



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109641018 B

(45) 授权公告日 2022.07.26

(21) 申请号 201780035680.2

(73) 专利权人 4D制药有限公司

(22) 申请日 2017.07.13

地址 英国利兹

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 安尼克·伯纳利尔-唐纳德尔

申请公布号 CN 109641018 A

劳伦·克劳泽 克洛伊·哈布兹

(43) 申请公布日 2019.04.16

(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

(30) 优先权数据

专利代理人 王达佐 洪欣

1612190.7 2016.07.13 GB

(51) Int.CI.

1616016.0 2016.09.20 GB

A61K 35/74 (2015.01)

1616018.6 2016.09.20 GB

A61K 9/19 (2006.01)

1703552.8 2017.03.06 GB

A61P 1/12 (2006.01)

1703548.6 2017.03.06 GB

A61P 1/10 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 29/00 (2006.01)

2018.12.07

A61P 1/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/GB2017/052077 2017.07.13

WO 2016057671 A1, 2016.04.14

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 0207741 A1, 2002.01.31

W02018/011594 EN 2018.01.18

CN 102325464 A, 2012.01.18

(83) 生物保藏信息

US 2016235792 A1, 2016.08.18

DSM 10507 1996.01.26

US 2016184370 A1, 2016.06.30

DSM 14294 2001.05.10

US 2010247489 A1, 2010.09.30

NCIMB 42381 2015.03.12

WO 2012142605 A1, 2012.10.18

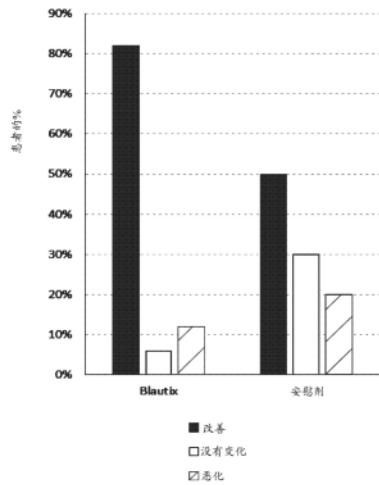
NCIMB 42486 2015.11.16

审查员 安玉萍

权利要求书1页 说明书21页

序列表5页 附图10页

(54) 发明名称



包含细菌菌株的组合物

(57) 摘要

本发明提供用于治疗或预防腹泻和/或便秘的包含一种或多种细菌菌株的组合物。

1. 以登录号DSM 10507保藏的氢营养布劳特氏菌(*Blautia hydrogenotrophica*)细菌菌株在制备用于治疗或预防对象的腹泻和/或便秘的药物中的用途。
2. 如权利要求1所述的用途,其中所述腹泻和/或便秘与肠易激综合症(IBS)和/或肠的炎性疾病相关联。
3. 如权利要求2所述的用途,其中所述炎性疾病是关于小肠、结肠或直肠的。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述腹泻和/或便秘与肠易激综合症(IBS)、克罗恩氏病或溃疡性结肠炎相关联。
5. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗或预防被诊断患有肠易激综合症(IBS)、克罗恩氏病或溃疡性结肠炎的对象的腹泻和/或便秘。
6. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗腹泻,其中所述对象患有腹泻而没有便秘。
7. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗便秘,其中所述对象患有便秘而没有腹泻。
8. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述对象另外患有腹部疼痛和/或气胀,和/或其中所述对象相对于健康对象在其呼吸中具有增加的氢水平。
9. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物还用于降低所述对象的呼吸中的氢水平。
10. 如权利要求1至3中任一项所述的用途,其中所述药物还用于在所述治疗或预防期间和/或之后监测所述对象的呼吸中的氢水平并且因此评定治疗或预防的可能有效性。
11. 以登录号DSM 10507保藏的氢营养布劳特氏菌(*Blautia hydrogenotrophica*)细菌菌株在制备用于在腹泻的治疗或预防中降低胃肠道中的肠杆菌(*Enterobacteriaceae*)水平的药物中的用途。
12. 如权利要求11所述的用途,其中所述腹泻与肠杆菌感染相关联。
13. 如权利要求11或权利要求12所述的用途,其中所述肠杆菌是大肠杆菌(*E.coli*)。
14. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述药物用于治疗或预防被诊断患有肠易激综合症(IBS)的对象的腹泻和/或便秘。
15. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述药物用于口服施用。
16. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,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剂。
17. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述细菌菌株是冻干的。
18. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述细菌菌株是有活力的。
19. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述药物包含所述氢营养布劳特氏菌细菌菌株作为单一菌株。
20. 如权利要求1至3、11和12中任一项所述的用途,其中所述药物包含所述氢营养布劳特氏菌细菌菌株作为微生物菌群的一部分。

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大于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(*Blautia*)属的菌株用于调控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来治疗广泛种类的腹部症状,但是未将任何细菌与任何疾病或症状联系在一起。

[0007] WO 2016/086206建议梭菌目中的细菌可用于治疗或预防各种病状,但是未将任何细菌与任何疾病或症状联系在一起。

[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物种,但是在WO' 605中没有关于所提出的细菌物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。

[0009] WO 02/07741建议使用来自梭菌纲的各种细菌来治疗胃肠病症,但是未将任何细

菌与任何疾病或症状联系在一起。WO 2016/086209 建议使用梭菌目中的大量可能的细菌来减少促炎细胞因子的分泌和/或增加抗炎细胞因子的分泌,但是没有关于所提出的细菌物种中的任一种如何可用于治疗所提出的疾病的任一种的教义。

发明内容

[0010] 本发明人已开发用于治疗和预防腹泻和/或便秘的新疗法。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和/或便秘。如在实施例中所述,口服施用包含氢营养布劳特氏菌 (*Blautia hydrogenotrophica*) 的组合物可减少患有肠易激综合症 (IBS) 的患者的腹泻和/或便秘。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,其用于治疗或预防腹泻和/或便秘的方法中的用途。

[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,其用于治疗或预防被诊断患有克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎或更优选地 IBS 的对象的腹泻和/或便秘的方法中的用途。在一些实施方案中,被诊断患有 IBS 的对象患有 IBS 连同腹泻和便秘两者。在一些实施方案中,被诊断患有 IBS 的对象患有 IBS 连同腹泻但没有便秘或仅具有少量便秘。在一些实施方案中,被诊断患有 IBS 的对象患有 IBS 连同便秘但没有腹泻或仅具有少量腹泻。

[0012] 在本发明的优选的实施方案中,组合物中的细菌菌株是氢营养布劳特氏菌。还可使用紧密相关的菌株,诸如具有与氢营养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% 同一的 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% 同一的 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 保藏的氢营养布劳特氏菌菌株。

[0013] 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% 同一的 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% 同一的 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。

[0014] 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% 同一的 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% 同一的 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。

[0015] 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治疗腹泻和/或便秘。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。

[0016] 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

载剂。

[0017] 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,并且显示在实施例中提供有效的组合物。

[0018] 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品。

[0019] 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。

[0020] 另外,本发明提供一种治疗或预防腹泻和/或便秘的方法,其包括施用包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。

[0021] 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(Enterobacteriaceae)感染诸如大肠杆菌感染相关联的疾病的方法中的用途。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中的用途。

[0022] 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、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中的用途。

[0023] 在特别优选的实施方案中,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腹泻的方法中的用途,或用于在腹泻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中的用途。

附图说明

[0024] 图1:I期临床试验的给药时间段(1-16天)期间患者症状的变化。

[0025] 图2:I期临床试验的清洗时间段期间患者症状的变化。

[0026] 图3:用Blautix处理的IBS患者(图3a)和用安慰剂处理的IBS患者(图3b)的第一天、第2天、第15天和第16天的氢呼吸测试Cmax结果。图3c是将具有在第15天和第16天的平均值与第一天和第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。

[0027] 图4a: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4b:将针对Blautix处理组的第一天和第15天的平均氢未校正呼吸测试结果进行比较的图;图4c:将针对Blautix处理组的第一天和第15天的平均氢校正呼吸测试结果进行比较的图。

[0028] 图5a: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5b:将针对安慰剂处理组的第一天和第15天的平均氢未校正呼吸测试结果进行比较的图;图5c:将针对安慰剂处理组的第一天和第15天的平均氢校正呼吸测试结果进行比较的图。

[0029] 图6:将针对Bautix处理组(Verum)和安慰剂组的第一天和第15天的平均氢呼吸测试结果进行比较的图(图6a:未校正氢;图6b:校正氢)。

具体实施方式

[0030] 细菌菌株

[0031] 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治疗或预防腹泻和/或便秘。优选的细菌菌株是氢营养 布劳特氏菌、粪便布劳特氏菌和韦氏布劳特氏菌物种。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*)。

[0032] 用于本发明的布劳特氏菌属菌株的实例包括氢营养布劳特氏菌、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. glucerasea*、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 物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]。布劳特氏菌可从人类肠道分离,虽然黏液真杆菌从败 血病样品分离。

[0033] 氢营养布劳特氏菌 (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。氢营养布劳特氏菌的菌株类型是S5a33=DSM 10507 =JCM 14656。氢营养 布劳特氏菌菌株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)。此示例性氢营养布劳特氏菌 菌株在[17]和[18]中描述。S5a33菌株和S5a36菌株对应于从健康对象 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,用于本发明的氢营养布劳特氏菌具有SEQ ID NO:5的16s rRNA序 列。

[0034] 以登录号DSM 10507并且还以登录号DSM 14294保藏的氢营养 布劳特氏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10日以登录号DSM 14294保藏为“S5a33”。寄托人是INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genès Champanelle, 法国。保藏物的所有权通过转让传给4D Pharma Plc公司。

[0035] 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[17]。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[17] 中描述。

[0036] 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。

[0037] 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 N0:4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“布劳特氏菌属/瘤胃球菌属MRx0008”并且指定保藏号为NCIMB 42486。

[0038] 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治疗或预防腹泻和/或便秘。在某些实施方案中,用于本发明的细菌菌株具有与氢营养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%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID N0:5至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

[0039] 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 N0:1或SEQ ID N0:3至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID N0:3。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID N0:3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%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明的细菌菌株具有与SEQ ID N0:2或SEQ ID N0:4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是针对SEQ ID N0:4。优选地,用于本发明的细菌菌株具有由SEQ ID N0:4表示的16s rRNA序列。

[0040] 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治疗或预防腹泻和/或便秘。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。

[0041] 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保藏的氢营养布劳特氏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 N0:5至少99%同一(例如,至少99.5%或至少99.9%同一)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保藏的氢营养布劳特氏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 N0:5的16S rRNA序列。

[0042] 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氢营养布劳特氏 菌、粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌菌株。

[0043] 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。

[0044] 可用于本发明的组合物和方法的其他布劳特氏菌菌株(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 当的对于腹泻和/或便秘的作用,这可通过使用在实施例中所述的培 养和施用方案来识别。

[0045] 本发明的特别优选的菌株是以登录号DSM 10507/14294保藏的 氢营养布劳特氏菌菌株。这是在实施例中测试的示例性BH菌株并且 显示对于治疗疾病是有效的。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 的氢营养布劳特氏菌菌株的分离细胞或其衍生物。

[0046] 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 当的对于腹泻和/或便秘的作 用,这可通过使用在实施例中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。

[0047] 对以登录号DSM 10507/14294保藏的氢营养布劳特氏菌菌株的 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 safety and therapeutic efficacy features 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 safety and therapeutic efficacy features 的任何

细胞，并且本发明涵盖此类细胞。

[0048] 在优选的实施方案中，本发明的组合物中的细菌菌株是有活力的 并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0049] 治疗性用途

[0050] 在优选的实施方案中，本发明的组合物用于治疗腹泻和/或便秘 中的用途。在一些实施方案中，所述组合物用于治疗患有腹泻和便秘 两者的患者中的用途。在一些实施方案中，所述组合物用于治疗患有 腹泻而没有便秘的患者中的用途。在一些实施方案中，所述组合物用 于治疗患有便秘而没有腹泻的患者中的用途。虽然患者经常表现出腹 泻或便 秘，但是单个患者可在不同的时间处表现出两种病状。患有IBS 和/或肠的炎性疾病 的患者 经常表现出腹泻和/或便秘。因此，本发明 提供用于治疗被诊断患有或怀疑患有IBS或肠的 炎性疾病 的患者的 本发明的组合物。例如，IBS患者可经历交替循环的腹泻和便秘，或 者 IBS患者可表征为具有腹泻的IBS患者或具有便秘的IBS患者。在 一些实施方案中，本发明的组合物可用于治疗患有IBS的患者、患有 IBS连同腹泻的患者或患有IBS连同便秘的患者。例如，在一些实施 方案中，被诊断患有IBS的对象患有IBS连同腹泻和便秘两者。在一些实施方案中，被诊断患有IBS的对象患有IBS连同腹泻但没有便秘 或仅具有少量便秘。在一些实施方案中，被诊断患有IBS的对象患有 IBS连同便秘但没有腹泻或仅具有少量腹泻。在一些实施方案中，炎 性疾病是关于小肠、结肠或直肠的。腹泻是克罗恩氏病和溃疡性结 肠 炎的症状。因此，本发明的组合物可用于治疗患有克罗恩氏病或溃疡 性结肠炎的患者。

[0051] 如在实施例中所证明，本发明的细菌组合物可有效于减少腹泻和 /或便秘。

[0052] 在优选的实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防与克罗恩 氏病、溃疡性结 肠炎或更优选地IBS相关联的腹泻和/或便秘中的用 途。在优选的实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防被诊断患 有克罗恩氏病、溃疡性结肠炎或更优选地IBS的对象的腹泻 和/或便 秘中的用途。在优选的实施方案中，本发明的组合物用于在克罗恩氏 病、溃疡性结 肠炎或更优选地IBS的治疗中治疗或预防腹泻和/或便 秘中的用途。在一些实施方案中，除腹泻和/或便秘之外，所述患者 患有腹部疼痛和/或气胀。在此类实施方案中，所述患者 可患有这些 病状中的两种、三种或全部四种的组合。例如，所述患者可患有腹泻、便秘、腹 部疼痛和气胀；腹泻、便秘和腹部疼痛；腹泻、便秘和气胀； 腹泻、腹部疼痛和/或气胀而没 有便秘；便秘、腹部疼痛和/或气胀而 没有腹泻。

[0053] 在某些实施方案中，所述组合物可呈细菌培养物的形式。在一些 实施方案中，所述组合物可优选地是冻干物。

[0054] 在一些实施方案中，本发明的组合物用于治疗相对于健康对象在 其呼吸中具有增加的氢水平的对象的腹泻和/或便秘中的用途。在一 些实施方案中，本发明的组合物用于降低患有腹泻和/或便秘的对象 的呼吸中的氢水平中的用途。所述对象优选地是被诊断为患有IBS和 /或肠的炎性疾病 的对象。在一些实施方案中，炎性疾病是关于小肠、结肠或 直肠的。在一些实施方案中，所述对象被诊断患有克罗恩氏病、溃疡性结肠炎或更优选地 IBS，例如本文所述的IBS类型中的一种。不受理论约束，推测增加的氢水平由肠中的炎症 所基于的机制产生。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。

[0055] 氢呼吸测试也是用于监测使用本发明的组合物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,在通过本发明的组合物治疗或预防之后在对象的呼吸中检测到的氢水平的降低可指示所述治疗具有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或预防期间和/或之后监测对象的呼吸中的氢水平,并且因此评定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(组合物施用给对象期间)对象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,可能希望在第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的降低指示治疗或预防是有效的或可能是有效的。在一些实施方案中,对象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。

[0056] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于预防正在接受或已接受或即将接受(例如,同一天稍后时间、第二天或在2、3、4、5、6、7、10、14或21天内)抗生素治疗或正在患有或已患有细菌胃肠炎的对象的腹泻和/或便秘中的用途。抗生素治疗和细菌胃肠炎与在腹泻和/或便秘之前发生并且可通过本发明的组合物预防的肠道微生物群变化相关联。本发明的组合物可与抗生素治疗同时、单独或顺序地施用。例如,本发明的组合物可与抗生素治疗同时施用。

[0057] 在优选的实施方案中,用本发明的组合物进行的治疗使得腹泻和/或便秘减少。

[0058] 腹泻和/或便秘的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。

[0059] 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的疾病中的用途。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中的用途。在此类实施方案中,肠杆菌可以是致病菌株。

[0060] 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的疾病中的用途。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中的用途。在此类实施方案中,肠杆菌可以是共生或非致病菌株。

[0061] 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、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中的用途。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。

[0062] 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中的用途。

[0063] 施用模式

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 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，suphocire、witepsol)、甘油-明胶、聚乙二醇或皂甘油组合物的形式施用。

[0067] 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。

[0068] 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。实施例证明施用在腹泻和/或便秘的治疗中提供成功的定居和临床益处。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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，以便预防腹泻和/或便秘在她的子宫内和/或出生之后的孩子身上发生。

[0073] 本发明的组合物可施用给已诊断有腹泻和/或便秘或与腹泻和/或便秘相关联的疾病或病状或者已鉴定为具有患腹泻和/或便秘的风险的患者。所述组合物还可作为预防性措施施用以防止腹泻和/或便秘在健康患者中发生。

[0074] 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并且具体地是氢营养布劳特氏菌、粪便布劳特氏菌或韦氏布劳特氏菌进行的定居。

[0075] 本发明的组合物可作为食品诸如营养补充剂施用。

[0076] 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。

[0077] 在一些实施方案中,施用组合物的对象是人类成人。在一些实施方案中,施用组合物的对象是人类婴儿。

[0078] 组合物

[0079] 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。

[0080] 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]。冻干物组合物可以是特别有效的。在优选的实施方案中,本发明的组合物包含冻干细菌并且用于与IBS相关联的腹泻和/或便秘的治疗。

[0081] 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。

[0082] 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有活力的。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有活力的并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0083] 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。

[0084] 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在多孔基质内、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]。

[0085] 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。

[0086] 所述组合物可配制为益生菌。

[0087] 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可以产生对患者的肠的递送和/或对象的肠的部分或完全定居。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或载剂。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剂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。合适的载剂的实例包括乳糖、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。药物载剂、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剂、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。合适的载剂的另一个实例是蔗糖。防腐剂的另一个实例是半胱氨酸。

[0094] 本发明的组合物可配制为食品。例如, 食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。

[0095] 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。

[0096] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含单一细菌菌株或物种并 且不含任何其他细菌菌株或物种。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物种。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。

[0097] 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,例如氢营养布劳特氏菌,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的单一物种,例如氢 营养布劳特氏菌,并且不含有任何其他细菌物种,或者其仅包含微少 的或生物非相关的量的来自另一种物种的细菌。在某些实施方案中, 本发明的组合物包含布劳特氏菌的单一菌株,例如氢营养布劳特氏菌 的单一菌株,并且不含有任何其他细菌菌株物种,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物种的细菌。

[0098] 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物 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 一物种内的菌株(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物 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 同一物种内的菌株(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 物种的细菌。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种来自同一物种内的菌株,并且任选地不含来自任何其他 物种的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含多于一种来自同 一属内的物种(例如,多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、 17、20、23、25、30、35或40种物种),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 物种(例如,少于50、45、40、35、30、25、20、15、 12、10、8、7、6、5、4或3种物种),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 来自同一属内的物种,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。

[0099] 在一些实施方案中,所述组合物包含微生物菌群。例如,在一些 实施方案中,所述组合物包含布劳特氏菌细菌菌株作为微生物菌群的 一部分。例如,在一些实施方案中,布劳特氏菌细菌菌株与一种或多 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氢营养布 劳特氏菌的细菌菌株。在一些实施 方案中,微生物菌群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,微生物菌群在自然界中发 现不 在一起。例如,在一些实施方案中,微生物菌群包含从至少两个 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

人类。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。

[0100] 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 保藏的氢营养布劳特氏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 保藏的氢营养布劳特氏菌菌株或者其不是氢营养布劳特氏菌或者其不是布劳特氏菌的细菌菌株。

[0101] 在本发明的组合物包含多于一种细菌菌株、种或属的一些实施方案中，各个细菌菌株、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、种或属中的全部，或者所述细菌菌株、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、种或属单独保存但是在使用之前混合在一起。

[0102] 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。

[0103] 在一些实施方案中，所述一种或多种布劳特氏菌细菌菌株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。

[0104] 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。

[0105] 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有活力的。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有活力的并且能够部分地或完全地在肠定居。

[0106] 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。

[0107] 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。

[0108] 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下量存在：当施用给有需要的对象时，足以治疗病症；并且其中所述病症是腹泻和/或便秘，诸如与克罗恩氏病、溃疡性结肠炎或更优选地IBS相关联的腹泻和/或便秘。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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剂: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。

[0113] 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。

[0114] 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、黄蓍胶、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。

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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°C或约25°C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。

[0120] 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。

[0121] 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”)。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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®)。

[0127] 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。

[0128] 培养方法

[0129] 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。

[0130] 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)：酪胨(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、NaHCO₃(0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、K₂HPO₄(0.045g)、KH₂PO₄(0.045g)、NaCl(0.09g)、(NH₄)₂SO₄(0.09g)、MgSO₄·7H₂O(0.009g)、CaCl₂(0.009g)、刃天青(0.1mg)、氯化血红素(1mg)、生物素(1μg)、钴胺素(1μg)、对氨基苯甲酸(3μg)、叶酸(5μg)以及吡哆胺(15μg)。

[0131] 总则

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 与数值x相关的术语“约”是任选的并且是平均值，例如x±10%。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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)。

[0139] 用于实施本发明的模式

[0140] 实施例1-I期临床试验期间患者症状的变化

[0141] 实施I期临床试验，其中将氢营养布劳特氏菌 (“Blautix”，以登录 号DSM 10507并且还以登录号DSM 14294保藏的菌株) 施用给患有肠 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，其中两种是腹泻和便秘。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1和2中示出。

[0142] 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1)。症状(其 中两种是腹泻和便秘)的改善支持 Blautix用于治疗或预防腹泻和/或 便秘的用途。

[0143] 接受安慰剂的患者中的50%报告症状的改善(图1)。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/5ab6fcceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fcceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml>)。

[0144] 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2)。因此，在Blautix给药停止之后症状(其中两 种是腹泻 和便秘)的恶化也支持Blautix在治疗或预防腹泻和/或便秘中的用途。

[0145] 实施例2-氢呼吸测试结果

[0146] 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。对人类对象施用乳果糖，并且在四个时间点处对 氢(H₂) 水平(Cmax) 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。

[0147] 从分析中排除一些点。关于对象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 CMAX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)。对象3.12 (Blautix) 、 3.24(Blautix)、4.07(Blautix) 作为非响应者被排除。对象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)。对象4.09(安 慰剂) 由于异常值而被排 除。

[0148] 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3a和图3c)。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 3b和图3c)。这些百分比与在Blautix处理或安慰剂施用之后表现出症状改善的患 者的百

分比相似。

[0149] 图4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Cmax 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5)。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6)。

[0150] 实施例3-稳定性测试

[0151] 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℃或4℃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。

[0152] 序列

[0153] 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 tgcaagtgcg gcgaaaggcgt tacgacagaa cttcgaaaa aagatgtaa ggactgagcg
61 gcggacgggt gagtaacgcg tggtaacct gcctcataca ggggataac agttggaaac
121 ggctgctaat accgcataag cgacggtat cgcatgatac agtgtaaaa actccgtgg
181 tatgagatgg acccgctct gattagctt ttggagggt aacggccac caaggcgcac
241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggg ctgagacacg gcccagactc
301 ctacggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggg aaccctgatg cagcgcac
361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtt acttctatca gcagggaga aaatgacgg
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gttaggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgttagac ggaagagcaa gtctgtatgt
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaaactgt ttttctttag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtaaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
[0154] 661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcgaa aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagataacc ctggtagtcc acgccccaaa ccatgaaatac taggtgttgg ggagcaaaac
781 tcttcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgggtgg gcatgtggtt taattcgaag
901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggAACCTTT
961 ctttcggac agagaagaca ggtgtgtcat ggtgtgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
1021 gggtaagtc ccgcaacgg cgcaacccct atcctagta gccagcaggta gaagctggc
1081 actctgttgg aactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgcacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttggctt cacacgtgt acaatggcgt aaacaaagg aagcggcccc
1201 gcgagggggg gcaaattcca aaaataacgt cccagttcgg actgcgtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaaatcgct agtaatcgac aatcagaatg tcgcgtgaa tacgttcccg
1321 ggtttgtac acaccgcgg tcacaccatg ggagttagt acgccccgg tc

```

[0155] 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)

- [0156] 1 caagtcgaac gggatttttatttgcgtat ttaattttat tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctca gtgaaaaact ccggtgttat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagttgtt gttgggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc
 241 catagccgc ctgagagggt gaacggccac attggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtggaa tattgcacaa tggggaaac cctgtatgcag cgacgcgcg
 361 tgaaggaaga agtatctcg tatgtaaact tctatcagca gggagatag tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagcccg gtaatacgta gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag ctagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggagggt
 601 agcggattc ctagttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcggtt ggcaaaagcca
 781 ttcgggtccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgaccaa gcggtgagc atgtggttt attcgaagca
 901 acgcaagaa ctttaccaag tcttgcacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatcttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tggtgcattt ttgtcgatcg ctcgtgtcgat gagatgtgg
 1021 gttaaatccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcattaa ggtggcact
 1081 ctggggagac tgccaggat aacctggagg aaggcgggg tgacgtaaa tcattatgcc
 1141 ctttatgatt tggctacac acgtctaca atggctaaa caaaggaaag cgagattgt
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcgact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgccgt cagaatgccc cggtgaatac gttccgggt
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgaccta
 1381 tgcaagaag gagctgccg aggccggacc gatgacttgg gtgaagtcgt aacaaggt
- [0157] SEQ ID NO:3 (粪便布劳特氏菌菌株830的共有16S rRNA序列)
 TTTKGTCGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGTGCTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGTTACGACAGAACCTT
 CGGGGGAAAGATGTAAGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGTAAACCTGCCCATACAGGGGATAACA
 GTTGGAAACGGCTGCTAAACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACTGTAAGGAAACTCCGGTGGTATGAGAT
 GGACCCCGCTGATTAGCTAGTTGGAGGGTAACGGCCACCAAGGCAGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
 ACGGCCACATTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCAATGGGGAAA
 CCTCTGATGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACCTCTATCAGCAGGGAAAGAAAATGACGG
 TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
 ACTGGGTGTAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGCTAACCCAGGACTGCATTGG
 AACTGTTTCTTGAGTGCAGGAGGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
 CACCAGTGGCGAAGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGAGCAAAGCTCTCGGTGCCGAGCAAACGCAA
 TAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGTGGAG
 CATGTGGTTTATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTGACATCGATCTGACCGGTTCGTAATGGAACCTT
 TCCTTCGGGACAGAGAACAGGTGGTCATGGTGTGTCAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTATCGCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGACTCTGAGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
 AAGGCGGGAGCGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
 AAGCGAGCCCCCGAGGGGGAGCAAATCCAAAAAAACGTCCCAGTTCGAGCTGCACTGCAACTCGACTGCACGA
 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCAC
 ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGCGGGATTGATAACTG
 GGGTGAAGTCAGGGGGT
- [0158] SEQ ID NO:4 (韦氏布劳特氏菌菌株MRX008的共有16S rRNA 序列)

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGCGGGTAAACCTGCCTTAT
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAAACTC
 CGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTGGATTAGCTTGTGGTGGGTAAACGGCCCACCAAGGCAGCATCCATAGCCG
 GCCTGAGAGGGTGAACGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG
 CACAATGGGGAAACCCCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAACTTCTATCAGCAGG
 GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAACGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGTAATACGTAGGGGCAAG
 CGTTATCCGGATTTACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGCTAACCT
 GTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGGCGAGGGTAAGCGGAATTCTCTAGTGTAGGGTGAATGCGTA
 GATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGC
 AAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGAGCATGGCTTTCGGTG
 CCGTCGAAACCGCAGTAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCC
 GCACAAGCGGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGAAGAACCTTACCAAGTCTGACATCCGCTGACCGA
 TCCTTAACCGGATCTTCCTTCGGACAGGCAGACAGGTGGTCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGCACTCTGGGAGACTGCCA
 GGGATAACCTGGAGGAAGGCAGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAAT
 GCGTAAACAAAGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCAAAATAACGTCCCAGTTCGACTGTAGTCTGC
 AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCGGTCTTGT
 CACACCGCCCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAATGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

[0161] SEQ ID NO:5(氢营养布劳特氏菌菌株S5a36 16S核糖体RNA基因,部分序列-X95624.1)

```

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
61 ttccggttga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tggtaacct
121 gcccataca ggggataac agttagaaat gactgctaatt accgcataag cgcacagctt
181 cgcatgaagc ggtgtaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttg gattagctag
241 ttggtaggat aacggccac caaggcgcacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca
361 caatggggga aaccctgatg cagcgcacg gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa
421 acttctatca gcagggaaaga aagtgcggat acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
481 gccagcagcc gcggtaatac gtaagggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt agcgggtaaaa
661 tgcgtagata ttaggagggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcggtgc cgcacaaac gcaataagta
841 ttcccacctg gggagtagt tcgcaagaat gaaactaaa ggaattgacg gggacccgca
901 caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gAACCTTACCAaatcttgc
961 atccctctga ccgggaagta atgtccctt ttcttgcggaa cagaggagac aggtggtgca
1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga ggcacaccct
1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgcccttat gatttggct acacacgtgc
1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatttc aaaaataacg
1261 tctcagttcg gattgttagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
1321 gaatcagaat gtcgcggta atacgtccc gggcttgta cacaccgccc gtcacaccat
1381 gggagtcagt aacgcccggaa gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaaggtgg
1441 gactgataac tgggggtga

```

[0163] 参考文献

[0164] [1]Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol.9(4):279-90.

- [0165] [2]Eckburg et al. (2005) *Science*.10;308 (5728) :1635-8.
- [0166] [3]Tap et al. (2009) *Environ Microbiol*,11 (10) :2574-84
- [0167] [4]Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect*.3 (12) :1021-35
- [0168] [5]Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci*.59 (12) :2088-96.
- [0169] [6]Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122 (1) :107-18.
- [0170] [7]Frank et al. (2007) *PNAS* 104 (34) :13780-5.
- [0171] [8]Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol*.44 (11) :3980-8.
- [0172] [9]Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis*.16 (12) :2034-42.
- [0173] [10]Machiels et al. (2013) *Gut*.63 (8) :1275-83.
- [0174] [11]Lopetuso et al. (2013) *Gut Pathogens*.5:23
- [0175] [12]WO 2013/050792
- [0176] [13]WO 03/046580
- [0177] [14]WO 2013/008039
- [0178] [15]WO 2014/167338
- [0179] [16]Lee and Lee (2014) *World J Gastroenterol*.20 (27) :8886-8897.
- [0180] [17]Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58,1896-1902.
- [0181] [18]Bernalier et al. (1996) *Arch.Microbiol*.166 (3) .176-183.
- [0182] [19]Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol*.62 (Pt 4) :776-9.
- [0183] [20]Masco et al. (2003) *Systematic and Applie Microbiology*,26:557-563.
- [0184] [21]Srùtková et al. (2011) *J Microbiol.Methods*,87 (1) :10-6.
- [0185] [22]Darfeuille-Michaud et al. (2004) *Gastroenterology* 127 (2) :412-21.
- [0186] [23]Strus et al. (20015) *Cent Eur J Immunol* 40 (4) :420-30.
- [0187] [24]Petersen et al. (2015) *Scand J Gastroenterol*.;50 (10) :1199-207.
- [0188] [25]Miy amoto-Shinohara et al. (2008) *J.Gen.,Appl Microbiol.*,54,9-24.
- [0189] [26]Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [0190] [27]Leslie et al. (1995) *Appl.Environ.Microbiol*.61,3592-3597.
- [0191] [28]Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.
- [0192] [29]Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol*.3 (2) :39-48.
- [0193] [30]Handbook of Pharmaceutical Excipients,2nd Edition, (1994) ,Edited by A Wade and PJ Weller
- [0194] [31]Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985)
- [0195] [32]US2016/0067188
- [0196] [33]Handbook of Microbiological Media,Fourth Edition (2010) Ronald Atlas,CRC Press.
- [0197] [34]Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C.Hunter-Cevera,Academic Press
- [0198] [35]Strobel (2009) *Methods Mol Biol*.581:247-61.

- [0199] [36]Gennaro (2000) Remington:The Science and Practice of Pharmacy.20th edition,ISBN:0683306472.
- [0200] [37]Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course , (Ream et al.,eds.,1998,Academic Press) .
- [0201] [38]Methods In Enzymology (S.Colowick and N.Kaplan,eds.,Academic Press,Inc.)
- [0202] [39]Handbook of Experimental Immunology,Vols.I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell,eds,1986,Blackwell Scientific Publications)
- [0203] [40]Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) .
- [0204] [41]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi,K.S.ed.,CRC Press,1997)
- [0205] [42]Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology,5th edition (Current Protocols) .
- [0206] [43]PCR(Introduction to Biotechniques Series) ,2nd ed. (Newton&Graham eds.,1997,Springer Verlag)
- [0207] [44]Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel et al.,eds., 1987) Supplement 30
- [0208] [45]Smith&Waterman (1981) Adv.Appl.Math.2:482-489.

- [0001] 序列表
[0002] <110> 4D制药有限公司 (4D PHARMA PLC)
[0003] <120> 包含细菌菌株的组合物
[0004] <130> P068687WO
[0005] <141> 2017-03-06
[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] tgcaagtgcga gcgaaggcgct tacgacagaa cttcgggg aagatgttaag ggactgaggcg 60
[0024] gggacgggt gagtaacgcg tggtaacct gcctcataca ggggataac agttggaaac 120
[0025] ggctgctaatt accgcataag cgacggtat cgcatgatac agtgtgaaaa actccggtgg 180
[0026] tatgagatgg acccgctct gattagcttag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg 240
[0027] atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc 300
[0028] ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggaa aaccctgtg cagcgacgcc 360
[0029] gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaaaga aaatgacgg 420
[0030] acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca 480
[0031] agcgttatcc ggatttactg ggttaaagg gacgttagac ggaagagcaa gtctgatgt 540
[0032] aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag 600
[0033] gtaagcggaa ttccctgtgt agcggtgaaa tcgctgatata tttaggaggaa caccagtggc 660
[0034] gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aacgtgggg agcaaacagg 720
[0035] attagatacc ctggtagtcc acggcgtaaa cgtatgaatac taggtgttgg ggagcaaaagc 780
[0036] tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtagctt cgcaagaatg 840
[0037] aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aacgtggtaa gcatgtggtt taattcgaag 900
[0038] caacgcgaag aaccttacca agtctgaca tcgatctgac cggtcgtaa tggAACCTT 960
[0039] cttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcggtc gtgagatgtt 1020
[0040] gggttaagtc ccgcaacgag cgcaacccct atcctcagta gccagcaggt gaagctggc 1080
[0041] actctgtgga gactgccagg gataaacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat 1140

- [0042] gcccctttagt atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc 1200
 [0043] gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct gcaactcgac 1260
 [0044] tgcacgaagc tggaaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtaaa tacgttcccc 1320
 [0045] ggtcttgtac acaccgcccc tcacaccatg ggagtcatg acgcccgaag tc 1372
 [0046] <210> 2
 [0047] <211> 1438
 [0048] <212> DNA
 [0049] <213> 韦氏布劳特氏菌 (Blautia wexlerae)
 [0050] <220>
 [0051] <221> modified_base
 [0052] <222> 19
 [0053] <223> ‘n’ 是a、c、g或t
 [0054] <400> 2
 [0055] caagtcgaac gggaaattttt ttattgaaac ttccggcgat ttaatttaat tcttagtggcg 60
 [0056] gacgggttag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataaacagt cagaaatggc 120
 [0057] tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat 180
 [0058] aagatggacc cgcggtggat tagcttggtaac ggccacccaa ggacgacgatc 240
 [0059] catagccggc ctgagagggtaac ggccacccaa ggacgacgatc 300
 [0060] cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccg 360
 [0061] tgaaggaaga agtatctcggt tatgtaaact tctatcagca gggaaagatag tgacggtacc 420
 [0062] tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccg 480
 [0063] gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgttagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa 540
 [0064] ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat actttagtgc cggaggggta 600
 [0065] agcggattc ctagtgtac ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa 660
 [0066] ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 720
 [0067] agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcggt ggcaaaagcca 780
 [0068] ttccggccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa 840
 [0069] actcaaagga attgacgggg acccgacaa gcgggtggagc atgtggttt attcgaagca 900
 [0070] acgcgaagaa ctttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatcttcc 960
 [0071] ttccggacag gcgagacagg tggtgcatgg ttgtcgtag ctcgtgtcgt gagatgttgg 1020
 [0072] gttaaatccc gcaacgagcg caacccctat cctcagtagc cagcattaa ggtggcact 1080
 [0073] ctggggagac tgccaggat aacctggagg aaggcgggtaa tgacgtcaaa tcatcatgcc 1140
 [0074] ctttatgatt tggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaaggaaag cgagattgtg 1200
 [0075] agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac 1260
 [0076] acgaagctgg aatcgcttagt aatcgccgat cagaatgccg cggtgaatac gttcccggt 1320
 [0077] ctgtacaca ccgcgggtca caccatggtaac gtcagtaac cccgaagtca gtgaccta 1380
 [0078] tgcaaaagaag gagctggcga aggccggacc gatgactggg gtgaagtctgtaa 1438
 [0079] <210> 3
 [0080] <211> 1481
 [0081] <212> DNA
 [0082] <213> 粪便布劳特氏菌 (Blautia stercoris)
 [0083] <220>

- [0084] <221> modified_base
 [0085] <222> 4
 [0086] <223> ‘k’ 是g或t
 [0087] <400> 3
 [0088] ttktgtctgg ctcaggatga acgctggcgg cgtgcttaac acatgcaagt cgagcgaagc 60
 [0089] gcttacgaca gaaccttcgg gggaaagatgt aaggactgaa gcggcggacg ggttagtaac 120
 [0090] gcgtggtaa cctgcctcat acaggggat aacagttgaa aacggctgct aataccgcat 180
 [0091] aagcgacag tatcgcatga tacagtgtaa aaaactccgg tggatgaga tggaccgcg 240
 [0092] tctgattagc tagttggagg ggttaacggcc caccaaggcg acgatcagta gccggcctga 300
 [0093] gagggtaac ggccacattt ggactgagac acggcccaga ctcctacggg aggcagcagt 360
 [0094] gggaaatatt gcacaatggg ggaaaccctg atgcagcgac gccgcgtgaa ggaagaagta 420
 [0095] tctcggtatg taaaacttcta tcagcaggta agaaaatgac ggtacctgac taagaagccc 480
 [0096] cggttaacta cgtgccagca gcccggtaa tacgttaggg gcaagcgtta tccggattta 540
 [0097] ctgggtgtaa agggagcgta gacggaagag caagtctgat gtgaaaggct ggggcttaac 600
 [0098] cccaggactg cattggaaac tgttttctt gagtgccgga gaggttaagcg gaattcctag 660
 [0099] tgttagcggtg aaatgcgtat atattaggag gaacaccagt ggcgaaggcg gcttactgga 720
 [0100] cggttaacta cgttgaggct cgaaagcgtg gggagcaaac aggattagat accctggtag 780
 [0101] tccacgcgt aaacgatgaa tactaggtgt tggggagcaa agctttcgg tgccgcagca 840
 [0102] aacgcaataa gtattccacc tggggagtagtac gttcgcaaga atgaaactca aaggaattga 900
 [0103] cggggaccccg cacaagcggt ggagcatgtt gtttattcga agcaacgcga agaaccttac 960
 [0104] caagtcttga catcgatctg accggttcgtt aatggAACCT ttccttcggg acagagaaga 1020
 [0105] caggtgggtc atggttgtcg tcagctcgat tcgttagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080
 [0106] agcgcaaccc ctatcgtagt tagccagcag gtaaagctgg gcactctgag gagactgcc 1140
 [0107] ggataaccc ggaggaaggc ggggacgacg tcaaatacatc atgcccctta tgatttggc 1200
 [0108] tacacacgtg ctacaatggc gtaaacaag ggaagcggc ccgcggggg gagcaaatcc 1260
 [0109] caaaaataac gtcccagttc ggactgcgtt ctgcaactcg actgcacgaa gctggaatcg 1320
 [0110] cttagtaatcg cgaatcagaa tgtcggtgtt aatacgttcc cgggtcttgtt acacaccgcc 1380
 [0111] cgtcacacca tgggagtcag taacgcccga agtcaatgac ccaaccttag ggagggagct 1440
 [0112] gccgaaggcg ggattgataa ctgggtgaa gtctaggggg t 1481
 [0113] <210> 4
 [0114] <211> 1384
 [0115] <212> DNA
 [0116] <213> 韦氏布劳特氏菌 (Blautia wexlerae)
 [0117] <220>
 [0118] <221> modified_base
 [0119] <222> 749
 [0120] <223> ‘n’ 是a、c、g或t
 [0121] <400> 4
 [0122] ttcatggata cttcggtgaa tttagattct atttctatgt gcggacgggt gagtaacgcg 60
 [0123] tgggttaacctt gccttataaca gggggataac agtcagaaat ggctgctaat accgcataag 120
 [0124] cgcacagagc tgcattggctc agtgtgaaaa actccgggtgg tataagatgg acccgcggtt 180
 [0125] gattagtttgc ttgggtgggtt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag 240

[0126] ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc ctacggagg cagcagtggg 300
 [0127] gaatattgca caatggggaa aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct 360
 [0128] cggtatgtaa acttctatca gcagggaaaga tagtgacggt acctgactaa gaagccccgg 420
 [0129] ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gttaggggca agcgttatcc ggatttactg 480
 [0130] ggtgtaaagg gagcgttagac ggtgtggcaa gtctgatgt aaaggcatgg gctcaacctg 540
 [0131] tggactgcat tggaaactgt catacttgag tgccggaggg gtaagcggaa ttccctagtgt 600
 [0132] agcggtaaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggct tactggacgg 660
 [0133] taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc 720
 [0134] acgccgtaaa cgatgaatac taggtgtcng gggagcatgg ctcttcggtg ccgtcgcaaa 780
 [0135] cgccagtaagt attccacactg gggagttacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg 840
 [0136] gggacccgca caagcggtgg agcatgtggg ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc 900
 [0137] aagtcttgac atccgcctga ccgatcctta accggatatt tccttcggga caggcgagac 960
 [0138] aggtggtgca tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga 1020
 [0139] ggcacaacccc tatcctcagt agccagcatt taaggtggc actctggga gactgccagg 1080
 [0140] gataacctgg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg atttggccta 1140
 [0141] cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagatc gtgagatgga gcaaattccca 1200
 [0142] aaaataacgt cccagttcgg actgttgtct gcaacccgac tacacgaagc tggaaatcgct 1260
 [0143] agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtaaa tacgttcccg ggtcttgtac acaccgcccc 1320
 [0144] tcacaccatg ggagtcaagta acgcccgaag tcagtgacact aactgcaaag aaggagctgc 1380
 [0145] cgaa 1384
 [0146] <210> 5
 [0147] <211> 1458
 [0148] <212> DNA
 [0149] <213> 氢营养布劳特氏菌 (*Blautia hydrogenotrophica*)
 [0150] <220>
 [0151] <221> modified_base
 [0152] <222> 1416
 [0153] <223> ‘n’ 是a、c、g或t
 [0154] <400> 5
 [0155] gatgaacgct ggccgcgtgc ttaacacatg caagtgcgaac gaagcgatag agaacggaga 60
 [0156] ttcgggtga agtttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggttaacct 120
 [0157] gccctataca gggggataaac agtttagaaat gactgctaatt accgcataag cgcacagctt 180
 [0158] cgcattgaagc ggtgtaaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttgc gattagctag 240
 [0159] ttgggtgaggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc 300
 [0160] cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacggagg cagcagtggg gaatattgca 360
 [0161] caatggggaa aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa 420
 [0162] acttctatca gcagggaaaga aagtgcgtgt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt 480
 [0163] gccagcagcc gcggtaatac gtaagggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg 540
 [0164] gagcgttagac ggtttggcaa gtctgatgt aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat 600
 [0165] tgaaaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttccctagtgt agcggtaaaa 660
 [0166] tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt 720
 [0167] tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa 780

[0168] cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagg cattcggtgc cgccagcaaac gcaataagta 840
[0169] ttccccacactg gggagtagct tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgc 900
[0170] caagcggtgg agcatgtgg ttaattcgaa gcaacgcgaa gaacaccttacc aaatcttgac 960
[0171] atcccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca 1020
[0172] tggttgcgt cagctcggt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcacccct 1080
[0173] tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg 1140
[0174] gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gattgggct acacacgtgc 1200
[0175] tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg 1260
[0176] tctcagttcg gattgttagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320
[0177] gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggcttgta cacaccgccc gtcacaccat 1380
[0178] gggagtcagt aacgcccggaa gtcagtgacc caaccnnaag gagggagctg ccgaaggtgg 1440
[0179] gactgataac tgggtgta 1458

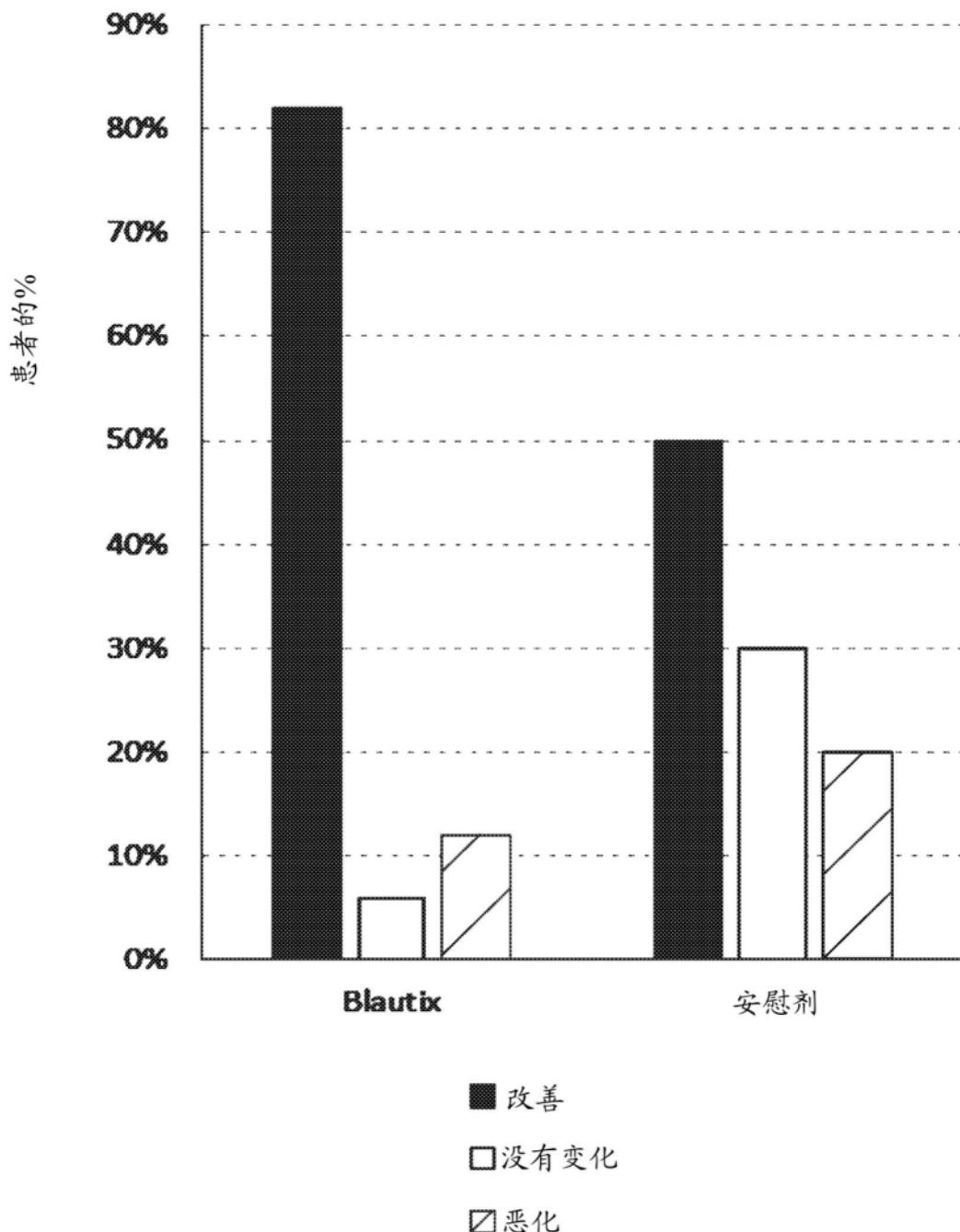


图1

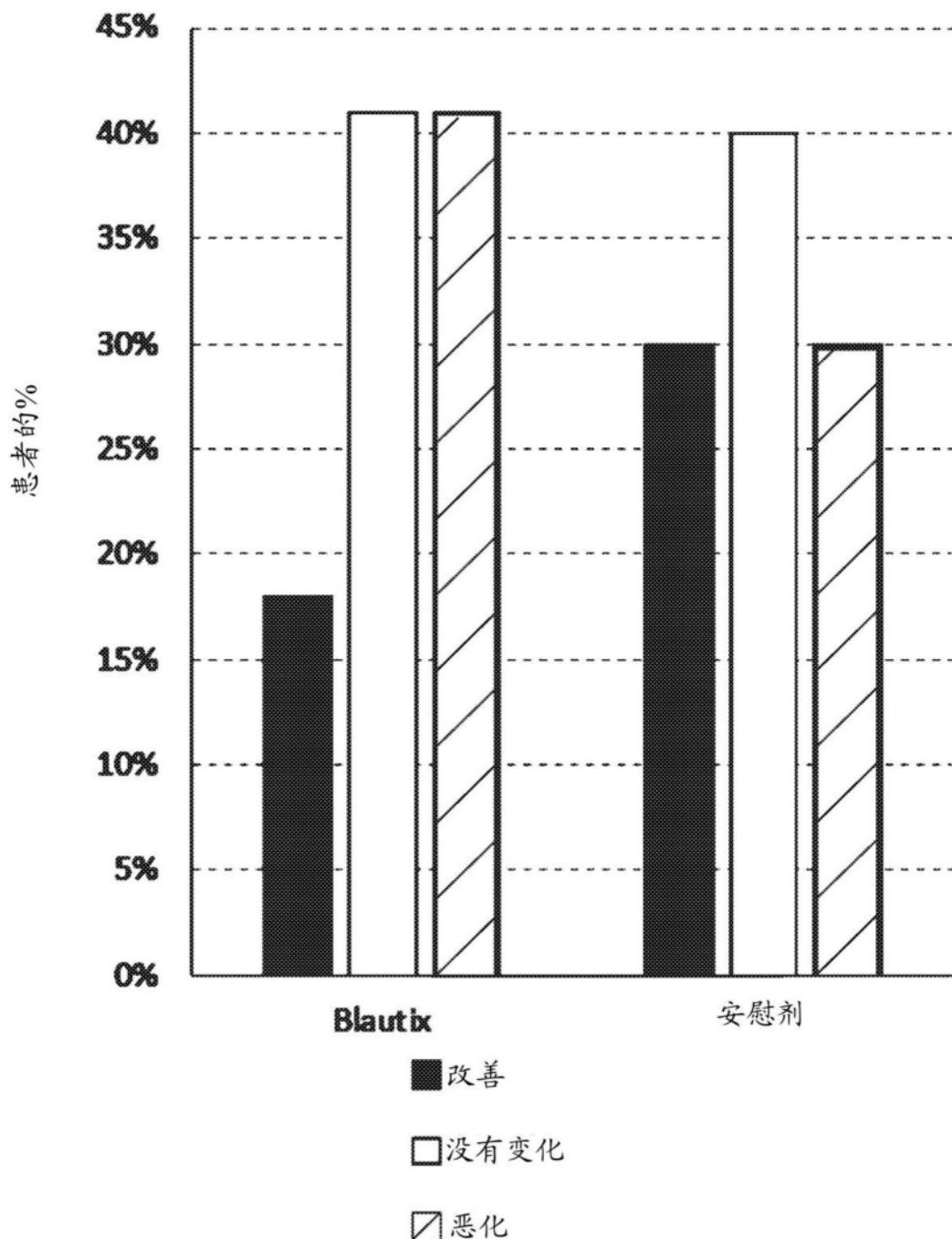


图2

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

图3a

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

图3b

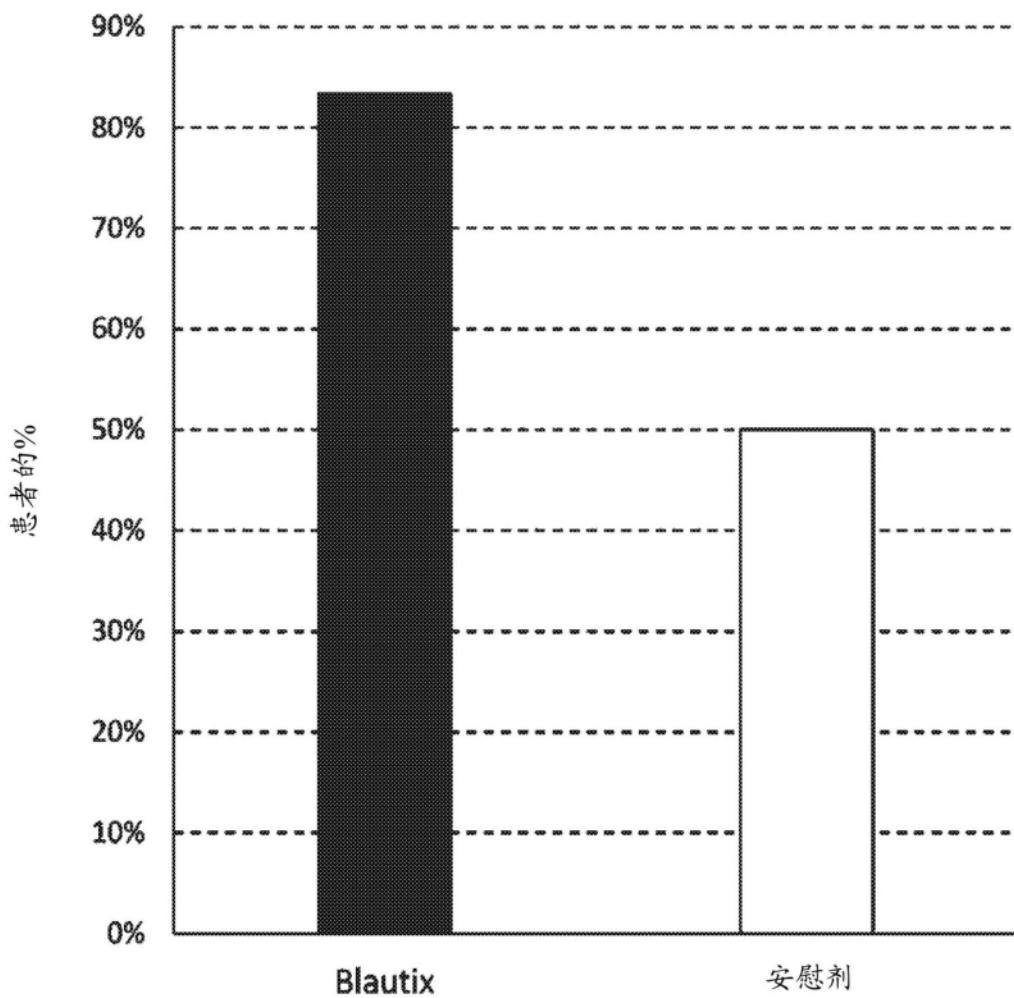


图3c

VERUM 组		第1天		第15天		H2校正		随机数		第1天		第15天	
随机数量	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX	CMAX
3.02	89.8	23.0				3.02		123.0		34.0			
3.04	68.0	21.0				3.04		70.0		25.0			
3.05	130.4	112.8				3.05		163.0		167.0			
3.07	56.8	37.6				3.07		71.0		46.0			
3.09	96.8	52.8				3.09		121.0		66.0			
3.11	63.0	104.9				3.11		75.0		128.0			
3.12	12.3	38.7				3.12		16.0		53.0			
3.13	110.3	82.5				3.13		118.0		85.0			
3.15	115.7	53.8				3.15		155.0		63.0			
3.17	97.8	83.7				3.17		134.0		139.0			
3.19	51.1	66.1				3.19		72.0		87.0			
3.21	144.0	71.4				3.21		144.0		75.0			
3.22	52.7	43.9				3.22		59.0		55.0			
3.24	27.1	26.7				3.24		29.0		27.0			
													单向T测试 0.04793585

氢未校正

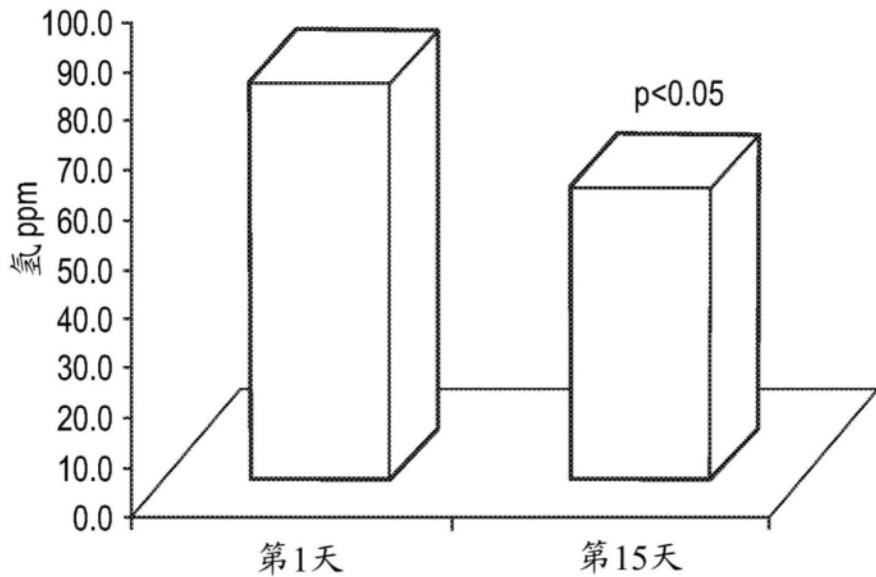


图4b

氢校正

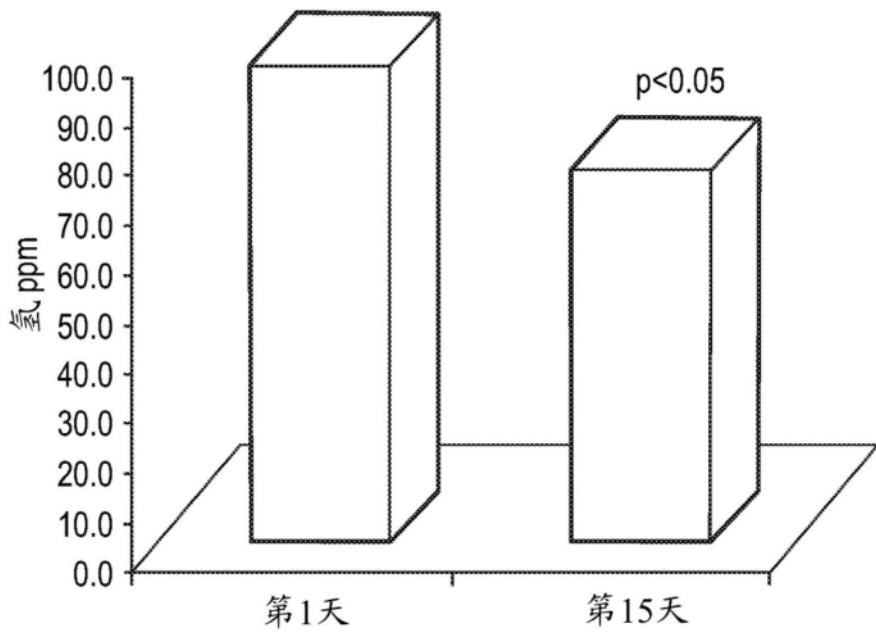


图4c

安慰剂组

数量	第1天		第15天		H2校正		随机		第1天		第15天	
	C _{MAX}	C _{MAX}	C _{MAX}	C _{MAX}	数量	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T1测试	0.44620699						单向T1测试	0.27096549		
		第1天	第15天						第1天	第15天		
平均值	61.7	60.0					平均值	82.0		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5a

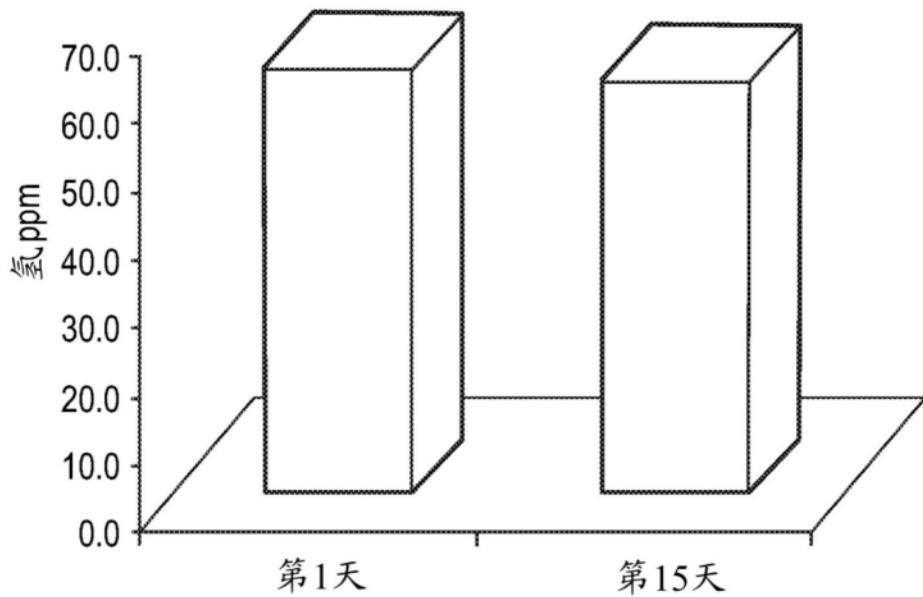
氢未校正安慰剂

图5b

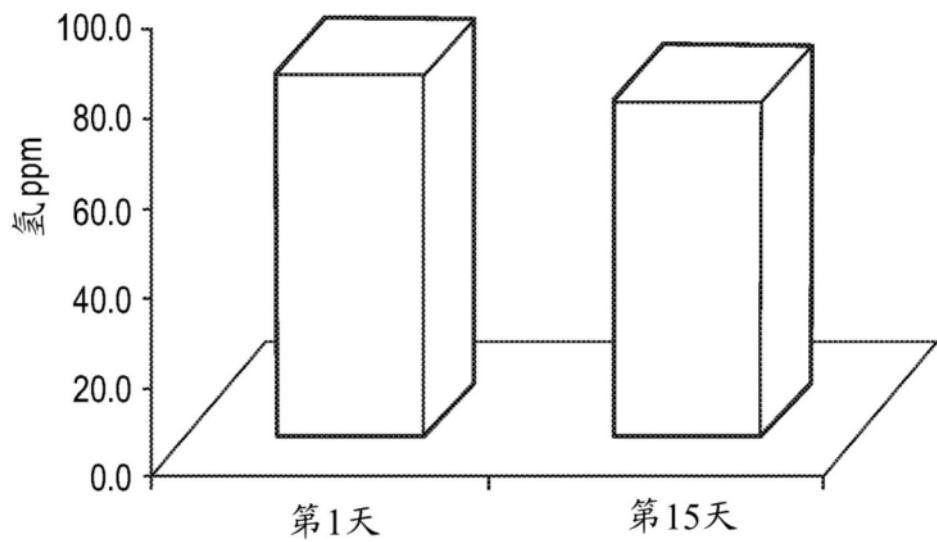
氢校正安慰剂

图5c

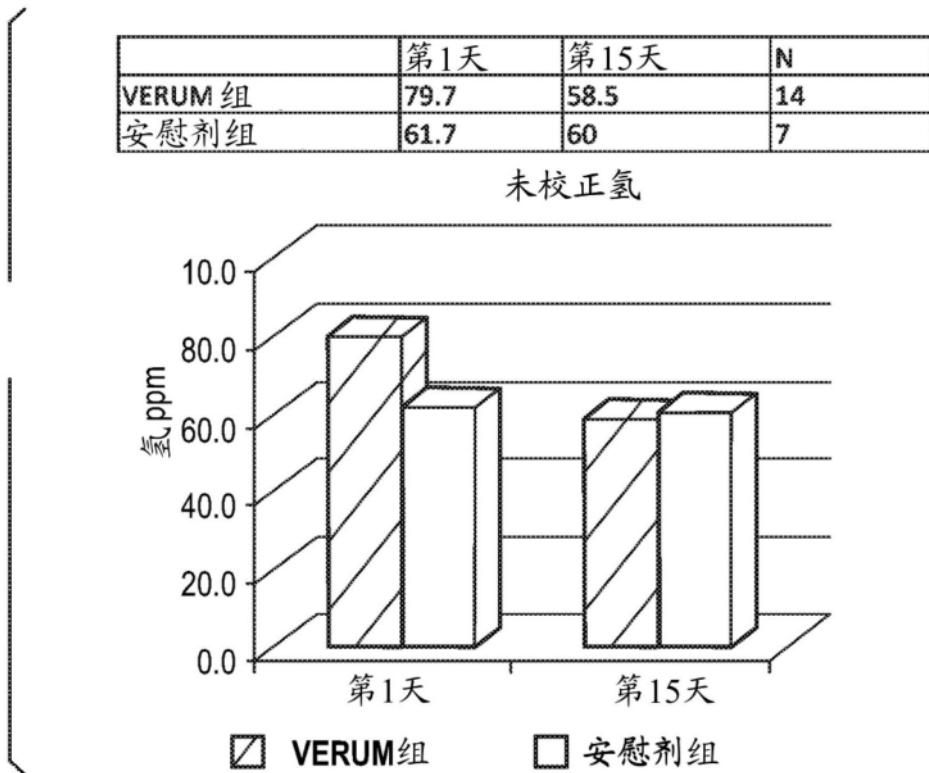


图6a

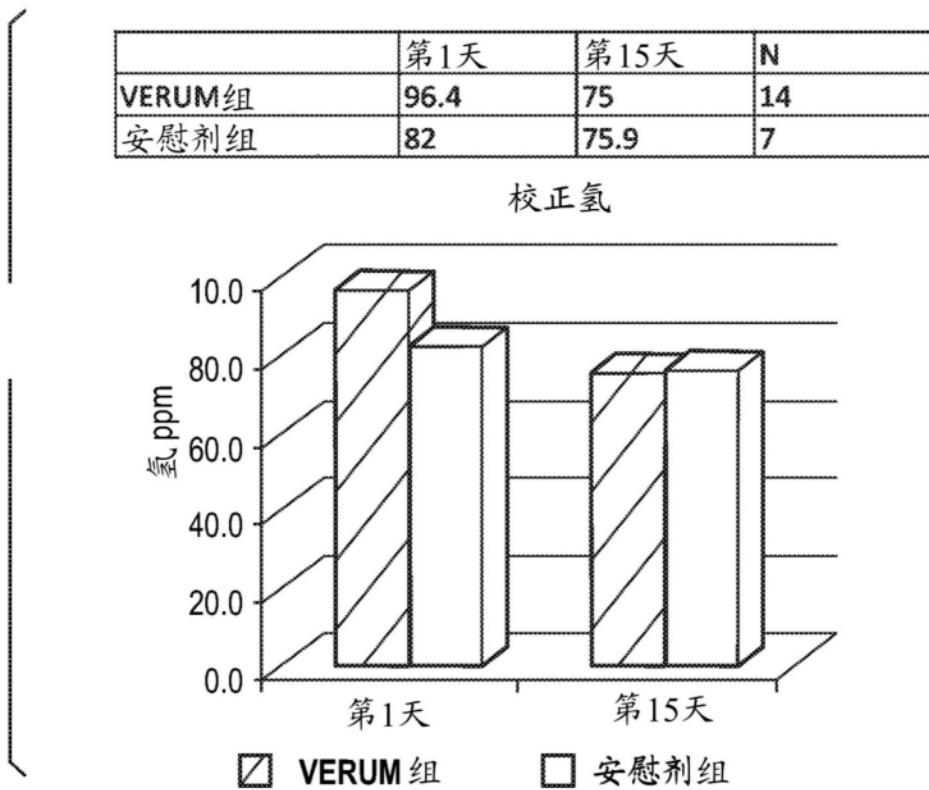


图6b