



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104755091 B

(45)授权公告日 2020.07.21

(21)申请号 201380029676.7

(22)申请日 2013.06.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104755091 A

(43)申请公布日 2015.07.01

(30)优先权数据
61/689,338 2012.06.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SE2013/050646 2013.06.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/184064 EN 2013.12.12

(83)生物保藏信息
ATCC PTA 6475 2004.12.21

(73)专利权人 生命大地女神有限公司
地址 瑞典莱鲁姆S-443 21
专利权人 密歇根州立大学

(72)发明人 埃蒙·康诺利
罗伯特·艾伦·布里顿
劳拉·雷·麦凯布

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
代理人 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 35/747(2015.01)

A23L 33/135(2016.01)

A23L 33/155(2016.01)

A61P 19/08(2006.01)

A61P 19/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 101160134 A,2008.04.09,

WO 03/105893 A2,2003.12.24,

CN 101233231 A,2008.07.30,

夏维波等.维生素D缺乏与骨质疏松.《中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志》.2009,第2卷(第3期),第145-154页.

Jens Walter等.Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the Lactobacillus reuteri paradigm.《PNAS》.2011,第108卷(第1期),4645-4652.

Katharina E. Scholz-Ahrens等.Prebiotics,Probiotics,and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content,and Bone Structure.《Effects of Probiotics and Prebiotics》.2008,第838S-846S页.

审查员 黄大智

权利要求书1页 说明书14页 附图3页

(54)发明名称

预防哺乳动物骨质疏松的乳酸杆菌的选择和应用

(57)摘要

本发明包括一种选择有效用于预防人体骨质疏松的乳酸杆菌菌株的方法和根据所述方法选择的菌株。所述选择方法是基于所述菌株能够重建变异的微生物群落至正常态和/或具有四种特定SNP的至少一种。

1. 罗伊氏乳杆菌 (*L reuteri*) ATCC PTA 6475在制备用于预防或治疗骨质疏松的组合物中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,用于在更年期女性、有过子宫切除术的女性、糖尿病患者、骨质减少的个体、骨质疏松的个体和代谢紊乱的个体中预防骨质疏松。

3. 根据权利要求1所述的用途,用于改进骨折后的骨修复。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述组合物与维生素D结合使用。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中所述组合物与激素结合使用。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的用途,其中所述组合物为药物组合物。

预防哺乳动物骨质疏松的乳酸杆菌的选择和应用

技术领域

[0001] 本发明一般涉及医学、药物学和食品补充剂,更具体地说,本发明涉及用于预防哺乳动物中骨质疏松的乳酸杆菌的选择和应用。

背景技术

[0002] 超过4000万50岁以上的(其中1400万是男性)美国人受到低骨密度或骨质疏松症以及与此相关的高骨折风险的疾病困扰。患有骨质疏松症骨折的人容易出现抑郁、依赖性和增加的死亡率。衰老是骨质疏松症的主要原因,疾病、废用性和某些药物也可在生命的任何阶段导致骨质疏松。

[0003] 骨骼是一个支撑着身体的重量、容纳骨髓间质和造血干细胞并充当含钙储层的高度组织化的系统。骨质的结构包括外皮质密集壳体和内松质骨网。运动可以增加骨小梁矿物质密度(BMD)、骨容积率(BVF)、骨小梁厚度、皮质BMD和厚度。与此相反,疾病、废用性和某些药物(如糖皮质激素)会降低这些参数,并导致男性和女性骨质疏松。骨质疏松症定义为骨量减少(低于平均值超过2.5个标准差(SD))和改变的骨质微体系结构(比如下降的骨小梁厚度)。骨折的风险随着骨量的降低而增加。因此,在被诊断为骨质疏松症时,与具有正常骨密度的人相比,患者在骨折风险上增加了16倍。骨折与抑郁症、依赖症和增加的死亡率(对于老年人来说在12个月内超过25%)有关,并且髌部骨折导致每年超过50000人死亡(国家骨质疏松症基金会(NOF)的统计量)。而骨质疏松症在男性中不太普遍,30%以上的髌部骨折发生在男性中,与女性相比,男性死亡率要更大一些。目前,美国花费超过200亿美元,欧盟花费300亿美元以支付骨质疏松症的直接成本。更令人关注的是,据估计,到2020年,在美国超过6100万50岁以上的男性和女性将会患有低骨密度或骨质疏松症(NOF统计),因此,当务之急是寻找有效的、新颖的治疗方法。事实上,三分之一的50岁以上的女性,在她们的一生中将会经历与骨折相关的骨质疏松症。随着与其相关的骨折风险的增加,骨质疏松可能对新陈代谢和胰岛素分泌产生负面影响。尽管市场上拥有可用的治疗,但在美国和世界各地骨质疏松症患者的数量呈上升趋势。对此有几个原因,包括缺乏人在早期生活中就处于风险中的意识,增加的老龄人口和由于不必要的药物副作用而导致的患者不依从。此外,传统的骨质疏松的治疗并不总是有效的。目前对于患有低骨密度或骨质疏松症的人,还没有能够用于代替骨质疏松症药物的备选或自然疗法。因此,医生们正在寻找新方法来增加患者的骨质密度,公司正努力改善药理学骨质治疗药物。

[0004] 某些人比其他人更容易发展成骨质疏松症,风险因素是;

[0005] *女性

[0006] 年长者

[0007] *骨质疏松症或断骨的家族史

[0008] *矮小和瘦弱者

[0009] *某些人种/种族,比如白种人、亚洲人、或西班牙人/拉丁美洲

[0010] 人,尽管非美裔国人也处于风险中

- [0011] *断骨的历史者
- [0012] *性激素水平低者
- [0013] *雌激素水平低包括更年期的女性,
- [0014] *月经消失(闭经)者
- [0015] *睾丸激素和雌激素水平低的男性
- [0016] *饮食
- [0017] -钙摄取量低
- [0018] -维生素D摄取量低
- [0019] -过量摄入蛋白质、钠和咖啡因
- [0020] *懒散的生活方式
- [0021] *吸烟
- [0022] *酗酒
- [0023] *如类固醇药物、抗惊厥药物等等某些药物,
- [0024] *如神经性厌食症、类风湿性关节炎、胃肠疾病等某些疾病和状况,
- [0025] 更年期妇女在更年期期间由于雌激素水平下降更容易骨质疏松。甚至在绝经期期间(更年期前2~8年的期间)雌激素水平可能会开始下降。随着时间的推移,大量的骨质疏松首先会导致骨量减少(低骨量)然后是骨质疏松症。
- [0026] 儿童和成人的1型糖尿病(T1D)的诊断正在增加。虽然医学进步延长了患者的寿命,但是即使在警惕治疗下,保持正常的血糖仍然是困难的。因此,更多的T1D患者(男性和女性)患有包括骨质疏松的并发症。这意味着病人伴随着已经增加的骨折风险开始衰老/绝经。一旦发生骨折,他们很难治愈,需要长期的住院,降低了生活质量并增加了死亡率。不良的骨健康也负面地影响整个身体。患有T1D糖尿病的绝经后的女性比没有糖尿病的女性具有更高的骨质疏松性骨折的发生率。患有T1D的儿童比没有糖尿病的儿童具有更低的骨密度。因此,保持骨健康对T1D患者的整体的生活质量来说是至关重要的,并且由于骨髓细胞和骨质细胞相互转换,其对于涉及骨髓免疫/祖细胞的最大化医学/治愈性疗法是非常重要的。
- [0027] 二型糖尿病(T2D)患者也比非糖尿病患者具有更高的骨质疏松性骨折的风险。
- [0028] 强化骨质和预防骨质疏松症的两个关键要素是:1) 获得最大的骨密度和2) 在成年期间和衰老期间防止骨质疏松。因为骨质是动态变化并不断适应环境线索以形成或再吸收骨质,从而发生骨重塑。目标骨重塑通过成骨细胞(骨质形成细胞)和破骨细胞(骨质再吸收细胞)的活动,保持在临界范围内的血钙水平,同时在需要支持的位点保持骨质强壮。当构建和再吸收活动平衡时,就没有骨骼的净增加或减少,然而当构建减少和/或再吸收增加时,骨质疏松就会随之发生。
- [0029] 增加的破骨细胞活性导致骨再吸收。破骨细胞来自于造血干细胞。这些细胞产生单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞,在合适的条件下,所述单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞发展成破骨细胞的前体。而且通过诸如RANKL(位于成骨细胞表面)等因素发出信号刺激破骨细胞成熟。成熟的破骨细胞表达参与骨基质降解的酶(包括组织蛋白酶K和TRAP5b)。
- [0030] 增加的成骨细胞活性导致骨形成,其可以在多个级别上进行调节,包括:1) 谱系的选择,2) 成熟和3) 死亡。因为骨髓基质细胞(BMSC)产生成骨细胞、脂肪细胞和其他细胞类

型,选择一种谱系(脂肪细胞)可能会以牺牲另一种谱系(成骨细胞)为代价。骨脂肪和矿物质密度之间的互反关系支持了这一理论,这种互反关系由衰老、肢体卸载、细胞培养模型和I型糖尿病(T1)识别。成骨细胞的活动可以通过死亡/细胞凋亡作进一步调节。成骨细胞死亡的增加将导致更少的骨制造细胞,由此骨质疏松。实施例包括对废用性/卸载的快速骨适应,这导致骨质疏松、骨髓脂肪增加、和骨细胞死亡增加。老化也会增加骨细胞凋亡。许多因素都有助于调整成骨细胞调节作用的部分或所有方面(谱系、成熟和死亡),所述因素包括:积极的因素,如TGF β 、骨形态发生蛋白(BMPs)、甲状旁腺激素(PTH)和Wnts,以及消极的因素,如细胞因子。

[0031] 双磷酸盐是用于骨质疏松症的最常见疗法中的一种。这些化合物结合到骨矿物质中,通过破骨细胞来抑制骨分解代谢并有效降低骨折。然而,许多这些化合物需要空腹服用,可能会引起胃返流和恶心,导致患者的依从性降低。还需要关注这些化合物停留在骨上的时间的长度,以及它们对骨重建和骨强度的长期影响。可选择的雌激素受体调节剂(SERMS)是另一种治疗的疗法,但它们对于癌症而言会带来一些问题。经研究,激素替代疗法对预防或减缓骨质疏松症的发生是有效的,但多年持续使用激素替代可能会增加女性患乳腺癌的风险,可能会增加静脉血栓(血凝块)的发生率、已有的肝脏疾病的恶化、子宫内膜癌风险的增加,以及高血压。安进(Amgen)公司开发了一种药物(类似于骨骼保护素(osteoprotegerin)),所述药物通过修改RANKL/RANK系统来工作,因此抑制破骨细胞的活性。间歇性PTH治疗是一种合成代谢治疗,但这种静脉注射疗法是昂贵的,并指明只用于严重骨质疏松症患者。综合来看,许多被诊断为低骨密度的人仍然迷惑该做些什么就不足为奇了。许多人不想服用药物,由于害怕长期的影响。虽然负重运动和充足的钙摄入量是两种天然的方法,但是他们总是不能克服疾病、药物和老化的影响。

发明内容

[0032] 本发明的主要目的是提供一种如何找到能够预防骨质疏松的乳酸细菌菌株的方法,尤其是更年期女性、糖尿病患者、骨质减少的人,所述骨质减少的人包括例如具有大能量摄入和低运动频率的年轻人。

[0033] 本发明的一个目的是在更年期女性中使用包含所述菌株的产品,以预防骨质疏松。

[0034] 本发明的一个目的是在有过子宫切除术的女性中使用包含所述菌株的产品,以预防骨质疏松。

[0035] 另一个目的是在男性中使用含有所述菌株的产品,以预防骨质疏松,所述男性包括但不限于糖尿病患者、代谢紊乱的年轻男性和骨质减少的男性。

[0036] 另一个目的是将所述产品与用于骨质疏松或骨形成的治疗药物相结合,以便减少所述药物的剂量,从而能够最大限度地减少副作用。

[0037] 另一个目的是改进骨折后的骨修复。

[0038] 因此,本发明的第一方面提供了一种选择用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株的方法,所述方法包括选择一种相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112(SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%同一性的乳酸杆菌菌株,并且所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112(SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少

一个：碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0039] 在根据第一方面的实施例中，所述方法包括选择一种相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有至少96% (诸如97%，98%，99%) 同一性的乳酸杆菌菌株，并且所述的乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有相同的核苷酸，所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个：碱基对271391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0040] 本发明的第二方面提供了一种选择用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株 (诸如罗伊氏乳杆菌菌株) 的方法，所述方法包括选择一种相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有相同的核苷酸的罗伊氏乳杆菌菌株，所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个：碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0041] 在根据第一或第二方面的方法的实施例中，所述乳酸杆菌菌株具有所述四种核苷酸中的至少两种，诸如所述四种核苷酸中的至少三种、所述四种核苷酸中的全部四种。

[0042] 本发明的第三方面提供了一种选择用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株的方法，所述方法包括选择一种相对于罗伊氏乳杆菌JCM1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有至少95%同一性的乳酸杆菌菌株，条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组不具有至少一种突变，所述突变选自碱基对271391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0043] 在第三方面的实施例中，所述方法包括选择一种相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有至少96% (诸如97%，98%，99%) 同一性的乳酸杆菌菌株，条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组不具有至少一种突变，所述突变选自碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0044] 在根据第三方面的方法的实施例中，所述乳酸杆菌菌株不具有所述四种突变中的至少两种，诸如所述四种突变中的至少三种、所述四种突变中的任何一种。

[0045] 本发明的第四方面是提供一种用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株，所述乳酸杆菌菌株是根据第一、第二或第三方面所述的方法选择的。

[0046] 在第四方面的实施例中，选择的用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475，。公众可从美国菌种保藏中心 (美国弗吉尼亚州马纳萨斯市大学大街10801号) 得到所述菌株，根据布达佩斯条约于2004年12月21日保藏在该菌种保藏中心。

[0047] 根据第五方面，本发明提供了一种用于预防或治疗骨质疏松的乳酸杆菌菌株，所述乳酸杆菌菌株相对于与罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有至少95%的同一性，并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1) 的基因组具有相同的核苷酸，所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个：碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0048] 在第五方面的实施例中，所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ

ID NO:1)的基因组具有至少96% (诸如97%、98%、99%)的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0049] 在第五方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株具有所述四种核苷酸中的至少两种,诸如所述四种核苷酸中的至少三种、所述核苷酸的全部四种。

[0050] 根据第六方面,本发明提供了一种乳酸杆菌菌株,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自自由碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0051] 在第六方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自自由碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0052] 在第六方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株不具有所述四种突变中的至少两种,诸如所述四种突变中的至少三种、所述四种突变的任何一种。

[0053] 根据第五或第六方面的优选的实施例,所述乳酸杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475。

[0054] 本发明的第七方面提供了一种包含乳酸杆菌菌株的组合物,所述乳酸杆菌菌株根据本发明第一、第二或第三方面所述的方法选择。

[0055] 根据第八方面,提供了一种包含乳酸杆菌菌株的组合物,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0056] 在第八方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0057] 在第八方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株具有所述四种核苷酸中的至少两种,诸如所述四种核苷酸中的至少三种、所述核苷酸的全部四种。

[0058] 根据第九方面,本发明提供了一种包含乳酸杆菌菌株的组合物,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自自由碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0059] 在第九方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自由碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0060] 在第九方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株不具有所述四种突变中的至少两种,诸如所述四种突变中的至少三种,诸如所述四种突变的任何一种。

[0061] 在第八或第九方面的优选的实施例中,所述乳酸杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475。

[0062] 在第八或第九方面的实施例中,所述组合物用于预防或治疗骨质疏松。

[0063] 在第八或第九方面的另一个实施例中,所述组合物在更年期女性、有过子宫切除术的女性、糖尿病患者、骨质减少的个体、骨质疏松性的个体和代谢紊乱的个体中用于预防骨质疏松。

[0064] 在第八或第九方面的再一实施例中,所述组合物是用于改进骨折后的骨修复。

[0065] 在第八或第九方面的实施例中,上述组合物与维生素D结合用于预防或治疗骨质疏松。

[0066] 在第八或第九方面的另一个实施例中,上述组合物与激素(用于激素替代疗法)结合用于预防或治疗骨质疏松。

[0067] 在第八或第九方面的实施例中,上述组合物是一种药物组合物(优选地包括至少一种药学上可接受的赋形剂),或食物产品或食物补充剂(优选地包括至少一种食品级赋形剂,所述食品级赋形剂对本领域普通技术人员来说是公知的)。

[0068] 根据第十方面,本发明提供了一种乳酸杆菌菌株的用途,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C,用于制备一种用于预防或治疗骨质疏松的药物组合物。

[0069] 在第十方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0070] 在第十方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株具有所述四种核苷酸中的至少两种,诸如所述四种核苷酸中的至少三种、所述核苷酸的全部四种。

[0071] 根据第十一方面,本发明提供了一种乳酸杆菌菌株的用途,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自由碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组,用于制备一种用于预防或治疗骨质疏松的药物组合物。

[0072] 在第十一方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0073] 在第十一方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株不具有所述四种突变中的至少两种,诸如所述四种突变中的至少三种、所述四种突变的任何一种。

[0074] 在第十或第十一方面的目前优选的实施例中,所述乳酸杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌 ATCC PTA 6475。

[0075] 本发明的第十二方面提供了一种用于治疗或预防骨质疏松的方法,所述方法包括向个体施用乳酸杆菌菌株,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0076] 在根据第十二方面的方法的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,并且相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有相同的核苷酸,所述核苷酸位于下列四个位置中的至少一个:碱基对271 391中的C、碱基对453 538中的G、碱基对529 228中的G、和碱基对599 338中的C。

[0077] 在第十二方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株具有所述四种核苷酸中的至少两种,诸如所述四种核苷酸中的至少三种、所述核苷酸的全部四种。

[0078] 根据第十三方面,本发明提供了一种用于治疗或预防骨质疏松的方法,所述方法包括向个体施用乳酸杆菌菌株,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少95%的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0079] 在第十三方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组具有至少96% (如97%、98%、99%)的同一性,条件是所述乳酸杆菌菌株相对于罗伊氏乳杆菌JCM 1112 (SEQ ID NO:1)的基因组不具有至少一种突变,所述突变选自碱基对271 391中的C到T、碱基对453 538中的G到A、碱基对529 228中的G到A、和碱基对599 338中的C到T四种突变组成的组。

[0080] 在第十三方面的实施例中,所述乳酸杆菌菌株不具有所述四种突变中的至少两种,诸如所述四种突变中的至少三种、所述四种突变的任何一种。

[0081] 在第十二或第十三方面的一个目前优选的实施例中,所述乳酸杆菌菌株是罗伊氏乳杆菌 ATCC PTA 6475。

附图说明

[0082] 图1表示聚集在空肠和回肠中的微生物群落;

[0083] 图2表示通过罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475抑制骨质疏松;

[0084] 图3表示不同的罗伊氏乳杆菌菌株中对骨质疏松的作用。

[0085] 发明详细说明和优选实施例

[0086] 慢性炎症性疾病往往与全身性的骨质疏松相关联。在美国国立卫生研究院 (NIH) 授权的授权号1R21AT005472-01A1的摘要中, 麦凯布指出, 能够提高整体肠道健康的疗法潜在地具有有益于骨健康。麦凯布和布里顿发现罗伊氏乳杆菌疗法能够降低回肠内TNF的水平, 增加健康雄性鼠而不是雌性鼠体内的骨体积, 并且建议罗伊氏乳杆菌通过抑制肠道炎症和上调骨形成, 以依赖性别的方式增加骨质密度。他们认为, 罗伊氏乳杆菌通过使用能够减轻肠道炎症的益生菌从而具有增加骨质量的新方法。但是, 不同于本发明选择的某些特定的菌株, 这是骨形成的性别依赖性上调, 而不是预防骨质疏松, 其与罗伊氏乳杆菌消炎特性相关联, 与本发明选择的某些特定的用于预防男性和女性的骨质疏松的菌株是不同的。

[0087] 益生菌可以增加鸡肉皮质骨厚度并降低衰老小鼠骨质疏松。Narva等人在“生物活性肽, 缬氨酰-脯氨酰-脯氨酸 (VPP) 和含有VPP的瑞士乳酸杆菌发酵乳对切除卵巢的老鼠的骨质疏松的影响”中描述了瑞士乳酸杆菌发酵乳预防骨质疏松, 其可能是由于肽缬氨酰-脯氨酰-脯氨酸的作用。Narva等人进一步在“瑞士乳酸杆菌发酵乳对绝经后妇女的钙代谢的急性变化的作用”中描述了瑞士乳酸杆菌发酵乳对钙代谢起到了积极的急性效应。

[0088] Yeo等人在“通过在补充有益生元的豆浆中的益生菌的血管紧张素I-转换酶抑制活性和异黄酮的生物转化”中指出混入在补充有益生元的豆浆中的益生菌可潜在作为饮食治疗使用, 例如骨质疏松症。

[0089] Kim等人在“发酵乳产品干酪乳杆菌393对切除卵巢的老鼠的骨代谢的影响”中显示了干酪乳杆菌393FMP对切除卵巢的老鼠的骨质疏松具有预防作用。

[0090] 然而, 以上提到的现有技术无论是单独还是联合都没有给出如何选择特定的用于有效预防骨质疏松的益生菌菌株的启示。

[0091] 在此, 本发明包括一种选择有效预防人类骨质疏松的乳酸杆菌菌株的方法以及根据本方法选择出的菌株。正如本领域人员所知, 诸如食品、营养添加剂和配方、药物或包含来自于这些菌株的全部细胞或成分的医疗器械的产品可以予以制备, 而且所述产品通常包括公知的添加有乳酸杆菌菌株的可摄取的支持物, 或其衍生的组分。

[0092] 基于现有技术, 人们可自然地想到菌株的预防骨质疏松的能力与其对肠道健康的普通影响或其抗炎特性相关联, 然而, 发明人惊讶地发现这些特性对于预防骨质疏松的作用是不可预测的。罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659是两个几乎相同的菌株, 它们都能抗炎和改善肠道健康。因此, 人们自然地假设这些菌株对骨质疏松也会产生同样的效果。但是发明人发现这些菌株对预防骨质疏松不具有相同的效果, 在此观察的基础上, 他们发明了一种新的选择乳酸杆菌菌株例如罗伊氏乳杆菌的方法, 其将有效地治疗和/或预防骨质疏松。

[0093] 向人施用按照本文提供的方法特定选择的乳酸杆菌以预防骨质疏松。

[0094] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659在四个SNP处不同, 所述四个SNP对于细菌预防骨质疏松的能力是十分重要的。Walter等人显示了这些SNP (Walter等人, 在脊椎动物胃肠道内宿主-微生物共生和罗伊氏乳杆菌范例; 美国国家科学院院刊, 108卷4645-4652页), 在此其全部内容通过引用并入。对于SNP的分析, 测序结果映

射到参考基因组(罗伊氏乳杆菌JCM1112,GenBank登记号AP007281,SEQ ID NO:1)。在罗伊氏乳杆菌ATCCPTA 4659中发现7个SNP,在罗伊氏乳杆菌ATCCPTA6475中也发现了这7个SNP中的3个(SNP 4位于bp 567 368,SNP6位于bp 968 088,和SNP 8位于bp 1 358 460,关于参考基因组,罗伊氏乳杆菌JCM 1112,GenBank登记号AP007281,SEQ ID NO:1),其余4个独特的SNP(用于本文的目的,以下分别简称SNP 1,SNP 2,SNP 3和SNP 5)构成在罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475和罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659之间的基因组的差异。所述四个SNP位于:

[0095] -bp 271 391 (SNP 1),

[0096] -bp 453 538 (SNP2),

[0097] -bp 529 228 (SNP3),和

[0098] -bp 599 338 (SNP5),

[0099] (关于参考基因组,罗伊氏乳杆菌JCM 1112,GenBank登记号AP007281,SEQ ID NO:1)。

[0100] SNP 1位于用于编码保守的假定蛋白的基因处(罗伊氏乳杆菌JCM1112:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224225>),SNP 2位于用于编码氯离子通道蛋白的基因处(罗伊氏乳杆菌JCM 1112:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224386>),SNP 3位于用于编码ATP合酶 γ 亚基的基因处(罗伊氏乳杆菌JCM 1112:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224455>),SNP 5位于用于编码DNA错配修复蛋白HexB的基因处(罗伊氏乳杆菌JCM 1112:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224511>)。本发明涉及的SNP是与罗伊氏乳杆菌ATCCPTA 6475相匹配的SNP,其序列与罗伊氏乳杆菌JCM1112在SNP1、SNP2、SNP 3和SNP 5的位置处具有相同的核苷酸。下面列出的是罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475和4659之间不同的核苷酸:

[0101] SNP1)用于编码假定蛋白的基因,其中,核苷酸267在ATCCPTA4659中从C(如ATCC PTA6475和JCM 1112)变到T。

[0102] SNP 2)用于编码氯离子通道蛋白的基因,其中,核苷酸373在ATCC PTA4659中从G(如ATCC PTA6475和JCM 1112)变到A。

[0103] SNP 3)用于编码ATP合酶 γ 亚基的基因,其中,核苷酸296在ATCC PTA4659中从G(如ATCC PTA6475和JCM 1112)变到A。

[0104] SNP 5)用于编码HexB蛋白的基因,其中,核苷酸1966从C(如ATCC PTA6475和JCM 1112)变到T。

[0105] 在本发明的选择方法中,寻求的菌株是,在这些SNP中的至少一个SNP,具有与罗伊氏乳杆菌ATCC 6475PTA的上述SNP相同的核苷酸。

[0106] 微生物群在骨质疏松中扮演一个重要的角色;许多患有骨质疏松的病人有着紊乱的肠道微生物群。能够在胃肠道中重建正常的微生物群落的乳酸杆菌令人惊讶地更有效地预防骨质疏松。

[0107] 本发明公开了一种独特的选择方法,选择用于有效预防骨质疏松的菌株。重建总肠道微生物成分的能力对于预防骨质疏松的功能也是令人惊讶地非常重要的。发明人发现菌株能够将改变的微生物群落重建为正常和/或具有四个特定SNP中的至少一个的菌株,对于防止骨质疏松是有效的。

[0108] 防止骨质疏松的能力对于某些菌株是独特的,其并不是所有乳酸杆菌菌株具有这

种独特的能力。在选择有效的菌株时,使用抗炎能力作为选择标准并不是足够的,因为发明人明确表明这个效果并不依赖于抗炎特性。罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475和罗伊氏乳杆菌ATCCPTA 4659都是抗炎菌株,但当用于预防骨质疏松时,罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475更加有效,而根据本发明则不选择罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。一般来讲,根据本发明选择的特定的乳酸杆菌菌株可以用于防止骨质疏松,以下实施例并不是为了限制本发明的范围,而是用于例证优选的实施例。

[0109] 维生素D对骨骼健康是十分重要的,低维生素D水平的人具有更低的骨密度和骨质量。由于吸收钙需要维生素D,没有摄取足够维生素D的人可能会产生骨质疏松。本发明人发现改变的微生物群会导致维生素D缺乏和骨质疏松,施用根据本发明选择的乳酸杆菌将重建微生物群,从而增加肠道维生素D的吸收并恢复维生素D的水平。将维生素D与选择的菌株结合也是一个选择,以便得到一个更有效的方法/产品用于预防骨质疏松。

[0110] T1D病人患有例如骨质疏松的并发症。患有T1D的病人将会因此情况具有改变的微生物群。施用根据本发明选择的乳酸杆菌将重建微生物群并预防骨质疏松。

[0111] 在青年和成年阶段的高骨密度可以帮助预防晚年的骨质疏松症的疾病。这是由于在达到骨质疏松区域内的骨密度之前,高的骨密度将允许更程度的骨质疏松。因此,本发明的目的是通过向青年和成年人施用根据本发明选择的乳酸杆菌菌株,以预防骨质疏松,这样能帮助个体获得最大的骨密度以预防晚年发生骨质疏松症。根据本发明选择的特定的乳酸杆菌可以预防健康的接受者以及那些患有骨质疏松的人的骨质疏松。

[0112] 选择的乳酸杆菌的施用可以与激素替代疗法相结合。这样的组合使得能够减少激素的用量,从而减少副作用,例如降低罹患癌症的风险。

[0113] 选择用于预防骨质疏松的乳酸杆菌最好向更年期妇女和容易患上骨质疏松症的骨质减少的男人施用,选择的乳酸杆菌的施用可以预防骨质疏松,从而预防低骨密度和骨质疏松症。

[0114] 发明人已了解雌激素的消耗会改变肠道微生物群,使用根据本发明选择的乳酸杆菌治疗将重建在雌激素水平降低的患者体内的微生物群,由此预防骨质疏松,雌激素水平降

[0115] 根据本发明选择的乳酸细菌菌株还可以用于改善骨折修复。

[0116] 为了减少药物的副作用,例如用于治疗骨质疏松的二磷酸盐和激素替代疗法,可以把药物与施用选择的乳酸杆菌相结合,从而减少剂量,最小化副作用。

[0117] 实施例1

[0118] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475在切除卵巢小鼠中重建改变的微生物群落的能力的研究。

[0119] 对照物(未切除卵巢)、切除卵巢,以及用罗伊氏乳杆菌喂养的切除卵巢在肠道微生物群落中具有显著变化。

[0120] 实验组和组织收集

[0121] 为了测量切除卵巢的小鼠(ovx)和用罗伊氏乳杆菌6475治疗的切除卵巢的小鼠的效果,我们比较了三个实验动物组。没有切除卵巢的小鼠的对照小鼠接受每周3次溶剂对照喂养。切除卵巢的小鼠接受每周3次溶剂对照喂养。切除卵巢和罗伊氏乳杆菌6475的小鼠每周3次接受300 μ l过夜的罗伊氏乳杆菌6475持续4周。实验结束后将小鼠安乐死,分离来自

胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠近端和结肠远端的组织样品并保存用以微生物生态学分析。

[0122] DNA提取

[0123] 将小鼠的肠道组织放置在MoBio超洁净排泄物DNA磁珠试管中(cat.#12811-100-DBT)磁珠试管中包含360μl缓冲液ATL(Qiagen cat.#19076),并在小型磁珠搅拌器-8(BioSpec产品)上全速搅拌1分钟溶解。使用Qiagen DNeasy血液和组织试剂盒从小鼠肠道组织提取DNA(cat.#69504)。通过添加40μl蛋白酶K(Qiagen,cat.#19133)并在55℃培育1小时进一步分裂组织。使用Qiagen DNeasy血液和组织试剂盒提取DNA(cat.#69504)。使用Nanodrop 1000量化DNA的产量。

[0124] 聚合酶链式反应扩增

[0125] 使用V3-V5条形码引物组和由人类微生物项目布罗德研究所开发的扩增协议,扩增细菌16S序列用于来自小鼠肠道组织的454测序。通过IDT DNA技术合成条形码正向引物,通过Sigma合成反向引物。在96孔板中将条形码正向引物稀释至4μM的工作浓度;将反向引物加入至最终浓度为4μM的每个孔中。制备25μl体积的反应物一式三份,反应物包括400μg小鼠肠道DNA,2μl的4μM引物和1X Accuprime缓冲液II中的0.15μl Accuprime HiFi Taq聚合酶(Invitrogen,cat.#12346086)。反应物在埃普多夫亲(Eppendorf Pro)铝板热循环仪中扩增,循环为2分钟95℃变性,接着进行95℃x 20秒、50℃x 30秒、72℃x 5分钟的30个循环。

[0126] 产品纯化的扩增

[0127] 使用Ampure Agencourt XP磁珠(Beckman Coulter,cat#A63880)纯化16S扩增产品。首先,每个样品的三份反应物在1.7毫升微量离心管中混合并以0.7倍体积比加入Ampure XP磁珠。涡流后,混合的样本在室温下培育10分钟,然后放在一个磁性表座上分离磁珠(Invitrogen,cat.#123-21D)。将磁珠按照制造商的说明使用200μl 70%的乙醇洗涤2次。将磁珠在37℃下干燥5分钟,并用20μl 10μM的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Tris)/0.1μM的乙二胺四乙酸(EDTA)洗脱DNA。在磁性表座上将洗脱液与磁珠分离,并转移到新的1.7毫升的微离心管中,使用Quant-It dsDNA高灵敏度测定试剂盒(Invitrogen,cat#Q33120)定量。然后将等量的每个样本汇集到454测序管中。

[0128] 454测序和序列分析

[0129] 采用使用钛化学的GS初级(Roche)进行454测序。除了利用GS初级的标准的过滤器确定已经传递的测定的序列,我们使用修改的扩增子处理算法来减少错误丢弃的序列。相对于大肠杆菌16S序列,由核糖体数据库项目人员在MSU进行对齐16S rRNA序列,和在大肠杆菌16S核苷酸位置617到900进行整理。使用MOTHUR v.1.21(<http://www.mothur.org/wiki/>)进行后续处理和分析(包括多样性指标)。使用软件包PAST进行ANOSIM(相似性分析)和主坐标分析。使用Bray-Curtis方法利用附图和表格测量两个或两个以上的微生物群落之间的不相似程度。在这些分析中,我们选择临界值0.03的操作分类单位(OUT),这被认为是观察在种级的群落。从这些数据,我们得出结论是对切除卵巢的老鼠喂食罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475的治疗产生了与改善骨骼健康相关的在回肠和空肠的微生物群落的显著转变。(表1中的切除卵巢和乳酸杆菌)。

[0130] 表1

[0131]	组织	对照	R值(p值)
--------	----	----	--------

空肠	野生型-卵巢切除-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.3367 (0.0183) *
	野生型-卵巢切除	0.0443 (0.3633)
	野生型-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.6078 (0.0250) *
	卵巢切除-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.3297 (0.0712)
回肠	野生型-卵巢切除-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.2068 (0.0084) *
	野生型-卵巢切除	0.1710 (0.1180)
	野生型-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.2540 (0.0290) *
	卵巢切除-卵巢切除并乳酸杆菌喂养	0.2209 (0.0206) *

[0132] 表1:使用Bray-Curtis相异性矩阵在种级进行ANOSIM分析,

[0133] **表示统计学意义

[0134] 野生型、卵巢切除和卵巢切除并用乳酸杆菌治疗的三方对比显示了微生物群落的显著变化(表1)。这些差异在很大程度上是由在罗伊氏乳酸菌治疗后菌群群落的巨大变化而引起的。使用来自野生型对照组(三角形△)、切成卵巢组(圆形○)和使用罗伊氏乳杆菌治疗的切成卵巢组(方形□)的微生物群落的主坐标分析,来观察菌群群落如何聚集在空肠和回肠中。图1显示,用来自菌群群落的一簇的罗伊氏乳杆菌治疗的切成卵巢的小鼠,明显不同于野生型和切除卵巢的小鼠的在空肠和回肠中的微生物群落。几个被分类为Clostridiales的OTU是主要的细菌群落,这些OUT引起治疗切除卵巢小鼠的罗伊氏乳杆菌的微生物群落与其他两组的区别。

[0135] 实施例2

[0136] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475在切除卵巢小鼠中重建改变的微生物群落的能力的研究。

[0137] 按照实施例1进行实验,但采用罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659代替罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475。

[0138] 相对于对照组,罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659疗法不能重建卵巢切除小鼠。

[0139] 实施例3

[0140] 特定SNP的识别

[0141] 罗伊氏乳杆菌基因组的Illumina序列

[0142] 在此研究中使用的罗伊氏乳杆菌是在MRS培养基中培育的ATCC PTA4659和6475,并使用Genomic-Tip系统制备基因组DNA。DNA通过20分钟超声处理(130W)裂解以获得平均500bp的片段,然后用QIAquick PCR提纯离心柱(Qiagen)进一步提纯和浓缩。移除3'延伸量并填入5'延伸量的处理导致基因组片段端部钝化。将腺嘌呤碎片通过末端转移酶添加到3'终端,将由此产生的碎片连接到Solexa适配器。将产品用琼脂糖凝胶电泳分离,将150bp到200bp之间的片段从凝胶上切除。使用QIAquick凝胶萃取试剂盒(Qiagen)将DNA片段从琼脂糖凝胶片上提取出。经过适配器修饰的DNA片段使用Solexa通用适配器引物通过18-周期PCR来富集。定量DNA片段库,然后稀释到10-nM工作原液用来产生菌群簇。适配器连接的片段(2nM)在0.1M氢氧化钠溶液中变性5分钟,然后进一步在1毫升预冷的杂交缓冲液中稀释至最终浓度9pM并浓缩,并使用Cluster Station引入到Solexa流动细胞上。随着恒温扩增,通过0.1M的氢氧化钠变性将菌群簇制成单链,并通过Solexa Cluster Station计量穿过的流动细胞。将与Solexa适配器互补的测序引物添加到每个菌群簇的单链上。一旦杂化并洗

脱多余的引物,准备好流动的细胞用于测序。将Solexa基因组分析仪II编程以提供36个连续流动的荧光标记,3'-OH将核苷酸和聚合酶阻隔在流动细胞的表面,从而产生固定的36bp的读取长度。在每个碱基掺入步骤之后,洗脱流动细胞表面的反应物,然后由显微镜物镜成像。本实验每个流动细胞通道采集了300个平铺图像(“片”),每个平铺图像平均含有30000个菌群簇。

[0143] SNP分析

[0144] 双向测序的结果分别映射对照基因组罗伊氏乳杆菌JCM 1112T (GenBank登记号AP007281)。使用映射软件Maq版本0.6.6 (<http://maq.sourceforge.net/maq-man.shtml>) 进行映射(默认参数)。将SNP用MAQ软件识别和验证,并分类为编码SNP和属间的SNP。编码SPN被确定为同义和非同义。在Sanger序列测定之后,SNP最终用周边区域的PCR扩增验证。

[0145] 实施例4

[0146] 菌株的选择方法

[0147] 有效预防骨质疏松的菌株的选择是以重建改变的微生物群落的能力为基础的。基于实施例1和2的结果,基于菌株具有重建改变微生物群落的能力的事实,选择罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475。基于实施例2的结果不选择罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0148] 实施例5

[0149] 菌株的选择方法

[0150] 有效预防骨质疏松菌株的选择是以特定的SNP的存在为基础的。由实施例3的结果可知,选择罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475是因为它具有全部的四个所需的SNP。由于罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659缺乏这些SNP,故而不选它。

[0151] 实施例6

[0152] 菌株的选择方法

[0153] 有效预防骨质疏松的菌株的选择是以实施例3、4和5为基础的,选择具有四个所需SNP中的至少一个并具有重建改变微生物群落能力的菌株。基于这些标准选择罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475。

[0154] 实施例7

[0155] 罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475抑制由切除卵巢诱发的骨质疏松

[0156] 在这项研究中,使用切除卵巢的(ovx) BALB/c小鼠作为骨质疏松的小鼠模型。将小鼠(12周大)切除卵巢,分成两组,将第一组用罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475持续4周每周3次治疗。没有切除卵巢的BALB/c作为对照组。测定远端股骨骨体积分数(BV/TV)和骨TRAP5RNA(相对于HPRT)。使用罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475治疗的小鼠的骨体积分数与对照组相同。此外,还可以看出,TRAP5(破骨细胞功能的一个标志)在罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475治疗的基础上回到基线(对照组)。

[0157] 图2显示罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475对骨质疏松的抑制接近100%,以及TRAP5的表达回到基线。

[0158] 实施例8

[0159] 选择的罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475在抑制骨质疏松方面优于未选择的罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 4659。

[0160] 在这个实验中我们填喂法喂养动物菌株罗伊氏乳杆菌ATCC PTA6475和罗伊氏乳

杆菌ATCC PTA 4659,同时也提供也不间断的在饮用水中提供菌株28天。通过 μ CT来测量远端股骨骨体积分数 (BV/TV)。罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475能抑制骨质疏松,并与对照小鼠难以区别(图3)。罗伊氏乳杆菌ATCC PTA4659不能抑制骨质疏松至达到统计学意义的足够水平 ($p < .01$)。罗伊氏乳杆菌ATCC PTA4659并不像选择的罗伊氏乳杆菌ATCC PTA 6475一样有效。

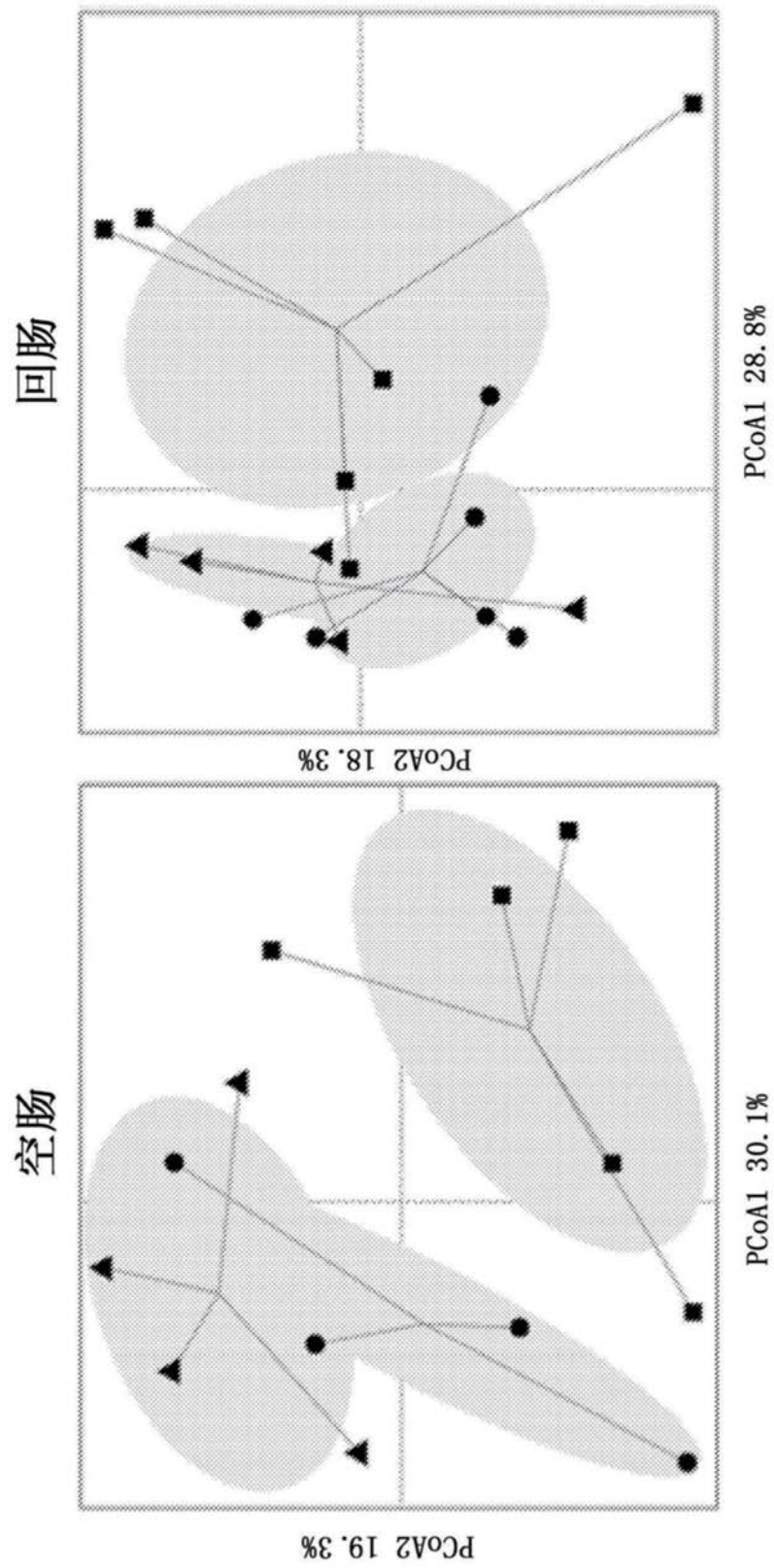


图1

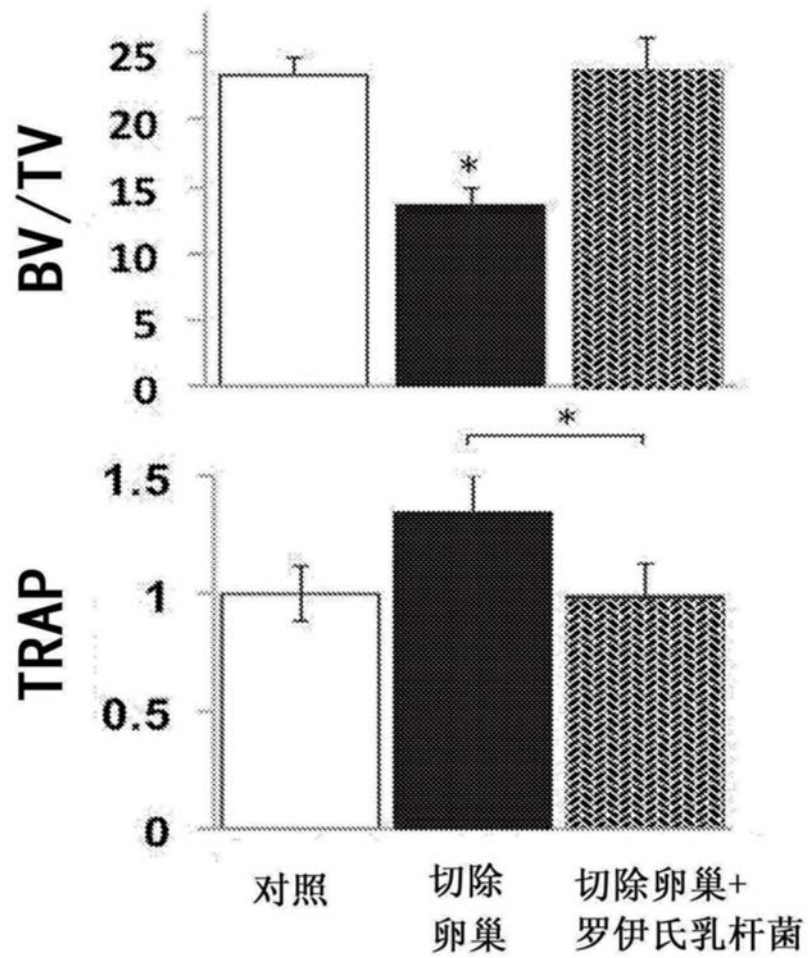


图2

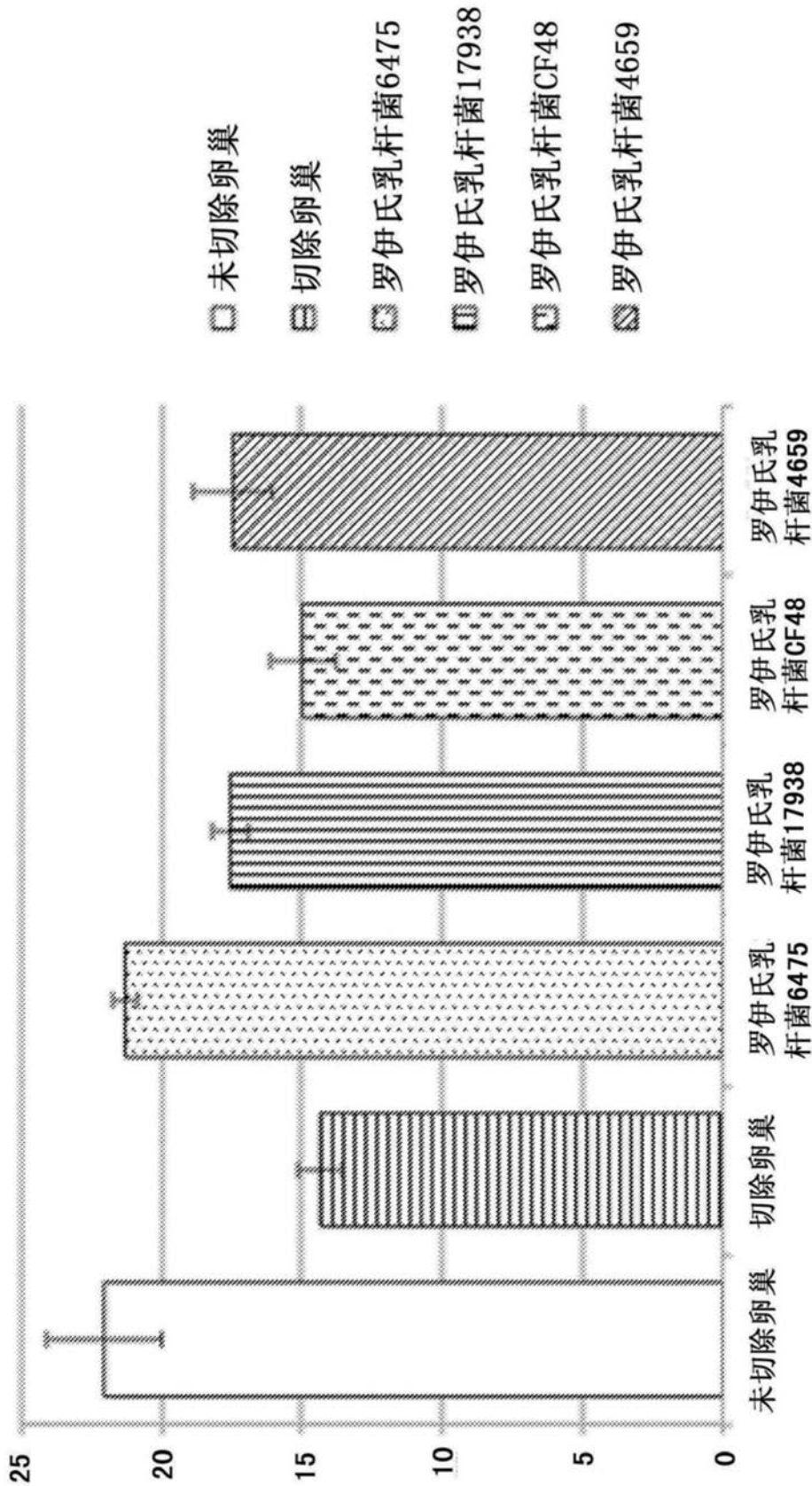


图3