



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I814739 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 09 月 11 日

(21) 申請案號：107131777

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 10 日

(51) Int. Cl. : A61K35/74 (2015.01)

A61K45/06 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2017/09/08 美國

62/556,015

2018/05/09 美國

62/669,151

(71) 申請人：美商艾弗洛生物科技股份有限公司 (美國) EVELO BIOSCIENCES, INC. (US)
美國(72) 發明人：古德曼 布莱恩 GOODMAN, BRIAN (US)；包斯 邦多納 BOSE, BAUNDAUNA
(US)；大衛特 克里斯 J H DAVITT, CHRIS J. H. (IE)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

EP 2494865A2

WO 2014152484A1

期刊 Macdonald IA and Kuehn MJ. "Stress-induced outer membrane vesicle production by Pseudomonas aeruginosa", J Bacteriol., Vol. 195, Issue 13, 26 Apr 2013, Pages 2971-81.

審查人員：王顥棟

申請專利範圍項數：21 項 圖式數：23 共 261 頁

(54) 名稱

細菌胞外囊泡

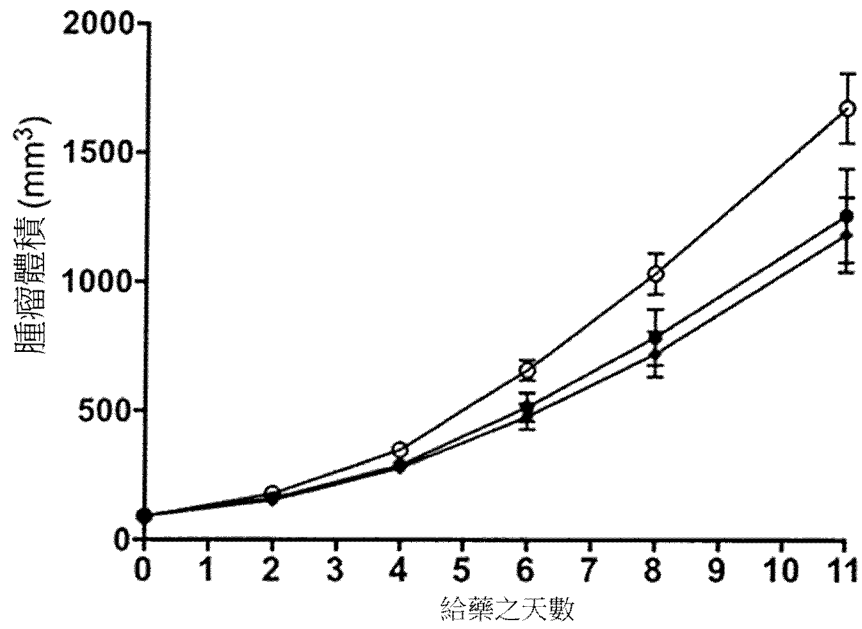
(57) 摘要

本文提供關於可用作治療劑之 EV 之方法及組合物。

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

指定代表圖：

CT26腫瘤模型，第11天



- 媒劑 (IV) Q3Dx4
- ◆ 抗PD-1 (IP) Q4D x 3
- 馬賽布勞特氏菌EV (IV) Q3D x 4

【圖1】



I814739

【發明摘要】

【中文發明名稱】

細菌胞外囊泡

【英文發明名稱】

BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES

【中文】

本文提供關於可用作治療劑之EV之方法及組合物。

【英文】

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

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

細菌胞外囊泡

【英文發明名稱】

BACTERIAL EXTRACELLULAR VESICLES

【技術領域】

【先前技術】

【發明內容】

【0001】 在某些態樣中，本文提供包含適用於治療及/或預防疾病(例如，癌症、自體免疫性疾病、發炎性疾病、代謝疾病)之細菌胞外囊泡(EV)之醫藥組合物，及製造及/或識別此等EV之方法，及使用此等醫藥組合物之方法(例如，用於治療癌症、自體免疫性疾病、發炎性疾病、代謝疾病，單獨或與其他治療劑組合使用)。在一些實施例中，該等醫藥組合物包含EV及完整細菌兩者(例如，活細菌、被殺死之細菌、減毒細菌)。在某些實施例中，本文提供包含細菌但不包含EV之醫藥組合物。在一些實施例中，該等醫藥組合物包含EV但不包含細菌。在一些實施例中，該等醫藥組合物包含來自表1及/或表2中列舉之細菌菌株或物種中之一或多者之EV及/或細菌。

【0002】 在某些實施例中，該醫藥組合物包含特定比率的細菌對EV顆粒。例如，在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、

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

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

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

7x10¹¹、8x10¹¹、9x10¹¹及/或1x10¹²個EV顆粒而言，該醫藥組合物包含不超過1個細菌。在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1x10³、2x10³、3x10³、4x10³、5x10³、6x10³、7x10³、8x10³、9x10³、1x10⁴、2x10⁴、3x10⁴、4x10⁴、5x10⁴、6x10⁴、7x10⁴、8x10⁴、9x10⁴、1x10⁵、2x10⁵、3x10⁵、4x10⁵、5x10⁵、6x10⁵、7x10⁵、8x10⁵、9x10⁵、1x10⁶、2x10⁶、3x10⁶、4x10⁶、5x10⁶、6x10⁶、7x10⁶、8x10⁶、9x10⁶、1x10⁷、2x10⁷、3x10⁷、4x10⁷、5x10⁷、6x10⁷、7x10⁷、8x10⁷、9x10⁷、1x10⁸、2x10⁸、3x10⁸、4x10⁸、5x10⁸、6x10⁸、7x10⁸、8x10⁸、9x10⁸、1x10⁹、2x10⁹、3x10⁹、4x10⁹、5x10⁹、6x10⁹、7x10⁹、8x10⁹、9x10⁹、1x10¹⁰、

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

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

9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個細菌而言，該醫藥組合物包含不超過1個EV顆粒。

【0003】 在某些態樣中，EV係來自經改造之細菌，該細菌係經修飾以增強某些所需性質。例如，在一些實施例中，該等經改造之細菌係經修飾以增加EV之產生。在一些實施例中，該等經改造之細菌係經修飾以產生具有增強之經口遞送之EV（例如，藉由改善耐酸性、黏膜黏附性及/或浸潤及/或對膽汁酸之耐受性、對抗微生物肽及/或抗體中和之耐受性），以靶向所需細胞類型（例如，M細胞、杯裝細胞、腸上皮細胞、樹突細胞、巨噬細胞）以全身性改善生物利用度或在適當之棲位（例如，腸系膜淋巴結、派伊爾氏淋巴集結(Peyer's patches)、固有層、腫瘤引流淋巴結及/或血液)改善生物利用度，以增強其等產生之EV之免疫調節及/或治療效應（例如，單獨或與其他治療劑組合使用），以由其等產生之EV增強免疫活化及/或以改善細菌及/或EV製造（例如，更大之穩定性、經改善之凍融耐受性、更短之產生時間）。在一些實施例中，本文提供製造此EV及細菌之方法。

【0004】 在某些實施例中，本文提供治療患有癌症之個體之方法，該等方法包括向該個體投與本文描述之醫藥組合物。在某些實施例中，本文提供治療患有免疫失調症（例如，自體免疫性疾病、發炎性疾病、過敏）

之個體，該等方法包括向該個體投與本文描述之醫藥組合物。在某些實施例中，本文提供治療患有代謝疾病之個體之方法，該等方法包括向該個體投與本文描述之醫藥組合物。

【0005】 在一些實施例中，該方法進一步包括向該個體投與抗生素。在一些實施例中，該方法進一步包括向該個體投與一或多種其他癌症治療(例如，手術移除腫瘤、投與化學治療劑、投與放射治療及/或投與癌症免疫治療，諸如免疫查核點抑制劑、癌症特異性抗體、癌症疫苗、經引發之抗原呈現細胞(primed antigen presenting cell)、癌症特異性T細胞、癌症特異性嵌合抗原受體(CAR) T細胞、免疫活化蛋白及/或佐劑)。在一些實施例中，該方法進一步包括投與其他治療細菌及/或EV。在一些實施例中，該方法進一步包括投與免疫抑制劑及/或抗炎劑。在一些實施例中，該方法進一步包括投與代謝疾病治療劑。

【圖式簡單說明】

【0006】 圖1顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，靜脈內投與馬賽布勞特氏菌(*Blautia massiliensis*)之效力與腹膜內(i.p.)投與抗PD-1之效力之比較。

【0007】 圖2顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，藉由靜脈內投與馬賽布勞特氏菌之腫瘤生長(以體積計)之抑制與腹膜內(i.p.)投與抗PD-1之腫瘤生長(以體積計)之抑制之比較。

【0008】 圖3A顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，經口或腹膜內投與之棲組織普雷沃菌(*Prevotella histicola*)及棲組織普雷沃菌(*P. histicola*)衍生之EV在抗原激發後24小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力。效力在經口及腹膜內投與組中均可見。

【0009】 圖3B顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，經口或腹膜內投與之棲組織普雷沃菌及棲組織普雷沃菌衍生之EV在抗原激發後48小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力。

【0010】 圖3C顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，經腹膜內投與之棲組織普雷沃菌衍生之EV在指定劑量(10 μg 、3 μg 、1 μg 及0.1 μg)下在抗原激發後48小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力。

【0011】 圖3D顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，腹膜內投與之棲組織普雷沃菌衍生之EV在抗原激發後48小時減少IL-1 β 之表現之能力。

【0012】 圖3E顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，腹膜內投與之棲組織普雷沃菌衍生之EV在抗原激發後48小時增加Treg於頸部淋巴結中之積聚之能力。

【0013】 圖4顯示棲組織普雷沃菌在接受誘導NASH症狀之缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食之小鼠中有效降低NASH活動分數(NAS)。

【0014】 圖5A顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少脂肪變性。

【0015】 圖5B及圖5C顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少炎症。

【0016】 圖5D顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少鼓脹。

【0017】 圖6顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少肝總膽固醇。

【0018】 圖7A及圖7B顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠

中減少纖維化分數。

【0019】 圖8A顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，投與棲組織普雷沃菌、產黑色素普雷沃菌(*P. melanogenica*)、棲組織普雷沃菌衍生之EV、產黑色素普雷沃菌衍生之EV在抗原激發後24小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力。產黑色素普雷沃菌衍生之EV比產黑色素普雷沃菌更有效。

【0020】 圖8B顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，投與棲組織普雷沃菌、產黑色素普雷沃菌、棲組織普雷沃菌衍生之EV、產黑色素普雷沃菌衍生之EV在抗原激發後48小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力。產黑色素普雷沃菌衍生之EV比產黑色素普雷沃菌更有效。

【0021】 圖9A顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中對肝游離脂肪酸之影響。

【0022】 圖9B顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中對肝總膽固醇之影響。

【0023】 圖9C顯示棲組織普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中對肝三酸甘油酯之影響。

【0024】 圖9D顯示棲組織普雷沃菌及產黑色素普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中對丙胺酸胺基轉移酶之影響。

【0025】 圖9E顯示棲組織普雷沃菌及產黑色素普雷沃菌在飼餵MCD飲食之小鼠中對天冬胺酸胺基轉移酶之影響。

【0026】 圖10A顯示棲組織普雷沃菌在接受誘導NASH症狀之缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食之小鼠中有效降低NASH活動分數(NAS)。

【0027】 圖10B顯示棲組織普雷沃菌、產黑色素普雷沃菌、棲組織

普雷沃菌與OCD之組合在接受誘導NASH症狀之缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食之小鼠中降低NASH活動分數(NAS)。

【0028】 圖11顯示在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，經口投與之當別町範永氏球菌(*Veillonella tobetsuensis*)及小範永氏球菌(*Veillonella parvula*)菌株在24小時減少抗原特異性耳腫脹(耳厚度)之效力與媒劑(陰性對照)、抗炎地塞米松(陽性對照)及動物乳酸雙歧桿菌(*Bifidobacterium animalis lactis*)之比較。

【0029】 圖12顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，來自兩個當別町範永氏球菌及小範永氏球菌菌株之EV之效力與經腹膜內注射(i.p.)之抗PD-1或媒劑之比較。

【0030】 圖13顯示在小鼠結腸直腸癌模型中的第11天，來自當別町範永氏球菌及小範永氏球菌菌株之EV之效力與經腹膜內注射(i.p.)之抗PD-1或媒劑之比較。

【0031】 圖14顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，來自當別町範永氏球菌及小範永氏球菌菌株之EV之劑量及投與途徑依賴性效力與經腹膜內注射(i.p.)之抗PD-1或媒劑之比較。

【0032】 圖15顯示在小鼠結腸直腸癌模型中的第11天，來自當別町範永氏球菌及小範永氏球菌菌株之EV之劑量及投與途徑依賴性效力與經腹膜內注射(i.p.)之抗PD-1或媒劑之比較。

【0033】 圖16顯示小範永氏球菌在接受誘導NASH症狀之缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食之小鼠中有效降低NASH活動分數(NAS)。

【0034】 圖17顯示小範永氏球菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少纖維化。

【0035】 圖18顯示小範永氏球菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少肝總膽固醇。

【0036】 圖19顯示小範永氏球菌在飼餵MCD飲食之小鼠中減少肝三酸甘油酯。

【0037】 圖20顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，假性鼻疽伯克霍爾德菌(*Burkholderia pseudomallei*) EV之效力與經靜脈內(i.v.)投與之抗PD-1或媒劑之比較。

【0038】 圖21顯示在小鼠結腸直腸癌模型中的第11天，假性鼻疽伯克霍爾德菌EV之效力與經靜脈內(i.v.)投與之抗PD-1或媒劑之比較。**在第11天，相較於媒劑對照組，在經假性鼻疽伯克霍爾德菌EV處理之組中之腫瘤體積之差異係非常明顯的，P值為0.0011，如藉由以GraphPad計算之T檢驗(兩尾，未配對，經韋爾奇校正)測定。

【0039】 圖22顯示在小鼠結腸直腸癌模型中，腦膜炎奈瑟菌(*Neisseria Meningitidis*) EV之效力與經腹膜內(i.p.)投與之抗PD-1或媒劑之效力之比較。

【0040】 圖23顯示在小鼠結腸直腸癌模型中的第11天，腦膜炎奈瑟菌EV之效力與經腹膜內(i.p.)投與之抗PD-1或媒劑之效力之比較。

【實施方式】

【0041】 本申請案主張對2017年9月8日申請之具有序列號62/556,015之美國臨時專利申請案及2018年5月9日申請之62/669,151之優先權，該等案件之各者之內容係以全文引用之方式併入本文中。

定義

【0042】 「佐劑」或「輔助治療」廣泛地係指影響病患或個體之免

疫或生理反應之藥劑。例如，佐劑可增加抗原經時或針對受關注之區域(諸如腫瘤)之存在，有助於吸收抗原呈現細胞抗原，活化巨噬細胞及淋巴細胞並支持細胞介素之產生。藉由改變免疫反應，佐劑可允許較小劑量之免疫相互作用劑以增加特定劑量之免疫相互作用劑之有效性或安全性。例如，佐劑可防止T細胞耗盡並因此增加特定免疫相互作用劑之有效性或安全性。

【0043】 「投與」廣泛地係指向個體投與組合物之投與途徑。投與途徑之實例包括經口投與、直腸投與、局部投與、吸入(鼻)或注射。藉由注射之投與包括靜脈內(IV)、肌內(IM)、瘤內(IT)及皮下(SC)投與。本文描述之醫藥組合物可以任何形式藉由任何有效途徑投與，包括(但不限於)瘤內、經口、非經腸、腸內、靜脈內、腹膜內、局部、經皮(例如，使用任何標準貼劑)、皮內、經眼、經鼻(鼻內)、局部、非經口(諸如噴霧)、吸入、皮下、肌內、頰、舌下、(經)直腸、陰道、動脈內及鞘內、經黏膜(例如，舌下、經舌、(經)頰、(經)尿道、陰道(例如，經陰道及陰道周圍)、植入、膀胱內、肺內、十二指腸內、胃內及支氣管內。在較佳實施例中，本文描述之醫藥組合物係經口、直腸、瘤內、局部、膀胱內、藉由注射至引流淋巴結內或附近、靜脈內、藉由吸入或噴霧或皮下進行投與。

【0044】 如本文使用，術語「抗體」可係指完整抗體及其抗原結合片段兩者。完整抗體係醣蛋白，該等醣蛋白包括由雙硫鍵相互連接之至少兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈。各重鏈包括重鏈可變區(本文中縮寫為V_H)及重鏈恆定區。各輕鏈包括輕鏈可變區(本文中縮寫為V_L)及輕鏈恆定區。該等V_H及V_L區可進一步細分為高變區，被稱為互補決定區(CDR)，其中穿插更保守之區域，被稱為框架區(FR)。各V_H及V_L係由三個CDR及四個FR

構成，其等自胺基端至羧基端以下列順序排佈：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。術語「抗體」包括(例如)單株抗體、多株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)、單鏈抗體及抗原結合抗體片段。

【0045】 如本文使用，術語抗體之「抗原結合片段」及「抗原結合部分」係指抗體之保留結合至抗原之能力之一或多個片段。包含於術語抗體之「抗原結合片段」內之結合片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、由雙硫鍵連接之Fv、Fd、雙功能抗體、單鏈抗體、NANOBODIES®、經分離之CDRH3及保留完整抗體之可變區之至少一部分之其他抗體片段。此等抗體片段可使用習知重組及/或酶技術獲得且可針對抗原結合以與完整抗體相同之方式進行篩選。

【0046】 「癌症」廣泛地係指宿主自身細胞之不受控制、異常生長，此在宿主中導致入侵周圍組織及遠離異常細胞生長之初始位點之潛在組織。主要類別包括瘤，其為上皮組織(例如，皮膚、鱗狀細胞)之癌症；肉瘤，其為結締組織(例如，骨、軟骨、脂肪、肌肉、血管等)之癌症；白血病，其為血液形成組織(例如，骨髓組織)之癌症；淋巴瘤及骨髓瘤，其為免疫細胞之癌症；及中樞神經系統癌症，其等包括來自腦及脊髓組織之癌症。「癌症」、「贅瘤」及「腫瘤」在本文中可互換使用。如本文使用，「癌症」係指所有類型之癌症或贅瘤或惡性腫瘤，其等包括白血病、癌及肉瘤，無論新的或復發性的皆可。癌症之具體實例係：癌、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤及混合型腫瘤。癌症之非限制性實例係腦、黑色素瘤、膀胱、乳房、子宮頸、結腸、頭及頸、腎、肺、非小細胞肺、間皮

瘤、卵巢、前列腺、肉瘤、胃、子宮及神經管胚細胞瘤之新的或復發性癌症。

【0047】 「細胞增強」廣泛地係指細胞之流入或細胞在環境中之擴增，該等細胞在投與組合物之前大體上不存在於該環境中且不存在於該組合物本身中。增強環境之細胞包括免疫細胞、基質細胞、細菌及真菌細胞。特別受關注之環境係其中癌細胞駐留或定位之微環境。在一些實例中，該微環境係腫瘤微環境或腫瘤引流淋巴結。在其他實例中，該微環境係癌前組織位點或組合物之局部投與位點或其中該組合物在遠程投與後將積聚之位點。

【0048】 「支」係指種系發生樹之OTU或成員，其等係種系發生樹中之統計有效節點之下游。支包含種系發生樹中之一組終端葉子，其係不同之單系進化單元且在某種程度上共用序列相似性。「操作分類單位」、「OTU」(或複數「OTUs」)係指種系發生樹中之終端葉子且係由核酸序列(例如，整個基因組，或特定遺傳序列，及在物種層面下與此核酸序列共用序列一致性之所有序列)定義。在一些實施例中，該特定遺傳序列可係16S序列或該16S序列之一部分。在其他實施例中，兩個實體之整個基因組係經測序及比較。在另一實施例中，選擇區域(諸如多位點序列標籤(MLST)、特定基因或基因組)可進行遺傳比較。在16S實施例中，在整個16S或該16S之一些可變區上共用 $\geq 97\%$ 平均核苷酸一致性之OTU被視為相同OTU(參見，例如，Claesson M J、Wang Q、O'Sullivan O、Greene-Diniz R、Cole J R、Ros R P及O'Toole P W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene

regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200。Konstantinidis K T、Ramette A及Tiedje J M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940.)。在涉及完整基因組、MLST、特定基因或基因組之實施例中，共用 $\geq 95\%$ 平均核苷酸一致性之OTU被視為相同OTU (參見，例如，Achtman M及Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431-440。Konstantinidis K T、Ramette A及Tiedje J M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929-1940))。OTU通常藉由比較生物體之間之序列進行定義。一般而言，具有小於95%序列一致性之序列不被視為形成相同OTU之一部分。OTU亦可由核苷酸標記或基因(特定言之高度保守基因(例如，「管家」基因))之任何組合，或其組合進行表徵。此表徵採用(例如) WGS資料或全基因組序列。

【0049】 來自兩種或更多種微生物菌株之EV之「組合」包括兩種EV之物理共存(於相同材料或產品中或於物理連接之產品中)，及來自兩種菌株之EV之時間共投與或共定位。

【0050】 術語「減少」或「消除(deplete)」意指當相較於預處理狀態時，使得差異在處理後(視情況而定)為至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1/100、1/1000、1/10,000、1/100,000、1/1,000,000或不可偵測的變化。

【0051】 如本文使用，術語「生態失調」係指其中微生物與腫瘤之間的協同作用經破壞之狀態，諸如微生物不再支持腫瘤之成核、維持、進展或擴散或轉移。

【0052】術語「抗原決定基」意指可特異性結合至抗體或T細胞受體之蛋白質決定子。抗原決定基通常由分子之化學活性表面基團組成，諸如胺基酸或糖側鏈。某些抗原決定基可由抗體可結合之胺基酸之特定序列界定。

【0053】如本文使用，「經改造之細菌」係藉由人為干預已在遺傳上自天然狀態改變之任何細菌及任何此等細菌之繼代。經改造之細菌包括(例如)靶向遺傳修飾之產物、隨機誘變篩選之產物及定向演化之產物。

【0054】術語「基因」廣泛用以係指與生物功能相關聯之任何核酸。術語「基因」適用於特定基因組序列，及適用於由該基因組序列編碼之cDNA或mRNA。

【0055】兩個核酸分子之核酸序列之間的「一致性」可使用已知電腦演算法(諸如「FASTA」程式)，使用(例如)如於Pearson等人，(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444中之預設參數測定為一致性百分率(其他程式包括GCG套裝程式(Devereux, J.等人，Nucleic Acids Research 12(I):387 (1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA Atschul, S. F.等人，J Molec Biol 215:403 (1990)；Guide to Huge Computers, Mrtin J. Bishop 編，Academic Press, San Diego, 1994，及Carillo等人，(1988) SIAM J Applied Math 48:1073)。例如，可使用國家生物技術資訊中心資料庫之BLAST功能以測定一致性。其他商業或公開可獲得之程式包括DNASar「MegAlign」程式(Madison, Wis.)及威斯康辛大學遺傳學電腦組(UWG)「Gap」程式(Madison Wis.)。

【0056】如本文使用，術語「免疫失調症」係指由免疫系統之活動引起之任何疾病、失調症或疾病症狀，包括自體免疫性疾病、發炎性疾病

及過敏。免疫失調症包括(但不限於)自體免疫性疾病(例如，狼瘡、硬皮病、溶血性貧血、血管炎、一型糖尿病、格雷夫病(Grave's disease)、類風濕性關節炎、多發性硬化、古德帕斯雷症候群(Goodpasture's syndrome)、惡性貧血及/或肌病)、發炎性疾病(例如，尋常型痤瘡、哮喘、乳糜瀉、慢性前列腺炎、腎小球性腎炎、發炎腸病、盆腔炎、再灌注損傷、類風濕性關節炎、肉狀瘤病、移植排斥、血管炎及/或間質性膀胱炎)，及/或過敏(例如，食物過敏、藥物過敏及/或環境過敏)。

【0057】「免疫治療」係使用個體之免疫系統以治療疾病(例如，免疫疾病、發炎性疾病、代謝疾病、癌症)之治療且包括(例如)查核點抑制劑、癌症疫苗、細胞介素、細胞治療、CAR-T細胞及樹突細胞治療。

【0058】術語「增加」意指當相較於預處理狀態時，使得差異在處理後(視情況而定)為至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、2倍、4倍、10倍、100倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍，及/或 10^7 倍更大之變化。可增加之性質包括免疫細胞、細菌細胞、基質細胞、骨髓衍生之抑制細胞、成纖維細胞、代謝物及細胞介素。

【0059】「先天免疫促效劑」或「免疫佐劑」係特異性靶向先天免疫受體(包括類鐸受體(TLR)、NOD受體、RLR、C型凝集素受體、STING-cGAS通路組分、發炎體複合物)之小分子、蛋白質或其他藥劑。例如，LPS係細菌衍生或合成之TLR-4促效劑及鋁可用作免疫刺激佐劑。免疫佐劑係更廣泛之佐劑或佐劑治療之特定類別。STING促效劑之實例包括(但不限於) 2'3'-cGAMP、3'3'-cGAMP、c-di-AMP、c-di-GMP、2'2'-cGAMP及2'3'-cGAM(PS)2 (Rp/Sp) (2'3'-cGAMP之雙硫代磷酸酯類似物之Rp、Sp異構物)。TLR促效劑之實例包括(但不限於) TLR1、TLR2、

TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10及TLR11。NOD促效劑之實例包括(但不限於) N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸(胞壁醯基二肽(MDP))、 γ -D-麩胺醯基-內消旋-二胺基庚二酸(iE-DAP)，及去胞壁醯基肽(DMP)。

【0060】 「內轉錄間隔區」或「ITS」係位於通常用於識別真核物種(特定言之，真菌)之共同前體轉錄本上之結構核糖體RNA (rRNA)之間之一段非功能性RNA。形成核糖體之核之真菌之rRNA係經轉錄為信號基因且由8S、5.8S及28S區域及分別在8S與5.8S之間及5.8S與28S區域之間的ITS4及5組成。如先前描述，在18S與5.8S之間及5.8S與28S區域之間的此等兩個雙譯基因嵌段(intercistronic segment)係藉由剪接移除且出於條碼之目的在物種之間含有顯著變化(Schoch等人，Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS 109:6241-6246. 2012)。18S rDNA傳統上用於種系發生重建，然而ITS可發揮此功能，因為其通常係高度保守的，但含有高變區，該等高變區具有足夠之核苷酸多樣性來區分大多數真菌之屬及物種。

【0061】 術語「經分離」或「經富集」包含微生物、EV或其他實體或物質已經(1)與最初產生(無論在自然中或在實驗環境中)時與之相關聯之至少一些組分分離，及/或(2)由人工產生、製備、純化及/或製造。經分離之微生物可與至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或更多最初與之相關聯之其他組分分離。在一些實施例中，經分離之微生物係超過約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或超

過約99%純。如本文使用，若物質大體上不含其他組分，則該物質係「純」的。術語「純化(purify或purifying)」及「經純化(purified)」係指微生物或其他材料已與最初產生或形成(例如，無論在自然中或在實驗環境中)時或在初始產生後之任何時間期間與之相關聯之至少一些組分分離。若微生物或微生物種群在產生時或產生後係與(諸如)含有該微生物或微生物種群之材料或環境分離，則該微生物或微生物種群可視為經純化，且經純化之微生物或微生物種群可含有其他材料多達約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或大於約90%，且仍被視為「經分離」。在一些實施例中，經純化之微生物或微生物種群係超過約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或超過約99%純。在本文提供之微生物組合物之實例中，存在於組合物中之一或多種微生物類型可獨立地純化自含有該微生物類型之材料或環境中產生及/或存在之一或多種其他微生物。微生物組合物及其微生物組分係通常純化自殘餘生境產物。

【0062】 如本文使用之「代謝物」係指在任何細胞或微生物代謝反應中用作受質或作為產物化合物、組合物、分子、離子、輔助因子、觸媒或營養素產生自任何細胞或微生物代謝反應之任何及所有分子化合物、組合物、分子、離子、輔助因子、觸媒或營養素。

【0063】 「微生物」係指表徵為細菌、真菌、微觀藻類、原生動物及與該生物體相關聯之發育階段或生命週期階段(例如，植物、孢子(包括孢子形成、休眠及萌發)、潛伏、生物膜)之任何天然或經改造之生物體。腸道微生物之實例包括：葛氏放線菌(*Actinomyces graevenitzi*)、齶齒放

線菌(*Actinomyces odontolyticus*)、嗜黏蛋白阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*)、糞擬桿菌(*Bacteroides caccae*)、脆弱擬桿菌(*Bacteroides fragilis*)、腐敗擬桿菌(*Bacteroides putredinis*)、多形擬桿菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)、普通擬桿菌(*Bacteroides vulgatus*)、青春雙歧桿菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、兩歧雙歧桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)、對沃氏嗜膽菌(*Bilophila wadsworthia*)、布勞特氏菌(*Blautia*)、丁酸弧菌(*Butyrivibrio*)、纖細彎曲桿菌(*Campylobacter gracilis*)、梭菌群III (*Clostridia cluster III*)、梭菌群IV (*Clostridia cluster IV*)、梭菌群IX (*Clostridia cluster IX*) (胺基酸球菌科群(*Acidaminococcaceae group*))、梭菌群XI (*Clostridia cluster XI*)、梭菌群XIII (*Clostridia cluster XIII*) (消化鏈球菌群(*Peptostreptococcus group*))、梭菌群XIV (*Clostridia cluster XIV*)、梭菌群XV (*Clostridia cluster XV*)、產氣柯林斯菌(*Collinsella aerofaciens*)、糞球菌(*Coprococcus*)、桑氏棒狀桿菌(*Corynebacterium sunsvallense*)、豬脫硫單胞菌(*Desulfomonas pigra*)、產甲酸多爾氏菌(*Dorea formicigenerans*)、長鏈多爾氏菌(*Dorea longicatena*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、龐大真桿菌(*Eubacterium hadrum*)、直腸真桿菌(*Eubacterium rectale*)、普拉梭菌(*Faecalibacteria prausnitzii*)、孿生球菌(*Gemella*)、乳球菌(*Lactococcus*)、蘭氏螺菌(*LanchnoSPIra*)、柔膜細菌群XVI (*Mollicutes cluster XVI*)、柔膜細菌群XVIII (*Mollicutes cluster XVIII*)、普雷沃菌(*Prevotella*)、黏滑羅氏菌(*Rothia mucilaginosa*)、伶俐瘤胃球菌(*Ruminococcus callidus*)、活潑瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*)、扭鏈瘤胃球菌(*Ruminococcus torques*)及鏈球菌

(Streptococcus)。

【0064】 「微生物群系」廣泛地係指棲居於個體或病患之身體部位上或中之微生物。微生物群系中之微生物可包括細菌、病毒、真核微生物及/或病毒。微生物群系中之個別微生物可係代謝活性、休眠、潛伏或作為孢子存在，可以浮游形式存在或存在於生物膜中，或可以可持續或短暫之方式存在於該微生物群系中。該微生物群系可係共生或健康狀態微生物群系或疾病狀態微生物群系。該微生物群系對個體或病患而言可係天然的，或該微生物群系之組分可因健康狀態(例如，癌前狀態或癌狀態)或處理條件(例如，抗生素治療、曝露於不同微生物)之變化而經調整、引入或消除。在一些態樣中，該微生物群系出現於黏膜表面。在一些態樣中，該微生物群系係腸道微生物群系。在一些態樣中，該微生物群系係腫瘤微生物群系。

【0065】 組織或樣本之「微生物群系概況(microbiome profile)」或「微生物群系特徵(microbiome signature)」係指微生物群系之細菌組成之至少部分表徵。在一些實施例中，微生物群系概況指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個細菌菌株存在於微生物群系中或不存在於微生物群系中。在一些實施例中，微生物群系概況指示是否至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多個癌症相關細菌菌株存在於樣本中。在一些實施例中，微生物群系概況指示樣本中偵測之各細菌菌株之相對量或絕對量。在一些實施例中，微生物群系概況係癌症相關微生物群系概況。癌症相關微生物群系概況係以比一般群體更大之

頻率出現於患有癌症之個體中之微生物群系概況。在一些實施例中，相較於正常存在於取自未患癌症之個體之在其他方面當量之組織或樣本之微生物群系中之細菌，該癌症相關微生物群系概況包含更大數量或量之癌症相關細菌。

【0066】 關於細菌之「經修飾」廣泛地係指自野生型形式已經變化之細菌。細菌修飾之實例包括遺傳修飾、基因表現、表型修飾、調配、化學修飾及劑量或濃度。經改善之性質之實例係描述於整個說明書中且包括(例如)減毒、營養缺陷、歸巢或抗原性。表型修飾可包括(以實例說明之)細菌於修飾細菌之表型之培養基中生長以增加或降低毒力。

【0067】 如本文使用，若基因在至少一些條件下在經改造之細菌中之表現程度高於其在相同條件下在相同物種之野生型細菌中之表現程度，則該基因係「過表現」於細菌中。同樣地，若基因在至少一些條件下在經改造之細菌中之表現程度低於其在相同條件下在相同物種之野生型細菌中之表現程度，則該基因係「低表現」於細菌中。

【0068】 術語「多核苷酸」及「核酸」可互換使用。其等係指任何長度之核苷酸之聚合形式，脫氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其類似物。多核苷酸可具有任何三維結構，且可表現任何功能。下列係多核苷酸之非限制性實例：基因或基因片段之編碼或非編碼區域、定義自連鎖分析之基因座(loci)(基因座(locus))、外顯子、內含子、信使RNA (mRNA)、微小RNA (miRNA)、沉默RNA (siRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、核糖酶、cDNA、重組多核苷酸、分支多核苷酸、質粒、載體、任何序列之經分離之DNA、任何序列之經分離之RNA、核酸探針及引子。多核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及核苷酸類似物。若存在，則對核苷

酸結構之修飾可在聚合物之組裝之前或之後賦予。多核苷酸可經進一步修飾，諸如藉由與標記組件結合。在本文提供之所有核酸序列中，U核苷酸可與T核苷酸互換。

【0069】 如本文使用之「腫瘤生物群系」包含致病、致瘤及/或癌症相關微生物區，其中該微生物區包含病毒、細菌、真菌、原生生物、寄生蟲或其他微生物中之一或多者。

【0070】 「腫瘤營養性(Oncotrophic)」或「嗜腫瘤(oncophilic)」微生物及細菌係與癌症微環境高度相關聯之微生物或存在於癌症微環境中之微生物。其等可被優先選擇用於該環境中，優先在癌症微環境中生長或適應該環境。

【0071】 「操作分類單位」及「OTU」係指種系發生樹中之終端葉子且係由核酸序列定義，例如，整個基因組，或特定遺傳序列，及在物種層面下與此核酸序列共用序列一致性之所有序列。在一些實施例中，該特定遺傳序列可係16S序列或該16S序列之一部分。在其他實施例中，兩個實體之整個基因組係經測序及比較。在另一實施例中，選擇區域(諸如多位點序列標籤(MLST)、特定基因或基因組)可進行遺傳比較。就16S而言，在整個16S或該16S之一些可變區上共用 $\geq 97\%$ 平均核苷酸一致性之OTU被視為相同OTU。參見，例如，Claesson MJ、Wang Q、O'Sullivan O、Greene-Diniz R、Cole JR、Ross RP及O'Toole PW. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 38: e200。Konstantinidis KT、Ramette A及Tiedje JM. 2006. The bacterial species definition in

the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929–1940。就完整基因組、MLST、特定基因、除16S外或基因組而言，共用 $\geq 95\%$ 平均核苷酸一致性之OTU被視為相同OTU。參見，例如，Achtman M及Wagner M. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431–440。Konstantinidis KT、Ramette A及Tiedje JM. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1929–1940。OTU通常係藉由比較生物體之間之序列進行定義。一般而言，具有小於95%序列一致性之序列不被視為形成相同OTU之一部分。OTU亦可由核苷酸標記或基因(特定言之高度保守基因(例如，「管家」基因))之任何組合，或其組合進行表徵。本文提供操作分類單位(OTU)及對(例如)屬、物種及種系發生支所作之分類學分配。

【0072】 如本文使用，術語「胞外囊泡」或「EV」係指衍生自細菌之組合物，其包含細菌脂質及含於奈米顆粒中之細菌蛋白質及/或細菌核酸及/或碳水化合物部分。此等EV可含有1、2、3、4、5、10或超過10種不同之脂質種類。EV可含有1、2、3、4、5、10或超過10種不同之蛋白質種類。EV可含有1、2、3、4、5、10或超過10種不同之核酸種類。EV可含有1、2、3、4、5、10或超過10種不同之碳水化合物種類。

【0073】 如本文使用，若物質大體上不含其他組分，則該物質係「純」的。術語「純化(purify或purifying)」及「經純化」係指EV或其他材料已與最初產生或形成(例如，無論在自然中或在實驗環境中)時或在初始產生後之任何時間期間與之相關聯之至少一些組分分離。若EV在產生時或產生後與(諸如)一或多種其他細菌組分分離，則該EV可被視為經純

化，及經純化之微生物或微生物種群可含有其他材料多達約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或超過約90%且仍被視為「經純化」。在一些實施例中，經純化之EV係超過約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或超過約99%純。EV組合物及其微生物組分係(例如)純化自殘餘生境產物。

【0074】 如本文使用，術語「經純化之EV組合物」或「EV組合物」係指如下之製劑：其包括已與源材料或在用以產生該製劑之任何方法中與EV相關聯之任何材料中發現之至少一種相關物質分離(例如，與至少一種其他細菌組分分離)之EV。其亦係指已經顯著富集或濃縮之組合物。在一些實施例中，該等EV係經濃縮2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、100倍、1000倍、10,000倍或超過10,000倍。

【0075】 「殘餘生境產物」係指自個體內或個體上之微生物群生境衍生的材料。例如，微生物生存於胃腸道之糞便中、皮膚本身上、唾液中、呼吸道之黏液中或泌尿生殖道之分泌物中(即，與微生物群落相關聯之生物物質)。大體上不含殘餘生境產物意指該微生物組合物不再含有與人類或動物個體上或人類或動物個體中之微生物環境相關聯之生物物質且係100%不含、99%不含、98%不含、97%不含、96%不含或95%不含與該微生物群落相關聯之任何污染生物物質。殘餘生境產物可包括非生物材料(包括未經消化之食物)或其可包括非所需之微生物。大體上不含殘餘生境產物亦可意指該微生物組合物不含有來自人類或動物之可偵測細胞且意指僅微生物細胞係可偵測的。在一項實施例中，大體上不含殘餘生境產物亦可意指該微生物組合物不含有可偵測之病毒(包括微生物病毒(例如，噬菌

體))、真菌、支原體污染物。在另一實施例中，相較於微生物細胞，其意指微生物組合物中小於 $1 \times 10^{-2}\%$ 、 $1 \times 10^{-3}\%$ 、 $1 \times 10^{-4}\%$ 、 $1 \times 10^{-5}\%$ 、 $1 \times 10^{-6}\%$ 、 $1 \times 10^{-7}\%$ 、 $1 \times 10^{-8}\%$ 之活細胞係人類或動物。達成此純度的方法有很多，該等方法中無任何一者係限制性的。因此，污染物可藉由通過在固體培養基上對單菌落進行多個畫線步驟，直至來自系列性單菌落之複製(諸如但不限於兩個)畫線已顯示僅單一菌落形態來分離所需成分而減少。或者，污染物之減少可藉由多輪連續稀釋至單一所需細胞(例如， 10^{-8} 或 10^{-9} 之稀釋)，諸如通過多個10倍連續稀釋完成。此可藉由顯示多個經分離之菌落具有相似細胞形狀及革蘭氏染色行為進一步證實。用於證實足夠之純度之其他方法包括遺傳分析(例如，PCR、DNA測序)、血清學及抗原分析、酶及代謝分析及使用儀器之方法，諸如使用自污染物區分所需成分之試劑之流式細胞術。

【0076】 如本文使用，「特異性結合」係指抗體結合至預定抗原之能力或多肽結合至其預定結合搭配物之能力。通常，抗體或多肽以對應於約 10^{-7} M或更小之 K_D 之親和力特異性結合至其預定抗原或結合搭配物，及以比其結合至非特異性及無關抗原/結合搭配物(例如，BSA、酪蛋白)之親和力低至少10倍、低至少100倍或低至少1000倍之親和力(以 K_D 表示)結合至預定抗原/結合搭配物。或者，特異性結合更廣泛地適用於雙組分系統，其中一種組分係蛋白質、脂質或碳水化合物或其組合並以特異性方式結合第二種組分，其係蛋白質、脂質、碳水化合物或其組合。

【0077】 術語「個體」或「病患」係指任何動物。描述為「有此需要」之個體或病患係指需要疾病治療之個體或病患。哺乳動物(即，哺乳類動物)包括人類、實驗室動物(例如，靈長類動物、大鼠、小鼠)、牲畜

(例如，牛、綿羊、山羊、豬)及家養寵物(例如，狗、貓、嚙齒動物)。

【0078】 「菌株」係指具有遺傳特徵之細菌物種之成員，該遺傳特徵使得其可與相同細菌物種之密切相關成員進行區分。遺傳特徵可為缺乏至少一個基因之所有或部分、缺乏至少調節區域(例如，啟動子、終止子、核糖開關、核糖體結合位點)上之所有或部分、缺乏(「固化」)至少一個天然質粒、存在至少一個重組基因、存在至少一個突變基因、存在至少一個外源基因(衍生自其他物種之基因)、存在至少一個突變調節區域(例如，啟動子、終止子、核糖開關、核糖體結合位點)、存在至少一個非天然質粒、存在至少一個抗生素抗性匣或其組合。不同菌株間之遺傳特徵可藉由PCR擴增且視需要接著進行受關注基因組區域或全基因組之DNA測序來識別。在其中一種菌株(與相同物種之另一菌株相比)已獲得或失去抗生素抗性或獲得或失去生物合成能力(諸如營養缺陷型菌株)之情況下，菌株可藉由分別使用抗生素或營養物/代謝物進行選擇或反選擇來區分。

【0079】 如本文使用，術語「治療」個體之疾病或「治療」患有或疑似患有疾病之個體係指使該個體經受醫藥治療，例如，一或多種藥劑之投與，使得該疾病之至少一種症狀減少或防止惡化。因此，在一項實施例中，「治療」尤其係指延遲進展、加快緩解、誘導緩解、增加緩解、加速恢復、增加替代治療之效力或降低對替代治療之抗性或其組合。

細菌

【0080】 在某些態樣中，本文提供包含細菌及/或製造自細菌之EV之醫藥組合物。

【0081】 在一些實施例中，獲得EV之細菌係經修飾以增強EV產生，以增強產生之EV之經口遞送(例如，藉由改善耐酸性、黏膜黏附性及/

或浸潤及/或對膽汁酸、消化酶之耐受性、對抗微生物肽及/或抗體中和之耐受性)，以靶向所需細胞類型(例如，M細胞、杯裝細胞、腸上皮細胞、樹突細胞、巨噬細胞)，以增強產生之EV之其等免疫調節及/或治療效應(例如，單獨或與其他治療劑組合使用)，及/或以由產生之EV增強免疫活化或抑制(例如，通過多糖、線毛、繖毛、黏附素之經修飾之產生)。在一些實施例中，本文描述之經改造之細菌係經修飾以改善細菌及/或EV製造(例如，更高之耐氧性、穩定性、經改善之凍融耐受性、較短之產生時間)。例如，在一些實施例中，本文描述之經改造之細菌包括具有一或多種遺傳改變之細菌，此改變係包含於細菌染色體或內源性質粒及/或一個或多個外源性質粒上之一或多個核苷酸之插入、刪除、易位或取代，或其任何組合，其中該遺傳改變可導致一或多個基因之過表現及/或低表現。經改造之微生物可使用此項技術中已知的任何技術產生，包括(但不限於)定點誘變、轉座子誘變、敲除、敲入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外線誘變、轉形(化學或藉由電穿孔)、噬菌體轉導、定向演化，或其任何組合。

【0082】 如本文使用，術語「細菌」廣泛地係指原核生物體(包括革蘭氏陽性及革蘭氏陰性生物體)之域。可用以產生本文描述之EV之細菌之物種及/或菌株之實例係提供於表1及/或表2中及整個說明書之其他地方。在一些實施例中，細菌菌株係具有與表1及/或表2中列舉之菌株具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列一致性之基因組之細菌菌株。在一些實施例中，該等EV係來自腫瘤營養性細菌。在一些實施例中，該等EV係來自免疫刺激細菌。在

一些實施例中，該等EV係來自免疫抑制細菌。在一些實施例中，該等EV係來自免疫調節細菌。在某些實施例中，EV係產生自本文提供之細菌菌株之組合。在一些實施例中，該組合係至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45或50個細菌菌株之組合。在一些實施例中，該組合包括來自表1及/或表2中列舉之細菌菌株及/或具有與表1及/或表2中列舉之菌株具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列一致性之基因組之細菌菌株之EV。

表1：示例性細菌菌株

OTU	公開DB登錄號
缺陷乏養菌	ACIN02000016
副毗鄰乏養菌	AB022027
乏養菌屬口腔純系P4PA_155 P1	AY207063
延長厭氧醋菌	NR_042930
解纖維醋弧菌	NR_025917
產乙醇醋弧菌	FR749897
醋化醋酸桿菌	NR_026121
可可豆醋酸桿菌	NR_042678
羅旺醋酸桿菌	NR_040832
蘋果醋酸桿菌	NR_025513
東方醋酸桿菌	NR_028625
巴氏醋酸桿菌	NR_026107
果實醋桿菌	NR_042112
蒲桃醋酸桿菌	NR_040868
熱帶醋酸桿菌	NR_036881
醋酸桿菌科細菌AT_5844	AGEZ01000040
萊氏無膽黴漿菌	NR_074448
反硝化無色桿菌	NR_042021
皮氏無色桿菌	ADMS01000149
木糖氧化無色桿菌	ACRC01000072
發酵胺基酸球菌	CP001859
腸胺基酸球菌	CP003058
胺基酸球菌屬D21	ACGB01000071

食醴酸葉菌	AY350586
食鐵嗜酸硫桿菌	NR_074660
食酸菌屬98_63833	AY258065
鮑曼氏不動桿菌	ACYQ01000014
乙酸鈣不動桿菌	AM157426
不動桿菌複合群C1	AY278636
溶血性不動桿菌	ADMT01000017
約氏不動桿菌	ACPL01000162
瓊氏不動桿菌	ACPM01000135
魯氏不動桿菌	ACPN01000204
小不動桿菌	AIEB01000124
抗輻射不動桿菌	ACVR01000010
申氏不動桿菌	NR_025412
不動桿菌屬56A1	GQ178049
不動桿菌屬CIP 101934	JQ638573
不動桿菌屬CIP 102143	JQ638578
不動桿菌屬CIP 53.82	JQ638584
不動桿菌屬M16_22	HM366447
不動桿菌屬RUH2624	ACQF01000094
不動桿菌屬SH024	ADCH01000068
伴放線放線桿菌	AY362885
小放線桿菌	ACFT01000025
胸膜肺炎放線桿菌	NR_074857
產琥珀酸放線桿菌	CP000746
豚放線桿菌	AEVG01000167
馬西裡氏放線桿菌	AF487679
夏氏放線桿菌	AY957507
放線桿菌屬BM#101342	AY282578
放線桿菌屬P2P_19 P1	AY207066
加地夫放線菌	GU470888
歐洲放線菌	NR_026363
芬氏放線菌	HQ906497
放線菌複合群C1	AY278610
放線菌複合群C2	AY278611
放線菌複合群P1口腔純系MB6_C03	DQ003632
喬氏放線菌	GU561319
以色列放線菌	AF479270
馬賽放線菌	AB545934
邁耶放線菌	GU561321
納士放線菌	X81062
鼻放線菌	AJ508455
紐氏放線菌	X71862
齶齒放線菌	ACYT01000123

山地放線菌	NR_025559
人口腔放線菌	AJ575186
口腔放線菌	BABV01000070
放線菌屬7400942	EU484334
放線菌屬c109	AB167239
放線菌屬CCUG 37290	AJ234058
放線菌屬ChDC B197	AF543275
放線菌屬GEJ15	GU561313
放線菌屬HKU31	HQ335393
放線菌屬ICM34	HQ616391
放線菌屬ICM41	HQ616392
放線菌屬ICM47	HQ616395
放線菌屬ICM54	HQ616398
放線菌屬M2231_94_1	AJ234063
放線菌屬口腔純系GU009	AY349361
放線菌屬口腔純系GU067	AY349362
放線菌屬口腔純系IO076	AY349363
放線菌屬口腔純系IO077	AY349364
放線菌屬口腔純系IP073	AY349365
放線菌屬口腔純系IP081	AY349366
放線菌屬口腔純系JA063	AY349367
放線菌屬口腔分類群170	AFBL01000010
放線菌屬口腔分類群171	AECW01000034
放線菌屬口腔分類群178	AEUH01000060
放線菌屬口腔分類群180	AEPP01000041
放線菌屬口腔分類群848	ACUY01000072
放線菌屬口腔分類群C55	HM099646
放線菌屬TeJ5	GU561315
泌尿生殖放線菌	ACFH01000038
黏性放線菌	ACRE01000096
產雌馬酚阿德勒氏菌	AB306661
棲血氣球菌	AY837833
豚氣球菌	CP002512
馬豚氣球菌	NR_043443
綠色氣球菌	ADNT01000041
海洋氣微菌	NR_025681
氣微菌屬JC14	JF824798
異常嗜醣氣單胞菌	S39232
腸棕氣單胞菌	X71121
嗜水氣單胞菌	NC_008570
簡氏氣單胞菌	X60413
殺鮭氣單胞菌	NC_009348
易損氣單胞菌	X60415

維羅氏氣單胞菌	NR_044845
阿菲波菌複合群4	EU117385
伴放線凝聚桿菌	CP001733
嗜沫凝聚桿菌	CP001607
惰性凝聚桿菌	AEPS01000017
放射形土壤桿菌	CP000628
根癌土壤桿菌	AJ389893
耶納膿球菌	NR_026275
嗜黏蛋白阿克曼氏菌	CP001071
糞產鹼桿菌	AB680368
產鹼桿菌屬CO14	DQ643040
產鹼桿菌屬S3	HQ262549
酸熱脂環酸芽孢桿菌	NR_074721
酸土脂環酸芽孢桿菌	NR_040844
汙染脂環酸芽孢桿菌	NR_041475
產環庚酸性脂環酸芽孢桿菌	NR_024754
草脂環酸芽孢桿菌	NR_024753
果實脂環酸芽孢桿菌	NR_024801
脂環酸芽孢桿菌屬CCUG 53762	HE613268
芬戈爾德氏另枝菌	NR_043064
不明顯另枝菌	AB490804
奧登多克氏另枝菌	NR_043318
腐敗另枝菌	ABFK02000017
沙氏另枝菌	FP929032
另枝菌屬HGB5	AENZ01000082
另枝菌屬JC50	JF824804
另枝菌屬RMA 9912	GQ140629
金屬還原嗜鹼菌	AY137848
奧倫蘭氏嗜鹼菌	NR_043674
廣棲別樣斯卡多維氏菌	NR_042583
別樣斯卡多維氏菌屬OB7196	AB425070
產氫厭氧菌	ACJX02000009
產琥珀酸厭氧螺菌	NR_026075
托馬斯厭氧螺菌	AJ420985
氫化厭氧球菌	ABXA01000039
解乳厭氧球菌	ABYO01000217
八疊厭氧球菌	NR_026360
普氏厭氧球菌	CP001708
厭氧球菌屬8404299	HM587318
厭氧球菌屬8405254	HM587319
厭氧球菌屬9401487	HM587322
厭氧球菌屬9403502	HM587325
厭氧球菌屬gpac104	AM176528

厭氧球菌屬gpac126	AM176530
厭氧球菌屬gpac155	AM176536
厭氧球菌屬gpac199	AM176539
厭氧球菌屬gpac215	AM176540
四聯厭氧球菌	ACGC01000107
陰道厭氧球菌	ACXU01000016
人糞厭氧棒形菌	ABIL02000005
孿生厭氧球形菌	AGCJ01000054
運動厭氧孢桿菌	NR_042953
糞厭氧棒狀菌	ABAX03000023
厭氧棒狀菌屬3_2_56FAA	ACWB01000002
黑羅特克斯歐里何米尼斯菌	ABGD02000021
邊緣邊蟲	ABOR01000019
嗜吞噬細胞邊蟲	NC_007797
解硫胺素硫胺素芽孢桿菌	AB101592
米氏解硫胺素芽孢桿菌	NR_028657
米氏解硫胺素芽孢桿菌	NR_036799
嗜熱嗜氣解硫胺素芽孢桿菌	NR_042271
嗜熱氣解硫胺素芽孢桿菌	NR_029303
污染厭氧芽孢桿菌	NR_029006
黃色嗜熱厭氧芽孢桿菌	NR_074667
溶血隱秘桿菌	NR_025347
化膿隱秘桿菌	GU585578
布氏弓形桿菌	AEPT01000071
嗜低溫弓形桿菌	NR_025905
運動節桿菌	NR_026198
阿氏節桿菌	NR_074608
貝熱爾氏節桿菌	NR_025612
球形節桿菌	NR_026187
煙草節桿菌	NR_026190
微小奇異菌	HM007583
極小奇異菌	CP001721
齧裂奇異菌	ACFE01000007
奇異菌屬BS2	HQ616367
奇異菌屬F0209	EU592966
奇異菌屬ICM42b10	HQ616393
奇異菌屬ICM57	HQ616400
陰道奇異菌	AEDQ01000024
殺珊瑚橙色單胞菌	AY065627
阿爾塔米拉洞橙色單胞菌	FN658986
<i>Auritibacter ignavus</i>	FN554542
達爾豪斯艾弗裡菌	DQ481464
風化芽孢桿菌	NR_025557

嗜氣芽孢桿菌	NR_042339
艾氏芽孢桿菌	GQ980243
嗜鹼芽孢桿菌	X76436
解澱粉芽孢桿菌	NR_075005
炭疽芽孢桿菌	AAEN01000020
萎縮芽孢桿菌	NR_075016
栗褐芽孢桿菌	NR_036893
蠟樣芽孢桿菌	ABDJ01000015
環狀芽孢桿菌	AB271747
克勞氏芽孢桿菌	FN397477
凝結芽孢桿菌	DQ297928
堅韌芽孢桿菌	NR_025842
彎曲芽孢桿菌	NR_024691
福氏芽孢桿菌	NR_025786
明膠芽孢桿菌	NR_025595
鹽沼芽孢桿菌	NR_026144
耐鹽芽孢桿菌	AY144582
黑布施泰因芽孢桿菌	NR_042286
霍爾氏芽孢桿菌	NR_036860
病研所芽孢桿菌	NR_043268
遲緩芽孢桿菌	NR_040792
地衣芽孢桿菌	NC_006270
巨大芽孢桿菌	GU252124
尼氏芽孢桿菌	NR_044546
農研所芽孢桿菌	NR_043334
菸酸芽孢桿菌	NR_024695
抱川芽孢桿菌	NR_041377
短小芽孢桿菌	NR_074977
沙福芽孢桿菌	JQ624766
單純芽孢桿菌	NR_042136
索諾氏芽孢桿菌	NR_025130
芽孢桿菌屬10403023 MM10403188	CAET01000089
芽孢桿菌屬2_A_57_CT2	ACWD01000095
芽孢桿菌屬2008724126	GU252108
芽孢桿菌屬2008724139	GU252111
芽孢桿菌屬7_16AIA	FN397518
芽孢桿菌屬9_3AIA	FN397519
芽孢桿菌屬AP8	JX101689
芽孢桿菌屬B27(2008)	EU362173
芽孢桿菌屬BT1B_CT2	ACWC01000034
芽孢桿菌屬GB1.1	FJ897765
芽孢桿菌屬GB9	FJ897766
芽孢桿菌屬HU19.1	FJ897769

芽孢桿菌屬HU29	FJ897771
芽孢桿菌屬HU33.1	FJ897772
芽孢桿菌屬JC6	JF824800
芽孢桿菌屬口腔分類群F26	HM099642
芽孢桿菌屬口腔分類群F28	HM099650
芽孢桿菌屬口腔分類群F79	HM099654
芽孢桿菌屬SRC_DSF1	GU797283
芽孢桿菌屬SRC_DSF10	GU797292
芽孢桿菌屬SRC_DSF2	GU797284
芽孢桿菌屬SRC_DSF6	GU797288
芽孢桿菌屬tc09	HQ844242
芽孢桿菌屬zh168	FJ851424
球形芽孢桿菌	DQ286318
產孢芽孢桿菌	NR_026010
枯草芽孢桿菌	EU627588
嗜熱澱粉芽孢桿菌	NR_029151
蘇雲金芽孢桿菌	NC_008600
魏氏芽孢桿菌	NR_074926
擬桿菌目細菌ph8	JN837494
擬桿菌複合群P1	AY341819
擬桿菌複合群P2口腔純系MB1_G13	DQ003613
擬桿菌複合群P3口腔純系MB1_G34	DQ003615
擬桿菌複合群P4口腔純系MB2_G17	DQ003617
擬桿菌複合群P5口腔純系MB2_P04	DQ003619
擬桿菌複合群P6口腔純系MB3_C19	DQ003634
擬桿菌複合群P7口腔純系MB3_P19	DQ003623
擬桿菌複合群P8口腔純系MB4_G15	DQ003626
生酸擬桿菌	NR_028607
巴氏桿菌擬桿菌	NR_041446
糞擬桿菌	EU136686
解纖維素擬桿菌	ACCH01000108
克拉氏擬桿菌	AFBM01000011
凝固擬桿菌	AB547639
糞居擬桿菌	ABIY02000050
嗜糞擬桿菌	ACBW01000012
多裡氏擬桿菌	ABWZ01000093
埃氏擬桿菌	ACWG01000065
糞便擬桿菌	GQ496624
芬戈爾德氏擬桿菌	AB222699
曲黴擬桿菌	AFBN01000029
脆弱擬桿菌	AP006841
半乳糖醛酸擬桿菌	DQ497994
潰瘍擬桿菌	CP002352

解肝素擬桿菌	JN867284
腸擬桿菌	ABJL02000006
馬賽擬桿菌	AB200226
諾德擬桿菌	NR_043017
<i>Bacteroides oleiciplenus</i>	AB547644
卵形擬桿菌	ACWH01000036
果膠擬桿菌	ABVQ01000036
普通擬桿菌	AB200218
化膿性擬桿菌	NR_041280
<i>Bacteroides salanitronis</i>	CP002530
<i>Bacteroides salyersiae</i>	EU136690
擬桿菌屬1_1_14	ACRP01000155
擬桿菌屬1_1_30	ADCL01000128
擬桿菌屬1_1_6	ACIC01000215
擬桿菌屬2_1_22	ACPQ01000117
擬桿菌屬2_1_56FAA	ACWI01000065
擬桿菌屬2_2_4	ABZZ01000168
擬桿菌屬20_3	ACRQ01000064
擬桿菌屬3_1_19	ADCJ01000062
擬桿菌屬3_1_23	ACRS01000081
擬桿菌屬3_1_33FAA	ACPS01000085
擬桿菌屬3_1_40A	ACRT01000136
擬桿菌屬3_2_5	ACIB01000079
擬桿菌屬315_5	FJ848547
擬桿菌屬31SF15	AJ583248
擬桿菌屬31SF18	AJ583249
擬桿菌屬35AE31	AJ583244
擬桿菌屬35AE37	AJ583245
擬桿菌屬35BE34	AJ583246
擬桿菌屬35BE35	AJ583247
擬桿菌屬4_1_36	ACTC01000133
擬桿菌屬4_3_47FAA	ACDR02000029
擬桿菌屬9_1_42FAA	ACAA01000096
擬桿菌屬AR20	AF139524
擬桿菌屬AR29	AF139525
擬桿菌屬B2	EU722733
擬桿菌屬D1	ACAB02000030
擬桿菌屬D2	ACGA01000077
擬桿菌屬D20	ACPT01000052
擬桿菌屬D22	ADCK01000151
擬桿菌屬F_4	AB470322
擬桿菌屬NB_8	AB117565
擬桿菌屬WH2	AY895180

擬桿菌屬XB12B	AM230648
擬桿菌屬XB44A	AM230649
糞便擬桿菌	ABFZ02000022
多形擬桿菌	NR_074277
單形擬桿菌	AB050110
解尿素擬桿菌	GQ167666
普通擬桿菌	CP000139
木聚糖酶擬桿菌	ADKP01000087
擬桿菌門細菌口腔分類群D27	HM099638
擬桿菌門細菌口腔分類群F31	HM099643
擬桿菌門細菌口腔分類群F44	HM099649
腸道巴氏桿菌	AB370251
腸居巴氏桿菌	NR_041508
桿菌狀巴爾通氏體	NC_008783
格氏巴爾通氏體	CP001562
漢氏巴爾通氏體	NC_005956
五日熱巴爾通氏體	BX897700
泰咪爾巴爾通氏體	EF672728
華氏巴爾通氏體	FJ719017
布德樓弧菌屬MPA	AY294215
雙歧桿菌複合群C1	AY278612
青春雙歧桿菌	AAXD02000018
角雙歧桿菌	ABYS02000004
動物雙歧桿菌	CP001606
兩歧雙歧桿菌	ABQP01000027
短雙歧桿菌	CP002743
鏈狀雙歧桿菌	ABXY01000019
牙雙歧桿菌	CP001750
沒食子雙歧桿菌	ABXB03000004
嬰兒雙歧桿菌	AY151398
卡氏雙歧桿菌	AB491757
長雙歧桿菌	ABQQ01000041
假鏈狀雙歧桿菌	ABXX02000002
偽長雙歧桿菌	NR_043442
斯氏雙歧桿菌	AJ307005
雙歧桿菌屬HM2	AB425276
雙歧桿菌屬HMLN12	JF519685
雙歧桿菌屬M45	HM626176
雙歧桿菌屬MSX5B	HQ616382
雙歧桿菌屬TM_7	AB218972
嗜熱雙歧桿菌	DQ340557
尿雙歧桿菌	AJ278695
對沃氏嗜膽菌	ADCP01000166

比斯加德分類群	AY683487
比斯加德分類群	AY683489
比斯加德分類群	AY683491
比斯加德分類群	AY683492
泳池芽單胞菌	NR_040824
球形布勞特氏菌	AB571656
格魯氏(Glucerasea)布勞特氏菌	AB588023
格魯氏(Glucerasei)布勞特氏菌	AB439724
漢森布勞特氏菌	ABYU02000037
產氫營養型布勞特氏菌	ACBZ01000217
盧氏布勞特氏菌	AB691576
生產性布勞特氏菌	AB600998
申克布勞特氏菌	NR_026312
布勞特氏菌屬M25	HM626178
糞便布勞特氏菌	HM626177
韋氏布勞特氏菌	EF036467
支氣管炎鮑特氏菌	NR_025949
霍爾氏鮑特氏菌	AB683187
副百日咳鮑特氏菌	NR_025950
百日咳鮑特氏菌	BX640418
阿氏螺旋體	ABCU01000001
伯氏螺旋體	ABGI01000001
麝鼠勺螺旋體	DQ057990
達頓螺旋體	NC_011229
伽氏螺旋體	ABJV01000001
赫氏螺旋體	AY597657
西班牙螺旋體	DQ057988
伊朗包柔氏螺旋體	HM161645
回歸熱包柔氏螺旋體	AF107367
螺旋體屬NE49	AJ224142
斯皮爾曼螺旋體	ABKB01000002
墨西哥包柔氏螺旋體	NC_008710
法雷斯螺旋體	ABCY01000002
食物短桿菌	NR_026269
凝聚短桿菌	AB537169
乳酪發酵短桿菌	NR_026272
阿爾博氏短螺菌	FM178386
毛腸短螺菌	NR_075069
短螺菌屬HIS3	FM178387
短螺菌屬HIS4	FM178388
短螺菌屬HIS5	FM178389
土壤短桿菌	NR_040983
短短桿菌	NR_041524

中孢短桿菌	NR_043414
橋石短桿菌	NR_040980
短桿菌汙染短桿菌	NR_041836
側孢短桿菌	NR_037005
類短短桿菌	NR_040981
羅伊氏短桿菌	NR_040982
短桿菌屬phR	JN837488
嗜熱短桿菌	NR_026514
橙黃短桿菌	NR_044854
乳酪短桿菌	JF951998
表皮短桿菌	NR_029262
冷藏短桿菌	NR_042639
亞麻短桿菌	AJ315491
麥克布瑞德氏短桿菌	ADNU01000076
少食短桿菌	EU086796
血短桿菌	NR_028016
短桿菌屬H15	AB177640
短桿菌屬JC43	JF824806
近弧狀短波單胞菌	CP002102
流產布氏桿菌	ACBJ01000075
犬布氏桿菌	NR_044652
鯨種布氏桿菌	ACJD01000006
地中海熱布氏桿菌	AE009462
田鼠布氏桿菌	NR_042549
綿羊布氏桿菌	NC_009504
布氏桿菌屬83_13	ACBQ01000040
布氏桿菌屬BO1	EU053207
豬布氏桿菌	ACBK01000034
需甲酸鹽布瑞特氏菌	ACCL02000018
蚜蟲初級內共生菌	NR_074609
緩慢布雷德菌	ADFR01000011
鬚芒草伯克霍爾德菌	AAUZ01000009
新洋蔥伯克霍爾德菌	AAHI01000060
洋蔥伯克霍爾德菌	NR_041719
鼻疽伯克霍爾德菌	CP000547
多食伯克霍爾德菌	NC_010086
俄克拉何馬伯克霍爾德菌	DQ108388
假性鼻疽伯克霍爾德菌	CP001408
產根黴素伯克霍爾德菌	HQ005410
伯克霍爾德菌屬383	CP000151
食異生素伯克霍爾德菌	U86373
伯克霍爾德菌細菌1_1_47	ADCQ01000066
普利卡柯倫丁酸球菌	HH793440

維羅薩丁酸單胞菌	AB443949
穗狀丁酸弧菌	ABWN01000012
溶纖維丁酸弧菌	U41172
錳氧化暖單胞菌	NR_040787
生孢卡米尼希拉菌	NR_025485
結腸彎曲桿菌	AAFL01000004
簡要彎曲桿菌	CP000792
曲形彎曲桿菌	NC_009715
胎兒彎曲桿菌	ACLG01001177
纖細彎曲桿菌	ACYG01000026
人彎曲桿菌	NC_009714
空腸彎曲桿菌	AL139074
紅嘴鷗彎曲桿菌	CP000932
直腸彎曲桿菌	ACFU01000050
昭和彎曲桿菌	ACVQ01000030
彎曲桿菌屬FOBRC14	HQ616379
彎曲桿菌屬FOBRC15	HQ616380
彎曲桿菌屬口腔純系BB120	AY005038
生痰彎曲桿菌	NR_044839
烏普薩拉彎曲桿菌	AEPU01000040
分節絲狀菌屬SFB_小鼠_Yit	NR_074460
葉蟬內共生菌	CP002163
犬咬嗜二氧化碳噬纖維細菌	CP002113
嗜二氧化碳噬纖維細菌複合群C1	AY278613
牙齦嗜二氧化碳噬纖維細菌	ACLQ01000011
顆粒嗜二氧化碳噬纖維細菌	X97248
黃褐嗜二氧化碳噬纖維細菌	AEOH01000054
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬GEJ8	GU561335
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔純系AH015	AY005074
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔純系ASCH05	AY923149
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔純系ID062	AY349368
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔菌株A47ROY	AY005077
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔菌株S3	AY005073
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬口腔分類群338	AEXX01000050
嗜二氧化碳噬纖維細菌屬S1b	U42009
生痰嗜二氧化碳噬纖維細菌	ABZV01000054
人心桿菌	ACKY01000036
瓣膜心桿菌	NR_028847
廣布肉桿菌	NR_044706
產乳酸菌素肉桿菌	NC_019425
香港海鷗菌	AB671763
光岡鏈型桿菌	AB030224
卡托氏菌複合群P1口腔純系MB5_P12	DQ003629

痰卡托氏菌	ACIL02000016
卡托氏菌屬口腔純系FL037	AY349369
戴氏西地西菌	AF493976
芬氏纖維菌	AY501364
索拉鯨桿菌	AJ438155
鼠衣原體	AE002160
鸚鵡熱衣原體	NR_036864
沙眼衣原體	U68443
衣原體目細菌NS11	JN606074
衣原體目細菌NS13	JN606075
衣原體目細菌NS16	JN606076
獸類衣原體	D88317
肺炎衣原體	NC_002179
鸚鵡熱嗜性衣原體	D85712
綠彎菌複合群P1	AY331414
小克裡斯滕森氏菌	AB490809
紫色色桿菌	NC_005085
人類金黃色桿菌	AM982793
黏金黃色桿菌	ACKQ02000003
人金黃色桿菌	NR_042517
無丙二酸檸檬酸桿菌	FR870441
布氏檸檬酸桿菌	NR_028687
法氏檸檬酸桿菌	AF025371
弗氏檸檬酸桿菌	NR_028894
吉利檸檬酸桿菌	AF025367
柯氏檸檬酸桿菌	NC_009792
莫林檸檬酸桿菌	AF025369
鼠檸檬酸桿菌	NR_074903
塞氏檸檬酸桿菌	AF025364
檸檬酸桿菌屬30_2	ACDJ01000053
檸檬酸桿菌屬KMSI_3	GQ468398
沃克曼檸檬酸桿菌	AF025373
楊氏檸檬酸桿菌	ABWL02000011
埃夫裡桿菌	GQ258966
梭菌科細菌END_2	EF451053
梭菌科細菌JC13	JF824807
梭菌屬細菌1_7_47FAA	ABQR01000074
梭菌屬細菌9400853	HM587320
梭菌屬細菌9403326	HM587324
梭菌屬細菌口腔純系P4PA_66 P1	AY207065
梭菌屬細菌口腔分類群093	GQ422712
梭菌屬細菌口腔分類群F32	HM099644
梭菌屬細菌ph2	JN837487

梭菌屬細菌SY8519	AB477431
梭菌複合群BVAB3	CP001850
梭菌屬SM4_1	FP929060
梭菌屬SS3_4	AY305316
梭菌屬SSC_2	FP929061
丙酮丁醇梭酸	NR_074511
耐氧梭酸	X76163
阿爾登氏梭菌	NR_043680
奧德里奇氏梭菌	NR_026099
藻狀梭菌	NR_041746
解藻木聚糖梭菌	NR_028726
胺基戊酸梭菌	NR_029245
苦杏仁梭菌	AY353957
阿根廷梭菌	NR_029232
天門冬形梭菌	ACCJ01000522
巴氏梭菌	NR_029229
巴特氏梭菌	ABEZ02000012
拜氏梭菌	NR_074434
雙醇素梭菌	X73437
鮑氏梭菌	ABCC02000039
肉毒梭菌	NC_010723
丁酸梭菌	ABDT01000017
屍毒梭菌	AB542932
食氧化碳梭菌	FR733710
肉梭菌	NR_044716
隱藏梭菌	X77844
速生梭菌	JQ246092
纖維素梭菌	NR_044624
尚沃氏梭菌	EU106372
香茅梭菌	ADLJ01000059
澄清梭菌	NR_041235
梭狀梭菌	M59089
梭形梭菌	NR_044715
球形梭菌	EF025906
匙形梭菌	NR_044717
耳蝸形梭菌	NR_026495
犬腸梭菌	FJ957863
鷓鴣梭菌	NR_026151
難辨梭菌	NC_013315
雙孢梭菌	NR_026491
酯化梭菌	NR_042153
福氏梭菌	NR_044714
<i>Clostridium favosporum</i>	X76749

費新尼亞梭菌	AF270502
梭狀梭菌	NR_024919
產氣梭菌	NR_024945
戈氏梭菌	AB542933
乙二醇梭菌	FJ384385
人糞梭菌	AB233029
溶血梭菌	NR_024749
哈氏梭菌	AY552788
平野氏梭菌	AB023970
溶組織梭菌	HF558362
海氏梭菌	AB023973
吡哌梭菌	AF028351
無害梭菌	M23732
不規則梭菌	NR_029249
板藍根梭菌	NR_026347
克氏梭菌	NR_074165
發酵乳糖梭菌	NR_025651
拉瓦勒塞梭菌	EF564277
柔嫩梭菌	AJ305238
泥渣梭菌	FR870444
大梭菌	X77835
惡名梭菌	FR749893
馬約貝梭菌	FR733682
甲基戊糖梭菌	ACEC01000059
系結梭菌	X73443
諾維氏梭菌	NR_074343
酪酸梭菌	Y18187
乳清酸梭菌	FR749922
副腐敗梭菌	AB536771
產氣莢膜梭菌	ABDW01000023
植物發酵梭菌	NR_074652
毛髮狀梭菌	D14639
腐敗梭菌	NR_024995
奎尼梭菌	NR_026149
多枝梭菌	M23731
直腸梭菌	NR_029271
噬糖梭菌	DQ100445
化糖梭菌	CP002109
撒丁島梭菌	NR_041006
煎盤梭菌	NR_026490
裂解梭菌	AF262238
敗血梭菌	NR_026020
索氏梭菌	AB448946

梭菌屬7_2_43FAA	ACDK01000101
梭菌屬D5	ADBG01000142
梭菌屬HGF2	AENW01000022
梭菌屬HPB_46	AY862516
梭菌屬JC122	CAEV01000127
梭菌屬L2_50	AA YW02000018
梭菌屬L MG 16094	X95274
梭菌屬M62_1	ACFX02000046
梭菌屬MLG055	AF304435
梭菌屬MT4 E	FJ159523
梭菌屬NMBHI_1	JN093130
梭菌屬NML 04A032	EU815224
梭菌屬SS2_1	ABGC03000041
梭菌屬SY8519	AP012212
梭菌屬TM_40	AB249652
梭菌屬YIT 12069	AB491207
梭菌屬YIT 12070	AB491208
楔樣梭菌	X73449
螺狀梭菌	X73441
生孢梭菌	ABKW02000003
球孢梭菌	NR_044835
糞堆梭菌	NR_025100
斯蒂克蘭德氏梭菌	L04167
斯特拉文斯梭菌	NR_024829
近端梭菌	NR_041795
產硫梭菌	NR_044161
共生梭菌	ADLQ01000114
第三梭菌	Y18174
破傷風梭菌	NC_004557
嗜熱纖維梭菌	NR_074629
酪丁酸梭菌	NR_044718
綠色梭菌	NR_026204
解木聚糖梭菌	NR_037068
產氣柯林斯菌	AAVN02000007
腸柯林斯菌	ABXH02000037
糞便柯林斯菌	ABXJ01000150
田中氏柯林斯菌	AB490807
叢毛單胞菌科細菌NML000135	JN585335
叢毛單胞菌科細菌NML790751	JN585331
叢毛單胞菌科細菌NML910035	JN585332
叢毛單胞菌科細菌NML910036	JN585333
叢毛單胞菌科細菌口腔分類群F47	HM099651
叢毛單胞菌屬NSP5	AB076850

奎尼氏康曲奉菌	NR_041821
鏈型冀芽孢菌	AB030218
冀芽孢菌屬29_1	ADKX01000057
冀芽孢菌屬D7	ACDT01000199
靈巧冀球菌	EU266552
陪伴冀球菌	ABVR01000038
一致冀球菌	EF031543
冀球菌屬ART55_1	AY350746
紅螞菌科細菌BV3Ac1	JN809768
紅螞菌科細菌JC110	CAEM01000062
紅螞菌科細菌pH1	JN837493
擁擠棒狀桿菌	ACGD01000048
產氨棒狀桿菌	ADNS01000011
無枝菌酸棒狀桿菌	ABZU01000033
闌尾棒狀桿菌	NR_028951
銀色棒狀桿菌	EF463055
<i>Corynebacterium atypicum</i>	NR_025540
金色黏液棒狀桿菌	ACLH01000041
牛棒狀桿菌	AF537590
犬棒狀桿菌	GQ871934
乳酪棒狀桿菌	NR_025101
混雜棒狀桿菌	Y15886
科伊爾棒狀桿菌	X96497
白喉棒狀桿菌	NC_002935
硬棒狀桿菌	Z97069
高效棒狀桿菌	ACLI01000121
福氏棒狀桿菌	Y13024
微黃棒狀桿菌	NR_037040
生殖器棒狀桿菌	ACLJ01000031
灰棒狀桿菌	NR_028971
解葡萄糖苷棒狀桿菌	ABYP01000081
麩胺酸棒狀桿菌	BA000036
漢森棒狀桿菌	AM946639
模擬棒狀桿菌	AF537597
傑氏棒狀桿菌	ACYW01000001
克羅彭施泰特氏棒狀桿菌	NR_026380
黃色嗜脂棒狀桿菌	ACHJ01000075
麥氏棒狀桿菌	AB359393
乳腺炎棒狀桿菌	AB359395
馬氏棒狀桿菌	ACSH02000003
微細棒狀桿菌	X82064
產黏棒狀桿菌	NR_026396
丙酸棒狀桿菌	NR_037038

假白喉棒狀桿菌	X84258
假生殖道棒狀桿菌	ABYQ01000237
假結核棒狀桿菌	NR_037070
產丙酮酸棒狀桿菌	FJ185225
腎棒狀桿菌	NR_037069
抗棒狀桿菌	ADGN01000058
裡氏棒狀桿菌	EU848548
模擬棒狀桿菌	AF537604
單側棒狀桿菌	NR_026394
棒狀桿菌屬 <i>lex</i> 綿羊	Y13427
棒狀桿菌屬 L_2012475	HE575405
棒狀桿菌屬 NML 93_0481	GU238409
棒狀桿菌屬 NML 97_0186	GU238411
棒狀桿菌屬 NML 99_0018	GU238413
紋帶棒狀桿菌	ACGE01000001
桑氏棒狀桿菌	Y09655
結核硬脂酸棒狀桿菌	ACVP01000009
托氏桿菌棒狀桿菌	AY677186
潰瘍棒狀桿菌	NR_074467
解脲棒狀桿菌	X81913
快速食尿棒狀桿菌	AM397636
可變棒狀桿菌	NR_025314
乾燥棒狀桿菌	FN179330
貝納特氏立克次體	CP000890
丙二酸鹽克羅諾桿菌	GU122174
阪崎克羅諾桿菌	NC_009778
圖列茨克羅諾桿菌	FN543093
銼隱小桿菌	GQ422741
耐金屬貪銅菌	GU230889
解木聚糖噬細胞菌	FR733683
脫鐵桿菌屬口腔純系JV001	AY349370
脫鐵桿菌屬口腔純系JV006	AY349371
脫鐵桿菌屬口腔純系JV023	AY349372
耐輻射異常球菌	AE000513
異常球菌屬 R_43890	FR682752
食酸代爾夫特菌	CP000884
人皮膚桿菌	FJ263375
皮生球菌屬 Ellin185	AEIQ01000090
活躍鏈孢子菌	AM940019
鏈孢子菌屬 8437	AFHT01000143
弗氏脫硫桿菌	AJ276701
哈氏脫硫桿菌	NR_074996

脫硫球莖菌屬口腔純系CH031	AY005036
致黑脫硫腸狀菌	NR_044832
脫硫脫硫弧菌	DQ092636
費爾韋德脫硫弧菌	U42221
<i>Desulfovibrio piger</i>	AF192152
脫硫弧菌屬3_1_syn3	ADDR01000239
尋常型脫硫弧菌	NR_074897
渾濁戴阿利斯特菌	ACIM02000001
微好氣戴阿利斯特菌	AFBB01000028
微好氣戴阿利斯特菌	AENT01000008
侵肺戴阿利斯特菌	HM596297
產丙酸戴阿利斯特菌	NR_043231
戴阿利斯特菌屬口腔分類群502	GQ422739
嗜琥珀酸戴阿利斯特菌	AB370249
鹼湖迪茨氏菌	GQ870426
迪茨氏菌屬BBDP51	DQ337512
迪茨氏菌屬CA149	GQ870422
帝汶迪茨氏菌	GQ870424
產甲酸多爾氏菌	AAXA02000006
長鏈多爾氏菌	AJ132842
嘉德營發酵單胞菌	ADLV01000001
莫斯氏營發酵單胞菌菌	ADLW01000023
遲鈍愛德華菌	CP002154
遲緩埃格特菌	AF292375
中華埃格特菌	AY321958
埃格特菌屬1_3_56FAA	ACWN01000099
埃格特菌屬HGA1	AEXR01000021
埃格特菌屬YY7918	AP012211
查菲艾利希體	AAIF01000035
嚙蝕艾肯氏菌	ACEA01000028
氣囊棲水菌	ACYI01000081
產氣腸桿菌	AJ251468
阿氏腸桿菌	NR_024640
生癌腸桿菌	Z96078
陰溝腸桿菌	FP929040
考氏腸桿菌	NR_025566
霍氏腸桿菌	AFHR01000079
腸桿菌屬247BMC	HQ122932
腸桿菌屬638	NR_074777
腸桿菌屬JC163	JN657217
腸桿菌屬SCSS	HM007811
腸桿菌屬TSE38	HM156134
腸桿菌科細菌9_2_54FAA	ADCU01000033

腸桿菌科細菌CF01Ent_1	AJ489826
腸桿菌科細菌Smarlab 3302238	AY538694
鳥腸球菌	AF133535
糞腸球菌	AY943820
酪黃腸球菌	AEWT01000047
耐久腸球菌	AJ276354
糞腸球菌	AE016830
屎腸球菌	AM157434
鶉雞腸球菌	AB269767
灰黃腸球菌	AY033814
夏威夷腸球菌	AY321377
希氏腸球菌	AF061011
義大利腸球菌	AEPV01000109
蒙氏腸球菌	NR_024906
棉子糖腸球菌	FN600541
腸球菌屬BV2CASA2	JN809766
腸球菌屬CCRI_16620	GU457263
腸球菌屬F95	FJ463817
腸球菌屬RfL6	AJ133478
泰國腸球菌	AY321376
陰道孤獨球菌	AENN01000008
意外丹毒絲菌	NR_025594
豬紅斑丹毒絲菌	ACLK01000021
扁桃體丹毒絲菌	NR_040871
丹毒絲菌科細菌3_1_53	ACTJ01000113
丹毒絲菌科細菌5_2_54FAA	ACZW01000054
艾伯氏大腸桿菌	ABKX01000012
大腸桿菌	NC_008563
弗格森氏大腸桿菌	CU928158
赫爾曼氏大腸桿菌	HQ407266
大腸桿菌屬1_1_43	ACID01000033
大腸桿菌屬4_1_40B	ACDM02000056
大腸桿菌屬B4	EU722735
傷口埃希菌	NR_041927
哈爾濱產乙醇桿菌	AY675965
真桿菌科細菌P4P_50 P4	AY207060
巴克氏真桿菌	NR_044661
兩形真桿菌	ABYT01000002
短真桿菌	U13038
布氏真桿菌	NR_024682
卡氏真桿菌	NR_026330
溶纖維素真桿菌	AY178842
扭曲真桿菌	FR749946

產糞甾醇真桿菌	HM037995
圓柱狀真桿菌	FP929041
鏈狀真桿菌	NR_044644
細長真桿菌	L34682
挑剔真桿菌	CP001104
斷鏈真桿菌	FR749935
龐大真桿菌	FR749933
霍氏真桿菌	L34621
嬌弱真桿菌	U13039
淤泥真桿菌	CP002273
串珠狀真桿菌	HF558373
多形真桿菌	NR_024683
產亞硝酸真桿菌	NR_024684
糾纏真桿菌	U13041
細枝真桿菌	AJ011522
直腸真桿菌	FP929042
反芻真桿菌	NR_024661
口臭真桿菌	AB525414
隱枝真桿菌	NR_026031
惰性真桿菌	ABCA03000054
真桿菌屬3_1_31	ACTL01000045
真桿菌屬AS15b	HQ616364
真桿菌屬OBRC9	HQ616354
真桿菌屬口腔純系GI038	AY349374
真桿菌屬口腔純系IR009	AY349376
真桿菌屬口腔純系JH012	AY349373
真桿菌屬口腔純系JI012	AY349379
真桿菌屬口腔純系JN088	AY349377
真桿菌屬口腔純系JS001	AY349378
真桿菌屬口腔純系OH3A	AY947497
真桿菌屬WAL 14571	FJ687606
纖細真桿菌	M59118
多曲真桿菌	NR_044648
凸腹真桿菌	L34421
嗜木聚糖真桿菌	L34628
尤氏真桿菌	AEES01000073
美洲愛文氏菌	JN175329
乙醯微小桿菌	FJ970034
人費克藍姆菌	Y10772
普氏糞桿菌	ACOP02000011
齧溝產線菌	CP002390
絨毛產線菌	NR_041928
大芬戈爾德菌	ACHM02000001

黃桿菌科基因屬C1	AY278614
黃桿菌屬NF2_1	FJ195988
普氏梭桿菌	AY724678
拉氏彎螺菌	AY126479
紅海灣揉桿菌	NR_074881
新兇手法蘭西斯菌	ABSS01000002
蜃樓法蘭西斯氏菌	AY928394
土拉法蘭西斯氏菌	ABAZ01000082
黃腐病菌屬NML 060897	EF589680
犬貓科梭桿菌	AY162222
梭桿菌複合群C1	AY278616
梭桿菌複合群C2	AY278617
微生子梭桿菌	ACET01000043
死亡梭桿菌	ACDB02000034
舟形梭桿菌	HQ223106
壞疽梭桿菌	X55408
壞死梭桿菌	AM905356
核粒梭桿菌	ADVK01000034
牙周梭桿菌	ACJY01000002
拉氏梭桿菌	NR_044687
梭桿菌屬1_1_41FAA	ADGG01000053
梭桿菌屬11_3_2	ACUO01000052
梭桿菌屬12_1B	AGWJ01000070
梭桿菌屬2_1_31	ACDC02000018
梭桿菌屬3_1_27	ADGF01000045
梭桿菌屬3_1_33	ACQE01000178
梭桿菌屬3_1_36A2	ACPU01000044
梭桿菌屬3_1_5R	ACDD01000078
梭桿菌屬AC18	HQ616357
梭桿菌屬ACB2	HQ616358
梭桿菌屬AS2	HQ616361
梭桿菌屬CM1	HQ616371
梭桿菌屬CM21	HQ616375
梭桿菌屬CM22	HQ616376
梭桿菌屬D12	ACDG02000036
梭桿菌屬口腔純系ASCF06	AY923141
梭桿菌屬口腔純系ASCF11	AY953256
潰瘍梭桿菌	ACDH01000090
變形梭桿菌	ACIE01000009
陰道加德納菌	CP001849
溶血孿生球菌	ACDZ02000012
麻疹孿生球菌	NR_025904
麻疹孿生球菌	ACRX01000010

血孿生球菌	ACRY01000057
孿生球菌屬口腔純系ASCE02	AY923133
孿生球菌屬口腔純系ASCF04	AY923139
孿生球菌屬口腔純系ASCF12	AY923143
孿生球菌屬WAL 1945J	EU427463
甲酸芽殖菌	GU562446
地桿菌嗜熱地桿菌	NR_074989
地桿菌屬E263	DQ647387
地桿菌屬WCH70	CP001638
嗜熱脂肪地桿菌	NR_040794
熱鏈型地桿菌	NR_043020
熱反硝化地桿菌	NR_074976
熱葡萄糖苷地桿菌	NR_043022
食熱油地桿菌	NR_074931
貝米吉格地桿菌	CP001124
無類囊體藍藻	NR_074282
固氮葡萄糖醋桿菌	NR_028767
内生固氮葡萄糖醋桿菌	NR_074292
恩氏葡萄糖醋桿菌	NR_028909
歐洲葡萄糖醋桿菌	NR_026513
漢森葡萄糖醋桿菌	NR_026133
約翰尼葡萄糖醋桿菌	NR_024959
溫馴葡萄糖醋桿菌	NR_041295
木糖葡萄糖醋桿菌	NR_074338
支氣管戈登氏菌	NR_027594
食聚異戊二烯戈登氏菌	DQ385609
戈登氏菌屬KTR9	DQ068383
痰液戈登氏菌	FJ536304
土地戈登氏菌	GQ848239
潘蜜拉戈登氏桿菌	AM886059
潘蜜拉戈登氏桿菌	FP929047
耐熱纖細桿菌	NR_043559
福塞蒂黃桿菌	NR_074707
毗鄰顆粒鏈菌	ACKZ01000002
苛養顆粒鏈菌	AB252689
副毗鄰顆粒鏈菌	AY879298
顆粒鏈菌屬M658_99_3	AJ271861
顆粒鏈菌屬口腔純系ASC02	AY923126
顆粒鏈菌屬口腔純系ASCA05	DQ341469
顆粒鏈菌屬口腔純系ASCB09	AY953251
顆粒鏈菌屬口腔純系ASCG05	AY923146
霍利斯格裡蒙菌	ADAQ01000013
血球桿菌屬BC14248	GU396991

埃及嗜血桿菌	AFBC01000053
杜克雷氏嗜血桿菌	AE017143
嗜血桿菌複合群P2口腔純系MB3_C24	DQ003621
嗜血桿菌複合群P3口腔純系MB3_C38	DQ003635
溶血性嗜血桿菌	JN175335
流感嗜血桿菌	AADP01000001
副溶血嗜血桿菌	GU561425
副流感嗜血桿菌	AEWU01000024
副溶血性嗜沫嗜血桿菌	M75076
副豬嗜血桿菌	GU226366
睡眠嗜血桿菌	NC_008309
嗜血桿菌屬70334	HQ680854
嗜血桿菌屬HK445	FJ685624
嗜血桿菌屬口腔純系ASCA07	AY923117
嗜血桿菌屬口腔純系ASCG06	AY923147
嗜血桿菌屬口腔純系BJ021	AY005034
嗜血桿菌屬口腔純系BJ095	AY005033
嗜血桿菌屬口腔純系JM053	AY349380
嗜血桿菌屬口腔分類群851	AGRK01000004
唾液嗜血桿菌	AFNK01000005
蜂房哈佛尼亞菌	DQ412565
細長鹽單胞菌	NR_074782
約翰遜鹽單胞菌	FR775979
解脂鹽紅菌	AB477978
膽型螺桿菌	ACDN01000023
加拿大螺桿菌	ABQS01000108
同性戀螺桿菌	ABQT01000054
幼禽螺桿菌	ABQU01000097
幽門螺桿菌	CP000012
無幽門螺桿菌	U44756
溫哈門螺桿菌	ACDO01000013
嗜中溫日光桿菌	NR_074517
固氮内生草螺菌	CP002039
草螺菌屬JC206	JN657219
睡眠嗜組織菌	AF549387
纖維狀霍爾德菌	Y11466
食醣厭氧產氫桿菌	NR_044425
丁酸高溫熱菌	CP000493
食磺酸生絲微菌	AY468372
海王生絲單胞菌	NR_074092
印度型依格納季氏菌	HQ823562
依格納季氏菌屬NML 95_0260	HQ823559
冰島燃球菌	X99562

淤泥固氮螺菌	NR_029046
淤泥兩面神菌	NR_026362
甜瓜兩面神菌	EF063716
細長桿菌屬SY12	EF455530
<i>Johnsonella ignava</i>	X87152
<i>Jonquetella anthropi</i>	ACOO02000004
豬腿克斯特氏菌	NR_025669
脫氮金氏桿菌	AEWV01000047
遺傳金氏桿菌屬P1口腔純系MB2_C20	DQ003616
金蝶金氏桿菌	AFHS01000073
口金氏桿菌	ACJW02000005
金氏桿菌屬口腔純系ID059	AY349381
催產克雷白氏菌	AY292871
肺炎克雷白氏菌	CP000647
克雷白氏菌屬AS10	HQ616362
克雷白氏菌屬Co9935	DQ068764
克雷白氏菌屬富集培養純系SRC_DSD25	HM195210
克雷白氏菌屬OBRC7	HQ616353
克雷白氏菌屬SP_BA	FJ999767
克雷白氏菌屬SRC_DSD1	GU797254
克雷白氏菌屬SRC_DSD11	GU797263
克雷白氏菌屬SRC_DSD12	GU797264
克雷白氏菌屬SRC_DSD15	GU797267
克雷白氏菌屬SRC_DSD2	GU797253
克雷白氏菌屬SRC_DSD6	GU797258
變異克雷白氏菌	CP001891
抗壞血酸克呂沃爾菌	NR_028677
棲冷克呂沃爾菌	NR_028803
海考克氏菌	GQ260086
沼澤考克氏菌	EU333884
嗜根考克氏菌	AY030315
玫瑰色考克氏菌	X87756
變異考克氏菌	AF542074
牛毛桿菌	GU324407
多產毛螺菌	FR733699
裂果膠毛螺菌	L14675
毛螺菌科細菌1_1_57FAA	ACTM01000065
毛螺菌科細菌1_4_56FAA	ACTN01000028
毛螺菌科細菌2_1_46FAA	ADLB01000035
毛螺菌科細菌2_1_58FAA	ACTO01000052
毛螺菌科細菌3_1_57FAA_CT1	ACTP01000124
毛螺菌科細菌4_1_37FAA	ADCR01000030
毛螺菌科細菌5_1_57FAA	ACTR01000020

毛螺菌科細菌5_1_63FAA	ACTS01000081
毛螺菌科細菌6_1_63FAA	ACTV01000014
毛螺菌科細菌8_1_57FAA	ACWQ01000079
毛螺菌科細菌9_1_43BFAA	ACTX01000023
毛螺菌科細菌A4	DQ789118
毛螺菌科細菌DJF VP30	EU728771
毛螺菌科細菌ICM62	HQ616401
毛螺菌科細菌MSX33	HQ616384
毛螺菌科細菌口腔分類群107	ADDS01000069
毛螺菌科細菌口腔分類群F15	HM099641
毛螺菌科複合群C1	AY278618
酸魚乳桿菌	NR_024718
嗜酸乳桿菌	CP000033
食品乳桿菌	NR_044701
解澱粉乳桿菌	ADNY01000006
噬澱粉乳桿菌	CP002338
胃寶乳桿菌	ACLL01000037
短乳桿菌	EU194349
布赫內氏乳桿菌	ACGH01000101
乾酪乳桿菌	CP000423
鏈狀乳桿菌	M23729
人陰道乳桿菌	ACOH01000030
棒狀乳桿菌	NR_044705
捲曲乳桿菌	ACOG01000151
彎曲乳桿菌	NR_042437
戴耳布呂克氏乳桿菌	CP002341
糊精乳桿菌	NR_036861
香腸乳桿菌	NR_044707
發酵乳桿菌	CP002033
加氏乳桿菌	ACOZ01000018
胃乳桿菌	AICN01000060
乳桿菌複合群C1	AY278619
乳桿菌複合群C2	AY278620
瑞士乳桿菌	ACLM01000202
希氏乳桿菌	ACGP01000200
人乳桿菌	FR681902
脞性乳桿菌	AEKJ01000002
詹氏乳桿菌	ACQD01000066
約氏乳桿菌	AE017198
卡裡乳桿菌	NR_029083
馬乳酒樣乳桿菌	NR_042440
高加索乳桿菌	NR_042230
泡菜乳桿菌	NR_025045

萊希曼氏乳桿菌	JX986966
黏膜乳桿菌	FR693800
鼠乳桿菌	NR_042231
諾登西絲乳桿菌	NR_041629
酒類乳桿菌	NR_043095
口乳桿菌	AEKL01000077
類短乳桿菌	NR_042456
類布氏乳桿菌	NR_041294
副乾酪乳桿菌	ABQV01000067
類高加索乳桿菌	NR_029039
戊糖乳桿菌	JN813103
惡味乳桿菌	NR_029360
植物乳桿菌	ACGZ02000033
腦橋乳桿菌	HM218420
羅伊乳桿菌	ACGW02000012
鼠李糖乳桿菌	ABWJ01000068
羅氏乳桿菌	GU269544
瘤胃乳桿菌	ACGS02000043
清酒乳桿菌	DQ989236
唾液乳桿菌	AEBA01000145
<i>Lactobacillus saniviri</i>	AB602569
老年乳桿菌	AB602570
乳桿菌屬66c	FR681900
乳桿菌屬BT6	HQ616370
乳桿菌屬KLDS 1.0701	EU600905
乳桿菌屬KLDS 1.0702	EU600906
乳桿菌屬KLDS 1.0703	EU600907
乳桿菌屬KLDS 1.0704	EU600908
乳桿菌屬KLDS 1.0705	EU600909
乳桿菌屬KLDS 1.0707	EU600911
乳桿菌屬KLDS 1.0709	EU600913
乳桿菌屬KLDS 1.0711	EU600915
乳桿菌屬KLDS 1.0712	EU600916
乳桿菌屬KLDS 1.0713	EU600917
乳桿菌屬KLDS 1.0716	EU600921
乳桿菌屬KLDS 1.0718	EU600922
乳桿菌屬KLDS 1.0719	EU600923
乳桿菌屬口腔純系HT002	AY349382
乳桿菌屬口腔純系HT070	AY349383
乳桿菌屬口腔分類群052	GQ422710
香腸乳桿菌	NR_042194
烏蘭乳桿菌	ACGU01000081
陰道乳桿菌	ACGV01000168

酒乳桿菌	NR_042196
犢乳桿菌	NR_041305
玉米乳桿菌	NR_037122
格氏乳球菌	AF061005
乳酸乳球菌	CP002365
棉子糖乳球菌	NR_044359
長卵形內酯桿菌	DQ100449
香港海鷗型菌	CP001154
奇異勞特羅普氏菌	AEQP01000026
勞特羅普氏菌屬口腔純系AP009	AY005030
哈開裡軍團菌	M36028
長灘軍團菌	M36029
嗜肺軍團菌	NC_002942
軍團菌屬D3923	JN380999
軍團菌屬D4088	JN381012
軍團菌屬H63	JF831047
軍團菌屬NML 93L054	GU062706
斯蒂氏軍團菌	HQ398202
格氏勒米諾菌	AJ233421
理氏勒米諾菌	HF558368
博氏鉤端螺旋體	NC_008508
布魯氏鉤端螺旋體	NR_043200
問號鉤端螺旋體	NC_005823
黎氏鉤端螺旋體	EF612284
頰纖髮菌	CP001685
纖髮菌複合群C1	AY278621
古氏纖髮菌	ADAD01000110
霍夫氏纖髮菌	ACVB02000032
沙氏纖髮菌	AY029806
纖髮菌屬中性粒細胞減少症病患	AF189244
纖髮菌屬口腔純系GT018	AY349384
纖髮菌屬口腔純系GT020	AY349385
纖髮菌屬口腔純系HE012	AY349386
纖髮菌屬口腔純系IK040	AY349387
纖髮菌屬口腔純系P2PB_51 P1	AY207053
纖髮菌屬口腔分類群223	GU408547
肉明串珠菌	NR_040811
嗜檸檬酸明串珠菌	AM157444
伴氣明串珠菌	FN822744
仁荷明串珠菌	NR_025204
泡菜明串珠菌	NR_075014
乳酸明串珠菌	NR_040823
腸膜明串珠菌	ACKV01000113

假腸膜明串珠菌	NR_040814
格雷氏李斯特氏菌	ACCR02000003
無毒李斯特氏菌	JF967625
伊氏李斯特氏菌	X56151
單核球增多性李斯特氏菌	CP002003
威氏李斯特氏菌	AM263198
血黃球菌	NR_025507
嗜熱污泥孢菌	NR_041236
梭形離胺酸桿菌	FN397522
球形離胺酸桿菌	NR_074883
溶酪大球菌	NR_074941
溶血曼海姆菌	ACZX01000102
需鉀酸鹽馬文布萊恩特氏菌	AJ505973
馬賽菌屬CCUG 43427A	FR773700
漏斗巨單胞菌	AB300988
超巨單胞菌	AJ420107
埃氏巨球形菌	AY038996
巨球形菌複合群C1	AY278622
巨球形菌複合群型號_1	ADGP01000010
微核巨球形菌	A ECS01000020
巨球形菌屬BLPYG_07	HM990964
巨球形菌屬UPII 199_6	AFIJ01000040
勤奮金屬球菌	D26491
甲酸甲烷桿菌	NR_025028
抗酸甲烷短桿菌	NR_028779
嗜樹木甲烷短桿菌	NR_042783
彎曲甲烷短桿菌	NR_044796
表皮甲烷短桿菌	NR_044776
絲狀甲烷短桿菌	NR_044801
哥特甲烷短桿菌	NR_044789
米氏甲烷短桿菌	NR_042785
奧利亞甲烷短桿菌	NR_043024
口腔甲烷桿菌	HE654003
反芻動物甲烷短桿菌	NR_042784
史密斯甲烷短桿菌	ABYV02000002
索氏甲烷短桿菌	NR_044787
韋氏甲烷短桿菌	NR_044788
沃爾氏甲烷短桿菌	NR_044790
斯氏甲烷球形菌	AY196684
扭脫甲基桿菌	NC_010172
足甲基桿菌	AY468363
耐輻射甲基桿菌	GU294320
甲基桿菌屬1sub	AY468371

甲基桿菌屬MM4	AY468370
森林甲基細胞菌	NR_074237
嗜甲基菌屬ECd5	AY436794
巧克力微桿菌	NR_037045
黃色微桿菌	EU714363
古本微桿菌	NR_025098
乳酸微桿菌	EU714351
食油微桿菌	EU714381
氧化微桿菌	EU714348
副氧化微桿菌	AJ491806
葉球形微桿菌	EU714359
雪萊微桿菌	NR_044936
微桿菌屬768	EU714378
微桿菌屬口腔菌株C24KA	AF287752
磚紅色微桿菌	EU714365
南極微球菌	NR_025285
藤黃微球菌	NR_075062
里拉微球菌	NR_026200
微球菌屬185	EU714334
銅綠微囊藻	NC_010296
賈氏光岡菌	NR_028840
多酸光岡菌	ABWK02000005
光岡菌屬口腔分類群521	GU413658
光岡菌屬口腔分類群G68	GU432166
柯氏動彎桿菌	AEPZ01000013
羞怯動彎桿菌	ACKW01000035
威斯康辛米勒氏菌	JN175344
分生艱難桿菌	NR_027191
難養艱難桿菌	NR_027203
短小艱難桿菌	NR_028608
膽怯艱難桿菌	Z36296
柔膜細菌pACH93	AY297808
熱醋穆爾氏菌	NR_075001
卡他莫拉菌	CP002005
林肯莫拉菌	FR822735
奧斯陸莫拉菌	JN175341
莫拉菌屬16285	JF682466
莫拉菌屬GM2	JF837191
摩根摩根氏菌	AJ301681
摩根氏菌屬JB_T16	AJ781005
腦桑槲狀球菌	JN175352
莫亞拉產吡啶菌	AF527773
膿腫分枝桿菌	AGQU01000002

非洲分枝桿菌	AF480605
<i>Mycobacterium alsiensis</i>	AJ938169
鳥分枝桿菌	CP000479
龜分枝桿菌	AB548610
哥倫比亞分枝桿菌	AM062764
象皮病分枝桿菌	AF385898
戈登分枝桿菌	GU142930
胞內分枝桿菌	GQ153276
堪薩斯分枝桿菌	AF480601
拉克絲分枝桿菌	NR_025175
麻風分枝桿菌	FM211192
瀰漫型麻風分枝桿菌	EU203590
麥氏分枝桿菌	FR798914
曼氏分枝桿菌	FJ042897
海分枝桿菌	NC_010612
田鼠分枝桿菌	NR_025234
新金分枝桿菌	AF268445
副癩癰分枝桿菌	ADNV01000350
副土分枝桿菌	EU919229
草分枝桿菌	GU142920
耻垢分枝桿菌	DQ536403
包皮垢分枝桿菌	CP000480
分枝桿菌屬1761	EU703150
分枝桿菌屬1776	EU703152
分枝桿菌屬1781	EU703147
分枝桿菌屬1791	EU703148
分枝桿菌屬1797	EU703149
分枝桿菌屬AQ1GA4	HM210417
分枝桿菌屬B10_07.09.0206	HQ174245
分枝桿菌屬GN_10546	FJ497243
分枝桿菌屬GN_10827	FJ497247
分枝桿菌屬GN_11124	FJ652846
分枝桿菌屬GN_9188	FJ497240
分枝桿菌屬GR_2007_210	FJ555538
分枝桿菌屬HE5	AJ012738
分枝桿菌屬NLA001000736	HM627011
分枝桿菌屬W	DQ437715
結核分枝桿菌	CP001658
潰瘍分枝桿菌	AB548725
脆弱分枝桿菌	EU834055
無乳支原體	AF010477
兩形支原體	AY531656
關節炎支原體	NC_011025

牛眼支原體	NR_025987
咽支原體	NR_024983
發酵支原體	CP002458
絮狀支原體	X62699
生殖器支原體	L43967
人型支原體	AF443616
口腔支原體	AY796060
綿羊肺炎支原體	NR_025989
穿透支原體	NC_004432
肺炎支原體	NC_000912
腐敗支原體	U26055
唾液支原體	M24661
支原體科複合群P1口腔純系MB1_G23	DQ003614
香味類香菌	NR_042354
類香味菌屬MY15	GU253339
桿狀奈瑟菌	AFAY01000058
灰色奈瑟菌	ACDY01000037
長形奈瑟菌	ADBF01000003
淺黃奈瑟菌	ACQV01000025
奈瑟菌複合群P2口腔純系MB5_P15	DQ003630
淋病奈瑟菌	CP002440
乳糖奈瑟菌	ACEQ01000095
獼猴奈瑟菌	AFQE01000146
腦膜炎奈瑟菌	NC_003112
黏膜奈瑟菌	ACDX01000110
咽奈瑟菌	AJ239281
多醣奈瑟菌	ADBE01000137
乾燥奈瑟菌	ACKO02000016
奈瑟菌屬KEM232	GQ203291
奈瑟菌屬口腔純系AP132	AY005027
奈瑟菌屬口腔純系JC012	AY349388
奈瑟菌屬口腔菌株B33KA	AY005028
奈瑟菌屬口腔分類群014	ADEA01000039
奈瑟菌屬SMC_A9199	FJ763637
奈瑟菌屬TM10_1	DQ279352
淡黃色奈瑟菌	ACEO01000067
裡氏新立克次氏體	CP001431
腺熱新立克次氏體	NC_007798
巴西諾卡菌	AIHV01000038
蓋爾森基興諾卡菌	HQ009486
皮疽諾卡菌	NC_006361
膿性諾卡菌	NR_028994
諾卡菌屬01_Je_025	GU574059

達松維爾類諾卡菌	CP002041
食芳煙新鞘氨醇菌	AAAV03000008
卡尼海洋桿菌	NR_041533
海洋桿菌屬Ndiop	CAER01000083
人類蒼白桿菌	NC_009667
中間蒼白桿菌	ACQA01000001
假中間蒼白桿菌	DQ365921
紋臭桿菌	AB490805
內臟臭桿菌	CP002544
奧卡德拉胃球菌	HQ699465
解脲寡源桿菌	NR_041998
尿道寡源桿菌	NR_041753
奧爾森菌複合群C1	AY278623
普惠生奧爾森菌	FN178466
奧爾森菌屬F0004	EU592964
奧爾森菌屬口腔分類群809	ACVE01000002
烏氏奧爾森菌	CP002106
土豐祐菌	NR_074978
鼻竇口腔桿菌	ACKX01000142
口腔桿菌屬ACB1	HM120210
口腔桿菌屬ACB7	HM120211
口腔桿菌屬CM12	HQ616374
口腔桿菌屬ICM51	HQ616397
口腔桿菌屬OBRC12	HQ616355
口腔桿菌屬口腔分類群078	ACIQ02000009
口腔桿菌屬口腔分類群102	GQ422713
口腔桿菌屬口腔分類群108	AFIH01000001
恙蟲病東方體	AP008981
巴伐利亞烏胺酸桿菌	NR_044923
烏胺酸桿菌屬7_10AIA	FN397526
顫桿菌屬G2	HM626173
產戊酸顫桿菌	NR_074793
克魯斯顫螺菌	AB040495
產甲酸草酸桿菌	ACDQ01000020
巴塞隆納類芽孢桿菌	NR_042272
巴倫葛茲類芽孢桿菌	NR_042756
千葉類芽孢桿菌	NR_040885
庫氏類芽孢桿菌	NR_025372
堅韌類芽孢桿菌	NR_037017
解葡聚糖類芽孢桿菌	D78470
乳酸類芽孢桿菌	NR_025739
燦爛類芽孢桿菌	NR_040882
飼料類芽孢桿菌	NR_040853

多黏類芽孢桿菌	NR_037006
金龜子類芽孢桿菌	NR_040888
類芽孢桿菌屬CIP 101062	HM212646
類芽孢桿菌屬HGF5	AEXS01000095
類芽孢桿菌屬HGF7	AFDH01000147
類芽孢桿菌屬JC66	JF824808
類芽孢桿菌屬口腔分類群F45	HM099647
類芽孢桿菌屬R_27413	HE586333
類芽孢桿菌屬R_27422	HE586338
蒂蒙氏類芽孢桿菌	NR_042844
成團泛菌	AY335552
菠蘿泛菌	CP001875
布氏泛菌	EU216735
檸檬泛菌	EF688008
不平常泛菌	EU216737
敗血泛菌	EU216734
食肉桂酸乳頭桿菌	NR_025025
狄氏副擬桿菌	CP000140
古氏副擬桿菌	AY974070
戈登氏副擬桿菌	AB470344
約氏副擬桿菌	ABYH01000014
屎副擬桿菌	EU136685
副擬桿菌屬D13	ACPW01000017
副擬桿菌屬NS31_3	JN029805
副衣原體屬UWE25	BX908798
反硝化副球菌	CP000490
馬氏副球菌	NR_044922
克拉副普雷沃菌	AFFY01000068
嗜木聚糖副普雷沃菌	AFBR01000011
居齒副斯卡爾維氏菌	ADEB01000020
人排洩物副薩特氏菌	AFBP01000029
次要副薩特氏菌	AB491209
微小微單胞菌	AB729072
微單胞菌屬口腔分類群110	AFII01000002
貝氏巴氏桿菌	L06088
咬傷巴氏桿菌	ACZR01000003
多殺性巴氏桿菌	NC_002663
乳酸片球菌	ACXB01000026
戊糖片球菌	NR_075052
黑色消化球菌	NR_029221
消化球菌屬口腔純系JM048	AY349389
消化球菌屬口腔分類群167	GQ422727
不解糖嗜脛菌	D14145

杜爾丹尼氏嗜脛菌	EU526290
海氏嗜脛菌	NR_026358
引哢嗜脛菌	AY153431
艾弗嗜脛菌	Y07840
淚腺嗜脛菌	ADDO01000050
嗜脛菌屬gpac007	AM176517
嗜脛菌屬gpac018A	AM176519
嗜脛菌屬gpac077	AM176527
嗜脛菌屬gpac148	AM176535
嗜脛菌屬JC140	JF824803
嗜脛菌屬口腔分類群386	ADCS01000031
嗜脛菌屬口腔分類群836	AEAA01000090
消化鏈球菌科細菌ph1	JN837495
厭氧消化鏈球菌	AY326462
微小消化鏈球菌	AM176538
消化鏈球菌屬9succ1	X90471
消化鏈球菌屬口腔純系AP24	AB175072
消化鏈球菌屬口腔純系FJ023	AY349390
消化鏈球菌屬P4P_31 P3	AY207059
口炎消化鏈球菌	ADGQ01000048
屎考拉桿菌	NR_026111
考拉桿菌屬YIT 12068	AB490812
琥珀酸考拉桿菌	AB490811
<i>Phenylobacterium zucineum</i>	AY628697
非共生光桿菌	Z76752
<i>Pigmentiphaga daeguensi</i>	JN585327
韓國游動微菌	NR_025011
類志賀毗鄰單胞菌	X60418
卟啉單胞菌科細菌NML 060648	EF184292
不解糖卟啉單胞菌	AENO01000048
牙髓卟啉單胞菌	ACNN01000021
牙齦卟啉單胞菌	AE015924
利氏卟啉單胞菌	NR_025907
獼猴卟啉單胞菌	NR_025908
索拉卟啉單胞菌	AB547667
卟啉單胞菌屬口腔純系BB134	AY005068
卟啉單胞菌屬口腔純系F016	AY005069
卟啉單胞菌屬口腔純系P2PB_52 P1	AY207054
卟啉單胞菌屬口腔純系P4GB_100 P2	AY207057
卟啉單胞菌屬UQD 301	EU012301
上野卟啉單胞菌	ACLR01000152
阿爾伯斯普雷沃菌	NR_025300
安氏普雷沃菌	AB547670

伯氏普雷沃菌	ACKS01000100
二路普雷沃菌	ADFO01000096
短雷沃菌	NR_041954
頰普雷沃菌	ACRB01000001
口頰普雷沃菌	JN867261
糞便普雷沃菌	ACBX02000014
人體普雷沃菌	L16465
牙普雷沃菌	AB547678
棲牙普雷沃菌	CP002589
解糖腺普雷沃菌	AEDO01000026
普雷沃菌複合群C1	AY278624
普雷沃菌複合群C2	AY278625
普雷沃菌複合群P7口腔純系MB2_P31	DQ003620
普雷沃菌複合群P8口腔純系MB3_P13	DQ003622
普雷沃菌複合群P9口腔純系MB7_G16	DQ003633
解肝素普雷沃菌	GQ422742
棲組織普雷沃菌	JN867315
中間普雷沃菌	AF414829
洛氏普雷沃菌	JN867231
斑狀普雷沃菌	AGEK01000035
馬氏普雷沃菌	AEEI01000070
產黑色素普雷沃菌	CP002122
彩虹普雷沃菌	AGWK01000061
多形普雷沃菌	AEWX01000054
食多糖普雷沃菌	AFJE01000016
南錫普雷沃菌	JN867228
變黑普雷沃菌	AFPX01000069
口腔普雷沃菌	AEPE01000021
口普雷沃菌	ADDV01000091
齦炎普雷沃菌	L16472
蒼白普雷沃菌	AFPY01000135
棲瘤胃普雷沃菌	CP002006
唾液普雷沃菌	AB108826
普雷沃菌屬BI_42	AJ581354
普雷沃菌屬CM38	HQ610181
普雷沃菌屬ICM1	HQ616385
普雷沃菌屬ICM55	HQ616399
普雷沃菌屬JCM 6330	AB547699
普雷沃菌屬口腔純系AA020	AY005057
普雷沃菌屬口腔純系ASCG10	AY923148
普雷沃菌屬口腔純系ASCG12	DQ272511
普雷沃菌屬口腔純系AU069	AY005062
普雷沃菌屬口腔純系CY006	AY005063

普雷沃菌屬口腔純系DA058	AY005065
普雷沃菌屬口腔純系FL019	AY349392
普雷沃菌屬口腔純系FU048	AY349393
普雷沃菌屬口腔純系FW035	AY349394
普雷沃菌屬口腔純系GI030	AY349395
普雷沃菌屬口腔純系GI032	AY349396
普雷沃菌屬口腔純系GI059	AY349397
普雷沃菌屬口腔純系GU027	AY349398
普雷沃菌屬口腔純系HF050	AY349399
普雷沃菌屬口腔純系ID019	AY349400
普雷沃菌屬口腔純系IDR_CEC_0055	AY550997
普雷沃菌屬口腔純系IK053	AY349401
普雷沃菌屬口腔純系IK062	AY349402
普雷沃菌屬口腔純系P4PB_83 P2	AY207050
普雷沃菌屬口腔分類群292	GQ422735
普雷沃菌屬口腔分類群299	ACWZ01000026
普雷沃菌屬口腔分類群300	GU409549
普雷沃菌屬口腔分類群302	ACZK01000043
普雷沃菌屬口腔分類群310	GQ422737
普雷沃菌屬口腔分類群317	ACQH01000158
普雷沃菌屬口腔分類群472	ACZS01000106
普雷沃菌屬口腔分類群781	GQ422744
普雷沃菌屬口腔分類群782	GQ422745
普雷沃菌屬口腔分類群F68	HM099652
普雷沃菌屬口腔分類群G60	GU432133
普雷沃菌屬口腔分類群G70	GU432179
普雷沃菌屬口腔分類群G71	GU432180
普雷沃菌屬SEQ053	JN867222
普雷沃菌屬SEQ065	JN867234
普雷沃菌屬SEQ072	JN867238
普雷沃菌屬SEQ116	JN867246
普雷沃菌屬SG12	GU561343
普雷沃菌屬sp24	AB003384
普雷沃菌屬sp34	AB003385
冀普雷沃菌	AB244774
譚氏普雷沃菌	ACIJ02000018
蒂蒙斯普雷沃菌	ADEF01000012
真口普雷沃菌	ACVA01000027
空腸普雷沃菌、桔紅色普雷沃菌、巴羅尼亞普雷沃菌、科羅納普雷沃菌、人體普雷沃菌、齒狀普雷沃菌、埃諾普雷沃菌、福氏普雷沃菌、深黑色普雷沃菌、解肝素普雷沃菌、洛氏普雷沃菌、食多糖普雷沃	

菌、南錫普雷沃菌、米普雷沃菌、帕拉迪普雷沃菌、胸膜炎普雷沃菌、棲瘤胃普雷沃菌、解糖普雷沃菌、靶心普雷沃菌、沙氏普雷沃菌、動膠普雷沃菌	
普雷沃菌科細菌P4P_62 P1	AY207061
海洋原綠球藻	CP000551
丙酸桿菌科細菌NML 02_0265	EF599122
產丙酸丙酸桿菌	NC_019395
痤瘡丙酸桿菌	ADJM01000010
貪婪丙酸桿菌	AJ003055
費氏丙酸桿菌	NR_036972
顆粒丙酸桿菌	FJ785716
詹森丙酸桿菌	NR_042269
丙酸丙酸桿菌	NR_025277
丙酸桿菌屬434_HC2	AFIL01000035
丙酸桿菌屬H456	AB177643
丙酸桿菌屬LG	AY354921
丙酸桿菌屬口腔分類群192	GQ422728
丙酸桿菌屬S555a	AB264622
特恩氏丙酸桿菌	NR_042270
奇異變形桿菌	ACLE01000013
羽狀變形桿菌	ABVP01000020
變形桿菌屬HS7514	DQ512963
普通變形桿菌	AJ233425
產鹼普羅威登斯菌	ABXW01000071
雷氏普羅威登斯菌	AM040492
拉氏普羅威登斯菌	AM040489
斯氏普羅威登斯菌	AF008581
帝蒙氏假棍狀菌	FJ375951
假毛蘚菌	AY136666
銅綠假單胞菌	AABQ07000001
螢光假單胞菌	AY622220
蓋氏假單胞菌	FJ943496
門多薩假單胞菌	AAUL01000021
蒙氏假單胞菌	NR_024910
草假單胞菌	GU188951
類產鹼假單胞菌	NR_037000
惡臭假單胞菌	AF094741
假單胞菌屬2_1_26	ACWU01000257
假單胞菌屬G1229	DQ910482
假單胞菌屬NP522b	EU723211
施氏假單胞菌	AM905854
托拉假單胞菌	AF320988

綠黃假單胞菌	NR_042764
非解乳糖假枝桿菌	AB036759
北極嗜冷桿菌	CP000082
養料嗜冷桿菌	HQ698586
鹽晶嗜冷桿菌	CP000323
糞嗜冷桿菌	HQ698566
海雪嗜冷桿菌	HQ698587
肺炎嗜冷桿菌	HQ698582
嗜冷桿菌屬13983	HM212668
<i>Pyramidobacter piscolens</i>	AY207056
皮氏羅爾斯通氏菌	NC_010682
羅爾斯通氏菌屬5_7_47FAA	ACUF01000076
解鳥胺酸拉烏爾菌	AB364958
植生拉烏爾菌	AF129443
土生拉烏爾菌	NR_037085
紅桿菌屬口腔分類群C30	HM099648
球形紅桿菌	CP000144
類棒狀紅球菌屬	X80615
馬紅球菌	ADNW01000058
紅串紅球菌	ACNO01000030
聚集紅球菌	NR_037021
沼澤紅假單胞菌	CP000301
小蛛立克次氏體	CP000847
康氏立克次氏體	AE008647
普氏立克次氏體	M21789
立克次立克次氏體	NC_010263
斯洛伐克立克次氏體	L36224
地方性斑疹傷寒立克次氏體	AE017197
<i>Robinsoniella peoriensis</i>	AF445258
盲腸羅斯拜瑞氏菌	GU233441
糞羅斯拜瑞氏菌	AY804149
糞便羅斯拜瑞氏菌	AY305310
人羅斯拜瑞氏菌	AJ270482
腸道羅斯拜瑞氏菌	FP929050
食菊糖羅斯拜瑞氏菌	AJ270473
羅斯拜瑞氏菌屬11SE37	FM954975
羅斯拜瑞氏菌屬11SE38	FM954976
光合玫瑰菌	CP000804
頸玫瑰單胞菌	ADVL01000363
黏膜玫瑰單胞菌	NR_028857
玫瑰單胞菌屬NML94_0193	AF533357
玫瑰單胞菌屬NML97_0121	AF533359
玫瑰單胞菌屬NML98_0009	AF533358

玫瑰單胞菌屬NML98_0157	AF533360
天空羅氏菌	DQ673320
齶齒羅氏菌	ADDW01000024
黏滑羅氏菌	ACVO01000020
鼠鼻羅氏菌	NR_025310
羅氏菌屬口腔分類群188	GU470892
嗜澱粉反芻桿菌	NR_026450
瘤胃球菌科細菌D16	ADDX01000083
白色瘤胃球菌	AY445600
布氏瘤胃球菌	EU266549
伶俐瘤胃球菌	NR_029160
<i>Ruminococcus champanellensis</i>	FP929052
生黃瘤胃球菌	NR_025931
活潑瘤胃球菌	X94967
漢森瘤胃球菌	M59114
乳酸瘤胃球菌	ABOU02000049
卵瘤胃球菌	AY169419
瘤胃球菌屬18P13	AJ515913
瘤胃球菌屬5_1_39BFAA	ACII01000172
瘤胃球菌屬9SE51	FM954974
瘤胃球菌屬ID8	AY960564
瘤胃球菌屬K_1	AB222208
扭鏈瘤胃球菌	AAVP02000002
綠色糖單胞菌	X54286
邦戈爾沙門氏菌	NR_041699
腸炎沙門氏菌	NC_011149
腸炎沙門氏菌	NC_011205
腸炎沙門氏菌	DQ344532
腸炎沙門氏菌	ABEH02000004
腸炎沙門氏菌	ABAK02000001
腸炎沙門氏菌	NC_011080
腸炎沙門氏菌	EU118094
腸炎沙門氏菌	NC_011094
腸炎沙門氏菌	AE014613
腸炎沙門氏菌	ABFH02000001
腸炎沙門氏菌	ABEM01000001
腸炎沙門氏菌	ABAM02000001
鼠傷寒沙門氏菌	DQ344533
鼠傷寒沙門氏菌	AF170176
胃八疊球菌	NR_026146
罕見斯卡多維氏菌	AB029087
韋格斯卡多維氏菌	AY278626
圓形慢反應脂肪酸菌	CP001958

褶皺慢反應脂肪酸菌	ACZI01000025
蛛形月形單胞菌	HM596274
魚月形單胞菌	GQ422719
福氏月形單胞菌	AF287803
月形單胞菌複合群C1	AY278627
月形單胞菌複合群C2	AY278628
月形單胞菌複合群P5	AY341820
月形單胞菌複合群P6口腔純系MB3_C41	DQ003636
月形單胞菌複合群P7口腔純系MB5_C08	DQ003627
月形單胞菌複合群P8口腔純系MB5_P06	DQ003628
損傷新月形單胞菌	AF287802
有害月形單胞菌	GU470909
反芻動物月形單胞菌	NR_075026
月形單胞菌屬FOBRC9	HQ616378
月形單胞菌屬口腔純系FT050	AY349403
月形單胞菌屬口腔純系GI064	AY349404
月形單胞菌屬口腔純系GT010	AY349405
月形單胞菌屬口腔純系HU051	AY349406
月形單胞菌屬口腔純系IK004	AY349407
月形單胞菌屬口腔純系IQ048	AY349408
月形單胞菌屬口腔純系JI021	AY349409
月形單胞菌屬口腔純系JS031	AY349410
月形單胞菌屬口腔純系OH4A	AY947498
月形單胞菌屬口腔純系P2PA_80 P4	AY207052
月形單胞菌屬口腔分類群137	AENV01000007
月形單胞菌屬口腔分類群149	AEEJ01000007
生痰月形單胞菌	ACKP02000033
居泉沙雷菌	NR_025339
液化沙雷菌	NR_042062
黏質沙雷菌	GU826157
臭味沙雷菌	ADBY01000001
變形斑沙雷菌	AAUN01000015
腐敗希瓦菌	CP002457
波伊德氏志賀氏菌	AAKA01000007
痢疾志賀氏菌	NC_007606
福氏志賀氏菌	AE005674
宋內志賀氏菌	NC_007384
衛星肖特沃思氏菌	ACIP02000004
肖特沃思氏菌屬MSX8B	HQ616383
肖特沃思氏菌屬口腔分類群G69	GU432167
米氏西蒙斯菌	ADCY01000105
產雌馬酚斯奈克氏菌	EU377663
弱生斯奈克氏菌	ACUX01000029

犬糞斯奈克氏菌	NR_042220
還原天芥菜鹼斯奈克氏菌	NR_074439
異黃酮化合物斯奈克氏菌	AB566418
梨形斯奈克氏菌	AB490806
斯奈克氏菌屬NATTS	AB505075
莫氏細小桿菌	AECQ01000039
糞鞘胺醇桿菌	NR_025537
水氏鞘胺醇桿菌	JF708889
多食鞘胺醇桿菌	NR_040953
食神鞘胺醇桿菌	ACHA02000013
刺狀鞘胺醇單胞菌	NR_024700
鞘胺醇單胞菌屬口腔純系FI012	AY349411
鞘胺醇單胞菌屬口腔純系FZ016	AY349412
鞘胺醇單胞菌屬口腔分類群A09	HM099639
鞘胺醇單胞菌屬口腔分類群F71	HM099645
阿拉斯加鞘胺醇盒菌	CP000356
異常螺原體屬	NR_025705
白蟻生孢菌	NR_044972
菊糖芽孢乳桿菌	NR_040962
中山芽孢桿菌	NR_042247
新約克芽胞八疊球菌	AFPZ01000142
芽胞八疊球菌屬2681	GU994081
葡萄球菌科細菌NML 92_0017	AY841362
金黃色葡萄球菌	CP002643
耳葡萄球菌	JQ624774
頭狀葡萄球菌	ACFR01000029
山羊葡萄球菌	ACRH01000033
肉葡萄球菌	NR_075003
科氏葡萄球菌	JN175375
香料葡萄球菌	NR_029345
表皮葡萄球菌	ACHE01000056
馬胃葡萄球菌	NR_027520
弗氏葡萄球菌	NR_041326
溶血性葡萄球菌	NC_007168
人葡萄球菌	AM157418
路鄧葡萄球菌	AEQA01000024
巴氏葡萄球菌	FJ189773
假中間葡萄球菌	CP002439
解糖葡萄球菌	NR_029158
腐生性葡萄球菌	NC_007350
松鼠葡萄球菌	NR_025520
葡萄球菌屬純系bottae7	AF467424
葡萄球菌屬H292	AB177642

葡萄球菌屬H780	AB177644
琥珀酸葡萄球菌	NR_028667
小牛葡萄球菌	NR_024670
瓦氏葡萄球菌	ACPZ01000009
木糖葡萄球菌	AY395016
嗜麥芽寡養單胞菌	AAVZ01000005
寡養單胞菌屬FG_6	EF017810
念珠狀鏈桿菌	NR_027615
無乳鏈球菌	AAJO01000130
非解乳鏈球菌	NR_041781
咽峽炎鏈球菌	AECT01000011
澳大利亞鏈球菌	AEQR01000024
牛鏈球菌	AEEL01000030
犬鏈球菌	AJ413203
星座鏈球菌	AY277942
脊鏈球菌	AEVC01000028
道恩鏈球菌	AEKN01000002
停乳鏈球菌	AP010935
馬鏈球菌	CP001129
馬腸鏈球菌	AEVB01000043
解沒食子酸鏈球菌	FR824043
鏈球菌複合群C1	AY278629
鏈球菌複合群C2	AY278630
鏈球菌複合群C3	AY278631
鏈球菌複合群C4	AY278632
鏈球菌複合群C5	AY278633
鏈球菌複合群C6	AY278634
鏈球菌複合群C7	AY278635
鏈球菌複合群C8	AY278609
戈登氏鏈球菌	NC_009785
小兒鏈球菌	ABJK02000017
嬰兒鏈球菌	AFNN01000024
中間鏈球菌	NR_028736
巴黎鏈球菌	NR_037096
馬鏈球菌	AY769997
米勒鏈球菌	X81023
緩症鏈球菌	AM157420
突變鏈球菌	AP010655
寡發酵鏈球菌	AY099095
口腔鏈球菌	ADMV01000001
副血鏈球菌	AEKM01000012
巴氏鏈球菌	AP012054
泛口腔鏈球菌	AEVF01000016

肺炎鏈球菌	AE008537
豬鏈球菌	EF121439
假性肺炎鏈球菌	FJ827123
假豬鏈球菌	AENS01000003
醱膿鏈球菌	AE006496
鼠鏈球菌	X58304
唾液鏈球菌	AGBV01000001
血鏈球菌	NR_074974
中華鏈球菌	AF432857
鏈球菌屬16362	JN590019
鏈球菌屬2_1_36FAA	ACOI01000028
鏈球菌屬2285_97	AJ131965
鏈球菌屬69130	X78825
鏈球菌屬AC15	HQ616356
鏈球菌屬ACS2	HQ616360
鏈球菌屬AS20	HQ616366
鏈球菌屬BS35a	HQ616369
鏈球菌屬C150	ACRI01000045
鏈球菌屬CM6	HQ616372
鏈球菌屬CM7	HQ616373
鏈球菌屬ICM10	HQ616389
鏈球菌屬ICM12	HQ616390
鏈球菌屬ICM2	HQ616386
鏈球菌屬ICM4	HQ616387
鏈球菌屬ICM45	HQ616394
鏈球菌屬M143	ACRK01000025
鏈球菌屬M334	ACRL01000052
鏈球菌屬OBRC6	HQ616352
鏈球菌屬口腔純系ASB02	AY923121
鏈球菌屬口腔純系ASCA03	DQ272504
鏈球菌屬口腔純系ASCA04	AY923116
鏈球菌屬口腔純系ASCA09	AY923119
鏈球菌屬口腔純系ASCB04	AY923123
鏈球菌屬口腔純系ASCB06	AY923124
鏈球菌屬口腔純系ASCC04	AY923127
鏈球菌屬口腔純系ASCC05	AY923128
鏈球菌屬口腔純系ASCC12	DQ272507
鏈球菌屬口腔純系ASCD01	AY923129
鏈球菌屬口腔純系ASCD09	AY923130
鏈球菌屬口腔純系ASCD10	DQ272509
鏈球菌屬口腔純系ASCE03	AY923134
鏈球菌屬口腔純系ASCE04	AY953253
鏈球菌屬口腔純系ASCE05	DQ272510

鏈球菌屬□腔純系ASCE06	AY923135
鏈球菌屬□腔純系ASCE09	AY923136
鏈球菌屬□腔純系ASCE10	AY923137
鏈球菌屬□腔純系ASCE12	AY923138
鏈球菌屬□腔純系ASCF05	AY923140
鏈球菌屬□腔純系ASCF07	AY953255
鏈球菌屬□腔純系ASCF09	AY923142
鏈球菌屬□腔純系ASCG04	AY923145
鏈球菌屬□腔純系BW009	AY005042
鏈球菌屬□腔純系CH016	AY005044
鏈球菌屬□腔純系GK051	AY349413
鏈球菌屬□腔純系GM006	AY349414
鏈球菌屬□腔純系P2PA_41 P2	AY207051
鏈球菌屬□腔純系P4PA_30 P4	AY207064
鏈球菌屬□腔分類群071	AEEP01000019
鏈球菌屬□腔分類群G59	GU432132
鏈球菌屬□腔分類群G62	GU432146
鏈球菌屬□腔分類群G63	GU432150
鏈球菌屬SHV515	Y07601
豬鏈球菌	FM252032
嗜熱鏈球菌	CP000419
乳房鏈球菌	HQ391900
尿鏈球菌	DQ303194
前庭鏈球菌	AEKO01000008
綠色鏈球菌	AF076036
白色鏈黴菌	AJ697941
灰鏈黴菌	NR_074787
鏈黴菌屬1 AIP_2009	FJ176782
鏈黴菌屬SD 511	EU544231
鏈黴菌屬SD 524	EU544234
鏈黴菌屬SD 528	EU544233
鏈黴菌屬SD 534	EU544232
嗜熱鏈黴菌	NR_027616
變異罕見小球菌	AJ518869
希佩氏琥珀酸單胞菌	AEVO01000027
莫比利尼薩特菌	AJ832129
帕維魯布拉薩特菌	AB300989
血根薩特菌	AJ748647
薩特菌屬YIT 12072	AB491210
犬糞薩特菌	NR_025600
華德薩特菌	ADMF01000048
互養菌複合群C1	AY278615
互養菌屬RMA 14551	DQ412722

互養菌門細菌ADV897	GQ258968
互養菌門細菌LBVCM1157	GQ258969
互養菌門細菌口腔分類群362	GU410752
互養菌門細菌口腔分類群D48	GU430992
蔗糖互營鏈球菌	NR_036869
互營單胞菌科複合群P1	AY341821
福賽斯坦納菌	CP003191
坦納菌屬6_1_58FAA_CT1	ACWX01000068
麥克達德埃特洛克菌	M36032
痰塔特姆氏菌	NR_025342
四球菌屬口腔分類群F04	HM099640
嗜鹽四聯球菌	NR_075020
韓國四聯球菌	NR_043113
假乙醇熱厭氧桿菌	CP000924
嗜熱放線菌	NC_007333
花葵中慢升根瘤菌	X14835
水棲熱菌	NR_025900
極尖泰氏菌	NR_044860
關島特布林西菌	AY373830
牙密螺旋體	ADEC01000002
遺傳密螺旋體P1	AY341822
遺傳密螺旋體P4口腔純系MB2_G19	DQ003618
遺傳密螺旋體P5口腔純系MB3_P23	DQ003624
遺傳密螺旋體P6口腔純系MB4_G11	DQ003625
解卵磷脂密螺旋體	NR_026247
梅毒螺旋體	CP001752
微小密螺旋體	AF302937
潰蝕齒密螺旋體	AEFH01000172
惡臭密螺旋體	AJ543428
曲折密螺旋體	AF426101
索氏密螺旋體	NR_024868
密螺旋體屬6:H:D15A_4	AY005083
密螺旋體屬純系DDKL_4	Y08894
密螺旋體屬口腔純系JU025	AY349417
密螺旋體屬口腔純系JU031	AY349416
密螺旋體屬口腔純系P2PB_53 P3	AY207055
密螺旋體屬口腔分類群228	GU408580
密螺旋體屬口腔分類群230	GU408603
密螺旋體屬口腔分類群231	GU408631
密螺旋體屬口腔分類群232	GU408646
密螺旋體屬口腔分類群235	GU408673
密螺旋體屬口腔分類群239	GU408738
密螺旋體屬口腔分類群247	GU408748

密螺旋體屬口腔分類群250	GU408776
密螺旋體屬口腔分類群251	GU408781
密螺旋體屬口腔分類群254	GU408803
密螺旋體屬口腔分類群265	GU408850
密螺旋體屬口腔分類群270	GQ422733
密螺旋體屬口腔分類群271	GU408871
密螺旋體屬口腔分類群508	GU413616
密螺旋體屬口腔分類群518	GU413640
密螺旋體屬口腔分類群G85	GU432215
密螺旋體屬綿羊腐蹄病	AJ010951
奮森氏密螺旋體	ACYH01000036
惠普普利菌	BX251412
化膿隱秘菌	NR_044858
微變塚村氏菌	X80628
耐酪胺酸塚村氏菌	AB478958
<i>Turicibacter sanguinis</i>	AF349724
微小脲原體	AE002127
解脲脲原體	AAYN01000002
複雜脲芽孢桿菌	NR_043746
蘇雲脲芽孢桿菌	NR_043232
特倫斯脲芽孢桿菌	NR_025394
嗜熱性脲芽孢桿菌	NR_043747
嗜熱球形脲芽孢桿菌	NR_040961
河流漫遊球菌	NR_026489
非典型範永氏球菌	AEDS01000059
殊異範永氏球菌	ACIK02000021
範永氏球菌複合群P1口腔純系MB5_P17	DQ003631
蒙皮立範永氏球菌	AF473836
小範永氏球菌	ADFU01000009
範永氏球菌屬3_1_44	ADCV01000019
範永氏球菌屬6_1_27	ADCW01000016
範永氏球菌屬ACP1	HQ616359
範永氏球菌屬AS16	HQ616365
範永氏球菌屬BS32b	HQ616368
範永氏球菌屬ICM51a	HQ616396
範永氏球菌屬MSA12	HQ616381
範永氏球菌屬NVG 100cf	EF108443
範永氏球菌屬OK11	JN695650
範永氏球菌屬口腔純系ASCA08	AY923118
範永氏球菌屬口腔純系ASCB03	AY923122
範永氏球菌屬口腔純系ASCG01	AY923144
範永氏球菌屬口腔純系ASCG02	AY953257
範永氏球菌屬口腔純系OH1A	AY947495

範永氏球菌屬口腔分類群158	AENU01000007
範永氏球菌科細菌口腔分類群131	GU402916
範永氏球菌科細菌口腔分類群155	GU470897
霍亂弧菌	AAUR01000095
河流弧菌	X76335
弗氏弧菌	CP002377
擬態弧菌	ADAF01000001
副溶血性弧菌	AAWQ01000116
弧菌屬RC341	ACZT01000024
創傷弧菌	AE016796
食物谷菌科細菌NML 080035	FJ394915
瓦達食谷菌	ABDE02000010
普羅米維桿菌	NR_025308
貝尼氏魏斯氏菌	EU439435
食竇魏斯氏菌	NR_036924
混淆魏斯氏菌	NR_040816
赫倫魏斯氏菌	AB680902
坎氏魏斯氏菌	NR_044659
韓國魏斯氏菌	NR_075058
類腸膜魏斯氏菌	ACKU01000017
魏斯氏菌屬KLDS 7.0701	EU600924
產琥珀酸沃林氏菌	BX571657
黃單胞菌科細菌NML 03_0222	EU313791
野油菜黃單胞菌	EF101975
黃單胞菌屬kmd_489	EU723184
<i>Xenophilus aerolatus</i>	JN585329
阿氏耶爾森氏菌	AJ871363
阿裡克謝耶爾森氏菌	AJ627597
貝氏耶爾森氏菌	AF366377
小腸結腸炎耶爾森菌	FR729477
弗氏耶爾森氏菌	AF366379
中間耶爾森氏菌	AF366380
克裏斯滕耶爾森氏菌	ACCA01000078
莫氏耶爾森氏菌	NR_027546
鼠疫耶爾森氏菌	AE013632
假結核耶爾森氏菌	NC_009708
羅氏耶爾森氏菌	ACCD01000071
雷金斯堡約克氏菌	AB273739
二歧齊默爾曼氏菌	AB012592
運動發酵單胞菌	NR_074274

表2：示例性嗜腫瘤細菌

屬	物種	腫瘤相關
支原體	豬鼻支原體	胃癌
丙酸桿菌	痤瘡丙酸桿菌	前列腺癌
支原體	生殖器支原體	前列腺癌
嗜甲基菌	屬	前列腺癌
衣原體	沙眼衣原體	前列腺癌
螺桿菌	幽門螺桿菌	胃MALT
李斯特氏菌	威氏李斯特氏菌	腎癌
鏈球菌	肺炎鏈球菌	淋巴瘤及白血病
嗜血桿菌	流感嗜血桿菌	淋巴瘤及白血病
葡萄球菌	金黃色葡萄球菌	乳癌
李斯特氏菌	單核球增多性李斯特氏菌	乳癌
甲基桿菌	耐輻射甲基桿菌	乳癌
鞘胺醇單胞菌	矢野鞘胺醇單胞菌	乳癌
梭桿菌	屬	喉癌
普羅維特利斯 (Provetelis)	屬	喉癌
鏈球菌	肺炎鏈球菌	喉癌
孳生球菌	屬	喉癌
鮑特氏菌	百日咳鮑特氏菌	喉癌
棒狀桿菌	結核硬脂酸棒狀桿菌	口腔鱗狀細胞癌
微球菌	藤黃微球菌	口腔鱗狀細胞癌
普雷沃菌	產黑色素普雷沃菌	口腔鱗狀細胞癌
微小桿菌	耐氧化微小桿菌	口腔鱗狀細胞癌
梭桿菌	舟形梭桿菌	口腔鱗狀細胞癌
範永氏球菌	小範永氏球菌	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	唾液鏈球菌	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	緩症/口腔鏈球菌	口腔鱗狀細胞癌
範永氏球菌	殊異範永氏球菌	口腔鱗狀細胞癌
消化鏈球菌	口腔炎消化鏈球菌	口腔鱗狀細胞癌
鏈球菌	戈登氏鏈球菌	口腔鱗狀細胞癌
孳生球菌	溶血孳生球菌	口腔鱗狀細胞癌
孳生球菌	麻疹孳生球菌	口腔鱗狀細胞癌
約翰遜菌	<i>Johnsonella ignava</i>	口腔鱗狀細胞癌

鏈球菌	副血鏈球菌	口腔鱗狀細胞癌
顆粒鏈菌	毗鄰顆粒鏈菌	口腔鱗狀細胞癌
分枝桿菌	海分枝桿菌	肺感染
彎曲桿菌	簡要彎曲桿菌	巴雷特氏食道症
彎曲桿菌	直腸彎曲桿菌	巴雷特氏食道症
口腔桿菌	屬	食道腺癌
卡托氏菌	屬	食道腺癌
消化鏈球菌	屬	食道腺癌
真桿菌	屬	食道腺癌
戴阿利斯特菌	屬	食道腺癌
範永氏球菌	屬	食道腺癌
厭氧球形菌	屬	食道腺癌
巨球形菌	屬	食道腺癌
奇異菌	屬	食道腺癌
細小桿菌	屬	食道腺癌
羅氏菌	屬	食道腺癌
放線菌	屬	食道腺癌
梭桿菌	屬	食道腺癌
纖毛菌	屬	食道腺癌
纖髮菌	屬	食道腺癌
嗜二氧化碳噬纖細菌	屬	食道腺癌
普雷沃菌	屬	食道腺癌
卟啉單胞菌	屬	食道腺癌
彎曲桿菌	屬	食道腺癌
嗜血桿菌	屬	食道腺癌
奈瑟菌	屬	食道腺癌
TM7	屬	食道腺癌
顆粒鏈菌	屬	食道腺癌
貪噬菌	屬	腹膜假性黏液瘤
大腸桿菌	志賀氏菌	腹膜假性黏液瘤
假單胞菌	屬	腹膜假性黏液瘤
四球菌	屬	腹膜假性黏液瘤
不動桿菌	屬	腹膜假性黏液瘤
螺桿菌	肝螺桿菌	乳癌
衣原體	鸚鵡熱衣原體	MALT淋巴瘤

螺旋體	伯氏螺旋體	B細胞淋巴瘤皮膚
大腸桿菌	大腸桿菌NC101	結腸直腸癌
沙門氏菌	鼠傷寒沙門氏菌	糞便
腸球菌	糞腸球菌	血液
鏈球菌	緩症鏈球菌	血液
鏈球菌	血鏈球菌	血液
鏈球菌	咽峽炎鏈球菌	血液
鏈球菌	唾液鏈球菌	血液
葡萄球菌	表皮葡萄球菌	血液
鏈球菌	解沒食子酸鏈球菌	結腸直腸癌
彎曲桿菌	昭曲彎曲桿菌CC57C	結腸直腸癌
纖髮菌	屬	結腸直腸癌

【0083】 在某些實施例中，本文描述之EV係獲得自專性厭氧菌。專性厭氧菌之實例包括革蘭氏陰性桿菌(包括擬桿菌、普雷沃菌、卞啉單胞菌、梭桿菌、嗜膽菌及薩特氏菌屬(*spp.*)之屬(*genera*))、革蘭氏陽性球菌(主要為消化鏈球菌屬)、革蘭氏陽性孢子形成菌(梭菌屬)、非孢子形成桿菌(放線菌、丙酸桿菌、真桿菌、乳桿菌及雙歧桿菌屬)及革蘭氏陰性球菌(主要為範永氏球菌屬)。在一些實施例中，該等專性厭氧菌係選自以下之屬之細菌：阿加薩桿菌(*Agathobaculum*)、奇異菌、布勞特氏菌、伯克霍爾德菌、迪爾莫菌、長鏈菌(*Longicatena*)、副梭菌、蘇黎世桿菌及泰澤菌。

【0084】 在一些實施例中，本文描述之EV係獲得自選自以下之屬之細菌：大腸桿菌、克雷白氏菌、乳桿菌、志賀氏菌及葡萄球菌。

【0085】 在一些實施例中，本文描述之細菌及/或EV係選自以下物種之細菌及/或EV：馬賽布勞特氏菌、解苯副梭菌、苛求迪爾莫菌(*Dielma fastidiosa*)、*Longicatena caecimuris*、當別町範永氏球菌。

【0086】 在一些實施例中，本文描述之EV及/或細菌係經修飾使得

其等包含、連接至及/或結合治療部分。在一些實施例中，該治療部分係癌症特異性部分。在一些實施例中，該癌症特異性部分對癌細胞具有結合特異性(例如對癌症特異性抗原具有結合特異性)。在一些實施例中，該癌症特異性部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該癌症特異性部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，該癌症特異性部分包含表現於癌細胞表面上受體之配體或其受體結合片段。在一些實施例中，該癌症特異性部分係二分(bipartite)融合蛋白，其具有兩個部分：結合至及/或連接至細菌之第一部分及可結合至癌細胞(例如藉由對癌症特異性抗原具有結合特異性)之第二部分。在一些實施例中，該第一部分係全長肽聚醣識別蛋白(諸如PGRP)之片段或全長肽聚醣識別蛋白。在一些實施例中，該第一部分對EV具有結合特異性(例如藉由對細菌抗原具有結合特異性)。在一些實施例中，該第一及/或第二部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該第一及/或第二部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，該第一及/或第二部分包含表現於癌細胞表面上受體之配體或其受體結合片段。在某些實施例中，癌症特異性部分及EV之共投與(組合投與或分開投與)增加EV靶向癌細胞。

【0087】 在一些實施例中，本文描述之EV係經修飾使得其等包含、連接至及/或結合磁性及/或順磁性部分(例如磁珠)。在一些實施例中，該磁性及/或順磁性部分包含細菌及/或直接連接至細菌。在一些實施例中，該磁性及/或順磁性部分係連接至結合至EV之EV結合部分之一部分及/或為結合至EV之EV結合部分之一部分。在一些實施例中，該EV結合部分係全長肽聚醣識別蛋白(諸如PGRP)之片段或全長肽聚醣識別蛋白。在一些實施例中，該EV結合部分具有對EV之結合特異性(例如藉由對細菌抗

原具有結合特異性)。在一些實施例中，該EV結合部分包含抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該EV結合部分包含T細胞受體或嵌合抗原受體(CAR)。在一些實施例中，該EV結合部分包含表現於癌細胞表面上受體之配體或其受體結合片段。在某些實施例中，磁性及/或順磁性部分及EV之共投與(一起投與或分開投與)可用以增加EV靶向癌症細胞及/或個體存在癌細胞之一部分。

EV之產生

【0088】 在某些態樣中，本文描述之EV可使用此項技術中已知的任何方法製備。

【0089】 在一些實施例中，該等EV係經製備而無需EV純化步驟。例如，在一些實施例中，包含本文描述之EV之細菌係使用讓細菌EV保持完整之方法殺死且所得之細菌組分(包括EV)係用於本文描述之方法及組合物中。在一些實施例中，該等細菌係使用抗生素(例如，使用本文描述之抗生素)殺死。在一些實施例中，該等細菌係使用UV輻射殺死。

【0090】 在一些實施例中，本文描述之EV係純化自一或多種其他細菌組分。用於自細菌純化EV之方法係為此項技術中已知。在一些實施例中，EV係使用S. Bin Park等人，PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011)或G. Norheim等人，PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015)中描述之方法製備自細菌培養物，該等文獻之各者係以全文引用之方式併入本文中。在一些實施例中，該等細菌係經培養至高光密度及然後經離心以使細菌集結成粒(例如，在4°C下，以10,000 x g離心30分鐘)。在一些實施例中，然後使培養上清液通過過濾器以排除完整細菌細胞(例如，0.22 μm過濾器)。在一些實施例中，經過濾之上清液係經離心以使細菌EV集結成粒(例如，在4

°C下，以100,000至150,000 x g離心1至3小時)。在一些實施例中，該等EV係藉由重懸浮所得EV集結粒(例如，於PBS中)，並將重懸浮之EV施用至蔗糖梯度(例如，30至60%不連續之蔗糖梯度)，接著離心(例如，在4°C下，以200,000 x g離心20小時)加以進一步純化。EV帶可經收集，用(例如，用PBS)清洗，並離心以使EV集結成粒(例如，在4°C下，以150,000 x g離心3小時)。經純化之EV可經儲存(例如，在-80°C下)直至使用。在一些實施例中，該等EV係藉由用DNA酶及/或蛋白酶K處理加以進一步純化。

【0091】 例如，在一些實施例中，本文揭示之細菌之培養物可在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘以使細菌集結成粒。可使培養上清液通過0.22 μm過濾器以排除完整細菌細胞。然後可使用可包括(但不限於)硫酸銨沈澱、超離心或過濾之方法濃縮經過濾之上清液。例如，就硫酸銨沈澱而言，可將1.5-3 M硫酸銨緩慢添加至經過濾之上清液，同時在4°C下攪拌。可在4°C下將沈澱培養8至48小時及然後在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘。所得集結粒含有細菌EV及其他殘渣。可使用超離心，經過濾之上清液在4°C下以100,000至200,000 x g離心1至16小時。此離心之集結粒含有細菌EV及其他殘渣。在一些實施例中，使用過濾技術，諸如通過使用Amicon超自旋過濾器或藉由切向流過濾，上清液可經過濾以便於保留分子量> 50或100 kDa之物質。

【0092】 或者，EV可在生長期間(或在生長期間之所選時間點下)藉由將生物反應器連接至交變切向流(ATF)系統(例如，來自Repligen之XCell ATF)而連續獲得自細菌培養物。該ATF系統保留完整細胞(>0.22 μm)於生物反應器中，且容許較小組分(例如，EV、游離蛋白質)通過過濾器以供收集。例如，該系統可經結構設計使得<0.22 μm濾液然後通過100

kDa之第二過濾器，容許收集諸如0.22 μm 與100 kDa之間之EV的物質，並將小於100 kDa之物質泵送回生物反應器中。或者，該系統可經結構設計以容許生物反應器中之培養基在培養物之生長期間得到補充及/或修飾。藉由此方法收集之EV可藉由如上文針對經過濾之上清液描述之超離心或過濾加以進一步純化及/或濃縮。

【0093】 藉由本文提供之方法獲得之EV可藉由基於尺寸之管柱層析術、藉由親和層析術及藉由梯度超離心，使用可包括(但不限於)使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法加以進一步純化。簡而言之，使用蔗糖梯度方法，若使用硫酸銨沈澱或超離心以濃縮經過濾之上清液，則將集結粒重懸浮於60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0中。若使用過濾以濃縮經過濾之上清液，則使用Amicon超管柱將濃縮物緩衝液交換成60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0。將樣本施用至35至60%連續蔗糖梯度並在4°C下以200,000 x g離心3至24小時。簡而言之，使用Optiprep梯度方法，若使用硫酸銨沈澱或超離心以濃縮經過濾之上清液，則將集結粒重懸浮於含於PBS中之35% Optiprep中。在一些實施例中，若使用過濾以濃縮經過濾之上清液，則濃縮物係使用60% Optiprep稀釋至35% Optiprep之最終濃度。將樣本施用至35至60%不連續蔗糖梯度並在4°C下以200,000 x g離心3至24小時。

【0094】 在一些實施例中，為證實EV製劑之無菌性及分離，將EV連續稀釋至瓊脂培養基(其用於測試中之細菌之例行培養)上，並使用例行條件進行培養。使非無菌製劑通過0.22 μm 過濾器以排除完整細胞。為進一步增加純度，經分離之EV可經DNA酶或蛋白酶K處理。

【0095】 在一些實施例中，為製備用於活體內注射之EV，經純化之EV係如先前描述進行處理(G. Norheim等人，PLoS ONE. 10(9):

e0134353 (2015))。簡而言之，在蔗糖梯度離心後，將含有EV之帶於含有3%蔗糖之溶液或熟習此項技術者已知的適用於活體內注射之其他溶液中重懸浮至50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之最終濃度。此溶液亦可含有佐劑，例如，0至0.5% (w/v)濃度之氫氧化鋁。

【0096】 在某些實施例中，為使樣本與其他測試相容(例如，為在TEM成像或活體外分析之前移除蔗糖)，使用過濾(例如，Amicon超管柱)、透析或超離心(200,000 $\times g$ ， ≥ 3 小時，4 $^{\circ}\text{C}$)及重懸浮將樣本緩衝液交換成PBS或30 mM Tris，pH 8.0。

【0097】 在一些實施例中，EV製劑之無菌性可藉由將一部分EV接種至瓊脂培養基(其用於用以產生EV之細菌之標準培養)上及使用標準條件進行培養加以證實。

【0098】 在一些實施例中，所選EV係藉由層析術分離及富集並結合EV的表面部分。在其他實施例中，所選EV係藉由螢光細胞分選藉由使用親和試劑、化學染料、重組蛋白之方法或熟習此項技術者已知的其他方法分離及/或富集。

醫藥組合物

【0099】 在某些實施例中，本文提供之方法係包含本文提供之EV及/或細菌之醫藥組合物(例如，EV組合物)。在一些實施例中，該EV組合物包含EV及/或本文描述之EV及醫藥上可接受之載劑之組合。

【0100】 在一些實施例中，醫藥組合物包含大體上或完全不含細菌之EV。在一些實施例中，醫藥組合物包含EV及完整細菌(例如，活細菌、被殺死之細菌、減毒細菌)。在某些實施例中，醫藥組合物包含大體上或完全不含EV之細菌。在一些實施例中，醫藥組合物包含來自表1及/

或表2中列舉之細菌菌株或物種中之一或多者(例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多者)之EV及/或細菌。

【0101】 在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、

2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、
 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、
 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、
 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個EV顆粒而言，醫藥組合物包含至少1個細菌。

【0102】 在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、

2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個EV顆粒而言，醫藥組合物包含約1個細菌。

【0103】 在某些實施例中，醫藥組合物包含一定比率之細菌顆粒對EV顆粒。細菌顆粒之數量可基於實際顆粒數量或(若細菌係活的)CFU之數量。顆粒數量可藉由組合一組數量之經純化之EV及一組數量之經純化之細菌，藉由修飾培養細菌之生長條件，或藉由修飾細菌本身以產生更多或更少EV來確定。

【0104】 在一些實施例中，為定量細菌樣本中存在之EV及/或細菌之數量，可使用電子顯微術(例如，超薄冷凍切片之EM)以觀測囊泡及細菌並計數其等相對數量。或者，可使用奈米顆粒跟蹤分析(NTA)、庫爾特計數及動態光散射(DLS)之組合或此等技術之組合。NTA及庫爾特計數器計數顆粒並顯示其等尺寸。DLS給出顆粒之粒度分佈，而非濃度。細菌通常具有1至2 μm 之直徑。完整範圍係0.2至20 μm 。來自庫爾特計數及NTA之組合結果可揭示給定樣本中之細菌數量。庫爾特計數揭示具有0.7至10 μm 之直徑之顆粒之數量。NTA揭示具有50至1400 nm 之直徑之顆粒之數量。就大多數細菌樣本而言，庫爾特計數器單獨可揭示樣本中之細菌數量。EV之直徑係20至250 nm 。NTA將容許吾人計數直徑為50至250 nm 之顆粒之數量。DLS揭示具有於1 nm 至3 μm 之近似範圍內之不同直徑之顆粒之分佈。

【0105】 在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、

1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個EV顆粒而言，醫藥組合物包含不超過1個細菌。

【0106】 在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、

3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個細菌而言，醫藥組合物包含至少1個EV顆粒。

【0107】 在一些實施例中，就每1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、 1×10^3 、 2×10^3 、 3×10^3 、 4×10^3 、 5×10^3 、 6×10^3 、 7×10^3 、 8×10^3 、 9×10^3 、 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 、 6×10^4 、 7×10^4 、 8×10^4 、 9×10^4 、 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、

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

6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、
 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、
 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、
 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、
 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、
 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、
 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 及/或 1×10^{12} 個細菌而
言，醫藥組合物包含不超過1個EV顆粒。

【0108】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、
4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、
16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、
27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、
38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、
49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、
60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、
71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、
82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、
93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係EV。

【0109】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、
4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、
16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、
27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、
38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、

49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係細菌。

【0110】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係EV。

【0111】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、

82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係細菌。

【0112】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係EV。

【0113】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之顆粒係細菌。

【0114】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、

4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係EV蛋白。

【0115】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係細菌蛋白。

【0116】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、

38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係EV蛋白。

【0117】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係細菌蛋白。

【0118】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、

71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係EV蛋白。

【0119】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之蛋白質係細菌蛋白。

【0120】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之脂質係EV脂質。

【0121】 在一些實施例中，醫藥組合物中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之脂質係細菌脂質。

【0122】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之脂質係EV脂質。

【0123】 在一些實施例中，醫藥組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、

27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之脂質係細菌脂質。

【0124】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之脂質係EV脂質。

【0125】 在一些實施例中，醫藥組合物中約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、

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

【0126】 在一些實施例中，醫藥組合物中之EV係純化自一或多種其他細菌組分。在一些實施例中，該醫藥組合物進一步包含其他細菌組分。在一些實施例中，該醫藥組合物包含細菌細胞。

【0127】 在某些態樣中，本文提供用於向個體投與之醫藥組合物。在一些實施例中，該等醫藥組合物係與額外之活性及/或非活性材料組合以產生最終產品，其可呈單劑量單位或以多劑量形式。在一些實施例中，該等醫藥組合物係與佐劑諸如免疫佐劑(例如，STING促效劑、TLR促效劑、NOD促效劑)組合。

【0128】 在一些實施例中，該組合物包含至少一種碳水化合物。「碳水化合物」係指糖或糖之聚合物。術語「醣類」、「多醣」、「碳水化合物」及「寡醣」可互換使用。大多數碳水化合物係具有許多羥基(通常在分子之各碳原子上有一個羥基)之醛或酮。碳水化合物通常具有分子式 $C_nH_{2n}O_n$ 。碳水化合物可係單醣、二醣、三醣、寡醣或多醣。大多數鹼性碳水化合物係單醣，諸如葡萄糖、蔗糖、半乳糖、甘露糖、核糖、阿拉伯糖、木糖及果糖。二醣係兩個連接之單醣。示例性二醣包括蔗糖、麥芽糖、纖維二糖及乳糖。通常，寡醣包括三至六個單醣單元(例如，棉子糖、水蘇糖)，及多醣包括六個或更多個單醣單元。示例性多醣包括澱粉、糖原及纖維素。碳水化合物可含有經修飾之醣單元，諸如2'-脫氧核糖(其中羥基係經移除)、2'-氟核糖(其中羥基係經氟置換)或N-乙酰基葡萄

糖胺(葡萄糖之含氮形式(例如，2'-氟核糖、脫氧核糖及己糖))。碳水化合物可以許多不同形式(例如，構型異構物、環形、非環形、立體異構物、互變異構物、變旋異構物及異構物)存在。

【0129】 在一些實施例中，該組合物包含至少一種脂質。如本文使用，「脂質」包括脂肪、油、三酸甘油酯、膽固醇、磷脂質、任何形式之脂肪酸(包括游離脂肪酸)。脂肪、油及脂肪酸可為飽和、不飽和(順式或反式)或部分不飽和(順式或反式)。在一些實施例中，該脂質包含至少一種選自以下之脂肪酸：月桂酸(12:0)、肉豆蔻酸(14:0)、棕櫚酸(16:0)、棕櫚油酸(16:1)、十七酸(17:0)、十七碳烯酸(17:1)、硬脂酸(18:0)、油酸(18:1)、亞油酸(18:2)、亞麻酸(18:3)、十八碳四烯酸(18:4)、花生酸(20:0)、二十碳烯酸(20:1)、二十碳二烯酸(20:2)、二十碳四烯酸(20:4)、二十碳五烯酸(20:5) (EPA)、二十二烷酸(22:0)、二十二烯酸(22:1)、二十二碳五烯酸(22:5)、二十二碳六烯酸(22:6) (DHA)及二十四烷酸(24:0)。在一些實施例中，該組合物包含至少一種經修飾之脂質，例如，已藉由烹飪修飾之脂質。

【0130】 在一些實施例中，該組合物包含至少一種補充礦物或礦物源。礦物之實例包括(但不限於)：氯化物、鈉、鈣、鐵、鉻、銅、碘、鋅、鎂、錳、鋁、磷、鉀及硒。前述礦物中之任何一者之合適之形式包括可溶性礦物鹽、微溶性礦物鹽、不溶性礦物鹽、螯合礦物、礦物複合物、非反應性礦物(諸如羰基礦物)及還原礦物，及其組合。

【0131】 在一些實施例中，該組合物包含至少一種補充維生素。該至少一種維生素可係脂溶性或水溶性維生素。合適之維生素包括(但不限於)維生素C、維生素A、維生素E、維生素B12、維生素K、核黃素、菸鹼

酸、維生素D、維生素B6、葉酸、吡哆醇、硫胺素、泛酸及生物素。前述中之任何一者之合適之形式係維生素之鹽、維生素之衍生物、具有與維生素相同或相似活性之化合物及維生素之代謝物。

【0132】 在一些實施例中，該組合物包含賦形劑。合適之賦形劑之非限制性實例包括緩衝劑、防腐劑、穩定劑、黏合劑、壓實劑、潤滑劑、分散增強劑、崩解劑、調味劑、甜味劑及著色劑。

【0133】 在一些實施例中，該賦形劑係緩衝劑。合適之緩衝劑之非限制性實例包括檸檬酸鈉、碳酸鎂、碳酸氫鎂、碳酸鈣及碳酸氫鈣。

【0134】 在一些實施例中，該賦形劑包含防腐劑。合適之防腐劑之非限制性實例包括抗氧化劑(諸如 α -生育酚及抗壞血酸鹽)及抗菌劑(諸如對羥基苯甲酸酯、氯丁醇及苯酚)。

【0135】 在一些實施例中，該組合物包含作為賦形劑之黏合劑。合適之黏合劑之非限制性實例包括澱粉、預膠化澱粉、明膠、聚乙烯吡咯啉酮、纖維素、甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、聚丙烯醯胺、聚乙烯噁唑啉酮、聚乙烯醇、C₁₂-C₁₈脂肪酸醇、聚乙二醇、多元醇、醣類、寡醣，及其組合。

【0136】 在一些實施例中，該組合物包含作為賦形劑之潤滑劑。合適之潤滑劑之非限制性實例包括硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、硬脂酸鋅、氫化植物油、史提諾特(sterotex)、聚氧乙烯單硬脂酸酯、滑石、聚乙二醇、苯甲酸鈉、月桂基硫酸鈉、月桂基硫酸鎂及輕質礦物油。

【0137】 在一些實施例中，該組合物包含作為賦形劑之分散增強劑。合適之分散劑之非限制性實例包括澱粉、海藻酸、聚乙烯吡咯啉酮、瓜爾膠、高嶺土、膨潤土、經純化之木纖維素、乙醇酸澱粉鈉、無定形矽

酸鹽及作為高HLB乳化劑表面活性劑之微晶纖維素。

【0138】 在一些實施例中，該組合物包含作為賦形劑之崩解劑。在一些實施例中，該崩解劑係非泡騰崩解劑。合適之非泡騰崩解劑之非限制性實例包括澱粉(諸如玉米澱粉、土豆澱粉、其預膠化及經修飾之澱粉)、甜味劑、黏土(諸如膨潤土)、微晶纖維素、藻酸鹽、乙醇酸澱粉鈉、樹膠(諸如瓊脂、瓜爾膠、刺槐豆、刺梧桐膠、果膠及紫雲英樹膠)。在一些實施例中，該崩解劑係泡騰崩解劑。合適之泡騰崩解劑之非限制性實例包括碳酸氫鈉與檸檬酸之組合，及碳酸氫鈉與酒石酸之組合。

【0139】 在一些實施例中，該組合物係食品(例如，食物或飲料)，諸如健康食物或飲料、嬰兒之食物或飲料、孕婦、運動員、老年人或其他指定群體之食物或飲料、功能性食物、飲料、針對指定健康用途之食物或飲料、膳食補充劑、病患之食物或飲料或動物飼料。該等食物及飲料之具體實例包括各種飲料，諸如果汁、提神飲料、茶飲料、飲料製劑、果凍飲料及功能性飲料；酒精飲料，諸如啤酒；含有碳水化合物之食物，諸如大米食品、麵條、麵包及義大利麵；糊狀產品，諸如魚肉火腿、香腸、糊狀海鮮產品；蒸煮袋產品，諸如咖喱、用濃稠澱粉醬汁調味之食物及中國湯；湯；乳製品，諸如牛奶、乳製品飲料、霜淇淋、乳酪及優酪乳；發酵產品，諸如發酵之大豆醬、優酪乳、發酵飲料及醃漬物；豆製品；各種糖果製品，包括餅乾、曲奇及類似物、糖果、口香糖、軟糖、包括果凍之冷餐甜點、奶油焦糖及冷凍甜點；即食食物，諸如即食湯及即食大豆湯；微波食物；及類似物。此外，該等實例亦包括以粉末、顆粒、錠劑、膠囊、液體、糊劑及凝膠劑之形式製備之健康食物及飲料。

【0140】 在一些實施例中，該組合物係用於動物(包括人類)之食

品。除人類外之動物無特定限制，且該組合物可用於各種牲畜、家禽、寵物、實驗動物，及類似物。動物之具體實例包括豬、牛、馬、綿羊、山羊、雞、野鴨、鴕鳥、家鴨、狗、貓、兔、倉鼠、小鼠、大鼠、猴，及類似物，但該等動物不限於此。

治療劑

【0141】 在某些態樣中，本文提供之方法包括向個體投與本文描述之醫藥組合物，其單獨投與或與額外治療劑組合投與。在一些實施例中，該額外治療劑係免疫抑制劑、類固醇、癌症治療劑。

【0142】 在一些實施例中，EV係在投與治療劑之前(例如，至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之前或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之前)向個體投與。在一些實施例中，EV係在投與治療劑之後(例如，至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之後或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之後)向個體投與。在一些實施例中，EV及治療劑係向個體同時或幾乎同時投與(例如，彼此在一小時內投與)。在一些實施例中，向個體投與抗生素，然後(例如，至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之後或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之後)向該個體投與EV。

在一些實施例中，向個體投與EV，然後(例如，至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小時之後或至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天之後)向該個體投與抗生素。在一些實施例中，EV及抗生素係向個體同時或幾乎同時投與(例如，彼此在一小時內投與)。

【0143】 在一些實施例中，該額外治療劑係癌症治療劑。在一些實施例中，該癌症治療劑係化學治療劑。此等化學治療劑之實例包括(但不限於)烷化劑，諸如噻替派及環磷醯胺；磺酸烷基酯，諸如白消安、英丙舒凡及哌泊舒凡；氮丙啶，諸如苯佐替派、卡波醌、美妥替派及烏瑞替派；伸乙亞胺及甲基蜜胺，包括六甲蜜胺、三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三乙基硫磷醯胺及三羥甲基蜜胺；番荔枝內酯(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(包括合成類似物拓撲替康)；苔蘚蟲素；卡利斯他汀(callystatin)；CC-1065 (包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；念珠藻素(特定言之，念珠藻素1及念珠藻素8)；尾海兔素(dolastatin)；倍癌黴素(duocarmycin)(包括合成類似物KW-2189及CB1-TM1)；艾榴塞洛素(eleutherobin)；水鬼蕉鹼(pancratistatin)；珊瑚類二萜(sarcodictyin)；海綿抑制素(spongistatin)；氮芥類，諸如氮芥苯丁酸、萘氮芥、膽磷醯胺、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、甲基二氯乙基胺、甲基二氯乙基胺氧化物鹽酸鹽、美法侖、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥末；硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氮唑黴素

(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及倫納司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如，卡奇黴素(calicheamicin)、尤其卡奇黴素 γ II及卡奇黴素 ω 11；達內黴素(dynemicin)，包括達內黴素A；雙膦酸鹽，諸如氯膦酸鹽；埃斯培拉黴素(esperamicin)；及新抑癌蛋白生色團(neocarzinostatin chromophore)及相關之色素蛋白烯二炔抗生素發色團、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放射菌素、胺茴黴素(authrarnycin)、重氮絲胺酸(azaserine)、博來黴素(bleomycin)、放射菌素c (cactinomycin)、卡拉賓(carabycin)、卡米諾黴素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycini)、放射菌素d、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、多柔比星(包括嗎啉基-多柔比星、氰基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星及脫氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素，諸如絲裂黴素C、黴酚酸、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、波非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、三鐵阿黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲菌素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他汀(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如氮甲喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如二甲葉酸(denopterin)、氮甲喋呤、喋羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鳥嘌呤；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紮胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷、去氧

氟尿苷、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、丙酸甲雄烷酮、環硫雄醇、美雄烷(mepitiostane)、甾內脂；抗腎上腺，諸如氨魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如弗林酸；醋葡醛內酯；醛磷醯胺糖苷；胺基乙醯丙酸；恩尿嘧啶；安吡啶；貝斯特羅比爾(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲酸鹽(edatraxate)；地磷醯胺；地美可辛(demecolcine)；地吡醯；依氟烏胺酸；醋酸羥吡嘧啶；埃博黴素；乙環氧啶；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖；洛尼達寧(lonidainine)；美登素類，諸如美登素及安那黴素；米托胍脲；米托蔥醯；莫匹達莫；硝胺(nitraerine)；噴司他汀(pentostatin)；蛋氨酸芥(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蔥醯；鬼臼酸；2-乙基醯肼；丙苄肼；PSK多醣複合物)；雷佐生(razoxane)；根黴素(rhizoxin)；西佐呋喃(sizofuran)；螺旋鍺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸；三亞胺醯；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢黴烯(尤其T-2毒素、疣孢菌素A、桿孢菌素A及蛇形菌素(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴衛矛醇；胍血生(pipobroman)；胍基胞嘧啶(gacytosine)；阿拉伯糖苷(「Ara-C」)；環磷醯胺；噻替派；紫杉烷類，例如，紫杉醇及多西他賽(doxetaxel)；氮芥苯丁酸；吉西他濱(gemcitabine)；6-硫鳥嘌呤；巯基嘌呤；氮甲嘌呤；鉑配合物，諸如順鉑、奧沙利鉑(oxaliplatin)及卡鉑(carboplatin)；長春花鹼(vinblastine)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蔥醯(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)；長春瑞濱(vinorelbine)；諾消靈(novantrone)；替尼泊苷(teniposide)；依達曲沙(edatrexate)；正定黴素

(daunomycin)；氨喋呤(aminopterin)；希羅達(xeloda)；伊班膦酸鹽(ibandronate)；依立替康(例如，CPT-11)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(DMFO)；類視色素諸如視黃酸；卡培他濱(capecitabine)；及上文中之任何一者之醫藥上可接受之鹽、酸或衍生物。

【0144】 在一些實施例中，該癌症治療劑係癌症免疫治療劑。免疫治療係指用個體之免疫系統以治療癌症之治療，例如，查核點抑制劑、癌症疫苗、細胞介素、細胞治療、CAR-T細胞及樹突細胞治療。免疫治療之非限制性實例係查核點抑制劑，包括尼沃單抗(BMS，抗PD-1)、派姆單抗(Merck，抗PD-1)、伊匹單抗(BMS，抗CTLA-4)、MEDI4736(AstraZeneca，抗PD-L1)及MPDL3280A(Roche，抗PD-L1)。其他免疫治療可係腫瘤疫苗，諸如Gardail、Cervarix、BCG、sipulencel-T、Gp100:209-217、AGS-003、DCVax-L、Algenpantucel-L、Tergenpantucel-L、TG4010、ProstAtak、Prostvac-V/R-TRICOM、Rindopepim μ l、E75乙酸肽、IMA901、POL-103A、Belagenpumatumucel-L、GSK1572932A、MDX-1279、GV1001及Tecemotide。免疫治療可經由注射(例如，靜脈內、瘤內、皮下或淋巴結內)投與，但亦可經口、局部或經由噴霧投與。免疫治療可包含諸如細胞介素之佐劑。

【0145】 在一些實施例中，該免疫治療劑係免疫查核點抑制劑。免疫查核點抑制劑廣泛地係指抑制癌細胞可產生之查核點以防止或下調免疫反應。免疫查核點蛋白之實例包括(但不限於)CTLA4、PD-1、PD-L1、PD-L2、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、KIR、LAG3、TIM-3或VISTA。免疫查核點抑制劑可係結合至免疫查核點蛋白並抑制免疫查核點蛋白之抗

體或其抗原結合片段。免疫查核點抑制劑之實例包括(但不限於)尼沃單抗、派姆單抗、匹利珠單抗、AMP-224、AMP-514、STI-A1110、TSR-042、RG-7446、BMS-936559、MEDI-4736、MSB-0020718C、AUR-012及STI-A1010。

【0146】 在一些實施例中，本文提供之方法包括投與本文描述之醫藥組合物與一或多種額外治療劑之組合。在一些實施例中，本文揭示之方法包括投與兩種額外免疫治療劑(例如，免疫查核點抑制劑)。例如，本文提供之方法包括投與本文描述之醫藥組合物與PD-1抑制劑及CTLA-4抑制劑或PD-L1抑制劑及CTLA-4抑制劑之組合。

【0147】 在一些實施例中，免疫治療劑係(例如)結合至癌症相關抗原之抗體或其抗原結合片段。癌症相關抗原之實例包括(但不限於)親脂素、AIM-2、ALDH1A1、 α -輔肌動蛋白-4、 α -胎兒蛋白(「AFP」)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCR-ABL融合蛋白b3a2、 β -連環蛋白、BING-4、CA-125、CALCA、癌胚抗原(「CEA」)、CASP-5、CASP-8、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、週期蛋白D1、週期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延長因子2、ENAH(hMena)、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮腫瘤抗原(「ETA」)、ETV6-AML1融合蛋白、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1,2,8、GAGE-3,4,5,6,7、GAS7、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、Hepsin、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放素4、

KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1(亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、Lengsin、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、蘋果酸酶、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子(Midkine)、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「PEM」)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、分離蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活素、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β R2、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施例中，該抗原係新抗原。

【0148】 在一些實施例中，免疫治療劑係癌症疫苗及/或癌症疫苗之組分(例如，抗原肽及/或蛋白質)。該癌症疫苗可係蛋白質疫苗、核酸疫苗或其組合。例如，在一些實施例中，該癌症疫苗包含多肽，該多肽包含癌症相關抗原之抗原決定基。在一些實施例中，該癌症疫苗包含核酸(例如，DNA或RNA，諸如mRNA)，其編碼癌症相關抗原之抗原決定基。癌

症相關抗原之實例包括(但不限於)親脂素、AIM-2、ALDH1A1、 α -輔肌動蛋白-4、 α -胎兒蛋白(「AFP」)、ARTC1、B-RAF、BAGE-1、BCLX(L)、BCR-ABL融合蛋白 b3a2、 β -連環蛋白、BING-4、CA-125、CALCA、癌胚抗原(「CEA」)、CASP-5、CASP-8、CD274、CD45、Cdc27、CDK12、CDK4、CDKN2A、CEA、CLPP、COA-1、CPSF、CSNK1A1、CTAG1、CTAG2、週期蛋白D1、週期蛋白-A1、dek-can融合蛋白、DKK1、EFTUD2、延長因子2、ENAH (hMena)、Ep-CAM、EpCAM、EphA3、上皮腫瘤抗原(「ETA」)、ETV6-AML1融合蛋白、EZH2、FGF5、FLT3-ITD、FN1、G250/MN/CAIX、GAGE-1,2,8、GAGE-3,4,5,6,7、GAS7、磷脂醯肌醇蛋白聚糖-3、GnTV、gp100/Pmel17、GPNMB、HAUS3、Hepsin、HER-2/neu、HERV-K-MEL、HLA-A11、HLA-A2、HLA-DOB、hsp70-2、IDO1、IGF2B3、IL13R α 2、腸道羧基酯酶、K-ras、激肽釋放素4、KIF20A、KK-LC-1、KKLC1、KM-HN-1、KMHN1(亦稱為CCDC110)、LAGE-1、LDLR-岩藻糖基轉移酶AS融合蛋白、Lengsin、M-CSF、MAGE-A1、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A9、MAGE-C1、MAGE-C2、蘋果酸酶、乳腺球蛋白-A、MART2、MATN、MC1R、MCSP、mdm-2、ME1、Melan-A/MART-1、Meloe、中期因子、MMP-2、MMP-7、MUC1、MUC5AC、黏蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、肌凝蛋白、肌凝蛋白I類、N-raw、NA88-A、neo-PAP、NFYC、NY-BR-1、NY-ESO-1/LAGE-2、OA1、OGT、OS-9、P多肽、p53、PAP、PAX5、PBF、pml-RAR α 融合蛋白、多形上皮黏蛋白(「PEM」)、PPP1R3B、PRAME、PRDX5、PSA、PSMA、

PTPRK、RAB38/NY-MEL-1、RAGE-1、RBAF600、RGS5、RhoC、RNF43、RU2AS、SAGE、分離蛋白1、SIRT2、SNRPD1、SOX10、Sp17、SPA17、SSX-2、SSX-4、STEAP1、存活素、SYT-SSX1或-SSX2融合蛋白、TAG-1、TAG-2、端粒酶、TGF- β R2、TPBG、TRAG-3、丙糖磷酸異構酶、TRP-1/gp75、TRP-2、TRP2-INT2、酪胺酸酶、酪胺酸酶(「TYR」)、VEGF、WT1、XAGE-1b/GAGED2a。在一些實施例中，該抗原係新抗原。在一些實施例中，該癌症疫苗係與佐劑一起投與。佐劑之實例包括(但不限於)免疫調節蛋白、佐劑65、 α -GalCer、磷酸鋁、氫氧化鋁、磷酸鈣、 β -葡聚醣肽、CpG ODN DNA、GPI-0100、脂質A、脂多醣、利波夫(Lipovant)、蒙塔尼(Montanide)、N-乙醯基-胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸、Pam3CSK4、quil A、霍亂毒素(CT)及來自腸毒性大腸桿菌(*Escherichia coli*)之不耐熱毒素(LT)，包括此等之衍生物(CTB、mmCT、CTA1-DD、LTB、LTK63、LTR72、dmLT)及海藻糖二黴菌酸酯。

【0149】 在一些實施例中，免疫治療劑係用於個體之免疫調節蛋白。在一些實施例中，該免疫調節蛋白係細胞介素或趨化介素。免疫調節蛋白之實例包括(但不限於) B淋巴細胞化學引誘物(「BLC」)、C-C結構組元趨化介素11(「伊紅趨素-1」)、嗜酸性粒細胞趨化蛋白2(「伊紅趨素-2」)、粒細胞群落刺激因子(「G-CSF」)、粒細胞巨噬細胞群落刺激因子(「GM-CSF」)、1-309、細胞間黏附分子1(「ICAM-1」)、干擾素 α (「IFN- α 」)、干擾素 β (「IFN- β 」)、干擾素 γ (「IFN- γ 」)、介白素-1 α (「IL-1 α 」)、介白素-1 β (「IL-1 β 」)、介白素1受體拮抗劑(「IL-1ra」)、介白素-2(「IL-2」)、介白素-4(「IL-4」)、介白素-5(「IL-

5」)、介白素-6 (「IL-6」)、介白素-6可溶性受體(「IL-6 sR」)、介白素-7 (「IL-7」)、介白素-8 (「IL-8」)、介白素-10 (「IL-10」)、介白素-11 (「IL-11」)、介白素-12之亞單元 β (「IL-12 p40」或「IL-12 p70」)、介白素-13 (「IL-13」)、介白素-15 (「IL-15」)、介白素-16 (「IL-16」)、介白素-17A-F (「IL-17A-F」)、介白素-18 (「IL-18」)、介白素-21 (「IL-21」)、介白素-22 (「IL-22」)、介白素-23 (「IL-23」)、介白素-33 (「IL-33」)、趨化介素(C-C結構組元)配體2 (「MCP-1」)、巨噬細胞群落刺激因子(「M-CSF」)、由 γ 干擾素誘導之單核因子(「MIG」)、趨化介素(C-C結構組元)配體2 (「MIP-1 α 」)、趨化介素(C-C結構組元)配體4 (「MIP-1 β 」)、巨噬細胞發炎蛋白-1- δ (「MIP-1 δ 」)、血小板源生長因子亞單元B (「PDGF-BB」)、趨化介素(C-C結構組元)配體5、調節活化正常T細胞表現及分泌因子(「RANTES」)、TIMP金屬肽酶抑制因子1 (「TIMP-1」)、TIMP金屬肽酶抑制因子2 (「TIMP-2」)、腫瘤壞死因子、淋巴毒素- α (「TNF α 」)、腫瘤壞死因子、淋巴毒素- β (「TNF β 」)、可溶性TNF受體1型 (「sTNFR1」)、sTNFR2、腦源神經營養因子(「BDNF」)、鹼性成纖維細胞生長因子(「bFGF」)、骨成形性蛋白4 (「BMP-4」)、骨成形性蛋白5 (「BMP-5」)、骨成形性蛋白7 (「BMP-7」)、神經生長因子(「b-NGF」)、表皮生長因子(「EGF」)、表皮生長因子受體(「EGFR」)、內分泌腺源血管內皮細胞生長因子(「EG-VEGF」)、成纖維細胞生長因子4 (「FGF-4」)、角質細胞生長因子(「FGF-7」)、生長分化因子15 (「GDF-15」)、膠質細胞源神經營養因子(「GDNF」)、生長激素、肝素結合之EGF樣生長因子(「HB-EGF」)、肝細胞生長因子(「HGF」)、胰島素樣生長因子結合蛋白1 (「IGFBP-

1」)、胰島素樣生長因子結合蛋白2 (「IGFBP-2」)、胰島素樣生長因子結合蛋白3 (「IGFBP-3」)、胰島素樣生長因子結合蛋白4 (「IGFBP-4」)、胰島素樣生長因子結合蛋白6 (「IGFBP-6」)、胰島素樣生長因子1 (「IGF-1」)、胰島素、巨噬細胞群落刺激因子(「M-CSF R」)、神經生長因子受體(「NGF R」)、神經滋養素-3 (「NT-3」)、神經滋養素-4 (「NT-4」)、破骨細胞生成抑制因子(「骨保護素」)、血小板源生長因子受體(「PDGF-AA」)、磷脂酰肌醇聚醣生物合成(「PIGF」)、Skp、Cullin、含有F盒之複合物(「SCF」)、幹細胞因子受體(「SCF R」)、轉形生長因子 α (「TGF α 」)、轉形生長因子 β -1 (「TGF β 1」)、轉形生長因子 β -3 (「TGF β 3」)、血管內皮細胞生長因子(「VEGF」)、血管內皮細胞生長因子受體2 (「VEGFR2」)、血管內皮細胞生長因子受體3 (「VEGFR3」)、VEGF-D 6Ckine、酪胺酸-蛋白激酶受體UFO (「Ax1」)、 β 細胞調節素 (「BTC」)、黏膜相關上皮趨化介素 (「CCL28」)、趨化介素(C-C結構組元)配體27 (「CTACK」)、趨化介素(C-X-C結構組元)配體16 (「CXCL16」)、C-X-C結構組元趨化介素5 (「ENA-78」)、趨化介素(C-C結構組元)配體26 (「伊紅趨素-3」)、粒細胞趨化蛋白2 (「GCP-2」)、GRO、趨化介素(C-C結構組元)配體14 (「HCC-1」)、趨化介素(C-C結構組元)配體16 (「HCC-4」)、介白素-9 (「IL-9」)、介白素-17 F (「IL-17F」)、介白素-18-結合蛋白(「IL-18 BPa」)、介白素-28 A (「IL-28A」)、介白素29 (「IL-29」)、介白素31 (「IL-31」)、C-X-C結構組元趨化介素10 (「IP-10」)、趨化介素受體CXCR3 (「I-TAC」)、白血病抑制因子(「LIF」)、Light、趨化介素(C結構組元)配體(「淋巴細胞趨化介素」)、單核細胞化學引誘蛋白2 (「MCP-

2」)、單核細胞化學誘導蛋白3(「MCP-3」)、單核細胞化學誘導蛋白4(「MCP-4」)、巨噬細胞源趨化介素(「MDC」)、巨噬細胞移動抑制因子(「MIF」)、趨化介素(C-C結構組元)配體20(「MIP-3 α 」)、C-C結構組元趨化介素19(「MIP-3 β 」)、趨化介素(C-C結構組元)配體23(「MPIF-1」)、巨噬細胞刺激蛋白 α 鏈(「MSP α 」)、核小體組裝蛋白1樣4(「NAP-2」)、分泌型磷蛋白1(「骨橋蛋白」)、肺及活化調節之細胞介素(「PARC」)、血小板因子4(「PF4」)、基質細胞源因子-1 α (「SDF-1 α 」)、趨化介素(C-C結構組元)配體17(「TARC」)、胸腺表現之趨化介素(「TECK」)、胸腺基質淋巴細胞生成素(「TSLP 4-IBB」)、CD 166抗原(「ALCAM」)、分化簇80(「B7-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員17(「BCMA」)、分化簇14(「CD14」)、分化簇30(「CD30」)、分化簇40(「CD40配體」)、癌胚抗原相關細胞黏附分子1(膽汁醣蛋白)(「CEACAM-1」)、死亡受體6(「DR6」)、脫氧胸苷激酶(「Dtk」)、1型膜醣蛋白(「內皮醣蛋白」)、受體酪胺酸蛋白激酶 erbB-3(「ErbB3」)、內皮-白血球黏附分子1(「E-選擇素」)、細胞凋亡抗原1(「Fas」)、Fms樣酪胺酸激酶3(「Flt-3L」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員1(「GITR」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員14(「HVEM」)、細胞間黏附分子3(「ICAM-3」)、IL-1 R4、IL-1 RI、IL-10 R β 、IL-17R、IL-2R γ 、IL-21R、溶酶體膜蛋白2(「LIMPII」)、中性粒細胞明膠酶相關脂質運載蛋白(「脂質運載蛋白-2」)、CD62L(「L-選擇素」)、淋巴管內皮(「LYVE-1」)、MHC I類多肽相關序列A(「MICA」)、MHC I類多肽相關序列B(「MICB」)、NRG1- β 1、 β 型血小板源生長因子受體(「PDGF R β 」)、血小板內皮細胞黏附分子(「PECAM-1」)、RAGE、A型肝炎病

毒細胞受體1 (「TIM-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員IOC (「TRAIL R3」)、Trappin蛋白轉麩醯胺酸酶結合域(「Trappin-2」)、尿激酶受體(「uPAR」)、血管細胞黏附蛋白1 (「VCAM-1」)、XEDAR活化素A、野鼠相關蛋白(「AgRP」)、核糖核酸酶5 (「血管生成素」)、血管生成素1、血管抑素、組織蛋白酶S、CD40、隱匿性家族蛋白IB (「Cripto-1」)、DAN、Dickkopf相關蛋白1 (「DKK-1」)、E-鈣黏著蛋白、上皮細胞黏附分子(「EpCAM」)、Fas配體(FasL或CD95L)、Fcγ RIIB/C、卵泡抑素(FoUistatin)、半乳糖凝集素-7、細胞間黏附分子2 (「ICAM-2」)、IL-13 R1、IL-13R2、IL-17B、IL-2 Ra、IL-2 Rb、IL-23、LAP、神經元細胞黏附分子(「NrCAM」)、纖維蛋白溶酶原活化物抑制因子-1 (「PAI-1」)、血小板源生長因子受體(「PDGF-AB」)、抵抗素、基質細胞源因子1 (「SDF-1 β」)、sgpl30、分泌型捲曲相關蛋白2 (「ShhN」)、唾液酸結合免疫球蛋白型凝集素(「Siglec-5」)、ST2、轉形生長因子-β 2 (「TGF β 2」)、Tie-2、血小板生成素(「TPO」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員10D (「TRAIL R4」)、骨髓細胞上表現之觸發受體1 (「TREM-1」)、血管內皮細胞生長因子C (「VEGF-C」)、VEGFR1脂聯素、降脂蛋白(「AND」)、α-胎兒蛋白(「AFP」)、血管生成素樣4 (「ANGPTL4」)、β-2-微球蛋白(「B2M」)、基底細胞黏附分子(「BCAM」)、糖類抗原125 (「CA125」)、癌症抗原15-3 (「CA15-3」)、癌胚抗原(「CEA」)、cAMP受體蛋白(「CRP」)、人類表皮生長因子受體2 (「ErbB2」)、卵泡抑素、促卵泡激素(「FSH」)、趨化介素(C-X-C結構組元)配體1 (「GRO α」)、人絨毛膜促性腺激素(「β HCG」)、胰島素樣生長因子1受體(「IGF-1 sR」)、IL-1 sRII、IL-3、IL-18 Rb、IL-21、瘦素、基質金屬

蛋白酶-1 (「MMP-1」)、基質金屬蛋白酶-2 (「MMP-2」)、基質金屬蛋白酶-3 (「MMP-3」)、基質金屬蛋白酶-8 (「MMP-8」)、基質金屬蛋白酶-9 (「MMP-9」)、基質金屬蛋白酶-10 (「MMP-10」)、基質金屬蛋白酶-13 (「MMP-13」)、神經細胞黏附分子(「NCAM-1」)、巢蛋白(「巢蛋白-1」)、神經元特異性烯醇酶(「NSE」)、抑瘤素M (「OSM」)、降鈣素原、催乳素、前列腺特異性抗原(「PSA」)、唾液酸結合Ig樣凝集素9 (「Siglec-9」)、ADAM 17肽鏈內切酶(「TACE」)、甲狀腺球蛋白、金屬蛋白酶抑制因子4 (「TIMP-4」)、TSH2B4、含解聚素及金屬蛋白酶域之蛋白9 (「ADAM-9」)、血管生成素2、腫瘤壞死因子配體超家族成員13/富含酸性白胺酸之核磷蛋白32家族成員B (「APRIL」)、骨成形性蛋白2 (「BMP-2」)、骨成形性蛋白9 (「BMP-9」)、補體組分5a (「C5a」)、組織蛋白酶L、CD200、CD97、趨化素(Chemerin)、腫瘤壞死因子受體超家族成員6B (「DcR3」)、脂肪酸結合蛋白2 (「FABP2」)、成纖維細胞活化蛋白 α (「FAP」)、成纖維細胞生長因子19 (「FGF-19」)、半乳糖凝集素-3、肝細胞生長因子受體(「HGF R」)、IFN- γ α/β R2、胰島素樣生長因子2 (「IGF-2」)、胰島素樣生長因子2受體(「IGF-2 R」)、介白素-1受體6 (「IL-1R6」)、介白素24 (「IL-24」)、介白素33 (「IL-33」、激肽釋放素14、天冬醯胺醯基肽鏈內切酶 (「Legumain」)、氧化型低密度脂蛋白受體1 (「LOX-1」)、甘露糖結合凝集素(「MBL」)、腦啡肽酶 (「NEP」)、易位相關Notch同系物1 (果蠅) (「Notch-1」)、過度表現之腎母細胞瘤(「NOV」)、骨活素、程式性細胞死亡蛋白1 (「PD-1」)、N-乙醯胞壁酸-L-丙胺酸醯胺酶(「PGRP-5」)、絲胺酸蛋白酶抑制劑A4、分泌型捲曲相關蛋白3 (「sFRP-3」)、血

栓調節蛋白、類鐸受體2 (「TLR2」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員10A (「TRAIL R1」)、轉鐵蛋白(「TRF」)、WIF-1/ACE-2、白蛋白、AMICA、血管生成素4、B細胞活化因子(「BAFF」)、糖類抗原19-9 (「CA19-9」)、CD 163、聚集素、CRT AM、趨化介素(C-X-C結構組元)配體14 (「CXCL14」)、胱抑素C、核心蛋白聚醣(「DCN」)、Dickkopf相關蛋白3 (「Dkk-3」)、Delta樣蛋白1 (「DLL1」)、胎球蛋白A、肝素結合生長因子1 (「aFGF」)、葉酸受體 α (「FOLR1」)、弗林蛋白酶、GPCR相關分選蛋白1 (「GASP-1」)、GPCR相關分選蛋白2 (「GASP-2」)、粒細胞群落刺激因子受體(「GCSF R」)、絲胺酸蛋白酶hepsin (「HAI-2」)、介白素-17B受體(「IL-17B R」)、介白素27 (「IL-27」)、淋巴細胞活化基因3 (「LAG-3」)、脂蛋白元A-V (「LDL R」)、胃蛋白酶原I、視黃醇結合蛋白4 (「RBP4」)、SOST、硫酸乙醯肝素蛋白多醣(「配聚醣-1」)、腫瘤壞死因子受體超家族成員13B (「TACI」)、組織因子通路抑制因子(「TFPI」)、TSP-1、腫瘤壞死因子受體超家族成員10b (「TRAIL R2」)、TRANCE、肌鈣蛋白I、尿激酶纖維蛋白溶酶原活化因子(「uPA」)、鈣黏著蛋白5 (2型或VE-鈣黏著蛋白(血管內皮細胞)，亦稱為CD144 (「VE-鈣黏著蛋白」))、WNT1誘導型傳訊通路蛋白1 (「WISP-1」)，及核因子 κ B之受體活化因子(「RANK」)。

【0150】 在一些實施例中，該癌症治療劑係抗癌症化合物。示例性抗癌症化合物包括(但不限於)阿崙單抗(Campath®)、阿利維A酸(Panretin®)、阿那曲唑(Arimidex®)、貝伐單抗(Avastin®)、貝沙羅汀(Targretin®)、硼替佐米(Velcade®)、博舒替尼(Bosulif®)、本妥昔單抗(Adcetris®)、卡巴坦尼(Cometriq™)、卡菲佐米(Kyprolis™)、西妥昔單

抗(Erbitux®)、克裡唑蒂尼(Xalkori®)、達沙替尼(Sprycel®)、地尼介白素(Ontak®)、鹽酸埃羅替尼(Tarceva®)、依維莫司(Afinitor®)、依西美坦(Aromasin®)、氟維司群(Faslodex®)、吉非替尼(Iressa®)、替坦異貝莫單抗(Zevalin®)、甲磺酸伊馬替尼(Gleevec®)、伊匹單抗(Yervoy™)、二對甲苯磺酸拉帕替尼(Tykerb®)、來曲唑(Femara®)、尼洛替尼(Tasigna®)、奧法木單抗(Arzerra®)、帕尼單抗(Vectibix®)、鹽酸帕唑帕尼(Votrient®)、帕妥珠單抗(Perjeta™)、普拉曲沙(Folotyn®)、瑞戈非尼(Stivarga®)、利妥昔單抗(Rituxan®)、羅米地辛(Istodax®)、甲苯磺酸索拉非尼(Nexavar®)、蘋果酸舒尼替尼(Sutent®)、他莫昔芬、西羅莫司(Torisel®)、托瑞米芬(Fareston®)、托西莫單抗及¹³¹I-托西莫單抗(Bexxar®)、曲妥珠單抗(Herceptin®)、維甲酸(Vesanoid®)、凡德他尼(Caprelsa®)、威羅菲尼(Zelboraf®)、伏立諾他(Zolinza®)及阿柏西普(Zaltrap®)。

【0151】修飾調節基因表現及其他細胞功能之蛋白質之功能的示例性抗癌症化合物(例如，HDAC抑制劑，類視色素受體配體)係伏立諾他(Zolinza®)、貝沙羅汀(Targretin®)及羅米地辛(Istodax®)、阿利維A酸(Panretin®)及維甲酸(Vesanoid®)。

【0152】誘導細胞凋亡之示例性抗癌症化合物(例如，蛋白酶體抑制劑，葉酸拮抗劑)係硼替佐米(Velcade®)、卡菲佐米(Kyprolis™)及普拉曲沙(Folotyn®)。

【0153】增加抗腫瘤免疫反應之示例性抗癌症化合物(例如，抗CD20、抗CD52；抗細胞毒性T-淋巴細胞相關抗原-4)係利妥昔單抗(Rituxan®)、阿耨單抗(Campath®)、奧法木單抗(Arzerra®)及伊匹單抗

(Yervoy™)。

【0154】 將毒劑遞送至癌細胞之示例性抗癌症化合物(例如，抗CD20-放射性核素融合物；IL-2-白喉毒素融合物；抗CD30-單甲基澳瑞他汀E (MMAE)-融合物)係托西莫單抗及¹³¹I-托西莫單抗(Bexxar®)及替坦異貝莫單抗(Zevalin®)、地尼介白素(Ontak®)及本妥昔單抗(Adcetris®)。

【0155】 其他示例性抗癌症化合物係小分子抑制劑及其結合物，例如，Janus 激酶、ALK、Bcl-2、PARP、PI3K、VEGF 受體、Braf、MEK、CDK及HSP90。

【0156】 示例性基於鉑之抗癌症化合物包括(例如)順鉑、卡鉑、奧沙利鉑、賽特鉑、吡鉑、奈達鉑、三鉑(Triplatin)及脂鉑(Lipoplatin)。適用於治療之其他基於金屬之藥物包括(但不限於)基於鈮之化合物、二茂鐵衍生物、基於鈦之化合物及基於鎘之化合物。

【0157】 在一些實施例中，該癌症治療劑係包含放射性核素之放射性部分。示例性放射性核素包括(但不限於) Cr-51、Cs-131、Ce-134、Se-75、Ru-97、I-125、Eu-149、Os-189m、Sb-119、I-123、Ho-161、Sb-117、Ce-139、In-111、Rh-103m、Ga-67、Tl-201、Pd-103、Au-195、Hg-197、Sr-87m、Pt-191、P-33、Er-169、Ru-103、Yb-169、Au-199、Sn-121、Tm-167、Yb-175、In-113m、Sn-113、Lu-177、Rh-105、Sn-117m、Cu-67、Sc-47、Pt-195m、Ce-141、I-131、Tb-161、As-77、Pt-197、Sm-153、Gd-159、Tm-173、Pr-143、Au-198、Tm-170、Re-186、Ag-111、Pd-109、Ga-73、Dy-165、Pm-149、Sn-123、Sr-89、Ho-166、P-32、Re-188、Pr-142、Ir-194、In-114m/In-114及Y-

90。

【0158】 在一些實施例中，該癌症治療劑係抗生素。例如，若根據本文提供之方法偵測到存在癌症相關細菌及/或癌症相關微生物群系概況，則可投與抗生素以消除來自個體之癌症相關細菌。「抗生素」廣泛地係指可抑制或預防細菌感染之化合物。抗生素可以許多方法分類，包括其等針對特定感染之用途、其等作用機制、其等生物利用度或其等標靶微生物之光譜(例如，革蘭氏陰性相對於革蘭氏陽性細菌、好氧相對於厭氧細菌等)及此等可用以殺死宿主之特定區域(「棲位」)中之特定細菌(Leekha 等人，2011. *General Principles of Antimicrobial Therapy*. *Mayo Clin Proc.* 86(2): 156-167)。在某些實施例中，抗生素可用以選擇性靶向特定棲位之細菌。在一些實施例中，已知治療特定感染(包括癌症棲位)之抗生素可用以靶向癌症相關微生物，包括該棲位中之癌症相關細菌。在其他實施例中，抗生素係在細菌處理後投與。在一些實施例中，抗生素係在細菌處理後投與以移除移植。

【0159】 在一些態樣中，抗生素可基於其等殺菌或抑菌性質進行選擇。殺菌抗生素包括破壞細胞壁(例如， β -內醯胺)、細胞膜(例如，達托黴素(daptomycin))或細菌DNA (例如，氟喹諾酮類)之作用機制。抑菌劑抑制細菌複製及包括磺胺類、四環素類及大環內酯類，且藉由抑制蛋白合成發揮作用。此外，儘管一些藥物在某些生物體中可殺菌及在其他生物體中可抑菌，但已知標靶生物體容許熟習此項技術者以適當之性質選擇抗生素。在某些治療條件下，抑菌抗生素抑制殺菌抗生素之活性。因此，在某些實施例中，殺菌及抑菌抗生素不組合。

【0160】 抗生素包括(但不限於)胺基糖苷類、安莎黴素類

(ansamycins)、碳頭孢烯類(carbacephems)、碳青黴烯類(carbapenems)、頭孢菌素類(cephalosporins)、醣肽類、林可醯胺類(lincosamides)、脂肽類、大環內酯類、單環 β -內醯胺類(monobactams)、硝基呋喃類(nitrofurans)、噁唑烷酮類、青黴素類、多肽抗生素、喹諾酮類(quinolones)、氟喹諾酮類、磺胺類、四環素類及抗分枝桿菌化合物，及其組合。

【0161】 胺基糖苷類包括(但不限於)丁胺卡那黴素(Amikacin)、慶大黴素(Gentamicin)、卡那黴素(Kanamycin)、新黴素(Neomycin)、奈替米星(Netilmicin)、妥布黴素(Tobramycin)、巴龍黴素(Paromomycin)及大觀黴素(Spectinomycin)。胺基糖苷類可有效例如對抗革蘭氏陰性細菌，諸如大腸桿菌、克雷白氏菌、銅綠假單胞菌及土拉法蘭西斯氏菌，及可有效抗某些好氧細菌，但抗專性/兼性厭氧菌之效果不佳。據信胺基糖苷類結合至細菌30S或50S核糖體亞單元，藉此抑制細菌蛋白合成。

【0162】 安莎黴素類包括(但不限於)格爾德黴素(Geldanamycin)、除莠黴素(Herbimycin)、利福黴素(Rifamycin)及鏈菌素(Streptovaricin)。據信格爾德黴素及除莠黴素抑制或改變熱休克蛋白90之功能。

【0163】 碳頭孢烯類包括(但不限於)勞拉卡頭孢菌素(Loracarbef)。據信碳頭孢烯類抑制細菌細胞壁合成。

【0164】 碳青黴烯類包括(但不限於)厄他培南(Ertapenem)、多尼培南(Doripenem)、亞胺培南(Imipenem) /西司他汀(Cilastatin)及美羅培南(Meropenem)。碳青黴烯類作為廣譜抗生素對革蘭氏陽性及革蘭氏陰性細菌兩者均係殺菌的。據信碳青黴烯類抑制細菌細胞壁合成。

【0165】 頭孢菌素類包括(但不限於)頭孢羥氨苄(Cefadroxil)、頭孢唑啉(Cefazolin)、頭孢噻吩(Cefalotin)、頭孢噻吩(Cefalothin)、頭孢氨苄(Cefalexin)、頭孢克洛(Cefaclor)、頭孢孟多(Cefamandole)、頭孢西丁(Cefoxitin)、頭孢丙烯(Cefprozil)、頭孢呋辛(Cefuroxime)、頭孢克肟(Cefixime)、頭孢地尼(Cefdinir)、頭孢妥侖(Cefditoren)、頭孢哌酮(Cefoperazone)、頭孢噻肟(Cefotaxime)、頭孢泊肟(Cefpodoxime)、頭孢他啶(Ceftazidime)、頭孢布烯(Ceftibuten)、頭孢唑肟(Ceftizoxime)、頭孢曲松鈉(Ceftriaxone)、頭孢吡肟(Cefepime)、頭孢洛林酯(Ceftaroline fosamil)及頭孢托羅(Ceftobiprole)。所選頭孢菌素類可有效例如對抗革蘭氏陰性細菌及對抗革蘭氏陽性細菌(包括假單胞菌)，某些頭孢菌素類可有效對抗耐甲氧西林金黃色葡萄球菌(MRSA)。據信頭孢菌素類藉由破壞細菌細胞壁之肽聚醣層之合成抑制細菌細胞壁合成。

【0166】 醣肽類包括(但不限於)替考拉寧(Teicoplanin)、萬古黴素(Vancomycin)及特拉萬星(Telavancin)。醣肽類可有效例如對抗好氧及厭氧革蘭氏陽性細菌(包括MRSA及難辨梭菌)。據信醣肽類藉由破壞細菌細胞壁之肽聚醣層之合成抑制細菌細胞壁合成。

【0167】 林可醯胺類包括(但不限於)克林黴素(Clindamycin)及林可黴素(Lincomycin)。林可醯胺類可有效例如對抗好氧細菌，及葡萄球菌及鏈球菌。據信林可醯胺類結合至細菌50S核糖體亞單元，藉此抑制細菌蛋白合成。

【0168】 脂肽類包括(但不限於)達托黴素。脂肽類可有效例如對抗革蘭氏陽性細菌。據信脂肽類結合至細菌膜並引起快速去極化。

【0169】 大環內酯類包括(但不限於)阿奇黴素(Azithromycin)、克

拉黴素 (Clarithromycin) 、地紅黴素 (Dirithromycin) 、紅黴素 (Erythromycin) 、羅紅黴素 (Roxithromycin) 、醋竹桃黴素 (Troleandomycin) 、泰利黴素 (Telithromycin) 及螺旋黴素 (Spiramycin) 。大環內酯類可有效例如對抗鏈球菌及支原體。據信大環內酯類結合至細菌或50S核糖體亞單元，藉此抑制細菌蛋白合成。

【0170】 單環 β -內醯胺類包括(但不限於)氨曲南(Aztreonam) 。單環 β -內醯胺類可有效例如對抗革蘭氏陰性細菌。據信單環 β -內醯胺類藉由破壞細菌細胞壁之肽聚醣層之合成抑制細菌細胞壁合成。

【0171】 硝基呋喃類包括(但不限於)呋喃唑酮(Furazolidone)及呋喃妥因(Nitrofurantoin) 。

【0172】 噁唑烷酮類包括(但不限於)利奈唑胺(Linezolid) 、安替比林(Posizolid) 、雷得唑來(Radezolid)及托瑞唑胺(Torezolid) 。據信噁唑烷酮類係蛋白合成抑制劑。

【0173】 青黴素類包括(但不限於)阿莫西林(Amoxicillin) 、安比西林(Ampicillin) 、阿洛西林(Azlocillin) 、羧苄青黴素(Carbenicillin) 、氯唑西林(Cloxacillin) 、雙氯西林(Dicloxacillin) 、氟氯西林(Flucloxacillin) 、美洛西林(Mezlocillin) 、甲氧西林(Methicillin) 、萘西林(Nafcillin) 、苯唑西林(Oxacillin) 、青黴素G、青黴素V、哌拉西林(Piperacillin) 、替莫西林(Temocillin)及替凱西林(Ticarcillin) 。青黴素類可有效例如對抗革蘭氏陽性細菌、兼性厭氧菌(例如，鏈球菌、螺旋體及密螺旋體)。據信青黴素類藉由破壞細菌細胞壁之肽聚醣層之合成抑制細菌細胞壁合成。

【0174】 青黴素組合包括(但不限於)阿莫西林/克拉維酸(clavulanate) 、安比西林/舒巴坦(sulbactam) 、哌拉西林/他唑巴坦

(tazobactam)及替凱西林/克拉維酸。

【0175】多肽抗生素包括(但不限於)枯草桿菌肽、黏菌素及多黏菌素B及E。多肽抗生素可有效例如對抗革蘭氏陰性細菌。據信某些多肽抗生素抑制涉及細菌細胞壁之肽聚醣層之合成之焦磷酸異平酯，而其他多肽抗生素藉由置換細菌反離子而使細菌外膜不穩定。

【0176】喹諾酮類及氟喹諾酮類包括(但不限於)環丙沙星(Ciprofloxacin)、依諾沙星(Enoxacin)、加替沙星(Gatifloxacin)、吉米沙星(Gemifloxacin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)、洛美沙星(Lomefloxacin)、莫西沙星(Moxifloxacin)、萘啶酸(Nalidixic acid)、諾氟沙星(Norfloxacin)、氧氟沙星(Ofloxacin)、曲伐沙星(Trovafloxacin)、格帕沙星(Grepafloxacin)、司帕沙星(Sparfloxacin)及替馬沙星(Temafloxacin)。喹諾酮類/氟喹諾酮類可有效例如對抗鏈球菌及奈瑟菌。據信喹諾酮類/氟喹諾酮類抑制細菌DNA旋轉酶或拓撲異構酶IV，藉此抑制DNA複製及轉錄。

【0177】磺胺類包括(但不限於)磺胺米隆、乙醯磺胺、磺胺嘧啶、銀磺胺嘧啶、達美磺胺、磺胺甲二唑、磺胺甲噁唑、磺胺噻亞胺、柳氮磺胺吡啶、磺胺異噁唑、甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲噁唑(複方新諾明)及磺醯胺柯衣定(Sulfonamidochrysoidine)。據信磺胺類藉由二氫蝶酸合成酶之競爭抑制來抑制葉酸合成，藉此抑制核酸合成。

【0178】四環素類包括(但不限於)地美環素(Demeclocycline)、強力黴素(Doxycycline)、米諾環素(Minocycline)、土黴素(Oxytetracycline)及四環素。四環素類可有效例如對抗革蘭氏陰性細菌。據信四環素類結合至細菌30S核糖體亞單元，藉此抑制細菌蛋白合成。

【0179】抗分枝桿菌化合物包括(但不限於)氯法齊明(Clofazimine)、二胺苯砒(Dapsone)、捲曲黴素(Capreomycin)、環絲胺酸(Cycloserine)、乙胺丁醇(Ethambutol)、乙硫異菸醯胺(Ethionamide)、異菸酸酐(Isoniazid)、吡嗪醯胺(Pyrazinamide)、利福平(Rifampicin)、利福布丁(Rifabutin)、利福噴丁(Rifapentine)及鏈黴素。

【0180】合適之抗生素亦包括腫凡納明(arsphenamine)、氯黴素(chloramphenicol)、磷黴素(fosfomicin)、夫西地酸(fusidic acid)、甲硝唑(metronidazole)、莫匹羅星(mupirocin)、平板黴素(platensimycin)、奎奴司汀(quinupristin)/達福司汀(dalfopristin)、替加環素(tigecycline)、替硝唑(tinidazole)、甲氧苄氨嘧啶阿莫西林/克拉維酸、安比西林/舒巴坦、安福黴素瑞斯托菌素(amphomycin ristocetin)、阿奇黴素(azithromycin)、枯草桿菌肽、抗菌肽 II (buforin II)、卡波黴素(carbomycin)、天蠶素Pl (cecropin Pl)、克拉黴素、紅黴素、呋喃唑酮、夫西地酸、夫西地酸鈉(Na fusidate)、短桿菌肽(gramicidin)、亞胺培南、吲哚菌素(indolicidin)、交沙黴素(josamycin)、馬加南II (magainan II)、甲硝唑、硝基咪唑類、米卡黴素(mikamycin)、變鏈素B-Ny266 (mutacin B-Ny266)、變鏈素B-JH1 140、變鏈素J-T8、乳鏈菌肽(nisin)、乳鏈菌肽A、新生黴素(novobiocin)、夾竹桃黴素(oleandomycin)、牡蠣菌素(ostreogrycin)、哌拉西林/他唑巴坦、普那黴素(pristinamycin)、雷莫拉寧(ramoplanin)、牛蛙皮膚抗菌肽(ranalexin)、羅伊氏菌素(reuterin)、利福昔明(rifaximin)、薔薇黴素(rosamicin)、羅沙米星(rosaramicin)、大觀黴素、螺旋黴素、葡黴素(staphylomycin)、鏈黴殺陽菌素(streptogramin)、鏈黴殺陽菌素A、協同菌素(synergistin)、牛磺羅

定(taurolidine)、替考拉寧、泰利黴素、替凱西林/克拉維酸、三乙醯基夾竹桃黴素(triacetyloleandomycin)、泰樂菌素(tylosin)、短桿菌酪肽(tyrocidin)、短桿菌素(tyrothricin)、萬古黴素(vancomycin)、維莫黴素(vemamycin)及維吉尼亞黴素(virginiamycin)。

【0181】 在一些實施例中，額外治療劑係免疫抑制劑、DMARD、止痛藥、類固醇、非類固醇抗炎藥(NSAID)或細胞介素拮抗劑，及其組合。代表性藥劑包括(但不限於)環孢菌素、類視色素、皮質類固醇激素、丙酸衍生物、乙酸衍生物、烯醇酸衍生物、芬那酸衍生物、Cox-2抑制劑、羅美昔布(lumiracoxib)、布洛芬(ibuprofen)、水楊酸膽鹼鎂(cholin magnesium salicylate)、非諾洛芬(fenoprofen)、雙水楊酸酯(salsalate)、二氟苯水楊酸(difunisal)、托美汀(tolmetin)、酮洛芬(ketoprofen)、氟比洛芬(flurbiprofen)、奧沙普秦(oxaprozin)、吲哚美辛(indomethacin)、舒林酸(sulindac)、依託度酸(etodolac)、酮咯酸(ketorolac)、萘丁美酮(nabumetone)、萘普生(naproxen)、伐地考昔(valdecoxib)、依託考昔(etoricoxib)、MK0966；羅非昔布(rofecoxib)、對乙醯胺基酚(acetaminophen)、塞來昔布(Celecoxib)、雙氯芬酸(Diclofenac)、曲馬多(tramadol)、吡羅昔康(piroxicam)、美洛昔康(meloxicam)、替諾昔康(tenoxicam)、屈昔康(droxicam)、氯諾昔康(lornoxicam)、伊索昔康(isoxicam)、甲芬那酸(mefenamic acid)、甲氯芬那酸(meclofenamic acid)、氟芬那酸(flufenamic acid)、托芬那酸(tolfenamic)、伐地考昔(valdecoxib)、帕瑞昔布(parecoxib)、依託度酸(etodolac)、吲哚美辛、阿司匹林、布洛芬、非羅考昔(firocoxib)、氮甲喋呤(MTX)、抗瘧疾藥物(例如，羥基氯喹及氯喹)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、來氟米特

(Leflunomide)、硫唑嘌呤(azathioprine)、環孢菌素、金鹽、米諾環素(minocycline)、環磷醯胺、D-青黴胺(D-penicillamine)、米諾環素、金諾芬(auranofin)、他克莫司(tacrolimus)、硫代苯酸金鈉(myocrisin)、氯芥苯丁酸、TNF α 拮抗劑(例如，TNF α 拮抗劑或TNF α 受體拮抗劑)、例如，阿達木單抗(Humira®)、依那西普(Enbrel®)、英夫利昔單抗(Remicade®；TA-650)、聚乙二醇賽妥珠單抗(Cimzia®；CDP870)、戈利木單抗(Simpom®；CNTO 148)、阿那白滯素(Kineret®)、利妥昔單抗(Rituxan®；MabThera®)、阿巴西普(Orencia®)、托珠單抗(RoActemra/Actemra®)、整合素拮抗劑(TYSABRI® (那他珠單抗))、IL-1拮抗劑(ACZ885 (Ilaris))、阿那白滯素(Kineret®)、CD4拮抗劑、IL-23拮抗劑、IL-20拮抗劑、IL-6拮抗劑、BLyS拮抗劑(例如，阿塞西普(Atacicept)、Benlysta®/ LymphoStat-B® (貝利木單抗))、p38抑制劑、CD20拮抗劑(奧瑞珠單抗、奧法木單抗(Arzerra®))、干擾素 γ 拮抗劑(芳妥珠單抗)、潑尼松龍、強的松、地塞米松、皮質醇、可的松、氫化可的松、甲基潑尼松龍、倍他米松(betamethasone)、曲安奈德(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasone)、氟氫可的松(fludrocortisone)、去氧皮質酮、醛固酮、強力黴素(Doxycycline)、萬古黴素、吡格列酮(pioglitazone)、SBI-087、SCIO-469、Cura-100、Oncoxin + Viusid、TwHF、甲氧沙林(Methoxsalen)、維生素D-麥角鈣化醇(ergocalciferol)、米那普崙(Milnacipran)、紫杉醇、羅西格塔松(rosiglitazone)、他克莫司(Prograf®)、RADOOL、拉帕蒙(rapamune)、雷帕黴素(rapamycin)、福斯馬替尼(fostamatinib)、芬太尼(Fentanyl)、XOMA 052、福斯馬替尼二鈉、羅格列酮(rosiglitazone)、薑黃素(Longvida™)、

瑞舒伐他汀(Rosuvastatin)、馬拉韋羅(Maraviroc)、雷米普利(ramipril)、米那普崙、考前列酮(Cobiprostone)、生長激素(somatropin)、tgAAC94 基因治療載體、MK0359、GW856553、埃索美拉唑(esomeprazole)、依維莫司(everolimus)、曲妥珠單抗(trastuzumab)、JAK1及JAK2抑制劑、泛JAK抑制劑，例如，四環吡啶酮6 (P6)、325、PF-956980、狄諾塞麥(denosumab)、IL-6拮抗劑、CD20拮抗劑、CTLA4拮抗劑、IL-8拮抗劑、IL-21拮抗劑、IL-22拮抗劑、整合素拮抗劑(Tysarbri® (那他珠單抗))、VGEF拮抗劑、CXCL拮抗劑、MMP拮抗劑、防禦素拮抗劑、IL-1拮抗劑(包括IL-1 β拮抗劑)及IL-23拮抗劑(例如，受體誘捕物、拮抗性抗體等)。

【0182】 在一些實施例中，該藥劑係免疫抑制劑。免疫抑制劑之實例包括(但不限於)皮質類固醇激素、美沙拉嗪(mesalazine)、美沙拉明(mesalamine)、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、柳氮磺胺吡啶衍生物、免疫抑制藥物、環孢菌素A、巯基嘌呤、硫唑嘌呤(azathiopurine)、強的松、氨甲喋呤、抗組胺藥、糖皮質激素、腎上腺素、茶鹼、色甘酸鈉、抗白三烯、用於鼻炎之抗膽鹼能藥物、TLR拮抗劑、發炎體抑制劑、抗膽鹼能解充血劑、肥大細胞穩定劑、單株抗IgE抗體、疫苗(例如，用於其中使過敏原之量逐漸增加之接種疫苗之疫苗)、細胞介素抑制劑(諸如抗IL-6抗體)、TNF抑制劑(諸如英夫利昔單抗、阿達木單抗、聚乙二醇賽妥珠單抗、戈利木單抗或依那西普及其組合)。

投與

【0183】 在某些態樣中，本文提供向個體遞送本文描述之醫藥組合物之方法。在本文提供之方法之一些實施例中，該醫藥組合物係與額外治

療劑之投與結合投與。在一些實施例中，該醫藥組合物包含與額外治療劑共調配之EV及/或細菌。在一些實施例中，該醫藥組合物係與額外治療劑共投與。在一些實施例中，該額外治療劑係投與醫藥組合物之前(例如，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分鐘之前，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時之前，或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之前)向個體投與。在一些實施例中，該額外治療劑係在投與醫藥組合物之後(例如，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或55分鐘之後，約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22或23小時之後，或約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天之後)向個體投與。在一些實施例中，使用相同遞送模式以遞送醫藥組合物及額外治療劑兩者。在一些實施例中，使用不同遞送模式以投與醫藥組合物及額外治療劑。例如，在一些實施例中，該醫藥組合物係經口投與，而額外治療劑係經由注射投與(例如，靜脈內、肌內及/或瘤內注射)。

【0184】 在某些實施例中，本文描述之醫藥組合物、劑型及套組可結合任何其他習知抗癌症治療(諸如，例如，腫瘤之放射治療及手術切除)一起投與。此等治療可視需要及/或視指示施用且可在本文描述之醫藥組合物、劑型及套組之投與之前、同時或之後發生。

【0185】 給藥方案可係各種方法及量中之任何一者，且可由熟習此項技術者根據已知臨床因素確定。如醫學領域中所知，用於任何一個病患之劑量可取決於許多因素，包括個體之物種、尺寸、體表面積、年齡、性

別、免疫活性及一般健康、待投與之特定微生物、投與之持續時間及途徑、疾病之種類及階段(例如，腫瘤尺寸)及其他化合物(諸如同時投與之藥物)。除上文因素外，此等程度可受微生物之感染性及微生物之性質影響，如可由熟習此項技術者確定。在本發明之方法中，微生物之適當最小劑量程度可係足夠使微生物存活、生長及複製之程度。本文描述之醫藥組合物之劑量可根據劑型、投與途徑、標靶疾病之程度或階段及類似物適當地進行設定或調整。例如，藥劑之一般有效劑量可介於以下範圍：0.01 mg/kg體重/天至1000 mg/kg體重/天、0.1 mg/kg體重/天至1000 mg/kg體重/天、0.5 mg/kg體重/天至500 mg/kg體重/天、1 mg/kg體重/天至100 mg/kg體重/天，或5 mg/kg體重/天至50 mg/kg體重/天。該有效劑量可係0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500或1000 mg/kg體重/天或更多，但劑量不限於此。

【0186】 在一些實施例中，向個體投與之劑量係足以預防疾病(例如，自體免疫性疾病、發炎性疾病、代謝疾病、癌症)、延遲其發作或減緩或停止其進展。熟習此項技術者將知曉劑量將取決於各種因素，該等因素包括採用之特定化合物之強度及個體之年齡、物種、病症及體重。劑量之大小亦將由投與之途徑、時序及頻率及可能伴隨特定化合物之投與之任何不良副效應之存在、性質及程度及所需生理效應確定。

【0187】 合適之劑量及給藥方案可藉由彼等一般技術者已知的習知測距技術確定。一般而言，治療係以較小劑量開始，該等較小劑量係小於化合物之最佳劑量。此後，該劑量係以小增量增加直至達成在此情況下的最佳效應。有效劑量及治療方案可由例行及習知方式確定，以(例如)實驗

室動物中之低劑量開始及然後增加該劑量同時監測效應，且同時系統地改變給藥方案。動物研究通常用以確定每公斤重量生物活性劑之最大可耐受劑量(「MTD」)。彼等熟習此項技術者定期針對在其他物種中(包括人類)的效力外推劑量，同時避免毒性。

【0188】 根據上文，在治療應用中，根據本發明使用之活性劑之劑量取決於活性劑、接受者病患之年齡、重量及臨床病症，及臨床醫生或執業醫師投與治療之經驗及判斷、影響所選劑量之其他因素等而變化。一般而言，劑量應足以導致減緩(及較佳地消退)腫瘤生長，及最佳地引起癌症之完全消退。

【0189】 分開投與可包括任何數量之兩次或更多次投與，包括二、三、四、五或六次投與。熟習此項技術者可容易地根據此項技術中已知的用於監測治療方法之方法及本文提供之其他監測方法確定進行投與的次數或進行一或多次額外投與之期望。因此，本文提供之方法包括向個體提供醫藥組合物之一或多次投與之方法，其中投與次數可藉由監測個體確定，且基於監測之結果，判定是否需提供一或多次額外投與。可基於各種監測結果決定是否需提供一或多次額外投與。

【0190】 投與之間的時間週期可係各種時間週期中之任何一者。投與之間的時間週期可隨各種因素中之任何一者而變化，該等因素包括監測步驟(如關於投與次數描述)、個體激發免疫反應之時間週期及/或個體自正常組織清除EV之時間週期。在一項實例中，該時間週期可隨個體激發免疫反應之時間週期而變化；例如，該時間週期可大於個體激發免疫反應之時間週期，諸如超過約一週、超過約十天、超過約兩週或超過約一個月；在另一實例中，該時間週期可小於個體激發免疫反應之時間週期，諸如小

於約一週、小於約十天、小於約兩週或小於約一個月。在另一實例中，該時間週期可隨個體自正常組織清除EV之時間週期而變化；例如，該時間週期可大於個體自正常組織清除EV之時間週期，諸如超過約一天、超過約兩天、超過約三天、超過約五天或超過約一週。

【0191】 在一些實施例中，額外治療劑與本文描述之醫藥組合物之組合之遞送減少額外治療劑之不良反應及/或改善額外治療劑之效力。

【0192】 本文描述之額外治療劑之有效劑量係針對特定病患、組合物及投與模式有效達成所需治療劑反應且對病患的毒性最小之治療劑的量。有效劑量程度可使用本文描述之方法識別且將取決於各種藥物動力學因素，該等因素包括投與之特定組合物之活性、投與途徑、投與時間、所採用之特定化合物之排洩速率、治療之持續時間、與採用之特定組合物組合使用之其他藥物、化合物及/或材料、治療中之病患之年齡、性別、體重、病症、一般健康及既往病史，及醫學領域中熟知的類似因素。一般而言，額外治療之有效劑量將係治療劑之量，其係有效產生治療效應之最低劑量。此有效劑量一般取決於上文描述之因素。

【0193】 額外治療之毒性係個體在治療期間及治療之後經受之不利效應之程度。與額外之治療毒性相關聯之不良事件包括(但不限於)腹痛、酸性消化不良、胃酸反流、過敏反應、毛髮脫落、過敏性休克、貧血症、焦慮、食欲不振、關節痛、乏力、共濟失調、氮血症、平衡缺失、骨痛、出血、血塊、低血壓、高血壓、呼吸困難、支氣管炎、瘀傷、低白血球計數、低血紅細胞計數、低血小板計數、心臟中毒、膀胱炎、出血性膀胱炎、心律失常、心臟瓣膜疾病、心肌症、冠狀動脈疾病、白內障、中樞神經毒性、認知障礙、意識不清、結膜炎、便秘、咳嗽、抽搐、膀胱炎、深

靜脈血栓形成、脫水、抑鬱、腹瀉、頭暈、口乾、皮膚乾燥、消化不良、呼氣困難、浮腫、電解質失衡、食道炎、疲勞、生育能力下降、發燒、脹氣、潮紅、胃反流、胃食道逆流疾病、生殖器疼痛、粒細胞減少、男性乳房發育症、青光眼、脫髮、手足症候群、頭痛、聽力損失、心臟衰竭、心悸、胃灼熱、血腫、出血性膀胱炎、肝中毒、高澱粉酶血症、高鈣血症、高氯血症、高血糖症、高鉀血症、高脂肪酶血症(hyperlipasemia)、高鎂血症、高鈉血症、高磷血症、色素沉著、高三酸甘油酯血症、高尿酸血症、低蛋白血症、低鈣血症、低氯血症、低血糖、低鉀血症、低鎂血症、低鈉血症、低磷血症、陽痿、感染、注射部位反應、失眠、缺鐵、瘙癢、關節疼痛、腎衰竭、白血球減少症、肝功能不全、記憶喪失、絕經、口腔潰瘍、黏膜炎、肌肉疼痛、肌痛、骨髓抑制、心肌炎、中性粒細胞減少性發熱、惡心、腎中毒、中性粒細胞減少症、流鼻血、麻痺、耳中毒、疼痛、掌蹠紅腫、全血細胞減少症、心包炎、周圍神經病變、咽炎、畏光、光敏性、肺炎、局限性肺炎、蛋白尿、肺栓塞、肺纖維化、肺中毒、皮疹、心跳加速、直腸出血、躁動、鼻炎、癲癇發作、呼吸急促、鼻竇炎、血小板減少症、耳鳴、尿路感染、陰道流血、陰道乾燥、眩暈、保水性、虛弱、體重減輕、體重增加及口乾症。一般而言，若個體通過治療達成之利益勝過個體因治療所經受之不良事件，則毒性係可接受的。

免疫失調症

【0194】 在一些實施例中，本文描述之方法及組合物係關於治療或預防與病理學免疫反應相關之疾病或失調症(諸如自體免疫性疾病、過敏反應及/或發炎性疾病)。在一些實施例中，該疾病或失調症係發炎腸病(例如，克羅恩病或潰瘍性結腸炎)。

【0195】 本文描述之方法可用以治療有此需要之任何個體。如本文使用，「有此需要之個體」包括患有與病理學免疫反應相關聯之疾病或失調症(例如，發炎腸病)之任何個體，及具有增加獲得此疾病或失調症之可能性之任何個體。

【0196】 本文描述之組合物可(例如)用作預防或治療(部分或完全減少以下疾病之不利影響)自體免疫性疾病，諸如慢性發炎腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、穆-韋二氏症候群、類風濕性關節炎、多發性硬化或橋本病(Hashimoto's disease)；過敏疾病，諸如食物過敏、花粉熱或哮喘；傳染性疾病，諸如感染難辨梭菌；發炎性疾病，諸如TNF介導之發炎性疾病(例如，胃腸道之發炎性疾病，諸如結腸袋炎，心血管發炎病症，諸如動脈粥樣硬化或發炎肺疾病，諸如慢性阻塞性肺疾病)之醫藥組合物；用作用於抑制器官移植中之排斥或其中可能發生組織排斥之其他情況之醫藥組合物；用作用於改善免疫功能之補充物、食物或飲料；或用作用於抑制免疫細胞之增殖或功能之試劑。

【0197】 在一些實施例中，本文提供之方法適用於治療炎症。在某些實施例中，身體之任何組織及器官之炎症，包括肌肉骨骼炎症、血管炎症、神經炎症、消化系統炎症、眼部炎症、生殖系統炎症及其他炎症，如下文討論。

【0198】 肌肉骨骼系統之免疫失調症包括(但不限於)彼等影響骨骼關節(包括手、手腕、肘部、肩部、下巴、脊柱、頸部、臀部、膝蓋、踝部及足部之關節)之病症，及影響將肌肉連接至骨頭之組織(諸如肌腱)之病症。可用本文描述之方法及組合物治療之此等免疫失調症之實例包括(但不限於)關節炎(包括，例如，骨關節炎、類風濕性關節炎、銀屑病關

節炎、強直性脊柱炎、急性及慢性感染性關節炎、與痛風及假性痛風相關聯之關節炎及幼年特發性關節炎)、肌腱炎、滑膜炎、肌鞘炎、黏液囊炎、纖維組織炎(纖維肌痛)、上髌炎、肌炎及骨炎(包括,例如,佩吉特氏病(Paget's disease)、恥骨炎及纖維囊性骨炎)。

【0199】 眼部免疫失調症係指影響眼睛之任何結構(包括眼瞼)之免疫失調症。可用本文描述之方法及組合物治療之眼部免疫失調症之實例包括(但不限於)瞼緣炎、眼瞼皮膚松垂症、結膜炎、淚腺炎、角膜炎、乾燥性角膜結膜炎(乾眼症)、鞏膜炎、倒睫及葡萄膜炎。

【0200】 可用本文描述之方法及組合物治療之神經系統免疫失調症之實例包括(但不限於)腦炎、格林-巴里症候群(Guillain-Barre syndrome)、腦膜炎、神經性肌強直、嗜睡症、多發性硬化、脊髓炎及神經分裂症。可用本文描述之方法及組合物治療之脈管系統或淋巴系統之炎症之實例包括(但不限於)關節硬化、關節炎、靜脈炎、血管炎及淋巴管炎。

可用本文描述之方法及組合物治療之消化系統免疫失調症之實例包括(但不限於)膽管炎、膽囊炎、腸炎、小腸結腸炎、胃炎、腸胃炎、發炎腸病、迴腸炎及直腸炎。發炎腸病包括(例如)一組相關病症之某些本領域公認之形式。已知發炎腸病之幾種主要形式,此等失調症中最常見的為克羅恩病(區域性腸病,例如,非活性及活性形式)及潰瘍性結腸炎(例如,非活性及活性形式)。另外,發炎腸病包含大腸激燥症候群、微觀結腸炎、淋巴細胞性-漿細胞性腸炎、乳糜瀉、膠原性結腸炎、淋巴細胞性結腸炎及嗜酸性小腸結腸炎。IBD之其他不常見形式包括不確定性結腸炎、假膜性結腸炎(壞死性結腸炎)、缺血性發炎腸病、白塞氏病(Behcet's

disease)、肉狀瘤病、硬皮病、IBD相關發育不良、與發育不良相關之腫塊或病變及原發性硬化性膽管炎。

【0201】 可用本文描述之方法及組合物治療之生殖系統免疫失調症之實例包括(但不限於)子宮頸炎、絨毛膜羊膜炎、子宮內膜炎、附睪炎、臍炎、卵巢炎、睪丸炎、輸卵管炎、輸卵管卵巢膿腫、尿道炎、陰道炎、外陰炎及外陰痛。

【0202】 本文描述之方法及組合物可用以治療具有發炎成分之自體免疫病症。此病症包括(但不限於)全身性急性播散性禿頭症、白塞氏病、恰加斯病(Chagas' disease)、慢性疲勞症候群、自主神經障礙、腦脊髓炎、強直性脊柱炎、再生障礙性貧血、化膿性汗腺炎、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎、乳糜瀉、克羅恩病、糖尿病1型、巨細胞動脈炎、古德帕斯雷症候群、格雷夫病、格林-巴里症候群、橋本病、亨諾-許蘭二氏紫斑症(Henoch-Schonlein purpura)、川崎病(Kawasaki's disease)、紅斑狼瘡、微觀結腸炎、微觀多動脈炎、混合結締組織病、穆-韋二氏症候群(Muckle-Wells syndrome)、多發性硬化、重症肌無力、眼陣攣肌陣攣症候群、視神經炎、奧爾德甲狀腺炎、天皰瘡、結節性多動脈炎、多肌痛、類風濕性關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、顛動脈炎、韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、溫熱自體免疫性溶血性貧血、間質性膀胱炎、萊姆病(Lyme disease)、侷限性硬皮病、牛皮癬、肉狀瘤病、硬皮病、潰瘍性結腸炎及白斑病。

【0203】 本文描述之方法及組合物可用以治療具有發炎成分之T細胞介導之超敏性疾病。此病症包括(但不限於)接觸性超敏反應、接觸性皮

炎(包括由於毒葛引起之接觸性皮炎)、蕁麻疹、皮膚過敏、呼吸道過敏(花粉熱、過敏性鼻炎、屋塵蟎過敏)及麩質敏感性腸病(乳糜瀉)。

【0204】 可用本發明之方法及組合物治療之其他免疫失調症包括(例如)闌尾炎、皮炎、皮肌炎、心內膜炎、纖維組織炎、齒齦炎、舌炎、肝炎、化膿性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、腎炎、耳炎、胰臟炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、局限性肺炎、前列腺增生症、腎盂腎炎及口炎、移植排斥(涉及諸如腎、肝、心臟、肺、胰臟(例如，胰島細胞)、骨髓、角膜、小腸之器官，同種異體皮膚移植、皮膚同種移植物及心臟瓣膜異種移植、血清病及移植物抗宿主病)、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、急性呼吸窘迫症候群、西紮利氏症候群(**Sexary's syndrome**)、先天性腎上腺增生、非化膿性甲狀腺炎、癌症相關高鈣血症、天皰瘡、皰疹樣大皰性皮炎、重度多形紅斑、剝脫性皮炎、脂溢性皮炎、季節性或常年過敏性鼻炎、支氣管哮喘、接觸性皮炎、異位性皮炎、藥物過敏反應、過敏性結膜炎、角膜炎、眼帶狀皰疹、虹膜炎及虹膜睫狀體炎、脈絡膜視網膜炎、視神經炎、症狀性結節病、暴發性或播散性肺結核化療、成人特發性血小板減少性紫癜、成人繼發性血小板減少症、獲得性(自體免疫性)溶血性貧血症、成人白血病及淋巴瘤、兒童急性白血病、區域性腸炎、自體免疫性血管炎、多發性硬化、慢性阻塞性肺疾病、實體器官移植排斥反應、敗血症。較佳治療包括以下之治療：移植排斥、類風濕性關節炎、銀屑病關節炎、多發性硬化、1型糖尿病、哮喘、發炎腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、慢性阻塞性肺疾病及伴隨感染病症之炎症(例如，敗血症)。

代謝失調症

【0205】 本文描述之方法及組合物可用以治療代謝失調症及代謝症候群。此病症包括(但不限於) II型糖尿病、腦病、泰薩二氏病(Tay-Sachs disease)、克拉伯病(Krabbe disease)、半乳糖血症、苯丙酮酸尿症(PKU)及楓糖漿尿病。因此，在某些實施例中，本文提供治療代謝疾病之方法，其等包括向個體投與本文提供之組合物。在某些實施例中，該代謝疾病係II型糖尿病、腦病、泰薩二氏病、克拉伯病、半乳糖血症、苯丙酮酸尿症(PKU)或楓糖漿尿病。

癌症

【0206】 在一些實施例中，本文描述之方法及組合物係關於癌症之治療。在一些實施例中，任何癌症可使用本文描述之方法治療。可藉由本文描述之方法及組合物治療之癌症之實例包括(但不限於)來自以下之癌細胞：膀胱、血液、骨頭、骨髓、腦、乳房、結腸、食道、胃腸、牙齦、頭、腎、肝、肺、鼻咽、頸、卵巢、前列腺、皮膚、胃、睪丸、舌頭或子宮。另外，該癌症可特定地係下列組織學類型，但其不限於此等類型：贅瘤，惡性；癌；癌，未分化；巨大及梭細胞癌；小細胞癌；乳頭狀癌；鱗狀細胞癌；淋巴上皮癌；基底細胞癌(basal cell carcinoma)；毛髮基質(pilomatrix)癌；移行細胞癌；乳頭狀移行細胞癌；腺癌；胃泌素瘤，惡性；膽管癌；肝細胞癌；肝細胞癌合併膽管癌；小梁腺癌；腺樣囊性癌；腺瘤息肉之腺癌；腺癌，家族性結腸息肉；實體癌；類癌瘤，惡性；細支氣管肺泡(branchiolo-alveolar)腺癌；乳頭狀腺癌；嫌色細胞癌；嗜酸性細胞癌；嗜酸性腺癌；嗜鹼性粒細胞癌；透明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾泡性腺癌；乳頭狀及濾泡性腺癌；非包膜性硬化性癌；腎上腺皮質癌；子宮內膜樣癌；皮膚附器癌；頂漿(apocrine)腺癌；皮脂腺癌；耵聍

(ceruminous)腺癌；黏液表皮樣癌；囊腺癌；乳頭狀囊腺癌；乳頭狀漿液性囊腺癌；黏液性囊腺癌；黏液性腺癌；戒環細胞癌；浸潤性管狀癌；髓樣癌；小葉癌；發炎癌；佩吉特氏病，乳房；腺泡細胞癌；腺鱗癌；腺癌與鱗狀轉移瘤(adenocarcinoma w/squamous metaplasia)；胸腺瘤，惡性；卵巢間質瘤，惡性；卵泡膜細胞瘤(thecoma)，惡性；粒層細胞瘤，惡性；及成釉細胞瘤，惡性；賽特利氏(sertoli)細胞癌；睪丸間質細胞(leydig cell)瘤，惡性；脂質細胞瘤，惡性；副神經節瘤，惡性；乳房外副神經節瘤，惡性；嗜鉻細胞瘤；血管球肉瘤(glomangiosarcoma)；惡性黑色素瘤；無色素性黑色素瘤；淺表擴散黑色素瘤；巨大色素痣中之惡性黑色素瘤；上皮樣細胞黑色素瘤；藍痣，惡性；肉瘤；纖維肉瘤；纖維組織細胞瘤，惡性；黏液肉瘤；脂肉瘤(liposarcoma)；平滑肌肉瘤；橫紋肌肉瘤；胚胎性橫紋肌肉瘤；肺泡橫紋肌肉瘤；基質肉瘤；混合瘤，惡性；苗勒氏混合瘤(mullerian mixed tumor)；腎母細胞瘤；肝母細胞瘤；癌肉瘤；間質瘤，惡性；布倫納瘤(brenner tumor)，惡性；葉狀瘤，惡性；滑膜肉瘤；間皮瘤，惡性；無性細胞瘤；胚胎癌；畸胎瘤，惡性；卵巢甲狀腺瘤，惡性；絨毛膜癌；中腎瘤，惡性；血管肉瘤；血管內皮瘤，惡性；卡波西肉瘤(kaposi's sarcoma)；血管外皮細胞瘤，惡性；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；近皮質骨肉瘤；軟骨肉瘤；軟骨胚細胞瘤，惡性；間葉細胞軟骨肉瘤；骨巨細胞瘤；尤因肉瘤(ewing's sarcoma)；齒源性腫瘤，惡性；釉質母細胞齒源性瘤；釉質母細胞瘤，惡性；釉質母細胞纖維肉瘤；松果體瘤，惡性；脊索瘤；神經膠質瘤，惡性；室管膜瘤；星形細胞瘤；原漿性星形細胞瘤；纖維性星形細胞瘤；星形細胞瘤；膠質母細胞瘤；少突神經膠質瘤；少突膠質母細胞瘤；原始神經外胚葉腫瘤；小腦肉瘤；節細胞母

細胞瘤；神經母細胞瘤；視網膜母細胞瘤；嗅神經源性腫瘤；腦膜瘤，惡性；神經纖維肉瘤；神經鞘瘤，惡性；顆粒細胞瘤，惡性；惡性淋巴瘤；霍奇金病(Hodgkin's Disease)；霍奇金淋巴瘤；副肉芽腫；小淋巴細胞性惡性淋巴瘤；瀰漫性大細胞惡性淋巴瘤；濾泡型惡性淋巴瘤；蕈樣真菌病；其他指定非霍奇金淋巴瘤；惡性組織細胞增生症；多發性骨髓瘤；肥大細胞肉瘤；免疫增殖性小腸病；白血病；淋巴樣白血病；漿細胞白血病；紅白血病；淋巴肉瘤細胞白血病；髓樣白血病；嗜鹼性白血病；嗜酸性粒細胞白血病；單核細胞白血病；肥大細胞白血病；巨核細胞性白血病；髓樣肉瘤；及毛細胞白血病。

【0207】 在一些實施例中，本文提供之方法及組合物係關於白血病之治療。術語「白血病」廣義上意指造血器官/系統之進展性惡性疾病且其特徵通常為白血球及其等前體於血液及骨髓中之畸形增殖及發育。白血病之非限制性實例包括急性非淋巴細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、急性粒細胞白血病、慢性粒細胞白血病、急性前髓細胞白血病、成人T細胞白血病、白血球缺乏性白血病、白血球性白血病、嗜鹼性白血病、胚細胞白血病、牛白血病、慢性髓細胞白血病、皮膚白血病、胚胎性白血病、嗜酸性粒細胞白血病、格羅斯白血病(Gross' leukemia)、李德爾氏細胞白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、幹細胞白血病、亞白血病性白血病、未分化細胞白血病、毛細胞白血病、成血細胞性白血病、血母細胞性白血病、組織細胞性白血病、幹細胞白血病、急性單核細胞白血病、白血球減少性白血病、淋巴性白血病、淋巴母細胞性白血病、淋巴細胞性白血病、淋巴源性白血病、淋巴樣白血病、淋巴肉瘤細胞白血病、肥大細胞白血病、巨核細胞白血病、微小髓母細胞性白血

病、單核細胞白血病、髓母細胞性白血病、髓細胞性白血病、髓性粒細胞白血病、骨髓單核細胞性白血病、內格利白血病(Naegeli leukemia)、漿細胞白血病、漿細胞性白血病及前髓細胞白血病。

【0208】 在一些實施例中，本文提供之方法及組合物係關於癌之治療。術語「癌」係指由趨向於浸潤周圍組織，及/或抵抗生理及非生理性細胞死亡信號並引起轉移之上皮細胞組成之惡性生長。癌之非限制性示例性類型包括腺泡癌、腺泡狀癌、腺囊性癌、腺樣囊性癌、腺瘤性癌、腎上腺皮質癌、肺泡癌、肺泡細胞癌、基底細胞癌(basal cell carcinoma)、基底細胞癌(carcinoma basocellulare)、基底細胞樣癌、基底鱗狀細胞癌、細支氣管肺泡癌、細支氣管癌、支氣管肺癌、腦型癌、膽管細胞癌、絨毛膜癌、膠樣癌、粉刺癌、子宮體癌、篩骨狀癌、鎧甲狀癌、皮膚癌、柱狀癌、柱狀細胞癌、管狀癌、硬癌、胚胎癌、腦樣癌、闌尾癌、腺樣上皮癌、外生癌、潰瘍性癌、纖維癌、明膠樣癌、膠狀癌、巨大細胞癌、戒環細胞癌、單純癌、小細胞癌、馬鈴薯狀癌、球狀細胞癌、梭細胞癌、海綿狀癌、鱗狀癌、鱗狀細胞癌、繩捆癌、血管擴張性癌、毛細管擴張性癌、移行細胞癌、結節性皮膚癌、結節性癌、疣狀癌、絨毛狀癌、巨細胞癌、腺癌、顆粒細胞癌、毛基質癌、血樣癌、肝細胞癌、許特萊氏細胞腺癌(Hurthle cell carcinoma)、玻質狀癌、腎上腺樣癌、嬰兒胚胎癌、原位癌、表皮內癌、上皮內癌、克龍派切爾癌(Krompecher's carcinoma)、庫爾契茨基氏細胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、扁豆狀癌、豆狀核癌、脂肪瘤癌、淋巴上皮癌、延髓癌、髓樣癌、黑色素癌、痣癌、黏液素癌(mucinous carcinoma)、黏液癌(carcinoma muciparum)、黏液細胞癌、黏液表皮樣癌、黏膜癌、黏液癌(mucous carcinoma)、黏液瘤、鼻

咽癌、燕麥細胞癌、骨化癌、骨樣癌、乳頭狀癌、門靜脈周癌、侵襲前癌、棘細胞癌、糜爛性癌、腎之腎細胞癌、儲備細胞癌、肉瘤樣癌、施奈德癌(schneiderian carcinoma)、硬癌及陰囊癌。

【0209】 在一些實施例中，本文提供之方法及組合物係關於肉瘤之治療。術語「肉瘤」通常係指由諸如胚胎結締組織之物質組成之腫瘤且通常由插入於纖維狀、非均質或均質物質中之緊密排列之細胞構成。肉瘤包括(但不限於)軟骨肉瘤、纖維肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、黏液肉瘤、骨肉瘤、子宮內膜肉瘤、基質肉瘤、尤因肉瘤、筋膜肉瘤、成纖維細胞肉瘤、巨細胞肉瘤、阿米希肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肪肉瘤(adipose sarcoma)、脂肉瘤(liposarcoma)、牙槽軟組織肉瘤、釉質母細胞肉瘤、葡萄狀肉瘤、綠肉瘤、絨毛膜癌、胚胎性肉瘤、威爾姆斯瘤肉瘤(Wilms' tumor sarcoma)、粒細胞肉瘤、霍奇金肉瘤、特發性多發性色素性出血肉瘤、B細胞免疫母細胞肉瘤、淋巴瘤、T細胞免疫母細胞肉瘤、詹森肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西肉瘤、庫普弗細胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤、白血球肉瘤、惡性間葉質肉瘤、骨旁肉瘤、網織細胞肉瘤、勞氏肉瘤(Rous sarcoma)、漿細胞性肉瘤、滑膜肉瘤及毛細血管擴張性肉瘤。

【0210】 可使用本文描述之方法及組合物治療之額外之示例性腫瘤包括霍奇金病(Hodgkin's Disease)、非霍奇金淋巴瘤、多發性骨髓瘤、神經母細胞瘤、乳癌、卵巢癌、肺癌、橫紋肌肉瘤、原發性血小板增多症、原發性巨球蛋白血症、小細胞肺腫瘤、原發性腦腫瘤、胃癌、結腸癌、惡性胰臟胰島素瘤、惡性類癌、癌前皮膚病變、睪丸癌、淋巴瘤、甲狀腺癌、神經母細胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、惡性高鈣血症、宮頸癌、子

宮內膜癌、漿細胞瘤、結腸直腸癌、直腸癌及腎上腺皮質癌。

【0211】 在一些實施例中，所治療之癌症係黑色素瘤。術語「黑色素瘤」被認為係指產生自皮膚及其他器官之黑色素細胞系統之腫瘤。黑色素瘤之非限制性實例係哈-帕二氏黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年黑色素瘤、小痣性惡性黑色素瘤、惡性黑色素瘤、肢端小痣性黑色素瘤、無色素性黑色素瘤、良性幼年黑色素瘤、克勞德曼黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、結節性黑色素瘤甲下黑色素瘤及淺表擴散黑色素瘤。

【0212】 可使用本文描述之方法及組合物治療之腫瘤之特定類別包括淋巴球增生性疾病、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、宮頸癌、子宮內膜癌、骨癌、肝癌、胃癌、結腸癌、胰癌、甲狀腺癌、頭頸癌、中樞神經系統之癌症、外周神經系統之癌症、皮膚癌、腎癌、及所有上文之轉移。腫瘤之特定類型包括肝細胞癌、肝腫瘤、肝母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、食道癌、甲狀腺癌、神經節母細胞瘤、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、尤因腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、侵襲性管狀癌、乳頭狀腺癌、黑色素瘤、肺鱗狀細胞癌、基底細胞癌(basal cell carcinoma)、腺癌(高度分化、中度分化、低分化或未分化)、細支氣管肺泡癌、腎細胞癌、腎上腺樣瘤、腎上腺樣腺癌、膽管癌、絨毛膜癌、精原細胞癌、胚胎癌、韋爾姆斯瘤、睪丸腫瘤、肺癌(包括小細胞、非小細胞及大細胞肺癌)、膀胱癌、神經膠質瘤、星形細胞瘤、神經管胚細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、視網膜母細胞瘤、神經母細胞瘤、結腸癌、直腸癌、造血系統惡性腫瘤，包括所有類型的白血病及淋巴瘤，包括：急性髓性白血病、急性髓細胞性白血病、急性淋巴細胞性

白血病、慢性髓性白血病、慢性淋巴細胞白血病、肥大細胞白血病、多發性骨髓瘤、髓樣淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、漿細胞瘤、結腸直腸癌及直腸癌。

【0213】 在某些實施例中治療之癌症亦包括癌前病變，例如，光化性角化病(日光性角化病)、痣(發育不良痣)、光化性唇炎(農民唇)、即皮角、巴雷特氏食道症、萎縮性胃炎、先天性角化不良、側腦室性吞嚥困難、扁平苔蘚、口腔粘膜下纖維化、光化性(日光性)彈性組織變性及宮頸非典型增生。

【0214】 在某些實施例中治療之癌症包括(例如)內胚層、外胚層或間葉細胞源之非癌或良性腫瘤，包括(但不限於)膽管癌、結腸息肉、腺瘤、乳頭狀瘤、囊腺瘤、肝細胞腺瘤、葡萄胎、腎小管腺瘤、鱗狀細胞乳頭狀瘤、胃息肉、血管瘤、骨瘤、軟骨瘤、脂肪瘤、纖維瘤、淋巴管瘤、平滑肌瘤、橫紋肌瘤、星形細胞瘤、色素痣、腦膜瘤及神經節瘤。

其他疾病及失調症

【0215】 在一些實施例中，本文描述之方法及組合物係關於非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)及非酒精性脂肪性肝炎(NASH)之治療。

【0216】 在一些實施例中，本文描述之方法及組合物係關於肝疾病之治療。此疾病包括(但不限於)阿拉吉爾症候群(Alagille Syndrome)、酒精相關肝病、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症、自體免疫性肝炎、良性肝腫瘤、膽管閉鎖、肝硬化、半乳糖血症、吉爾伯特症候群、血色素沉著病、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、肝性腦病、妊娠期肝內膽汁淤積症(ICP)、溶酶體酸脂肪酶缺乏症(LAL-D)、肝囊腫、肝癌、新生兒黃疸、非酒精性脂肪肝病、原發性膽汁性膽管炎(PBC)、原發性硬化性膽管炎(PSC)、雷

氏症候群 (Reye Syndrome)、I型糖原貯積病及威爾森病 (Wilson Disease)。

【0217】 本文描述之方法及組合物可用以治療神經退化性及神經性疾病。在某些實施例中，神經退化性及/或神經性疾病係帕金森氏症 (Parkinson's disease)、阿茲海默症 (Alzheimer's disease)、普里昂疾病、杭丁頓症 (Huntington's disease)、運動神經元疾病 (MND)、脊髓小腦共濟失調、脊髓性肌萎縮症、肌張力障礙、特發性顱內高壓、癲癇、神經系統疾病、中樞神經系統疾病、運動障礙、多發性硬化、腦病、周圍神經病變或術後認知功能障礙。

製造增強之細菌之方法

【0218】 在某些態樣中，本文提供製造用於產生本文描述之EV之經改造之細菌之方法。在一些實施例中，該等經改造之細菌係經修飾以增強某些所需性質。例如，在一些實施例中，該等經改造之細菌係經修飾以增加細菌之EV產生。在一些實施例中，該等經改造之細菌係經修飾以產生具有增強之經口遞送(例如，藉由改善耐酸性及/或對膽汁酸之抗性)之EV，以增強細菌產生之EV之免疫調節及/或治療效應(例如，單獨或與其他治療劑組合使用)，以增強細菌產生之EV之免疫活化及/或以改善細菌及/或EV製造(例如，更高耐氧性、經改善之凍融耐受性、較短之產生時間)。經改造之細菌可使用此項技術中已知的任何技術產生，包括(但不限於)定點誘變、轉座子誘變、敲除、敲入、聚合酶鏈反應誘變、化學誘變、紫外線誘變、轉形(化學或藉由電穿孔)、噬菌體轉導、定向演化、CRISPR/Cas9或其任何組合。

【0219】 在本文提供之方法之一些實施例中，細菌係藉由定向演化

進行修飾。在一些實施例中，該定向演化包含將細菌曝露於環境條件並選擇在環境條件下具有經改善之存活及/或生長之細菌。在一些實施例中，該方法包括使用識別增強之細菌之分析篩選誘變細菌。在一些實施例中，該方法進一步包括誘變細菌(例如，藉由曝露於化學誘變劑及/或UV輻射)，接著進行分析以偵測具有所需表型之細菌(例如，活體內分析、離體分析或活體外分析)。

【0220】 在一些實施例中，本文提供之細菌係藉由曝露於由壓力誘導之環境(例如，誘導包膜壓力之環境)進行修飾。在一些實施例中，在此生長條件下之生長增加由細菌之EV產生。例如，在一些實施例中，該細菌係在亞抑菌濃度之本文描述之抗生素(例如，0.1至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯黴素，或0.1至0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 慶大黴素)之存在下生長。在一些實施例中，宿主抗微生物肽(例如，溶菌酶、防禦素及Reg蛋白)係代替抗生素使用或與抗生素組合使用。在一些實施例中，使用由細菌產生之抗微生物肽(例如，細菌素及小菌素)。在一些實施例中，該壓力係溫度壓力(例如，在37至50°C下生長)。在一些實施例中，該壓力係碳限制壓力(例如，在包含有限碳源之培養基中生長，諸如碳源受限低於1% (w/v)之培養基)。在一些實施例中，該壓力係鹽壓力(例如，在含有0.5 M NaCl之培養基中生長)。在一些實施例中，該壓力係UV壓力(例如，在UV燈下生長，在整個培養週期期間或僅在培養週期之一部分之期間內)。在一些實施例中，該壓力係反應性氧壓力(例如，在含有亞抑菌濃度之過氧化氫，諸如250至1,000 μM 過氧化氫之培養基中生長)。在一些實施例中，將本文揭示之壓力之組合施用至細菌。

實例

實例1：自細菌製備及純化EV。

【0221】胞外囊泡(EV)係使用熟習此項技術者已知的方法製備自細菌培養物(S. Bin Park等人, PLoS ONE. 6(3):e17629 (2011))。

【0222】例如，將細菌培養物在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘以使細菌集結成粒。然後使培養上清液通過0.22 μm過濾器以排除完整細菌細胞。使用可包括(但不限於)硫酸銨沈澱、超離心或過濾之方法濃縮經過濾之上清液。簡而言之，就硫酸銨沈澱而言，將1.5至3 M硫酸銨緩慢添加至經過濾之上清液，同時在4°C下攪拌。在4°C下將沈澱培養8至48小時及然後在4°C下以11,000 x g離心20至40分鐘。集結粒含有細菌EV及其他殘渣。簡而言之，使用超離心，將經過濾之上清液在4°C下以100,000至200,000 x g離心1至16小時。此離心之集結粒含有細菌EV及其他殘渣。簡而言之，使用過濾技術，使用Amicon超自旋過濾器或藉由切向流過濾，將上清液過濾以便於保留分子量> 50或100 kDa之物質。

【0223】或者，EV係在生長期間(或在生長期間之在所選時間點下)連續獲得自細菌培養物，藉由根據製造商之說明書將生物反應器連接至交變切向流(ATF)系統(例如，來自Repligen之XCell ATF)。該ATF系統保留完整細胞(>0.22 μm)於生物反應器中，及容許較小組分(例如，EV、游離蛋白質)通過過濾器以供收集。例如，該系統可經結構設計使得<0.22 μm濾液然後通過100 kDa之第二過濾器，容許收集諸如在0.22 μm與100 kDa之間的EV之物質，並將小於100 kDa之物種泵送回生物反應器中。或者，該系統可經結構設計以容許生物反應器中之培養基在培養物之生長期間得到補充及/或修飾。藉由此方法收集之EV可藉由如上文描述用於經過濾之上清液之超離心或過濾進行進一步純化及/或濃縮。

【0224】藉由上文描述之方法獲得之EV可藉由梯度超離心，使用可包括(但不限於)使用蔗糖梯度或Optiprep梯度之方法進行進一步純化。簡而言之，使用蔗糖梯度方法，若使用硫酸銨沈澱或超離心以濃縮經過濾之上清液，則將集結粒重懸浮於60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0中。若使用過濾以濃縮經過濾之上清液，則將濃縮物緩衝液交換成60%蔗糖，30 mM Tris，pH 8.0，使用Amicon超管柱。將樣本施用至35至60%不連續蔗糖梯度並在4°C下以200,000 x g離心3至24小時。簡而言之，使用Optiprep梯度方法，若使用硫酸銨沈澱或超離心以濃縮經過濾之上清液，則將集結粒重懸浮於含於PBS中之35% Optiprep中。若使用過濾以濃縮經過濾之上清液，則濃縮物係使用60% Optiprep稀釋至35% Optiprep之最終濃度。將樣本施用至35至60%不連續蔗糖梯度並在4°C下以200,000 x g離心3至24小時。

【0225】為證實EV製劑之無菌性及分離，將EV連續稀釋於瓊脂培養基(其用於測試中之細菌之例行培養)上，並使用例行條件進行培養。使非無菌製劑通過0.22 μm過濾器以排除完整細胞。為進一步增加純度，經分離之EV可用DNA酶或蛋白酶K處理。

【0226】或者，為製備用於活體內注射之EV，經純化之EV係如先前描述進行處理(G. Norheim 等人，PLoS ONE. 10(9): e0134353 (2015))。簡而言之，在蔗糖梯度離心後，將含有EV之帶於含有3%蔗糖之溶液中或熟習此項技術者已知的適用於活體內注射之其他溶液中重懸浮至50 μg/mL之最終濃度。此溶液亦可含有佐劑，例如，0至0.5% (w/v)濃度之氫氧化鋁。

【0227】為使樣本可與進一步測試相容(例如，以在TEM成像或活

體外分析之前，移除蔗糖)，使用過濾(例如，Amicon超管柱)、透析或超離心(200,000 x g， \geq 3小時，4°C)及重懸浮將樣本緩衝液交換成PBS或30 mM Tris，pH 8.0。

實例2：標記細菌EV

【0228】 在各種製劑中及在用哺乳動物細胞進行之分析中，為追蹤EV之活體內生物分佈並活體外定量及定位其等，EV係如先前描述進行標記(N. Kesty等人，EMBO Journal. 23: 4538-4549 (2004))。

【0229】 例如，用異硫氰酸螢光素(FITC) (Sigma-Aldrich, USA)、Cy7或適用於流式細胞術之任何其他螢光染料在25°C下1:1培養經純化之EV，持續1小時。培養步驟可在4°C下延長過夜。為移除額外之螢光染料，EV係然後(1)藉由在200,000 x g下離心3小時至過夜而集結成粒，清洗並重懸浮於PBS中或另一適當之緩衝液中用於下游應用；或(2)藉由透析或藉由過濾(例如，使用Amicon超管柱)將緩衝液交換成PBS或另一適當之緩衝液用於下游應用。

【0230】 或者，EV係獲得自在含有0.8 mM 3-疊氨基-D-丙胺酸或HADA之培養基中培養之細菌。若以3-疊氨基-D-丙胺酸生長，則將EV重懸浮PBS中或緩衝液交換成PBS及一部分係用含於1%BSA/PBS中之10 uM 二苯并-氮雜-環辛炔(DIBAC)-螢光染料(染料包括Cy5、TAMRA、羅丹明-綠及Cy7)進一步標記。未併入之染料係如上文描述移除，藉由(1)超離心、清洗及重懸浮；或(2)藉由透析或過濾進行緩衝液交換。

【0231】 經標記之EV亦可產生自表現綠螢光蛋白(GFP或任何其他螢光蛋白)之細菌。就革蘭氏陰性細菌而言，將周質靶向序列添加至螢光蛋白，使得其等適當地定位以在EV形成時被EV內化。

【0232】 可使用量子點以標記EV用於非侵入性活體內成像研究(K. Kikushima等人, *Scientific Reports*. 3(1913) (2013))。將量子點結合至經證實存在於EV膜中之抗體。經分離之EV係用量子點結合物培養, 及額外之結合物係如上文描述移除, 藉由(1)超離心、清洗及重懸浮; 或(2)藉由透析或過濾進行緩衝液交換。

【0233】 活體外及離體樣本中之經螢光標記之EV係藉由共聚焦顯微術、奈米顆粒追蹤分析及/或流式細胞術進行偵測。另外, 整個動物及/或經解剖之器官及組織中之經螢光標記之EV係使用諸如IVIS光譜CT (Perkin Elmer) 之儀器偵測, 如 H-I. Choi 等人, *Experimental & Molecular Medicine*. 49: e330 (2017)中所述。

【0234】 另外, EV可如先前描述進行放射性標記(Z. Varga等人, *Cancer Biother Radiopharm*. 2016 Jun;31(5):168-73)。

【0235】 例如, 經純化之EV係以^{99m}Tc-三羰基複合物 [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ 使用市售套組 (Isolink®; Mallinckrodt Medical B.V.), 根據製造商之使用說明進行放射性標記。

實例3：利用透射電子顯微術觀測細菌產生EV及經純化之細菌EV

【0236】 透射電子顯微術(TEM)係用以觀測細菌產生EV或經純化之細菌EV(S. Bin Park等人, *PLoS ONE*. 6(3):e17629 (2011))。EV係製備自如實例1中描述之細菌分批培養物。將EV安裝於300-或400-目-尺寸碳塗覆銅網(Electron Microscopy Sciences, USA)上歷時2分鐘並用去離子水清洗。EV係使用2% (w/v)乙酸鈾醯陰性染色20秒至1分鐘。銅網係用無菌水清洗並乾燥。影像係使用透射電子顯微鏡以100至120 kV加速電壓獲取。經染色之EV在直徑20至250 nm之間出現且為電子緻密的。對各網篩

選10至50個視野。

實例4：圖譜分析EV組成及內容物

【0237】 EV可藉由各種方法中之任何一者進行表徵，該等方法(包括但不限於) NanoSight表徵、SDS-PAGE凝膠電泳、西方墨點轉漬法、ELISA、液相層析術-質譜法及質譜法、動態光散射、脂質水平、總蛋白質、脂質與蛋白質比率、核酸分析及 ζ 電位。

【0238】 EV之NanoSight表徵

【0239】 奈米顆粒跟蹤分析(NTA)係用以表徵經純化之細菌EV之粒度分佈。於NanoSight機器(Malvern Instruments)上運行經純化之EV製劑以評估EV尺寸及濃度。

【0240】 SDS-PAGE凝膠電泳

【0241】 為識別經純化之EV之蛋白質組分(實例1)，將樣本於Bolt Bis-Tris Plus 4-12%凝膠(Thermo-Fisher Scientific)上使用標準技術運行。將樣本於1x SDS樣本緩衝液中煮沸10分鐘，冷卻至4°C，及然後在16,000 x g下離心1分鐘。然後，將樣本於SDS-PAGE凝膠上運行並使用幾種標準技術(例如，銀染色、考馬斯藍(Coomassie Blue)、凝膠代碼藍(Gel Code Blue))中之任何一者進行染色以使帶(band)可視化。

【0242】 西方墨點轉漬法分析

【0243】 為識別及定量經純化之EV之特定蛋白質組分，EV蛋白係藉由如上文描述之SDS-PAGE分離及經受西方墨點轉漬法分析(Cvjetkovic等人，Sci. Rep. 6, 36338 (2016)並經由ELISA定量。

【0244】 液相層析術-質譜法(LC-MS/MS)及質譜法(MS)

【0245】 存在於EV中之蛋白質係藉由質譜法技術識別及定量。另

外，代謝內容物係使用液體層析技術與質譜法之組合進行確定。存在確定各種樣本之代謝內容物且為熟習此項技術者已知的各種技術，該等技術涉及溶劑萃取、層析分離及耦合至質量測定之各種電離技術(Roberts等人，2012 Targeted Metabolomics. Curr Protoc Mol Biol. 30: 1-24；Dettmer等人，2007, Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev. 26(1):51-78)。作為一項非限制性實例，LC-MS系統包括與1100系列泵(Agilent)及HTS PAL自動進樣器(Leap Technologies)組合之4000 QTRAP三重四級桿質譜儀(AB SCIEX)。培養基樣本或其他複雜代謝混合物(~10 µL)係使用九體積的含有穩定之同位素標記內標物(纈胺酸-d8，Isotec；及苯丙胺酸-d8，Cambridge Isotope Laboratories)之74.9:24.9:0.2 (v/v/v)乙腈/甲醇/甲酸進行萃取。標準物可取決於受關注之代謝物進行調整或修飾。樣本係經離心(10分鐘，9,000g，4°C)，及上清液(10 µL)係藉由將溶液注射於HILIC管柱(150 × 2.1 mm, 3 µm粒度)上而呈遞至LCMS。管柱係藉由使5%流動相[10 mM甲酸銨，0.1%甲酸於水中]以250 µl/分鐘之速率流動1分鐘，接著線性梯度歷時10分鐘至40%流動相之溶液[具有0.1%甲酸之乙腈]進行溶離。將離子噴霧電壓設定至4.5 kV及源溫度係450°C。

【0246】 資料係使用市售軟體(諸如來自AB SCIEX之Multiquant 1.2)進行分析以用於質譜峰積分。受關注之峰應手動控制並與標準進行比較來證實該峰之同一性。用適當之標準物進行定量以確定在細菌調節(bacterial conditioning)後及在腫瘤細胞生長後，初始培養基中存在之代謝物之量。

【0247】 動態光散射(DLS)

【0248】 DLS量測(包括不同尺寸之顆粒在不同EV製劑中之分佈)係使用儀器諸如DynaPro NanoStar (Wyatt Technology)及Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)進行。

【0249】 脂質水平

【0250】 脂質水平係使用FM4-64 (Life Technologies)，藉由類似於彼等由A.J. McBroom等人，J Bacteriol 188:5385-5392.及A. Frias等人，Microb Ecol. 59:476-486 (2010)描述者之方法進行定量。樣本係用FM4-64培養(3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 於PBS中，在37°C下在黑暗中培養10分鐘)。在515 nm下激發後，在635 nm下之發射係使用Spectramax M5平板閱讀器(Molecular Devices)量測。絕對濃度係藉由將未知樣本與已知濃度之標準物(諸如棕櫚醯油酸磷脂醯甘油(POPG)囊泡)進行比較而測定。

【0251】 總蛋白質

【0252】 蛋白質水平係藉由標準分析(諸如布拉德福德(Bradford)及BCA分析)定量。該等布拉德福德分析係使用Quick Start布拉德福德1x染料試劑(Bio-Rad)，根據製造商之方案運行。BCA分析係使用Pierce BCA蛋白質分析套組(Thermo-Fisher Scientific)運行。絕對濃度係藉由與產生自己知濃度之BSA之標準曲線進行比較而測定。

【0253】 脂質:蛋白質比率

【0254】 脂質:蛋白質比率係藉由脂質濃度除以蛋白質濃度產生。相較於各製劑中之游離蛋白質，此等提供囊泡之純度之量度。

【0255】 核酸分析

【0256】 核酸係萃取自EV並使用Qubit螢光計定量。粒度分佈係使用生物分析儀評估並將材料測序。

【0257】 ζ 電位

【0258】 不同製劑之 ζ 電位係使用諸如 Zetasizer ZS (Malvern Instruments)之儀器量測。

實例5：通過壓力操作細菌以產生各種量之EV及/或改變EV之內容物

【0259】 壓力及特定言之包膜壓力已顯示增加一些細菌菌株產生EV(I. MacDonald, M. Kuehn. J Bacteriol 195(13): doi: 10/1128/JB.02267-12)。為改變細菌產生EV，細菌係使用各種方法施加壓力。

【0260】 細菌可經受單一壓力源或壓力源組合。不同壓力源對不同細菌之影響係藉由改變壓力條件及測定IC50值(抑制50%細胞生長所需之條件)來經驗性地確定。EV純化、定量及表徵如實例1至4中之詳細描述發生。EV產生係(1)在細菌及EV之複雜樣本中藉由奈米顆粒跟蹤分析(NTA)或透射電子顯微術(TEM)；或(2)在EV純化後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量進行定量。EV內容物係純化後接著藉由上文描述之方法進行評估。

【0261】 抗生素壓力

【0262】 細菌係在標準生長條件下以添加亞抑菌濃度之抗生素進行培養。此可包括0.1至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯黴素，或0.1至0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 慶大黴素，或類似濃度之其他抗生素(例如，安比西林、多黏菌素B)。宿主抗菌產物(諸如溶菌酶、防禦素及Reg蛋白)可代替抗生素使用。亦可使用由細菌產生之抗微生物肽(包括細菌素及小菌素)。

【0263】 溫度壓力

【0264】 細菌係在標準生長條件下，但在比通常用於其等生長之溫

度更高或更低之溫度下進行培養。或者，細菌係在標準條件下生長，及然後分別藉由在低溫或高溫下短期間培養而經受冷休克或熱休克。例如，在37°C下生長之細菌係在4°C至18°C下培養1小時用於冷休克或在42°C至50°C下培養1小時用於熱休克。

【0265】 飢餓及營養物限制

【0266】 為誘導營養壓力，細菌係在其中一或多種營養素受限之條件下培養。細菌可在整個生長期間經受營養壓力或自富培養基轉移至貧培養基。受限之培養基組分之一一些實例係碳、氮、鐵及硫。一項實例培養基係M9最小培養基(Sigma-Aldrich)，其含有低葡萄糖作為唯一碳源。特別對於普雷沃菌屬，鐵可用性係藉由改變培養基中氯化血紅素之濃度及/或藉由改變培養基中存在之卟啉或其他鐵載劑之類型改變，因為發現在低氯化血紅素條件中生長之細胞產生更多EV (S. Stubbs等人，*Letters in Applied Microbiology*. 29:31-36 (1999)。培養基組分亦藉由添加螯合劑(諸如EDTA及去鐵胺)進行操作。

【0267】 飽和度

【0268】 使細菌生長至飽和及在飽和點後培養各種時間週期。或者，使用條件培養基以在指數生長期間模擬飽和環境。如實例1中描述，條件培養基係藉由離心及過濾自飽和培養物移除完整細胞製備，及條件培養基可經進一步處理以濃縮或移除特定組分。

【0269】 鹽壓力

【0270】 細菌係在含有NaCl、膽汁鹽或其他鹽之培養基中培養或短暫曝露於含有NaCl、膽汁鹽或其他鹽之培養基。

【0271】 UV壓力

【0272】 UV壓力係藉由在UV燈下培養細菌或藉由將細菌曝露於UV使用諸如Stratalinker (Agilent)之儀器達成。UV可在整個培養週期期間，在短爆發期內或生長後之單一定義週期內施用。

【0273】 反應性氧壓力

【0274】 細菌係在亞抑菌濃度之過氧化氫(250至1,000 μM)之存在下培養以誘導反應性氧物質形式之壓力。好氧細菌係在對其等有毒之濃度之氧中培養或曝露於對其等有毒之濃度之氧。

【0275】 洗滌劑壓力

【0276】 細菌係在洗滌劑中培養或曝露於洗滌劑，諸如月桂基硫酸鈉(SDS)或脫氧膽酸鹽。

【0277】 pH壓力

【0278】 細菌係在不同pH培養基中培養有限時間或曝露於不同pH培養基有限時間。

實例6：無EV之細菌之製備

【0279】 製備含有最少量EV之細菌樣本。EV產生係(1)在細菌及胞外組分之複雜樣本中藉由NTA或TEM；或(2)在自細菌樣本純化EV後，藉由NTA、脂質定量或蛋白質定量進行定量。

【0280】 a. 離心及清洗：將細菌培養物在11,000 x g下離心以自上清液(包括游離蛋白質及囊泡)分離完整細胞。集結粒用緩衝液(諸如PBS)清洗並以穩定方式儲存(例如，與甘油混合，快速冷凍並在-80°C下儲存)。

【0281】 b. ATF：藉由將生物反應器連接至ATF系統分離細菌及EV。將無EV之細菌保留於生物反應器中，且可藉由離心及清洗(如上文描述)進一步分離自殘餘EV。

【0282】 c.使細菌在發現限制EV之產生之條件下生長。可改變之條件包括彼等針對實例5列舉者。

實例7：活體外篩選用於增強活化樹突細胞之EV

【0283】 霍亂弧菌EV通過上皮細胞間接活化樹突細胞之能力係霍亂弧菌EV刺激哺乳動物宿主中之免疫反應之一種非限制性機制(D. Chatterjee, K. Chadhuri. J Biol Chem. 288(6):4299-309. (2013))。由於此EV活性很可能與活體內刺激促炎症級聯反應之其他細菌共用，因此本文揭示分析細菌EV活化DC之活體外方法。簡而言之，PBMC係藉由梯度離心使用Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway)分離自來自CM之肝素化靜脈血或使用基於磁珠之人血樹突細胞分離套組(Miltenyi Biotech, Cambridge, MA)分離自小鼠脾臟或骨髓。使用抗人類CD14 mAb，單核細胞係藉由Moflo純化並在cRPMI中以 5×10^5 個細胞/ml之細胞密度於96孔盤(Costar Corp)中在 37°C 下培養7天。就樹突細胞之成熟而言，培養物以 0.2 ng/mL IL-4及 1000 U/ml GM-CSF在 37°C 下刺激一週。或者，成熟係通過單獨用重組GM-CSF培養一週達成。小鼠DC可使用珠富集直接獲取自脾臟或分化自造血幹細胞。簡而言之，骨髓係獲得自小鼠之股骨。回收細胞並裂解紅細胞。幹細胞係在細胞培養基中與 20 ng/ml 小鼠GMCSF一起培養4天。添加含有 20 ng/ml 小鼠GM-CSF之額外培養基。在第6天，將培養基及非黏附細胞移除並用含有 20 ng/ml GMCSF之新鮮細胞培養基置換。具有 20 ng/ml GM-CSF之細胞培養基之最終添加係在第7天添加。在第10天，獲取非黏附細胞並接種於細胞培養盤中過夜並視需要進行刺激。然後，樹突細胞用 25 至 $75 \text{ }\mu\text{g/mL}$ EV及抗生素處理24小時。經測試之EV組合物可包括來自單一細菌物種或菌株之EV。經測試之EV組合物亦可包括

來自細菌屬、屬內物種或物種內菌株之EV之混合物。PBS及來自乳桿菌之EV係作為陰性對照包括於其中且LPS、抗CD40抗體及來自雙歧桿菌屬之EV係用作陽性對照。在培養後，DC係用抗CD11b、CD11c、CD103、CD8a、CD40、CD80、CD83、CD86、MHCI及MHCII染色，及藉由流式細胞術分析。相較於陰性對照在CD40、CD80、CD83及CD86中顯著增加之DC被視為由相關細菌EV組合物活化。此等實驗最少重複三次。

【0284】 為篩選經EV活化之上皮細胞刺激DC之能力，上述方案係以添加24小時上皮細胞EV共培養物且接著用DC培養進行。在用EV培養後，清洗上皮細胞及然後在缺乏EV之情況下與DC共培養24小時，然後如上文進行處理。上皮細胞系可包括Int407、HEL293、HT29、T84及CACO2。

【0285】 作為DC活化之額外量測，在用EV或經EV處理之上皮細胞將DC培養24小時後，自孔移除100 μ l培養上清液並使用Luminex Magpix. 多工套組(EMD Millipore, Darmstadt, Germany)分析分泌的細胞介素、趨化介素及生長因子。簡而言之，用緩衝液預濕該等孔，並添加25 μ l 1x經抗體塗覆之磁珠且使用2x 200 μ l清洗緩衝液對中使用磁珠的每孔進行清洗。添加50 μ l培養緩衝液、50 μ l稀釋劑及50 μ l樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 μ l清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 μ l之1X生物素化偵測抗體及在黑暗中振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 μ l清洗。將100 μ l之1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 μ l清洗並添加125 μ l清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0286】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B、IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12 (p40/p70)、IL-17A、IL-17F、IL-21、IL-22、IL-23、IL-25、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)之仔細定量。評估小鼠及人類起源兩者之樣本中之此等細胞介素。經細菌處理之樣本中之此等細胞介素之增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素之能力之此分析之其他變化係藉由通過分選方法獲取此等細胞進行評估並為此項技術中之一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素 mRNA以解決因應EV組合物之細胞介素釋放。宿主細胞中之此等變化刺激與癌症微環境中之活體內反應類似之免疫反應。

【0287】 此DC刺激方案可使用經純化之EV及活細菌菌株之組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例8：當用腫瘤細胞培養時，活體外篩選用於增強活化CD8+ T細胞殺死之EV

【0288】 本文描述用於篩選可活化腫瘤細胞之CD8+ T細胞殺死之EV之活體外方法。簡而言之，DC係分離自人類PBMC或小鼠脾臟並用單株EV、EV之混合物及適當對照培養，如實例12中描述。另外，CD8+ T細胞係使用基於磁珠之小鼠CD8a+ T細胞分離套組及基於磁珠之人類CD8+ T細胞分離套組(兩者均來自Miltenyi Biotec, Cambridge, MA)獲得自人類PBMC或小鼠脾臟。在用EV將DC培養24小時後，或用經EV刺激之上皮細胞(實例12中詳細描述)將DC培養24小時後，用PBS清洗液自細胞移除EV，在96孔盤中將具有抗生素之100 ul新鮮培養基添加至各孔，並將200,000個T細胞添加至各實驗孔。抗CD3抗體係以2 ug/ml之最終濃

度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0289】 進入共培養物培養72小時後，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔盤中的各孔中。所用之小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人類腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 µl之CD8+ T細胞及DC混合物轉移至含有腫瘤細胞之孔。在37°C下在正常氧條件下將盤培養24小時。星形孢菌素(Staurosporine)係用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0290】 在此培養後，使用流式細胞術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞係用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性門控並量測死(被殺死)腫瘤細胞之百分率。資料亦顯示為每孔死腫瘤細胞之絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a)上清液顆粒酶B、IFN γ 及TNF α 於培養上清液中之濃度，如下文描述；b)活化標誌物(諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、 γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B)之CD8+ T細胞表面表現；c) IFN γ 、顆粒酶B、TNF α 於CD8+ T細胞中之胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度(包括IFN γ 、TNF α 、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化介素等)外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0291】 作為CD8+ T細胞活化之額外量測，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 µl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組(EMD Millipore, Darmstadt, Germany)分析分泌的細胞介素、趨化介素及生長因子。簡而言之，該等孔係用緩衝液預濕，並添加25 µl之1x經抗體塗覆之磁珠且2x 200 µl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50

µl培養緩衝液、50 µl稀釋劑及50 µl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 µl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 µl之1X生物素化偵測抗體並在黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 µl清洗。將100 µl之1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 µl清洗並添加125 µl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0292】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B、IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12 (p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)之仔細定量。評估小鼠及人類起源兩者之樣本中之此等細胞介素。經細菌處理之樣本中之此等細胞介素之增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素之能力之此分析之其他變化係藉由通過分選方法獲取此等細胞進行評估並為此項技術中之一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決因應EV組合物之細胞介素釋放。宿主細胞中之此等變化刺激與癌症微環境中之活體內反應類似之免疫反應。

【0293】 此CD8+ T細胞刺激方案可使用經純化之EV及活細菌菌株之組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例9：藉由PBMC活體外篩選用於增強腫瘤細胞殺死之EV

【0294】 本文包括針對刺激PBMC (其進一步活化CD8+ T細胞以殺死腫瘤細胞)之能力篩選EV之方法。PBMC係藉由用於小鼠或人類血液之菲可-派克(ficoll-paque)梯度離心分離自來自CM之肝素化靜脈血或用淋巴

細胞分離培養基(Cedarlane Labs, Ontario, Canada)分離自小鼠血液。PBMC係用單株EV、EV之混合物及適當對照培養，如實例12中描述。另外，CD8+ T細胞係獲得自人類PBMC或小鼠脾臟，如實例12中。在用EV將PBMC培養24小時後，用PBS清洗自細胞移除EV，在96孔盤中將具有抗生素之100 μ l新鮮培養基添加至各孔，並將200,000個T細胞添加至各實驗孔。抗CD3抗體係以2 μ g/ml之最終濃度添加。然後，容許在37°C下在正常氧條件下將共培養物培養96小時。

【0295】 進入共培養物培養72小時後，以50,000個腫瘤細胞/孔接種於新96孔盤中的各孔中。所用之小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+B16.F10等等。人類腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在96小時共培養完成後，將100 μ l之CD8+ T細胞及PBMC混合物轉移至含有腫瘤細胞之孔。在37°C下在正常氧條件下將盤培養24小時。星形孢菌素係用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0296】 在此培養後，使用流式細胞術以量測腫瘤細胞死亡及表徵免疫細胞表型。簡而言之，腫瘤細胞係用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性門控並量測死(被殺死)腫瘤細胞之百分率。資料亦顯示為每孔死腫瘤細胞之絕對數量。細胞毒性CD8+ T細胞表型可藉由下列方法表徵：a)上清液顆粒酶B、IFN γ 及TNF α 於培養上清液中之濃度，如下文描述；b)活化標誌物(諸如DC69、CD25、CD154、PD-1、 γ/δ TCR、Foxp3、T-bet、顆粒酶B)之CD8+ T細胞表面表現；c) IFN γ 、顆粒酶B、TNF α 於CD8+ T細胞中之胞內細胞介素染色。除上清液細胞介素濃度(包括IFN γ 、TNF α 、IL-12、IL-4、IL-5、IL-17、IL-10、趨化介素等)

外，亦可藉由胞內細胞介素染色評估CD4+ T細胞表型。

【0297】 作為CD8+ T細胞活化之額外量測，在用DC將T細胞培養96小時後，自孔移除100 µl培養上清液並使用Luminex Magpix.多工套組(EMD Millipore, Darmstadt, Germany)分析分泌的細胞介素、趨化介素及生長因子。簡而言之，該等孔係用緩衝液預濕，並添加25 µl之1x經抗體塗覆之磁珠且2x 200 µl清洗緩衝液係在每個孔中使用磁珠進行。添加50 µl培養緩衝液、50 µl稀釋劑及50 µl樣本並經由在室溫下在黑暗中振盪2小時進行混合。然後，用200 µl清洗緩衝液清洗該等珠兩次。添加100 µl之1X生物素化偵測抗體並及黑暗中伴隨振盪培養懸浮液1小時。然後，用清洗緩衝液進行兩次200 µl清洗。將100 µl之1x SAV-RPE試劑添加至各孔並在室溫下在黑暗中培養30分鐘。進行三次200 µl清洗並添加125 µl清洗緩衝液及進行2至3分鐘振盪。然後，將該等孔呈遞至Luminex xMAP系統中用於分析。

【0298】 標準物容許細胞介素(包括GM-CSF、IFN-g、IFN-a、IFN-B、IL-1a、IL-1B、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-12 (p40/p70)、IL-17、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、MIG、MIP1a、TNFa及VEGF)之仔細定量。評估小鼠及人類起源兩者之樣本中之此等細胞介素。經細菌處理之樣本中之此等細胞介素之增加指示宿主增強產生蛋白質及細胞介素。檢查特定細胞類型釋放細胞介素之能力之此分析之其他變化係藉由通過分選方法獲取此等細胞進行評估並為此項技術中之一般技術者知曉。此外，亦評估細胞介素mRNA以解決因應EV組合物之細胞介素釋放。宿主細胞中之此等變化刺激與癌症微環境中之活體內反應類似之免疫反應。

【0299】 此PBMC刺激方案可使用經純化之EV及活細菌菌株之組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例10：活體外偵測抗原呈遞細胞中之EV

【0300】 固有層中之樹突細胞藉由延伸其等樹突穿過腸上皮以不斷地在腸腔中取樣活細菌、死細菌及微生物產物，此係由細菌在腸腔中產生之EV可直接刺激樹突細胞之一種方法。下列方法表示一種評估抗原呈遞細胞差異攝取EV之方法。視需要，此等方法可用以評估向病患投與之EV之免疫調節行為。

【0301】 樹突細胞(DC)係根據標準方法或套組方案(例如，Inaba K、Swiggard WJ、Steinman RM、Romani N、Schuler G，2001. Isolation of dendritic cells. Current Protocols in Immunology，第3章：第3.7單元)及如實例12中討論分離自人類或小鼠骨髓、血液或脾臟。

【0302】 為評估EV進入及/或存在於DC中，將250,000個DC接種於圓形蓋玻片上的完全RPMI-1640培養基中及然後在1:1與1:10之間的多重感染(MOI)下用來自單一細菌菌株之EV或組合EV進行培養。經純化之EV已用如實例2中描述之螢光染料或螢光蛋白標記。在培養1小時後，細胞係用冰冷PBS清洗兩次，使用胰蛋白酶分離自盤。使細胞保持完整或裂解。然後處理樣本以用於流式細胞術。自裂解之樣本定量總內化EV，及藉由計數螢光細胞量測攝取EV之細胞之百分率。上文描述之方法亦可使用巨噬細胞或上皮細胞系(獲得自ATCC)代替DC以大體上相同方式進行。

實例11：當用靶細胞培養時，活體外篩選具有活化NK細胞殺死之增強之能力之EV

【0303】 為證實當用腫瘤細胞培養時，所選EV組合物引起對腫瘤細

胞之有效NK細胞細胞毒性之能力，使用下列活體外分析。簡而言之，自健康人類供體獲得來自肝素化血液之單核細胞。視需要，如先前描述般進行增加NK細胞之數量之擴增步驟(例如，參見Somanschi等人，2011 J Vis Exp.)。將其等調整至於含有5%人類血清之RPMI-1640培養基中之 1×10^6 個細胞/ml濃度。然後，用適當之抗體標記PMNC細胞及通過FACS將NK細胞分離為CD3-/CD56+細胞且準備用於後續之細胞毒性分析。或者，NK細胞係使用autoMACs儀器及NK細胞分離套組遵循製造商之使用說明(Miltenyl Biotec)進行分離。

【0304】 對NK細胞計數，並以5000個細胞每孔接種於96孔模式中，及用單株EV、來自細菌菌株之混合物之EV及適當之對照進行培養，如實例12中描述。作為額外之陰性對照，此分析係用來自核粒梭桿菌之EV運行。已知核粒梭桿菌(*F. nucleatum*)對NK細胞活性具有抑制性(參見，例如，Gur等人，2005 Immunity 42:1-12)。用EV培養NK細胞5至24小時後，用PBS清洗將EV自細胞移除，將NK細胞重懸浮於具有抗生素之10種新鮮培養基中，並添加至含有50,000個標靶腫瘤細胞/孔之96孔盤。所用之小鼠腫瘤細胞系包括B16.F10、SIY+ B16.F10等等。人類腫瘤細胞系係與供體HLA匹配，且可包括PANC-1、UNKPC960/961、UNKC及HELA細胞系。在37°C下在正常氧條件下將盤培養24小時。星形孢菌素係用作陰性對照以解釋細胞死亡。

【0305】 在此培養後，使用流式細胞術以量測腫瘤細胞死亡。簡而言之，腫瘤細胞係用活性染料染色。使用FACS分析以對腫瘤細胞特異性門控並量測死(被殺死)腫瘤細胞之百分率。資料亦顯示為每孔死腫瘤細胞之絕對數量。

【0306】 此NK細胞刺激方案可使用經純化之EV及活細菌菌株之組合重複以最大化免疫刺激潛力。

實例12：使用活體外免疫活化分析以預測EV組合物之活體內癌症免疫療法效力

【0307】 活體外免疫活化分析識別可刺激樹突細胞(其進一步活化CD8+ T細胞殺死)之EV。由A. Sivan等人，*Science* 350(6264): 1084-1089 (2015)之工作已表明CD8+ T細胞因應雙歧桿菌屬之口服攝入而增強殺死腫瘤細胞係小鼠中有效之癌症免疫療法。因此，上文描述之活體外分析係用作針對潛在免疫治療活性之大量候選EV之預測、快速篩選。優先選擇顯示增強刺激樹突細胞、增強刺激CD8+ T細胞殺死、增強刺激PBMC殺死及/或增強刺激NK細胞殺死之EV以供活體內癌症免疫療法效力研究。

實例13：當經口遞送至小鼠時，確定EV之生物分佈

【0308】 用受關注之EV組合物經口接種野生型小鼠(例如，C57BL/6或BALB/c)以確定經純化之EV之活體內生物分佈圖(實例1)。EV係如實例2中標記以有助於下游分析。

【0309】 小鼠可在規定時間過程內接受單一劑量之EV (25至100 µg)或數個劑量(25至100 µg)。遵循經批准之方案將小鼠飼養在無特定病原體之條件下。或者，可將小鼠飼養並保持在消毒、無菌條件下。血液及糞便樣本可在適當之時間點下採集。

【0310】 在用EV組合物接種後之各種時間點(即，小時至天)下將小鼠人道處死並在無菌條件下進行完全屍檢。遵循標準方案，獲取淋巴結、腎上腺、肝、結腸、小腸、盲腸、胃、脾臟、腎、膀胱、胰臟、心臟、皮

膚、肺、腦及受關注之其他組織及直接使用或快速凍結用於進一步測試。遵循熟習此項技術者已知的標準方案將該等組織樣本解剖並均質化以製備單細胞懸浮液。然後，通過流式細胞術定量於樣本中所存在之EV數量(實例17)。定量亦可在適當處理全小鼠組織後利用螢光顯微術進行(Vankelecom H., Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization, Cold Spring Harb. Protoc., 2009)。或者，動物可使用活體成像根據EV標記技術進行分析。

實例14：投與具有增強之活體外免疫活化之EV組合物以治療同基因小鼠腫瘤模型

【0311】 癌症之小鼠模型係藉由皮下注射腫瘤細胞系或病患衍生之腫瘤樣本並容許將其移植至6至8週齡之C57BL/6雌性小鼠內而產生。使用數種腫瘤細胞系重複本文提供之方法，該等腫瘤細胞系包括：B16-F10或B16-F10-SIY細胞(作為黑色素瘤之原位模型)；Panc02細胞(作為胰癌之原位模型)，以 1×10^6 個細胞之濃度注射於右脅腹內(Maletzki等人，2008. Gut 57:483-491)；LLC1細胞(作為肺癌之原位模型)；CT-26(作為結腸直腸癌之原位模型)及RM-1 (作為前列腺癌之原位模型)。作為一項實例，本文深入提供用於B16-F10模型之方法。

【0312】 使用具有極高轉移頻率之自發性黑色素瘤之同基因小鼠模型以測試細菌減少腫瘤生長及轉移之擴散之能力。經選擇用於此分析之EV係顯示增強活化免疫細胞亞群並刺激增強殺死活體外腫瘤細胞(實例12至16)之組合物。小鼠黑色素瘤細胞系B16-F10係獲得自ATCC。將細胞作為單層在37°C及5% CO₂/空氣之氣氛下活體外培養於RPMI培養基中，該RPMI培養基用10%熱滅活之胎牛血清及1%青黴素/鏈黴素補充。指數生

長之腫瘤細胞係藉由胰蛋白酶化獲取，用冷1x PBS清洗三次，並製備5E6個細胞/ml之懸浮液用於投與。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，於各小鼠之脅腹內皮下注射100 µl之B16-F10細胞懸浮液。該等小鼠係在細胞移植之前藉由克他明(ketamine)及甲苯噻嗪麻醉。實驗中使用之動物可經由自第2天至第5天滴注卡那黴素(0.4 mg/ml)、慶大黴素(0.035 mg/ml)、黏菌素(850 U/ml)、甲硝唑(0.215 mg/ml)及萬古黴素(0.045 mg/ml)於飲用水中之混合物，並在腫瘤注射後第7天腹膜內注射克林黴素(10 mg/kg)而開始抗生素治療。

【0313】 原發性脅腹腫瘤之尺寸係用卡尺每隔2至3天量測及腫瘤體積係使用下式計算：腫瘤體積= 腫瘤寬度² × 腫瘤長度 × 0.5。在原發性腫瘤達成約100 mm³後，基於動物之體重將其等分選成數組。然後，自各組隨機挑選小鼠並分配至治療組。EV組合物係如實例1中描述製備。該等小鼠係藉由強飼25至100 µg待測試之EV、25至100 µg來自乳桿菌(陰性對照)之EV、PBS或25至100 µg來自雙歧桿菌屬(陽性對照)之EV而經口接種。每天、每週、每兩週、每月、每兩個月或在整個治療週期之任何其他給藥時間表經口強飼小鼠相同數量之EV。小鼠係經IV注射於尾靜脈中或直接注射於腫瘤內。可對小鼠注射10 ng至1 µg之EV、細菌及EV或經滅活之細菌及EV。小鼠可每週或每月一次注射。小鼠亦可接受經純化之EV及活細菌之組合以最大化腫瘤殺死潛力。所有小鼠係在無特定病原體之條件下遵循經批准之方案飼養。每隔3至4天監測腫瘤尺寸、小鼠體重及體溫並在B16-F10小鼠黑色素瘤細胞注射後6週內或當原發性腫瘤體積達成1000 mm³時人道處死該等小鼠。每週抽血並在方案終止時在無菌條件下進行完全屍檢。

【0314】可在小鼠B16-F10黑色素瘤模型中輕易地觀測到癌細胞，因為其產生黑色素。遵循標準方案，收集來自淋巴結之組織樣本及來自頸部及胸部區域之器官且使用下列分類規則分析微轉移及巨轉移之存在。若在每個淋巴結或器官中發現至少兩個微轉移及一個巨轉移病變，則將器官歸類為轉移陽性。微轉移係藉由用蘇木精-曙紅遵循熟習此項技術者已知的標準方案染色石蠟包埋之淋巴組織切片進行偵測。轉移之總數量係與原發性腫瘤之體積相關且發現腫瘤體積與腫瘤生長時間及淋巴結及內臟器官中巨轉移及微轉移之數量及亦與所有可見轉移之總數顯著相關。如先前描述般識別二十五個不同轉移位點(Bobek V.等人，Syngeneic lymph-node-targeting model of green fluorescent protein-expressing Lewis lung carcinoma, Clin. Exp. Metastasis, 2004;21(8):705-8)。

【0315】進一步分析腫瘤組織樣本的腫瘤浸潤性淋巴細胞。CD8+細胞毒性T細胞可藉由FACS分離(參見，實例17)及然後可使用定製p/MHC I類微陣列進行進一步分析以揭示其等抗原特異性(參見，例如，Deviren G.等人，Detection of antigen-specific T cells on p/MHC microarrays, J. Mol. Recognit., 2007 Jan-Feb;20(1):32-8)。CD4+ T細胞可使用定製p/MHC II類微陣列進行分析。

【0316】對多發性肺黑色素瘤轉移之小鼠模型亦進行相同實驗。小鼠黑色素瘤細胞系B16-BL6係獲得自ATCC且細胞係如上文描述活體外培養。此實驗使用雌性C57BL/6小鼠。該等小鼠係6至8週齡且重約16至20 g。就腫瘤發展而言，將100 μ l之2E6個細胞/ml B16-BL6細胞懸浮液注射於各小鼠的尾靜脈中。IV注射後植入之腫瘤細胞最終進入肺中。

【0317】9天後將小鼠人道殺死。將肺稱重並分析肺表面上之肺結

節之存在。經提取之肺係用費可特溶液(Fekete's solution)漂白，該溶液因為B16細胞中之黑色素而不漂白腫瘤結節，雖然一小部分結節係無黑色素的(即，白色)。仔細計數腫瘤結節之數量以確定小鼠中之腫瘤負荷。通常，在對照組小鼠(即，PBS強飼)之肺上發現200至250個肺結節。

【0318】 針對三個治療組計算百分率腫瘤負荷。將此量測值定義為屬於治療組之小鼠之肺表面上之肺結節之平均數量除以對照組小鼠之肺表面上之肺結節之平均數量。

【0319】 用H-NMR1測定代謝內容物

【0320】 使用Sartorius Centrisart I過濾器(截留點10 kDa)對細菌調節後及腫瘤生長後的培養基及用過之培養基樣本之生物三聯體進行脫蛋白。在使用之前，該過濾器係藉由水離心清洗兩次以移除甘油並將少量體積(20 μ l)於D₂O中之20.2 mM三甲基甲矽烷基-2,2,3,3-四氘化丙酸(TSP，鈉鹽)添加至700 μ l超濾液，提供化學位移參照(0.00 ppm)及氬鎖信號。將650 μ l樣本放置於5 mm NMR管中。單脈衝¹H-NMR光譜(500 MHz)係於Bruker DMX-500分光儀或堪比如先前描述之儀器上獲得(由Engelke等人，2006 NMR spectroscopic studies on the late onset form of 3-methylglutaconic aciduria type I and other defects in leucine metabolism. NMR Biomed. 19: 271-278)。手動校正相位及基線。將所有光譜縮放至TSP並使代謝物信號與洛倫茲線形半自動擬合。用過之培養基中之代謝物濃度係相對於標準培養基中之已知濃度計算並以mM之單位相應地表示。特定代謝物之濃度係藉由在1.04 ppm下或在適當之標準下，相應峰之面積相對於纈胺酸雙峰之面積進行計算。

【0321】 用LCMS測定代謝內容物

【0322】 樣本之代謝內容物係使用液體層析技術與質譜法之組合確定。存在測定各種樣本之代謝內容物且為熟習此項技術者已知的各種技術，該等技術涉及溶劑萃取、層析分離及耦合至質量測定之各種電離技術 (Roberts等人，2012 Targeted Metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 30: 1-24；Dettmer等人，2007, *Mass spectrometry-based metabolomics. Mass Spectrom Rev.* 26(1):51-78)。作為一項非限制性實例，LC-MS系統包括與1100系列泵(Agilent)及HTS PAL自動進樣器(Leap Technologies)組合之4000 QTRAP三重四級桿質譜儀(AB SCIEX)。培養基樣本或其他複雜代謝混合物(~10 μ L)係使用九體積的含有穩定之同位素標記內標物(纈胺酸-d8，Isotec；及苯丙胺酸-d8，Cambridge Isotope Laboratories)之74.9:24.9:0.2 (v/v/v)乙腈/甲醇/甲酸進行萃取。標準物可取決於受關注之代謝物進行調整或修飾。樣本係經離心(10分鐘，9,000g，4 $^{\circ}$ C)，及上清液(10 μ L)係藉由將溶液注射於HILIC管柱(150 \times 2.1 mm, 3 μ m粒度)上而呈遞至LCMS。管柱係藉由使5%流動相[10 mM甲酸銨，0.1%甲酸於水中]以250 μ l/分鐘之速率流動1分鐘，接著線性梯度歷時10分鐘至40%流動相之溶液[具有0.1%甲酸之乙腈]進行溶離。將離子噴霧電壓設定至4.5 kV及源溫度係450 $^{\circ}$ C。

【0323】 資料係使用市售軟體(諸如來自AB SCIEX之Multiquant 1.2)進行分析以用於質譜峰積分。受關注之峰應手動控制並與標準進行比較來證實該峰之同一性。用適當之標準物進行定量以確定在細菌調節後及在腫瘤細胞生長後，初始培養基中存在之代謝物之量。

【0324】 呈遞腫瘤活檢及血液樣本用於經由本文描述之LCMS技術之代謝分析。測試組之間的胺基酸、糖、乳酸鹽及其他代謝物之不同濃度

證實微生物組合物破壞腫瘤代謝狀態之能力。

【0325】 RNA測序以確定作用機制

【0326】 樹突細胞係純化自腫瘤、伊爾氏斑(Peyers patch)及腸系膜淋巴結，如實例12中描述。進行RNAseq分析並根據熟習此項技術者已知的標準技術進行分析 (Z. Hou. Scientific Reports. 5(9570):doi:10.1038/srep09570 (2015))。在該分析中，特別關注先天性發炎通路基因，其等包括TLR、CLR、NLR及STING、細胞介素、趨化介素、抗原處理及呈遞通路、交叉呈遞及T細胞共刺激。

實例15：投與具有增強之活體外免疫活化之EV與PD-1或PD-L1抑制之組合以治療同基因小鼠腫瘤模型

【0327】 為確定EV在同基因腫瘤小鼠模型中之效力，使用結腸直腸癌(CT-26)。簡而言之，將CT-26 (CAT# CRL-2638)腫瘤細胞作為單層在37°C及5% CO₂/空氣之氣氛下活體外培養於RPMI-1640或DMEM中，該RPMI-1640或DMEM用10%熱滅活之胎牛血清補充。在腫瘤接種之前，獲取並計數指數生長之細胞。此實驗使用6至8週齡雌性BALB/c小鼠。就腫瘤發展而言，向各小鼠之一個或兩個後脅腹皮下注射含於0.1 ml 1x PBS中之5x10⁵個CT-26腫瘤細胞。一些小鼠可接受抗生素預處理。在非連續之幾天內，每週至少三次監測腫瘤尺寸及小鼠體重。

【0328】 測試EV在小鼠腫瘤模型中之效力。EV或抗PD-1係在不同時間點下及在不同劑量下投與。例如，在腫瘤注射後第10天或在腫瘤體積達成100 mm³後，小鼠用EV或抗PD-1處理。給藥量係根據表3投與。芽孢桿菌EV組顯示腫瘤生長抑制

堪比抗PD-1組中可見之腫瘤生長抑制(圖1及2)。

表3：給藥量。

組	治療	劑量、途徑、給藥方案
1 (n=10)	IV 媒劑(PBS)	N/A, IV, Q3Dx4
2 (n=10)	抗PD-1	200 μ g, IP, Q4Dx3
3 (n=10)	EV (IV)芽孢桿菌	5 μ g, IV, Q3Dx4

【0329】 例如，一些小鼠係以15、20或15 μ g/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑注射。一些組的小鼠亦可注射有效劑量之查核點抑制劑。例如，小鼠接受於100 μ l PBS中之100 μ g抗PD-L1 mAB (純系10f.9g2, BioXCell)或另一抗PD-1或抗PD-L1 mAB，及一些小鼠接受媒劑及/或其他適當之對照(例如，對照抗體)。在初始注射後之第3、6及9天，對小鼠注射mAB。為評估查核點抑制及EV免疫治療是否具有額外之抗腫瘤效應，將接受抗PD-1或抗PD-L1 mAB之對照小鼠計入標準對照組。評估原發性(腫瘤尺寸)及繼發性(腫瘤浸潤性淋巴細胞及細胞介素分析)端點，及一些組的小鼠係經後續腫瘤細胞接種再激發以評估治療對記憶反應之影響。

實例16：實驗性自體免疫腦脊髓炎(EAE)之小鼠模型中之EV

【0330】 EAE 係經充分研究之多發性硬化動物模型，如由 Constantinescu 等人檢視 (Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011 Oct; 164(4): 1079-1106)。其可使用不同髓磷脂相關肽，藉由經活化之致腦炎 T 細胞之過繼轉移，或使用易受 EAE 影響之 TCR 轉基因小鼠在各種小鼠及大鼠品系中誘導，如於 Mangalam 等人，(Two discreet subsets of CD8+ T cells modulate PLP₉₁₋₁₁₀ induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice. *J Autoimmun.* 2012 Jun; 38(4): 344-353) 中討論。

【0331】 測試 EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療) 在 EAE 之啮齒動物模型中之效力。例如，雌性 6 至 8 週齡 C57Bl/6 小鼠係獲得自 Taconic (Germantown, NY)。對各組小鼠的背部兩個位置 (上方及下方) 投與兩次皮下 (s.c.) 注射 0.1 ml 髓磷脂少突膠質細胞醣蛋白 35-55 (MOG35-55；每次注射 100 ug；每隻小鼠 200 ug (每隻小鼠總計 0.2 ml))，其乳化於完全弗氏佐劑中 (CFA；2 至 5 mg 經殺死之結核分枝桿菌 H37Ra/ml 乳劑)。在上文發生後約 1 至 2 小時，對小鼠腹膜內 (i.p.) 注射含於 0.1 ml PBS (2 ug/ml) 中之 200 ng 百日咳毒素 (PTx)。PTx 之額外 IP 注射係在第 2 天投與。或者，使用適當量之代替髓磷脂肽 (例如，蛋白脂質蛋白 (PLP)) 以誘導 EAE。一些動物充當天然對照 (naïve control)。評估 EAE 嚴重程度並自第 4 天開始根據此項技術中已知的方法每天分配殘疾分數 (Mangalam 等人，2012)。

【0332】 EV 治療係在一些時間點 (在免疫之時間附近或在 EAE 免疫

之後)下開始。例如，EV可在免疫(第1天)之同時投與，或其等可在出現殘疾之第一跡象(例如，跛尾)後投與，或在嚴重之EAE期間投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0333】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射、皮下(s.c.)注射或鼻途徑投與。

【0334】 一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用額外抗炎劑或EAE治療劑(例如，抗CD154 (TNF家族之成員之阻滯劑)、維生素D或其他治療)及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0335】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0336】 在各種時間點下，將小鼠處死並可移除發炎之位置(例如，腦及脊髓)、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組

織學、細胞介素及/或流式細胞術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於)TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或在離體獲得之經純化之CD45+中樞神經系統(CNS)-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，在對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0337】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物(例如，經活化之致腦炎T細胞或EAE誘導肽之回注)再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及EAE嚴重程度之易感性。

實例17：膠原誘導之關節炎(CIA)之小鼠模型中之EV

【0338】 膠原誘導之關節炎(CIA)係常用以研究類風濕性關節炎(RA)之動物模型，如由Caplazi等人，(Mouse models of rheumatoid arthritis. *Veterinary Pathology*. Sept. 1, 2015. 52(5): 819-826)描述(亦參見Brand等人，Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*. 2007. 2:

1269-1275 ; Pietrosimone等人 , Collagen-induced arthritis: a model for murine autoimmune arthritis. *Bio Protoc.* 2015 Oct. 20; 5(20): e1626) 。

【0339】 在CIA嚙齒動物模型之其他版本中，一種模型涉及用小雞II型膠原使HLA-DQ8 Tg小鼠免疫，如由Taneja等人，(*J. Immunology.* 2007. 56: 69-78；亦參見Taneja等人，*J. Immunology* 2008. 181: 2869-2877；及Taneja等人，*Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78)描述。小雞CII之純化已由Taneja等人，(*Arthritis Rheum.*, 2007. 56: 69-78)描述。監測小鼠在免疫後之CIA疾病發作及進展，及評估疾病之嚴重程度並如由Wooley, *J. Exp. Med.* 1981. 154: 688-700描述進行「評級」。

【0340】 針對CIA誘導使小鼠免疫並將小鼠分為各種治療組。測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療)在CIA中之效力。

【0341】 EV治療係在用膠原免疫之時間附近或在免疫之後開始。例如，在一些組中，EV可在免疫(第1天)之同時投與，或EV可在出現殘疾之第一跡象後投與，或在嚴重症狀發作後投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。

【0342】 例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可每隻小鼠接受25、50或100 mg之EV。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他組小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取

並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0343】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射、皮下(s.c.)注射、皮內(i.d.)注射或鼻途徑投與。

【0344】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外抗炎劑或CIA治療劑(例如，抗CD154 (TNF家族之成員之阻滯劑)、維生素D或其他治療)，及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0345】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0346】 在各種時間點下，獲得血清樣本以使用標準ELISA評估抗小雞及抗小鼠CII IgG抗體之濃度(Batsalova等人，Comparative analysis of collagen type II-specific immune responses during development of collagen-induced arthritis in two B10 mouse strains. Arthritis Res Ther. 2012. 14(6): R237)。同樣地，將一些小鼠處死且可移除發炎之位置(例如，滑膜)、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組織學、細胞介素及/或流式細胞術分析。使用此項技術中已知的技術分析滑膜及滑液中之漿細胞浸潤及抗體之存在。另外，使用解離酶根據製造商之使用說明解離組織以檢查細胞浸潤物之概況。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗

CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+滑膜-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0347】為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物(例如，CIA誘導之肽之活化回注)再激發。分析小鼠在再激發後對疾病及CIA嚴重程度之易感性。

實例18：結腸炎之小鼠模型中之EV

【0348】葡聚糖硫酸鈉(DSS)誘導之結腸炎係經充分研究之結腸炎動物模型，如由Randhawa等人，(A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. Korean J Physiol Pharmacol. 2014. 18(4): 279-288；亦參見Chassaing等人，Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. Curr Protoc Immunol. 2014 Feb 4; 104: Unit 15.25)檢視。

【0349】測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎劑)在DSS誘導之結腸炎之小鼠模型中之效力。

【0350】 如此項技術中已知，各組小鼠係用DSS處理以誘導結腸炎 (Randhawa 等人，2014；Chassaing 等人，2014；亦參見Kim 等人，Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. J Vis Exp. 2012. 60: 3678)。例如，雄性6至8週齡C57Bl/6小鼠係獲得自 Charles River Labs, Taconic或其他供應商。結腸炎係藉由將3% DSS (MP Biomedicals, Cat. #0260110)添加至飲用水來誘導。一些小鼠不接受含於飲用水中之DSS且充當天然對照。一些小鼠接受水，歷時五(5)天。一些小鼠可接受DSS，歷時較短之持續時間或長於五(5)天。監測小鼠並使用此項技術中已知的殘疾活動指數基於重量損失進行評分(例如，無重量損失(0分)；1至5%重量損失(1分)；5至10%重量損失(2分))；糞便稠度(例如，正常(0分)；大便稀溏(2分)；腹瀉(4分))；及出血(例如，未出血(0分)、潛血陽性(1分)；潛血陽性及視神經集結粒出血(2分)；肛門周圍之血液，大出血(4分))。

【0351】 EV治療係在一些時間點(在DSS投與之第1天，或在之後的某一時刻)下開始。例如，EV可在DSS開始(第1天)的同時投與，或其等可在出現疾病之第一跡象(例如，重量損失或腹瀉)後投與，或在嚴重之結腸炎之整個階段期間投與。每天觀察小鼠的重量、發病率、存活、腹瀉及/或血便之存在。

【0352】 EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠

可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0353】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑投與。

【0354】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外之抗炎劑(例如，抗CD154 (TNF家族之成員之阻滯劑)或其他治療)，及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0355】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些小鼠接受DSS而未預先接受抗生素。

【0356】 在各種時間點下，使用小動物內窺鏡(Karl Storz Endoskope, Germany)在異氟烷麻醉下使小鼠經歷視訊內窺鏡檢查。記錄靜止影像及視訊以評估結腸炎之程度及對治療之反應。使用此項技術中已知的標準對結腸炎進行評分。收集糞便材料用於研究。

【0357】 在各種時間點下，將小鼠處死並收集結腸、小腸、脾臟及淋巴結(例如，腸系膜淋巴結)。另外，將血液收集至血清分離管內。組織損傷係通過組織學研究評估，該等組織學研究評估(但不限於)隱窩結構、發炎細胞浸潤程度及杯狀細胞耗竭。

【0358】 可移除胃腸(GI)道、淋巴結及/或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組織學、細胞介素及/或流式細胞術分析。例如，獲取組織且可使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+ GI道-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0359】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發。分析小鼠在再激發後對結腸炎之易感性。

實例19：遲髮型超敏反應(DTH)之小鼠模型中之EV

【0360】 遲髮型超敏反應(DTH)係異位性皮炎(或過敏性接觸性皮炎)之動物模型，如由Petersen等人，(In vivo pharmacological disease models for psoriasis and atopic dermatitis in drug discovery. Basic & Clinical Pharm & Toxicology. 2006. 99(2): 104-115；亦參見Irving C.

Allen (編) *Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2013. , 第1031卷, DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13)檢視。其可使用各種半抗原或抗原(例如,用佐劑乳化之抗原)在各種小鼠及大鼠品系中誘導。DTH之特徵在於敏化作用及抗原特異性T細胞介導之反應,其導致紅斑、浮腫及細胞浸潤-尤其抗原呈現細胞(APC)、嗜酸性粒細胞、經活化之CD4+ T細胞及細胞介素表現之Th2細胞之浸潤。

【0361】 通常,小鼠係用在佐劑(例如,完全弗氏佐劑)之情況下投與之抗原誘發以誘導藉由腫脹及抗原特異性抗體滴度衡量之繼發(或記憶)免疫反應。

【0362】 測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合,添加或未添加其他抗炎治療)在DTH之小鼠模型中之效力。例如,6至8週齡C57Bl/6小鼠係獲得自Taconic (Germantown, NY)或其他供應商。對各組小鼠背部四個位置(上方及下方)四次皮下(s.c.)注射有效劑量(每個位置50 μ l總體積)的抗原(例如,卵白蛋白(OVA))。就DTH反應而言,在克他明/甲苯噻嗪麻醉下(分別約50 mg/kg及5 mg/kg),對動物耳朵進行皮內(i.d.)注射。一些小鼠充當對照動物。第8天,一些組的小鼠以每隻耳朵10 μ l (左耳媒劑對照(0.01% DMSO於生理鹽水中)及右耳抗原(21.2 μ g (12 nmol)))激發。為量測耳炎,使用Mitutoyo千分尺量測人工限制之動物之耳厚度。耳厚度係在皮內激發之前作為各個別動物之基線水平進行量測。接著,耳厚度係在皮內激發後,在約24小時及48小時(即,第9天及第10天)時量測兩次。

【0363】 EV治療係在一些時間點(在引發之時間附近或在DTH激發之時間附近)下開始。例如,EV可在皮下注射(第0天)的同時投與,或其等

可在皮內注射之前或皮內注射後投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼、局部投與、皮內(i.d.)注射或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第0天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0364】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射、i.d.注射、局部投與或鼻途徑投與。

【0365】 對小鼠沿背部之4個位置i.d注射KLH及CFA (與CFA 1:1比率製備之50 ug KLH/小鼠，每個位置總體積50 ul)。小鼠係經如下給藥9天：1) 經口投與厭氧PBS (媒劑)；2) 經口投與10 mg棲組織普雷沃菌；3) 經口投與100 ug棲組織普雷沃菌衍生之EV；4) i.p.投與PBS；5) i.p.投與地塞米松(陽性對照)；及6) i.p.投與10 μg棲組織普雷沃菌衍生之EV。就EV而言，總蛋白質係使用遵循製造商之使用說明進行之Bio-rad分析(Cat# 5000205)進行量測。在用10 ug KLH (10 ul體積)激發後之24及48小時，在經口及i.p投與組中，接受棲組織普雷沃菌(活細胞)或棲組織普雷沃菌衍生之EV之組均顯示比媒劑組更少之炎症(圖3A及3B)。在基於KLH之遲發型超敏反應小鼠模型中，在抗原激發後48小時，在減少抗原特異性耳腫脹

(耳厚度)(圖3C)中觀測到在i.p.注射10 μg 、3 μg 、1 μg 及0.1 μg 的棲組織普雷沃菌衍生之EV後之可見劑量依賴性DTH反應。

【0366】 對小鼠沿背部之4個位置i.d注射KLH及CFA (與CFA 1:1比率製備之50 μg KLH/小鼠，每個位置總體積50 μl)。小鼠係經如下給藥9天：；1) 經口投與厭氧PBS (媒劑)；2) 經口投與10 mg 棲組織普雷沃菌；3) 經口投與 1×10^9 CFU棲組織普雷沃菌生物量；4) 經口投與 2.09×10^8 CFU產黑色素普雷沃菌生物量；5) 經口投與100 μg 棲組織普雷沃菌衍生之EV；6) 經口投與100 μg 產黑色素普雷沃菌衍生之EV；及7) i.p.投與地塞米松(陽性對照)。就EV而言，總蛋白質係使用遵循製造商之使用說明進行之Bio-rad分析(Cat# 5000205)進行量測。在用10 μg KLH (10 μl 體積)激發後之24及48小時，接受棲組織普雷沃菌(活細胞)或棲組織普雷沃菌衍生之EV之組均顯示比媒劑組更少之炎症(圖8A及8B)。在用10 μg KLH (10 μl 體積)激發後之24及48小時，接受產黑色素普雷沃菌衍生之EV之組顯示比媒劑組及接受產黑色素普雷沃菌(活細胞)之組更少之炎症(圖8A及8B)。

【0367】 製備測試調配物以用於基於KLH之遲髮型超敏反應模型。DTH模型提供活體內機制以研究細胞介導之免疫反應，並在曝露於小鼠已經致敏之特異性抗原後，引起炎症。已使用DTH模型之幾種變化且其等為此項技術中熟知(Irving C. Allen (編). *Mouse models of Innate Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.*，第1031卷，DOI 10.1007/978-1-62703-481-4_13, Springer Science + Business Media, LLC 2013)。例如，匙孔血藍蛋白(KLH)及完全弗氏佐劑(CFA)之乳化液係在免疫當天(第0天)新鮮製備。為此，將8 mg KLH粉末稱重並完

全重懸浮於16 mL生理鹽水中。乳化液係藉由使用注射器及魯爾鎖連接器(luer lock connector)混合KLH/生理鹽水及等體積之CFA溶液(例如, 10 mL KLH/生理鹽水+ 10 mL CFA溶液)進行製備。將KLH及CFA用力混合幾分鐘以形成白色乳化液以獲得最大穩定性。進行滴落測試以檢查是否獲得均質乳化液, 繼續混合直至在水中可見完整液滴。

【0368】 在第0天, C57Bl/6J雌性小鼠(約7週齡)係用含於CFA中之KLH抗原藉由皮下免疫(4個位置, 每個位置50 μ L)引發。

【0369】 地塞米松(皮質類固醇)係已知抗炎劑, 其改善小鼠中之DTH反應, 並充當陽性對照用於在此模型中抑制炎症(Taube及Carlsten, *Action of dexamethasone in the suppression of delayed-type hypersensitivity in reconstituted SCID mice. Inflamm Res.* 2000. 49(10): 548-52)。就陽性對照組而言, 在第0天藉由將6.8 mg地塞米松稀釋於400 μ L 96%乙醇中製備17 mg/mL地塞米松之儲備溶液。就給藥之每天而言, 藉由將儲備溶液100x稀釋於無菌PBS中以及在隔膜小瓶中獲得0.17 mg/mL之最終濃度製備用於腹膜內給藥的工作溶液。經地塞米松治療之小鼠i.p.接受100 μ L地塞米松(5 mL/kg之0.17 mg/mL溶液)。冷凍蔗糖充當陰性對照(媒劑)。韋榮球菌菌株係以 1×10^{10} CFU p.o.每天給藥。地塞米松(陽性對照)、媒劑(陰性對照)及動物乳酸雙歧桿菌(10 mg粉末)係每天給藥。

【0370】 在第8天, 用含於生理鹽水(以10 μ L之體積)中之10 μ g KLH皮內(i.d.)激發小鼠的左耳。炎症反應係使用此項技術中已知的方法進行量測。耳廓厚度係在抗原激發後之24小時進行量測(圖11)。如由耳厚度確定, 相較於單獨接受媒劑之小鼠(堪比地塞米松治療), 範永氏球菌菌株係有效抑制炎症。

【0371】 韋榮球菌菌株之效力可使用不同時序及不同劑量進行進一步研究。例如，使用韋榮球菌細菌組合物之治療可在某一時間點(在引發之時間附近或在DTH激發之時間附近)下開始。例如，韋榮球菌(每隻小鼠每天 1×10^9 CFU)可在皮下注射(第0天)的同時投與，或在皮內注射之前或在皮內注射後投與。韋榮球菌菌株可在不同劑量下及在規定時間間隔下投與，且以各種組合。例如，對一些小鼠以每隻小鼠 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞之範圍靜脈內注射韋榮球菌。一些小鼠接受菌株之混合物。雖然一些小鼠將通過i.v.注射接受韋榮球菌，但另一些小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼、局部投與、皮內(i.d.)注射或其他投與方式接受韋榮球菌。一些小鼠可每天(例如，起始自第0天)接受韋榮球菌，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受韋榮球菌。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0372】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑(例如，抗CD154 (TNF家族之成員之阻滯劑)或其他治療)，及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0373】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0374】 在各種時間點下，採集血清樣本。將其他組之小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結(MLN)、小腸、結腸及其他組織以使用此項技術中已知的方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素及/或

流式細胞術分析。一些小鼠係在O₂/CO₂麻醉下自眼血管叢抽血並進行ELISA分析。

【0375】 組織可使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45⁺浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0376】 如上文描述，小鼠係用KLH引發並激發，且在48小時時之耳腫脹之量測後，處死小鼠。

【0377】 自經處死之小鼠移除耳朵並放置於冷無EDTA之蛋白酶抑制劑混合物(Roche)中。使用珠破壞將耳朵均質化並藉由Luminex套組(EMD Millipore)遵循製造商之使用說明分析上清液中的IL-1 β 。經10 μ g 棲組織普雷沃菌EV (i.p.)處理之小鼠顯示堪比地塞米松組(陽性對照)中可見之IL-1 β 濃度。(圖3D)。棲組織普雷沃菌衍生之EV可抑制促炎症細胞介

素。

【0378】 另外，頸部淋巴結係通過細胞過濾器解離，清洗，並針對FoxP3 (PE-FJK-16s)及CD25 (FITC-PC61.5)使用此項技術中已知的方法進行染色(圖3E)。相對於天然小鼠(陰性對照)，經10 µg棲組織普雷沃菌EV (i.p.)處理之小鼠顯示頸部淋巴結中Treg之增加，且堪比地塞米松組(陽性對照)。棲組織普雷沃菌衍生之EV可誘導Treg進入受激發之小鼠之引流淋巴結中。

【0379】 為檢查DTH保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用激發性抗原(例如，OVA)再激發。分析小鼠對DTH及反應嚴重程度之易感性。

實例20：1型糖尿病(T1D)之小鼠模型中之EV

【0380】 1型糖尿病(T1D)係一種自體免疫性疾病，其中免疫系統靶向胰臟之胰島，藉此破壞身體產生胰島素之能力。

【0381】 存在T1D之動物模型之各種模型，如由Belle等人，(Mouse models for type 1 diabetes. Drug Discov Today Dis Models. 2009；6(2): 41-45；亦參見Aileen JF King. The use of animal models in diabetes research. Br J Pharmacol. 2012 Jun；166(3): 877-894檢視。存在用於化學誘導之T1D、病原體誘導之T1D之模型及其中小鼠自發發展T1D之模型。

【0382】 測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療)在T1D之小鼠模型中之效力。

【0383】 取決於T1D誘導之方法及/或T1D發展是否係自發性的，EV治療係在一些時間點(在誘導之時間附近或在誘導後，或在自發出現

T1D發作之前(或發作後))下開始。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0384】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑投與。

【0385】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外之治療及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0386】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0387】 血糖係在實驗開始前兩週一次進行監測。在此後的各種時間點下，量測非空腹血糖。在各種時間點下，將小鼠處死且可移除胰臟、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組織學、細胞介素及/或流式細胞術分析。例如，組織係使用解離酶根據製造商之使用說

明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於)TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之組織-浸潤性免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。抗體產生亦可藉由ELISA進行評估。

【0388】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可用疾病觸發物再激發，或針對復發之易感性進行評估。分析小鼠在再激發(或自發出現復發)對糖尿病發作及嚴重程度之易感性。

實例21：原發性硬化性膽管炎(PSC)之小鼠模型中之EV

【0389】 原發性硬化性膽管炎(PSC)係緩慢損害膽管並導致末期肝硬化之慢性肝疾病。其係與發炎腸病(IBD)相關聯。

【0390】 存在用於PSC之各種動物模型，如由Fickert等人，(Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). J Hepatol. 2014 Jun. 60(6): 1290-1303；亦參見Pollheimer及Fickert. Animal models in primary biliary cirrhosis and primary

sclerosing cholangitis. Clin Rev Allergy Immunol. 2015 Jun. 48(2-3): 207-17)檢視。PSC模型中疾病之誘導包括化學誘導(例如，3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氫可力丁(DCC)誘導之膽管炎)、病原體誘導(例如，小球隱孢子蟲)、實驗性膽管梗阻(例如，膽總管結紮術(CBDL))及抗原驅動之膽管損傷之轉基因小鼠模型(例如，Ova-Bil轉基因小鼠)。例如，膽管結紮術係如由Georgiev等人，(Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. Br J Surg. 2008. 95(5): 646-56)描述進行，或疾病係藉由DCC曝露如由Fickert等人，(A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. Am J Path. , 第171(2): 525-536卷描述誘導。

【0391】 測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加一些其他治療劑)在PSC之小鼠模型中之效力。

DCC誘導之膽管炎

【0392】 例如，6至8週齡C57Bl/6小鼠係獲得自Taconic或其他供應商。給小鼠餵食0.1% DCC補充飲食，持續各種持續時間。一些組接受DCC補充食物，歷時1週，其他歷時4週，其他歷時8週。一些組的小鼠可在一段時間內接受DCC補充飲食及然後容許恢復，此後接受正常飲食。可研究此等小鼠自疾病恢復之能力及/或其等一經後續曝露於DCC則復發之易感性。EV治療係在一些時間點(在DCC餵養之時間附近或在開始曝露於DCC之後)下開始。例如，EV可在第1天投與，或其等可在此後之某一時刻投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50、100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過

i.p.注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取，及投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑投與。一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外之藥劑及/或適當之對照(例如，媒劑或抗體)進行處理。

【0393】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸(BA)濃度。

【0394】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎之位置(例如，肝、小腸及大腸、脾臟)、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素及/或流式細胞術分析(參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). J Hepatol. 2014. 60(6): 1290-1303)。例如，染色膽管以表現ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術

進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)，及黏附分子表現(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於)TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+膽管-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。

【0395】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶(例如，AST或ALT)之血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸之肝含量可使用預定方案進行量測。炎症及纖維化標誌物之肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子進行。此等標誌物可包括(但不限於) MCP-1、 α -SMA、Coll1a1及TIMP-。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0396】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可稍後用DCC再激發。分析小鼠在再激發後對膽管炎及膽管炎嚴重程度之易感性。

BDL誘導之膽管炎

【0397】 或者，測試EV在BDL誘導之膽管炎中之效力。例如，6至8週齡C57Bl/6J小鼠係獲得自Taconic或其他供應商。在適應期後，使該等小鼠經受手術程序以進行膽管結紮術(BDL)。一些對照動物接受假手術。BDL程序在7至21天內導致肝損傷、炎症及纖維化。

【0398】 EV治療係在一些時間點(在手術之時間附近或在手術後之某一時刻)下開始。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過i.p.注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。其等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取，及投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑投與。一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用額外之藥劑及/或適當之對照(例如，媒劑或抗體)進行處理。

【0399】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。在各種時間點下，分析血清樣本中的

ALT、AP、膽紅素及血清膽汁酸(BA)濃度。

【0400】 在各種時間點下，將小鼠處死，記錄體重及肝重量，且移除發炎之位置(例如，肝、小腸及大腸、脾臟)、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體組織形態學表徵、細胞介素及/或流式細胞術分析(參見，Fickert等人，Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC)). *J Hepatol.* 2014. 60(6): 1290-1303)。例如，染色膽管以表現ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1。一些組織係經染色用於組織學檢查，而其他組織係使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)，及黏附分子表現(ICAM-1、VCAM-1、MadCAM-1)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於)TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFNy、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+膽管-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。

【0401】 製備肝組織以用於組織學分析，例如，使用天狼星紅染色，接著對纖維化區域定量。在治療結束時，收集血液用於肝酶(例如，

AST或ALT)之血漿分析，及用以測定膽紅素濃度。羥脯胺酸之肝含量可使用預定方案量測。炎症及纖維化標誌物之肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子進行。此等標誌物可包括(但不限於) MCP-1、 α -SMA、Coll1a1及TIMP-。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定代謝組學方法進行。最後，對肝切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0402】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例22：非酒精性脂肪性肝炎(NASH)之小鼠模型中之EV

【0403】 非酒精性脂肪性肝炎(NASH)係非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)之嚴重形式，其中肝脂肪(脂肪變性)及炎症之逐步發展導致肝損傷及肝細胞細胞死亡(鼓脹)。

【0404】 存在NASH之各種動物模型，如由Ibrahim等人，(Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. Dig Dis Sci. 2016 May. 61(5): 1325-1336；亦參見Lau等人，Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances 2017 Jan. 241(1): 36-44)檢視。

【0405】 測試EV (單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加另一治療劑)在NASH之小鼠模型中之效力。例如，將8至10週齡C57Bl/6J小鼠(獲得自Taconic (Germantown, NY)或其他供應商)放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食上，歷時4至8週之週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。

【0406】 測試棲組織普雷沃菌細菌細胞及棲組織普雷沃菌衍生之EV

(單獨或彼此結合，以不同比例，添加或未添加另一治療劑)在NASH之小鼠模型中之效用力。例如，使8週齡C57Bl/6J小鼠(獲得自Charles River (France)或其他供應商)適應5天之週期，基於體重隨機分為10隻小鼠之組，並放置於缺乏甲硫胺酸膽鹼(MCD)之飲食上，例如來自Research Diets (USA)之A02082002B，歷時4週之週期，在此期間NASH特徵發展，包括脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化。給對照食物小鼠餵養正常食物飲食，例如，來自SDS Diets (UK)之RM1 (E) 801492。隨意提供對照食物、MCD飲食及水。

【0407】 使用冷凍活棲組織普雷沃菌之治療係針對一些小鼠在MCD飲食之第1天開始並連續繼續28天。一些MCD飲食小鼠通過每天經口強飼100 μ l含有 1.47×10^9 個細菌細胞之懸浮液而經投與細菌細胞。對照食物及一些MCD飲食小鼠仍未經處理，而一些MCD飲食小鼠係經每天投與媒劑溶液，通過每天經口強飼，歷時28天。一些MCD飲食小鼠係經投與參照化合物及FXR促效劑、膽甾酸(OCA；陽性對照)，以30 mg/kg之劑量，通過每天經口強飼，歷時28天。在治療結束時(第28天)，將小鼠處死並移除肝、小腸、內腔內容物、血液及排洩物用於使用此項技術中已知的方法進行離體組織學、生物化學、分子或細胞介素及/或流式細胞術分析。例如，將0.5 cm^3 肝樣本儲存於福爾馬林中，歷時24小時，及然後在4°C下儲存於乙醇中，接著進行蘇木精/伊紅(H&E)及天狼星紅染色，及測定NASH活動分數(NAS)。組織學分析及評分係在Histalim (Montpelier, France)下以盲蔽方式進行。含有一個用H&E或天狼星紅染色之肝葉切片之載玻片係使用NanoZoomer數位化及使用NDP檢視器可視化，均來自Hamamatsu (Japan)。各切片係經個別地評估及評分。使用自Kleiner等人，(Design

and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005 Jun. 41(6): 1313-1321)調適之NAS評分系統以確定脂肪變性之程度(0至3分)、小葉炎症(0至3分)、肝細胞鼓脹(0至3分)及纖維化(0至4分)。個別小鼠NAS分數係藉由針對脂肪變性、炎症、鼓脹及纖維化之分數(0至13分)求和進行計算。另外，血漿AST及ALT之濃度係使用來自Horiba (USA)之Pentra 400儀器，根據製造商之使用說明進行測定。肝總膽固醇、三酸甘油酯、脂肪酸、丙胺酸胺基轉移酶及天冬胺酸胺基轉移酶之濃度亦係使用此項技術中已知的方法進行測定。

【0408】 在接受MCD (NASH誘導之)飲食之小鼠中，相較於媒劑及非治療組(陰性對照)，經口投與之棲組織普雷沃菌係有效減少NAS分數(圖4)。棲組織普雷沃菌減少脂肪變性(圖5A)、炎症(圖5B及圖5C)及鼓脹(圖5D)，及肝總膽固醇(圖6)。在經治療之小鼠中，棲組織普雷沃菌亦減少纖維化分數(圖7A及圖7B)。

【0409】 圖9A顯示在飼餵MCD飲食之小鼠中，棲組織普雷沃菌對肝游離脂肪酸之影響。圖9B顯示在飼餵MCD飲食之小鼠中，棲組織普雷沃菌對肝總膽固醇之影響。圖9C顯示在飼餵MCD飲食之小鼠中，棲組織普雷沃菌對肝甘油三酯之影響。圖9D顯示在飼餵MCD飲食之小鼠中，棲組織普雷沃菌及產黑色素普雷沃菌對丙胺酸胺基轉移酶之影響。圖9E顯示在飼餵MCD飲食之小鼠中，棲組織普雷沃菌及產黑色素普雷沃菌對天冬胺酸胺基轉移酶之影響。

【0410】 在接受MCD (NASH誘導之)飲食之小鼠中，相較於媒劑及非治療組(陰性對照)，經口投與之棲組織普雷沃菌及產黑色素普雷沃菌係有效減少NAS分數(圖10A及10B)。

【0411】 在其他研究中，炎症、纖維化、脂肪變性、ER壓力或氧化壓力標誌物之肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子進行。此等標誌物可包括(但不限於) IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1、 α -SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。

【0412】 EV治療係在一些時間點(在飲食開始時，或在飲食開始後之某一時刻(例如，一週後))下開始。例如，EV可在開始MCD飲食的同一天投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、皮下(s.c.)注射、鼻途徑投與、經口強飼或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第1天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0413】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射或鼻途徑投與。一些組的小鼠可在各種時間點及有效劑量下，用額外之NASH治療劑(例如，FXR促效劑、PPAR促效劑、CCR2/5拮抗劑或其他治療)及/或適當之對照進行處理。

【0414】 在各種時間點下及/或在治療結束時，將小鼠處死並可移除肝、腸、血液、排洩物或其他組織用於使用此項技術中已知的方法進行離

體組織學、生物化學、分子或細胞介素及/或流式細胞術分析。例如，稱重並製備肝組織用於組織學分析，其可包含用H&E、天狼星紅染色，及測定NASH活動分數(NAS)。在各種時間點下，收集血液用於肝酶(例如，AST或ALT)之血漿分析，使用標準分析。另外，膽固醇、三酸甘油酯或脂肪酸之肝含量可使用預定方案進行量測。炎症、纖維化、脂肪變性、ER壓力或氧化壓力標誌物之肝基因表現分析可藉由qRT-PCR使用經驗證之引子進行。此等標誌物可包括(但不限於) IL-6、MCP-1、 α -SMA、Coll1a1、CHOP及NRF2。血漿、組織及糞便樣本中的代謝物量測可使用預定之基於生物化學及質譜之代謝組學方法進行。分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+膽管-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對肝或腸切片進行免疫組織化學以量測中性粒細胞、T細胞、巨噬細胞、樹突細胞或其他免疫細胞浸潤物。

【0415】 為檢查疾病保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可針對恢復進行分析。

實例23：牛皮癬之小鼠模型中之EV

【0416】 牛皮癬係T細胞介導之慢性炎症皮膚疾病。所謂之「斑塊型」牛皮癬係牛皮癬之最常見形式且特徵係幹鱗、紅色斑塊、及皮膚因免疫細胞浸潤至真皮及表皮內而增厚。數種動物模型有助於瞭解此疾病，如由Gudjonsson等人，(Mouse models of psoriasis. *J Invest Derm.* 2007. 127: 1292-1308；亦參見van der Fits等人，Imiquimod-induced psoriasis

-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* 2009 May 1. 182(9): 5836-45)檢視。

【0417】 牛皮癬可於各種小鼠模型中誘導，包括彼等使用轉基因、敲除或異種移植模型，並局部施用咪喹莫特(IMQ)(一種TLR7/8配體)模型。

【0418】 測試EV(單獨或與完整細菌細胞組合，添加或未添加其他抗炎治療)在牛皮癬之小鼠模型中之效力。例如，6至8週齡C57Bl/6或Balb/c小鼠係獲得自Taconic (Germantown, NY)或其他供應商。將小鼠之背部及右耳剃光。各組小鼠接受每天62.5 mg局部劑量的市售IMQ乳膏(5%) (Aldara; 3M Pharmaceuticals)。將該劑量施用至經剃毛之區域，歷時連續5或6天。每隔一定時間，對小鼠的紅斑、結垢及增厚按自0至4之標度進行評分，如由der Fits等人，(2009)描述。使用Mitutoyo千分尺監測小鼠的耳厚度。

【0419】 EV治療係在一些時間點(在第一次施用IMQ之時間附近，或之後的某一時刻)下開始。例如，EV可在皮下注射(第0天)的同時投與，或其等可在施用之前或在施用後投與。EV係在不同劑量下及在規定時間間隔下投與。例如，一些小鼠係以15、20或15 ug/小鼠靜脈內注射EV。其他小鼠可接受25、50或100 mg之EV/小鼠。雖然一些小鼠通過i.v.注射接受EV，但其他小鼠可通過腹膜內(i.p.)注射、鼻途徑投與、經口強飼、局部投與、皮內(i.d.)注射、皮下(s.c.)注射或其他投與方式接受EV。一些小鼠可每天(例如，起始自第0天)接受EV，而其他小鼠可在交替時間間隔下(例如，每隔一天或每三天一次)接受EV。額外組的小鼠可接受一定比率之細菌細胞與EV。該等細菌細胞可係活的、死的或弱的。該等細菌細

胞可新鮮(或冷凍)獲取並投與，或其等可在投與前經輻射或熱滅活。

【0420】 例如，一些組的小鼠可以與EV投與分開或組合之投與接受 1×10^4 至 5×10^9 個細菌細胞。如與EV一起投與，則細菌細胞投與可藉由投與途徑、劑量及給藥方案改變。此可包括經口強飼、i.v.注射、i.p.注射、i.d.注射、s.c.注射、局部投與或鼻途徑投與。

【0421】 一些組的小鼠可在各種時間點下及在有效劑量下，用抗炎劑(例如，抗CD154 (TNF家族之成員之阻滯劑)或其他治療)，及/或適當之對照(例如，媒劑或對照抗體)進行處理。

【0422】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些免疫小鼠係經治療而不接受抗生素。

【0423】 在各種時間點下，採集來自背部及耳朵皮膚之樣本用於使用此項技術中已知的方法進行冰凍切片染色分析。將其他組之小鼠處死且可移除淋巴結、脾臟、腸系膜淋巴結(MLN)、小腸、結腸及其他組織用以使用此項技術中已知的方法進行組織學研究、離體組織學、細胞介素及/或流式細胞術分析。一些組織可使用解離酶根據製造商之使用說明進行解離。冰凍切片樣本、組織樣本或離體獲得之細胞係經染色用於藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、

CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1、F4/80)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNF α 、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或離體獲得之經純化之CD45+皮膚-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對各種組織切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0424】 為檢查牛皮癬保護之影響及壽命，一些小鼠不被處死而是可經研究以評估恢復，或其等可用IMQ再激發。分析經再激發之小鼠對牛皮癬及反應之嚴重程度之易感性。

實例24：製造條件

【0425】 使用經富集之培養基以使細菌生長並製備細菌用於活體外及活體內用途。例如，培養基可含有糖、酵母提取物、基於植物之蛋白胨、緩衝液、鹽、微量元素、表面活性劑、消泡劑及維生素。複雜組分(諸如酵母提取物及蛋白胨)之組成可未經定義或經部分定義(包括胺基酸、糖等之近似濃度)。微生物代謝可取決於資源(諸如碳及氮)之可用性。可測試各種糖或其他碳源。或者，可製備培養基並使所選細菌生長，如由Saarela等人，*J. Applied Microbiology*. 2005. 99: 1330-1339顯示，該案以引用之方式併入本文中。發酵時間、冷凍保護劑及細胞濃縮物之中和對冷凍乾燥存活、儲存穩定性及無基於牛奶之成分所產生之所選細菌之酸及膽汁曝露之影響。

【0426】 大規模地，對培養基進行滅菌。滅菌可藉由超高溫(UHT)

處理。UHT處理係在極高溫度下進行較短之時間週期。UHT範圍可係自135至180°C。例如，可在135°C下將培養基滅菌10至30秒。

【0427】 接種物可在燒瓶或較小生物反應器中進行製備並監測生長。例如，接種物尺寸可係在總生物反應器體積之約0.5與3%之間。取決於施用及材料之需求，生物反應器體積可係至少2 L、10 L、80 L、100 L、250 L、1000 L、2500 L、5000 L、10,000 L。

【0428】 在接種之前，生物反應器係使用培養基在所需之pH、溫度及氧濃度下進行製備。培養基之初始pH可不同於製程設定點。pH壓力在低細胞濃度下可係不利的；初始pH可在pH 7.5與製程設定點之間。例如，pH可設定於4.5與8.0之間。在發酵期間，pH可通過使用氫氧化鈉、氫氧化鉀或氫氧化銨進行控制。溫度可控制在25°C至45°C之間，例如，在37°C下。厭氧條件係藉由在自約8 mg/L至0 mg/L之培養液中減小氧濃度產生。例如，可使用氮或氣體混合物(N₂、CO₂及H₂)以建立厭氧條件。或者，不使用氣體且厭氧條件係藉由細胞自培養基消耗殘餘之氧建立。取決於菌株及接種物尺寸，生物反應器發酵時間可變化。例如，發酵時間可自約5小時至48小時變化。

【0429】 自冷凍狀態恢復微生物可需具體考量。產生培養基可在解凍後對細胞產生壓力；可能需要特定解凍培養基以自始至終地自經解凍之材料開始菌種培養。出於增加菌種體積或維持微生物生長狀態之目的，種材料至新鮮培養基之轉移或傳代之動力學可受微生物之當前狀態(例如，指數生長、靜止生長、無壓力、受壓力)影響。

【0430】 產生發酵器之接種可影響生長動力學及細胞活性。生物反應器系統之初始狀態必須經最佳化以促進成功且始終如一之產生。種培養

物相對於總培養基之分率(例如，百分率)對生長動力學有顯著影響。範圍可係發酵器工作體積之1至5%。培養基之初始pH可不同於製程設定點。pH壓力在低細胞濃度下可係不利的；初始pH可在pH 7.5與製程設定點之間。在接種期間，攪動及氣體流入系統內可不同於製程設定點。在低細胞濃度下，物理及化學壓力因兩個條件而可係不利的。

【0431】 處理條件及對照設定可影響微生物生長及細胞活性之動力學。處理條件之變化可改變膜組成、代謝物之產生、生長速率、細胞壓力等。用於生長之最佳化溫度範圍可隨菌株改變。該範圍可係20至40°C。用於細胞生長及下游活性表現之最佳pH可隨菌株改變。該範圍可係pH 5至8。溶解於培養基中之氣體可被細胞用於代謝。可能需要在整個過程期間調節O₂、CO₂及N₂濃度。營養素之可用性可改變細胞生長。當可獲得過量之營養素時，微生物可具有替代動力學。

【0432】 微生物在發酵結束時及在獲取期間之狀態可影響細胞存活及活性。微生物可在獲取前不久進行預處理以更好地製備其等用於涉及分離及下游處理之物理及化學壓力。當自發酵器移除時，溫度之變化(通常減小至20至5°C)可減少細胞代謝、減緩生長(及/或死亡)及生理變化。離心濃度之有效性可受培養pH影響。pH上升1至2點可改善濃度之有效性但對細胞亦可係不利的。微生物可藉由增加鹽及/或糖在培養基中之濃度而在獲取前不久即受壓力。以此方式受壓力之細胞可在下游期間更好地在冷凍及凍乾中存活。

【0433】 分離方法及技術可影響自培養基分離微生物之效率。固體可使用離心技術移除。離心濃度之有效性可受培養pH或由利用絮凝劑影響。pH上升1至2點可改善濃度之有效性但對細胞亦可係不利的。微生物

可藉由增加鹽及/或糖在培養基中之濃度而在獲取前不久即受壓力。以此方式受壓力之細胞可在下游期間更好地在冷凍及凍乾中存活。另外，微生物亦可經由過濾進行分離。若細胞需過量之g分鐘以成功離心，則就純化而言，過濾優於離心技術。可在分離之前之後添加賦形劑。可添加賦形劑用於冷凍保護或用於在凍乾期間進行保護。賦形劑可包括(但不限於)蔗糖、海藻糖或乳糖，且此等可或者與緩衝液及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將與賦形劑混合之細胞集結粒之液滴浸沒於液氮中。

【0434】 獲取可藉由連續離心進行。產品可用各種賦形劑重懸浮至所需之最終濃度。可添加賦形劑用於冷凍保護或用於在凍乾期間進行保護。賦形劑可包括(但不限於)蔗糖、海藻糖或乳糖，且此等可或者與緩衝液及抗氧化劑混合。在凍乾之前，將與賦形劑混合之細胞集結粒之液滴浸沒於液氮中。

【0435】 材料(包括活細菌)之凍乾以初級乾燥開始。在初級乾燥階段期間，將冰移除。此處，產生真空並將適當量之熱量施用至材料用於使冰升華。在第二次乾燥階段期間，將結合水分子之產物移除。此處，使溫度上升至高於初級乾燥階段中之溫度以打破已在水分子與產物材料之間形成的任何物理-化學相互作用。在此階段期間，可使壓力進一步降低以增強解吸附。在冷凍乾燥過程完成後，可用惰性氣體(諸如氮)填充腔室。產物可在乾燥條件下密封於冷凍乾燥器內，防止曝露於大氣水及污染物。

實例25：小鼠黑色素瘤模型

【0436】 雌性 6 至 8 週齡 C57Bl/6 小鼠係獲得自 Taconic (Germantown, NY)。將100,000個B16-F10 (ATCC CRL-6475)腫瘤細胞重懸浮於含有50% Matrigel之無菌PBS中，並以100 ul最終體積接種於各

小鼠之一個後脅腹(第一脅腹)內。使用韋榮球菌菌株之治療係在腫瘤細胞接種後之某一時刻在不同劑量下及在規定時間間隔下開始。例如，一些小鼠接受每個劑量 $1-5 \times 10^9$ CFU (100 μ l最終體積)。可能之投與途徑包括經口強飼(p.o.)、靜脈內注射、瘤內注射(IT)或腫瘤周圍或腫瘤下或皮下注射。為評估韋榮球菌治療之全身性抗腫瘤效應，在用韋榮球菌於第一脅腹中之IT、腫瘤周圍或腫瘤下治療之前，可對額外小鼠之對側(未治療，第二)脅腹接種腫瘤細胞。

【0437】 一些小鼠可在第1天(腫瘤細胞注射後之第二天)接受韋榮球菌(p.o.)。其他小鼠可接受七(7)次連續劑量之細菌菌株(在第14至21天，每天一個劑量)。其他小鼠接受每日給藥，或者，一些小鼠每隔一天接受給藥。或者，在規定時間點下(例如，在第13天)或當腫瘤達成一定尺寸(例如，100 mm³)時，將小鼠隨機分為各種治療組及因此然後開始治療。例如，當腫瘤體積達成平均100 mm³ (腫瘤細胞接種約10至12天)時，將動物分佈於組中並用媒劑或細菌菌株進行處理(p.o.或IT)。一些額外組的小鼠可用額外之癌症治療劑或適當之對照抗體進行處理。可投與之癌症治療劑之一項實例係免疫查核點之抑制劑，例如，抗PD-1、抗PD-L1或阻斷免疫查核點結合至其配體之其他治療。可將查核點抑制劑(抗PD-1及抗PD-L1)調配於PBS中並以有效劑量腹膜內(i.p.)投與。例如，起始自第1天，每隔四天對小鼠給予100 ug抗PD-1 (i.p.)，並繼續研究之持續時間。

【0438】 另外，一些小鼠在治療前用抗生素處理。例如，將萬古黴素(0.5 g/L)、安比西林(1.0 g/L)、慶大黴素(1.0 g/L)及兩性黴素B (0.2 g/L)添加至飲用水，並在治療時或治療前幾天停止抗生素治療。一些小鼠在未接受抗生素治療之前經接種腫瘤細胞。

【0439】 在各種時間點下，將小鼠處死且可移除腫瘤、淋巴結或其他組織以使用此項技術中已知的方法進行離體流式細胞術分析。例如，腫瘤係使用Miltenyi腫瘤解離酶混合物根據製造商之使用說明進行解離。記錄腫瘤重量並將腫瘤切碎，及然後放置於含有酶混合物之15 ml管中並放置在冰上。然後在37°C下將樣本放置於輕柔振盪器上振盪45分鐘並用多達15 ml完全RPMI中止。各細胞懸浮液係通過70 µm過濾器濾入50 ml falcon管內並在1000 rpm下離心10分鐘。將細胞重懸浮於FACS緩衝液中並清洗以移除殘餘之殘渣。視需要，使樣本通過第二70 µm過濾器再次濾入新管內。染色細胞以藉由流式細胞術使用此項技術中已知的技術進行分析。染色抗體可包括抗CD11c (樹突細胞)、抗CD80、抗CD86、抗CD40、抗MHCII、抗CD8a、抗CD4及抗CD103。可分析之其他標誌物包括泛免疫細胞標誌物CD45、T細胞標誌物(CD3、CD4、CD8、CD25、Foxp3、T-bet、Gata3、Roryt、顆粒酶B、CD69、PD-1、CTLA-4)及巨噬細胞/髓樣標誌物(CD11b、MHCII、CD206、CD40、CSF1R、PD-L1、Gr-1)。除免疫表型分型外，亦分析血清細胞介素，其等包括(但不限於) TNFa、IL-17、IL-13、IL-12p70、IL12p40、IL-10、IL-6、IL-5、IL-4、IL-2、IL-1b、IFN γ 、GM-CSF、G-CSF、M-CSF、MIG、IP10、MIP1b、RANTES及MCP-1。可對獲得自淋巴結或其他組織之免疫細胞，及/或在離體獲得之經純化之CD45+腫瘤-浸潤之免疫細胞進行細胞介素分析。最後，對腫瘤切片進行免疫組織化學以量測T細胞、巨噬細胞、樹突細胞及查核點分子蛋白表現。

【0440】 一些小鼠不被處死而是可用再挑戰腫瘤細胞注射於對側脅腹(或其他區域)內再激發以確定免疫系統記憶反應對腫瘤生長之影響。

【0441】在接受MCD (NASH誘導之)飲食之小鼠中，相較於媒劑及非治療組(陰性對照)，經口投與之韋榮球菌係有效減少NAS分數(圖16)。韋榮球菌在經治療之小鼠中減少纖維化分數(圖17)。韋榮球菌減少肝總膽固醇(圖18)及肝三酸甘油酯(圖19)。

實例26：結腸直腸癌模型

【0442】雌性6至8週齡Balb/c小鼠係獲得自Taconic (Germantown, NY)。將100,000個CT-26結腸直腸腫瘤細胞(ATCC CRL-2638)重懸浮於無菌PBS中並在50% Matrigel之存在下接種。將CT-26腫瘤細胞皮下注射至各小鼠之後脅腹內。當腫瘤體積達成平均100 mm³ (腫瘤細胞接種後約10至12天)時，將動物分佈於下列組中：1)媒劑；2) 範永氏球菌菌株；3) 抗PD-1抗體。起始自第1天，每隔四天，以200 µg/小鼠(100 µl最終體積)腹膜內(i.p.)投與抗體，投與總計3次(Q4Dx3)，及起始自第1天，每隔三天，靜脈內(i.v.)注射範永氏球菌EV (5 µg)，投與總計4次(Q3Dx4)。兩個範永氏球菌組均顯示比抗PD-1組中可見之腫瘤生長抑制更大之腫瘤生長抑制(圖12及13)。

【0443】另一項實例，當腫瘤體積達成平均100 mm³ (腫瘤細胞接種後約10至12天)時，將動物分佈於下列組中：1)媒劑；2)假性鼻疽伯克霍爾德菌；及3)抗PD-1抗體。起始自第1天，每隔四天，以200 µg/小鼠(100 µl最終體積)腹膜內(i.p.)投與抗體，及起始自第1天直至研究結束，靜脈內(i.v.)每天注射假性鼻疽伯克霍爾德菌EV (5 µg)。假性鼻疽伯克霍爾德菌組顯示比抗PD-1組中可見之腫瘤生長抑制更大之腫瘤生長抑制(圖20及21)。

【0444】另一項實例，當腫瘤體積達成平均100 mm³ (腫瘤細胞接

種後約10至12天)時，將動物分佈於下列組中：1)媒劑；2)分離自Bexsero®疫苗之腦膜炎奈瑟菌EV；及3)抗PD-1抗體。起始自第1天，每隔四天，以200 µg/小鼠(100 µl最終體積)腹膜內(i.p.)投與抗體，及起始自第1天直至研究結束，腹膜內(i.p.)每天投與腦膜炎奈瑟菌細菌(約 1.1×10^2)。腦膜炎奈瑟菌組顯示比抗PD-1組中可見之腫瘤生長抑制更大之腫瘤生長抑制(圖22及23)。

表4：在第11天比較治療組相對於對照組中之腫瘤體積之顯著性檢驗。在GraphPad中計算T檢驗(兩尾，未配對，經韋爾奇校正)。

比較	P值	總結
IP媒劑相較於腦膜炎奈瑟菌EV。	0.0004	***

實例27：EV之效力基於源微生物、劑量及投與途徑而改變

【0445】雌性6至8週齡Balb/c小鼠係獲得自Taconic (Germantown, NY)。將100,000個CT-26結腸直腸腫瘤細胞(ATCC CRL-2638)重懸浮於無菌PBS中並在50% Matrigel之存在下接種。CT-26腫瘤細胞係經皮下注射至各小鼠之後脅腹內。當腫瘤體積達成平均 100 mm^3 (腫瘤細胞接種後約10至12天)時，將動物分佈於如表5中突出顯示之下列組中。

表5：治療組

組	治療	劑量/途徑/時間表
1	IV媒劑(PBS)	N/A / IV / Q3Dx4
2	PO媒劑(蔗糖)	N/A / PO / QD
3	抗PD-1	200 µg / IP / Q4Dx3
4	小範永氏球菌EV	10 µg / IV / Q3Dx4
5	小範永氏球菌EV	5 µg / IV / Q3Dx4
6	小範永氏球菌EV	2 µg / IV / Q3Dx4
7	當別町範永氏球菌EV	75 µg / PO. QD
8	當別町範永氏球菌EV	5 µg / IV / Q3Dx4

【0446】如表中所示，起始自第1天，每隔四天，以200 µg/小鼠(100 µl最終體積)腹膜內(i.p.)投與抗體，投與總計3次(Q4Dx3)及起始自第1天，每隔三天，靜脈內(i.v.)注射EV，投與總計4次(Q3Dx4)。藉由口腔(p.o.)投與之治療組係每天投與(QD)。韋榮球菌EV之效力係基於源微生物、劑量及投與途徑而改變(圖14及15)。

併入本文中之參考文獻

【0447】本文提及之所有公開案、專利申請案係以全文引用之方式併入本文中，該引用之程度就如同各個別之公開案或專利申請案明確地及個別地以引用之方式併入本文中。在有矛盾之情況下，以本申請案(包括本文之任何定義)為準。

等效物

【0448】彼等熟習此項技術者將知曉本文描述之本發明之特定實施例之許多等效物或可使用不超出例行實驗確定本文描述之本發明之特定實施例之許多等效物。此等等效物意欲包含於下列申請專利範圍中。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種醫藥組合物，其包含經分離之細菌胞外囊泡(EV)，其中該EV係來自普雷沃菌(*Prevotella*)或範永氏球菌(*Veillonella*)。

【請求項2】

如請求項1之醫藥組合物，其中該組合物不含細菌。

【請求項3】

如請求項1之醫藥組合物，其進一步包含細菌。

【請求項4】

如請求項3之醫藥組合物，其中：

- (i) 該醫藥組合物中90%至100%之總EV及細菌顆粒係EV；
- (ii) 該醫藥組合物中0%至1%之總EV及細菌顆粒係細菌；
- (iii) 該醫藥組合物中95%至100%之總蛋白質係存在於EV中；
- (iv) 該醫藥組合物中0%至1%之總蛋白質係存在於細菌中；
- (v) 該醫藥組合物中90%至100%之總脂質係存在於EV中；或
- (vi) 該醫藥組合物中0%至1%之總脂質係存在於細菌中。

【請求項5】

如請求項3或4之醫藥組合物，其中該組合物包含活細菌、被殺死之細菌或減毒細菌。

【請求項6】

如請求項3或4之醫藥組合物，其中該產生EV的細菌受到UV輻射。

【請求項7】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中：

該EV係來自以下：空腸普雷沃菌(*Prevotella jejuni*)、桔紅色普雷沃菌(*Prevotella aurantiaca*)、巴羅尼亞普雷沃菌(*Prevotella baroniae*)、科羅納普雷沃菌(*Prevotella colorans*)、人體普雷沃菌(*Prevotella corporis*)、齒狀普雷沃菌(*Prevotella dentasini*)、埃諾普雷沃菌(*Prevotella enoeca*)、福氏普雷沃菌(*Prevotella falsenii*)、深黑色普雷沃菌(*Prevotella fusca*)、解肝素普雷沃菌(*Prevotella heparinolytica*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、食多糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)、南錫普雷沃菌(*Prevotella nanceiensis*)、米普雷沃菌(*Prevotella oryzae*)、帕拉迪普雷沃菌(*Prevotella paludivivens*)、胸膜炎普雷沃菌(*Prevotella pleuritidis*)、棲瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*)、解糖普雷沃菌(*Prevotella saccharolytica*)、靶心普雷沃菌(*Prevotella scopos*)、沙氏普雷沃菌(*Prevotella shahii*)、動膠普雷沃菌(*Prevotella zoogloformans*)、阿爾伯斯普雷沃菌(*Prevotella albensis*)、安氏普雷沃菌(*Prevotella amnii*)、伯氏普雷沃菌(*Prevotella bergensis*)、二路普雷沃菌(*Prevotella bivia*)、短普雷沃菌(*Prevotella brevis*)、頰普雷沃菌(*Prevotella buccae*)、口頰普雷沃菌(*Prevotella buccalis*)、糞便普雷沃菌(*Prevotella copri*)、人體普雷沃菌(*Prevotella corporis*)、牙普雷沃菌(*Prevotella dentalis*)、棲牙普雷沃菌(*Prevotella denticola*)、解糖腺普雷沃菌(*Prevotella disiens*)、普雷沃菌複合群C1 (*Prevotella genomosp. C1*)、普雷沃菌複合群C2(*Prevotella genomosp. C2*)、普雷沃菌複合群P7口腔純系MB2_P31 (*Prevotella genomosp. P7 oral clone MB2_P31*)、普雷沃菌複合群P8口腔純系MB3_P13 (*Prevotella genomosp. P8 oral clone MB3_P13*)、普雷沃菌複合群P9口腔純系MB7_G16 (*Prevotella*

genomosp. P9 oral clone MB7_G16)、解肝素普雷沃菌(*Prevotella heparinolytica*)、棲組織普雷沃菌(*Prevotella histicola*)、中間普雷沃菌(*Prevotella intermedia*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、斑狀普雷沃菌(*Prevotella maculosa*)、馬氏普雷沃菌(*Prevotella marshii*)、產黑色素普雷沃菌(*Prevotella melaninogenica*)、彩虹普雷沃菌(*Prevotella micans*)、多形普雷沃菌(*Prevotella multiformis*)、食多糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)、南錫普雷沃菌(*Prevotella nanceiensis*)、變黑普雷沃菌(*Prevotella nigrescens*)、口腔普雷沃菌(*Prevotella oralis*)、口普雷沃菌(*Prevotella oris*)、齦炎普雷沃菌(*Prevotella oulorum*)、蒼白普雷沃菌(*Prevotella pallens*)、棲瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*)、唾液普雷沃菌(*Prevotella salivae*)、普雷沃菌屬BI_42 (*Prevotella sp. BI_42*)、普雷沃菌屬CM38 (*Prevotella sp. CM38*)、普雷沃菌屬ICM1 (*Prevotella sp. ICM1*)、普雷沃菌屬ICM55 (*Prevotella sp. ICM55*)、普雷沃菌屬JCM 6330 (*Prevotella sp. JCM 6330*)、普雷沃菌屬口腔純系AA020 (*Prevotella sp. oral clone AA020*)、普雷沃菌屬口腔純系ASCG10 (*Prevotella sp. oral clone ASCG10*)、普雷沃菌屬口腔純系ASCG12 (*Prevotella sp. oral clone ASCG12*)、普雷沃菌屬口腔純系AU069 (*Prevotella sp. oral clone AU069*)、普雷沃菌屬口腔純系CY006 (*Prevotella sp. oral clone CY006*)、普雷沃菌屬口腔純系DA058 (*Prevotella sp. oral clone DA058*)、普雷沃菌屬口腔純系FL019 (*Prevotella sp. oral clone FL019*)、普雷沃菌屬口腔純系FU048 (*Prevotella sp. oral clone FU048*)、普雷沃菌屬口腔純系FW035 (*Prevotella sp. oral clone FW035*)、普雷沃菌屬口腔純系GI030

(*Prevotella sp. oral clone GI030*)、普雷沃菌屬口腔純系 GI032
(*Prevotella sp. oral clone GI032*)、普雷沃菌屬口腔純系 GI059
(*Prevotella sp. oral clone GI059*)、普雷沃菌屬口腔純系 GU027
(*Prevotella sp. oral clone GU027*)、普雷沃菌屬口腔純系 HF050
(*Prevotella sp. oral clone HF050*)、普雷沃菌屬口腔純系 ID019
(*Prevotella sp. oral clone ID019*)、普雷沃菌屬口腔純系 IDR_CEC_0055
(*Prevotella sp. oral clone IDR_CEC_0055*)、普雷沃菌屬口腔純系 IK053
(*Prevotella sp. oral clone IK053*)、普雷沃菌屬口腔純系 IK062
(*Prevotella sp. oral clone IK062*)、普雷沃菌屬口腔純系 P4PB_83 P2
(*Prevotella sp. oral clone P4PB_83 P2*)、普雷沃菌屬口腔分類群 292
(*Prevotella sp. oral taxon 292*)、普雷沃菌屬口腔分類群 299 (*Prevotella sp. oral taxon 299*)、普雷沃菌屬口腔分類群 300 (*Prevotella sp. oral taxon 300*)、普雷沃菌屬口腔分類群 302 (*Prevotella sp. oral taxon 302*)、普雷沃菌屬口腔分類群 310 (*Prevotella sp. oral taxon 310*)、普雷沃菌屬口腔分類群 317 (*Prevotella sp. oral taxon 317*)、普雷沃菌屬口腔分類群 472 (*Prevotella sp. oral taxon 472*)、普雷沃菌屬口腔分類群 781 (*Prevotella sp. oral taxon 781*)、普雷沃菌屬口腔分類群 782 (*Prevotella sp. oral taxon 782*)、普雷沃菌屬口腔分類群 F68 (*Prevotella sp. oral taxon F68*)、普雷沃菌屬口腔分類群 G60 (*Prevotella sp. oral taxon G60*)、普雷沃菌屬口腔分類群 G70 (*Prevotella sp. oral taxon G70*)、普雷沃菌屬口腔分類群 G71 (*Prevotella sp. oral taxon G71*)、普雷沃菌屬 SEQ053 (*Prevotella sp. SEQ053*)、普雷沃菌屬 SEQ065 (*Prevotella sp. SEQ065*)、普雷沃菌屬 SEQ072 (*Prevotella sp. SEQ072*)、普雷沃菌屬

SEQ116(*Prevotella sp. SEQ116*)、普雷沃菌屬SG12 (*Prevotella sp. SG12*)、普雷沃菌屬sp24 (*Prevotella sp. sp24*)、普雷沃菌屬sp34 (*Prevotella sp. sp34*)、糞普雷沃菌(*Prevotella stercorea*)、譚氏普雷沃菌(*Prevotella tannerae*)、蒂蒙斯普雷沃菌(*Prevotella timonensis*)、真口普雷沃菌(*Prevotella veroralis*)、空腸普雷沃菌(*Prevotella jejuni*)、桔紅色普雷沃菌(*Prevotella aurantiaca*)、巴羅尼亞普雷沃菌(*Prevotella baroniae*)、科羅納普雷沃菌(*Prevotella colorans*)、人體普雷沃菌(*Prevotella corporis*)、齒狀普雷沃菌(*Prevotella dentasini*)、埃諾普雷沃菌(*Prevotella enoeca*)、福氏普雷沃菌(*Prevotella falsenii*)、深黑色普雷沃菌(*Prevotella fusca*)、解肝素普雷沃菌(*Prevotella heparinolytica*)、洛氏普雷沃菌(*Prevotella loescheii*)、食多糖普雷沃菌(*Prevotella multisaccharivorax*)、南錫普雷沃菌(*Prevotella nanceiensis*)、米普雷沃菌(*Prevotella oryzae*)、帕拉迪普雷沃菌(*Prevotella paludivivens*)、胸膜炎普雷沃菌(*Prevotella pleuritidis*)、棲瘤胃普雷沃菌(*Prevotella ruminicola*)、解糖普雷沃菌(*Prevotella saccharolytica*)、靶心普雷沃菌(*Prevotella scopos*)、沙氏普雷沃菌(*Prevotella shahii*)、非典型範永氏球菌(*Veillonella atypica*)、殊異範永氏球菌(*Veillonella dispar*)、範永氏球菌複合群P1口腔純系MB5_P17 (*Veillonella genomosp. P1 oral clone MB5_P17*)、蒙皮立範永氏球菌(*Veillonella montpellierensis*)、小範永氏球菌(*Veillonella parvula*)、範永氏球菌屬3_1_44 (*Veillonella sp. 3_1_44*)、範永氏球菌屬6_1_27 (*Veillonella sp. 6_1_27*)、範永氏球菌屬ACP1 (*Veillonella sp. ACP1*)、範永氏球菌屬AS16 (*Veillonella sp. AS16*)、範永氏球菌屬BS32b (*Veillonella sp. BS32b*)、範永氏球菌屬

ICM51a (*Veillonella sp. ICM51a*)、範永氏球菌屬MSA12 (*Veillonella sp. MSA12*)、範永氏球菌屬NVG 100cf (*Veillonella sp. NVG 100cf*)、範永氏球菌屬OK11 (*Veillonella sp. OK11*)、範永氏球菌屬口腔純系ASCA08 (*Veillonella sp. oral clone ASCA08*)、範永氏球菌屬口腔純系ASCB03 (*Veillonella sp. oral clone ASCB03*)、範永氏球菌屬口腔純系ASCG01 (*Veillonella sp. oral clone ASCG01*)、範永氏球菌屬口腔純系ASCG02 (*Veillonella sp. oral clone ASCG02*)、範永氏球菌屬口腔純系OH1A (*Veillonella sp. oral clone OH1A*)、範永氏球菌屬口腔分類群158 (*Veillonella sp. oral taxon 158*)、及當別町範永氏球菌(*Veillonella tobetsuensis*)。

【請求項8】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調配為經口遞送。

【請求項9】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調配成膠囊或錠劑。

【請求項10】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含至少 1×10^6 個經分離之細菌胞外囊泡(EV)。

【請求項11】

如請求項8之醫藥組合物，其包含至少 5×10^6 個經分離之細菌EV。

【請求項12】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中該醫藥組合物進一步包

含醫藥上可接受之載劑。

【請求項13】

如請求項1至4中任一項之醫藥組合物，其中該細菌EV係來自單一菌株之細菌。

【請求項14】

一種如請求項1至13中任一項之醫藥組合物之用途，其係用於製備治療個體之疾病之藥劑。

【請求項15】

如請求項14之用途，其中該疾病係自體免疫性疾病或發炎性疾病。

【請求項16】

如請求項14或15之用途，其中該醫藥組合物經口投與。

【請求項17】

一種如請求項1至13中任一項之醫藥組合物之用途，其係用於製備治療個體之免疫失調症之藥劑。

【請求項18】

如請求項17之用途，其中：

該免疫失調症係選自由以下組成之群：全身性急性播散性禿頭症、白塞氏病、恰加斯病(Chagas' disease)、慢性疲勞症候群、自主神經障礙、腦脊髓炎、強直性脊柱炎、再生障礙性貧血、化膿性汗腺炎、自體免疫性肝炎、自體免疫性卵巢炎、乳糜瀉、克羅恩病、糖尿病1型、巨細胞動脈炎、古德帕斯雷症候群、格雷夫病、格林-巴里症候群、橋本病、亨諾-許蘭二氏紫斑症、川崎病(Kawasaki's disease)、紅斑狼瘡、微觀結腸炎、微

觀多動脈炎、混合結締組織病、穆-韋二氏症候群(Muckle-Wells syndrome)、多發性硬化、重症肌無力、眼陣攣肌陣攣症候群、視神經炎、奧爾德甲狀腺炎、天皰瘡、結節性多動脈炎、多肌痛、類風濕性關節炎、萊特爾氏症候群(Reiter's syndrome)、休格倫氏症候群(Sjogren's syndrome)、顛動脈炎、韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、溫熱自體免疫性溶血性貧血、間質性膀胱炎、萊姆病(Lyme disease)、侷限性硬皮病、牛皮癬、肉狀瘤病、硬皮病、潰瘍性結腸炎、白斑病、接觸性超敏反應、接觸性皮炎(包括由毒葛引起之接觸性皮炎)、蕁麻疹、皮膚過敏、呼吸道過敏(花粉熱、過敏性鼻炎、屋塵蟎過敏)及麩質敏感性腸病(乳糜瀉)、闌尾炎、皮炎、皮肌炎、心內膜炎、纖維組織炎、齒齦炎、舌炎、肝炎、化膿性汗腺炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、心肌炎、腎炎、耳炎、胰臟炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、局限性肺炎、前列腺增生症、腎盂腎炎及口炎、移植排斥(涉及諸如腎、肝、心臟、肺、胰臟(例如，胰島細胞)、骨髓、角膜、小腸之器官，同種異體皮膚移植、皮膚同種移植物及心臟瓣膜異種移植、血清病及移植物抗宿主病)、急性胰臟炎、慢性胰臟炎、急性呼吸窘迫症候群、西紮利氏症候群(Sexary's syndrome)、先天性腎上腺增生、非化膿性甲狀腺炎、癌症相關聯高鈣血症、天皰瘡、皰疹樣大皰性皮炎、重度多形紅斑、剝脫性皮炎、脂溢性皮炎、季節性或常年過敏性鼻炎、支氣管哮喘、接觸性皮炎、異位性皮炎、藥物過敏反應、過敏性結膜炎、角膜炎、眼

帶狀皰疹、虹膜炎及虹膜睫狀體炎、脈絡膜視網膜炎、視神經炎、症狀性結節病、暴發性或播散性肺結核化療、成人特發性血小板減少性紫癍、成人繼發性血小板減少症、獲得性(自體免疫性)溶血性貧血、成人白血病及淋巴瘤、兒童急性白血病、區域性腸炎、自體免疫性血管炎、多發性硬化、慢性阻塞性肺疾病、實體器官移植排斥反應、敗血症。較佳治療包括以下之治療：移植排斥、類風濕性關節炎、銀屑病關節炎、多發性硬化、1型糖尿病、哮喘、發炎腸病、全身性紅斑狼瘡、牛皮癬、慢性阻塞性肺疾病及伴隨感染病症之炎症(例如，敗血症)。

【請求項19】

如請求項17或18之用途，其中該醫藥組合物係經口投與。

【請求項20】

如請求項14或15之用途，其中：

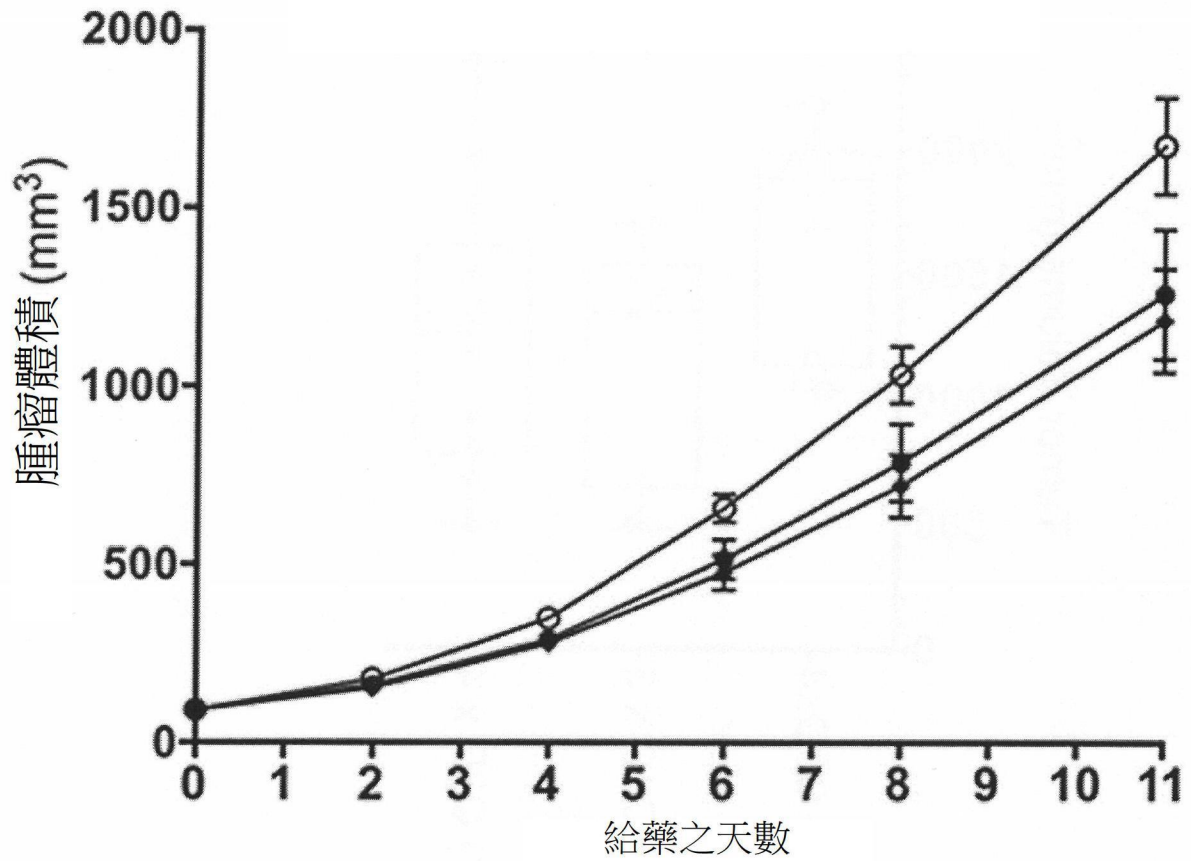
該個體係人類，或非人類哺乳動物。

【請求項21】

如請求項20之用途，其中該非人類哺乳動物係選自由以下組成之群：狗、貓、牛、馬、豬、驢、山羊、駱駝、小鼠、大鼠、天竺鼠、綿羊、駱馬(llama)、猴、大猩猩(gorilla)及黑猩猩。

【發明圖式】

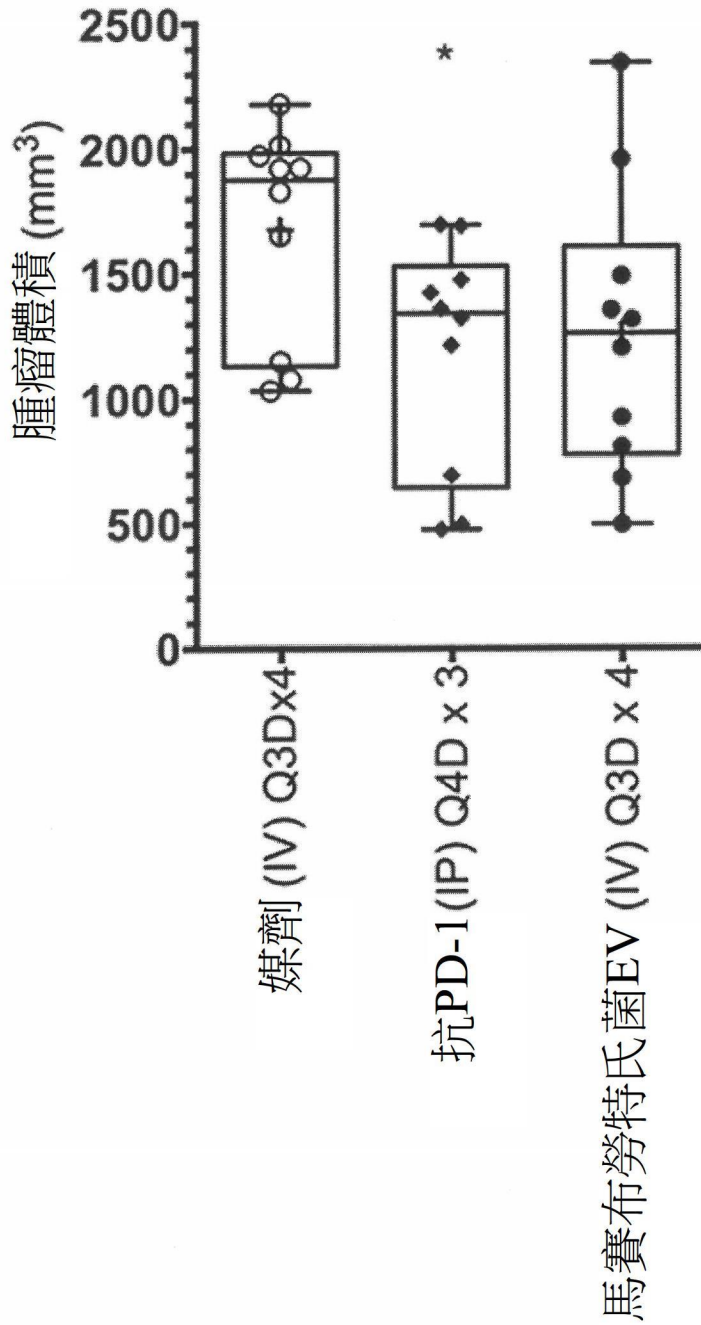
CT26腫瘤模型，第11天



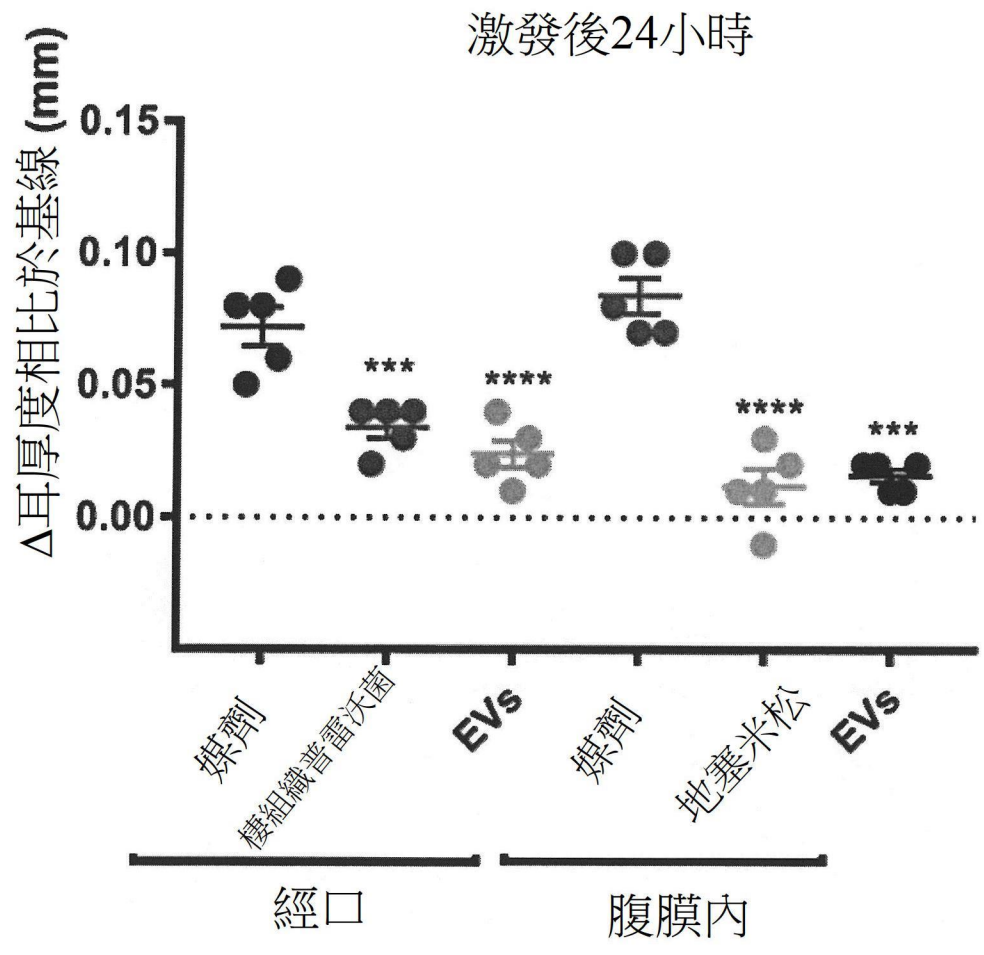
- 媒劑 (IV) Q3Dx4
- ◆ 抗PD-1 (IP) Q4D x 3
- 馬賽布勞特氏菌EV (IV) Q3D x 4

【圖1】

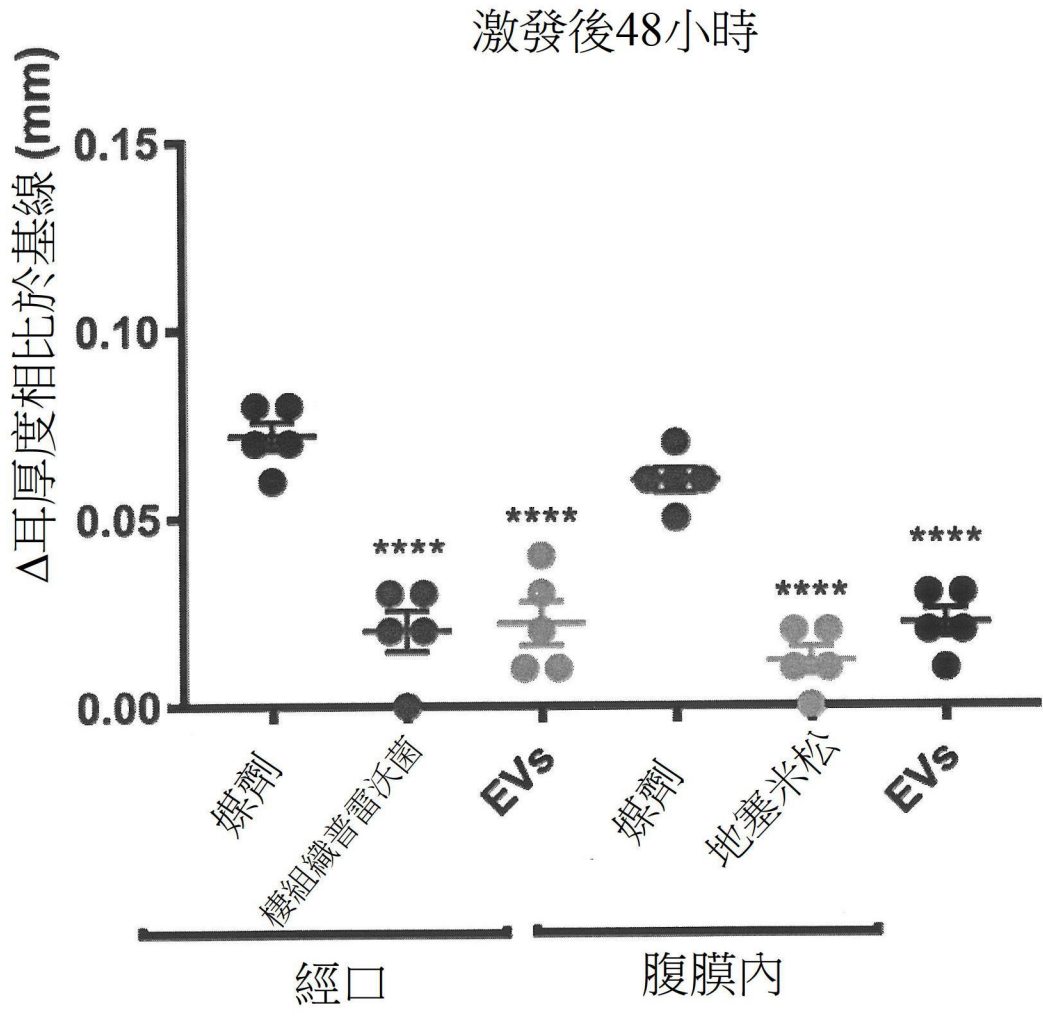
CT26腫瘤模型，第11天



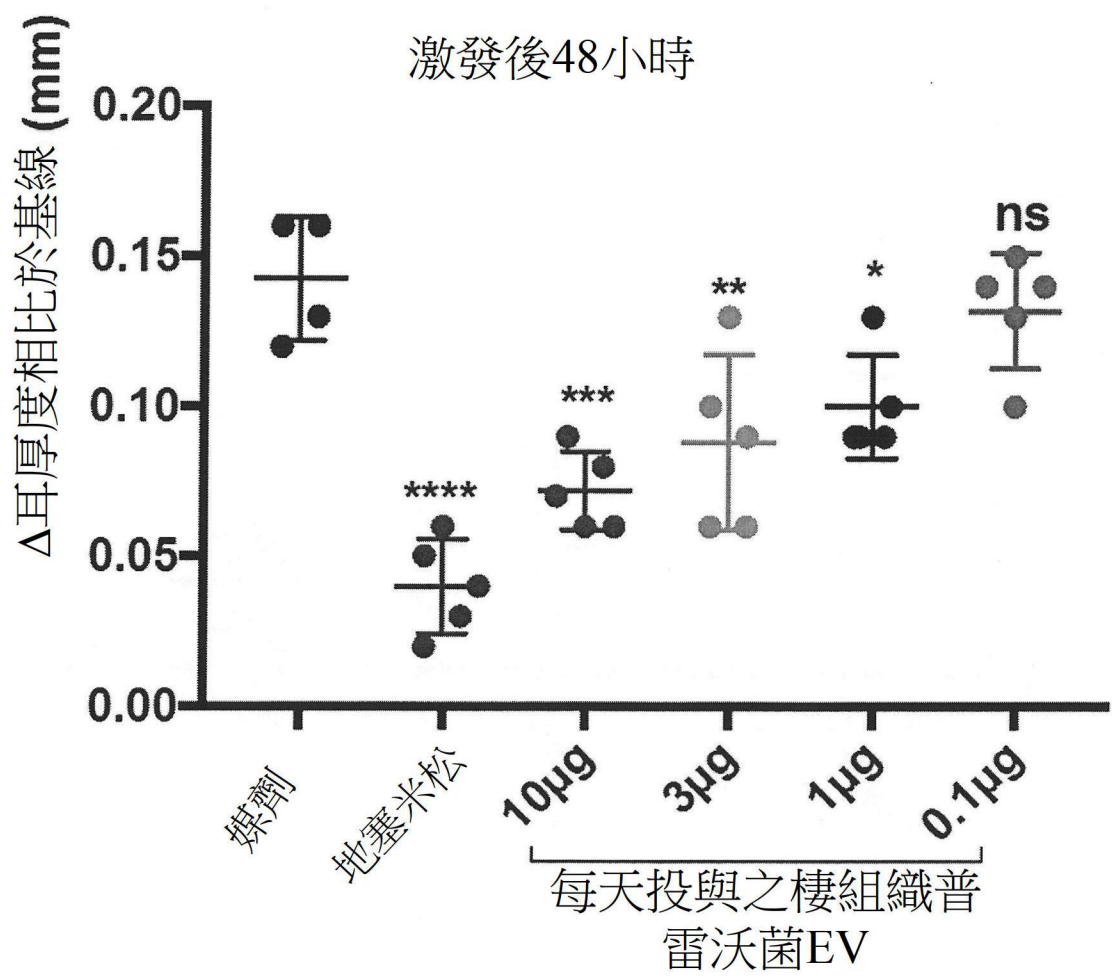
【圖2】



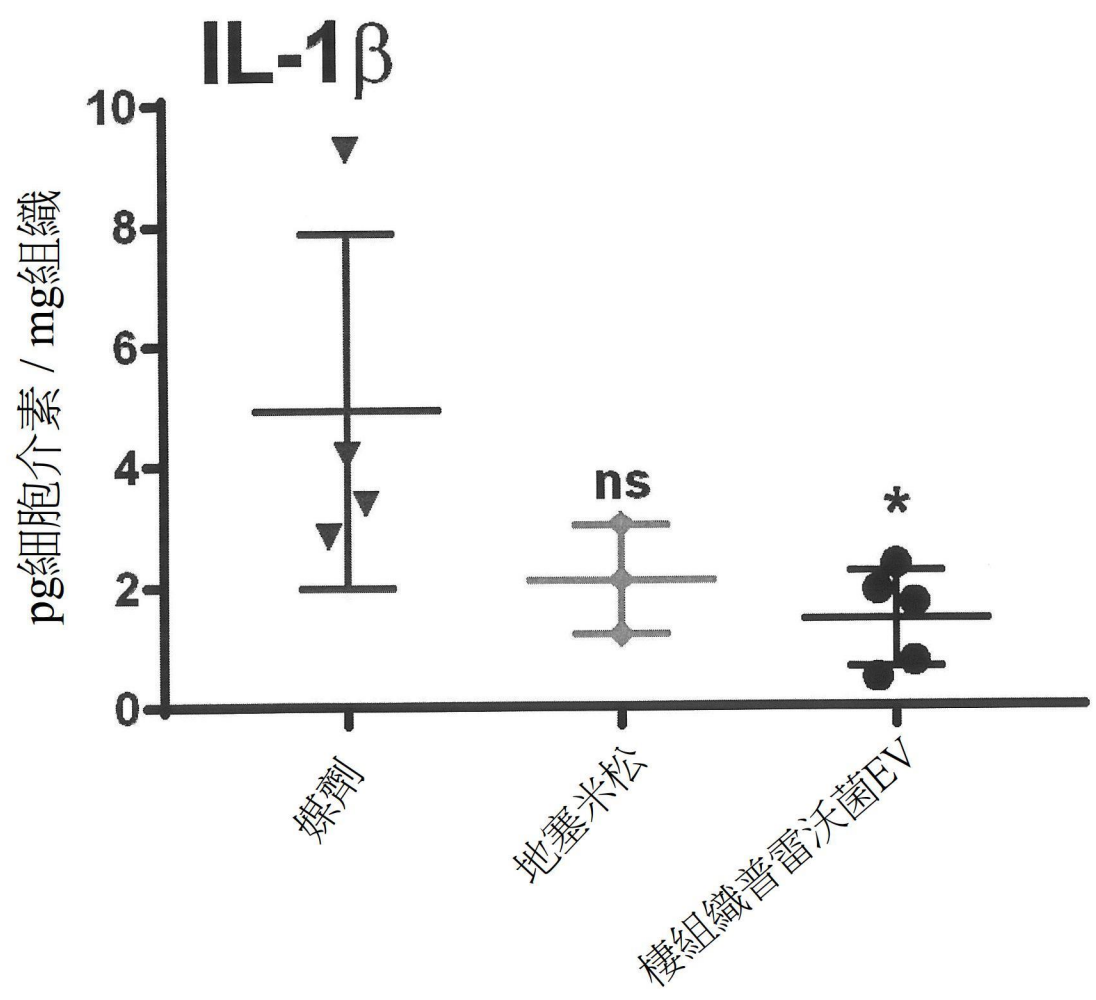
【圖3A】



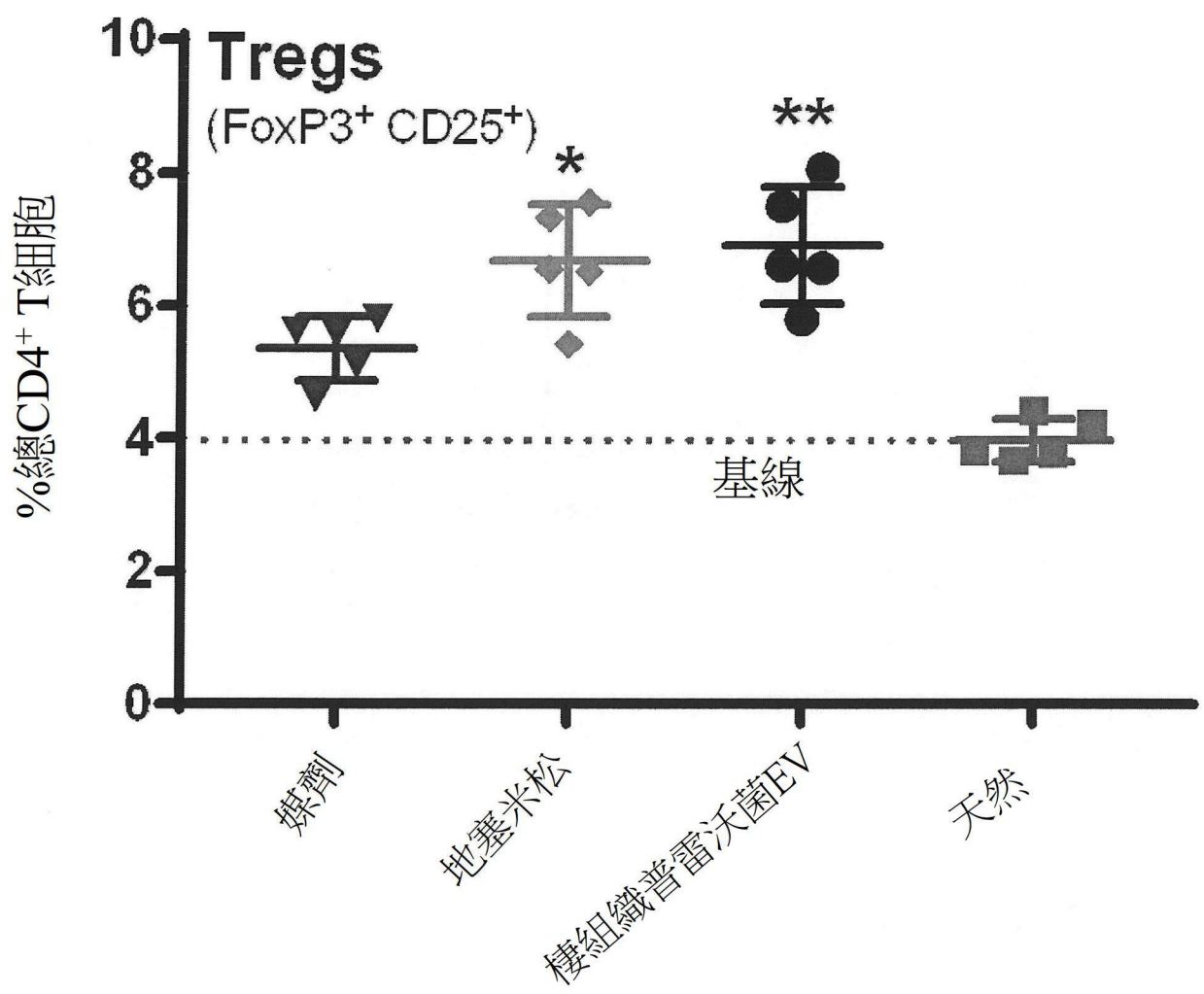
【圖3B】



【圖3C】

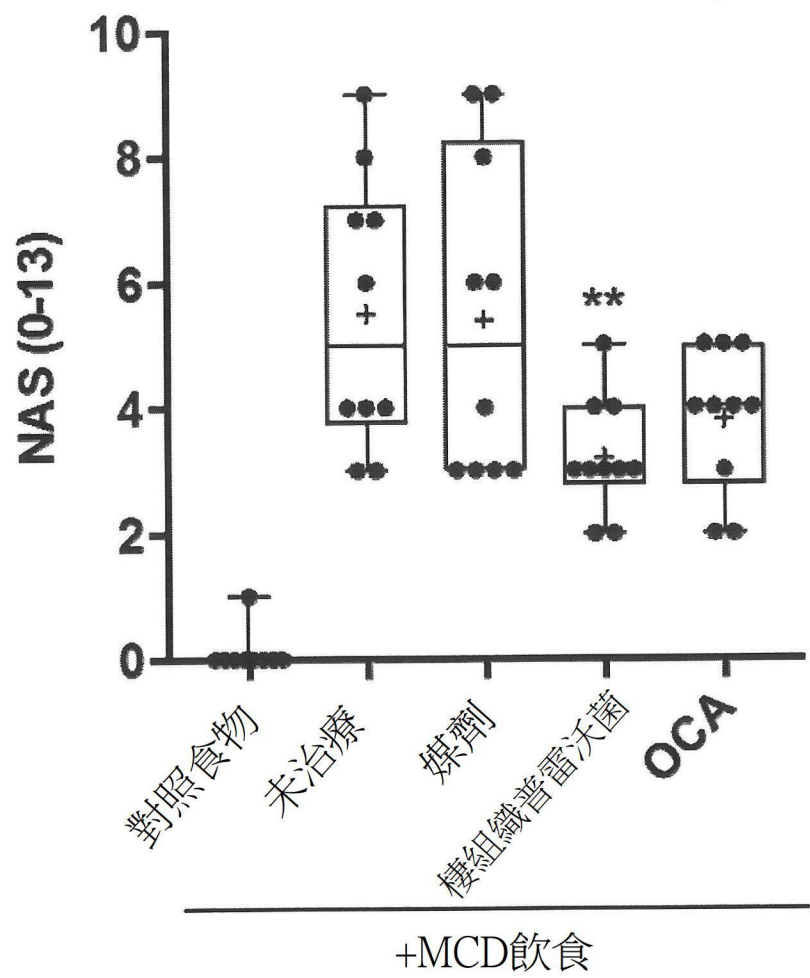


【圖3D】



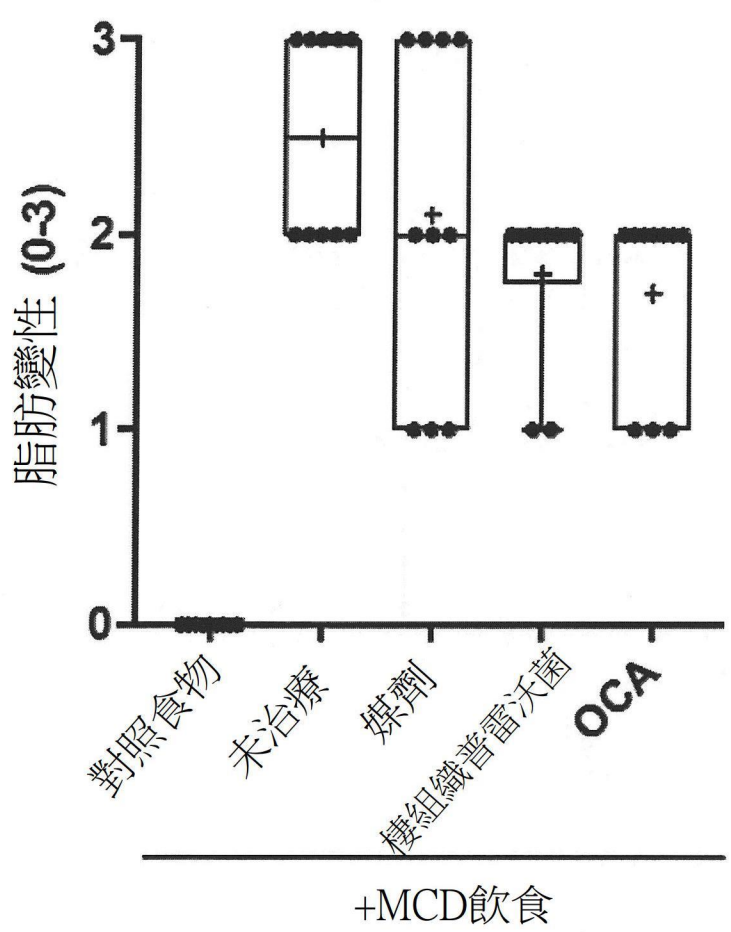
【圖3E】

NASH活動分數



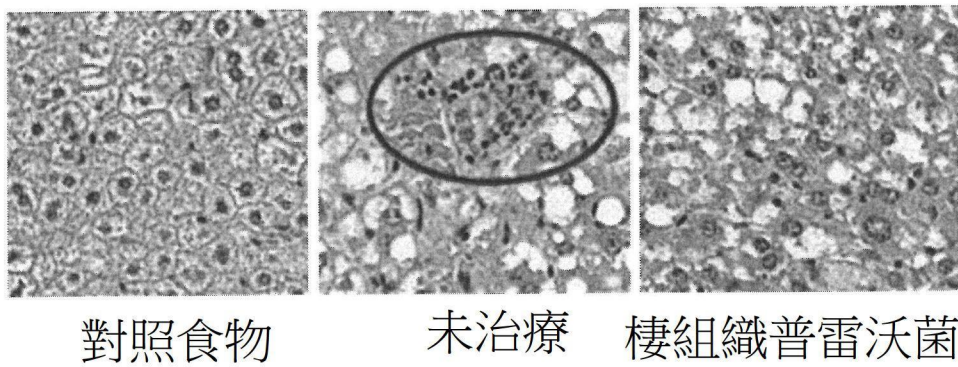
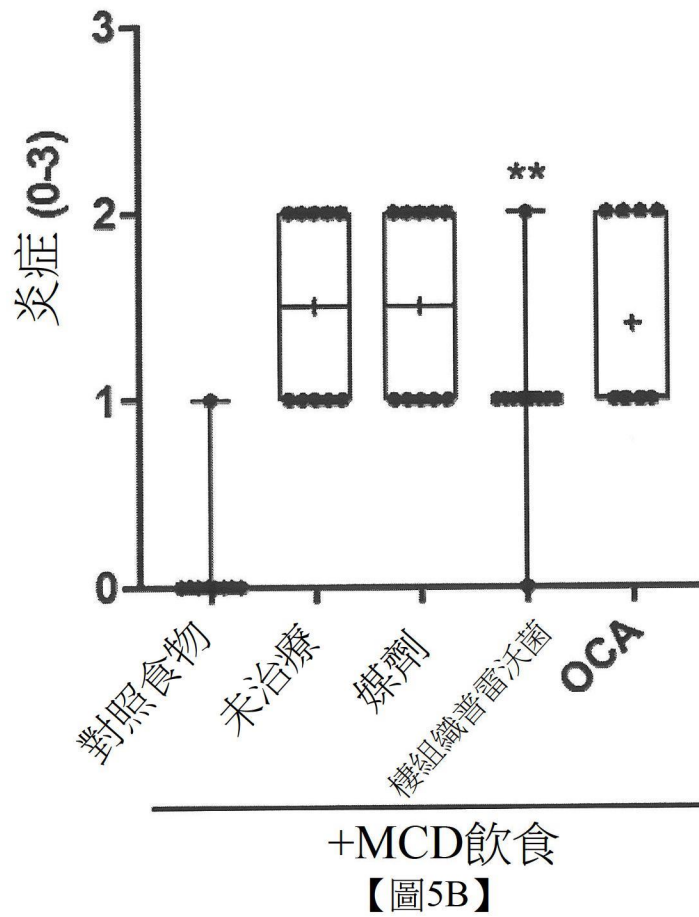
【圖4】

脂肪變性

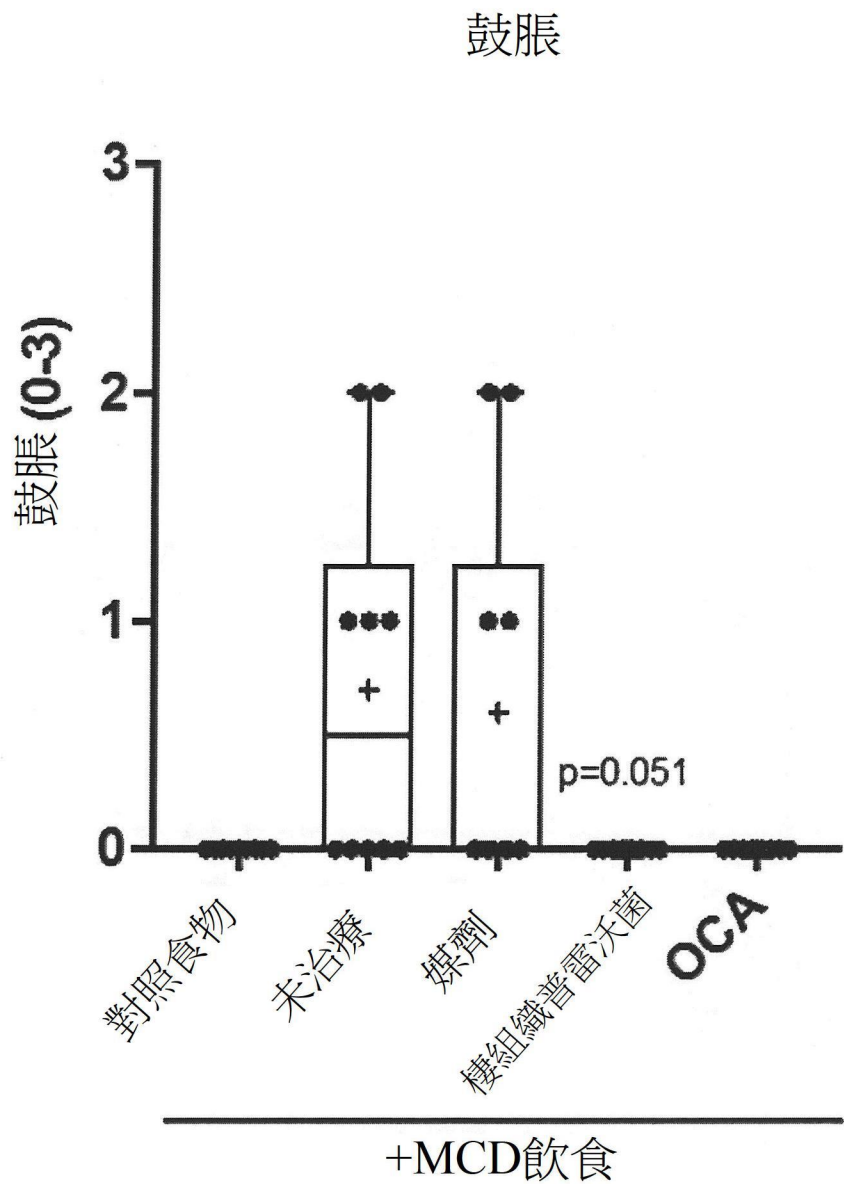


【圖5A】

炎症

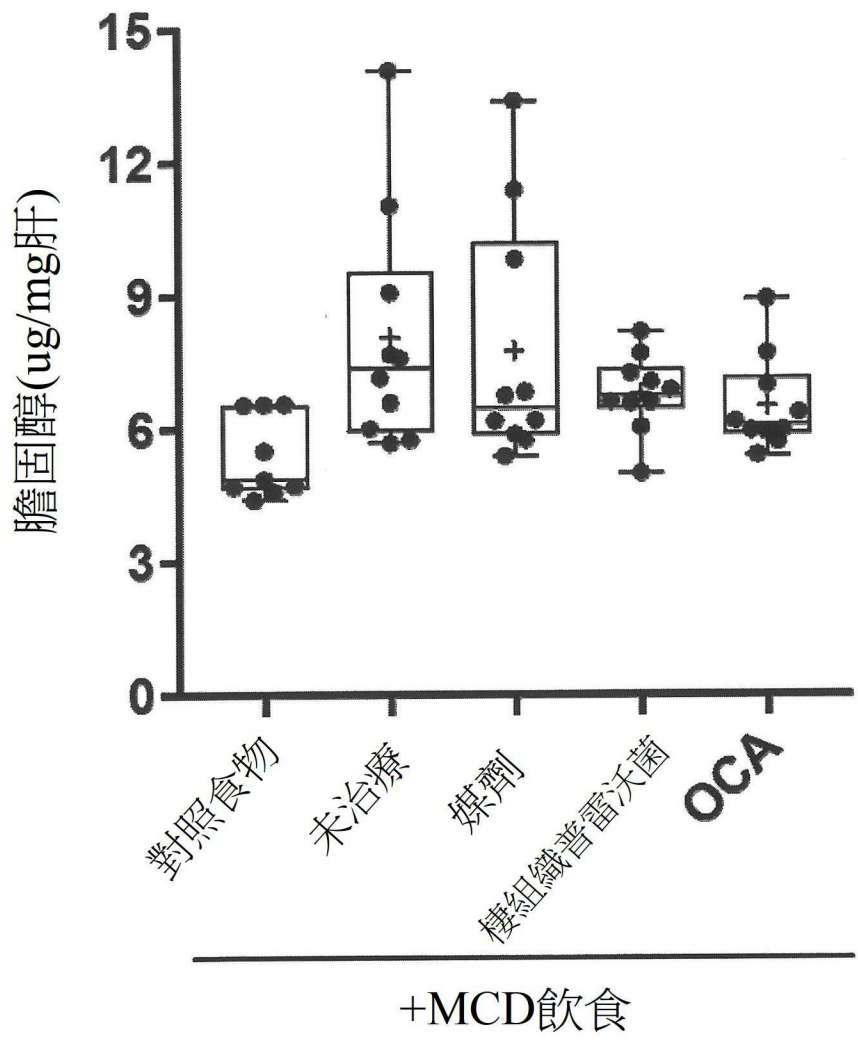


【圖5C】

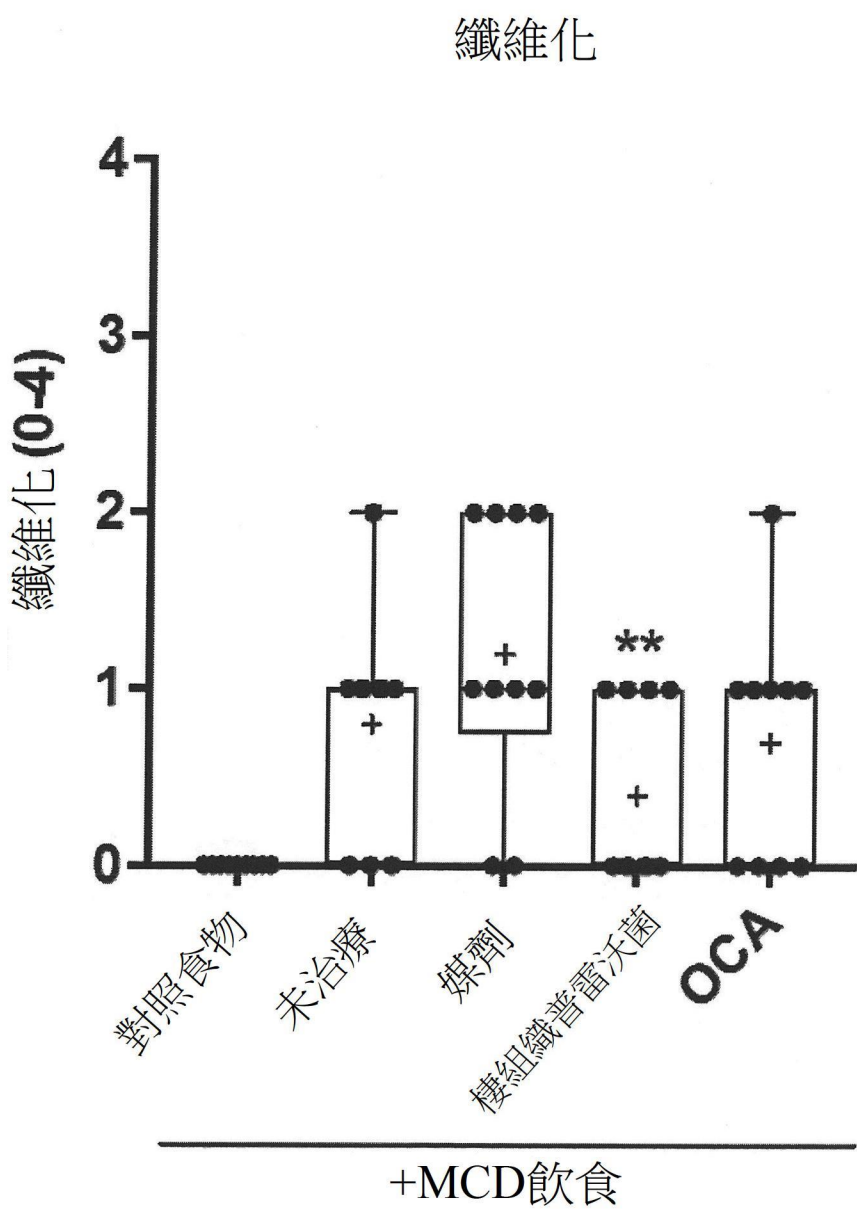


【圖5D】

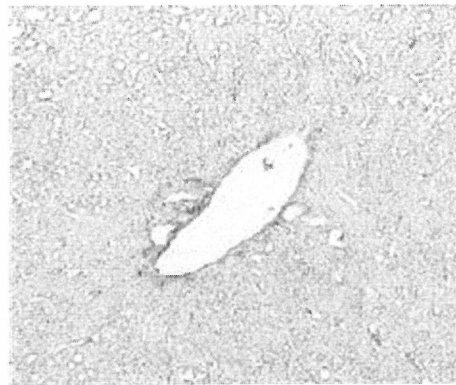
肝總膽固醇



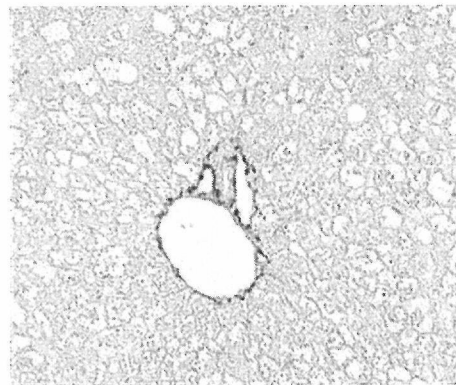
【圖6】



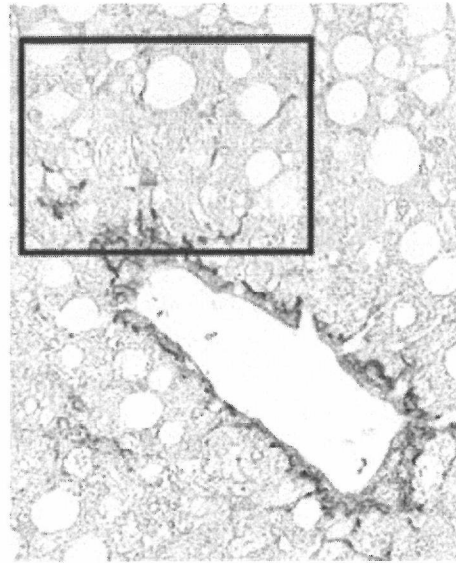
【圖7A】



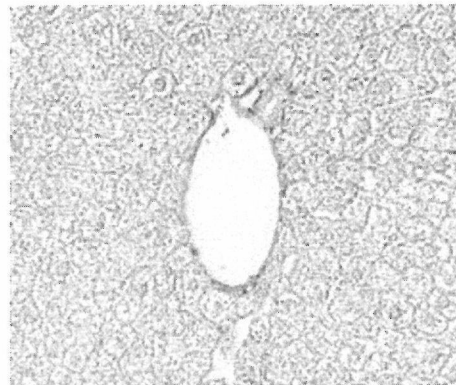
OCA



棲組織普雷沃菌

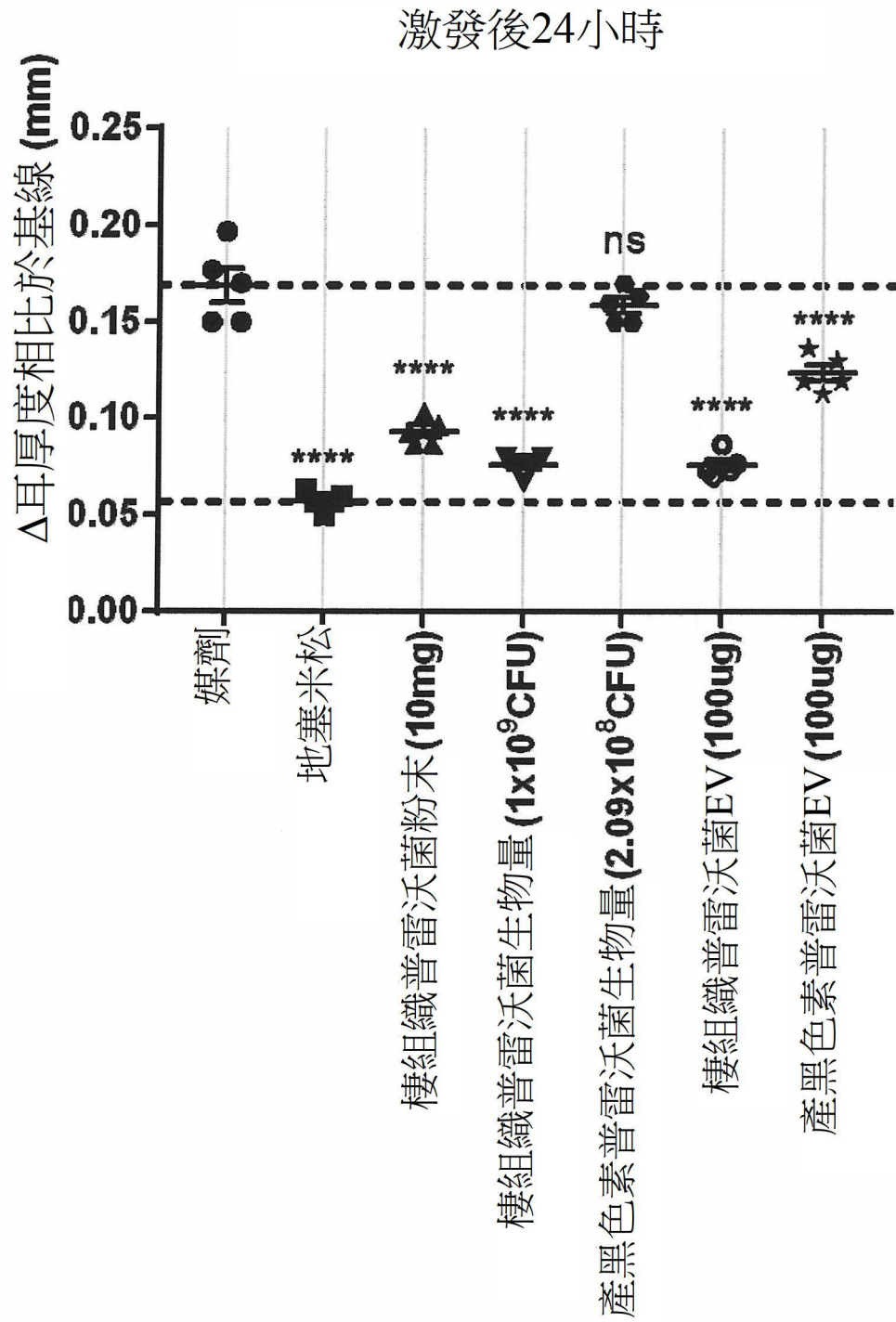


未治療
2分 (門靜脈周圍纖維化)

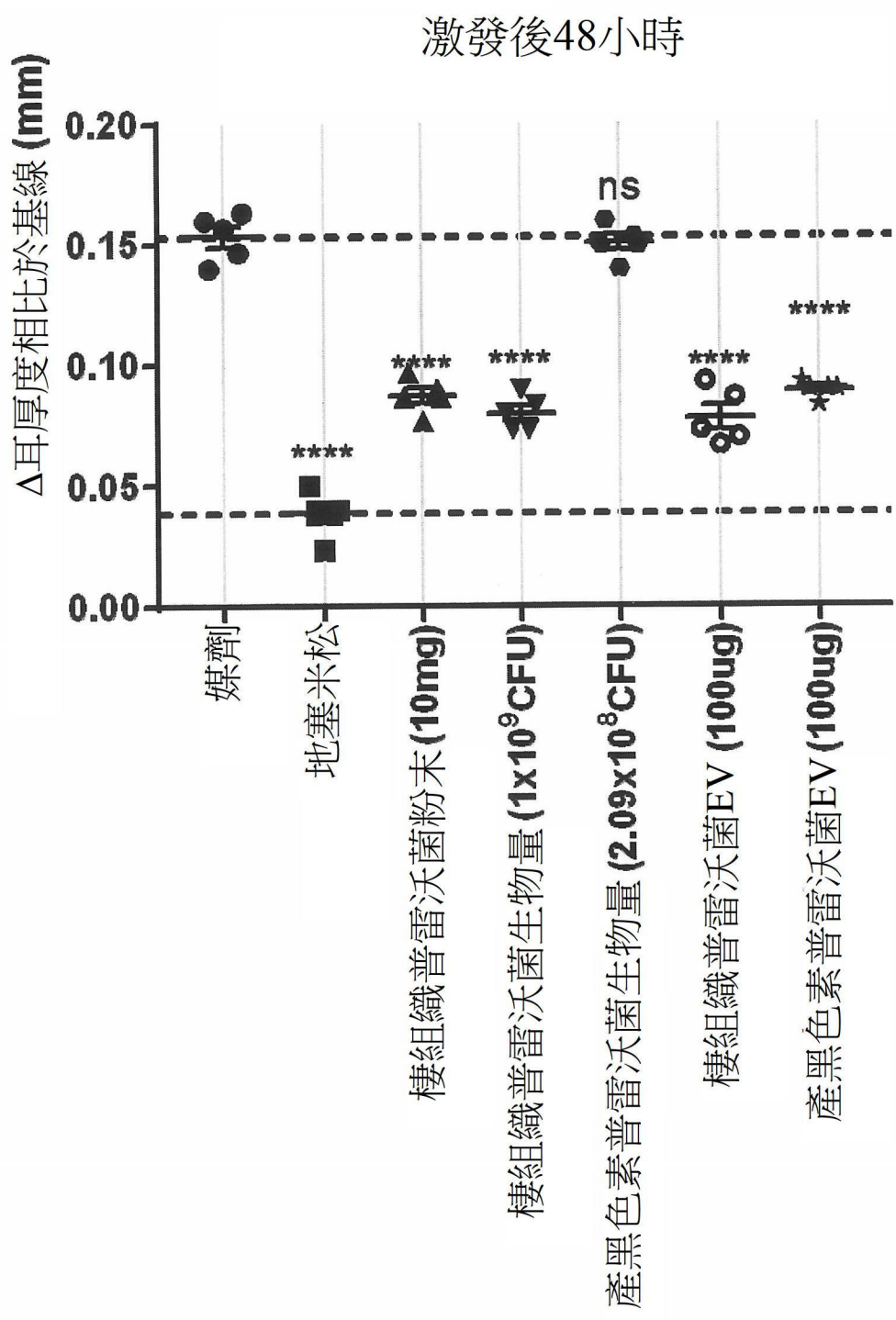


對照食物

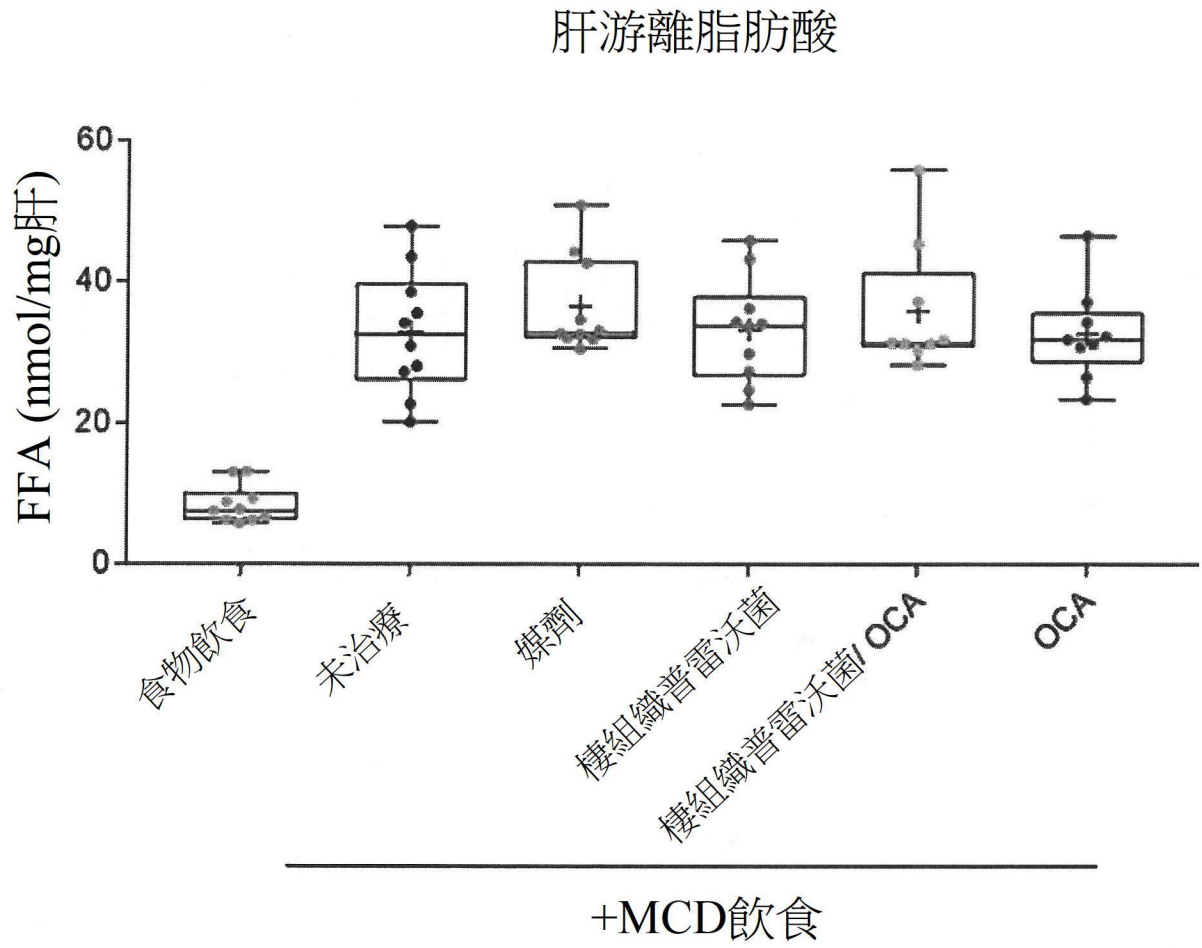
【圖7B】



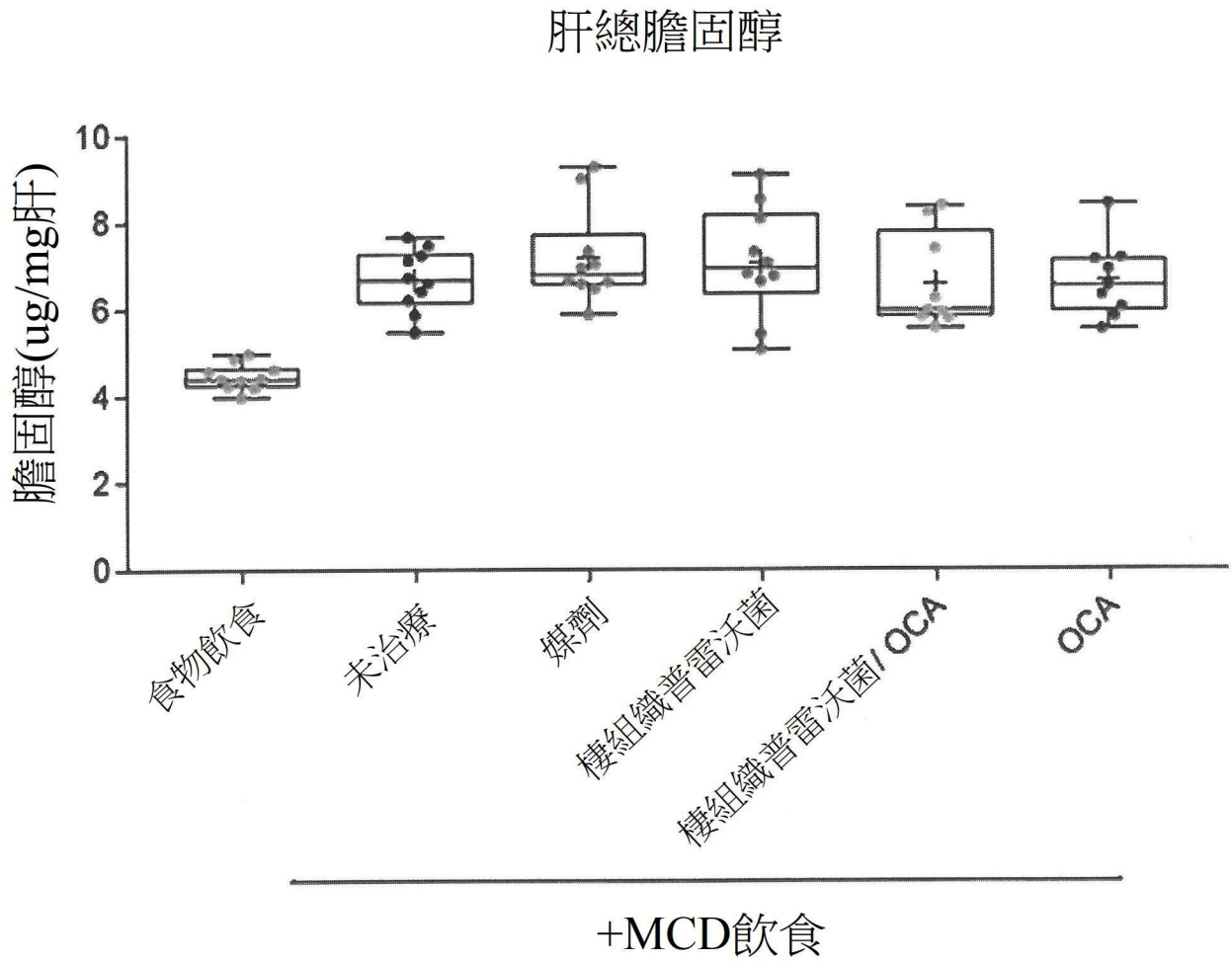
【圖8A】



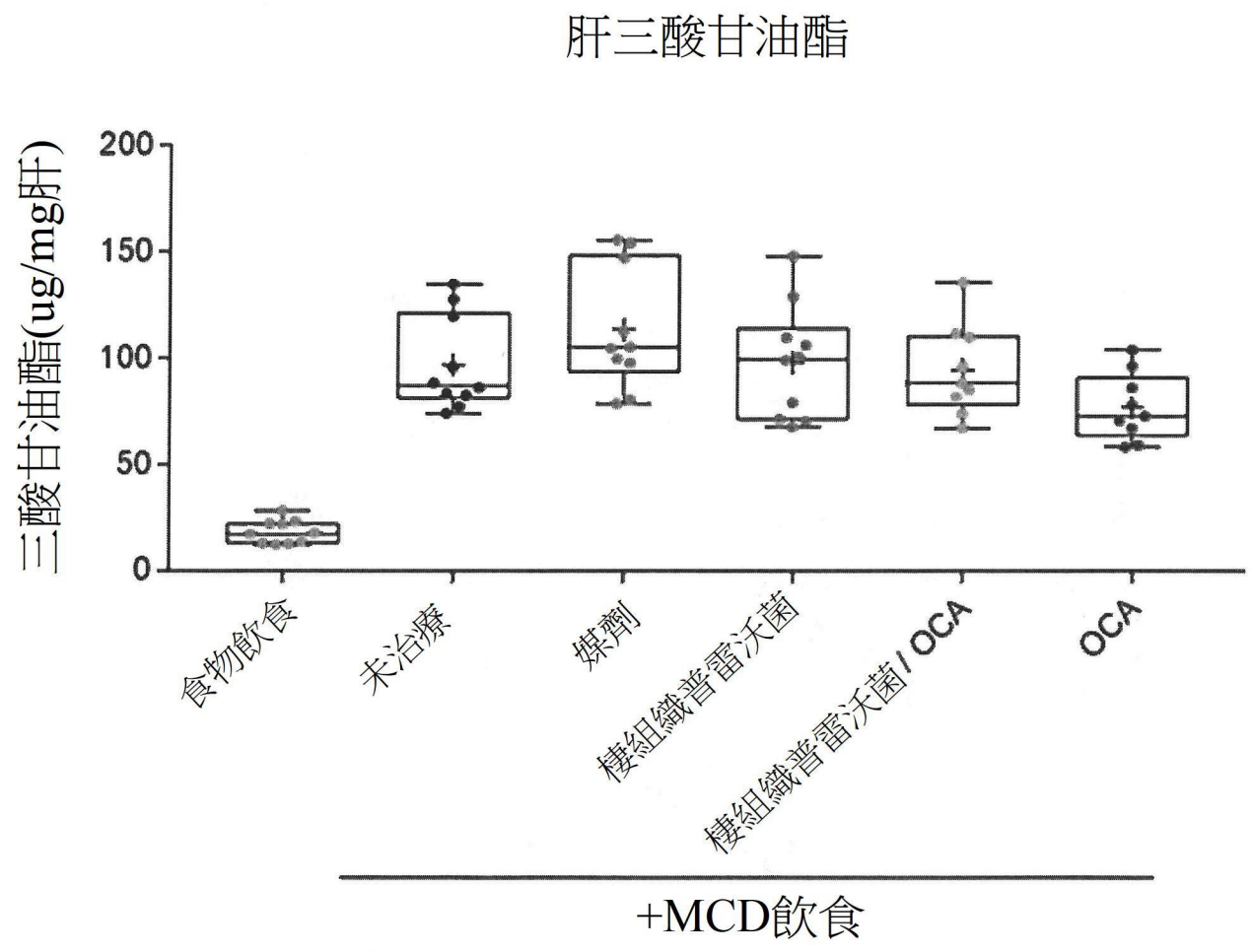
【圖8B】



【圖9A】

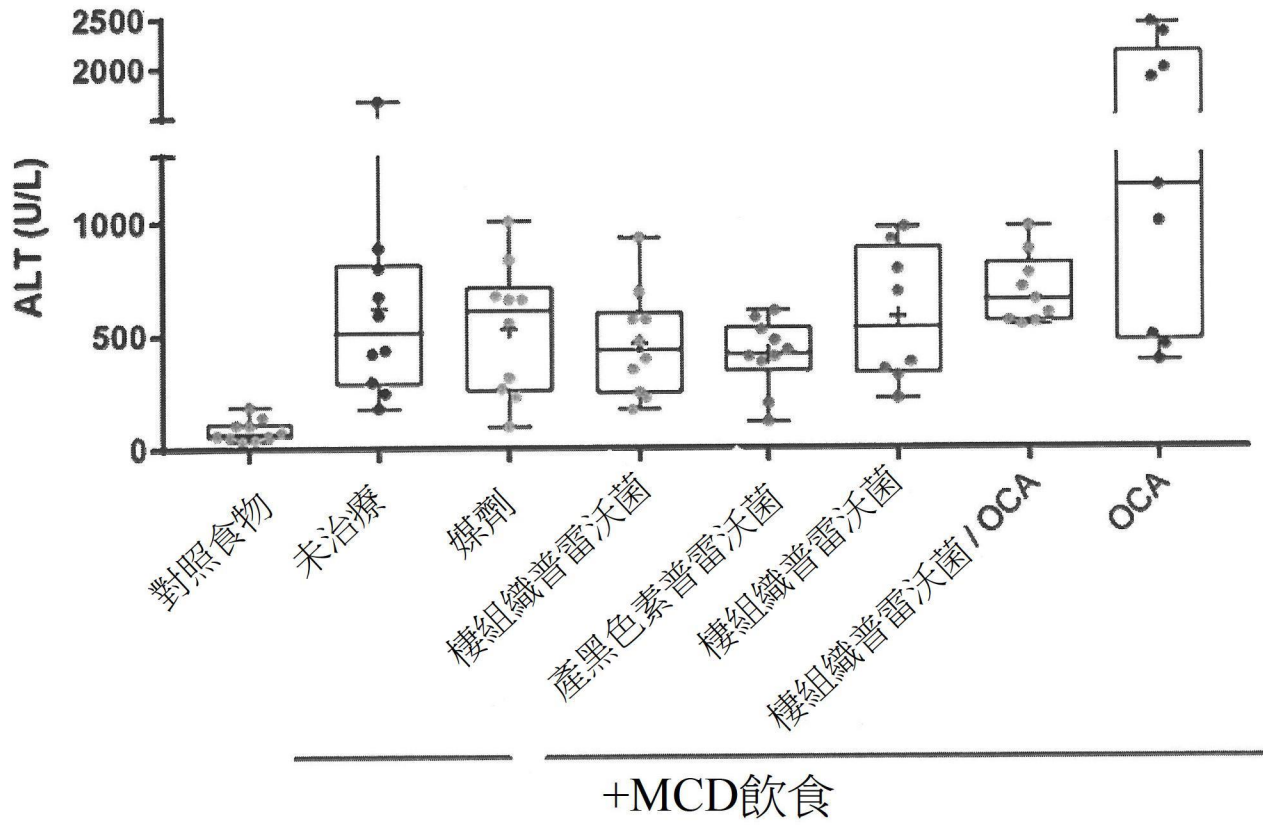


【圖9B】



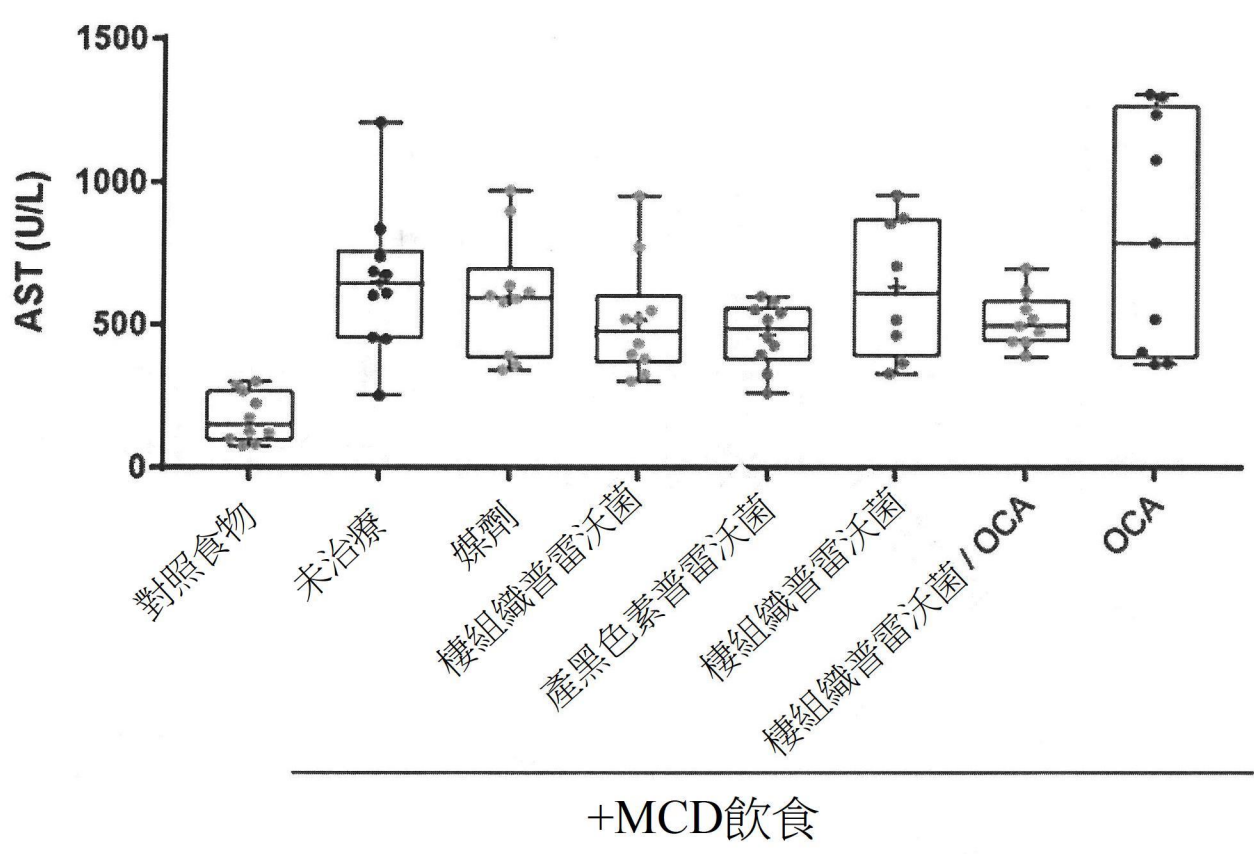
【圖9C】

丙胺酸胺基轉移酶



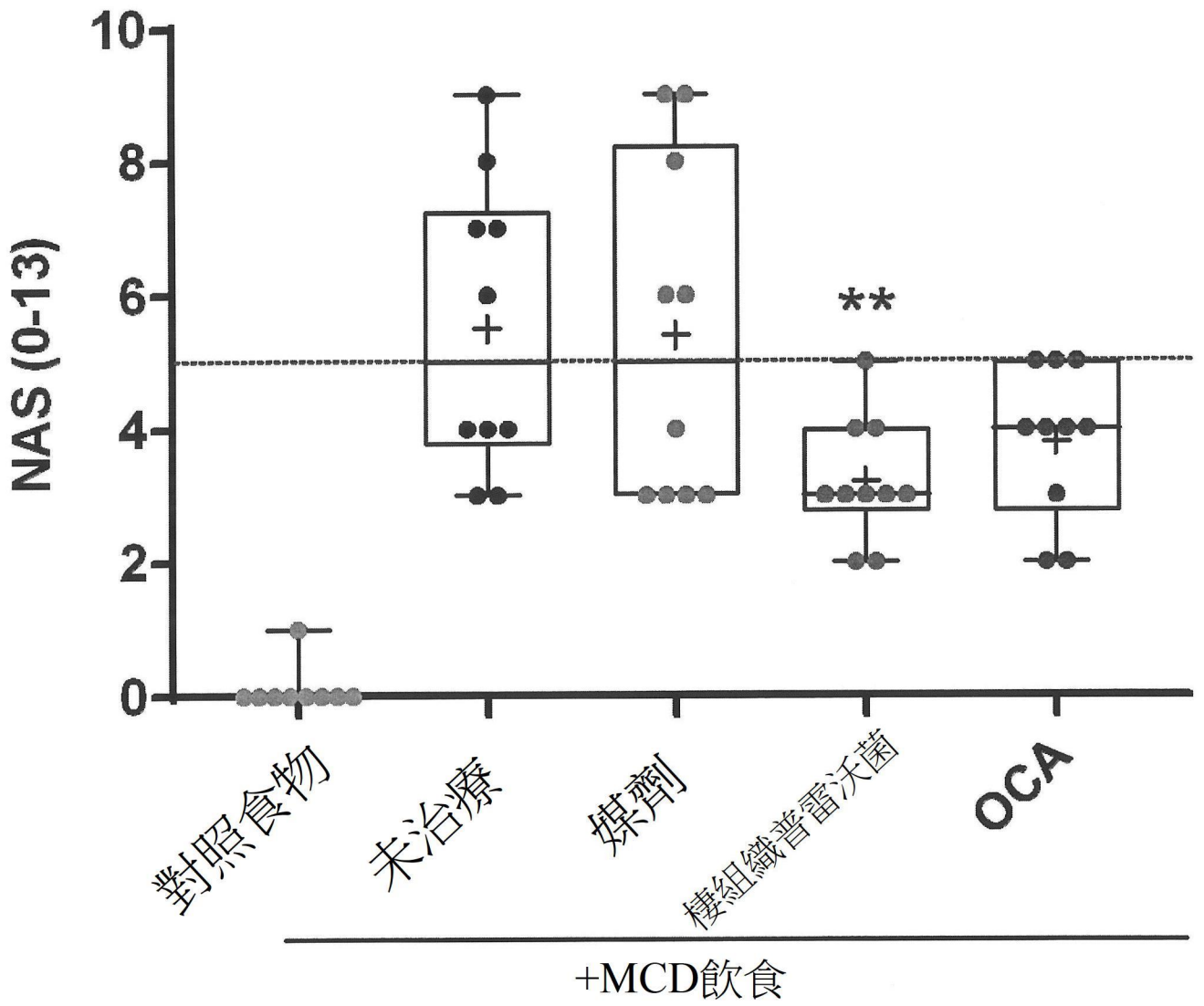
【圖9D】

天冬胺酸胺基轉移酶



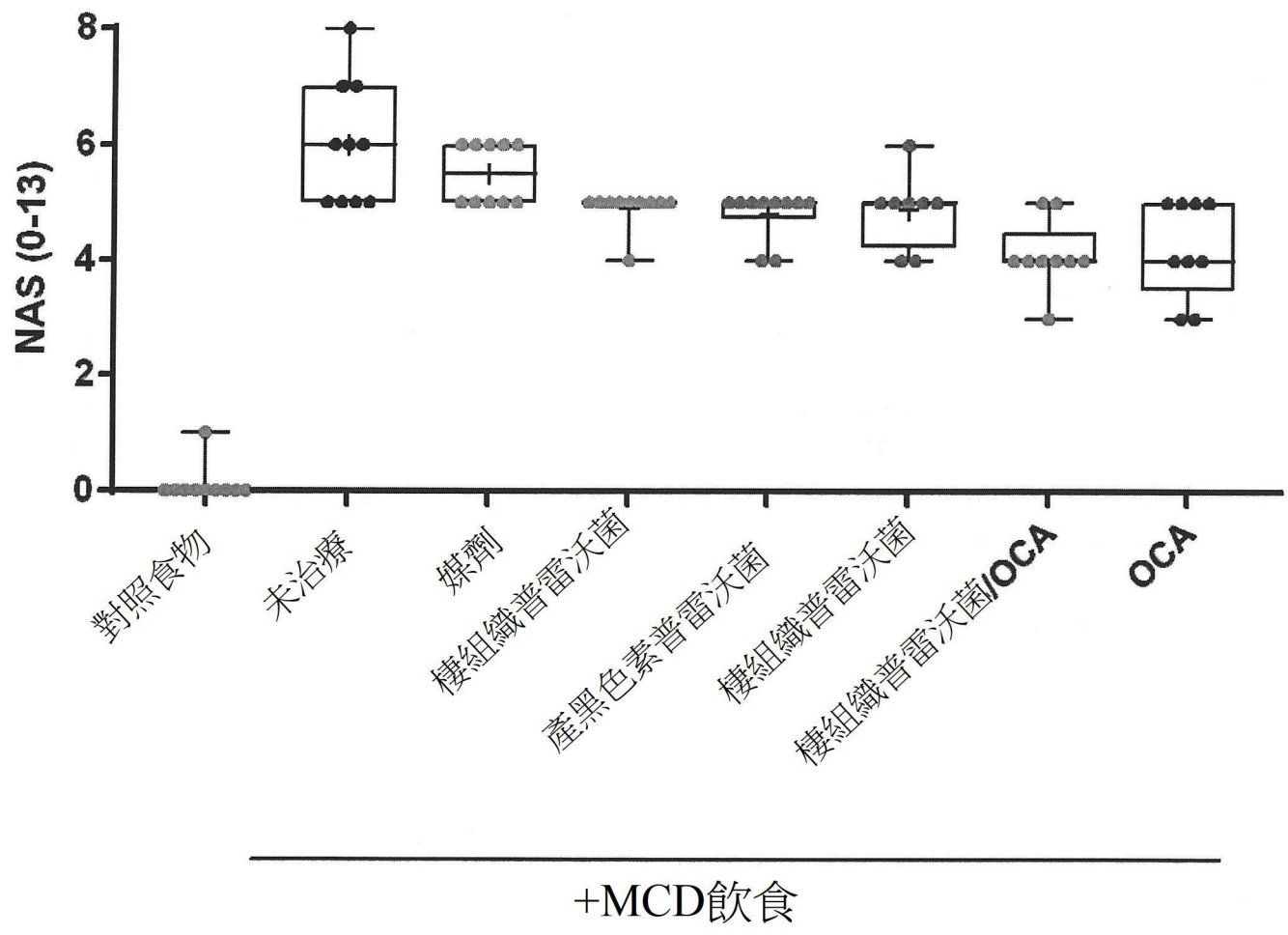
【圖9E】

NASH活動分數

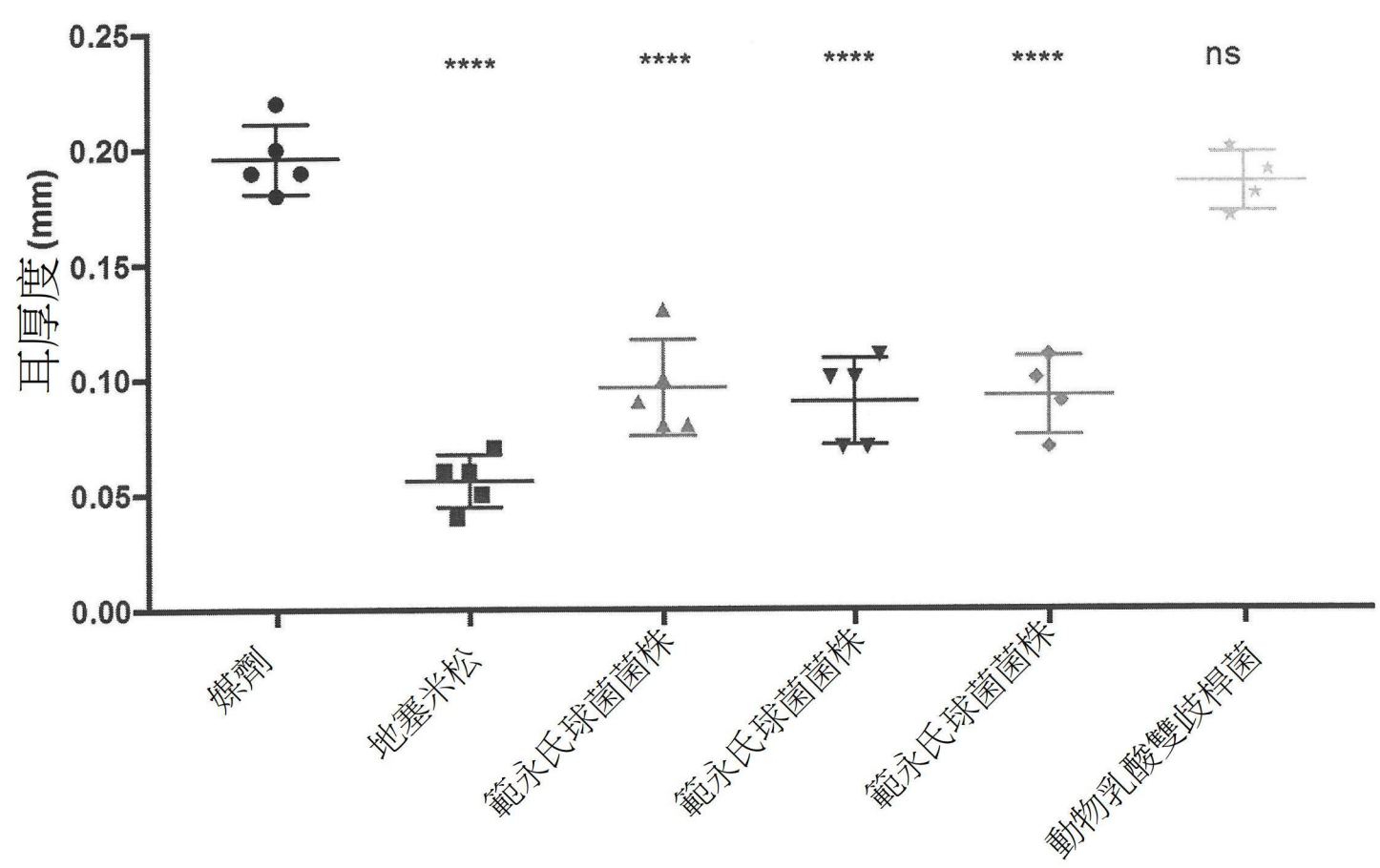


【圖10A】

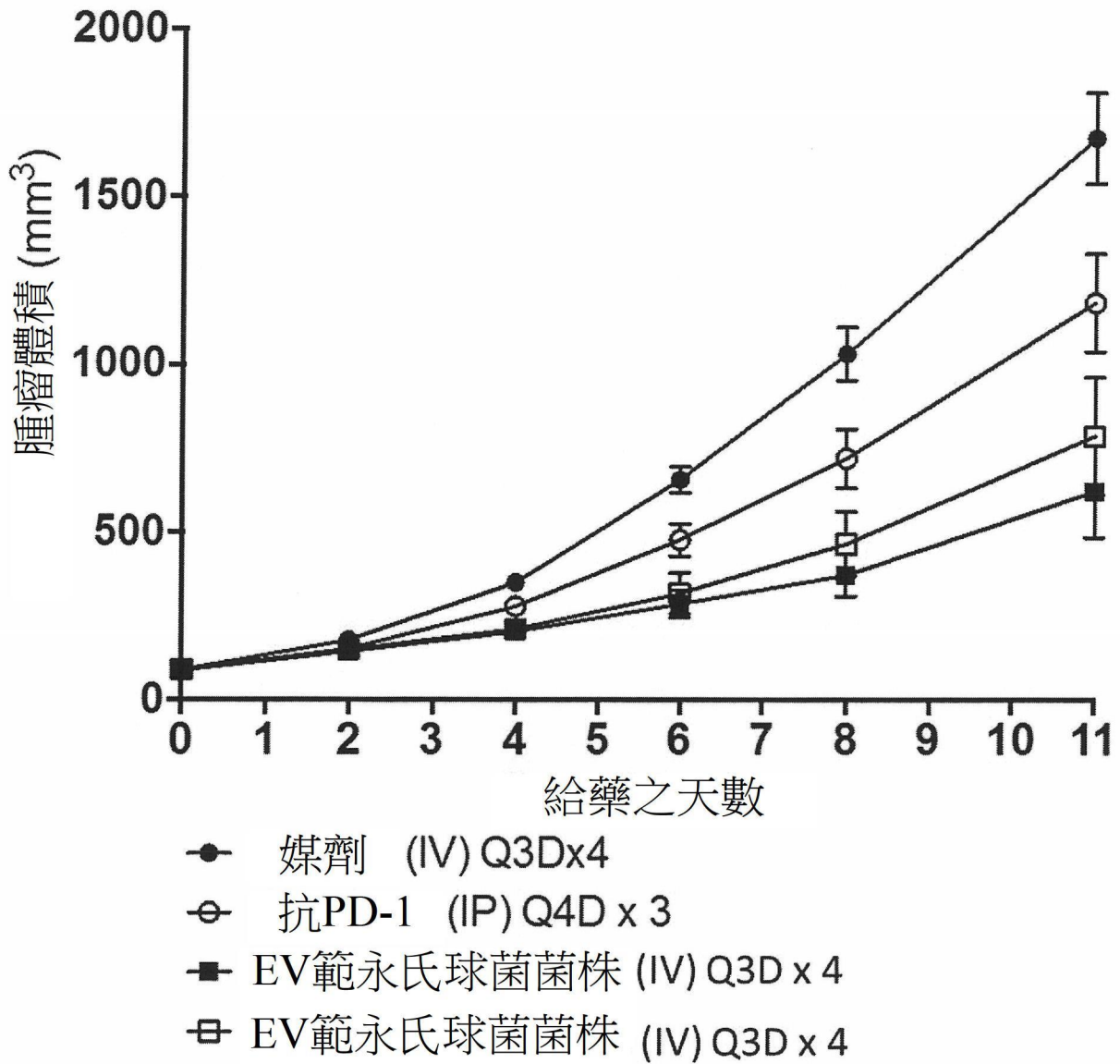
NASH活動分數



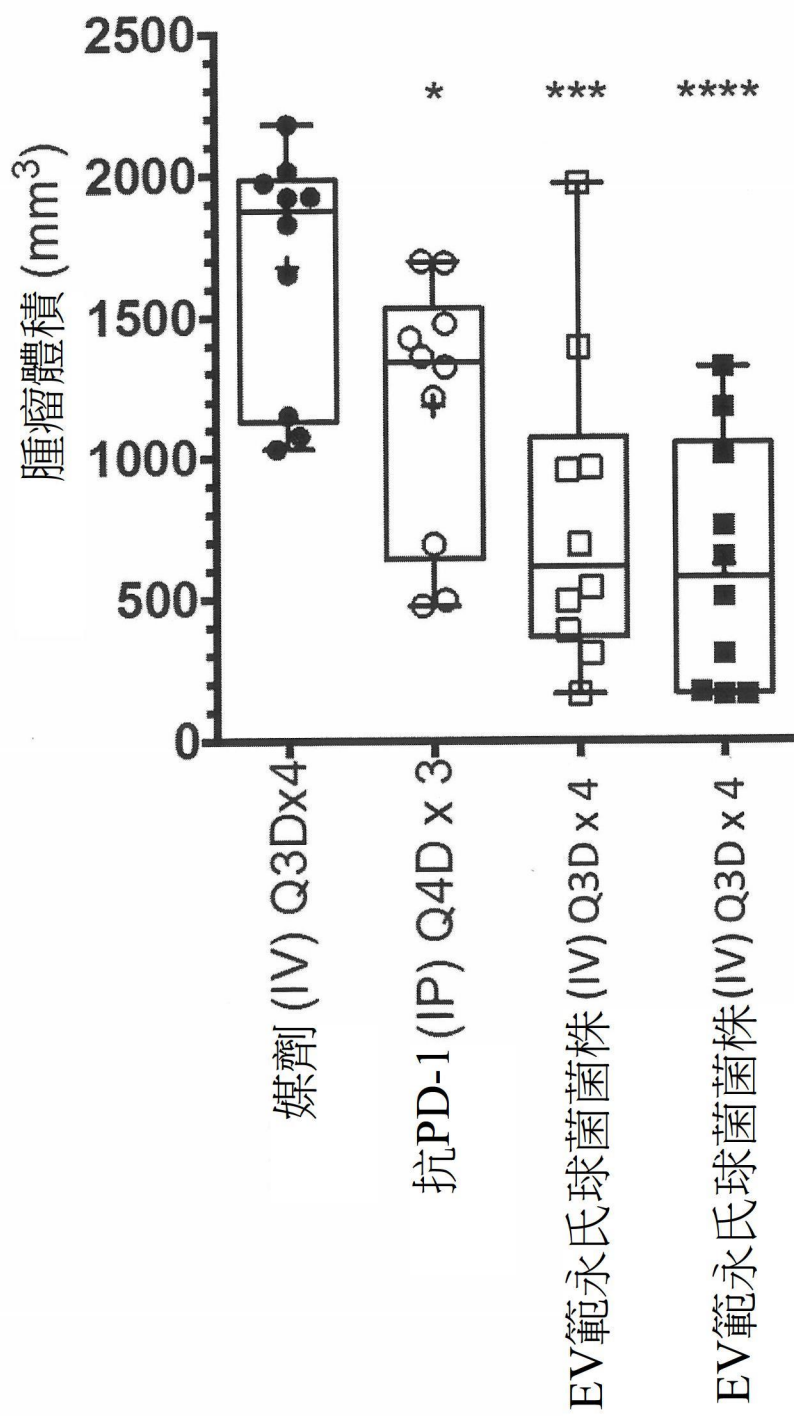
【圖10B】



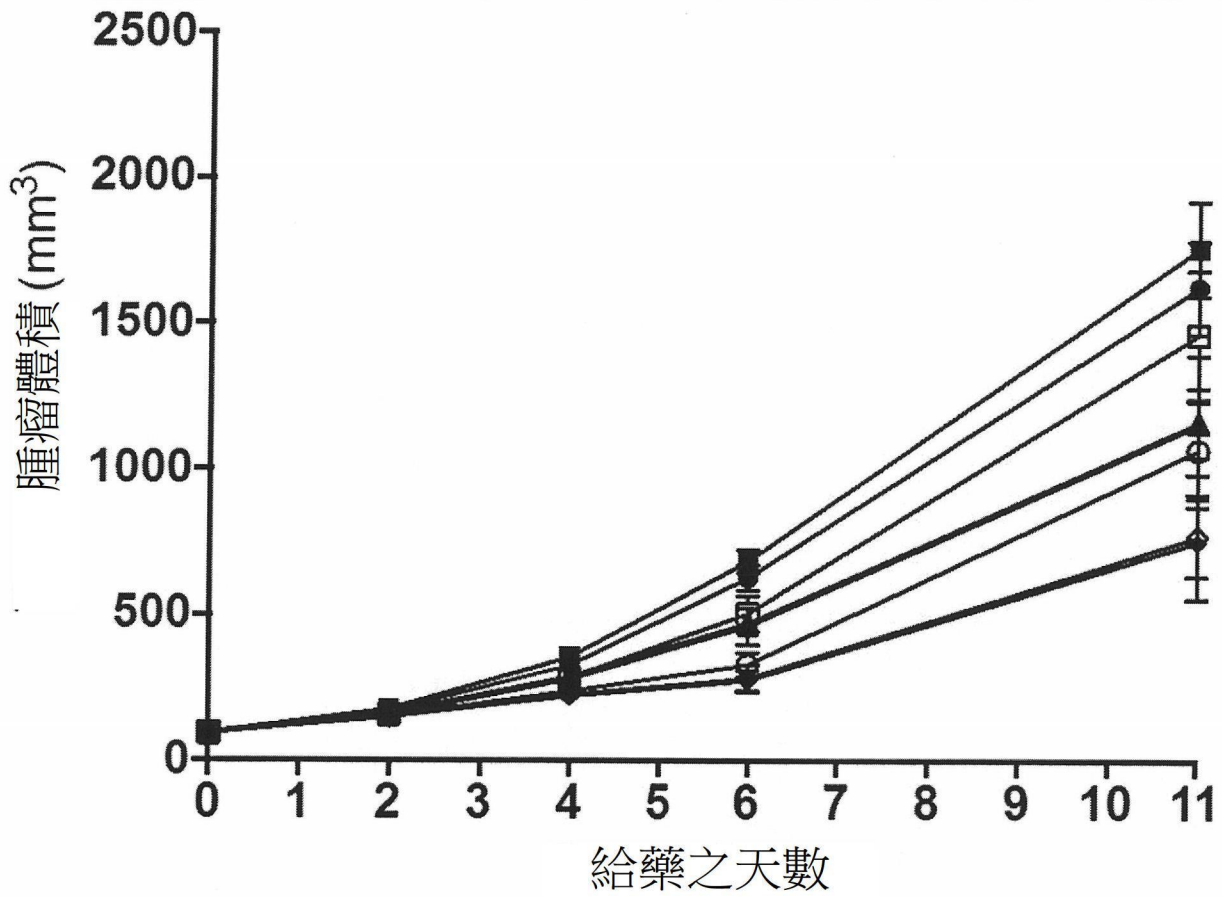
【圖11】



【圖12】

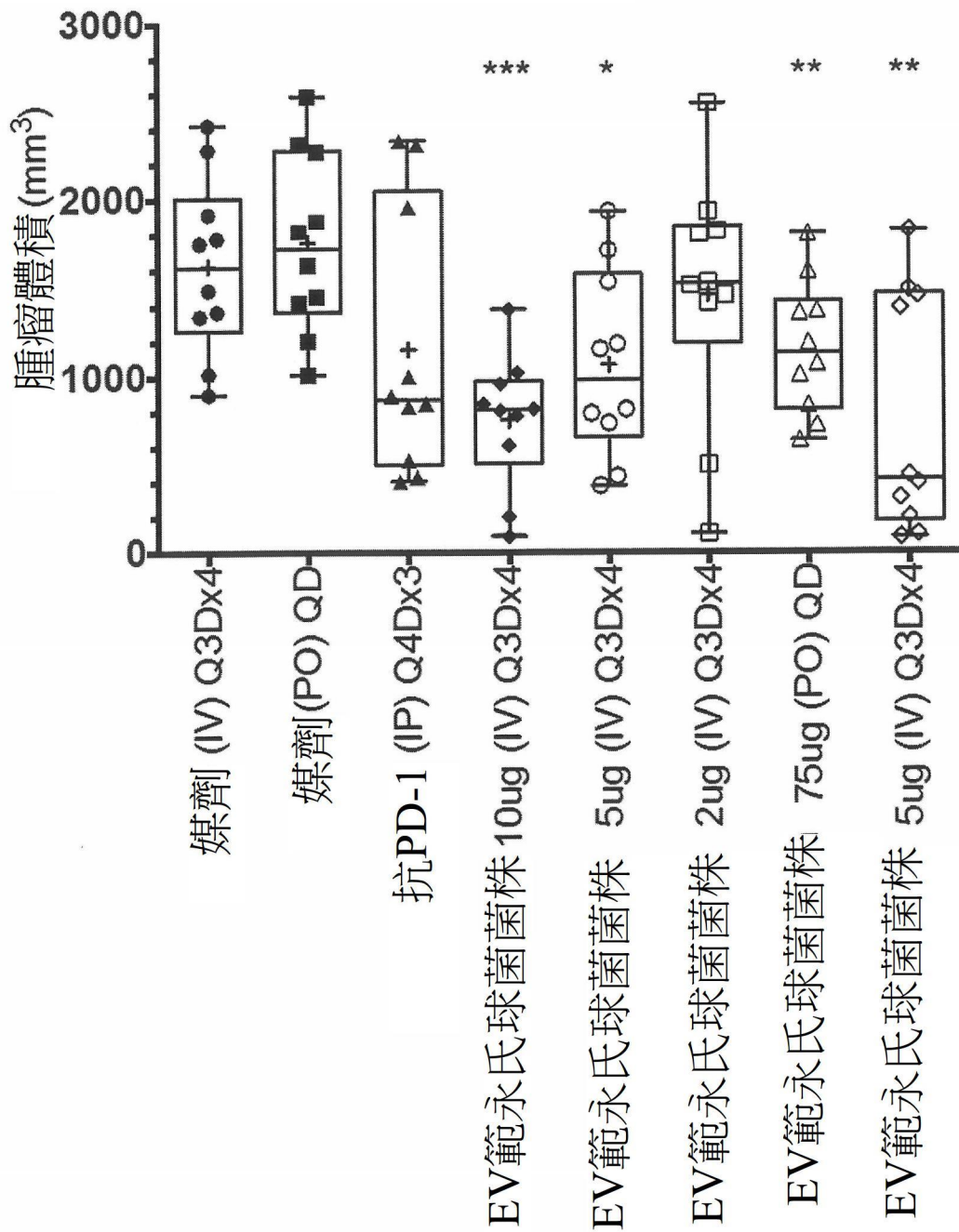


【圖13】



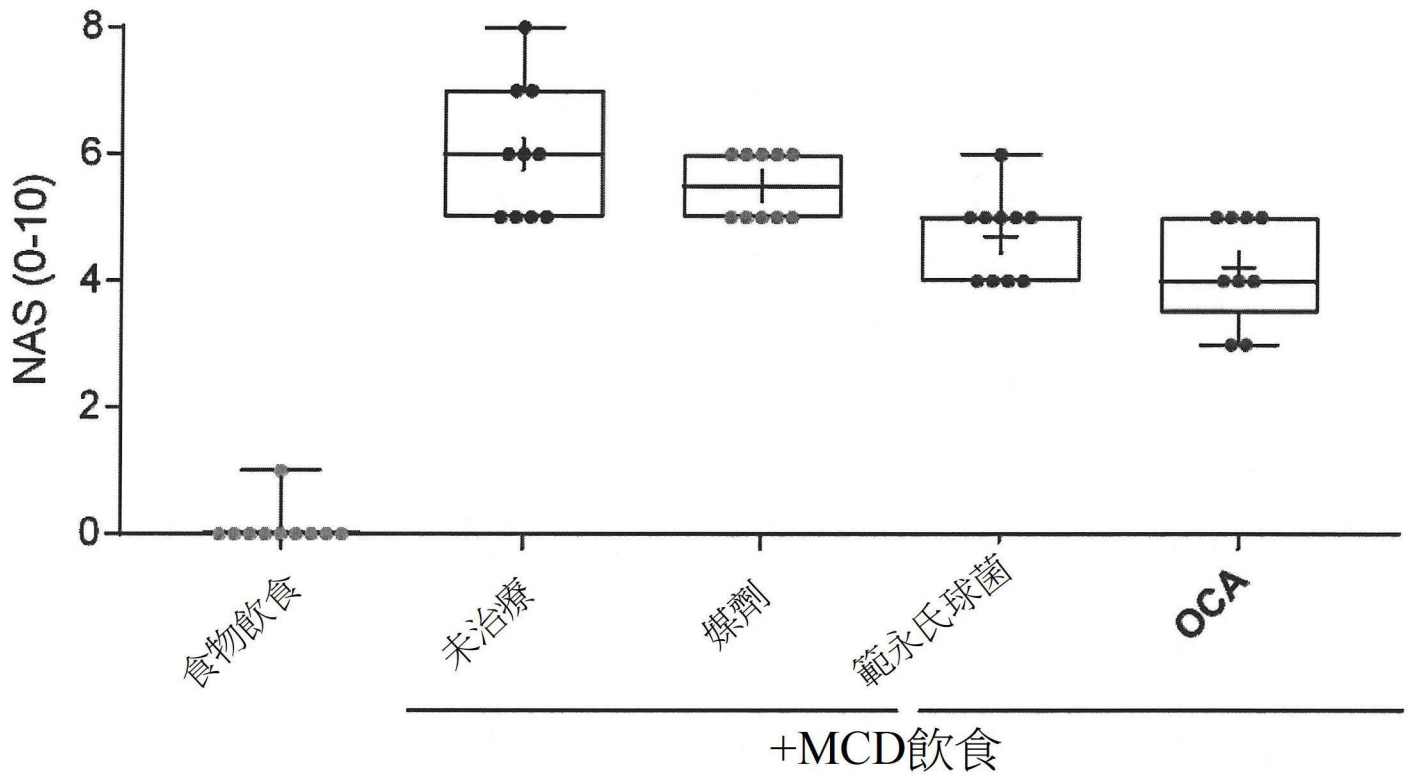
- 媒劑 (IV) Q3Dx4
- 媒劑 (PO) QD
- ▲ 抗PD-1 (IP) Q4Dx3
- ◆ EV範永氏球菌菌株 10ug (IV) Q3Dx4
- ⊖ EV範永氏球菌菌株 5ug (IV) Q3Dx4
- ⊕ EV範永氏球菌菌株 2ug (IV) Q3Dx4
- △ EV範永氏球菌菌株 75ug (PO) QD
- ◇ EV範永氏球菌菌株 5ug (IV) Q3Dx4

【圖14】

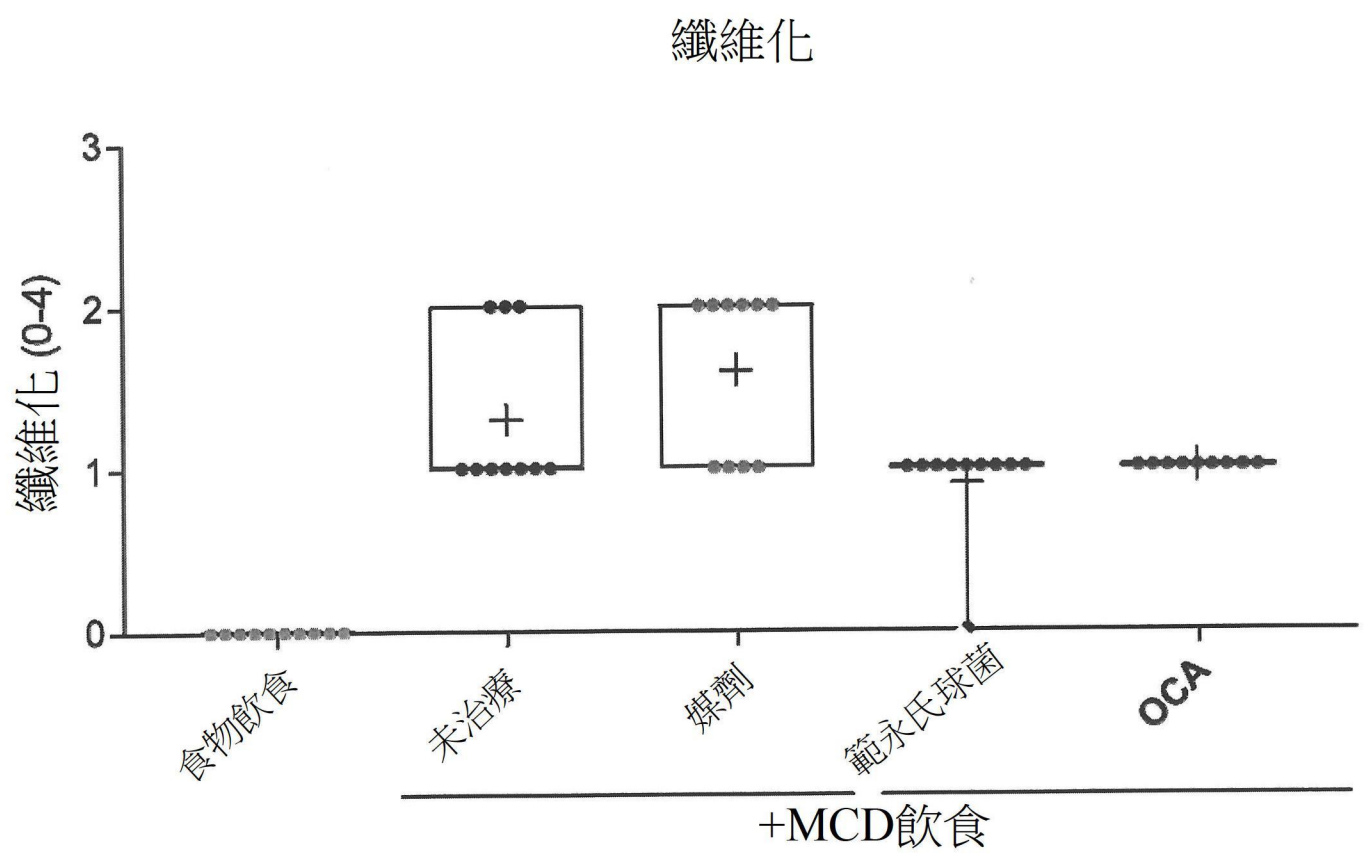


【圖15】

NASH活動分數

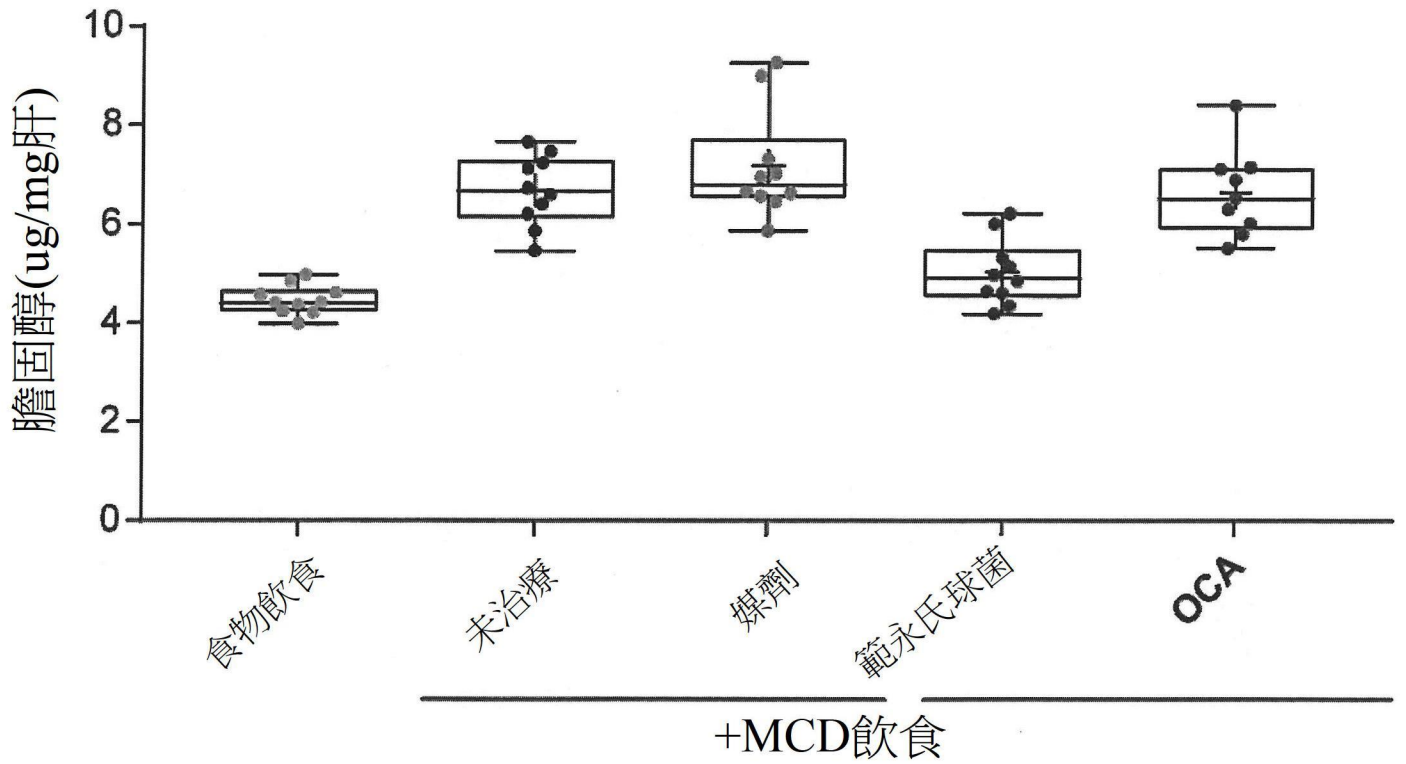


【圖16】



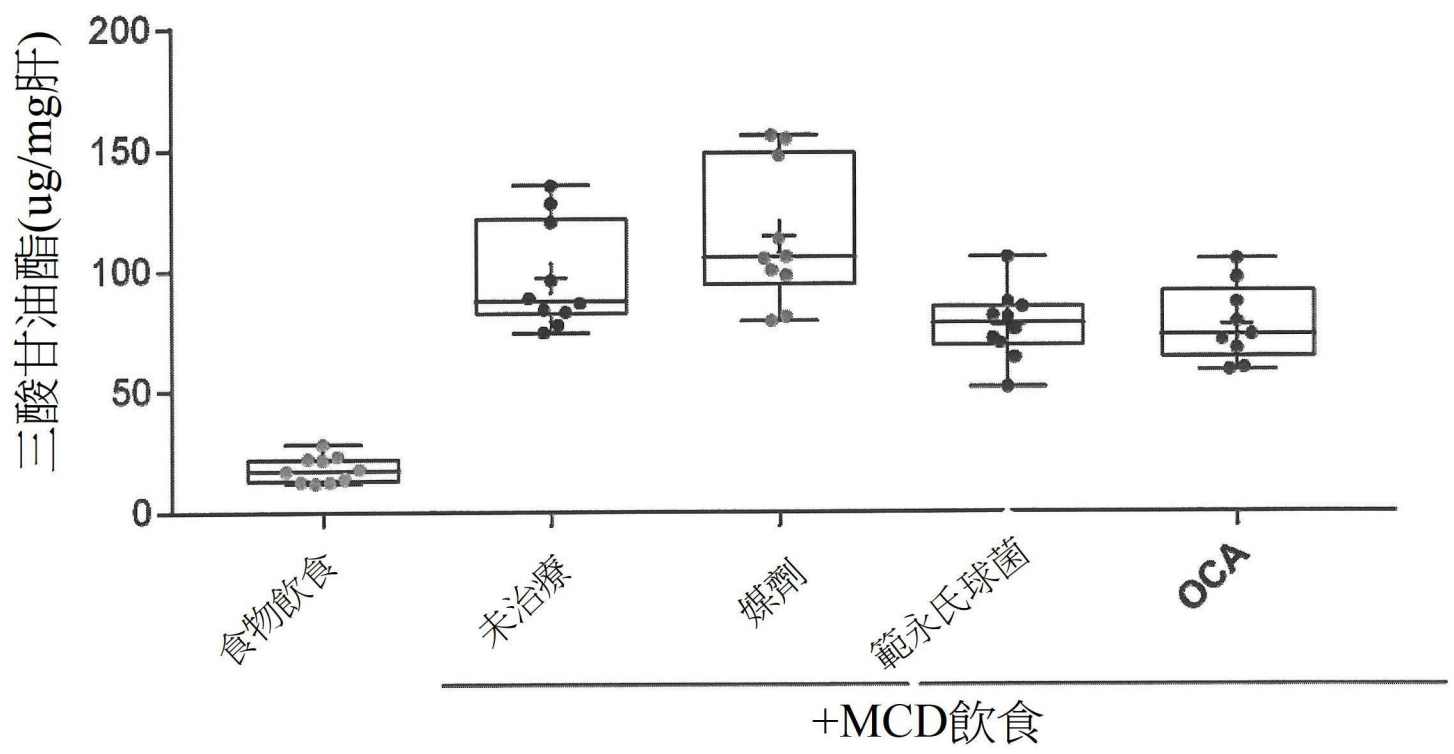
【圖17】

肝總膽固醇

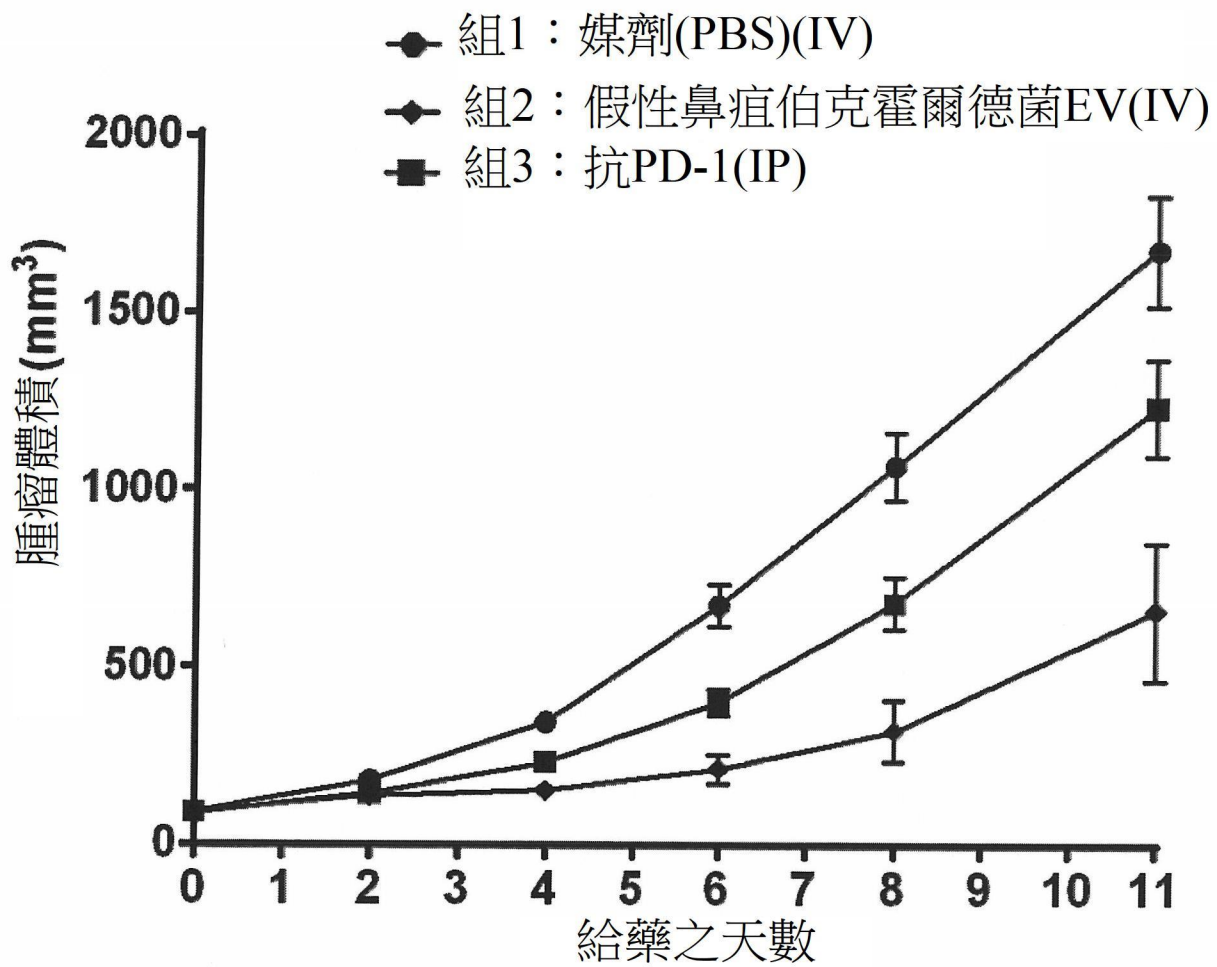


【圖18】

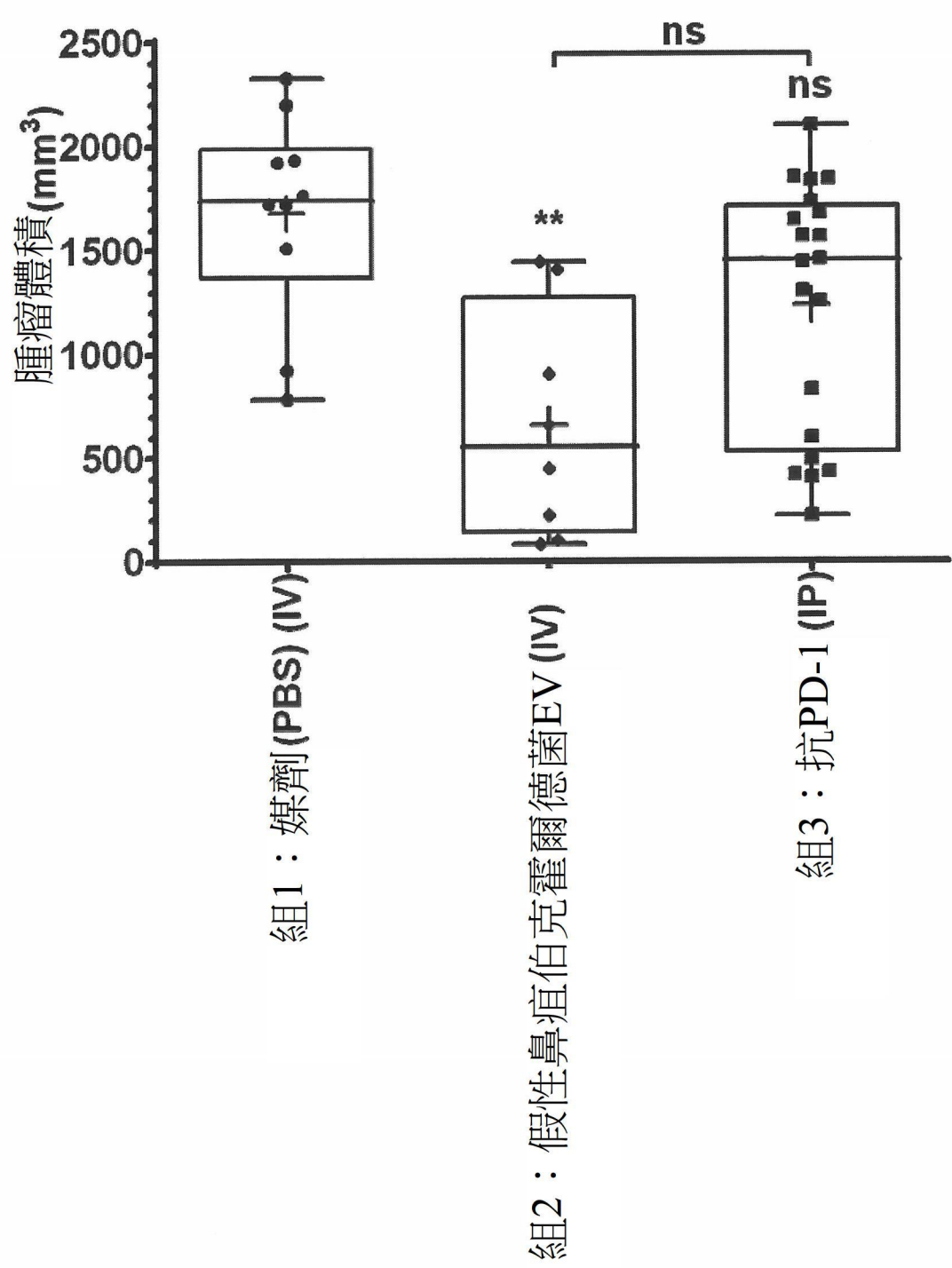
肝三酸甘油酯



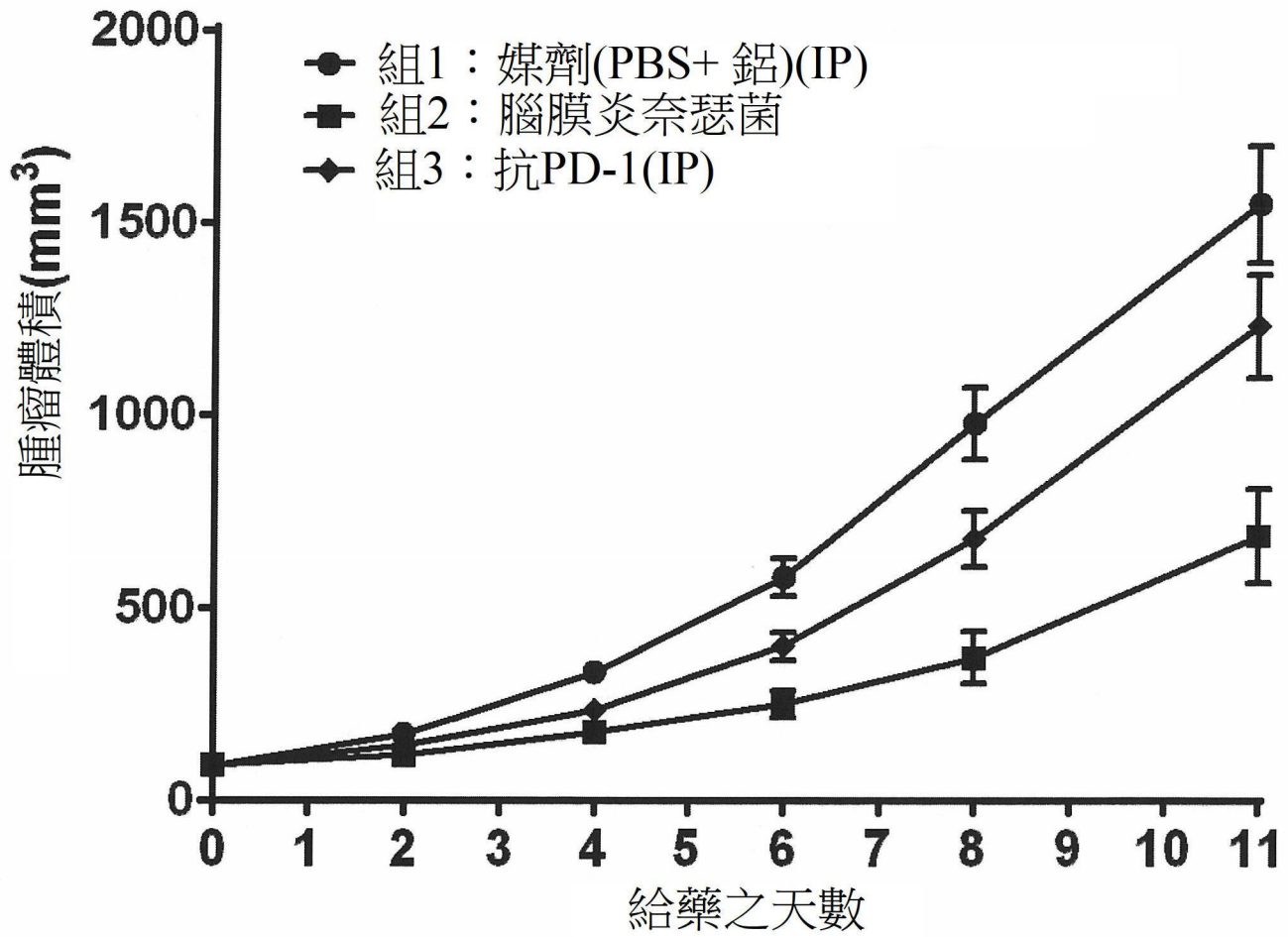
【圖19】



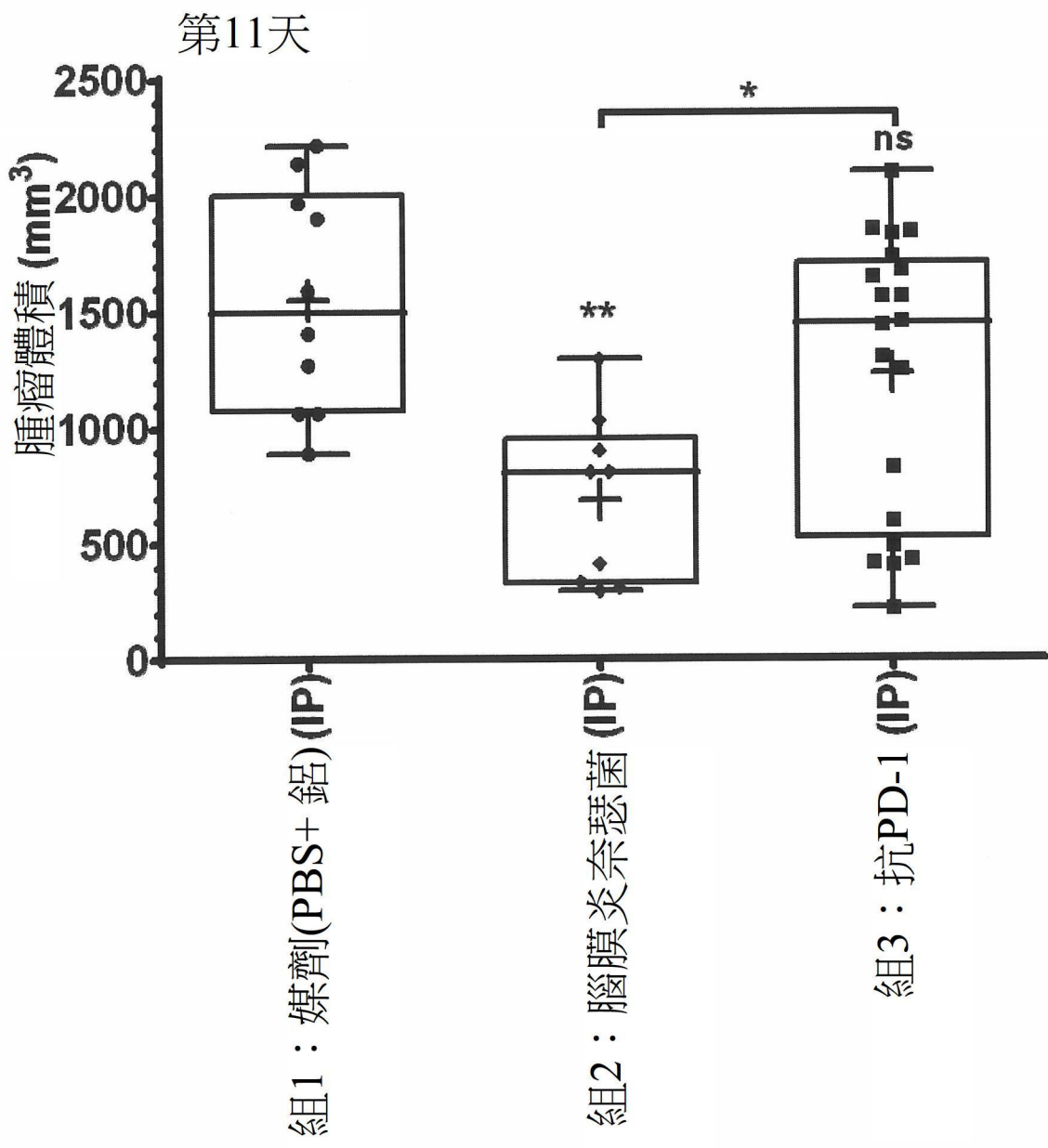
【圖20】



【圖21】



【圖22】



【圖23】