



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201016145 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：098131601

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A23L1/30* (2006.01) *A61K35/74* (2006.01)
A61P1/00 (2006.01) *A61P31/00* (2006.01)

(30)優先權：2008/09/19 美國 12/284,208

(71)申請人：美強生營養品公司 (美國) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY (US)
美國

(72)發明人：羅素 威廉 RUSSELL, WILLIAM MICHAEL (US)；西迪亞 麥克 CEDDIA,
MICHAEL (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：14 共 61 頁

(54)名稱

益生菌嬰兒產品

PROBIOTIC INFANT PRODUCTS

(57)摘要

本發明關於一種嬰兒配方或兒童營養產品，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) AH1206。

圖 6A

AH1206

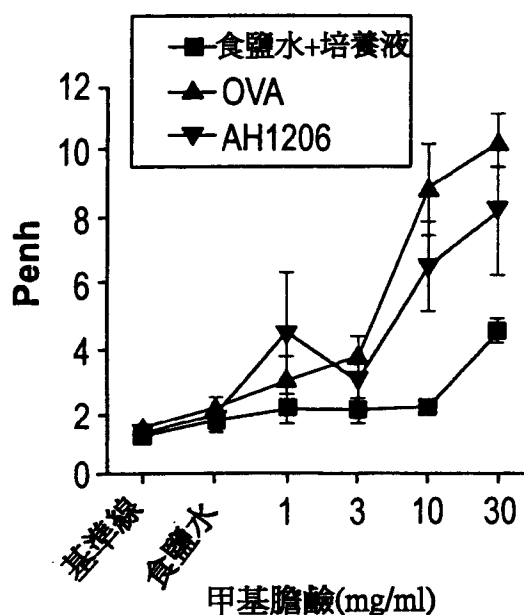
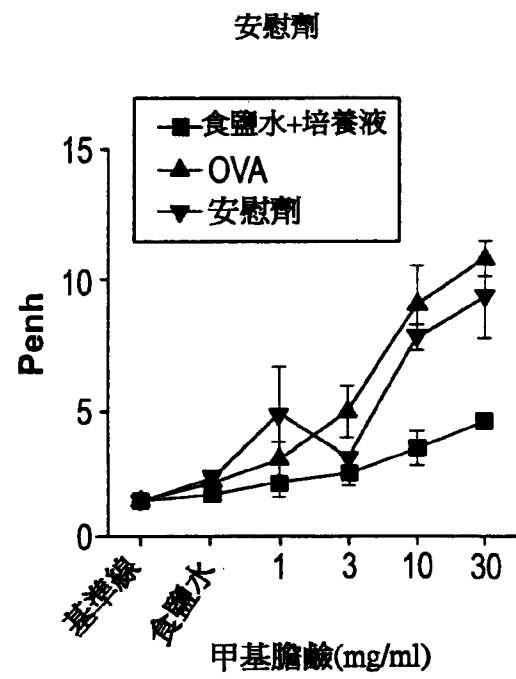


圖 6B





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201016145 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：098131601

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 09 月 18 日

(51)Int. Cl. : *A23L1/30* (2006.01) *A61K35/74* (2006.01)
A61P1/00 (2006.01) *A61P31/00* (2006.01)

(30)優先權：2008/09/19 美國 12/284,208

(71)申請人：美強生營養品公司 (美國) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY (US)
美國

(72)發明人：羅素 威廉 RUSSELL, WILLIAM MICHAEL (US)；西迪亞 麥克 CEDDIA,
MICHAEL (US)

(74)代理人：林志剛

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：14 共 61 頁

(54)名稱

益生菌嬰兒產品

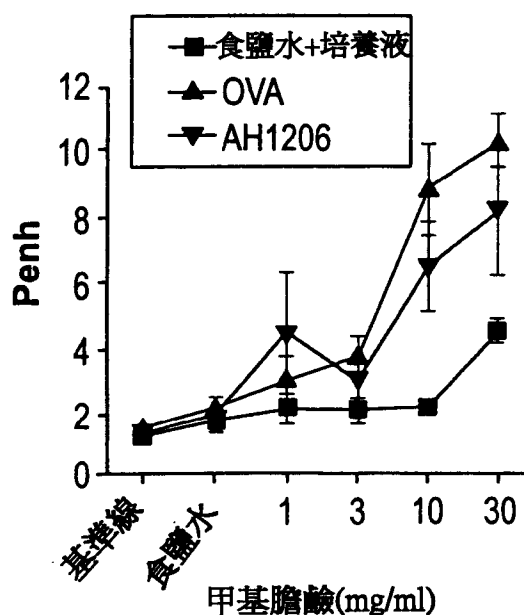
PROBIOTIC INFANT PRODUCTS

(57)摘要

本發明關於一種嬰兒配方或兒童營養產品，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) AH1206。

圖 6A

AH1206



六、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明概括關於益生菌嬰兒配方及兒童營養產品。

簡言之，本發明在具體實例中指向一種嬰兒配方或兒童營養產品，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌 AH1206。

在另一具體實例中，本發明指向一種減少在嬰兒或兒童中發炎之方法，其包含以龍根雙歧桿菌 AH1206 施予嬰兒或兒童。

【先前技術】

如上所述，本發明概括關於益生菌嬰兒配方及兒童營養產品。與益生菌嬰兒配方及兒童營養產品有關的參考資料可包括頒予 Dennen 等人之美國專利第 7,179,460 號及頒予 Luchansky 等人之美國專利第 5,922,375 號。

【發明內容】

爲了更完全瞭解本發明，現參考連同所附圖式的下列敘述。

進行本發明的最佳模式

現將詳細參考陳述於下的一或多個實例的本發明具體實例。每個實例係以解釋本發明的方式提供，而非限制本發明。事實上，那些熟習所屬技藝者明白可在本發明達成

各種修改及變異而不違背本發明的範疇或精神。例如，以一個具體實例的一部分所例證或敘述之特性可用於另一具體實例上，得到又另一具體實例。

因此，意欲以本發明涵蓋此等修改及變異如同落於所附之申請專利範圍及其同等物之範疇內。本發明的其他目的、特性及觀點被揭示於或顯而易見於下列的詳細說明中。一般熟習所屬技藝者應瞭解本發明的討論僅為示例性具體實例的說明而已，而無意限制本發明更寬闊的觀點。

以本發明欲解決的技術問題係提供含有新穎益生菌之嬰兒配方及兒童營養產品。因此，在具體實例中，本發明指向含有龍根雙歧桿菌株 AH1206 之嬰兒配方或兒童營養產品。龍根雙歧桿菌株 AH1206 係在 2006 年 5 月 11 日寄存在 National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) , Scotland, UK 且授予存取編號 NCIMB 41382。NCIMB 為在布達佩斯條約下認可之國際寄存機構。菌株為酸性且耐受於膽汁，並通過胃腸道。在本發明特殊的具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 係從嬰兒糞便分離出來。

在另一具體實例中，嬰兒配方或兒童營養產品含有龍根雙歧桿菌株 AH1206 或其突變體或變異體。突變體可為基因改造突變體。變異體可為雙歧桿菌屬的自然生成之變異體。在一些具體實例中，菌株可為益生菌。在其他的具體實例中，菌株可具有純生物培養菌形式。在又其他具體實例中，菌株為分離菌株。

如本文所使用之術語“突變體”、“變異體”及“基因改造突變體”包括其基因及／或表現型性質與母株相比有變更之雙歧桿菌株。龍根雙歧桿菌的自然生成之變異體包括經選擇分離靶定性質的自發變更。蓄意的母株性質變更係以習知（試管內）的基因操控技術完成，諸如基因分裂及接合轉移。

基因改造包括外源及／或內源 DNA 序列引入雙歧桿菌株之基因組中，例如藉由載體（包括細胞質體 DNA 或噬菌體）嵌入細菌株之基因組中。自然或誘發突變包括至少單鹼基變更，諸如脫失、嵌入、異位或其他的 DNA 改造，其可造成以 DNA 序列編碼之胺基酸序列的變更。

術語“突變體”、“變異體”及“基因改造突變體”亦包括經歷與所有微生物自然一致的速度累積在基因組中的基因變更及／或經由自發突變及／或基因取得及／或基因損失發生的基因變更的雙歧桿菌株，其不經由蓄意（試管內）的基因組操控而達成，但是經由變異體及／或突變體的自然選擇而達成，在暴露於環境壓力時（諸如抗生素），其提供選擇優勢以支持細菌存活。突變體可藉由蓄意（試管內）的特異性基因嵌入基因組中而產生，該嵌入根本上不變更生物的生化功能性，但是其產品可用於細菌的鑑定或選擇，例如抗生素抗性。

熟習所屬技藝者理解雙歧桿菌的突變體或變異體菌株可藉由與母株的 DNA 序列同源性分析予以鑑定。具有與母株接近的序列一致性的雙歧桿菌株被認為是突變體或變

異體菌株。與母體 DNA 序列具有 96% 或更高，諸如 97% 或更高，或 98% 或更高，或 99% 或更高之序列一致性（同源性）的雙歧桿菌株可被認為是突變體或變異體。序列同源性可使用在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 公開取得的線上型同源性演算法“BLAST”程式測定。

母株的突變體亦包括具有與母株的 16s-23s 基因間分隔區多核苷酸序列至少 85% 之序列同源性，諸如至少 90% 之序列同源性，或至少 95% 之序列同源性的衍生性雙歧桿菌株。這些突變體可進一步包含在細菌基因組中的其他 DNA 序列中的 DNA 突變。

在本發明的一個具體實例中，雙歧桿菌株具有活菌細胞形式。或者，雙歧桿菌株具有失活細胞形式。術語“失活”意謂菌株之代謝活性或複製能力已被降低或破壞。失活可經由所屬技藝中目前已知或尚未發展的任何方法發生。失活可例如經由熱處理、冷凍、紫外線、 γ 輻射、壓力、化學分裂、機械分裂或 pH 變化來完成。例如，益生菌可經由貯存在 80°C 到 100°C 之範圍內 10 分鐘的熱處理而失活。益生菌亦可經由在與 30 瓦 UVC 燈距離 5 公分處照射 5 分鐘的紫外線而失活。或者，益生菌可經由在距離 20 公分處使用鈷-60 源以 2 kg-Gray (kGy) 照射的 γ 輻射而失活。如本文所使用之術語“失活”與“非活菌”為同義字。

在具體實例中，可將龍根雙歧桿菌株 AH1206 補充到兒童或嬰兒配方中。術語“嬰兒”意謂少於約 1 歲之新生

人類。術語“兒童”意謂在約 1 到 12 歲之年齡範圍內的人類。在某些具體實例中，兒童係在約 1 到 6 歲之年齡範圍內。在其他的具體實例中，兒童係在約 7 到 12 歲之年齡範圍內。

補充到本發明配方中的龍根雙歧桿菌 AH1206 量可相當於每公克配方約 1×10^4 到約 1×10^{12} 群落形成單位 (cfu) 之範圍。在另一具體實例中，補充到本發明配方中的量可相當於每公克配方約 1×10^6 到約 1×10^9 cfu 之範圍。在另一具體實例中，補充到本發明配方中的量可相當於每公克配方約 1×10^9 到約 1×10^{12} cfu 之範圍。在另一具體實例中，補充到本發明配方中的量可相當於每公克配方至少約 1×10^6 cfu。

在本發明中的龍根雙歧桿菌 AH1206 施予形式不重要，只要以有效量施予兒童或嬰兒。在一些具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 係經由片劑、丸劑、包封劑、糖衣錠、膠囊錠、膠囊、油滴劑、囊袋、液體、液體濃縮劑、粉劑、酏劑、溶液、懸浮液、乳液、錠劑、珠粒及其組合物施予兒童或嬰兒。在另一具體實例中，將龍根雙歧桿菌 AH1206 包封在糖、脂肪或多醣中。在又另一具體實例中，將龍根雙歧桿菌 AH1206 加到食物或飲食產品中且吸收。食物或飲食產品可為營養補充品或兒童營養產品，諸如較大嬰兒配方、成長奶粉、飲料、牛奶、優格、果汁、水果為主之飲品、咀嚼錠、餅乾、薄脆餅乾或奶粉。

在其他的具體實例中，產品可為嬰兒營養產品，諸如

嬰兒配方或人乳補強劑。如本文所使用之「嬰兒配方」意謂以人乳替代品滿足嬰兒的營養需求之組成物。術語「人乳補強劑」意謂可加到人乳中以增強人乳的營養價值之組成物。在一些具體實例中，組成物為酸化產品（如某些醫學食物規定所要求）。

營養產品可為用於足月嬰兒、足月前嬰兒、低出生體重兒或非常低出生體重兒之產品。如本文所使用之術語「足月前」或「足月前嬰兒」可包括低出生體重兒或非常低出生體重兒。低出生體重兒為那些從約 32 到約 37 週懷孕期出生或在出生時重量從 3.25 到約 5.5 磅之嬰兒。非常低出生體重兒為那些約 32 週懷孕期之前出生或在出生時重量少於約 3.25 磅之嬰兒。因此，足月前嬰兒可包括在約 37 週懷孕期之前出生之嬰兒及／或那些在出生時重量少於約 5.5 磅之嬰兒。

在某些具體實例中，配方可經腸或非經腸施予。如本文所使用之「經腸」意謂經過或在胃腸道或消化道內，而「經腸施予」包括經口餵進、經胃內餵食、經幽門施予或任何其他引入消化道中的方式。術語「非經腸」意謂以除了經過消化道以外的方式進入體內或施予，諸如以靜脈內或肌肉內注射。

本發明配方可提供最少、部分或全部的營養支持。組成物可為營養補充品或代餐。在一些具體實例中，組成物可連同食物或營養組成物施予。在此具體實例中，組成物可在由受驗者消化之前與食物或營養組成物混合或可在食

物或營養組成物消化之前或之後施予受驗者。組成物可施予接受嬰兒配方、母乳、人乳補強劑或其組合物之足月前嬰兒。組成物可為但非必要為全營養。以術語“全營養”意謂組成物含有維持長期健康的人類生命之適當營養。

在一些具體實例中，本發明可包含由懷孕婦女吸收的產前膳食補充品，藉此提供龍根雙歧桿菌 AH1206 予子宮中的胎兒。在其他的具體實例中，本發明可包含由餵乳母親吸收的產後膳食補充品，藉此經由母乳提供龍根雙歧桿菌 AH1206 予產後嬰兒。

若龍根雙歧桿菌 AH1206 係經由嬰兒配方或兒童營養產品施予時，則配方可為全營養且含有適合的脂質、碳水化合物、蛋白質、維生素及礦物質類型及量。脂質或脂肪量典型地可從約 3 改變到約 7 公克/100 千卡。脂質源可為所屬技藝中已知或使用的任何來源，例如乳脂、蛋黃脂質、魚油、植物油（諸如棕櫚油、大豆油、軟質棕櫚油、棕櫚油、棕櫚仁油、椰子油、中鏈三酸甘油酯、高油酸葵花油、橄欖油、高油酸紅花子油）及脂肪酸酯。

蛋白質量典型地可從約 1 改變到約 5 公克/100 千卡。蛋白質源可為所屬技藝中已知或使用的任何來源，例如牛奶蛋白質、脫脂奶粉固體、脫脂牛奶、乳清蛋白質、酪蛋白、大豆蛋白質、動物蛋白質、穀類蛋白質、植物蛋白質或其組合物。配方可含有富含蛋白質及／或肽之麩醯胺酸/麩胺酸酯。蛋白質源可為完整、部分水解或完全水解蛋白質。在一些具體實例中，蛋白質源可為完整蛋白質與水

解蛋白質之組合物。蛋白質源可為分離物或濃縮物。

在某些具體實例中，本發明組成物可含有氮源（亦即胺基酸及／或蛋白質），使得胺基酸或蛋白質總量可從約 1 公克/100 千卡到約 10 公克/100 千卡總組成物，在一些具體實例中約 2 公克/100 千卡到約 6 公克/100 千卡。每 100 千卡總組成物的脂質源量可大於 0 公克到至多約 6 公克，在一些具體實例中約 0.5 公克到約 5.5 公克，而在其他的具體實例中約 2 公克到約 5.5 公克；每 100 千卡總組成物的非纖維碳水化合物源量可為約 5 公克到約 20 公克，而在一些具體實例中可為約 7.5 公克到約 15 公克。在全營養組成物中的維生素與礦物質可足以符合約 500 到約 3,000 千卡的 100% 之美國每日建議攝取量（RDI），在一些具體實例中約 1,000 到約 3,000 千卡。在特殊的具體實例中，組成物可不含蛋白質。在此一具體實例中，組成物可含有包含 100% 之無脂肪酸的蛋白質同效物源。

碳水化合物量典型地可從約 8 改變到約 12 公克/100 千卡。碳水化合物源可為所屬技藝中已知或使用的任何來源，例如乳糖、果糖、葡萄糖、玉米糖漿、玉米糖漿固體、麥芽糊精、蔗糖、澱粉、米糖漿固體、米澱粉、改造玉米澱粉、改造樹薯澱粉、米粉、大豆粉及其組合物。配方可包括佐劑、細菌組份、藥物實體或生物化合物中任何一或多者。

習知且市售可取得的嬰兒配方及其他配方可用於本發明的實際應用中。例如，Enfamil®、Enfamil®早產兒配方

、含鐵 Enfamil®、Lactofree®、Nutramigen®、Pregestimil® 及 ProSobee® (可取自 Mead Johnson & Company, Evansville, IN. U.S.A.) 可以適合的龍根雙歧桿菌 AH1206 水平補充且用於本發明的實際應用中。

本發明配方可隨意地包括下列維生素或其衍生物中之一或多者，包括（但不限於此）生物素、維生素 B₁、噻胺、噻胺焦磷酸鹽、維生素 B₂、核黃素、黃素單核苷酸、黃素腺嘌呤二核苷酸、吡哆醇鹽酸鹽、噻胺單硝酸鹽、葉酸、維生素 B₃、菸鹼、菸鹼酸、菸鹼醯胺 (nicotinamide、niacinamide)、菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸、色胺酸、生物素、泛酸、維生素 B₆、維生素 B₁₂、鈷胺素、甲基鈷胺素、脫氧腺嘌呤鈷胺素、氰基鈷胺素、泛酸鈣、泛酸、維生素 C、抗壞血酸、維生素 A、視網醇、視網醛、視網酸、 β -胡蘿蔔素、維生素 D、維生素 D₃、促鈣醇、膽促鈣醇、二羥基維生素 D、1,25-二羥基膽促鈣醇、7-脫氫膽固醇、膽鹼、維生素 E、維生素 E 乙酸鹽、維生素 K、甲萘醌、甲基萘醌類、葉綠醌、萘酚醌及其混合物。

本發明配方可隨意地包括下列礦物質或其衍生物中之一或多者，包括（但不限於此）磷、鉀、硫、鈉、多庫酸鈉 (docusate sodium)、氯化物、錳、鎂、硬脂酸鎂、碳酸鎂、氧化鎂、氫氧化鎂、硫酸鎂、銅、硫酸銅、碘化物、硼、鋅、氧化鋅、鉻、鉬、鐵、羰基鐵、三價鐵、富馬酸鐵、多醣鐵、氟化物、硒、鉬、磷酸鈣或乙酸鈣、磷酸鉀、硫酸鎂或氧化鎂、氯化鈉、氯化鉀或乙酸鉀、正磷酸

鐵、乙酸 α -生育酚酯、硫酸鋅或氧化鋅、葡萄糖酸銅、氯化鉻或 2-吡啶甲酸鉻、碘化鉀、硒酸鈉、鉬酸鈉、葉綠醌、氰基鈷胺素、亞硒酸鈉、硫酸銅、肌醇、碘化鉀、鈷及其混合物。礦物質化合物的非限制性示例衍生物包括任何礦物質化合物的鹽類、鹼鹽類、酯類及螯合物。

本發明組成物亦可含有乳化劑及穩定劑，諸如大豆卵磷脂、角叉菜膠及其組合物。本發明組成物可隨意地含有可具有益效果之其他物質，諸如乳鐵素、核苷酸、核苷、免疫球蛋白及其組合物。

在本發明的一個具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 可與一或多種益生菌組合施予。術語“益生菌”意謂致力於宿主健康的有益效果之微生物。所屬技藝中已知的任何益生菌可為此具體實例中所接受，其先決條件係達成意欲的結果。在特殊的具體實例中，益生菌可選自鼠李醣乳酸桿菌 GG (LGG)、龍根雙歧桿菌物種及亞乳酸動物雙歧桿菌 BB-12。在具體實例中，額外的益生菌可為活菌或非活菌。

在本發明的另一具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 可與一或多種益菌生組合施予。術語“益菌生” (prebiotic) 意謂刺激益生菌生長及／或活性的不可消化之食物成分。所屬技藝中已知的任何益菌生可為此具體實例中所接受，其先決條件係達成意欲的結果。有用於本發明的益菌生可包括寡醣、多醣及含有果糖、木糖、大豆、半乳糖、葡萄糖及甘露糖的其他益菌生。更特定言之，有用

於本發明的益菌生可包括乳酮糖、葡萄糖寡糖（gluco-oligosaccharide）、菊糖、聚葡萄糖（polydextrose）、半乳寡糖（galacto-oligosaccharide）、果寡糖（fructo-oligosaccharide）、異麥芽寡糖（isomalto-oligosaccharide）、大豆寡糖、乳果寡糖（lactosucrose）、木寡糖（xylo-oligosaccharide）及龍膽寡糖（gentio-oligosaccharide）。

在本發明的又另一具體實例中，配方可含有其他的活性劑，諸如長鏈聚不飽和脂肪酸（LCPUFA）。適合的LCPUFA包括（但不限於此） α -亞麻油酸、 γ -亞麻油酸、亞麻油酸、次亞麻油酸、二十碳五烯酸（EPA）、花生四烯酸（ARA）及／或二十二碳六烯酸（DHA）。在具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 與 DHA 組合施予。在另一具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 與 ARA 組合施予。在又另一具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 與 DHA 及 ARA 二者組合施予。含有 DHA、ARA 或其組合物的市售可取得的嬰兒配方可以龍根雙歧桿菌 AH1206 補充且用於本發明中。例如，含有效水平之 DHA 及 ARA 之 Enfamil®LIPIL®係市售可取得，並可以龍根雙歧桿菌 AH1206 補充且用於本發明中。

在一個具體實例中，DHA 及 ARA 二者係與龍根雙歧桿菌 AH1206 組合施予。在此具體實例中，ARA：DHA 之重量比可從約 1：3 到約 9：1。在本發明的一個具體實例中，此比為從約 1：2 到約 4：1。在又另一具體實例中，

此比為從約 2 : 3 到約 2 : 1。在一個特殊的具體實例中，此比為約 2 : 1。在本發明另一特殊的具體實例中，此比為約 1 : 1.5。在其他的具體實例中，此比為約 1 : 1.3。在又其他的具體實例中，此比為約 1 : 1.9。在特殊的具體實例中，此比為約 1.5 : 1。在進一步的具體實例中，此比為約 1.47 : 1。

在本發明的某些具體實例中，DHA 水平係在以重量計約 0.0% 到 1.00% 之脂肪酸範圍內。DHA 水平可為約 0.32 重量%。在一些具體實例中，DHA 水平可為約 0.33 重量%。在另一具體實例中，DHA 水平可為約 0.64 重量%。在另一具體實例中，DHA 水平可為約 0.67 重量%。在又另一具體實例中，DHA 水平可為約 0.96 重量%。在進一步的具體實例中，DHA 水平可為約 1.00 重量%。

在本發明的具體實例中，ARA 水平係在以重量計 0.0% 到 0.67% 之脂肪酸範圍內。在另一具體實例中，ARA 水平可為約 0.67 重量%。在另一具體實例中，ARA 水平可為約 0.5 重量%。在又另一具體實例中，ARA 水平可在以重量計約 0.47% 到 0.48% 之範圍內。

若包括 DHA，則在本發明的具體實例中的 DHA 有效量典型地以每天每公斤體重計從約 3 毫克到以每天每公斤體重計約 150 毫克。在本發明的一個具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 6 毫克到以每天每公斤體重計約 100 毫克。在另一具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 10 毫克到以每天每公斤體重計約 60 毫克。在又另

一具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 15 毫克到以每天每公斤體重計約 30 毫克。

若包括 ARA，則在本發明的具體實例中的 ARA 有效量典型地以每天每公斤體重計從約 5 毫克到以每天每公斤體重計約 150 毫克。在本發明的一個具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 10 毫克改變到以每天每公斤體重計約 120 毫克。在另一具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 15 毫克改變到以每天每公斤體重計約 90 毫克。在又另一具體實例中，此量係以每天每公斤體重計從約 20 毫克改變到以每天每公斤體重計約 60 毫克。

若使用嬰兒配方，則在嬰兒配方中的 DHA 量可從約 5 毫克/100 千卡改變到約 80 毫克/100 千卡。在本發明的一個具體實例中，DHA 量係從約 10 毫克/100 千卡改變到約 50 毫克/100 千卡；而在另一具體實例中從約 15 毫克/100 千卡改變到約 20 毫克/100 千卡。在本發明的特殊具體實例中，DHA 量為約 17 毫克/100 千卡。

若使用嬰兒配方，則在嬰兒配方中的 ARA 量可從約 10 毫克/100 千卡改變到約 100 毫克/100 千卡。在本發明的一個具體實例中，ARA 量係從約 15 毫克/100 千卡改變到約 70 毫克/100 千卡。在另一具體實例中，ARA 量係從約 20 毫克/100 千卡改變到約 40 毫克/100 千卡。在本發明的特殊具體實例中，ARA 量為約 34 毫克/100 千卡。

若使用嬰兒配方，則嬰兒配方可使用所屬技藝中已知的標準技術以含有 DHA 及 ARA 之油補充。例如，DHA 及

ARA 可藉由取代正常存在於配方中的等量油（諸如高油酸葵花油）而加到配方中。含有 DHA 及 ARA 之油可藉由取代正常存在於沒有 DHA 及 ARA 之配方中的等量其餘總脂肪摻合物而加到配方中，作為另一實例。

若使用 DHA 及 ARA，則 DHA 及 ARA 源可為所屬技藝中已知的任何來源，諸如水產動物油、魚油、單細胞油、蛋黃脂質及腦脂質。在一些具體實例中，DHA 及 ARA 源自於單細胞 Martek 油、DHASCO®或其變異體。DHA 及 ARA 可具有自然形式，其先決條件係 LCPUFA 源的剩餘部分不對嬰兒造成任何實質有害的效果。或者，DHA 及 ARA 可以精製形式使用。

在本發明的具體實例中，DHA 及 ARA 源可為單細胞油，如在美國專利第 5,374,567 號、第 5,550,156 號及第 5,397,591 號中所教示，將其完整的揭示內容併入本文以供參考。然而，本發明不限於此等油而已。

在一個具體實例中，將含有 EPA 之 LCPUFA 源與龍根雙歧桿菌 AH1206 組合使用。在另一具體實例中，將實質上不含 EPA 之 LCPUFA 源與龍根雙歧桿菌 AH1206 組合使用。例如，在本發明的一個具體實例中，含有少於約 16 毫克 EPA/100 千卡之嬰兒配方以龍根雙歧桿菌 AH1206 補充且用於本發明的方法中。在另一具體實例中，含有少於約 10 毫克 EPA/100 千卡之嬰兒配方以龍根雙歧桿菌 AH1206 補充且用於本發明的方法中。在又另一具體實例中，含有少於約 5 毫克 EPA/100 千卡之嬰兒配方以龍根雙

歧桿菌 AH1206 補充且用於本發明的方法中。本發明的另一具體實例包括以龍根雙歧桿菌 AH1206 補充不含甚至微量 EPA 之嬰兒配方。

應理解龍根雙歧桿菌 AH1206 與益生菌、益菌生、LCPUFA 或其他活性成分之組合可以單一配方或在相同或不同時間施予且使用相同或不同的施予途徑之單獨配方施予。

在本發明的一個具體實例中，可將配方用於免疫及疫苗接種流程中。使用益生菌作為載體的經口免疫作用不僅會保護宿主免於感染，並可取代正常會誘出病原體的免疫刺激，因此有助於宿主的免疫訓練。

在本發明的具體實例中，配方有用於治療、減少及／或預防發炎。如本文所使用之術語“治療”意謂改良、改善或醫治疾病、病症或疾病或症狀之徵候。術語“減少”意謂縮小範圍、量或程度。術語“預防”意謂經由一些作用停止或阻礙疾病、病症或疾病或症狀之徵候。

在特殊的具體實例中，本發明包含龍根雙歧桿菌 AH1206 供製造用於減少或預防在嬰兒或兒童中的發炎之組成物的用途。實例 2-6 各指出施予龍根雙歧桿菌 AH1206 可減少或預防在嬰兒或兒童中的發炎。可減少或預防在胃腸道、呼吸道中的發炎，或可減少全身性發炎。減少或預防發炎可改善過敏或氣喘。

在此具體實例中，發炎可為呼吸系發炎，諸如氣喘、過敏性鼻炎、鼻竇炎、氣道組織發炎、上呼吸系感染、流

行性感冒、喉炎、呼吸系融合細胞病毒、支氣管炎、細支氣管炎、肺炎或氣道內腔發炎。同樣地，發炎可為胃腸道發炎，諸如腹瀉、發炎性腸道疾病、克隆氏（Crohn's）病、腸結腸炎、潰瘍性結腸炎、過敏性結腸炎、刺激性腸症候群、囊炎、感染後結腸炎、艱難梭菌引起的腹瀉、輪狀病毒引起的腹瀉或感染後腹瀉，或由於感染劑（諸如大腸桿菌）的腹瀉病。在其他的具體實例中，發炎可為全身性，諸如類風濕性關節炎。如本文所使用之術語“全身性”意謂關於或影響全身。

在一些具體實例中，減少或預防發炎可改善或預防異位性症狀或疾病。例如，減少或預防發炎可改善或預防異位性皮膚炎。在特殊的具體實例中，減少或預防發炎可改善或預防常見的嬰兒或兒童病。例如，減少或預防發炎可改善或預防腹瀉或急性中耳炎。在又另一具體實例中，減少或預防發炎可改善或預防食物過敏。

威信龍根雙歧桿菌 AH1206 係藉由拮抗及排除胃腸道或發炎位置的發炎微生物而起作用。亦威信龍根雙歧桿菌 AH1206 係藉由減少前發炎細胞介素（cytokine）水平而起作用。

在特殊的具體實例中，菌株可修改在受驗者中的 IL-10 水平。IL-10 係由 T 細胞、B 細胞、單核細胞或巨噬細胞所產生。此細胞介素擴大 B 細胞增生及分化成抗體分泌細胞。IL-10 主要展現抗發炎活性。其向上調節以單核細胞的 IL-1RA 表現且抑制大部分的單核細胞發炎活性。IL-

10 係經由反饋機制來抑制細胞介素的單核細胞生成、反應性氧與氮中間物、主要組織相容性複合物（MHC）類別 II 表現、捕殺寄生蟲及 IL-10 生成。亦經證明此細胞介素係藉由干擾前列腺素 E2-環腺苷單磷酸（PGE₂-cAMP）依賴途徑來阻斷腸內膠原酶及第 IV 型膠原酶的單核細胞生成，而因此可為慢性發炎疾病中所見之結締組織破壞的重要調節劑。因此，在具體實例中，在攝取此菌株之嬰兒或兒童中菌株可向上調節或誘發分泌的 IL-10 水平。

在其他的具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 向下調節或降低 TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-5 及／或 IFN- γ 或其他前發炎細胞介素或趨化素的分泌。TNF- α （前發炎細胞介素）引發梯瀑式（cascade）細胞介素及生物效應，造成發炎狀態。在一些具體實例中，T 調節細胞的百分比可因龍根雙歧桿菌 AH1206 施予而增加。在其他的具體實例中，施予龍根雙歧桿菌 AH1206 抑制 OVA-特異性 IgE 反應的誘發作用。

在一些具體實例中，本發明配方有用於保持免疫系統的恆定性。在其他的具體實例中，本發明配方有用於改善或增強受驗者中的免疫性。

在一些具體實例中，增強免疫性或抑制發炎可包括刺激腸道健全；減少腸道滲透性；改善黏液素合成、分泌及／或品質；改善腸道上皮的成熟及分化；改善營養吸收；增加轉移抗微生物活性的可溶性因子的生成；刺激、改善或支持抗感染性；支持對抗病毒或細菌感染的細胞或體液

反應；增加細胞毒性（抗病毒及抗腫瘤二者）；支持全身性及／或黏膜疫苗接種反應；增加或支持細胞及／或體液免疫性；增加或支持自然免疫性（包括嗜中性球、吞噬細胞、巨噬細胞及自然殺手細胞活性）；增加或支持適應的 T 及 B 細胞免疫性；刺激輔助 T 細胞 1（Th1）細胞介素模式（增加 IL-1、IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α 、人類白血球抗原-Dr（HLA-Dr）表現）；抑制發炎或全身性及黏膜發炎介導體（包括細胞介素及／或趨化素）的生成；藉由減少總 IgE 及／或過敏原特異性 IgE 而減少致敏作用；減少過敏性細胞介素的生成；減少 Th2 支持之免疫球蛋白輪廓；及其組合。

於多種腫瘤類型中多功能細胞介素的生成暗示在患有癌症的病患中有明顯的發炎反應進行。因此，在本發明的具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 可有用於治療癌症徵候。由於龍根雙歧桿菌 AH1206 的抗發炎性質，此細菌株可減少惡性細胞轉變的速度。此外，腸道細菌可從膳食化合物、具有基因毒性、致癌性及促腫瘤活性之物質產生，且腸道細菌可活化前致癌物成為 DNA 反應劑。通常，雙歧桿菌屬物種具有比腸道內的其他族群（諸如擬桿菌、真細菌及梭菌）低的異型生物質代謝酵素活性。因此，增加腸道內的雙歧桿菌屬細菌數量可有益於修改這些酵素水平。

在特殊的具體實例中，龍根雙歧桿菌 AH1206 可與抗發炎療法（諸如非類固醇抗發炎藥物（NSAID）或因福利

美 (infliximab)) 組合施予。

嬰兒腸道微生物叢在出生後前幾週內快速建立。此腸道菌落的本性最初係由早期暴露的微生物環境源與嬰兒健康來決定。經由剖腹產出生之嬰兒、足月前嬰兒或其生命最初期於無菌保溫箱中度過的其他嬰兒及／或在生命早期施予抗生素之嬰兒可能在健康的腸道微生物叢發展有顯著的遲緩。因為這些嬰兒沒有機會從其母親或環境取得健康的腸道微生物叢，所以龍根雙歧桿菌 AH1206 的吸收可有助益於腸道免疫系統的適當發展及功能。

在本發明的一些具體實例中，嬰兒或兒童需要治療、減少或預防發炎。受驗者由於遺傳傾向、膳食、生活方式、疾病或病症而具有發炎風險。例如，足月前嬰兒或免疫抑制之嬰而可具有發炎風險，而因此可能需要此等治療、減少或預防。

可將本發明組成物包裝在所屬技藝中已知用於貯存營養產品的任何類型容器中，諸如玻璃、加襯紙板、塑膠及塗佈之金屬罐。在一些具體實例中，組成物係經由吹-填-封包裝技術包裝。在其他的具體實例中，組成物係經提供於單一劑量容器中。組成物的包裝係在滅菌條件下進行。在一些具體實例中，組成物係經製備使得可接受其經由鼻胃管、鼻十二指腸管或鼻空腸管而直接輸送給足月前嬰兒。

本發明組成物可具有貨架上保存穩定性。“貨架上保存穩定性”意謂具有可輕易吸收形式的組成物維持單一均

勻相（亦即在以目視檢查時未分離成一相以上），及／或在冰箱中貯存隔夜之後以目視檢查時未發生沉降。

下列的實例敘述本發明的各種具體實例。在本文申請專利範圍內的其他具體實例可從思考如本文所揭示之本發明說明書或實際應用而為熟習所屬技藝者明白。意欲以說明書與實例一起被認為是示例而已，本發明的範疇及精神係由實例之後的申請專利範圍指定。在實例中，所有的百分比係以重量為基準提供，除非另有指示。

【實施方式】

實例 1

此實例例證從嬰兒糞便分離的細菌特徵。

益生菌的分離

新鮮糞便係從餵母乳的 2 天大男嬰獲得且將稀釋液系列覆蓋在補給 0.05% 半胱胺酸及莫匹羅星（mupirocin）的 TPY（胰化蛋白、胰及酵母萃取液）及 MRS（deMann、Rogosa 及 Sharpe）培養基上。將平盤在厭氧瓶（BBL, Oxoid）中使用 CO₂ 產生套組（Anaerocult A, Merck）於 37°C 下培育 2-5 天。革蘭氏（Gram）陽性、催化酶陰性棒狀或分叉/多形細菌分離物畫線純化培養在複合式非選擇性培養基（MRS 及 TPY）上。分離物按慣例在 37°C 及厭氧條件下栽培在 MRS 或 TPY 培養基中，除非另有陳述。將預定之雙歧桿菌屬貯存在 40% 甘油中且貯存在 -20°C 及 -

80℃ 下。

在分離出經指定命名為 AH1206 的純雙歧桿菌株之後，評定微生物特徵且總結於下列表 1。AH1206 為革蘭氏陽性、催化酶陰性多形狀細菌屬，其為確認其身分為雙歧桿菌屬之果糖-6-磷酸磷酸酮酶陽性菌。使用其中嵌入單一碳源之基礎培養基，AH1206 能夠生長在所有測試之碳源上（葡萄糖、乳糖、核糖、阿拉伯糖、半乳糖、棉子糖、果糖、麥芽萃取物、甘露糖、麥芽糖、蔗糖）。

表 1. 龍根雙歧桿菌 AH1206 之物理化學特徵

菌株特徵	龍根雙歧桿菌 AH1206
革蘭氏菌株	+
催化酶	-
運動性	-
F6PPK*	+
牛奶凝固作用	+
45℃ 之厭氧培養物	-
45℃ 之需氧培養物	-
碳水化合物發酵作用	
葡萄糖	+
乳糖	+
核糖	+
阿拉伯糖	+
半乳糖	+
棉子糖	+
果糖	+
麥芽萃取物	+
甘露糖	+
麥芽糖	+
蔗糖	+

*表示果糖-6-磷酸磷酸酮酶檢定法

物種鑑定

16s 基因間分隔區 (IGS) 定序係經執行以鑑定分離之雙歧桿菌物種。簡言之，DNA 係使用 100 微升萃取溶液及 25 微升組織製備溶液 (Sigma, XNAT2 套組) 而從 AH1206 分離出來。將樣品在 95°C 下培育 5 分鐘及接著加入 100 微升中和溶液 (XNAT2 套組)。基因組 DNA 溶液係使用微量分光光度計定量且貯存在 4°C 下。PCR 係使用 IGS 引子，IGS L:5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' (序列識別號 3) (其係以序列識別號 1 為基準) 及 IGS R:5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (序列識別號 4) (其係以序列識別號 2 為基準) 執行。循環條件為 94°C 經 3 分鐘 (1 次循環)、94°C 經 30 秒、53°C 經 30 秒、72°C 經 30 秒 (28 次循環)。PCR 反應含有 4 微升 (50 毫微克) DNA、PCR 混合物 (XNAT2 套組)、0.4 μ M IGS L 與 R 引子 (MWG Biotech, Germany)。PCR 反應係在 Eppendorf 聚合酶連鎖反應器上執行。PCR 產物 (10 微升) 係在 TAE 中以 2% 洋菜糖 EtBr 染色之凝膠上沿著分子量標記物 (100bp Ladder, Roche) 運轉，以測定 IGS 輪廓。雙歧桿菌屬之 PCR 產物 (單譜帶) 係使用 Promega Wizard PCR 純化套組純化。純化之 PCR 產物係使用基因間分隔區之引子序列 (如上) 定序。接著比對美國國家生物科技資訊中心 (NCBI) 核苷酸資料庫搜尋序列數據，以核苷酸同源性決定菌株身分。所得 DNA 序列數據呈交於 NCBI 標準核苷酸

對核苷酸同源性 BLAST 搜尋引擎 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。鑑定最接近相配的序列，並接著使用 DNASTAR MegAlign 軟體供比較排列出序列。可在序列表中查看所獲得的序列，其中序列識別號 1 為 IGS 正向序列及序列識別號 2 為 IGS 反向序列。搜尋 NCIMB 資料庫揭露 AH1206 具有其最接近於龍根雙歧桿菌之序列同源性的獨特 IGS 序列。於此呈交表 3 的序列表之影本及電腦可讀格式且以其完整內容併入本文以供參考。在磁片上的電腦可讀格式命名為 AH1206_ST25.txt, Size: 2KB, 2008 年 9 月 12 日創建。

為了發展 AH1206 之條碼 PCR 輪廓，故使用 BOX 引子執行 PCR。循環條件為 94℃ 經 7 分鐘（1 次循環）、94℃ 經 1 分鐘、65℃ 經 8 分鐘（30 次循環）及 65℃ 經 16 分鐘。PCR 反應含有 50 毫微克 DNA、PCR 混合物（XNAT2 套組）及 0.3 μ M BOXA1R 引子（5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'）（序列識別號 5）（MWG Biotech, Germany）。PCR 反應係在 Eppendorf 聚合酶連鎖反應器上執行。PCR 產物（1 微升）係使用 DNA 7500 LabChip® 在 Agilent 2100 生物分析儀上沿著分子量標記物（DNA 7500 ladder, Agilent Germany）運轉。條碼（PCR 產物輪廓）係使用鑑定波峰數量（PCR 產物）及尺寸的 Agilent 生物分析儀軟體測定（圖 1）。

抗生素敏感性輪廓

龍根雙歧桿菌株的抗生素敏感性輪廓係使用“紙錠藥物敏感性”檢定法測定。將培養物在適當的培養液培養基中生長 24-48 小時，塗抹（100 微升）於洋菜培養基上及將含有已知濃度的抗生素紙錠藥物放在洋菜上。在 37℃ 及厭氧條件下培育 1-2 天之後檢查菌株的抗生素敏感性。若察看到 1 毫米或更大的抑制區帶時，則認為是敏感的菌株。獨立評定每個抗生素的最小抑制濃度（MIC）。氯潔黴素（clindamycin）、萬古黴素（vancomycin）及咪唑尼達（metronidazole）之 MIC 分別為 0.32、0.75 及 0.38。

腸道通過率

為了測定龍根雙歧桿菌是否可存活於與那些在胃中所發現相同的低 pH 值下，細菌細胞係穫自新鮮的隔夜培養物，以磷酸鹽緩衝液（pH 6.5）清洗兩次及懸浮在調整到 pH 2.5（以 1M HCl）之 TPY 培養液中。將細胞在 37℃ 下培育，並使用平盤計數法在 5、30、60 及 120 分鐘間隔測量存活率。AH1206 在 pH 2.5 下成功地存活 5 分鐘，但是在 30 分鐘之後沒有回收到任何活菌細胞。

存在於胃中時，將推定的抗生素暴露於小腸中的膽鹽中。為了測定雙歧桿菌存活暴露於膽汁中的能力，故將培養物畫線培養在以 0.3%（w/v）、0.5%、1%、2%、5%、7.5% 或 10% 豬膽汁補給之 TPY 洋菜盤上。在含有至多 1% 膽汁之平盤上觀察到龍根雙歧桿菌 AH1206 生長。

在鼠科模式中評定龍根雙歧桿菌 AH1206 通過胃腸道

的能力。使小鼠每天攝取 1×10^9 AH1206，並檢查糞便粒是否有餵食之微生物存在。藉由分離出雙歧桿菌的自發性利福平（rifampicin）抗性變異體有助於 AH1206 的偵測。使用併入 TPY 盤中的利福平評定通過率且確保僅培養所餵食之抗利福平之雙歧桿菌。收集每天的糞便樣品且確認通過胃腸道的龍根雙歧桿菌（圖 2）。

抗微生物活性

將此研究中所使用之指標病原微生物在下列的培養基中在下列的生長條件下繁殖：在以 0.6% 酵母萃取液（TSAYE, Oxoid）補充之胰化蛋白大豆培養液/洋菜中的沙門氏鼠傷寒桿菌（*Salmonella typhimurium*）（37℃，需氧）、在血洋菜培養基上的空腸弧菌（*Campylobacter jejuni*）（37℃，厭氧）與大腸桿菌 O157:H7（37℃，厭氧）及在強化之梭菌培養基（RCM, Oxoid）中的艱難梭菌（*Clostridium difficile*）（37℃，厭氧）。將所有的菌株接種到新鮮的生長培養基中且生長隔夜，然後在實驗中使用。

抗微生物活性係使用延遲法偵測。簡言之，將龍根雙歧桿菌 AH1206 培育 36-48 小時。將 10 倍稀釋液系列塗抹（100 微升）於 TPY 洋菜培養基上。在隔夜培育之後，將具有明顯菌落的平盤以標識菌覆蓋。標識菌苔係藉由傾注於接種之 TPY 平盤表面上的 2%（v/v）隔夜標識培養物接種熔融覆蓋物而製備。將平盤在適合於標識菌生長的條

件下再培育隔夜。具有抑制區帶大於 1 毫米半徑的標識培養物被認為對試驗菌具敏感性。龍根雙歧桿菌 AH1206 抑制所有測試之病原微生物生長，沙門氏鼠傷寒桿菌、空腸弧菌、大腸桿菌 O157:H7 及艱難梭菌分別具有明確測得 14、> 80、13.33 及 17 毫米之區帶。

實例 2

此實例例證藉由 PBMC 對龍根雙歧桿菌之回應的細胞介素生成。PBMC 係從健康的捐贈者藉由密度梯度離心分離而來。將 PBMC 在 37℃ 下以益生菌株刺激 72 小時。在此時收集培養物上清液，離心，分裝且貯存在 -70℃，直到使用細胞球珠陣列法（BD BioScience）評定 IL-10 水平為止。AH1206 誘發人類 PBMC 明顯分泌的抗發炎細胞介素 IL-10，暗示此菌株可用作為活體內抗發炎劑（圖 3）。其可在人類中用作為減少及預防發炎的抗發炎劑。

實例 3

此實例例證龍根雙歧桿菌 AH1206 在氣喘之鼠科模式中減弱呼吸系疾病的效果。此研究使用以 Balb/c OVA-致敏之過敏性氣道發炎的小鼠模式。將小鼠以腹膜內注射 OVA 致敏且以 OVA 之鼻內挑戰引發疾病。小鼠係在最後挑戰（第 15 天）之後 24 小時接受氣道反應測量及接著 BAL 程序。以 OVA 致敏之食鹽水挑戰的小鼠充當控制組。動物係在第一天（亦即在第一次 OVA 致敏時）開始經

由強飼針接受連續 14 天的龍根雙歧桿菌 AH1206。以 MRS 培養液強飼的動物充當控制組。

氣道發炎係藉由在 BAL 流體中的發炎細胞計數評定。細胞係藉由離心而從 BAL 流體移出且將細胞懸浮在磷酸鹽緩衝之食鹽水（1 毫升）中。將 BAL 細胞以台酚藍染色，並使用血球計計數活菌細胞。BAL 細胞抹片係以 Cytospin（Thermo Shandon, Pittsburgh, PA）製備且以用於細胞分類計數的 HEMA3 試劑（Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ）染色，在此以每個灌洗液計數總共 200 個細胞。龍根雙歧桿菌 AH1206 的吸收比安慰劑明顯減少了總 BAL 細胞，大部分此差異係在嗜酸性球族群中察看到（圖 4）。

重複此研究，以進一步調查益生菌株龍根雙歧桿菌 AH1206 是否抑制在以 OVA-致敏之過敏性氣道發炎的小鼠模式中的過敏反應。簡言之，將雄性 BALB/c 成鼠在第 0 天及第 6 天以腹膜內注射 OVA 而致敏。在第 12 天及 14 天時，以 OVA 經鼻內挑戰小鼠。小鼠係在最後挑戰（第 15 天）之後 24 小時接受氣道反應測量及接著 BAL 程序。以 OVA/alum 致敏之食鹽水挑戰小鼠充當控制組。動物在整個試驗期間接收益生菌或安慰劑。氣道發炎（細胞介素及細胞計數）係以 BAL 流體中的發炎細胞計數評定。氣道反應亦使用 Buxco 全身體積變化描記器測量。亦將脾臟細胞從 OVA 致敏小鼠分離出來且在抗-CD3 及抗-CD28 抗體存在下培育，然後以流動式細胞儀測量上清液中的細胞

介素水平。

當與培養液餵食之動物相比時，以龍根雙歧桿菌 AH1206 治療造成在 OVA 挑戰之後明顯減少從 BAL 流體回收的細胞（圖 5）。測量氣道反應，並在與食鹽水挑戰小鼠相比時，OVA 致敏小鼠顯示增強對甲基膽鹼之氣道過度反應（AHR）。然而，未察看到任何對甲基膽鹼的此增強之氣道反應的調節，如以增強暫停之變化所評定（圖 6）。

BAL 細胞介素水平係以細胞球珠陣列法測量，未註明 IL-10、IFN- γ 、IL-6 及 CCL2 水平有任何明顯差異。AH1206 比 OVA 控制組明顯減少了 TNF- α 水平（圖 7）。

在脾臟細胞上清液中的細胞介素水平係在試管內 OVA 或抗-CD3/抗 CD-28 刺激之後以細胞球珠陣列法（CBA）定量。在以 AH1206 餵食之小鼠中未觀察到從 OVA 刺激之脾臟細胞的 IL-10 釋放增加，其與活體內 OVA 致敏作用有關聯。IL-6、TNF 及 MCP-1（CCL2）水平沒有明顯差異。從 CD3/CD28 脾臟細胞釋放的 IL-10 未在以 AH1206 餵食之動物中增加。然而，前發炎細胞介素 TNF- α 及 IFN- γ 的分泌在以 AH1206 餵食之動物的脾臟細胞培養物上清液中明顯減少了（圖 8）。在經測量的其他細胞介素中未發現有任何明顯變化。

實例 4

此研究的目標係調查益生菌（龍根雙歧桿菌 AH1206

）是否抑制在以 OVA 誘發之過敏小鼠模式中的過敏反應。將 BALB/c 小鼠分組（8 隻/組），且餵食安慰劑、龍根雙歧桿菌 AH1206 或蒸餾水 4 週。所有的小鼠於每週經口強飼在 300 微升以磷酸鹽緩衝之食鹽水（PBS）中的卵白蛋白及霍亂毒素，除了蒸餾水組之外，其僅經口強飼 300 微升 PBS，作為控制組。在治療 4 週之後，經由臉靜脈穿刺收集每個小鼠的血液樣品，並執行後續的酵素連結免疫檢定法（ELISA），以測量 OVA-特異性 IgE 水平。將脾臟及腸繫膜淋巴結細胞分離出來，並在試管內以 LPS 及抗 CD3/CD28 與免疫顯性 OVA 肽刺激。以細胞球珠陣列法 CBA 測量 Th1 及 Th2 細胞介素。

在 AH1206 餵食組中誘發之 OVA-特異性 IgE 明顯少於相比之安慰組及正控制組（圖 9）。負控制組與 AH1206 餵食組沒有差異，暗示以 AH1206 餵食完全預防 OVA-特異性 IgE 反應的誘發。此實例進一步暗示施予 AH1206 可預防人類中的發炎攻擊。統計係使用未配對 T 試驗計算。

將脾臟細胞從益生菌、安慰劑及蒸餾水餵食之 BALB/c 小鼠分離出來，並處於未經刺激或以脂多醣（LPS）、抗 CD3/CD28 或免疫顯性 OVA 肽刺激及接著以 Th1/Th2 細胞球珠陣列法分析 TNF- α 、IL-2、IFN- γ 、IL-4 及 IL-5 之細胞介素生成。細胞介素結果總結於表 2 中。

表 2.細胞介素總結

未經刺激之脾臟細胞

菌株	TNF- α	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
AH1206					

以 LPS 刺激之脾臟細胞

菌株	TNF- α	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
AH1206	↑ rt NC		↑ rt NC		

以抗 CD3/CD28 刺激之脾臟細胞

菌株	TNF- α	IL-2	IFN- γ	IL-4	IL-5
AH1206	↑ rt NC rt PC ↓	↑ rt NC rt PC ↓	↑ rt NC rt PC ↓	rt PC ↓	↑ rt NC rt PC ↓

rt=相對於

NC=負控制組（以水餵食，以 PBC 挑戰）

PC=正控制組（以水餵食，以 OVA 及 CT 挑戰）

在未經刺激之脾臟細胞中，未觀察到任何與控制動物相比的變更。從 LPS 刺激之脾臟細胞釋放之 TNF- α 及 IFN- γ 以 AH1206 餵食之動物明顯高於相比之負控制組，但是這些水平與那些以 OVA 致敏及施予霍亂毒素之正控制組所觀察之水平一致。以 CD3/CD28 刺激揭露在益生菌餵食組有顯著的淋巴細胞傳訊變更。以 AH1206 餵食之動

物分泌明顯少於相比之正控制組的 $\text{TNF-}\alpha$ ，但是此水平高於相比之負控制組（圖 10）。以 AH1206 餵食之動物具有明顯少於相比之非益生菌餵食之正控制組的 $\text{IFN-}\gamma$ 、 IL-2 、 IL-4 及 IL-5 水平。

實例 5

此研究調查攝取益生菌對健康小鼠中的調節 T 細胞數量及活性的效果。將 BALB/c 小鼠（10 隻/組）餵食龍根雙歧桿菌 AH1206 或安慰劑 3 週。在攝取益生菌/安慰劑之後，將 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{T}$ 調節細胞分離出來，且其在試管內抑制活性係藉由使用流動式細胞儀測量抗- CD3/CD28 刺激之 CFSE 標記之 CD4^+ 反應 T 細胞的增生來測定。 CD4^+ 反應 T 細胞與作為控制組的 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{T}$ 細胞共同培育。在鼠科脾臟細胞中的 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 細胞（調節 T 細胞）（亦為 FoxP3 正）百分比係在益生菌或安慰劑餵食之小鼠的脾臟中測定。

將與來自益生菌/安慰劑餵食之小鼠的 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 細胞共同培育時增生之 CD4^+ 細胞百分比與來自相同試驗小鼠的 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞共同培育時增生之 CD4^+ 細胞百分比相比。在此情況中，在含有 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ 細胞之培養物中的 T 細胞增生少於僅含 CD4 細胞且耗盡 CD25^+ 細胞之培養物（圖 11）。

測定在亦為 CD25^+ 之 CD4^+ 族群中的細胞百分比（圖 12）。龍根雙歧桿菌 AH1206 餵食組具有比其對應之安慰

劑餵食組明顯更多亦為 $CD25^+$ 的 $CD4^+$ T 細胞（亦即 T 調節細胞）（ $p=0.0081$ ）。此暗示在 $CD4^+$ 族群內的 T 調節細胞百分比係藉由餵食 AH1206 而明顯增加。此結果顯示施予 AH1206 可減少或預防在人類中的發炎。

亦測定在以益生菌或安慰劑餵食之小鼠的整個脾臟細胞族群中的 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 細胞數量。在以益生菌餵食之小鼠的脾臟中表現 FoxP3 之 $CD4^+CD25^+$ T 調節細胞數量相對於安慰劑或未餵食之小鼠而言沒有改變。

實例 6

購買 6 週大無菌小鼠且將其保持在 UCC 中的生物維護單位的無菌單位中。使動物攝取益生菌株龍根雙歧桿菌 AH1206 14 天或維持無菌。以流動式細胞儀評定 T 調節細胞的誘發。

在以 AH1206 餵食之無菌小鼠的脾臟中的 $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ 細胞數量在以 AH1206 餵食之後明顯增加了（圖 13）。再者，此結果顯示施予 AH1206 可減少或預防在人類中的發炎。總 CD3/CD4 或 CD3/CD28 計數維持不變。

實例 7：穩定性結果

益生菌株-AH1206 的穩定性係在 30°C 下經 3 個月評定（圖 13）。結果顯示經過試驗期的 LGG 為差的益生菌，經 3 個月期間下降 100 倍，反之，AH1206 非常穩定，經

此期間未記錄到任何活力損失。

於此說明書中引述的所有參考資料，包括（而非限制）所有論文、公報、專利、專利申請案、報告書、教科書、報導、手稿、小冊子、書籍、網路貼文、雜誌文章及期刊皆以其完整內容併入本說明書以供參考。本文中參考資料討論僅意欲總結由該等作者提出的主張，並非承認任一參考資料構成先前技藝。申請者保留挑戰所引述之參考資料的準確性與切題性之權利。

這些及其他對本發明的修改及變異可由那些一般熟習所屬技藝者以不違背更特別陳述於所附申請專利範圍中的本發明精神及範疇達成。另外，應瞭解各種具體實例的觀點可全部或部分地交換。此外，那些一般熟習所屬技藝者應理解前述說明僅為實例方式而已，而無意限制以所附申請專利範圍中如此進一步敘述的本發明。因此，所附之申請專利範圍的精神及範疇應不受限於其中所含版本的說明。

【圖式簡單說明】

圖 1 為龍根雙歧桿菌 AH1206 之 BOX 聚合物鏈反應（BOX PCR）（生物分析儀）條碼輪廓。鹼基對尺寸係使用 Agilent 2100 軟體測定；

圖 2 為例證經 8 天餵食期之龍根雙歧桿菌 AH1206 的糞便回收率之圖形及證明 AH1206 可存活於鼠科胃腸道中；

圖 3 為顯示龍根雙歧桿菌 AH1206 對藉由人類末梢血液單核細胞 (PBMC) 的介白素 (IL) -10 細胞介素生成的效果之條形圖。將結果以測量平均 $\pm$ 標準誤差 (SEM) ($n=6$) 表示；

圖 4 為顯示餵食龍根雙歧桿菌 AH1206 對致敏性小鼠肺部的嗜酸性球補充的效果之條形圖。圖 4A 顯示在支氣管肺泡灌洗液 (BAL) 中存在的細胞總數量在以 AH1206 餵食之小鼠中減少了。圖 4B 顯示以 BAL 之差示細胞計數揭露減少的細胞數量主要是嗜酸性球族群。(細胞數量表現在 y-軸 ($\times 10^4$) 上；*表示相對於安慰組之 $p < 0.05$)；

圖 5A 及 B 為顯示 (A) 益生菌株 AH1206 及 (B) 安慰劑對在致敏性動物中以卵白蛋白 (OVA) 挑戰之後的 BAL 流體中的總細胞數量的效果之圖形 ($n=10$ /組，*表示與單獨的 OVA 挑戰相比之 $p < 0.05$)；

圖 6A 及 B 為顯示 (A) 龍根雙歧桿菌 AH1206 治療及 (B) 安慰劑對甲基膽鹼之氣道反應的效果之圖形，其係藉由在以 OVA 或食鹽水的鼻內挑戰之後 24 小時於 OVA-致敏小鼠中的增強暫停 (Penh) 之變化予以評定。每個數據點代表平均 $\pm$ SEM ($n=10$ /組，*表示與單獨的 OVA 相比之 $p < 0.05$)；

圖 7 為顯示在來自 OVA-致敏小鼠的 BAL 流體中的腫瘤壞死因子 (TNF) 細胞介素水平之圖形。每個柱狀圖代表平均 $\pm$ SEM ($n=10$ ，*表示與 OVA-挑戰之 MRS (deMann, Rogosa and Sharpe) 培養液治療控制組相比之 $p < 0.05$)

;

圖 8A 及 B 為顯示以益生菌株 AH1206 之經口治療對從 OVA-致敏小鼠分離之活化脾臟細胞（以 CD3/CD28 刺激之脾臟細胞）的（A）TNF 及（B）干擾素（IFN）- γ 細胞介素生成的效果之圖形。每個柱狀圖代表平均 $\pm$ SEM（ $n=10$ ，*表示與 OVA-挑戰之 MRS 培養液治療控制組相比之 $p<0.05$ ）；

圖 9 為顯示從餵食 AH1206 之小鼠分離之血清中的 OVA-特異性免疫球蛋白 E（IgE）水平明顯比未以 AH-1206 餵食之控制組更低（** $p<0.01$ ）之圖形；

圖 10 為例證以益生菌株 AH1206 之經口治療對從 OVA-致敏小鼠分離之活化脾臟細胞（以 CD3/CD28 刺激之脾細胞）的 TNF- α 生成的效果之圖形。例證每組的平均值（與 OVA-及霍亂毒素（CT）-挑戰之 MRS 培養液治療控制組相比，* $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ）；

圖 11 為例證實質上減少來自 AH1206 餵食之動物的 CD4⁺CD25⁺細胞增生之圖形（每組 $n=10$ ，除了控制組 $n=20$ 以外）；

圖 12A 及 B 為顯示在亦為 CD25⁺之 CD4⁺族群中的細胞百分比之圖形，其係藉由流動式細胞測量術予以評定（未餵食組之 $n=11$ ，安慰組之 $n=20$ 及 AH1206 餵食組之 $n=10$ ）；

圖 13 例證表現轉錄因子 FoxP3 之 CD4/CD25⁺細胞的百分比在攝取 AH1206 之無菌小鼠中明顯向上調節（每組

n=8 或 9) (相對於安慰組之 $*p < 0.05$) ; 及

圖 14 為例證益生菌株 AH1206 經 3 個月的穩定性之圖形。

19400-10059seqlist_ST25.txt

序列表

<110> Russell, Michael
Ceddia, Michael

<120> Probiotic Infant Formulas

<130> MJE00254

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 488
<212> DNA
<213> Bifidobacterium longum

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(42)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (65)..(65)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (128)..(128)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)..(133)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (139)..(139)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (143)..(143)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (149)..(149)
<223> n is a, c, g, or t

19400-10059seqlist_ST25.txt

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)..(156)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (169)..(169)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (175)..(175)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (184)..(184)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (188)..(188)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)..(192)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)..(195)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (202)..(202)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)..(210)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (227)..(227)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (236)..(236)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)..(254)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature

19400-10059seqlist_ST25.txt

```
<222> (258)..(258)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (262)..(262)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (274)..(274)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (285)..(285)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (288)..(288)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (293)..(293)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (308)..(308)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (328)..(328)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (338)..(338)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (364)..(364)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (368)..(368)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (372)..(372)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (380)..(380)
<223> n is a, c, g, or t
```

19400-10059seqlist_ST25.txt

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (404)..(404)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (416)..(416)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (426)..(426)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (439)..(439)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (451)..(451)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (462)..(462)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (464)..(464)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (469)..(469)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (485)..(485)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 1	
tgcngncaca cgtcaccaca cgggtgtcgca tggccgcaag gnaticcttcc tagcaaattc	60
ccagnacgac aaatcatcac actaaaatga tcacaaaacg atcgaaacaa acactaaaaa	120
tagagttnga ttngaaatna ttngaaatna acagcnagaa cgaggaatna aaggnaaccc	180
cgtnttgntt gngtncacta tncagttttn aagccaccac gcaccancac gccgtncgga	240
cgggaccagc ccgncatnag gnacgatggg catngaactg cgccnggnca aancctgggg	300
tggcgatncg ggagcccaaa agcgcatnca caccactncc gcggaacatt ccacgacgga	360
cgcnccgnaa gnccatgatn tttttcacac cagcagcccc aagncgccgc gactgncgcg	420
acgccngggc tcgcaccgnc ggacgaacat ncggccgtat tntnctgana aaggaggtat	480
cccancaa	488

<210> 2
<211> 476
<212> DNA
<213> Bifidobacterium longum

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (68)..(68)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (277)..(277)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (337)..(337)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)..(345)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (347)..(347)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)..(358)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (372)..(372)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (375)..(375)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (381)..(381)
<223> n is a, c, g, or t

19400-10059seqlist_ST25.txt

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (401)..(401)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (404)..(404)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (411)..(411)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (433)..(433)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (450)..(450)
 <223> n is a, c, g, or t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (453)..(453)
 <223> n is a, c, g, or t

<400> 2
 agntaagccg aattctccgc ggtgcgngcc ccggcgctcg ggcagtcg cgggcctggg 60
 gctgctgntg tggaagagat catgggcttt cggtcgctcc gtcgtgggat gttccgcggg 120
 agtggtgtgg atgcgctttt gggctcccgg atcgccaccc caggcttttg cctggcgcgga 180
 ttcgatgccc atcgtgcctg atggcgggct ggtcccgtcc ggacggcggt gtggtgcgtg 240
 gtggccttgag aactggatag tggacgcgag caagachggg tttcctttga ttcctcgttc 300
 ttgctgttga tttcgaatcg aactctattt ttaatgnttg tttcnancgt tttgtganca 360
 ttttaatgtg anganttgtc ntctgggaat ttgctaagaa nganccttgc ngccatgccc 420
 accgtgtggt gcntgttgcc tgcaagggn tanggtggaa gccttgccac ccagaa 476

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220>
 <223> synthesized

<400> 3
 gctggatcac ctcttttc 18

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA

19400-10059seqlist_ST25.txt

<213> Unknown

<220>

<223> Synthesized

<400> 4

ctggtgcca ggcattcca

18

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> synthesized

<400> 5

ctacggcaag gcgacgctga cg

22

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98131601

※申請日：98年09月18日

※IPC分類：A23L¹/₃₀ (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

益生菌嬰兒產品

Probiotic infant products

A61K³⁵/₇₄ (2006.01)

A61P¹/₀₀ (2006.01)

A61P³¹/₀₀ (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明關於一種嬰兒配方或兒童營養產品，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) AH1206。

三、英文發明摘要：

An infant formula or children's nutritional product which comprises a protein source, a fat source, a carbohydrate source, and *B. longum* AH1206.

七、申請專利範圍

1. 一種嬰兒配方，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌（*B. longum*）AH1206。

2. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該嬰兒配方包含以每公克嬰兒配方計約 1×10^4 cfu 至約 1×10^{10} cfu 之範圍內的龍根雙歧桿菌 AH1206。

3. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該龍根雙歧桿菌 AH1206 為活菌。

4. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其中該龍根雙歧桿菌 AH1206 為非活菌。

5. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其進一步包含額外的益生菌。

6. 如申請專利範圍第 5 項之嬰兒配方，其中該額外的益生菌包含鼠李糖乳酸桿菌 GG（LGG）。

7. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其進一步包含益菌生（prebiotic）。

8. 如申請專利範圍第 7 項之嬰兒配方，其中該益菌生係選自乳酮糖、葡萄糖寡糖（gluco-oligosaccharide）、菊糖、聚葡萄糖（polydextrose）、半乳寡糖（galacto-oligosaccharide）、果寡糖（fructo-oligosaccharide）、異麥芽寡糖（isomalto-oligosaccharide）、大豆寡糖、乳果寡糖（lactosucrose）、木寡糖（xylo-oligosaccharide）及龍膽寡糖（gentio-oligosaccharide）。

9. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其進一步包

含至少一種長鏈聚不飽和脂肪酸（LCPUFA）。

10. 如申請專利範圍第 1 項之嬰兒配方，其進一步包含花生四烯酸（ARA）及二十二碳六烯酸（DHA）。

11. 一種兒童營養產品，其包含蛋白質源、脂肪源、碳水化合物源及龍根雙歧桿菌 AH1206。

12. 一種減少或預防在嬰兒或兒童中發炎之方法，其包含以龍根雙歧桿菌 AH1206 施予嬰兒或兒童。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中以減少或預防發炎來改善過敏。

14. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中以減少或預防發炎來改善氣喘。

15. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中以減少或預防發炎來改善選自腹瀉、呼吸感染及中耳炎之疾病。

圖1

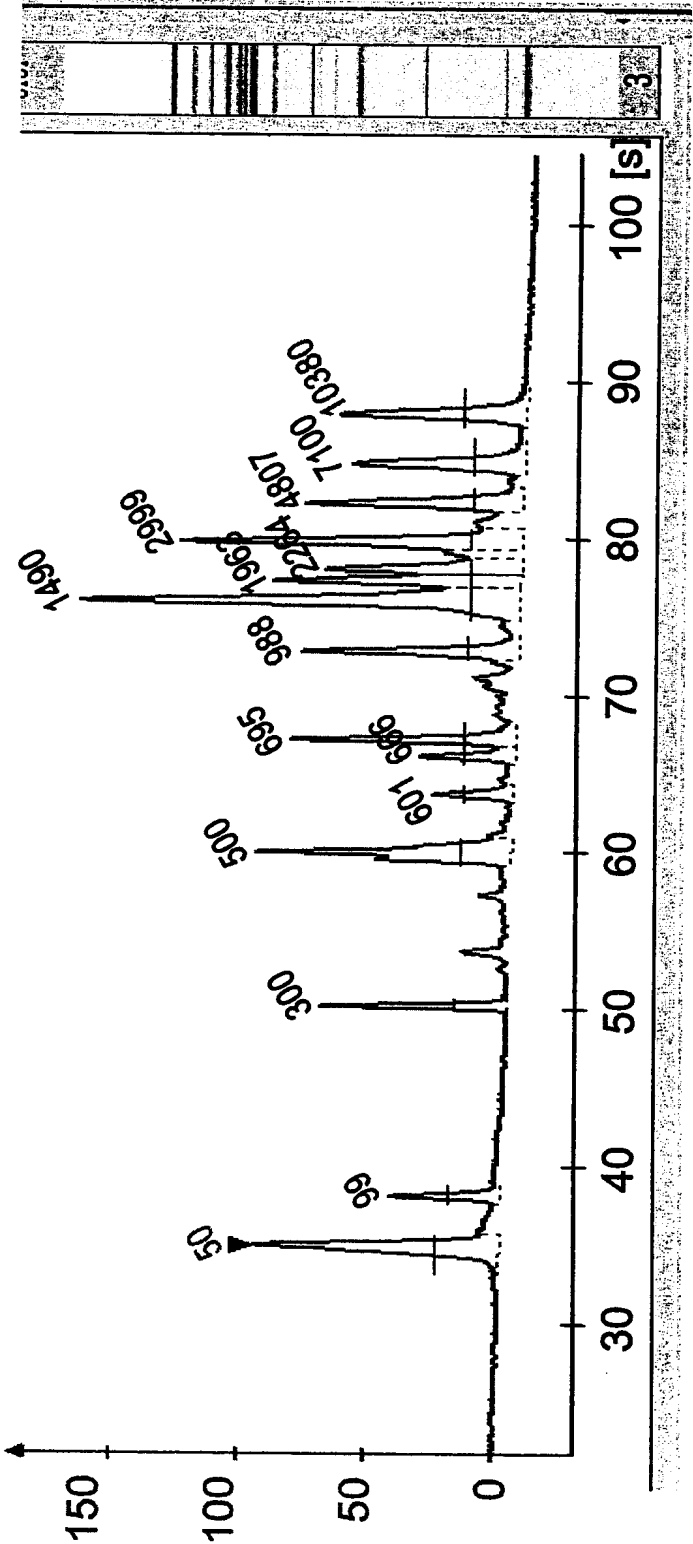


圖2

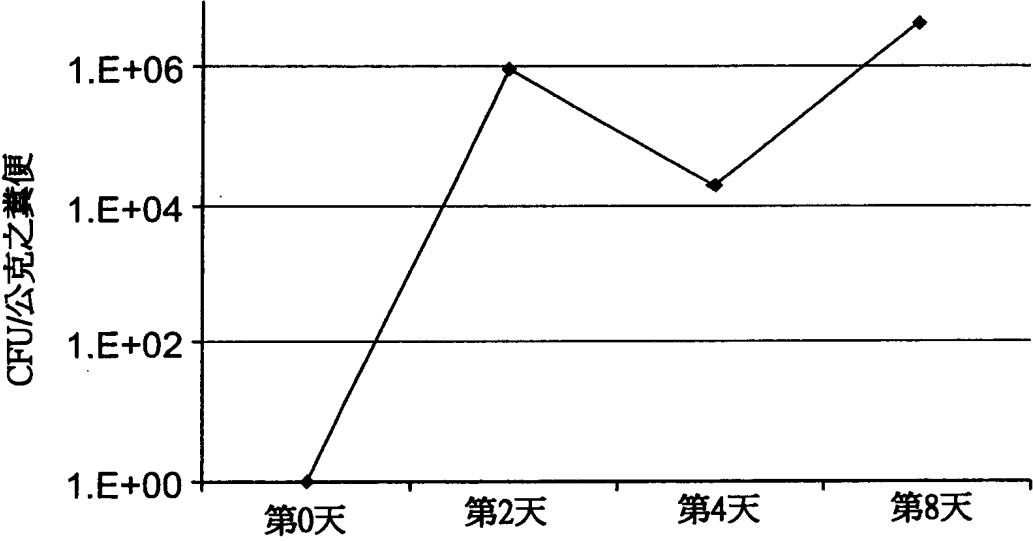


圖3

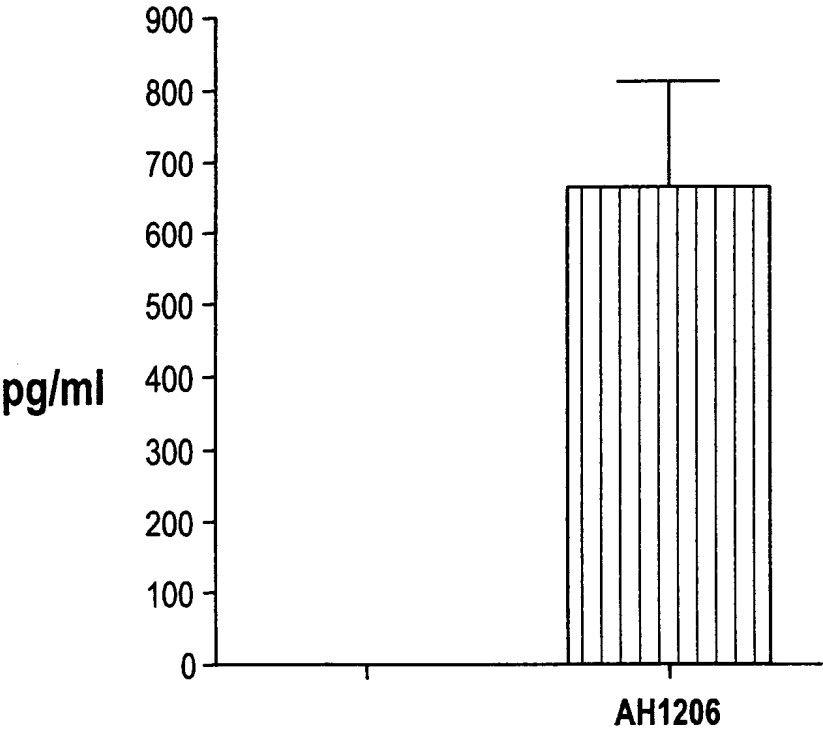


圖 4A

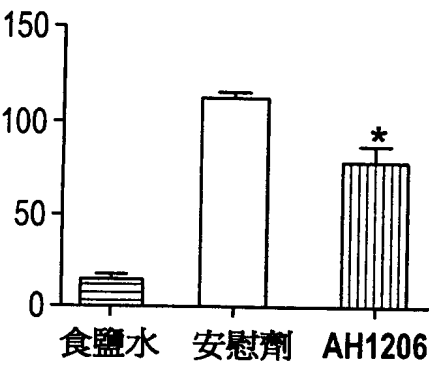


圖 4B

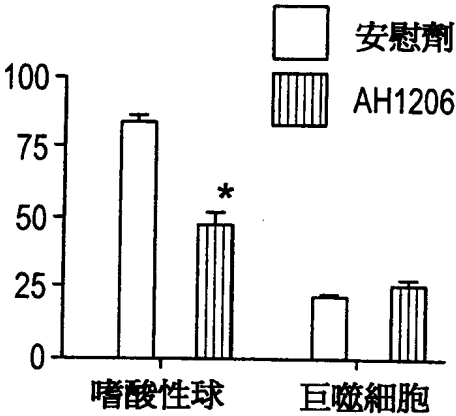


圖 5A

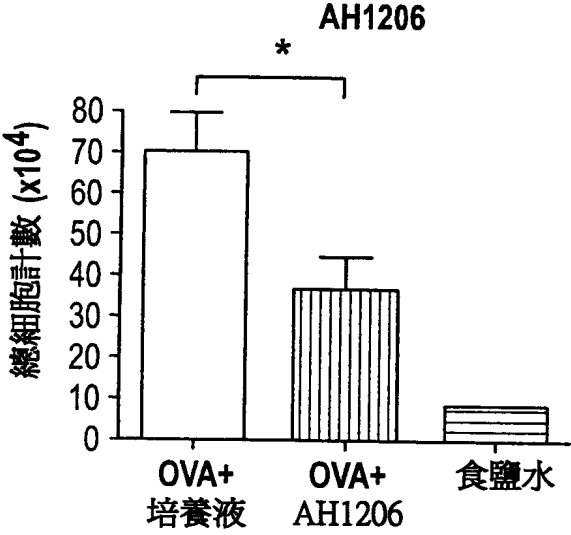


圖 5B

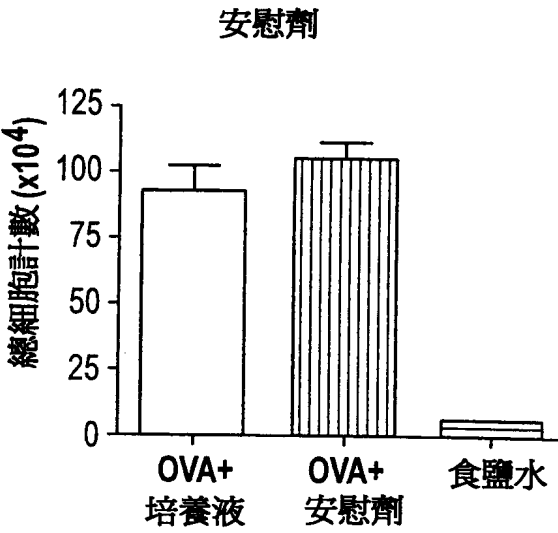


圖 6A

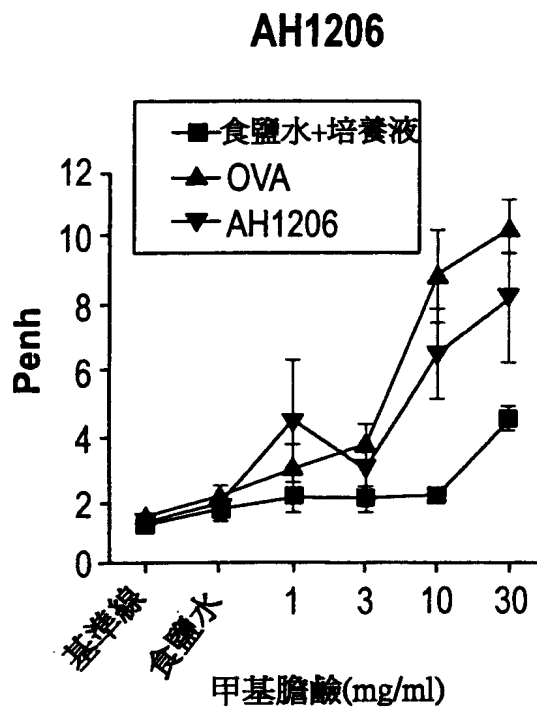


圖 6B

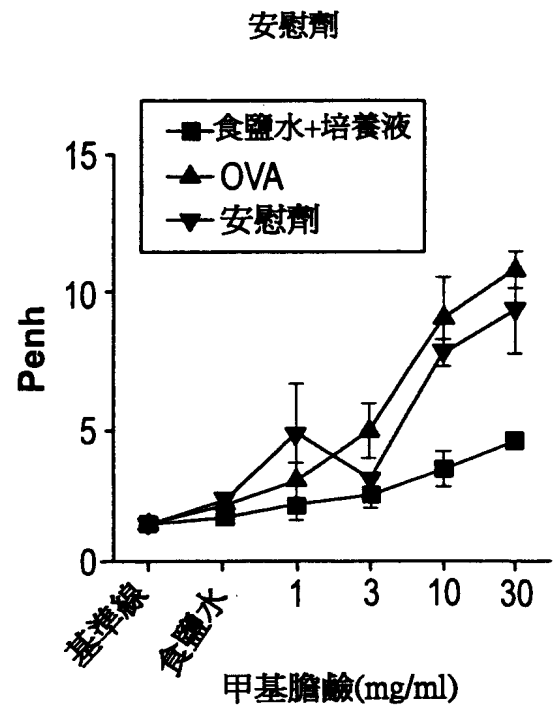


圖 7

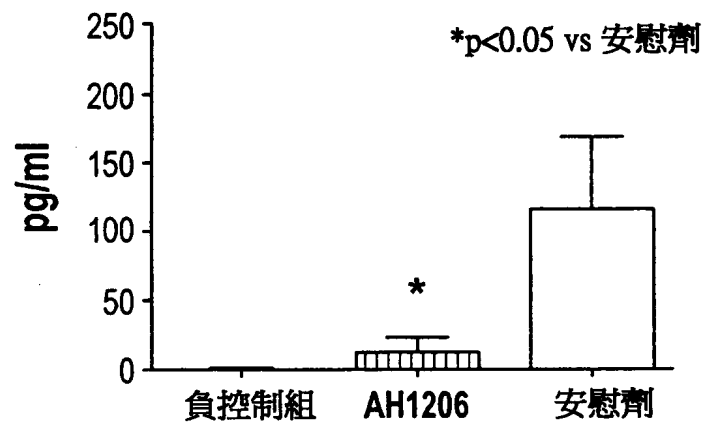


圖 8A

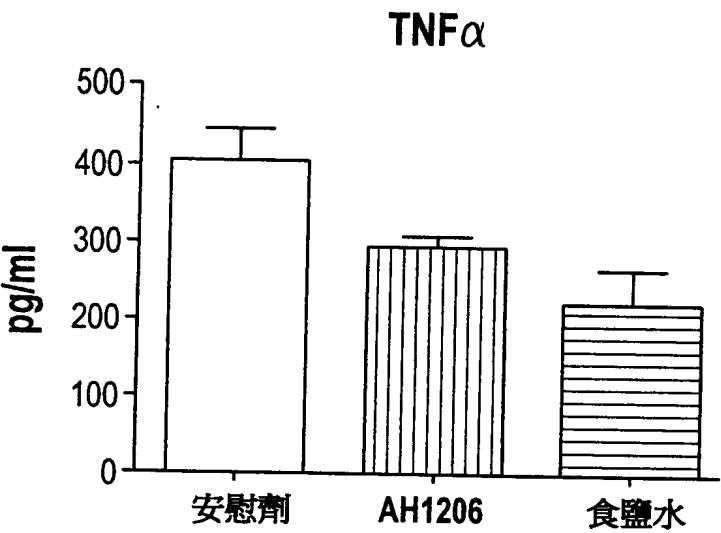


圖 8B

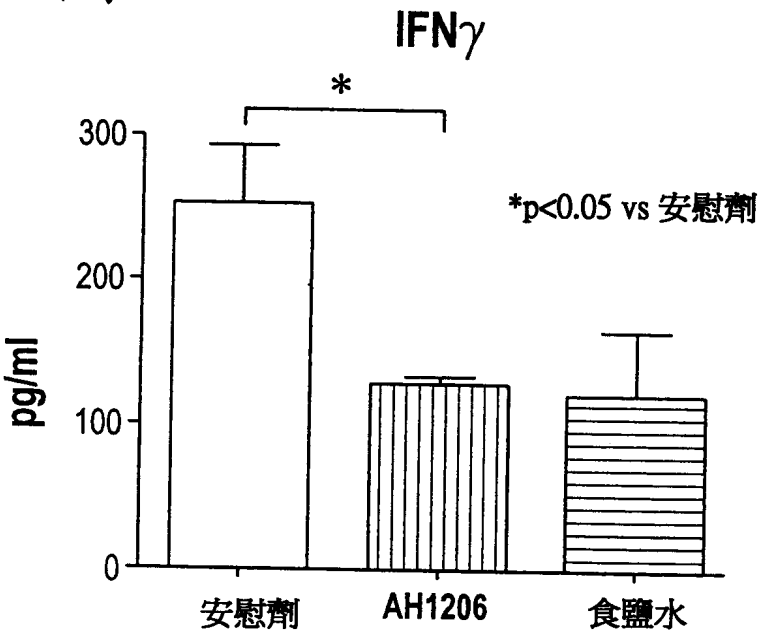


圖 9

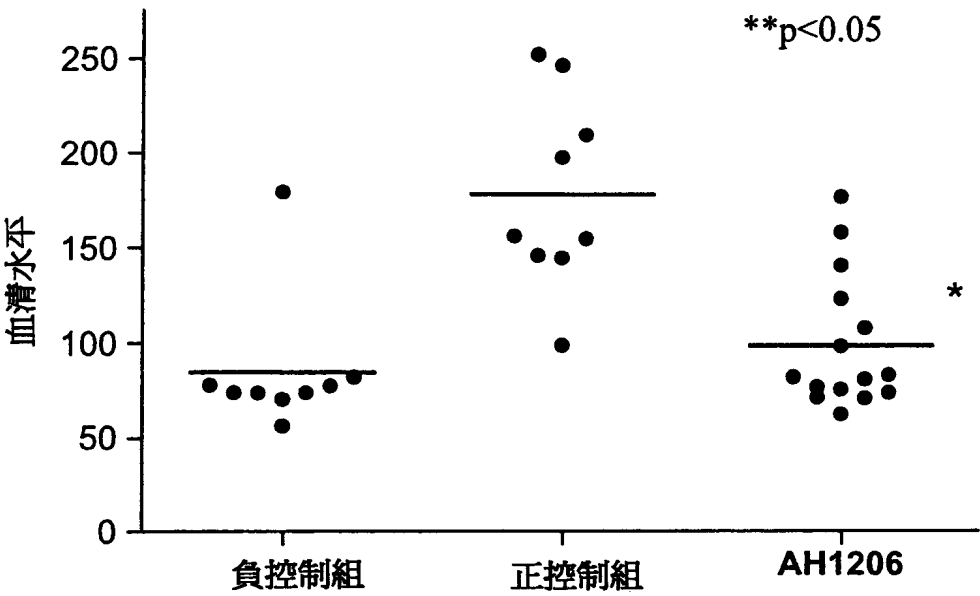


圖 10

[TNF] (pg/mL)

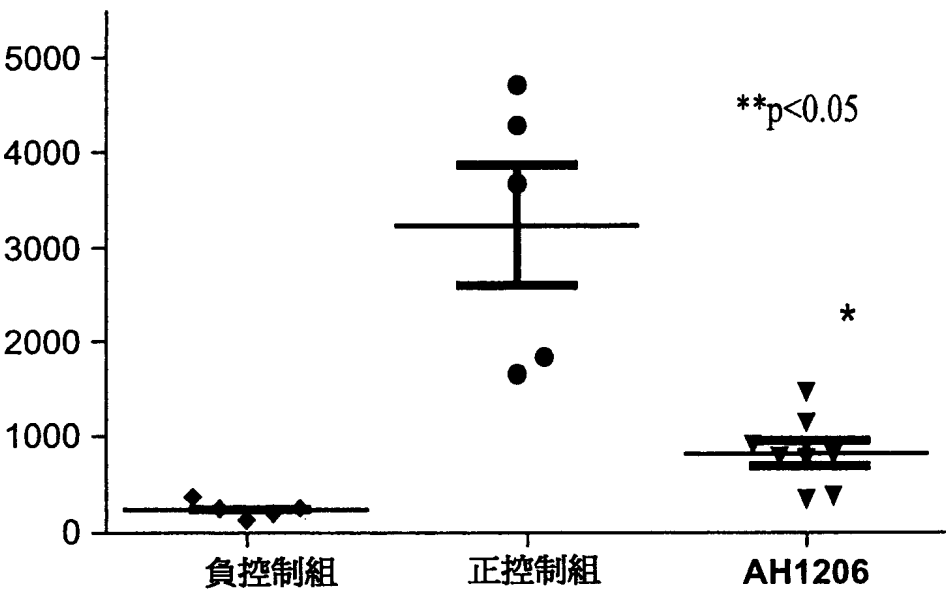


圖 11

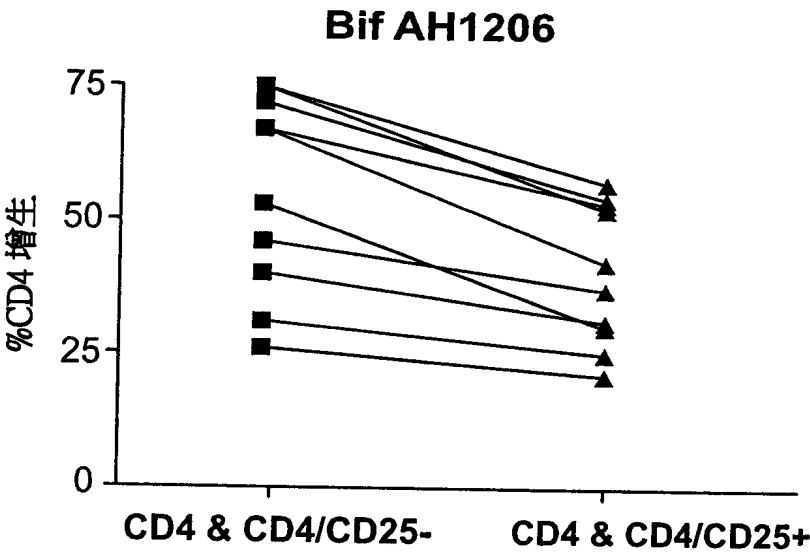


圖 12A

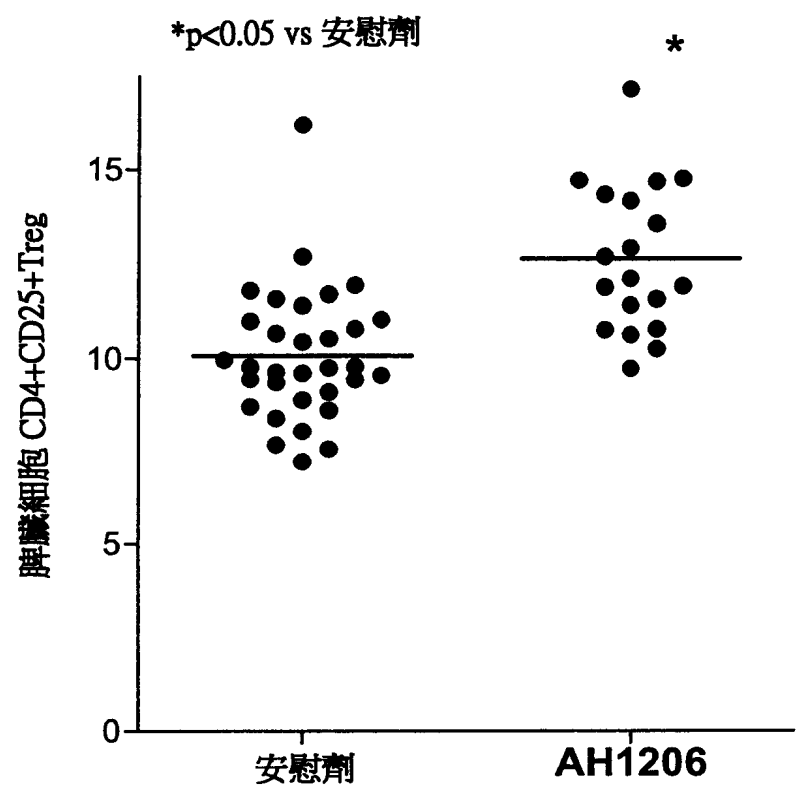


圖 12B

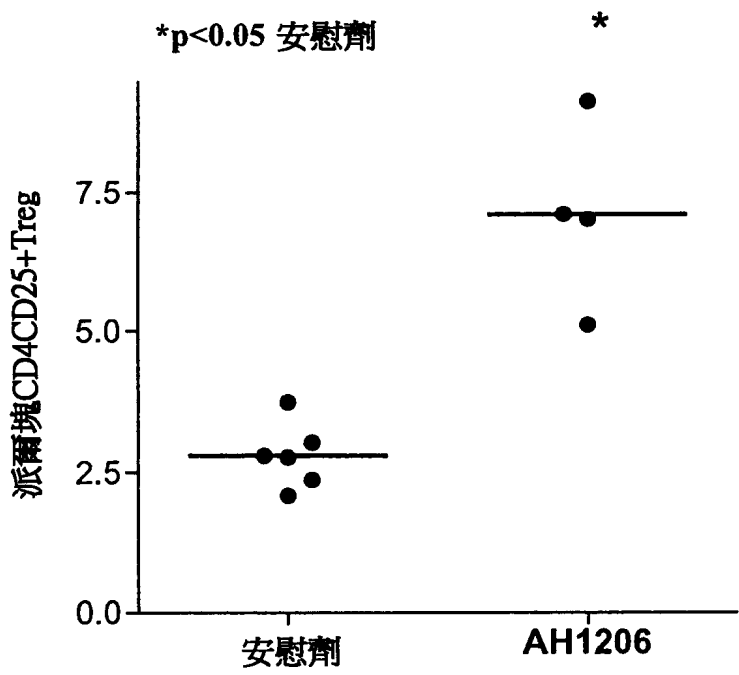


圖 13

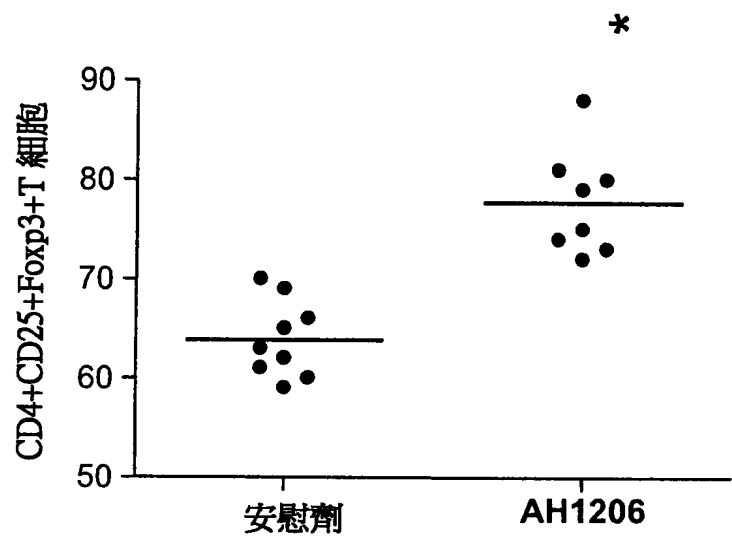
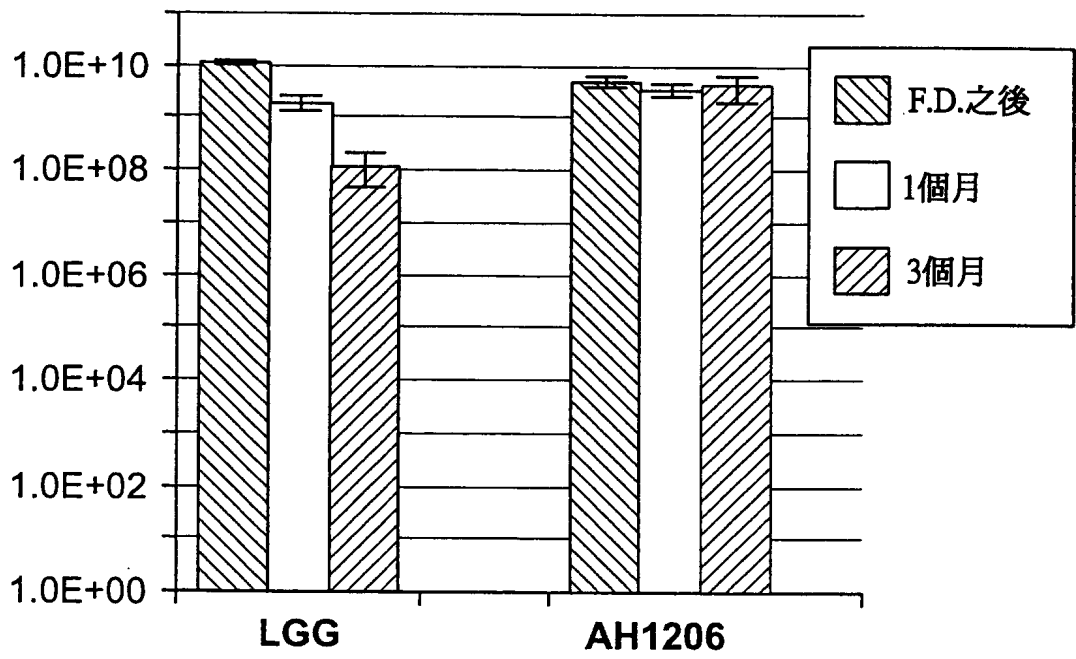


圖 14



四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(6)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無