

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580019583.1

[51] Int. Cl.

C12P 21/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1997748A

[22] 申请日 2005.4.20

[21] 申请号 200580019583.1

[30] 优先权

[32] 2004.4.20 [33] US [31] 60/564,049

[86] 国际申请 PCT/US2005/013646 2005.4.20

[87] 国际公布 WO2005/112976 英 2005.12.1

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.14

[71] 申请人 芝加哥大学

地址 美国伊利诺斯州

[72] 发明人 E·B·常 E·O·彭托夫

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈轶兰

权利要求书 3 页 说明书 47 页 序列表 2 页
附图 19 页

[54] 发明名称

来自乳杆菌 GG 的益生化合物及其用途

[57] 摘要

本发明提供了用于治疗炎症病症例如炎症肠病 (IBD) 的方法和组合物。使用不含细菌的、从益生菌衍生的化合物而不用活细菌提供了优于使用活细菌的安全性优点。此外,已显示分离的化合物的临床功效比益生菌更一致,后者依赖于建立和维持细菌定殖的能力。

1. 包含分离的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物的组合物。
2. 权利要求 1 的组合物，其中所述细胞保护性化合物来源于乳杆菌 GG-条件培养基。
3. 权利要求 1 的组合物，其中所述细胞保护性化合物保护上皮细胞对抗选自热和氧化的应激。
4. 权利要求 1 的组合物，其中所述化合物诱导至少一种热激蛋白的表达。
5. 权利要求 4 的组合物，其中所述热激蛋白选自 Hsp25 和 Hsp72。
6. 权利要求 1 的组合物，其中所述细胞保护性化合物是蛋白。
7. 权利要求 6 的组合物，其中所述蛋白是热稳定的、酸稳定的或具有小于 10kDa 的分子量。
8. 包含由下列性质表征的蛋白的分离的细胞保护性化合物，所述性质是：
 - (a) 从乳杆菌 GG 分离的能力；
 - (b) 在肠上皮细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 的表达的能力；
 - (c) 小于 10kDa 的分子量；
 - (d) 酸稳定性；和
 - (e) 热稳定性。
9. 用于治疗患有炎症病症的受治疗者的方法，其包括给患者施用治疗有效剂量的分离的来源于乳杆菌 GG-条件培养基的细胞保护性化合物。
10. 权利要求 9 的方法，其中所述受治疗者是人患者。
11. 权利要求 9 的方法，其中所述炎症病症是炎症肠病。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述炎症肠病选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。
13. 权利要求 10 的方法，其中所述化合物诱导至少一种热激蛋白的表达。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述热激蛋白选自 Hsp25 和 Hsp72。

15. 在细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 中至少一种的表达的方法，其包括将所述细胞与分离的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物接触。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述细胞保护性化合物存在于乳杆菌 GG-条件培养基中。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述细胞是肠上皮细胞。

18. 一种药物组合物，其包含分离的来源于乳杆菌 GG-条件培养基的细胞保护性化合物和至少一种药物可接受赋形剂。

19. 权利要求 18 的药物组合物，其中所述化合物诱导至少一种热激蛋白的表达。

20. 权利要求 18 的药物组合物，其中所述热激蛋白选自 Hsp25 和 Hsp72。

21. 生产分离的细胞保护性化合物的方法，其包括：

(a) 获得乳杆菌 GG；和

(b) 从乳杆菌 GG 分离细胞保护性化合物。

22. 权利要求 21 的方法，其还包括培养乳杆菌 GG 至少 8 小时。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述细胞保护性化合物是蛋白。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述蛋白是热稳定的、酸稳定的或具有小于 10kDa 的分子量。

25. 用于改善炎性病征的症状的方法，其包括给受治疗者施用治疗有效剂量的权利要求 18 的药物组合物。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述受治疗者是人。

27. 权利要求 25 的方法，其中所述炎性病征是炎性肠病。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述炎性肠病选自克罗恩病和溃疡性结肠炎。

29. 权利要求 1 的组合物，其中所述化合物在上皮细胞中激活信号转导途径，导致选自 Hsp25 和 Hsp72 的热激蛋白的表达。

30. 权利要求 29 的组合物，其中所述激活由热激因子-1 (HSF-1) 介导。

31. 权利要求 29 的组合物，其中所述信号转导途径包含选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶。

32. 权利要求 31 的组合物，其中所述途径的激活包括选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶的激活。

33. 在上皮细胞中激活信号转导途径的方法，其包括将所述细胞与有效量的权利要求 29 的化合物接触。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述信号转导途径包含选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶。

35. 预防对细胞的氧化剂损伤的方法，包括对上皮细胞施用有效量的权利要求 1 的化合物。

36. 稳定细胞骨架的方法，包括对上皮细胞施用有效量的权利要求 1 的化合物。

37. 预防炎症病症的方法，包括给受治疗者施用治疗有效剂量的权利要求 18 的药物组合物。

38. 药盒，其包含权利要求 18 的药物组合物和向受治疗者施用所述组合物的方案。

来自乳杆菌 GG 的益生化合物及其用途

依据来自国立卫生院的资助号 DK47722、DK42086 和 K08 DK064840-01, 政府拥有本发明的权利。

发明领域

本发明总体上涉及炎症病症领域。更明确地, 其涉及炎症肠病或障碍, 例如溃疡性结肠炎和克罗恩病。本发明的实施涉及对来源于乳杆菌 GG (*Lactobacillus GG*) (LGG) 的新的生物活性化合物的鉴定和表征以及使用这些化合物治疗炎症肠病的用途。

背景

炎症肠病 (IBD) 是一组影响易感个体的消化道的慢性病症。炎症诱发的损伤与修复和细胞保护进程之间的平衡失调确定 IBD 中粘膜损伤的程度和严重性。示例性 IBD, 例如溃疡性结肠炎和克罗恩病, 导致消化道的炎症或溃疡。遗传背景、对环境因子的暴露或某些刺激性共生细菌的定殖的不幸组合可在易感个体中导致 IBD 的发生。

作为治疗策略, 用益生菌制剂改变 IBD 患者的肠道菌群已受到一定的关注。近来体外和体内的研究已显示多种益生菌制剂在预防或减轻和实验性结肠炎相关的肠粘膜炎症方面是有效的 (Madsen 等人, 2001; Gionchetti 等人, 2000b; Campierei 等人, 2000; 在参考文献列表中提供了完整的引用)。此外, 益生菌似乎降低慢性炎症情境下结肠粘膜的恶性转化率 (Wollowski 等人, 2001)。许多初步的临床试验已显示益生菌在囊炎和 IBD 中是有效的。也在进行数项多中心临床试验以确定这些试剂的有效性并优化在 IBD 患者中的剂量。尽管这些结果很有前景, 但益生菌作用的机制仍不清楚, 并且活益生菌生物的使用存在感染和其他不良结果的风险。

溃疡性结肠炎（一种示例性的 IBD）导致结肠和直肠内衬的炎症和溃疡。其极少影响小肠，除了和结肠连接的末端（称为末端回肠）。溃疡性结肠炎也可称为结肠炎或直肠炎。溃疡性结肠炎可在任何年龄的人中发生，但最常见地其始于年龄 15 至 30 岁之间。溃疡性结肠炎对男性和女性的影响相同并且似乎倾向于在某些家族中发生。关于导致溃疡性结肠炎的原因的理论非常多，但没有一个已被证实。流行的理论是，身体的免疫系统通过在肠壁中引发持续炎症来对病毒或细菌作出反应。

溃疡性结肠炎的最普遍的症状是腹痛和血性腹泻。患者也可经历疲劳、体重减轻、食欲不振、直肠出血，以及体液和营养的丢失。大约一半的患者具有轻微症状。其他患者经常发烧、血性腹泻、恶心和具有严重的腹部痛性痉挛。溃疡性结肠炎也可产生问题例如关节炎、眼部炎症、肝病（肝炎、肝硬化和原发性硬化性胆管炎）、骨质疏松、皮疹和贫血。没有人确切知道在结肠外发生问题的原因。科学家认为当免疫系统在身体的其他部分引发炎症时可发生这些并发症。当结肠炎得到治疗时，这些问题中的一些就消失了。

对溃疡性结肠炎的治疗取决于疾病的严重性。多数人用药物进行治疗。在严重的病例中，患者可能需要进行手术以除去患病的结肠。一些其症状是通过某些食物引发的人能够通过避免食用使其肠不适的食物（如调味浓重的食物、生水果和蔬菜或奶糖（乳糖））来控制症状。一些人具有持续数月或甚至数年的缓解。然而，大多数患者的症状最终会复发。

因为存在大量出血、严重的疾病、结肠的破裂或癌症的风险，大约 25-40% 的溃疡性结肠炎患者最终必须将其结肠切除。如果医药治疗失败，或如果皮质激素或其他药物的副作用威胁患者的健康，有时医生会推荐切除结肠。

克罗恩病和溃疡性结肠炎的不同在于其可影响消化道的任何部分。其引起可影响消化道内衬最深层的炎症和溃疡。一般开处抗炎药，例如 5-氨基水杨酸（例如，美沙拉秦）或皮质激素，但其并不总是有效。

使用环孢菌素进行的免疫抑制有时对于对皮质激素耐药或不耐受的患者是有益的。

然而，在 90%患有克罗恩病的患者中最终需要外科矫治；50%进行结肠切除。(Leiper 等人, 1998; Makowiec 等人, 1998)。手术后的复发率很高，50%的患者在 5 年内需要再次手术。(Leiper 等人, 1998; Besnard 等人, 1998)。

目前关于 IBD 的发病机理的概念表明存在细胞保护和创伤愈合过程与促炎症反应途径之间的平衡失调，其净结果最终导致促炎症反应的过度活动的状态和所致的对肠粘膜的破坏(Chang, 1999; Podolsky, 2002)。保持粘膜完整性的核心是维持上皮屏障功能，这一点由这样的事实证明，即导致屏障功能受损的改变的紧密连接结构被认为是促成溃疡性结肠炎的临床后遗症的原因(Schmitz 等人, 1999)。

可使用治疗来诱导和维持缓解，以及提高患有炎症性疾病或病症例如溃疡性结肠炎的人的生活质量。目前可获得几类药物。

氨基水杨酸药物，例如含有 5 氨基水杨酸 (5-ASA) 的药物，有助于控制炎症。柳氮磺吡啶是磺胺吡啶和 5-ASA 的组合，其用于诱导和维持缓解。磺胺吡啶组分将抗炎的 5-ASA 运送至肠。然而，磺胺吡啶可导致副作用例如恶心、呕吐、胃灼热、腹泻和头痛。其他 5-ASA 试剂例如奥沙拉秦、美沙拉秦和巴柳氮，具有不同的载体，提供较少的副作用，并可为不能服用柳氮磺吡啶的人使用。5-ASA 可口服、通过灌肠法施用，或以栓剂的形式施用，取决于炎症在结肠中的位置。首先使用该组药物对大多数患有轻微或中度溃疡性结肠炎的人进行治疗。

皮质激素，例如泼尼松和氢化可的松，也减轻炎症。它们可为具有中度至严重溃疡性结肠炎或对 5-ASA 药物不起反应的人使用。皮质激素可口服、经静脉内、通过灌肠法或以栓剂的形式施用。这些药物可导致副作用例如体重增加、痤疮、面毛、高血压、心境不稳和增加的感染风险。因为该原因，不推荐长期使用这些药物。

免疫调节剂，例如硫唑嘌呤和 6-巯基-嘌呤 (6-MP)，通过影响免

免疫系统减轻炎症。其用于对 5-ASA 或皮质激素不起反应或依赖于皮质激素的患者。然而，免疫调节剂作用缓慢，其可能需要长达 6 个月的时间才能显现完全的益处。监测服用这些药物的患者中的合并症（包括胰腺炎和肝炎、减少的白细胞计数和增加的感染的风险）。可将环孢菌素 A 和 6-MP 或硫唑嘌呤一起使用来在对静脉内的皮质激素不起反应的人中治疗活动性的、严重的溃疡性结肠炎。除了上述药物外，可施用其他药物来放松患者或减轻疼痛、腹泻或感染。

乳杆菌 GG 已成功地用于在婴儿和儿童中治疗急性和轮状病毒腹泻，也成功地用于治疗由于正常共生菌群的改变而导致的抗生素相关性腹泻（22、40 和 43）。最后，已显示乳杆菌 GG 在结肠癌的鼠类模型中减少肿瘤负荷水平，表明该益生菌菌株可能还具有抗癌活性。

细胞热激蛋白（Hsp）表达的诱导，如在热应激例如发烧后发生的诱导，是一种已详尽说明的机制，通过该机制细胞能够保护其自身免受进一步的伤害。该现象，称为“应激耐受性”，在整个进化和在所有物种中是高度保守的。在面临各种不同类型的应激（从热和渗透压应激至氧化和炎症性应激物）时，可诱导的热激蛋白为细胞提供了保护作用。已显示肠上皮细胞中 Hsp72 的过量表达增强了存活力和对抗来自单氯胺的氧化伤害的保护作用，单氯胺是一种在炎症期间当由先天性细胞和炎症性细胞释放的次氯酸和氨反应时大量产生的病理生理相关的活性氧代谢物。在肠上皮细胞中，可诱导的热激蛋白 Hsp72 和 Hsp25 据报道强化了上皮屏障对抗来自许多有害损伤的破坏，从而保持紧密连接和屏障功能。也已报道 Hsp25 稳定肌动蛋白细胞骨架。

通过使用有义和反义转染实验，已显示热激蛋白在对上皮细胞提供细胞保护中起着核心作用，这一点通过其在氧化应激的情况下保护上皮屏障功能的能力（Ropeleski 等人，2003；Urayama 等人，1998）得以说明。可诱导的热激蛋白（Hsp）属于高度保守的蛋白的家族，所述蛋白在保护细胞对抗环境中的生理和病理应激物方面发挥重要作用。在应激例如热、暴露于重金属和毒素、局部缺血/再灌注损伤或来自炎症的氧化应激的条件下，Hsp 的诱导既快速又强烈。通过温和的“应

激”获得的热激蛋白的诱导赋予对抗随后的损伤或伤害的保护作用，否则所述损伤和伤害可导致细胞死亡。该已详细描述的现象称为“应激耐受性” (Parsell 等人, 1993)。

在肠上皮细胞中，可诱导的热激蛋白提供一定程度对抗应激物例如来自炎症性细胞的氧化剂和热应激(例如，发烧)的细胞保护作用；可诱导的 Hsp 也在恶劣的条件下保存肠上皮细胞屏障功能的完整性 (Chang, 1999; Musch 等人, 1996; Musch 等人, 1999)。肠上皮细胞中热激蛋白的诱导在应激条件下延长了存活力 (Musch 等人, 1996) 和保存紧密连接(如通过跨上皮电阻所测量的) (Musch 等人, 1999)。

也已报道活 LGG 细菌激活 p38 MAP 激酶，尽管在单独使用条件培养基的情况下没有看到对 MAP 激酶中的任一种的效应 (Yan 等人, 2002)。通过将细菌培养在 MRS 肉汤中，然后沉淀、漂洗，重悬浮细菌于组织培养基中，让其再进行 2 小时的生长，之后在使用前过滤，来制备所用的条件培养基。

对益生菌的用途存在不断增长的兴趣，所述益生菌被定义为可摄入的微生物，其在治疗各种胃肠疾病中具有超越其内在营养价值的健康益处，所述胃肠疾病包括炎性肠病 (Gionchetti 等人, 2000a)、肠易激综合征 (Niedzielin 等人, 2001)、囊炎 (Gionchetti 等人, 2000b; Gionchetti 等人, 2003)，以及轮状病毒和抗生素相关性腹泻 (Isolauro 等人, 1991; Majamaa 等人, 1995; Arvola 等人, 1999)。尽管对其作用机制知之甚少，但益生菌似乎对肠粘膜具有保护性、营养性和抗炎性效果。

益生菌生物乳杆菌 GG 已成功地用于在婴儿和儿童中治疗急性和轮状病毒腹泻 (Isolauro 等人, 1991; Majamaa 等人, 1995)，也成功地用于治疗抗生素相关性腹泻 (Arvola 等人, 1999; Kalliomaki 等人, 2003)。轮状病毒感染需要 VP4 突起蛋白和上皮细胞表面的起始相互作用，C 末端片段 VP5*被认为负责细胞的细胞膜透化作用，其是病毒进入所必需的 (Zarate 等人, 2000)。

益生菌也被证实在治疗和预防异位性疾病中是有用的。在几种动

物模型中, 益生菌的使用表现出抗小球隐孢子虫 (*C. parvum*)、幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 和念珠菌感染的保护性。此外, 已显示乳杆菌 GG 在结肠癌的鼠类模型中减少肿瘤负荷的水平, 表明该益生菌菌株可能还具有抗癌活性 (Goldin 等人, 1996)。

尽管益生菌显示改善许多疾病的病程, 但对益生菌的作用机制了解甚少, 这在本领域是公认的不足。只是近年来才试图理解其作用和其与宿主细胞相互作用背后的机制。已提出许多不同的可能机制, 包括粘液产生的上调、上皮屏障功能的改善、IgA 产生的增加和增加的对肠上皮上的粘附位点的竞争, 以及抑制致病菌生长的有机酸、氨、过氧化氢和细菌素的产生。

作为治疗策略, 正在对用益生菌制剂改变 IBD 患者的肠道菌群进行研究, 但益生菌的作用机制仍不清楚。此外, 益生菌的临床功效高度依赖于建立和维持细菌定殖的能力, 依赖于细菌可靠一致地产生活性剂, 且受限于制剂的未调节组成和这些试剂的顺势疗法递送。另外, 活细菌的使用存在不可避免的感染和染病的风险。因此, 需要分离的、具有生物活性的益生因子和需要更有效的疗法来预防或治疗炎症病症例如炎性肠病。

发明概述

本发明通过提供具有生物活性的细胞保护性化合物来满足本领域中至少一个上述需要, 所述化合物由乳杆菌 GG 分泌并且诱导热激蛋白的表达。热激蛋白的细胞保护性作用可支持细胞抵抗炎症。因此, 本发明的化合物提供了用于治疗 IBD 和其他炎症病症的方法和组合物。

不受理论的束缚, 要指出的是益生菌对肠上皮细胞功能的保护作用 and 有益作用表明益生菌作用的机制之一可包括对细胞保护性热激蛋白的诱导。本公开内容显示由益生菌 LGG 合成的肽具有在鼠肠上皮细胞中以时间和浓度依赖性的方式诱导细胞保护性热激蛋白的能力, 包括通过转录因子 HSF-1 进行的转录调控。进一步有意义的是, 本发现

表明来自 LGG 的条件培养基不仅提供了对抗氧化剂应激的保护作用和上调上皮细胞热激蛋白, 而且其还调节信号转导途径。

在一个方面, 本发明提供了包含分离的来源于乳杆菌 GG 例如乳杆菌 GG-条件培养基 (*Lactobacillus* GG-conditioned medium) 的细胞保护性化合物的组合物。如此处所用的, “来源于”是指通过直接分离或基于特征(例如此处公开的特征或根据此处的公开内容使用常规方法确定的特征)最终从其获得的意思。使用本领域已知的任何技术例如重组表达法、化学合成法等获得所述化合物。在某些实施方案中, 所述细胞保护性化合物诱导至少一种热激蛋白的表达。在优选的实施方案中, 细胞保护性化合物诱导 Hsp25 和 Hsp72 中至少一个的表达。在本发明的一些实施方案中, 细胞保护性化合物是蛋白。也存在其中蛋白是热稳定的实施方案。如此处所用的, “热稳定的”是指在水中煮沸 20 分钟后仍能保持可检测的活性的蛋白。可通过测定本发明的细胞保护性蛋白诱导至少一种热激蛋白例如 Hsp25 或 Hsp72 的表达的能力来确定其活性。在一些实施方案中, 所述蛋白是酸稳定的。如此处所用的, “酸稳定的”蛋白是指在低于 7.0 的 pH 下最具活性的蛋白, 其中通过蛋白诱导 Hsp25 的表达的能力来确定活性。在一些实施方案中, 蛋白具有低于 10 kDa 的分子量。在优选的实施方案中, 所述细胞保护性化合物是热稳定、酸稳定和具有低于 10kDa 的分子量的蛋白。在一些实施方案中, 所述细胞保护性化合物保护上皮细胞免受选自热和氧化的应激的伤害。在另一个优选的实施方案中, 分离的细胞保护性化合物是这样的蛋白, 该蛋白具有从乳杆菌 GG 分离的能力、具有在上皮细胞例如肠上皮细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 表达的能力、具有小于 10 kDa 的分子量, 并且是酸稳定的和热稳定的。

本发明的另一方面提供了用于治疗患有炎症病症的受治疗者例如人患者的方法, 其包括给患者施用治疗有效量或剂量的分离的来源于乳杆菌 GG-条件培养基的细胞保护性化合物。如此处所用的, “治疗有效量”是这样的量, 该量在预防、改善或影响炎症病症的进程(例如, 通过抑制该病症的发生或延缓其速度)方面具有可检测的有益效

果。适合于根据本方法治疗的示例性炎症病症是炎症肠病，例如，克罗恩病和溃疡性结肠炎。在一些实施方案中，细胞保护性化合物诱导至少一种热激蛋白例如 Hsp25 和/或 Hsp72 的表达。

本发明的相关方面涉及用于改善炎症病症的症状或与炎症病症相关的症状的方法，其包括给受治疗者例如人患者施用治疗有效剂量的分离的来源于乳杆菌 GG 如乳杆菌 GG 培养基的细胞保护性化合物。本发明的该方面的示例性实施方案是用于改善炎症肠病例如克罗恩病或溃疡性结肠炎的症状的方法。和其相关的是本发明这一方面，提供了预防炎症病症的方法，该方法包括给受治疗者例如人患者施用分离的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物，例如分离的存在于乳杆菌 GG-条件培养基中的细胞保护性化合物。

炎症病症可以是自身免疫病症。可根据本发明治疗的自身免疫病症的实例包括类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣关节炎、特应性皮炎、湿疹性皮炎、牛皮癣、斯耶格伦综合征、克罗恩病、口疮性溃疡，虹膜炎、结膜炎、角结膜炎、溃疡性结肠炎、哮喘、过敏性哮喘、皮肤红斑狼疮、硬皮病、阴道炎、麻风病逆转反应、麻风结节性红斑、自身免疫眼色素层炎、多软骨炎、史蒂文斯-约翰逊综合征、扁平苔癣、结节病、原发性胆汁性肝硬化、后色素层炎、间质性膀胱炎或间质性肺纤维化。

在优选的实施方案中，炎症病症是炎症肠病。在示例性实施方案中，炎症肠病是克罗恩病。在本发明的另一个示例性实施方案中，炎症肠病是溃疡性结肠炎。在其他实施方案中，所施用的化合物诱导至少一种热激蛋白例如 Hsp25 和/或 Hsp72 的表达。

在治疗、改善和炎症病症相关的症状或预防炎症病症的方法中，本发明包括给受治疗者例如人患者施用有效量或剂量的此处公开的包含细胞保护性化合物的药物组合物。下面描述这些药物组合物。

本发明的另一个方面提供了用于在细胞中诱导至少一种热激蛋白例如 Hsp25 和/或 Hsp72 表达的方法，其包括将细胞和分离的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物例如存在于乳杆菌 GG-条件培养基中的

细胞保护性化合物接触。在某些实施方案中，本发明提供了在细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 之一或两者的表达的方法，其包括将细胞和从乳杆菌 GG 或乳杆菌 GG-条件培养基分离的细胞保护性化合物接触。在某些实施方案中，分离的细胞保护性化合物和表皮细胞例如肠上皮细胞接触。在其他实施方案中，所述细胞是免疫细胞例如树突细胞。

本发明的另一个方面提供了这样的药物组合物，该组合物包含分离的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物（例如发现于乳杆菌 GG-条件培养基中或从其中纯化的细胞保护性化合物）和至少一种药物可接受的赋形剂。在某些实施方案中，药物可接受的赋形剂是聚乙二醇。细胞保护性化合物或生物活性剂为“分离的”形式，意味着已将其和至少一种这样的蛋白分离，其与所述蛋白一起天然地在乳杆菌 GG 细胞或培养基中被发现。在本发明的该方面的一些实施方案中，所述化合物诱导至少一种热激蛋白例如 Hsp25 和/或 Hsp72 表达。

在另一个方面，本发明提供了产生分离的细胞保护性化合物的方法，其包括获得乳杆菌 GG 和从乳杆菌 GG 分离细胞保护性化合物的步骤。如上面所提到的，细胞保护性化合物的分离形式是指已将该化合物和至少一种和其一起在乳杆菌 GG 细胞或培养基中天然地被发现的蛋白分离开。在获得乳杆菌 GG 的过程中，可获得大量这样的细胞，或可在合适的培养基例如 MRS 中生长或培养这些细胞，从而在条件培养基中获得所述细胞。在一个实施方案中，为确保细胞保护性化合物的产生，预期培养期至少为 8 个小时。在某些实施方案中，细胞保护性化合物是蛋白。在一些实施方案中，细胞保护性化合物是热稳定的和/或酸稳定的和/或具有小于 10 千道尔顿 (kDa) 的分子量。在另一个方面，本方法还包括表征和/或鉴定细胞保护性化合物。

本领域技术人员熟悉用于分离蛋白的方法。例如，可通过 HPPLC、FPLC、疏水性 LC、离子交换 LC、配体/亲和 LC、大小排阻 LC、薄层层析、膜过滤、等电聚焦或聚丙烯酰胺凝胶电泳、或这些方法的任何组合，分离本发明的细胞保护性蛋白质。

用于表征本发明的化合物的细胞保护特性的方法对于本领域技

术人员来说是熟知的。细胞保护活性的指标包括,例如,诱导热激蛋白表达的能力,和在患有炎症病症的受治疗者中减少细胞损伤和/或促进伤口愈合的能力。因此,表征本发明的化合物的一个方法是测定对热激蛋白的诱导。另一个表征本发明的化合物的方法是测定化合物在受治疗者中减少细胞损伤和/或促进伤口愈合的能力。

用于鉴定蛋白的方法对本领域技术人员来说是熟知的。例如,可通过将样品接受 6N 水解,然后通过 HPLC-质谱测序以鉴定组成感兴趣的肽的所有单个氨基酸来鉴定细胞保护性蛋白。此外,可从容易鉴定的经胰蛋白酶处理的片段来确定内部氨基酸序列。可通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 来确定这些片段的氨基酸序列。然后将所述氨基酸序列和相关数据库(例如,SwissProt, Genbank)比较以鉴定感兴趣的蛋白或多肽。

在另一个方面,本发明的方法还包括获得更具细胞保护性的化合物。可通过本领域技术人员已知的任何方法获得更具细胞保护性的化合物。例如,可通过从乳杆菌 GG 或乳杆菌 GG-条件培养基中分离来获得更具细胞保护性的化合物。可选择地,更具细胞保护性的化合物可通过编码该细胞保护性化合物的重组 DNA 的表达来获得。

在另一个方面,本发明的方法还包括将更具保护性的化合物置于药物组合物中。在某些方面,该方法还包括给患有炎症病症的受治疗者施用该药物组合物。所述受治疗者可以是哺乳动物。优选地所述受治疗者是人。

在本发明的另一个方面,提供了分离的编码多肽保护性化合物的多核苷酸,其中所述被编码的多肽的特征在于下列特征:从乳杆菌 GG 分离的能力;在肠上皮细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 表达的能力;低于 10 kDa 的分子量;以及酸稳定和热稳定的性质。

本发明的其他方面涉及包含上述分离的细胞保护性化合物的组合物,其中所述化合物在上皮细胞中激活信号转导途径,导致选自 Hsp25 和 Hsp72 的热激蛋白的表达。除非另外指出,Hsp70 和 Hsp72 同物异名,这一点在本领域是已知的,尽管 Hsp72 包含更精确的蛋白质

量的估计。在一些实施方案中，激活作用是通过热激因子-1 (HSF-1) 介导的。在一些实施方案中，信号转导途径包含选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶。在某些实施方案中，所述途径的激活包括选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶的激活。

在相关的方面，本发明提供了在上皮细胞中激活信号转导途径的方法，其包括将细胞和有效量的此处公开的分离的细胞保护性化合物接触。在一些实施方案中，该信号转导途径包含选自 MAP 激酶、SAP 激酶、ERK1 和 ERK2 的激酶。在一些实施方案中，以药物组合物的形式施用所述分离的细胞保护性化合物。

本发明的另一个方面涉及预防氧化剂损伤的方法，其包括给细胞例如上皮细胞施用有效量的此处公开的分离的细胞保护性化合物或包含该化合物的药物组合物。

本发明的另一个方面是稳定细胞骨架的方法，其包括给细胞例如上皮细胞施用有效量的此处公开的分离的细胞保护性化合物或包含该化合物的药物组合物。

本发明的另一个方面是预防炎性病症的方法，其包括给受治疗者施用有效剂量的此处公开的药物组合物。优选的受治疗者是人患者。

本发明的另一个方面是试剂盒，其包含此处公开的药物组合物和用于给受治疗者施用该组合物的方案。本发明涉及适合用于预期目的的本领域已知的任何给药方案。优选的受治疗者是人患者。

预期可等同地实施此处描述的任何方法或组合物以及此处描述的任何其他方法或组合物。

权利要求中使用的术语“或者”是指“和/或”，除非明确表明是指仅仅择一或者可选项是互相排斥的，尽管公开内容支持定义仅仅指择一以及“和/或”。

在本申请通篇中，术语“大约”用于表示这样的值，该值包括用于确定该值的设备或方法的误差的标准偏差。

在权利要求中或说明书中，词“一种”和“一个”当和词“包含”结合使用时，是指一个（种）或多个（种），除非明确地指出。

根据下列详细的描述,本发明的其他特征和有利方面将变得更加明显。然而,应当理解,详细的描述和特定的实施例(尽管表示本发明的特定的实施方案)仅以举例说明的方式提供,因为根据本详述的说明书,在本发明的精神和范围内的各种改变和变动对本领域技术人员来说将变得显而易见。

附图简述

下列附图形成了本说明书的组成部分,其包括在内用于进一步说明本发明的某些方面。通过将附图中的一幅或多幅和此处提供的特定实施方案的详细描述结合参考可更好地理解本发明。

图 1A 和图 1B: LGG-条件培养基以时间和浓度依赖性的方式在结肠上皮细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72。图 1A 显示 LGG-CM 诱导的时间进程(600 μ l LGG-CM/孔)。图 1B 描述在 16 个小时的处理的情况下, LGG-CM 的剂量-反应关系。

图 2: LGG-条件培养基对热激蛋白的诱导涉及 HSF-1。

图 3: LGG-条件培养基中的生物活性因子显示具有小的分子量。

图 4: LGG-条件培养基中的生物活性因子显现具有热稳定性和在酸性 pH 下最活跃。

图 5: 用胃蛋白酶使 LGG-条件培养基中的生物活性因子失活。

图 6: 用 DTT 使 LGG-条件培养基中的生物活性因子失活。

图 7: 由实时 PCR 显示的 LGG-CM 诱导的热激蛋白的表达式的时间进程直方图。图 7A: Hsp72 的诱导; 图 7B: Hsp25 的诱导。

图 8: 电泳迁移率变动测试法, 使用抗 HSF-1 和抗 HSF-2 的抗体作为探针/结合剂, 证明了 LGG-CM 对热激蛋白的诱导在性质上是至少部分转录性的。

图 9: 显示在暴露于 LGG-CM 后热激蛋白是上调最显著的上皮细胞基因的散布图。

图 10: 洗出实验(washout experimental)的结果的电泳图, 该结果表明在将上皮细胞暴露于 LGG-CM 后, 热激蛋白诱导信号被快速

传递（图 10A），其由至少一种信号转导途径介导（图 10B）。

图 11：显示 LGG-CM 对受到氧化剂应激攻击的上皮细胞的保护作用（如通过使用 ^{51}Cr 进行的存活力检测法（图 11A）或通过细胞骨架完整性的 G/F 肌动蛋白测定法（图 11B）所显示的）的直方图。

图 12：来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性因子的物理性质的说明。显示所述因子对胃蛋白酶的易感性（图 12A）、因子的电泳大小（图 12B）、和因子的热稳定性的电泳证据的电泳图。

图 13：显示 LGG-CM 的细胞保护性因子的稳定性作为 pH 的函数（图 13A）和在重新酸化后因子的部分复性（图 13B）的电泳图。

发明详述

A. 总体描述

益生菌是主要在食物补充剂中发现的提供除其营养价值外的保健益处的活生物。预期本发明的益生化合物对宿主具有多种有益效果。由一种常见益生菌-乳杆菌 GG 产生的可溶性因子作用于上皮细胞，从而产生对细胞保护性热激蛋白 Hsp25 和 Hsp72 的时间和浓度依赖性的诱导。由 LGG 产生的可溶性因子足以诱导 Hsp 而不需要活的细菌。尽管 Hsp 蛋白的实际出现需要数小时，其中只将细胞暴露于 LGG-CM 几分钟的洗出实验显示，启动上皮细胞上调热激蛋白的信号所需要的时间非常短，表明信号转导途径在将启动信号从 LGG-CM 传递至上皮细胞中起作用。已知许多蛋白激酶在应激反应中被激活，已证实 LGG-CM 的暴露激活许多 MAP 激酶。尽管在我们的 YAMC 细胞中存在激活的 ERK1/2 的基线水平，但 LGG-CM 预处理如佛波酯 PMA 一样有效地激活 ERK1/2，并且也激活 p38 和 JNK。在 LGG-CM 暴露前，用 p38 和 JNK 的抑制剂处理细胞抑制了 LGG-CM 对 Hsp72 的诱导但对 Hsc73 的表达无影响。这表明这两种 MAP 激酶在传递启动通过暴露于 LGG-CMM 触发的可诱导的 Hsp 的表达所需的细胞信号中起作用。其他研究已显示 p38 和 JNK 通过共同的途径起作用，该途径不同于 ERK1/2 (Liu 等人, Free Radic. Biol. Med. 21: 771-781 (1996))。这些结果显示 LGG-CM 在上皮细胞

中影响信号转导，从而表明至少一种用于诱导 Hsp 产生的快速信号转导通过至少一种信号传导途径来启动。

来自益生菌乳杆菌 GG 的条件培养基 (LGG-CM) (在整个公开内容中，“培养基”可通过上下文判定以单数或复数的情况使用) 在肠上皮细胞中诱导热激蛋白的表达。Hsp25 和 Hsp72 都由 LGG-CM 以时间和浓度依赖性的方式诱导。此外，这些作用由酸稳定和热稳定的小分子量肽介导。DNA 微阵列实验显示在上皮细胞中，Hsp72 (Hsp70) 是对 LGG-CM 处理起反应的最高度上调的基因之一。实时 PCR 和电泳迁移率变动分析证实，Hsp 诱导的调节在性质上是至少部分转录性的并且涉及转录因子 HSF-1。即使暴露后数小时 Hsp 仍不被诱导，但短暂的暴露于 LGG-CM 足以启动 Hsp 诱导的信号，且鉴于反应是快速的，这些时间暗示可能有信号传导途径参与。实验显示，LGG-CM 通过活化 MAP 激酶在肠上皮细胞中调节某些信号传导途径的活性。p38 和 JNK 的抑制剂阻断了通常由 LGG-CM 诱导的 Hsp72 的表达。功能研究表明对肠道上皮细胞的 LGG-CM 处理保护其免于氧化剂应激的伤害并保持细胞骨架的完整性。通过在肠道上皮细胞中诱导细胞保护性 Hsp 的表达，和/或通过激活信号传导途径，由 LGG 分泌的分离的肽产物促成了该肽的有益的临床效果。

本发明表明可从乳杆菌 GG (LGG) (益生菌微生物) 分离生物活性化合物。使用不含细菌的、来源于益生菌的化合物而不是活细菌提供了优于使用活细菌的安全有利方面。此外，分离的化合物的临床功效可能比益生菌更一致，后者依赖于建立和维持细菌定殖的能力。

存在于 LGG-CM 中的负责热激蛋白诱导的因子是具有惊人的酸和热稳定性的小分子量肽。这些性质可为这些分泌因子提供在其通过 GI 道时在肠道的恶劣环境中存活所需的复原力。有趣地也要指出的是，肠腔中部的物理化学环境和上皮细胞表面发现的环境很不同，肠腔中部的环境倾向于更酸 (Rechkemmer 等人, 1986)。该酸性微环境据认为在发挥功能例如膜运输、药物摄取和营养吸收上起着重要的作用 (Sanderson, 1999)。已显示酸性微环境对某些二肽进入肠上皮细胞

的运输具有直接的作用 (Lister 等人, 1995)。如果 LGG-CM 中的生物活性肽通过受体介导的途径起作用, 那么其不寻常的酸稳定性可在其结合上皮细胞表面上的受体和启动对细胞保护性 Hsp 的诱导的能力中发挥重要的作用。

因此, 本发明的化合物为炎症病症例如 IBD 的治疗提供优于目前在本领域可获得的治疗法的新疗法。在一个方面, 本发明提供了这样的组合物, 该组合物包含可从乳杆菌 GG 分离的或来源的分离的细胞保护性化合物。此外, 本发明提供了用于预防、治疗或改善炎症病症患者的至少一种已知症状的方法, 其包括给患者施用有效剂量或量的来源于乳杆菌 GG 的细胞保护性化合物。在其他方面, 本发明提供了用于分离和表征具有细胞保护特性的来源于乳杆菌 GG-条件培养基的化合物。

B. 细胞保护性化合物的鉴定和表征

本发明提供了鉴定和表征来源于细菌培养物的具有细胞保护特性的化合物。本发明也提供了可从益生菌生物分离的细胞保护性化合物, 以及用于治疗、预防或改善炎症疾病的至少一种症状的组合物和方法。

1. 细胞保护性化合物的分离

任何细菌菌株或益生菌制剂都适合用于筛选细胞保护性化合物。优选地, 细菌是非致病性肠细菌。在此处公开的示例性实施方案中, 细菌是乳杆菌 GG。细菌培养的方法对本领域技术人员来说是熟知的。一般使用 MRS 肉汤来分离和培养乳杆菌种类。例如, 在 37°C 下在 5%CO₂ 中在微需氧的条件下, 乳杆菌 GG 容易地生长在 MRS 肉汤中。用于培养乳杆菌种类的培养基的另一个实例是蕃茄汁肉汤。

细胞保护性化合物经确定是在乳杆菌 GG-条件培养基中发现的可溶性因子。为帮助鉴定和表征这些化合物, 优选地从培养基中除去细菌细胞。本领域技术人员熟悉分离培养基中的细胞和可溶性因子的方法。例如, 可通过离心、过滤或这两种技术的组合除去细胞。除去细菌细胞后, 然后将“条件培养基”用作这样的来源, 可从该来源进一

步纯化和表征分离的细胞保护性化合物。

(a) 其他分离技术

也预期使用本领域技术人员已知的其他分离技术分级分离条件培养基，从而分离益生因子（即，生物活性剂）。高效液相色谱（HPLC）的特征在于非常快速的分离，同时具有极高的峰分辨率。这可以通过使用非常细的颗粒和保持足够流速的高压来实现。分离可在大概数分钟内完成，或最多 1 小时内完成。此外，只需要非常小体积的样品，因为颗粒非常小并且装填紧密，这样外水体积只是柱床体积的极小部分。还有，样品的浓度不必非常高，因为条带窄到只有非常少的样品稀释。

快速蛋白液相色谱法（FPLC）是普遍用于蛋白分离的技术。FPLC 基本上是在低压下运行的 HPLC 形式，其具有由惰性物质如纤维素或葡聚糖制成的“树脂”，所述惰性物质具有附着至其上的为其提供特异性结合特性的化学侧基。所述侧链决定了色谱的类型。例如，疏水性 LC 通过蛋白含有的疏水性氨基酸的量来分离蛋白；离子交换 LC 通过带电荷的氨基酸的数目和类型来分离蛋白；配体/亲和 LC 通过蛋白对某些底物、染料或抗体的特异性来分离蛋白；和大小排阻 LC（或凝胶过滤）通过蛋白的大小来分离蛋白。

凝胶过滤层析法或分子筛层析法是基于分子大小的特殊类型的分配层析法。凝胶层析法背后的原理是：由包含小孔的惰性物质的微小颗粒制备的柱子在分子取决于其大小通过小孔或绕过小孔时将较大的分子和较小的分子分离。只要制备颗粒的材料不吸附分子，确定流速的唯一因素是大小。因此，只要形状相对恒定，分子以大小减小的顺序从柱子上洗脱。凝胶色谱法在用于分离不同大小的分子上非常优越，因为分离不依赖于所有其他因素，例如 pH、离子强度、温度等。实际上也不存在吸附，区域扩散较小，洗脱体积以简单的方式和分子量相关。

此外，可使条件培养基通过具有特定分子量截止值的过滤器。例如，可通过具有特定分子量截止值的 Centricon 滤器制备本发明的一

些级分。

也可使用基于电荷的分离技术。一种这样的技术是离子交换层析法。在使用离子交换层析的情况下，样品和带电荷的基质可逆地结合。一般使用包含二乙基氨乙基（DEAE）和羧甲基（CM）纤维素的基质。然后通过增加盐浓度或改变流动相的 pH 来产生解吸脱附。基于此处公开的层析数据确定，LGG-CM 中的细胞保护性因子在低 pH 下是稳定的，其等电点预期较低，因此，该蛋白应当带负电荷，这使其成为基于电荷的分离技术的良好候选者。因此一个分离的方法包括将条件培养基在恰当衍生的（例如，引入在想要的 pH 下带正电荷的官能团）Mono S 柱上接受阴离子交换层析法，如本领域熟知的。为加速分离，可将这些柱子用于 FPLC 系统。

本领域技术人员已知的用于基于电荷分离化合物的另一种技术是 IEF（等电聚焦）。一种通常使用 IEF 的方法是双向电泳法。可使用本领域已知的方法进行双向凝胶电泳（参见，例如，美国专利号 5,534,121 和 6,398,933）。一般地，首先通过等电聚焦分离样品的蛋白，在该阶段，在 pH 梯度中通过 pI 分离样品中的蛋白直至其到达其净电荷为 0（即，等电点或 pI）时所处的点。该第一分离步骤产生了蛋白的一维排列。使用一般不同于第一分离步骤中所用的技术在第二维中进一步对一维排列中的蛋白进行分离。例如，在第二维中，使用聚丙烯酰胺凝胶，例如在十二烷基硫酸钠存在下的聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），对通过等电聚焦分离的蛋白进一步分离。SDS-PAGE 凝胶使得可以进一步进行基于蛋白分子量的分离。

可使用本领域已知的任何合适的方法检测二维排列中的蛋白。可用比色染料（例如，考马斯）、银染和荧光染色（例如，Ruby Red），完成对蛋白的染色。如本领域技术人员所知道的，可从凝胶上切下蛋白点并用气相离子光谱测定法进行分析。可选择地，可通过例如施加电场将蛋白从凝胶转移至惰性膜上，然后通过气相离子光谱测定法进行分析。

可单独地或以任何组合的方式使用上述蛋白质分离技术。在纯化

或分离过程中，可能想要检测级分以追踪保留细胞保护活性的级分。例如，可就诱导至少一种细胞保护性热激蛋白表达的能力对培养基或级分进行筛选。在下面更加详细地描述这些测定法。可以等分的形式冷冻具有生物学活性的制剂以在日后用于抗炎性和细胞保护性化合物的鉴定、纯化和将来的生产。

2. 细胞保护性化合物的鉴定

通过本领域技术人员已知的蛋白质鉴定方法鉴定本发明的细胞保护性化合物。

例如，首先将条件培养基分级分离，就生物学活性（例如，诱导热激蛋白表达的能力）对级分进行检测。例如通过 PAGE，然后通过银染分析，可确定保留活性的级分的纯度。如果活性成分已分离成均一的状态，那么可以至少两种方法分析蛋白。第一，通过将所述样品接受 6N 水解（在真空管中用 HCl 进行 24 小时），然后进行 HPLC-质谱测序以鉴定组成目的肽的所有单个氨基酸，来进行氨基酸序列分析。第二，可根据容易鉴定的胰蛋白酶处理片段确定内部氨基酸序列。一般将分离的蛋白浓缩，然后用胰蛋白酶进行处理。干燥片段，然后将其在 C18 反相 HPLC 上进行分离，通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF) 确定这些峰的氨基酸序列。然后将氨基酸序列和一种或多种已知序列（例如在任何已知的数据库（SwissProt, Genbank）中发现的序列）比较以鉴定目的蛋白或肽。

3. 细胞保护性化合物的表征

可使用此处描述的或本领域已知的方法就细胞保护特性对在 LGG-条件培养基中发现的化合物进行测定。细胞保护活性的指征包括，例如，诱导热激蛋白表达的能力和在患有炎症病症的受治疗者中减轻炎症的能力。

(a) 热激蛋白

此处公开的数据显示 LGG-条件培养基诱导热激蛋白特别是至少

Hsp72 和 Hsp25 的表达。热激蛋白是保护细胞免受环境应激因子伤害的蛋白家族。Hsp72 结合和稳定至关重要的细胞蛋白，防止其变性。其也具有通过保持线粒体的完整性、抑制细胞色素 C 渗漏和阻断半胱天冬酶 8 活性来抗细胞凋亡的作用 (Liu 等人, 2003)。Hsp25/27 是肌动蛋白稳定剂，其保存细胞骨架和紧密连接的功能。诱导热激蛋白表达的能力表明 LGG-条件培养基中的活性化合物具有细胞保护性。

分析热激蛋白的诱导的方法对本领域技术人员来说是已知的。例如，可通过标准的蛋白印迹分析法使用抗特定同种型的单克隆抗体 (Stressgen) 进行 Hsp72 和 Hsp25 的诱导。可进行针对组成型热激关联蛋白 (cognates) Hsp60 和 Hsc73 的免疫印迹法，以检查反应的特异性和确保泳道的相同上样量 (这些蛋白的表达通常保持恒定)。此外，可通过免疫荧光法和 ELISA 使用抗体检测热激蛋白的表达。

分析热激蛋白的诱导的其他方法包括使用例如，RT-PCR、基因组微阵列和实时 PCR 测定 Hsp mRNA 的水平。用于分析热激蛋白的诱导的另一种方法是使用电泳迁移率变动分析法观察转录因子 HSF-1 的结合。另外，可使用 HSE 萤光素酶报告分子检测法来测量转录因子 HSF-1 的活性。

(b) 动物模型

对本发明的化合物的表征可包括使用各种动物模型，包括这样的转基因动物，所述转基因动物通过基因工程改造具有特定缺陷或携带这样的标志物，该标志物可用于测量候选物质到达和影响生物体内不同细胞的能力。由于大小、操作的容易性、关于其生理和遗传组成的信息、和本领域内承认的作为人炎症的模型的有效性，小鼠是优选的动物模型，特别是在转基因的研究中尤其如此。然而，其他动物也同样适合，包括大鼠、兔子、仓鼠、豚鼠、沙土鼠、旱獭、猫、狗、绵羊、山羊、猪、母牛、马和猴子 (包括黑猩猩、长臂猿和狒狒)。可使用来源于这些物种中的任一种的动物模型进行检测。

用于结肠炎的小鼠模型的一些示例包括 DSS 诱发的结肠炎模型、敲除 IL-10 的小鼠、敲除 A20 的小鼠、TNBS 诱发的结肠炎模型、敲除

IL-2 的小鼠、敲除 TCR α 受体的小鼠和敲除上皮细胞钙粘蛋白的小鼠。

用试验或候选化合物治疗动物包括以适当的形式给动物施用化合物。预期本领域技术人员已知的炎症疾病的任何动物模型。可通过可用于临床或非临床目的的任何途径进行施药。例如，可通过管饲法或通过直肠给药来递送化合物。此外，通过在动物模型中诱发例如结肠炎之前施用化合物来检测化合物的保护性效果。可选择地，通过在动物模型中诱导例如结肠炎之后施用化合物来测定该化合物的治疗效果。

在体内确定化合物的功效涉及许多不同的标准。本领域技术人员熟悉大量可获得的用于测定受治疗者（无论该受治疗者是动物或是人受治疗者）中的炎症的技术。例如，通过组织学评定和对结肠炎的严重性分级评分来测量炎症。用于测定受治疗者中炎症的其他方法包括，例如，测量髓过氧化物酶 (MPO) 活性、转运活性、绒毛蛋白的表达、或跨皮肤的电阻 (TER)。

也可使用评估细胞增殖的试验来测定化合物的功效。例如，可通过测量 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 的摄取来测定细胞增殖。确定化合物功效的另一个方法是评估编程性细胞死亡的程度。用于研究编程性细胞死亡的方法在本领域是熟知的，包括例如 TUNEL 测定法。

此外，可以比以体外或细胞内测定法更有意义的方式在动物中进行毒性和剂量反应的测量，所述测量法在本领域内是常规方法。

C. 药物组合物

本发明的组合物包含有效量的细胞保护性化合物，其可溶解和/或分散在药物可接受的载体和/或含水介质中。

可通过本领域技术人员已知的任何方法（参见，例如，“Remington's Pharmaceutical Sciences”第 15 版）递送本发明的细胞保护性化合物。例如，可经口、经直肠、经肠胃外或局部递送药物组合物。

可在适当地与表面活性剂（例如聚乙二醇 (PEG) 或羟丙基纤维素）混合的水中制备包含本发明的化合物的溶液。在普通的贮存和使

用条件下，这些制剂包含阻止微生物生长的防腐剂。适合用于注射用途的药物形式包括无菌水溶液或分散体以及用于临时配制无菌注射液或分散体的无菌粉剂。所述形式一般应当是无菌的并且必须是达到可操作的可注射性程度的流体。其在生产和贮存条件下必须是稳定的并且必须经过防腐处理以防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。

对于以水溶液的形式经胃肠外给药，例如，如果需要，适当地对溶液进行缓冲，首先用充足的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特殊水溶液特别适合用于静脉内、肌内、皮下、瘤内和腹膜内给药。在这方面，根据本公开内容，可使用的无菌含水介质对本领域技术人员来说是已知的。

也可使用栓剂。栓剂是固体，包括凝胶，一般含药，用于插入直肠、阴道和/或尿道的具有各种重量和/或形状的剂型。在插入后，栓剂变软、熔化和/或溶解在腔液中。一般地，对于栓剂，常规的粘合剂和/或载体可包括，例如，聚烷撑二醇和/或甘油三酯；可从以例如 0.5% 至 10%、优选地 1%-2% 的范围含有活性化合物的混合物形成这些栓剂。也可通过灌肠法递送本发明的药物组合物。

口服制剂包括一般使用的赋形剂例如，药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁和/或诸如此类。这些组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放的制剂和/或粉剂的形式。在某些确定的实施方案中，口服药物组合物包含惰性稀释剂和/或可同化食用的载体，和/或其可包封在硬和/或软壳明胶胶囊中，和/或其可压制成片剂，和/或其可直接被掺入饮食的食物中。对于口服治疗给药，可将活性化合物和赋形剂一起整合和/或以可摄取的片剂、口含片剂、药锭、胶囊、酏剂、混悬液、糖浆剂、糯米纸囊剂和/或诸如此类形式使用。这些组合物和/或制剂应当包含至少 0.1% 的活性化合物。当然，组合物和/或制剂的百分比可以是变化的和/或可方便地在单位重量的大约 2 至大约 75% 之间，优选地在 25 至 60% 之间。这些治疗上有用的组合物中的活性化合物的量是使得可获得如本领域中已知的或可确定的合适的剂量。

片剂、药锭、丸剂、胶囊和/或诸如此类也可包含下列物质：粘合剂，如西黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉、和/或明胶；赋形剂，例如磷酸二钙；崩解剂，例如玉米淀粉、土豆淀粉、藻酸和/或诸如此类；润滑剂，例如硬脂酸镁；和/或也可加入甜味剂，例如蔗糖、乳糖和/或糖精和/或增香剂例如薄荷、冬青油和/或樱桃调味剂。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的材料外，其可包含液体载体。许多其他材料也可以包衣的形式存在和/或以其他方式修饰剂量单位的物理形式。例如，可用紫胶、糖和/或两者包被片剂、丸剂和/或胶囊。酏剂的糖浆可包含活性化合物、用作甜味剂的蔗糖、用作防腐剂的羟苯甲酸甲酯和/或对羟基苯甲酸丙酯、染料和/或调味剂例如樱桃和/或柑橘香料。

局部制剂包括包含活性化合物的乳膏剂、软膏剂、胶冻剂、凝胶剂、表皮溶液或混悬液等。

对于人施用，制剂应当满足由FDA生物标准办公室所要求的无菌性、致热原性、总体安全性和纯度的标准。

术语“药物可接受的”和“药理学可接受的”是指当给人施用时不产生过敏或类似的不良反应的分子实体和组合物。

考虑到例如因素例如受治疗者的体重和年龄、要治疗的疾病的类型、疾病状况的严重性、先前和并存的治疗干预、给药方式等，细胞保护性化合物的剂量和剂量方案以受治疗者个案为基础而变化，这可由本领域技术人员容易地确定。

以和剂量制剂相容的任何方式和以将在治疗上有效的量给药。要施用的量取决于要被治疗的受治疗者。要求施用的活性成分的精确量取决于医师的判断。

D. 实施例

下列实施例包括在内用于说明本发明的优选的实施方案。本领域技术人员认识到，下面的实例中公开的技术代表此处公开的在本发明的实施中良好地发挥作用的技术。然而，根据本公开内容，本领域技

术人员认识到在公开的具体的实施方案中可作许多变化,而仍能获得类似的或相似的结果而不背离本发明的精神和范围。

下列实施例中报道的所有实验,每个实验最少重复3至6次。所有数值表示为平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。当进行多重比较时,利用使用邦弗朗尼校正法的ANOVA分析评估组之间差异的显著性。 $P<0.05$ 被认为有统计上的显著意义。

实施例 1

培养

组织培养。YAMC (年轻成年小鼠结肠)细胞是从 Immortimouse 衍生的条件永生化小鼠结肠上皮细胞系。这些细胞在 II 型 MHC 启动子的 γ 干扰素敏感部分的控制下表达温度敏感型 SV40 大 T 抗原的转基因 (tsA58) (Whitehead 等人, 1993, 此处引用作为参考)。该特殊性质使 YAMC 细胞能够在非允许(非转化的)条件下,在 37°C 下、在不存在 γ 干扰素 (IFN- γ) 的情况下进行培养。在允许条件 (33°C) 下在 RPMI 1640 培养基 (含有 5% (体积/体积) 胎牛血清、5U/ml 鼠 IFN- γ (GibcoBRL, Grand Island, NY)、50 μ g/ml 链霉素和 50U/ml 青霉素, 补充 ITS-X Premix (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA)) 中维持培养 YAMC 细胞。

在非允许 (非转化) 条件下在 37°C 下不存在 IFN- γ 的条件下, 这些细胞经历分化并发展成熟上皮细胞的功能和特性, 包括紧密连接的形成、极性、微绒毛顶膜和转运功能。

在各研究开始之前, 以每 60mm 组织培养皿 2×10^5 的密度将细胞进行涂板。为制备 RNA, 以每 100mm 组织培养皿 7.5×10^5 个细胞的密度将细胞进行涂板。在 33°C 下培养 24 小时后, 用不含 IFN 的培养基更换培养基并将细胞转移至 37°C (非允许条件) 培养 24 小时以使分化的结肠细胞表型得到发展。用 LGG-条件培养基 (1:10 的稀释度, 或 600 μ l) 处理细胞过夜, 然后第二天进行收获。在 42°C 下对热激对照热激 23 分钟, 然后在收获前置于 37°C 下 2 小时。

细菌培养。将益生菌-乳杆菌 GG (ATCC 53103) 在 MRS 肉汤 (每升肉汤包含: 10g Bacto Proteose Peptone #3、10g Bacto 牛肉膏、5g Bacto 酵母提取物、20g Bacto 葡萄糖、1.0g 聚山梨酯 80、2.0g 柠檬酸铵、5.0g 醋酸钠、0.1g 硫酸镁、0.05g 硫酸锰、2.0g 磷酸氢二钾) 中培养 16 小时至大约 3×10^9 CFU/ml 的浓度 (如通过菌落计数所确定的), 然后在 4℃ 下在台式 Sorvall 离心机中以低速 (3000 x g) 离心 10 分钟。将上清液 (条件培养基) 通过 0.22 微米的低蛋白结合 Millex 滤膜 (Millipore, Billerica, MA) 过滤以进行灭菌和除去所有细菌细胞。将 LGG-条件培养基的等分在 -80℃ 下贮存在无菌微量离心管中直至进一步使用。

实施例 2

LGG-CM 在肠上皮细胞中诱导 Hsp25 和 Hsp72 的表达—Western 分析

用来自益生菌 LGG 的条件培养基处理肠上皮细胞, 然后就可诱导的热激蛋白的表达对其进行测定。为进行表达的蛋白印迹分析, 在冰冷的 PBS (137mM NaCl、2.7mM KCl、8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) 中洗涤细胞两次, 然后刮入其中。沉淀细胞 (在室温下 14,000 x g 下进行 20 秒), 然后将其重悬浮于冰冷的裂解缓冲液 (10mM Tris、pH 7.4、5mM MgCl_2 、DNA 酶和 RNA 酶各 50U/ml、和完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN))。使用双辛可宁酸法 (Smith 等人, 1985) 确定蛋白浓度。在加入 3X Laemmli 终止缓冲液后将样品加热至 75℃ 5 分钟, 然后在 -80℃ 下贮存直至使用。

将每泳道 20 微克的蛋白在 12.5% SDS-PAGE 上进行分离。如先前所描述的 (Kojima 等人, 2003), 将样品在 1X Towbin 缓冲液 (25mM Tris、192mM 甘氨酸、pH 8.8、15% 体积/体积甲醇) 中转移至 PVDF 膜 (Perkin-Elmer NEN, Boston, MA) 上。在 5% (重量/体积) 的脱脂奶 TBS-Tween 溶液 (含有 0.01 % (体积/体积) Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液 (150mM NaCl、5mM KCl、10mM Tris, pH 7.4)) 中在室温下封闭

膜 1 小时。将一抗即特异性抗 Hsp25 抗体 (SPA801, Stressgen, Victoria, BC, Canada)、抗 Hsp72 抗体 (SPA 810, Stressgen) 或抗 Hsc73 抗体 (SPA 815, Stressgen) 加入至 TBS-Tween 并在 4℃ 下温育过夜。在用二抗温育之前, 在 TBS-Tween 中洗涤印迹 5 次。用缀合至辣根过氧化物酶的二抗 (Jackson Immunoresearch Labs, Inc., Fort Washington, PA) 在室温下温育膜 1 小时, 然后在 TBS-Tween 中洗涤 5 次, 接着在 TBS (无 Tween) 中进行最后的洗涤。然后按照厂商说明书用增强的化学发光系统 ECL 试剂 (Supersignal, Pierce, Rockford, IL) 处理膜和进行显影。

来自益生菌 LGG 的条件培养基以时间依赖性方式在培养的鼠结肠 YAMC 细胞中诱导热激蛋白 Hsp25 和 Hsp72 的表达, 18-20 小时后开始表达 Hsp25, Hsp72 表达稍微早些, 最初在 6-8 小时出现 (图 1A)。在该处理期间, 组成型表达的管家基因 hsc73 的表达没有改变, 表明 LGG-CM 的效果对于可诱导形式的热激蛋白是特异性的。此外, 上皮细胞以浓度依赖性的方式对 LGG-CM 作出反应, 在 1:10 的稀释度观察到最强的反应 (图 1B)。在未处理的细胞 (NOTX) (图 1B, 第 1 泳道) 中或在与非条件 MRS 肉汤接触的细胞 (图 1B, 第 2 泳道) 中没有观察到热激反应。

和在热应激 (所述热应激在大概 2 小时内 YAMC 细胞中诱导热激蛋白) 的情况下看到的快速反应不同, 对 LGG-CM 的反应需要显著更长的时间。因此, LGG-CM 对 Hsp 的诱导的潜在机制和热应激的机制不同。

也确定在短暂地暴露于 LGG-CM 之后是否能够启动 Hsp 的诱导。换句话说, 如果在处理过程的早期洗去 LGG-CM, 问题就是该短暂的暴露是否足以产生对 Hsp 的诱导, 或 Hsp 诱导是否需要延长对 LGG-CM 的暴露。将细胞在短时间内暴露于 LGG-CM, 洗去 LGG-CM, 然后照常收获细胞并就 Hsp 的产生对其进行分析 (图 10A)。即使几分钟的暴露时间也足以诱导强烈的 Hsp 诱导反应, 表明在上皮细胞中启动诱导热激蛋白的信号所需的时间很短。

实施例 3

MAP 激酶测定法

为评估信号转导途径参与由 LGG-CM 诱导的 Hsp 的表达,进行 MAP 激酶测定法。为进行这些测定法,在室温下在 TBS-Tween 中的 3%重量/体积牛血清白蛋白中封闭 PVDF 膜 1 小时。将一抗加入 TBS-Tween 并在 4℃ 下温育过夜。一抗对于 MAP 激酶或相关分子的形式中的一种是特异性的,其包括抗 p38 MAP 激酶 (MAPK) 抗体 (#9212, Cell Signaling, Beverly, MA)、抗磷酸 p38 MAPK 抗体 (#9211S, Cell Signaling)、抗 p44/42 MAPK 抗体 (#9102, Cell Signaling)、抗磷酸 p44/42 MAPK 抗体 (#9101S)、抗 SAPK/JNK 抗体 (#9252, Cell Signaling)、和抗磷酸 SAPK/JNK 抗体 (#9251S, Cell Signaling)。激酶的磷酸化形式表示激活的形式。作为阳性对照,使用 37.7 μ M 茴香霉素 (Alexis, San Diego, CA) 激活 p38 和 SAPK/JNK,使用 100nM 佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯 (PMA [Sigma, St. Louis, MO]) 激活 ERK1/2。

使用 MAP 激酶抑制剂的实验确认了通过 MAP 激酶测定法获得的结果。在 MAP 激酶抑制剂的研究中,在加入 LGG-CM 之前,将 YAMC 细胞暴露于几种已知的 MAP 激酶抑制剂即 p38 抑制剂 SB203580 (20 μ M; Alexis Biochemicals, Carlsbad, CA)、JNK 抑制剂 SP600125 (20 μ M; Alexis Biochemicals) 或 ERK 抑制剂 PD98059 (50 μ M; Alexis Biochemicals) 中的一种,进行 2 小时。在加入 LGG-CM 之后,将细胞温育 15 分钟。然后用新鲜的 RPMI 更换培养基,4 小时后收获 YAMC 细胞进行蛋白印迹分析。

鉴于对 LGG-CM 的快速反应,数据与信号转导途径在上皮细胞中参与建立反应一致。为调查该可能性,用 LGG-CM 处理细胞 15 分钟,然后进行激酶测定法。

已知许多蛋白激酶通过应激例如 LPS、TNF α 、热、紫外照射、化学物质和渗透压休克而被激活,这些激酶中的几种属于 MAP 激酶家族 (Keyse, Stress Response: methods and protocols, Totowa: Humana

Press, 2000)。因此,选择对该组激酶的效应作为信号转导激活的读出。即使是在短暂的暴露时间之后,也可清楚地显现经处理的和未处理的细胞之间在激酶活化上的差异(图10B)。单独地用LGG-CM预处理细胞激活所有被调查的三种MAP激酶。尽管在YAMC细胞中存在基线水平的激活的ERK1/2,但由LGG-CM导致的ERK1/2的激活几乎和由佛波酯PMA导致的激活一样强烈,而LGG-CM处理导致清晰的但不如使用茴香霉素(一种已知的激活p38和SAP/JNK的有力刺激剂)时观察到的那样显著的p38和JNK的激活。使用所有被调查的三种MAP激酶的抑制剂来确定MAP激酶途径的激活是否是LGG-CM对Hsp的诱导所必需的。在LGG-CM处理之前将YAMC细胞暴露于p38和JNK的抑制剂导致Hsp72表达受阻,从而确认了在上皮细胞中,MAP激酶信号传导途径在LGG-CM对Hsp的诱导中的作用(图10C)。

已报道在应激条件下由Hsp72 (Hsp70)提供的细胞保护作用部分地通过抑制p38和JNK来发挥作用,这赋予对应激诱导的细胞死亡的抗性(Gabai 等人, J Biol Chem 272: 18033-18037, 1997; Mosser 等人, Mol Cell Biol 17: 5317-5327, 1997)。然而,此处公开的数据确定在LGG-CM处理后观察到的p38和JNK的激活的抑制不可能是由Hsp72 (Hsp70)造成的,因为效果在如此短的时间内发生,而LGG-CM处理后Hsp的出现需要数小时。已显示JNK的激活在化学和物理应激条件下介导细胞死亡中起着重要作用,JNK的阻断提供了对由各种形式的应激诱导的细胞死亡的抗性(Zanke 等人, Curr Biol 6: 606-613, 1996)。对于激酶p38已获得了相似的观察资料(Gabai 等人, 1997),研究表明p38和JNK都通过共同的与ERK1/2不同的途径发挥作用(Liu 等人, Free Radic Biol Med 21: 771-781, 1996)。因此,预计LGG-CM中的可溶性因子具有其自身的细胞保护性质,除了其诱导细胞保护性Hsp的能力外,所述因子还通过其他的机制起作用。

和Yan 等人, J Biol Chem 277: 50959-50965, 2002报道的相反,乳杆菌GG确实产生至少一种可从条件培养基中回收的生物活性因子。生长研究显示当在MRS培养基中生长时细菌要花8小时才能产生这些

生物活性因子,而当在组织培养基中生长时,该生物不产生这些生物活性因子。

实施例 4

RNA 分离和反转录

在冰冷的 HBS 中洗涤细胞两次,然后如上所述收获细胞,之后按照厂商说明书加入 1.0ml TRIzol®(Invitrogen, Carlsbad, CA)和按每 1 ml 用于均质化的 TRIzol 加入 200 μ L 的氯仿(Fisher, Fair Lawn, NJ),将材料在 4 $^{\circ}$ C 下以 14,000 $\times$ g 离心 15 分钟。移出水相,使用异丙醇沉淀 RNA,然后用 75%乙醇洗涤 2 次。干燥 RNA 沉淀,将其溶解在不含 RNA 酶的水中,然后按照厂商说明书使用 RNeasy spin 柱(QIAGEN, Valencia, CA)进一步纯化 RNA。在 1%的琼脂糖凝胶上和通过 280nm 和 260 nm 的吸光度分析样品的完整性。使用 SuperScript II RT (Invitrogen, Carlsbad, CA)合成 cDNA。使用 3 μ g 总 RNA 在 20 μ l 的总体积(包含下列物质: 1X 第一链缓冲液、250ng 随机六核苷酸序列引物、3 μ g RNA、500 μ M dNTPs、10mM DTT、40 个单位的无 RNA 酶的(Rnase out)核糖核酸酶抑制剂,和 200 个单位的 SuperScript IIRT)中进行反转录反应。在 25 $^{\circ}$ C 下温育反应混合物 15 分钟,然后在 42 $^{\circ}$ C 下温育 50 分钟,然后在 70 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟使反转录酶失活。将 cDNA 用作模板通过 PCR 进行扩增。将 cDNA 模板稀释至 1:5 并在-20 $^{\circ}$ C 下贮存直至进一步研究。使用异丙醇沉淀 RNA,然后用 75%的乙醇/DEPC 处理的水洗涤 2 次。在 1%的琼脂糖凝胶上和通过分析在 280nm 和 260 nm 的 UV 波长吸光度分析样品的完整性;然后,如在本领域中已知的,将该比率用于验证 RNA 的纯度。

实施例 5

实时 PCR

使用实时 PCR 确定 Hsp 表达的时间进程。使用从 Genbank 下载的序列设计针对小鼠 Hsp25 和 Hsp72 编码区的引物。使用 Primer Express

软件 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 设计引物。针对小鼠 Hsp25 的有义和反义引物是: 5'-CCA TGT TCG TCC TGC CTT TC-3' (SEQ ID NO: 1) 和 5'-GAG GGC TGC TTC TGA CCT TCT-3' (SEQ ID NO: 2); 针对小鼠 Hsp72: 5'-GGC TGA TCG GAC GGA AGT T-3' (SEQ ID NO: 3) 和 5'-GGA ACG GCC AGT GCT TCA T-3' (SEQ ID NO: 4); 针对小鼠 GAPDH: 5'-GGC AAA TTC AAC GGC ACA GT-3' (SEQ ID NO: 5) 和 5'-AGA TGG TGA TGG GCT TCC C-3' (SEQ ID NO: 6)。在 iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA) 用 iQSYBR Green PCR supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) 进行实时 PCR, 重复三次。通过测量由 SYBR 绿色染料与双链(ds) DNA 的结合产生的荧光的增加来监测 PCR 产物的直接检测。25 μ l 终体积含有 1X SYBR Green PCR supermix 和终浓度为 300nM 的引物。将 3 μ l 稀释 (1: 5) 的 cDNA 加入至 23 μ l 的 PCR 主混合物 (master mixture) 中。使用下列定量循环实验方案: 在 95 $^{\circ}$ C 下进行 4 分钟以活化 Taq DNA 聚合酶, 然后进行 45 个循环: 在 95 $^{\circ}$ C 下变性 15 秒, 在 60 $^{\circ}$ C 下退火-延伸 15 秒。将阈值循环参数 (Ct) 定义为荧光超过高于基线的固定阈值的循环分数。通过从平均 Hsp 25 或 Hsp72 Ct 值减去平均 GAPDH Ct 值来确定 Δ Ct 值。 $\Delta\Delta$ Ct 的计算用于靶的相对定量, 而无需在样品板上运行标准曲线。这包括减去任意常数, 这样 $\Delta\Delta$ Ct 的标准偏差和 Δ Ct 值的标准偏差相同。使用下列公式: 倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来确定 YAMC RNA (靶基因) 相对于 GAPDH 内源对照的倍数变化。

使用实时 PCR, 发现 Hsp25 和 Hsp72 的 mRNA 水平在 LGG-CM 处理后都增加了, 表明 LGG-CM 对这两种 Hsp 的诱导在性质上是转录性的 (图 12)。

实施例 6

电泳迁移率变动检测法

为进一步调查 LGG-CM 对 Hsp 的诱导的性质, 进行电泳迁移率变动检测法 (EMSA) (图 8)。如上所述用 LGG-条件培养基 (LLG-CM) 或热激处理细胞。通过在干冰/乙醇浴中冷冻一次, 在冰上融化, 用移液

器移液头轻轻地剪切,在 4℃下以 50,000xg 离心 5 分钟来在裂解缓冲液(25% 体积/体积甘油、420mM NaCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、0.5mM DTT、20mM HEPES, pH 7.4, 和完全蛋白酶抑制剂混合物)中制备全细胞提取物。(参见 Mosser 等人(1988),此处引用作为参考)。将 10 微克全细胞提取物和 γ -³²P-ATP 标记的 HSE 寡核苷酸(包含热激元件的 4 串联反向重复(nGAAn): 5'-CTAGAAGCTTCTAGAAGCTTCTAG-3'; SEQ ID NO: 7)和 0.5 μ g 聚(dI-dC)加上 20 个单位的 T4 多核苷酸激酶(New England Biolabs, Beverly, MA)在 1X 结合反应缓冲液(终浓度为: 20mM Tris、pH 7.4, 100mM NaCl、1mM EDTA、10%体积/体积甘油)中混合。让结合反应在 37℃下温育 60 分钟,按照厂商说明书使用 G50 spin 柱(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)将标记的寡核苷酸和游离的探针分离。在 95℃下进行标记的寡核苷酸和未标记的寡核苷酸链的退火 5 分钟,然后让其慢慢冷却过夜。然后将样品在 0.5X TBE 缓冲液中在 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶上跑胶来进行分析。干燥凝胶,并进行放射自显影以检测 DNA-蛋白复合物。为进行超迁移实验(supershift experiments),用 LGG-CM 温育 YAMC 细胞,然后在 HSE 结合反应前将 1 μ g 大鼠单克隆抗 HSF-1 抗体(SPA 950, Stressgen, Victoria, BC, Canada)、1 μ g 大鼠单克隆抗 HSF-2 (SPA 960, Stressgen)或 1 μ g 兔免疫前血清和细胞提取物在 25℃下预温育 30 分钟。在该预温后,使用本领域已知的或此处描述的标准方法学进行结合反应和分析。

结果显示响应 LGG-CM 的 HSF-1 的结合在暴露于 LGG-CM 的第 1 个小时内发生,表明该诱导在性质上是至少部分地转录性的(图 7)。使用针对 HSF-1 和 HSF-2 的抗体的超迁移分析显示 HSF-1 是参与的首要转录因子(图 8)。

实施例 7

微阵列分析

Hsp 是在对 LGG-CM 暴露起反应时最高度上调的基因。在已确定

LGG-CM处理诱导强烈的热激蛋白诱导和确定上皮细胞中LGG-CM对Hsp的诱导的背后机制在性质上至少很大程度是转录性的之后,通过DNA微阵列分析来确定和其他上皮细胞基因相比Hsp上调的幅度。使用2种不同的微阵列芯片(一种包含19,000种鼠基因探针,另一种包含12,000种鼠基因探针)比较经LGG-CM处理的和经MRS-处理的(模拟处理)的细胞。

如上所述制备RNA,然后按照厂商说明书使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN, Valencia, CA)将其接受一步额外的纯化步骤。通过在1%的琼脂糖凝胶上分离来检查RNA的完整性。只使用具有1.8至2.0的280nm/260nm比的RNA。

一式两份运行含有19,000种鼠基因的Affymetrix微阵列芯片430A;使用含有12,000个鼠基因的U74Av2芯片(但其使用不同的探针组)确认用芯片430A获得的结果。使用Affymetrix Microarray Suite 5.0版本(MAS 5.0)分析数据。在各情况下,将LGG处理和模拟处理对照进行比较。结果表示为与对照相比,经处理的细胞的倍数变化,该倍数变化通过使用GENESPRING软件(版本4.2.1, Silicon Genetics, Mountain View, CA)得以计算。使用D芯片软件进行统计学分析。参见Tusher等人(2001)和Li等(2001)。基于下列阈值选择差异表达的基因:相对差异大于1.5倍,绝对差异大于100个信号强度单位并且统计学差异 $p < 0.05$ 。已将来自Affymetrix 430A微阵列芯片的数据保藏在可通过互联网获得的Gene Expression Omnibus数据库中(参见series登录, GSE1940)。

根据散布图可以看出,响应LGG-CM处理,上调最显著的基因是热激蛋白基因(图9)。为确认这些发现,使用另一含有12,000个鼠基因和使用不同探针组的基因芯片,再次发现Hsp是在对LGG-CM处理的反应中上调最高的基因。下面的表6中提供了前10位上调的基因。

表1中列出了24个这样的基因,所述基因在芯片430A和芯片U74Av2上都表现出LGG-CM处理细胞与对照之间的变化大于2倍。列于表1和列于之前段落中的对应于GenBank目录号的所有序列在此引

用作为参考。

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
430A	1416041_at	血清/糖皮质激素 调节的激酶	NM_011361	4.15
U74Av2	97890_at	血清/糖皮质激素 调节的激酶	AW046181	3.48
430A	1416855_at	生长停滞特异性 1	NM_008086	-2.69
430A	1448494_at	生长停滞特异性 1	BB550400	-2.33
U74Av2	94813_at	生长停滞特异性 1	X65128	-3.06
430A	1417516_at	DNA-损伤可诱导的 转录物 3	NM_007837	4.04
U74Av2	101429_at	DNA-损伤可诱导的 转录物 3	X67083	10.55
430A	1453851_a_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45γ	AK007410	2.45
U74Av2	101979_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45γ	AF055638	2.73
430A	1448830_at	双重特异性磷酸酶 1	NM_013642	3.34
U74Av2	104598_at	双重特异性磷酸酶 1	X61940	3.01
430A	1418930_at	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 10	NM_021274	2.47
U74Av2	93858_at	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 10	M33266	4.72
430A	1449363_at	活化转录因子 3	BC019946	3.76
U74Av2	104155_f_at	活化转录因子 3	U19118	5.76

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化	
430A	1419149_at	丝氨酸（或半胱氨酸）蛋白酶 抑制剂，进化支 E，成员 1	NM_008871	3.15	
U74Av2	94147_at	丝氨酸（或半胱氨酸）蛋白酶 抑制剂，进化支 E，成员 1	M33960	2.43	
430A	1419291_x_at	生长停滞特异性 5	NM_013525	2.44	
U74Av2	98531_g_at	生长停滞特异性 5	AI849615	2.61	
430A	1449519_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	NM_007836	3.28	
U74Av2	102292_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	U00937	4.09	
430A	1419665_a_at	核蛋白 1	NM_019738	3.36	
430A	1419666_x_at	核蛋白 1	NM_019738	2.79	
U74Av2	160108_at	核蛋白 1	AI852641	5.8	
430A	1422557_s_at	金属硫蛋白 1	NM_013602	-2.15	
U74Av2	93573_at	金属硫蛋白 1	V00835	2.53	
430A	1422990_at	met 原癌基因	NM_008591	-3.43	
U74Av2	100309_at	met 原癌基因	Y00671	-2.68	
430A	1423062_at	胰岛素样生长因子 结合蛋白 3	AV175389	-2.35	
U74Av2	95082_at	胰岛素样生长因子 结合蛋白 3	AI842277	-3.74	
430A	1423100_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	AV026617	2.96	
U74Av2	160901_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	V00727	4.54	
430A	1451313_a_at	RIKEN cDNA 1110067D22 基因	BC019131	2.32	
U74Av2	160704_at	RIKEN cDNA 1110067D22 基因	AW121603	2.17	
430A	1426559_at	cDNA 序列	BC021875	BG065326	2.59
U74Av2	104106_at	cDNA 序列	BC021875	AI837830	-5.64
430A	1427585_at	小鼠 DNA 胞嘧啶 甲基转移酶 mRNA	AF071754	25.2	
U74Av2	95396_at	小鼠 DNA 胞嘧啶 甲基转移酶 mRNA	AF071754	5.86	
430A	1428529_at	RIKEN cDNA 2810026P18 基因	AK012825	2.18	
U74Av2	104089_at	RIKEN cDNA 2810026P18	AW045664	3.01	

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
		基因		
430A	1430271_x_at	RIKEN cDNA 4930553M18	AA672926	2.07
		基因		
U74Av2	104640_f_at	RIKEN cDNA 4930553M18	AI464596	2.1
		基因		
430A	1436549_a_at	异源核 核糖核蛋白 A1	BE685966	2.17
U74Av2	92724_at	异源核 核糖核蛋白 A1	AI183202	2.08
430A	1436791_at	无翼相关的 MMTV 整合位点 5A	BB067079	-2.61
U74Av2	99390_at	无翼相关的 MMTV 整合位点 5A	M89798	-2.16
430A	1455904_at	生长停滞特异性 5	BI650268	2.66
U74Av2	98531_g_at	生长停滞特异性 5	AI849615	2.61
430A	1449773_s_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45β	AI323528	2.41
U74Av2	161666_f_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45β	AV138783	2.52

表 1

在表 2 至表 5 中显示芯片 430A 和芯片 U74Av2 之间的 4 个常见基因本体 (ontology) 组。只显示在 LGG-CM 处理细胞和对照之间表现大于 2 倍变化的基因。表 2 至 5 中所列的对应于 Genbank 目录号的所有序列在此引用作为参考。

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
430A	1416855_at	生长停滞特异性 1	NM_008086	-2.69
	1448494_at	生长停滞特异性 1	BB550400	-2.33
	1417516_at	DNA-损伤可诱导的 转录物 3	NM_007837	4.04
	1418936_at	v-maf 肌腱膜 纤维肉瘤癌基因家族, 蛋白 F(鸟)	BC022952	2.27
	1419291_x_at	生长停滞特异性 5	NM_013525	2.44
	1449519_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	NM_007836	3.28
	1450016_at	细胞周期蛋白 G1	NM_009831	-2.65
	1450017_at	细胞周期蛋白 G1	BG065754	-2.35
	1421679_a_at	细胞周期蛋白依赖性激酶 抑制剂 1A (P21)	NM_007669	-2.15

	1450533_a_at	多形腺瘤基因样 1	NM_009538	-3.05
	1422990_at	met 原癌基因	NM_008591	-3.43
	1423100_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	AV026617	2.96
	1426208_x_at	多形腺瘤基因样 1	AF147785	-2.22
	1455904_at	生长停滞特异性 5	BI650268	2.66
U74Av2	94813_at	生长停滞特异性 1	X65128	-3.06
	98531_g_at	生长停滞特异性 5	AI849615	2.61
	103048_at	成神经细胞瘤 myc-相关的 癌基因 1	M12731	-2.09
	94338_g_at	生长停滞特异性 2	M21828	3.23
	101429_at	DNA-损伤可诱导的转录物 3	X67083	10.55
	102292_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	U00937	4.09
	92502_at	凋亡和细胞周期停滞的 锌指蛋白调节剂	X95504	-2.56
	95348_at	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1	J04596	-2.61
	100309_at	met 原癌基因	Y00671	-2.68
	160901_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	V00727	4.54

表 2. 细胞周期调控基因。对于 430A 芯片, 在 125-组 (全部: 212/13281, p 值: 0.000000) 中发现 14 个基因本体 “细胞周期调控” 基因。对于 U74Av2 芯片, 在 96-组 (全部: 146/6741, p 值: 0.000038) 中发现 10 个基因本体 “细胞周期调控” 基因。

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
430A	1416120_at	核糖核苷酸还原酶 M2	BF119714	-2.31
	1448458_at	拓扑异构酶 (DNA) IIB	BB166592	-2.4
	1416855_at	生长停滞特异性 1	NM_008086	-2.69
	1448494_at	生长停滞特异性 1	BB550400	-2.33
	1417516_at	DNA-损伤可诱导的转录物 3	NM_007837	4.04
	1448830_at	双重特异性磷酸酶 1	NM_013642	3.34
	1418936_at	v-maf 肌腱膜 纤维肉瘤癌基因家族, 蛋白 F(鸟)	BC022952	2.27
	1419291_x_at	生长停滞特异性 5	NM_013525	2.44
	1449519_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	NM_007836	3.28
	1450016_at	细胞周期蛋白 G1	NM_009831	-2.65
	1450017_at	细胞周期蛋白 G1	BG065754	-2.35
	1421679_a_at	细胞周期蛋白依赖性激酶 抑制剂 1A (P21)	NM_007669	-2.15
	1450533_a_at	多形腺瘤基因样 1	NM_009538	-3.05

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
	1422990_at	met 原癌基因	NM_008591	-3.43
	1423100_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	AV026617	2.96
	1426208_x_at	多形腺瘤基因样 1	AF147785	-2.22
	1434496_at	细胞因子可诱导的激酶	BM947855	2.6
	1455904_at	生长停滞特异性 5	BI650268	2.66
U74Av2	94813_at	生长停滞特异性 1	X65128	-3.06
	98531_g_at	生长停滞特异性 5	AI849615	2.61
	103048_at	成神经细胞瘤 myc-相关的 癌基因 1	M12731	-2.09
	104598_at	双重特异性磷酸酶 1	X61940	3.01
	94338_g_at	生长停滞特异性 2	M21828	3.23
	101429_at	DNA-损伤可诱导的转录物 3	X67083	10.55
	101930_at	核因子 I/X	Y07688	-2.4
	102292_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	U00937	4.09
	92502_at	凋亡和细胞周期停滞的 锌指蛋白调节剂	X95504	-2.56
	95348_at	趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1	J04596	-2.61
	100309_at	met 原癌基因	Y00671	-2.68
	101180_at	共济失调性毛细血管扩张症 突变的同源物 (人)	U43678	-2.49
	160859_s_at	核因子 I/B	Y07685	-2.27
	160901_at	FBJ 骨肉瘤癌基因	V00727	4.54

表 3. 细胞周期基因。对于 430A 芯片, 在 125-组 (全部: 465/13281, p 值: 0.000000) 中发现 18 个基因本体“细胞周期”基因。对于 U74Av2 芯片, 在 96-组 (全部: 326/6741, p 值: 0.000188) 中发现 14 个基因本体“细胞周期”基因。

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
430A	1416855_at	生长停滞特异性 1	NM_008086	-2.69
	1448494_at	生长停滞特异性 1	BB550400	-2.33
	1417516_at	DNA-损伤可诱导的转录物 3	NM_007837	4.04
	1419291_x_at	生长停滞特异性 5	NM_013525	2.44
	1449519_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45α	NM_007836	3.28
	1421679_a_at	细胞周期蛋白依赖性激酶 抑制剂 1A (P21)	NM_007669	-2.15
	1455904_at	生长停滞特异性 5	BI650268	2.66
U74Av2	94813_at	生长停滞特异性 1	X65128	-3.06
	98531_g_at	生长停滞特异性 5	AI849615	2.61
	94338_g_at	生长停滞特异性 2	M21828	3.23
	101429_at	DNA-损伤可诱导的转录物 3	X67083	10.55

102292_at 生长停滞和 DNA-
损伤可诱导的 45 α

U00937 4.09

表 4. 细胞周期停滞基因。对于 430A 芯片, 在 125-组(全部: 26/13281, p 值: 0.000000)中发现 7 个基因本体“细胞周期停滞”基因。对于 U74Av2 芯片, 在 96-组(全部: 22/6741, p 值: 0.000011)中发现 5 个基因本体“细胞周期停滞”基因。

芯片	探针组	基因	GenBank Accession	倍数变化
430A	1453851_a_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 γ	AK007410	2.45
	1449519_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 α	NM_007836	3.28
	1449773_s_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 β	AI323528	2.41
U74Av2	101979_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 γ	AF055638	2.73
	102292_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 α	U00937	4.09
	161666_f_at	生长停滞和 DNA- 损伤可诱导的 45 β	AV138783	2.52

表 5. 核糖体蛋白 L7Ae/L30e/Gadd45 基因。对于 430A 芯片, 在 118-组(全部: 14/13714, p 值: 0.000211)中发现 3 个基因本体“核糖体蛋白 L7Ae/L30e/S12e/Gadd45”基因。对于 U74Av2 芯片, 在 99-组(全部: 77/7501, p 值: 0.000075)中发现 3 个基因本体“核糖体蛋白 L7Ae/L30e/S12e/Gadd45”基因。

对于这些微阵列研究, 使用 Tusher 等人(2001)和 Li 等人(2001) (两者都在此引用作为参考)中描述的“D 芯片”和“Sam”软件进行统计学分析。

Genbank 目录号	相对表达变化 (倍数变化, LGG-CM 对空白)	P 值	基因说明
AW763765	68.59	0.00002	小鼠可诱导的热激蛋白, 70kDa3(即, Hsp72, 可选择 地称为 Hsp70)
M12573.1	36.76	0.00002	小鼠可诱导的热激蛋白, 70kDa1(Hsp68, 小鼠 Hsp72/Hsp70 的人同源物)
U03561.1	22.63	0.00002	小鼠热激蛋白 Hsp27 内部

			缺失变体 b
AF071754.1	13.93	0.000492	小鼠 DNA 胞嘧啶甲基转移酶
AK013777.1	13.00	0.00003	蛋白酪氨酸磷酸酶, 非受体类型 21
BC025911.1	12.13	0.000241	小鼠分选微管连接蛋白 6
NM-013560.1	11.31	0.00002	小鼠热激蛋白, 25kDa (Hsp25, 小鼠 Hsp25 的人同源物)
L07264.1	11.31	0.00002	小鼠肝素-结合性 EGF 样生长因子前体
BH320427	11.31	0.001832	RIKEN cDNA 5430423014 基因 (EST, 基因功能未知)
L25109.1	10.56	0.000147	小鼠无脑回基因 (LIS1) 部分 cds.

表 6.

实施例 8

⁵¹Cr 铬释放测定法

LGG-CM 也保护上皮细胞免受氧化剂的损伤。鉴于 LGG-CM 上调可诱导的 Hsp, 采取功能测定法以确定热激诱导是否促成对抗氧化剂损伤的保护作用。当从先天免疫细胞释放出来的次氯酸和氨反应时, 通常产生氧化剂单氯胺, 该氧化剂通过造成细胞骨架的崩溃、削弱的膜运输、紧密屏障功能的丧失和最终细胞的死亡来影响上皮细胞 (Grisham 等人, Inflammation 14: 531-542, 1990; Musch 等人, Am J Physiol 270: C429-436, 1996; Musch 等人, Gastroenterology 117: 115-122, 1999)。研究已显示可诱导的 Hsp 提供在肠道上皮细胞中对抗由单氯胺产生的氧化剂应激的细胞保护作用 (Musch 等人, 1996; Musch 等人, 1999)。

将 YAMC 细胞培养在 24 孔板中, 不用 LGG-CM 处理 (对照) 或用 LGG-CM 处理 1 小时, 然后更换培养基, 将细胞在 37℃、5% CO₂ 培养箱中放置过夜。然后用 ⁵¹Cr (50μCi/ml; Sigma Chemical Co.) 装载细

胞, 进行 60 分钟, 洗涤细胞, 并在含有 0.6mM 的氧化剂单氯胺的培养基中温育以诱发细胞损伤。60 分钟后, 收获培养基, 用 1N HNO₃ 提取细胞中保留的 ⁵¹Cr, 进行 4 小时。通过液体闪烁光谱学对释放级分和细胞级分中的 ⁵¹Cr 进行计数。通过将释放的量除以释放的量和细胞内保留量的总和来计算释放的 ⁵¹Cr。汇集数据并使用 Instat 软件 (Graphpad, San Diego, CA) 进行分析, 使用成对 Student's T 检验来进行比较。

使用 LGG-CM 预处理上皮细胞提供了统计学上显著意义的对抗氧化剂损伤的保护作用, 其通过在面临来自单氯胺的氧化剂损伤时提高上皮细胞的存活力来提供, 这一点已通过铬释放测定法得以证明 (图 11A)。

实施例 9

G/F 肌动蛋白测定法

用 F/G 肌动蛋白测定法进一步研究了 LGG-CM 在上皮细胞中诱导细胞保护性作用的能力, 该测定法是另一种对 LGG-CM 处理保护上皮细胞免受氧化剂应激伤害的能力的功能性读出, 该测定法更特异性地评估抗细胞骨架破坏的保护作用 (图 11B)。

将汇合的 YAMC 细胞单层转换至 37℃ 下的不含 IFN- γ 培养基中, 用 LGG-CM 处理 1 小时, 之后更换培养基, 或不作处理 (对照)。将细胞放置过夜, 然后用氧化剂单氯胺 (0.6mM 进行 30 分钟) 处理以诱发细胞损伤 (Musch 等人, 1996; Musch 等人, 1999)。在 PBS 中漂洗细胞, 收获细胞, 离心 (在室温下在 14,000 x g 下进行 20 秒), 将沉淀重悬浮于 200 μ l、30℃ 的裂解缓冲液 (1mM ATP、50mM PIPES, pH 6.9, 50mM NaCl、5mM MgCl₂、5mM EGTA、5% (体积/体积) 甘油、0.1% (体积/体积) Nonidet P-40、Tween 20 和 Triton X-100, 含有完全蛋白酶抑制剂混合物)。通过轻轻地用移液器上下吹打 10 次均质化细胞, 然后在 30℃ 下温育 10 分钟, 将其在 100,000 x g 下离心 60 分钟 (30℃)。取出上清液以测定 G 肌动蛋白, 将沉淀 (包含 F 肌动蛋白) 重悬浮于

200 μ l 4℃的含有 1 μ M 细胞松弛素 D 的蒸馏水中并在冰上放置 60 分钟。该处理使 F 肌动蛋白级分解聚, 这样在随后的蛋白印迹分析中只观察到 45 kDa 的单体形式。然后, 取出 20 μ l 各提取物, 加入 Laemmli 终止液并将样品加热至 65℃进行 10 分钟。通过 SDS-PAGE 将样品在 12.5%的聚丙烯酰胺凝胶上进行分离并立即转移至 PVDF 膜(更详细内容参见关于蛋白印迹分析的部分)。转移后, 使用多克隆抗肌动蛋白抗体(Cytoskeleton, Denver, CO)进行肌动蛋白的免疫印迹分析。

如所预期的, 未经处理的对照(C)显示 F 肌动蛋白多于 G 肌动蛋白, 单独用 LGG 预处理不改变该比例。用单氯胺(NH_2Cl)处理细胞产生了从肌动蛋白的纤丝状(F)至球状(G)形式的转变, 因为其破坏了肌动蛋白细胞骨架的完整性。在单氯胺暴露之前用 LGG-CM 进行处理导致 F 肌动蛋白的保留和对抗单氯胺诱导的对肌动蛋白细胞骨架的破坏的部分保护作用(最后两个泳道, 和经 NH_2Cl 处理的泳道相比)。

实施例 10

具有生物活性的益生剂的性质

LGG-CM 的主要生物学活性似乎存在于低于 10kDa 的化合物中。如图 3 中所示, 主要的活性, 如通过诱导 Hsp25 的能力所测量的, 存在于通过具有 10kDa 分子量截止值的 Centricon 过滤器制备的滤出液(F)中。(也参见图 12B)。将细胞和过滤截留物质接触不诱导 Hsp25 的表达。此外, 滤出液和截留物质(R+F)的组合不增强活性。然而, 更大分子量的多聚体组分对于活性可能是需要的。

LGG-CM 的生物学活性的其他性质是其在热或酸存在的情况下的稳定性。如图 4(第 2 泳道)中所示, LGG-CM 在煮沸 20 分钟后仍保持其生物学活性。同样如图 4 中(第 3 泳道)所示, LGG-CM 在酸性 pH 下最具活性。应当指出, 图 4 中标示的 pH(pH4)是条件培养基的 pH。当被加入至 YAMC 细胞的浸浴培养基时, 产生 1:10 的稀释度, 终 pH 在 6.5 至 6.9 之间, 接近在肠上皮细胞的顶膜的酸性微环境中发现的 pH。当将条件培养基的 pH 调节至 7.0 时, 生物学活性丧失(第 4 泳道)。

当将 pH 调节至 4.0 时, 活性未恢复 (第 5 泳道), 这表明活性化合物在近中性 pH 时不稳定, 尽管在中性 pH 时活性的丧失并不是绝对不可逆的。如果让条件培养基在 pH 4.0 下“恢复”2 天, 活性部分恢复, 表明该作用不是完全不可逆转的, 对近中性 pH 的暴露可能涉及活性化合物的可逆的、部分的解折叠或变性。

使用蛋白水解酶-胃蛋白酶, 使 LGG 生物活性化合物失活。在使用标准的实验方案用胃蛋白酶进行处理后, 将反应混合物通过 10kDa 分筛柱进行过滤以除去任何残留的胃蛋白酶。在该情况下使用胃蛋白酶是因为其活性 (和其他蛋白酶相反) 在酸性 pH 下是最佳的。如图 5 中所示, 对 LGG-条件培养基的胃蛋白酶处理显著地降低了生物学活性 (比较泳道 2 和 3), 如通过 Hsp25 和 Hsp72 的诱导所评估的。(也参见图 12A)。平行地进行的未过滤的对照实验确定胃蛋白酶自身不直接影响 Hsp 的表达。(参见图 12A 的泳道 5、6 和 7)。这些作用是特异性的, 因为没有在组成型 Hsp 同源物 Hsc73 中观察到变化。

然后将 LGG-CM 接受选择性超滤以确定活性因子的分子质量。之后使用滤出液 (包含小于 10kDa 的分子) 和截留物质 (包含大于 10kDa 的分子) 或两者一起处理 YAMC 细胞并制备 Hsp25 和 Hsp72 的免疫印迹。只有滤出液 (泳道 3) 或一起施用的两个级分 (泳道 4, R+F) 在 YAMC 细胞中诱导 Hsp 表达, 这表明所述生物活性因子是小于即 10kDa 的小分子质量的蛋白或肽。对活性肽的进一步表征显示其是热稳定的, 即使在煮沸后仍然保持活性 (图 12C, 比较泳道 2 和 3)。

使用还原剂二硫苏糖醇 (DTT) 处理 LGG-CM 导致生物学活性的丧失, 由蛋白印迹分析显示的可诱导的 Hsp25 和 Hsp72 的表达丧失阐明了这一点 (图 6)。这些数据表明所述活性化合物是这样的蛋白, 所述蛋白可能含有半胱氨酸残基并且二硫键可能在维持该生物活性因子的二级结构上起着极重要的作用。

对所述活性肽的表征显示其在低 pH 下也是稳定的。为确定其在各种 pH 下的稳定性, 改变 LGG-CM 的 pH (图 13)。在 7.0 中性 pH 下, 如果立即使用 LGG-CM 处理细胞, 其活性消失 (图 13A), 但如果将其

返回至 pH 4.0 并让其平衡过夜, 则其可能重新产生其诱导 Hsp 的能力 (图 13B)。这表明该肽在 pH 7.0 是不稳定的, 但该不稳定性不是该肽的不可逆变性的结果, 因为将 LGG-CM 返回 pH 4.0 导致生物学活性的至少部分恢复 (图 13B)。

根据本公开内容可制备和执行此处公开的和要求保护的所有组合物和方法而无需过多的实验。尽管已根据优选的实施方案描述了本发明的组合物和方法, 但对于本领域技术人员来说显而易见的是, 可对所述组合物和方法以及在此处描述的方法的步骤或步骤的顺序进行改变而不背离本发明的构思、精神和范围。更明确地, 很显然的是, 可用某些在化学和生理学上都相关的试剂替代此处描述的试剂而获得相同或类似的结果。如按照所附权利要求所定义的, 对于本领域技术人员来说显然的所有这些类似的替代物和改变都被认为在本发明的精神、范围和构思之内。

参考文献

下面的文献在此明确引用作为参考，其程度为它们提供示例性的方法或对这里公开的内容进行补充的其它细节内容。

U.S. Patent 5,534,121

U.S. Patent 6,398,933

Annuk *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 94:403-412, 2003.

Arvola *et al.*, *Pediatrics*, 104:e64, 1999.

Besnard *et al.*, *Gut*, 43(5):634-638, 1998.

Braude and Siemienski, *J. Clin. Invest.*, 47:1763-1773, 1968.

Campierei *et al.*, *Gastroenterology*, 118:A4179, 2000.

Chang, In: *Inflammatory Bowel Diseases*, Kirsner (Ed.), Philadelphia, W. B. Saunders Company, 3-19, 1999.

Cleveland *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.*, 71:1-20, 2001.

Geiss *et al.*, *J. Virol.*, 75(9):4321-4331, 2001.

Gionchetti *et al.*, *Gastroenterology*, 119:305-309, 2000b.

Gionchetti *et al.*, *Gastroenterology*, 124:1202-1209, 2003.

Gionchetti *et al.*, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15:489-493, 2000a.

Goldin *et al.*, *Nutr. Cancer*, 25:197-204, 1996.

Goss *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(9):5116-5121, 2001.

Isolaurei *et al.*, *Pediatrics*, 88:90-97, 1001.

Iyer *et al.*, *Science*, 283(5398):83-87, 1999.

Kalliomaki *et al.*, *Lancet*, 362:1869-1871, 2003.

Kojima *et al.*, *Gastroenterology*, 124:1395-1407, 2003.

Kullisaar *et al.*, *Int. J. Food Microbiol.*, 72:215-224, 2002.

Lee and Goldberg, *Mol. Cell. Biol.*, 18:30-38, 1998.

Lee *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3692-3697, 2000.

Lee *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 52:925-930, 2003.

- Leiper *et al.*, *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 12(1):179-99, 1998.
- Li and Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(1):31-36, 2001.
- Liu *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 284:C1073-1082, 2003.
- Maassen *et al.*, *Vaccine*, 18:2613-2623, 2000.
- Madsen *et al.*, *Gastroenterology*, 121:580-591, 2001.
- Majamaa *et al.*, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 20:333-338, 1995.
- Makowiec *et al.*, *Z. Gastroenterol.*, 36(8):619-24, 1998.
- Mosser *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 8(11):4736-4744, 1988.
- Musch *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 270:C429-436, 1996.
- Musch *et al.*, *Gastroenterology*, 117:115-122, 1999.
- Niedzielin *et al.*, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 13:1143-1147, 2001.
- Ocana *et al.*, *Curr. Microbiol.*, 38:279-284, 1999.
- Paraje *et al.*, *New Microbiol.*, 23:423-431, 2000.
- Parsell and Lindquist, *Annu. Rev. Genet.*, 27:437-496, 1993.
- Podolsky, *N. Engl. J. Med.*, 347:417-429, 2002.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Ropeleski *et al.*, *Gastroenterology*, 124:1358-1368, 2003.
- Schmitz *et al.*, *Gastroenterology*, 116:301-309, 1999.
- Smith, *Anal. Biochem.*, 150:76-85, 1985.
- Urayama *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 102:1860-1865, 1998.
- Whitehead *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:587-591, 1993.
- Wollowski *et al.*, *Amer. J. Clinical Nutrition*, 73:451S-455S, 2001.
- Alak *et al.*, Effect of *Lactobacillus reuteri* on intestinal resistance to *Cryptosporidium parvum* infection in a murine model of acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 175: 218-221, 1997.
- Antony *et al.*, *Lactobacillus bacteremia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis. Clin Infect Dis* 23: 773-778, 1996.

- Arvola et al., Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. *Pediatrics* 104: e64, 1999.
- Borriello et al., Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* 36: 775-780, 2003.
- Chang, E., Intestinal epithelial function and response to mucosal injury in inflammatory bowel diseases. In: *Inflammatory Bowel Diseases* (5th edition ed.), edited by Kirsner J. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1999, p. 3-19.
- Cleveland et al., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71: 1-20, 2001.
- Gabai et al., Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272: 18033-18037, 1997.
- Goldin et al., The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 25: 197-204, 1996.
- Grisham et al., Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. *Inflammation* 14: 531-542, 1990.
- Hamilton-Miller, JM, The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* 22: 360-366, 2003.
- Hamilton-Miller et al., Deficiencies in microbiological quality and labelling of probiotic supplements. *Int J Food Microbiol* 72: 175-176, 2002.
- Isolauri et al., A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88: 90-97, 1991.
- Kalliomaki et al., Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361: 1869-1871, 2003.
- Keyse, SM, *Stress Response: methods and protocols*. Totowa: Humana Press, 2000.
- Kojima et al., Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 124: 1395-1407, 2003.
- Lee et al., Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66: 3692-3697, 2000.
- Lee et al., Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 52: 925-930, 2003.
- Lister et al., Dipeptide transport and hydrolysis in isolated loops of rat small intestine: effects of stereospecificity. *J Physiol* 484 (Pt 1): 173-182, 1995.

- Liu et al., Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C1073-1082, 2003.
- Liu et al., Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite. *Free Radic Biol Med* 21: 771-781, 1996.
- Madsen et al., Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121: 580-591, 2001.
- Majamaa et al., Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 20: 333-338, 1995.
- Malin et al., Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 40: 137-145, 1996.
- McNeil et al., Mucosal surface pH of the large intestine of the rat and of normal and inflamed large intestine in man. *Gut* 28: 707-713, 1987.
- Mosser et al., Role of the human heat shock protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17: 5317-5327, 1997.
- Mounier et al., Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 7: 167-176, 2002.
- Musch et al., Induction of heat shock protein 70 protects intestinal epithelial IEC-18 cells from oxidant and thermal injury. *Am J Physiol* 270: C429-436, 1996.
- Musch et al., Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 117: 115-122, 1999.
- Parsell et al., The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496, 1993.
- Rautio et al., Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 28: 1159-1160, 1999.
- Rechkemmer et al., pH-microclimate at the luminal surface of the intestinal mucosa of guinea pig and rat. *Pflugers Arch* 407: 33-40, 1986.
- Reid et al., Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16: 658-672, 2003.
- Ropeleski et al., Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress. *Gastroenterology* 124: 1358-1368, 2003.
- Salminen et al., *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 35: 1155-1160, 2002.

Salminen et al., Probiotics demonstrating efficacy in clinical settings. *Clin Infect Dis* 32: 1577-1578, 2001.

Sanderson, IR, The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 69: 1028S-1034S, 1999.

Shanahan, F, Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *Br J Nutr* 88 Suppl 1: S5-9, 2002.

Sipsas et al., Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents. *Clin Infect Dis* 34: 1283-1284; author reply 1284-1285, 2002.

Smith et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85, 1985.

Szajewska et al., Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 138: 361-365, 2001.

Tuomola et al., Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73: 393S-398S, 2001.

Urayama et al., Dexamethasone protection of rat intestinal epithelial cells against oxidant injury is mediated by induction of heat shock protein 72. *J Clin Invest* 102: 1860-1865, 1998.

Vanderhoof et al., *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 135: 564-568, 1999.

Wagner et al., Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun* 65: 4165-4172, 1997.

Whitehead et al., Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 587-591, 1993.

Yan et al., Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277: 50959-50965, 2002.

Zanke et al., The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 6: 606-613, 1996.

Zarate et al., The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J Virol* 74: 593-599, 2000.

<110>	Chang, et al.	
<120>	来自乳杆菌 GG 的益生化合物及其用途	
<130>	27373/40049A	
<150>	US 60/564,049	
<151>	2004-04-20	
<160>	7	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	1	
	ccatgttcgt cctgcctttc	20
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	2	
	gagggctgct tctgaccttc t	21
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	3	
	ggctgatcgg acggaagtt	19
<210>	4	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	4	
	ggaacggcca gtgcttcat	19

<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	5	
	ggcaaattca acggcacagt	20
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	6	
	agatggtgat gggcttccc	19
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成引物	
<400>	7	
	ctagaagctt ctagaagctt ctag	24

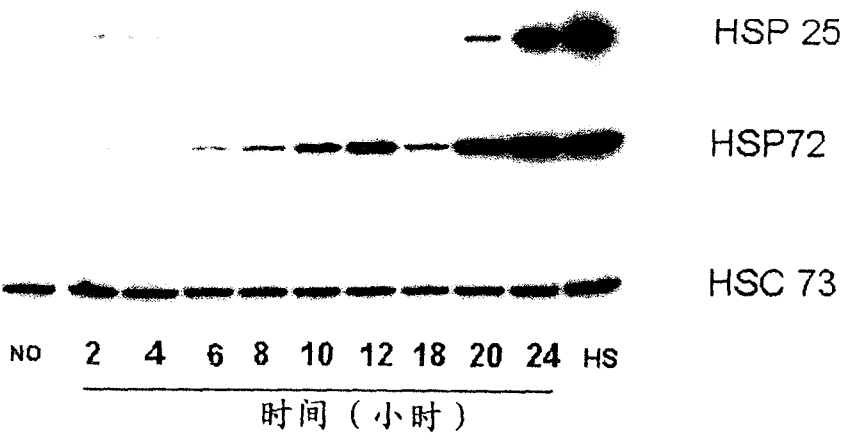


图 1A

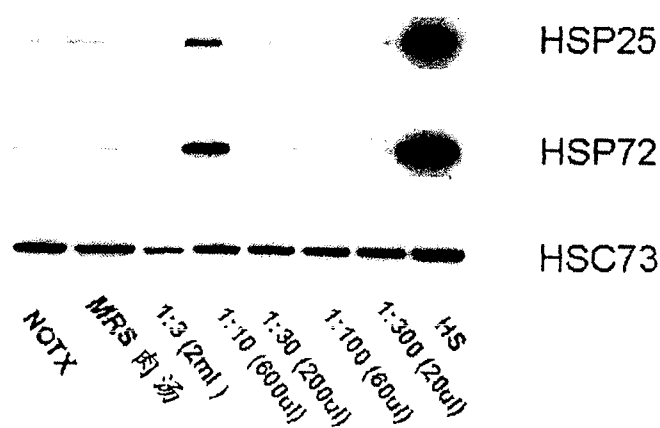


图 1B

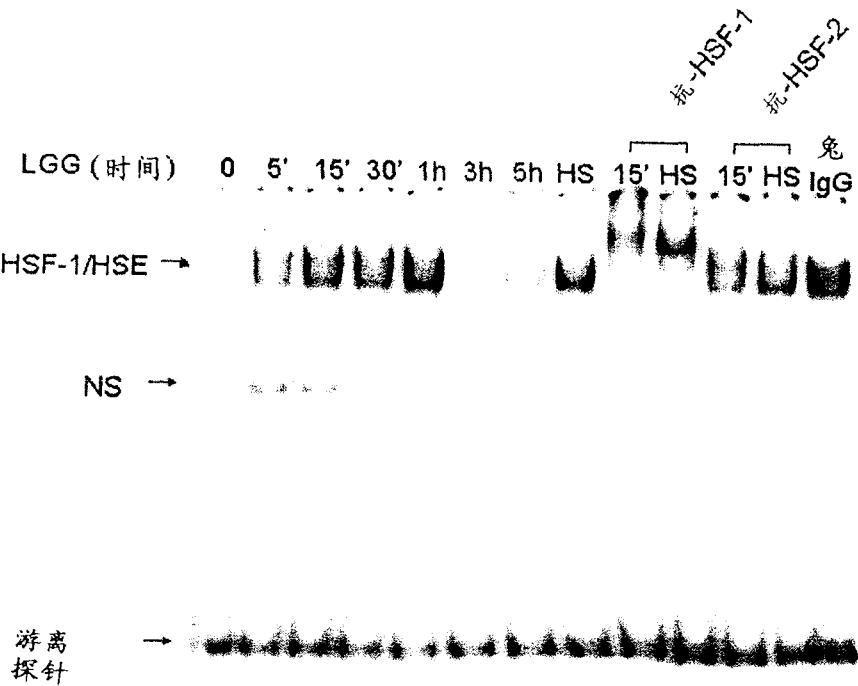


图 2

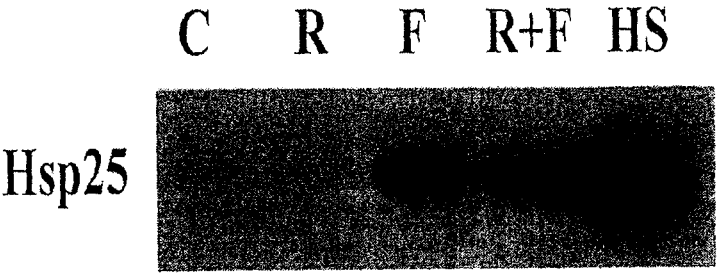


图 3

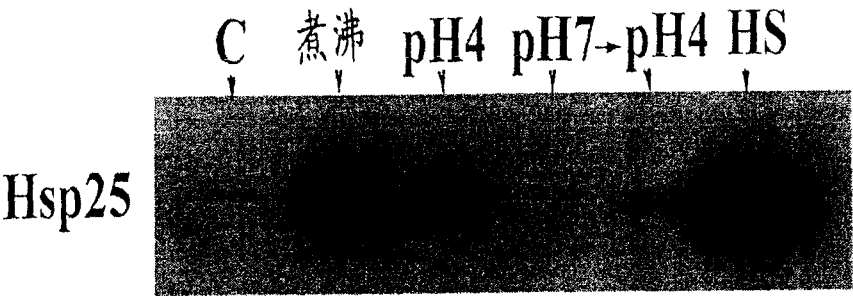


图 4

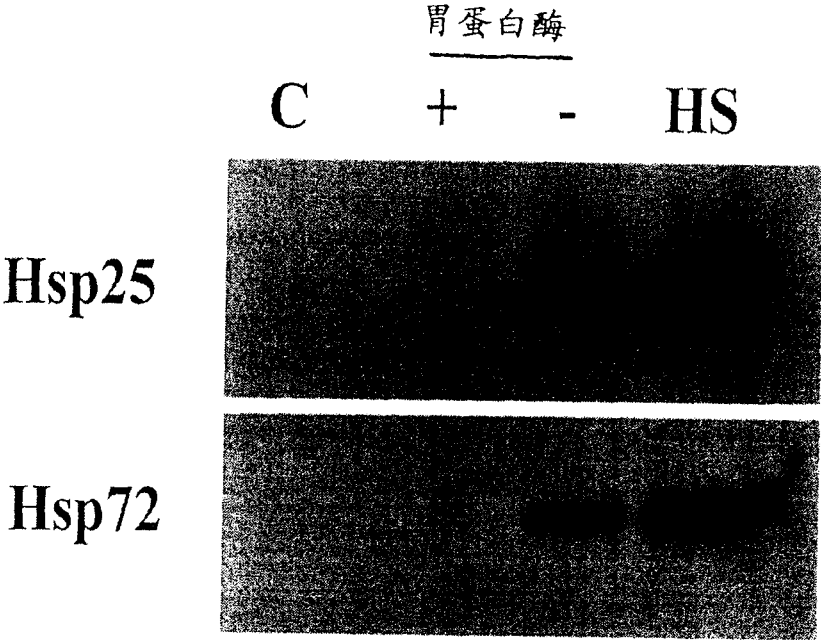


图5

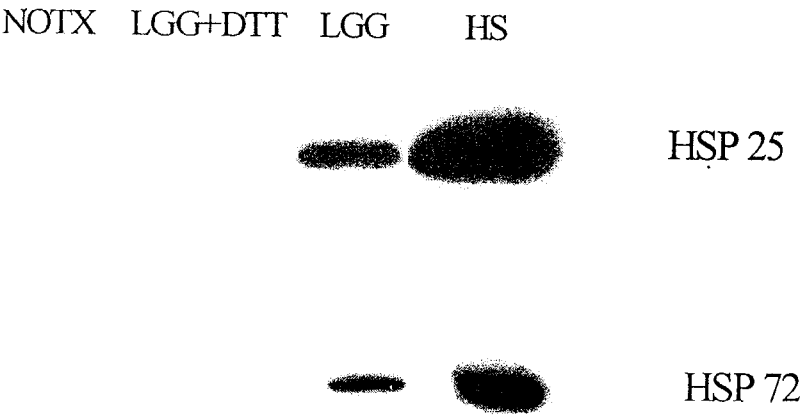


图 6

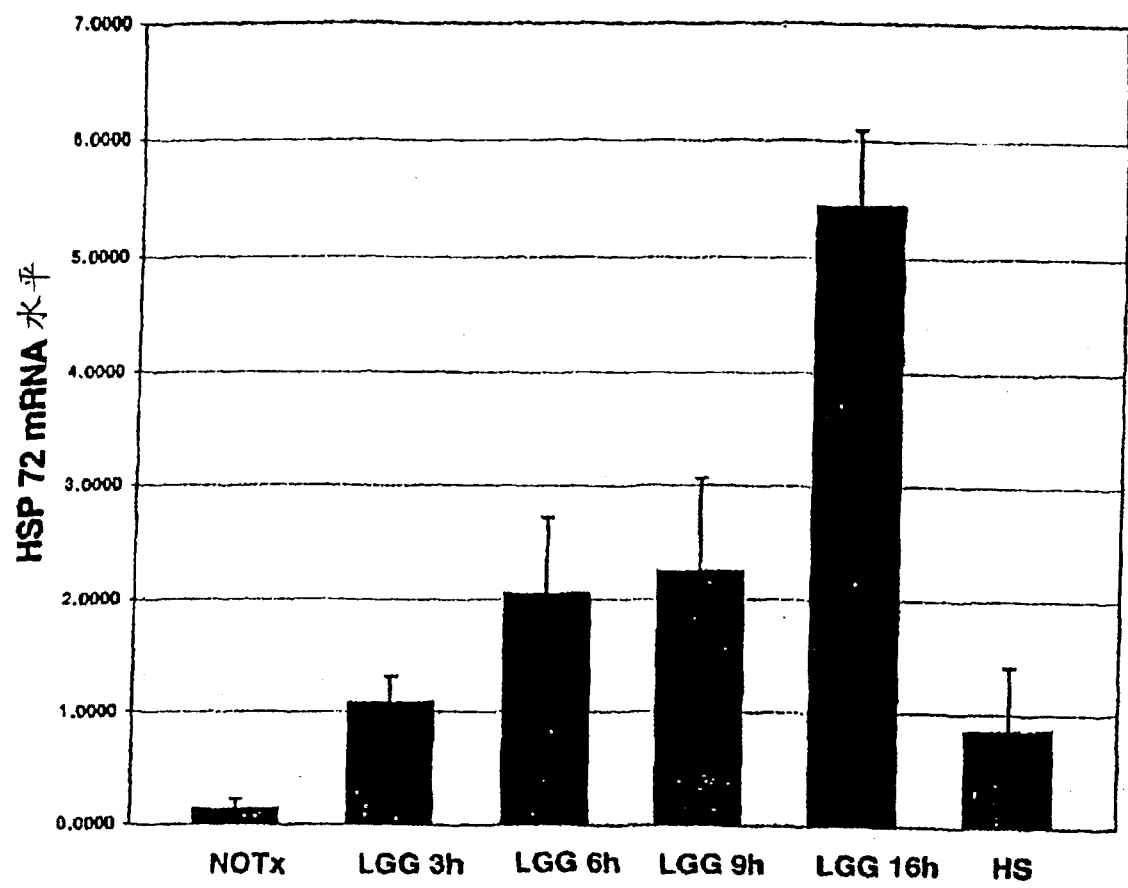


图 7A

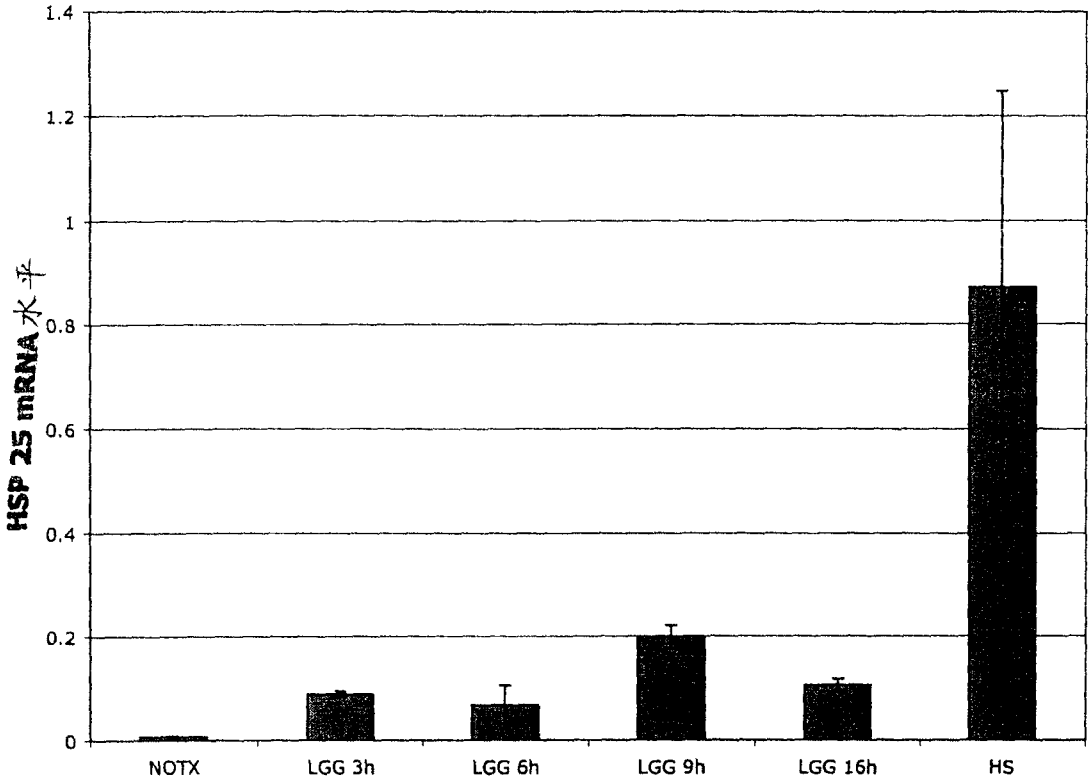


图 7B

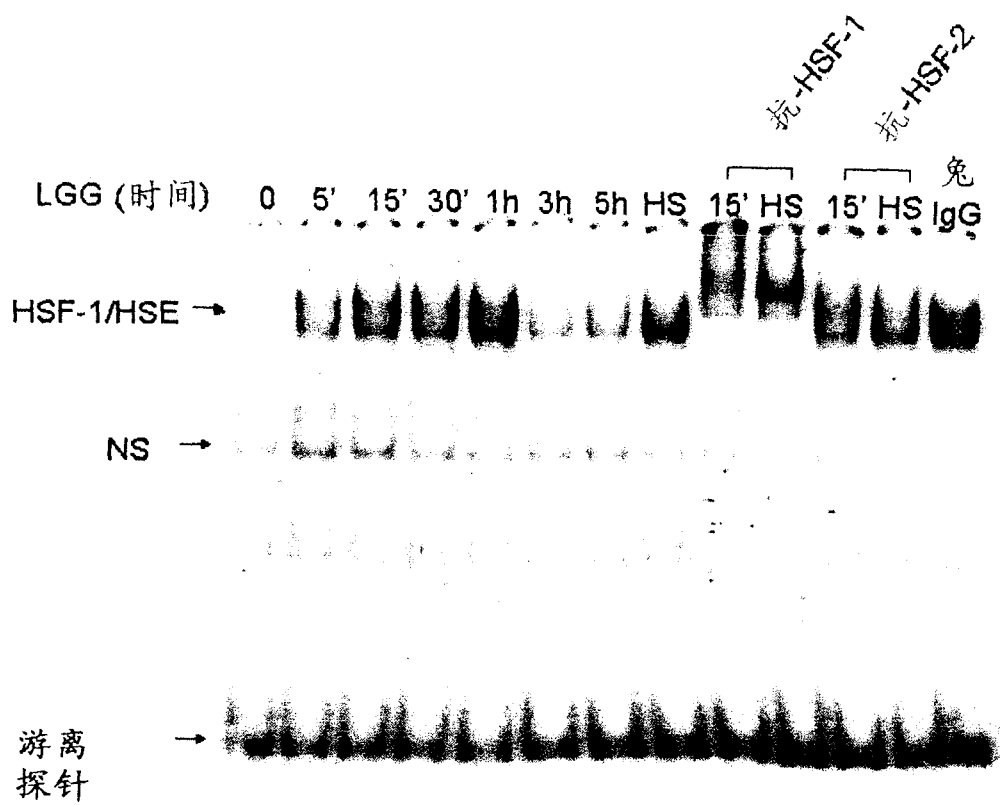


图 8

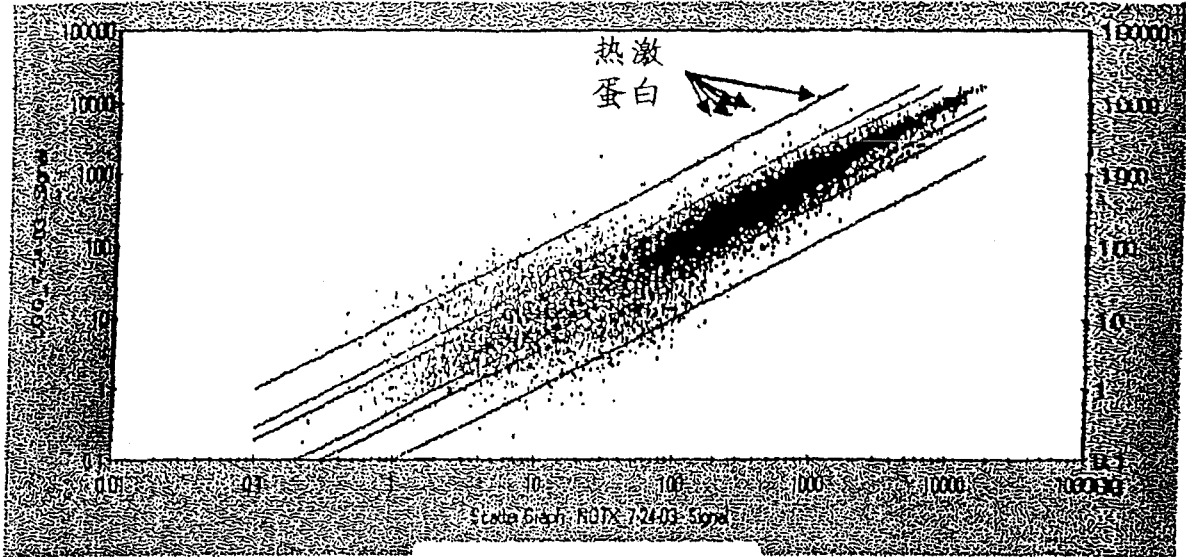


图 9A

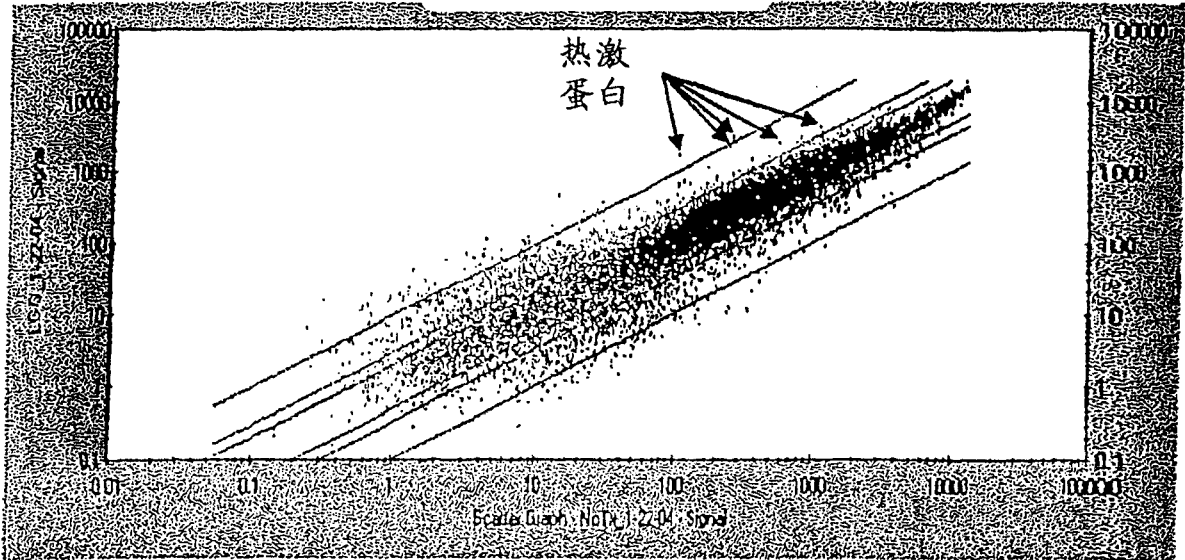


图 9B

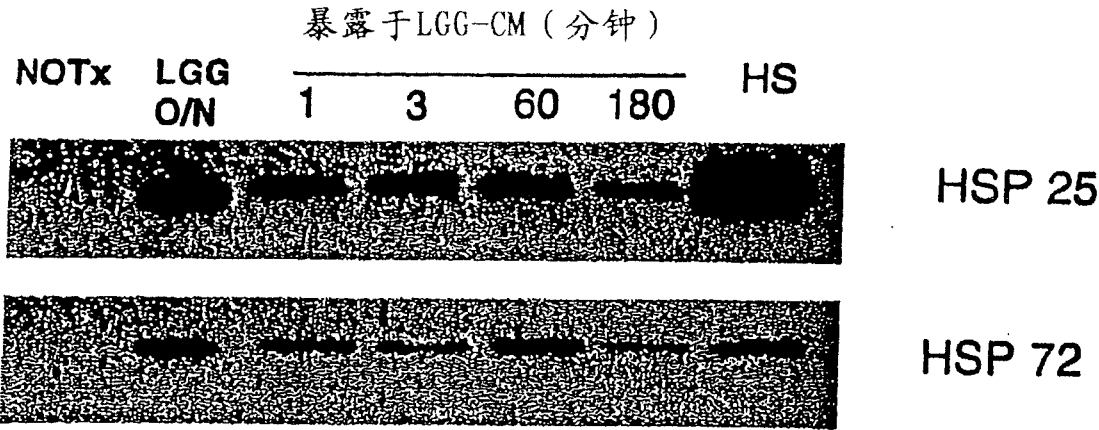


图 10A

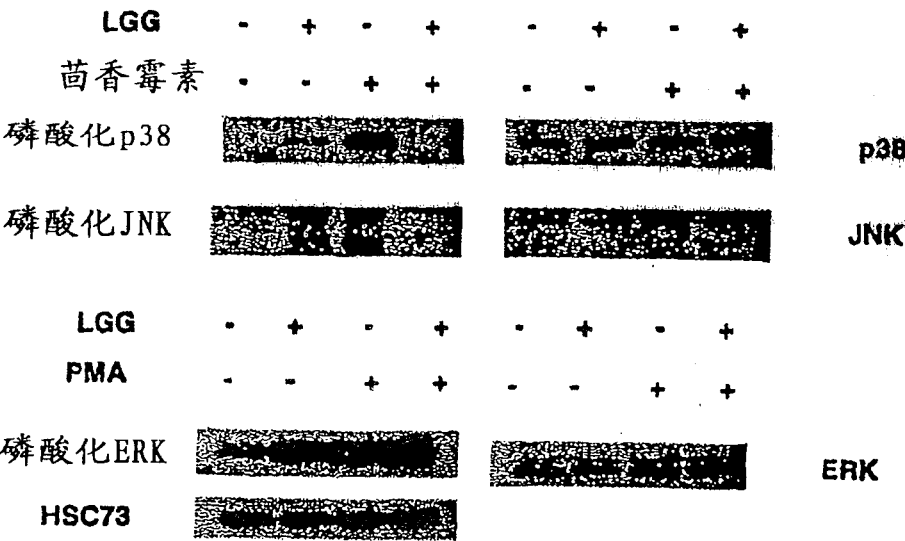


图10B

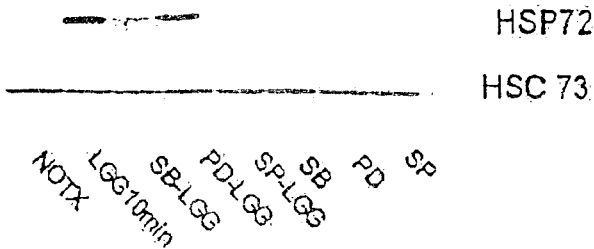


图 10C

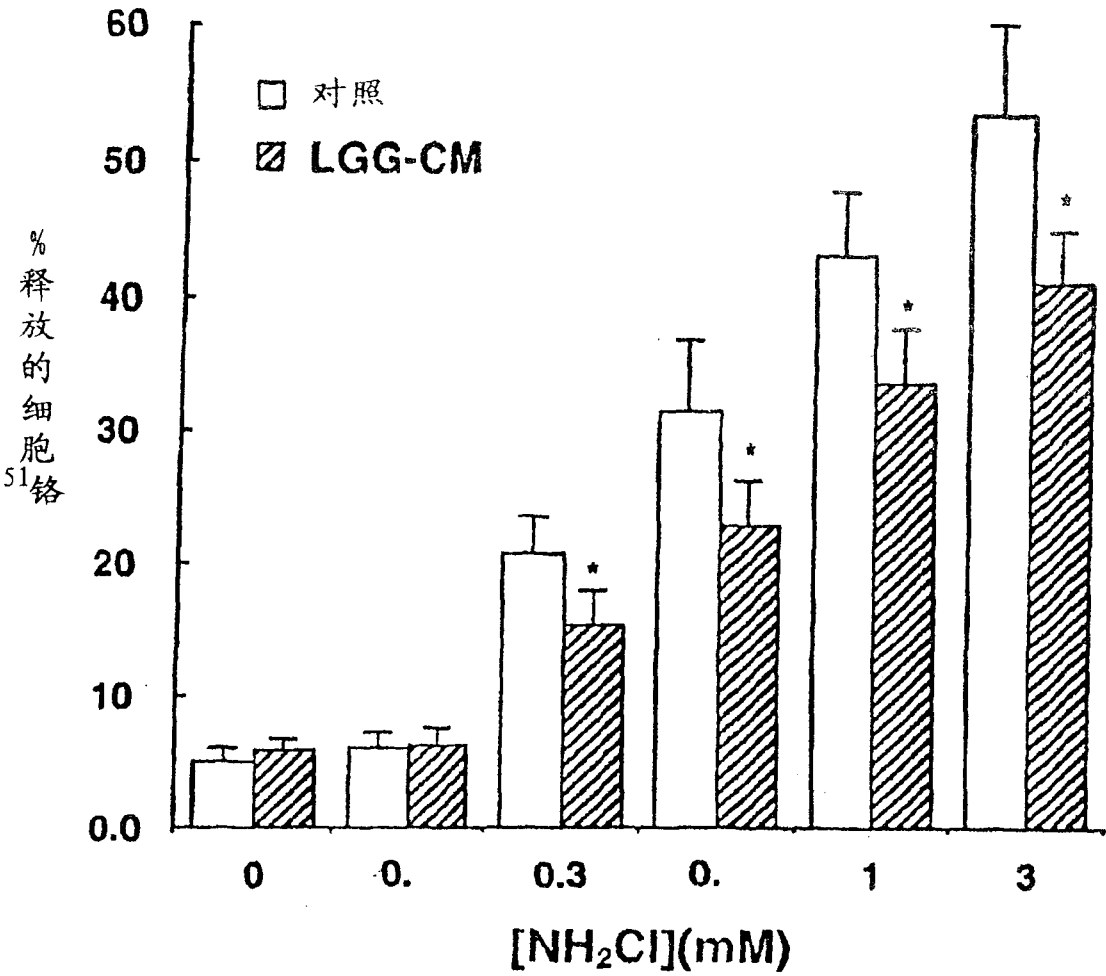


图 11A

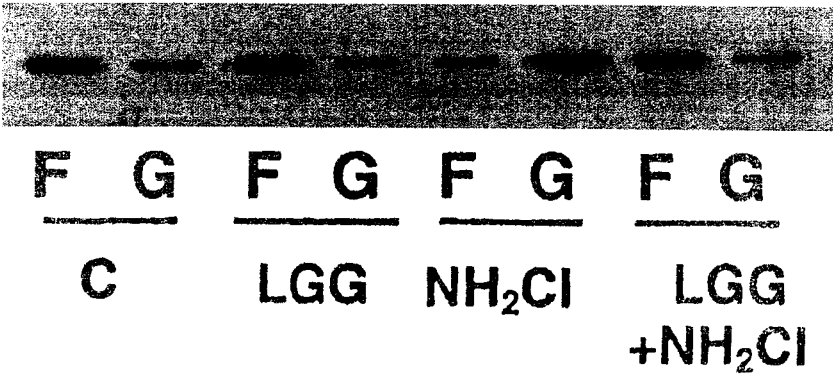


图 11B

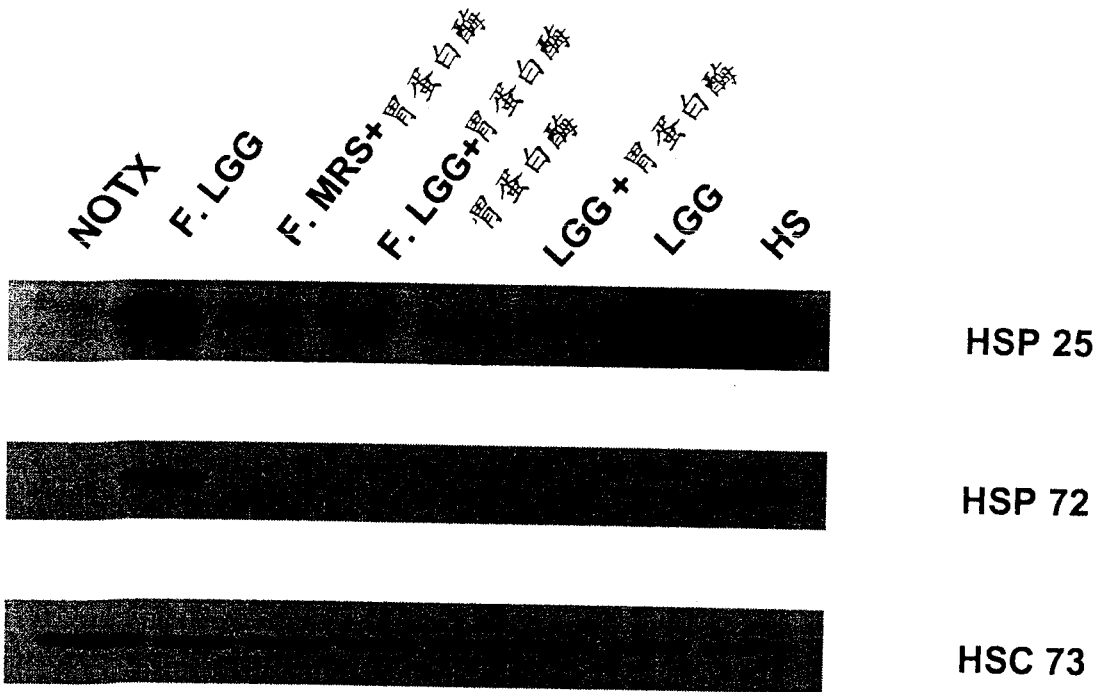


图 12A

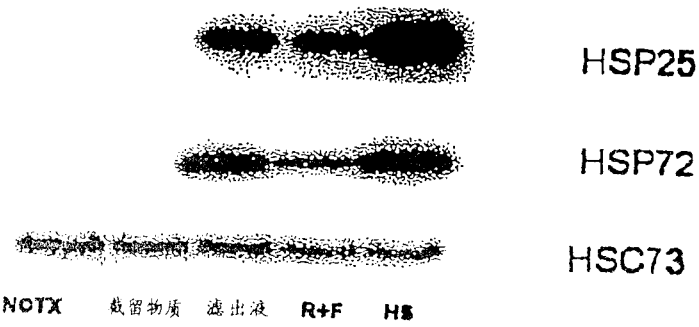


图 12B

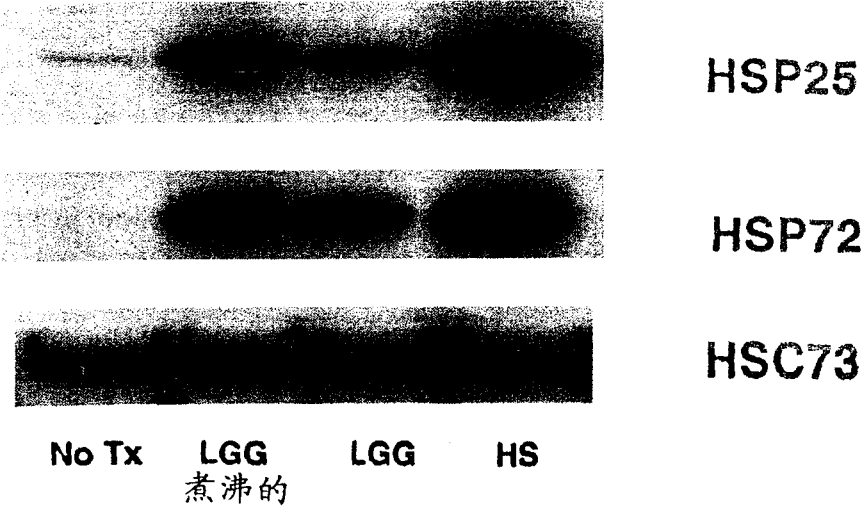


图12C

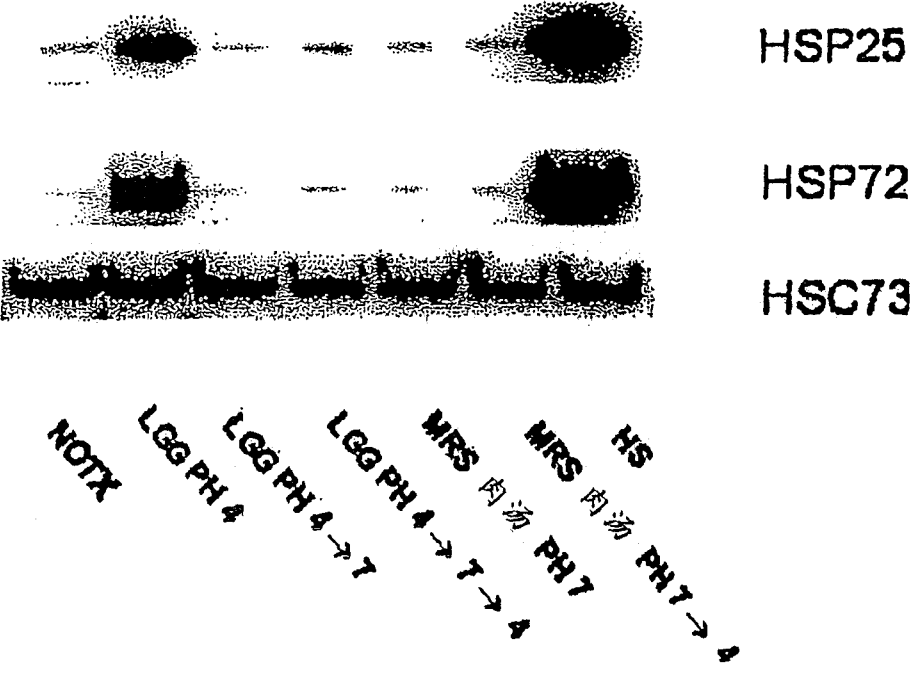


图13A

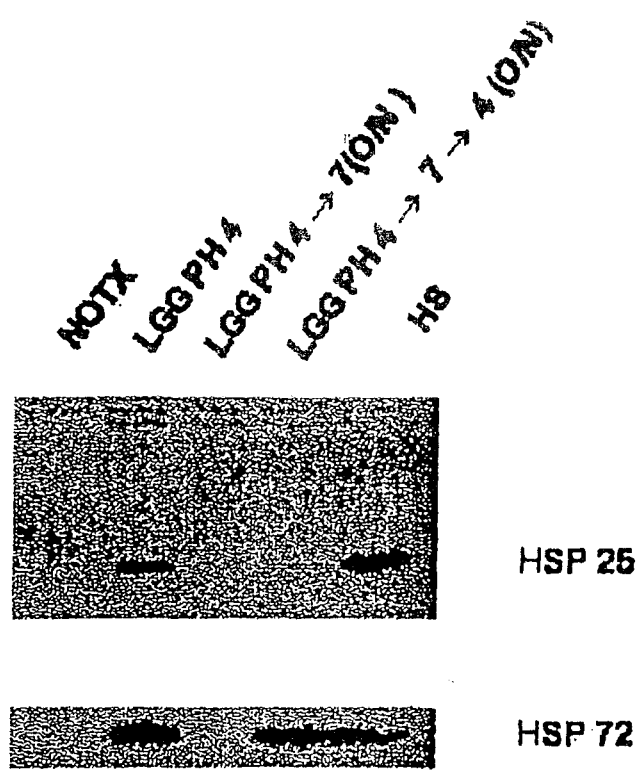


图 13B