



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101511377 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 03

(21) 申请号 200780031253. 3

A61P 9/10(2006. 01)

(22) 申请日 2007. 08. 14

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

224672/2006 2006. 08. 21 JP

JP 特开 2006-151952 A, 2006. 06. 15, 全文.

JP 特开 2006-111573 A, 2006. 04. 27, 全文.

US 4919936 A, 1990. 04. 24, 说明书第 3 栏第

17、18 行、第 28-41 行、第 4 栏第 56-60 行、表 4.

JP 特表 2002-509891 A, 2002. 04. 02, 全文.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2009. 02. 23

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/JP2007/065848 2007. 08. 14

审查员 李濯冰

(87) PCT 申请的公布数据

W02008/023608 JA 2008. 02. 28

(73) 专利权人 卡尔皮斯株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 铃木宏美 藤原茂

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 徐雁漪

(51) Int. Cl.

A61K 35/74(2006. 01)

A61P 3/06(2006. 01)

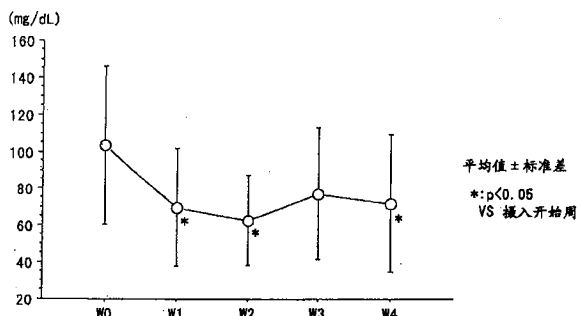
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

降低血清甘油三酯剂

(57) 摘要

为了提供没有副作用、可以持续摄入且具有降低血清甘油三酯的活性的药物和食品。一种改善脂质代谢的药物和一种降低血清甘油三酯的药物,每个含有作为活性成分的属于杆菌属的细菌的培养物。细菌优选枯草杆菌,更优选枯草杆菌 C-3102(FERMBP-1096)。改善脂质代谢的药物和降低血清甘油三酯的药物可用于治疗和预防例如动脉硬化的疾病。



1. 作为活性成分的枯草杆菌 C-3102 (FERM BP-1096) 的培养物在制备降低血清甘油三酯剂中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中, 所述培养物是枯草杆菌 C-3102 (FERM BP-1096) 用大豆油粕粉、煮熟的大豆、煮熟的赤豆、煮熟的大米、与大麦一起煮熟的大米、麦麸或煮熟的玉米培养获得的, 所述大豆油粕粉、煮熟的大豆、煮熟的赤豆、煮熟的大米、与大麦一起煮熟的大米、麦麸或煮熟的玉米是适于用作食物的天然来源的物质。

## 降低血清甘油三酯剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种脂质代谢改善剂,其包含作为活性成分的杆菌属 (genus *Bacillus*) 细菌的细胞或培养物、尤其是枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) C-3102 细菌的细胞或培养物,且具有降低血清甘油三酯的作用。

### 背景技术

[0002] 升高的血清甘油三酯水平是例如高脂血症、动脉硬化、缺血性心脏病 (心绞痛和心肌梗塞) 和糖尿病的疾病开始的主要因素,且一般是生活方式疾病的指示。而且,已知中性脂肪水平的餐后升高和维持在较高水平是影响心血管疾病的最大的因素。

[0003] 限制脂质摄取的药物治疗和饮食治疗一般是治疗高脂血症所选择的。例如 HMG-CoA 还原酶抑制剂的药物和胆汁酸吸附剂 (阴离子交换树脂) 用于药物治疗,其中,所述 HMG-CoA 还原酶抑制剂的药物通过抑制甲羟戊酸从 3- 羟基 -3- 甲基戊二酰基辅因子 A (HMG-CoA) 通过胆固醇合成路径的生物合成来抑制胆固醇的生物合成。

[0004] 但是,HMG-CoA 还原酶抑制剂具有副作用,例如,过敏反应、肝功能异常和横纹肌溶解。另外,当使用例如考来烯胺 (cholestyramine) 的阴离子交换树脂时,阴离子交换树脂吸附胆汁酸,胆汁酸在消化道内含有许多胆固醇,从而阻塞肠肝循环,并导致从身体排泄胆固醇。但是,阴离子交换树脂难于大剂量吞咽。而且,它们可能导致便秘和消化道症状。至于饮食治疗,该方法由于饮食限制而伴随精神苦闷,使其难于持续超过延长期限。

[0005] 因此,需要具有降低血清甘油三酯活性的药物和食物产品,而没有副作用且易于长时间摄取。

[0006] 发明公开

[0007] 本发明的目标是提供一种用于治疗 and 预防例如动脉硬化的疾病的脂质代谢改善剂。

[0008] 本发明提供了一种脂质代谢改善剂,包含作为活性成分的杆菌属 (genus *Bacillus*) 细菌的细胞或培养物。本发明也提供了一种降低血清甘油三酯剂,包含作为活性成分的杆菌属细菌的细胞或培养物。属于杆菌属细菌优选枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*), 更优选枯草杆菌 C-3102 (FERM BP-1096)。

[0009] 附图简述

[0010] 图 1 显示来自枯草杆菌 C-3102 的基因组 DNA 的限制性内切酶 NotI 或 SfiI 的消化图谱。

[0011] 图 2 显示摄取本发明的脂质代谢改善剂的受试者的血清甘油三酯浓度随时间的改变。

[0012] 优选的实施方式

[0013] 杆菌属细菌 (例如,枯草杆菌),已经长期与人的饮食习惯密切相关。尽管已存在关于该生物体的功能性的丰富的信息,以前没有报道它具有降低血清甘油三酯的作用或脂质代谢改善效应。

[0014] 本发明的脂质代谢改善剂和降低血清甘油三酯剂的特征在于,含有作为活性成分的杆菌属细菌的细胞或培养物,优选枯草杆菌的细胞或培养物。枯草杆菌的细菌学特征如 Bergey's Manual of Bacteriology, 11 卷 (1986) 描述,且包括以下:

- [0015] (1) 革兰氏阳性
- [0016] (2) 形成卵形孢子
- [0017] (3) 杆状的
- [0018] (4) 能动的
- [0019] (5) 需氧的
- [0020] (6) 过氧化氢酶:阳性
- [0021] (7) 在 50°C 的生长:+
- [0022] (8) 在 pH 5.7 的生长:+
- [0023] (9) 利用枸橼酸盐:+
- [0024] (10) 从阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、甘露醇的糖的产酸作用:+
- [0025] (11) VP 反应:+
- [0026] (12) 淀粉水解作用:+
- [0027] (13) 硝酸还原作用:+
- [0028] (14) 吲哚的产生:-
- [0029] (15) 明胶水解:+
- [0030] (16) 酪蛋白的水解作用:+
- [0031] (17) 在液体培养基中成膜:+
- [0032] (18) 牛奶的乳凝:-
- [0033] (19) 牛奶酪化:+

[0034] 用于本发明的脂质代谢改善剂和降低血清甘油三酯剂的枯草杆菌可能包括,例如,枯草杆菌 C-3102 (1985 年 12 月 25 日保存于日本国家生物科学和人类技术研究所 (Japan's National Institute of Bioscience and Human Technology), 入藏登记号为 ERM BP-1096)。枯草杆菌 C-3102 的大豆培养物对于家畜具有许多理想的效应,例如,改进肠内菌丛、身体生长,防止感染,增加蛋壳硬度,提高肉质并改善粪臭,并可用作饲料添加剂 (日本专利公开号 H4-24022)。该菌株对于人类健康的有益效应包括调节肠道功能,和减少肠道腐败产物 (Chonai Saikin Gakkaishi (Journal of Intestinal Microbiology) Vol. 18, No. 2, 93-99 (2004))。

[0035] 用枯草杆菌 C-3102, 使用下面的 SEQ ID NOs :1 和 2 的 PCR 引物,通过 PCR 扩增一个大约 700bps 片段。在其它枯草杆菌菌株中,用这些 PCR 引物没有观察到扩增。用枯草杆菌 C-3102 作为模板,扩增大约 700bps 片段,与淀粉酶序列没有同源性。这清楚地区别了 C-3102 菌株和其它枯草杆菌菌株。

[0036] 序列 1 :5' -GCCCCGCACATACGAAAAGACTGGCTGAAA-3' (SEQ IDNO :1)

[0037] 序列 2 :5' -GGATCCCACGTTGTGATTAAGCAGCGAT-3' (SEQ IDNO :2)

[0038] 枯草杆菌 C-3102 也具有以下特征:

- [0039] (1) 缺乏质粒 DNA。
- [0040] (2) 从用限制性内切酶 NotI 或 SfiI 消化的基因组 DNA 获得的消化图谱,和通过琼

脂糖电泳分离如图 1 所示。

[0041] (3) 产生对于 *B. cerous* 的抗菌物质。

[0042] (4) 缺乏对于氨苄西林、氯霉素、环丙沙星、红霉素、庆大霉素、卡那霉素、利奈唑胺、奎奴普丁 / 达福普汀、利福平、链霉素、四环素、甲氧苄啶和万古霉素（每种情况下，最小抑制浓度为 0.03-4  $\mu$ g/mL）的耐药性。

[0043] 枯草杆菌可以使用通常用来生长微生物的液体或固体培养基来培养，其含有，例如，碳源、氮源和无机物。碳源可以是枯草杆菌能够利用的任一碳源，例如，葡萄糖、果糖、蔗糖、淀粉或糖蜜。可以使用的氮源的例子包括蛋白胨、酪蛋白水解物、肉浸膏和硫酸铵。另外，如果需要，可以加入磷酸及其盐，例如，钾盐、镁盐、钙盐、钠盐、铁盐和锰盐，还有维生素类、氨基酸类和表面活性剂。除了这样的人工培养基，也可以使用源自天然产物的物质来培养枯草杆菌，例如，大豆油粕粉。培养优选在需氧条件下进行。培养装置的优选的例子包括对于具有发酵罐的充气转器液体培养的装置、托盘型固体培养装置和自动制造日本酒曲的培养装置。培养温度优选 20-50°C，更优选 30-45°C；培养期为 12 小时 -7 天；初始 pH 优选 5-9，更优选 6-8。

[0044] 因此获得的培养物包含枯草杆菌细胞、培养基和发酵产物。可以无需处理直接使用培养物作为脂质代谢改善剂或降低血清甘油三酯剂。或者，可以浓缩并使用培养物。可以向培养物或浓缩的培养物中加入赋形剂和其它成分，作为制备干燥粉末、粒剂或片剂来使用。从培养物分离的细胞、不含细胞的培养物或含有细胞的培养物，可以用于本发明。在一种特别优选的实施方式中，使用适于用作食物的天然来源的物质来培养枯草杆菌，例如，大豆油粕粉、煮熟的大豆、煮熟的赤豆、煮熟的大米、与大麦一起煮熟的大米、麦麸、煮熟的玉米和其它谷物，且将枯草杆菌直接混入食品中无需从培养物中分离细胞。

[0045] 本发明的脂质代谢改善剂和降低血清甘油三酯剂，可以采取以下形式，例如，液体、粉末、粒剂或片剂，或可以作为食物添加剂混合到饮料和食品中并被摄入。饮料和食品的示例性的例子包括饮料、蜜饯和糖果、膏剂、面包、加工的鱼和肉制品，及乳制品。本发明的脂质代谢改善剂和降低血清甘油三酯剂，可以添加到这些各种食物原料中，并作为具有促进健康益处的健康饮料、健康食物或营养制品 (nutraceuticals) 来供给。

[0046] 如上所述，本发明提供了具有降低血清甘油三酯活性的脂质代谢改善剂，其包含作为活性成分的枯草杆菌的细胞或其培养物。本发明的作为活性成分的枯草杆菌，以非常小的量和在短时间内是有效的。它具有非常好的保存性和耐酸性，易于到达大肠内且易于在大肠内生长，且预期具有持续的降低血清甘油三酯效应。

[0047] 本文在本说明书中引入所有专利和参考文献的完整内容，作为参考。另外，作为本发明的优先权基础的日本专利申请 2006-224672 的说明书和附图的完整内容由于提及而引入本文。

[0048] 下面通过工作实施例更详细地描述了本发明，尽管没有通过实施例限制本发明的范围。

[0049] 实施例 1

[0050] 在下面的工作实施例中，枯草杆菌 C-3102(1985 年 12 月 25 日保存于日本国家生物科学和人类技术研究所，入藏登记号为 ERMBP-1096) 作为杆菌属的细菌的例子使用。

[0051] 向 5 千克粒状的商购的大豆油粕粉加入 5 千克自来水，并将此混合物在 121°C 灭菌

120 分钟,然后用已经预培养过的枯草杆菌菌株 C-3102 的培养肉汤接种。产生的混合物在 37°C 培养 40 小时,以产生枯草杆菌 C-3102 的大豆培养物。将产生的培养物干磨,与如下表所示的其它成分混合,并制备 500mg 片剂(每个含有  $3 \times 10^9$  枯草杆菌孢子)。表 1-1 显示片剂中含有的营养物,表 1-2 显示片剂的组成。

[0052] 表 1

[0053] 片剂的营养物分析(每 100g)

[0054]

| 营养物   |            | 值    |
|-------|------------|------|
| 蛋白质   | g/100 g    | 4.1  |
| 脂质    | g/100 g    | 1.4  |
| 灰分    | g/100 g    | 18   |
| 碳水化合物 | g/100 g    | 74.6 |
| 能量    | Kcal/100 g | 327  |
| 钠     | Mg/100 g   | 20.2 |

[0055] 片剂的组成

[0056]

| 成分                 | 含量(%)  |
|--------------------|--------|
| 糖粉                 | 64.10% |
| 蛋壳钙                | 22.00% |
| 葡萄糖                | 6.00%  |
| 枯草杆菌 C-3102 的大豆培养物 | 5.60%  |
| 蔗糖酯                | 1.00%  |
| 紫胶                 | 0.60%  |
| 阿拉伯胶粉末             | 0.35%  |
| 巴西棕榈蜡              | 0.35%  |

[0057] 实施例 2

[0058] 血清甘油三酯升高抑制试验(人类摄入测试)

[0059] 步骤:

[0060] 选择 10 名年龄为 25-40 岁的健康男性和女性(5 名女性和 5 名男性)作为受试者。选择标准如表 2 所示。服用或摄取用于特定健康用途的特定药物或食物的个体除外。

[0061] 表 2

[0062] 选择满足以下标准且没有符合排除标准的 10 个个体(5 名女性和 5 名男性)作为受试者。

[0063]

| 选择标准(选择受试者的标准)                                |
|---|
| (1) 年龄为 25-40 岁的个体。                           |
| (2) 没有服用任何药物且没有明显疾病的个体(TG、T-cho、BS、血压、便秘、等等)。 |
| a) 中性脂肪 < 250mg/dL。                           |
| b) 总胆固醇 < 240mg/dL。                           |

|  |
|--|
| c) 空腹血糖 < 126mg/dL。                                      |
| d) GOT < 50IU/L ;GPT < 50IU/L ; $\gamma$ -GTP < 100IU/L。 |
| e) 收缩压 < 140mmHg ;舒张压 < 90mmHg。                          |
| (3) 具有相对稳定的饮食和运动水平的个体。                                   |
| (4) 接受医学设备的常规检查的个体。                                      |
| (5) 没有显示对于摄入所研究的食物（豆豉培养物）的过敏反应的个体。                       |
| (6) 能够限制其酒精饮料摄入的个体（每天不超过相当于 500 mL 啤酒的量）。                |
| (7) 在测试过程中能够保持恒定的日常生活方式的个体。                              |
| (8) 在整个测试期间中能够记日记（以记录对于所研究的药物的摄入、运动、饮食和体重）的个体。           |
| (9) 在开始测试前,已经同意参与测试且已经签署知情同意书 并登记日期的个体。                  |

[0064] 只要有可能,受试者每日早饭后口服摄入一个 500mg 片剂（一个枯草杆菌 C-3102 的大豆培养物片剂含有  $3 \times 10^9$  枯草杆菌孢子）,进行 4 周的时期。在开始摄入前和开始摄入的 1 周后、2 周后、3 周后和 4 周后收集禁食血样（在前一晚 9 点后没有进食或饮水 ;在早晨固定时间点 取血）,并测量每个样品的血清甘油三酯水平。测试时间表如表 3 所示。

[0065] 表 3 测试时间表（测试项目 / 时期）

[0066]

| 测试项目/时期 (周)  | 摄入时期 (4 周)          |                     |                     |                     |                     |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|  | 开始                  | 1 周                 | 2 周                 | 3 周                 | 4 周                 |
|  | 在 9 月<br>22 日<br>左右 | 在 9 月<br>29 日<br>左右 | 在 10<br>月 6 日<br>左右 | 在 10<br>月 13<br>日左右 | 在 10<br>月 20<br>日左右 |
| 体重指数 + 心血管检查<br>身高 (初始检查)、体重、身体脂肪百分比 (BI 方法)、血压、脉搏、体温  | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| 血液生物化学 (1)<br>TG、T-cho、AG 比例、总胆红素、空腹血糖、GOT、GPT、AL-P、 $\gamma$ -GTP、淀粉酶、LDL-cho、HDL-cho、LDH、总蛋白质、白蛋白、UA、BUN、肌酐、ZTT、Na、Cl、K、Ca、离子钙、P、Mg、Fe | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| 血液生物化学 (2)<br>PT (凝血酶原)、肝促凝血酶原激酶 (hepaplantin)、HbA1c、TT (凝血试验)、纤维蛋白原 (fibrinogen)、APTT (促凝血酶原激酶时间)、维生素 K 部分                              | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| 常规血液检验<br>WBC、RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、血小板   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| 常规尿检验<br>糖、蛋白质、尿胆素原 (urobilinogen)、沉淀 (当蛋白质阳性时, 进行)  | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| 医生对患者会诊: 检查主观症状和不利事件, 核对日记和提供的指导   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |

[0067] 0:已经检查的

[0068] 以上测试的结果如图 2 所示。在开始摄入时, 血清甘油三酯水平为  $103.6 \pm 42.82 \text{mg/dL}$ ; 在摄入 1 周后, 血清甘油三酯水平为  $69.8 \pm 32.00 \text{mg/dL}$ ; 在摄入 2 周后, 血清甘油三酯水平为  $63.0 \pm 24.58 \text{mg/dL}$ ; 在摄入 3 周后, 血清甘油三酯水平为  $77.0 \pm 35.63 \text{mg/dL}$ ; 和在摄入 4 周后, 血清甘油三酯水平为  $71.8 \pm 37.26 \text{mg/dL}$ 。根据摄入时期的重复测量的变异的单向 (one-way) 分析显示显著性差异 ( $p < 0.01$ )。作为多重比较的结果 (Tukey-Kramer 测试), 在开始摄入时和摄入 1 周后之间观察到显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 在开始摄入时和摄入 2 周后之间观察到显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 在开始摄入时和摄入 4 周后之间观察到显著性差异 ( $p < 0.05$ )。根据以上结果, 可以明显看出枯草杆菌

C-3102 的大豆培养物具有降低血清甘油三酯的效应。

[0069] 工业实用性

[0070] 本发明的脂质代谢改善剂能够降低人类血清甘油三酯浓度,因而可作为预防和改善动脉硬化的药物使用。

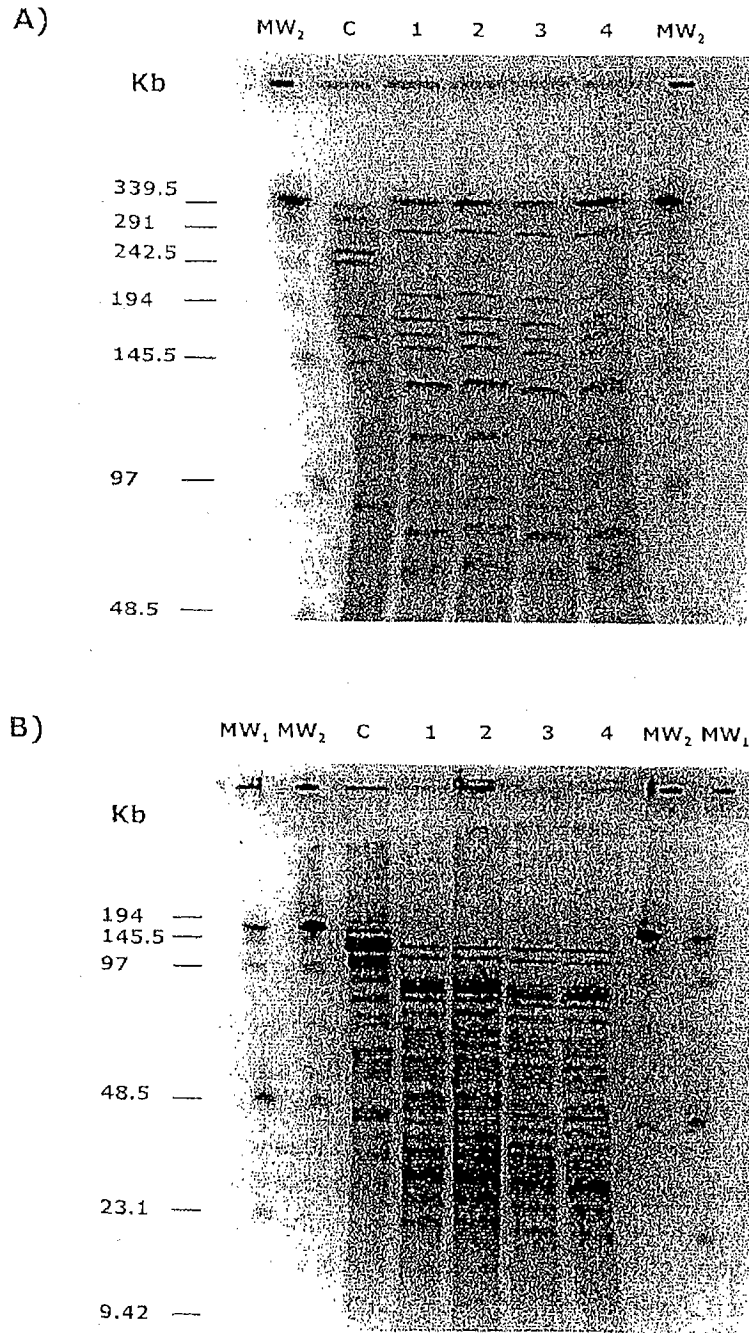


图 1

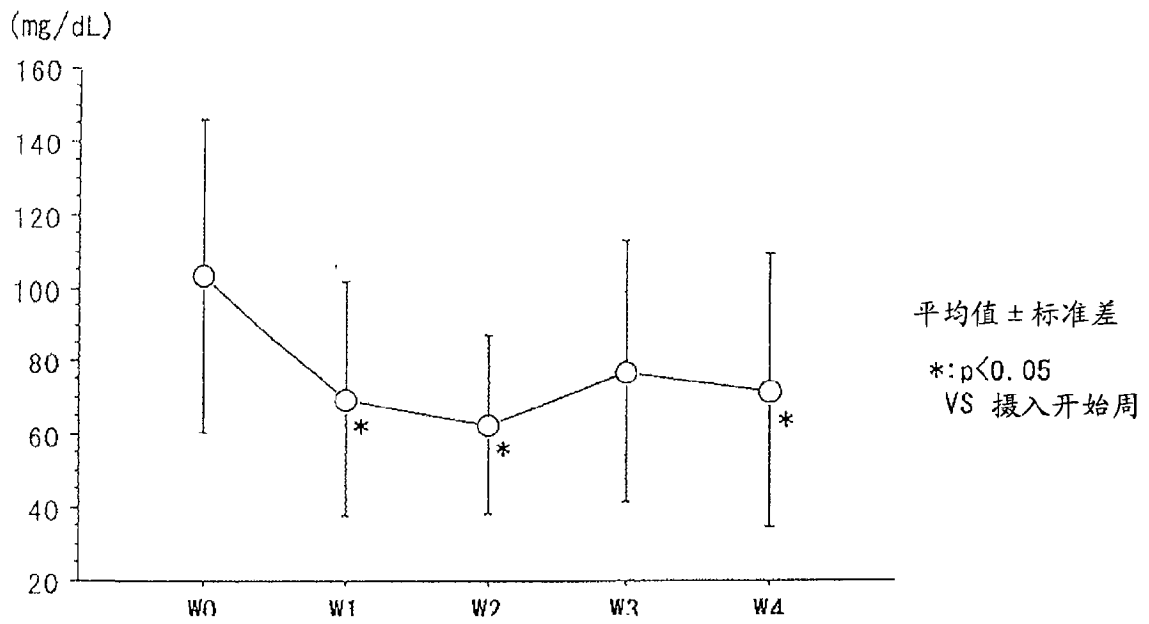


图 2