



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119033822 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202411196564.7

(22) 申请日 2017.12.20

(30) 优先权数据

62/436,711 2016.12.20 US

62/447,992 2017.01.19 US

(62) 分案原申请数据

201780086503.7 2017.12.20

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国

(72) 发明人 E·萧 J·矢野 H·王

C·奥尔森

(74) 专利代理机构 北京嘉和天工知识产权代理

事务所(普通合伙) 11269

专利代理师 王玥娇 缪策

(51) Int.Cl.

A61K 35/741 (2015.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A23L 33/00 (2016.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书26页 附图38页

(54) 发明名称

用于抑制癫痫发作的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制癫痫发作的组合物和方法。本发明提供了与治疗或预防癫痫发作相关的方法和组合物。在一些方面,本发明提供了通过向受试者施用包含副拟杆菌属和艾克曼菌属细菌的组合物来治疗或预防所述受试者的癫痫发作的方法。

1. 一种预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

2. 一种通过改变受试者中的神经递质素生物合成来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

3. 一种通过改变受试者中的血清生酮氨基酸来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

4. 一种通过使受试者中的 γ -谷氨酰转肽酶活性降低来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

5. 一种通过使受试者中的谷氨酰胺合成酶活性降低来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

6. 一种通过使受试者中的 γ -谷氨酰基氨基酸减少来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

7. 一种通过使受试者中的GABA/谷氨酸盐比率水平增加来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

8. 一种通过使受试者中的谷氨酰胺水平增加来预防或治疗所述受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向所述受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述艾克曼菌属 (Akk) 的所述细菌包括嗜粘蛋白艾克曼菌。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述副拟杆菌属 (Pb) 的所述细菌包括粪副拟杆菌。

用于抑制癫痫发作的组合物和方法

[0001] 本申请是2017年12月20日递交的PCT国际申请PCT/US2017/067548于2019年08月14日进入中国国家阶段的中国专利申请号为201780086503.7、发明名称为“用于抑制癫痫发作的组合物和方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2016年12月20日提交的美国临时专利申请序列号62/436,711和2017年1月19日提交的美国临时专利申请序列号62/447,992的优先权权益,所述美国临时专利申请各自以引用的方式整体并入本文。

[0004] 政府资助

[0005] 本发明根据由国立卫生研究院授予的拨款号GM065823和拨款号GM106996在政府资助下完成。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0006] 本申请涉及用于抑制癫痫发作的组合物和方法。

背景技术

[0007] 癫痫的特征在于复发性癫痫发作,其可导致意识丧失、知觉丧失和/或运动、自主功能、感觉(包括视觉、听觉和味觉)、情绪和/或精神功能的障碍。癫痫折磨发达国家1-2%的人口。

[0008] 低碳水化合物高脂肪生酮膳食(KD)是一种针对其中超过三分之一的癫痫个体不对现有抗惊厥药物起响应的难治性癫痫的治疗。KD的功效由多个回顾性和前瞻性研究所支持,所述研究估计约30%的患者变为无癫痫发作,并且约60%的患者经受显著益处。然而,尽管KD具有治疗癫痫的价值以及它正日益增加应用于包括自闭症、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、代谢综合征和癌症的其它病症,但由于难以实施、膳食顺应性和不利副作用,所以对它的使用仍然是低下的。实际上,即使成功减轻癫痫发作,截至膳食性疗法的第三年,估计仅12%癫痫患者保持采用KD。此外,对KD的有益作用的潜在机理的了解不充分,并且缺乏用于干预的分子和/或细胞靶标。膳食在药物失败的情况下成功控制各种类型的症状表明它使不由现有药物靶向的内源性神经保护路径增强。

发明内容

[0009] 本文提供了用于通过向受试者施用益生菌组合物来模拟生酮膳食的作用的方法和组合物。在某些实施方案中,方法和组合物用于治疗或预防受试者(例如患有诸如自闭症谱系障碍、雷特综合征(Rett syndrome)、X染色体脆折(fragile X)、注意力缺陷障碍(ADD)、注意力缺陷/活动过度障碍(ADHD)、难治性癫痫和/或非难治性癫痫之类的神经发育病症的受试者)的癫痫发作。在其它实施方案中,方法和组合物用于预防或治疗受试者的疾患(例如癫痫、癫痫发作、自闭症谱系障碍、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病(Huntington's

disease)、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、癌症、中风、代谢疾病(例如糖尿病或肥胖症)、线粒体病症、抑郁症、偏头痛(例如慢性偏头痛)、雷特综合征、注意力缺陷障碍、脆性X染色体综合征或创伤性脑损伤(TBI))。优选地,方法包括向受试者施用一种包含艾克曼菌属(Akkermansia,Akk)和副拟杆菌属(Parabacteroides,Pb)的细菌的组合物或多种合起来包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。在一些实施方案中,组合物包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌。在一些实施方案中,艾克曼菌属(Akk)的细菌包括嗜粘蛋白艾克曼菌(Akkermansia muciniphila)。在一些实施方案中,副拟杆菌属(Pb)的细菌包括粪副拟杆菌(Parabacteroides merdae)和/或迪氏副拟杆菌(Parabacteroides distasonis)。在一些方面,方法包括使受试者的肠道微生物群消减,以及向受试者施用包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组合物。在一些实施方案中,组合物中至少10%、至少30%、至少50%、至少70%或至少90%的细菌是艾克曼菌属(Akk)细菌。在一些实施方案中,组合物中至少10%、至少30%、至少50%、至少70%或至少90%的细菌是副拟杆菌属(Pb)细菌。在一些实施方案中,受试者正在采用某种膳食,并且所述膳食可为对照膳食、生酮膳食、高脂肪膳食或低碳水化合物膳食。组合物可被配制用于经口或经直肠递送。组合物可为食物产品。在一些实施方案中,食物产品是乳制品(例如酸奶)。在一些实施方案中,组合物包含益生菌。在一些实施方案中,组合物是自我施用的。在一些实施方案中,组合物包含粪便样品(例如来自粪便库的粪便样品),所述粪便样品包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属(Pb)的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)。在一些实施方案中,对受试者给与抗生素以使受试者的肠道微生物群消减。

[0010] 在一方面,提供一种预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0011] 在一方面,提供一种通过改变受试者中的神经递质生物合成来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0012] 在一方面,提供一种通过改变受试者中的血清生酮氨基酸来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0013] 在一方面,提供一种通过使受试者中的 γ -谷氨酰转肽酶活性降低来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0014] 在一方面,提供一种通过使受试者中的谷氨酰胺合成酶活性降低来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0015] 在一方面,提供一种通过使受试者中的 γ -谷氨酰基氨基酸减少来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物。

[0016] 在一方面,提供一种通过使受试者中的GABA/谷氨酸盐比率水平增加来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属

(Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

[0017] 在一方面,提供一种通过使受试者中的谷氨酰胺水平增加来预防或治疗受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

[0018] 在一方面,提供一种治疗或预防受试者中的对生酮膳食起响应的疾患的方法,其包括

[0019] (a) 使受试者的肠道微生物群消减,

[0020] (b) 向受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

[0021] 在一方面,提供一种组合物,其包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌。

[0022] 在一方面,提供一种预防或治疗受试者中的疾患的方法,其包括向受试者施用包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb) 的细菌的组合物。

[0023] 在一些实施方案中,艾克曼菌属 (Akk) 的细菌包括嗜粘蛋白艾克曼菌。

[0024] 在一些实施方案中,副拟杆菌属 (Pb) 的细菌包括粪副拟杆菌。

[0025] 在一些实施方案中,副拟杆菌属 (Pb) 的细菌包括迪氏副拟杆菌。

[0026] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少10%是艾克曼菌属 (Akk)。

[0027] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少30%是艾克曼菌属 (AKK)。

[0028] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少50%是艾克曼菌属 (Akk)。

[0029] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少70%是艾克曼菌属 (Akk)。

[0030] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少90%是艾克曼菌属 (Akk)。

[0031] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少10%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。

[0032] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少30%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。

[0033] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少50%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。

[0034] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少70%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。

[0035] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少90%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。

[0036] 在一些实施方案中,疾患是癫痫发作,任选其中受试者患有例如选自癫痫、自闭症谱系障碍、雷特综合征、注意力缺陷障碍和脆性X染色体综合征的神经发育疾患。

[0037] 在一些实施方案中,受试者患有选自阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、癌症、中风、代谢疾病、线粒体病症、抑郁症、偏头痛和创伤性脑损伤 (TBI) 的疾患。

[0038] 在一些实施方案中,受试者正在采用某种膳食,并且膳食是对照膳食。

[0039] 在一些实施方案中,受试者正在采用某种膳食,并且膳食是生酮膳食。

[0040] 在一些实施方案中,受试者正在采用某种膳食,并且膳食是高脂肪膳食。

[0041] 在一些实施方案中,受试者正在采用某种膳食,并且膳食是低碳水化合物膳食。

[0042] 在一些实施方案中,组合物被配制用于经口递送。

[0043] 在一些实施方案中,组合物是食物产品。

[0044] 在一些实施方案中,食物产品是乳制品。

[0045] 在一些实施方案中,食物产品是酸奶。

[0046] 在一些实施方案中,组合物被配制用于经直肠递送。

[0047] 在一些实施方案中,组合物是自我施用的。

- [0048] 在一些实施方案中,组合物包含粪便样品,粪便样品包含艾克曼菌属 (Akk) 和副拟杆菌属 (Pb)。
- [0049] 在一些实施方案中,粪便样品来自粪便库。
- [0050] 在一些实施方案中,方法进一步包括向受试者施用抗生素以使受试者的肠道微生物群消减。
- [0051] 在一些实施方案中,方法进一步包括对受试者的肠道微生物群测序。
- [0052] 在一些实施方案中,疾患选自阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、癌症、中风、代谢疾病、线粒体病症、抑郁症、偏头痛和创伤性脑损伤 (TBI)。
- [0053] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少10%是艾克曼菌属 (Akk) 细菌。
- [0054] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少30%是艾克曼菌属 (Akk) 细菌。
- [0055] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少50%是艾克曼菌属 (Akk) 细菌。
- [0056] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少70%是艾克曼菌属 (Akk) 细菌。
- [0057] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少90%是艾克曼菌属 (Akk) 细菌。
- [0058] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少10%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。
- [0059] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少30%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。
- [0060] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少50%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。
- [0061] 在一些实施方案中,组合物中细菌的至少90%是副拟杆菌属 (Pb) 细菌。
- [0062] 在一些实施方案中,乳制品是酸奶。
- [0063] 在一些实施方案中,疾患是自闭症谱系障碍、癫痫、癫痫发作、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化 (ALS)、癌症、中风、代谢疾病、线粒体病症、抑郁症、偏头痛、雷特综合征、注意力缺陷障碍、脆性X染色体综合征和创伤性脑损伤 (TBI)。

附图说明

[0064] 图1具有六个部分A-F,其显示响应于生酮膳食的癫痫发作保护作用和生酮作用与肠道微生物群的变化相关联。部分A显示喂以对照膳食 (CD) 或生酮膳食 (KD) 2、4、8、10或14天的小鼠的独立群组中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值 (左侧)。n=8、6、9、20、6 (CD); 8、7、12、21、5 (KD)。在膳食性处理后14天,在经癫痫发作测试小鼠的代表性群组中的行为 (右侧)。在y=10秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值,并且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。n=16。部分B显示喂以CD或KD 2、4、8、10或14天的小鼠的独立群组中的血清葡萄糖水平。将数据相对于各时间点处在SPF CD小鼠中所见的血清葡萄糖水平加以归一化。n=8、5、8、8、19 (CD); 8、8、8、7、19 (KD)。部分C显示喂以CD或KD 2、4、8、10或14天的小鼠的独立群组中的血清 β -羟基丁酸 (BHB) 水平。n=8、13、8、8、37 (CD); 8、16、8、7、38 (KD)。部分D显示基于对来自喂以CD或KD 0、4、8或14天的小鼠的独立群组的粪便的16S rDNA剖析,对加权 (左侧) 和未加权 (右侧) UniFrac距离矩阵的主坐标分析 (PCoA)。n=3笼 (9只小鼠)/组。部分E显示来自喂以CD或KD 14天的小鼠的粪便16S rDNA测序数据的 α -多样性。n=3笼/组。部分F显示由粪便16S rDNA测序数据获得的嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种的相对丰度。n=3笼 (9只小鼠)/组。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的双因素ANOVA (a-c,e),使用邦弗伦尼检验的克鲁斯凯-沃利斯 (Kruskal-Wallis) 检验 (f): $P <$

0.05, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。n.s. = 非统计显著。SPF = 无特定病原体(常规定殖), CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, CC50 = 在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度, BHB = β -羟基丁酸, OTU = 操作分类单元。

[0065] 图2具有两个部分A-B, 其显示生酮膳食使区分KD肠道微生物群与CD肠道微生物群的所选细菌物种富集。部分A显示在用CD(顶部)对照KD(底部)处理之后, 在第0、4、8和14天, 基于对粪便肠道微生物群的16S rDNA测序的 α -多样性。n=3/时间点。部分B显示在喂以KD(顶行)或CD(底行)的SPF小鼠中富集的所选细菌分类单元的相对丰度。n=3。数据呈现为平均值+s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的克鲁斯凯-沃利斯检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ 。n.s. = 非统计显著。CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食。

[0066] 图3具有四个部分A-D, 其显示肠道微生物群与生酮膳食的抗癫痫发作作用的关系。部分A显示喂以CD或KD的SPF小鼠、GF小鼠或常规化GF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值。n=13、18、12、6。部分B显示喂以CD或KD的SPF小鼠、GF小鼠或常规化GF小鼠中的血清BHB(左侧)和葡萄糖(右侧)水平。n=37、38、19、8。部分C显示在用媒介物或Abx膳食前处理进行处理的SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值。n=13、18、13。部分D显示在用媒介物或Abx膳食前处理进行处理的SPF小鼠中的血清BHB(左侧)和葡萄糖(右侧)水平。n=18、18、19(BHB); n=12、11、11(葡萄糖)。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。n.s. = 非统计显著。SPF = 无特定病原体(常规定殖), GF = 无菌, GF-conv = 用SPF微生物群无菌常规化, CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, CC50 = 在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度。BHB = β 羟基丁酸, veh = 媒介物, Abx = 抗生素(氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑[AVNM])。

[0067] 图4具有两个部分A-B, 其显示KD相关细菌充分介导生酮膳食的抗癫痫发作作用。部分A显示用媒介物或Abx预处理以及用副拟杆菌属种(粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌)、嗜粘蛋白艾克曼菌、两者、或长双歧杆菌定殖的SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(左侧)。n=13、18、15、6、8、5、5。在经癫痫发作测试小鼠的代表性群组中的行为(右侧)。在y=10秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值, 并且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。n=12、16、8、25。部分B显示用副拟杆菌属种(粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌)和/或嗜粘蛋白艾克曼菌定殖的GF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(顶部)。n=15、4、9、9。在经癫痫发作测试小鼠中的行为(底部)。在y=10秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值, 并且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。n=17、19。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。SPF = 无特定病原体(常规定殖), GF = 无菌, CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, CC50 = 在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度, veh = 媒介物, Abx = 用抗生素(氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑[AVNM])预处理, Pb = 副拟杆菌属种(粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌), Akk = 嗜粘蛋白艾克曼菌, AkkPb = 嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌, Bf = 长双歧杆菌。

[0068] 图5具有三个部分A-C, 其显示KD相关微生物群在喂以对照膳食的小鼠中赋予癫痫发作保护作用。部分A显示移植了CD微生物群(CD-FMT)或KD微生物群(KD-FMT)并喂以CD或KD的经Abx处理SPF中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(左侧)。n=6、5、5。在经癫痫发作测试小鼠的代表性群组中的行为(右侧)。在y=10秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值, 并

且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。 $n=12$ 。部分B显示用媒介物或Abx预处理以及用副拟杆菌属种(粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌)、嗜粘蛋白艾克曼菌、两者、或长双歧杆菌定殖的SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(左侧)。 $n=13、18、9、8、6、6$ 。部分C显示用嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌(AkkPb)、单独嗜粘蛋白艾克曼菌(Akk)或经热杀灭嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种(hk-AkkPb)进行口服管饲的SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(左侧)。 $n=6、6、4、3$ 。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA: $*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.0001$ 。SPF=无特定病原体(常规定殖),CD=对照膳食,KD=生酮膳食,CC50=在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度,CD-FMT=用CD微生物群移植,KDFMT=用KD微生物群移植,veh=媒介物,Abx=用抗生素(氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑[AVNM])预处理,Pb=副拟杆菌属种(粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌),Akk=嗜粘蛋白艾克曼菌,AkkPb=嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌,Bf=长双歧杆菌,hk-AkkPb=经热杀灭嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌。

[0069] 图6具有四个部分A-D,其显示响应于对照膳食,KD微生物群和KD相关癫痫发作保护作用的逆转。部分A显示基于对来自喂以CD 28天的SPF小鼠(CD)、喂以KD 28天的小鼠(KD)、或喂以KD 14天继之以喂以CD 14天的小鼠(KD-CD)的粪便的纵向16S rDNA剖析,对加权UniFrac距离矩阵的主坐标分析(PCoA)。 $n=3$ 笼/组。部分B显示喂以CD 28天的SPF小鼠(CD)、喂以KD 28天的小鼠(KD)、或喂以KD 14天继之以喂以CD 14天的小鼠(KD-CD)中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值(左侧)。 $n=4$ 。部分C显示在用嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌(AkkPb)、单独嗜粘蛋白艾克曼菌(Akk)或经热杀灭嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种(hk-AkkPb)进行益生菌处理之后21天,SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值。(左侧)。 $n=8$ 。部分D显示用媒介物或嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌(AkkPb)进行口服管饲4天的SPF小鼠中响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值。 $n=6、7、7、7$ 。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA: $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.0001$,n.s.=非统计显著。SPF=无特定病原体(常规定殖),CD=对照膳食,KD=生酮膳食,KD-CD=喂以KD 14天继之以喂以CD 14天。CC50=在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度,veh=媒介物,Akk=嗜粘蛋白艾克曼菌,AkkPb=嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌,hk-AkkPb=经热杀灭嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌。

[0070] 图7具有五个部分A-E,其显示KD相关细菌介导响应于生酮膳食的针对强直-阵挛癫痫发作的保护作用。部分A显示基于对来自喂以CD或KD 14天的Kcna1^{-/-}小鼠的粪便的16S rDNA剖析,对加权UniFrac距离的主坐标分析(PCoA)。 $n=5$ 笼/组。部分B显示由粪便16SrDNA测序数据获得的嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种的相对丰度(右侧)。 $n=5$ 笼/组。部分C显示代表性EEG迹线,其显示用于规定部分D中定量的癫痫发作的阶段。部分D显示用媒介物或Abx处理、用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种定殖或不加以定殖以及喂以CD或KD的SPF Kcna1^{-/-}小鼠中每天癫痫发作的平均次数(左侧)和每天癫痫发作的总持续时间(右侧)。 $n=2、8、6、12、9、3$ 。部分E显示用GGsTop处理的SPF CD Kcna1^{-/-}小鼠中每天癫痫发作的平均次数(左侧)、每次癫痫发作平均持续时间(中间)和每天癫痫发作的总持续时间(右侧)。SPF CD小鼠的数据如(D)中所示。 $n=6、4$ 。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的克鲁斯凯-沃利斯检验(A、B),使用邓恩检验的非参数单因素嵌套ANOVA(D),非参

数柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫 (Kolmogorov-Smirnov) t 检验 (E)。SPF = 无特定病原体 (常规定殖), CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, veh = 媒介物, Abx = 用抗生素 (氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑 [AVNM]) 预处理, AkkPb = 嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌。

[0071] 图8具有四个部分A-D, 其显示外周 γ -谷氨酰基氨基酸减少和海马GABA/谷氨酸盐比率增加与膳食和微生物群依赖性癫痫发作保护作用的关联。部分A显示对来自喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的结肠管腔代谢物 (顶部) 和血清代谢物 (底部) 的主成分分析。 $n=8$ 笼/组。部分B显示来自喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的结肠管腔内含物中的 γ -谷氨酰基化氨基酸和半胱氨酸的水平。 $n=8$ 笼/组。部分C显示来自喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的血清中的 γ -谷氨酰基氨基酸和谷氨酰胺的水平。 $n=8$ 笼/组。部分D显示喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的海马中的GABA/谷氨酸 (左侧) 和谷氨酰胺 (右侧) 的水平。 $n=5$ 。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。双因素ANOVA对比 (A-C), 使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA (D) : * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。n.s. = 非统计显著。CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, SPF = 无特定病原体 (常规定殖), veh = 媒介物, Abx = 用抗生素 (氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑 [AVNM]) 预处理, AkkPb = 嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌, a.u. = 任意单位。

[0072] 图9具有四个部分A-D, 其显示由生酮膳食和微生物群状况对结肠管腔和血清代谢物组的调节。部分A显示在结肠管腔中检测到的622个代谢物以及在血清中检测到的670个代谢物中具有统计显著改变的代谢物的数目。以黑色文本指示的值是改变的代谢物的总数, 其中呈绿色的值表示上调, 而呈红色的值表示下调。 $n=8$ 笼/组。部分B显示通过对结肠管腔 (顶部) 和血清 (底部) 的代谢物组学筛选而检测到的葡萄糖 (左侧) 和BHB (右侧) 的水平。 $n=8$ 笼/组。部分C显示来自喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的结肠管腔内含物中的非 γ -谷氨酰基化氨基酸的水平。 $n=8$ 笼/组。部分D显示来自喂以CD的SPF小鼠、喂以KD的SPF小鼠、喂以KD的经Abx处理小鼠和喂以KD的经AkkPb定殖小鼠的血清中的非 γ -谷氨酰基化氨基酸的水平。 $n=8$ 笼/组。数据呈现为平均值 \pm s.e.m.。双因素ANOVA对比: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。n.s. = 非统计显著。CD = 对照膳食, KD = 生酮膳食, SPF = 无特定病原体 (常规定殖), veh = 媒介物, Abx = 用抗生素 (氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑 [AVNM]) 预处理, AkkPb = 嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌, a.u. = 任意单位, BHB = β -羟基丁酸。

[0073] 图10具有八个部分A-H, 其显示生酮膳食和细菌交互饲养使 γ -谷氨酰转肽酶 (GGT) 活性降低, 此充分赋予癫痫发作保护作用。部分A显示喂以CD的SPF小鼠中响应于用GGT抑制剂GGsTop进行的口服管饲的6Hz癫痫发作阈值 (左侧)。 $n=6, 9$ 。在经癫痫发作测试小鼠中的行为 (右侧)。在 $y=10$ 秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值, 并且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。 $n=16$ 。部分B显示嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种富集的经Abx处理SPF小鼠中响应于用生酮氨基酸进行补充的6Hz癫痫发作阈值 (左侧)。 $n=5, 6$ 。在经癫痫发作测试小鼠中的行为 (右侧)。在 $y=10$ 秒处的虚线代表用于对癫痫发作进行评分的阈值, 并且在24mA处的三角表示每个实验群组的起始电流。 $n=12$ 。部

分C显示来自SPF CD小鼠、SPF KD小鼠、AkkPb KD小鼠或AkkPb CD小鼠的每100mg粪便的总GGT活性(左侧)以及由GGsTop达成的抑制(右侧)。n=5。部分D显示来自用媒介物、嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种益生菌、或经热杀灭细菌每日两次处理28天的SPF CD动物的每100mg粪便的总GGT活性(左侧)以及由GGsTop达成的抑制(右侧)。n=5。部分E显示在于CD培养基相对于KD培养基中或于叠加有含有活体粪副拟杆菌(PbM)或不含有细菌(0)的M9基本培养基的CD或KD琼脂中孵育之后,活体嗜粘蛋白艾克曼菌(Akk)的水平。n=3。部分F显示在于叠加在含有Akk或不含有细菌(0)的CD或KD琼脂上的M9基本培养基中孵育之后,活体PbM的水平。n=5。部分G显示在t=24小时在叠加在含有嗜粘蛋白艾克曼菌或不含有细菌的CD琼脂上的M9培养基中生长的粪副拟杆菌中的GGT活性以及由GGsTop达成的GGT活性抑制。n=5。部分H显示在t=24小时在叠加在含有嗜粘蛋白艾克曼菌或不含有细菌的KD琼脂上的M9培养基中生长的粪副拟杆菌中的GGT活性以及由GGsTop达成的GGT活性抑制。n=5。数据呈现为平均值±s.e.m.。史都登氏t检验(Student's t-test)(a,b),使用邦弗伦尼检验的双因素ANOVA(C,D),单因素ANOVA伴邦弗伦尼检验(E-H):**P<0.01,***P<0.001,****P<0.0001。SPF=无特定病原体(常规定殖),CD=对照膳食,KD=生酮膳食,CC50=在50%的测试小鼠中产生癫痫发作的电流强度,AA=氨基酸,veh=媒介物,Abx=用抗生素(氨苄青霉素、万古霉素、新霉素、甲硝哒唑[AVNM])预处理,AkkPb=嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌,GGsTop=GGT抑制剂,PbM=粪副拟杆菌,Akk=嗜粘蛋白艾克曼菌,M9=基本培养基,GGT=γ-谷氨酰转肽酶,AU=吸光度单位。

[0074] 图11具有两个部分A和B,其显示氨基酸对癫痫发作、细菌GGT活性和膳食性调节用于氨基酸代谢的细菌基因的影响。部分A显示用GGsTop或媒介物处理的常规培养的粪副拟杆菌(左侧)和嗜粘蛋白艾克曼菌(右侧)中的GGT活性。n=5。部分B显示在于叠加有于M9基本培养基中的用媒介物或GGsTop预处理的粪副拟杆菌(PbM)的CD琼脂中孵育0、7或24小时之后,嗜粘蛋白艾克曼菌(Akk)的水平。n=3。数据呈现为平均值±s.e.m.。使用邦弗伦尼检验的单因素ANOVA(a):*P<0.05,使用邦弗伦尼检验的双因素ANOVA(b):**P<0.01,PbM=粪副拟杆菌,Akk=嗜粘蛋白艾克曼菌,GGsTop=GGT抑制剂,GGT=γ-谷氨酰转肽酶,AU=吸光度单位。

具体实施方式

[0075] 本文提供了治疗受试者中的通过施用益生菌组合物来模拟生酮膳食的作用的方法和组合物。在某些实施方案中,方法和组合物用于治疗或预防受试者(例如患有诸如自闭症谱系障碍、雷特综合征、X染色体脆折、注意力缺陷障碍(ADD)、注意力缺陷/活动过度障碍(ADHD)、难治性癫痫和/或非难治性癫痫之类的神经发育病症的受试者)的癫痫发作。在其它实施方案中,方法和组合物用于预防或治疗受试者的疾患(例如自闭症谱系障碍、癫痫、癫痫发作、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、癌症、中风、代谢疾病(例如肥胖症或糖尿病)、线粒体病症、抑郁症、偏头痛(例如慢性偏头痛)、雷特综合征、注意力缺陷障碍、脆性X染色体综合征或创伤性脑损伤(TBI))。在优选实施方案中,方法包括向受试者施用一种包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组合物或多种合起来包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组

合物。在其它实施方案中,方法和组合物改变受试者中的神经递质生物合成。在某些实施方案中,方法和组合物改变受试者中的血清生酮氨基酸。在其它实施方案中,方法和组合物使受试者中的 γ -谷氨酰转肽酶活性降低。在某些实施方案中,方法和组合物使受试者中的谷氨酰胺合成酶活性降低。在其它实施方案中,方法和组合物使受试者中的 γ -谷氨酰基氨基酸减少。在某些实施方案中,方法和组合物使受试者中的GABA/谷氨酸盐比率水平增加。在其它实施方案中,方法和组合物使受试者中的谷氨酰胺水平增加。在其它实施方案中,方法包括使受试者的肠道微生物群消减,以及向受试者施用一种包含艾克曼菌属和副拟杆菌属的细菌的组合物或多种合起来包含艾克曼菌属和副拟杆菌属的细菌的组合物。

[0076] 定义

[0077] 如本文在说明书中所用,“一个(种)(a/an)”可意指一个(种)或多个(种)。如本文在权利要求中所用,当与字词“包含”联合使用时,字词“一个(种)”可意指一个(种)或超过一个(种)。如本文所用,“另一”可意指至少第二或更多。

[0078] 如本文所用的短语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的物质、组合物或媒介物,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封物质。各载体在可与制剂的其它成分相容,并且不对受试者有损伤的意义上必须是“可接受的”。可充当药学上可接受的载体的物质的一些示例包括:(1)糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;(4)粉状黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,诸如可可脂和栓剂蜡;(9)油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10)二醇,诸如丙二醇;(11)多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;(12)酯,诸如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等张盐水;(18)林格氏溶液(Ringer's solution);(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)用于药物制剂中的其它无毒可相容物质。

[0079] 术语“预防”是本领域公知的,并且当关于疾患诸如局部复发使用时在本领域中是被充分理解的,并且包括施用相对于未接受组合物的受试者,使受试者的医学疾患的症状的频率降低,或使所述症状的发作延迟的所述组合物。因此,预防癫痫发作包括例如相对于未治疗对照群体,使接受防治性治疗的患者群体的癫痫发作次数降低,和/或相对于未治疗对照群体,使经治疗群体的可检测病变的出现延迟,例如以统计和/或临床显著数量达成降低和/或延迟。

[0080] 术语“防治性”或“治疗性”治疗是本领域公知的,并且包括向宿主施用一种或多种主题组合物。如果主题组合物在非所欲疾患(例如宿主动物的疾病或其它非所欲状态)的临床表现之前施用,那么治疗是防治性的(即它保护宿主以防显现非所欲疾患),而如果主题组合物在非所欲疾患的表现之后施用,那么治疗是治疗性的(即它意图使现有非所欲疾患或其副作用减弱、改善或稳定)。

[0081] 术语“受试者”是指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如牛科动物、马科动物、犬科动物、羊科动物或猫科动物。

[0082] 化合物关于主题治疗方法的“治疗有效量”是指制剂中化合物的以下量:其在作为所需剂量方案的一部分(向哺乳动物,优选是人)施用,根据针对治疗的病症或疾患或美容目的的临床可接受标准,例如在可适用于任何医学治疗的合理益处/风险比率下,使症

状缓和,使疾患改善,或使疾病状况的发作减缓。

[0083] 如本文所用,术语“治疗(treating/treatment)”包括以用以使受试者的疾患改进或稳定的方式逆转、减轻或遏止疾患的症状、临床病征和潜在病理。

[0084] 治疗方法

[0085] 本文公开内容部分地涉及发现生酮膳食(KD)会诱导肠道微生物群系的实质性变化,以及通过益生菌施用、粪便移植或对天然微生物群系的选择性微生物重构来富集KD相关细菌会模拟KD的有益作用。本文提供了可在治疗或预防如所述的疾患方面替代KD膳食的方法和组合物。本文所述的方法和组合物可单独或与KD膳食联合用于治疗或预防本文所述的疾患。

[0086] 在某些实施方案中,方法治疗或预防受试者的癫痫发作。在一些实施方案中,方法包括施用包含艾克曼菌属和副拟杆菌属的细菌的组合物。在其它实施方案中,方法改变受试者中的神经递质生物合成。在某些实施方案中,方法改变受试者中的血清生酮氨基酸。在其它实施方案中,方法使受试者中的 γ -谷氨酰转肽酶活性降低。在某些实施方案中,方法使受试者中的谷氨酰胺合成酶活性降低。在其它实施方案中,方法使受试者中的 γ -谷氨酰基氨基酸减少。在某些实施方案中,方法使受试者中的GABA/谷氨酸盐比率水平增加。在其它实施方案中,方法使受试者中的谷氨酰胺水平增加。在其它实施方案中,本文提供的方法包括使受试者的肠道微生物群消减,以及向受试者施用包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组合物。在一些实施方案中,受试者患有癫痫(例如难治性或非难治性癫痫)。在一些实施方案中,受试者患有神经发育病症。代表性神经发育病症包括自闭症谱系障碍、雷特综合征、X染色体脆折、注意力缺陷障碍和注意力缺陷/活动过度障碍。在一些实施方案中,神经发育病症是已知与癫痫发作共生的病症。

[0087] 在其它实施方案中,受试者患有对生酮膳食起响应的疾患。疾患可为阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、癌症、中风、代谢疾病、线粒体病症、抑郁症、偏头痛(例如慢性偏头痛)或创伤性脑损伤(TBI)。在一些实施方案中,方法和组合物包括向受试者施用本文提供的组合物。在一些实施方案中,疾患是癫痫、癫痫发作、自闭症谱系障碍、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、癌症、中风、代谢疾病(例如肥胖症或糖尿病)、线粒体病症、抑郁症、偏头痛(例如慢性偏头痛)、雷特综合征、注意力缺陷障碍、脆性X染色体综合征或创伤性脑损伤(TBI)。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法适用于治疗或预防老化或老化相关疾患。在一些实施方案中,本文提供的组合物和方法可在治疗或预防本文所述的疾患方面替代生酮膳食;在其它实施方案中,本文提供的组合物和方法可与生酮膳食组合。关于疾患的更多信息可见于Stafstrom等(2012)Front.Pharmacol.3:59中,所述文献据此整体并入本文。

[0088] 组合物可被配制以进行用于口服经口递送。在一些实施方案中,组合物可包含益生菌。在一些实施方案中,本文公开的组合物是食物产品。组合物可呈丸剂、片剂或胶囊形式。在一些实施方案中,受试者可为哺乳动物(例如人)。在一些实施方案中,组合物是自我施用的。尽管对于单一组合物来说优选的是包含所有待施用细菌,但应认识到对于本文所述的各种实施方案中的任一者,细菌的组合可以多种合起来包含细菌的组合物类似地施用。举例来说,本发明进一步提供包括多种合起来包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋

白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组合物的试剂盒。

[0089] 在一些实施方案中,组合物被配制以用于经直肠递送(例如粪便样品)。在一些实施方案中,受试者经受粪便微生物群移植,其中移植植物包含本文公开的组合物。粪便微生物群移植(FMT),也通常称为'粪便细菌疗法',代表一种允许对结肠微生物群落进行重构的治疗方案。过程涉及将来自健康个体的粪便细菌移植至接受者中。FMT通过引入健康细菌区系来恢复结肠微生物区系,所述引入通过例如采用灌肠法、口胃管进行粪便样品输注或以含有从健康供体获得的冻干物质的胶囊形式经口来达成。在一些实施方案中,粪便样品来自粪便库。

[0090] 在一些实施方案中,对受试者的肠道微生物群中的细菌DNA测序。可在施用组合物之前对受试者的肠道细菌DNA测序。举例来说,可从受试者获得包含细菌DNA的样品,并且接着对艾克曼菌属(Akk)和/或副拟杆菌DNA进行细菌DNA测序,因此测量艾克曼菌和/或副拟杆菌在受试者的肠道微生物群中的存在或水平。如果艾克曼菌和/或副拟杆菌的水平较低,那么可接着向受试者施用本文公开的组合物。在一些实施方案中,如果样品中小于.0001%、小于.001%、小于.01%、小于.02%、小于.03%、小于.04%、小于.05%、小于.06%、小于.07%、小于.08%、小于.09%、小于.1%、小于.2%、小于.3%、小于.4%、小于.5%、小于.6%、小于.7%、小于.8%、小于.9%、小于1%、小于2%、小于3%、小于5%、小于7%、小于10%、小于20%、小于30%、小于40%或小于50%的细菌具有艾克曼菌和/或副拟杆菌DNA,那么受试者被视为具有低水平的艾克曼菌和/或副拟杆菌。待测序的细菌DNA可通过本领域中已知的任何手段来获得,包括但不限于从受试者获得粪便样品以及分离细菌DNA。细菌DNA测序通过本领域中的任何已知技术来进行,包括但不限于Maxam Gilbert测序、Sanger测序、鸟枪测序、桥式PCR或下一代测序方法,诸如大规模平行签名测序(MPSS)、聚合酶克隆测序、454焦磷酸测序、Illumina(Solexa)测序、SOLiD测序、离子激流半导体测序、DNA纳米球测序、heliscope单分子测序、单分子实时(SMRT)测序或纳米孔DNA测序。

[0091] 在一些实施方案中,以上方法直接起使受试者中(即所述受试者的胃肠道中)的病原性细菌的量降低的作用。在一些实施方案中,这包括实现使病原性生物体的数目降低的相同目标的任何此类疗法在与本文所述的组合物组合使用时将导致患病状态下涉及的病原性微生物区系被与非患病状态相关的天然微生物区系替换,或较少病原性物种占据与导致疾病状态的类型相同的小生境。举例来说,受试者可经受用抗生素(例如抗微生物化合物)或包含抗生素的组合物进行的治疗以靶向和降低病原性生物体的普遍性,并且随后用本文所述的组合物治疗。治疗也可包括抗真菌或抗病毒化合物。

[0092] 适合抗微生物化合物包括卷曲霉素(capreomycin),包括卷曲霉素IA、卷曲霉素IB、卷曲霉素IIA和卷曲霉素IIB;卡波霉素(carbomycin),包括卡波霉素A;卡芦莫南(carumonam);头孢克洛(cefaclor)、头孢羟氨苄(cefadroxil)、头孢孟多(cefamandole)、头孢曲嗪(cefatrizine)、头孢西酮(cefazedone)、头孢唑林(cefazolin)、头孢拉宗(cefbuperazone)、头孢卡品酯(cefcape pivoxil)、头孢立定(cefclidin)、头孢地尼(cefdinir)、头孢托仑(cefditoren)、头孢克肟(cefime)、头孢他美(ceftamet)、头孢甲肟(cefmenoxime)、头孢美唑(cefmetazole)、头孢米诺(cefminox)、头孢地嗪(cefodizime)、头孢尼西(cefonicid)、头孢哌酮(cefoperazone)、头孢雷特(ceforanide)、头孢噻肟(cefotaxime)、头孢替坦(cefotetan)、头孢替安(cefotiam)、头孢西丁(cefexitin)、头孢

咪唑(cefpimizole)、头孢匹胺(cefpiramide)、头孢匹罗(cefpirome)、头孢罗齐(cefprozil)、头孢沙定(cefroxadine)、头孢磺啉(cefsulodin)、头孢他啶(ceftazidime)、头孢特仑(cefteram)、头孢替唑(ceftezole)、头孢布坦(ceftibuten)、头孢噻呋(ceftiofur)、头孢唑肟(ceftizoxime)、头孢曲松(ceftriaxone)、头孢呋辛(cefuroxime)、头孢唑喃(cefuzonam)、头孢氨苄(cephalexin)、头孢来星(cephalogycin)、头孢噻啶(cephaloridine)、头孢菌素C(cephalosporin C)、头孢噻吩(cephalothin)、头孢匹林(cephapirin)、诸如头霉素C之类的头霉素(cephamycin)、头孢拉定(cephradine)、氯四环素(chlortetracycline);克拉霉素(chlarithromycin)、克林霉素(clindamycin)、氯甲西林(clometocillin)、氯莫环素(clomocycline)、氯唑西林(cloxacillin)、环青霉素(cyclacillin)、达氟沙星(danofloxacin)、地美环素(demeclocyclin)、越霉素A(destomycin A)、双氯西林(dicloxacillin)、地红霉素(dirithromycin)、多西环素(doxycyclin)、依匹西林(epicillin)、红霉素A(erythromycin A)、乙胺丁醇(ethambutol)、芬贝西林(fenbenicillin)、氟氧头孢(flomoxef)、氟苯尼考(flurfenicol)、氟氯青霉素(floxacillin)、氟甲喹(flumequine)、福提霉素A(fortimicin A)、福提霉素B、磷霉素(forfomycin)、呋喃他酮(foraltadone)、夫西地酸(fusidic acid)、庆大霉素(gentamycin)、葡烟腈(glyconiazide)、胍甲环素(guamecycline)、海他西林(hetacillin)、伊达比星(idarubicin)、亚胺培南(imipenem)、异帕米星(isepamycin)、交沙霉素(josamycin)、卡那霉素(kanamycin)、鲁霉素(leumycin)诸如鲁霉素A1、林可霉素(lincomycin)、洛美沙星(lomefloxacin)、氯拉卡比(loracarbef)、赖甲四环素(lymecycline)、美罗培南(meropenam)、美坦西林(metampicillin)、甲烯土霉素(methacycline)、甲氧西林(methicillin)、美洛西林(mezlocillin)、小诺米星(micronomicin)、麦迪霉素(midecamycin)诸如麦迪霉素A1、蜜柑霉素(mikamycin)、米诺环素(minocycline)、丝裂霉素(mitomycin)诸如丝裂霉素C、拉氧头孢(moxalactam)、莫匹罗星(mupirocin)、萘夫西林(nafcillin)、萘替米星(netilicin)、诺卡迪安(norcardian)诸如诺卡迪安A、竹桃霉素(oleandomycin)、氧四环素(oxytetracycline)、培尼培南(panipenem)、帕珠沙星(pazufloxacin)、培那西林(penamecillin)、青霉素(诸如青霉素G、青霉素N和青霉素O、青霉素二酸(penicillic acid)、戊基青霉素)、培洛霉素(peplomycin)、苯氧乙基青霉素(phenethicillin)、吡拉西林(pipacillin)、哌拉西林(piperacillin)、吡利霉素(pirlimycin)、匹氨西林(pivampicillin)、匹头孢氨苄(pivcefalexin)、波福霉素(porfiromycin)、普罗吡林(propiallin)、喹那西林(quinacillin)、核糖霉素(ribostamycin)、利福布丁(rifabutin)、利福酰胺(rifamide)、利福平(rifampin)、利福霉素SV(rifamycin SV)、利福喷丁(rifapentine)、利福昔明(rifaximin)、利替培南(ritipenem)、罗他霉素(rekitamycin)、罗利环素(rolitetracycline)、蔷薇霉素(rosaramicin)、罗红霉素(roxithromycin)、生环素(sancycline)、西苏霉素(sisomicin)、司帕沙星(sparfloxacin)、壮观霉素(spectinomycin)、链脲霉素(streptozocin)、磺苄西林(sulbenicillin)、舒他西林(sultamicillin)、酞氨西林(talampicillin)、替考拉宁(teicoplanin)、替莫西林(temocillin)、四环素、硫链丝菌肽(thostrepton)、硫姆林(tiamulin)、替卡西林(ticarcillin)、替吉莫南(tigemonam)、替米考星(tilmicosin)、妥布霉素(tobramycin)、曲普斯派克特霉素(tropospectromycin)、曲伐沙星

(trovafloxacin)、泰乐菌素(tylosin)和万古霉素(vancomycin)及其类似物、衍生物、药学上可接受的盐、酯、前药和经保护形式。

[0093] 适合抗真菌化合物包括酮康唑(ketoconazole)、咪康唑(miconazole)、氟康唑(fluconazole)、克霉唑(clotrimazole)、十一碳烯酸(undecylenic acid)、舍他康唑(sertaconazole)、特比萘芬(terbinafine)、布替萘芬(butenafine)、氯碘羟喹(clioquinol)、卤普罗近(haloprogin)、制霉菌素(nystatin)、萘替芬(naftifine)、托萘酯(tolnaftate)、环匹罗司(ciclopirox)、两性霉素B(amphotericin B)或茶树油及其类似物、衍生物、药学上可接受的盐、酯、前药和经保护形式。

[0094] 适合抗病毒剂包括阿昔洛韦(acyclovir)、叠氮尿苷(azidouridine)、茴香霉素(anismoycin)、金刚烷胺(amantadine)、溴乙烯基脱氧尿苷(bromovinyldeoxusidine)、氯乙烯基脱氧尿苷(chlorovinyldeoxusidine)、阿糖胞苷(cytarabine)、德拉韦定(delavirdine)、地达诺新(didanosine)、脱氧野尻霉素(deoxynojirimycin)、二脱氧胞苷、二脱氧肌苷、二脱氧核苷、地昔洛韦(desciclovir)、脱氧阿昔洛韦(deoxyacyclovir)、依法韦仑(efavirenz)、恩韦肟(enviroxime)、非西他滨(fiacitabine)、膦甲酸(foscarnet)、非阿尿苷(fialuridine)、氟胸苷、氟尿苷、更昔洛韦(ganciclovir)、金丝桃素(hypericin)、碘苷(idoxuridine)、干扰素(interferon)、白介素(interleukin)、羧乙基磺酸盐(isethionate)、奈韦拉平(nevirapine)、喷他脒(pentamidine)、利巴韦林(ribavirin)、金刚烷乙胺(rimantadine)、司他夫定(stavudine)、沙格司亭(sargramostin)、苏拉明(suramin)、天花粉蛋白(trichosanthin)、三溴胸苷、三氯胸苷、三氟胸苷、膦甲酸三钠、阿糖腺苷(vidarabine)、齐多夫定(zidoviridine)、扎西他滨(zalcitabine)和3-叠氮基-3-脱氧胸苷及其类似物、衍生物、药学上可接受的盐、酯、前药和经保护形式。

[0095] 其它适合抗病毒剂包括2',3'-二脱氧腺苷(ddA)、2',3'-二脱氧鸟苷(ddG)、2',3'-二脱氧胞苷(ddC)、2',3'-二脱氧胸苷(ddT)、2'3'-二脱氧-二脱氧胸苷(d4T)、2'-脱氧-3'-硫杂-胞嘧啶(3TC或拉米夫定(lamivudine))、2',3'-二脱氧-2'-氟腺苷、2',3'-二脱氧-2'-氟肌苷、2',3'-二脱氧-2'-氟胸苷、2',3'-二脱氧-2'-氟胞嘧啶、2'3'-二脱氧-2',3'-二脱氢-2'-氟胸苷(Fd4T)、2'3'-二脱氧-2'-β-氟腺苷(F-ddA)、2'3'-二脱氧-2'-β-氟肌苷(F-ddI)和2',3'-二脱氧-2'-β-氟胞嘧啶(F-ddC)。在一些实施方案中,抗病毒剂选自膦甲酸三钠、更昔洛韦、三氟胸苷、阿昔洛韦、3'-叠氮基3'-胸苷(AZT)、二脱氧肌苷(ddI)和碘苷及其类似物、衍生物、药学上可接受的盐、酯、前药和经保护形式。

[0096] 组合物

[0097] 在一些方面,本发明涉及一种包含艾克曼菌属(Akk)和副拟杆菌属(Pb)的细菌的组合物(例如食物产品或药物组合物)。组合物可包含药学上可接受的载体。组合物可包含益生菌。本文公开的药物组合物可以粉剂、软膏剂、滴剂、液体、凝胶剂、片剂、胶囊、丸剂或乳膏剂形式通过任何适合施用途径来递送,包括口服、经颊、舌下、胃肠外和经直肠。在某些实施方案中,药物组合物被全身递送(例如通过口服施用)。在某些其它实施方案中,本文公开的组合物被经直肠递送。

[0098] 在某些实施方案中,本发明提供包括多种合起来包含艾克曼菌属的细菌(例如嗜粘蛋白艾克曼菌)和副拟杆菌属的细菌(例如粪副拟杆菌或迪氏副拟杆菌)的组合物(例如如果加以组合,那么将产生如在这个章节中任何地方所述的组合物)的试剂盒。

[0099] 组合物可包含副拟杆菌属的任何物种,包括但不限于*P. chartae*、*P. chinchillae*、迪氏副拟杆菌、*P. faecis*、戈尔茨坦副拟杆菌 (*P. goldsteinii*)、戈登副拟杆菌 (*P. gordonii*)、约翰逊副拟杆菌 (*P. johnsonii*) 或粪副拟杆菌 (*P. merdae*)。在一些实施方案中,组合物中至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%的细菌是副拟杆菌属 (*Pb*) 细菌。组合物中的艾克曼菌属细菌可包括嗜粘蛋白艾克曼菌。在一些实施方案中,本文公开的组合物可包含至少1%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%艾克曼菌属细菌。

[0100] 本文所述的组合物可用于口服施用以达到胃肠道,目的在于实现将细菌(例如,本文公开的细菌)引入胃肠道的组织中的目标。本发明的组合物(例如,益生菌组合物)的制剂也可包括其它益生菌剂或促进芽孢萌发和/或细菌生长的营养物。示例性物质是促双歧杆菌生长性寡糖,其促进有益益生菌的生长。在一些实施方案中,益生菌组合物与治疗有效剂量的(优选是广谱)抗生素或抗真菌剂一起施用。在一些实施方案中,本文所述的组合物被囊封成以肠溶方式包覆的定时释放胶囊或片剂。肠溶性包衣允许胶囊/片剂在穿过胃肠道时保持完整(即,不溶解),直至在某一时间之后和/或直至它到达胃肠道的某一部分(例如,小肠)。定时释放组分持续预定时期防止本文所述的组合物中的益生菌菌株的“释放”。

[0101] 组合物可为食物产品,诸如但不限于乳制品。乳制品可为培养或非培养(例如,奶)乳制品。培养乳制品的非限制性示例包括酸奶、白干酪、酸奶油、酸乳酒、酪乳等。乳制品也经常含有各种特色乳品成分,例如乳清、脱脂奶粉、乳清蛋白浓缩固体等。乳制品可以本领域中已知的任何方式加工以实现诸如风味、稠化力、营养、特定微生物之类的合乎需要的品质和诸如霉菌生长控制之类的其它性质。本发明组合物也可包括已知抗氧化剂、缓冲剂,以及其它试剂,诸如着色剂、调味剂、维生素或矿物质。

[0102] 在一些实施方案中,本发明组合物与载体(例如,药学上可接受的载体)组合,所述载体在生理上可与所述载体施用至的受试者的胃肠组织相容。载体可包含基于固体的干燥物质以用于配制成片剂、胶囊或粉状形式;或载体可包含基于液体或凝胶的物质以用于配制成液体或凝胶形式。载体的特定类型以及最终制剂部分地取决于所选施用途径。本发明的治疗性组合物也可包括多种载体和/或粘合剂。在一些实施方案中,载体是以足以完成1克剂量总重量的量添加的微晶纤维素(MCC)。载体可为基于固体的干燥物质以用于以片剂、胶囊或粉状形式配制,并且可为基于液体或凝胶的物质以用于以液体或凝胶形式配制,所述形式部分地取决于施用途径。用于干燥制剂的典型载体包括但不限于:海藻糖、麦芽糖糊精、米粉、微晶纤维素(MCC)、硬脂酸镁、肌醇、FOS、GOS、右旋糖、蔗糖和类似载体。适合的基于液体或凝胶的载体包括但不限于:水和生理盐溶液;脲;醇和衍生物(例如,甲醇、乙醇、丙醇、丁醇);二醇(例如,乙二醇、丙二醇等)。优选地,基于水的载体具有中性pH值(即,pH 7.0)。用于施用本文所述的组合物的其它载体或试剂在本领域中是已知的,例如在美国专利号6,461,607中。

[0103] 在一些实施方案中,组合物进一步包含已知定殖于胃肠道的其它细菌或微生物。

举例来说,组合物可包含属于硬壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、软壁菌门(Tenericutes)、放线菌门(Actinobacteria)的物种或它们的组合。可包括在主题组合物中的额外细菌和微生物的示例包括但不限于酵母(Saccharomyces)、拟杆菌(Bacteroides)、真细菌(Eubacterium)、梭菌(Clostridium)、乳酸杆菌(Lactobacillus)、梭杆菌(Fusobacterium)、丙酸杆菌(Propionibacterium)、链球菌(Streptococcus)、肠球菌(Enterococcus)、乳球菌(Lactococcus)和葡萄球菌(Staphylococcus)、消化链球菌(Peptostreptococcus)。在某些实施方案中,组合物大致上不含使癫痫发作的风险增加或另外减损生酮膳食的作用的细菌。所述细菌包括双歧杆菌属(Bifidobacterium)细菌。因此,在一些实施方案中,组合物大致上不含拟杆菌属细菌。如果某一细菌类型构成组合物中细菌的小于10%,优选构成所述组合物中细菌的小于5%,甚至更优选小于1%,最优选小于0.5%,或甚至0%,那么组合物基本上不含该细菌类型。

[0104] 在一些实施方案中,组合物包含粪便样品,所述粪便样品包含至少一个艾克曼菌属(Akk)物种和至少一个副拟杆菌属(Pb)物种。在一些实施方案中,粪便样品来自粪便库。在一些实施方案中,组合物可在向受试者施用之前添加至粪便样品中。

[0105] 在一些实施方案中,本文提供了通过向受试者施用富含至少一个艾克曼菌属(Akk)物种和至少一个副拟杆菌属(Pb)物种的组合物(例如粪便样品)来治疗或预防疾患诸如癫痫发作的方法。如果粪便样品中至少.01%、至少.02%、至少.03%、至少.04%、至少.05%、至少.06%、至少.07%、至少.08%、至少.09%、至少0.1%、至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少0.6%、至少0.7%、至少0.8%、至少0.9%、至少1%、或至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的细菌是艾克曼菌属(Akk),那么粪便样品是经富集的。在一些实施方案中,如果粪便样品中至少.01%、至少.02%、至少.03%、至少.04%、至少.05%、至少.06%、至少.07%、至少.08%、至少.09%、至少0.1%、至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少0.6%、至少0.7%、至少0.8%、至少0.9%、至少1%、或至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的细菌是副拟杆菌属(Pb),那么粪便样品是经富集的。在一些实施方案中,粪便样品来自粪便库。在一些实施方案中,粪便样品来自供体。

[0106] 组合物可进一步包含营养物。在一些实施方案中,营养物有助于细菌(例如,本文公开的细菌)的生长。在一些实施方案中,营养物是图12中所列的组分。在一些实施方案中,营养物是脂质(例如,亚油酸、硬脂酸或棕榈酸)。在一些实施方案中,营养物可与本文公开的组合物联合施用。如本文所用,短语“联合施用”是指两种或更多种不同试剂(例如,本文公开的组合物和本文公开的营养物)的任何施用形式,以使当先前施用的试剂在身体中仍然有效时施用第二试剂。举例来说,本文公开的组合物和本文公开的营养物可于同一制剂中施用,或于单独制剂中并行或依序施用。

[0107] 可改变药物组合物中的活性成分的实际剂量水平以便获得某一量的活性成分,该量的活性成分在对患者无毒的情况下有效实现特定患者、组合物和施用模式所需的治疗响应。

[0108] 所选剂量水平将取决于多种因素,包括所采用特定药剂的活性,施用途径,施用时

间,所采用特定化合物的排泄或代谢速率,治疗的持续时间,与所采用特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料,所治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康状况和先前医学史,以及医学领域中熟知的类似因素。

[0109] 具有本领域中的普通技能的医师或兽医可易于确定和指定所需药物组合物的有效量。举例来说,医师或兽医可在低于为实现所需治疗作用所需的水平的水平下指定和/或施用药物组合物中采用的化合物的剂量,并且逐渐增加剂量直至实现所需作用。

[0110] 现已一般性描述本发明,通过参照以下实施例,本发明将更易于被理解,所述实施例仅出于说明本发明的某些方面和实施方案的目的而被包括,而非旨在限制本发明。

[0111] 例示

[0112] 实施例1:材料和方法

[0113] 动物和膳食

[0114] 3至4周龄SPF野生型Swiss Webster小鼠(Taconic Farms)、GF野生型Swiss Webster小鼠(Taconic Farms)和SPF C3HeB/FeJ KCNA1K0小鼠(Jackson Laboratories)在UCLA健康科学中心屏障设施中加以养育。对育种动物喂以“育种者”食物(Lab Diets 5K52)。对实验动物喂以标准食物(Lab Diet 5010)、6:1生酮膳食(Harlan TekladTD.07797.PWD)或维生素和矿物质匹配的对照膳食(Harlan TekladTD.150300)。将幼体小鼠用于i)模拟典型使用KD来治疗儿科和青少年癫痫患者,ii)使小鼠脑发育的时机与早期人脑发育对准,其中在3周龄小鼠的情况下的神经发育重要事件与2-3岁人脑的神经发育重要事件类似⁶⁰,和iii)排除断奶前膳食性处理,其中膳食对母性行为 and 生理的影响将使膳食对后代的直接影响混乱。将小鼠随机指定至实验组中。所有动物实验都由UCLA动物护理和使用委员会核准。

[0115] 6Hz精神运动性癫痫发作测定

[0116] 如先前¹³所述进行6Hz测试。试探性研究揭示在癫痫发作阈值方面无性别二态性。所有后续实验群组都含有雄性小鼠。在刺激之前10-15分钟将1滴(约50ul)0.5%盐酸丁卡因(tetracaine hydrochloride)眼用溶液施加于各小鼠的角膜中。角膜电极用薄层电极凝胶(Parker Signagel)涂布。恒流电流装置(ECT装置57800,Ugo Basile)用于在3秒持续时间、0.2ms脉冲宽度和6个脉冲/s频率下递送电流。测量CC50(为在实验组中的50%中引发癫痫发作所需的电流强度)作为癫痫发作易感性的量度。进行试探性实验以将24mA鉴定为SPF野生型Swiss Webster小鼠的CC50。各小鼠仅进行一次癫痫发作测试,因此至少n>6只小鼠用于充分推动各实验组。为测定各实验组的CC50,向每个群组的每个实验组的第一小鼠施用24mA电流,随后以2mA间隔进行固定增加或降低。在刺激期间手动约束小鼠,接着释放至新笼中以进行行为观察。使用Ethovision XT软件(Noldus)记录运动行为,并且对跌倒、尾部背屈(斯特劳布尾(Straub tail))、前肢阵挛、眼/触须抽动和行为缓解的定量测量进行手动评分。对于各行为参数,我们观察到在24mA癫痫发作期间的发生百分比与微生物状况或组癫痫发作易感性之间无关联,从而表明微生物群对癫痫发作发生而非呈现或形式具有主要作用。使用Ethovision以及用电子计时器手动对探索潜伏期(从实验小鼠被释放至观察笼中时(在角膜刺激之后)开始直至它首次侧向运动所流逝的时间)评分。盲化测试膳食内各组。由于膳食诱导的粪便颜色变化,所以跨越不同膳食组的真正盲化是不可能的。然而,来自试探性实验的结果揭示在从以盲化方式相对于非盲化方式测试的相同实验组获取的

结果之间无显著差异。如果小鼠不显示癫痫发作行为以及在10s内恢复正常探索行为,那么将它们评分为被保护免遭癫痫发作。使用每个实验组的平均对数电流间隔阶跃,如先前⁶¹所述测定癫痫发作阈值(CC50),其中样本n定义为显示较小频率癫痫发作行为的动物子组。用于计算CC50的数据也显示为在各电流强度的情况下的探索潜伏期,其中n代表每组的生物重复实验的总数而与癫痫发作结果无关。

[0117] 葡萄糖测量

[0118] 通过心脏穿刺来收集血液样品,并且将SST真空采血管(Becton Dickinson)旋转以达成血清分离。根据制造商说明书(Cayman Chemical),通过比色测定来检测血清中的葡萄糖水平。将跨越多个实验汇编的数据表示为相对于各实验内的SPF对照加以归一化的葡萄糖浓度。

[0119] β -羟基丁酸(BHB)测量

[0120] 通过心脏穿刺来收集血液,并且通过SST真空采血管(Becton Dickinson)来旋转以达成血清分离。洗涤结肠,并且用PBS冲洗以移除管腔内含物。对额叶皮质、海马、下丘脑和小脑进行显微解剖,并且收集肝并在PBS中洗涤。将组织样品于RIPA溶解缓冲液(Thermo Scientific)中在冰上在20mV下以10s间隔加以声波处理。根据制造商说明书(Cayman Chemical),通过比色测定来检测血清中的BHB水平。将数据相对于如通过BCA测定(Thermo Pierce)检测的总蛋白质含量加以归一化。将跨越多个实验汇编的数据表示为相对于各实验内的SPF对照加以归一化的BHB浓度。

[0121] 16S rDNA微生物群系剖析

[0122] 使用MoBio PowerSoil试剂盒从小鼠粪便样品或结肠管腔内含物提取细菌基因组DNA,其中样本n反映每笼含有3只小鼠的独立笼数。根据从⁶²改编的方法产生文库。使用个别条型码化通用引物和30ng经提取基因组DNA,对16S rDNA基因的V4区进行PCR扩增。一式三份建立PCR反应,并且使用Qiaquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化PCR产物。以通过Kapa文库定量试剂盒(Kapa Biosystems, KK4824)定量的相等摩尔浓度汇合纯化PCR产物,并且由Laragen, Inc.使用Illumina MiSeq平台和2x250 bp试剂盒进行双端测序来加以测序。通过基于与Greengenes 13_5数据库具有97%序列类似性进行开放参照OTU挑选来选择操作分类单元(OTU)。利用每个样品85,134个读段,使用QIIME1.8.0⁶³进行分类指定和稀释。使用PICRUST⁶⁴,从闭合参照OTU表推断宏基因组。将结果过滤以显示图S7C中与氨基酸代谢相关的最佳72个基因。

[0123] 微生物群常规化

[0124] 从成体SPF Swiss Webster小鼠新鲜收集粪便样品,并且于预还原PBS中在每个粪粒1ml下加以均质化。通过口服管饲来向接受GF小鼠施用100u1沉降混悬液。对于模拟处理,用预还原PBS对小鼠进行管饲。

[0125] 抗生素处理

[0126] 根据先前由Reikvam等,PloS one(6),2011所述的方法,每日每12小时用万古霉素(50mg/kg)、新霉素(100mg/kg)和甲硝哒唑(100mg/kg)的溶液对SPF小鼠进行管饲,持续7天。将氨苄青霉素(1mg/ml)提供于饮水中随意取用。对于模拟处理,每日每12小时用正常饮用水对小鼠进行管饲,持续7天。对于Kcna1^{-/-}小鼠,将饮用水补充以万古霉素(500mg/ml)、新霉素(1mg/ml)和氨苄青霉素(1mg/ml),持续1周以排除癫痫发作易犯性小鼠中口服

管饲的应激。

[0127] 经抗生素处理小鼠中的限菌定殖和细菌富集

[0128] 在厌氧条件下,在补充以0.05% III型猪胃粘蛋白(Sigma Aldrich)的脑心浸液(BHI)培养基中培养嗜粘蛋白艾克曼菌(ATCC BAA845)。使粪副拟杆菌(ATCC 43184)和迪氏副拟杆菌(ATCC 8503)在厌氧条件下在强化梭菌培养基(RCM)中生长。将 10^9 cfu细菌混悬于200ul预还原PBS中,并且口服管饲至经抗生素处理小鼠或无菌小鼠中。当以“嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种”形式共同施用,2:1:1的比率用于嗜粘蛋白艾克曼菌:粪副拟杆菌:迪氏副拟杆菌。对于模拟处理,用预还原PBS对小鼠进行管饲。试探性研究揭示在定殖组之间在作为与细菌负荷相关的量度的粪便DNA浓度或16S rDNA扩增方面无显著差异。将小鼠维持在微型隔离笼中,并且加以无菌处理。在定殖之后14天对小鼠进行癫痫发作测试。

[0129] 粪便微生物群移植

[0130] 从持续14天喂以KD或CD的供体小鼠新鲜收集粪便样品,并且在50mg/ml下混悬于预还原PBS中。通过口服管饲100ul混悬液来对经抗生素处理小鼠进行定殖处理。对于模拟处理,用预还原PBS对小鼠进行管饲。将小鼠舍饲在微型隔离笼中,并且加以无菌处理。在移植之后4天进行癫痫发作测试。

[0131] 细菌处理

[0132] 如上所述在厌氧条件下新鲜培养嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌,接着洗涤,集结,并且在 5×10^9 cfu/ml下重悬于预还原PBS中。嗜粘蛋白艾克曼菌与副拟杆菌属种在2:1:1比率下制备。对于热杀灭,将细菌放置在95°C下持续10分钟。用200ul细菌混悬液或作为媒介物对照的无菌预还原PBS每12小时对小鼠进行管饲,持续28天。

[0133] Kcna1癫痫发作记录

[0134] EEG植入和恢复。记录来自6-7周龄的雄性和雌性Kcna1^{-/-}小鼠的EEG。Kcna1^{+/+}同窝仔畜用作对照。我们观察到在雄性与雌性之间在癫痫发作频率和持续时间方面无显著差异。呈现的数据包括两个性别。用异氟烷(5%诱导,2%维持)使小鼠麻醉,并且将眼用软膏施加于各眼。沿头部去毛,并且用氯己定(chlorohexidine)和70%异丙醇进行3次交替擦洗来清洁区域。在生物安全橱柜中,使小鼠定位在立体定位设备(Harvard Biosciences)中,并且沿切口部位局部施加1mg/kg利多卡因(lidocaine)+1mg/kg丁哌卡因(bupivacaine)。使用无菌手术工具,沿背部中线从眼后缘至介于肩胛骨中间的位点产生2cm切口。沿背部侧腹产生皮下袋,并且用无菌盐水冲洗所述袋。插入无线遥测发射器,其中双电位导线呈颅侧定向。依次用3%过氧化氢和70%异丙醇清洁头颅。使用1.0mm微型钻头,对头颅进行穿孔以在前囟与人字缝尖之间的半途上,并且离矢状缝1-2mm处产生两个小孔。历经额顶皮质在硬膜上植入双侧EEG记录电极(Data Sciences International (DSI) PhysioTel, ETA-F10)。将无菌丙烯酸施加于干燥区域。切口部位用可吸收5-0缝合线闭合,并且依次用3%过氧化氢和70%乙醇清洁。将动物个别地舍饲在经热压处理的微型隔离笼中,并且使其恢复3-5天,随后启动记录。

[0135] 数据获取和分析

[0136] 在EEG记录期间,动物自由移动,并且采用实验膳食加以维持。使用DSI Ponemah V5.1数据获取系统历经3天获取EEG迹线。使行为性癫痫发作的同步视频记录与EEG记录相关联,并且基于经改编拉辛(Racine)量表来评分并以5个阶段加以规定:1)肌阵挛性抽搐,

2) 头部刻板和面部阵挛, 3) 双侧性和交替性前肢/后肢阵挛, 4) 站立和跌倒, 和5) 全身性强直-阵挛发作。由盲化研究者使用Neuroscore CNS软件 (DSI) 分析数据。使用10Hz高通滤波器过滤EEG信号, 并且通过盲化手动评分来检测癫痫发作事件。将癫痫发作定义为具有幅值以超过6s持续时间是背景的至少2倍大的高频率高电压同步异质棘波形式的样式。将尖峰频率测定为在给定癫痫发作的情况下超过基线出现的尖峰的数目, 并且分析每只小鼠在各时期的5个代表性癫痫发作的在各尖峰之间随时间而变化的尖峰间间隔。将最大尖峰幅值的持续时间测定为每只小鼠在各时期的5个代表性癫痫发作的在是基线的3倍大的尖峰的情况下花费的时间百分比。

[0137] 结肠管腔和血清代谢物组学

[0138] 从跨越各独立笼的舍饲小鼠收集样品, 其中每笼至少2只小鼠。由终末小鼠解剖收集结肠管腔内含物, 立刻快速冷冻在液氮中, 并且储存在-80°C下。通过心脏穿刺来收集血清样品, 使用SST真空采血管分离, 并且冷冻在-80°C下。使用自动化MicroLab STAR系统 (Hamilton Company) 制备样品, 并且由Metabolon, Inc. 在GC/MS、LC/MS和LC/MS/MS平台上分析。通过用有机水性溶剂连续提取来移除蛋白质部分, 使用TurboVap系统 (Zymark) 浓缩, 并且真空干燥。对于LC/MS和LC-MS/MS, 在含有>11种注射标准物的酸性或碱性LC可相容溶剂中复原样品, 并且在Waters ACQUITY UPLC和Thermo-Finnigan LTQ质谱仪上操作, 采用线性离子阱前端和傅里叶变换离子回旋共振质谱仪后端。对于GC/MS, 使用双三甲基-甲硅烷基-三氟乙酰胺在干燥氮气下使样品衍生化, 并且使用电子碰撞电离在Thermo-Finnigan Trace DSQ快速扫描单四极杆质谱仪上分析。化学实体通过与纯化标准物的代谢物组学文库条目进行比较来鉴定。在对数变换以及用各化合物的最小观察值插补之后, 使用单因素ANOVA分析数据以测试群组效应。基于双因素ANOVA对比来计算P值和q值。主成分分析用于显现方差分布。进行监督随机森林 (Supervised Random Forest) 分析以确认代谢物组学预测准确性。

[0139] 海马代谢物组学

[0140] 使海马组织在1ml冷的80% MeOH中均质化, 并且在冰上剧烈混合, 随后离心 (1.3×10^4 rpm, 4°C)。将5 μ g上清液转移至玻璃小瓶中, 补充5nmol D/L-正缬氨酸, 在真空下干燥, 并且最后重悬于70% 乙腈中。对于样品的基于质谱测定法的分析, 将5 μ l注射于Luna NH2 (150mm \times 2mm, Phenomenex) 管柱上。用与Q Exactive质谱仪 (Thermo Scientific) 联用的UltiMate 3000RSLC (Thermo Scientific) 分析样品。QExactive以全扫描模式, 在70-1050的m/z范围下, 采用极性转换 (+4.00kV/-4.00kV) 加以操作。使用A) 5mM NH₄AcO (pH 9.9) 和B) ACN实现分离。梯度以15% A) 起始, 历经18分钟达到90% A), 继之以持续9分钟的等度步骤, 以及倒转至初始15% A), 持续7分钟。使用准确质量测量 (≤ 3 ppm)、纯净标准物的保留时间和MS2片段化样式, 用TraceFinder 3.3定量代谢物。使用R进行数据分析, 包括主成分分析和分级聚类。

[0141] 氨基酸补充

[0142] 4周龄Swiss Webster SPF小鼠用抗生素处理, 用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种定殖, 并且持续14天喂以KD, 如以上方法中所述。在第11天的晚上开始, 用生酮氨基酸混合物 (Sigma Aldrich) -- 含L-亮氨酸 (2.0mg/kg)、L-赖氨酸 (2.0mg/kg)、L-酪氨酸 (2.4mg/kg)、L-色氨酸 (1.6mg/kg) 和L-苏氨酸 (3.1mg/kg) 的无菌PBS, 每12小时对小鼠进行腹膜内

注射,持续3天。浓度基于对各氨基酸报道的于小鼠血液中的生理水平²⁶以及在我们的代谢物组学数据集中对于各氨基酸观察到的在对照SPF CD小鼠与AkkPb KD小鼠之间的倍数变化(表S4)。经媒介物处理小鼠用PBS (200u1/30g小鼠)注射。在第14天,在末次早晨氨基酸注射之后2小时对小鼠进行6Hz癫痫发作测试,伴有在行为测试室中的先前1小时驯化时期。

[0143] GGSTop处理

[0144] 对于野生型小鼠:对4周龄SPF Swiss Webster小鼠喂以随意取用的CD,持续14天。在第11天的晚上开始,用含13.3mg/kg 3-[[(3-氨基-3-羧基丙基) 甲氧基磷酰基] 氧基] 苯乙酸(GGSTop, Tocris Bioscience) 的无菌水每12小时对小鼠进行口服管饲。经媒介物处理小鼠用无菌水 (200u1/30g小鼠) 进行管饲。在第14天,在末次早晨GGSTop管饲之后2小时对小鼠进行6Hz癫痫发作测试,伴有在行为测试室中的先前1小时驯化时期。对于Kcna1小鼠:对3-4周龄Kcna1^{-/-}小鼠喂以随意取用的CD,持续23天。在第15天,如以上Kcna1癫痫发作记录章节中所述植入EEG发射器。在第18天的晚上,用13.3mg/kg GGSTop每12小时对小鼠进行口服管饲,直至第21天的早晨。在末次管饲之后2小时开始,通过EEG来历经3天记录癫痫发作。

[0145] 交互饲养体外测定

[0146] 如先前所述测量交互饲养。将嗜粘蛋白艾克曼菌于5ml预还原的补充以1%琼脂的基于CD或KD的液体培养基中在 2×10^6 cfu/ml下埋置在厌氧管的底部,并且将粪副拟杆菌于5ml预还原的M9基本培养基中在 6×10^6 cfu/ml下叠加在它之上。基于膳食的培养基通过将上述小鼠KD膳食相对于CD膳食无菌混悬于M9培养基中以达到2kcal/ml来产生。试探性实验确认无经理置嗜粘蛋白艾克曼菌从琼脂区室异位移位至上方M9液体区室中。对于各时间点,从顶部和底部区室获取等分试样,以系列稀释方式涂铺在丰富培养基(RCM用于粪副拟杆菌,并且BHI+0.05%粘蛋白用于嗜粘蛋白艾克曼菌)中,并且对菌落计数。对于GGSTop预处理实验,使粪副拟杆菌与500uM GGSTop(相对于媒介物)一起在RCM培养基中在37°C下孵育2小时,接着用无菌培养基洗涤。试探性实验揭示GGSTop预处理对粪副拟杆菌活力无显著影响。

[0147] GGT活性测定

[0148] 如先前在van der Stel, Frontiers in Microbiology (6), 567 (2015) 中所述测量GGT活性。对于厌氧培养,将细菌在 3×10^5 cfu/ml下接种于基于CD的培养基和基于KD的培养基中。使1ml细菌混悬液集结,并且在-80°C下冷冻1小时。将同一混悬液的单独等分试样涂铺于BHI粘蛋白琼脂培养基或RCM中,并且在37°C下在Coy厌氧腔室中孵育以用于用细菌cfu进行稍后数据归一化。接着将集结块重悬于250u1溶解缓冲液(具有1ug/ml溶菌酶的50mM Tris-HCl)中,并且在冰上孵育30分钟。对于粪便样品,将一个粪粒称重,并且在1ml溶解缓冲液中均质化。接着对细菌混悬液和粪便混悬液进行声波处理(QSonica 125),并且在4°C下在12000xg下离心10分钟。使20u1上清液与180u1底物缓冲液(2.9mM L-γ-谷氨酰基-3-羧基-4-硝基酰苯胺(Gold Bio)、100mM甘氨酰基甘氨酸(Sigma Aldrich)、100mM Tris-HCl)和500uM GGSTop(如果指示)混合。使用自动化多模式板读取器(Biotek Synergy H1),在37°C下每分钟测量表示产生3-羧基-4-硝基苯胺的在405nm下的吸光度,持续1小时。

[0149] 肠可渗透性测定

[0150] 在7am开始,将小鼠禁食4小时,随后用0.6g/kg 4kDa FITC-右旋糖酐(Sigma

Aldrich) 进行管饲。在管饲之后4小时,通过心脏穿刺来收集血清样品,于水中稀释3倍,并且相对于在水中稀释3倍的正常小鼠血清中的储备FITC-右旋糖酐的标准稀释系列,使用 Synergy H9多模式板读取器 (Biotek) 在521nm下一式两份读取荧光强度。

[0151] 统计分析

[0152] 使用Prism软件 (GraphPad) 进行统计分析。评估数据的正态分布,并且在图中绘制为平均值 \pm s.e.m.。对于各图,n=独立生物重复实验的数目。无样品或动物从分析排除。使用双尾未配对史都登 (Student) t检验,采用韦尔奇氏修正 (Welch's correction) 来评估两个处理组之间的差异。在仅具有一个变量的>2个组之间的差异使用采用邦弗伦尼 (Bonferroni) 事后检验的单因素ANOVA来评估。通过采用邓恩氏事后检验 (Dunn's post hoc test) 的非参数单因素ANOVA来分析Kcna1小鼠的数据。采用邦弗伦尼事后检验的双因素ANOVA用于具有两个变量 (例如癫痫发作时间过程、BHB时间过程、代谢物组学数据、细菌生长曲线) 的 ≥ 2 个组。采用重复测量和邦弗伦尼事后检验的单因素ANOVA用于GGT测定。根据以上检验而显现的显著差异在图中由* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 指示。可觉察的接近显著差异 ($0.5 < P < 0.1$) 在图中加以指示。可觉察的非显著 (以及非接近显著) 差异在图中由“n.s.”指示。

[0153] 实施例2:生酮膳食改变肠道微生物群并且赋予针对癫痫发作的保护作用

[0154] 难治性癫痫的6Hz精神运动性癫痫发作模型涉及低频率角膜刺激以诱导暗示人颞叶癫痫的局灶性认知障碍性癫痫发作。KD针对6Hz癫痫发作进行保护,如由为在50%的测试受试者中引发癫痫发作所需的电流强度(CC50,癫痫发作阈值)增加所指示。对无特定病原体 (SPF) Swiss Webster小鼠喂以6:1脂肪:蛋白质KD或维生素和矿物质匹配的对照膳食 (CD)。相较于CD对照,食用KD的小鼠展现响应于6Hz刺激的癫痫发作阈值升高 (图1A)、血清葡萄糖降低 (图1B) 和血清 β -羟基丁酸 (BHB; 图1C) 增加。在CD组相对于KD组之间,在食物消耗或重量增加方面不存在显著差异。

[0155] 除使癫痫发作阈值升高之外,生酮膳食也改变肠道微生物群的组成 (图1D),使 α -多样性降低 (图1E),并且使嗜粘蛋白艾克曼菌的相对丰度增加 (图1F)。在喂以KD的小鼠中,副拟杆菌属种、萨特菌属种 (*Sutterella* spp.) 和丹毒丝菌科种 (*Erysipelotrichaceae* spp.) 也升高,而在喂以对照膳食的小鼠中,别样棒菌属种 (*Allobaculum* spp.)、双歧杆菌属种和脱硫弧菌属种 (*Desulfovibrio* spp.) 升高 (图2)。这些结果揭示肠道微生物群的组成响应于KD而得以快速和显著改变。

[0156] 实施例3:肠道微生物群赋予生酮膳食的抗癫痫发作作用

[0157] 测量无菌 (GF) 和经抗生素 (Abx) 处理SPF小鼠的6Hz精神运动性癫痫发作阈值以确定肠道微生物群是否为生酮膳食的抗癫痫发作作用所必需。

[0158] 相较于CD对照 (SPF CD),持续14天喂以KD的SPF小鼠 (SPF KD) 展现癫痫发作阈值增加和微生物群改变 (图3A和图1D)。这在GF小鼠 (图3A) 和经Abx处理SPF小鼠 (图3C) 的情况下被消除,从而指示肠道微生物群为KD介导的癫痫发作保护作用增加所需。用SPF肠道微生物群使GF小鼠常规化使KD相关癫痫发作保护作用恢复至在天然SPF KD小鼠的情况下所见的水平 (图3A),此表明微生物对KD癫痫发作抗性的介导作用不取决于断奶前微生物群定殖,并且微生物群主动介导由KD达成的癫痫发作保护作用。值得注意的是,微生物对KD相关癫痫发作抗性的调节不与血清BHB或葡萄糖水平的变化相关联 (图3B和图3D)。在各组之间在肠BHB、肝

BHB或脑BHB的水平方面也不存在显著差异。总之,这些数据证明肠道微生物群为KD在6Hz癫痫发作模型中的抗癫痫发作作用所需,并且进一步表明肠道微生物通过不涉及BHB水平改变的机理来调节癫痫发作易感性。

[0159] 为确定是否特定细菌分类单元介导响应于KD的癫痫发作保护作用,将经Abx处理SPF小鼠用所选KD相关细菌定殖,喂以KD,接着进行6Hz癫痫发作测试(图4)。用 10^9 cfu的以下细菌对小鼠进行管饲:i)嗜粘蛋白艾克曼菌;ii)1:1比率的粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌,其作为来自人微生物群的与副拟杆菌操作分类单元读段具有最高同源性的由KD富集的代表性肠副拟杆菌属种(图1D);或iii)2:1:1比率的嗜粘蛋白艾克曼菌、粪副拟杆菌和迪氏副拟杆菌。在管饲之后14天,对结肠管腔内含物的16S rDNA测序揭示用嗜粘蛋白艾克曼菌处理的小鼠具有 $43.7 \pm 0.4\%$ 嗜粘蛋白艾克曼菌相对丰度。用副拟杆菌属种进行管饲的小鼠具有 $70.9 \pm 4.0\%$ 相对丰度,并且用两个分类单元进行管饲的小鼠具有 $49.0 \pm 4.1\%$ 嗜粘蛋白艾克曼菌和 $22.5 \pm 5.4\%$ 副拟杆菌。与这个一致,对来自用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种处理的小鼠的结肠切片的FISH处理展现嗜粘蛋白艾克曼菌探针MUC1437以及拟杆菌属种和副拟杆菌属种探针BAC303的杂交增加,其中从BAC303阳性细胞至最接近MUC1437阳性细胞的平均距离是 0.64 ± 0.09 微米。嗜粘蛋白艾克曼菌与副拟杆菌属种两者均定位于小鼠结肠的管腔,而非粘膜间隙。在喂以CD的小鼠相对于喂以KD的小鼠之间,在重量、血清葡萄糖水平或嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种富集方面不存在显著差异。独立于定殖和癫痫发作状况,BHB在喂以KD的组中被类似诱导。这些数据揭示由Abx处理继之以口服管饲外源性细菌所达成的微生物群消减导致它们的持久肠富集,截至接种后14天。

[0160] 用单独KD进行的处理使癫痫发作阈值升高 24.5% ,从在SPF CD小鼠的情况下的 19.4 ± 0.8 mA升高至在SPF KD小鼠的情况下的 24.2 ± 0.3 mA。而共同施用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种使在喂以KD的经Abx处理小鼠的情况下针对6Hz癫痫发作的保护作用恢复,使阈值升高 36.0% ,从在Abx KD小鼠的情况下的 19.9 ± 0.3 mA升高至在AkkPb KD小鼠的情况下的 27.0 ± 0.5 mA(图4A)。细菌富集的癫痫发作保护作用为嗜粘蛋白艾克曼菌与粪副拟杆菌所特有,因为用嗜粘蛋白艾克曼菌和迪氏副拟杆菌进行管饲的小鼠不展现恢复癫痫发作保护作用。在单独嗜粘蛋白艾克曼菌或副拟杆菌属种的富集之后,在癫痫发作阈值方面不存在显著增加(图4A),从而指示两者均为介导生酮膳食的抗癫痫发作作用所需。用在经CD处理小鼠中增加(图1F)的长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)处理也无作用(图4A)。此外,当相较于副拟杆菌单定殖或嗜粘蛋白艾克曼菌单定殖在GF小鼠中时,嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种共同定殖在GF小鼠中促进响应于KD的癫痫发作保护作用(图4C)。总之,这些研究结果揭示嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种响应于生酮膳食而增加,并且介导它在6Hz癫痫发作模型中的保护作用。

[0161] 实施例4:肠道微生物群对喂以对照膳食的小鼠充分赋予癫痫发作保护作用

[0162] 为确定KD相关肠道微生物是否也对喂以对照膳食的小鼠赋予抗癫痫发作作用,经Abx处理小鼠用来自喂以CD或KD的SPF小鼠的CD微生物群相对于KD微生物群加以移植,并且在4天膳食性处理之后测试它们对6Hz癫痫发作的易感性。经Abx处理小鼠用于模拟涉及用Abx预处理以使天然微生物群消减的临床粪便移植方法。基于以下因素选择第4天:i)截至那个时间,KD能够诱导显著微生物群变化(图1D、图1F和图5A),以及ii)有证据表明在从KD变换成CD之后4天,KD微生物群展现不完全逆转成CD概况(图6A)。相较于喂以CD的对照,用CD微生物群移

植并喂以KD 4天的小鼠显示癫痫发作阈值增加(图5A)。用KD微生物群系移植,但喂以CD 4天的经Abx处理小鼠也展现癫痫发作保护作用。这表明用KD微生物群进行定殖使在喂以CD的小鼠的情况下的癫痫发作阈值升高。然而,值得注意的是,在第28天在KD微生物群完全逆转成CD概况之后,癫痫发作保护作用被消除(图6B),此表明需要KD微生物群、膳食和神经元活性之间的持久相互作用。相较于副拟杆菌属种、嗜粘蛋白艾克曼菌或长双歧杆菌对照,在使嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种在喂以CD的经Abx处理SPF小鼠中富集之后观察到类似抗癫痫发作作用(图5B)。然而,相对于SPF CD对照,在用单独Abx处理的SPF CD小鼠的情况下的癫痫发作阈值增加使对这些结果的解释混乱(图5B)。为使这个不确定性明晰,应用用以探究用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种进行的外源性处理是否在喂以CD的小鼠中赋予抗癫痫发作作用的细菌处理方法。用 10^9 cfu嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种或用媒介物每日两次对SPF CD小鼠进行管饲,持续28天。相对于媒介物管饲的对照,这个细菌处理使癫痫发作阈值增加(图6C)。与用喂以生酮膳食的小鼠进行的实验(图4)一致,这个癫痫发作保护作用未在单独嗜粘蛋白艾克曼菌处理的动物中观察到,此揭示共同施用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种为癫痫发作保护作用所需(图5C)。此外,相较于经媒介物处理对照,用经热杀灭细菌处理使癫痫发作阈值降低,此表明活细菌为赋予抗癫痫发作作用所必需,并且细菌细胞表面和/或细胞内因子的释放促进对6Hz癫痫发作的敏感性。需要持久暴露于嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种,因为在停止处理21天之后,癫痫发作阈值的增加丧失(图6C)。此外,未在仅处理4天的小鼠中观察到癫痫发作保护作用(图6D),此表明需要长期暴露。总之,这些研究结果揭示粪便移植KD微生物群和用KD相关分类单元嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种进行细菌处理在喂以对照膳食的小鼠中赋予针对6Hz精神运动性癫痫发作的保护作用。

[0163] 实施例5:KD相关细菌使Kcna1^{-/-}小鼠的强直-阵挛癫痫发作减轻

[0164] 癫痫是一种具有不同临床呈现的异质病症。为确定微生物群是否影响不同癫痫发作类型,在关于颞叶癫痫和在癫痫情况下的突然意外死亡(SUDEP)的Kcna1^{-/-}小鼠模型中测试肠道微生物群在调节全身性强直-阵挛癫痫发作方面的作用。Kcna1^{-/-}小鼠具有电压门控钾通道Kv1.1 α 亚单位的无效突变,从而模拟人KCNA1基因变体与癫痫、阵发性共济失调和SUDEP的关联。Kcna1^{-/-}小鼠显现重度自发性复发性癫痫发作,此由KD减轻54%。Kcna1^{-/-}SPF C3HeB/FeJ小鼠用Abx或媒介物处理1周,用媒介物或嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种进行管饲,并且喂以KD或CD 3周。癫痫发作频率和持续时间通过EEG来历经3天加以记录,其中电子图癫痫发作基于由以下5个时期组成的特征性癫痫样尖峰样式(图7C)来鉴定:A)低频率背景,伴有低电压尖峰化,B)同步高频率高电压尖峰化,C)高频率低电压尖峰化,D)未同步高频率高电压尖峰化,和E)高频率爆发性尖峰化。此外,EEG癫痫发作样式用通过5个阶段来鉴定的刻板化癫痫发作行为加以确证。在喂以KD的小鼠与喂以CD的小鼠之间,在重量增加、食物消耗方面不存在显著差异。未观察到在各组之间的存活差异。相较于喂以CD的Kcna1^{-/-}对照,喂以KD的Kcna1^{-/-}小鼠展现肠道微生物群概况改变(图7A),伴有嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种的增加。值得注意的是,相较于在Swiss Webster小鼠中所见的KD诱导的富集(图1F),这些变化是轻微的而非统计显著的,此强调宿主基因型对基线微生物群组成和KD响应具有影响。经媒介物处理Kcna1^{-/-}小鼠展现持续15-180秒的癫痫发作,伴有平均最大尖峰幅值 490 ± 26 uV(图7C)。观察到相较于喂以CD的Kcna1^{-/-}对照,在喂以KD的Kcna1^{-/-}小

鼠的情况下的癫痫发作发生和持续时间降低(图7D),这与如先前所述的KD介导的癫痫发作保护作用一致。相较于经媒介物处理的喂以KD的Kcna1^{-/-}对照,用Abx预处理以使肠道微生物群消减的Kcna1^{-/-}小鼠展现每天癫痫发作和总癫痫发作持续时间显著增加(图7D)。在每次癫痫发作的尖峰频率、尖峰间间隔和平均持续时间方面不存在显著差异,此表明Abx处理和消减肠道微生物群对癫痫发作发生具有主要作用。此外,用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种对经Abx处理Kcna1^{-/-}小鼠进行定殖使癫痫发作频率和癫痫发作总持续时间朝向在经媒介物处理的喂以KD的Kcna1^{-/-}对照中所见的水平降低(图7D)。这表明用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种进行处理在具有不同基线微生物群和经膳食改变的微生物群的小鼠品系(在这个情况下是C57B1/6相对于C3HeB/FeJ)中类似地赋予癫痫发作保护作用。总之,这些研究结果支持来自固有肠道微生物群的所选细菌物种跨越不同癫痫发作类型和模型来介导KD的抗癫痫发作作用的见解。

[0165] 实施例6:微生物群调节肠道、血清和脑代谢物组

[0166] 代谢物组学剖析用于鉴定喂以CD的SPF小鼠以及喂以KD的SPF小鼠、经Abx处理SPF小鼠和嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种经富集小鼠的结肠管腔内含物和血清中的候选微生物群依赖性分子(图8A和图9A)。结肠管腔内含物和血清中的代谢物组学概况以关于结肠管腔代谢物的预测准确性94%和关于血清代谢物的预测准确性87.5%区分了癫痫发作受保护(喂以KD的经媒介物处理SPF小鼠和喂以KD的嗜粘蛋白艾克曼菌与副拟杆菌属种经富集小鼠)组与癫痫发作易感性(喂以CD的经媒介物处理SPF小鼠和喂以KD的经Abx处理SPF小鼠)组。大多数的高度有助于组区分的代谢物与氨基酸代谢相关,包括赖氨酸、酪氨酸和苏氨酸的衍生物。此外,观察到相较于癫痫发作易感性组,来自癫痫发作受保护组的结肠管腔内含物(图8C)和血清(图8D)中的生酮 γ -谷氨酰基化氨基酸的子组— γ -谷氨酰基(GG)-亮氨酸、GG-赖氨酸、GG-苏氨酸、GG-色氨酸和GG-酪氨酸—广泛降低。这表明肠道微生物群调节 γ -谷氨酰基化自身或生酮GG-氨基酸的选择性代谢,并且生酮GG-氨基酸的增加与癫痫发作易感性相关联。支持这个见解的是,经插补宏基因组预测细菌基因的KD相关改变与氨基酸代谢相关。这些数据揭示肠道微生物群对肠和全身性代谢物组学KD响应具有显著影响,并且进一步揭示KD诱导的癫痫发作保护作用与生酮GG-氨基酸水平的微生物群依赖性改变之间的关联。

[0167] 脑依赖于必需氨基酸的主动输入以推动神经递质生物合成,因此,对外周氨基酸生物可用度的波动敏感。特定来说,GG-氨基酸据假设相较于非 γ -谷氨酰基化形式展现转运性质增加。基于揭示血清生酮氨基酸的膳食和微生物群依赖性改变的数据、氨基酸输入与脑GABA水平之间的关联、以及GABA有助于KD的抗癫痫发作作用的流行理论,考查了作为癫痫发作传播的关键区域的海马中的GABA和谷氨酸的整体水平。海马代谢物概况区分了癫痫发作受保护小鼠的样品相对于癫痫发作易感性小鼠的样品。相较于喂以CD的对照,喂以KD的SPF小鼠中的海马GABA/谷氨酸盐比率显著增加(图8D,左侧)。这些增加在喂以KD的经Abx处理小鼠中被消除,并且在经Abx处理小鼠富集有嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种之后得以恢复(图8D)。对于海马谷氨酰胺(谷氨酸和GABA的前体)水平,观察到类似变化(图8D,右侧)。总之,这些结果揭示在谷氨酰胺的生物可用度方面的膳食和微生物群依赖性调控,以及在癫痫发作受保护小鼠中,相对于谷氨酸,海马GABA水平优先增加。

[0168] 实施例7:细菌 γ -谷氨酰基化影响癫痫发作易感性

[0169] 基于发现相对于癫痫发作易感性实验组,癫痫发作受保护实验组的结肠管腔和血清中的必需生酮GG-氨基酸减少,假设对生酮GG-氨基酸的微生物群依赖性限制对于介导KD的抗癫痫发作作用是重要的。 γ -谷氨酰基化形式的氨基酸通过来自谷胱甘肽的GG部分转肽于氨基酸上来产生。为确定氨基酸的 γ -谷氨酰基化是否影响癫痫发作易感性,用作为GGT的选择性不可逆抑制剂的GGsTop对SPF CD小鼠进行管饲3天。用GGsTop处理的SPF CD小鼠展现癫痫发作阈值朝向在SPF KD小鼠中所见的水平增加(图10A)。类似地,用GGsTop处理的喂以CD的SPF *Kcna1*^{-/-}小鼠的EEG记录显示每天癫痫发作显著减少(图7E)。这证明外周抑制 γ -谷氨酰基化和限制GG-氨基酸促进癫痫发作保护作用,这与相较于癫痫发作易感性对照,观察到来自癫痫发作受保护组的结肠管腔内含物和血清中的生酮GG-氨基酸的代谢物组学降低一致。为确定是否氨基酸的限制而非谷胱甘肽的分解代谢为KD微生物群的抗癫痫发作作用所必需,通过每日两次腹膜内注射持续3天来用组合亮氨酸、赖氨酸、苏氨酸、色氨酸和酪氨酸对喂以KD的嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种经富集小鼠进行补充,接着进行6Hz癫痫发作测试。基于血清代谢物组学数据计算氨基酸的生理相关浓度,以使各自的剂量使血液水平恢复至在经媒介物处理SPF CD对照中所见的水平。升高生酮氨基酸的全身性水平使癫痫发作阈值降低至在经媒介物处理SPF CD对照中所见的水平(图10B)。这表明限制外周生酮氨基酸为介导微生物群和KD依赖性癫痫发作抗性增加所必需。

[0170] 宿主细胞与特定细菌物种两者均展现GGT活性。为获得对KD以及嗜粘蛋白艾克曼菌与副拟杆菌属种之间的相互作用是否在体内抑制细菌 γ -谷氨酰基化的了解,测量从喂以CD或KD的SPF小鼠或嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种经富集小鼠收集的粪便样品中的GGT活性。相较于CD对照,用KD对SPF小鼠喂食使粪便GGT活性降低(图10C)。在使嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种在喂以CD的小鼠中富集之后,观察到类似粪便GGT活性降低。此外,相对于在SPF KD小鼠和SPF CD小鼠中所见,使嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种富集以及用KD喂食进一步使粪便GGT活性降低。使所有粪便样品暴露于GGT抑制剂GGsTop都使检测信号消除,从而确认测量结果反映GGT活性。与此一致,相对于经媒介物处理对照和用经热杀灭细菌处理的小鼠,用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种处理喂以CD的SPF小鼠使粪便GGT活性降低(图10D)。总之,这些数据揭示使嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种富集或用嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种进行外源性处理使粪便GGT活性降低,此可解释在癫痫发作受保护小鼠中观察到的低水平的结肠和血清GG-氨基酸。

[0171] 为探究细菌 γ -谷氨酰基化是否受嗜粘蛋白艾克曼菌与副拟杆菌属种之间的相互作用的影响,测量在体外交互饲养系统中生长的细菌中的GGT活性。当将嗜粘蛋白艾克曼菌于基于CD或KD的琼脂中埋置,并且将粪副拟杆菌于M9基本培养基中叠加在所述琼脂上时,两种细菌均展现生长增强(图10E和图10F),此表明嗜粘蛋白艾克曼菌释放可溶性因子以使得能够达成粪副拟杆菌生长,并且转而粪副拟杆菌使嗜粘蛋白艾克曼菌生长增强。试探性实验揭示当叠加在于KD或CD琼脂中埋置的粪副拟杆菌上时,嗜粘蛋白艾克曼菌于M9培养基中不生长,此表明嗜粘蛋白艾克曼菌不能仅依赖于与粪副拟杆菌的交互饲养来持续。

[0172] 粪副拟杆菌展现高GGT活性,所述活性通过添加于CD或KD琼脂中埋置的嗜粘蛋白艾克曼菌而消除(图10G和图10H)。为确定粪副拟杆菌中的GGT活性降低是否促进嗜粘蛋白艾克曼菌生长,粪副拟杆菌用媒介物或GGsTop预处理以在药理学上抑制GGT活性,随后在交互饲养测定中测试。相较于暴露于经媒介物处理粪副拟杆菌的嗜粘蛋白艾克曼菌,在孵育

之后24小时,暴露于用GGsTop预处理的粪副拟杆菌的嗜粘蛋白艾克曼菌展现生长增加(图11B)。总之,这些研究结果表明嗜粘蛋白艾克曼菌能够代谢来自KD和CD膳食的组分以支持粪副拟杆菌生长,并且协作性相互作用使GGT活性降低。转而,粪副拟杆菌中的GGT活性降低促进嗜粘蛋白艾克曼菌生长。这与发现嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种的富集使粪便GGT活性、结肠管腔GG-氨基酸和血清GG-氨基酸减少一致。这证明氨基酸限制为癫痫发作保护作用所需,并且抑制GGT促进癫痫发作保护作用。这与将GGT活性与癫痫发作严重性改变相关联的先前研究一致。在对75名癫痫患者的研究中,相较于对照,在84.5%的患者中观察到高血清GGT活性。在大鼠癫痫发作模型中,在5次连续每日电击递送之后,GGT活性增加。在动物和人中,各种外周氨基酸的减少与KD介导的癫痫发作抑制相关联。

[0173] 基于本文数据和关于外周氨基酸作为用于脑神经递质生物合成的底物的作用的现有文献,假设细菌对GG-氨基酸的调控使推动GABA/谷氨酸代谢的氨基酸的脑输入改变(图8)。值得注意的是,若干肠道细菌据报道会重新合成GABA;然而,循环GABA展现跨越血脑屏障的有限转运。此外,肠道微生物群的变化已与脑GABA水平的改变相关联,但涉及的分子机理仍然不明确。需要额外研究来确定GG-氨基酸是否影响氨基酸的脑转运以及谷氨酸相对于GABA的局部合成。

[0174] 总之,这个研究证明所选KD相关肠道细菌-嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种一在小鼠难治性癫痫模型中在介导和赋予癫痫发作保护作用方面具有新颖作用。在人、仓鼠、松鼠和蟒蛇禁食期间以及响应于小鼠中的热量限制和高多不饱和脂肪膳食,而类似地观察到嗜粘蛋白艾克曼菌增加。在人中,嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种也与酮症增加和生酮膳食正性相关。本文数据揭示KD促进所选微生物-微生物相互作用所利用的可能路径,所述相互作用使宿主生酮GG-氨基酸水平降低,并且使得在海马中,相对于谷氨酸,GABA的总生物可用度升高。药理学抑制 γ -谷氨酰基化使癫痫发作阈值增加,此表明GGT活性降低对于在小鼠中介导KD相关肠道微生物群的抗癫痫发作作用是重要的。值得注意的是,鉴于在GF条件下缺乏细菌GGT活性与癫痫发作易感性相关联,有可能的是嗜粘蛋白艾克曼菌和副拟杆菌属种贡献除抑制GGT活性之外的也可有助于癫痫发作保护的作用。

[0175] 以引用的方式并入

[0176] 本文提及的所有出版物和专利都据此以引用的方式整体并入本文,所述引用的程度就好像已明确地和个别地指示将各个别出版物或专利以引用的方式并入本文一样。在起冲突的情况下,将以包括本文任何定义的本申请为准。

[0177] 等效物

[0178] 尽管已讨论本发明的特定实施方案,但以上说明书是说明性的而非限制性的。本发明的许多变化形式将在审阅本说明书和以下权利要求后变得为本领域技术人员显而易见。本发明的完全范围应通过参照权利要求连同它们的完全范围的等效物一起以及说明书连同所述变化形式一起来确定。

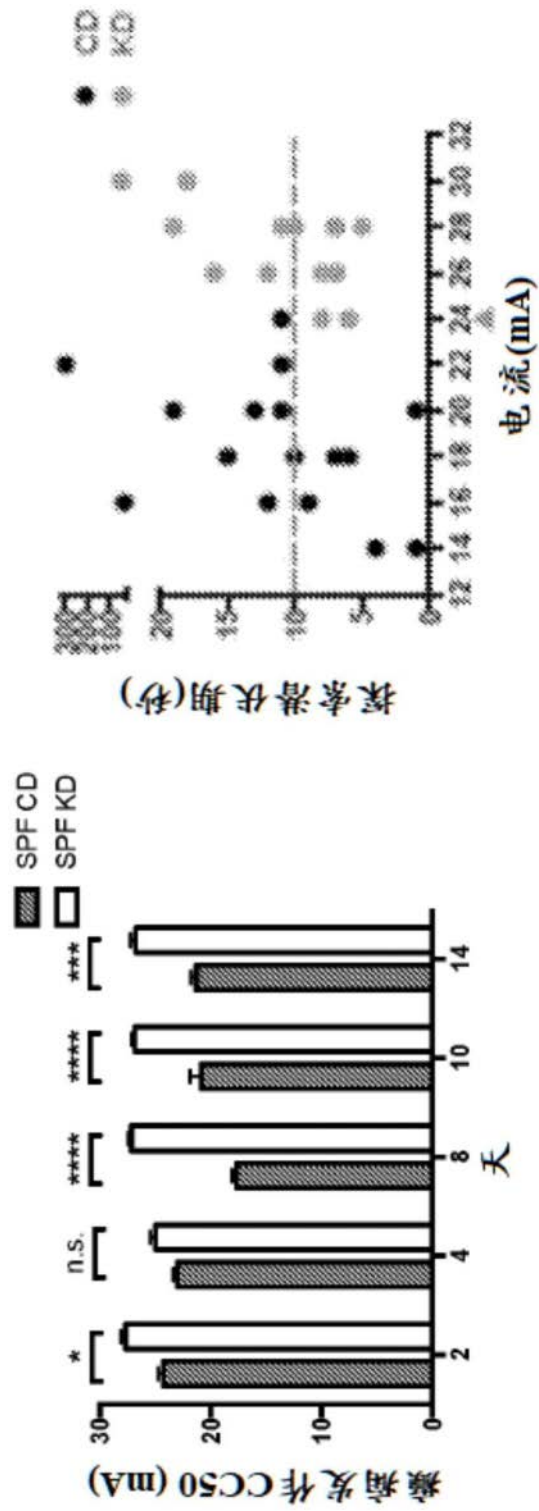


图1A

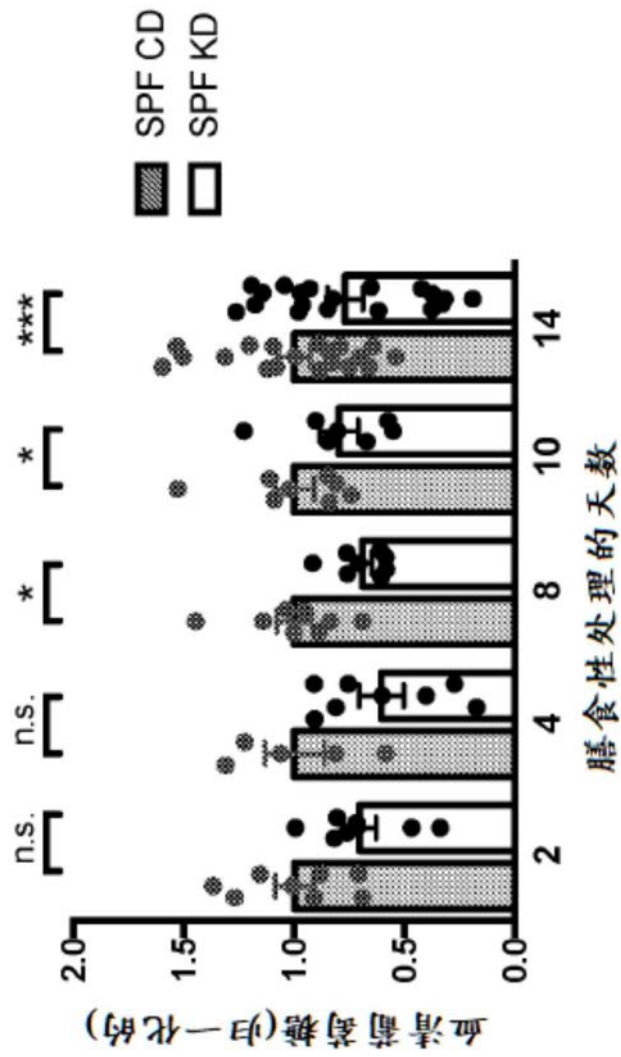


图1B

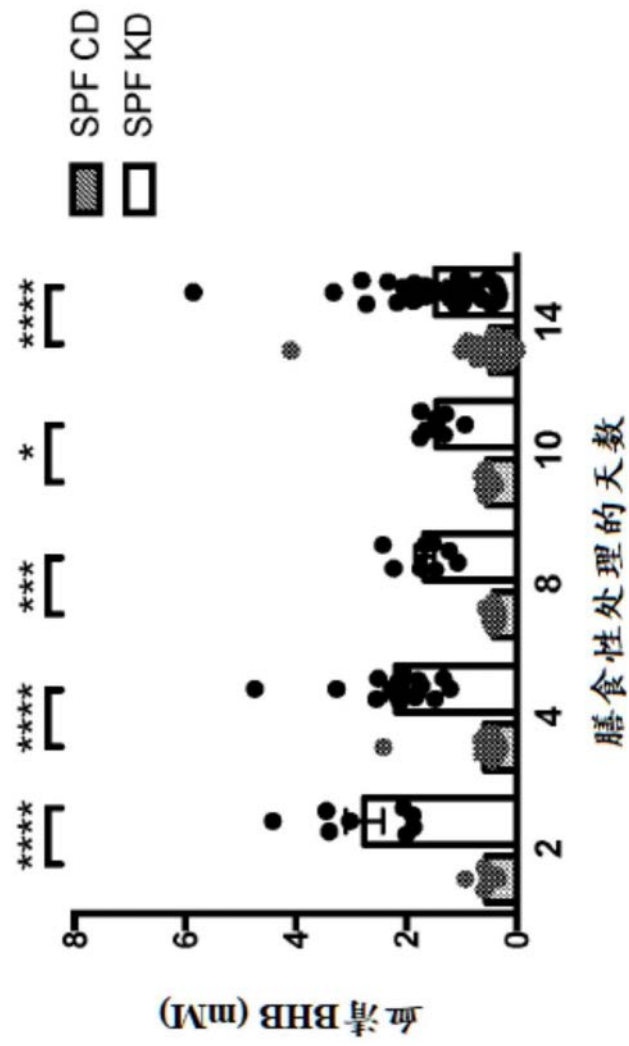


图1C

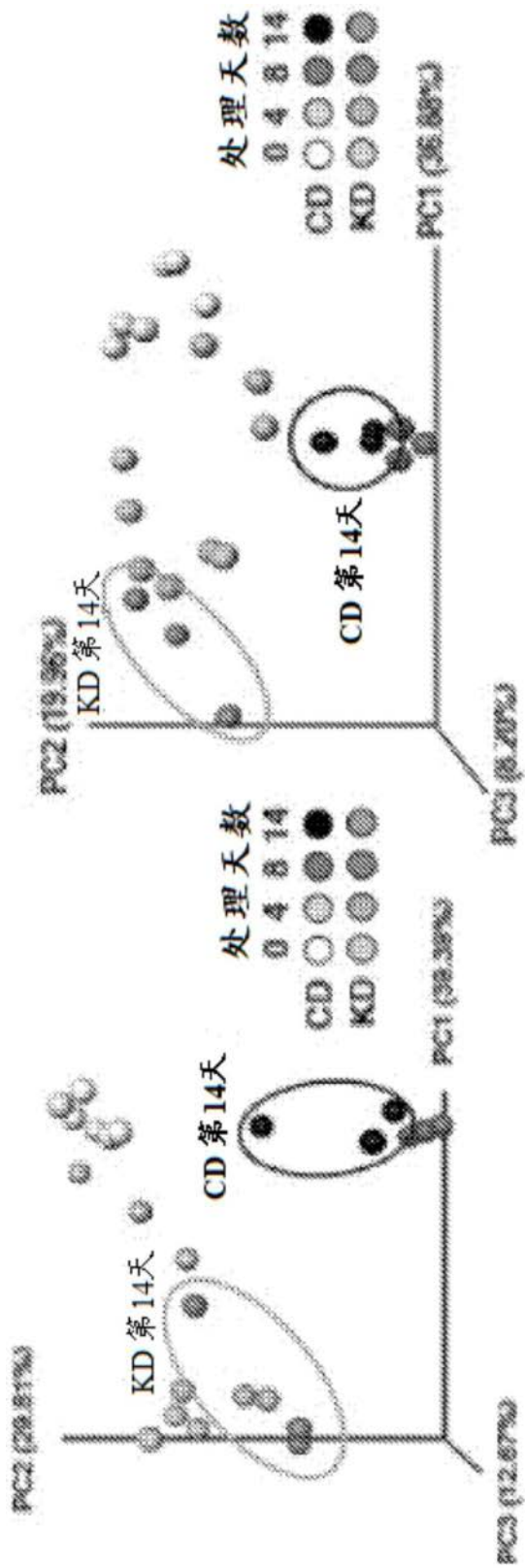


图1D

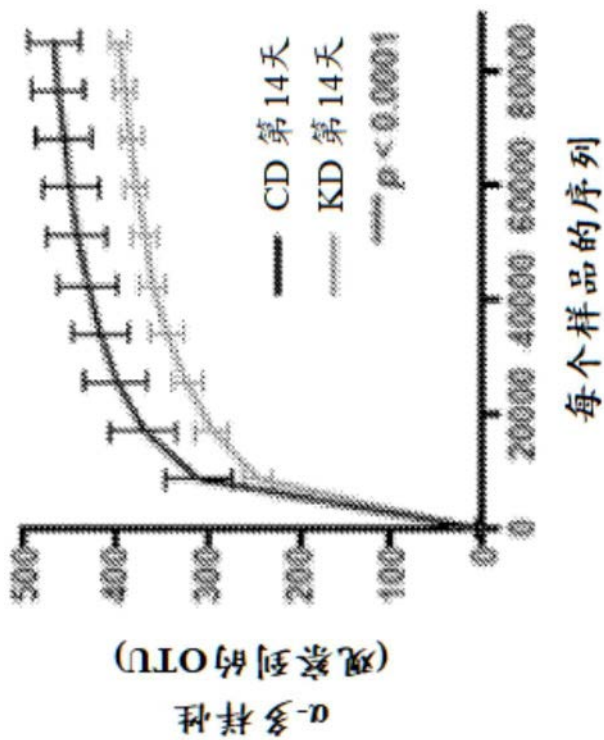


图1E

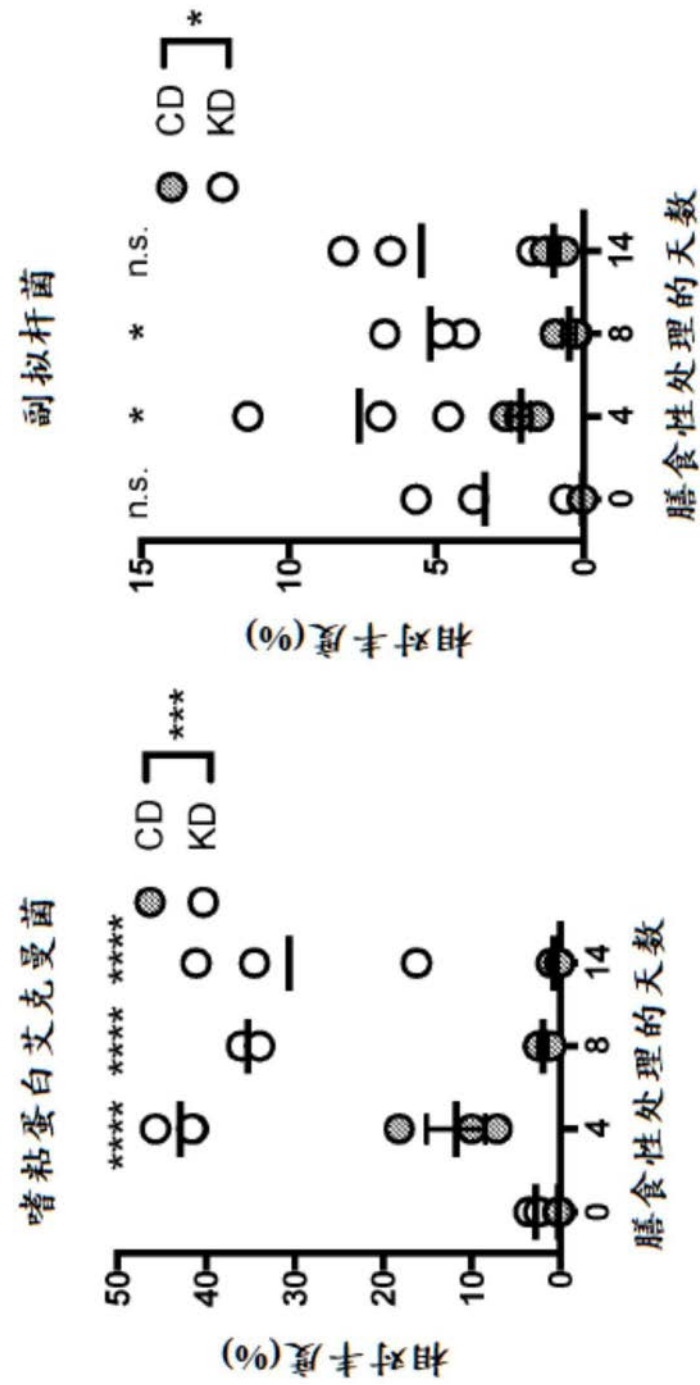


图1F

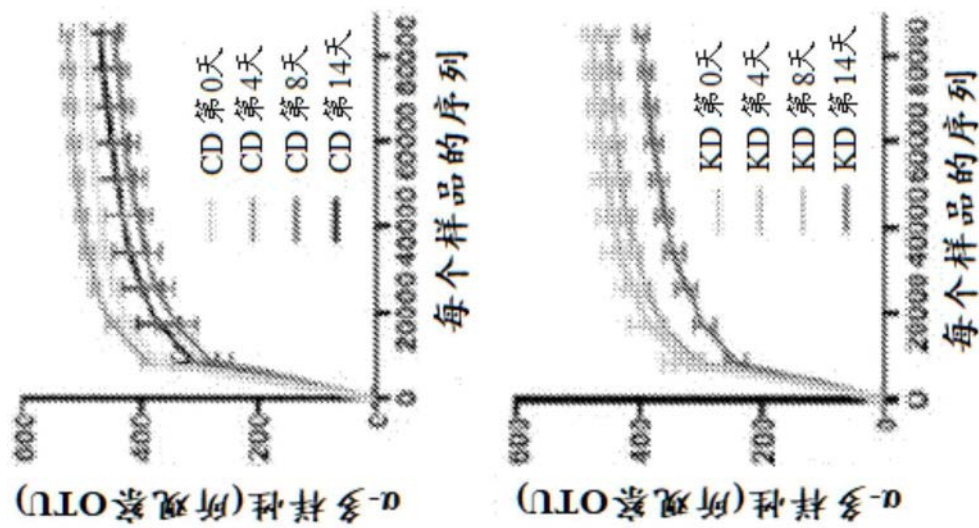


图2A

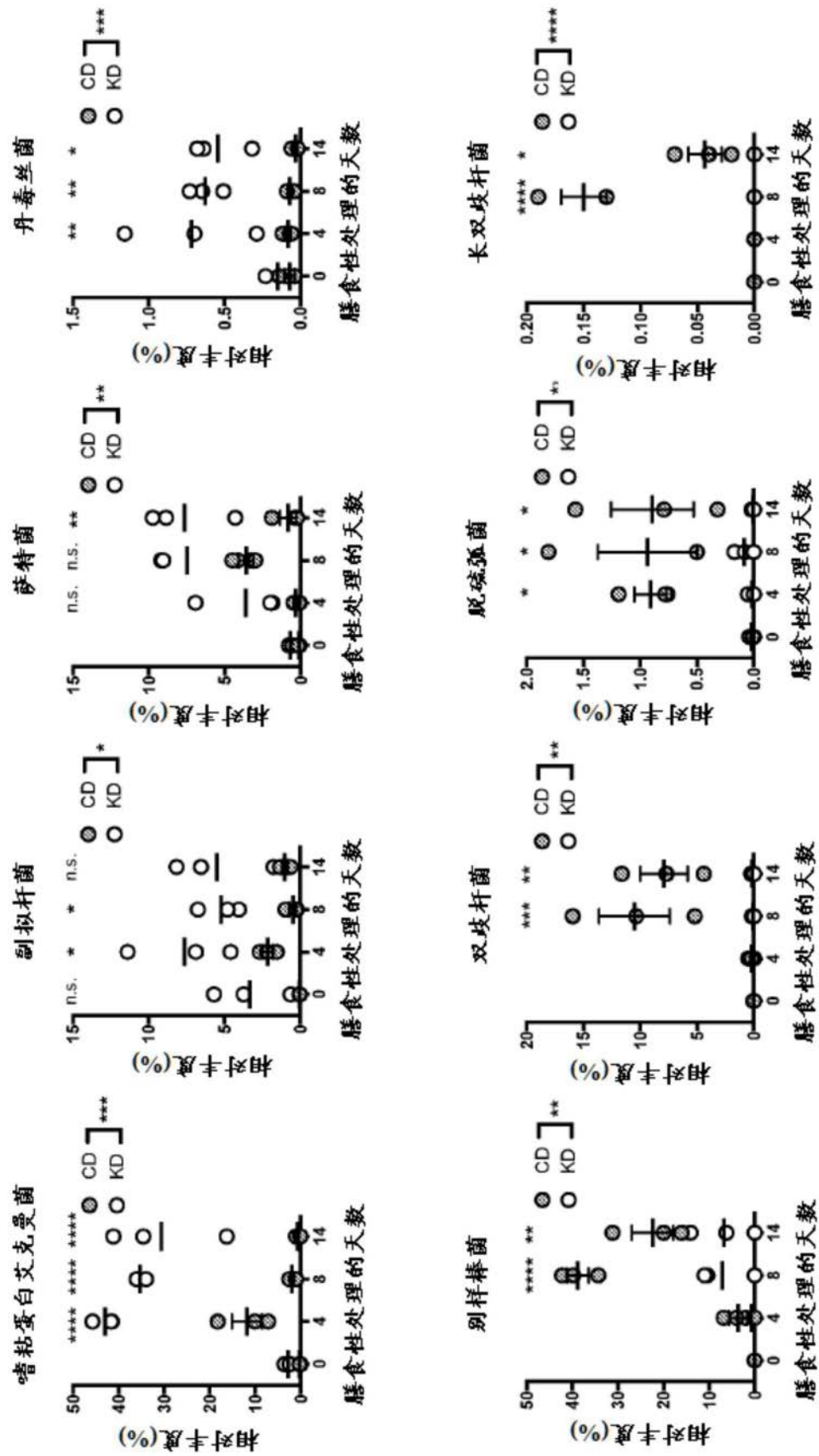


图2B

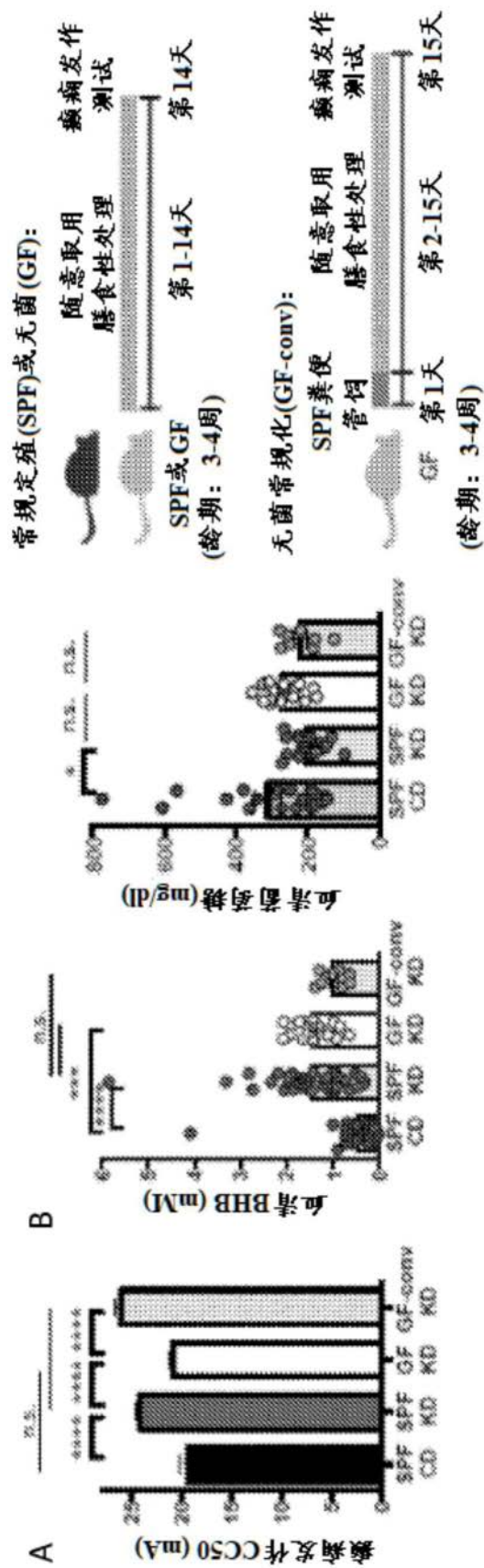


图3A和图3B

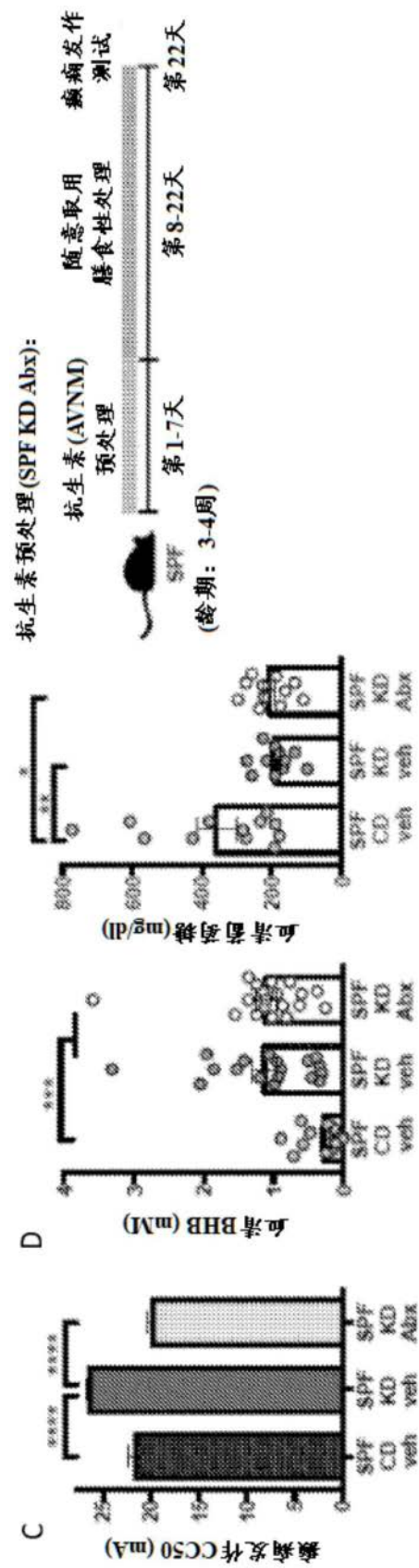


图3C和图3D

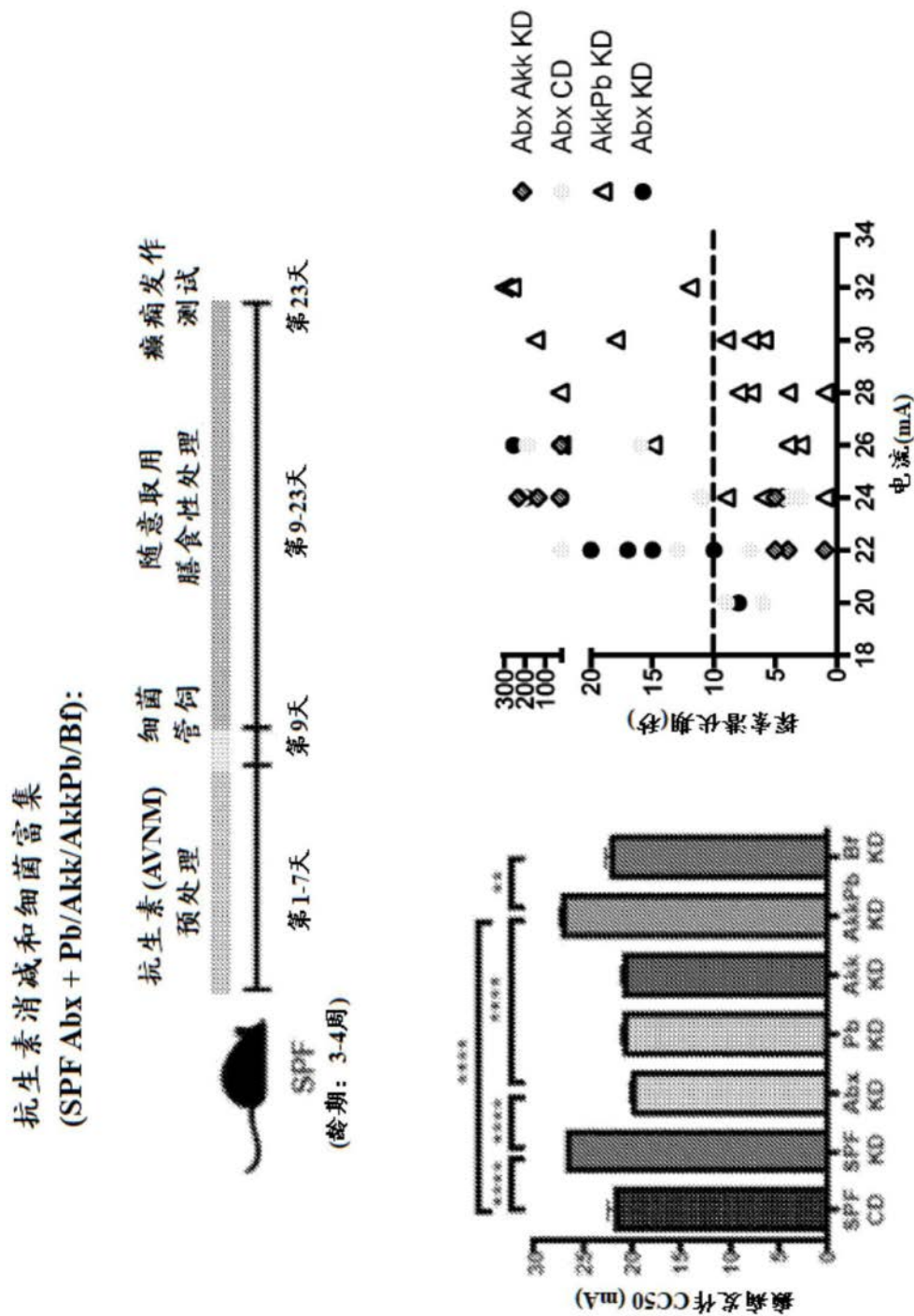


图4A

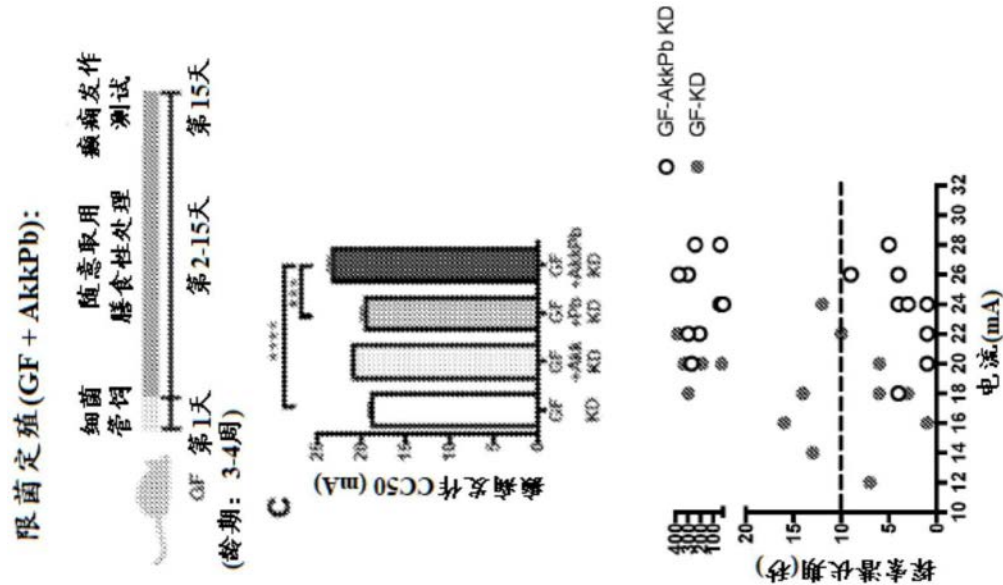


图4B

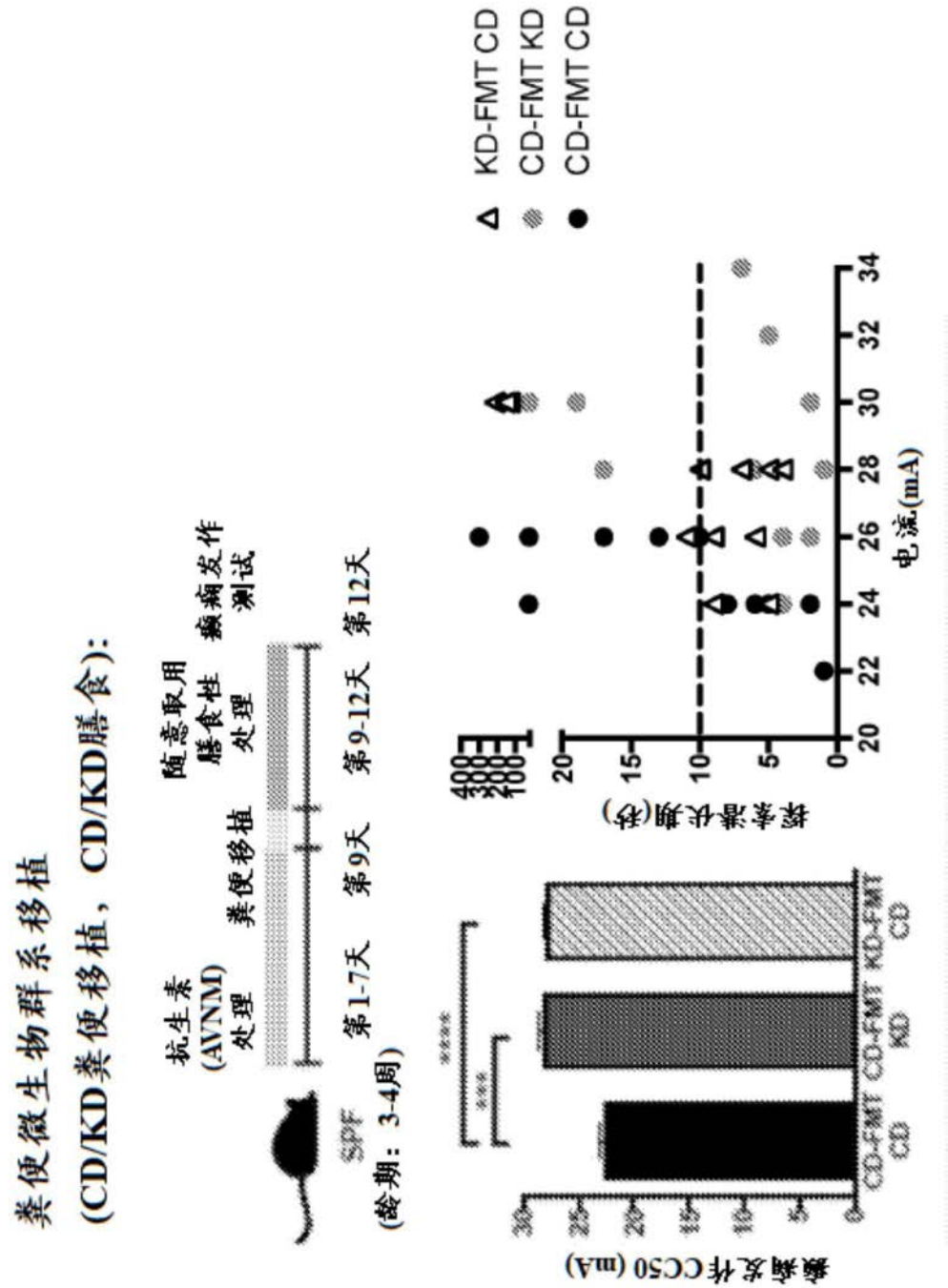


图5A

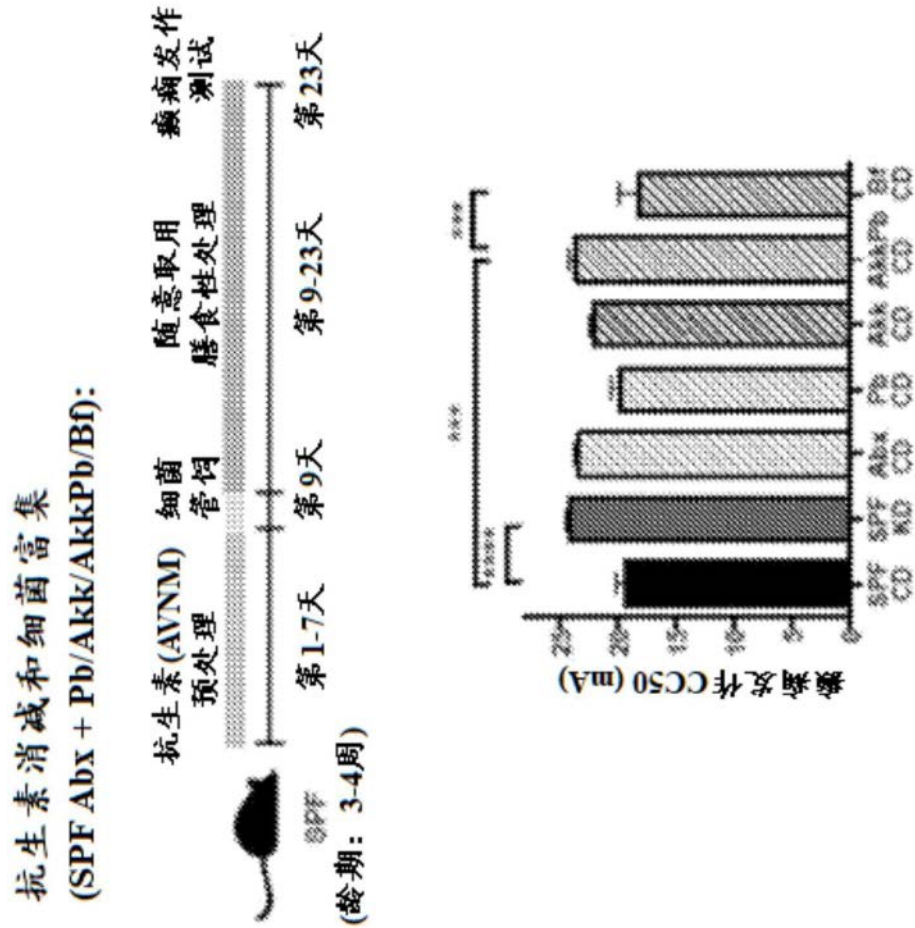


图5B

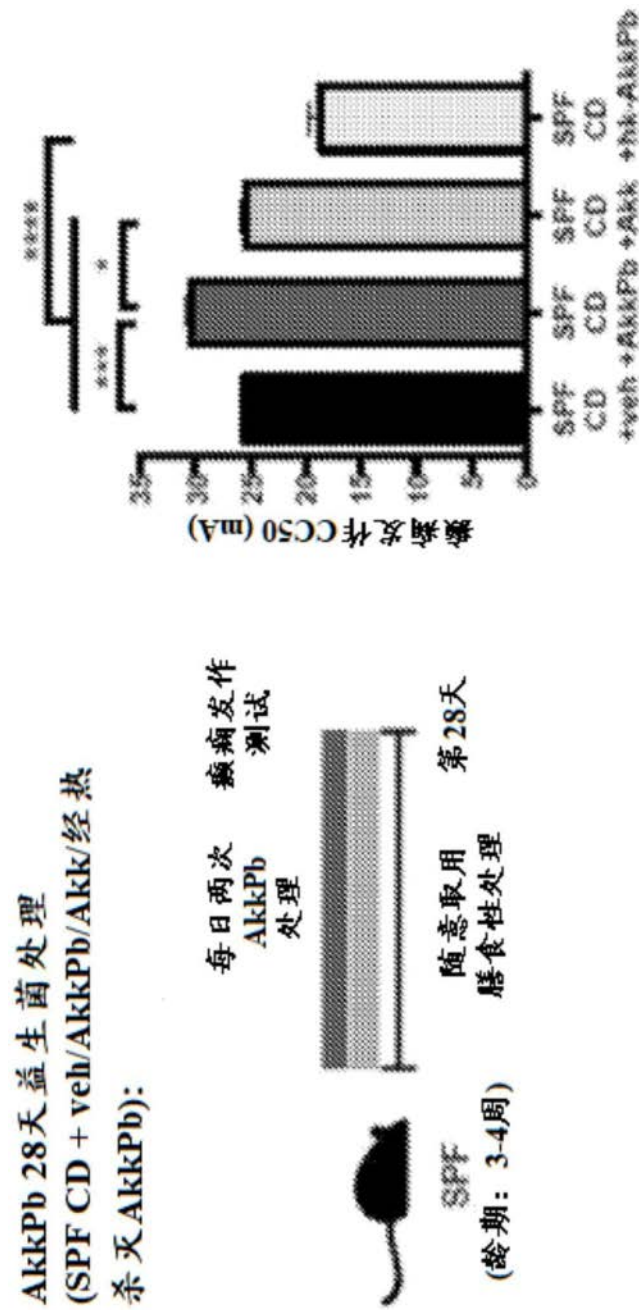


图5C

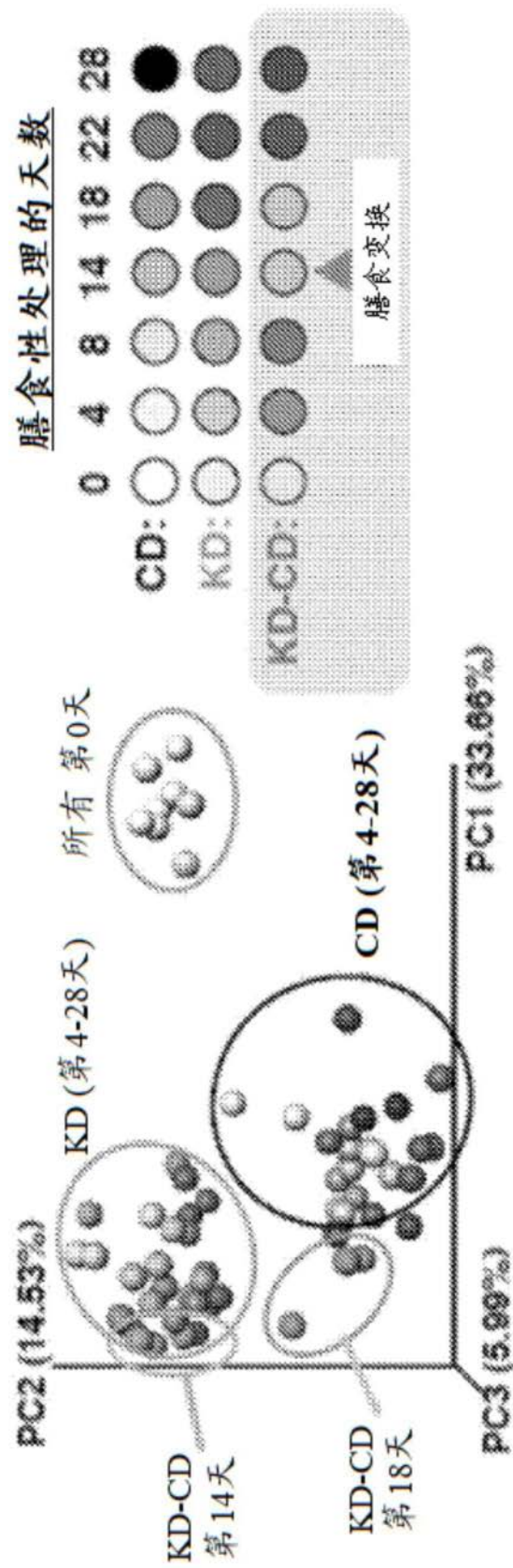


图6A

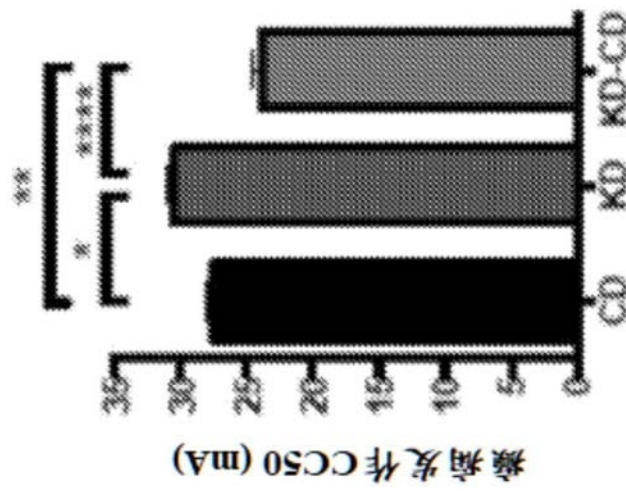


图6B

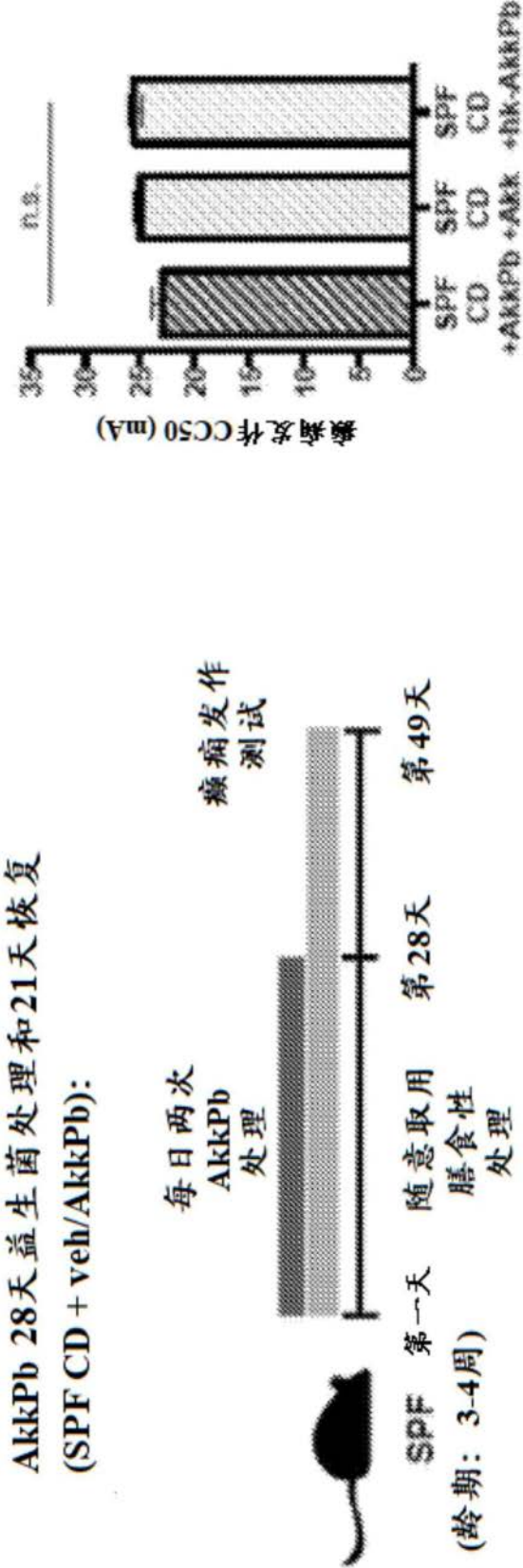


图6C

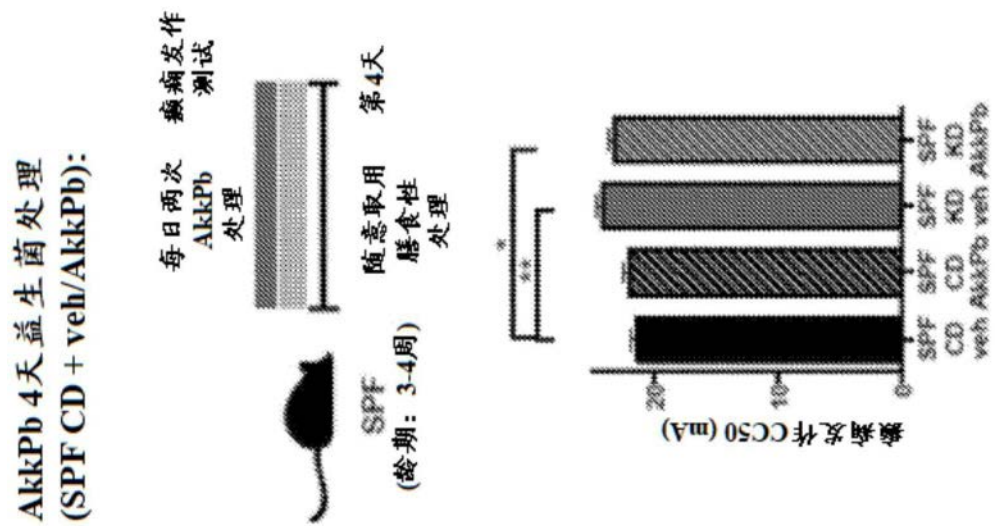


图6D

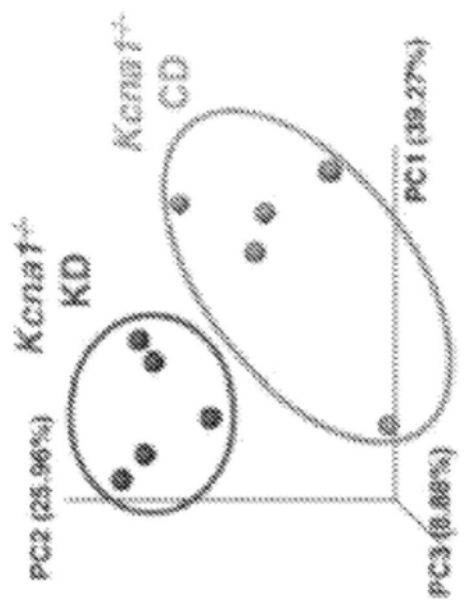


图7A

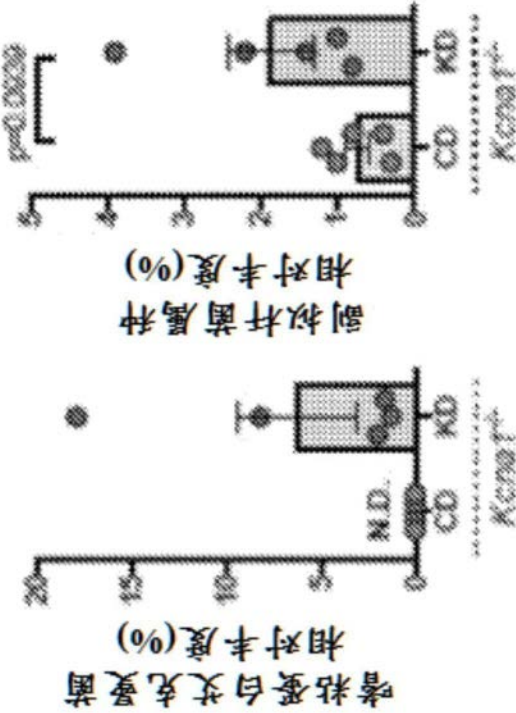


图7B

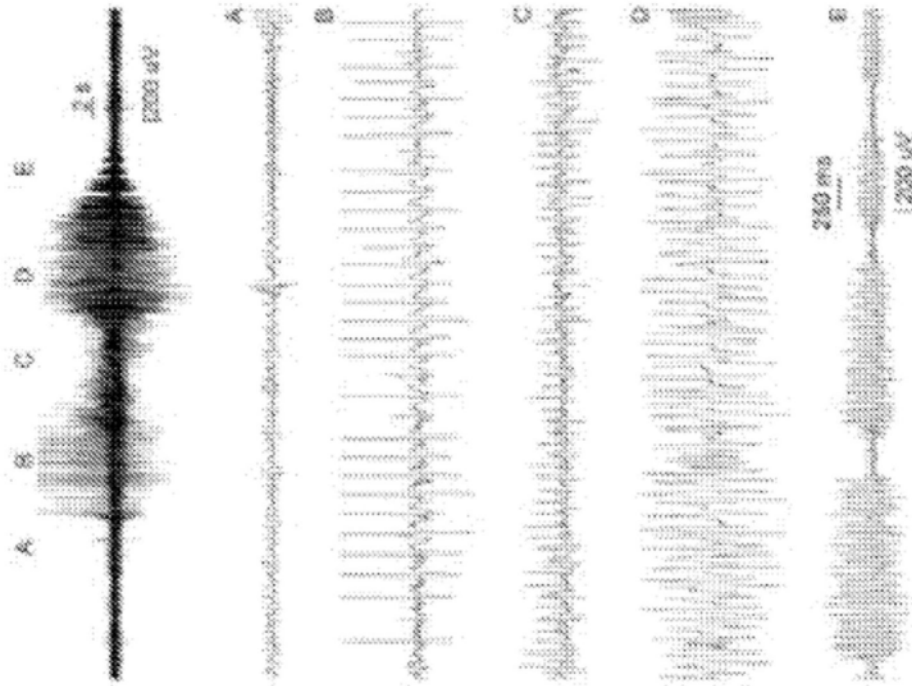


图7C

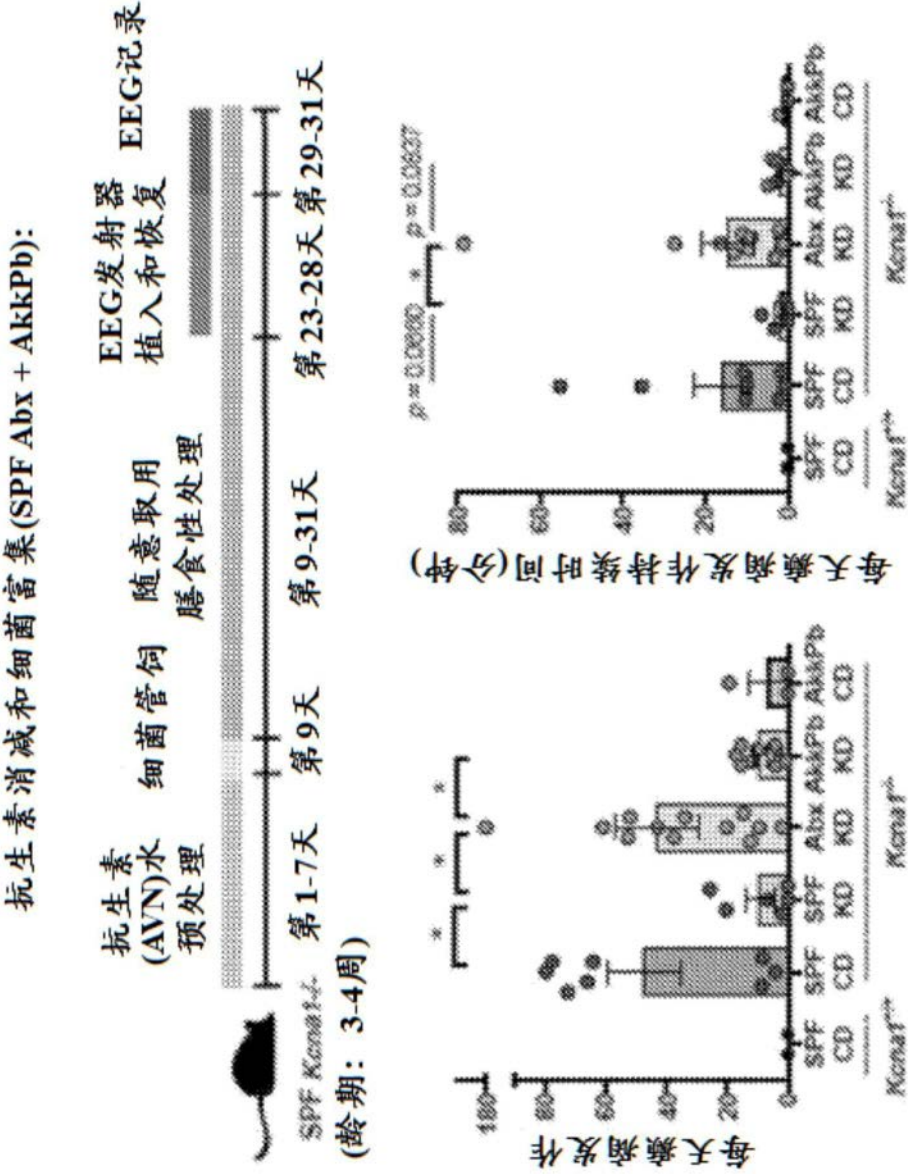


图7D

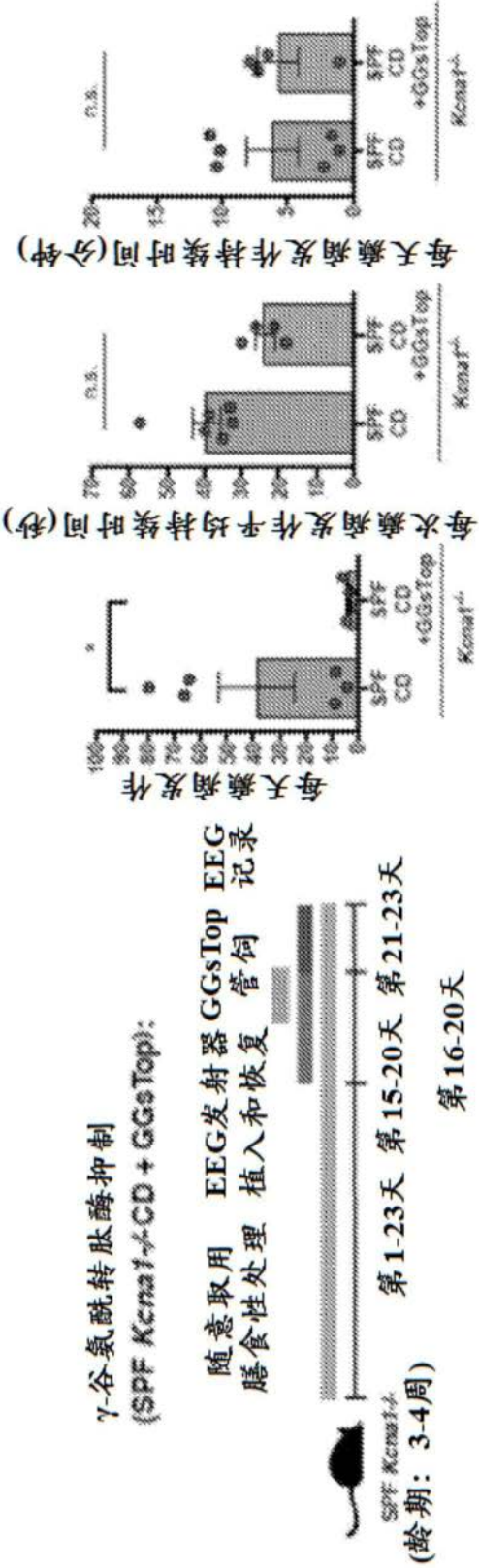


图7E

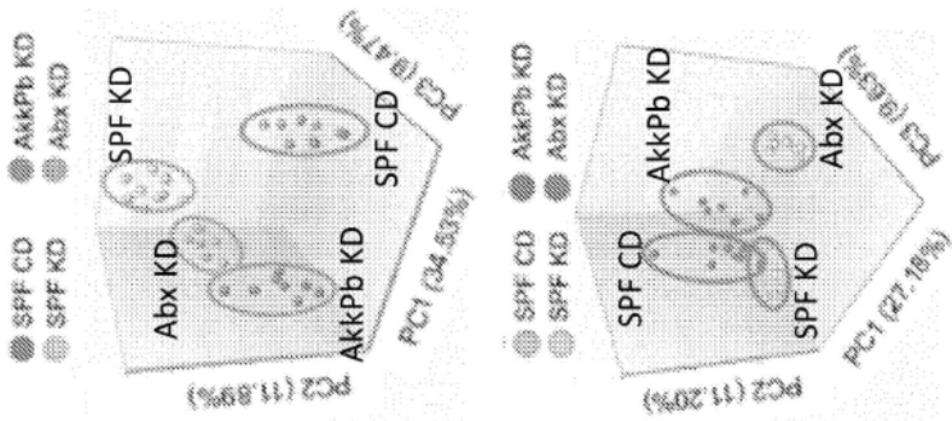


图8A

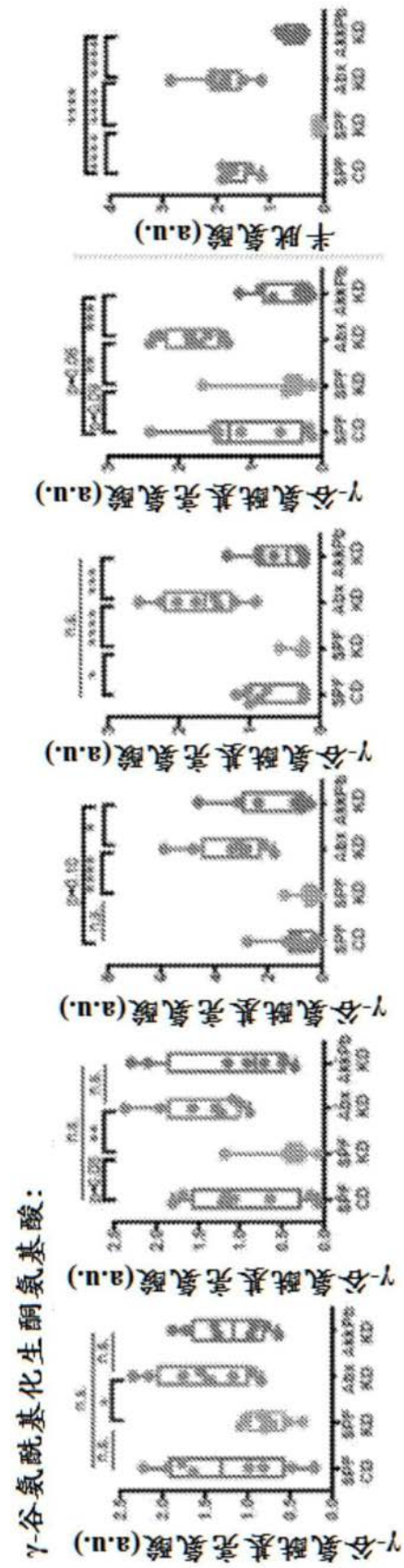


图8B

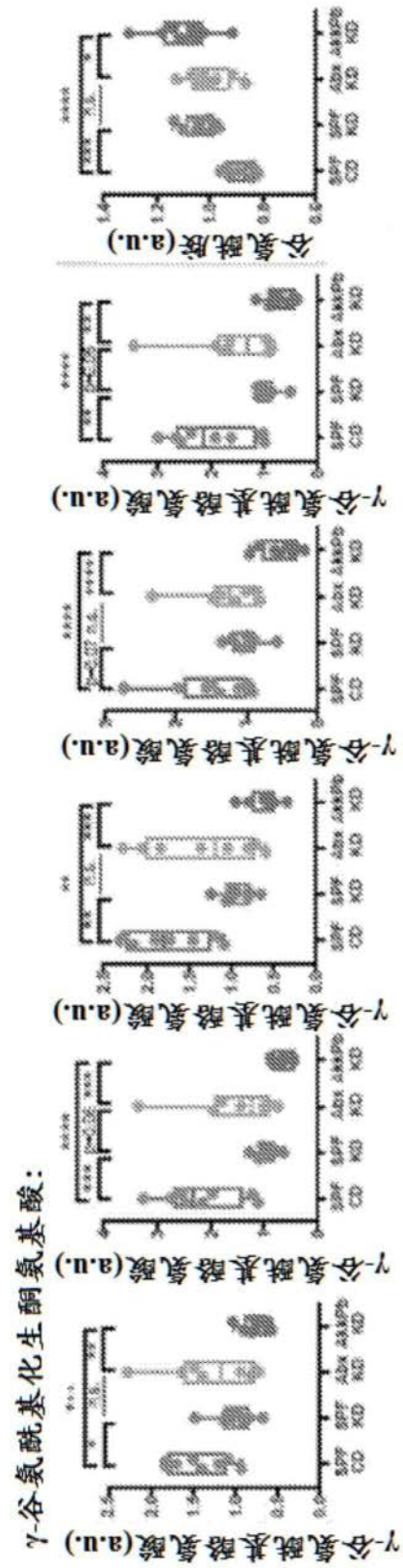


图8C

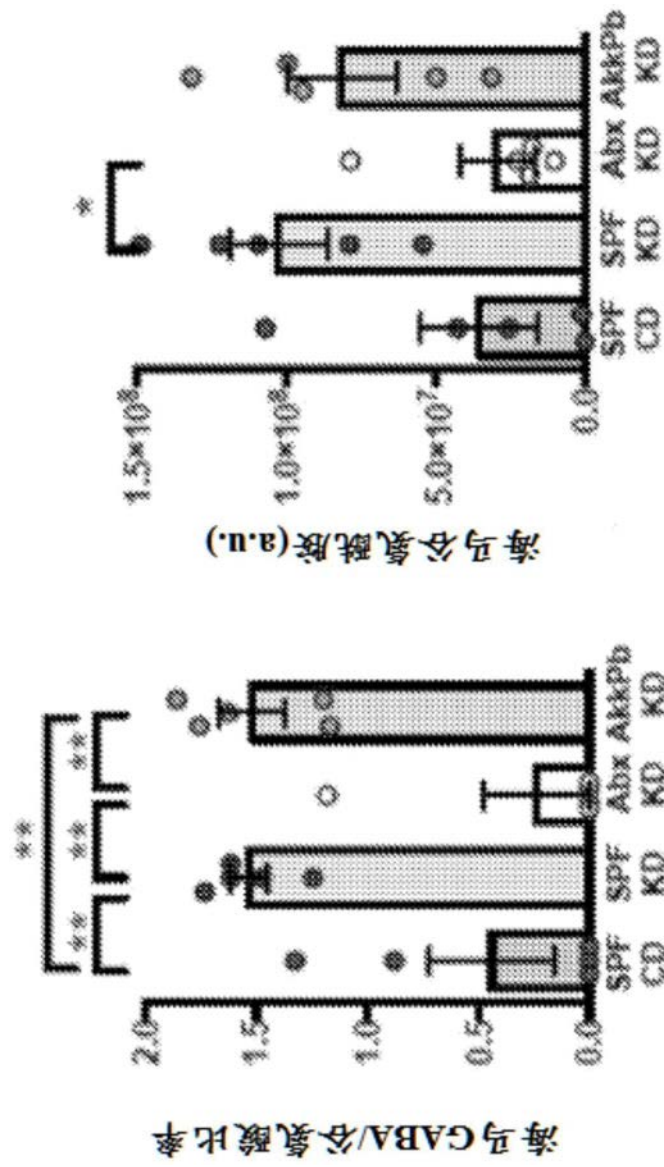


图8D

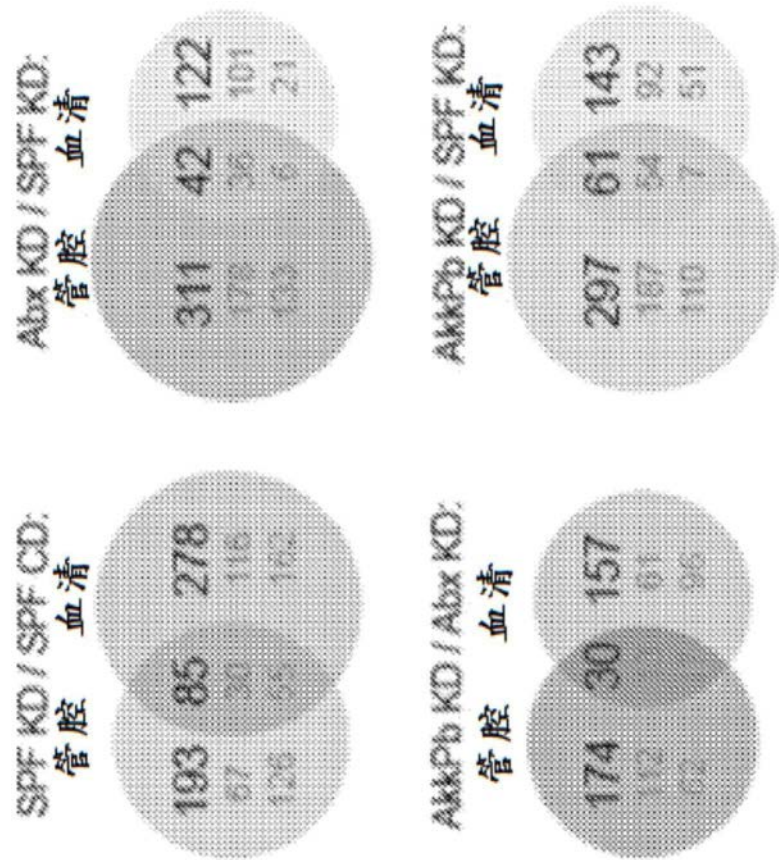


图9A

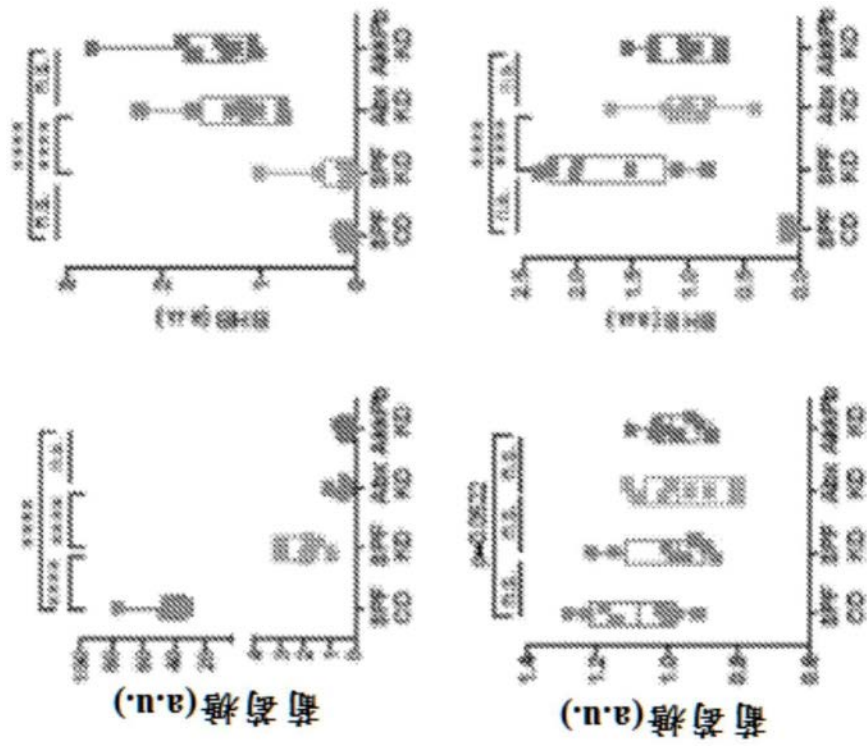


图9B

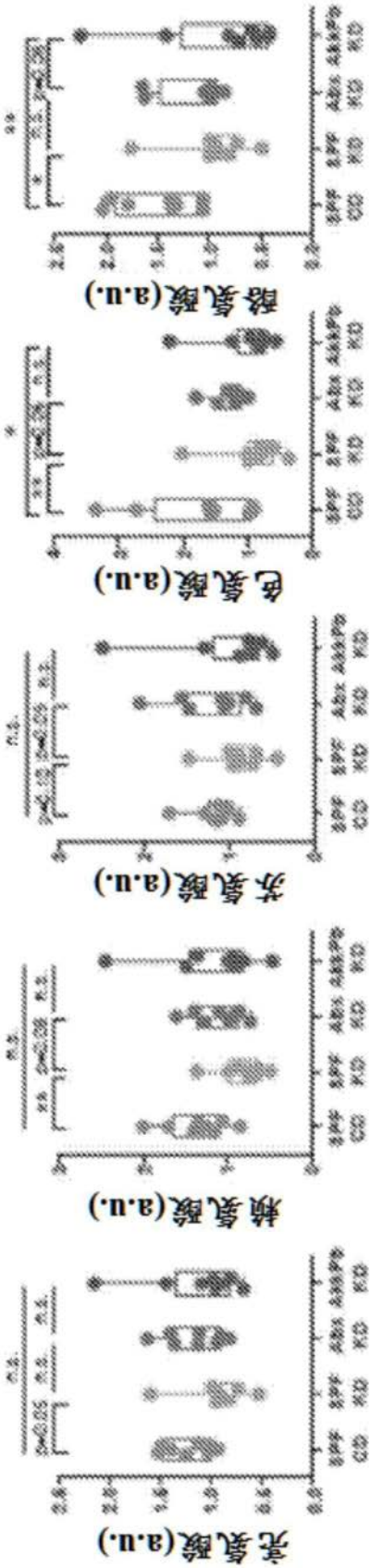


图9C

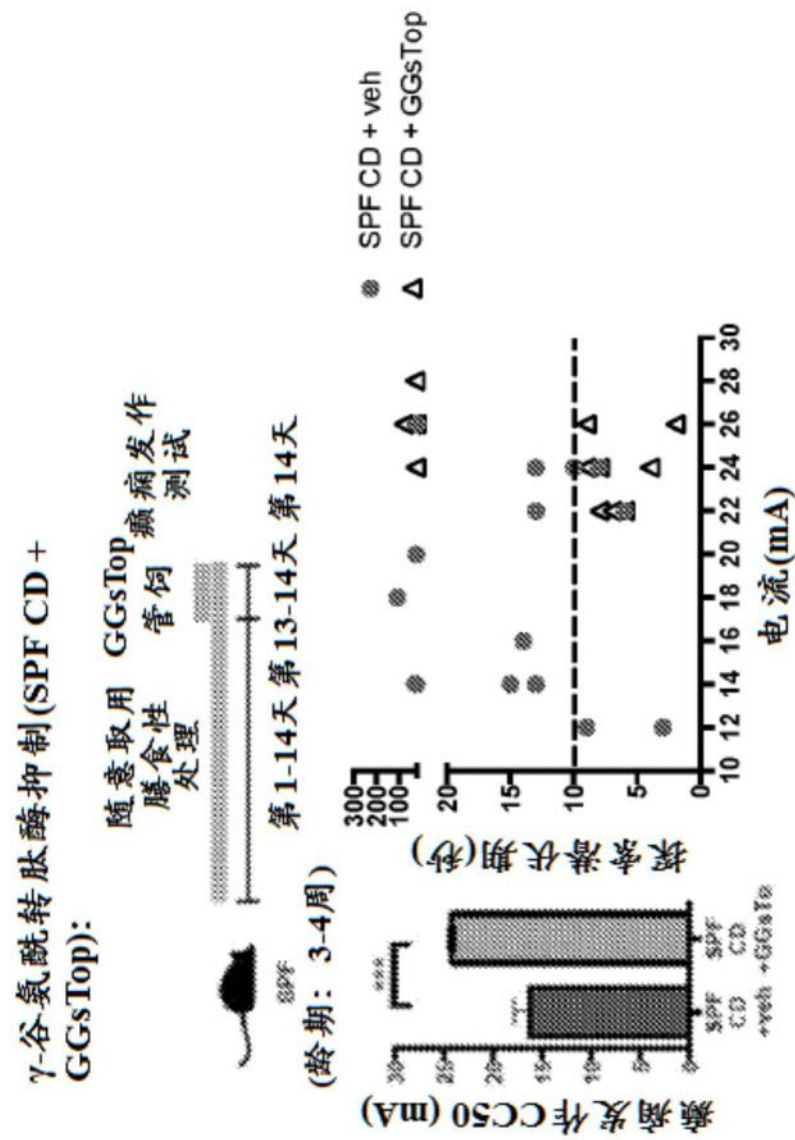


图10A

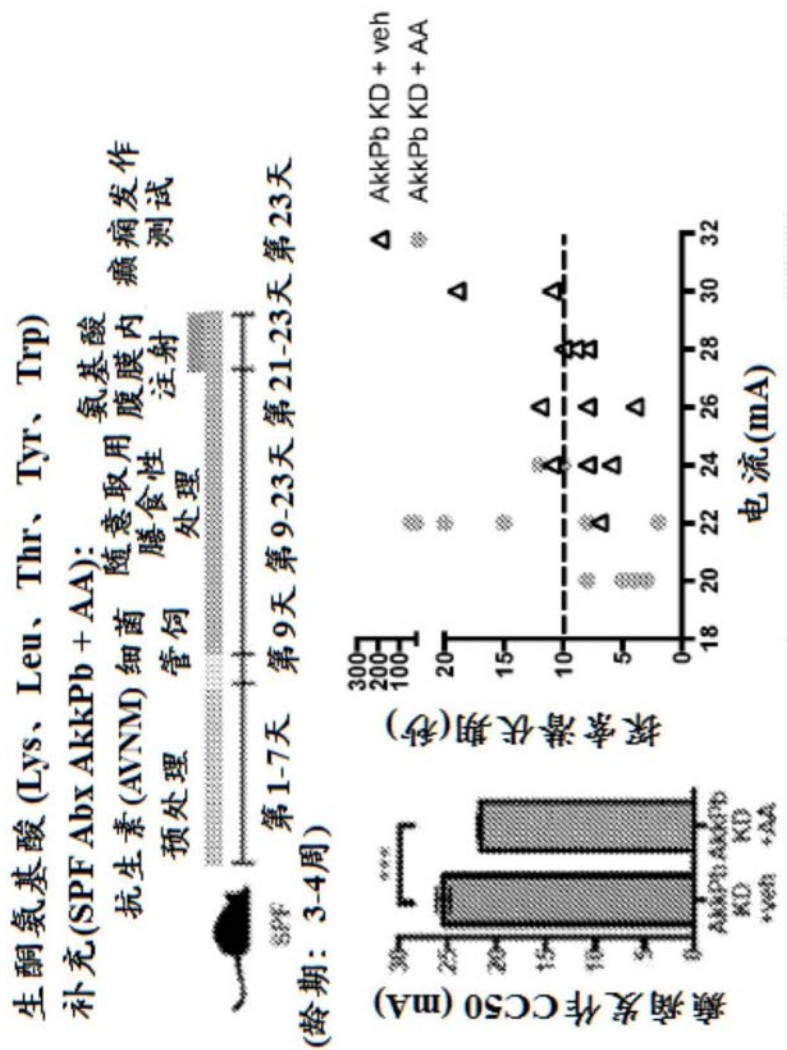


图10B

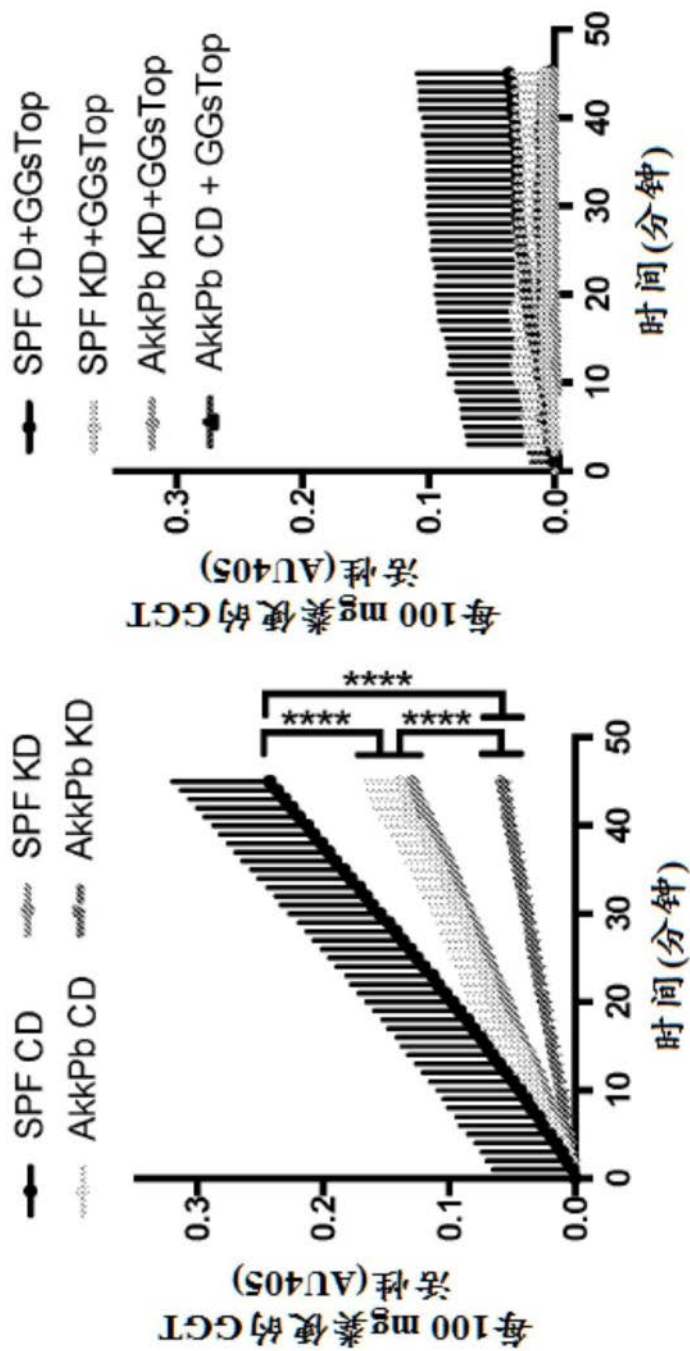


图10C

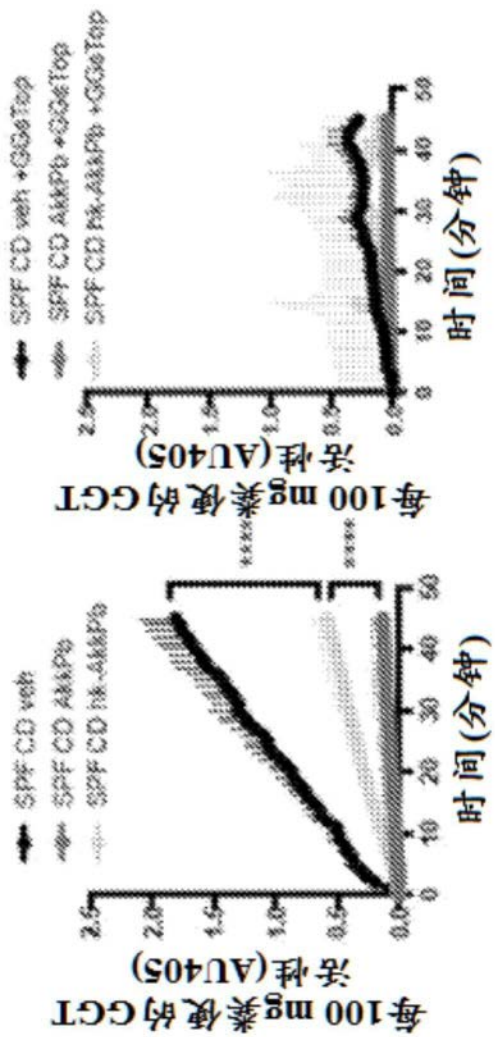


图10D

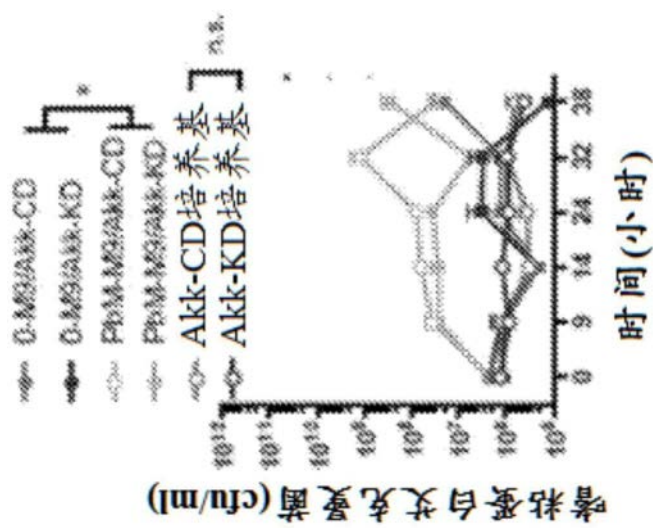


图10E

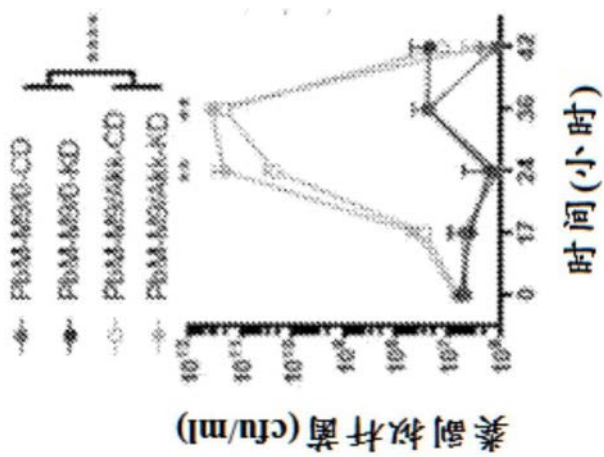


图10F

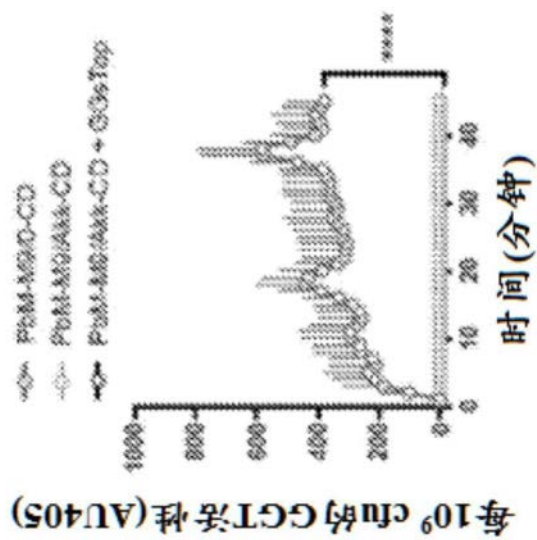


图10G

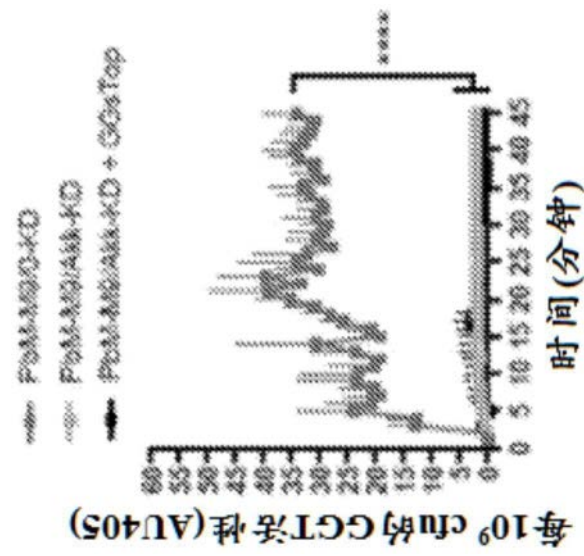


图10H

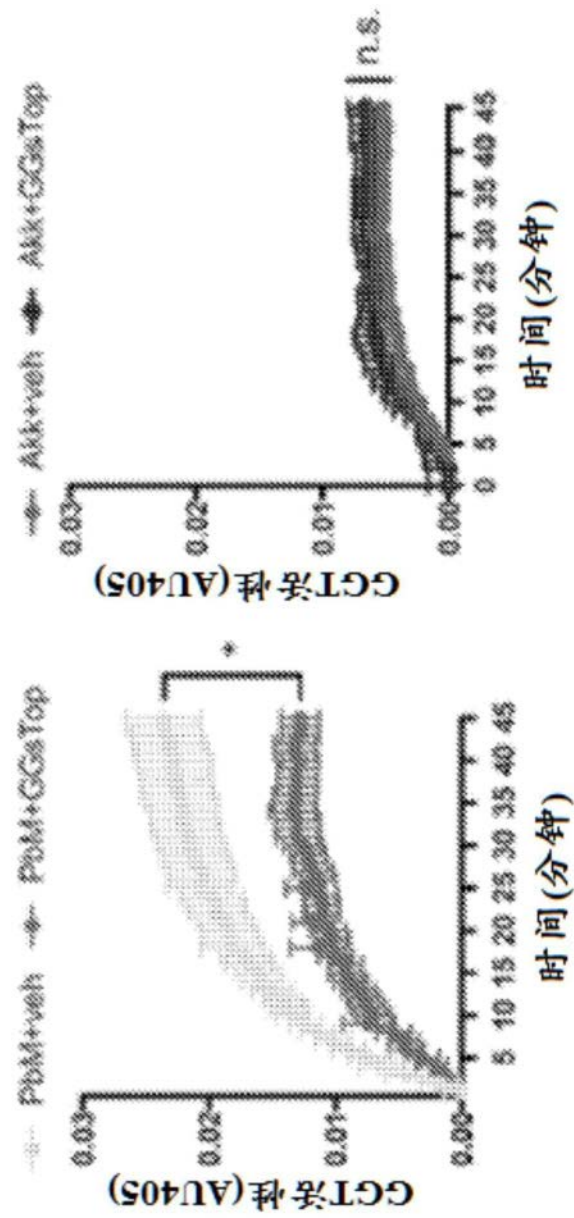


图11A

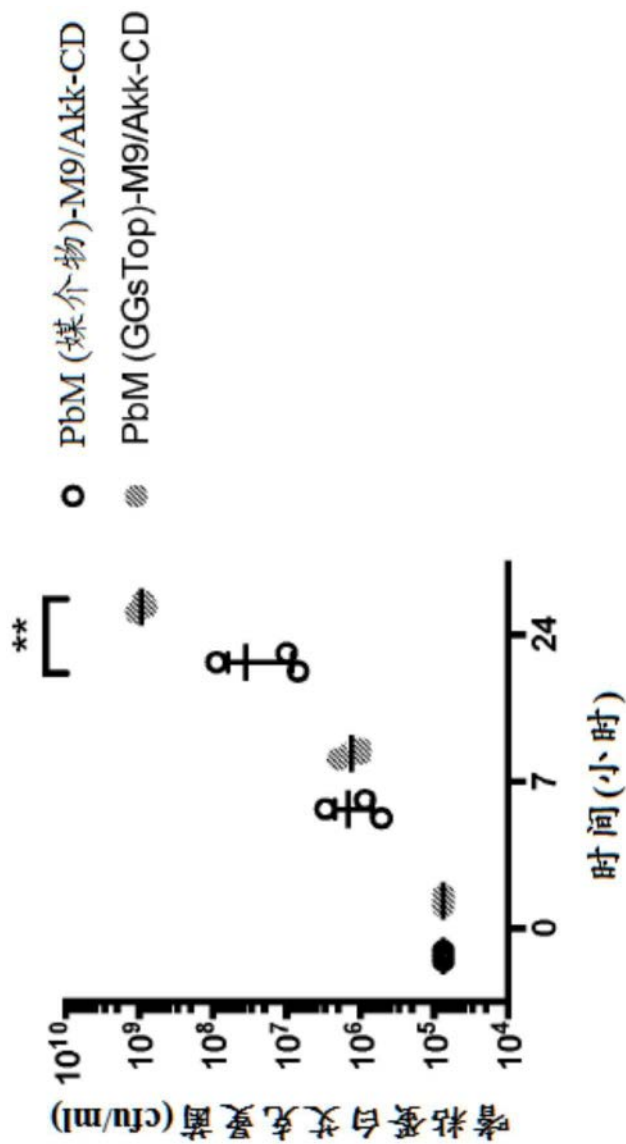


图11B