

用于提高免疫力的组合物

相关申请

本申请要求中国专利申请 202010657312.5、202011259564.9 和 202110223880.9 号的优先权,通过援引加入的方式将三篇专利文献的整体内容并入本文。本申请还要求 2020 年 4 月 28 日提交的美国临时申请 63/016,759 号、2020 年 5 月 15 日提交的美国临时申请 63/025,310 号和 2020 年 8 月 12 日提交的美国临时申请 63/064,821 号的优先权,通过援引加入的方式将三篇美国临时专利申请的整体内容并入本文。

技术领域

本申请大体涉及药品、食品、保健品领域。具体而言,本申请提供了基于对于肠道菌群的调节而提高个体免疫力或辅助治疗和预防疾病或提高疾病疗效的组合物及其用途。

背景技术

人体或动物体的肠道菌群中存在种类多样、组成复杂的细菌,并且对于肠道菌群的研究报道也很多。肠道菌群不仅仅与消化功能相关,而且对于机体抵抗病原体感染、自体免疫疾病等疾病的能力,甚至对于药物治疗的反应均有关联性。

肠道菌群中有一类对于机体有益的细菌,被称为益生菌。通常,益生菌指定殖在人体内,改变宿主某一部位菌群组成的一类对宿主有益的活性微生物。益生菌能通过调节宿主粘膜与系统免疫功能或通过调节肠道内菌群平衡,促进营养吸收保持肠道健康的作用,从而产生有利于健康作用。常见的益生菌包括双歧杆菌、乳杆菌、酵母菌等。

有一些物质与益生菌关系密切,被称为益生元。通常,益生元指一些不被宿主消化吸收却能够选择性地促进体内益生菌的代谢和增殖,从而改善宿主健康的有机物质。一般情况下,益生元应在通过上消化道时,大部分不被消化而能被肠道菌群所发酵的。最重要的是益生元能刺激有益菌群的生长,而不刺激有潜在致病性或腐败活性的有害细菌。常见的益生元有低聚糖类,也称为膳食纤维。

基于益生菌/益生元调节肠道菌群,进而促进机体健康水平(例如提高免疫力)是本领域一直以来的课题。

发明概述

第一方面,本申请提供了一种益生菌(probiotics)组合物,包含两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)和长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)。

在一些实施方案中，以菌落形成单位计，两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 1: (0.21-2.36)。

在一些实施方案中，益生菌组合物还包含青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)。

在一些实施方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (0.57-3.56): 1: (0.21-2.36)。在一些具体方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (0.75-1): 1: (0.75-1)。

在一些实施方案中，益生菌组合物还包含鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)。

在一些实施方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量的比值为 (0.57-3.36): 1: (0.21-2.36): 1。

在一些实施方案中，益生菌组合物为单位剂量形式，并且以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量独立地为 10^4 至 10^{12} CFU 的量级。在一些实施方案中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的总量为 10^6 至 10^{12} CFU 的量级。

在一些实施方案中，所述益生菌组合物用于给予成年人，并且青春双歧杆菌的量为 2.59×10^5 - 4.49×10^{11} CFU；和/或两歧双歧杆菌的量为 1.26×10^5 - 7.35×10^{11} CFU；和/或长双歧杆菌的量为 2.23×10^5 - 7.02×10^{11} CFU；和/或鼠李糖乳杆菌的量为 1.26×10^5 - 2.59×10^{11} CFU。

在一些实施方案中，益生菌组合物用于给予儿童，并且青春双歧杆菌的量为 2.05×10^5 - 4.55×10^{11} CFU；和/或两歧双歧杆菌的量为 1.47×10^5 - 3.6×10^{11} CFU；和/或长双歧杆菌的量为 7.55×10^4 - 2.5×10^{11} CFU；和/或鼠李糖乳杆菌的量为 1.47×10^5 - 3.6×10^{11} CFU。

在一些实施方案中，益生菌组合物不含本申请的各个实施方案所写明的益生菌之外的其他益生菌。在一些实施方案中，益生菌组合物不含青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌之外的益生菌。在一些实施方案中，益生菌组合物不含青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌之外的双歧杆菌。

第二方面，本申请提供了一种益生元 (prebiotics) 组合物，包含低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维。

在一些实施方案中，以重量计，低聚木糖、低聚半乳糖，玉米膳食纤维的量的比值为 (0.25-5): (0.75-4): (0.5-1)。在一些具体实施方案中，以重量计，低聚木糖、低聚半乳糖，玉米膳食纤维的量的比值为 (0.25-0.5): (2-4): (0.5-0.75)。

在一些实施方案中，益生元组合物为单位剂量形式，并且以重量计，所述低聚木糖、低聚半乳糖，玉米纤维的总量为 0.1-12g。在一些实施方案中，益生元组合物为单位剂量形式，并且以重量计，所述低聚木糖、低聚半乳糖，玉米纤维的总量为 0.1-5g。

在一些实施方案中，低聚木糖的量为 0.01g-6g；和/或低聚半乳糖的量为 0.04g-9.6g；和/或玉米膳食纤维的量为 0.01g-6g。

在一些实施方案中，益生元组合物不包含低聚木糖、低聚半乳糖，玉米膳食纤维之外的益生元组分。

第三方面，本申请提供了一种膳食组合物（一些情况下也称为“合生元（synbiotics）”组合物），包含第一方面的益生菌组合物和第二方面的益生元组合物。

在一些具体实施方案中，膳食组合物包含作为益生菌的青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌以及作为益生元的低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维，其中以菌落形成单位（CFU）计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为（0.75-1）: 1:（0.75-1），并且三种菌总计约 2×10^{11} CFU，并且以重量计，低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的比为（0.25-0.5）:（2-4）:（0.5-0.75）并且低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的总量为 1.2-1.5g。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物被配制为用于经口施用。在一些实施方案中，经口施用包括口服、与口服类产品混合、管饲等方式。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物为食品补充剂、食品添加剂或食品。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物被配制为粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物施用于个体，用于辅助预防和/或治疗病原体感染、或增强病原体感染的治疗效果、或提高个体的免疫力、或平衡个体的肠道微生态（包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种和/或减少不理想细菌）。在一些实施方案中，病原体为病毒、细菌或真菌。在一些实施方案中，病原体为呼吸道疾病病毒，例如新冠病毒（COVID-19）、流行性感冒、呼吸道合胞病毒。

第四方面，本申请提供了第一方面的益生菌组合物、或第二方面的益生元组合物、或第三方面的膳食组合物在制备用于辅助预防和/或治疗个体的病原体感染或增强个体的病原体感染的治疗效果或提高个体的免疫力或平衡个体的肠道微生态（包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种和/或减少不理想细菌）的膳食产品或药品中的用途。在一些实施方案中，病原体为病毒、细菌或真菌。在

一些实施方案中，病原体为呼吸道疾病病毒，例如 COVID-19、流行性感、呼吸道合胞病毒。

第五方面，本申请提供了用于辅助预防和/或治疗个体的病原体感染或增强个体的病原体感染的治疗效果或提高个体的免疫力或平衡个体的肠道微生态(包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种和/或减少不理想细菌)的方法，包括向所述个体给予第一方面的益生菌组合物、或第二方面的益生元组合物、或第三方面的膳食组合物。在一些实施方案中，病原体为病毒、细菌或真菌。在一些实施方案中，病原体为呼吸道疾病病毒，例如 COVID-19、流行性感、呼吸道合胞病毒。

附图简要说明

图 1 显示了前期研究鉴定的理想细菌物种和各种益生菌之间的关系。理想细菌物种有增强免疫力的潜在能力，并且其丰度与 COVID-19 疾病严重程度或 SARS-CoV-2 病毒载量呈负相关。圆圈代表理想细菌物种和益生菌的丰度呈正相关，大小指示正相关的强度，方框圈出本申请鉴定得出的目标益生菌。

图 2 显示了实施例 2 的队列研究的部分结果，其中 A 图显示了青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌在各个队列研究中的阳性率及总体阳性率；B 图显示了受试者的粪便样品包含三种双歧杆菌，三种双歧杆菌中的任何两种、或三种双歧杆菌中仅一种或不包含任何一种的发生率。

图 3 显示了实施例 3 的临床研究中合生元组合物和标准治疗的 COVID-19 患者的部分结果，其中 A 图显示了第 1 周和第 2 周的临床症状缓解评分(评分定义为 20)以及抗体形成情况；B 图显示了血浆中免疫反应标志物的定量(转换为 log10 显示)，对于所有箱形图，中心都是通过测量的中值绘制的，而箱形图的上下边界分别对应于第一和第三百分位数。p 值由两面确定，p 值<0.05 被认为具有统计学显著性(Wilcoxon 秩和检验)；C 图显示了与基线相比，第 5 周的炎性免疫反应标志物的百分比下降量，各个条形表示中位数百分比下降量，p 值由双面 Wilcoxon 秩和检验确定；D 图显示了在基线、首次服用合生元组合物的 2 周和 5 周后的益生菌浓度，浓度通过 qPCR 确定，并在 log10 转化后显示(ng/μl)，p 值<0.05 被认为具有统计学显著性(Wilcoxon 秩和检验)。

图 4 显示了实施例 4 的研究设计方案。

图 5 显示了实施例 4 中健康人以及在合生元组合物组和标准治疗组的 COVID-9 患者在基线、第 2、第 4 和第 5 周的合生元组合物中的 3 种双歧杆菌属益生菌(青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双

歧杆菌)的总相对丰度,其中上方的图为汇总图,下方的图为各个时间点的图。相对丰度(百分比)以转换成 $\log_{10}$ 的方式显示。第2、第4和第5周与基线相对丰度间的p值由Wilcoxon秩和检验确定。

图6显示了实施例4中健康人以及在合生元组合物组和标准治疗组的COVID-9患者在基线、第2、第4和第5周的香农多样性指数。第2、第4和第5周与基线香农多样性指数间的p值由Wilcoxon秩和检验确定。

图7显示了实施例4中的健康人以及在合生元组合物组和标准治疗组的COVID-9患者在基线、第2、第4和第5周的理想细菌物种(A)和不理想细菌物种(B)的总相对丰度,其中A图显示了理想细菌物种(在非COVID-19人中丰度较高的物种)的总相对丰度,B图显示了不理想细菌物种(在COVID-19患者中丰度较高)的总相对丰度。相对丰度(百分比)以转换成 $\log_{10}$ 的方式显示。第2、第4和第5周与基线相对丰度间的p值由Wilcoxon秩和检验确定。

图8显示了实施例4中合生元组合物组和标准治疗组之间在基线、第2、第4和第5周时丰度有差异的物种($LDA > 2, p < 0.05$)。与标准治疗组相比,合生元组合物组中多种理想细菌物种(方框标记)水平显著更高,而在合生元组合物组中的不理想细菌物种(肺炎克雷伯菌、小韦荣球菌和大肠杆菌),则明显低于标准治疗组。方块色度与LDA数值对应关系如图解。若LDA值为正,则表示该物种在合生元组合物治疗组水平显著更高,更深的颜色代表更大差异。若LDA值为负,则表示该物种在标准治疗组水平显著更高,更浅的颜色代表更大差异。

发明详细描述

本申请的发明人对于肠道菌群、特别是益生菌进行了大量深入的研究,并发现益生菌与可增强免疫力并可促进预防和治疗病原体感染(例如呼吸道感染)的理想细菌物种呈显著正相关,从而基于上述发现,提供了益生菌/益生元/合生元组合物,预期这些组合物能有效增强机体免疫力,并且有助于预防和/或治疗病原体感染,例如呼吸道病原体感染,如新型冠状病毒(COVID-19),流行性感,呼吸道合胞病毒等。

在下文中,根据一些具体实施方案来进一步阐述本申请的内容。然而,所列举的具体实施方案仅出于例示目的,而不旨在限制本申请的范围。本领域技术人员会认识到,以下某一实施方案中的具体特征可以用于任何其他实施方案,只要其不背离本申请的主旨即可。

除非另外说明,本申请中的术语的含义与本领域技术人员通

常理解的含义相同。本文所引用的所有专利文献、学术论文及其他公开出版物，其中的全部内容整体并入本文作为参考。

应当理解，本文中给出的具体数值不仅可作为单独的数值理解，还应当认为提供了某一范围的端点值，并且可以相互组合提供其他范围。例如，当公开了组合物的某组分的含量为 1、2 或 3g 时，相当于还公开了该组分的含量可以为 1-2g、1-3g 或 2-3g。

第一方面，本申请提供了一种益生菌组合物，包含两歧双歧杆菌（*Bifidobacterium bifidum*）和长双歧杆菌（*Bifidobacterium longum*）。

本文所述的“益生菌组合物”指以益生菌作为活性成分的组合物，不排除存在由于益生菌的培养、分离和纯化所需要的辅助成分和/或根据希望目的配制组合物的辅料成分。

在一些实施方案中，以菌落形成单位计，两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 1: (0.21-2.36)。

菌落形成单位(CFU)是本领域常见的表征微生物的量的形式。除非另作规定，本申请中描述微生物的量时以菌落形成单位计算。

例如，两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为可以为 1: (0.21、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.36)。在一些实施方案中，组合物用于给予成年人，两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 1: (0.36-2.36)。在一些实施方案中，组合物用于给予儿童，两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 1: (0.21-1.7)。

在一些实施方案中，益生菌组合物还包含青春双歧杆菌（*Bifidobacterium adolescentis*）。

在一些实施方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为(0.57-3.56): 1: (0.21-2.36)。在一些实施方案中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (0.57、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.56): 1: (0.21、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.36)。在一些具体方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (0.75-1): 1: (0.75-1)。在一些实施方案中，组合物用于给予成年人，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (1-3.56): 1: (0.86-2.36)。在一些实施方案中，组合物用于给予儿童，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为 (0.57-3.09): 1: (0.21-1.7)。

在一些实施方案中，益生菌组合物还包含鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)。短链脂肪酸(SCFA, 例如丁酸和丙酸)会影响 T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞的分化或功能，这对于维持免疫稳态具有意义。鼠李糖乳杆菌能增加肠道中 SCFA 的产量，鼠李糖乳杆菌与两歧双歧杆菌和长双歧杆菌中的组合预期能增加总的 SCFA 产生量。此外据报道，口服鼠李糖乳杆菌可以增加肠道中拟杆菌属和费氏杆菌属的含量。

在一些实施方案中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量的比值为 (0.57-3.56): 1: (0.21-2.36): 1。在一些实施方案中，以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量的比值为 (0.57、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.56): 1: (0.21、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.36): 1。在一些实施方案中，组合物用于给予成年人，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量的比值为 (1-3.56): 1: (0.86-2.36): 1。在一些实施方案中，组合物用于给予儿童，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量的比值为 (0.57-3.09): 1: (0.21-1.7): 1。

在一些实施方案中，益生菌组合物为单位剂量形式，并且以菌落形成单位计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的量独立地为 10^4 至 10^{12} CFU 的量级。在一些实施方案中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的总量为 10^6 至 10^{12} CFU 的量级。在一些具体实施方案中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌的总量为约 2×10^{11} CFU。应当理解，本申请的益生菌组合物未必全部包含青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌，因此，此处的“总量”是指这四种益生菌中存在于益生菌组合物中的总量。

本文所述的“单位剂量形式”是指独立或分离包装的单次施用剂量的组合物，通常可以存在于单个片剂、胶囊或粉末/颗粒袋等。在一些实施方案中，为了便于施用，单位剂量形式被制备为含有每日剂量的组合物。

在一些实施方案中，所述益生菌组合物用于给予成年人，并且青春双歧杆菌的量为 2.59×10^5 - 4.49×10^{11} CFU；和/或两歧双歧杆菌的量为 1.26×10^5 - 7.35×10^{11} CFU；和/或长双歧杆菌的量为 2.23×10^5 - 7.02×10^{11} CFU；和/或鼠李糖乳杆菌的量为 1.26×10^5 - 2.59×10^{11} CFU。

在一些实施方案中，益生菌组合物用于给予儿童，并且青春双

歧杆菌的量为 2.05×10^5 – 4.55×10^{11} CFU; 和/或两歧双歧杆菌的量为 1.47×10^5 – 3.6×10^{11} CFU; 和/或长双歧杆菌的量为 7.55×10^4 – 2.5×10^{11} CFU; 和/或鼠李糖乳杆菌的量为 1.47×10^5 – 3.6×10^{11} CFU。

在一些实施方案中, 益生菌组合物不含本申请的各个实施方案所写明的益生菌之外的其他益生菌。

在此类实施方案的技术背景下, “不含”应当理解为“基本不含”, 不排除由于菌株的培养、分离和纯化等因素导致存在微量或痕量的其他益生菌。在一些具体实施方案中, 其他益生菌的量占组合物全部益生菌总量不超过 5%, 优选不超过 1%。

在一些实施方案中, 益生菌组合物不含青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌之外的益生菌。在一些实施方案中, 益生菌组合物不含青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌之外的双歧杆菌。

第二方面, 本申请提供了一种益生元组合物, 包含低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维。

本文所述的“益生元组合物”指以益生元作为活性成分的组合物, 不排除存在由于益生元的合成、分离、纯化等所引入的辅助成分和/或根据希望目的配制组合物的辅料成分。

在一些实施方案中, 以重量计, 所述低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的量的比值为(0.25-5): (0.75-4): (0.5-1)。在一些实施方案中, 以重量计, 所述低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的量的比值为(0.25、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0): (0.75、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0): (0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0)。在一些具体实施方案中, 以重量计, 低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的量的比值为(0.25-0.5): (2-4): (0.5-0.75)。

在一些实施方案中, 益生元组合物为单位剂量形式, 并且以重量计, 低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的总量为 0.1-12g, 例如 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12g。

在一些实施方案中, 益生元组合物为单位剂量形式, 低聚木糖的量为 0.01g-6g; 和/或低聚半乳糖的量为 0.04g-9.6g; 和/或玉米膳食纤维的量为 0.01g-6g。这样的单位剂量形式可以给予成年人或儿童。

在一些实施方案中，当益生元组合物作为食物的补充剂或添加剂时，低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的总量可以控制为0.1-5g，与食物搭配之后的总量预期可以达到期望值，例如约12g。

在一些实施方案中，益生元组合物不包含低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维之外的益生元组分。

在此类实施方案的技术背景下，“不含”应当理解为“基本不含”，不排除由于益生元的合成、提取、分离和纯化等因素导致存在微量或痕量的其他益生元。在一些具体实施方案中，其他益生元的量占组合物全部益生元总量不超过5%，优选不超过1%。

第三方面，本申请提供了一种膳食组合物（有时也称为“合生元（synbiotics）”组合物），包含第一方面的益生菌组合物和第二方面的益生元组合物。

本领域技术人员应当理解，上述膳食组合物不需要是单独配制了第一方面的益生菌组合物和第二方面的益生元组合物，然后将两者混合或配合。只要一种膳食组合物涵盖第一方面的益生菌组合物的一个实施方案的全部特征和第二方面的益生元组合物的一个实施方案的全部特征，即属于本申请第三方面的膳食组合物。

作为非限制性的一个实例，本申请的膳食组合物可以具有以下配方（每日用量，可以提供于单位剂量形式）：

益生菌	成人	儿童
青春双歧杆菌	2.59×10^5 - 4.49×10^{11} CFU	2.05×10^5 - 4.55×10^{11} CFU
两歧双歧杆菌	1.26×10^5 - 7.35×10^{11} CFU	1.47×10^5 - 3.6×10^{11} CFU
长双歧杆菌	2.23×10^5 - 7.02×10^{11} CFU	7.55×10^4 - 2.5×10^{11} CFU
鼠李糖乳杆菌	1.26×10^5 - 2.59×10^{11} CFU	1.47×10^5 - 3.6×10^{11} CFU
益生元（总量 0.1-5g）	成人或儿童	
低聚木糖	0.01g-6g	
低聚半乳糖	0.04g-9.6g	
玉米膳食纤维	0.05-6g	

在一些具体实施方案中，膳食组合物包含作为益生菌的青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌以及作为益生元的低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维，其中以菌落形成单位(CFU)计，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值为(0.75-1):1:(0.75-1)，并且三种菌总计约 2×10^{11} CFU，并且以重量计，低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的比为(0.25-0.5):(2-4):(0.5-0.75)并且低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的总量为1.2-1.5g。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或

益生元组合物或膳食组合物被配制为用于经口施用。在一些实施方案中，经口施用包括口服、与口服类产品混合、管饲等方式。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物为食品补充剂、食品添加剂或食品。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物被配制为粉剂、颗粒剂、片剂或胶囊剂。

本申请的益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物的主要应用方式是给予个体的胃肠道。直接经口施用是较为方便的方式，但是对于某些特殊个体（例如卧床患者）而言，也可以通过管饲等方式辅助施用。

本申请的益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物的产品形式可以多种多样，例如，可以制备为单独的膳食补充剂（例如胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂），随餐或不随餐服用；也可以制备为各种固体/半固体食品、冲调粉末/颗粒食品、饮料等在被个体摄入之前加入或调配的添加型产品；也可以作为各种固体/半固体食品、冲调粉末/颗粒食品、饮料直接的组成成分。

在第一至第三方面的一些实施方案中，所述益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物施用于个体，用于辅助预防和/或治疗病原体感染、或增强病原体感染的治疗效果、或提高个体的免疫力、或平衡个体的肠道微生态（包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种和/或减少不理想细菌）。在一些实施方案中，病原体为病毒、细菌或真菌。在一些实施方案中，病原体为呼吸道疾病病毒，例如 COVID-19、流行性感、呼吸道合胞病毒。

第四方面，本申请提供了第一方面的益生菌组合物、或第二方面的益生元组合物、或第三方面的膳食组合物在制备用于辅助预防和/或治疗个体的病原体感染或增强个体的病原体感染的治疗效果或提高个体的免疫力或平衡个体的肠道微生态（包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种和/或减少不理想细菌）的膳食产品或药品中的用途。在一些实施方案中，病原体为病毒、细菌或真菌。在一些实施方案中，病原体为呼吸道疾病病毒，例如 COVID-19、流行性感、呼吸道合胞病毒。

在不存在冲突的情况下，本申请的益生菌组合物或益生元组合物或膳食组合物的制备可以参照本领域中益生菌或益生元类产品的常规加工方式。例如，可以通过常规加工技术将各种益生菌或益生元成分依次或同时或作为冻干预混物混合到产品中。

第五方面，本申请提供了用于辅助预防和/或治疗个体的病原体感染或增强个体的病原体感染的治疗效果或提高个体的免疫力或平衡个体的肠道微生态（包括增加微生物丰度、增加理想细菌物种

和/或减少不理想细菌)的方法,包括向所述个体给予第一方面的益生菌组合物、或第二方面的益生元组合物、或第三方面的膳食组合物。在一些实施方案中,病原体为病毒、细菌或真菌。在一些实施方案中,病原体为呼吸道疾病病毒,例如 COVID-19、流行性感冒、呼吸道合胞病毒。

实施例

以下实施例仅用于说明而非限制本申请范围的目的。

实施例 1

本实施例描述了发明人进行的第一阶段队列研究。

方法

研究队列 1

发明人从香港 (n = 61) 和云南省 (n = 881) 招募了 942 名健康中国人。该研究获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会 (The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC 编号: 2016.407) 和昆明医学院附属第一医院研究伦理委员会的批准(编号: 2017.L.14)。所有受试者均签署书面知情同意书。研究对象的粪便样品保存在-80°C 进行细菌组分析。

研究队列 2

发明人公开招募了 546 名健康香港成年人。该研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会的批准 (The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC 编号: 2016.707)。所有受试者均签署书面知情同意书,捐赠粪便样本,并通过问卷调查提供人口统计学信息。研究对象的粪便样品保存在-80°C进行细菌组分析。

研究队列 3

发明人招募了 64 名健康儿童。该研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会的批准 (The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC 编号: 2016.607)。所有受试者均签署书面知情同意书,捐赠粪便样本,并通过问卷调查提供人口统计学信息。研究对象的粪便样品保存在-80°C进行细菌组分析。

队列 1 和队列 3 的粪便 DNA 提取和 DNA 测序

使用 Maxwell® RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒 (Promega)提取粪便 DNA。将约 100 mg 的每个粪便样品预先用 1 ml ddH₂O 洗涤,并通过以 13000 g 离心 1 分钟。将沉淀物重悬于 800μLTE 缓冲液 (pH 7.5) 中,加入 1.6 μl 2-巯基乙醇和 500 U 裂解酶 (Sigma),并在 37°C 下孵育 60 分钟。然后将样品以 13000 g 离心 2 分钟,弃去上清液。预处理后,随后使用 Maxwell® RSC PureFood GMO 和

Authentication 试剂盒(Promega), 根据产品说明提取 DNA。将 1 ml CTAB 缓冲液添加到沉淀中并振荡 30 s, 然后将溶液在 95°C 加热 5 分钟。此后, 将样品用珠子(Biospec, 真菌为 0.5mm, 细菌为 0.1mm, 1: 1) 以高速振荡研磨 15 分钟。此后, 加入 40 μ l 蛋白酶 K 和 20 μ l RNA 酶, 并在 70°C 孵育 10 分钟。然后通过以 13000 g 离心 5 分钟获得上清液, 并将其置于用于 DNA 提取的 Maxwell®RSC 仪器中。提取的粪便 DNA 通过 Illumina Novoseq 6000(Novogen, 北京, 中国) 用于超深度宏基因组学测序。每个样本平均获得 12G 数据。

队列 2 的粪便 DNA 提取和 DNA 测序

根据制造商的说明, 使用 DNeasy PowerSoil 试剂盒 (QIAGEN) 提取粪便 DNA。取 0.1g 粪便样本中提取 DNA, 然后使用 Qubit dsDNA BR 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 测定提取的 DNA 浓度。将 DNA 样本发送到测序服务提供商 (香港湾仔, Novogene HK Company Limited) 进行文库制备和配对猎枪宏基因组测序 (Illumina NovaSeq 6000), 每个样本平均返回 7.5 GB 的原始数据。

细菌物种间的相关性分析

根据本申请的发明人团队前期的研究成果, 肠道中包括多种拟杆菌及假链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*) 在内的多种细菌与 COVID-19 病人的疾病严重程度或 SARS-CoV-2 病毒载量呈负相关, 提示这些菌种 (本文中也称为“理想细菌物种”) 对 COVID-19 有保护作用 (相关研究记载于美国临时专利申请 63/016,759 和 63/025,310 中, 通过引用的方式将它们的内容整体并入本文, 用于所有目的)。然而, 理想细菌物种中的大部分目前尚未被批准应用于食品中。因此, 发明人将目前被批准应用食品的菌种与理想细菌物种在人群中的含量做相关性分析。用于相关性分析的理想细菌物种包括: *Akkermansia muciniphila*, *Alistipes onderdonkii*, *Anaerostipes hadrus*, *Bacteroides dorei*, 马赛拟杆菌 (*Bacteroides massiliensis*), 椭圆拟杆菌 (*Bacteroides ovatus*), 多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*), 假小链双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*), 粘液真杆菌 (*Eubacterium limosum*), 直肠真杆菌 (*Eubacterium rectale*), 凸腹真杆菌 (*Eubacterium ventriosum*), *Faecalibacterium prausnitzii*, 人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*), 肠道罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia intestinalis*), 霍氏真杆菌 (*Eubacterium hallii*)。

相关性分析在研究队列 1 和 2 中进行, 具体方式如下:

使用 Trimmomatic (v0.38) 默认参数对宏基因组学读数进行质量过滤和修剪。然后, 通过 Kneaddata (v0.7.2, <https://github.com/Trinityrnaseq/kneaddata>):

//bitbucket.org/biobakery/kneaddata/wiki/Home) 去除宿主 DNA (参考基因组: hg38)。使用 MetaPhlAn26 (v2.6.0) 进行物种级宏基因组注释。随后对 MetaPhlAn2 生成的相对丰度进行中心化对数比变换 (Centered log ratio, clr)。使用 R 包 corrplot v0.78 计算并绘制皮尔逊相关系数。

结果

益生菌种类的鉴定

在研究队列 1 和 2 的相关性分析中,一些益生菌的相对丰度与理想细菌物种具有显著相关性,其中两歧双歧杆菌、长双歧杆菌青春双歧杆菌与多种理想细菌物种呈正相关 (图 1 和表 1),提示补充此三种益生菌能增加至少一部分理想细菌物种在肠道中的含量,改善肠道健康,从而降低感染风险或疾病严重程度,例如增强免疫力、预防和治疗呼吸道感染。

表 1

细菌物种	NCBI:txid
青春双歧杆菌	1680
两歧双歧杆菌	1681
长双歧杆菌	216816

益生菌的比例

发明人计算了研究队列 1-3 的成年人和儿童中的青春双歧杆菌,两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的平均相对丰度。这些益生菌的比例是基于各种益生菌在健康人群中的自然比例,它们在研究队列 1-3 的约 1500 名健康中国人群中比例相对固定。因此,模拟健康人群中菌种的比例可能增加菌种在肠道中定植的机会。在此基础上,将青春双歧杆菌,双歧双歧杆菌和长双歧杆菌在合生元中的比例分别设计为成人 (1-3.56): 1: (0.86-2.36), 儿童 (0.57-3.09): 1: (0.21-1.7): 1。

益生元的选择和比例

益生元与益生菌通常是相辅相成的,因此在鉴定和选择益生菌之后,添加益生元而配合为合生元是有利的。针对上述研究中鉴定的益生菌种类,发明人针对性选择的益生元包括低聚木糖、低聚半乳糖,玉米膳食纤维。

低聚木糖又称木寡糖,是指 2-10 个木糖分子以 β -1,4 糖苷键连接而成的功能性低聚糖。低聚木糖是优良的双歧杆菌增殖因子。低聚木糖对两歧双歧杆菌和青春双歧杆菌的增殖效果非常明显。有报道称,青春双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和两歧双歧杆菌均通过产生木糖苷酶和

阿拉伯糖苷酶利用低聚木糖,且其对低聚木糖的水解能力取决于其木聚糖酶酶解系统的效率。低聚木糖对双歧杆菌的增殖作用和发酵后短链脂肪酸的产量随低聚木糖组分分子质量的增加而下降。体外消化试验证明,低聚木糖经过唾液至小肠黏膜酶液后的残留率达到了 99.6%,可充分被大肠内双歧杆菌发酵,且低聚木糖对双歧杆菌的增殖效果是其他功能性低聚糖的 10~20 倍。低聚木糖有耐酸、耐高温、稳定性强、配伍性好等特点,能很好地应用在食品方面。

低聚半乳糖和玉米膳食纤维可以促进多种双歧杆菌的生长。低聚半乳糖是一种新型的功能性物质,其分子结构一般是在半乳糖或葡萄糖分子上连接 1-7 个半乳糖基。它是具有天然属性的功能性低聚糖的一种。其适口性、水溶性和稳定性都较好,而且其进入人体后可以使人肠道中的益生菌尤其是双歧杆菌增殖,同时也能抑制腐败菌的生长。肠道中的益生菌利用低聚半乳糖增殖的同时还能产生大量胞外多糖。胞外多糖不仅有抗肿瘤活性、免疫活性,还能促进益生菌在肠道内长期定植。玉米膳食纤维进入胃后可吸收部分水分并促进肠道加快蠕动,加速排出粪便,从而降低直肠的压力,并预防和减少肠道疾病。同时,双歧杆菌对于玉米膳食纤维具有的发酵作用,玉米膳食纤维可以在盲肠中迅速地被微生物发酵,产生短链脂肪酸。

根据益生菌的比例,发明人进一步给出了三种益生元的合适比例,其中低聚木糖、低聚半乳糖、玉米膳食纤维的比例可以为(0.25-5):(0.75-4):(0.5-1)。

实施例 2

本实施例描述了发明人基于实施例 1 的研究队列 2 进行的扩展式第二阶段队列研究。

方法

研究队列 HC (即,实施例 1 的研究队列 2)

对于研究对象的粪便样品,根据制造商的说明,使用 QIAamp DNeasy PowerSoil 试剂盒进行粪便 DNA 提取。

研究队列 CR1

发明人公开招募了 219 名健康香港成年人。该研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会的批准(The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC 编号: 2017.369)。所有受试者均签署书面知情同意书,捐赠粪便样本,并通过问卷调查提供人口统计学信息。研究对象的粪便样品保存在-80°C进行细菌组分析。根据制造商的说明,使用 QIAamp DNA Stool Mini 试剂盒进行粪便 DNA 提取。

研究队列 CR2

发明人从一组无症状受试者中随机抽取了 30 名健康香港成年人的粪便样本，这些受试者均接受了结肠镜检查且结果正常。该研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会的批准（The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC 编号: 2017.198）。所有受试者均签署书面知情同意书，同意捐赠粪便样本。在微生物组分析之前，将来自研究对象的粪便样品储存在-80°C。根据制造商的说明，使用 Maxwell RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒进行粪便 DNA 提取。

研究队列 cov

发明人从一项 COVID-19 研究的健康对照组纳入了 78 个健康香港成年人的粪便样本。根据制造商的说明，使用 Maxwell RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒进行粪便 DNA 提取。

研究队列 LeanHC

发明人从研究队列 HC 中随机选择了 67 名 BMI <23 的健康香港成年人。将这些研究对象的粪便样品储存在-80°C 以用做微生物组分析。根据制造商的说明，使用 Maxwell RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒进行粪便 DNA 提取。

粪便样本和 DNA 提取

本实施例包括了从五个独立的队列研究收集的健康受试者的粪便样本。根据制造商的说明，使用 QIAamp DNeasy PowerSoil 试剂盒分离试剂盒，Maxwell RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒或 QIAamp DNA Stool Mini 试剂盒进行粪便 DNA 提取。使用 NanoDrop 分光光度计和凝胶电泳来确定 DNA 的质量和数量。

元基因组测序

通过末端修复，纯化和 PCR 扩增的过程构建 DNA 文库。构建完 DNA 文库后，在发明人实验室中的 NextSeq 平台使用 150bp 配对末端测序策略对 DNA 文库进行测序。平均每个样本可获得 12Gb 数据以进行进一步分析。所有实验程序均按照发明人实验室的统一标准。

宏基因组学数据的数据处理和统计分析

发明人使用 Fastp 对元基因组的测序片段进行质量过滤，PolyG 尾部修饰和适配器修饰，并删除了 50 个碱基或以下的测序片段。然后用 KneadData 清除品质修剪后的宏基因组的测序片段中的人类基因，再使用 MetaPhlAn2 分析物种水平的宏基因组，所有非零的水平

均会被是为正水平。发明人计算了每个物种及其组合的发生率。发明人使用 Pearson 相关分析探讨物种水平与年龄和性别之间的相关性。物种水平与年龄之间的相关性通过 Pearson 相关性进行分析，物种水平与性别之间的相关性通过 Spearman 相关性进行评估。

结果

在上述健康人队列的总体分析结果中，青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的阳性率分别为 68.2%，20.3% 和 81.7%（参见图 2 中 A 图）。少于 20% 的健康受试者的肠道中同时有这三种双歧杆菌物种，46.3% 的健康受试者的肠道中有这三种双歧杆菌中的其中两种，高达 36.3% 的健康受试者的肠道中只有三种双歧杆菌物种中的其中一种或全无（参见图 2 中 B 图）。发明人进一步分析了三种双歧杆菌物种水平与年龄和性别的相关性。结果表明年龄增长与这三种双歧杆菌都呈负相关。男性性别与长双歧杆菌的低水平有显著的相关性（表 2）。这些结果提示，大部分人群都适合补充本申请的益生菌/益生元/合生元组合物，尤其是年龄较大的人群和男性人群。

表 2 总队列中三种双歧杆菌与年龄和性别的相关性分析结果

变量	与年龄的相关性			与性别的相关性		
	r	95%置信区间	P	r	95%置信区间	P
青春双歧杆菌	-0.103	-0.186, -0.020	0.016	-0.017	-0.101, 0.067	0.691
两歧双歧杆菌	-0.186	-0.266, -0.104	< 0.0001	-0.039	-0.122, 0.046	0.368
长双歧杆菌	-0.173	-0.253, -0.091	< 0.0001	-0.144	-0.226, -0.060	0.001

实施例 3

本实施例描述了施用本申请的合生元组合物对住院 COVID-19 患者的症状改善和免疫反应标志物调节。据报道，由 SARS-CoV-2 病毒引起的冠状病毒疾病-2019（COVID-19）不仅针对肺部，也针对其他多个器官，包括肠道。肠道微生物可以调节宿主的免疫反应，因此有可能影响 COVID-19 患者的严重程度及预后。COVID-19 患者的肠道微生物组变得不平衡，例如共生体减少、机会病原体增加，这都与 COVID-19 的严重程度和粪便 SARS-CoV-2 病毒脱落有关。此外据报道，粪便样本中短链脂肪酸产生的益生菌的含量较高时，SARS-CoV-2 感染性较低，这突出了有益细菌在对抗 SARS-CoV-2 感染中的潜在有益作用。重新平衡 COVID-19 患者的肠道微生物组的治疗方案有可能改善临床效果。

发明人预期本申请的合生元组合物能改善 COVID-19 患者的临床症状,并因此设计和进行了一项初步研究,以评估在住院的 COVID-19 患者中这种合生元组合物对 COVID-19 的临床症状、血液免疫标志物和粪便微生物组的影响。发明人将这些结果与在同一时期接受标准治疗的 COVID-19 住院患者(对照组)进行了比较。此研究中使用的合生元组合物的配方如下:

合生元组合物包含作为益生菌的青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌以及作为益生元的低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维,其中以菌落形成单位(CFU)计,青春双歧杆菌、两歧双歧杆菌和长双歧杆菌的量的比值控制为(0.75-1):1:(0.75-1),并且三种菌总计控制为约 2×10^{11} CFU,并且以重量计,低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的比控制为(0.25-0.5):(2-4):(0.5-0.75)并且低聚木糖、低聚半乳糖和玉米膳食纤维的总量控制为 1.2-1.5g。

研究概述

发明人将在 2020 年 8 月 13 日至 2020 年 10 月 9 日期间威尔士亲王医院收治的 SARS-CoV-2 阳性的成年患者纳入研究。入组的 COVID-19 患者会在入院 48 小时内接受标准治疗或本申请的合生元组合物。受试者会接受标准治疗或服用合生元组合物胶囊 28 天。

主要结果是以下 3 项指标的综合评估:总体症状调查表评估症状是否缓解,是否需要呼吸支持,及从治疗开始到第 5 周的抗体产生情况。

总体症状调查表(表 3)中第 1 到第 19 和第 26 题评估 COVID-19 相关症状包括发热,呼吸道症状和一般症状,最低分为 20 分(正常),最高分为 80 分(症状最重),症状完全缓解的评分为 20 分。表 3 的第 20 到 25 题评估胃肠道(GI)症状,GI 症状完全缓解的评分为 6 分。

患者入院后 2 周内进行 SARS-CoV-2 免疫球蛋白 G(IgG)抗体检测。发明人每两天会对患者进行一次临床症状评估,直到症状消失或患者出院为止。发明人也将同一时间接受标准治疗的另一组患者纳入研究作为比较。在所有受试者中,发明人在基线和服用合生元组合物 5 周后收集血液样本,并使用 MILLIPLEX®MAP 免疫多重分析法检测了标准治疗组和合生元组基线和第 5 周血浆中的免疫反应标志物。发明人也分别在基线,服用合生元组合物后的 2、4 和 5 周收集了粪便和生活质量调查表。

表 3 总体症状调查表

今天以下症状对您的影响程度

请圈出最合适的答案（1-4）。

	不受影响	影响不大	受影响	严重影响
1. 咳嗽	1	2	3	4
2. 呼吸急促	1	2	3	4
3. 喉咙痛	1	2	3	4
4. 流鼻涕	1	2	3	4
5. 喘息	1	2	3	4
6. 疲劳	1	2	3	4
7. 全身乏力	1	2	3	4
8. 失去嗅觉或味觉	1	2	3	4
9. 头痛	1	2	3	4
10. 寒战	1	2	3	4
11. 发热， °C	1	2	3	4
12. 胸痛	1	2	3	4
13. 结膜炎	1	2	3	4
14. 肌肉疼痛	1	2	3	4
15. 关节痛	1	2	3	4
16. 无法走路	1	2	3	4
17. 皮疹	1	2	3	4
18. 整体不舒服	1	2	3	4
19. 出血	1	2	3	4
20. 厌食	1	2	3	4
21. 恶心	1	2	3	4
22. 呕吐	1	2	3	4
23. 腹痛	1	2	3	4
24. 腹胀	1	2	3	4
25. 腹泻	1	2	3	4
26. 其他症状 指定：	1	2	3	4

研究方法

受试者招募

本研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会（The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC Ref. No: 2020.407）的批准，并在临床试验注册中心注册（NCT04581018）。所有受试者均

签署书面知情同意书。入组的受试者包括合生元组合物组中的 25 名受试者和标准治疗组 (SC) 中的 30 名受试者。发明人招募了在 2020 年 8 月 13 日至 10 月 9 日期间, 经逆转录酶聚合酶链反应 (PCR) 试验确诊为 SARS-CoV-2 感染的 18 岁或以上并在香港威尔士医院住院的患者。接受重症监护或使用呼吸机的受试者, 对干预产品或其成分过敏或不耐受, 有已知心内膜炎病史或活动性心内膜炎, 近期接受 CAPD 或血液透析, 或在招募时怀孕的受试者均被排除。受试者如患有任何会阻止口服益生菌或增加与益生菌有关的风险的疾病也被排除, 这些风险包括但不限于无法吞咽或有误吸风险且没有其他给予方法 (例如, 没有 G/J 管), 已知的由于免疫抑制而增加的感染风险, 例如器官或造血干细胞移植史, 中性粒细胞减少症 ($ANC < 500$ 细胞/ μl) 或 HIV 和 $CD4 < 200$ 细胞/ μl 。

在 2020 年 8 月至 2020 年 10 月期间住院的受试者被分配到合生元组合物组或标准治疗组。2020 年 7 月起出院的受试者被分配到标准治疗组。在本研究中, 受试者按指示将合生元组合物胶囊与食物一起服用 28 天, 并每两天评估一次临床症状, 直到症状消失或出院。血液样本在基线和首次服用合生元组合物或入组后 5 周收集。粪便样本和生活质量调查表在基线和首次合生元组合物或入组后第 2、4 和 5 周收集。本研究是根据《赫尔辛基宣言》进行的。

血液免疫标志物

将全血样品静置 60 分钟后, 在 $4^{\circ}C$ 下无制动 $1500 \times g$ 离心 10 分钟, 收集血浆。未稀释的血浆被转移到 15 毫升聚丙烯锥形管中, 然后分装并保存在 $-80^{\circ}C$ 下用于后续研究。使用 Custom Premix Human Cyto Panel A 47 Plex (Millipore, #HCYTA-60K-47C) 检测血浆细胞因子和趋化因子的水平。所有样品均在首次解冻时进行检测。

结果

本研究纳入 25 例服用合生元组合物的 COVID-19 患者和 30 例接受标准治疗的患者。患者临床特征见表 3, 两组之间的年龄, 合并症, 基线症状评分和疾病严重程度均无显著差异。在诊断时, 两组之间的生命体征, 低氧血症和炎症标志物相似 (数据未显示)。

与标准治疗组相比, 合生元组合物组中达到完全症状缓解的比例明显更高 (图 3 中 A 图, 第一周为 64% vs 10% ; $p = < 0.001$; 第二周为 100% vs 52% ; $p < 0.001$), 抗体阳性率也明显更高 (第 16 天为 88% vs 63% ; $p = 0.037$)。标准治疗组的 8 名受试者 (26.7%) 和合生元组合物组的 1 名受试者 (4%) 出院前 IgG 抗体检测从未呈阳性。

所有接受合生元组合物的患者的胃肠道 (GI) 症状到第 2 周都得到缓解 (图 3 中 A 图)。通过 EuroQol 视觉模拟量表 (EQ-VAS) 和 EuroQol 指数评分 (EQ 指数评分) 评估 (具体数据未显示), 合生元组合物组的受试者在第四周的生活质量与基线相比有显著改善 (EQ-VAS 第四周和基线分数分别为 81.5 和 69.75, $p = 0.034$; EQ 指数评分第四周和基线分别为 0.839 和 0.805, $p < 0.0005$), 但标准治疗组则没有观察到这种改善。两组均无严重不良反应。在合生元组合物组中, 观察到一些不良事件, 包括轻度头晕症状 (4%), 癣感染 (4%), 高血压 (4%)。通过常规血液检查发现 1 名受试者 (4%) 患有慢性淋巴细胞性白血病。在标准治疗组中, 3 名受试者 (10%) 患有便秘, 1 名受试者 (3.3%) 患有轻度手部炎症。在合生元组合物组中, 八种主要免疫反应标志物: 白血球介素 (IL-6, IL-1RA, IL-18), 肿瘤坏死因子 (TNF- α), 巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF), CXC 趋化因子配体 10 (CXCL-10, 也称为 IP10), 单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 和干扰素- γ 诱导的单核因子 (MIG), 在第 5 周时的水平与基线时的相应水平相比显著降低。相反, 在标准治疗组中, 这些免疫反应标志物中的多种没有显著变化 (图 3 中 B 图)。与基线水平比, 合生元组合物组在第 5 周时, IL-6、CXCL-10、IL1RA、MIG、TNF- α 和 M-CSF 的百分比下降量显著高于对照组 (图 3 中 C 图)。在合生元组合物组中, 第 2 周和第 5 周的青春双歧杆菌和长双歧杆菌的丰度与基线相比显著增加 (图 3 中 D 图)。

表 4 合生元组合物组和标准治疗组的患者特征表

特征	合生元组合物 (n=25)	标准治疗 (n=30)	p 值
男性, n (%)	14 (56)	9 (30)	0.052
年龄中位数, (IQR) 年	50 (39-59)	46.5 (29.5- 56)	0.151
吸烟者/戒烟者, n(%)	7 (28)	6 (20)	0.298
饮酒者/ 戒酒者, n(%)	2 (8)	1 (3)	0.585
合并症, n(%)	11 (44)	16 (53)	0.729
最近的接触史, n(%)			
外游史	0 (0)	2 (6.7)	1.000
与 COVID19 患者接触	18 (72)	19 (63)	0.448
入院症状, n(%)			
发烧	20 (80)	15 (50)	0.030
失去味觉\嗅觉	4 (16)	4 (13)	
肌痛	5 (20)	1 (3)	0.085
萎靡	3 (12)	7 (23)	0.309

胃肠道症状			
腹泻	6 (24)	5 (17)	0.736
呼吸道症状			
咳嗽	15 (60)	16 (53)	0.721
痰	3 (12)	8 (27)	0.156
咽喉痛	7 (28)	11 (37)	0.440
鼻漏	4 (16)	5 (17)	1.000
气促	4 (16)	3 (10)	0.692
症状基线中位数(IQR)	25 (22-30)	25.5 (22-29)	0.575
COVID-19 的药物, n(%)			
抗生素	4 (16)	6 (20)	0.741
抗病毒药	12 (48)	19 (63)	0.254
地塞米松	4 (16)	5 (17)	1.000
入院时胸部 X 光检查, n(%)			
浸润	10 (40)	13 (43)	1.000
入院时的严重程度, n(%)			
轻度	16 (64)	21 (70)	0.637
中等	8 (32)	8 (27)	0.665
严重	1 (4)	1 (3)	1.000
危急	0 (0)	0 (0)	N/A

IQR: 症状基线中位数

讨论

这项初步研究发现,在住院 COVID-19 的患者中,使用本申请的合生元配方可以减轻胃肠道症状并抑制炎症细胞因子水平。本研究的理论基础是,在 COVID-19 患者中使用合生元组合物可以重新平衡肠道微生物组,从而减轻疾病的严重程度,并改善生活质量。由于在这之前尚未有对 COVID-19 患者进行过有关合生元的抗 SARS-CoV-2 效应的研究,因此相关事前数据有限。

发明人首次发现 COVID-19 患者的肠道缺乏了一系列有益细菌并且在呼吸道清除了 SARS-CoV-2 病毒后,病毒感染和复制的活动在肠道中仍然持续。通过使用大数据分析和机器学习,发明人开发了一种针对肠道微生态失衡的益生菌配方。在合生元组合物组中,益生菌的丰度在第 2 周时显著增加,这证实了益生菌已成功递送至肠道。研究显示 COVID-19 重症患者的免疫反应标志物水平升高,这些标志物包括 IL-6, IL-1RA, IL-18, TNF- α , M-CSF, CXCL10, MCP-1, MIG。发明人发现合生元组合物可以降低上述 8 种免疫反应标志物在第 5 周的血浆样品中的水平。同时,在合生元组合物治疗后第 2 周和第 5 周,

患者的 COVID-19 症状也得到缓解。这些结果提示合生元组合物治疗可能会增强宿主对 SARS-CoV2 的免疫反应，主要表现在能压抑 COVID-19 感染早期升高的细胞因子，这一结果为合生元针对肠道菌群进行靶向治疗提供了依据。发明人的研究提出了合生元有早期免疫干预的作用，为应用合生元组合物提升机体免疫力抗击 COVID-19 和其他新兴病毒感染带来了借鉴和希望。

实施例 4

本实施例为实施例 3 的基础上所进行的延伸研究。发明人从实施例 3 中纳入 25 例服用合生元组合物的 COVID-19 患者和 10 例接受标准治疗的患者，此外发明人另外纳入 69 例接受标准治疗的患者以及 78 例健康人作为对照组。通过元基因组学分析发现，本申请的合生元配方可以让失衡的肠道微生态回复平衡，并达到或接近正常人的水平。

研究方法

受试者招募

发明人从实施例 3 纳入 25 例服用合生元组合物的 COVID-19 患者和 10 例接受标准治疗的患者，此外发明人另外纳入 69 例接受标准治疗的患者。这研究已获得香港中文大学-新界东医院联网临床研究伦理联席委员会（The Joint CUHK-NTEC CREC, CREC Ref. No: 2020.076）的批准，并根据赫尔辛基宣言进行。所有受试者均签署书面知情同意书。这些 COVID-19 患者是在 2020 年 2 月至 2020 年 5 月间，从香港威尔斯亲王医院和联合基督教医院招募。医院工作人员收集了这些患者的鼻咽拭子，并由实验室通过定量逆转录聚合酶链反应（RT-qPCR）确认为 SARS-CoV-2 阳性。发明人还从一项香港人群肠道微生物组调查研究中纳入 78 例健康人作为对照组，这些健康人是通过广告或结肠镜检查试验招募的。

粪便样本收集

按图 4 所描述，发明人在不同时间点（基线、第 2、第 4 和第 5 周）收集了合生元组合物及标准治疗组的受试者的粪便样本。另外，发明人从健康对照组收集了一个时间点的粪便样本。

粪便样本和 DNA 提取

根据制造商的说明，使用 QIAamp DNeasy PowerSoil 试剂盒，Maxwell RSC PureFood GMO 和 Authentication 试剂盒或 QIAamp DNA Stool Mini 试剂盒进行粪便 DNA 提取。使用 NanoDrop 分光光度计和

凝胶电泳来确定 DNA 的质量和数量。

元基因组测序

通过末端修复、纯化和 PCR 扩增的过程构建 DNA 文库。构建完 DNA 文库后，在发明人实验室中的 NextSeq 平台使用 150bp 配对末端测序策略对 DNA 文库进行测序。平均每个样本可获得 12Gb 数据以进行进一步分析。所有实验程序均按照发明人实验室的统一标准。

宏基因组学数据的数据处理和统计分析

使用 Fastp 对元基因组的测序片段进行质量过滤，PolyG 尾部修饰和适配器修饰，并删除了 50 个碱基或以下的测序片段。然后用 KneadData 清除品质修剪后的宏基因组的测序片段中的人类基因，再使用 MetaPhlAn2 分析物种水平的宏基因组，所有非零的水平均会被认为是为正水平。发明人计算了每个物种及其组合的发生率。如同实施例 1 的描述，根据发明人前期的研究成果，将肠道中包括多种拟杆菌及假链状双歧杆菌（*Bifidobacterium pseudocatenulatum*）在内的多种细菌与 COVID-19 病人的疾病严重程度或 SARS-CoV-2 病毒载量呈负相关的物种定义为“理想细菌物种”（相关研究记载于美国临时专利申请 63/016,759 和 63/025,310）。另外，将 COVID-19 病人肠道中相对丰度较高的物种定义为“不理想细菌物种”。使用 R 软件内的 Vegan 包计算 α 生物多样性指数（香农多样性指数，Shannon diversity index）。使用 LEfSe 软件（linear discriminant analysis [LDA] effect size）分析微生物组间差异。LDA 大于 2 且 $p < 0.05$ 的物种被认为组间有显著差异。

结果

与基线比，接受标准治疗的 COVID-19 患者在第 2 周和第 4 周时，本申请的合生元配方中的 3 种双歧杆菌属益生菌的总丰度略有下降；相比之下，在接受合生元组合物的患者中，第 2 周和第 4 周时的 3 种双歧杆菌属益生菌的总丰度则显著增加（图 5）。与基线相比，接受标准治疗的 COVID-19 患者的香农多样性指数在第 2 周、第 4 周和第 5 周显著下降；相比之下，在接受合生元组合物的 COVID-19 患者中，其香农多样性指数则维持在与基线相似的高水平（图 6）。

在接受标准治疗的 COVID-19 患者中，与基线比，第 2 周和第 4 周时的理想细菌物种的总丰富度显著降低；相比之下，在接受合生元组合物的 COVID-19 患者中，与基线比，第 2 周和第 4 周时的理想细菌物种的总丰富度显著增加（图 7 中 A 图）。同时，与基线比，在第 2、第 4 和第 5 周时，接受合生元组合物的 COVID-19 患者中的不理

想细菌物种的总丰富度显著降低,而接受标准治疗的患者则没有降低(图7中B图)。

此外,与接受标准治疗的 COVID-19 患者相比,接受合生元组合物的 COVID-19 患者中包括青春双歧杆菌、直肠真杆菌、瘤胃球菌和长双歧杆菌等理想细菌物种显著较为丰富(图8)。

上文对本申请的各项发明的示例性实施方案进行了描述,但是,在不脱离本申请的实质和范围的情况下,本领域技术人员能够对本申请描述的示例性实施方案进行修改或改进,由此得到的变形方案或等同