



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113164532 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980050933.2

(72) 发明人 S·福雷斯

(22) 申请日 2019.05.30

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

(30) 优先权数据

代理人 李政璋 钱文字

62/678,253 2018.05.30 US

62/730,511 2018.09.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.01.29

A61K 35/745 (2015.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/702 (2006.01)

PCT/US2019/034765 2019.05.30

A61K 9/19 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 9/48 (2006.01)

W02019/232284 EN 2019.12.05

A61K 9/28 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C12N 1/04 (2006.01)

ATCC PTA-125180 2018.08.08

C12N 1/02 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 进化生物系统股份有限公司

权利要求书8页 说明书37页

地址 美国加利福尼亚州

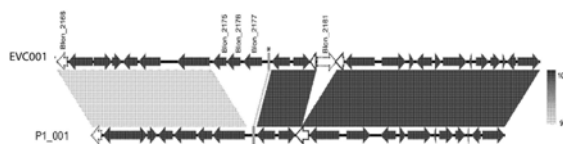
PCT/R0/134表1页 附图8页

(54) 发明名称

H5功能性长双歧杆菌婴儿亚种的组合物和使用方法

(57) 摘要

包含功能性H5簇的长双歧杆菌婴儿亚种(B.longum subsp.infantis),包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001,可以用于组合物中,用于改善婴儿和成人的肠道健康。



1. 一种组合物,其包含长双歧杆菌婴儿亚种(*B. longum* subsp. *infantis*)和至少一种寡糖,所述长双歧杆菌婴儿亚种包含功能性H5基因簇,而所述寡糖具有I型或II型核心。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述长双歧杆菌婴儿亚种是以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。

3. 如权利要求1或2所述的组合物,其中,所述H5簇包含Blon_2175、Blon_2176和Blon_2177。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的组合物,其中,所述功能性H5簇包含Blon_2171、Blon_2173、Blon_2174、Blon_2175、Blon_2176、Blon_2177和galT。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的组合物,其中,所述长双歧杆菌婴儿亚种是活化的。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌(*Bifidobacterium*)通过活化剂活化,其中所述活化剂来自表4。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的组合物,其中,所述组合物还包含选自表4的活化剂。

8. 如权利要求1-7中任一项所述的组合物,其中所述双歧杆菌包含LNB转运系统,所述LNB转运系统能够在一种或多种具有I型或II型核心的寡糖水解之前内化所述寡糖,并且能够水解内化的寡糖。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的组合物,其中,所述寡糖能获自哺乳动物乳,所述哺乳动物乳选自人、牛、猪、兔、山羊、绵羊、骆驼乳,或其混合物。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌已经在至少一种哺乳动物乳寡糖存在的情况下培养。

11. 如权利要求1-10中任一项所述的组合物,其中,与在复杂寡糖不存在的情况下培养的同一种的双歧杆菌相比,所述双歧杆菌对哺乳动物粘膜细胞的结合亲和力更高。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌包含选自下组的上调的基因:Blon_0042、Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022和其组合。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌包含选自下组的下调的基因:Blon_0518、Blon_0785、Blon_2167、Blon_2168和其组合。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌包含上调的Blon_0042基因。

15. 如权利要求1-14中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌包含下调的Blon_2168基因。

16. 如权利要求1-15中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌包含选自下组的上调的基因:Blon_0879、Blon_0880、Blon_0881、Blon_0882、Blon_2177、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2343、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347和Blon_2331。

17. 如权利要求1-16中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌表达编码唾液酸酶或岩藻糖苷酶的基因。

18. 如权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌表达编码唾液酸或岩藻糖转运体的基因。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌以100万cfu/g-5000亿cfu/g的浓度存在。

20. 如权利要求1-20中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌以50亿cfu/g-1000亿cfu/g的浓度存在。

21. 如权利要求1-20中任一项所述的组合物,其中,所述双歧杆菌以100亿cfu/g-500亿cfu/g或5000万cfu/g-50亿cfu/g的浓度存在。

22. 如权利要求1-21中任一项所述的组合物,其还包含分离的复杂寡糖。

23. 如权利要求22所述的组合物,其中,所述复杂寡糖是哺乳动物乳寡糖(MMO)。

24. 如权利要求23所述的组合物,其中,所述复杂寡糖分离自哺乳动物乳来源。

25. 如权利要求24所述的方法,其中,所述哺乳动物来源是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊或骆驼。

26. 如权利要求23所述的组合物,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括存在于人乳糖(HMO)、牛乳糖(BMO)、牛初乳寡糖(BCO)、山羊乳糖(GMO)或其组合中的寡糖分子。

27. 如权利要求26所述的方法,其中,所述牛来源来自牛乳、牛初乳、牛初乳浓缩物或其混合物。

28. 如权利要求27所述的组合物,其中,所述牛初乳寡糖包含水平大于1%的Hex(4); Hex(4)HexNAc(2)或Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)中的任一种。

29. 如权利要求24所述的组合物,其中,所述复杂寡糖来自乳清渗透物。

30. 如权利要求22-29中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括乳-N-二糖,乳-N-三糖,N-乙酰基乳糖酰胺,乳-N-新三糖,乳-N-四糖,乳-N-新四糖,岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻戊糖,乳二岩藻四糖,唾液乳糖,二唾液酸内酯-N-四糖,2'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖胺,3'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液-3-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖,6'-唾液乳糖胺,6'-唾液乳糖,二岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻糖基戊糖I,乳-N-岩藻糖基戊糖II,乳-N-岩藻糖基戊糖III,乳-N-岩藻糖基戊糖V,唾液乳-N-四糖,其衍生物或其组合。

31. 如权利要求22-30中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含(3Hex, 4HexNAc, 1Fuc)、(1Gal, 1GlcNAc, 1NeuAc)或(1Glu, 1Gal, 1NeuAc(3'或6'))中的至少一种。

32. 如权利要求22-31中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖是少于50%岩藻糖基化的。

33. 如权利要求22-32中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含下述成分比例之一:1)Hex(2)NeuAc(1):Hex(2)HexNAc(1)的比例小于5.0;2)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(1)的比例大于1.0;3)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(2)的比例大于2.0;4)Hex(3):Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)的比例小于100;或5)Hex(2)HexNAc(1):Hex(4)NeuAc(2)NeuGc(1)的比例大于10。

34. 如权利要求22-33中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖占组合物重量的至少20%。

35. 如权利要求22-33中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖占组合物重量的至少50%。

36. 如权利要求22-33中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖占组合物重量的至少80%。

37. 如权利要求22-36中任一项所述的组合物,其中,岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖包括总寡糖的1-5%。

38. 如权利要求22-36中任一项所述的组合物,其中,岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖包括总寡糖的5-20%。

39. 如权利要求22-36中任一项所述的组合物,其中,岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖包括总寡糖的20-50%。

40. 如权利要求22-39中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖与所述岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖的质量比为20:1-1:10。

41. 如权利要求22-40中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含多种具有3-10个残基的寡糖(DP3-10寡糖)。

42. 如权利要求23-41中任一项所述的组合物,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括乳-N-二糖。

43. 如权利要求23-41中任一项所述的组合物,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括乳-N-三糖。

44. 如权利要求22-43中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含植物来源的寡糖。

45. 如权利要求44所述的方法,其中,所述植物寡糖来自胡萝卜、豌豆、西兰花、洋葱、番茄、辣椒、大米、小麦、燕麦、麸皮、橙、可可、橄榄、苹果、葡萄、甜菜、白菜、玉米或其混合物。

46. 如权利要求44所述的组合物,其中,所述植物寡糖来自橙皮、可可豆壳、橄榄果渣、番茄皮、葡萄果渣、玉米青贮或其混合物

47. 如权利要求44-46中任一项所述的组合物,其中,所述植物来源的寡糖为2-10个糖残基(DP2-DP10),3-10个糖残基(DP3-DP10),5-10个糖残基(DP5-DP10),或多达DP20。

48. 如权利要求22-47中任一项所述的组合物,其中,所述组合物提供0.001-100克/天的量的寡糖总饮食摄入。

49. 如权利要求22-47中任一项所述的组合物,其中,所述寡糖的量为1-20克、3-20克或5-10克。

50. 如权利要求22-47中任一项所述的组合物,其中,所述寡糖的量为10、15、20、25、30、35、40、45或50克。

51. 如权利要求1-50中任一项所述的组合物,其中,所述寡糖中的至少一种具有I型核心。

52. 如权利要求1-50中任一项所述的组合物,其中,所述寡糖中的至少一种具有II型核心。

53. 如权利要求1-52中任一项所述的组合物,其中,所述组合物包含低聚半乳糖(GOS)。

54. 如权利要求1-53中任一项所述的组合物,其中,所述组合物还包含富含苏氨酸、N-乙酰基苏氨酸、 γ -谷酰基苏氨酸或其组合的蛋白质来源。

55. 如权利要求1-54中任一项所述的组合物,其中,所述组合物还包含次级代谢物。

56. 如权利要求55所述的组合物,其中,所述次级代谢物包括短链脂肪酸。

57. 如权利要求55所述的组合物,其中,所述次级代谢物包括乙酸盐、乳酸盐或其组合。

58. 如权利要求1-57中任一项的组合物,其中,所述组合物为干粉、悬浮在油中的干粉或溶液形式。

59. 如权利要求58所述的组合物,其中,所述干粉经喷雾干燥或冷冻干燥。

60. 如权利要求59所述的组合物,其中,所述组合物在合适的冷冻保护剂存在的情况下冷冻干燥。

61. 如权利要求1-60中任一项所述的组合物,其中,所述组合物还包含冷冻保护剂。

62. 如权利要求61所述的组合物,其中,所述冷冻保护剂是葡萄糖,乳糖,棉子糖,蔗糖,海藻糖,阿东糖醇,甘油,甘露醇,甲醇,聚乙二醇,丙二醇,核糖醇,海藻酸盐,牛血清白蛋白,肉毒碱,柠檬酸盐,半胱氨酸,右旋糖酐,二甲基亚砷,谷氨酸钠,甘氨酸甜菜碱,糖原,亚牛磺酸,蛋白胨,聚乙烯吡咯烷酮或牛磺酸,哺乳动物乳寡糖,几丁质,壳聚糖,其它多糖或其组合。

63. 如权利要求1-62中任一项所述的组合物,其还包含稳定剂。

64. 如权利要求63所述的组合物,其中,所述稳定剂是流动剂。

65. 如权利要求63所述的组合物,其中,所述稳定剂是乳蛋白。

66. 如权利要求1-65中任一项所述的组合物,其中,所述组合物是水活性水平小于0.35、小于0.30、小于0.25、小于0.2、小于0.1的粉末。

67. 如权利要求1-66中任一项所述的组合物,其中,所述组合物是无水组合物。

68. 如权利要求1-58中任一项所述的组合物,其中,所述组合物悬浮于油中。

69. 如权利要求68所述的组合物,其中,所述组合物为悬浮于油中的干粉形式。

70. 如权利要求68或69所述的组合物,其中,所述油是中链甘油三酯。

71. 如权利要求1-58中任一项的组合物,其中,所述组合物悬浮于具有至少57%的寡糖的糖浆中,其中水活性低至足以使双歧杆菌保持休眠。

72. 如权利要求1-71中任一项的组合物,其中,所述组合物为小包、小袋、口服崩解片剂、食品、胶囊、锭剂、泡腾片、栓剂、灌肠剂、胶囊、干粉、悬浮在油中的干粉、可咀嚼组合物、糖浆或凝胶形式。

73. 如权利要求72所述的组合物,其中,所述胶囊或片剂具有肠溶包衣。

74. 如权利要求73所述的组合物,其中,所述肠溶包衣包括下述物质的一种或多种:脂肪酸,蜡,虫胶,塑料,植物纤维,丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素琥珀酸酯,羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯,羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯,聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP),甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素偏苯三酸酯,藻酸钠和玉米蛋白。

75. 如权利要求1-74中任一项所述的药物组合物,其中,所述组合物是:药物组合物、饮食补充剂、营养产品、食品、益生菌和/或益生元。

76. 如权利要求75所述的组合物,其中,所述组合物被配制成单位剂量药物。

77. 一种改善哺乳动物胃肠道健康的方法,其包括将治疗有效量的权利要求1-76中任一项所述的组合物给予有此需要的哺乳动物。

78. 一种增加哺乳动物胃肠道中双歧杆菌浓度的方法,其通过向对象给予有效量的权利要求1-76中任一项所述的组合物进行,从而使所述哺乳动物粪便中所述给予的双歧杆菌的水平增加至大于该粪便中存在的总微生物组的10%。

79. 一种改善哺乳动物胃肠道健康的方法,其包括向有此需要的哺乳动物给予具有功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种和具有I型或II型核心的寡糖。

80. 如权利要求79所述的方法,其还包括向所述哺乳动物给予复杂寡糖。

81. 如权利要求80所述的方法,其中,所述复杂寡糖和所述双歧杆菌一起或分开给予。
82. 如权利要求79或80中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖以溶液提供,而所述双歧杆菌以肠溶包衣的片剂或胶囊提供。
83. 如权利要求79-81中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌和所述寡糖以液体组合物提供,所述液体组合物包含约1g/L-50g/L水平的复杂寡糖。
84. 如权利要求79-83中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖和双歧杆菌以干燥形式并以肠溶包衣的片剂或胶囊形式提供。
85. 如权利要求79-84中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖是哺乳动物乳寡糖(MMO)。
86. 如权利要求85所述的组合物,其中,所述复杂寡糖分离自哺乳动物乳来源。
87. 如权利要求86所述的组合物,其中,所述哺乳动物来源是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊或骆驼。
88. 如权利要求85所述的组合物,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括存在于人乳寡糖(HMO)、牛乳寡糖(BMO)、牛初乳寡糖(BCO)、山羊乳寡糖(GMO)或其组合中的寡糖分子。
89. 如权利要求88所述的组合物,其中,所述牛来源来自牛乳、牛初乳、牛初乳浓缩物或其混合物。
90. 如权利要求89所述的组合物,其中,所述牛初乳寡糖包含水平大于1%的Hex(4); Hex(4)HexNAc(2)或Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)中的任一种。
91. 如权利要求87所述的组合物,其中,所述复杂寡糖来自乳清渗透物。
92. 如权利要求85-91中任一项所述的组合物,其中,所述哺乳动物乳寡糖(MMO)包括乳-N-二糖,乳-N-三糖,N-乙酰基乳糖酰胺,乳-N-新三糖,乳-N-四糖,乳-N-新四糖,岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻戊糖,乳二岩藻四糖,唾液乳糖,二唾液酸内酯-N-四糖,2'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖胺,3'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液-3-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖,6'-唾液乳糖胺,6'-唾液乳糖,二岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻糖基戊糖I,乳-N-岩藻糖基戊糖II,乳-N-岩藻糖基戊糖III,乳-N-岩藻糖基戊糖V,唾液乳-N-四糖,其衍生物或其组合。
93. 如权利要求80-92中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含(3Hex, 4HexNAc, 1Fuc)、(1Gal, 1GlcNAc, 1NeuAc)或(1Glu, 1Gal, 1NeuAc(3'或6'))中的至少一种。
94. 如权利要求80-93中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖是少于50%岩藻糖基化的。
95. 如权利要求80-94中任一项所述的组合物,其中,所述复杂寡糖包含下述成分比例之一:1)Hex(2)NeuAc(1):Hex(2)HexNAc(1)的比例小于5.0;2)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(1)的比例大于1.0;3)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(2)的比例大于2.0;4)Hex(3):Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)的比例小于100;或5)Hex(2)HexNAc(1):Hex(4)NeuAc(2)NeuGc(1)的比例大于10。
96. 如权利要求80-95中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖为每日给予的重量的至少20%。
97. 如权利要求80-95中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖为每日给予的重量的至少50%。
98. 如权利要求80-95中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖为每日给予的重量的

至少80%。

99. 如权利要求80-98中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖在给予双歧杆菌之前给予。

100. 如权利要求80-98中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖与给予双歧杆菌同时给予。

101. 如权利要求80-98中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖在给予双歧杆菌之后给予。

102. 如权利要求80-101中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖以1-20克的日剂量提供。

103. 如权利要求80-101中任一项所述的方法,其中,所述复杂寡糖以1-10克的日剂量提供。

104. 如权利要求80-103中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌以100万-1000亿集落形成单位(CFU)的日剂量提供。

105. 如权利要求80-104中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌以50亿-500亿CFU的日剂量提供。

106. 如权利要求80-105中任一项所述的方法,其中,向所述有此需要的对象每天给予一个剂量或在全天以适当的间隔给予多个子剂量,任选地为2、3、4、5、6个。

107. 如权利要求77-106中任一项所述的方法,其中,在所述给予之后,所述哺乳动物粪便中给予的双歧杆菌的水平大于所述粪便中存在的总微生物组的20%。

108. 如权利要求77-106中任一项所述的方法,其中,在所述给予之后,所述哺乳动物粪便中给予的双歧杆菌的水平大于所述粪便中存在的总微生物组的50%。

109. 如权利要求77-106中任一项所述的方法,其中,在所述给予之后,所述哺乳动物粪便中给予的双歧杆菌的水平大于所述粪便中存在的总微生物组的70%。

110. 如权利要求77-109中任一项所述的方法,其还包括监测所述哺乳动物粪便中双歧杆菌的水平。

111. 如权利要求77-110中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌的给予持续至少5天。

112. 如权利要求77-110中任一项所述的方法,其中,所述寡糖的给予持续30-360天的时间。

113. 如实施方式77-112中任一项所述的方法,其中,向有此需要的哺乳动物的给予持续一段时间,从而在所述对象的肠道中建立双歧杆菌群。

114. 如实施方式77-112中任一项所述的方法,其中,持续向有此需要的哺乳动物给予,从而使双歧杆菌群在所述对象的肠道中保持。

115. 如权利要求114所述的方法,其中,给予所述剂量,从而保持双歧杆菌的水平大于所述哺乳动物的总粪便微生物组的至少5%。

116. 如权利要求114所述的方法,其中,给予所述剂量,从而保持双歧杆菌的水平大于所述哺乳动物的总粪便微生物组的至少20%。

117. 如权利要求114所述的方法,其中,给予所述剂量,从而保持双歧杆菌的水平大于所述哺乳动物的总粪便微生物组的至少50%。

118. 如权利要求77-117中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物是人、牛、猪、兔子、山羊、绵羊、猫、狗、马或骆驼。

119. 如权利要求118所述的方法,其中,所述哺乳动物是人类婴儿。

120. 如权利要求119所述的方法,其中,所述婴儿是通过剖宫产分娩的。

121. 如权利要求119所述的方法,其中,所述婴儿是经阴道分娩的。

122. 如权利要求119所述的方法,其中,所述婴儿用婴儿配方食品喂养,所述婴儿配方食品不含明显量的哺乳动物乳寡糖。

123. 如权利要求119-122中任一项所述的方法,其中,所述婴儿是从出生到受孕后约36个月。

124. 如权利要求119-112中任一项所述的方法,其中,所述婴儿是从出生到离乳龄。

125. 如权利要求119-124中任一项所述的方法,其中,所述婴儿由母亲进行哺乳,所述母亲通过基因测试为FUC-2缺陷型或在其乳汁中不存在复杂岩藻糖基化寡糖。

126. 如权利要求118所述的方法,其中,所述人是孕妇。

127. 如权利要求126所述的方法,其中,所述孕妇至少处于妊娠的第三个三月期。

128. 如权利要求118-125中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物健康的改善是减少婴儿腹绞痛。

129. 如权利要求77-125中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物健康的改善是加速婴儿中免疫系统的发育。

130. 如权利要求77-125中任一项所述的方法,其中,所述哺乳动物健康的改善是婴儿双歧杆菌定殖于婴儿胃肠道的结果,通过粪便分析测量所述婴儿双歧杆菌的水平超过总肠道微生物组的20%。

131. 一种制备活化的双歧杆菌的方法,其包括培养双歧杆菌,所述培养通过在使基因Blon_0042上调、基因Blon_2168下调或其组合的条件下孵育包含功能性H5簇的长双歧杆菌婴儿亚种,包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。

132. 一种制备活化的双歧杆菌的方法,其包括培养双歧杆菌,所述培养通过在使基因Blon_0042、Blon_0881、Blon_2175、Blon_2176、Blon_2177、Blon_2331、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2343、Blon_2344、Blon_2346和Blon_2347中的一种或多种上调和/或使基因Blon_2168下调的条件下孵育包含功能性H5簇的长双歧杆菌婴儿亚种,包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。

133. 一种制备活化的以ATCC登录号PTA-125180保藏的共生长双歧杆菌婴儿亚种EVC001的方法,其包括在哺乳动物乳寡糖(MMO)或选自表4所列化合物的活化剂存在的情况下培养所述细菌物种,从而活化培养基中的细菌细胞。

134. 如权利要求132或133中任一项的方法,其中,所述MMO或来自表4的化合物以足以诱导所述细菌细胞中编码唾液酸酶、岩藻糖苷酶或 α -N-乙酰半乳糖胺酶的基因和/或蛋白质或者表1或表2中所列基因的表达的量的量添加。

135. 如权利要求132-134中任一项的方法,其中,起始培养基组合物包含来自表4的一种或多种化合物,其量为培养基组合物重量/体积的0.1-3%。

136. 如权利要求132-135中任一项所述的方法,其中,所述MMO和/或所述活化剂构成碳

源,并且双歧杆菌细胞对所述碳源的消耗既增加细胞生物量又活化在寡糖被水解之前能够内化一种或多种寡糖的转运系统,因此双歧杆菌细胞能够进一步水解内化的寡糖,其中所述寡糖具有哺乳动物乳中存在的寡糖结构。

137. 如权利要求136所述的方法,其中,所述哺乳动物是人乳、牛乳、猪乳、兔乳、山羊乳、绵羊乳、骆驼乳、水牛乳或其混合物。

138. 如权利要求132-137中任一项所述的方法,其中,与在非活化单体或二聚体上培养的相同种的细菌细胞相比,活化的细菌细胞对哺乳动物粘膜细胞的结合亲和力更高。

139. 如权利要求132-138中任一项的方法,其中,所述细菌细胞的活化包括上调长婴儿双歧杆菌中的Blon_0881和Blon_2343或其它细菌种中的功能性同源物,该同源物在其它细菌种的活化过程中表达。

140. 如权利要求132-138中任一项所述的方法,其中,活化包括上调来自婴儿双歧杆菌的葡萄糖胺-6-磷酸异构酶和碳水化合物ABC转运体膜蛋白的表达。

141. 如权利要求132-138中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌细胞的活化包括上调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0042、Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022、Blon_2177和其组合,和/或下调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0518、Blon_0785、Blon_2167、Blon_2168。

142. 如权利要求132-138中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌细胞包含来自婴儿双歧杆菌的上调的Blon_0042基因。

143. 如权利要求132-138中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌细胞包含来自婴儿双歧杆菌的下调的Blon_2168和/或Blon_2177基因。

如权利要求132-138中任一项所述的方法,其中,所述双歧杆菌细胞的活化包括上调选自下组的基因:Blon_0882、Blon_0881、Blon_0880、Blon_0879、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347、Blon_2331和其组合。

H5功能性长双歧杆菌婴儿亚种的组合物和使用方法

发明领域

[0001] 本发明涉及选择和使用包含功能性H5基因簇(成功定殖于婴儿肠道所需的基因)的长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum subsp. infantis*)的方法和组合物,所述长双歧杆菌婴儿亚种包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001(“保藏的双歧杆菌”)。所述双歧杆菌可以配制成药物组合物、食品、益生菌或其组合。

背景技术

[0002] 人乳包含处于不能被用作婴儿能量来源形式的大量复杂寡糖(HMO,其占高达15%的总干重)。在所有哺乳动物乳汁中发现的类似的复杂寡糖在本文中称为MMO。某些微生物,诸如长双歧杆菌婴儿亚种(*B. infantis*)具有消耗寡糖(如人乳或牛乳中存在的寡糖)的独特能力。参见,美国专利号8,198,872和美国专利申请公开号2013/0195803。婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)是在分解HMO之前将其内化的生物的示例。其它微生物如两歧双歧杆菌(*B. bifidum*)会在细胞外分解HMO。当环境中存在HMO时,能破坏寡糖内部键的结合蛋白、转运系统和酶通过转录被诱导,以改变蛋白质表达概况。

[0003] 长双歧杆菌长亚种(*B. longum subsp. longum*)和长双歧杆菌婴儿亚种(*B. longum subsp. infantis*)在500万年前分化。基因组分析表明,使用HMO(婴儿双歧杆菌)相对于不使用HMO(长双歧杆菌)的能力似乎反映在5个HMO簇(H1-H5)的基因中。有人提出H1-H5对于描述婴儿双歧杆菌的营养偏好十分重要[LoCasico等.*Annl Environ Microbiol* (2010) 76 (22):7373-81]。

发明内容

含有具有H5基因簇的细菌的组合物:细菌的量

[0004] 本发明提供了包含长双歧杆菌婴儿亚种和至少一种寡糖的组合物,所述长双歧杆菌婴儿亚种包含功能性H5基因簇,所述至少一种寡糖具有I型或II型核心,其中H5簇包含至少B1on_2175、B1on_2176和B1on_2177,更典型地,其中功能性H5簇包含B1on_2171、B1on_2173、B1on_2174、B1on_2175、B1on_2176、B1on_2177和galT。具有功能性H5簇的生物体将运输和消耗LNB寡糖。在本发明的一个优选方式中,长双歧杆菌婴儿亚种是以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。双歧杆菌可以100万cfu/g-5000亿cfu/g的浓度存在于本发明的组合物中,和/或双歧杆菌可以50亿cfu/g-1000亿cfu/g的浓度存在于本发明的组合物中,和/或双歧杆菌可以100亿cfu/g-500亿cfu/g的浓度存在于本发明的组合物中。或者,双歧杆菌可以5000万cfu/g-40或50亿cfu/g的浓度存在于本发明的组合物中。

活化的细菌-功能性

[0005] 优选地,本发明组合物中的长双歧杆菌婴儿亚种是活化的。在本发明的组合物中,双歧杆菌优选包含LNB转运系统,所述LNB转运系统能够在寡糖水解之前内化一种或多种寡糖并且能够水解内化的寡糖,其中所述寡糖具有哺乳动物乳中存在的寡糖的结构,并且所述哺乳动物乳可以是人乳、牛乳、猪乳、兔乳、山羊乳、绵羊乳、骆驼乳或其混合物。与在复杂

寡糖不存在的情况下培养的同一种的双歧杆菌相比,所述双歧杆菌对哺乳动物粘膜细胞的结合亲和力更高。

活化的细菌-基因表达

[0006] 本发明组合中活化的双歧杆菌通常包含选自下组的上调的基因:Blon_0042、Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022、Blon_0879、Blon_0880、Blon_0881、Blon_0882、Blon_2177、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2343、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347和Blon_2331及其组合,和/或它们包含选自下组的下调的基因:Blon_0518、Blon_0785、Blon_2167、Blon_2168及其组合。优选地,活化的双歧杆菌表达编码唾液酸酶或岩藻糖苷酶的基因,和/或双歧杆菌表达编码唾液酸或岩藻糖转运体的基因。

活化的细菌-方法限定产品 (product-by-process)

[0007] 本发明组合物中的双歧杆菌可以是活化的,因为其已经在至少一种哺乳动物乳寡糖存在的情况下培养。或者,可以通过活化剂活化双歧杆菌,其中活化剂来自表4,所述活化剂可以是LNB,或者为LNB寡糖或在其它方面显示上调的活化剂;更优选地,组合物本身还包含LNB寡糖。

组合物加复杂寡糖

[0008] 本发明的组合物包含寡糖,所述寡糖需要作为H5簇的部分而表达的蛋白质,用于其被婴儿双歧杆菌摄取和/或代谢。这些复杂寡糖具有LNB核心结构,无论是I型还是II型(乳-N-二糖或N-乙酰基乳糖胺)。具有LNB核心结构的寡糖可以包括:半乳糖-N-乙酰基半乳糖胺二聚体(例如, β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc);或更优选地,任何半乳糖-N-乙酰基半乳糖胺三聚体(例如,Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-Gal)及其衍生物。作为本发明组合物的部分的寡糖通过LNB-ABC转运体系统在活化的婴儿双歧杆菌上被加工。

[0009] 在优选方式中,本发明的组合物还包含分离的复杂寡糖,其可以作为具有I型或II型核心的寡糖的附加。通常,组合物的复杂寡糖包含多种具有2-10个残基的寡糖(DP2-10寡糖),以包括乳-N-二糖和N-乙酰基乳糖胺。在这些优选的实施方式中,复杂寡糖可以是组合物重量的至少20%,和/或复杂寡糖可以是组合物重量的至少50%,和/或复杂寡糖可以是组合物重量的至少80%。在本发明的一些实施方式中,组合物提供每天0.001-100克,更优选每天1-20克、3-20克或5-10克,或者任选地每天10、15、20、25、30、35、40、45或50克的寡糖的总膳食摄入量。

来自MMO的寡糖

[0010] 本发明组合物中的复杂寡糖可以包括哺乳动物乳寡糖(MMO),其可以分离自哺乳动物乳来源,或者哺乳动物乳中鉴定的结构可以通过合成方式衍生。哺乳动物乳来源可以是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊乳或骆驼乳。本发明组合物中的MMO可以包含存在于人乳寡糖(HMO)、牛乳寡糖(BMO)、牛初乳寡糖(BCO)、山羊乳寡糖(GMO)或其组合,特别是存在于HMO中的寡糖分子。如果来源是牛,那么牛来源可以是来自牛乳、牛初乳、牛初乳浓缩物或它们的混合物,其中牛初乳寡糖可以大于1%的水平包含Hex(4);Hex(4)HexNAc(2);或Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)中的任何一种,或者复杂寡糖可以来自牛奶加工流,如乳清渗透物。

[0011] 特别地,MMO包括乳-N-二糖(LNB),乳-N-三糖(LNT),具有I型核心的至少一种寡糖,具有II型核心的至少一种寡糖和/或其组合。I型或II型可以是彼此的同分异构体。MMO通常包括一种或多种下述种类:乳-N-二糖(LNB),N-乙酰基乳糖胺,乳-N-三糖,乳-N-新三糖,乳-N-四糖(LNT),乳-N-新四糖(LNnT),岩藻糖基乳糖(FL),乳-N-岩藻戊糖(LNFP),乳二岩藻四糖(LDFT)唾液乳糖(SL),二唾液酸乳-N-四糖(DSLNT),2'-岩藻糖基乳糖(2FL),3'-唾液乳糖胺(3SLN),3'-岩藻糖基乳糖(3FL),3'-唾液-3-岩藻糖基乳糖(3S3FL),3'-唾液乳糖(3SL),6'-唾液乳糖胺(6SLN),6'-唾液乳糖(6SL),二岩藻糖基乳糖(DFL),乳-N-岩藻戊糖I(LNFPI),乳-N-岩藻戊糖II(LNFPII),乳-N-岩藻戊糖III(LNFPIII),乳-N-岩藻戊糖V(LNFPIV),唾液乳-N-四糖(SLNT),其衍生物或其组合。其它II型核心包括但不限于,三岩藻糖基乳-N-己糖(TFLNH),LnNH,乳-N-己糖(LNH),乳-N-岩藻戊糖III(LNFPIII),单岩藻糖基化的乳-N-己糖III(MFLNHI),单岩藻糖基单唾液乳-N-己糖(MFMSLNH)。

[0012] 任选地,复杂寡糖包含(3Hex,4HexNac,1Fuc)、(1Gal,1GlcNac,1NeuAc)或(1Glu,1Gal,1NeuAc(3'或6'))中的至少一种,和/或复杂寡糖的岩藻糖基化小于50%,和/或复杂寡糖包含下述组分比例之一:1)Hex(2)NeuAc(1):Hex(2)HexNac(1)的比例小于5.0;2)Hex(2)HexNac(1):Hex(3)HexNac(1)的比例大于1.0;3)Hex(2)HexNac(1):Hex(3)HexNac(2)的比例大于2.0;4)Hex(3):Hex(3)HexNac(1)NeuAc(1)的比例小于100;或5)Hex(2)HexNac(1):Hex(4)NeuAc(2)NeuGc(1)的比例大于10。岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖可占总寡糖的1-5%、总寡糖的5-20%,或总寡糖的20-50%,和/或复杂寡糖与岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖的质量比可以为20:1-1:10。在一实施方式中,寡糖选自2FL,3FL或其衍生物之一,并且I型或II型核心是任选的。

来自植物的寡糖

[0013] 或者,复杂寡糖可以是植物来源的寡糖,并且植物寡糖可以来自胡萝卜、豌豆、西兰花、洋葱、西红柿、辣椒、大米、小麦、燕麦、麸皮、橙子、可可、橄榄、苹果、葡萄、甜菜、卷心菜、玉米粉或其混合物,或者植物寡糖可以来自橙皮、可可壳、橄榄果渣、番茄皮、葡萄渣、玉米粉青贮或其混合物;通常,植物来源的寡糖为2-10个糖残基(DP2-DP10),3-10个糖残基(DP3-DP10),5-10个糖残基(DP5-DP10)或多达DP20。在一些方式中,植物寡糖可以模拟I型或II型活性。在其它实施方式中,它们还包含其它寡糖。在另一方式中,寡糖包括低聚半乳糖(GOS)。寡糖可以包括:(a)包括一个或多个II型寡糖核心,其中代表性物质包括LnNT;(b)一种或多种包含比例为1:5-5:1的II型核心和GOS的寡糖;(c)一种或多种包含比例为1:5-5:1的II型核心和2FL的寡糖;(d)(a)、(b)和/或(c)的组合;(e)包括一个或多个I型寡糖核心,其中代表性物质包括LNT,(f)一个或多个比例为1:5-5:1的I型核心和GOS;(g)一个或多个比例为1:5-5:1的I型核心和2FL;和/或(h)包括I型和II型核心的(a)-(g)的任意组合。

组合物的特征

[0014] 组合物可以是干粉、悬浮在油中的干粉或溶液形式,所述干粉可以是喷雾干燥的或冷冻干燥的,并且冷冻干燥可以在合适的冷冻保护剂存在的情况下进行。本发明的组合物可以是水活性水平小于0.35、小于0.30、小于0.25、小于0.2或小于0.1的粉末,或者所述组合物可以是无水组合物。在某些方式中,组合物还包含冷冻保护剂,并且所述冷冻保护剂可以是葡萄糖,乳糖,棉子糖,蔗糖,海藻糖,阿东糖醇,甘油,甘露醇,甲醇,聚乙二醇,丙二醇,核糖醇,海藻酸盐,牛血清白蛋白,肉毒碱,柠檬酸盐,半胱氨酸,右旋糖酐,二甲基亚砷,

谷氨酸钠,甘氨酸甜菜碱,糖原,亚牛磺酸,蛋白胨,聚乙烯吡咯烷酮或牛磺酸,哺乳动物乳寡糖,几丁质,壳聚糖,其它多糖或其组合。或者,组合物可以悬浮在油中,并且油可以是中链甘油三酯或其它消耗性油。或者,该组合物可以是至少57%的浓缩寡糖浆。在还包含双歧杆菌的糖浆组合物中,水活性低至足以使双歧杆菌保持休眠。

[0015] 本发明的任何组合物可以进一步包含稳定剂,其可以是流动剂或乳蛋白。组合物可以为小包、小袋、口服崩解片剂、食品、胶囊、锭剂、泡腾片、栓剂、灌肠剂、胶囊、干粉、悬浮在油中的干粉、可咀嚼组合物、糖浆或凝胶形式。片剂或胶囊可以具有肠溶包衣,其可以包括下述物质的一种或多种:脂肪酸,蜡,虫胶,塑料,植物纤维,丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素琥珀酸酯,羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯,羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯,聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP),甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素偏苯三酸酯,藻酸钠和玉米蛋白。

[0016] 组合物可以是:药物组合物、饮食补充剂、营养产品、食品、益生菌和/或益生元,并且可以配制成单位剂量药物。

组合物的可选功能性组分

[0017] 在一种方式中,组合物还包含富含苏氨酸、N-乙酰基-苏氨酸、 γ -谷酰基苏氨酸或其组合的蛋白质来源。

[0018] 在另一种方式中,根据本发明的组合物还包含次级代谢物,其可以是短链脂肪酸,如乙酸、乳酸或其组合。

[0019] 在另一种方式中,组合物还可包含维生素,如维生素A或D。

使用组合物的方法

[0020] 本发明还提供了改善哺乳动物胃肠道健康的方法,其包括以有效影响哺乳动物胃肠道健康的量和方式给予哺乳动物双歧杆菌和具有LNB核心的寡糖。这类给药可以包括对此需要的对象的治疗有效量的本发明的任何组合物。在本发明的方法中,改善哺乳动物健康可以是减少婴儿腹痛,或者改善哺乳动物健康是加速婴儿免疫系统发育,或者改善哺乳动物健康是婴儿双歧杆菌定殖于婴儿胃肠道的结果,通过粪便分析测量所述婴儿双歧杆菌的水平超过20%的总肠道微生物组。

定殖于胃肠道的给药

[0021] 本发明的方法提供了一种方法,包括向有此需要的对象给予双歧杆菌和具有LNB核心的寡糖的剂量,以一定的量给予一定时程,其中,双歧杆菌群在对象的肠道中建立。本发明的方法还提供了一种方法,包括向有此需要的对象给予双歧杆菌和具有LNB核心的寡糖的剂量,,以一定的量给予一定时程,其中,双歧杆菌群在对象的肠道中保持。在一些方式中,本发明的方法还包括监测哺乳动物粪便中双歧杆菌的水平。特别地,本发明提供了增加哺乳动物胃肠道中双歧杆菌浓度的方法,所述方法通过向对象给予有效量的本发明的任何组合物,从而使所述哺乳动物粪便中所述给予的双歧杆菌的水平增加至大于粪便中存在的总微生物组的10%,更优选地,使所述哺乳动物粪便中给予的双歧杆菌的水平增加至大于粪便中存在的总微生物组的20%,或大于粪便中存在的总微生物组的50%,或者甚至大于粪便中存在的总微生物组的70%。或者,根据本发明,哺乳动物对于含有乳糖N-二糖核心的MMO的利用可以用作双歧杆菌定殖的量度。

细菌和复杂寡糖的给药

[0022] 本发明的方法可以还包括给予对象复杂寡糖,并且复杂寡糖和双歧杆菌可以一起或分开提供。例如,复杂寡糖可以以溶液形式提供,并且双歧杆菌可以以干燥形式或以肠溶包衣的片剂或胶囊提供。或者,组合物可以具有两种组分的非水性液体或凝胶组合物提供,并且包含水平为约1g/L-50g/L的复杂寡糖。在本发明的方法中,复杂寡糖可以占组合物重量的至少20%,更优选占组合物重量的至少50%,甚至更优选复杂寡糖为组合物重量的至少80%。

[0023] 在本发明的方法中,可以在给予双歧杆菌之前给予复杂寡糖,或者可以在给予双歧杆菌的同时给予复杂寡糖,或者可以在给予双歧杆菌之后给予复杂寡糖。在本发明的方法中,复杂寡糖通常以1-20克日剂量提供,优选1-10克,并且双歧杆菌通常以10-1000亿集落形成单位(CFU)的日剂量提供,优选100-500亿CFU,并且有此需要的对象每天给予一次剂量或在一天中适当的时间间隔以多个(任选地为2、3、4、5、6个)亚剂量的方式给予,并且口服或直肠给予所述组合物。通常,给予组合物至少5天,但是可以以单剂量提供,优选给予组合物持续21-360天的时间。为了维持双歧杆菌的水平大于哺乳动物总粪便微生物组的至少5%,优选大于哺乳动物总粪便微生物组的至少20%,更优选大于哺乳动物总粪便微生物组的至少50%,可以给予本发明的组合物至少10天。

复杂寡糖的来源

[0024] 在优选方式中,本发明方法中的复杂寡糖可以包括哺乳动物乳寡糖(MMO),其可以分离自哺乳动物乳来源,或者哺乳动物乳中鉴定的结构可以通过合成方式衍生。哺乳动物乳来源可以是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊乳或骆驼乳。本发明组合物中的MMO可以包含存在于人乳寡糖(HMO)、牛乳寡糖(BMO)、牛初乳寡糖(BCO)、山羊乳寡糖(GMO)或其组合的寡糖分子。如果来源是牛,那么牛来源可以是来自牛乳、牛初乳、牛初乳浓缩物或它们的混合物,其中牛初乳寡糖可能大于1%的水平包含Hex(4);Hex(4)HexNAc(2);或Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)中的任何一种,或者复杂寡糖可以来自乳清渗透物。

[0025] MMO通常包括乳-N-二糖(LNB),乳-N-三糖(LNT),具有I型核心的至少一种寡糖,具有II型核心的至少一种寡糖和/或其组合。I型或II型可以彼此是同分异构体。MMO通常包括一种或多种下述种类:乳-N-二糖(LNB),N-乙酰基乳糖胺,乳-N-三糖,乳-N-新三糖,乳-N-四糖(LNT),乳-N-新四糖(LNnT),岩藻糖基乳糖(FL),乳-N-岩藻戊糖(LNFP),乳二岩藻四糖(LDFT)唾液乳糖(SL),二唾液酸乳-N-四糖(DSLNT),2'-岩藻糖基乳糖(2FL),3'-唾液乳糖胺(3SLN),3'-岩藻糖基乳糖(3FL),3'-唾液-3-岩藻糖基乳糖(3S3FL),3'-唾液乳糖(3SL),6'-唾液乳糖胺(6SLN),6'-唾液乳糖(6SL),二岩藻糖基乳糖(DFL),乳-N-岩藻戊糖I(LNFPI),乳-N-岩藻戊糖II(LNFPII),乳-N-岩藻戊糖III(LNFPIII),乳-N-岩藻戊糖V(LNFPIV),唾液乳-N-四糖(SLNT),其衍生物或其组合。其它II型核心包括但不限于,三岩藻糖基乳-N-己糖(TFLNH),LnNH,乳-N-己糖(LNH),乳-N-岩藻戊糖III(LNFPIII),单岩藻糖基化的乳-N-己糖III(MFLNHI),单岩藻糖基单唾液乳-N-己糖(MFMSLNH)。

[0026] 任选地,复杂寡糖包含(3Hex,4HexNAc,1Fuc)、(1Gal,1GlcNAc,1NeuAc)或(1Glu,1Gal,1NeuAc(3'或6'))中的至少一种,和/或复杂寡糖的岩藻糖基化小于50%,和/或复杂寡糖包含成分比例之一:1)Hex(2)NeuAc(1):Hex(2)HexNAc(1)的比例小于5.0;2)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(1)的比例大于1.0;3)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(2)的比例大于2.0;4)Hex(3):Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)的比例小于100;或5)Hex(2)HexNAc(1):

Hex (4) NeuAc (2) NeuGc (1) 的比例大于10。岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖可占总寡糖的1-5%、总寡糖的5-20%，或总寡糖的20-50%，和/或复杂寡糖与岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖的质量比可以为20:1-1:10。任选地，复杂寡糖包含至少一个甘露糖残基，或者至少一个岩藻糖或唾液酸残基。在一些实施方式中，LNB寡糖组合物可以还包含岩藻糖基乳糖和/或唾液乳糖或这些化合物的衍生物。

[0027] 或者，复杂寡糖可以是植物来源的寡糖，并且植物寡糖可以来自胡萝卜、豌豆、西兰花、洋葱、西红柿、辣椒、大米、小麦、燕麦、麸皮、橙子、可可、橄榄、苹果、葡萄、甜菜、卷心菜、玉米粉或其混合物，或者植物寡糖可以来自橙皮、可可壳、橄榄果渣、番茄皮、葡萄渣、玉米粉青贮或其混合物；通常，植物来源的寡糖为2-10个糖残基 (DP2-DP10)，3-10个糖残基 (DP3-DP10)，5-10个糖残基 (DP5-DP10) 或多达DP20。在另一模式中，寡糖包括低聚半乳糖 (GOS)。寡糖可以包括：(a) 包括一个或多个II型寡糖核心，其中代表性物质包括LnNT；(b) 一种或多种包含比例为1:5-5:1的II型核心和GOS的寡糖；(c) 一种或多种包含比例为1:5-5:1的II型核心和2FL的寡糖；(d) (a)、(b) 和/或 (c) 的组合；(e) 包括一个或多个I型寡糖核心，其中代表性物质包括LNT，(f) 一个或多个比例为1:5-5:1的I型核心和GOS；(g) 一个或多个比例为1:5-5:1的I型核心和2FL；和/或 (h) 包括I型和II型核心的 (a) - (g) 的任意组合。

目标群体

[0028] 接受本发明组合物的对象是哺乳动物，其可以是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊、猫、狗、马或骆驼；在一种优选方式中，哺乳动物是人婴儿，任选地，该婴儿是通过剖宫产分娩的，或者该婴儿是经阴道分娩的，早产的婴儿，/或该婴儿是0-3个月，3-6个月，6-12个月，出生到离乳龄。该组合物可以在离乳期间用于婴儿，针对绞痛或使粪便模式正常化。该组合物可用于使需要减少病原体或潜在病原体的任何哺乳动物的肠道双歧杆菌组成改变至少0.5log，或更优选至少1log，最优选至少2log。或者，所述人是孕妇，任选地，该所述孕妇至少处于妊娠的第三个三月期 (trimester)。在一些方式中，婴儿用婴儿配方食品喂养，所述婴儿配方食品不含明显量的哺乳动物乳寡糖，所述婴儿由母亲进行哺乳，所述母亲通过基因测试为FUC-2缺陷型或在其乳汁中不存在复杂岩藻糖基化寡糖。

制造具有H5基因簇的活化的细菌的方法

[0029] 本发明还提供了制备活化的双歧杆菌的方法，其包括培养双歧杆菌，所述培养通过在使基因Blon_0042上调、基因Blon_2168下调或其组合的条件下孵育包含功能性H5簇的长双歧杆菌婴儿亚种，包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。或者，本发明提供了一种制备活化的双歧杆菌的方法，其包括培养双歧杆菌，所述培养通过在使基因Blon0881、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2343、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347和Blon_2331、Blon_2175、Blon_2176、Blon_2175中任一种上调的条件下孵育包含功能性H5簇的长双歧杆菌婴儿亚种，包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。

在MMO存在的情况下培养

[0030] 本发明提供了制备活化的以ATCC登录号PTA-125180保藏的共生长双歧杆菌婴儿亚种EVC001的方法，其包括在哺乳动物乳寡糖 (MMO) 存在的情况下培养所述细菌物种，所述MMO可以分离自哺乳动物乳来源，或者在哺乳动物乳中鉴定的结构可以通过合成方式衍生的。哺乳动物乳来源可以是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊乳或骆驼乳。本发明组合物中的MMO

可以包含存在于人乳寡糖 (HMO)、牛乳寡糖 (BMO)、牛初乳寡糖 (BCO)、山羊乳寡糖 (GMO) 或其组合的寡糖分子。根据本发明的在MMO存在的情况下的培养还能保持双歧杆菌菌株基因组中的功能性H5基因簇,从而产生可以作为接种物回收的细胞,所述接种物用于制备具有功能性H5簇的双歧杆菌,以用于本发明的治疗方法。

在活化剂存在的情况下培养

[0031] 在优选方式中,本发明提供了制备以ATCC登录号PTA-125180保藏的活化的共生长双歧杆菌婴儿亚种EVC001的方法,其包括在选自表4所列化合物的活化剂存在的情况下培养所述细菌物种,其中培养基中的细菌细胞通过添加到培养基中的活化化合物的存在来活化。优选地,将来自表4的化合物以足以诱导所述细菌细胞中编码唾液酸酶、岩藻糖苷酶或 α -N-乙酰半乳糖胺酶的基因和/或蛋白质或者表1或表2中所列基因的表达的量添加,更优选将活化剂以足以增加唾液酸酶、岩藻糖苷酶或 α -N-乙酰半乳糖胺酶酶促活性的量添加到培养基。用于根据本发明进行培养的起始培养基组合物可以包含来自表4的一种或多种化合物,其量为培养基组合物重量/体积的0.1-3%。根据本发明的活化剂可以构成碳源,并且双歧杆菌细胞对所述碳源的消耗既增加细胞生物量又能够在寡糖被水解之前活化能够内化一种或多种寡糖的转运系统,因此双歧杆菌细胞能够进一步水解内化的寡糖,其中所述寡糖具有存在于哺乳动物乳中的寡糖结构,所述哺乳动物乳可以是人、牛、猪、兔、山羊、绵羊、骆驼或水牛乳或其混合物。

用活化剂培养的作用

[0032] 与在非活化单体或二聚体上培养的相同种的细菌细胞相比,根据本发明制备的活化的细菌细胞对哺乳动物粘膜细胞具有更高的结合亲和力。这类活化的细菌细胞展现出婴儿双歧杆菌中上调的Blon_0881和Blon_2343或其它细菌种中功能性同源物的上调,该同源物在其它细菌种的活化过程中表达。根据本发明活化的婴儿双歧杆菌展现出来自婴儿双歧杆菌的碳水化合物ABC转运体膜蛋白和葡萄糖胺-6-磷酸异构酶的上调的量。活化根据本发明的双歧杆菌细胞包括上调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0042、Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022、Blon_2177和其组合,和/或下调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0518、Blon_0785、Blon_2167、Blon_2168和/或Blon_2177。或者,活化根据本发明的双歧杆菌细胞包括上调选自下组的基因:Blon_0882,Blon_0881、Blon_0880、Blon_0879、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2343、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347、Blon_2331和其组合。

附图说明

[0033] 图1是描述全基因组表达分析的图表,其显示了在牛乳寡糖 (BMO) 或乳糖存在的情况下生长的婴儿双歧杆菌细胞的差异基因表达。

[0034] 图2A. 相较于模式菌株婴儿双歧杆菌ATCC 15697,12个婴儿双歧杆菌菌株的环状图。最内侧环表示%G+C和GC偏斜(skew)。HMO利用簇(HMO-utilization cluster)在最外侧环中显示。其余环显示了针对婴儿双歧杆菌ATCC 15697基因组的BLASTn搜索。基因组环如其在表1中出现的顺序依次排列,从ATCC 15697的基因组开始。核苷酸同一性为50%和100%之间的同源性区域分别用从最浅到最深的阴影表示。同一性小于50%的区域在各环中以空白区域显示。

[0035] 图2B.热图显示了相较于婴儿双歧杆菌ATCC 15697基因组,HMO利用基因(HMO-utilization gene)的序列同一性百分比(由TBLASTx确定)。热图的各个图块的阴影表示如色调所示的同源性百分比。

[0036] 图2C.显示12个婴儿双歧杆菌菌株存在/不存在概况的PanPhlan生成的热图,包括模式菌株婴儿双歧杆菌ATCC 15697.分级群聚通过基因家族模式的存在/不存在来诱导.生成了两个不同的分级群聚,并标记为1和2。

[0037] 图2D.包含LNB代谢基因簇(H5)的基因组比对。模式菌株EVC001中属于H5簇的基因用对应的Blon基因座标签注释。核苷酸序列水平的同源性由灰度块指示。PI_001菌株中不存在的基因是Blon_2175、Blon_2176和Blon_2177。tRNA用星号表示。与移动遗传元件相关的两个基因——噬菌体休克蛋白(Blon_2168)和转座子整合酶(Blon_2181)由带有虚线边框的箭头表示。Blon_2181的整合在ATCC 15797中产生了截短的抗终止子基因,其通过带有连续边框的白色箭头表示。

[0038] 图3A.含有汇集的HMO的培养基中婴儿双歧杆菌EVC001(组1)和婴儿双歧杆菌PI_001(组2)菌株的生长曲线。

[0039] 图3B.30小时培养后细菌上清液的糖概况。消耗量计算为6小时和30小时时间点之间HMO的百分比差异。

[0040] 图3C.婴儿双歧杆菌EVC001(组1)和婴儿双歧杆菌PI_001菌株之间的竞争指数(CI)分析。负CI值表示PI_001竞争生长的能力降低。用星号表示时间点之间CI值统计学上的显著差异(* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)。

[0041] 图4A.qPCR数据显示了以1:1比例饲喂 4×10^9 婴儿双歧杆菌EVC001和婴儿双歧杆菌PI_001各菌株之前(第0天)和3天后,婴儿双歧杆菌的绝对水平。

[0042] 图4B.qPCR数据显示了以1:1比例饲喂 4×10^9 婴儿双歧杆菌EVC001和婴儿双歧杆菌PI_001各菌株之前(第0天)和3天后,婴儿双歧杆菌的绝对水平。

发明详述

[0043] 本文所用“活化剂”广义上指这样的工业化生产过程,其中任何单体或二聚体或大于DP3-20的寡糖,或单体、二聚体碳水化合物和/或寡糖的组合,其能够开启表1中或国际申请号PCT/US2019/014097或PCT/US2015/057226中与HMO结合、转运或降解相关的一个或多个基因,或表2中与NAG消耗相关的一个或多个基因。活化剂的示例列于表4,国际申请PCT/US2019/014097。本发明可以使用但不限于,表4中列出的那些活化剂或本申请或PCT/US2015/057226中列出的任何MMO寡糖。

[0044] 本文所用激活/活化广义上指发酵过程中,相比乳糖或葡萄糖上生长的那些相同菌株中的表达水平,MMO(如HMO或结构相关的聚糖)消耗中涉及的基因的基因表达中的变化。将涉及HMO功能的基因定义为来自LoCascio,2010增刊中定义的5个HMO簇的基因,无论它们是否实际存在于那些簇中。可以将激活/活化确定为增加特定基因的基因表达和/或编码的蛋白质的功能读数,如唾液酸酶或岩藻糖苷酶或 α -N-乙酰半乳糖苷酶活性。激活/活化可以在发酵培养基中和/或在块状干燥的浓缩物和/或与赋形剂混合以将产物稀释至最终浓度的终产物中测量。活化的细胞可能显示出细胞表面上溶质结合蛋白(SBP)、胞外酶或ABC转运体的表达增加,或者变化可能是胞内的。

[0045] 激活/活化在细菌生产过程中发生,细菌在该状态下被干燥,其实例包括在2015年

10月23日提交的国际专利申请PCT/US2015/057226和2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/014097中。

[0046] 在体内或体外竞争试验期间,活化剂能够诱导生物体中基因的表达,但不一定能促进生物体优于其它生物体的选择性生长。

[0047] 培养基中的总碳源将提供营养物以支持生物体的指数生长,或倍增时间以产生足够产量的活化的产物。驱动快速生长和活化/激活的碳水化合物可能并非来自同一分子,但它们可以来自同一分子。本发明涵盖的发酵类型的总碳水化合物/总碳源通常在1-3%重量/体积或10-30g/L的范围内,但是可以更低或更高。可以在消耗的培养基中检测到残留糖。主要的碳源是用来驱动产量,而活化剂可以是主要的碳源,但其功能是改变基因表达。主要的碳源加上活化剂可以等于总碳水化合物或总碳源。

[0048] 本文所用“寡糖”广义上指来自任何来源具有3-20个糖残基或聚合度的碳水化合物。

[0049] 本文所用“寡糖(的)来源”广义上指来自动物、植物、真菌或藻类为游离寡糖的寡糖,以及与动物或植物蛋白或脂质(聚糖)结合的寡糖,以及在其由蛋白质或脂质或它们的混合物中释放后的那些聚糖结构。

[0050] 术语“合成(的)”组合物指通过化学合成过程产生并且可能是性质相同的的组合物。例如,该组合物可以包括化学合成和纯化或分离的成分。这不包括天然合成的组合物。

[0051] 本文所用“哺乳动物乳寡糖(MMO)”广义上指来自哺乳动物乳的寡糖,无论是纯化的还是富集的或是可在乳制品中检测到的,只要该寡糖不通过哺乳动物基因组中表达的消化酶进行代谢即可。MMO包括个体结构,所述个体结构经合成可产生已知在哺乳动物乳(包括来自人、牛、马、猪、山羊、骆驼、水牛和绵羊的乳)中的碳水化合物结构。无论其来源(植物或动物)如何,寡糖在功能上表现为MMO,并且可以由国际申请PCT/US2019/014097的发明所涵盖的单体、二聚体或上游或下游代谢中间体所模拟。本文所用术语“哺乳动物乳寡糖”或MMO广义上指那些不易消化的聚糖,有时称为“膳食纤维”,或未被哺乳动物消化道(例如,小肠)中内源性哺乳动物酶水解的碳水化合物聚合物。哺乳动物乳含有大量的MMO,所述MMO不能直接用作喂乳的哺乳动物的能量来源,但可以被该哺乳动物肠中的许多微生物使用。

[0052] 在一些实施方式中,寡糖纯化自人或牛乳/乳清/乳酪/乳制品(例如,由牛乳/乳清/乳酪/乳制品中的寡糖降解酶纯化出来)。寡糖的纯化可以表示将乳的某一成分与任何其它成分分离或以其它方式加工处理哺乳动物乳,包括表达人乳以提供例如部分脱脂的前乳,人供体乳或其它人乳产品,诸如用作具有H5簇的婴儿双歧杆菌的定殖因子的强化剂(fortifier)。

[0053] “LNB寡糖”包含乳-N-二糖部分,其是寡糖的核心或者可以是实体本身。其可能处于I型或II型核心构型中,分别意指 β 1-3或 β 1-4。N-乙酰基乳糖酰胺是II型实体的示例。LNnT是包含II型核心的较大寡糖结构。I型核心的一个示例是LNT。Bode“人乳寡糖:每位婴儿都需要一位糖妈妈((Human milk oligosaccharides:Every baby needs a sugar mama).”Glycobiology (2012) 22 (9) :1147-1162提供了包括I型和II型核心描述的不同HMO结构的可视化表现。

[0054] HMO的核心结构由还原端的乳糖组成,所述还原端通过 β -1-3连接的乳-N-二糖I

(LNB, Gal β 1-3GlcNAc) 和/或 β -1-3/6)-连接的N-乙酰基乳糖胺(LacNAc, Gal β 1-4GlcNAc) 延伸。这些核心结构可以用半乳糖(Gal)、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)的残基进一步延伸,并用岩藻糖或唾液酸修饰, Ninonuevo, 等(2006). J Agric Food Chem 54:7471-7480。延伸、岩藻糖基化和唾液酸化的组合作用产生了短链、长链和支链结构的异质混合物,迄今已鉴定了200多种不同的HMO类型[Kirmiz, 等(2018). Annu Rev Food Sci Technol 9:429]。此外,HMO的高丰度以及1型结构相对于2型结构的优势[Advances in Nutrition 3:473S(Urashima等,2012)](人乳所特有的特征)表明对结构特异性功能的适应(即I型HM)[Ninonuevo, 等(2006). J Agric Food Chem 54 7471-7480; Tao, 等(2011) J Proteome Res 10(4), 1548-1557]。1型四糖乳-N-四糖是母乳中丰度最高的寡糖之一,并且联同其异构体乳-N-新四糖(LNnT)和衍生物占70%的HMO总量[Ninonuevo, 等(2006). J Agric Food Chem 54 7471-7480]。

[0055] 在本发明中能够用于定殖的寡糖能够促进婴儿双歧杆菌的选择性生长。更优选地,它能够促进具有功能性或赋能性H5簇的婴儿双歧杆菌的选择性生长。

[0056] 长双歧杆菌婴儿亚种EVC001以ATCC登录号PTA-125180保藏;细胞根据《国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约》保藏于美国弗吉尼亚州马纳萨斯10801大学大道(10801University Blvd, Manassas, VA 20110)的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。

[0057] 此外,本文所用“保藏的细菌”指分离的长双歧杆菌婴儿亚种(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*) EVC001(保藏于ATCC并分配了访问号)和其变体,其中所述变体保留了所述细菌的表型和基因型特征,并且其中所述细菌和其变体具有LNT转运能力并包含功能性H5基因簇,所述功能性H5基因簇包含BLON2175、BLON2176和BLON2177。

[0058] 术语“双歧杆菌(*Bifidobacteria*)”及其同义词指对人类具有益处的一个厌氧细菌属。双歧杆菌是组成肠道菌群的细菌的主要分类学类别之一;双歧杆菌是驻留在胃肠道中并对其宿主具有健康益处的有益细菌。

[0059] “功能性H5簇”指双歧杆菌中负责含有LNB的人乳寡糖摄取和代谢的基因的簇。功能性H5簇包含Blon_2175、Blon_2176和Blon_2177。H5簇包含下述基因:Blon_2171、Blon_2173、Blon_2174、Blon_2175、Blon_2176、Blon_2177和galT。乳-N-二糖是作为人乳寡糖的部分的核心二聚体。已经使用一锅法(pot)酶促反应将其生产,以用作体内生长的双歧因子(Biosci. Biotechnol. Biochem, 71(8):2101-2104, 2007)。

优选实施方式详述

[0060] 发明人发现了婴儿双歧杆菌有两个主要谱系。一个谱系在其基因组中一个HMO簇(H5)中具有LNB-ABC转运体基因,而其它谱系缺少LNB-ABC基因。LNB-ABC转运体系统的存在赋予了体外和体内选择性优势。LNB转运的这一特征可用于将保藏的婴儿双歧杆菌EVC001(ATCC登录号PTA-125180,之前为ATCC SD-7035)菌株与不适合在富含MMO的环境中生长的其它婴儿双歧杆菌菌株区分。具体地取决于BLON 2175-2177的存在与否,赋予利用所有HMO的能力或者不存在利用所有HMO的能力。该信息可用于体内菌株鉴定、完整性和/或菌株活化或定殖潜力。

[0061] 维持对保藏的菌株的人工选择性压力以防止遗传漂移的工业应用可能需要具有LNB特征的寡糖。基于H5簇中包含的基因的活性,针对功能性H5基因簇选择和维持的菌株在

MMO环境中更具竞争力。相反,H5簇内基因的缺失表明菌株不适合在富含LNB的肠道环境中促进定殖。在具有I型核心(β 1-3键)或II型核心(β 1-4键)的寡糖存在的情况下,保藏的菌株的组合物可以最佳地施给予哺乳动物,以改善定殖。可以将某些单体或二聚体或完整的寡糖单独或组合添加到保藏的菌株的工业发酵中,以激活MMO利用途径并作为营养碳源。更通常地,含有3-10个糖残基的寡糖是已知能够激活该途径的底物,并且直到最近才发现单体和/或二聚体在该途径中诱导基因表达。

[0062] 发现HMO可以是游离寡糖(饮食聚糖)形式或通过糖苷键与蛋白质或脂质偶联。主要的HMO包括乳-N-四糖(LNT),乳-N-新四糖(LNnT)和乳-N-六糖,它们是中性HMO,此外还有岩藻糖基化的寡糖,如2-岩藻糖基乳糖(2FL),3-岩藻糖基乳糖(3FL)和乳-N-岩藻戊糖I、II和III。酸性HMO包括唾液-乳-N-四糖,3'和6'唾液乳糖(6SL)。HMO尤其富集于岩藻糖基化的寡糖中,美国专利号8,197,872。

[0063] 本发明提供了婴儿双歧杆菌菌株的组合物,其包含功能性H5簇,更具体地包含功能性基因,和/或BLON 2175、BLON 2176和BLON 2177的基因产物,优选地,其中组合物还至少包含一种含有乳-N-二糖的部分。更优选地,具有 β 1-4键的乳-N-二糖(LNB)(如N-乙酰基-乳糖胺),但该核心也称为II型核心,其可以是较大的寡糖结构(如LnNT)的部分。组合物可能包括I型核心。组合物可以同时包括I型和II型核心。

[0064] 本发明提供了无关于最终活化步骤,在发酵过程中保持菌株遗传完整性和菌株鉴定的方法。本发明还提供了制备处于活化形式的包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的方法,该方法包括在选自国际申请PCT/US2015/065323或PCT/US2019/014097(通过引用其全部内容纳入本文)中描述的化合物的活化剂存在的情况下,培养包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)。

[0065] 包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种能够转运LNB或包含LNB部分作为其部分的寡糖。功能性H5簇的确认可能取决于BLON2175、BLON2176和/或BLON2177基因,基因产物和/或基因活性的存在。其还可以包括破坏LNB部分(N-乙酰半乳糖苷酶)的BLON 2173和BLON 2174的活性。在其它实施方式中,发酵可包括双歧杆菌细胞的活化,如先前在国际申请PCT/US2015/065323或PCT/US2019/014097中所述。这些实施方式可以包括上调Blon_0881和Blon_2343。在其它实施方式中,活化涉及增强来自婴儿双歧杆菌的葡萄糖胺-6-磷酸异构酶和碳水化合物ABC转运体膜蛋白的表达。在其它实施方式中,活化包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)细胞包括上调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0042、Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022、Blon_2177和其组合,和/或下调选自下组的来自婴儿双歧杆菌的基因:Blon_0518、Blon_0785、Blon_2167、Blon_2168。在另一实施方式中,包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)细胞包括来自婴儿双歧杆菌的上调的Blon_0042基因。在另一实施方式中,包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)细胞包括来自婴儿双歧杆菌的下调的Blon_2168基因。在其它实施方式中,活化包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)包括上调选自下组的基因的表达:Blon_0882,Blon_0881、Blon_0880、Blon_0879、Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347和Blon_2331。在其它所述方法中,监测来自表1(国际申请PCT/US2019/014097)的一种或多种基因的基因表达和/或蛋白质表达或蛋白

质活性以确定活性。在一些实施方式中,将来自表2(国际申请PCT/US2019/014097)的基因表达用于监测活化/激活。

[0066] 在各种实施方式中,活化剂以足以在双歧杆菌中诱导编码唾液酸酶或岩藻糖苷酶的基因的量存在于本发明的培养基中。在一些实施方式中,活化剂在培养基中的存在量为起始组合物重量的0.1%-20%,在特定实施方式中,在发酵和/或干燥过程中可以存在乳-N-二糖。在其它实施方式中,在最终产物中可以检测到乳-N-二糖结构。

[0067] 在一些实施方式中,将上清液与生物质分离;在其它实施方式中,活化的上清液与细胞一起干燥。在一些实施方式中,将包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的细胞与MMO或其它寡糖,优选N-乙酰基乳糖酰胺, LnNT和其它II型核心寡糖(β 1-4)和/或I型核心如乳-N, LNT或具有 β 1-3键的其它结构来干燥。在这些或其它实施方式中,可以将赋形剂添加到回收的生物质中,并且赋形剂可以是MMO或寡糖。在一些实施方式中,赋形剂包含乳-N-二糖,岩藻糖基乳糖(FL)或FL的衍生物,包括但不限于乳-N-岩藻戊糖(LNFP)和乳二岩藻四糖(LDFT),乳-N-四糖(LNT)和乳-N-新四糖(LNnT),唾液酸乳糖。其还可以包括乳糖。本发明还可以提供组合物,其包含活化的双歧杆菌和来自MMO或列于国际申请PCT/US2019/014097中的活化剂。

[0068] 因此,新生儿肠道中包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的增殖(由母乳中提供的HMO引发并独特地赋予功能)对于该婴儿的健康和长期生存存在显著的益处。因此,包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)对新生儿提供了显著的益处,这包括但不限于,相对于处于活化前状态的生物体而言,与肠道粘膜更高的结合亲和力,胃肠道更高的定殖,从而防止了其它细菌进化支的生长,短链脂肪酸更高的产量,复杂寡糖更高的消耗和对免疫应答更大的刺激,通过免疫应答标志物的阳性改变来测量。Lewis等(2015) *Microbiome* 3:13;Huda等(2014) *Pediatrics* 134:2e362-e372。

[0069] 具有功能性H5簇,婴儿双歧杆菌成为人乳寡糖(HMO)的唯一消耗者,并且已经证明其在婴儿人肠道菌群中的相对比例增加至比其在出生时候(消耗HMO之前)或在那些只喂食不含乳聚糖的市售婴儿配方食品的婴儿中的水平高至少10倍的水平,并且其水平高达远端结肠总微生物种群的70%。当婴儿的肠道中存在婴儿双歧杆菌并且该婴儿以母乳作为营养的唯一来源时,婴儿双歧杆菌群体可以增加至肠道总细菌群体的90%,通过粪便中微生物定量来测量。活化的包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)将以高浓度保留在肠道中并保持活化,只要向哺乳动物提供选择性复杂寡糖的饮食来源(例如,向人婴儿提供HMO)。一旦从饮食中撤去了复杂寡糖的来源(例如,在离乳时),婴儿双歧杆菌就不再被活化,它就无法再与其它肠道微生物群竞争肠道中的营养物,并且其种群迅速减少至少于总微生物组的1%。离乳的婴儿、儿童或成人肠道中通常不存在水平超过1%的婴儿双歧杆菌。

基因型比较的描述

[0070] 使用全基因组测序来比较许多婴儿双歧杆菌菌株。确定H5簇与包括寡糖的应用在功能上相关,所述寡糖最优选包含II型核心结构。婴儿双歧杆菌基因组可以用于区分具有BLON 2175-BLON 2177的那些和不具有BLON 2175的那些。参见图2A-D。该信息可以用于生成菌株特异性引物,用于检测和监测复杂环境中的菌株。这对于菌株鉴定和随时间监测菌

株完整性而言很有用。

活化表型的描述

[0071] 在一些实施方式中,活化表型涉及上调一个或多个HMO基因簇中包含的一个或多个基因。表1中列出了来自婴儿双歧杆菌的这些基因簇的示例。各基因的功能是本发明的重要部分。

表1.与婴儿双歧杆菌中HMO消耗相关的基因的列表,如Locascio 2010和Garrido (2013) Microbiology 159:649-664所述。前缀Blon指长双歧杆菌和婴儿双歧杆菌中的基因。

婴儿双歧杆菌特异性基因簇					
H1 HMO簇	H2 岩藻糖苷酶	H3 岩藻糖苷酶	H4 唾液酸	H5 乳-N-二糖	脲酶簇
Blon_2331	Blon_0243	Blon_0423	Blon_0641	Blon_2171	Blon_0104
Blon_2332	Blon_0244	Blon_0424	Blon_0642	Blon_2172	Blon_0105
Blon_2334	Blon_0245	Blon_0425	Blon_0643	Blon_2173	Blon_0106
Blon_2336	Blon_0246	Blon_0426	Blon_0644	Blon_2174	Blon_0107
Blon_2342	Blon_0247		Blon_0645	Blon_2175	Blon_0108
Blon_2343	Blon_0248		Blon_0646	Blon_2176	Blon_0109
Blon_2344			Blon_0647	Blon_2177	Blon_0110
Blon_2347			Blon_0648		Blon_0111
Blon_2348			Blon_0649		Blon_0112
Blon_2350			Blon_0650		Blon_0113
Blon_2351			Blon_0651		Blon_0114
Blon_2352					Blon_0115
Blon_2354					
Blon_2355					
Blon_2357					
Blon_2359					
Blon_2360					
Blon_2361					

[0072] Blon_2177(基因名称:胞外溶质结合蛋白,家族);Blon_2176(基因名称:结合蛋白依赖性转运系统内膜成分);Blon_2175(基因名称:结合蛋白依赖性转运系统内膜成分)的存在可以用于鉴定具有功能性H5基因簇的婴儿双歧杆菌。

[0073] 活化表型可以涉及HMO的捕获、内化和/或代谢;和/或涉及对上皮细胞的结合亲和力;以及乳糖单体、二聚体或寡糖的分解代谢;和/或色氨酸或吲哚衍生物的产生。活化表型可以涉及伴随稳定的、活化的细菌表型的制备的任何诱导途径,伴随其在动物或人结肠内

消耗纤维/寡糖的能力改善,其中寡糖包括但不限于,寡糖和/或其它纤维,但是可以更特别地指MMO。本发明提供了在所述动物或人类中消耗和/或使用寡糖/纤维之前产生活化表型。在一些情况中,其是针对所述动物或人的新生婴儿。

[0074] 活化可以具体包括与NAG消耗有关的基因:来自婴儿双歧杆菌的Blon_0882(N-乙酰葡萄糖胺6-磷酸脱乙酰酶(EC 3.5.1.25)),Blon_0881(葡萄糖胺-6-磷酸异构酶),Blon_0880(NagC/Xy1R型转录调节因子),Blon_0879(NBD/HSP70家族的糖激酶)。(表2)来自其它物种的任何这些基因的功能性同源物可以用于测量其相应物种中的活化。

表2. 与可以代表活化的NAG途径相关的长双歧杆菌/婴儿双歧杆菌基因。

基因	功能
Blon_0882	N-乙酰葡萄糖胺6-磷酸脱乙酰酶(EC 3.5.1.25)
Blon_0881	葡萄糖胺-6-磷酸异构酶
(Blon_0880	NagC/Xy1R型转录调节剂
Blon_0879	NBD/HSP70家族的糖激酶

[0075] 在各种实施方式中,婴儿双歧杆菌中的活化需要上调Blon_0881(葡萄糖胺-6-磷酸异构酶)和Blon_2343(碳水化合物ABC转运体膜蛋白)和/或葡萄糖胺-6-磷酸异构酶和碳水化合物ABC转运体膜蛋白的同源物(表3),并且可以通过监测这些基因的表达来确认活化。在其它实施方式中,其它基因选自表1或表2中列出的簇之一或其与其它物种中的功能性同源物。在一些实施方式中,使用不是Blon_0881或Blon_2343或其物种特异性功能性同源物的一种或多种基因对活化另外进行测量。在一些实施方式中,HMO表型的活化涉及上调转录调节剂,如来自婴儿双歧杆菌的Blon_0042。在其它实施方式中,活化基因可以分别选自氨基酸缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和天冬氨酸的Blon_R0015、Blon_R0017、Blon_R0021、Blon_R0022转移RNA(tRNA)中的一种或多种。在进一步的实施方式中,活化可以涉及监测Blon_0518、Blon_0785(ABC型硝酸盐/磺酸盐/碳酸氢盐转运系统,周质组分)、Blon_2167(假想的蛋白质)、Blon_2168(噬菌体休克蛋白C(PspC)家族蛋白)的下调,被监测的标的是单独的或者除此之外还包括被选自表4的活化源激活的一种或多种基因。

[0076] 表1和表2描述了婴儿双歧杆菌中的基因基因组和基因功能,其同源物可以存在于其它物种中,所述物种是可以可靠地开启部分或全部HMO表型(活化表型),并且是描述双歧杆菌、乳杆菌和/或双球菌中活化的基础。在一些实施方式中,Blon_2343基因选自HMO簇1和HMO簇之一外侧区域的另一活化基因标志物。通常,还选择在生物体内组成性表达的基因以对数据进行标准化。表3显示了用于监测活化的一组合适的基因。

表3. 用于使用来自婴儿双歧杆菌的组成型参比基因确定活化的基因的基因座标签的列表。参比基因将数据标准化。

基因座标签	基因产物	基因目的
Blon_0881	葡萄糖胺-6-磷酸异构酶或 NAGB	活化
Blon_2343	碳水化合物 ABC 转运体膜蛋白	活化
Blon_0393	半胱氨酰-tRNA 合成酶	参比

[0077] 在一些实施方式中,当细胞在乳糖或葡萄糖上生长时,相较于相同基因,认为基因的相对表达上调时是活化。已知选择活化的基因在MMO(相较于乳糖或葡萄糖)存在的情况下生长时是上调的,因此,如果它们的表达相对于参比基因增加,那么这足以描述为活化。在一些实施方式中,基因激活涉及Blon_0881和Blon_2343,并且它们的表达大于1;也就是说,当 $\Delta\Delta$ 循环阈值($2^{\Delta\Delta Ct}$)大于1时,使用Blon_0393或另一个组成性表达的基因作为参照来计算DDCT。结果(活化)是基因表达的倍数变化($2^{\Delta\Delta Ct}>1$)。基于双 ΔCT ($2^{\Delta\Delta Ct}$)方法确定(Livak K和Schmittgen T. (2001)使用实时定量PCR和 $2(-\Delta\Delta C(T))$ 方法分析相对基因表达数据(Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method).Methods:25:402-8)。在其它实施方式中,除了Blon_0881和Blon_2343外,还使用表1的其它基因。

[0078] 在其它实施方式中,使用唾液酸酶和/或岩藻糖苷酶和/或 α -N-乙酰半乳糖苷酶活性来测量活化的功能性读数。在其它实施方式中,活化通过基因激活和功能性读数来确定。在一些实施方式中,使用溶质结合蛋白或ABC转运体监测活化。在一些实施方式中,对于活化,监测细胞结合。

可用于活化细胞的不同单体和二聚体的描述

[0079] 选定的一组单体或二聚体,包括但不限于,N-乙酰葡萄糖胺/半乳糖胺(NAG),含有NAG、岩藻糖和/或唾液酸中至少一个部分的二聚体,乳-N-二糖,半乳-N-二糖,己糖二糖(例如Fuc α 1,2Gal β),可用于根据本发明的发酵过程,作为MMO途径的活化剂,并且可选地,作为国际申请PCT/US2019/014097中所述的主要碳源。这些活化剂在表4中列出。

表4. 可用于本发明中以单独或组合形式用作活化剂以有条件地激活表达的寡糖途径的来源的列表

源
N-乙酰基葡萄糖胺/半乳糖胺(NAG)
二聚体N-乙酰基葡萄糖胺
岩藻糖
唾液酸
乳-N-二糖
半乳-N-二糖
Fuc α 1,2Gal β

使用LNB生成的工作储液

[0080] 在一些实施方式中,在含有LNB的琼脂上选择所需菌株,并将其转移到含有LNB的液体培养物,作为唯一碳源。细胞生长至稳定期,离心并用15%甘油冷冻。这些储液创建了用于大规模发酵运行的工作储液或起始培养物。使用LNB作为唯一碳源提供了选择性压力,以避免因遗传漂移而失去H5簇。大规模发酵运行可以使用任何碳源,无论它们是否能够激活产生生物物质。

生产活化的婴儿双歧杆菌的发酵过程描述

[0081] 在一些实施方式中,表4中列出的一种或多种来源可以用作发酵中所需的总碳源,以增加双歧杆菌的生物量并在从发酵罐收获细胞之前活化细胞。在其它实施方式中,表4中列出的来源以添加到发酵中的总碳水化合物化合物的百分比的形式添加,例如5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。而剩余的碳源来自葡萄糖、半乳糖或乳糖,以在发酵开始时实现100%的碳源。在其它实施方式中,表4中的活化化合物(源)可以在指数末期添加至发酵中以开启寡糖途径。在其它实施方式中,表4中列出的碳源在培养期间通过一种或多种进料流间歇地或连续地喂食(供应)到发酵罐。在其它实施方式中,将细胞重悬于包含表4中来源的溶液中。在其它实施方式中,将细胞转移到包含表4中列出的源物质的二级发酵容器中。

[0082] 在一些实施方式中,制备发酵培养基组合物,其包含活化剂作为唯一碳源(存在于发酵培养基中的总碳水化合物化合物的100%)。发酵通常从碳源(碳水化合物)开始,以1-3%的最终组合物(重量/体积)。在这些实施方式中,在收获细胞之前,活化剂可以增加生物量或产量并开启用于HMO消耗的正确基因。

[0083] 在其它实施方式中,制备发酵培养基组合物,其包含作为主要碳源的一种或多种简单的可发酵糖(如葡萄糖、半乳糖或乳糖)和活化剂(即NAG、岩藻糖、唾液酸或表4中列出的另一化合物,它们两者在发酵开始时添加。主要碳源可以是至少90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%。剩余的碳源可以是活化剂,其为起始培养基中存在的总碳水化合物(碳源)的10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%。

[0084] 当包含作为主要碳源的简单的可发酵糖(如葡萄糖、半乳糖或乳糖)的组合物被用于启动发酵时,其包含对于正在进行的发酵的规模而言,至多50%、60%、70%、80%、90%或100%所需的碳。然后,活化剂在指数期后期期间添加,此时简单可发酵糖从起始水平降低。活化剂(即NAG或表4中列出的任何其它糖)在指数期后期添加,以占发酵起始时存在的总碳水化合物化合物的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%。表4的活化化合物可以留在用过的培养基中并与生物体干燥,或者其可以在收获细胞之前被完全使用。

[0085] 一种制备/引发/活化包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的方法,以产生这样的酶,所述酶在使其处于休眠状态之前是消耗HMO所必需的。本文所述的任何组合物可以通过在无异种生物混杂的(axenic)培养物(例如,具有遗传同质性的培养物)中培养双歧杆菌来制备,并且如果培养基中包含表4列出的一种或多种化合物,那么该培养物将被“活化”。在各种实施方式中,本文所述的任何组合物可以这样制备:分离双歧杆菌;纯化细菌;用纯化的双歧杆菌菌株接种发酵罐;在表4中一种或多种活化剂存在的情况下培养双歧杆菌;和收集细胞。双歧杆菌的发酵可以在工业体积(例如,1-

500m³)的搅拌釜发酵罐中进行,其在整个发酵过程中保持在厌氧条件下。发酵可以包括在发酵过程中任何时间在液体培养物中提供表4的至少一种或多种活化剂,以至少1g/L的水平,通常为约1-50g/L,或2-20g/L,或5-10g/L,作为唯一或补充碳源来活化细胞。

[0086] 在各种实施方式中,唾液酸酶和/或岩藻糖苷酶基因表达或酶试验测定活性是确认培养物或冻干粉末中的活化的一种手段。溶质结合蛋白表达的增加也是激活HMO途径的功能性结果。(这增加了双歧杆菌与上皮细胞的结合)。B1on0042是HMO簇及其在其它菌株中的功能类似物的转录调节基因。可以检测与B1on0042具有至少70%同源性的蛋白质,作为活化的指标。

[0087] 需要低水活性以在长期储存期间保持生物体休眠。在一些实施方式中,粉末形式的活化的双歧杆菌或其它细菌的稳定性需要水活性小于0.35、小于0.25、小于0.2、小于0.1。在其它实施方式中,无水油用于将油悬浮液中的生物体保持在稳定的休眠状态,所述油悬浮液包括但不限于,中链甘油三酸酯(MCT)、天然食用油、还在油、真菌油、鱼油、矿物油、硅油、磷脂和糖脂。油具有低的水活性,并且食用油,例如中链甘油三酯、矿物油、植物油可以与活化的或未活化的包含功能性H5基因簇的双歧杆菌(包括保藏的双歧杆菌)混合。在有或没有其它稳定剂的情况下,具有足够低水活性的糖浆或其它赋形剂可以用于保持细胞休眠直至使用。

[0088] 组合物可以还包含食物源,所述食物源包含支持健康哺乳动物生命的所有营养需求。哺乳动物可以是但不限于,婴儿,青少年,成年或老年。食物来源可以是针对人,水牛,骆驼,猫,牛,狗,山羊,豚鼠,仓鼠,马,美洲驼,猪,兔,绵羊,猴子,小鼠或大鼠设计的营养配方。例如,食物来源可以是人类婴儿的食物来源,其进一步包含蛋白质,例如但不限于,乳蛋白质,谷物蛋白质,种子蛋白质或块茎蛋白质。食物来源可以是哺乳动物乳,包括但不限于来自人,牛,马,山羊或猪的乳。食物也可以是旨在满足哺乳动物(例如人)营养需求的医疗食品或肠内食品。

[0089] 组合物还可包含约5-90%来自哺乳动物来源的饮食聚糖,包括但不限于,人、猪或牛物种。

[0090] 包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌),无论其是否被活化,都可以包装在小瓶、小袋、棒状包装、胶囊、片剂或其它食品中作为单次使用或多次使用包装。

组合物

[0091] 本文所述的组合物包含含有功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种,包括保藏的双歧杆菌,如以ATCC登录号PTA-125180保藏的EVC001,任选地具有包含I型或II型核心乳-N-二糖部分的至少一种复杂寡糖。该复杂寡糖的存在可以诱导细菌发生变化,从而使该复杂寡糖成为细菌的能量来源,并且当哺乳动物摄取该组合物时,诱导或活化的细菌将为哺乳动物的肠道提供益处。这类组合物可以用于国际专利公开号WO 2016/065324、WO 2016/149149、WO 2017/156548、WO 2017/156550、WO 2018/006080和美国临时申请号62/558,344;62/558,349;62/613,405;和62/618,293中所述的任何方法,其中该方法需要婴儿双歧杆菌或相似的微生物;其中这些方法中的任何一种方法也需要复杂寡糖,例如存在于MMO的那些,该寡糖优选包含具有1型乳-N-二糖核心的一种或多种分子。

[0092] 合适的组合物包含婴儿双歧杆菌和任何半乳糖-N-乙酰基半乳糖胺三聚体(例如,

Gal-(1→3)-D-GlcNAc-(1→3)-Gal、或Gal-(1→3)-D-GlcNAc-(1→4)-Gal、或Gal-(1→6)-D-GlcNAc-(1→4)-Gal、或Gal-(1→6)-D-GlcNAc-(1→3)-Gal), 和其衍生物。

复杂寡糖

[0093] 在各个实施方式中,组合物包含多种寡糖。寡糖组合物可以源自人和非人聚糖来源,并且可以游离聚糖或结合蛋白质的聚糖的形式存在。在一些实施方式中,寡糖可以是牛或人乳寡糖。在一些实施方式中,寡糖组合物包含牛乳寡糖(BMO)。牛寡糖可包括来自成熟乳、早乳、初乳或其浓缩物的寡糖。在一些实施方式中,寡糖可包括但不限于,岩藻糖、唾液酸、N-乙酰葡萄糖胺和/或葡萄糖酸盐残基。

寡糖的组合物和制剂

[0094] 本文所定义的选择性寡糖(OS)是不被哺乳动物所消化且对特定细菌具有选择性的碳水化合物。选择性寡糖可以是哺乳动物乳、植物、藻类、酵母来源的,只要它们诱导所需的代谢谱即可。本文所用OS指来自任何来源,包括植物、藻类、酵母或哺乳动物,长度为DP2-DP20的那些难消化糖。具有存在于任何哺乳动物乳中的难消化寡糖的化学结构的寡糖在本文称之为OS,无论它们是否实际上源自哺乳动物乳。

[0095] OS可以包括下述一种或多种物质:乳-N-二糖,乳-N-三糖,乳-N-新四糖,岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻戊糖,乳二岩藻四糖,唾液乳糖,二唾液酸内酯-N-四糖,2'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖胺,3'-岩藻糖基乳糖,3'-唾液-3-岩藻糖基乳糖,3'-唾液乳糖,6'-唾液乳糖胺,6'-唾液乳糖,二岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻戊糖I,乳-N-岩藻戊糖II,乳-N-岩藻戊糖III,乳-N-岩藻戊糖V,唾液乳-N-四糖,或其衍生物。在一些实施方式中,OS包含I型核心。在混合物的优选实施方式中,OS包含II型核心。参见,例如,美国专利号8,197,872、8,425,930和9,200,091,其公开内容通过引用其全文的方式纳入本文。MMO的功能性等同物可以包括使用例如澳大利亚专利申请公开号2012/257395、澳大利亚专利申请公开号2012/232727和国际专利公开号WO 2017/046711中所述的重组DNA技术所产生的相同分子。

[0096] OS组合物(存在的结构)及其量(克)可以支持婴儿双歧杆菌的定殖和活化。OS组合物可以保持婴儿双歧杆菌的活化。

[0097] OS支持这些细菌的生长和代谢活性,并因此可以用于本发明,所述OS包括MMO及其功能性等同物,例如但不限于,合成的等同天然的MMO,修饰的植物多糖,修饰的动物多糖,或释放自动物或植物糖蛋白的聚糖。

[0098] 可以食物组合物的形式将MMO提供给哺乳动物。食物组合物可以包括哺乳动物乳,哺乳动物乳衍生产品,哺乳动物供体乳,婴儿配方食品,代乳品,或肠内营养产品或用于包括人在内的哺乳动物的代餐食品。在一些实施方式中,包括MMO的食物组合物和细菌组合物的添加可以同时发生,例如,彼此之间少于2小时内。

[0099] 用于本发明的MMO还可以包括,乳-N-岩藻戊糖(LNFP)和乳二岩藻四糖(LDFT),乳-N-四糖(LNT)和乳-N-新四糖(LNnT),它们可以纯化自哺乳动物乳,例如但不限于,人乳,牛乳,山羊乳或马乳,绵羊乳或骆驼乳,或通过化学合成直接产生。LNnT具有包含II型核心的寡糖结构。I型核心的一个示例是LNT。

[0100] MMO还可以是唾液乳糖(SL)或SL的衍生物,例如但不限于,3'唾液乳糖(3SL),6'唾液乳糖(6SL)和二唾液乳-N-四糖(DSLNT),他们可以纯化自哺乳动物乳,例如但不限于,人乳,牛乳,山羊乳或母马乳,绵羊乳或骆驼乳,或通过化学合成直接产生。该组合物可以进一

步包含一种或多种细菌菌株,其具有使用唾液乳糖或其衍生物作为唯一碳源生长和分裂的能力。这类细菌将表达HMO表型,但不一定表达H5基因簇的蛋白质。这类细菌菌株可以是天然存在的或经遗传修饰,并可以选择在唾液乳糖或其衍生物上生长,如果这类细菌菌株自然情况下不在那些寡糖上生长。

[0101] MMO可以是岩藻糖基乳糖 (FL) 或FL的衍生物和唾液乳糖 (SL) 或SL的衍生物的混合物,它们天然存在于哺乳动物乳中,例如但不限于,人乳,牛乳,山羊乳和马乳。FL和SL或其衍生物可以约1:10至10:1的比例存在。

[0102] 该组合物可以包含至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%的N-乙酰基-D-乳糖胺(二聚体;II型核心,通常在LNnT中)。例如,该组合物可以包含约5%-95%、10%-80%、50%-75%或20%-60%的N-乙酰基-D-乳糖胺(二聚体;II型核心,通常在LNnT中)。此外,该组合物可以包含至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%的I型核心HMO(Gal-(1,3)- β -GlcNAc),其通过与存在于人基因组中的 β -3-半乳糖基转移酶1(B3GALT1)具有同源性的酶合成。例如,该组合物可以包含约5%-95%、10%-80%、50%-75%或20%-60%的I型核心HMO(Gal-(1,3)- β -GlcNAc)。可以使用不存在于人乳的寡糖,诸如在寡糖的合成生产过程中发现的二聚体结构或其它中间二聚体,包括二糖,例如,乳-N-二糖。组合物可以包含5%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%或95%的乳-N-三糖I(Gal-(1,3)- β -GlcNAc-(1,3)-Gal)或乳-N-三糖II(GlcNAc-(1,3)-Gal-(1,3)- β -Glu)或乳-N-新三糖(Gal-(1,4)- β -GlcNAc-(1,3)-Gal)。例如,该组合物可以包含约5%-95%、10%-80%、50%-75%或20%-60%的乳-N-三糖I(Gal-(1,3)- β -GlcNAc-(1,3)-Gal)或乳-N-三糖II(GlcNAc-(1,3)-Gal-(1,3)- β -Glu)或乳-N-新三糖(Gal-(1,4)- β -GlcNAc-(1,3)-Gal)。MMO每天可以提供0.2克-40克。该组合物可以包含总碳水化合物的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%,作为I型或II型核心寡糖。

[0103] 以超过5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%百分比使用的MMO或相似的选择性寡糖在非特异性碳水化合物中稀释,所述非特异性碳水化合物的百分比低于95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%,所述非特异性碳水化合物例如但不限于,低聚半乳糖(GOS),低聚果糖(FOS),低聚木糖(XOS)或其组合。这些组合提供了增加选择性的程度,其中选择性寡糖结构的来源或MMO的比例越高,对某些细菌例如但不限于长双歧杆菌婴儿亚种(*B. longum* subsp. *infantis*)的选择性就越大。

[0104] 修饰寡糖结构以增加唾液酸化(唾液乳糖胺)或岩藻糖基化可以进一步提高它们的选择性。制剂可以包含乳糖胺的II型核心二聚体,以及岩藻糖基化和/或唾液酸化的寡糖作为特异性碳水化合物部分;其余部分由不具有特异性的碳水化合物组成。

[0105] 可以直接或以食物组合物的形式将OS提供给哺乳动物。组合物可以进一步包含食物,并且该食物可以包含部分或全部营养需求,以支持健康哺乳动物的生活,其中该哺乳动物可以是但不限于,婴儿或成人。食物组合物可以包括哺乳动物乳,哺乳动物乳衍生产品,

哺乳动物供体乳,婴儿配方食品,代乳品,肠内营养产品或用于包括人在内的哺乳动物的代餐食品。OS可以是粉末或液体(水基或油基)形式。

[0106] 在各种实施方式中,复杂乳寡糖包括:由3个Hex部分、4个HexNAc部分和1个岩藻糖(Fuc)部分组成的寡糖;由4个Hex部分、4个HexNAc部分和1个Fuc部分组成的寡糖;由3个Hex部分、5个HexNAc部分和1个Fuc部分组成的寡糖;由5个Hex部分、4个HexNAc部分和1个Fuc部分组成的寡糖;由4个Hex部分、5个HexNAc部分和1个Fuc部分组成的寡糖;由3个Hex部分、6个HexNAc部分和1个Fuc部分组成的寡糖;由3个己糖(Hex)部分和6个N-己糖胺(HexNAc)部分组成的寡糖;由4个Hex部分和3个HexNAc部分组成的寡糖;由3个Hex部分和4个HexNAc部分组成的寡糖;由6个Hex部分和2个HexNAc部分组成的寡糖;由4个Hex部分和4个HexNAc部分组成的寡糖;由3个Hex部分和5个HexNAc部分组成的寡糖;由5个Hex部分和4个HexNAc部分组成的寡糖;由4个Hex部分和5个HexNAc部分组成的寡糖;由3个Hex部分和6个HexNAc部分组成的寡糖。示例性的寡糖包括乳-N-四糖,乳-N-新四糖,乳-N-岩藻糖I,乳-N-岩藻糖II,乳-N-岩藻糖III,乳-N-岩藻糖V,乳-N-己糖,对-乳-N-己糖,乳-N-新己糖,对-乳-N-新己糖,单岩藻糖基乳-N-己糖II,异构岩藻糖基化乳-N-六糖(1),单岩藻糖基乳-N-己糖,异构岩藻糖基化乳-N-己糖(3),异构岩藻糖基化乳-N-己糖(2),二岩藻糖基-对-乳-N-新己糖,二岩藻糖基-对-乳-N-己糖,二岩藻糖基乳-N-己糖,乳-N-新八糖(Neocataose),对-乳-N-八糖,异-乳-N-八糖,乳-N-八糖,单岩藻糖基乳-N-新八糖,二岩藻糖基乳-N-八糖,二岩藻糖基乳-N-八糖I,二岩藻糖基乳-N-八糖II,二岩藻糖基乳-N-新八糖II,二岩藻糖基乳-N-新八糖I,乳-N-十糖,三岩藻糖基乳-N-新八糖,三岩藻糖基乳-N-八糖和三岩藻糖基-异-乳-N-八糖。

[0107] 在一些实施方式中,本文所述的寡糖包含两种或更多种单糖(例如,至少一种二糖或三糖),并且可以是牛或人乳聚糖或其化学合成的等同物。复杂寡糖可以是但不限于:(3Hex,4HexNAc,1Fuc),(1Gal,1GlcNAc,1NeuAc)和/或(1Glu,1Gal,1NeuAc(3'或6'))。在一些实施方式中,所选择的寡糖将具有至少一个甘露糖残基。

[0108] 在一些实施方式中,本文所述寡糖包含水平大于1%的Hex(4);Hex(4)HexNAc(2);和Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)中的任一种。在另一实施方式中,至少一种寡糖包含下述成分比例之一:1)Hex(2)NeuAc(1):Hex(2)HexNAc(1)的比例小于5.0;2)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(1)的比例大于1.0;3)Hex(2)HexNAc(1):Hex(3)HexNAc(2)的比例大于2.0;4)Hex(3):Hex(3)HexNAc(1)NeuAc(1)的比例小于100;或5)Hex(2)HexNAc(1):Hex(4)NeuAc(2)NeuGc(1)的比例大于10。

[0109] 可以使用本领域技术人员已知的方法从任何数量的来源分离复杂哺乳动物乳寡糖(MMO)。例如,可以使用本领域已知的方法由人乳获得HMO。人乳可以由国际乳库(International Milk Bank)(美国内华达州斯帕克斯)或任何这类相同的乳库提供。可以对人乳进行巴氏消毒,然后进行离心脱脂,将其分成奶油(主要是脂肪)和脱脂品(脱脂产品)。然后可以使用截点值为5-10kDa的膜过滤脱脂脱脂乳,以浓缩蛋白质部分(主要是乳清),并且将包含复杂HMO的渗透液通过喷雾干燥进行干燥。该干燥的HMO部分的组合物为约50%的乳糖和约30%的HMO,其余部分主要是肽和灰分。HMO部分主要是岩藻糖基化的。可以使用本领域技术人员已知的方法和任何数量的来源分离BMO。

[0110] 初乳寡糖(CO)可以分离自哺乳动物来源,例如但不限于,牛(BCO)、人(HCO)、山羊

(CCO)或绵羊(OCO),并且可以用于本发明中。初乳可以用作整个初乳或可以进行加工以选择性富集CO部分。加工步骤可以包括但不限于,超滤、巴氏灭菌、离心和沉淀。通常,选择处理过程以去除、抑制或破坏降解CO的酶。在一些实施例中,可以使用其它处理步骤来对产品进行灭菌,以消除任何潜在的细菌或病毒污染。这类步骤包括但不限于,常规巴氏灭菌,超高温(UHT)工艺, γ 辐射,冷冻和解冻,超声处理和微流体破坏。在其它实施方式中,可以使用本领域已知的方法来减少BCO的乳糖含量,例如但不限于,用酶处理提取物以降解乳糖或通过选择性去除乳糖的机械或生物学手段。在本发明的其它实施方式中,通过例如但不限于喷雾干燥、冷冻干燥、流化床干燥、隧道干燥和鼓式干燥的方法浓缩和/或干燥液态CO混合物。

[0111] 在各种实施方式中,复杂寡糖占组合物干重的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%。

[0112] 在替代性实施方式中,复杂寡糖进一步包含合成产生寡糖,其包含岩藻糖基乳糖(SPF)和/或合成产生的唾液乳糖(SPS)或其衍生物,包括但不限于,2'-岩藻糖基乳糖,3-岩藻糖基乳糖,二岩藻糖基乳糖,乳-N-岩藻糖基戊糖I,乳-N-岩藻糖基戊糖II,乳-N-岩藻糖基戊糖III,乳-N-岩藻糖基戊糖V,3'-唾液乳糖,6'-唾液乳糖,3'-唾液酸-3-岩藻糖乳糖,唾液酸乳-N-四糖和6'-唾液酸乳糖胺。可以使用本领域技术人员已知的方法由任何数量的来源衍生合成产生的寡糖(SPO)。例如,使用标准纯化方案产生SPF,如美国公开号20130035481中所公开,其内容通过引用纳入本文。

[0113] 可以将合成产生的寡糖(SPO)添加到生物产生的哺乳动物乳寡糖(MMO)并占组合物干重的至少5%-至少80%。在一些实施方式中,组合物包含MMO和SPF和/或SPS的混合物。在各种实施方式中,SP0是组合物干重的1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在一些实施方式中,SPF是组合物干重的1-50%。在一些实施方式中,SP0是组合物干重的5-30%。在其它实施方式中,SP0是组合物干重的10-20%。在各种实施方式中,MMO占组合物干重的至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或至少95%。在一些实施方式中,MMO包含BCO,其中BCO占组合物干重的至少20%。在另一优选实施方式中,BCO占组合物干重的至少50%。在另一优选实施方式中,BCO占组合物干重的至少70%。在一些实施方式中,MMO:SP0的质量比为20:1-1:10。在一些实施方式中,该比例为10:1-1:2,并且在另一实施方式中,该比例为5:1-1:1。在一些示例中,该比例为约10:1、约9:1、约8:1、约7:1、约6:1、约5:1、约4:1、约3:1、约2:1、约1:1、约1:2、约1:4、约1:5、约1:6、约1:3、约1:3,10:2、约9:2、约8:2、约7:2、约6:2、约5:2、约4:2或约3:2。

具有功能性H5基因簇的双歧杆菌

[0114] 在各种实施方式中,保藏的双歧杆菌包括以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001,其可以是活化的或未活化的。活化的双歧杆菌(ABI)在本文中定义为细胞的状态,通过基因的上调或下调来测量,这些基因包括但不限于编码寡糖结合蛋白、转运体和负责降解复杂寡糖的酶的那些基因,其可为新生婴儿提供显著的益处。这类益处包括但不限于,相对于处于活化前状态的生物体而言,与肠道粘膜更高的结合亲和力,胃肠道更高的定殖,从而防止了其它细菌进化支的生长,短链脂肪酸更高的产量,复杂寡糖更高的消耗和对免疫应答更大的刺激,通过免疫应答标志物的阳性改变来测量(Lewis,等,2015,

Microbiome,3:13;Huda,等,2014,Pediatrics,134:2e362-e372)。

[0115] 在各种实施方式中,双歧杆菌编码这样的基因簇,其包含涉及HMO利用的ATP结合盒(ABC)转运体和糖基水解酶,通常包括编码岩藻糖苷酶的基因。在一些实施方式中,双歧杆菌包含编码复杂寡糖转运体的基因。在一些实施方式中,双歧杆菌包含编码岩藻糖转运体的基因。在许多实施方式中,编码这些组分的基因被上调或表达。该基因可以被组成型上调或诱导。

[0116] 某些生物标志物可以作为标志物而被诱导和/或抑制,以预测双歧杆菌物种的活化状态,由此最佳地引发细菌进行复杂寡糖消耗。长双歧杆菌婴儿亚种合适的生物标志物包括上调的基因和下调的基因。示例性的上调的基因包括:Blon_0042(调节蛋白);Blon_R0015(tRNA);Blon_R0017(tRNA);Blon_R0021(tRNA)和Blon_R0022(tRNA)。示例性的下调的基因包括:Blon_0518(假想蛋白);Blon_0785(膜脂蛋白(可能的转运体成分));Blon_2167(假想蛋白)和Blon_2168(噬菌体休克蛋白C)。之前,并不知晓这些基因与活化的细胞有关。

[0117] 在另一实施方式中,活化的包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)包括Blon_0042,其中基因Blon_0042已经上调。活化的双歧杆菌可以包含基因Blon_2168,其中基因Blon_2168已经下调。在一个实施方式中,活化的双歧杆菌包含基因Blon_0042和基因Blon_2168,其中基因Blon_0042已经上调而基因Blon_2168已经下调。本领域技术人员可以容易地采用定量蛋白质组学方法来确定这些基因的基因产物(例如,mRNA和蛋白质)的表达水平,以确认活化。

[0118] 可以通过在包含上述复杂寡糖中至少一种寡糖的培养基中培养足够进行至少一种代谢酶的诱导和生物合成的时间来激活包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)。寡糖通常源自那些哺乳动物乳寡糖(MMO)或与那些MMO相同,包括但不限于,来自人乳和牛乳的那些。在一些实施方式中,寡糖可以是牛或人乳寡糖。在另一实施方式中,寡糖获自哺乳动物初乳。在一些实施方式中,寡糖组合物包含牛乳寡糖(BMO)。牛寡糖可包括来自成熟乳、早乳、初乳或其浓缩物的寡糖。在一些实施方式中,寡糖包括岩藻糖作为组分糖残基。在另一实施方式中,MMO补充有合成生产并纯化的寡糖,其包含岩藻糖基化和/或唾液酸化的寡糖。在本发明的一些实施方式中,合成产生的岩藻糖基乳糖(SPF)、唾液乳糖(SPS)或其衍生物用于以比单独通过BMO活化时更人样的方式活化双歧杆菌。在另一实施方式中,该组合物用于上调除了HMO簇以外的操纵子。

[0119] 本文所述的任何组合物可以通过在无异种生物混杂的培养物(例如,具有遗传同质性的培养物)中培养双歧杆菌来制备,并且如果培养物包含牛乳聚糖(例如,浓缩自牛初乳),那么包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)将被“活化”。在各种实施方式中,本文所述的任何组合物可以通过这样制备:分离双歧杆菌;纯化细菌;用纯化的双歧杆菌菌株接种发酵罐;和在主要碳源存在的情况下培养双歧杆菌,和任选地,复杂牛或人寡糖;和收集细胞。制剂可以包括在制剂过程中任何时间在液体培养物中提供水平为约1-50g/L、或2-20g/L、或5-10g/L的至少一种复杂寡糖作为唯一或补充碳源来激活细胞。

[0120] 在另一实施方式中,组合物可以包含每克干重约10万-5,000亿集落形成单位(cfu)的活细菌总数。在另一实施方式中,活细菌的总数为每克干重5000万-50亿或50亿-

1000亿cfu。在另一实施方式中,活细菌的总数为每克干重100亿-500亿cfu。在一些实施方式中,包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的浓度是10-100g干重/L。发酵产物也可以通过过滤或离心浓缩。包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)(包括活化的包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌))可以通过受控的干燥工艺干燥,例如但不限于,冷冻干燥。

配制组合物

[0121] 含有MMO和包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)的组合物可以通过将两种组分混合在一起来制备。任选地,可以将收获的和/或干燥的活化的双歧杆菌细胞与粉末形式的复杂牛或人乳寡糖组合。收获的和/或干燥的活化的双歧杆菌细胞和粉末形式的复杂牛或人乳寡糖可以是单剂量包装,其可以包含约0.1 1百万-约1,000亿cfu/克细菌,和任选地,约0.5g-约5g复杂寡糖。复杂牛寡糖可以存在于粉末组合物中,其中活化的双歧杆菌细胞与复杂寡糖的混合比例为每1.5g粉末复杂寡糖中300亿cfu。

[0122] 本文所述的任何组合物可以进一步包含次级代谢产物。次级代谢产物可以是短链脂肪酸,如乙酸、乳酸或其组合。本文所述的组合物可以进一步包含稳定剂,如流动剂。流动剂可以包括:淀粉,二氧化硅,磷酸三钙,粉末状纤维素,硬脂酸镁,碳酸氢钠,亚铁氰化钠,亚铁氰化钾,亚铁氰化钙,骨磷酸盐,硅酸钠,硅酸钙,三硅酸镁,滑石粉,硅铝酸钠,硅铝酸钾,硅铝酸钙,膨润土,硅酸铝,硬脂酸和聚二甲基硅氧烷。稳定剂可以是乳蛋白或另一种合适的药物级或婴儿配方级稀释剂(例如,乳糖)。乳蛋白可以包含脱脂乳粉的蛋白部分。

[0123] 本文所述的任何组合物可以进一步包含表面碳水化合物结合蛋白(例如,溶质结合蛋白)。通过与肠粘膜和/或粘液层的细胞表面糖基化结合,表面碳水化合物结合蛋白可以允许与肠粘膜更有效的结合和相互作用。然后,表面碳水化合物的这种结合可以排除病原细菌的结合。

[0124] 在各种实施方式中,本文所述的任何组合物可以被干燥(例如,通过喷雾干燥或冷冻干燥),并配制成单位剂量药物,如小包、小袋、口腔崩解片剂、食品、胶囊剂、锭剂、泡腾片等。单位剂量药物可由多种材料制成,包括但不限于,塑料或纸。在一些实施方式中,单位剂量药物包括防潮层和/或防氧层。或者,组合物可以用于肛门递送的形式提供,如栓剂或灌肠的形式。优选地,组合物包装在使用不透湿气和/或透氧聚合物的小袋中。

[0125] 在各种实施方式中,本文所述的任何组合物可以干粉制剂、溶液、悬浮液或以片剂或胶囊形式提供,具有或不具有肠溶包衣。可以将干燥粉末冷冻干燥或喷雾干燥。冷冻干燥的组合物优选在合适的冷冻保护剂存在的情况下冷冻。例如,冷冻保护剂可以葡萄糖,乳糖,棉子糖,蔗糖,海藻糖,阿东糖醇,甘油,甘露醇,甲醇,聚乙二醇,丙二醇,核糖醇,海藻酸盐,牛血清白蛋白,肉毒碱,柠檬酸盐,半胱氨酸,右旋糖酐,二甲基亚砷,谷氨酸钠,甘氨酸甜菜碱,糖原,亚牛磺酸,蛋白胍,聚乙烯吡咯烷酮,牛磺酸或其组合。肠溶包衣包括但不限于,脂肪酸,蜡,虫胶,塑料,植物纤维,丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素琥珀酸酯,羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯,羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯,聚乙酸乙烯邻苯二甲酸酯(PVAP),甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物,乙酸纤维素偏苯三酸酯,藻酸钠,玉米蛋白或其组合。

[0100] 在一些实施方式中,将微生物与冷冻保存剂(例如但不限于海藻糖或甘油)在厌氧条件下混合,并通过例如但不限于快速冷冻(用液氮冷却)或通过冷冻保存系统中控制的温

度降低的方法冷冻。冷冻后,可以使用最能保持微生物细胞完整性的方法在真空下将微生物脱水。干粉中的微生物浓度可以为10亿-5,000亿cfu/g。在一些实施方式中,干粉可以为50亿-1,000亿cfu/g,并且在最优选的实施方式中,干粉可以为100亿-500亿cfu/g。

[0101] 在本发明的一些实施方式中,将粉末状的微生物重悬于食用油中,例如但不限于,甘油三酸酯油(例如,植物油、橄榄油和中链甘油三酸酯),甘油二酸酯油,甘油单酸酯油和硅油。

[0102] 在各种实施方式中,寡糖组合物可以溶解在极性液体中,例如但不限于,水、生理盐水、哺乳动物乳或婴儿配方食品,并以液体形式提供给婴儿,同时双歧杆菌以粉末或载液中的悬浮物的形式单独提供,所述载液可以包括含有聚糖的溶液。

[0103] 在各种实施方式中,微生物和寡糖组合物可以组合提供或分开提供。在一些实施方式中,微生物与寡糖在单剂量包装中组合,所述单剂量包装包含约10-约1,000亿cfu的微生物和约0.5-约5g的寡糖。

组合物用于改善哺乳动物健康的用途

[0104] 在各种实施方式中,将本文所述的组合物递送给有此需要的对象,以预活化和纯化的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001组合物形式,长双歧杆菌婴儿亚种EVC001以ATCC登录号PTA-125180保藏,这与递送化合物至哺乳动物肠道基本上同时,以使肠道环境更有利于上述纯化的双歧杆菌组合物,其中所述化合物可以包含上述的复杂寡糖,合成产生和纯化的寡糖,和/或次级代谢产物作为肠发酵的结果。

[0105] 在各种实施方式中,本文所述的用途包括在给予本文所述组合物之前、期间和/或之后监测对象的肠道微生物组。本领域普通技术人员已知多种监测技术。例如,可以通过本领域众所周知的标准方法定性和/或定量分析对象粪便的常规样品中的微生物(Le Pare等(2014)Food and Nutrition Sciences (5):71-78)。

[0106] 在一些实施方式中,本文所述的组合物以有效在对象的胃肠道中建立高水平的双歧杆菌群的量和持续时间给予由此需要的对象。在一些实施方式中,本文所述的组合物以有效在对象的胃肠道中保持高水平的双歧杆菌群的量和持续时间给予由此需要的对象。在一些实施方式中,每天给予效量的组合物,以将对象肠道中的双歧杆菌群保持在大于哺乳动物总粪便微生物组的至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%,80%或至少90%。

[0107] 在一些实施方式中,给予有此需要的对象包含活化的以ATCC登录号PTA-125180保藏的长双歧杆菌婴儿亚种EVC001。在其它实施方式中,给予有此需要的对象包含补充有合成产生的和纯化的寡糖的复杂寡糖的组合物。在另一实施方式中,给予有此需要的对象包含活化的双歧杆菌和复杂寡糖的组合物。在另一实施方式中,给予有此需要的对象这样的组合物,所述组合物包含双歧杆菌和补充有合成产生的和纯化的寡糖的复杂寡糖。

[0108] 在各种实施方式中,双歧杆菌以每天10亿-1,000亿cfu双歧杆菌和1-20g复杂寡糖的剂量给予。在一些实施方式中,剂量以50-500亿cfu/天给予。在一些实施方式中,剂量以50-1,000亿cfu/天给予。在一些实施方式中,剂量以100-250亿cfu/天给予。在各种实施方式中,复杂寡糖以0.5g-5.0g/天的剂量给予。在各种实施方式中,剂量以1.0g-3.0g/天的剂量给予。

[0109] 包含H5基因簇的婴儿双歧杆菌的选择性生长可以通过同时消耗LNB或任何半乳

糖-N-乙酰基半乳糖胺二聚体(例如, β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc);或更优选任何N-乙酰基半乳糖胺三聚体(例如,Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 3)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-Gal或Gal-(1 \rightarrow 6)-D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)-Gal)或其衍生物来促进。

[0110] 剂量可以在全天以适当间隔给予的多个(例如,2、3、4、5、6或更多)子剂量。或者,它们可以同一组合物给予,或者组成成分可以依次给予。在一些实施方式中,处理持续一段时间,至少1周、2周、3周或至少4周。在一些实施方式中,给予处理一段时间,至少2个月、4个月、8个月、10个月或至少12个月。

[0111] 有此需要的对象可以是,例如,从出生到受孕后约36个月的婴儿。在其它实施方式中,本文所述的组合物可以给予至少处于妊娠的第三个三月期的女性。在妊娠期间给予的组合物可以包括双歧杆菌、寡糖或两者。在其它实施方式中,向经阴道分娩或通过剖宫产分娩出生的婴儿给予治疗量的本文所述的组合物。本文所述的组合物在分娩后立即给予婴儿,然后至少是该婴儿出生的第一个月至六个月。该组合物可以直接给予婴儿或与液体混合,包括但不限于母乳、婴儿配方食品或水。对于未母乳喂养的婴儿,本文所述的组合物还可以在婴儿配方食品中给予,并且这类组合物可以优选包含活化的婴儿双歧杆菌和乳糖性寡糖。对于通过剖宫产分娩出生的婴儿,可以给予包含活化的双歧杆菌和/或复杂寡糖的组合物。对于经阴道分娩出生的婴儿,可以给予包含活化的双歧杆菌和/或复杂寡糖的组合物。

[0112] 需要具有H5簇的生物体的对象可以是出生的前100天的婴儿,0-6个月、6-12个月、1-2年的婴儿,幼童,上至17岁的儿童或成人或老年人(+55)。对象可以是孕妇。孕妇可能在第三个或第四个三月期。对象可能需要预防或治疗疾病或病症或纠正营养不足或过度。所述病症可能包括绞痛、尿布疹、改善睡眠。疾病可能包括结直肠小肠结肠炎,I型或2型糖尿病,肥胖症,炎症性肠病,特应性和过敏性疾病,乳糜泻。对象可能正在从感染中恢复或患有B组链球菌。

[0113] 用途可能涉及使用特定的寡糖作为到达大肠的寡糖的重要来源来建立或保持具有可持续性和持久性的婴儿双歧杆菌EVC001群。持续的定殖可用于预防或治疗任何数量的疾病或病症。

[0114] 出于说明而非限制性的目的,给出了本发明的上述实施方式。虽然已经参照许多具体细节描述了本发明的这些实施方式,但是本领域的普通技术人员将认识到是,在不脱离本发明的精神的情况下,可以其它具体形式来实现本发明。因此,本领域的普通技术人员将理解的是,本发明并不限于前述说明性的细节,而是通过所附权利要求书限定。

[0115] 本说明书中提及的所有出版物(例如,非专利文献)、专利、专利申请公开和专利申请指示了本发明所属领域技术人员的技术水平。所有这类出版物(例如,非专利文献)、专利、专利申请公开和专利申请通过引用纳入本文,如同各出版物(例如,非专利文献)、专利、专利申请公开和专利申请具体地和单独地通过引用纳入本文。

[0116] 本文包含的实施例是以举例说明的方式提供的,不构成任何限制。

实施例

实施例1

用于产生干燥的婴儿双歧杆菌的发酵[0117]制造包含NAG为100%碳源的MRS发酵培养基。这占总培养基组合物的2% (重量/体积)。MRS培养基还包含矿物质、还原剂、氮源,并在添加婴儿双歧杆菌接种物之前经历高压灭菌。发酵在厌氧条件下进行72小时,直到发酵达到稳定期。将细胞与使用的培养基分离并浓缩。将冷冻保护剂与细胞混合以在冷冻干燥之前提供稳定性。一旦干燥,与在葡萄糖/乳糖上生长的干燥的制剂相比,分析该制剂的岩藻糖苷酶活性。活化的婴儿双歧杆菌通过活化的婴儿双歧杆菌表达的岩藻糖苷酶从无色的芳基取代的糖苷释放硝基酚。与之相比,当与在葡萄糖/乳糖上生长的婴儿双歧杆菌的对照细胞孵育时,该试验法未能证明释放的硝基酚(黄色)。使用分光光度计在450nm处测量吸光度,确认比色差异。在活化状态下,吸光度大于0.5nm,在未活化状态下,吸光度小于0.1nm。

实施例2

确定活化婴儿双歧杆菌所需的NAG水平[0118]进行了一系列发酵,其中婴儿双歧杆菌在各种浓度的NAG和葡萄糖上生长。在碳源不存在的情况下制备MRS肉汤。碳源以培养基的2%或20g/L添加。根据表5使用不同碳源。使细胞生长至稳定期并离心。除去上清液并裂解细胞。提取RNA。通过qPCR测试细胞Blon_0881和Blon_2343基因表达相对于Blon_0393的增加。 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 大于1,这确认了5、10、15和20g/L的NAG情况的活化。

表5.NAG/葡萄糖比例

NAG g/L	葡萄糖g/L
20	0
15	5
10	10
5	15
0	20

实施例3

婴儿双歧杆菌生物质的活化和干燥

[0119] 细胞在以乳糖(20g/L)作为碳源的MRS培养基上生长24小时并收获,然后重悬于缓冲培养基中2小时,所述缓冲培养基包含50%葡萄糖和50%唾液酸,占总培养基组合物(total media composition)的1% (重量/体积)。通过qPCR测试细胞Blon_0881和Blon_2343基因表达相对于Blon_0393的增加。

实施例4

制备可以专用某些复杂寡糖的活化的双歧杆菌(ABI)组合物[0120]从经阴道分娩、母乳喂养的人类婴儿的粪便中分离并纯化长双歧杆菌婴儿亚种(或者本文中的婴儿双歧杆菌),并通过反映存在与该生物体特别相关的基因集的DNA分析(Se1a等,2008,PNAS,105(48):第18964-69页)来确认其特征。或者,可从商业培养物保藏中心如华盛顿特区的美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得婴儿双歧杆菌菌株。

[0121] 将该生物体的种子培养物添加到500L搅拌发酵罐中的生长培养基中,所述生长培养基包含葡萄糖和BCO组合物(其使用实施例1中所述方法制备)以及其它标准盐和和维生素。在厌氧条件下生长3天后,测试培养物的样品是否存在活化的双歧杆菌(ABI)。通过岩藻糖苷酶或唾液酸酶的基因转录本的存在来鉴定ABI。通过离心对发酵罐进行收集,并将浓缩的

细胞团块与冷冻保存剂(例如,海藻糖加乳蛋白)混合并冷冻干燥。最终干燥产物为5.5kg细菌团块,计数为 130×10^9 cfu/g。活化的婴儿双歧杆菌通过岩藻糖苷酶从无色的芳基取代的糖苷释放出硝基酚。通过qPCR测试细胞Blon_0881和Blon_2343基因表达相对于Blon_0393的增加。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 大于1,这确认活化。

[0122] 该实施例证明了通过将双歧杆菌与复杂牛乳寡糖培养可以活化双歧杆菌。虽然在此使用了BC0,但是该方法或相似的方法可用于通过采用来自任何哺乳动物乳的MMO进行培养来获得ABI。这类ABI将适用于本发明的实施方式中。

实施例5

用于乳聚糖消耗的复杂寡糖上生长的双歧杆菌是活化的[0123]婴儿双歧杆菌EVC001在含有2%乳糖或牛乳寡糖(BMO)的MRS肉汤中生长。在指数期收集细胞,将RNA纯化并转化为cDNA,并在Illumina平台上测序。结果清楚地显示了BMO上生长期间的差异性表达。

[0124] 图1描绘了全基因组表达分析。该图显示了婴儿双歧杆菌内所有表达基因的主成分分析。该图清楚地显示了BMO上生长的细胞相对乳糖上生长的细胞的差异性表达。577个基因被差异性表达,这表明乳聚糖上的生长诱导了婴儿双歧杆菌中不同于乳糖情况的生理状态。

[0125] 进一步的分析表明,相较于乳糖上的生长,之前在婴儿双歧杆菌中鉴定的40kb乳聚糖消耗基因簇在BMO上的生长过程期间被优先诱导。这些结果清楚地表明,BMO上生长的婴儿双歧杆菌被活化用于消耗乳聚糖,并且上调了涉及新生儿结肠中定殖和宿主相互作用(host interface)的许多其它基因,包括Blon_2334、Blon_2335、Blon_2336、Blon_2337、Blon_2338、Blon_2339、Blon_2344、Blon_2346、Blon_2347和Blon_2331。

实施例6

用于治疗孕妇的治疗组合物[0126]可以使用不同的制备物将所需的组合物递送给孕妇。出于易于使用、感官考虑和其它原因考虑,可以使用多种剂型。

[0127] 通过首先用乳糖稀释实施例4的ABI产物来制备第一制剂,以提供每克250亿cfu的长双歧杆菌婴儿亚种的剂量。然后将该稀释的ABI产物包装在由胃耐性聚合物(诸如果胶)制成的2件式凝胶盖(1克/凝胶盖)中,以提供各胶囊250亿cfu活化的长双歧杆菌婴儿亚种的剂量,以在胃外胃肠道中释放其内含物的递送形式。

[0128] 第二制备物使用麦芽糖糊精代替乳糖,以产生对于乳糖不耐受个体而言不含乳糖的稀释的ABI。然后将该稀释的ABI产物包装在由胃耐性聚合物(诸如果胶)制成的2件式凝胶盖(1克/凝胶盖)中,以提供各胶囊250亿cfu活化的长双歧杆菌婴儿亚种的剂量,以在胃外胃肠道中释放其内含物的递送形式。

[0129] 通过将实施例4的ABI产物与LNT和2FL的混合物混合来制备第三制备物,其中将250亿cfu的长双歧杆菌婴儿亚种(170mg干燥产物)与5g LNT和2FL粉末混合。该制备物提供了250亿cfu的长双歧杆菌婴儿亚种与约2.5g寡糖的比例,并且将该混合物包装于使用不透湿且不透氧聚合物制成的小袋中。

[0130] 第四制备物将5克LNnT粉末的单个小袋包装到棒状包装中。

[0131] 第五制备物散装包装(bulk package)富含寡糖的喷雾干燥的牛初乳。

实施例7

给予孕妇组合物[0132]妇女在整个妊娠期间口服本文所述的组合物,至少在妊娠的第三个三月期。

[0133] 提供孕妇这样的治疗方案,所述治疗方案包括:每天两个第一或第二制备物(如实施例6所述)胶囊,以及治疗的前2周每天两个包装的第四制备物(LNT)。该过程在妇女肠道中建立了长双歧杆菌婴儿亚种群。或者,向妇女提供每天4小包实施例6的第三制备物,以保持其胃肠道中的长双歧杆菌婴儿亚种群。一天中分时服用4小袋,每餐一袋,睡前一袋。小袋中的内容物可以与乳、酸奶或布丁混合,以帮助口服。根据其它实施方案的本发明的组合物可以类似地给予。理想情况下,应在第三个三月期开始给药,持续到孩童出生;预计这将导致产妇粪便中婴儿双歧杆菌水平发生至少 $0.5-11\log$ 的改变。一旦在肠道中建立了婴儿双歧杆菌,可通过制备物4或制备物5维持水平。在诊断B组步骤的情况中,应当开始高剂量治疗方案以将婴儿双歧杆菌和LNT的剂量增加到各自每天4个剂量的剂量,但是也应当持续到第四个三月期至产后至少1个月。该治疗能导致经阴道分娩的婴儿合适地接种来自母亲的婴儿双歧杆菌的高得多的可能性。

实施例8

母乳喂养婴儿的定殖[0134]将80个母婴对(dyad)入组,分别为哺乳支持加婴儿双歧杆菌补充(BiLS)或单独的哺乳支持(LS)。从产后第7天开始,每天在母乳中向BiLS婴儿喂食 $1.8-2.8 \times 10^{10}$ CFU以ATCC登录号PTA-125180保藏的婴儿双歧杆菌EVC001,持续21天。母亲收集粪便样品,填写健康调查表,并从出生到出生后第61天每天记录有关婴儿喂养和胃肠道症状的日志。安全性和耐受性由母亲报告确定。完整的研究设计发表在Smilowitz 2017中,通过引用纳入本文[Smilowitz等BMC Pediatrics (2017) 17:133DOI 10.1186/S12887-017-0886-9]。

研究群体

[0135] 该IMPRINT研究是一项平行、部分随机、对照的2个月的试验。开始研究之前,使用Excel中的随机数生成器生成了三个单独的随机方案。根据分娩方式将参与者分为下述三种随机方案之一:阴道分娩、剖宫产(分娩前羊膜破裂时间 $\leq 6h$)或剖宫产(分娩前羊膜破裂时间 $> 6h$)。对于这15名参与者而言,两个分组之间的胎次和分娩方式没有差异。

[0136] 在入组时满足主要产后研究标准(第3或4天)后,将婴儿随机分为BiLS或LS组。在第7天,对过去24小时内婴儿配方食品的消耗进行筛查。在第3或4、7、15、22、33和61天,研究人员拜访了母亲的家,以进行研究操作。在所有6次访问中,母亲都填写了有关自身及其婴儿的健康,胃肠道症状,出现发烧,疾病以及看病的次数和原因的调查表。母亲在第6天(基线)之前和在第10、14、21、25、29、32、40、50和60天从婴儿的尿布中收集婴儿粪便样品,并将它们存储在厨房冰柜中。研究人员在第33和61天用数字婴儿秤(Tanita)测量婴儿体重。研究的国际委员会认证哺乳顾问(IBCLC)在产前以及在第3或4、7和15天为参与者提供了母乳喂养支持。在产后第22、33和61天,研究人员将样品从参与者的家中用干冰运到UC戴维斯分校,并储存在 -80°C 下。

[0137] 从第7天起一直持续到第27天,随机分为BiLS组的婴儿连续21天每天在其家中接受婴儿双歧杆菌。在第7天的哺乳咨询拜访期间,母亲接受了哺乳顾问的培训,以将各婴儿双歧杆菌与5毫升其母乳混合在塑料药杯中,然后用注射器或手指将其喂给婴儿。每天给予由一个625毫克的小袋组成的婴儿双歧杆菌EVC001(ATCC登录号PTA-125180),递送至少

156mg的活细菌(最低 1.8×10^{10} CFU)加上469mg的乳糖作为赋形剂。每包180亿CFU是产品说明书确定的最低保证CFU数。所有小袋冷冻保存在母亲的厨房冰柜中直到使用,并指示母亲保留所有使用过的和未使用的小袋。在第22天和第33天,通过计数和记录空的婴儿双歧杆菌小袋数量来评估依从性。

统计学[0138]来自每日日志和回顾性问卷的数据被分为三个时间段:基线(1-6天)、干预(7-27天)和干预后(28-61天)。对于回顾性问卷,将第7天的数据归入基线。计算所有三个时间段内连续变量和分类变量的均值和比例。二元分类变量的比例计算为各研究周期中报告天数/总天数,以及各干预组中婴儿数/婴儿总数。计算值乘以100即可生成百分比。

[0139] 对于该第I阶段研究,样品量基于婴儿粪便中婴儿双歧杆菌的差异,其是使用先前对母乳喂养婴儿的研究的均值和标准差计算得出的。Lewis等Microbiome 2015;3(1):13。为了以90%功效(power)和 $\alpha=0.05$ 检测婴儿粪便婴儿大肠杆菌中1.3z-评分的标准化组间差异,假设标准偏差相等且损耗率为20%,各组需要30名婴儿。对符合最终筛选标准的第7天开始研究的母婴对进行意向治疗分析。在IBM SPSS Statistics版本24中进行统计学分析,并在PRISM v.7中生成图表。统计学显著性被认为是 $p<0.05$ 。用柱状图和五分位数-五分位图以视检方式检查连续数据的正态性,并用Shapiro-Wilk检验以数值方式进行,以及使用Levene统计量检查方差是否相等。将非正常数据进行 Log_{10} 转换,并在进行参数分析之前再次确认其正态性。

[0140] 为了确定各组之间总婴儿粪便双歧杆菌的差异,使用GraphPad Prism v7进行Mann-Whitney U检验。使用皮尔逊独立性卡方检验(Pearson Chi-square Test for Independence)(分类变量)、Mann-Whitney U检验或单向ANOVA(连续变量)比较LS组和BiLS组之间的基线人口统计学、孕产妇健康、妊娠史以及婴儿喂养和胃肠道症状。对于正态分布的连续数据,重复测量ANOVA,其中组和时间固定因素,分娩为协变量,时间分组(group by time)为相互作用项。如果时间很重要,那么使用邦费罗尼校正(Bonferroni correction)进行多重比较事后分析,以比较基线、干预和干预后数据。通过逻辑回归分析粪便稠度、肠胃气胀和反流的组差异。

结果

[0141] 两组之间的出生时平均胎龄,出生后1个月和2个月体重和母乳摄入量无差异。从第6天到第28天,BiLS($6.6 \pm 2.8\text{SD}$)婴儿的粪便双歧杆菌中的平均 Log_{10} 变化高于LS婴儿($3.5 \pm 3.5\text{SD}$)($p=0.0002$)。与基线相比,补充期间LS婴儿的每日粪便数量更高($p<0.005$),而BiLS婴儿的粪便数量更低($p<0.05$)。在补充期间,相对于基线,BiLS婴儿中的水样粪便减少,而软粪便增加36%($p<0.05$),同时,对于LS婴儿,粪便稠度没有显著变化。对于各时间点的组,所有安全性和耐受性终点没有差异,包括肠胃气胀,便血,身体温度,胃肠道症状等级,使用抗生素或释气药物,婴儿绞痛,黄疸,疾病数量,就诊或湿疹诊断。

研究参与

[0142] 筛选了108名母亲参加了研究。80名女性符合初始研究标准,其中将15名随机分配,并将65名随机分配到LS($n=39$)和BiLS($n=41$)组。筛选失败是由于在第7天哺乳咨询摆放的24小时内使用婴儿配方食品。母亲由于对新生儿感到不知所措和/或由于哺乳困难而意外终止母乳喂养而退出研究($n=8$)。68个母婴二分体符合最终研究标准。报告了各组

所有参与者的数据 (n=34/组),除了干预后时期的一名参与者,其被纳入LS组并在出生后第26天退出。

婴儿特征

[0143] 各组之间的婴儿出生体重,出生身长,出生时胎龄和性别没有差异。出生时或第33和61天,各组之间的婴儿体重没有差异。

婴儿饮食

[0144] 根据母亲的报告,干预组在各个时间段的亲喂或用母乳瓶的平均母乳喂养次数是相同的。BiLS和LS组之间在天数,混合喂养的婴儿数量(消耗了一些婴儿配方食品)或婴儿配方食品摄入的平均量没有显著差异。BiLS组的1位母亲和LS组的2位母亲报告说,在干预后期间向她的婴儿喂食了非研究型益生菌。干预组之间婴儿的维生素D摄入没有差异(数据未显示)。

婴儿胃肠道健康和耐受性

[0145] BiLS和LS组在基线期期间的婴儿排便次数相同,但是在干预期(BiLS:均值,3.2/d,范围,0.50-7.2;LS:均值,5.5/d,范围,2.6-10.6)期间和干预后(BiLS:均值,1.7/d,范围,0.30-4.8);LS:均值,4.4/d,范围,0.97-9.9)期间显著不同 ($p<0.0005$)。平均排便次数不仅在各组之间不同 ($p<0.01$),而且在各组之间的时间上也不同 ($p<0.0005$)。在所有三个时间段内,胎次 (parity) 与每天的报告平均排便次数无关。母亲分别报告了BiLS与LS组中婴儿在干预期期间的水样和软粪便的比例 (0.20与0.33) 和 (0.79与0.67),这无统计学意义。然而,分配到BiLS组的婴儿的水样粪便的百分比从基线期到干预期降低了36% ($p<0.05$),而分配到LS组的婴儿仅降低了7%。如所预期,分配到BiLS组的婴儿的软粪便的百分比从基线到干预期增加了36% ($p<0.05$),而分配到LS组的婴儿仅增加了7%。从干预组到干预后组的稠度变化没有差异。粪便稠度也不受胎次的影响。

BiLS和LS组之间的婴儿疾病和不良事件没有差异(表7)。

表7. 婴儿耐受性

耐受性评估	BiLS (n = 34)						LS (n = 33)					
	基线		干预		干预后		基线		干预		干预后	
	均值	SD	均值	SD	均值	SD	均值	SD	均值	SD	均值	SD
温度高于100.3F, % (天数) ^a	0.005	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.029	0.000	0.000	0.001	0.005
血便, % (天数) ^a	0.000	0.000	0.003	0.016	0.002	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.031
抗生素使用, % (天数) ^a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.073	0.000	0.000
释气药物, % (天数) ^a	0.015	0.086	0.038	0.088	0.084	0.194	0.005	0.029	0.059	0.167	0.142	0.254
黄疸诊断, % (n) ^b	26.5%	(9)	5.9%	(2)	0%	(0)	26.5%	(9)	8.8%	(3)	2.9%	(1)
绞痛, 父母报告, % (n) ^b	0%	(0)	0%	(0)	5.9%	(2)	5.9%	(2)	8.8%	(3)	8.8%	(3)
湿疹诊断, % (n) ^b	0%	(0)	0%	(0)	5.9%	(2)	0%	(0)	0%	(0)	8.8%	(3)
疾病, % (报告数) ^b	2.9%	(1)	11.8%	(4)	20.6%	(7)	2.9%	(1)	8.8%	(3)	17.6%	(6)
疾病访医, % (报告数) ^b	2.9%	(1)	15%	(5)	15%	(5)	0%	(0)	2.9%	(1)	12%	(4)

^a比例计算为:各研究周期中(报告的天数)/总天数

^b比例计算为:各研究周期期间各干预组中(出现或诊断出病症的婴儿数量)/婴儿总数*100 粪便双歧杆菌

[0146] 为了将安全性终点与婴儿双歧杆菌EVC001的补充以及婴儿肠道中双歧杆菌属的定殖相关联,我们比较了LS和BiLS组从基线到补充期结束的总粪便双歧杆菌的平均差异。从第6天到第28天,BiLS组中婴儿($6.6 \pm 2.8SD$)的总粪便双歧杆菌中的平均 Log_{10} 变化显著大于LS组中婴儿($3.5 \pm 3.5SD$) ($p=0.0002$)。从第6天到第28天,总粪便双歧杆菌的中值 Log_{10} 变化对于LS组中的婴儿为0.0,并且对于BiLS组中的婴儿为7.5 ($p=0.0002$)。

[0147] 我们发现婴儿双歧杆菌EVC001被健康足月的婴儿良好耐受且安全消耗持续21天。参加这项研究的母亲报告的所有不良事件都是该年龄段婴儿的典型事件,并且婴儿双歧杆菌的喂养并未增加发病率。

[0148] BiLS组的婴儿相比LS组的婴儿排泄较少的每日粪便。另外,据报道,相较于LS组的婴儿,BiLS组中的婴儿更常排泄“软”粪便,并且“水样”粪便较少。根据对绞痛的存在,患病就医次数,疾病,基础医疗机构诊断的湿疹以及抗生素或释气药物使用的评估,不良事件在两组中均发生。然而,事件的类型对于该年龄的婴儿而言是正常的,本质上并不严重,并且BiLS组中不良事件发生率并不比LS组高。认为不良事件与婴儿双歧杆菌的研究操作或喂食无关。

实施例10

具有和不具有功能性LNB-ABC转运体途径的婴儿双歧杆菌菌株的体内竞争适应性
婴儿双歧杆菌菌株适应性的评估

[0149] 模式菌株长双歧杆菌婴儿亚种(婴儿双歧杆菌) ATCC 15697菌株的基因组测序揭示了许多专门用于输入和消耗HMO的基因座,包括编码胞外溶质结合蛋白(SBP家族1)的20个同源基因[Sela,等(2008).Proc Natl Acad Sci U S A 105:18964]。婴儿双歧杆菌捕获和消耗HMO的模式在双歧杆菌中是独特的。婴儿双歧杆菌通过特定寡糖结合F1SBP和ABC型转运体选择性地结合和输入HMO分子。内化后,HMO水解成它们的单糖成分,并通过“双歧分流(bifido shunt)”途径代谢,产生乳酸和乙酸盐作为发酵终产物。已经在婴儿双歧杆菌菌株的子集中观察到了基因F1SBP和ABC转运体的完整性丧失,并且在汇集的HMO上生长的能力有限[LoCascio,等(2010).Appl Environ Microbiol 76:7373]。然而,由于缺乏双歧杆菌的基因敲除模型,尚未研究这些菌株水平上差异的功能和生态意义。通过进行整体基因组比较分析,评估了婴儿双歧杆菌菌株之间的基因组多样性。婴儿双歧杆菌菌株之间关于在输入HMO方面涉及的关键基因的存在和分布与体外HMO上的生长表型以及菌株在母乳喂养的婴儿肠道中体内定殖和增殖的能力有关联。

材料和方法

[0150] 本研究中使用的细菌菌株(表8)分离自健康母乳喂养的婴儿的粪便,商业益生菌产品和美国典型培养物保藏中心(ATCC.org)。简言之,将益生菌产品或粪便样品均质化,稀释并在针对双歧杆菌的选择性培养基(BSIM)中培养。将板在 37°C 下厌氧室中孵育48-72小时直到形成明显的菌落,所述厌氧室用 $5\% \text{H}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 和 $90\% \text{N}_2$ 的混合气体(科伊实验室(Coy Laboratory)产品)维持。将所得菌落划线到BSIM琼脂上,并在两次传代后使其在补充有 $0.05\% 1$ -半胱氨酸-HCl的MRS肉汤中生长。通过Sanger测序确定各产品10个随机选择的菌落的种类,所述Sanger测序使用正向引物 $5' - \text{CTKTTGGGYCCCKGRYYG} - 3'$ 和反向引物 $5' - \text{CGCGTCCACTMTCCAGTTCTC} - 3'$ 对位于16S和23S rRNA基因之间的rRNA基因座内物种可变内部转录间隔子区域进行测序。将确认的婴儿双歧杆菌菌株在 -80°C 下保存在 15% 甘油中。在各

试验之前,将所有细菌菌株殖(strike)在MRS板上,并将单菌落在补充有0.05%L-半胱氨酸-HCl的MRS肉汤中亚培养,并在37°C下厌氧室中孵育16小时。

表8. 该研究中包括的双歧杆菌基因组的一般特征

菌株ID	分离来源	大小 (kbp)	覆盖 (x)	GC(%)	CDS	tRNA's	登录号
ATCC 15697	母乳喂养的 婴儿粪便	2832	n/a	59.8	2547	84	
JCM 1222	母乳喂养的 婴儿粪便	2828	n/a	59.8	2544	84	GCA_000269965
EVC001	母乳喂养的 婴儿粪便	2832	147	59.8	2553	84	
PI_001	益生元产品	2598	332	59.3	2226	59	
PI_002	益生元产品	2604	185	59.3	2227	59	
PI_003	益生元产品	2612	88	59.2	2232	59	
PI_004	益生元产品	2604	172	59.3	2226	59	
PI_005	益生元产品	2614	130	59.2	2233	59	
PI_006	益生元产品	2615	171	59.2	2234	59	
PI_007	益生元产品	2604	220	59.3	2228	59	
PI_008	益生元产品	2612	213	59.2	2230	59	
PI_009	益生元产品	2604	162	59.3	2230	59	
PI_010	益生元产品	2609	117	59.2	2231	59	

DNA提取、文库构建和测序

[0151] 生长16小时后,将3mL培养物以12,000x g离心2分钟。按照生产商的说明使用MasterPure革兰氏阳性DNA纯化试剂盒(艾比森得公司(Epicentre))由所得细胞沉淀物中提取高分子量(+30Kb)DNA,并用溶菌酶和无色肽酶(5U/ μ L)进行另外的裂解步骤。使用Quant-iTTMdsDNA高灵敏度试剂盒(英杰公司(Invitrogen))对提取的DNA进行定量,并在1%琼脂糖凝胶中检查完整性。

[0152] 通过配对的末端Illumina读数和Mini ON或PacBio长读数的组合生成基因组序列。使用Nextera XT文库制备试剂盒(亿明达公司(Illumina))制备多重化短读数文库,并使用与加利福尼亚大学戴维斯分校DNA技术核心实验室一起运行的2x300配对末端Illumina MiSeq确定序列。为了生成牛津纳米孔长读数,根据生产商的说明使用快速条码化试剂盒(SQK-RBK004)制备条码化的库。将测序文库加载到流通池(R9.4.1)中。在MinKnow控制软件上选择了6小时的测序方案。在加利福尼亚大学伯克利分校的Vincent J.Coates基因组测序实验室使用Pacific Biosciences RSII测序仪进行PacBio测序。

细菌基因组的杂交组装、注释和比较

[0153] 使用杂交组装方法进行细菌基因组组装,所述杂交足方法将PacBio或Mini ON长读取与Spades v3.11中的Illumina读取组合[Bankevich,等(2012).J Comput Biol 19:455],其中参数针对杂交组装进行了优化[Antipov等(2011).Bioinformatics 32:1009]。使用默认参数,用Prokka v1.12注释了组装的基因组[Seemann(2014).Bioinformatics 30:2068]。使用BLAST环图像生成器(BRIG)v0.95显示并全局比较细菌基因组[Alikhan等

(2011).BMC Genomics 12:402]。使用采用PanPhlan v1.2.3.2的基于泛基因组的种系基因组学 (phylogenomic) 分析对菌株之间的基因组成进行了第二次比较[Scholz等(2016).Nat Methods 13:435-438]。创建全基因组数据库,以追踪跨菌株的基因的存在与否。计算存在/不存在基因谱之间的杰卡德距离 (Jaccard distance),以基于全基因组图谱对菌株进行聚类。

在HMO上生长

[0154] 测试细菌菌株在乳-N-四糖 (LNT)、乳-N-新四糖 (LNnT)、2'岩藻糖基乳糖 (2'FL) 和所有三种的组合 (混合的HMO,mHMO) 作为唯一碳源中的生长能力。简言之,将各分离物的1% (v/v) 标准化的过夜培养物在修饰型MRS (mMRS) 培养基上生长,所述mMRS培养基包含 (每升):2g柠檬酸铵,10g胰蛋白胨,2g磷酸氢二钾,0.2g硫酸镁,0.05g硫酸锰,0.5g L-半胱氨酸HCL和20g HMO。通过使用Epoch2分光光度计 (伯腾公司 (Biotek)) 在37°C下测量光密度 (OD600) 来监测30小时内的生长概况,所述分光光度计置于用5%H₂、5%CO₂和N₂的混合气体 (科伊实验室产品) 保持的厌氧室内。在上述相同条件下使用RPMI 1640培养基 (康宁公司 (Corning)) 确定在汇集的HMO (pHMO) 上的生长。对各菌株进行三个生物学重复。

糖概况 (Glycoprofiling)

[0155] 在代表中滞后期和稳定期晚期的生长的6小时和30小时时,收集含有20g/L HMO的mMRS培养基中的细菌培养物。通过以10,000x g离心2分钟除去细菌细胞。收集上清液,并且对于单一混合物和HMO混合物,分别稀释10000倍或1000倍。通过0.22μm膜过滤稀释液,并根据Lee等(2015).J Dairy Sci:7644中的方法并进行一些改进在连接脉冲安培检测仪的高效阴离子交换色谱仪 (HPAE-PAD ICS-5000,赛默飞世尔科技公司 (Thermo Scientific),加利福尼亚州森尼维耳市) 上分析25μL进样。简言之,在CarboPac PA1分析柱 (4x 250mm, Dionex公司) 和CarboPac PA1保护柱 (4x 50mm,Dionex) 上以下述等度梯度进行色谱分离:0-30分钟25%B,1.5%C流速为1.0mL/分钟。每次洗涤后使柱平衡8分钟。用100%C洗涤。溶剂A是去离子水,溶剂B是100mM NaOH,和溶剂C是在100mM NaOH中的500mM NaOAc。相对于0.00025-0.005mg/mL的校准曲线对HMO进行了定量。设三重分析所有样品。

菌株特异性引物开发

[0156] 开发实时PCR试验以区分并定量EVC001和PI_001菌株的存在。将LNB磷酸化酶基因 (菌株ATCC 15697中的“Blon_2176”) 鉴定为候选区域。使用引物3 (Untergasser等,2012) Untergasser等使用Nucleic Acids Res 40:e115,以设计正向2174_F和反向2147_R引物,以及特异性探针EVC001_探针和PI_001_探针。未检测到非特异性扩增。另外,当与探针偶联时,引物2174_F和2147_R不会对之前未曾喂食过婴儿双歧杆菌的婴儿中产生错误的扩增。使用提取自己确定细胞数量的培养物的基因组DNA的5个1:10系列稀释液物,计算各引物/探针组的引物/探针效率。

菌株竞争测试

在30小时的共培养中,测试了PI_001菌株和EVC001之间的竞争试验。简言之,将各菌株的16小时培养物标准化至1.0的OD₆₀₀,以1:1的比例合并,并在含10g/L的LNT、LNnT、2FL或mHMO的10mL MRS培养基中稀释100倍。来自37°C下厌氧生长6、12和30小时收集的1.0mL样品的细菌细胞提取总基因组DNA。使用KingFisher flex纯化系统 (赛默飞世尔科技公司) 和来自ZymoBIOMICS 96MagBead DNA试剂盒 (Zymo研发公司 (Zymo Research)) 的试剂进行

DNA提取。使用提取自之前定量的婴儿双歧杆菌EVC001和婴儿双歧杆菌PI_001的培养物的基因组DNA,生成各菌株所有绝对定量的标准曲线。定量PCR在QuanStudio3(应用生物系统公司(Applied biosystems))上进行。反应混合物由0.5 μ L的各种引物(各种为10pM)、5 μ L的PerfeCTa多重qPCR ToughMix、11.5 μ L水和5 μ L模板DNA组成。PCR条件包括:95 $^{\circ}$ C下3分钟的1个初始变性循环,然后95 $^{\circ}$ C下15秒和60 $^{\circ}$ C下1分钟的40个循环。以针对接种物中的菌株比例进行标准化的给定时间点的菌株比例计算竞争指数(CI)值。

相对生态适应度量

在3天的周期内确定菌株EVC001和N1在母乳喂养的婴儿肠道的生态条件下的相对适应性。对各个菌株在其相应商业益生菌产品中的CFU进行定量,所述定量通过在BSIM琼脂平板上接种稀释系列物进行,以1:1比例混合菌株。在生命的第五天,给经阴道分娩母乳喂养的男婴喂食与挤出的母乳混合的 8×10^8 的婴儿双歧杆菌(各种菌株为 4×10^8)。DNA提取自粪便样品,所述粪便样品在向婴儿喂食菌株组合物的前一天和后三天收集。如针对菌株竞争性测试所述进行DNA提取和菌株定量。通过Lawley(Lawley等,2017)的方法对全部婴儿双歧杆菌进行定量。

结果

一般基因组特征为了确定婴儿双歧杆菌菌株的基因含量和基因组特征,我们对获自益生菌产品的11种分离物的基因组进行了测序和封闭,并进行了包括公众可获得的基因组在内的全基因组比较。

为了促进一致性比较分析,对所有测序的婴儿双歧杆菌基因组和从公共数据库中检索到的基因组进行了统一的基因预测分析。如表8中概述的那样。预测的编码序列的数量范围从对婴儿双歧杆菌PI_002的2227到婴儿双歧杆菌ATCC 15697菌株的2547。计算的G+C含量百分比的平均值为 $59.38 \pm 0.24\%$ 。平均基因组大小为 2659 ± 97.9 Kbp,其中EVC001具有最大的基因组(2832Kbp),而PI_001具有最小的基因组(2598Kbp)。预测ATCC和JCM 1222和EVC001的基因组编码84个tRNA,同时预测其它菌株编码59个预测为tRNA的基因(表8)。

比较基因组分析

为了研究婴儿双歧杆菌菌株的遗传内含物和基因组多样性,将益生菌分离的菌株的测序基因组与一个公众可及的基因组(JCM 1222)一起进行了分析,并使用模式菌株婴儿双歧杆菌ATCC 15697作为参比基因进行比对。鉴定了两种主要的染色体结构(图2A)。菌株EVC001和JCM 1222的染色体主链与模式菌株相同。相反,该模式菌株与其它菌株的比对被多种移动遗传元件所中断,包括噬菌体相关蛋白,假想蛋白和转座酶,以及参与聚糖运输和代谢的基因。

为了评估菌株之间基因含量变异的程度,我们使用PanPhlan进行了基于全基因组的种族基因组分析。该分析揭示了在所有13个婴儿双歧杆菌基因组中共有3243个基因,并且其中的1639个基因在各个检查的基因组中至少存在一次,从而代表了所分析的基因组集合的全基因组和核心基因组。有趣的是,并非所有预测利用HMO的基因都存在于核心基因组集合中。此外,该分析还揭示了有28个基因存在于分析的基因组中仅一个。菌株EVC001的基因组中存在11个独特基因。预测模式菌株ATCC 15697和菌株JCM 1222各自编码四个独特基因,PI_006编码5个独特基因,PI_010编码3个独特基因,和PI_009编码1个独特基因。除少数例外,分析的基因组集合中大多数预测的菌株特异性基因被标注为假想蛋白。

最后,我们使用基因存在/不存在的二进制矩阵对全基因组中存在的基因进行了分层聚类分析。根据该分析,菌株属于两个不同的簇之一,所述两个不同的簇与之前通过全基因组比对鉴定的两个基因组结构相对应。因此,我们将菌株分为两组。将具有与模式菌株相似染色体结构的菌株分为组I,并将与模式菌株不同的菌株分为组II(图2C)。

HMO利用基因的分析

婴儿双歧杆菌ATCC 15697的基因组编码五个基因簇,其中包含与HMO利用有关的基因。使用TBLASTX,将在所有五个HMO簇中编码的基因的基因序列与模式菌株婴儿双歧杆菌ATCC 15697进行比较。在所有婴儿双歧杆菌菌株中,编码F1SBP、ABC型转运体以及岩藻糖苷酶和唾液酸酶的H1簇是保守的。然而,在菌株亚组中的少数基因中,在氨基酸水平上的差异<91%。具体而言,于F1SBP Blon_2344(组II中的所有菌株),Blon_2347和Blon_2351(组II菌株PI_001、PI_002、PI_003、PI_007、PI_008、PI_009、PI_010),Blon_2350(组II菌株PI_004、005、006)以及ABC转运体渗透酶Blon2343(组II菌株PI_004、PI_005和PI_0066)(图2B)。其余HMO簇,H2,H3,H4和脲酶簇在所有婴儿双歧杆菌菌株中都完全保守(图2B)。最高的差异发生在涉及乳-N-二糖的运输和代谢的H5簇中(图2B)。与之前的报道相一致,我们的分析表明,编码ABC型转运体的基因Blon_2175、Blon_2176到Blon_2177不存在于菌株的子集(图2B)。比对ATCC 15697和PI_001菌株中的这个区域揭示了存在两个基因,他们与位于ABC转运体基因、噬菌体休克蛋白(Blon_2168)和转座子整合酶(Blon_2181)上游和下游的移动遗传元件相关联。整合Blon_2181在ATCC 15797中产生了截短的抗终止子基因(图2D)。PI_001基因组编码这样的基因,其与Blon_2168同源,但是与Blon_2181不同原,并且具有完整的抗终止子基因(图2D)。这表明染色体重排事件发生在移动遗传元件的整合之后,因为这已经在ATCC染色体的其它区域中被检测到。

在HMO上生长

在改良的MRS(mMRS)上评估婴儿双歧杆菌菌株组的浓度,所述mMRS补充有2%(重量/体积)的LNT、LNnT、2'FL或相同比例的所有三种HMO的组合(混合HMO)以代表母乳中最丰富的HMO。在37°C厌氧条件下30小时,通过OD₆₀₀确定细胞密度。组I和组II的菌株之间观察到LNT、LNnT和混合的HMO中婴儿双歧杆菌菌株的生长能力的显著变化(表9)。来自组I的菌株生长到高细胞密度(OD₆₀₀>1.2),而组II中的菌株显示中等程度的生长,OD₆₀₀值为0.5-0.9。当菌株在混合的HMO上生长时,发现相似的差异,其中组I中的菌株比组II中的菌株达到更高的OD₆₀₀值。对于所有菌株,在2'FL中的生长是中等程度的,OD₆₀₀值从未超过(OD₆₀₀=0.9)。将来自组I(EVC001菌株)和组II(PI_001菌株)的选定菌株在来自母乳的汇集的HMO上生长,如图3A所示,保持了生长差异,其中在开始生长16小时时,EVC001达到比PI_001菌株显著更高的密度(双向ANOVA重复测量,P<0.0001)(图3A)。根据菌株的生长概况,将菌株分类为高(HMO+)、中(HMO±)或差(HMO-)HMO表型。

表9.不同HMO上婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)菌株和长双歧杆菌(*B. longum*)菌株的生长

菌株	生长30小时时的OD ₆₀₀ ^a				HMO 表型
	LNT	LNNT	混合的HMO	2'FL	
<i>组I</i>					
EVC001	+	+	+	±	+
ATCC 15697	+	+	+	±	+
<i>组II</i>					
PI_001	±	±	±	±	±
PI_010	±	±	±	±	±
PI_007	±	±	±	±	±
PI_003	±	±	±	±	±
PI_004	±	±	±	±	±
PI_005	±	±	±	±	±
PI_006	±	±	±	±	±
PI_002	±	±	±	±	±
PI_009	±	±	±	±	±
PI_008	±	±	±	±	±

^a生长的水平如下分类:+,高(OD₆₀₀>1.0);±,中(OD₆₀₀=1至0.4);-,差(OD₆₀₀<0.4)。

HMO消耗的糖概况

为了确定HMO消耗,在组I和II的代表性菌株上确定HMO发酵30小时后使用的培养基的糖概况。正如预期,基于生长结果,EVC001(组I)和PI_001(组II)菌株之间LNT和LNnT的消耗显著不同,但是2'FL的消耗却没有显著差异(图3B)。EVC001菌株消耗了48.4±4.7%的LNT HMO,而PI_001菌株仅消耗了15.2±2.9%(斯氏t检验,P=0.0005)。相似地,LNnT的消耗也存在显著差异(斯氏t检验,P=0.0101),其中EVC001菌株消耗49.1±12.4%,而PI_001菌株消耗14.6±4.11%。菌株间2'FL的消耗没有显著差异(斯氏t检验,P=0.3536),EVC001消耗44.7±6.43%,而PI_001菌株为49.7±5.23%(图3B)。在PI_001使用的培养基中检测到痕量NAG(0.34±0.11mg/mL),但在LNT上生长的EVC001使用的培养基中未检测到,这表明PI_001菌株对该底物的无效或部分水解。

竞争指数

将竞争共接种模型用于研究Blon_2174-2177基因对菌株在不同的HMO上生长的能力的贡献。如图3C所示,相较于接种后6小时,接种后12小时时,混合的HMO上的PI_001菌株的竞争指数显著减弱(P=0.0001,单向ANOVA,然后进行邓奈特检验(Dunnett's test))。到30小时时,并且通过CI负值所指示,菌株PI_001在LNT(P=0.0056)、LNnT(P=0.0210)和混合的HMO(P=0.0001)期间显著降低其与EVC001竞争的能力,但是在2'FL(P=0.2026)或乳糖(P=0.51005)上非此情况(图4B)。

为了确定体外观察到的PI_001竞争能力下降是否会影响菌株定殖于婴儿肠道的能力,我们以1:1的比例将EVC001和PI_001喂食给母乳喂养的婴儿,并且确定了PI_001在3天时期内的竞争能力。如图4A所示,到喂食后的第一天,总婴儿双歧杆菌达到109CFU/μg粪便DNA,这与将EVC001喂食给母乳喂养的婴儿后观察到的之前的结果一致(Frese等,2017)。

然后,使用菌株特异性qPCR,我们确定了各菌株的CFU/ μg 粪便DNA,并计算了3天时期内EVC001相较PI_001的CI。如图4B所示,并通过CI负值所指示,在以相同数量喂食两种菌株后的第一天开始,菌株PI_001在母乳喂养婴儿肠道中不能与EVC001竞争。总之,这些结果表明利用LNT和LNnT的能力对于菌株定植于母乳喂养的婴儿肠道中的能力至关重要。

缺少在婴儿双歧杆菌中产生基因敲除的遗传工具已经阻碍了对婴儿双歧杆菌中不同基因的重要性的实验验证,这解释了母乳、婴儿和婴儿双歧杆菌之间的三方共进化关系。组II代表了功能性敲除,其促进对更好地适应婴儿肠道的重要特征的理解。

这种功能性基因组学方法提供了对婴儿双歧杆菌菌株中HMO代谢的机制性理解。分析分离自母乳喂养的婴儿的粪便和市售的益生菌产品的12个婴儿双歧杆菌菌株的种内基因组多样性显示,这些菌株之中的遗传变异主要由假想基因和移动遗传元件组成,但也包括预计涉及摄取HMO的基因。具体而言,在Blon_2175-2177中,ABC运载体系统位于H-5簇中。我们证明存在2个婴儿双歧杆菌株系:组I和II菌株。II组菌株在LNT或LNnT以及汇集的HMO中的生长均受到损害(表8,图4)。当进入母乳喂养的婴儿的肠道定植时,无法获得这些聚糖会带来相关的适应性损失,这支持了这样的观念,即人乳和婴儿双歧杆菌的组合物共同进化出它们的互利。

组I中菌株的基因组编码许多移动遗传元件,这表明它们的基因组已经通过获得新型遗传物质而成形(Sela,等(2008).*Proc Natl Acad Sci USA* 105:18964)(图2A和C)。在Blon_2175-2177的相邻区域中存在各种噬菌体相关序列表明水平转移事件使该区域成形。但是,缺少完整的前噬菌体基因表明该整合最近没有发生。仍然尚不清楚缺少Blon_2175-2177ABC运载体的婴儿双歧杆菌中心如何出现。虽然我们的工作是从分离自益生菌的菌株,已知他们在生产过程中容易发生噬菌体感染和基因组衰变(Douglas和Klaenhammer, 2010),但是其他人已经在分离自婴儿粪便的菌株中也发现了类似的基因型(LoCascio等, 2010)。尽管如此,这些菌株仍可能源于摄入的益生菌产品,因为我们自己在之前的临床研究中试图从对照婴儿(未喂食婴儿双歧杆菌益生菌)中分离婴儿双歧杆菌菌株的努力均未成功。这可能表明,Blon_2175-2177ABC转运体的缺失是益生菌菌株种系的一种人为现象,有可能获自普遍积储(stock)并由各个不同的生产商分发。

该研究中提供的结果提供了该ABC转运系统在HMO消耗和母乳喂养的婴儿的肠道定殖中的作用。我们发现婴儿双歧杆菌的HMO消耗行为与基因组分析推导的代谢能力一致。这种特定的ABC转运系统的缺失对应于LNT、LNnT和汇集的HMO上受损的生长。LNT、LNnT和小(DP<7)1型和2型聚糖是母乳中丰度最高的HMO,占汇集的HMO的70%(LoCascio等,2007)。我们的研究结果清楚地显示了Blon_2175-2177ABC转运系统在介导LNT和LNnT的新陈代谢中的作用。由这些基因的体内表征获得的信息有助于我们理解ABC转运体基因在婴儿双歧杆菌定植于母乳喂养的婴儿肠道中的作用。

根据此处显示的结果,益生菌在婴儿肠道内成功定殖很可能具有菌株特异性。因此,在选择菌株用于益生菌应用时,必须仔细考虑在母乳喂养的婴儿的生态条件下具有竞争力的基因型和表型特征。

[0157] 在该研究中,相比不包含功能性H5基因簇的婴儿双歧杆菌,包含功能性H5基因簇的长双歧杆菌婴儿亚种(包括保藏的双歧杆菌)显示出竞争优势。

关于微生物保藏の説明

申请人或代理人档案号	国际申请号
------------	-------

关于微生物保藏の説明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

微生物保藏の説明	
A.对说明书第 <u>1</u> 页, 第 <u>6</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明	
B. 保藏事项	更多的保藏在附加页説明 <input type="checkbox"/>
保藏单位名称ATCC-美国典型培养物保藏中心	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 美国	
保藏日期 2018-08-08	保藏号 ATCC PTA-125180
C.补充説明(必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
[0001]	
D.本説明是为下列指定国作的(如果説明不是为所有指定国而作的)	
E.补充説明(必要时)	
下列説明将随后向国际局提供(写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”)	

由受理局填写
<input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

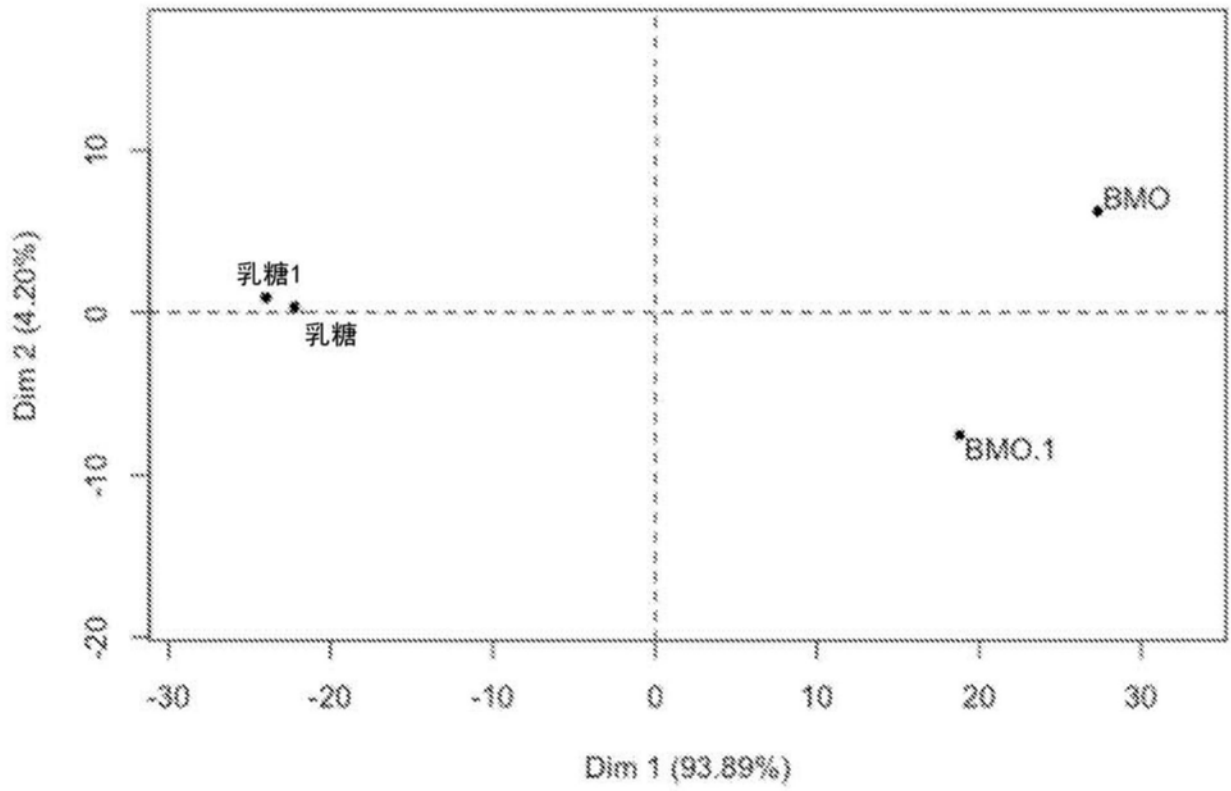


图1

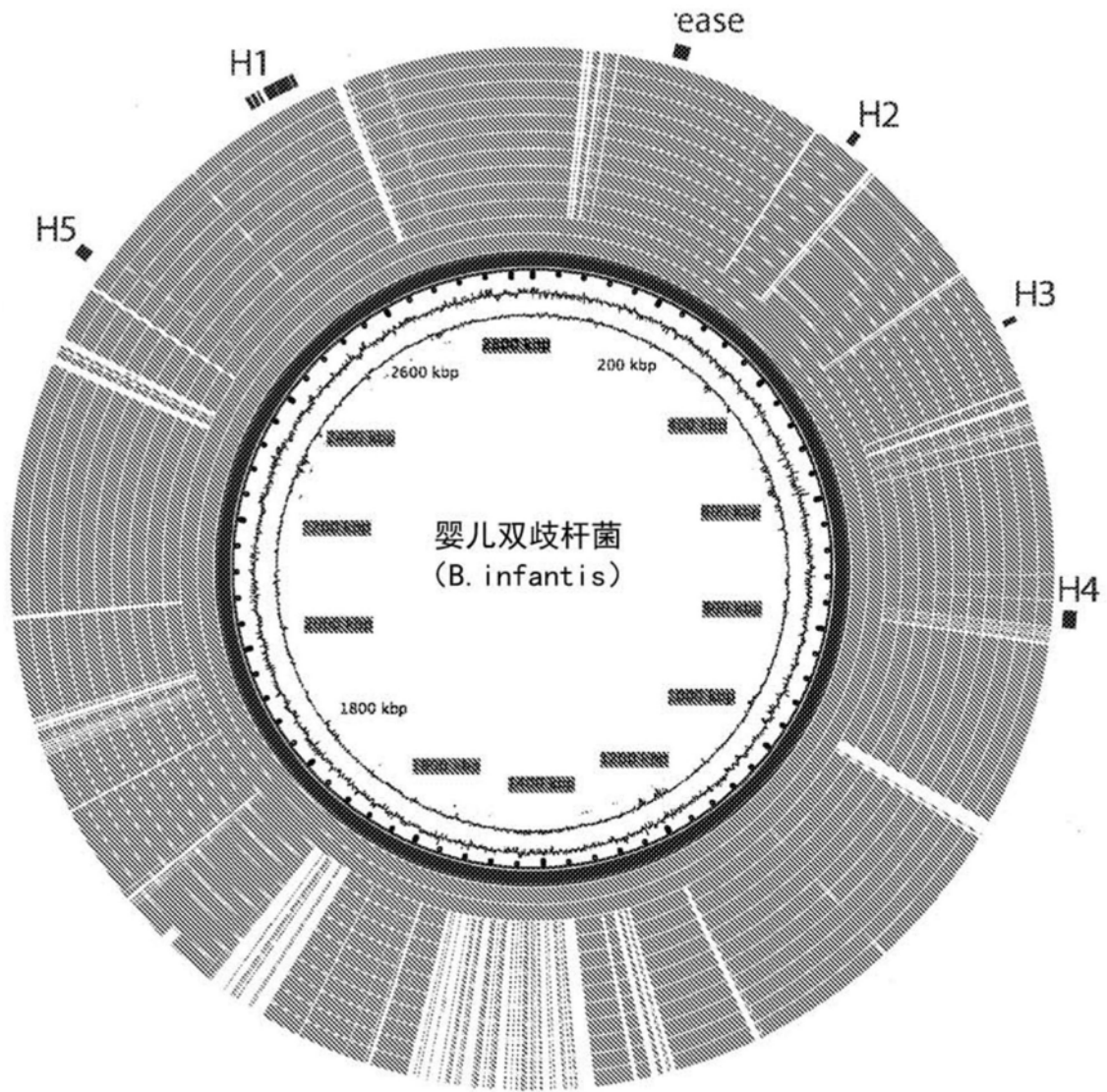


图2A

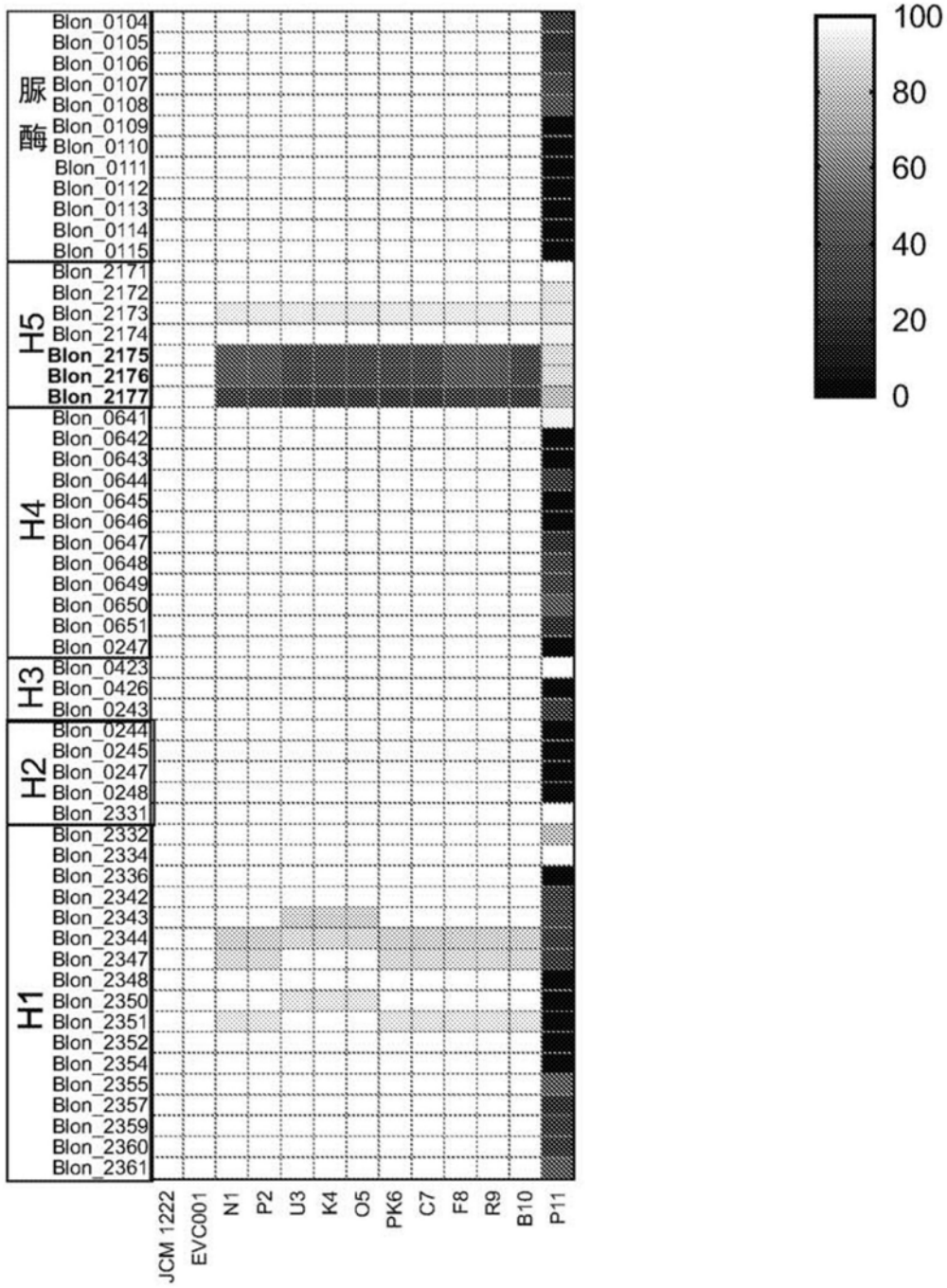


图2B

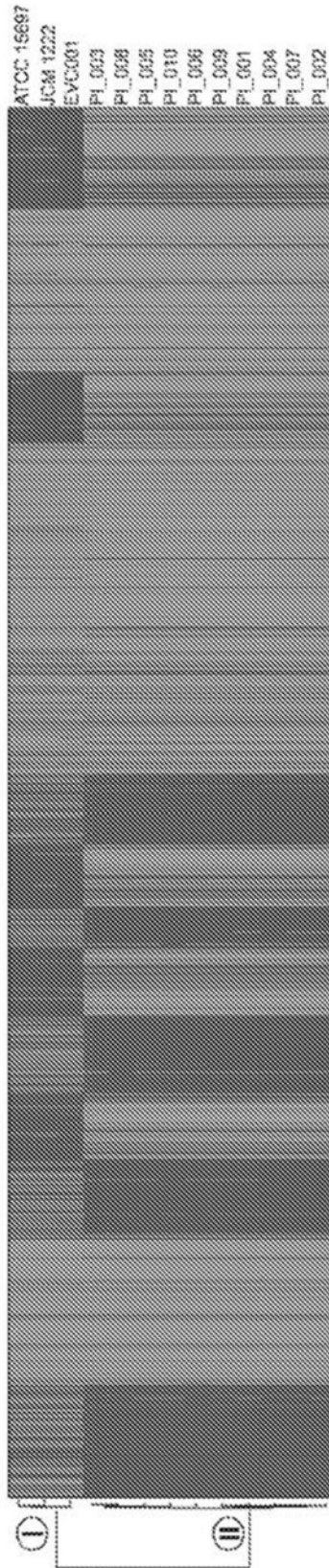


图2C

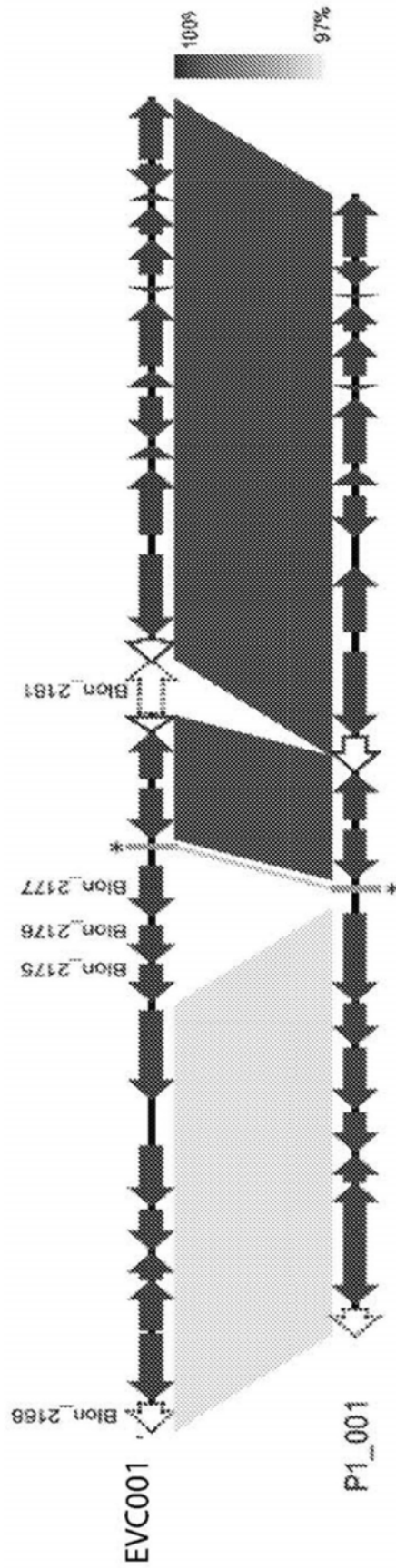


图2D

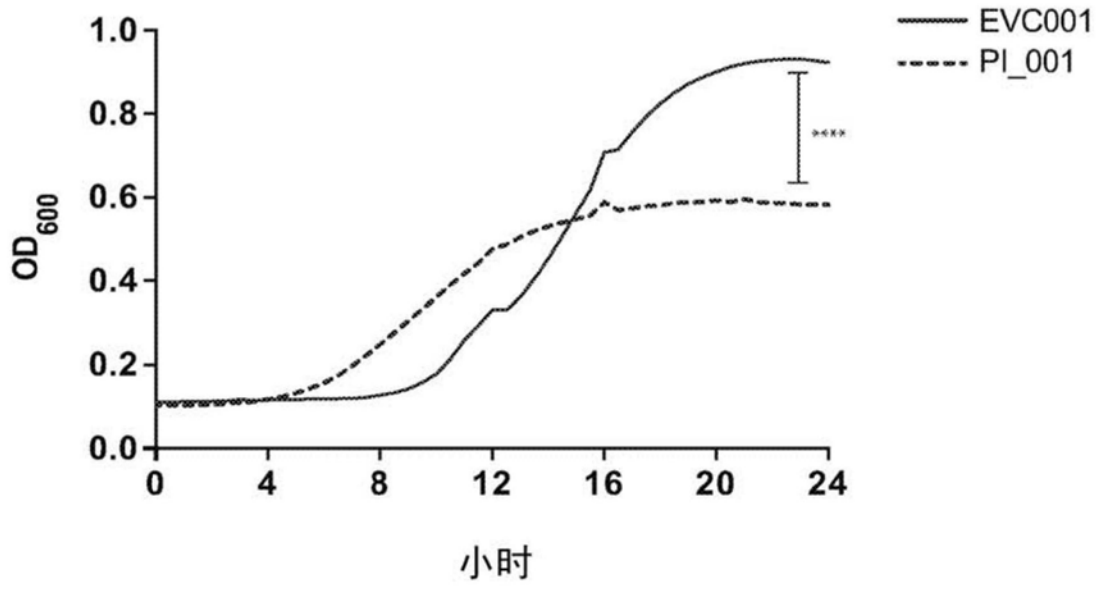


图3A

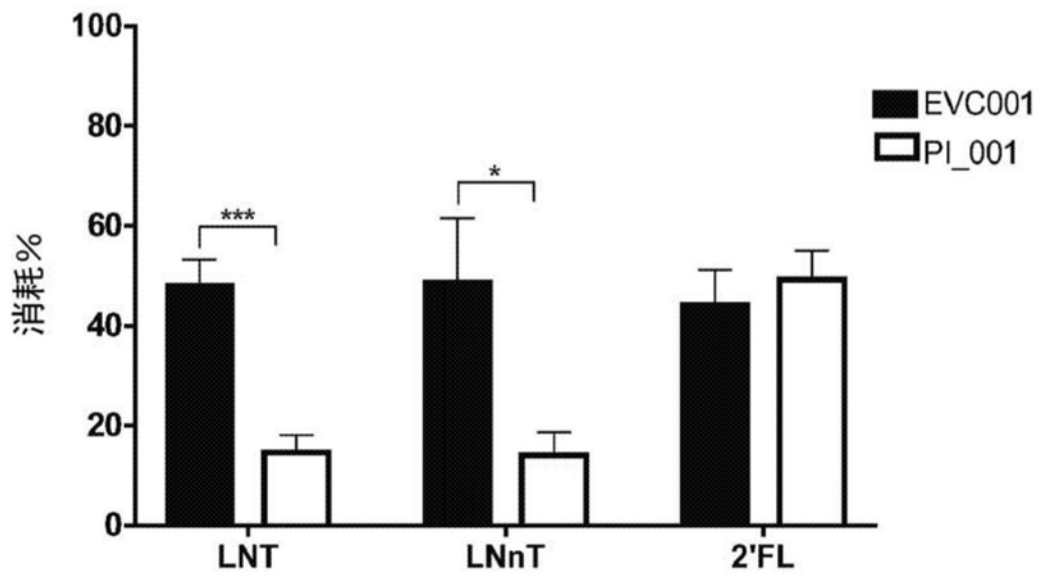


图3B

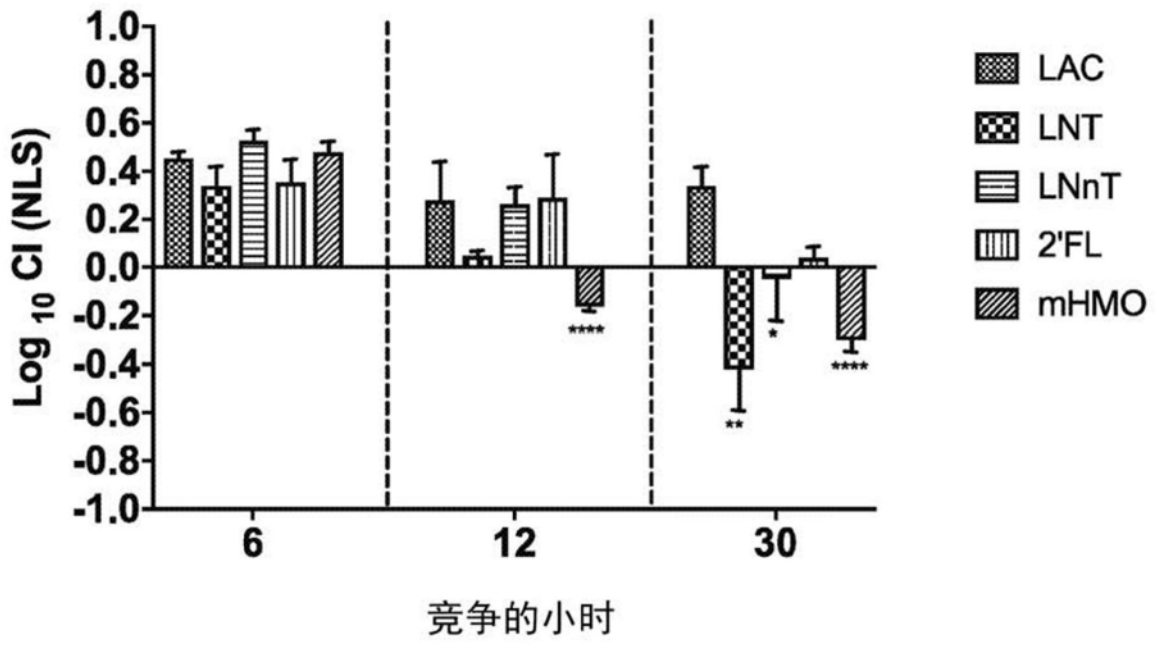


图3C

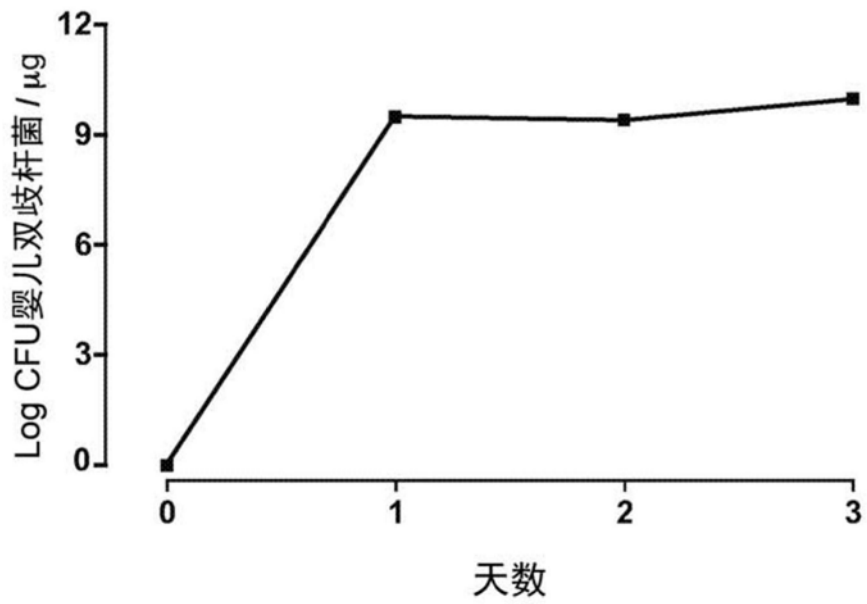


图4A

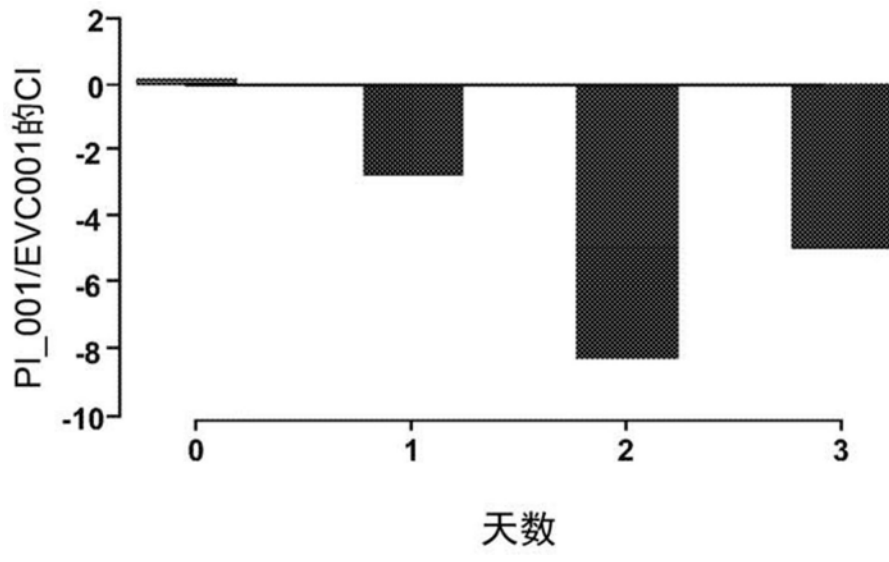


图4B