



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110520141 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201880008477.0

(72)发明人 M·摩西 H·索科尔

(22)申请日 2018.01.26

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(30)优先权数据

1750629 2017.01.26 FR

代理人 张力更

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.25

(51)Int.Cl.

A61K 35/74(2015.01)

A61P 37/08(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/051941 2018.01.26

A61P 31/04(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/138251 FR 2018.08.02

(71)申请人 索邦大学

地址 法国巴黎

申请人 国家研究中心

国立健康与医学研究所

公共救济事业局-巴黎医院

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

用于治疗接受造血干细胞移植的患者的粪便微生物群

(57)摘要

本发明涉及粪便微生物群样品,其用于在预防和/或治疗由造血干细胞(CSH)同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症中使用,或用于治疗受者患者的癌症,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞来自同一供者受试者,或者所述粪便微生物群样品在CSH移植之前被施用。

1. 粪便微生物群样品,用于在预防和/或治疗由受者患者的造血干细胞(CSH)同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症中使用,所述粪便微生物群样品在CSH移植之前被施用。

2. 根据权利要求1所述的用于使用的粪便微生物群样品,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞来自同一供者受试者。

3. 粪便微生物群样品,用于在预防和/或治疗由受者患者的造血干细胞(CSH)同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症中使用,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞来自同一供者受试者。

根据权利要求3所述的用于使用的粪便微生物群样品,其通过在所述CSH移植之后将该样品移种到受者患者的消化道中,优选通过在所述CSH移植之后1周-2年,任选地以重复的方式,将该样品移种到受者患者的消化道中来实现。

4. 根据权利要求1-3之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,其通过在所述CSH移植之前将该样品移种到受者患者的消化道中,通过在所述CSH移植之前1周-12个月、优选1周-8个月、优选1周-6个月、更优选1周-4个月、优选1周-3个月或者1-8周,任选地以重复的方式,将该样品移种到受者患者的消化道中来实现。

5. 根据权利要求1-4之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,用于预防和/或治疗梭菌或肠球菌的感染,尤其是抗万古霉素的肠球菌(ERV)的感染。

6. 根据权利要求1-5之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,用于预防和/或治疗GVH病。

7. 根据权利要求1-6之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,其中所述受者患者患有癌症。

8. 粪便微生物群样品,用于在治疗患有癌症并且在接受或已经接受造血干细胞同种异体移植的受者患者的癌症中使用,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞来自同一供者受试者。

9. 根据权利要求8所述的用于使用的粪便微生物群样品,其通过在所述CSH移植之前、优选在所述CSH移植之前1周-12个月、优选1周-8个月、优选1周-6个月、更优选1周-4个月、优选1周-3个月或者1周-8周,任选地以重复的方式,将该样品移种到受者患者的消化道中来实现。

10. 根据权利要求8所述的用于使用的粪便微生物群样品,其通过在所述CSH移植之后将该样品移种到受者患者的消化道中,优选通过在所述CSH移植之后1周-2年,任选地以重复的方式,将该样品移种到受者患者的消化道中来实现。

11. 根据权利要求1-10之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,其中所述受者患者患有恶性血液病。

12. 根据权利要求1-11之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,所述样品能够通过解冻由以下方式获得:i)混合供者受试者的粪便样品与包含冷冻保护剂和/或填充剂的盐水水溶液,之后任选地为ii)过滤,之后iii)冷冻以用于保存,混合和冷冻的步骤优选地在厌氧条件下进行。

13. 根据权利要求1-12之一所述的用于使用的粪便微生物群样品,其通过直肠途径施用。

用于治疗接受造血干细胞移植的患者的粪便微生物群

技术领域

[0001] 本发明涉及接受造血干细胞 (CSH) 移植的患者的治疗。

背景技术

[0002] 造血干细胞是所有血细胞系的根源的细胞。这些细胞能够通过自身分化而产生血液中的任何细胞 (红细胞、白细胞、血小板) 并且还能够自我更新。

[0003] 造血干细胞的移植是治疗某些血液疾病和癌症的主要治疗手段。这是因为, 它使得能够通过化疗和/或放射疗法 (以大剂量) 实现治疗强化, 从而导致疾病的治疗, 甚至使其痊愈而改善患者的存活率。它还允许向患者引入新的免疫系统 (同种异体移植的情况), 这可有助于控制癌症疾病。

[0004] 在这些治疗 (包括显著的血液毒性) 之后实现的移植使得能够重建骨髓并恢复血细胞的正常产生。

[0005] 造血干细胞的移植涉及治疗多种类型的病症: 恶性病症, 如急性白血病, 骨髓瘤, 淋巴瘤或某些实体瘤 (乳腺癌, 睾丸癌, 卵巢癌, 神经母细胞瘤等), 但也可以是非恶性病症, 如结构性或获得性缺陷 (免疫缺陷, 发育不全, 代谢缺陷和错误等)。

[0006] 可以进行两种类型的移植:

[0007] -自体移植, 其中患者接受在数周、数月或数年前从骨髓或外周血中提取并保持冷冻的自己的干细胞。

[0008] -同种异体移植 (或“同种异体的移植”), 它需要相容或不相容的家族供者, 或者相容或不相容的非亲属供者, 或者脐带血细胞。该移植分几个阶段进行。在移植前几天, 患者通常进行清髓性或非清髓性“调节 (conditionnement)” 。这通常涉及或多或少强的化疗以及可能的全照射以破坏受者的骨髓并允许植入。通常, 其目标在于破坏受者骨髓中存在的所有细胞, 以使得供者的造血干细胞能够在那里生长并且由此取代受者的破坏的骨髓。

[0009] 然后通过静脉内输血进行造血细胞移植。移植之后是一段发育不全的周期, 在此周期期间患者不再具有免疫防御功能。

[0010] 在同种异体移植的情况下, 在该同种异体移植之前的“调节”使得能够产生足够的免疫抑制以防止移植物排斥, 并且在必要时获得对恶性细胞的抗肿瘤效果。然而, 这种有益效果被与供者和受者之间的免疫反应相关的移植物抗宿主 (GVH: Graft versus host) 病的高风险所抵消。此外, 该“调节”使患者暴露于细菌、病毒或真菌感染的风险, 需要实施预防性或治疗性的抗感染治疗。

[0011] 迄今为止, 对这些严重并发症的治疗并不完全令人满意。

[0012] 仍然需要针对这些并发症的预防或治疗方法。

发明内容

[0013] 本发明的概述

[0014] 响应这种治疗需要, 本发明人提出将CSH移植与粪便微生物群移种相结合。本发明

人更特别地确认了粪便微生物群供者与CSH供者相同的益处。他们还确认了在CSH移植之前粪便微生物群移种的益处,无论是在同源条件的情况下(其中粪便微生物群供者与CSH供者是相同的),还是在其中粪便微生物群供者与CSH供者不同的情况下。

[0015] 本发明的一个方面因而涉及粪便微生物群样品在预防和/或治疗由受者患者的CSH同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症中的用途,所述粪便微生物群样品和所述CSH来自同一供者受试者。

[0016] 粪便微生物群移种(transplantation)可以在CSH同种异体移植(grefte)之前或之后进行。

[0017] 本发明的另一方面涉及粪便微生物群样品在预防和/或治疗由受者患者的CSH同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症中的用途,所述粪便微生物群样品在CSH移植之前施用。

[0018] 有利地,该粪便微生物群使得能够防止CSH同种异体移植后移植物抗宿主(GVH)病的发生或者降低该病发生的风险。

[0019] 该粪便微生物群还使得能够降低感染性并发症的风险,该感染性并发症可一直到败血症,这归因于在CSH同种异体移植之前并且甚至是在患者开始清髓性或非清髓性调节之前使受者患者感染的致病菌、尤其是对抗生素具有多重抗性的细菌的移殖(colonisation)。这种感染典型地是CSH同种异体移植的禁忌症。根据本发明的粪便微生物群的移种解决了这种禁忌症,患者变得能够接受调节和CSH同种异体移植。

[0020] 该受者患者可尤其患有癌症,特别是恶性血液病,但也可以是非恶性疾病。

[0021] 本发明的另一方面涉及粪便微生物群样品在治疗患有癌症、特别是恶性血液病并且在接受或已经接受CSH同种异体移植的受者患者的癌症中的用途,所述粪便微生物群样品和所述CSH优选来自同一供者受试者。

[0022] 同样,粪便微生物群的移种可以在CSH移植之前或之后进行。

[0023] 本发明的详细描述

[0024] 受者患者

[0025] 目标患者是已经接受或将接受造血干细胞移植的人,而无论其年龄及其性别。该患者患有可通过CSH移植治疗的任何疾病。这尤其涉及癌症,遗传性疾病,影响造血系统和/或免疫系统的疾病。可尤其提及:实体瘤,恶性血液病,其中包括慢性髓细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,急性淋巴细胞性白血病,骨髓增生性综合征,骨髓增生异常综合征,LNH(非霍奇金恶性淋巴瘤),霍奇金病,多发性骨髓瘤,特发性再生不良性贫血,阵发性夜间血红蛋白尿,异常血红蛋白性疾病,先天性免疫缺陷(SCID,Kostmann,Wiskott-Aldrich)和范科尼贫血。

[0026] 患者在造血干细胞移植之前进行调节(或准备),其可以是清髓性或非清髓性治疗。

[0027] Petersen等在2007年提出对这种类型的治疗的综述(Alloreactivity of therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies.Danish Medical Bulletin.2007年5月,54:112-39)。清髓性治疗的实例可如下所示:环磷酰胺(120mg/kg)结合白消安(16mg/kg)或者利用12Gy吸收半径剂量的患者的全照射(“全身照射”)。

[0028] 在非清髓性治疗的情况下,患者可以用小于12Gy的辐射剂量进行完全照射或者接受基于环磷酰胺和/或氟达拉滨的化疗。例如,可提供非清髓性淋巴细胞减少治疗,它包括在J-6和J-5静脉注射环磷酰胺50mg/kg一次,并且从J-6至J-2注射氟达拉滨25mg/m²(J0是造血干细胞移植的日期)。参见Sandmaier等人,Semin Oncol.2000年4月;27(2 Suppl 5):78-8。利用噻替派的顺序调节也是可能的,如在Duléry等的Biol Blood Marrow Transplant.2018年1月11日.pii:S1083-8791(18)中所述。

[0029] 所用的造血干细胞可以来自供者受试者的任何来源,例如外周血或骨髓。

[0030] 粪便微生物群

[0031] 本发明实施粪便微生物群样品的移种,所述粪便微生物群样品根据一些实施方案可有利地来自与CSH供者受试者相同的供者受试者。

[0032] 术语“粪便微生物群”被理解是指存在于健康个体粪便中的微生物菌丛,特别是细菌菌丛。人肠道微生物群是在人胃肠系统(胃、肠和结肠)中发现的微生物(细菌、酵母和真菌)的全体。微生物多样性目前据估计为大约10个细菌物种,其构成了成年个体的占优势的肠道微生物群,其中具有1014个细菌的丰度,代表了在每个个体中200 000-800 000个基因的细菌宏基因组(métagénome),即人基因组的基因数目的10至50倍。肠道(在子宫中是无菌的)从生命的最初一些天开始发生移殖至向独特的个体微生物群演变。每个人都拥有在物种方面相对类似的细菌,但是其微生物群的确切组成(物种、比例)在很大程度上(超过3/4的物种)是对宿主特异性的。

[0033] 术语“粪便微生物群的移种(transplantation)”或“粪便微生物群样品的移种”被理解是指将健康个体的粪便微生物菌丛(flore)、特别是细菌菌丛施用到患者。

[0034] 在本发明的上下文中,造血干细胞移植的受者“患者”不同于造血干细胞的供者“受试者”和粪便微生物群的供者“受试者”,要理解在某些特定的实施方案中,造血干细胞的供者“受试者”也是粪便微生物群样品的供者“受试者”。人类造血干细胞的供者“受试者”优选具有与受者“患者”的良好组织相容性,即供者具有尽可能接近受者的HLA分型。因而优选至少5-10种HLA抗原是相容的。

[0035] 优选地,粪便微生物群的供者受试者是健康受试者。术语“健康”受试者被理解是指未患有肠道微生物群失衡或由医疗机构诊断/识别出的病理学状况的受试者。更优选地,粪便微生物群的供者受试者是患者的近亲,优选其家庭成员,生活在相同的环境中。

[0036] 粪便微生物群样品典型地包括以下属的细菌:布劳特氏菌属(Blautia)、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、真杆菌属(Eubacterium)、霍尔德曼氏菌属(Holdemania)以及梭菌属(Clostridium),尤其是以下物种的细菌:卵形瘤胃球菌(Ruminococcus obeum)、哈氏梭菌(Clostridium hathewayi)、链状真杆菌(Eubacterium desmolans)、Dorea longicatena、乳酸瘤胃球菌(Blautia producta)、异型真杆菌(Eubacterium contorum)、粪瘤胃球菌(Ruminococcus faecis)、丝状霍尔德曼氏菌(Holdemania filiformis)、索氏梭菌(Clostridium sordelli)。

[0037] 粪便微生物群样品可通过本领域技术人员已知的任何手段获得并保存,同时确保有利地保持构成粪便微生物群的细菌、特别是厌氧细菌的生存力。

[0038] 这个步骤优选通过提取供者受试者的粪便样品来进行。实际上,该粪便样品包含供者受试者的粪便微生物群。因此,该方法包括提取至少一个来自供者受试者的包含粪便

微生物群的粪便样品的步骤。

[0039] 优选地,该粪便样品具有至少10g的质量。

[0040] 该粪便微生物群样品可被冷冻以用于在解冻状态下使用,或由新鲜粪便制备。新鲜粪便与经冷冻样品的混合物也是可能的。

[0041] 根据一种特定的实施方案,在本发明中使用可通过解冻由以下方式获得的样品:
i) 混合供者受试者的粪便样品与包含冷冻保护剂和/或填充剂的盐水水溶液,之后任选地为ii) 过滤,之后iii) 冷冻以用于保存,混合和冷冻的步骤优选地在厌氧条件下进行。

[0042] 这种用于制备粪便微生物群样品的方法例如被描述于专利申请W02016/170285中。

[0043] 它可尤其包括以下步骤:

[0044] a) 提取至少一个来自供者受试者的粪便微生物群样品,

[0045] b) 优选在取样后少于5分钟的时限内,将在a)中获得的所述样品放置在优选不透氧气的收集装置中,

[0046] c) 将在b)中获得的样品与至少一种包含至少一种冷冻保护剂和/或填充剂的盐水水溶液相混合,

[0047] d) 任选地,将在c)中获得的混合物进行过滤,尤其是通过包含具有小于或等于0.7mm、优选小于或等于0.5mm的直径的孔的过滤器来进行,和

[0048] e) 通过在典型地为-15°C至-100°C、优选-60°C至-90°C的温度下进行冷冻来储存在c)或d)中获得的混合物,

[0049] 步骤b)至e)在厌氧生活下进行。

[0050] 一旦将(在a)中获得的)所述样品放置在优选不透氧气的收集装置中,就可以任选地将它在33°C-40°C的温度下温育75小时的最大持续时间。优选地,这个温育步骤在35°C-38°C的温度下进行24小时-73小时的持续时间。理想地,这个步骤在大约37°C的温度下进行72小时。另外可选地,可以将所述样品任选地在2°C-10°C的温度下温育75小时的最大持续时间。优选地,这个温育步骤在4°C-8°C的温度下进行24小时-72小时的持续时间。

[0051] 然后进行步骤c):这个步骤包括将在b)中获得的样品与至少一种包含至少一种冷冻保护剂和/或填充剂的盐水水溶液进行混合。

[0052] 典型地,该盐水水溶液包含水和生理学上可接受的盐。典型地,所述盐为钙、钠、钾或镁与负氯离子、葡糖酸根离子、乙酸根离子或碳酸氢根离子的盐。

[0053] 该盐水水溶液还可以任选地包含至少一种抗氧化剂。所述抗氧化剂尤其选自抗坏血酸及其盐(抗坏血酸盐)、生育酚(尤其是 α -生育酚)、半胱氨酸及其成盐形式(尤其是盐酸盐)以及其混合物。

[0054] 优选地,该盐水水溶液包含:

[0055] -至少一种盐,其选自氯化钠、氯化钙、氯化镁、氯化钾、葡糖酸钠和乙酸钠,和

[0056] -任选地,至少一种抗氧化剂,其优选地选自L-抗坏血酸钠、生育酚、L-半胱氨酸盐酸盐一水合物及其混合物。

[0057] 典型地,所述盐以5-20g/L、优选7-10g/L的浓度存在于所述盐水水溶液中。

[0058] 典型地,所述抗氧化剂以相对于溶液总体积而言0.3-1%重量的量,优选地以相对于溶液总体积而言0.4-0.6%重量的量存在于所述盐水水溶液中。优选地,当所述氧化剂为

L-抗坏血酸钠和L-半胱氨酸盐酸盐一水合物的混合物时，L-抗坏血酸钠以相对于溶液总体积而言0.4至0.6%重量的量存在，并且L-半胱氨酸盐酸盐一水合物以相对于溶液总体积而言0.01至0.1%重量的量存在。

[0059] 优选地，该盐水水溶液还包含至少一种冷冻保护剂。冷冻保护剂是用于保护样品免于由冷冻所引起的（尤其是由于冰晶形成而引起的）损害的物质。

[0060] 优选地，所述冷冻保护剂选自多元醇、二至五糖（即二糖、三糖、四糖和五糖）、DMSO及其混合物。优选地，所述冷冻保护剂选自多元醇、三糖和二糖、DMSO及其混合物。更优选地，在所述盐水水溶液中存在的冷冻保护剂为二糖或三糖。

[0061] 在可使用的多元醇中，尤其找到甘油、甘露醇、山梨醇，但也找到丙二醇或乙二醇。在可使用的二至五糖中，可以提及相同或不同单元的二聚体、三聚体、四聚体和五聚体，所述单元选自葡萄糖、果糖、半乳糖、岩藻糖和N-乙酰神经氨酸。在可使用的二糖中，尤其找到海藻糖或其类似物，或蔗糖。最后，DMSO或二甲亚砜是传统的冷冻保护剂。

[0062] 这些冷冻保护剂可以单独地或以混合物进行使用。

[0063] 典型地，在所述盐水水溶液中存在的冷冻保护剂的总量为相对于溶液总体积而言3-30%重量，优选地相对于溶液总体积而言4%-20%重量。

[0064] 优选地，所述冷冻保护剂选自甘油、甘露醇、山梨醇、DMSO、丙二醇、乙二醇、海藻糖及其类似物、蔗糖、半乳糖-乳糖以及其混合物。更优选地，所述冷冻保护剂为半乳糖-乳糖或海藻糖。

[0065] 优选地，该盐水水溶液包含至少一种填充剂。

[0066] 所述填充剂优选地选自淀粉的部分水解产物。淀粉 (amidon)（尤其是小麦或玉米淀粉）的部分水解产物以及淀粉 (féculle)（例如马铃薯淀粉）的部分水解产物包含大量的麦芽糖糊精。麦芽糖糊精是淀粉部分水解的结果，并且由各种不同的糖（葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、寡糖和多糖）构成，它们的比例随水解程度而变化。

[0067] 优选地，在所述盐水水溶液中存在的填充剂为麦芽糖糊精的混合物，其中麦芽糖糊精的量为相对于溶液总体积而言4-20%重量。

[0068] 优选地，该盐水水溶液同时包含：

[0069] -至少一种上面所描述的冷冻保护剂，即选自多元醇、二至五糖（即二糖、三糖、四糖和五糖）、DMSO及其混合物的冷冻保护剂，和

[0070] -至少一种上面所描述的填充剂，即选自淀粉的部分水解产物的填充剂，优选地所述填充剂由麦芽糖糊精构成。

[0071] 优选地，在该情况下，冷冻保护剂的量为相对于溶液总体积而言3-30%重量，优选地相对于溶液总体积而言4%-20%重量；并且填充剂（优选地麦芽糖糊精）的量为相对于溶液总体积而言4-20%重量。

[0072] 将在b)中获得的样品与至少一种包含至少一种冷冻保护剂的盐水水溶液相混合的步骤c)尤其可以通过搅拌来进行，以便获得均匀的混合物。

[0073] 优选地，将在b)中获得的样品与上述盐水水溶液以0.5份重量:10份体积至2份重量:2份体积的各自的重量/体积比相混合。等于0.5份重量:10份体积的“样品:溶液”的重量/体积比意味着，以每10份体积的溶液（例如10ml）采用0.5份重量（例如0.5g）来混合样品。优选地，“样品:溶液”的重量/体积比等于每4份体积的溶液采用1份重量的样品（1份重

量:4份体积)。

[0074] 一旦实施了该步骤,就可以进行任意的步骤d)。步骤d)包括将在c)中获得的混合物进行过滤,尤其是通过包含具有小于或等于0.7mm,优选地小于或等于0.5mm的直径的孔的过滤器。这样的过滤使得能够截留粗颗粒和回收在滤液中的目的细菌(其构成粪便微生物群)。

[0075] 然后,在步骤c)或d)之后,当该后者发生时,通过在-15℃至-100℃的温度下进行冷冻来储存所获得的混合物:这是步骤e)。优选地,冷冻(和因此储存)的温度为-60℃至-90℃;更优选地,它为大约-80℃或大约-65℃。

[0076] 为了进行冷冻,在步骤c)或d)之后和在步骤e)之前,可以事先将所述混合物分成等分试样,以确保恒定体积的样本。例如,进行等分试样的分配以获得体积等于50ml、100ml、150ml或200ml的样本。优选地,进行等分试样的分配以获得体积等于100ml的样本。

[0077] 该冷冻和储存步骤使得能够将经处理的样品保存至少2个月的持续时间。此外,经如此储存的样品具有良好的质量,甚至在解冻之后。

[0078] 优选地,该方法包括在厌氧生活下使在e)中获得的经冷冻的样品解冻直至环境温度的步骤f)。该解冻步骤f)可以通过将经冷冻的样品置于温度为35℃至40℃(例如37℃)的水浴中数分钟(典型地,2至10分钟)的持续时间来进行。解冻步骤f)也可以通过将经冷冻的样品置于2℃至10℃(例如4℃至8℃)的温度下10至20小时的持续时间来进行。

[0079] 然后,可以向受者患者施用处于环境温度下的经如此解冻的样品。

[0080] 在一种优选的实施例中,粪便在排出后6小时内在微生物安全站中处理。通过使用天平、搅拌机、无菌容器和无菌医疗器械(注射器,过滤器等)将供者粪便称重并与低温保存盐水溶液(甘油+0.9%NaCl,10/90V/V)混合。对于50-100g粪便来说在500ml中进行均质化。通过使用具有无菌压缩物(compresses)和无菌容器的漏斗来过滤所获得的悬浮液,以在-80℃下冷冻之前除去任何固体残余物。

[0081] 在粪便移种前一天,将经冷冻的溶液置于冰箱中(4-8℃)进行过夜解冻。在粪便移种当天,将该溶液置于灌肠袋中。材料随时可用。

[0082] 在另一种实施方案中,可以使用新鲜(即未冷冻)的粪便。

[0083] 在一种优选的实施例中,粪便在排出后6小时内在微生物安全站中处理。通过使用天平、搅拌机、无菌容器和无菌医疗器械(注射器,过滤器等)将供者粪便称重并与无菌盐水溶液(NaCl 0.9%,10/90V/V)混合。对于50-100g粪便来说在500ml中进行均质化。通过使用具有无菌压缩物和无菌容器的漏斗来过滤所获得的悬浮液,以除去任何固体残余物。然后将该溶液置于灌肠袋中。材料随时可用。

[0084] 治疗适应症

[0085] 本文描述了用于预防和/或治疗由受者患者的造血干细胞(CSH)同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症的方法,包括向所述受者患者施用粪便微生物群样品,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞优选来自同一供者受试者。表述“CSH同种异体移植引起的感染性或非感染性并发症”被理解为尤其是指归因于为了CSH同种异体移植的患者调节的并发症,该调节降低了患者的免疫防御;以及归因于同种异体移植本身的并发症,也即尤其是急性 and/或慢性形式的移植物抗宿主(GVH)病。

[0086] 还公开了一种治疗方法,该方法通过需要这种治疗的患者的造血干细胞(CSH)移

植来进行,其中在CSH移植之前和/或之后向所述患者施用合适量的粪便微生物群样品,所述粪便微生物群样品优选来自与CSH相同的供者个体。

[0087] 术语“治疗(traitement)”包括有疗效的治疗,其导致减轻、改善、消除、减少和/或稳定疾病的症状或由它引起的痛苦的治愈或治疗。

[0088] 术语“预防”对应于预防性或防止性的治疗,其包括导致疾病预防的治疗,也包括减少和/或延迟疾病的发生率或它发生的风险的治疗。

[0089] 在本发明的上下文中,粪便样品的移种降低了受者患者在CSH移植之后发生一种或多种感染性或非感染性并发症的风险,和/或改善或治愈在CSH移植之后发生的一种或多种并发症。

[0090] 在其中在CSH移植之后发生粪便微生物群移种(TMf)的情况下,粪便微生物群样品来自与CSH同一供者的事实允许患者更好地耐受TMf。实际上,在预先移植CSH时,供者的免疫细胞被转移到受者患者体内。TMf期间的免疫反应则减少,因为在受者患者的体内存在相同供者的免疫细胞。

[0091] 在CSH移植之前进行的TMf使得能够减少甚至消除在CSH移植及其预先调节之前候选患者所携带的耐药细菌(如弗罗因德氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*)或铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))的感染。

[0092] 它还使得能够校正CSH移植的候选患者的肠道微生物群,并且因此使得能够降低CSH移植之后可能出现的并发症的发生率。

[0093] 本发明还使得能够减少对感染的抗生素疗法治疗。

[0094] 感染性并发症尤其是梭菌(*Clostridium*)或肠球菌(*entérocoque*)的感染,尤其是抗万古霉素的肠球菌(ERV)或抗传统抗生素的其他任何细菌的感染。

[0095] 艰难梭菌(*Clostridium difficile*)的感染、尤其是复发性感染是特别针对性的。在其他可引起感染性并发症的机会性物种当中,可以提及粪肠球菌(*E. faecalis*)、奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)或大肠杆菌(*E. coli*)。

[0096] 最熟知的非感染性并发症是移植物抗宿主(GVH)病。急性GVH通常在CSH移植后6个月内发生,并且根据供者和受者之间的遗传差异可具有10%-80%的病例的频率。当GVH在移植后超过100天出现时或者根据这种GVH的某些临床特征,则通常称作慢性GVH。

[0097] 其他并发症包括肠病和其他移植后消化并发症。

[0098] 根据另一个方面,描述了一种用于治疗患有癌症并且在接受或已经接受造血干细胞同种异体移植的受者患者的癌症的方法,该方法包括向所述患者施用粪便微生物群样品,所述粪便微生物群样品和所述造血干细胞优选来自同一供者受试者。

[0099] 术语“治疗(traitement)”或“治疗(traitement)”包括减缓癌症进展,完全缓解或降低复发风险。

[0100] 这可尤其涉及到治疗实体瘤或恶性血液病,正如上文所述的。

[0101] 实际上,同一供者的粪便微生物群移种和CSH移植可提供对消除残余癌细胞的协同效应,并因此持久性缓解癌症。事实上,CSH含有免疫活性细胞(自然杀伤细胞,特别是B和T淋巴细胞),它们已经与供者环境接触。这些CSH因而含有淋巴细胞和由供者的共生细菌(肠内菌丛)的抗原预活化的其他特异性免疫效应物。不受任何特定作用机理的束缚,本发明人推测在受者体内移种的这些预活化的免疫效应物被移种的细菌再刺激。

[0102] 在此还描述了组合的产品(“成份试剂盒(kit of parts)”),它一方面包括人类造血干细胞(CSH)并且另一方面包括粪便微生物群样品,CSH和粪便微生物群样品优选来自同一供者个体,用于在如上定义的CSH移植治疗中同时或者在时间上错开使用。

[0103] 还可提供一种试剂盒,它一方面包括在合适包装中的人类造血干细胞(CSH)并且另一方面包括在合适包装中的粪便微生物群样品,CSH和粪便微生物群样品优选来自同一供者个体。一方面是CSH并且另一方面是粪便微生物群样品的提取和包装方法是本领域技术人员公知的,并且尤其如上所述。术语“试剂盒”根据本发明被理解是指构成其的两个组成部分(elements)联合用于组合的使用,并且它们可一起或分开保存以用于同一个患者。

[0104] 操作程序

[0105] 在所述CSH移植之前或之后,可以将粪便微生物群样品施用(也称为“移种”)到受者患者的消化道中。

[0106] 患者可接受单次施用粪便微生物群样品,或重复施用,例如间隔4-8天或2-8周。

[0107] 在一种特定的实施方案中,在所述CSH移植之后1周-2年、优选1周-1年、更优选1周-6个月并且再优选1周-3个月,任选地以重复的方式,将粪便微生物群样品移种到受者患者的消化道中。

[0108] 在另一种特定的实施方案中,在所述CSH移植之前1周-12个月、优选1周-8个月、优选1周-6个月、更优选1周-4个月、优选1周-3个月或者1-8周、优选1-6周,任选地以重复的方式,将粪便微生物群样品移种到受者患者的消化道中。

[0109] 通常,施用的量为其允许植入的粪便微生物群的细菌和其他微生物的消化道的移植。施用的量典型地为100ml-1L、优选约500ml由粪便样品制备的盐水溶液(如上所述)。

[0110] 优选地,粪便微生物群样品包含 10^{10} - 10^{13} 个细菌/g样品。

[0111] 粪便微生物群样品的移种可以通过直肠途径、通过口服途径(例如以冻干形式或以胶囊形式)或通过能够将微生物群转移到肠道中的任何方法进行施用来实现。例如,灌肠袋可用于此目的。粪便微生物群样品的移种也可以通过结肠镜进行,结肠镜是通常用于检查结肠的仪器。

具体实施方式

[0112] 以下实施例说明本发明而不限制其范围。

[0113] 实施例1:患有急性髓细胞性白血病的女性患者在CSH移植后同源(isologue)粪便微生物群的移种

[0114] 操作程序

[0115] 该患者是一名患有急性髓细胞性白血病的16岁年轻女孩,在第一次CSH同种异体移植后复发。

[0116] 在强度减小的调节(包括药物和化疗的组合)之后,这个患者接受了来自其母亲的CSH的第二次移植。该患者在移植前六天接受5mg/kg噻替派,然后在移植之前的五至两天是氟达拉滨40mg/m²/天,并且在移植之前5至4天是白消安3.2mg/kg/天。最后,在移植后三至五天,患者接受50mg/kg/天的环磷酰胺。

[0117] 该患者在移植后即刻没有发生移植物抗宿主急性反应,并且其基于环孢素-A和霉酚酸莫非替克(mycophenolate mofetil)的免疫抑制治疗在移植后83天可停止。

[0118] 另一方面,在移植后的最初几个月内观察到多种细菌并发症(败血症,多重耐药细菌),需要使用广谱抗生素。在移植后一个月,该患者发生艰难梭菌感染的第一次发作,这利用甲硝唑成功地进行了治疗。在移植后的两个半月,通过直肠拭子检测到存在抗万古霉素的肠球菌(ERV)。由于对甲硝唑和非达霉素治疗具有抗性的艰难梭菌感染的复发,则在CSH移植后3个月进行第一次粪便微生物群(来自患者的母亲,也是CSH的供者)移种。

[0119] 先将母亲的粪便与低温保存盐水溶液(甘油+NaCl 0.9%,10/90V/V)混合。对于50-100g粪便来说在500ml中进行均质化。通过使用具有无菌压缩物和无菌容器的漏斗来过滤所获得的悬浮液,以除去任何固体残余物。然后将溶液置于灌肠袋中,准备使用。

[0120] 结果:

[0121] 胃肠道症状明显减轻并且检查显示艰难梭菌感染的治愈和抗万古霉素的肠球菌的根除。

[0122] CSH移植后六个月,患者出现与败血症相关的全血细胞缺乏症,这归因于病原细菌肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),产生超广谱 β -内酰胺酶,以及携带ERV。此外,患者出现腹痛和严重腹泻,没有梭菌感染也没有移植物抗宿主的胃肠反应的证据。

[0123] 对患者进行来自同一供者(母亲)的第二次粪便微生物群移种(TMf)以治疗ERV的移植。在TMf之后,临床症状得到改善,并且ERV变得无法检测到。

[0124] 在CSH移植后12个月,通过直肠拭子未检测到任何多重耐药细菌(尤其是梭菌或ERV)。

[0125] 在CSH移植后3年,患者完全缓解了其急性白血病。

[0126] 实施例2:患有急性淋巴细胞性白血病的女性患者在CSH移植后同源粪便微生物群的移种

[0127] 患者是一名19岁的年轻女孩,当她从其母亲那里接受CSH移植(单倍同一性)时,利用噻替派进行顺序调节(同上如在Duléry中随后所述),患有在几个疗程的化疗之后复发的急性淋巴细胞性白血病。

[0128] 在此移植之后,她发展为急性GVH(被治疗),然后是慢性GVH。

[0129] 在CSH移植后四个月,她被检测出对抗万古霉素的肠球菌(ERV)为阳性。

[0130] 在CSH移植后六个月和八个月,她接受了同样来自她母亲的粪便微生物群移种,样品如实施例1中所述来制备。

[0131] 此后通过直肠拭子未检测到多重耐药细菌。

[0132] 当患者在CSH移植后两年其白血病复发时,GVH的症状正在改善。

[0133] 实施例3:患有急性树突状细胞白血病的男性患者在CSH移植前同源粪便微生物群的移种。

[0134] 该患者47岁,被诊断为急性树突状细胞白血病,接受化疗(在诱导期组合氨甲喋呤、伊达比星和天冬酰胺酶,然后进行两个巩固阶段)。该患者被检测出对弗罗因德氏枸橼酸杆菌为阳性,这可是CSH移植的禁忌症。

[0135] 他接受的粪便微生物群的移种来自他HLA-相同的姊妹,其解决了弗罗因德氏枸橼酸杆菌的移植,使得该患者适于接受CSH移植。CSH移植(也来自他的姊妹)在包括噻替派、白消安和氟达拉滨的调节之后的9天后进行。

[0136] 如实施例1中所解释的,制备用于粪便微生物群移种的该姊妹的粪便。

- [0137] 该患者在CSH移植后即刻没有发生移植物抗宿主急性反应,并且其基于环孢素的免疫抑制治疗在同种异体移植后4个月可停止。
- [0138] 细菌感染性并发症(包括抗万古霉素的葡萄球菌(VRSA)的感染)是有限和受控的。
- [0139] 移植后一年,该患者处于缓解期。
- [0140] 实施例4:患有急性髓细胞性白血病的男性患者在CSH移植前非同源粪便微生物群的移种
- [0141] 患有急性髓细胞性白血病的这个64岁患者首先接受两线化疗的治疗。
- [0142] 在化疗的诱导治疗期间,这个患者发生严重的铜绿假单胞菌败血症。
- [0143] 粪便微生物群的移种由他女儿的粪便来进行,按照实施例1的操作程序来制备,其允许多重耐药菌的阴转(négativation)。
- [0144] 来自HLA-相同的供者的外周血干细胞的同种异体移植在没有主要感染发作的情况下并且在用白消安和氟达拉滨调节之后的41天后进行。
- [0145] 移植后未观察到急性消化GVH。
- [0146] 患者处于缓解期(CSH移植后2年)。
- [0147] 实施例5:患有急性髓细胞性白血病的男性患者在CSH移植前非同源粪便微生物群的移种
- [0148] 这名患者42岁,患有急性髓细胞性白血病,对一线化疗不起反应,但响应二线化疗。
- [0149] 该患者表现出多重耐药铜绿假单胞菌的移殖,没有相关的全身性感染并发症,但考虑到CSH的同种异体移植和因此的免疫抑制状态,决定进行从他姊妹的粪便微生物群移种。这种TMF根据实施例1的操作程序进行。在46天之后并且在利用噻替派的顺序调节(如同上在Duléry等中所述)之后,此患者能够接受来自其单倍同一性兄弟的CSH移植。
- [0150] 移植后未观察到任何特定的并发症(没有GVH,也没有感染)。
- [0151] 然而,该患者的白血病复发,并在CSH移植后11个月死亡。
- [0152] 实施例6:患有急性髓细胞性白血病的女性患者在CSH移植前非同源粪便微生物群的移种
- [0153] 这名45岁的女性患者被诊断出患有高危急性髓细胞性白血病,在毛里求斯接受了两线化疗。
- [0154] 她来到法国进行来自其姊妹的HLA-相同的CSH同种异体移植。
- [0155] 在移植前评估和解决多个心肺合并症问题的住院期间,在直肠拭子上检测到耐药的弗罗因德氏枸橼酸杆菌。要指出,该患者同时被耐药的肺炎克雷伯菌移殖。
- [0156] 粪便微生物群(新鲜粪便和冷冻粪便的混合物(根据实施例1中所述的操作程序,来自她的丈夫)的移种经直肠进行,其解决了弗罗因德氏枸橼酸杆菌的移殖,使得该患者适于在16天后接受CSH移植。
- [0157] 要指出,该患者在移植后发育不全期间没有出现主要的感染性并发症。还要指出,一直到移植的J60都可检测到的肺炎克雷伯菌在随后的直肠擦拭中不再检测到。
- [0158] 该患者在CSH移植之后未发生GVH(3个月随访)。