



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430479 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680076388.0

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2016.10.27

代理人 刘鸿林 张晓威

(30)优先权数据

62/247,629 2015.10.28 US

62/305,875 2016.03.09 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/715(2006.01)

A61K 36/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.06.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/059192 2016.10.27

(87)PCT国际申请的公布数据
W02017/075262 EN 2017.05.04

(71)申请人 凯敏工业公司
地址 美国衣阿华

(72)发明人 G·P·霍斯特 R·B·莱文

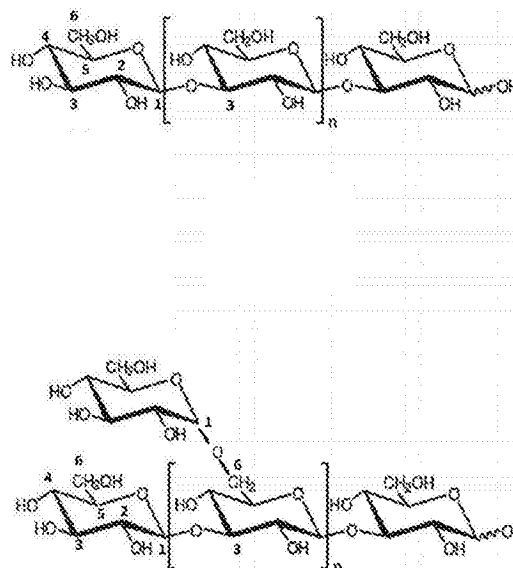
权利要求书2页 说明书53页 附图24页

(54)发明名称

β -1,3-葡聚糖用于调节免疫功能和治疗肠道炎症的用途

(57)摘要

本申请涉及 β -1,3-葡聚糖及其调节人体免疫力的用途。还提供了用于治疗和/或预防高胆固醇、糖尿病和变态反应的方法。还提供用于治疗和/或预防肠道炎症的方法。



1. 治疗患有病症的人的所述病症的方法,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻 (*Euglena*) 的 β -1,3-葡聚糖。

2. 权利要求1的方法,其中所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病。

3. 权利要求1至2中任一项的方法,其中所述病症是高脂血症。

4. 权利要求3的方法,其中所述组合物的施用降低所述人的胆固醇水平。

5. 权利要求3至4中任一项的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

6. 权利要求3至4中任一项的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

7. 权利要求3至6中任一项的方法,其中所述组合物与他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维酸衍生物或胆固醇吸收抑制剂联合施用。

8. 权利要求1的方法,其中所述病症选自炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌。

9. 权利要求1的方法,其中所述病症选自炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病。

10. 权利要求8至9中任一项的方法,其中所述病症是结肠炎。

11. 权利要求8至9中任一项的方法,其中所述病症是炎性肠病。

12. 权利要求8至9中任一项的方法,其中所述病症是克罗恩氏病。

13. 权利要求8的方法,其中所述病症是结肠癌。

14. 权利要求8至13中任一项的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

15. 权利要求8至14中任一项的方法,其中施用所述组合物增加抗炎细胞因子产生。

16. 权利要求8至15中任一项的方法,其中所述组合物与抗炎药、免疫抑制药物或抗生素联合施用。

17. 权利要求1至16中任一项的方法,其中所述裸藻是纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)。

18. 权利要求1至17中任一项的方法,其中所述裸藻是异养培养的。

19. 权利要求1至18中任一项的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是裸藻淀粉的形式。

20. 权利要求1至19中任一项的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。

21. 权利要求1至20中任一项的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻纯化的。

22. 权利要求1至20中任一项的方法,其中所述组合物包含裸藻生物质,所述裸藻生物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。

23. 权利要求22的方法,其中所述裸藻生物质已被干燥至约40%或更小的水分含量。

24. 权利要求23的方法,其中所述裸藻生物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

25. 权利要求1至24中任一项的方法,其中所述组合物每天以单次剂量施用。

26. 权利要求1至24中任一项的方法,其中所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

27. 权利要求1至26中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦 (kava

kava)、姜黄、螺旋藻(Spirulina)、小球藻(Chlorella)、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。

28. 权利要求27的方法,其中所述附加组分是锌。

29. 权利要求1至27中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含金属。

30. 权利要求29的方法,其中所述金属包括选自以下组中的成员:铁、镁、锂、锌、铜、铬、镍、钴、钒、钼、锰、硒,以及它们的组合。

31. 权利要求30的方法,其中所述 β -(1,3)-葡聚糖和所述金属形成络合物。

32. 权利要求31的方法,其中所述络合物包括锌 β -(1,3)-葡聚糖络合物。

33. 权利要求1至26中任一项的方法,其中所述组合物进一步包含选自雨生红球藻(Haematococcus pluvialis)、虾青素和初乳的附加组分。

34. 权利要求1至33中任一项的方法,其中所述组合物作为固体施用。

35. 权利要求1至33中任一项的方法,其中所述组合物作为悬浮液施用。

36. 组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖,所述组合物用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌的病症。

37. 权利要求36的组合物,其中所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病。

38. 包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌的病症的药物中的用途。

39. 权利要求38的用途,其中所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病。

β -1,3-葡聚糖用于调节免疫功能和治疗肠道炎症的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年10月28号提交的美国临时申请第62/247,629号和2016年3月9号提交的美国临时申请第62/305,875号的权益;其各自的全部内容通过援引并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及 β -1,3-葡聚糖及其调节人体免疫力的用途。还提供了用于治疗和/或预防高胆固醇、糖尿病和变态反应的方法。本申请还涉及 β -1,3-葡聚糖以及其用于增强具有肠道炎症的人的免疫功能的用途。还提供用于治疗和/或预防肠道炎症的方法。

背景技术

[0004] β -葡聚糖是通过 β -糖苷键连接的D-葡萄糖的聚合物,该 β -糖苷键是由各种有机体(包括酵母、真菌、细菌、藻类、燕麦、大麦以及巨藻)产生的。不同有机体产生具有不同支链结构、平均分子量、溶解度和/或三级结构的 β -葡聚糖。例如,来源于酵母的 β -葡聚糖通常是不溶的且具有 β -1,3-糖苷键和 β -1,6-糖苷键(β -1,3-/1,6-葡聚糖)。另一方面,来源于燕麦的 β -葡聚糖通常是更可溶的并具有 β -1,3-糖苷键和 β -1,4-糖苷键(β -1,3-/1,4-葡聚糖)。相反,来源于诸如裸藻(Euglena)的藻类的 β -葡聚糖几乎专有地具有1,3-糖苷键,但不具有1,6-糖苷键。各种 β -葡聚糖形式的特定糖苷键影响这些分子的性质。

[0005] 这些 β -葡聚糖已被认为具有有益的保健性质。由于 β -葡聚糖通常与致病性微生物的表面联接,所以较高等有机体的免疫系统已进化到识别 β -葡聚糖并启动免疫应答。例如,已经表明,来源于酵母的 β -葡聚糖可通过结合巨噬细胞上的补体受体3或dectin-1来影响免疫功能(见Brown等人,Journal of Experimental Medicine,vol.196(3),pp.407-412(2002))。在生理学水平, β -葡聚糖与细胞表面受体相互作用以启动级联事件(包括吞噬作用和某些细胞因子的产生)。通过引入某些 β -葡聚糖,免疫系统可以被引发使得其对实际疾病挑战的应答更稳定。

[0006] 用以抵抗疾病的个体的免疫功能的调节代表对传统药品的施用的一种替代。受调节的免疫功能可有效地治疗个体的疾病、或者可预防个体疾病的发作。同样,用以抵抗疾病的个体免疫功能的调节或增强代表对传统药品的施用的一种替代。调节或增强的免疫功能可有效地治疗个体的疾病、或者可预防个体疾病的发作。许多传统药品导致患者不期望的副作用。此外,细菌的耐抗生素菌株导致持久增加的健康风险。照此,需要一种具有较少副作用(如果有的话)的替代疾病疗法。还需要一种预防疾病发作的更自然的方法。

[0007] 虽然来源于酵母和燕麦的 β -葡聚糖已被广泛研究,但由来源于诸如裸藻的藻类的 β -1,3-葡聚糖引起的健康益处受到较少关注。本文描述的是通过施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖来调节个体的免疫功能的方法。某些疾病可以通过调节个体的免疫功能来治疗和/或预防。

[0008] 肠道炎症的当前治疗包括饮食和/或生活方式的改变、药物治疗和手术。然而,需要肠道炎症的更有效治疗,以及需要具有更少(如果有的话)副作用的治疗。本文描述的是

通过施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖来增强具有肠道炎症的个体的免疫功能的方法。

发明内容

[0009] 本发明提供治疗患有病症的人的所述病症的方法,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。在某些实施方案中,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病。

[0010] 在某些实施方案中,所述病症是高脂血症。在某些实施方案中,所述组合物的施用降低所述人的胆固醇水平。在某些实施方案中,所述组合物的有效量为约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。在某些实施方案中,所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。在某些实施方案中,所述组合物与他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维酸衍生物或胆固醇吸收抑制剂联合施用。

[0011] 在某些实施方案中,所述病症选自炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌。在某些实施方案中,所述病症选自炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病。在某些实施方案中,所述病症是结肠炎。在某些实施方案中,所述病症是炎性肠病。在某些实施方案中,所述病症是克罗恩氏病。在某些实施方案中,所述病症是结肠癌。在某些实施方案中,所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。在某些实施方案中,所述组合物的施用增加抗炎细胞因子产生。在某些实施方案中,所述组合物与抗炎药、免疫抑制药物或者抗生素联合施用。

[0012] 在某些实施方案中,所述裸藻是纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)。在某些实施方案中,所述裸藻是异养培养的。在某些实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖是裸藻淀粉的形式。在某些实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。在某些实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻中纯化的。在某些实施方案中,所述组合物包含裸藻生物质,所述裸藻生物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。在某些实施方案中,所述裸藻生物质被干燥至约40%或更少的水分含量。在某些实施方案中,所述裸藻生物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0013] 在某些实施方案中,所述组合物每天以单次剂量施用。在某些实施方案中,所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0014] 在某些实施方案中,所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦 (kava kava)、姜黄、螺旋藻 (*Spirulina*)、小球藻 (*Chlorella*)、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物 (*Echinacea*)、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻 (kelp)、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花 (*maiitake*)、灵芝 (*reishi*) 或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物 (*Sambucus*)、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。在某些实施方案中,所述附加组分是锌。

[0015] 在某些实施方案中,所述组合物进一步包含金属。在某些实施方案中,所述金属包括选自以下组中的成员:铁、镁、锂、锌、铜、铬、镍、钴、钒、钼、锰、硒,以及它们的组合。在某

些实施方案中,所述 β -(1,3)-葡聚糖和所述金属形成络合物。在某些实施方案中,所述络合物包括锌 β -(1,3)-葡聚糖络合物。

[0016] 在某些实施方案中,所述组合物进一步包括选自雨生红球藻 (*Haematococcus pluvialis*)、虾青素和初乳的附加组分。

[0017] 在某些实施方案中,所述组合物作为固体施用。在某些实施方案中,所述组合物作为悬浮液施用。

[0018] 本发明提供,本文所公开的方法还可适用于相应用途。

[0019] 本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物,所述组合物用于治疗选自以下病症的病症:高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病,以及结肠癌。在某些实施方案中,所述病症选自:高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎,以及克罗恩氏病。

[0020] 本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于治疗选自以下病症的病症的药物中的用途:高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病,以及结肠癌。在某些实施方案中,所述病症选自:高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎,以及克罗恩氏病。

[0021] 在一个方面,本申请公开了调节有此需要的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0022] 在一些实施方案中,所述组合物的每日有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0023] 在一些实施方案中,所述组合物的施用调节自身免疫应答、血糖水平、感染或炎症。在一个实施方案中,所述炎症与变态反应相关。在另一实施方案中,所述自身免疫应答与糖尿病相关。在另一实施方案中,所述感染是细菌感染、真菌感染或病毒感染。

[0024] 在某些实施方案中,所述裸藻是异养培养的。在一个实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。在另一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。在又一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻中纯化的。

[0025] 在一些实施方案中,所述组合物包含裸藻生物质,所述裸藻生物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,所述裸藻生物质是经干燥的。在又一些实施方案中,所述裸藻生物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0026] 在一个实施方案中,所述组合物每天以单次剂量施用。在另一实施方案中,所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0027] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。在一个实施方案中,所述组合物作为固体施用。在另一实施方案中,所述组合物作为悬

浮液施用。

[0028] 在另一方面,本申请提供调节具有高胆固醇或者处于具有高胆固醇的风险的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。在一些方面,所述组合物的施用降低所述人的胆固醇水平。

[0029] 在一个实施方案中,所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。在另一实施方案中,所述裸藻是异养培养的。在又一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。在再一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。在另一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻中纯化的。

[0030] 在一些实施方案中,所述组合物包含裸藻生物物质,所述裸藻生物物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。在又一些实施方案中,所述裸藻生物物质被干燥。在一些实施方案中,所述裸藻生物物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0031] 在一个实施方案中,所述组合物每天以单次剂量施用。在另一实施方案中,所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0032] 在一个实施方案中,所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。在其他实施方案中,所述组合物与他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维酸衍生物或胆固醇吸收抑制剂联合施用。在又一实施方案中,所述组合物作为固体施用。在另一实施方案中,所述组合物作为悬浮液施用。

[0033] 本发明提供,本文所公开的方法还可适用于相应用途。

[0034] 本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物,所述组合物用于调节有此需要的人的免疫功能。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于调节有需要的人的免疫功能的药物中的用途。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。

[0035] 本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物,所述组合物用于调节具有高胆固醇或处于具有高胆固醇风险的人的免疫功能。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于调节具有高胆固醇或处于具有高胆固醇风险的人的免疫功能的药物中的用途。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。

[0036] 本文还描述了通过施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖来增强具有肠道炎症的人的免疫功能的方法。这些方法可用于治疗诸如炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病的病症。

[0037] 在一个方面,本申请公开了增强具有肠道炎症的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -

1,3-葡聚糖。

[0038] 在一些实施方案中,所述组合物的每日有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0039] 在一些实施方案中,所述肠道炎症是炎性肠病。在一个实施方案中,所述肠道炎症是结肠炎。在另一实施方案中,所述肠道炎症是克罗恩氏病。

[0040] 在一些实施方案中,所述裸藻是异养培养的。在一个实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。在另一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。在又一实施方案中,所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻中纯化的。

[0041] 在一些实施方案中,所述组合物包含裸藻生物物质,所述裸藻生物物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,所述裸藻生物物质被干燥。在又一些实施方案中,所述裸藻生物物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0042] 在一个实施方案中,所述组合物每天以单次剂量施用。在另一实施方案中,所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0043] 在一些实施方案中,所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。在一个实施方案中,所述组合物作为固体施用。在另一实施方案中,所述组合物作为悬浮液施用。

[0044] 在一些实施方案中,所述组合物的施用增加了抗炎细胞因子产生。在又一些实施方案中,所述组合物与抗炎药、免疫抑制药物或者抗生素联合施用。

[0045] 本发明提供,本文所公开的方法还可适用于相应用途。

[0046] 本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物,所述组合物用于调节具有肠道炎症的人的免疫功能。这些用途可用于治疗诸如炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病的病症。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。本发明提供包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于增强具有肠道炎症的人的免疫功能的药物中的用途。这些方法可用于治疗诸如炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病的病症。在一些实施方案中,所述组合物是口服施用给所述人的。

[0047] 附图简要说明

[0048] 图1A示出了 β -1,3-葡聚糖链(诸如来源于裸藻的)的结构。图1B示出了具有 β -1,6-葡聚糖侧链的 β -1,3-葡聚糖主链(诸如来源于酵母的)的结构。

[0049] 图2示出了根据本发明的一个实施方案形成来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的图示。

[0050] 图3示出了根据本发明用于培养裸藻的系统的第一实施方案。

[0051] 图4A示出了通过重复分批方法利用发酵培养的裸藻的一个实施方案的图示。图4B示出了根据本发明的一个实施方案获自重复分批培养方法的裸藻浓度的图示。

[0052] 图5示出了根据本发明用于培养裸藻的系统的第二实施方案。

[0053] 图6示出了根据本发明用于培养裸藻的系统的第三实施方案。

[0054] 图7A图示了在 β -葡聚糖治疗的第14天从外周血取样的小鼠中性粒细胞的吞噬作用指数。阴性对照没有接受 β -葡聚糖并具有 $29.8 \pm 0.37\%$ 的应答。棒代表平均值 $\pm$ 标准差($n=3$ 只小鼠/治疗组)。图7B图示了在 β -葡聚糖治疗的第14天收获的小鼠脾细胞的天然杀伤(NK)细胞活性。阴性对照没有接受 β -葡聚糖并具有 $11.6 \pm 0.28\%$ 的应答。棒代表平均值 $\pm$ 标准差($n=3$ 只小鼠/治疗组)。图7C图示了在小鼠卵清蛋白注射以及每日给予 β -葡聚糖治疗23天之后的抗体形成。阴性对照接受卵清蛋白但没有接受 β -葡聚糖,并具有 49.1 ± 4.6 的应答。棒代表平均值 $\pm$ 标准差($n=3$ 只小鼠/治疗组)。

[0055] 图8图示了在第0天注射大肠杆菌(*E. coli*)之后小鼠的存活。从大肠杆菌注射之前2天开始(第-2天)以相当于 0.01% 的每天喂食定量的剂量经口灌胃喂食经干燥的藻(即裸藻)、经纯化的藻 β -1,3-葡聚糖和酵母来源 β -葡聚糖5天。PBS对照组仅给予PBS灌胃,而抗生素治疗组在第0至4天口服给予 13mg/kg 的氨苄青霉素。每个治疗组由 $n=10$ 只小鼠组成。浅灰虚线代表氨苄青霉素,在图的最右侧看到的最高至最低的线(即,第7-10天)分别代表经纯化的藻 β -1,3-葡聚糖、经干燥的藻、酵母 β -葡聚糖以及PBS对照。

[0056] 图9A图示了来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖对采用 β -葡聚糖治疗7天之后的小鼠树突细胞的细胞因子产生的影响。图9B图示了来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖对采用 β -葡聚糖治疗7天之后的小鼠巨噬细胞的细胞因子产生的影响。图9C图示了来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖对采用 β -葡聚糖治疗7天之后的小鼠NK细胞中的细胞因子表达的影响。在图9A-9C中, β -1,3-葡聚糖的剂量为 0mg/kg (A)、 5mg/kg (B)、 20mg/kg (C)以及 200mg/kg (D)。

[0057] 图10图示了喂食14天无 β -葡聚糖的高胆固醇饮食,接着另外30天喂食包含 β -葡聚糖产品的、具有正常水平的胆固醇的饮食(或对照饮食)的小鼠的(A)血清胆固醇水平和(B)血清甘油三酯水平。 β -葡聚糖是以 20mg/kg 的剂量施用的。收集禁食12小时后的小鼠的血清。虚线代表PBS对照,实线代表来源于裸藻的经纯化的 β -葡聚糖。

[0058] 图11图示了喂食14天具有 β -葡聚糖的高胆固醇饮食(或对照饮食),接着另外30天喂食包含 β -葡聚糖产品的、具有正常水平的胆固醇的饮食(或对照饮食)的小鼠的(A)血清胆固醇水平和(B)血清甘油三酯水平。 β -葡聚糖是以 20mg/kg 的剂量施用的。收集禁食12小时后的小鼠的血清。虚线代表PBS对照,实线代表来源于裸藻的经纯化的 β -葡聚糖。

[0059] 图12A图示了向患有DSS诱导的结肠炎的小鼠施用PBS(“无”)对身体重的影响。图12B图示了向患有DSS诱导的结肠炎的小鼠施用经纯化的 β -1,3-葡聚糖($>99\text{wt}\%$)(“AG”)对身体重的影响。图12C图示了向患有DSS诱导的结肠炎的小鼠施用包含约50重量% β -1,3-葡聚糖的经干燥的纤细裸藻(“A50”)对身体重的影响。在图12A-12C中,单条线代表单只小鼠的结果。

[0060] 图13图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的体重的影响。该图描绘了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠的组合结果,以随时间的初始体重的%计。棒代表平均值 $\pm$ 标准差($n=10$ 只小鼠/治疗组)。

[0061] 图14图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的体重的影响。该图描绘了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小

鼠的组合结果,以随时间的重量损失评分计。重量损失评分如下计算:0(无损失)、1(1-5%)、2(5-10%)、3(10-20%)以及4(>20%)。棒代表平均值±标准差(n=10只小鼠/治疗组)。

[0062] 图15图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的大便稠度的影响。该图描绘了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠的组合结果。大便稠度如下评分:0(正常固体)、2(半固体/柔软)、3(稀便)以及4(水样/腹泻)。棒代表平均值±标准差(n=10只小鼠/治疗组)。

[0063] 图16图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的便血的影响。该图描绘了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠的组合结果。棒代表平均值±标准差(n=10只小鼠/治疗组)。

[0064] 图17图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的结肠长度的影响。该图示出了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠第10天时的结肠长度。棒代表平均值±标准差(n=7只小鼠/治疗组)。

[0065] 图18A图示了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠第10天时结肠炎症的代表性影像。这些影像是在光学显微镜下使用10X物镜获得的。图18B图示了 β -1,3-葡聚糖对用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的结肠炎症的严重程度的影响。棒代表平均值±标准差(n=3只小鼠/治疗组)。

[0066] 图19A示出了在用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠第10天时T辅助细胞频率的代表性FACS分析影像。图19B图示了向患有DSS诱导的结肠炎的小鼠施用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)对细胞因子阳性细胞的产生的影响。棒代表平均值±标准差(n=3只小鼠/治疗组)。

[0067] 图20图示了 β -1,3-葡聚糖对患有DSS诱导的结肠炎的小鼠的结肠免疫细胞的细胞因子产生的影响。棒代表平均值±标准差(n=3只小鼠/治疗组)。该图示出了用PBS(“无”)、经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”)或者经干燥的纤细裸藻(“A50”)治疗的小鼠的细胞因子谱。棒代表平均值±标准差(n=3只小鼠/治疗组)。

[0068] 图21图示了在每日消耗250mg来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖之后个体的嗜碱粒细胞数量减少。

[0069] 图22图示了在每日消耗250mg来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖之后对个体的紧急排便或腹泻的影响。

[0070] 图23图示了在每日消耗250mg来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖之后对个体的超氧化物歧化酶(SOD)水平的影响。

[0071] 图24图示了在每日消耗250mg来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖之后对个体的丙二醛水平的影响。

[0072] 图25是制备 β -葡聚糖与痕量金属的络合物的发酵过程的实施方案的示意图。

[0073] 图26是制备 β -葡聚糖与痕量金属的络合物的发酵过程的另一实施方案的示意图。

具体实施方案

[0074] 本发明提供治疗患有病症的人的所述病症的方法,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。在某些实施方案中,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病。在某些实施方案中,包含来自利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物可包含裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合。所述组合物可用于治疗患有病症的人的所述病症,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗患有病症的人的所述病症,所述病症选自:高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎,以及克罗恩氏病。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗高脂血症。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗代谢综合征。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗炎性肠病。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗结肠炎。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗克罗恩氏病。在某些实施方案中,所述组合物可用于治疗结肠癌。

[0075] 本申请涉及来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖以及其用途。来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可调节个体的免疫功能。本申请还涉及来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖以及其用以调节或增强具有肠道炎症的人的免疫功能的用途。来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可调节或增强具有肠道炎症的个体的免疫功能。所述来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可作为可食用组合物口服施用,所述可食用组合物包含裸藻生物质或者从裸藻纯化的 β -1,3-葡聚糖。来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可以作为药物制剂施用,所述药物制剂可以口服或者静脉内施用。

[0076] 发明人已经发现,来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用可用于促进动物(包括人)的免疫系统健康并用以治疗和/或预防疾病。例如,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可用于调节自身免疫应答、血糖水平、感染或炎症。来源于通过发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用还导致动物(包括人)的血清胆固醇降低或者血清甘油三酯降低。

[0077] 发明人还已经令人惊奇地表明,来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用可用于促进动物(包括人)的免疫系统健康并用以治疗和/或预防肠道炎症。例如,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可用于调节或增强具有炎性肠病、结肠炎或克罗恩氏病的人的免疫功能。来源于通过发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用还导致动物(包括人)的抗炎细胞因子的产生增加。

[0078] 使用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖具有数个优点。首先, β -1,3-葡聚糖是通过利用发酵培养的裸藻有效地产生的。如本文所述通过发酵培养的裸藻使 β -1,3-葡聚糖积累到总裸藻细胞质量的约30%至约70%。相反,例如,酵母来源的 β -葡聚糖占小于总酵母细胞质量的15%。第二,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖可易于提取并纯化。另一方面,来源于酵母的 β -葡聚糖结合到酵母细胞壁上,从而使提取困难且昂贵。如以下所讨论, β -1,3-葡聚糖以颗粒累积在裸藻中。这促进纯化过程,因为来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖不与细胞壁组分(其可能难以分离)联接。第三,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖是生物可容易利用的,几乎没有或完全没有裸藻细胞处理。这允许来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖以裸藻生物质的形式有效地施用并且无需纯化。此外,如果需要经纯化的 β -1,3-葡聚糖(例如药物制剂中),则其可以使用本文所述的安全且有成本效益的方法容易地纯化。相反,由燕麦或酵母产生的 β -葡聚糖必须从细胞壁中提取且需要使用危险化学品或昂贵的酶。

[0079] 裸藻产生对调节免疫功能以及对治疗或预防性治疗高脂血症特别有用的独特的 β -葡聚糖。同样,裸藻产生对治疗或预防性治疗肠道炎症特别有用的独特的 β -葡聚糖。由裸藻产生的 β -1,3-葡聚糖的绝大部分作为裸藻淀粉体位于有机体的淀粉核或细胞质中,所述裸藻淀粉体是 β -1,3-葡聚糖的不溶于水的颗粒。该独特的 β -葡聚糖通常称为裸藻淀粉。与许多其他有机体(诸如燕麦或真菌的 β -葡聚糖)相比,由裸藻产生的 β -葡聚糖实质上更为线性,主要含有 β -1,3-键。 β -1,3-葡聚糖形式对调节免疫功能和降低血清胆固醇和甘油三酯水平特别有效。同样, β -1,3-葡聚糖形式对治疗或预防肠道炎症特别有效。

[0080] 定义

[0081] 术语“有效量”描述了化合物或组分的量,当在其用途的范畴内使用时,所述量产生或引起预期结果,不管所述结果是否与感染或疾病状态的预防或治疗或者如本文另外所描述的预防或治疗有关。

[0082] 术语“调节(modulate、modulating和modulation)”、“增强(enhance、enhancing和enhancement)”在本文同义地用于描述改善任何人或动物(包括但不限于狗、猫、啮齿动物、马、绵羊、奶牛、猪、山羊、驴、小鸡或兔)启动免疫应答的能力。

[0083] 术语“裸藻”应理解是指裸藻属内的任何物种或品系,除非另作说明。在优选实施方案中,裸藻是纤细裸藻,但也可以设想其他裸藻物种。

[0084] 术语“生物质”用于描述裸藻细胞材料。该产品可以是经加工的或未加工过的。例如,裸藻生物质可以被干燥或以湿细胞团形式提供。

[0085] 术语“来源于”意指化合物或材料源自特定来源。例如,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖表明所述 β -1,3-葡聚糖源自裸藻。 β -1,3-葡聚糖可以与裸藻相关、或者可以被纯化并因此从裸藻分离出。

[0086] 本文使用的术语“药学可接受的”意思是根据疾病的严重性和治疗的必要性,化合物或组合物适于施用给受试者(包括人类患者)以实现本文描述的治疗,而无过多有害副作用。

[0087] 术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文同义地用于描述任何人或动物(包括但不限于狗、猫、啮齿动物、马、绵羊、奶牛、猪、山羊、驴、小鸡或兔)。在一些实施方案中,术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文同义地用于描述任何人或动物(包括但不限于狗、猫、啮齿动物、马、绵羊、奶牛、猪、山羊、驴、美洲驼、鱼、小鸡或兔)。

[0088] 术语“治疗(treat、treating和treatment)”在本文同义地使用以指对处于疾病状态或病症风险或者罹患疾病状态或病症的患者提供益处的任何行为,包括通过减轻、抑制、压制或者消除至少一种症状改善病症,延缓疾病的进展、或者抑制疾病。

[0089] 术语“预防性施用”或“预防性治疗”是指在疾病发生之前用于降低该疾病的可能性的任何行为或者用于降低受试者疾病的后续发生的可能性的任何行为。

[0090] 术语“约”包括并描述数值或参数本身。例如,“约x”包括并描述“x”本身。在一些实施方案中,当与测量值结合使用或者用于修正数值、单位、常数或者数值的范围时,术语“约”是指 $\pm 1-10\%$ 的差异。在一些实施方案中,当与测量值结合使用或者用于修正数值、单位、常数或者数值的范围时,术语“约”是指 $\pm 5\%$ 的差异。在一些实施方案中,当与测量值结合使用或者用于修正数值、单位、常数或者数值的范围时,术语“约”是指 $\pm 10\%$ 的差异。

[0091] 术语“和/或”包括替代的主题以及组合的主题。例如,“x和/或y”包括“x或y”和“x

和y”。

[0092] 应当理解,本文描述的本发明的各方面和实施方案包括“由各方面和实施方案组成”和/或“基本由各方面和实施方案组成”。

[0093] 如本文所使用,单数英文形式“a”、“an”和“the”包括复数形式,除非上下文明确指出。

[0094] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的性质

[0095] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖在其糖支链结构、三维结构、溶解度以及生物利用度方面与其他有机体产生的 β -葡聚糖不同。

[0096] 糖支链结构

[0097] 由不同有机体产生的 β -葡聚糖可在聚合物的糖支链结构上显著变化。例如,来源于藻类(诸如裸藻)的 β -葡聚糖几乎专有地具有1,3-糖苷键,而不具有1,6-糖苷键(图1A)。相反,来源于酵母的 β -葡聚糖具有 β -1,3-糖苷键和 β -1,6-糖苷键的组合,通常具有 β -1,3-葡聚糖主链,所述主链每10-30个葡萄糖单体包含 β -1,6-侧链(2-3个葡萄糖单位长)(图1B)。来源于燕麦或大麦的 β -葡聚糖具有 β -1,3-糖苷键和 β -1,4-糖苷键的组合。来源于巨藻(例如海带)的 β -葡聚糖具有 β -1,3-糖苷键和 β -1,6-糖苷键的组合。

[0098] 由裸藻产生的 β -葡聚糖的绝大部分作为裸藻淀粉体位于藻细胞质中,且通常称为“裸藻淀粉”。来源于裸藻的裸藻淀粉具有线性结构,该线性结构几乎专有地具有 β -1,3-葡聚糖,而无 β -1,6-侧链。当考虑到其在免疫支持应用中的使用时,与 β -葡聚糖的其他来源相比,裸藻淀粉的非支链特性是一个重要的区别。

[0099] 裸藻淀粉的支链结构的研究显示了其独特结构,并且公开在美国专利公开第2013/0216586号中。在将裸藻淀粉从整个裸藻细胞中分离出之后,执行键分析以确定葡萄糖单体之间的每种类型的结合的相对量。结果概述于表1中。

[0100] 表1. 从纤细裸藻中提取的两个裸藻淀粉样品的键分析。

[0101]

糖基残基	样品1 (%)	样品2 (%)
末端连接的吡喃葡萄糖基残基	0.34	0.3
3-连接的吡喃葡萄糖基残基(3-gluc)	93.03	94.1
4-连接的吡喃葡萄糖基残基(4-gluc)	2.25	2.4
2,3-连接的吡喃葡萄糖基残基(2,3-gluc)	3.47	2.3
3,6-连接的吡喃葡萄糖基残基(3,5-gluc)	0.36	0.8
2,3,4-连接的吡喃葡萄糖基残基(2,3,4-gluc)	0.55	0.1
合计	100.0	100.0

[0102] 该键分析表明两个裸藻淀粉样品主要由3-连接的吡喃葡萄糖基残基组成。发现少量4-连接的和2,3-连接的吡喃葡萄糖基残基以及可忽略量的3,6-连接的、末端连接的和2,3,4-连接的吡喃葡萄糖基残基。这些数据证实裸藻淀粉主要包含线性非支链 β -1,3-葡聚糖。

[0103] β -1,3-葡聚糖是主要结合到免疫系统细胞表面上的受体(诸如Dectin-1(巨噬细胞受体)和补体受体3)的 β -葡聚糖的形式。 β -1,3-葡聚糖还可以通过个体的肠道中的微生物群落进行发酵,这可导致有益代谢产物如短链脂肪酸(其可影响动物的健康)的产生。 β -

1,3-葡聚糖还可以通过个体的肠道中的微生物群落进行发酵,这可导致有益代谢产物诸如短链脂肪酸(其可影响个体的健康)的产生。

[0104] 可用于本文所述的方法的来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖包含约85%或更多 β -1,3-糖苷键、约87%或更多 β -1,3-糖苷键、约90%或更多 β -1,3-糖苷键、约91%或更多 β -1,3-糖苷键、约92%或更多 β -1,3-糖苷键、约93%或更多 β -1,3-糖苷键、或者约94%或更多 β -1,3-糖苷键。

[0105] 三维结构

[0106] 在免疫刺激应用中, β -1,3-葡聚糖的三维结构和折叠可影响生物利用度、表面积和整体功效。在线性 β -1,3-葡聚糖链中,该结构是由糖苷键模式决定的。由于吡喃葡萄糖基的椅式环相当刚硬,故葡聚糖链的柔韧性大部分起因于围绕糖苷键的键旋转。X射线晶体学和光谱学技术表明在固态下线性葡聚糖具有三螺旋主链。由裸藻产生的裸藻淀粉被认为是具有少量糖基侧链的结构上更为简单的 β -葡聚糖之一。这与褐藻淀粉、香菇多糖、硬葡聚糖、或酵母来源 β -葡聚糖(他们具有朝螺旋结构的外部暴露的1,4-或1,6-连接的侧链)直接相反。

[0107] 在中性pH下三螺旋结构在较宽温度范围内是稳定的,从而得到水不溶性聚合物。然而,可以通过改变裸藻淀粉聚合物的构象的各种手段使氢键去稳定化。例如,在强离液剂(例如,尿素)的存在下、或者通过使温度增加到三螺旋熔融温度($\sim 135^{\circ}\text{C}$)之上,裸藻淀粉可以溶解在碱溶液(例如,0.2M NaOH或更强碱性的)、非质子极性溶剂(如DMSO)中。可以获得与 β -1,3-葡聚糖构象有关的不同免疫效应,无论其处于天然状态,已变性,还是变性并复性。处于这三种构象中的任何一种的 β -1,3-葡聚糖可用作增加或提高其功能的附加反应的构件。本文讨论了用以产生功能化 β -1,3-葡聚糖的这些修改中的几种以及一些他们的相应应用。所述 β -葡聚糖的构象及其所得的溶解度还可影响其如何递送。例如,水溶性 β -1,3-葡聚糖可以静脉内注射。

[0108] 粒度

[0109] 粒度是影响 β -1,3-葡聚糖颗粒的功能和生物利用度的因素。来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖颗粒可用于本文所述的方法。通常,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖颗粒具有以下平均直径:约7微米或更小、约6微米或更小、约5微米或更小、约4微米或更小、约3微米或更小、约2.5微米或更小、约2微米或更小、约1.5微米或更小、约1微米或更小、约0.5微米或更小、约0.4微米或更小、约0.3微米或更小、约0.2微米或更小、或者约0.1微米或更小。

[0110] β -1,3-葡聚糖的纯度水平

[0111] 已经确定 β -葡聚糖化合物的纯度水平对功效具有影响,这可能源于所存在的抑制 β -葡聚糖和免疫细胞之间的相互作用的其他材料。使用本文所述的方法, β -1,3-葡聚糖可以颗粒的形式容易地从裸藻细胞分离。因此,相对于来自酵母和其他有机体的 β -葡聚糖的普通制品,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的纯度非常高。例如,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖不与细胞壁组分联接,而来源于酵母和某些其他有机体的 β -葡聚糖的情况则是与细胞壁组分联接。相反,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖主要以水不溶性颗粒的形式被提取出。因此,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的纯化并不会因 β -葡聚糖与细胞壁组分的联接而复杂。使用本文所述的方法,以所收到的(as-received)计,可以获得大于95重量%的纯度水平。在一些实施方案中,以所收到的计,可以获得大于99重量%的纯度水平。相比之下,最高级别的酵母来

源的 β -葡聚糖很少能获得大于90%纯度,大部分为约70-80%纯度。而且,与酵母来源的葡聚糖相比,当通过裸藻产生时,可以更有成本效益地获得高纯度 β -1,3-葡聚糖,这是因为由裸藻细胞壁的缺乏而导致的容易分离以及 β -1,3-葡聚糖颗粒的容易回收。最终,由于不需要刺激性化学品(例如强酸和碱或溶剂)来回收来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖,故 β -1,3-葡聚糖可以其天然形式被回收,而不需改变其化学组成和构型。与得自其他有机体的溶解且改性的 β -葡聚糖(在提取和纯化过程期间被改性)相比,来源于裸藻的纯的、未改性的 β -1,3-葡聚糖的使用是有益的,部分是因为来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的较高生物利用度。在一些实施方案中,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖纯度大于85%、纯度大于90%、纯度大于92%、纯度大于94%、纯度大于95%、纯度大于96%、纯度大于97%、纯度大于98%、或者纯度大于99%。

[0112] 治疗高脂血症的方法

[0113] 近来发现来源于出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)的 β -葡聚糖的口服施用预防小鼠中高脂肪饮食(HFD)诱导的脂肪肝的形成(Aoki, S.等人, *Scientific Reports* 2015, 5, 10457)。来源于出芽短梗霉菌的 β -葡聚糖由 β -1,3-糖苷键和 β -1,6-糖苷键组成。在研究中,用于胆固醇合成、H MGR和胆固醇降解的限速酶CYP7A1在小鼠中显著地上调。研究的作者具体指出CYP7A1 mRNA表达的上调作为观察到的脂肪肝、肝损伤和胆固醇水平的改善的可能分子基础。IL-6的诱导还涉及小鼠中HFD诱导的脂肪肝的预防。涉及来源于酵母的 β -葡聚糖的单独研究提出小鼠的血浆胆固醇水平的降低是通过巨噬细胞介导的(Vetvicka, V.等人, *J. of Immunotoxicology*, 2009, 6:30-35)。明显地, β -葡聚糖通过其调节免疫系统并转而调节胆固醇水平的精确分子机制是复杂的,且可取决于 β -葡聚糖的精确结构。

[0114] 高脂血症或者异常的高血胆固醇或甘油三酯水平造成心脏病发作和心血管疾病的重大风险。高脂血症可起因于遗传因素或某些健康或生活方式因素,包括高脂肪或高胆固醇饮食、肥胖症、或者缺乏常规锻炼。高脂血症包括导致血胆固醇升高(即,高胆固醇血症)或血甘油三酯水平升高(高甘油三酯血症)的任何病症。胆固醇和甘油三酯与脂蛋白相关,包括低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。通常称为“坏”胆固醇的LDL聚集在血管壁中并可导致斑块生长和动脉粥样硬化。相反,HDL(通常称为“好”胆固醇)通过血流将脂肪传递出细胞、动脉壁和组织。增加HDL颗粒的浓度与降低动脉壁内的动脉粥样硬化的累积相关。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(包括人)以治疗高脂血症、或者预防性地施用给处于高脂血症风险的受试者。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(包括人)以降低HDL。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(包括人)以增加HDL。处于高脂血症风险的人可包括但不限于先前已经诊断为高脂血症的人、具有高脂肪或高胆固醇饮食的人、或者一个或更多个近亲具有高脂血症的人。

[0115] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)还可以施用给受试者(包括人)以治疗非酒精性脂肪肝疾病(NAFLD)、或者预防性地施用给处于NAFLD风险的受试

者。与肥胖症和2型糖尿病紧密相关的NAFLD被认为是心血管疾病的主要风险因素。

[0116] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(包括人)以治疗代谢综合征、或者预防性地施用给处于代谢综合征风险的受试者。代谢综合征是指一起出现以增加心脏疾病、中风和糖尿病的风险的一组病症,包括血压升高、高血糖水平、脂肪过多、胆固醇水平异常。

[0117] 已经表明,如本文所述的来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)的施用降低血液胆固醇和甘油三酯水平(见实施例7)。这种施用可以是口服的,诸如通过施用可食用组合物或者口服药物制剂、或者可以是静脉内的,诸如通过施用静脉内药物制剂。还可以设想替代施用途径,诸如通过吸入。口服可食用组合物或者口服药物制剂包含本文所述的来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的或未纯化的 β -1,3-葡聚糖。通常,静脉内药物制剂包含来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖。通常,适用于吸入的药物制剂包含来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖,并且可以通过例如鼻部喷雾施用。可食用组合物或药物制剂可以与一种或多种他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维素衍生物或者胆固醇吸收抑制剂联合施用以强化高脂血症的治疗。

[0118] 可用于产生用于治疗高脂血症的 β -1,3-葡聚糖的发酵的裸藻通常依赖于生长培养基,其为生长和 β -1,3-葡聚糖的产生提供营养素。尽管预期裸藻可以在完全光暴露或部分光暴露下生长,但通常优选的是,利用发酵培养的裸藻是异养培养的。在发酵期间,生长的裸藻有效地产生 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约30wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约30wt%至约40wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt% β -1,3-葡聚糖、约60wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、或者约50wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约50wt%至约60wt% β -1,3-葡聚糖或者约50wt%至约55wt% β -1,3-葡聚糖。

[0119] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖以经纯化的形式或未纯化的形式施用给受试者用于治疗高脂血症。例如,利用发酵培养的裸藻生物质可以口服施用给受试者以治疗高脂血症。由于利用发酵培养的裸藻包含有效量的 β -1,3-葡聚糖,所以即使不纯化 β -1,3-葡聚糖,裸藻生物质对降低血胆固醇水平或血甘油三酯水平也是有效的。这部分地由于通过发酵培养的裸藻产生的 β -1,3-葡聚糖的高生物利用度。相反,由酵母产生的 β -葡聚糖与酵母的细胞壁紧密联接,并具有较少量生物可利用 β -葡聚糖。

[0120] 例如,裸藻生物质被提供在可食用组合物中,所述可食用组合物被口服地施用以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。所述可食用组合物可以是食物产品或者膳食补充剂。为了辅助施用,裸藻生物质被加工成片状、糊剂、乳膏、散剂、胶囊、片剂、或者任何其他可食用固体或液体(诸如悬浮液),并单独地或者与其他食物产品联合施用。例如,在一些实施方案中,裸藻生物质以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式施用。

[0121] 在一个示例性实施方案中,裸藻生物质被干燥以对其进行制备,以用于口服施用。例如,裸藻生物质可以通过以下方式被干燥:冷冻干燥所述生物质,在烘箱、双滚筒干燥器

或类似的干燥设备中加热所述生物质、或者对所述生物质施加真空,达到约40%或更小、约30%或更小、约25%或更小、约20%或更小、约15%或更小、约10%或更小、约5%或更小、约4%或更小、约3%或更小、约2%或更小、或约1%或更小的水分含量。任选地,在干燥裸藻生物质之前或之后,所述生物质被加工成粉末。例如,可以将裸藻细胞悬浮在溶液中,通过剪切混合器粉碎,并干燥以产生粉末。在一些实施方案中,粉末状的裸藻生物质被加工成以下平均粒度:约1000微米或更小、约900微米或更小、约800微米或更小、约700微米或更小、约600微米或更小、约500微米或更小、约400微米或更小、约300微米或更小、约250微米或更小、约200微米或更小、约100微米或更小、约50微米或更小、约25微米或更小、约15微米或更小、约10微米或更小、约5微米或更小、约3微米或更小、约2微米或更小、约1微米或更小、或者约0.5微米或更小。然后,可将经干燥的裸藻生物质和/或粉末状的裸藻生物质直接或者通过与另一可食用组合物混合而口服施用给受试者,以降低所述受试者的血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。

[0122] 除了 β -1,3-葡聚糖外,口服施用的裸藻生物质可进一步包含营养补充剂。营养补充剂可以预先存在于裸藻生物质中或者可以添加到裸藻生物质中。示例性的附加补充剂包括: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。这些附加补充剂可独立地起作用或者与来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖协同地起作用以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0123] 口服施用的裸藻生物质可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素 (HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0124] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖还可以经纯化的形式施用给受试者以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。在一些实施方案中, β -1,3-葡聚糖从裸藻中纯化至大于85%的纯度、大于90%的纯度、大于92%的纯度、大于94%的纯度、大于95%的纯度、大于96%的纯度、大于97%的纯度、大于98%的纯度、或大于99%的纯度。通常, β -1,3-

葡聚糖是通过裂解裸藻细胞并分离 β -1,3-葡聚糖而提取的。可以使用声波降解法或高压匀浆法裂解裸藻细胞。任选地,在裂解步骤期间加入附加化学品以辅助裂解,但这些化学品并不是必需的。在裂解步骤期间加入的示例性附加化学品包括洗涤剂(诸如十二烷基硫酸钠)、酶、碱(诸如氢氧化钠)、或者酸(诸如乙酸或者盐酸)。可以使用过滤法或者重力分离法(诸如重力沉降或者离心)从裂解的裸藻细胞中分离 β -1,3-葡聚糖。为了获得较高的纯度水平,洗涤所分离的 β -1,3-葡聚糖,例如用水溶液或乙醇进行洗涤。

[0125] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可以被改性以增加其降低血清胆固醇水平或血清甘油三酯水平的效力。例如, β -1,3-葡聚糖可以被硫酸化、与吡啶部分缀合、或者与阳离子部分(诸如二甲基乙醇胺(DMAE))缀合。

[0126] 类似于裸藻生物物质,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以可食用组合物(诸如食物产品或膳食补充剂)的形式口服施用,以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以糊剂、散剂、胶囊、片剂、或者液体(诸如悬浮液)的形式提供,并可以单独地施用或者与其他食物产品混合。例如,经纯化的 β -1,3-葡聚糖以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式口服施用。

[0127] 组合物中口服施用的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可进一步包含一种或多种添加的补充剂,例如 α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0128] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可用于药物制剂,所述药物制剂被施用给受试者(诸如人)以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。所述药物制剂可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素(HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡糖酸盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0129] 所述药物制剂可以口服施用给受试者或静脉内施用给受试者以降低血胆固醇水平和/或血甘油三酯水平。口服施用的药物制剂可以固体或液体形式,诸如以片剂、胶囊或糖浆剂形式施用。对于静脉内施用的药物制剂,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖被悬浮或溶解在水溶液诸如盐水溶液中。

[0130] 有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物制剂的施用可在给药方案过程后降低血清胆固醇水平。例如,可以在7天后、14天后、21天后、30天后或60天后测量到血清胆固醇水平的降低。在一些实施方案中,来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用导致在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约5%或更多,在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约10%或更多,在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约15%或更多,在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约20%或更多,在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约25%或更多,在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约30%或更多、或者在30天的有效剂量后血清胆固醇水平降低约35%或更多。

[0131] 类似地,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物制剂的施用可在给药方案过程后降低血清甘油三酯水平。在一些实施方案中,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的施用导致在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约5%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约10%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约15%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约20%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约25%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约30%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约35%或更多,在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约40%或更多、或者在30天的有效剂量后血清甘油三酯水平降低约45%或更多。

[0132] 包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的组合物、包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的药物制剂以及包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的静脉内施用的药物制剂中的每一种以有效剂量施用,以降低血清胆固醇水平和/或血清甘油三酯水平。对于所述组合物或药物制剂中的每一种,这些给药方案通常理解为每kg体重的 β -1,3-葡聚糖的量。在一些实施方案中,所述组合物或药物制剂是以下列有效量施用给受试者的:约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、或者约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多。在一些实施方案中,所述组合物或药物组合物的有效量是约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、或者约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重和约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。如本文所述,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天以多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0133] 在一些实施方案中,所述组合物或药物组合物的有效量是约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,

3-葡聚糖/kg体重至约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、者约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。如本文所述,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0134] 有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者,以降低血清胆固醇水平和/或血清甘油三酯水平。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0135] 调节免疫功能的方法

[0136] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(诸如人)以调节免疫功能。向受试者施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖导致细胞因子产生、抗体滴度和免疫系统细胞活性(例如吞噬的速率和自然杀伤细胞的细胞毒性)可测量的增加,证实了收到调节的免疫功能。施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的受试者还对感染显示增强的响应。

[0137] 可用于调节免疫功能的来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖是通过使用本文所述的方法发酵裸藻而培养的。发酵的裸藻通常依赖于生长培养基,其为生长和 β -1,3-葡聚糖的产生提供营养素。尽管预期裸藻可以在完全光暴露或部分光暴露下生长,但通常优选的是,利用发酵培养的裸藻是异养培养的。在发酵期间,生长的裸藻有效地产生 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约30wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约30wt%至约40wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt% β -1,3-葡聚糖、约60wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、或者约50wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约50wt%至约60wt% β -1,3-葡聚糖或者约50wt%至约55wt% β -1,3-葡聚糖。

[0138] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖以经纯化的形式或未纯化的形式施用给受试者用于调节免疫功能。例如,利用发酵培养的裸藻生物质可以口服施用给受试者以调节免疫功能。由于利用发酵培养的裸藻包含有效量的 β -1,3-葡聚糖,所以即使不纯化 β -1,3-葡聚糖,裸藻生物质也是有效的。这部分地由于由裸藻产生的 β -1,3-葡聚糖的高生物利用度。相反,由酵母产生的 β -葡聚糖与酵母的细胞壁紧密联接,且具有较少量的生物可利用的 β -葡聚糖。

[0139] 裸藻生物质被以可食用组合物的形式提供,所述可食用组合物口服施用以调节免疫功能。所述可食用组合物可以是食物产品或者膳食补充剂。为了辅助施用,裸藻生物质被加工成片状、糊剂、乳膏、散剂、胶囊、片剂、或者任何其他可食用固体或液体(诸如悬浮液),并单独地或者与一些其他食物产品联合施用。例如,在一些实施方案中,裸藻生物质以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式施用。

[0140] 在一个示例性实施方案中,裸藻生物质被干燥已对其进行制备,以用于口服施用。例如,裸藻生物质可以通过以下方式被干燥:冷冻干燥所述生物质,加热所述生物质、或者对所述生物质施加真空,达到约40%或更小、约30%或更小、约25%或更小、约20%或更小、约15%或更小、约10%或更小、约5%或更小、约4%或更小、约3%或更小、约2%或更小、或约1%或更小的水分含量。任选地,在干燥裸藻生物质之前或之后,可以将其加工成粉末。例如,可以将裸藻细胞悬浮在溶液中,通过剪切混合器粉碎,并干燥以产生粉末。粉末状的裸藻生物质可被加工,从而具有以下平均粒度:约1000微米或更小、约900微米或更小、约800微米或更小、约700微米或更小、约600微米或更小、约500微米或更小、约400微米或更小、约300微米或更小、约250微米或更小、约200微米或更小、约100微米或更小、约50微米或更小、约25微米或更小、约15微米或更小、约10微米或更小、约5微米或更小、约3微米或更小、约2微米或更小、约1微米或更小、或者0.5微米或更小。然后,可以将经干燥裸藻生物质的和/或粉末状的裸藻生物质直接或者通过与另一可食用组合物混合而口服施用给受试者,以调节所述受试者的免疫功能。

[0141] 除了 β -1,3-葡聚糖外,口服施用的裸藻生物质可进一步包含营养补充剂。营养补充剂可以预先存在于裸藻生物质中或者可以添加到裸藻生物质中。示例性的附加补充剂包括: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。这些附加补充剂可独立地起作用或者与来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖协同地起作用以调节免疫功能。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0142] 口服施用的裸藻生物质可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂、或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素(HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸

盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0143] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖还可以经纯化的形式施用给受试者以调节功能。在一些实施方案中, β -1,3-葡聚糖从裸藻中纯化至大于85%的纯度、大于90%的纯度、大于92%的纯度、大于94%的纯度、大于95%的纯度、大于96%的纯度、大于97%的纯度、大于98%的纯度、或大于99%的纯度。通常, β -1,3-葡聚糖是通过裂解裸藻细胞并分离 β -1,3-葡聚糖而提取的。可以使用声波降解法或高压匀浆法裂解裸藻细胞。任选地,在裂解步骤期间加入附加化学品以辅助裂解,但这些化学品并不是必需的。在裂解步骤期间加入的示例性附加化学品包括洗涤剂(诸如十二烷基硫酸钠)、酶、碱(诸如氢氧化钠)、或者酸(诸如乙酸或者盐酸)。可以使用过滤法或者重力分离法(诸如重力沉降或者离心)从裂解的裸藻细胞中分离 β -1,3-葡聚糖。为了获得较高的纯度水平,洗涤所分离的 β -1,3-葡聚糖,例如用水溶液或乙醇进行洗涤。

[0144] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可以被改性以增加其作为免疫功能调节剂的效力。例如, β -1,3-葡聚糖可以被硫酸化、与吡啶部分缀合、或者与阳离子部分(诸如二甲基乙醇胺(DMAE))缀合。

[0145] 类似于裸藻生物物质,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以可食用组合物(诸如食物产品或膳食补充剂)的形式口服施用,以调节免疫功能。经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以糊剂、散剂、胶囊、片剂、或者液体(诸如悬浮液)的形式提供,并可以单独地施用或者与其他食物产品混合。例如,经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式口服施用。

[0146] 组合物中口服施用的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可进一步包含一种或多种添加的补充剂,例如 α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0147] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可用于药物制剂,所述药物制剂被施用给受试者(诸如人)以调节免疫功能。所述药物制剂可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂、或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素(HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡

糖酸盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0148] 所述药物制剂可以口服施用给受试者或静脉内施用给受试者以调节免疫功能。还可以设想替代施用途径,诸如通过吸入。口服施用的药物制剂可以固体或液体形式,诸如以片剂、胶囊或糖浆剂形式施用。对于静脉内施用的药物制剂,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖被悬浮或溶解在水溶液诸如盐水溶液中。适用于吸入的药物制剂可以通过例如鼻部喷雾施用。可食用组合物或药物制剂可以与一种或多种药物联合施用以增强变态反应、糖尿病或感染的治疗。例如,可食用组合物或药物制剂可以与抗组胺药、胰岛素或抗生素联合施用。

[0149] 通过施用有效量的来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(诸如通过施用本文所述的可食用组合物或药物制剂)调节受试者的免疫功能提供许多健康益处。可以施用包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的所述组合物或制剂以调节免疫功能用于疾病的治疗或者用于预防性治疗。例如,所述组合物或药物制剂的施用可以用于调节受试者的自身免疫应答、调节受试者的血糖水平、调节受试者的感染、或者调节受试者的炎症。

[0150] 包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)的所述组合物或药物制剂可以施用给受试者(包括人)以调节与糖尿病、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、纤维肌痛、系统性红斑狼疮、肾小球性肾炎、硬皮病或多发性硬化相关的自身免疫应答。在一些实施方案中,可食用组合物或药物组合物被预防性地施用以限制糖尿病、克罗恩氏病、类风湿性关节炎、纤维肌痛、系统性红斑狼疮、肾小球性肾炎、硬皮病、或多发性硬化的进展。

[0151] 如本文所述的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)的组合物或药物制剂还可以施用给受试者以调节所述受试者的血糖水平。在施用包含 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂之后,餐后血糖通常低于不施用 β -1,3-葡聚糖时的血糖。血糖尤其是餐后血糖的调节对于普通糖尿病护理以及I型和II型糖尿病患者的管理是重要的。可以使用A1C测试测定血糖水平,其反应了过去两到三个月的平均血糖水平。具体地,A1C测试测定了包覆糖的(即,糖化的)血红蛋白的百分比。因此,如本文所述的包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物和药物组合物可用于治疗糖尿病患者的高血糖症。在一些实施方案中,如本文所述的包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物制剂被预防性地施用给受试者以限制高血糖症。

[0152] 组合物或药物制剂中的来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)还可以施用给受试者以调节所述受试者的感染,诸如细菌感染、真菌感染或病毒感染。施用本文所述的包含 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂导致先天性免疫功能和适应性免疫功能的活性增加。例如,施用所述组合物或药物制剂导致吞噬性嗜中性粒细胞、自然杀伤细胞的细胞毒性和抗体产生增加。这些受调节的免疫功能中的每一种都影响感染。包含来源于通过发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以施用给具有感染的受试者以治疗感染、或者预防性地施用给受试者以限制感染的风险。由于抗生素抗性细菌(包括甲氧西林耐受性金黄色葡萄球菌(MRSA))的风险,感染的治疗或预防性治疗的这些进步对细菌性感染尤其重要。

[0153] 如本文所述的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)的组合物或药物制剂可以施用给受试者(包括人)以调节所述受试者的炎症。所施用的 β -1,3-葡聚糖起抑制炎症细胞因子的产生的作用,从而导致受试者中受调节的炎症应答。在一些实施方案中,炎症与变态反应或哮喘相关。本文所述的包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以施用给受试者以治疗炎症,诸如变态反应或哮喘。此外,本文所述的包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以预防性地施用给受试者以限制炎症,诸如变态反应或哮喘。

[0154] 包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的组合物、包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的药物制剂以及包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的静脉内施用的药物制剂中的每一种以有效剂量施用以调节免疫功能。对于所述组合物或药物制剂中的每一种,这些给药方案通常理解为每kg体重的 β -1,3-葡聚糖的量。在一些实施方案中,所述组合物或药物制剂是以下列有效量施用给受试者的:约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、或者约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多。在其他实施方案中,用以调节受试者的免疫功能、用以治疗疾病、或用于预防性施用的组合物和药物组合物的有效量可以为:约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、或约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。如本文所述,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0155] 在一些实施方案中,所述组合物或药物组合物的有效量是约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、或者约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。如本文所述,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或

药物制剂可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0156] 有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者以调节免疫功能。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0157] 治疗肠道炎症的方法

[0158] 炎症可以通过 β -1,3-葡聚糖来调节。在近来的研究中,发现裸藻淀粉、来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用抑制小鼠的特应性皮炎样皮肤损伤(J.Vet.Med.Sci.2010,72(2),755-763)。在人类中,特应性皮炎是一种常见的疾病,其以皮肤的慢性复发性炎症为特征,导致皮肤瘙痒、发红、肿胀以及龟裂。特应性皮炎的确切原因是未知的,但可能的因素包括遗传、免疫系统功能障碍和环境暴露。该小鼠研究的作者发现,口服施用裸藻淀粉降低血清中的IL-4和IFN- γ 水平,并且还降低皮肤损伤中的IL-18和IL-12水平。这些结果表明,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可通过激活某些细胞因子途径而抑制小鼠的特应性皮炎样皮肤损伤。然而, β -1,3-葡聚糖调节炎症的确切机理一般而言尚有待阐明。另外, β -1,3-葡聚糖可通过不同途径调节不同身体器官的炎症。

[0159] 肠道炎症可影响所有或部分的消化道。肠道炎症是一类自身免疫病,并且是指小肠、大肠、肠或者它们的任意组合的炎症。肠道炎症的症状包括严重或慢性腹痛、腹泻、突然的体重损失、厌食,以及直肠出血。另外,具有肠道炎症的个体还可具有与胃肠道无关的症状,诸如关节痛、皮疹、眼痛、口腔疼痛,以及发烧。肠道炎症可导致威胁生命的并发症,以及增加个体的结肠癌风险。虽然肠道炎症确切的潜在生理学原因是未知的,但通常认为遗传和环境因素改变个体的免疫应答使得产生异常免疫应答。

[0160] 炎性肠病是大肠和小肠的一组炎性病症,包括结肠炎和克罗恩氏病。克罗恩氏病影响肠壁的总厚度,然而结肠炎被限制到结肠的上皮层。结肠炎的具体例子包括溃疡性结肠炎、镜下结肠炎、淋巴细胞性结肠炎、胶原性结肠炎、改道性结肠炎、化学性结肠炎、缺血性结肠炎以及感染性结肠炎。如本文所述, β -1,3-葡聚糖治疗肠道炎症的用途同样是指 β -1,3-葡聚糖治疗炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病的用途。同样如本文所述, β -1,3-葡聚糖治疗肠道炎症的用途同样是指 β -1,3-葡聚糖预防性地治疗肠道炎症的用途。类似地,如本文所述, β -1,3-葡聚糖预防性地治疗肠道炎症的用途同样是指 β -1,3-葡聚糖预防性地治疗炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病的用途。

[0161] 溃疡性结肠炎是炎性肠病(IBD)的主要形式之一。其是引起结肠内衬的炎症和溃疡的慢性疾病。尽管其他主要形式,即克罗恩氏病最通常地影响小肠的末端(回肠)和结肠的开端,但溃疡性结肠炎通常限于结肠。溃疡性结肠炎通常进展缓慢并可随时间变得更糟。症状可从轻微到严重。大部分人具有可持续数周或数年的缓解期。尽管没有研究人结肠炎的理想动物模型,但在各种化学诱导的结肠炎动物模型中,葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结

肠炎模型是最广泛使用的,因为其简易性和主要与人溃疡性结肠炎的许多相似性。(Comp.Clin.Pathol.2010,19,235-239)。

[0162] DSS主要影响大肠,特别是结肠的中间和远侧三分之一。肠上皮屏障的扰乱以及由此内腔细菌或细菌抗原进入粘膜和免疫激活是人结肠炎的主要事件。类似的现象出现在DSS结肠炎中,但在该情况下,对结肠上皮有直接毒性的硫酸化多糖使上皮细胞损伤,且所导致的免疫应答改变整个结肠上皮的粘膜屏障功能。在它们的饮用水中将DSS施用给小鼠一段时间导致相当可重现的急性炎症的诱导,该急性炎症限于结肠且特征在于溃疡、隐窝缺失和粒细胞的浸润。DSS结肠炎模型还已经用于广泛研究与结肠炎症相关的结肠癌形成,诸如发生在患有长期存在的溃疡性结肠炎的患者中的结肠癌形成。虽然DSS诱导的结肠炎主要是在不存在适应性免疫下,由上皮的破坏和巨噬细胞和中性粒细胞的激活引起,但T细胞应答可加重炎症应答。事实上,强的T细胞应答与人溃疡性结肠炎有关。因此,使用DSS模型在啮齿动物中测试的组合物或者药物的阳性治疗转归可表明人溃疡性结肠炎治疗的治疗价值。重要地,如果药剂具有抗炎性质并产生免于DSS诱导的结肠炎的保护,则该药剂在其他IBD中可具有治疗价值。

[0163] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖(例如,裸藻生物质、来自裸藻的 β -1,3-葡聚糖、或者来自裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或者它们的组合)可以施用给受试者(包括人)以治疗肠道炎症、或者预防性地施用给处于肠道炎症风险的受试者。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖可以施用给受试者(包括人)以治疗炎性肠病。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖可以施用给受试者(包括人)以治疗结肠炎。来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖可以施用给受试者(包括人)以治疗克罗恩氏病。处于肠道炎症风险的人可包括但不限于先前已经诊断为肠道炎症的人、或者一个或更多个近亲具有肠道炎症的人。

[0164] 如本文所述,施用来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖防止化学诱导的结肠炎(见实施例12-19)。这种施用可以是口服的,诸如通过施用可食用组合物或者口服药物制剂、或者可以是静脉内的,诸如通过施用静脉内药物制剂。还可以设想替代施用途径,诸如通过吸入。口服的可食用组合物或者口服的药物制剂包含本文所述的来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的或未纯化的 β -1,3-葡聚糖。通常,静脉内药物制剂包含来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖。通常,适用于吸入的药物制剂包含来源于利用发酵培养的裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖,并且可以通过例如鼻部喷雾施用。可食用组合物或药物制剂可以与一种或多种抗炎药、免疫抑制药物或抗生素联合施用以强化肠道炎症的治疗。合适的药物的例子包括但不限于美沙拉秦、布地奈德、环孢霉素以及英夫利昔。

[0165] 可用于产生用于治疗肠道炎症的 β -1,3-葡聚糖的发酵的裸藻通常依赖于生长培养基,所述生长培养基为生长和 β -1,3-葡聚糖的产生提供营养素。尽管预期裸藻可以在完全光暴露或部分光暴露下生长,但通常优选的是,利用发酵培养的裸藻是异养培养的。在发酵期间,生长的裸藻有效地产生 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约30wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约30wt%至约40wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt% β -1,3-葡聚糖、约60wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、或者约50wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻细胞积累以下量的 β -1,3-葡聚糖:约50wt%至约60wt% β -1,3-葡聚糖或者约50wt%至约

55wt% β -1,3-葡聚糖之。

[0166] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖以经纯化的形式或未纯化的形式施用给受试者用于治疗肠道炎症。例如,利用发酵培养的裸藻生物质可以口服施用给受试者以治疗肠道炎症。由于利用发酵培养的裸藻包含有效量的 β -1,3-葡聚糖,所以即使不纯化 β -1,3-葡聚糖,裸藻生物质对治疗肠道炎症也是有效的。这部分地由于通过发酵培养的裸藻产生的 β -1,3-葡聚糖的高生物利用度。具体地,来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖积聚在水不溶性颗粒中,并且不与细胞壁组分联接。相反,由酵母产生的 β -葡聚糖与酵母的细胞壁紧密联接,且具有较少量生物可利用 β -葡聚糖。在一些实施方案中,对于使用本文所述的方法治疗受试者的肠道炎症而言,包含未纯化的 β -1,3-葡聚糖的经干燥的裸藻生物质比经纯化的 β -1,3-葡聚糖更有效。

[0167] 裸藻生物质被提供在可食用组合物中,所述可食用组合物被口服地施用以治疗肠道炎症。所述可食用组合物可以是食物产品或者膳食补充剂。为了辅助施用,裸藻生物质被加工成片状、糊剂、乳膏、散剂、胶囊、片剂、或者任何其他可食用固体或液体(诸如悬浮液),并单独地或者与一些其他食物产品联合施用。例如,在一些实施方案中,裸藻生物质可以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式施用。

[0168] 在一个示例性实施方案中,裸藻生物质被干燥以对其进行制备,用于口服施用。例如,裸藻生物质可以通过以下方式被干燥:冷冻干燥所述生物质,在烘箱、双滚筒干燥器或类似的干燥设备中加热所述生物质、或者对所述生物质施加真空,达到约40%或更小、约30%或更小、约25%或更小、约20%或更小、约15%或更小、约10%或更小、约5%或更小、约4%或更小、约3%或更小、约2%或更小、或约1%或更小的水分含量。任选地,在干燥裸藻生物质期间或之后,所述生物质被加工成粉末。例如,将裸藻细胞干燥,然后通过剪切混合器或锤式研磨机粉碎,以产生粉末。在一些实施方案中,粉末状的裸藻生物质被加工成以下平均粒度:约1000微米或更小、约900微米或更小、约800微米或更小、约700微米或更小、约600微米或更小、约500微米或更小、约400微米或更小、约300微米或更小、约250微米或更小、约200微米或更小、约100微米或更小、约50微米或更小、约25微米或更小、约15微米或更小、约10微米或更小、约5微米或更小、约3微米或更小、约2微米或更小、约1微米或更小、或者约0.5微米或更小。在一些实施方案中,在干燥裸藻生物质之前,将裸藻细胞破碎或裂解。例如,可以在干燥之前将裸藻细胞悬浮在水溶液中,暴露于使细胞破裂的高剪切力,然后干燥。任选地,可如上所述的进一步研磨经干燥的生物质,以获得约1000微米或更小的平均粒度。然后,可将经干燥的裸藻生物质和/或粉末状的裸藻生物质直接或者通过与另一可食用组合物混合而口服施用给受试者,以治疗所述受试者的肠道炎症。

[0169] 除了 β -1,3-葡聚糖外,口服施用的裸藻生物质可进一步包含营养补充剂。营养补充剂可以预先存在于裸藻生物质中或者可以添加到裸藻生物质中。例如,附加补充剂可包括金属、氨基酸、酶、益生菌、脂肪酸、低聚糖、维生素以及免疫刺激物。示例性的附加补充剂包括: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨

木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。这些附加补充剂可独立地起作用或者与来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖协同地起作用以治疗肠道炎症。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0170] 口服施用的裸藻生物质可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂、或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素 (HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0171] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖还可以经纯化的形式施用给受试者以治疗肠道炎症。在一些实施方案中, β -1,3-葡聚糖从裸藻中纯化至大于85%的纯度、大于90%的纯度、大于92%的纯度、大于94%的纯度、大于95%的纯度、大于96%的纯度、大于97%的纯度、大于98%的纯度、或大于99%的纯度。通常, β -1,3-葡聚糖是通过裂解裸藻细胞并分离 β -1,3-葡聚糖而提取的。可以使用声波降解法或高压匀浆法裂解裸藻细胞。任选地,在裂解步骤期间加入附加化学品以辅助裂解,但这些化学品并不是必需的。在裂解步骤期间加入的示例性附加化学品包括洗涤剂(诸如十二烷基硫酸钠)、酶、碱(诸如氢氧化钠)、或者酸(诸如乙酸或者盐酸)。可以使用过滤法或者重力分离法(诸如重力沉降或者离心)从裂解的裸藻细胞中分离 β -1,3-葡聚糖。为了获得较高的纯度水平,洗涤所分离的 β -1,3-葡聚糖,例如采用水溶液或乙醇进行洗涤。

[0172] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可以被改性以增加其治疗肠道炎症的效力。例如, β -1,3-葡聚糖可以被硫酸化、与吡啶部分缀合、或者与阳离子部分(诸如二甲基乙醇胺(DMAE))缀合。

[0173] 类似于裸藻生物质,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以可食用组合物(诸如食物产品或膳食补充剂)的形式口服施用,以治疗肠道炎症。经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以糊剂、凝胶、散剂、胶囊、片剂、或者液体(诸如悬浮液)的形式提供,并可以单独地施用或者与其他食物产品混合。例如,经纯化的 β -1,3-葡聚糖以饮料(诸如营养混合饮料)形式,以营养棒形式,以烘焙食品形式、或者以谷类食品形式口服施用。

[0174] 组合物中口服施用的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可进一步包含一种或多种添加的补充剂,例如 α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄

叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物,以及紫檀芪。附加组分包括雨生红球藻、虾青素和初乳中的任一者。

[0175] 经纯化的 β -1,3-葡聚糖还可用于药物制剂,所述药物制剂被施用给受试者(诸如人)以治疗肠道炎症。所述药物制剂可进一步包含药学可接受的赋形剂。示例性的药学可接受的赋形剂包括填充剂、粘合剂、包衣剂、防腐剂、润滑剂、调味剂、甜味剂、着色剂、表面活性剂、溶剂、缓冲剂、螯合剂、或稳定剂。药学可接受的填充剂的例子包括纤维素、磷酸氢钙、碳酸钙、微晶纤维素、蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、麦芽糖醇、预胶化淀粉、玉米淀粉,以及马铃薯淀粉。药学可接受的粘合剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、乳糖、木糖醇、山梨醇、麦芽糖醇、明胶、蔗糖、聚乙二醇、甲基纤维素,以及纤维素。药学可接受的包衣剂的例子包括羟丙甲纤维素(HPMC)、虫胶、玉米醇溶蛋白,以及明胶。药学可接受的崩解剂的例子包括聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素和羟基乙酸淀粉钠。药学可接受的润滑剂的例子包括聚乙二醇、硬脂酸镁和硬脂酸。药学可接受的防腐剂的例子包括对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸,以及山梨酸。药学可接受的甜味剂的例子包括蔗糖、糖精、天冬甜素或山梨醇。药学可接受的缓冲剂的例子包括碳酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、醋酸盐、磷酸盐或酒石酸盐。

[0176] 所述药物制剂可以口服施用给受试者或静脉内施用给受试者以治疗肠道炎症。口服施用的药物制剂可以固体或液体形式,诸如以片剂、胶囊或糖浆剂形式施用。对于静脉内施用的药物制剂,来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖被悬浮或溶解在水溶液诸如盐水溶液中。

[0177] 有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物制剂的施用可在给药方案过程后治疗肠道炎症。例如,可以在7天后、14天后、21天后、30天后或60天后测得与肠道炎症相关的症状的减轻。与肠道炎症相关的症状的减轻包括腹痛减轻、腹泻减轻、体重损失减少、厌食减轻,以及直肠出血减轻。这些症状可以通过体重、大便稠度、便血以及结肠长度来测定。与肠道炎症相关的症状的减轻还可以通过由病理学确定的降低的免疫细胞浸润和结肠损伤来确定。如本文所述,施用来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖导致在30天的有效剂量后腹痛减轻、腹泻减轻、体重损失减少、厌食减轻,和/或直肠出血减轻。在一些实施方案中,施用来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖导致在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约5%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约10%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约15%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约20%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约25%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约30%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约35%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约40%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约45%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约50%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约55%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约60%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约65%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约70%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约75%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约80%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症

相关的症状减轻约85%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约90%或更多、在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约95%或更多、或者在30天的有效剂量后与肠道炎症相关的症状减轻约99%或更多。

[0178] 另外,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物制剂的施用可在给药方案过程后增加抗炎细胞因子产生。例如,IL-10与限制和终止炎症应答有关(Asadullah,K.等人,Pharm.Rev.2003,55,241-269)。另外的抗炎细胞因子包括IL-1受体拮抗剂、IL-4、IL-6,以及IL-11和IL-13。IL-1、肿瘤坏死因子- α 和IL-18的特异性细胞因子受体可用作促炎细胞因子抑制剂(Opa1,S.M.等人,CHEST 2000,117,1162-1172)。

[0179] 例如,可以在例如7天后、14天后、21天后、30天后或60天后测得抗炎细胞因子产生增加。个体中抗炎细胞因子产生增加可以通过例如分析从个体中获得的血液或组织样品来确定。在一些实施方案中,施用来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖导致在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约5%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约10%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约15%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约20%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约25%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约30%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约35%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约40%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约45%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约50%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约55%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约60%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约65%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约70%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约75%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约80%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约85%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约90%或更多、在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约95%或更多、或者在30天的有效剂量后抗炎细胞因子产生增加约100%或更多。

[0180] 包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的组合物、包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服施用的药物制剂以及包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的静脉内施用的药物制剂中的每一种以有效剂量施用以治疗肠道炎症。对于所述组合物或药物制剂中的每一种,这些给药方案通常理解为每kg体重的 β -1,3-葡聚糖的量。在一些实施方案中,所述组合物或药物制剂是以下列有效量施用给受试者的:约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多、或者约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重或更多。在一些实施方案中,所述组合物或药物组合物的有效量是约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体

重、约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.2mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约15mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约0.5mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约10mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重、或者约25mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约75mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。如本文所述,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者。在一些实施方案中,有效量的所述组合物或药物制剂可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的组合物或药物制剂可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0181] 有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物或药物制剂可以每天一次施用给受试者以治疗肠道炎症。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每天作为多个剂量施用给受试者,例如,每天两次或者更大频率、每天三次或更大频率、或者每天四次或更大频率。在一些实施方案中,有效量的包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的可食用组合物或药物组合物可以每周一次或更大频率、每周两次或更大频率、每周三次或更大频率、每周四次或更大频率、每周五次或更大频率、或者每周六次或更大频率施用给受试者。

[0182] 与痕量金属的络合物

[0183] 在一些实施方案中, β -葡聚糖可以与痕量金属络合以产生络合物,所述络合物在促进全身性免疫系统活动时还同时用于提高痕量金属的生物利用度。痕量金属包括铜、锌、铁、钴、镁、钼、锰、锂、铬、镍、钒、硒,以及它们的组合。 β -葡聚糖和痕量金属的络合物可以是使可溶的无机痕量金属盐与 β -葡聚糖在溶液中络合的结果。

[0184] β -葡聚糖多糖可包括生物可利用的形式的 β -葡聚糖(诸如存在于干或湿的全细胞藻类悬浮液中的裸藻淀粉颗粒,或存在于干或湿的全细胞酵母中的 β -葡聚糖)、或者来自藻类、酵母或其他有机体的提取的 β -葡聚糖源。所述多糖可以包含在一个或更多个无菌生物反应器中异养培养的纤细裸藻的悬浮液或糊状物。裸藻还可以最佳方式培养,使得藻产品的 β -葡聚糖部分占大于20%的藻生物质,以干重计。图5和6中示出了用于培养和产生这种产品的过程的例子。

[0185] 参照图25,示出了发酵过程的实施方案。藻生物质是在无菌条件下在发酵罐(1)中在化学成分确定的培养基上生产的。在发酵罐(1)中经所需时间量后,将发酵罐的发酵液转移到离心机(2)中,该离心机使发酵液脱水以产生两种过程物流(process streams):包含约75%水分的湿藻糜(meal);和所使用的培养基。湿藻糜包含全藻细胞、藻细胞碎片和多糖颗粒的混合物。湿藻糜可以是多糖溶液,其包含以干重计大于50%的不可消化的多糖 β -葡聚糖。将湿藻糜转移到混合器(3),诸如混合罐或能够混合的任何设备(例如螺条混合机)。任选地,可以通过添加酸或碱(A)调节多糖溶液的pH。

[0186] 可溶性金属盐(B)的浓缩溶液(诸如 $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)可以添加到混合器(3)并与多糖溶液剧烈混合1-120分钟。可以使用任何水溶性金属盐(B)。例如,金属盐(B)可以与 β -葡聚糖

混合,使得最终产物可以是铜多糖络合物、锌多糖络合物、铁多糖络合物、钴多糖络合物、镁多糖络合物、锰多糖络合物,以及它们的组合。可溶性金属盐(B)的溶液的制备可涉及在搅拌下加热金属盐(B)在水中的混合物。任选地,该混合器(3)可以被加热或冷却。任选地,混合器(3)可以加热到对材料进行巴氏消毒并使酶活性失活所需要的温度。当多糖溶液和金属盐(B)的溶液混合时,在金属离子和存在于湿藻糜中的多糖之间会出现一定量络合,使得最终产物可以被认为是金属多糖络合物。

[0187] 在所需量的混合之后,将混合物转移到脱水机(4),该脱水机是能够干燥材料的任何设备。例如,脱水机(4)可以是盘式干燥器、带式干燥器、旋转滚筒干燥器等。一旦材料包含小于10%水分,其就被转移到将其粒度降低至小于500 μm 的研磨机(5)中。更优选地,其粒度被降低至小于250 μm 。一旦材料被磨碎,其就被装入(6)合适大小并加贴标签的容器中。任选地,可以省去金属盐(B)的溶液往湿藻糜的添加,并且所得产物会是藻糜。

[0188] 参照图26,示出了发酵过程的另一实施方案。藻生物质是在无菌条件下在发酵罐(7)中在化学成分确定的培养基上生产的。任选地,藻生物质可以在非无菌条件下,使用任何培养基在生长罐中进行生产,所述培养基仅包含饲料级材料并且不含有害物质(例如,重金属、毒素、危险化学品)。在发酵罐或生长罐(7)中经所需量的时间后,将发酵罐的发酵液转移到混合器(8),诸如混合罐或能够提供混合的任何设备(例如,螺条混合机)。发酵罐的发酵液包含全藻细胞、藻细胞碎片和多糖颗粒的混合物。在非无菌生长罐的情况下,还可以存在低水平的非藻生物质。

[0189] 任选地,发酵罐的发酵液的pH是通过将酸或碱化学品(C)添加到混合器(8)以裂解细胞来调节的,从而将大多数多糖颗粒从细胞内释放出。这可以通过向发酵罐的发酵液添加碱(例如,NaOH)来完成。任选地,发酵液还可以通过高压匀浆器或超声细胞破碎仪进行机械加工以裂解细胞。任选地,可以将发酵液调节至碱性pH,然后在离心分离之前中和。在足够时间(大多数(如果不是全部的话)细胞被裂解)之后,将所得混合物转移到离心机(9),该离心机使发酵液脱水以产生两种过程物流:粗多糖溶液(D);以及其他生物质材料的混合物(E)。

[0190] 将粗多糖溶液(D)转移到混合器(10),诸如混合罐或能够提供混合的任何设备(例如螺条混合机)。粗多糖溶液(D)可以任选地采用水或适合的醇(乙醇、异丙醇)洗涤以去除非多糖材料。可以采用适于去除非多糖材料的任何化学品来进行附加洗涤。可任选地采用酸或碱(F)来调节粗多糖溶液(D)的pH。

[0191] 制备可溶性金属盐(G)的浓缩溶液(诸如 $\text{ZnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$)并添加到混合罐(10)并且与多糖溶液剧烈混合1-120分钟。可以使用任何水溶性金属盐,使得最终产物可以是例如铜多糖络合物、锌多糖络合物、铁多糖络合物、钴多糖络合物、镁多糖络合物或锰多糖络合物。可溶性金属盐溶液的制备可涉及在搅拌下加热金属盐在水中的混合物。任选地,该混合器(10)可以被加热或冷却。任选地,混合器(10)可以加热到对材料进行巴氏消毒并使酶活性失活所需的温度。当多糖溶液和金属盐溶液混合时,在金属离子和所存在的多糖之间会出现一定量络合,使得最终产物可以被认为是金属多糖络合物。

[0192] 在所需量的混合之后,将混合物转移到脱水机(11),该脱水机是能够干燥材料的任何设备。例如,脱水机(11)可以是盘式干燥器、带式干燥器、旋转滚筒干燥器等。一旦材料包含小于10%水分,其就被转移到将其粒度降低至小于500 μm 的研磨机(12)中。更优选地,

其粒度被降低至小于250 μm 。一旦材料被磨碎,其就被装入(13)合适大小并加贴标签的袋中。

[0193] 非多糖材料(E)包含部分水解的蛋白质和氨基,并被转移到混合器(14),诸如混合罐或能够提供混合的任何设备(例如,螺条混合机)。可以任选地采用酸或碱(H)调节非多糖材料(E)的pH。制备可溶性金属盐(I)的浓缩溶液(诸如 $\text{ZnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$)并添加到混合器(14)并且与富含氨基酸的材料剧烈混合1-120分钟。可以使用任何水溶性金属盐使得最终产物可以是例如蛋白铜、蛋白锌、蛋白铁、蛋白钴、蛋白镁、蛋白锰,以及它们的组合。可溶性金属盐溶液的制备可涉及在搅拌下加热金属盐在水中的混合物。任选地,混合器(14)可以被加热或冷却。任选地,混合器(14)可以加热到对材料进行巴氏消毒并使酶活性失活所需的温度。当非多糖溶液和金属盐溶液混合时,在金属离子和部分水解的蛋白质以及氨基酸之间会出现一定量络合,使得最终产物可以被认为是金属蛋白盐。

[0194] 在所需量的混合之后,将混合物转移到脱水机(15),该脱水机是能够干燥材料的任何设备。例如,脱水机(15)可以是盘式干燥器、带式干燥器、旋转滚筒干燥器,多效蒸发器等。一旦材料包含小于10%水分,其就被转移到将其粒度降低至小于500 μm 的研磨机(16)中。更优选地,其粒度被降低至小于250 μm 。一旦材料被磨碎,其就被装入(17)合适大小并加贴标签的袋中。任选地,可以省去金属盐溶液往每个过程物流(D、E)的添加,且所得产物会是相对纯的多糖和部分水解的蛋白糜。

[0195] 将痕量金属和 β -葡聚糖络合的优势包括痕量金属的生物利用度增加以及 β -葡聚糖的免疫系统调节方面。例如, β -葡聚糖在肠道中难消化,且可防护痕量金属免于与激动剂结合直至其在肠中释放。

[0196] 此外,因为饮食中通常需要一些微量元素(诸如锌)以获得最佳免疫系统功能,所以,在混合到动物饲料或维生素预混共混物中的一些情况下,相较于将相同的痕量金属与诸如氨基酸或蛋白质的其他源(其也可以作为单独的产品提供)联合,与免疫增强化合物(诸如 β -葡聚糖)联合是优选的。所述过程表明裸藻来源的 β -葡聚糖结合或吸收足够浓度的锌和其他痕量金属从而递送动物饮食中的显著浓度的痕量金属的能力。

[0197] 金属 β -葡聚糖络合物的一些实施方案包括选自以下组中的成员:铜 β -葡聚糖络合物、锌 β -葡聚糖络合物、铁 β -葡聚糖络合物、钴 β -葡聚糖络合物、镁 β -葡聚糖络合物、钼 β -葡聚糖络合物、锰 β -葡聚糖络合物,以及它们的组合。

[0198] 尽管可以使用任何包含微量矿物质的无机盐,但盐的一些例子包括已经商业化用作饲料成分的那些商品。此类无机盐的例子包括但不限于金属硫酸盐、金属氧化物、金属氯化物、水合的金属盐、金属乙酸盐、金属溴化物、金属碘化物、金属磷酸盐、金属亚硒酸盐,以及它们的组合,其中所述盐的一部分可包含铁、镁、锂、锌、铜、铬、镍、钴、钒、钼、锰、硒、钨、碘以及它们的组合。

[0199] 在一些实施方案中,所得的金属多糖络合物包含3%至25%重量的金属和至少25%重量的 β -葡聚糖。在某些情况下,该产物的多糖部分可以包含至少50%重量的 β -葡聚糖。在某些情况下,该产物的多糖部分可以包含约50%至60%重量的 β -葡聚糖。硫酸锌或氧化锌可以用作包含微量矿物质的盐以制备锌 β -葡聚糖络合物,其中所述锌 β -葡聚糖络合物可包含以干重计至少1%重量的锌,其可以以在动物饮食中小于3%重量的总含量施用。

[0200] 在某些情况下,所述产物的多糖部分包含约30wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约

30wt%至约40wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt% β -1,3-葡聚糖、约60wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、或约50wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,所述产物的多糖部分可以包含约50wt%至约60wt% β -1,3-葡聚糖、或约50wt%至约55wt% β -1,3-葡聚糖。

[0201] 生产包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物的方法

[0202] 裸藻是绿藻属,其自然生长并在光合作用状态下复制,从而依赖阳光生存。然而,大规模培养利用光合作用生长的裸藻是困难的且没有成本效益。此外,利用光合作用生长的裸藻产生低得多的量的 β -葡聚糖(即,小于总裸藻细胞质量的20%)。因此,可用于本文所述的方法和组合物的裸藻是通过在大型发酵罐中发酵培养的。通常,发酵的裸藻培养物是在很少或没有环境光下异养培养的,依赖于所提供的营养素来合成 β -1,3-葡聚糖和其他细胞组分。与天然存在或光合作用的裸藻培养物相比,利用发酵培养的裸藻可生长至更大的细胞密度,从而产生更大量的 β -1,3-葡聚糖。本文所述的发酵的裸藻可以使用US2013/0303752中所述的方法获得。

[0203] 优选地,可用于本文所述的方法的裸藻在受控环境中培养,使得裸藻仍是所述环境中的主要微生物。任何有机体的受控生长都是困难的,因为许多污染性有机体能够竞争相同的生物资源(例如,营养素、微量营养素、矿物质,和/或有机能量)。这些微生物中的许多具有更快的生长速度并且能够淘汰缺乏几个受控生长机制(所述受控生长机制有利于裸藻)的裸藻。这些生长机制可包括一种或多种方法,诸如有利于裸藻的生长培养基的应用、在有利于裸藻的温度下操作、有利于裸藻的pH水平、对非裸藻的竞争有机体有毒的化合物的添加,以及裸藻的选择性过滤或分离。这些方法中的每一个影响裸藻的生长速度和将能量转化为 β -1,3-葡聚糖的能力。通常,在不受控环境下生长的裸藻不会显示在更受控生长环境下产生的裸藻会显示的相同有益性质,即高 β -1,3-葡聚糖浓度、快速生长速度和 β -1,3-葡聚糖的有效产生。

[0204] 为了获得有效地产生 β -1,3-葡聚糖的有成本效益的大规模裸藻培养物,有机体通常在大型需氧发酵罐中培养。生长培养基提供碳源、氮源以及用于裸藻生长和 β -1,3-葡聚糖产生的其他生长营养素。小心地控制培养基、收获时间表和发酵条件以确保最佳的 β -1,3-葡聚糖产生。在一些实施方案中,该生产方法产生大量裸藻,所述裸藻具有约30wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约30wt%至约40wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt% β -1,3-葡聚糖、约50wt%至约60wt% β -1,3-葡聚糖、约60wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖、或约50wt%至约70wt% β -1,3-葡聚糖。

[0205] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的有效生产以几种方式降低了 β -1,3-葡聚糖生产的成本。第一,由裸藻产生的 β -1,3-葡聚糖不包含在有机体的细胞壁中,且无需如用来产生 β -葡聚糖的其他已知有机体所需的精细和/或昂贵的分馏方法或提取工艺。第二,裸藻有机体相对大,且可以通过应用离心机、过滤器或其他分离设备从水中较快地分离。第三,与其他有机体相比,各个裸藻细胞含有更高百分比的 β -1,3-葡聚糖(作为总细胞质量的百分比),这导致容易回收 β -1,3-葡聚糖。在一些实施方案中,裸藻培养是通过光暴露来补充的。

[0206] 裸藻的发酵培养

[0207] 可用于本文所述的组合物和方法的来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖是通过利用发酵

培养裸藻产生的。通常,生长培养基被提供给裸藻,使得培养物异养培养。然而,预期裸藻可以在至少部分暴露于光下培养。当裸藻异养发酵而不是利用光合作用培养时, β -1,3-葡聚糖的大规模生产实质上更有成本效益,这部分地由于藻类的光合作用生长条件的大规模设施和利用发酵培养期间可获得的细胞密度增加。

[0208] 本文以及美国专利公开2013/0303752描述了利用发酵培养裸藻的示例性方法。这些有效且有成本效益的方法允许用于本文所描述的方法和组合物的裸藻的培养,包括来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的产生,其可以裸藻生物物质的形式施用或进一步纯化。例如,裸藻生物物质可以用于可食用组合物。来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以作为可以口服或静脉内施用的可食用组合物或药物制剂施用。

[0209] 利用发酵培养的裸藻是使用生长培养基培养的。生长培养基向生长的裸藻培养物提供营养素,包括碳源、氮源和其他微量营养素。生长培养基还包括用以维持生长培养基的pH的缓冲剂。为了防止不需要的有机体(诸如细菌)的生长,生长培养基在被添加到发酵罐之前被灭菌。例如,生长培养基可以使用过滤器、蒸汽、高压灭菌或它们的组合来灭菌。任选地,培养基的不同组分单独存放用以防止存放期间形成完全生长培养基和防止生长培养基的污染。

[0210] 发酵的裸藻依赖于存在于生长培养基中的碳源。示例性碳源包括葡萄糖、右旋糖或其他糖;乙酸盐;或乙醇。在一些实施方案中,裸藻在具有以下浓度的碳源的生长培养基中培养:约50g/L或更小、约40g/L或更小、约30g/L或更小、约25g/L或更小、约20g/L或更小、约15g/L或更小、约10g/L或更小、约5g/L或更小、约4g/L或更小、约3g/L或更小、约2g/L或更小、约1g/L或更小、约0.5g/L或更小、或者约0.1g/L或更小。任选地,在培养过程期间用额外的碳源补充生长培养基。例如,在裸藻培养物生长期间,碳源可以添加到生长培养基两次或更多次,添加到生长培养基三次或更多次、或添加到生长培养基四次或更多次。碳源可以半连续地添加。碳源还可以持续地添加到生长培养基。

[0211] 可用于通过发酵培养裸藻的生长培养基还包括氮源,诸如氢氧化铵、氨气、硫酸铵、或谷氨酸盐。在一些实施方案中,生长培养基包含约0.1g/L至约3g/L氮源、约0.2g/L至约2g/L氮源、或约0.5g/L至约1g/L氮源。优选地,氮源是氢氧化铵。

[0212] 生长培养基进一步包含裸藻培养物所需的附加营养素。例如,生长培养基可包含磷酸钾(诸如约0.25g/L至约5g/L磷酸钾、约0.5g/L至约4g/L磷酸钾、或约1g/L至约3g/L磷酸钾)、硫酸镁(诸如约0.25g/L至约5g/L硫酸镁、约0.5g/L至约4g/L硫酸镁、或约1g/L至约3g/L硫酸镁)、氯化钙(诸如约0.005g/L至约0.5g/L氯化钙、约0.01g/L至约0.4g/L氯化钙、或0.1g/L至约0.25g/L氯化钙)、或包含微量营养素的痕量金属原液。

[0213] 维持生长培养基的pH允许有效的 β -1,3-葡聚糖产生、裸藻细胞生长,并有助于限制不需要的细菌的生长。约3至约4的pH有利于裸藻,但对大部分细菌而言提供低于最佳的生长条件。在一些实施方案中,生长培养基的pH为约2至约7、约2至约6、约3至约5、约3至约4、或约3至约3.5。缓冲剂(例如柠檬酸盐和/或柠檬酸)可以包含在生长培养基中以将生长培养基的pH维持在期望的范围。

[0214] 可以通过几种方式获得或维持生长培养基的期望的pH。生长培养基的pH可以手动监控,且定期手动添加酸或碱以达到生长培养基的期望的pH。替代地或额外地,可以采用连接到自动控制系统的pH传感器来测量生长培养基的pH,且自动控制系统控制泵、料斗、或自

动地添加酸或碱以达到生长培养基的期望的pH的其他装置,所述生长培养基的期望的pH被编程到自动控制系统。在一些实施方案中,裸藻的代谢过程足够将生长培养基的pH调节在期望的范围内。

[0215] 为了在发酵期间向裸藻提供充足氧气,生长培养基可任选地充氧至例如约0.5mg/L至约4mg/L氧、约1mg/L至约3mg/L氧、或约2mg/L氧。细胞培养基可以在被添加到发酵罐之前充氧,或者发酵的裸藻培养物可以被混合以促进环境氧溶入生长培养基中。

[0216] 用于发酵裸藻的系统可包括一个或更多个生物反应器。裸藻培养物在生物反应器中培养至特定细胞密度或特定时长,然后培养物被收获或者用于接种到更大的生物反应器。任选地,裸藻培养物的一部分可以保留在生物反应器中以接种到被添加到该生物反应器的新鲜生长培养基。利用发酵培养的裸藻可以以多级方法培养,这可能需要两个或更多个、三个或更多个、或者四个或更多个生物反应器,其中较早的生物反应器的内容物被转移到随后的生物反应器并在其中稀释。在发酵裸藻的另一例子中,裸藻细胞培养物是使用分批补料方法培养的,其中随着裸藻培养物生长,新鲜生长培养基或特定培养基组分被连续添加到生物反应器。重复分批方法也可以用于发酵裸藻,其中裸藻培养物以规则的间隔收获或者连续收获并用新鲜生长培养基替换。

[0217] 在一个例子中,裸藻在单个生物反应器或者发酵罐中培养。细胞生长培养基被添加到生物反应器并接种裸藻培养物。裸藻培养物可以是例如来自不同生物反应器的培养物或者选自培养板的裸藻集落。在一些实施方案中,单个生物反应器为约100升或更大、约200升或更大、约300升或更大、约500升或更大、约750升或更大、或者约1000升或更大。在一些实施方案中,单个生物反应器为约100升或更大、约200升或更大、约300升或更大、约500升或更大、约750升或更大、约1,000升或更大、约5000升或更大、约10000升或更大、约15000升或更大、或者约20000升或更大。在收获之前,裸藻在生物反应器中发酵。

[0218] 裸藻培养物还可采用多级发酵法生长,其中依次使用多个生物反应器。在多级发酵法中,相比先前的生物反应器中的生物反应器,每个生物反应器具有较大生物反应器体积。裸藻培养物在第一个中生长以达到一定细胞密度。然后将培养物用于接种下一顺次的生物反应器。

[0219] 图2示出了形成可用于本文所公开的方法和组合物的、来源于以多级方法利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的示例性实施方案的概观。图3示出了可以用于以多级方法利用发酵培养裸藻的示例性生物反应器。在200,生长培养基被添加到第一生物反应器级并接种裸藻细胞。第一生物反应器级可以是例如可用于起子培养物的任何较小容器,例如锥形烧瓶或斜面,所述锥形烧瓶或斜面通过在旋转或旋涡振动台或磁力搅拌棒上的表面扩散而充氧。图3示出了在该图中标识为“斜面”的第一生物反应器的一个实施方案。可以使用加热台加热第一生物反应器。第一生物反应器还可具有气候受控环境。加热振动台(诸如New Brunswick Scientific Innova 4000 Heated Desktop Incubator)是通过提供充分运动以搅拌生长培养基的表面而将加热和对烧瓶充氧的能力结合的装置的例子。在接种生长培养基之后,裸藻培养物在第一生物反应器中生长直至达到预定时间点或者细胞密度。在一些实施方案中,裸藻在第一生物反应器中培养约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、约60小时或更长、约72小时或更长、约84小时或更长、约96小时或更长、约108小时或更长、或者约120小时或更长。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中

生长直至达到以下细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者约200g干重/L或更大。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中生长直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。如果需要或要求,在裸藻生长的同时采用新鲜生长培养基补充第一生物反应器。

[0220] 在步骤205,第一生物反应器的内容物或第一生物反应器的内容物的一部分被转移到第二生物反应器。任选地,在步骤210,第一生物反应器的内容物或第一生物反应器的内容物的一部分被收获用于进一步加工。第一生物反应器的内容物的一部分可以保留作为不同培养的接种物。任选地,在200,过滤第一生物反应器级的内容物,或者在210,在将裸藻转移到第二级之前以其他方式浓缩裸藻。

[0221] 来自第一生物反应器的裸藻培养物用于接种第二生物反应器的生长培养基以开始进一步的裸藻培养。通常,第二生物反应器大于第一生物反应器。图3示出了在该图中标识为“烧瓶”的第二生物反应器级的一个例子。第一生物反应器的内容物在第二生物反应器中稀释,使得稀释后第二生物反应器中的裸藻的浓度为约0.1g干重/L至约10g干重/L。第二生物反应器可以比第一生物反应器级大至多约10倍、比第一生物反应器级大至多约20倍、比第一生物反应器级大至多约30倍、比第一生物反应器级大至多约50倍、比第一生物反应器级大至多约75倍、或者比第一生物反应器级大至多约100倍。在一些实施方案中,裸藻是通过在第二生物反应器中发酵以下时间培养的:约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、约60小时或更长、约72小时或更长、约84小时或更长、约96小时或更长、约108小时或更长、或者约120小时或更长。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中发酵直至达到以下细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者约200g干重/L或更大。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中发酵直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。如果需要或要求,在裸藻生长的同时采用新鲜生长培养基补充第二生物反应器。

[0222] 如图2进一步显示,在步骤215将第二生物反应器的内容物或内容物的一部分转移到第三生物反应器。图3示出了在该图中标识为“种子发酵罐”的第一生物反应器的一个实施方案。任选地,在步骤220,从第二生物反应器收获第二生物反应器的内容物或者一部分。通常,第三生物反应器比第二生物反应器大约1至约100倍,且可以为约100升或更大、约250升或更大、约500升或更大、约1000升或更大、约2500升或更大、约5000升或更大、约7500升或更大、约10000升或更大、约15000升或更大、约25000升或更大、约50000升或更大、或者约100000升或更大。在一些实施方案中,裸藻通过在第三生物反应器中发酵约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、约60小时或更长、约72小时或更长、约84小时或更长、约96小时或更长、约108小时或更长、或者约120小时或更长而生长,以达到以下细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、

L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者200g干重/L或更大。在一些实施方案中,裸藻在第三生物反应器中发酵直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。如果需要或要求,在裸藻生长的同时采用新鲜生长培养基补充第三生物反应器。

[0223] 如图2进一步显示,在步骤225将第三生物反应器的内容物或内容物的一部分转移到第四生物反应器。图3示出了在该图中标识为“生产发酵罐”的第四生物反应器的一个实施方案。任选地,在步骤230,从第三生物反应器收获第三生物反应器的内容物或者一部分。通常,第四生物反应器具有比第三生物反应器级大约1至约100倍的体积,并具有约100升或更大、约250升或更大、约500升或更大、约1000升或更大、约2500升或更大、约5000升或更大、约7500升或更大、约10000升或更大、约15000升或更大、约25000升或更大、约50000升或更大、约100000升或更大、约200000升或更大、约400000升或更大、约600000或更大、约800000或更大、或约1000000升或更大的体积。在一些实施方案中,裸藻通过在第四生物反应器中发酵约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、约60小时或更长、约72小时或更长、约84小时或更长、约96小时或更长、约108小时或更长、或者约120小时或更长而生长,以达到以下细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者200g干重/L或更大。在一些实施方案中,裸藻在所述生物反应器中发酵直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。在裸藻生长的同时可以用新鲜生长培养基补充第四生物反应器。图2示出了在步骤240收获的第四生物反应器的内容物,但进一步预期可以使用后续的生物反应器。图3示出了使用离心机收获的一个方法。

[0224] 重复分批方法还可以用于利用发酵培养裸藻。在重复分批方法中,在生物反应器中培养的裸藻的一部分被收获和/或转移到不同生物反应器,且裸藻的一部分保留在生物反应器中作为随后的裸藻培养的接种物。然后通过将新鲜生长培养基添加到生物反应器而稀释接种物。图4A示出了通过重复分批方法利用发酵培养的裸藻的一个示例性实施方案。在步骤400,生长培养基被添加到生物反应器并接种裸藻细胞。允许裸藻在生物反应器中通过发酵生长直至裸藻细胞密度达到以下预定细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者约200g干重/L或更大。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中发酵直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。裸藻培养可持续约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、或约60小时或更长,以达到期望的细胞密度。

[0225] 在步骤410,收获生物反应器的内容物的第一部分。将生物反应器的内容物的第二部分保留在生物反应器中以接种下一培养。因此,在收获第一生物反应器的内容物的第一

部分后,在420将新鲜培养基添加到生物反应器以稀释细胞密度。该过程可持续,直至达到期望的量的裸藻产生,或者直至污染有机体最终占生物反应器的明显充足的部分从而成为排空生物反应器并对其消毒的理由。图4B示出了裸藻培养的重复分批收获对时间的例子。如图4B所示,一旦裸藻发酵至预定的细胞密度,则收获内容物的一部分,剩余的用新鲜培养基稀释以接种新的培养。

[0226] 分批补料方法(诸如恒定分批补料方法)还可用于利用发酵培养裸藻。在分批补料方法中,允许裸藻培养物在接种的生长培养基中生长,直至其达到期望的细胞密度。该起始培养时间段通常称作“分批阶段”。该分批阶段可以为约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、或约60小时或更长,在该时间期间,裸藻培养物达到以下细胞密度:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者约200g干重/L或更大。例如,在分批阶段期间裸藻可在生物反应器中生长直至达到以下细胞密度:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。在分批阶段完成后,持续收获裸藻细胞并用新鲜生长培养基替换。该收获和替换过程称作连续阶段。在连续阶段期间,例如使用一个或更多个传感器监测营养水平、pH、溶解氧或其他参数。

[0227] 在一个实施方案中,重复分批方法进行长达30天。在另一实施方案中,重复分批方法进行长达60天。在又一实施方案中,重复分批方法进行长达90天。在再一实施方案中,重复分批方法进行长达120天。

[0228] 生物反应器中的任何一个(不管是多级方法中的第一生物反应器、第二生物反应器、第三生物反应器、第四生物反应器或随后的生物反应器,重复分批方法中的生物反应器,还是分批补料方法中的生物反应器)可以用以在培养期间容纳裸藻的金属或玻璃发酵罐。图5和6示出了可用于通过发酵培养裸藻的示例性生物反应器。

[0229] 通常,除了一个或更多个受控排气口、用于通气或充氧的一个或更多个入口、或用于供应额外的生长培养基的一个或更多个入口,生物反应器在操作期间是不通大气的。这允许对发酵条件的更好控制并限制污染。用于供应生长培养基的入口可包括灭菌过滤器(例如具有小于0.2微米孔径的过滤器)以防止不期望的非裸藻微生物进入腔室。为了进一步限制污染,可以在批次之间清洁或消毒生物反应器中的任一个。清洁或消毒生物反应器可包括蒸汽、加热、或消毒剂(诸如乙醇)、漂白剂、或其他化学品。

[0230] 为了在发酵期间帮助刺激裸藻生长和 β -1,3-葡聚糖产生,生长培养基可以被充氧或混合。例如,可以通过对生长培养基通气或接受额外的液体(其中加压氧气已经预溶解在所述液体中),向裸藻培养物提供额外的氧气。可以例如通过在培养期间将富氧空气供应到生长培养基中或者通过用一个或更多个搅拌培养物的混合机构来混合培养物,对生长培养基进行通气。

[0231] 用于发酵裸藻的生物反应器中的一个或更多个可包括用以混合裸藻或者对生长培养基进行通气的气升式或鼓泡塔式系统。图6示出了具有气升(air lift)的利用发酵培养裸藻的生物反应器的例子。在培养期间气升式反应器提供足够的混合和通气,同时剪应力较小。

[0232] 生物反应器中的一个或多个可包括机械搅拌设备,该机械搅拌设备包括用于在培养期间混合裸藻或对裸藻通气的混合叶片。图5示出了示例性生物反应器,其包括机械搅拌设备,例如低剪切混合叶片(诸如船用叶片或固定角度叶片)。低剪切混合叶片限制对生长的裸藻细胞的损伤。

[0233] 在最终的生物反应器中生长之后将裸藻收获或转移,不管这是第一生物反应器、第二生物反应器、第三生物反应器、第四生物反应器、或随后的生物反应器。在一些实施方案中,裸藻在生物反应器中发酵约12小时或更长、约24小时或更长、约36小时或更长、约48小时或更长、约60小时或更长、约72小时或更长、约84小时或更长、约96小时或更长、约108小时或更长、或约120小时或更长,然后被收获或转移到新生物反应器。例如,可以培养裸藻约12至约120小时,然后被收获或转移到新生物反应器,例如在约24小时至约96小时、约36小时至约72小时、或约48小时至约60小时后被收获或转移到新生物反应器。在收获裸藻细胞培养物中,可以收获最终生物反应器的全部内容物,或者可以保留细胞培养物的一部分。保留的细胞培养物可以用作不同生物反应器或相同生物反应器的接种物。

[0234] 在一些实施方案中,利用发酵培养裸藻的方法产生以下细胞密度的裸藻:约20g干重/L或更大、约30g干重/L或更大、约40g干重/L或更大、约50g干重/L或更大、约75g干重/L或更大、约100g干重/L或更大、约125g干重/L或更大、约150g干重/L或更大、约175g干重/L或更大、或者约200g干重/L或更大。在其他实施方案中,培养裸藻的方法产生以下细胞密度的裸藻:约10g干重/L至约200g干重/L、约15g干重/L至约150g干重/L、约20g干重/L至约100g干重/L、约20g干重/L至约60g干重/L、或者约40g干重/L至约60g干重/L。在另一些实施方案中,裸藻具有约30wt%至约70wt%的 β -1,3-葡聚糖,诸如约30wt%至约40wt%的 β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约50wt%的 β -1,3-葡聚糖、约50wt%至约60wt%的 β -1,3-葡聚糖、或约60wt%至约70wt%的 β -1,3-葡聚糖、约40wt%至约70wt%的 β -1,3-葡聚糖、或约50wt%至约70wt%的 β -1,3-葡聚糖。

[0235] 将裸藻从生物反应器收获之后,将裸藻生物质从生长培养基中分离,例如通过离心机、切向流过滤、压滤机、带压机或其他固液分离设备。通常,将裸藻生物质从生长培养基中分离直至组成成分达到约20wt%固体或更多、约25wt%固体或更多、约30wt%固体或更多、约35wt%固体或更多、或约40wt%固体或更多。

[0236] 然后可以干燥收获的裸藻生物质,然后将其进一步加工。可以使用带式干燥器、喷雾干燥器、滚筒干燥器或者通过将生物质分散在大表面积上并使用蒸发式干燥来干燥裸藻生物质。可以施加热或真空以辅助干燥过程。还可以冷冻干燥裸藻生物质以产生经干燥的生物质。可以干燥裸藻生物质直至其达到以下水分含量:约40%或更少、约30%或更少、约25%或更少、约20%或更少、约15%或更少、约10%或更少、约5%或更少、约4%或更少、约3%或更少、约2%或更少、或约1%或更少。

[0237] 干燥的裸藻生物质可以作为可食用组合物施用以降低血清胆固醇水平或血清甘油三酯水平,或者其可以被施用以调节受试者的免疫功能。还可以进一步加工裸藻生物质以从裸藻生物质纯化 β -1,3-葡聚糖用于可食用组合物或药物制剂,其被施用以降低受试者的血清胆固醇水平或血清甘油三酯水平或者调节免疫功能。

[0238] 干燥的裸藻生物质可以作为可食用组合物施用以治疗受试者的肠道炎症。还可以进一步加工裸藻生物质以从裸藻生物质纯化 β -1,3-葡聚糖用于可食用组合物或药物制剂,

其被施用以治疗受试者的肠道炎症。

[0239] 来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的纯化

[0240] β -葡聚糖可以通过液/固分离、物理分离方法或其他方法从裸藻中提取。由裸藻产生的绝大部分 β -1,3-葡聚糖是裸藻淀粉的形式。裸藻淀粉通常以约0.5至约2微米大小的水不溶性颗粒的形式存在于裸藻中并位于裸藻细胞内。因此,通常通过裂解裸藻细胞并将 β -1,3-葡聚糖从残留生物物质中分离而纯化 β -1,3-葡聚糖。任选地,使用甲醇来纯化 β -1,3-葡聚糖。优选地,在不使用氯仿的情况下纯化 β -1,3-葡聚糖。

[0241] 通过裂解细胞并分离 β -1,3-葡聚糖来提取来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖。可以使用声波降解法或高压匀浆法裂解裸藻细胞。任选地,在裂解步骤期间包含裂解化学品。然而,可以在不添加裂解化学品的情况下裂解裸藻细胞。在裂解步骤期间可以加入的示例性裂解化学品包括洗涤剂(诸如十二烷基硫酸钠)、酶、碱(诸如氢氧化钠)、或者酸(诸如乙酸或者盐酸)。在裂解裸藻细胞之后,使用过滤法或重力分离法(诸如重力沉降或离心)分离 β -1,3-葡聚糖。然后可以洗涤所分离的 β -1,3-葡聚糖(例如采用水溶液或乙醇)以获得较高纯度。

[0242] 在纯化来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖之后,额外的加工步骤可使纯化的 β -1,3-葡聚糖改性。改性的 β -1,3-葡聚糖显示出对免疫系统受体(诸如Dectin-1、已被认定为 β -葡聚糖受体的蛋白质)增加的结合亲和性。例如,已经表明硫酸化多糖显示抗HIV活性(例如,美国专利5861383)。在制备硫酸化 β -1,3-葡聚糖的一个示例性方法中,经纯化的 β -1,3-葡聚糖溶解在二甲亚砜中并与无水吡啶和氯磺酸的混合物混合。然后加热混合物并倒出上清液。随后,将蒸馏水或甲醇添加到上清液中以沉淀 β -1,3-葡聚糖吡啶硫酸盐,其然后通过过滤收集。或者,将氯化钠添加到上清液,并使pH升高至9,从而允许 β -1,3-葡聚糖硫酸钠沉淀在丙酮溶液中(参见Sakagami等, *In vivo* 3:243-248 (1989))。

[0243] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖还可以改性为阳离子型。阳离子型 β -葡聚糖作为免疫调节剂可以更具生物活性,因为其与 β -葡聚糖受体(诸如Dectin-1和补体受体3)具有增加的结合亲和性(见Sakagami等人, *Antiviral Research*, 21:1-14 (1993))。来源于通过发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖可以采用二甲基乙醇胺(DMAE)进行改性以产生阳离子型 β -1,3-葡聚糖。产生DMAE β -1,3-葡聚糖的一个示例性方法包括将来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖溶解于碱溶液(诸如包含NaOH的溶液),并添加DMAE氯化物(溶液或干燥的粉末)。所得反应产生DMAE β -1,3-葡聚糖。

[0244] 示例性实施方案

[0245] 实施方案I-1. 本发明提供了调节有此需要的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0246] 实施方案I-2. 本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物的有效量为约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0247] 实施方案I-3. 本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物的施用调节自身免疫应答、血糖水平、感染或炎症。

[0248] 实施方案I-4. 本发明提供了实施方案I-3的方法,其中所述炎症与变态反应相关。

[0249] 实施方案I-5. 本发明提供了实施方案I-3的方法,其中所述自身免疫应答与糖尿病相关。

[0250] 实施方案I-6.本发明提供了实施方案I-3的方法,其中所述感染是细菌感染、真菌感染或病毒感染。

[0251] 实施方案I-7.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述裸藻是异养培养的。

[0252] 实施方案I-8.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。

[0253] 实施方案I-9.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。

[0254] 实施方案I-10.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻纯化的。

[0255] 实施方案I-11.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物包含裸藻生物物质,所述裸藻生物物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。

[0256] 实施方案I-12.本发明提供了实施方案I-11的方法,其中所述裸藻生物物质是经干燥的。

[0257] 实施方案I-13.本发明提供了实施方案I-12的方法,其中所述裸藻生物物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0258] 实施方案I-14.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物每天以单次剂量施用。

[0259] 实施方案I-15.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0260] 实施方案I-16.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。

[0261] 实施方案I-17.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物作为固体施用。

[0262] 实施方案I-18.本发明提供了实施方案I-1的方法,其中所述组合物作为悬浮液施用。

[0263] 实施方案I-19.本发明提供了调节具有高胆固醇或者处于具有高胆固醇的风险的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0264] 实施方案I-20.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物的施用降低所述人的胆固醇的水平。

[0265] 实施方案I-21.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物的有效量为约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至约50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0266] 实施方案I-22.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述裸藻是异养培养的。

[0267] 实施方案I-23.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。

[0268] 实施方案I-24.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖不包含 β -1,6-糖苷键。

[0269] 实施方案I-25.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻纯化的。

[0270] 实施方案I-26.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物包含裸藻生物物质,所述裸藻生物物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。

[0271] 实施方案I-27.本发明提供了实施方案I-26的方法,其中所述裸藻生物物质是经干燥的。

[0272] 实施方案I-28.本发明提供了实施方案I-27的方法,其中所述裸藻生物物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0273] 实施方案I-29.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物每天以单次剂量施用。

[0274] 实施方案I-30.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0275] 实施方案I-31.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。

[0276] 实施方案I-32.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物与他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维酸衍生物或胆固醇吸收抑制剂联合施用。

[0277] 实施方案I-33.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物作为固体施用。

[0278] 实施方案I-34.本发明提供了实施方案I-19的方法,其中所述组合物作为悬浮液施用。

[0279] 实施方案II-1.本发明提供了增强具有肠道炎症的人的免疫功能的方法,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0280] 实施方案II-2.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物的有效量为约0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重和约100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0281] 实施方案II-3.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述肠道炎症是炎性肠病。

[0282] 实施方案II-4.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述肠道炎症是结肠炎。

[0283] 实施方案II-5.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述肠道炎症是克罗恩

氏病。

[0284] 实施方案II-6.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述裸藻是异养培养的。

[0285] 实施方案II-7.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖包含裸藻淀粉。

[0286] 实施方案II-8.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖不包含 β -(1,6)-糖苷键。

[0287] 实施方案II-9.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻纯化的。

[0288] 实施方案II-10.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物包含裸藻物质,所述裸藻物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。

[0289] 实施方案II-11.本发明提供了实施方案II-10的方法,其中所述裸藻物质是经干燥的。

[0290] 实施方案II-12.本发明提供了实施方案II-11的方法,其中所述裸藻物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0291] 实施方案II-13.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物每天以单次剂量施用。

[0292] 实施方案II-14.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0293] 实施方案II-15.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物进一步包含附加组分,所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪,以及它们的组合。

[0294] 实施方案II-16.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物作为固体施用。

[0295] 实施方案II-17.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物作为悬浮液施用。

[0296] 实施方案II-18.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物的施用增加抗炎细胞因子产生。

[0297] 实施方案II-19.本发明提供了实施方案II-1的方法,其中所述组合物与抗炎药、免疫抑制药物或抗生素联合施用。

[0298] 实施方案III-1.本发明提供了治疗患有病症的人的所述病症的方法,所述病症选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0299] 实施方案III-2.本发明提供了治疗患有病症的人的所述病症的方法,所述病症选

自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病,所述方法包括向所述人口服施用有效量的组合物,所述组合物包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖。

[0300] 实施方案III-3.本发明提供实施方案III-1至III-2中任一者的方法,其中所述病症是高脂血症。

[0301] 实施方案III-4.本发明提供实施方案III-3的方法,其中所述组合物的施用降低所述人的胆固醇水平。

[0302] 实施方案III-5.本发明提供了实施方案III-3至III-4中任一者的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0303] 实施方案III-6.本发明提供了实施方案III-3至III-4中任一者的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至50mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0304] 实施方案III-7.本发明提供了实施方案III-3至III-6中任一者的方法,其中所述组合物与他汀类、烟酸、胆汁酸树脂、纤维酸衍生物或胆固醇吸收抑制剂联合施用。

[0305] 实施方案III-8.本发明提供了实施方案III-1的方法,其中所述病症选自炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌。

[0306] 实施方案III-9.本发明提供了实施方案III-1的方法,其中所述病症选自炎性肠病、结肠炎和克罗恩氏病。

[0307] 实施方案III-10.本发明提供实施方案III-8至III-9中任一者的方法,其中所述病症是结肠炎。

[0308] 实施方案III-11.本发明提供实施方案III-8至III-9中任一者的方法,其中所述病症是炎性肠病。

[0309] 实施方案III-12.本发明提供实施方案III-8至III-9中任一者的方法,其中所述病症是克罗恩氏病。

[0310] 实施方案III-13.本发明提供实施方案III-8的方法,其中所述病症是结肠癌。

[0311] 实施方案III-14.本发明提供了实施方案III-8至III-13中任一者的方法,其中所述组合物的有效量为0.1mg β -1,3-葡聚糖/kg体重至100mg β -1,3-葡聚糖/kg体重。

[0312] 实施方案III-15.本发明提供了实施方案III-8至III-14中任一者的方法,其中施用所述组合物增加抗炎细胞因子产生。

[0313] 实施方案III-16.本发明提供了实施方案III-8至III-15中任一者的方法,其中所述组合物与抗炎药、免疫抑制药物或抗生素联合施用。

[0314] 实施方案III-17.本发明提供实施方案III-1至III-16中任一者的方法,其中所述裸藻是纤细裸藻。

[0315] 实施方案III-18.本发明提供实施方案III-1至III-17中任一者的方法,其中所述裸藻是异养培养的。

[0316] 实施方案III-19.本发明提供了实施方案III-1至III-18中任一者的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是裸藻淀粉的形式。

[0317] 实施方案III-20.本发明提供了实施方案III-1至III-19中任一者的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖不含 β -1,6-糖苷键。

[0318] 实施方案III-21.本发明提供了实施方案III-1至III-20中任一者的方法,其中所述 β -1,3-葡聚糖是从裸藻纯化的。

[0319] 实施方案III-22. 本发明提供了实施方案III-1至III-20中任一者的方法, 其中所述组合物包含裸藻生物质, 所述裸藻生物质包含所述 β -1,3-葡聚糖。

[0320] 实施方案III-23. 本发明提供了实施方案III-22的方法, 其中所述裸藻生物质已被干燥至约40%或更小的水分含量。

[0321] 实施方案III-24. 本发明提供了实施方案III-23的方法, 其中所述裸藻生物质已被进一步加工以具有1000微米或更小的平均粒度。

[0322] 实施方案III-25. 本发明提供了实施方案III-1至III-24中任一者的方法, 其中所述组合物每天以单次剂量施用。

[0323] 实施方案III-26. 本发明提供了实施方案III-1至III-24中任一者的方法, 其中所述组合物在一天中以多个分开的剂量施用。

[0324] 实施方案III-27. 本发明提供了实施方案III-1至III-26中任一者的方法, 其中所述组合物进一步包含附加组分, 所述附加组分选自: α -生育酚、胆钙化醇、锌、铬、硒、精氨酸、抗坏血酸、烷基甘油、咖啡因、卡瓦、姜黄、螺旋藻、小球藻、甜叶菊、D-葡萄糖二酸钙、辅酶Q10、肽类、二甲基甘氨酸、二十二碳六烯酸、二十碳五烯酸、 α -亚麻酸、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、乳杆菌属益生菌、双歧杆菌属益生菌、甘露寡糖、果寡糖、黄芪、紫锥花属植物、施保利通、大蒜、谷胱甘肽、巨藻、L-精氨酸、L-鸟氨酸、卵磷脂颗粒、来自灰树花、灵芝或香菇的提取物、锰、槲皮素、菠萝蛋白酶、橄榄叶、接骨木属植物、Umcka、泛酸、槲皮素、 α -硫辛酸、精油、鱼油、香味料及它们的衍生物、紫檀芪, 以及它们的组合。

[0325] 实施方案III-28. 本发明提供了实施方案III-27的方法, 其中所述附加组分是锌。

[0326] 实施方案III-29. 本发明提供了实施方案III-1至III-27中任一者的方法, 其中所述组合物进一步包含金属。

[0327] 实施方案III-30. 本发明提供了实施方案III-29的方法, 其中所述金属包括选自以下组中的成员: 铁、镁、锂、锌、铜、铬、镍、钴、钒、钼、锰、硒, 以及它们的组合。

[0328] 实施方案III-31. 本发明提供了实施方案III-30的方法, 其中所述 β -(1,3)-葡聚糖和所述金属形成络合物。

[0329] 实施方案III-32. 本发明提供了实施方案III-31的方法, 其中所述络合物包括锌 β -(1,3)-葡聚糖络合物。

[0330] 实施方案III-33. 本发明提供了实施方案III-1至III-26中任一者的方法, 其中所述组合物进一步包含选自雨生红球藻、虾青素和初乳的附加组分。

[0331] 实施方案III-34. 本发明提供了实施方案III-1至III-33中任一者的方法, 其中所述组合物作为固体施用。

[0332] 实施方案III-35. 本发明提供了实施方案III-1至III-33中任一者的方法, 其中所述组合物作为悬浮液施用。

[0333] 实施方案III-36. 本发明提供了包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物, 所述组合物用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌的病症。

[0334] 实施方案III-37. 本发明提供了包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物, 所述组合物用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病的病症。

[0335] 实施方案III-38. 本发明提供了包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎、克罗恩氏病以及结肠癌的病症的药物中的用途。

[0336] 实施方案III-39. 本发明提供了包含来源于利用发酵培养的裸藻的 β -1,3-葡聚糖的组合物在制备用于治疗选自高脂血症、代谢综合征、炎性肠病、结肠炎以及克罗恩氏病的病症的药物中的用途。

[0337] 以下实施例进一步示出了本申请的实施方案。这些实施例仅仅是为了说明本申请的实施方案,且不应解释为限制性的。

[0338] 实施例

[0339] 免疫应答/高脂血症

[0340] 实施例1: 包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物质的口服施用

[0341] 裸藻是使用重复分批方法在生物反应器中利用发酵培养的。在最终步骤中,将裸藻培养至约40g干重/L至约80g干重/L的细胞密度并收获。裸藻细胞具有约70wt%的 β -1,3-葡聚糖含量。使用切向流过滤来过滤裸藻细胞培养物,处理耗尽的生长培养基,并在水中洗涤细胞。将所得裸藻生物质轧成薄片并干燥至小于10%的水分含量。然后将裸藻生物质口服施用给人以调节免疫功能。

[0342] 实施例2: 作为营养补充剂的包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物质的口服施用

[0343] 裸藻是使用重复分批方法在生物反应器中利用发酵培养的。在最终步骤中,将裸藻培养至约40g干重/L至约80g干重/L的细胞密度并收获。裸藻细胞具有约70wt%的 β -1,3-葡聚糖含量。使用切向流过滤来过滤裸藻细胞培养物,处理耗尽的生长培养基,并在水中洗涤细胞。然后在滚筒干燥器中将裸藻生物质干燥至小于5%的水分含量。使用锤式研磨机将干燥的薄片加工成具有小于250微米的平均粒度的粉末。然后将粉末成形为片剂用于口服施用以调节免疫功能,治疗高脂血症或预防性地治疗高脂血症。或者,将粉末与食物产品混合并与食物产品一起口服施用以调节免疫功能。或,将粉末置于胶囊中用于口服施用以调节免疫功能,治疗高脂血症或预防性地治疗高脂血症。

[0344] 实施例3: 从裸藻纯化 β -1,3-葡聚糖

[0345] 在一个示例性实施方案中, β -1,3-葡聚糖是通过在1%十二烷基硫酸钠溶液中加热如本文所述的通过发酵培养的裸藻,将该溶液离心并用水和乙醇洗涤丸粒,从而从裸藻中纯化的。将大约1份裸藻生物质(以干重计)悬浮在5份1% (w/v) 十二烷基硫酸钠溶液中。混合该悬浮液,然后加热至约100℃持续约30分钟。然后冷却该溶液并在 >500 RCF下离心约5分钟。弃去上清液,通过在10份水中再悬浮来洗涤丸粒,剧烈混合,并在 >500 RCF下离心5分钟。洗涤过程可以采用10份95%乙醇再重复两次以达到95%纯度的 β -葡聚糖丸粒。该丸粒可进一步干燥成百色粉末。

[0346] 在另一示例性实施方案中,通过高压匀浆器抽吸本文所述的通过发酵培养的裸藻来裂解细胞而纯化 β -1,3-葡聚糖。然后离心该裂解的混合物以回收 β -1,3-葡聚糖。弃去上清液,通过在水中再悬浮来洗涤丸粒,剧烈混合,并在 >500 RCF下离心。洗涤过程可以采用10份水再重复两次以达到95%纯度的 β -1,3-葡聚糖丸粒。该丸粒可进一步干燥成百色粉末。

[0347] 本文所述的方法比关于 β -1,3-葡聚糖的提取所描述的一些先前方法毒性小,其可

具有接受安全和纯天然产品保证的额外益处,这是制备食品级或营养保健级产品所必需的。然后将所得经纯化的 β -1,3-葡聚糖成形为片剂用于口服施用或者与食物产品混合并口服施用。或者地,经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以与水溶液混合作为药物组合物。该药物组合物可进一步包含药学可接受的赋形剂。然后可以静脉内施用该药物组合物。

[0348] 实施例4:施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的小鼠的免疫应答

[0349] 使用本文所述的发酵过程培养包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物质。在小鼠研究中测试全细胞产品和经纯化的 β -葡聚糖提取物。从在作为有机碳源的葡萄糖上培养的裸藻细胞中制备全细胞产品。该全细胞产品包含约50wt% β -1,3-葡聚糖并将其离心,然后在没有任何进一步加工的情况下干燥。筛分该全细胞产品以分离 β -1,3-葡聚糖,然后反复地洗涤 β -葡聚糖部分以去除非 β -葡聚糖细胞组分,产生经纯化的 β -1,3-葡聚糖样品。经纯化的样品包含约93wt% β -1,3-葡聚糖。还比较了市售的酵母来源的 β -葡聚糖。

[0350] 将全细胞裸藻生物质样品、经纯化的 β -1,3-葡聚糖样品和酵母来源的 β -葡聚糖产品干燥并研磨成小于500微米的粒度。然后将这些干粉与PBS缓冲液混合,并在通过灌胃给予BALB/c小鼠之前稀释成适当浓度。从每只小鼠采集血液以测量非特异性免疫系统活性。评估以下参数:吞噬作用活性(巨噬细胞摄入外来颗粒的能力)、自然杀伤(NK)细胞活性(NK细胞破坏外来细胞或被感染细胞的能力),以及抗体滴度。

[0351] 吞噬作用

[0352] 吞噬作用是用以捕获和破坏潜在有害颗粒(例如,细菌)的免疫系统的一个应答。按照主动捕获和吞噬标记颗粒的中性粒细胞的百分数测定吞噬作用指数(图7A)。将九只BALB/c小鼠分配给每个治疗组并每天灌胃喂食 β -葡聚糖产品(20mg/kg小鼠)。对照组仅灌胃接受PBS。在第1、7和14天,处死来自每个治疗组的三只小鼠以收获材料用于分析。按照在指定时间内主动捕获和吞食标记颗粒的中性粒细胞的百分数测定吞噬作用指数。仅给予PBS对照的小鼠具有30%的吞噬作用指数,而喂食最高剂量的来源于裸藻的经纯化的 β -葡聚糖的小鼠表现出几乎两倍的吞噬作用活性(59%)。接受经纯化的裸藻 β -葡聚糖产品的组在每个剂量水平都显示出最佳性能。喂食全裸藻生物质和酵母来源的 β -葡聚糖的小鼠在两个最低剂量水平表现出类似的吞噬作用活性,但是喂食酵母来源的 β -葡聚糖的小鼠在两个最高剂量水平具有稍高的吞噬作用活性。

[0353] 自然杀伤细胞的细胞毒性

[0354] 测定自然杀伤(NK)细胞活性(NK细胞破坏外来细胞或被感染细胞的能力)以确定由施用的 β -葡聚糖引起的免疫功能调节的程度(图7B)。NK细胞的细胞毒性是NK细胞杀伤潜在致病有机体的非特异性免疫应答的指数。将九只BALB/c小鼠分配给每个治疗组并通过灌胃每天喂食 β -葡聚糖产品(20mg/kg小鼠)。对照组仅灌胃接受PBS。在第1、7和14天,处死来自每个治疗组的三只小鼠以收获材料用于分析。喂食PBS对照的小鼠显示出12%的细胞毒性指数,而喂食低至10mg/kg的全裸藻生物质或经纯化的裸藻 β -葡聚糖的小鼠表现出超过三倍高的细胞毒性指数(36%至50%)。在20mg/kg和更高的剂量下,全裸藻生物质和经纯化的裸藻 β -葡聚糖治疗引起比酵母来源的 β -葡聚糖产品更强的细胞毒性应答。

[0355] 抗体滴度

[0356] 抗体形成表明 β -葡聚糖可充当疫苗的佐剂(调节剂)。将三只BALB/c小鼠分配给每个治疗组,并从第0天开始接受相当于4、10、20和40mg/kg的 β -葡聚糖产品的每日口服剂量。

在第3和16天通过腹膜内注射给予抗原(卵清蛋白),在用PBS灌胃作为阴性对照的情况下在第23天使用ELISA分析测定抗体滴度(图7C)。抗体滴度的显著增加表明诸如 β -葡聚糖的产品用作疫苗佐剂(增强剂)的潜力。所有 β -葡聚糖治疗组引起抗体产生相对于阴性对照增加,并且该效应在较高剂量下增强。经纯化的藻 β -葡聚糖治疗在每一治疗水平下都产生最多的抗体,紧接着是全裸藻生物质治疗组。与以中等剂量水平(10和20mg/kg)喂食来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的那些小鼠相比,喂食酵母 β -葡聚糖产品的小鼠表现出显著较低(低15%至50%)的抗体滴度,但与以最高剂量率喂食全裸藻生物质产品的小鼠具有类似的滴度。

[0357] 小结

[0358] 对于喂食 β -葡聚糖产品中的任何一种的治疗组,特异性免疫应答(即抗体产生)和非特异性免疫应答(NK细胞的细胞毒性和吞噬作用活性)都显著增加。对于所有的免疫度量,经纯化的藻 β -1,3-葡聚糖在所有的治疗水平都引起最强的免疫应答。全裸藻生物质和经纯化的藻 β -1,3-葡聚糖都引起非常强的抗体应答,其比阴性对照中发现的滴度高几倍。这些数据表明这些产品用作佐剂的潜力。

[0359] 在抗体产生和NK细胞的细胞毒性测定中,在几乎所有的治疗水平,全裸藻生物质表现得与酵母来源的 β -葡聚糖产品同样好(如果不比后者好的话)。在大部分情况下,与酵母来源的产品相比,全裸藻生物质在仅四分之一或一半剂量水平下诱导几乎相同或更好的应答。

[0360] 酵母来源的 β -葡聚糖产品引起比经纯化的藻 β -葡聚糖低的吞噬作用应答,但在这一类别,与全裸藻生物质产品相比表现得同样好或更好。通常,所有 β -葡聚糖产品对吞噬作用的总体影响比对NK细胞的细胞毒性和抗体产生的影响更温和。

[0361] 实施例5:施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的小鼠的大肠杆菌挑战

[0362] 在本文所述的无菌发酵罐中培养裸藻。一旦发酵罐中达到裸藻生物质的目标密度,则将细胞离心并在 -20°C 冷冻保存所得糊状物。将冷冻的糊状物解冻,在 65°C 下干燥,直到其形成干薄片,然后研磨至小于250微米的粒度以产生包含裸藻生物质的组合物,该生物质包含来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖。来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖是通过裂解裸藻细胞并通过产生具有 $>90\%$ β -葡聚糖和小于250微米的粒度的提取物的方法分离 β -1,3-葡聚糖来制备的。为了将来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的样品与来源于酵母的经纯化的 β -葡聚糖进行比较,将每个干燥产品与磷酸盐缓冲盐水(PBS)混合并在以规定剂量水平通过灌胃给予小鼠之前稀释至合适的浓度。

[0363] 将10只BALB/c小鼠分配给每个治疗组,并经由肌肉内注射在第0天接受标称致死剂量的大肠杆菌(3×10^7)。从大肠杆菌注射前2天(第-2天)开始至注射后两天(第+2天)经口灌胃给予小鼠 β -葡聚糖产品(20mg/kg小鼠)。对照组仅灌胃接受PBS,而抗生素治疗组在第0、1、2、3和4天接受口服剂量的氨基青霉素(13mg/kg)。每天评估小鼠直至第10天。

[0364] 图8总结了大肠杆菌攻击实验的结果。仅接受PBS的对照组的所有小鼠在大肠杆菌注射的七天内死亡。相反,在所有治疗组第10天的死亡率减少至少40%。值得注意的是,在大肠杆菌注射后10天,70%的接受来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖的小鼠存活。该治疗组和接收氨基青霉素的一个组显示出随时间非常相似的存活率,表明裸藻 β -1,3-葡聚糖治疗对小鼠提供与普通抗生素氨基青霉素类似的防御细菌感染的保护。与对照组相比,

接受含有约50%β-葡聚糖的全裸藻生物物质产品的小鼠也显示出死亡率显著下降。与喂食酵母来源的β-葡聚糖提取物的组中存活40%相比,在该治疗组中,在注射大肠杆菌之后10天,50%的小鼠存活。

[0365] 实施例6:施用于来源于裸藻的β-1,3-葡聚糖的小鼠中的细胞因子表达

[0366] 如本文所述的,使用发酵过程培养包含β-1,3-葡聚糖的裸藻生物物质。筛分全细胞产品以分离β-葡聚糖,然后反复洗涤β-葡聚糖部分以去除非β-1,3-葡聚糖细胞组分。经纯化的样品包含约93wt%β-1,3-葡聚糖。经纯化的β-葡聚糖产品用于评估β-1,3-葡聚糖对细胞因子表达的影响。细胞因子在免疫系统中起重要作用并参与感染和炎症的宿主应答。

[0367] 通过经口灌胃给予BALB/c小鼠(6/组)经纯化的β-1,3-葡聚糖7天。对小鼠施用0mg/kg(A)、5mg/kg(B)、20mg/kg(C)以及200mg/kg(D)的剂量。在第8天,通过磁性分选和培养过夜将树突细胞(DC;CD11c+细胞)从胶原酶消化的小肠中分离。对于各细胞因子和趋化因子,通过luminex多重分析测试上清液。如图9A所示,β-1,3-葡聚糖量的增加提高了IL-1b、TNF-α、IL-10、IL-18、IP-10以及MCP-1的产生。剂量效应对Rantes和MIP-1a较不明显,因为这些趋化因子的水平对于以5、20和200mg/kg剂量施用的β-1,3-葡聚糖而言高且相对不变。IFN-γ、IL-12、IL-6、IL-9、IL-2、IL-23、GM-CSF、IL-4以及IL-5的表达不可检测。

[0368] 通过经口灌胃给予BALB/c小鼠(6/组)经纯化的β-1,3-葡聚糖7天。对小鼠施用0mg/kg(A)、5mg/kg(B)、20mg/kg(C)以及200mg/kg(D)的剂量。在第8天,通过通过磁性分选和培养过夜将巨噬细胞(F4/80细胞)从胶原酶消化的小肠中分离。对于各细胞因子和趋化因子,通过luminex多重分析测试上清液。图9B显示β-1,3-葡聚糖量的增加提高了IL-6、IL-1b、TNF-α、IL-10、IL-18、Rantes、MIP-1a、IP-10以及MCP-1的产生。IFN-γ、IL-17、IL-22、IL-4、IL-9、IL-18、IL-2、IL-23以及GM-CSF的表达不可检测。

[0369] 通过经口灌胃给予BALB/c小鼠(6/组)经纯化的β-1,3-葡聚糖7天。对小鼠施用0mg/kg(A)、5mg/kg(B)、20mg/kg(C)以及200mg/kg(D)的剂量。在第8天,通过通过磁性分选和培养过夜将NK1.1+细胞(NK细胞)从胶原酶消化的小肠中分离。对于各细胞因子和趋化因子,通过luminex多重分析测试上清液。图9C显示β-1,3-葡聚糖量的增加提高了IFN-γ、IL-1b、TNF-α、IL-10、IL-22、Rantes以及IL-17的产生。相反,β-1,3-葡聚糖对MIP-1a、IP-10和MCP-1表达的影响显示出相对独立于所施用的β-葡聚糖剂量。IL-23的产生随着β-1,3-葡聚糖的量增加而降低。IL-6、IL-4、IL-9、IL-2和GM-CSF的表达不可检测。

[0370] 实施例7:通过施用于来源于裸藻的β-1,3-葡聚糖治疗小鼠的高脂血症

[0371] 如本文所述的在无菌发酵罐中培养裸藻。一旦发酵罐中达到裸藻生物物质的目标密度,则将裸藻过滤、裂解,并纯化β-1,3-葡聚糖。来源于裸藻的经纯化的β-1,3-葡聚糖用于以下所述的小鼠实验中。磷酸盐缓冲盐水作为对照施用。

[0372] 在第一实验中,对Balb/c小鼠喂食不含β-葡聚糖的高胆固醇饮食(每天约16mg胆固醇)14天。该时间段之后,另外30天对小鼠喂食包含来源于裸藻的经纯化的β-1,3-葡聚糖或对照饮食的、具有正常胆固醇水平(约110mg/dL)的饮食。在12小时的禁食之后收集血清,并测量血胆固醇和甘油三酯。如图10A所示,小鼠的血清胆固醇水平在高胆固醇饮食期间从平均约115mg/dL升高至约265mg/dL。对于在回到具有正常量胆固醇的饮食之后施用磷酸盐缓冲盐水的对照小鼠,胆固醇水平保持升高直至至少第34天,并在第44天降低至约181mg/dL。相反,施用于来源于裸藻的β-1,3-葡聚糖的小鼠观察到血胆固醇水平立即稳定的下降。对

于甘油三酯水平得到了类似的结果。如图10B所示,当小鼠消耗高胆固醇饮食时,血清甘油三酯水平从约105mg/dL升高至约138mg/dL。在30天正常胆固醇饮食之后,对照小鼠仅观察到血清甘油三酯水平稍微降低。相反,施用 β -葡聚糖的小鼠观察到血清甘油三酯水平的立即连续下降,其在第44天小于实验的开始。

[0373] 在第二实验中,对Ba1b/c小鼠喂食高胆固醇饮食(每天约16mg胆固醇)连同来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖或对照饮食14天。在14天之后,对小鼠喂食正常胆固醇饮食(约110mg/dL)并施用相同 β -葡聚糖产品或对照饮食另外30天。在12小时的禁食之后收集血清,并测量血胆固醇和甘油三酯。如图11A所示,仅施用对照饮食的小鼠的血清胆固醇在14天的高胆固醇饮食期间升高的最多,从约118mg/dL升高至约275mg/dL。施用来源于裸藻的经纯化的 β -1,3-葡聚糖的小鼠显示出血清胆固醇的较小增加,从约118mg/dL增加至约230mg/dL。对于甘油三酯水平得到了类似的结果。如图11B所示,当喂食高胆固醇饮食时,对照小鼠的血清甘油三酯水平增加最多(从约105mg/dL增加至约145mg/dL)。在30天正常胆固醇饮食之后,对照小鼠仅观察到血清甘油三酯水平稍微降低。相反,施用 β -葡聚糖的小鼠在回到正常胆固醇饮食之后观察到血清甘油三酯水平的立即连续下降,其在第44天小于实验的开始。

[0374] 实施例8:评估消耗来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖对个体代谢健康的影响的临床研究

[0375] 临床试验用于评估消耗来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖对胆固醇水平、血糖水平、感染和炎症的影响。在提供书面知情同意书(经注册机构审查委员会批准)和筛选过程之后招募志愿者。该研究为4周的持续时间并且评估发生在 β -1,3-葡聚糖消耗的基线、2和4周处。以胶囊形式施来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖以向每个个体提供250mg的每日剂量。

[0376] β -葡聚糖对代谢健康的影响是使用以下中的一个或多个测定的:与葡萄糖和脂质代谢有关的标记物的空腹血液水平、全身健康和身心健康的评估,以及血压和血液化学的测定。血液化学分析可包括蛋白质羰基含量(氧化应激的标记)、急性期炎症标记(诸如C-反应蛋白、 α -1酸性糖蛋白、纤维蛋白原以及血小板因子-4)、代谢性生物标记(诸如C-肽、皮质醇、胰多肽、胰岛素原,以及肽YY)、细胞因子谱以及抗体分析。

[0377] 肠道炎症

[0378] 实施例9:包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物物质的口服施用

[0379] 裸藻是使用重复分批方法在生物反应器中利用发酵培养的。在最终步骤,将裸藻培养至约40g干重/L至约80g干重/L的细胞密度并收获。裸藻细胞具有约50wt%的 β -1,3-葡聚糖含量。使用切向流过滤来过滤裸藻细胞培养物,处理耗尽的生长培养基并在水中洗涤细胞。将所得裸藻生物物质轧成薄片并干燥至小于10%的水分含量。将干燥的生物物质研磨至小于1000微米,然后将裸藻生物物质口服施用给人以治疗肠道炎症。

[0380] 实施例10:包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物物质作为营养补充剂的口服施用

[0381] 裸藻是使用重复分批方法在生物反应器中利用发酵培养的。在最终步骤,将裸藻培养至约40g干重/L至约80g干重/L的细胞密度并收获。裸藻细胞具有约50wt%的 β -1,3-葡聚糖含量。使用切向流过滤来过滤裸藻细胞培养物,处理耗尽的生长培养基并在水中洗涤细胞。然后在滚筒干燥器中将裸藻生物物质干燥至小于5%的水分含量。使用锤式研磨机将薄片加工成具有小于250微米的平均粒度的粉末。然后将粉末成形为片剂用于口服施用以

治疗肠道炎症。或者,将粉末与食物产品混合并与食物产品一起口服施用以治疗肠道炎症。或者,将粉末置于胶囊中用于口服施用以治疗肠道炎症。

[0382] 实施例11:从裸藻纯化 β -1,3-葡聚糖

[0383] 在一个示例性实施方案中, β -1,3-葡聚糖是通过在1%十二烷基硫酸钠中加热如本文所述通过发酵培养的裸藻,离心该溶液并采用水和乙醇洗涤丸粒而从裸藻中纯化的。将大约1份裸藻生物质(以干重计)悬浮在5份的1% (w/v) 十二烷基硫酸钠溶液中。混合该悬浮液,然后加热至约100℃持续约30分钟。然后冷却该溶液并在 $>500\text{RCF}$ 下离心约5分钟。弃去上清液,通过在10份水中再悬浮来洗涤丸粒,剧烈混合,并在 $>500\text{RCF}$ 下离心5分钟。洗涤过程可以采用10份95%乙醇再重复两次以达到95%纯度的 β -葡聚糖丸粒。该丸粒可进一步干燥成百色粉末。

[0384] 在另一示例性实施方案中,通过高压匀浆器抽吸如本文所述通过发酵培养的裸藻来裂解细胞而纯化 β -1,3-葡聚糖。然后离心所裂解的混合物以回收 β -1,3-葡聚糖。弃去上清液,通过在水中再悬浮来洗涤丸粒,剧烈混合,并在 $>500\text{RCF}$ 下离心。洗涤过程可以采用10份水再重复两次以达到95%纯度的 β -1,3-葡聚糖丸粒。该丸粒可进一步干燥成百色粉末。

[0385] 本文所述的方法比关于 β -1,3-葡聚糖的提取所描述的一些先前方法毒性小,其可具有接受安全和纯天然产品保证的额外益处,这是制备食品级或营养保健级产品所必需的。然后将所得经纯化的 β -1,3-葡聚糖成形为片剂用于口服施用或者与食物产品混合并口服施用。或者,经纯化的 β -1,3-葡聚糖可以与水溶液混合作为药物组合物。该药物组合物可进一步包含药学可接受的赋形剂。然后可以静脉内施用该药物组合物。

[0386] 实施例12:测定来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖对化学诱导的急性结肠炎的预治疗的效果的体内研究

[0387] 如本文所述使用发酵过程培养包含 β -1,3-葡聚糖的裸藻生物质。在小鼠研究中测试经干燥的裸藻生物质和经纯化的 β -葡聚糖提取物。经干燥的裸藻生物质由在作为有机碳源的葡萄糖上培养的裸藻细胞产生。裸藻生物质包含约50wt% β -1,3-葡聚糖,并且被离心然后干燥而没有任何进一步加工。筛分裸藻生物质产品以分离 β -1,3-葡聚糖,然后反复洗涤 β -葡聚糖部分以去除非 β -葡聚糖细胞组分,产生经纯化的 β -1,3-葡聚糖样品。经纯化的样品包含约95wt% β -1,3-葡聚糖。磷酸盐缓冲盐水(PBS)用作阴性对照。

[0388] 将干燥的裸藻生物质和经纯化的 β -1,3-葡聚糖样品干燥并研磨成小于500微米的粒度。然后将这些干粉与PBS缓冲液混合,并在通过灌胃给予C57BL/6J小鼠之前稀释至适当浓度。为了持续试验(15天),在禁食2小时后,用(i) PBS(“无”)、(ii) 经干燥的裸藻生物质(“A50”;250 μg /小鼠/天)或(iii) 经纯化的 β -1,3-葡聚糖(“AG”;125 μg 小鼠/天)每天对小鼠治疗一次。该剂量确保施用经干燥的裸藻生物质的鼠与施用经纯化的 β -1,3-葡聚糖的小鼠一样接受等剂量的 β -1,3-葡聚糖。每个治疗组使用十只小鼠。在5天后(第0天),以它们的饮用水,给小鼠施用2.5%的葡聚糖硫酸钠(DSS)溶液(已知诱导急性结肠炎的化合物)直至第5天,然后切换回常规水。每天进行体重和肉眼观察。在第10天使小鼠安乐死。处理结肠样品并分离免疫细胞用于细胞因子分析。实施例13-19中描述了使用各种参数测定的来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预治疗对化学诱导的急性结肠炎的影响。

[0389] 实施例13:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预治疗对患有化学诱导的急性结肠炎的

小鼠的体重的影响

[0390] 如实施例12所述的治疗小鼠。在实验期间每天记录每只小鼠的体重。体重损失被认为是结肠炎的标志。为了计算随后时间点的体重的百分比,初始体重被认为是100%。测量初始体重的百分比随着DSS处理后的时间的变化(图12A-12C)。该数据的统计学意义列于表2。

[0391] 表2. 体重数据的t-检验的p值(初始体重的%)。

[0392]

天	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50	0	0.1971	0.3156	0.9217	0.4897	0.0042	0.0017	0.0003	0.0002	0.0014	0.0004
AG	0	0.1246	0.5088	0.7166	0.6594	0.1861	0.8449	0.2767	0.2303	0.0058	0.0017

[0393] 采用PBS(图12A)或经纯化的 β -1,3-葡聚糖(图12B)治疗的小鼠显示出在DSS处理后第5天体重急剧降低。至第10天,采用PBS治疗的小鼠的体重下降至初始体重的约75%。从第5天至第8天,采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠显示出类似的体重降低,下降至初始体重的约80%。然而,在第9天和第10天,采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠的体重分别增加至约83%和85%。该数据显示,使用经纯化的 β -1,3-葡聚糖的治疗对于从DSS诱导的急性结肠炎的较早恢复是有效的,尤其是在与其他因素(诸如大便稠度和存在便血)一起考虑时。

[0394] 采用经干燥的裸藻生物质治疗的小鼠显示出体重无显著降低,直至DSS处理后的第6天,在该时间观察到体重逐渐降低(图12C)。在第9天,采用经干燥的裸藻生物质治疗的小鼠的体重损失降低至初始体重的约92%。然而,采用经干燥的裸藻生物质治疗的小鼠的体重在第10天稍微增加至约95%。该数据显示,使用经干燥的裸藻生物质的治疗对于预防小鼠的DSS诱导的急性结肠炎或将其严重程度最小化是有效的。

[0395] 图13示出了采用PBS、经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或经干燥的裸藻生物质治疗的小鼠的组合结果。采用PBS、经纯化的 β -1,3-葡聚糖、或经干燥的裸藻生物质治疗的小鼠的组合结果还表示为随时间的体重损失评分的函数(图14)。重量损失评分如下计算:0(无损失)、1(1%-5%)、2(5%-10%)、3(10%-20%)以及4(>20%)。该数据的统计学意义列于表3。

[0396] 表3. 体重数据(重量损失评分)的t-检验的p值

[0397]

天	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50					0.036878	0.005121	0.002798	0.000725	0.004405	0.000746	0.000746
AG					0.036787	0.343436	0.051003	0.343436	0.343436	0.193422	0.010708

[0398] 实施例14: 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的大便稠度的影响

[0399] 如实施例12所述的治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在实验期间每天记录每只小鼠的大便稠度。体重损失被认为是结肠炎的标志。大便稠度如下评分:0(正常固体)、2(半固体/柔软)、3(稀便)以及4(水样/腹泻)。DSS处理后,测定大便稠度随着DSS处理后的时间的变化(图15)。该数据的统计学意义列于表4。

[0400] 表4. 大便稠度的t-检验的p值

[0401]

天	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

A50				0.002561	0.000108	0.0001	0.003241	0.011508	0.21258	0.089781
AG				0.002561	0.508646	1	0.014956	0.00311	0.21258	0.110765

[0402] 采用PBS治疗的小鼠在第0-3天显示出正常的大便稠度。从第4天开始,采用PBS治疗的小鼠发展成稀便。采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠在第0-4天显示出正常的大便稠度,从第5天开始发展成稀便。采用经干燥的裸藻生物物质治疗的小鼠产生正常的大便稠度直至第5天(在该时间产生半固体/软便)。该数据显示,使用经干燥的裸藻生物物质治疗的小鼠对于预防小鼠的DSS诱导的急性结肠炎或将其严重程度最小化特别有效。

[0403] 实施例15:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的便血的影响

[0404] 如实施例12所述治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在实验期间每天记录每只小鼠的看得见的便血程度/直肠出血水平。便血评分如下:0(无血)、1(粪便粒上有淡红色)、2(粪便上有血斑)、3(血液覆盖/混合粪便),以及4(肛周大出血/出血)。记录便血评分随着DSS处理后的时间的变化(图16)。该数据的统计学意义列于表5。

[0405] 表5. 便血的t-检验的p值

[0406]

天	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A50					0.000746	5×10^{-5}	2.86×10^{-5}	0.023856	1	1	
AG					0.000746	0.027655	0.036787	0.397385	0.239172	0.167851	

[0407] 采用PBS治疗的小鼠在第0-3天显示无便血。从第4天开始,采用PBS治疗的小鼠发展成粪便有血。采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠在第0-4天显示无便血,并在第5天开始显示出粪便有血。采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠产生的便血的量显著低于采用PBS治疗的小鼠所产生的。采用经干燥的裸藻生物物质治疗的小鼠不产生便血直至第6天,在该时间较少量的便血是明显的。采用经干燥的裸藻生物物质治疗的小鼠产生的便血的量小于采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠所产生的。该数据显示,使用经干燥的纤细裸藻或经纯化 β -1,3-葡聚糖的治疗对于预防小鼠的DSS诱导的急性结肠炎或将其严重程度最小化是有效的。

[0408] 实施例16:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的结肠长度的影响

[0409] 如实施例12所述的治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在第10天在小鼠安乐死之后测定各小鼠的结肠长度(7只小鼠/治疗组)。数据列于图17中。采用PBS或经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠的结肠长度在误差之内,但采用经干燥的裸藻生物物质治疗的小鼠的结肠长度显著增加。具体地,采用PBS治疗的小鼠的结肠长度为约5.5cm,而采用经干燥的纤细裸藻治疗的小鼠的结肠长度为约6.5。该数据显示,使用经干燥的裸藻生物物质的治疗对于预防小鼠的DSS诱导的急性结肠炎或将其严重程度最小化特别有效。

[0410] 实施例17:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的结肠炎症的影响

[0411] 如实施例12所述的治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在第10天在小鼠安乐死之后测定各小鼠的结肠炎症程度(3只小鼠/治疗组)。将末端结肠片段进行速冻,冷冻切片(6 μ m的区段)并进行苏木精/曙红染色。图18A中示出了每个治疗组的代表性图像。还基于免疫细胞浸润以及粘膜和粘膜下层的总体结构的损害,由病理学家对各小鼠的结肠炎症的

严重程度进行评级(0-4)(图18B)。检验3只小鼠的总共15个区段(每个处于500 μ m距离)。

[0412] 在三个治疗组中,采用PBS治疗的小鼠显示出最高的结肠炎症级别(评级为约3.4)。采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠显示出稍微低的结肠炎症级别(评级为约2.8),而采用经干燥的纤细裸藻治疗的小鼠具有最低的结肠炎症级别(评级为约1.8)。该数据显示,使用经干燥的纤细裸藻或经纯化的 β -1,3-葡聚糖的治疗对于预防小鼠的DSS诱导的急性结肠炎或将其严重程度最小化是有效的。

[0413] 实施例18:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的T辅助细胞应答的影响

[0414] 如实施例12所述的治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在第10天分析各小鼠中与T辅助细胞功能有关的细胞因子的频率(3只小鼠/治疗组)。使用PMA/罗奴霉素(lonomycin)激活肠系膜淋巴结细胞,在与T辅助细胞功能有关的细胞因子存在的情况下染色,并通过FACS进行分析(图19A)。图19B中示出了细胞因子阳性细胞的百分比。

[0415] 与采用PBS治疗的小鼠相比,采用经干燥的裸藻物质治疗的小鼠的产生Th1($\text{IFN-}\gamma$)、Th17(IL-17和IL-22)和Th9(IL-9)的CD4⁺ T细胞的频率显著更低。与采用PBS治疗的小鼠相比,采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠的产生Th1($\text{IFN-}\gamma$)的CD4⁺ T细胞的水平相对较低。该数据的统计学意义列于表6。

[0416] 表6.细胞因子阳性细胞数据的t-检验的p值

[0417]

	IFN- γ	IL-17	IFN- γ /IL-17	IL-22	IL-10	IL-9	IL-4
A50	0.00317	0.012647	0.055607	0.028488	0.12169	0.059027	0.772352
AG	0.036243	0.462057	0.909833	0.167452	0.262387	0.213291	0.291673

[0418] 实施例19:来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的预处理对患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠的T辅助细胞的细胞因子谱的影响

[0419] 如实施例12所述的治疗患有化学诱导的急性结肠炎的小鼠。在第10天分析各小鼠中的结肠免疫细胞的细胞因子产生(3只小鼠/治疗组)。使用磁分离将免疫细胞从结肠组织中分离,培养来自每只小鼠的等量细胞24小时。使用一式三份的多重分析测定自发性释放的细胞因子(T辅助细胞特异性的)的水平(图20)。

[0420] 该数据显示,在采用经干燥的裸藻物质治疗的小鼠中Th1($\text{IFN-}\gamma$)和Th17(IL-17)细胞因子受抑制。在采用经纯化的 β -1,3-葡聚糖治疗的小鼠中,结肠免疫细胞产生更高水平的促炎细胞因子(IL-22、IL-9(Th9))和抗炎细胞因子(IL-10、IL-4(Th2))。采用经干燥的裸藻物质的治疗所产生的抗小鼠结肠炎保护特别显著,这看起来是由于细胞因子IL-10产生的增加和促炎免疫细胞募集的抑制。

[0421] 实施例20:评估消耗来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖对个体的肠道炎症的影响的临床研究

[0422] 临床试验是用于评估消耗来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖对治疗肠道炎症的影响。在提供书面知情同意书(经注册机构审查委员会批准)和筛选过程之后招募志愿者。该研究为4周的持续时间并且评估发生在 β -1,3-葡聚糖消耗的基线、2和4周处。以胶囊形式施用来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖以向每个个体提供250mg的每日剂量。

[0423] β -葡聚糖对肠道炎症的影响是使用以下中的一个或多个测定的:腹痛的程度、

腹泻的发生、体重、食欲水平、直肠出血的存在、全身健康和身心健康的评估以及血压和血液化学的测定。血液化学分析可包括蛋白质羰基含量(氧化应激的标记)、急性期炎症标记(诸如C-反应蛋白、 α -1酸性糖蛋白、纤维蛋白原以及血小板因子-4)、细胞因子谱以及抗体分析。

[0424] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗降低个体的炎症性嗜碱粒细胞的数量,如图21所示。该数据表明来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖调节个体的免疫系统功能。

[0425] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗影响个体的紧急排便或腹泻的数量,如图22所示。该数据显示0-2周的肠问题的统计学显著降低($p < 0.05, *$),且2-4周的肠问题增加,达到统计学趋势($p < 0.1, (*)$)。该数据表明来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖在个体的肠道健康中起作用。

[0426] 来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗还调节个体对氧化应激的应答,其可以在炎症中起作用。超氧化物歧化酶(SOD)是参与中和超氧化物离子的一种酶,其是高反应性的并破坏自由基。SOD在降低氧化应激中起重要作用。来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗增加个体的SOD的水平,如图23所示。在最初2周的来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗期间,观察到平均SOD水平显著增加,随后在接下来的两周期间轻微降低。尽管在研究的最后两周内轻微降低,但对于所有参与者,但跨4周的总体改善是高度显著的($p < 0.01, **$)。

[0427] 体内的自由基应激的另一量度是脂质过氧化。脂质过氧化是由氧化应激诱导的细胞损伤的主要机制之一。具体地,丙二醛是体内自由基应激的标记物以及对血流中脂质的氧化损伤的量度。在最初2周的来源于裸藻的 β -1,3-葡聚糖的口服消耗期间,观察到脂质过氧化显著降低,随后在接下来的两周期间轻微增加(图24)。尽管在研究的最后两周内轻微增加,但跨4周的总体改善是高度显著的($p < 0.01, **$)。

[0428] 以上说明包括正文和附图中的几个数值范围。这些公开的数值范围支持处于所公开数值范围内的任何范围或值,尽管说明书中没有逐字地陈述精确的范围限制,这是因为本发明的实施方案在整个公开的数值范围内都是可以实践的。

[0429] 上述说明用于使本领域技术人员能够制造并使用本发明,并根据特定应用及其要求来提供。对优选实施方案的各种修改对本领域技术人员是显而易见的,在不背离本发明的精神和范围的情况下,本文定义的一般原理可以应用于其他实施方案和应用。因此,本发明并不旨在限定于所示实施方案,而是应当与符合本文公开的原理和特征的最宽范围一致。本申请所引用的专利和出版物的所有公开内容都通过援引并入本文。最后,本发明可以根据权利要求和它们的等同来解释。

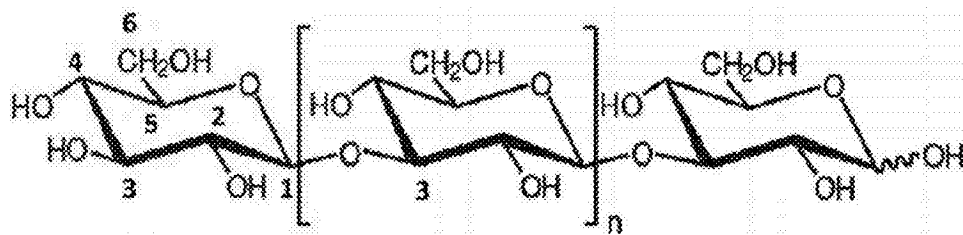


图1A

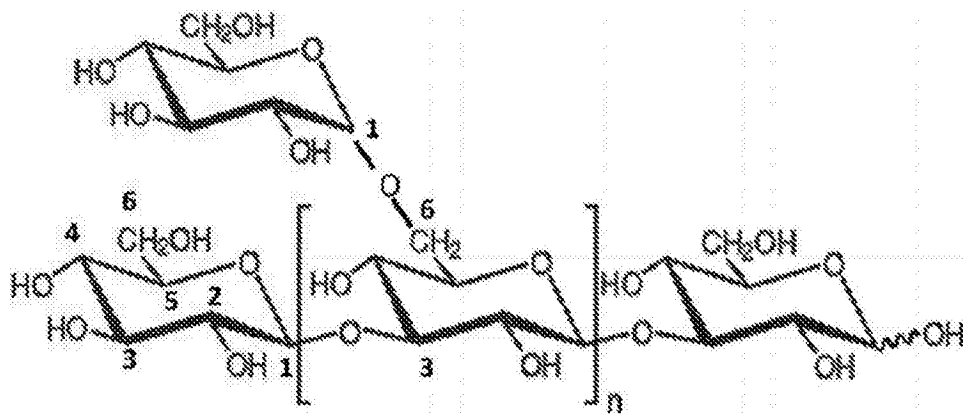


图1B

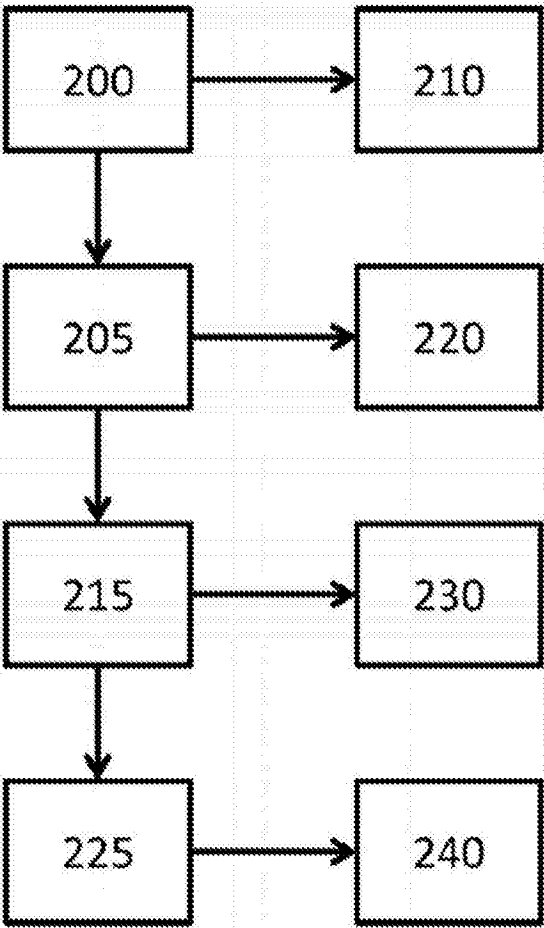


图2

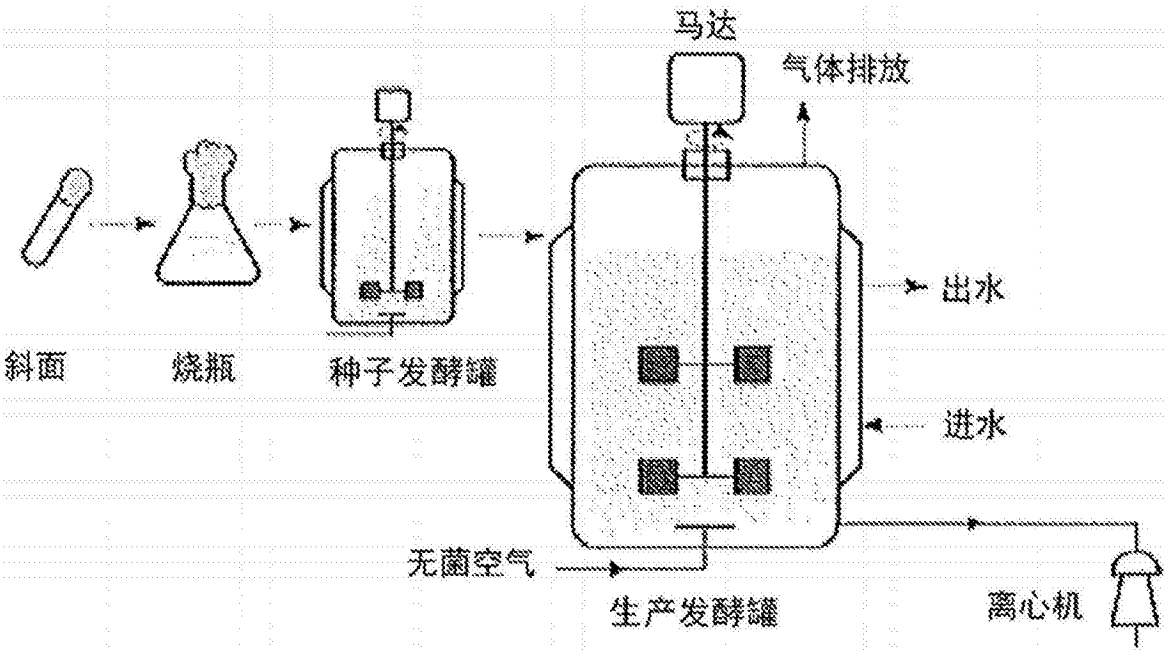


图3

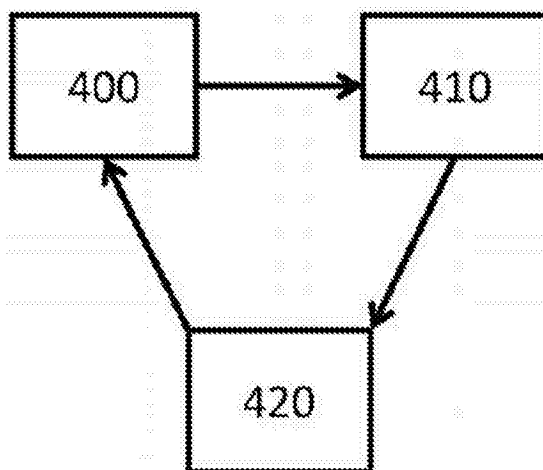


图4A

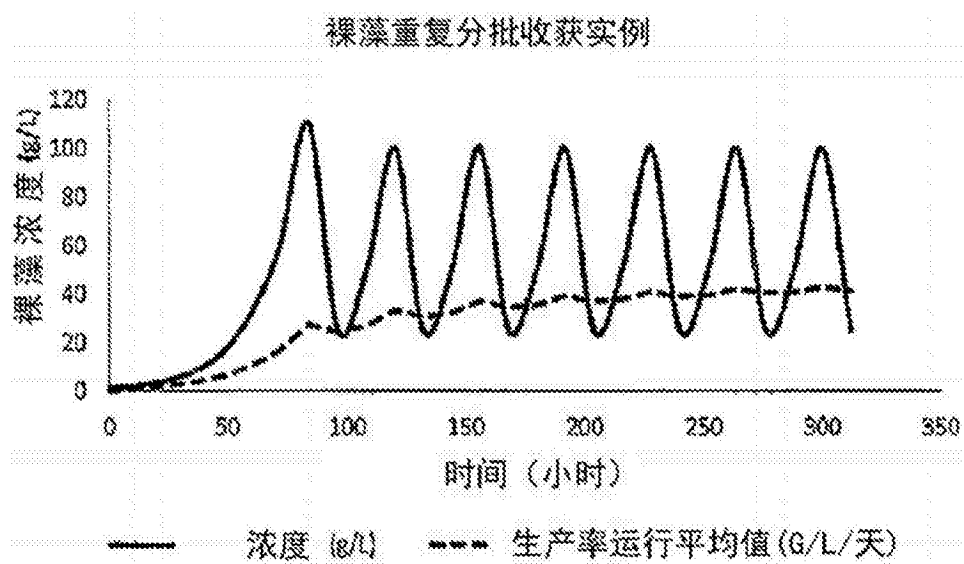


图4B

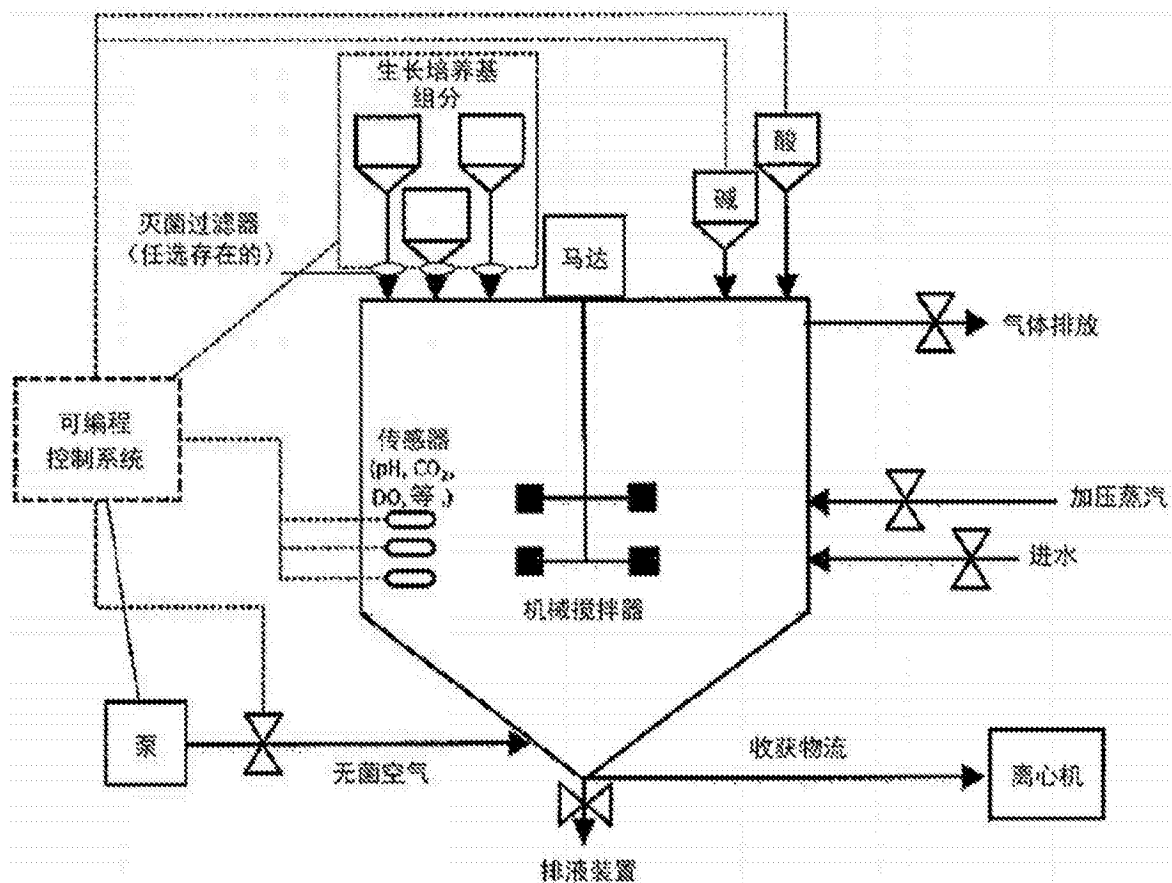


图5

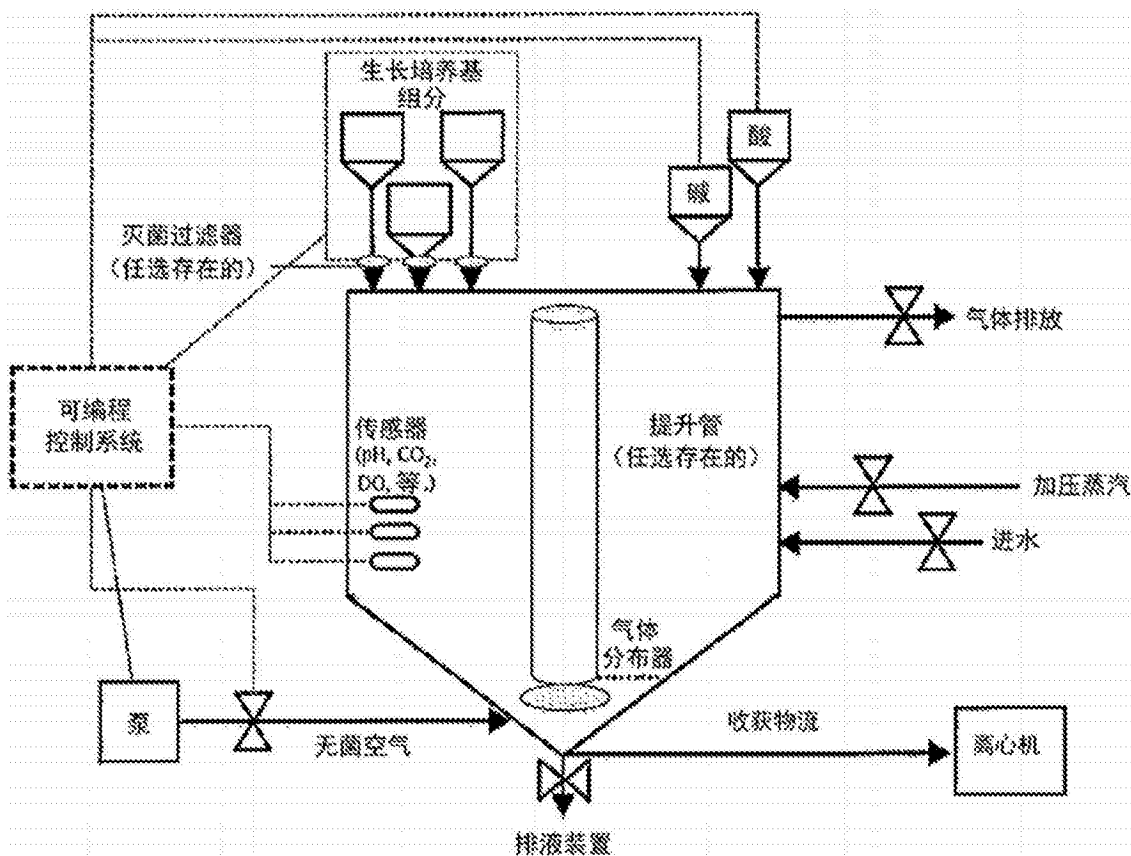


图6

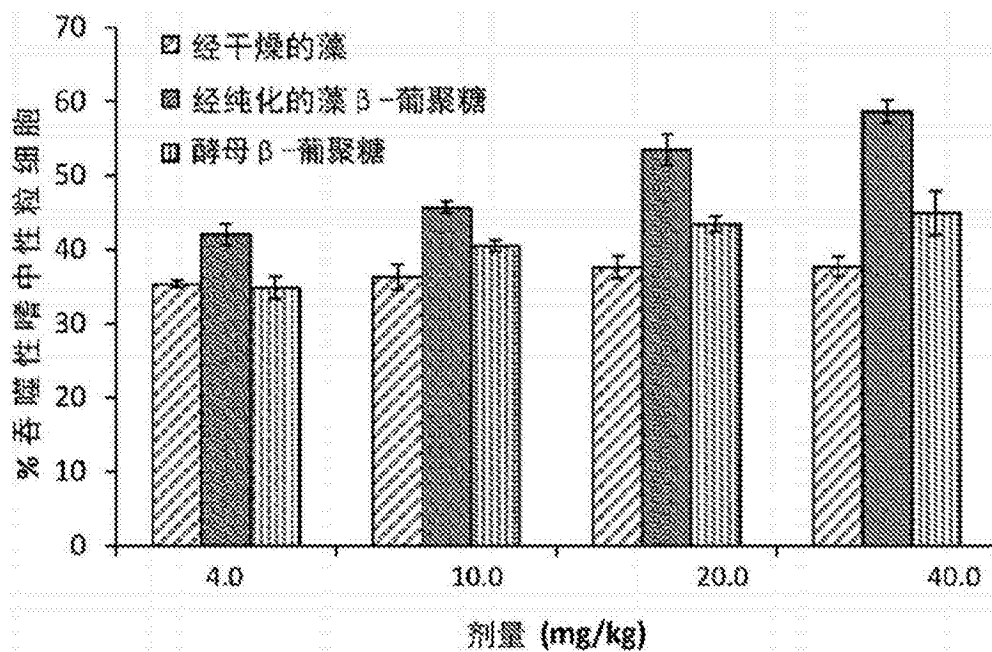


图7A

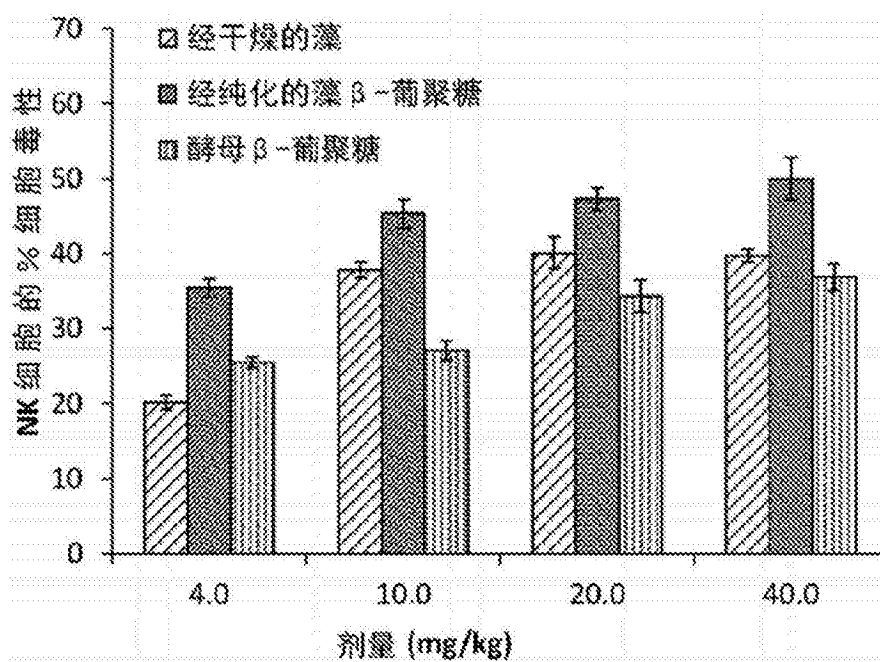


图7B

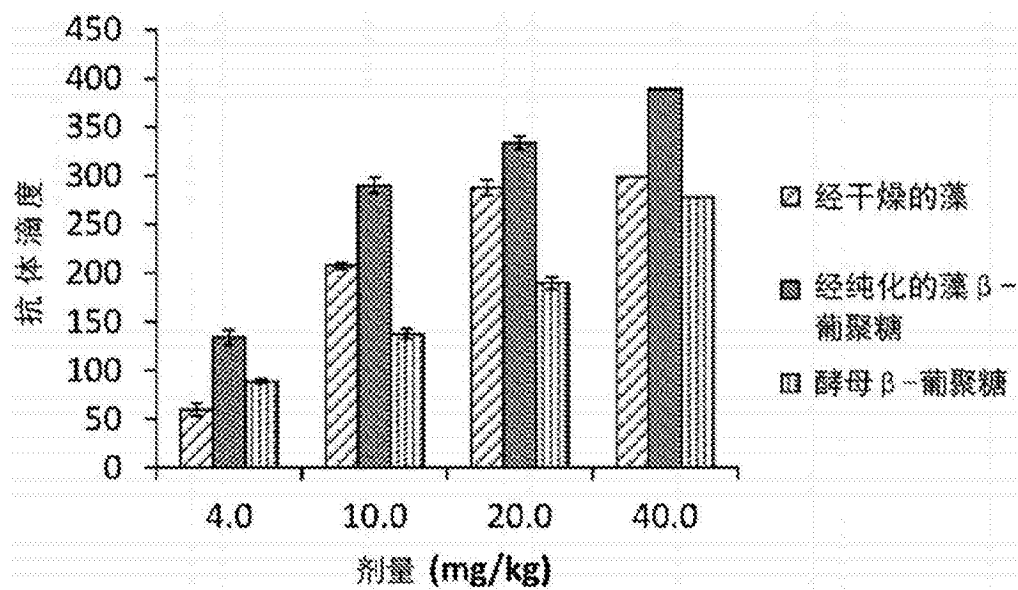


图7C

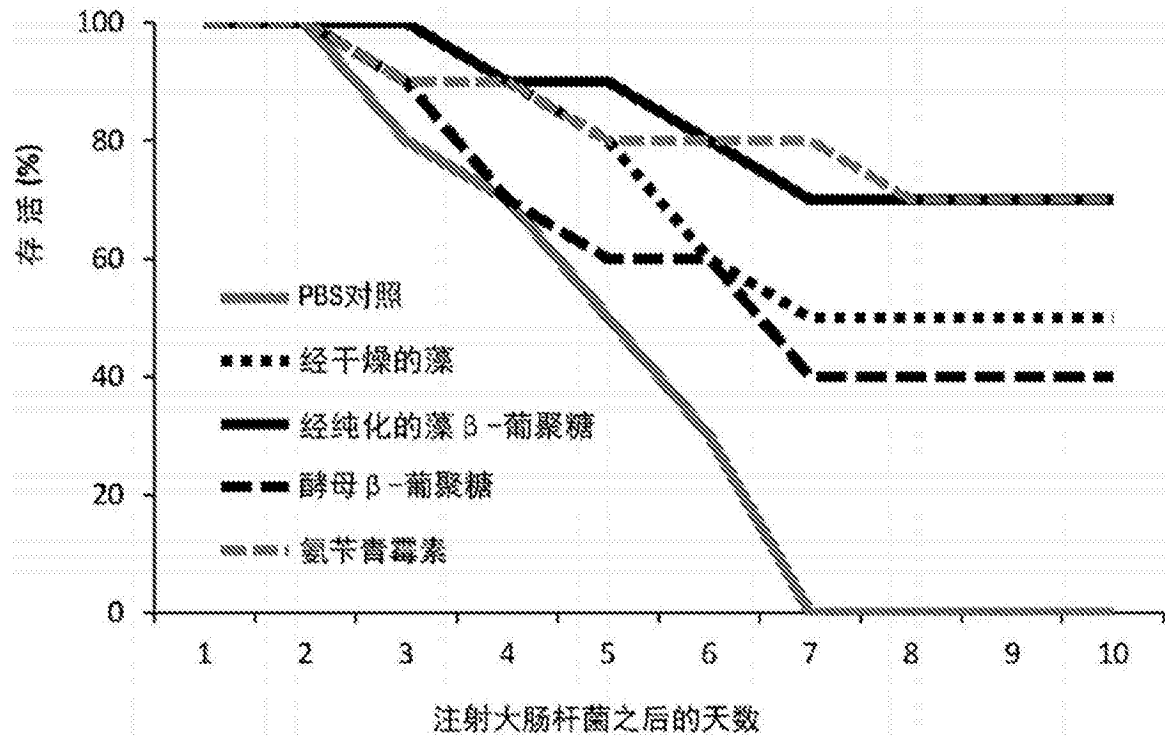


图8

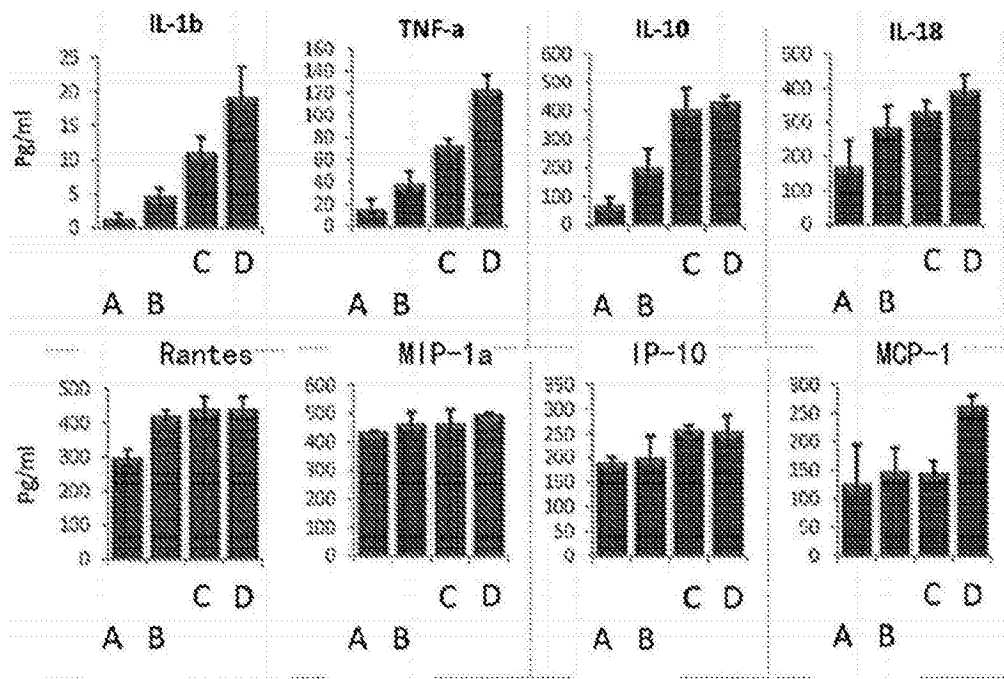


图9A

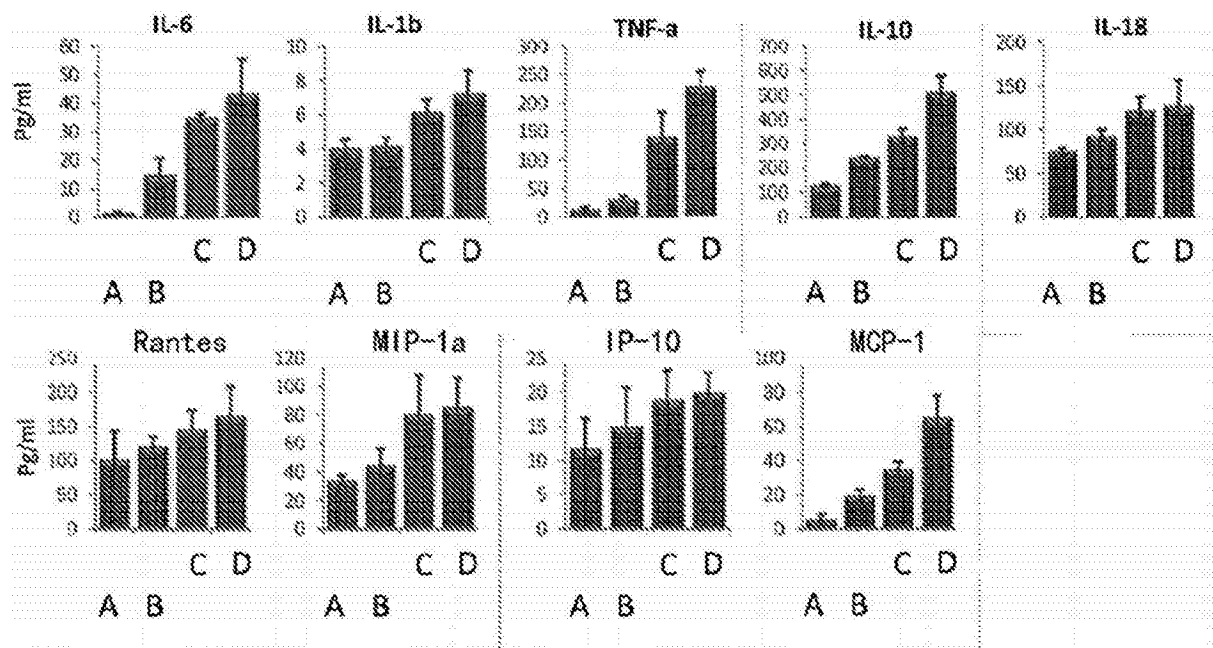


图9B

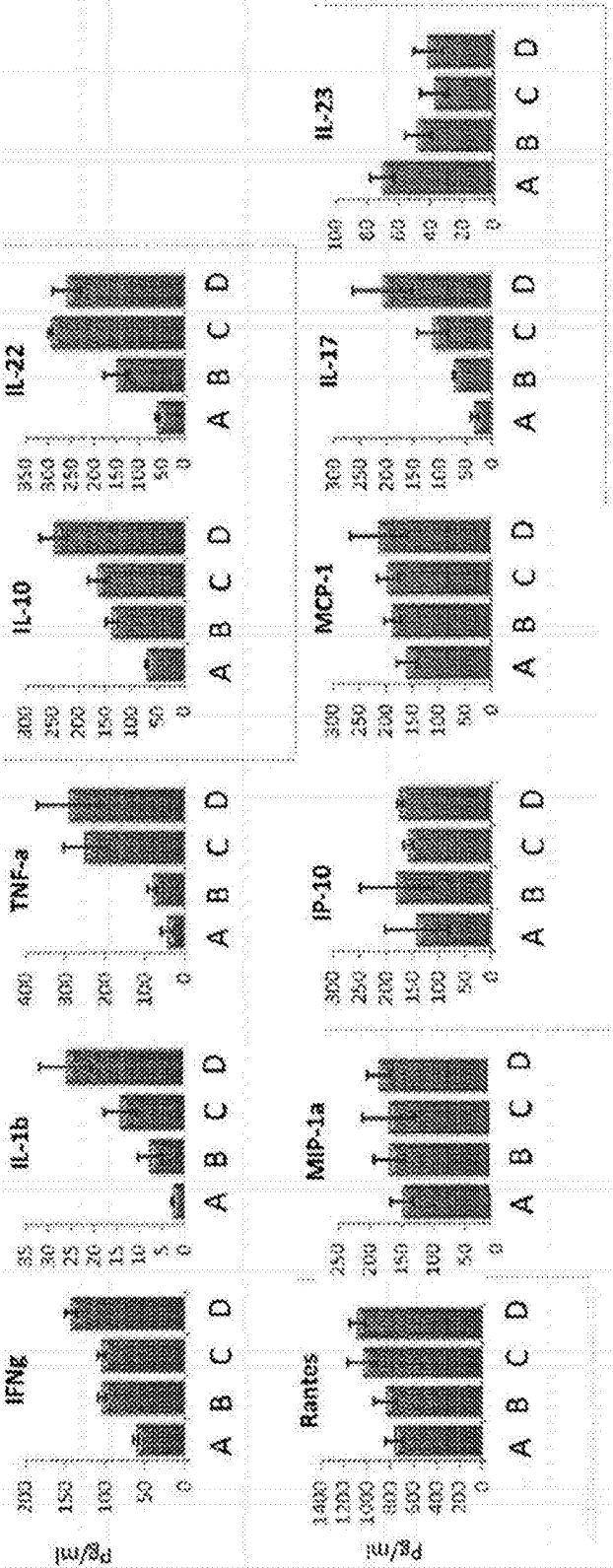


图9C

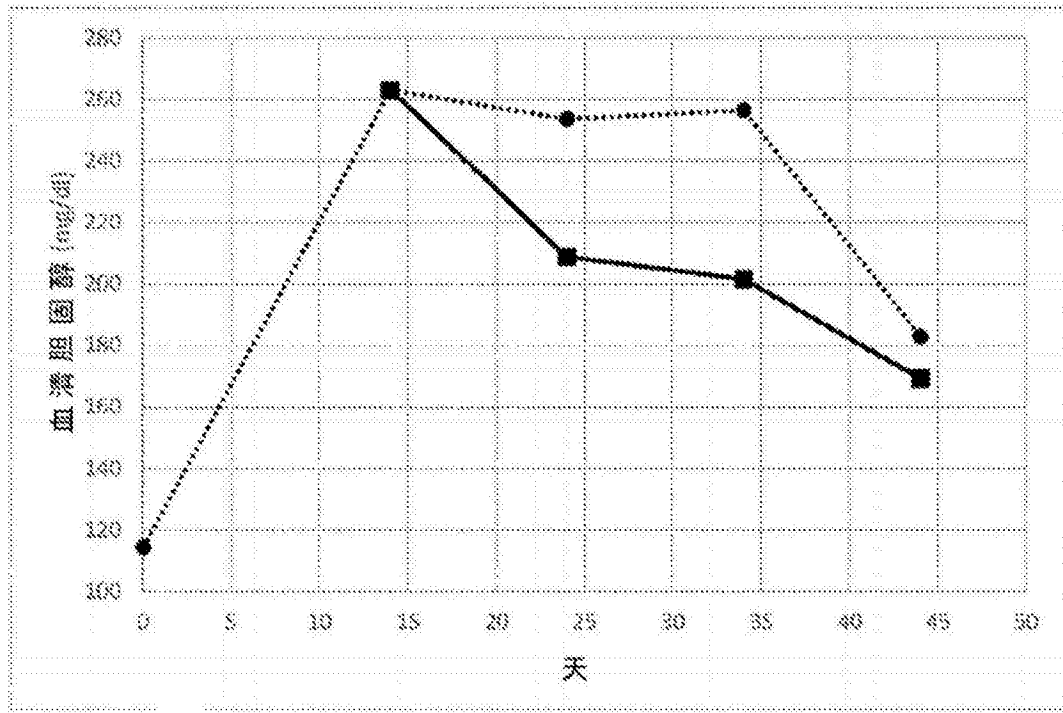


图10A

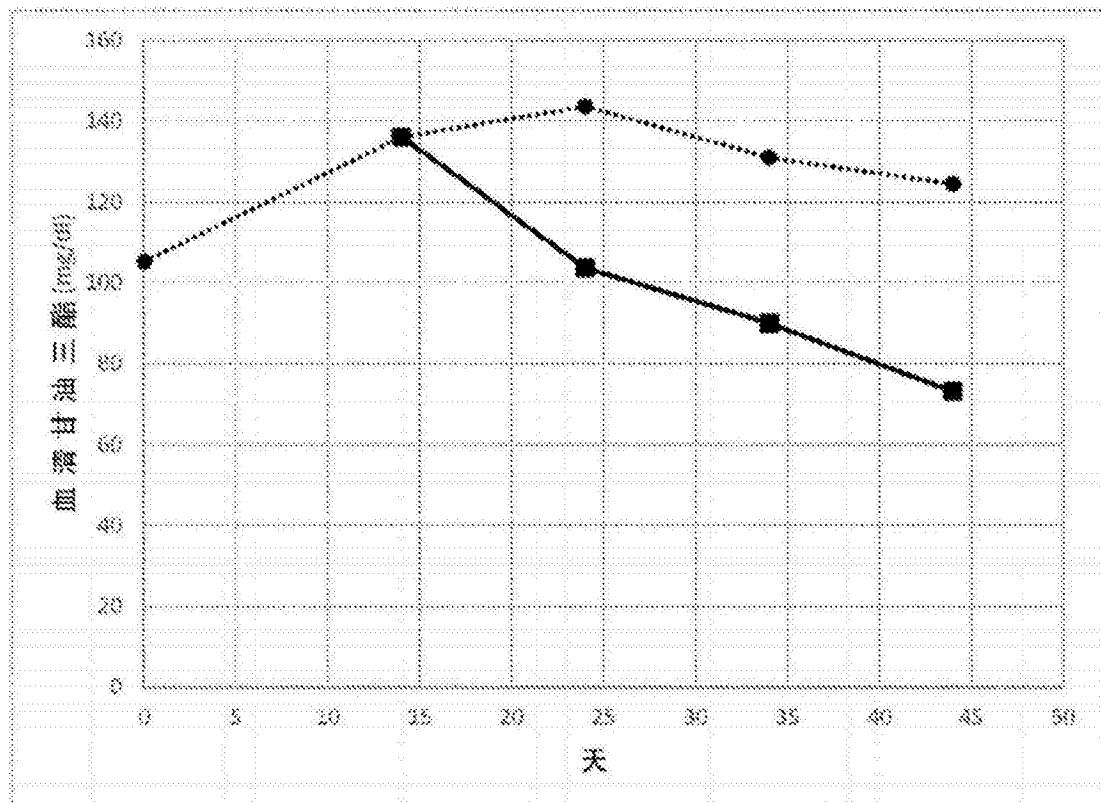


图10B

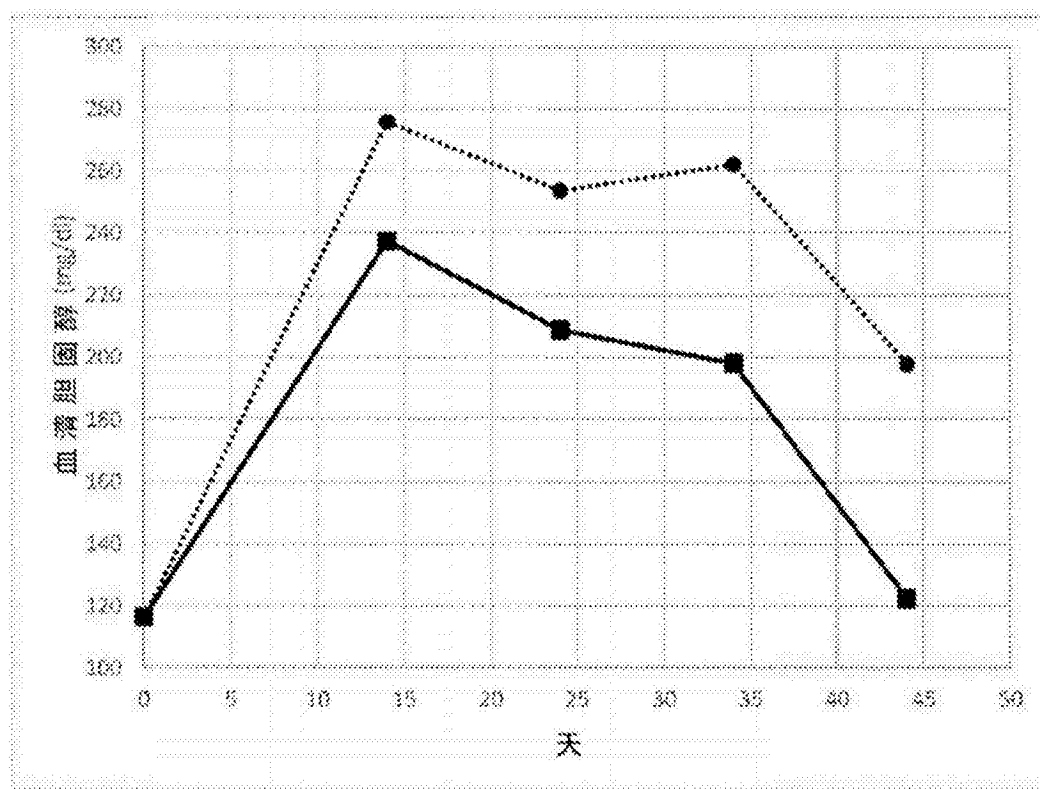


图11A

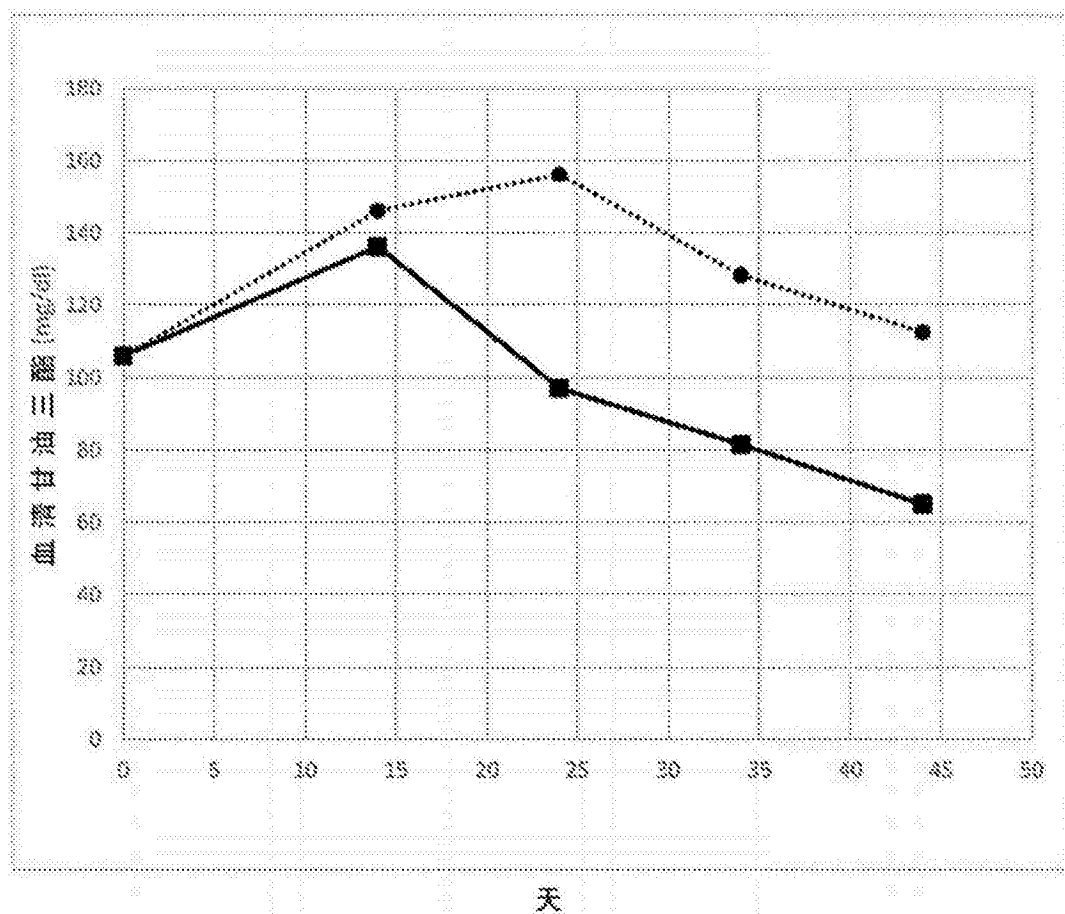


图11B

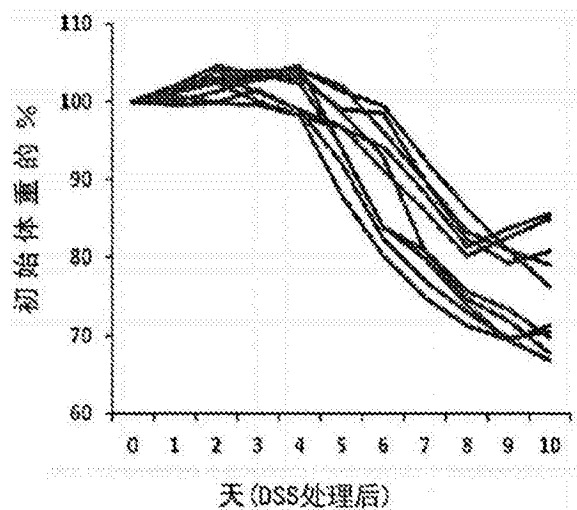


图12A

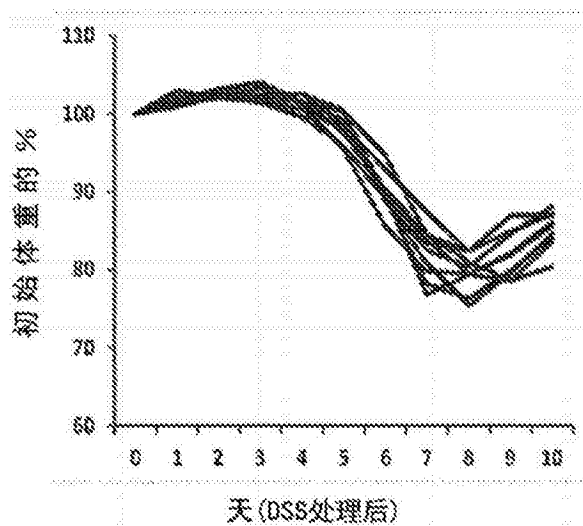


图12B

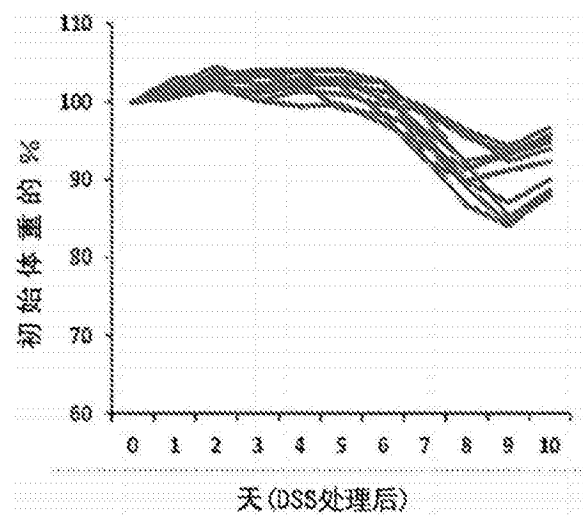


图12C

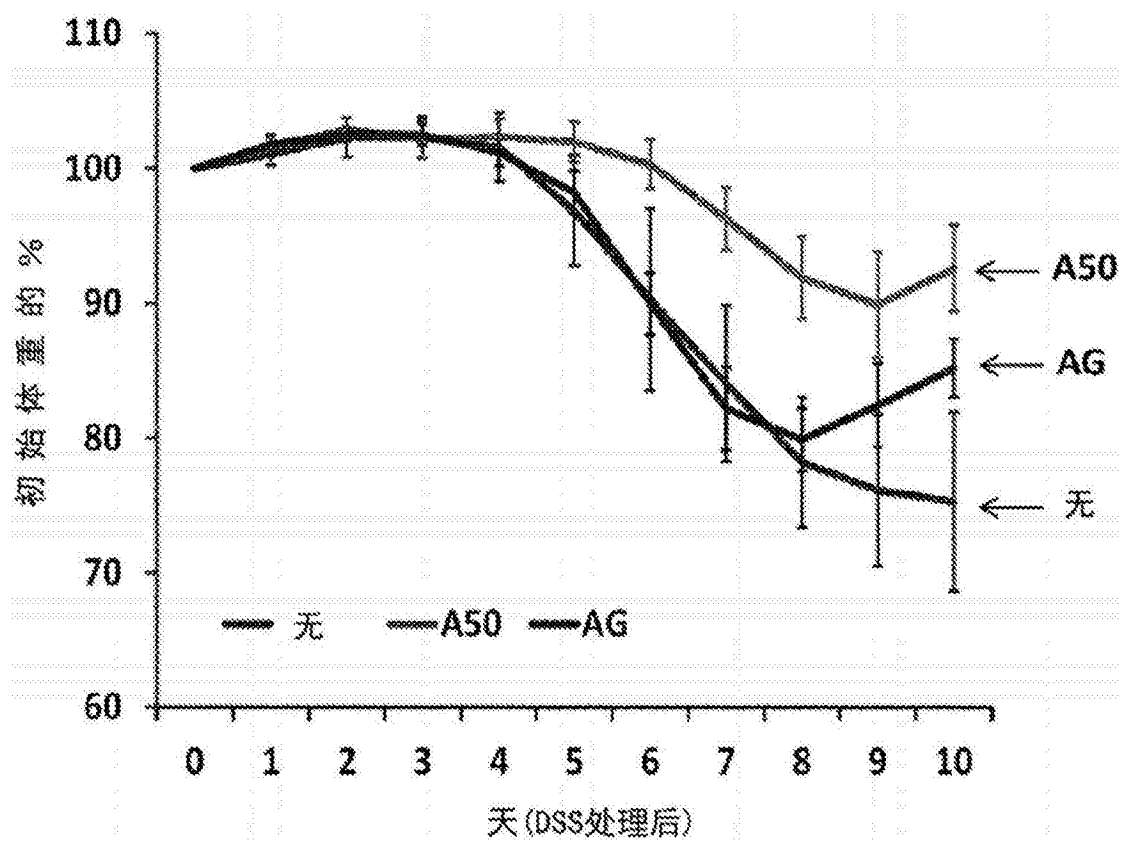


图13

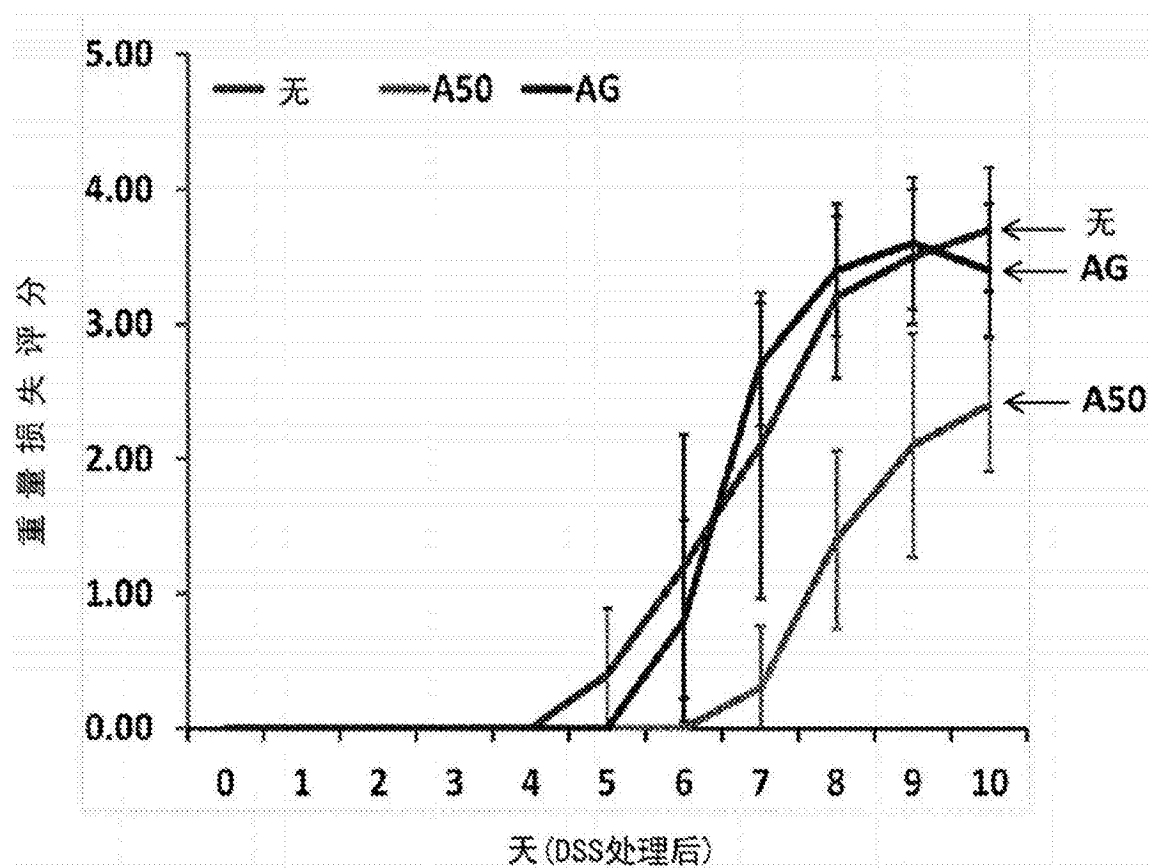


图14

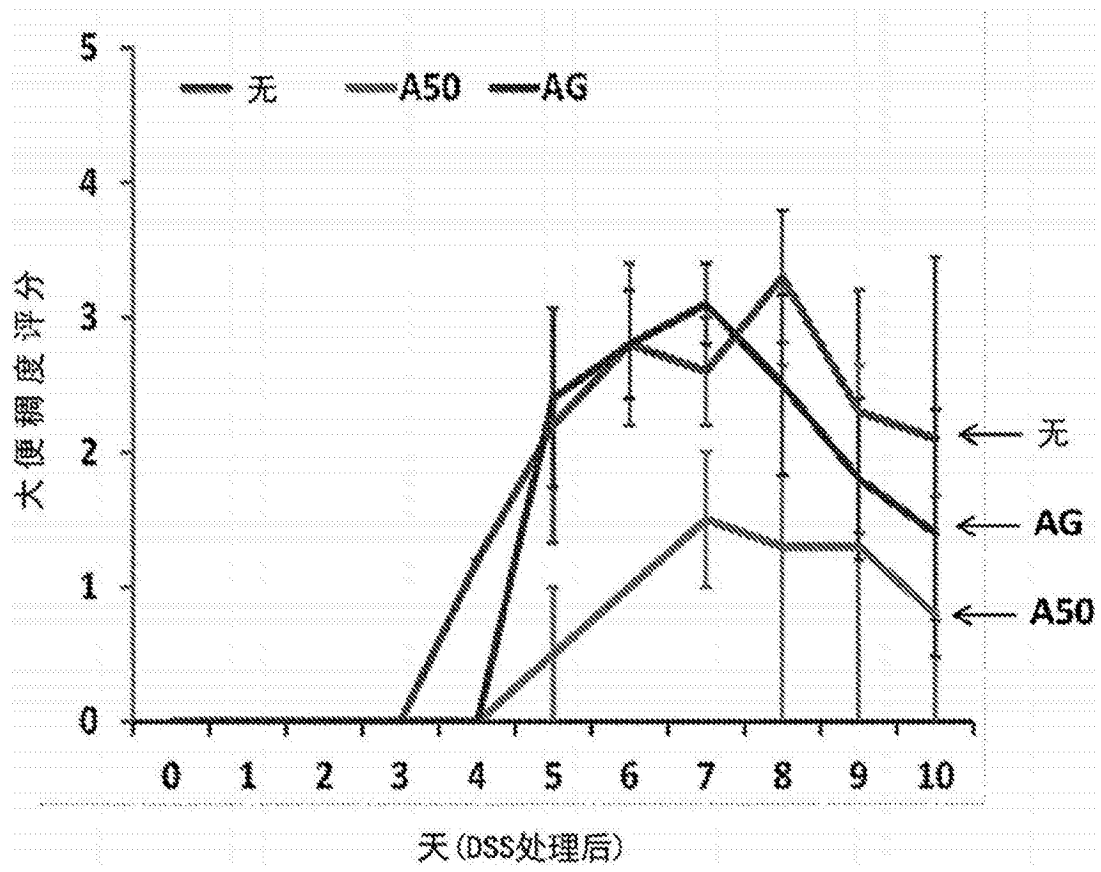


图15

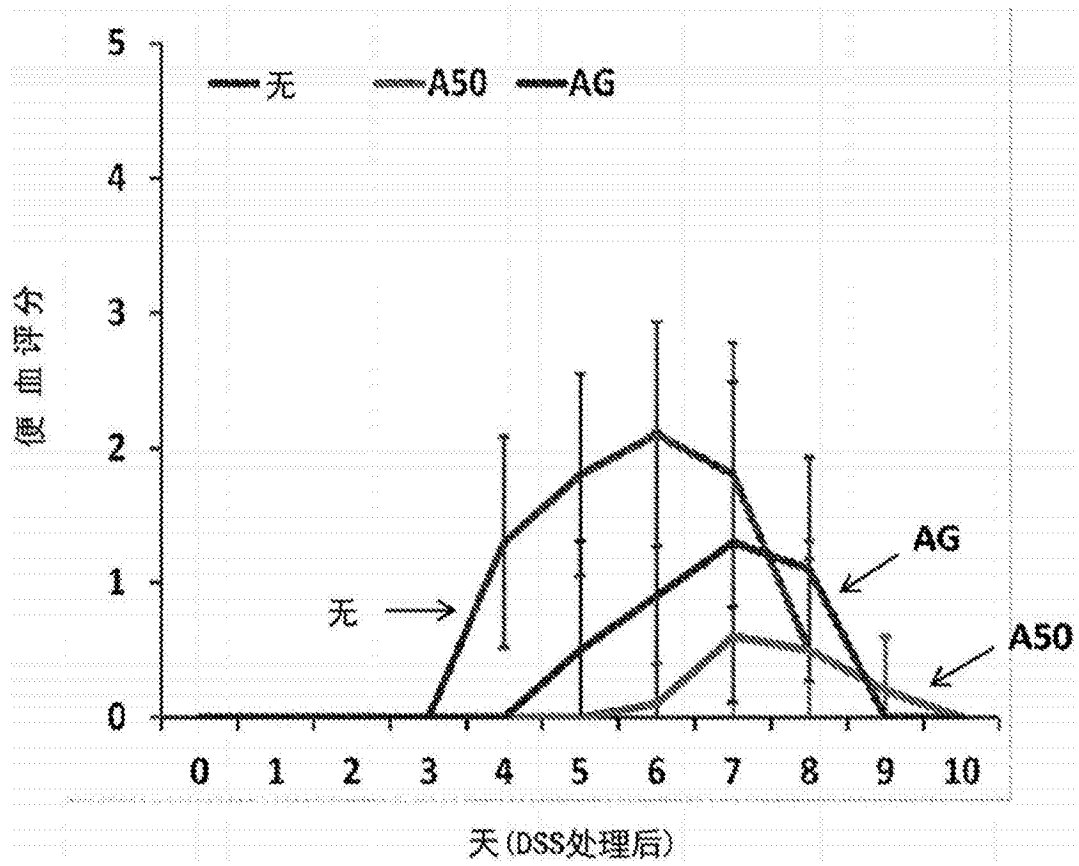


图16

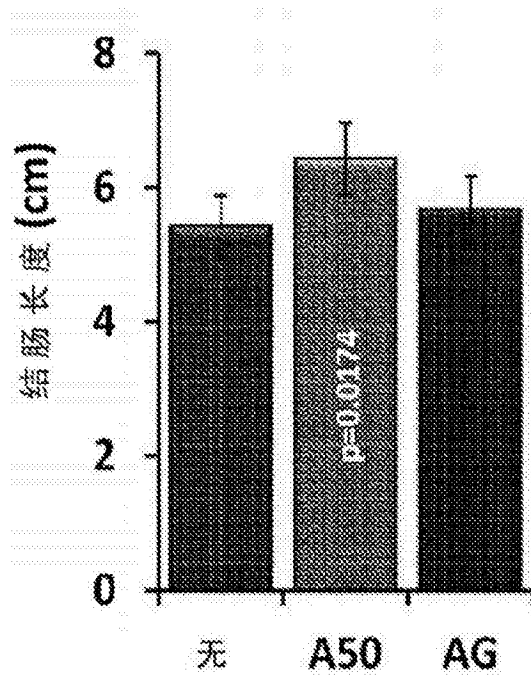


图17

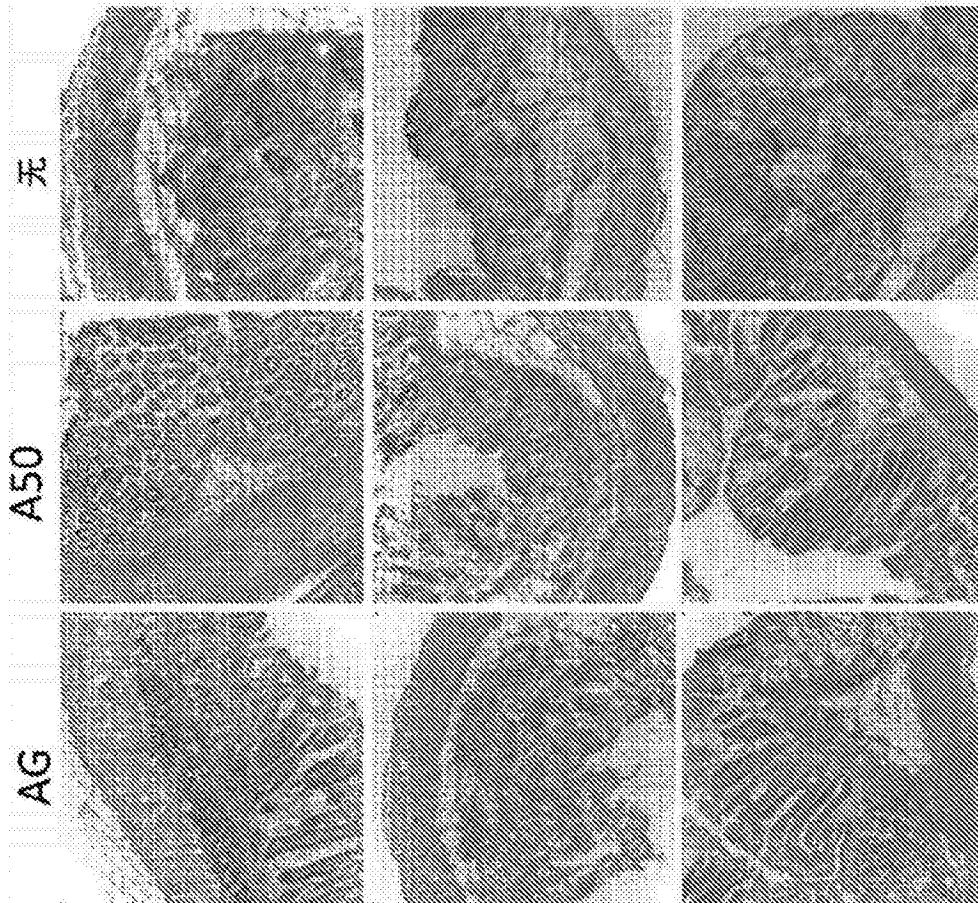


图18A

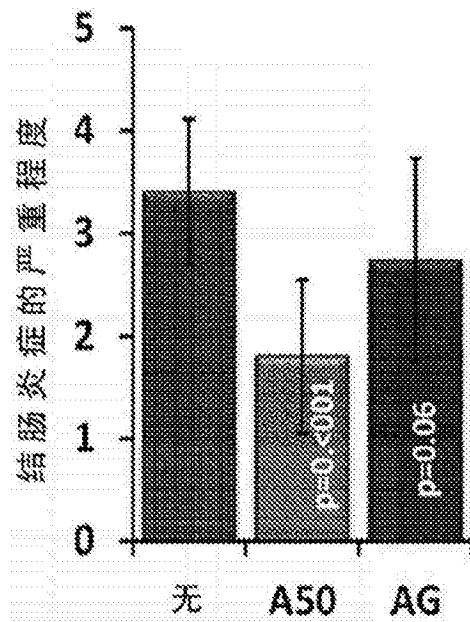


图18B

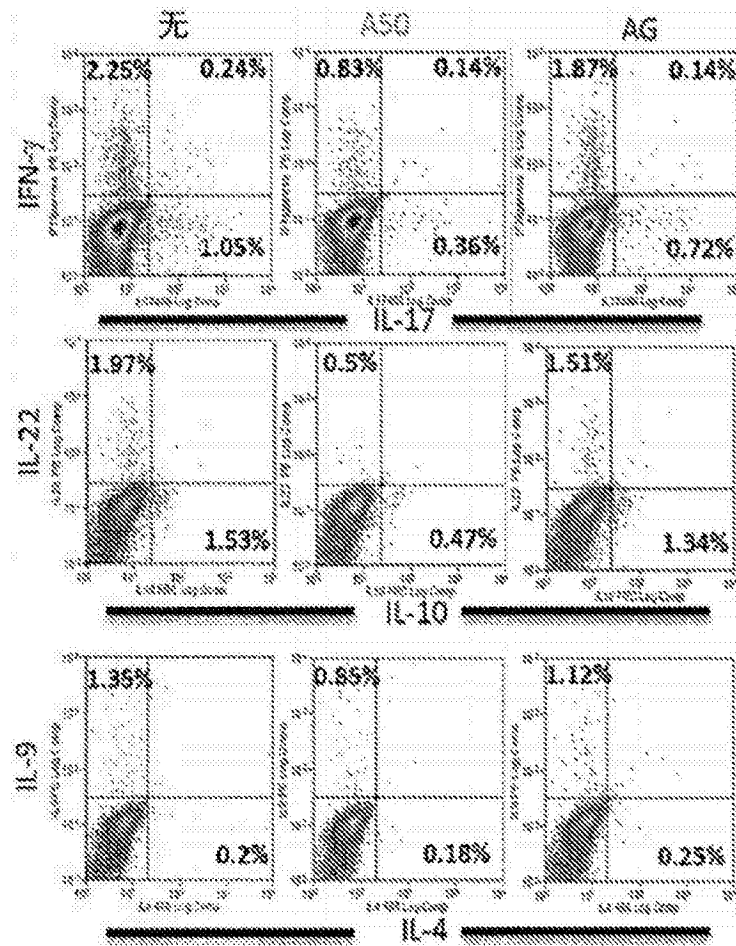


图19A

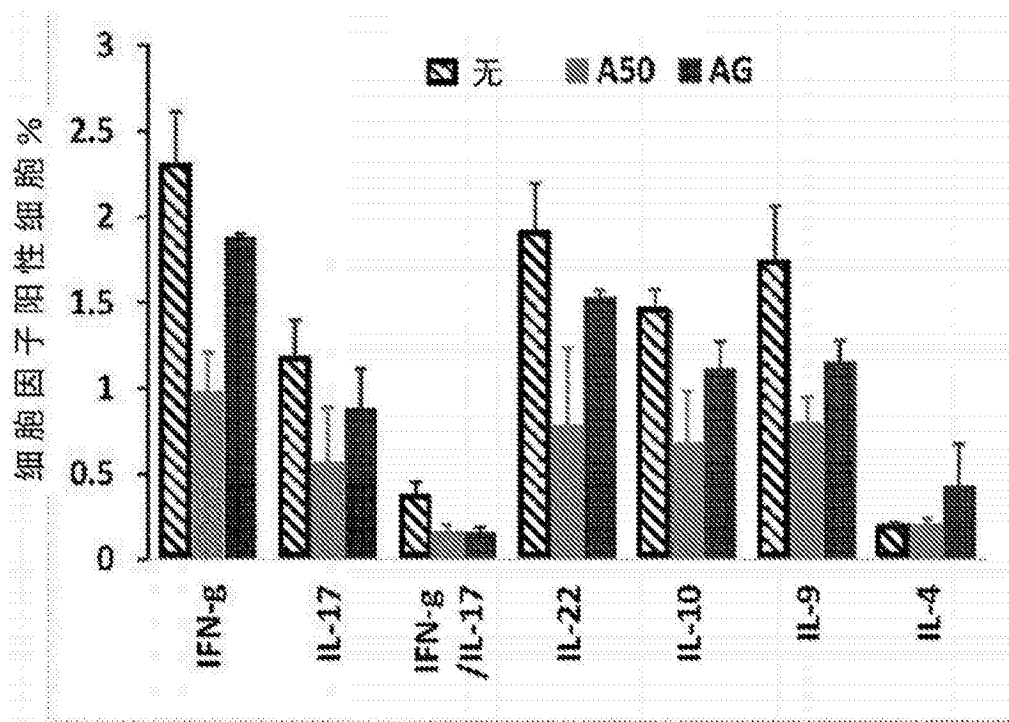


图19B

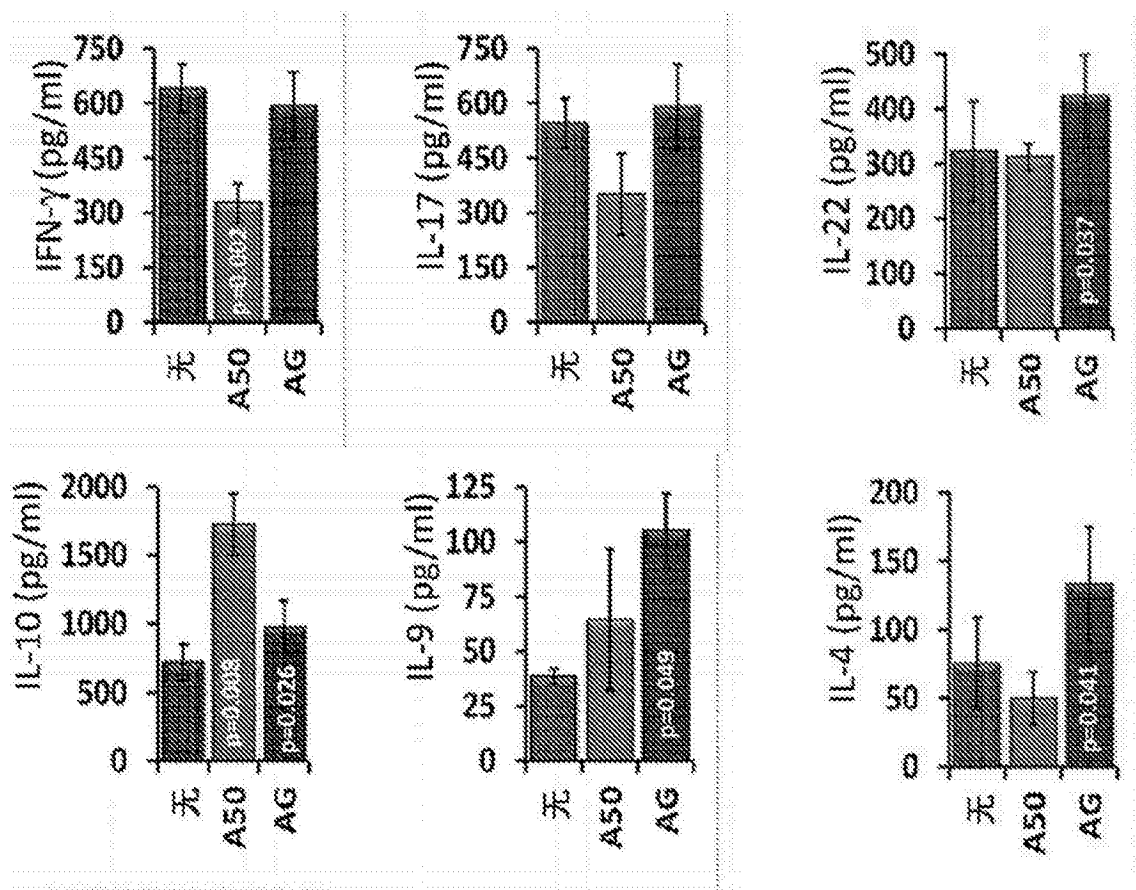


图20

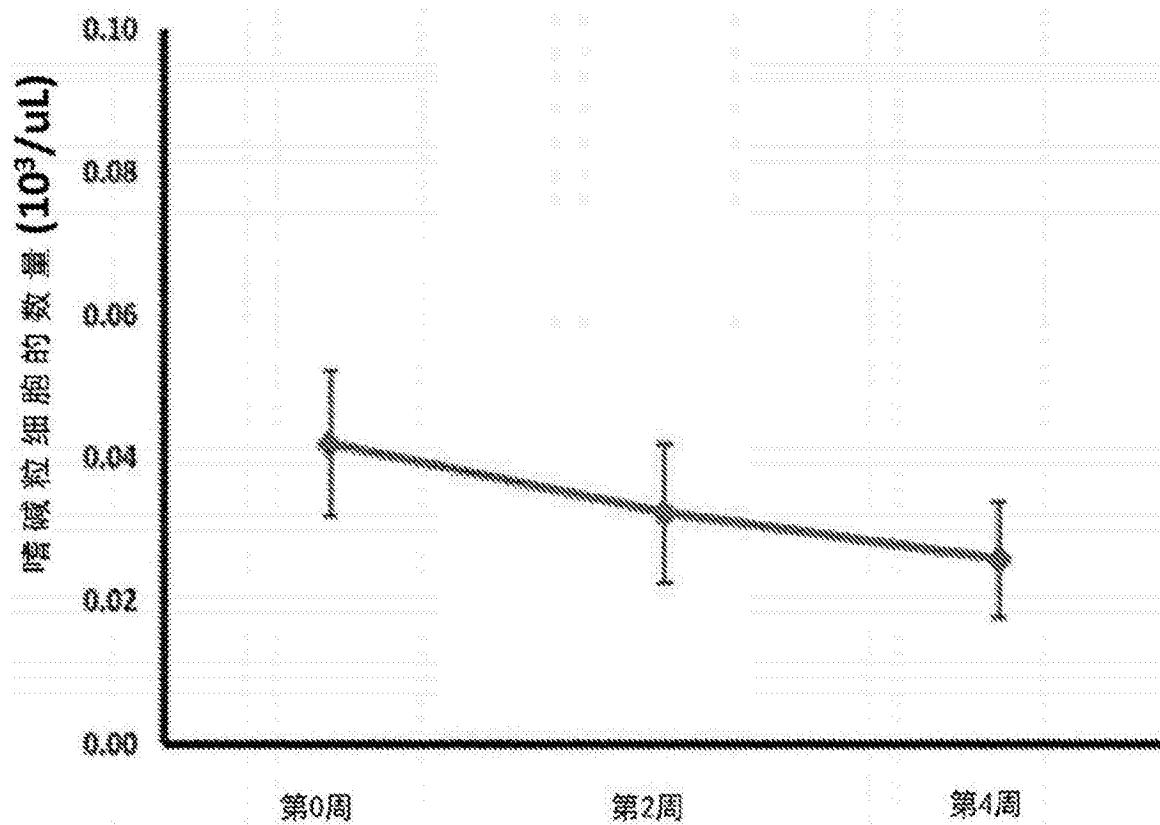


图21

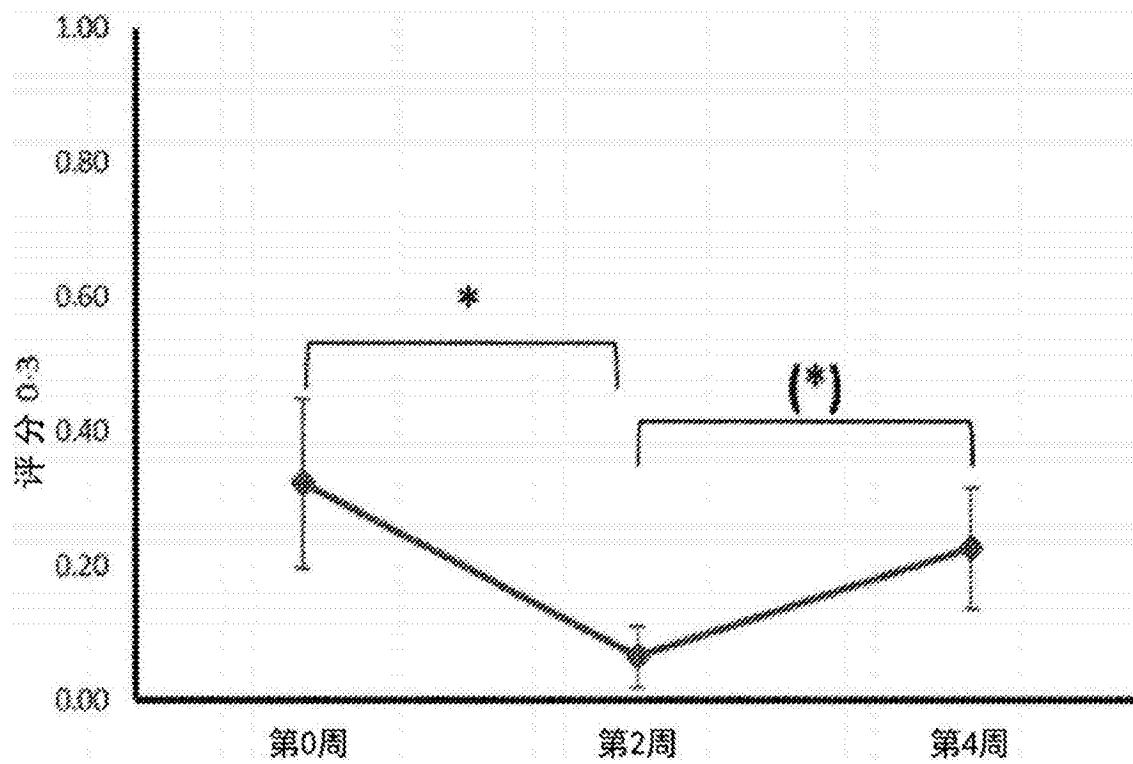


图22

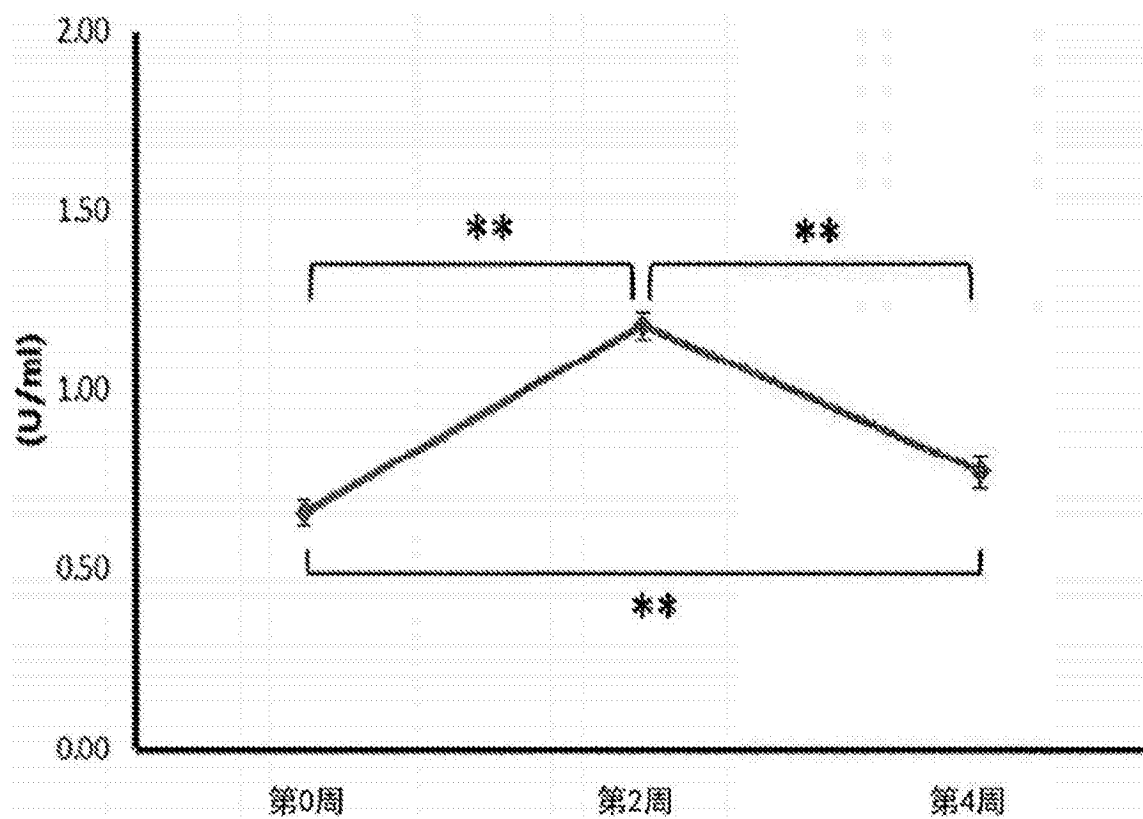


图23

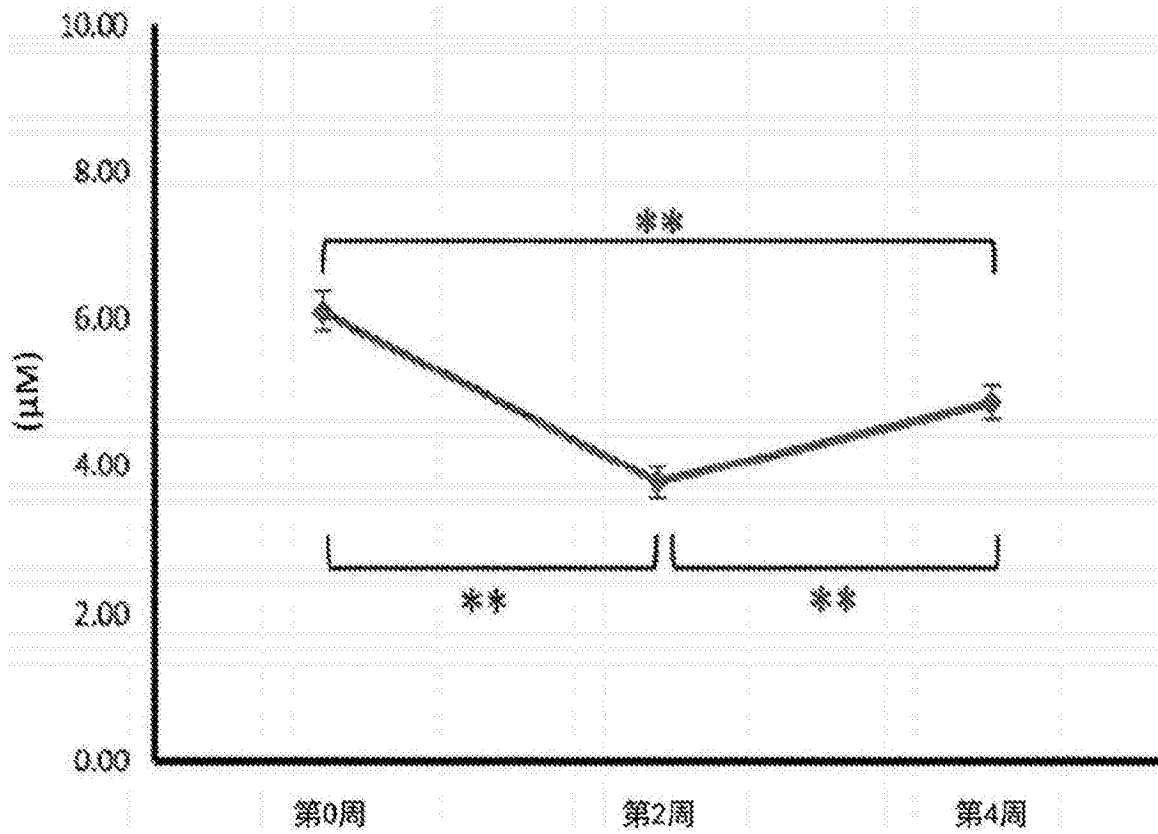


图24

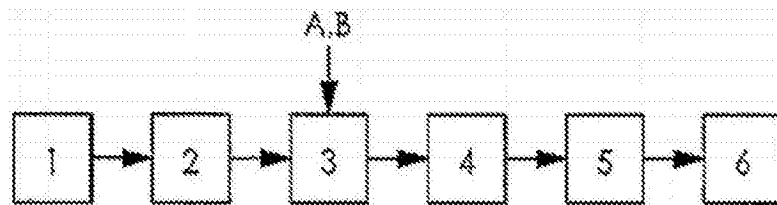


图25

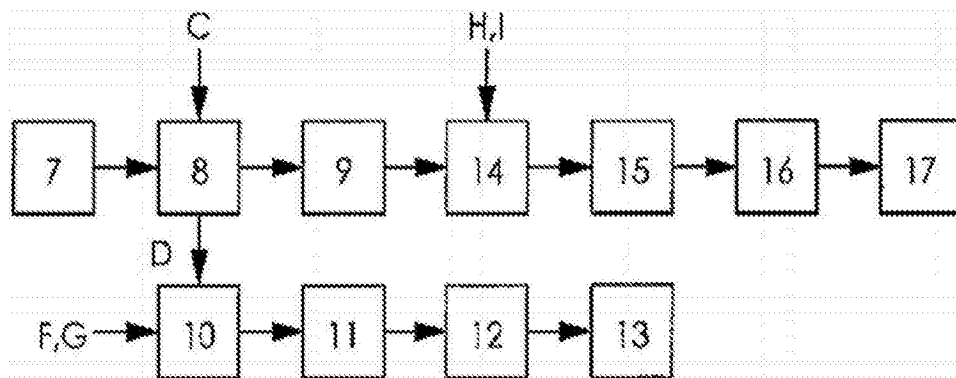


图26