



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111683665 A

(43)申请公布日 2020.09.18

(21)申请号 201880088085.X

(22)申请日 2018.11.30

(30)优先权数据

PA201700680 2017.11.30 DK

PA201700690 2017.12.05 DK

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/059501 2018.11.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/106620 EN 2019.06.06

(71)申请人 格礼卡姆股份公司

地址 丹麦,霍斯霍尔姆自治市

(72)发明人 L·K·比格斯奈斯 B·麦康奈尔

(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 顾小曼 周琴

(51)Int.Cl.

A61K 31/702(2006.01)

A61P 3/04(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

A61P 25/22(2006.01)

A61P 25/24(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

用于微生物群调节的人乳寡糖及其合成组合物

(57)摘要

本发明涉及用于调节人胃肠道中的微生物群、尤其是用于增加人肠道微生物群中的阿克曼氏菌丰度的方法、化合物和组合物。

1. 一种人乳寡糖 (HMO), 其用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。
2. 一种合成组合物, 其用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度, 所述组合物包含至少一种人乳寡糖 (HMO)。
3. 根据权利要求2所述的用途的合成组合物, 其含有1g至15g、优选2g至10g、更优选3g至7g的量的至少一种HMO。
4. 一种封装物, 其包含至少14个独立日剂量的有效量的至少一种人乳寡糖 (HMO), 所述封装物用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。
5. 根据权利要求4所述的用途的封装物, 其中每个日剂量含有1g至15g、优选2g至10g、更优选3g至7g的至少一种HMO。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的HMO、所述用途的合成组合物或所述用途的封装物, 用于在人中治疗或预防:
  - 肠致病性感染,
  - 与肥胖、糖尿病和肝病相关联的代谢病症,
  - 肠屏障功能受损,
  - 食物不耐受/敏感性, 比如非乳糜泻小麦敏感性,
  - 脑肠病症, 比如压力、焦虑和抑郁样行为,
  - 孤独症样行为, 和/或
  - 与胃肠道病况有关的炎症。
7. 一种或多种人乳寡糖 (HMO),
  - 包含一种或多种人乳寡糖 (HMO) 的合成组合物, 或
  - 包含至少14个独立日剂量的有效量的一种或多种人乳寡糖的封装物在患有以下一种或多种的患者的饮食管理中的用途:
  - 肠致病性感染,
  - 与肥胖、糖尿病和肝病相关联的代谢病症,
  - 肠屏障功能受损,
  - 食物不耐受/敏感性, 比如非乳糜泻小麦敏感性,
  - 脑肠病症, 比如压力、焦虑和抑郁样行为,
  - 孤独症样行为,
  - 与胃肠道病况有关的炎症。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的用途的HMO、所述用途的合成组合物、所述用途的封装物、或所述用途, 其中所述人乳寡糖包含2'-FL、3-FL、DFL、LNT、LNnT、3'-SL、6'-SL、LNFP-I、或其混合物。
9. 根据权利要求1或6所述的用途的HMO、根据权利要求2、3或6中任一项所述的用途的合成组合物、根据权利要求4至6中任一项所述的用途的封装物、或根据权利要求7所述的用途, 其中所述人乳寡糖包含至少一种中性HMO, 由至少一种中性HMO组成, 或基本上由至少一种中性HMO组成。
10. 根据权利要求9所述的用途的HMO、所述用途的合成组合物、所述用途的封装物或所述用途, 其中所述中性HMO是岩藻糖基化HMO和非岩藻糖基化HMO的混合物。
11. 根据权利要求10所述的用途的HMO、所述用途的合成组合物、所述用途的封装物或

所述用途,其中所述混合物包含2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种,由2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种组成,或基本上由2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种组成。

12. 根据权利要求11所述的用途的人乳寡糖、所述用途的合成组合物、所述用途的封装物或所述用途,其中所述混合物包含2'-FL和LNnT,由2'-FL和LNnT组成,或基本上由2'-FL和LNnT组成,优选质量比为约4:1至1:1。

13. 一种用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的方法,所述方法包括向所述人经口服或肠内施用有效量的人乳寡糖(HMO)。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中阿克曼氏菌的丰度在胃肠道的粘膜层中增加。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中阿克曼氏菌的丰度在结肠中增加。

16. 根据权利要求13至15中任一项所述的方法,其中双歧杆菌的丰度也增加。

17. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对人的肠致病性感染的预防或治疗。

18. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有2型糖尿病、肥胖和/或肝病的人的预防或治疗。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所施用的量足以改善肠通透性和/或增加胰岛素敏感性。

20. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有与胃肠道病况有关的炎症的人的预防或治疗。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述胃肠道病况是肠道疾病或肠易激综合症,优选其中所述HMO的量足以诱导抗炎免疫应答。

22. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有肠脑病症的人的预防或治疗。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述肠脑病症是压力、焦虑或抑郁样行为。

24. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有食物不耐受和/或敏感性的人的预防或治疗。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述食物不耐受和/或敏感性是非乳糜泻小麦敏感性。

26. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有肠屏障功能受损的人的预防或治疗。

27. 根据权利要求13至16中任一项所述的方法,其引起对患有孤独症样行为的人的预防或治疗。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述HMO施用于所述人至少14天的时间。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每天向所述人施用1g至15g、优选2g至10g、更优选3g至7g的量的至少一种HMO。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述HMO施用于所述人至少14天。

31. 根据前述权利要求12中任一项所述的方法,其中所述HMO包含2'-FL、3-FL、DFL、LNT、LNnT、3'-SL、6'-SL、LNFP-I、或其混合物。

32. 根据权利要求13至30中任一项所述的方法, 其中所述人乳寡糖包含至少一种中性HMO, 由至少一种中性HMO组成, 或基本上由至少一种中性HMO组成。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述中性HMO是岩藻糖基化HMO和非岩藻糖基化HMO的混合物。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述混合物包含2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种, 由2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种组成, 或基本上由2'-FL和DFL中的至少一种以及LNnT和LNT中的至少一种组成。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述混合物包含2'-FL和LNnT, 由2'-FL和LNnT组成, 或基本上由2'-FL和LNnT组成, 优选质量比为约4:1至1:1。

36. 根据权利要求13所述的方法, 其包括肠内地对所述人施用:

-在至少7天时间的第一步骤中, 第一用量的人乳寡糖或包含第一用量的人乳寡糖的合成组合物, 其中所述第一用量有效地增加所述人的胃肠道中阿克曼氏菌的丰度, 以及

-在另外至少7天时间的第二步骤中, 第二用量的人乳寡糖或包含第二用量的人乳寡糖的合成组合物, 其中所述第二用量有效地维持所述人的胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。

## 用于微生物群调节的人乳寡糖及其合成组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于调节人胃肠道中的微生物群、尤其是用于增加人肠道微生物群中的阿克曼氏菌 (*Akkermansia*) 丰度的方法、化合物和组合物。

### 背景技术

[0002] 据估计,人的肠道中容纳着 $10^{13}$ 至 $10^{14}$ 个细菌细胞,细菌的数量超过了人体中细胞总数的10倍。人的肠道微生物群是一个复杂而动态的微生物生态系统,对人类宿主具有许多重要功能,包括防止病原体,诱导免疫调节功能,营养物加工和代谢功能。肠道微生物群由各种群体组成,这对于维护人类健康至关重要,最近的研究已经能够将肠道细菌群体的失衡与肠道和肠道外炎症性疾病联系起来。

[0003] 肠粘液由两层组成。内层没有细菌,外层较厚,由共生细菌定殖并降解。结肠粘液构成了复杂的液体,其中富含形成凝胶的粘蛋白。粘蛋白是大的糖蛋白,其特征在于附着在羟基氨基酸簇上的大量且可变的O-连接聚糖。仅某些特定的肠道细菌(粘液定殖细菌)能够使用粘蛋白作为营养来源,因为它们具有分解粘蛋白聚糖所需的酶促装置。粘液定殖细菌可以保护宿主免受肠道病原体侵害,有助于微生物群的恢复并影响宿主应答。阿克曼氏菌(包括类型为嗜粘蛋白阿克曼氏菌 (*Akk.muciniphila*) 的细菌种)是人类肠道微生物群中含量最高的粘液定殖细菌之一,也是人类中鉴定出的少数几种核心微生物之一。由于存在编码以下酶:唾液酸酶、岩藻糖苷酶、N-乙酰基- $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶和GlcNAc硫酸酯酶的基因,阿克曼氏菌能够利用粘液用作唯一的碳和氮源。活泼瘤胃球菌 (*Ruminococcus gnavus*, 另一种与炎症性肠病有关的粘液定殖细菌)和阿克曼氏菌的粘蛋白降解酶的生化分析表明它们的表型存在明显差异。对于活泼瘤胃球菌,显示一种自私的表型,而阿克曼氏菌与刺激营养链的表型相容。这表明阿克曼氏菌参与推动粘膜群落的存在。

[0004] 几项研究已报告,在人类多种病症和疾病中阿克曼氏菌的丰度降低。这些中大多数包括肠道疾病,比如炎症性肠病,也包括肠道外疾病,比如特应反应、肥胖、2型糖尿病、高血压、肝病和孤独症。这表明阿克曼氏菌与保护性和/或抗炎作用相关联,而在上述疾病中这种作用丧失。

[0005] 几项临床前研究表明,嗜粘蛋白阿克曼氏菌可以抵消啮齿动物中高脂饮食的有害代谢特征,包括恢复上皮完整性(粘液厚度),降低代谢内毒素血症(血清LPS)和改善代谢病况,比如葡萄糖耐量。这表明与肥胖症、糖尿病和肝病有关的代谢症状有所改善。还已经表明,嗜粘蛋白阿克曼氏菌可增加肠道中调节性T细胞和杯状细胞的数量,从而导致免疫信号传导和粘液产生。此外,已经研究了嗜粘蛋白阿克曼氏菌影响核苷酸寡聚化结构域样受体和Toll样受体 (TLR) 的能力。这些受体是一组特殊的膜和细胞内蛋白质,它们在免疫调节中起关键作用,并直接参与免疫系统对细菌成分的识别。有研究表明,嗜粘蛋白阿克曼氏菌与TLR2特异性相互作用。该受体在调节肠内稳态和宿主代谢中很重要,其功能障碍与比如非乳糜泻小麦敏感性、IBD和IBS的疾病相关联。这表明阿克曼氏菌通过刺激粘蛋白产生(例如取决于粘液厚度)和通过诱导调节性免疫应答而在与宿主积极地交互。

[0006] 选择性刺激特定肠道细菌以促进其生长和代谢活性(例如,SCFA的产生)可能是创建有益的肠道微生物群落的有用方法,该群落能够调节免疫和代谢功能。例如,一项研究表明,服用低聚果糖可增加阿克曼氏菌的数量并改善宿主健康。但是,有些人对低聚果糖敏感,并且会出现比如腹胀、腹痛和增加胃肠气胀发生的副作用。

[0007] 还已经描述(WO 2014/076246)阿克曼氏菌的重复施用影响与肥胖症和相关病症相关联的一些底层的功能障碍(即代谢功能障碍),与较高的血液脂多糖(LPS)水平和肠胃功能损害相关联的低度炎症状态。因此,作为一种益生菌补充剂施用阿克曼氏菌可能是一种方法。然而,尚未批准将阿克曼氏菌益生菌用于食品用途,并且添加外源有机体可能不足以充分促进有益作用。

[0008] 人乳寡糖(HMO)是人乳中发现的可溶性聚糖的异质混合物。它们是人乳中仅次于乳糖和脂质的第三种最丰富的固体成分,并且以5-25g/l的浓度存在(Bode:Human milk oligosaccharides and their beneficial effects,见:Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk(Zibadi等著),pp.515-31,瓦赫宁根学术出版社(Wageningen Academic Publishers)(2013))。HMO的结构类似于在粘液中发现的O-聚糖和在人细胞中发现的N-聚糖。HMO对小肠中的酶水解具有抵抗力,因此在很大程度上未被消化和吸收。到达结肠的大多数HMO作为底物,通过选择性刺激特定细菌的生长来塑造肠道生态系统。据信,HMO实质上可调节婴儿肠道微生物群,并在配方奶喂养和母乳喂养的婴儿的微生物群差异中起决定性作用。然而,尚不清楚HMO是否会影响成年微生物群落,从而刺激阿克曼氏菌的生长。

[0009] 在碳水化合物发酵期间产生的代谢终产物,比如短链脂肪酸(乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐),也有助于阿克曼氏菌的肠道功能和有益特性。阿克曼氏菌由于粘蛋白降解而产生乙酸盐和丙酸盐。这些代谢物可影响微生物群的相互作用和宿主反应。乙酸盐可刺激其它粘膜细菌的生长和代谢活性,并提供对穿过粘液层到达肠道细胞的病原菌的定植抵抗力。丙酸盐可通过Gpr43和Gpr41受体向宿主发出信号。这可以触发宿主表达装置中的级联应答,并且与其它信号传导通路一起可导致免疫调节和代谢信号传导。另外,虽然阿克曼氏菌不产生丁酸盐作为粘蛋白降解的最终产物,但是已经证明了肠道中通过产生丁酸盐的细菌对乙酸盐的代谢交叉补给的重要性。丁酸盐是结肠细胞的主要能源,据报道,丁酸盐通过改变粘蛋白基因和紧密连接表达来调节正常结肠粘膜的物理和功能完整性。此外,丁酸盐具有免疫调节作用,可使免疫细胞保持平衡,并可影响脑源性神经营养因子和神经胶质源性神经营养因子的表达,从而导致神经元调节。

[0010] 因此,需要有效地增加人类、优选非婴儿人类的胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的手段,优选口服或肠内施用手段,更优选饮食手段。

## 发明内容

[0011] 本发明的第一方面涉及人乳寡糖(HMO),其用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。优选地,HMO用于增加人胃肠道中的阿克曼氏菌的丰度以在人中治疗或预防:

[0012] -肠致病性感染,

[0013] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0014] -肠屏障功能受损,

[0015] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0016] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0017] -孤独症样行为,和/或

[0018] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0019] 本发明的第二方面是包含人乳寡糖的合成组合物,其用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,优选在人中治疗或预防:

[0020] -肠致病性感染,

[0021] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0022] -肠屏障功能受损,

[0023] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0024] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0025] -孤独症样行为,和/或

[0026] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0027] 合成组合物可以是营养或药物组合物。

[0028] HMO可以是中性HMO或酸性HMO。中性HMO可以是一种或多种岩藻糖基化HMO或一种或多种非岩藻糖基化HMO。优选地,HMO是2'-FL、3-FL、DFL、LNT、LNnT、3'-SL、6'-SL、LNFP-I、或其混合物。优选地,HMO包括、由或基本上由以下组成:2'-FL、以及LNnT和LNT中的至少一者;2'-FL和DFL中的至少一者以及LNnT和LNT中的至少一者(例如2'-FL、DFL、以及LNnT和LNT中的至少一者);2'-FL和6'-SL;DFL和6'-SL;2'-FL、DFL和6'-SL;2'-FL、6'-SL、以及LNnT和LNT中的至少一者;和2'-FL、DFL、6'-SL、以及至少LNnT和LNT。

[0029] 本发明的第三方面是一种用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效量的人乳寡糖(HMO)。优选地,阿克曼氏菌的丰度在胃肠道的粘膜层中增加;更优选在结肠中;例如,远端结肠。优选地,将HMO施用于人至少约14天、更优选至少约21天的时间。而且,优选地,每天向人施用约1g至约15g的量的HMO,更优选地,每天约2g至约10g。例如,可以每天向人施用约3g至约7g。“约”是指+/-5%。

[0030] 在第三方面的一个实施方式中,该方法包括向人、优选非婴儿人肠内、优选口服施用:

[0031] (a) 在第一步中进行至少约7天的时间(也称为治疗或初始治疗阶段):

[0032] -第一用量的人乳寡糖,或

[0033] -包含第一用量的人乳寡糖的合成组合物,

[0034] 其中该第一用量有效地增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,和

[0035] (b) 在第二步中进行额外的时间、优选至少约7天(也称为维持阶段):

[0036] -第二用量的人乳寡糖,或

[0037] -包含第二用量的人乳寡糖的合成组合物,

[0038] 其中该第二用量有效地维持人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。优选地,在第一步中施用HMO至少约14天,更优选至少约21天,例如至多约28天的时间。还优选地,第二步中的额外时间为至少约21天,例如至少约28天。可以在第一步期间向患者施用较高剂量,并且在第二步期间施用较低剂量。在第一步期间施用的剂量优选为每天约3g至约10g(例如每天约4g至约7.5g),并且在第二步期间施用的剂量优选为每天约2g至约7.5g(例如每天约2g至约

5g)。

[0039] 本发明的第四方面是一种用于预防或治疗人的肠致病性感染的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0040] 本发明的第五方面是一种用于预防或治疗患有2型糖尿病、肥胖和/或肝病的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。优选地,施用的量足以在受试者中改善肠通透性和/或增加胰岛素敏感性和/或促进体重减轻。

[0041] 本发明的第六方面是一种用于预防或治疗患有炎症相关胃肠道病况的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。胃肠道病况可能是肠道疾病或肠易激综合症。优选地,HMO的量足以诱导抗炎免疫应答。

[0042] 本发明的第七方面是一种用于预防或治疗患有脑肠病症的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。脑肠病症可能是压力、焦虑和抑郁样行为。

[0043] 本发明的第八方面是一种用于预防或治疗患有食物不耐受/敏感性的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。在一个实施方式中,食物不耐受/敏感性可以是非乳糜泻小麦敏感性。

[0044] 本发明的第九方面是一种用于预防或治疗患有肠屏障功能受损的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0045] 本发明的第十方面是一种用于预防或治疗患有孤独症样行为的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0046] 在本发明的第四至第十方面的任何一个中,优选将HMO施用于人至少约14天时间,更优选至少约21天。

[0047] 在本发明的第四至第十方面的任何一个中,优选每天向人施用1g至15g的量的HMO,更优选每天2g至10g。例如,可以每天向人施用3g至7g。

[0048] 本发明的第十一方面涉及一种封装物,其包括至少14个独立日剂量的有效量的至少一种人乳寡糖(HMO),该封装物用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,优选在人中治疗或预防:

[0049] -肠致病性感染,

[0050] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0051] -肠屏障功能受损,

[0052] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0053] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0054] -孤独症样行为,和/或

[0055] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0056] 优选地,每个剂量含有约1g至15g的人乳寡糖,更优选约2g至约10g,例如,约3g至

约7g。优选地,封装物包含至少21个日剂量,更优选至少28个日剂量,例如,至少35个日剂量。该封装物可包括使用说明书。

[0057] 本发明的第十二方面是以下:

[0058] -一种或多种人乳寡糖(HMO),

[0059] -包含一种或多种人乳寡糖(HMO)的合成组合物,或

[0060] -包含至少14个独立日剂量的有效量的一种或多种人乳寡糖的封装物

[0061] 在患有以下一种或多种的患者的饮食管理中的用途:

[0062] -肠致病性感染,

[0063] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0064] -肠屏障功能受损,

[0065] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0066] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0067] -孤独症样行为,和/或

[0068] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0069] 在本发明的所有方面,人优选是非婴儿的人。

## 附图说明

[0070] 图1示出在一项人类临床试验中,与安慰剂组相比,在九个治疗组中阿克曼氏菌丰度变化的百分比。

[0071] 图2示出在3周的治疗期间,在供给HMO的体外肠道模型中阿克曼氏菌变化的百分比。

## 具体实施方式

[0072] 现已令人惊讶地发现,向人施用人乳寡糖(HMO)优先增加其胃肠道微生物群中阿克曼氏菌的丰度。先前在WO 2016/138911中已有报道,将HMO施用于人类受试者增加青春双歧杆菌(*B.adolescentis*)系统发育组的双歧杆菌的丰度,尤其是青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)和/或假链状双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)。青春双歧杆菌系统发育组的双歧杆菌的这种增加是暂时的,持续约14天。此后,长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)和/或两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)的丰度增加。现已令人惊讶地发现,与开始施用HMO之前的阿克曼氏菌水平相比,向人施用HMO刺激人胃肠道中的阿克曼氏菌生长,将阿克曼氏菌的水平提高多达2-10倍,比如3-5倍。

[0073] 因此,已经发现,通过口服或肠内摄入人乳寡糖,除了在人肠道中的双歧杆菌外,还通过优先促进阿克曼氏菌的生长来动态地调节人肠道微生物群。结果,可以塑造和维持更有益的肠道微生物群落和肠道环境,并且通过增加阿克曼氏菌的丰度,可以抑制病原体感染,并且可以预防或改善肠道和肠道外疾病。阿克曼氏菌的增加也发生在粘膜层,而不仅是肠腔。

[0074] 在本文中,以下术语具有以下含义:

[0075] “非婴儿的人”或“非婴儿”意指3岁及年龄更大的人。非婴儿的人可以是儿童、青少

年、成人或老人。

[0076] “人乳寡糖”或“HMO”意指在人母乳中发现的复杂碳水化合物 (Urashima等:Milk Oligosaccharides. Nova Science Publisher (2011)); Chen Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 72, 113 (2015))。HMO具有在还原末端包含乳糖单元的核心结构,其可以通过一个或多个 $\beta$ -N-乙酰基-乳糖胺基和/或一个或多个 $\beta$ -乳-N-二糖基单元延长,并且该核心结构可以由 $\alpha$ L-吡喃岩藻糖基 (fucopyranosyl) 和/或 $\alpha$ -N-乙酰基-神经氨酸基(唾液酸基)部分取代。在这方面,非酸性(或中性)HMO不含唾液酸残基,而酸性HMO在其结构中具有至少一个唾液酸残基。非酸性(或中性)HMO可以是岩藻糖基化或非岩藻糖基化的。这类中性非岩藻糖基化HMO的实例包括乳-N-四糖(LNT)、乳-N-新四糖(LNnT)、乳-N-新己糖(LNnH)、对-乳-N-新己糖(pLNnH)、对-乳-N-己糖(pLNH)和乳-N-己糖(LNH)。中性岩藻糖基化HMO的实例包括2'-岩藻糖基乳糖(2'-FL)、乳-N-岩藻五糖I(LNFP-I)、乳-N-二岩藻己糖I(LNDFH-I)、3-岩藻糖基乳糖(3-FL)、二岩藻糖基乳糖(DFL)、乳-N-岩藻五糖II(LNFP-II)、乳-N-岩藻五糖III(LNFP-III)、乳-N-二岩藻己糖III(LNDFH-III)、岩藻糖基-乳-N-己糖II(FLNH-II)、乳-N-岩藻五糖V(LNFP-V)、乳-N-岩藻五糖VI(LNFP-VI)、乳-N-二岩藻己糖II(LNDFH-II)、岩藻糖基-乳-N-己糖I(FLNH-I)、岩藻糖基-对-乳-N-己糖I(FpLNH-I)、岩藻糖基-对-乳-N-新己糖II(F-pLNnH II)和岩藻糖基-乳-N-新己糖(FLNnH)。酸性HMO的实例包括3'-唾液乳糖(3'-SL)、6'-唾液乳糖(6'-SL)、3-岩藻糖基-3'-唾液乳糖(FSL)、LST a、岩藻糖基-LST a(FLST a)、LST b、岩藻糖基-LST b(FLST b)、LST c、岩藻糖基-LST c(FLST c)、唾液酸基-LNH(SLNH)、唾液酸基-乳-N-己糖(SLNH)、唾液酸基-乳-N-新己糖I(SLNH-I)、唾液酸基-乳-N-新己糖II(SLNH-II)和二唾液酸基-乳-N-四糖(DSLNT)。

[0077] “合成组合物”意指人工制备的组合物,并且优选地意指含有至少一种以化学和/或生物学方式离体产生(例如通过化学反应、酶促反应或重组)的化合物的组合物。在一些实施方式中,本发明的合成组合物可以与天然存在的组合物相同,但优选不同。合成组合物通常包含一种或多种化合物,有利地为HMO,其能够优先增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。在一些实施方式中,合成组合物可以包含除HMO之外的一种或多种化合物或组分,该化合物或组分可以对人类受试者体内的微生物群具有有益的作用,例如不可消化的寡糖或益生元。同样,在一些实施方式中,合成组合物可以包含一种或多种营养或药理学活性组分,其不会不利地影响上述化合物的功效。下面还描述本发明的合成组合物的一些非限制性实施方式。

[0078] “微生物群”、“微生物区系”和“微生物组”是指通常栖息于身体器官或部分、特别是非婴儿人类的胃肠器官的活微生物群体。胃肠微生物群的最主要成员包括厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)、互养菌门(Synergistetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、梭杆菌门(Fusobacteria)和广古菌门(Euryarchaeota)这些门的微生物。在属水平的微生物包括拟杆菌属(Bacteroides)、栖粪杆菌属(Faecalibacterium)、双歧杆菌属(Bifidobacterium)、罗斯氏菌属(Roseburia)、Alistipes、柯林斯氏菌(Collinsella)、布劳特氏菌属(Blautia)、粪球菌属(Coproccoccus)、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、真杆菌属(Eubacterium)和多尔氏菌属(Dorea);在物种水平的微生物包括单形拟杆菌(Bacteroides uniformis)、Alistipes putredinis、Parabacteroides merdae、布氏瘤胃球菌

(*Ruminococcus bromii*)、*Dorea longicatena*、粪拟杆菌 (*Bacteroides caccae*)、多形拟杆菌 (*Bacteroides thetaiotaomicron*)、霍氏真杆菌 (*Eubacterium hallii*)、扭链瘤胃球菌 (*Ruminococcus torques*)、粪普拉梭杆菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*)、酸奶瘤胃球菌 (*Ruminococcus lactaris*)、产气柯林斯菌 (*Collinsella aerofaciens*)、*Dorea formicigenerans*、普通拟杆菌 (*Bacteroides vulgatus*) 和罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia intestinalis*)。胃肠微生物群包括位于或附着于覆盖胃肠道上皮的粘液层的粘膜相关微生物群,以及胃肠道腔中发现的腔相关微生物群。

[0079] “肠内施用”意指用于将组合物递送至人类的任何常规形式,其引起组合物在胃肠道(包括胃)中的沉积。肠内施用的方法包括通过鼻胃管或空肠管、经口、舌下和直肠进给。

[0080] “口服施用”意指用于通过口将组合物递送至人的任何常规形式。因此,口服施用是肠内施用的一种形式。

[0081] “有效量”是指以足量提供HMO以在人中引起期望的治疗结果的组合物的量。有效量可以以一个或多个剂量施用,以实现期望的治疗结果。

[0082] 细菌种类的“相对丰度”是指人胃肠道微生物群中该种类相对于其它细菌的丰度。

[0083] 细菌种类的“相对生长”是指人胃肠道微生物群中该种类相对于其它细菌的生长。

[0084] “青春双歧杆菌系统发育组的双歧杆菌”是指选自以下的细菌:青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、角形双歧杆菌 (*Bifidobacterium angulatum*)、链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium catenulatum*)、假链状双歧杆菌 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、*Bifidobacterium kashiwanohense*、齿双歧杆菌 (*Bifidobacterium dentum*)、*Bifidobacterium stercoris* (Duranti等Appl.Environ.Microbiol.79,336 (2013),Bottacini等Microbial Cell Fact.13:S4 (2014))。优选地,青春双歧杆菌系统发育组的双歧杆菌是青春双歧杆菌和/或假链状双歧杆菌。

[0085] “治疗”意指解决医学病状或疾病,目的是改善或稳定被治疗的人的预后或潜在营养需求。因此,治疗包括通过解决被治疗者的营养需而进行的医疗状况或疾病的饮食或营养管理。“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”具有语法上对应的含义。

[0086] “微生物群的调节”意指对微生物群施加调节或控制的影响,例如导致双歧杆菌 (*Bifidobacterium*)、*Barnesiella*、粪杆菌属 (*Faecalibacterium*) 和/或其它产丁酸盐细菌的固有肠道丰度增加的影响。在另一个实例中,影响可引起活泼瘤胃球菌 (*Ruminococcus gnavus*) 和/或变形菌的肠内丰度的减少。“变形菌”是一种革兰氏阴性菌门,并且包括各种病原菌,比如埃希氏菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、弧菌属 (*Vibrio*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*) 和许多其它著名的属。

[0087] “疗法”意指为减少或消除疾病或病理病况的症状而给予的治疗或采取的措施。

[0088] “预防性治疗”或“预防”是指为减少疾病发作或复发的风险而给予的治疗或采取的行动。

[0089] “二级预防”是指在高风险患者中预防病况发作,或在已经患有该病况的患者中预防症状复发。“高风险”患者是指容易患病的个体,例如有该病况家族史的人。

[0090] “饮食管理”意指由于疾病、病症或医疗状况而经历以下的患者的全部或部分进餐:

[0091] -摄取、消化、吸收、代谢或排泄普通食物或其中所含的某些营养素或代谢物的能

力受限、受损或受干扰,或者

[0092] -具有其它医学确定的营养素要求

[0093] (参阅:欧盟委员会关于特殊医疗用途食品分类的委员会公告,欧盟官方公报C 401,25.11.2017,第10-11页)。

[0094] 根据本发明,已经发现HMO可刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,特别是当施用于人几天内,例如至少约14天。因此,HMO可用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度。因此,HMO可用于在人中治疗或预防病毒和/或细菌感染(尤其是肠致病性感染),肠炎性疾病(尤其是IBD),IBS,肠脑病症和肠外疾病:代谢性疾病(比如肥胖症和2型糖尿病及其相关共病,比如葡萄糖不耐受、脂质代谢异常、动脉粥样硬化、高血压、心脏病、中风、免疫系统功能障碍、高胆固醇、甘油三酯升高);肝脏疾病(比如非酒精性脂肪肝、高血糖症、肝脂肪变性、血脂异常);哮喘;睡眠呼吸暂停;骨关节炎;神经变性;胆囊疾病;综合征X;炎性和免疫性病症;动脉粥样硬化性血脂异常;癌症,特别是肠道(gut)癌、肠(intestine)癌和结肠癌;孤独症和食物不耐受/敏感性。

[0095] 因此,本发明的第一方面涉及HMO用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,从而用于在人中治疗和/或预防病毒和/或细菌感染(尤其是肠致病性感染),肠炎性疾病(尤其是IBD),IBS,肠脑病症和肠外疾病(尤其是肥胖症和2型糖尿病、肝脏疾病、孤独症和食物不耐受/敏感性)。

[0096] 本发明的第二方面是包含HMO的合成组合物用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,从而治疗和/或预防病毒和/或细菌感染(尤其是肠致病性感染),肠炎性疾病(尤其是IBD),IBS,肠脑病症和肠外疾病(尤其是肥胖症和2型糖尿病、肝脏疾病、孤独症和食物不耐受/敏感性)。

[0097] 本发明的第三方面是一种用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效量的人乳寡糖(HMO)。

[0098] 本发明的第四方面是一种用于预防或治疗人的肠致病性感染的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0099] 本发明的第五方面是一种用于预防或治疗患有2型糖尿病、肥胖和/或肝病的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0100] 本发明的第六方面是一种用于预防或治疗患有炎症相关胃肠道病况的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。胃肠道病况可以是肠道疾病或肠易激综合症。

[0101] 本发明的第七方面是一种用于预防或治疗患有脑肠病症的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。脑肠病症可以是压力、焦虑和抑郁样行为。

[0102] 本发明的第八方面是一种用于预防或治疗患有食物不耐受/敏感性的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。在一个实施方式中,食物不耐受/敏感性可以是非乳糜泻小麦敏感性。

[0103] 本发明的第九方面是一种用于预防或治疗患有肠屏障功能受损的人的方法,该方

法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0104] 本发明的第十方面是一种用于预防或治疗患有孤独症样行为的人的方法,该方法包括向人经口服或肠内施用有效增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度的量的一种或多种人乳寡糖。

[0105] 本发明的第十一方面涉及一种封装物,其包括至少14个独立日剂量的有效量的至少一种人乳寡糖(HMO),该封装物用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度,优选在人中治疗或预防:

[0106] -肠致病性感染,

[0107] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0108] -肠屏障功能受损,

[0109] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0110] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0111] -孤独症样行为,和/或

[0112] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0113] 本发明的第十二方面是以下:

[0114] -一种或多种人乳寡糖(HMO),

[0115] -包含一种或多种人乳寡糖(HMO)的合成组合物,或

[0116] -包含至少14个独立日剂量的有效量的一种或多种人乳寡糖的封装物

[0117] 在患有以下一种或多种的患者的饮食管理中的用途:

[0118] -肠致病性感染,

[0119] -与肥胖、糖尿病和肝病有关的代谢病症,

[0120] -肠屏障功能受损,

[0121] -食物不耐受/敏感性,比如非乳糜泻小麦敏感性,

[0122] -脑肠病症,比如压力、焦虑和抑郁等行为,

[0123] -孤独症样行为,和/或

[0124] -与胃肠道病况有关的炎症。

[0125] 关于每个方面,适用于增加人胃肠道中阿克曼氏菌丰度的HMO,可以通过熟知的方法从哺乳动物(包括但不限于人、牛、绵羊、猪或山羊物种)分泌的一种或多种乳中分离或富集。还可以通过使用微生物发酵、酶促方法、化学合成或这些技术的组合的熟知方法来生产HMO。作为实例,使用化学法,可以如W0 2011/100980和W0 2013/044928中所述那样制造LNnT,可以如W0 2012/155916和W0 2013/044928中所述那样合成LNT,可以如W0 2013/091660中所述那样制造LNT和LNnT的混合物,可以如W0 2010/115934和W0 2010/115935中所述那样制造2'-FL,可以如W0 2013/139344中所述那样制造3-FL,可以如W0 2010/100979中所述那样制造6'-SL及其盐,可以如W0 2012/113404中所述那样制备唾液酸化寡糖,并且可以如W0 2012/113405中所述那样制备人乳寡糖的混合物。作为酶促生产的实例,可以如W0 2012/007588中所述那样制造唾液酸化寡糖,如W0 2012/127410中所述那样制造岩藻糖基化寡糖,并且可以如W0 2012/156897和W0 2012/156898中所述那样有利地制备人乳寡糖的多种混合物。可以在W0 01/04341和W0 2007/101862中找到描述如何使用基因修饰的大肠

杆菌制造核心人乳寡糖(任选地由岩藻糖或唾液酸取代)的生物技术方法。

[0126] 在上述方面中的任一项中,HMO可以是单一HMO或任何适合于本发明目的的HMO的混合物。HMO可以是中性HMO或酸性HMO。在一个实施方式中,中性HMO是一种或多种岩藻糖基化HMO;在另一个实施方式中,中性HMO是一种或多种非岩藻糖基化HMO。特别地,岩藻糖基化中性HMO选自以下组成的列表:2'-FL、3-FL、DFL、LNFP-I、LNFP-II、LNFP-III、LNFP-V、LNFP-VI、LNDFH-I、LNDFH-II、LNDFH-III、FLNH-I、FLNH-II、FLNnH、FpLNH-I和F-pLNnH II,优选2'-FL,且非岩藻糖基化中性HMO选自LNT、LNnT、LNH、LNnH、pLNH和pLNnH组成的列表,例如LNnT。该一种或多种岩藻糖基化HMO可以是例如包含2'-FL和DFL、由其组成或基本上由其组成的混合物。

[0127] 在一个实施方式中,混合物包含以下、由其组成或基本上由其组成:中性HMO,优选至少第一中性HMO和至少第二中性HMO,其中第一中性HMO是岩藻糖基化中性HMO,且第二中性HMO是非岩藻糖基化中性HMO。岩藻糖基化中性HMO和非岩藻糖基化HMO可以以约4:1至1:1的质量比存在。特别地,HMO的混合物包含岩藻糖基化HMO以及非岩藻糖基化中性HMO、由其组成或基本上由其组成,该岩藻糖基化HMO选自2'-FL、3-FL、DFL、LNFP-I、LNFP-II、LNFP-III、LNFP-V、LNDFH-I、LNDFH-II、LNDFH-III、FLNH-I、FLNH-II、FLNnH、FpLNH-I和F-pLNnH II组成的列表,该非岩藻糖基化中性HMO选自LNT、LNnT、LNH、LNnH、pLNH和pLNnH组成的列表。更优选地,中性HMO的混合物含有、由以下组成或基本上由以下组成:选自2'-FL、3-FL和DFL组成的列表的岩藻糖基化HMO,以及选自LNT和LNnT组成的列表的非岩藻糖基化中性HMO;有利地,混合物包含、由以下组成或基本上由以下组成:2'-FL和LNnT和LNT中的至少一者;或2'-FL和DFL中的至少一者,以及LNnT和LNT中的至少一者;或2'-FL、DFL以及LNnT和LNT中的至少一者。

[0128] 在其它实施方式中,混合物包含至少第一(酸性)HMO和至少第二(中性)HMO、由其组成或基本上由其组成,其中第一(酸性)HMO选自3'-SL、6'-SL和FSL组成的列表并且第二(中性)HMO是选自2'-FL、3-FL、DFL、LNT和LNnT组成的列表;有利地,混合物包含、由或基本上由以下组成:2'-FL和6'-SL;或6'-SL以及2'-FL和DFL中的至少一个;或2'-FL、6'-SL以及LNnT和LNT中的至少一者;或2'-FL、DFL、6'-SL以及LNnT和/或LNT中的至少一者。

[0129] 合成组合物可以是药物组合物。药物组合物可以含有药学上可接受的载体,例如,磷酸盐缓冲盐溶液,乙醇在水的混合物,水和乳液(如油/水或水/油乳液),以及各种润湿剂或赋形剂。药物组合物还可以含有其它物质,当向人施用,该物质不会产生有害、过敏或其它不需要的反应。载体和其它物质可包括溶剂、分散剂、包衣剂、吸收促进剂、控释剂和一种或多种惰性赋形剂,如淀粉、多元醇、制粒剂、微晶纤维素、稀释剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂。如果需要,抗感染组合物的片剂剂量可以通过标准的水性或非水性技术进行包衣。

[0130] 药物组合物可以口服施用,例如作为含有预定量的片剂、胶囊或丸剂,或作为含有预定浓度的粉剂或颗粒剂,或含有预定浓度的在水性或非水性液体中的凝胶剂、糊剂、溶液剂、混悬剂、乳液剂、糖浆、大丸剂、药糖剂或浆剂。口服施用组合物可以包含粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、调味剂和湿润剂。口服施用组合物如片剂可以任选地被包衣并且可以被配制为提供其中混合物的持续、延迟或受控释放。

[0131] 药物组合物也可以通过直肠栓剂、气雾剂管、鼻胃管或直接输注到胃肠道或胃中来施用。

[0132] 药物组合物还可包含治疗剂,如抗病毒剂、抗生素、益生菌、止痛药和抗炎剂。这些组合物对于人的合适剂量可以基于比如免疫状态、体重和年龄这些因素以常规方式确定。在某些情况下,剂量的浓度将与母乳中HMO的浓度相似。所需量通常范围为每天约200mg至约20g,在某些实施方式中为每天约300mg至约15g,每天约400mg至约10g,在某些实施方式中为每天约500mg至约10g,在某些实施方式中为每天约1g至约10g。适当的剂量方案可以通过常规方法确定。

[0133] 合成组合物也可以是营养组合物。它可包含蛋白质、脂质和/或可消化的碳水化合物的来源,并且可以呈粉末或液体形式。可以将组合物设计为唯一营养来源或营养补充剂。

[0134] 合适的蛋白质来源包括乳蛋白、大豆蛋白、大米蛋白、豌豆蛋白和燕麦蛋白、或其混合物。乳蛋白可以是乳蛋白浓缩物、乳蛋白分离物,乳清蛋白或酪蛋白或两者的混合物的形式。蛋白质可以是完整蛋白质或水解蛋白质、部分水解或深度水解。水解蛋白提供易于消化的优势,这对患有胃肠道发炎的人至关重要。蛋白质也可以游离氨基酸的形式提供。蛋白质可占营养组合物能量的约5%至约30%,通常约10%至20%。

[0135] 蛋白质来源可以是以下的来源:谷氨酰胺、苏氨酸、半胱氨酸、丝氨酸、脯氨酸或这些氨基酸的组合。谷氨酰胺来源可以是谷氨酰胺二肽和/或富含谷氨酰胺的蛋白质。由于肠细胞将谷氨酰胺用作能量源,因此可以包含谷氨酰胺。苏氨酸、丝氨酸和脯氨酸是产生粘蛋白的重要氨基酸。粘蛋白覆盖胃肠道且可以改善粘膜愈合。半胱氨酸是谷胱甘肽的主要前体,它是机体抗氧化防御的关键。

[0136] 合适的可消化碳水化合物包括麦芽糊精、水解或改性的淀粉或玉米淀粉、葡萄糖聚合物、玉米糖浆、玉米糖浆固体、高果糖玉米糖浆、来源于大米的碳水化合物、来源于豌豆的碳水化合物、来源于马铃薯的碳水化合物、木薯淀粉、蔗糖、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、蜂蜜、糖醇(例如麦芽糖醇、赤藓糖醇、山梨糖醇)或其混合物。通常,可消化的碳水化合物提供营养组合物能量的约35%至约55%。优选地,营养组合物不含乳糖。特别合适的可消化碳水化合物是低葡萄糖当量(DE)麦芽糊精。

[0137] 合适的脂质包括中链甘油三酸酯(MCT)和长链甘油三酸酯(LCT)。优选地,脂质是MCT和LCT的混合物。例如,MCT可以占脂质重量的约30%至约70%,更具体地占重量的约50%至约60%。MCT具有易于消化的优势,这对胃肠道发炎的人至关重要。通常,脂质提供营养组合物能量的约35%至约50%。脂质可以含有必需脂肪酸( $\Omega$ -3和 $\Omega$ -6脂肪酸)。优选地,这些多不饱和脂肪酸提供的脂质源的总能量少于约30%。认为降低这些多不饱和脂肪酸的含量降低对过氧化的敏感性;这对患有炎症性病况的人可能是有益的。

[0138] 长链甘油三酸酯的合适来源是菜籽油、葵花籽油、棕榈油、大豆油、乳脂、玉米油、高油性油和大豆卵磷脂。分馏椰子油是中链甘油三酸酯的合适来源。营养组合物的脂质分布优选设计为具有约4:1至约10:1的多不饱和脂肪酸 $\Omega$ -6(n-6)与 $\Omega$ -3(n-3)之比。例如,n-6与n-3的脂肪酸比例可以为约6:1至约9:1。

[0139] 营养组合物优选还包含维生素和矿物质。如果营养组合物旨在作为唯一的营养来源,则其优选包括完整的维生素和矿物质谱。维生素的实例包括维生素A、B-复合物(如B1、B2、B6和B12)、C、D、E和K、烟酸和酸性维生素,如泛酸、叶酸和生物素。矿物质的实例包括钙、铁、锌、镁、碘、铜、磷、锰、钾、铬、钼、硒、镍、锡、硅、钒和硼。

[0140] 营养组合物还可包含类胡萝卜素,如叶黄素、番茄红素、玉米黄质和 $\beta$ -胡萝卜素。

所包含的类胡萝卜素的总量可在约0.001 $\mu$ g/ml至约10 $\mu$ g/ml范围内变化。叶黄素可以以约0.001 $\mu$ g/ml至约10 $\mu$ g/ml的量被包括在内,优选地约0.044 $\mu$ g/ml至约5g/ml的叶黄素。番茄红素可以以约0.001 $\mu$ g/ml至约10 $\mu$ g/ml的量被包括在内,优选约0.0185mg/ml至约5g/ml的番茄红素。 $\beta$ -胡萝卜素可包含约0.001 $\mu$ g/ml至约10mg/ml,例如约0.034 $\mu$ g/ml至约5 $\mu$ g/ml的 $\beta$ -胡萝卜素。

[0141] 营养组合物优选还含有低浓度的钠;例如,约300mg/l至约400mg/l。剩余电解质的浓度可以在不给肾脏功能带来不必要肾溶质负担的情况下满足需要。例如,钾优选以约1180mg/l至约1300mg/l的范围存在;并且氯化物优选以约680mg/l至约800mg/l的范围存在。

[0142] 营养组合物还可含有各种其它常规成分,如防腐剂,乳化剂,增稠剂,缓冲剂,纤维和益生元(例如低聚果糖、低聚半乳糖),益生菌(例如动物双歧杆菌(*B. animalis*)乳酸亚种(subsp. *lactis*) BB-12、乳酸双歧杆菌(*B. lactis*) HN019、乳酸双歧杆菌Bi07、婴儿双歧杆菌(*B. infantis*) AJCC 15697、鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) GG、鼠李糖乳杆菌HN001、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*) LA-5、嗜酸乳杆菌NCFM、发酵乳杆菌(*L. fermentum*) CECT5716、长双歧杆菌(*B. longum*) BB536、长双歧杆菌AH1205、长双歧杆菌AH1206、短双歧杆菌(*B. breve*) M-16V、罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*) ATCC 55730、罗伊氏乳杆菌ATCC PTA-6485、罗伊氏乳杆菌DSM 17938), 抗氧化剂/抗炎化合物,其包括生育酚、类胡萝卜素、抗坏血酸/维生素C、抗坏血酸棕榈酸酯、多酚,谷胱甘肽和超氧化物歧化酶(melon),其他生物活性因子(例如生长激素、细胞因子、TFG- $\beta$ ),着色剂,调味剂和稳定剂,润滑剂等。

[0143] 营养组合物可以是可溶粉末、液体浓缩物或即用型制剂的形式。组合物可以通过鼻胃管或经口服供给到人。也可以存在各种调味剂、纤维和其它添加剂。

[0144] 营养组合物可以通过用于制备固体或液体形式的营养组合物的任何常用制造技术来制备。例如,可以通过合并各种进料溶液来制备组合物。可以通过加热和混合脂质源,然后在加热和搅拌的同时添加乳化剂(例如卵磷脂)、脂溶性维生素和至少一部分蛋白质源来制备脂肪蛋白(protein-in-fat)进料溶液。然后通过加热和搅拌的同时向水中添加矿物质、痕量和超痕量矿物质、增稠剂或悬浮剂来制备碳水化合物进料溶液。在添加碳水化合物(例如,HMO和可消化的碳水化合物源)之前,将所得溶液在持续加热和搅拌下保持10分钟。然后将所得进料溶液在加热和搅拌时共混在一起,并将pH调节至6.6-7.0,然后将组合物经受高温短时加工,在此期间将组合物进行热处理、乳化和均质化,然后使其冷却。添加水溶性维生素和抗坏血酸,如果需要,将pH调节至所需范围,添加调味剂,并添加水以达到所需的总固体含量。

[0145] 对于液体产品,然后将所得溶液无菌包装以形成无菌包装的营养组合物。以这种形式,营养组合物可以是即食或浓缩液体形式。另外可选地,可将组合物喷雾干燥并加工并包装为可重构粉末。

[0146] 当营养产品是即食营养液体时,液体中HMO的总浓度以液体重量计为约0.0001%至约2.0%,包括约0.001%至约1.5%,包括约0.01%至约1.0%。当营养产品是浓缩营养液体时,液体中HMO的总浓度以液体重量计为约0.0002%至约4.0%,包括约0.002%至约3.0%,包括约0.02%至约2.0%。

[0147] 营养组合物也可以是单位剂型,比如胶囊、片剂或小袋。例如,合成组合物可以为

片剂形式,其包含HMO和一种或多种辅助配制和施用的附加组分,比如稀释剂、赋形剂、抗氧化剂、润滑剂、着色剂、粘合剂、崩解剂等。

[0148] 合适的稀释剂、赋形剂、润滑剂、着色剂、粘合剂和崩解剂包括聚乙烯,聚氯乙烯,乙基纤维素,丙烯酸酯聚合物及其共聚物,羟乙基纤维素,羟丙基甲基纤维素(HPMC),羧甲基纤维素钠,聚甲基丙烯酸羟乙酯(PHEMA),聚乙烯醇(PVA),聚乙烯吡咯烷酮(PVP),聚环氧乙烷(PEO)或聚丙烯酰胺(PA),角叉菜胶,藻酸钠,聚卡波非,聚丙烯酸,黄芪胶,甲基纤维素,果胶,天然胶,黄原胶,瓜尔胶,卡拉亚胶(karaya gum),羟丙甲纤维素,硬脂酸镁,微晶纤维素和胶体二氧化硅。合适的抗氧化剂是维生素A、类胡萝卜素、维生素C、维生素E、硒、类黄酮、多酚、番茄红素、叶黄素、木酚素、辅酶Q10(“CoQ10”)和谷胱甘肽。

[0149] 单位剂型,特别是小袋剂型,还可以包含各种营养素,包括常量营养素。

[0150] 本发明的第一目标组包括健康人。他们摄入一种或多种HMO将刺激健康人的胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并将胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍)。

[0151] 本发明的第二目标组包括患有肠致病性感染的人。他们摄入一种或多种HMO将刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并使胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍),结果,诱导针对肠致病性微生物的有利免疫应答,抑制或治疗感染。

[0152] 本发明的第三目标组包括肥胖的人、和/或诊断患有2型糖尿病的瘦或肥胖的人。他们摄入一种或多种HMO将刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并使胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍),结果,改善肠道通透性和/或增加胰岛素敏感性,从而减轻2型糖尿病和/或肥胖症的病理状况。

[0153] 本发明的第四目标组包括诊断患有肠炎和相关疾病如IBD和IBS的人。他们摄入一种或多种HMO将刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并使胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍),结果,通过诱导抗炎免疫应答而有助于免疫调节,从而改善症状。

[0154] 胃肠道病况优选是肠道疾病或肠易激综合症。

[0155] 本发明的第五目标组包括诊断为食物不耐受/敏感性的人。他们摄入一种或多种HMO将刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并使胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍),结果,有助于免疫调节和改善肠屏障性能,从而改善症状。

[0156] 本发明的第六目标组包括患有肠脑疾病,例如压力、焦虑或抑郁样行为或孤独症的人。他们摄入一种或多种HMO会刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,并使胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至高达100-1000%(即2-11倍),从而改善症状。

[0157] HMO可以如下施用于人:

[0158] (a) 在第一步中进行多达约14天:

[0159] 第一用量的人乳寡糖或包含第一用量的人乳寡糖的合成组合物,以将人胃肠道中阿克曼氏菌的丰度提高至与开始施用前的阿克曼氏菌丰度相比高达100%或更高的水平,比如,高200-500%,并且

[0160] (b) 在第二步中进行额外的时间:

[0161] 第二用量的人乳寡糖或包含第二用量的人乳寡糖的合成组合物,以维持第一步后达到的人胃肠道中的阿克曼氏菌水平。

[0162] 为了刺激人胃肠道中阿克曼氏菌的生长,需要施用的HMO的量将根据以下因素而变化:比如肥胖、2型糖尿病、炎性胃肠道病况、食物不耐受/敏感性、肠脑病症或肠道致病性感染的风险和严重程度,年龄,组合物形式,以及正在施用的其它药物。然而,所需量可以由执业医师容易地设定,并且通常的范围为每天约10mg至约20g,在某些实施方式中为每天约10mg至约15g,每天约100mg至约10g,在某些实施方式中为每天约500mg至约10g,在某些实施方式中为每天约1g至约7.5g。适当的剂量可以基于几个因素确定,这些因素包括,例如体重和/或状态,2型糖尿病、炎性胃肠道病况或肠道致病性感染的严重程度,正在接受治疗或预防,其它轻微病变和/或疾病,副作用的发生率和/或严重程度以及给药方式。适当的剂量范围可通过本领域技术人员已知的方法来确定。在初始治疗阶段(第一步)中,剂量可以较高(例如每天200mg至20g,优选每天500mg至15g,更优选每天1g至10g,在某些实施方式中为每天2.5g至7.5g)。在维持阶段(第二步)期间,剂量可以减少(例如,每天10mg至10g,优选每天100mg至7.5g,更优选每天500mg至5g,在某些实施方式中为每天1g至2.5g)。

[0163] 尽管已经参照优选实施方式描述本发明,但是应当理解,在本发明的范围内可以进行各种修改。

[0164] 实施例

[0165] 本文描述的工作实施例仅用于说明目的,不应视为限制性的。

[0166] 实施例1

[0167] 总共招募100位男性和女性健康成年人参与研究。在筛选访问和1-2周的磨合期后,选择参与者并将其随机分为十组,每组十位受试者。一组施用含2克葡萄糖的安慰剂产品。其余的9组分别施用包含以下的治疗产品:a) 20g 2'-FL,b) 10g 2'-FL,c) 5g 2'-FL,d) 20g LNnT,e) 10g LNnT,f) 5g LNnT,g) 20g 2'-FL和LNnT的2:1混合物,h) 10g 2'-FL和LNnT的2:1混合物(按重量计),和i) 5g 2'-FL和LNnT的2:1混合物(按重量计),持续4周。安慰剂和治疗产品以粉末形式存在于单位剂量容器中。

[0168] 健康成年人如果年龄在18-60岁之间,则有资格参与。所有招募的参与者都能够并且愿意理解并遵守研究程序。如果有以下情况,则排除参与者:他们在筛选访问之前一个月参加了一项临床研究;他们在筛查测试中具有异常结果,这些结果与研究参与临床相关;他们患有严重的疾病,比如恶性肿瘤、糖尿病、严重的冠状动脉疾病、肾脏疾病、神经系统疾病、或严重的精神疾病或任何可能混淆研究结果的疾病;在研究前3个月使用高剂量的益生菌补充剂(允许使用酸奶);他们在研究前6个月服用抗生素药物;他们在研究前2周定期服用可能干扰症状评估的任何药物;以及正在怀孕或哺乳。

[0169] 在筛查访问时,将登记病史和伴随用药,并收集用于安全性分析的血液样本。分发粪便样本试剂盒。指导参与者将其样本保存在冰箱中,直到下次访问为止。

[0170] 在第二次访问时,检查资格标准,并在试验中将符合条件的受试者随机分为十组(治疗组和安慰剂组)。收集粪便样本并分发用于新样本的装置。参与者熟悉每天记录数据的交互式互联网功能系统,并向其提供治疗或对照产品。提醒受试者在研究期间不要改变其日常饮食。收集血液样本用于生物标志物研究。粪便样本在-80℃下保存直至分析。

[0171] 该研究进行2周,参与者每天服用安慰剂或治疗产品。指导参与者在早上随早餐服用产品。通过交互式互联网功能系统监视依从性。

[0172] 参与者还使用该系统记录:

[0173] Bristol粪便形态量表 (BSFS) 信息。

[0174] 症状信息,比如腹痛、腹部不适、腹部绞痛、腹胀和腹饱胀感。

[0175] 其它胃肠道症状分级量表 (GSRS) 信息。

[0176] 该问卷包括15个项目,涵盖五个方面(腹痛、消化不良、反流、腹泻、便秘),并使用七级李克特 (Likert) 量表。

[0177] 2周后,每位参与者都与医疗团队进行访问。收集粪便样本和血液样本。粪便样本在-80℃下保存直至分析。分发用于新样本的装置。提醒受试者在研究期间不要改变其日常饮食。

[0178] 在电化学发光平台上以多重形式同时分析血液样本。在小组中包括以下分析物: BUN、LDL胆固醇、HDL胆固醇、铁、甘油三酯、ApoA1、ApoB、胰岛素、FFA、胰高血糖素、IL-10、IL-6和TNF- $\alpha$ 。

[0179] 为了评估微生物群特征,使用96孔PowerSoil DNA分离试剂盒 (MO-BIO) 从粪便样本中提取DNA。每个板中最少要留空一个样本孔,以在PCR期间用作阴性对照。使用连接有Illumina衔接子的正向引物S-D-Bact-0341-b-S-17和反向引物S-D-Bact-0785-a-A-21进行PCR (Klindworth等, Nucleic Acids Res. 41, e1 (2013))。这些是针对V3-V4区的通用细菌16S rDNA引物。使用以下PCR程序: 98℃ 30s, 25x (98℃ 10s, 55℃ 20s, 72℃ 20s), 72℃ 5min。通过将产物在1%琼脂糖凝胶上电泳来验证扩增。使用Nextera Index试剂盒V2 (Illumina) 通过以下PCR程序在巢式PCR中添加条形码: 98℃ 30s, 8x (98℃ 10s, 55℃ 20s, 72℃ 20s), 72℃ 5min。通过将产物在1%琼脂糖凝胶上电泳来验证引物的附着。使用SequalPrep标准化板试剂盒对来自巢式PCR的产物进行标准化并合并。通过蒸发将合并的文库浓缩,并使用Qubit高灵敏度测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 在Qubit荧光计上测量合并的文库的DNA浓度。使用MiSeq试剂盒V3 (Illumina) 在MiSeq桌面测序仪上进行测序,以进行2x 300bp配对末端测序。USEARCH的64位版本用于序列数据的生物信息学分析。

[0180] 如图1所示,微生物群落分析的结果表明,服用HMO时,阿克曼氏菌的丰度增加,而在安慰剂组中,阿克曼氏菌的丰度保持不变(数值计算为与t=0值相比的百分比变化)。这意味着口服摄取HMO显然会增加健康成年人肠道菌群中阿克曼氏菌的丰度。

#### [0181] 实施例2

[0182] 在M-TripleSHIME™体外胃肠道模型 (Prodigest) 中研究HMO对微生物群的影响。M-TripleSHIME™的典型反应器设置由一系列模拟人胃肠道不同部分的四个反应器组成。前两个反应器采用填充-抽出原理,可模拟食物摄取和消化的不同步骤,使用蠕动泵添加一定量的SHIME进料 (140ml 3x/天) 和胰胆汁液 (60ml 3x/天),分别排至胃和小肠室,并在指定间隔后排空各自的反应器。最后两个腔室是具有恒定体积和pH控制的连续搅拌反应器。不同容器的保留时间和pH选择为类似于结肠不同部位的体内条件。近端结肠设定为pH 5.4-5.6,保留时间=12h,远端结肠设定为pH 6.0-6.5,保留时间=20h。将2'-FL、LNnT或者质量比为4:1的2'-FL和LNnT的混合物添加至SHIME进料中,其浓度等于每天10克。

[0183] 接种粪便微生物群后,这些反应器模拟近端结肠、横结肠和远端结肠。在结肠不同区域的微生物群落适应两周后,在三个结肠腔室中建立一个代表性的微生物群落,其不同结肠区域的组成和功能均不同。

[0184] 此外,在模拟结肠的反应器中包括猪粘蛋白,以考虑粘液层的定殖。因此,M-

TripleSHIME™允许在数周的时间内培养与肠腔和粘液相关的微生物群落。

[0185] M-TripleSHIME™分为四个阶段运行：

[0186] 1. 稳定化：用取自健康成年人的新鲜粪便样本接种反应器后，两周的稳定期使微生物群落可以根据局部环境条件在不同的反应器中分化。在此期间，提供基本营养基质以支持最初存在于粪便接种物中的肠道微生物群的最大多样性。

[0187] 2. 对照：在这两周的时间内，将标准营养基质注入模型中，持续14天。不同反应器中的基线微生物群落组成和活性通过分析样本确定，并将其用作参考。

[0188] 3. 处理：SHIME系统在正常条件下运行3周，但在标准营养基质中补充有HMO。测试的HMO是2'-FL、LNnT以及2'-FL和LNnT的4:1混合物。

[0189] 4. 冲洗：在这两周的时间内，仅使用标准营养基质运行SHIME系统。

[0190] 定期收集每个反应器中的液体样本，并使用16S rRNA测序分析微生物代谢产物和驻留微生物群落的组成。

[0191] 发酵系统的结果表明，HMO影响碱酸的消耗，这意味着HMO在近端结肠以及在较小程度上在远端结肠中均会发酵。细菌代谢物分析表明，HMO处理诱导两个结肠区域的总SCFA立即增加，主要是由于乙酸盐和丙酸盐的产生增加。在HMO处理的第三周，丁酸盐增加。

[0192] 对微生物群落的分析表明，在治疗的3周期间，结肠区域远端部分的阿克曼氏菌丰度增加。实际上，在近端部分没有发生这种变化。图2示出处理期间远端部分阿克曼氏菌丰度的变化（值计算为与对照时期相比的百分比变化）。

[0193] 可以看出，向M-TripleSHIME™中进料HMO影响SCFA的产生，处理使结肠区域的远端部分中阿克曼氏菌的丰度增加。

[0194] 实施例3

[0195] 将HMO 2'-FL和LNnT以4:1的质量比引入旋转混合器。将0.25质量%的硬脂酸镁引入到混合器中，并且将混合物混合10分钟。然后将混合物在流化床中附聚，并装入5克棒状封装物，并将封装物密封。

## 阿克曼氏菌

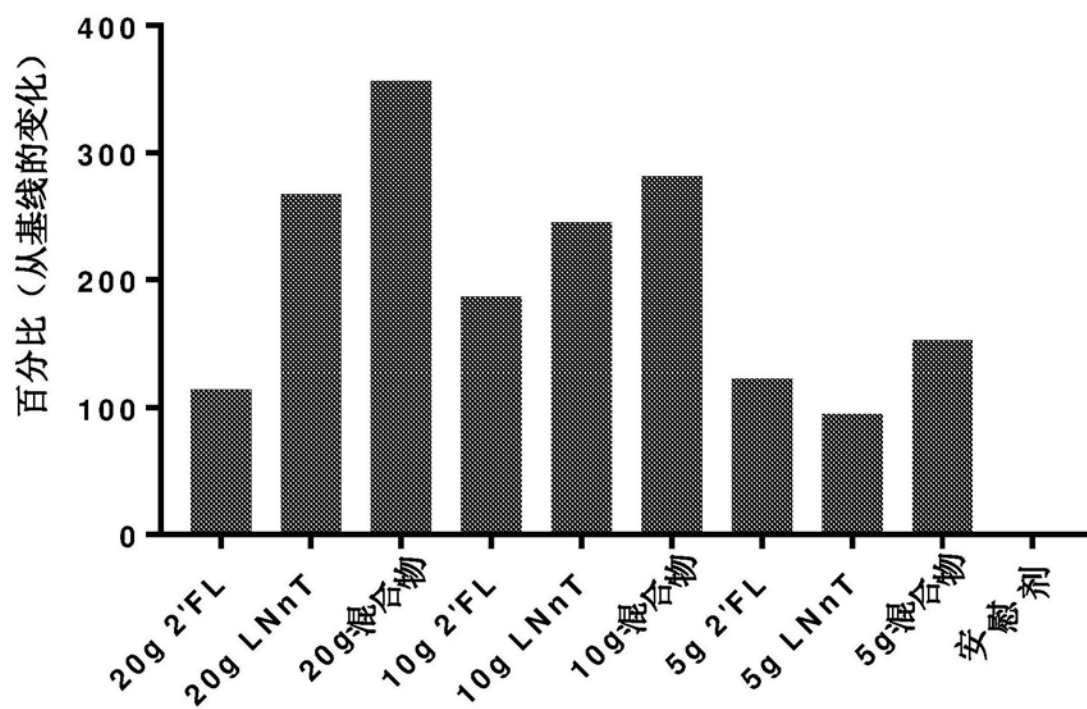


图1

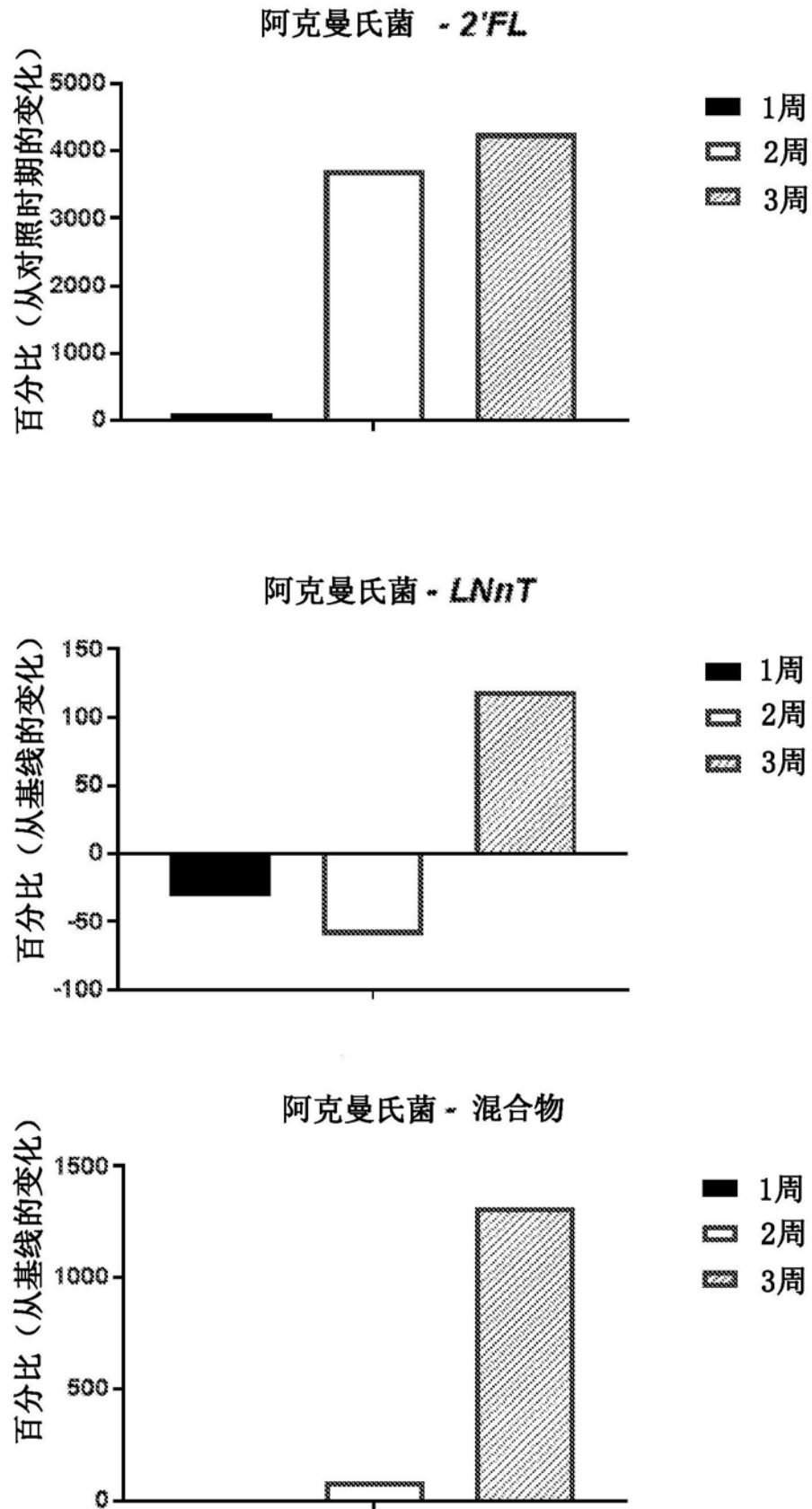


图2