(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113473997 A
(43)申请公布日 2021.10.01

(21)申请号 201980070398.7

(22)申请日 2019.10.25

(30)优先权数据
102018000009822 2018.10.26 IT

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2019/059175 2019.10.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/084589 EN 2020.04.30

(83)生物保藏信息
DSM 26760 2013.01.11
CNCM I-1572 1995.05.05

(71)申请人 LAC2生物群系有限公司
地址 意大利米兰

(72)发明人 A·比菲

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 李栋修 庞东成

(51)Int.Cl.
A61K 35/745(2006.01)
A61K 35/747(2006.01)
A61P 13/02(2006.01)
A61P 15/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书17页 附图14页

(54)发明名称

口服或局部应用于治疗女性泌尿生殖道病症的副干酪乳杆菌物种的细菌菌株

(57)摘要

本发明涉及基于属于副干酪乳杆菌物种的细菌的组合物，其用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道的病理状况以及/或者用于治疗和/或预防与所述病理状况相关的症状，所述病理状况优选是女性生殖道、更优选阴道的病理状况，所述病理状况由阴道微生物群失衡所导致或与之相关。

CN 113473997 A

1.一种包含至少一种属于乳杆菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物应用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道的病理状况或者用于治疗和/或预防与所述病理状况有关的症状,所述病理状况是由阴道微生物群失衡引起或与之相关,其中所述至少一种细菌菌株属于副干酪乳杆菌物种,并且其选自包含以下或由其组成的组:

-由SOFAR S.p.A.于2012年11月20日以登录号DSM 26760保藏在德国微生物菌种保藏中心的鉴定为副干酪乳杆菌LPC-S01的菌株,

-由SOFAR S.p.A.于1995年5月5日以登录号CNCM I-1572保藏在巴黎巴斯德研究所国家微生物培养物保藏中心的鉴定为干酪乳杆菌DG®的菌株,以及

-它们的混合物。

2.根据权利要求1所述应用的组合物,其中,所述病理状况是女性生殖道、优选阴道的病理状况。

3.根据权利要求1或2所述应用的组合物,其中,所述病理状况选自:女性泌尿生殖道的感染,优选女性生殖道的感染,更优选阴道感染;阴道病,优选细菌性和/或真菌性阴道病和/或与酵母菌和/或病毒有关的阴道病;念珠菌病、衣原体、生殖器疱疹、淋病;阴道炎,优选萎缩性阴道炎;外阴痛;月经周期改变,优选月经过多、月经过少,以及它们的组合。

4.根据权利要求1至3中任一项所述应用的组合物,其中,与所述病理状况有关的所述症状选自:瘙痒、发红、灼热感、抽筋、分泌物、疼痛、性交困难、红斑、超敏反应、阴道排液、刺激性、宫颈炎、粘液及其组合。

5.根据权利要求1至4中任一项所述应用的组合物,其中,所述病理状况与以下情况相关或依赖于以下情况:1)阴道生态系统中的乳杆菌属细菌菌株水平的降低,和/或2)阴道生态系统中的至少一种属于以下属的微生物的增殖的增加:加德纳菌属、多雷亚菌属、链球菌属、厌氧球菌属、芬戈尔德菌属、普雷沃菌属、别样斯氏菌属、葡萄球菌属、棒状杆菌属及其组合;优选加德纳菌属、厌氧球菌属、芬戈尔德菌属和葡萄球菌属。

6.根据权利要求5所述应用的组合物,其中,所述病理状况与以下情况相关或依赖于以下情况:阴道生态系统中的卷曲乳杆菌和格氏乳杆菌物种的细菌菌株的水平的降低。

7.根据权利要求5所述应用的组合物,其中,所述病理状况与阴道生态系统中的至少一种微生物的增殖的增加相关或依赖于阴道生态系统中的至少一种微生物的增殖的增加,所述微生物属于选自以下的物种:阴道加德纳菌;产甲酸多雷亚菌、长链多雷亚菌;化脓性链球菌、无乳链球菌、粪链球菌、肺炎链球菌、变异链球菌;产氢厌氧球菌、解乳厌氧球菌、八度厌氧球菌、普氏厌氧球菌、四联厌氧球菌、阴道厌氧球菌;大芬戈尔德菌;苏格兰普雷沃菌、二路普雷沃菌、短普雷沃菌、布氏普雷沃菌、粪便普雷沃菌、中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌、产黑色素普雷沃菌、口腔普雷沃菌、口普雷沃菌、唾液普雷沃菌;嗜胨菌属,不解糖嗜胨菌、海氏嗜胨菌、考克斯嗜胨菌、阴道嗜胨菌、劳氏嗜胨菌、帕氏嗜胨菌、吲哚嗜胨菌、艾弗嗜胨菌、泪腺嗜胨菌;栖人体别样斯氏菌;金黄色葡萄球菌、耳葡萄球菌、头状葡萄球菌、山羊葡萄球菌、科氏葡萄球菌、海豚葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、猪葡萄球菌、中间葡萄球菌、路邓葡萄球菌、假中间葡萄球菌、腐生葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、木糖葡萄球菌;白喉杆菌、阴道棒状杆菌、扁阔棒状杆菌、皮欧氏棒状杆菌、简单棒状杆菌、马里棒状杆菌、溃疡棒状杆菌、假结核棒状杆菌(或绵羊棒状杆菌)、化脓性棒状杆菌、溶血棒状杆菌、谷氨酸棒状杆菌、水生棒状杆菌、假白喉棒状杆菌(或哈氏棒状杆菌)、解脲棒状杆菌

(D2组棒状杆菌)、马棒状杆菌、牛棒状杆菌、干燥棒状杆菌、无枝菌酸棒状杆菌、杰氏棒状杆菌(JK组棒状杆菌)、纹带棒状杆菌、纤弱棒状杆菌、解葡糖醛酸棒状杆菌;以及它们的组合;优选阴道加德纳菌。

8.根据权利要求1至7中任一项所述应用的组合物,其中,所述组合物还包含:至少一种细菌、至少一种酵母菌、至少一种真菌和/或至少一种微生物。

9.根据权利要求8所述应用的组合物,其中,所述至少一种酵母菌属于酵母菌属,优选地属于酿酒酵母和/或布拉酵母物种。

10.根据权利要求1至9中任一项所述应用的组合物,其中,在所述至少一种细菌菌株中,所述细菌是活细菌或死细菌,或者是裂解物或细菌提取物的形式,或者是后生元的形式。

11.根据权利要求1至10中任一项所述应用的组合物,其中,所述组合物包含所述至少一种细菌菌株,细菌菌株的含量为每剂10亿至1000亿细菌细胞、优选20亿至600亿细菌细胞、更优选20亿至500亿细菌细胞,甚至更优选30亿至550亿个细菌细胞,更优选每剂200亿至300亿细菌细胞。

12.根据权利要求1至11中任一项所述应用的组合物,其中,所述组合物配制用于口服应用。

13.根据权利要求12所述应用的组合物,其中,所述组合物为片剂、胶囊、条、粒状粉末、凝胶帽、口溶性颗粒、小袋或丸剂的固体形式;或者所述组合物配制为液体,优选作为糖浆或作为饮料或可饮用小瓶;或者所述组合物添加到食品中,优选添加到酸奶、奶酪、果汁中,所述组合物用于口服应用。

14.根据权利要求1至11中任一项所述应用的组合物,其中,所述组合物配制成能够通过局部途径进行作用的形式。

15.根据权利要求14所述所述应用的组合物,其中,所述组合物为妇科悬浮液用粉末、阴道胚珠剂、阴道片剂和/或胶囊、阴道灌洗液、阴道凝胶、阴道乳膏或灌肠剂的形式,所述组合物用于局部应用。

口服或局部应用于治疗女性泌尿生殖道病症的副干酪乳杆菌物种的细菌菌株

技术领域

[0001] 本发明涉及基于细菌和/或酵母菌和/或其他微生物的组合物，其优选用于口服或局部应用，用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道的病理状况或者用于治疗和/或预防与所述病理状况相关的症状，所述病理状况优选是女性生殖道、更优选阴道的病理状况，所述病理状况由阴道微生物群失衡所导致或与之相关。

背景技术

[0002] 细菌性阴道病(BV)是育龄女性中最常见的疾病之一。

[0003] BV的特征是正常阴道菌群发生了深层改变，其中乳杆菌被厌氧性混合微生物群所取代。当BV在进展时，阴道pH值会升高，直到达到无法使乳杆菌存活的值。这种生物学环境有助于包括阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)在内的厌氧细菌，其在阴道中达到比正常情况高出多达一千倍的浓度。另一方面，即使局部或全身进行采用抗生素或化学疗法的治疗，虽然这对治疗特定形式的阴道病是必不可少的，但可能导致非致病菌群(首先是乳酸菌)的破坏，从而引起复发的风险。

[0004] 女性生殖道，特别是阴道，在出生之前是无菌的：它在进入产道的过程中或之后立即开始被构成内生微生物群的各种微生物所定殖。

[0005] 在育龄妇女中，阴道微生物菌群主要由嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)组成，其具有降解单糖的独特特征，这源于通过细胞酶和乳酸对上皮衍生的糖原的切割，并确保对阴道环境的酸化。

[0006] 乳杆菌在阴道粘膜上定殖的能力取决于施用途径和对上皮细胞的粘附程度。如果以适当的量施用，直接进入阴道的制剂(例如胶囊、片剂、灌洗液或凝胶)能够增加乳杆菌的局部含量。相反，乳杆菌的口服制剂必须能够在通过肠道的过程中保持其活力，优选达到直肠管的水平，其后回流并定殖阴道。

[0007] 因此，仍然需要定性和定量地改善阴道细菌菌群和治疗/预防女性泌尿生殖道的病理状况及其相关症状。

[0008] 此外，需要提供允许既可通过口服途径也可通过局部途径施用的使阴道细菌菌群重新平衡的组合物。

[0009] 特别地，口服施用使组合物的施用及其定量给药容易且简单。

[0010] 最后，需要对于女性泌尿生殖道的疾病、症状和/或病症的治疗有效、耐受性良好、无副作用、易于生产且具有成本效益的组合物。

[0011] 在进行深入研究和开发之后，本申请人通过提供包含根据本说明书和所附权利要求书所示的至少一种乳杆菌属细菌菌株的组合物来处理并解决上述需求。

[0012] 本发明所述的组合物可有效治疗女性泌尿生殖道的疾病、症状和/或病症，其耐受性良好，无副作用，易于生产且具有成本效益。

[0013] 借助所附的权利要求书中要求保护的技术特征，通过本发明的细菌菌株、混合物

和组合物所实现的这些目的和其它目的将在下文的详细描述中变得明显。

发明内容

[0014] 本发明的第一方面涉及基于细菌和/或酵母菌和/或其他微生物的组合物,优选用于口服或局部应用,用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道的病理状况(优选女性生殖道、更优选阴道的病理状况)或者用于治疗和/或预防与所述病理状况相关的症状,所述病理状况由阴道微生物群失衡所导致或与之相关。

[0015] 特别是,特别有效的是属于选自以下属的细菌:乳杆菌属(Lactobacillus)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、芽孢杆菌属(Bacillus)、丙酸杆菌属(Propionibacterium)、链球菌属(Streptococcus)、乳球菌属(Lactococcus)、气球菌属(Aerococcus)和肠球菌属(Enterococcus);优选属于乳杆菌属和/或双歧杆菌属的细菌。

[0016] 事实上,申请人出人意料地证明,基于属于乳杆菌属和/或双歧杆菌属的细菌的组合物、特别是包含副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)细菌物种的益生菌组合物的应用(优选以口服形式)定性且定量地改善了阴道微生物群的组成。

[0017] 因此,本发明的组合物特别有利于治疗与泌尿生殖道、优选女性泌尿生殖道中的乳杆菌缺乏有关的疾病。

[0018] 特别地,申请人发现本发明的组合物能够显著降低阴道生态系统的潜在致病体(pathobiont)的水平,例如,属于念珠菌属(Candida)、加德纳菌属(Gardnerella)、多雷亚菌属(Dorea)、链球菌属(Streptococcus)、厌氧球菌属(Anaerococcus)、芬戈尔德菌属(Finegoldia)、普雷沃菌属(Prevotella)、嗜胨菌属(Peptoniphilus)、别样斯氏菌属(Alloscardovia)、葡萄球菌属(Staphilococcus)和棒状杆菌属(Corynebacteriyum)的那些,优选加德纳菌属、葡萄球菌属、厌氧球菌属和芬戈尔德菌属。

[0019] 通过以下的详细描述和实施例,本发明的其他优点将变得明显,但是,所述实施例是通过非限制性实例而提供的。

附图说明

[0020] 图1显示了用本发明的组合物治疗之前健康志愿者的阴道微生物群的分析。

[0021] 图1.A显示了图1中用虚线I A突出显示的区域的放大图。

[0022] 图2显示了在用本发明的组合物治疗之前的健康志愿者的阴道微生物群的组成中最重要的微生物的概要图。

[0023] 图3显示了用本发明的组合物治疗后健康志愿者的阴道微生物群的分析。

[0024] 图3.A显示了图3中用虚线III A突出显示的区域的放大图。

[0025] 图4显示了用本发明的组合物治疗之前或之后或用安慰剂治疗后的健康志愿者中的加氏乳杆菌水平的定量;统计上的显著差异基于Wilcoxon符号秩检验。

[0026] 图5.a显示了用本发明的组合物治疗之前或之后或用安慰剂治疗后的健康志愿者中加德纳菌物种(Gardnerella spp)的水平的定量;统计上的显著差异基于Wilcoxon符号秩检验。

[0027] 图5.b显示了阴道拭子中的加德纳菌细胞的绝对qPCR定量。

[0028] 图6显示了在用本发明的组合物治疗之前、期间和之后的健康志愿者的阴道微生

物群和肠道微生物群的微生物之间的相关性。

[0029] 图6.A、6.B、6.C示出了分别由图6中的虚线VI A、VI B、VI C突出显示的区域的三个放大图。

[0030] 图7显示了在用安慰剂治疗之前和之后的健康志愿者的阴道微生物群和肠道微生物群的微生物之间的相关性。

[0031] 图7.A、7.B示出了分别由图7中的虚线VII A、VIIB突出显示的区域的两个放大图。

[0032] 定义

[0033] 在本发明的上下文中，表述“阴道微生物群”或“阴道生态系统”用于指代居住在女性泌尿生殖道(优选阴道)中并且在彼此之间以及与容纳它们的阴道环境平衡地存活的微生物组。

[0034] 在本发明的上下文中，表述“致病体(pathobiont)”用于指代存在于阴道生态系统中并且如果大量存在则可能具有潜在病原性的细菌。

[0035] 在这种背景下，表述“益生菌(probiotics)”用于指代FAO和OMS提供的指导原则：“在以适当量施用时赋予宿主健康益处的活微生物”。

[0036] 益生菌是“据认为在食用时会提供健康益处的微生物”，基本引用了上述两个组织的定义。

具体实施方式

[0037] 本发明的第一方面涉及基于细菌(或细菌菌株)的组合物，其优选用于口服或局部应用，用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道、优选女性生殖道、更优选阴道的病理状况，所述病理状况是由阴道微生物群失衡引起或与之相关。此外，本发明涉及基于细菌的组合物，其用于治疗和/或预防有需要的受试者中与所述病理状况有关的症状(简称为本发明应用的组合物或本发明的组合物)。

[0038] 优选地，所述组合物基于如上定义的益生菌，优选属于乳杆菌属和/或双歧杆菌属的所述细菌。

[0039] 优选地，乳杆菌属的细菌属于以下物种中的至少一种：副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)、嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)、鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)、解淀粉乳杆菌(Lactobacillus amylolyticus)、食淀粉乳杆菌(Lactobacillus amylovorus)、消化乳杆菌(Lactobacillus alimentarius)、鸟乳杆菌(Lactobacillus aviaries)、短乳杆菌(Lactobacillus brevis)、布氏乳杆菌(Lactobacillus buchneri)、干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)、纤维二糖乳杆菌(Lactobacillus cellobiosus)、棒状乳杆菌(Lactobacillus coryniformis)、卷曲乳杆菌(Lactobacillus crispatus)、弯曲乳杆菌(Lactobacillus curvatus)、德氏乳杆菌(Lactobacillus delbrueckii)、法氏乳杆菌(Lactobacillus farciminis)、发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum)、母鸡乳杆菌(Lactobacillus gallinarum)、格氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)、瑞士乳杆菌(Lactobacillus helveticus)、希氏乳杆菌(Lactobacillus hilgardii)、惰性乳杆菌(Lactobacillus iners)、詹氏乳杆菌(Lactobacillus jensenii)、约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)、马乳酒样乳杆菌(Lactobacillus kefiranofaciens)、开菲尔乳杆菌(Lactobacillus kefiri)、粘膜乳杆菌

(Lactobacillus mucosae)、面包乳杆菌(Lactobacillus panis)、丘状乳杆菌(Lactobacillus collinoides)、类植物乳杆菌(Lactobacillus paraplantarum)、戊糖乳杆菌(Lactobacillus pentosus)、植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)、桥乳杆菌(Lactobacillus pontis)、罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri)、清酒乳杆菌(Lactobacillus sakei)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)和旧金山乳杆菌(Lactobacillus sanfranciscensis)。

[0040] 优选地,所述组合物包含副干酪乳杆菌物种的乳杆菌,所述副干酪乳杆菌更优选是菌株LPC-S01(副干酪乳杆菌LPC-S01,DSMZ的DSM 26760)和/或干酪乳杆菌DG®(副干酪乳杆菌CNCM I-1572)。细菌菌株干酪乳杆菌DG®由SOFAR S.p.A.于1995年5月5日保藏在巴黎巴斯德研究所国家微生物培养物保藏中心,保藏号为CNCM I-1572;所述菌株最初命名为干酪乳杆菌DG®干酪亚种CNCM I-1572;随后被重新分类为副干酪乳杆菌DG®CNCM I-1572。应当注意的是,无论其名称为干酪乳杆菌DG®还是副干酪乳杆菌DG®,它仍然是且唯一地是同一细菌菌株。

[0041] 优选地,组合物包含菌株LPC-S01(副干酪乳杆菌LPC-S01,DSMZ的DSM 26760),该菌株由SOFAR S.p.A.于2012年11月20日以登录号DSM 26760保藏在德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)。

[0042] 事实上,申请人通过实例证明,副干酪乳杆菌LPC-S01菌株(例如通过口服途径施用)能够在通过肠道时保持其活力,达到直肠管水平并且并逆流而在阴道定殖。事实上,如在实施例中所深入描述的,阴道拭子和/或粪便样品的宏基因组学分析的结果证明,阴道生态系统中存在副干酪乳杆菌LPC-S01菌株,证明事实上该细菌穿过肠道而居住在阴道生态系统中。

[0043] 优选地,双歧杆菌属的细菌属于以下物种中的至少一种:动物双歧杆菌(B.animalis)、两岐双歧杆菌(B.bifidum)、短双歧杆菌(B.breve)、婴儿双歧杆菌(B.infantis)、长双歧杆菌(B.longum)、青春双歧杆菌(B.adolescentis)、链状双歧杆菌(B.catenulatum)、角双歧杆菌(B.angulatum)、星状双歧杆菌(B.asteroides)、牛双歧杆菌(B.boum)、猪双歧杆菌(B.choerinum)、棒状双歧杆菌(B.coryneforme)、兔双歧杆菌(B.cuniculi)、栖齿双歧杆菌(B.denticolens)、齿双歧杆菌(B.dentium)、高卢双歧杆菌(B.gallicum)、鸡双歧杆菌(B.gallinarum)、印度双歧杆菌(B.indicum)、异形双歧杆菌(B.inopinatum)、乳双歧杆菌(B.lactis)、大双歧杆菌(B.magnum)、瘤胃双歧杆菌(B.merycicum)、最小双歧杆菌(B.minimum)、假链状双歧杆菌(B.pseudocatenulatum)、假长双歧杆菌(B.pseudolongum)、小鸡双歧杆菌(B.pullorum)、反刍双歧杆菌(B.ruminantium)、世纪双歧杆菌(B.saeculare)、纤细双歧杆菌(B.subtile)、嗜热嗜酸双歧杆菌(B.thermacidophilum)、嗜热双歧杆菌(B.thermophilum)和鹤见双歧杆菌(B.tsurumiense)。

[0044] 优选地,所述病理状况选自:女性泌尿生殖道的感染,优选女性生殖道的感染,阴道感染;阴道病,优选细菌性和/或真菌性阴道病和/或由酵母菌和/或病毒引起的阴道病,更优选念珠菌病、衣原体、生殖器疱疹和淋病;阴道炎,优选萎缩性阴道炎;外阴痛;月经周期改变,优选月经过多、月经过少,以及它们的组合。

[0045] 在本发明的优选实施方式中，所述病理状况是由阴道生态系统中的乳杆菌(乳杆菌属的细菌)水平的降低所引起或与之相关。

[0046] 在本发明的优选实施方式中，与所述病理状况有关的症状选自：瘙痒、发红、灼热感、抽筋、分泌物、疼痛、性交困难、红斑、超敏反应、阴道排液、刺激性、宫颈炎、粘液及其组合。

[0047] 在本发明的优选实施方式中，所述病理状况是由阴道生态系统中的乳杆菌(优选属于卷曲乳杆菌和格氏乳杆菌物种)的水平降低所导致或与其相关。因此，本发明的组合物在治疗和/或预防具有在阴道生态系统水平的卷曲乳杆菌和/或格氏乳杆菌减少或缺乏的受试者中的病理状况和/或与之相关的症状方面特别有利。

[0048] 在本发明的另外的优选实施方式中，病理状况是由阴道生态系统中的至少一种致病体细菌的增殖增加所引起或与之相关，所述致病体细菌优选选自：加德纳菌属，优选阴道加德纳菌物种；多雷亚菌属，优选产甲酸多雷亚菌(D.formicigenerans)和长链多雷亚菌(D.longicatena)物种；链球菌属，优选化脓性链球菌(S.pyogenes)、无乳链球菌(S agalactiae)、粪链球菌(S.faecalis)、肺炎链球菌(S.pneumoniae)、变异链球菌(S.mutans)物种；厌氧球菌属，优选产氢厌氧球菌(A.hydrogenalis)、解乳厌氧球菌(A.lactolyticus)、八度厌氧球菌(A.octavius)、普氏厌氧球菌(A.prevotii)、四联厌氧球菌(A.tetradius)、阴道厌氧球菌(A.vaginalis)物种；芬戈尔德菌属，优选大芬戈尔德菌(F.magna)物种；普雷沃菌属，优选苏格兰普雷沃菌(P.albensis)、二路普雷沃菌(P bivia)、短普雷沃菌(P.brevis)、布氏普雷沃菌(P.bryantii)、粪便普雷沃菌(P.copri)、中间普雷沃菌(P.intermedia)、变黑普雷沃菌(P.nigrescens)、产黑色素普雷沃菌(P.melaninogenica)、口腔普雷沃菌(P.oralis)、口普雷沃菌(P.oris)、唾液普雷沃菌(P.salivae)物种；嗜胨菌属(Peptoniphilus)，优选不解糖嗜胨菌(P.asaccharolyticus)、海氏嗜胨菌(P.harei)、考克斯嗜胨菌(P.coxii)、阴道嗜胨菌(P.vaginalis)、劳氏嗜胨菌(P.raoultii)、帕氏嗜胨菌(P.pacaensis)、吲哚嗜胨菌(P.indolicus)、艾弗嗜胨菌(P.ivorii)、泪腺嗜胨菌(P.lacrimalis)物种；别样斯氏菌属，优选栖人体别样斯氏菌(Alloscardovia omnicolens)物种；葡萄球菌属，优选金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、耳葡萄球菌(Staphylococcus auricularis)、头状葡萄球菌(Staphylococcus capitis)、山羊葡萄球菌(Staphylococcus caprae)、科氏葡萄球菌(Staphylococcus cohnii)、海豚葡萄球菌(Staphylococcus delphini)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、溶血葡萄球菌(Staphylococcus haemolyticus)、人葡萄球菌(Staphylococcus hominis)、猪葡萄球菌(Staphylococcus hyicus)、中间葡萄球菌(Staphylococcus intermedius)、路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)、假中间葡萄球菌(Staphylococcus pseudintermedius)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、沃氏葡萄球菌(Staphylococcus warneri)、木糖葡萄球菌(Staphylococcus xylosus)；和棒状杆菌属物种，优选白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、阴道棒状杆菌(Corynebacterium vaginale)、扁阔棒状杆菌(Corynebacterium fascians)、皮欧氏棒状杆菌(Corynebacterium piogens)、简单棒状杆菌(Corynebacterium simplex)、马里棒状杆菌(Corynebacterium malli)、溃疡棒状杆菌(Corynebacterium ulcerans)、假结核棒状杆菌(Corynebacterium pseudotuberculosis)

(或绵羊棒状杆菌(Corynebacterium ovis))、化脓性棒状杆菌(Corynebacterium pyogenes)、溶血棒状杆菌(Corynebacterium haemolyticum)、谷氨酸棒状杆菌(Corynebacterium glutamicum)、水生棒状杆菌(Corynebacterium aquaticum)、假白喉棒状杆菌(Corynebacterium pseudodiptheriticum)(或哈氏棒状杆菌(Corynebacterium hofmannii))、解脲棒状杆菌(Corynebacterium urealyticum)(D2组棒状杆菌))、马棒状杆菌(Corynebacterium equi)、牛棒状杆菌(Corynebacterium bovis)、干燥棒状杆菌(Corynebacterium xerosis)、无枝菌酸棒状杆菌(Corynebacterium amycolatum)、杰氏棒状杆菌(Corynebacterium jeikeiun)(JK组棒状杆菌)、纹带棒状杆菌(Corynebacterium striatum)、纤弱棒状杆菌(Corynebacterium tenuis)、解葡糖醛酸棒状杆菌(Corynebacterium glucoronolyticum),以及它们的组合。

[0049] 在本发明的另一个实施方式中,所述病理状况同时由以下情况导致或与之相关:阴道生态系统中的乳杆菌(优选属于卷曲乳杆菌和格氏乳杆菌物种)水平的降低,和阴道生态系统中的至少一种致病体细菌(优选选自属于上文所述的属或种的致病体细菌)的增殖的增加。

[0050] 根据本发明的优选实施方式,如上所述,应用组合物(优选用于口服或局部应用)优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株,还包含单独考虑或组合考虑的细菌和/或酵母菌和/或真菌和/或其他微生物。

[0051] 酵母菌优选为酵母菌属,更优选为酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和/或布拉酵母(Saccharomyces boulardii)物种。

[0052] 通常,本发明的组合物中包含的微生物是EFSA QPS列表中指出的任何微生物物种的单一微生物或组合微生物。

[0053] 本发明的组合物的微生物优选是活微生物或死微生物,因此,在活微生物的情况下,该组合物也可以被定义为益生菌,而在死微生物的情况下,也可以被定义为副益生菌(paraproboitic)。

[0054] 作为另选,组合物的微生物是裂解物或提取物的形式,因此该组合物也可以被定义为副益生菌。

[0055] 在一个替代实施方式中,组合物还包含定义为后生元(postbiotics)的由微生物产生的代谢生物产物和/或任何其他细菌相关产品。

[0056] 因此,本发明的组合物也是已知的或推定的益生菌或副益生菌或后生元。

[0057] 组合物中的细菌可以被单独考虑或各自组合考虑。

[0058] 优选地,组合物中包含的细菌(优选副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物)能够在胃肠道中存活并能活着且有活力地到达肠道;然后,优选地,组合物中包含的细菌潜在地能够活着到达阴道生态系统(优选穿过直肠管)。

[0059] 根据本发明的一个方面,优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株的组合物所包含的细菌的含量(浓度)为每次施用(或每剂)10亿至1000亿、优选20亿至700亿、更优选20亿至600亿、更优选30亿至550亿个细菌细胞,更优选每次施用(或每剂)200亿至300亿细菌细胞。

[0060] 优选地，每天至少进行1至2次施用。施用可以通过任何途径进行。本发明的组合物可以配制用于通过肠胃途径施用，例如口服、舌下或经颊途径，或配制用于局部施用，例如经粘膜、直肠、皮肤或阴道施用。

[0061] 优选地，组合物的施用通过口服途径进行，更优选为片剂、胶囊、条、粒状粉末、凝胶帽(gelcap)、口溶性颗粒、小袋(sachet)、丸剂或可饮用小瓶的形式。

[0062] 作为另选，本发明的组合物被配制成能够通过局部途径进行作用的形式，例如作为妇科悬浮液用粉末、阴道胚珠(vaginal ovules)、阴道片剂和/或胶囊、阴道灌洗液、阴道凝胶、阴道乳膏或灌肠剂。

[0063] 作为另选，本发明的组合物被配制成液体，例如作为糖浆或作为饮料；或者所述组合物被添加到食品例如酸奶、奶酪、果汁中。

[0064] 在本发明的实施方式中，优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株的组合物还包含对于益生菌和/或药物和/或食品生产通常可接受的赋形剂。在本发明的背景下，用于药学或食品目的可接受的赋形剂包括本领域技术人员已知的用于制备固体、半固体或液体形式的组合物的所有辅助物质，例如稀释剂、溶剂(包括水、甘油、乙醇)、增溶剂、酸化剂、增稠剂、甜味剂、增香剂、着色剂、润滑剂、表面活性剂、防腐剂、pH稳定缓冲剂及其混合物。

[0065] 在本发明的另一个实施方式中，优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株的本发明的组合物可以用以下物质来充实：维生素、微量元素(优选锌和硒)、酶、益生元物质例如低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、菊粉、瓜尔豆胶，植物剂(即，植物提取物)、大豆异黄酮或其组合。

[0066] 优选地，针对上文所述的医疗应用，组合物可以通过口服或局部途径每天一次或每天两次进行施用。

[0067] 在优选的实施方式中，组合物连续地或在任何需要时以单次施用或每日数次施用的方式进行施用。

[0068] 本发明的另一方面涉及用于治疗性和/或预防性治疗女性泌尿生殖道(优选女性生殖道、更优选阴道)的病理状况或相关症状的方法，所述病理状况由阴道微生物群失衡所引起或与之相关，其中所述施用提供了对有需要的受试者的有效量的本发明的组合物的施用，所述组合物优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株。

[0069] 优选包含选自副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)、干酪乳杆菌DG®(CNCM I-1572)及其混合物的细菌菌株的本发明应用的组合物可以是药物组合物(或活生物治疗产品)、医疗器械组合物、膳食补充剂或食品，或者用于特殊医学目的的食品或益生菌产品的组合物，优选营养剂食品。

[0070] 在本发明的上下文中，表述“医疗器械”以根据1997年2月24日的意大利第46号法令或根据新的医疗器械法规(EU)2017/745(MDR)的含义使用。

[0071] 在本发明的上下文中，表述“受试者”用于指代人类受试者或动物受试者(例如宠物，如狗或猫或其他哺乳动物)。优选地，本发明的组合物用于针对人类受试者的治疗方法中。

[0072] 除非另有说明,以“包含在x至y范围内”的量包含成分的组合物或混合物等的表述用于指所述成分可以以所述范围内存在的所有量(即使没有指明,包括范围的端点)存在于组合物或混合物等中。

[0073] 本发明的实施方式(FRnr)如下所示:

[0074] FR1.一种包含属于乳杆菌属和/或双歧杆菌属的细菌、优选益生菌的组合物,其用于治疗和/或预防女性泌尿生殖道的病理状况,优选女性生殖道的病理状况,更优选阴道的病理状况,或用于治疗和/或预防与所述病理状况有关的症状所述病理状况由阴道微生物群失衡所引起或与之相关。

[0075] FR2.根据FR1应用的组合物,其中所述病理状况选自:女性泌尿生殖道的感染,优选女性生殖道的感染,更优选阴道感染;阴道病,优选细菌性和/或真菌性阴道病和/或与酵母菌和/或病毒有关的阴道病;念珠菌病、衣原体、生殖器疱疹、淋病;阴道炎,优选萎缩性阴道炎;外阴痛;月经周期改变,优选月经过多、月经过少,以及它们的组合。

[0076] FR3.根据FR1或FR2应用的组合物,其中与所述病理状况有关的所述症状选自:瘙痒、发红、灼热感、抽筋、分泌物、疼痛、性交困难、红斑、超敏反应、阴道排液、刺激性、宫颈炎、粘液及其组合。

[0077] FR4.根据FR1-FR3中任一项应用的组合物,其中所述病理状况与以下情况相关或依赖于以下情况:1)阴道生态系统中的乳杆菌属细菌(优选属于卷曲乳杆菌和/或格氏乳杆菌物种的细菌)的水平的降低,和/或2)阴道生态系统中的至少一种选自以下的微生物的增殖的增加:加德纳菌属,优选阴道加德纳菌属;多雷亚菌属,优选产甲酸多雷亚菌(D.formicigenerans)和长链多雷亚菌(D.longicatena)物种;链球菌属,优选化脓性链球菌(S.pyogenes)、无乳链球菌(S agalactiae)、粪链球菌(S.faecalis)、肺炎链球菌(S.pneumoniae)、变异链球菌(S.mutans)物种;厌氧球菌属,优选产氢厌氧球菌(A.hydrogenalis)、解乳厌氧球菌(A.lactolyticus)、八度厌氧球菌(A.octavius)、普氏厌氧球菌(A.prevotii)、四联厌氧球菌(A.tetradius)、阴道厌氧球菌(A.vaginalis)物种;芬戈尔德菌属,优选大芬戈尔德菌(F.magna)物种;普雷沃菌属,优选苏格兰普雷沃菌(P.albensis)、二路普雷沃菌(P bivia)、短普雷沃菌(P.brevis)、布氏普雷沃菌(P.bryantii)、粪便普雷沃菌(P.copri)、中间普雷沃菌(P.intermedia)、变黑普雷沃菌(P.nigrescens)、产黑色素普雷沃菌(P.melaninogenica)、口腔普雷沃菌(P.oralis)、口普雷沃菌(P.oris)、唾液普雷沃菌(P.salivae)物种;嗜胨菌属(Peptoniphilus),优选不解糖嗜胨菌(P.asaccharolyticus)、海氏嗜胨菌(P.harei)、考克斯嗜胨菌(P.coxii)、阴道嗜胨菌(P.vaginalis)、劳氏嗜胨菌(P.raoultii)、帕氏嗜胨菌(P.pacaensis)、吲哚嗜胨菌(P.indolicus)、艾弗嗜胨菌(P.ivorii)、泪腺嗜胨菌(P.lacrimalis)物种;别样斯氏菌属,优选栖人体别样斯氏菌(Alloscardovia omnicolens)物种;葡萄球菌属,优选金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、耳葡萄球菌(Staphylococcus auricularis)、头状葡萄球菌(Staphylococcus capitis)、山羊葡萄球菌(Staphylococcus caprae)、科氏葡萄球菌(Staphylococcus cohnii)、海豚葡萄球菌(Staphylococcus delphini)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、溶血葡萄球菌(Staphylococcus haemolyticus)、人葡萄球菌(Staphylococcus hominis)、猪葡萄球菌(Staphylococcus hyicus)、中间葡萄球菌(Staphylococcus intermedius)、路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)、假中间

葡萄球菌(Staphylococcus pseudintermedius)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、沃氏葡萄球菌(Staphylococcus warneri)、木糖葡萄球菌(Staphylococcus xylosus)物种;和棒状杆菌属,优选白喉杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、阴道棒状杆菌(Corynebacterium vaginale)、扁阔棒状杆菌(Corynebacterium fascians)、皮欧氏棒状杆菌(Corynebacterium piogens)、简单棒状杆菌(Corynebacterium simplex)、马里棒状杆菌(Corynebacterium malli)、溃疡棒状杆菌(Corynebacterium ulcerans)、假结核棒状杆菌(Corynebacterium pseudotuberculosis)(或绵羊棒状杆菌(Corynebacterium ovis))、化脓性棒状杆菌(Corynebacterium pyogenes)、溶血棒状杆菌(Corynebacterium haemolyticum)、谷氨酸棒状杆菌(Corynebacterium glutamicum)、水生棒状杆菌(Corynebacterium aquaticum)、假白喉棒状杆菌(Corynebacterium pseudodiptheriticum)(或哈氏棒状杆菌(Corynebacterium hofmannii))、解脲棒状杆菌(Corynebacterium urealyticum)(D2组棒状杆菌))、马棒状杆菌(Corynebacterium equi)、牛棒状杆菌(Corynebacterium bovis)、干燥棒状杆菌(Corynebacterium xerosis)、无枝菌酸棒状杆菌(Corynebacterium amycolatum)、杰氏棒状杆菌(Corynebacterium jeikeiun)(JK组棒状杆菌)、纹带棒状杆菌(Corynebacterium striatum)、纤弱棒状杆菌(Corynebacterium tenuis)、解葡糖醛酸棒状杆菌(Corynebacterium glucoronolyticum),以及它们的组合。

[0078] FR5.根据FR1-FR4中任一项应用的组合物,其中所述乳杆菌属的细菌属于以下物种中的至少一种:副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)、嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)、鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)、解淀粉乳杆菌(Lactobacillus amylolyticus)、食淀粉乳杆菌(Lactobacillus amylovorus)、消化乳杆菌(Lactobacillus alimentarius)、鸟乳杆菌(Lactobacillus aviaries)、短乳杆菌(Lactobacillus brevis)、布氏乳杆菌(Lactobacillus buchneri)、干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)、纤维二糖乳杆菌(Lactobacillus cellobiosus)、棒状乳杆菌(Lactobacillus coryniformis)、卷曲乳杆菌(Lactobacillus crispatus)、弯曲乳杆菌(Lactobacillus curvatus)、德氏乳杆菌(Lactobacillus delbrueckii)、法氏乳杆菌(Lactobacillus farciminis)、发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum)、母鸡乳杆菌(Lactobacillus gallinarum)、格氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)、瑞士乳杆菌(Lactobacillus helveticus)、希氏乳杆菌(Lactobacillus hilgardii)、惰性乳杆菌(Lactobacillus iners)、詹氏乳杆菌(Lactobacillus jensenii)、约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)、马乳酒样乳杆菌(Lactobacillus kefiranofaciens)、开菲尔乳杆菌(Lactobacillus kefiri)、粘膜乳杆菌(Lactobacillus mucosae)、面包乳杆菌(Lactobacillus panis)、丘状乳杆菌(Lactobacillus collinoides)、类植物乳杆菌(Lactobacillus paraplantarum)、戊糖乳杆菌(Lactobacillus pentosus)、植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)、桥乳杆菌(Lactobacillus pontis)、罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri)、清酒乳杆菌(Lactobacillus sakei)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)、旧金山乳杆菌(Lactobacillus sanfranciscensis)及其组合。

[0079] FR6.根据FR1-FR5中任一项应用的组合物,其中所述乳杆菌属细菌是副干酪乳杆

菌物种LPC-S01菌株(DSMZ的DSM 26760)和/或干酪乳杆菌物种菌株DG®(副干酪乳杆菌CNCM I1572)。

[0080] FR7.根据FR1-FR6中任一项应用的组合物,其中双歧杆菌属的细菌属于以下物种中的至少一种:动物双歧杆菌(B.animalis)、两岐双歧杆菌(B.bifidum)、短双歧杆菌(B.breve)、婴儿双歧杆菌(B.infantis)、长双歧杆菌(B.longum)、青春双歧杆菌(B.adolescentis)、链状双歧杆菌(B.catenulatum)、角双歧杆菌(B.angulatum)、星状双歧杆菌(B.asteroides)、牛双歧杆菌(B.boum)、猪双歧杆菌(B.choerinum)、棒状双歧杆菌(B.coryneforme)、兔双歧杆菌(B.cuniculi)、栖齿双歧杆菌(B.denticolens)、齿双歧杆菌(B.dentium)、高卢双歧杆菌(B.gallicum)、鸡双歧杆菌(B.gallinarum)、印度双歧杆菌(B.indicum)、异形双歧杆菌(B.inopinatum)、乳双歧杆菌(B.lactis)、大双歧杆菌(B.magnum)、瘤胃双歧杆菌(B.merycicum)、最小双歧杆菌(B.minimum)、假链状双歧杆菌(B.pseudocatenulatum)、假长双歧杆菌(B.pseudolongum)、小鸡双歧杆菌(B.pullorum)、反刍双歧杆菌(B.ruminantium)、世纪双歧杆菌(B.saeculare)、纤细双歧杆菌(B.subtile)、嗜热嗜酸双歧杆菌(B.thermacidophilum)、嗜热双歧杆菌(B.thermophilum)、鹤见双歧杆菌(B.tsurumiense)及其组合。

[0081] FR8.根据FR1-FR7中任一项应用的组合物,其中所述组合物还包含:细菌、酵母菌、真菌和/或其他微生物。

[0082] FR9.根据FR1-FR8中任一项应用的组合物,其中所述酵母属于酵母菌属,优选属于酿酒酵母和/或布拉酵母物种。

[0083] FR10.根据FR1-FR9中任一项应用的组合物,其中所述细菌是活细菌或死细菌,是裂解物或提取物的形式,或为后生元的形式。

[0084] FR11.根据权利要求FR1-FR10中任一项应用的组合物,其中所述细菌的含量为每次施用10亿至1000亿细菌细胞、优选20亿至600亿细菌细胞、更优选20亿至500亿细菌细胞,甚至更优选30亿至550亿细菌细胞,更优选每次施用200亿至300亿细菌细胞。

[0085] FR12.根据FR1-FR11中任一项应用的组合物,其被配制用于口服应用,优选为片剂、胶囊、条、粒状粉末、凝胶帽、口溶性颗粒、小袋、丸剂或可饮用小瓶的形式;或者所述组合物被配制为能够通过局部途径进行作用的形式,优选例如妇科悬浮液用粉末、阴道胚珠、阴道片剂和/或胶囊、阴道灌洗液、阴道凝胶、阴道乳膏或灌肠剂;或者所述组合物被配置为液体,优选作为糖浆或作为饮料;或者所述组合物被添加到食品中,优选添加到酸奶、奶酪、果汁中。

[0086] FR13.根据FR1-FR12中任一项应用的组合物,其中所述组合物每天施用至少1-2次。

[0087] FR14.根据FR1-FR13中任一项应用的组合物,其与以下进行组合:氨基酸、补充剂、维生素、微量元素(优选锌和/或硒)、酶和/或益生元物质、优选低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、菊粉、瓜尔豆胶、植物剂(即,植物提取物)、大豆异黄酮或其组合。

[0088] FR15.包含属于乳杆菌属和/或双歧杆菌属的细菌、优选益生菌的组合物的应用,其用于:1)增加卷曲乳杆菌和/或格氏乳杆菌物种的细菌的水平或增加其增殖,和/或2)减少选自以下的至少一种微生物的水平或降低其增殖:加德纳菌属,优选阴道加德纳菌物种;多雷亚菌属,优选产甲酸多雷亚菌和长链多雷亚菌物种;链球菌属,优选化脓性链球菌、无

乳链球菌、粪链球菌、肺炎链球菌、变异链球菌物种;厌氧球菌属,优选产氢厌氧球菌、解乳厌氧球菌、八度厌氧球菌、普氏厌氧球菌、四联厌氧球菌、阴道厌氧球菌物种;芬戈尔德菌属,优选大芬戈尔德菌物种;普雷沃菌属,优选苏格兰普雷沃菌、二路普雷沃菌、短普雷沃菌、布氏普雷沃菌、粪便普雷沃菌、中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌、产黑色素普雷沃菌、口腔普雷沃菌、口普雷沃菌、唾液普雷沃菌物种;嗜胨菌属,优选不解糖嗜胨菌、海氏嗜胨菌、考克斯嗜胨菌、阴道嗜胨菌、劳氏嗜胨菌、帕氏嗜胨菌、吲哚嗜胨菌、艾弗嗜胨菌、泪腺嗜胨菌物种;别样斯氏菌属,优选栖人体别样斯氏菌物种;葡萄球菌属,优选金黄色葡萄球菌、耳葡萄球菌、头状葡萄球菌、山羊葡萄球菌、科氏葡萄球菌、海豚葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、猪葡萄球菌、中间葡萄球菌、路邓葡萄球菌、假中间葡萄球菌、腐生葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、木糖葡萄球菌;和棒状杆菌属物种,优选白喉杆菌、阴道棒状杆菌、扁阔棒状杆菌、皮欧氏棒状杆菌、简单棒状杆菌、马里棒状杆菌、溃疡棒状杆菌、假结核棒状杆菌(或绵羊棒状杆菌)、化脓性棒状杆菌、溶血棒状杆菌、谷氨酸棒状杆菌、水生棒状杆菌、假白喉棒状杆菌(或哈氏棒状杆菌)、解脲棒状杆菌(D2组棒状杆菌))、马棒状杆菌、牛棒状杆菌、干燥棒状杆菌、无枝菌酸棒状杆菌、杰氏棒状杆菌(JK组棒状杆菌)、纹带棒状杆菌、纤弱棒状杆菌、解葡糖醛酸棒状杆菌,以及它们的组合。

[0089] 实施例

[0090] 在该背景下,借助以安慰剂进行对照的随机化、双盲、交叉临床研究,经实验证明了采用本发明的主题组合物(简称“研究组合物”)通过口服途径施用的副干酪乳杆菌菌株LPC-S01(DSM 26760):

[0091] -能够以活体形式到达阴道水平;

[0092] -定性且定量地改变阴道微生物群的组成。

[0093] 副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)是最初从健康成年女性的阴道粘膜中分离出的细菌菌株,其经证实具有与作为肠道益生菌使用相容的特性,因为它具有抵抗体内胃肠道转运、粘附于体外肠上皮、并在极化的Caco-2肠上皮细胞中在炎性刺激的存在下减少NF-κB的活化的能力(Balzaretti等,2015)。

[0094] 该试验涉及以下步骤:

[0095] -预招募步骤(4周),其中健康志愿者遵循其常规饮食,禁止服用:益生菌发酵乳(因此允许服用常规酸奶)、益生菌膳食补充剂、益生元膳食补充剂;

[0096] -该预招募期结束时,志愿者被随机分配每天接受1粒PREGYN®(Sofar,Trezzano Rosa,意大利)胶囊或不含微生物的安慰剂的胶囊,持续4周;

[0097] PREGYN®由包含240亿CFU(集落形成单位)的副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)的胶囊组成。安慰剂由与益生菌相同的胶囊组成。活性物质和安慰剂的味道和颜色相同。

[0098] 所述产品在早晨早餐前至少10分钟在饥饿条件下施用,或者如果忘记则在晚上睡觉前施用,无论何种情况均在前一餐后2小时施用。

[0099] -在治疗的首个4周之后,志愿者经历与预招募期相同的4周洗脱(wash-out)。

[0100] -在洗脱期结束时,根据交叉设计,志愿者每天服用1粒PREGYN®或安慰剂胶囊,持续4周。

[0101] 该试验方案已经由米兰大学萨科医院(Sacco hospital,Università degli Studi di Milano)的研究伦理委员会批准(意见0019288号,2015年7月24日)。

[0102] 准入标准

[0103] • 健康的成年女性,年龄在18至45岁之间,且18.5≤BMI≤25

[0104] • 患者的书面知情同意

[0105] 排除标准

[0106] 存在下列标准的任一项都导致志愿者被排除在试验之外:

[0107] • 前三个月的泌尿生殖系统感染,尤其是细菌性阴道病

[0108] • 泌尿生殖异常

[0109] • 已确认或计划怀孕的女性或母乳喂养的女性

[0110] • 在实验开始前一个月服用抗生素和/或益生菌

[0111] • 正在或在招募前一个月内通过全身或局部途径使用类固醇、速通血糖皮质激素(如倍氯米松二丙酸酯或布地奈德)进行治疗;

[0112] • 慢性炎性肠病;

[0113] • 传染性、光化性、内分泌性或由药物引起或与之有关的肠道疾病(微观结肠炎);

[0114] • 免疫缺陷;

[0115] • 具有任何类型的恶性肿瘤或既往有肿瘤史的志愿者(因此,可以招募那些既往患有经手术切除的其他恶性肿瘤并在入选试验前的五年内未显示复发的患者);

[0116] • 具有临床意义的肾脏、肝脏、血液、心脏、肺、神经、精神、免疫、胃肠道或内分泌疾病;

[0117] • 任何可能干扰治疗的严重疾病;

[0118] • 最近的酒精或物质滥用史或者怀疑滥用酒精或物质;

[0119] • 存在任何类型的痴呆症或其他可能导致精神能力逐步下降或心理-身体能力丧失(从而降低接受处方治疗的能力)的原因

[0120] • 可靠性不足或存在能够确定志愿者不服从/无法参加方案的条件

[0121] • 以前参加过此试验

[0122] 志愿者招募和研究设计

[0123] 最初指引每位志愿者遵循整个程序,涉及从受试者月经结束约14天后每位志愿者共5次会面。在第一次会面期间,收集志愿者的知情同意书和个人数据。此外,志愿者获得了有关试验实施的一般信息,并被告知在接下来的4周预招募中将要进行的饮食改变(禁止服用前文指定的产品)。最后,志愿者填写有关其饮食习惯和性生活的问卷,并接收特殊日志,该日志要在试验结束前每天填写。

[0124] 4周后,志愿者携带其粪便样品参加第二次会面(样品T0,访问V1),该粪便样品在之前的24小时内收集在前一次会面分发的专用容器中。为了最佳保存,将粪便样品保存在环境温度下,并在24小时内送到实验室。此外,进行阴道拭子并抽血。在第二次会面时,给予志愿者提在接下来的4周内要服用的益生菌产品(或安慰剂)。最后,指导志愿者如何服用该产品,并填写第一次会面时所填写的关于饮食习惯和性生活的相同问卷。

[0125] 在服用产品(或安慰剂)的4周结束时,志愿者参加第三次会面,并在之前的24小时内收集了另一份粪便样品(T1,访问V2),并进行了另一次阴道拭子检查,并再抽血。在第三次会面时,志愿者填写了一份与摄取产品有关的可能效果(正面和负面)的问卷。然后,对志愿者进行随后4周的指导,在此期间,志愿者再次无法服用前文提到的产品,并填写了与先

前会面相同的问卷。

[0126] 在这4周结束时，志愿者携带其粪便样品参加第四次会面(T2，访问V3)，进行阴道拭子并抽血，收到要在随后4周服用的益生菌产品(或安慰剂)。最后，志愿者填写了与先前会面相同的问卷。

[0127] 最后，在服用产品(或安慰剂)4周后，志愿者参加第五次会面，提交最终的粪便样品(T3，访问V4)并进行了最终的阴道拭子和抽血。在最后一次会面期间，志愿者填写了与第三次会面时所给出的相似的问卷。此外，在这次会面中，志愿者还填写相同的饮食习惯和性生活问卷，并交回日志。

[0128] 每次访问都收集前几周志愿者饮食的信息。

[0129] 招募了40名志愿者，其中24名按照所述方案(服从率60％)完成了试验。

[0130] 方法和材料

[0131] 益生菌产品和安慰剂胶囊

[0132] -益生菌产品(根据本发明的组合物)包含在明胶胶囊中，该明胶胶囊含有至少240亿副干酪乳杆菌LPC-S01菌株(DSM 26760)的活细胞。所述胶囊包含二氧化硅和硬脂酸镁作为抗结块剂，并在外部用二氧化钛着色。

[0133] -安慰剂由颜色和形状均与益生菌产品相同的胶囊组成。

[0134] 阴道样品收集和总DNA提取

[0135] 在访问V1、V2、V3和V4时收集阴道拭子(表1)，转移至750μl PowerBead溶液(Qiagen GmbH，Hilden，德国)中，并保存在-80℃直至进行DNA提取处理。此外，在访问V1至V4期间，志愿者提交在此前24小时内收集在访问V0时给予其的专用容器内的粪便样品。粪便样品也在如下进行DNA提取处理前保存在-80℃。

[0136] 将PowerBead溶液中的阴道拭子在冰中解冻。在无菌条件下，将拭子在采样管的内壁上旋转挤压数次，以释放附着在阴道拭子上的缓冲液或阴道粘液的全部量(随后的拭子用于分离目标益生菌菌株)。然后使用DNeasy® PowerLyzer® PowerSoil®试剂盒(Qiagen GmbH)对样品进行处理，细微改动包括在添加溶液C1之后将样品在PowerBead溶液中于65℃温育10分钟。使用Bead Beater Precellys 24(Bertin Technologies，Montigny le Bretonneux，法国)进行细胞的机械裂解。遵循类似的程序以从粪便样品中提取DNA。特别地，在冰中解冻后，使用无菌刮刀将样品强力混合2至3分钟。将样品在PowerBead试管中称重(250mg)，并如上所述提取DNA。使用Take3 Micro-Volume对从阴道或粪便样品中获得的DNA进行定量，使用Gen5软件(BioTek Instruments，Inc.，Winooski，VT，美国)在微孔板阅读器中进行分析，稀释至10ng/μl并在-80℃保存待用。

[0137] 在实验中心收集的所有粪便和阴道样品都应在进行微生物群分析之前保存在-80℃。具体而言，就16S rRNA细菌核糖体亚基编码基因部分和就副干酪乳杆菌LPC-S01菌株的存在进行核苷酸序列分析，分析了粪便和阴道微生物群。更具体地，采用了由以下步骤组成的宏基因组学策略：

[0138] -样品的宏基因组DNA的提取、定量和归一化；

[0139] -PCR扩增编码细菌基因的16S rRNA的高变区V3；

[0140] -PCR产物的定量；

[0141] -使用Ion Torrent(单次读取200bp；Life Technologies)的融合引物技术进行测

序;

[0142] -序列的生物信息学分析(微生物群落的表征、层次聚类、分类学分析、使用热图构建系统发育树状图)。

[0143] 使用定量PCR对阴道和粪便中的副干酪乳杆菌LPC-S01的定量

[0144] 使用采用qS01a-F(5'TGGAAGAGACCCTGCGAA-3')和qS01a-R(5'GAGGTTGATTCACAAACCGTGC-3')(靶向LPC-S01菌株的基因组计划中的蛋白的理论编码序列的菌株特异性引物)的定量PCR(qPCR)对阴道和粪便样品中的益生菌菌株副干酪乳杆菌LPC-S01(DSM 26760)进行定量(Balzaretti等,2015)。此外,使用预期用于基因16S rRNA的V3-V5区的357F-907R泛细菌引物来定量细菌总数(Muyzer等,1993)。qPCR扩增至最终体积为15μl,其包含7.5μlEvaGreen®Supermix(Bio-Rad Laboratories S.r.l.,Segrate,意大利)、0.5μM的各种引物和50ng来自阴道和粪便样品的宏基因组DNA。使用以下条件进行扩增:初始在95℃保持3分钟,以下循环39次:在95℃保持30秒,在58℃保持30秒,在72℃保持30秒。使用Bio-Rad CFX Manager 3.1分析融合曲线,以确认扩增产物的特异性。通过在阴道拭子中混合不同数量的LPC-S01细胞来准备用于定量LPC-S01细胞的标准校准曲线。为此,从志愿者那里收集大量阴道拭子样品,并将其转移到750mL的PowerBead溶液中。将拭子样品在试管中合并,充分混合并均匀分配在七个试管中。使用C6 Plus BD Accuri™流式细胞仪(BD Biosciences,San Jose,California,美国)对副干酪乳杆菌LPC-S01进行定量后,将益生菌细胞(101至106个细胞)添加到每个拭子样品中(从101个到106个细胞),例外的是一个不添加细菌细胞而用作对照样品;然后,如上所述提取DNA。类似地,如上所述,准备用于定量粪便样品中益生菌菌株的标准校准曲线(Arioli等,2018)。此外,通过建立阴道拭子池来准备用于定量阴道拭子样品中总细菌细胞的标准校准曲线。为此,健康志愿者将阴道拭子样品提交至750ml PowerBead溶液中并混合。然后,将阴道拭子池正确混合并通过离心浓缩。通过流式细胞术确定细菌细胞的总浓度后,将浓缩的缓冲液连续稀释,并按照上述步骤对每个稀释液进行DNA提取。随后将从阴道拭子池的各先前稀释液中获得的DNA用于定量PCR,以生成标准校准曲线,从而用于估计阴道拭子样品和试验中的总细菌细胞。

[0145] 通过qPCR定量阴道拭子中的阴道加德纳菌

[0146] 使用qPCR用靶向乳酸脱氢酶基因的物种特异性引物确定阴道拭子中存在阴道加德纳菌的细胞。

[0147] 从阴道拭子中分离副干酪乳杆菌LPC-S01

[0148] 经过无菌处理以完全提取DNA后,将阴道拭子转移至补充了核糖(1%p/v)、万古霉素(1μg/ml)和卡那霉素(10μg/ml)的Man-Rogosa-Sharpe(MRS)(pH 6.5)培养液(rvkMRS)中以用于益生菌菌株的半选择性分离。将含有拭子的接种的培养液试管在厌氧条件下(Anaerocult A,Merck KGaA,Darmstadt,德国)在37℃温育48小时。如上所述,将培养液用于提取DNA和使用LPC-S01特异性引物进行qPCR。将每种培养液同时铺在琼脂培养基(琼脂rvkMRS)上。在显微镜下检查随机选择的菌落以确立其形态,并通过集落PCR进行鉴定其(Arioli等,2018)。

[0149] 阴道和粪便样品的rRNA 16S基因的扩增

[0150] 使用Illumina HiSeq 2500对可变区V3-V4快速运行测序,并通过16S rRNA基因的扩增,在基因组科学研究所(University of Maryland,School of Medicine,Baltimore,

MD,美国)中分析了从粪便样品和阴道拭子中提取的DNA。共215个样品产生的读数的总数为6,470,846,平均每个样品30,097个读数。过滤后的读数的总数为5,501,139,其中5,099,077个读数进行了合并。尤其是,对于阴道和粪便DNA,每个样品的组合读数的数量分别为13,340±8,677(平均值±标准差)(最大-最小值11,594-4,570)和34,387±9,376(34,125-22,393)。使用R统计软件(3.1.2版)以及与speciateIT分类分配工具相关的DADA2软件包(Callahan等,2016),分析了用于分析粪便和阴道微生物群的16S rRNA基因谱数据。

[0151] 关于区域V3-V4,DADA2使用255nt以上的读取截留值且在反向读取中使用225nt。根据GitHub上可免费获取的个性化管线(https://github.com/Ravel-Laboratory/speciateIT)在SILVA数据库上进行了分类学分配。使用R软件分别进行了α-多样性(Chao1、辛普森(Simpson)、逆辛普森(invSimpson)和香农(Shannon))和β-多样性指数分析以分别描述主体内和主体间多样性。基于样品中最具代表性的分类单元(taxon)的相对丰度,进行群落状态类型的阴道微生物群分层,使用每个样品总读数的50%作为限制。如果样品中没有分类单元超过50%的丰度,则将该样品分配给群落状态类型(CST)IV。元数据已提交至欧洲生物信息学研究所的欧洲核苷酸档案库(ENA)中,保藏号为PRJEB30833。

[0152] 统计分析

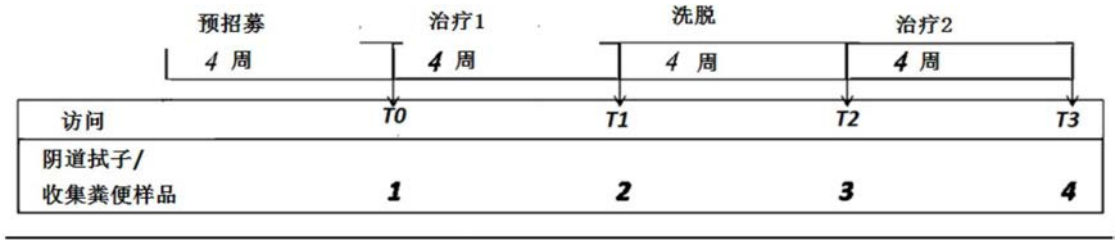
[0153] 对于必要时通过使用Benjamini-Hochberg校正(Haynes,2013年)配对的数据,通过带符号秩Wilcoxon检验确定细菌类群相对丰度的统计学显著变化。使用Kendall和Spearman公式进行了与粪便和阴道分类单元的相对丰度的相关性分析。显著性设定为$P \leq 0.05$;在$0.05<P<0.10$区间内的显著性承认为趋势。为了找到益生菌治疗与相对细菌丰度变化之间的联系,通过使用R统计软件(版本3.4.2)中的"lme4"库中的"lmer"功能,采用了由自动学习监督的LMM(线性混合模型)算法(Bates等,2015)。使用Akaike信息准则(AIC)对MM适应性进行测试。

[0154] 研究设计

[0155] 试验涵盖如表1所述的5次访问。

[0156] 表1

[0157]



[0158] 结果

[0159] 考虑到群落状态类型(CST)的分层样品进行了统计分析,目的是考虑即使数量较少但在分类学组成方面仍可能更加均一的样品。

[0160] -基线志愿者的阴道微生物群的组成(T0,访问V1)。

[0161] 测序读数的分类分配后,共发现69个细菌分类群(每个样品平均17个分类单元,中位数为15个分类单元)。该分析表明,在试验的女性受试者(n=10)中最为常见的CST I(卷曲乳杆菌优势)存在显著差异(图1和2)。事实上,最主要的细菌是卷曲乳杆菌和惰性乳杆菌,在68%的受试者中被检出,其次是芬戈尔德菌属(65%)、链球菌属(65%)和双歧杆菌属(62%)。其它分类单元均见于少于50%的受试者中。

[0162] -安全性和耐受性。

[0163] 试验期间未观察到严重不良事件。

[0164] -治疗后志愿者的阴道微生物群的组成。

[0165] 为了确定口服副干酪乳杆菌LPC-S01菌株是否改变了所研究受试者的阴道微生物群组成,我们使用了rRNA 16S基因谱分析,以对从没有按照方案完成试验的女性收集的4个阴道拭子(每个受试者)进行了分析。特别地,根据表1中所示的交叉设计,在施用根据本发明的组合物(或安慰剂)的步骤之前和之后立即表征阴道细菌群落。

[0166] 特别是,观察到潜在致病体的显著减少,如葡萄球菌属(P=0.022)、芬戈尔德菌属(P=0.022)和厌氧球菌属(P=0.036),它们都与细菌性阴道病有关(表2A)。

[0167] 关于CST I,观察到关于卷曲乳杆菌(P=0.064)物种的增加趋势,以及另外两种普雷沃菌属(P=0.059)和嗜胨菌属(P=0.059)致病体的减少趋势(表2A)(图3)。

[0168] 最后,当一起考虑CST摄生学(eubiotics)I、II(加氏乳杆菌占优势)和"Bif"(双歧杆菌属占优势)时(n=13),在服用益生菌时,观察到细菌分类单元的显著变化。

[0169] 特别是,在服用益生菌的时段后(T1,访问V2),观察到卷曲乳杆菌的明显增加(P=0.027)和厌氧球菌属的减少(P=0.036),以及涉及芬戈尔德菌属(P=0.067)和葡萄球菌属(P=0.097)的下降趋势。

[0170] 相反,对于同一组受试者,仅观察到双歧杆菌属相对于服用安慰剂步骤的增加趋势(P=0.059)(表2B)。

[0171] 表2A

[0172]

	副干酪乳杆菌 LPC-S01		安慰剂	
属	**P 值**	**趋势**	**P 值**	**趋势**
葡萄球菌属	**0.022**	**减少**	n.s.	/
芬戈尔德菌属	**0.022**	**减少**	n.s.	/
厌氧球菌属	**0.036**	**减少**	n.s.	/
普雷沃菌属	0.059	减少	n.s.	/
嗜胨菌属	0.059	减少	n.s.	/
卷曲乳杆菌	0.064	增加	n.s.	/

[0173] 表2B

[0174]

	副干酪乳杆菌 LPC-S01		安慰剂	
属	**P 值**	**趋势**	**P 值**	**趋势**
卷曲乳杆菌	**0,026**	**增加**	n.s.	/
厌氧球菌属	**0.036**	**减少**	n.s.	/
芬戈尔德菌属	0,066	减少	n.s.	/
葡萄球菌属	0,097	减少	n.s.	/
双歧杆菌属	n.s.	/	0.059	增加

[0175] 相反,在其他CST的任何特定分类单元中均未观察到明显变化,这可能是由于样品之间的分类组成的极大变化和/或每组受试者的数量有限而造成的。

[0176] 由于阴道细菌群落结构的强分层和根据方案完成试验的志愿者人数相对较少(n=24),这极大限制了评估口服施用益生菌对阴道微生物群中特定细菌分类单元的相对丰度的影响的可能性。因此,通过"Wilcoxon符号秩"检验针对在至少30%样品中存在的分类

单元的进行了统计分析(任意限制)。Wilcoxon符号秩检验表明,在LPC-S01施用期后,加德纳菌属的相对丰度显著降低(P＝0.0496)(图5.a)。考虑到阴道加德纳氏菌的致病性,这些结果表明该组合物研究对象对阴道微生物生态系统具有潜在的积极作用。

[0177] 还通过qPCR实验观察到在施用本发明的组合物期间阴道加德纳菌的丰度显著降低,所述qPCR实验是使用阴道加德纳菌的特异性引物对从阴道拭子提取的DNA进行的(图5.b)。

[0178] 此外,观察到加氏乳杆菌物种的增加趋势(P＝0.078)(图4)。

[0179] -从志愿者的阴道中回收副干酪乳杆菌LPC-S01菌株

[0180] 阴道拭子的16S rRNA基因谱显示在3个受试者(受试者S1、S17和S23中存在分类学上指认为副干酪乳杆菌/鼠李糖乳杆菌的读数)。特别地,所述读数是在施用本发明的组合物后出现在这三名志愿者中的;因此,从理论上讲,这些结果是副干酪乳杆菌LPC-S01菌株从小肠向阴道粘膜迁移的结果。为了验证该理论,使用从试验期间收集的所有阴道拭子分离的DNA,使用副干酪乳杆菌LPC-S01菌株的特异性引物进行了qPCR分析。根据rRNA 16S基因谱分析,仅针对受试者S1(对于在访问V2时收集的拭子)和S17(对于在访问V2和V3时收集的拭子)获得了显著扩增,而对受试者S32没有获得显著扩增。此外,仅在来自受试者S17的拭子的rvkMRS平板上分离出副干酪乳杆菌LPC-S01菌株。此外,对每个菌株进行了特异性qPCR测试,以对粪便样品中的副干酪乳杆菌LPC-S01菌株定量。LPC-S01仅在23个研究对象的21个中在益生菌施用期结束时收集到的粪便样品中观察到,浓度为每克粪便中5.6至8.1log10细胞。

[0181] 总体上,这些结果证明副干酪乳杆菌LPC-S01菌株迁移并在一定百分比的摄入该细菌的健康女性的阴道粘膜临时定殖。

[0182] 结论

[0183] 因此,施用PREGYN®(根据本发明的组合物)能够重新平衡阴道微生物群,增加乳杆菌(例如卷曲乳杆菌)的浓度,这对于防止对阴道生态系统具有潜在致病性的微生物的高增殖很重要。

[0184] 在用本发明的组合物处理的三分之二的分析对象的阴道拭子样品中观察到副干酪乳杆菌LPC-S01,表明通过口服途径摄取的副干酪乳杆菌LPC-S01可以在阴道中定殖,即使是有限的。

[0185] 此外,PREGYN®(本发明的组合物)对于降低潜在以下致病微生物的水平是重要的:例如加德纳菌属、多雷亚菌属、链球菌属、厌氧球菌属、芬戈尔德菌属、普雷沃菌属、嗜胨菌属、别样斯氏菌属、葡萄球菌属和棒状杆菌属(优选加德纳菌属、厌氧球菌属、芬戈尔德菌属和葡萄球菌属)。

[0186] 总之,该试验证实,健康的意大利高加索人育龄女性的阴道微生物群可以在先前针对其他人群描述的相同群落结构中进行分层。此外,已确认卷曲乳杆菌占优势的CST在育龄的高加索人女性中最为常见,其次是惰性乳杆菌占优势的CST。最后,该试验表明,健康女性的阴道细菌生态系统相当稳定;但是,口服施用副干酪乳杆菌LPC-S01细菌菌株可以影响特定分类单元如阴道加德纳菌的相对丰度。该发现表明,口服施用副干酪乳杆菌LPC-S01细菌菌株对阴道微生物生态系统具有潜在的积极影响。

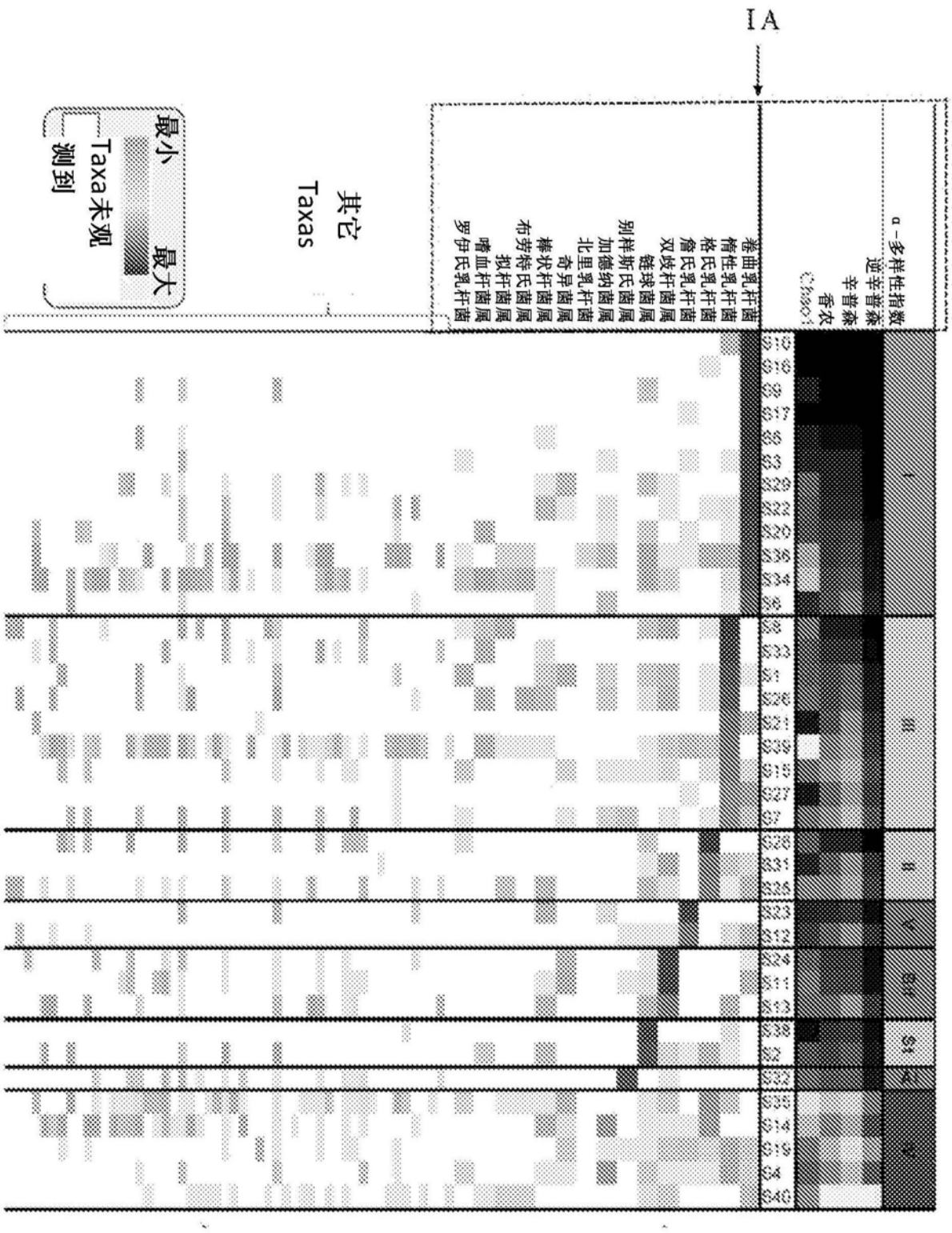

IA
α-多样性指数
逆辛普森
辛普森
香农
Chao1
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
詹氏乳杆菌
双歧杆菌属
链球菌属
别样斯氏菌属
加德纳菌属
北里乳杆菌
奇异菌属
棒状杆菌属
布劳特氏菌属
拟杆菌属
嗜血杆菌属
罗伊氏乳杆菌
其它
Taxas
最小
最大
Taxa未观
测到
S10
S16
S9
S17
S5
S3
S29
S22
S20
S36
S34
S6
S8
S33
S1
S26
S21
S39
S15
S27
S7
S28
S31
S25
S23
S12
S24
S11
S13
S38
S2
S32
S35
S14
S19
S4
S40
I
III
II
V
Bif
St
Al
H

图1

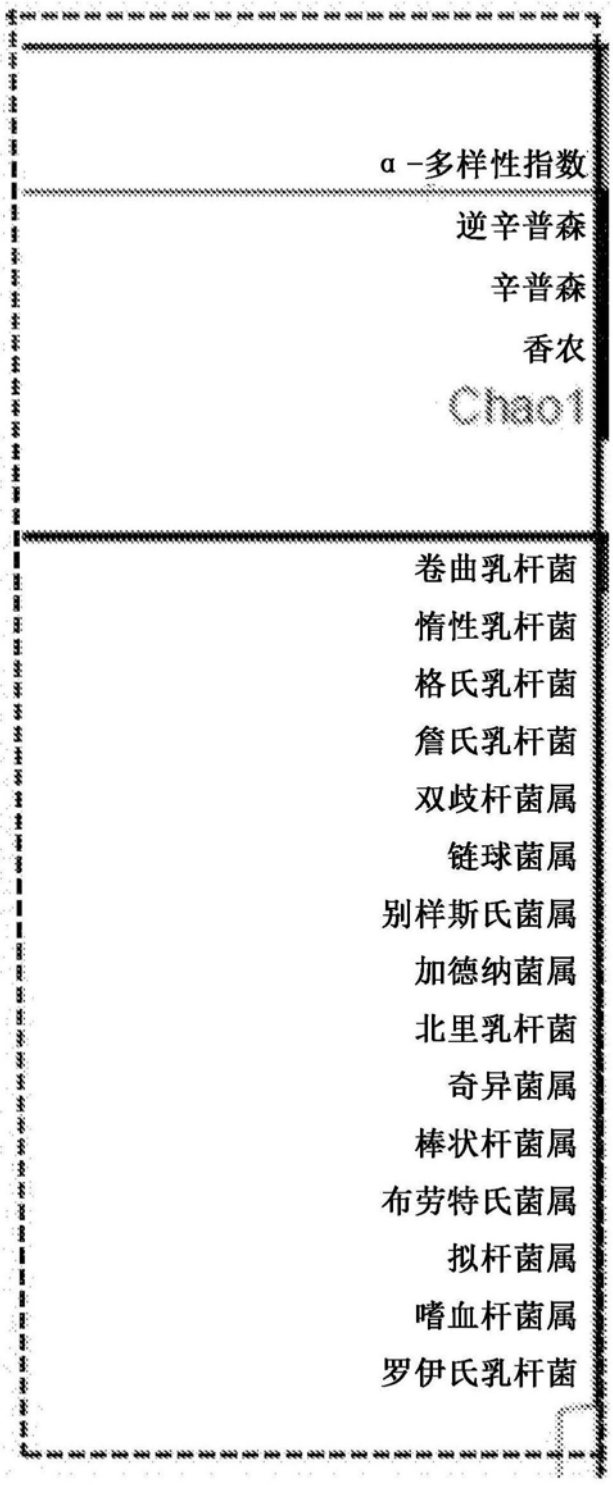

α-多样性指数
逆辛普森
辛普森
香农
Chao1
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
詹氏乳杆菌
双歧杆菌属
链球菌属
别样斯氏菌属
加德纳菌属
北里乳杆菌
奇异菌属
棒状杆菌属
布劳特氏菌属
拟杆菌属
嗜血杆菌属
罗伊氏乳杆菌

图1A

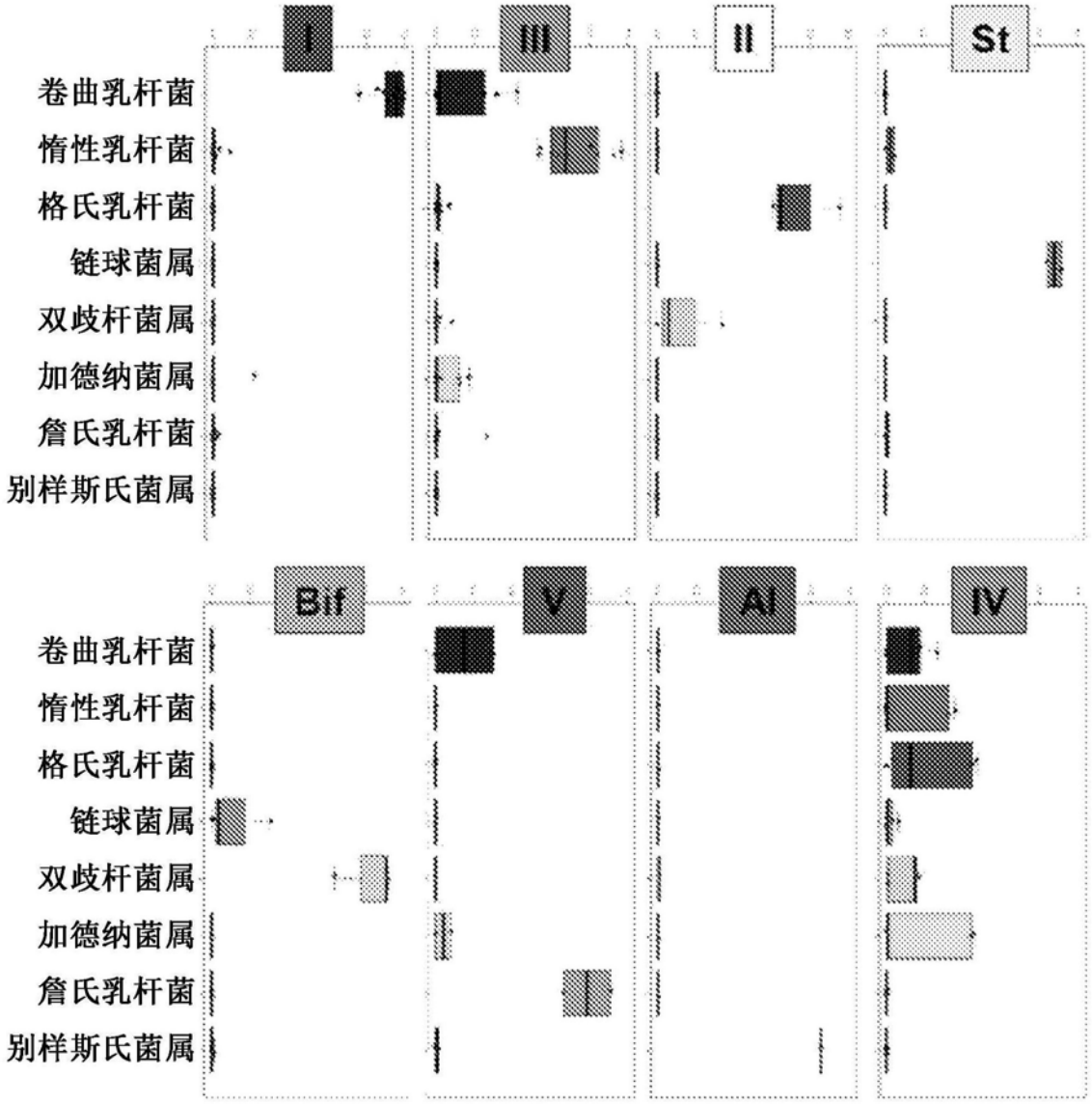

I
III
II
St
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
链球菌属
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌
别样斯氏菌属
Bif
V
Al
IV
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
链球菌属
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌
别样斯氏菌属

图2

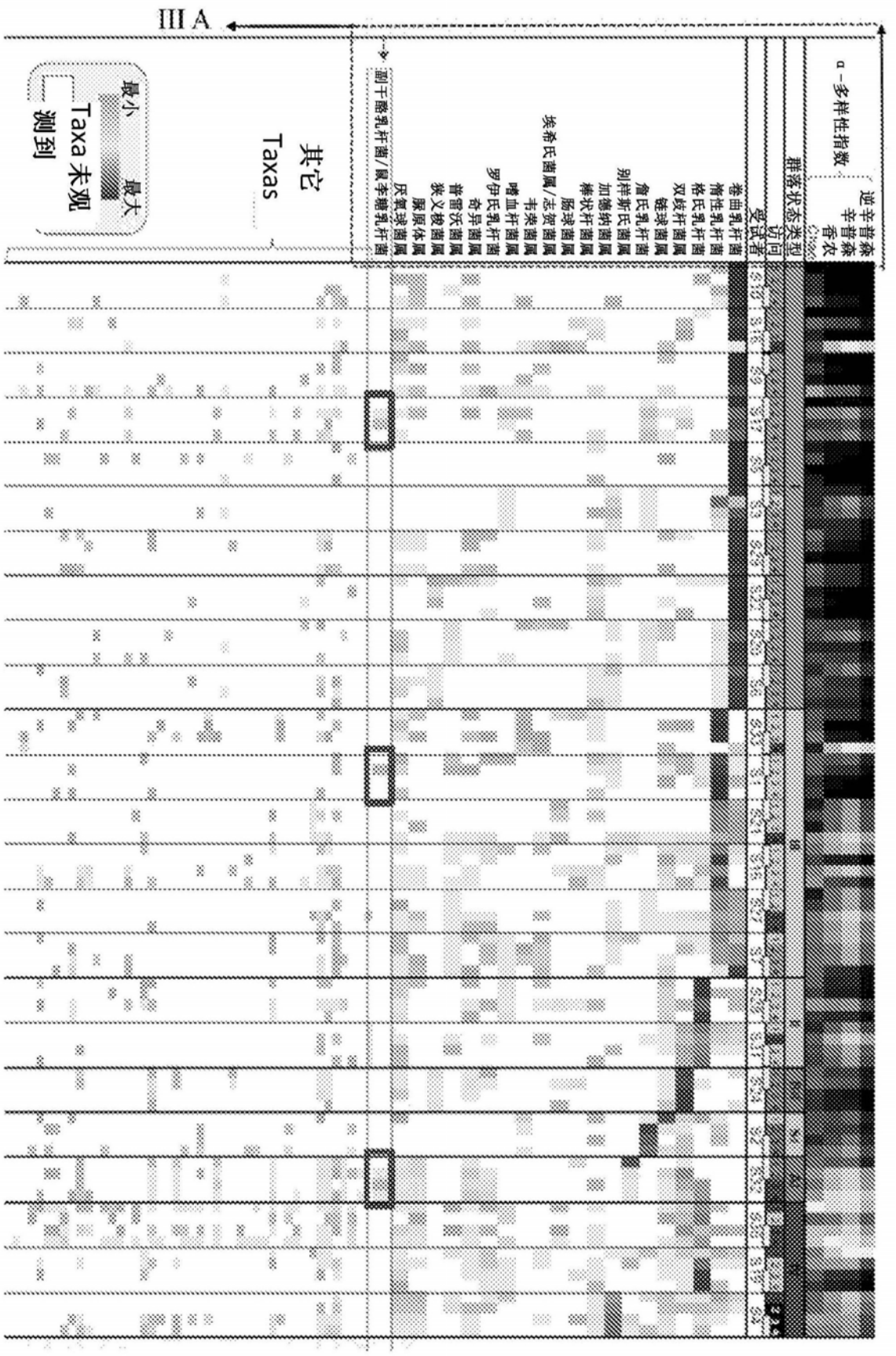

III A
逆辛普森
辛普森
香农
α-多样性指数
群落状态类型
访问
受试者
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
链球菌属
詹氏乳杆菌
别样斯氏菌属
加德纳菌属
棒状杆菌属
肠球菌属
埃希氏菌属/志贺菌属
韦荣菌属
嗜血杆菌属
罗伊氏乳杆菌
奇异菌属
普雷沃菌属
猴头梭菌属
颤原体属
厌氧球菌属
副干酪乳杆菌/鼠李糖乳杆菌
其它
Taxas
最小
最大
Taxa 未观
测到

图3

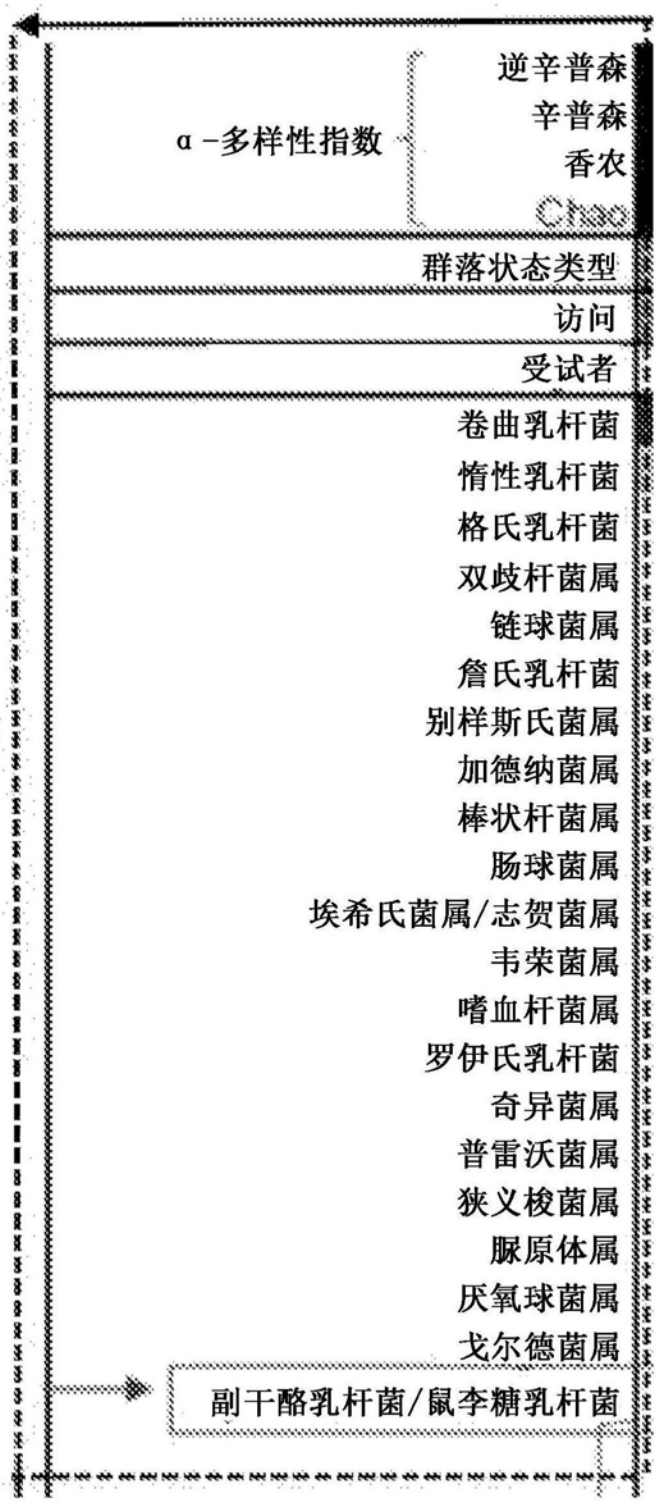

逆辛普森
辛普森
香农
α-多样性指数
Chao
群落状态类型
访问
受试者
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
链球菌属
詹氏乳杆菌
别样斯氏菌属
加德纳菌属
棒状杆菌属
肠球菌属
埃希氏菌属/志贺菌属
韦荣菌属
嗜血杆菌属
罗伊氏乳杆菌
奇异菌属
普雷沃菌属
狭义梭菌属
脲原体属
厌氧球菌属
戈尔德菌属
副干酪乳杆菌/鼠李糖乳杆菌

图3A

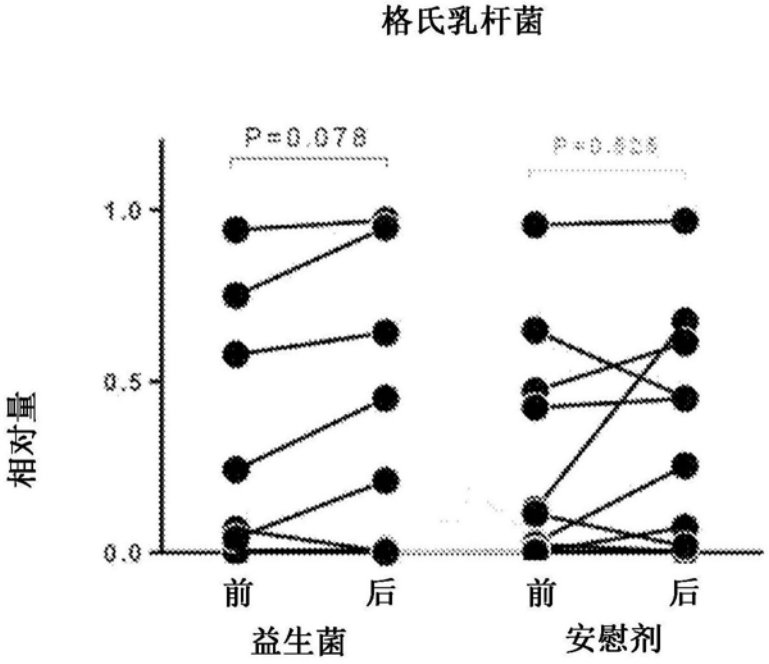

格氏乳杆菌
P=0.078
1.0
0.5
0.0
相对量
前
后
前
后
益生菌
安慰剂

图4

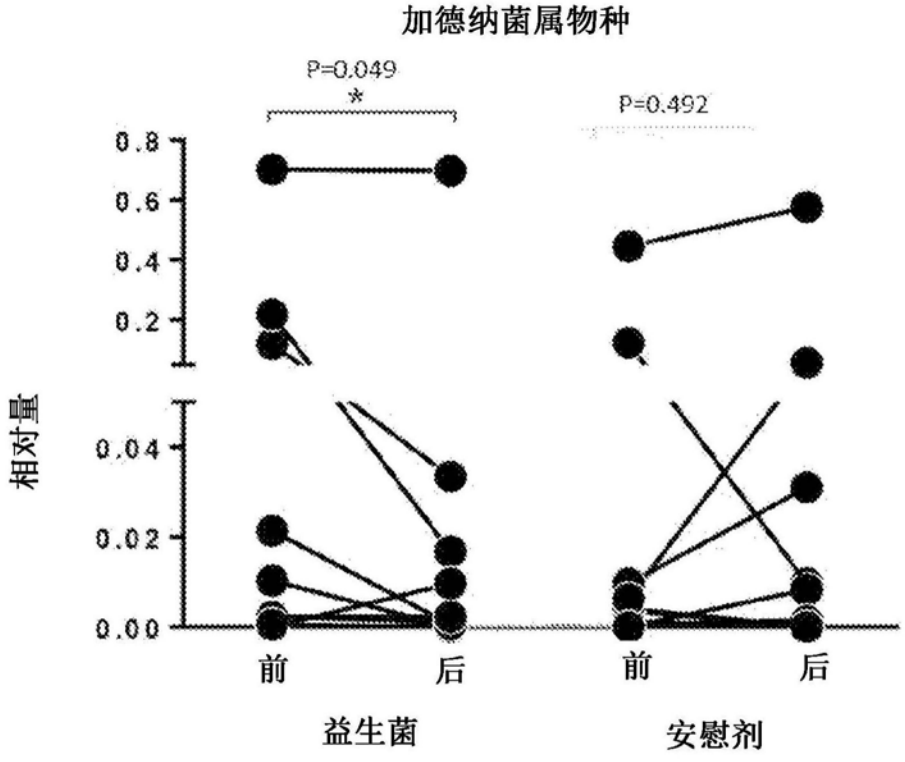

加德纳菌属物种
P=0.049
*
P=0.492
0.8
0.6
0.4
0.2
0.04
0.02
0.00
相对量
前
后
前
后
益生菌
安慰剂

图5a

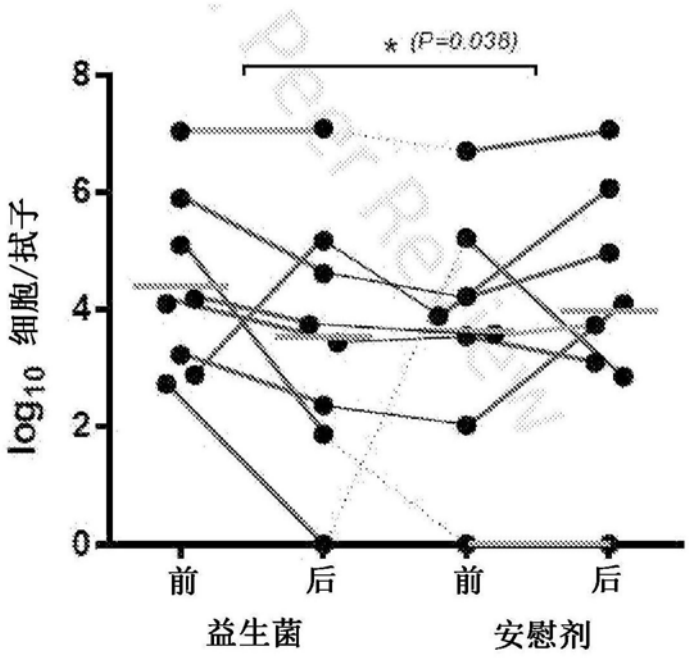


图5b

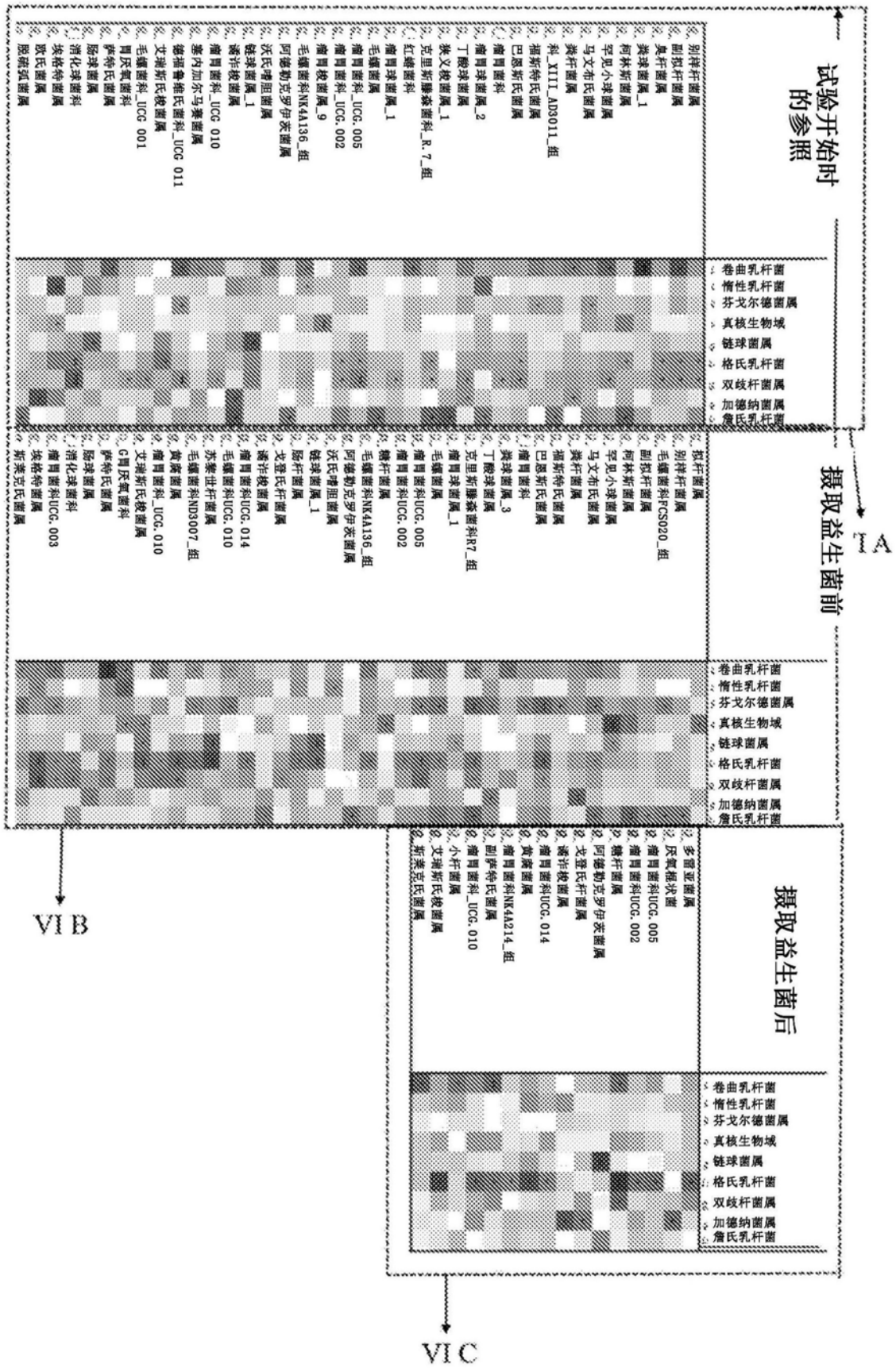

试验开始时的参照
摄取益生菌前
A
摄取益生菌后
VI B
VI C
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌

图6

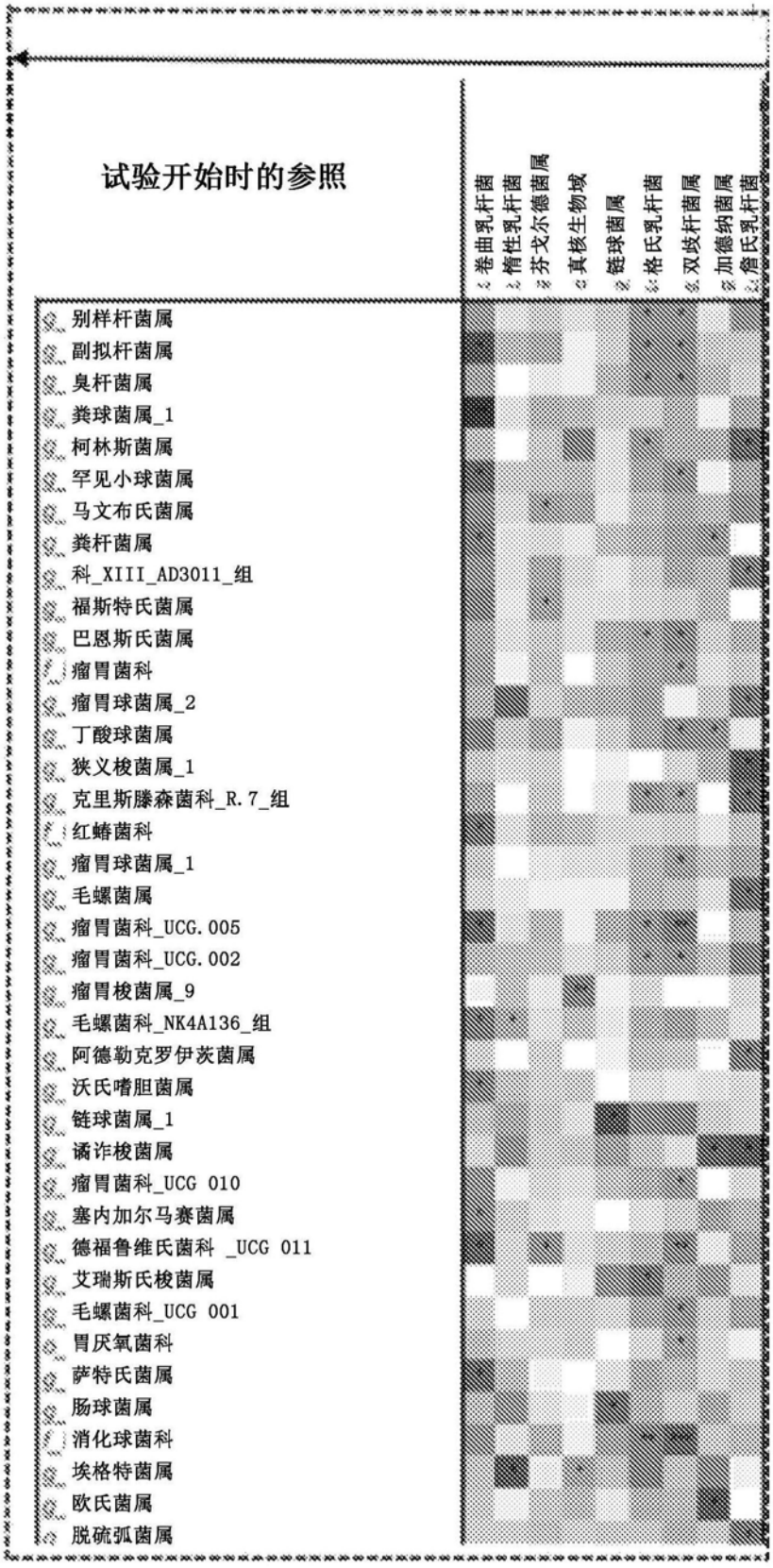

试验开始时的参照
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌
别样杆菌属
副拟杆菌属
臭杆菌属
粪球菌属_1
柯林斯菌属
罕见小球菌属
马文布氏菌属
粪杆菌属
科_XIII_AD3011_组
福斯特氏菌属
巴恩斯氏菌属
瘤胃菌科
瘤胃球菌属_2
丁酸球菌属
狭义梭菌属_1
克里斯滕森菌科_R.7_组
红蝽菌科
瘤胃球菌属_1
毛螺菌属
瘤胃菌科_UCG.005
瘤胃菌科_UCG.002
瘤胃梭菌属_9
毛螺菌科_NK4A136_组
阿德勒克罗伊茨菌属
沃氏嗜胆菌属
链球菌属_1
谵诈梭菌属
瘤胃菌科_UCG 010
塞内加尔马赛菌属
德福鲁维氏菌科 _UCG 011
艾瑞斯氏梭菌属
毛螺菌科_UCG 001
胃厌氧菌科
萨特氏菌属
肠球菌属
消化球菌科
埃格特菌属
欧氏菌属
脱硫弧菌属

图6A

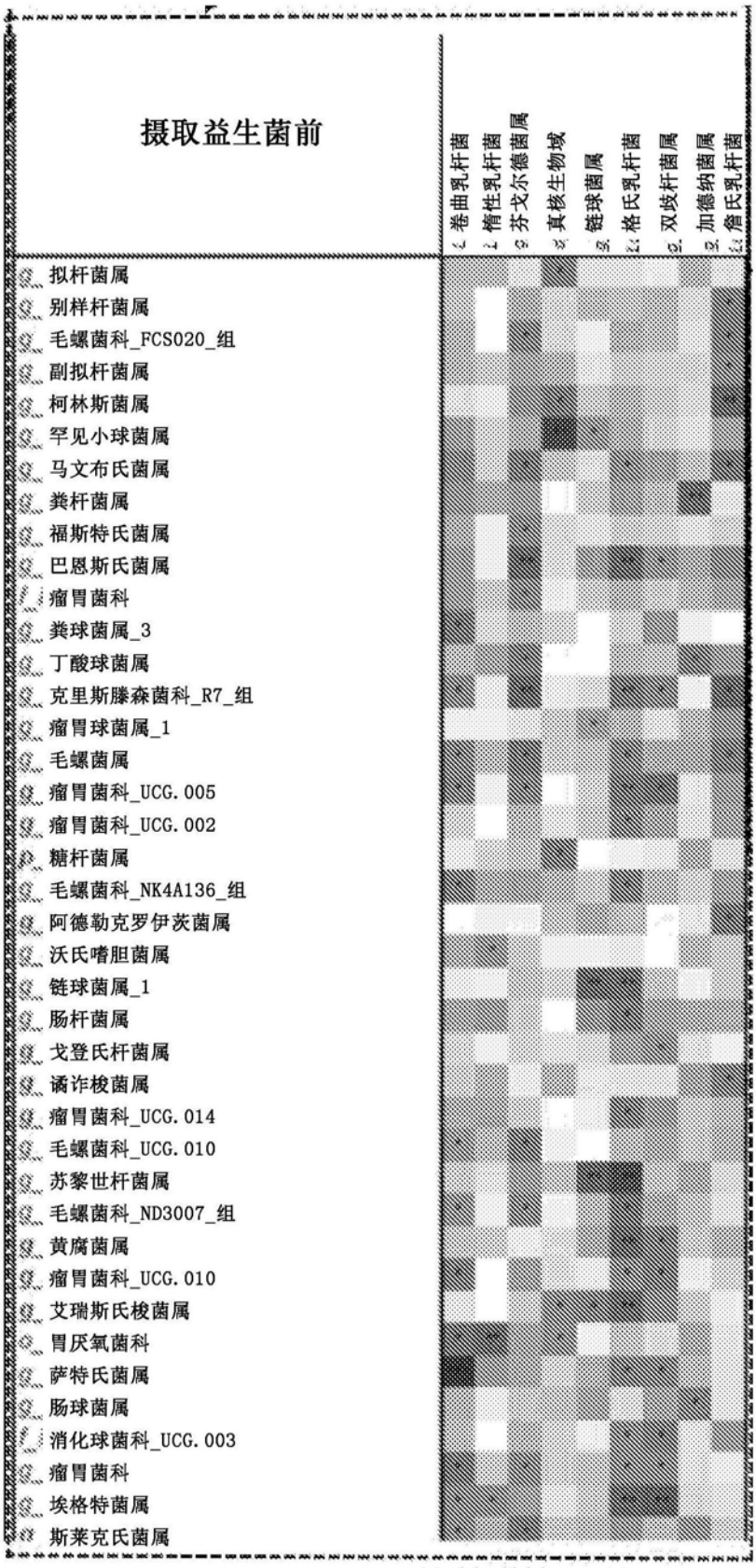

摄取益生菌前
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌
拟杆菌属
别样杆菌属
毛螺菌科_FCS020_组
副拟杆菌属
柯林斯菌属
罕见小球菌属
马文布氏菌属
粪杆菌属
福斯特氏菌属
巴恩斯氏菌属
瘤胃菌科
粪球菌属_3
丁酸球菌属
克里斯滕森菌科_R7_组
瘤胃球菌属_1
毛螺菌属
瘤胃菌科_UCG.005
瘤胃菌科_UCG.002
糖杆菌属
毛螺菌科_NK4A136_组
阿德勒克罗伊茨菌属
沃氏嗜胆菌属
链球菌属_1
肠杆菌属
戈登氏杆菌属
谵诈梭菌属
瘤胃菌科_UCG.014
毛螺菌科_UCG.010
苏黎世杆菌属
毛螺菌科_ND3007_组
黄腐菌属
瘤胃菌科_UCG.010
艾瑞斯氏梭菌属
胃厌氧菌科
萨特氏菌属
肠球菌属
消化球菌科_UCG.003
瘤胃菌科
埃格特菌属
斯莱克氏菌属

图6B

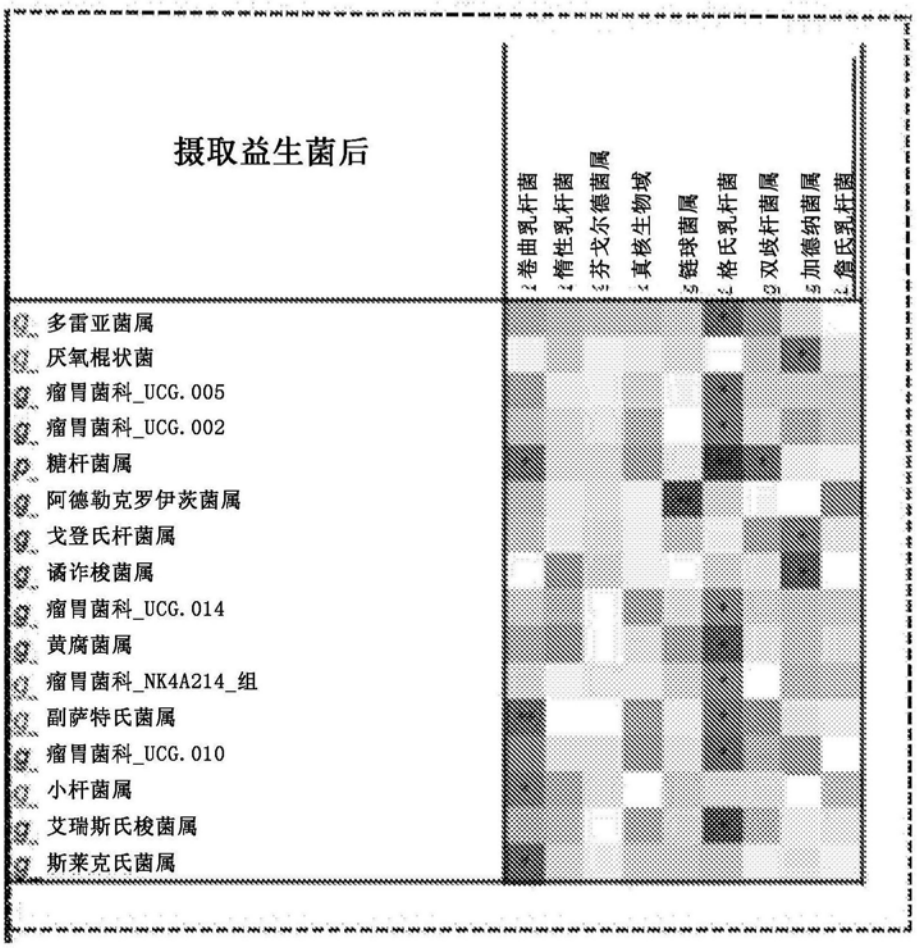

摄取益生菌后
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌
多雷亚菌属
厌氧棍状菌
瘤胃菌科_UCG.005
瘤胃菌科_UCG.002
糖杆菌属
阿德勒克罗伊茨菌属
戈登氏杆菌属
谵诈梭菌属
瘤胃菌科_UCG.014
黄腐菌属
瘤胃菌科_NK4A214_组
副萨特氏菌属
瘤胃菌科_UCG.010
小杆菌属
艾瑞斯氏梭菌属
斯莱克氏菌属

图6C

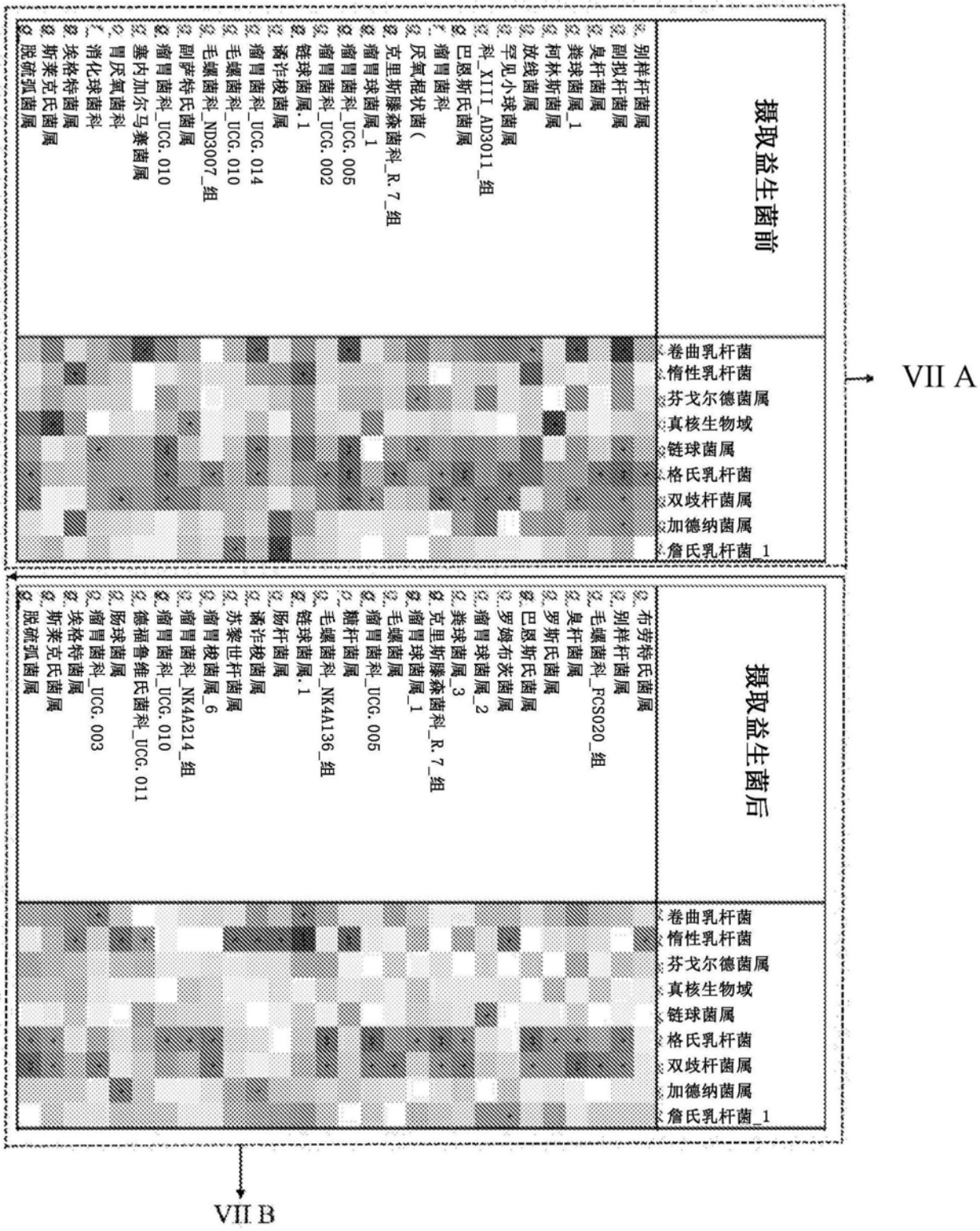

摄取益生菌前
别样杆菌属
副拟杆菌属
臭杆菌属
粪球菌属_1
柯林斯菌属
放线菌属
罕见小球菌属
科_XIII_AD3011_组
巴恩斯氏菌属
瘤胃菌科
厌氧棍状菌(
克里斯滕森菌科_R-7_组
瘤胃球菌属_1
瘤胃菌科_UCG-005
瘤胃菌科_UCG-002
链球菌属_1
诺许梭菌属
瘤胃菌科_UCG-014
毛螺菌科_UCG-010
毛螺菌科_ND3007_组
副萨特氏菌属
瘤胃菌科_UCG-010
塞内加尔马赛菌属
胃厌氧菌科
消化球菌科
埃格特菌属
斯莱克氏菌属
脱硫弧菌属
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌_1
VII A
摄取益生菌后
布劳特氏菌属
别样杆菌属
毛螺菌科_FCS020_组
臭杆菌属
罗斯氏菌属
巴恩斯氏菌属
罗姆布茨菌属
瘤胃球菌属_2
粪球菌属_3
克里斯滕森菌科_R-7_组
瘤胃球菌属_1
毛螺菌属
瘤胃菌科_UCG-005
糖杆菌属
毛螺菌科_NK4A136_组
链球菌属_1
肠杆菌属
诺许梭菌属
苏黎世杆菌属
瘤胃梭菌属_6
瘤胃菌科_NK4A214_组
瘤胃菌科_UCG-010
德福鲁维氏菌科_UCG-011
肠球菌属
瘤胃菌科_UCG-003
埃格特菌属
斯莱克氏菌属
脱硫弧菌属
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌_1
VII B

图7

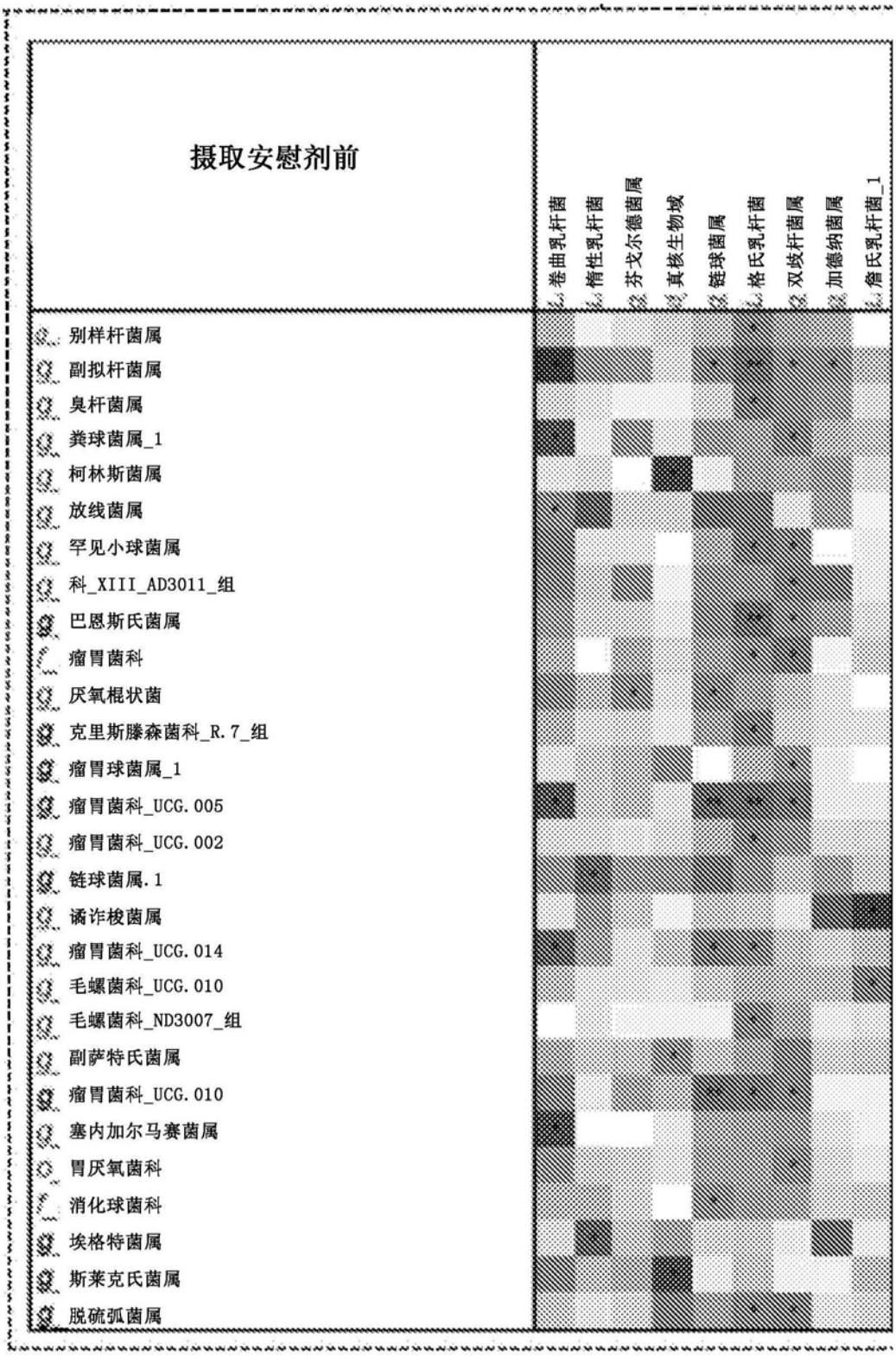

摄取安慰剂前
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌_1
别样杆菌属
副拟杆菌属
臭杆菌属
粪球菌属_1
柯林斯菌属
放线菌属
罕见小球菌属
科_XIII_AD3011_组
巴恩斯氏菌属
瘤胃菌科
厌氧棍状菌
克里斯滕森菌科_R.7_组
瘤胃球菌属_1
瘤胃菌科_UCG.005
瘤胃菌科_UCG.002
链球菌属.1
谦诈梭菌属
瘤胃菌科_UCG.014
毛螺菌科_UCG.010
毛螺菌科_ND3007_组
副萨特氏菌属
瘤胃菌科_UCG.010
塞内加尔马赛菌属
胃厌氧菌科
消化球菌科
埃格特菌属
斯莱克氏菌属
脱硫弧菌属

图7A

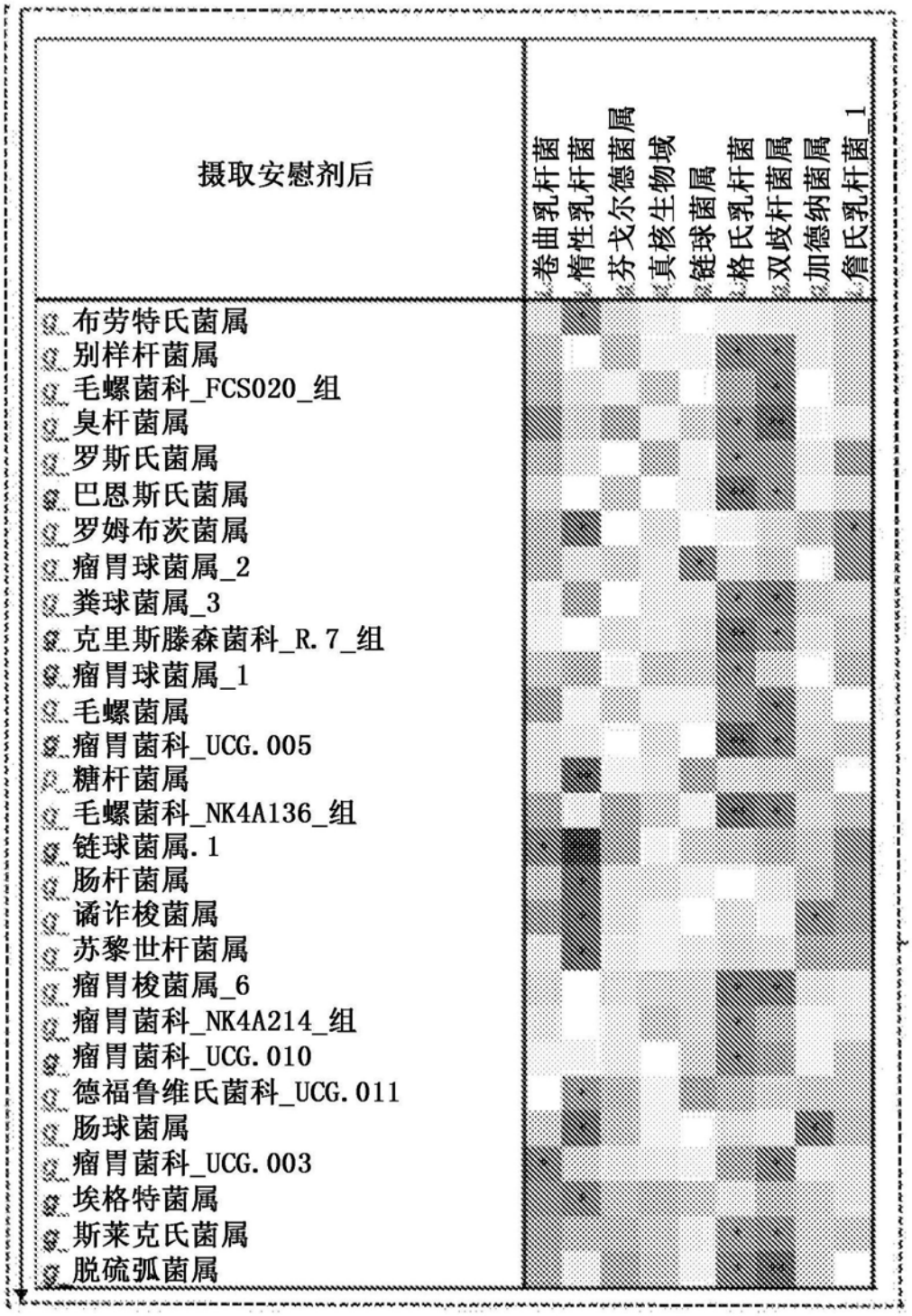

摄取安慰剂后
卷曲乳杆菌
惰性乳杆菌
芬戈尔德菌属
真核生物域
链球菌属
格氏乳杆菌
双歧杆菌属
加德纳菌属
詹氏乳杆菌_1
布劳特氏菌属
别样杆菌属
毛螺菌科_FCS020_组
臭杆菌属
罗斯氏菌属
巴恩斯氏菌属
罗姆布茨菌属
瘤胃球菌属_2
粪球菌属_3
克里斯滕森菌科_R.7_组
瘤胃球菌属_1
毛螺菌属
瘤胃菌科_UCG.005
糖杆菌属
毛螺菌科_NK4A136_组
链球菌属.1
肠杆菌属
谯诈梭菌属
苏黎世杆菌属
瘤胃梭菌属_6
瘤胃菌科_NK4A214_组
瘤胃菌科_UCG.010
德福鲁维氏菌科_UCG.011
肠球菌属
瘤胃菌科_UCG.003
埃格特菌属
斯莱克氏菌属
脱硫弧菌属

图7B