

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A61K 35/74

C12N 1/20 A23L 1/29

A23C 9/152

/(C12N1/20,C12R

1: 225)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00807401.1

[43]公开日 2002 年 5 月 22 日

[11]公开号 CN 1350461A

[22]申请日 2000.3.2 [21]申请号 00807401.1

[30]优先权

[32]1999.3.11 [33]EP [31]99104922.2

[86]国际申请 PCT/EP00/01795 2000.3.2

[87]国际公布 WO00/53200 英 2000.9.14

[85]进入国家阶段日期 2001.11.9

[71]申请人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72]发明人 J·-R·尼斯 R·雷尼洛

A·塞尔万

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张广育 刘 玥

权利要求书 1 页 说明书 14 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 预防腹泻病原菌的乳杆菌菌株

[57]摘要

本发明涉及乳杆菌属的新微生物,它们可用于预防病原菌导致的腹 泻。具体而言,本发明涉及使用该微生物制备可摄食的支持物和含有该 支持物的组合物。

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

权 利 要 求 书

1. 属于乳杆菌属具有防止引起腹泻的病原菌在肠道定居能力的乳酸菌菌株。

2. 权利要求 1 的乳杆菌菌株，它能够附着在宿主有机体的肠道粘
5 膜上。

3. 前述任一权利要求的乳杆菌菌株，它能在高达 0.4%胆汁盐存在时生长。

4. 前述任一权利要求的乳杆菌菌株，它选自鼠李糖乳杆菌或类干酪乳杆菌。

10 5. 权利要求 4 的乳杆菌菌株，它是类干酪乳杆菌。

6. 权利要求 5 的乳杆菌菌株，它是类干酪乳杆菌 CNCM I-2116 (NCC 2461)。

7. 前述任一权利要求的乳杆菌菌株用于制备可摄入的支持物材料的用途。

15 8. 权利要求 7 的用途，其中在支持物材料中含有的乳杆菌菌株量为约 10^5 cfu/g 到约 10^{12} cfu/g 支持物材料。

9. 权利要求 1 到 6 任一项的乳杆菌菌株培养物的上清用于制备可摄入的支持物的用途。

10. 权利要求 7 到 9 任一项的用途，其中支持物材料是选自牛奶、
20 酸奶、凝乳、发酵牛奶、牛奶基发酵产品、冰激凌、发酵谷物基产品、牛奶基粉末、婴儿配方食品的食品组合物。

11. 权利要求 7 到 10 任一项的用途，其中支持物材料用来治疗和/或预防与腹泻有关的疾病。

12. 含有至少一种权利要求 1 到 6 任一项的乳杆菌菌株或其培养物
25 上清的食品或药物组合物。

13. 权利要求 12 的组合物，它选自牛奶、酸奶、凝乳、乳酪、发酵牛奶、牛奶基发酵产品、冰激凌、发酵谷物基产品、牛奶基粉末、婴儿配方食品、丸剂、液体细菌悬液、干的口服补剂、湿的口服补剂、干的管饲产品或湿的管饲产品。

说明书

预防腹泻病原菌的乳杆菌菌株

5 本发明涉及乳杆菌属的新微生物，它们可用于预防病原菌引起的腹泻。具体而言，本发明涉及使用该微生物制备可摄食的支持物和含有该支持物的组合物。

10 产生乳酸作为主要代谢成分的生物早已为人所知。这些细菌分别可见于牛奶和牛奶加工厂、活的或腐烂的植物，也存在于人和动物的肠道中。这些微生物统称为“乳酸细菌”，它们代表了非同质性的组群，包括例如乳球菌属、乳杆菌属、链球菌属、双歧杆菌属，片球菌属等。

乳酸细菌已被用作保存食物的发酵剂，这利用了其低 pH 和在发酵活动中产生的发酵产物的作用来抑制腐败细菌的生长。为此，乳酸细菌已被用来制备多种不同的食品，如乳酪、酸奶和其他牛奶发酵制品。

15 最近，乳酸细菌引起广泛关注是因为发现某些菌株在摄入后对人和动物具有有利作用。具体而言，已经发现乳杆菌属或双歧杆菌属的特定菌株能够在肠粘膜上定居，帮助维持人和动物的健康。

20 在这方面，EP 0 768 375 公开了双歧杆菌属的特定菌株，它们可以植入肠道菌群，也可以附着肠细胞。据报道，这些双歧杆菌帮助免疫调节，能够竞争性排斥病原菌对肠道细胞的附着，从而有助于维持个体健康。

25 最近几年，研究集中在乳酸细菌作为益生剂 (probiotic agent) 的潜在用途。益生菌是活的微生物制品，它通过保存肠道内的天然菌群促进个体健康。只要微生物制品的有效微生物和其作用方式是已知的，该微生物制品通常被认为是益生菌。人们认为，益生菌附着在肠道粘膜上，定居在肠道内，同样防止有害微生物附着于肠粘膜上。其作用的一个重要前提是它们必须以合适和活的形式到达肠道粘膜，而不会在胃肠道前部被破坏，特别是在胃中低 pH 的影响下。

30 在这方面，WO 97/00078 公开了一种称为乳杆菌 GG (ATCC 53103) 的特异菌株，它是益生菌。该微生物特别是用在防止或治疗食物引起的过敏反应的方法中，它与已经用胃蛋白酶和/或胰蛋白酶水解处理过的食物一起给予服用者。选用的乳杆菌菌株据称具有附着和定居特性，具有蛋白酶系统，因此，食物中含有的蛋白质被该特异性乳杆菌菌株分泌

的蛋白酶进一步降解。该文献中讨论的方法最终导致蛋白质原料被肠道吸收，不再有明显的过敏物质。

并且，EP 0 577 903 提及使用具有取代幽门螺杆菌能力的乳酸菌制备用于治疗或预防由幽门螺杆菌引起的溃疡的支持物，幽门螺杆菌被认为是导致溃疡的病因。

了解到乳酸菌的某些菌株可能提供的有利特性，本领域希望获得其他对人和/或动物的健康有益的乳酸菌。

因此，本发明意欲提供对人和/或动物具有新的有益特性的细菌菌株。

10 通过提供新的微生物，即属于乳杆菌属具有防止腹泻病原菌定居于肠道能力的乳酸细菌，实现了本发明的目的。

根据优选实施方案，乳杆菌菌株可以附着在哺乳动物肠粘膜上，可以在 0.4% 的胆汁盐存在时生长。

然而，根据另一个优选实施方案，乳酸菌选自鼠李糖乳杆菌或类干酪乳杆菌，优选类干酪乳杆菌，更优选类干酪乳杆菌 CNCM I-2116。

已经证实，本发明的微生物尤其显示下列特性：它们是革兰氏阳性，触酶阴性， NH_3 形成精氨酸阴性，二氧化碳产生阴性，它们产生 L(+) 乳酸，能够在胆汁盐浓度达约 0.4% 时生长，可以基本上防止导致腹泻的细菌定居于肠道细胞，导致腹泻的细菌如致肠炎大肠杆菌等病原性大肠杆菌或鼠伤寒沙门氏菌等沙门氏菌。

25 新微生物可以用来制备多种可摄食的支持物材料，如牛奶、酸奶、凝乳、发酵牛奶、牛奶基发酵产品、发酵谷物基产品、牛奶基粉末、婴儿配方食品，在支持物中的含量可以为约 10^5 cfu/g 到约 10^{11} cfu/g。在本发明中，cfu 代表菌落形成单位，其定义是通过在琼脂平板上的微生物计数获得的细菌细胞数量。

本发明也提供含有至少一种具有上述特性的乳杆菌菌株和/或含有微生物已在其中生长的培养物上清或其一个级分的食品或药物组合物。

30 为了制备本发明的食品组合物，至少一种本发明的乳杆菌菌株被包含在合适的支持物中，含量为约 10^5 cfu/g 到约 10^{11} cfu/g，优选约 10^6 cfu/g 到约 10^{10} cfu/g，更优选约 10^7 cfu/g 到约 10^9 cfu/g。

在制备药物时，产品可以制备成丸剂、液体细菌悬液、干的口服补

剂、湿的口服补剂、干的管饲产品或湿的管饲产品，加入的乳杆菌菌株的量为约 10^{12} cfu/g，优选约 10^7 cfu/g 到约 10^{11} cfu/g，更优选约 10^7 cfu/g 到约 10^{10} cfu/g。

5 新微生物在个体肠道中的活性通常是剂量依赖的。即，通过摄入上述食品原料或药物组合物导入的新微生物越多，微生物的保护和/或治疗活性越高。因为新微生物对人和动物没有害处，已从婴儿的粪便中分离出了该微生物，可以大量导入该微生物，使得个体肠道的大部分都被该新微生物定居。

10 但是，根据另一个优选实施方案，本发明的乳杆菌培养物上清可以用来制备一种上述可摄入支持物。上清可以原样使用，或者在不会破坏微生物分泌到液体培养基中的代谢化合物的条件下干燥，如冻干，可以包含在载体中。为了减少上清中未知化合物的数量，乳杆菌菌株优选生长在成分明确且不会对生长的宿主有不利影响的培养基中。并且，本领域技术人员根据其一般知识，可以排除上清中的不想要的产物，如通过
15 层析。

附图说明：

图 1 显示细胞培养试验的结果，其中培养的 ST11 细胞用于抑制病原性大肠杆菌对上皮细胞的附着的试验中。

20 图 2 显示细胞培养试验的结果，其中 ST11 培养物上清用于抑制病原性大肠杆菌对上皮细胞的附着的试验中。

图 3 显示细胞培养试验的结果，其中培养的 ST11 细胞用于抑制鼠伤寒沙门氏菌对上皮细胞的侵袭的试验中。

图 4 显示细胞培养试验的结果，其中 ST11 培养物上清用于抑制鼠伤寒沙门氏菌对上皮细胞的侵袭的试验中。

25 图 5 显示乳酪乳杆菌菌株 CNCMI-2116 (ST11) 在不同生长培养基中的酸化。

图 6 显示乳酪乳杆菌菌株 ST11 在 10° 测定的 30 天存活率。

图 7 显示源自骨髓的小鼠附着细胞与系列稀释的 ST11 温育后，其中的 IL-12 和 IL-10 mRNA 图谱。

30 图 8 显示由于 IL-4 的产生减少导致的 Th2 分化的结果。

在实现本发明的广泛研究过程中，发明人研究了婴儿粪便，从其中分离了多种不同细菌菌株。随后考察了这些菌株防止已知会引起腹泻的

细菌对上皮细胞的定居的能力。

筛选了包括乳杆菌属、乳球菌属和链球菌属的几个细菌属的腹泻抑制特性。抑制试验基本上以病原性大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌作为在个体中引起腹泻的病原微生物的代表来进行。

- 5 多种乳酸菌在合适的培养基如 MRS、Hugo-Jago 或 M17 培养基中在约 30 到 40°C 的温度（相应于其最佳生长温度）下生长。达到静止生长后，离心收集细菌，重悬于生理盐水溶液。不同试验之间，细菌细胞冰冻保存（-20°C）。

为了评价抗细菌特性，选择了下列方法。

- 10 一种方法是，分别考察本发明培养的乳杆菌属菌株防止引起腹泻的病原菌附着于肠道细胞或侵入肠道细胞。为此，肠道细胞与病原菌和本发明培养的乳杆菌属菌株接触，分别评价附着率或侵入率。

第二种方法是，本发明的乳杆菌属菌株的细胞培养物上清与病原微生物一起加入肠道细胞，分别评价附着率或侵入率。

- 15 因此，结果显示培养的乳杆菌和上清对防止对肠道细胞的附着和侵入都极其有效，这表明新微生物分泌的代谢化合物可能与抗腹泻活性有关。

除了上述发现，还发现本发明的菌株出人意料地也表现出抗过敏特性，所述菌株对不同免疫介体的合成有影响。

- 20 通常认为，体液免疫应答和过敏反应是由具有 2 型表型（Th2）的 CD4+ T 细胞介导的。Th2 细胞的特征在于产生高水平白介素 4（IL-4），这种细胞因子对 IgE 的分泌是必需的，而 IgE 是参与过敏反应的主要抗体类别。

- 25 Th2 细胞的分化为 IFN- γ 抑制，后者是由互斥的 Th1 亚类 CD4+ T 细胞产生的。所述 Th1 细胞又受白介素 12（IL-12）的强烈诱导。与此相对，另一种细胞因子 IL-10 已被证实对 Th1 细胞的增殖具有强烈的抑制作用，因此被认为在免疫抑制机制中发挥作用。

- 30 总之，IL-12 和 IL-10 通过影响 Th1 亚类的发育都对 CD4+ T 细胞的发育具有强烈的调节作用。IL-12 是诱导 Th1 分化的关键调节细胞因子，从而抑制 Th2 应答的产生。因此，抑制 Th2 细胞的主要途径见于辅助细胞对 IL-12 合成的刺激。

众所周知，革兰氏阴性细菌的某些成分如 LPS 在附着细胞如巨噬

细胞和树突细胞中诱导高水平 IL - 12。因此，现已发现革兰氏阴性细菌可以强烈促进 CD4+ T 细胞向 Th1 表型的分化。

微生物 ST11 作为本发明乳杆菌属菌株的实例，已经测试了其在诱导参与调控 CD4+ T 细胞分化的细胞因子中的可能作用。具体而言，已经研究了 ST11 对经历 Th2 分化的 CD4+ T 细胞表型的作用。

为此，ST11 诱导源自骨髓的小鼠附着细胞中编码这两种调节细胞因子的 mRNA 合成的能力与其他四株乳杆菌菌株和革兰氏阴性细菌对照（大肠杆菌 K12）进行了比较。细胞与 10^7 到 10^9 cfu/ml 系列稀释的细菌温育 6 小时后，通过半定量 RT - PCR 测定 mRNA。

10 尽管所有乳杆菌菌株都可以诱导 IL - 12 mRNA 一定程度的转录，但 ST11 是最强的诱导者，因为，即使在最低细菌剂量下，也可检测到强 PCR 信号。实际上，ST11 诱导 IL - 12 mRNA 转录的能力同大肠杆菌一样强。IL - 10 mRNA 的诱导一般弱于 IL - 12 mRNA，只有在较高的细菌剂量下才可检测到信号。但是，与其他乳杆菌菌株和大肠杆菌对照相比，ST11 仍是 IL - 10 的最强诱导者。

因此，ST11 被认为可以有效地诱导参与 CD4+ T 细胞分化的免疫调节细胞因子。其诱导 IL - 12 的能力强使其成为抑制 Th2 应答的候选者，其明显的 IL - 10 诱导能力防止了炎症应答。

除了上述发现之外，也确定了 ST11 是否对经历 Th2 分化的 CD4+ T 20 细胞具有抑制作用，对 Th1 功能具有正效应。使用了成熟的细胞分化培养系统，其中前体 CD4+ T 细胞经多克隆活化和调节经历 Th1 或 Th2 分化，具体取决于在培养基中提供的共刺激因素的类型。Th1/Th2 分化在 7 天的原代培养期间诱导，然后细胞在仅含培养基的继代培养中再刺激 2 天，通过测定上清中产生的细胞因子类型（IFN - γ vs. IL - 4）评价特异表型（Th1 或 Th2）。25

众所周知，源自 BALB/c 背景的小鼠的前体 CD4+ T 细胞在中性条件（第一代培养物中只有培养基）下激活后优先向优势 Th2 表型分化（在第二代培养上清中 IL - 4 高 IFN - γ 低）。这种表型在第一代培养物中加入针对 IL - 4 的封闭单克隆抗体后可以完全逆转到 Th1 表型（高 30 IFN - γ 低 IL - 4）。

为了研究 ST11 对 Th2 抑制的可能作用，来自 BALB/c 小鼠的纯化前体 CD4+ T 细胞在第一代培养时在存在骨髓附着细胞作为辅助细胞

的情况下激活。这些细胞在仅有培养基时或在存在 1 mg/ml LPS 或 10^8 cfu/ml ST11 或 10^8 cfu/ml 其他乳杆菌时共培养。此时，洗涤细胞，再次纯化 CD4⁺ T，在仅有培养基的第二代培养中再刺激。

分化 CD4⁺ T 细胞产生的细胞因子在 2 天后测定。不出所料，在仅有培养基存在时分化的细胞显示主要是 Th2 表型。加入 ST11 至第一代培养中强烈地调节 Th2 分化的结果，因为它导致 IL-4 的产生减少了 8 倍。抑制的幅度类似于在存在 LPS 时分化的细胞培养物中观察到的结果。与此相对，其他乳杆菌菌株对 IL-4 水平没有明显可见的作用。有趣的是，IFN- γ 水平在第一代培养中加入 ST11 时没有增加。

总之，ST11 特异性阻止经历 Th2 分化的 CD4⁺ T 细胞产生 IL-4，但并不显著增加 IFN- γ 的分泌。ST11 不增加 IFN- γ 产生可能是由于其诱导 IL-10 的能力，因此尽管其具有抗 Th2 活性，但它保持了低炎症效应。

因此，结果显示，ST11 是一种具有良好抗 Th2 谱的乳杆菌菌株，这使其成为具有抗过敏的益生活性的细菌的优秀候选者。

以下通过实施例介绍本发明，但本发明不限于此。

培养基和溶液：

MRS (Difco)

Hugo-Jago (胰胨 30 g/l (Difco)，酵母提取物 10 g/l (Difco)，乳糖 5 g/l (Difco)，磷酸二氢钾 6 g/l，牛肉提取物 2 g/l (Difco)，琼脂 2 g/l (Difco))

M17 (Difco)

DMEM (Dulbecco 改良 Eagle 培养基)

CFA (Ghost et al, 临床微生物学杂志, 1993 31 2163 - 6)

Muller Hinton 琼脂 (Oxoid)

LB (Luria Bertami, Maniatis, 实验室指南, Cold Spring Harbor, 1992)

抗生素获自 Sigma

C¹⁴ 乙酸盐 (53.4 Ci/mMol, Amersham International PLC)

PBS (氯化钠 8 g/l，氯化钾 0.2 g/l，磷酸氢二钠 1.15 g/l，磷酸二氢钾 0.2 g/l)

胰蛋白酶 - EDTA 溶液 (Seromed)

FCS 胎牛血清 (Gibco)

大肠杆菌 DAEC C 1845 获自西雅图的华盛顿大学, 大肠杆菌 JPN15 获自美国马里兰大学的疫苗开发中心。鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 获自美国加州斯坦福大学微生物学系。

5 实施例 1

由婴儿粪便中分离乳酸菌

由 16 名 15 到 27 日龄健康婴儿的尿布收集新鲜粪便。将 1g 新鲜粪便至于厌氧条件下转运至实验室, 取样后 2 小时进行微生物分析, 在 Ringer 溶液中系列稀释, 在选择培养基上铺平板。MRS 琼脂培养基加
10 抗生素 (phosphomycine 80 $\mu\text{g/ml}$, 磺胺甲恶唑 93 $\mu\text{g/ml}$, 甲氧苄啶 5 $\mu\text{g/ml}$) 37°C 温育 48 小时以分离乳酸菌。随机挑取菌落并纯化。对分离物进行生理和遗传鉴定。

实施例 2

培养 Caco-2 细胞

15 在抑制实验中, 细胞系 Caco-2 用作肠道模型。该细胞系具有肠道细胞的典型特征, 如极化、肠道酶的表达, 产生特定结构多肽等。

细胞生长在三种不同的支持物上, 即在塑料平皿 (25 cm^2 , Corning) 上生长和增殖, 在去脂和无菌的 6 孔玻璃平板 (22 $\times$ 22 mm, Corning) 上进行附着实验, 在 24 孔玻璃平板 (Corning) 上进行抑制实验。

20 培养 2 天后, 每日更换培养基 (DMEM)。在使用前, 培养基中加入 100 U/ml 青霉素/链霉素, 1 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin 和 20% 56°C 灭活 30 分钟的 FCS。在含有 90% 空气和 10% 二氧化碳的气氛中 37°C 培养。细胞每 6 天分裂一次。通过用 PBS 中的 0.25% 胰蛋白酶和 3 mM EDTA, pH7.2 处理使细胞同孔壁脱离。为了中和胰蛋白酶的作用, 向得到的细
25 胞悬液中加入等体积 FCS, 混合物离心 (1000 rpm 10 分钟), 将细胞沉淀再次置于培养物中。大约 3.5×10^5 细胞被转移到新的培养瓶中, 培养到细胞单层汇合。

实施例 3

培养细菌

30 ST11:

细菌菌株在含有 15% 甘油的 MRS 培养基中 -20°C 保存。菌株在厌氧条件下在 MRS 培养基中生长, 每隔 24 小时转移到新培养基中, 抑

制实验之前共转移两次。实验中使用 2×10^9 cfu/ml 的浓度。

20000rpm 离心 1 小时收集上清，然后检查所得上清中是否存在细菌。

大肠杆菌：

- 5 使用两种大肠杆菌菌株大肠杆菌 DAEC C1845（扩散附着大肠杆菌）和大肠杆菌 JPN15（EPEC：致肠病大肠杆菌）。

解冻后第一次传代在 CFA - Muller Hinton 琼脂上进行，该培养基适于细菌表达附着因子。

- 10 每次实验之前，细菌细胞在 37°C 温育，每隔 24 小时转移到新鲜培养基中，共转移两次。由于 JPN15 含有氨苄青霉素抗性基因，生长过程中使用该抗生素选择。

沙门氏菌：

鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 用于该实验，使用前将其生长于 LB 培养基中。

- 15 实施例 4

大肠杆菌抑制实验

两次传代到新鲜培养基中后，病原菌株用 $10 \mu\text{Ci/ml}$ C^{14} - 乙酸盐在 LB 培养基中标记。在该培养基中将菌株 37°C 温育 18 小时。

- 20 然后将细菌悬液离心（ $1041g$, 15min ），以除去上清中剩余的 C^{14} - 乙酸盐。细胞沉淀悬浮于 PBS 中洗涤，细胞悬液的浓度为约 10^8 细胞/ml，其中含有 1% 无菌甘露糖。抑制甘露糖抑制非特异性附着。

不同病原菌株（大肠杆菌）与 Caco-2 细胞单层接触（ 37°C , 10% 二氧化碳, 90% 空气）3 小时。使用上清（20000 rpm 离心 40 分钟得到）进行同样的实验。

- 25 作为对照，病原菌与 Caco-2 细胞单层接触，但分别不同时加入 ST11 或培养物上清。

- 30 温育 3 小时后，更换培养基，将单层用 PBS 洗涤 3 次。每一洗涤步骤包括 $20 \times$ PBS 溶液搅动，以便基本上除去所有非特异性附着。然后加入 1 毫升碳酸钠裂解细胞， 37°C 温育 40 分钟。匀浆后，取一试样（250 微升）在 5 毫升闪烁液（Hionicfluor Packcard）中稀释并计数（Packard 2000）。病原细胞对 Caco-2 细胞的附着百分比根据对照计算，对照设定为 100%（附着，或侵入见实施例 5）。

实施例 5

沙门氏菌抑制实验

沙门氏菌是侵入上皮细胞并在其中增殖的细菌。为了确定 ST11 的抑制活性，鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 如上所述在含有 C^{14} 乙酸盐的培养基中温育，如实施例 4 所述进行实验。

温育后，Caco-2 细胞用 PBS 洗涤，以便除去所有非附着细胞。然后将培养基加入到含有庆大霉素 ($20 \mu\text{g/ml}$)， 37°C 继续温育 1 小时。庆大霉素不会进入肠道细胞，因此，杀死所有细胞外微生物，而已经侵入肠道细胞内的沙门氏菌则存活下来。用 PBS 洗涤细胞两次后，细胞通过加入无菌蒸馏水裂解，如实施例 4 所述测定发射活性。

实施例 4 和 5 的结果见图 1 到 4。由结果可见，培养的 ST11 细胞和培养物上清在防止引起腹泻的微生物对肠道细胞的附着和侵袭方面非常有效。

实施例 6

ST11 的特性

ST11 已经经受了模拟胃液的温育。模拟胃液通过将胃蛋白酶 (3 g/l) 悬浮于无菌盐水 ($0.5\% \text{ w/v}$) 中并用浓盐酸调节 pH 为 2.0 到 3.0 来制备。ST11 在上述培养基中以不同量生长，微生物的抗性也被确定。

结果总结在下表 1 中。

表 1

pH	Cfu/ml, T0	Cfu/ml, T1	Cfu/ml, T15	Cfu/ml, T30	Cfu/ml, T60
2.0	2.0×10^9	1.8×10^9	1.2×10^9	3.7×10^8	7.0×10^3
3.0	2.0×10^9	1.9×10^9	1.7×10^9	1.7×10^9	8.4×10^8

ST11 具有根据 Ed. B.J.B. Wood 和 W.H. Holzapfel, Blackie A&P 在乳酸细菌属公开的方法限定的下列特性。

- 革兰氏阳性
- 触酶阴性
- 氨形成精氨酸阴性
- 二氧化碳产生阴性
- L(+)乳酸产生

- 在浓度高达约 0.4%的胆汁盐存在下生长

实施例 7

在不同条件下 ST11 的生长

- 5 ST11 在基于番茄的培养基（4% 番茄粉在蒸馏水中重配）中 37°C 培养不同时间，培养基中补加有蔗糖（0, 0.5, 1 或 2%）或大豆蛋白胨（0.5%）或葡萄糖（0.5%）。结果见图 5。

再将 2.5%的 ST11 加入由稻米淀粉（3%）、小麦淀粉（2%）或蔗糖（3%）组成的培养基中，37°C 温育直至 pH 达到 4.4。冷却后，加入
10 或不加入维生素 C 将产物包装，并储存在 10°C。

图 5 显示 ST11 在用不同塑料材料（HDPE 高密度聚乙烯，PS 聚苯乙烯）包装的谷物饮料中 10°C 存活数据。

实施例 8

ST11 诱导小鼠附着细胞中 IL-12 和 IL-10 mRNA 合成

- 15 由 8 周龄无病原菌 C57BL/6 小鼠股骨和胫骨分离骨髓细胞，并在 RPMI 培养基（Gibco）中以 2×10^6 细胞/毫升的浓度在 5% 二氧化碳气氛下 37°C 培养 12 小时，培养基中含有 10% 胎牛血清，1 mM L-谷氨酰胺，12 mM Hepes, 0.05 mM 2-巯基乙醇，100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素（所有试剂来自 Gibco）。非附着细胞通过用温热培养基 3 次连续
20 洗涤除去，收获留下的附着细胞，以 10^6 细胞/ml 的浓度在细菌存在或不存在时温育 6 小时。以前已经确定，6 小时是小鼠附着细胞响应于 LPS 合成细胞因子 mRNA 的最佳时间点。细菌以 10^9 到 10^7 cfu/ml 的不同浓度加入。细菌如前所述生长和保存。

- 6 小时培养期末，离心分离细胞，使用 TRIzol 试剂盒（GibcoBRL，
25 目录号 15596-018）按照厂商说明裂解细胞。通过异丙醇沉淀分离总 RNA，使用 200 单位逆转录酶（Superscript II, BRL）在 40 微升反应体积中 42°C 90 分钟将 RNA 逆转录成 cDNA，反应溶液中含有 200mM Tris pH8.3, 25 mM KCl, 1 μ g/ml 寡聚 d(T)₁₅(Boehringer Mannheim)和 40 U/ml Rnasin (Promega)。PCR 引物和条件如 Kopf 等所述（实验医学杂志，1996 Sep 1; 184(3):1127-36）。样品中 cDNA 的量使用管家基因（ β -2-微球蛋白）特异性引物校准。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上分离，
30 在紫外光下分析条带。

如图 7 所示, ST11 对 IL-12 和 IL-10 mRNA 显示最强烈的诱导作用, 与阳性对照(大肠杆菌)中观察到的水平相当。在最低细菌浓度下可以最清楚地看到差异。

实施例 9

5 通过 ST11 抑制 IL-4 合成

CD4⁺ T 细胞使用 Miltenyi Biotec (目录号 492-01) 的 MiniMACS 试剂盒从物特异病原菌的 BALB/c 小鼠脾脏纯化。CD4⁺ T 细胞以 2×10^5 细胞/ml 在 RPMI 培养基中培养, 培养基中含有 10% 胎牛血清, 1 mM L-谷氨酰胺, 12 mM Hepes, 0.05 mM 2-巯基乙醇, 100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 在一周期间通过与培养板结合的抗 CD3 (克隆 2C11) 和 CD28 (克隆 37.51) 单克隆抗体(两种抗体均来自 Pharmingen)交叉结合而被激活。在第一代培养中, CD4⁺ T 细胞与作为辅助细胞的骨髓附着细胞(如上分离)和 10^8 cfu/ml ST11 或 cfu/ml La1 或 1 mg/ml LPS 或仅培养基共同培养。此后, 洗涤细胞, 使用 MiniMACS 试剂盒再次纯化 CD4⁺ T 细胞, 在仅含培养基的第二代培养中再次刺激。分化 CD4⁺ T 细胞产生的细胞因子在 2 天后使用夹心 ELISA 在上清中测定(试剂盒来自 Endogen 和 Pharmingen)。

结果示于图 5。在仅含培养基时分化的细胞显示以高水平 IL-4 为特征的优势 Th2 表型。加入 ST11 至第一代培养物中强烈地调节 Th2 分化的结果, 因为它导致 IL-4 的产生降低 8 倍。这种抑制的幅度类似于来自在 LPS 存在时分化的细胞的培养物中观察到的结果。与此相对, 其他乳杆菌菌株对 IL-4 水平没有可检测的结果。有趣的是, IFN- γ 水平在第一代培养中加入 ST11 时没有增加。

由以上可见, 利用微生物的有利特性, 本发明的菌株可以制备成食品 and/或药物载体。

实施例 10

在 Guatemala 市郊的一个社区进行的临床试验中测试了 ST11 菌株影响该地区大部分儿童患过的急性雨季腹泻病的传递和发病的能力。本研究招募了总共 203 名 35 到 70 个月龄的儿童, 他们在 29 天的进食期间接受了 10^{10} 活微生物(ST11)或对照(安慰剂)。选择样品和安慰剂的儿童由于营养不良在重量-年龄和高度-年龄方面具有典型缺陷。

在学龄前儿童进食试验开始之前，进行了体外和体内安全性评价研究。体外研究显示了类似于食品中应用的其他乳杆菌的抗生素抗性特征，没有由于降解粘蛋白和解聚胆汁盐形成生物源氨的可能。在包括42个成年志愿者的安慰剂对照临床研究中，在监测的可能表型如肠胃气胀、每日排便次数和粪便稠度中，ST11耐受良好，没有诱发任何副作用；血清中急性期蛋白水平相对于可能的炎症反应没有出现任何值得关注之处。

样品和安慰剂在瑞士 Konolfingen 的 Nestle Product Technology Centre 制造厂包装成酏剂(sachet)，低温海运到 Guatemala。每10克酏剂由巧克力味赋形剂和0.2克ST11(10^{10} cfu)组成，安慰剂则是0.2克奶粉。巧克力味赋形剂由可可粉、糖、大豆卵磷脂、香草和肉桂组成。酏剂保存在4°C到6°C，使用前2小时取出。使用前，酏剂必需溶解在100毫升Nestle提供的水中，这种水中不含任何细菌污染。

根据应用的方法，腹泻定义为24小时期间排出3次或更多次液体或不定形粪便。腹泻事件定义为表现出腹泻特征（24小时腹泻排泄3次）的事件。其持续时间自3次指标粪便首次的时刻到首次出现成形粪便或24小时未排泄的时刻。对于儿童，前一事件终止后至少48小时才计算为新的事件。如果不是这样，则计算为同一事件的持续，使用总的持续事件来评价。一个病例是在29天的观察期内，经历了一次或多次有记录的事件的儿童。腹泻事件的强度根据产生的松散粪便总数评价。事件严重性的因素包括粪便中带血、粘液或脓，以及有发烧和呕吐症状。每24小时排便7次的强度或需要在诊所、健康中心或医院中由专业人员干预也被归入严重事件。

当预警系统监视腹泻事件时，取腹泻粪便的样品进行显微镜检查，并培养以鉴定该事件可能的病原体。检查样品中的轮状病毒抗原、贾第鞭毛虫和E. Histolytica，样品是痢疾，检查细菌病原体包括志贺氏菌、沙门氏菌、气单胞菌、类志贺邻单胞菌、大肠杆菌和可能的霍乱弧菌。

在研究期间，收集产物样品以检查施用期间包括的微生物的活力。可以证实，在整个研究期间，酏剂内微生物都是活的，所以研究结束时，酏剂用水重配时仍能提供 10^{10} 活微生物。

该研究揭示，与对照组（安慰剂）相比，含有益生微生物的样品可以降低腹泻的出现约30%。然而，相对于没有接受样品或安慰剂的正

常人群，对照组中腹泻的发生也降低了。后一发现可能部分归因于接受了额外的有价值营养和无污染的水的儿童。但是，由于该研究是在自然环境中进行的，很显然 ST11 可以减少体内腹泻的发生。

申请人或代理人档案号

国际申请号

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A. 对说明书第 <u>3</u> 页, 第 <u>25</u> 行所述的微生物的说明,	
B. 保藏事项 其他保藏在补充页中 <u>二</u>	
保藏单位名称 <u>国立微生物保藏中心</u>	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) <u>28, Rue du Cocteur Roux F-75724 Paris Cedex 15 法国</u>	
保藏日期 <u>1999年1月12日</u>	保藏编号 <u>NCC 2461 (I-2116)</u>
C. 补充说明(必要时) 本栏内容有补充页 <u>二</u>	
D. 本说明是为下列指定国作的(如果说明下是为所有指定国而作的)	
E. 补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

由受理局填写
<u>二</u> 本页已经和国际申请一起收到
受权官员

由国际局填写
<u>二</u> 国际局收到本页日期:
受权官员

说明书附图

与细菌培养物NCC2461接触期间
对肠毒性大肠杆菌附着的抑制

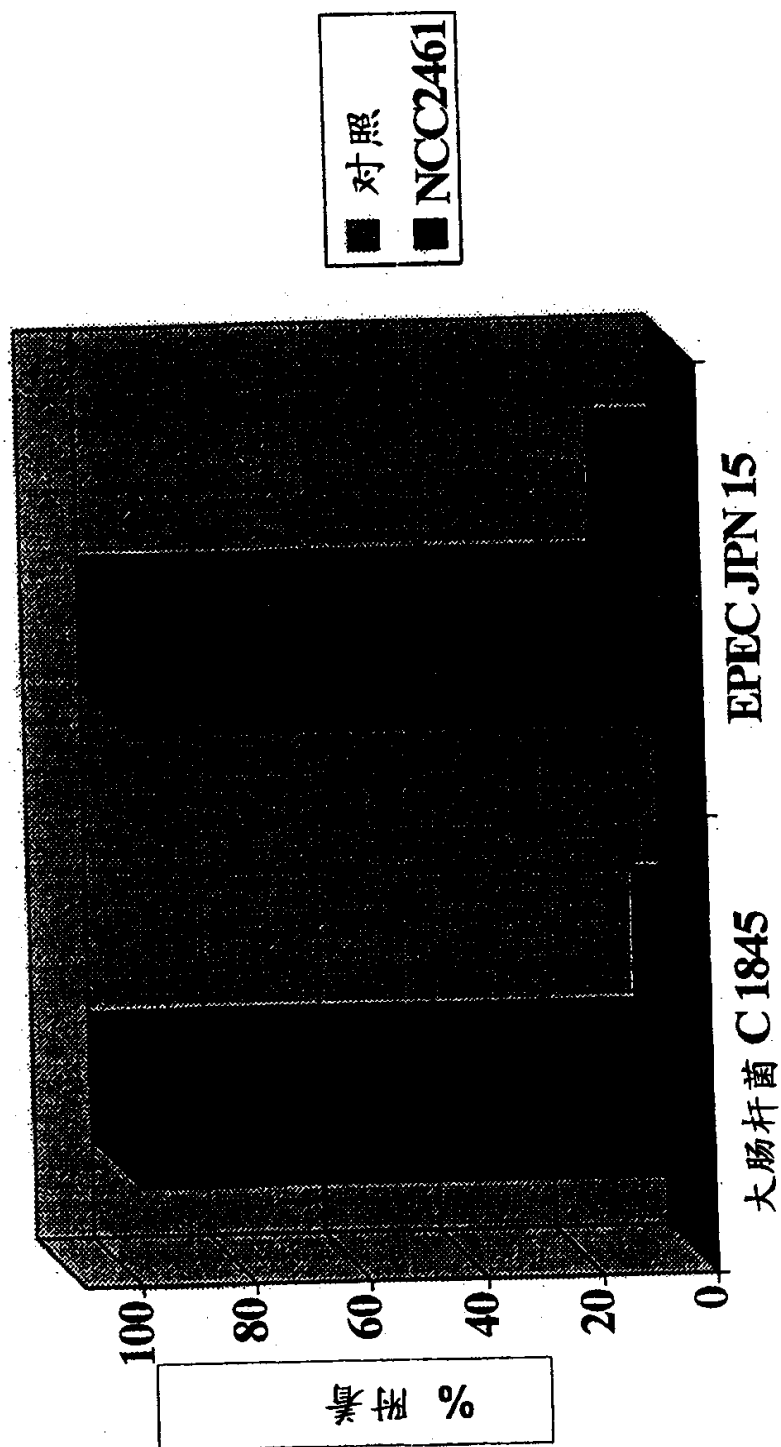


图 1

与NCC2461接触期间 对肠毒性大肠杆菌附着的抑制

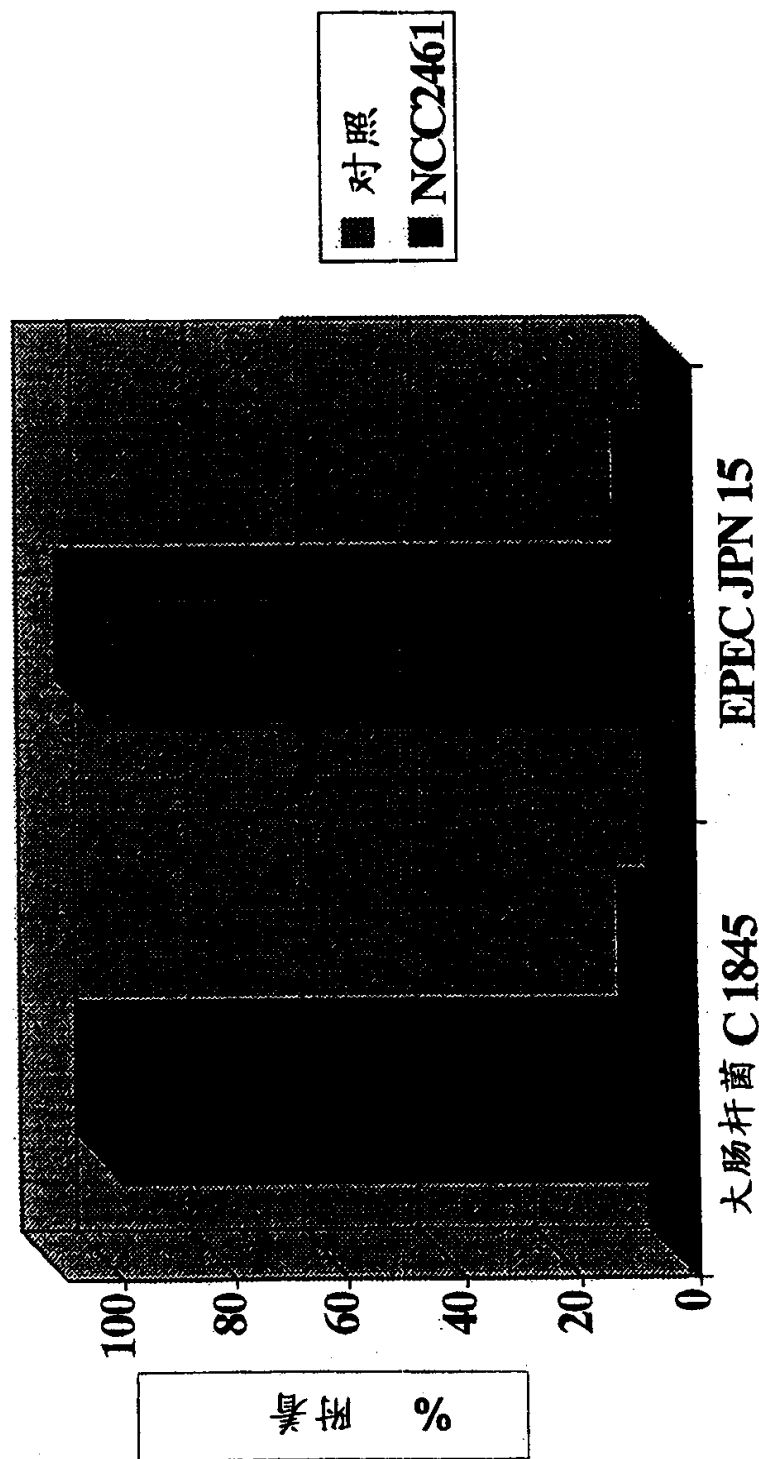


图 2

与细菌培养物NCC2461接触期间 对沙门氏菌侵袭的抑制

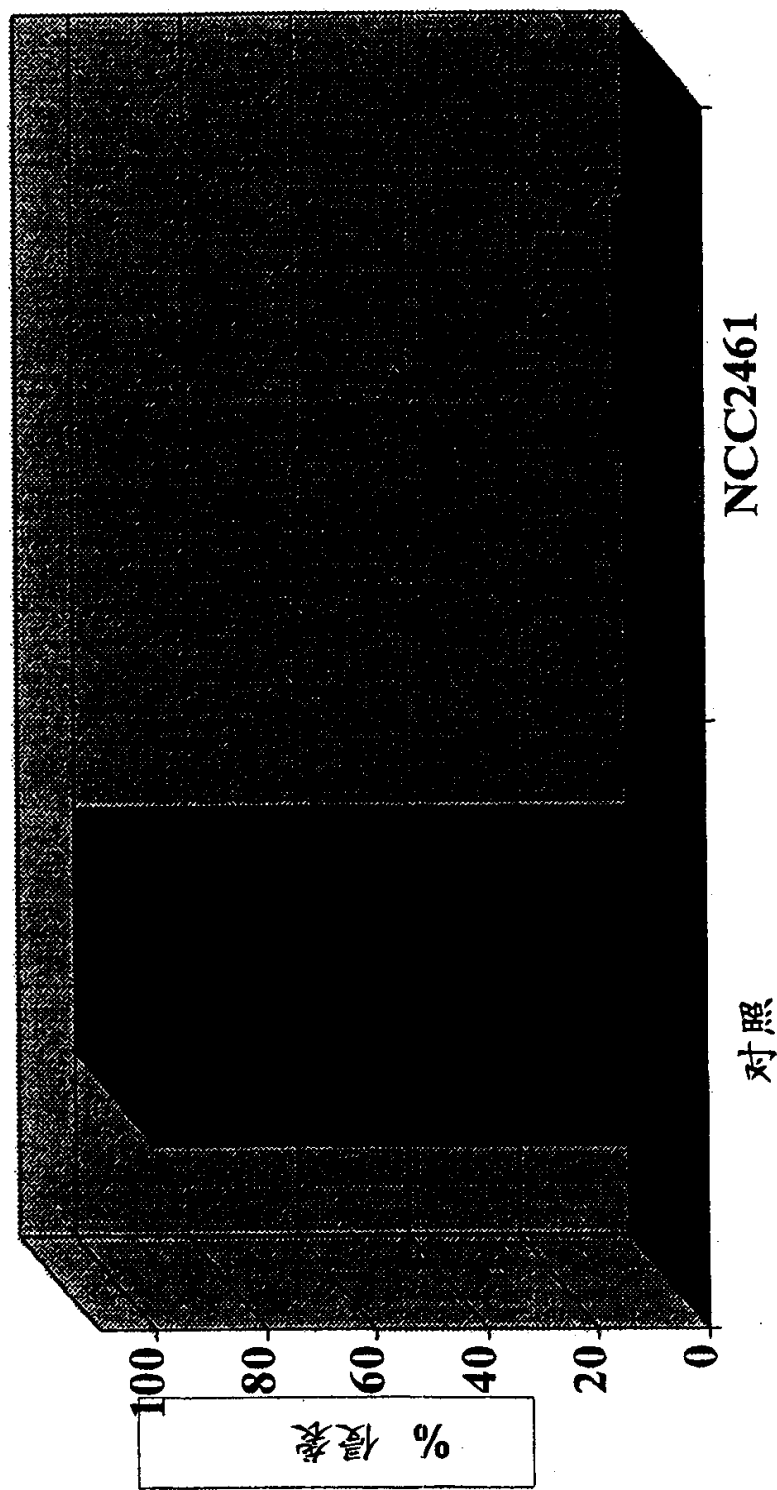


图 3

与NCC2461上清接触期间 对鼠伤寒沙门氏菌侵袭的抑制

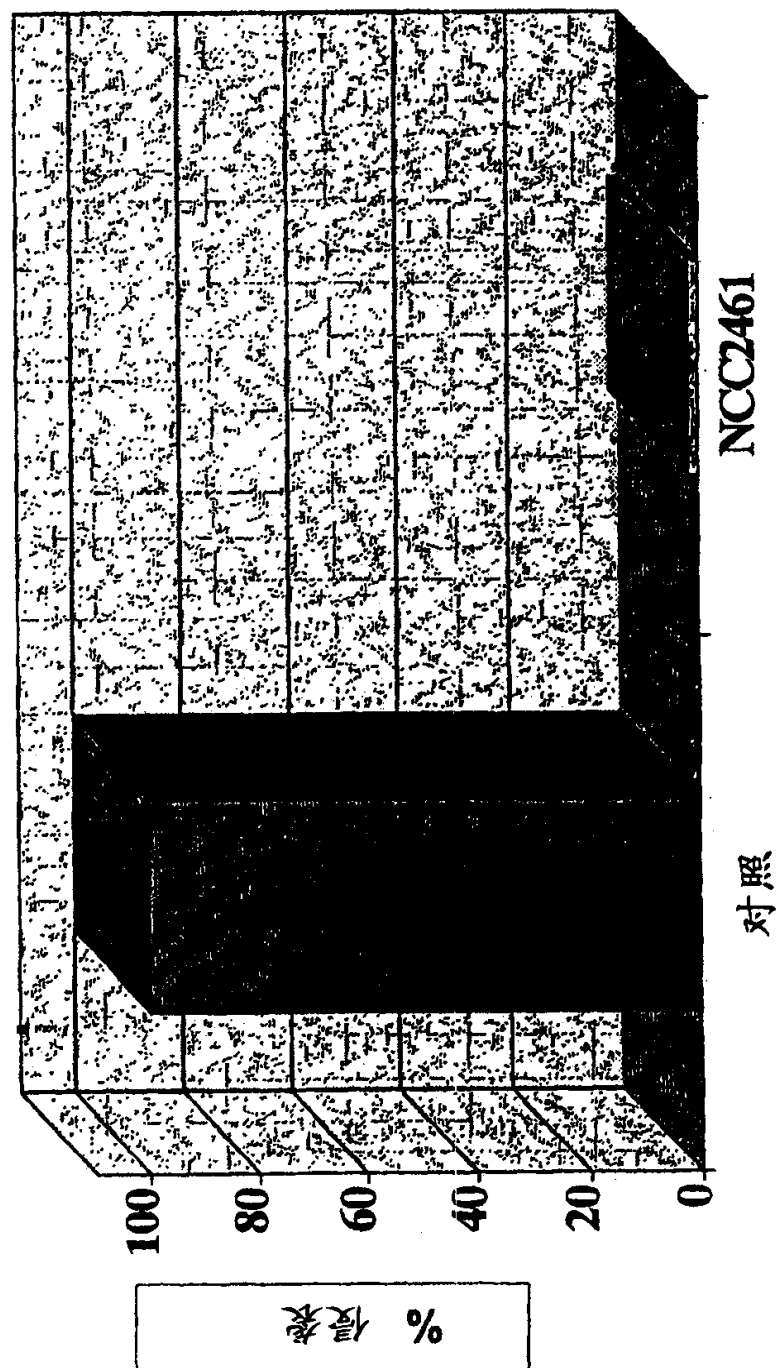


图 4

乳酪乳杆菌ST11在不同培养基中的酸化

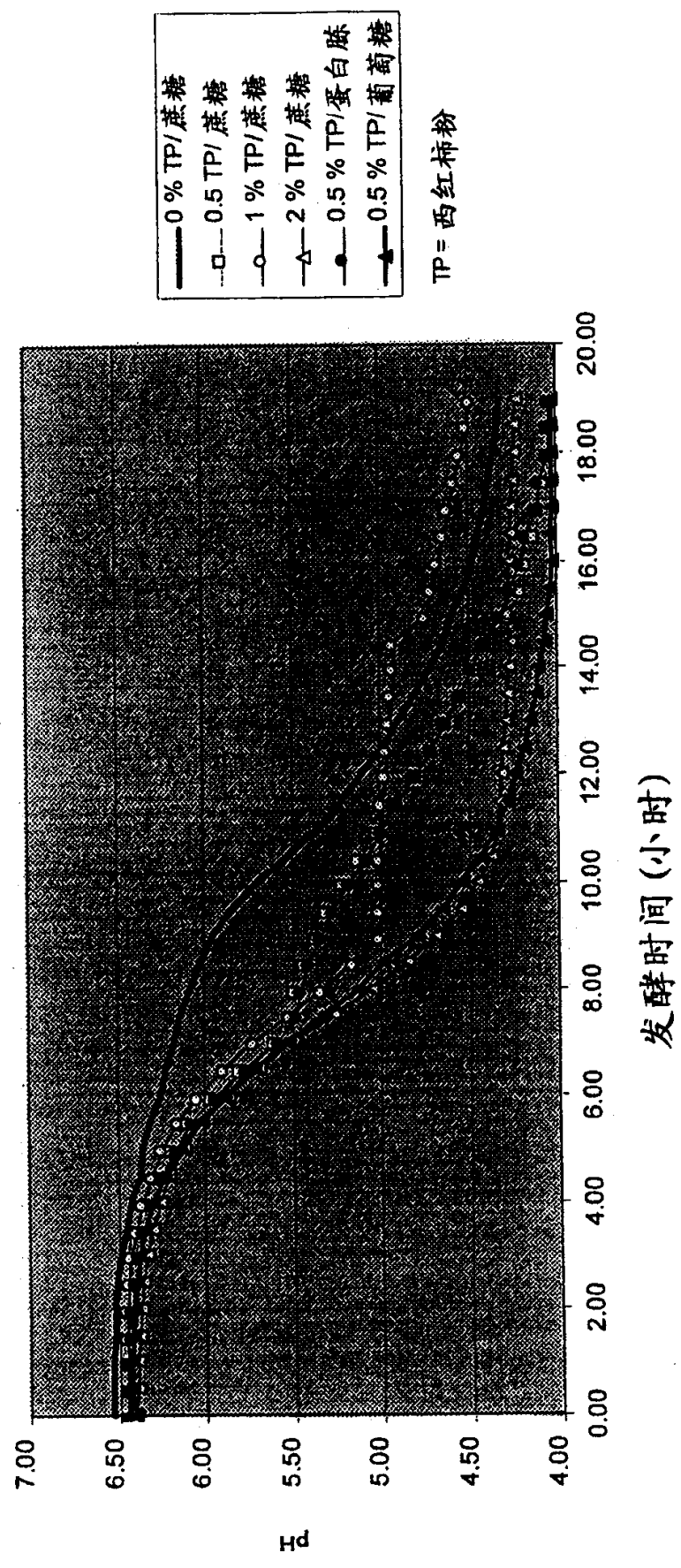


图 5

在谷类饮料中的存活 乳酪杆菌ST11的存活

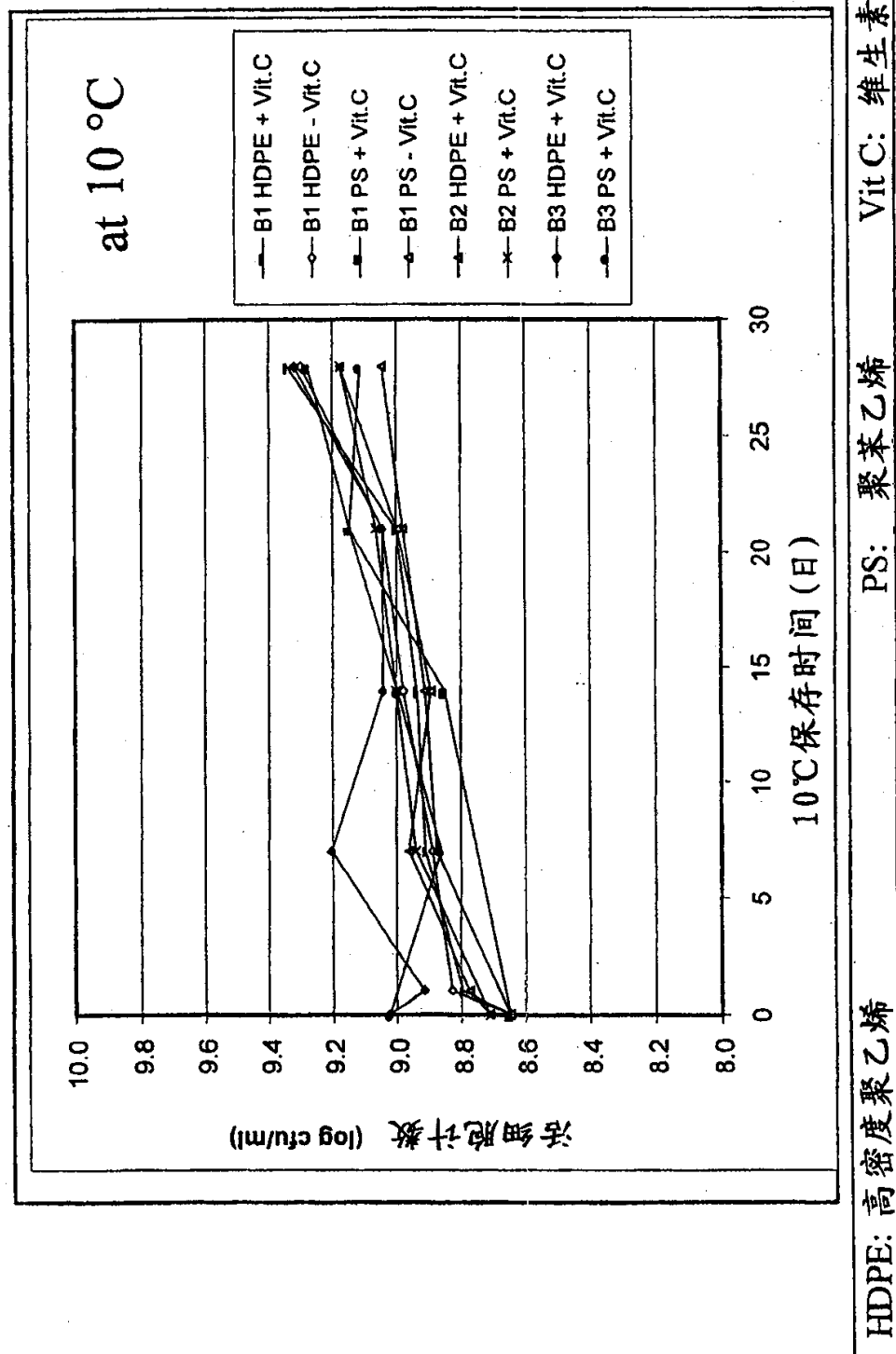


图 6

• 小鼠巨噬细胞中LAB对细胞因子mRNA的诱导

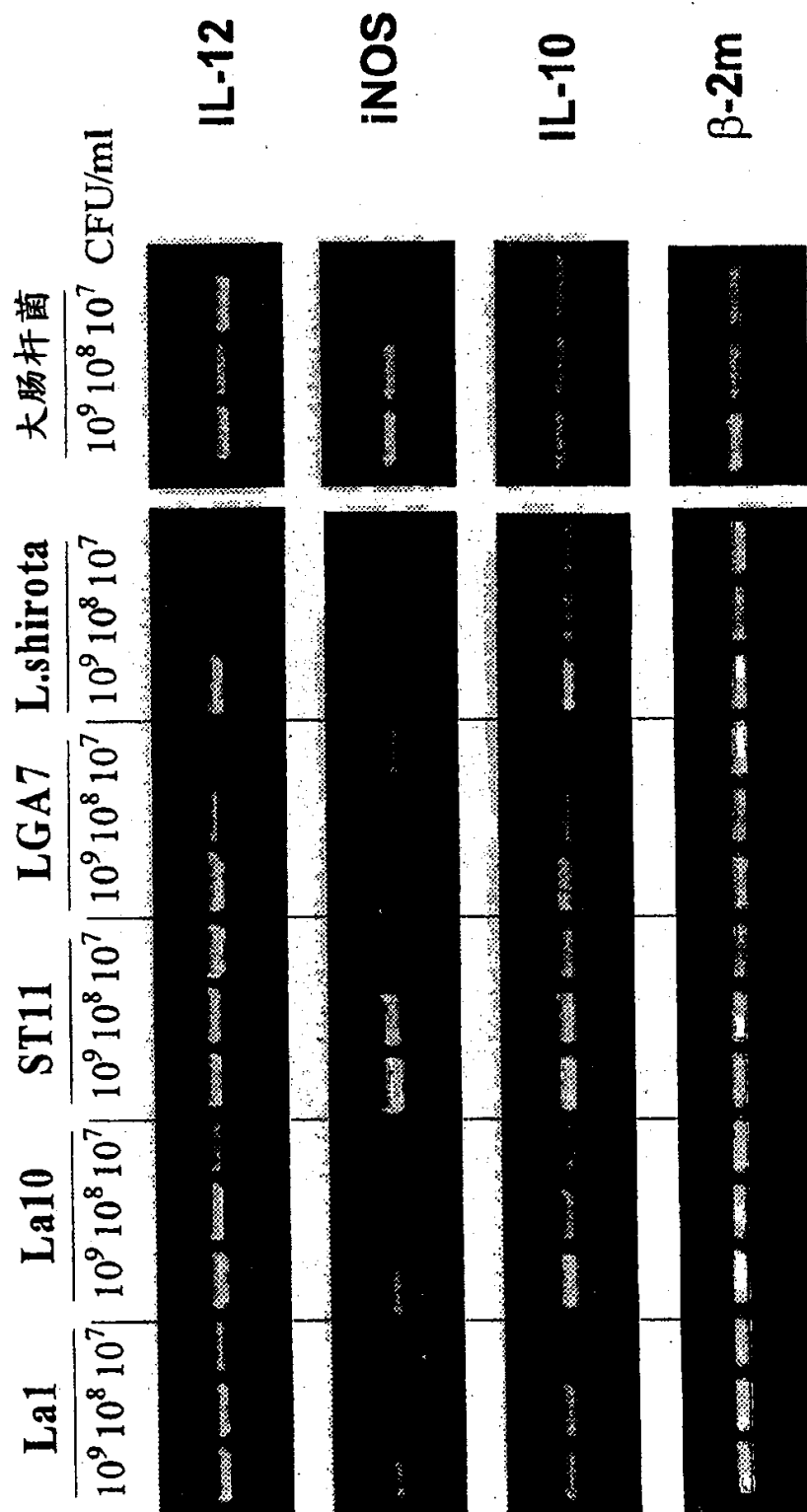


图 7

