

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/20

A61K 35/74

//(C12N1/20,C12R1 : 225)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02818376.2

[43] 公开日 2004 年 12 月 22 日

[11] 公开号 CN 1556852A

[22] 申请日 2002.9.19 [21] 申请号 02818376.2

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 20 [33] SE [31] 0103127 -7

[86] 国际申请 PCT/SE2002/001704 2002.9.19

[87] 国际公布 WO2003/038068 英 2003.5.8

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.19

[71] 申请人 艾伦股份公司

地址 瑞典恩厄尔霍尔姆

[72] 发明人 C·萨缪尔森 E·克万塔

A·吉菲尔韦内

[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 刘晓东

权利要求书 3 页 说明书 24 页 PCT/RO/134 表 5 页
附图 3 页

[54] 发明名称 作为人体阴道中的益生菌物的乳酸产生细菌

[57] 摘要

本发明公开了乳杆菌属和片球菌属的乳酸产生菌的新型分离菌株和分离该细菌菌株的方法, 该细菌菌株甚至在月经流注期间也能够 在人阴道内定居并繁殖。而且还记载了用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的且含有所述细菌菌株的组合物和卫生用品如棉条。本发明还记载了一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的方法, 其中阴道施用了至少一种所述细菌菌株。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 乳杆菌属或片球菌属的分离菌株, 其特征在于所述菌株选自以下一组菌株: 加氏乳杆菌菌株 LN40, 其保藏号为 LMG P-20560、干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株 LN113, 其保藏号为 LMG P-20562、发酵乳杆菌菌株 LN99, 其保藏号为 LMG P-20561、卷曲乳杆菌菌株 LN01, 其保藏号为 LMG P-20558 和乳酸片球菌菌株 LN23, 其保藏号为 LMG P-20559, 或其表型和/或基因型特性基本相应的变异体, 所述菌株于 2001 年 6 月 14 日被保藏在比利时微生物协调保藏中心。

2. 乳杆菌属或片球菌属的分离菌株, 其具有以下鉴定特性:

a) 在月经流注期间经阴道施用能够在人阴道内定居并繁殖, 其中从开始施用计算至少两个月经周期后, 如果阴道中仍有所述细菌存在, 就认为所述细菌定殖了,

b) 经重复培养后保持了遗传特性,

c) 经冻干和保存被冻干细菌保持了细菌的存活力, 其中在 -18°C 下保存至少 12 个月后至少有 40% 的冻干细菌仍然存活。

3. 如权利要求 2 所述的分离细菌菌株, 其中所述细菌菌株选自以下一组菌株: 加氏乳杆菌菌株 LN40, 其保藏号为 LMG P-20560、干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株 LN113, 其保藏号为 LMG P-20562、发酵乳杆菌菌株 LN99, 其保藏号为 LMG P-20561、卷曲乳杆菌菌株 LN01, 其保藏号为 LMG P-20558 和乳酸片球菌菌株 LN23, 其保藏号为 LMG P-20559, 或其表型和/或基因型特性基本相应的变异体, 所述菌株于 2001 年 6 月 14 日被保藏在比利时微生物协调保藏中心。

4. 分离乳杆菌属或片球菌属的细菌菌株的方法, 其中所述细菌菌株能够在人体阴道中定居和繁殖, 该方法包括以下步骤:

a) 从具有正常、健康阴道微生物菌群的妇女阴道中收集细菌样品,

b) 从步骤 a) 的阴道样品中筛选出乳酸产生细菌,

c) 利用适当的培养基对步骤 b) 的乳酸产生细菌进行体外纯培养

从而提供至少一种分离细菌菌株,

d)就在月经流注期间对妇女阴道施用所述菌株在阴道中进行定居和繁殖的能力,来评价步骤 c)的至少一种纯培养细菌菌株和/或步骤 c)的至少两种细菌菌株的组合,所述妇女的阴道微生物菌群发生紊乱,其中如果从开始施用起计算至少两个月经周期后所述细菌菌株仍然存在于阴道中,就认为该细菌菌株或菌株已经定殖,和

e)筛选出至少一种步骤 d)的细菌菌株,其能够在阴道中定居并繁殖。

5. 如权利要求 4 所述的方法,还包括另一个步骤,其中步骤 c)的至少一种纯培养细菌菌株和/或步骤 c)的至少两种细菌菌株的组合被冻干。

6. 如权利要求 5 所述的方法,还包括另一个步骤,其中就经冻干后细菌存活力的稳定性和经长期保存后冻干细菌的存活力方面对步骤 c)的至少一种被冻干的纯培养细菌菌株和/或步骤 c)的至少两种被冻干的细菌菌株的组合进行评价和选择,其中如果经过冻干和在-18℃下冻干细菌保存至少 12 个月后至少有 40%的细菌保持存活就认为所述细菌的存活力是稳定的。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的方法,还包括另一个步骤,其中就经过重复培养后的遗传稳定性方面对步骤 c)的至少一种被冻干的纯培养细菌菌株和/或步骤 c)的至少两种被冻干的细菌菌株的组合进行评价和选择。

8. 乳杆菌属或片球菌属的细菌菌株,其能够在月经流注期间于人体阴道中进行定居和繁殖,其中所述菌株由权利要求 4-7 的任一项所述的方法获得。

9. 如权利要求 8 所述的细菌菌株,其中所述菌株选自以下一组菌株:加氏乳杆菌菌株 LN40,其保藏号为 LMG P-20560、干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株 LN113,其保藏号为 LMG P-20562、发酵乳杆菌菌株 LN99,其保藏号为 LMG P-20561、卷曲乳杆菌菌株 LN01,其保藏号为 LMG P-20558 和乳酸片球菌菌株 LN23,其保藏号为 LMG P-20559,或其表

型和/或基因型特性基本相应的变异体,所述菌株于2001年6月14日被保藏在比利时微生物协调保藏中心。

10. 用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的组合物,其含有至少一种如权利要求1-3、8或9的任一项所述的细菌菌株。

11. 如权利要求10所述的组合物,其被配制成适于阴道施用。

12. 用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的卫生用品,其含有至少一种如权利要求1-3、8或9的任一项所述的细菌菌株。

13. 如权利要求12所述的卫生用品,其是棉条形式。

14. 至少一种权利要求1-3、8或9的任一项所述的细菌菌株用于生产预防和/或治疗泌尿生殖道感染的组合物或卫生用品的用途。

15. 如权利要求14所述的用途,其用于预防和/或治疗细菌性阴道病或任何其它阴道细菌性病症。

16. 用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的方法,其中至少一种权利要求1-3、8或9的任一项所述的细菌菌株被以治疗有效量阴道施用以预防、治疗微生物感染和/或减缓微生物感染的效应。

17. 如权利要求16所述的方法,其用于预防和/或治疗细菌性阴道病或任何其它阴道细菌性病症。

作为人体阴道中的益生微生物的乳酸产生细菌

技术领域

本发明涉及乳酸产生细菌及其用途。

技术背景

人体阴道中的正常微生物菌群包括乳酸产生细菌，该细菌的传统命名是 Döderlein 菌。

这种乳酸产生细菌是无孢子形成的革兰氏阳性菌，通过对多种糖如糖原和/或葡萄糖进行发酵而产生乳酸。

乳酸产生细菌包括例如乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*) 和肠球菌属 (*Enterococcus*)。

根据其代谢途径可将乳酸产生细菌分成同型发酵菌和异型发酵菌。同型发酵菌(例如嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*))只产生乳酸，而异型发酵菌还产生例如氧化碳、乙醇或乙酸。

乳杆菌属是兼性厌氧的、过氧化氢酶阴性、棒状乳酸产生细菌的表型异源群。已经识别出 50 多个不同的菌种，并且这些菌种的 DNA 通常含有低含量的鸟嘌呤 (G) 和胞嘧啶 (C)，约为 33-53%。同一种菌种的 GC-含量是恒定的。在人体内，例如在口腔、肠道和阴道内发现了几个乳杆菌菌种。阴道中的乳杆菌菌种是例如嗜酸乳杆菌、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) (鼠李糖亚种) 和詹氏乳杆菌 (*Lactobacillus jensenii*)。

片球菌属是革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性、兼性厌氧、耐氧、圆

形(直径约为 0.6-1.0 μm)、非致病性的乳酸产生细菌的表型群。

健康的育龄妇女(约 15-60 岁)在月经间期,阴道中的 pH 约为 3.8-4.2,这主要是由于乳酸产生所致。酸性环境防止例如结肠中存在的细菌如阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*)、动弯杆菌属(*Mobiluncus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃氏菌属(*Prevotella*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)出现在阴道中。

健康妇女的泌尿生殖道的表皮以及泌尿生殖器粘膜寄宿了特定的益生和/或共生的微生物菌群,诸如乳杆菌属的多个菌种。然而,泌尿生殖道还定居了致病微生物。不希望有的微生物的定居可能是由性交引起的,它可能自然发生或可能是由正常菌群失调引起的。已知后一种情况例如发生在某种抗生素治疗之后。

因此,女性泌尿生殖道如阴道中的微生物菌群由于感染了微生物、抗生素治疗或其它复杂原因而可能发生失调和变化,其中所述微生物感染诸如是酵母菌(白色假丝酵母(*Candida albicans*))、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和细菌性阴道病(特点是阴道加德纳氏菌和动弯杆菌的流行性增强)。

在月经和性交期间,阴道中的 pH 分别由于血液和精液的流入而升高。这两种液体含有大量可被细菌(例如阴道加德纳氏菌和动弯杆菌)消化的蛋白,如前述,该细菌可能在高 pH 条件下定居在阴道中。而后产生了降解产物如胺(例如腐胺和尸胺)。在高 pH 下,这些胺开始挥发并带有腥臭味。而且这些妇女常常抱怨阴道排出液增多和有痛感。这种病症被称作细菌性阴道病(BV),该病症是伴有疼痛感和有气味的阴道排出液增多的常见病(参见 Morris, M; Nicoll, A; Simms, I; Wilson, J; Catchpole, M, Bacterial vaginosis: A public health review, British Journal of Obstetrics and Gynaecology, 108 (5): 439-450, May 2001)。

细菌性阴道病被确认为是由于阴道乳酸产生细菌被一系列有害菌如阴道加德纳氏菌、拟杆菌、动弯杆菌、双路普雷沃氏菌(*Prevotella*

bivia) 和人型枝原体 (*Mycoplasma hominis*) 所取代而引起的。

由 Amsel Criteria 记载了诊断细菌性阴道病 (BV) 的方法。首先, 测定阴道排出液的 pH。约 90% 的患 BV 的妇女的 pH 高于 4.5。其次, 如果向阴道排出液中加入 10% 的 KOH, 约 70% 的患 BV 的妇女的阴道排出液散发出“腥臭”味。第三, 在湿扁平上皮细胞表面观察到覆盖着微小杆菌 (“索细胞”)。检测 BV 的另一个可靠方法是对阴道液体进行直接革兰氏染色。对 BV 革兰氏染色进行释义的标准方法由 Nugent 等提供 (参见实施例 1)。

已知乳酸产生细菌能够抑制多种泌尿生殖器感染相关病原体的生长和/或降低其致病力 (例如参见 Redondo-Lopez, V; Cook, R L; Sobel, J D, Emerging role of lactobacillus in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora, Reviews of infectious diseases, 第 12 卷第 5 期, 1990 年 9-10 月, 和 Boris, S; Barbes, C, Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens, Microbes and infection, 第 2 卷, 543-546 页, 2000)。

而且还得知乳酸产生细菌对所述病原体的拮抗特性至少部分表示为其产生不同拮抗物如乳酸、过氧化氢、细菌素等的的能力。

据估计健康阴道拥有 10^8 - 10^9 cfu (=菌落形成单位) 的乳酸产生细菌。该菌群的形成是由于妇女具有的这种特定菌株是由母亲遗传得到的和/或这种菌株是由她的消化道转移到了泌尿生殖道。

现有技术记载了含乳酸产生细菌的制剂如混悬液、栓剂和明胶胶囊。这种制剂例如被公开在 US 5466463 和 WO 9309793 中。

而且, 已知带有乳酸产生细菌的浸渍吸收用品如棉条 (tampon) 和卫生巾被用于保持妇女泌尿生殖道中的正常菌群, 因而防止泌尿生殖道的感染或者在妇女泌尿生殖道中重新建立正常菌群。这种产品被公开在 EP 0594628 和瑞典专利申请 0003544-4 中。

然而, 为了达到上述效果, 关键是抑制尿路病原体的乳酸产生细菌真正在体内定居并繁殖, 并且通过施用于阴道而在阴道中实际保留

一个月经周期以上。

细菌菌株是否定居在阴道中取决于特定细菌菌株的粘附特性以及阴道的激素、营养和酸性程度。持续的生殖器感染或采用抗生素进行治疗还会影响引进菌株在阴道中的定居能力。

月经周期还会影响粘附力，并且在排卵前以及月经流注（discharge）前粘附力最大（US 6180100 和 Chan 等，Journal of Urology, March 1984）。因此，被施用的乳酸产生细菌最难在阴道中定居并繁殖的时间是在月经流注期间。

在乳酸产生细菌于体内的定居和繁殖方面，临床结果与由体外分析结果推测出的细菌性状之间存在着较大的差异。常见的是阴道中的不同细菌菌种间发生相互作用，并且很难在实验室中再建这种相互作用的模式。因此，即使体外结果显示细菌菌种很有希望，也可能在体内不能繁殖生长而由此不能提供理想的疗效，即不能预防、减轻和/或治疗泌尿生殖道的微生物感染。

而且，非常重要是通过重复性的大规模生产培养和长期存在于体内，所述细菌表现出遗传特征的稳定性。

生产提供具有理想疗效的公认消费产品需要满足的另一个条件是通过细菌进行冷冻干燥和保存被冷冻干燥的细菌（即保存期限）来保持细菌的存活力。

本发明的概述

本发明公开了分离的乳杆菌属和片球菌属的新型菌株，甚至在月经流注期间阴道施用其中至少一种菌株，该菌株也能够人在阴道内定居并繁殖。从开始施用计算至少两月经周期后，如果阴道中仍有所述细菌存在，就认为所述细菌定殖（established）起来了。

有利地是本发明的细菌菌株能够在月经流注期间定殖，由此能够利用例如浸渍了所述细菌的棉条来方便地施用该细菌。

定殖的乳酸产生细菌的所述菌株能够预防、减轻和/或治疗泌尿生殖道的微生物感染，尤其是阴道细菌病。为了获得这些疗效，必须通过施用来真正定殖所述细菌，甚至该细菌在经历了几轮月经流注后仍

然存在于阴道中。

按照布达佩斯条约的规定将所述细菌菌株于2001年6月14日保藏在比利时的BCCM/LMG(Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriënverzameling, Universiteit Gent),所述被保藏的菌株包括被申请人命名为LN40的加氏乳杆菌菌株,其保藏号为LMG P-20560、被申请人命名为LN113的干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株,其保藏号为LMG P-20562、被申请人命名为LN99的发酵乳杆菌菌株,其保藏号为LMG P-20561、被申请人命名为LN01的卷曲乳杆菌菌株,其保藏号为LMG P-20558和被申请人命名为LN23的乳酸片球菌,其保藏号为LMG P-20559,或与其表型和/或基因型特性基本相应的变体。

而且,本发明记载了一种用于从乳杆菌属或片球菌属中分离能够在人阴道中定居并繁殖的菌株的方法,其中

a) 从具有正常、健康阴道微生物菌群的妇女阴道中收集细菌样品如阴道液体,

b) 从步骤a)的阴道样品中筛选出乳酸产生细菌,

c) 利用适当的营养培养基对步骤b)的乳酸产生细菌进行体外纯培养从而提供至少一种分离菌株,

d) 就在月经流注期间对妇女阴道施用所述菌株在阴道中进行定居和繁殖的能力来评价步骤c)的至少一种纯培养菌株和/或步骤c)的至少两种纯培养菌株的混合菌,所述妇女的阴道微生物菌群发生紊乱,其中如果从开始施用起计算至少两个月经周期后所述细菌菌株仍然存在于阴道中,就认为该细菌菌株或菌株已经定殖,和

e) 筛选出至少一种能够在阴道中定居并繁殖的步骤d)细菌菌株。

优选地,对步骤c)的至少一种纯培养细菌菌株和/或步骤c)的至少两种细菌菌株的混合菌进行冻干。

而且,优选地对该/这些菌株经冻干后的细菌存活力的稳定性和被冻干细菌经长期保存后的存活力进行评价和筛选,其中如果经过冻干

并将冻干细菌在约 - 18℃ 保存至少 12 个月后至至少 40% 的细菌保持存活力, 就认为所述细菌的存活力是稳定的。

另外, 优选地对该/这些菌株经反复培养和阴道体内施用后的遗传稳定性进行评价和筛选, 其中如果其遗传特性在体内保持了至少 12 个月, 所述细菌就被认为遗传稳定。

本发明还公开了乳杆菌属或片球菌属的能够在月经来潮期间在人阴道中定居并繁殖的细菌菌株, 其中能够利用上述方法分离出该菌株。该菌株优选地是被申请人命名为 LN40 的加氏乳杆菌菌株, 其保藏号为 LMG P-20560、被申请人命名为 LN113 的干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株, 其保藏号为 LMG P-20562、被申请人命名为 LN99 的发酵乳杆菌菌株, 其保藏号为 LMG P-20561、被申请人命名为 LN01 的卷曲乳杆菌菌株, 其保藏号为 LMG P-20558 和被申请人命名为 LN23 的乳酸片球菌, 其保藏号为 LMG P-20559, 或与其表型和/或基因型特性基本相应的变异体。

另外, 本发明记载了一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的组合物, 该组合物含有至少一种所述菌株 (LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)。

优选地, 所述组合物含有所述的全部菌株, 即菌株 LN 40、菌株 LN 113、菌株 LN 99、菌株 LN01 和菌株 LN 23。

在本技术领域已知不同细菌的混合物缩短了细菌的传代时间, 结果使得细菌的生长速度更快。而且, 由于不同种的乳酸产生细菌具有不同的发酵模式和特性, 所以优选地是利用不同菌种的混合物。

与单独使用每种所述菌株相比, 本发明的所述菌株的组合物, 即 LN 40, LN 113, LN 99, LN01, 和 LN 23 的组合物, 能够更好地抑制泌尿病原体。

所述组合物优选地被配制成适于阴道施用的剂型, 如栓剂、胶囊、丸剂、片剂、混悬液、喷雾剂、凝胶剂、乳剂、粉剂或任何其它形式的阴道插入物。

另外, 本发明记载了一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的卫

生用品, 诸如女性用吸收用品(例如棉条、卫生巾、衬裤垫)、尿布和失禁防护用品, 所述卫生品含有至少一种所述菌株 LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)。

优选地, 出于与上述组合物相同的目的, 所述卫生品含有所有所述菌株, 即菌株 LN 40、菌株 LN 113、菌株 LN 99、菌株 LN01 和菌株 LN 23。

所述卫生用品优选地是棉条。

而且, 本发明还记载了至少一种所述细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)用于生产预防和/或治疗泌尿生殖道感染, 优选地是细菌性阴道病或任何其它阴道细菌性病征的组合物或卫生用品的用途。

并且, 本发明还记载了一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染, 优选地是细菌性阴道病或任何其它阴道细菌性病征的方法, 其中为了预防、治疗微生物感染和/或减缓微生物感染的效应, 以治疗有效量对阴道至少施用了一种所述细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)。

本发明的其它特点和优势通过以下对本发明进行的详细描述而变得一目了然。

附图的简要描述

图 1a 和 1b 分别表示细菌菌株 LN 40, LN 99, LN 113 和 LN 23 的生长过程。

图 2 表示利用 RAPD 和凝胶电泳得到的带有菌株特定产物的凝胶照片。菌株 LN 40, LN 99, LN 113, LN 01 和 LN 23 分别与各个细菌菌种的典型菌株进行比较。

图 3 和 4 表示实施例 6 中使用的实验装置。

本发明的详细描述

本文使用的术语“乳酸产生细菌”是指通过发酵产生乳酸的细菌。

本文使用的术语“治疗有效量”是指能够产生理想治疗效果的量。

所述理想治疗效果是指预防和/或治疗泌尿生殖道感染, 诸如细菌

性阴道病或任何其它阴道细菌性病征。

本文使用的术语“分离的细菌菌株”是指利用含有所述菌株的培养物可以进行体外培养的菌株。

本文使用的术语“细菌样品”是指含有细菌的样品。该样品可以，例如是阴道液体/排出液。

本文使用的术语“正常、健康的阴道微生物菌群”是指未患阴道疾病并且根据 Nugent 等提供的方法(参见实施例 1)，阴道样品中的革兰氏菌株达到 0-3 的总级数的妇女。

本文使用的术语“阴道微生物菌群失调”是指患有某些阴道疾病如阴道排出液增多和/或阴道散发“腥臭”味的妇女。而且，根据 Nugent 等提供的方法(参见实施例 1)，阴道样品中的革兰氏菌株达到至少 4，特别是>7 的总级数的妇女。

本文使用的术语“合适的培养基”是指培养基，诸如可以用来培养细菌的 LAB 肉汤或 MRS 肉汤。

本文使用的术语“卫生用品”是指棉条(指状棉条和带有施用器的棉条)、卫生巾、衬裤垫、尿布、失禁防护用品等。

本发明公开了乳杆菌属和片球菌属的分离的乳酸产生细菌的新菌株，该菌株通过阴道施用至少一种细菌菌株后能够在人阴道中定居并繁殖，即使在月经流注期间。如果从施用起计算至少两个月经周期后所述细菌仍存在于阴道中，那么就认为该细菌定殖了。

根据布达佩斯条约的规定将所述细菌菌株于 2001 年 6 月 14 日保藏在比利时的 BCCM/LMG(Belgian Coordinated Collections of Microorganisms)，所述被保藏的菌株包括被申请人命名为 LN40 的加氏乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20560、被申请人命名为 LN113 的干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株，其保藏号为 LMG P-20562、被申请人命名为 LN99 的发酵乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20561、被申请人命名为 LN01 的卷曲乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20558 和被申请人命名为 LN23 的乳酸片球菌菌株，其保藏号为 LMG P-20559，或与其表型和/或基因型特性基本相应的变异体。

而且，本发明记载了一种用于分离乳杆菌属或片球菌属的能够在人阴道中定居并繁殖的菌株的方法，其中

a) 从具有正常、健康阴道微生物菌群的妇女阴道中收集细菌样品如阴道液体，

b) 从步骤 a) 的阴道样品中筛选出乳酸产生细菌，

c) 利用适当的培养基对步骤 b) 的乳酸产生细菌进行体外纯培养从而提供至少一种分离的细菌菌株，

d) 就在月经流注期间对妇女阴道施用所述细菌菌株在阴道中进行定居和繁殖的能力来评价步骤 c) 的至少一种纯培养细菌菌株和/或步骤 c) 的至少两种纯培养细菌菌株的混合菌，所述妇女的阴道微生物菌群发生紊乱，其中如果从开始施用起计算至少两个月经周期后所述细菌菌株仍然存在于阴道中，就认为该细菌菌株已经定殖了，和

e) 筛选出至少一种能够在阴道中定居并繁殖的步骤 d) 的细菌菌株。

优选地，对步骤 c) 的至少一种纯培养细菌菌株和/或步骤 c) 的至少两种细菌菌株的组合进行冻干。

冻干后应当具有必需量的细菌，然后通过保存来保持存活力。而且，室温下保存能够使被配制于例如用于商业销售目的的组合物和/或卫生用品中的必需量的冻干细菌保持存活力。

因此，优选地对所述菌株进行冻干后细菌存活稳定性和长期保存后冻干细菌存活力方面的评价和选择，其中如果经过冻干并将冻干细菌在-18℃下保存至少 12 个月至少 40% 的细菌保持了存活力，就认为所述细菌的存活力是稳定的。

而且，被配制于某种保护剂如油中的以及被包含在一种组合物和/或卫生用品中的至少 1% 的冻干细菌在室温下应当保持至少 12 个月的存活力。

而且，一个重要的特性是以大规模生产的形式重复培养后以及在生产例如组合物和卫生用品的过程中细菌遗传特征的稳定性。优选地是经过至少 10 次重复培养后，所述细菌应当保持其遗传特性。而且，

所述细菌在施用后的较长时间内，诸如至少 12 个月，仍具有体内遗传稳定性。因此，优选地通过阴道施用对所述菌株进行体内遗传稳定性的评价和选择，其中如果所述细菌的遗传特性能被体内保持至少 12 个月，就认为其遗传稳定。而且，所述细菌的生长和传代时间也是重要的。进行阴道施用的冻干细菌在施用后的至少 4 个小时内应当开始生长。其传代时间应当少于 2 小时。

本发明还公开了一种在月经流注期间能够在人阴道中定居并繁殖的乳杆菌属或片球菌属的细菌菌株，其中该菌株可以通过上述方法分离得到。这种细菌优选地是被申请人命名为 LN40 的加氏乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20560、被申请人命名为 LN113 的干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌株，其保藏号为 LMG P-20562、被申请人命名为 LN99 的发酵乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20561、被申请人命名为 LN01 的卷曲乳杆菌菌株，其保藏号为 LMG P-20558 和被申请人命名为 LN23 的乳酸片球菌，其保藏号为 LMG P-20559，或与其表型和/或基因型特性基本对应的变异体。

乳杆菌菌株和片球菌菌株的分离和评价

按照以下步骤分离能够在人阴道中定居并繁殖的乳杆菌属或片球菌属的细菌菌株：

- 从具有正常、健康阴道微生物菌群的妇女的阴道中收集阴道液体，
- 通过将所述液体涂到用于筛选如酸产生菌的 MRS 琼脂上来选择乳酸产生细菌(约 25 个不同的菌株)(挑出单菌落并平铺到新鲜的 MRS 琼脂上以便控制纯度)，
- 然后用适当的培养基，在适当的条件(pH、温度等)下对乳酸产生细菌进行体外纯培养从而提供出分离的细菌菌株，和
- 然后通过月经流注期间对阴道微生物菌群紊乱的妇女阴道施用纯培养的细菌菌株来评价所述细菌菌株在阴道中的定居和繁殖能力。

在约 37℃ 和微需氧的条件下，于 LAB 肉汤(约 pH 6.5)中对 LN 40

进行纯培养。

在约 37℃ 和微需氧的条件下，于 MRS 肉汤 (约 pH 6.5) 中对 LN 113 进行纯培养。

在约 37℃ 和微需氧的条件下，于 LAB 肉汤 (约 pH 6.5) 中对 LN 99 进行纯培养。

在约 37℃ 和厌氧的条件下，于 MRS 肉汤 (约 pH 6.5) 中对 LN 01 进行纯培养。

在约 37℃ 和微需氧的条件下，于 MRS 肉汤 (约 pH 6.5) 中对 LN 23 进行纯培养。

首先评价所述纯培养的细菌菌株的传代时间。选出那些传代时间 < 30 分钟的细菌菌株 (约 15 个不同菌株)。根据其体外抑制某些微生物生长的能力来筛选这些被选菌株 (没有显示数据)。首先评价抑制表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) (两个不同菌株)、*Enterococcus cloace*、大肠杆菌、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcesus*)、溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeicticus*) 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) 生长的能力。8 个不同菌株 (乳杆菌属的 7 个菌株和片球菌的 1 个菌株) 显示出这种能力，因而被选出来。进一步评价这 8 个菌株抑制泌尿病原菌阴道加德纳氏菌生长的能力。最好的菌株 (即在紊乱微生物菌群中定居能力最强的菌株) 是 LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23。

借助临床研究手段对这些菌株进一步进行评价，其中如果从施用 (在第一个月经流注期间开始施用所述细菌) 起计算至少两月经周期后细菌仍存在于阴道中，那么就认为所述细菌在阴道中定殖。筛选出那些能够在阴道中定居并繁殖的细菌菌株 (LN 40, LN 113, LN 99, LN 01 和 LN 23)。

另外，评价细菌冻干后的存活稳定性和冻干细菌经长期保存后的存活力 (保存期)，经重复培养后和体内的遗传特性的保持情况以及细菌的生长过程。

实施例 1 经阴道施用后的乳酸产生细菌的定居和繁殖

对 15 名 BV-患者(被诊断患有细菌性阴道病的妇女)进行研究。采用克林霉素胶囊 (clindamycin ovules) 对全部 15 名患者进行 3 天的治疗 (Dalacin®2% 胶囊, 购自 Pharmacia)。此后, 继续对双盲法安慰对照组进行治疗, 其中在抗生素治疗后的第一个月经周期期间, 6 名患者使用了含约 10^3 cfu 的冻干细菌菌株 LN 01, LN 23, LN 99, LN 113 和 LN 40 的棉条, 其它 9 名患者使用了不含乳酸产生细菌的常规棉条。在第二个月经周期期间, 所有 15 名患者使用了不含乳酸产生细菌的常规棉条, 并在该月经结束几天后采集阴道样品。

对阴道样品进行革兰氏染色。采用 Nugent 等提供的标准革兰氏染色方法分析特定细菌形态型存在与否。形态型大的是革兰氏阳性乳杆菌属的杆菌形态型; 较小的革兰氏变异杆菌被称作加德纳氏菌形态型; 和弯曲杆菌。对阴道液体中存在的微生物进行定量并转化为级数 (见表 1)。

表 1

编码			
乳杆菌形态型	加德纳氏菌属和 拟杆菌属形态型	弯曲革兰氏 变异杆菌	级数
4+	0	0	0
3+	1+	1+或 2+	1
2+	2+	3+或 4+	2
1+	3+		3
0	4+		4

编码 0 至 4+ 基于具有每个油浸法视野中的形态型的微生物的平均数; 1+, < 1 存在; 2+, 1-4 存在; 3+, 5-30 存在; 4+, ≥ 30 存在。总级数通过将全部三种形态型的级数相加而得到。总级数的含义如下: 0-3, 正常; 4-6, 中等; 以及 ≥ 7 , BV。

表 2

患者序号	开始研究前进行革兰氏染色	棉条 (L=乳酸产生细菌)	第二个月经期后的革兰氏染色
1	7	L	0
2	8	L	0
3	9		7
4	5		4
5	10		0
6	8		4
7	8	L	0
8	9		4
9	4	L	0
10	8		4
11	8		4
12	8		0
13	8	L	1
14	0		5
15	9	L	0

在 6 名使用了带有乳酸产生细菌的棉条的患者体内没有检测出细菌性阴道病。而且，所述结果表明第二个月经周期后乳酸产生细菌仍然存在于阴道内。

而且，这些结果表明施用较少数量的细菌(大约 10^3 cfu)就足以使本发明的细菌菌株在月经来潮期间实现在阴道中的定居和繁殖。

另外，本发明的细菌菌株对阴道粘膜具有很好的粘附性。

实施例 2：经阴道施用后的乳酸产生细菌的定居与繁殖

在 12-18 个月内，四名未患阴道病症的健康妇女在其每月月经流注期间使用了约含 10^3 cfu 的冻干细菌菌株 LN01, LN 23, LN 99, LN 113 和 LN 40 的棉条。

过了所述试验期后分析上述妇女的阴道样品。利用实施例 10 中记载的 RAPD(随机扩增多态性 DNA)鉴定在所述样品中发现的乳杆菌和片球菌。

在所述妇女的两个阴道样品中鉴定出 LN 01 和 LN 113。

在所述妇女的一个阴道样品中鉴定出 LN 40。

在所述妇女阴道样品中未鉴定出 LN 23 和 LN 99。

对这三种结果的解释如下：当所述细菌混合物被施用于具有健康阴道菌群且 pH 正常的妇女时，LN 23 基本上不生长。然而，当所述细菌混合物被施用于阴道微生物菌群紊乱的妇女时，LN 23 开始定殖并将为其它细菌菌株(LN01, LN 113, LN 40 和 LN 99)提供了一个良好的生长环境。

应当注意由于特定菌株和/或菌株的特定组合物的适应性，在妇女阴道中进行定居和生长方面存在着个体差异。

在每一阴道样品中鉴定出了至少一个本发明的菌株。

实施例 3：细菌菌株 LN 40, LN 113, LN 99 和 LN 23 经冻干并长期保存(保存期)后的存活稳定性

冻干细菌菌株 LN 40, LN 113, LN 99 和 LN 23 在约-18℃下经长期保存(即保存期)后，对其存活稳定性进行评价。

表 3

冻干后的 时间(月)	活菌[cfu/g]				
	LN40	LN113	LN99	LN23	LN01
0	83 x 10 ⁹	224 x 10 ¹⁰	33 x 10 ⁹	290 x 10 ⁹	20 x 10 ⁹
12	47 x 10 ⁹ (~57%)	192 x 10 ¹⁰ (~86%)	14 x 10 ⁹ (~42%)	272 x 10 ⁹ (~94%)	19 x 10 ⁹ (~95%)
78	22 x 10 ⁹ (~27%)	46 x 10 ⁹ (~21%)	6 x 10 ⁹ (~18%)	155 x 10 ⁹ (~53%)	2 x 10 ⁹ (~10%)

表3中提供的结果表明至少40%的细菌于-18℃下保存12个月后仍然存活。而且，-18℃下78个月以后至少10-20%的细菌仍然存活。

而且，还按照API 50CH对所述细菌进行分析，分析结果表明菌株LN 40, LN 113, LN 99, LN 23和LN 01以冻干形式于-18℃下保存至少78个月仍能保持其遗传特性。

将冻干细菌(LN 40, LN 113, LN 99和LN 23)分散在Akosoft®36(得自Karlshamns AB)中并对其分别于8℃和22℃下保存较长时间(即保存期)后的存活稳定性进行评价。

表 4

制备后的时间 (周/月)	活菌[cfu/g]	
	+8℃	+22℃
0	3.5×10^{10}	3.5×10^{10}
1 周	2.7×10^{10} (~75%)	1.9×10^{10} (~53%)
1	2.5×10^{10} (~71%)	1.3×10^{10} (~37%)
3.5	2.0×10^{10} (~55%)	6×10^9 (~17%)
6	2.4×10^{10} (~68%)	3.9×10^9 (~11%)
9	1.8×10^{10} (~50%)	1.0×10^9 (~2.8%)
12	$1. \times 10^{10}$ (~49%)	1.3×10^9 (~3.7%)

表4中提供的结果表明约45-50%的细菌于8℃保存12个月后仍然存活。而且，约4%的细菌在室温(即22℃)保存12个月后仍然存活。

对于含有本发明所有菌株的冻干细菌混合物也获得了类似的结果，其中所述冻干细菌包括 LN01。

实施例 4：细菌菌株 LN 40, LN 113, LN99, LN01 和 LN 23 经重复培养后遗传特性的保持

对细菌菌株 (LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23) 进行 10 次重复培养，然后采用 API 50CH 进行评估。重复培养后，每一细菌菌株 (实施例 9) 的发酵模式都得到了保持。因此，所述结果表明所述细菌菌株经重复培养后保持了其遗传特性。

实施例 5：细菌菌株 LN 40, LN 99, LN 113, LN 23 和 LN 01 的生长过程

为了提供所述的疗效，阴道施用的冻干细菌应当在施用后的至少 4 个小时内开始生长。

测定被加入到灭菌 MRS 肉汤中的冻干细菌 (LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN01) 在 620 nm 下的吸光度 (光密度, OD)。进行了两种实验 (参见图 1a 和 1b)：

a) 将 0.01 g 的冻干细菌加到 3 ml MRS 肉汤中，并将 100 μ l 的这种分散液用另外 3 ml MRS 肉汤稀释，和

b) 以能够产生约 0.100 吸光度的量将冻干细菌加到 MRS 肉汤中。

将装有上述细菌分散液的比色杯放置在 37℃ 下并且每 15 分钟测定一次吸光度一直持续 10.5 小时。

正如图 1a 和 1b 所示，每一细菌菌株 (LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN01 分别) 的生长速度都很快，并且所有细菌菌株在至少 2 小时内开始生长。

而且，每一细菌菌株的传代时间约为 20-25 分钟。因此，所述细菌比泌尿病原体的生长速度快，因此利用本文记载的细菌是有利的。

除此之外，在本技术领域已知不同细菌的组合物可以缩短细菌的传代时间，结果使得细菌的生长更快。而且。由于不同种的乳酸产生细菌具有不同的发酵模式和特性，所以优选地是采用不同菌种的组合物。

应当提示的是冻干的 LN 40, LN 99, LN 113, LN 23 和 LN 01 的组合物在 1.5 小时内开始生长, 因此比每个细菌菌株所需的时间至少快了 25%。

实施例 6: 抑制泌尿病原体 (uropathogen) 生长的能力

该实施例的目的在于显示 LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN 01 的细菌混合物能够比单独使用每个细菌菌株更有效地抑制泌尿病原体的生长。

将被测试的乳酸产生细菌均匀地加入到融化的无菌缓冲琼脂培养基如 MRS 琼脂中。将得到的混合物倒入培养皿 (Ø90 mm) 1 中并如图 3 所示将该培养皿倾斜放置以使琼脂混合物 2 在该培养皿的一侧高度达到约 1 mm 而在另一侧的高度达到约 11 mm。

将泌尿病原体均匀地加入到融化的无菌缓冲琼脂培养基如 VRB (Violet Red Bile) 琼脂中。如图 3 所示, 将该混合物倒在上述含有乳酸产生细菌的固化琼脂上, 并使该琼脂混合物 3 固化。

然后在 37°C 下将乳酸产生细菌和泌尿病原体培养约 24 小时。如图 4 所示, 从培养皿 1 的上面可以看到 4 和 5 两条不同的带。在第一条带 4 中, 泌尿病原体能够生长。在第二条带 5 中, 乳酸菌抑制了泌尿病原体的生长。

乳酸菌抑制泌尿病原体的能力可以通过测定第二条带 5, 即被抑制生长的带 5 的长度 L 来进行定量分析。

一个肠病原体 E coli (EPEC) 菌株被用于该实验中。

LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23 中的每个细菌菌株的被抑制生长的带长度 L 为 8 至 22 mm。

然而, 含有 LN 40, LN 113, LN 99, LN 01 和 LN 23 的细菌混合物的被抑制生长的带长度为 32-34 mm。

因此, 含有 LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23 所有细菌菌株的细菌混合物比单独使用的每一个细菌菌株能够更有效地抑制泌尿病原体如 E coli 的生长。因此, 优选地是利用本发明的所述细菌菌株的组合物。

细菌菌株 LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23 的性质

通过表型和遗传型方法对所述细菌进行性质鉴定。

实施例 7: 细菌菌株 LN 40, LN 113, LN99, LN01 和 LN 23 微生物学特性

菌株 (LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN 01) 在细胞形态学、革兰氏染色、氧化酶和过氧化氢酶反应方面的性质鉴定。

菌株 LN 40 为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、无芽孢形成、棒状(约 0.9 μm x 3-10 μm) 细菌, 以单细胞形式或双细胞的形式存在。

菌株 LN 99 为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、无芽孢形成、棒状(约 0.9 μm x 1.5-2.0 μm) 细菌, 以单细胞形式存在。

菌株 LN 113 为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、无芽孢形成、棒状(约 0.9 μm x 2 μm) 细菌, 以单细胞形式或双细胞的形式存在。

菌株 LN 01 为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、无芽孢形成、直线或略弯曲的棒状(约 8.6-1.6 μm x 2.3-11 μm) 细菌, 以单细胞形式或链状的形式存在。

菌株 LN 23 为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性、氧化酶阴性、无芽孢形成、圆形($\varnothing$ 约 1 μm) 细菌, 以单细胞形式或双细胞的形式存在。

实施例 8: 细菌菌株 LN 40, LN 113, LN99, LN01 和 LN 23 的 SDS-PAGE 和群分析

在 37°C 和厌氧条件下利用 MRS 琼脂(Oxoid CM361) 将培养物培养 24 小时。按照由根特大学微生物实验室的研究小组建立的实验方案制备细胞提取物并在 BCCM™/LMG 下进行蛋白凝胶电泳(SDS-PAGE) (Pot, B, Vandamme, P, Kersters, K, Analysis. of elctrophoretic whole-organism protein fingerprints, Chemical Methods in Prokaryotic Systematics, M, Goodfellow 和 A G, O'Donell(编辑), J Wiley & Sons, Chichester (1994))。

利用 BCCM 数据库(1999 年 12 月)中的参照特性对 LN 40, LN 113,

LN 99 和 LN 23 进行标准化和数字化蛋白模型的数字化分析和聚类。利用 CCUG 数据库(2001 年 1 月)中的参照特性对 LN 01 进行分析和聚类。

发现菌株 LN 40 属于约氏乳杆菌菌种或加氏乳杆菌菌种。

发现菌株 LN 99 属于发酵乳杆菌菌种。

发现菌株 LN 113 属于干酪乳杆菌鼠李糖亚种菌种。

发现菌株 LN 23 属于乳酸片球菌菌种。

发现菌株 LN 01 属于卷曲乳杆菌菌种。

实施例 9: 利用 API 50CH 和快速 ID32strep 对细菌菌株 LN 40, LN 113, LN99, LN 23 和 LN01 进行性质鉴定

菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN 01)对不同碳水化合物进行发酵的能力如表 5 所示。利用 API 50CH API 和快速 ID32strep 在 37℃下按照厂家说明书进行测试。从结果上来看, API 50CH API 与快速 ID32strep 之间的存在着差异, 而 API 50CH 的结果被认为更可靠。

在 CCUG 数据库中检索最终发酵型。每个菌株获得的最高数据库积分证实了由上述分析(SDS-PAGE/群分析)得到的结果与所述菌株所属的各个菌种有关。

而且, 与鼠李糖的反应证实了菌株 LN 113 属于干酪乳杆菌鼠李糖亚种。

然而, LN 40, LN 99, LN 113, LN 23 和 LN01 之间的比较, 以及每个菌种的典型菌株(分别是 CCUG 31451^T, CCUG30138^T, CCUG 21452^T, CCUG 32235^T和 CCUG 44117^T)之间的比较表明所有菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN01)的发酵型具有显著的差异。

在表 5 中, 1 表示未发生反应, 2 表示反应微弱, 3 表示发生了反应, 4 表示反应强烈, 5 表示反应非常强烈。

表 5

	LN40	LN99	LN113	LN23	LN01
API 50CH					
对照	1	1	1	1	1
甘油	1	1	1	1	1
赤藓醇	1	1	1	1	1
D-阿拉伯糖	1	1	1	1	1
L-阿拉伯糖	1	1	1	5	1
核糖	1	5	1	5	1
D-木糖	1	5	5	5	1
L-木糖	1	1	1	1	1
富寿草醇	1	1	1	1	1
β -甲基-D-木糖苷	1	1	1	1	1
半乳糖	4	5	5	5	3
葡萄糖	5	5	5	5	5
果糖	5	4	5	5	5
甘露糖	4	3	5	5	4
山梨糖	1	1	5	1	1
鼠李糖	1	1	3	1	1
半乳糖醇	1	1	1	1	1
肌醇	1	1	3	1	1
甘露糖醇	1	1	5	1	1
山梨醇	1	1	5	1	1
α -甲基-D-甘露糖苷	1	1	1	1	1
α -甲基-D-葡萄糖苷	1	1	5	1	1
N-乙酰-氨基葡萄糖	5	1	4	4	3
扁桃苷	3	1	4	2	3
熊果苷	1	1	4	4	3
七叶武	5	1	5	5	3
水杨苷	2	1	4	4	3
纤维二糖	5	1	5	5	3
麦芽糖	5	4	3	1	5
乳糖	3	4	5	1	3
蜜二糖	5	4	1	1	1
蔗糖	5	4	3	1	5
海藻糖	1	4	5	1	3
菊粉	1	1	1	1	1
松三糖	1	1	5	1	1
D-棉子糖	5	4	1	1	3
淀粉	1	1	1	1	4
糖原	1	1	1	1	4
木糖醇	1	1	1	1	1
β -龙胆二糖	4	1	3	3	2
D-松二糖	1	1	5	1	3

D-来苏糖	1	1	3	1	1
D-塔格糖 (tagarose)	2	1	5	4	1
D-岩藻糖	1	1	1	1	1
L-岩藻糖	1	1	1	1	1
D-阿拉伯糖醇	1	1	1	1	1
L-阿拉伯糖醇	1	1	1	1	1
葡萄糖酸	1	3	2	1	1
2-酮-葡萄糖酸	1	1	1	1	1
5-酮-葡萄糖酸	1	1	1	1	1
API 快速 ID32s					
精氨二氢酶	1	5	1	5	1
β -葡萄糖苷酶	5	1	5	3	1
β -半乳糖糖苷酶 (1)	1	5	1	1	5
β -葡萄糖醛酸酶	1	1	1	1	1
α -半乳糖苷酶	5	3	1	1	1
碱性磷酸酯酶	1	1	1	1	2
核糖	1	5	5	1	1
甘露糖醇	1	1	5	1	1
山梨醇	1	1	1	1	1
乳糖	1	5	1	1	1
海藻糖	1	5	5	1	3
棉子糖	5	1	1	1	2
3-羟基丁酮	5	5	5	5	1
丙氨酸-苯丙氨酸	5	1	4	3	5
脯氨酸芳氨酶	1	5	5	1	5
β -半乳糖苷酶 (2)					
焦谷氨酸盐	4	1	5	1	1
N-乙酰- β -葡萄糖胺	1	1	2	1	1
甘氨酸基-色氨酸	1	1	1	1	1
马尿酸盐	1	1	5	4	1
糖原	1	1	1	1	1
支链淀粉	1	1	1	1	1
麦芽糖	2	5	1	1	5
蜜二糖	5	1	1	1	1
松三糖	1	1	2	1	1
蔗糖	5	5	1	1	5
L-阿拉伯糖	1	1	1	1	1
D-阿拉伯糖醇	1	1	1	1	1
甲基- β -D-吡喃葡萄糖苷	2	1	1	1	1
塔格糖	3	1	3	1	1
β -甘露糖苷酶	1	1	1	1	1
环糊精	1	1	1	1	1
脲酶	1	1	1	1	1
溶血	3	1	3	3	3

实施例 10: 利用随机扩增多态 DNA 对细菌菌株 LN 40, LN 113, LN99,

LN 23 和 LN 01 性质鉴定

采用 RAPD(随机扩增多态 DNA)进一步对细菌菌株进行分析。该技术被例如 Willians, J G 等记载在 Nucl Acids Res, 18: 6531 (1990) 中, 并且以前不仅被用来检测菌株的多样性, 而且还被用于基因绘图、种群分析、流行病学研究而且被用于进行分类学和系统发生关系的分析(Welsh, J 等, PCR 2: A Practical Approach, McPherson, M J, Hames, B D 和 Taylor, G R, 编辑, 第 11 章, IRL 出版社(1995))。

在低严紧度条件下利用短寡聚核苷酸引物(5' ACGCGCAAC3')通过 PCR(聚合酶链式反应)来制备菌株特定产物的可再生(reproducible)序列。然后通过凝胶电泳对所得到的序列进行分析并与每种细菌菌种的典型菌株进行比较, 所述菌株经过了同样的处理。

该分析结果被概括在图 2 当中。

泳道 1 是发酵乳杆菌 ATCC 14931^T,

泳道 2 是 LN 99,

泳道 3 是卷曲乳杆菌 CCUG 44117^T,

泳道 4 是 LN01,

泳道 5 是 100 bp 摩尔重量标准品

泳道 6 是 LN 23,

泳道 7 是 LN 40,

泳道 8 是加氏乳杆菌 ATCC19992^T,

泳道 9 是 LN 113, 以及

泳道 10 是干酪乳杆菌 ATCC4646^T。

从图 2 可以看出本发明的细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN 23 和 LN01)之间的主要差别并且可以看到各个典型菌株。

本发明还涉及一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的组合物, 该组合物至少含有一种所述的细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)。

优选地, 所述组合物含有所述的全部菌株, 即菌株 LN 40、菌株 LN 113、菌株 LN 99、菌株 LN01 和菌株 LN 23。

所述组合物优选地被配制成为适于阴道施用，诸如栓剂、胶囊、丸剂、片剂、混悬液、喷雾剂、凝胶体、乳剂、粉剂或其它任何形式的阴道插入物，该组合物可以含有本技术领域中的常规药用赋形剂。另外，本发明记载了一种被用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染的卫生用品，诸如妇女吸收用品(例如棉条、卫生巾、衬裤垫等)、尿布和失禁防护用品，所述卫生用品至少含有一种所述细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)。

优选地，所述卫生用品含有所有所述菌株，即菌株 LN 40、菌株 LN 113、菌株 LN 99、菌株 LN01 和菌株 LN 23。

所述卫生用品优选地是棉条。

而且本发明记载了至少一种所述细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)用于生产预防和/或治疗泌尿生殖道感染、优选地是细菌阴道病或任何其它阴道细菌性病征的组合物或卫生用品的用途。

并且，本发明记载了一种用于预防和/或治疗泌尿生殖道感染、优选地是细菌阴道病或任何其它阴道细菌性病征的方法，其中以治疗有效量阴道施用至少一种所述细菌菌株(LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23)以便预防、治疗微生物感染和/或减缓微生物感染的效应。优选地是利用阴道制剂和/或卫生用品、最优选地是棉条来施用所述细菌菌株。

总之，细菌菌株 LN 40, LN 113, LN 99, LN01 和 LN 23 由于以下原因而显示出优良的特性：

- 能够抑制泌尿病原体(包括快速的细菌生长)生长，
- 经阴道施用，甚至在月经流注期间能够在体内定居和繁殖，
- 细菌经冻干和长期保存(保存期)后的存活力仍然稳定，和
- 通过重复培养以及在体内能够保持遗传特性。

而且，从经济角度出发，这些细菌菌株也是有利的。

总之，这些特性意味着本发明的细菌菌株非常适于大规模工业生产用于预防、治疗泌尿生殖道感染和/或减缓其效应的消费品(诸如组合物或卫生用品)，该消费品含有所述细菌菌株。

当借助具体的实施方案对本发明进行详细描述时，在不脱离本发明的实质和其保护范围的条件下对其进行的各种改变和改进对于本技术领域的技术人员来说都将是显而易见的。

关于保藏的微生物的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>5</u> 页第 <u>2-11</u> 行所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页☒	
保藏单位名称： 比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： Universiteit Gent K.L Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent BELGIUM	
保藏日期：2001 年 6 月 14 日	保藏编号： LMG P-20558
C. 其它说明（如果不适用则留空） 该信息续在附页上☒	
一所附收到保藏和存活证明（见附页） 一保藏者的名称：Ellen AB 一保藏者的地址：Grev Ture gatan 19, SE-114 83 Stockholm, SWEDEN 一在优先权日之前保藏（2001 年 9 月 20 日） 一根据布达佩斯条约关于用于专利程序的微生物保藏的国际条约保藏。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）	
以下说明将在以后提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
核准人签字

本栏由国际局填写
☒ 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日
核准人签字

PCT/RO/134 表

关于保藏的微生物的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

A. 以下所作的说明涉及说明书第 5 页第 2-11 行所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页☒	
保藏单位名称： 比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： Universiteit Gent K.L Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent BELGIUM	
保藏日期：2001 年 6 月 14 日	保藏编号： LMG P-20559
C. 其它说明（如果不适用则留空） 该信息续在附页上☒	
一所附收到保藏和存活证明（见附页） 一保藏者的名称：Ellen AB 一保藏者的地址：Grev Ture gatan 19, SE-114 83 Stockholm, SWEDEN 一在优先权日之前保藏（2001 年 9 月 20 日） 一根据布达佩斯条约关于用于专利程序的微生物保藏的国际条约保藏。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国） 	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空） 以下说明将在以后提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”） 	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
核准人签字

本栏由国际局填写
☒ 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日
核准人签字

PCT/RO/134 表

关于保藏的微生物的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>5</u> 页第 <u>2-11</u> 行所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称： 比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： Universiteit Gent K.L Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent BELGIUM	
保藏日期：2001 年 6 月 14 日	保藏编号： LMG P-20560
C. 其它说明（如果不适用则留空） 该信息续在附页上 ☒	
一所附收到保藏和存活证明（见附页） 一保藏者的名称：Ellen AB 一保藏者的地址：Grev Ture gatan 19, SE-114 83 Stockholm, SWEDEN 一在优先权日之前保藏（2001 年 9 月 20 日） 一根据布达佩斯条约关于用于专利程序的微生物保藏的国际条约保藏。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国） 	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空） 以下说明将在以后提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”） 	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
核准人签字

本栏由国际局填写
☒ 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日
核准人签字

PCT/RO/134 表

关于保藏的微生物的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>5</u> 页第 <u>2-11</u> 行所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页☒	
保藏单位名称： 比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： Universiteit Gent K.L Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent BELGIUM	
保藏日期：2001 年 6 月 14 日	保藏编号： LMG P-20561
C. 其它说明（如果不适用则留空） 该信息续在附页上☒	
一所附收到保藏和存活证明（见附页） 一保藏者的名称：Ellen AB 一保藏者的地址：Grev Ture gatan 19, SE-114 83 Stockholm, SWEDEN 一在优先权日之前保藏（2001 年 9 月 20 日） 一根据布达佩斯条约关于用于专利程序的微生物保藏的国际条约保藏。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）	
以下说明将在以后提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
核准人签字

本栏由国际局填写
☒ 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日
核准人签字

PCT/RO/134 表

关于保藏的微生物的说明

(PCT 实施细则第 13 条之二)

A. 以下所作的说明涉及说明书第 <u>5</u> 页第 <u>2-11</u> 行所指的微生物。	
B. 保藏物标识 更多的保藏物标识见附页 ☒	
保藏单位名称： 比利时微生物协调保藏中心	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： Universiteit Gent K.L Ledeganckstraat 35 B-9000 Gent BELGIUM	
保藏日期：2001 年 6 月 14 日	保藏编号： LMG P-20562
C. 其它说明（如果不适用则留空） 该信息续在附页上 ☒	
一所附收到保藏和存活证明（见附页） 一保藏者的名称：Ellen AB 一保藏者的地址：Grev Ture gatan 19, SE-114 83 Stockholm, SWEDEN 一在优先权日之前保藏（2001 年 9 月 20 日） 一根据布达佩斯条约关于用于专利程序的微生物保藏的国际条约保藏。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）	
以下说明将在以后提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）	

本栏由受理局填写
☒ 本页和国际申请一起收到
核准人签字

本栏由国际局填写
☒ 国际局于以下日期收到本页： 年 月 日
核准人签字

PCT/RO/134 表

图1a

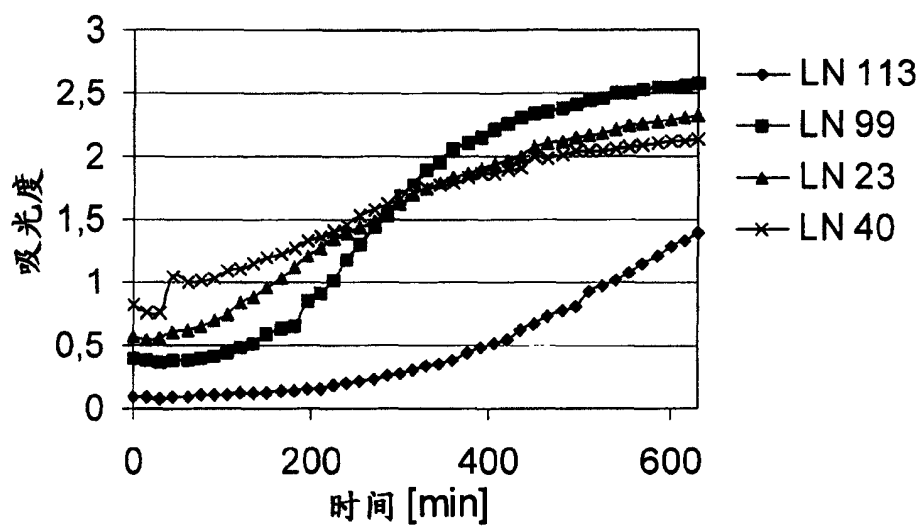


图1b

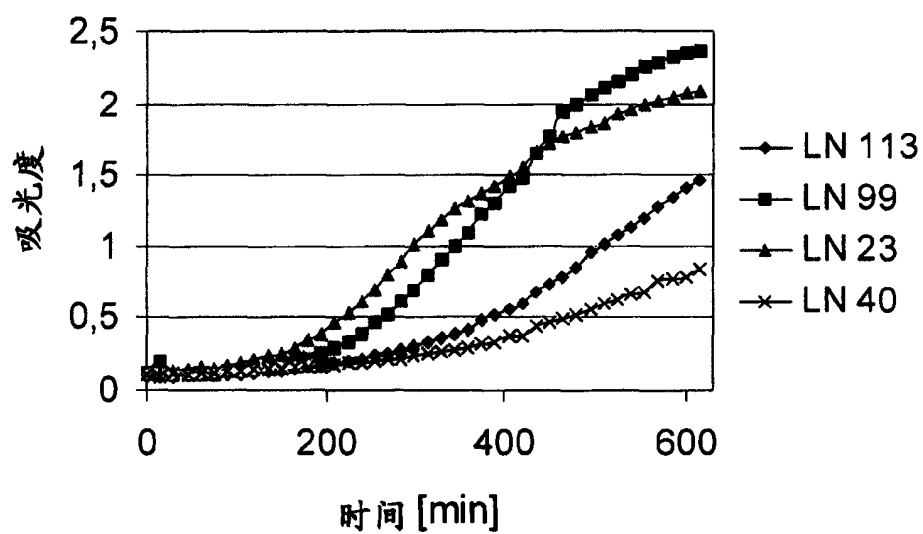


图2



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

图 3

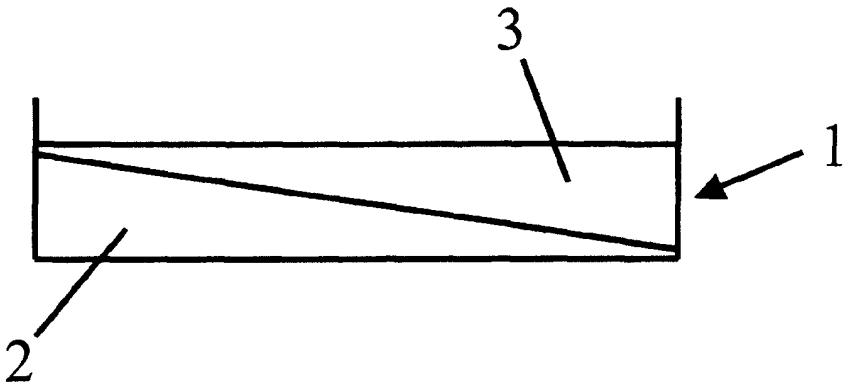


图 4

