[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02807884.5

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1250232C

[22] 申请日 2002.2.1 [21] 申请号 02807884.5
[30] 优先权
[32] 2001. 2. 6 [33] EP [31] 01200436.2
[86] 国际申请 PCT/EP2002/001163 2002.2.1
[87] 国际公布 WO2002/062360 英 2002.8.15
[85] 进入国家阶段日期 2003.10.8
[71] 专利权人 雀巢制品公司
地址 瑞士沃韦
[72] 发明人 E·施夫林 G·科丘宾斯基
审查员 程心旻

[74] 专利代理机构 中国专利代理（香港）有限公司
代理人 邹雪梅 段晓玲

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 5 页

[54] 发明名称

乳酸菌和/或双歧杆菌、含有它们的组合物及其用途

[57] 摘要

本发明涉及使用具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌中的至少一种菌株制备一种用于预防或治疗因内毒素引起的和/或与内毒素有关的病症的组合物，及用具有疏水表面性质的乳酸菌菌株和/或双歧杆菌中的至少一种菌株制备的人类或宠物食物组合物。

1. 具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌中的至少一种菌株在制备预防或治疗内毒素引起和/或有关病症的组合物中的用途，其中乳酸菌或双歧杆菌的疏水性百分比，% H至少为80%H.

2. 权利要求1的用途，其中乳酸菌或双歧杆菌的疏水性百分比，% H为85-100 %H.

3. 权利要求1的用途，其中乳酸菌和双歧杆菌具有结合内毒素或与革兰氏阴性细菌共聚集的能力。

4. 权利要求1-3中任何一项所述的用途，其中乳酸菌菌株或双歧杆菌选自约氏乳杆菌、路氏乳杆菌、类干酪乳杆菌、动物乳芽胞杆菌、 瘤胃乳杆菌、 嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、 发酵乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种、双歧杆菌属、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌、假长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和青春双歧杆菌.

5. 权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的用途，其中所述菌株是嗜酸乳杆菌 NCC 2463 (CNCM - I 2623)、双歧双歧杆菌 NCC 189 (CNCM-I-2333)、双歧双歧杆菌 NCC 235 (CNCM-I-2335)、青春双歧杆菌 NCC 251 (CNCM I-2168)或乳双歧杆菌(ATCC27536).

6. 权利要求 1-3 中任一项权利要求所述的用途，其中所述菌株的使用量是使每人每日能得到 10^3 - 10^{14} cfu 的量.

7. 一种分离出的具有疏水表面性质并能够结合内毒素或与革兰氏阴性细菌共聚集的乳酸菌或双歧杆菌菌株.

8. 权利要求 7 所述的菌株，其中乳酸菌或双歧杆菌至少从浓度类似于肠道中内毒素含量的溶液中结合 30 % 的内毒素.

9. 权利要求 7 或 8 所述的菌株，选自约氏乳杆菌、路氏乳杆菌、 类于酪乳杆菌、动物乳杆菌、 瘤胃乳杆菌、 嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、 发酵乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种、双歧杆菌属、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌、假长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和青春双歧杆菌.

10. 权利要求 7 或 8 所述的菌株，是嗜酸乳杆菌 NCC 2463(CNCM

- I 2623)、双歧双歧杆菌 NCC 189 (CNCM-I-2333)、双歧双歧杆菌 NCC 235 (CNCM-I-2335)、青春双歧杆菌 NCC 251 (CNCM I-2168)或乳双歧杆菌 (ATCC27536)。

11. 一种人类或宠物食物组合物，含有权利要求 7 -10 中任一项权利要求所述的乳酸菌和/或双歧杆菌中的至少一种菌株，并与一种能吸收的载体或药用基质结合。

12. 权利要求 11 所述的组合物，其中所述菌株以其活的形式或无活性形式使用。

13. 权利要求 11 或 12 所述的组合物，其中乳酸菌菌株选自约氏乳杆菌、路氏乳杆菌、类干酪乳杆菌、动物乳杆菌、 瘤胃乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、 发酵乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种、双歧杆菌属、双珐双歧杆菌、长双歧杆菌、假长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和青春双歧杆菌。

14. 权利要求 11 或 12 所述的组合物，其中菌株是嗜酸乳杆菌 NCC 2463 (CNCM - I 2623)、双歧双歧杆菌 NCC 189 (CNCM-I-2333)、双歧双歧杆菌 NCC 235 (CNCM-I-2335)、青春双歧杆菌 NCC 251 (CNCM I-2168)或乳双歧杆菌 (ATCC27536)。

15. 权利要求 11 或 12 所述的组合物，其中乳酸菌菌株的使用量是使每人每日得到相当于 10^3 - 10^{14} cfu 的量。

16. 权利要求 11 或 12 所述的组合物，它减少、预防或治疗内毒素引起和/或有关的病症。

乳酸菌和/或双歧杆菌、含有它们的组合物及其用途

本发明涉及用具有疏水性质的乳酸菌和/或双歧杆菌制备一种用于预防或治疗因内毒素引起的和/或与内毒素有关的病症的食物组合物。本发明还涉及用具有疏水性质的乳酸菌和/或双歧杆菌制备的组合物。

发明背景

已经发现诱导败血症的毒素与病原菌、病毒、植物和毒液有关。记载较完备的细菌毒素是革兰氏阴性细菌的内毒素或脂多糖（LPS）。这些分子是所有革兰氏阴性细菌外膜中普遍存在的糖脂，被认为与革兰氏阴性败血症有关。这类败血症是极其常见的病症，并且是经常致命的。

已经进行过许多治疗败血症的尝试。这些包括使用LPS的抗体、使用肿瘤坏死因子的抗体、使用可溶解的肿瘤坏死因子（TNF）受体、使用可溶解的白细胞间介素-1（IL-1）受体，仅举几个例子。虽然每种方法达到一些效果，但总的说来结果令人失望。

其它人曾尝试设计和研究结合 LPS/内毒素蛋白质的工作，并且将这些尝试的说明性报告发表在 Rustic, A. 等，Science(1993)259: 361-364; Matsuzaki, K. 等，Biochemistry(1993)32:11704-11710; Hoess, A. 等， EMBO J(1993)12: 3351-3356; 以及 Elsbach, P. 等，Current Opinion in Immunology(1993)5: 103-107. 事实上，一旦LPS进入血液，可结合在称为脂多糖结合蛋白（LBP)的一种蛋白质上。抑制LBP,如用抗LBP抗体，已被建议作为治疗内毒素引起的败血症的疗法(国际专利申请号 PCT/US90/04250, 申请日1990 年6月30日)。同时，几个实验室的工作表明血浆脂蛋白,特别是高密度脂蛋白（HDL）可结合并中和LPS(Skarnes 等，1968, J. Bacteriology 95: 2031; Flegel 等，1993, Infect. Immunol. 61(12): 5140)，而且还表明这些粒子可在血浆中产生LPS 中和活性。

以前对于因内毒素引起和/或有关的疾病的治疗是追补性的（即在出现临床病症之后的治疗），并限于化学治疗法介入。这些治疗方法不能达到预防的目的。

因此，为了预防或减轻败血症和脓毒性休克的症状，需要一种有效的药物中和革兰氏阴性内毒素(即 LPS)。

本发明的疏水性的乳酸菌和双歧杆菌提供了能够结合内毒素并改善/预防其作用的补充化合物。

发明概要

因此，本发明涉及用具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌中的至少一种菌株制备预防或治疗内毒素引起和/或有关病症的组合物。

事实上，已经出人意料地发现一些特别是具有疏水表面的乳酸菌和双歧杆菌能够结合内毒素。因此，它们可作为有效的制剂，预防内毒素性休克和消化道起源的败血症、细菌移位、坏死性小肠结肠炎、炎症性肠病、肠内的感染、慢性内毒素血症有关的或促进分解代谢的和全身的炎症。

优选的，疏水性的乳酸菌或双歧杆菌的疏水性百分比（% H）至少为80，更优选为85-100 % H。

在优选的实施方案中，菌株选自约氏乳杆菌、路氏乳杆菌、类于酪乳杆菌、动物乳杆菌、瘤胃乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种、双歧杆菌属、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌、假长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌。

在另一个方面，发明涉及分离出的一种具有疏水表面性质的乳酸菌或双歧杆菌菌株，这种菌株因其具有与内毒素结合或与革兰氏阴性细菌共聚集的能力而被选择。

又一方面，本发明为人类或宠物提供了预防或治疗因内毒素引起和/或有关的疾病的食物组合物，该组合物含有至少一种具有上述特性的乳酸菌和/或双歧杆菌菌株以及可吸收药物载体或基质。

这些组合物能减少小肠细菌滋生并减少内毒素从消化道渗漏到体内环境，这是宠物发的常见病，可能引起例如腹泻的发作、营养不良以及肠内的和全身的炎症。

最后一方面，本发明涉及了预防或治疗内毒素引起和/或有关病症的方法，包括让人或动物摄食一种组合物的步骤，该组合物含有至少一种具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌以及可吸收载体或药用基质。

发明详述

在下面的描述中，"NCC"指 Nestlé菌种保藏（Nestlé 研究中心，Vers- chez- les- Blanc，瑞士洛桑市）。

关于本发明第一个目的，是关于用至少一种具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌制备预防或治疗内毒素引起和/或有关病症的组合物。

事实上，已经出人意料地发现一些乳酸菌和双歧杆菌，特别是具有疏水表面的乳酸菌和双歧杆菌能够结合内毒素。

的确，根据本发明的菌株能够将内毒素结合在其疏水性的细胞壁上，因此清除了这些革兰氏阴性菌的前炎症产物，否则其可从肠道进入血液内，从而引起炎症反应，严重时，引起内毒素性休克。

根据本发明的乳酸菌或双歧杆菌选自适于动物消耗的菌株，它们的疏水性百分比（% H）参见 A. G. Zavaglia 等，Journal of Food protection，61卷，第7期,1998，865-873页。

优选根据本发明的菌株的 % H至少是80，更优选的是85-100 % H。

使用前述MATH方法（Pérez，P. F. 等，1998，Appl. Environ. Microbiol. 64：21-26）确定表面疏水性。简言之，用0.4 ml二甲苯经涡流混合120秒抽提2毫升细菌悬液（约10^8 CFU/ml，PBS）。用倾析法分相，测定水相的A_{600}。用下式计算细胞表面疏水性（% H)：H % =[(A_0-A)/A_0] × 100，其中A_0和A分别是用二甲苯提取前后的吸光度。

在优选的实施方案中，菌株可选自约氏乳杆菌、路氏乳杆菌、类于酪乳杆菌、动物乳杆菌、瘤胃乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、发酵乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种、双歧杆菌属、双歧双歧杆菌、长双歧杆菌、假长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌。

在最优选的实施方案中，菌株可以是例如嗜酸乳杆菌 NCC 2463（CNCM- I 2623）、双歧双歧杆菌 NCC 189(原名 CIDCA 536，CNCM-I-2333)、双歧双歧杆菌 NCC 235(原名 CIDCA 533，CNCM-I-2335)、青春双歧杆菌 NCC 251(CNCM I-2168)、乳双歧杆菌(ATCC27536)。

在根据本发明选择的多种菌株中，以下菌株按照布达佩斯条约分别被保藏在国立微生物保藏中心(CNCM)，Institut Pasteur，28 rue du Docteur Roux，75724 Paris Cedex 15，France，嗜酸乳杆菌 NCC

2463，保藏日：2001.2.02，保藏号 CNCM I-2623、双歧双歧杆菌 NCC 189 和 NCC 235，保藏日：1999.10.12，保藏号 CNCM-I-2333 和 CNCM I-2335。青春双歧杆菌 NCC 251，保藏日：1999.03.15，保藏号 CNCM I-2168。

乳双歧杆菌菌株(Bb12)(ATCC27536)，由 Hansen 提供(Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P. O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Danemark)。其疏水性为 89 % H。

根据本发明的菌株可以用于制备改善人类或动物健康情况的组合物，特别是预防或治疗人类和宠物中与内毒素有关系的病症。该菌株可以用作有效的制剂，预防内毒素性休克和消化道起源的败血症、细菌移位、坏死性小肠结肠炎、炎症性肠病、肠内感染，以及慢性内毒素血症有关的或促进分解代谢的和全身的炎症。

根据本发明的菌株可以按其活的形式或无活性形式使用。

在优选的实施方案中，乳酸菌株在其发酵生长培养基中使用。所述培养基可以例如单独消毒或与食物一起消毒、挤出或喷雾干燥、冷却或者存放。

菌株的使用量可以是每人每日相当于大约10^3-10^{14}cfu（菌落形成单位）。此量取决于个体重量，对于人类来说优选大约为10^9-10^{12}cfu/日，对于宠物为10^7-10^{10} cfu/日。

根据另一方面，本发明涉及一种分离出的具有疏水表面性质并能够结合内毒素或与革兰氏阴性细菌共聚集的乳酸菌或双歧杆菌菌株。

本发明菌株结合内毒素的能力可以使用FITC-标记的内毒素容易地测定出，测量放射性同位素标记的内毒素与细菌细胞的结合，在这种情况下内毒素的分子结构是不变的，而与FITC缀合后分子可能会改变(见实施例）。

优选测量菌株将内毒素从溶液中除去的能力，该溶液中的内毒素含量是模仿人类肠中发现的内毒素量。用微量分析法检查内毒素水平，如检测革兰氏阴性细菌的脂多糖中的2-酮-3-脱氧辛酸酯（2-keto-3-deoxyoctonate）基团(Karkhanis Y D, 等, Analytical Chemistry(1978)85: 595-601)。优选选用可由此溶液中除去30%以上内毒素含量的细菌。在此分析中，被检测为非疏水性的细菌不会改变内毒素的初始含量(见实施例）。

这类菌株可以用作如上所述的用途，特别是作为有效的制剂，预防例如内毒素性休克和消化道起源的败血症、细菌性移位、坏死性小肠结肠炎、炎症性肠病、肠内感染，以及慢性内毒素血症有关的或促进分解代谢的和全身的炎症。

根据另一方面，本发明涉及一种人类或宠物食物组合物，其含有至少一种分离出的具有上述特性的菌株的乳酸菌和/或双歧杆菌以及可吸收的载体或药物基质。

所述菌株可以按如上所述进行选择。

优选该乳酸菌或双歧杆菌可以作为日常饮食的补充而服用，或作为人类或宠物营养完全的食物的成分而服用。

如上所述人类或宠物食物组合物可以至少包含如上所述的乳酸菌和/或双歧杆菌菌株，使菌株的使用量是每人每日相当于大约10^3-10^{14} cfu。此量取决于个体重量，对于人类来说优选大约为10^9- 10^{12} cfu/日，对于宠物为10^7-10^{10} cfu/日。

人类食物的形式可以例如是营养制剂、婴儿制剂、以奶为基础的产品、乳制品、以谷类为基础的产品等形式。为了制备这种食品产品或组合物，如上所述菌株可以在制造时引入在食物，比如谷类粉末、奶粉、酸乳酪之中。

在一个实施方案中，可以制备包括蛋白质来源和至少一种根据本发明的菌株的营养制剂。膳食蛋白质优选用作蛋白质的来源。膳食蛋白质可以是任何适当的膳食蛋白质；例如动物性蛋白质（比如牛乳蛋白质、肉蛋白质和卵蛋白质）、植物蛋白质（比如大豆、小麦、大米或豌豆蛋白质）、游离氨基酸混合物或以上膳食蛋白质的组合。牛乳蛋白质比如酪蛋白、乳清蛋白和大豆蛋白质是特别优选的。组合物还可含有碳水化合物来源和脂肪源。

如果营养制剂包括脂肪源，该脂肪源优选提供大约营养制剂中大约5%-55%的能量； 例如大约20%-50%的能量。组成脂肪源的脂类可以是任何适当的脂肪或脂肪混合物。植物脂肪是特别适合的；例如大豆油、棕榈油、椰子油、红花油、向日葵油、玉米油、菜籽油、卵磷脂等。如需要，也可加入动物脂肪，如奶油。

如果营养制剂包括碳水化合物源，该碳水化合物源优选提供大约营养制剂中40%- 80%的能量。可以使用任何适当的碳水化合物，例如

蔗糖、乳糖、葡萄糖、果糖、淀粉糖浆干粉，及麦芽糖糊精和上述碳水化合物的混合物。

如需要，也可以加入膳食纤维素。许多类型的膳食纤维素是可用的。其它的适当膳食纤维素源可以包括大豆、豌豆、燕麦、果胶、瓜耳豆胶和阿拉伯树胶。如果使用膳食纤维素，优选包括相当于营养制剂中最多至大约5%的能量。适当的维生素和矿物质可以以通常的方式包括在此营养制剂中以符合相应的指标。如需要，一种或多种食物级乳化剂可以加入此营养制剂；例如二乙酰酒石酸的单和二甘油酯、卵磷脂及单和二甘油酯。同样地，可以包括适当的盐和稳定剂。

营养制剂优选经肠道服用； 例如以粉末、液态浓缩液或即饮的饮料形式。

营养制剂可以用任何适当的方式制备。例如，营养制剂可以将膳食蛋白质源、碳水化合物源和脂肪源以适当的比例混合在一起而制备。如果使用乳化剂，可以在混合时加入。维生素和矿物质可以在混合时加入，但是通常后加入，避免热降解。任何亲脂性的维生素、乳化剂等等可以在混合之前溶解到脂肪源中。然后将水，优选是经反向渗透的水混合，形成液体混合物。水的温度通常是大约50℃- 80℃，以有助于组分的分散。市场上可买到的液化剂可用于形成液体混合物。例如用两个步骤配制时，将液体混合物均匀化。

然后，液体混合物可以进行热处理，以减少细菌存在。如液体混合物可以被迅速加热到大约80℃- 150℃的温度范围并维持大约5秒-5分钟。这可以用注入蒸汽、高压釜或热交换器，例如用平板式热交换器进行。然后将液体混合物冷却至大约60℃-大约85℃，如通过瞬间冷却。然后可将液体混合物再均匀化；例如在两段法中，第一阶段的压力大约在7 MPa- 40 MPa，第二阶段大约在2 MPa- 14 MPa。如果要加入任何热敏感的成分，如维生素和矿物质，均匀化的混合物可以进一步冷却。均匀化混合物的pH和固体含量通常是标准化的。

如果欲生产粉末状的营养制剂，将均匀的混合物转入到适当的干燥设备，比如喷雾干燥器或冷冻干燥机中，制成粉末。粉末的含湿量应小于大约5%（按重量计算）。

如果欲生产液体制剂，均匀化的混合物优选无菌充入适当的容器中。无菌灌装入容器可以通过以下方法进行：预热均匀化的混合物（例

如大约75-85℃），然后将蒸汽注入均匀化的混合物，以提高温度至大约140-160℃，例如在大约150℃。然后将均匀化的混合物冷却，如通过瞬间冷却至温度大约75-85℃。然后可将均匀化的混合物均匀化。进一步冷却至大约室温并充入容器中。进行此种性质的无菌灌装的适当装置是市场上可买到的。液体制剂可以是即可服用的制剂形式，具有大约10-14%（按重量计算）固体含量或可以是浓缩液的形式； 通常的固体含量大约在20-26%（按重量计）。可在液体制剂中加入香料，以便配制成为方便、香浓、即饮的饮料。

在另一个实施方案中，通常的食品可以富含本发明所述的菌株。例如：发酵牛奶、酸奶、鲜乳酪、凝乳、糕饼条、早餐谷类薄饼或条、饮料、奶粉、大豆制品、非奶发酵产品或用于临床营养的营养增补剂。

在另一实施方案中，可以制备全营养宠物食物组合物。该组合物可以是粉末状、干的形式、半潮湿的或湿的、冷却的或储藏稳定的宠物食物产品。它还可以是用于宠物的营养增补剂或药物组合物。这些宠物食物可以按常规方法生产。除该菌株外，这些宠物食物可以包括任何一种或多种淀粉源、蛋白质源和脂肪源。

适当的淀粉源是谷类物和豆类，比如玉米、大米、小麦、大麦、燕麦、大豆和它们的混合物。适当的蛋白质源可以选自任何适当的动物或植物蛋白源，例如肉类和肉粉、家禽粉、鱼粉、大豆蛋白质浓缩物、牛乳蛋白质、面筋等。对于年长的动物，更优选的是包含高质量蛋白质的蛋白源。适当的脂肪源包括肉类、动物脂肪和植物脂肪。另外，还可有各种其它组分,例如：糖、盐、香料、调味品、维生素、矿物质、调味剂、脂肪等等都可按需要加入宠物食物。

制备干的宠物食物适当的方法是挤出烹制，虽然可以使用烘焙及其他适当的方法。当进行挤出烹制时,通常得到碎块形式的干的宠物食物。如果使用前生物（prebiotic），可在加工之前将该前生物与干的宠物食物的其他组分混合。适合的方法参见欧洲专利申请0850569的描述，该专利申请的公开引入作为参考。如果使用前微生物，最好将该有机体覆盖在干宠物食物上，或充入干宠物食物中。适合的方法参见欧洲专利申请 No 0862863的描述，该专利申请的公开引入作为参考。

对于湿的食物，美国专利4,781,939 和 5,132,137所述的方法可用于生产人造肉制品。这些专利的公开在此引入作为参考。对于生产

块型产品的其它加工方法也可以使用，例如在蒸汽灶上烹制。或者，块型产品可以用下法生产，将适当的肉类原料乳化，以生产肉糜，在装入罐或其它容器之前加适当的胶凝剂，并且加热肉糜。

前生物在宠物食物中的量优选大约是20%（按重量计算）；尤其大约10%（按重量计算）。例如，宠物食物可以包含大约0.1%-5%（按重量计算）的前生物。对于宠物食物，用菊苣作为前生物时，饲料混合物中可以包含大约0.5%-10%(按重量计算)的菊苣；更优选大约含1%-5%（按重量计算）。

如果使用前微生物，每克宠物食物中优选含有大约10^4-10^{10}前微生物细胞；更优选每克宠物食物含有大约10^6-10^8前微生物细胞。宠物食物可以含有大约0.5%-20%（按重量计算）前微生物的混合物；优选大约1%-6%（按重量计算），例如大约3%-6%（按重量计算）。

该宠物食物可以含有其它活性剂，如长链脂肪酸。适当的长链脂肪酸包括α-亚油酸、γ亚油酸、亚油酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸。鱼油是适当的二十碳五烯酸源和二十二碳六烯酸源。琉璃苣籽油、blackcurrent籽油和月见草油是适当的γ亚油酸源。红花油、向日葵油、玉米油和大豆油是适当的亚油酸源。必要时，在宠物食物中补充矿物质和维生素以使营养完全。

此外，如需要，可将菌株用胶囊包裹；例如置于糖基质、脂肪基质或多糖基质中。

宠物消耗该宠物食物以获得有益的效果的消耗量取决于宠物的大小或宠物的类型及年龄。然而能提供每日量大约为至少一种乳酸菌或双歧杆菌菌株的10^3- 10^{14} cfu（菌落形成单位）的宠物食物的通常是合适的。优选对于狗，大约服用10^9- 10^{10} cfu/日，猫10^7- 10^{10} cfu/日。

根据本发明的组合物特别适于预防或治疗与革兰氏阴性细菌、产生内毒素的细菌如螺杆菌属、沙门氏菌属有关的感染，以及与小肠细菌滋生（SIBO）有关的感染，所有这些感染临床上表现为腹泻、肠道或全身发炎的病症，或异化作用和营养不良。

根据最后方面，发明提供了一种预防或治疗内毒素引起和/或有关病症的方法，该方法包括的步骤是让人或动物摄食含有至少一种具有疏水表面性质的乳酸菌和/或双歧杆菌菌株以及有关的可吸收的载体

或药用基质的组合物。

此方法特别适于预防或治疗与革兰氏阴性细菌、产生内毒素的细菌，如螺杆菌属、沙门氏菌属有关的感染，以及与小肠细菌滋生(SIBO)有关的感染，所有这些感染临床上表现为腹泻、肠道或全身发炎的病症，或异化作用和营养不良。

以下给出的实施例仅为了说明，而决不应理解为对本申请发明的限制。除非另有说明，所有给出的百分比均为重量百分比。实施例前有以下附图的简述。

附图

图1：双歧双歧杆菌菌株 NCC 189(原名CIDCA 536, CNCM I-2333)直方图，显示结合了FITC- LPS。A: 无 FITC-LPS的对照。B: 用 50微升/m1FITC- LPS培养。至少分析16000次结果。

图2: 白蛋白对乳酸菌和双歧杆菌结合FITC-LPS的影响。A:双歧双歧杆菌菌株 NCC 200(原名 CIDCA 538,CNCM I-2334)。B: 嗜酸乳杆菌菌株 NCC 2463(CNCM I-2623)。C: 双歧双歧杆菌菌株 NCC 189(原名 CIDCA 536, CNCM I-2333)。

图3: 双歧双歧杆菌菌株 NCC 189(原名 CIDCA 536, CNCM I-2333)生长和FITC-LPS结合动力学。数值来自两次独立实验的平均数。

图4: LPS被双歧杆菌菌株结合，用微量分析法确定脂多糖中的2-酮-3-辛酸酯基团(KDO)。溶液的初浓度是100μg/ml。矩形显示溶液用疏水性的双歧杆菌菌株NCC 189 和 NCC 251(CNCM I-2168)培养后与用非疏水性的双歧杆菌菌株(NCC 200(CNCM I-2334))培养后的终浓度比较。

图5: 用疏水性的细菌预培养的LPS溶液在HT- 29人上皮细胞上的前炎活性(IL-8(ng/mL))。

检测对照样品DMEM、人乳(HM)2%、单独的LPS(2.5 μg/ml)、单独的双歧双歧杆菌属菌株 NCC 189(1.5e8 cfu/ml)的基础刺激活性。LPS +人乳 (sCD14的来源)的试液与用双歧双歧杆菌菌株NCC 189(1.5e8 cfu/ml)预培养的含2.5μg/ml LPS +2%人乳的溶液比较。

实施例

实施例1: 选择本发明的疏水性的乳酸菌菌株:

疏水性的细菌基于细菌细胞在有机(疏水性的)相和水相的分配百

分比进行最初的选择。利用以前所述的MATH方法确定表面疏水性(Pérez, P. F. 等, 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26)。简言之，2 ml 细菌悬液(约10^8 CFU/ml, PBS)用0.4毫升的二甲苯进行涡流混合抽提120秒。用倾析法分离不同的相并测量水相A_{600}。用下式计算细胞表面疏水性(% H): H% =[(A_0-A)/A_0] × 100，其中A_0和A是分别用二甲苯提取前后的吸光度。

随后根据细菌将内毒素从模仿人肠道内毒素含量的溶液中除去的能力，选择乳酸菌或双歧杆菌。用微量分析法检测革兰氏阴性细菌的脂多糖中的2-酮-3-辛酸酯基团，以测定内毒素水平。(Karkhanis Y D, 等, Analytical Chemistry(1978)85: 595-601)。

选择由此溶液中除去30%以上内毒素的细菌。在此分析中测定为非疏水性的细菌不能改变内毒素的初始含量。

实施例 2: 乳酸菌作为内毒素清除剂的体外效果

选择80 % H以上细菌和一些非疏水性的"阴性"对照，对来自大肠杆菌的LPS和不同的表面性质的乳酸菌之间相互作用进行了研究，用流式细胞术完成与荧光标记的内毒素相互作用的测定。

材料和方法

菌株和生长条件

嗜酸乳杆菌菌株 NCC 2463(CNCM I-2623)来自 Nestec collection(Lausanne, Switzerland)。双歧双歧杆菌NCC 189(原名CIDCA 536, I-2333)和双歧双歧杆菌NCC 200(原名CIDCA 538,(CNCM I-2334))菌株来自 collection of the Centro de Investigacion y Desarrollo en Criotecnologia de Alimentos(La plata, Argentina)。用 10%(体积/体积)甘油保存的冷冻悬浮液(-80℃)在实验之前在MRS肉汤中再活化一次。所有培养在37℃厌氧状态下进行(BBL GasPak Plus)。

FITC-LPS 结合

脂多糖和 FITC-标记的脂多糖来自 Escherichia coli 血清型 0111 : B4(Skelly, R. R 等, 1979, Infect. Immun. 23: 287293)购自Sigma。含1000μl/ml的储备液用蒸馏水制备并进行适当稀释。

细菌培养物用PBS洗3次，将悬浮液标定为10^7 CFU/ml。取400μl与不同的量的FITC- LPS或LPS混合，获得从0到50μg/ml浓度范围的

反应混合物。在4℃或 37℃下在温育30分钟，然后用PBS洗细胞2次，并用1%(体积/体积)多聚甲醛在4℃下固定30分钟。使用蓝绿激发光(FACScan™)进行流式细胞分析。

表面疏水性

用前述MATH方法(Pérez, P. F. 等, 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26)确定表面疏水性。简言之，用0.4 ml二甲苯经涡流混合抽提2毫升细菌悬液（约10^8 CFU/ml, PBS）。用倾析方法分离不同的相并测量水相的A_{600}。用下式计算细胞表面疏水性(% H)：$H\% = [(A_0-A)/A_0] \times 100$，其中$A_0$和A分别是用二甲苯提取前后的吸光度。

结果

所研究的菌株表面疏水性结果见表1。嗜酸乳杆菌NCC 2463(CNCM I-2623)和双歧双歧杆菌NCC 189(CNCM I-2333)菌株表面疏水性值分别是93和96%，而婴儿双歧杆菌NCC200菌株（CNCM I- 2334）不是疏水性的，显示值约为 3%。

菌株	疏水性 %
NCC 2463(CNCM I-2623)	93 ±3
NCC 189(CNCM I-2333)	96±3
NCC 200(CNCM I-2334)	3±2

表1：所研究的菌株疏水性，表中数值是至少3次测定的平均值。

用50 μg/ml FITC标记的LPS培养的菌株NCC 189细菌群落显然进入荧光区之内。位于图右侧(标记M1)的结果代表90%的控制的菌群（图1b）。对于未用FITC-LPS培养的悬浮液，仅有2%不同结合能力的结果。

表 2(下)显示FITC- LPS结合是剂量依赖性的。NCC200菌株发现有5%- 15%的FITC（+）细胞。另一方面，菌株NCC 189显示出约95%的FITC（+）细胞。约在 10 μg/ml FITC LPS时出现饱和。加入白蛋白，一种脂肪结合物，明显减少在所有研究的菌株中FITC（+）的比率（图 2）。而在有0.4%白蛋白和50 μg/ml的FITC- LPS存在时，菌株CIDCA 536显示出约30%的FITC（+）细胞（图2C）。此外对于此菌株，用浓度高达3%白蛋白时，发现有10%的FITC(+)细胞。二价阳离子(Ca2+ 0.9 mM和 Mg2+ 0.5 mM）不改变结合能力（数据未显示）。

FITC-LPS (μg/ml)	菌株	
	NCC 189	NCC 200
0	0. 1	0.2
1	88.1	0.7
10	92.1	5.2
20	92.8	5.9
30	93.9	3.7
40	94.7	4.6
50	94.8	4.6

表 2：在不同的浓度FITC- LPS时FITC(+)细菌百分比。

至少分析30000个实例。

FITC- LPS对于双歧双歧杆菌 NCC 189菌株（原名为CIDCA 536, CNCM I- 2333）的结合强烈依赖于生长期（图3）。在稳定期收获的细菌显示出高比率的FITC（+）细胞。这些数值在延滞期显著地下降，在生长期逐步的恢复。在4℃- 37℃之间，该结合发现无差异。

总之，对于菌株NCC 189这样的高度疏水性的菌株显示出达到约95%的 FITC（+）细胞。非疏水性的菌株 NCC 200从未达高于5%的值。这些结果表明LPS的结合与表面疏水性关联。

这些结果清楚地表明了疏水性的细菌结合FITC-标记的内毒素，从而变为有荧光的。用流式细胞术进行检测时，内毒素浓度为10μg/ml时，超过90%的疏水性的细胞培养物变为有荧光的；相反，在类似的内毒素浓度下，非疏水性的细菌细胞中，小于10%的细胞变为阳性。

当疏水性的培养物被放入含浓度范围在 30和 90 μg/ml之间内毒素的培养基中时，浓度在10^7-10^8细菌/ml的细菌培养物，至少消除20%的内毒素。使用放射性同位素标记的内毒素证实了这些数据。

实施例 3：对人免疫活性细胞的实验

对消除在疏水菌株培养系统存在下内毒素诱导的人免疫活性细胞的前炎症反应，就培养系统中存在疏水菌株与非疏水性的细菌进行了对比研究。

疏水性双歧双歧杆菌 NCC 189(CNCM I-2333)和非疏水性婴儿双歧杆菌 NCC 200(CNCM I-2334)在含规定量内毒素（用KDO方法测定）的溶液中培养（见实施例 1）（图4）。

用疏水细菌悬浮液培养后，存在的内毒素明显减少，而对于非疏水菌株则未观察到变化。

实施例 4：疏水细菌功能研究

材料和方法

洗涤过的细菌再悬浮在DMEM-高葡萄糖（AMIMED）中，并用终浓度为2.5μg/ml的大肠杆菌0111：B4(Sigma)的LPS预培养。离心后，200μl的上清液或再悬浮细菌小粒用于刺激HT 29上皮细胞。

在37℃培养20小时后，使用酶联免疫吸附方法检查 HT-29细胞培养物上清液中是否存在IL-8。

结果

结果见图 5 。当LPS溶液用疏水细菌预培养时，LPS的前炎活性显著降低。离心后，加至人上皮的细胞培养物中(在人乳存在下，因为LPS刺激依赖于sCD14存在)的上清液比没有用疏水细菌预培养的上清液显著减少。

实施例 5：婴儿制剂

为获得婴儿制剂食品，我们制备了以下混合物的制剂，其中每100ml制剂含有：0.5-5%，优选2%的缩氨酸、0.2- 10%，优选4%的脂肪、1-25%，优选8%的非果聚糖碳水化合物（包括乳糖65%、麦芽糖糊精20%、淀粉15 %），和至少10^6 cfu/ml的以下菌株：嗜酸乳杆菌NCC 2463(CNCM I-2623)，双歧双歧杆菌NCC189(CNCM I-2333)，双歧双歧杆菌 CNCM I-2335，青春双歧杆菌 CNCM I-2168，并配合少量的维生素和微量元素，以适应每日需要，及0.01-2%，优选0.3 %的矿物质，和50-90%，优选75%的水。

实施例 6：在乳制品中使用本发明的疏水性的乳酸菌菌株

双歧双歧杆菌(CNCM I-2333)、嗜酸乳杆菌NCC 2463(CNCM I-2623)、双歧双歧杆菌NCC235(CNCM I-2335)或青春双歧杆菌NCC251(CNCM I-2168)中的一种或多种菌株，根据本发明可以用于制造发酵的酸奶样奶产品。

为此，制备了含2.8 %的脂肪和补充了2%脱脂奶粉和6%蔗糖的1升乳制品，在96℃巴氏杀菌30分钟，然后将其温度降至42℃。在含10%重新配制的牛奶粉和0.1%市售的酵母抽提物的无菌MSK培养基中，对非增稠的嗜热链球菌和非粘性的保加利亚乳杆菌菌株的预培养物进行再

活化。

同时，在含10%重配的牛奶粉末和0.1%市售的酵母抽提物与1 %蔗糖的培养基中使一种或多种菌株的预培养物再活化。将每个再活化的预培养物按1%的接种量接入经巴氏杀菌的乳制品中，然后将这些乳制品在32℃发酵，直到pH达到4.5。用此法生产发酵酸奶样产品，并在4℃贮藏。

实施例 7:干的狗粮

一种饲料混合物，由大约58%（按重量计算）玉米、大约5.5%（按重量计算）玉米面筋、大约22%（按重量计算）鸡粉、2.5%干的菊苣、嗜酸乳杆菌NCC 2463（CNCM-I 2623)的菌株发酵乳组成，对于狗的量相当于大约10^{9}- 10^{10} cfu/日，其余成分是盐维生素和矿物质。

饲料混合物被送入预调节器并浸湿，然后将湿润的饲料送入挤出机-烹制机，制成凝胶状。从挤出机挤出的凝胶状基质通过冲模冲压并挤出。压出物被切割成适合喂给家犬的小片，在大约110℃干燥约20分钟，冷却形成小粒。

此干的狗粮能改善宠物健康情况，特别是能预防宠物的与内毒素有关的病症。

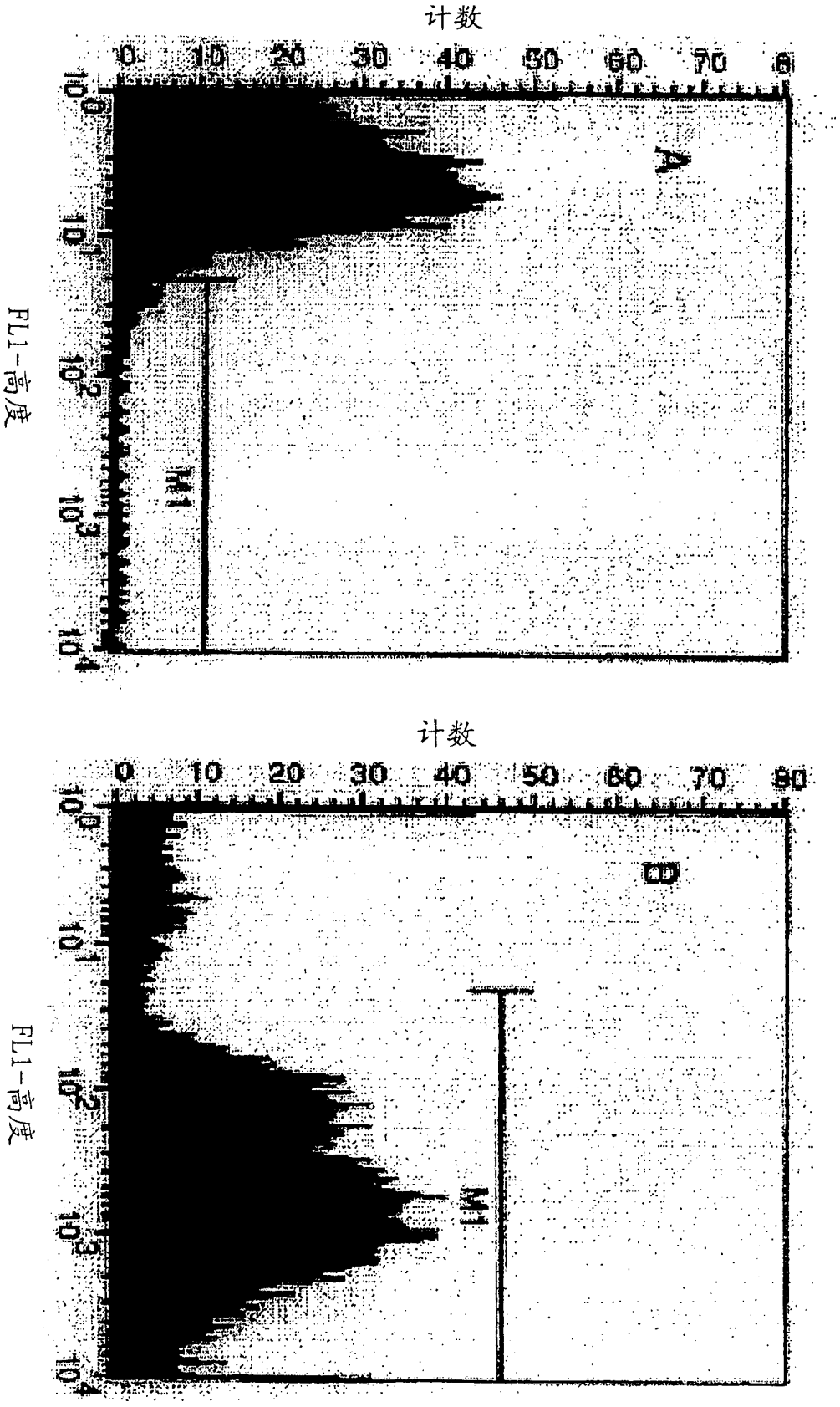

图 1

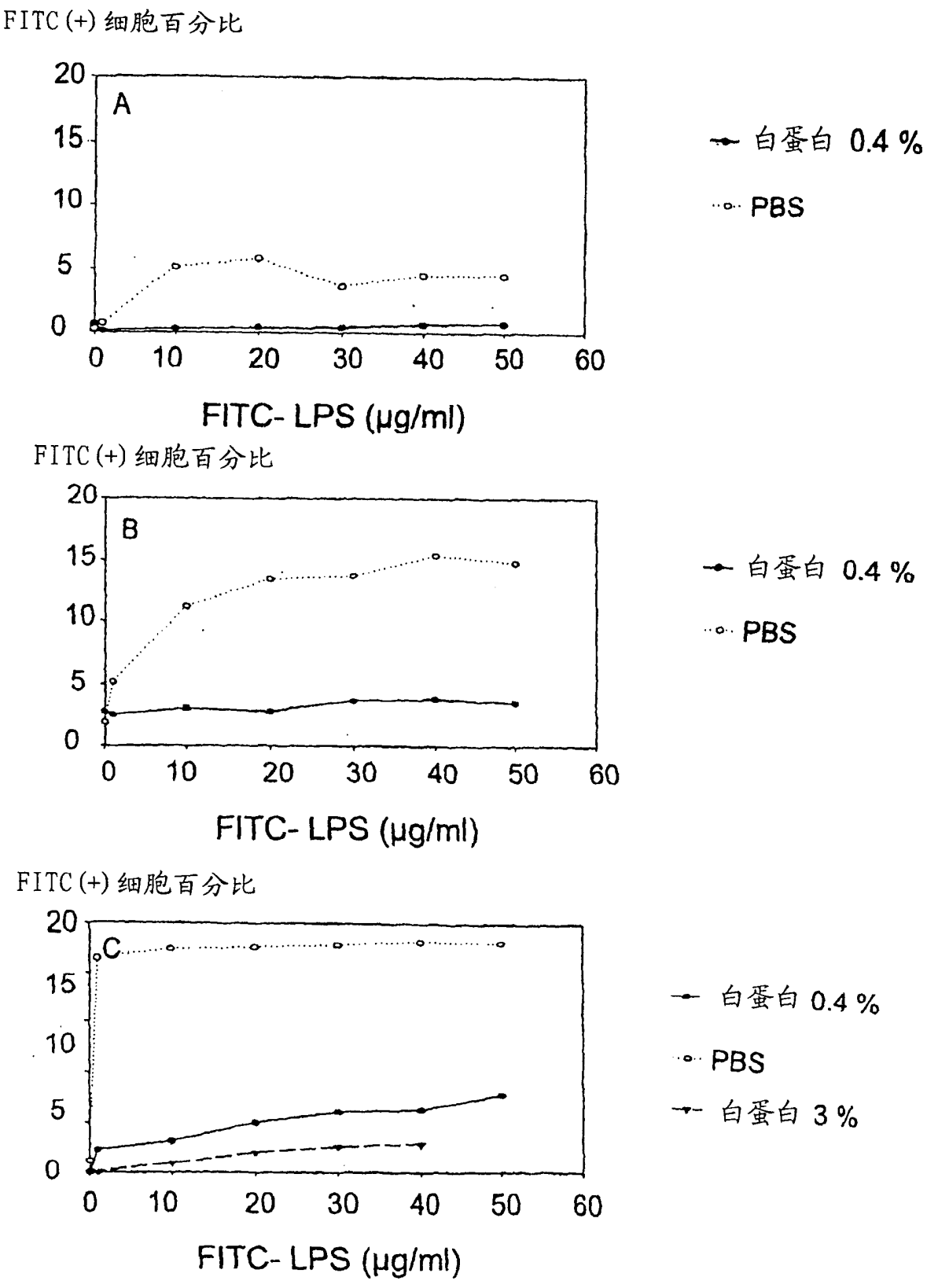
FITC(+)细胞百分比
A
20
15
10
5
0
0 10 20 30 40 50 60
FITC- LPS (μg/ml)
白蛋白 0.4 %
PBS
FITC(+)细胞百分比
B
20
15
10
5
0
0 10 20 30 40 50 60
FITC- LPS (μg/ml)
白蛋白 0.4 %
PBS
FITC(+)细胞百分比
C
20
15
10
5
0
0 10 20 30 40 50 60
FITC- LPS (μg/ml)
白蛋白 0.4 %
PBS
白蛋白 3 %

图 2

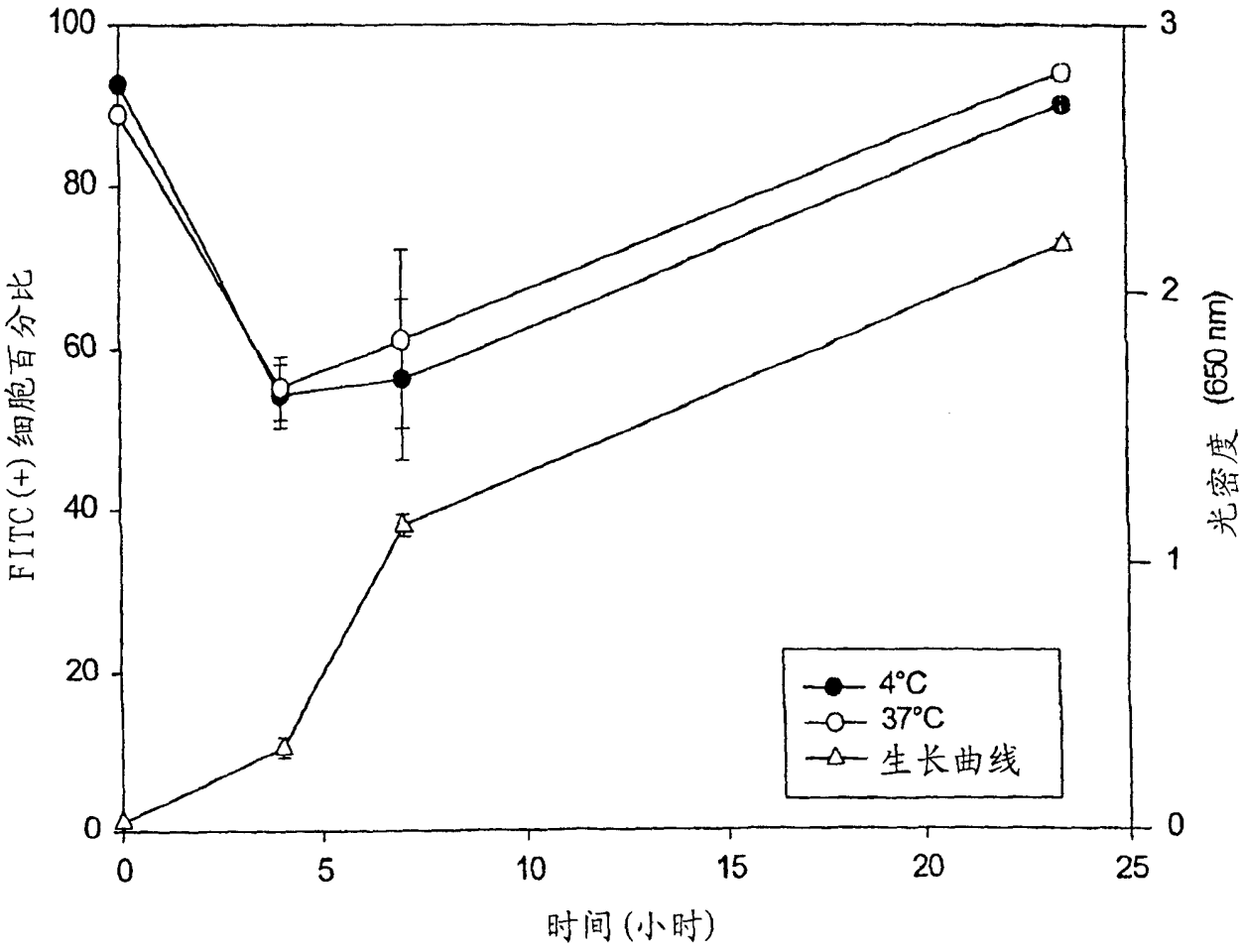
100
80
60
40
20
0
FITC(+)细胞百分比
3
2
1
0
光密度 (650 nm)
0
5
10
15
20
25
时间(小时)
4°C
37°C
生长曲线

图 3

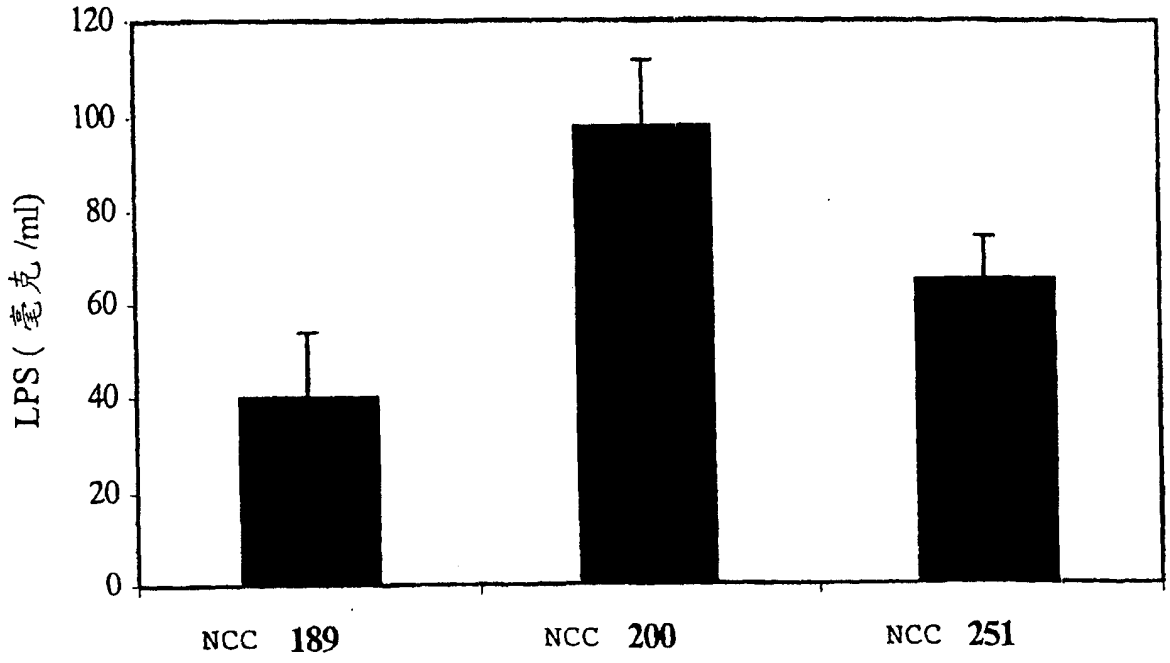

图 4

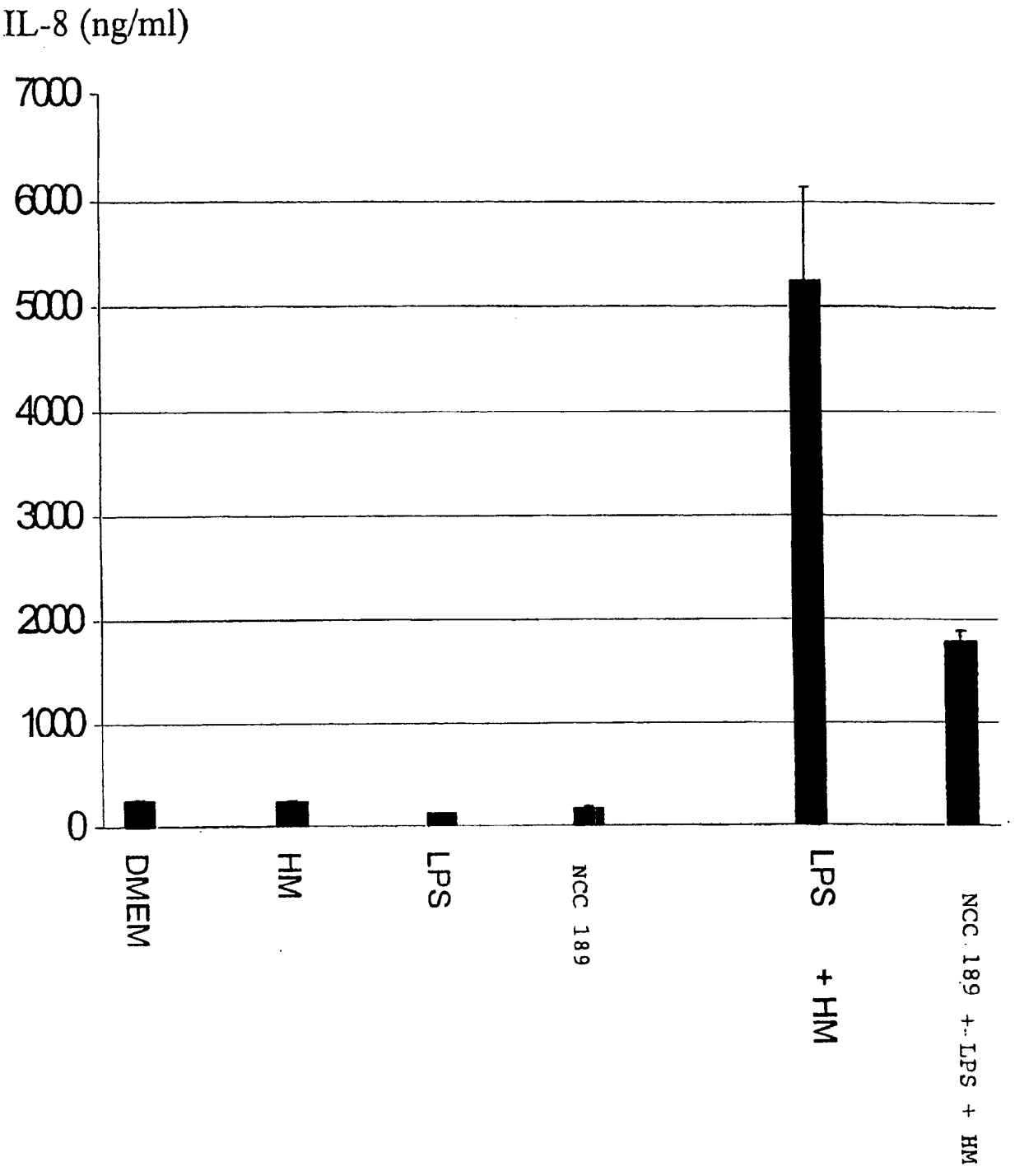
IL-8 (ng/ml)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
DMEM
HM
LPS
NCC 189
LPS + HM
NCC 189 + LPS + HM

图 5