



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109789170 B

(45) 授权公告日 2022.10.04

(21) 申请号 201780040583.2

(22) 申请日 2017.07.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109789170 A

(43) 申请公布日 2019.05.21

(30) 优先权数据
1612190.7 2016.07.13 GB
1616018.6 2016.09.20 GB
1616016.0 2016.09.20 GB
1703548.6 2017.03.06 GB
1703552.8 2017.03.06 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.28

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2017/052076 2017.07.13

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/011593 EN 2018.01.18

(83) 生物保藏信息
DSM 14294 2001.05.10
NCIMB 42381 2015.03.12
NCIMB 42486 2015.11.16

(73) 专利权人 4D制药有限公司
地址 英国利兹

(72) 发明人 劳伦·克劳泽 克洛伊·哈布兹
安尼克·伯纳利尔-唐纳德尔

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204
专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A61P 13/02 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

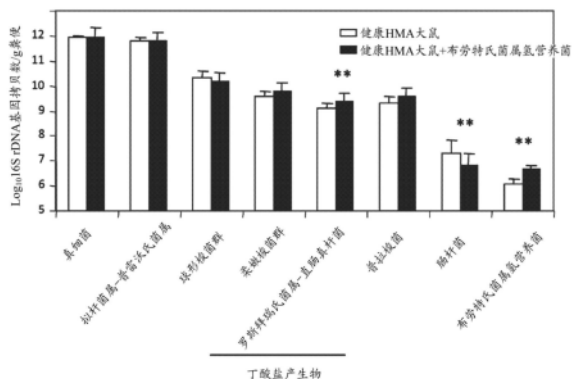
(56) 对比文件
CN 105555286 A, 2016.05.04
WO 0185187 A1, 2001.11.15
WO 2014121298 A3, 2014.10.09
EP 2124972 B1, 2012.06.13
WO 2012142605 A1, 2012.10.18
REY, F.E.等. "Dissecting the in Vivo
Metabolic Potential of Two Human Gut
Acetogens". 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL
CHEMISTRY》. 2010, 第285卷 (第29期), (续)

审查员 张林森

权利要求书1页 说明书24页
序列表5页 附图19页

(54) 发明名称
包含细菌菌株的组合物

(57) 摘要
本发明提供包含一种或多种细菌菌株的组合物,其用于降低胃肠道中的肠杆菌的水平的方法。



CN 109789170 B

[接上页]

(56) 对比文件

Bernalier, A. 等. Genbank: NR_026314.1.
《Genbank》. 2015,
Bernalier A 等. "Ruminococcus

hydrogenotrophicus sp. Nov., a new H₂/
CO₂-utilizing acetogenic bacterium
isolated from human feces". 《Archives of
microbiology》. 1996, 第166卷 (第3期),

1. 包含具有与SEQ ID NO:5至少95%相同的16s rRNA序列的氢营养布劳特氏菌(*Blautia hydrogenotrophica*)物种的细菌菌株的益生菌组合物在制备用于降低胃肠道中的致病肠杆菌的水平中的用途。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述肠杆菌是大肠杆菌。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述药物用于在IBS、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、腹泻、胃肠炎、尿道感染或新生儿脑膜炎的治疗或预防中降低胃肠道中的肠杆菌的水平。

4. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中所述药物用于治疗或预防腹泻、肠胃炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。

5. 包含具有与SEQ ID NO:5至少95%相同的16s rRNA序列的氢营养布劳特氏菌物种的细菌菌株的益生菌组合物在制备用于治疗由胃肠道中的致病肠杆菌导致的感染的药物中的用途。

6. 如权利要求5所述的用途,其中由致病肠杆菌导致的所述感染是大肠杆菌感染。

7. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少97%相同的16s rRNA序列。

8. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少98%相同的16s rRNA序列。

9. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少99%相同的16s rRNA序列。

10. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少99.5%相同的16s rRNA序列。

11. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少99.9%相同的16s rRNA序列。

12. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株具有SEQ ID NO:5的16s rRNA序列。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物用于降低被诊断有IBS的受试者的胃肠道中的致病肠杆菌的水平。

14. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述药物用于口服施用。

15. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述药物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

16. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株被冻干。

17. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述细菌菌株是可存活的。

18. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其中所述药物包含单一菌株。

19. 如权利要求1或权利要求5所述的用途,其包含氢营养布劳特氏菌细菌菌株作为微生物聚生体的一部分。

20. 如权利要求1或5所述的用途,其中所述细菌菌株是以登录号DSM 10507/14294保藏的菌株。

包含细菌菌株的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及包含从哺乳动物消化道分离的细菌菌株的组合物以及此类组合物在治疗疾病中的用途的领域。

背景技术

[0002] 人类肠道被认为在子宫中是无菌的,但是在出生之后它立即暴露于各种各样的母体和环境微生物。然后,发生动态时间段的微生物定居和繁衍,这被诸如以下的因素影响:分娩方式、环境、饮食和宿主基因型,全部这些都影响肠道微生物群的组成,在早期生命期间尤其如此。随后,微生物群稳定化并且变得成熟[1]。人类肠道微生物群含有多于1500种不同的种系型,其中两种主要的细菌分类(门)在丰度水平上占据主导地位:拟杆菌门和厚壁菌门[2-3]。由人类肠道的细菌定居产生的成功的共生关系已产生各种各样的代谢、结构、保护性和其他有益的功能。所定居的肠道的增强的代谢活动确保以其他方式难以消化的膳食组分随着副产物的释放而被降解,从而为宿主提供重要的营养物质来源和另外的健康益处。相似地,肠道微生物群的免疫学重要性被充分地认知并且在无菌动物中例示,所述无菌动物具有在引入共生细菌之后在功能上重构的受损免疫系统[4-6]。

[0003] 微生物群组成的动态变化已在肠胃病症诸如炎性肠病(IBD)中有所记载。例如,梭菌(*Clostridium*) 集群XIVa和梭菌集群XI(普拉梭菌(*F.prausnitzii*))细菌的水平在IBD患者中降低,而大肠杆菌(*E.coli*)的数量增加,从而表明肠道内共生生物和病原生物平衡的变化[7-11]。

[0004] 在认识到某些细菌菌株对于动物肠道可能具有的潜在积极作用之后,已提出各种菌株用于治疗各种疾病(参见,例如[12-15])。已提出多种菌株(主要包括乳杆菌属(*Lactobacillus*)和双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)菌株)用于治疗各种肠病(针对综述参见[16])。还已提出布劳特氏菌属(genus *Blautia*)的菌株用于调控IBS患者中的消化生态系统的微生物平衡(WO 01/85187)。然而,不同细菌菌株与不同疾病之间的关系以及特定细菌菌株对于肠道和在系统性水平下以及对于任何特定类型的疾病的准确作用并未被良好地表征。

[0005] 需要对肠道细菌的潜在作用进行表征,使得可开发使用肠道细菌的新疗法。

[0006] US 2010/0247489描述矿物营养物质用于治疗消化病症的用途。US '789提出任选地还使用多种不同的细菌属包括肠杆菌来防止并减少结肠中的气体形成,所以此文献建议可采用在胃肠道中增加肠杆菌属某些种来治疗某些疾病。US '789未讨论用于减少肠杆菌属某些种的任何方法。

[0007] WO 2016/086206建议使用梭菌目中的细菌包括肠杆菌属某些种来治疗或预防菌群失调。WO' 206中没有建议使用降低胃肠道中的肠杆菌属某些种的水平来治疗疾病,也没有关于如何实现肠杆菌属某些种的水平降低的任何建议。

[0008] WO 2012/142605提出可能用微生物的组合来治疗多种不同的疾病。WO' 605提出可采用的大量可能的细菌菌种,但是在WO' 605中没有关于所提出的细菌菌种中的任一种如何

可用于治疗所提出的疾病中的任一种的教义。

发明内容

[0009] 本发明人已开发用于治疗 and 预防与肠杆菌、特别是大肠杆菌相关联的疾病的新疗法。具体地，本发明人已认识到来自布劳特氏菌属的细菌菌株可有效于降低胃肠道中的肠杆菌的水平。如在实施例中所所述，口服施用包含布劳特氏菌属氢营养菌 (*Blautia hydrogenotrophica*) 可降低胃肠道中的肠杆菌包括大肠杆菌的水平，并且可治疗或预防与肠杆菌或大肠杆菌相关联的疾病。因此，在第一实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，其用于降低胃肠道中的肠杆菌的水平的方法。

[0010] 在本发明的所有方面的优选实施方案中，所述肠杆菌是大肠杆菌。在本发明的所有方面的优选实施方案中，细菌菌株是布劳特氏菌属氢营养菌并且优选地是以登录号 DSM 10507/14294 保藏细菌。

[0011] 在优选的实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，其用于治疗或预防与肠杆菌感染诸如大肠杆菌感染相关联的疾病的方法。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防腹泻、肠胃炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防肠杆菌感染诸如大肠杆菌感染。

[0012] 在另外优选的实施方案中，本发明的组合物用于在 IBS、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、腹泻、肠胃炎、尿道感染或新生儿脑膜炎的治疗或预防中降低胃肠道中的肠杆菌的水平，优选地大肠杆菌的水平。

[0013] 本发明人已开发用于治疗 and 预防腹泻的新疗法。具体地，本发明人已认识到来自布劳特氏菌属的细菌菌株可有效于减少腹泻。如在实施例中所所述，口服施用包含布劳特氏菌属氢营养菌的组合物可减少具有肠易激综合症 (IBS) 的患者的腹泻。

[0014] 在本发明的优选的实施方案中，组合物中的细菌菌株是布劳特氏菌属氢营养菌。还可使用紧密相关的菌株，诸如具有与布劳特氏菌属氢营养菌的细菌菌株的 16s rRNA 序列至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列的细菌菌株。优选地，所述细菌菌株具有与 SEQ ID NO:5 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列。更优选地，组合物中的细菌菌株是以登录号 DSM 10507/14294 保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株。

[0015] 在本发明的另外的实施方案中，组合物中的细菌菌株是粪便布劳特氏菌 (*Blautia stercoris*)。还可使用紧密相关的菌株，诸如具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的 16s rRNA 序列至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列的细菌菌株。优选地，所述细菌菌株具有与 SEQ ID NO:1 或 3 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列。优选地，序列同一性是针对 SEQ ID NO:3。优选地，用于本发明的细菌菌株具有由 SEQ ID NO:3 表示的 16s rRNA 序列。

[0016] 在本发明的另外的实施方案中，组合物中的细菌菌株是韦氏布劳特氏菌 (*Blautia wexlerae*)。还可使用紧密相关的菌株，诸如具有与韦氏布劳特氏菌的细菌菌株的 16s rRNA 序列至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列的细菌菌株。优选地，所述细菌菌株具有与 SEQ ID NO:2 或 4 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.9% 相同的 16s rRNA 序列。优选地，序列同一性是针对 SEQ ID NO:4。优选地，用于本发明

的细菌菌株具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

[0017] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于口服施用。口服施用本发明的菌株可有效于降低胃肠道中的肠杆菌的水平。另外,口服施用对于患者和从业人员是便利的并且允许递送到肠和/或肠的部分或完全定居。

[0018] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

[0019] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含已冻干的细菌菌株。冻干是一种用于制备允许细菌递送的稳定组合物的有效且便利的技术,并且显示在实施例提供有效的组合物。

[0020] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含如上所述的组合物的食物产品。

[0021] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含如上所述的组合物的疫苗组合物。

[0022] 另外,本发明提供一种降低胃肠道中的肠杆菌的水平并且因此治疗或预防与肠杆菌相关联的疾病的方法,其包括施用包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。

附图说明

[0023] 图1:通过qPCR进行的BH群体的测量,其示出针对接受BH冻干物的IBS HMI大鼠在第14天和第28天的BH的增加。

[0024] 图2:HIM大鼠中的给药研究-接受不同浓度的细菌菌种的健康HIM大鼠的粪便样品中布劳特氏菌属氢营养菌的RT-PCR量化。

[0025] 图3:在向健康HIM大鼠口服施用(10^9 /天)之后布劳特氏菌属氢营养菌的转运时间。

[0026] 图4:在14天施用(布劳特氏菌属氢营养菌在 10^{10} /天/大鼠下施用)之后健康HIM大鼠的粪便和盲肠样品中存在的布劳特氏菌属氢营养菌的比较(RT-PCR量化)。

[0027] 图5:布劳特氏菌属氢营养菌施用对于健康人类微生物群相关大鼠的粪便微生物群组成的影响。 10^{10} 个布劳特氏菌属氢营养菌/天的施用,持续14天(来自2个健康人类粪便微生物群(20只HIM大鼠)的结果-qPCR分析)。

[0028] 图6:布劳特氏菌属氢营养菌施用对于IBS-HIM大鼠中微生物群体的影响。

[0029] 图7a:在Blautix处理期间和之后患者微生物群布劳特氏菌属氢营养菌的水平变化。

[0030] 图7b:在Blautix处理期间和之后患者微生物群肠杆菌的水平变化。

[0031] 图8:用Blautix处理的IBS患者(图8a)和用安慰剂处理的IBS患者(图8b)的第1天、第2天、第15天和第16天的氢呼吸测试Cmax结果。图8c是将具有在第15天和第16天的平均值与第1天和第2天的平均值之间氢减少的Blautix处理患者的百分比与在这些时间点之间具有氢减少的安慰剂处理患者的百分比进行比较的图。

[0032] 图9a:针对Blautix处理的IBS患者的第1天和第15天的氢未校正和氢校正呼吸测试配对数据;图9b:将针对Blautix处理组的第1天和第15天的平均氢未校正呼吸测试结果进行比较的图;图9c:将针对Blautix处理组的第1天和第15天的平均氢校正呼吸测试结果进行比较的图。

[0033] 图10a:针对安慰剂处理的IBS患者的第1天和第15天的氢未校正和氢校正呼吸测

试配对数据;图10b:将针对安慰剂处理组的第1天和第15天的平均氢未校正呼吸测试结果进行比较的图;图10c:将针对安慰剂处理组的第1天和第15天的平均氢校正呼吸测试结果进行比较的图。

[0034] 图11:将针对Bautix处理组 (Verum) 和安慰剂组的第1天和第15天的平均氢呼吸测试结果进行比较的图(图11a:未校正氢;图11b:校正氢)。

[0035] 图12:用或不用包含布劳特氏菌属氢营养菌的组合物 (BlautiX) 处理28天的IBS-HMA大鼠的粪便样品中劳特氏菌属氢营养菌群体的qPCR评估。

[0036] 图13:在布劳特氏菌属氢营养菌 (BlautiX) 施用相对于对照溶液之后IBS HMA大鼠粪便样品中的细菌枚举。

[0037] 图14:I期临床试验的给药时间段(1-16天)期间患者症状的变化。

[0038] 图15:I期临床试验的清洗时间段期间患者症状的变化。

具体实施方式

[0039] 细菌菌株

[0040] 本发明的组合物包含布劳特氏菌属的细菌菌株。实施例证明此属的细菌可用于降低胃肠道中的肠杆菌、特别是大肠杆菌的水平。优选的细菌菌株是布劳特氏菌属氢营养菌、粪便布劳特氏菌和韦氏布劳特氏菌菌种。用于本发明的其他优选的细菌菌株是黏液真杆菌 (*Blautia producta*)、球形布劳特氏菌 (*Blautia coccoides*) 和汉氏布劳特氏菌 (*Blautia hansenii*)。更优选的是布劳特氏菌属氢营养菌,具体地是以登录号DSM 10507/14294保藏的细菌。

[0041] 用于本发明的布劳特氏菌属菌株的实例包括布劳特氏菌属氢营养菌、粪便布劳特氏菌、粪布劳特氏菌 (*B. faecis*)、球形布劳特氏菌 (*B. coccoides*)、*B. gluceracea*、汉氏布劳特氏菌 (*B. hansenii*)、*B. luti*、黏液真杆菌 (*B. producta*)、*B. schinkii*以及韦氏布劳特氏菌。布劳特氏菌属菌种是革兰氏反应阳性的非运动性细菌,所述细菌可以是球菌状的或卵形的,并且它们全部是产生乙酸作为葡萄糖发酵的主要终产物的专性厌氧菌[17]。布劳特氏菌属可从人类肠道分离,虽然黏液真杆菌从败血病样品分离。

[0042] 布劳特氏菌属氢营养菌(先前已知为嗜氢瘤胃球菌 (*Ruminococcus hydrogenotrophicus*))从动物的肠道分离,是严格厌氧的,并且将 H_2/CO_2 代谢为乙酸盐,这对于人类营养和健康可以是重要的。布劳特氏菌属氢营养菌的菌株类型是S5a33=DSM 10507=JCM 14656。布劳特氏菌属氢营养菌菌株S5a36的16S rRNA基因序列的GenBank登录号是X95624.1(本文中公开为SEQ ID NO:5)。此示例性布劳特氏菌属氢营养菌菌株在[17]和[18]中描述。S5a33菌株和S5a36菌株对应于从健康受试者的排泄物样品分离的菌株的两个亚克隆。它们显示相同的形态、生理和代谢并且具有相同的16S rRNA序列。因此,在一些实施方案中,用于本发明的布劳特氏菌属氢营养菌具有SEQ ID NO:5的16S rRNA序列。

[0043] 以登录号DSM 10507并且还以登录号DSM 14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌细菌在实施例中测试并且在本文中还称为BH菌株。BH菌株在德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) [德国微生物保藏中心 ([German Microorganism Collection])] (Mascheroder Weg 1b, 38124不伦瑞克,德国)在1996年1月26日以登录号DSM 10507保藏为“嗜氢瘤胃球菌”并且还在2001年5月14日以登录号DSM

14294保藏为“S5a33”。受托人是INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122Saint Genès Champanelle,法国。保藏物的所有权通过转让传给4D Pharma Plc公司。

[0044] 粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1^T的16S rRNA基因序列的GenBank登录号是HM626177(本文中公开为SEQ ID NO:1)。示例性粪便布劳特氏菌菌株在[19]中描述。韦氏布劳特氏菌的菌株类型是WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850[Error!Bookmark not defined.]。韦氏布劳特氏菌菌株WAL 14507T的16S rRNA基因序列的GenBank登录号是EF036467(本文中公开为SEQ ID NO:2)。此示例性韦氏布劳特氏菌菌株在[Error!Bookmark not defined.]中描述。

[0045] 优选的粪便布劳特氏菌菌株是以登录号NCIMB 42381保藏的菌株,其在本文中还称为菌株830。830菌株的16S rRNA序列提供在SEQ ID NO:3中。菌株830在2015年3月12日由GT Biologics有限公司(Life Sciences Innovation Building,Aberdeen,AB25 2ZS,苏格兰)在国际保藏单位NCIMB(Ferguson Building,Aberdeen,AB21 9YA,苏格兰)保藏为“粪便布劳特氏菌830”并且指定保藏号为NCIMB 42381。GT Biologics有限公司随后将其名称更换为4D Pharma Research有限公司。

[0046] 优选的韦氏布劳特氏菌菌株是以登录号NCIMB 42486保藏的菌株,其在本文中还称为菌株MRX008。MRX008菌株的16S rRNA序列提供在SEQ ID NO:4中。菌株MRX008在2015年11月16日由4D Pharma Research有限公司(Life Sciences Innovation Building,Aberdeen,AB25 2ZS,苏格兰)在国际保藏单位NCIMB(Ferguson Building,Aberdeen,AB21 9YA,苏格兰)保藏为“布劳特氏菌/瘤胃球菌MRx0008”并且指定保藏号为NCIMB 42486。

[0047] 还预期与在实施例中测试的菌株紧密相关的细菌菌株有效于降低胃肠道中的肠杆菌、特别是大肠杆菌的水平。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与布劳特氏菌属氢营养菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。

[0048] 在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID NO:3。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:3表示的16s rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与韦氏布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%相同的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID NO:4。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

[0049] 还预期是以登录号DSM 10507/14294保藏的细菌的生物型或以登录号NCIMB 42381和NCIMB 42486保藏的细菌的生物型的细菌菌株有效于降低胃肠道中的肠杆菌、特别是大肠杆菌的水平。生物型是具有相同或非常相似的生理和生物化学特征的紧密相关的菌株。

[0050] 是以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的生物型并且适用于本发明的菌株可通过对以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的其他核苷酸序列进行测序来识别。例如,基本上可对全基因组进行测序并且用于本发明的生物型菌株可具有跨其全基因组的至少80% (例如,跨至少85%、90%、95%或99%,或跨其全基因组)的至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。例如,在一些实施方案中,生物型菌株具有跨其基因组的至少98%的至少98%序列同一性或跨其基因组的99%的至少99%序列同一性。用于识别生物型菌株的其他合适的序列可包括hsp60或重复序列,诸如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP或[20]。生物型菌株可具有与以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有与作为DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株的对应序列具有至少97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列,并且包含与SEQ ID NO:5至少99%相同(例如,至少99.5%或至少99.9%相同)的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有与作为DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株的对应序列具有至少97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列,并且具有SEQ ID NO:5的16S rRNA序列。

[0051] 可替代地,是以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的生物型并且适用于本发明的菌株可通过使用登录号DSM 10507/14294保藏物、登录号NCIMB 42381保藏物或登录号NCIMB 42486保藏物和限制性片段分析和/或PCR分析,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性 (FAFLP) 和重复DNA元件 (rep) -PCR指纹分析或蛋白质剖析或部分16S或23s rDNA测序来识别。在优选的实施方案中,此类技术可用于识别其他布劳特氏菌属氢营养菌、粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌菌株。

[0052] 在某些实施方案中,是以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的生物型并且适用于本发明的菌株是当通过扩增核糖体DNA限制性分析 (ARDRA), 例如当使用Sau3AI限制性酶(例如参见例如[21]的方法和指导)分析时提供与以保藏号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌相同的模式的菌株。可替代地,生物型菌株被识别为与以保藏号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌具有相同的碳水化合物发酵模式的菌株。

[0053] 可用于本发明的组合物和方法的其他布劳特氏菌属菌株(诸如以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌的生物型)可使用任何适当的方法或策略(包括实施例中所所述的测定)来识别。例如,用于本发明的菌株可通过培养细菌并且施用给大鼠以在腹胀测定中测试来识别。具体地,与以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的细菌具有相似的生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可用于本发明。可用的菌株与DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486菌株具有相当的微生物群调节活性。具体地,生物型菌株将引起与在实施例中所示的作用相当的对于肠杆菌的作用,这可通过使用在实施例中所所述的培养和施用方案来识别。

[0054] 本发明的特别优选的菌株是以登录号DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株。这是在实施例测试的示例性BH菌株并且显示有效于降低胃肠道中的肠杆菌、特别是大肠杆菌的水平。因此,本发明提供一种用于尤其针对本文所述的疾病的疗法的细

胞,诸如以登录号DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株的分离细胞或其衍生物。

[0055] 以登录号DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486保藏的菌株的衍生物可以是来自原体的子代菌株(后代)或从原体培养的菌株(亚克隆)。本发明的菌株的衍生物可在不损失生物活性的情况下例如在基因水平下进行修饰。具体地,本发明的衍生物菌株是治疗学上有效的。衍生物菌株与原始DSM 10507/14294、NCIMB 42381或NCIMB 42486菌株具有相当的微生物群调节活性。具体地,衍生物菌株将引起与在实施例中所示的作用相当的对于肠杆菌的作用,这可通过使用在实施例中所所述的培养和施用方案来识别。DSM 10507/14294菌株的衍生物通常是DSM 10507/14294菌株的生物型。NCIMB 42381菌株的衍生物通常是NCIMB 42381菌株的生物型。NCIMB 42486菌株的衍生物通常是NCIMB 42486菌株的生物型。

[0056] 对以登录号DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株的细胞的引用涵盖与以登录号DSM 10507/14294保藏的菌株具有相同的安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且本发明涵盖此类细胞。对以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌的细胞的引用涵盖与以登录号NCIMB 42381保藏的菌株具有相同的安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且本发明涵盖此类细胞。对以登录号NCIMB 42486保藏的韦氏布劳特氏菌的细胞的引用涵盖与以登录号NCIMB 42486保藏的菌株具有相同的安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且本发明涵盖此类细胞。

[0057] 在优选的实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是可存活的并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0058] 治疗性用途

[0059] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于降低胃肠道中的肠杆菌的水平。胃肠道中增加的肠杆菌水平与多种病理病状和疾病相关联,并且实施例证明本发明的组合物可有效于降低胃肠道中的肠杆菌的水平。

[0060] 在本发明的所有方面的优选的实施方案中,所述肠杆菌是大肠杆菌。因此,优选地,本发明的组合物用于降低胃肠道中的大肠杆菌的水平。

[0061] 在某些实施方案中,肠杆菌是致病菌株,诸如大肠杆菌0157:H7、0104:H4、0121、026、0103、0111、0145、0104:H21或0104:H4。

[0062] 在可替代的实施方案中,肠杆菌是共生或非致病菌株。此类肠杆菌的增加的水平可促成诸如IBS和克罗恩氏病的病状,并且实施例证明本发明的组合物在IBS的情况下对于肠杆菌可具有减少作用。

[0063] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防与肠杆菌感染诸如大肠杆菌感染相关联的疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防腹泻、肠胃炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。在此类实施方案中,肠杆菌可以是致病菌株。

[0064] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防与肠杆菌诸如大肠杆菌的增加水平相关联的疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防腹泻、肠胃炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。在此类实施方案中,肠杆菌可以是共生或非致病菌株。

[0065] 在一些实施方案中,所述疾病或病状的发病机理影响肠。在一些实施方案中,所述疾病或病状的发病机理不影响肠。在一些实施方案中,所述疾病或病状的发病机理局限在

肠。在一些实施方案中,所述治疗或预防在除了肠以外的部位处发生。在一些实施方案中,所述治疗或预防在肠发生并且还在除了肠以外的部位处发生。在某些实施方案中,所述疾病或病状是系统性的。

[0066] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防肠杆菌感染诸如大肠杆菌感染。在优选的实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防胃肠道并且特别是盲肠中的感染。在此类实施方案中,肠杆菌可以是致病菌株。

[0067] 在一些实施方案中,肠杆菌的水平在受试者的粪便中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在来自受试者的粪便样品中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在受试者的远端肠道中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在盲肠中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在结肠中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在直肠中降低。在一些实施方案中,肠杆菌的水平在小肠中降低。

[0068] 在优选的实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗由致病肠杆菌导致的感染。

[0069] 在优选的实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,其用于治疗大肠杆菌感染。

[0070] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于在与肠杆菌的增加水平相关联的疾病诸如IBS、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、腹泻、胃肠炎、尿道感染或新生儿脑膜炎的治疗或预防中降低胃肠道中的肠杆菌的水平,优选地大肠杆菌的水平。已知肠杆菌并且特别是大肠杆菌是克罗恩氏病和溃疡性结肠炎或已知加剧克罗恩氏病和溃疡性结肠炎的潜在触发物[22-24],所以在实施例中所示的本发明的组合物的作用在这些病状的治疗中可以是有益的。

[0071] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于通过降低胃肠道中的肠杆菌的水平来治疗或预防IBS、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、腹泻、胃肠炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。

[0072] 在优选的实施方案中,本发明的组合物包含以登录号DSM 10507/14294保藏的细菌,并且用于在克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良或最优选地IBS的治疗中降低胃肠道中的肠杆菌的水平。在另外优选的实施方案中,本发明的组合物包含以登录号DSM 10507/14294保藏的细菌,并且用于通过降低胃肠道中的肠杆菌的水平来治疗或预防克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良或最优选地IBS。

[0073] 在某些实施方案中,所述组合物与抗生素诸如氟喹诺酮、阿奇霉素、环丙沙星或利福昔明组合施用。在某些实施方案中,所述组合物与脱水处理诸如口服再水合溶液组合施用。本发明的组合物可与抗生素或脱水处理在同一时间施用,或与抗生素或脱水处理顺序施用。

[0074] 在某些实施方案中,所述组合物用于例如当与健康受试者或健康受试者的群体相比时表现出或预期表现出胃肠道中增加的肠杆菌水平的患者。

[0075] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗、预防或减少通过肠杆菌进行的胃肠道的定居的方法。

[0076] 在一些实施方案中,本发明的组合物用于在相对于健康受试者在其呼吸中具有增加的氢水平的受试者中减少胃肠道中的肠杆菌的水平的方法。在一些实施方案中,本发明

的组合用于降低表现出或预期表现出胃肠道中增加的肠杆菌水平的受试者的呼吸中的氢水平。所述受试者优选地是被诊断为具有以下的受试者：IBS、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、腹泻、胃肠炎、尿道感染或新生儿脑膜炎和/或由致病肠杆菌例如大肠杆菌导致的感染。实施例显示用本发明的组合物进行的治疗降低在氢呼吸测试中检测到的氢水平。因此，氢水平优选地使用氢呼吸测试来评定。氢呼吸测试在本领域中是熟知的，并且因此技术人员将知道如何实施这种测试。在一些实施方案中，患者被施用乳果糖作为测试的底物。

[0077] 氢呼吸测试也是用于监测使用本发明的组合物降低肠杆菌的水平和进行的治疗或预防的有效性或可能的有效性的有用工具。例如，在用本发明的组合物治疗之后在受试者的呼吸中检测到的氢水平的降低可指示所述治疗具有降低的、治疗性或预防性作用。因此，在一些实施方案中，所述方法和本发明的使用还包括在用本发明的组合物治疗期间和/或之后监测受试者的呼吸中的氢水平，并且因此评定降低、治疗或预防的有效性或可能的有效性。例如，氢水平可根据需要在一个或多个（例如，1、2、3、4或多于4个）时间处监测，例如，包括在治疗之前、在治疗开始时、在治疗期间、在治疗结束时和/或在治疗之后监测。在一些实施方案中，将在给药时间段结束时和/或给药时间段之后（组合物施用给受试者期间）受试者的呼吸中的氢水平与在给药时间段开始时和/或给药时间段之前的水平相比较，并且所述水平的降低指示降低、治疗或预防的有效性或可能的有效性。例如，在给药时间段是16天的实施方案中，可能希望第1天和第16天或例如在第1天、第2天、第15天和第16天取得测量值。在一些实施方案中，取得多个测量值并且获得这些测量值的平均值（例如，第1天和第2天的平均值和第15天和第16天的平均值）。在一些实施方案中，氢水平C_{max}的至少40ppm的降低指示降低、治疗或预防是有效的或可能是有效的。在一些实施方案中，受试者的呼吸中的氢水平仅例如在治疗结束时或治疗之后测量一次，并且所述水平处于预先确定的水平下或接近预先确定的水平的发现指示降低、治疗或预防可能是有效的。氢呼吸测试是标准测定并且因此预先确定的水平在本领域中是已知的。

[0078] 治疗或预防可是指例如症状严重性的减轻或对于患者是问题的触发物的加剧频率或范围的降低。

[0079] 肠杆菌的水平可使用标准技术（诸如在实施例中使用的qPCR技术）来从患者的粪便中检测。

[0080] 施用模式

[0081] 优选地，本发明的组合物施用到胃肠道以便允许本发明的细菌菌株递送到肠和/或本发明的细菌菌株部分或完全定居在肠。通常，本发明的组合物口服施用，或者它们可直肠、鼻内或通过口腔或舌下途径施用。

[0082] 在某些实施方案中，本发明的组合物可作为泡沫、作为喷雾剂或凝胶施用。

[0083] 在某些实施方案中，本发明的组合物可作为栓剂诸如直肠栓剂，例如呈可可油（可可脂）、合成硬脂（例如，suppocire、witepsol）、甘油-明胶、聚乙二醇或皂甘油组合物的形式施用。

[0084] 在某些实施方案中，本发明的组合物通过管（诸如鼻胃管、口胃管、胃管、空肠造瘘管（J管）、经皮内窥镜胃造口术（PEG）或端口（诸如提供到胃的路径的胸壁端口、空肠或其他合适的路径端口）来施用到胃肠道。

[0085] 本发明的组合物可施用一次,或者它们可作为治疗方案的一部分顺序地施用。在某些实施方案中,本发明的组合物每天施用。实施例证明每天施用成功地提供定居和临床益处。

[0086] 在某些实施方案中,本发明的组合物规律地施用,诸如每天一次、每两天一次或每周一次施用,持续延长的时间段,诸如持续至少一周、两周、一月、两月、六月或一年。实施例证明BH施用可能不产生永久性的肠定居,所以规律地施用延长的时间段可提供更多的治疗性益处。

[0087] 在一些实施方案中,本发明的组合物施用7天、14天、16天、21天或28天或不多于7天、14天、16天、21天或28天。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物施用16天。

[0088] 在本发明的某些实施方案中,根据本发明的治疗伴随对患者的肠道微生物群的评定。如果未实现本发明的菌株的递送和/或本发明的菌株的部分或完全定居而使得未观察到功效,则可重复治疗,或者如果递送和/或部分或完全定居成功并且观察到功效,则可停止治疗。

[0089] 在某些实施方案中,本发明的组合物可施用给怀孕动物,例如哺乳动物诸如人类,以便预防升高的肠杆菌水平在她的子宫内和/或出生之后的孩子身上发生。

[0090] 本发明的组合物可施用给已诊断有升高的肠杆菌水平或与升高的肠杆菌水平相关联的疾病或病状或者已鉴定为具有患升高的肠杆菌水平的风险的患者。所述组合物还可作为预防性措施施用以防止升高的肠杆菌水平在健康患者中发生。

[0091] 本发明的组合物可施用给已鉴定为具有异常的肠道微生物群的患者。例如,所述患者可具有减少的或不存在的由布劳特氏菌属并且具体地是布劳特氏菌属氢营养菌、粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌进行的定居。

[0092] 本发明的组合物可作为食物产品诸如营养补充剂施用。

[0093] 通常,本发明的组合物用于治疗人类,虽然它们可用于治疗动物,包括单胃哺乳动物,诸如家禽、猪、猫、狗、马或兔。本发明的组合物可用于增强动物的生长和性能。如果施用给动物,则可使用口服管饲法。

[0094] 在一些实施方案中,施用组合物的受试者是人类成人。在一些实施方案中,施用组合物的受试者是人类婴儿。

[0095] 组合物

[0096] 通常,本发明的组合物包含细菌。在本发明的优选的实施方案中,所述组合物以冻干形式配制。例如,本发明的组合物可包括颗粒或明胶胶囊,例如包含本发明的细菌菌株的硬明胶胶囊。

[0097] 优选地,本发明的组合物包含冻干的细菌。细菌的冻干是良好建立的程序,并且相关指导可见于例如参考文献[25-27]。实施例证明冻干物组合物是特别有效的。

[0098] 可替代地,本发明的组合物可包含活的有效的细菌培养物。实施例证明本发明的细菌的培养物是治疗上有效的。

[0099] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株未被灭活,例如未被热灭活。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株未被杀死,例如未被热杀死。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株未被减毒,例如未被热减毒。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株未被杀死、灭活和/或减毒。例如,在一些实施方案中,本发明

的组合物中的细菌菌株是活的。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是可存活的。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株能够部分地或完全地在肠定居。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株是可存活的并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0100] 在一些实施方案中,所述组合物包含活细菌菌株和已被杀死的细菌菌株的混合物。

[0101] 在优选的实施方案中,本发明的组合物被封装以允许将细菌菌株递送到肠。封装保护组合物不被降解,直至通过例如用化学或物理刺激(诸如压力、酶活性或可通过pH变化触发的物理崩解)破裂来递送在目标位置。可使用任何适当的封装方法。示例性封装技术包括包埋多孔基质内、附着或吸附在固体载体表面上、通过絮凝自聚集或与交联剂聚集、以及机械包含在微孔膜或微胶囊之后。关于可用于制备本发明的组合物的封装的指导可见于例如参考文献[28-29]。

[0102] 所述组合物可口服施用并且可呈片剂、胶囊或粉末的形式。封装的产品是优选的,因为布劳特氏菌是厌氧菌。可包括其他成分(例如像维生素C)作为氧清除剂和益生菌底物以改善体内递送和/或部分或完全定居和存活。可替代地,本发明的益生菌组合物可作为食物或营养产品(诸如基于奶或乳清的发酵乳制品)或作为药物产品口服施用。

[0103] 所述组合物可配制为益生菌。

[0104] 本发明的组合物包含治疗有效量的本发明的细菌菌株。治疗有效量的细菌菌株足以向患者施加有益作用。治疗有效量的细菌菌株足以产生对患者的肠的递送和/或受试者的肠的部分或完全定居。

[0105] 细菌的例如针对成人的合适的每日剂量可以是约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位(CFU);例如,约 1×10^7 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中,约 1×10^6 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中,约 1×10^7 至约 1×10^{11} 个CFU;在另一个实例中,约 1×10^8 至约 1×10^{10} 个CFU;在另一个实例中,约 1×10^8 至约 1×10^{11} 个CFU。

[0106] 在某些实施方案中,细菌的剂量是至少 10^9 个细胞/天,诸如至少 10^{10} 、至少约 10^{11} 或至少约 10^{12} 个细胞/天。

[0107] 在某些实施方案中,所述组合物包含相对于组合物的重量的约 1×10^6 至约 1×10^{11} 个CFU/g的量的细菌菌株;例如约 1×10^8 至约 1×10^{10} 个CFU/g。所述剂量可以是例如1g、3g、5g和10g。

[0108] 通常,益生菌(诸如本发明的组合物)任选地与至少一种合适的益生菌化合物组合。益生菌化合物通常是不易消化的碳水化合物,诸如寡糖或多糖或者糖醇,其在上消化道中不被降解或吸收。已知的益生菌包括商业产品诸如菊粉和半乳糖-寡糖。

[0109] 在某些实施方案中,本发明的益生菌组合物包含相对于总重量组成的约1至约30重量%(例如,约5至20重量%)的量的益生菌化合物。碳水化合物可选自由以下组成的组:果糖-寡糖(或FOS)、短链果糖-寡糖、菊粉、异麦芽糖醇-寡糖、果胶、木寡糖(或XOS)、壳聚糖-寡糖(或COS)、 β -葡聚糖、改性的阿拉伯树胶和抗性淀粉、聚糊精、D-塔格糖、金合欢纤维、角豆树、燕麦、以及柑橘纤维。在一方面,益生菌是短链果糖-寡糖(为了简单起见,以下在本文中示为FOS-c.c.);所述FOS-c.c.是不易消化的碳水化合物,通常通过甜菜糖的转化获得并且包含三个葡萄糖分子所结合的蔗糖分子。

[0110] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或载体。此类合适的赋形剂的实例可见于参考文献[30]。用于治疗性用途的可接受的载体或稀释剂在制药领域是熟知的,并且例如在参考文献[31]中描述。合适的载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨醇等。合适的稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可考虑预期的施用途径和标准药学实践来选择。所述药物组合物除载体、赋形剂或稀释剂之外可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂。合适的粘合剂的实例包括淀粉;明胶;天然糖,诸如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖;玉米甜味剂;天然和合成胶,诸如阿拉伯树胶、黄蓍胶或藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。在所述药物组合物中可提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸、半胱氨酸以及对羟基苯甲酸的酯,例如,在一些实施方案中,防腐剂选自苯甲酸钠、山梨酸和对-羟基苯甲酸的酯。还可使用抗氧化剂和悬浮剂。合适的载体的另一个实例是蔗糖。防腐剂的另一个实例是半胱氨酸。

[0111] 本发明的组合物可配制为食物产品。例如,食物产品可提供除本发明的治疗性作用之外的营养益处,诸如呈营养补充剂的形式。相似地,可配制食物产品以增强本发明的组合物的口味或通过与普通食品而非与药物组合物更相似来使得组合物对于消费者更具吸引力。在某些实施方案中,本发明的组合物被配制为基于奶的产品。术语“基于奶的产品”意指具有变化的脂肪含量的任何液体或半固体的基于奶或乳清的产品。基于奶的产品可以是例如牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂奶、全脂奶、由奶粉和乳清重组而没有任何加工的奶、或加工产品,诸如酸乳酪、凝固奶、凝乳、酸奶、酸化全脂奶、黄油乳以及其他酸奶产品。另一个重要的组包括奶饮料诸如乳清饮料、发酵奶、炼乳、婴儿或幼儿奶;调味奶、冰淇淋;含奶食物诸如糖。

[0112] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种布劳特氏菌属的细菌菌株,并且不含有来自任何其他细菌属的细菌,或者其仅包含微少的或生物非相关的量的来自另一个属的细菌。

[0113] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含单一细菌菌株或菌种并且不含任何其他细菌菌株或菌种。此类组合物可仅包含微少的或生物非相关的量的其他细菌菌株或菌种。此类组合物可以是基本上不含其他种类的生物体的培养物。在一些实施方案中,此类组合物可以是基本上不含其他种类的生物体的冻干物。

[0114] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种布劳特氏菌属的细菌菌株,例如布劳特氏菌属氢营养菌,并且不含有任何其他细菌属,或者其仅包含微少的或生物非相关的量的来自另一个属的细菌。在某些实施方案中,本发明的组合物包含布劳特氏菌属的单一菌种,例如布劳特氏菌属氢营养菌,并且不含有任何其他细菌菌种,或者其仅包含微少的或生物非相关的量的来自另一种菌种的细菌。在某些实施方案中,本发明的组合物包含布劳特氏菌属的单一菌株,例如布劳特氏菌属氢营养菌的单一菌株,并且不含有任何其他细菌菌株菌种,或者其仅包含微少的或生物非相关的量的来自另一种菌株或菌种的细菌。

[0115] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含多于一种细菌菌株或菌种。例如,在一些实施方案中,本发明的组合物包含多于一种来自同一菌种内的菌株(例如,多于1、2、3、4、5、

6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40或45种菌株),并且任选地不含来自任何其他菌种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含少于50种来自同一菌种内的菌株(例如,少于45、40、35、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4或3种菌株),并且任选地不含来自任何其他菌种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含1-40、1-30、1-20、1-19、1-18、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-50、2-40、2-30、2-20、2-15、2-10、2-5、6-30、6-15、16-25或31-50种来自同一菌种内的菌株,并且任选地不含来自任何其他菌种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含多于一种来自同一属内的菌种(例如,多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、17、20、23、25、30、35或40种菌种),并且任选地不含来自任何其他属的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含少于50种来自同一属内的菌种(例如,少于50、45、40、35、30、25、20、15、12、10、8、7、6、5、4或3种菌种),并且任选地不含来自任何其他属的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含1-50、1-40、1-30、1-20、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-50、2-40、2-30、2-20、2-15、2-10、2-5、6-30、6-15、16-25或31-50种来自同一属内的菌种,并且任选地不含来自任何其他属的细菌。本发明包括前述内容的任何组合。

[0116] 在一些实施方案中,所述组合物包含微生物聚生体。例如,在一些实施方案中,所述组合物包含布劳特氏菌属细菌菌株作为微生物聚生体的一部分。例如,在一些实施方案中,布劳特氏菌属细菌与一种或多种(例如,至少2、3、4、5、10、15或20种)来自其他属的其他细菌菌株组合存在,布劳特氏菌属细菌可与所述其他细菌菌株在体内在肠中以共生方式存活。例如,在一些实施方案中,所述组合物包含与来自不同属的细菌菌株组合的布劳特氏菌属氢营养菌的细菌菌株。在一些实施方案中,微生物聚生体包含从单一生物体例如人类的粪便样品获得的两种或更多种细菌菌株。在一些实施方案中,微生物聚生体在自然界中发现不在一起。例如,在一些实施方案中,微生物聚生体包含从至少两个不同的生物体的粪便样品获得的细菌菌株。在一些实施方案中,两个不同的生物体来自同一物种,例如两个不同的人。在一些实施方案中,两个不同的生物体是婴儿人类和成人人类。在一些实施方案中,两个不同的生物体是人类和非人类哺乳动物。

[0117] 在一些实施方案中,本发明的组合物另外包含具有与以登录号DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株相同的安全性和治疗性功效但是其不是以登录号DSM 10507/14294保藏的布劳特氏菌属氢营养菌菌株或者其不是布劳特氏菌属氢营养菌或者其不是布劳特氏菌属的细菌菌株。

[0118] 在本发明的组合物包含多于一种细菌菌株、菌种或属的一些实施方案中,各个细菌菌株、菌种或属可用于单独、同时或顺序施用。例如,所述组合物可包含所述多于一种细菌菌株、菌种或属中的全部,或者所述细菌菌株、菌种或属可单独保存并且单独、同时或顺序施用。在一些实施方案中,所述多于一种细菌菌株、菌种或属单独保存但是在使用之前混合在一起。

[0119] 在一些实施方案中,用于本发明的细菌菌株从成人粪便获得。在本发明的组合物包含多于一种细菌菌株的一些实施方案中,所有细菌菌株均从成人粪便获得,或者如果存在其他细菌菌株,它们仅以微少的量存在。细菌可在从成人粪便获得并且用于本发明的组合物之后进行培养。

[0120] 在一些实施方案中,所述一种或多种布劳特氏菌属细菌是本发明的组合物中的唯

一的治疗活性剂。在一些实施方案中,组合物中的细菌菌株是本发明的组合物中的唯一的治疗活性剂。

[0121] 用于根据本发明使用的组合物可能需要或可能不需要市场批准。

[0122] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株被冻干。在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株进行喷雾干燥。在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株被冻干或进行喷雾干燥并且其中它是活的。在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株被冻干或进行喷雾干燥并且其中它是可存活的。在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株被冻干或进行喷雾干燥并且其中它能够部分地或完全地在肠定居。在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述细菌菌株被冻干或进行喷雾干燥并且其中它是可存活的并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0123] 在一些情况下,冻干的或喷雾干燥的细菌菌株在施用之前进行重构。在一些情况下,所述重构通过使用本文所述的稀释剂进行。

[0124] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0125] 在某些实施方案中,本发明提供一种药物组合物,其包含:本发明的细菌菌株;以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中所述细菌菌株以以下量存在:当施用给有需要的受试者时足以降低肠杆菌的水平和/或治疗与升高的肠杆菌水平相关联的病症;并且其中所述病症与升高的肠杆菌水平相关联,诸如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、功能性消化不良、或更优选地IBS、或腹泻、胃肠炎、尿道感染或新生儿脑膜炎。

[0126] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中细菌菌株的量是相对于组合物的重量的约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位/克。

[0127] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述组合物在1g、3g、5g或10g的剂量下施用。

[0128] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其中所述组合物通过选自由以下组成的组的方法施用:口服、直肠、皮下、鼻腔、口腔以及舌下。

[0129] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其包含选自由以下组成的组的载体:乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇以及山梨醇。

[0130] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其包含选自由以下组成的组的稀释剂:乙醇、甘油和水。

[0131] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其包含选自由以下组成的组的赋形剂:淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、阿拉伯树胶、黄耆胶、藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠以及氯化钠。

[0132] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其还包含防腐剂、抗氧化剂和稳定剂中的至少一种。

[0133] 在某些实施方案中,本发明提供以上的药物组合物,其包含选自由以下组成的组的防腐剂:苯甲酸钠、山梨酸以及对羟基苯甲酸的酯。

[0134] 在某些实施方案中,提供本发明的药物组合物,其中所述组合物不包含任何矿物质,或者更具体地不包含原子数大于33的任何金属,例如,其中所述组合物不包含选自由以

下组成的组的任何矿物质：硒、钼、钨、硒化合物、钼化合物和钨化合物。

[0135] 在某些实施方案中，本发明提供以上的药物组合物，其中所述细菌菌株被冻干。

[0136] 在某些实施方案中，本发明提供以上的药物组合物，其中当所述组合物保存在约4℃或约25℃下的密封容器中并且所述容器置于具有50%相对湿度的气氛中时，如以菌落形成单位测量的细菌菌株的至少80%在至少约以下的时间段之后仍保留：1月、3月、6月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年。

[0137] 在一些实施方案中，本发明的组合物在包含如本文所述的组合物的密封容器中提供。在一些实施方案中，密封容器是小袋或瓶。在一些实施方案中，本发明的组合物在包含如本文所述的组合物的注射器中提供。

[0138] 在一些实施方案中，本发明的组合物提供为药物制剂。例如，所述组合物可提供为片剂或胶囊。在一些实施方案中，所述胶囊是明胶胶囊（“凝胶套”）。

[0139] 在一些实施方案中，本发明的组合物口服施用。口服施用可涉及吞咽，使得化合物进入胃肠道，和/或涉及口腔、舌或舌下施用，通过所述施用，化合物直接从口进入血管。

[0140] 适用于口服施用的药物制剂包括固体填料、固体微颗粒、半固体和液体（包括多相或分散系统），诸如片剂；含有多颗粒或纳米颗粒、液体（例如，含水溶液）、乳液或粉末的软胶囊或硬胶囊；糖锭（包括液体填充）；咀嚼剂；凝胶；快速分散剂型；膜；卵形体；喷雾剂；以及口腔/粘膜粘附贴片。

[0141] 在一些实施方案中，所述药物制剂是肠溶性制剂，即适于通过口服施用将本发明的组合物递送到肠的胃耐受性制剂（例如，耐受胃pH）。当所述组合物的细菌或另一种组分是酸敏感的，例如易于在酸条件下降解时，肠溶性制剂可以是特别有用的。

[0142] 在一些实施方案中，所述肠溶性制剂包含肠溶性包衣。在一些实施方案中，所述制剂是肠溶包衣剂型。例如，所述制剂可以是肠溶包衣片剂或肠溶包衣胶囊等。肠溶性包衣可以是常规的肠溶性包衣，例如，用于口服递送的片剂、胶囊等的常规包衣。所述制剂可包括膜包衣，例如，肠溶性聚合物例如酸不可溶的聚合物的薄膜层。

[0143] 在一些实施方案中，肠溶性制剂是本质上肠溶性的，例如胃耐受性的而不需要肠溶性包衣。因此，在一些实施方案中，所述制剂是不包括肠溶性包衣的肠溶性制剂。在一些实施方案中，所述制剂是由热胶凝化材料制成的胶囊。在一些实施方案中，热胶凝化材料是纤维素材料，诸如甲基纤维素、羟甲基纤维素或羟丙基甲基纤维素（HPMC）。在一些实施方案中，所述胶囊包括不含有任何成膜聚合物的壳体。在一些实施方案中，所述胶囊包括壳体并且所述壳体包含羟丙基甲基纤维素并且不包含任何成膜聚合物（例如，参见[32]）。在一些实施方案中，所述制剂是本质上肠溶性的胶囊（例如，来自Capsugel公司的 **Vcaps®**）。

[0144] 在一些实施方案中，所述制剂是软胶囊。软胶囊是由于存在于胶囊壳体中的软化剂例如像甘油、山梨醇、麦芽糖醇以及聚乙二醇的添加而可具有某种弹性和柔软性的胶囊。软胶囊可例如基于明胶或淀粉来产生。基于明胶的软胶囊可从各种供应商商购获得。基于施用方法例如像口服或直肠方式，软胶囊可具有各种形状，它们可以是例如圆形、卵形、椭圆形或鱼雷形。软胶囊可通过常规方法例如像通过Scherer法、Accogel法或微滴或喷吹法产生。

[0145] 培养方法

[0146] 用于本发明的细菌菌株可使用如在例如参考文献[33-35]中详述的标准微生物技

术来培养。

[0147] 用于培养的固体或液体培养基可以是例如YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可包含(每100ml,大约值):酪胺(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、 NaHCO_3 (0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、 K_2HPO_4 (0.045g)、 KH_2PO_4 (0.045g)、 NaCl (0.09g)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.09g)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.009g)、 CaCl_2 (0.009g)、刃天青(0.1mg)、氯化血红素(1mg)、生物素(1 μg)、钴胺素(1 μg)、对氨基苯甲酸(3 μg)、叶酸(5 μg)以及吡哆胺(15 μg)。

[0148] 总则

[0149] 除非另外指示,否则本发明的实践将采用本领域的技术内的化学、生物化学、分子生物学、免疫学以及药学的常规方法。这些技术在文献中被充分解释。参见,例如参考文献[36-43]等。

[0150] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如“包含”X的组合物可排外地由X组成或者可包括另外的事物,例如X+Y。

[0151] 与数值x相关的术语“约”是任选的并且是平均值,例如 $x \pm 10\%$ 。

[0152] 词语“基本上”不排除“完全地”,例如“基本上不含”Y的组合物可完全不含Y。在需要的情况下,词语“基本上”可从本发明的定义省略。

[0153] 两个核苷酸序列之间的百分比序列同一性的引用意指当对齐时,比较两个序列的核苷酸的百分比是相同的。此对齐和百分比同源性或序列同一性可使用本领域已知的软件程序,例如参考文献[44]的7.7.18章节中描述的那些来确定。优选的比对通过Smith-Waterman同源性搜索算法使用仿射间隔搜索的具有间隔开放罚分(gap open penalty)为12,间隔延伸罚分(gap extension penalty)为2,BLOSUM矩阵为62来确定。Smith-Waterman同源性搜索算法在参考文献[45]中公开。

[0154] 除非明确地声明,否则包括多个步骤的工艺或方法可在方法开始或结束时包括另外的步骤或者可包括另外的插入步骤。另外,在适当的情况下,步骤可组合、省略或以可替代的顺序执行。

[0155] 本发明的各种实施方案在本文中描述。应理解,在每个实施方案中指定的特征可与其他指定的特征组合以提供另外的实施方案。具体地,在本文中突出显示为合适的、典型的或优选的实施方案可彼此组合(当它们相互排斥时除外)。

[0156] 用于实施本发明的模式

[0157] 实施例1-向具有IBS肠道微生物群的大鼠施用细菌接种物

[0158] 概述

[0159] 将大鼠接种有来自人类IBS受试者的粪便微生物群。然后对大鼠施用根据本发明的包含细菌菌株的组合物,并且分析通过布劳特氏菌属氢营养菌进行的定居。

[0160] 菌株

[0161] 布劳特氏菌属氢营养菌(BH)菌株DSM 10507/14294。

[0162] 组合物和施用

[0163] BH冻干物-通过口服管饲法施用

[0164] 对照溶液,通过口服管饲法施用

[0165] 大鼠

[0166] 接种有来自IBS受试者的人类肠微生物群。

[0167] 研究设计

[0168] 第-14天-将大鼠接种有来自IBS受试者的人类肠微生物群

[0169] 第0天至第28天-每天给药BH冻干物或对照溶液

[0170] 第0、14和28天-粪便样品中BH群体的qPCR

[0171] 结果

[0172] 图1呈现来自施用对照溶液 (IBS) 或BH冻干物 (IBS+BH) 的大鼠的粪便样品中的BH群体的qPCR分析的结果。在第14天和第28天看到接受BH冻干物的大鼠中的BH群体的增加, 这确认成功的定居。

[0173] 结论

[0174] 施用包含布劳特氏菌属氢营养菌的组合物引起成功的定居。

[0175] 实施例2-向健康大鼠施用细菌冻干物以及对于肠杆菌的影响

[0176] 研究施用布劳特氏菌属氢营养菌 (BH) 菌株DSM 10507/14294的冻干物对于健康HIM大鼠的影响并且结果在图2至图5中报告。关于实验的另外的细节在以上附图说明中提供。图2示出大鼠中BH的适当剂量是 10^9 个细胞/天或更大。图3示出在这些实验中, BH没有永久性地在大鼠消化道定居。图4示出BH主要存在于盲肠中。引人注意的是, 图5示出施用BH诱导大鼠粪便中肠杆菌的统计上显著的减少, 如通过qPCR所检测的。

[0177] 实施例3-在IBS的大鼠模型中施用细菌冻干物

[0178] 进一步调查施用布劳特氏菌属氢营养菌 (BH) 菌株DSM 10507/14294的冻干物对于IBS的大鼠模型的影响。将无菌大鼠接种有来自C-IBS (具有便秘) 或U-IBS (未定亚型) 患者的粪便样品。结果在图6中报告并且关于实验的另外的细节在以上附图说明中提供。图6确认施用BH冻干物致使肠杆菌 (其主要是大肠杆菌) 的统计上显著的减少。如所预期的, 还观察到BH增加。

[0179] 实施例4-患者微生物群布劳特氏菌属氢营养菌的比较

[0180] 实施I期临床试验, 其中将布劳特氏菌属氢营养菌 (“Blautix”, 以登录号DSM 10507/14294保藏的菌株) 施用给具有肠易激综合症 (IBS) 的人类患者。在给药时间段 (第1-16天) 期间对患者施用Blautix, 其中清洗时间段为第19-23天。发现Blautix是安全的且耐受性良好的。在第1天、第16天和研究结束 (EOS) 时测量患者微生物群布劳特氏菌属氢营养菌 (Blautix), 其中结果如下:

[0181] 表1:

患者	处理	Blautix 第 1 天		Blautix 第 16 天		Blautix EOS		
		平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD	
[0182]	安慰剂	健康	4.30E+07	8.40E+07	4.79E+07	7.63E+07	3.59E+07	6.23E+07
	Blautix	健康	2.92E+07	2.25E+07	6.35E+07	1.02E+08	2.58E+07	3.34E+07
	安慰剂	IBS	3.58E+07	3.45E+07	2.44E+07	3.13E+07	2.09E+07	2.47E+07
	Blautix	IBS	3.17E+07	6.28E+07	8.53E+07	1.57E+08	3.71E+07	5.56E+07

[0183] 分析示出患者粪便样品中布劳特氏菌属氢营养菌水平的趋势 (参见图7a)。在给药时间段 (第16天) 之后, 接受Blautix的参与者在其粪便样品中具有增加的细菌水平。这证明Blautix成功递送到肠道。在清洗时间段 (研究结束; EOS) 之后, 所述水平返回至正常。因此,

一旦给药停止,Blautix不永久性地在肠道定居。两个观察与临床前模型一致。

[0184] 实施例5-患者微生物群肠杆菌的比较。

[0185] 也在第1天、第16天和研究结束时在I期临床试验期间测量患者微生物群肠杆菌,其中结果如下:

患者	处理	肠杆菌第 1 天		肠杆菌第 16 天		肠杆菌 EOS	
		平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
[0186] 安慰剂	健康	5.89E+08	1.00E+09	3.32E+08	6.26E+08	2.85E+08	4.28E+08
Blautix	健康	9.96E+08	1.06E+09	4.87E+08	6.64E+08	2.70E+08	3.76E+08
安慰剂	IBS	7.85E+08	1.28E+09	3.01E+08	4.92E+08	2.45E+09	2.45E+09
Blautix	IBS	8.38E+09	1.96E+10	1.12E+09	1.45E+09	6.17E+08	9.91E+08

[0187] 分析示出患者粪便样品中肠杆菌水平的趋势(参见图7b)。用Blautix处理的IBS患者具有肠杆菌减少。这与来自临床前模型的观察一致。

[0188] 实施例6-氢呼吸测试结果

[0189] 呼吸氢水平是Blautix活性的生物标记物-MoA涉及内源性H₂的代谢以产生乙酸盐。对人类受试者施用乳果糖,并且在四个时间点处对氢(H₂)水平(C_{max})进行采样:第1天、第2天、第15天和第16天。将氢未校正结果转化为氢校正结果。

[0190] 从分析中排除一些点。关于受试者为何未包括在氢呼吸测试分析中,存在三个原因:1)他们在四个采样天数中的一个上产生<20的C_{MAX}氢呼吸测试结果,并且因此被认为不对测试产生应答;2)他们是甲烷产生者(被认为在呼吸测试中产生比氢多的甲烷),这影响氢响应;和/或3)存在在氢呼吸测试中获得的异常值(232ppm)。受试者3.12(Blautix)、3.24(Blautix)、4.07(Blautix)作为非响应者被排除。受试者3.03(Blautix)和3.08(安慰剂)作为甲烷产生者被排除(如以上被排除而提及的,4.07也是甲烷产生者)。受试者4.09(安慰剂)由于异常值而被排除。

[0191] 将来自给药时间段结束(第15/16天)的校准氢分析的结果与来自基线(第1/2天)的那些结果进行比较。接受Blautix的12位患者中10位(83%)在此时间段内具有氢水平的降低(图8a和图8c)。相比之下,接受安慰剂的6位患者中3位(50%)具有降低的氢水平(图8b和图8c)。

[0192] 图9示出Blautix(Verum)处理组的未校正和校正的氢结果连同结果的统计分析。发现未校正和校正的H₂两者的平均值在第1天与第15天之间不同。在13.5天的处理之后,在乳果糖刺激之后检测到C_{max}呼吸测试中H₂的统计上显著的(p<0.05)降低。相比之下,对于安慰剂组,发现第1天和第15天的平均值相等(p>0.05)(图10)。因此,对于未校正的氢结果和校正的氢结果两者,处理组(还称为VERUM组)的平均值在第1天与第15天之间降低,而安慰剂组的平均值在第1天与第15天之间相等(图11)。

[0193] 实施例7-稳定性测试

[0194] 含有本文所述的至少一种细菌菌株的本文所述的组合物保存在25°C或4°C下的密封容器中,并且所述容器置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的气氛中。在1月、2月、3月、6月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年之后,至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株仍保留,如通过标准方案以菌落形成单位所测量的。

[0195] 实施例8-布劳特氏菌属氢营养菌改变人类微生物群相关大鼠(HMA大鼠)模型中的

微生物群的能力

[0196] 概述

[0197] 将16只无菌大鼠的组(对照组中包括8只大鼠并且处理组中包括8只大鼠)接种有来自人类IBS受试者的粪便微生物群(IBS-HMA大鼠)。使用来自3位不同IBS患者的粪便样品实施三个连续实验。将另外两组的大鼠(n=10)接种有健康受试者(n=2个受试者;2组健康-HMA大鼠)的粪便样品作为对照。因此,存在24只IBS-微生物群相关大鼠(对照),24只用Blautix处理的IBS微生物群相关大鼠和20只健康-微生物群相关大鼠。然后对一半IBS-HMA大鼠施用根据本发明的包含布劳特氏菌属氢营养菌的细菌菌株的组合物,而另一半动物接受对照溶液。在施用之后第28天,分析来自粪便微生物群的微生物的水平,先前发现在IBS患者中受影响。

[0198] 菌株

[0199] 布劳特氏菌属氢营养菌(BH)菌株DSM 10507^T/14294。

[0200] 组合物和施用

[0201] 将BH冻干物在无菌矿物质溶液中悬浮至 10^{10} 个细菌/ml的浓度。通过口服管饲法每天对每只IBS-HMA大鼠施用2ml的此悬浮液,持续28天时间段。

[0202] 对照溶液是无菌矿物质溶液,其通过口服管饲法每天施用(2ml/大鼠)给对照组的IBS-HMA大鼠。

[0203] 大鼠

[0204] 将无菌雄性Fisher大鼠(10周大年龄)接种有来自IBS受试者的人类粪便微生物群(IBS-HMA大鼠)。将十六只大鼠接种有相同的人类粪便接种物。使用来自三位不同IBS受试者的粪便样品执行三个连续实验。将另外两组的十只大鼠接种有来自2位健康受试者的粪便样品(正常敏感性对照组)。

[0205] 研究设计

[0206] 第-14天-将无菌大鼠接种有人类粪便微生物群。

[0207] 第0天至第28天-通过口服管饲法每天给药BH冻干物(测定组)或对照溶液(对照组)

[0208] 第0、14和28天-采集粪便样品用于微生物分析:qPCR,用于使用选择性培养基和严格厌氧的方法评估BH群体和微生物的其他共生组以及微生物的功能组的枚举。

[0209] 结果

[0210] 图12呈现来自接受对照溶液或BH冻干物的IBS-HMA大鼠的粪便样品中的布劳特氏菌属氢营养菌群体的qPCR分析的结果。在接受BH冻干物的大鼠中在施用时间段结束(D 28)时观察到BH群体的显著增加,这确认BH成功递送在结肠中。

[0211] 图13报告施用布劳特氏菌属氢营养菌对于粪便微生物群中的某些微生物的影响,发现所述某些微生物在IBS患者中受影响。在布劳特氏菌属氢营养菌施用之后,肠杆菌菌种的水平降低。

[0212] 结论

[0213] 施用布劳特氏菌属氢营养菌引起肠杆菌的减少。

[0214] 实施例9-I期临床试验期间患者症状的变化

[0215] 实施I期临床试验,其中将布劳特氏菌属氢营养菌(“Blautix”,以登录号DSM

10507并且还以登录号DSM 14294保藏的菌株)施用给具有肠易激综合症(IBS)的人类患者。在给药时间段(第1-16天)期间对患者施用Blautix,其中清洗时间段为第19-23天。发现Blautix是安全的且耐受性良好的。监测四种症状,其中一种是腹泻。研究记录患者是否经历这些症状中的每种的改善、没有变化或恶化。将来自施用Blautix的患者的结果与使用施用安慰剂的患者获得的结果进行比较。在三个时间点处监测症状:第1天、第15/16天和研究结束时。结果在图14和图15中示出。

[0216] 当在第16天的患者的报告症状与来自第1天的基线进行比较时,接受Blautix的17位IBS患者中的82%报告症状的改善(图14)。症状(其中一种是腹泻)的改善支持Blautix用于治疗或预防腹泻的用途。

[0217] 接受安慰剂的患者中的50%报告症状的改善(图14)。高安慰剂应答速率是在IBS临床研究中建立的现象。基于相对于安慰剂的远远较小的改善,Xifaxan最近被批准用于治疗IBS(参见:<http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml>)。

[0218] 基于在此呈现的教义,预期与在给药完成(第16天)后存在的症状相比在研究完成(第19-23天)时的症状的恶化。此症状恶化在I期临床试验中看到:在Blautix给药停止之后,41%的IBS患者报告症状的恶化(图15)。因此,在Blautix给药停止之后症状(其中一种是腹泻)的恶化也支持Blautix在治疗或预防腹泻中的用途。

[0219] 序列

[0220] SEQ ID NO:1(粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1 16S核糖体RNA基因,部分序列-HM626177)

```

1  tgcaagtoga  gccaagcgct  tacgacagaa  ccttcggggg  aagatgtaag  ggactgagcg
[0221] 61  gcgagcgggt  gagtaacgcg  tgggtaacct  gcctcataca  gggggataac  agttggaaac
121  ggctgctaata  accgcataag  cgcacgggat  cgcatgatac  agtgtgaaaa  actccgggtg
181  tatgagatgg  acccgctct  gattagctag  ttggaggggt  aacggcccac  caaggcgacg
241  atcagtagcc  ggcctgagag  ggtgaacggc  cacattggga  ctgagacacg  gcccagactc
301  ctacgggagg  cagcagtggg  gaatattgca  caatggggga  aaccctgatg  cagcgacgcc
361  gcgtgaagga  agaagtatct  cggtatgtaa  acttctatca  gcaggaaga  aatgacgggt
421  acctgactaa  gaagccccg  ctaactacgt  gccagcagcc  gcggaatac  gtagggggca
481  agcgttatcc  ggatttactg  ggtgtaaagg  gagcgtagac  ggaagagcaa  gtctgatgtg
541  aaaggctggg  gcttaacccc  aggactgcat  tggaaactgt  ttttcttgag  tgccggagag
601  gtaagcggaa  ttctagtgt  agcggtgaaa  tgcgtagata  ttaggaggaa  caccagtggc
661  gaaggcggct  tactggacgg  taactgacgt  tgaggctcga  aagcgtgggg  agcaaacagg
721  attagatacc  ctggtagtcc  acgccgtaa  cgatgaatac  taggtgttg  ggagcaaagc
[0222] 781  tcttcggtgc  cgcagcaaac  gcaataagta  ttccacctgg  ggagtacgtt  cgcaagaatg
841  aaactcaaag  gaattgacgg  ggacccgcac  aagcggtgga  gcatgtgggt  taattcgaag
901  caacgcgaag  aacctacca  agtcttgaca  tcgatctgac  cggttcgtaa  tggaaccttt
961  ccttcgggac  agagaagaca  ggtggtgcat  gggtgtcgtc  agctcgtgtc  gtgagatggt
1021  gggttaagtc  ccgcaacgag  cgcaaccct  atcctcagta  gccagcaggt  gaagctgggc
1081  actctgtgga  gactgccagg  gataacctgg  aggaaggcgg  ggacgacgtc  aatcatcat
1141  gcccttatg  atttgggcta  cacacgtgct  acaatggcgt  aaacaaagg  aagcgagccc
1201  gcgaggggga  gcaaatcca  aaaataacgt  cccagttcgg  actgcagtct  gcaactcgac
1261  tgacgaagc  tggaatcgct  agtaatcgcg  aatcagaatg  tcgcggtgaa  tacgttcccc
1321  ggtctgttac  acaccgccc  tcacaccatg  ggagtcagta  acgcccgaag  tc

```

[0223] SEQ ID NO:2 (韦氏布劳特氏菌菌株WAL 14507 16S核糖体RNA基因,部分序列-EF036467)

1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtgggat
181 aagatggacc cgcgttggat tagcttgttg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgcccgcg
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacgggtacc
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg gggggcaagc
481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
601 agcgggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
781 ttcggtgccc tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
841 actcaaagga attgacgggg acccgcaaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
901 acgcaagaa cttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc
961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgcatg ttgtcgtcag ctctgtctgt gagatgttgg
1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggact
1081 ctggggagac tgccaggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1141 cttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggag cgagattgtg
1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac gttcccgggt
1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

[0224]

[0225] SEQ ID NO:3 (粪便布劳特氏菌菌株830的共有16S rRNA序列)

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT
CGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGTAACCTGCCTCATAACGGGGATAACA
GTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGAAA
CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAATATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGG
TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
ACTGGGTGTAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
AACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGTAAGTACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
TAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTT
TCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCAA
CGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAGTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
AAGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCCGGTCAC
ACCATGGGAGTCAGTAACGCCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGGGGATTGATAACTG
GGTGAAGTCTAGGGGT

[0226]

[0227] SEQ ID NO:4 (韦氏布劳特氏菌菌株MRX008的共有16S rRNA序列)

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGT CAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
 GTGGACTGCATTGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTGNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTG
 CCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATGACGGGGACCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAGTCTTGACATCCGCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GGGCTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA
 CACACCGCCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCACTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

[0228]

[0229] SEQ ID NO:5 (布劳特氏菌属氢营养菌菌株S5a36 16S核糖体RNA基因,部分序列-
 X95624.1)

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
 61 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcy tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagcctt
 181 cgcatagaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggtatg acccgcttg gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaa
 421 acttctatca gcaggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccg ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggtaatac gtaagggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcctagtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcgcc tgctggacgg taactgacgt
 [0230] 721 tgaggctcga aagcgtggg agcaaacag attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaag cattcgggtc cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtagct tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgca
 901 caagcgtgg agcatgtggt ttaattcga gcaacgcgaa gaaccttacc aaatctgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcgaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctgg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaagtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaag ggtgacctg agcaaatctc aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc ggtcttgta cacaccgcc gtcacacat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaag gagggagctg ccgaaggtgg
 1441 gactgataac tggggtga

[0231] 参考文献

[0232] [1] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol.9(4):279-90.

- [0233] [2]Eckburg et al. (2005) *Science*.10:308 (5728) :1635-8.
- [0234] [3]Tap et al. (2009) ,*Environ Microbiol*,11 (10) :2574-84.
- [0235] [4]Macpherson et al. (2001)*Microbes Infect*.3 (12) :1021-35
- [0236] [5]Macpherson et al. (2002)*Cell Mol Life Sci*.59 (12) :2088-96.
- [0237] [6]Mazmanian et al. (2005)*Cell* 15:122 (1) :107-18.
- [0238] [7]Frank et al. (2007)*PNAS* 104 (34) :13780-5.
- [0239] [8]Scanlan et al. (2006)*J Clin Microbiol*.44 (11) :3980-8.
- [0240] [9]Kang et al. (2010)*Inflamm Bowel Dis*.16 (12) :2034-42.
- [0241] [10]Machiels et al (2013)*Gut*.63 (8) :1275-83.
- [0242] [11]Lopetuso et al. (2013) ,*Gut Pathogens*,5:23
- [0243] [12]WO 2013/050792
- [0244] [13]WO 03/046580
- [0245] [14]WO 2013/008039
- [0246] [15]WO 2014/167338
- [0247] [16]Lee and Lee (2014)*World J Gastroenterol*.20 (27) :8886-8897.
- [0248] [17]Liu et al. (2008)*Int J Syst Evol Microbiol* 58,1896-1902.
- [0249] [18]Bernalier et al. (1996)*Arch.Microbiol*.166 (3) ,176-183.
- [0250] [19]Park et al. (2012)*Int J Syst Evol Microbiol*.62 (Pt 4) :776-9.
- [0251] [20]Masco et al. (2003)*Systematic and Applied Microbiology*,26:557-563.
- [0252] [21]Srutková et al. (2011)*J.Microbiol.Methods*.87 (1) :10-6.
- [0253] [22]Darfeuille-Michaud et al. (2004)*Gastroenterology* 127 (2) :412-21.
- [0254] [23]Strus et al. (2015)*Cent Eur J Immunol*.40 (4) :420-30.
- [0255] [24]Petersen et al. (2015)*Scand J Gastroenterol.*:50 (10) :1199-207.
- [0256] [25]Miyamoto-Shinohara et al. (2008)*J.Gen.Appl.Microbiol.*,54,9-24.
- [0257] [26]*Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*,ed.by Day and McLellan,Humana Press.
- [0258] [27]Leslie et al. (1995)*Appl.Environ.Microbiol*.61,3592-3597.
- [0259] [28]Mitropoulou et al. (2013)*J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [0260] [29]Kailasapathy et al. (2002)*Curr Issues Intest Microbiol*.3 (2) :39-48.
- [0261] [30]*Handbook of Pharmaceutical Excipients*,2nd Edition, (1994) ,Edited by A Wade and PJ Weller
- [0262] [31]*Remington's Pharmaceutical Sciences*,Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985)
- [0263] [32]US 2016/0067188
- [0264] [33]*Handbook of Microbiological Media*,Fourth Edition (2010) Ronald Atlas,CRC Press.
- [0265] [34]*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C.Hunter-Cevera,Academic Press
- [0266] [35]Strobel (2009)*Methods Mol Biol*.581:247-61.

- [0267] [36]Gennaro (2000)Remington:TheScience and Practice of Pharmacy.20th edition,ISBN:0683306472.
- [0268] [37]Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course,(Ream et al.,eds.,1998,Academic Press).
- [0269] [38]Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan,eds.,Academic Press,Inc.)
- [0270] [39]Handbook of Experimental Immunology,Vols.I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds,1986,Blackwell Scientific Publications)
- [0271] [40]Sambrook et al. (2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [0272] [41]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi,K.S.ed.,CRC Press,1997)
- [0273] [42] Ausubel et al. (eds) (2002)Short protocols in molecular biology, 5thedition (Current Protocols).
- [0274] [43]PCR (Introduction to Biotechniques Series),2nd ed. (Newton&Graham eds.,1997,Springer Verlag)
- [0275] [44]Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel et al.,eds., 1987) Supplement 30
- [0276] [45]Smith&Waterman (1981) Adv.Appl.Math.2:482-489.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 4D PHARMA PLC公司
- [0003] <120> 包含细菌菌株的组合物
- [0004] <130> P068629W0
- [0005] <141> 2017-07-13
- [0006] <150> GB 1612190.7
- [0007] <151> 2016-07-13
- [0008] <150> GB 1616018.6
- [0009] <151> 2016-09-20
- [0010] <150> GB 1616016.0
- [0011] <151> 2016-09-20
- [0012] <150> GB 1703548.6
- [0013] <151> 2017-03-06
- [0014] <150> GB 1703552.8
- [0015] <151> 2017-03-06
- [0016] <160> 5
- [0017] <170> SeqWin2010,1.0版
- [0018] <210> 1
- [0019] <211> 1372
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> 粪便布劳特氏菌 (*Blautia stercoris*)
- [0022] <400> 1
- [0023] tgcaagtcga gcaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg 60
- [0024] gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agtttgaaac 120
- [0025] ggctgctaat accgcataag cgacaggtat cgcatgatac agtgtgaaaa actccgggtg 180
- [0026] tatgagatgg acccgctct gattagctag ttggaggggt aacggcccaac caaggcgacg 240
- [0027] atcagtagcc gccctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc 300
- [0028] ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc 360
- [0029] gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcaggaaga aaatgacggt 420
- [0030] acctgactaa gaagccccg ctaactacgt gccagcagcc gcggtatac gtagggggca 480
- [0031] agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gacgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg 540
- [0032] aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag 600
- [0033] gtaagcgaa ttctagtgt agcgggaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc 660
- [0034] gaagcggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg 720
- [0035] attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg ggagcaaagc 780
- [0036] tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg 840
- [0037] aaactcaaag gaattgacgg ggaccgcac aagcgggtga gcatgtggtt taattcgaag 900
- [0038] caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt 960
- [0039] ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctgctc agctcgtgctc gtgagatggt 1020
- [0040] gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt gaagctgggc 1080
- [0041] actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgctc aaatcatcat 1140

[0042]	gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc	1200
[0043]	gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac	1260
[0044]	tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccc	1320
[0045]	ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc	1372
[0046]	<210>	2
[0047]	<211>	1438
[0048]	<212>	DNA
[0049]	<213>	韦氏布劳特氏菌 (<i>Blautia wexlerae</i>)
[0050]	<220>	
[0051]	<221>	misc_feature
[0052]	<222>	19
[0053]	<223>	'n' 是a、c、g或t
[0054]	<400>	2
[0055]	caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg	60
[0056]	gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc	120
[0057]	tgctaatacc gcataagcgc acagagetgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat	180
[0058]	aagatggacc cgcgttgat tagcttggtg gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc	240
[0059]	catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta	300
[0060]	cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg	360
[0061]	tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtagc	420
[0062]	tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaataccta gggggcaagc	480
[0063]	gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa	540
[0064]	ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta	600
[0065]	agcgggaattc ctagttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa	660
[0066]	ggcggettac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt	720
[0067]	agataacctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca	780
[0068]	ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa	840
[0069]	actcaaagga attgacgggg acccgacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca	900
[0070]	acgcaagaa cttaccaag tcttgacatc cgectgaccg atccttaacc ggatctttcc	960
[0071]	ttcgggacag gcgagacagg tggatcatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttgg	1020
[0072]	gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggact	1080
[0073]	ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc	1140
[0074]	ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggag cgagattgtg	1200
[0075]	agatggagca aatccccaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac	1260
[0076]	acgaagctgg aatcgctagt aatcgcgat cagaatgccg cggatgaatac gttccccggg	1320
[0077]	cttgtagaca ccgccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac	1380
[0078]	tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt	1438
[0079]	<210>	3
[0080]	<211>	1481
[0081]	<212>	DNA
[0082]	<213>	粪便布劳特氏菌 (<i>Blautia stercoris</i>)
[0083]	<220>	

[0084]	<221>	misc_feature	
[0085]	<222>	4	
[0086]	<223>	k是g或t	
[0087]	<400>	3	
[0088]		tttkgtctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgagcgaagc	60
[0089]		gcttacgaca gaaccttcgg gggaagatgt aagggactga gcggcggacg ggtgagtaac	120
[0090]		gcgtgggtaa cctgcctcat acaggggat aacagttgga aacggctgct aataccgcat	180
[0091]		aagcgcacag tatcgcatga tacagtgtga aaaactccgg tggatgaga tggacccgcg	240
[0092]		tctgattagc tagttggagg ggtaacggcc caccaaggcg acgatcagta gccggcctga	300
[0093]		gagggtgaac ggccacattg ggactgagac acggcccaga ctctacggg aggcagcagt	360
[0094]		ggggaatatt gcacaatggg ggaacctctg atgcagcgac gccgcgtgaa ggaagaagta	420
[0095]		tctcggtatg taaacttcta tcagcagga agaaaatgac ggtacctgac taagaagccc	480
[0096]		cggctaacta cgtgccagca gccgcgtaa tacgtagggg gcaagcgta tccgattta	540
[0097]		ctgggtgtaa agggagcgtg gacggaagag caagtctgat gtgaaaggct ggggcttaac	600
[0098]		cccaggactg cattggaaac tgtttttctt gagtgccgga gaggtaagcg gaattcctag	660
[0099]		tgtagcgtg aatgcgtag atattaggag gaaccaccgt ggcaaggcg gcttactgga	720
[0100]		cggtaaactga cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag	780
[0101]		tccacccgt aaacgatgaa tactaggtgt tggggagcaa agctcttcgg tgccgcagca	840
[0102]		aacgcaataa gtattccacc tggggagtac gttcgcaaga atgaaactca aaggaattga	900
[0103]		cggggacccg cacaagcggg ggagcatgtg gtttattcga agcaacgcga agaaccttac	960
[0104]		caagtcttga catcgatctg accggttctg aatggaacct ttccttcggg acagagaaga	1020
[0105]		cagtggtgac atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg	1080
[0106]		agcgaaccc ctatcgtcag tagccagcag gtaaagctgg gcactctgag gagactgcca	1140
[0107]		gggataacct ggaggaaggc ggggacgac tcaaatcatc atgcccctta tgatttgggc	1200
[0108]		tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag ggaagcagc ccgcgagggg gagcaaatcc	1260
[0109]		caaaaataac gtcccagttc ggactgcagt ctgcaactcg actgcacgaa gctggaatcg	1320
[0110]		ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcggtg aatacgttc cgggtcttgt acacaccgcc	1380
[0111]		cgtcacacca tgggagtcag taaccccga agtcagtgac ccaaccttag ggaggagct	1440
[0112]		gccgaaggcg ggattgataa ctgggggtgaa gtctaggggg t	1481
[0113]	<210>	4	
[0114]	<211>	1384	
[0115]	<212>	DNA	
[0116]	<213>	韦氏布劳特氏菌 (<i>Blautia wexlerae</i>)	
[0117]	<220>		
[0118]	<221>	misc_feature	
[0119]	<222>	749	
[0120]	<223>	'n' 是a、c、g或t	
[0121]	<400>	4	
[0122]		ttcattgaga cttcgggtgga tttagattct atttctagtg gcggacgggt gagtaacgcg	60
[0123]		tgggtaacct gccttataca gggggataac agtcagaaat ggctgctaata accgcataag	120
[0124]		cgcacagagc tgcatggctc agtgtgaaaa actccgggtg tataagatgg acccgcgttg	180
[0125]		gattagcttg ttgggtgggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggccctgagag	240

[0126]	ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtggg	300
[0127]	gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct	360
[0128]	cggtatgtaa acttctatca gcaggggaaga tagtgacggt acctgactaa gaagccccgg	420
[0129]	ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagggggca agcgttatcc ggatttactg	480
[0130]	ggtgtaaagg gagcgtagac ggtgtggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg	540
[0131]	tggactgcat tggaaactgt catacttgag tgccggaggg gtaagcggaa ttcctagtgt	600
[0132]	agcggtgaaa tgcgtagata ttagggaggaa caccagtggc gaaggcggt tactggacgg	660
[0133]	taactgacgt tgaggctga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc	720
[0134]	acgccgtaaa cgatgaatac taggtgtcng gggagcatgg ctcttcggtg ccgtcgaaa	780
[0135]	cgcagtaagt attccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaa ggaattgacg	840
[0136]	gggaccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc	900
[0137]	aagtcttgac atccgcctga ccgatcctta accggatctt tccttcggga caggcgagac	960
[0138]	aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga	1020
[0139]	gcgcaacccc tctctcagt agccagcatt taaggtgggc actctgggga gactgccagg	1080
[0140]	gataacctgg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg atttgggcta	1140
[0141]	cacacgtgct acaatggcgt aaacaaagg aagcgagatc gtgagatgga gcaaatccca	1200
[0142]	aaaataacgt cccagttcgg actgtagtct gcaaccgac tacacgaagc tggaatcgt	1260
[0143]	agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtgaa tacgttccc ggtcttgtag acaccgccc	1320
[0144]	tcacccatg ggagttagta acgcccgaag tcagtacct aactgcaaag aaggagctgc	1380
[0145]	cgaa	1384
[0146]	<210>	5
[0147]	<211>	1458
[0148]	<212>	DNA
[0149]	<213>	布劳特氏菌属氢营养菌 (<i>Blautia hydrogenotrophica</i>)
[0150]	<220>	
[0151]	<221>	misc_feature
[0152]	<222>	1416
[0153]	<223>	'n' 是a、c、g或t
[0154]	<400>	5
[0155]	gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga	60
[0156]	tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcgacgggt gagtaacgcg tgggtaacct	120
[0157]	gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt	180
[0158]	cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttg gattagctag	240
[0159]	ttggtgaggt aacggccac caaggcgac atccatagcc ggctgagag ggtgaacggc	300
[0160]	cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca	360
[0161]	caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa	420
[0162]	acttctatca gcaggggaaga aagtacggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt	480
[0163]	gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg	540
[0164]	gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat	600
[0165]	tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa	660
[0166]	tgcgtagata ttagggaggaa caccagtggc gaaggcgcc tgctggacgg taactgacgt	720
[0167]	tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaa	780

[0168]	cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta	840
[0169]	ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggacccgca	900
[0170]	caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac	960
[0171]	atccctctga ccggaagta atgttcctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca	1020
[0172]	tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct	1080
[0173]	tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg	1140
[0174]	gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttggget acacacgtgc	1200
[0175]	tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg	1260
[0176]	tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc	1320
[0177]	gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc ggtcttgta cacaccgcc gtcacacat	1380
[0178]	gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg	1440
[0179]	gactgataac tggggtga	1458

通过q-PCR进行的BH群体的测量

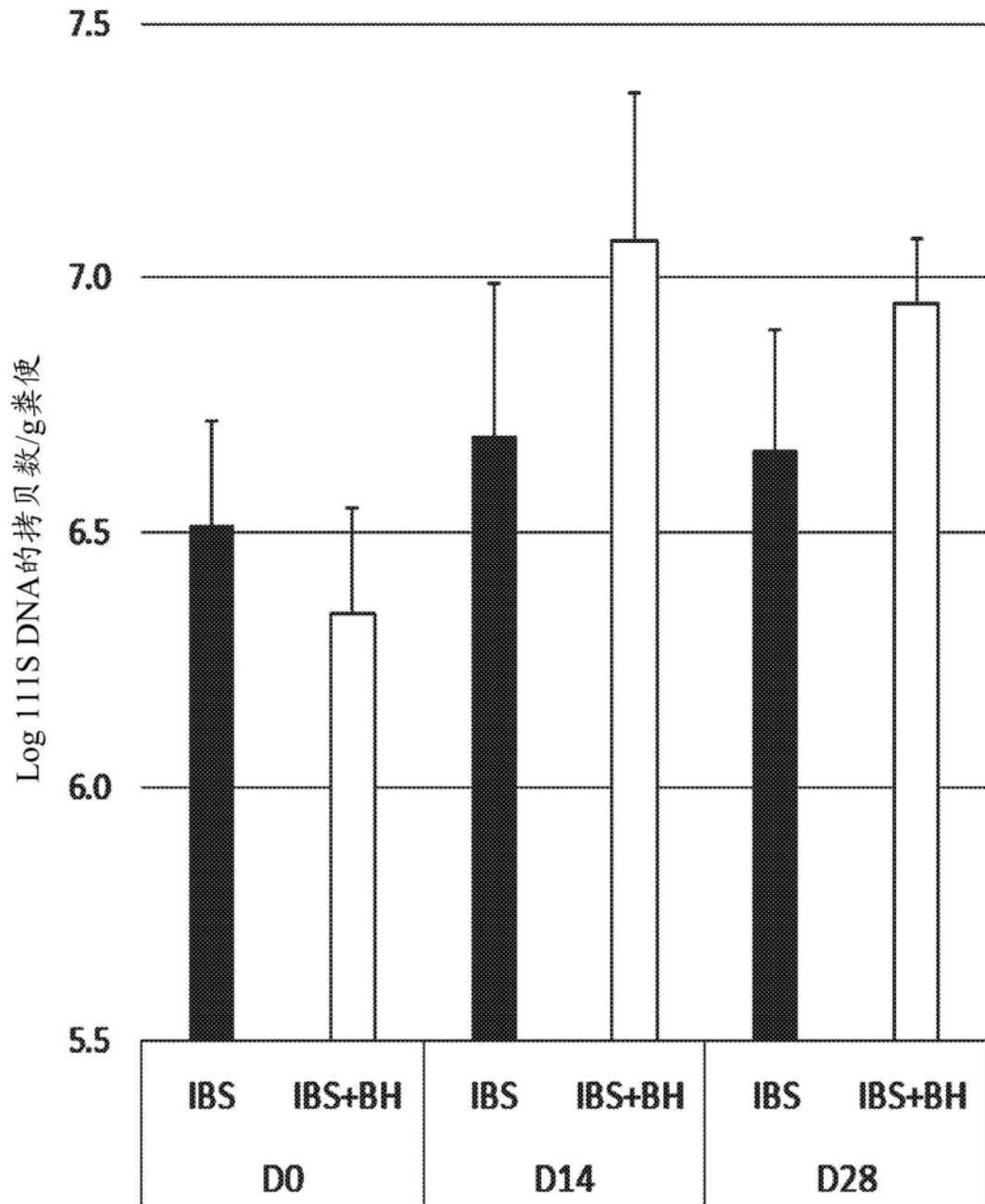


图1

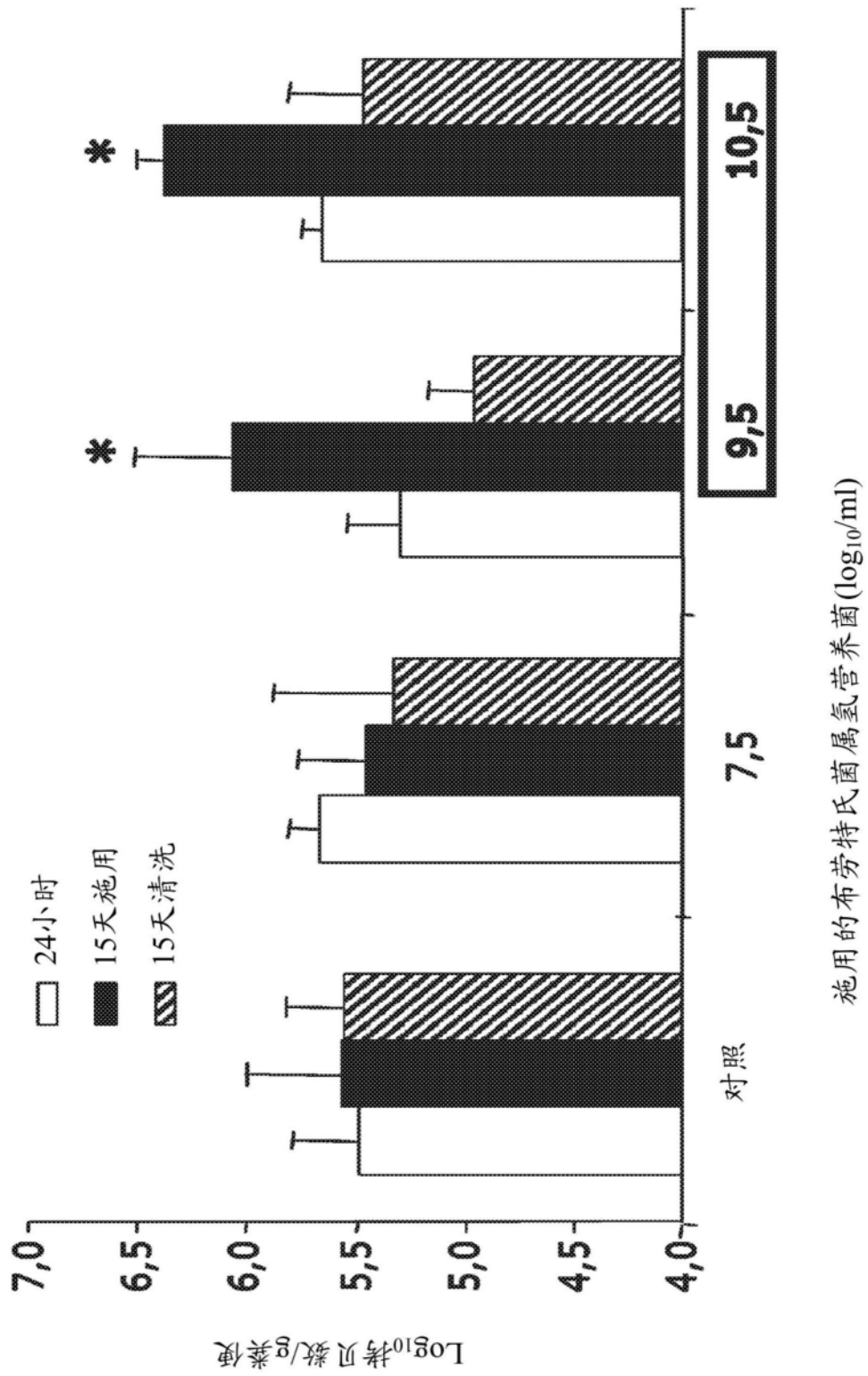


图2

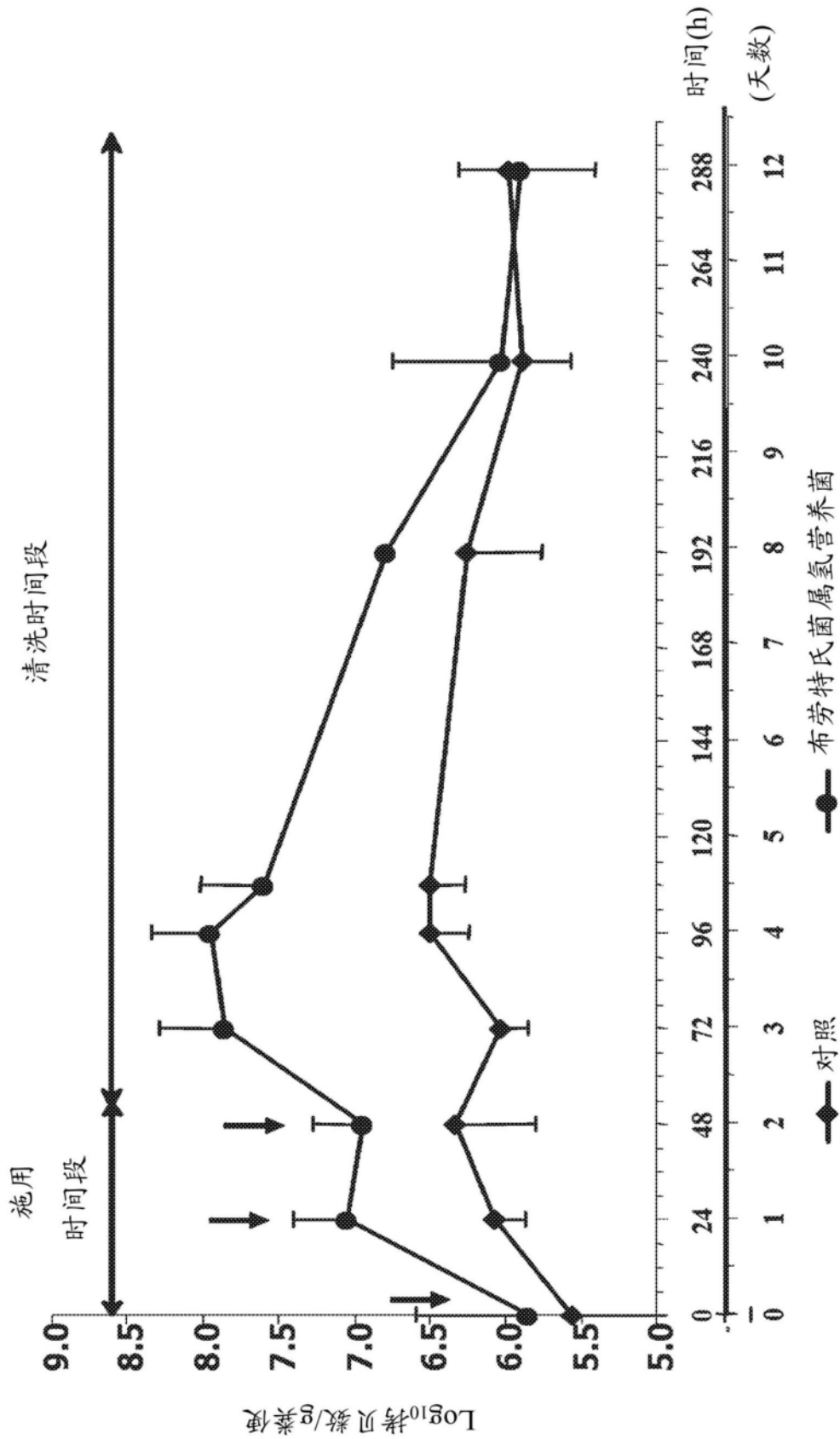


图3

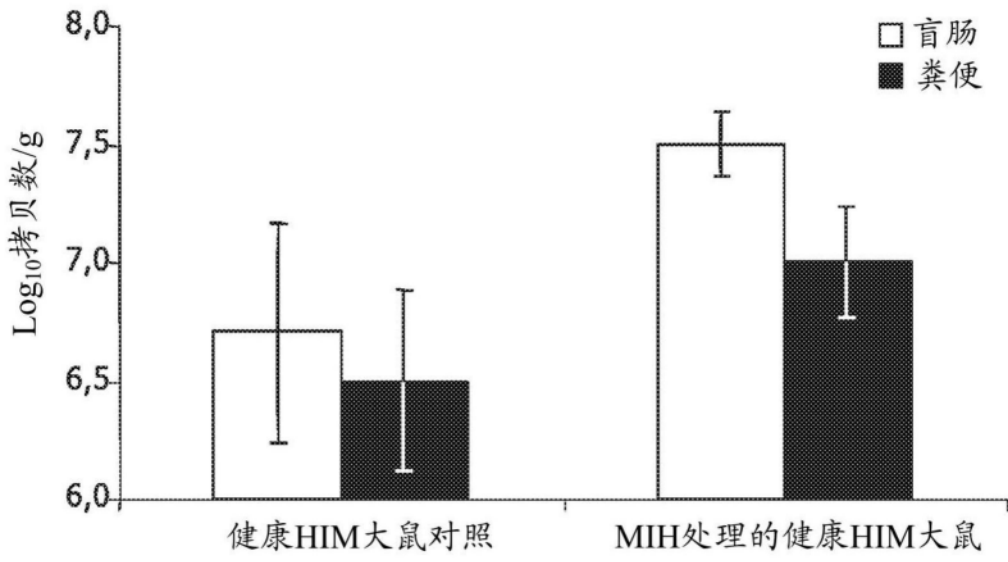


图4

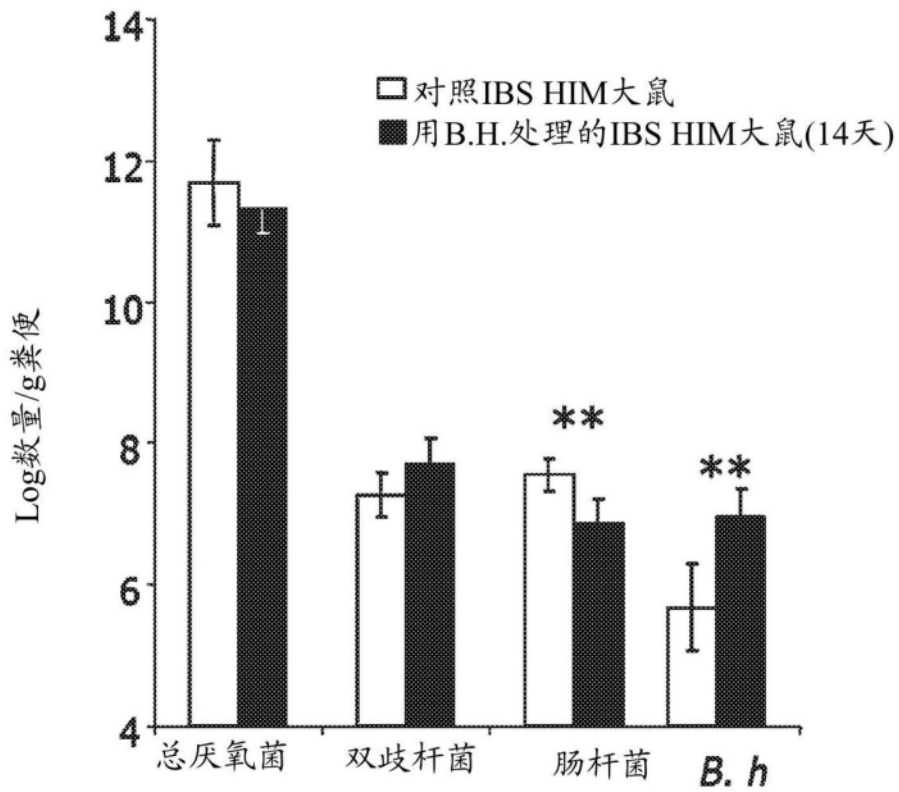


图6

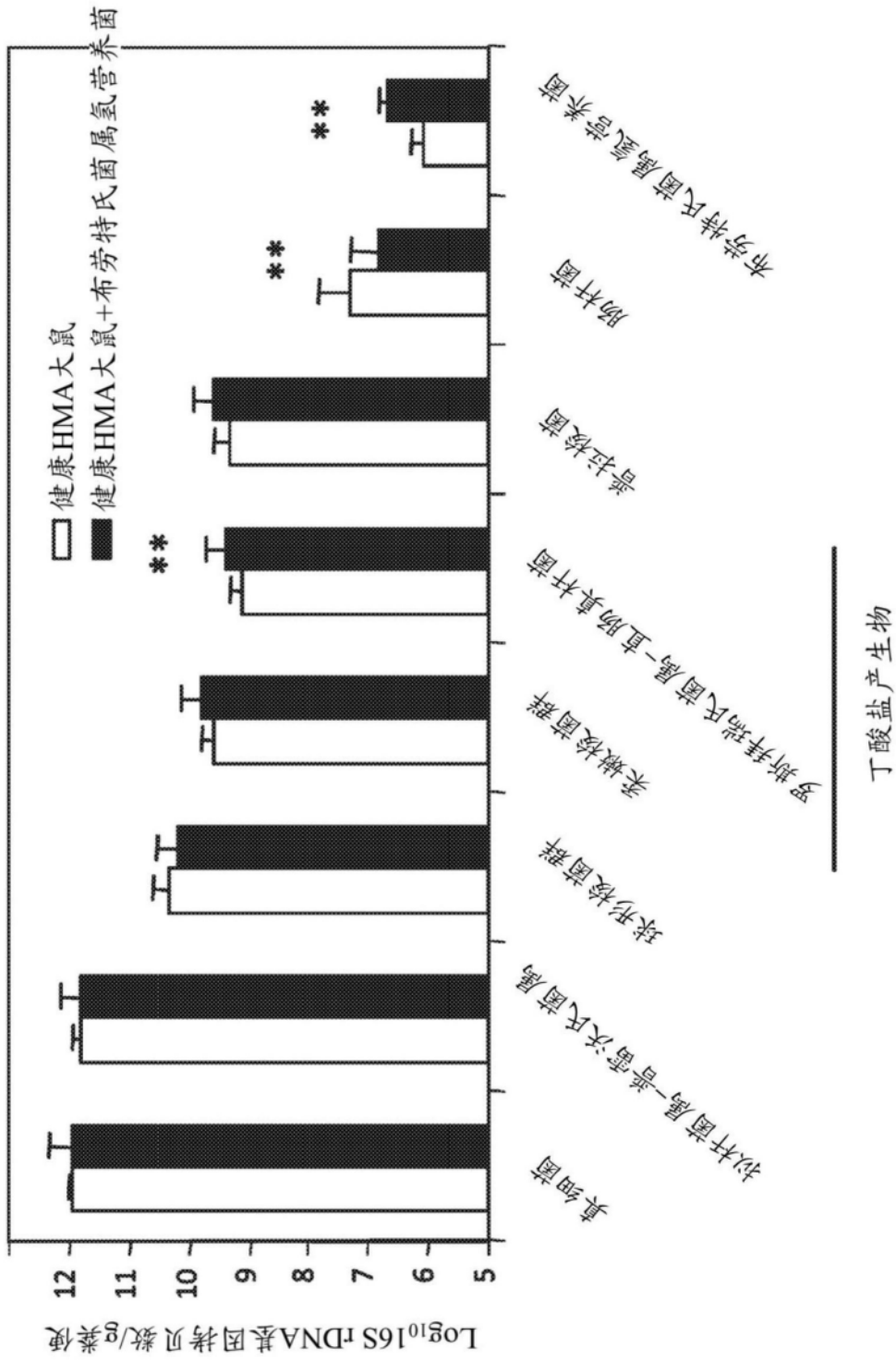


图5

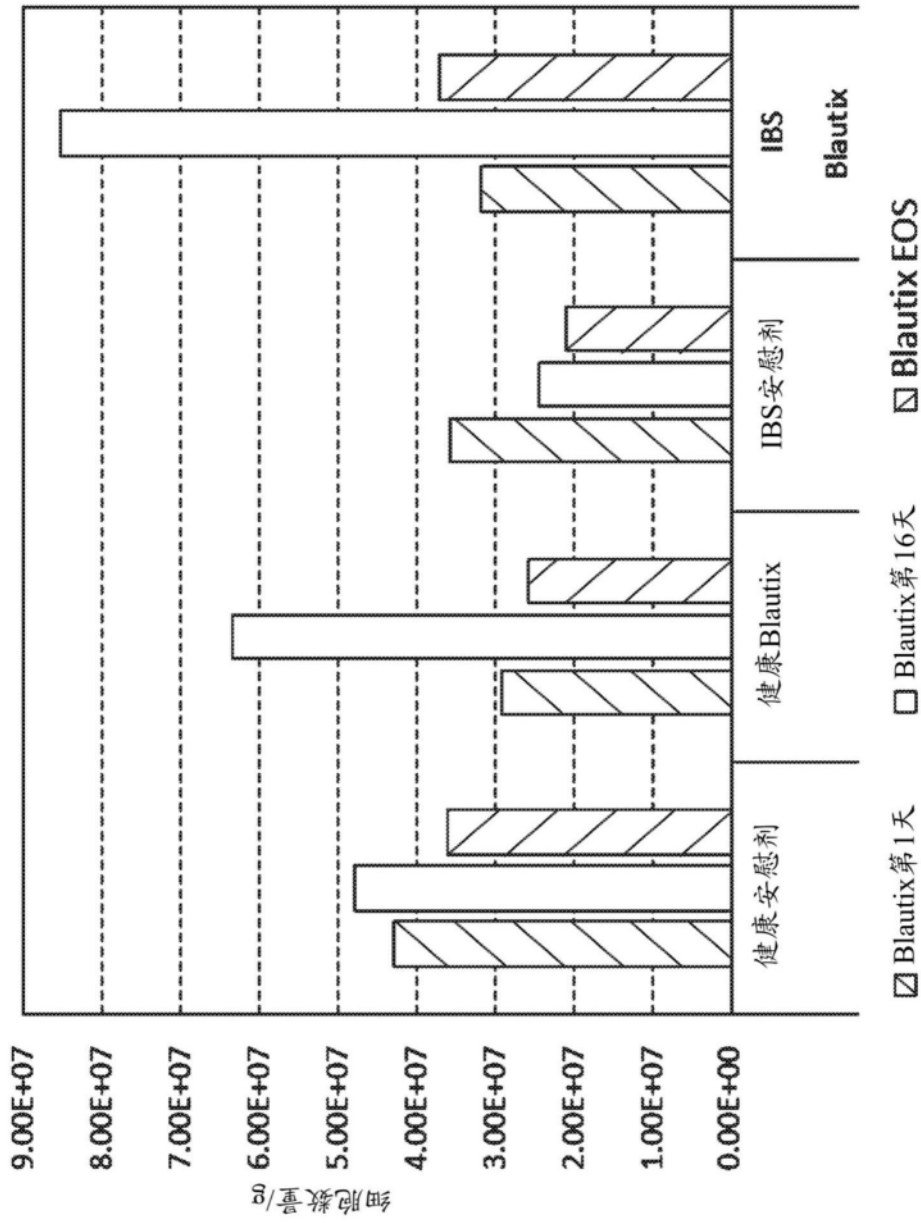


图7a

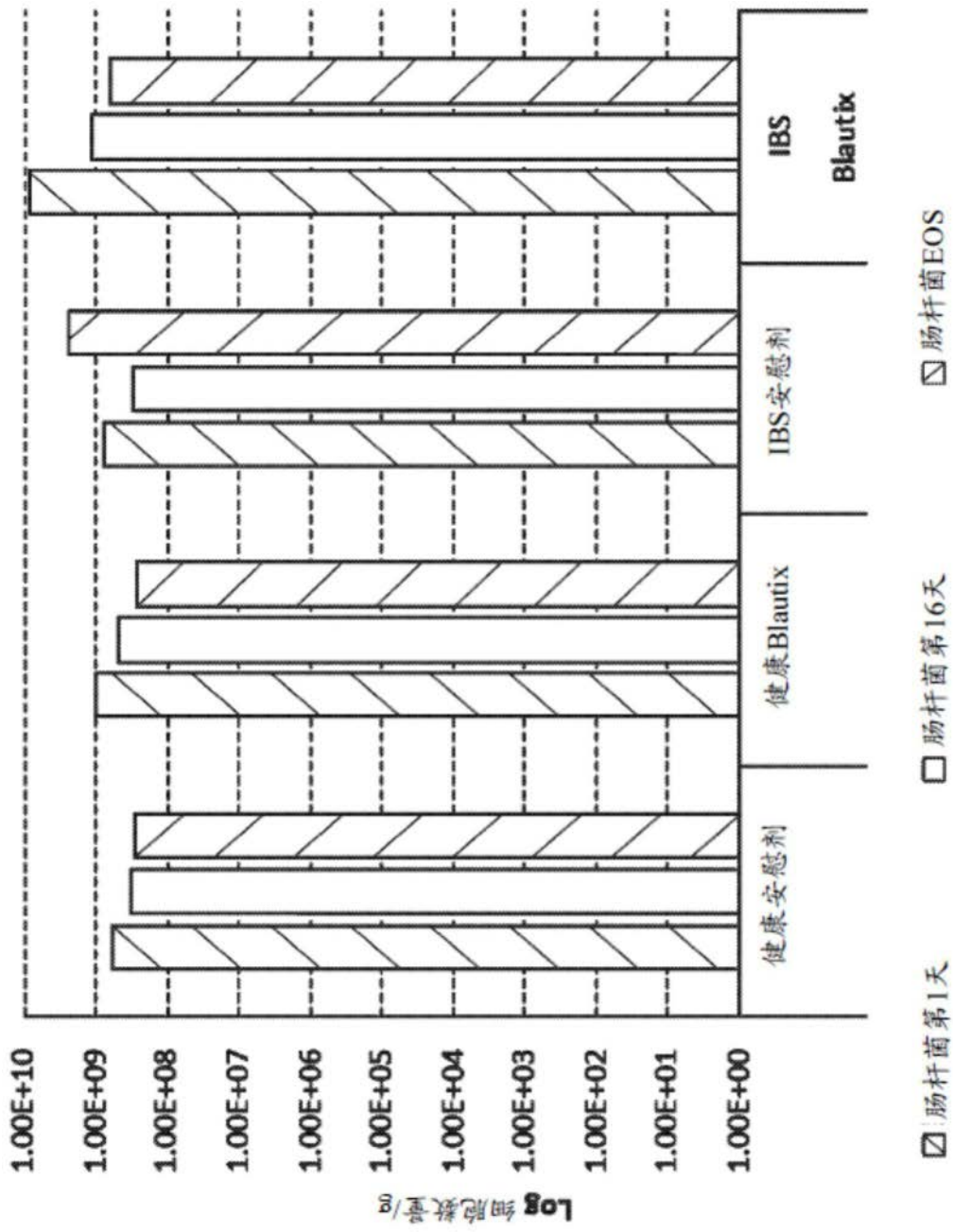


图7b

Blautix 10/12显示氢减少(83%)

患者ID	第1天		第2天		平均值		第15天		第16天		平均值		差值	
	C	MAX	C	MAX	C	MAX	C	MAX	C	MAX	C	MAX	C	MAX
3.02	123.0	94.0	108.5	34.0	74.0	54.0	74.0	34.0	74.0	54.0	74.0	54.0	74.0	-54.5
3.04	70.0	32.0	51.0	25.0	46.0	35.5	46.0	25.0	46.0	35.5	46.0	35.5	46.0	-15.5
3.05	163.0	116.0	139.5	167.0	111.0	139.0	111.0	167.0	111.0	139.0	111.0	139.0	111.0	-0.5
3.07	71.0	69.0	70.0	46.0	80.0	63.0	80.0	46.0	80.0	63.0	80.0	63.0	80.0	-7.0
3.09	121.0	76.0	98.5	66.0	65.0	65.5	65.0	66.0	65.0	65.5	65.0	65.5	65.0	-33.0
3.11	75.0	98.0	86.5	128.0	76.0	102.0	76.0	128.0	76.0	102.0	76.0	102.0	76.0	15.5
3.13	118.0	41.0	79.5	85.0	59.0	72.0	59.0	85.0	59.0	72.0	59.0	72.0	59.0	-7.5
3.15	155.0	99.0	127.0	63.0	87.0	75.0	87.0	63.0	87.0	75.0	87.0	75.0	87.0	-52.0
3.17	134.0	210.0	172.0	139.0	107.0	123.0	107.0	139.0	107.0	123.0	107.0	123.0	107.0	-49.0
3.19	72.0	53.0	62.5	87.0	85.0	86.0	85.0	87.0	85.0	86.0	85.0	86.0	85.0	23.5
3.21	144.0	139.0	141.5	75.0	126.0	100.5	126.0	75.0	126.0	100.5	126.0	100.5	126.0	-41.0
3.22	59.0	71.0	65.0	55.0	34.0	44.5	34.0	55.0	34.0	44.5	34.0	44.5	34.0	-20.5
平均值	108.8	91.5	100.1	80.8	79.2	80.0	80.0	80.8	79.2	80.0	80.0	80.0	80.0	-20.1
SD	37.3	48.4		43.5	26.7			43.5	26.7					26.2
中值	119.5	85.0		70.5	78.0			70.5	78.0					-18.0
														10 (83%)

H₂减少的患者

图8a

安慰剂3/6显示氢减少(50%)

患者ID	第1天		第2天		平均值		第15天		第16天		平均值		差值	
	CMAX		CMAX				CMAX		CMAX				CMAX	
3.06	126.0		91.0		108.5		86.0		131.0		108.5		0.0	
3.10	124.0		168.0		146.0		107.0		88.0		97.5		-48.5	
3.14	55.0		79.0		67.0		53.0		68.0		60.5		-6.5	
3.16	98.0		123.0		110.5		123.0		151.0		137.0		26.5	
3.23	58.0		113.0		85.5		79.0		99.0		89.0		3.5	
4.13	58.0		69.0		63.5		25.0		38.0		31.5		-32.0	
平均值	86.5		107.2		96.8		78.8		95.8		87.3		-9.5	
SD	33.8		36.0		31.2		35.7		41.2		37.0		26.8	
中值	78.0		102.0		97.0		82.5		93.5		93.3		-3.3	
													H ₂ 减少的患者 3 (50%)	

图8b

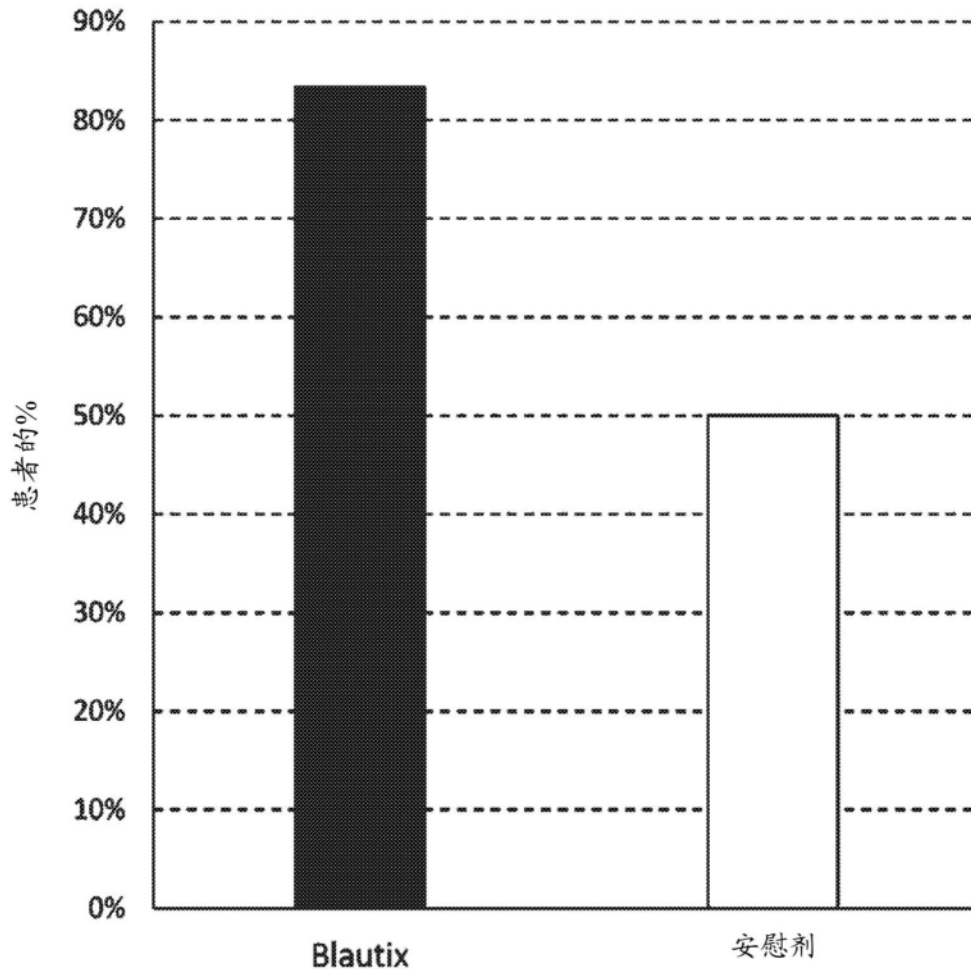


图8c

VERUM组		第1天		第15天		H2校正		随机		第1天		第15天	
数量	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	数量	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX
3.02	89.8	23.0	23.0			3.02	123.0	123.0	123.0	123.0	34.0	34.0	
3.04	68.0	21.0	21.0			3.04	70.0	70.0	70.0	70.0	25.0	25.0	
3.05	130.4	112.8	112.8			3.05	163.0	163.0	163.0	163.0	167.0	167.0	
3.07	56.8	37.6	37.6			3.07	71.0	71.0	71.0	71.0	46.0	46.0	
3.09	96.8	52.8	52.8			3.09	121.0	121.0	121.0	121.0	66.0	66.0	
3.11	63.0	104.9	104.9			3.11	75.0	75.0	75.0	75.0	128.0	128.0	
3.12	12.3	38.7	38.7			3.12	16.0	16.0	16.0	16.0	53.0	53.0	
3.13	110.3	82.5	82.5			3.13	118.0	118.0	118.0	118.0	85.0	85.0	
3.15	115.7	53.8	53.8			3.15	155.0	155.0	155.0	155.0	63.0	63.0	
3.17	97.8	83.7	83.7			3.17	134.0	134.0	134.0	134.0	139.0	139.0	
3.19	51.1	66.1	66.1			3.19	72.0	72.0	72.0	72.0	87.0	87.0	
3.21	144.0	71.4	71.4			3.21	144.0	144.0	144.0	144.0	75.0	75.0	
3.22	52.7	43.9	43.9			3.22	59.0	59.0	59.0	59.0	55.0	55.0	
3.24	27.1	26.7	26.7			3.24	29.0	29.0	29.0	29.0	27.0	27.0	
		单方向T测试	0.02032643								单方向T测试	0.04798585	
平均值	第1天 79.7	第15天 58.5				平均值	第1天 96.4	第15天 75.0					
SD	38.7	29.5				SD	46.5	43.0					
N	14	14				N	14	14					
中值	78.9	53.3				中值	96.5	64.5					
最小值	12.3	21.0				最小值	16.0	25.0					
最大值	144.0	112.8				最大值	163.0	167.0					

图9a

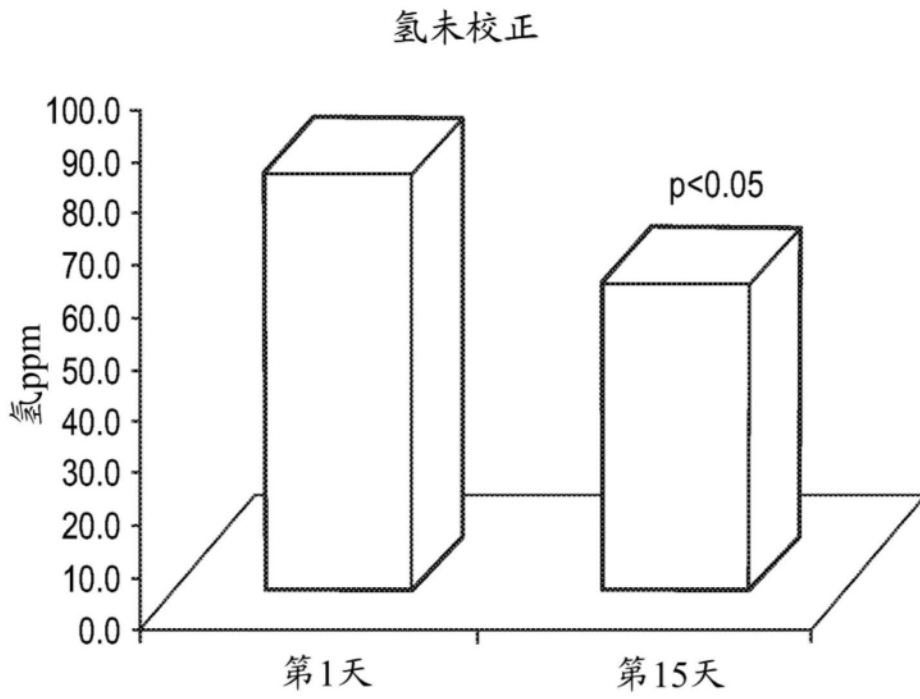


图9b

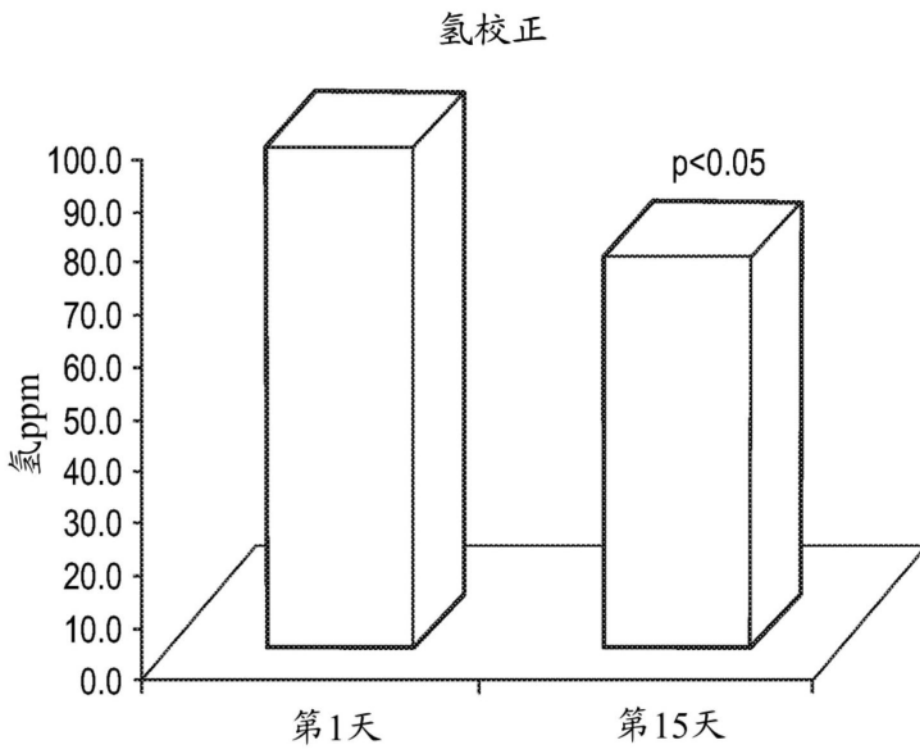


图9c

安慰剂组

随机	第1天	第15天	H2校正	随机	第1天	第15天
数量	C _{MAX}	C _{MAX}		数量	C _{MAX}	C _{MAX}
3.06	103.3	81.9		3.06	126.0	86.0
3.08	42.3	43.3		3.08	55.0	58.0
3.10	97.6	84.3		3.10	124.0	107.0
3.14	35.0	42.4		3.14	55.0	53.0
3.16	59.0	80.9		3.16	98.0	123.0
3.23	41.1	62.2		3.23	58.0	79.0
4.13	53.2	25.0		4.13	58.0	25.0
		单向T测试 0.41620609				单向T测试 0.27096549
平均值	第1天 61.7	第15天 60.0		平均值	第1天 82.0	第15天 75.9
SD	27.7	23.5		SD	33.1	33.5
N	7	7		N	7	7
中值	53.2	62.2		中值	58.0	79.0
最小值	35.0	25.0		最小值	55.0	25.0
最大值	103.3	84.3		最大值	126.0	123.0

图10a

氢未校正安慰剂

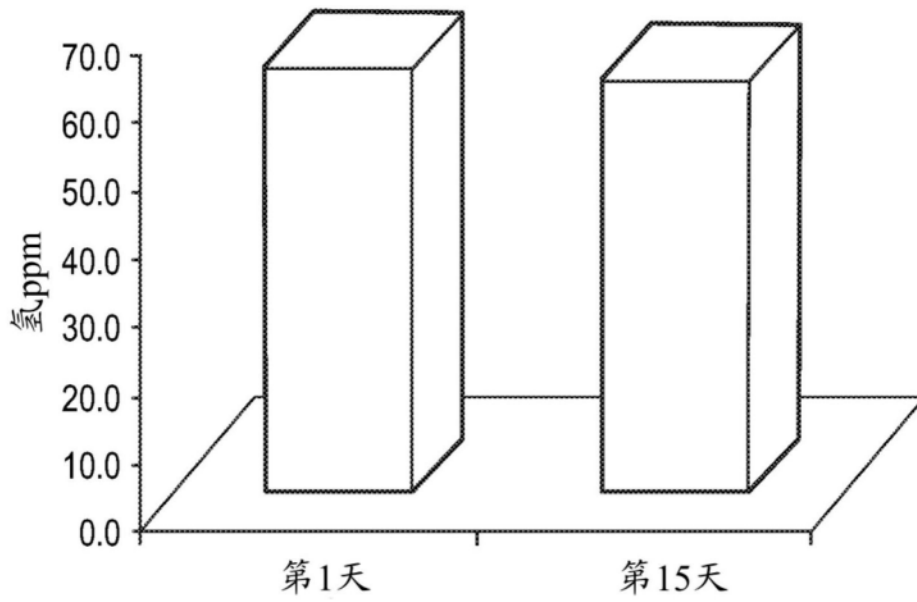


图10b

氢校正安慰剂

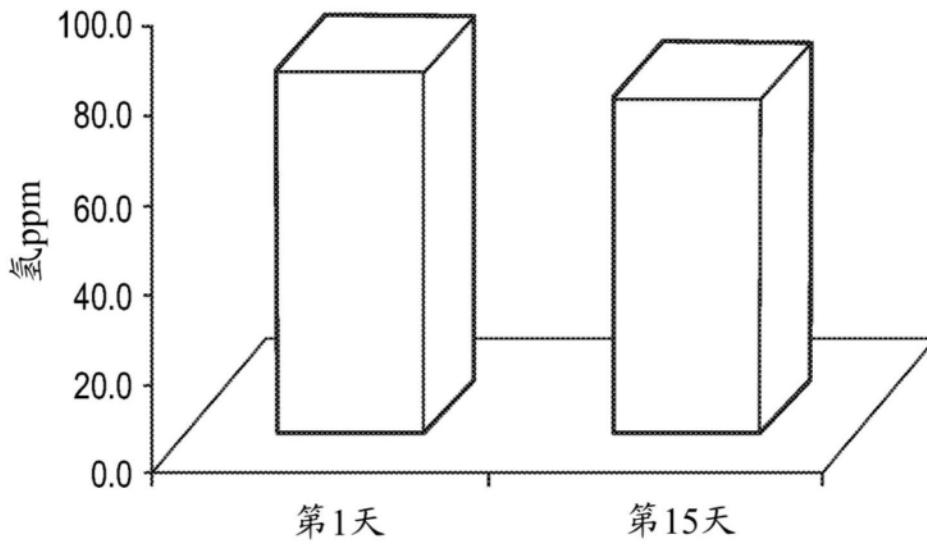


图10c

	第1天	第15天	N
VERUM 组	79.7	58.5	14
安慰剂组	61.7	60	7

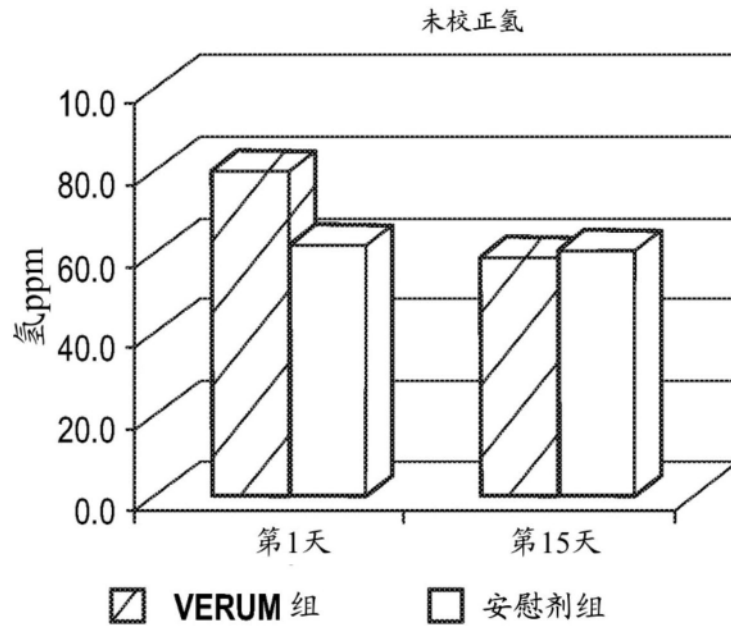


图11a

	第1天	第15天	N
VERUM 组	96.4	75	14
安慰剂组	82	75.9	7

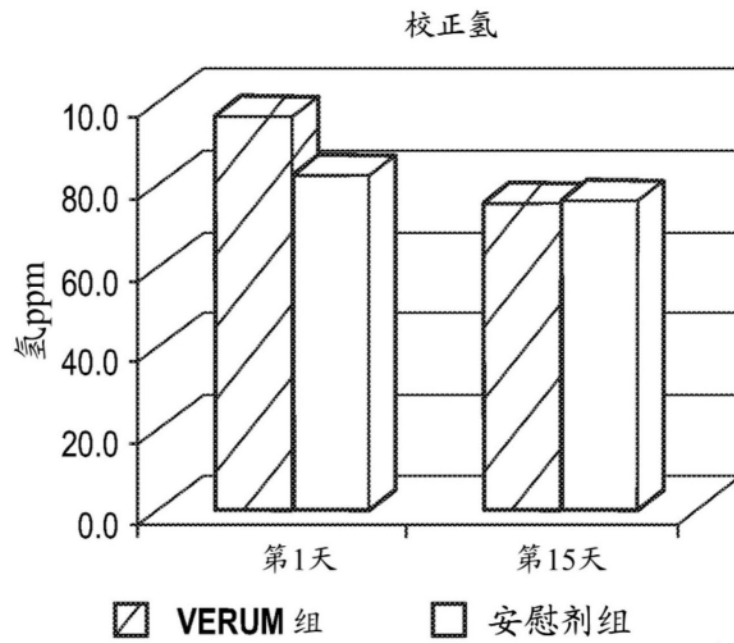


图11b

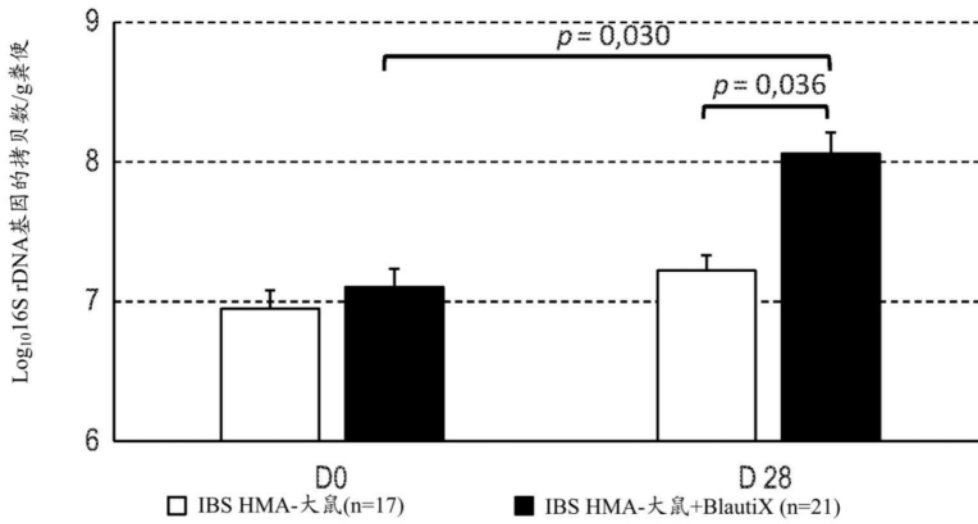


图12

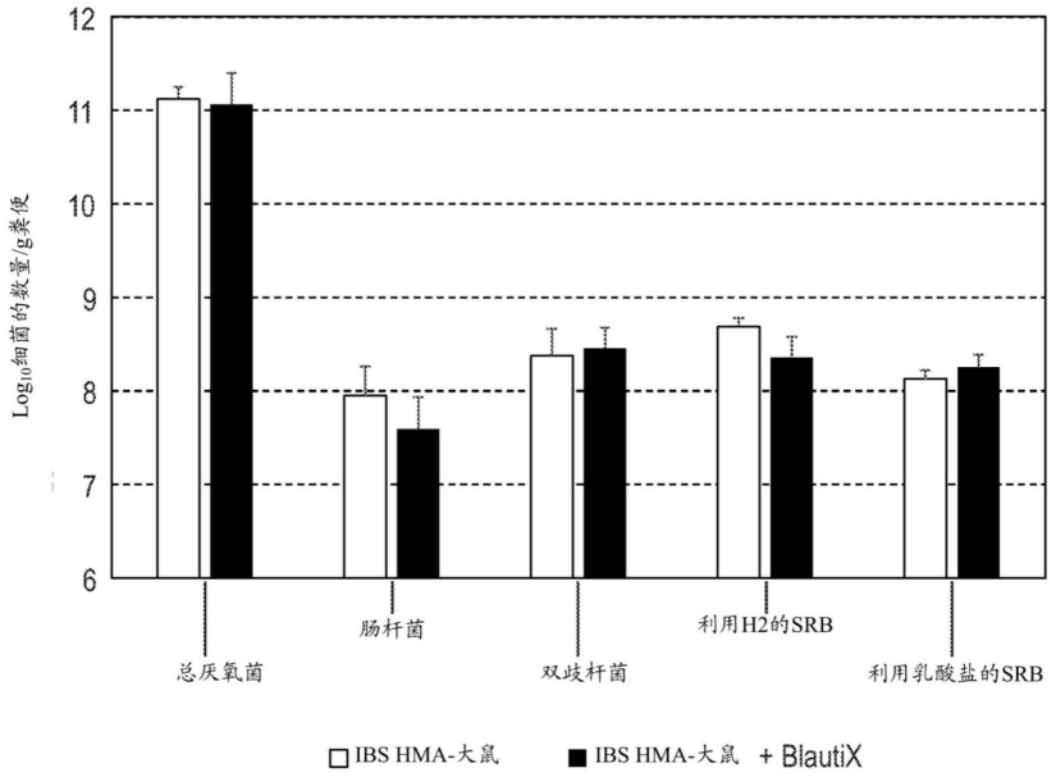


图13

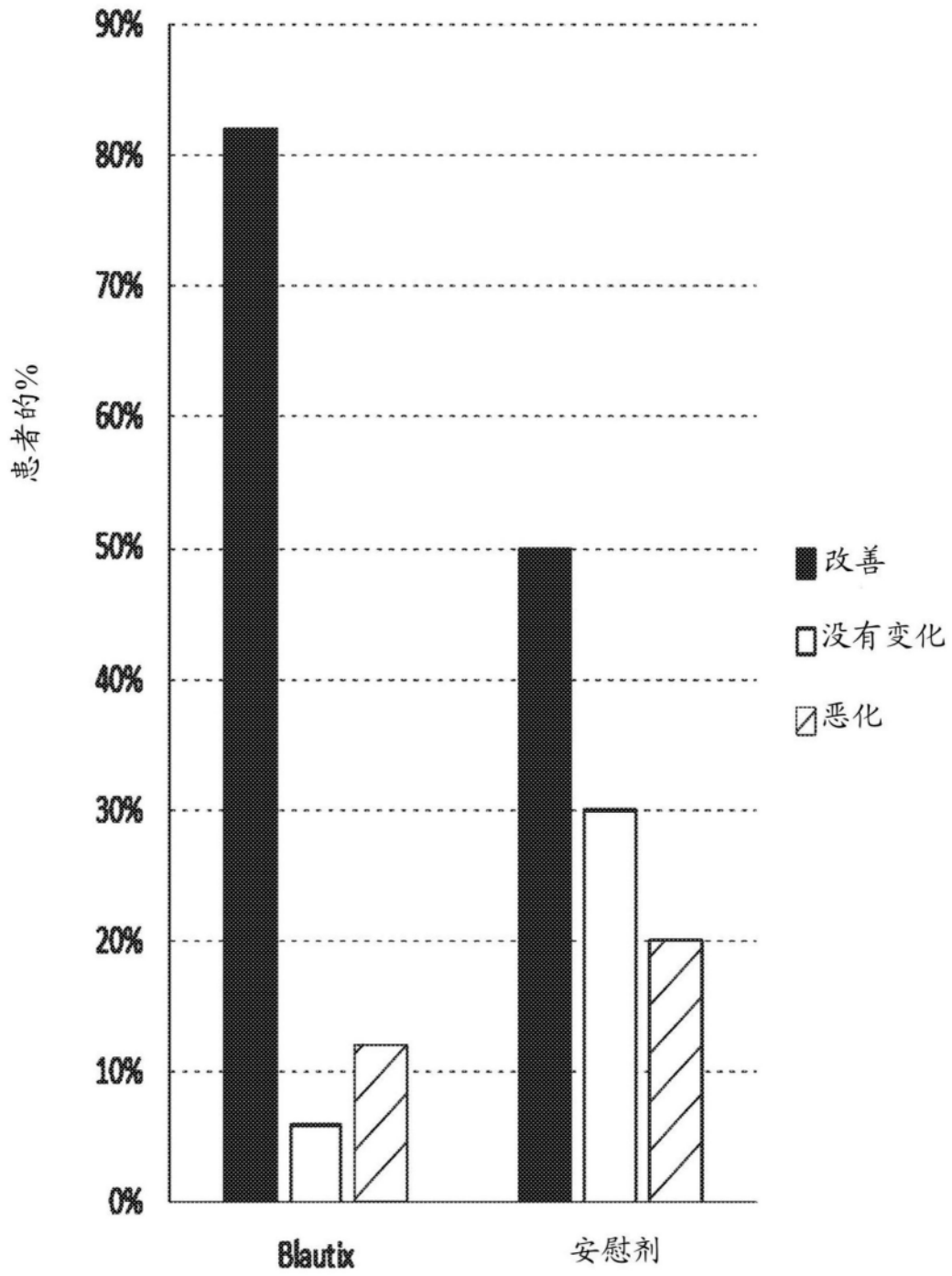


图14

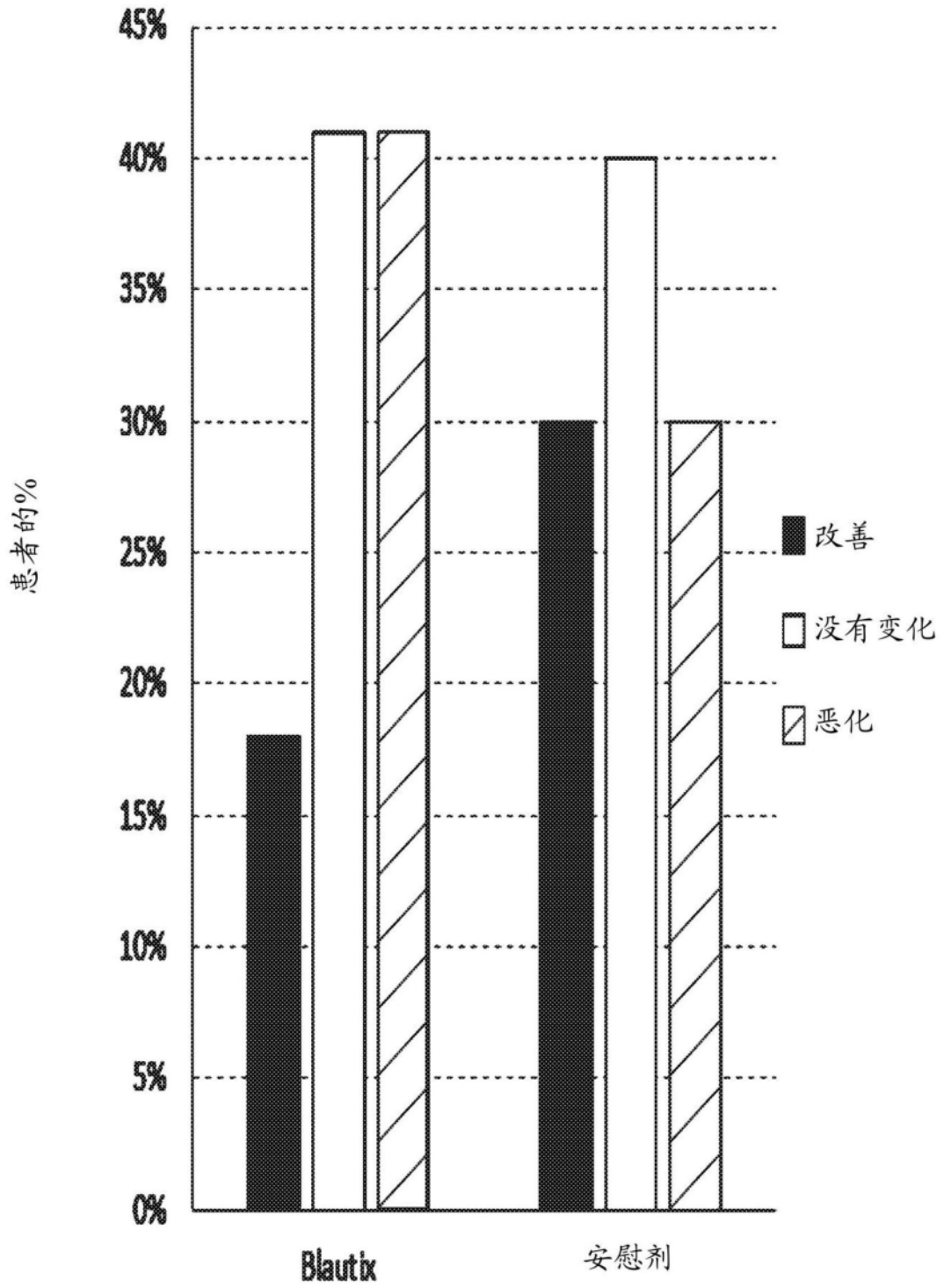


图15