

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-529431

(P2020-529431A)

(43) 公表日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 35/744 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/744	4 B 0 1 8
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-505827 (P2020-505827)	(71) 出願人	514079985
(86) (22) 出願日	平成30年8月10日 (2018.8.10)		フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和2年3月12日 (2020.3.12)		4 D P H A R M A R E S E A R C H
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/071831		L I M I T E D
(87) 国際公開番号	W02019/030411		イギリス国 エイビー25 2ゼットエス
(87) 国際公開日	平成31年2月14日 (2019.2.14)		アバディーン コーンヒルロード ライ
(31) 優先権主張番号	1712857.0		フサイエンシーズ イノベーションビルデ
(32) 優先日	平成29年8月10日 (2017.8.10)		ィング
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(74) 代理人	100107984
(31) 優先権主張番号	1800866.4		弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成30年1月19日 (2018.1.19)	(74) 代理人	100102255
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		弁理士 小澤 誠次
		(74) 代理人	100096482
			弁理士 東海 裕作
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌株を含む組成物

## (57) 【要約】

本発明は、細菌株を含む組成物、及び疾患の治療に、そのような組成物を使用することを提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物であって、疾患を罹患していると診断された対象における微生物叢の多様性を向上及び / または安定化させるのに使用するための前記組成物。

## 【請求項 2】

微生物叢の多様性の向上及び / または安定化が、前記対象の腸または遠位消化管におけるものである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

疾患が、マイクロバイオームの多様性の低下によって特徴付けられる、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 4】

*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物であって、炎症性腸疾患、体重減少、潰瘍性大腸炎及びクローン病からなる群から選択される疾患を治療するための、前記組成物。

## 【請求項 5】

(a) シクロホスファミドと、(b) *Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物とを含む組合せであって、がん、炎症性障害または自己免疫障害を治療するための、前記組合せ。

## 【請求項 6】

*Enterococcus* が、*Enterococcus hirae* ではない、請求項 5 に記載の組合せ。

## 【請求項 7】

シクロホスファミドが、1 日当たり 1000 mg 以下、800 mg 以下、500 mg 以下または 200 mg 以下の投与量で投与される、請求項 5 または 6 に記載の組合せ。

## 【請求項 8】

シクロホスファミドが、1 日当たり 10 ~ 500 mg、50 ~ 250 mg または 80 ~ 150 mg の間の投与量で投与される、請求項 5 または 6 に記載の組合せ。

## 【請求項 9】

シクロホスファミドが、経口投与される、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

## 【請求項 10】

a) 細菌株が、*Enterococcus gallinarum* もしくは *Enterococcus casei* であり、及び / または

b) *Enterococcus gallinarum* もしくは *Enterococcus casei* の細菌株の 16S rRNA 配列と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくは 99.9 % 同一である 16S rRNA 配列を細菌株が有し、及び / または

c) 配列番号 1、2 もしくは 5 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくは 99.9 % 同一である 16S rRNA 配列を細菌株が有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物または組合せ。

## 【請求項 11】

(a) 配列番号 2 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくは 99.9 % 同一である 16S rRNA 配列を細菌株が有するか、または、配列番号 2 の 16S rRNA 配列を細菌株が有するか、あるいは、(b) 配列番号 5 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくは 99.9 % 同一である 16S rRNA 配列を細菌株が有するか、または配列番号 5 の 16S rRNA 配列を細菌株が有する、請求項 1 ~ 4、10 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 5 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記細菌株が、

a) 受託番号NCIMB42488として寄託された*Enterococcus gallinarum*細菌及び/または

b) 受託番号NCIMB42761として寄託された*Enterococcus gallinarum*細菌及び/または

c) *Enterococcus casei* *flavus* 細菌

である、請求項1～4、10～11のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～11のいずれか1項に記載の組合せ。

【請求項13】

組成物が、

10

a) *Clostridium*種のレベルを低下させ、及び/または

b) *Clostridium*クラスターXIVaの細菌のレベルを低下させ、及び/または

c) *Lachnospiraceae*種の細菌のレベルを上昇させ、及び/または

d) *Roseburia*種の細菌のレベルを上昇させ、及び/または

e) *Barnesiella intestinihominis*種のレベルを上昇させ、及び/または

f) ペントースリン酸経路と関連する少なくとも1つの代謝物のインビボでの形成を減少させる、

請求項1～4、10～12のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～12のいずれか1項に記載の組合せ。

20

【請求項14】

ペントースリン酸経路の代謝物が、リボース5-リン酸、エリトロース4-リン酸及びセドヘブツロース7-リン酸からなる群から選択される、請求項13(f)に記載の組成物または組合せ。

【請求項15】

組成物が、*Alistipes*、*Prevotella*、*Parabacteroides*、*Hallella*、*Anaerotruncus*、*Bacteroides*、*Flavonifractor*、*Clostridium* XIVb、*Vampirovibrio*、*Anaeroplasma*及び/または*Barnesiella*のうちの1または2以上のレベルを上昇させる、請求項1～4、10～14のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～14のいずれか1項に記載の組合せ。

30

【請求項16】

a) 組成物が、1または2以上の薬学的に許容される賦形剤もしくは担体を含み、及び/または

b) 細菌株が、凍結乾燥されており、及び/または

c) 細菌株が、生存可能であり、及び/または

d) 細菌株が、腸に部分的もしくは完全に定着できる、

請求項1～4、10～15のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～15のいずれか1項に記載の組合せ。

40

【請求項17】

*Enterococcus*の単一の株を含む、請求項1～4、10～16のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～16のいずれか1項に記載の組合せ。

【請求項18】

組成物が*Enterococcus*を含み、及び、いずれかの他の属の細菌を含まないか、またはそのような他の細菌をわずかな量で含むに過ぎない、請求項1～4、10～17のいずれか1項に記載の組成物、または請求項5～17のいずれか1項に記載の組合せ。

【請求項19】

組成物が、*Enterococcus gallinarum*を含み、及び、いずれか

50

の他の種の細菌を含まないか、またはそのような他の細菌をわずかな量で含むに過ぎない、請求項 1 ~ 4、10 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 5 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

【請求項 20】

*Enterococcus* を微生物コンソーシアムの一部として含む、請求項 1 ~ 4、10 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 5 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の組合せ。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 4、10 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む食品またはワクチン。

【請求項 22】

対象における腸内微生物叢の多様性を向上させる方法であって、前記向上の必要な対象に、*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物を投与することを含み、任意に、前記 *Enterococcus* が、*Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus casseliflavus* である、前記方法。

【請求項 23】

炎症性腸疾患、体重減少、潰瘍性大腸炎またはクローン病の治療方法であって、前記治療の必要な対象に、*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物を投与することを含み、任意に、前記 *Enterococcus* が、*Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus casseliflavus* である、前記方法。

【請求項 24】

がん、炎症性障害または自己免疫疾患の治療方法であって、前記治療の必要な対象に、(a) シクロホスファミドと、(b) *Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物との組合せを投与することを含み、任意に、前記 *Enterococcus* が、*Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus casseliflavus* である、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細菌株を含む組成物の分野、及びそのような組成物を疾患の治療に使用する分野におけるものである。

【背景技術】

【0002】

ヒトの腸は、子宮内では無菌であると考えられるが、出生直後に、さまざまな種類の母体微生物及び環境微生物に暴露される。その後、微生物の定着及び遷移の動的期間が生じるが、この動的期間は、分娩様式、環境、食事及び宿主の遺伝子型のような要因による影響を受け、これらのすべての要因が、特に幼少期に、腸内微生物叢の組成に影響を及ぼす。その後、微生物叢は安定して、成人様になる [1]。ヒト腸内微生物叢には、500 ~ 1000 個超の異なるファイロタイプが含まれ、これらは本質的に、*Bacteroidetes* 及び *Firmicutes* という 2 つの主な細菌門に属する [2]。ヒト消化管への細菌定着に起因する良好な共生関係によって、多種多様な代謝的機能、構造的機能、保護的機能及びその他の有益な機能が得られている。定着した消化管の代謝活性が増強されると、増強されない場合には難消化性である食事が、副産物の放出を伴いながら分解され、重要な栄養源が宿主に供給される。同様に、腸内微生物叢の免疫学的な重要性は、十分に認識されており、免疫系が損なわれた無菌動物であって、共生細菌の導入あとに免疫系が機能的に再構成される無菌動物において例証されている [3 ~ 5]。

【0003】

微生物叢組成の急激な変化は、炎症性腸疾患 (IBD) のような消化器障害で立証されている。例えば、*Clostridium* クラスター X IV a の細菌のレベルは、IBD 患者で低下する一方で、*E. coli* の数は増加することから、消化管内の善玉菌と悪玉

10

20

30

40

50

菌のバランスが変化することが示唆されている[6~9]。興味深いことに、IBDの炎症状態と関連するこの微生物変化は、エフェクターT細胞集団のアンバランスによって特徴付けられる。

#### 【0004】

微生物叢の変化に関連する、ヒトの多くの疾患の特徴は、微生物叢の多様性の喪失であり、健常な対象における典型的な集団の微生物叢と比べて、単純に微生物叢組成が変化したものであるいわゆるディスバイオシスとは異なる。腸内微生物叢の多様性の変化は、がんを発現するリスクの調節に関連付けられている[10]。健常な微生物叢の再構築は、困難であることがある。消化管内の細菌が、定着抵抗性を示すからである。これにより、不健康な対象の微生物叢の多様性を向上させることによって、不健康な対象の微生物叢を治療しようとするときに、難題が生じる[11]。しかしながら、微生物叢の多様性とがんとの関連性に対する理解は、不十分である。

10

#### 【0005】

当該技術分野においては、微生物叢の多様性を向上させ、及び/または微生物叢の多様性の安定性を向上させると効果が得られる疾患の新規な治療方法に対するニーズが存在する。

#### 【発明の概要】

#### 【0006】

本発明者は、対象の腸内微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させることによって、疾患を治療及び/または予防するための新規療法を開発した。特に、本発明者は、Enterococcus属の細菌株が、対象の遠位消化管内の腸内微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのに有効であり得ることを見出した。本発明者は、Enterococcus gallinarum及びEnterococcus caselliflavusからなるリストから選択した種の細菌株が、対象、特に、疾患を罹患していると診断された対象における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのに特に有効であり得ることを確認した。

20

#### 【0007】

本発明は、Enterococcus属の細菌株を含む組成物であって、対象における微生物叢の多様性の向上及び/または安定化方法で用いる方法を提供する。同様に、本発明は、対象における微生物叢の多様性の向上及び/または安定化方法であって、Enterococcus属の細菌株を含む組成物を対象に投与する工程を含む方法も提供する。好ましくは、そのEnterococcusは、Enterococcus gallinarumまたはEnterococcus caselliflavusの種の細菌株である。

30

#### 【0008】

「微生物叢の多様性の向上」という表現は、本明細書では、対象の微生物叢における異なる種類の細菌の数を増加させ、及び/またはその異なる種類の均等度を向上させることを意味するものとして使用する。微生物叢の多様性は、対象における異なる細菌属、細菌種または細菌株の数の増加によって測定できる。微生物叢の多様性のこの向上は、対象の腸内または対象の遠位消化管内の向上であることができる。この向上または均等度は、本発明による組成物を投与する前の対象における多様性/均等度と比較して測定し得る。微生物叢における異なる種類の細菌の相対存在量は、本発明の組成物による治療後に、均等度が上昇する。

40

#### 【0009】

「微生物叢の多様性の安定化」とは、微生物叢における異なる属の相対数が、安定した状態を保つ(例えば、相対数の非変動度が、2回の測定間で70%超、80%超、90%超、95%超または99%超である)ことを意味する。微生物叢の多様性の安定化は、対象の腸内または対象の遠位消化管内におけるものであることができる。相対的な安定性は、本発明による組成物を投与する前の安定性に比較して評価し得る。

#### 【0010】

50

対象の微生物叢の安定性は、2つの異なる時点における、対象のマイクロバイオーームを比較することによって評価できる。その2つの異なる時点は、少なくとも3日以上離れた時点、例えば、少なくとも1週間、2週間、1カ月、3カ月、6カ月、1年または2年離れた時点であることができる。その2つの異なる時点は、3～7日離れた時点、1～2週間離れた時点、2～4週間離れた時点、4～8週間離れた時点、8～24週間離れた時点、24～40週間離れた時点、40～52週間離れた時点、または52週間超離れた時点であり得る。3個以上の異なる時点、例えば、3個、4個、5個、または6個以上の時点を使用できる。例えば上で定めたような様々な時点の中で、好適な間隔を選択する。

#### 【0011】

微生物叢の多様性の向上または安定化は、試料において、配列ベースの細菌分類数、または典型的には、16S rRNAアンプリコンシーケンシング法によって求めた操作的分類単位(OTU)の数を測定することによって定量し得る。多様性の向上は、Shannon多様性指数またはChao指数の上昇によって測定し得る[12]。

#### 【0012】

本発明者は、対象における微生物叢の多様性を向上させ、及び/または微生物叢の多様性を安定化させることによって、疾患を治療及び予防するための新規療法も開発した。例えば、本発明は、Enterococcus属の細菌株を含む組成物であって、がんと診断された対象における微生物叢の多様性を向上させ、及び/または微生物叢の多様性を安定化させる方法で用いる組成物を提供する。当業者が認識するように、がん患者は、そのがん及び/またはがん治療の影響により、マイクロバイオーームの多様性の低下をきたすことがあり、その低下は、二次疾患の発現または増悪に関連することがある。

#### 【0013】

その発現及び/または増悪が、マイクロバイオーームの多様性の低下と関連するとされている疾患の数は増加している。これらの疾患としては、アルツハイマー病[13]、パーキンソン病[14]、自閉症[15]及び多発性硬化症[16、17]のような神経学的状態、過敏性腸症候群[18]及び炎症性腸疾患[19、20、21]のような消化器障害、関節リウマチ[22]及び乾癬性関節炎[23]のような筋骨格障害、I型糖尿病[24]を含む代謝障害、ならびにサルコペニア[25]及び筋痛性脳脊髄炎[26]を含む、るいそう/疲労状態が挙げられる。

#### 【0014】

したがって、対象(がん患者を含む)のマイクロバイオーームの多様性を安定化または向上させることができる、すなわち、マイクロバイオーームの多様性の低下によって特徴付けられる疾患を治療または予防できる本発明の組成物は望ましい。

#### 【0015】

本発明は、Enterococcus属の細菌株を含む組成物であって、対象における微生物叢の多様性を向上させ、及び/または微生物叢の多様性を安定化させる方法で用いる組成物を提供する。Enterococcus属の細菌は、生化学的な手段を用いることによって同定できる[27]。本発明の組成物の細菌株は、Enterococcus gallinarumの細菌株の16S rRNA配列と少なくとも95%同一である16S rRNA配列を有してよい。したがって、本発明は、配列番号1、2または5と(その配列の100%に対して)少なくとも95%同一である16S rRNA配列を有する細菌株を含む組成物であって、対象における微生物叢の多様性及び/または微生物叢の安定性を向上させる方法で用いる組成物を提供する。

#### 【0016】

本発明の組成物中の細菌株は、Enterococcus gallinarumまたはEnterococcus casseliflavusの細胞株であってよい。Enterococcus gallinarumまたはEnterococcus casseliflavusの細菌株の16S rRNA配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または99.9%同一である16S rRNA配列を有する細菌株のような近縁の株も用いてよい。好ましくは、その細菌株は、配列番号1、

10

20

30

40

50

2 または 5 と少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % または 99.9 % 同一である 16S rRNA 配列を有する。好ましくは、本発明で用いる細菌株は、配列番号 1、2 または 5 によって表される 16S rRNA 配列を有する。この方が好ましい。本発明者は、このような株が、微生物叢の多様性を特に大きく向上させることを見出したからである。

【0017】

本発明の細菌株は、受託番号 NCIMB 42488 として寄託された *Enterococcus gallinarum* 細菌であってよい。その細菌株は、受託番号 NCIMB 42761 として寄託された *Enterococcus gallinarum* 細菌であってよい。本発明の細菌株は、*Enterococcus casei* fl avus 細菌であってよい。

10

【0018】

本発明の組成物は、経口投与に適することがある。本発明の組成物の株の経口投与は、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効であり得る。また、経口投与は、患者及び医療従事者にとって利便的であり、腸への送達、及び / または部分もしくは完全定着を可能にする。

【0019】

本発明の組成物は、1 または 2 以上の薬学的に許容される賦形剤または担体を含んでよい。本発明の組成物は、凍結乾燥した細菌株を含んでよい。凍結乾燥は、細菌の送達を可能にする安定な組成物を調製するための有効かつ利便的な技法である。

20

【0020】

本発明は、上記のような組成物を含む食品を提供する。本発明は、上記のような組成物を含むワクチン組成物を提供する。

【0021】

本発明は、*Enterococcus* 属（好ましくは、*Enterococcus gallinarum* 種）の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものを療法で使用することも提供する。

【0022】

加えて、本発明は、対象における微生物叢の多様性の向上方法であって、*Enterococcus gallinarum* 種の細菌株を含む組成物をその対象に投与することを含む方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】図 1 a は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 518 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点で観察された多様性である。図 1 b は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 518 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点の Shannon 多様性である。図 1 c は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 0554 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点で観察された多様性である。図 1 d は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 0554 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点の Shannon 多様性である。図 1 e は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 0858 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点で観察された多様性である。図 1 f は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の MRX 0858 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点の Shannon 多様性である。図 1 g は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の REF 10 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点で観察された多様性である。図 1 h は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の REF 10 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点の Shannon 多様性である。図 1 i は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の抗 CTLA 4 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点で観察された多様性である。図 1 j は、EMT 6 マウスにおける、- 14 日目の抗 CTLA 4 による処置後、0 日目及び 22 日目の時点の Shannon 多様性である。

40

【図 2】LLC マウスにおいて、細菌株 MRX 518 (G2)、MRX 0554 (G3)

50

、MRX0858 (G4)、REF10-DSM100110 (G5)、抗CTLA4 (G6) による処置後、及び未処置 (G1) における18日目のShannon多様性である。

【図3a】Bray-Curtis非類似度に基づく微生物叢プロファイルのPCoA座標付けプロットである。データは、時点に従って群分けされており、全処置群を含む (p値 = 0.001)。総数Nは210であり、各時点のnは70である。

【図3b】Bray-Curtis非類似度に基づく微生物叢プロファイルのPCoA座標付けプロットである。データは、-15日目の時点に、処置に従って群分けされている (p値 = 0.077)。総数Nは70であり、各処置のnは10である。

【図3c】Bray-Curtis非類似度に基づく微生物叢プロファイルのPCoA座標付けプロットである。データは、22日目の時点に、処置に従って群分けされている (p値 = 0.001)。総数Nは70であり、各処置のnは10である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

細菌株

本発明による用途用の組成物は、Enterococcus属の細菌株を含む。実施例によって、この属の細菌が、対象における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのに有用であることが実証されている。この属の好ましい細菌種は、Enterococcus gallinarumまたはEnterococcus casseliflavusである。受託番号NCIMB42488及び受託番号NCIMB42761として寄託されたEnterococcus gallinarumの細菌株が好ましい。本発明者は、これらの株で良好な結果を得たからである。本発明の細菌株は、Enterococcus hiraeではないことが好ましい。

【0025】

Enterococcus spp. は、ランダム増幅多型DNA (RAPD) 解析によって同定できる。RAPD解析には、標的生物のDNA配列の特定の知識はいずれも不要である。RAPDマーカーは、任意のヌクレオチド配列の1つのプライマーによって、ゲノムDNAのランダムなセグメントをPCR増幅して得られるDNA断片であるとともに、遺伝的に異なる個体を鑑別できるDNA断片である [28]。

【0026】

Enterococcus gallinarumは、大半はペアまたは短鎖で、球菌様細胞を形成する。Enterococcus gallinarumは、非運動性であり、血液寒天培地または普通寒天培地上のコロニーは、円状かつスムーズである。Enterococcus gallinarumは、Lancefield D群抗血清と反応する。Enterococcus gallinarumの基準株は、F87/276 = PB21 = ATCC49573 = CCUG18658 = CIP103013 = JCM8728 = LMG13129 = NBRC100675 = NCIMB702313 (以前はNCDO2313) = NCTC12359 [29] である。Enterococcus gallinarumの16S rRNA遺伝子配列のGenBank受託番号は、AF039900である (本明細書では、配列番号1として開示されている)。例示的なEnterococcus gallinarum株は、[29] に記載されている。

【0027】

受託番号NCIMB42488として寄託されたEnterococcus gallinarum株は、実施例で試験したものであり、本明細書では、MRX518株とも称する。試験したMRX518株の16S rRNA配列は、配列番号2に示されている。MRX518株は、4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) が2015年11月16日に、「Enterococcus sp」として、国際寄託当局のNCIMB, Ltd (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) に寄託したものであ



り、受託番号 NCIMB 42488 が割り当てられたものである。

【0028】

受託番号 NCIMB 42761 として寄託された *Enterococcus gallinarum* 株は、実施例で試験したものであり、本明細書では、MRX554 株とも称する。MRX554 及び MRX0554 への言及は、同義的に使用する。MRX554 株は、4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) が 2017 年 5 月 22 日に、「*Enterococcus sp.*」として、国際寄託当局の NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) に寄託したものであり、NCIMB 42761 の受託番号が割り当てられたものである。

10

【0029】

*Enterococcus gallinarum* MRX518 株のゲノムは、染色体及びプラスミドを含む。MRX518 株の染色体配列は、配列番号 3 に示されている。MRX518 株のプラスミド配列は、配列番号 4 に示されている。これらの配列は、PacBio RS II のプラットフォームを用いて生成されたものである。

【0030】

実施例で試験した株と近縁の細菌株も、対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させるのに有効であることが予想される。したがって、本発明による組成物は、その組成物を投与する前の対象における微生物の多様性のレベルまたは安定性と比べて、対象における微生物の多様性を向上及び／または安定化させることができる株を含み得る。

20

【0031】

本発明で用いる細菌株は、*Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus casseliflavus* の細菌株の 16S rRNA 配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% または 99.9%、好ましくは、少なくとも 99.5% または 99.9% 同一である 16S rRNA 配列を有することができる。本発明で用いる細菌株は、配列番号 1、2 または 5 と少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% または 99.9% 同一である 16S rRNA 配列を有してもよい。好ましくは、本発明で用いる細菌株は、配列番号 1、2 または 5 によって表される 16S rRNA 配列を有する。

30

【0032】

受託番号 NCIMB 42488 または受託番号 NCIMB 42761 として寄託された細菌のバイオタイプである細菌株も、対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させるのに有効であることが予想される。バイオタイプは、生理的及び生化学的特徴が同じであるか、または非常に似ている近縁の株であり、例えば、本発明の組成物を投与する前の対象における微生物の多様性と比べて、対象における微生物の多様性を、受託番号 NCIMB 42488 または受託番号 NCIMB 42761 として寄託された細菌と同じまたは同程度のレベル（例えば、 $x \pm 20\%$ 、 $x \pm 10\%$ 、 $x \pm 5\%$  または  $x \pm 1\%$ ）まで向上及び／または安定化させることができる。

40

【0033】

受託番号 NCIMB 42488 または受託番号 NCIMB 42761 として寄託された細菌のバイオタイプであるとともに、本発明で用いるのに適する株は、受託番号 NCIMB 42488 または受託番号 NCIMB 42761 として寄託された細菌に対して、他のヌクレオチド配列をシーケンシングすることによって同定し得る。例えば、実質的に全ゲノムをシーケンシングしてよく、本発明で用いるバイオタイプ株は、その全ゲノムの少なくとも 80%（例えば、少なくとも 85%、90%、95% もしくは 99%、またはその全ゲノム）にわたる配列同一性が少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% または 99.9% であってよい。例えば、バイオタイプ株は、そのゲノムの少なくとも 98% にわたる配列同一性が少なくとも 98% であるか、または、そのゲノムの

50

９９％にわたる配列同一性が少なくとも９９％であることができる。バイオタイプ株を同定するのに用いるのに好適な他の配列としては、h s p 6 0、またはB O X、E R I C、( G T G )<sub>5</sub>もしくはR E Pのような繰り返し配列を挙げてよい〔 3 0 〕。

【 0 0 3 4 】

バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 4 8 8として寄託された細菌の対応する16 S r R N A配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である16 S r R N A配列を有してよい。バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 4 8 8として寄託されたM R X 5 1 8株の対応する16 S r R N A配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である16 S r R N A配列を有することができ、配列番号2と少なくとも９９％同一である（例えば、少なくとも９９．５％または少なくとも９９．９％同一である）16 S r R N A配列を含む。バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 4 8 8として寄託されたM R X 5 1 8株の対応する16 S r R N A配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である16 S r R N A配列を有することができ、配列番号2の16 S r R N A配列を有する。好ましくは、バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 4 8 8として寄託されたM R X 5 1 8株の対応する配列と少なくとも９９％同一である（例えば少なくとも９９．５％同一であるか、または少なくとも９９．９％同一である）16 S r R N A配列を有する。

10

【 0 0 3 5 】

バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 7 6 1として寄託された細菌の対応する全ゲノム配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である全ゲノム配列を有してよい。バイオタイプ株は、N C I M B 4 2 7 6 1として寄託されたM R X 5 5 4株の対応する全ゲノム配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である全ゲノム配列を有するとともに、さらに、配列番号5と少なくとも９９％同一である（例えば、少なくとも９９．５％または少なくとも９９．９％同一である）16 S r R N A配列を含むことができる。バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 4 8 8として寄託されたM R X 5 1 8株の対応する配列との配列同一性が少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％または９９．９％である全ゲノム配列を有することができるとともに、配列番号5の16 S r R N A配列を有する。好ましくは、バイオタイプ株は、受託番号N C I M B 4 2 7 6 1として寄託されたM R X 5 5 4株の対応する配列と少なくとも９９％同一である（例えば、少なくとも９９．５％同一であるか、または少なくとも９９．９％同一である）全ゲノム配列を有する。

20

30

【 0 0 3 6 】

本発明のバイオタイプは、対象における腸内微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させる有効性が、上で定義したような*Enterococcus gallinarum*または*Enterococcus casseliflavus*と同程度となる。したがって、本発明のバイオタイプでは、上で定義したような*Enterococcus gallinarum*株または*Enterococcus casseliflavus*株の細菌によって得られる向上度と比べて、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％の向上度が得られることになる。この代わりに、またはこれに加えて、本発明のバイオタイプは、微生物叢の多様性を、上で定義したような*Enterococcus gallinarum*または*Enterococcus casseliflavus*と同様のレベルまで安定化させることができ、すなわち、対象の微生物叢内の異なる種類の細菌の数であって、上で定義したような*Enterococcus gallinarum*または*Enterococcus casseliflavus*によって安定化される、異なる種類の細菌の数の少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％または少なくとも９９％である数を維持できる。微生物の多様性は、異なる種類の細菌の数を考察することによって

40

50

評価できる。

【0037】

本発明で用いる細菌株は、配列番号3と配列同一性を有する染色体を有してよい。本発明で用いる細菌株は、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の少なくとも60%（例えば、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）にわたって、少なくとも90%である（例えば、配列同一性が少なくとも92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%である）染色体を有することができる。例えば、本発明で用いる細菌株は、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の70%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の80%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の90%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の100%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の70%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の80%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の90%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の100%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の70%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の80%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の90%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号3との同一性が、配列番号3の95%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の100%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号3との配列同一性が、配列番号3の90%にわたって、少なくとも99.5%であるか、配列番号3との同一性が、配列番号3の95%にわたって、少なくとも99.5%であるか、配列番号3との同一性が、配列番号3の98%にわたって、少なくとも99.5%であるか、または配列番号3との配列同一性が、配列番号3の100%にわたって少なくとも99.5%である染色体を有してよい。

10

20

30

40

【0038】

本発明で用いる細菌株は、配列番号4と配列同一性を有するプラスミドであることができる。本発明で用いる細菌株は、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の少なくとも60%（例えば、少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）にわたって、少なくとも90%である（例えば、配列同一性が少なくとも92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%である）プラスミドを有することができる。例えば、本発明で用いる細菌株は、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の70%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の80%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の90%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の100%にわたって、少なくとも90%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の70%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の80%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の90%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の100%にわたって、少なくとも95%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の70%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の80%にわたって、少なくとも98%であるか、配列番号4との配列同一性が、配列番号4の90%にわたって、少なくとも98%であるか、または配列番号4との配列同一性が、配列番号4の100%にわたって、少なくとも98%であるプラスミドを有してよい。

【0039】

本発明で用いる細菌株は、例えば上記のように、配列番号3と配列同一性を有する染色

50

体と、例えば上記のように、配列番号 1 または 2 のいずれかと配列同一性を有する 16S rRNA 配列、好ましくは、配列番号 2 と少なくとも 99% 同一である 16S rRNA 配列を有してよく、より好ましくは、配列番号 2 の 16S rRNA 配列を含み、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含む。

【0040】

本発明で用いる細菌株は、例えば上記のように、配列番号 3 と配列同一性を有する染色体を有してよく、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含み、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効である。

【0041】

本発明で用いる細菌株は、例えば上記のように、配列番号 3 と配列同一性を有する染色体と、例えば上記のように、配列番号 1 または 2 のいずれかと配列同一性を有する 16S rRNA 配列を有することができ、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含み、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効である。

10

【0042】

本発明で用いる細菌株は、配列番号 2 によって表される 16S rRNA 配列と少なくとも 99%、99.5% または 99.9% 同一である（例えば、配列番号 2 の 16S rRNA 配列を含む）16S rRNA 配列と、配列番号 3 との配列同一性が、配列番号 3 の少なくとも 90% にわたって、少なくとも 95% である染色体を有してよく、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含み、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効である。

20

【0043】

本発明で用いる細菌株は、配列番号 2 によって表される 16S rRNA 配列と少なくとも 99%、99.5% または 99.9% 同一である（例えば、配列番号 2 の 16S rRNA 配列を含む）16S rRNA 配列と、配列番号 3 との配列同一性が、配列番号 3 の少なくとも 98% にわたって（例えば、少なくとも 99% または少なくとも 99.5% にわたって）、少なくとも 98% である（例えば、配列同一性が少なくとも 99% または少なくとも 99.5% である）染色体を有することができ、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含み、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効である。

30

【0044】

本発明で用いる細菌株は、*Enterococcus gallinarum* であってよく、配列番号 2 によって表される 16S rRNA 配列と少なくとも 99%、99.5% または 99.9% 同一である（例えば、配列番号 2 の 16S rRNA 配列を含む）16S rRNA 配列と、配列番号 3 との配列同一性が、配列番号 3 の少なくとも 98% にわたって（例えば、少なくとも 99% または少なくとも 99.5% にわたって）、少なくとも 98% である（例えば、配列同一性が少なくとも 99% または少なくとも 99.5% である）染色体を有してよく、任意に、上記のように、配列番号 4 と配列同一性を有するプラスミドを含み、対象における微生物叢の多様性を増大させるのに有効である。

【0045】

2つのヌクレオチド配列間の配列同一性の割合（%）への言及は、その2つの配列をアラインメントして比較した際に同じであるヌクレオチドの割合（%）指す。このアラインメント及び相同性または配列同一性の割合（%）は、当該技術分野において知られているソフトウェアプログラム、例えば、参考文献[31]の7.7.18節に記載されているプログラムを用いて求めることができる。好ましいアラインメントは、ギャップオープンペナルティーが12、ギャップエクステンションペナルティーが2、BLOSUMマトリックスが62のアフィンギャップ検索を用いるSmith-Watermanの相同性検索アルゴリズムによって求める。Smith-Watermanの相同性検索アルゴリズムは、参考文献[32]に開示されている。

40

【0046】

他の考え得るコンピュータープログラムは、BLASTまたはFASTAであり、その

50

プログラムでは、各残基の最適な照合のために、(1つもしくは両方の配列の全長、または1つもしくは両方の配列の所定の部分のいずれかに沿って)2つの配列をアラインメントする。そのプログラムでは、デフォルトのオープニングペナルティ及びデフォルトのギャップペナルティが提供されており、そのコンピュータプログラムと併せて、PAM250[33]のようなスコアリングマトリックスを使用できる。例えば、続いて、同一マッチの総数に100を掛けてから、マッチ範囲内の長い方の配列の長さと、2つの配列をアラインメントするために、短い方の配列に導入したギャップの数の合計で除したものとして、同一性の割合(%)を算出できる。

#### 【0047】

あるいは、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された細菌のバイオタイプであるとともに、本発明で用いるのに適する株は、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761寄託株、ならびに制限断片解析及び/またはPCR解析を用いることによって、例えば、蛍光増幅断片長多型(FALP)及び反復DNAエレメント(rep)-PCRフィンガープリンティング、タンパク質プロファイリング、または部分的な16Sもしくは23srDNAシーケンシングを用いることによって同定し得る。これらの技法を用いて、他のEnterococcus gallinarumまたはEnterococcus casseliflavus株を同定し得る。

#### 【0048】

受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された細菌のバイオタイプであるとともに、本発明で用いるのに適する株は、増幅リボソームDNA制限解析(ARDRA)によって解析したときに、例えばSau3AI制限酵素を用いたときに(例示的な方法及び手引きについては、例えば、参考文献34を参照されたい)、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された細菌と同じパターンを示す株であってよい。あるいは、バイオタイプ株は、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された細菌と同じ炭水化物発酵パターンを有する株として同定し得る。炭水化物発酵パターンは、API50CHLパネル(bioMerieux)を用いて求めることができる。本発明で用いる細菌株は、好ましくは、API50CHL解析によって(好ましくは、bioMerieuxのAPI50CHLパネルを用いて)求めた場合に、

(i)L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、N-アセチルグルコサミン、アミグダリン、アルブチン、サリシン、D-セロビオース、D-マルトース、D-トレハロース、ゲンチオビオース及びD-タガトースのうちの少なくとも1個(例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個またはすべて)の発酵性が陽性であり、及び/または

(ii)D-マンニトール、メチル-D-グリコピラノシド、D-ラクトース、デンプンのうちの少なくとも1個(例えば、少なくとも2個、3個、4個またはすべて)の発酵性が擬陽性であることができる。

#### 【0049】

好ましくは、本発明で用いるのに適するバイオタイプ株は、好ましくは、API50CHL解析によって(好ましくは、bioMerieuxのAPI50CHLパネルを用いて)求めた場合に、

(i)L-アラビノース、D-リボース、D-キシロース、D-ガラクトース、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、N-アセチルグルコサミン、アミグダリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、D-セロビオース、D-マルトース、D-トレハロース、ゲンチオビオース及びD-タガトースの発酵性が陽性であり、及び/または

(ii)D-マンニトール、メチル-D-グリコピラノシド、デンプンの発酵性が擬陽性である

炭水化物発酵パターンを有する株である。

## 【0050】

好ましくは、本発明で用いるのに適するバイオタイプ株は、好ましくは、API 50 CHL 解析によって（好ましくは、bioMerieuxのAPI 50 CHL パネルを用いて）求めた場合に、

(i) L - アラビノース、D - キシロース、D - ガラクトース、D - グルコース、D - フルクトース、D - マンノース、N - アセチルグルコサミン、アミグダリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、D - セロビオース、D - マルトース、D - ラクトース、D - サッカロース（スクロース）、D - トレハロース及びゲンチオビオースの発酵性が陽性であり、及び／または

(ii) メチル - D - グリコピラノシド及びメリビオースの発酵性が擬陽性である

炭水化物発酵パターンを有する株である。受託番号NCIMB 42488または受託番号NCIMB 42761として寄託された細菌のバイオタイプのように、本発明の組成物及び方法で有用である他の株は、実施例に記載されているアッセイを含むいずれかの適切な方法または方策を用いて同定し得る。例えば、本発明で用いる株は、嫌気性YCF Aで培養し、及び／またはその細菌をII型コラーゲン誘導関節炎マウスモデルに投与してから、サイトカインレベルを評価することによって同定し得る。特に、受託番号NCIMB 42488または受託番号NCIMB 42761として寄託された細菌と同様の成長パターン、代謝種類及び／または表面抗原を有する細菌株が、本発明で有用であり得る。有用な株は、受託番号NCIMB 42488株に匹敵する免疫調節活性を有することになる。

## 【0051】

本発明で用いる細菌株は、好ましくは、炭水化物、アミノ酸及び硝酸塩の代謝アッセイ、任意に、アルカリホスファターゼ活性のアッセイによって求めた場合、より好ましくは、Rapid ID 32 A解析によって（好ましくは、bioMerieuxのRapid ID 32 Aシステムを用いて）求めた場合に、

(i) マンノース発酵、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、アルギニンアリールアミダーゼ、フェニルアラニンアリールアミダーゼ、ピログルタミン酸アリールアミダーゼ、チロシンアリールアミダーゼ、ヒスチジンアリールアミダーゼ及びセリンアリールアミダーゼのうちの少なくとも1個（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個またはすべて）に対して陽性であり、及び／または

(ii) - ガラクトシダーゼ - 6 - リン酸、 - グルコシダーゼ及びN - アセチル - グルコサミニダーゼのうちの少なくとも1個（例えば、少なくとも2個またはすべて）に対して擬陽性であることができ、及び／または

(iii) ラフィノース発酵、プロリンアリールアミダーゼ、ロイシルグリシンアリールアミダーゼ、ロイシンアリールアミダーゼ、アラニンアリールアミダーゼ、グリシンアリールアミダーゼ及びグルタミルグルタミン酸アリールアミダーゼのうちの少なくとも1個（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個またはすべて）に対して陰性であることができる。

## 【0052】

本発明で用いる細菌株は、

(i) 例えば、炭水化物、アミノ酸及び硝酸塩の代謝のアッセイによって求めた場合、好ましくは、Rapid ID 32 A解析によって（好ましくは、bioMerieuxのRapid ID 32 Aシステムを用いて）求めた場合に、グリシンアリールアミダーゼ、ラフィノース発酵、プロリンアリールアミダーゼ及びロイシンアリールアミダーゼのうちの少なくとも1個（例えば、少なくとも2個、3個または4個すべて）に対して陰性であることができ、及び／または

(ii) 好ましくは、API 50 CHL 解析によって（好ましくは、bioMerieuxのAPI 50 CHL パネルを用いて）求めた場合に、L - フコースの発酵性が擬陽性であることができる。

## 【0053】

本発明で用いる細菌株は、細胞外ATP産生菌、例えば、ATP Assay Kit (Sigma-Aldrich、MAK190)を用いて測定した場合に、ATPを6~6.7 ng/μl (例えば、6.1~6.6 ng/μlもしくは6.2~6.5 ng/μl、または6.33±0.10 ng/μl)産生する菌である。細菌の細胞外ATPは、T細胞受容体を介するシグナル伝達の活性化[35]、腸内Th17細胞の分化の活性化[36]、及びNLRP3インフラマソームを活性化することによる、炎症誘発性メディエーターIL-1の分泌の誘導[37]を含む多面的作用を有することができる。したがって、細胞外ATP産生菌である細菌株は、対象における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのに有用である。

#### 【0054】

10

本発明で用いる細菌株は、可動性エレメントタンパク質、キシロースABCトランスポーター(パーミアーゼ成分)及びFIG00632333(仮想タンパク質)という3つの遺伝子のうちの1または2以上を含むことができる。例えば、本発明で用いる細菌株は、可動性エレメントタンパク質及びキシロースABCトランスポーター(パーミアーゼ成分)、可動性エレメントタンパク質及びFIG00632333(仮想タンパク質)、キシロースABCトランスポーター(パーミアーゼ成分)及びFIG00632333(仮想タンパク質)、または可動性エレメントタンパク質、キシロースABCトランスポーター(パーミアーゼ成分)及びFIG00632333(仮想タンパク質)をコードする遺伝子を含む。

#### 【0055】

20

上で論じたように、本発明で用いるEnterococcus gallinarum株またはEnterococcus caseelliflavus株は、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された株と同じ安全性特性及び治療有効性特性を有する株であってよい。したがって、本発明の組成物は、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された株ではないが、受託番号NCIMB42488または受託番号NCIMB42761として寄託された株と同じ安全性特性及び治療有効性特性を有するEnterococcus gallinarum株を含むことができる。株の安全性特性は、例えば、その株の抗菌薬耐性を試験することによって、例えば、抗菌薬に対する内因性耐性と伝達耐性を区別することによって定めることができる。株の安全性特性は、インビトロでの株の病原特性、例えば、毒素の産生レベルを評価することによっても定めることができる。他の安全性試験としては、ラットモデル及びマウスモデルにおいて、細菌株の急性または慢性毒性を試験することが挙げられる。株の治療有効性は、関連するモデルを用いて、インビトロ及びインビボで細菌株の機能の特徴づけることによって定めることができる。

30

#### 【0056】

好ましい実施形態では、本発明の組成物中の細菌株は、生菌であり、腸に部分的または完全に定着できる。

#### 【0057】

##### 治療的使用

本発明の組成物は、疾患を罹患していると診断された対象における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させる方法で用いるためのものである。本発明の組成物を投与すると、微生物叢の多様性が向上し得ることが実施例によって実証されている。実施例によってさらに、本発明の組成物が、対象における微生物叢の多様性の安定性を向上できることが示されている。

40

#### 【0058】

したがって、本発明の組成物を用いて治療または予防する疾患は好ましくは、健常な対象の微生物叢の多様性と比べて、微生物叢の多様性のレベルの低下と関連する疾患、及び/または微生物叢の安定性の低下と関連する疾患である。

#### 【0059】

本発明の組成物は、例えば、健常な対象または健常な対象の集団と比べると、微生物叢

50

の多様性のレベルが低下しているか、または低下していると予想される対象で用いるためのものである。例えば、本発明の組成物は、101個未満の異なる細菌種（例えば、100個未満、99個未満、98個未満、97個未満、96個未満、95個未満、93個未満、90個未満、85個未満、80個未満、75個未満もしくは70個未満の細菌種）及び／または195個未満の異なる株（例えば、193個未満、190個未満、187個未満、185個未満、183個未満、180個未満、175個未満、170個未満、165個未満、160個未満、150個未満、140個未満の細菌株）をその微生物叢に有する対象の治療で用いるためのものであることができる。例えば、本発明の組成物は、健常な対象と比べて、または健常な対象の集団に比べて、少なくとも1個少ない細菌属（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個または10個少ない細菌属）をその腸内微生物叢に有する対象の治療で用いるためのものであることができる。本発明の治療または予防は、微生物叢の多様性のレベルが低下している者として対象を診断する工程を含むことができ、そして、多様性のレベルの低下が見られることが明らかになった場合には、その対象を、本発明による組成物で治療する。

10

20

30

40

50

#### 【0060】

微生物叢の多様性の低下は、多くの病理学的疾患と関連しており、実施例によって、本発明の組成物が、対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させるのに有効であり得ることが実証されている。当業者は、患者における微生物叢の多様性及び／または安定性を評価して、それを健常な対象の微生物叢の多様性及び／または安定性と比較することによって、本発明の組成物で微生物叢の多様性／安定性を向上させると恩恵を受ける好適な疾患を容易に特定できる。

#### 【0061】

その疾患の発症機序は、腸に影響を及ぼし得る。しかしながら、別のケースでは、その疾患の発症機序は、腸に影響を及ぼさないか、または腸に局在しない。その疾患の治療または予防は、腸で行うことも、遠位部位で行うこともできる。治療する疾患は、全身性であってもよい。

#### 【0062】

微生物叢の多様性の低下によって特徴付けられる疾患であって、本発明の組成物を用いて治療し得る疾患の例としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、自閉症及び多発性硬化症のような神経学的状態、過敏性腸症候群及び炎症性腸疾患のような消化器障害、関節リウマチ及び乾癬性関節炎のような筋骨格障害、I型糖尿病を含む代謝障害、ならびにサルコペニア及び筋痛性脳脊髄炎を含む、るいそう／疲労状態が挙げられる。

#### 【0063】

実施例によって、本発明の組成物で治療すると、微生物叢の多様性及び／または微生物叢の安定性が向上することが示されている。したがって、上記のような組成物は、対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させる方法において有用である。上で説明したように、マイクロバイオームの多様性の低下と関連する疾患は、かなりの数存在する。マイクロバイオームの多様性の低下は、特定の疾患（例えば、がん）またはそれらの疾患を治療するために使用する療法によって発生及び／または悪化し得る。

#### 【0064】

本発明の組成物は、がんと診断された対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させるのに使用できる。消化管マイクロバイオームと、がんの数との関連性が、これまで示唆されてきている。例えば、結腸直腸癌患者から得た糞便試料の分類学的解析によって、健常な患者と比べて、微生物叢の多様性の低下が見られた。したがって、微生物叢の多様性の向上は、マイクロバイオームの多様性の低下によって特徴付けられる疾患を予防または治療し得るのみならず、有益なことに、結腸直腸癌のようながんの予防または治療にも寄与し得る。

#### 【0065】

本発明の組成物は、例えば、健常な対象または健常な対象の集団と比べると、微生物叢の多様性の安定性が低下しているか、または低下していると予想される対象で用いるため



のものである。本発明の治療または予防は、微生物叢の安定性が低下している対象を診断する工程を含むことができ、そして、安定性の低下が見られることが明らかになった場合には、その対象を、本発明による組成物で治療する。

【0066】

本明細書で定義されているような *Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物は、がん、炎症性障害または自己免疫疾患の治療に用いるシクロホスファミドと併用してもよい。

【0067】

微生物叢中の細菌は、実施例で用いた qPCR 法のような標準的な技法を用いて、対象から得た糞便で検出してよい。

【0068】

対象は、乳児（0～1歳の対象）、小児（1～18歳の対象）または成人（18歳超の対象）であることができる。対象は、健常な対象であることができ、その場合には、疾患を予防する目的で、本発明の組成物を使用でき、任意に、その健常な対象は、微生物叢の多様性の低下によって特徴付けられる疾患を発現するリスクのある者として同定された対象であってよい。

【0069】

対象は、抗菌薬による治療を以前に受けたことがあるか、受けているか、または（例えば、本発明による組成物の投与から1週間または1カ月以内に）受けることになっている。本発明の治療は、抗菌薬による治療の後、抗菌薬による治療と同時、または抗菌薬による治療の前に、本発明の組成物を投与することを含むことができる。本発明の組成物及びその1または2以上の抗菌薬は、個別投与、同時投与または順次投与用であってよい。

【0070】

本発明の組成物は、健常な対象と比べて、呼気中の水素レベルが上昇している対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させる方法で用いるためのものであることができる。本発明の組成物は、微生物叢の多様性及び／または安定性のレベルが低下しているか、または低下していると予想される対象の呼気中の水素レベルを低下させるのに用いることができる。本発明の対象は、がんであると診断された対象であってよい。本発明の組成物による治療は、水素呼気検査で検出される水素のレベルを低下させる。したがって、その水素レベルは好ましくは、水素呼気検査を用いて評価する。水素呼気検査は、当該技術分野において周知であるので、当業者は、その検査の実施方法を理解するであろうし、ラクツロースを対象に投与することを伴うことができる。

【0071】

水素呼気検査は、本発明の組成物または併用療法を用いた治療の後に、微生物叢の多様性を向上または安定化させる有効性または有効性の可能性をモニタリングするのに有用なツールでもある。例えば、本発明の組成物または併用療法による治療の後に、対象の呼気で検出される水素のレベルが低下することは、その治療が、対象における微生物叢の多様性を向上させていることを示し得る。したがって、本発明の方法及び用途は、本発明の組成物による治療の最中及び／または後に、対象の呼気中の水素レベルをモニタリングし、それによって、その対象における微生物叢の多様性を向上させる有効性または有効性の可能性を評価することをさらに含む。例えば、水素レベルは、所望に応じて、治療前、治療開始時、治療の最中、治療終了時及び／または治療後を含め、1回以上（例えば、1回、2回、3回、4回、または5回以上）モニタリングしてよい。投与期間（その期間中、本発明の組成物を対象に投与する）の終了時及び／または後の対象の呼気中の水素のレベルを、投与期間の開始時及び／または前のレベルと比較し、そのレベルの低下によって、対象における微生物叢の多様性を向上させる有効性または有効性の可能性が示される。対象の呼気中の水素レベルは、複数回測定できる。例えば、投与期間が16日である場合には、1日目及び16日目、または例えば、1日目、2日目、15日目及び16日目に測定するのが望ましいことがある。複数回、測定を行って、それらの測定値の平均（例えば、1日目及び2日目の平均、15日目及び16日目の平均）を得ることができる。水素レベル

10

20

30

40

50

のCmaxが少なくとも40ppm低下することによって、組成物が、その対象における微生物叢の多様性を向上させるのに有効であるか、または有効である可能性の高いことが示される。水素呼吸検査は、標準的なアッセイであるので、規定のレベルは、当該技術分野において知られている。

#### 【0072】

本発明者は、本明細書の実施例によって明らかなように、本明細書に定義されているような*Enterococcus*属の細菌株を含む組成物の投与後に、*Barnesiella intestinihominis*の存在量が増加したことを示した。その細菌は、免疫刺激作用を有することが示されている。より具体的には、その細菌は、がん病変におけるIFN産生T細胞の浸潤を通じて、シクロホスファミドの誘導による治療的免疫調節作用を促進することが示されている。さらに、*Barnesiella intestinihominis*特異的メモリーTh1細胞免疫応答は選択的に、化学免疫療法で治療を行った進行性肺癌患者及び進行性卵巣癌患者の無増悪生存率を延長すると予測された[38]。したがって、本発明は、*Enterococcus*属の細菌株を含む組成物を用いることによって、*Barnesiella intestinihominis*のレベルを上昇させるので、シクロホスファミドの有効性を向上させる。したがって、本発明の併用療法は、シクロホスファミドによる治療から恩恵を受けることが知られている疾患を治療するのに特に有用である。併用することで、その治療の有効性が増強されるからである。シクロホスファミドで治療できる既知の疾患は、がん、炎症性障害及び自己免疫障害を含む。

10

20

#### 【0073】

本発明の組成物の投与を通じて、マイクロバイオームの多様性が安定化する（向上しない場合）のみならず、有益なことに、*Barnesiella intestinihominis*の存在量も増加する。したがって、本発明の組成物は、がん患者におけるマイクロバイオームの多様性を安定化または向上させるのに特に有用である。

#### 【0074】

したがって、本発明の組成物は、*Barnesiella intestinihominis*種のレベルを上昇し得る。当業者は、この上昇は、本発明の組成物の投与前の*Barnesiella intestinihominis*種のレベルに対する上昇であることを理解するであろう。

30

#### 【0075】

*Barnesiella intestinihominis*は、シクロホスファミドの免疫調節作用を増強することが報告されている[38]。したがって、実施例のデータによって、*Enterococcus gallinarum*種の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものが、特に有用であることが確認される。したがって、本発明の一態様によると、*Enterococcus*属の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものを療法で用いることを提供する。好ましくは、その細菌株は、*Enterococcus gallinarum*種の株である。

#### 【0076】

このような実施形態では、*Enterococcus*属の細菌株を含む組成物を投与して、患者の消化管における*Barnesiella intestinihominis*のレベルを上昇させて、シクロホスファミドの免疫調節作用を増強し得る。

40

#### 【0077】

本発明のこの態様の実施形態では、*Enterococcus*属の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものを用いて、がんを治療し得る。例えば、その組み合わせは、がん治療において、腫瘍サイズを縮小するか、腫瘍の成長を減少させるか、または血管新生を減少させるのに用いるためのものであってよい。

#### 【0078】

特定の実施形態では、その組み合わせは、大腸癌のような結腸直腸癌、好ましくは結腸直腸腺癌を治療または予防するのに用いるためのものである。いくつかの実施形態では、

50

そのがんは、腸のがんである。別の実施形態では、その組み合わせは、肺癌、リンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、卵巣癌、乳癌（特には癌腫）、小細胞肺癌、神経芽腫、肉腫、網膜芽腫、腺癌（特には、卵巣の腺癌）または肝臓癌を治療または予防するのに用いるためのものである。別の実施形態では、本発明の組成物は、癌腫を治療または予防するのに用いるためのものである。

#### 【0079】

実施形態では、*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものは、自己免疫疾患または炎症性疾患を治療するのに有用である。その組み合わせで治療し得る疾患（シクロホスファミドによる治療に応答することが知られている疾患）の例としては、ネフローゼ症候群、全身性ループスエリテマトーデス、多発性血管炎性肉芽腫症、再生不良性貧血、顕微鏡的多発性血管炎、結節性多発動脈炎、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症（チャグ・ストラウス症候群）、ベーチェット症候群、原発性中枢神経系血管炎、孤立性血管炎ニューロパチー、臓器移植後及び骨髄移植の準備中が挙げられる。概して、本発明の組成物とシクロホスファミドを組み合わせたものは、疾患に罹患している対象における微生物叢の多様性を向上及び／または安定化させると有益と予測される疾患に用いることになる。

10

#### 【0080】

本発明の組成物では、有益なことに、*Barnesiella intestihomini* レベルに対するプラスの作用（及びマイクロバイオームの多様性の向上）に加えて、実施例において、*Lachnospiraceae* 属及び *Roseburia* 属の細菌を含む短鎖脂肪酸産生細菌の数のレベルを上昇させることが実証されている。それらの属に属する細菌は、炎症性腸疾患（*Roseburia* 属に属する細菌の場合 [39]）及び体重減少（*Lachnospiraceae* 属のメンバーの場合）を含むいくつかの疾患の治療と関連付けられている。

20

#### 【0081】

したがって、本発明の組成物は、*Lachnospiraceae* 種及び／または *Roseburia* 種のレベルを上昇し得る。当業者は、この上昇が、本発明の組成物の投与前の *Lachnospiraceae* 種及び／または *Roseburia* 種のレベルと（それぞれ）比較したものであることを理解するであろう。

#### 【0082】

実施例によって、本発明の組成物が、*Lachnospiraceae* 属の細菌の存在量を増加できることが実証されている。ヒト微生物叢における *Lachnospiraceae* 属の細菌レベルの低下は、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎及びクローン病のような消化器疾患に関連付けられている [40]。シクロホスファミドによる治療は、*Lachnospiraceae* 属の細菌を含む多くの細菌種のレベルを低下させることが示されている [41]。

30

#### 【0083】

したがって、いくつかの実施形態では、*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物と、シクロホスファミドを組み合わせたものを用いて、消化管における *Lachnospiraceae* 属のレベルを上昇させることができる。*Enterococcus* 属の細菌株と組み合わせて、シクロホスファミドを投与すると、シクロホスファミドによる治療と関連する、*Lachnospiraceae* 属の細菌の関連性の低下が阻止される。*Lachnospiraceae* 属のレベルの上昇によって、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎及びクローン病のような消化器疾患が予防または治療され得る。

40

#### 【0084】

本発明の組成物はさらに、*Clostridium* 種のレベルに影響を及ぼすことが示されている。これらの細菌は、免疫系の調節、ならびに自己免疫疾患、感染症及びアレルギー疾患の予防及び治療の有効性と関連付けられている。

#### 【0085】

実施例によって、本発明の組成物が、*Alislistipes* 属の細菌のレベルを上昇でき

50

ることも示されている。IBD患者は、その微生物叢の多様性が低下している。健常なコントロールと比べて優位に減少する分類群としては、*Alis stip es* 属及び *Barnesiella* 属の細菌が挙げられる[42]。したがって、本発明の組成物は、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎及びクローン病のような消化器疾患を治療または予防するのに有用であり得る。本発明の組成物は、*Alis stip es* 属及び/または *Barnesiella* 属の細菌のレベルを上昇させることによって、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎及びクローン病のような消化器疾患を治療し得る。

#### 【0086】

本発明の組成物は、実施例において、リボース5-リン酸、エリトロース4-リン酸及びセドヘブツロース7-リン酸を含む代謝物の形成の低下によって特徴付けられるように、ペントースリン酸経路に対する制限作用を及ぼすことが実証されている。

10

#### 【0087】

本発明の組成物のこの特性も有益である。ペントースリン酸経路は、解糖作用を引き起こすがん細胞が、酸化ストレスに対抗するのを補助する際の保護作用を有するとして関連があるとされているので、腫瘍細胞を保護し得るからである。さらに、文献によって、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを欠損させると、がん、特に乳癌、結腸直腸癌などから保護できること、及びペントースリン酸経路のメンバーの増加が、がん患者における不良転帰と関連することが示されている[43、44]。したがって、本発明の組成物を用いて、ペントースリン酸経路の低下から恩恵を受ける対象(例えば、がん患者)におけるマイクロバイオームの多様性を促進するときに、本発明の組成物は、上記に作用をさらに発揮し得る。

20

#### 【0088】

したがって、本発明のさらなる態様に従って、*Enterococcus* 属の細菌株を含む組成物であって、上記のような治療が必要な対象、例えば、ペントースリン酸の正常な機能または機能の増進によって発症または悪化する疾患の罹患リスクがあるか、その疾患と診断された対象において、ペントースリン酸経路と関連する少なくとも1つの代謝物のインビボでの形成を軽減するのに用いるための組成物を提供する。例えば、その代謝物は、リボース5-リン酸、エリトロース4-リン酸及びセドヘブツロース7-リン酸であってよい。

#### 【0089】

本発明の組成物を用いて、以前に化学療法を受けたことのある患者における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させることができる。本発明の組成物を用いて、化学療法による治療に耐えられなかった患者における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させ得る。

30

#### 【0090】

本発明の組成物は、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨腫瘍、骨肉腫/悪性線維性組織球腫、脳幹グリオーマ、脳腫瘍、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫/悪性グリオーマ、上衣腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、乳癌、気管支腺腫/カルチノイド、バーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、子宮頸癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、大腸癌、皮膚T細胞性リンパ腫、子宮体癌、上衣腫、食道癌、ユーイング肉腫、眼内黒色腫、網膜芽腫、胆嚢癌、胃癌、消化管カルチノイド腫、消化管間質腫瘍(GIST)、胚細胞腫瘍、小児視経路及び視床下部グリオーマ、ホジキンリンパ腫、メラノーマ、膵島細胞癌、カポジ肉腫、腎細胞癌、喉頭癌、白血病、リンパ腫、中皮腫、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、口腔咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、副甲状腺癌、咽頭癌、下垂体腺腫、形質細胞新生物、前立腺癌、腎細胞癌、網膜芽腫、肉腫、睾丸癌、甲状腺癌または子宮癌と診断された患者における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのにも有用であり得る。

40

#### 【0091】

本発明の組成物を用いて、さらなる治療剤で治療している患者における微生物叢の多様

50

性を向上及び／または安定化させ得る。本発明の組成物は、抗がん剤と組み合わせでよい。好ましくは、本発明は、*Enterococcus gallinarum*種の細菌株及び抗がん剤を含む組成物を提供する。好ましくは、その抗がん剤は、免疫チェックポイント阻害剤、標的化抗体免疫療法剤、CAR-T細胞療法剤、腫瘍溶解性ウイルスまたは細胞増殖抑制剤である。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、Yervoy（イピリムマブ、BMS）、Keytruda（ペンブロリズマブ、Merck）、Opdivo（ニボルマブ、BMS）、MEDI4736（AZ/MedImmune）、MPDL3280A（Roche/Genentech）、トレメリムマブ（AZ/MedImmune）、CT-011（ピジリズマブ、CureTech）、BMS-986015（リリルマブ、BMS）、MEDI0680（AZ/MedImmune）、MSB-0010718C（Merck）、PF-05082566（Pfizer）、MEDI6469（AZ/MedImmune）、BMS-986016（BMS）、BMS-663513（ウレルマブ、BMS）、IMP321（Prima Biomed）、LAG525（Novartis）、ARGX-110（arGEN-X）、PF-05082466（Pfizer）、CDX-1127（バルリルマブ、CellDex Therapeutics）、TRX-518（GITR Inc.）、MK-4166（Merck）、JTX-2011（Jounce Therapeutics）、ARGX-115（arGEN-X）、NLG-9189（インドキシモド、NewLink Genetics）、INCB024360（Incyte）、IPH2201（Innate Immunotherapeutics/AZ）、NLG-919（NewLink Genetics）、抗VISTA（JnJ）、エパカドスタット（INCB24360、Incyte）、F001287（Flexus/BMS）、CP870893（University of Pennsylvania）、MGA271（Macrogenix）、エマクツズマブ（Roche/Genentech）、ガルニセルチブ（Eli Lilly）、ウロクブルマブ（BMS）、BKT140/BL8040（Biokine Therapeutics）、バビツキシマブ（Peregrine Pharmaceuticals）、CC90002（Celgene）、852A（Pfizer）、VTX-2337（VentiriX Pharmaceuticals）、IMO-2055（Hybridon、Idera Pharmaceuticals）、LY2157299（Eli Lilly）、EW-7197（Ewha Women's University, Korea）、ベムラフェニブ（Plexxikon）、ダブルラフェニブ（Genentech/GSK）、BMS-777607（BMS）、BLZ945（Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre）、Unituxin（ジヌツキシマブ、United Therapeutics Corporation）、Blinicyto（ブリナツモマブ、Amgen）、Cyramza（ラムシルマブ、Eli Lilly）、Gazyva（オビヌツズマブ、Roche/Biogen）、Kadcyla（アド-トラスツズマブエムタンシン、Roche/Genentech）、Perjeta（ベルツズマブ、Roche/Genentech）、Adcetris（ブレンツキシマブベドチン、Takeda/Millennium）、Arzerra（オフアツムマブ、GSK）、Vectibix（パニツムマブ、Amgen）、Avastin（ベバシズマブ、Roche/Genentech）、Erbix（セツキシマブ、BMS/Merck）、Bexxar（トシツモマブ-I131、GSK）、Zevalin（イブリツモマブチウキセタン、Biogen）、Campath（アレムツズマブ、Bayer）、Mylotarg（ゲムツズマブオゾガマイシン、Pfizer）、Herceptin（トラスツズマブ、Roche/Genentech）、Rituxan（リツキシマブ、Genentech/Biogen）、ボロシキシマブ（Abbvie）、エナバツズマブ（Abbvie）、ABT-414（Abbvie）、エロツズマブ（Abbvie/BMS）、ALX-0141（Abllynx）、オゾラリズマブ（Abllynx）、Actimab-C（Actinium）、Actimab-P（Actinium）、ミラツズマブ-DOX（Actiniu

m)、Emab-SN-38(Actinium)、ナブツモマブエスタフェナトクス(Active Biotech)、AFM13(Affimed)、AFM11(Affimed)、ACS-16C3F(Agensys)、AGS-16M8F(Agensys)、AGS-22ME(Agensys)、AGS-15ME(Agensys)、GS-67E(Agensys)、ALXN6000(サマリズマブ、Alexion)、ALT-836(Altor Bioscience)、ALT-801(Altor Bioscience)、ALT-803(Altor Bioscience)、AMG780(Amgen)、AMG228(Amgen)、AMG820(Amgen)、AMG172(Amgen)、AMG595(Amgen)、AMG110(Amgen)、AMG232(アデカツムマブ、Amgen)、AMG211(Amgen/MedImmune)、BAY20-10112(Amgen/Bayer)、リロツマブ(Amgen)、デノスマブ(Amgen)、AMP-514(Amgen)、MEDI575(AZ/MedImmune)、MEDI3617(AZ/MedImmune)、MEDI6383(AZ/MedImmune)、MEDI551(AZ/MedImmune)、モキセツモマブパストクス(AZ/MedImmune)、MEDI565(AZ/MedImmune)、MEDI0639(AZ/MedImmune)、MEDI0680(AZ/MedImmune)、MEDI562(AZ/MedImmune)、AV-380(AVEO)、AV203(AVEO)、AV299(AVEO)、BAY79-4620(Bayer)、アネツマブラブタンシン(Bayer)、バンチクツマブ(Bayer)、BAY94-9343(Bayer)、シブロツズマブ(Boehringer Ingelheim)、BI-836845(Boehringer Ingelheim)、B-701(BioClin)、BIIB015(Biogen)、オビヌツズマブ(Biogen/Genentech)、BI-505(Bioinvent)、BI-1206(Bioinvent)、TB-403(Bioinvent)、BT-062(Biotest)、BIL-010t(Biosceptre)、MDX-1203(BMS)、MDX-1204(BMS)、ネシツマブ(BMS)、CAN-4(Cantargia AB)、CDX-011(Celldex)、CDX1401(Celldex)、CDX301(Celldex)、U3-1565(Daiichi Sankyo)、パトリツマブ(Daiichi Sankyo)、チガツズマブ(Daiichi Sankyo)、ニモツズマブ(Daiichi Sankyo)、DS-8895(Daiichi Sankyo)、DS-8873(Daiichi Sankyo)、DS-5573(Daiichi Sankyo)、MORab-004(Eisai)、MORab-009(Eisai)、MORab-003(Eisai)、MORab-066(Eisai)、LY3012207(Eli Lilly)、LY2875358(Eli Lilly)、LY2812176(Eli Lilly)、LY3012217(Eli Lilly)、LY2495655(Eli Lilly)、LY3012212(Eli Lilly)、LY3012211(Eli Lilly)、LY3009806(Eli Lilly)、シクスツマブ(Eli Lilly)、フランボツマブ(Eli Lilly)、IMC-TR1(Eli Lilly)、ラムシルマブ(Eli Lilly)、タバルマブ(Eli Lilly)、ザノリムマブ(Emergent Biosolution)、FG-3019(FibroGen)、FPA008(Five Prime Therapeutics)、FP-1039(Five Prime Therapeutics)、FPA144(Five Prime Therapeutics)、カツマキソマブ(Fresenius Biotech)、IMAB362(Ganymed)、IMAB027(Ganymed)、HuMax-CD74(Genmab)、HuMax-TFADC(Genmab)、GS-5745(Gilead)、GS-6624(Gilead)、OMP-21M18(デムシズマブ、GSK)、マバツムマブ(GSK)、IMGN289(ImmunoGen)、IMGN901(ImmunoGen)、IMGN853(ImmunoGen)、IMGN529(ImmunoGen)、IMMU-130(

Immunomedics)、ミラツズマブ - DOX (Immunomedics)、IMMU - 115 (Immunomedics)、IMMU - 132 (Immunomedics)、IMMU - 106 (Immunomedics)、IMMU - 102 (Immunomedics)、エブラツズマブ (Immunomedics)、クリバツズマブ (Immunomedics)、IPH41 (Innate Immunotherapeutics)、ダラツムマブ (Janssen / Genmab)、CNTO - 95 (インテツムマブ、Janssen)、CNTO - 328 (シルツキシマブ、Janssen)、KB004 (KaloBios)、モガムリズマブ (Kyowa Hakko Kirrin)、KW - 2871 (エクロメキシマブ、Life Science)、ソネブシズマブ (Lpath)、マルジェツキシマブ (Macrogenics)、エノブリツズマブ (Macrogenics)、MGD006 (Macrogenics)、MGF007 (Macrogenics)、MK - 0646 (ダロツズマブ、Merck)、MK - 3475 (Merck)、Sym004 (Symphogen / Merck Serono)、DI17E6 (Merck Serono)、MOR208 (Morphosys)、MOR202 (Morphosys)、Xmab5574 (Morphosys)、BPC - 1C (エンシツキシマブ、Precision Biologics)、TAS266 (Novartis)、LFA102 (Novartis)、BHQ880 (Novartis / Morphosys)、QGE031 (Novartis)、HCD122 (ルカツムマブ、Novartis)、LJM716 (Novartis)、AT355 (Novartis)、OMP - 21M18 (デムシズマブ、OncoMed)、OMP52M51 (Oncomed / GSK)、OMP - 59R5 (Oncomed / GSK)、パンチクツマブ (Oncomed / Bayer)、CMC - 544 (イノツズマブオゾガマイシン、Pfizer)、PF - 03446962 (Pfizer)、PF - 04856884 (Pfizer)、PSMA - ADC (Progenics)、REGN1400 (Regeneron)、REGN910 (ネスバクマブ、Regeneron / Sanofi)、REGN421 (エノチクマブ、Regeneron / Sanofi)、RG7221、RG7356、RG7155、RG7444、RG7116、RG7458、RG7598、RG7599、RG7600、RG7636、RG7450、RG7593、RG7596、DCDS3410A、RG7414 (パルサツズマブ)、RG7160 (イムガツズマブ)、RG7159 (オビヌツズマブ)、RG7686、RG3638 (オナルツズマブ)、RG7597 (Roche / Genentech)、SAR307746 (Sanofi)、SAR566658 (Sanofi)、SAR650984 (Sanofi)、SAR153192 (Sanofi)、SAR3419 (Sanofi)、SAR256212 (Sanofi)、SGN - LIV1A (リンツズマブ、Seattle Genetics)、SGN - CD33A (Seattle Genetics)、SGN - 75 (ボルセツズマブマホドチン、Seattle Genetics)、SGN - 19A (Seattle Genetics)、SGN - CD70A (Seattle Genetics)、SEA - CD40 (Seattle Genetics)、イブリツモマブチウキセタン (Spectrum)、MLN0264 (Takeda)、ガニツマブ (Takeda / Amgen)、CEP - 37250 (Teva)、TB - 403 (Thrombogenic)、VB4 - 845 (Viventia)、Xmab2512 (Xencor)、Xmab5574 (Xencor)、ニモツズマブ (YM Biosciences)、カルルマブ (Janssen)、NY - ESO TCR (Adaptimmune)、MAGE - A - 10 TCR (Adaptimmune)、CTL019 (Novartis)、JCAR015 (Juno Therapeutics)、KTE - C19 CAR (Kite Pharma)、UCART19 (Cellecctis)、BPX - 401 (Belllicum Pharmaceuticals)、BPX - 601 (Belllicum Pharmaceuticals)、ATTCK20 (Unum Therapeutics)、CAR - NKG2D (Cel

yad)、Onyx-015(Onyx Pharmaceuticals)、H101(Shanghai Sunwaybio)、DNX-2401(DNAtrix)、VCN-01(VCN Biosciences)、Colo-Ad1(Psioxus Therapeutics)、Prostatak(Advantagene)、Oncos-102(Oncos Therapeutics)、CG0070(Cold Genesys)、Pexa-vac(JX-594、Jennerex Biotherapeutics)、GL-ONC1(Genelux)、T-VEC(Amgen)、G207(Medigene)、HF10(Takara Bio)、SEPREHVI R(HSV1716、Virttu Biologies)、OrienX010(OrienGene Biotechnology)、Reolysin(Oncolytics Biotech)、SVV-001(Neotropix)、Cacatak(CVA21、Viralytics)、Alimta(Eli Lilly)、シスプラチン、オキサリプラチン、イリノテカン、フォリン酸、メトトレキサート、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル、Zykadia(Novartis)、Tafinlar(GSK)、Xalkori(Pfizer)、Iressa(AZ)、Gilotrif(Boehringer Ingelheim)、Tarceva(Astellas Pharma)、Halaven(Eisai Pharma)、ペリパリブ(Abbvie)、AZD9291(AZ)、アレクチニブ(Chugai)、LDK378(Novartis)、ガネテスビブ(Synta Pharma)、テルジェンブマツセル-L(NewLink Genetics)、GV1001(Kael-GemVax)、チパンチニブ(ArQule)、Cytotoxan(BMS)、Oncovin(Eli Lilly)、Adriamycin(Pfizer)、Gemzar(Eli Lilly)、Xeloda(Roche)、Ixempra(BMS)、Abraxane(Celgene)、Trelstar(Debiopharm)、Taxotere(Sanofi)、Nexavar(Bayer)、IMMU-132(Immunomedics)、E7449(Eisai)、Thermodox(Celsion)、Cometriq(Exellxis)、Lonsurf(Taiho Pharmaceuticals)、Camptosar(Pfizer)、UFT(Taiho Pharmaceuticals)及びTS-1(Taiho Pharmaceuticals)からなる群から選択した抗がん剤を含む。

#### 【0092】

##### 投与方法

好ましくは、本発明の組成物は、本発明の細菌株を腸に送達し、及び/または部分定着もしくは完全定着させることができるように、消化管に投与することになる。概して、本発明の組成物は、経口投与するが、直腸内投与、鼻腔内投与、または口腔内経路もしくは舌下経路を介した投与を行ってよい。

#### 【0093】

本発明の組成物は、泡、スプレーまたはゲルとして投与してよい。本発明の組成物は、肛門坐剤のような坐剤として、例えば、テオブロマ油(カカオ脂)、合成ハードファット(例えば、Suppocire、Witepsol)、グリセロゼラチン、ポリエチレングリコールまたは石鹸グリセリン組成物の形態で投与し得る。

#### 【0094】

本発明の組成物は、経鼻胃管、経口胃管、胃管、空腸瘻管(J管)、経皮内視鏡的胃瘻造設術(PEG)のような管、または胃、空腸に到達させる胸壁ポート及び他の好適なアクセスポートのようなポートを介して、消化管に投与し得る。

#### 【0095】

本発明の組成物は、静脈内投与、直腸内投与、舌下投与、皮下投与または経鼻投与用に調合してもよい。

#### 【0096】

本発明の組成物は、1回投与しても、または治療レジメンの一部として順次投与しても

10

20

30

40

50



よい。例えば、本発明の組成物は、毎日投与できる。

【0097】

本発明による治療は、患者の腸内微生物叢を評価することによって行うことができる場合もある。本発明の株の送達及び／または部分もしくは完全定着が行われず、その結果、有効性が観察されない場合には、治療を反復してよく、あるいは、送達及び／または部分もしくは完全定着がうまくいき、有効性が観察される場合には、治療を停止してよい。

【0098】

本発明の組成物は、子供が生まれた後に、微生物叢の多様性及び／または微生物叢の安定性の向上を促すために、妊娠している動物、例えば、ヒトのような哺乳動物に投与し得る。

10

【0099】

本発明の組成物は、腸内微生物叢が異常であると確認された患者に投与し得る。例えば、その患者は、*Enterococcus gallinarum*または*Enterococcus casseliflavus*の定着が低下しているかまたは見られない者であってよい。

【0100】

本発明の組成物は、栄養補助サプリメントのような食品として投与し得る。

【0101】

好ましくは、本発明の組成物は、ヒトを治療するためのものであるが、本発明の組成物を用いて、家禽、ブタ、ネコ、イヌ、ウマまたはウサギのような単胃哺乳動物を含む動物を治療してもよい。本発明の組成物は、動物の成長及び出来栄を高めるのに有用であり得る。動物に投与する場合には、強制経口を使用し得る。

20

【0102】

療法において、*Enterococcus gallinarum*種の細菌株を含む組成物をシクロホスファミドと併用する本発明の実施形態では、シクロホスファミドは、その組成物の一部として投与しても、別個に投与してもよい。シクロホスファミドを別個に投与する場合には、同時に（例えば、医療専門家への同じ回の診察時に）または順次に投与してよい。また、シクロホスファミドは、本発明の組成物と同じ経路で投与しても、異なる経路で投与してもよい。

【0103】

30

好ましくは、シクロホスファミドは、経口投与するか、または（任意に、注射または注入によって）静脈内投与する。シクロホスファミドを経口投与する場合には、1日当たり1000mg以下、800mg以下、500mg以下または200mg以下の投与量で投与し得る。その1日当たりの投与量は、10～500mg、50～250mgまたは80～150mgであってよい。シクロホスファミドを静脈内投与する場合には、1日当たり500～2000mgの投与量で投与し得る。

【0104】

組成物

概して、本発明の組成物は、細菌を含む。本発明の組成物は、凍結乾燥形態で調合できる。例えば、本発明の組成物は、上記のような細菌株を含む顆粒剤またはゼラチンカプセル剤、例えば、硬カプセル剤を含み得る。

40

【0105】

あるいは、本発明の組成物は、活性生菌培養物を含み得る。したがって、本発明の組成物中の細菌株は、例えば熱によって、不活化、殺傷及び／または弱毒化されていない。本発明の組成物中の細菌株は、生存可能であり、及び／または腸に部分的または完全に定着できる。本発明の組成物は、生菌株と、殺傷された細菌株の混合物を含むことができる。

【0106】

本発明の組成物は、細菌株を腸に送達可能にするために、カプセル化できる。カプセル化すると、例えば、圧力、酵素活性または物理的崩壊（pHの変化によって誘発し得る）のような化学的または物理的な刺激によって破裂させることで、標的の位置に送達される

50

まで、組成物が分解から保護される。いずれかの適切なカプセル化法を使用し得る。例示的なカプセル化技法としては、多孔性マトリックス内への取り込み、固体担体表面上への結合または吸着、フロキュレーションまたは架橋剤による自己凝集、微多孔膜またはマイクロカプセルへの機械的封入が挙げられる。本発明の組成物の調製に有用であり得るカプセル化に関する手引きは、例えば参考文献[45]及び[46]に見ることができる。

#### 【0107】

本発明の組成物は、経口投与してよく、錠剤、カプセル剤または散剤の形態であってよい。カプセル化した製品が好ましい。Enterococcus gallinarumは嫌気菌であるからである。送達及び/または部分もしくは完全定着、ならびにインビボでの生存性を高めるために、他の成分(例えばビタミンCなど)を脱酸素剤及びプレバイオティクス基質として含めてもよい。あるいは、本発明のプレバイオティクス組成物は、乳もしくはホエイベースの発酵乳製品のような食品もしくは栄養製品、または医薬品として経口投与し得る。

10

#### 【0108】

本発明の組成物は、プロバイオティクス製品として調合し得る。

#### 【0109】

本発明の組成物は、本発明の細菌株を治療有効量含む。細菌株の治療有効量は、患者に有効な作用を及ぼすのに十分な量である。細菌株の治療有効量は、患者の腸に送達させ、及び/または部分定着もしくは完全定着させるのに十分な量であり得る。細菌株の治療有効量は、すでに説明したように、インビトロまたはインビボモデルにおいて、該当する細菌株が有意な当該治療作用を発揮できる能力を、未治療のコントロールと比較することによって定めることができる。

20

#### 【0110】

例えば成人のヒトに対する1日当たりの好適な細菌投与量は、約 $1 \times 10^3$  ~ 約 $1 \times 10^{11}$ コロニー形成単位(CFU)、例えば、約 $1 \times 10^7$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  CFU、別の例では、約 $1 \times 10^6$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  CFUであってよい。本発明の組成物は、その組成物の重量に対して、細菌株を約 $1 \times 10^6$  ~ 約 $1 \times 10^{11}$  CFU/g、例えば約 $1 \times 10^8$  ~ 約 $1 \times 10^{10}$  CFU/gの量で含むことができる。その投与量は、例えば、1g、3g、5g及び10gであってよい。

#### 【0111】

典型的には、本発明の組成物のようなプロバイオティクス製品は任意に、少なくとも1つの好適なプロバイオティクス化合物と組み合わせる。プロバイオティクス化合物は通常、オリゴ糖もしくは多糖、または糖アルコールのような難消化性の炭水化物(上部消化管で分解または吸収されない)である。既知のプロバイオティクス製品としては、イヌリン及びトランスガラクトオリゴ糖のような市販品が挙げられる。

30

#### 【0112】

本発明のプレバイオティクス組成物は、その組成物の総重量に対して、プロバイオティクス化合物を約1 ~ 約30重量%(例えば5 ~ 20重量%)の量で含み得る。炭水化物は、フルクトオリゴ糖(すなわちFOS)、短鎖フルクトオリゴ糖、イヌリン、イソマルトオリゴ糖、ペクチン、キシロオリゴ糖(すなわちXOS)、キトサンオリゴ糖(すなわちCOS)、 $\alpha$ -グルカン、アラビアガム、変性及び難消化性デンプン、ポリデキストロース、D-タガトース、アカシアファイバー、イナゴマメ、オート麦及びシトラスファイバーからなる群から選択し得る。一態様では、本発明のプレバイオティクス物質は、短鎖フルクトオリゴ糖(簡略化のために、以下ではFOSs-c.c.として示す)であり、前記FOSs-c.c.は、概してビート糖を変換することによって得られるとともに、3つのグルコース分子が結合しているサッカロース分子を含む難消化性の炭水化物である。

40

#### 【0113】

本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤または担体含み得る。このような好適な賦形剤の例は、参考文献[47]で見ることができる。治療で用いる許容可能な担体または希釈剤は、製剤分野において周知であり、例えば、参考文献[48]に記載されている

50

。好適な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール及び水が挙げられる。製剤用担体、賦形剤または希釈剤の選択は、意図されている投与経路及び標準的な製剤作業との関連で行うことができる。本発明の医薬組成物は、担体、賦形剤または希釈剤として、または担体、賦形剤または希釈剤に加えて、いずれかの好適な結合剤（複数可）、潤沢剤（複数可）、懸濁化剤（複数可）、コーティング剤（複数可）、可溶化剤（複数可）を含み得る。好適な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、グルコース、無水ラクトース、自由流動ラクトース、 $\alpha$ -ラクトース、トウモロコシ甘味料のような天然の糖、アカシアガム、トラガカントガムまたはアルギン酸ナトリウムのような天然及び合成ガム、カルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールが挙げられる。好適な潤沢剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。保存剤、安定剤、色素及びさらには香味剤を本発明の医薬組成物に供給してもよい。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及び  $p$ -ヒドロキシ安息香酸のエステルが挙げられる。抗酸化剤及び懸濁化剤も用いてよい。

10

20

30

40

50

#### 【0114】

本発明の組成物は、食品として調合し得る。例えば、食品は、本発明の治療作用に加えて、栄養補助サプリメントにおけるような栄養的な効果をもたらし得る。同様に、本発明の組成物の味を高めたり、または医薬組成物よりもむしろ、一般的な食品に似せることによって、消費するものとしての組成物の魅力を高めたりするために、食品を調合してよい。本発明の組成物は、乳ベースの製品として調合する。「乳ベースの製品」という用語は、脂肪含有量が様々であるいずれかの液体または半固体の乳またはホエイベースの製品を意味する。乳ベースの製品は、例えば、牛乳、ヤギ乳、ヒツジ乳、脱脂粉乳、全乳、いずれの加工も行わずに、粉乳及びホエイから還元した乳、またはヨーグルト、凝乳、カード、酸乳、全酸乳、バターミルク及び他の酸乳製品のような加工製品であることができる。別の重要な群としては、ホエイ飲料、発酵乳、コンデンスミルク、乳幼児用ミルクのような乳飲料、フレーバーミルク、アイスクリーム、菓子のような乳含有食品が挙げられる。

#### 【0115】

本発明の組成物は、単一の細菌株または種を含むことができ、いずれかの他の細菌株または種を含まないでよい。このような組成物は、他の細菌株または種をわずかに、または生物学的に無関係な量で含むに過ぎなくてよい。このような組成物は、実質的に他の種の細菌を含まない培養物であってよい。本発明は、*Enterococcus gallinarum* 種の株を1または2以上含む組成物であって、いずれかの他の種の細菌を含まないか、または治療で用いるための別の種の細菌をわずかに、もしくは生物学的に無関係な量で含むに過ぎない組成物を提供し得る。

#### 【0116】

本発明の組成物は、1以上の細菌株または種を含むことができる。例えば、本発明の組成物は、同じ種の中の1以上の株（例えば、1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、15個以上、20個以上、25個以上、30個以上、35個以上、40個以上または45個以上の株）を含み、任意に、いずれかの他の種の細菌を含まない。本発明の組成物は、同じ種の中の株を50個未満（例えば、45個未満、40個未満、35個未満、30個未満、25個未満、20個未満、15個未満、12個未満、10個未満、9個未満、8個未満、7個未満、6個未満、5個未満、4個未満または3個未満）含むことができ、任意に、いずれかの他の種の細菌を含まない。本発明の組成物は、同じ種の中の株を1~40個、1~30個、1~20個、1~19個、1~18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個または31~50個含むことができ、任意に、いずれかの他の種の細菌を

含まない。本発明の組成物は、同じ属の中の種を2個以上（例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、13個以上、16個以上、18個以上、21個以上、24個以上、26個以上、31個以上、36個以上または41個以上）を含むことができ、任意に、いずれかの他の属の細菌を含まない。本発明の組成物は、同じ属の中の種を50個未満（例えば、50個未満、45個未満、40個未満、35個未満、30個未満、25個未満、20個未満、15個未満、12個未満、10個未満、8個未満、7個未満、6個未満、5個未満、4個未満または3個未満）含むことができ、任意に、いずれかの他の属の細菌を含まない。本発明の組成物は、同じ属の中の種を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個または31～50個含み、任意に、いずれかの他の属の細菌を含まない。本発明は、上記をいずれかに組み合わせたものを含むことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0117】

本発明の組成物は、微生物コンソーシアムを含むことができる。例えば、本発明の組成物は、配列番号2と少なくとも95%同一である16S rRNA配列を有する細菌株であって、例えば*Enterococcus gallinarum*である細胞株を微生物コンソーシアムの一部として含む。例えば、その細菌株は、インビボの腸内で共生的に生存できる、他の属の1個以上（例えば、少なくとも2個、3個、4個、5個、10個、15個または20個）の他の細菌株とともに存在する。例えば、本発明の組成物は、配列番号2と少なくとも95%同一である16S rRNA配列を有する細菌株であって、例えば*Enterococcus gallinarum*である細菌株を、異なる属の細菌株とともに含む。本発明の微生物コンソーシアムは、単一の生物、例えばヒトの糞便試料から得られる2個以上の細菌株を含むことができる。本発明の組成物中の微生物コンソーシアムは、天然においては、合わさった形では見ることができない。例えば、本発明の微生物コンソーシアムは、同じ種に由来し得る少なくとも2体の異なる生物、例えば、2人の異なるヒト、例えば、2人の異なるヒトの乳児、またはヒトの乳児及びヒトの成人の糞便試料から得た細菌株を含み得る。その2体の生物は、異なる種に由来することもでき、例えば、その2体の生物は、ヒト及びヒト以外の哺乳動物である。

#### 【0118】

本発明の組成物が、2個以上の細菌株、細菌種または細菌属を含む場合には、個々の細菌株、細菌種または細菌属は、別個、同時または順次に投与し得る。例えば、2個以上の細菌株、細菌種または細菌属は、別個に保存されているが、使用前に混ぜ合わせる。

#### 【0119】

本発明で用いる細菌株は、ヒトの乳児、青年または成人の糞便から得ることができる。本発明の組成物が、2個以上の細菌株を含む場合には、すべての細菌株をヒトの乳児、青年または成人の糞便から得ることができる。その細菌は、ヒトの乳児の糞便から得た後に培養して、本発明の組成物で使用し得る。

#### 【0120】

本発明に従って用いるための組成物は、市販の認可を得る必要があることも、ないこともある。

#### 【0121】

好ましくは、本発明の組成物は、凍結乾燥した細菌を含む。細菌の凍結乾燥は、十分に確立された手順であり、関連する手引きは、例えば参考文献[49～51]で得ることができる。本発明は、上記の医薬組成物であって、前記細菌株が噴霧乾燥されていてよい医薬組成物を提供する。好ましくは、本発明は、上記の医薬組成物であって、その細菌株が凍結乾燥または噴霧乾燥されており、その細菌が、生存しており、生存可能であり、及び/または腸に部分的または完全に定着できる医薬組成物である。

#### 【0122】

いくつかのケースでは、凍結乾燥または噴霧乾燥されている細菌株を投与前に再構成する。いくつかのケースでは、その再構成は、本明細書に記載されている希釈剤を使用することによるものである。

【0123】

本発明の組成物は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体を含むことができる。

【0124】

本発明による組成物は、本発明で用いるような細菌株と、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含んでよく、その細菌株は、微生物叢の多様性を向上させる必要のある対象に投与したときに、対象における微生物叢の多様性を向上させるのに十分な量である。

10

【0125】

本発明は、本発明で用いるような細菌株と、薬学的に許容される賦形剤、担体または希釈剤を含む医薬組成物を提供でき、その細菌株は、障害を治療する必要のある対象に投与したときに、障害を治療するのに十分な量であり、その障害は、脳腫瘍、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌または大腸癌と診断された対象における微生物叢の多様性及び/または微生物叢の安定性の低下である。

【0126】

本発明の組成物中の細菌株の量は、その組成物の重量に対して、1 g 当たり約  $1 \times 10^3$  ~ 約  $1 \times 10^{11}$  コロニー形成単位であってよい。

20

【0127】

本発明の組成物は、1 g、3 g、5 g または 10 g の用量で投与し得る。

【0128】

本発明の組成物は、経口、直腸内、皮下、経鼻、口腔内及び舌下からなる群から選択した方法によって投与し得る。

【0129】

本発明の組成物は、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール及びソルビトールからなる群から選択した担体を含み得る。

【0130】

本発明の組成物は、エタノール、グリセロール及び水からなる群から選択した希釈剤を含み得る。

30

【0131】

本発明の組成物は、デンプン、ゼラチン、グルコース、無水ラクトース、自由流動ラクトース、 $\alpha$ -ラクトース、トウモロコシ甘味料、アカシア、トラガカントガム、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレングリコール、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム及び塩化ナトリウムからなる群から選択した賦形剤を含み得る。

【0132】

本発明の組成物は、保存剤、抗酸化剤及び安定剤のうちの少なくとも1つをさらに含み得る。保存剤は、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及び p - ヒドロキシ安息香酸のエステルからなる群から選択できる。

40

【0133】

本発明の組成物は、密閉容器に約 4 週間または約 2 5 年間で保存し得る。その容器は、相対湿度が 50 % である雰囲気中に置いてよく、コロニー形成単位で測定した場合に、少なくとも約 1 カ月、3 カ月、6 カ月、1 年、1 . 5 年、2 年、2 . 5 年または 3 年の期間の後に、細菌株の少なくとも 80 % が維持される。その密閉容器は、小袋またはボトルであってよい。本明細書に記載されているような本発明の組成物は、シリンジで提供することもできる。

【0134】

50

本発明の組成物は、医薬製剤として提供し得る。例えば、本発明の組成物は、錠剤またはカプセル剤として提供してよく、任意に、そのカプセル剤は、ゼラチンカプセル剤（「ジェルキャップ」）である。

【0135】

本発明の組成物は、経口投与できる。経口投与には、化合物が消化管に入る嚥下投与、及び／または化合物が口から直接、血流に入る口腔内投与、舌上投与または舌下投与が含まれてよい。経口投与に適する医薬製剤としては、固体プラグ剤、固体微粒子剤、錠剤のような半固体及び液体剤（複数の相または分散系を含む）、多粒子またはナノ粒子、液体（例えば水溶液）、乳濁液または粉末を含む軟カプセル剤及び硬カプセル剤、ロゼンジ剤（液体が充填されたものを含む）、咀嚼剤、ゲル剤、分散速度の速い剤形、フィルム剤、卵形剤、噴霧剤、ならびに口腔内／粘膜付着パッチが挙げられる。

10

【0136】

本発明の医薬製剤は、本発明の組成物を腸に経口投与によって送達するのに適する腸溶性製剤、すなわち、胃耐性製剤（例えば、胃のpHに対する耐性がある製剤）であることができる。腸溶性製剤は、本発明の組成物の細菌または別の成分が酸感受性であり、例えば、胃内条件下で分解しやすいときに、特に有用であり得る。本発明の腸溶性製剤は、腸溶性コーティングを含み、腸溶性被覆剤形であることができる。例えば、その製剤は、腸溶性被覆錠剤、腸溶性被覆カプセル剤などであってよい。本発明の腸溶性コーティングは、従来の腸溶性コーティング、例えば、経口送達用の錠剤、カプセル剤などのための従来のコーティングであってよい。本発明の製剤は、フィルムコーティング、例えば、腸溶性ポリマー、例えば酸不溶性ポリマーの薄膜層を含んでよい。

20

【0137】

本発明の腸溶性製剤は、本質的に腸溶性であることができ、例えば、腸溶性コーティングを必要とすることなく、胃耐性であることができる。したがって、その製剤は、腸溶性コーティングを含まない腸溶性製剤であり、カプセル剤を熱ゲル化物質から作製できる。熱ゲル化物質は、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロースまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）のようなセルロース物質であることができる。本発明のカプセル剤は、いずれのフィルム形成ポリマーも含まないシェルも含むことができる。そのシェルは、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを含むことができ、いずれのフィルム形成ポリマーも含まない（例えば、[52]を参照）。本発明の製剤は、本質的に腸溶性であるカプセル剤（例えば、CapsugelのVcaps（登録商標））であることができる。

30

【0138】

本発明の製剤は、軟カプセル剤であることができる。軟カプセル剤は、カプセル剤のシェル内に存在する軟化剤（例えば、グリセロール、ソルビトール、マルチトール及びポリエチレングリコールなど）を加えることにより、特定の弾性及び軟度を有し得るカプセル剤である。軟カプセル剤は、例えば、ゼラチンまたはデンプンをベースに作製できる。ゼラチンベースの軟カプセル剤は、様々な供給業者から市販されている。例えば経口投与または直腸内投与のような投与方法に応じて、軟カプセル剤は、様々な形状を有することができる、例えば、円形、卵状、横長または魚雷型の形であることができる。軟カプセル剤は、従来のプロセスによって、例えば、Scherrerプロセス、Accogelプロセス、または滴下もしくはブロープロセスによるなどして作製できる。

40

【0139】

培養方法

本発明で用いる細菌株は、例えば、参考文献[53～55]に詳述されているような標準的な微生物学的技法を用いて培養できる。

【0140】

培養に用いる固体培地または液体培地は、YCF A寒天またはYCF A培地であってよい。YCF A培地は、カシトン（1.0 g）、酵母エキス（0.25 g）、NaHCO<sub>3</sub>（0.4 g）、システイン（0.1 g）、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>（0.045 g）、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

50

(0.045 g)、NaCl (0.09 g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.09 g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.009 g)、 $\text{CaCl}_2$  (0.009 g)、レザズリン (0.1 mg)、ヘミン (1 mg)、ビオチン (1  $\mu\text{g}$ )、コバラミン (1  $\mu\text{g}$ )、p-アミノ安息香酸 (3  $\mu\text{g}$ )、葉酸 (5  $\mu\text{g}$ ) 及びピリドキサミン (15  $\mu\text{g}$ ) を含んでよい (カッコ内は100 ml 当たりの概算値)。

#### 【0141】

ワクチン組成物で用いる細菌株

本発明者は、本発明の細菌株が、対象における微生物叢の多様性を向上及び/または安定化させるのに有用であることを確認した。これは、本発明の細菌株が宿主の免疫系に及ぼす作用によるものである可能性が高い。したがって、本発明の組成物は有益なことに、対象の微生物叢の多様性を維持及び/または向上させるのに加えて、ワクチン組成物として投与すると、がんを治療または予防する作用も有し得る。本発明の細菌株は、生存可能であり、及び/または腸に部分的または完全に定着することができる。本発明の細菌株は、殺傷、不活化または弱毒化されたものであってよい。ワクチンに用いる本組成物は、ワクチンアジュバントを含んでよく、皮下注射のような注射を介して投与できる。

10

#### 【0142】

一般

本発明の実施の際には、別段に示されていない限り、当該技術分野の技術の範囲内における、化学、生化学、分子生物学、免疫学及び薬理学の従来の方法を使用することになる。このような技法は、文献で十分に説明されている。例えば、参考文献 [56] 及び [57 ~ 63] などを参照されたい。

20

#### 【0143】

「含む (comprising)」という用語には、「含む (including)」及び「なる」が含まれ、例えば、Xを「含む (comprising)」組成物は、Xのみからなっても、追加のもの、例えば X + Y を含んでもよい。

#### 【0144】

数値 x に関連する「約」という用語は、任意であり、例えば、 $x \pm 10\%$  を意味する。

#### 【0145】

「実質的に」という語句は、「完全に」を排除せず、例えば、Yを「実質的に含まない」組成物は、Yを完全に含まなくてもよい。必要な場合には、「実質的に」という語句は、本発明の定義から除外してもよい。

30

#### 【0146】

具体的な記載のない限り、多くの工程を含むプロセスまたは方法は、その方法の最初または最後に追加の工程を含んでよく、あるいは、追加の中間工程を含んでもよい。また、適切な場合には、工程を組み合わせたり、除外したり、または別の順序で行ったりしてもよい。

#### 【0147】

本発明の様々な実施形態が本明細書に記載されている。各実施形態に定められている特徴は、定められている他の特徴と組み合わせて、さらなる実施形態をもたらす得ることは明らかであろう。特に、本明細書で好適なもの、典型的なものまたは好ましいものとして明らかにされている実施形態を相互に組み合わせてもよい (ただし、互いに排他的である場合を除く)。

40

#### 【実施例】

#### 【0148】

手法

細菌株

MRX518 - *Enterococcus gallinarum* 株、NCIMB 42488

MRX0554 - *Enterococcus gallinarum* 株、NCIMB 42761

50

MRX0858 - *Enterococcus casseliflavus* 株  
REF10 - *Enterococcus gallinarum* 株、DSM10011

0

#### 【0149】

##### 16Sアンブリコンのシーケンシング

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kitをメーカーの指示に従って使用して、-14日目、0日目及び22日目に、処置したEMT6マウスから得た0.2gの凍結糞便試料から、微生物DNAを抽出した。

#### 【0150】

Illumina (San Diego, California, USA)の開発した16S Sequencing Library Preparation Nexteraプロトコルを用いて、16S rRNA遺伝子アンブリコンの調製及びシーケンシングを行った。PCR、及び16S rRNA遺伝子のV3/V4可変領域を標的とするプライマーを用いて、50ngの各DNA糞便抽出物を増幅した。その産物を精製し、フォワードバーコード及びリバースバーコードを第2ラウンドのアダプターPCRによって結合させた。得られたPCR産物を精製し、定量し、続いて、等モル量の各アンブリコンをプールしてから、シーケンシングのために、供給業者のGATC GmbHに、MiSeq (2×250bpの化学物質)またはHiSeq (2×300bpの化学物質)のプラットフォームのいずれかで送付した。

10

#### 【0151】

##### マイクロバイーム組成データ解析 (ポストシーケンシング)

フラッシュ法を用いて、生の配列データをマージ及びトリミングした。これによって、リードペアからシングルリードが生成されて、質の低いリードが除去される。USEARCHパイプライン法 (バージョン8.1.1861\_\_linux64)を用いて、1つのリードによって表されるに過ぎないシングルトン配列を特定し、それらを、OTU (操作的分類単位)生成工程から遮蔽した。それらのリードが、真の生物学的変動を表すものではなく、むしろ、技術的な変動によるものである可能性により、この遮蔽を行う。続いて、UPARSEアルゴリズムを使用して、それらの配列をOTUに97%の類似度でクラスタリングした。これにより、データセット内の配列変動を反映する代表的な配列のリストが生成される。門について、RDPクラシファイヤーを用いて、科のレベルまで、これらの代表的な配列を分類学的レベルに割り当て、属及び種レベルでは、APC関連のSPINGOクラシファイヤーを用いた。

20

30

#### 【0152】

キメラ配列は、生物学的に異なる2または3以上の転写物に由来する配列である。キメラ配列は、それらの配列の供給源が、系統学的に異なる供給源のものであっても、類似性のレベルが高い16S配列がアニーリングすることにより、2つの配列を組み合わせる新たな配列を生成すると生じる。これらのキメラ配列は、Chimeraslayer参照データベース (2016年9月9日にダウンロード)とともに、UCHIMEキメラ除去アルゴリズムを用いて除去した。続いて、USEARCHグローバルアラインメントアルゴリズムを用いて、残りのOTU配列でのシングルトンを含め、すべてのリードをマッピングし、これにより、初期試料の真の分類学的変動が反映されている。個別の配列をOTUに群分けして、マイクロバイームの組成情報 (存在量及び多様性)を得た。これらの工程によって、各試料における各分類群の存在量を推定可能になった。

40

#### 【0153】

##### 高レベルデータ解析

1)各試料内の分類群の数 (豊富度)及びそれらの相対存在量 (均等度)を表すShannon多様性指数、ならびに2)phyloseqというライブラリーを用いて、各試料で観察された種の数 (豊富度)を用いて、アルファ多様性を調べた。

#### 【0154】

群間で、グローバルなマイクロバイームプロファイルに有意差があるか明らかにする

50



ために、RのAdonis関数を用いて、Permutational MANOVAを非類似度行列に対して行った。統計ソフトウェアRのストリップチャート及びボックスプロット関数を用いて、ボックスプロットを構築した。

#### 【0155】

負の二項統計法(DES eq 2法)を用いて、選択した対照内で、存在量に有意差が見られた分類学的な変数を特定した。生成されたままの状態のP値は、複数の試験のために、Benjamini/Hochberg法を用いて調整した。

#### 【0156】

実施例1-Enterococcus gallinarumによる治療後の微生物叢の変化

#### 概要

Enterococcus gallinarum及びEnterococcus casseliflavusが、微生物叢の多様性及び安定性に及ぼす作用をマウスモデルで試験した。

#### 【0157】

#### 試験デザイン

乳癌モデル(EMT6)のマウス(n=40)を $2 \times 10^8$ の濃度のMRX518、MRX0554、MRX0858またはREF10の細菌株、10mL/kgの濃度の抗CTLA4のいずれかで処置した。そのマウスは、-14日目に各細菌株で処置し、0日目に腫瘍細胞を接種した。抗CTLA4は、試験の13日目に投与した。試験中の3つの時点、すなわち、-14日目、0日目及び22日目(試験終了時)に、糞便試料を採取した。試験全体を通じて、120個の糞便試料を採取した。

#### 【0158】

9個の試料で、データを得られなかった。プレシーケンシングを増幅できなかったか、またはシーケンシングから得られたリードの数が、解析するには非常に少なかったためである。合計で、n=111の試料について、データが得られた。表1に、処置群ごと、時点ごとに、成功して戻ってきた試料の数がまとめられている。

#### 【0159】

#### 【表1】

処置	MRX518	MRX0554	MRX0858	REF10	抗CTLA4
-14日目(菌の接種)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=7
0日目 (腫瘍細胞の接種)	n=8	n=5	n=7	n=7	n=8
22日目(試験終了)	n=7	n=8	n=6	n=8	n=8

表1：処置群ごと及び時点ごとの試料のうち、データが戻ってきた試料の数

#### 【0160】

#### 結果

#### 微生物叢の多様性の変化

処置が微生物叢の多様性に及ぼした作用であって、-14日目、0日目及び22日目における作用は、図1a~jに見ることができる。これらの図は、Enterococcus gallinarumまたはEnterococcus casseliflavusの細菌株による処置後に観察された、多様性の向上と整合している。例えば、図1a~d及び図1g~hには、Enterococcus gallinarumの細菌株で処置したマウスにおけるマイクロバイオームの多様性が向上したことが示されている。図1e~fには、Enterococcus casseliflavusによる処置も、マウスにおけるマイクロバイオームの多様性を向上できることが示されている。

## 【0161】

この多様性の向上は、試験全体にわたって維持され、このことは、これらの細菌株が、マイクロバイオームの安定性を維持できる能力と整合している。例えば、図1a～d及び図1e～fにおける、22日目のマイクロバイオームの多様性は、0日目に観察された多様性と同程度である。これにより、*Enterococcus gallinarum*の細菌株が、マイクロバイオームの安定性を維持できることが示されている。

## 【0162】

## 分類群の変動

GB1712857.0に開示されているデータを再解析した。下記の表2に示されているように、3つのすべての時点（-14日目、0日目及び22日目）に、処置群において、コントロール群と比べて、存在量が有意に異なる分類群が観察された（ $p$ 値＜0.05）。は、処置群における分類群の有意な増加を示しており、は、処置群における分類群の有意な減少を示している。言及した図では、存在量の変化（log2倍率変化）が反映されている。表3には、各時点において、各処置群で見られた存在量の異なる分類群の数がまとめられている。

## 【0163】

## 【表2】

	MRX518	MRX554	MRX858	REF10	抗CTLA4
-14日目	Eubacterium dolichum (↑、3.565)	Clostridium XIVa (↓、4.599)	0	0	Roseburia faecis (↓、-3.98) Clostridium polysaccharolyticum (↓、-5.131) Clostridium XIVa (↓
0日目	Barnesiella intestinihominis (↓、-3.666) Oscillospira guilliermondii (↑、2.024) Odoribacter splanchnicus (↓、-3.094)	Clostridium XIVa (↓、-4.396)	Roseburia (↑、2.554) Clostridium XIVa (↓、-2.227) Lachnospiraceae (↑、3.392) Clostridium XIVa (↑、4.676)	0	0

22日目	Lachnospiraceae (↑、3.483) Clostridium XIVa (↓、-3.035) Firmicutes (↑、 4.253) Lachnospiraceae (↑、3.137) Clostridium XIVa (↓、-6.038) Eubacterium (↓、 2.373) Clostridium XIVa (↓、-4.003) Bacteroides acidifaciens (↑、 2.880) Barnesiella intestinihominis (↓、-3.062)	Clostridium XIVa (↓、- 6.731) Clostridium XIVa (↓、- 6.860) Clostridium saccharolyticum (↓、-4.884)	Clostridium XIVa (↑、3.594) Clostridium XIVa (↓、-5.858) Clostridium XIVa (↓、-6.077) Clostridium saccharolyticum (↓、-4.039)	Clostridium m XIVa (↑、 3.105) Eubacteriu m (↓、- 4.999) Clostridiu m XIVa (↓、- 6.365) Lachnospir aceae (↓、- 4.157) Lachnospir acea (↑、 3.246) Clostridiu m XIVa	Clostridium XIVa (↓、- 6.145) Lachnospiraceae (↑、 3.556) Clostridium XIVa (↓、- 6.333) Clostridium saccharolyticum (↓、- 4.576)
------	---	--	---	---	--

10

20

30

表2：EMT 6マウスにおいて、-14日目、0日目及び22日目の時点で、ビヒクルコントロールと比較した際に、各処置群で見られた、存在量の異なる分類群

【0164】

【表3】

	-14日目→0日目	0日目→22日目	-14日目→22日目
MRX518	13	13	17
MRX0554	2	0	2
MRX0858	13	0	11
REF10	11	7	14
抗CTLA4	1	9	31

40

表3：試験時点間に各処置群で見られた、存在量の異なる分類群の数

【0165】

E. gallinarumまたはE. caselliflavusの細菌株による処置後、微生物叢の多様性は向上し、この向上には、Lachnospiraceae及びRaseburiaの存在量の増加が含まれる。存在量の減少が見られる細菌群の1つは、Clostridium XIVa Spp.である。

50

## 【0166】

データは、マイクロバイームをさらに安定化させる *E. gallinarum* または *E. caseelli flavus* による処置と整合している。

## 【0167】

実施例 2 - *Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus caseelli flavus* で処置後の微生物叢の多様性の変化

## 概要

*Enterococcus gallinarum* または *Enterococcus caseelli flavus* が、微生物叢の多様性及び安定性に及ぼす作用を試験した。

## 【0168】

10

## 試験デザイン

肺癌モデル (LLC) のマウス ( $n = 48$ ) を  $2 \times 10^8$  の濃度の MRX518、MRX0554、MRX0858 または REF10 の細菌株、 $10 \text{ mL} / \text{kg}$  の濃度の抗 CTLA4 のいずれかで処置するか、未処置にするかした。マウスは、-14 日目に各細菌株で処置し、0 日目に腫瘍細胞を接種し、関連する抗 CTLA4 は、試験の 13 日目に投与した。糞便試料は、18 日目の試験終了時に採取した。

## 【0169】

11 個の試料で、データが得られなかった。マウスが、データ収集の前に死亡したか、または試料で、プレシーケンシングを増幅できなかったからである。合計で、 $n = 37$  の試料について、データが得られた。表 4 に、治療群ごと、時点ごとに、成功して戻ってきた試料の数がまとめられている。

20

## 【0170】

## 【表 4】

	未処置	MRX518	MRX0554	MRX0858	REF10	抗CTLA4
D18 (処置終了)	n=5	n=5	n=7	n=7	n=6	n=7

表 4：治療群ごと及び時点ごとの試料のうち、データが戻ってきた試料の数

30

## 【0171】

## 結果

## 微生物叢の多様性の変化

処置が微生物叢の多様性の変化に及ぼした 18 日目における作用は、図 2 に見ることができる。Shannon 多様性指数は、MRX518 及び MRX0858 による処置後、未治療のコントロールと比べて上昇したが、これは、*E. gallinarum* または *E. caseelli flavus* の細菌株が、微生物叢の多様性を向上させる能力と整合している。MRX554 による処置後には、多様性の低下が観察された。しかしながら、このデータは、実験誤差によるものである可能性が高い。図 1 c ~ d には、この細菌株が、マイクロバイームの多様性を向上できることが示されているからである。

40

## 【0172】

## 分類群の変動

GB1712857.0 に開示されているデータを再解析した。下記の表 5 に示されているように、コントロール群と比べた場合に、処置群における、存在量が有意に異なる分類群が明らかになった。は、処置群における分類群の有意な増加を示しており、は、処置群における分類群の有意な減少を示している。言及した図では、存在量の変化 ( $\log_2$  倍率変化) が反映されている。

## 【0173】

【表 5】

MRX518	MRX554	MRX858	REF10	抗CTLA4
Clostridium disporicum (↓、 -3.853)				Clostridium XIVa (↓、 - 4.845)
Lactobacillus (↑、 2.356)				Ruminococcaceae (↓、 -3.044)
Alloprevotella rara (↑、 2.397)	Clostridium XIVa (↑、 5.162)	Alistipes massiliensis (↓、 - 6.215)		Clostridium disporicum (↓、 -6.256)
Barnesiella intestinalis (↑、 7.134)	Barnesiella intestinalis (↑、 4.180)	Alistipes massiliensis (↓、 - 7.733)		Ruminococcus (↑、 3.049)
Eubacterium (↑、 3.548)	Lachnospiraceae	Barnesiella intestinalis (↑、 6.473)		Acetatifactor muris (↑、 3.439)
Roseburia intestinalis (↓、 -2.911)	Incertae sedis (↑、 4.303)	Turicibacter sanguinis (↑、 3.081)		Roseburia intestinalis (↓、 -5.368)
Eubacterium ramulus (↓、 - 2.430)	Barnesiella intestinalis (↑、 5.978)	Gordonibacter pamelaee (↑、 4.265)	Gordonibacter pamelaee (↑、 4.265)	Eubacterium ramulus (↓、 -2.571)
Barnesiella intestinalis (↑、 3.392)	Clostridium viride (↓、 - 3.939)	Alistipes (↓、 - 4.532)		Roseburia faecis (↑、 3.251)
Barnesiella intestinalis (↑、 3.716)	Gordonibacter pamelaee (↑、 4.095)			Lachnospiraceae (↓、 -2.699)
Barnesiella intestinalis (↑、 3.157)				Clostridium lavalense (↓、 - 1.747)
Barnesiella intestinalis (↑、 2.298)				Clostridium XIVa (↓、 - 4.036)
Gordonibacter pamelaee (↑、 4.528)				Clostridium viride (↓、 - 3.991)
Akkermansia muciniphila (↑、 5.431)				Eubacterium plexiclaudatum (↓、 -3.199)
				Barnesiella intestinalis (↑、 2.443)
				Eubacterium plexicaudatum (↓、 -2.976)
				Clostridium XIVa (↑、 4.097)
				Turicibacter sanguinis (↑、 3.371)
				Olsenella profusa (↑、 3.197)
				Clostridium XIVa (↓、 - 3.626)
				Eubacterium siraeum (↑、 3.341)

表 5：18日目において、ビヒクルコントロールと比較した際に、存在量の異なる分類群の数（処置群ごと）

【0174】

E. gallinarumまたはE. casseliflavusの細菌株による処置

10

20

30

40

50

は、微生物叢の多様性、特に、*Lachnospiraceae* 及び *Roseburia* (PMID: 26416813) の割合を向上させることができる。

【0175】

*Clostridium* Cluster XIVa spp. は、*E. gallinarum* または *E. caselliiflavus* の細菌株による処置後に減少する。

【0176】

処置によってさらに、*Barnesiella intestinihominis* が選択的に増加した。この株は以前に、腫瘍内で、IFN- $\gamma$  産生 T 細胞を増加させて、特異的メモリー Th1 細胞の免疫応答を誘導し、すなわち、追加の免疫刺激機序をもたらすことが示されている [38]。したがって、本発明の組成物は、対象に投与すると、それらの対象の微生物叢の多様性を安定化及び/または向上させるように機能するのみならず、抗がん作用を持つものとして実証されている細菌の成長も促進し、それらの対象が、がん患者であるか、またはがんになるリスクがあると特定された対象である場合には、特に有益である。

【0177】

実施例 3 - 安定性試験

本明細書に記載されている組成物であって、本明細書に記載されている細菌株を少なくとも 1 つ含む組成物を密閉容器に 25 °C または 4 °C で保存し、その容器を、相対湿度が 30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、75 %、80 %、90 % または 95 % の雰囲気中に置く。標準的なプロトコールによって求められるコロニー形成単位で測定した場合に、1 カ月後、2 カ月後、3 カ月後、6 カ月後、1 年後、1.5 年後、2 年後、2.5 年後または 3 年後に、その細菌株の少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 % または 90 % が残存するものとする。

【0178】

実施例 4 - 代謝解析

概要

*Enterococcus gallinarum* が、マウスにおける微生物叢の代謝プロファイルに及ぼす作用を調べた。

【0179】

試験デザイン

乳癌モデル (EMT6) のマウスを、200  $\mu$ l 中に  $2 \times 10^8$  個の濃度の MRX518 ( $n = 9$ )、MRX0518 ( $n = 8$ )、MRX0554 ( $n = 8$ )、MRX0858 ( $n = 8$ ) または REF10-DSM100110 ( $n = 8$ ) で処置するか、EMT6 マウスに、10 mL/kg の濃度の抗 CTLA4 ( $n = 8$ ) を投与するかした。細菌種の投与は、-14 日目に開始した。マウスには、0 日目に腫瘍細胞を生着させた。抗 CTLA4-4 抗体 (10 mg/kg、腹腔内) による処置は、腫瘍が体積 50 ~ 70 mm<sup>3</sup> に達したら開始した。腫瘍体積は、3 ~ 4 日おきに測定した。

【0180】

急速凍結した盲腸から、盲腸内容物を単離し、糞便スラリーから、短鎖脂肪酸代謝物、極性代謝物及び脂質代謝物を別々に抽出した。GC-MS (短鎖脂肪酸)、ならびに HILIC (極性代謝物) 及び UPLC (脂質代謝物) を用いた LC-MS 解析によって、抽出物を解析した。未処置群を他のすべての群と比較するために、統計 t 検定とともに、偽発見率 10 % でベンジャミーニ-ホッホベルク法による補正を行うことを通じて、データを解析した。代謝物は、p 値が、各化合物に関して算出したベンジャミーニ-ホッホベルクの臨界値 ( $(i/m)Q$ ) 未満である場合に、統計的に有意とした。

【0181】

MRX518 で処置したマウスでは、代謝物プロファイルに有意差が見られた (表 6)。これに対して、抗 CTLA4-4 による処置は、代謝物産生のいずれの変化とも関連がなかった。さらに、MRX0518 及び MRX0554 による処置の最中には、ペントースリン酸経路全体における代謝物が減少する。

## 【 0 1 8 2 】

MR×0518及びMR×0554で処置したマウスでは、リボース5 - リン酸、エリトロース4 - リン酸及びセドヘブツロース7 - リン酸を含むペントースリン酸経路のメンバーの減少も見られた。上で論じたように、この経路のメンバーの高発現レベルは、がん患者の不良転帰と関連するので、この減少は有益であり、したがって、本発明の組成物を投与して、このような患者の微生物叢の安定性を安定化及び/または向上させると、これらの組成物はさらに、がんの予防または治療に寄与することになる。

## 【 0 1 8 3 】

【表 6】

	群3 (MRx0518)	群4 (MRx0554)	群5 (MRx0858)	群6 (REF10)	群7 (抗 CTLA4)
極性 代謝物 (正イオン化)	Neu5AC ↑↑ グルタミン ↑ セリン ↑ 及び12個の未同定 の代謝物	ManNAc ↑ シチジン ↑ セリン ↑ ベタイン ↑ Neu5AC ↑ グルタミン ↑ (イソ)ロイシン ↑ ヒスチジン ↑ プロリン ↑ アスパラギン酸 ↑ シトルリン ↑	ManNAc ↑ シチジン ↑	ManNAc ↑ シチジン ↑ グルタミン ↑ セリン ↑ Neu5AC ↑ ヒスチジン ↑ 及び6個の未同定の代 謝物	なし
極性代謝物 (負イオン化)	グルコース1ーリ ン酸 ↓ セドヘプツロース ー7ーリン酸 ↓ グルコース6ー リ ン酸 ↓ リボース5ーリン 酸 ↓ エリトロースー4 ーリン酸 ↓ 及び145個の未同 定の代謝物	グルコース1ーリン 酸 ↓ セドヘプツロース ー7ーリン酸 ↓ グルコース6ーリン 酸 ↓ リボース5ーリン酸 ↓ エリトロースー4ー リン酸 ↓ パントテン酸 ↑ 及び23個の未同定	なし	なし	なし
短鎖脂肪酸代 謝物	酪酸塩 ↓	酪酸塩 ↓	なし	なし	なし

10

20

30

40



脂質代謝物 (正イオン化)	3個の未同定の代謝物	なし	2個の脂質	なし	なし
脂質代謝物 (負イオン化)	68個の脂質	6個の脂質	2個の脂質	なし	なし

10

表6 未治療のコントロール群と比べて、MRx0518群または抗CTLA-4群間で有意に異なっていた極性代謝物、SCFA代謝物及び脂質代謝物

#### 【0184】

実施例5 - *Enterococcus gallinarum*による処置後の微生物叢の変化

##### 試験デザイン

健常な雌の5～7週齢のBalb/C (BALB/cByJ)マウス(n=210)をCHARLES RIVER (L'Arbresles)から入手し、EMT-6腫瘍細胞を注射して、乳癌モデルを作製した。試験は、3つの時点(-15日目、-1日目及び22日目)に標本化した、群ごとに10匹のマウスを含む7つの処置群で構成させた。処置群は、以下のとおりであった。

20

群	治療
G1	未処置
G2	YCFA
G3	MRx0518
G4	抗PD1
G5	抗PD1+MRx0518
G6	抗CTLA4
G7	抗CTLA4+MRx0518

30

#### 【0185】

-15日目に、マウスを強制経口投与によって、 $2 \times 10^8$ 個のMRX518で処置した。1日目(D-1)に、200 $\mu$ LのRPMI1640中の $1 \times 10^6$ 個のEMT-6細胞を右側腹部に皮下注射することによって、マウスにEMT-6腫瘍細胞を生着させた。試験の13日目に、マウスの腹腔腔に注射することによって、10ml/kgの体積(マウスの直近の個々の体重に合わせて調整した)で、抗CTLA4(BE0131、Bioxecl)及びPD-1を投与した。試験中の3つの時点(-15日目、-1日目及び22日目(試験終了時))に、糞便試料を採取した。

40

#### 【0186】

##### マイクロバイーム組成データの生成-16Sアンブリコンシーケンシング

社内パイプラインの適応を用いて、データの前処理を行った。シーケンシングから戻ってきたリードの質は不良であったことから、厳格なクオリティフィルタリング工程を加えることになった。トリミング及びクオリティフィルタリングには、Trimomatic

50

cというツール(v0.36)を使用した。フォワードリードからは最初の16個の塩基対、リバーシリードからは最初の20個の塩基対を除去して、プライマー配列を除去した。この後、Phredクオリティスコア25を下回るリーディング塩基対またはトレーリング塩基対をトリミングした。次に、データにスライディングウィンドウ4を適用し、ウィンドウ内のリードが、平均Phredスコア22を下回った場合には、そのリードの末端を除去した。前のクオリティトリミング工程後に、リードペアの1つまたは両方が180塩基対未満であった場合には、そのリードペアを除去した。クオリティフィルタリング後、次の工程は、FLASHというツール(v1.2.11)を用いて、リードをマージするものであった。これによって、リードペアからシングルリードが生成される一方で、組み合わせないリードペアが除去される。

10

#### 【0187】

マイクロバイーム組成データの解析(ポストシーケンシング)

QIIME(v1.9.1)及びSPINGO(v1.3)を用いて、代表的なOTU配列の分類学的分類を行った。QIIMEのassign\_taxonomy.pyというスクリプトを用いて、RDP11.2というデータベースを参照することによって、分類を属レベルに割り当てた。SPINGOのツールを用いて、種レベルの分類を割り当てた。ブートストラップ信頼値が0.8未満の分類はいずれも、「未分類」というラベルを割り当てた。

#### 【0188】

##### 【表7】

20

試料数	210
試料ごとのリード深度(平均(標準偏差))	17871(6884.056)
OTU生成数	4181

表7: データセット統計

30

#### 【0189】

89794\_\_D\_\_15という1つの試料は、配列深度が非常に低かった(1,086)。したがって、マウス89794の全試料を多様性の算出から除去した。

#### 【0190】

高レベルデータ解析

R v3.4.3という統計ソフトウェアを用いて、解析を行った。Bray-Curtis非類似度行列を用いて、データセットの組成非類似度を調べた。veganパッケージのvegdist関数を用いて、割合で正規化したデータで、Bray-Curtis行列を算出した。主座標解析(PCoA)の座標付けプロットを作成して、異なる処置が分類群の組成に及ぼす作用を可視化した。PCoAプロットは、made4及びggplot2パッケージを用いて作成した。veganパッケージのadonis関数を用いて、Bray-Curtis非類似度に対するPermutational MANOVA統計試験を行った。

40

#### 【0191】

結果

RパッケージのDESeq2を用いて、分類群の存在量の差を試験した。処置の作用をYCHAコントロールと比較するような方法で、完全データセットをモデル化した。試験は、OTUレベルで、分類学的な分類の5つの各レベル(門、綱、目、科及び属)で行った。分類群は、調整済みp値が0.05未満である場合に有意とみなした。log倍率変化が0.5超の分類群のみを、信頼性のあるものとみなした。各時点に、これを繰り返し

50

た。- 15日目には、有意な分類群は見られなかった。- 1日目における有意な分類群は、表8に、22日目における有意な分類群は、表9に示されている。正のlog倍率変化によって、処置群において、ビヒクルと比べて、分類群が増加することが示されている。

【0192】

【表8】

レベル	処置	分類群	分類	分類	log2倍率 変化	標準 誤差	調整済 p値
属	抗CTLA4	Anaerotruncus	NA	NA	-1.290	0.38	0.028
OTU_Table	MRx0518	OTU_50	科	Lachnospiraceae	4.780	1.13	0.043
OTU_Table	MRx0518	OTU_121	属	Barnesiella	2.120	0.44	0.004
OTU_Table	抗PD1	OTU_121	属	Barnesiella	2.237	0.48	0.014
OTU_Table	抗PD1	OTU_354	科	Lachnospiraceae	5.245	1.17	0.014
OTU_Table	抗CTLA4	OTU_77	科	Lachnospiraceae	-24.844	3.91	8.21E-07
OTU_Table	抗CTLA4	OTU_79	網	Clostridia	-1.398	0.32	0.014
OTU_Table	抗CTLA4	OTU_121	属	Barnesiella	2.382	0.48	0.002
OTU_Table	抗CTLA4	OTU_186	科	Lachnospiraceae	4.196	0.98	0.017

表8：1日目に、YCFA（ビヒクル）と比べた際に、各処置群で観察された、存在量の異なる分類群

【0193】

【表 9】

レベル	処置	分類群	分類 レベル	分類	log2倍率 変化	標準誤 差	調整済 みp値
門	抗PD1	Deferribacteres	NA	NA	1.556	0.559	0.048
門	抗CTLA4	Deferribacteres	NA	NA	1.470	0.559	0.039
門	抗CTLA4	Tenericutes	NA	NA	-2.587	0.741	0.004
網	抗PD1	Deferribacteres	NA	NA	1.526	0.559	0.044
網	抗PD1	未分類	NA	NA	-1.004	0.313	0.019
網	抗CTLA4	Mollicutes	NA	NA	-2.583	0.761	0.010
網	抗CTLA4	未分類	NA	NA	-0.954	0.313	0.016
目	抗PD1	Anaeroplasmatales	NA	NA	-2.182	0.774	0.041
目	抗PD1	未分類	NA	NA	-1.198	0.365	0.017
目	抗CTLA4	Anaeroplasmatales	NA	NA	-2.997	0.775	0.002
目	抗CTLA4	未分類	NA	NA	-1.286	0.365	0.004
科	抗PD1	Anaeroplasmataceae	NA	NA	-2.232	0.764	0.043
科	抗PD1	未分類	NA	NA	-1.185	0.407	0.043
科	抗CTLA4	Anaeroplasmataceae	NA	NA	-2.981	0.764	0.002
科	抗CTLA4	Desulfovibrionaceae	NA	NA	0.972	0.348	0.042
科	抗CTLA4	未分類	NA	NA	-1.200	0.407	0.039
属	抗CTLA4	Anaeroplasmata	NA	NA	-3.042	0.774	0.004
OTU_Table	MRx0518	OTU_125	科	Lachnospirac eae	8.098	1.825	0.012
OTU_Table	MRx0518	OTU_2853	属	Alistipes	2.062	0.469	0.012
OTU_Table	抗CTLA4	OTU_125	科	Lachnospirac eae	9.871	2.022	0.002

表9：22日目に、YCFA（ビヒクル）と比べた際に、各処置群で観察された、存在量の異なる分類群

## 【0194】

図3(c)には、MRx0518による処置と関連する分類群の傾向が示されている。座標プロットの上部では、MRx0518で処置したマウスがクラスタリングされており、PC2値はプラスであるが、座標プロットの下部では、他の処置がクラスタリングされており、PC2値はマイナスである。これは、図3(a)にも示されている。図3(b)には、処置前の分類群が示されている。このクラスタリングは、MRx0518による処

置後のみに見られることは明らかである。

【0195】

図3の座標付けプロットの第2軸で可視化されているように、相補解析を行って、MRx0518応答と関連する分類群を同定した。この解析によって、22日目に観察されたMRx0518応答と関連する分類群の差が示されている。

【0196】

この解析は、Rでcor.test関数を用いて行うようなスピアマンの相関解析から構成させた。有意な分類群のみ、プラスの（それらの分類群がその傾向と関連すること示す）及びマイナスの（それらの分類群が逆に関連することを示す）で示されている。

【0197】

表6には、22日目の時点に、ビヒクルコントロール(YFCA)と比べて、有意に異なる分類群が示されている。これらのデータによって、MRx0518によって処置すると、Barnesiella種の存在量が増加することが確認される。本発明の組成物は、シクロホスファミドの有効性に関連付けられているBarnesiella種のレベルを向上させることができる。

【0198】

【表10】

	P値	$\rho$
Alistipes	1.77E-05	-0.571
Prevotella	0.000332	0.491
Parabacteroides	0.00183	0.441
Hallella	0.00553	0.404
Anaerotruncus	0.0126	0.375
Bacteroides	0.0136	0.366
Flavonifractor	0.045	0.318
Clostridium XIVb	0.0451	0.308
Vampirovibrio	0.0451	0.313
Anaeroplasm	0.0487	0.301
Barnesiella	0.0487	0.297

表10：22日目に、MRx0518による処置と関連することが観察された分類群

【0199】

配列

配列番号1(Enterococcus gallinarum 16S rRNA遺伝子 - AF039900)

```

1 taatacatgc aagtcgaacg ctttttcttt caccggagct tgctccaccg aaagaaaaag
61 agtggcgaaac ggggtgagtaa cacgtgggta acctgcccac cagaagggga taacacttgg
121 aaacaggtgc taataccgta taacactatt ttccgcatgg aagaaagttg aaaggcgctt
181 ttgcgtcact gatggatgga cccgcggtgc attagctagt tggtaggta acggctcacc
241 aaggccacga tgcatacgag acctgagagg gtgatcggcc aactgggac tgagacacgg
301 cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcggc aatggacgaa agtctgaccg
361 agcaacgccc cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa actctgttgt tagagaagaa
421 caaggatgag agtagaacgt tcatcccttg acggtatcta accagaaagc cacggctaac
481 tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt
541 aaagcgagcg caggcggttt cttaagtctg atgtgaaagc ccccggtcacc accgggggag
601 gtcattggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggagag tgggaattcca tgtgtagcgg
661 tgaaatgcgt agatatatgg aggaacacca gtggcgaaag cggctctctg gtctgtaact
721 gacgctgagg ctcgaaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggg agtccacgcc
781 gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt cagtgtctgca gcaaacgcat
841 taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc
901 ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc
961 ttgacatcct ttgaccactc tagagataga gcttccccct cgggggcaaa gtgacaggtg
1021 gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccg caccgagcga
1081 acccttattg ttagttgcca tcatttagtt gggcactcta gcgagactgc cggtgacaaa
1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatac tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg
1201 tgctacaatg ggaagtacaa cgagttgcga agtcgcgagg ctaagctaata ctcttaaagc
1261 ttctctcagt tcggattgta ggctgcaact cgcctacatg aagccggaat cgctagtaat
1321 cgcggatcag caccgcgagg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac
1381 caccgagagt tgtaacaccc gaagtcggtg aggtaacctt tttggagcca gccgcctaag
1441 gtgggataga tgattggggg gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg
1501 atcacc

```

10

20

【 0 2 0 0 】

30

配列番号 2 ( *Enterococcus gallinarum* 株 MRX518 のコン  
センサス 16 S rRNA 配列 )

TGCTATACATGCAGTCGAACGCTTTTCTTTACCGGAGCTTGCTCCACCGAAAGAAAAAGAGTGGCGAACGGGTGA  
 GTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACACTATTTTC  
 CGCATGGAAGAAAGTTGAAAGGCGCTTTTGCCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTA  
 ACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC  
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACCCGCGTGAGTGAAGAAG  
 GTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAGAACGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAA  
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC  
 GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACCTGG  
 GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCACT  
 GCGGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG  
 TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCA

10

CTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG  
 GTTTAATTCGAAGCAACGCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCTT  
 CGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC  
 GCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG  
 GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAA  
 GTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGA  
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACACGGA  
 GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTG

20

## 【 0 2 0 1 】

配列番号 3 ( M R X 5 1 8 株の染色体配列 ) - 電子的な配列表を参照。

## 【 0 2 0 2 】

配列番号 4 ( M R X 5 1 8 株のプラスミド配列 ) - 電子的な配列表を参照。

## 【 0 2 0 3 】

配列番号 5 ( *Enterococcus gallinarum* 株 M R x 0 5 5 4 の  
 コンセンサス 1 6 S r R N A 配列 )

30

TTCACCGCGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCGGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACA  
 ATCCGAAGTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTAGCTTAGCCTCGCGACTTCGCAACTCGTTGTACTTCCCAT  
 TGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTT  
 TGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTT  
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCC  
 CGAAGGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCT  
 TCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGG  
 TCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTTCAACACT  
 TAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGAGCC  
 TCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTAC  
 CGCTACACATGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGT  
 TGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCCAATAAATCCGGA  
 CAACGCTTGCCACCTACGATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATAC  
 CGTCAAGGGATGAACGTTCTACTCTCATCCTTGTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAAC  
 CTTCTTCACTCACGCGGCTTGCTCGGTGAGCTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC  
 CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCCGGCTATGCATCGT  
 GGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGTCCATCCATCAGTGACGCAAAA  
 GCGCCTTTCAACTTTCTTCCATGCGGAAAATAGTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTAT  
 CCCCTTCTGATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTCCGCACTCTTTT

40

50

## 【0204】

## 参考文献

- [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 . 10
- [5] Mazmanian et al. (2005) Cell 15; 122 (1): 107 - 18 .
- [6] 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 . 20
- [10] Sheflin et al (2014) Curr Oncol Rep. 16 (10): 406 .
- [11] Lozupone (2012). Nature. 2012 September 13; 489 (7415): 220 - 230
- [12] DeSantis et al (2007) Microbial Ecology, 53, 3, 371 - 383 .
- [13] Vogt et al (2017) Scientific Reports 7 (1): 13537 doi: 10.1038/s41598-017-13601-y
- [14] Keshavarzian et al. (2015) Movement Disorders, 30, pp. 1351 - 1360 doi: 10.1002/mds.26307 30
- [15] Kang et al (2013) PLoS ONE 8 (7) e68322 doi: 10.1371/journal.pone.0068322
- [16] Jangi et al. (2015) Nature Communications, 7, 12015 doi: 10.1038/ncomms12015
- [17] Chen et al. (2016) Sci. Rep. 6, 28484 doi: 10.1038/srep28484
- [18] Pozuelo et al. (2015) Scientific Reports. 5: 12693. doi: 10.1038/srep12693 40
- [19] Ott et al. (2004) Gut 53: 685 - 693 doi: 10.1136/gut.2003.025403
- [20] Frank et al. (2007) Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 13780 - 13785 doi:
- [21] Michail et al. (2012) Inflammatory Bowel Diseases 18 (10) pp 1799 - 1808. doi: 10.1002/ibd.22860
- [22] Chen et al. (2016) Genome Med. 8: 43 doi: 10.1186/s13073-016-0299-7
- [23] Scher et al. (2015) Arthritis Rheumat 50



- ol. 67, 128 - 139 doi:10.1002/art.38892.
- [24] Giongo et al. (2011) ISME J., 5 pp. 82 - 91 doi:10.1038/ismej.2010.92
- [25] Claesson et al. (2012) Nature 488, 178 - 184. doi:10.1038/nature11319
- [26] Giloteaux et al. (2016) Microbiome, 4 (30) doi:10.1186/s40168-016-0171-4
- [27] Manero et al. (1999) Appl. Environ. Microbiol., 65, 10 4425 - 4430.
- [28] Williams et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18:6531 - 6535. 10
- [29] Collins et al. (1984) Int J Syst Evol Microbiol. 34:220 - 223.
- [30] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557 - 563.
- [31] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [32] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482 - 489. 20
- [33] Dayhoff et al. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3
- [34] Srutkova et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87 (1): 10 - 6.
- [35] Schenk et al (2011) Sic Signal, 4, 162
- [36] Atarashi et al (2008) Nature, 455, 7214, 808 - 812
- [37] Karmakar et al (2015) Nature Communications 7, 10555
- [38] Dailly et al (2016) Immunity. 18; 45 (4): 931 - 943 30
- [39] WO2013/050792
- [40] McIlroy et al. (2018) Aliment Pharmacol Ther. 47:26 - 42.
- [41] Viaud et al. (2013) Science 342 (6161): 971 - 976.
- [42] Moustafa et al. (2018) Clinical and Translational Gastroenterology, 9.e132
- [43] Cocco J (1987) Epidemiol Community Health. ; 41 (2): 89 - 93. 40
- [44] Benito et al. (2017) Oncotarget. ; 8 (63): 106693 - 106706
- [45] Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.
- [46] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3 (2): 39 - 48.
- [47] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [48] Remington's Pharmaceutical Sciences 50

, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)

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

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

[51] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592 - 3597.

[52] US2016/0067188

10

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

[54] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter - Cervera, Academic Press

[55] Strobels (2009) Methods Mol Biol. 581: 247 - 61.

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

20

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

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

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

30

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

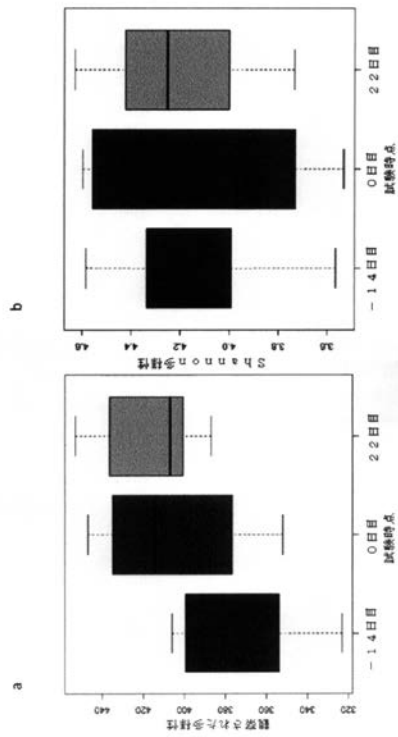
[61] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S. ed., CRC Press, 1997)

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

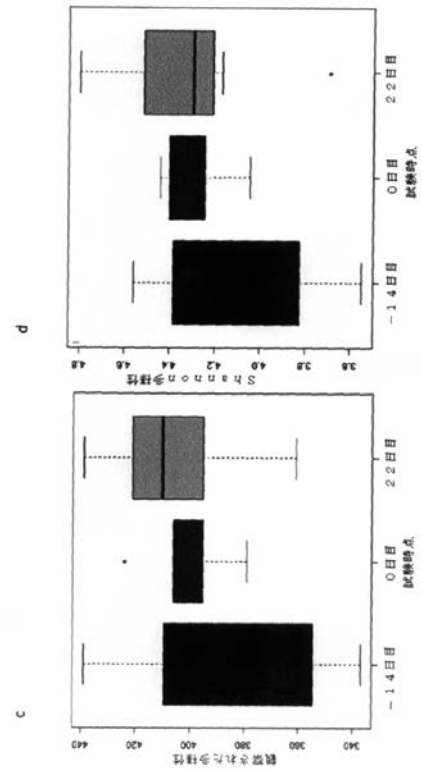
[63] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)

40

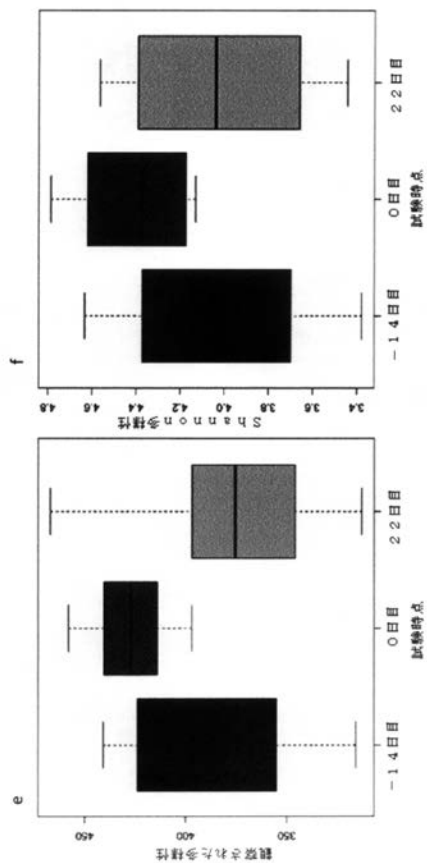
【図 1 - 1】



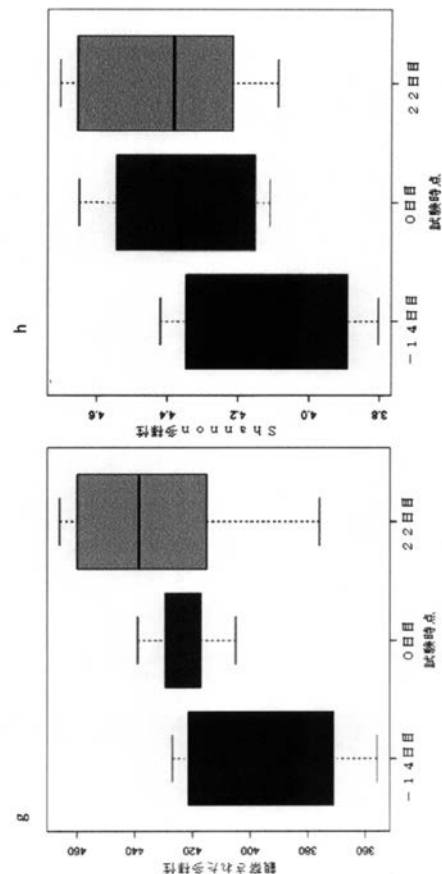
【図 1 - 2】



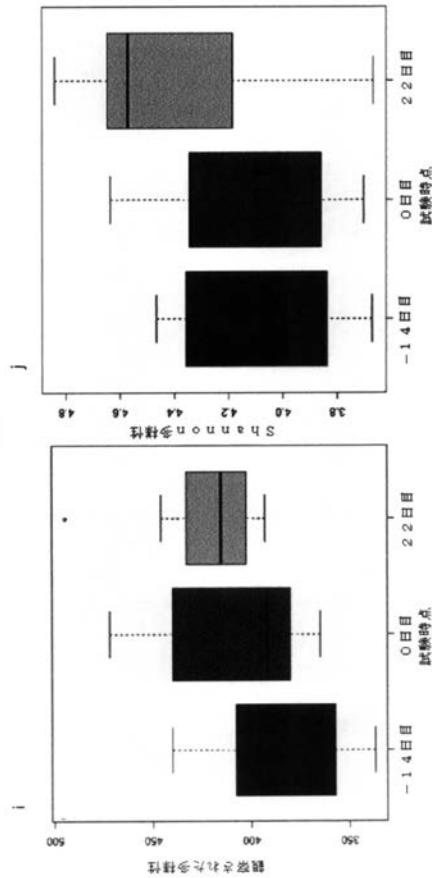
【図 1 - 3】



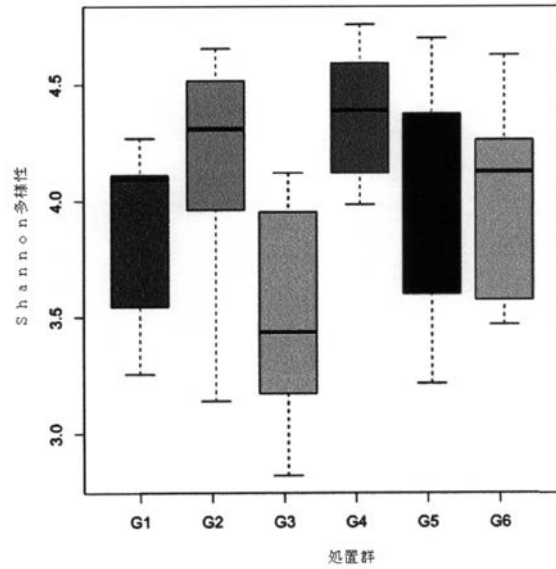
【図 1 - 4】



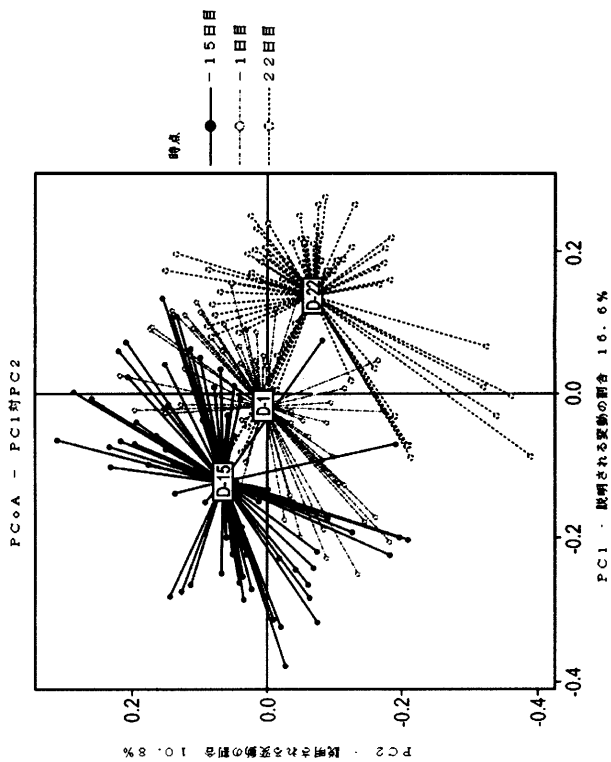
【図 1 - 5】



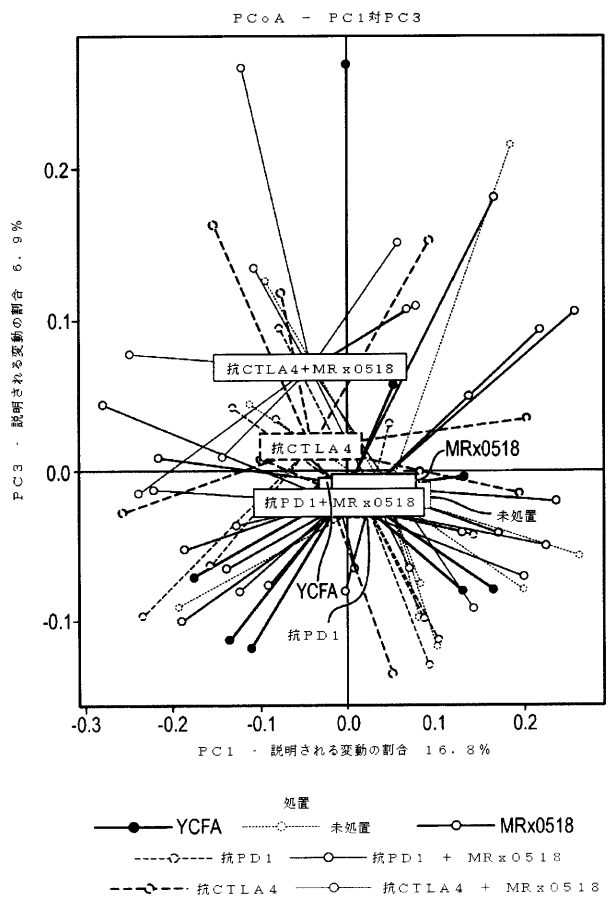
【図 2】



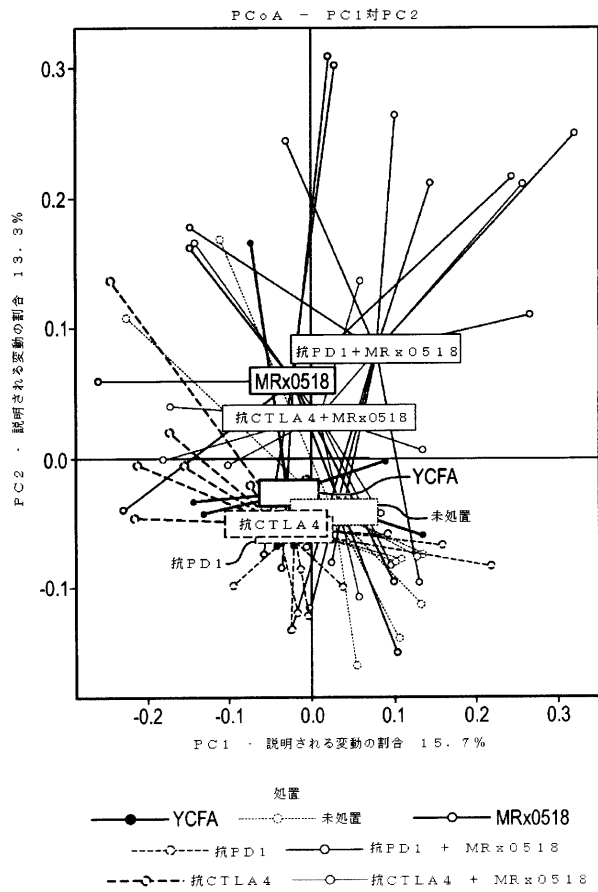
【図 3 a】



【図 3 b】



【図 3 c】



【配列表】

2020529431000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/071831

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K35/744 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A23L33/135  
A61P1/12

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/143772 A1 (MULDER IMKE ELISABETH [GB] ET AL) 25 May 2017 (2017-05-25) paragraphs [0009], [0012], [0119], [0087], [0098]	1-6,9-24
Y	-----	1-24
X	US 2017/143773 A1 (MULDER IMKE ELISABETH [GB] ET AL) 25 May 2017 (2017-05-25) paragraphs [0008], [0010], [0019], [0074], [0085], [0122], [0155]	1-6,9,13-24
Y	-----	1-24
X	US 2016/303172 A1 (ZITVOGEL LAURENCE [FR] ET AL) 20 October 2016 (2016-10-20) paragraphs [0011] - [0013], [0019], [0087] - [0090], [0164]; examples 1,2,3	1-5,13-24
Y	-----	1-24
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2018

Date of mailing of the international search report

26/11/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zellner, Eveline

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/071831

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/071367 A1 (BAUER JOHANN [DE] ET AL) 21 March 2013 (2013-03-21)	1-4, 21-24
Y	paragraphs [0019], [0034], [0035], [0036]	1-24
X	----- BASHIARDES STAVROS ET AL: "The microbiome in anti-cancer therapy", SEMINARS IN IMMUNOLOGY, vol. 32, 18 April 2017 (2017-04-18), pages 74-81, XP085246126, ISSN: 1044-5323, DOI: 10.1016/J.SMIM.2017.04.001	1-5, 13-24
Y	page 77, column 1, paragraph 2	1-24
X	----- SAFARI REZA ET AL: "Host-derived probiotics Enterococcus casseliflavus improves resistance against Streptococcus iniae infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) via immunomodulation", FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 52, 17 March 2016 (2016-03-17), pages 198-205, XP029500734, ISSN: 1050-4648, DOI: 10.1016/J.FSI.2016.03.020	1-4, 21-24
Y	abstract	1-24
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/071831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017143772 A1	25-05-2017	AU 2016357554 A1	14-06-2018
		CA 3005781 A1	26-05-2017
		CN 108513545 A	07-09-2018
		DK 3209310 T3	16-04-2018
		EA 201891200 A1	31-08-2018
		EP 3209310 A1	30-08-2017
		EP 3363446 A1	22-08-2018
		ES 2662617 T3	09-04-2018
		GB 2561748 A	24-10-2018
		HR P20180501 T1	01-06-2018
		HU E036362 T2	30-07-2018
		JP 6312919 B2	18-04-2018
		JP 2018126147 A	16-08-2018
		JP 2018500271 A	11-01-2018
		KR 20180054896 A	24-05-2018
		LT 3209310 T	25-04-2018
		MD 3209310 T2	30-06-2018
		PE 13352018 A1	21-08-2018
		PL 3209310 T3	31-08-2018
		PT 3209310 T	20-04-2018
		SG 11201804161V A	28-06-2018
		SI 3209310 T1	29-06-2018
		TW 201739462 A	16-11-2017
		US 2017143772 A1	25-05-2017
		US 2018055892 A1	01-03-2018
		US 2018078585 A1	22-03-2018
		WO 2017085520 A1	26-05-2017
US 2017143773 A1	25-05-2017	AR 106768 A1	14-02-2018
		AU 2016357553 A1	07-06-2018
		CA 3005518 A1	26-05-2017
		CN 108513544 A	07-09-2018
		EA 201891199 A1	31-10-2018
		EP 3377082 A1	26-09-2018
		KR 20180081509 A	16-07-2018
		PE 11552018 A1	19-07-2018
		SG 11201804118V A	28-06-2018
		TW 201729822 A	01-09-2017
		US 2017143773 A1	25-05-2017
		WO 2017085518 A1	26-05-2017
US 2016303172 A1	20-10-2016	AU 2014351348 A1	09-06-2016
		CA 2931363 A1	28-05-2015
		CN 106170557 A	30-11-2016
		EP 2876167 A1	27-05-2015
		EP 3071709 A1	28-09-2016
		JP 2016539119 A	15-12-2016
		KR 20160079122 A	05-07-2016
		SG 10201803877Y A	28-06-2018
		US 2016303172 A1	20-10-2016
		WO 2015075688 A1	28-05-2015
US 2013071367 A1	21-03-2013	AU 2011234591 A1	25-10-2012
		BR 112012024925 A2	22-09-2015
		CA 2794999 A1	06-10-2011
		CN 102984954 A	20-03-2013
		DE 102010013209 A1	29-09-2011
		EP 2552230 A2	06-02-2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2006)



### Information on patent family members

PCT/EP2018/071831

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 31/675 (2006.01)		A 6 1 K 31/675		
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04		
A 6 1 K 39/02 (2006.01)		A 6 1 K 39/02		
A 6 1 P 1/14 (2006.01)		A 6 1 P 1/14		
A 2 3 L 33/135 (2016.01)		A 2 3 L 33/135	Z N A	

(31)優先権主張番号 18183642.0

(32)優先日 平成30年7月16日(2018.7.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100113860  
弁理士 松橋 泰典(74)代理人 100131093  
弁理士 堀内 真(74)代理人 100150902  
弁理士 山内 正子(74)代理人 100141391  
弁理士 園元 修一(74)代理人 100198074  
弁理士 山村 昭裕(74)代理人 100096013  
弁理士 富田 博行(72)発明者 ムルダール イムケ エリザベス  
イギリス国 エイビー 2 5 2 ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒルロード ライフサイエンスイノベーションビルディング フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド気付(72)発明者 マククラスキー セアニン マリー  
イギリス国 エイビー 2 5 2 ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒルロード ライフサイエンスイノベーションビルディング フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド気付(72)発明者 サヴィニャック ヘレン  
イギリス国 エイビー 2 5 2 ゼットエス アバディーンシャー アバディーン コーンヒルロード ライフサイエンスイノベーションビルディング フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド気付(72)発明者 ジェフェリー イアン  
アイルランド国 コーク ユニバーシティカレッジシーオー フードサイエンスビルディング ル

## ーム447 フォーディー ファーマ コーク リミテッド気付

F ターム(参考) 4B018 LB07 LE04 LE05 MD85 ME11  
4C085 AA03 BA08 CC07 EE01 GG05  
4C086 AA01 AA02 DA35 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA66 ZA68 ZA69  
ZB08 ZB11 ZB26 ZC75  
4C087 AA01 AA02 BC55 CA09 MA02 NA14 ZA66 ZA68 ZA69 ZB08  
ZB11 ZB26 ZC75