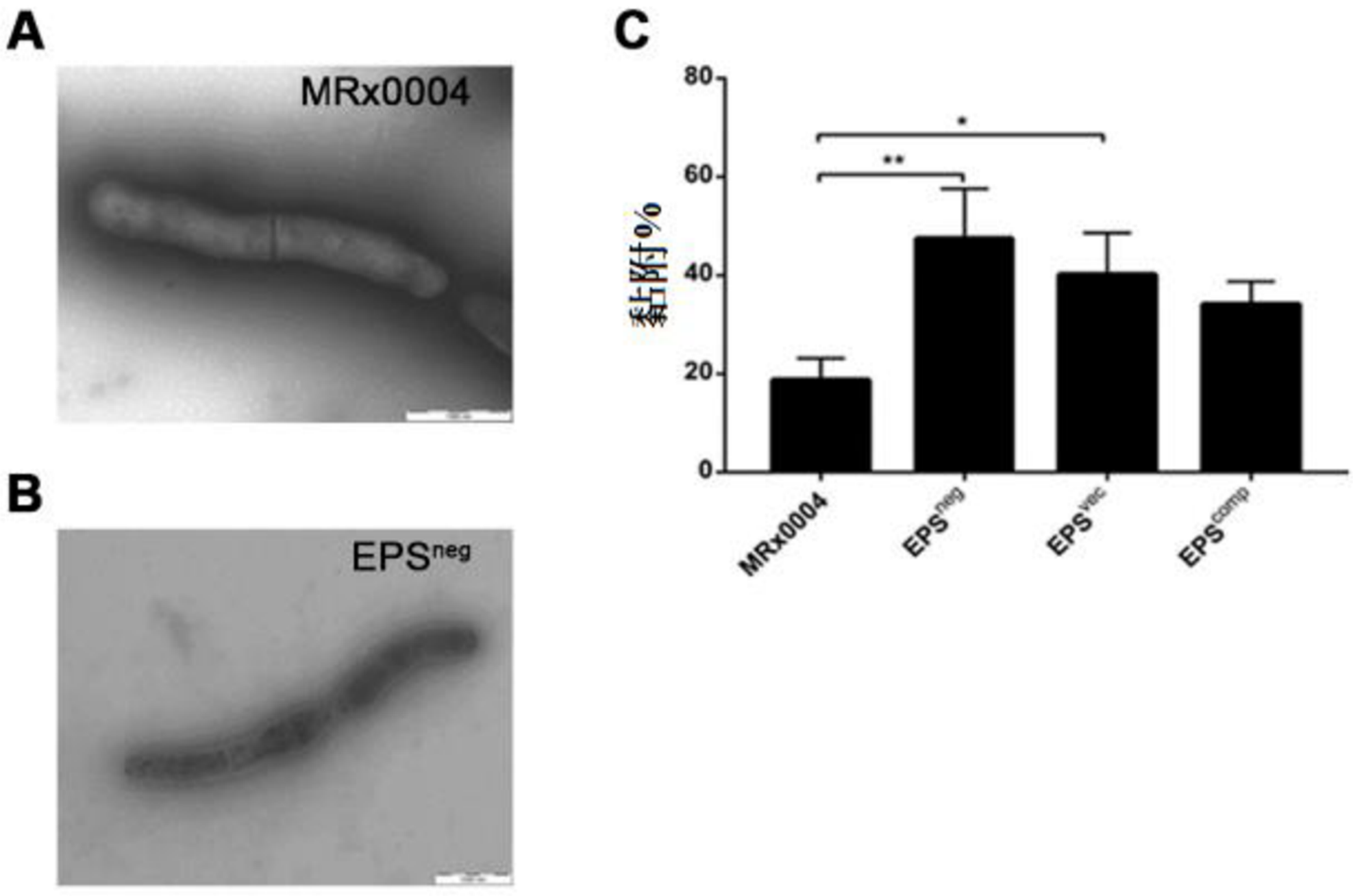
【圖 7】


對數後期相對於靜止期
IEC相對於對數後期
變化倍數
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
eftU
烯醇酶
pGTF
luxS
oppA
pks
支鏈澱粉酶
絲胺酸蛋白酶抑制劑
tadA
轉錄終止因子

【圖 8】

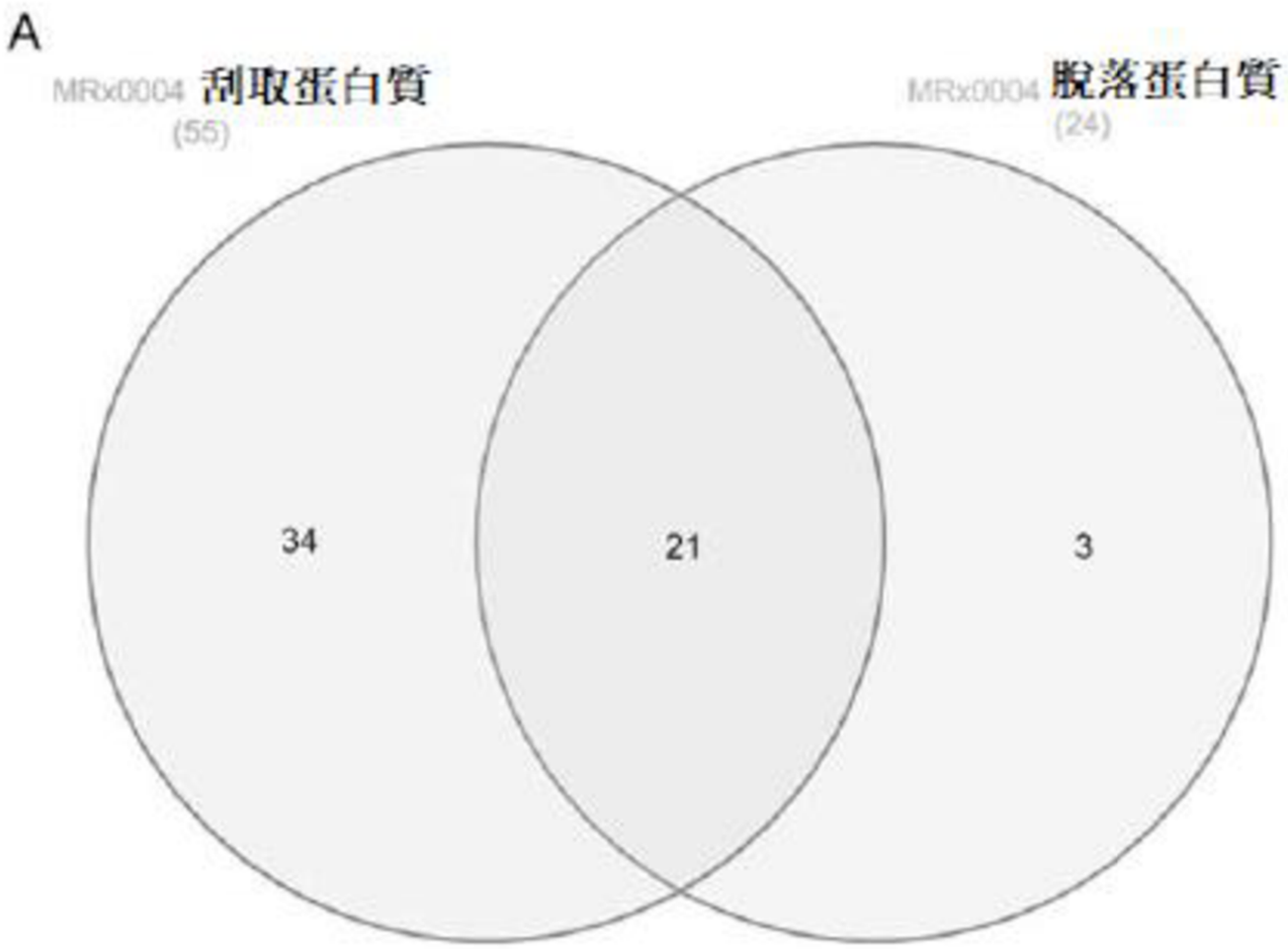

A
基因功能
引發GTF
酚新酸磷酸酶
膜蛋白質
轉位酶
GTP
GTP
膜蛋白質
轉位酶
膜蛋白質
膜蛋白質
轉位酶
膜蛋白質
膜蛋白質
膜蛋白質
膜蛋白質
翻轉酶
膜蛋白質
翻轉酶
膜蛋白質
翻轉酶
膜蛋白質
膜蛋白質
膜長決定子
一致ID
短重疊群
B
差異表現Log2比率
2.9
-3.6
相似性評分
100 %
90% - 100 %
60% - 80 %
<60%
差異表現
(靜止期/對數後期)

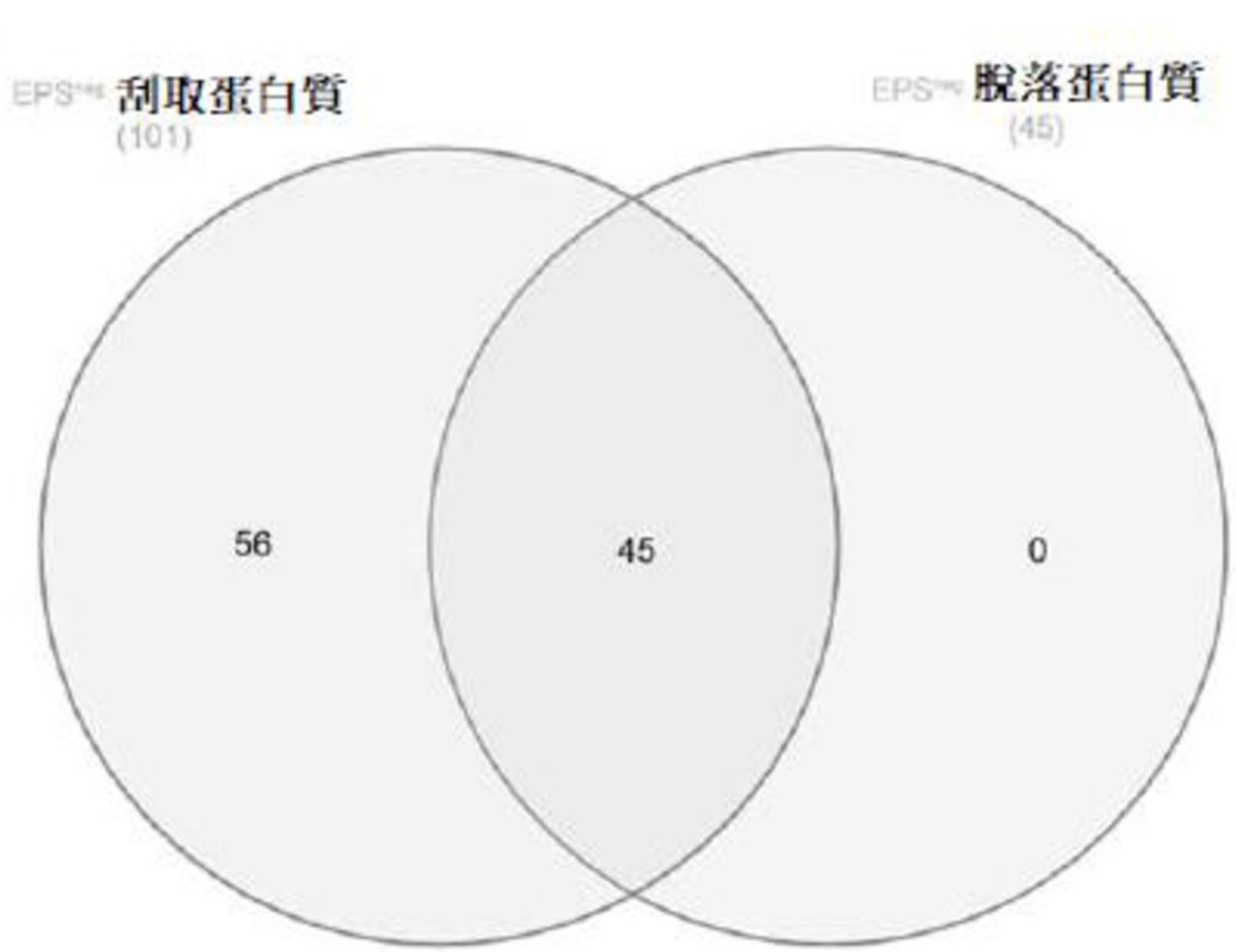
【圖 9】

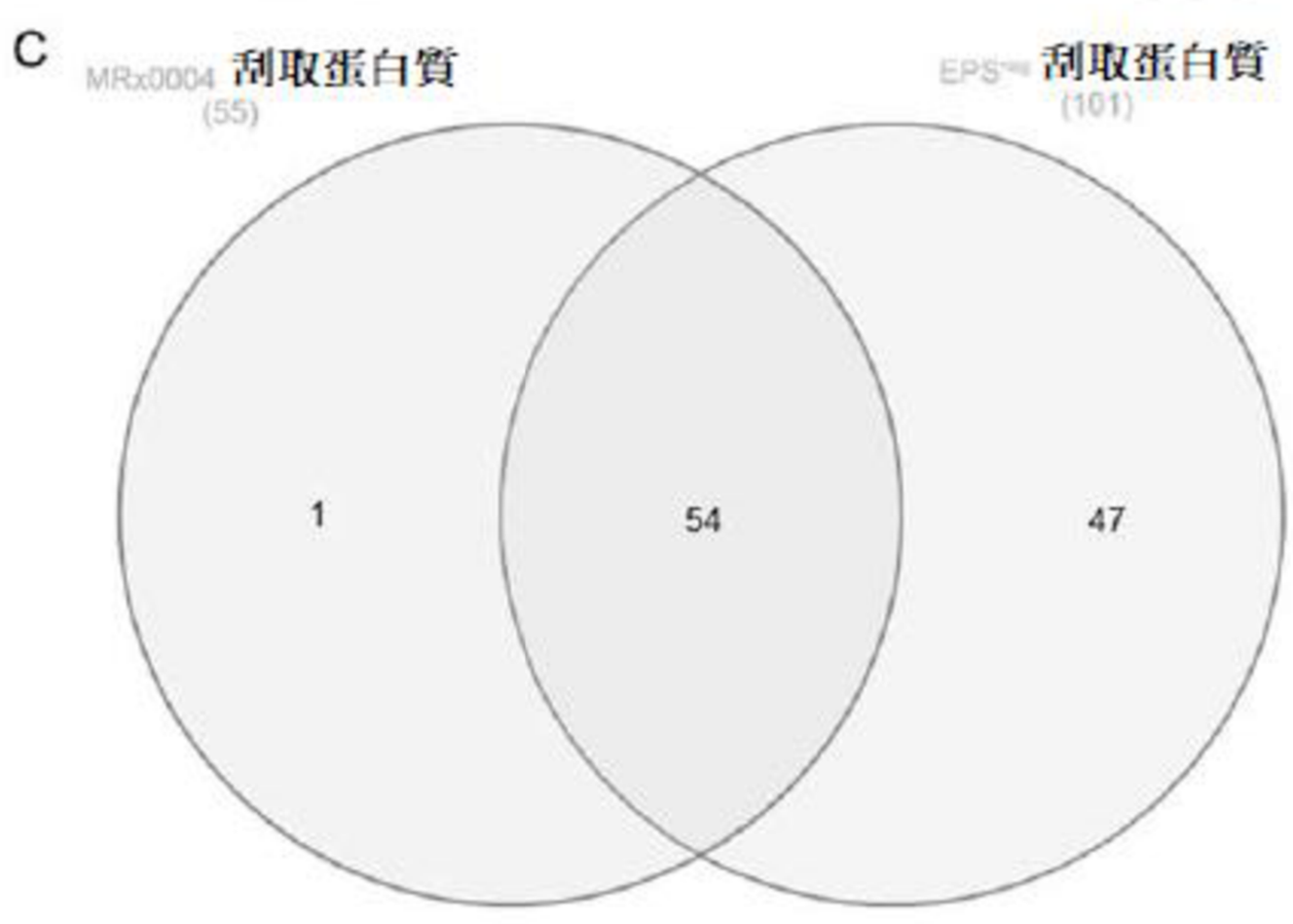

A
MRx0004
B
EPSneg
C
黏附%
80
60
40
20
0
*
**
MRx0004
EPSneg
EPSvec
EPScomp

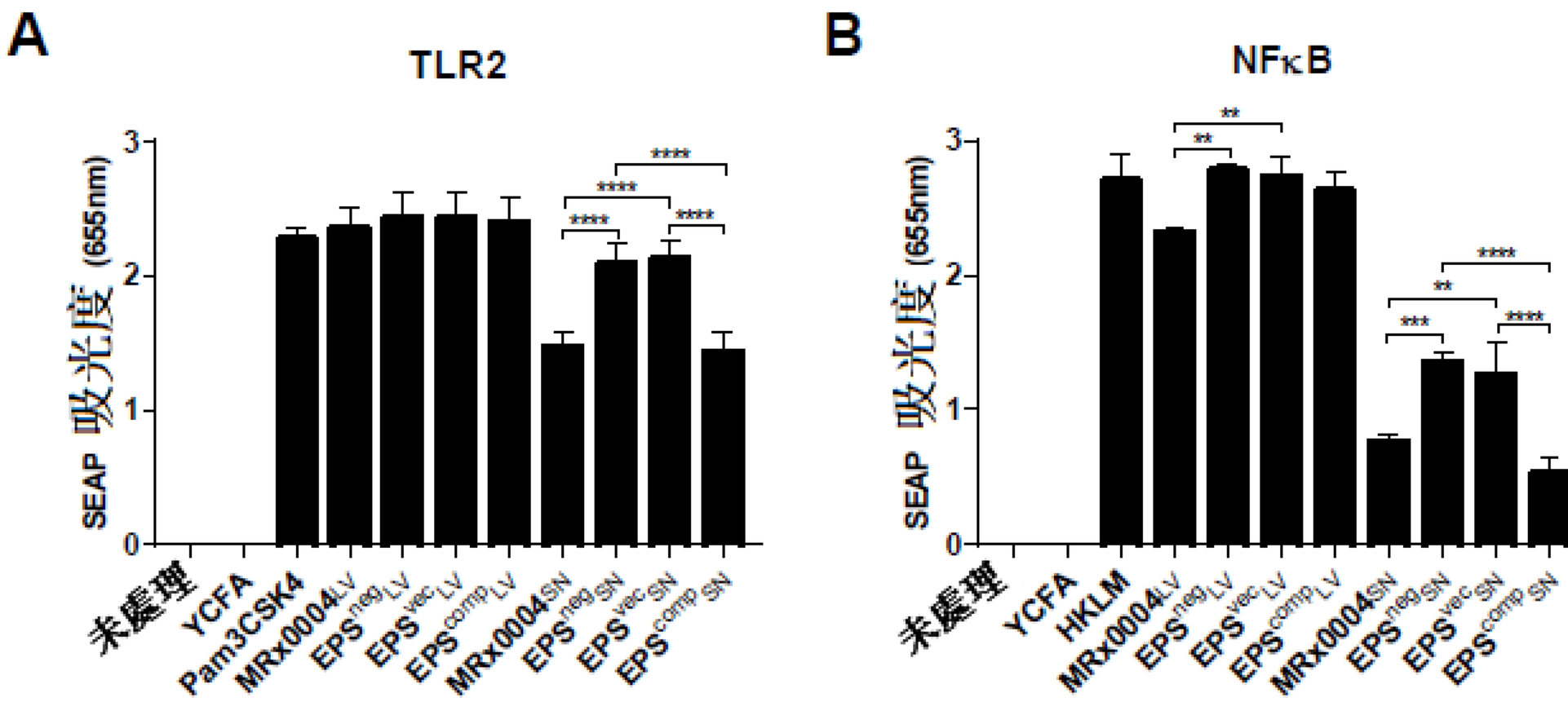
【圖 10】

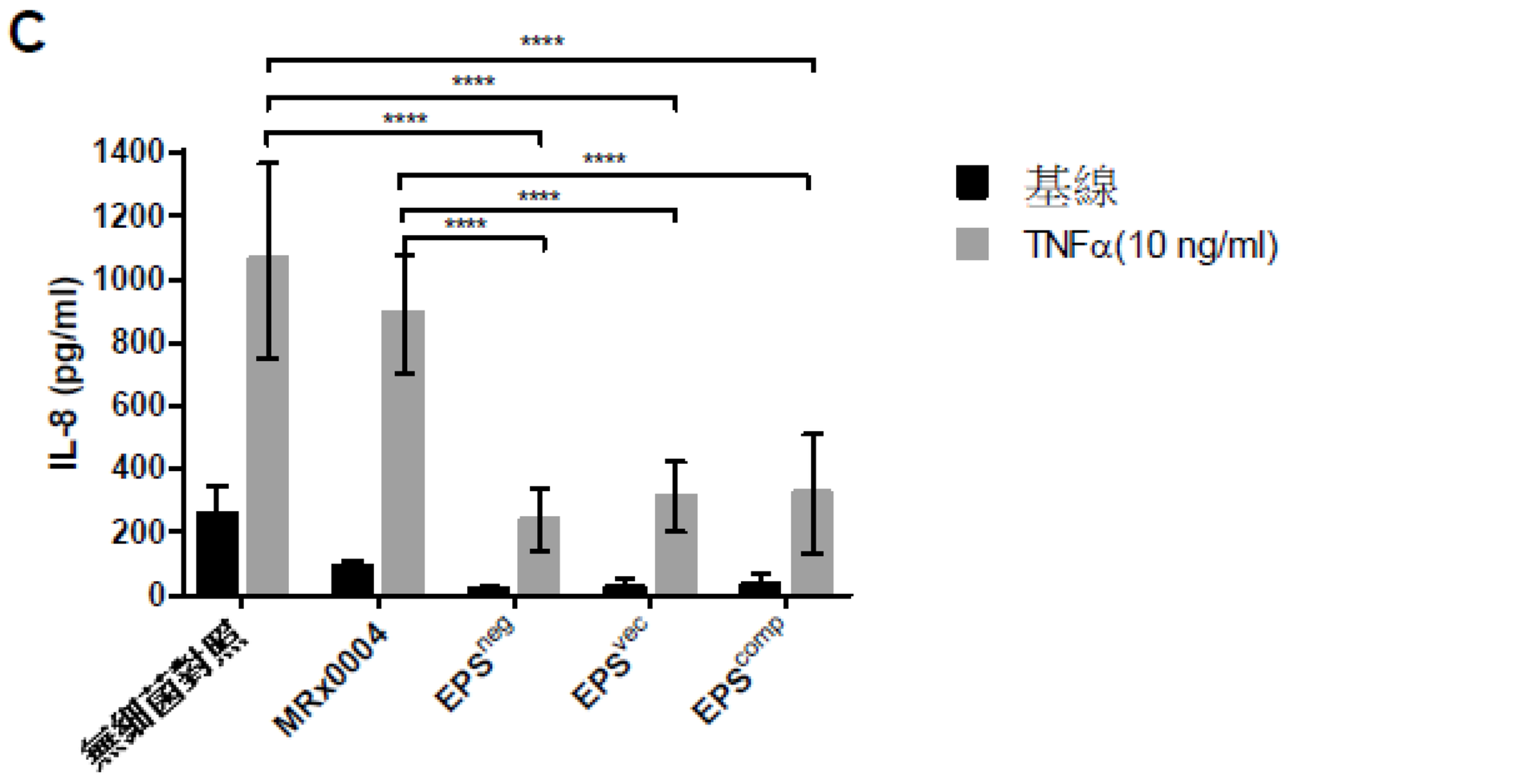
【圖11】


A
MRx0004 刮取蛋白質
(55)
MRx0004 脫落蛋白質
(24)
34
21
3

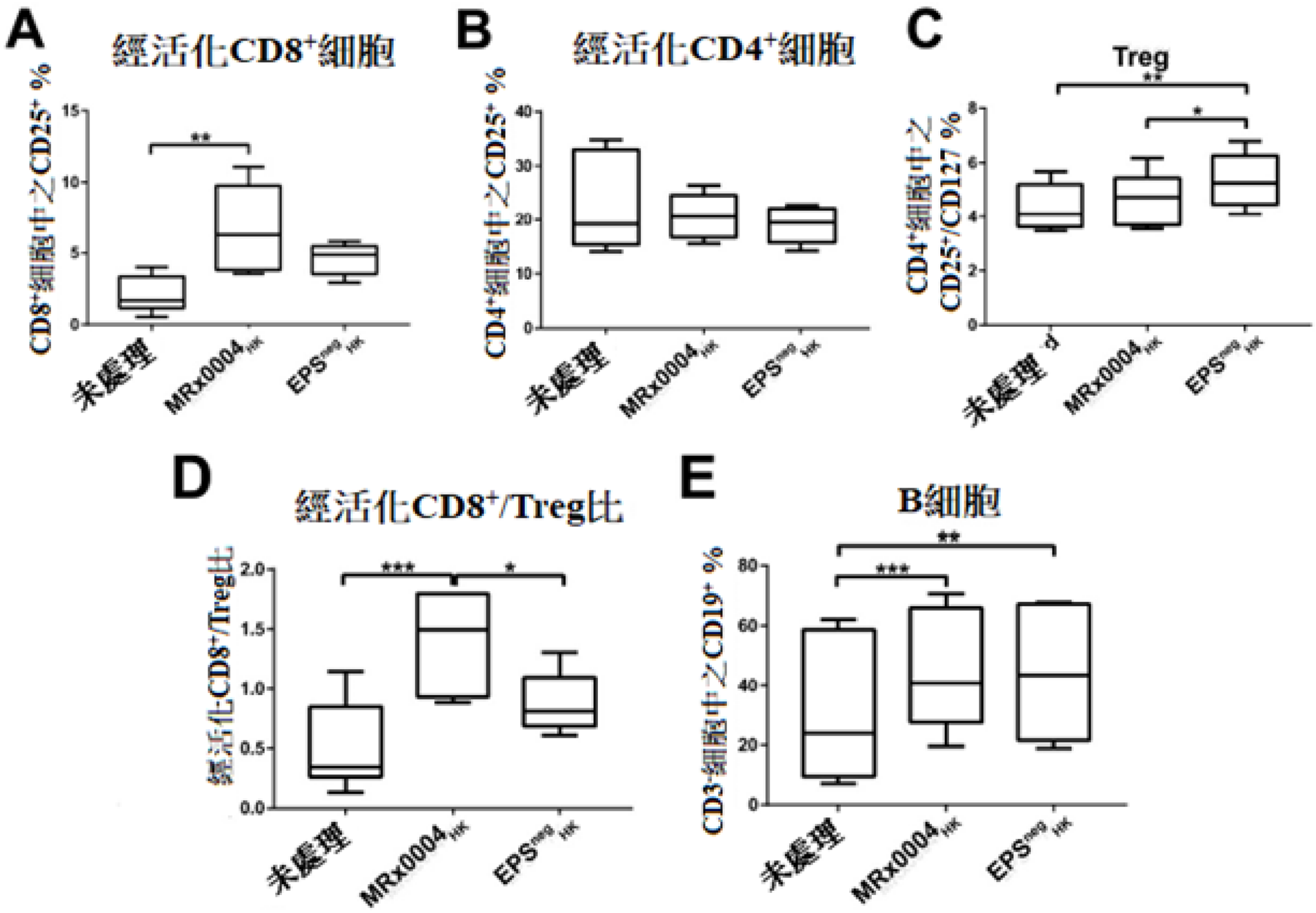

B
EPS™ 刮取蛋白質
(101)
EPS™ 脫落蛋白質
(45)
56
45
0


C
MRx0004 刮取蛋白質
(55)
EPS™ 刮取蛋白質
(101)
1
54
47

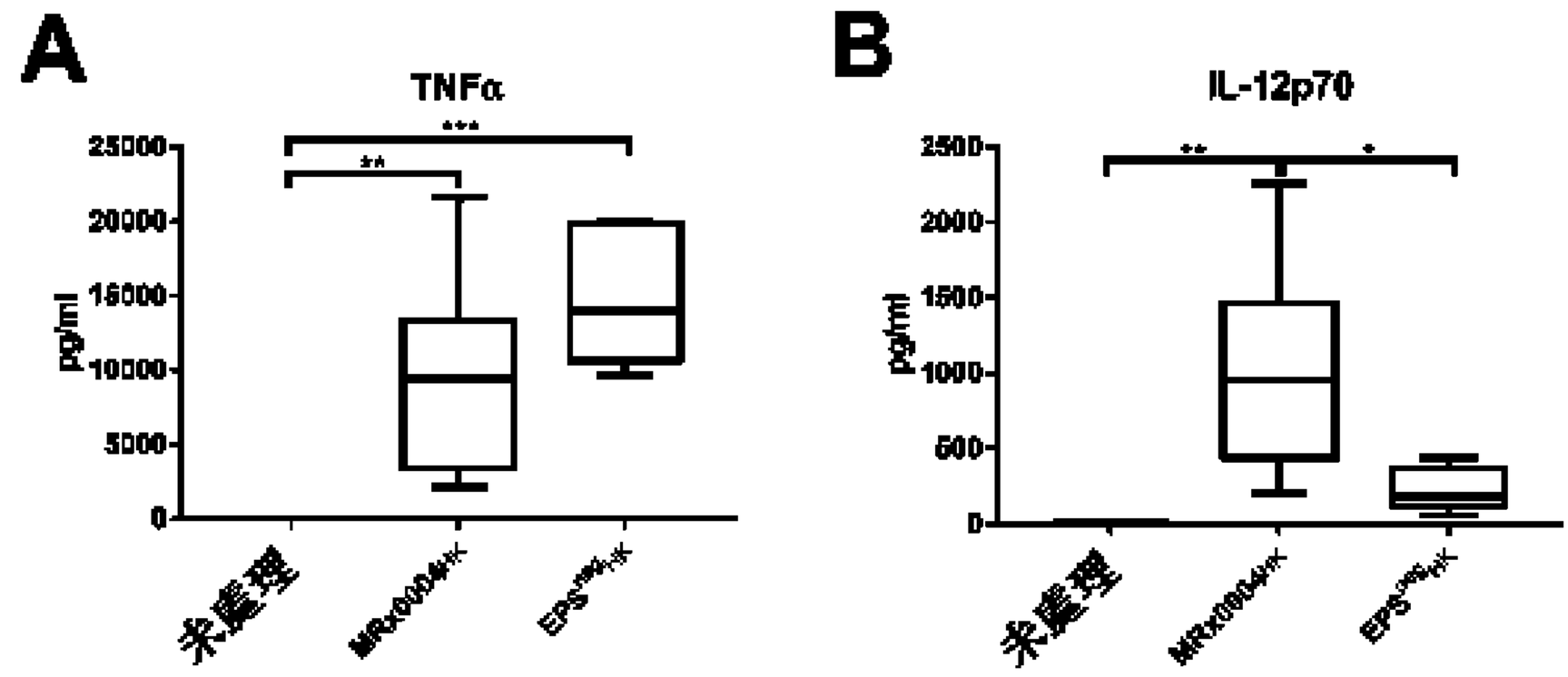

A
TLR2
SEAP 吸光度 (655nm)
0
1
2
3
****
****
****
****
未處理
YCFA
Pam3CSK4
MRx0004LV
EPSnegLV
EPSvecLV
EPScompLV
MRx0004SN
EPSnegSN
EPSvecSN
EPScompSN
B
NFκB
SEAP 吸光度 (655nm)
0
1
2
3
**
**
***
**
****
****
未處理
YCFA
HKLM
MRx0004LV
EPSnegLV
EPSvecLV
EPScompLV
MRx0004SN
EPSnegSN
EPSvecSN
EPScompSN

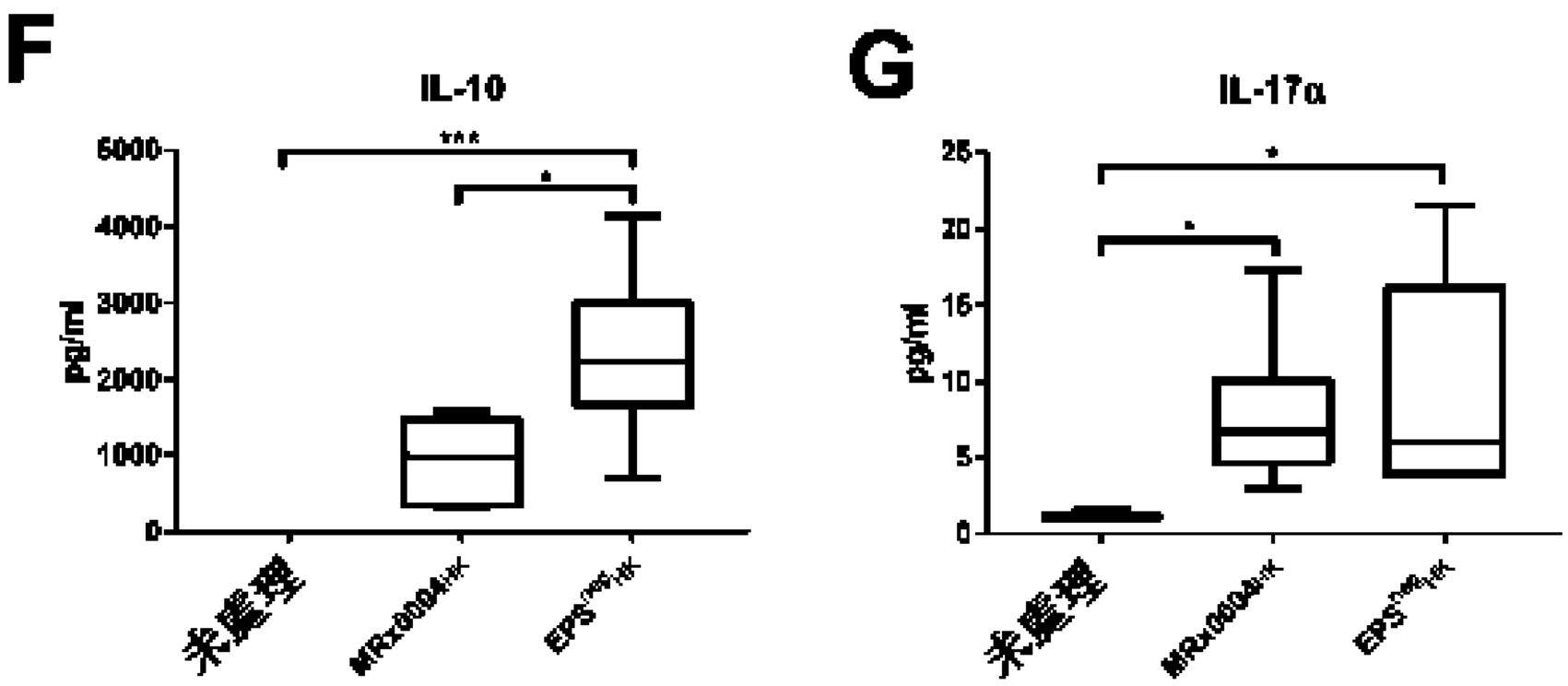

C
IL-8 (pg/ml)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
****
****
****
****
****
****
基線
TNFα(10 ng/ml)
無細菌對照
MRx0004
EPSneg
EPSvec
EPScomp

【圖 12】

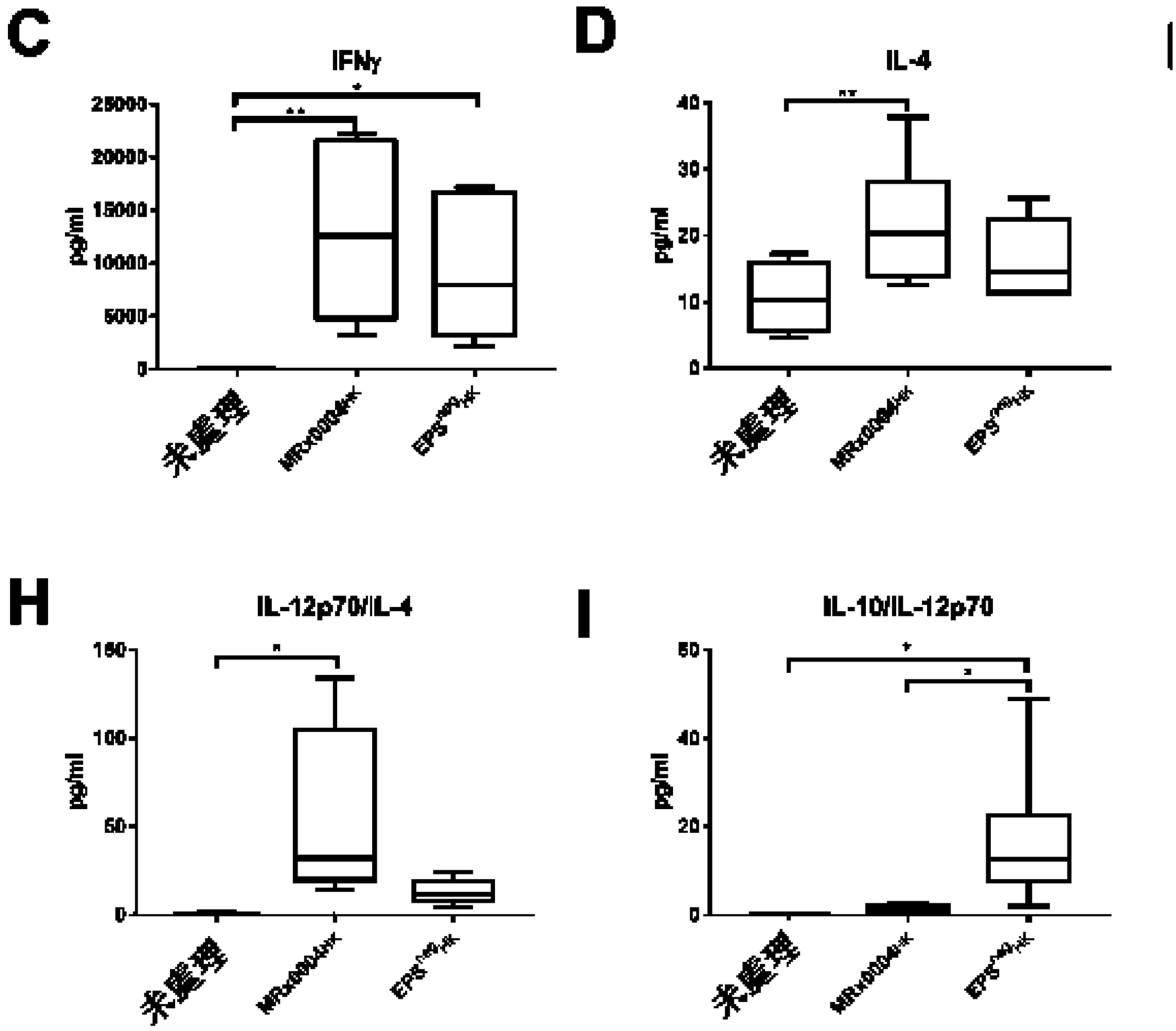

A
經活化CD8+細胞
CD8+細胞中之CD25+ %
B
經活化CD4+細胞
CD4+細胞中之CD25+ %
C
Treg
CD4+細胞中之CD25+/CD127 %
D
經活化CD8+/Treg比
經活化CD8+/Treg比
E
B細胞
CD3-細胞中之CD19+ %
未處理
MRx0004HK
EPSmutHK

【圖 13】

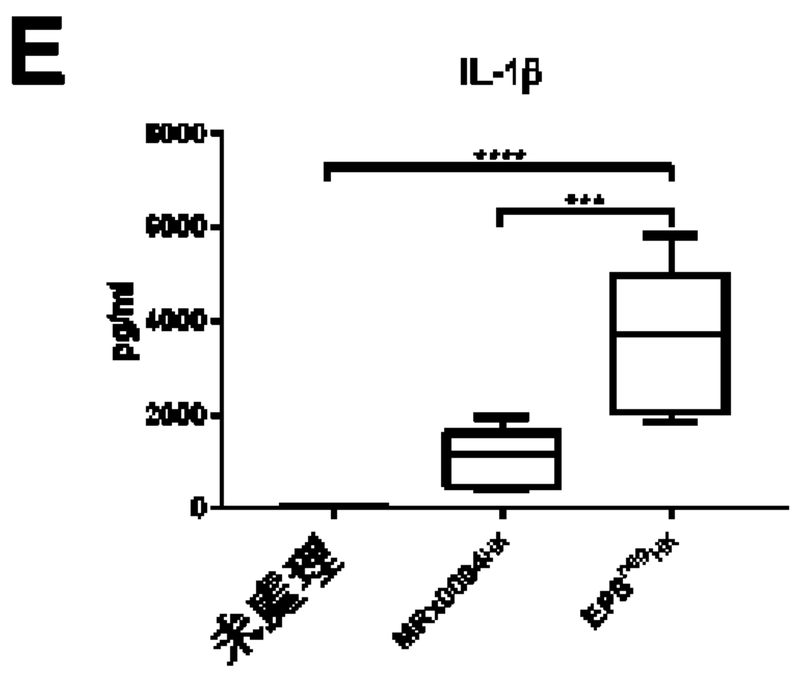

A
TNFα
pg/ml
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
**
未處理
MRx0004
EPS
B
IL-12p70
pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
未處理
MRx0004
EPS

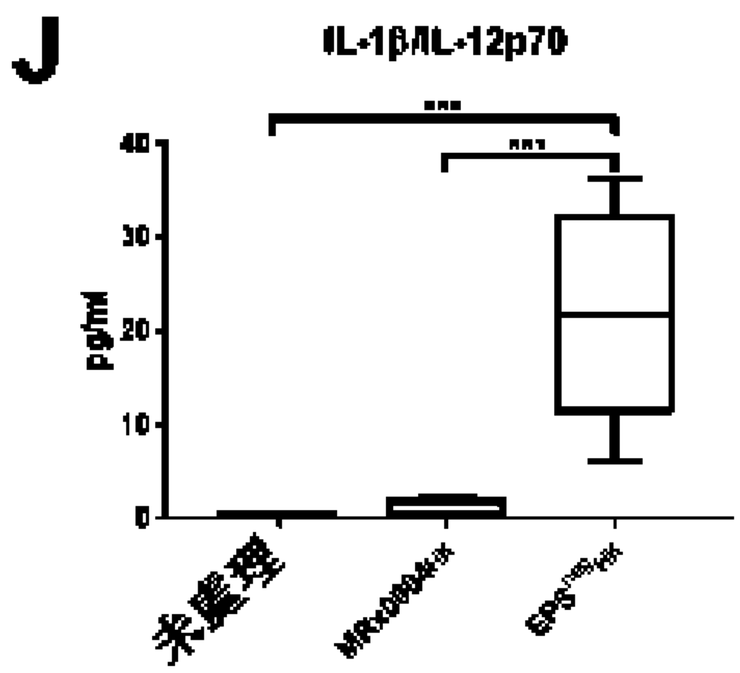

F
IL-10
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
***
*
未處理
MRx0004
EPS
G
IL-17α
pg/ml
25
20
15
10
5
0
*
*
未處理
MRx0004
EPS

【圖 14】

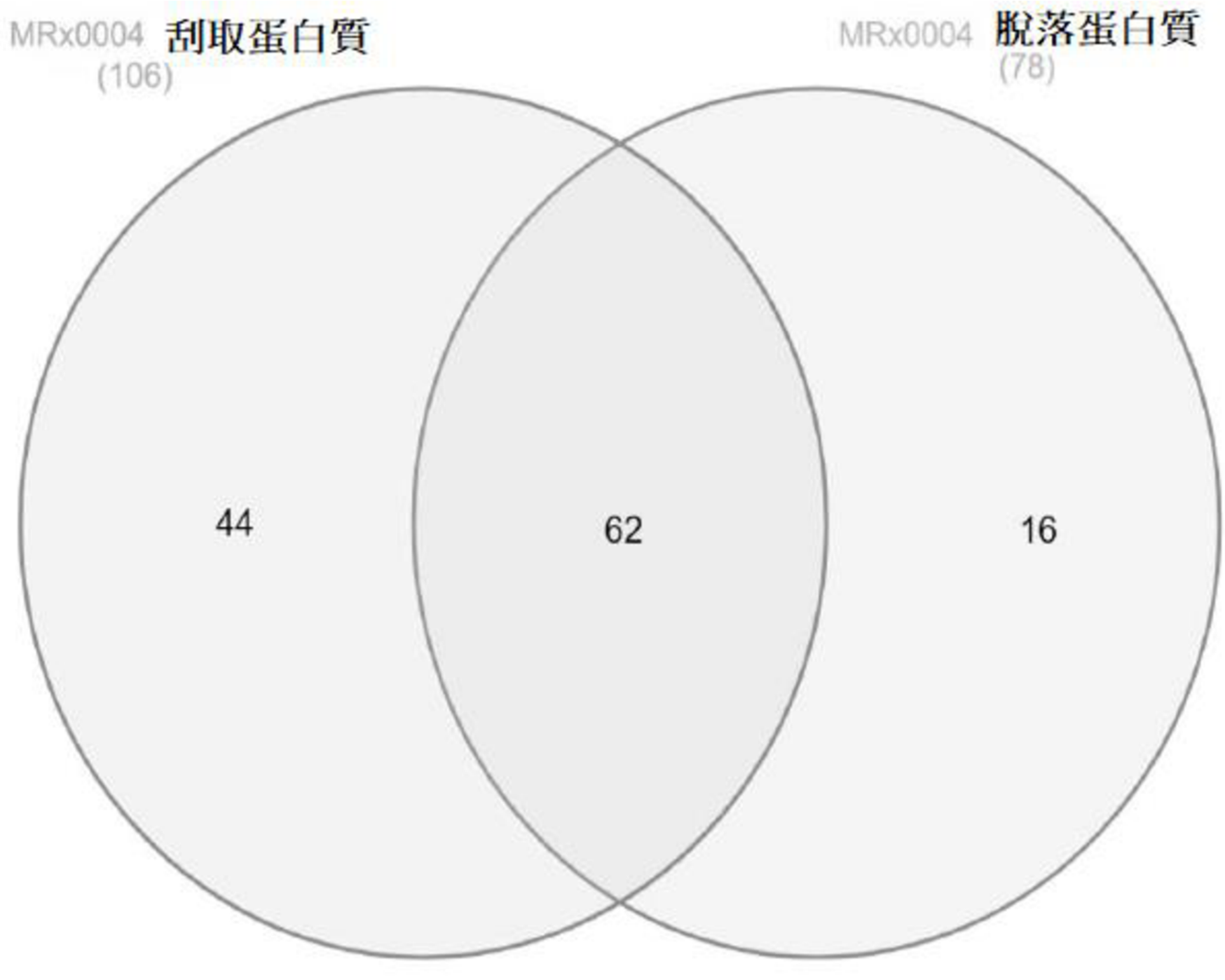

C
IFNγ
pg/ml
25000
20000
15000
10000
5000
0
未處理
D
IL-4
pg/ml
40
30
20
10
0
未處理
H
IL-12p70/IL-4
pg/ml
150
100
50
0
未處理
I
IL-10/IL-12p70
pg/ml
60
40
20
0
未處理

【圖 14 續】


E
IL-1β
pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
****
***
未處理

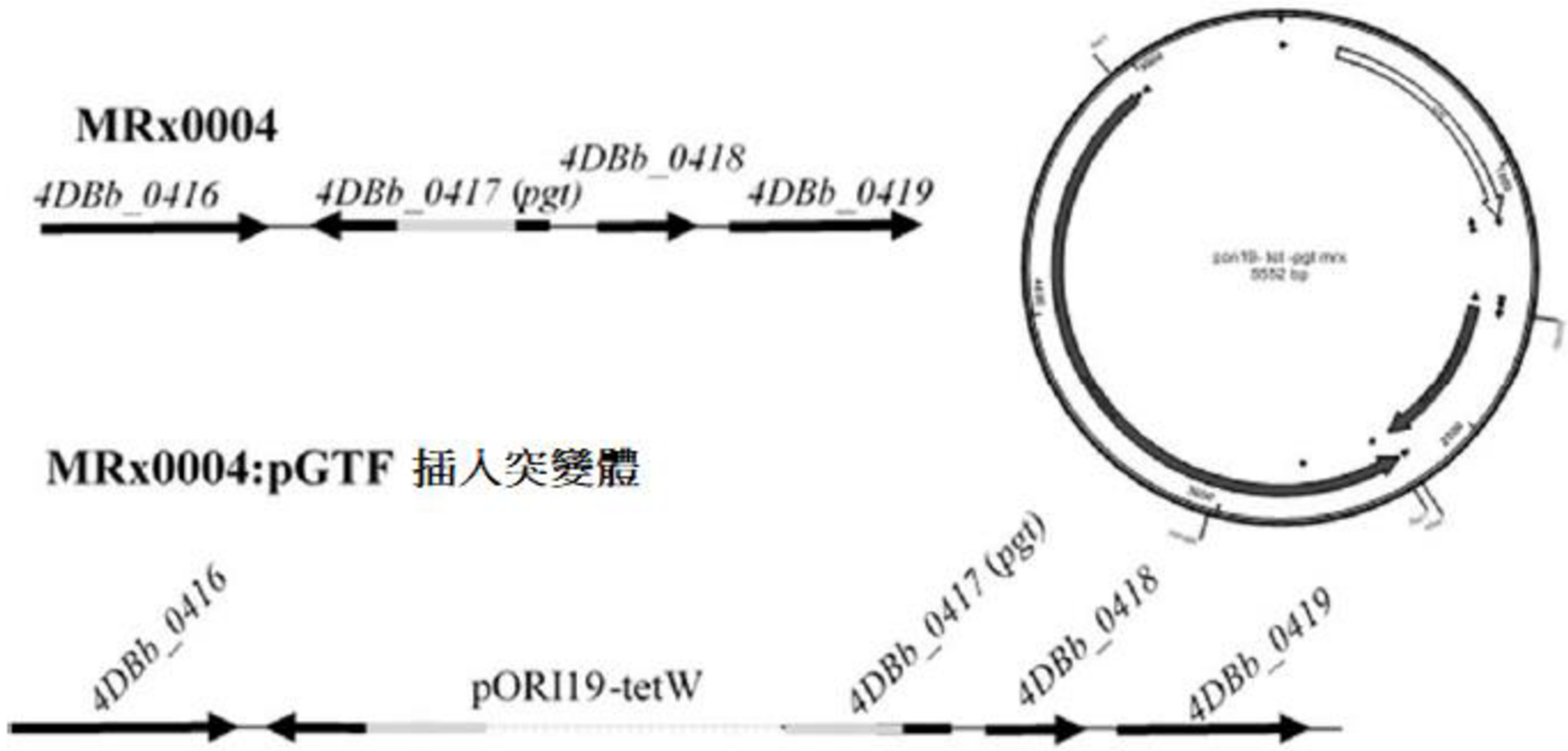

J
IL-1β/IL-12p70
pg/ml
40
30
20
10
0
***
未處理

【圖 14 續】

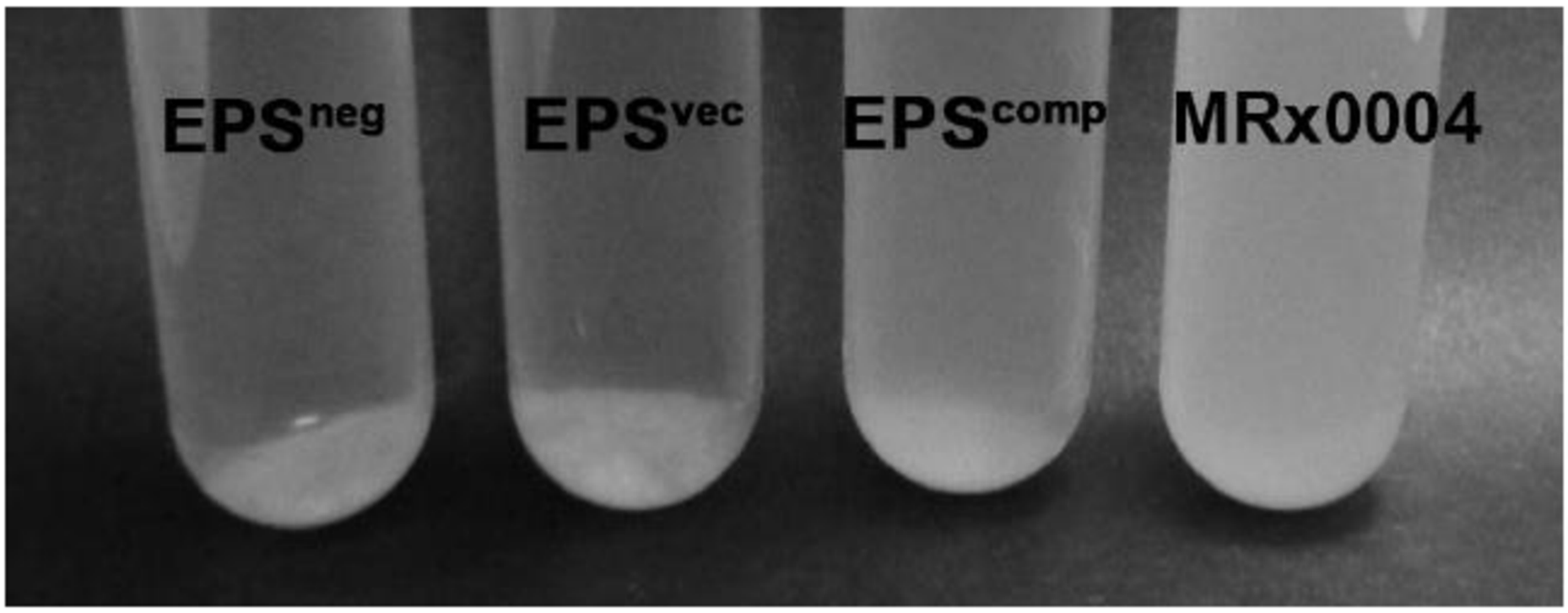


【圖 15】

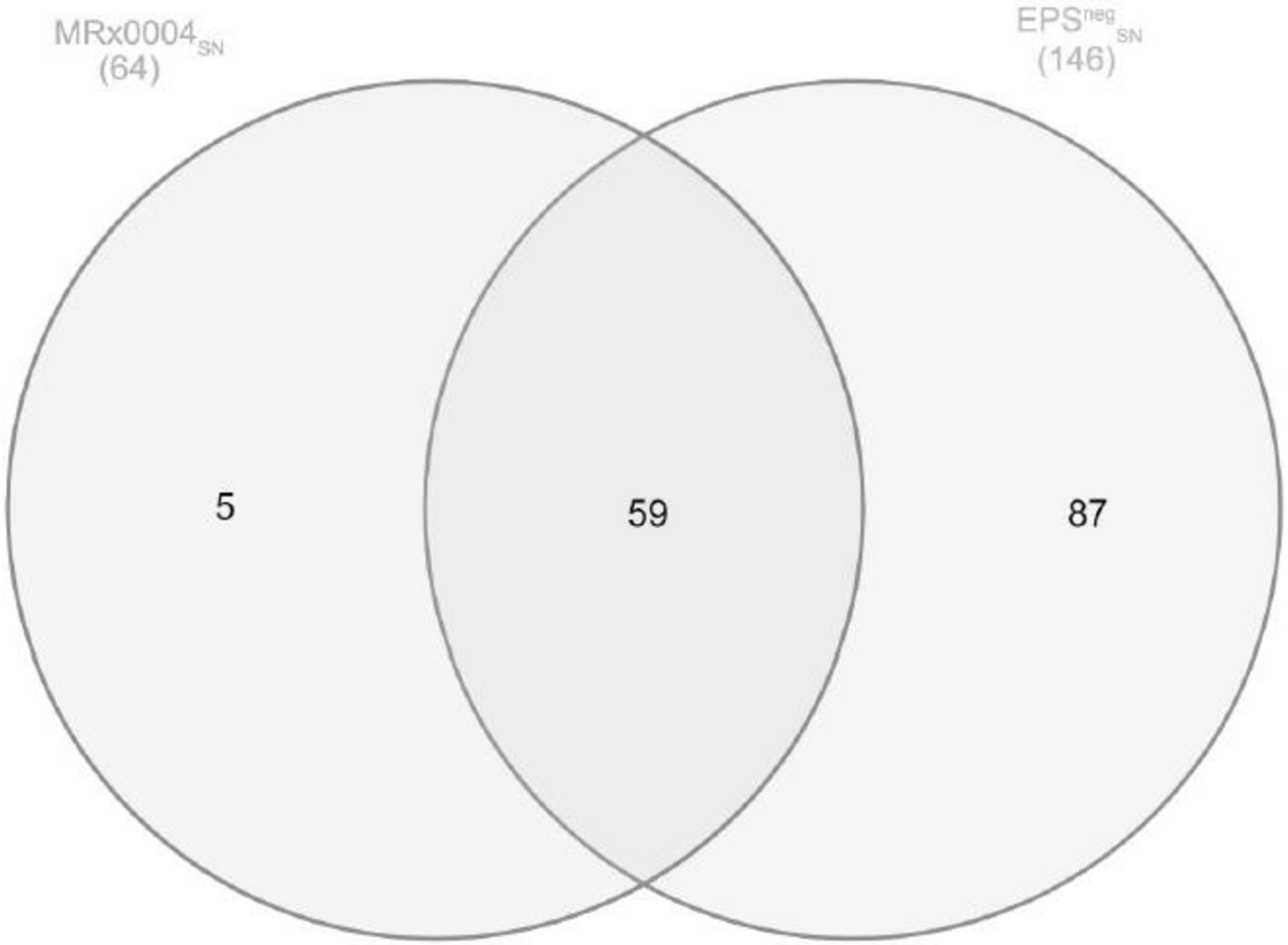
A


MRx0004
4DBb_0416
4DBb_0417 (pgt)
4DBb_0418
4DBb_0419
MRx0004:pGTF 插入突變體
4DBb_0416
pORI19-tetW
4DBb_0417 (pgt)
4DBb_0418
4DBb_0419

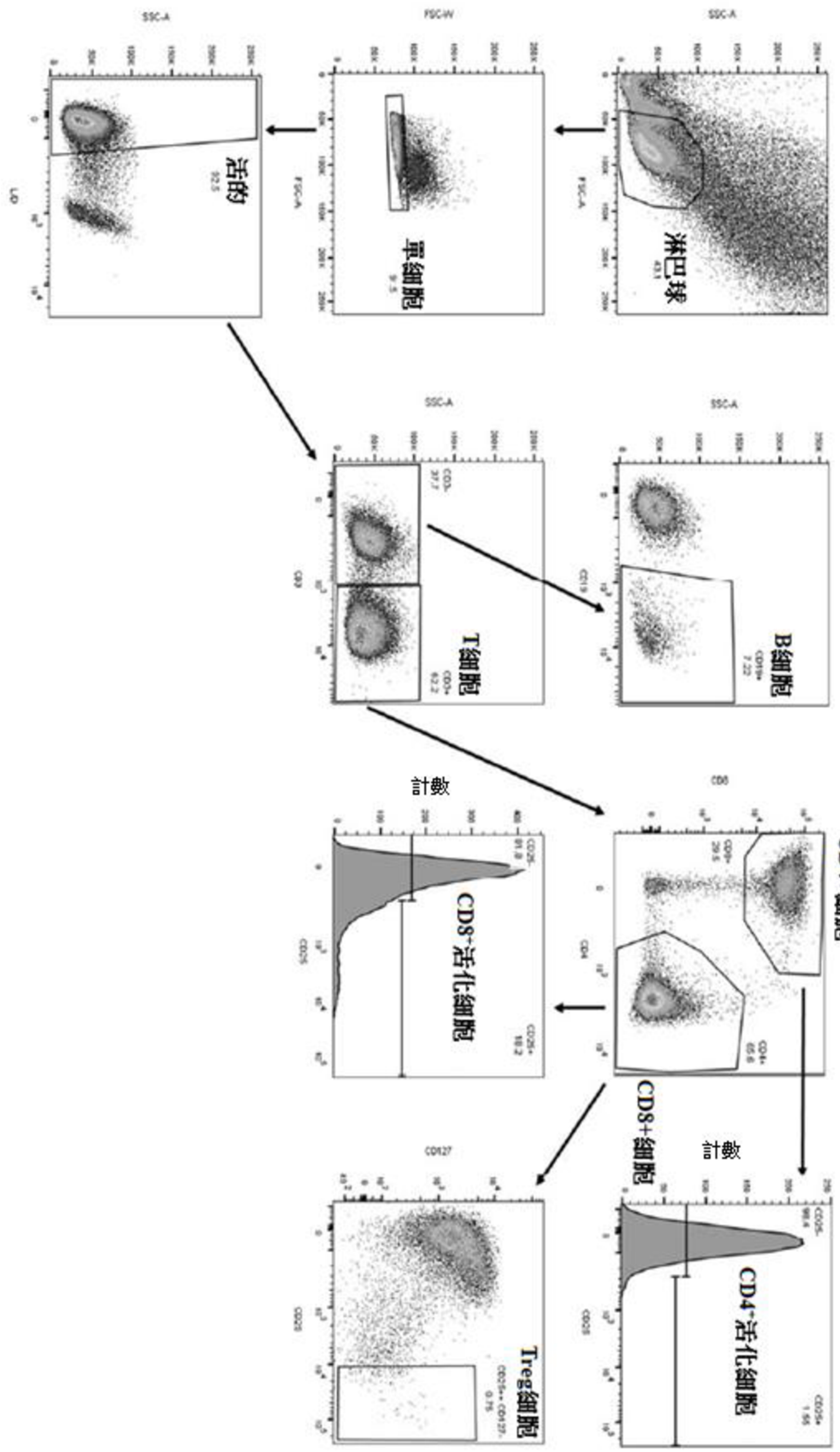
B


EPSneg
EPSvec
EPScomp
MRx0004

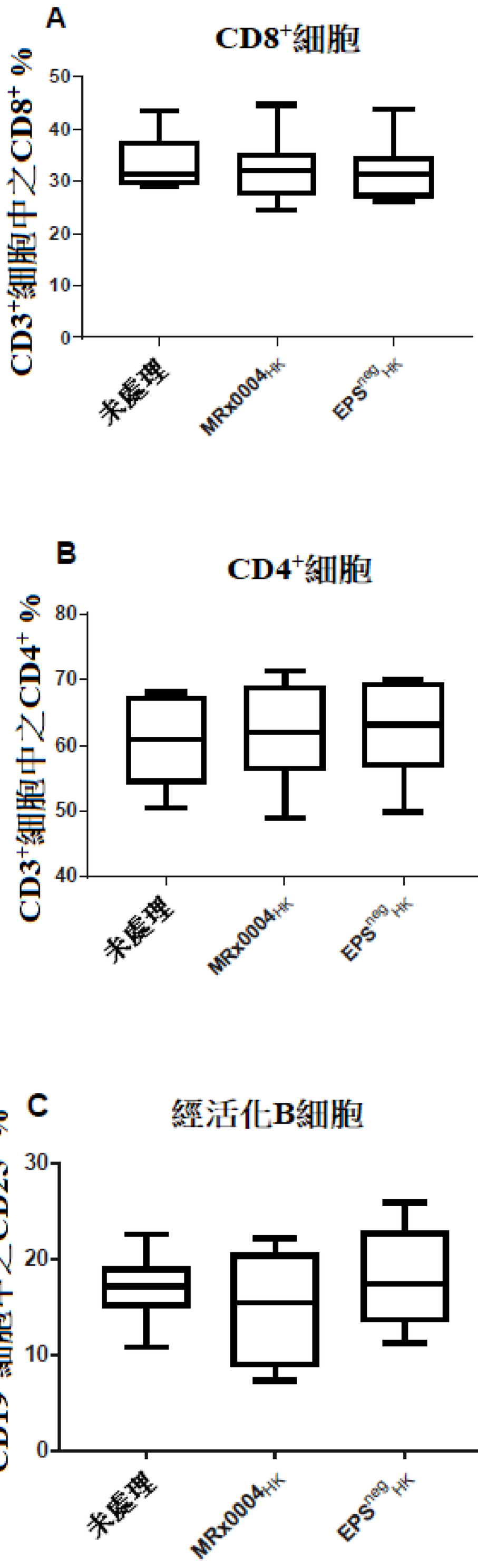
【圖 16】



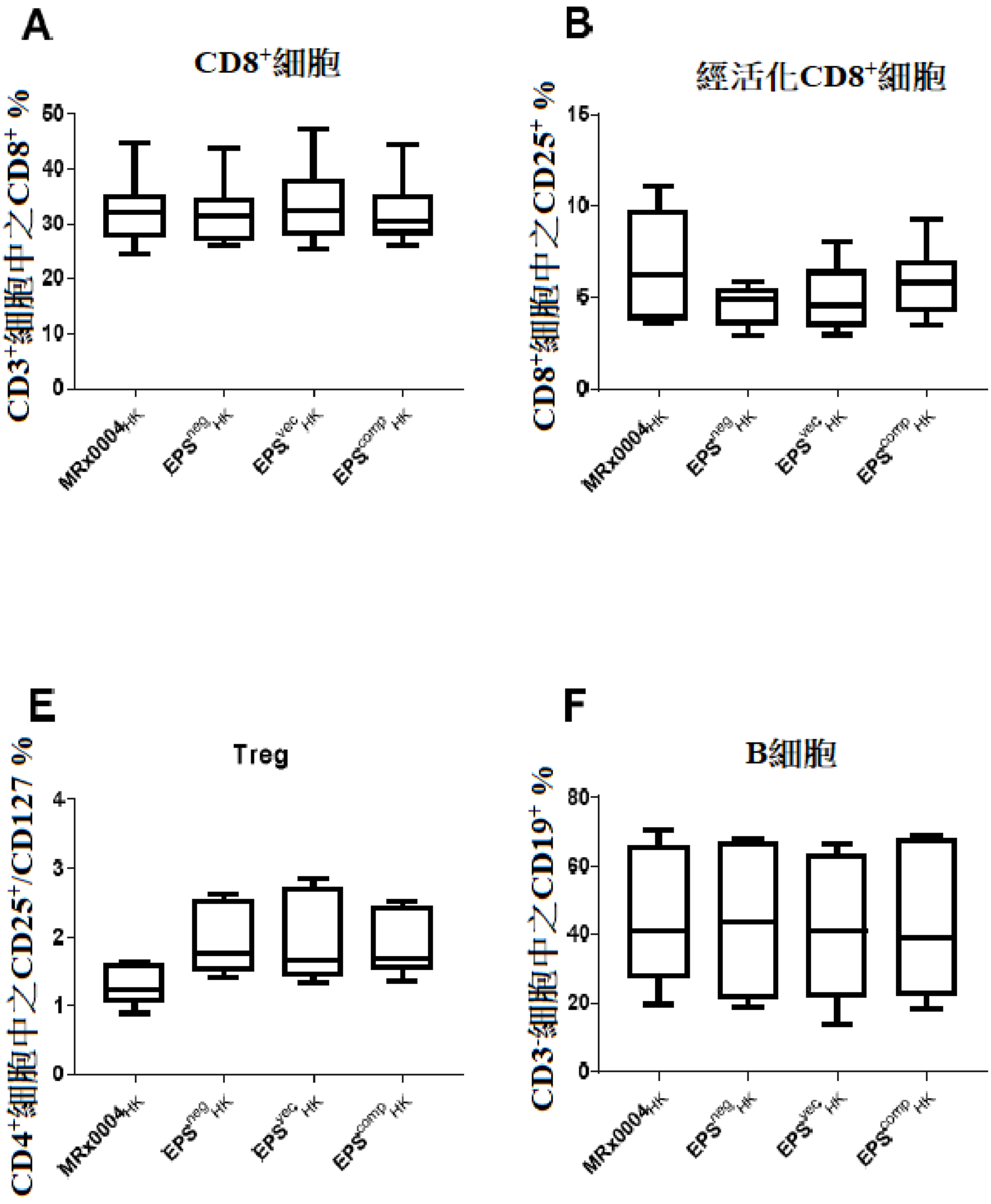
【圖 17】


SSC-A
FSC-A
淋巴球
FSC-W
FSC-A
單細胞
SSC-A
LD
活的
B細胞
CD19
SSC-A
T細胞
CD3
計數
CD8
CD4+細胞
CD4
CD8+細胞
CD8+活化細胞
CD25
CD127
CD4+活化細胞
Treg細胞

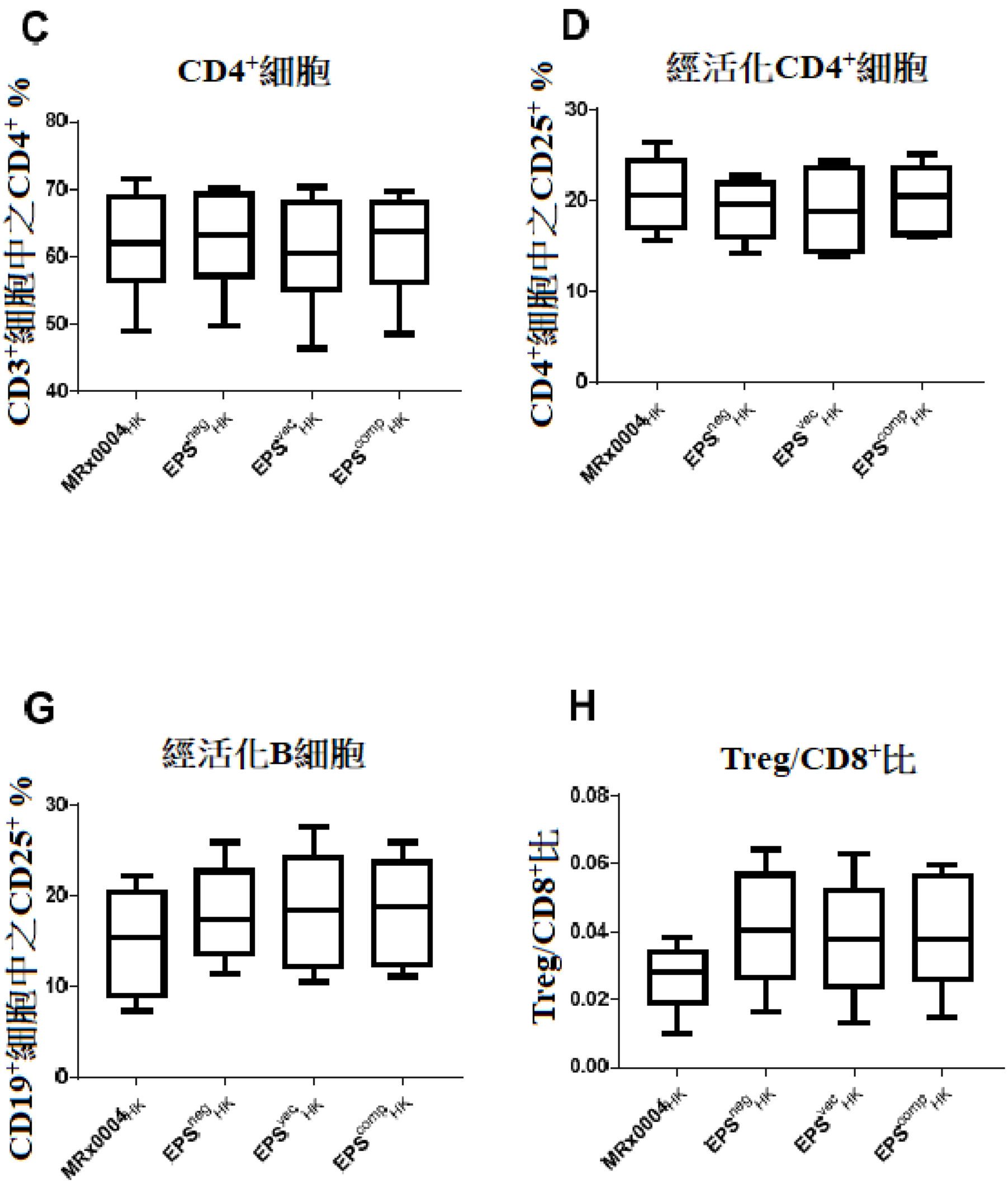
【圖 18】


A
CD8+細胞
CD3+細胞中之CD8+ %
50
40
30
20
10
0
未處理
MRx0004HK
EPSneg HK
B
CD4+細胞
CD3+細胞中之CD4+ %
80
70
60
50
40
未處理
MRx0004HK
EPSneg HK
C
經活化B細胞
CD19+細胞中之CD25+ %
30
20
10
0
未處理
MRx0004HK
EPSneg HK

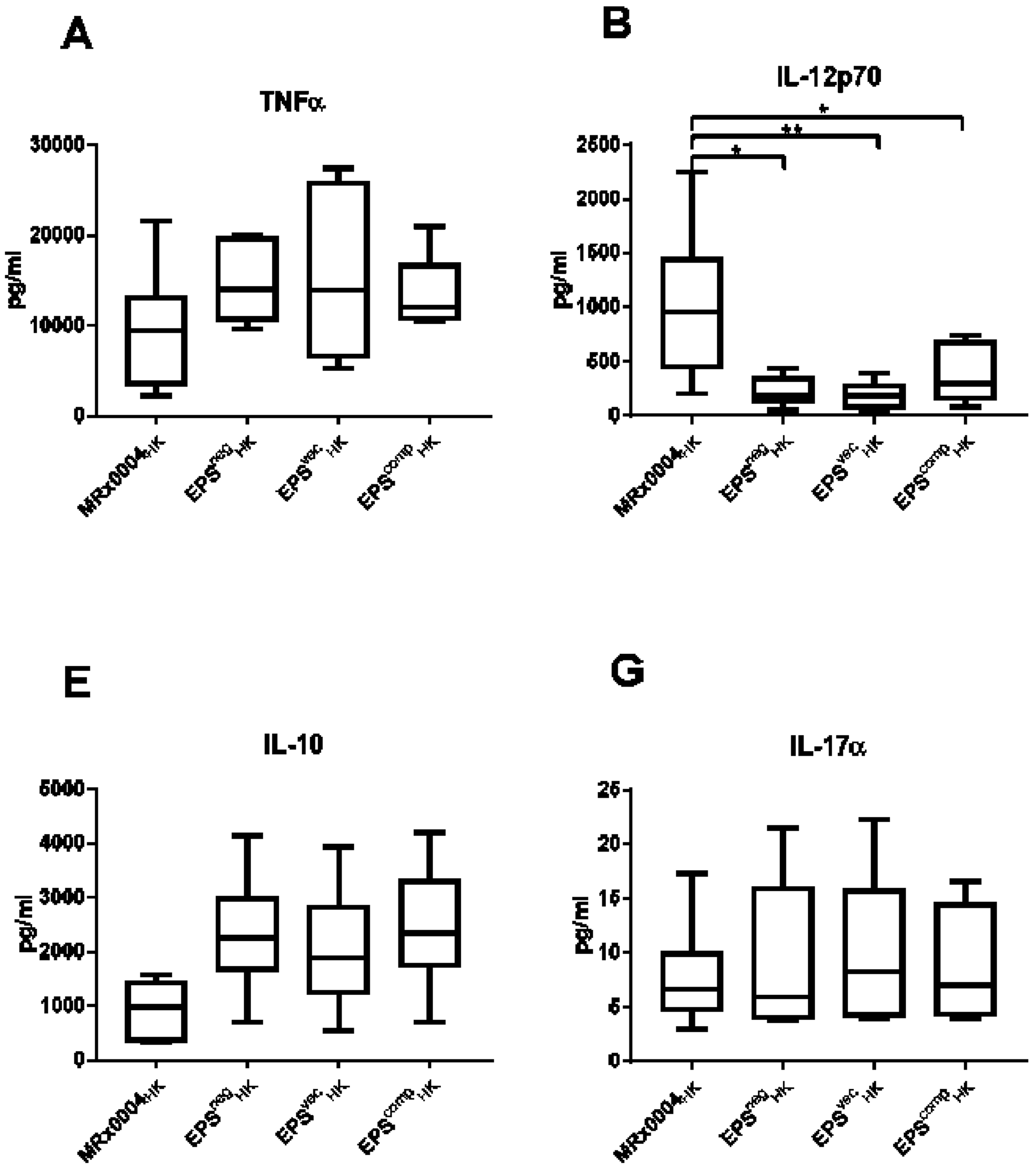
【圖 19】


A
CD8+細胞
CD3+細胞中之CD8+ %
B
經活化CD8+細胞
CD3+細胞中之CD25+ %
E
Treg
CD4+細胞中之CD25+/CD127 %
F
B細胞
CD3-細胞中之CD19+ %
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK

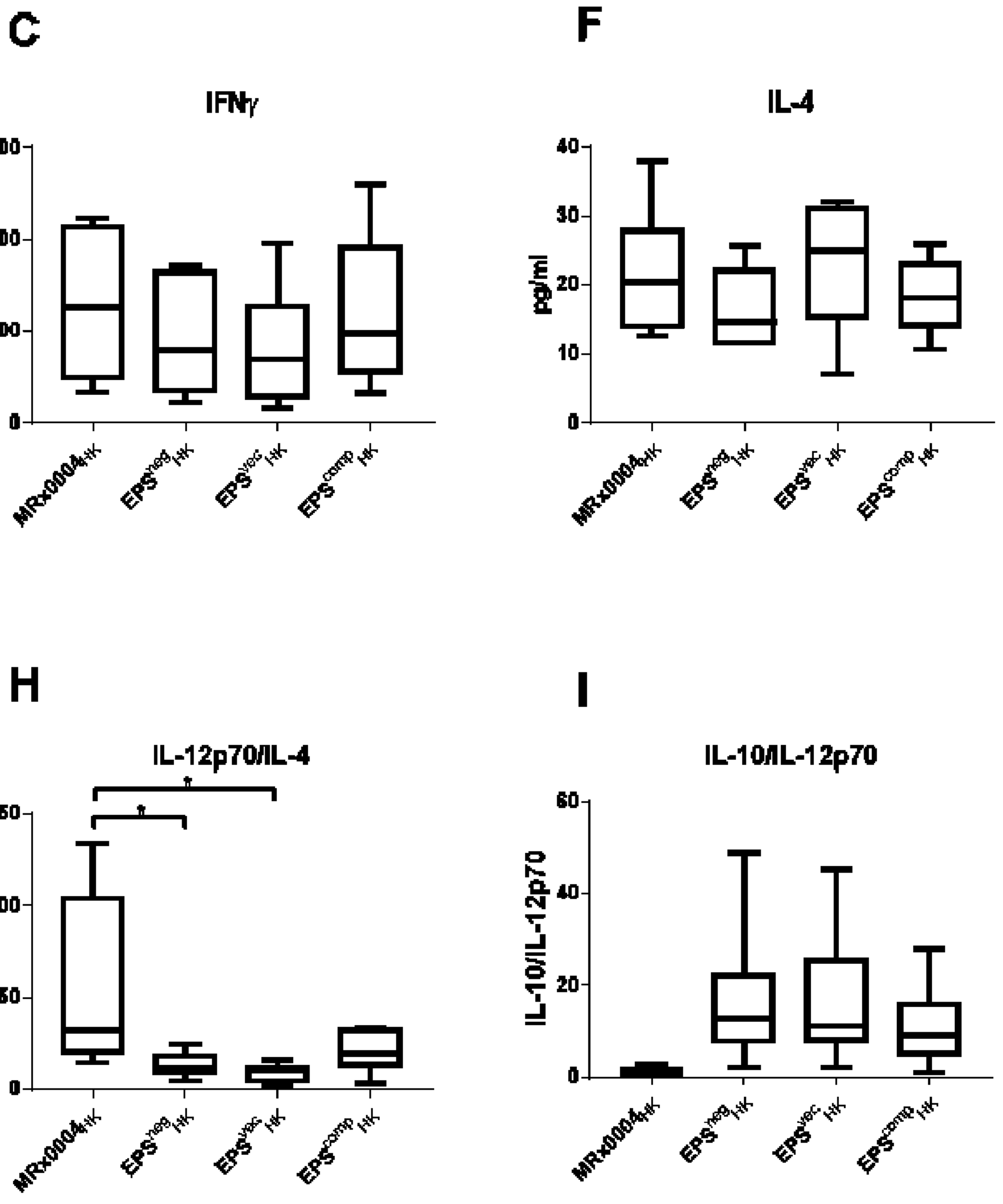
【圖 20】


C
CD4+細胞
CD3+細胞中之CD4+ %
80
70
60
50
40
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
D
經活化CD4+細胞
CD4+細胞中之CD25+ %
30
20
10
0
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
G
經活化B細胞
CD19+細胞中之CD25+ %
30
20
10
0
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
H
Treg/CD8+比
Treg/CD8+比
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK

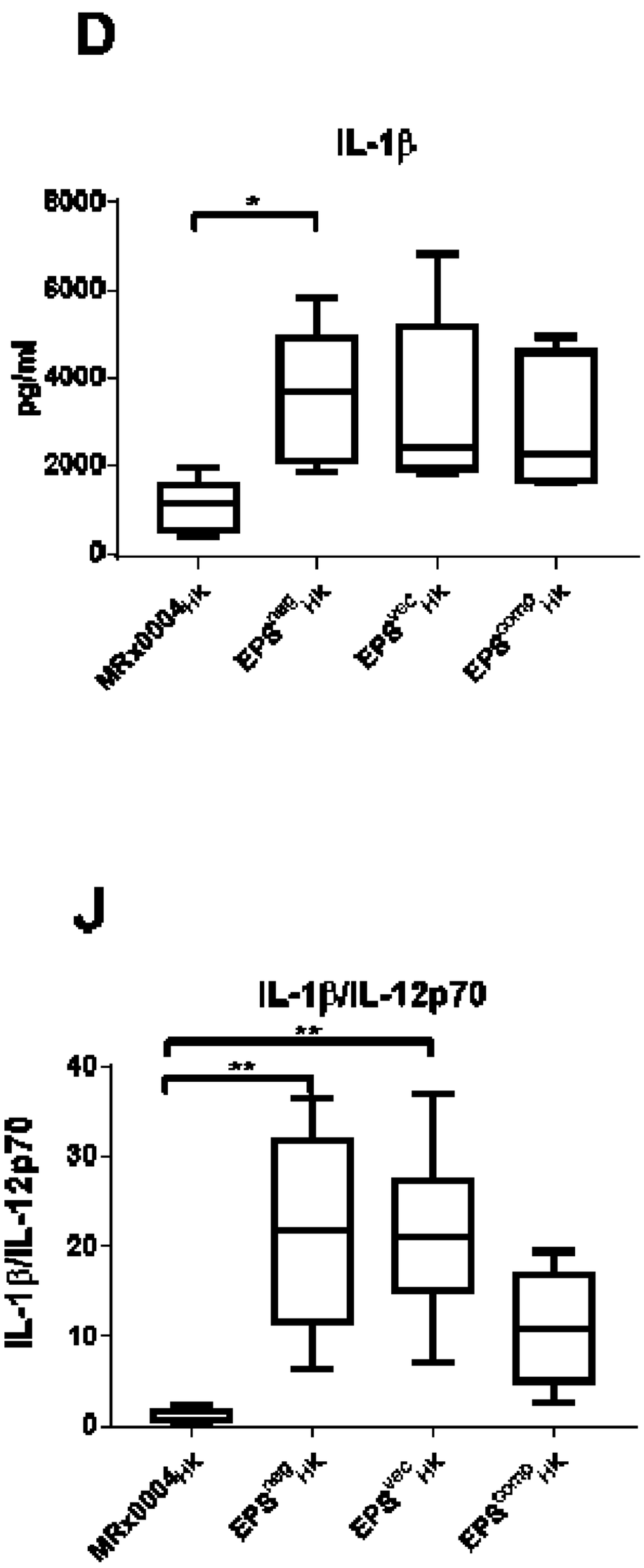
【圖 20 續】


A
TNFα
pg/ml
30000
20000
10000
0
MRx0004-HK
EPSneg-HK
EPSvisc.-HK
EPScomp-HK
B
IL-12p70
pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
*
**
*
MRx0004-HK
EPSneg-HK
EPSvisc.-HK
EPScomp-HK
E
IL-10
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
MRx0004-HK
EPSneg-HK
EPSvisc.-HK
EPScomp-HK
G
IL-17α
pg/ml
25
20
15
10
5
0
MRx0004-HK
EPSneg-HK
EPSvisc.-HK
EPScomp-HK

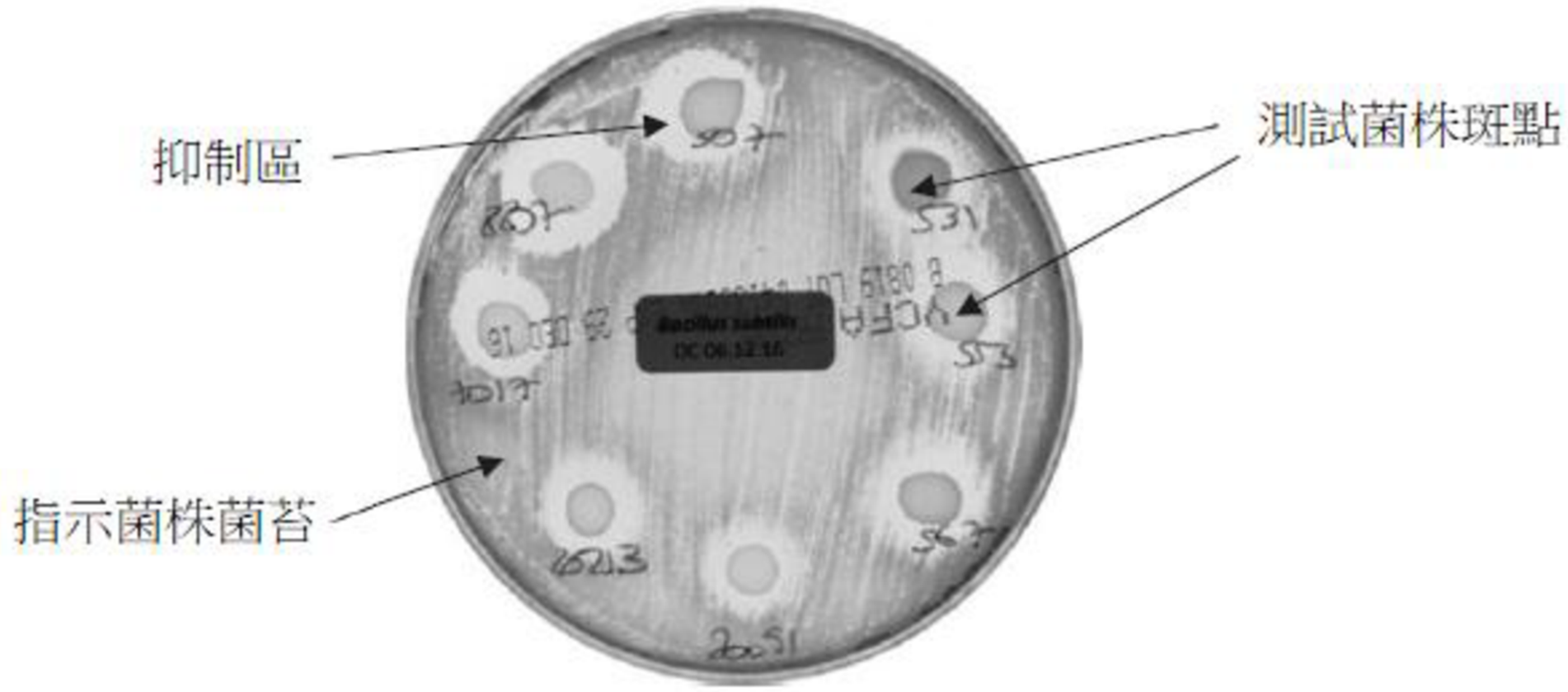
【圖 21】


C
IFNγ
pg/ml
30000
20000
10000
0
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
F
IL-4
pg/ml
40
30
20
10
0
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
H
IL-12p70/IL-4
IL-12p70/IL-4
150
100
50
0
*
*
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK
I
IL-10/IL-12p70
IL-10/IL-12p70
60
40
20
0
MRx0004HK
EPSnegHK
EPSvecHK
EPScompHK

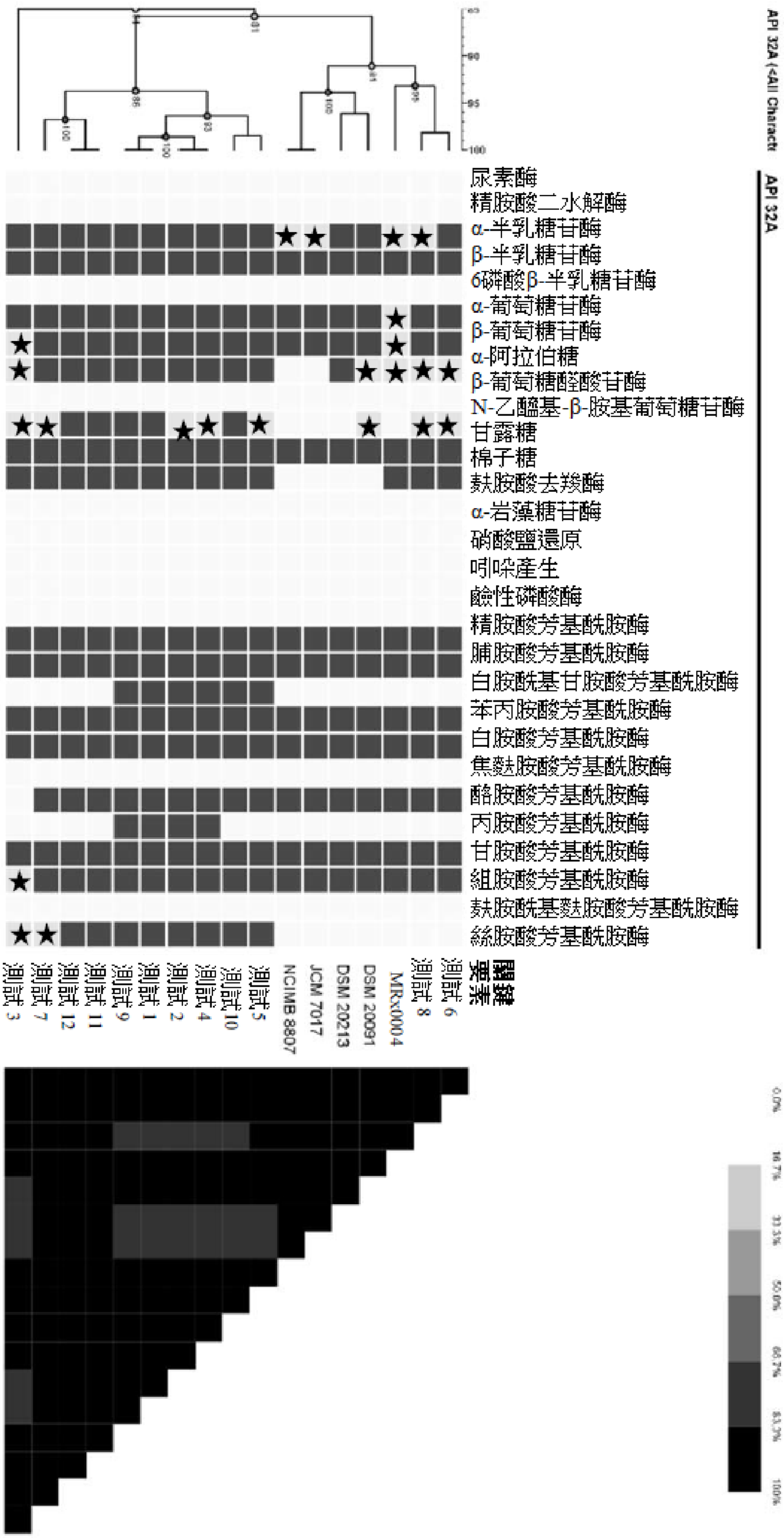
【圖 21 續】


D
IL-1β
pg/ml
8000
6000
4000
2000
0
*
MRx0004HK
EPSneg HK
EPSvec HK
EPScontrol HK
J
IL-1β/IL-12p70
IL-1β/IL-12p70
40
30
20
10
0
**
MRx0004HK
EPSneg HK
EPSvec HK
EPScontrol HK

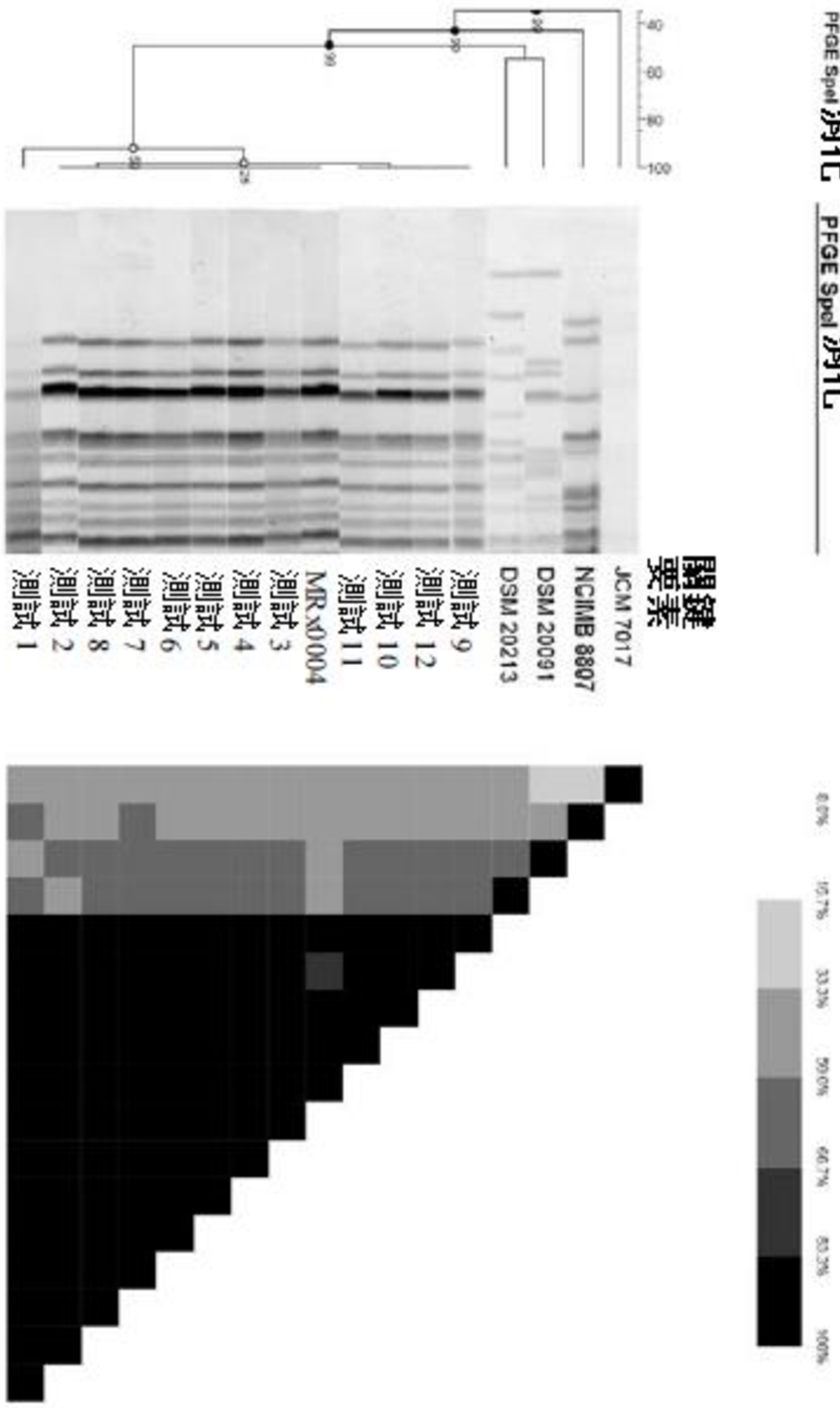
【圖 21 續】



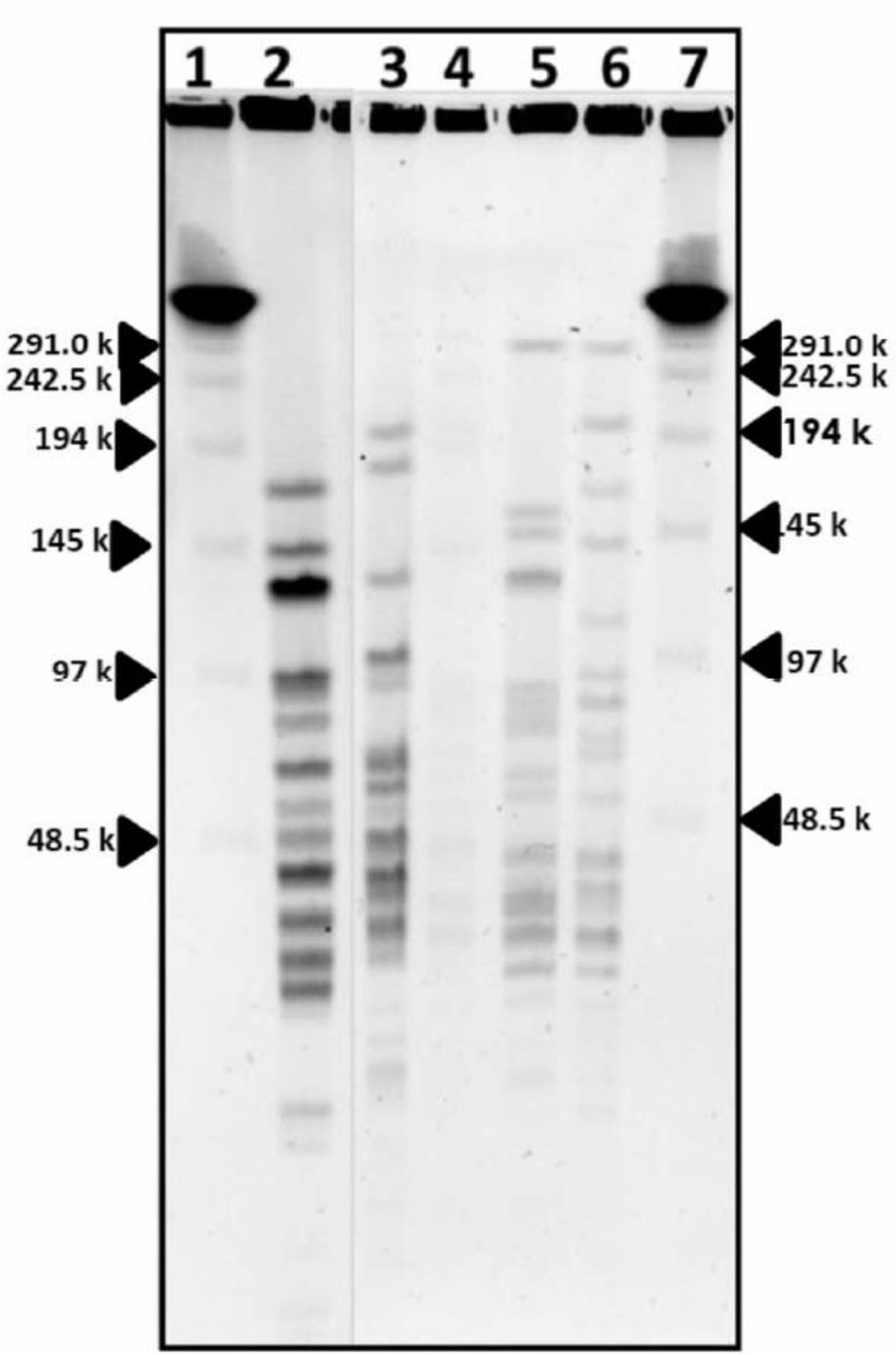
【圖 22】


API 32A (<All Characte
API 32A
尿素酶
精胺酸二水解酶
α-半乳糖苷酶
β-半乳糖苷酶
6磷酸β-半乳糖苷酶
α-葡萄糖苷酶
β-葡萄糖苷酶
α-阿拉伯糖
β-葡萄糖醛酸苷酶
N-乙醯基-β-胺基葡萄糖苷酶
甘露糖
棉子糖
麩胺酸去羧酶
α-岩藻糖苷酶
硝酸鹽還原
吲哚產生
鹼性磷酸酶
精胺酸芳基醯胺酶
脯胺酸芳基醯胺酶
白胺酰基甘胺酸芳基醯胺酶
苯丙胺酸芳基醯胺酶
白胺酸芳基醯胺酶
焦麩胺酸芳基醯胺酶
酪胺酸芳基醯胺酶
丙胺酸芳基醯胺酶
甘胺酸芳基醯胺酶
組胺酸芳基醯胺酶
麩胺酰基麩胺酸芳基醯胺酶
絲胺酸芳基醯胺酶
關鍵要素
測試 6
測試 8
MRx0004
DSM 20091
DSM 20213
JCM 7017
NCIMB 8807
測試 5
測試10
測試 4
測試 2
測試 1
測試 9
測試11
測試12
測試 7
測試 3
0.0%
16.7%
33.3%
50.0%
66.7%
83.3%
100%

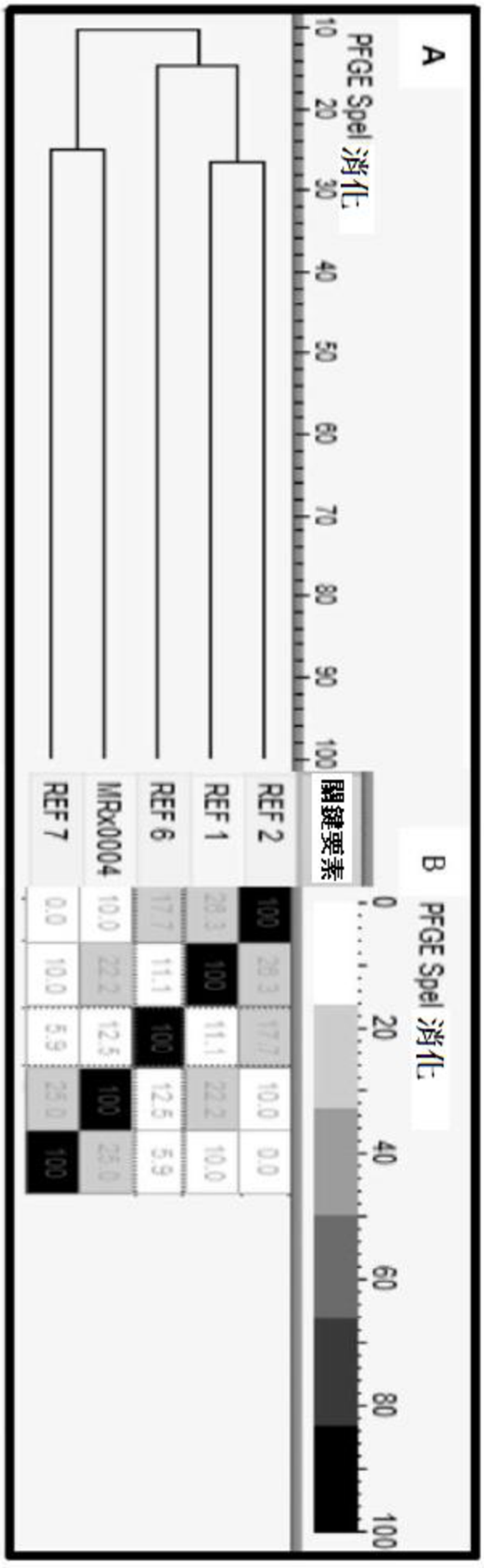
【圖 23】


PFGE SpeI 演化
PFGE SpeI 演化
40
60
80
100
99
99
99
99
關鍵要素
JCM 7017
NCIMB 8807
DSM 20091
DSM 20213
測試 9
測試 12
測試 10
測試 11
MRx0004
測試 3
測試 4
測試 5
測試 6
測試 7
測試 8
測試 2
測試 1
0.0%
16.7%
33.3%
50.0%
66.7%
83.3%
100%

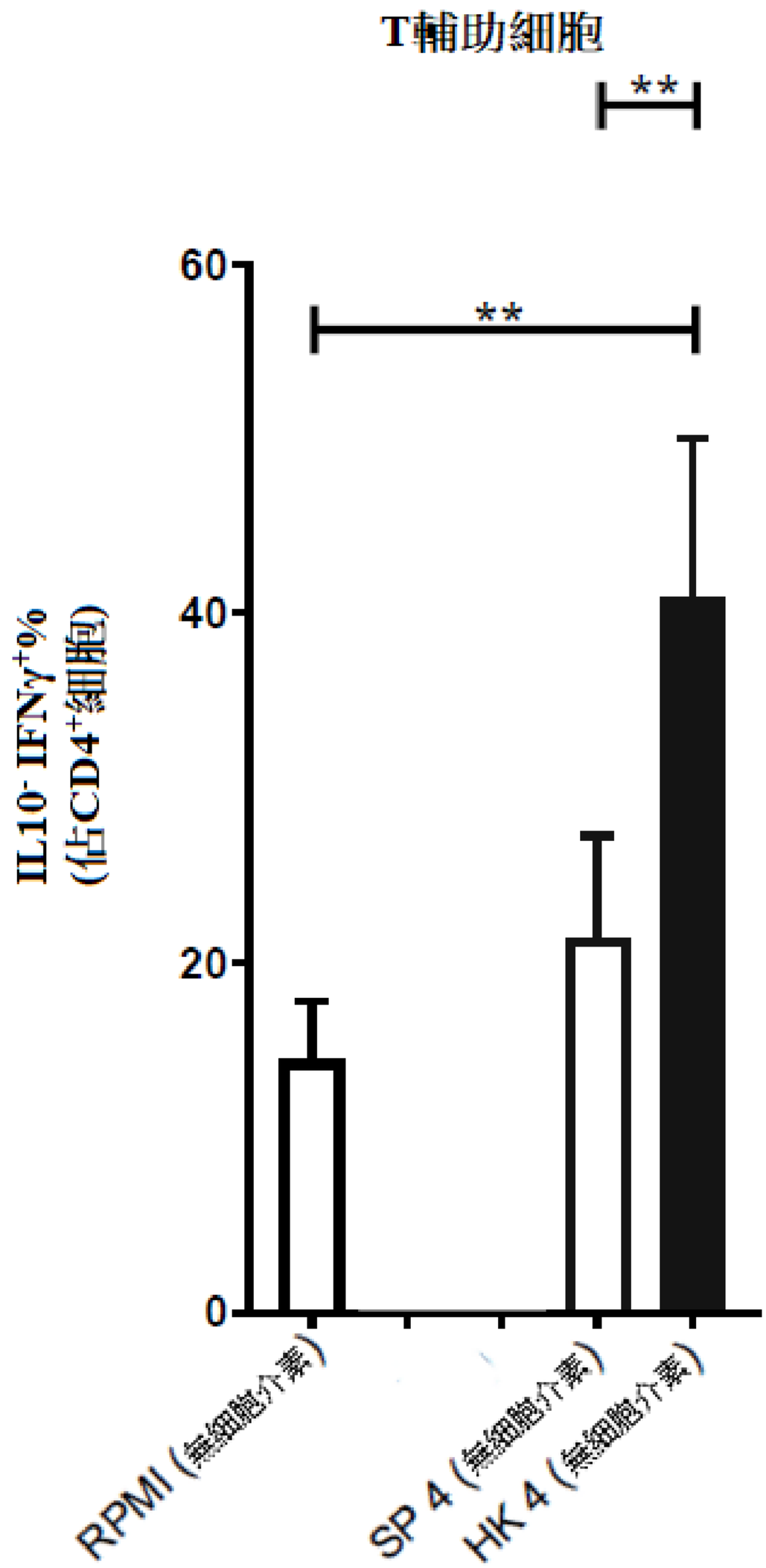
【圖 24】


1
2
3
4
5
6
7
291.0 k
242.5 k
194 k
145 k
97 k
48.5 k
291.0 k
242.5 k
194 k
45 k
97 k
48.5 k

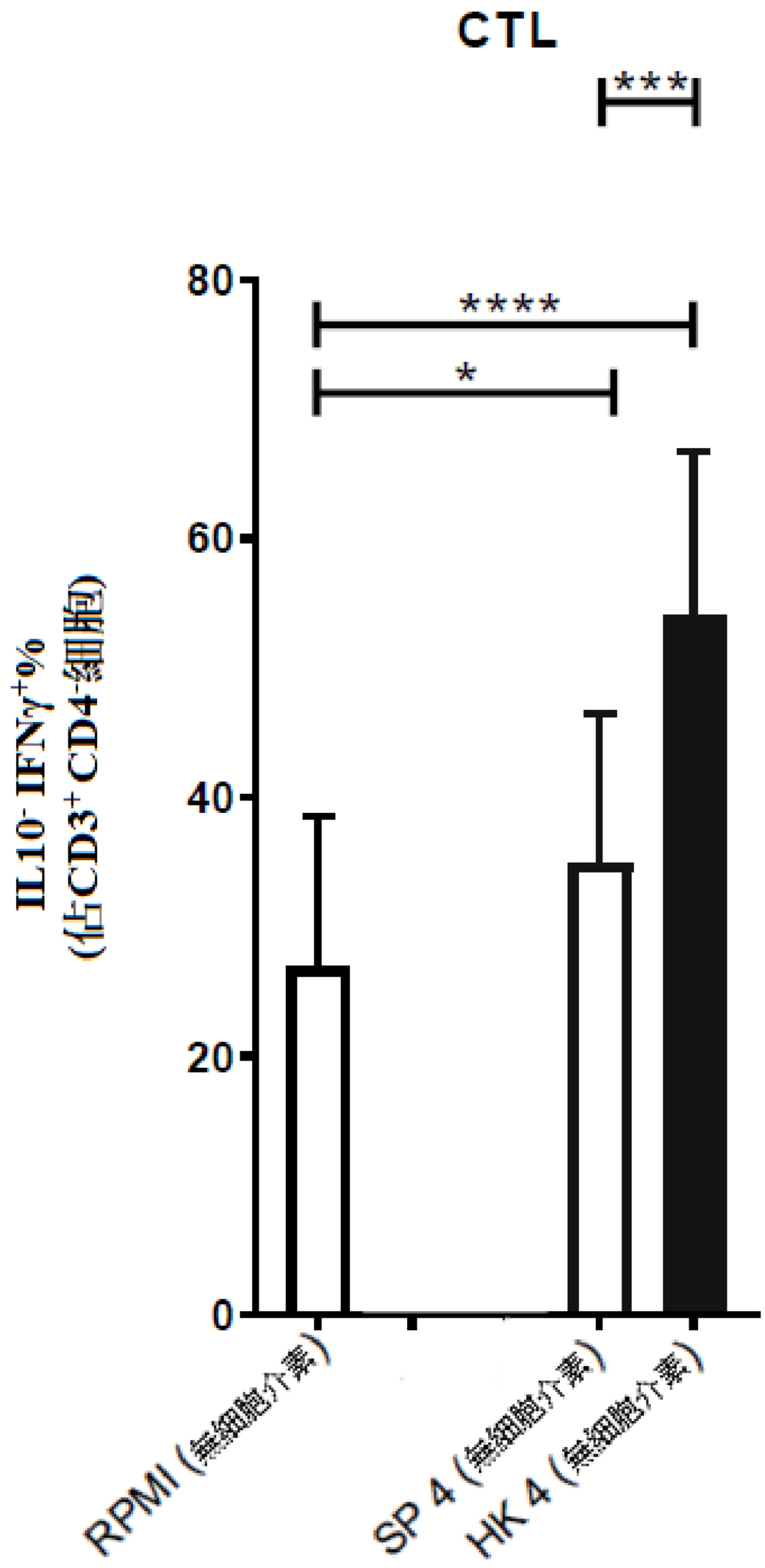
【圖 25】


A
PFGE Spel 消化
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
B
關鍵要素
PFGE Spel 消化
0
20
40
60
80
100
REF 2
REF 1
REF 6
MRx0004
REF 7
100 28.3 17.7 10.0 0.0
28.3 100 11.1 22.2 10.0
17.7 11.1 100 12.5 5.9
10.0 22.2 12.5 100 23.0
0.0 10.0 5.9 23.0 100

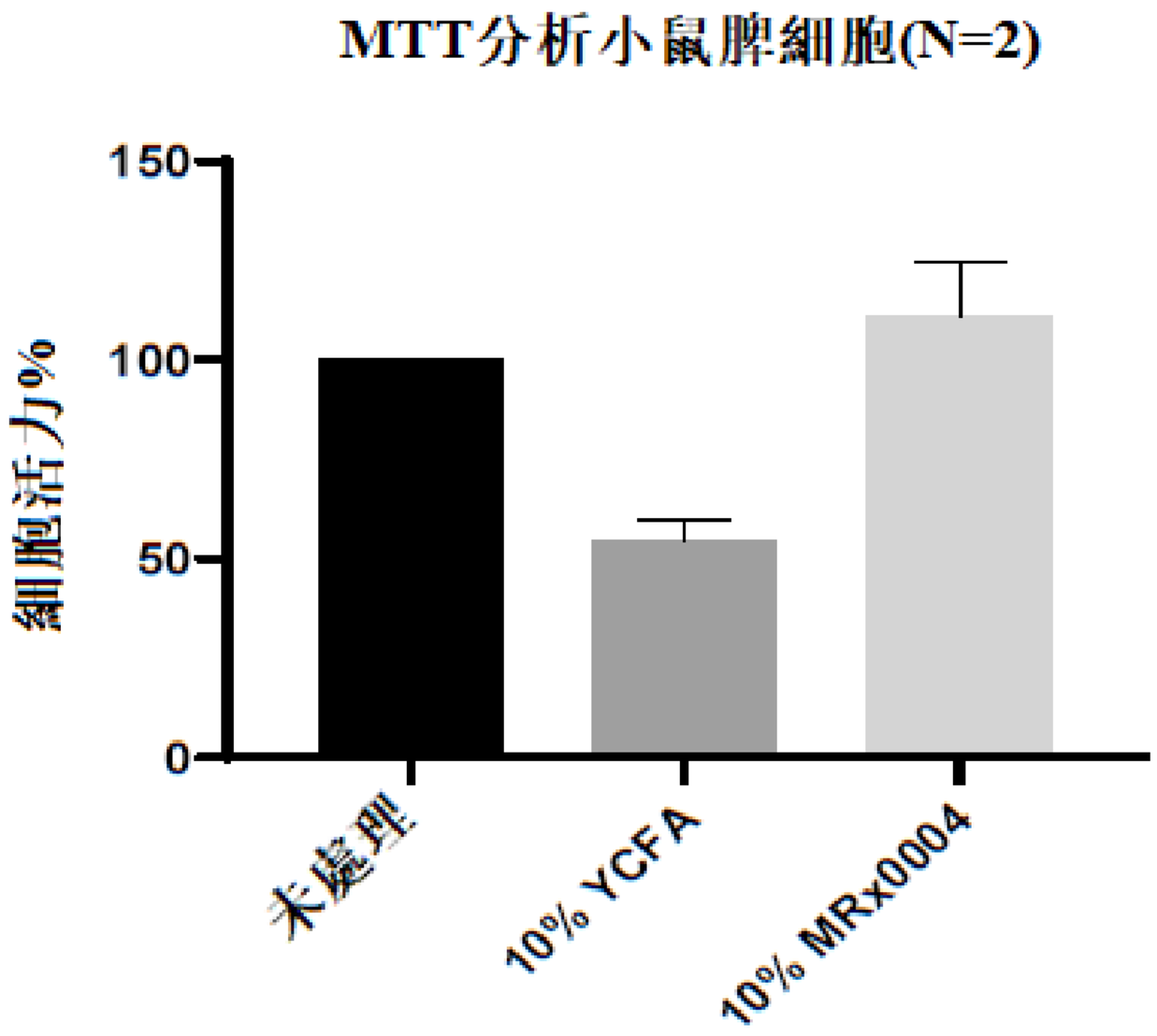
【圖 26】


T輔助細胞
**
**
60
40
20
0
IL10- IFNγ+%
(占CD4+細胞)
RPMI (無細胞介素)
SP 4 (無細胞介素)
HK 4 (無細胞介素)

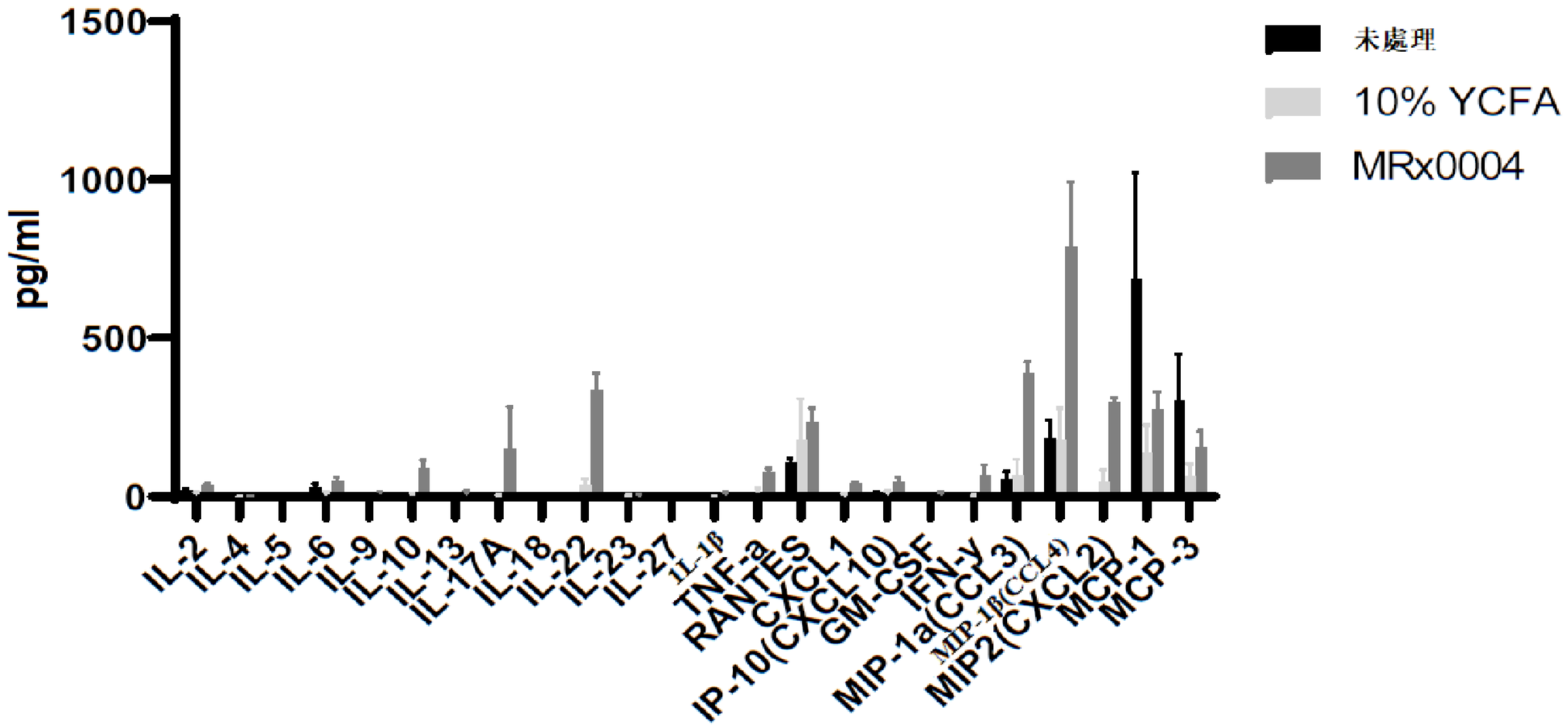
【圖 27】


CTL
***
80
****
*
60
40
20
0
IL10- IFNγ+%
(佔CD3+CD4-細胞)
RPMI (無細胞介素)
SP 4 (無細胞介素)
HK 4 (無細胞介素)

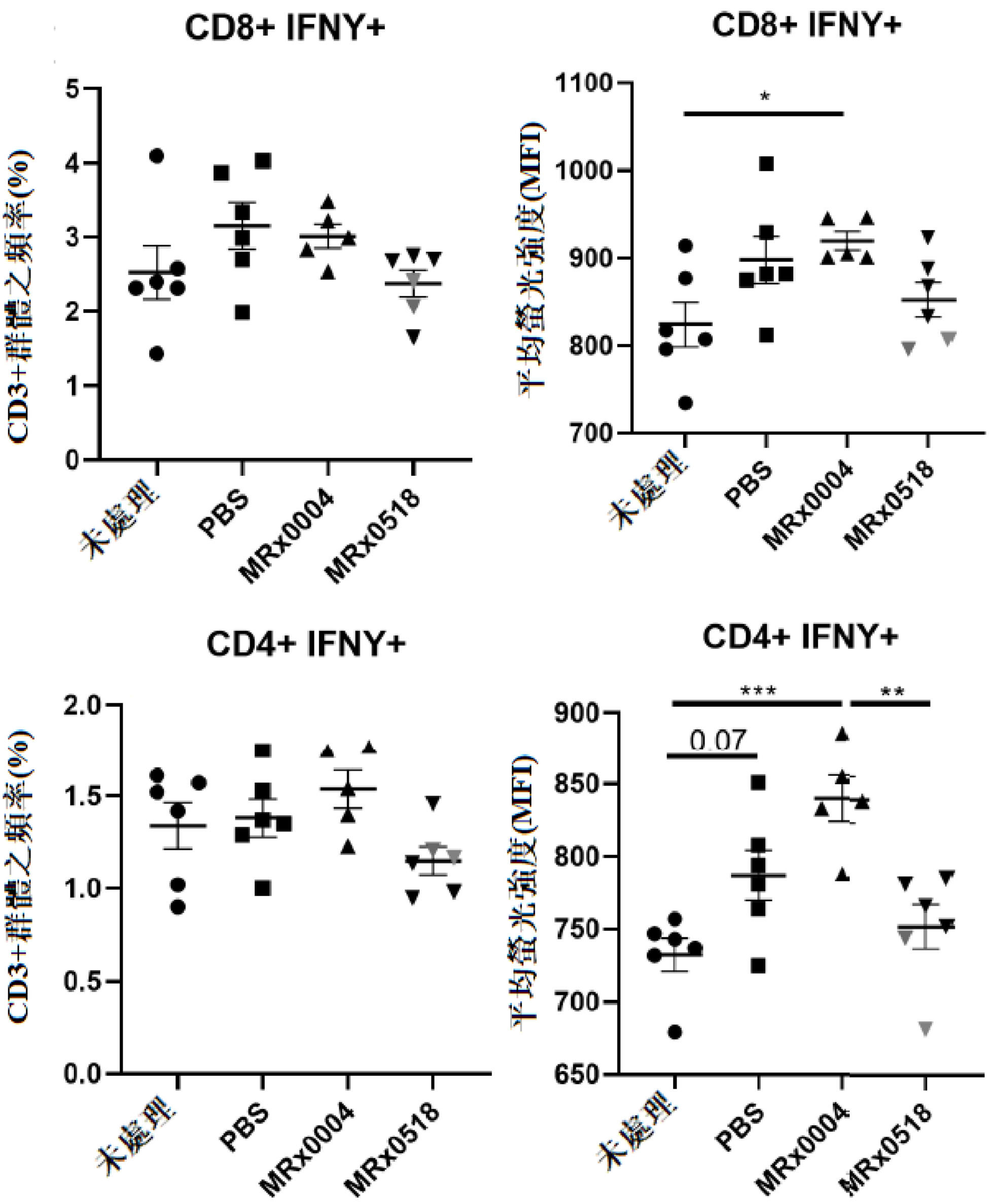
【圖 28】



【圖 29】


1500
1000
500
0
pg/ml
未處理
10% YCFA
MRx0004
IL-2
IL-4
IL-5
IL-6
IL-9
IL-10
IL-13
IL-17A
IL-18
IL-22
IL-23
IL-27
IL-1β
TNF-a
RANTES
CXCL1
IP-10(CXCL10)
GM-CSF
IFN-γ
MIP-1a(CCL3)
MIP-1β(CCL4)
MIP2(CXCL2)
MCP-1
MCP-3

【圖 30】


CD8+ IFNY+
CD3+群體之頻率(%)
5
4
3
2
1
0
未處理
PBS
MRx0004
MRx0518
CD8+ IFNY+
平均螢光強度(MFI)
1100
1000
900
800
700
*
未處理
PBS
MRx0004
MRx0518
CD4+ IFNY+
CD3+群體之頻率(%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未處理
PBS
MRx0004
MRx0518
CD4+ IFNY+
平均螢光強度(MFI)
***
**
900
850
800
750
700
650
0.07
未處理
PBS
MRx0004
MRx0518

【圖 31】