(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115667555 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202180036768.2
(22)申请日 2021.05.19
(30)优先权数据
2007452.2 2020.05.19 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.21
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2021/051206 2021.05.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/234380 EN 2021.11.25
(71)申请人 百奥利康微生物有限公司
地址 英国剑桥
(72)发明人 马修·鲁滨逊 特雷沃罗·劳利 迈克尔·罗曼诺斯 凯文·弗维尔 西蒙·哈里斯 吉斯·巴格达什 阿米·波普尔 多米尼卡·克利什科
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 高丽娜 张莹
(51)Int.Cl.
C12Q 1/689(2006.01)

权利要求书3页 说明书66页
序列表25页 附图18页

(54)发明名称

治疗性细菌组合物

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症的细菌组合物。特别地,该组合物可以用作与免疫检查点疗法的联合疗法。本发明还涉及用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法应答的受试者的方法,包括确定来自所述受试者的生物样品中的细菌丰度。

CN 115667555 A

1.包含选自至少两个物种的分离的细菌的组合物,其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列,并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列。

2.根据权利要求1所述的组合物,进一步包含来自至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个不同物种的分离的细菌,其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID No:3至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列的16S rDNA序列。

3.根据权利要求1所述的组合物,进一步包含来自至少4个不同物种的分离细菌,其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID NO:3至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列的16S rDNA序列。

4.根据权利要求1所述的组合物,进一步包含来自至少7个不同物种的分离的细菌,其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID NO:3至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列的16S rDNA序列。

5.根据权利要求1所述的组合物,进一步包含细菌分离菌,其包含选自与根据SEQ ID NO:7的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列的16S rDNA序列。

6.根据权利要求1所述的组合物,其包含选自如表3所示的聚生体1至4或6至10的聚生体。

7.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物被配制用于口服或直肠施用。

8.根据权利要求7所述的组合物,其中所述组合物为胶囊、片剂、凝胶或液体的形式。

9.根据权利要求8所述的组合物,其中所述组合物被包封在肠包衣中。

10.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含活的、减毒的或灭活的细菌。

11.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含细菌孢子。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中所述组合物不包含细菌孢子。

13.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含源自一个或多个人类供体的细菌菌株。

14.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述细菌是冻干的。

15.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物包含至少约$1x10^3$至$1x10^{13}$ CFU的细菌。

16.根据任一前述权利要求所述的组合物,其中所述组合物的施用在受试者中诱导免疫应答和/或增加包括免疫检查点抑制剂的抗癌疗法的功效。

17.药物组合物,其包含权利要求1至16中任一项所述的组合物和药物载体。

18.根据权利要求17所述的药物组合物,还包含有效量的免疫检查点抑制剂或疫苗。

19.根据权利要求18所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1、PDL-1、CTLA-4、LAG3或TIM-3活性。

20.根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PDL-1或CTLA-4抗体或其片段。

21.根据权利要求20所述的药物组合物,其中抗PD-1、PD-L1或CTLA-4抗体选自纳武利

尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

22.根据权利要求18所述的药物组合物，其中所述免疫检查点抑制剂为干扰核酸分子、小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)、替代蛋白支架或其他免疫检查点抑制剂。

23.根据权利要求22所述的药物组合物，其中所述干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。

24.根据权利要求1至16中任一项所述的组合物，或权利要求17至23中任一项所述的药物组合物，其用于治疗疾病。

25.根据权利要求1至16中任一项所述的组合物，或权利要求17至23中任一项所述的药物组合物，其用于治疗癌症或传染病或用作疫苗佐剂或用于提高癌症治疗的功效。

26.一种在有需要的受试者中治疗癌症或传染病的方法，包括向所述受试者施用根据权利要求1至17中任一项的组合物或权利要求17的药物组合物。

27.权利要求26所述的方法，其中所述受试者正在接受、已经接受或将接受免疫检查点抑制剂的疗法，从而治疗所述癌症或传染病。

28.在有需要的受试者中治疗癌症的方法，包括向所述受试者施用根据权利要求18所述的组合物。

29.根据权利要求26或27所述的方法，其中所述组合物的施用增强受试者的免疫应答和/或抑制癌症的免疫逃逸和/或提高免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效。

30.根据权利要求25应用的组合物或根据权利要求26至29中任一项所述的方法，其中所述癌症选自黑素瘤，例如哈-帕二氏黑素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑黑素瘤、恶性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、无黑色素性黑素瘤、良性幼年黑素瘤、克罗德曼黑素瘤、S91黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤、皮肤黑素瘤、葡萄膜/眼内黑素瘤和浅表扩散黑素瘤或骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肾癌、软组织肉瘤、尿道癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤、尿路上皮癌、白血病、前列腺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、淋巴瘤，例如霍奇金病、非霍奇金病、胃癌和多发性骨髓瘤。

31.根据权利要求25应用的组合物或根据权利要求26至29中任一项所述的方法，其中所述组合物或药物组合物通过口服施用或直肠施用来施用。

32.根据权利要求25应用的组合物或根据权利要求26至29中任一项所述的方法，其中所述受试者已经接受免疫检查点抑制剂的先前抗癌疗法。

33.根据权利要求25应用的组合物或根据方面26或29中任一项所述的方法，进一步包括施用免疫检查点抑制剂的抗癌疗法。

34.根据权利要求33应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂在所述细菌制剂之前、之后或同时施用。

35.根据权利要求33或34应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂通过注射施用。

36.根据权利要求33至35中任一项应用的组合物或方法，其中所述注射是静脉内、肌肉

内、肿瘤内或皮下注射。

37.根据权利要求33至36中任一项应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1、PDL-1或CTLA-4活性。

38.根据权利要求37应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PDL-1或CTLA-4抗体。

39.根据权利要求38应用的组合物，其中所述抗PD-1、PD-L1或CTLA-4抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

40.根据权利要求33至37中任一项应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子、小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或其他免疫检查点抑制剂。

41.根据权利要求40应用的组合物或方法，其中所述干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子或小分子或肽。

42.根据权利要求25或30至41应用的组合物，或根据权利要求26至41中任一项的方法，进一步包括外科手术、放射和/或化学疗法癌症干预或第二抗癌疗法的施用。

43.根据权利要求25或30至42的组合物或根据权利要求26至42中任一项的方法，还包括向所述受试者施用抗生素。

44.根据权利要求25或30至43应用的组合物或根据权利要求26至43中任一项的方法，其中所述受试者被鉴定为处于发生癌症的风险。

45.试剂盒，其包含根据权利要求1至17中任一项所述的组合物，以及任选地包含免疫检查点抑制剂的抗癌治疗。

46.食品或疫苗佐剂，其包含权利要求1至17中任一项的组合物。

47.处理施用于受试者之前的粪便移植物的方法，包括用选自至少两个物种的分离的细菌补充所述粪便移植物，其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的16S rDNA序列，并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的16S rDNA序列。

48.权利要求1至17中任一项的组合物或权利要求18的药物组合物在提高免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效中的用途。

49.权利要求1至17中任一项的组合物或权利要求18的药物组合物在增强免疫检查点阻断中的用途。

50.用于增强免疫检查点阻断的方法，包括施用权利要求1至17中任一项的组合物或权利要求18的药物组合物。

51.组合物，其包含选自表1的一种或多种细菌的细菌。

52.治疗或预防癌症的方法，包括调节受试者中选自表1的一种或多种细菌的水平。

治疗性细菌组合物

[0001] 引言

[0002] 恶性癌细胞的免疫抑制和逃逸被称为癌症的标志之一。许多共抑制受体及其配体(称为免疫检查点)有助于这一过程。免疫检查点抑制剂癌症免疫疗法在癌症管理中具有变革性,因为它们可以导致长期缓解,并且可以对许多癌症有效。这些检查点包括程序性细胞死亡1(PD-1)、PD-L1和CTLA-4。将PD-1抑制剂引入临床实践对癌症治疗产生了革命性的影响,但仅在一小部分患者中观察到一致的应答和良好的长期结果。大多数患者对疗法没有应答。黑素瘤的比例最高(达到40%),但其他癌症的比例要低得多。此外,大量患者出现免疫相关不良事件并不得不停止疗法。

[0003] 因此,需要(a)预测对免疫检查点抑制剂的应答的生物标志物和(b)增加对疗法应答的癌症患者比例的方法。

[0004] PD-1(UniProt登录号Q15116,GenBank登录号U6486)蛋白由PDCD1基因编码并表达为55kDa I型跨膜蛋白(Agata 1996Int Immunol8(5):765-72)。PD-1是免疫球蛋白超家族成员(Ishida 1992 EMBO11(11):3887-95),它是T细胞调节剂的扩展CD28/CTLA-4家族的抑制性成员。该家族的其他成员包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1作为单体存在,缺乏其他CD28家族成员的未配对半胱氨酸残基特征(Zhang2004 Immunity 20:337-47)。其细胞质结构域包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)和基于免疫受体酪氨酸的开关基序(ITSM),它们在信号转导过程中被磷酸化(Riley 2009Immunol Rev 229(1):114-25)。

[0005] PD-1在B细胞、T细胞和单核细胞上表达(Agata 1996)。PD-1在维持免疫学自我耐受中的作用在PDCD1-/-小鼠中得到证实,这些小鼠会发展为自身免疫性疾病(Nishimura 1999Immunity 11:141-51,Nishimura 2001Science 291(5502):319-22)。因此,PD-1通路调节抗原应答,平衡自身免疫和耐受性。

[0006] PD-1有两种配体介导其调节功能。PD-L1(B7-H1)通常在树突细胞、巨噬细胞、静息B细胞、骨髓来源的肥大细胞和T细胞以及非造血细胞谱系上表达(在Francisco 2010 Immunol Rev 236:219-42中进行了综述)。PD-L2(B7-DC)主要在树突细胞和巨噬细胞上表达(Tseng 2001 J Exp Med193(7):839-45)。配体表达受局部介质(mediator)的影响,并且可以被炎性细胞因子上调。

[0007] PD-1被称为负调节TCR信号的免疫抑制蛋白。PD-1和PD-L1之间的相互作用可以充当免疫检查点,这可以导致例如肿瘤浸润淋巴细胞减少、T细胞受体介导的增殖减少和/或癌细胞的免疫逃逸。通过抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的局部相互作用可以逆转免疫抑制;当PD-1与PD-L1和PD-L2的相互作用被阻断时,效果是累加的。

[0008] PD-1通路可在癌症或感染中被利用,从而肿瘤或病毒可以逃避有效的免疫识别,并且T细胞表现出“衰竭”的表型。

[0009] PD-1:PD-L1相互作用的破坏增强了T细胞活性。抑制性抗PD-1单克隆抗体可阻断PD-1与其配体之间的相互作用(Wang 2014 Cancer Immunol Res 2(9):846-56)。体外T细胞功能可以通过PD-1阻断来增强,正如T细胞和树突细胞的混合淋巴细胞反应中改善的增殖和细胞因子应答所证明的那样。来自黑素瘤患者的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)也已被证明

在体外使用抗体纳武单抗(nivolumab)通过PD-1阻断而得到增强,并且可以对于调节性T细胞的抑制具有抗性(Wang 2009 Int Immunol 21(9):1065 -1077)。该抗体已被证明对黑素瘤和非小细胞肺癌(NSCLC)患者有效。另一种PD-1阻断抗体帕博利珠单抗(pembrolizumab)在对CTLA-4阻断无效的NSCLC患者中表现出应答。纳武单抗和帕博利珠单抗都在功能上阻断人PD-1与其配体的相互作用。

[0010] 癌症患者的肠道微生物组是对免疫检查点疗法应答的主要驱动力。

[0011] 以前的研究分析了临床数据集,以鉴定与治疗功效相关的肠道微生物群(Frankel Neoplasia(2017)19:848;Gopalakrishnan Science(2018)359:97;Matson Science(2018)359:104;Routy Science(2018)359:91)。然而,该领域的主要挑战是独立研究中鉴定的微生物组特征非常不同。已发表的研究在应答标准和癌症适应症方面有所不同,已知的影响微生物组分析的因素,例如样品收集、储存和处理以及地理位置也不同。因此,很难理解交叉研究噪声中真正的特征是什么。

[0012] 因此,需要提供癌症的有效治疗以及可预测对治疗的应答的生物标志物,并且本发明旨在解决该需要。

发明内容

[0013] 本发明基于以下发现:对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者中的肠道微生物组与对免疫检查点抑制剂疗法无应答的受试者的肠道微生物组不同,因此肠道微生物组可能用作免疫检查点抑制剂疗法的诊断或治疗的来源。

[0014] 因此,本发明针对多个方面,包括但不限于以下方面:

[0015] -包含本文定义的某些细菌的组合物,这些细菌已在对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者中鉴定并且可用作疾病的治疗,包括癌症、传染病的治疗或用作疫苗佐剂;

[0016] -包含具有本文定义的某些细菌的组合物和免疫检查点抑制剂疗法的联合疗法和

[0017] -提供如本文所定义的某些细菌作为免疫检查点抑制剂疗法的诊断物,以鉴定受益于免疫检查点抑制剂疗法的患者,并且还鉴定可能接受细菌或其他疗法的患者,例如在施用检查点抑制剂疗法之前。

[0018] 本文进一步描述了本发明的这些方面以及其他相关方面和实施方案。

[0019] 发明人已经鉴定了与对免疫检查点抑制剂疗法的应答相关并高度预测对免疫检查点抑制剂疗法的应答的微生物组生物标志物特征。这在该领域具有重要意义,为以下提供了基础:检查点抑制剂疗法的预测性生物标志物;活细菌治疗(LBT)疗法;与免疫检查点抑制剂(例如用于治疗癌症的抗PD-1、抗PD-L1或抗CTLA-4药物)的活细菌治疗联合疗法,以增加对检查点抑制剂有应答的患者比例。特别地,发明人已经鉴定了存在于肠道微生物组中的许多细菌物种(species),它们表现出指示对免疫检查点抑制剂疗法的应答的调节的丰度。因此,检测这些细菌的调节丰度可用于区分对检查点抑制剂疗法的应答者和无应答者。此外,预计将此类活细菌作为药物施用可使对检查点抑制剂无应答的患者转变为应答者。

[0020] 本文鉴定和描述的细菌可单独用于确定应答和/或提供治疗,或可提供细菌的组合以增加诊断方法的辨别力并提供应答与不应答的非侵入性诊断方法以及治疗方法。

[0021] 发明人已经鉴定了与检查点抑制剂应答相关的特定肠道细菌。因此,本发明提供

了可用于调节微生物组以改善免疫检查点抑制剂患者例如癌症患者的治疗应答的肠道细菌。本公开中的研究使用了一组黑素瘤患者，这些患者正在接受抗PD-1药物疗法或抗PD-1加抗CTLA-4药物联合疗法。通过宏基因组全基因组鸟枪法测序对这些患者在免疫检查点疗法之前采集的肠道微生物组样品进行了表征。在免疫检查点阻断治疗(例如，基于PD-1的治疗)的应答者与无应答者的肠道微生物组组成中观察到显著差异，治疗前与无应答者相比应答者肠道微生物组中特定细菌的丰度增加或减少。具体而言，发现如本文所述的细菌在应答者中更丰富。因此，这些细菌及其亚群可用于单独或与免疫检查点抑制剂疗法组合用于治疗包括癌症在内的疾病的组合物中。此外，这些细菌可用作生物标志物，即用作诊断物以区分检查点抑制剂(例如PD-1抑制剂)治疗的应答者和免疫检查点抑制剂疗法的无应答者。

[0022] 本研究表明，具有“有利的”肠道微生物组(具有调节的，例如本文所述的一种或多种细菌的高相对丰度)的患者具有增强的抗肿瘤免疫应答。相比之下，具有“不利的”肠道微生物组(如本文定义的B1-B15物种的相对丰度较低)的患者具有受损的抗肿瘤免疫应答。这些发现强调了肠道微生物组的平行调节以显著提高检查点阻断治疗功效的潜力。基于这些发现，本文提供了疾病管理方法，例如癌症治疗和诊断。本文还提供了使用本文所述的组合物作为预测性生物标志物组合物来鉴定将对免疫检查点阻断具有有利的应答的患者的方法。此外，本文所述的组合物具有免疫刺激特性。因此，疾病的治疗不限于癌症，而是组合物提供对其他疾病的治疗，例如有益于免疫刺激治疗的疾病，例如非癌症免疫疗法。

[0023] 因此，在第一方面，本发明涉及一种组合物，该组合物包含一种或多种细菌分离菌，特别是属于选自表1的一个或多个细菌物种的细菌群。因此，本发明涉及包含选自表1的一种或多种细菌的细菌的组合物。具体而言，本发明因此涉及包含一种或多种具有选自SEQ ID No:1至15的16SrDNA的细菌分离菌的组合物。

[0024] 该组合物可以包含或由2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种分离的细菌组成。这些是选自不同物种的不同细菌，即具有选自SEQ ID No:1至29的16SrDNA或与选自SEQ ID No:1至29，例如选自SEQ ID No:1至15的核酸序列具有至少95％、97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的序列或与选自SEQ ID No:1至15的核酸序列具有至少95％、97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列的细菌。

[0025] 在一个实施方案中，该组合物因此包含或由选自至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个细菌物种的分离的细菌组成，其中所述细菌包含选自SEQ ID No:1至29，例如1至15的16S rDNA序列，或与选自SEQ ID No:1至15的核酸序列具有至少95％、97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的序列。

[0026] 在一个实施方案中，组合物包含或由选自至少两个物种的分离的细菌组成，其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少95％、97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的16S rDNA序列，并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少95％、97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的16S rDNA序列。

[0027] 在一个实施方案中，所述组合物包含或由选自至少9个物种的分离的细菌组成，其中所述细菌包含选自SEQ ID No:1至29，例如1至15的16SrDNA序列或与选自SEQ ID No:1至29，例如1至15的序列具有至少95％、97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的序列。

在一个实施方案中,9个物种包括包含根据SEQ ID NO:1的16S rDNA序列或与其具有至少95%、97%、98%、98.7%、99%或100%序列同一性的序列的细菌,和包含根据SEQ ID NO:2的16S rDNA序列或与其具有至少95%、97%、98%、98.7%、99%或100%序列同一性的序列的细菌。

[0028] 另一方面,本发明涉及如本文所述的药物组合物、药物载体和任选的免疫检查点抑制剂。

[0029] 另一方面,本发明涉及如本文所述的组合物,其用于治疗疾病,例如特定的癌症或传染病。该组合物也可以用作疫苗佐剂。这用于增强疫苗应答,并且可以与疫苗一起施用。

[0030] 在另一个方面,本发明涉及如本文所述的组合物,该组合物提高了用免疫检查点抑制剂进行的抗癌治疗的功效。

[0031] 在另一个方面,本发明涉及治疗癌症的方法,包括调节受试者中选自表1的一种或多种细菌的水平/丰度。

[0032] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含如本文所述的组合物和任选地包括免疫检查点抑制剂的抗癌治疗。

[0033] 在另一个方面,本发明涉及一种用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答的受试者的方法,该方法包括确定在来自包含肠道菌群的所述受试者的生物样品中选自表1的细菌中的一种或多种细菌的丰度,其中,选自表1的细菌中的一种或多种细菌的丰度增加表明受试者将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答。

[0034] 在另一方面,本发明涉及选自表1的细菌中的一种或多种细菌在鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者中的用途。

[0035] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含:

[0036] 配置成接收生物样品的可密封的容器;

[0037] 用于扩增来自至少一种肠道相关细菌的16S rDNA多核苷酸序列以形成扩增的16S rDNA多核苷酸序列的多核苷酸引物,其中扩增的16S rDNA序列与选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:29;例如1至15的多核苷酸序列具有至少95%、97%、98%、98.7%、99%或100%的序列同一性;检测试剂,用于检测扩增的16S rDNA序列;和使用说明。

[0038] 在另一个方面,本发明涉及用于增强疫苗应答的食品或疫苗联合疗法,其包含如本文所述的组合物。

[0039] 在另一个方面,本发明涉及一种用于鉴定粪便供体,例如用于治疗癌症的方法,包括评估受试者的粪便样品中选自表1的一种或多种细菌的存在,并基于选自表1的一种或多种细菌的存在和/或丰度鉴定粪便供体。

[0040] 在另一个方面,本发明涉及选自表1的一种或多种细菌在鉴定供体用于FMT疗法例如用于治疗癌症的方法中的用途。

[0041] 在另一个方面,本发明涉及一种在施用于受试者之前处理粪便移植物的方法,包括用一种或多种选自表1的分离的细菌补充粪便移植物。

[0042] 在另一个方面,本发明涉及筛选/鉴定粪便供体的方法,包括评估受试者的粪便样品中一种或多种与对癌症的应答相关的细菌的存在;和基于一种或多种细菌的存在和/或丰度来鉴定粪便供体。

附图说明

[0043] 图1A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用定义特征中的细菌丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度为91.16%。x轴是组。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度84.62%;gajewski准确度89.74%;melresist准确度93.18%;wargo准确度100%。X轴是组。C)基于基于相同微生物组特征的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC=0.98。X轴是1-特异性,y轴是灵敏度。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.958;AUC gajewski 0.978;AUC melresist 0.983;AUC wargo 1。X轴是1-特异性,y轴是灵敏度。

[0044] 图2A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体(consortium)1中15种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是77.55%。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度79.49%;gajewski准确度66.67%;melresist准确度81.82%;wargo准确度84%。C)基于基于聚生体1的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC=0.8。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.867;AUC gajewski 0.725;AUC melresist 0.879;AUC wargo 0.773。

[0045] 图3A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体2中9种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是74.15%。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度76.92%;gajewski准确度69.23%;melresist准确度75%;wargo准确度76%。C)基于基于聚生体2的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC=0.75。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.831;AUC gajewski 0.676;AUC melresist 0.788;AUC wargo 0.734。

[0046] 图4A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体3中12种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是74.15%。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度76.92%;gajewski准确度66.67%;melresist准确度81.82%;wargo准确度68%。C)基于基于聚生体3的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC=0.773。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.844;AUC gajewski 0.685;AUC melresist 0.862;AUC wargo 0.76。

[0047] 图5A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体4中9种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是71.43%。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度76.92%;gajewski准确度64.1%;melresist准确度

77.27％;wargo准确度64％。C)基于基于聚生体4的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC＝0.737。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.781;AUC gajewski0.667;AUC melresist 0.791;AUC wargo 0.708。

[0048] 图6A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体5中9种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是68.71％。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度71.79％;gajewski准确度58.97％;melresist准确度70.45％;wargo准确度76％。C)基于基于聚生体3的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC＝0.69。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.75;AUC gajewski 0.596;AUC melresist 0.766;AUC wargo 0.675。

[0049] 图7A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体6中9种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是69.39％。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度69.23％;gajewski准确度58.97％;melresist准确度77.27％;wargo准确度72％。C)基于基于聚生体3的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC＝0.71。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.767;AUC gajewski 0.577;AUC melresist 0.81;AUC wargo 0.708。

[0050] 图8基于基于聚生体1的机器学习预测,NSCLC队列的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。NSCLC数据集是来自Routy和Zitvogel等人(2018Science 359:91-97)使用Microbiotica高精度平台分类的宏基因组序列。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC＝0.744。

[0051] 图9分离的细菌诱导树突细胞成熟和细胞因子产生。分离的细菌激活树突细胞(DC)的能力通过在无氧条件下以约10:1的感染倍数(MOI)与人单核细胞衍生的树突细胞共培养来确定。树突细胞的后续成熟通过流式细胞术测定的成熟标志物CD86(A)和CD83(B)的表达水平来确定。与LPS对照相比,数据显示为平均荧光强度(MFI)的倍数变化,以便在不同的供体和实验之间进行归一化。CD86(C)和CD83(D)在用聚生体5(MOI约为10:1)处理后的DC表达同样通过流式细胞术确定。用聚生体5刺激后这些标志物的MFI以白色条形图显示。CD86(E)和CD83(F)在用聚生体6、7、8和9处理后的DC表达通过流式细胞术确定。这些标志物的MFI以白色条形图显示。(G)通过ELISA测定单独用分离的细菌(MOI约为10:1)或作为聚生体5和6(MOI约为10:1)处理后DC产生的IL-12和IL-10。MOI 10N＝5(5个独立实验中的5个供体)。数据显示为IL-12与IL-10的比率。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂,并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是5(A和B)、2(C、D、E和F)和3(G)个独立实验的平均值±SEM。

[0052] 图10用分离的细菌处理的树突细胞可激活细胞毒性CD8+T淋巴细胞(CTL)。如图9所示,在与分离的细菌或对照刺激物共培养后,人单核细胞衍生的DC被洗涤并与纯化的同

种异体CD8+T细胞共培养6天。通过使用细胞内染色和流式细胞术分析粒酶B(A)、IFN-γ(B)和穿孔素(C)的表达来确定CTL活化。与LPS对照相比，数据显示为阳性细胞百分比的倍数变化，以在不同的供体和实验中归一化。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂，并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是4个独立实验中7个供体的平均值±SEM。

[0053] 图11用聚生体6、7、8和9处理的树突细胞可激活细胞毒性CD8+T淋巴细胞(CTL)。如图9所示，在与聚生体6、7、8和9或对照刺激物共培养后，人单核细胞衍生的DC被洗涤并与纯化的同种异体CD8+T细胞共培养6天。通过使用细胞内染色和流式细胞术分析粒酶B(A)、IFN-γ(B)和穿孔素(C)的表达来确定CTL活化。数据显示为阳性细胞的百分比。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂，并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是单个代表性实验的重复试验的平均值±SEM。

[0054] 图12用聚生体5处理的树突细胞激活细胞毒性CD8+T淋巴细胞(CTL)。如图11所示，在与聚生体5或对照刺激物共培养后，人单核细胞衍生的DC被洗涤并与纯化的同种异体CD8+T细胞共培养6天。通过使用细胞内染色和流式细胞术分析粒酶B(A)、IFN-γ(B)和穿孔素(C)的表达来确定CTL活化。数据显示为阳性细胞的百分比。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂，并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是单个代表性实验的重复试验的平均值±SEM。

[0055] 图13分离的细菌和聚生体6、7、8和9赋予诱导的CTL肿瘤杀伤能力。评估了由细菌/聚生体处理的DC(如图10和11所示)引发的CD8+T细胞杀死SKOV-3细胞的能力。通过测量SKOV-3细胞降低的电阻抗来确定细胞溶解。数据显示为与CD8+T细胞共培养72小时后SKOV-3细胞的细胞溶解百分比。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂，并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是3个独立实验的平均值±SEM。

[0056] 图14聚生体5和布劳特氏菌属(Blautia sp.)赋予诱导的CTL肿瘤杀伤能力。评估了由聚生体5或布劳特氏菌属(Blautia sp.)处理的DC(如图12所示)引发的CD8+T细胞杀死SKOV-3细胞的能力。通过测量SKOV-3细胞降低的电阻抗来确定细胞溶解。数据显示为与CD8+T细胞共培养72小时后SKOV-3细胞的细胞溶解百分比。LPS(10ng/ml)、Poly I:C(20μg/ml)和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)(MOI约为10:1)是DC活化的强诱导剂，并且可用作所有测定的阳性对照(灰色条形图)。显示未受刺激或未成熟(Imm)的DC用于比较(灰色条形图)。结果是单个代表性实验的重复试验的平均值±SEM。

[0057] 图15分离的细菌具有可变的诱导浆细胞样树突细胞产生IFN-α的能力。在与加热灭活的细菌(moimoi约为10:1)孵育过夜后，通过ELISA确定浆细胞样树突细胞(pDC)产生的IFN-α。分别取10ng/ml IL-3和10μg/ml CpG(灰色条形图)作为阴性和阳性对照。结果是2个独立实验中3个供体的平均值±SEM。

[0058] 图16在小鼠癌症模型中的体内疗效。在肿瘤植入之前，在饮用水中给SPF C57BL/

6N雌性小鼠施用抗生素(卡那霉素(0.4mg/ml)、粘菌素(850U/ml)、甲硝唑(0.215mg/ml)、万古霉素(0.045mg/ml)、庆大霉素(0.035mg/ml))7天(第-9天至第-2天)。随后,在第-1天通过口服管饲法用来自黑素瘤患者的人类供体粪便(20mg)重建小鼠。在第0天,将5x10^5个MCA-205鼠纤维肉瘤细胞皮下植入侧腹。聚生体5(n=8)和聚生体6(n=8)从第-1天开始每周两次通过口服管饲法给药,持续3周(大约总共1x10^9CFU/剂量),并与用赋形剂对照处理的动物进行比较。从第6天开始,每周三次(10mg/kg腹膜内)施用抗PD-1抗体(RMP1-14),持续2周。图表显示随着时间的推移响应赋形剂对照、抗PD1和聚生体5(A)或聚生体6(B)的肿瘤生长(按体积测量)。数据是平均值±SEM肿瘤大小,代表至少三个(A)和两个(B)实验。

[0059] 图17A)来自四项黑素瘤研究的所有147名患者根据临床结果分为有应答者和无应答者。基于使用聚生体10中9种细菌的丰度的机器学习预测,从基线粪便样品中预测对免疫疗法无应答的概率。使用0.5的截止值来确定预测的准确度。准确度是75.51%。B)同A,但每项研究均单独考虑。frankel准确度74.36%;gajewski准确度71.79%;melresist准确度77.27%;wargo准确度。C)基于基于聚生体3的机器学习预测,组合黑素瘤数据集的接受者操作特征(ROC)曲线显示假阳性率作为真阳性率的函数。AUC=0.81。D)同C,但每项研究均单独考虑。随机森林袋外错误用于防止过度乐观的性能并提高通用性。AUC frankel 0.85;AUC gajewski0.725;AUC melresist 0.826;AUC wargo 0.805。

[0060] 在图中,Con代表聚生体。聚生体如表3所示。

[0061] 详细说明

[0062] 现在将进一步描述本发明。在以下段落中,更详细地定义了本发明的不同方面。如此定义的每个方面可以与任何其他方面或多个方面组合,除非明确指出相反。特别地,被指示为优选或有利的任何特征可以与被指示为优选或有利的任何其他一个或多个特征组合。

[0063] 一般而言,与本文描述的微生物学、细胞和组织培养、病理学、分子生物学、免疫肿瘤学、遗传学和蛋白质和核酸化学以及杂交相关的术语和技术是本领域公知和常用的那些。除非另有说明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域公知的常规方法进行,并且如在整个本说明书中引用和讨论的各种通用和更具体的参考文献中所述。参见,例如,Green和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第4版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(2012)。

[0064] 与本文所述的分析化学、微生物学、生物信息学以及药物和药物化学相关的术语以及实验程序和技术是本领域公知和常用的那些。

[0065] 本发明涉及细菌组合物,其各自包含或由来自本文所公开的一个或多个物种的一种或多种细菌分离菌组成,例如,确定的细菌分离菌的聚生体。该组合物具有免疫刺激特性,因此是可用于治疗疾病的治疗组合物。在一些实施方案中,组合物是选自表1中鉴定的多于一种的细菌分离菌的混合物。

[0066] 该组合物不是粪便微生物群移植物(FMT)并且不包含粪便材料,而是包含不含粪便材料的细菌分离菌的定义混合物。因此,含有定义细菌混合物的制剂通常被认为是比FMT更安全的治疗方法。本发明组合物的一个优点是它仅包含完全定义和表征的细菌,并且不包含可能存在于供体粪便中的未定义或不需要的成分,从而使治疗组合物标准化并提高组合物的安全性。

[0067] FMT依赖于来自人类供体的粪便样品,该粪便样品被直接施用给接受者,例如通过

结肠镜检查，在向接受者施用FMT之前不分离粪便样品中存在的细菌。虽然FMT被广泛使用，但也有一些与FMT相关的缺点。FMT材料的组成非常依赖于供体，因此是不一致的。尽管对供体进行了筛选，但很难确定样品的细菌负荷。还必须对供体进行病原体筛查，并评估耐药细菌定植的风险。在下文描述的某些方面，本发明还涉及用如本文公开的来自一个或多个物种的一种或多种细菌分离菌来增强FMT疗法和用于筛选/鉴定粪便供体的方法。

[0068] 如本文所述的组合物包括分离的细菌。术语“分离的”是指从自然环境中分离出来的细菌。分离的细菌，例如分离的细菌菌株，基本上不含其他细胞物质、化学物质和/或粪便物质。因此，如本文所用，术语“分离的”细菌是指已与一种或多种不希望的组分(例如另一种细菌或细菌菌株、生长培养基的一种或多种组分和/或样品例如粪便样品的一种或多种组分)分开的细菌。在一些实施方案中，细菌基本上从来源中分离，使得来源的其他成分未被检测到。如本文所用，术语“物种”是指通常由基因组序列和/或表型特征定义的分类学实体。“菌株”是已根据常规微生物技术分离和纯化的物种的特定实例。应当理解，术语细菌和细菌分离菌是指多个细菌，即细菌种群。

[0069] 在一个实施方案中，组合物的细菌在施用前是代谢失活的。例如，细菌是冻干的。在一个实施方案中，该组合物包括营养细菌细胞并且不包括细菌孢子。在一个实施方案中，该组合物包括营养细菌细胞和/或细菌孢子。在一个实施方案中，该组合物包括营养细菌细胞并且不包括细菌孢子或者基本上没有孢子。在一个实施方案中，该组合物包括少于约0.5％、1％、2％、3％、4％或5％的孢子。

[0070] 该组合物优选为活细菌治疗剂、细菌疗法或活生物治疗产品。如本文所述，活细菌产品(也称为细菌组合物、活细菌聚生体、细菌混合物或细菌聚生体)包含来自本文所述一个或多个细菌物种的一种或多种细菌菌株。术语活细菌疗法在本文可与细菌疗法互换使用，并定义了使用活细菌来恢复健康或减轻疾病/疾病症状或增加对疗法的应答的疗法。

[0071] 本发明的细菌组合物提供免疫刺激作用。在一些实施方案中，细菌组合物在施用于受试者时诱导或刺激免疫治疗作用，例如抗癌作用(例如，癌细胞的抑制或细胞毒性)。在一些实施方案中，如本文进一步解释的，当施用至受试者时，细菌组合物诱导或刺激提供抗癌或其他有益治疗效果的免疫应答。

[0072] 如本文所述，所述组合物可包含一个或多个选自表1中所列的细菌物种。可以使用本领域已知的任何方法评估特定细菌或活细菌产品的细菌物种的组合诱导有益作用，即免疫刺激作用，例如抗癌作用的能力，例如，体外测定，例如使用细胞培养，或体内研究。合适的测定显示在实施例中。

[0073] 在一些实施方案中，抗癌活细菌产品诱导特定的免疫细胞群(例如，CD8+T细胞、Th17、Th1细胞)。可以通过本领域已知的任何方法评估特定细胞群(例如，CD8+T细胞、Th17、Th1细胞)的丰度，例如通过检测指示细胞类型的细胞标志物、评估细胞类型的直接或间接活性，和/或通过测量由特定细胞类型产生的一种或多种细胞因子的产生。在一些实施方案中，抗癌活细菌产品诱导CD8+T细胞(或“CD8+T细胞”)。如本领域普通技术人员将理解的，可以选择和组合本文所述的细菌物种和/或来自一个或多个物种的多种菌株的组合，以产生诱导CD8+T细胞的抗癌活细菌产品。

[0074] 在一个实施方案中，分离的细菌，例如来自本文所列物种的分离的细菌菌株，可以是当施用至所述受试者时能够在受试者的胃肠道定居的活细菌。

[0075] 发明人已经表明，通过组合来自不同物种的细菌，可以提供一种治疗组合物，该组合物可用作与检查点抑制剂的联合治疗。在第一方面，本发明涉及一种组合物，该组合物包含分离的细菌，例如选自如表1所示的细菌物种B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15或其子集中的一种或多种的细菌菌株。本发明因此涉及包含一种或多种具有选自SEQ ID No:1至19，例如1至15的16SrDNA的细菌分离菌(例如细菌群)的组合物。因此，本发明涉及一种组合物，其包含或由表1中所示的一个或多个物种的细菌分离菌组成。

[0076] 下面的表1列出了15种不同的细菌物种，存在于组合物中的分离的细菌是从中选出的。表1还提供了对表征每个物种的示例性16S rDNA序列的参考。本文中使用的术语16S rDNA序列或16S rRNA是指编码16SrRNA-核酸序列即核酸分子的DNA核酸序列，即核酸分子。下面引用的核酸序列列于表2中。此外，如下文进一步解释的，本文所述的组合物和其他方面的细菌可具有与如下所列的SEQ ID No具有某些序列同一性的16S rDNA序列。

[0077] 表1组合物的细菌物种和生物标志物特征

[0078]

No	生物分类学	16S rDNA 序列- 序列标识符	可能的替代分类法：基于从公共数据库中鉴定的密切相关细菌的名称和/或密切相关的物种
B1	Eisenbergiella sp.	SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 21	Eisenbergiella tayi
B2	Butyricicoccus sp.	SEQ ID No: 2; SEQ	Butyricicoccus pullicaecorum, 细菌

[0079]

		ID No: 17; SEQ ID No: 22	NLAE-zl-H41, 细菌 NLAE-zl-H55, 细菌 NLAE-zl-H60
B3	梭菌属 (Clostridiales sp.)	SEQ ID No: 3	n/a
B4	Alistipes obesi	SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 16	n/a
B5	Alistipes indistinctus	SEQ ID No: 5	n/a
B6	Gordonibacter urolithinfaciens	SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 18; SEQ ID No: 23	n/a
B7	屎豆属菌（Faecalitalea sp.）	SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 24	Longicatena caecimuris
B8	布劳特氏菌属(Blautia sp.)	SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 25	Blautia producta, Blautia coccoides, Blautia marasmi, Blautia stercoris
B9	Barnesiella intestinihominis	SEQ ID No: 9; SEQ ID No: 26	n/a
B10	Alistipes timonensis	SEQ ID No: 10	n/a
B11	布劳特氏菌属(Blautia sp.)	SEQ ID No: 11; SEQ ID No: 19; SEQ ID No: 27	n/a
B12	毛螺菌属（Lachnospira sp.）	SEQ ID No: 12; SEQ ID No: 20; SEQ ID No: 28	Lactobacillus rogosae
B13	Ruminococcus callidus	SEQ ID No: 13	n/a
B14	Roseburia faecis	SEQ ID No: 14; SEQ ID No: 29	n/a
B15	Faecalibacterium prausnitzii	SEQ ID No: 15	n/a

[0080] 本文描述的本发明的方面和实施方案通过参考物种名称和/或SEQ ID NO定义，如表1所示。在一些情况下，表1中提供了相同物种的不同示例性序列，例如对应于属于相同物种的不同示例性菌株。在为一个物种提供多个序列的情况下，这些序列具有高序列同一性，例如由SEQ ID No:2和SEQ ID No:17定义的不同菌株具有至少99％的序列同一性，SEQ ID No:4和SEQ ID No:16具有至少99％的序列同一性，SEQ ID No:6和SEQ ID No:18具有至少

99％的序列同一性，并且SEQ ID No:12和SEQ ID No:20具有至少99％的序列同一性。

[0081] 在本文所述的方面和实施方案中，对于B1至B15中的每一个，可以使用上文定义的任何序列(SEQ ID No:1至29)。因此，在为单个物种提供多个序列的情况下，可以使用这些序列中的任何一个。

[0082] 应当理解，发明人提供了具有某些细菌物种的组合物，这些细菌物种具有免疫刺激作用，例如抗癌作用。还应当理解，对于每个物种，可以使用不同的菌株，即上面鉴定的菌株或属于相同物种的其他菌株。应当理解，也可以包括具有相似或相同生物学特性的密切相关的细菌菌株(例如，由16S rDNA序列定义)。在一些实施方案中，本文提供的细菌菌株可以用具有相似或相同生物学特性的细菌菌株代替。

[0083] 在一些实施方案中，抗癌/活细菌组合物包含表1中所示的15种列举的物种中的一个或多个的一种或多种细菌菌株。在一些实施方案中，抗癌/活细菌组合物包含所述15个物种中的一个以上，例如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种中的一种或多种细菌菌株。

[0084] 在一个实施方案中，组合物包含15种分离的细菌或由其组成，例如来自表1中列出的15种细菌物种中的每一种的细菌，例如参考表中所示的16S rDNA序列或如下所述与其具有一定百分比同一性的序列或参考如上所示的物种名称。

[0085] 本发明还涉及包含选自表1所列细菌物种的子集的细菌或由其组成的组合物；例如，包含或由选自表1所列细菌物种的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种的不同细菌组成的组合物，参考表1中所示的16S rDNA序列或如下所述与其具有一定百分比同一性的序列，或参考如上所示的物种名称。设想了所有组合。

[0086] 因此，在一个实施方案中，该组合物包含或由至少一种分离的细菌群体组成，该细菌群体属于表1中的一个或多个物种。例如，该组合物包含选自表1中列出的2、3、6、9或12个细菌物种的细菌或由其组成。这些可以选自表3中所示的聚生体，例如聚生体2、4、5、6和10。细菌可以通过参考它们的16S rDNA来定义，如序列标识符表1中所示。因此，选自表1所列的不同细菌可以组合在单一组合物中。

[0087] 例如，所述组合物包含分离的细菌或由其组成，所述分离的细菌选自至少2种，例如多至3种，多至4种，多至5种，多至6种，多至7种，多至8种，多至9种，多至10种，多至11种、多至12种、多至13种、多至14种或多至15种表1中所示的种，例如参考表中所示的序列。例如，该组合物包含来自表1中列出的9个细菌物种的分离细菌或由其组成。在一个实施例中，该组合物包含来自表3中所示的9个物种的分离的细菌或由其组成，即聚生体2、4、5、6和10。细菌可以通过参考它们的16S rDNA来定义，如表1中的序列标识符所示。

[0088] 在一个实施方案中，该组合物包含选自表1中列出的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个物种的分离细菌或由其组成，例如参考表1中所示的序列ID。在一个实施方案中，该组合物包含选自表3中的聚生体的分离的细菌或由其组成。在一个实施方案中，组合物包含具有选自表1所示SEQ ID NO的16S rDNA的分离细菌或由其组成。细菌可以通过参考它们的16S rDNA来定义，如表1中的序列标识符所示。如本文所示具有一定百分比序列同一性的序列也在本发明的范围内。

[0089] 在一个实施方案中，组合物包含选自表1中列出的至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至

少14个或至少15个物种的分离细菌，例如参考表1所示的序列ID。在一个实施方案中，该组合物包含选自如表1中所示的至少9个物种的分离的细菌。如本文所示具有一定百分比序列同一性的序列也在本发明的范围内。

[0090] 在一个实施方案中，所述组合物包含选自表1中所列的不超过2个、不超过3个、不超过4个、不超过5个、不超过6个、不超过7个、不超过8个、不超过9个、不超过10个、不超过11个、不超过12个、不超过13个、不超过14个或不超过15个物种的分离细菌或由其组成，例如参考表1所示的序列，例如参考表1所示的序列ID。如本文所示具有一定百分比序列同一性的序列也在本发明的范围内。

[0091] 在一个实施方案中，组合物包含选自表1中所示的2至4、2至5、2至6、2至7、2至8、2至9、2至10、2至11、2至12、2至13、2至14或2至15个物种的分离细菌或由其组成，例如参考如表1所示的序列，例如参考如表1所示的序列ID。如本文所示具有一定百分比序列同一性的序列也在本发明的范围内。

[0092] 在一个实施方案中，该组合物包含分离的细菌混合物，该混合物包含2至15种细菌菌株或由其组成，这些菌株与选自SEQ ID No:1至15的16srDNA序列具有至少90％、95％、97％、98％、98.7％或99％的序列同一性，例如SEQ ID No:16至29。示例性组合物在本文中列出，例如在表3中。

[0093] 技术人员将理解，选自表1并用于本发明的组合物和方法的细菌物种可以具有表1和表2中所示的序列或与其具有一定百分比同一性并保留生物活性的序列；即抗癌活性/增强使用免疫检查点抑制剂的治疗效果的功效。

[0094] 在一个实施方案中，组合物可以如上所述，但不包含任何其他物种的细菌，即未在表1中列出的物种，或者组合物仅包含来自另一种的微量或生物学无关量的细菌。生物学无关是指对癌症治疗没有影响的细菌。因此，在一个实施方案中，所述组合物由所列举的细菌组成。

[0095] 在一个实施方案中，该组合物不包含属于表1所列属的其他细菌物种。

[0096] 在一个实施方案中，该组合物可包含属于表1所列属的其他细菌物种，但不包含未列于表1的属的细菌物种。在一个实施方案中，该组合物可以包含属于不同属的其他细菌物种。

[0097] 确定序列同一性的方法是本领域已知的。已知进化枝、处理分类单位(OTU)、物种和菌株在一些实施方案中通过它们的16S rDNA序列来鉴定。相关性可以通过同一性百分比来确定，这可以使用本领域已知的方法来确定。

[0098] 可基于16S核酸序列(全长或其部分，例如V区)鉴定用于本文所述组合物中的细菌物种和菌株。16S核糖体DNA基因编码细菌核糖体30S亚基的DNA成分。它广泛存在于所有细菌物种中。不同的细菌物种有一个到多个拷贝的16S rRNA基因。16S rRNA基因测序是迄今为止靶向管家基因研究细菌系统发育和属/种分类的最常用方法之一。因此，细菌可以根据编码16S核酸序列的基因序列进行分类学上地分类，例如细菌中的核糖体DNA(rDNA)。该基因序列也称为核糖体DNA序列(rDNA)。细菌16S rDNA的长度约为1500个核苷酸，用于使用系统发育方法重建一种细菌分离菌与另一种细菌分离菌的进化关系和序列相似性。16S rDNA序列用于系统发育重建，因为它们通常高度保守，但包含特定的高变区，该高变区具有足够的核苷酸多样性以区分大多数微生物的属和种。

[0099] 使用众所周知的技术来确定完整的16S rDNA序列或16S rDNA序列的任何高变区的序列，从细菌样品中提取基因组DNA，使用聚合酶链式反应(PCR)扩增16S rDNA(完整区域或特定高变区)，清洗PCR产物，并且描绘核苷酸序列以确定16S rDNA基因或基因亚结构域的遗传组成。如果进行全16S rDNA测序，使用的测序方法可以是但不限于Sanger测序。如果使用一个或多个高变区，例如V4区，测序可以但不限于使用Sanger方法或使用下一代测序方法进行，例如使用允许多重反应的条形码引物的Illumina(合成测序)方法。16S rDNA的V1-V9区域是指16S rDNA基因的前9个高变区，通常用于细菌样品的基因分型。在一些实施方案中，V1至V9中的至少一个用于表征细菌分离菌。

[0100] 在一些实施方案中，如本文所述鉴定的细菌物种通过与本领域已知和本文所述的16S rDNA序列的序列同一性来鉴定。在一些实施方案中，所选种通过与如表2所示的全长16S rDNA序列的序列同一性来鉴定。在一些实施方案中，所选种通过与表2中所示的部分16S rDNA序列的序列同一性来鉴定，例如V3和/或V4。

[0101] 如本文所用，术语“同源性”或“同一性”通常是指在比对序列之后以及在一些实施方案中，如果需要，在引入空位以实现最大同源性百分比，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分之后，序列中与与其比较的参考序列的残基相同的核酸残基的百分比。因此，两个核酸序列之间的同源性百分比等同于两个序列之间的同一性百分比。用于比对的方法和计算机程序是众所周知的。可以使用众所周知的数学算法确定两个序列之间的同一性百分比。

[0102] 在一个实施方案中，查询序列和参考序列之间的序列同一性程度可以借助可商购的序列比较程序来确定。这通常涉及使用默认评分矩阵和默认空位罚分比对两个序列，识别完全匹配的数量，并将完全匹配的数量除以参考序列的长度。用于确定同一性的合适的计算机程序包括，例如，BLAST(blast.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0103] 在本文所述的各种实施方案中，当提及SEQ ID NO时，与全长序列具有一定百分比序列同一性的序列也在本发明的范围内。

[0104] 因此，参考表1中的序列标识符在表2中列出的并且用于本发明的组合物和方法中的细菌物种的全长或部分16S rDNA与相应的参考16S rRNA(即SEQ ID 1至29)具有至少90％，例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、98.7％、99％、99.5％或100％的序列同一性。在一些实施方案中，阈值序列同一性为至少94.5％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少95％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少96％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少97％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少98％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少98.7％。在一个实施方案中，所述序列同一性为至少99％。

[0105] 因此，在一个方面，所述组合物包含两种或多种细菌，即细菌物种，其包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或包含与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少90％，例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如的97％或98.7％同一性的16S r DNA序列。此类序列包括SEQ ID No:16至29，例如SEQ ID No:16至20。

[0106] 在一些实施方案中，阈值序列同一性是94.5％，94.6％，94.7％，94.8％，94.9％，95.0％，95.1％，95.2％，95.3％，95.4％，95.5％，95.6％，95.7％，95.8％，95.9％，96.0％，96.1％，96.2％，96.3％，96.4％，96.5％，96.6％，96.7％，96.8％，96.9％，97.0％，97.1％，

97.2%,97.3%,97.4%,97.5%,97.6%,97.7%,97.8%,97.9%,98.0%,98.1%,98.2%,98.3%,98.4%,98.5%,98.6%,98.7%,98.8%,98.9%99.0%,99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%.99.6%,99.7%,99.8%,99.9%或100%。

[0107] 在一个实施方案中,存在于组合物中的细菌属于与本文公开的细菌相同的种,具有与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如的97%或98.7%的同一性,并且保持抗癌活性/在增强使用免疫检查点抑制剂的治疗效果的功效。此类序列包括SEQ ID No:16至29,例如SEQ ID No:16至20。

[0108] 在一个实施方案中,所述组合物包含以下15种细菌中的一种或多种或由其组成,所述细菌具有以下SEQ ID No的16sDNA:

[0109] SEQ ID No:1或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0110] SEQ ID No:2或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0111] SEQ ID No:3或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0112] SEQ ID No:4或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0113] SEQ ID No:5或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0114] SEQ ID No:6或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0115] SEQ ID No:7或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0116] SEQ ID No:8或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0117] SEQ ID No:9或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0118] SEQ ID No:10或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0119] SEQ ID No:11或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0120] SEQ ID No:12或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0121] SEQ ID No:13或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0122] SEQ ID No:14或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列,

[0123] SEQ ID No:15或与其具有至少90%,例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列。

[0124] 以上的例子是SEQ ID No:16-29。

[0125] 因此,该组合物包含属于上述具有16sDNA的15种细菌中的一种或多种的细菌群或由其组成。

[0126] 在一个实施方案中,该组合物不包括普氏栖粪杆菌(Faecalibacterium prausnitzii)(例如SEQ ID No:15)。在一个实施方案中,该组合物不包括Alistipes indistinctus(例如SEQ ID No:5)、肥胖令枝杆菌(Alistipes obesi)(例如SEQ ID No:4或16)和/或Alistipes timonensis(例如SEQ ID No:10)。

[0127] 在一个实施方案中,该组合物包含如表3中所示的聚生体。

[0128] 因此,在一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:3或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:4或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:5或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:6或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:8或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体2)。

[0129] 在一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:3或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:6或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:8或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID

No:11或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:12或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:13或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌;具有SEQ ID No:14或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌;具有SEQ ID No:15或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体3)。

[0130] 在另一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列,SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:3或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:6或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:8或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:11或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:14或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体4)。

[0131] 在另一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:8或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％;例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、

99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:13或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:16或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:17或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:18或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,和具有SEQ ID No:20或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体5)。

[0132] 在另一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:2或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:13或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:16或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:18或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:19或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,和具有SEQ ID No:20或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体6)。

[0133] 在另一个实施方案中,该组合物包含以下细菌或由其组成:具有SEQ ID No:1或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,SEQ ID No:2或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:7或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:9或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,具有SEQ ID No:18或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌,和具有SEQ ID No:19或与其具有至少90%例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%;例如97%或98.7%的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体7)。

[0134] 在另一个实施方案中，该组合物包含以下细菌或由其组成：具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌和具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体8)，

[0135] 在另一个实施方案中，该组合物包含以下细菌或由其组成：具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌和具有SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体9)，

[0136] 因此，在一个实施方案中，该组合物包含以下细菌或由其组成：具有SEQ ID No:1或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:2或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:3或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:5或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:7或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:10或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:11或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，具有SEQ ID No:13或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌，和具有SEQ ID No:14或与其具有至少90％例如至少91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％；例如97％或98.7％的同一性的16S rDNA序列的细菌(表3中的聚生体10)。

[0137] 参考针对上述组合物的实施方案列举的同一性百分比，在一个实施方案中，序列同一性为至少98.7％或99％。应当理解，在表1提供单个物种的多个序列的情况下，可以根据上述实施方案使用这些序列中的任何一个。

[0138] 在一个实施例中，组合物中使用的物种是基于它们的16S rDNA序列(例如，全长序列或部分序列)来鉴定的。在一些情况下，可用于本发明的细菌物种的菌株，例如本文公开的物种的菌株，可以从公共生物资源中心获得，例如ATCC(atcc.org)、DSMZ(dsmz.de)，或日本理化所生物资源中心(en.brc.riken.jp)。可用于鉴定物种或本发明的其他方面的16s rDNA序列可以从公共数据库获得，例如人类微生物组计划(HMP)网站或GenBank。

[0139] 技术人员会理解，组合物可以包括一种或多于一种如表1中所列的特定细菌物种的菌株。例如，本发明的组合物包含一个物种的一种以上的细菌菌株。例如，在一些实施方

案中，本发明的组合物包含多于一个来自同一个物种的菌株(例如多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40或45个菌株)。在另一个实施方案中，本发明的组合物包含每个物种的一个细菌菌株。

[0140] 在一个实施方案中，组合物的细菌能够定殖于受试者的胃肠道。在一个实施方案中，组合物的细菌能够在受试者的胃肠道中持续植入。

[0141] 在一个实施方案中，该组合物具有以下一种或多种特征：

[0142] • 该组合物具有免疫刺激作用；

[0143] • 该组合物在治疗和/或预防受试者、组织或细胞中的癌症方面是有效的，例如当与检查点抑制剂疗法一起使用时；

[0144] • 该组合物可有效治疗和/或预防受试者、组织或细胞中的传染病；

[0145] • 根据包括免疫检查点抑制剂的抗癌疗法，将组合物施用于受试者、组织或细胞诱导受试者中的免疫应答和/或增加功效；

[0146] • 将组合物施用于受试者、组织或细胞增强CD8+应答；

[0147] • 将组合物施用于受试者、组织或细胞增强免疫检查点阻断；

[0148] • 组合物的施用维持或诱导肿瘤免疫检查点的应答；

[0149] • 向受试者、组织或细胞施用组合物增加免疫系统细胞类型的数量或活性，例如T细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、NK细胞、浆细胞样树突细胞及其组合；

[0150] • 向受试者、组织或细胞施用组合物改变受试者中免疫细胞的比例，有利于抑制肿瘤生长的细胞类型，例如T细胞、细胞毒性T淋巴细胞、T辅助细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、浆细胞样树突细胞、抗肿瘤巨噬细胞、B细胞、树突细胞及其组合和/或

[0151] • 向受试者、组织或细胞施用组合物改变受试者中针对能够保护肿瘤的细胞类型的免疫细胞的比例，例如髓源性抑制细胞(MDSC)、调节性T细胞(Treg)、肿瘤相关中性粒细胞(TAN)、M2巨噬细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)及其组合；

[0152] • 向受试者、组织或细胞施用组合物增加受试者体内细菌的丰度/水平，其阻止癌症/肿瘤生长、扩散和/或逃避治疗/免疫应答；

[0153] • 将组合物施用于受试者、组织或细胞增加受试者组织或细胞中细菌的丰度，其产生有助于治疗癌症和/或抑制癌症/肿瘤生长的环境或微环境(例如代谢组)。

[0154] 受试者可以是人或动物模型(例如小鼠模型)中的动物。体外模型也可用于测试功效，例如基于组织或细胞的模型。合适的模型和测定也显示在实施例中。

[0155] 如本文所用，“免疫应答”是指免疫系统细胞(例如，T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞、嗜中性粒细胞等)和由任何这些细胞或肝脏产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用，该作用导致从受试者中选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除入侵病原体、被病原体感染的细胞或组织、癌细胞或其他异常细胞。这可以通过评估合适的标志物或细胞类型来测量。

[0156] 如本文所用，术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式改变免疫应答的方法来治疗或预防癌症。

[0157] 细菌分离菌可以如WO2013/171515或WO2017/182796中所述进行分离和培养，两者均通过引用并入本文。在一个实施方案中，细菌菌株被单独培养和生长，然后组合在组合物中。

[0158] 组合物中使用的细菌分离菌优选是非致病菌株。换言之，当将细菌施用于健康人类个体时，该细菌优选不会在所述个体中引起疾病。

[0159] 在一个实施方案中，组合物中存在的每种细菌对用一种或多种抗生素治疗敏感。换句话说，该细菌对至少一种抗生素的治疗没有抗药性。这允许在施用给个体的治疗组合物中包含的一种或多种细菌导致个体疾病的情况下(这与预期相反)，对个体进行抗生素治疗。因此，在一个实施方案中，细菌对用一种或多种选自下组的抗生素治疗敏感：β-内酰胺、夫西地酸、厄法霉素(elfamycin)、氨基糖苷、磷霉素、衣霉素甲硝唑和/或万古霉素。用于筛选细菌的抗生素抗性的体外和计算机方法是本领域已知的。

[0160] 在一个实施方案中，包含在组合物中的分离的细菌可以不包含一种或多种编码一种或多种毒力因子的基因和/或优选不产生一种或多种毒力因子。在这种情况下，毒力因子是增强细菌在个体中引起疾病的潜力的特性。毒力因子包括细菌毒素的产生，例如细菌的内毒素和外毒素，以及可能导致细菌致病的水解酶的产生。筛选细菌中编码毒力因子的基因的方法是本领域已知的。

[0161] 在一些实施方案中，一种或多种细菌菌株是人源细菌，意味着一种或多种细菌菌株获自或鉴定自人或其样品(例如，人供体)。在本文提供的组合物的一些实施方案中，所有细菌菌株都是人源细菌。在本文提供的组合物的一些实施方案中，细菌菌株来源于多于一个人类供体。

[0162] 本文提供的活细菌产品中使用的细菌菌株通常分离自健康个体的微生物组，例如人类粪便，但在某些情况下可能不是来自健康个体。在一些实施方案中，活细菌产品包括源自单个个体的菌株。在一些实施方案中，活细菌产品包括源自多个个体的菌株。在一些实施方案中，细菌菌株获自多个个体，单独分离并生长。随后可以组合单独生长的细菌组合物以提供本公开的组合物。应当理解，本文提供的活细菌产品的细菌菌株的来源不限于来自健康个体的人类微生物组。

[0163] 可以使用本领域的标准方法实现分离和表征。例如，可以对16S rRNA编码基因的V4-V5区域进行扩增和测序。然后可以将序列与本文提供的细菌分离菌的16S序列进行比对和比较。序列方案和比对软件在本领域中是众所周知的。

[0164] 在一些情况下，可用于本发明的细菌物种的菌株，例如本文公开的种的菌株，可以从如上所述的公共生物资源中心获得。

[0165] 在本发明的组合物包含多于一种如本文所列的细菌菌株或种的一些实施方案中，单独的细菌菌株或物种可以单独、同时或顺序施用。例如，该组合物可以包含来自表1所列物种的全部或子集的细菌，或者细菌菌株或物种选自表1中所列的那些，但可以单独地储存和单独地、同时地或顺序地施用。在一些实施方案中，多于一种细菌菌株或物种单独地储存，但在使用前混合在一起。

[0166] 如本文所解释的，本发明的细菌组合物在施用于受试者时具有治疗效果并且可以用于治疗或预防癌症。因此，本文所述的组合物是治疗组合物。因此，本发明还延伸至包含如本文所述的细菌组合物的药物组合物。这可能包括其他成分，例如疫苗。

[0167] 在一个实施方案中，组合物可以包含药学上可接受的辅料、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其他材料。这样的材料应该是无毒的并且不应该干扰治疗组合物中存在的分离细菌的功效。药学上可接受的辅料或其他材料的确切性质将取决于施用途

径，可以是口服或直肠给药。许多制备治疗组合物的方法是本领域技术人员已知的。

[0168] 本发明的细菌组合物可以包含益生元、药学上可接受的载体、不溶性纤维、缓冲剂、渗透剂、消泡剂和/或防腐剂。包含在组合物中的辅料的具体实例在下文公开。

[0169] 益生元可以为存在于细菌组合物中的分离的细菌提供营养，以帮助它们在施用于个体后早期生长和定殖。可以使用本领域已知的任何益生元。益生元的非限制性实例包括寡糖，例如果寡糖如低聚果糖和菊粉、甘露寡糖和低聚半乳糖、可溶性、富含低聚果糖的菊粉和可溶性纤维。不溶性纤维可以作为载体包含在治疗组合物中，例如以在运输或储存期间提供保护。细菌组合物中可包含缓冲剂以促进存在的分离细菌的活力。抗真菌剂可以作为防腐剂包含在细菌组合物中。

[0170] 在一个实施方案中，治疗性细菌组合物可以不包含除本文所述的细菌分离菌以外的其他活性成分，包括不包含其他分离的细菌，以及任选的益生元。因此，治疗组合物的活性成分可以由如本文所述的细菌分离菌组和任选的益生元组成。

[0171] 本发明的细菌组合物可以以本文别处更详细描述的多种方式施用于受试者，包括以胶囊、片剂、凝胶或液体的形式。

[0172] 本发明的细菌组合物可以向受试者口服或直肠给药。当组合物用于口服给药时，组合物可以是胶囊或片剂的形式。当治疗组合物用于直肠给药时，治疗组合物可以是灌肠剂、片剂或胶囊的形式。合适的胶囊、片剂和灌肠剂的制备在本领域是众所周知的。胶囊或片剂可包含肠包衣以保护胶囊或片剂免受胃酸的影响。例如，胶囊或片剂可以是肠包衣的、pH依赖性的、缓释的和/或耐胃的。例如，此类胶囊和片剂用于使胶囊或片剂在胃中的溶解最小化，但允许在小肠中溶解。当打算用于口服给药时，组合物可以是固体或液体形式，其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式包括在本文认为的固体或液体形式内。

[0173] 作为用于口服给药的固体组合物，该组合物可以配制成粉剂、颗粒、压制片剂、丸剂、胶囊、口香糖、威化饼等。这种固体组合物通常包含一种或多种惰性稀释剂。此外，可以存在以下一种或多种：粘合剂如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素或明胶，辅料如淀粉、乳糖或糊精，崩解剂如海藻酸、海藻酸钠、玉米淀粉等；润滑剂例如硬脂酸镁，助流剂如胶体二氧化硅，甜味剂如蔗糖或糖精，调味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂；和着色剂。当组合物为胶囊形式(例如明胶胶囊)时，除了上述类型的材料之外，它还可以包含液体载体，例如聚乙二醇、环糊精或脂肪油。

[0174] 当打算用于口服给药时，组合物可包含甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂中的一种或多种。在用于注射给药的组合物中，还可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0175] 细菌组合物可以包括可以是颗粒的药学上可接受的载体或赋形剂，使得组合物例如是片剂或粉末形式。术语“载体”是指稀释剂、佐剂或辅料，组合物与它们一起施用。这样的药物载体可以是液体，例如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的那些，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。载体可以是盐水、阿拉伯树胶、明胶、淀粉糊、滑石、角蛋白、胶态二氧化硅、尿素等。此外，还可使用助剂、稳定剂、增稠剂、润滑剂和着色剂。在一个实施方案中，组合物和药学上可接受的载体是无菌的。盐水溶液和葡萄糖和甘油水溶液也可以用作液体载体，特别是用于可注射溶液。合适的药物载体还包括辅料，例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、

脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，本发明的组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂，或pH缓冲剂。

[0176] 组合物可以采取一种或多种剂量单位的形式。在一个实施例中，剂量单位包括至少1×10^{3}、1×10^{4}、1×10^{5}、1×10^{6}、1×10^{7}、1×10^{8}、1×10^{9}、1×10^{10}、1×10^{11}、1×10^{12}、1×10^{13}或大于1×10^{13}菌落形成单位(cfu)的营养细菌细胞。在一个实施方案中，剂量单位包含药学上可接受的辅料、肠包衣或其组合。可以以合适的剂量提供细菌分离菌或组合物。

[0177] 可以应用处理或特定过程来提高组合物中细菌分离菌的稳定性或活力。细菌组合物可以以干形式或湿形式施用。可以将细菌组合物冻干。冻干的治疗组合物可以包含一种或多种稳定剂和/或冷冻保护剂。冻干的细菌组合物可以在施用于个体之前使用合适的稀释剂重构。

[0178] 本发明还涉及一种药物组合物，其包含一种或多种选自表1的细菌物种的细菌或包含如本文所述的组合物并且进一步包含有效量的免疫检查点抑制剂。

[0179] 免疫检查点是免疫系统内参与维持免疫稳态(例如，自我耐受、调节免疫应答的持续时间和程度)的调节途径，以尽量减少由于异常免疫应答引起的细胞损伤。免疫检查点的抑制剂，本文称为“免疫检查点抑制剂”，具体抑制免疫检查点，可能对免疫应答具有刺激或抑制作用。

[0180] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗体或其片段、干扰核酸分子或另一种化学实体。

[0181] 许多检查点抑制剂在本领域中是已知的，并且许多治疗已被监管机构批准，包括抗体治疗，而其他治疗，包括使用单克隆抗体或抗体片段(例如单域抗体)的治疗，已在广泛的癌症范围内显示出功效。

[0182] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制PD-1活性，即充当PD-1拮抗剂。

[0183] “PD-1拮抗剂”或“PD-1抑制剂”是指阻断癌症和/或免疫细胞上表达的PD-L1与免疫细胞(T细胞、B细胞或NKT细胞)上表达的PD-1结合的任何化合物或生物分子并且优选地还阻断在癌症和/或免疫细胞上表达的PD-L2与免疫细胞表达的PD-1的结合。

[0184] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或PD-L2抑制剂，例如抗PD-1抗体或抗PD-L1或抗PD-L2抗体。在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗PD-1抗体。在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗PD-1或PD-L1抗体，任选选自纳武利尤单抗(MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558)、派姆单抗(商品名KEYTRUDA®以前的Lambrolizumab®，也称为Merck 3745、MK-3475或SCH-900475)、西米普利单抗(cemiplimab)、阿维鲁单抗(avelumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、阿替利珠单抗(atezolizumab)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab)、信迪利单抗(sintilimab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、匹地利珠单抗(pidilizumab)、或特瑞普利单抗(toripalimab)。

[0185] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4抑制剂)，即抑制CTLA-4的活性。CTLA-4(CD152)是B7/CD28家族成员，可抑制T细胞功能，NCBI基因ID:1493。CTLA-4mAb或CTLA-4配体可阻止CTLA-4与其天然配体结合，从而阻断CTLA-4的T细胞负调控信号的转导，增强T细胞对各种抗原的应答性。在这方面，体内和体外研究的结果基本一致。

[0186] CTLA4抑制剂可以是CTLA4抗体，任选伊匹单抗(Ipilimumab)或曲美木单抗(Tremelimumab)。

[0187] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗TGIT、抗LAG3或抗TIM3药剂，例如抗体。这里列出的检查点靶标不是限制性的，技术人员会理解其他检查点靶标也在本发明的范围内并且可以被抑制。

[0188] 还应理解，多种免疫检查点抑制剂可用于本文公开的方法、组合物和试剂盒中。

[0189] 在一些实施方案中，癌症免疫治疗剂包括抗癌疫苗(在本文中也称为癌症疫苗)。癌症疫苗通常起到增加对癌细胞的免疫应答的作用。例如，癌症疫苗包括用于诱导或刺激针对带有癌症抗原的细胞的免疫应答的癌症抗原。诱导或刺激的免疫应答可以包括抗体(体液)免疫应答和/或T细胞(细胞介导的)免疫应答。

[0190] 除非另有说明，本文使用的术语PD-1是指人PD-1。术语“程序性死亡1”、“程序性细胞死亡1”、“蛋白质PD-1”、“PD-1”、PD1、“PDCD1”、“hPD-1”和“hPD-1”可互换使用，并且包括人PD-1的变体、同工型、物种同源物。术语PD-1抗体或抗体片段是指能够特异性结合人PD-1抗原并拮抗PD-1作用的分子。人PD-1氨基酸序列可在NCBI基因座号:NP_005009中找到。人PD-L1和PD-L2氨基酸序列可以分别在NCBI基因座号:NP_054862和NP_079515中找到。

[0191] 如本文所用，术语“抗体”泛指任何免疫球蛋白(Ig)分子或其抗原结合部分(包含四条多肽链，两条重(H)链和两条轻(L)链)，或保留了Ig分子的基本表位结合特征的其任何功能片段、突变体、变体或衍生物。此类突变体、变体或衍生抗体形式是本领域已知的。抗体可以是单特异性的或多特异性的，例如双特异性的。该抗体可以与另一种抗体疗法组合施用，例如另一种靶向检查点抑制剂的抗体，或与另一种抗癌疗法组合施用，例如化学疗法和靶向疗法、手术和/或放射疗法。

[0192] 在全长抗体中，每条重链包含重链可变区或结构域(本文缩写为HCVR)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区或结构域(本文缩写为LCVR)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。

[0193] 重链和轻链可变区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，中间散布着更保守的区域，称为框架区(FR)。每个重链和轻链可变区由三个CDR和四个FR组成，从氨基端到羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0194] 免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG 1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0195] 如本文所用的术语抗体包括抗体片段，例如F(ab')2、Fab、Fv、scFv、仅重链抗体、单域抗体(V_H、V_L、V_{HH})或抗体模拟蛋白。各种抗体形式已显示出针对检查点抑制剂的功效，包括单域抗体(例如Yu S等人Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging,Int J Mol Med.2021;47(2):444-454)。

[0196] scFv片段(～25kDa)由两个可变结构域V_H和V_L组成。自然地，V_H和V_L结构域通过疏水相互作用非共价结合并且倾向于解离。然而，可以通过用亲水性柔性接头连接结构域来改造稳定片段，以产生单链Fv(scFv)。最小的抗原结合片段是单个可变片段，即V_H或V_L结构域。靶标结合不需要分别与轻链/重链伴侣结合。此类片段用于单域抗体。因此，单域抗体(～12至15kDa)具有V_H或V_L结构域。

[0197] 抗体可以是人的、人源化的或嵌合的。嵌合抗体是包含可变结构域的重组蛋白，该

可变结构域包括源自一个物种的抗体优选啮齿动物抗体的互补决定区(CDR),而抗体分子的恒定结构域源自人类抗体的恒定结构域。

[0198] 人源化抗体是一种重组蛋白,其中来自一个物种的抗体例如啮齿动物抗体的CDR从啮齿动物抗体的重链和轻链可变链转移到人重链和轻链可变结构域(例如,框架区序列)。抗体分子的恒定结构域来源于人抗体的恒定结构域。在某些实施方案中,来自亲本(啮齿动物)抗体的有限数量的框架区氨基酸残基可以被置换到人抗体框架区序列中。

[0199] 检查点抑制剂不限于抗体。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子,任选地其中干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。

[0200] 在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROteolysis TArgeting Chimera)(PROTAC)、替代支架蛋白、生物制剂或其他免疫检查点抑制剂。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子。在一个实施方案中,干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或其他免疫检查点抑制剂。对磺胺间甲氧嘧啶和磺胺二甲嘧啶的研究提供了小分子可用作检查点抑制剂的例子。抑制PD-L1的示例性小分子化合物在通过引用并入本文的US9850225中公开。目前在人体临床试验中的一种小分子是一种叫做Ca-170的分子,它抑制PD-L1通路和T细胞活化(VISTA)通路的V结构域Ig抑制因子。

[0201] 在一个实施方案中,免疫检查点抑制剂是肽抑制剂。示例是肽拮抗剂(D)PPA-1,它在体内阻断PD-1/PD-L1相互作用并减少肿瘤生长(Chang H.N等人,Blocking of the PD-1/PD-L1 Interaction by a D-Peptide Antagonist for Cancer Immunotherapy.Angew.Chem.Int.Ed.2015;54:11760-11764)。另一种肽抑制剂是PL120131,显示可作为PD-L1的竞争性抑制剂(Magiera-Mularz K.等人Bioactive Macrocyclic Inhibitors of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint.Angew.Chem.Int.Ed.2017;56:13732-13735)和TPP-1(Li C.,Zhang N等人,Peptide Blocking of PD-1/PD-L1Interaction for Cancer Immunotherapy.Cancer Immunol.Res.2018;6:178-188)。

[0202] 在另一方面,提供了用于治疗疾病例如癌症的本文所述的细菌组合物。在另一个方面,提供了本文所述的细菌组合物在制备用于治疗或预防疾病例如癌症的药物中的用途。

[0203] 在另一个方面,提供了一种治疗或预防疾病的方法,包括将本文所述的细菌组合物施用于受试者。在另一个方面,提供了一种治疗或预防受试者疾病的方法,包括调节受试者中一种或多种细菌的水平,例如增加其水平/相对丰度,所述细菌选自如表1所示的B1、B2、B3、B4、B5、B6的B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15或其子集。在一个实施方案中,子集包含选自表1中所示的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个细菌物种的细菌或由其组成。调节根据受试者中的一种或多种细菌的水平增强受试者的免疫应答和/或抑制癌症的免疫逃逸和/或提高根据免疫检查点抑制剂的抗癌治疗的功效。在一个实施方案中,该方法包括施用如本文所述的组合物。

[0204] 如下所述,可以将水平/丰度与来自参考受试者或受试者群体的参考值进行比较。

[0205] 在一个实施方案中,该疾病是癌症。在一个实施方案中,癌症是黑素瘤。“黑素瘤”是指由皮肤和其他器官的黑色素细胞系统产生的肿瘤。黑素瘤的非限制性实例是哈-帕二

氏黑素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年黑素瘤、恶性雀斑黑素瘤、恶性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、无黑色素性黑素瘤、良性幼年黑素瘤、克罗德曼黑素瘤、S91黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤、皮肤黑素瘤、葡萄膜/眼内黑素瘤和浅表扩散黑素瘤。

[0206] 本发明的组合物特别可用于治疗可通过检查点抑制剂治疗的癌症。

[0207] 在一个实施方案中,癌症与表达异常高水平的PD-1的细胞(例如,衰竭的T细胞、B细胞、单核细胞等)有关。其他癌症包括以PD-1和/或其配体PD-L1和/或PD-L2表达升高为特征的癌症。

[0208] 在一个实施方案中,癌症选自具有高水平的癌症相关基因突变和/或高水平的肿瘤抗原表达的癌症。在另一个实施方案中,癌症选自已知具有免疫原性或在用其他癌症疗法治疗后能够变得免疫原性的癌症。在另一个实施方案中,癌症可以选自通常通过非免疫疗法如化学疗法治疗的癌症,患者的免疫系统可能在其中发挥作用。

[0209] 癌症可以选自实体或非实体肿瘤。例如,除了黑素瘤,癌症可以选自另一种皮肤癌或骨癌、胰腺癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肾癌、软组织肉瘤、尿道癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤、尿路上皮癌、白血病、前列腺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、淋巴瘤,例如霍奇金病、非霍奇金病、胃癌和多发性骨髓瘤。

[0210] 在一个实施方案中,肿瘤是实体瘤。可以相应治疗的实体瘤的实例包括乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤和淋巴瘤。此类肿瘤的一些例子包括表皮样肿瘤、鳞状肿瘤,例如头颈部肿瘤、结直肠肿瘤、前列腺肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤,包括小细胞和非小细胞肺肿瘤、胰腺肿瘤、甲状腺肿瘤、卵巢肿瘤和肝脏肿瘤。其他实例包括卡波西肉瘤、CNS、瘤、神经母细胞瘤、毛细血管母细胞瘤、脑膜瘤和脑转移瘤、黑素瘤、胃肠癌和肾癌和肉瘤、横纹肌肉瘤、胶质母细胞瘤,优选多形性胶质母细胞瘤和平滑肌肉瘤。本发明的拮抗剂对其有效的血管化皮肤癌的实例包括鳞状细胞癌、基底细胞癌和可以通过抑制恶性角质形成细胞例如人恶性角质形成细胞的生长来治疗的皮肤癌。在一个实施方案中,癌症是NSCL。

[0211] 在一个实施方案中,肿瘤是非实体瘤。非实体瘤的例子包括白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤。

[0212] 在一个方面,癌症被鉴定为PD-1和/或PD-L1阳性癌症或另一种检查点蛋白阳性的癌症。一方面,癌症是局部晚期、不可切除、转移性或复发性癌症。

[0213] 使用本发明的药剂可以抑制其生长的优选癌症包括通常对免疫疗法有应答的癌症。用于治疗的优选癌症的非限制性实例包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、肾癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、乳腺癌、结肠癌和肺癌(例如非小细胞肺癌)。

[0214] 如本文所用,“治疗(treat)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指抑制或缓解疾病或病症。例如,治疗可包括延迟与疾病或病症相关的症状的发展,和/或降低将或预期与所述疾病一起发展的此类症状的严重性。这些术语包括改善现有症状、预防额外症状以及改善或预防这些症状的根本原因。因此,这些术语表示对至少一些正在接受治疗的哺乳动物,例如人类患者,产生了有益的结果。许多药物治疗对接受治疗的部分患者有效,但并非对所有患者有效。

[0215] 术语“受试者”或“患者”是指动物，例如人，其是治疗、观察或诊断的对象。仅举例来说，受试者包括但不限于哺乳动物，包括但不限于人类或非人类哺乳动物，例如非人类灵长类动物、鼠科动物、牛科动物、马科动物、犬科动物、绵羊或猫科动物。在一个实施方案中，受试者是已经接受过先前的抗癌治疗或正在接受抗癌治疗的癌症患者。在一个实施方案中，抗癌治疗是用免疫检查点抑制剂疗法。本文描述了示例性免疫检查点抑制剂。

[0216] 术语“抗癌疗法”是指旨在减少或消除癌症、减缓癌症进展、预防或降低癌症转移风险和/或减少或预防与癌症相关的任何一种或多种症状的任何治疗方案。本文所述的抗癌疗法涉及向受试者施用抗癌疗法，例如患有癌症或有患癌症风险的受试者。

[0217] 根据上述方法和用途的施用包括口服施用或直肠施用。

[0218] 在一个实施方案中，受试者已经接受了使用免疫检查点抑制剂的先前抗癌治疗。在一个实施方案中，将包含免疫检查点抑制剂的抗癌疗法施用于受试者。这可以与本发明的组合物同时施用，或者作为相同药物的一部分或作为第二种药物。也可以在施用本发明的组合物之前或之后施用。其他治疗方案也在本发明的范围内。

[0219] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂在细菌组合物之前、之后或同时施用。在一个实施方案中，开始检查点治疗，然后如果在3-6个月后没有观察到应答，则补充使用本文所述的细菌组合物的治疗。

[0220] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂在细菌组合物之后施用。在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂通过注射/输注施用。在一个实施方案中，注射是静脉内、肌肉内、瘤内或皮下注射。

[0221] 可根据治疗方面使用的检查点抑制剂如上文定义。例如，免疫检查点抑制剂可抑制PD-1、CTLA-4或PD-L1活性。在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗PD-1、CTLA-4或PD-L1抗体。在一个实施方案中，抗PD-1、CTLA-4或PD-L1抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

[0222] 在治疗特定病症或病症中有效/活性的抗体量将取决于病症或病症的性质并且可以通过标准临床技术确定。此外，可以任选地使用体外或体内测定来帮助确定最佳剂量范围。组合物中使用的精确剂量还取决于施用途径和疾病或病症的严重程度，并且应该根据医师的判断和每个患者的情况来决定。应考虑年龄、体重、性别、饮食、施用时间、排泄率、宿主状况、药物组合、反应敏感性和疾病严重程度等因素。

[0223] 通常，该量为组合物重量的至少约0.01％的抗PD-1、CTL-4或PD-L1抗体。当打算用于口服施用时，该量可以在组合物重量的约0.1％至约80％的范围内变化。口服组合物可包含按组合物重量计约4％至约50％的抗体。

[0224] 可以制备抗体组合物，使得肠胃外剂量单位含有按重量计约0.01％至约2％的抗体。

[0225] 对于通过注射施用，组合物可包含约通常约0.1mg/kg至约250mg/kg动物体重，优选约0.1mg/kg至约20mg/kg动物体重，和更优选约1mg/kg至约10mg/kg动物体重。在一个实施方案中，组合物以约1至30mg/kg、例如约5至25mg/kg、约10至20mg/kg、约1至5mg/kg或约3mg/kg的剂量施用。给药方案可以从例如每周一次到每2、3或4周一次变化。

[0226] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子。在一个实施方案中，干扰

核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。在一个实施方案中，例如如上所述，免疫检查点抑制剂是小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或其他免疫检查点抑制剂。

[0227] 在一个实施方案中，该方法和用途还包括施用抗癌疗法，例如除了免疫检查点抑制剂之外的第二抗癌疗法。抗癌疗法可以包括治疗剂或放射疗法，并且包括基因疗法、病毒疗法、RNA疗法、骨髓移植、纳米疗法、靶向抗癌疗法或溶瘤药物或其组合。其他治疗剂的例子包括其他检查点抑制剂、抗肿瘤剂、免疫原性剂、减毒癌细胞、肿瘤抗原、抗原呈递细胞如用肿瘤衍生抗原或核酸脉冲的树突细胞、免疫刺激细胞因子(例如，IL-2、IFNa2、GM-CSF)、靶向小分子和生物分子(例如信号转导途径的成分，例如酪氨酸激酶的调节剂和受体酪氨酸激酶的抑制剂，以及与肿瘤特异性抗原结合的试剂，包括EGFR拮抗剂)，抗炎剂、细胞毒剂、放射性毒剂或免疫抑制剂和用编码免疫刺激细胞因子(例如，GM-CSF)的基因转染的细胞，化学疗法。在一个实施方案中，该组合物与手术联合使用。在一个实施方案中，所述组合物与干细胞移植疗法联合使用，所述干细胞移植疗法包括外周血移植、骨髓移植、脐带血移植或皮肤来源的干细胞移植。

[0228] 在一个实施方案中，该组合物与过继细胞转移(ACT)组合使用。一般而言，过继细胞转移疗法涉及从受试者收获细胞，特异性地产生或扩增特定细胞群，任选地激活细胞，并将扩增的细胞施用于受试者。在一些实施方案中，所需细胞是能够杀死或消除癌细胞的免疫细胞。

[0229] 在一些实施方案中，过继细胞转移疗法使用工程化的T细胞受体或嵌合抗原受体，其可称为CAR-T疗法。CAR-T细胞包括取自受试者的T细胞，这些T细胞经过基因工程改造以在细胞表面表达嵌合抗原受体(CAR)。CAR-T细胞受体被设计为识别癌细胞上的特定抗原(例如，癌症抗原)。在将CAR-T细胞注入受试者后，CAR-T细胞会识别并杀死在其表面表达特定抗原的癌细胞。在一些实施方案中，CAR-T细胞是自体细胞，这意味着T细胞被收获并重新施用于同一受试者。在一些实施方案中，CAR-T细胞是CD8+T细胞。在一些实施方案中，CAR-T细胞是同种异体细胞，这意味着T细胞是从一名受试者(例如，供体)收获并施用于不同的受试者(例如，接受者)。

[0230] 可以被CAR-T细胞靶向的癌症抗原的例子是本领域已知的，并且用于靶向的癌症抗原的选择将取决于诸如被靶向的癌症等因素。

[0231] 在一些实施方案中，抗癌疗法涉及施用一种或多种共刺激剂。在一些实施方案中，共刺激剂是靶向一种或多种共刺激分子从而调节免疫应答的分子。在一些实施方案中，共刺激剂增强抗癌免疫应答，例如，通过防止免疫应答的下调。可以在癌症疗法中单独施用共刺激剂或与一种或多种癌症疗法组合施用以增强癌症疗法的治疗效果。在一些实施方案中，共刺激剂是靶向CD-28、OX-40、4-1BB或CD40的抗体。

[0232] 在本发明的一个实施方案中，组合物与化学治疗剂和/或放射疗法同时施用。在另一个具体的实施方案中，在施用本发明的组合物之前或之后施用化学治疗剂和/或放射疗法，优选在施用本发明组合物之前或之后至少一小时、五小时、12小时、一天、一周、一个月，更优选几个月(例如多至三个月)。

[0233] 如本文所用，化疗剂是指特异性或优先杀死癌细胞或防止癌细胞增殖的分子(例如药物)。化疗剂通常可以基于化疗剂的分子靶标、作用机制和/或药剂的结构进行分类。在一些实施方案中，化疗剂是烷化剂、植物生物碱、抗肿瘤抗生素、抗代谢物、拓扑异构酶抑制

剂或其他抗肿瘤剂。

[0234] 在一个实施方案中，所述化疗剂选自由以下各项组成的组：烷基化剂、烷基磺酸盐、氮丙啶、亚乙基胺、甲胺(methylamelamine)、多聚乙酰、喜树碱苔藓抑素、利他汀(callystatin)、CC-1065、隐藻素(cryptophycin)、多拉司他汀、多卡霉素、软珊瑚醇(eleutherobin)、pancratistatin、sarcodictyin、海绵抑素、氮芥、亚硝基脲、抗生素、强力霉素；双膦酸盐、esperamicin、新制癌菌素生色团和相关色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素、carabicin、caminomycin、嗜癌霉素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-去甲亮氨酸、阿霉素、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、potfiromycin、嘌呤霉素、三铁阿霉素、rodurubicin、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、新制癌菌素、佐柔比星抗代谢物、叶酸类似物、嘌呤类似物、嘧啶类似物、雄激素、抗肾上腺素、叶酸补充乙酰丙酮、醛磷酰胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶、安吖啶、bestrabucil、比生群、依达曲沙、地吖醌、elformithine、依利醋铵、epothilone、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、lonidainine、美登素(maytansinoid)、米托胍腙、米托蒽醌、mopidanmol、nitraerine、喷司他丁、蛋氨氮芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基肼、丙卡巴嗪、PSK多糖复合物、雷佐生、根霉毒素、sizofuran、螺旋锗、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌、2,2',2"-三氯三乙胺、三氯乙烯、氨基甲酸乙酯、长春地辛、达卡巴嗪、甘露莫司汀、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、哌泊溴烷、gacytosine、阿糖胞苷("Ara-C")、环磷酰胺、塞替派、紫杉烷、ABRAXANE Cremophor-free、紫杉醇和TAXOTERE doxetaxel的白蛋白工程化的纳米粒子制剂、氯丁嘧啶、GEMZAR吉西他滨、6-硫代鸟嘌呤、巯嘌呤、甲氨蝶呤、铂类似物、长春碱、铂、依托泊苷(VP-16)、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、NAVELBINE、长春瑞滨、诺消灵、替尼泊苷、依达曲沙、柔红霉素、氨基蝶呤、希罗达、伊班膦酸盐、伊立替康(Camptosar,CPT-11)、拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)、类视黄醇、卡培他滨、考布他汀、亚叶酸(LV)、奥沙利铂、Binimetinib(Mektovi)、Encorafenib(Braftovi)和lapatinib(TYKERB)、PKC-a抑制剂、Raf抑制剂、H-Ras抑制剂、EGFR抑制剂、VEGF-A抑制剂、其药学上可接受的盐、酸或衍生物及其组合。

[0235] 在一些实施方案中，本发明的组合物可以与两种或更多种(例如，2、3、4、5或更多种)治疗剂一起施用。

[0236] 在一个实施方案中，与参与T细胞活化的药剂、肿瘤微环境调节剂(TME)或肿瘤特异性靶标一起施用。

[0237] 在一个实施方案中，该方法和用途进一步包括向受试者施用抗生素。

[0238] 在又一方面，本发明提供了一种调节受试者的免疫应答的方法，包括向受试者施用本发明的组合物。

[0239] 在一些实施方案中，个体患有对一种或多种抗癌疗法具有抗性(已被证明具有抗性)的癌症。在一些实施方案中，抗癌疗法的抗性包括癌症或难治性癌症的复发。复发可能是指癌症在治疗后在原始部位或新部位再次出现。在一些实施方案中，对抗癌疗法的抗性包括在用抗癌疗法治疗期间癌症的进展。在一些实施方案中，癌症处于早期或晚期。

[0240] 本发明的组合物具有免疫刺激特性。因此，该组合物的用途不限于治疗癌症。因此，由于免疫刺激特性，该组合物可用于治疗任何需要免疫刺激的疾病，例如非癌症免疫疗

法。免疫疗法被统称为一种靶向或操纵免疫系统的治疗方法。最终，免疫疗法旨在利用宿主的适应性和先天免疫应答来实现长期消除病变细胞，并且可以大致分为被动(包括过继和基于抗体)和主动(包括疫苗疗法和过敏原特异性)方法。被动介导的免疫疗法涉及将离体产生的免疫元件(抗体、免疫细胞)施用于患者，并且不刺激宿主免疫应答，而主动免疫疗法诱导患者的免疫应答并导致特异性免疫效应物(抗体和T细胞)的发展。免疫疗法提供了一种可能的方式来提高预防或治疗传染病的能力(Naran等人，Front Microbiol.2018;9:3158)。因此，在一些实施方案中，该疾病是传染病。

[0241] 最近PD-1和PD-L1阻断在癌症疗法中的成功说明了PD-1/PD-L1通路在调节抗肿瘤免疫应答中的重要作用。然而，受PD-1/PD-L通路调节的信号传导也与大量炎症作用相关，炎症作用可以类似于自身免疫应答、慢性感染和败血症中的那些，这与该通路在平衡保护性免疫和免疫病理学以及稳态和耐受性中的作用一致，(Quin等人，Front Immunol.2019;10:2298;Rao等人，Int.J.Infect.Dis.2017;56:223)。因此，另一方面，本发明提供如本文所述的组合物；例如包含表1中的B1至B15中的一种或多种，例如具有一种或多种细菌分离菌的组合物用于治疗传染病，该细菌分离菌具有选自SEQ ID No:1至15的序列或与其有具有至少97％、98％，98.7％或99％的序列同一性的序列，例如SEQ ID No:16-29的16SrDNA。还提供了一种用于治疗传染病的方法，包括将本发明的组合物施用于受试者。还包括如本文所述的组合物，其用于制备用于治疗传染病的药物。

[0242] 传染病可以是病毒、真菌和细菌感染。传染病可以是慢性传染病。非限制性实例包括人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎(HBV)、丙型肝炎(HCV)、JC(John Cunningham)病毒/进行性多灶性白质脑病和结核病。

[0243] 用本发明的组合物治疗感染可以作为与免疫疗法例如免疫检查点抑制剂，其他抗病毒剂或抗感染剂的联合疗法。

[0244] 另一方面，本发明提供如本文所述的组合物，例如包含表1中的B1至B15中的一种或多种，例如具有一种或多种细菌分离菌的组合物用作疫苗佐剂，所述细菌分离菌具有选自SEQ ID No:1至15或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列的16S rDNA。还提供了一种用于提高疫苗功效的方法，包括向受试者施用如本文所述的组合物，例如包含表1中的B1至B15中的一种或多种，例如具有一种或多种细菌分离菌的组合物，该细菌分离菌具有选自SEQ ID NO:1至15的序列或与其具有至少97％、98％、98.7％、99％或100％序列同一性的序列，例如SEQ ID No:16-29的序列的16S rDNA。所述受试者可以在施用细菌组合物之前、之后或同时接受疫苗。

[0245] 施用可以是“治疗有效量”，这足以显示对个体的益处。这种益处可以是至少改善至少一种症状。因此，特定疾病的“治疗”是指至少一种症状的改善。实际给药量、给药速率和时间进程将取决于所治疗的性质和严重程度、所治疗的特定患者、个体患者的临床状况、组合物的递送部位、治疗组合物的类型、给药方法、给药时间安排和其他医生已知的因素。治疗处方，例如剂量决定等，是全科医生和其他医生的责任，并且可能取决于症状的严重程度和/或所治疗疾病的进展。本发明的治疗组合物的治疗有效量或合适剂量可以通过在动物模型中比较其体外活性和体内活性来确定。将小鼠和其他试验动物的有效剂量外推到人类的方法是已知的。精确剂量将取决于许多因素，包括治疗组合物是用于预防还是用于治疗。

[0246] 在需要施用组合物的方法的一个实施方案中，该方法包括在施用后检测已在受试者中施用的一种或多种细菌菌株的存在的进一步步骤。检测方法包括例如检测在所述受试者中施用的至少一种细菌分离菌的如本文定义的16S核酸序列。

[0247] 本发明的组合物可以通过一种方法制备，该方法包括在一种或多种合适的培养基中培养组合物中存在的两种或更多种分离的细菌。适用于培养将包含在本发明的治疗组合物中的细菌的培养基和条件在本文别处详细描述。例如，制备根据本发明的治疗组合物的方法可以包括以下步骤：

[0248] (i)培养第一种分离的细菌；

[0249] ii)培养第二种和任选另一种分离的细菌;和

[0250] (iii)将(i)和(ii)中获得的细菌混合以制备治疗组合物。

[0251] 可以在单独的步骤中培养要包含在组合物中的分离的细菌。换言之，优选制备要包含在治疗组合物中的每种细菌的单独培养物。这允许评估每种细菌的生长并且根据需要控制药物组合物中包含的每种细菌的量。在步骤(i)和(ii)中培养的细菌优选具有不同的16S核酸序列，即具有小于99％、98％、97％、96％或95％序列同一性的16S核酸序列。

[0252] 上述方法可以包括培养要包含在组合物中的每种分离的细菌的步骤。

[0253] 该方法可以任选地包括一个或多个进一步的步骤，其中将细菌与一种或多种附加成分混合，例如药学上可接受的辅料、益生元、载体、不溶性纤维、缓冲剂、渗透剂、消泡剂和/或防腐剂。此外，或备选地，该方法可以包括将在(i)和任选地(ii)中获得的细菌悬浮在恒化器培养基或盐水，例如0.9％盐水中。(i)和任选地(ii)中获得的细菌可以在还原气氛下提供，例如N2、CO2、H2或其混合物，例如N2:CO2:H2。为了保护存在于治疗组合物中的细菌，气体可以以适当的比例存在。例如，还原气氛可以包括80％的N2、10％的CO2和10％的H2。此外或备选地，该方法可以包括将在(i)和任选地(ii)中获得的细菌，任选地在稳定剂和/或冷冻保护剂的存在下冻干的步骤。该方法还可以包括制备包含在(i)和任选地(ii)中获得的细菌的胶囊、片剂或灌肠剂的步骤。胶囊或片剂可以是肠包衣的、pH依赖性的、缓释的和/或耐胃的。

[0254] 本发明的组合物还可以以食品补充剂、饮料或其他食品的形式提供。因此，本发明还涉及包含本发明组合物的食品或疫苗。

[0255] 还提供了一种免疫原性组合物，其包含选自表1中所列细菌的细菌片段，用作施用给癌症患者的基于抗PD-1/PD-L1/PD-L2抗体的疗法的佐剂。

[0256] 生物标志物

[0257] 本发明提供了微生物组生物标志物，这些标志物可预测癌症患者对免疫检查点抑制剂疗法的肿瘤应答。具体而言，本发明提供了一种微生物组生物标志物特征，其可预测用免疫检查点抑制剂进行的肿瘤应答疗法。如本文所用，微生物组生物标志物特征是复合生物标志物特征，其包括来自至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个细菌物种的细菌，如表1所示，每种细菌在对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者中的丰度增加。在一个实施方案中，特征包括选自表1中的至少9、10、11、12、13、14或15个细菌物种的细菌，每种细菌在对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者群体中的丰度增加。下文更详细地描述了生物标志物特征。

[0258] 另一方面提供了治疗受试者癌症的方法，包括向所述受试者施用治疗有效量的免

疫检查点抑制剂,其中已确定受试者在肠道微生物组中具有有利的微生物谱。有利的微生物谱的特征在于存在本文所述的生物标志物/生物标志物特征。

[0259] 另一方面提供了治疗受试者癌症的方法,其中已确定受试者在肠道微生物组中具有不利的微生物谱。不利的微生物谱的特征在于不存在本文所述的生物标志物/生物标志物特征。该方法可以进一步包括施用不是免疫检查点抑制剂疗法的抗癌疗法。在另一个实施方案中,该方法包括施用本文所述的治疗性细菌组合物以及与免疫检查点抑制剂疗法例如PD-1抑制剂的联合疗法。

[0260] 因此,本发明还涉及一种用于鉴定将对免疫检查点抑制剂(例如PD-1)治疗有应答的受试者的方法,该方法包括确定表1中被鉴定为B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15的一种或多种细菌在包括肠道(即肠的)菌群的来自所述受试者的生物样品中的丰度,其中B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15,例如B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8和/或B9中的一个或多个的丰度增加表明受试者将对免疫检查点抑制剂如PD-1的疗法产生应答。B1至B15列在表1中,这包括对序列标识符的引用以定义细菌。相应的序列列于表2。在一个实施方案中,受试者是已被诊断患有癌症例如黑素瘤的患者。

[0261] 特别地,本发明还涉及一种用于预测患有癌症的受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答的方法/一种用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者的方法,该方法包括:

[0262] a)确定从受试者获得的生物样品中选自表1的B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15一种或多种的细菌的丰度和

[0263] b)将丰度与来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的癌症患者的参考水平进行比较;或将丰度与来自对免疫检查点抑制剂疗法有应答的癌症患者的参考水平进行比较;

[0264] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的癌症患者,则与参考水平相比,B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15中的一种或多种的丰度的增加表明受试者将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答或

[0265] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者,则B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15中的一种或多种的丰度相同、基本相同或增加,表明受试者将对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答。

[0266] 额外步骤可以包括鉴定将对疗法有应答的受试者。

[0267] 特别地,本发明还涉及一种用于预测患有癌症的受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答的方法/一种用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者的方法,该方法包括:

[0268] a)确定从受试者获得的生物样品中选自表1的B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15一种或多种的细菌的丰度和

[0269] b)将丰度与来自癌症患者或健康受试者的参考水平进行比较,以及

[0270] c)应用随机森林分析。在这个实施方案中,参考水平来自癌症患者,即癌症患者库(pool)。这些可能包括应答者和非应答者。

[0271] 额外步骤可包括鉴定将对疗法作出应答的受试者或预测应答。

[0272] 因此,确定选自表1中B1、B2、B3、B4、B5、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和B15的

1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个不同种的细菌丰度。表征种的各个序列作为SEQ ID 1至15提供。如别处解释的，也可以使用SEQ ID 16-29。在一些实施方案中，确定选自表1中鉴定为B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和B15的至少9、10、11、12、13、14或15种不同种的细菌的丰度。因此，确定了具有选自以下SEQ ID中的至少9个的序列ID的细菌的丰度:SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列，例如SEQ ID 16至29。

[0273] 还提供了一种用于预测正在治疗或已经治疗癌症的患者复发的方法，包括评估在例如在不同时间点获得的来自所述患者的粪便样品中选自B1、B2、B3、B4、B5、B6、B7、B8、B9、B10、B11、B12、B13、B14和/或B15的一种或多种细菌的存在/相对丰度。

[0274] 当确定丰度时，获得每种细菌(即细菌物种)的丰度分数并进行测量。根据该方法，表1中列出的一种或多种细菌的丰度即丰度得分的增加表明受试者将对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答。增加是指与参考值相比丰度即丰度得分增加。因此，该方法还可以包括将表1中列出的一种或多种细菌的丰度与一个或多个参考值进行比较。例如，可以将表1中列出的一种或多种细菌的丰度与表1中列出的一种或多种细菌的参考值进行比较。或者，可以将表1中列出的一种或多种细菌丰度的算术平均值与作为表1中列出的一种或多种细菌丰度的参考算术平均值的单个参考值进行比较。在一个实施方案中，该方法确定选自B1至B15的至少9、10、11、12、13、14或15种不同细菌的丰度，从而确定基于复合特征的微生物组生物标志物特征，即微生物组生物标志物特征得分。

[0275] 在该方法的一个实施方案中，测定了表1中列出的所有细菌的丰度。在另一个实施方案中，测定了表1中列出子集的细菌的丰度。在一个实施方案中，子集包含选自表1的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种不同细菌或由其组成。在一个实施方案中，该子集包括9种细菌或由9种细菌组成，例如Eisenbergiella sp.、Butyricicoccus sp.、梭菌属(Clostridiales sp.)、Alistepes obesi、Alistipes indictus、Gordonibacter urolithinfaciens、屎豆属菌(Faecalitalea sp.)，布劳特氏菌属(Blautia sp.)(B8)和Barnesiella inthihominis。在一个实施方案中，子集包含9或12种细菌或由其组成，例如表3中的细菌聚生体之一。在一个实施方案中，生物标志物不包括Alistipes物种。

[0276] 参考值可以是来自参考样品的预定值。例如，参考值可以分别是参考受试者池中每个细菌的平均丰度或其复合特征。

[0277] 例如，参考值是预定值，例如预定阈值。这样的值可以从参考样品中预先确定。与B1至B15的一种或多种细菌丰度有关的预定阈值是指样品(例如，粪便样品)中细菌的丰度占样品中总微生物群的比例，样品评分高于或低于预定阈值为特征阳性，因此对免疫检查点抑制剂的疗法有应答。例如，如果测试样品的丰度评分处于或高于预定阈值，则认为样品对于特征是阳性的并且受试者对免疫检查点抑制剂的疗法有应答。

[0278] 例如，样品池中被测细菌水平的丰度评分存储在计算机或计算机可读介质上，以在需要时用作与来自测试样品的被测细菌的丰度进行比较的参考水平。使用训练数据(其包括一组受试者或其他模型中的多个生物标志物的信息)训练的通常用于鉴定生物标志物的机器学习算法和/或模型，例如Cox模型，可用于建立参考值和/或将样品中选自表1中列出的一种或多种细菌的细菌丰度与受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答相关联。

[0279] 术语“相关”在本文中用于基于一种或多种细菌的调节丰度来确定或计算对治疗

状态的应答性，应理解为是指任何相关方法，例如算法方法。本文描述的方法采用称为随机森林分类的数学建模技术，但也可以采用其他建模技术。因此，在一个实施方案中，随机森林分类模型或类似模型用于将样品中选自表1中列出的一种或多种细菌的细菌的丰度与受试者对免疫检查点抑制剂治疗的应答相关联。因此，在一个实施方案中，本发明的方法可以使用计算机程序来将调节的细菌丰度与免疫检查点抑制剂疗法应答相关联。

[0280] 或者，参考值不是预先确定的，而是作为单个实验的一部分而建立的。因此，可以将测试样品中一种或多种测试细菌的丰度与样品池中一种或多种测试细菌的丰度进行比较，其中测试样品中测试细菌的丰度和来自池的测试细菌的丰度在单个实验过程中确定。

[0281] 在各种实施方案中，参考样品/样品池可以是已显示对免疫检查点抑制剂疗法有应答或无应答的癌症患者群体。在其他实施方案中，参考样品/样品池可以是尚未接受检查点抑制剂疗法的癌症患者群体。

[0282] 在一个实施方案中，用于建立参考值的参考样品可以来自对免疫检查点抑制剂疗法的无应答者。如果与参考样品相比，测试样品显示选自B1到B15的一种或多种细菌的丰度增加，则测试受试者可能会对检查点免疫抑制剂的疗法产生应答。该增加可以是至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更多。

[0283] 在一个实施方案中，用于建立参考值的参考样品可以来自对免疫检查点抑制剂疗法的应答者。如果测试样品显示出与参考样品相比，选自B1至B15的一种或多种细菌的丰度相同、基本相同或增加，则测试受试者可能对使用检查点免疫抑制剂的疗法有应答。

[0284] 如本领域技术人员将理解的，如本文所用的参考值或参考基因特征评分是指细菌丰度特征的评分，该评分已被确定为将参考受试者群体中的至少大多数应答者与至少大多数非应答者分开。

[0285] 如本文所用，“对治疗的良好应答者”，也称为“应答者”或“应答性”患者，或换言之“受益于”该治疗的患者，是指患有癌症并且在接受这种治疗后，显示或将显示出临床上显著的癌症缓解的患者。相反，“不良应答者”或“无应答者”是指在接受这种治疗后没有或不会显示出临床上显著的癌症缓解的患者。可以根据本领域公认的标准评估对治疗的应答，例如免疫相关应答标准(irRC)、WHO或RECIST标准。

[0286] 本文所述的特征生物标志物可用于鉴定最有可能从免疫检查点抑制剂疗法中获得临床益处的癌症患者。该实用性支持在各种研究和商业应用中使用这些生物标志物，包括但不限于其中根据其微生物组基因特征评分选择患者的PD-1拮抗剂的临床试验，用于确定患者微生物组基因特征评分或应用将患者分类为微生物组特征生物标志物阳性或阴性的诊断方法和产品，包括根据患者的微生物组特征评分定制患者的药物治疗的个性化治疗方法，以及包括用于治疗微生物组特征生物标志物检测呈阳性的患者的PD-1拮抗剂的药物组合物和药物产品。

[0287] 技术人员还将理解，本文要求保护的任何应用的实用性并不要求对本发明的生物标志物测试呈阳性的患者100％实现对免疫检查点抑制剂的抗肿瘤应答；也不要求诊断方法或试剂盒在确定每个受试者中是否存在生物标志物时具有特定程度的特异性或敏感性，也不要求本文要求保护的诊断方法对于每个受试者时在预测受试者是否可能对PD-1拮抗剂产生有益应答中是100％准确的。因此，发明人在此意图不应该将术语“确定”、“确定”和“预测”解释为需要确定的或肯定的结果；相反，这些术语应被解释为意味着要求保护的方

法为至少大多数受试者提供准确的结果，或者任何给定受试者的结果或预测更可能是正确的而不是不正确的。优选地，由本发明的诊断方法提供的结果的准确性是技术人员或监管机构认为适合使用该方法的特定应用的结果。

[0288] 如本文所用，样品是来自肠道的生物样品，即包含肠道菌群的生物样品。这是指从受试者的肠道获得的样品，例如粪便样品。从粪便样品中分离细菌的方法是已知的。在某些情况下，微生物组样品是通过粘膜活检获得的。测试样品是从正在评估的对象获得的样品。

[0289] 在该方法的一个实施方案中，丰度是相对丰度。如本文所用，应用于样品中细菌的术语“相对丰度”应理解为表示样品中细菌的丰度占样品或参考样品中总微生物群的比例。在一个实施方案中，相对丰度是样品中细菌的丰度占样品中总微生物群的比例。

[0290] 在一个实施方案中，调节的丰度是样品中细菌的相对丰度与来自参考受试者的相同样品中的相对丰度相比的差异。

[0291] 在一个实施方案中，占样品中总微生物群的比例的样品中细菌的丰度被测量以确定细菌的相对丰度。然后，在这样的实施方案中，将样品中细菌的相对丰度与来自参考个体的相同样品中的相对丰度(在本文中也称为“参考相对丰度”)进行比较。与参考相对丰度相比，样品中细菌的相对丰度的差异，例如增加是调节的相对丰度。调节的丰度的检测也可以通过将样品丰度值与绝对参考值进行比较以绝对方式进行。

[0292] 可以采用任何合适的检测细菌存在/丰度的方法，包括例如琼脂平板定量测定、荧光样品定量、PCR方法、16S rRNA/rDNA基因扩增子测序、Shotgun宏基因组测序和基于染料的代谢产物耗竭或代谢产物产生测定。使用的PCR技术可以定量测量DNA、cDNA或RNA的起始量。根据本发明的基于PCR的技术的例子包括诸如但不限于定量PCR(Q-PCR)、逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)、定量逆转录酶PCR(QRT-PCR)、滚环扩增(RCA)或数字PCR的技术。这些技术是众所周知的并且很容易获得，并且不需要精确的描述。在具体实施方案中，本发明细菌基因的拷贝数的测定通过定量PCR进行。

[0293] 在一个实施方案中，使用核酸扩增反应分析样品。分析可包括检测细菌基因组中的科、目、纲和/或属特异性16S rRNA/rDNA或其他序列。在一个实施方案中，可以检测全长16S rDNA。在一个实施方案中，可以检测部分16S rDNA，例如V区之一。在一个实施方案中，分析包括将样品中的细菌核酸与珠子或阵列例如核酸微阵列杂交。

[0294] 基于PCR的技术使用设计为对被测序列特异的扩增引物进行。因此，本发明还涉及适用于进行上述方法的一组引物，即，包括用于扩增对每种待检测微生物种(即，从表1、表2和表3所述物种中选择的至少一种以上物种)特异的序列的引物对的一组引物。

[0295] 本文提供了B1-B15的16S rDNA序列，这可用于生成用于此类分析的引物。在一个实施方案中，检测多种细菌。在一个实施方案中，使用基因组测序分析样品的细菌核酸。

[0296] 在一个实施方案中，受试者是癌症患者，例如黑素瘤患者。癌症患者可能已经或可能没有接受过抗癌治疗。因此，受试者可能是需要用免疫检查点抑制剂疗法的人。在一个实施方案中，受试者是健康个体，例如具有癌症(例如黑素瘤)家族史的健康个体。

[0297] 在一个实施方案中，如果受试者是癌症患者并且已被鉴定为将对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答的受试者，那么该方法可以包括向所述患者施用免疫检查点抑制剂的进一步步骤。

[0298] 在一个实施方案中，该方法还包括获得包含肠道菌群的生物样品的先前步骤。

[0299] 在一个实施方案中，该方法还包括鉴定需要用免疫检查点抑制剂疗法的受试者的初始步骤。

[0300] 在该方法的一个实施方案中，如果受试者被鉴定为应答者，例如如果表1中列出的一种或多种细菌已显示在样品中具有增加的丰度，则包含免疫检查点抑制剂的抗癌疗法被施用于受试者。

[0301] 检查点抑制剂如本文所定义。在该方法的一个实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制PD-1活性，即充当PD-1拮抗剂。在该方法的一个实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制PD-L1活性，即充当PD-L1拮抗剂。在该方法的一个实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制CTLA-4活性，即充当CTLA-4拮抗剂。在该方法的一个实施方案中，免疫检查点抑制剂抑制LAG3、TIGIT或TIM3活性。

[0302] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PD-L1或CTLA-4抗体。在一个实施方案中，抗PD-1抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、或特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

[0303] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子。在一个实施方案中，干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。

[0304] 在一个实施方案中，免疫检查点抑制剂是如上所述的小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或另一种免疫检查点抑制剂。

[0305] 在一个实施方案中，在该方法的另一步骤中，对所述受试者进行外科手术、放射和/或化学治疗癌症干预或施用第二种抗癌治疗剂。

[0306] 在另一方面，本发明涉及一种检测受试者对免疫检查点抑制剂疗法无应答的风险的方法。该方法包括确定来自所述受试者的生物样品中表1所列细菌中的一种或多种细菌的丰度，所述生物样品包含肠道菌群，其中丰度降低或丰度低于表1中所列的细菌中的一种或多种的参考水平表示受试者对免疫检查点抑制剂的疗法没有应答。该方法还可以包括将表1中列出的一种或多种细菌的丰度与一个或多个参考值进行比较。参考值如上所述。确定的丰度是相对丰度。在进一步的步骤中，如果受试者已被鉴定为不会对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答的受试者，则施用替代的抗癌治疗。或者，在进一步的步骤中，如果受试者已被鉴定为对免疫检查点抑制剂疗法无应答的受试者，则本文所述的治疗性细菌组合物与检查点抑制剂疗法，例如抗PD-1疗法一起施用。

[0307] 另一方面，本发明涉及一种鉴别对免疫检查点抑制剂疗法有应答的受试者和对免疫检查点抑制剂疗法没有应答的受试者的方法。所述方法包括确定来自所述受试者的生物样品中的一种或多种表1所列细菌的丰度，该生物样品包含肠道菌群，其中丰度降低或丰度低于表1中所列的细菌中的一种或多种的参考水平表示受试者将对免疫检查点抑制剂的疗法没有应答，以及表1中所列的细菌中的一种或多种的丰度增加表示受试者将对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答。该方法还可以包括将表1中列出的一种或多种细菌的丰度与一个或多个参考值进行比较。参考值如上所述。确定的丰度是相对丰度。在进一步的步骤中，如果受试者已被鉴定为不会对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答的受试者，则施用替代的抗癌治疗。

[0308] 在上述生物标志物方法的一个实施方案中，选自表1的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、

10、11、12、13、14或15种不同细菌的调节丰度表示对治疗的应答。在上述生物标志物方法的另一个实施方案中，选自表1的至少9、10、11、12、13、14或15种不同细菌的调节丰度表示对治疗的应答。因此，建立包括至少9、10、11、12、13、14或15种不同细菌的丰度的复合特征是该方法的特定实施方案。正是细菌的整体，即生物标志物特征，提供了一种特别强大的鉴别工具。

[0309] 在上述各种方法的一个实施方案中，评估至少9个细菌物种/选自表1中的9个细菌物种群体的丰度，即选自SEQ ID No:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14和15的9个物种。在一个实施方案中，9的子集对应于如表3中所示的聚生体，即聚生体2、4、5、6或10。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:1或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:2或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:3或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:4或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:5或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:6或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:7或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:8或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:9或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:10或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:11或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:12或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:13或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:14或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，这9个物种包括如SEQ ID NO:15或与其具有至少97％、98％、98.7％或99％序列同一性的序列所定义的细菌。在一个实施方案中，该9个物种不包括Alistipes种。

[0310] 在一个实施方案中，上述生物标志物方法可以包括确定另一种生物标志物的进一步步骤，该生物标志物可预测免疫检查点抑制剂例如PD-1、PD-L1或CTLA-4拮抗剂的肿瘤应答。例如，生物标志物可以是程序性死亡配体1(PD-L1)或程序性死亡配体1(PD-L2)基因特征。因此，该方法可以包括以下步骤：从测试受试者的肿瘤中获取样品，测量PD-1和/或PD-L1基因特征中一个或多个基因在肿瘤样品中的RNA表达水平，并将RNA表达水平达与参考水平进行比较。表达可以通过任何合适的方法测量，包括免疫组织化学。

[0311] 在另一个方面，本发明涉及一种或多种列于表1中的细菌，其用作在确定使用检查点抑制剂(例如PD-1疗法)的治疗性干预的功效中的预测性生物标志物。如本文所用的术语预测性生物标志物是描述提供关于治疗干预效果(即对免疫检查点抑制剂疗法的应答性)

的信息的生物标志物。因此，本发明还涉及一种或多种细菌；例如，选自表1中列出的一个或多个细菌物种的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种不同的细菌在鉴定将对免疫检查点抑制剂的疗法产生应答的患者中的用途。

[0312] 本发明还涉及生物标志物特征，其是表1中列出的一种或多种细菌的聚生体，例如表3，其可用于预测使用检查点抑制剂疗法(例如使用PD-1抑制剂或其他检查点抑制剂疗法)的治疗干预的功效。

[0313] 系统和计算机可读介质

[0314] 本发明的实施方案还提供系统(和用于使计算机系统产生的计算机可读介质)以便进行用于确定受试者对免疫检查点抑制剂治疗的应答性的方法。在另一个方面，提供了一种计算机执行的方法，用于指示受试者对免疫检查点抑制剂治疗有应答的可能性。该方法包括：在计算机上检索个体的生物标志物信息，其中生物标志物信息包括生物标志物值，每个生物标志物值对应于选自表1中所列细菌组的一种或多种细菌的丰度；用计算机对每个生物标记值进行分类；并且基于多个分类指示受试者对免疫检查点抑制剂治疗产生应答的可能性。

[0315] 在另一方面，提供了一种计算机程序产品，用于指示受试者对免疫检查点抑制剂治疗作出应答的可能性。计算机程序产品包括计算机可读介质，该计算机可读介质包含可由计算设备或系统的处理器执行的程序代码，该程序代码包括：检索归因于来自个体的生物样品的数据的代码，其中所述数据包括各自对应于选自表1所列细菌组的一种或多种细菌的丰度的生物标志物值；以及执行分类方法的代码，该分类方法指示作为生物标志物值的功能个体对免疫检查点抑制剂疗法作出应答的可能性。

[0316] 在一个实施方案中，将要由比较模块读取的存储在存储装置中的参考数据进行比较，例如，如本文所述的参考样品中特定细菌的相对丰度。“比较模块”可以使用各种可用的软件程序和格式进行比较，以将确定系统中确定的细菌丰度信息数据与参考样品和/或存储的参考数据(例如预定阈值)进行比较。在一个实施方案中，比较模块被配置为使用模式识别技术将来自一个或多个条目的信息与一个或多个参考数据模式进行比较。比较模块可以使用现有的市售的或免费的软件来配置用于比较模式，并且可以针对进行的特定数据比较进行优化。比较模块提供与应答相关细菌相关的计算机可读信息。

[0317] 比较模块提供计算机可读比较结果，其可以通过预定义标准或用户定义的标准以计算机可读形式处理，以提供部分基于可以存储和输出的比较结果的内容。

[0318] 因此，本文所述的方法提供系统(和用于使计算机系统产生的计算机可读介质)以便执行用于确定受试者对免疫检查点抑制剂治疗的应答性的方法。

[0319] FMT

[0320] 将人类微生物群植入或施用到病人的肠道中称为粪便微生物群移植(FMT)，通常也称为粪便细菌疗法。FMT被认为可以用多种微生物重新填充肠道，这些微生物为常驻肠道细菌带来缺失的有益功能或微生物群，通过创造不利的生态环境取代有害微生物群或控制关键病原体。

[0321] 在另一个方面，本发明涉及筛选/鉴定粪便供体的方法，包括评估受试者的粪便样品中是否存在与对癌症的应答相关的一种或多种细菌；例如，当患者接受免疫检查点抑制剂疗法时对癌症应答；和基于一种或多种细菌的存在和/或丰度来鉴定粪便供体。

[0322] 例如,在这样的方法中,基于选自表1的一种或多种细菌的存在和/或丰度来鉴定选自表1的一种或多种细菌和粪便供体。

[0323] 在另一方面,本发明涉及筛选/鉴定粪便供体的方法,包括评估受试者的粪便样品中选自表1的一种或多种细菌的存在,并基于选自表1的一种或多种细菌的存在和/或丰度来鉴定粪便供体。该方法还可以包括从供体获得粪便样品。可以通过本领域已知的方法,例如细菌基因组的序列分析,例如使用鸟枪测序方法,来评估受试者的粪便样品中一种或多种细菌的存在。例如,一种或多种细菌以预定阈值以上存在,供体被选为用于细菌治疗目的的供体。预定阈值可以基于从供体群体获得的粪便样品中一种或多种细菌的平均丰度。高于平均丰度表明粪便适合FMT治疗。

[0324] 本发明还涉及一种或多种选自表1的细菌在鉴定FMT疗法供体的方法中的用途。

[0325] 本发明涉及处理施用于受试者之前的粪便移植物的方法,包括用一种或多种选自表1的细菌分离菌或通过上述方法从供体获得的粪便样品补充粪便移植物。

[0326] 根据本发明的另一个方面,使用已被证明在表1中一个或多个物种中是丰富的来自健康个体的粪便微生物群,和/或来自一个或多个接受免疫检查点抑制剂疗法并证明对该疗法有应答的个体的粪便微生物群,和/或来自一个或多个表现出肠道微生物谱(所述肠道微生物谱鉴定他/她/他们可能对设想的治疗有应答)的个体或有应答的患者的粪便微生物群,通过FMT治疗需要免疫检查点抑制剂疗法治疗的个体。

[0327] 在上述方面,FMT疗法用于治疗本文提及的疾病,例如癌症,例如黑素瘤。

[0328] 用于增加宿主中细菌丰度的组合物和方法

[0329] 在本发明的另一个方面,可以改变受试者的微生物组以增加表1或其子集中所列细菌的丰度。聚糖代谢已被证明会影响人类肠道微生物群,而益生元可以丰富促进抗肿瘤免疫的细菌分类群(Koropatkin等人,Nature Reviews Microbiology第10卷,第323-335页(2012年);Li等人,Cell Report,第30卷,第6期,P1753-1766.e6,2020年2月11日)。因此,提供了一种通过施用包含寡糖例如聚糖的组合物来增加在受试者中表1或其子集中所列细菌的丰度的方法。还设想了用于这种方法的包含寡糖(例如聚糖)的组合物。

[0330] 试剂盒

[0331] 在还一个方面,本发明涉及一种试剂盒。该试剂盒包括本文所述的组合物和任选地包括如本文所述的免疫检查点抑制剂的抗癌治疗。在一个实施例中,试剂盒可以包括在不损害样品的情况下运送收集的材料的材料(例如,以冻干形式包装,或包装在水性介质中等)。该试剂盒可以包括在无菌容器中的处理的材料或治疗,例如鼻胃管(NG)、小瓶(例如,用于保留灌肠)、耐胃胶囊(例如,生物耐酸以达到肠道,外部无菌)等。该试剂盒还可以包括使用说明。

[0332] 在一个替代方面,该试剂盒包括

[0333] • 配置成接收生物样品,例如粪便样品的可密封的容器;

[0334] • 用于扩增来自至少一种肠道相关细菌的16S rDNA多核苷酸序列以形成扩增的16S rDNA多核苷酸序列的多核苷酸引物,其中扩增的16S rDNA序列与选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:15的多核苷酸序列具有至少97%、98%、98.7%或99%的同源性,例如SEQ ID NO:16至29。

[0335] • 检测试剂,用于检测扩增的16S rDNA序列;和

[0336] • 使用说明。

[0337] 本发明还涉及包含组合物的试剂盒，所述组合物包含寡糖，例如聚糖，用于通过施用组合物来增加受试者中表1或其子集所列细菌丰度的方法。

[0338] 本发明还涉及本发明的组合物(即，包含一种或多种如表1中所示的参照其中所示SEQ ID NO的细菌分离菌，或由其组成)在增加免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效中的用途。本发明还涉及本发明的组合物(即，包含一种或多种如表1所示的参考表中所示SEQ ID NO的细菌分离菌，或由其组成)在增强免疫检查点阻断中的用途。本发明还涉及一种提高免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效的方法，该方法包括向受试者施用本发明的组合物(即，包含一种或多种如表1所示的参考表中所示SEQ ID NO的细菌分离菌，或由其组成)。本发明还涉及增强免疫检查点阻断的方法，包括向受试者施用本发明的组合物(即，包含一种或多种如表1所示的参考表中所示SEQ ID NO的细菌分离菌，或由其组成)。

[0339] 本发明还涉及本发明的组合物在提供免疫刺激作用中的用途。

[0340] 本发明还涉及一种用于确定在施用免疫检查点抑制剂之前癌症患者是否需要本发明的细菌组合物(即，包含一种或多种如表1所示的参考表中所示SEQ ID NO的细菌分离菌，或由其组成)的方法，该方法包括评估来自所述患者的粪便样品中存在或不存在选自表1中的物种的一种或多种细菌分离菌。

[0341] 方面

[0342] 本发明在以下方面作进一步说明。

[0343] 1.包含选自至少两个物种的分离的细菌的组合物，其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的16S rDNA序列，并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的16S rDNA序列。

[0344] 2.根据方面1的组合物，进一步包含来自至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个不同物种的分离的细菌，其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID No:3至15的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列的16S rDNA序列。

[0345] 3.根据方面1的组合物，进一步包含来自至少4种不同物种的分离细菌，其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID NO:3至15的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列的16S rDNA序列。

[0346] 4.根据方面1的组合物，进一步包含来自至少7种不同物种的分离的细菌，其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID NO:3至15的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列的16S rDNA序列。

[0347] 5.根据方面1的组合物，进一步包含细菌分离菌，其包含选自与根据SEQ ID NO:7的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列的16S rDNA序列。

[0348] 6.根据方面1的组合物，其包含选自如表3所示的聚生体1至4或6至10的聚生体。

[0349] 7.根据任一前述方面的组合物，其中所述组合物被配制用于口服或直肠施用。

[0350] 8.根据方面7的组合物，其中所述组合物为胶囊、片剂、凝胶或液体的形式。

[0351] 9.根据方面8的组合物，其中所述组合物被包封在肠包衣中。

[0352] 10.根据任一前述方面的组合物，其中所述组合物包含活的、减毒的或灭活的细菌。

[0353] 11.根据任一前述方面的组合物,其中所述组合物包含细菌孢子。

[0354] 12.根据方面1至11中任一项的组合物,其中所述组合物不包含细菌孢子。

[0355] 13.根据任一前述方面的组合物,其中所述组合物包含源自一个或多个人类供体的细菌菌株。

[0356] 14.根据任一前述方面的组合物,其中所述细菌是冻干的。

[0357] 15.根据任一前述方面的组合物,其中所述组合物包含至少约$1x10^{3}$至$1x10^{13}$CFU的细菌。

[0358] 16.根据任一前述方面的组合物,其中所述组合物的施用在受试者中诱导免疫应答和/或增加包括免疫检查点抑制剂的抗癌疗法的功效。

[0359] 17.一种药物组合物,其包含方面1至16中任一项的组合物和药物载体。

[0360] 18.根据方面17所述的药物组合物,还包含有效量的免疫检查点抑制剂或疫苗。

[0361] 19.根据方面18所述的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1、PDL-1、CTLA-4、LAG3或TIM-3活性。

[0362] 20.根据方面19的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PDL-1或CTLA-4抗体或其片段。

[0363] 21.根据方面20的药物组合物,其中抗PD-1、PD-L1或CTLA-4抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

[0364] 22.根据方面18的药物组合物,其中所述免疫检查点抑制剂为干扰核酸分子、小分子或蛋白靶向水解嵌合体(PROTAC)、替代蛋白支架或其他免疫检查点抑制剂。

[0365] 23.根据方面22的药物组合物,其中所述干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子。

[0366] 24.根据方面1至16中任一项的组合物,或方面17至23中任一项的药物组合物,其用于治疗疾病。

[0367] 25.根据方面1至16中任一项的组合物或方面17至23中任一项的药物组合物,其用于治疗癌症或传染病或用作疫苗佐剂或用于提高癌症治疗的功效。

[0368] 26.一种在有需要的受试者中治疗癌症或传染病的方法,包括向所述受试者施用根据方面1至17中任一项的组合物或方面17的药物组合物。

[0369] 27.方面26的方法,其中所述受试者正在接受、已经接受或将接受免疫检查点抑制剂的疗法,从而治疗癌症或传染病。

[0370] 28.一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,包括向所述受试者施用根据方面18的组合物。

[0371] 29.根据方面26或27的方法,其中组合物的施用增强受试者的免疫应答和/或抑制癌症的免疫逃逸和/或提高免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效。

[0372] 30.根据方面25应用的组合物或根据方面26至29中任一项的方法,其中癌症选自黑素瘤,例如哈-帕二氏黑素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑黑素瘤、恶性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、无黑色素性黑素瘤、良性幼年黑素瘤、克罗德曼黑素瘤、S91黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤、皮肤黑素瘤、葡萄膜/眼内黑素瘤和浅表扩散黑素瘤或骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头

颈癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肾癌、软组织肉瘤、尿道癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤、尿路上皮癌、白血病、前列腺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、淋巴瘤，例如霍奇金病、非霍奇金病、胃癌和多发性骨髓瘤。

[0373] 31.根据方面25应用的组合物或根据方面26至29中任一项所述的方法，其中所述组合物或药物组合物通过口服施用或直肠施用来施用。

[0374] 32.根据方面25应用的组合物或根据方面26至29中任一项所述的方法，其中所述受试者已经接受免疫检查点抑制剂的先前抗癌疗法。

[0375] 33.根据方面25应用的组合物或根据方面26或29中任一项的方法，进一步包括施用免疫检查点抑制剂的抗癌疗法。

[0376] 34.根据方面33应用的组合物或方法，其中免疫检查点抑制剂在所述细菌制剂之前、之后或同时施用。

[0377] 35.根据方面33或34应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂通过注射施用。

[0378] 36.根据方面33至35中任一项应用的组合物或方法，其中所述注射是静脉内、肌肉内、肿瘤内或皮下注射。

[0379] 37.根据方面33至36中任一项应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1、PDL-1或CTLA-4活性。

[0380] 38.根据方面37应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PDL-1或CTLA-4抗体。

[0381] 39.根据方面38应用的组合物，其中所述抗PD-1、PD-L1或CTLA-4抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

[0382] 40.根据方面33至37中任一项应用的组合物或方法，其中所述免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子、小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或其他免疫检查点抑制剂。

[0383] 41.根据方面40应用的组合物或方法，其中干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子或小分子或肽。

[0384] 42.根据方面25或30至41应用的组合物，或根据方面26至41中任一项的方法，进一步包括外科手术、放射和/或化学疗法癌症干预或第二抗癌疗法的施用。

[0385] 43.根据方面25或30至42的组合物或根据方面26至42中任一项的方法，还包括向所述受试者施用抗生素。

[0386] 44.根据方面25或30至43应用的组合物或根据方面26至43中任一项所述的方法，其中所述受试者被鉴定为处于发生癌症的风险。

[0387] 45.试剂盒，其包含根据方面1至17中任一项所述的组合物，以及任选地包含免疫检查点抑制剂的抗癌治疗。

[0388] 46.食品或疫苗佐剂，其包含方面1至17中任一项的组合物。

[0389] 47.处理施用于受试者之前的粪便移植物的方法，包括用选自至少两个物种的分

离的细菌补充所述粪便移植物,其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列,并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列。

[0390] 48.方面1至17中任一项的组合物或方面18的药物组合物在提高免疫检查点抑制剂抗癌治疗的功效中的用途。

[0391] 49.方面1至17中任一项的组合物或方面18的药物组合物在增强免疫检查点阻断中的用途。

[0392] 50.用于增强免疫检查点阻断的方法,包括施用方面1至17中任一项的组合物或方面18的药物组合物。

[0393] 51.组合物,其包含选自表1的一种或多种细菌的细菌。

[0394] 52.治疗或预防癌症的方法,包括调节受试者中选自表1的一种或多种细菌的水平。

[0395] 本发明还在以下附加方面作进一步说明。

[0396] 1.一种用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答的受试者的方法,包括确定来自所述受试者的生物样品中来自至少9种不同物种的细菌的丰度,所述生物样品包含肠道菌群,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列,其中所述丰度指示受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答。

[0397] 2.根据方面1的用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答的受试者的方法,该方法包括:

[0398] a)确定从受试者获得的生物样品中细菌的丰度和

[0399] b)将丰度与来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的癌症患者或对免疫检查点抑制剂疗法有应答的癌症患者的参考水平进行比较;

[0400] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的患者,则与参考水平相比,每种细菌的丰度的增加,表明受试者将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答或

[0401] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者,则每种细菌的丰度相同、基本相同或增加,表明受试者将对免疫检查点抑制剂的治疗产生应答。

[0402] 3.根据方面1的用于鉴定将对免疫检查点抑制剂疗法产生应答的受试者的方法,该方法包括:

[0403] a)确定从受试者获得的生物样品中细菌的丰度;

[0404] b)将丰度与来自癌症患者的参考水平进行比较,以及

[0405] c)应用随机森林分析。

[0406] 4.根据前述方面的方法,其中所述细菌物种包含选自SEQ ID NO:1或2的16S rDNA序列或与其具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列。

[0407] 5.根据前述方面的方法,其中所述方法包括确定来自10、11、12、13、14或15个物种的细菌的丰度,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%的序列同一性的序列。

[0408] 6.根据前述方面的方法,其中所述受试者是癌症患者。

[0409] 7.根据方面6的方法,其中所述癌症选自黑素瘤、骨癌、胰腺癌、头颈癌、皮肤或眼

内恶性黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、乳腺癌、脑癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、肾癌、软组织肉瘤、尿道癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、胸腺瘤、尿路上皮癌、白血病、前列腺癌、间皮瘤、肾上腺皮质癌、淋巴瘤，例如霍奇金病、非霍奇金病、胃癌和多发性骨髓瘤。

[0410] 8.根据方面7的方法，其中所述黑素瘤选自哈-帕二氏黑素瘤、幼年黑素瘤、恶性雀斑黑素瘤、恶性黑素瘤、肢端雀斑样黑素瘤、无黑色素性黑素瘤、良性幼年黑素瘤、克罗德曼黑素瘤、S91黑素瘤、结节性黑素瘤、甲下黑素瘤、皮肤黑素瘤、葡萄膜/眼内黑素瘤和浅表扩散黑素瘤。

[0411] 9.根据前述方面的方法，还包括鉴定需要免疫检查点抑制剂治疗的受试者的步骤。

[0412] 10.根据前述方面的方法，还包括向所述受试者施用免疫检查点抑制剂。

[0413] 11.根据前述方面的方法，其中所述免疫检查点抑制剂抑制PD-1、PDL-1或CTLA-4活性。

[0414] 12.根据方面11应用的方法，其中所述免疫检查点抑制剂是抗PD-1、PDL-1或CTLA-4抗体。

[0415] 13.根据方面12应用的方法，其中所述抗PD-1、CTLA-4或PD-L1抗体选自纳武利尤单抗、派姆单抗、西米普利单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、阿替利珠单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、信迪利单抗、替雷利珠单抗、匹地利珠单抗、特瑞普利单抗、伊匹单抗或曲美木单抗。

[0416] 14.根据方面1至11中任一项的方法，其中所述免疫检查点抑制剂是干扰核酸分子、小分子或蛋白水解靶向嵌合体(PROTAC)或其他免疫检查点抑制剂。

[0417] 15.根据方面14的方法，其中所述干扰核酸分子是siRNA分子、shRNA分子或反义RNA分子或小分子或肽。

[0418] 16.根据前述方面的方法，其中所述丰度是样品中细菌的丰度占样品中总微生物群的比例。

[0419] 17.根据前述方面的方法，进一步包括从所述受试者获得包含肠道菌群的生物样品的步骤。

[0420] 18.根据前述方面的方法，其中样品是粪便样品。

[0421] 19.选自至少9个不同细菌物种的细菌在鉴定对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者中的用途，其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列。

[0422] 20.试剂盒，其包含

[0423] 配置成接收生物样品的可密封的容器；

[0424] 用于扩增来自至少9个不同细菌物种的16S rDNA多核苷酸序列的多核苷酸引物，其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7％序列同一性的序列；

[0425] 检测试剂，用于检测扩增的16S rDNA序列；和

[0426] 使用说明。

[0427] 21.鉴定粪便供体的方法,包括评估受试者的粪便样品中来自至少9个不同细菌物种的细菌的存在,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列,并基于所述细菌的存在和/或丰度鉴定粪便供体。

[0428] 22.来自至少9个不同细菌物种的细菌在用于鉴定FMT疗法供体的方法中的用途,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列。

[0429] 23.用于确定癌症患者在施用免疫检查点抑制剂之前是否需要细菌补偿的方法,包括在来自所述患者的粪便样品中评估来自至少9个不同细菌物种的细菌的存在或不存在,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列。

[0430] 24.用于预测患有癌症的受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答的方法,包括确定在来自所述受试者的生物样品中来自至少9个不同物种的细菌的丰度,所述生物样品包含肠道菌群,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的16S rDNA序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列,其中所述丰度指示受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答或者无应答。

[0431] 25.根据方面24的用于预测患有癌症的受试者对免疫检查点抑制剂疗法的应答的方法,所述方法包括:

[0432] a)确定从受试者获得的生物样品中细菌的丰度;

[0433] b)将丰度与来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的患者或对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者的参考水平进行比较;

[0434] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法无应答的癌症患者,则与参考水平相比,每种细菌的丰度的增加,表明受试者将对免疫检查点抑制剂产生应答或

[0435] 其中如果参考水平来自对免疫检查点抑制剂疗法有应答的患者,则每种细菌的丰度相同、基本相同或增加,表明受试者将对免疫检查点抑制剂的治疗产生应答。

[0436] 26.根据方面24所述的方法,所述方法包括:

[0437] a)确定从受试者获得的生物样品中细菌的丰度和

[0438] b)将丰度与来自癌症患者或健康受试者的参考水平进行比较,以及

[0439] c)应用随机森林分析。

[0440] 27.根据方面24至26中任一项的方法,所述方法包括预测应答的步骤。

[0441] 28.根据方面24至27中任一项的方法,其中如果预测受试者是无应答者,则施用不是免疫检查点抑制剂的抗癌疗法。

[0442] 29.根据方面24至28中任一项的方法,其中如果预测受试者是无应答者,则施用包含来自一个或多个物种的分离的细菌的组合物,其中所述细菌包含选自SEQ ID NO:1至15的序列或与选自SEQ ID NO:1至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列。

[0443] 30.根据方面29的方法,其中如果预测受试者是无应答者,则施用包含选自至少两个物种的分离的细菌的组合物,其中来自第一物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列,并且来自第二物种的细菌包含与根据SEQ ID NO:2的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的16S rDNA序列。

[0444] 31.根据方面29或31的方法,其中所述组合物进一步包含来自至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个不同物种的分离的细菌,其中所述细菌包含选自与根据SEQ ID No:3至15的核酸序列具有至少98.7%序列同一性的序列的16S rDNA序列。

[0445] 32.根据方面24至27中任一项的方法,其中如果预测受试者是应答者,则施用免疫检查点抑制剂疗法。

[0446] 鉴于包括以下实验示例的本公开内容,本发明的其他方面和实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0447] 除非本文另有定义,与本公开相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。虽然前述公开内容提供了包含在本发明范围内的主题的一般描述,包括制造和使用本发明的方法及其最佳模式,但提供以下实施例以进一步使本领域的技术人员能够实践本发明并提供其完整的书面描述。然而,本领域技术人员将理解这些实施例的细节不应被理解为对本发明的限制,本发明的范围应从本公开所附的权利要求及其等同物中理解。鉴于本公开内容,本发明的各种其他方面和实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0448] 本说明书中提到的所有文件均通过引用整体并入本文,包括对基因登录号的任何引用和对专利出版物的引用。

[0449] 此处使用的“和/或”应被视为两个指定特征或组件中的每一个的具体公开,有或没有另一个。例如,“A和/或B”将被视为(i)A、(ii)B和(iii)A和B中每一个的具体公开,就好像每一个都在本文中单独列出一样。除非上下文另有规定,否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案,并且同样适用于所描述的所有方面和实施方案。

[0450] 本发明在非限制性实施例面作进一步说明。

[0451] 实施例1促进对免疫疗法的应答的肠道细菌和分离菌的鉴定

[0452] 发明人在MELRIST研究中分析了黑素瘤患者的微生物组如何影响对免疫检查点抑制剂疗法的应答。这项研究是在剑桥大学医院进行的,在样品收集和处理方面采用了最佳标准。这项研究涉及69名患者,其中许多患者进行了纵向粪便采样。发明人通过进行鸟枪宏基因组测序分析了基线MELRESIST粪便样品中肠道细菌的相对丰度。宏基因组测序是使用一个全面且高度精确的参考基因组数据库进行分析的,该数据库主要建立在培养分离菌的参考质量基因组上。这种基于参考的宏基因组分析提供了高度敏感和准确的细菌鉴定(Forster等人Nat Biotechnol.2019;37:186)。为了支持这一分析,发明人使用相同的分析平台重新分析了来自即将接受免疫检查点抑制剂疗法的黑素瘤患者的另外三个鸟枪宏基因组数据集。

[0453] 通过机器学习方法检查微生物组,以选择最能预测对免疫检查点抑制剂疗法应答的特定细菌物种。在该领域,首次发鉴定了一致的微生物组特征,该特征与多个研究中的应答相关并高度预测反应。MELRESIST数据集的大小和质量,通过基于参考的宏基因组分析和机器学习分析对细菌的全面和准确的鉴定,都有助于发现这种交叉研究的微生物组特征。该特征还进一步证实了肠道微生物组作为免疫检查点抑制剂应答的主要驱动因素的核心重要性。这为预测性生物标志物和活细菌治疗联合疗法以增加对检查点抑制剂有应答的患者比例提供了基础,。使用特征缩减步骤,这种微生物组特征被缩减为小型细菌聚生体,其中包含对免疫疗法有应答的患者中更丰富的物种。这些较小的聚生体在整个研究中仍然可

以预测应答,因此可以作为生物标志物。此外,这些聚生体可以形成活细菌治疗剂,用于与免疫检查点抑制剂共同施用治疗癌症。

[0454] 该分析能够鉴定代表聚生体中十三个物种的菌株分离菌。用这些菌株(单独或作为多达九菌株的聚生体)刺激的树突细胞有效激活细胞毒性T淋巴细胞。还在同基因小鼠癌症模型中测试了两个九菌株的聚生体,两个聚生体都表现出肿瘤生长抑制。这些结果证实了细菌是抗肿瘤应答的驱动因素。

[0455] 1.1基于MELRIST临床研究的发现

[0456] MELRIST是剑桥大学医院进行的一项研究,其中69名晚期黑素瘤患者在使用基于抗PD1的免疫治疗之前和/或之后提供了粪便样品。还记录了完整的临床元数据,包括治疗应答、抗生素使用和毒性。采用了严格的样品采集方案,以确保达到最高的可能标准。在Microbiotica中一次性提取DNA,并进行鸟枪法宏基因组学分析。鸟枪法宏基因组学测序在本领域是众所周知的,例如在Quince,C.等人的Shotgun metagenomics,from sampling to analysis.Nat Biotechnol 35,833-844(2017)中描述的。

[0457] 基于参考的宏基因组学用于分析基线粪便样品的序列,以提供更灵敏和特异性的细菌鉴定。生物信息学工具进一步提高了准确性,以掩盖移动元素,从而减少水平基因转移引起的虚假信号。合适的方法也描述于通过引用并入的WO2020065347中。额外的分类过滤去除了由污染和基因复制引起的错误分配的读数。该平台可以准确分类95%以上的宏基因组读数,从而精确绘制样品中几乎所有细菌的丰度图。

[0458] 为了支持和验证该分析,使用Microbiotica高精度平台对来自即将接受免疫检查点抑制剂疗法的黑素瘤患者的另外三个数据集进行了重新分析。这些是:

[0459] • Frankel Neoplasia(2017)19:848,晚期黑素瘤,39名患者

[0460] • Gopalakrishnan等人和Wargo Science(2018)359:97,转移性黑素瘤,25名患者(图中称为Wargo)

[0461] • Matson等人和Gajewski Science(2018)359:104,转移性黑素瘤,39名患者(图中称为Gajewsi)

[0462] 1.2生物信息学分析以便推导预测对免疫疗法的应答的微生物组特征

[0463] 来自MELRESIST的基线样品用于通过将样品中每种细菌的相对丰度与临床结果数据相联系来定义应答特征。在初步分析中,6个月时疾病稳定、部分应答和完全应答均被确定为应答,而进展性疾病被视为无应答。机器学习方法,包括随机森林模型,被用来选择提供最大功效的物种作为预测应答的特征的一部分。

[0464] 随机森林分类器是一种基于许多决策树结果的算法。在单个决策树中,迭代选择特征以最好地将样品分为应答者和非应答者类别,直到所有特征都被利用。在患病率数据的情况下,这些特征可能是给定物种的存在或不存在,其中单个物种的存在可能优先与应答者样品相关,反之亦然。或者,给定物种的相对丰度可以预测应答,其中它在应答者样品中可能更丰富或更不丰富。由于单个决策树通常会过度拟合数据并且不会产生稳健的结果,因此通常使用随机森林来代替。随机森林分类器基于许多不同的决策树,其中每棵树仅使用可用数据的一个子集,例如,每棵树随机遗漏20%的观察的物种。在某些情况下,样品的一个子集用于训练随机森林。因此,随机森林分类器学习在所有可能的特征和样品中哪些信号最强。对于所有随机森林模型,袋外误差用于防止过度乐观的性能并提高普遍性。

[0465] 发明人通过包括额外的黑素瘤数据集来扩展分析，以鉴定与跨多项研究的应答相关的细菌。首先，对来自不同研究的数据进行了标准化，例如，在必要时将应答标准更改为与MELRESIST研究一致。然后使用机器学习过程对所有四个黑素瘤数据集的组合数据集生成特征。然后在组合数据集上测试了该特征作为生物标志物的能力，它预测患者是否会对治疗产生应答，准确度为91％(图1A)。该分析的接受者操作特征(ROC)曲线给出的曲线下面积(AUC)为0.98(图1C)，从而证实了该特征的预测性有多高。重要的是，当单独针对研究进行测试时，特征的准确度为83-100％(图1B)，ROC曲线给出的AUC从0.96到1(图1D)。这是基于微生物组的预测性生物标志物的首次展示，该生物标志物准确地预测研究中的应答。

[0466] 为了将特征作为生物标志物改进并选择细菌以包含在活细菌治疗中，发明人鉴定了与应答最密切相关的细菌。来自三项或所有四项研究的有应答的患者中丰度持续增加的物种被选为高级的物种。随后，通过排除宏基因组读数未广泛且均匀地覆盖基因组的物种，应用过滤步骤来选择具有最干净信号的细菌。

[0467] 整个分析从一开始就重复进行，但尽可能排除病情稳定的患者，以关注与更好的临床应答相关的细菌。这次重新分析与第一次分析有相当大的重叠，从而验证了它，并用于完善最终的物种清单。这些分析产生了一份包含15个细菌物种的清单，即聚生体1，在多项研究中这些细菌在随后对免疫检查点抑制剂疗法有应答的黑素瘤患者中的丰度都有所增加(见表1和表3)。通过在组合数据集中重复测试作为生物标志物证明了这种减少的特征的稳健性，它预测患者是否会对疗法产生应答，准确度为77％(图2A)。该分析的接受者操作特征(ROC)曲线给出的曲线下面积(AUC)为0.8(图2C)，从而证实了该特征的预测性有多高。重要的是，当单独针对研究进行测试时，特征的准确度为67-84％(图2B)，并且ROC给出的AUC从0.73到0.88(图2D)。由15个中的9或12个物种组成的另外六个聚生体2、3、4、5、6和10(表3)也作为生物标志物进行了测试，并且在组合数据集和单个研究中都具有良好的应答预测性(图3-7和17)。

[0468] 因此，结果表明，鉴定出的细菌可用作黑素瘤患者中对抗PD1疗法应答的预测性生物标志物，也可用作细菌联合疗法以增加黑素瘤患者对检查点抑制剂有应答的比例。

[0469] 为了解细菌是否可用于使用检查点抑制剂的其他癌症适应症，发明人分析了非小细胞肺癌(NSCLC)患者队列中完整特征的预测值(Routy等人，2018 Science 359:91-97)。该研究在基于抗PD1的治疗之前对患者的粪便进行了采样，并对其进行了鸟枪法宏基因组测序。这是使用Microbiotica高精度平台重新分析的。聚生体1中的15个物种可预测非小细胞肺癌患者是否对抗PD1疗法有应答(ROC AUC＝0.722;图8)。因此，本文描述的和在黑素瘤患者中发现的细菌也与NSCLC中的应答有关。这表明本文所述的细菌可用作另一种癌症适应症的预测性生物标志物。此外，这也表明本文所述的细菌可用作其他癌症适应症的细菌联合疗法。

[0470] 1.3细菌分离菌的选择

[0471] 使用来自培养的分离物的基因组的基于参考的宏基因组分析使得所鉴定的细菌能够关联回相关培养物收集中的特定菌株和/或密切相关菌株的分离物。代表表1中物种的所有可用菌株都进行了硅片表征，以选择具有所需发育性和安全性谱的菌株。主要选择标准由抗微生物抗性、噬菌体产生和孢子形成组成。选择具有良好谱的菌株用于进一步测试。这些细胞被扩增，产生了细胞库，并对其生长进行了表征，以实现体外试验和体内模型的测

试。此外，通过实验室测试和计算机模拟分析(in silico analysis)，每个菌株都经过了充分的可开发性和安全性测试。对于每个基因组组装，以两种方式鉴定16S rDNA区域。首先，使用barrnap(https://github.com/tseemann/barrnap)，第二，通过搜索与7F(5'-AGAGTTTGATYMTGCTCAG-3')(SEQ ID NO:30)1510R(5'-ACGGYTACCTTGTTACGACT-3')(SEQ ID NO:31)通用16S引物的DNA匹配，在计算机中提取所需长度(1200至1800bp之间)的序列。当从一个组装中提取多个重叠的16S序列时，保留最长的序列。

[0472] 1.4宿主相互作用

[0473] 主要细菌是根据多项研究中与临床应答的强烈关联而选择的，因此，被认为是纳入活细菌治疗的合适候选者。为了了解其作用机制，在几次人细胞体外试验中，对细菌单独地，作为完整的聚生体和亚聚生体进行了描绘。细胞毒性T淋巴细胞(CTL)是抗肿瘤免疫应答中的重要效应细胞，通过粒酶B和穿孔素释放直接裂解肿瘤细胞，并产生诸如IFNγ的细胞因子。CTL可以表达共刺激和共抑制受体。免疫检查点抑制剂疗法通过阻断共抑制受体(如PD-1)与其配体(如PD-L1)之间的相互作用来阻断CTL活性的抑制。后者可以被肿瘤细胞表达为逃避免疫介导的耗竭的机制，而检查点抑制剂疗法可以逆转这种机制。CTL由树突状细胞激活和训练，树突细胞是先天性免疫哨兵细胞，具有许多受体来感知和响应细菌。因此，对鉴定出的细菌(单独或作为聚生体)进行了刺激树突细胞(DC)的能力测试，以及这些DC是否激活了CTL。

[0474] 代表15个物种中的13个的细菌菌株被鉴定并在细菌培养基中生长。在厌氧条件下，将这些洗涤并添加到与人单核细胞衍生的DC共培养中。然后加入抗生素并在有氧环境中培养DC。通过成熟标志物CD86(共刺激配体)和CD83的上调来测量DC的激活。13个物种中的11个强烈诱导两种标志物的表达，Gordonibacter urolithinfaciens和Alistipes indictincus是DC成熟的不良激活剂(图9A和9B)。事实上，许多诱导了与阳性对照、脂多糖(LPS)、Poly I:C和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)相似水平的CD86和CD83表达，所有这些已知都是非常有效的DC激活剂。九个物种的两个聚生体(聚生体5和6)，以及含有六个、三个和两个物种的聚生体6的亚聚生体也都触发了DC成熟，如通过CD86和CD83上调所测量的(图9B-9E)。细菌还触发细胞因子从DC释放。IL-12是引发CTL应答的一种非常重要的细胞因子，IL-10与T细胞应答的抑制有关。因此，使用IL-12与IL-10的比率来测量DC是否可以是阳性CTL应答的强诱导剂。所测试的10个物种中的9个以及聚生体5和6触发了比IL-10更高水平的IL-12，即使与LPS和Poly I:C等强烈的炎症刺激相比也是如此(图9G)。未显示Gordonibacter urolithinfaciens的数据，因为释放的细胞因子水平太低，无法使比率有意义。这些数据表明，被鉴定为与免疫检查点抑制剂疗法应答相关的细菌是DC成熟的扩大有效激活剂，并释放可指导增强的T细胞应答的细胞因子。

[0475] 为了解这些DC在刺激CTL方面的效果如何，将成熟DC与同种异体的CD8表达T细胞(CTL)共培养6天。通过粒酶B、穿孔素和IFNγ的上调来量化CTL激活。对13个细菌物种进行了测试，结果显示所有细菌都能诱导可能激活CTL的DC(图10)。激活水平与强烈的炎症刺激LPS、Poly I:C和鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)相当或更好。有趣的是，即使是Gordonibacter urolithinfaciens和Alistipes indictincus也被证明会导致强大的CTL激活，尽管它们是DC的CD86和CD83表达的不良刺激物。所测试的聚生体(5、6、7、8和9)也都诱导了强烈的CTL激活(图11和12)。这些数据表明，被鉴定为与免疫检查点抑制剂疗法应

答相关的细菌是通过刺激DC产生CTL应答的有效激活物。这适用于单个物种和2到9个物种的聚生体。这种CTL激活的诱导可能是一种关键机制，通过这种机制，这些细菌的丰度增加导致在抗PD1存在下增强抗肿瘤免疫。它还可能表明包含这些细菌的治疗组合物可以增强疫苗应答和/或抗病毒免疫力。

[0476] 细菌导致有效的CTL激活，因此接下来测试了它们杀死肿瘤细胞的能力。在此测定中，由细菌刺激的DC激活的CTL与肿瘤细胞系SKOV-3细胞共培养。如通过电阻抗的降低所测量的，所测试的所有十个物种导致CTL对肿瘤细胞的有效细胞溶解。肿瘤细胞杀伤水平优于其他已知的强先天刺激。所测试的聚生体(5、6、7、8和9)也导致了高水平的肿瘤细胞杀伤(图13和14)。这些数据表明，被鉴定为与免疫检查点抑制剂疗法应答相关的细菌是免疫介导的肿瘤细胞杀伤的有效激活剂。这对于测试的单个物种和2到9个物种的聚生体都是如此。

[0477] 总的来说，上述数据表明，被鉴定为与抗PD-1应答相关的细菌物种能够刺激DC以触发CTL激活和肿瘤细胞杀伤。这种机制可能至少部分地解释了为什么这些细菌与黑素瘤中基于抗PD-1疗法的应答有关。这种机制与免疫检查点抑制剂在多种肿瘤中的功效相关，表明本文所述的细菌可用作其他癌症适应症的细菌联合疗法。事实上，本文描述的细菌可能是与任何增强CTL应答的免疫疗法(例如过继性T细胞转移疗法和CAR-T细胞疗法)的有效联合疗法。有趣的是，测试的两种菌株(Gordonibacter urolithinfaciens和Alistipes indictincus)没有诱导DC激活的经典标志物(CD86和CD83)，但DC仍然诱导CTL激活。

[0478] 1型干扰素(IFN)、IFNα和IFNβ是有效的CTL免疫的诱导剂，可具有直接的抗肿瘤作用。浆细胞样树突细胞能够产生非常高水平的IFNα和IFNβ。为了测试与抗PD-1应答相关的分离的细菌是否诱导IFNα释放，用代表九个物种的菌株刺激浆细胞样树突细胞。浆细胞样树突细胞不能耐受厌氧条件，因此在有氧环境中使用热灭活细菌。九种菌株中的七种诱导IFNα从浆细胞样DC释放(图15)。这可能是这些细菌增强抗肿瘤免疫应答的另一种潜在机制。有趣的是，来自微生物组的补剂1型干扰素信号与肺部的增强的抗病毒应答有关(Bradley等人2019Cell Reports28:245-256)。因此，鉴定出的物种也可能潜在驱动抗病毒应答和/或抗病毒疫苗功效。

[0479] 此外，除了上述机制测定之外，还测试了两个选定的聚生体在癌症同基因模型中的功效。在植入MCA205肿瘤细胞前一天，SPF小鼠在植入黑素瘤患者的微生物组之前接受了抗生素治疗。通过口服强饲法给药聚生体5或6可诱导肿瘤生长抑制(图16)，尽管其程度与阳性对照(抗PD1)不同。这显示了这些聚生体的抗肿瘤潜力，并通过与改善的临床结果相关联验证了这些物种的选择。MCA-205是一种纤维肉瘤细胞系，其进一步证明本文所述的细菌在黑素瘤以外的癌症适应症中具有潜力。此处提供的数据共同表明，我们已经在多种黑素瘤研究和NSCLC中鉴定了可预测对检查点抑制剂治疗应答的细菌物种。这些物种能够刺激DC，导致CTL激活和肿瘤细胞杀伤。这些物种的两个聚生体在体内癌症模型中得到进一步验证。

[0480] 表2序列

[0481]

SEQ ID	16S rDNA 序列
SEQ ID No. 1	AGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGT CGAACGGAGTTATGCAGAGGAAGTTTTCGGATGGAATCGGCGTAACTTAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTGGGAAACCTGCCCTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAG GTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGCTTCACATGAGGCAGTGTGAAAAACTCCGGTG GTACAGGATGGTCCCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAACGGCCTACCAAAGC GACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC CCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGAT GCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGG AAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGAC GGCATGACAAGCCAGATGTGAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCATTTGGAAC TGCCAGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTA AACGATGATTGCTAGGTGTAGGTGGGTATGGACCCATCGGTGCCGCAGCTAACGCAA TAAGCAATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCCAATGACGTGTCCGTAACGGGGCATTCTCTTCGGAGCATTGGA GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTAGCCAGCAGGTAGAGCTGGGCACTCTAGGGA GACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT ATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGACAGTGAT GTTGAGCAAATCCCAGAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTAC ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGAAATGCCCGAAGCCTGTGAC CTAACCGCAAGGGAGGAGCAGTCGAAGGCAGGTCTAATAACTGGGGTGAAGTCGTAA CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 2	TTTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGAGTTATTTTGGAAATCTCTTCGGGGATGGAATTCATAACTTAGTGGCGG ACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAATCTGCCCTTAGGTGGGGGATAACAGCCGGAAACG GCTGCTAATACCGCATAACACATTGAAGCCGCATGGTTTTGATGTCAAAGATTTATTGC CTTTGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTGGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCG ACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACG CAGCAACGCCGCGTGATTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGATCTTTAATTGGGGAC GAATTTTGACGGTACCCAAAGAATAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGCGAGTAGGCG GGCTGGCAAGTTGGGAGTGAAATCCCGGGGCTTAACCCCGGAACTGCTTTCAAAACT GCTGGTCTTGAGTGATGGAGAGGCAGGCGGAATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATACGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGACATTAACTGACGCTG AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGGATACTAGGTGTGGGAGGTATTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACACAATA AGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG CCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG GTCTTGACATCCCTCTGACCGCCCTAGAGATAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGA CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTACGGTTAGTTGATACGAAAGATCACTCTAGCCGGACTGCCGTT

[0482]

	GACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGG CTACACACGTACTACAATGGCAGTCATACAGAGGGAAGCAAAACAGTGATGTGGAGCA AATCCCTAAAAGCTGTCCCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCG GAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGAGAGCCGGTAATACCCGAAGTCCGTAGCCTAACCGC AAGGAGGGCGCGGCCGAAGGTAGGACTGGTAATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG CCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 3	TTTAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGAAGCTTGATTTCTGATTTTTTCGGAATGACGAATGATATGACTGAGTGGC GGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCCCTTCGGAACGGGATAGTGTCTGGAAA CGGACAGTAATACCGTATAATATATATTGATCGCATGGTTGATATATCAAAACTGAGGT GCCGAAGGATGGGCTCGCGTCTGATTAGATAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGT CGACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGAT GCAGCAACGCCGCGTGAAGGAAGACGGTTTTCGGATTGTAAACTTCTGTTCTTAGTGA AGAATAATGACGGTAGCTAAGGAGCAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGGC GGGATGCCAAGTCAGCTGTGAAAACTATGGGCTTAACTTGTAGACTGCAGTTGAAACT GGTATTCTTGAGTGAAGTAGAGGTTGGCGGAATTCCGAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA GATATTCGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGGCTTTAACTGACGCTGA GGCTCGAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAA CGATGATAACTAGGTGTGGGGGGTCTGACCCCTTCCGTGCCGCAGCTAACGCAATAA GTTATCCACCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGAC CCGCACAAGCAGTGGATTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGC ACTTGACATCCGACTAACGAAGTAGAGATACATTAGGTGCCCTTCGGGGAAAGTCGAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTGCCATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGGGACCGCTA CCGACAAGGTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTGCTG GGCTACACACGTAATACAATGGCCATCAACAAAGAGAAGCAATACCGCGAGGTGGAG CAAAACTATAAAAATGGTCTCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCACGAAGT TGGAATTGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTAACACCCGAAGTCAGTAGTCTAACCG CAAGGAGGACGCTGCCGAAGGTGGGATTGACGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA GCCGTATCAGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 4	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAA GTCGAGGGGCAGCATAATGGTAGCAATACTATTGATGGCGACCGGCGGACGGGTGC GTAACGCGTATGCAACCTACCCTTTACAGGGGGATAACACTGAGAAATCGGTACTAAT ACCCCATAATATTCTGGGAGGCATCTTTCGGAGTTGAAAGCTTTGGTGGTAAAGGATG GGCATGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACATA GGGGGACTGAGAGGTTAACCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCG CGTGCAGGAAGACGGCTCTATGAGTTGTAAACTGCTTTTGTACGAGGGTAAACGCAGA TACGTGTATCTGCCTGAAAGTATCGTACGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGC GTAGGCGGTTTAGTAAGTCAGCGGTGAAATTTTGGTGCTTAACACCAAACGTGCCGTT GATACTGCTGGGCTAGAGAGTAGTTGCGGTAGGCGGAATGTATGGTGTAGCGGTGAA ATGCTTAGAGATCATACAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAACTATATCTGA CGTTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC

[0483]

	AGTAAACGATGATAGCTCGTTGTCGGCGATACACAGTCGGTGACTAAGAGAAATCGAT AAGCTATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACC CGGGCTTGAAAGTTACTGACGATTCTGGAAACAGGATTTCCCTTCGGGGCAGGAAACT AGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGGTTAAGTCCCATAA CGAGCGCAACCCCTACTGATAGTTGCCATCAGAGCGTTTGAGCGATCAAACAAGCTG GGCACTCTATCGGGACTGCCGGTGTAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT CAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGTAGGTACAGAGGGC AGCCACCCAGTGATGGGGAGCGAATCTCGAAAGCCTATCTCAGTTCGGATTGGAGGC TGAAACTCGCCTCCATGAAGTTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCG GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGTTGGGGGT GCCTGAAGTTCGTGACCGAAAGGAGCGACCTAGGGCAAAACCGATGACTGGGGCTAA GTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTTT
SEQ ID No. 5	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATAAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAA GTCGAGGGGCAGCGGGTGGAGTATTTCGGTACTCCTGCCGGCGACCGGCGCACGGG TGCGTAACGCGTATGCAACCTACCTTTAACAGGGGGATAATCCGAAGAAATTTGGTCT AATACCCCATAATATCATTTAAGGCATCTTAGATGGTTGAAAATTCCGATGGTTAGAGA TGGGCATGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTACGATACA TAGGGGGACTGAGAGGTTTTCCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCT ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGC CGCGTGCAGGATGAAGGTGCTATGCATTGTAAACTGCTTTTGTACGAGGGTAAATGCA GGTACGTGTACCTGTTTGAAAGTATCGTACGAATAAGGGTCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGACCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGT GCGTAGGCGGATTAGTAAGTTAGAGGTGAAAGCTCGATGCTCAACATCGAAATTGCCT CTGATACTGTTAGTCTAGAGTATAGTTGCGGAAGGCGGAATGTGTGGTGTAGCGGTGA AATGCTTAGATATCACACAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTTTCCAAGCTATTACTGA CGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGATAACTCGTTGCAGGCGATACACAGTCTGTGACTTAGCGAAAGCGTT AAGTTATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACC CGGGCTTGAAAGTTAGCGACGGATCCTGAAAGGGGTCTTCTCTTCGGAGCGCGAAAC TAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGGTTAAGTCCCATA ACGAGCGCAACCCCTACTGTTAGTTACCAGCACGTCAAGGTGGGCACTCTAGCAGGA CTGCCGGTGTAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTAC GTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGTCGGTACAGAGGGTCGCTACCCCGTGAG GGGATGCCAATCTCGAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGAGGCTGAAACTCGCCTCC ATGAAGTTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGTTGGGGGTGCCTGAAGTACGTGA CCGCAAGGAGCGTCCTAGGGCAAAACCGATGACTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAG CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTT
SEQ ID No. 6	ACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGTTAAGGCGCCTTCGGGCGCGAATAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA CGTGACCAACCTGCCCCCCTCCCCGGGATAACGCGAGGAAACCCGCGCTAATACCGG ATACTCCGCCCCTCCCGCATGGGAGGGGCGGGAAAGCCCCGACGGAGGGGGATGG GGTCGCGGCCCATTAGGTAGACGGCGGGGCAACGGCCCACCGTGCCTGCGATGGGT AGCCGGGTTGAGAGACCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGGAACCCTGACGCAGCAACGC CGCGTGCGGGACGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGTTGA

[0484]

	CGGTACCTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGGGGCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCCCGTCA AGCGGAACCTCTAACCCGAGGGCTCAACCCCCGGCCGGGTTCCGAACTGGCAGGCT CGAGTTTGGTAGAGGAAGATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCG GGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGTCTTCTGGGCCATCAACTGACGCTGAGGCGC GAAAGCTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATG GGTGCTAGGTGTGGGGGGATCATCCCTCCGTGCCGCAGCCAACGCATTAAGCACCCC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTG ACATGCTGGTGAAGCCGGGGAAACCCGGTGGCCGAGAGGAGCCAGCGCAGGTGGTG CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCCTGCCATATGTTGCCAGCATTCAGTTGGGGACTCATATGGGACTGCCGGCGTC AAGCCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTTATGCCCTGGGCTG CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAACGGGCCGCGACCTGGCGACAGGAAGCGAAT CCCTCAAAGCCGGCCCCAGTTCGGATCGGAGGCTGCAACCCGCCTCCGTGAAGTCG GAGTTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCACCCGAGTCGTCTGCACCCGAAGCCGCCGGCCGAACCC GCAAGGGGCGGAGGCGTCGAAGGTGTGGAGGGTAAGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 7	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAA GTCGAACGAAGTCTTTAGGAAGCTTGCTTCCAAAGAGACTTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTAGGTAACCTGCCCATGTGCCCGGGATAACTGCTGGAAACGGTAGCTAA AACCGGATAGGTATGAGGGAGGCATCTTCCTCATATTAAAGCACCTTCGGGTGTGAAC ATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCCCACCAAGGCGAT GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGTCAATGGGGGGAACCCTGAACGA GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCACTGTTGTAAGTGAAGA ATGCCATATAGAGGAAATGCTATGTGGGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATCATTG GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGCACGATAAGTCTGAAGTAAAAGGCAACAGCTCAAC TGTTGTATGCTTTGGAAACTGTCGAGCTAGAGTGCAGAAGAGGGCGATGGAATTCCAT GTGTAGCGGTAAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTCGCC TGGTCTGTAACTGACACTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCC TAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGAACTAAGTGTTGGAGAGATTCAGTGCTGCAGT TAACGCAATAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTATGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGCCTTGACATGGATATAAATGTTCTAGAGATAGAAAGATAGCTATATAT CACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTCTGTTACCAGCATTAAGTTGGGGACTCAGGAGAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCGCCTACAAAGAGCAGCGACACCGCGAG GTGGAGCGAATCTCATAAAGGGCGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTC ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCTCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTCAAACCATGGGAGTTGGTAATACCCGAAGCCGGTGGC ATAACCGCAAGGAGTGAGCCGTCGAAGGTAGGACCGATGACTGGGGTTAAGTCGTAA CAAGGTATCCCTACGGGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 8	TCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAGCGAAGCACTTAAGTGGATCTCTTCGGATTGAAACTTATTTGACTGAGCGGCG

[0485]

	GACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAAT GGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGACCGCATGGTCTGGTGTGAAAAACTCCGG TGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCACCAAG GCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTG ATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGGAAA CTGTTTTTCTAGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTT GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGAATACTAGGTGTCGGGTGGCAAAGCCATTCGGTGCCGCAGCAAACGCAAT AAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGA CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA AGTCTTGACATCCCTCTGACCGGCCCGTAACGGGGCCTTCCCTTCGGGGCAGAGGAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTAGCCAGCAGGTAGAGCTGGGCACTCTAGGGAG ACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGACAGCGAT GTTGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGC ACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGA CCCAACCTTACAGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGACCGATAACTGGGGTGAAGTCG TAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 9	CGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGACAGGCCTAACACATGCAAG TCGAGGGGCAGCGGAGAGGTAGCAATACCTTTGCCGGCGACCGGCGCACGGGTGAG TAACACGTATGCAATCCACCTGTAACAGGGGGATAACCCGGAGAAATCCGGACTAATA CCCCATAATATGGGCGCTCCGCATGGAGAGTCCATTAAAGAGAGCAATTTTGGTTACA GACGAGCATGCGCTCCATTAGCCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAAGCGACGAT GGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAAACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGTCGGCAGACTGAACCAGCCA AGTCGCGTGAGGGAAGACGGCCCTACGGGTTGTAAACCTCTTTTGTCGGAGAGTAAA GTACGCTACGTGTAGTGTATTGCAAGTATCCGAAGAAAAAGCATCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAA GGGTGCGTAGGCGGCACGCCAAGTCAGCGGTGAAATTTCCGGGCTCAACCCGGACT GTGCCGTTGAAACTGGCGAGCTAGAGTGCACAAGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTA GCGGTGAAATGCATAGATATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAGGG TGCGACAGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCAGTAAACGATGAATACTAACTGTTTGCGATACAATGTAAGCGGTACAGC GAAAGCGTTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGG AACCTTACCCGGGCTCAAACGCAGGGGGAATGCCGGTGAAAGTCGGCAGCTAGCAAT AGTCACCTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTT AAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTATGGACAGTTACTAACGGGTGAAGCCGAGGAC TCTGTCTAGACTGCCGGCGCAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCA CGGCCCTTACGTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCAGGTACAGAAGGCAGCCA GTCAGCAATGACGCGCGAATCCCGAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAAC

[0486]

	CCGACTCCATGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAAT ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCCGGGAGTACCTGA AGCATGCAACCGCAAGGAGCGTACGAAGGTAATACCGGTAACTGGGGCTAAGTCGTA ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTTT
SEQ ID No. 10	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAA GTCGAGGGGCAGCGGGATTGAAGCTTGCTTCAATCGCCGGCGACCGGCGCACGGGT GCGTAACGCGTATGCAACCTACCCAGAACAGGGGGATAACACTGAGAAATTGGTACTA ATATCCCATAACATCATAAGGGGCATCCCTTTTGGTTGAAAACTCCGGTGGTTCTGGAT GGGCATGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATACAT AGGGGGACTGAGAGGTTAACCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCATGCC GCGTGCAGGAAGACGGCTCTATGAGTTGTAAACTGCTTTTGTACTAGGGTAAACTCAG ATACGTGTATCTGACTGAAAGTATAGTACGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACGGAGGATTCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGC GTAGGCGGTTTGATAAGTTAGAGGTGAAATACCGGTGCTTAACACCGGAACTGCCTCT AATACTGTTGAGCTAGAGAGTAGTTGCGGTAGGCGGAATGTATGGTGTAGCGGTGAAA TGCTTAGAGATCATACAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAACTATATCTGAC GTTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCA GTAAACGATGATAACTCGCTGTCGGCGATACACAGTCGGTGGCTAAGCGAAAGCGAT AAGTTATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACC CGGGCTTGAAAGTTAGTGACGGATCTGGAAACAGGTCTTCCCTTCGGGGCGCGAAAC TAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGGTTAAGTCCCATA ACGAGCGCAACCCCTACCGTTAGTTGCCATCAGGTCAAGCTGGGCACTCTGACGGGA CTGCCGGTGTAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTAC GTCCGGGGCCACACACGTGTTACAATGGTAGGTACAGAGGGCAGCTACCCAGCGATG GGATGCGAATCTCGAAAGCCTATCTCAGTTCGGATCGGAGGCTGAAACCCGCCTCCG TGAAGTTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTGCCTGAAGTTCGTGA CCGCAAGGAGCGACCTAGGGCAAAACCGGTGACTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAG CCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTTT
SEQ ID No. 11	TCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAGCGAAGCACTTGCCATTGACTCTTCGGAAGATTTGGCATTTGACTGAGCGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGAATAACAGTTAGAAAT GGCTGCTAATGCCGCATAAGCGCACAGGACCGCATGGTCTGGTGTGAAAAACTGAGG TGGTATGAGATGGGCCCGCGTCTGATTAGGTAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAG CCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTG ATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGACGGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGACTGCATTGGAAA CTGTCCATCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGTTGCAAAGCAATCCGGTGCCGCAGCAAACGCAG TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC

[0487]

	AAGTCTTGACATCTGCCTGACCGTTCCTTAACCGGAACTTTCCTTCGGGACAGGCAAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTGTCCTTAGTAGCCAGCAGTCCGGCTGGGCACTCTAGGGAGA CTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT GATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGGAGTGGTGACA CTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCA CGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC CTAACCGCAAGGGAGGAGCTGCCGAAGGCGGGACCGATAACTGGGGTGAAGTCGTA ACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 12	TTATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAACGAAGCATTTAAGACGGATTCTTTCGGGATGAAGACTTTTATGACTGAGTGG CGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCACACAGGGGGATAGCAGTTGGA AACGGCTGATAATACCGCATAAGCGCACAGTACCGCATGGTACAGTGTGAAAAACTCC GGTGGTGTGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGCAGGGTAACGGCCTACCA AGGCAACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCT GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTAATTCGTTATGTAAAGCTCTATCAGCAG GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCTCCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGTGTAGG TGGCATCACAAGTCAGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGCTTTTGAAA CTGTGGAGCTGGAGTGCAGGAGAGGCAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACTGTAACTGACAC TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGCTCATAAGAGCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCA ATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCTCTTGACCGGTCAGTAATGTGACCTTTTCTTCGGAACAAGAGTG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTATTCTTAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTAGGAAGAC TGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATG ACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGTGAAGCGAGAGTGTGAGCTT AAGCAAATCACAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGA AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCT TGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCGGAAATGCCCGAAGTCGGTGACCTAA CGAAAGAAGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT AGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 13	TAAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCACGCTTAACACATGCAAGT CGAACGGAGAATATCGAAGCTTGCTTTGATATTCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA CGTGAGTAACCTGCCTCTGAGAGTGGGATAGCTTCTGGAAACGGATGGTAATACCGC ATGAAATCATAGTATCGCATGGTACAATGATCAAAGATTTATCGCTCAGAGATGGACTC GCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCAGTAGCCG GACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGATGCCGCGT GGAGGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAACTCCTGTTGAAGAGGACGATAATGACGGTAC TCTTTTAGAAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGAGC GAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGGACGGCAAGTCAG ATGTGAAAACTATGGGCTCAACCCATAGACTGCATTTGAAACTGTTGTTCTTGAGTGAG

[0488]

	GTAGAGGTAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAAC ATCGGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGGCCTTTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGG GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTACTAGGTG TGGGGGGACTGACCCCTTCCGTGCCGCAGTTAACACAATAAGTAATCCACCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGGA GTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGAGTGA CGTACCTAGAGATAGGTATTTTCTTCGGAACACAAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTACCATT AGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTACTACAATGGC AATATAACAGAGGGAAGCAATACAGCGATGTGGAGCAAATCCCCAAAAATTGTCCCAG TTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCAGAT CAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG GGAGTCGGTAACACCCAAAGCCGGTCGTCTAACCTTCGGGAGGACGCCGTCTAAGGT GGGATTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTG GATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 14	ATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGT CGAACGAAGCACTCTATTTGATTTTCTTCGGAAATGAAGATTTTGTGACTGAGTGGCGG ACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACAGTTGGAAACG ACTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGATCGCATGGTCCGGTGTGAAAAACTCCGGT GGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAACGGCCTACCAAAG CGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGA TGCAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGG GAAGAAGAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCACCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAG GCGGTGCGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCATTGGAA ACTGTCGTACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATAACTGACG CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGAGCATTGCTCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCA ATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCCGATGACAGAGTATGTAATGTACTTTCTCTTCGGAGCATCGGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTGTTCTTAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGCACTCTAGGGAG ACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGGAGCCGTGAG GCCGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTAC ACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGAAATGCCCGAAGTCAGTGA CCCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCCGAAGGCAGGTTCGATAACTGGGGTGAAGTCGT AACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 15	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCG AACGAGAGAGAGGGAGCTTGCTTCCTTGATCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGT GAGGAACCTGCCTCAAAGAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATA AGCCCACGACCCGGCATCGGGAAGAGGGAAAAGGAGCAATCCGCTTTGAGATGGCCT CGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCACCAAGCGACGATCGGTAGCCG

[0489]

	GACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGT GGAGGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAACTCCTGTTGTTGAGGAAGATAATGACGGTAC TCAACAAGGAAGTGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAACGTAGGTCAC AAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGCGATCAAGTTGGA AGTGAAATCCATGGGCTCAACCCATGAACTGCTTTCAAAACTGGTCGTCTTGAGTAGT GCAGAGGTAGGCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCGGGAGGAA CACCAGTGGCGAAGGCGGCCTACTGGGCACCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGT GGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGATTACTAGG TGTTGGGAGATTGACCCTCTCAGTGCCGCAGTTAACACAATAAGTAATCCACCTGGGG AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCAGTGG AGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCCTTGA CGATGCTGGAAACAGTATTTCTCTTCGGAGCAAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGG TCAGTTACTACGCAAGAGGACTCTGGCCAGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTTATGACTTGGGCTACACACGTACTACAATG GCGTTAAACAAAGAGAAGCAAGACCGCGAGGTGGAGCAAAACTCAGAAACAACGTCC CAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGT GGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC CATGAGAGCCGGGGGGACCCGAAGTCGGTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGCCGCCG AAGGTAAAACTGGTGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
SEQ ID No. 16	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAA GTCGAGGGGCAGCATAATGGTAGTAATACTATTGATGGCGACCGGCGGACGGGTGCG TAACGCGTATGCAACCTACCCTTTACAGGGGGATAACACTGAGAAATCGGTACTAATA CCCCATAATATTCTGGGAGGCATCTTTCGGAGTTGAAAGCTTTGGTGGTAAAGGATGG GCATGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACATAG GGGGACTGAGAGGTTAACCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCCTACG GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGC GTGCAGGAAGACGGCTCTATGAGTTGTAAACTGCTTTTGTACGAGGGTAAACGCAGAT ACGTGTATCTGCCTGAAAGTATCGTACGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGT AGGCGGTTTAGTAAGTCAGCGGTGAAATTTTGGTGCTTAACACCAAACGTGCCGTTGA TACTGCTGGGCTAGAGAGTAGTTGCGGTAGGCGGAATGTATGGTGTAGCGGTGAAAT GCTTAGAGATCATACAGAACACCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAAACTATATCTGACG TTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAG TAAACGATGATAGCTCGTTGTCGGCGATACACAGTCGGTGACTAAGAGAAATCGATAA GCTATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC CCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCG GGCTTGAAAGTTACTGACGATTCTGGAAACAGGATTTCCCTTCGGGGCAGGAAACTAG GTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGGTTAAGTCCCATAACG AGCGCAACCCCTACTGATAGTTGCCATCAGAGCGTTTGAGCGATCAAACAAGCTGGG CACTCTATCGGGACTGCCGGTGTAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA GCACGGCCCTTACGTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGTAGGTACAGAGGGCAG CCACCCAGTGATGGGGAGCGAATCTCGAAAGCCTATCTCAGTTCGGATTGGAGGCTG AAACTCGCCTCCATGAAGTTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGTTGGGGGTGC CTGAAGTTCGTGACCGAAAGGAGCGACCTAGGGCAAAACCGATGACTGGGGCTAAGT CGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTTT

[0490]

SEQ ID No. 17	TTTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGAGTTATTTTGGAAATCTCTTCGGAGATGGAATTCATAACTTAGTGGCGG ACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAATCTGCCCTTAGGTGGGGGATAACAGCCGGAAACG GCTGCTAATACCGCATAACACATTGAAGCCGCATGGTTTTGATGTCAAAGATTTATTGC CTTTGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTGGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCG ACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACG CAGCAACGCCGCGTGATTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGATCTTTAATTGGGGAC GAAAAATGACGGTACCCAAAGAATAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGCGAGTAGGCG GGCTGGCAAGTTGGGAGTGAAATCCCGGGGCTTAACCCCGGAACTGCTTTCAAAACT GCTGGTCTTGAGTGATGGAGAGGCAGGCGGAATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATACGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGACATTAACTGACGCTG AGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGGATACTAGGTGTGGGAGGTATTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACACAATA AGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG CCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG GTCTTGACATCCCTCTGACCGCCCTAGAGATAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGGTGA CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA ACGAGCGCAACCCTTACGGTTAGTTGATACGCAAGATCACTCTAGCCGGACTGCCGTT GACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGG CTACACACGTACTACAATGGCAGTCATACAGAGGGAAGCAAAACAGTGATGTGGAGCA AATCCCTAAAAGCTGTCCCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCG GAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCATGAGAGCCGGTAATACCCGAAGTCCGTAGCCTAACCGC AAGGAGGGCGCGGCCGAAGGTAGGACTGGTAATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG CCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 18	ACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGTTAAGGCGCCTTCGGGCGCGAATAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA CGTGACCAACCTGCCCCCCTCCCCGGGATAACGCGAGGAAACCCGCGCTAATACCGG ATACTCCGCCCCTCCCGCATGGGAGGGGCGGGAAAGCCCCGACGGAGGGGGATGG GGTCGCGGCCCATTAGGTAGACGGCGAGGCAACGGCCCACCGTGCCTGCGATGGGT AGCCGGGTTGAGAGACCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGGAACCCTGACGCAGCAACGC CGCGTGCGGGACGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGTTGA CGGTACCTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGGGGCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCCCGTCA AGCGGAACCTCTAACCCGAGGGCTCAACCCCCGGCCGGGTTCCGAACTGGCAGGCT CGAGTTTGGTAGAGGAAGATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCG GGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGTCTTCTGGGCCATCAACTGACGCTGAGGCGC GAAAGCTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATG GGTGCTAGGTGTGGGGGGATCATCCCTCCGTGCCGCAGCCAACGCATTAAGCACCCC GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC AAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTG ACATGCTGGTGAAGCCGGGGAAACCCGGTGGCCGAGAGGAGCCAGCGCAGGTGGTG CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCCTGCCATATGTTGCCAGCATTCAGTTGGGGACTCATATGGGACTGCCGGCGTC AAGCCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTTATGCCCTGGGCTG CACACGTGCTACAATGGCCGGTACAACGGGCCGCGACCTGGCGACAGGAAGCGAAT CCCTCAAAGCCGGCCCCAGTTCGGATCGGAGGCTGCAACCCGCCTCCGTGAAGTCG GAGTTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCACCCGAGTCGTCTGCACCCGAAGCCGCCGGCCGAACCC GCAAGGGGCGGAGGCGTCGAAGGTGTGGAGGGTAAGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 19	TCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAGCGAAGCACTTGCCATTGACTCTTCGGAAGATTTGGCATTTGACTGAGCGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGAATAACAGTTAGAAAT GGCTGCTAATGCCGCATAAGCGCACAGGACCGCATGGTCTGGTGTGAAAAACTGAGG

[0491]

	TGGTATGAGATGGGCCCGCGTCTGATTAGGTAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAG CCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTG ATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGACGGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGACTGCATTGGAAA CTGTCCATCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGTTGCAAAGCAATCCGGTGCCGCAGCAAACGCAG TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AAGTCTTGACATCTGCCTGACCGTTCCTTAACCGGAACTTTCCTTCGGGACAGGCAAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCCTGTCCTTAGTAGCCAGCAGTCCGGCTGGGCACTCTAGGGAGA CTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT GATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGGAGTGGTGACA CTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCA CGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC CTAACCGCAAGGGAGGAGCTGCCGAAGGCGGGACCGATAACTGGGGTGAAGTCGTA ACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID No. 20	TTATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAACGAAGCATTTAAGACGGATTCTTTCGGGATGAAGACTTTTATGACTGAGTGG CGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCACACAGGGGGATAGCAGTTGGA AACGGCTGATAATACCGCATAAGCGCACAGTACCGCATGGTACAGTGTGAAAAACTCC GGTGGTGTGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGCAGGGTAACGGCCTACCA AGGCAACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCT GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTAATTCGTTATGTAAAGCTCTATCAGCAG GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCTCCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGTGTAGG TGGCATCACAAGTCAGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGCTTTTGAAA CTGTGGAGCTGGAGTGCAGGAGAGGCAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACTGTAACTGACAC TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGCTCATAAGAGCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCA ATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCTCTTGCCCGGTCAGTAATGTGACCTTTTCTTCGGAACAAGAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATTCTTAGTAGCCAGCATATAAGGTGGGCACTCTAGGAAGA CTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT GACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGTGAAGCGAGAGTGTGAGC TTAAGCAAATCACAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACAT GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCGGAAATGCCCGAAGTCGGTGACC TAACGAAAGAAGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAA GGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

SEQ ID NO. 21	AGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGT CGAACGGAGTTATGCAGAGGAAGTTTTCGGATGGAATCGGCGTAACTTAGTGGCGGA CGGGTGAGTAACGCGTGGGAAACCTGCCCTGTACCGGGGGATAACACTTAGAAATAG GTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGCTTCACATGARGCAGTGTGAAAAACTCCGGTGG TACAGGATGGTCCCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAAYGGCCTACCAAAGCG ACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATG

[0492]

	CAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGA AGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACG GCATGACAAGCCAGATGTGAAAACCCAGGGCTCAACCCTGGGACTGCATTTGGAACT GCCAGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGT AGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACTGACGTTG AGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAA ACGATGATTGCTAGGTGTAGGTGGGTATGGACCCATCGGTGCCGCAGCTAACGCAAT AAGCAATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AAGTCTTGACATCCCAATGACGTGTCCGTAACGGGGCATTCTCTTCGGAGCATTGGAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTAGCCAGCAGGTARAGCTGGGCACTCTAGGGAG ACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGAYGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGACAGTGAT GTTGAGCAAATCCCAGAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTAC ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGAAATGCCCGAAGCCTGTGAC CTAACCGCAAGGGAGGAGCAGTCGAAGGCAGGTCTAATAACTGGGGTGAAGTCGTAA CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 22	TTTAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGAGTTATTTTGGAAATCTCTTCGGGGATGGAATTCATAACTTAGTGGCGG ACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAATCTGCCCTTAGGTGGGGGATAACAGCCGGAAACG GCTGCTAATACCGCATAACACATTGAAGCCGCATGGTTTTGATGTCAAAGATTTATTGC CTTTGGATGAGCTCGCGTCTGATTAGCTGGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCG ACGATCAGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCTGACG CAGCAACGCCGCGTGATTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGATCTTTAATTGGGGAC GAAWWWTGACGGTACCCAAAGAATAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG GTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGCGAGTAGGC GGGCTGGCAAGTTGGGAGTGAAATCCCGGGGCTTAACCCCGGAACTGCTTTCAAAAC TGCTGGTCTTGAGTGATGGAGAGGCAGGCGGAATTCCGTGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGATATACGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGACATTAACTGACGCT GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGGATACTAGGTGTGGGAGGTATTGACCCCTTCCGTGCCGGAGTTAACACAAT AAGTATCCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA GGTCTTGACATCCCTCTGACCGCCCTAGAGATAGGGTTTCCCTTCGGGGCAGAGGTG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC AACGAGCGCAACCCTTACGGTTAGTTGATACGAAAGATCACTCTAGCCGGACTGCCGT TGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG GCTACACACGTACTACAATGGCAGTCATACAGAGGGAAGCAAAACAGTGATGTGGAG CAAATCCCTAAAAGCTGTCCCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGT CGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG TACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGCCGGTAATACCCGAAGTCCGTAGCCTAACC GCAAGGAGGGCGCGGCCGAAGGTAGGACTGGTAATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGG TAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 23	ACGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAA GTCGAACGGTTAAGGCGCCTTCGGGCGCGAATAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA CGTGACCAACCTGCCCCCCTCCCCGGGATAACGCGAGGAAACCCGCGCTAATACCGG ATACTCCGCCCCTCCCGCATGGGAGGGGCGGGAAAGCCCCGACGGAGGGGGATGG GGTCGCGGCCCATTAGGTAGACGGCGGGGCAACGGCCCACCGTGCCTGCGATGGGT AGCCGGGTTGAGAGACCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGCGCAATGGGGGGAACCCTGACGCAGCAACGC CGCGTGCGGGACGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTCAGCAGGGAAGAAGTTGA CGGTACCTGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGGGGCGAGCGTTATCCGGATTCATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGCCCGTCA AGCGGAACCTCTAACCCGAGGGCTCAACCCCCGGCCGGGTTCCGAACTGGCAGGCT

[0493]

	CGAGTTTGGTAGAGGAAGATGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCG GGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGTCTTCTGGGCCATCAACTGACGCTGAGGCGC GAAAGCTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATG GGYGCTAGGTGTGGGGGGATCATCCCTCCGTGCCGCAGCCAACGCATTAAGCRCCC CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA CAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTT GACATGCTGGTGAAGCCGGGGAAACCCGGTGGCCGAGAGGAGCCAGCGCAGGTGGT GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCCCTGCCATATGTTGCCAGCATTCAGTTGGGGACTCATATGGGACTGCCGGCGT CAAGCCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTTATGCCCTGGGCT GCACACGTGCTACAATGGCCGGTACAACGGGCCGCGACCTGGCGACAGGAAGCGAA TCCCTCAAAGCCGGCCCCAGTTCGGATCGGAGGCTGCAACCCGCCTCCGTGAAGTCG GAGTTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCACACCACCCGAGTCGTCTGCACCCGAAGCCGCCGGCCGAACCC GCAAGGGGCGGAGGCGTCGAAGGTGTGGAGGGTAAGGGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 24	ATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAA GTCGAACGAAGTCTTTAGGAAGCTTGCTTCCAAAGAGACTTAGTGGCGAACGGGTGA GTAACACGTAGGTAACCTGCCCATGTGCCCGGGATAACTGCTGGAAACGGTAGCTAA AACCGGATAGGTATGAGGGAGGCATCTTCCTCATATTAAAGCACCTTCGGGTGTGAAC ATGGATGGACCTGCGGCGCATTAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCCCACCAAGGCGAT GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA AACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGTCAATGGGGGGAACCCTGAACGA GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAGCACTGTTGTAAGTGAAGA ATGCCATATAGAGGAAATGCTATGTGGGTGACGGTAGCTTACCAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATCATTG GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGCACGATAAGTCTGAAGTAAAAGGCAACAGCTCAAC TGTTGTATGCTTTGGAAACTGTCGAGCTAGAGTGCAGAAGAGGGCGATGGAATTCCAT GTGTAGCGGTAAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTCGCC TGGTCTGTAACTGACACTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCC TAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGAACTAAGTGTTGGAGAGATTCAGTGCTGCAGT TAACGCAATAAGTTCTCCGCCTGGGGAGTATGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAAT TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA ACCTTACCAGGCCTTGACATGGATATAAATGTTCTAGAGATAGAAAGATAGCTATATAT CACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC CGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTCTGTTACCAGCATTAAGTTGGGGACTCAGGAGAG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGGCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGCGCCTACAAAGAGCAGCGACACCGCGAG GTGGAGCGAATCTCATAAAGGGCGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTC ATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCTCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTCAAACCATGGGAGTTGGTAATACCCGAAGCCGGTGGC ATAACCGCAAGGAGTGAGCCGTCGAAGGTAGGACCGATGACTGGGGTTAAGTCGTAA CAAGGTATCCCTACGGGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 25	TCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAGCGAAGCRCTTRARYGGATCTCTTCGGATTGAARYTTWTKTGACTGAGCGGC GGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACAGTTAGAAA TGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGACCGCATGGTCTGGTGTGAAAAACTCCG GTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCACCAA GGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCT GATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAG GGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG ACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGGAA ACTGTTTTTCTAGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGTGGCAAAGCCATTCGGTGCCGCAGCAAACGCAA

[0494]

	TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AAGTCTTGACATCCCTCTGACCGGCCCGTAACGGGGCCTTCCCTTCGGGGCAGAGGA GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATCCTTAGTAGCCAGCAGGTRRAGCTGGGCACTCTAGGGA GACTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTT ATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGACAGCGA TGTTGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTG CACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGA CCCAACCTTAYAGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGACCGATAACTGGGGTGAAGTCG TAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 26	CGAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGACAGGCCTAACACATGCAAG TCGAGGGGCAGCGGRGAGGYAGCAATACCTTTGCCGGCGACCGGCGCACGGGTGAG TAACACGTATGCAATCCACCTGTAACAGGGGGATAACCCGGAGAAATCCGGACTAATA CCCCATAATATGGGCGCTCCGCATGGAGRGTCCATTAAAGAGAGCAATTTTGGTTACA GACGAGCATGCGCTCCATTAGCCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAAGCGACGAT GGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAAACT CCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGTCGGCAGACTGAACCAGCCA AGTCGCGTGAGGGAAGACGGCCCTACGGGTTGTAAACCTCTTTTGTCGGAGAGTAAA GTRCGCTACGTGTAGYGTATTGCAAGTATCCGAAGAAAAAGCATCGGCTAACTCCGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAA GGGTGCGTAGGCGGCACGCCAAGTCAGCGGTGAAATTTCCGGGCTCAACCCGGACT GTGCCGTTGAAACTGGCGAGCTAGAGTGCACAAGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTA GCGGTGAAATGCATAGATATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAGGG TGCGACAGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTATCGAACAGGATTAGATACCCTGGT AGTCCACGCAGTAAACGATGAATACTAACTGTTTGCGATACAATGTAAGCGGTACAGC GAAAGCGTTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAA TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGG AACCTTACCCGGGCTCAAACGCAGGGGGAATGCCGGTGAAAGTCGGCAGCTAGCAAT AGTCACCTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTT AAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTATGGACAGTTACTAACGGGTGAAGCCGAGGAC TCTGTCTAGACTGCCGGCGCAAGCCGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCA CGGCCCTTACGTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCAGGTACAGAAGGCAGCCA GTCAGCAATGACGCGCGAATCCCGAAAACCTGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAAC CCGACTCCATGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAAT ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCCGGGAGTACCTGA AGCATGCAACCGCAAGGAGCGTACGAAGGTAATACCGGTAACTGGGGCTAAGTCGTA ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAACACCTCCTTT
SEQ ID NO. 27	TCAGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAGCGAAGCACTTRYYATTGAMTCTTCGGARGATTTRGCATKTGACTGAGCGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGAATAACAGTTAGAAAT GGCTGCTAATGCCGCATAAGCGCACAGGRCCGCATGGTCYGGTGTGAAAAACTSMGG TGGTATGAGATGGRCCCGCGTCTGATTAGGTAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAG CCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACG GCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTG ATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC GGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGA CGGACGGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGACTGCATTGGAAA CTGTCCATCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGT TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGTTGCAAAGCAATCCGGTGCCGCAGCAAACGCAG TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG ACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC AAGTCTTGACATCTGCCTGACCGTTCCTTAACCGGAACTTTCCTTCGGGACAGGCAAG ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC

[0495]

	AACGAGCGCAACCCCTGTCCTTAGTAGCCAGCAGTCCGGCTGGGCACTCTAGGGAGA CTGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT GATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGGAGTGGTGACA CTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCA CGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGG GTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGAC CTAACCGCAAGGGAGGAGCTGCCGAAGGCGGGACCGATAACTGGGGTGAAGTCGTA ACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 28	TTATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAA GTCGAACGAAGCATTTGMGACRGATTYYTTCGGRWTGAAGACTTTTATGACTGAGTGG CGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCACACAGGGGGATAGCAGTTGGA AACGGCTGATAATACCGCATAAGCGCACAGTACCGCATGGTACAGTGTGAAAAACTCC GGTGGTGTGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGCRGGGTAACGGCCYACCA AGGCAACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCT GATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTAATTCGTTATGTAAAGCTCTATCAGCAG GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCTCCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGAGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGTGTAGG TGGCATCACAAGTCAGAAGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGACTGCTTTTGAAA CTGTGGAGCTGGAGTGCAGGAGAGGCAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACTGTAACTGACAC TGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT AAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGCTCATAAGAGCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCA ATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCTCTTGRCCGGTCAGTAATGTGRYCTTTTCTTCGGAACAAGAGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTATTCTTAGTAGCCAGCATTTAAGRTGGGCACTCTAGGAAGA CTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT GACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGTGAAGCGAGAGTGTGAGC TTAAGCAAATCACAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACAT GAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGG TCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCGGAAATGCCCGAAGTCGGTGACC TAACGAAAGAAGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAA GGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT
SEQ ID NO. 29	ATGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGT CGAACGAAGCACTCTATTTGATTTTCTTCGGRAATGAAGATTTTGTGACTGAGTGGCG GACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACAGTTGGAAAC GACTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGGATYGCATGRTCCGGTGTGAAAAACTCCGGT GGTATGRGATGGACCCGCGTCTGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAACGGCCTACCAAAG CGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGA TGCAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGTATTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGG GAAGAAGAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCACCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCG CGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAG GCGGTGCGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGTACTGCATTGGAA ACTGTCGTACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATAACTGACG CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGAATACTAGGTGTCGGGGAGCATTGCTCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCA ATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC CAAGTCTTGACATCCCGATGACAGAGTATGTAATGTASYYTCYCTTCGGRGCATCGGT GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTGTYCTTAGTAGCCAGCGGTTCGGCCGGGCACTCTAGGGAG ACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA TGACTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCRRAGCCGTGAG GCCGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTAC

[0496]

	ACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCG GGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGAAATGCCCGAAGTCAGTGA CCCAACCGCAAGGAGGGAGCTGCCGAAGGCAGGTTCGATAACTGGGGTGAAGTCGT AACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT

[0497] 表3

[0498]

No	生物分类学	16S rDNA 序列标识符	聚生体									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
B1	Eisenbergiella sp.	SEQ ID No: 1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B2	Butyricicoccus sp.	SEQ ID No: 2	X	X	X	X		X	X	X	X	X
B3	梭菌属(Clostridiales sp.)	SEQ ID No: 3	X	X	X	X						X
B4	肥胖令枝杆菌（Alistipes obesi）	SEQ ID No: 4	X	X								
B5	Alistipes indistinctus	SEQ ID No: 5	X	X								X
B6	Gordonibacter urolithinfaciens	SEQ ID No: 6	X	X	X	X						
B7	屎豆属菌（Faecalitalea sp.）	SEQ ID No: 7	X	X	X	X	X	X	X	X		X
B8	布劳特氏菌属(Blautia sp.)	SEQ ID No: 8	X	X	X	X	X					
B9	Barnesiella intestinihominis	SEQ ID No: 9	X	X	X	X	X	X	X			
B10	Alistipes timonensis	SEQ ID No: 10	X									X
B11	布劳特氏菌属(Blautia sp.)	SEQ ID No: 11	X		X	X						X
B12	毛螺菌属（Lachnospira sp.）	SEQ ID No: 12	X		X							
B13	Ruminococcus callidus	SEQ ID No: 13	X		X		X	X				X
B14	Roseburia faecis	SEQ ID No: 14	X		X	X						X
B15	Faecalibacterium prausnitzii	SEQ ID No: 15	X		X							
B4	肥胖令枝杆菌（Alistipes obesi）	SEQ ID No: 16					X	X				
B2	Butyricicoccus sp.	SEQ ID No: 17					X					
B6	Gordonibacter urolithinfaciens	SEQ ID No: 18					X	X	X			
B11	布劳特氏菌属(Blautia sp.)	SEQ ID No: 19						X	X			
B12	毛螺菌属（Lachnospira sp.）	SEQ ID No: 20					X	X				
细菌的数量			15	9	12	9	9	9	6	3	2	9

序列表

<110> 百奥利康微生物有限公司

<120> 治疗性细菌组合物

<130> P37180WO1

<150> GB 2007452.2

<151> 2020-05-19

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1527

<212> DNA

<213> Eisenbergiella sp.

<400> 1

agagagtttg atcctggctc aggatgaacg ctggcggcgt gcctaacaca tgcaagtcga 60
acggagttat gcagaggaag ttttcggatg gaatcggcgt aacttagtgg cggacgggtg 120
agtaacgcgt gggaaacctg ccctgtaccg ggggataaca cttagaaata ggtgctaata 180
ccgcataagc gcacagcttc acatgaggca gtgtgaaaaa ctccggtggt acaggatggt 240
cccgcgtctg attagccagt tggcagggta acggcctacc aaagcgacga tcagtagccg 300
gcctgagagg gtgaacggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc 360
agcagtgggg aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agcgacgccg cgtgagtgaa 420
gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag cagggaagaa aatgacggta cctgactaag 480
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggggcaa gcgttatccg 540
gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gcatgacaag ccagatgtga aaacccaggg 600
ctcaaccctg ggactgcatt tggaactgcc aggctggagt gcaggagagg taagcggaat 660
tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt 720
actggactgt aactgacgtt gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
tggtagtcca cgcggtaaac gatgattgct aggtgtaggt gggtatggac ccatcggtgc 840
cgcagctaac gcaataagca atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag 900
gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca agtcttgaca tcccaatgac gtgtccgtaa cggggcattc tcttcggagc 1020
attggagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt atccttagta gccagcaggt agagctgggc actctaggga 1140
gactgccggg gataacccgg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg 1200
atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagaca gtgatgttga 1260
gcaaatccca gaaataacgt ctcagttcgg attgtagtct gcaactcgac tacatgaagc 1320
tggaatcgct agtaatcgcg aatcagcatg tcgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac 1380
acaccgcccg tcacaccatg ggagttggaa atgcccgaag cctgtgacct aaccgcaagg 1440
gaggagcagt cgaaggcagg tctaataact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc 1500

ggaaggtgcg gctggatcac ctccttt 1527

<210> 2

<211> 1525

<212> DNA

<213> Butyricicoccus sp.

<400> 2

tttagagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt 60
cgaacggagt tattttggaa atctcttcgg ggatggaatt cataacttag tggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgagcaat ctgcccttag gtgggggata acagccggaa acggctgcta 180
ataccgcata acacattgaa gccgcatggt tttgatgtca aagatttatt gcctttggat 240
gagctcgcgt ctgattagct ggttggcggg gtaacggccc accaaggcga cgatcagtag 300
ccggactgag aggttgaacg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cgcaatgggg gaaaccctga cgcagcaacg ccgcgtgatt 420
gaagaaggcc ttcgggttgt aaagatcttt aattggggac gaattttgac ggtacccaaa 480
gaataagctc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgtta 540
tccggattta ctgggtgtaa agggcgagta ggcgggctgg caagttggga gtgaaatccc 600
ggggcttaac cccggaactg ctttcaaaac tgctggtctt gagtgatgga gaggcaggcg 660
gaattccgtg tgtagcggtg aaatgcgtag atatacggag gaacaccagt ggcgaaggcg 720
gcctgctgga cattaactga cgctgaggag cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat 780
accctggtag tccacgccgt aaacgatgga tactaggtgt gggaggtatt gacccccttcc 840
gtgccggagt taacacaata agtatcccac ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc 900
aaaggaattg acgggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accaggtctt gacatccctc tgaccgccct agagataggg tttcccttcg 1020
gggcagaggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccttacggtt agttgatacg aaagatcact ctagccggac 1140
tgccgttgac aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc 1200
tgggctacac acgtactaca atggcagtca tacagaggga agcaaaacag tgatgtggag 1260
caaatcccta aaagctgtcc cagttcagat tgcaggctgc aactcgcctg catgaagtcg 1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaat acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag 1440
ggcgcggccg aaggtaggac tggtaattag ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg 1500
aaggtgcggc tggatcacct ccttt 1525

<210> 3

<211> 1527

<212> DNA

<213> Clostridiales sp.

<400> 3

tttaagagtt tgatcctggc tcaggacgaa cgctggcggc gtgcctaaca catgcaagtc 60
gaacgaagct tgatttctga ttttttcgga atgacgaatg atatgactga gtggcggacg 120

ggtgagtaac gcgtgagcaa cctgcccttc ggaacgggat agtgtctgga aacggacagt 180
aataccgtat aatatatatt gatcgcatgg ttgatatatc aaaactgagg tgccgaagga 240
tgggctcgcg tctgattaga tagttggtgg ggtaacggcc taccaagtcg acgatcagta 300
gccggactga gaggttgaac ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctcctacggg 360
aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcaac gccgcgtgaa 420
ggaagacggt tttcggattg taaacttctg ttcttagtga agaataatga cggtagctaa 480
ggagcaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt 540
gtccggaatt actgggtgta aagggagcgt aggcgggatg ccaagtcagc tgtgaaaact 600
atgggcttaa cttgtagact gcagttgaaa ctggtattct tgagtgaagt agaggttggc 660
ggaattccga gtgtagcggt gaaatgcgta gatattcgga ggaacaccgg tggcgaaggc 720
ggccaactgg gctttaactg acgctgaggc tcgaaagtgt ggggagcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacactg taaacgatga taactaggtg tggggggtct gacccccttcc 840
gtgccgcagc taacgcaata agttatccac ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc 900
aaaggaattg acggggaccc gcacaagcag tggattatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accagcactt gacatccgac taacgaagta gagatacatt aggtgccctt 1020
cggggaaagt cgagacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg 1080
ttaagtcccg caacgagcgc aacccctgcc attagttgct acgcaagagc actctaatgg 1140
gaccgctacc gacaaggtgg aggaaggtgg ggacgacgtc aaatcatcat gccccttatg 1200
tgctgggcta cacacgtaat acaatggcca tcaacaaaga gaagcaatac cgcgaggtgg 1260
agcaaaacta taaaaatggt ctcagttcgg actgcaggct gcaacccgcc tgcacgaagt 1320
tggaattgct agtaatcgtg gatcagcatg ccacggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac 1380
acaccgcccg tcacaccatg ggagttggta acacccgaag tcagtagtct aaccgcaagg 1440
aggacgctgc cgaaggtggg attgacgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc 1500
agaaggtgcg gctggatcac ctccttt 1527

<210> 4
<211> 1539
<212> DNA
<213> Alistipes obesi
<400> 4

atggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctagcggc aggcttaaca catgcaagtc 60
gaggggcagc ataatggtag caatactatt gatggcgacc ggcggacggg tgcgtaacgc 120
gtatgcaacc tacccttac aggggataa cactgagaaa tcggtactaa taccccataa 180
tattctggga ggcatctttc ggagttgaaa gctttggtgg taaaggatgg gcatgcgttg 240
tattagctag ttggtaaggt aacggcttac caaggcgacg atacataggg ggactgagag 300
gttaaccccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag 360
gaatattggt caatggacgg aagtctgaac cagccatgcc gcgtgcagga agacggctct 420
atgagttgta aactgctttt gtacgagggt aaacgcagat acgtgtatct gcctgaaagt 480
atcgtacgaa taaggatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatac ggaggatcca 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggc ggtttagtaa gtcagcggtg 600

aaattttggt gcttaacacc aaacgtgccg ttgatactgc tgggctagag agtagttgcg 660
gtaggcggaa tgtatggtgt agcggtgaaa tgcttagaga tcatacagaa caccgattgc 720
gaaggcagct taccaaacta tatctgacgt tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgatagc tcgttgtcgg cgatacacag 840
tcggtgacta agagaaatcg ataagctatc cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata 960
cgcgaggaac cttacccggg cttgaaagtt actgacgatt ctggaaacag gatttccctt 1020
cggggcagga aactaggtgc tgcatggttg tcgtcagctc gtgccgtgag gtgtcgggtt 1080
aagtcccata acgagcgcaa cccctactga tagttgccat cagagcgttt gagcgatcaa 1140
acaagctggg cactctatcg ggactgccgg tgtaagccga gaggaaggtg gggatgacgt 1200
caaatcagca cggcccttac gtccggggcg acacacgtgt tacaatggta ggtacagagg 1260
gcagccaccc agtgatgggg agcgaatctc gaaagcctat ctcagttcgg attggaggct 1320
gaaactcgcc tccatgaagt tggattcgct agtaatcgcg catcagccat ggcgcggtga 1380
atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagccat gggagttggg ggtgcctgaa 1440
gttcgtgacc gaaaggagcg acctagggca aaaccgatga ctggggctaa gtcgtaacaa 1500
ggtagccgta ccggaaggtg cggctggaac acctccttt 1539

<210> 5
<211> 1525
<212> DNA
<213> Alistipes indistinctus
<400> 5

atggagagtt tgatcctggc tcaggataaa cgctagcggc aggcctaaca catgcaagtc 60
gaggggcagc gggtggagta tttcggtact cctgccggcg accggcgcac gggtgcgtaa 120
cgcgtatgca acctaccttt aacaggggga taatccgaag aaatttggtc taatacccca 180
taatatcatt taaggcatct tagatggttg aaaattccga tggttagaga tgggcatgcg 240
ttgtattagc tagttggtga ggtaacggct caccaaggct acgatacata gggggactga 300
gaggttttcc ccccacactg gtactgagac acggaccaga ctcctacggg aggcagcagt 360
gaggaatatt ggtcaatgga cgcaagtctg aaccagccat gccgcgtgca ggatgaaggt 420
gctatgcatt gtaaactgct tttgtacgag ggtaaatgca ggtacgtgta cctgtttgaa 480
agtatcgtac gaataagggt cggctaactc cgtgccagca gccgcggtaa tacggaggac 540
ccgagcgtta tccggattta ttgggtttaa agggtgcgta ggcggattag taagttagag 600
gtgaaagctc gatgctcaac atcgaaattg cctctgatac tgttagtcta gagtatagtt 660
gcggaaggcg gaatgtgtgg tgtagcggtg aaatgcttag atatcacaca gaacaccgat 720
tgcgaaggca gctttccaag ctattactga cgctgatgca cgaaagcgtg gggagcgaac 780
aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgatgat aactcgttgc aggcgataca 840
cagtctgtga cttagcgaaa gcgttaagtt atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg 900
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggagga acatgtggtt taattcgatg 960
atacgcgagg aaccttaccc gggcttgaaa gttagcgacg gatcctgaaa ggggtcttct 1020
cttcggagcg cgaaactagg tgctgcatgg ttgtcgtcag ctcgtgccgt gaggtgtcgg 1080

gttaagtccc ataacgagcg caacccctac tgttagttac cagcacgtca aggtgggcac 1140
tctagcagga ctgccggtgt aagccgagag gaaggtgggg atgacgtcaa atcagcacgg 1200
cccttacgtc cggggcgaca cacgtgttac aatggtcggt acagagggtc gctaccccgt 1260
gaggggatgc caatctcgaa agccgatctc agttcggatt ggaggctgaa actcgcctcc 1320
atgaagttgg attcgctagt aatcgcgcat cagccatggc gcggtgaata cgttcccggg 1380
ccttgtacac accgcccgtc aagccatggg agttgggggt gcctgaagta cgtgaccgca 1440
aggagcgtcc tagggcaaaa ccgatgactg gggctaagtc gtaacaaggt agccgtaccg 1500
gaaggtgcgg ctggaacacc tcctt 1525

<210> 6
<211> 1506
<212> DNA
<213> Gordonibacter urolithinfaciens
<400> 6

acggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaaca catgcaagtc 60
gaacggttaa ggcgccttcg ggcgcgaata gagtggcgaa cgggtgagta acacgtgacc 120
aacctgcccc cctccccggg ataacgcgag gaaacccgcg ctaataccgg atactccgcc 180
cctcccgcat gggaggggcg ggaaagcccc gacggagggg gatggggtcg cggcccatta 240
ggtagacggc ggggcaacgg cccaccgtgc ctgcgatggg tagccgggtt gagagaccga 300
ccggccacat tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt 360
ttgcgcaatg gggggaaccc tgacgcagca acgccgcgtg cgggacgaag gccttcgggt 420
tgtaaaccgc tttcagcagg gaagaagttg acggtacctg cagaagaagc cccggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcgagcgt tatccggatt cattgggcgt 540
aaagcgcgcg taggcggccc gtcaagcgga acctctaacc cgagggctca acccccggcc 600
gggttccgaa ctggcaggct cgagtttggt agaggaagat ggaattcccg gtgtagcggt 660
ggaatgcgca gatatcggga agaacaccga tggcgaaggc agtcttctgg gccatcaact 720
gacgctgagg cgcgaaagct gggggagcga acaggattag ataccctggt agtcccagcc 780
gtaaacgatg ggtgctaggt gtgggggggat catccctccg tgccgcagcc aacgcattaa 840
gcaccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg 900
cacaagcagc ggagcatgtg gcttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccagggcttg 960
acatgctggt gaagccgggg aaacccggtg gccgagagga gccagcgcag gtggtgcatg 1020
gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccctg 1080
ccatatgttg ccagcattca gttggggact catatgggac tgccggcgtc aagccggagg 1140
aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatgcc ctttatgccc tgggctgcac acgtgctaca 1200
atggccggta caacgggccg cgacctggcg acaggaagcg aatccctcaa agccggcccc 1260
agttcggatc ggaggctgca acccgcctcc gtgaagtcgg agttgctagt aatcgcggat 1320
cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacccga 1380
gtcgtctgca cccgaagccg ccggccgaac ccgcaagggg cggaggcgtc gaaggtgtgg 1440
agggtaaggg gggtgaagtc gtaacaaggt agccgtaccg gaaggtgcgg ctggatcacc 1500
tccttt 1506

<210> 7
<211> 1535
<212> DNA
<213> Faecalitalea sp.
<400> 7
atggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc atgcctaata catgcaagtc 60
gaacgaagtc tttaggaagc ttgcttccaa agagacttag tggcgaacgg gtgagtaaca 120
cgtaggtaac ctgcccatgt gcccgggata actgctggaa acggtagcta aaaccggata 180
ggtatgaggg aggcatcttc ctcatattaa agcaccttcg ggtgtgaaca tggatggacc 240
tgcggcgcat tagctggttg gtgaggtaac ggcccaccaa ggcgatgatg cgtagccgac 300
ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag 360
cagtagggaa ttttcgtcaa tgggggggaac cctgaacgag caatgccgcg tgtgtgaaga 420
aggtcttcgg atcgtaaagc actgttgtaa gtgaagaatg ccatatagag gaaatgctat 480
gtgggtgacg gtagcttacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat 540
acgtaggtgg caagcgttat ccggaatcat tgggcgtaaa gggtgcgtag gtggcacgat 600
aagtctgaag taaaaggcaa cagctcaact gttgtatgct ttggaaactg tcgagctaga 660
gtgcagaaga gggcgatgga attccatgtg tagcggtaaa atgcgtagat atatggagga 720
acaccagtgg cgaaggcggt cgcctggtct gtaactgaca ctgatgcacg aaagcgtggg 780
gagcaaatag gattagatac cctagtagtc cacgccgtaa acgatgagaa ctaagtgttg 840
gagagattca gtgctgcagt taacgcaata agttctccgc ctggggagta tgcacgcaag 900
tgtgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagtatgt ggtttaattc 960
gaagcaacgc gaagaacctt accaggcctt gacatggata taaatgttct agagatagaa 1020
agatagctat atatcacaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1080
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtcttctgtt accagcatta agttggggac 1140
tcaggagaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc 1200
cccttatggc ctgggctaca cacgtactac aatggcgcct acaaagagca gcgacaccgc 1260
gaggtggagc gaatctcata aagggcgtct cagttcggat tgaagtctgc aactcgactt 1320
catgaagtcg gaatcgctag taatcgcaga tcagcatgct gcggtgaata cgttctcggg 1380
ccttgtacac accgcccgtc aaaccatggg agttggtaat acccgaagcc ggtggcataa 1440
ccgcaaggag tgagccgtcg aaggtaggac cgatgactgg ggttaagtcg taacaaggta 1500
tccctacggg aacgtgggga tggatcacct ccttt 1535
<210> 8
<211> 1530
<212> DNA
<213> Blautia sp.
<400> 8
tcagagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60
gagcgaagca cttaagtgga tctcttcgga ttgaaactta tttgactgag cggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcctcata cagggggata acagttagaa atggctgcta 180

ataccgcata agcgcacagg accgcatggt ctggtgtgaa aaactccggt ggtatgagat 240
ggacccgcgt ctgattagct agttggaggg gtaacggccc accaaggcga cgatcagtag 300
ccggcctgag agggtgaacg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cacaatgggg gaaaccctga tgcagcgacg ccgcgtgaag 420
gaagaagtat ctcggtatgt aaacttctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact 480
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggaagagc aagtctgatg tgaaaggctg 600
gggcttaacc ccaggactgc attggaaact gtttttctag agtgccggag aggtaagcgg 660
aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cttactggac ggtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggtggcaaa gccattcggt 840
gccgcagcaa acgcaataag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 900
aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac caagtcttga catccctctg accggcccgt aacggggcct tcccttcggg 1020
gcagaggaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc ctatccttag tagccagcag gtagagctgg gcactctagg 1140
gagactgccg gggataaccc ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta 1200
tgatttgggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgaga cagcgatgtt 1260
gagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggactgcagt ctgcaactcg actgcacgaa 1320
gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt 1380
acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcagtgac ccaaccttac 1440
aggagggagc tgccgaaggc gggaccgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530

<210> 9
<211> 1528
<212> DNA
<213> Barnesiella intestinihominis
<400> 9

cgaagagttt gatcctggct caggatgaac gctagcgaca ggcctaacac atgcaagtcg 60
aggggcagcg gagaggtagc aataccttg ccggcgaccg gcgcacgggt gagtaacacg 120
tatgcaatcc acctgtaaca gggggataac ccggagaaat ccggactaat accccataat 180
atgggcgctc cgcatggaga gtccattaaa gagagcaatt ttggttacag acgagcatgc 240
gctccattag ccagttggcg gggtaacggc ccaccaaagc gacgatggat aggggttctg 300
agaggaaggt cccccacatt ggaactgaga cacggtccaa actcctacgg gaggcagcag 360
tgaggaatat tggtcaatgg tcggcagact gaaccagcca agtcgcgtga gggaagacgg 420
ccctacgggt tgtaaacctc ttttgtcgga gagtaaagta cgctacgtgt agtgtattgc 480
aagtatccga agaaaaagca tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga 540
tgcgagcgtt atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcacg ccaagtcagc 600
ggtgaaattt ccgggctcaa cccggactgt gccgttgaaa ctggcgagct agagtgcaca 660

agaggcaggc ggaatgcgtg gtgtagcggt gaaatgcata gatatcacgc agaaccccga 720
ttgcgaaggc agcctgctag ggtgcgacag acgctgaggc acgaaagcgt gggtatcgaa 780
caggattaga taccctggta gtccacgcag taaacgatga atactaactg tttgcgatac 840
aatgtaagcg gtacagcgaa agcgttaagt attccacctg gggagtacgc cggcaacggt 900
gaaactcaaa ggaattgacg gggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat 960
gatacgcgag gaaccttacc cgggctcaaa cgcaggggga atgccggtga aagtcggcag 1020
ctagcaatag tcacctgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc 1080
ggcttaagtg ccataacgag cgcaacccct atggacagtt actaacgggt gaagccgagg 1140
actctgtcta gactgccggc gcaagccgcg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcagcac 1200
ggcccttacg tccggggcga cacacgtgtt acaatggcag gtacagaagg cagccagtca 1260
gcaatgacgc gcgaatcccg aaaacctgtc tcagttcgga ttggagtctg caacccgact 1320
ccatgaagct ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg 1380
ggccttgtac acaccgcccg tcaagccatg gaagccggga gtacctgaag catgcaaccg 1440
caaggagcgt acgaaggtaa taccggtaac tggggctaag tcgtaacaag gtagccgtac 1500
cggaaggtgc ggctggaaca cctccttt 1528

<210> 10
<211> 1525
<212> DNA
<213> Alistipes timonensis
<400> 10

atggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctagcggc aggcctaaca catgcaagtc 60
gaggggcagc gggattgaag cttgcttcaa tcgccggcga ccggcgcacg ggtgcgtaac 120
gcgtatgcaa cctacccaga acaggggggat aacactgaga aattggtact aatatcccat 180
aacatcataa ggggcatccc ttttggttga aaactccggt ggttctggat gggcatgcgt 240
tgtattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa cgatacatag ggggactgag 300
aggttaaccc cccacattgg tactgagaca cggaccaaac tcctacggga ggcagcagtg 360
aggaatattg gtcaatggac gcaagtctga accagccatg ccgcgtgcag gaagacggct 420
ctatgagttg taaactgctt ttgtactagg gtaaactcag atacgtgtat ctgactgaaa 480
gtatagtacg aataaggatc ggctaactcc gtgccagcag ccgcggtaat acggaggatt 540
caagcgttat ccggatttat tgggtttaaa gggtgcgtag gcggtttgat aagttagagg 600
tgaaataccg gtgcttaaca ccggaactgc ctctaatact gttgagctag agagtagttg 660
cggtaggcgg aatgtatggt gtagcggtga aatgcttaga gatcatacag aacaccgatt 720
gcgaaggcag cttaccaaac tatatctgac gttgaggcac gaaagcgtgg ggagcaaaca 780
ggattagata ccctggtagt ccacgcagta aacgatgata actcgctgtc ggcgatacac 840
agtcggtggc taagcgaaag cgataagtta tccacctggg gagtacgttc gcaagaatga 900
aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggaggaa catgtggttt aattcgatga 960
tacgcgagga accttacccg ggcttgaaag ttagtgacgg atctggaaac aggtcttccc 1020
ttcggggcgc gaaactaggt gctgcatggt tgtcgtcagc tcgtgccgtg aggtgtcggg 1080
ttaagtccca taacgagcgc aacccctacc gttagttgcc atcaggtcaa gctgggcact 1140

ctgacgggac tgccggtgta agccgagagg aaggtgggga tgacgtcaaa tcagcacggc 1200
ccttacgtcc ggggccacac acgtgttaca atggtaggta cagagggcag ctacccagcg 1260
atgggatgcg aatctcgaaa gcctatctca gttcggatcg gaggctgaaa cccgcctccg 1320
tgaagttgga ttcgctagta atcgcgcatc agccatggcg cggtgaatac gttcccgggc 1380
cttgtacaca ccgcccgtca agccatggaa gctgggggtg cctgaagttc gtgaccgcaa 1440
ggagcgacct agggcaaaac cggtgactgg ggctaagtcg taacaaggta gccgtaccgg 1500
aaggtgcggc tggaacacct ccttt 1525

<210> 11
<211> 1528
<212> DNA
<213> Blautia sp.
<400> 11

tcagagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60
gagcgaagca cttgccattg actcttcgga agatttggca tttgactgag cggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcctcata caggggaata acagttagaa atggctgcta 180
atgccgcata agcgcacagg accgcatggt ctggtgtgaa aaactgaggt ggtatgagat 240
gggcccgcgt ctgattaggt agttggcggg gtaacggccc accaagccga cgatcagtag 300
ccgacctgag agggtgaccg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cacaatggag gaaactctga tgcagcgacg ccgcgtgaag 420
gaagaagtat ctcggtatgt aaacttctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact 480
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggacgggc aagtctgatg tgaaagcccg 600
gggcttaacc ccgggactgc attggaaact gtccatcttg agtgccggag aggtaagcgg 660
aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cttactggac ggtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggttgcaaa gcaatccggt 840
gccgcagcaa acgcagtaag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 900
aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac caagtcttga catctgcctg accgttcctt aaccggaact ttccttcggg 1020
acaggcaaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc ctgtccttag tagccagcag tccggctggg cactctaggg 1140
agactgccgg ggataacccg gaggaaggcg gggacgacgt caaatcatca tgccccttat 1200
gatttgggct acacacgtgc tacaatggcg taaacaaagg gaagcggagt ggtgacactg 1260
agcaaatctc aaaaataacg tcccagttcg gactgcagtc tgcaactcga ctgcacgaag 1320
ctggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta 1380
cacaccgccc gtcacaccat gggagtcagt aacgcccgaa gtcagtgacc taaccgcaag 1440
ggaggagctg ccgaaggcgg gaccgataac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgtat 1500
cggaaggtgc ggctggatca cctccttt 1528

<210> 12

<211> 1530
<212> DNA
<213> Lachnospira sp.
<400> 12
ttatgagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt 60
cgaacgaagc atttaagacg gattctttcg ggatgaagac ttttatgact gagtggcgga 120
cgggtgagta acgcgtgggt aacctgcctc acacaggggg atagcagttg gaaacggctg 180
ataataccgc ataagcgcac agtaccgcat ggtacagtgt gaaaaactcc ggtggtgtga 240
gatggacccg cgtctgatta gcttgttggc agggtaacgg cctaccaagg caacgatcag 300
tagccgacct gagagggtga ccggccacat tgggactgag acacggccca gactcctacg 360
ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg gaggaaactc tgatgcagcg acgccgcgtg 420
agtgaagaag taattcgtta tgtaaagctc tatcagcagg gaagatagtg acggtacctg 480
actaagaagc tccggctaaa tacgtgccag cagccgcggt aatacgtatg gagcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaagggagtg taggtggcat cacaagtcag aagtgaaagc 600
ccggggctca accccgggac tgcttttgaa actgtggagc tggagtgcag gagaggcaag 660
tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg aggaacacca gtggcgaagg 720
cggcttgctg gactgtaact gacactgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt gtcggggctc ataagagctt 840
cggtgccgca gcaaacgcaa taagtattcc acctggggag tacgttcgca agaatgaaac 900
tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac 960
gcgaagaacc ttaccaagtc ttgacatcct cttgaccggt cagtaatgtg acctttтctt 1020
cggaacaaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
taagtcccgc aacgagcgca acccctattc ttagtagcca gcatttaagg tgggcactct 1140
aggaagactg ccagggataa cctggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1200
ttatgacttg ggctacacac gtgctacaat ggcgtaaaca aagtgaagcg agagtgtgag 1260
cttaagcaaa tcacaaaaat aacgtctcag ttcggattgt agtctgcaac tcgactacat 1320
gaagctggaa tcgctagtaa tcgcgaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt tcccgggtct 1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt cggaaatgcc cgaagtcggt gacctaacga 1440
aagaaggagc cgccgaaggc aggtctgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530
<210> 13
<211> 1507
<212> DNA
<213> Ruminococcus callidus
<400> 13
taaagagttt gatcctggct caggacgaac gctggcggca cgcttaacac atgcaagtcg 60
aacggagaat atcgaagctt gctttgatat tcttagtggc ggacgggtga gtaacacgtg 120
agtaacctgc ctctgagagt gggatagctt ctggaaacgg atggtaatac cgcatgaaat 180
catagtatcg catggtacaa tgatcaaaga tttatcgctc agagatggac tcgcgtctga 240

ttagctagtt ggtaaggtaa cggcttacca aggcgacgat cagtagccgg actgagaggt 300
tgatcggcca cattgggact gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga 360
atattgcaca atgggggaaa ccctgatgca gcgatgccgc gtggaggaag aaggttttcg 420
gattgtaaac tcctgttgaa gaggacgata atgacggtac tcttttagaa agctccggct 480
aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt agggagcgag cgttgtccgg aattactggg 540
tgtaaaggga gcgtaggcgg gacggcaagt cagatgtgaa aactatgggc tcaacccata 600
gactgcattt gaaactgttg ttcttgagtg aggtagaggt aagcggaatt cctggtgtag 660
cggtgaaatg cgtagagatc aggaggaaca tcggtggcga aggcggctta ctgggccttt 720
actgacgctg aggctcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac 780
gccgtaaacg atgattacta ggtgtggggg gactgacccc ttccgtgccg cagttaacac 840
aataagtaat ccacctgggg agtacggccg caaggttgaa actcaaagga attgacgggg 900
gcccgcacaa gcagtggagt atgtggttta attcgaagca acgcgaagaa ccttaccagg 960
tcttgacatc gagtgacgta cctagagata ggtattttct tcggaacaca aagacaggtg 1020
gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca 1080
acccttacca ttagttgcta cgcaagagca ctctaatggg actgccgttg acaaaacgga 1140
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtacta 1200
caatggcaat ataacagagg gaagcaatac agcgatgtgg agcaaatccc caaaaattgt 1260
cccagttcag attgcaggct gcaactcgcc tgcatgaagt cggaattgct agtaatcgca 1320
gatcagcatg ctgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg tcacaccatg 1380
ggagtcggta acacccaaag ccggtcgtct aaccttcggg aggacgccgt ctaaggtggg 1440
attgatgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc ggaaggtgcg gctggatcac 1500
ctccttt 1507

<210> 14
<211> 1530
<212> DNA
<213> Roseburia faecis
<400> 14

atgagagttt gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg 60
aacgaagcac tctatttgat tttcttcgga aatgaagatt ttgtgactga gtggcggacg 120
ggtgagtaac gcgtgggtaa cctgcctcat acaggggat aacagttgga aacgactgct 180
aataccgcat aagcgcacag gatcgcatgg tccggtgtga aaaactccgg tggtatgaga 240
tggacccgcg tctgattagc cagttggcag ggtaacggcc taccaaagcg acgatcagta 300
gccgacctga gagggtgacc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctcctacggg 360
aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgac gccgcgtgag 420
cgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaagaatga cggtacctga 480
ctaagaagca ccggctaaat acgtgccagc agccgcggta atacgtatgg tgcaagcgtt 540
atccggattt actgggtgta aagggagcgc aggcggtgcg gcaagtctga tgtgaaagcc 600
cggggctcaa ccccggtact gcattggaaa ctgtcgtact agagtgtcgg aggggtaagt 660
ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gatattagga ggaacaccag tggcgaaggc 720

ggcttactgg acgataactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgccg taaacgatga atactaggtg tcggggagca ttgctcttcg 840
gtgccgcagc aaacgcaata agtattccac ctggggagta cgttcgcaag aatgaaactc 900
aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accaagtctt gacatcccga tgacagagta tgtaatgtac tttctcttcg 1020
gagcatcggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccctgttctt agtagccagc ggttcggccg ggcactctag 1140
ggagactgcc agggataacc tggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgcccctt 1200
atgacttggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcgga gccgtgaggc 1260
cgagcaaatc tcaaaaataa cgtctcagtt cggactgtag tctgcaaccc gactacacga 1320
agctggaatc gctagtaatc gcagatcaga atgctgcggt gaatacgttc ccgggtcttg 1380
tacacaccgc ccgtcacacc atgggagttg gaaatgcccg aagtcagtga cccaaccgca 1440
aggagggagc tgccgaaggc aggttcgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530

<210> 15
<211> 1473
<212> DNA
<213> Faecalibacterium prausnitzii
<400> 15

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgcgc ctaacacatg caagtcgaac 60
gagagagagg gagcttgctt ccttgatcga gtggcgaacg ggtgagtaac gcgtgaggaa 120
cctgcctcaa agagggggac aacagttgga aacgactgct aataccgcat aagcccacga 180
cccggcatcg ggaagaggga aaaggagcaa tccgctttga gatggcctcg cgtccgatta 240
gctagttggt gaggtaacgg cccaccaagc gacgatcggt agccggactg agaggttgaa 300
cggccacatt gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat 360
tgcacaatgg gggaaaccct gatgcagcga cgccgcgtgg aggaagaagg tcttcggatt 420
gtaaactcct gttgttgagg aagataatga cggtactcaa caaggaagtg acggctaact 480
acgtgccagc agccgcggta aaacgtaggt cacaagcgtt gtccggaatt actgggtgta 540
aagggagcgc aggcgggcga tcaagttgga agtgaaatcc atgggctcaa cccatgaact 600
gctttcaaaa ctggtcgtct tgagtagtgc agaggtaggc ggaattcccg gtgtagcggt 660
ggaatgcgta gatatcggga ggaacaccag tggcgaaggc ggcctactgg gcaccaactg 720
acgctgaggc tcgaaagtgt gggtagcaaa caggattaga taccctggta gtccacaccg 780
taaacgatga ttactaggtg ttgggagatt gaccctctca gtgccgcagt taacacaata 840
agtaatccac ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc aaaggaattg acgggggccc 900
gcacaagcag tggagtatgt ggtttaattc gacgcaacgc gaagaacctt accaagtctt 960
gacatccctt gacgatgctg gaaacagtat ttctcttcgg agcaaggaga caggtggtgc 1020
atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcaaccc 1080
ttatggtcag ttactacgca agaggactct ggccagactg ccgttgacaa aacggaggaa 1140
ggtggggatg acgtcaaatc atcatgccct ttatgacttg ggctacacac gtactacaat 1200

ggcgttaaac aaagagaagc aagaccgcga ggtggagcaa aactcagaaa caacgtccca 1260
gttcggactg caggctgcaa ctcgcctgca cgaagtcgga attgctagta atcgtggatc 1320
agcatgccac ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac cgcccgtcac accatgagag 1380
ccgggggggac ccgaagtcgg tagtctaacc gcaaggagga cgccgccgaa ggtaaaactg 1440
gtgattgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgt 1473

<210> 16
<211> 1539
<212> DNA
<213> Alistipes obesi
<400> 16

atggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctagcggc aggcttaaca catgcaagtc 60
gaggggcagc ataatggtag taatactatt gatggcgacc ggcggacggg tgcgtaacgc 120
gtatgcaacc tacccтttac agggggataa cactgagaaa tcggtactaa taccccataa 180
tattctggga ggcatctttc ggagttgaaa gctttggtgg taaaggatgg gcatgcgttg 240
tattagctag ttggtaaggt aacggcttac caaggcgacg atacataggg ggactgagag 300
gttaaccccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag 360
gaatattggt caatggacgg aagtctgaac cagccatgcc gcgtgcagga agacggctct 420
atgagttgta aactgctttt gtacgagggt aaacgcagat acgtgtatct gcctgaaagt 480
atcgtacgaa taaggatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatac ggaggatcca 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggc ggtttagtaa gtcagcggtg 600
aaattttggt gcttaacacc aaacgtgccg ttgatactgc tgggctagag agtagttgcg 660
gtaggcggaa tgtatggtgt agcggtgaaa tgcttagaga tcatacagaa caccgattgc 720
gaaggcagct taccaaacta tatctgacgt tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgatagc tcgttgtcgg cgatacacag 840
tcggtgacta agagaaatcg ataagctatc cacctgggga gtacgttcgc aagaatgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata 960
cgcgaggaac cttacccggg cttgaaagtt actgacgatt ctggaaacag gatttccctt 1020
cggggcagga aactaggtgc tgcatggttg tcgtcagctc gtgccgtgag gtgtcgggtt 1080
aagtcccata acgagcgcaa cccctactga tagttgccat cagagcgttt gagcgatcaa 1140
acaagctggg cactctatcg ggactgccgg tgtaagccga gaggaaggtg gggatgacgt 1200
caaatcagca cggcccttac gtccggggcg acacacgtgt tacaatggta ggtacagagg 1260
gcagccaccc agtgatgggg agcgaatctc gaaagcctat ctcagttcgg attggaggct 1320
gaaactcgcc tccatgaagt tggattcgct agtaatcgcg catcagccat ggcgcggtga 1380
atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcaagccat gggagttggg ggtgcctgaa 1440
gttcgtgacc gaaaggagcg acctagggca aaaccgatga ctggggctaa gtcgtaacaa 1500
ggtagccgta ccggaaggtg cggctggaac acctccttt 1539

<210> 17
<211> 1525
<212> DNA

<213> Butyricicoccus sp.

<400> 17

tttagagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt 60
cgaacggagt tattttggaa atctcttcgg agatggaatt cataacttag tggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgagcaat ctgcccttag gtgggggata acagccggaa acggctgcta 180
ataccgcata acacattgaa gccgcatggt tttgatgtca aagatttatt gcctttggat 240
gagctcgcgt ctgattagct ggttggcggg gtaacggccc accaaggcga cgatcagtag 300
ccggactgag aggttgaacg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cgcaatgggg gaaaccctga cgcagcaacg ccgcgtgatt 420
gaagaaggcc ttcgggttgt aaagatcttt aattggggac gaaaaatgac ggtacccaaa 480
gaataagctc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgtta 540
tccggattta ctgggtgtaa agggcgagta ggcgggctgg caagttggga gtgaaatccc 600
ggggcttaac cccggaactg ctttcaaaac tgctggtctt gagtgatgga gaggcaggcg 660
gaattccgtg tgtagcggtg aaatgcgtag atatacggag gaacaccagt ggcgaaggcg 720
gcctgctgga cattaactga cgctgaggag cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat 780
accctggtag tccacgccgt aaacgatgga tactaggtgt gggaggtatt gacccttcc 840
gtgccggagt taacacaata agtatcccac ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc 900
aaaggaattg acgggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accaggtctt gacatccctc tgaccgccct agagataggg tttcccttcg 1020
gggcagaggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccttacggtt agttgatacg caagatcact ctagccggac 1140
tgccgttgac aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc 1200
tgggctacac acgtactaca atggcagtca tacagaggga agcaaaacag tgatgtggag 1260
caaatcccta aaagctgtcc cagttcagat tgcaggctgc aactcgcctg catgaagtcg 1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaat acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag 1440
ggcgcggccg aaggtaggac tggtaattag ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg 1500
aaggtgcggc tggatcacct ccttt 1525

<210> 18

<211> 1506

<212> DNA

<213> Gordonibacter urolithinfaciens

<400> 18

acggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaaca catgcaagtc 60
gaacggttaa ggcgccttcg ggcgcgaata gagtggcgaa cgggtgagta acacgtgacc 120
aacctgcccc cctccccggg ataacgcgag gaaacccgcg ctaataccgg atactccgcc 180
cctcccgcat gggaggggcg ggaaagcccc gacggagggg gatggggtcg cggcccatta 240
ggtagacggc gaggcaacgg cccaccgtgc ctgcgatggg tagccgggtt gagagaccga 300
ccggccacat tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt 360

ttgcgcaatg gggggaaccc tgacgcagca acgccgcgtg cgggacgaag gccttcgggt 420
tgtaaaccgc tttcagcagg gaagaagttg acggtacctg cagaagaagc cccggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcgagcgt tatccggatt cattgggcgt 540
aaagcgcgcg taggcggccc gtcaagcgga acctctaacc cgagggctca acccccggcc 600
gggttccgaa ctggcaggct cgagtttggt agaggaagat ggaattcccg gtgtagcggt 660
ggaatgcgca gatatcggga agaacaccga tggcgaaggc agtcttctgg gccatcaact 720
gacgctgagg cgcgaaagct gggggagcga acaggattag ataccctggt agtcccagcc 780
gtaaacgatg ggtgctaggt gtgggggggat catccctccg tgccgcagcc aacgcattaa 840
gcaccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg 900
cacaagcagc ggagcatgtg gcttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccagggcttg 960
acatgctggt gaagccgggg aaacccggtg gccgagagga gccagcgcag gtggtgcatg 1020
gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccctg 1080
ccatatgttg ccagcattca gttggggact catatgggac tgccggcgtc aagccggagg 1140
aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatgcc ctttatgccc tgggctgcac acgtgctaca 1200
atggccggta caacgggccg cgacctggcg acaggaagcg aatccctcaa agccggcccc 1260
agttcggatc ggaggctgca acccgcctcc gtgaagtcgg agttgctagt aatcgcggat 1320
cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacccga 1380
gtcgtctgca cccgaagccg ccggccgaac ccgcaagggg cggaggcgtc gaaggtgtgg 1440
agggtaaggg gggtgaagtc gtaacaaggt agccgtaccg gaaggtgcgg ctggatcacc 1500
tccttt 1506

<210> 19
<211> 1528
<212> DNA
<213> Blautia sp.
<400> 19

tcagagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60
gagcgaagca cttgccattg actcttcgga agatttggca tttgactgag cggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcctcata caggggaata acagttagaa atggctgcta 180
atgccgcata agcgcacagg accgcatggt ctggtgtgaa aaactgaggt ggtatgagat 240
gggcccgcgt ctgattaggt agttggcggg gtaacggccc accaagccga cgatcagtag 300
ccgacctgag agggtgaccg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cacaatggag gaaactctga tgcagcgacg ccgcgtgaag 420
gaagaagtat ctcggtatgt aaacttctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact 480
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggacgggc aagtctgatg tgaaagcccg 600
gggcttaacc ccgggactgc attggaaact gtccatcttg agtgccggag aggtaagcgg 660
aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cttactggac ggtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggttgcaaa gcaatccggt 840

gccgcagcaa acgcagtaag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 900
aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac caagtcttga catctgcctg accgttcctt aaccggaact ttccttcggg 1020
acaggcaaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc ctgtccttag tagccagcag tccggctggg cactctaggg 1140
agactgccgg ggataacccg gaggaaggcg gggacgacgt caaatcatca tgccccttat 1200
gatttgggct acacacgtgc tacaatggcg taaacaaagg gaagcggagt ggtgacactg 1260
agcaaatctc aaaaataacg tcccagttcg gactgcagtc tgcaactcga ctgcacgaag 1320
ctggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta 1380
cacaccgccc gtcacaccat gggagtcagt aacgcccgaa gtcagtgacc taaccgcaag 1440
ggaggagctg ccgaaggcgg gaccgataac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgtat 1500
cggaaggtgc ggctggatca cctccttt 1528

<210> 20
<211> 1530
<212> DNA
<213> Lachnospira sp.
<400> 20

ttatgagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt 60
cgaacgaagc atttaagacg gattctttcg ggatgaagac ttttatgact gagtggcgga 120
cgggtgagta acgcgtgggt aacctgcctc acacaggggg atagcagttg gaaacggctg 180
ataataccgc ataagcgcac agtaccgcat ggtacagtgt gaaaaactcc ggtggtgtga 240
gatggacccg cgtctgatta gcttgttggc agggtaacgg cctaccaagg caacgatcag 300
tagccgacct gagagggtga ccggccacat tgggactgag acacggccca gactcctacg 360
ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg gaggaaactc tgatgcagcg acgccgcgtg 420
agtgaagaag taattcgtta tgtaaagctc tatcagcagg gaagatagtg acggtacctg 480
actaagaagc tccggctaaa tacgtgccag cagccgcggt aatacgtatg gagcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaagggagtg taggtggcat cacaagtcag aagtgaaagc 600
ccggggctca accccgggac tgctttgaa actgtggagc tggagtgcag gagaggcaag 660
tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg aggaacacca gtggcgaagg 720
cggcttgctg gactgtaact gacactgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt gtcggggctc ataagagctt 840
cggtgccgca gcaaacgcaa taagtattcc acctggggag tacgttcgca agaatgaaac 900
tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac 960
gcgaagaacc ttaccaagtc ttgacatcct cttgcccggt cagtaatgtg acctttctt 1020
cggaacaaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
taagtcccgc aacgagcgca acccctattc ttagtagcca gcatataagg tgggcactct 1140
aggaagactg ccagggataa cctggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1200
ttatgacttg ggctacacac gtgctacaat ggcgtaaaca aagtgaagcg agagtgtgag 1260
cttaagcaaa tcacaaaaat aacgtctcag ttcggattgt agtctgcaac tcgactacat 1320

gaagctggaa tcgctagtaa tcgcgaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt tcccgggtct 1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt cggaaatgcc cgaagtcggt gacctaacga 1440
aagaaggagc cgccgaaggc aggtctgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530

<210> 21
<211> 1527
<212> DNA
<213> Eisenbergiella sp.
<221> misc_feature
<223> R=A或G, Y=C或T
<400> 21

agagagtttg atcctggctc aggatgaacg ctggcggcgt gcctaacaca tgcaagtcga 60
acggagttat gcagaggaag ttttcggatg gaatcggcgt aacttagtgg cggacgggtg 120
agtaacgcgt gggaaacctg ccctgtaccg ggggataaca cttagaaata ggtgctaata 180
ccgcataagc gcacagcttc acatgargca gtgtgaaaaa ctccggtggt acaggatggt 240
cccgcgtctg attagccagt tggcagggta ayggcctacc aaagcgacga tcagtagccg 300
gcctgagagg gtgaacggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc tacgggaggc 360
agcagtgggg aatattgcac aatgggggaa accctgatgc agcgacgccg cgtgagtgaa 420
gaagtatttc ggtatgtaaa gctctatcag cagggaagaa aatgacggta cctgactaag 480
aagccccggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg tagggggcaa gcgttatccg 540
gatttactgg gtgtaaaggg agcgtagacg gcatgacaag ccagatgtga aaacccaggg 600
ctcaaccctg ggactgcatt tggaactgcc aggctggagt gcaggagagg taagcggaat 660
tcctagtgta gcggtgaaat gcgtagatat taggaggaac accagtggcg aaggcggctt 720
actggactgt aactgacgtt gaggctcgaa agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc 780
tggtagtcca cgcggtaaac gatgattgct aggtgtaggt gggtatggac ccatcggtgc 840
cgcagctaac gcaataagca atccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg aaactcaaag 900
gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag 960
aaccttacca agtcttgaca tcccaatgac gtgtccgtaa cggggcattc tcttcggagc 1020
attggagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc 1080
ccgcaacgag cgcaaccctt atccttagta gccagcaggt aragctgggc actctaggga 1140
gactgccggg gataacccgg aggaaggcgg ggaygacgtc aaatcatcat gccccttatg 1200
atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagaca gtgatgttga 1260
gcaaatccca gaaataacgt ctcagttcgg attgtagtct gcaactcgac tacatgaagc 1320
tggaatcgct agtaatcgcg aatcagcatg tcgcggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac 1380
acaccgcccg tcacaccatg ggagttggaa atgcccgaag cctgtgacct aaccgcaagg 1440
gaggagcagt cgaaggcagg tctaataact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc 1500
ggaaggtgcg gctggatcac ctccttt 1527

<210> 22
<211> 1525

<212> DNA
<213> Butyricicoccus sp.
<221> misc_feature
<223> W=A或 T
<400> 22
tttagagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcctaac acatgcaagt 60
cgaacggagt tattttggaa atctcttcgg ggatggaatt cataacttag tggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgagcaat ctgcccttag gtgggggata acagccggaa acggctgcta 180
ataccgcata acacattgaa gccgcatggt tttgatgtca aagatttatt gcctttggat 240
gagctcgcgt ctgattagct ggttggcggg gtaacggccc accaaggcga cgatcagtag 300
ccggactgag aggttgaacg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cgcaatgggg gaaaccctga cgcagcaacg ccgcgtgatt 420
gaagaaggcc ttcgggttgt aaagatcttt aattggggac gaawwwtgac ggtacccaaa 480
gaataagctc cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggga gcaagcgtta 540
tccggattta ctgggtgtaa agggcgagta ggcgggctgg caagttggga gtgaaatccc 600
ggggcttaac cccggaactg ctttcaaaac tgctggtctt gagtgatgga gaggcaggcg 660
gaattccgtg tgtagcggtg aaatgcgtag atatacggag gaacaccagt ggcgaaggcg 720
gcctgctgga cattaactga cgctgaggag cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat 780
accctggtag tccacgccgt aaacgatgga tactaggtgt gggaggtatt gaccccttcc 840
gtgccggagt taacacaata agtatcccac ctggggagta cggccgcaag gttgaaactc 900
aaaggaattg acgggggccc gcacaagcag tggagtatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accaggtctt gacatccctc tgaccgccct agagataggg tttcccttcg 1020
gggcagaggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccttacggtt agttgatacg aaagatcact ctagccggac 1140
tgccgttgac aaaacggagg aaggtgggga cgacgtcaaa tcatcatgcc ccttatgacc 1200
tgggctacac acgtactaca atggcagtca tacagaggga agcaaaacag tgatgtggag 1260
caaatcccta aaagctgtcc cagttcagat tgcaggctgc aactcgcctg catgaagtcg 1320
gaattgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac 1380
accgcccgtc acaccatgag agccggtaat acccgaagtc cgtagcctaa ccgcaaggag 1440
ggcgcggccg aaggtaggac tggtaattag ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg 1500
aaggtgcggc tggatcacct ccttt 1525
<210> 23
<211> 1506
<212> DNA
<213> Gordonibacter urolithinfaciens
<221> misc_feature
<223> R=A或G, Y=C或T
<400> 23
acggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaaca catgcaagtc 60

gaacggttaa ggcgccttcg ggcgcgaata gagtggcgaa cgggtgagta acacgtgacc 120
aacctgcccc cctccccggg ataacgcgag gaaacccgcg ctaataccgg atactccgcc 180
cctcccgcat gggaggggcg ggaaagcccc gacggagggg gatggggtcg cggcccatta 240
ggtagacggc ggggcaacgg cccaccgtgc ctgcgatggg tagccgggtt gagagaccga 300
ccggccacat tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt 360
ttgcgcaatg gggggaaccc tgacgcagca acgccgcgtg cgggacgaag gccttcgggt 420
tgtaaaccgc tttcagcagg gaagaagttg acggtacctg cagaagaagc cccggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gggcgagcgt tatccggatt cattgggcgt 540
aaagcgcgcg taggcggccc gtcaagcgga acctctaacc cgagggctca acccccggcc 600
gggttccgaa ctggcaggct cgagtttggt agaggaagat ggaattcccg gtgtagcggt 660
ggaatgcgca gatatcggga agaacaccga tggcgaaggc agtcttctgg gccatcaact 720
gacgctgagg cgcgaaagct gggggagcga acaggattag ataccctggt agtcccagcc 780
gtaaacgatg ggygctaggt gtgggggggat catccctccg tgccgcagcc aacgcattaa 840
gcrccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga cgggggcccg 900
cacaagcagc ggagcatgtg gcttaattcg aagcaacgcg aagaacctta ccagggcttg 960
acatgctggt gaagccgggg aaacccggtg gccgagagga gccagcgcag gtggtgcatg 1020
gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaacccctg 1080
ccatatgttg ccagcattca gttggggact catatgggac tgccggcgtc aagccggagg 1140
aaggtgggga cgacgtcaag tcatcatgcc ctttatgccc tgggctgcac acgtgctaca 1200
atggccggta caacgggccg cgacctggcg acaggaagcg aatccctcaa agccggcccc 1260
agttcggatc ggaggctgca acccgcctcc gtgaagtcgg agttgctagt aatcgcggat 1320
cagcatgccg cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca caccacccga 1380
gtcgtctgca cccgaagccg ccggccgaac ccgcaagggg cggaggcgtc gaaggtgtgg 1440
agggtaaggg gggtgaagtc gtaacaaggt agccgtaccg gaaggtgcgg ctggatcacc 1500
tccttt 1506

<210> 24
<211> 1535
<212> DNA
<213> Faecalitalea sp.
<400> 24

atggagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc atgcctaata catgcaagtc 60
gaacgaagtc tttaggaagc ttgcttccaa agagacttag tggcgaacgg gtgagtaaca 120
cgtaggtaac ctgcccatgt gcccgggata actgctggaa acggtagcta aaaccggata 180
ggtatgaggg aggcatcttc ctcatattaa agcaccttcg ggtgtgaaca tggatggacc 240
tgcggcgcat tagctggttg gtgaggtaac ggcccaccaa ggcgatgatg cgtagccgac 300
ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag 360
cagtagggaa ttttcgtcaa tgggggggaac cctgaacgag caatgccgcg tgtgtgaaga 420
aggtcttcgg atcgtaaagc actgttgtaa gtgaagaatg ccatatagag gaaatgctat 480
gtgggtgacg gtagcttacc agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat 540

acgtaggtgg caagcgttat ccggaatcat tgggcgtaaa gggtgcgtag gtggcacgat 600
aagtctgaag taaaaggcaa cagctcaact gttgtatgct ttggaaactg tcgagctaga 660
gtgcagaaga gggcgatgga attccatgtg tagcggtaaa atgcgtagat atatggagga 720
acaccagtgg cgaaggcggt cgcctggtct gtaactgaca ctgatgcacg aaagcgtggg 780
gagcaaatag gattagatac cctagtagtc cacgccgtaa acgatgagaa ctaagtgttg 840
gagagattca gtgctgcagt taacgcaata agttctccgc ctggggagta tgcacgcaag 900
tgtgaaactc aaaggaattg acgggggccc gcacaagcgg tggagtatgt ggtttaattc 960
gaagcaacgc gaagaacctt accaggcctt gacatggata taaatgttct agagatagaa 1020
agatagctat atatcacaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1080
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gtcttctgtt accagcatta agttggggac 1140
tcaggagaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc 1200
cccttatggc ctgggctaca cacgtactac aatggcgcct acaaagagca gcgacaccgc 1260
gaggtggagc gaatctcata aagggcgtct cagttcggat tgaagtctgc aactcgactt 1320
catgaagtcg gaatcgctag taatcgcaga tcagcatgct gcggtgaata cgttctcggg 1380
ccttgtacac accgcccgtc aaaccatggg agttggtaat acccgaagcc ggtggcataa 1440
ccgcaaggag tgagccgtcg aaggtaggac cgatgactgg ggttaagtcg taacaaggta 1500
tccctacggg aacgtgggga tggatcacct ccttt 1535

<210> 25
<211> 1530
<212> DNA
<213> Blautia sp.
<221> misc_feature
<223> M=A或C, R=A或 G, Y=C或T, K=G或 T, W=A或T
<400> 25

tcagagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60
gagcgaagcr cttrarygga tctcttcgga ttgaaryttw tktgactgag cggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcctcata cagggggata acagttagaa atggctgcta 180
ataccgcata agcgcacagg accgcatggt ctggtgtgaa aaactccggt ggtatgagat 240
ggacccgcgt ctgattagct agttggaggg gtaacggccc accaaggcga cgatcagtag 300
ccggcctgag agggtgaacg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cacaatgggg gaaaccctga tgcagcgacg ccgcgtgaag 420
gaagaagtat ctcggtatgt aaacttctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact 480
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggaagagc aagtctgatg tgaaaggctg 600
gggcttaacc ccaggactgc attggaaact gtttttctag agtgccggag aggtaagcgg 660
aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cttactggac ggtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggtggcaaa gccattcggt 840
gccgcagcaa acgcaataag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 900

aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac caagtcttga catccctctg accggcccgt aacggggcct tcccttcggg 1020
gcagaggaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc ctatccttag tagccagcag gtrragctgg gcactctagg 1140
gagactgccg gggataaccc ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta 1200
tgatttgggc tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaaag ggaagcgaga cagcgatgtt 1260
gagcaaatcc caaaaataac gtcccagttc ggactgcagt ctgcaactcg actgcacgaa 1320
gctggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt 1380
acacaccgcc cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcagtgac ccaaccttay 1440
aggagggagc tgccgaaggc gggaccgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530

<210> 26
<211> 1528
<212> DNA
<213> Barnesiella intestinihominis
<221> misc_feature
<223> R=A或G, Y=C或T
<400> 26

cgaagagttt gatcctggct caggatgaac gctagcgaca ggcctaacac atgcaagtcg 60
aggggcagcg grgaggyagc aataccttg ccggcgaccg gcgcacgggt gagtaacacg 120
tatgcaatcc acctgtaaca gggggataac ccggagaaat ccggactaat accccataat 180
atgggcgctc cgcatggagr gtccattaaa gagagcaatt ttggttacag acgagcatgc 240
gctccattag ccagttggcg gggtaacggc ccaccaaagc gacgatggat aggggttctg 300
agaggaaggt cccccacatt ggaactgaga cacggtccaa actcctacgg gaggcagcag 360
tgaggaatat tggtcaatgg tcggcagact gaaccagcca agtcgcgtga gggaagacgg 420
ccctacgggt tgtaaacctc ttttgtcgga gagtaaagtr cgctacgtgt agygtattgc 480
aagtatccga agaaaaagca tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga 540
tgcgagcgtt atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcacg ccaagtcagc 600
ggtgaaattt ccgggctcaa cccggactgt gccgttgaaa ctggcgagct agagtgcaca 660
agaggcaggc ggaatgcgtg gtgtagcggt gaaatgcata gatatcacgc agaacccga 720
ttgcgaaggc agcctgctag ggtgcgacag acgctgaggc acgaaagcgt gggtatcgaa 780
caggattaga taccctggta gtccacgcag taaacgatga atactaactg tttgcgatac 840
aatgtaagcg gtacagcgaa agcgttaagt attccacctg gggagtacgc cggcaacggt 900
gaaactcaaa ggaattgacg gggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat 960
gatacgcgag gaaccttacc cgggctcaaa cgcaggggga atgccggtga aagtcggcag 1020
ctagcaatag tcacctgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc 1080
ggcttaagtg ccataacgag cgcaacccct atggacagtt actaacgggt gaagccgagg 1140
actctgtcta gactgccggc gcaagccgcg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcagcac 1200
ggcccttacg tccggggcga cacacgtgtt acaatggcag gtacagaagg cagccagtca 1260

gcaatgacgc gcgaatcccg aaaacctgtc tcagttcgga ttggagtctg caacccgact 1320
ccatgaagct ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg 1380
ggccttgtac acaccgcccg tcaagccatg gaagccggga gtacctgaag catgcaaccg 1440
caaggagcgt acgaaggtaa taccggtaac tggggctaag tcgtaacaag gtagccgtac 1500
cggaaggtgc ggctggaaca cctccttt 1528

<210> 27
<211> 1528
<212> DNA
<213> Blautia sp.
<221> misc_feature
<223> M=A或C, R=A或G, Y=C或T, K=G或T, S=G或C
<400> 27
tcagagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcttaaca catgcaagtc 60
gagcgaagca cttryyattg amtcttcgga rgatttrgca tktgactgag cggcggacgg 120
gtgagtaacg cgtgggtaac ctgcctcata caggggaata acagttagaa atggctgcta 180
atgccgcata agcgcacagg rccgcatggt cyggtgtgaa aaactsmggt ggtatgagat 240
ggrcccgcgt ctgattaggt agttggcggg gtaacggccc accaagccga cgatcagtag 300
ccgacctgag agggtgaccg gccacattgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga 360
ggcagcagtg gggaatattg cacaatggag gaaactctga tgcagcgacg ccgcgtgaag 420
gaagaagtat ctcggtatgt aaacttctat cagcagggaa gaaaatgacg gtacctgact 480
aagaagcccc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggggg caagcgttat 540
ccggatttac tgggtgtaaa gggagcgtag acggacgggc aagtctgatg tgaaagcccg 600
gggcttaacc ccgggactgc attggaaact gtccatcttg agtgccggag aggtaagcgg 660
aattcctagt gtagcggtga aatgcgtaga tattaggagg aacaccagtg gcgaaggcgg 720
cttactggac ggtaactgac gttgaggctc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatgaat actaggtgtc gggttgcaaa gcaatccggt 840
gccgcagcaa acgcagtaag tattccacct ggggagtacg ttcgcaagaa tgaaactcaa 900
aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga 960
agaaccttac caagtcttga catctgcctg accgttcctt aaccggaact ttccttcggg 1020
acaggcaaga caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
tcccgcaacg agcgcaaccc ctgtccttag tagccagcag tccggctggg cactctaggg 1140
agactgccgg ggataacccg gaggaaggcg gggacgacgt caaatcatca tgccccttat 1200
gatttgggct acacacgtgc tacaatggcg taaacaaagg gaagcggagt ggtgacactg 1260
agcaaatctc aaaaataacg tcccagttcg gactgcagtc tgcaactcga ctgcacgaag 1320
ctggaatcgc tagtaatcgc gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggtcttgta 1380
cacaccgccc gtcacaccat gggagtcagt aacgcccgaa gtcagtgacc taaccgcaag 1440
ggaggagctg ccgaaggcgg gaccgataac tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgtat 1500
cggaaggtgc ggctggatca cctccttt 1528

<210> 28

<211> 1530
<212> DNA
<213> Lachnospira sp.
<221> misc_feature
<223> M=A或C, R=A或G, Y=C或T, W=A或T
<400> 28
ttatgagagt ttgatcctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt 60
cgaacgaagc atttgmgacr gattyyttcg grwtgaagac ttttatgact gagtggcgga 120
cgggtgagta acgcgtgggt aacctgcctc acacaggggg atagcagttg gaaacggctg 180
ataataccgc ataagcgcac agtaccgcat ggtacagtgt gaaaaactcc ggtggtgtga 240
gatggacccg cgtctgatta gcttgttggc rgggtaacgg ccyaccaagg caacgatcag 300
tagccgacct gagagggtga ccggccacat tgggactgag acacggccca gactcctacg 360
ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg gaggaaactc tgatgcagcg acgccgcgtg 420
agtgaagaag taattcgtta tgtaaagctc tatcagcagg gaagatagtg acggtacctg 480
actaagaagc tccggctaaa tacgtgccag cagccgcggt aatacgtatg gagcaagcgt 540
tatccggatt tactgggtgt aaagggagtg taggtggcat cacaagtcag aagtgaaagc 600
ccggggctca accccgggac tgcttttgaa actgtggagc tggagtgcag gagaggcaag 660
tggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg aggaacacca gtggcgaagg 720
cggcttgctg gactgtaact gacactgagg ctcgaaagcg tggggagcaa acaggattag 780
ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg aatactaggt gtcggggctc ataagagctt 840
cggtgccgca gcaaacgcaa taagtattcc acctggggag tacgttcgca agaatgaaac 900
tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac 960
gcgaagaacc ttaccaagtc ttgacatcct cttgrccggt cagtaatgtg rycttttctt 1020
cggaacaaga gtgacaggtg gtgcatggtt gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
taagtcccgc aacgagcgca acccctattc ttagtagcca gcatttaagr tgggcactct 1140
aggaagactg ccagggataa cctggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc 1200
ttatgacttg ggctacacac gtgctacaat ggcgtaaaca aagtgaagcg agagtgtgag 1260
cttaagcaaa tcacaaaaat aacgtctcag ttcggattgt agtctgcaac tcgactacat 1320
gaagctggaa tcgctagtaa tcgcgaatca gaatgtcgcg gtgaatacgt tcccgggtct 1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt cggaaatgcc cgaagtcggt gacctaacga 1440
aagaaggagc cgccgaaggc aggtctgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530
<210> 29
<211> 1530
<212> DNA
<213> Roseburia faecis
<221> misc_feature
<223> R=A或G, Y=C或T, S=G或C
<400> 29

atgagagttt gatcctggct caggatgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg 60
aacgaagcac tctatttgat tttcttcggr aatgaagatt ttgtgactga gtggcggacg 120
ggtgagtaac gcgtgggtaa cctgcctcat acagggggat aacagttgga aacgactgct 180
aataccgcat aagcgcacag gatygcatgr tccggtgtga aaaactccgg tggtatgrga 240
tggacccgcg tctgattagc cagttggcag ggtaacggcc taccaaagcg acgatcagta 300
gccgacctga gagggtgacc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctcctacggg 360
aggcagcagt ggggaatatt gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgac gccgcgtgag 420
cgaagaagta tttcggtatg taaagctcta tcagcaggga agaagaatga cggtacctga 480
ctaagaagca ccggctaaat acgtgccagc agccgcggta atacgtatgg tgcaagcgtt 540
atccggattt actgggtgta aagggagcgc aggcggtgcg gcaagtctga tgtgaaagcc 600
cggggctcaa ccccggtact gcattggaaa ctgtcgtact agagtgtcgg aggggtaagt 660
ggaattccta gtgtagcggt gaaatgcgta gatattagga ggaacaccag tggcgaaggc 720
ggcttactgg acgataactg acgctgaggc tcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgccg taaacgatga atactaggtg tcggggagca ttgctcttcg 840
gtgccgcagc aaacgcaata agtattccac ctggggagta cgttcgcaag aatgaaactc 900
aaaggaattg acggggaccc gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc 960
gaagaacctt accaagtctt gacatcccga tgacagagta tgtaatgtas yytcycttcg 1020
grgcatcggt gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080
agtcccgcaa cgagcgcaac ccctgtyctt agtagccagc ggttcggccg ggcactctag 1140
ggagactgcc agggataacc tggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgcccctt 1200
atgacttggg ctacacacgt gctacaatgg cgtaaacaaa gggaagcrra gccgtgaggc 1260
cgagcaaatc tcaaaaataa cgtctcagtt cggactgtag tctgcaaccc gactacacga 1320
agctggaatc gctagtaatc gcagatcaga atgctgcggt gaatacgttc ccgggtcttg 1380
tacacaccgc ccgtcacacc atgggagttg gaaatgcccg aagtcagtga cccaaccgca 1440
aggagggagc tgccgaaggc aggttcgata actggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
atcggaaggt gcggctggat cacctccttt 1530

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<223> 引物序列
<221> misc_feature
<223> M=A或C
<400> 30
agagtttgat ymtggctcag 20

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<223> 引物序列

<400> 31

acggytacct tgttacgact t 21

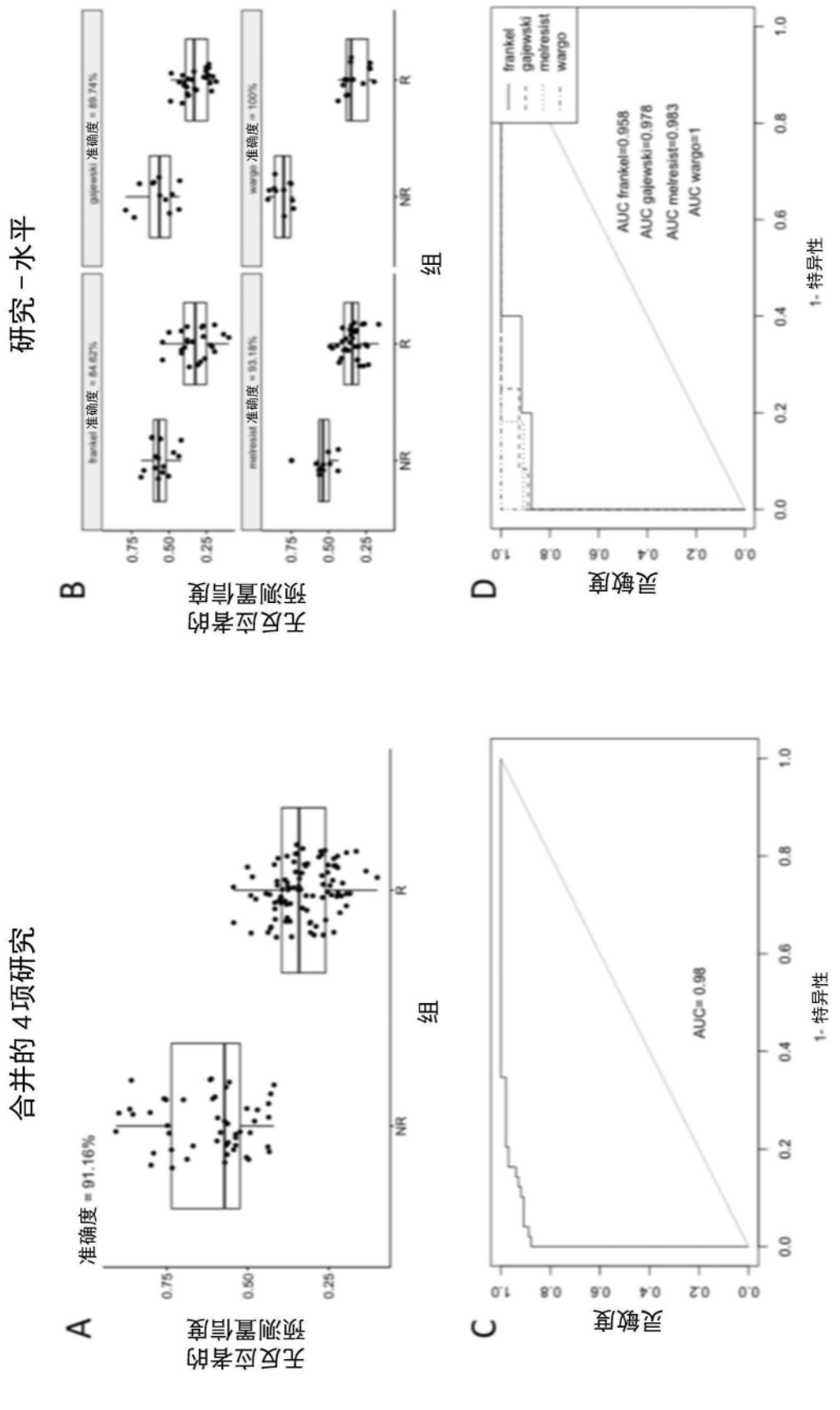

合并的 4 项研究
研究 - 水平
A
B
C
D
无反应者的预测置信度
组
NR
R
准确度 = 91.16%
frankel 准确度 = 84.62%
gajewski 准确度 = 89.74%
melresist 准确度 = 93.18%
wargo 准确度 = 100%
灵敏度
1- 特异性
AUC= 0.98
AUC frankel=0.958
AUC gajewski=0.978
AUC melresist=0.983
AUC wargo=1

图1

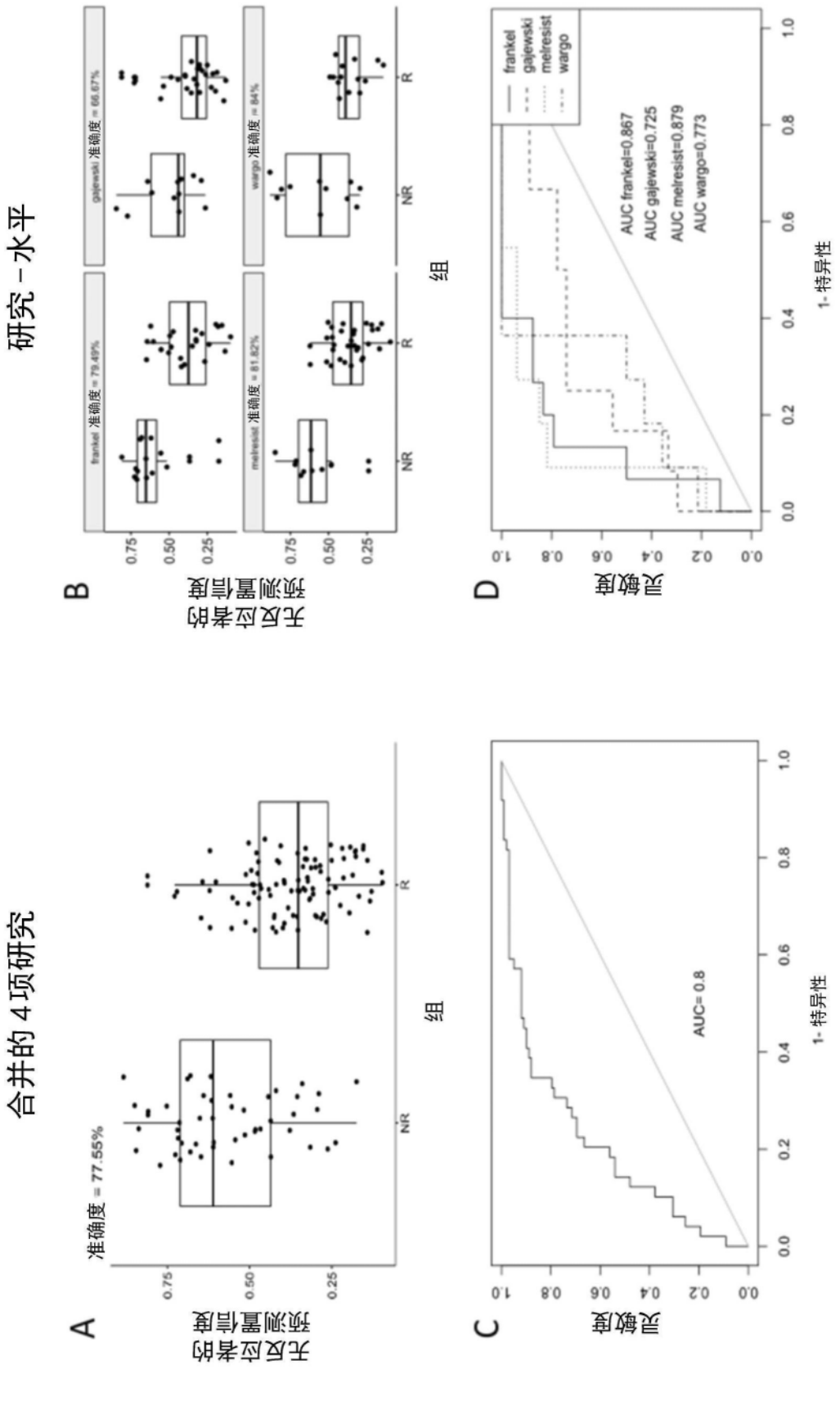

合并的 4 项研究
研究 - 水平
A
B
C
D
无反应者的预测置信度
准确度 = 77.55%
NR
R
组
frankel 准确度 = 79.49%
gajewski 准确度 = 66.67%
melresist 准确度 = 81.82%
wargo 准确度 = 84%
灵敏度
1- 特异性
AUC= 0.8
AUC frankel=0.867
AUC gajewski=0.725
AUC melresist=0.879
AUC wargo=0.773

图2

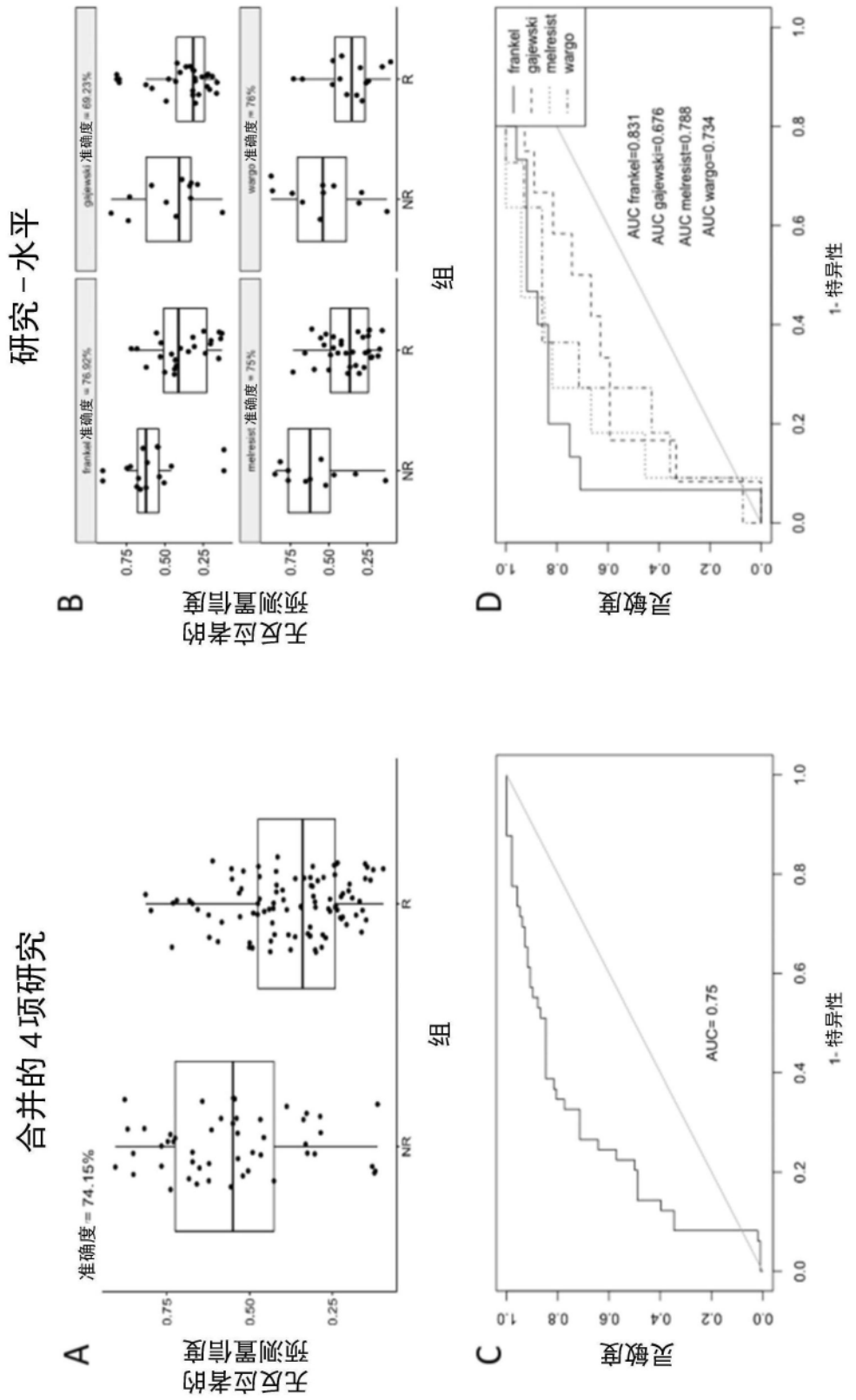

合并的 4 项研究
准确度 = 74.15%
无反应者的预测置信度
组
NR
R
A
C
AUC= 0.75
灵敏度
1- 特异性
研究 - 水平
frankel 准确度 = 76.92%
gajewski 准确度 = 69.23%
melresist 准确度 = 75%
wargo 准确度 = 76%
B
D
frankel
gajewski
melresist
wargo
AUC frankel=0.831
AUC gajewski=0.676
AUC melresist=0.788
AUC wargo=0.734

图3

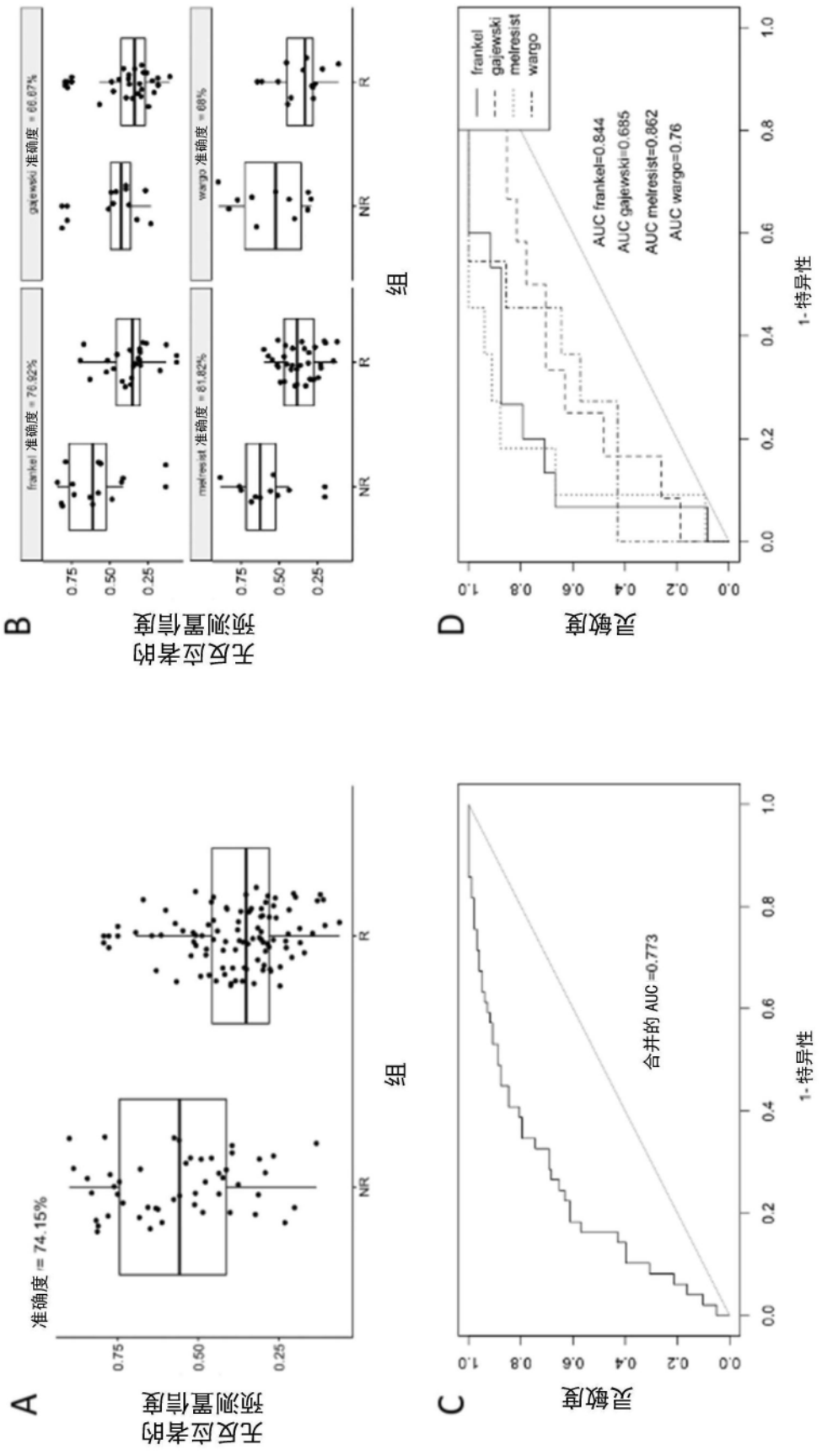

A
无反应者的预测置信度
准确度 = 74.15%
0.75
0.50
0.25
NR
R
组
B
无反应者的预测置信度
frankel 准确度 = 76.92%
gajewski 准确度 = 66.67%
melresist 准确度 = 61.82%
wargo 准确度 = 68%
0.75
0.50
0.25
NR
R
组
C
灵敏度
1- 特异性
合并的 AUC =0.773
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
D
灵敏度
1- 特异性
frankel
gajewski
melresist
wargo
AUC frankel=0.844
AUC gajewski=0.685
AUC melresist=0.862
AUC wargo=0.76
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

图4

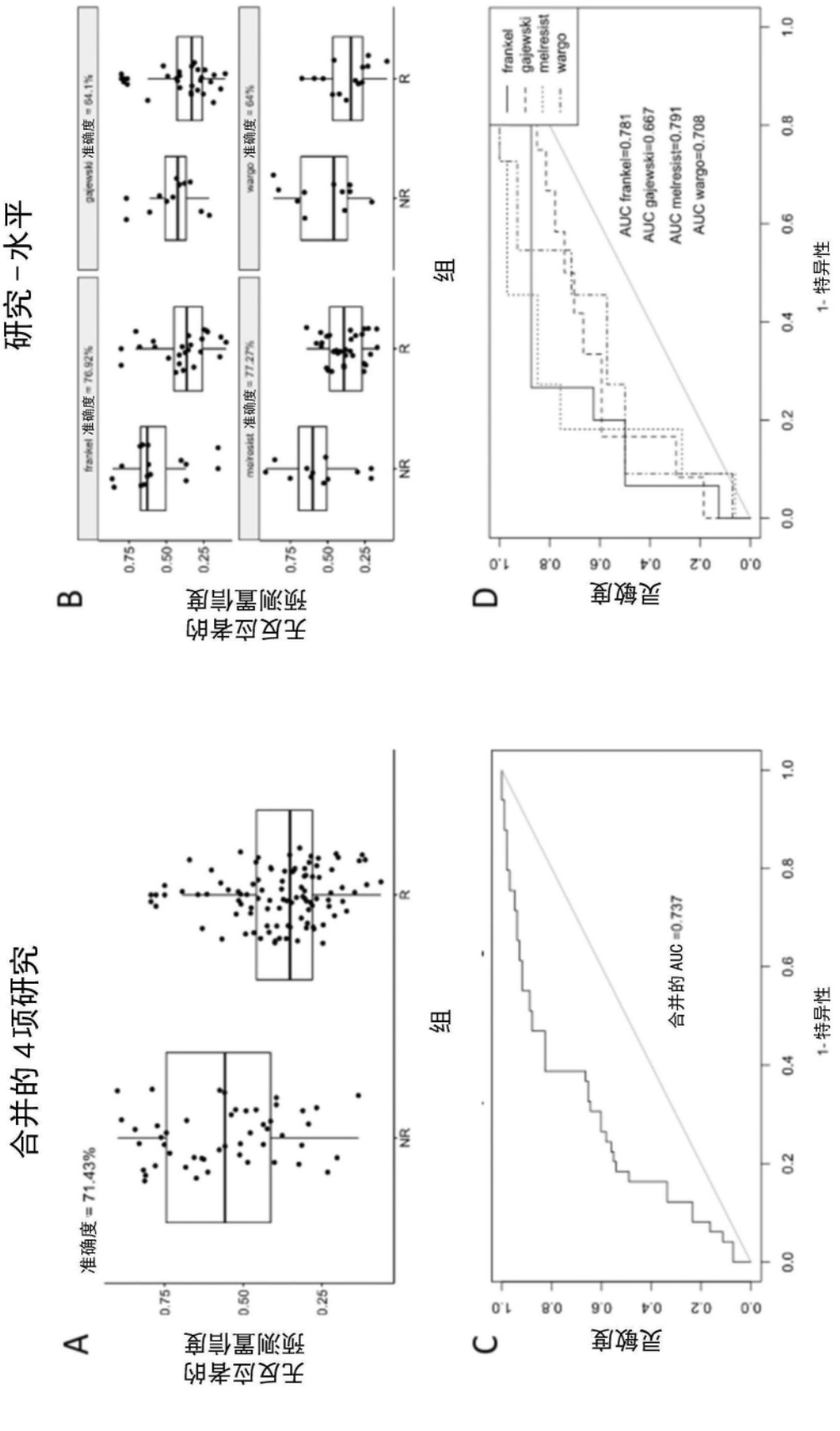

合并的 4 项研究
A
准确度 = 71.43%
无反应者的预测置信度
0.75
0.50
0.25
NR
R
组
C
灵敏度
合并的 AUC =0.737
1- 特异性
研究 - 水平
B
frankel 准确度 = 76.92%
gajewski 准确度 = 64.1%
meiresist 准确度 = 77.27%
wargo 准确度 = 64%
无反应者的预测置信度
组
D
灵敏度
frankel
gajewski
meiresist
wargo
AUC frankel=0.781
AUC gajewski=0.667
AUC meiresist=0.791
AUC wargo=0.708
1- 特异性

图5

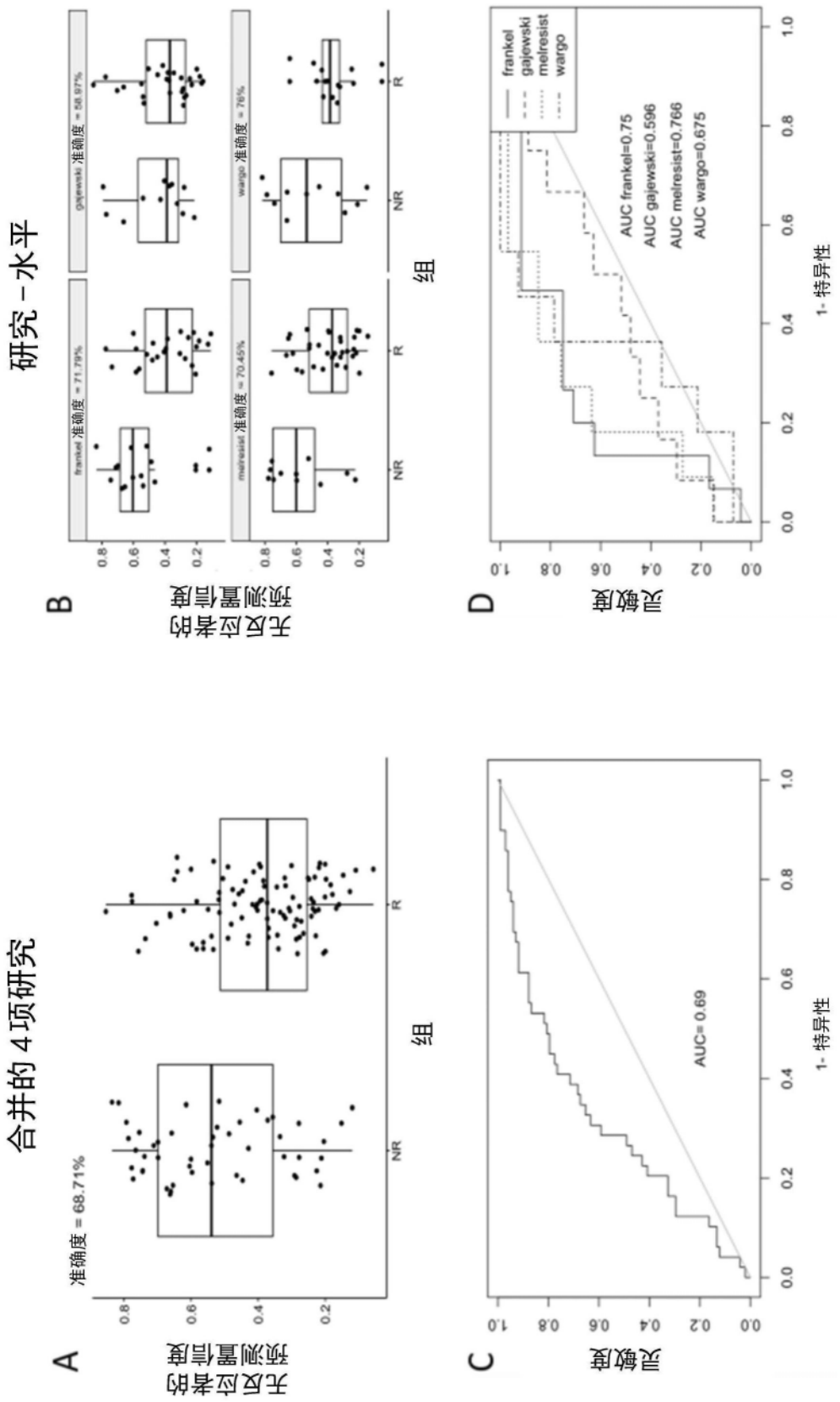

合并的 4 项研究
准确度 = 68.71%
无反应者的预测置信度
NR
R
组
A
AUC= 0.69
灵敏度
1- 特异性
C
研究 - 水平
frankel 准确度 = 71.79%
gajewski 准确度 = 58.97%
melresist 准确度 = 70.45%
wargo 准确度 = 76%
B
frankel
gajewski
melresist
wargo
AUC frankel=0.75
AUC gajewski=0.596
AUC melresist=0.766
AUC wargo=0.675
D

图6

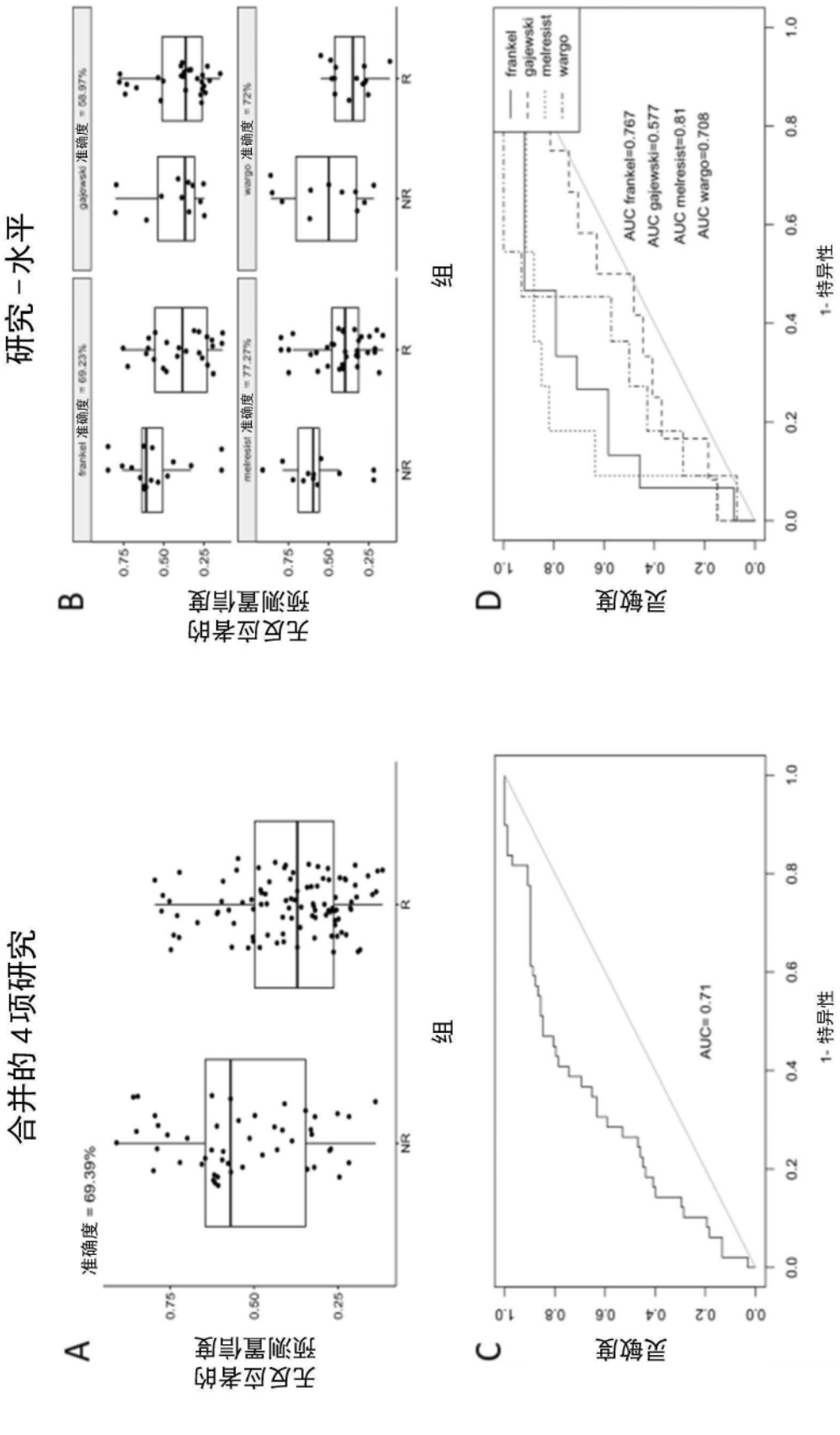

合并的 4 项研究
研究 - 水平
A
B
C
D
准确度 = 69.39%
frankel 准确度 = 69.23%
gajewski 准确度 = 58.97%
melresist 准确度 = 77.27%
wargo 准确度 = 72%
无反应者的预测置信度
组
NR
R
灵敏度
1- 特异性
AUC= 0.71
AUC frankel=0.767
AUC gajewski=0.577
AUC melresist=0.81
AUC wargo=0.708
frankel
gajewski
melresist
wargo

图7

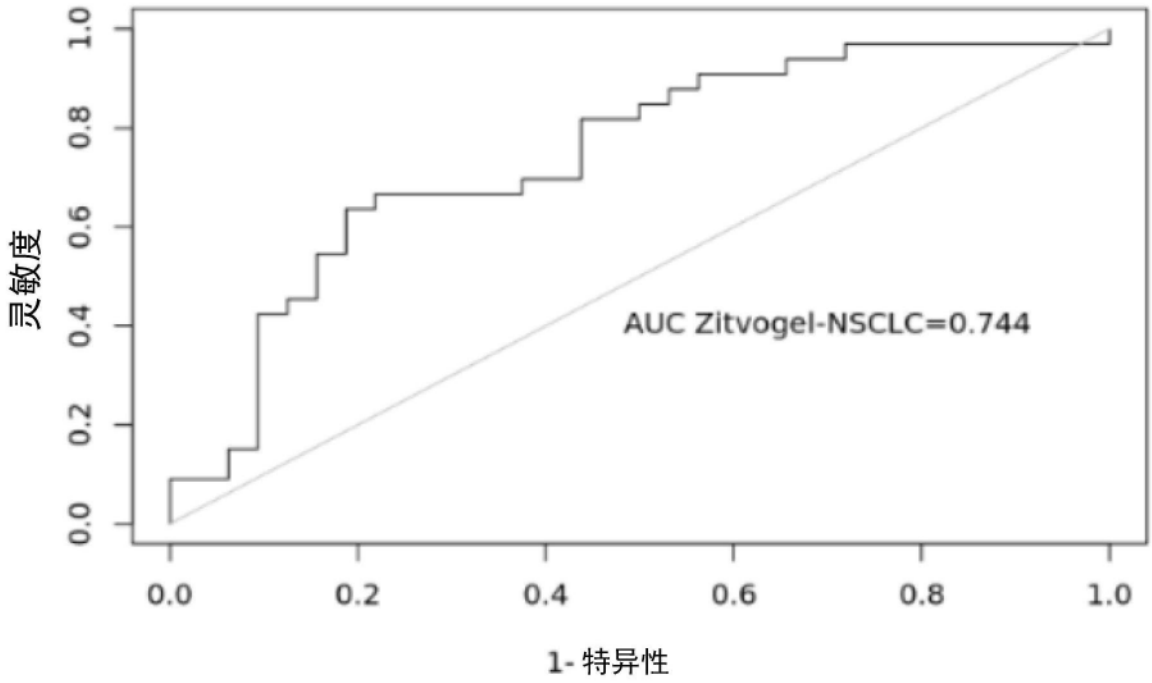


图8

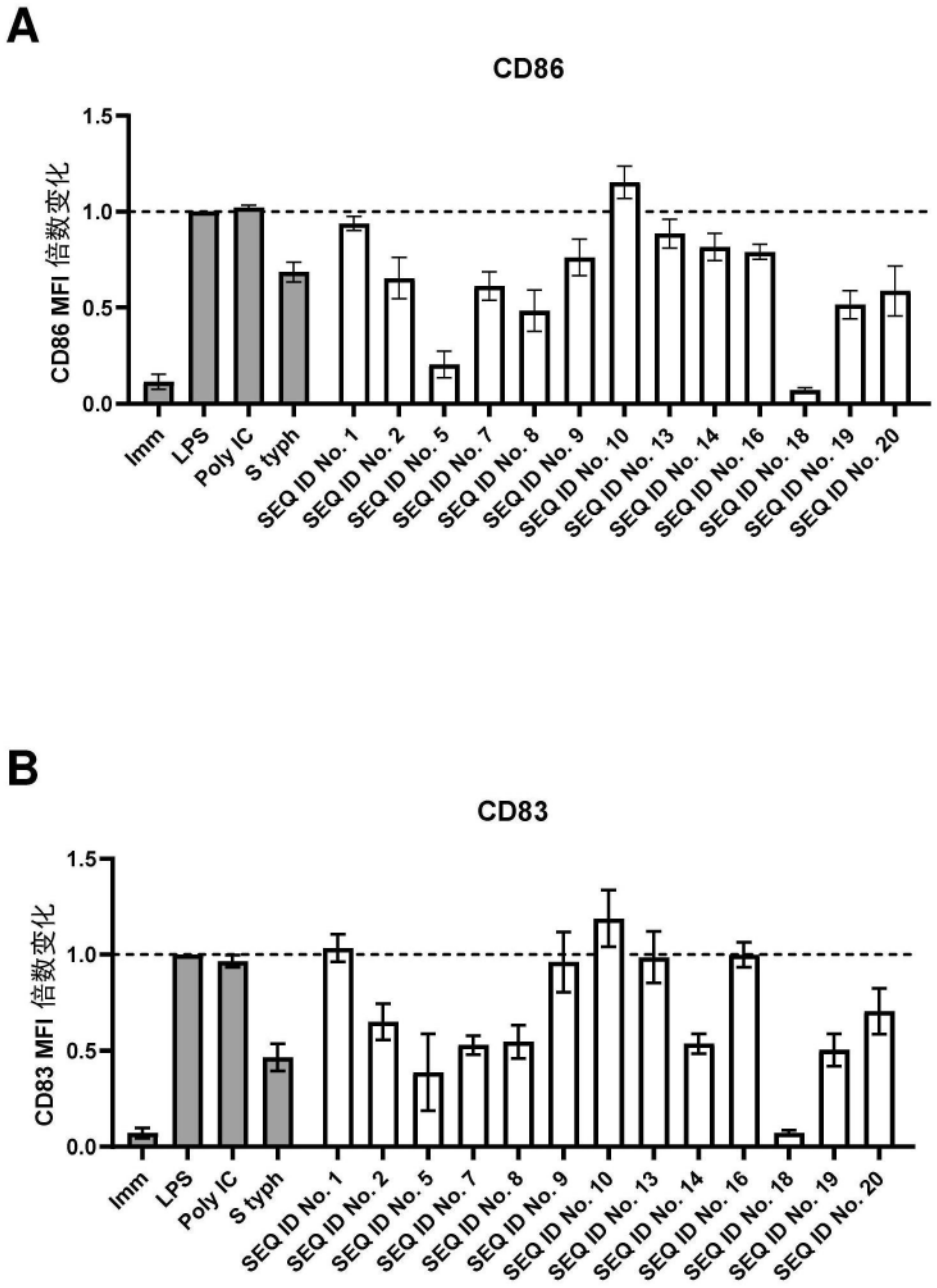
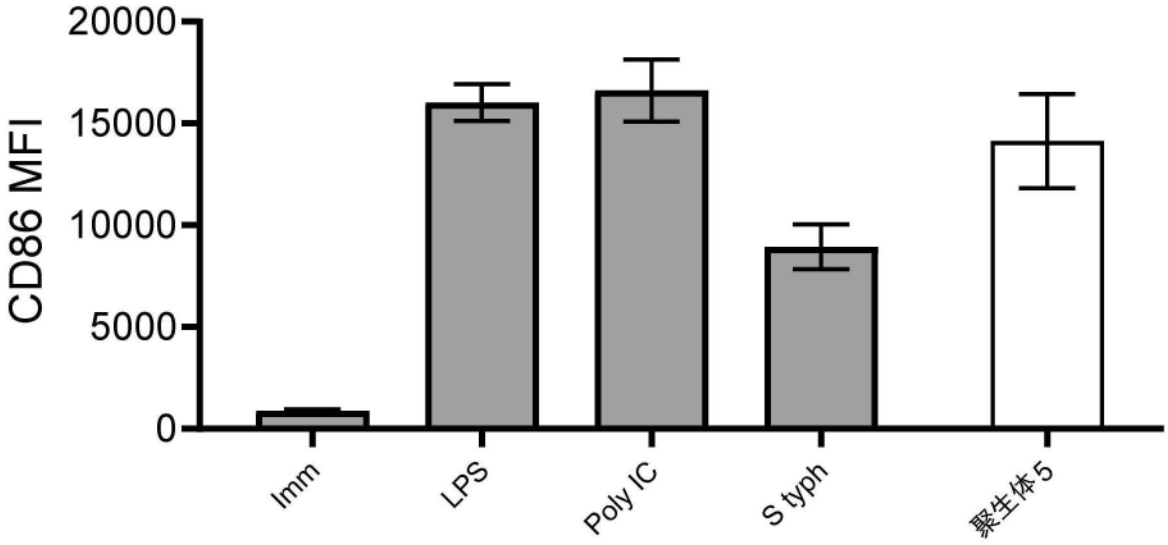

A
CD86
CD86 MFI 倍数变化
1.5
1.0
0.5
0.0
Imm
LPS
Poly IC
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 5
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 8
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 10
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 14
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 18
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20
B
CD83
CD83 MFI 倍数变化
1.5
1.0
0.5
0.0
Imm
LPS
Poly IC
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 5
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 8
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 10
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 14
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 18
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20

图9

C


20000
15000
10000
5000
0
CD86 MFI
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体5

D

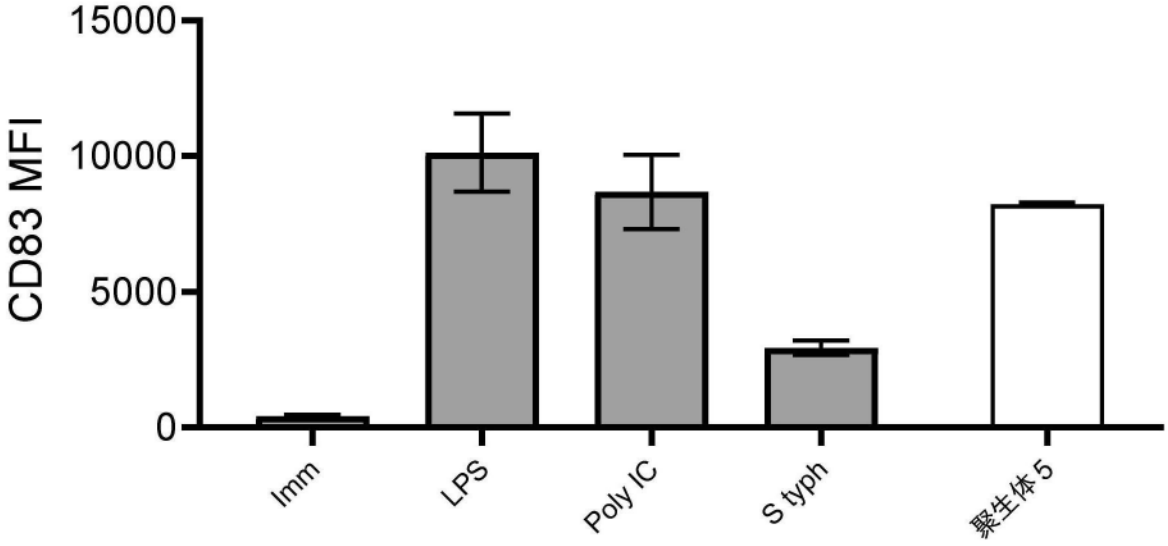

15000
10000
5000
0
CD83 MFI
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体5

图9

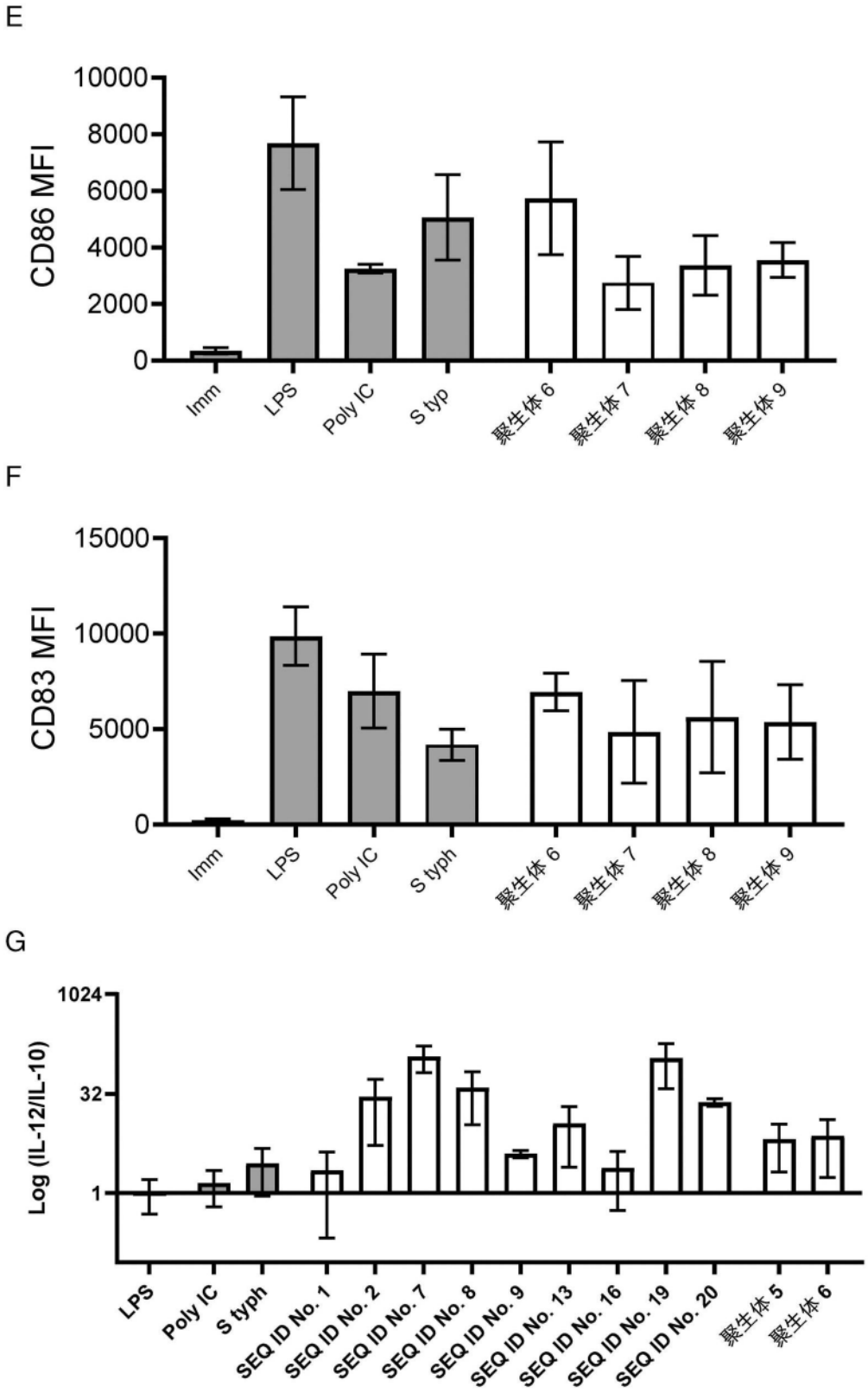

E
CD86 MFI
10000
8000
6000
4000
2000
0
Imm
LPS
Poly IC
S typ
聚生体 6
聚生体 7
聚生体 8
聚生体 9
F
CD83 MFI
15000
10000
5000
0
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 6
聚生体 7
聚生体 8
聚生体 9
G
Log (IL-12/IL-10)
1024
32
1
LPS
Poly IC
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 8
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20
聚生体 5
聚生体 6

图9

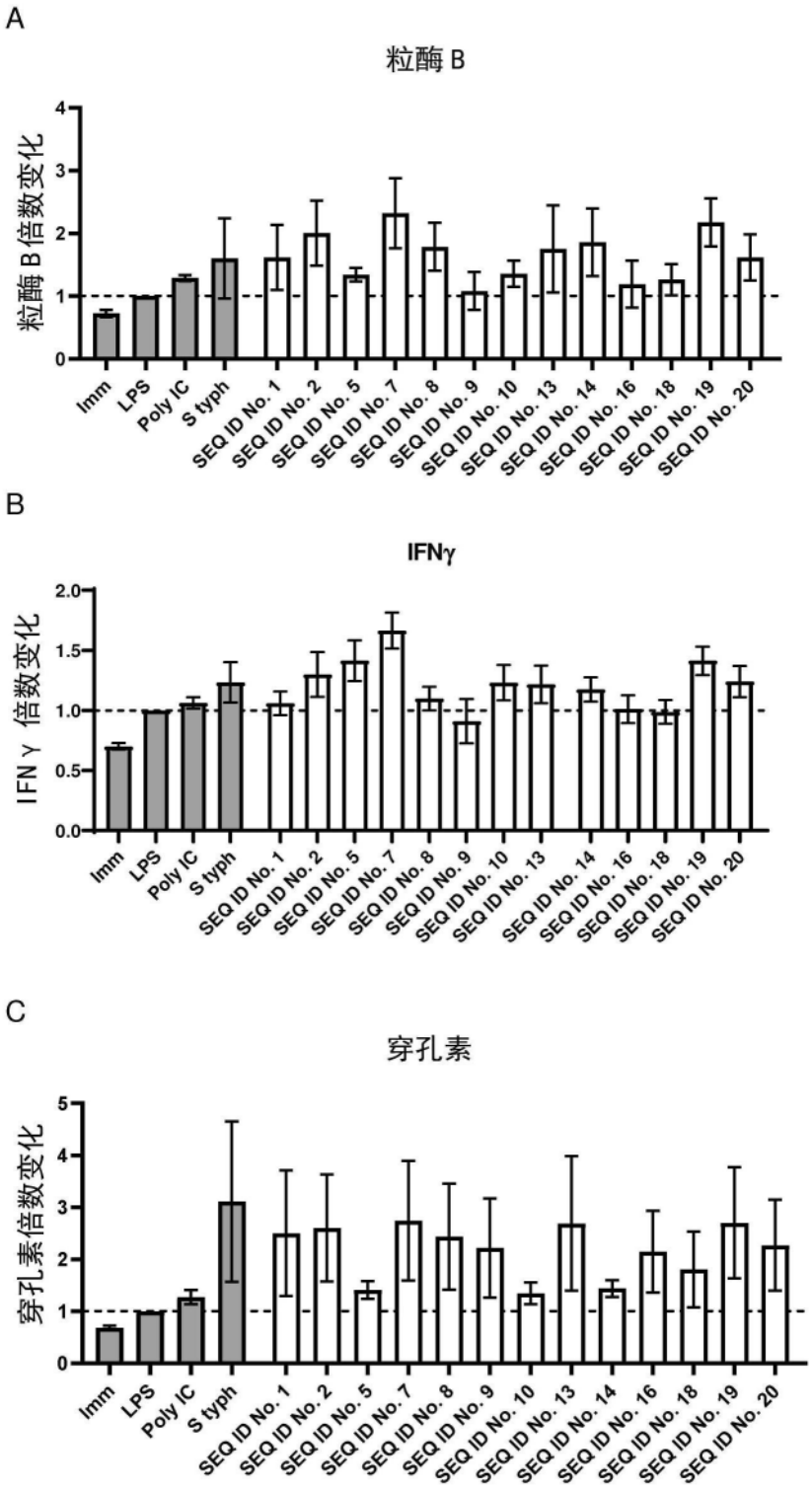

A
粒酶 B
粒酶 B 倍数变化
0
1
2
3
4
Imm
LPS
Poly IC
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 5
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 8
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 10
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 14
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 18
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20
B
IFNγ
IFN γ 倍数变化
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
C
穿孔素
穿孔素倍数变化
0
1
2
3
4
5

图10

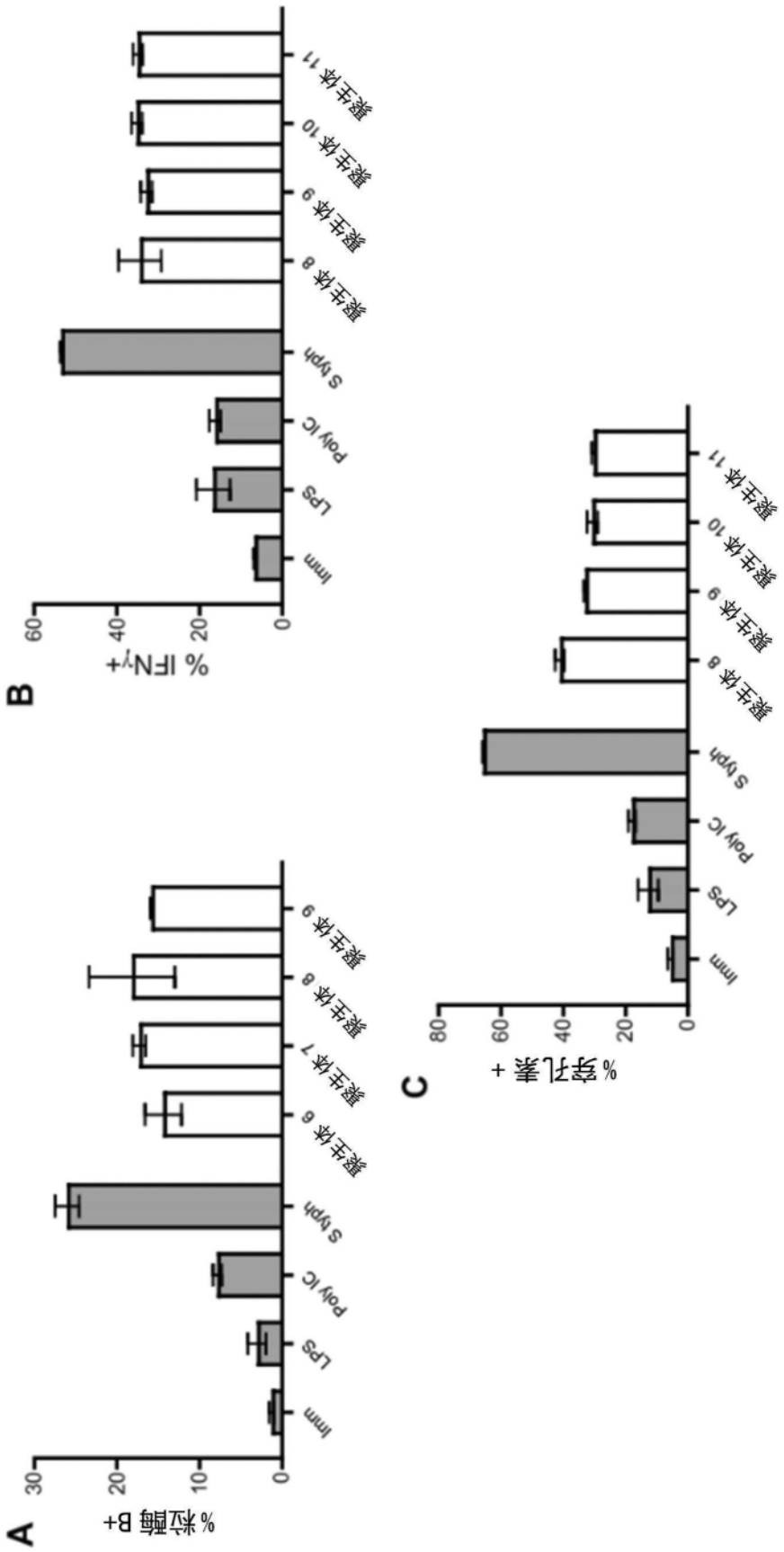

A
% 粒酶 B+
0
10
20
30
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 6
聚生体 7
聚生体 8
聚生体 9
B
% IFNγ+
0
20
40
60
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 8
聚生体 9
聚生体 10
聚生体 11
C
% 穿孔素 +
0
20
40
60
80
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 8
聚生体 9
聚生体 10
聚生体 11

图11

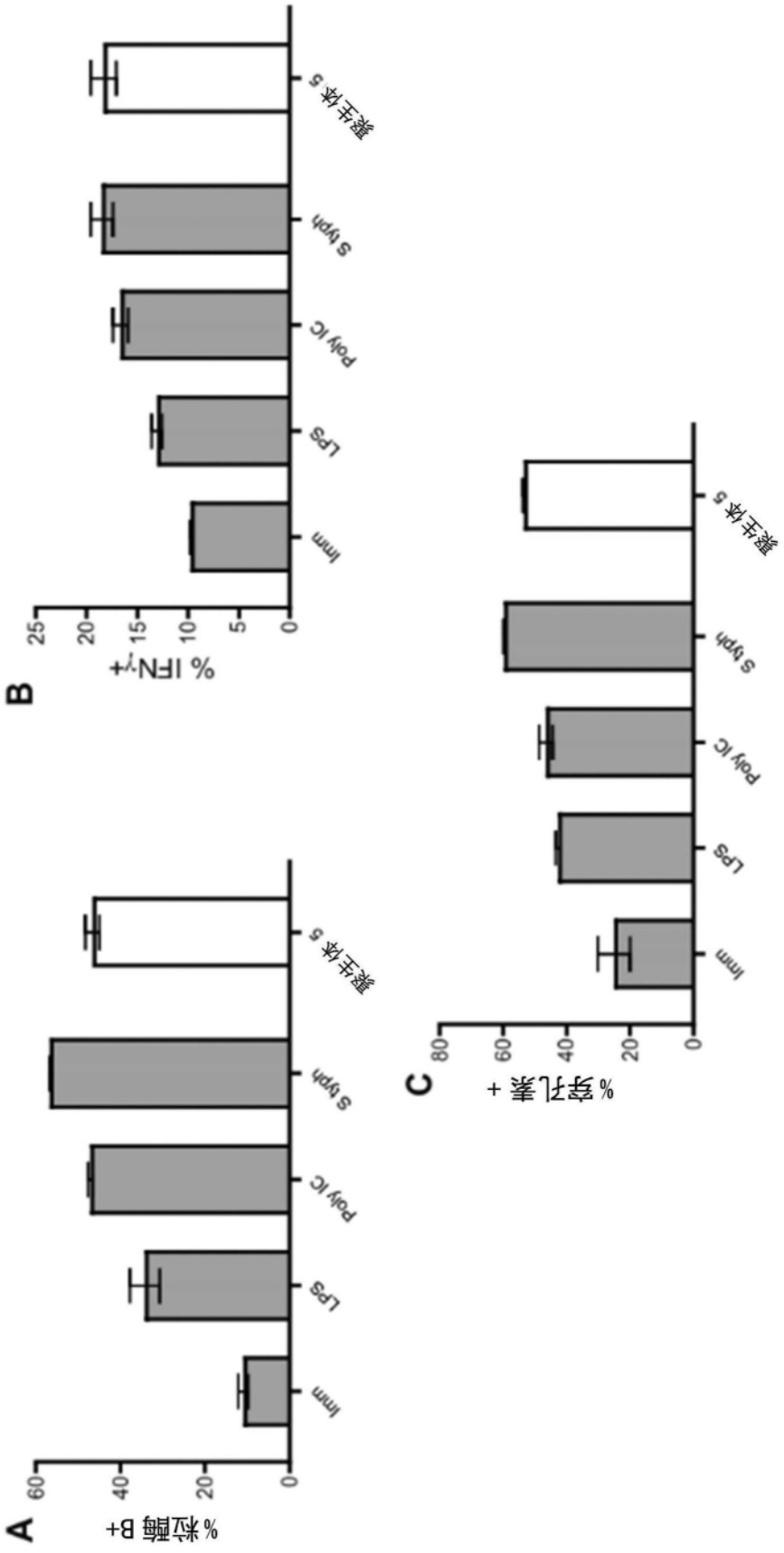

A
% 粒酶 B+
0
20
40
60
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 5
B
% IFNγ+
0
5
10
15
20
25
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 5
C
% 穿孔素 +
0
20
40
60
80
Imm
LPS
Poly IC
S typh
聚生体 5

图12

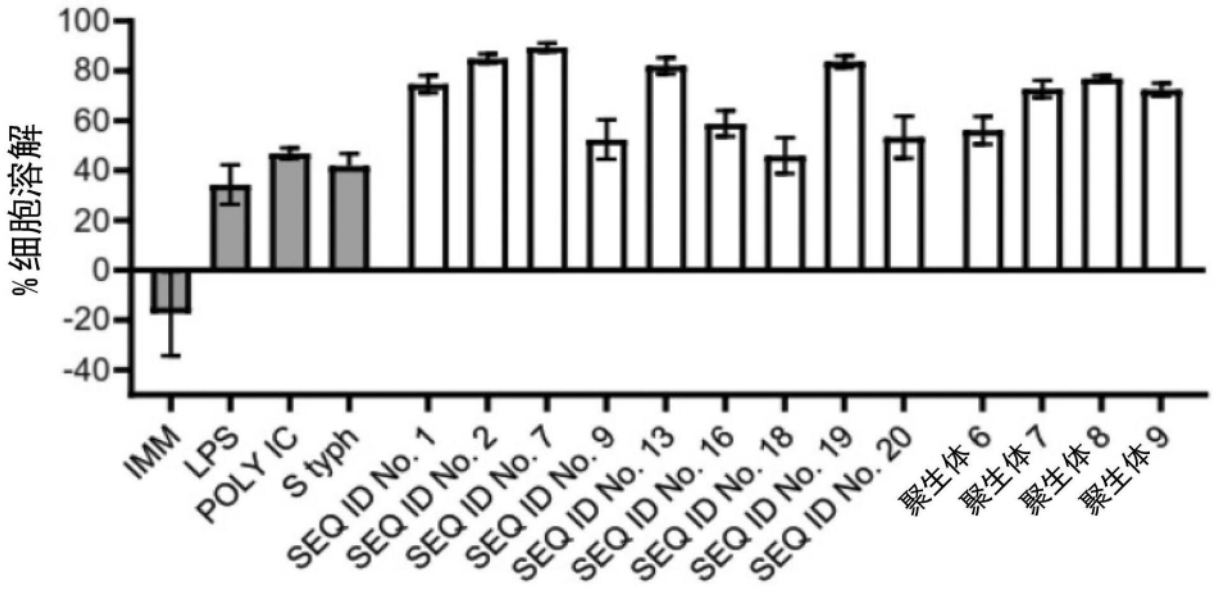

% 细胞溶解
100
80
60
40
20
0
-20
-40
IMM
LPS
POLY IC
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 18
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20
聚生体 6
聚生体 7
聚生体 8
聚生体 9

图13

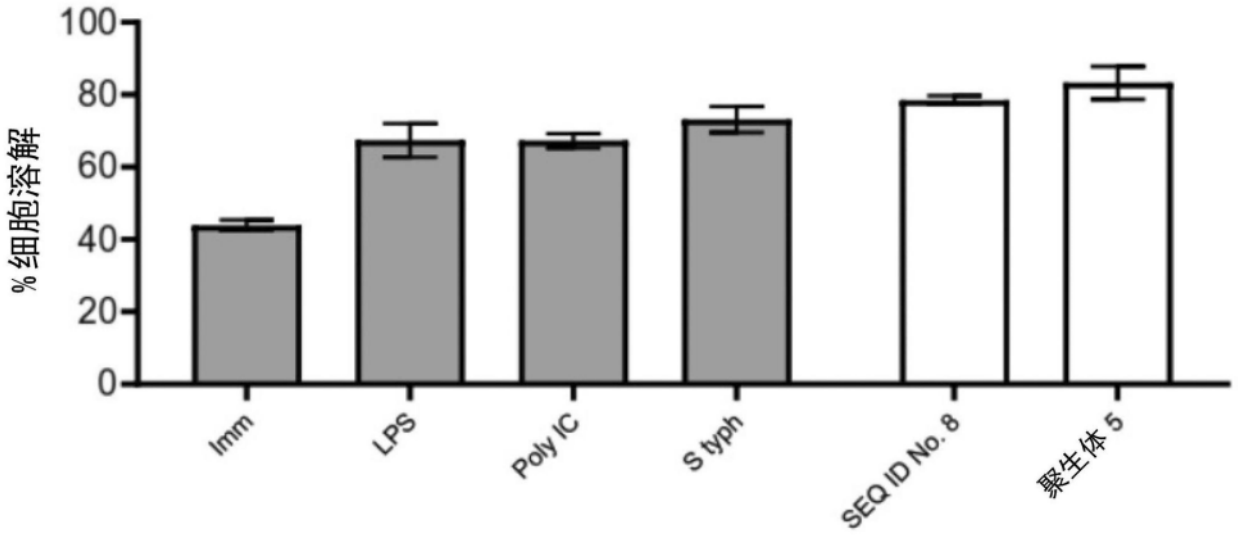

% 细胞溶解
100
80
60
40
20
0
Imm
LPS
Poly IC
S typh
SEQ ID No. 8
聚生体 5

图14

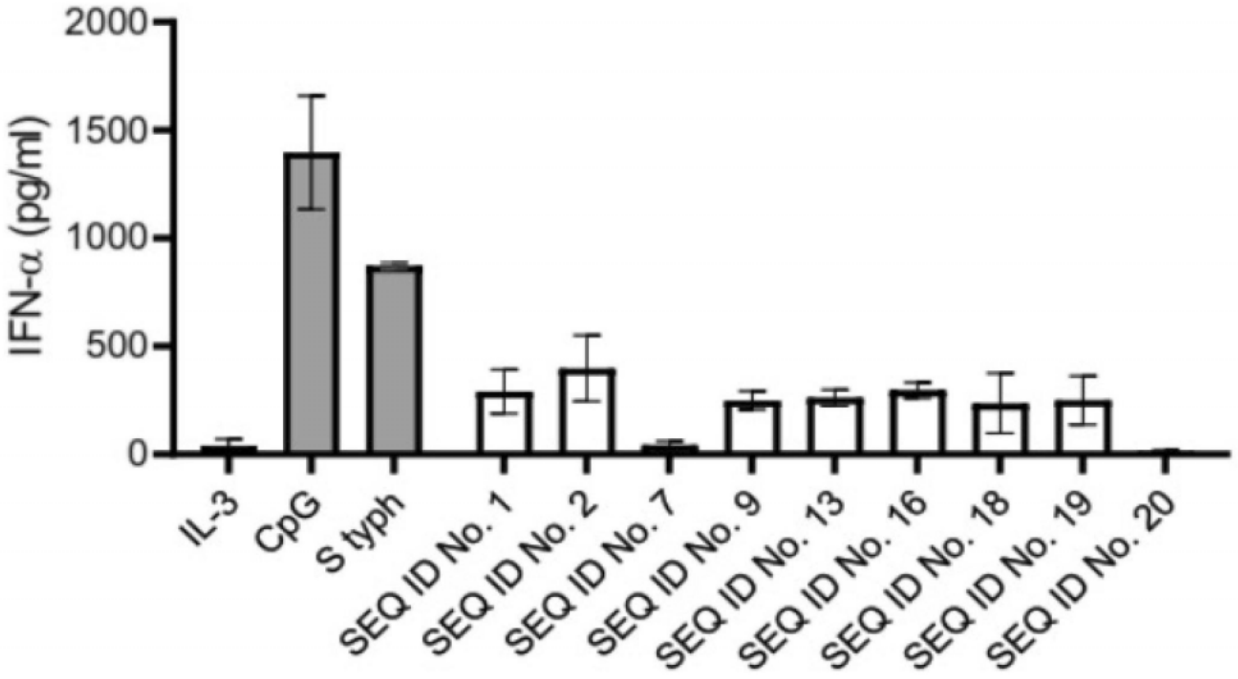
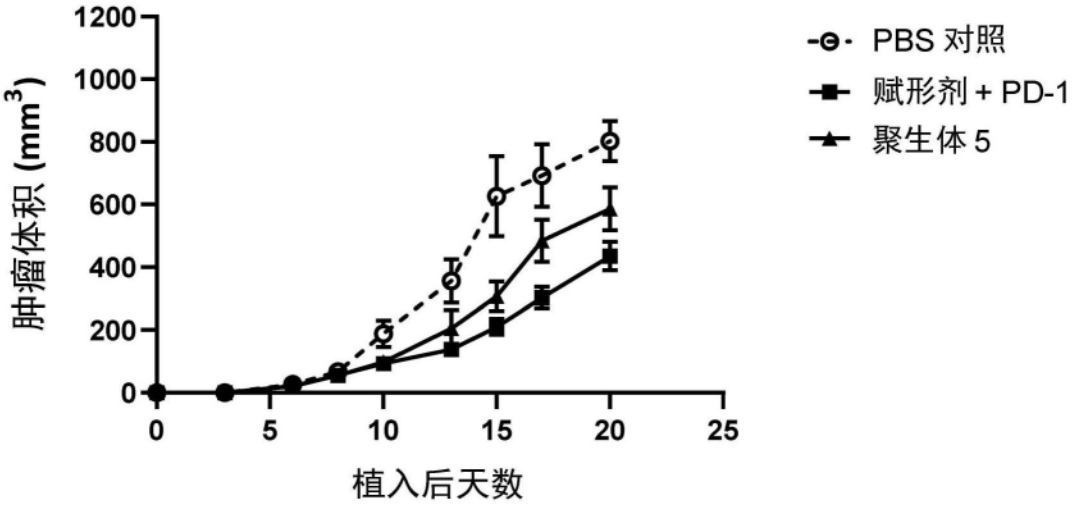

IFN-α (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
IL-3
CpG
S typh
SEQ ID No. 1
SEQ ID No. 2
SEQ ID No. 7
SEQ ID No. 9
SEQ ID No. 13
SEQ ID No. 16
SEQ ID No. 18
SEQ ID No. 19
SEQ ID No. 20

图15

A


1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 (mm3)
0
5
10
15
20
25
植入后天数
PBS 对照
赋形剂 + PD-1
聚生体 5

B

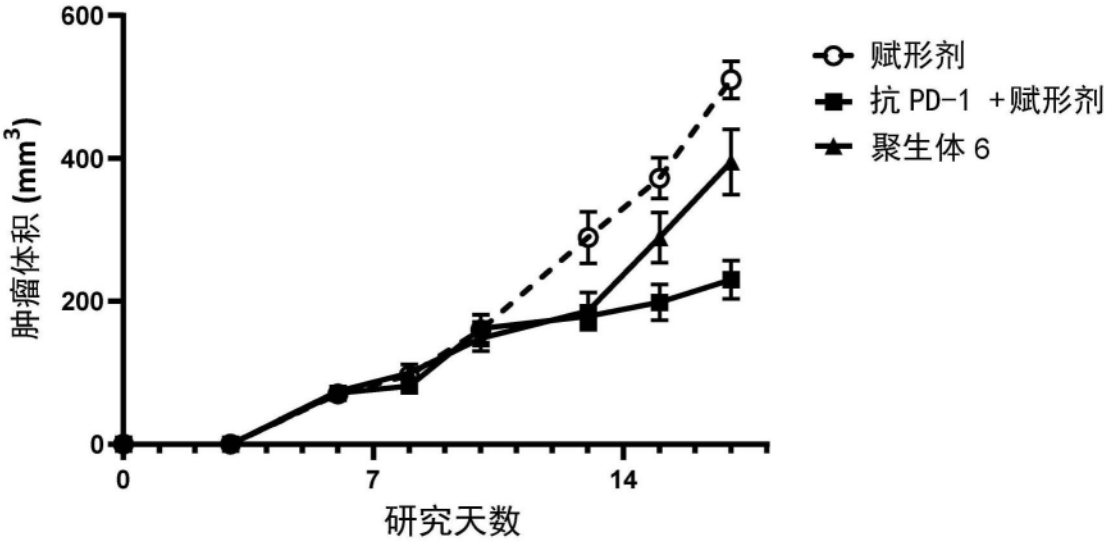

600
400
200
0
肿瘤体积 (mm3)
0
7
14
研究天数
赋形剂
抗 PD-1 +赋形剂
聚生体 6

图16

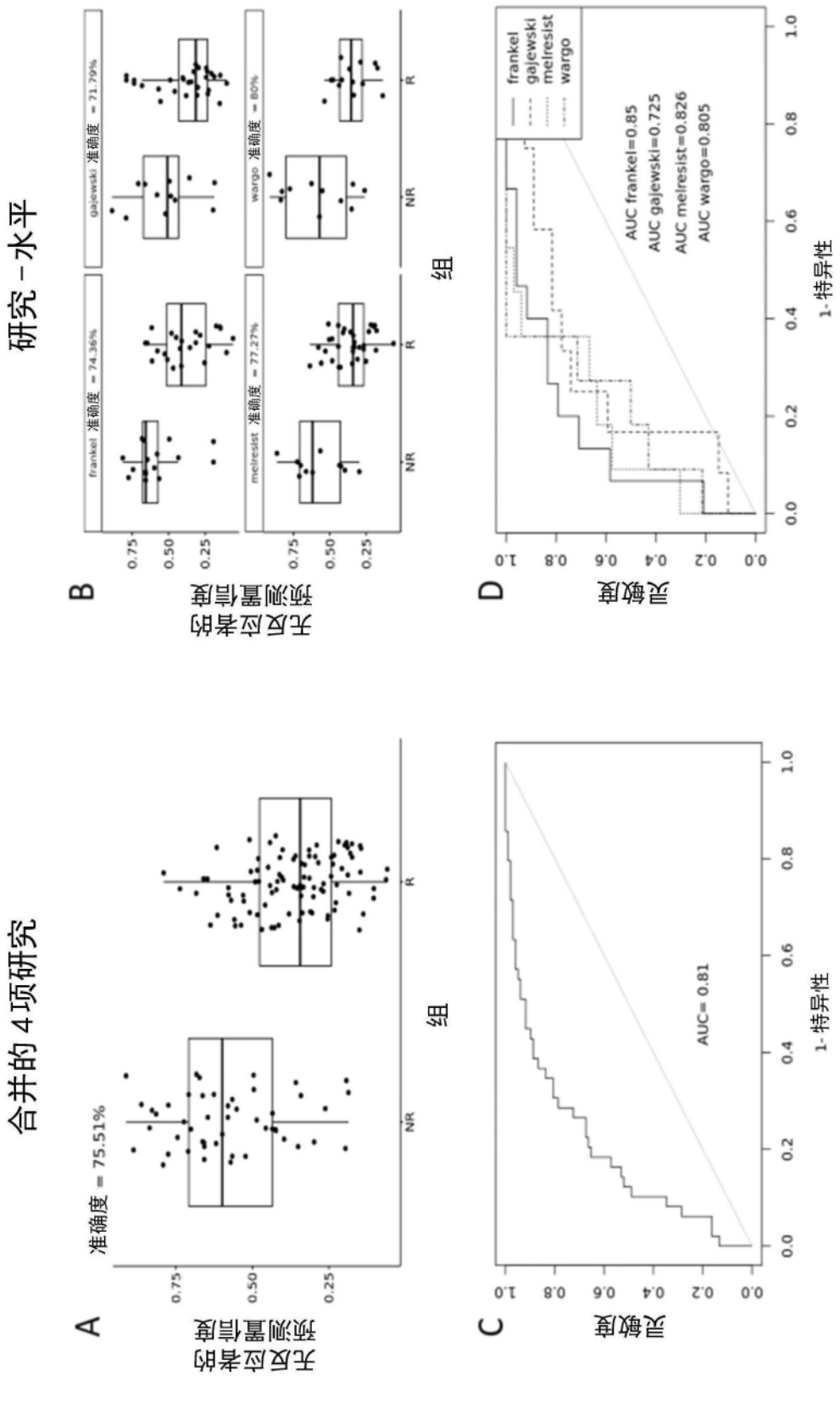

合并的 4 项研究
研究 - 水平
A
准确度 = 75.51%
无反应者的预测置信度
0.75
0.50
0.25
NR
R
组
B
frankel 准确度 = 74.36%
gajewski 准确度 = 71.79%
melresist 准确度 = 77.27%
wargo 准确度 = 80%
无反应者的预测置信度
C
灵敏度
1- 特异性
AUC= 0.81
D
frankel
gajewski
melresist
wargo
AUC frankel=0.85
AUC gajewski=0.725
AUC melresist=0.826
AUC wargo=0.805
灵敏度
1- 特异性

图17