



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105473152 A

(43) 申请公布日 2016.04.06

(21) 申请号 201480044316.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.06.04

A61K 35/24(2015.01)

A61P 1/00(2006.01)

(30) 优先权数据

61/831,409 2013.06.05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016.02.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/040856 2014.06.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/197562 EN 2014.12.11

(71) 申请人 雷柏奥提斯有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 李·A·琼斯 考特尼·R·琼斯

埃德温·J·赫拉夫卡

莱恩·D·戈登

(74) 专利代理机构 上海和跃知识产权代理事务

所(普通合伙) 31239

代理人 胡艳

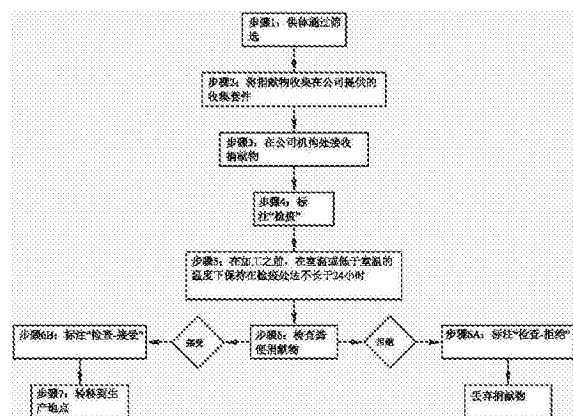
权利要求书2页 说明书34页 附图7页

(54) 发明名称

菌群恢复疗法(MRT)、组合物和制造方法

(57) 摘要

公开了菌群恢复治疗组合物及用于制造、加工、和/或输送菌群恢复治疗组合物的方法。用于制造菌群恢复治疗组合物的一个示例性方法可包括采集人粪便样品、和将稀释剂添加到人粪便样品中而形成稀释的样品。该稀释剂可包含冷冻保护剂。该方法还可包括用混合装置将稀释的样品混合、和将稀释的样品过滤。过滤可形成滤液。该方法还可包括将滤液转移到样品袋中、和将样品袋密封。



1. 一种用于制造菌群恢复治疗组合物的方法,所述方法包括:
采集人粪便样品;
将稀释剂添加到所述人粪便样品而形成稀释样品,其中所述稀释剂包含冷冻保护剂;
用混合装置将所述稀释的样品混合;
将所述稀释的样品过滤,其中过滤形成滤液;
将所述滤液转移到样品袋;和
将所述样品袋密封。
2. 如权利要求1所述的方法,其中将稀释剂添加到所述人粪便样品而形成稀释样品包括将生理盐水与所述冷冻保护剂的混合物添加到所述人粪便样品。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述冷冻保护剂包含括聚乙二醇,并且其中将稀释剂添加到所述人粪便样品而形成稀释样品包括将生理盐水与聚乙二醇的混合物添加到所述人粪便样品。
4. 如权利要求1-3中任一项所述的方法,其中将所述稀释样品过滤包括用过滤袋将所述稀释样品过滤。
5. 如权利要求4所述的方法,其中用混合装置将所述稀释样品混合包括将所述过滤袋布置在所述混合装置的内部。
6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,还包括在大约-20°C至大约-80°C的温度下储存所述样品袋。
7. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,还包括在大约-80°C的温度下储存所述样品袋。
8. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,还包括在大约4°C至大约-4°C的温度下预冷却所述样品袋。
9. 如权利要求8所述的方法,还包括在大约-20°C至大约-80°C的温度下冷冻所述预冷却的样品并储存经冷冻的样品。
10. 如权利要求9所述的方法,还包括解冻经冷冻的样品。
11. 如权利要求10所述的方法,其中解冻经冷冻的样品包括在大约4°C至大约-4°C的温度下解冻经冷冻的样品。
12. 如权利要求11所述的方法,还包括在隔热的包装组装件中包装经解冻的样品。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述样品袋容纳所述菌群恢复治疗组合物,并且还
包括将所述菌群恢复治疗组合物给药予患者。
14. 一种用于制造、加工和包装菌群恢复治疗组合物的方法,所述方法包括:
从预筛选的供体中采集粪便样品;
将所述粪便样品转移到过滤袋;
将稀释剂添加到所述过滤袋,其中所述稀释剂包含冷冻保护剂;
将所述过滤袋密封;
将经密封的过滤袋转移到混合器;
将来自所述过滤袋的滤液转移到样品袋;
其中将来自所述过滤袋的滤液转移到样品袋把所述菌群恢复治疗组合物限制在所述样品袋的内部;

将所述样品袋密封；
使样品袋冷却；
将经冷却的样品袋转移到温度受控制的储存设备；
其中将经冷却的样品袋转移到温度受控制的储存设备包括冷冻所述菌群恢复治疗组合物；
将经冷冻的菌群恢复治疗组合物解冻；
在隔热的包装系统中包装所述样品袋；和
将经包装的样品袋运送至治疗设施。

15. 如权利要求14所述的方法，其中所述冷冻保护剂包括聚乙二醇，并且其中将稀释剂添加到所述过滤袋包括将生理盐水与聚乙二醇的混合物添加到所述过滤袋中。

菌群恢复疗法(MRT)、组合物和制造方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依照美国法典第35章第119条,本申请要求于2013年6月5日提交的美国临时专利申请序列号61/831,409的优先权,该临时专利申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本公开是关于用于治疗消化道疾病和/或病症的组合物和方法。

背景技术

[0004] 现已开发出了用于治疗消化道疾病和/或病症的多种组合物和方法。就已知的组合物和方法而言,各自具有某些优点和缺点。对于提供用于治疗消化道疾病和/或病症的替代组合物和方法存在着持续的需求。

发明内容

[0005] 本文中公开了菌群恢复治疗组合物和用于制造、加工和/或输送菌群恢复治疗组合物的方法。用于制造菌群恢复治疗组合物的示例性方法可包括采集人粪便样品、和将稀释剂添加到人粪便样品中而形成稀释样品。稀释剂可包含冷冻保护剂。该方法还可包括用混合装置将稀释样品混合、和过滤稀释样品。过滤可形成滤液。该方法还可包括将滤液转移到样品袋、和将样品袋密封。

[0006] 一种用于制造、加工和包装菌群恢复治疗组合物的示例性方法可包括从预筛选的供体中采集粪便样品、将粪便样品转移到过滤袋、和将稀释剂添加到过滤袋中。稀释剂可包含冷冻保护剂。该方法还可包括:将过滤袋密封、将密封的过滤袋转移到混合器、和将滤液从过滤袋转移到样品袋。将滤液从过滤袋转移到样品袋可将菌群恢复治疗组合物限制在样品袋的内部。该方法还可包括将样品袋密封、使样品袋冷却、和将冷却的样品袋转移到温度受控制的储存设备。将冷却的样品袋转移到温度受控制的储存设备可包括将菌群恢复治疗组合物冷冻。该方法还可包括:将冷冻的菌群恢复治疗组合物解冻、将样品袋在隔热的包装系统中包装、和将包装的样品袋运送到治疗设施。

[0007] 一种用于医疗的示例性方法可包括:从预筛选的供体中采集粪便样品、将粪便样品转移到过滤袋、和将稀释剂添加到过滤袋。稀释剂可包含冷冻保护剂。该方法还可包括:将过滤袋密封、将密封的过滤袋转移到混合机、和将滤液从过滤袋转移到样品袋。将滤液从过滤袋转移到样品袋可将菌群恢复治疗组合物限制在样品袋中。该方法还可包括:将样品袋密封、使样品袋冷却、和将冷却的样品袋转移到温度受控制的储存设备。将冷却的样品袋转移到控制温度的储存设备可包括将菌群恢复治疗组合物冷冻。该方法还可包括:将冷冻的菌群恢复治疗组合物解冻、将样品袋在隔热的包装系统中包装、将包装的样品袋运送到治疗设施、和将菌群恢复治疗组合物给药予患者。

[0008] 上面对一些实施方式的概述并非意图描述本公开的各公开实施方式或者每个实施方案。下面的附图和详细说明更具体地举例说明了这些实施方式。

附图说明

[0009] 基于以下的详细说明并结合附图可更完全地理解本公开,在附图中:

[0010] 图1是示例性地描绘用于采集和检查供体粪便样品的过程的流程图;

[0011] 图2是示意性地描绘用于筛选粪便供体的流程图;

[0012] 图3A和图3B是描绘用于制造菌群恢复治疗组合物的一个示例性方法的流程图;

[0013] 图4是描绘用于订购和运送菌群恢复治疗组合物的示例性过程的流程图;

[0014] 图5是描绘用于订购和运送菌群恢复治疗组合物的其他示例性过程的流程图;

[0015] 图6是一个示例性包装系统的示意图;

[0016] 图7示出了一个示例性的样品袋;

[0017] 图8示出了一个示例性的管组件。

[0018] 虽然本公开适合于各种修改和替代形态,但通过在附图中的举例而揭示了其细节并且将详细地描述其细节。然而,应当理解的是,意图并非是将本发明局限于所描述的具体实施方式。相反,本发明包括落在本公开精神和范围内的所有修改、等同物、和替代物。

具体实施方式

[0019] 就以下所定义的术语而言,应当采用这些定义,除非在权利要求中或者在本说明书中的其他地方给出不同的定义。

[0020] 无论是否明确地指出,本文中的所有数值假定是由术语“大约”所修饰。术语“大约”一般指代本领域技术人员将会认为等同于所列举值(例如,具有相同的功能或结果)的数量范围。在许多情况下,术语“大约”可包括被四舍五入到最接近的有效数字的数量。

[0021] 利用端点对数值范围的陈述包括在该范围内的所有数量(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4和5)。

[0022] 本说明书和所附权利要求中所使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数所指对象,除非上下文中明确地规定。本说明书和所附权利要求中所使用的术语“或者”通常是以包括“和/或”的意义而使用,除非上下文中明确地指出。

[0023] 应注意的是,本说明书中对“一个实施方式”、“一些实施方式”、“其他实施方式”等的引述表明所描述实施方式可包括1个以上的特定的特征、结构和/或特性。然而,这种陈述不一定意味着所有实施方式包括该特定的特征、结构和/或特性。此外,当结合一个实施方式来描述特定的特征、结构、和/或特性时,应当理解的是,无论是否明确地描述,这种特征、结构和/或特性也可使用于其他实施方式,除非明确地指出相反的情况。

[0024] 应参照附图来阅读以下的详细说明,其中在不同的附图中对于类似的元件赋予相同的编号。附图(不一定按比例绘制)描绘了说明性的实施方式而并非意图限制本发明的范围。

[0025] 本文中使用的“哺乳动物”是指哺乳纲的任何成员,包括但不限于:人类和非人灵长类(如黑猩猩、及其他的猿和猴种);家畜(如牛、绵羊、猪、山羊和马);家养哺乳动物(如狗和猫);实验动物,包括啮齿类动物(如小鼠、大鼠和豚鼠),等。该术语并不指代特定的年龄或性别。因此,成年人和新生儿受试者以及胎儿,无论是雄性或雌性,均意图被包括在该术语的范围内。

[0026] 本文中使用的术语“冷冻保存”是指在低温下冷却和储存生物细胞、组织或器官以维持它们的存活的过程。作为非限制性例，冷冻保存可以是在低于冻结点的温度下(例如，-20°C以下、-80°C以下，等)冷却和储存细胞的技术，该技术允许解冻时的细胞的高存活率。

[0027] 本文中使用的术语“冷冻保护剂”是指用于防止生物细胞或组织受到冷冻影响的物质。

[0028] 本文中所使用的“菌群”可以指代人类微生物组、人类菌群、或人肠道菌群。人类微生物菌落(或人类菌群)可被理解成是存在于皮肤表面上和皮肤的深层中、唾液和口腔黏膜中、结膜中、和人胃肠道中的微生物的聚集体。人类微生物组是由细菌、真菌、病毒、和古细菌所组成。这些生物体中的至少部分执行对人宿主有用的任务。在正常情况下，这些微生物不导致人宿主的疾病，而是参与维持健康。因此，该种群的生物体常常被称为“正常菌群”。

[0029] 生存于人胃肠道中的微生物种群通常被称为“微生物菌群”、“肠道菌群”和/或“肠道菌群”。人肠道的微生物菌群包括有助于消化、维生素合成、和形成并非由有人体所产生酶的多种微生物。

[0030] 本文中所使用的词组“菌群恢复治疗剂”是指一种组合物，该组合物可包括但不限于：取自患者或供体的含有活肠道菌群的人粪便材料、稀释剂、和冷冻保护剂。其他组合物包括等效的经冷冻干燥并复原的粪便、或者“合成的”粪便组合物。在将其使用于菌群恢复治疗之前，对人粪便材料进行筛检以确定是否存在病原微生物。对人粪便材料进行筛检以确定以下病原微生物的存在：梭菌属(*Clostridium species*) (包括艰难梭菌 *C. difficile*)、诺如病毒 *Norovirus*、腺病毒 *Adenovirus*、肠道病原体 *enteric pathogens*、贾第鞭毛虫属 *Giardia species*、隐孢子虫属 *Cryptosporidia species* 的抗原、及其他病原体(包括耐酸细菌 *acid-fast bacteria*、肠球菌 *enterococci*，包括但不限于万古霉素耐药肠球菌(VRE)、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA))、以及任何卵或寄生体、或者芽孢形成寄生虫(包括但不限于等孢子球虫、圆孢球虫、和囊孢子虫)。

[0031] 有多于1000个不同属的细菌存在于健康的胃肠(GI)道中。梭菌是厌氧的产芽孢细菌。某些属的梭菌是产生对人类会是有害的毒素的病原体。艰难梭菌(“C diff”)是如果在胃肠道中种群过密则可以释放出会导致若干症状的毒素的梭菌的一个属，所述症状包括胃气胀、便秘、腹泻、炎症、腹痛、在某些情况下会导致死亡的其他症状。

[0032] 当受到应激时，艰难梭菌形成可以耐受许多活性细菌所不能耐受的极端条件的芽孢。通常，梭菌在健康的胃肠道中竞争较弱。然而，抗生素会扰乱正常的肠内菌群，从而导致艰难梭菌的过度生长。在某些实例中，艰难梭菌芽孢对各种抗生素会是耐药。因此，当正常肠内菌丛被清除时，艰难梭菌芽孢仍然存在，从而导致大的艰难梭菌群体。

[0033] 根据美国疾病控制与预防中心(CDC)，在美国每年报告了大约337,000例艰难梭菌感染(CDI)，其中导致大约14,000例死亡。目前的标准治疗是抗生素治疗；通常使用甲硝唑和/或万古霉素。在最初的抗微生物治疗之后，大约25%的患者经历症状的复发。在这个复发性患者人群中，大约45-65%形成持续的复发性艰难梭菌感染。持续的复发性艰难梭菌感染与高发病率和死亡率有关。例如，在美国每年艰难梭菌种群过密发生率据估计为150至270万例发生，并且还在增加中。在一个估计中，从2001年到2005年由于艰难梭菌的退院数加倍，并且据估计具有5%至25%的复合年增长率。目前的估计表明受艰难梭菌种群过密影响的患者经历从3天到36天的延长的住院时间，其中将近20%的受影响患者在180天内重新

入院,各患者比未受影响的患者更有可能转到长期护理机构。据估计艰难梭菌的经济负担是在每年10至30亿美元。此外,据估计每天300例患者死亡归因于艰难梭菌种群过密,死亡率为1至7.7%,并且还在增加中。

[0034] 艰难梭菌的传统治疗通常包括抗生素的应用。由于低价格和高疗效,甲硝唑(“Flagyl®”)是所选用的抗生素。然而,对于复发的病例(高达20%的总病例,例如对甲硝唑耐药)、怀孕患者、或者年龄小于10岁的患者而言,通常使用万古霉素(“Vancocin®”)。然而,万古霉素,尽管通常具有比甲硝唑更少的副作用,但具有高得多的成本并且会导致现存的艰难梭菌对其他抗生素产生耐药性。

[0035] 在第一次发生中,艰难梭菌的抗生素治疗可以在2至4天内以大约90%以上的比率有效地快速地治疗腹泻。然而,艰难梭菌通常在第一次复发后(例如,抗生素中止使用的数天至12周后)以估计的20%比率(例如,15%-30%)复发。然而,对于第一次复发后的各次复发,复发率大大地增加到第二次复发后的估计的40%复发率,并且增加到其后的大于所估计的60%以上的复发率。据估计,大约5%的患者具有6次以上的复发。

[0036] 各次发病之后艰难梭菌的治疗通常有变化。例如,对于第一次轻度至中度的复发,可以口服给予甲硝唑(例如,以500mg的剂量,每日三次(“TID”)达10至14天)。对于第二次复发,可以以逐步减小的剂量或脉冲式剂量口服给予万古霉素(例如,以125mg的剂量,每日四次(“QID”)达14天;以125mg的剂量,每日两次(“BID”)达7天;以125mg的剂量,每日一次(“QD”)达7天;以125mg的剂量,每2天一次达8天(四次给药);以125mg的剂量,每3天一次达15天(五次给药)等)。对于第三次复发,可以以更大的剂量应用万古霉素(例如,以125mg的剂量,每天四次(“QID”)达14天),并与用于复发性感染的任何其他选择相结合,例如静脉注射免疫球蛋白(例如,以400mg/kg体重的剂量,每三周一,根据效果总共2或3次给药),或者在万古霉素给药后使用利福霉素(例如,利福霉素,以400mg的剂量,每日两次(“BID”)达14天)等。

[0037] 粪便移植(FT)(是一种与菌群恢复治疗(MRT)有关的治疗方法)已被用作对于一些具有复发性艰难梭菌感染的患者的最后对策。在抗微生物治疗后,将粪便移植用于在患者胃肠道菌群中重新建立健康微生物混合物。在超过480个已报告病例中,在治愈复发性艰难梭菌感染中有约90%的累积成功率,并且没有归因于粪便移植材料的任何不良事件。目前的惯例是从家庭成员或治疗机构内部的志愿者中获取粪便样品以便移植入患者。该治疗技术的一个明显问题是粪便移植材料未经标准化。尽管所选择的供体通常在提供时被认为是健康的,但这不足以同时保证被移植微生物的质量和存活率。可存在影响粪便材料的、对供体是未知的疾病状态。除了粪便原材料的质量外,在接受或治疗机构中缺乏用于加工和处理的标准化程序会导致在给予患者的粪便移植材料的质量和存活率方面的问题。此外,各机构必须对粪便原材料进行处理,这并不方便。

[0038] 对于保证用于患者的菌群恢复治疗产品在给药时的质量和存活率的标准化的、经预处理的菌群恢复治疗产品存在着需求。还期望具有也可以在易于处理和可输送状态下进行加工被运送至合适的治疗机构的菌群恢复治疗(MRT)产品,以避免在各机构对粪便原材料进行处理。由于这些改进,菌群恢复治疗可以变为一种理想的/可行的用于艰难梭菌感染(CDI)的主要治疗选择,而不是在少量机构处的最后治疗对策。

[0039] 此外,本专利文件描述了:接收取自多位供体的多个供体粪便样品、并且利用各供

体粪便样品的至少一个特性来储存和检索各个供体粪便样品。在一个实例中,可以对供体粪便样品进行筛选和加工以便随后用于粪便细菌疗法,从而用健康或期望的肠道菌群来代替患者消化道中的致病性或不受欢迎的生物。

[0040] 本公开提供了一种菌群恢复治疗组合物,该组合物包含有效量的粪便菌群与有效量的冷冻保护剂的混合物。一个示例性的冷冻保护剂可包含聚乙二醇。此外,在本公开的菌群恢复治疗组合物中,聚乙二醇是以大约5-60g/ml、或者大约5-30g/ml、或者小于大约30g/ml的浓度而存在。该组合物还可以包含生理盐水作为稀释剂。本公开的组合物可包含具有在大约600至大约20000范围内的平均分子量的聚乙二醇。例如,可以使用具有3150的平均分子量的PEG-3150。在某些实施方式中,菌群恢复治疗组合物包括来源于1个以上的人粪便样品的粪便菌群。

[0041] 可使用其他的冷冻保护剂,例如右旋糖、甜菜碱、甘氨酸、蔗糖、聚乙烯醇、Pluronic F-127、甘露醇、Tween-80、乙二醇、1,3-丙二醇、羟丙基纤维素、甘油、PEG/甘油混合物、牛奶(例如,脱脂奶)、和丙二醇。

[0042] 在其他实施方式中,本公开的组合物的菌群的存活率可通过将菌群(和/或滤液和/或细菌疗法组合物)在拟杆菌胆盐七叶苷琼脂(BBE)平板(从Becton&Dickinson公司购得,产品编号221836,BBL™拟杆菌胆盐七叶苷琼脂BBE平板)、或者疾病控制中心(CDC)平板(从Becton&Dickinson公司购得,产品编号221733,BBL™ CDC厌氧菌5%绵羊血琼脂平板)、或者这两者中进行培养而确定。至少在一些实施方式中,可以通过在 10^{-5} 的系列稀释下存在大约30CFU至大约300CFU菌落形成单位(CFU)计数、或者在 10^{-6} 的系列稀释下存在大约30CFU至大约300CFU的CFU计数,而确定本公开组合物在BBE平板和/或CDC平板上的菌群存活率。还提供其中菌群的浓度为大约 10^7 微生物/ml的菌群恢复治疗组合物。此外,用于生产菌群恢复治疗组合物的方法还可包括进行前供体筛选和后供体筛选的步骤,人粪便样品在两次筛选之间采集。

[0043] 除了确定微生物的存活率外,平皿测试也可以确定所存在活微生物的多样性。所存在微生物的混合物或者微生物的多样性是人粪便样品质量和由该样品所制造的菌群恢复治疗产品质量的另一个衡量尺度。CDC平板和BBE平板,单独地或者联合地,提供通过多样性的质量衡量尺度,如本文中所描述。

[0044] 本公开还提供用于确保被加工成菌群恢复治疗组合物的人粪便样品的质量的方法,该方法包括:鉴定人粪便供体;执行供体的捐献前筛选,包括健康史问卷、日常饮食问卷、和至少一次血液检查;从供体中采集人粪便样品;对取自供体的粪便样品进行加工而形成至少一个以上的菌群恢复治疗组合物;以大约15-120天、或者大约30-100天、或者大约45-90天的间隔执行供体的捐献后筛选,包括健康史问卷和至少一次血液检查;对由在捐献前筛选与捐献后筛选之间的间隔期间所采集供体粪便样品所加工的1个以上菌群恢复治疗组合物进行检疫;基于前筛选和后筛选结果而确定菌群恢复治疗组合物的质量;和给使用于需要菌群恢复治疗的人的菌群恢复治疗组合物发许可证书。前筛选/后筛选可提高采集健康样品的可能性。将间隔选择成允许有充分时间以便用症状证明或者在筛选后的人粪便或血清检查中肯定地确定疾病状态或者在采集人粪便时所存在的其他因素。此外,可以对该组合物进行检疫并加以储存,直到通过前筛选和后筛选而确认供体健康。

[0045] 本公开的方法还可包括对人粪便样品进行至少一次检测以确定是否存在传染病

的步骤。此外,本公开的方法还可包括检测人粪便样品以判断选自下列的组分的步骤:艰难梭菌;诺如病毒;腺病毒、肠道病原体;贾第鞭毛虫抗原;隐孢子虫抗原;抗酸染色(圆孢球虫,等孢球虫属);虫卵和寄生虫;万古霉素耐药肠球菌(VRE)、甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)及其组合。本公开的方法可包括检测供体的血液,其中血液检查包括对选自下列的组分的至少一次检测:HIV、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、RPR及其组合。

[0046] 用于由人粪便样品生产菌群恢复治疗组合物并且保证该组合物的存活率的代表性方法可以包括:采集期望量的人粪便样品、添加生理盐水、添加冷冻保护剂(例如,聚乙二醇)、和将该组合物混合。然后,可以对所形成的混合物进行过滤并且收集含有微生物的滤液。可以收集一部分的滤液用于检测并且可以对滤液的剩余部分进行冷冻作为检疫品,直到在检测中基于检测样品的培养并结合上述的前筛选和后筛选的结果来验证冷冻滤液的质量。

[0047] 本公开涉及组合物、制造方法、和采用通过用健康的有效菌落代替致病性和/无效的生物体的胃肠道菌群恢复治疗的治疗方法。可治疗的示例性病症和疾病状态包括:艰难梭菌感染、肠易激综合征(IBS)、克罗恩病、溃疡性结肠炎(UC)、由葡萄球菌或艰难梭菌感染所造成的暴发性结肠炎、炎性肠病(IBD)、溃疡、糖尿病、结肠癌、便秘、肥胖症、与肠道菌落的不平衡有关的其他病症和疾病状态。

[0048] 在一些实例中,提供组合物、制造方法和采用用于艰难梭菌感染(CDI)治疗的菌群恢复治疗(MRT)的治疗方法。艰难梭菌感染是常见的医院内感染并且常常与严重的发病率和死亡率有关,特别是在老年患者中。

[0049] 各个体具有个体化的肠道菌群,该肠道菌群包含估计的500至5000个以上属的细菌、真菌、病毒、古细菌和其他微生物,存在于消化道中多达100兆的单独生物体提供许多有用的共生功能,例如包括帮助消化、为结肠提供营养、产生维生素、刺激免疫系统、促进针对外源性细菌的防御、调节能量代谢、和短链脂肪酸(SCFA)的产生,特别是膳食碳水化合物,包括抗性淀粉和膳食纤维,这些是用于产生SCFA(主要是作为最终产物的乙酸盐、丙酸盐、和丁酸盐)的发酵的基质。然而,不适当地平衡或起作用的肠道菌群会在某些疾病或疾患中发挥作用,如假膜性结肠炎、艰难梭菌结肠炎、抗生素相关性腹泻(AAD)、溃疡性结肠炎(UC)、睾丸炎、肠易激综合征(IBS)、肥胖症等。

[0050] 因此,除此之外,本发明人已认识到了提供细菌疗法的系统和方法,该细菌疗法通过用健康菌落或者意图有益于患有与肠道菌群有关的疾患的特定个体的菌落来替换患者消化道中的致病性生物体而治疗与肠道菌群有关的疾患(包括艰难梭菌结肠炎)。在一个实例中,本文中所描述系统和方法可以提供一种方便的、卫生的机制,该机制能够与现有诊所和医院的现有能力和常规密切配合从而为患者提供细菌疗法。在某些实例中,类似的治疗对于患有其他疾病(例如IBS、克罗恩病、溃疡性结肠炎(UC)、炎性肠病(IBD)、溃疡、或者其他胃肠道、代谢、或消化道相关疾病)的患者会是有效的。在其他实例中,细菌疗法可以用于帮助体重减轻,用更有效的菌群代替肠道中的有效菌群。在其他实例中,细菌疗法可以用于帮助心血管和外周血管疾病的治疗。

[0051] 在一个实例中,可以提供利用抗生素与健康或期望的哺乳动物菌落的重建的组合来治疗艰难梭菌或一种以上的其他消化道疾病或疾患的细菌疗法。在某些实例中,菌落的重建可以包括粪便细菌疗法、或者粪便秘植。

[0052] 粪便细菌疗法的过程可以包括将健康供体的粪便样品、或者具有一种上述特性的供体导入患者胃肠道中以便重建健康的或期望的肠道菌群。在某些实例中，在粪便样品的导入之前，可以用抗生素扰乱患者的肠内菌丛，使得健康的或期望的肠道菌群，一旦被导入患者，可以容易地存活于胃肠道中。

[0053] 任选地，在将其使用于菌群恢复治疗之前，对人粪便材料进行过滤。

[0054] 在本公开的一些实施方式中，该组合物是取自经预筛选供体的标准化的粪便微生物制剂。在血清和人粪便中对供体进行筛查是否有常见传染病。这包括实验室测试以及对供体疾病史的复查。一旦供体已被确认为合格，他/她将被要求按所选择的间隔接受完整的重新筛选。这可以包括各自为1至3个月的时间段，一个示范性的间隔为大约每3个月。在用于采集质量或正常粪便材料的系统的一些方法中，在完整的重新筛选之间，如果供体的健康状况发生变化，将指导供体立即与样品采集器接触。此外，在完整筛选之间的每次捐献时可以通过问卷或其他方式采集该健康信息。供体可以继续是合格的供体，只要他/她继续通过他们的筛选试验并满足健康状况要求。

[0055] 可以以如本文中所公开的方式对所采集的人粪便进行处理，然后进行冷冻和检疫。当采集前和采集后医学筛选(例如，人粪便和血液检查以及健康状况)完成时，可以从检疫中解除。这保证在各筛选之间所采集样品的质量。可以将该产品解冻并且在温度控制的容器中运送至机构、或者可替代地冷冻运送而在机构处解冻。

[0056] 本发明的组合物尤其适合于具有复发性艰难梭菌感染的患者。复发性艰难梭菌感染被定义为在初次发作后已具有最少至少一次复发事件并且将已完成至少两个疗程的口服抗生素以治疗他们的艰难梭菌感染的患者。该组合物也适合于艰难梭菌感染初次发作的治疗。

[0057] 在本发明菌群恢复治疗(MRT)的治疗的一个方法中，患者可以完成口服抗生素的10-14天疗程，包括在治疗方案结束时的至少7天的万古霉素，接着是24-48小时的清洗期。然后，可以通过灌肠而导入菌群恢复治疗组合物。如果在第一次灌肠给药后的第60天有艰难梭菌感染症状的缓解，则认为该治疗是成功的。在一些患者中，如果在60天内症状恢复则可以给予使用菌群恢复治疗组合物的第二次灌肠，并且成功的治疗可以是在第二次灌肠后60天内症状的不复发。

[0058] 人粪便材料在本质上在各供体之间是可变的并且甚至在相同供体中每天也不同。此外，单独的人粪便材料的样品在任何时间具有多于1000种的不同存在微生物，使得无法检测和划定样品中的整个粪便微生物组，并且甚至较难确定单个属的微生物对给定疾病(例如艰难梭菌感染)的效果。然而，在本公开中，已发现可以鉴定标准化或正常的粪便材料样品并且加工成保证安全性和存活率的菌群恢复治疗组合物或菌群恢复治疗产品。对于变化的原材料，本发明的组合物利用供体筛选方法、粪便检测方法、粪便加工方法、加工材料处理、贮存和保存方法、和检测方法而制造，从而由人粪便生产一致的、可重复的、质量受控的组合物，以用于治疗受胃肠道内部的微生物不平衡影响的各种病症和疾病状态的治疗产品的形式而输送

[0059] 本发明的组合物可以开始于正常的人粪便样品。为了确定正常的人粪便样品，可以通过问卷或者其他健康史方式外加血液和/或人粪便检测对患者进行筛选，以便确定或检查其他特性。此外，可以以受控制的方式使用所形成的被检测产品对人粪便样品进行处

理和加工以便确认人粪便样品是正常的以及已以维持产品组合物中的微生物存活率的方式而完成加工和处理。除了存活率外,可以执行所选择的检测以确认所存在活微生物的多样性(健康或正常粪便的另一个衡量尺度)。这样,可以了解供体与供体之间和供体内各天之间的变化可以并且将其应用于用于正常人粪便样品的标准。此外,可以确认被设计和实施的加工和处理技术的有效性。采集正常人粪便与使用经验证加工和处理技术的组合导致标准化的组合物或产品。一旦制造出标准化的组合物,必须从生产到给药以维持产品的存活率从而保证成功治疗的方式对其进行储存和处理。从生产时间到向患者给药维持标准化产品的存活率的经验证过程对于成功的治疗是重要的。应当理解的是,在样品的加工期间,将这种提取物封装以便生产本公开的药剂,通常理想的是跟踪样品以确保生产的药剂被适当地跟踪、包存和储藏以便以后的加工、处理和使用。为了便于这种跟踪,理想的是利用合适的标记来鉴定样品、提取物和药品,并且使这些标记能够彼此相互关联,并且与被治疗患者相互关联。这可以通过使用供体样品的RFID标记或DNA分析而实现。本领域技术人员将会熟悉适合于跟踪本公开的药剂的其他标记,例如条形码。

[0060] 在鉴定人粪便样品以确定该样品是否正常或者是否在被认为是正常的范围内,可以采用健康史数据、血清和/或血液分析及人粪便分析。此外,可以采用一套固定的工艺参数来生产产品,该产品可以在所选择的培养基上进行培养以便确定可行的所选择微生物和微生物群的存在从而确认人粪便样品内部的存活率和多样性。这些工艺参数也可以用于生产产品,该产品可以在所选择的培养基上进行培养以便确定某些微生物和/或微生物群的缺失。工艺方案的该部分可以用于确认使用于菌群恢复治疗产品的粪便样品的安全性。

[0061] 将人粪便样品的处理和加工成标准化的和可行的菌群恢复治疗产品可以包括:前后一致且经证实的采集和处理技术、过滤过程、受控制的均质化、及所选择液体的添加和这些液体的量。此外,可以将所生产的组合物(该组合物是标准化的组合物或产品,由此进行控制并且证明的处理和加工)在所选择的培养基上进行培养以便确定可行的所选择微生物个微生物群的存在从而确认产品中微生物的存活率和多样性。

[0062] 从生产标准化产品的时间到给予患者的时间,必须维持标准化的产品的存活以便进行成功的治疗。这可以包括利用冷冻贮存技术和冷冻保护剂来维持存活率。具体地,本专利申请人已发现可以将聚乙二醇(PEG)用作作用于菌群恢复治疗产品的有效冷冻保护剂。解冻产品的贮存时间、解冻技术、运送技术和处理也是影响存活率的因素并且在本文中作了规定。可以从接收粪便捐献的时间到标准化产品的生产时间并且到向患者给药采用本文中所定义的技术。本文中所提供的技术也允许维持并确认菌群恢复治疗产品中菌群的存活率。提供了通过在所选择的培养基上进行培养而确认所选择微生物和微生物群的存在、存活和多样性的方案。此外,本文中所提供的技术可以用于在生产工艺期间的任何时间点,从采集到加工到生产到贮存到解冻后到即将向患者给药前以及在其间的每个时间点,确认性所选择微生物和微生物群存在、存活和多样。在一个实施方式中,在加工时,可以将冷冻保护剂聚乙二醇(PEG)与人粪便样品和等渗生理盐水混合。可以从大约0.1g/ml至大约70g/ml、或者从大约2g/ml至大约68g/ml、或者从大约4g/ml至大约65g/ml、或者从大约5g/ml至大约60g/ml的浓度添加PEG。所使用的PEG可以具有大约600至大约20000的平均分子量。在一些实施方式中,PEG具有大约2000至大约4000,例如大约3350的平均分子量,如采用PEG 3350的制剂形式而提供。

[0063] 用于形成正常人粪便样品的培养物的生长可以包括以下技术：认识到人粪便原材料不能前后一致地培养。通过如下方式制造经加工的样品产品：使用50克(g)人粪便样品并且在前后一致的条件以下以大约2至大约4mL的PEG/生理盐水混合物与1g人粪便的比率在灭菌混合/过滤袋中混合而形成细菌悬液。在一些实施方式中，根据标准技术，在培养之前将该细菌悬液过滤。细菌悬液的平板接种和保温培养是在生长培养基上完成，如下文中所描述，并且根据工业标准厌氧培养方法而完成。对所形成的菌落形成单位(CFU)进行计数，利用这些方案获得前后一致的结果。

[0064] 将两种培养基用于培养细菌悬液。第一种是疾病控制中心(CDC)平板，通常被称为“CDC厌氧菌5%绵羊血琼脂平板。该平板是普通的厌氧微生物平板，该平板能够对苛养的和慢速生长的指定厌氧菌进行分离和培养。第二种是拟杆菌胆盐七叶苷琼脂(BBE)平板，该平板是特定的用于拟杆菌的指示种培养基。例如，这两种类型的培养基通常是经由实验室产品供应商(如Becton and Dickinson公司、和Fisher Scientific公司)而购得。

[0065] 通过在所选择的培养基上进行培养，本发明申请人能够提供存在于人粪便中、生产的产品、和给药的产品中的微生物多样性的衡量尺度。上面所公开的技术可以用于在任何阶段提供人粪便样品中微生物的多样性的衡量尺度。具体地，CDC平板被设计用于使5至7个不同科的可以存在于菌群恢复治疗材料中的微生物生长。在一个非限制性实例中，用细菌悬液培养的CDC平板必须具有至少3种在其上面生长的可识别微生物，以便对细菌悬液进行处理和/或用于菌群恢复治疗。此外，BBE平板的使用可以提供菌群恢复治疗产品中的微生物多样性的另一个衡量尺度。BBE平板使拟杆菌属微生物内部的多个属生长。BBE平板上的充分的CFU反映了存在于菌群恢复治疗产品中的属内部的多样性。在某些实施方式中，CDC平板或BBE平板可以单独地用作多样性的衡量尺度。在其他实施方式中，CDC平板和BBE平板两者可以共同地使用以便提供在微生物属层次下、以及在特定的微生物属内部的属层次下的多样性的增强的衡量尺度。

[0066] 图1是描绘示例性菌群恢复治疗剂生产工艺的一部分的流程图。更具体地，图1示意性地示出了用于采集和检查供体粪便样品的过程。作为采集/检查过程中的第一步骤，对可能的粪便供体进行筛选。本文中更详细地描述了筛选/预筛选。一旦供体通过筛选，步骤2可包括使用如本文中定义的人粪便采集套件采集供体的粪便，无论在家里或者在采集机构。该套件可以包括但不限于：清洁的带盖的人粪便收集容器、大的可闭合/可密封袋、捐献表格和人粪便采集说明卡。可以对采集的时间和日期、以及供体属性和运输方法进行记录以便跟踪从采集到加工的时间、以及运输的条件。作为非限制性例子，采集容器可以包括样品所接触的最低温度和最高温度的指示器。作为另一个非限制性例子，可以将低于大约4°C的温度和大于大约室温(大约22-29°C)的温度下改变颜色的1个以上的温度敏感的贴剂附着到容器。

[0067] 步骤3可包括将样品运输到加工机构。应当理解的是，如果在加工机构采集样品，则不必运输样品。在一些情况下，理想的是在加工机构采集样品以便更明确地建立样品的监管链。在任何个体的第一次粪便捐献时，将为各供体建立档案。后面的粪便样品可以经历人粪便检测，该检测是用于匹配和确认供体与捐献的一致性。基于先前所采集的样品，形成用于供体的人粪便档案并且可以在重复的捐献期间维持或增强。任何新的样品将与该档案进行比较以确认它是相同的供体。可以基于人粪便中拟杆菌属的表征进行区别以便确认供

体一致性。在一个非限制性例子中,在加工机构采集用于形成档案的基本组的粪便样品以保证档案样品中的供体一致性。在另一个非限制性例子中,可以在除加工机构以外的地点采集用于形成档案的基本组的粪便样品,其中供体一致性保证方案适合于该状况或地点。

[0068] 该方法的步骤4可包括标记捐献“检疫”并且在在加工前将检疫中捐献物在室温或低于室温的温度下保持达不长于24小时。在其中温度指示器已被激活或者其中在捐献于接收之间的时间超过24小时的情况下可拒绝捐献。另外,在适用的情况下,人粪便检测结果必须与供体档案一致。如果人粪便检测不与供体档案一致,那么这天所采集的捐献将被放弃并且供体将被取消资格。

[0069] 在本公开的一种方法中,对在采集的大约24小时内对人粪便样品进行处理。在本申请的另一个方法中,在粪便样品到达加工机构的时间记录采集时间。步骤6可包括检查粪便捐献。当粪便样品到达加工机构时可以完成目视检查。在粪便样品是松软的、未成形的、重量不足(例如,小于大约50g)、或者由于任何其他原因,包括但不限于表明样品质量差的证据或者关于供体健康的问题的情况下,可拒绝样品并标记为“检查-拒绝”并且将捐献物放弃。此外,可以由受过训练的人员对粪便采集表格上问题的回答进行复查。采集表格中的某些回答会要求充分的拒绝。如果样品被接收,可将其标记为“检查-接收”并且可转移到制造过程。

[0070] 图2中所示的流程图说明了筛选供体、获得人粪便样品、和将粪便样品加工成菌群恢复治疗产品的另一个示例性方法。步骤1可包括征募潜在的供体。步骤2可包括使潜在的供体完成最初供体健康史问卷(IDHHQ)。该问卷可类似于由用于可能的血液供体筛选的红十字所使用的问卷(具有可能地其他筛选问题,若需要)。“不合格”的结果导致潜在的供体被拒绝并且将该供体从群体中排除。例如,供体将接收在类似于将会导致潜在的供体在红十字筛选中不合格的情况下的“不合格”结果。“通过”的结果导致供体被接收做进一步检测。步骤4可包括进一步的检测和复查,如果供体不合格,则将该供体从群体中排除。定期地对供体进行筛选以确定是否有常见传染病和本文中所列出的其他疾病。将以规则的间隔(例如但不限于大约每15-90天)执行受训练的人员对供体疾病史的检查、和重复筛选试验。筛选可以包括下面的表1中所列出的组成部分。

[0071] 表1:供体筛选试验

[0072]

检测名称	待检测的材料	合格标准
艰难梭菌 B, 通过 PCR 和 GDH	粪便	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 艰难梭菌阴性 ▪ GDH 结果未通过/未达到标准-仅供参考
诺如病毒, 通过 PCR	粪便	阴性
原病毒, 通过 PCR	粪便	阴性
腺病毒, 通过 PCR	粪便	阴性

[0073]

肠道病原体（志贺氏菌 Shigella、沙门氏菌 Salmonella、弯曲杆菌 Campylobacter、山梨糖醇- 阴性的大肠杆菌、气单胞菌 Aeromonas、耶尔森氏菌 Yersinia、毗邻单胞菌 Plesiomonas、志贺毒素 Shiga toxins）	粪便	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 对于志贺氏菌、沙门氏菌、Camphylobacter、山梨糖醇阴性的大肠杆菌、气单胞菌、耶尔森氏菌、和毗邻单胞菌为阴性。 ▪ 未检测到志贺毒素
贾第鞭毛虫抗原	粪便	阴性
隐孢子虫抗原	粪便	阴性
抗酸染色（圆孢球虫、等孢球虫属）	粪便	阴性
虫卵和寄生虫	粪便	未检测/鉴定：贾第鞭毛虫、溶组织内阿米巴（阿米巴）、蠕虫卵、原虫、蠕虫幼虫和节片
万古霉素耐药肠球菌（VRE）	粪便	未分离出 VRE
甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（MRSA）	粪便	未分离出 MRSA
弧菌	粪便	无反应
李斯特菌属	血液（血清）	阴性的
人免疫缺陷病毒（HIV）	血液（血清）	无反应
甲型肝炎(IgG); 必须是+ 或者是已接种的	血液（血清）	无反应
乙型肝炎：抗乙型肝炎表面抗原必须是+或者是已接种的	血液（血清）	无反应

[0074]

丙型肝炎抗体	血液（血清）	无反应
密螺旋体抗体	血液（血清）	阴性

[0075] 这些只是例子。也可采用其他检测。

[0076] 步骤5可包括将通过的供体接纳到供体群中，步骤6可包括为供体提供粪便采集套件。步骤7可包括开始从接收的供体中定期地采集粪便样品的步骤，步骤8可包括由所采集的粪便样品制造药品。步骤9可包括对药品进行检疫，步骤10可包括在第45天重新筛选供体粪便样品。如果样品未通过筛选，将在过去45天前由供体中所生产的所有药品丢弃。如果样品通过了筛选，从检疫放行（步骤11）。

[0077] 在另一个示例性方法中，将人粪便样品称重并且将45至75g的样品转移进入灭菌过滤袋。将生理盐水与冷冻保护剂（例如，聚乙二醇（PEG）3350）的混合物用作稀释剂，因此可以将其添加到人粪便样品中。本文中所使用的术语“生理盐水/PEG混合物”与“稀释剂”是可互换的。稀释剂的PEG浓度可以是大约30-90g/升。稀释剂的PEG浓度也可以是在大约25-75g/升之间。在一个实例中，生理盐水/PEG混合物与粪便样品的比率为2:1，或2mL生理盐水/PEG混合物比1克人粪便。作为一个非限制性例，可以将大约100mL的生理盐水/PEG混合物可以使用于50g的人粪便。虽然生理盐水/PEG适合于用作稀释剂（和/或冷冻保护剂），但这并非意图是限制性的。也可使用其他冷冻保护剂。例如，右旋糖、甜菜碱、甘氨酸、蔗糖、聚乙烯醇、Pluronic F-127、甘露醇、Tween-80、乙二醇、1,3-丙二醇、羟丙基纤维素、甘油、PEG/甘油混合物、丙二醇、或者其组合可被用作冷冻保护剂。这些材料可单独使用或者连同溶剂（如生理盐水）一起使用。

[0078] 一旦将稀释剂添加到容纳人粪便样品的袋中，则将袋密封。利用桨式混合机，将粪便样品与稀释剂混合。粪便样品与稀释剂的混合产品被称为细菌制剂。

[0079] 可以根据标准技术将该细菌制剂过滤，并且可以将该滤液从混合袋中取出并转移进入灭菌小袋或袋中。在一些实施方式中，不对该细菌制剂进行过滤。

[0080] 在其他实施方式中，容纳细菌制剂（过滤或未过滤）的各袋是一次剂量的菌群恢复治疗产品的等同物，并且作为一次剂量的菌群恢复治疗进行处理。在其他实施方式中，可将这些袋根据适当的方案进行储存并且在后面的日期等分为较小的量。在其他实施方式中，可根据适当的方案储存这些袋，并且合并成一次以上的剂量。此外，可以保留细菌制剂的1个以上的袋用于质量控制（QC）。

[0081] 在一个非限制性例中，可以用产品编号标记这些袋并且冷冻。一旦发生了这种情况，则可将这些袋看作是各剂量的菌群恢复治疗产品。产品编号可以包括供体识别（ID）和生产日期（加工日期）。菌群恢复治疗产品可以在大约-20°C至大约-80°C或以下的温度下冷冻。然后，可以对菌群恢复治疗产品进行检疫直到对来自QC检测的结果进行评价和进行如下所述的其他检测。

[0082] 在另一个非限制性例中，可以用产品编号标记这些袋并且冷冻。产品编号可以包括供体ID和生产日期（加工日期）。可以将这些标记袋进行冷冻在大约-20°C至大约-80°C或以下的温度下（例如，低至大约-192°C，若需要可通过用液氮冷冻而实现）。然后，可以对这些袋的内容物进行检疫，直到对来自QC检测的结果进行评价并且进行如下所述的其他检

测。

[0083] 在所制造的菌群恢复治疗产品的质量(包括所加工的微生物的存活率)的一个示例性检测,可以对从单个合格的供体在一天中所采集的粪便捐献或粪便样品进行处理。在一些实施方式中,将不制作各供体的样品之间或者在单独供体之间的样品群。在其他实施方式中,将取自单独供体的样品制剂加以汇聚或合并。在其他实施方式中,将取自多于一个的供体的样品制剂加以合并。

[0084] 可以根据标准工业步骤将经加工的人粪便或者菌群恢复治疗产品的样品稀释、平板接种、保温和计数。可以在CDC平板上对厌氧CFU进行计数并且可以在BBE平板上对拟杆菌CFU进行计数。将根据质量控制标准对平板计数进行检查,该质量控制标准可以包括但不限于:来自特定供体的现前捐献的检测结果、和其他确立的适当标准。如果这些计数是在可接受的范围内,菌群恢复治疗产品将被认为是可接受的。如果这些计数不是在可接受范围内,将把由相同的人粪便样品所制造的菌群恢复治疗产品的所有的袋从冷柜中取出并销毁。在样品制剂或菌群恢复治疗产品的冷冻之前,最后的可接受计数范围可以是在CDC平板上以 10^{-6} 的系列稀释水平的大约30至大约300CFU之间、和在BBE平板上的 10^{-5} 的系列稀释水平的大约30至大约300CFU之间。

[0085] 图3A和图3B中示出了从检疫放行到运送至消费者的加工药用物质(菌群恢复治疗组合物)的一个示例性方法。步骤1可包括从检疫中给药用物质放行,步骤2可包括将采集容器转移到II级生物安全柜。步骤3可包括在校准秤上将生物安全柜内的袋保持器上的过滤袋去皮,接着在步骤4中称量大约 $50\text{g} \pm 10\text{g}$ 的药用物质并置于过滤袋中。步骤5可包括将 3mL/g 的预先混合的PEG/生理盐水溶液添加到过滤袋整中的药用物质中。可在步骤A中,通过将PEG粉末以 30g/L 冲泡在 0.9% 氯化钠冲泡液(USP)中而制备预先混合的PEG/生理盐水溶液。步骤6可包括将装载的过滤袋密封入密实袋中并且将密实袋密封。步骤7可包括从生物安全柜中取出密封的袋组件并且将袋放入桨式混合机中。在步骤8中,可将袋在桨式混合机中以 230rpm 混合2分钟,接着在步骤9中将袋从桨式混合机中取出并将袋放回到生物安全柜中。在步骤10中,可将 150mL 的过滤悬浮液移液入乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVA)灌肠袋中,接着在步骤7中将灌肠袋密封。可留下取自过滤悬浮液的一个样品,用于产品质量检测。在步骤B1中,可制备CDC平板和BBE平板。步骤B2可包括由剩余的过滤悬浮液形成系列稀释。对于每批次执行一次该步骤。在步骤B3中,用系列稀释对CDC平板和BBE平板进行接种并且在 37°C 下保温培养48小时。在步骤B4中,对每个平板的菌落形成单位(CFU)进行计数。

[0086] 图3B中继续示出了该示例性方法。在步骤13中,可将被密封在EVA灌肠袋中的药品在 0°C 下预冷却60分钟。在步骤14中,在检疫期间可将EVA袋置于 -80°C 的冷柜中直到接收到来自步骤B和供体检测的结果。如果该药品未通过检测,那么将所有的受影响剂量的药品放弃。如果该药品通过检测,则在步骤15中可从检疫取出EVA袋并放置到 -80°C 冷柜的长期贮存区。在将药品储存在 -80°C 冷柜中时,可接收来自消费者的订单。在步骤16中,从冷柜中取出EVA并且解冻到 0°C 达60分钟。在步骤17中,可对EVA袋进行检查以确定是否有泄漏。如果袋未通过检查,则将该产品放弃,如果袋通过检查,则在步骤18将EVA袋包装并运送给消费者。

[0087] 图4在流程图中汇总了输送方法的一个实例。菌群恢复治疗产品的消费者或现场顺序触发分布合格的产品从 -80°C 的长期贮存中取出。现场可以是医生办公室、诊所、医院、

或者其中使用菌群恢复治疗产品的其他地点。将产品解冻并且进行标记。执行标记过程的质量控制(QC),其中标记过程的失败导致产品被重新标记并再次通过质量控制。通过QC将产品转移到包装阶段,其中将产品包装进入装运箱然后运送到现场。

[0088] 图5在流程图中汇总了输送方法的另一个例子。产品被订购、接收、和检查。产品未通过检查导致产品被放弃、将报告发送至加工中心、和产品的重新订购。如果产品通过检查,则将报告发送至加工中心,并且将产品送给患者进行治疗或者在被送给患者进行治疗之前储存在安全的地点。在任何情况下,在将产品提供给患者之前将一级包装丢弃。

[0089] 图6中示出了一个示例性的包装系统10。该包装系统10可包括样品袋12。样品袋12可用于容纳如本文中所描述的菌群恢复治疗组合物、保护性内盒14、管组件16、用于管组件16的包装袋18(例如, TYVEK®)、保存盒20(其容纳样品袋12、保护性内盒14、在包装袋18内部的管组件16、和说明书)。可将架子盒20连同冰袋放置在隔热的运送箱22(例如,其可包括聚苯乙烯泡沫塑料),并且可将运送箱22运输至治疗机构。可将运送箱22闭合并且以H形用胶带密闭从而限制包装系统10与外部大气之间的空气交换。

[0090] 然后,在延长的时间段中,使包装系统10经历变化的温度范围。检测条件包括将样品袋12从解冻浴中取出(例如,在 $0 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、将包装系统10放置于“冷的”环境中(例如, $-20 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $4\text{h} \pm 30\text{min}$)、将包装系统10在室温下保持第一时间段($22 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $8\text{h} \pm 30\text{min}$)、将包装系统10放置在在“热的”环境中($50 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $4\text{h} \pm 30\text{min}$)、将包装系统10在室温下保持达第二时间段($22 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $8\text{h} \pm 30\text{min}$)、将包装系统10放置在“温暖的”环境中($35 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $4\text{h} \pm 30\text{min}$)、将包装系统10在室温下保持第三时间段($22 \pm 3^\circ\text{C}$ 达 $8\text{h} \pm 30\text{min}$)。在这些条件下,整个时间段(大约36小时)样品袋12的温度保持在低于 20°C 。根据这些检测结果,包装系统10为样品袋12提供合适的保护,以防止受到本文中所公开菌群恢复治疗组合物的输送所预期的极端气候的影响。

[0091] 图7示出了样品袋12。袋12可由乙烯乙酸乙烯酯构成。可想到其他材料。例如,袋12可包括聚对苯二甲酸乙二醇酯薄膜(一种基本上不透过气体的材料)、其他聚合物等。袋12可类似于静脉袋,任选地,袋12可包括将允许袋12被挂在架子上(例如,定位/挂在内窥镜的上方)的附件。

[0092] 袋12可具有在大约25-250ml范围内的容量(例如,50ml)。袋12可具有用于将菌群恢复治疗组合物输送进入袋12的装料口24。装料口24可包括鲁尔接头或者用于便于输送菌群恢复治疗组合物的其他类型接头。在用菌群恢复治疗组合物填充袋12之后,可将装料口24密封,从而有效地将菌群恢复治疗组合物密封在袋12的内部。袋12也可包括插接口26。插接口26可用于在使用时从袋12中取出菌群恢复治疗组合物。

[0093] 图8示出了管组件16。管组件16可包括被设计用于将插接口26连接到袋12上的插接构件28。管组件16也可包括带阶梯状接头32的管体30。阶梯状接头32可允许将管16与输送管34联接。

[0094] 管组件16可包括若干其他特征。例如,夹具36可联接到输送管34。另外,也可沿输送管34设置视觉标记38。可沿插接构件28设置插接帽40。

[0095] 本文中所公开的菌群恢复治疗组合物被设计成在延长的时间段中在各种温度条件下保持稳定。例如,当在大约 $20-25^\circ\text{C}$ 的温度下贮存时,菌群恢复治疗组合物可保持稳定(例如,具有活的微生物群体)达大约24小时以上、大约48小时以上、大约96小时以上、或者

大约192小时以上。当在大约4°C的温度下储存时,菌群恢复治疗组合物可保持稳定(例如,其中活的微生物群体)达大约24小时以上、大约48小时以上、大约96小时以上、大约192小时以上、或者大约240小时以上。换句话说,菌群恢复治疗组合物的“解冻保存期”可以是大约24小时以上、大约48小时以上、大约96小时以上、大约192小时以上、或者大约240小时以上。

[0096] 当在大约-20°C的温度下储存时,菌群恢复治疗组合物可保持稳定(例如,具有或微生物群体)达大约60-90天以上、大约4-6个月以上、或者大约6-9个月以上。当在大约-80°C的温度下储存时,菌群恢复治疗组合物可保持稳定(例如,具有活的微生物群体)达大约60-90天以上、大约4-6个月以上、大约6-9个月以上、或者大约12个月以上。换句话说,菌群恢复治疗组合物的“冷冻保存期”可以是大约60-90天以上、大约4-6个月以上、大约6-9个月以上、或者大约12个月以上。

[0097] 本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1门、至少2个门、至少3个门、至少4个门、至少5个门、至少6个门、至少7个门、至少8个门、至少9个门、或者至少10个门的成员细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个纲、至少2个纲、至少3个纲、至少4个纲、至少5个纲、至少6个纲、或者至少7个纲的成员细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个目、至少2个目、至少3个目、至少4个目、至少5个目、至少6个目、或者至少7个目的成员细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个科、至少2个科、至少3个科、至少4个科、至少5个科、至少6个科、至少7个科中的成员的细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少5个、至少10个、至少20个、或者至少30个不同属的成员细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括至少10个、至少50个、至少100个、至少200个、至少300个、或者至少400个不同种的细菌。

[0098] 例如,菌群恢复治疗组合物可包含来自1个以上的目或2个以上的目的活细菌,包括但不限于类杆菌和梭菌。在一些实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约20-95%、或者大约30-85%、或者大约40-60%可以是来自类杆菌目。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物的活菌的大约10-85%、或者大约20-60%、或者大约30-40%可以是来自梭菌目。

[0099] 另外或者可替代地,菌群恢复治疗组合物可包括来自5个以上科、或者大约6-12个科、或者大约7-10个科的细菌。这可包括来自拟杆菌科、伯克氏菌科、诺卡氏菌科、梭菌、优杆菌、拟杆菌科、霜霉菌科、紫单胞菌科、普雷沃氏菌科科、理研菌科、瘤胃菌科、和消化球菌科的细菌。在一些实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约20-84%、或者大约30-50%、或者大约36-48%可以是来自拟杆菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-2%或大约1%的可以是来自伯克氏菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约1-10%、或者大约1-8%、或者大约2-7%可以是来自诺卡氏菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约1-22%、或者大约3-22%、或者大约1-10%、或者大约1-8%、或者大约4-7%可以是来自梭菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约1-10%、或者大约1-9%、或者大约4-8%可以是来自优杆菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-2%或者大约1%

可以是来自拟杆菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-23%、或者大约1-10%、或者大约4-9%可以是来自霜霉菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-8%、或者大约1-5%、或者大约1-3%可以是来自紫单胞菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-2%或大约1%可以是来自普雷沃氏菌科科在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约1-30%、或者大约1-52%、或者大约4-23%可以是来自理研菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中大约5-30%、或者大约8-25%、或者大约10-18%的活菌可以是来自瘤胃菌科。在这些实施方式的部分实施方式中并且在其他实施方式中,菌群恢复治疗组合物中活菌的大约0.5-2%或者大约1%可以是来自链球菌科。

[0100] 本公开的菌群恢复治疗组合物可具有大约0.4-2.5、或者大约1.0-2.0、或者大约1.08-1.89、或者大约1.25-1.75的香农多样性指数。这些数是在“科”的层次进行计算。在其他层次(例如,门、属等)进行计算将会导致不同的数(例如,1-8左右)。因此,当在门、属、或者其他层次进行计算时,香农多样性指数可以是大约1-8。

[0101] 可利用适合于沉积在受试者(例如,人、哺乳动物、动物等)的胃肠道(优选结肠)中的方法,而施用本公开的菌群恢复治疗组合物。给药途径的例子包括通过结肠镜、栓剂、灌肠、上消化道内镜、上小肠镜的直肠给药。此外,可采用通过鼻胃管、鼻肠管或鼻空肠管的经过鼻或口的插管法。也可采用通过固体制剂(如丸剂、片剂、混悬剂、凝胶剂、凝胶片、半固体制剂、片剂、冲剂、锭剂或胶囊或微胶囊的口服给药,或者作为肠内制剂、或重新配制以便最终以液体形式输送、混悬剂、凝胶剂、凝胶片、半固体制剂、片剂、冲剂、锭剂或胶囊,或者用为肠内制剂。组合物可以是经处理的或未经处理的粪便菌群,将整个(或者大体上整个)菌群、或者部分地基本上或者完全地分离或纯化的粪便菌群冻干、冷冻干燥或冷冻、或者加工成粉末。

[0102] 对于用于本公开方法的治疗而言,组合物可以含有一种以上药学上可接受载体的剂型而方便地给药。合适的载体在本领域是众所周知的,并且随着组合物的期望剂型和给药方式而变化。例如,载体可包括稀释剂或赋形剂,例如填充剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂、助流剂、润滑剂等。通常,载体可以是固体(包括粉末)、液体或者其组合。各载体优选地从与组合物中的其他成分是相容的并且对受试者无害的意义上讲是“可接受的”。载体可以是生物学上可接受的并且是惰性的(例如,载体允许组合物维持生物材料的存活率直到被输送至适当的地点)。

[0103] 口服组合物可包括惰性稀释剂或者可食用载体。为了口服治疗给药的目的,可以将活性化合物可以与赋形剂合并并且以片剂、锭剂、或胶囊(如明胶胶囊)的剂型而使用。口服组合物也可以通过将本公开的组合物与食物混合而制备。在一个实施方式中,使用于给药的食物冷却,例如冰淇淋。可以包括药学上相容的粘合剂、和/或辅料作为该组合物的部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有任何的以下成分、或者具有类似性质的化合物:粘合剂(如微晶纤维素、黄耆胶或明胶)、赋形剂(如淀粉或乳糖)、崩解剂(如海藻酸、交联羧甲淀粉钠、或玉米淀粉);润滑剂,例如硬脂酸镁或硬脂酸盐;助流剂,如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;或者矫味剂,如薄荷、水杨酸甲酯、柑橘矫味剂,或者其他合适的矫味剂。这些

只是为了举例的目的,而并非意图是限制性的。

[0104] 活性化合物也可以以栓剂的剂型(例如,使用常规的栓剂基质,例如可可脂和其他甘油三酯类)而制备或者以保留灌肠的形式而制备以便直肠给药。活性化合物可与将防止化合物从身体中快速消除的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物。可以使用可生物降解的、生物相容性的聚合物,例如乙烯/乙酸乙烯酯共聚物、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸类、和聚乳酸。这种制剂可以采用标准技术制备。这些材料也可以从例如Alza公司和Nova Pharmaceuticals有限公司购得。脂质体悬浮液也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法而制备。

[0105] 可将组合物包封。例如,当将组合物口服给药时,将剂型配制成使得组合物不暴露于在胃肠道中在结肠前占优势的条件,例如高酸度和存在于胃和/或肠中的消化酶。用于治疗使用的组合物的包封在本领域是常规方法。包封可包括硬壳胶囊,该硬壳胶囊可用于干的粉状成分软壳胶囊。胶囊可由胶凝剂(如动物蛋白(例如,明胶))、植物多糖或其衍生物(如角叉菜胶)及改形形式的淀粉和纤维素水溶液而制成。可将其他成分添加到胶凝剂溶液中,如增塑剂(例如,甘油和/或山梨糖醇)、着色剂、防腐剂、崩解剂、润滑剂和表面处理剂。

[0106] 适合于直肠给药的制剂包括凝胶剂、乳膏、洗剂、水性或油性悬浮剂、分散性粉剂或颗粒剂、乳剂、水溶性固体材料、冲洗剂等。这些制剂优选地是作为将活性成分包含在构成栓剂基质(例如可可脂)的一种以上固体载体中单位剂量栓剂而提供。用于这种制剂的合适载体包括矿脂、羊毛脂、聚乙二醇类、醇类、及其组合。可替代地,本公开的含有快速再殖菌分布剂的结肠冲洗剂可配制用于结肠或直肠给药。

[0107] 适合于口服给药的制剂可以分离单元的形式而提供,例如片剂、胶囊、扁囊剂、糖浆剂、酏剂、口香糖剂、“棒棒糖”制剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、锭剂、或凝胶包覆安瓿,各单元含有预定量的活性化合物;作为粉剂或颗粒剂的形式;以在水性或非水液体中的溶液剂或混悬剂的形式;或者以水包油型或油包水型乳剂的形式而提供。

[0108] 适合于经粘膜给药方法(例如通过舌下或口腔含化给药)的制剂包括包含活性化合物的锭剂、贴剂、片剂等,通常有味基质,例如糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶及包含在惰性基质(如明胶和甘油或蔗糖或阿拉伯胶)中的活性化合物的含药锭。

[0109] 本公开的制剂可通过任何合适的方法而制备,通常是通过均匀地且紧密地将预定的肠道菌群与液体或细碎的固体载体或两者以所要求比例混合,然后若有需要将所形成的混合物成形为期望的形状。另外,将对预定的肠道菌群进行处理以便延长保存期,优选地通过冷冻干燥延长预定肠道菌群的保存期。

[0110] 此外,片剂可通过挤压包含活性成分的粉末或颗粒和一种以上的任选成分(例如粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、或表面活性分散剂)紧密混合物而制备,或者通过模压本公开的粉状活性成分的紧密的混合物而制备。除了上面具体描述的成分外,本公开的制剂可包括本领域技术人员已知的其他剂,具有所述制剂的类型。例如,适合于口服给药的制剂可包括矫味剂,并且适合于经鼻给药的制剂可包括香料。

[0111] 本公开的治疗组合物可以通过可用于药物的任何常规方法以单独的治疗剂或者各治疗剂的组合的形式而给药。当然,给药的剂量将根据已知因素而变化,例如特定剂的药效动力学特性及其给药方式和给药途径;受者的年龄、健康和体重;症状的性质和程度;并行治疗的类型;治疗的频率;和期望的效果。活性成分的每日剂量可以预计是大约0.001

至1000毫克(mg)每千克(kg)体重。

[0112] 剂型(组合物适合于给药)含有大约1mg至大约500mg的活性成分/单位。在这些药物组合物中,活性成分通常是以大约0.5-95重量%(基于组合物的总重量)的量而存在。

[0113] 软膏剂、糊剂、泡沫剂、封堵剂、乳膏和凝胶剂也可以含有赋形剂,例如淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、硅酮、膨润土、硅酸、和滑石、或者其混合物。粉剂和喷雾剂也可以含有赋形剂,如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、和硅酸钙、或者这些物质的混合物。

[0114] 适合于直肠给药的制剂可通过与多种基质(例如乳化基质或水溶性基质)混合而制成栓剂。

[0115] 适合于阴道给药的制剂可以含有除了活性成分以外的成分的子宫托、月经塞、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫剂、或喷雾剂的形式而提供,这种载体在本领域中被认为是适当的。合适的药用载体描述于Mack出版公司的《雷明顿制药科学》,该书是在本领域标准的参考教科书。

[0116] 在本公开的上下文中给予受试者(特别是动物,尤其是人)的剂量应当在合理的时间段内足以影响动物中的治疗反应。本领域技术人员将认识到剂量将取决于多种因素,包括动物的状态、动物的体重、以及治疗的病症。合适的剂量是将导致已知可实现期望反应的治疗组合物在受试者中的浓度的剂量。

[0117] 剂量的大小也将决定于给药途径、定时和频率,以及会伴随治疗组合物的给药的任何副作用的存在、性质和程度,和期望的生理效应。

[0118] 应当理解的是该组合物的化合物可按如下方式给药:(1)同时地由复方制剂中的各化合物的组合;或者(2)可替换地,即在单独的药物制剂中顺序地、相继地、并行地或同时地给予化合物。在替代的治疗中,给予第二活性成分、和任选地第三活性成分的给药中的延迟,不应是例如失去各活性成分的组合的协同治疗效果的益处。根据采用任何给药方法(1)或(2)的某些实施方式,理想地应给予该组合从而实现最有效的结果。在某些实施方式中,通过任何给药方法(1)或(2),理想地应给予该组合从而实现每个活性成分的血浆峰值浓度。

[0119] 本领域技术人员应当理解的是,用于治疗的所需的本公开的组合中活性成分的量将根据多种因素而变化,包括正在治疗的疾病的性质及患者的年龄和疾病,并且将最终取决于主治医师或保健医生的决定。应考虑的因素包括制剂的给药途径和性质、动物的体重、年龄和全身状况及被治疗疾病的性质和严重程度。

[0120] 可将该示例性的药物组合物包装进入保存盒然后包装进入隔热的瓦楞纸箱以便在订购时运送给消费者。在从-80°C的长期贮存冷柜中解冻到0°C之后,运送该示例性的药物组合物。为了确保充分地防止液体悬浮液受到运送期间的温度变化的影响,该包装系统在24小时的时间段内经历变化的温度。该检测过程的设计是根据美国材料与试验国际协会F2825-10,“用于单包裹投递的包装系统的气候应力的标准规程”而改进。该检测的目的是确保产品不经历低于可接受阈值(32°F或0°C)或者超过可接受阈值(84°F或29°C)的温度。

[0121] 可将该产品给予具有多种不同病况的患者并且理想地影响这些病况。可理想地受影响的部分的病况包括:心血管和/或外周血管疾病、变态反应、肥胖症、低血糖、便秘、口炎性腹泻(例如,乳糜泻)、胃肠道癌(例如胃肠道癌是胃癌、食道癌、结肠癌、胆癌、肝癌、胰腺癌、结直肠癌、肛门癌、和胃肠道间质瘤中的至少一种)、肌阵挛肌张力障碍、骶髂关节炎、脊

椎关节病、脊椎关节炎、近端肌强直性肌病、自身免疫性疾病肾炎综合征、孤独症、旅行者腹泻、小肠细菌过度生长、慢性胰腺炎、胰功能不全、慢性疲劳综合征、良性肌痛性脑脊髓炎、慢性疲劳免疫功能紊乱综合征、帕金森氏病(PD)、肌萎缩侧索硬化(ALS)、多发性硬化症(MS)、退行性神经系统疾病、癫痫大发作或癫痫小发作、萎缩性肌强直、慢性传染性单核细胞增多症、流行性肌痛性脑脊髓炎、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、急性或慢性变态反应、肥胖症、厌食症、肠易激综合征(IBS或痉挛性结肠)、克罗恩病、肠易激病(IBD)、结肠炎、溃疡性结肠炎或克罗恩氏结肠炎、慢性传染性单核细胞增多症、流行性肌痛性脑脊髓炎、急性或慢性荨麻疹、狼疮、类风湿关节炎(RA)或幼年特发性关节炎(JIA)、糖尿病前期综合征、纤维肌痛(FM)、I型或II型糖尿病、急性或慢性失眠症、和注意力缺陷/多动症(ADHD)。

[0122] 在人类的情况下,本公开包括与异常肠道菌群的存在有关的慢性疾病的治疗方法。这种疾病包括但不限于以下类型的疾病:胃肠道疾病(包括肠易激综合征或痉挛性结肠)、功能性肠病(FBD)(包括便秘占主导的FBD、疼痛占主导的FBD、上腹部FBD、非溃疡性消化不良(NUD)、胃食道返流、炎性肠病(包括克罗恩病、溃疡性结肠炎、未定型结肠炎、胶原性结肠炎、显微镜下结肠炎、慢性艰难梭菌感染、假膜性结肠炎、黏液性结肠炎、抗生素相关性结肠炎、特发性或单纯性便秘、憩室病、AIDS肠病、小肠细菌过度生长、腹部病变、结肠息肉病、结肠息肉、慢性特发性假性梗阻综合征;特定病原体(包括细菌、病毒、真菌和原虫)的慢性肠道感染;病毒性胃肠疾病,包括病毒性胃肠炎、诺瓦克病毒性胃肠炎、轮状病毒胃肠炎、艾滋病相关性腹泻;肝病,例如原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、脂肪肝或隐源性肝硬化;风湿性疾病,例如类风湿关节炎、非类风湿性关节炎、非类风湿因子阳性关节炎、强直性脊柱炎、莱姆病、和赖特氏综合征;免疫介导性疾病,例如肾小球肾炎、溶血性尿毒综合征、儿童糖尿病、混合型冷球蛋白血症、多发性动脉炎、家族性地中海热、淀粉样变性、硬皮病、系统性红斑狼疮、和白塞综合征;自身免疫性疾病包括系统性狼疮、特发性血小板减少性紫癜、干燥综合征、溶血性尿毒综合征或硬皮病;神经系统综合征,例如慢性疲劳综合征、偏头痛、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化、重症肌无力症、吉兰-巴雷综合征、帕金森氏病、阿滋海默症、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根神经病、和其他退行性疾病;精神疾病包括慢性抑郁症、精神分裂症、精神障碍、躁狂抑郁症;退化疾病,包括阿斯伯格综合征、蕾特氏综合征、注意力缺陷多动障碍(ADHD)、和注意力缺乏症(ADD);退化疾病、孤独症;婴儿猝死综合征(SIDS)、神经性厌食症;皮肤病,例如慢性荨麻疹、痤疮、疱疹样皮炎和血管炎;及心血管和/或血管病变和疾病。

[0123] 实施例

[0124] 可通过参考以下的实施例来进一步说明本公开,这些实施例的目的是举例说明一些实施方式,而并非以任何方式限制本发明。

[0125] 实施例1:样品表征方法的确认

[0126] 完成检测以确认用于鉴定正常人粪便样品的方法。实施测量系统分析(MSA)以便鉴定上述检测测量中的变化的要素。为此,不同年龄、性别和体重的5位健康人供体被征募。从各供体中采集粪便样品,并且根据预定的标准方法进行处理。将所形成的细菌悬液平板接种并生长于上述两个不同平板(CDC平板和BBE平板)上。

[0127] 检测变量包括:5位不同的供体、3个液体与人粪便比率、2个平板类型、每个平板4个稀释水平、每个稀释水平6个平板、双计数(用于计算归因于人平板计数器的误差)、总共

550个计数两次的平板、和20次执行(平板的组)。

[0128] 使用Minitab15统计软件利用嵌套量具的重复性和再现性对检测测量值进行分析并且对误差带进行了评价。检测过程被确定在特定的误差带内是可接受的和可重现的。虽然被认识到不是所有的微生物可以进行培养和计数,但该方法表明细菌悬液中的代表性的微生物亚群可以用作正常健康人粪便样品的指示物。

[0129] 实施例2:灌肠袋和端口耐久性

[0130] 对类似于样品袋12的三个乙烯/乙酸乙烯酯(EVA)袋进行检测以便评价在-80°C下冷冻时端口的耐久性。在每个制造工序中使用温度和时间来模拟将来的产品生产和处理。在冷冻前、解冻前和解冻后,对这些袋进行检测以确定是否泄漏。用100mL生理盐水溶液填充这些袋并且将端口密封。为了确定沿袋边缘的密封是否泄漏,将这些袋倒置以确定这些端口是否完全地被密封。将这些袋在0°C冷却浴中放置1小时,然后在-80°C冷柜中在变化的方位中放置1个月。将袋样品A放置在平面上,将袋样品B放置在长边上,将袋样品C放置在短边上。在1个月后,将这些袋从-80°C冷柜中取出并且检查是否有断裂、破裂、和泄漏。此外,通过从36英寸的高度将冷冻的EVA袋下落到拐角、表面和端口上而执行跌落测试。跌落检测包括当把将来的产品从贮存中取出时使样品下落到产品的拐角、端口、和平直表面上以便模拟可能的处理误差。然后,根据上述标准,在各跌落后对这些袋进行重新检查。对于每个样品而言,除了袋周边密封的初步检查外,重复进行三次各跌落检测。所有的样品袋均通过了检测(未检测到泄漏)。

[0131] 然后,这些袋经历解冻过程。将各样品在甘油/水浴中在0°C下浸泡1小时。然后,取出样品,干燥,并且重复进行跌落检测。再次,所有样品袋通过所有检测(未检测出泄漏)。

[0132] 实施例3:临床研究

[0133] 在2期临床研究中,将本文中所公开的菌群恢复治疗组合物给药予31位受试者。未报告严重不良事件,并且无不良事件与产品或其给药有关。在这些受试者中,在使用一个或两个剂量的菌群恢复治疗组合物之后27位受试者经历了他们的rCDAD(复发性艰难梭菌相关性腹泻)症状的成功消退,该消退被定义为在给药后rCDAD症状不复发达56天。在这些27位受试者中,在使用一个剂量的菌群恢复治疗组合物之后,16位患者经历了rCDAD的完全消退,并且其他11位受试者在第一次给药后复发,但然后在菌群恢复治疗组合物的第二次给药后成功地到达56天疗效终点。在这些受试者中,4位受试者被认为是治疗失败:3位受试者在接收他们的菌群恢复治疗组合物的第二次给药后经历了rCDAD的复发,并且1位受试者在第一次给药之后复发且位接受第二次给药。

[0134] 从可获得的制成临床批次中,随机地选择菌群恢复治疗组合物药剂。给药的药剂反映了从4位供体中制造的产品。没有任何产品属性(药剂的量、存活微生物、保存期、解冻保存期等)似乎与临床结果相关,或者可以用于预测给药是否将导致成功的预后。此ID的结束时,提供临床结果信息。

[0135] 关于在2期临床研究中给药的菌群恢复治疗组合物剂量的信息:

[0136] 将45个剂量的菌群恢复治疗组合物解冻、运送,并且向患者给药。提供了药剂年龄(AD)(从药剂的生产日期到向临床患者给药的日期)。下面提供了与菌群恢复治疗组合物的若干属性相关的统计结果:

[0137] AD平均时间=43.2小时

[0138] AD标准差=14.9小时

[0139] AD最小时间=22.1小时

[0140] AD最大时间=73.8小时

[0141] 临床结果(复发性艰难梭菌相关性腹泻的消退)与这些产品属性之间似乎没有相关性或损害。

[0142] 实施例4:冷冻保护剂的选择

[0143] 冷冻保护剂,具体地聚乙二醇(PEG)的使用,已发现维持菌群恢复治疗组合在冷冻和重新解冻后的存活率(通过CDC平板和BBE平板上的CFU而确定)。这包括从解冻开始的时间段、在控制温度包装中运送并且允许从打开包装直到治疗患者的时间。如同上述的质量检测,在被冷冻之前菌群恢复治疗产品的最后可接受的计数范围可以是在CDC平板上的稀释水平 10^{-6} 下在大约30至大约300CFU之间,在BBE平板上稀释水平 10^{-5} 下从大约30到大约300CFU。确保存活率得以维持的一种方法是要求最终用户或消费者(包括但不限于内科医生或临床医生)在接收产品的48小时内使用该产品。此外,将要求最终用户在大约2和大约29°C之间的温度下储存该产品直到使用。

[0144] 从两个角度对冷冻保护剂的添加进行分析。首先,对若干个冷冻保护剂进行筛选以评价将冷冻保护剂添加到菌群恢复治疗产品中的最初效果。该检测是用于确定当与特定冷冻保护剂混合时菌群恢复治疗产品的死亡率或存活率。所分析的第二角度是当将菌群恢复治疗产品冷冻然后重新解冻以便向患者给药时特定冷冻保护剂对菌群恢复治疗产品的实际冷冻保护能力。该培养的结果表明在冷冻/解冻后该产品活力保持得怎样。

[0145] 完成检测以便检查将多种不同的活菌群恢复治疗冷冻保护剂添加到均质化且过滤的人粪便混合物(或菌群恢复治疗产品)中的效果。这些检测只是用于对细菌对冷冻保护剂的最初添加的反应进行定量,并且不包括检测在随后的冷冻-解冻循环中冷冻保护剂是否成功地保护细菌。在这些检测中,将单个人粪便捐献物划分到各种检测中,其中仅将等渗生理盐水(即,未添加冷冻保护剂)的“对照”样品用于基线。同时使用CDC平板和BBE平板两者。对于所有的检测,使用将两种不同稀释水平的结果加以复合的CFU计数的加权平均值。所使用的冷冻保护剂包含:10%脱脂奶、5%甘油、10%甘油、10%DMSO和具有在从600到20000范围内的分子量的聚乙二醇(PEG)。

[0146] 对于CDC平板:10%脱脂奶、10%甘油、和PEG均合理地起作用,其中CFU计数停留在生理盐水对照品的大约25%内。值得注意的是,较高浓度的甘油以剂量依赖性关系导致大量的微生物死亡。

[0147] 对于BBE平板:仅PEG制剂不显示显著的微生物死亡率。值得注意的是,10%甘油制剂获得接近90%的死亡率(10%的生存率),较高浓度的甘油获得100%的死亡率(如采用目前的稀释水平所看见)。

[0148] 基于来自10%甘油的BBE平板的结果,实施了附加的研究以判断由于添加甘油所导致的90%死亡率(在BBE平板上)是否可以消除。假设将甘油浓度减小到5%,或者在添加甘油之前使微生物混合物冷却(以减慢代谢活动)可以降低预期的高死亡率。5%甘油溶液具有小于10%的死亡率,并且冷却也以剂量依赖性关系降低死亡率。然而,这些效果并不足够强到克服基线结果,并且在所有的甘油与对照品的比较检测中看到至少60%的死亡率。

[0149] 从人粪便采集的时间到将菌群恢复治疗产品向患者给药的时间维持菌群恢复治

疗产品中微生物的存活率是重要的。因此,重要的是所添加的冷冻保护剂当最初添加时对微生物不具有显著的毒性作用。在所检测的冷冻保护剂中,仅PEG制剂发挥良好的作用。在BBE结果中,脱脂奶尤其不发挥良好的作用。使用牛奶的其他缺点包括提高牛奶过敏反应机会的可能性以及牛奶的可变表征特性。同样地,DMSO在BBE平板上并不发挥良好的作用。另外,虽然将DMSO局部地使用于药物用途,但目前尚未知在人胃肠系统中的使用。10%甘油在CDC平板上发挥良好的作用,但在BBE平板上显示80-90%的死亡率(10-20%生存率)。

[0150] 实施例5:其他的冷冻保护剂

[0151] 将人肠道菌群从人粪便中提取到含有特定浓度的若干不同的潜在冷冻保护剂的生理盐水溶液中。检测这些溶液的pH值并且在CDC平板和BBE琼脂平板上进行培养以便测量活微生物负荷,然后在-80℃下冷冻达1至7天之间,然后解冻。然后,检测取自解冻溶液的样品的pH值,并且在CDC和BBE琼脂平板上进行培养以便测量活微生物负荷。筛选结果为“++”的冷冻保护剂显示明显大于PEG3350(和甘油)的存活率结果,筛选结果为“+”的冷冻保护剂具有至少与甘油同样好的结果,筛选结果为“0”的冷冻保护剂具有混合结果并且可以或者可以不是合适的冷冻保护剂,筛选结果为“-”的冷冻保护剂的作用比甘油差并且不应被认为是用于人肠道菌群溶液的有效冷冻保护剂。这些结果,基于使用CDC和BBE琼脂平板的pH测量和活微生物的计数,表明下列:在DMSO中的右旋糖、甜菜碱、甘氨酸、蔗糖、聚乙烯醇、和Pluronic F-127具有被评分为“++”的结果。甘露醇、Tween-80、乙二醇、1,3-丙二醇、羟丙基纤维素、甘油、PEG/甘油混合物、和丙二醇具有被评分为“+”的结果。丙二醇(3%w/v)和鱼油具有被评分为“0”的结果。氢氧化镁、尿素、和黄原胶具有被评分为“-+”的结果。“-+”的评分是用于表示pH值被发现是不是可接受的,但平板接种的结果被发现是可接受的。

[0152] 实施例6:示例性的生产工艺

[0153] 完成了检测以模拟示例性的整个生产工艺,其中使经加工的人粪便(稀释、均质化、和过滤)样品冷却、冷冻以便长期贮存、解冻、运送至消费者地点,并且在保留灌肠之前升温到体温。该生产工艺模拟用于下列的名义工艺:人粪便的采集;以2:1至4:1的比率将人粪便直接地稀释进入冷冻保护液(或者稀释剂或生理盐水/PEG混合物);名义的均质化和过滤过程;在循环的流体浴中使包装产品冷却;长期冷冻的贮存;在循环的流体浴中将包装产品升温;产品的包装以便使用“冰袋”并且在隔热材料中输送;隔夜运送给消费者;产品的床侧升温以便立即输入患者中。作为研究的一部分,改变三个参数以便检查它们对总体微生物存活率或生存率的作用(通过系列稀释到CDC和BBE平板上以便进行CFU的保温培养和计数而测量)。这些参数包括冷冻保护剂的使用、冷却浴的温度、解冻浴的温度。

[0154] 在冷冻保护剂检测中,研究包括:无冷冻保护剂(生理盐水)的样品;10%甘油和59g/升的PEG 3350。为了检测冷却浴的使用,研究包括:直接地放置入冷柜(-80℃)中因此不经历冷却浴的样品;直接地放置入0℃冷却浴中的样品;和直接地放置入-11℃冷却浴的样品。在0℃、+10℃、和+20℃下对升温进行检测。将各检测排列标准化为使用相同冷冻保护剂的对照样品,但立即进行平板接种而不经历任何冷冻-解冻过程。

[0155] 将冷冻保护剂,如果使用,与生理盐水混合并且在均质化过程期间添加(参见稀释剂和生理盐水/PEG混合物的定义)。因此,由于冷冻保护剂的添加所导致的任何微生物死亡率(例如,例如在使用甘油时看到的,特别是在BBE平板中)将只通过与对照样品的CFU进行比较来观察

[0156] 已发现,冷冻和解冻参数对于总体的微生物生存率有很小的作用。通常这对于CDC平板是清楚的,其中数据通常具有正常状态并且所有冷冻-解冻参数的结果只在单个对数水平的稀释中变化。对于BBE平板而言,原始数据状态差得多,具有表观异常值的若干情况和其中违反了对相邻稀释水平(即,对数水平)进行比较的10倍准则的情况。然而,由于冷冻-解冻参数,因而仍然不存在表观差异。

[0157] 明确地观察到由于使用不同冷冻保护剂的影响。对于此分析而言,使用来自不同冷冻-解冻参数的结果的简单算数平均数对冷冻保护剂性能进行比较。对于CDC平板而言,在冷冻-解冻中“无冷冻保护”具有18%的生存率(82%的死亡率),而甘油和PEG的添加使死亡率降低为大约30%(67%和75%的生存率,分别)。关于用甘油处理的样品,以上结果忽略了由于甘油的最初添加所导致的死亡率。当冷冻保护剂的最初添加加到冷冻/解冻的影响时,该作用的量值为大约80%的死亡率。对此与使用PEG作为冷冻保护剂的样品的大约32%的死亡率进行了比较。

[0158] 在BBE平板上添加甘油的影响是80%至90%的非常高的死亡率。相反,PEG平板显示来自冷冻保护剂的毒性低或无毒性,并在冷冻-解冻循环中显示强保护效果。相对于对照品,使用PEG的总累积生存率为75%(25%的死亡率)。结论是,基于初始死亡率与冷冻-解冻损失的组合为大约1-log的损失(10%的生存率)10%甘油在BBE平板上的作用差,。PEG-3350在CDC平板和BBE平板两者均上发挥良好的作用。PEG对微生物具有低的初始毒性(很少或没有由于将冷冻保护剂添加到人粪便中苏所造成的损失)并且相对于“无冷冻保护剂”它提供显著的保护。预计菌群恢复治疗剂的各给药将具有最小为 10^7 微生物/mL的悬浮液,其中每次给药给予最小的100mL的悬浮液。

[0159] 实施例7:粪便秘植套件

[0160] 在一个实例中,可以形成用于帮助粪便秘植的各部件的套件。在一个实例中,可以将捐献物套件运送至临床医生。该捐献物套件可以包括用于取自患者或者在某些实例中取自健康供体的血液和粪便样品的设备。因为许多的患者肠道菌群是厌氧的,所以许多生物体会由于暴露于空气而死亡。在一个实例中,捐献套件可以包括在不损害样品的情况下运送血液和粪便样品的材料(例如,快速冷冻、干冰等)。

[0161] 一旦被运送至机构(例如,一个地点、局部的地点、许多地点等),可以对样品进行检测,并且可以确认艰难梭菌或者一种以上的其他疾病或病症的存在或不存在。在其他实例中,可以对健康的粪便样品进行检测并且进行制备以使用作治疗剂。

[0162] 在一个实例中,一旦对患者的样品进行检测以便验证疾病或病症,或者对供体的样品进行检测以便验证健康或其他适合性(例如,1种以上期望状态的存在等)、可以制备治疗剂(例如,使用健康供体粪便样品,至少一部分的一个以上的健康的储存的粪便样品,例如取自粪便库的材料,等)并且运送回到临床医生以便向患者的给药和治疗。在某些实例中,在运送期间保持治疗剂(例如,冷冻等)。该套件可以包含在灭菌容器(例如鼻饲(NG)管、小玻璃瓶(例如,用于保留灌肠)、耐胃酸胶囊(例如,生物耐酸以便到达肠道,具有灭菌的外侧)等)中的经加工的粪便样品或治疗剂。在一个实例中,一旦被接收,临床医生可以以保存菌群的方式储存内容物,直到已被插入患者中。

[0163] 实施例8:延长保存期制剂

[0164] 对供体粪便的健康人微生物内容物生存的长期贮存进行了研究。在使用和不使用

冷冻保护剂的情况下对粪便样品进行加工,并且在变化的控制温度下进行冷却/解冻。然后,在 -80°C 和 -20°C 下贮存360天(12个月)后取出样品,在受控制的温度下进行解冻并且平板接种于两种类型的琼脂平板(分别是疾病控制中心5%血琼脂(CDC)和拟杆菌胆盐七叶苷琼脂(BBE))上。对总每毫升菌落形成单位(CFU/mL)进行记录和分析。基于该研究,首先对不使用冷冻保护剂情况下所保存的样品进行分析,接着使用变化浓度的不同冷冻保护剂来保存样品。

[0165] 从“无冷冻保护剂”样品中生长的CDC平板计数表明冷柜温度和贮存时间对于可恢复的CFU数具有显著的影响。这些数据与在以前的时间点所记录的数据是一致的。在此模型中, R^2 值表明数据中大约59%的变化(相邻的 R^2)是由该模型进行解释,该模型表明在180天(6个月)的贮存后从大约80%的下降。

[0166] 当在 -20°C 下储存时,大部分的生产样品CFU/mL计数下降至低于产品规格中认为是可接受的下限(10^8 CFU/mL)。相反,在 -80°C 下储存的样品所显示的计数仍然在产品规格的期望下限之上。由此得出的结论是,不使用冷冻保护剂的所制备样品的长期贮存以及在 -80°C 下的存放被发现导致大于在 -20°C 下所存放样品的存活率。

[0167] 就从使用冷冻保护剂存放的样品中所采集的数据而言,贮存时间和冷柜温度是CDC计数反应(单位为CFU/mL)的最显著的因素。在该数据中所看到的大部分的变化可由贮存时间、冷柜温度、和这些之间的相互作用而解释,正如可以由在0.59处所获得的 R^2 值所可见。

[0168] 与冷冻保护剂混合且在 -20°C 下存放的样品继续显示可恢复CFU/mL更显著的减小。在 -20°C 下存放的样品在60天和90天(2和3个月)之间,每毫升菌落形成单位开始下降至低于 10^8 产品规格下限。在超过60天的(2个月)的贮存后,可恢复CFU/mL的数量减小速率减慢。然而,在 -80°C 的贮存温度下,在270天(9个月)的贮存期间,可恢复CFU/mL计数保持相对稳定。此外,大部分的计数仍然超过 10^8 CFU/mL的产品规格最小限。

[0169] 在较低的冷柜温度下存放样品达较短时间对计数具有积极作用——随着从生产点开始时间进一步推移,变得更加难以保证CFU/mL的可靠恢复,该CFU/mL表示产品的活微生物群体。然而,数据表明贮存时间的作用会由于添加作为冷冻保护剂的PEG 3550、以及将物料储放在低温下(在这种情况下, -80°C)而减弱。

[0170] 实施例9:延长保存期制剂

[0171] 以如本文中所公开的方式对人粪便进行加工;使用经加工悬浮液的初始样品而形成用于琼脂平板的接种的系列稀释。一旦将样品从悬浮液中取出,则将剩余的悬浮液(大约150mL)转移到两个(2个)单独的灭菌EVA贮存袋中。将各袋在 -80°C 下冷冻1周。

[0172] 在1周后,根据菌群恢复治疗组合物批次方案,将这些袋从冷柜中取出并解冻。对这些袋进行取样,以便测量冷冻后可立即恢复的CFU/mL计数和多样性;将各样品顺序地稀释并且平板接种于CDC和BBE平板上。然后在两个不同温度(4°C 和 25°C)下存放这些袋,并且每24小时取样总共达192小时。

[0173] 在各时间点,由生物多样性的合同实验室通过采用16s rRNA方法也对样品进行检测。对于各样品而言,从细菌细胞中提取RNA并且使用由启动RNA复制所需的一系列碱基对所制作的标记引物进行复制(“扩增”)。在RNA被扩增后,对基因序列进行降噪(一种确定正确或不正确配对的核苷酸组的统计概率的方法、并且用于使用BLASTn软件从生物技术信息

中心(NCBI)序列数据库鉴定各生物体。在各样品中所发现的生物体的一致性是由样品中含有最连续统计碱基对的序列的长度所决定。然后,将最终数(从门到属所鉴定的生物体的直接计数和百分率,如果适用)报告给Rebiotix以便用于确定各样品中生物多样性随时间推移的变化。

[0174] 一旦从冷柜中取出和解冻($t=0$ 小时的时间点),产品则经历CDC平板和BBE平板上可恢复CFU/mL的初始下降,与从由Rebiotix所进行的先前研究中所观察的结果一致(P-006、P-007、P-009、P-012)。

[0175] 在 25°C 下保持的解冻产品维持高于在 4°C 下存放192小时的材料材料的总可恢复CFU/mL计数。

[0176] 在所有CDC平板上计数的可恢复CFU/mL,不论总计数如何,在整个实验中在两种温度下基于Rebiotix测量系统(P-001)被认为是“稳定”的。在两种存放温度下的CFU/mL结果在解冻到192小时时停留在与初始计数相差的1个log内。

[0177] 在BBE平板上计数的可恢复CFU/mL证实与在192小时贮存过程中原来的预冷冻样品相比的在 25°C 下存放时可恢复CFU/mL的增加。然而,在 4°C 下,在全部的192小时保持时间中可恢复CFU/mL维持不变的(变化小于1log)计数。

[0178] 在这两种温度下解冻的产品在全部的192小时保持时间中符合Rebiotix产品发布规格,不论CFU/mL计数中的增加或损失:

[0179] CDC冷冻后微生物负荷规格: 10^7 至 10^{14} CFU/mL

[0180] BBE冷冻后微生物负荷规格: 10^5 至 10^{14} CFU/mL

[0181] 从该研究中目前采集的结果表明,当在解冻后在 25°C 下储存放产品时,在CDC平板上的可恢复的表型多样性最接近地符合冷冻前原来样品的多样性。另外,两个样品随时间推移均满足 ≥ 3 个唯一结肠表型的用于多样性的Rebiotix产品发布规则。

[0182] 由检查全部细菌类型的合同实验室执行样品的基因生物多样性鉴定(16s rRNA)(到属,如果可能)以及存在于样品中的这些类型细菌随时间推移的百分浓度。

[0183] 在长达192小时的保持期期间在两种不同温度下的产品性能的初步了解继续满足CFU/mL的Rebiotix产品发布标准,当用于接种CDC平板和BBE平板时。许多更多的工作来确认这些发现。各时间点的16s rRNA数据目前正在分析中。

[0184] 实施例10:16s rRNA数据

[0185] 本公开提供包含粪便微生物的组合物。本文中使用的术语“粪便微生物”是指存在于正常健康成年人的肠道、小肠、或结肠(优选结肠)中的微生物。这种组合物可通过以本文中所公开的方式加工粪便材料而制备。本文中所使用的术语“粪便材料”是指人粪便。未经加工的粪便材料含有非活体的材料和生物材料。“非活体材料”可包括但不限于死菌、脱落的宿主细胞、蛋白质、碳水化合物、脂肪、矿物质、黏液、胆盐、未消化的纤维和其他食物、以及由食物和代谢废物及食物的部分或完全消化所产生的其他化合物。“生物材料”是指粪便材料中的活物质并且包括微生物,微生物包含原核细胞,例如细菌和古细菌(例如,活的原核细胞以及可以形成孢子而变为活的原核细胞的芽孢)、真核细胞(如原虫和真菌)、和病毒。“生物材料”也可指代存在于正常健康人结肠中的活物质(例如,微生物、真核细胞、和病毒)。可存在于本公开组合物中的原核细胞的例子包括是放线菌纲的成员的细胞,例如放线菌亚纲或科里氏杆菌亚纲,例如双歧杆菌目或者Coriobacteriales目,和/例如双歧杆菌科

或棒状杆菌科;拟杆菌门的成员,例如拟杆菌纲(例如类杆菌纲)、和/或例如拟杆菌科或理研菌科;拟杆菌门的成员,例如杆菌纲、梭菌纲、或丹毒丝菌纲,如芽孢杆菌目或乳杆菌目或梭菌目或丹毒丝菌目、和/或例如类芽孢杆菌科或Aerococcaceae科或乳酸菌科或链球菌科或Catabacteroaceae或Peptococcaceae可或消化链球菌科或瘤胃菌科或诺卡氏菌科或优杆菌科或霜霉菌科或韦荣球菌科;变形菌门的成员,例如变形菌纲或 β -变形菌纲或 γ -变形菌纲,例如根瘤菌目或伯克氏菌目或AJteromonadales目或肠杆菌目、和/或例如红游动菌科或伯克氏菌科或希瓦氏菌科或肠杆菌科;软壁菌门的成员,例如柔膜体纲(例如虫原体目),和/或例如螺原体科;和/或疣微菌纲的成员,例如疣微菌目、和/或例如疣微菌科。这些只是例子。

[0186] 本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个门、至少2个门、至少3个门、至少4个门、至少5个门、至少6个门、至少7个门、至少8个门、至少9个门、或者至少10个门的成员的细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个纲、至少2个纲、至少3个纲、至少4个纲、至少5个纲、至少6个纲、或者至少7个纲的成员的细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个目、至少2个目、至少3个目、至少4个目、至少5个目、至少6个目、或者至少7个目的成员的细菌。至少在一些实施方式中,在本公开的菌群恢复治疗组合物可包括是至少1个科、至少2个科、至少3个科、至少4个科、至少5个科、至少6个科、至少7个科的成员的细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括至少5种、至少10种、至少20种、或者至少30种不同属的成员的细菌。至少在一些实施方式中,本公开的菌群恢复治疗组合物可包括至少10个、至少50个、至少100个、至少200个、至少300个、或者至少400个不同种的细菌。

[0187] 将所制造的菌群恢复治疗组合物的样品(以如本文中所公开的方法制造)提供给研究和检测实验室,Lubbock,使用Illumina MiSeq平台的TX for16sRNA扩增和序列测定。该分析的目的是可用于下列的数据:验证试验性价释放测定;和评价供体内和供体间细菌多样性和一致性。

[0188] 所有产品批次的16s rRNA分析表明本文中所公开的工艺导致期望的细菌多样性特性前后一致。数据还表明该制造工艺维持一定程度的与正常粪便一致的细菌多样性并且认为对于复发性艰难梭菌的治疗是可行的,包括维持占优势的拟杆菌门和硬壁菌门。

[0189] 另外,由不同时间来自单独供体的粪便所制造的产品维持非常类似的多样性特性。表2提供了简要版的数据,强调了用于所有制造和检测批次的细菌目的均值和标准差。这些“目”类型代表了在各产品批次中最通常鉴定的细菌群落。

[0190] 表2.所有批次(60)基于目进行比较

[0191]

界	门	纲	目	平均%	标准差
细菌	拟杆菌	拟杆菌纲	类杆菌	59	15
细菌	拟杆菌	杆菌	乳杆菌目	0	1
细菌	拟杆菌	梭菌	梭菌	35	11
细菌	拟杆菌	未知	未知	1	1
细菌	变形菌	β -变形菌	伯克氏菌科	0	0
细菌	变形菌	γ -变形菌	肠杆菌科	0	0
未匹配	未匹配	未匹配	未匹配	5	6

[0192] 实施例11:16s rRNA数据-单独供体

[0193] 为了进一步说明制造产品的一致性,对不同时间由相同供体制造的多批次产品进行了分析。以下的表表明,在临床试生产器中,取自单个供体的多批次产品显示类似的多样性特性。利用细菌科对用于各供体的菌群进行分析以确保多样性中的趋势将会在更细的遗传水平上继续。香农(Shannon)多样性指数(也表示为H')是用于描述存在于微生物组中的生物体的丰度和均匀度的工业可接收的方法,并且使用于整个的本实施例。已证明对于最完全地包括取样深度中的变化,因此可用于描述复合的微生物群落。

[0194] 将供体1的细菌多样性汇总于表3中。

[0195] 表3. 供体1-细菌科中各批次的均值和变化

	科	平均%	标准差
	拟杆菌科	36	7
	类杆菌(未知)	0	0
	诺卡氏菌科	6	2
	梭菌(科)	0	0
	梭菌(未知)	7	3
[0196]	肠杆菌科	0	0
	优杆菌科	6	1
	霜霉菌科	4	1
	紫单胞菌科	2	1
	普雷沃氏菌科	1	0
	理研菌科	5	2
	瘤胃菌科	18	3
	葡萄球菌科	0	6
[0197]	消化球菌科	0	0
	X 无匹配	15	6

[0198] 将取自供体1的多个样品的香农多样性指数汇总于表4中。

[0199] 表4. 供体1-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13000-071713	1.91
13000-072913	1.96
13000-080513	1.96
13000-080613	1.81
13000-092313	1.87
13000-092613	2.00
13000-110613	1.80
13000-021314	1.78
平均值	1.89
标准差	0.08

[0201] 将供体2的细菌多样性汇总于表5中。

[0202] 表5供体2-细菌科的各批次的均值和变化

[0203]

科	平均%	标准差
拟杆菌科	43	13
诺卡氏菌科	2	2
梭菌(科)	4	3
优杆菌	6	3
拟杆菌(未知)	0	0
霜霉菌科	1	0
紫单胞菌科	3	1
理研菌科	23	20
瘤胃菌科	14	7
消化球菌科	1	1
X无匹配	2	1

[0204] 将取自供体2的多个样品的香农多样性指数汇总于表6。

[0205] 表6. 供体2-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13001-080613	1.45
13001-080913	1.70
[0206] 13001-081213	1.46
13001-112513	1.44
13001-121013	1.64
平均值	1.54
标准差	0.12

[0207] 将供体3的细菌多样性汇总于表7中。

[0208] 表7. 供体3-细菌科的各批次的均值和变化

[0209]

科	平均%	标准差
拟杆菌科	70	11
伯克氏菌科(未知)	0	0
诺卡氏菌科	7	3
梭菌(未知)	5	2
优杆菌	4	2
拟杆菌(未知)	0	0
霜霉菌科	1	1
紫单胞菌科	1	1
理研菌科	0	0
瘤胃菌科	10	5
消化球菌科	0	0
无匹配	1	0

[0210] 将取自供体3的多个样品的香农多样性指数汇总于表8中。

[0211] 表8. 供体3-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13003-071613	1.19
[0212] 13003-081313	0.98
13003-082013	1.04
13003-082713	1.06

[0213]	13003-082913	1.01
	13003-090513	1.17
	13003-090913	1.10
	13003-091113	0.78
	13003-091213	0.76
	13003-091313	1.02
	13003-092513	1.21
	13003-100213	0.97
	13003-101013	1.23
	13003-101513	0.42
	13003-110513	1.70
	13003-111913	1.22
	13003-120213	1.28
	13003-021414	1.28
	13003-021714	1.18
	13003-021914	1.45
	平均值	1.08
	标准差	0.27

[0214] 将供体4的细菌多样性汇总于表10中。

[0215] 表10. 供体4-细菌科的各批次的均值和变化

[0216]

科	平均%	标准差
拟杆菌科	44	12
伯克氏菌科(未知)	1	1
诺卡氏菌科	4	1
梭菌(未知)	6	2
优杆菌	8	5
拟杆菌(未知)	1	1
霜霉菌科	9	4
紫单胞菌科	1	0
理研菌科	5	2
瘤胃菌科	17	8
消化球菌科	0	1
X无匹配	2	3

[0217] 将来自供体4的多个样品的香农多样性指数汇总于表11中。

[0218] 表11. 供体4-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13004-071513	1.65
13004-071613	1.93
13004-071813	1.75
13004-072213	1.89
13004-072313	1.97
13004-072913	1.46
13004-073113	1.34
13004-080513	1.64
13004-080713	1.79
13004-080813	1.72
[0219] 13004-090313	1.64
13004-090413	1.98
13004-100913	1.46
13004-102913	1.87
13004-103113	1.80
13004-110413	1.56
13004-111913	1.77
13004-112113	1.78
13004-120213	1.84
13004-021414	2.02
13004-021814	1.56
平均值	1.73
标准差	0.18

[0220] 将供体5的细菌多样性汇总于表12中。

[0221] 表12. 供体5-细菌科的各批次的均值和变化

科	平均%	标准差
[0222] 拟杆菌科	48	6
类杆菌 (未知)	0	0

[0223]	伯克氏菌科（未知）	0	0
	诺卡氏菌科	5	2
	梭菌（未知）	4	1
	优杆菌	5	2
	霜霉菌科	4	0
	紫单胞菌科	1	1
	理研菌科	4	1
	瘤胃菌科	18	5
	萨特氏菌科	0	0
	无匹配	9	5

[0224] 将来自供体5的多个样品的香农多样性指数汇总于表13中。

[0225] 表13. 供体5-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13005-080713	1.75
13005-081513	1.65
13005-100113	1.83
13003-110513	1.71
13005-110613	1.52
13005-120913	1.65
平均值	1.68
标准差	0.11

[0227] 将供体6的细菌多样性汇总于表14中。

[0228] 表14. 供体6-细菌科的各批次的均值和变化

科	平均%	标准差
拟杆菌科	48	不适用
类杆菌（未知）	0	不适用
伯克氏菌科（未知）	0	不适用
诺卡氏菌科	5	不适用
梭菌（未知）	4	不适用
优杆菌	5	不适用
霜霉菌科	4	不适用

[0230]	紫单胞菌科	1	不适用
	理研菌科	4	不适用
	瘤胃菌科	18	不适用
	萨特氏菌科	0	不适用
	无冲击	9	不适用

[0231] 将取自供体6的多个样品的香农多样性指数汇总于表15中。

[0232] 表15. 供体6-香农多样性指数

批次 ID	香农多样性指数 (H')
13008-021314	1.59
平均值	不适用
标准差	不适用

[0234] 由于从供体6中只生产一个批次,因而在此时没有可以计算(H')的平均值(H')或标准差。

[0235] 本文中所公开的菌群恢复治疗组合物的16s rRNA分子特征表明通过该制造工艺保留了相当多的细菌多样性。虽然在各供体之间各种细菌的相对数量中存在着变动,但通过特定细菌目的平均百分比的标准差所测量的变化是相当地小。由随时间所采集的单独供体所制造产品的多样性特性在科层次中显示高度的相似性(参见表中的供体1-供体5)。相反,在由健康供体所制造的菌群恢复治疗组合物中明显地缺乏通常与患者中疾病相关的微生物的16s数据。在此分析中评价的各产品批次被使用于2期临床研究,该临床研究显示87%的治愈率并且具有可接受的轻度至中度的不良事件。该数据是重要的,因为该数据也证实该层次的细菌多样性在本文中所公开的菌群恢复治疗组合物中提供了治疗益处。

[0236] 实验12:供体性别成功/失败

[0237] 考虑供体的性别,将使用本文中所公开菌群恢复治疗组合物的治疗的成功加以汇总。当粪便供体(其粪便样品被用于制造菌群恢复治疗组合物)为男性时,观察到在菌群恢复治疗组合物的单次给药后的治疗成功率更大。因为剂量2的反应在各供体之间是更加类似的并且这些剂量被输送给未使用过抗生素的患者(无抗生素预处理并且具有活动性疾病),但取自女性供体的菌群对抗生素更加敏感。

[0238] 表16. 供体性别成功/失败

[0239]

供体	患者		患者	
	剂量1	剂量2	剂量1	剂量2
	成功	失败	成功	失败
F	2/11(18%)	9/11(82%)	3/4(75%)	1/4(25%)
M	7/10(70%)	3/10(30%)	3/5(60%)	2/5(40%)
F	4/9(44%)	5/9(56%)	4/4(100%)	

M	3/3(100%)		1/1(100%)	
---	-----------	--	-----------	--

[0240] 美国专利申请61/337,283以引用的方式并入本文中。

[0241] 美国专利申请61/351,184以引用的方式并入本文中。

[0242] 美国专利申请13/576,573,以美国专利申请公开US2013/0045274而公布,以引用的方式并入本文中。

[0243] 美国专利申请14/093,913,以美国专利申请公开US2014/0086877而公布,以引用的方式并入本文中。

[0244] 应当理解的是,本公开在许多方面中只是说明性的。在不超过本公开的范围的前提下,可作出具体的变更,尤其是在形状、尺寸、和步骤的布置方面。这可包括,到适当的程度,将一个示例性实施方式的任何特征使用于其他实施方式中的使用。当然,本发明的范围被限定于其中表示所附权利要求的用语中。

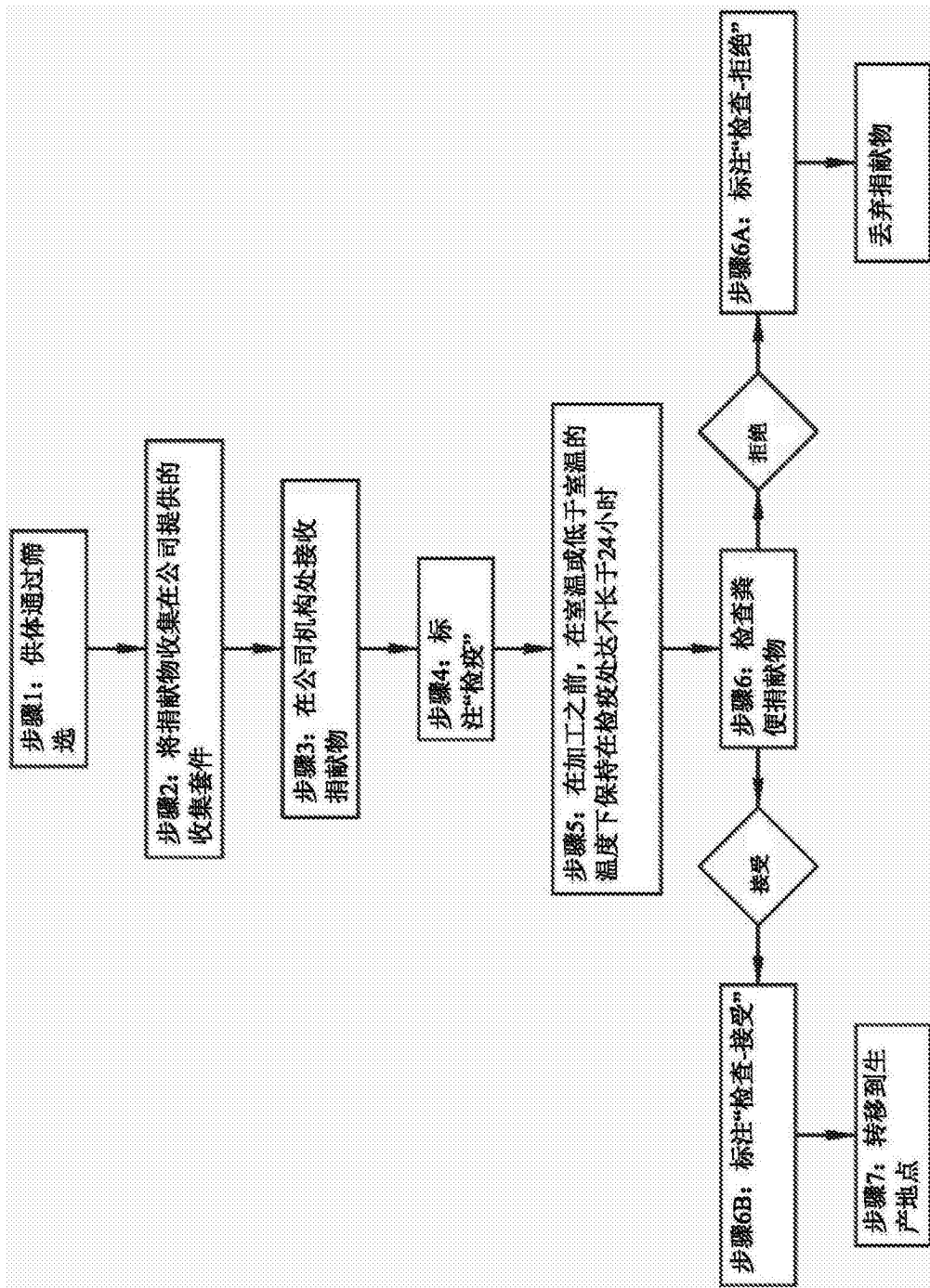


图1

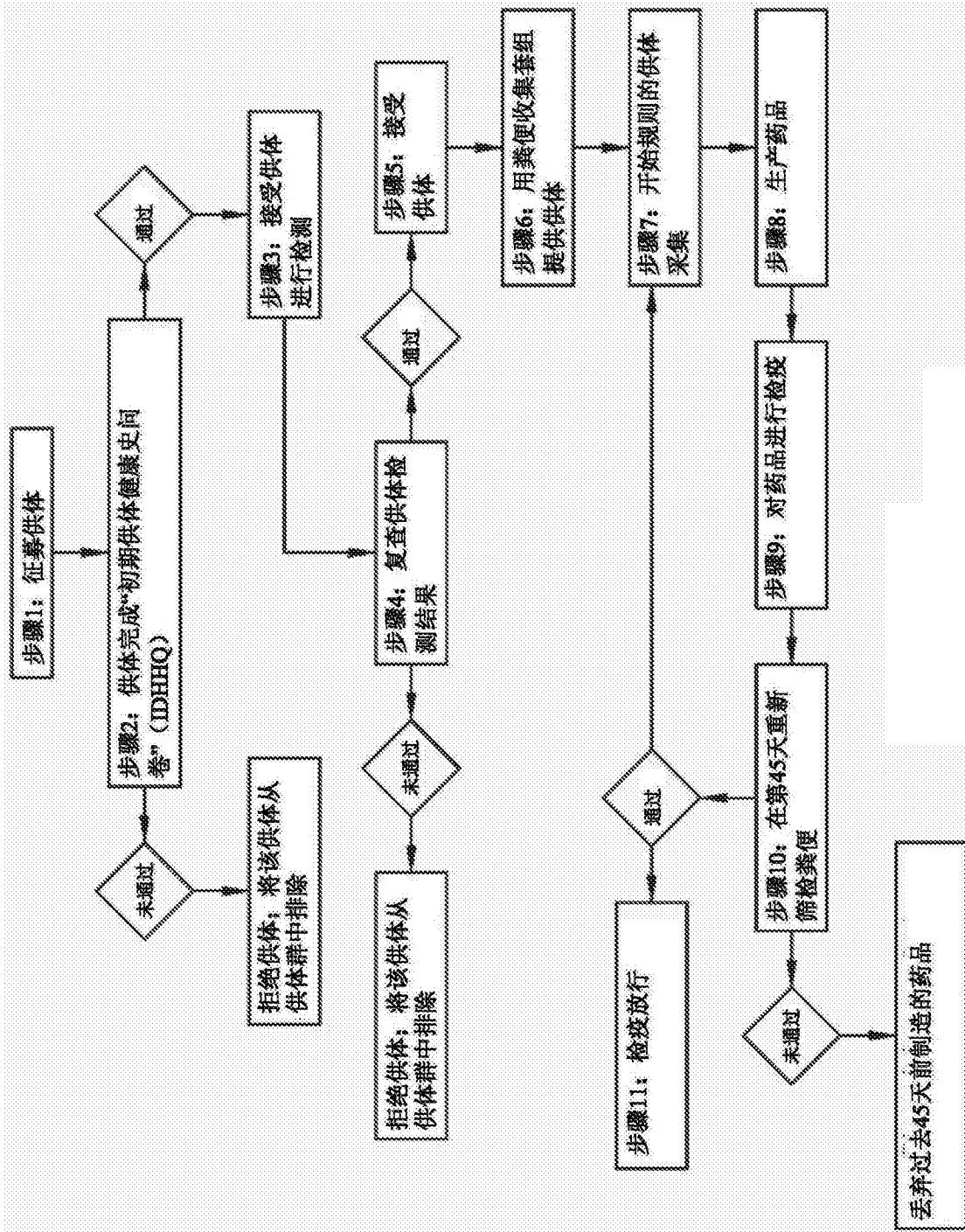


图2

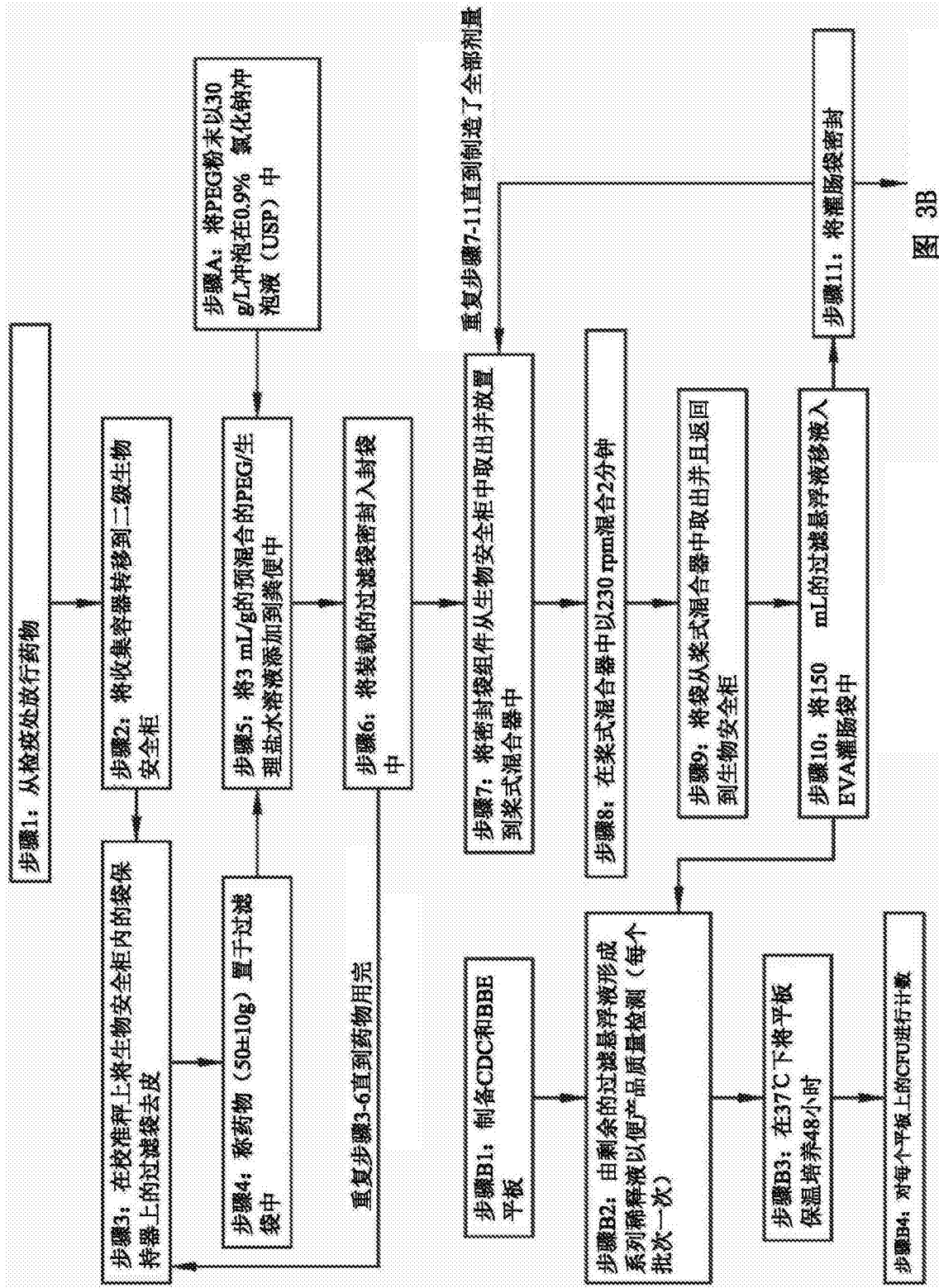


图 3B

图3A

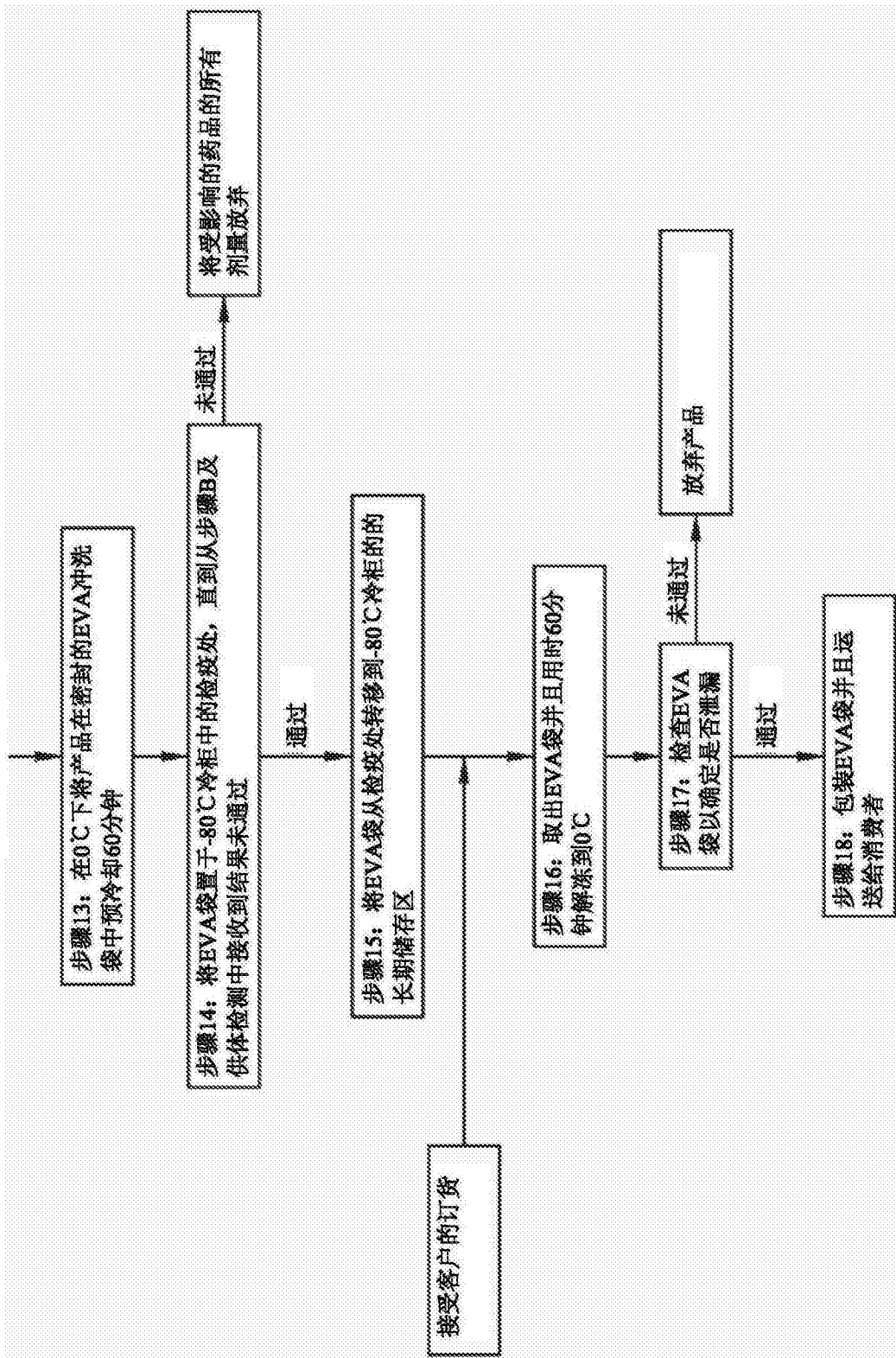


图3B

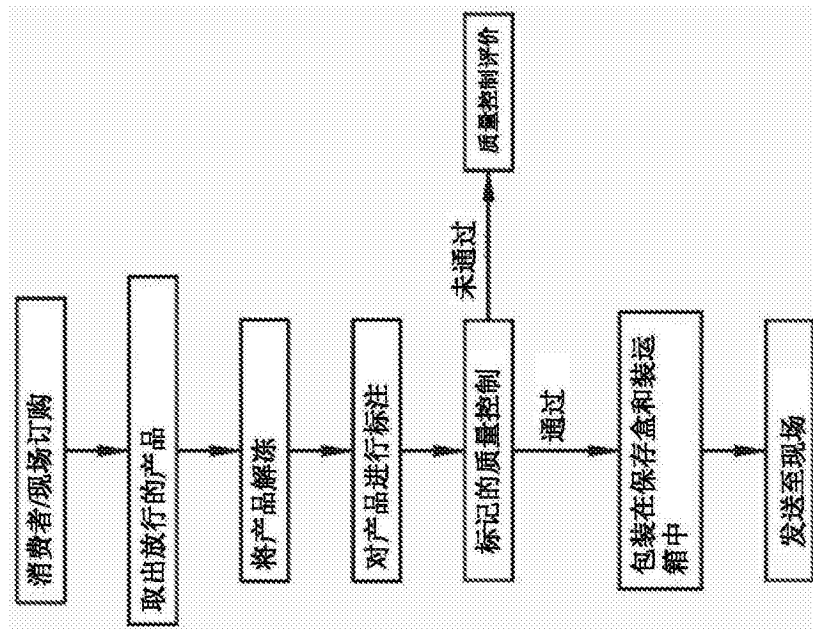


图4

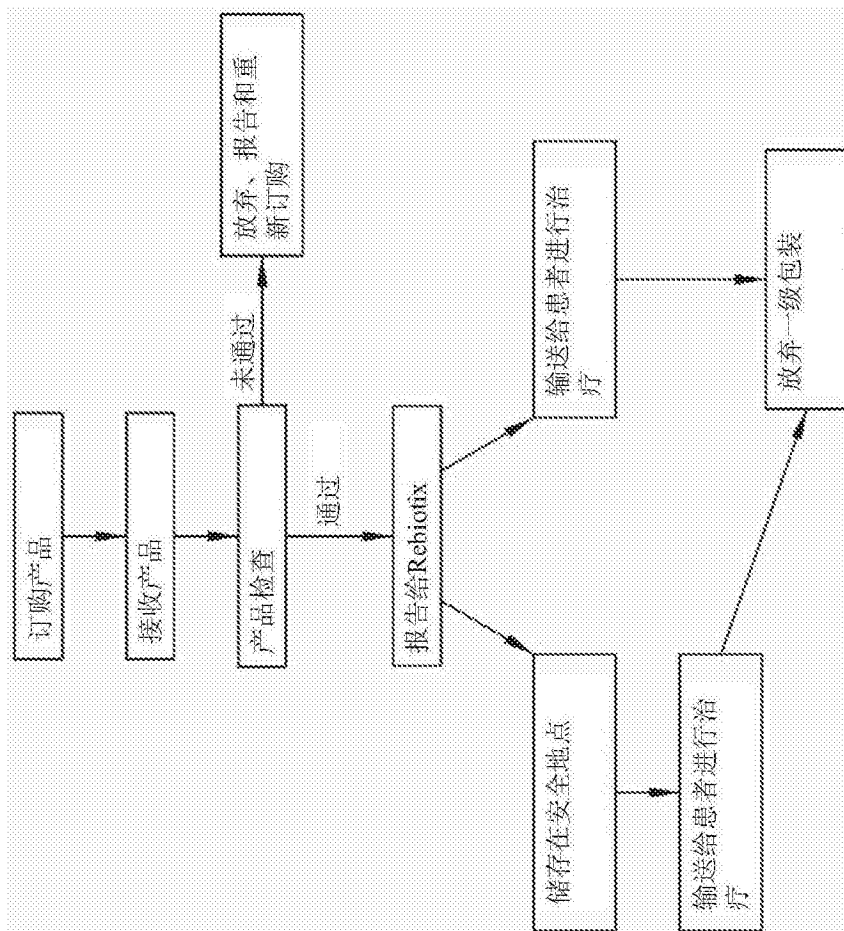


图5

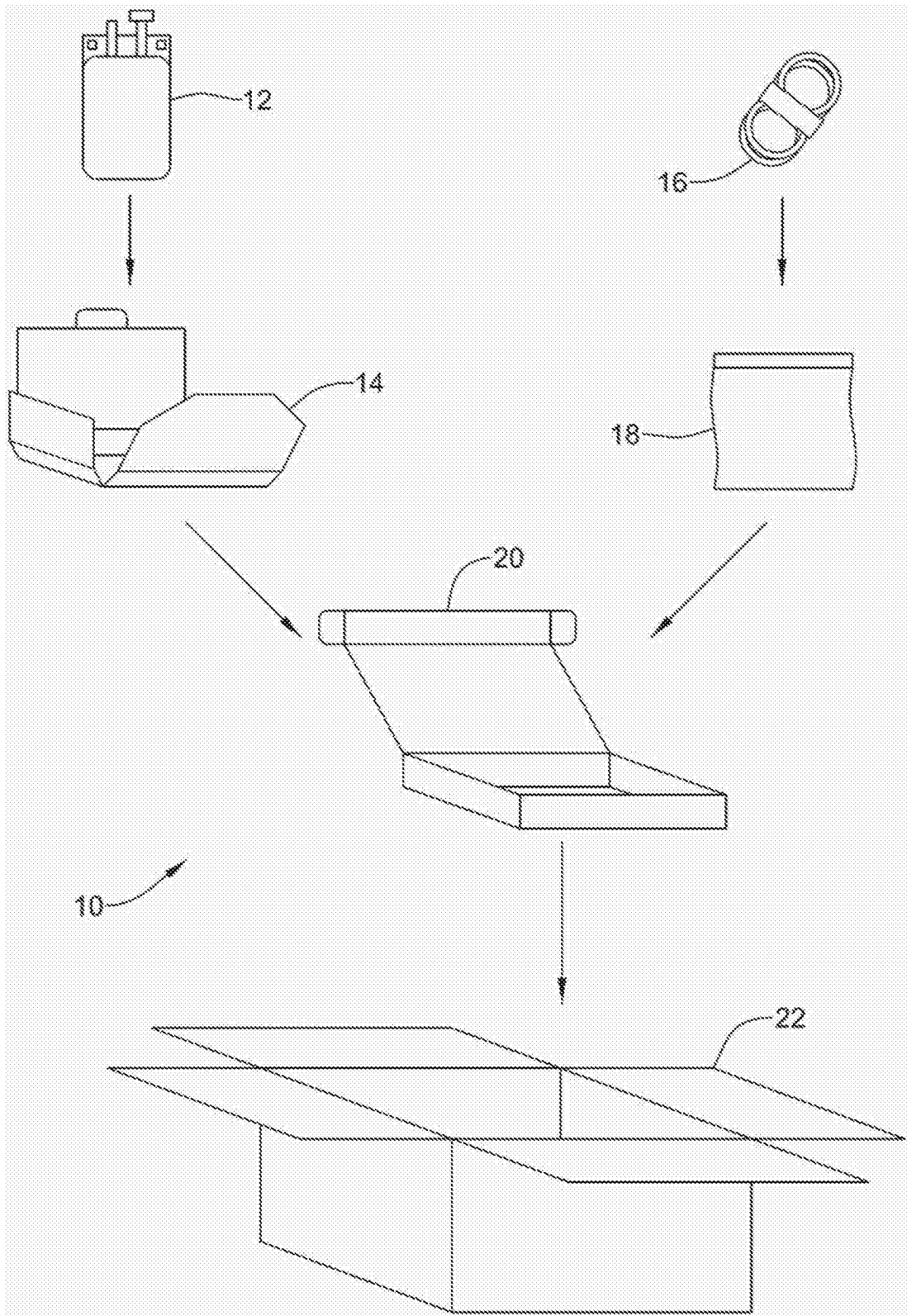


图6

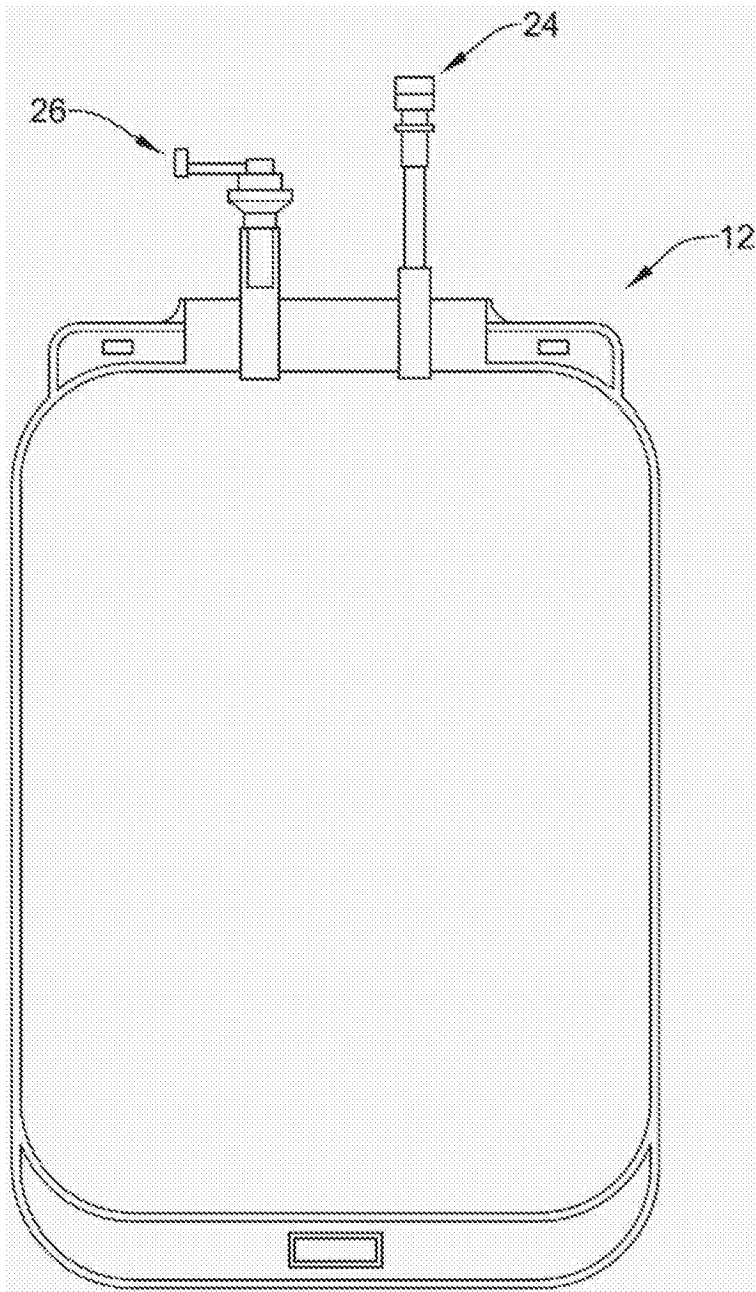


图7

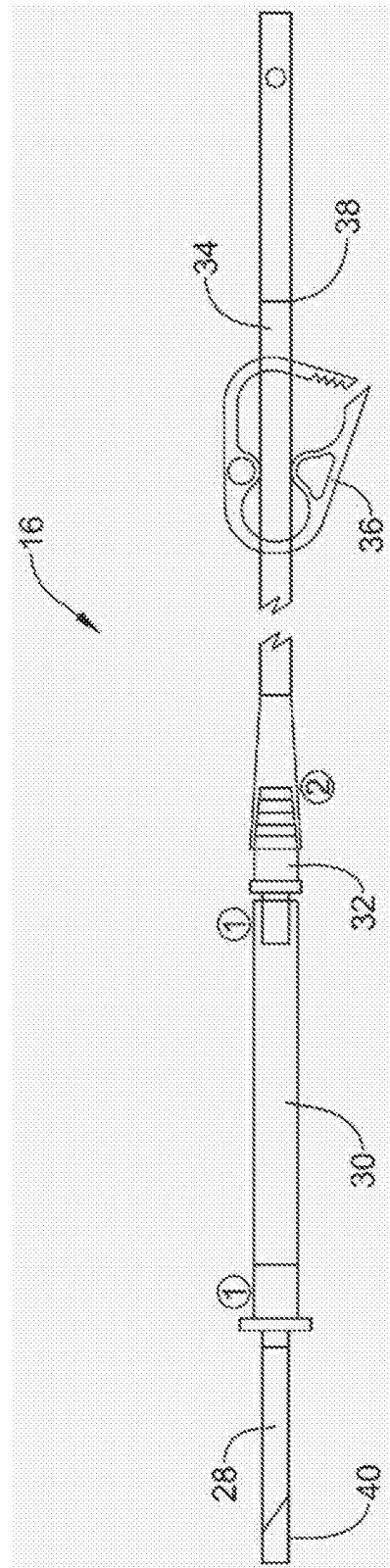


图8