(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108348558 A
(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680052208.5

(22)申请日 2016.07.08

(30)优先权数据
62/190,123 2015.07.08 US
62/250,829 2015.11.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/041538 2016.07.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/008026 EN 2017.01.12

(71)申请人 赛里斯治疗公司
地址 美国马塞诸塞州

(72)发明人 D·库克 M·海恩 J·拉齐

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 侯宝光

(51)Int.Cl.
A61K 35/742(2006.01)
A61K 9/20(2006.01)

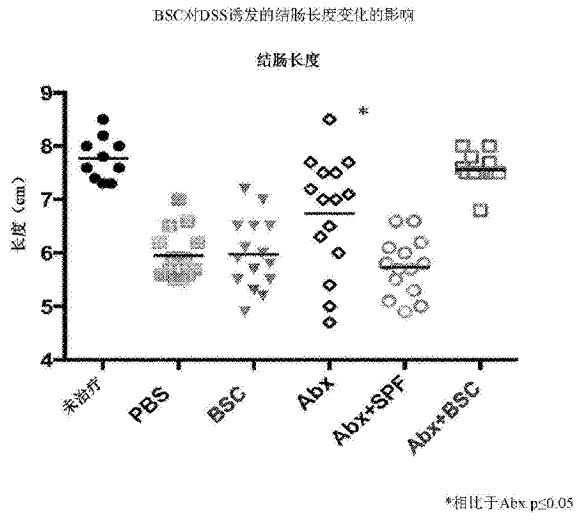
权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54)发明名称

治疗结肠炎的方法

(57)摘要

提供使用微生物组合物和抗生素治疗结肠炎的方法。



*相比于Abx $p \leq 0.05$

CN 108348558 A

1.一种治疗诊断患有结肠炎的个体的方法,所述方法包含:

(a)向所述个体投与抗生素;和

(b)向所述个体投与细菌孢子组合物(bacterial spore composition,BSC)。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述结肠炎是克罗恩氏病(Crohn's disease)或溃疡性结肠炎。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述抗生素是万古霉素(vancomycin)。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述抗生素和所述细菌孢子组合物同时投与。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述抗生素和所述细菌孢子组合物依序投与。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌孢子组合物在所述抗生素最终给药24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、两周或三周内投与。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌孢子组合物呈单次剂量投与。

8.根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌孢子组合物每天、至少每隔一天、至少每3天、至少每4天、至少每5天、至少每6天、至少每周、至少每2周、至少每3周、至少每4周、至少每8周、至少每12周或至少每16周投与。

9.根据权利要求1所述的方法,其中所述细菌孢子组合物呈胶囊或丸剂。

10.根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物包含少于或等于99%营养细胞。

11.根据权利要求1所述的方法,其中所述个体患有活动性结肠炎。

12.根据权利要求1所述的方法,其中所述个体已诊断患有轻度到中度溃疡性结肠炎。

13.根据权利要求1所述的方法,其中所述个体用所述BSC每周治疗为期至少8周或每日治疗为期至少8周。

14.根据权利要求1所述的方法,其中所述BSC包含孢子形成细菌。

15.根据权利要求1所述的方法,其中所述BSC包含孢子。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述孢子直接来源于人类粪便。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述孢子使用乙醇直接衍生。

18.根据权利要求14所述的方法,其中所述组合物基本上由孢子组成。

19.根据权利要求10所述的方法,其中所述组合物包含少于或等于20%营养细胞。

20.一种细菌孢子组合物与抗生素组合用于治疗结肠炎的用途。

21.一种细菌孢子组合物与抗生素组合用于制备用于治疗结肠炎的药剂的用途。

治疗结肠炎的方法

技术领域

[0001] 本申请涉及使用微生物组相关技术治疗发炎性肠病的方法。

背景技术

[0002] 结肠炎是涉及结肠发炎的病状并包括发炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)。IBD的特征在于复发性和缓解性征象和症状以及胃肠(GI)道中不同部位处的慢性炎症。克罗恩氏病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是IBD的实例。IBD的症状通常引起腹泻和腹痛。根据《墨克手册(Merck Manual)》"[n]o已鉴别特定环境、膳食或感染病因"(Walfish和Sachar,2012,merckmanuals.com/professional)。

[0003] 尽管并不总是,但克罗恩氏病通常涉及小肠。患者通常罹患瘘、肿块和脓肿,并且可能具有显著肛周病变。溃疡性结肠炎通常限制于结肠并涉及直肠乙状结肠。显著直肠出血总是发生在溃疡性结肠炎患者中,然而,这些患者不会罹患瘘或显著肛周病变。针对IBD的治疗可以包括例如支持治疗、5-氨基水杨酸和衍生物、皮质类固醇、免疫调节剂、细胞因子、抗生素和益生菌,例如非病原性大肠杆菌(E.coli)、乳杆菌属(Lactobacillus)物种和酵母菌属(Saccharomyces),其可有效预防结肠袋炎,但其它治疗作用尚未清晰定义(墨克手册,见上文)。据报导,在某些情况下,人类粪便移植已产生积极结果。

[0004] 鉴于可用的不充分治疗,需要治疗结肠炎的改善方法,所述方法包括相比于护理标准治疗具有提高的功效和/或在降低的不期望副作用风险下具有与护理标准相似功效和/或提高护理标准功效的改善方法。

发明内容

[0005] 本发明涉及以下发现:可以使用细菌孢子组合物与抗生素的组合治疗结肠炎。

[0006] 因此,本发明提供治疗诊断患有结肠炎(例如,IBD,例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)个体(例如,人类个体)的方法。所述方法包括治疗例如患有活动性结肠炎的个体和/或已诊断患有轻度到中度溃疡性结肠炎的个体。所述方法包括(a)向个体投与抗生素(例如,万古霉素)和(b)向个体投与细菌孢子组合物(bacterial spore composition,BSC)。

[0007] 在某些实施例中,抗生素和细菌孢子组合物同时投与,而在其它实施例中抗生素和细菌孢子组合物依序投与。

[0008] 在不同实例中,细菌孢子组合物任选地在抗生素给药(例如,最终给药)24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、两周或三周内投与。

[0009] 细菌孢子组合物可以任选地以单次剂量或多次剂量投与。

[0010] 此外,细菌孢子组合物可以任选地每天、至少每隔一天、至少每3天、至少每4天、至少每5天、至少每6天、至少每周、至少每2周、至少每3周、至少每4周、至少每8周、至少每12周或至少每16周投与。

[0011] 在某些实施例中,个体用BSC每周治疗,为期至少8周,或用BSC每日治疗,为期至少8周。

[0012] 在不同实施例中，细菌孢子组合物呈胶囊或丸剂形式。

[0013] 在其它实施例中，组合物包括少于或等于99％营养细胞(例如，少于或等于20％营养细胞)。

[0014] 细菌孢子组合物可以包括孢子形成细菌和/或孢子。在不同实例中，例如通过使用乙醇，孢子直接来源于人类粪便。在一些实施例中，组合物基本上由孢子组成。

[0015] 本发明还提供细菌孢子组合物与抗生素组合用于治疗结肠炎(例如，如本文所述)的用途，以及细菌孢子组合物与抗生素组合用于制备供治疗结肠炎(例如，如本文所述)用药剂的用途。

[0016] 本文所参考的每一专利文献和科学论文和借此引用的那些专利文献和科学论文的全部公开内容出于所有的目的以引用的方式明确并入本文中。

[0017] 下文更具体地描述本发明的其它特征和优势。

附图说明

[0018] 图1是展示细菌孢子组合物(BSC)对DSS诱导的结肠长度变化的影响的图式。

[0019] 图2是展示在结肠炎的DSS模型中，BSC对结肠宏观病理学得分的影响的图式。

[0020] 图3是展示BSC对DSS诱导的最大体重变化的影响的图式。

[0021] 图4是展示在结肠炎的DSS模型中BSC对临床得分的影响的图式。

具体实施方式

[0022] 本文所提供的治疗组合物和方法适用于治疗结肠炎。还提供适用于研发相比于护理标准具有改善的功效和低不良事件发生率的结肠炎治疗的方法。另外，提供用于治疗发炎性肠病(IBD)的非免疫抑制治疗组合物和方法。如本文所用，“治疗性组合物”包含可以在形式上和/或时间上一起或分别投与的微生物组合物，例如细菌孢子组合物(BSC)和任选地抗生素。在一些实施例中，治疗在无抗生素下使用BSC。

[0023] 在一些实施例中，本文所述的方法包括向诊断患有结肠炎的患者投与抗生素和微生物组合物，例如衍生自大便的微生物组合物(例如，含有营养细菌和孢子或基本上仅含有孢子)或包含经过选择的细菌的设计组合物。在一些实施例中，至少一些经过选择的细菌能够形成孢子。在一些实施例中，细菌基本上呈孢子形式并且微生物组合物在本文中称为细菌孢子组合物(BSC)。

[0024] 本发明还包括如本文所述的BSC与如本文所述的抗生素组合用于治疗结肠炎(例如IBD，如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)的用途，和这些试剂用于制备供这类治疗用的药剂的用途。

[0025] 微生物组合物

[0026] 本发明中所用的微生物组合物包括细菌孢子组合物(BSC)。除了孢子形成细菌(呈孢子形式和/或呈营养形式)以外，这类组合物还可以任选地包括非孢子形成细菌(例如，乳杆菌属(Lactobacillus)、拟杆菌属(Bacteroides)或双歧杆菌属(Bifidobacterium))。因此，在一些实施例中，适用于本发明中的微生物组合物是基本上由孢子(孢子组合物)或孢子形成细菌组成的细菌组合物，例如，其含有大于或等于1％孢子、大于或等于5％孢子、大于或等于10％孢子、大于或等于20％孢子、大于或等于50％孢子、大于或等于80％孢子、大

于或等于85％孢子、大于或等于90％孢子、大于或等于95％孢子、大于或等于98％孢子、大于或等于99％孢子或等于100％孢子。可以使用所属领域中已知的方法测定孢子含量，例如使用吡啶二羧酸(DPA)分析、孢子CFU分析或这类分析的组合。在一些实施例中，孢子百分比指代组合物中可萌芽细菌孢子的百分比。孢子百分比可以进一步指代全部生物的百分比生物质(w/w)数量，例如使用所属领域中已知方法所侦测的活生物百分比生物质(w/w)数量。百分比孢子还可以由所侦测的基因组数量所指代。

[0027] 值得注意的是，因为孢子对氧和胃酸具有抵抗性，所以孢子提供方便的配制物。可以通过其中主要生物质(例如，51％、60％、70％、80％、90％、95％、99％或更多)包含这些孢子形成的生物营养形式的孢子组合物获得相似效果。

[0028] 适用于本发明的微生物组合物(例如孢子组合物)包括衍生自粪便物质的孢子制剂、来自粪便材料的微生物丛的纯化制剂或例如由呈孢子形式的培养细菌制备的孢子配制物。在不同实施例中，孢子制剂由人类粪便物质，如获自健康人类供体的人类粪便物质制成。在某些实例中，用溶剂(例如，乙醇，如50％乙醇，wt/wt)处理包括来自这类人类粪便物质的细菌细胞和孢子的溶离份，以产生包括厚壁菌门(Firmicutes)孢子的组合物。这类组合物的实例提供于例如PCT/US2014/014745(WO 2014/121302)和实例1中，见下文。

[0029] 孢子分析

[0030] 测定组合物孢子含量的方法为所属领域中已知。举例来说，可以使用吡啶二羧酸分析(DPA分析)，其基于在与DPA结合时铽离子的荧光增强，使用在加热不活化孢子时DPA释放的荧光监测(例如，参见Rosen等人，1997，《分析化学(Anal Chem)》69:1082-1085)。

[0031] 所属领域中已知的微生物分析方法适用于测定组合物的孢子含量。一般来说，这类分析涉及：在杀灭营养细胞(例如，加热或适当溶剂)的条件下处理组合物；在有利于萌发和生长的条件下接种所得孢子；以及以菌落形成单位(colony forming units，CFU)计测定孢子数量和/或孢子多样性。一般来说，孢子数量CFU始终低于孢子总数，因为萌发是内在随机过程并且整个群体并不同步萌芽。在不使用溶剂或加热不活化下，相似程序和生长培养基可用于定量包括可以存在于组合物中的孢子形成营养生物的总CFU含量。

[0032] 抗生素

[0033] 在本文所述方法的某些实施例中，抗生素疗法在微生物组合物(BSC)之前、与其同时、在其之前和与其同时二者、在其之后、或与其同时或在其之后二者投与。适用抗生素的实例包括例如万古霉素、新霉素(neomycin)、利福昔明(rifaximin)、甲硝哒唑(metronidazole)和非达霉素(fidaxomicin)。一般来说，抗生素与梭菌属(Clostridium)感染(例如，氟喹诺酮(fluoroquinolones)、头胞菌素(cephalosporins)、氯林可霉素(clindamycin)和青霉素(penicillins))无关。

[0034] 剂量、配制物、递送

[0035] 适用于本发明的方法包括例如投与BSC与一或多种抗生素(称为“治疗组合”)的组合。一般来说，使用治疗组合治疗患有结肠炎的个体引起改善至少一种疾病征象或症状，提高改善至少一种疾病征象或症状的持续时间，或减少至少一种副作用或不良事件，如通常可归因于单独使用抗生素(或单独BSC)的治疗的那些副作用或不良事件。

[0036] 给药

[0037] BSC剂量中的孢子数量通常为10^4到10^9。在一些实施例中，剂量为例如10^5到10^9、10^6

到10^9、10^6到10^8、10^7到10^9、10^8到10^9、10^6、10^7、10^8、10^9或10^{10}或这些值中的一个之间的任何范围。

[0038] 通常以如所属领域中已知的标准剂量提供治疗组合的抗生素组分。

[0039] 给药方案通常包括每日、每两天、每三天、每四天、每五天、每周、每两周、每三周或每月提供治疗组合。例如回应于结肠炎发作，治疗可以为长期的或为期有限时间。

[0040] 配制

[0041] 基于其递送和存储方法配制孢子。举例来说，用于经由灌肠、直肠管、鼻胃管、胃镜或结肠镜递送的孢子通常呈医药学上可接受的液体形式。可以在PCT/US2014/014745(WO 2014/121302)中发现用于制备BSC的方法实例。

[0042] 递送

[0043] 可以使用所属领域中已知的方法(例如，经口(例如，以胶囊形式))将治疗组合物或这类组合物(例如BSC或抗生素)的分离组分以胶囊或丸剂形式经由结肠镜递送到近端结肠、通过灌肠/直肠管递送到远端下部GI道、通过鼻胃管/胃镜递送到上部GI道。递送可靶向到已知或疑似疾病部位。可以通过其它合适方法，例如注射或灌注递送抗生素。

[0044] 关于例如BSC组合物的给药、配制和递送的额外细节如下。

[0045] 本文所述的组合物可以使用所属领域中已知的方法制备和投与，所述方法包括适合于如上文所描述的组合物类型的局部投药和全身投药途径。举例来说，微生物组合物通常经口投与或直接投与到胃肠道，而作为方法组分的抗生素治疗剂可以通过灌注、注射、吸入或所属领域中所用的其它方法经口直接递送到胃肠道。

[0046] 治疗性组合物的组分可以使用常规药物载体、水、散剂或油性基质、增稠剂等。

[0047] 在一些实施例中，医药组合物包含一种或多种以上试剂作为活性成分与一种或多种药物学上可接受的载剂(赋形剂)组合。在制造治疗组合物或其组分中，试剂通常与赋形剂混合，由赋形剂稀释或封入呈例如胶囊、药囊、纸或其它容器形式的这类载体内。当赋形剂用作稀释剂时，其可以是固体、半固体或液体物质，充当活性成分的媒剂、载剂或介质。因此，配制物可以呈以下形式：片剂、丸剂、散剂、口含剂、药囊、扁胶剂、酏剂、悬浮液、乳液、溶液、糖浆、气溶胶(呈固体形式或于液体介质中)、含有例如高达10重量％的活性化合物的软膏、软及硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液以及无菌封装散剂。

[0048] 组合物可以呈单位剂型配制。术语“单位剂型”指代适用作人类个体和其它哺乳动物的单位剂量的物理离散单元，每一单元含有与合适医药赋形剂结合的经计算以产生所需治疗效果的预定数量的活性物质。治疗性组合物的组分可以提供于具有用于投与组分的说明书的套组中。

[0049] 包含组合物的胶囊、锭剂或丸剂可以经过涂布或以其它方式复合，以得到提供延长作用或在胃肠道的所需区段(例如结肠)中释放的优势的剂型。举例来说，可以呈胶囊提供的BSC可以包含内部和外部组分，后者呈包封前者的形式。用于这类胶囊的合适物质包括例如羟丙甲纤维素。

[0050] 可以制备包含细菌组合物的液体配制物用于经口递送，例如呈以下形式：水溶液、适当调味的糖浆、水或油悬浮液或含有食用油(如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的调味乳液，以及酏剂和类似医药媒剂。

[0051] 向患者投与的组合物的量和频率将取决于所投与药物、投药目的(如防治或疗

法)、患者病况、投药方式等而变化。在治疗应用中,将组合物以足以治愈或至少部分抑制疾病和其并发症症状(即改善疾病)的量投与已患疾病的患者。有效剂量将取决于所治疗的疾病状况以及取决于如疾病严重程度、患者的年龄、体重和一般状况等因素通过主治医师判断。

[0052] 组合物的治疗性剂量可以根据例如治疗所针对的特定用途、组合物的投药方式、患者的健康和状况以及处方医师的判断而变化。

[0053] 关于根据本发明的组合物的给药、配制和递送的其它信息如下。在一些实例中,组合物呈固体、半固体、微乳液、凝胶或液体形式作为药物制剂投与。这类剂型的实例包括美国专利案第3,048,526号、第3,108,046号、第4,786,505号、第4,919,939号和第4,950,484号中所公开的锭剂形式;美国专利案第4,904,479号、第6,482,435号、第6,572,871号和第5,013,726号中所公开的凝胶形式;美国专利案第4,800,083号、第4,532,126号、第4,935,243号和第6,258,380号中所公开的胶囊形式;以及美国专利案第4,625,494号、第4,478,822号和第5,610,184号中所公开的液体形式;其每一者以全文引用的方式并入本文中。可以经口使用的组合物形式包括片剂、由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和如丙三醇或山梨醇的增塑剂制成的软密封胶囊。片剂可以任选地使用一种或多种副成分通过压缩或模制制成。

[0054] 压缩片剂可以通过如下制备:在合适机器中将活性成分压缩成自由流动形式,如粉末或颗粒,任选地与粘合剂(例如聚维酮、明胶、羟丙基甲基纤维素)、惰性稀释剂、防腐剂、抗氧化剂、崩解剂(例如羟基乙酸淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)或润滑剂、表面活性剂或分散剂混合。模制片剂可通过在合适机器中模制用惰性液体稀释剂湿润的粉末状化合物的混合物来制造。片剂可以任选地经包衣或刻痕并且可以经配制以便提供其中活性成分的缓慢或控制释放。片剂可以任选地具有肠溶衣,以提供在胃或除胃以外的肠部分(例如,结肠、下肠道)中的释放。用于经口投药的所有配制物都可以呈适合于这类投药的剂量。推入配合胶囊可以含有活性成分与如乳糖的填充剂、如淀粉的粘合剂和/或如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂的掺合物。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮于适合液体中,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外,可以添加稳定剂。糖衣丸芯具有合适包衣。出于此目的,可以使用浓缩糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波莫凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇或二氧化钛、漆溶液和合适有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料加入片剂或糖衣丸包衣以标识或表征活性化合物剂量的不同组合。经口使用的配制物还可以呈硬明胶胶囊形式呈现,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合;或呈软明胶胶囊形式呈现,其中活性成分与水溶性载剂(如聚乙二醇)或油性介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。经口液体制剂可以呈例如水性或油性悬浮液、溶液、乳液糖浆或酏剂形式,或可以呈在使用前用水或其它合适媒剂复原的干燥产物的形式呈现。这类液体制剂可以含有常规添加剂,如悬浮剂,例如山梨糖醇、甲基纤维素、葡萄糖浆、明胶、羟基乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶或氢化食用脂肪;乳化剂,例如卵磷脂、脱水山梨糖醇单油酸酯、阿拉伯胶;非水性媒剂(其可以包括食用油),例如杏仁油、油性酯(如丙三醇、丙二醇或乙醇);防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸,以及必要时常规调味剂或着色剂。

[0055] 在一个实施例中,所提供的细菌孢子组合物包括软凝胶配制物。软凝胶可以含有

基于明胶的壳，壳包围液体填充物。壳可以由明胶、增塑剂(例如丙三醇和/或山梨糖醇)、改性剂、水、颜料、抗氧化剂或调味剂制成。壳可以用淀粉或角叉菜胶制得。外层可以包覆肠溶衣。在一个实施例中，软凝胶配制物可以包括组合物的水或油溶性填充物溶液或悬浮液，例如由明胶层覆盖的细菌孢子组合物。

[0056] 肠溶衣可以控制在消化系统中吸收细菌孢子组合物的位置。举例来说，肠溶衣可以经过设计，使得细菌孢子组合物不在胃中溶解，而是行进到小肠中进行溶解。肠溶衣在低pH值下(如胃中)稳定，并且在较高pH值下(例如小肠中)能够溶解。可以用于肠溶衣的物质包括例如褐藻酸、邻苯二甲酸乙酸纤维素、塑料、蜡、虫胶以及脂肪酸(例如硬脂酸、棕榈酸)。肠溶衣描述于例如美国专利案第5,225,202号、第5,733,575号、第6,139,875号、第6,420,473号、第6,455,052号和第6,569,457号中，其全部以全文引用的方式并入本文中。肠溶衣可以是水性肠溶衣。可以用于肠溶衣的聚合物的实例包括例如虫胶、邻苯二甲酸乙酸纤维素、聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯和甲基丙烯酸。肠溶衣可用于(1)防止胃液与活性物质反应或毁坏活性物质；(2)防止在其达到肠之前稀释活性物质；(3)确保活性物质直到制剂已通过胃之后才释放；以及(4)防止制剂中含有的活细菌由于胃中的低pH值而被杀死。在一个实施例中，食物或饮料的细菌孢子组合物或细菌组分以具有肠溶衣的锭剂、胶囊或囊片形式提供。在一个实施例中，肠溶衣经设计以在胃中时将锭剂、胶囊或囊片固持在一起。肠溶衣经设计以在胃的酸条件下固持在一起并且在非酸条件下分解并且因此将药物释放在肠中。软凝胶递送系统还可以合并磷脂或聚合物或天然胶以使组合物(例如，益生元组合物)驻留在具有外涂层的明胶层中，从而获得所需延迟/控制释放效果，如肠溶衣。

[0057] 在一个实施例中，以包含有效量的如本文所述的细菌孢子群体和一种或多种释放控制赋形剂的剂型提供组合物。合适的调节释放剂量媒剂包括但不限于亲水性或疏水性基质装置、水溶性分离层包衣、肠溶衣、渗透压装置、多颗粒装置和其组合。在一个实施例中，剂型是片剂、囊片、胶囊或棒棒糖。在另一实施例中，剂型是液体、经口悬浮液、经口溶液或经口糖浆。在又一实施例中，剂型是凝胶胶囊、软明胶胶囊或硬明胶胶囊。在另一实施例中，包含细菌孢子群体的组合物以泡腾剂型提供。组合物还可以包含非释放控制赋形剂。

[0058] 在另一实施例中，任选地具有益生物质的包含细菌孢子组合物的组合物以肠包衣颗粒形式提供，以用于经口投药。组合物可以进一步包含单硬脂酸甘油酯40-50、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素、硬脂酸镁、甲基丙烯酸共聚物C型、聚山梨醇酯80、糖球状物、滑石和柠檬酸三乙酯。在一个实施例中，包含细菌孢子群体的组合物以肠包衣颗粒形式提供，以用于经口投药。组合物可以进一步包含巴西棕榈蜡、交联聚维酮、二乙酰化单酸甘油酯、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙甲纤维素邻苯二甲酸酯、硬脂酸镁、甘露糖醇、氢氧化钠、硬脂酰反丁烯二酸钠、滑石、二氧化钛和黄色氧化铁。

[0059] 在一个实施例中，组合物可以配制成不同剂型以用于经口投药。组合物还可以配制为调节释放剂型，包括立即释放、延迟释放、扩展释放、延长释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、扩展释放、加速释放、快速释放、靶向释放、程序化释放和胃潴留剂型。这些剂型可以根据已知方法和技术制备(参见，《雷明顿：医药科学和实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》，见上文；《调节释放药物递送技术(Modified-Release Drug Delivery Technology)》，Rathbone等人编，《药学与制药科学(Drugs and the Pharmaceutical Science)》，Marcel Dekker,Inc.:New York,N.Y.,2002；第126卷，其以全

文引用的方式并入本文中)。在一个实施例中,组合物呈一个或多个剂型。举例来说,组合物可以呈固体或液体形式投与。固体剂型的实例包括但不限于呈胶囊或片剂形式的离散单元,如粉末或颗粒或以通过压缩模制常规形成的片剂形式呈现。这类压缩片剂可以通过在合适机器中压缩三种或更多种试剂和医药学上可接受的载剂制备。模制片剂可以任选地经包衣或刻痕,具有刻于其上的标记并且可以因此经配制以便引起包含益生元的组合物的立即、基本上立即、缓慢、控制或延长释放。此外,本发明的剂型可以包含所属领域中已知的可接受的载剂或盐,如以全文引用的方式并入本文中的《医药赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》,美国医药协会(American Pharmaceutical Association)(1986)中所描述的那些可接受的载剂或盐。

[0060] 本文所述的组合物可以任选地呈液体形式。液体配制物可以包含例如试剂于水中的溶液和/或悬浮液形式;以及媒剂,包含聚乙氧基化蓖麻油、醇和/或聚氧乙基化脱水山梨糖醇单油酸酯,有或无调味剂。每一剂型包含有效量的活性剂并且可以任选地包含医药学上的惰性试剂,如常规赋形剂、媒剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、pH调节物质、缓冲液、溶剂、增溶剂、甜味剂、着色剂和可以包括于用于经口投药的医药上剂型中的任何其它无活性试剂。这类媒剂和添加剂的实例可以见于《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第17版(1985)。

[0061] 组合物能够任意消耗。在其中由疾病、病症、症状或事件引起的菌群失调是通过投与组合物解决的实例中,消耗的总持续时间可以为1周到约52周、或约4周到约26周、或约4周到约12周、或约6周。在一个实施例中,细菌孢子组合物还可以与如本文所述的另一物质(例如,抗生素)组合物投与。在一个实施例中,治疗总持续时间为约5天到约35天。在一个实施例中,治疗总持续时间为约7天到约90天、或约7天到约60天、或约14天到约50天、或约14天到约40天、或约5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天、32天、33天、34天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天、46天、47天、48天、49天、50天、51天、52天、53天、54天、55天、56天、57天、58天、59天或60天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约30天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约34天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约36天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约38天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约42天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约60天。在另一实施例中,治疗总持续时间为约90天。在另一实施例中,一个疗程可以跟随另一疗程,如诱导方案跟随维持方案。

[0062] 动物模型

[0063] 本文所提供的治疗组合物和方法可以在结肠炎动物模型中测试,如所属领域中已知的那些动物模型。已描述至少66种不同类型的动物模型(Mizoguchi,2012,《分子生物学与转化科学进展(Prog Mol Biol Transl Sci)》105:263-320),包括右旋糖苷硫酸钠(DSS)模型和三硝基苯磺酸盐(TNBS)模型。候选治疗性组合物和/或方法通过在动物中诱发疾病征象或症状之前、在诱发期间或表现至少一种征象或症状之后向动物模型投与组合物来测试。在涉及预治疗和与抗生素同时治疗的方法中,可以在诱发之前、在诱发期间或表现一种或多种征象或症状之后投与预治疗。实例(见下文)提供这类测试的其它指导。

[0064] 功效测量

[0065] 治疗功效可以通过以下判定：评估征象和或症状并且根据是否实现诱发改善和/或维持缓解或改善的症状，例如维持至少1周、至少2周、至少3周、至少4周、至少8周或至少12周。举例来说，以用内窥镜、组织学上或通过成像技术判断的粘膜愈合可用于这类评估，尤其用于预测诊断患有结肠炎，例如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎的个体的长期临床结果。缓解或征象或症状可以使用临床指数判定，如(对于克罗恩氏病而言)克罗恩氏病活性指数(Crohn's Disease Activity Index,CDAI)、PCDAI或PCDAI或CDAI的改善或一个或多个元素，例如液状粪或软便次数、腹痛、总体幸福感、存在并发症(如关节痛或关节炎、葡萄膜炎；虹膜炎症；存在结节性红斑、坏疽性脓皮病或口疮性溃疡；肛裂、瘘或脓肿；其它瘘或发热)、针对腹泻服用鸦片制剂或地芬诺酯/阿托品(atropine)、存在腹部肿块、<0.47(男性)或<0.42(女性)的血细胞比容；或与标准体重的百分比偏差。在一些实施例中，根据本文所述的的方法治疗的个体达到和/或保持低于150的CDAI。在一些实施例中，方法的阳性反应是个体的CDAI减少至少70点。

[0066] 对于溃疡性结肠炎，疗效的指示包括例如大便频率正常化、缺少或尿急和大便中不存在血液。如果在完成治疗之后至少一种征象或症状减少至少四周，那么考虑实现缓解。粘膜愈合是测量临床缓解的一个实例。其它征象/症状可以包括C-反应蛋白的正常化和/或其它急性期指标，以及个体标志，如与生活品质相关的那些个体标志。标志的其它实例可以包括使用蒙特利尔分类(Montreal Classification)、梅友评分(Mayo Score)(有或无内窥镜检查分项评分)或儿童溃疡性结肠炎指数(Pediatric Ulcerative Colitis Index)。

[0067] 一般来说，本文所述的方法和组合物适用于处理诊断患有结肠炎的个体。

[0068] 用于治疗结肠炎的治疗性组合物和/或方法的功效的其它指标包括：在第7天植入至少一种治疗性组合物的BSC组分中所鉴别的细菌OTU，例如植入或至少一种基础细菌OTU；在第2周、第3周、第4周、第5周、第6周、第7周、第8周、第9周、第10周、第11周或第12周植入至少一种细菌OTU；在第4周、第5周、第6周、第7周、第8周、第9周、第10周、第11周或第12周(例如，梅友评分<=2，无分项评分>1)临床缓解；或在第4周内窥镜缓解(梅奥内镜评分为0)。PCT/US2014/030817(WO2014/145958)中已描述基础OTU。

[0069] 定义

[0070] 本文所述的治疗性组合物的“治疗有效量”可以根据如以下各者的因素变化：个体的疾病病况、年龄、性别和体重，和化合物在个体内引发所需反应的能力，例如改善至少一个病症参数、或改善至少一种病症的症状(和任选地，所投与的任何其它试剂的效果)。治疗有效量还是治疗有益效果超过组合物的任何毒性或不利效果的量。如本文所述的组合物通常以治疗有效量投与。

[0071] 还了解可能存在一系列治疗有效量的治疗性组合物(BSC和抗生素)的个体组分。

[0072] 等效物

[0073] 所有技术特征均可以这类特征的所有可能组合单独组合。

[0074] 可在不脱离本发明的精神或本质特征的情况下，以其它特定形式实施本发明。因此，前述实施例被视为在所有方面都是说明性的，而不是对本文所述的本发明进行限制。

[0075] 实例

[0076] 以下非限制性实例进一步说明本文所述的本发明的实施例。

[0077] 实例1：制造BSC的方法

[0078] 使用获自健康人类供体的大便样本制备BSC。将大便样品分级分离，从而制备厚壁菌门孢子。简单来说，收集新鲜大便样本并随后在-80℃下冷冻。使约150g在生理盐水中悬浮和均质化并经由筛网过滤。所得浆液经离心，收集含有细菌细胞和孢子的上清液并且使用100％乙醇达到50％(wt/wt)。将乙醇制剂在室温下培育一小时，通过离心集结，用盐水洗涤以去除乙醇，并且再悬浮于无菌丙三醇，从而产生BSC。将BSC储存在-80℃直到备用。

[0079] BSC特征在于孢子浓度和不存在残余革兰氏阴性细菌。孢子含量通过测量吡啶二羧酸(DPA)含量并针对已知的表示三种共生物种的孢子数量的DPA含量标准化来测定(Hindle和Hall.1999《分析家(Analyst)》124:1599-604)。通过在麦康凯(MacConkey)乳糖琼脂和拟杆菌属胆汁七叶甙琼脂上选择性接种确认不存在残余革兰氏阴性细菌。在分析检测极限内(<30个集落形成单位/毫升)未在任何BSC制剂中发现营养微生物。

[0080] 实例2:有或无广谱抗生素预治疗的结肠炎的右旋糖苷硫酸钠(DSS)模型

[0081] DSS模型是结肠炎的良好表征模型，用作用于包括例如溃疡性结肠炎的发炎性肠病(IBD)的模型(Wirtz,2007《自然实验手册(Nat Protoc)》2:541-6)。在此模型中，DSS以饮用水形式递送并通过对基底隐窝细胞的直接毒性诱发结肠炎并且在随后的先天性免疫激活下造成粘膜破坏。DSS诱发的炎症限于大肠并且病理学与适应性免疫无关。在此模型中测试BSC以确定健康微生物组改善IBD的这些特征(例如，DSS模型中所表达的溃疡性结肠炎)的能力。

[0082] 简单来说，根据表1治疗三周龄雄性C57BL/6小鼠，每组15只(未治疗对照组中10只)。

[0083] 表1

[0084]

组编号	组大小(n)	组描述	抗生素预治疗第0-9天[1]	DSS疾病诱发第31-35天[2]	测试项目和起始天数[3]
1	10	未经治疗对照	无	无	无
2	15	阴性对照	无	+	PBS[4] 第10天
3	15	阳性对照	无	+	布地奈德 (Budesonide) 第24天
4	15	BSC[5]	无	+	BSC 第0天
5	15	Abx[6]对照	+	+	PBS 第10天
6	15	Abx + SPF[7]	+	+	SPF盲肠浆液 第10天
7	15	Abx + BSC	+	+	BSC 第10天

[0085] [1]以饮用水形式抗生素混合物的任意经口投药

[0086] [2]以饮用水形式2％DSS的任意经口投药

[0087] [3]通过经口管饲投与疗法，一周3次直到在指示当天开始的第41天

[0088] [4]PBS＝磷酸盐缓冲盐水

[0089] [5]BSC＝研究级BSC是在无特殊预防措施以确保无菌封闭操作下在实验室环境中在

小规模制造过程中产生。研究级物质表示临床级物质并含有临床方法BSC的活性孢子组分。每剂量约1e7孢子。

[0090] [6]Abx＝抗生素混合液(0.5mg/ml卡那霉素(kanamycin)、0.044mg/ml庆大霉素(gentamycin)、1062.5U/ml粘菌素(colistin)、0.269mg/ml甲硝哒唑、0.156mg/ml环丙沙星(ciprofloxacin)、0.1mg/ml安比西林(ampicillin)和0.056mg/ml万古霉素)。

[0091] [7]SPF＝来自PBS中不含特异性病原体小鼠的盲肠内含物。每剂量约1e8有机物。

[0092] 此实验的目标是评估在治疗IBD(例如UC)中使用抗生素混合液的预治疗对BSC功效的影响。因此,三个组在接受其治疗之前接受呈饮用水形式的抗生素混合液的10天疗程(第5-7组)。第2组和第4-7组中的小鼠通过使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(第2和5对照组)、BSC(第4和7组)或小鼠盲肠浆液(第6组)每周三次经口管饲给药。在第31-35天,将小鼠暴露于呈其饮用水形式的2％DSS(第2-7组),并且随后观测直到第41天。周期性测量包括体重和临床得分。在第41天,将动物安乐死并评估包括重量、长度和宏观病理学的结肠特征。制备结肠样品用于组织病理学并由对治疗组和测试组性质盲目的病理学家对其评分。

[0093] 总体而言,相比于未经治疗小鼠,DSS治疗引起体重显著下降、临床和宏观病理学得分恶化并且结肠长度减少(第2组对第1组)。在接受单独BSC(第4组)或布地奈德(第3组;糖皮质激素阳性对照)的小鼠中未观测到任何疾病参数的统计学上显著的变化,不同之处在于使用布地奈德治疗(第3组)相比于在无抗生素预治疗存在下接受PBS的阴性对照小鼠(第2组)临床得分显著提高。

[0094] 使用广谱抗生素混合液预治疗并投与PBS(Abx对照,第5组)的小鼠相比于阴性对照组很大程度上受保护免受DSS病理学。在抗生素混合液之后使用SPF小鼠盲肠物质经口接种的小鼠(Abx+SPF,第6组)损失此保护并展示与阴性对照组相当的DSS敏感度。Abx+BSC(第7组)治疗的小鼠类似于单独抗生素治疗(Abx对照,第5组)受保护免受DSS诱发的疾病。然而,相比于单独抗生素治疗(第5组),在Abx+BSC(第7组)中基于增加的结肠长度存在进一步保护免受结肠病理学的指示(图1)。一般来说,结肠缩短指示炎症。尽管Abx+PBS与Abx+BSC治疗之间的结肠组织病理学得分整体上无显著差异,但Abx+BSC组中的治疗效果更加一致(图2)。针对体重变化在组内观测到类似的一致性效果(Abx+BSC具有比Abx+PBS更加一致的保护作用)(图3)。在DSS治疗之后,在Abx+BSC组中存在倾向于减少的体重下降百分比、较低的临床得分和较低的宏观病理学得分的非显著趋势(图4)。

[0095] 综上所述,这些数据表明DSS治疗引起体重下降、临床得分增加、结肠缩短和发炎。在无抗生素预治疗存在下,单独布地奈德和BSC治疗提供极少或不提供保护免受病理学。使用广谱抗生素预治疗预防DSS诱发的疾病;然而,使用来自正常小鼠的盲肠内含物接种恢复对DSS病理学的敏感度。在抗生素预治疗之后投与的PBS和BSC治疗两者(第5组和第7组)均有效预防DSS诱发的疾病。另外,BSC提供超过通过单独抗生素获得的保护的改善,如组内动物间变化减少和更长的结肠长度所证明。这些数据表明BSC与抗生素预治疗组合在小鼠DSS实验结肠炎模型中具有保护性。

[0096] 实例3:有或无万古霉素预治疗的结肠炎的DSS模型

[0097] 为进一步检验抗生素和BSC对溃疡性结肠炎的影响,使用上文所描述的DSS模型,添加评估万古霉素作为单一抗生素的组。在此实验中,根据表2治疗三周龄雄性C57BL/6小鼠,每组15只(未治疗对照组中9只)。

[0098] 表2

[0099]

组编号	组大小（n）	组描述	抗生素预治疗第0-9天[1]	DSS疾病引发第28-32天[2]	测试项目和起始天数[3]
1	9	未治疗对照	无	无	无
2	15	阴性对照	无	+	PBS[4]第9天
3	15	阳性对照	无	+	Anti-IL12[5]第28天
4	15	BSC[6]	无	+	BSC第0天
5	15	Vanco[7]对照	万古霉素	+	PBS第9天
6	15	Vanco + BSC	万古霉素	+	BSC第9天
7	15	Abx[8]对照	抗生素混合物	+	PBS第9天
8	15	Abx +BSC	抗生素混合物	+	BSC第9天

[0100] [1]以饮用水形式单独抗生素混合物或万古霉素的任意经口投药

[0101] [2]以饮用水形式2％DSS的任意经口投药

[0102] [3]通过经口管饲投与疗法，一周3次直到在指示当天开始的第38天

[0103] [4]PBS＝磷酸盐缓冲盐水

[0104] [5]抗IL12＝抗介白素12p40亚单位抗体并且在第28天腹膜内投与一次

[0105] [6]BSC＝研究级BSC是在无特殊预防措施以确保无菌封闭操作下在实验室环境中在小规模制造过程中产生。研究级物质表示临床级物质并含有临床BSC的活性孢子组分。

[0106] [7]Vanco＝万古霉素

[0107] [8]Abx＝抗生素混合液(0.5mg/ml卡那霉素、0.044mg/ml庆大霉素、1062.5U/ml粘菌素、0.269mg/ml甲硝哒唑、0.156mg/ml环丙沙星、0.1mg/ml安比西林和0.056mg/ml万古霉素)

[0108] 在接受治疗之前以其饮用水形式向小鼠投与万古霉素(第5组和第6组)或抗生素混合物(第7组和第8组)以评估对BSC功效的影响。小鼠使用PBS(第2组、第5组和第7组)或BSC(第6组和第8组)通过经口管饲给药，在第9天开始每周三次并持续到研究结束(第38天)。使用BSC在第0天开始每周三次给药第4组。在第28-32天，将小鼠暴露于呈其饮用水形式的2％DSS(第2-8组)，并且观测直到第38天。周期性测量包括体重和临床得分。在第38天，将动物安乐死并评估包括重量、长度和宏观病理学的结肠特征。制备结肠样品用于组织病理学并由对治疗组和测试项目盲目的病理学家对其评分。

[0109] 总体而言，DSS治疗引起显著体重下降、临床和宏观病理学得分恶化、结肠增厚、结肠长度减少以及结肠发炎和水肿增加(阴性对照第2组对未治疗第1组)。阳性对照、抗IL-12p40(第3组)展示活性信号，其中相比于阴性对照，在第36-38天开始体重和临床得分提高并且最大临床和组织病理学得分整体上减少。

[0110] 相比于阴性对照，在DSS诱发之后接受单独BSC(第4组)的动物展示更加严重的最

大体重下降(15.5%对22.1%)。然而,在第38天研究结束时临床得分、结肠长度、宏观病理学和组织病理学得分不存在差异。在将DSS添加到饮用水之前,在3周BSC治疗期间未观测到体重变化和临床症状。

[0111] 使用万古霉素(第5组)预治疗提供显著的保护免受DSS诱发的疾病。万古霉素组(第5组)中的最大体重减轻相比于阴性对照组显著减少。万古霉素(第5组)引起临床得分降低和结肠病理学的整体上改善,如相比于阴性对照(第2组)结肠长度增加、结肠体重减少和宏观病理学和组织病理学得分提高所证明。

[0112] Vanco+BSC(第6组)与Vanco对照(第6组)同等程度地保护免受体重下降。然而,Vanco+BSC治疗相比于单独万古霉素提供多次测量的益处。接受Vanco+BSC的小鼠展示相比于单独Vanco组(第5组)临床得分提高和结肠重量降低。Vanco+BSC组中的宏观病理学得分高于仅Vanco组,但盲目微观组织病理学得分无差异。

[0113] 与Vanco对照组类似,Abx对照(第7组)组相比于阴性对照(第2组)展示回应于DSS治疗而体重下降减少、临床得分提高以及结肠病理学减少。Abx与BSC组合(第8组)相对于单独Abx(第7组)引起类似结果,除了使用Abx+BSC(第8组)治疗引起结肠体重降低。结肠体重减少的观测结果与比较Vanco+BSC与仅Vanco对照所观测到的类似影响相一致。

[0114] 综上所述,这些数据表明DSS治疗引起体重下降、临床得分增加、结肠缩短和发炎。阳性对照、抗IL-12p40(第3组)展示活性信号,其中相比于阴性对照,在第36-38天开始体重和临床得分提高并且最大临床和组织病理学得分整体上减少。在无抗生素预治疗存在下,单独BSC治疗良好耐受,如在将DSS添加到饮用水之前在3周BSC治疗期间不存在体重和临床症状变化所证明。然而,单独BSC治疗不保护免受DSS诱发的病理学。使用万古霉素或广谱抗生素混合物预治疗很大程度上保护免受DSS诱发的疾病,但这些组展示结肠病理学恶化,如相比于未治疗小鼠宏观病理学和组织病理学得分变化所证明。在万古霉素预治疗之后投与BSC也保护免受DSS诱发的疾病并且基于临床得分和结肠体重的改善比Vanco更加显著有效,并且不存在倾向于最大体重下降减少、结肠长度增加和组织病理学减少的显著趋势。尽管在广谱抗生素混合物之后使用BSC治疗在大多数测量中相比于其对照组未提供对DSS诱发的提高的防护级别,但当BSC与抗生素治疗组合时结肠体重降低。综合而言,这些数据表明在小鼠DSS实验结肠炎模型中在万古霉素之后使用BSC治疗具有保护性并且因此适用作用于治疗IBD(例如溃疡性结肠炎)的疗法。

[0115] 实例4:有和无广谱抗生素预治疗的结肠炎的TNBS模型

[0116] 三硝基苯磺酸(TNBS)又称为2,4,6-三硝苯基酸,为发炎性肠病的频繁使用化学诱发剂(Wirtz,2007,见上文)。为获得TNBS诱发的结肠炎,在乙醇中制备TNBS并直接投与到结肠中。乙醇与TNBS的组合导致破坏上皮粘膜层和自体与微生物蛋白质的半抗原化,这提高其免疫原性并诱发适应性Th1型免疫反应。此模型允许评估涉及保护免受上皮损坏以及适应性免疫的调节因子的治疗。

[0117] 为测试此模型中BSC的功效,根据表3治疗三周龄雌性Balb/c小鼠,每组18只(未治疗对照组中10只)。

[0118] 表3

[0119]

组编号	组大小（n）	组描述	抗生素预治疗第 0-9 天[1]	TNBS 疾病诱发第 31 天[2]	治疗和起始天数[3]
1	10	未治疗对照	无	无	无
2	18	阴性对照	无	+	PBS[4] 第 10 天
3	18	阳性对照	无	+	布地奈德 第 24 天
4	18	BSC[5]	无	+	BSC 第 0 天
5	18	Abx[6] 对照	+	+	PBS 第 10 天
6	18	Abx + SPF[7]	+	+	SPF 盲肠浆液 第 10 天
7	18	Abx + BSC	+	+	BSC 第 10 天

[0120] [1]以饮用水形式抗生素混合物的任意经口投药

[0121] [2] 80μl 2%TNBS的结肠内投药

[0122] [3]通过经口管饲投与疗法，一周3次直到在指示当天开始的第38天

[0123] [4]PBS＝磷酸盐缓冲盐水

[0124] [5]BSC＝研究级BSC是在无特殊预防措施以确保无菌封闭操作下在实验室环境中在小规模制造过程中产生。研究级物质表示临床级物质并含有临床BSC的活性孢子组分。

[0125] [6]Abx＝抗生素

[0126] [7]SPF＝由不含特异性病原体(SPF)小鼠的盲肠内含物制备的微生物丛

[0127] 实验的目标为评估抗生素预治疗对BSC功效的影响，因此三个组在接受其治疗之前接受呈饮用水形式的抗生素混合液的10天疗程(第5-7组)。第2组和第4-7组中的小鼠通过使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(第2和5对照组)、BSC(第4组和第7组)或小鼠盲肠浆液(第6组)每周三次经口管饲给药。在第31天，小鼠结肠内投与2%TNBS(第2-7组)，并随后观测直到第38天。周期性测量包括体重和临床得分。在第38天，将动物安乐死并评估结肠特征以产生总体病理学得分。制备结肠样品用于组织病理学并由对治疗组和测试项目盲目的病理学家对其评分。

[0128] TNBS诱发之后死亡是最引人注目的结果。损失超过50％动物表明发生TNBS过量。另外，在TNBS滴注时使用甲苯噻嗪和氯胺酮麻醉可能促进疾病的严重程度。此发现与文献(Scheiffele和Fuss，2002《免疫学分册(Curr Protocols Immunol.)》第15.19单元.在线发布:1 AUG 2002,DOI:10.1002/0471142735.im1519s49)中的报告一致。死亡动力学未在治疗组之间呈现不同(第2-7组)。死亡率在39％(阴性对照第2组和BSC第4组中死亡7/18)到61％(阳性对照第3组中死亡11/18)范围内。Abx对照第5组具有处于56％(死亡10/18)的死亡率中等级别。未治疗组中不存在死亡。接受BSC的组(第4和7组)的死亡率与任何其它治疗组相同。

[0129] TNBS治疗相比于未治疗小鼠也引起显著体重下降、临床和宏观病理学得分恶化和死亡(第2组对第1组)。布地奈德(第3组)糖皮质激素阳性对照关于所检测的任一参数未显

著保护小鼠免受TNBS诱发的疾病。相反，阳性对照组比阴性对照小鼠更加显著地损失体重并具有恶化的临床得分。单独投与BSC的小鼠（第4组）在体重、临床得分或宏观病理学和组织结构得分方面与阴性对照小鼠相同。Abx对照（第5组）展示相比于阴性对照（第2组）显著更多的最大体重下降和恶化的临床得分。总体而言，Abx+SPF（第6组）组表现地类似于其Abx对照（第5组），不同之处在于提高的临床得分。

[0130] 相比于其它具有极少功效的治疗组，Abx+BSC（第7组）具有一致的改善征象。Abx+BSC（第7组）在第36天比其对照（Abx对照第5组）显著损失更少的体重并且总体而言具有更低的最大体重下降。尽管统计学上并不显著，但Abx+BSC（第7组）具有在治疗组最低之间的临床得分并且显著低于其对照（Abx对照第5组）。Abx+BSC（第7组）也展示关于宏观病理学（$p=0.1$）强烈倾向于保护的趋势。Abx+BSC小鼠具有任何治疗组的最低宏观病理学得分。关于组织病理学得分，针对任一治疗组未观测到显著差异。因此，似乎将BSC添加到抗生素混合物预治疗对体重、临床得分和结肠宏观病理学具有有益影响。

[0131] 综上所述，这些数据与在TNBS结肠炎模型中抗生素治疗之后递送的BSC的功效信号相一致，尽管观测到这些数据是在以下环境中：存在高水平死亡率和对应的显著临床症状和组织病理学，表明使用TNBS对动物的过量给药，可能作为麻醉结果。在一些实施例中，使用抗生素与BSC的组合治疗诊断患有IBD或处于IBD爆发风险的个体。

[0132] 实例5：有和无广谱抗生素或万古霉素预治疗的结肠炎的TNBS模型

[0133] 使用BSC与抗生素的组合使用TNBS模型（见上文描述）进行其它实验。在这些实验中，根据表4治疗三周龄雄性Balb/c小鼠，每组24只（未治疗对照组中9只）。

[0134] 表4

[0135]

组编号	组大小（n）	组描述	抗生素预治疗第1-5天[1]	TNBS疾病诱发第28天[2]	测试项目和起始天数[3]
1	9	未治疗对照	无	无	无
2	24	阴性对照	无	+	PBS[4] 第7天
3	24	阳性对照	无	+	抗IL12[5] 第28天
4	24	BSC[6]	无	+	BSC 第0天
5	24	Vanco[7]对照	万古霉素	+	PBS 第7天
6	24	Vanco + BSC	万古霉素	+	BSC 第7天
7	24	Abx[8]对照	抗生素混合物	+	PBS 第7天
8	24	Abx + BSC	抗生素混合物	+	BSC 第7天

[0136] [1]以饮用水形式单独抗生素混合物或万古霉素的任意经口投药

[0137] [2] 80μl 2%TNBS的结肠内投药

[0138] [3]通过经口管饲投与疗法，一周3次直到在指示当天开始的第35天，除了所指示时。

[0139] [4]PBS＝磷酸盐缓冲盐水

[0140] [5]抗IL12＝对介白素12p40亚单位的抗体，在第28天腹膜内投与一次25mg/kg。

[0141] [6]BSC＝研究级BSC是在无特殊预防措施以确保无菌封闭操作下在实验室环境中在小规模制造过程中产生。研究级物质表示临床级物质并含有临床BSC的活性孢子组分。

[0142] [7]Vanco＝万古霉素

[0143] [8]Abx＝抗生素

[0144] 在接受治疗之前以其饮用水形式向小鼠投与万古霉素(第5组和第6组)或抗生素混合物(第7组和第8组)以评估对BSC功效的影响(第5-8组)。小鼠使用PBS(第2组、第5组和第7组)或BSC(第6组和第8组)通过经口管饲给药，在第7天开始每周三次并持续到研究结束(第35天)。第4组中的小鼠在第0天开始通过经口管饲接受BSC，每周三次。在第28天，小鼠经异氟醚麻醉并接受结肠内2％TNBS(第2-8组)。周期性测量包括体重和临床得分。在第35天，将动物安乐死并评估宏观病理学。制备结肠样品用于组织病理学并由对治疗组和测试项目盲目的病理学家对其评分。

[0145] 总体而言，TNBS治疗引起显著体重下降、死亡以及临床和宏观病理学恶化(阴性对照第2组对未治疗第1组)。TNBS诱发之后的死亡率在阴性对照组中最高，处于33％(8/24死亡或安乐死)。在未治疗对照第1组、Abx对照第7组或Abx+BSC第8组中不存在死亡。死亡率的中间级别见于阳性对照第3组(1/24，4％)、BSC第4组(1/24，4％)、Vanco对照第5组(2/24，8％)和Vanco+BSC第6组(3/24，12％)中。所有存活曲线的比较发现在治疗组之间死亡分布的显著差异(对数级(Mantel-Cox)测试，p＝0.02)。进一步成对分析展示在阴性对照第2组中相比于未治疗第1组存活率降低的强烈趋势(p＝0.06)，其它组未彼此不同。因此，所观测到的存活曲线的差异可归因于阴性对照组中较高的死亡率。

[0146] 相比于未治疗第1组，阴性对照/第2组中的小鼠展示显著的体重减轻。此体重下降在第28天在TNBS投药之后并且维持到第35天(结束)。在第31-33天期间，阳性对照第3组、BSC第4组和Abx对照第7组中的小鼠全部获得比阴性对照小鼠显著更多的体重。分析最大百分比体重减轻，单独BSC(第4组)也展示相比于阴性对照小鼠(p＝0.10)倾向于改善的趋势。

[0147] 尽管使用单独抗生素混合物预治疗的小鼠(Abx对照第7组)展示保护免受体重减轻，但不存在单独万古霉素(Vanco对照第5组)的影响。当在万古霉素或抗生素预治疗(第6组和第8组)之后投与BSC时，相比于其各别对照组(第5组和第7组)，不存在显著体重增加。总体而言，当与阴性对照/第2组比较时，针对接受万古霉素或抗生素混合物的任何组，不存在对最大百分比体重下降的显著影响。

[0148] 阴性对照组的临床得分相比于未治疗组由TNBS治疗显著恶化。尽管所有组均显著低于阴性对照组，但阳性对照第3组、BSC第4组和Abx对照第7组的临床得分提高。Vanco对照第5组相对于阴性对照第2组未统计学上提高；然而，BSC与万古霉素组合(第6组)相对于Vanco对照第5组具有提高的临床得分，展示使用组合治疗增加的益处。在Abx对照组与Abx+BSC之间观测到临床得分无显著差异。因此，抗IL-12阳性对照和单独BSC两者均改善TNBS结肠炎的临床征象和症状。万古霉素之后的BSC也展示相比于仅万古霉素对照的改善。

[0149] 正如预期，在阴性对照第2组中，相比于未治疗第1组，TNBS治疗引起显著增加的宏观病理学得分。与体重下降降低和临床得分提高一致，结肠宏观病理学得分在单独BSC(第4组)中显著提高。组织病理学得分也与其它终点相一致，其中阳性对照第2组具有显著的疾病的组织学征象并且BSC第4组具有强烈的改善趋势(p＝0.14)。尽管Vanco组与阴性对照第

2组相同，但组合Vanco+BSC组（第6组）相比于单独Vanco（第5组）存在显著的组织病理学改善。在各组之间未注意到其它显著差异。

[0150] 综上所述，TNBS诱发的疾病表征为体重减轻、死亡以及临床和宏观病理学得分恶化。接受单独BSC的组在所测量的三个参数方面显著改善（体重、临床得分和宏观病理学得分），在三个其它参数（死亡、最大体重下降和组织病理学）方面具有倾向于改善的强烈趋势。另外，BSC与万古霉素的组合相比于其仅万古霉素的对照组显著提高临床和组织病理学得分。相比之下，通过单独抗生素混合物（Abx对照第5组）获得的显著的防护级别使得难以检测归因于添加BSC治疗（Abx+BSC）的增加的益处。

[0151] 这些数据表明，BSC和万古霉素两者跟随有BSC在小鼠TNBS实验结肠炎模型中具有保护性。

[0152] 申请人注意到在此实验的重复中，TNBS诱发的疾病表征为体重减轻、死亡以及临床得分和结肠病理学恶化。尽管死亡率低于第一TNBS研究中的那些死亡率，但其仍高达25％，表明TNBS毒性主导实验中所见的影响。BSC单独或与万古霉素或抗生素组合未显著改善结果。抗IL-12p40在此研究中对体重、死亡率或临床得分不具有有益影响，并且与如通过改善的宏观病理学所评估的组织损伤的改善相关。由于在抗IL-12p40对照中未预期的不良反应，申请人认为此实验的整体结果是异常的。

[0153] 实例6：具有活性轻度到中度溃疡性结肠炎的人类个体的治疗

[0154] 为确定BSC用于治疗溃疡性结肠炎的安全性和可能功效，鉴别具有轻度到中度溃疡性结肠炎的个体（例如，通过乙状结肠镜检查判定具有至少15cm疾病、梅友评分≥4到10并且梅奥内窥镜分项评分≥2的个体）。使用媒剂或万古霉素预治疗个体6天，随后按表5中的指示治疗个体。

[0155] 表5：用于治疗人类轻度到中度溃疡性结肠炎的实验设计

[0156]

预治疗（6天）	BSC	频率	持续时间
安慰剂	BSC+安慰剂	每周BSC；安慰剂6天/周	8周
万古霉素	BSC+安慰剂	每周BSC；安慰剂6天/周	8周
万古霉素	仅BSC	每天	8周
安慰剂	安慰剂	每天	8周

[0157] 除了评估溃疡性结肠炎的临床症状以外，还评定个体胃肠道微生物组的组合物的变化。

[0158] 使用BSC治疗改善溃疡性结肠炎，如通过例如以下所示：总梅友评分从基线的降低≥1点（例如，≥3点）；在第8周，直肠出血分项评分降低≥1点或绝对直肠出血分项评分为0或1；完成内窥镜缓解，如由第8周内窥镜梅友评分为0或1所指示；或完成缓解，如由第8周总梅友评分≥2并且内窥镜分项评分为0或1所指示。

[0159] 在以下编号段落中进一步描述本发明。

[0160] 1.一种治疗诊断患有结肠炎个体的方法，所述方法包含：(a)向所述个体投与抗生素；和(b)向所述个体投与细菌孢子组合物(BSC)。

[0161] 2.根据段落1所述的方法，其中所述结肠炎是克罗恩氏病或溃疡性结肠炎。

[0162] 3.根据段落1或2所述的方法，其中所述抗生素是万古霉素。

[0163] 4.根据段落1到3中任一项所述的方法，其中所述抗生素和所述细菌孢子组合物同时投与。

[0164] 5.根据段落1到3中任一项所述的方法，其中所述抗生素和所述细菌孢子组合物依序投与。

[0165] 6.根据段落1到5中任一项所述的方法，其中所述细菌孢子组合物在所述抗生素最终给药24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、两周或三周内投与。

[0166] 7.根据段落1到6中任一项所述的方法，其中所述细菌孢子组合物以单次剂量投与。

[0167] 8.根据段落1到6中任一项所述的方法，其中所述细菌孢子组合物每天、至少每隔一天、至少每3天、至少每4天、至少每5天、至少每6天、至少每周、至少每2周、至少每3周、至少每4周、至少每8周、至少每12周或至少每16周投与。

[0168] 9.根据段落1到8中任一项所述的方法，其中所述细菌孢子组合物呈胶囊或丸剂形式。

[0169] 10.根据段落1到9中任一项所述的方法，其中所述组合物包含少于或等于99％营养细胞。

[0170] 11.根据段落1到10中任一项所述的方法，其中所述个体患有活动性结肠炎。

[0171] 12.根据段落1到11中任一项所述的方法，其中所述个体已诊断患有轻度到中度溃疡性结肠炎。

[0172] 13.根据段落1到12中任一项所述的方法，其中所述个体用所述BSC每周治疗为期至少8周或每日治疗为期至少8周。

[0173] 14.根据段落1到13中任一项所述的方法，其中所述BSC包含孢子形成细菌。

[0174] 15.根据段落1到14中任一项所述的方法，其中所述BSC包含孢子。

[0175] 16.根据段落15所述的方法，其中所述孢子直接来源于人类粪便。

[0176] 17.根据段落16所述的方法，其中所述孢子使用乙醇直接衍生。

[0177] 18.根据段落14到17中任一项所述的方法，其中所述组合物基本上由孢子组成。

[0178] 19.根据段落10所述的方法，其中所述组合物包含少于或等于20％营养细胞。

[0179] 20.一种细菌孢子组合物与抗生素组合用于治疗结肠炎的用途。

[0180] 21.一种细菌孢子组合物与抗生素组合用于制备用于治疗结肠炎的药剂的用途。

[0181] 其它实施例是在所附权利要求书的范围内。

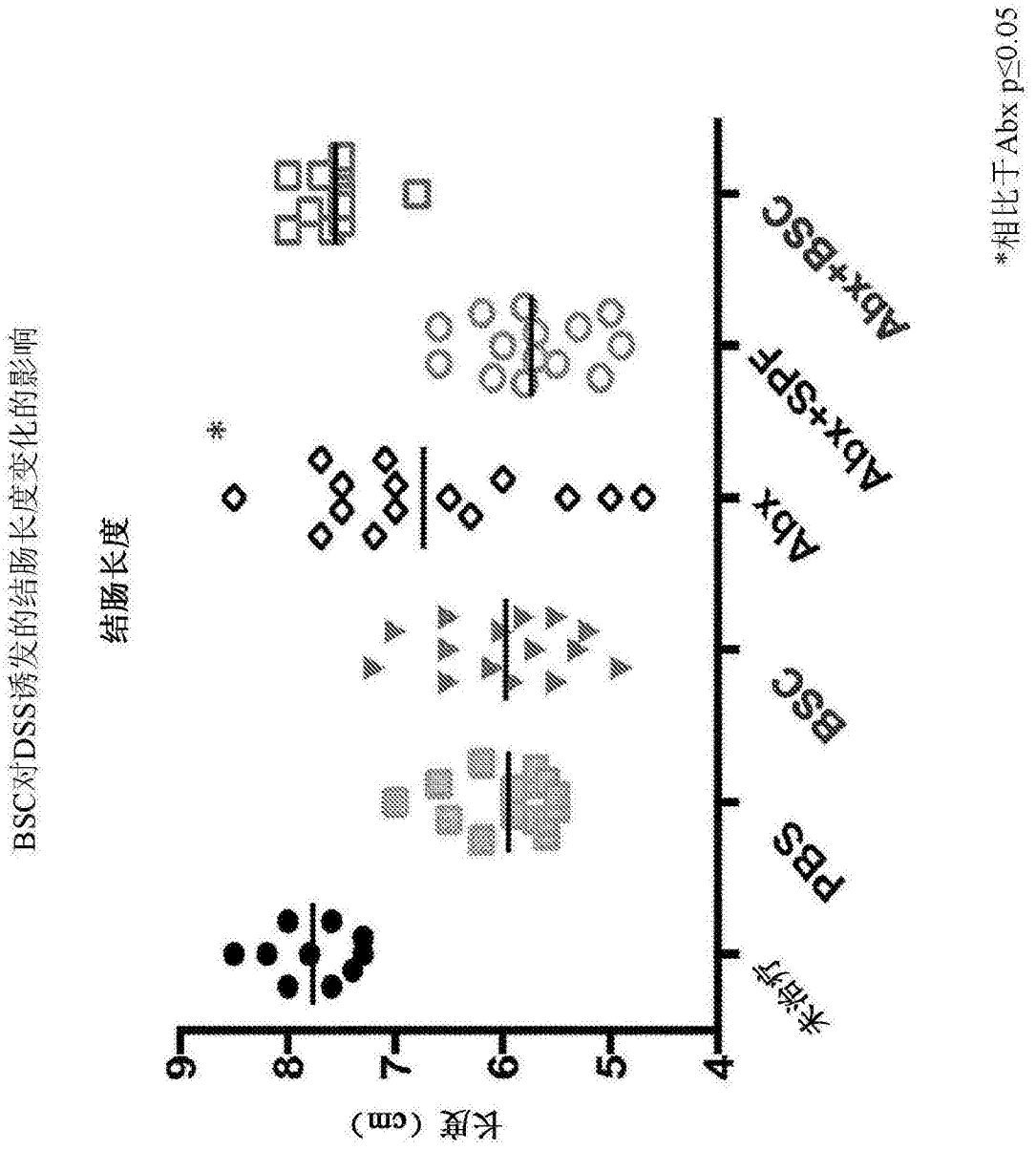

BSC对DSS诱发的结肠长度变化的影响
结肠长度
长度（cm）
9
8
7
6
5
4
未治疗
PBS
BSC
Abx
Abx+SPF
Abx+BSC
*
*相比于Abx p≤0.05

图1

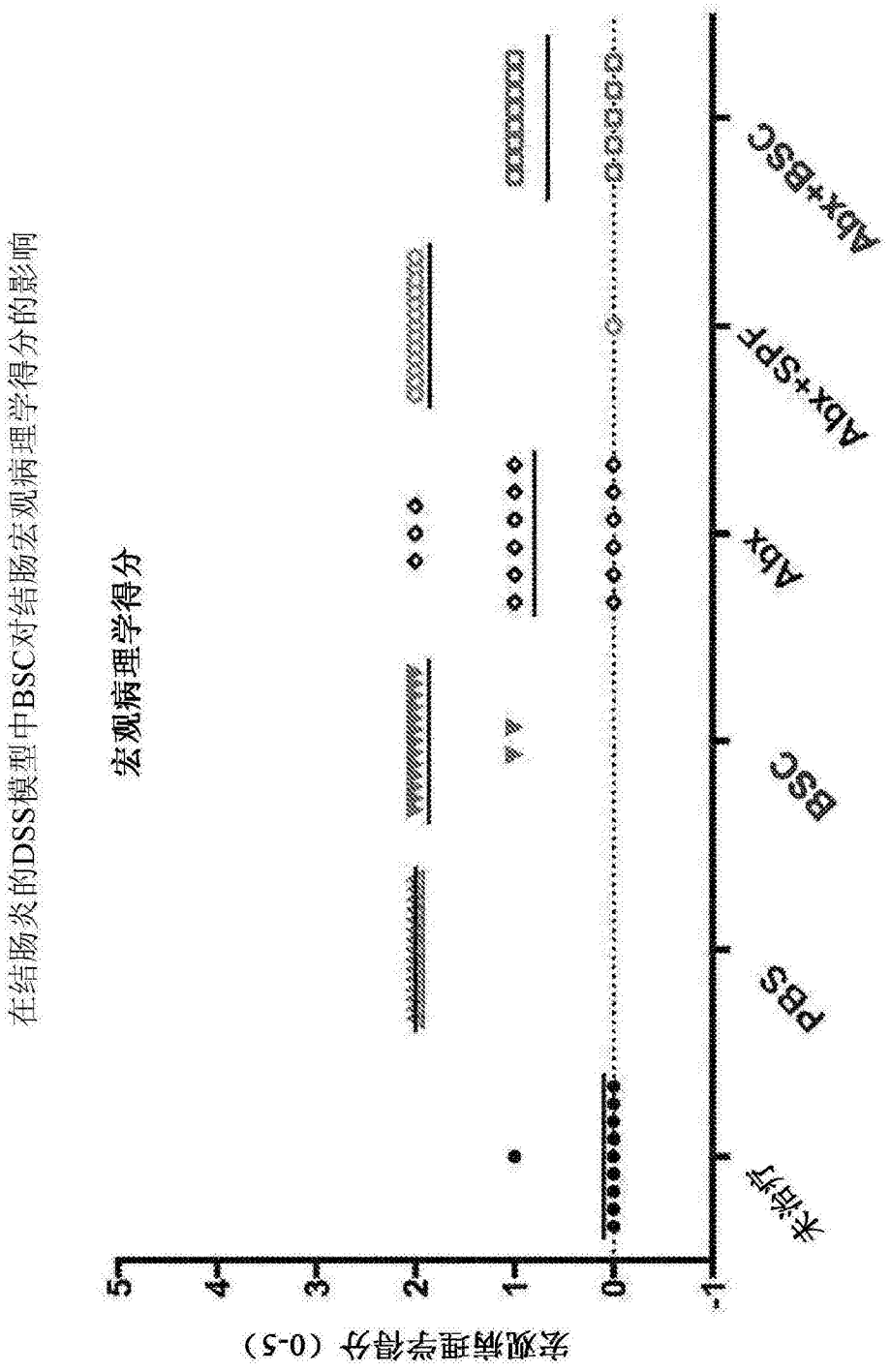

在结肠炎的DSS模型中BSC对结肠宏观病理学得分的影响
宏观病理学得分
宏观病理学得分（0-5）
5
4
3
2
1
0
-1
未治疗
PBS
BSC
Abx
Abx+SPF
Abx+BSC

图2

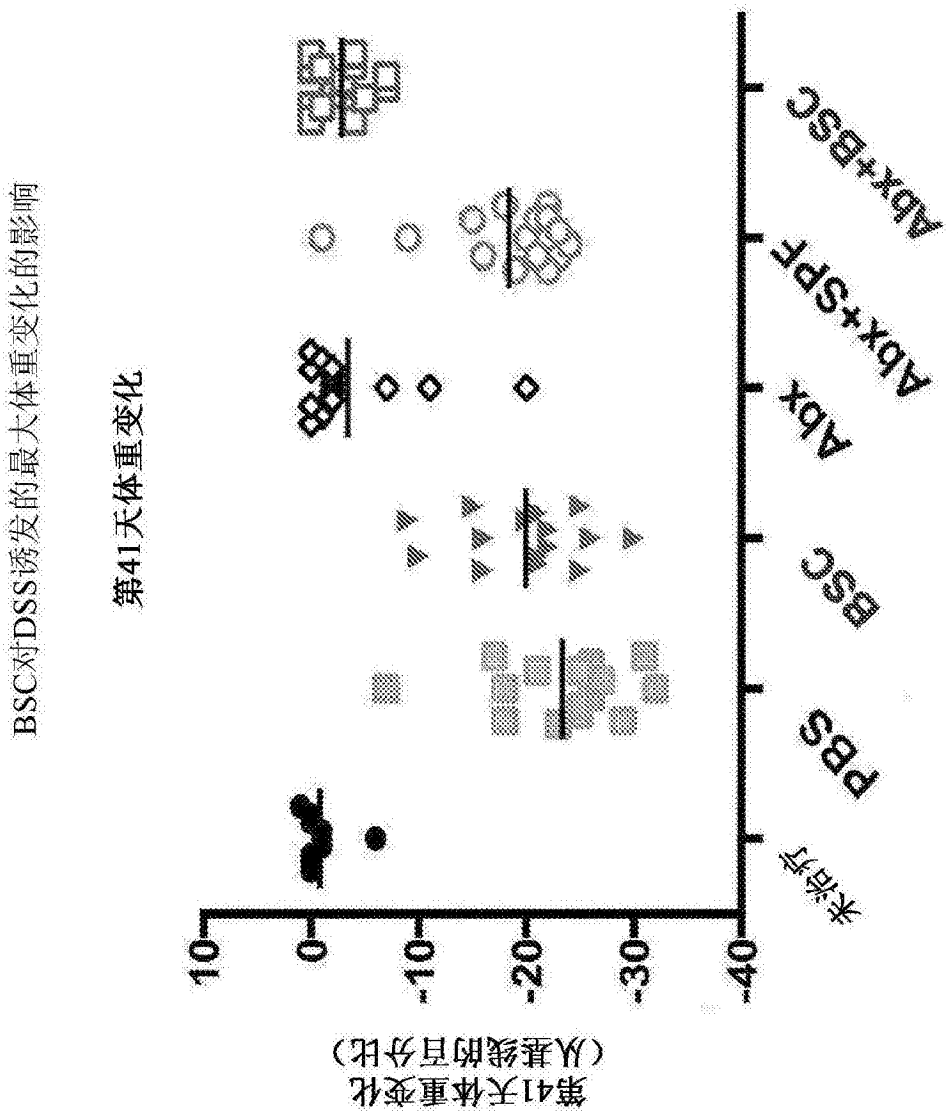

BSC对DSS诱发的最大体重变化的影响
第41天体重变化
第41天体重变化
（从基线的百分比）
10
0
-10
-20
-30
-40
未治疗
PBS
BSC
Abx
Abx+SPF
Abx+BSC

图3

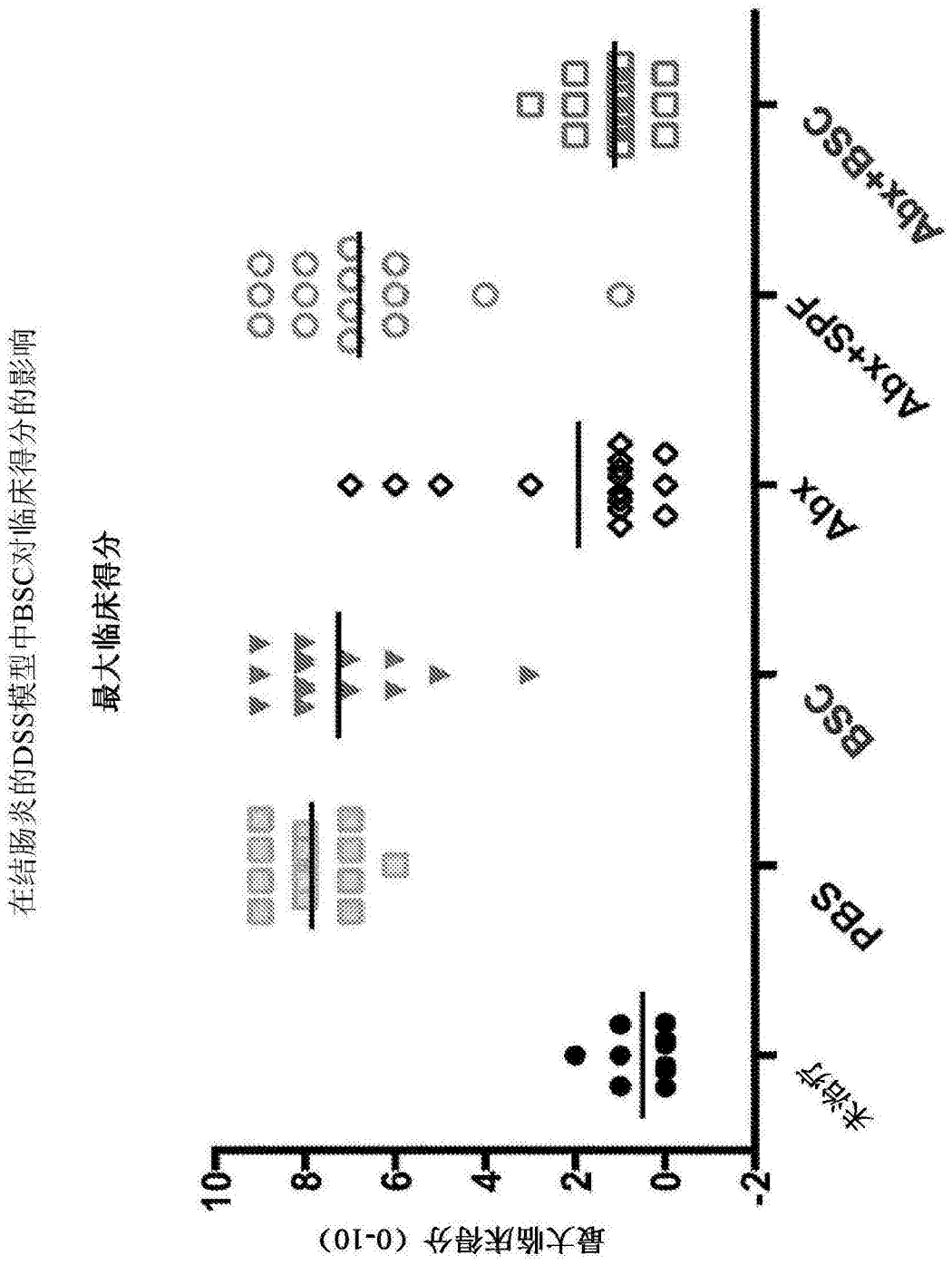

在结肠炎的DSS模型中BSC对临床得分的影响
最大临床得分
最大临床得分 (0-10)
10
8
6
4
2
0
-2
未治疗
PBS
BSC
Abx
Abx+SPF
Abx+BSC

图4