



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109890955 B

(45) 授权公告日 2023.05.09

(21) 申请号 201780066547.3

(72) 发明人 J·库恩卡斯特拉纳

(22) 申请日 2017.09.29

J·萨塔斯吉特利兹

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

申请公布号 CN 109890955 A

专利代理人 王永伟 赵蓉民

(43) 申请公布日 2019.06.14

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C12N 1/20 (2006.01)

16382453.5 2016.10.03 EP

C12R 1/01 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 35/744 (2006.01)

2019.04.26

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2016030331 A1, 2016.02.04

PCT/EP2017/074844 2017.09.29

US 2016030331 A1, 2016.02.04

(87) PCT国际申请的公布数据

KR 20110019803 A, 2011.03.02

W02018/065324 EN 2018.04.12

US 2006153959 A1, 2006.07.13

(83) 生物保藏信息

US 2013209374 A1, 2013.08.15

CECT 8633 2014.05.26

CN 103298924 A, 2013.09.11

CECT 7480 2009.02.18

审查员 单珊

CECT 7481 2009.01.28

(73) 专利权人 AB生物有限公司

权利要求书2页 说明书29页

地址 西班牙,加泰罗尼亚

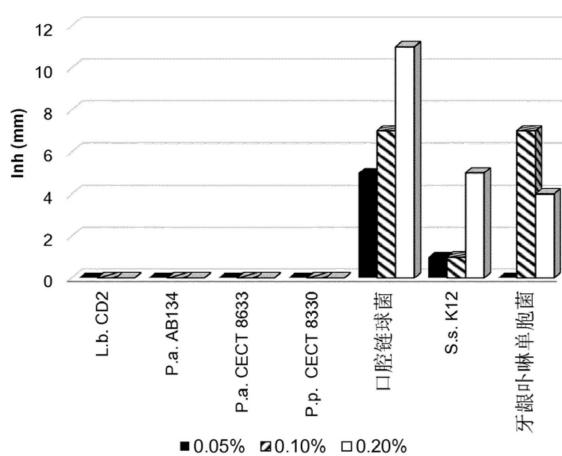
序列表1页 附图9页

(54) 发明名称

耐受抗菌剂的乳酸菌

(57) 摘要

本发明涉及具有耐受抗菌剂的能力的乳酸菌菌株。所述乳酸菌菌株进一步具有拮抗口腔病原体生长的能力。具体地说，具有这些特征的所述乳酸菌属于片球菌属，更具体地说，属于乳酸片球菌种。因此，本发明的菌株可用于个人护理领域中的组合物和产品，并且具体地说，用于口腔护理，以及用于药物产品。



1. 一种片球菌属菌株与至少一种抗菌剂组合在制备产品中的用途, 其中所述片球菌属菌株具有耐受至少一种选自由以下组成的组的抗菌剂的能力:

a) 三氯生(triclosan);

b) 精油, 其包括至少一种选自由以下组成的组的个别组分: 薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯; 以及

c) 选自由以下组成的组的个别组分: 薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯;

其中当通过对所述片球菌属菌株观察的纸片扩散测定所确定的抑制光晕小于牙龈卟啉单胞菌的抑制光晕时, 认为所述片球菌属菌株具有耐受所述抗菌剂的能力, 其中所述抗菌剂所处浓度可观察到牙龈卟啉单胞菌被抑制; 并且

其中所述片球菌属菌株和所述抗菌剂被配制成用于单独、依序、伴随施用或混合施用; 并且其中所述牙龈卟啉单胞菌是牙龈卟啉单胞菌DSM20709;

其中所述片球菌属菌株是乳酸片球菌菌株。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述乳酸片球菌菌株是以登录号CECT 8633保藏在西班牙典型培养物保藏中心(Spanish Type Culture Collection)的乳酸片球菌菌株。

3. 根据权利要求1到2中任一项所述的用途, 其中所述片球菌属菌株与至少一种选自由以下组成的组的抗菌剂组合: 三氯生; 精油, 其包括至少一种选自由薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯组成的组的个别组分; 选自由薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯组成的组的个别组分。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述片球菌属菌株与至少一种选自由以下组成的组的抗菌剂组合: 三氯生; 以及精油, 其包括至少一种选自由薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯组成的组的个别组分。

5. 根据权利要求1到2中任一项所述的用途, 其中所述抗菌剂与可接受的赋形剂和/或载剂一起被配制成人护理产品的形式, 并且所述片球菌属菌株与可接受的赋形剂和/或载剂一起被配制成人护理产品或药物产品的形式。

6. 根据权利要求5所述的用途, 其中所述个人护理产品是口腔护理产品。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中所述口腔护理产品是牙膏、口腔凝胶、口腔喷雾剂、漱口水或口服分散片剂。

8. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述产品用作药物。

9. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述产品用于预防和/或治疗口腔病症中的用途。

10. 根据权利要求9所述的用途, 其中所述预防和/或治疗包括将所述抗菌剂和所述片球菌属菌株分开施用, 即, 在施用所述片球菌属菌株与施用所述抗菌剂之间等待某一时间间隔, 并且其中所述时间间隔不长于1小时。

11. 根据权利要求10所述的用途, 其中所述预防和/或治疗包括指示待治疗的受试者用含有抗菌剂的漱口水漱口30-60秒, 并且然后将所述漱口水吐出, 并且然后将含有所述片球菌属菌株的口服片剂放入口中并且使其缓慢溶融。

12. 根据权利要求9所述的用途, 其中所述口腔病症是由口腔病原体引起。

13. 一种菌株, 其属于乳酸片球菌菌株, 所述菌株以登录号CECT 8633保藏在西班牙典型培养物保藏中心。

14. 一种用于获得以登录号CECT 8633保藏在西班牙典型培养物保藏中心的乳酸片球

菌的突变体的方法，其中所述方法包括使用所保藏CECT 8633菌株作为起始材料以及施加诱变，并且其中所获得的突变体至少保留或增强所述保藏菌株耐受抗菌剂的能力。

耐受抗菌剂的乳酸菌

技术领域

[0001] 本发明涉及个人护理、医学和微生物学领域。具体地说，本发明包含特别适用于与抗菌剂，更具体地说，用于口腔护理的抗菌剂组合的乳酸菌菌株。

背景技术

[0002] 健康的嘴是独特而宝贵的资产，并且还是一般健康和生活质量的整体组成部分。然而，口腔健康经常受到各种形式的口腔疾病(主要是龋齿和牙周病)的影响，并且偶尔也会受到口腔癌、HIV/AIDS病变、粘膜和唾液腺疾病以及口面部疼痛和裂缝的影响。这些口腔病症是人类最常见的慢性疾病，对重要的口腔功能、自尊、生活质量和整体健康和福祉产生重大影响。目前认识到口腔疾病是世界范围的流行病和主要的公共卫生问题。估计世界上90%的人口在其生命历程的某些阶段患有某些形式的口腔疾病。[Jin LJ等人“全球口腔疾病负担：新兴概念、管理和与系统健康的相互作用”《口腔疾病(Oral Diseases)》2016]。

[0003] 牙周病非常常见，并且涵盖影响牙周组织中的一种或多种的许多病症。虽然许多不同的疾病影响牙齿支持结构，但牙菌斑引起的炎症性病变占牙周的绝大多数，并且传统上分为牙龈炎或牙周炎。

[0004] 牙龈炎是影响人类最常见的慢性炎症性疾病之一，在西方人群中患病率约为75%。其特征在于发红；牙龈肿胀和频繁出血，并且这是由牙龈环境中细菌的积累引起的。这种慢性炎症可能局限于牙龈，或者当牙齿附着设备破坏时可能发展成牙周炎。因此，牙龈炎总是先于牙周炎，尽管在一些个体中，牙龈炎可能永远不会发展成牙周炎。

[0005] 因此，牙周疾病始于细菌，生物膜引起的牙齿周围软组织的炎症。细菌生物膜，也称为牙菌斑，以不同的白色阴影出现，并且与通常在与牙齿接壤的牙龈边缘发现的食物残渣结合。生物膜也常见于牙齿之间，其中通过使用牙线和牙间刷去除所述生物膜需要额外的努力。当临幊上明显时，细菌生物膜被认为是主要原因，并且累积通常与炎症的严重程度成比例。生物膜中的细菌数量与牙周病的严重程度相关。某些与破坏性牙周病相关的细菌被认为是高风险的，并且包含牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、普鲁氏菌属(*Prevotella* sp.)、齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)、核粒梭形杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)和福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)，尤其是[Haffajee, AD等人，“破坏性牙周病的微生物病原体”《牙周病学(Periodontology)》2000.1994, 第5卷, 第78-11页]。

[0006] 初始牙周治疗通常涉及生物膜的物理去除并且导致炎症的减少和整个牙周病症的改善。牙医和牙周病医生可能会建议另外的治疗方式，所述方式包含手术清创、使用局部化疗药物和处方全身抗生素。对于怀疑患者患有严重牙周病的医生，推荐抗菌口腔清洗剂通常是一种治疗选择，特别是基于经验性牙周诊断时。这种策略允许临时管理牙周状况，直到牙医可以评估患者、建立诊断并且建议进一步治疗[Laudenbach等人，“常见的牙科和牙周疾病：评估和管理”《北美医疗诊所(Med Clin N Am)》2014, 第98卷, 第1239-1260页]

[0007] 用于细菌诱导的牙周炎的常见抗菌口腔冲洗剂是葡萄糖酸氯己定0.12%。通常将此冲洗液每日使用两次，共计2周。虽然葡萄糖酸氯己定已经被确定为对牙菌斑病原体有

效,但很少推荐它作为唯一的治疗方法,并且通常用作细菌菌斑和牙结石清创术的外科手术和非手术治疗的辅助手段。此外,应告知患者潜在的副作用。氯己定可能刺激并且损害口腔粘膜,导致牙齿和其它口腔表面的变色和染色,增加结石的形成并且改变味觉。还报道了口腔刺激和局部过敏症状。此外,已经报道了粘膜副作用,包含口腔炎、牙龈炎和溃疡。因此,不建议长期使用氯己定[Flötra,L.等人“氯己定口洗的副作用”。《斯堪的纳维亚牙科研究期刊(Scand J Dent Res)》1971,第73卷,第119-125页]。

[0008] 在漱口剂中使用的其它常见抗菌剂是三氯生([5-氯-2-(2,4-氯苯氧基)苯酚)。三氯生是一种非离子型卤代苯酚,具有广泛的抗菌活性,广泛应用于北美、欧洲和亚洲。三氯生对许多类型的细菌和某些类型的真菌有效,通过包含细菌细胞壁渗透和靶向多个细胞质和膜位点的机制,

[0009] 包含RNA合成和大分子的产生,防止细菌繁殖和/或最终导致细胞死亡。然而,在担心所述化合物可能对人类健康和环境有害之后,三氯生正在受到越来越多的关注。围绕使用三氯生的潜在健康问题包含抗生素耐药性、皮肤刺激、内分泌干扰、过敏率增加以及-产品致癌的形成[Dann AB等人,“三氯生:环境暴露、毒性和作用机制”《应用毒理学(Journal of Applied Toxicology)》2011,第31卷,第285-311页]。

[0010] 作为含有合成化合物的漱口水的替代品,一些产品用如精油等“天然”化合物配制。例如, Listerine®是从精油中提取的化合物的混合物:薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯。Listerine®可以对抗有害细菌,如变形链球菌、粪肠球菌和侵蚀艾肯菌以及酵母白色念珠菌[Vlacho jannis C等人,“Listerine®、其组分及其混合物的抗菌活性的初步调查”,《植物疗法研究期刊(Phytotherapy research)》2015,第29卷,第1590-1594页]。与含有氯己定的漱口水相比,含有精油的漱口水被认为更安全并且具有更少的令人不快的副作用(例如牙齿染色和结石累积)。然而,据报道,短期治疗的有效性也较低。此外,一些精油组分可以发挥细胞毒作用,因此有理由认为含有它们的产品应该通过综合毒性研究来支持,特别要注意暴露的持续时间和所涉及的任何精油

[0011] 组分的浓度[Vlacho jannis C等人,“Listerine®产品:有效性和安全性的最新进展”《植物疗法研究期刊》2016,第30卷,第367-373页]。

[0012] 抗菌剂最相关的不良作用之一与口腔微生物群中由于其非选择性抗菌效果引起的改变有关。与抗生素不同,所述抗生素具有选择性毒性并且在

[0013] 细菌细胞内的特定部位起作用,大多数抗菌剂没有明显的细菌细胞靶标,长期使用抗菌剂,特别是在高浓度时,可以去除生物膜和/或杀死疾病相关细菌,但也可能破坏常驻口腔微生物群落的天然和有益性质。这可能导致口腔中的生态失调(也称为菌群失调)问题,这是可能导致龋齿或牙周病的发生的微生物不平衡。生态失调假说认为,从牙周健康到疾病的转变反映了牙周袋细菌群落中低丰度物种丰度的变化。微生物群落组成的这种转变导致宿主-微生物串扰的改变,足以介导破坏性炎症和骨质流失。事实上,认为牙周病的病因是基于确定是否会发生活动性牙周病的三组因素:易感宿主、致病物种的存在以及缺乏所谓的“有益细菌”。随之而来的对严格共生体与病态生物之间的比例关系的破坏触发了破坏性的级联,导致炎症的激活和随后的骨质破坏[Castalanga M等人,“口腔微生物组和牙周病和龋齿的免疫生物学”《免疫学快报(Immunology Letters)》214,第12卷,第22-38页]。

[0014] 因此,希望寻找可以减少口腔漱口剂的副作用或可以增加其功效的替代品或改进的产品,因此需要较低的剂量,尤其是在长期治疗期间。

[0015] 作为替代预防工具,已经提出使用益生菌。益生菌可能是牙周治疗研究的一个有前途的领域。益生菌被定义为“当以足够的量施用时赋予宿主健康益处的活微生物”。据信益生菌可以重新填充有益细菌,这可以帮助杀死致病细菌并且对抗感染。口服益生菌可以通过阻止有害微生物群的生长或通过调节口腔中的粘膜免疫来有益于口腔健康。益生菌种大多属于乳杆菌属和双歧杆菌属。

[0016] 市场上已知的口服益生菌是罗伊氏乳杆菌 (*L.reuteri Prodentis*)。最近的一项研究指示,含有益生菌株罗伊氏乳杆菌的片剂口服治疗可诱导大多数慢性牙周炎患者促炎细胞因子反应的显著减少和临床参数的改善 [Szkaradkiewicz, AK等人,“口服施用罗伊氏乳杆菌益生菌株对慢性牙周炎患者促炎性细胞因子反应的影响”]。《实验性阿奇夫姆免疫疗法 (Arch Immunol Ther Exp)》(Warsz) 2014, 第62卷, 第495到500页]。另一项研究的目的是评估含有罗伊氏乳杆菌的益生菌含片作为慢性牙周炎患者结垢和根面平整(SRP)的辅助手段的效果。在用益生菌处理的SRP组中观察到牙龈卟啉单胞菌的减少,但在其它研究的致病细菌中未观察到变化 [Teughels, W等人,“罗伊氏乳杆菌益生菌治疗慢性牙周炎的临床和微生物学效应:随机安慰剂对照研究”]《临床牙周病学期刊 (Journal of clinical periodontology)》2013, 第40卷, 第1025-1035页]。然而,罗伊氏乳杆菌对口腔微生物群的影响仍然值得怀疑,因为在一项平行研究中,每日摄入含有罗伊氏乳杆菌的益生菌含片(ATCC55730和ATCC PTA5289)似乎并未显著影响实验性牙龈炎期间生物膜的斑块积聚、炎症状态或微生物组成 [Hallstroem, H.等人,“实验性牙龈炎中益生菌含片对炎症反应和口腔生物膜的影响”]。《斯堪的纳维亚牙科学报 (Acta Odontologica Scandinavica)》2013, 第71卷, 第828-833页]。

[0017] 另一个例子是最近的一项研究,所述研究描述了口服施用含片与鼠李糖乳杆菌GG 和动物双歧杆菌亚种乳酸BB-12对牙菌斑、牙龈炎症和健康年轻人口腔微生物群的影响。益生菌含片可降低牙菌斑和牙龈指数,但两组中唾液的微生物组成均未发现益生菌诱导的变化。结论是益生菌含片在牙龈炎症方面改善牙周状态而不影响口腔微生物群 [Toivainen, A等人,“口服施用含片与鼠李糖乳杆菌GG 和动物双歧杆菌亚种乳酸BB-12对唾液变形链球菌数量、牙菌斑数量、牙龈炎症和健康成人口腔微生物组的影响”]。《临床口腔检查 (Clin Oral Investig)》2015, 第19卷, 第77-83页]。

[0018] 如短乳杆菌CD2等其它益生菌可以用于促进口腔健康和抑制炎性骨质疏松。然而,临床疗效尚不清楚 [Maekawa, T等人,“用益生菌短乳杆菌CD2局部治疗”抑制实验性牙周炎症和骨质疏松”]《牙周病研究期刊 (J Periodont Res)》214, 第44卷, 第785-791页]。

[0019] Nadkerny等人于2015年发表了一项临床试验,评估和比较益生菌漱口水与0.2% 氯己定和生理盐水的抗菌斑和抗炎潜力。益生菌漱口水 (Sporlac Plus ®) 通过将含有嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、产孢乳杆菌、长双歧杆菌和布拉氏酵母菌的益生菌配制品与化学家可商购的10ml蒸馏水混合来制备。益生菌和洗必泰对牙龈指数和口腔卫生指数的影响相似 [Nadkerny PV等人,“益生菌和氯己定含漱剂对牙龈炎临床炎症参数的疗效的比较评价:随机对照临床研究”]《印度牙周病学会期刊 (J Indian Soc Periodontol)》2015, 第16卷, 第633-639页]。

[0020] 最近的一项临床试验研究了益生菌作为慢性牙周炎和口臭患者治疗中洁治加根面平整(SRP)的辅助手段[Penala,S等人,“局部使用益生菌作为慢性牙周炎和口臭的洁治加根面平整的辅助手段的效果:随机对照试验”《药学实践与研究期刊(J Res Pharm Pract)》2016,第5卷第2期,第86-93页]。将受试者随机分配到检验组和对照组中。试验组(SRP+益生菌)接受龈下递送益生菌和益生菌漱口水,并且对照组(SRP+安慰剂)接受龈下递送安慰剂和安慰剂漱口水15天。益生菌包含两种益生菌的组合:每个胶囊的唾液乳杆菌(2E+09CFU)和罗伊氏乳杆菌(2E+09CFU)。每位患者给予28粒胶囊,并且要求将胶囊倒入10ml蒸馏水中,并且要求冲洗1分钟,每天冲洗两次,持续14天。在研究结束时,两组的所有临床和微生物学参数均降低,然而,PD减少(PDR)和临床附着增益(CAG)的组间比较显示除了检验组的中度口袋中的PDR之外没有统计学显著性。因此,益生菌消费的临床疗效仍然值得怀疑。

[0021] 相反,所述领域的评价[Yanine,N等人,“益生菌在牙周病中的作用:系统评价”。《临床口腔检查(Clinical oral investigations)》2013,第17卷,第1627-1634页]得出结论,益生菌对预防和治疗牙周病的有效性值得怀疑。对于主要结果,探测口袋深度,益生菌将没有临床有益效果。对于次要结果,益生菌对菌斑指数和牙龈炎症显示出很小的益处。同样,最近的一项荟萃分析得出结论,尽管益生菌治疗可以对牙龈炎症的指标产生积极影响,但目前还没有足够的证据支持使用益生菌来控制(即预防或治疗)牙周病。因此可能需要在这方面进行更多的研究,特别是考虑到媒剂或益生菌治疗剂量的影响。[Gruner,D.等人,“用于治疗龋齿和牙周炎的益生菌:系统评价和荟萃分析”。《牙科学期刊(J Dent)》2016,第48卷,第16-15页]。总之,在现有技术中已经看到益生菌可以有助于改善牙周和牙龈过程中的炎症,但益生菌是否可以具有明显的临床效果仍然值得怀疑。

[0022] L.Dunn等人的文章(《食品科学期刊(Journal of Food Science)》第81卷,2016年11月2日,第M438-M444页)描述了一系列精油(和如百里酚等单独的油组分)对不同乳酸菌(例如,乳酸菌(*Pediococcus acidilactici*),布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)和柠檬酸明串珠菌(*Leuconostoc citrovorum*))的抗微生物功效的检验。所述文章的目的是检验精油组分(例如百里酚)是否可用于适当抑制相关的乳酸菌生长,并且从而用作食品的防腐添加剂。

[0023] 因此,在所述制品中,食品中乳酸菌(例如乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*))的存在可被视为不需要的。

[0024] 换句话说,所述文章没有描述将片球菌属菌株与抗菌剂(例如百里酚)组合用于任何实际目的,如,例如预防和/或治疗口腔病症。

[0025] WO2017012905A1(AB-BIOTICS)公开了一种粉末形式的自成膜组合物,其允许益生菌在口腔中充分定植。它没有描述将片球菌属菌株与抗菌剂(例如百里酚)组合用于任何实际目的,如,例如预防和/或治疗口腔病症。

发明内容

[0026] 本发明要解决的一个问题可以被视为与提供乳酸菌(LAB)有关,其可以在包括抗菌剂的治疗方案中施用。诸位发明人发现,片球菌属菌株对抗菌剂特别耐受。

[0027] 因此,本发明的第一方面涉及与至少一种抗菌剂组合使用的片球菌属菌株,其中

所述片球菌属菌株具有耐受至少一种选自由以下组成的组的抗菌剂的能力：

[0028] a) 三氯生；

[0029] b) 精油，其包括至少一个选自由以下组成的组的个别组分：薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯；以及

[0030] c) 选自由以下组成的组的个别组分：薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯；

[0031] 其中当通过对所述片球菌属菌株观察的纸片扩散测定确定的抑制光晕小于牙龈卟啉单胞菌的抑制光晕时，认为所述片球菌属菌株具有耐受所述抗菌剂的能力，其中所述抗菌剂的浓度为观察牙龈卟啉单胞菌的抑制作用；并且

[0032] 其中所述片球菌属菌株和所述抗菌剂被配制成为单独、顺序、伴随施用或混合施用。

[0033] 可替代地，此第一方面可以配制片球菌属菌株组合抗菌剂的用途，其中片球菌属菌株具有耐受至少一种如上文所描述的抗菌剂的能力。

[0034] 第二方面涉及细菌组合物，其包括 10^4 cfu/g到 10^{12} cfu/g的至少一种片球菌属菌株的活细胞，其中片球菌属菌株至少具有如第一方面所限定的特征。

[0035] 第三方面涉及根据第二方面的组合物，其用于预防和/或治疗口腔病症。

[0036] 第四方面涉及个人护理产品或药物产品，其包括如第二方面所限定的组合物，以及可接受的赋形剂和/或载剂。

[0037] 第五方面涉及一种用于筛选和分离乳酸菌菌株的方法，其包括以下步骤：

[0038] i) 测定来自乳酸菌菌株候选物池的乳酸菌中的单独乳酸菌耐受抗菌剂的能力；以及

[0039] ii) 选择和分离耐受抗菌剂的能力高于牙龈卟啉单胞菌的乳酸菌菌株。

[0040] 在本说明书中广泛和共同的含义理解本发明的权利要求和方面中使用的术语。然而，它们在下文中在本发明的详细描述中限定。

[0041] 在整个说明书和权利要求书中，词语“包括”及其变体并不旨在排除其它技术特征、添加剂、组分或步骤。通过阅读说明书，本发明的另外的目的、优点和特征对于本领域技术人员来说将变得显而易见，或者可以通过本发明的实践来学习。此外，本发明涵盖本文所述的具体和优选实施例的所有可能组合。本文提供以下实例和附图用于说明目的，而不旨在限制本发明。

具体实施方式

[0042] 如上文所述，通常认为抗菌剂具有广谱的抗微生物活性。这样可以杀死大量的细菌和真菌，但它们也会对共生细菌或益生菌产生负面影响。事实上，众所周知，在施用后可以发现痕量的抗菌剂，因此即使在施用抗菌剂后也会损害益生菌的使用。因此，乳酸菌的使用，具体地说是作为益生菌的治疗，从未被建议可以与抗菌剂结合使用。

[0043] 本发明人惊奇地发现，片球菌属菌株具有更高的耐受抗菌剂的能力，因此当抗菌剂用于治疗或美容目的时，可以施用菌株。不受理论束缚，据信通过有利于友好细菌的竞争排斥原理，如果它们在致病菌株之前粘附，则与抗菌剂组合的片球菌属施用可以特别有效地防止机会性病原体的定植。

[0044] 因此，本发明的一个方面提供了一种与抗菌剂组合使用的片球菌属菌株，其中片

球菌属菌株具有耐受选自由以下组成的组的至少一种抗菌剂的能力:

[0045] a) 三氯生;

[0046] b) 精油,其包括至少一个选自由以下组成的组的个别组分:薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯;以及

[0047] c) 选自由以下组成的组的个别组分:薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯;

[0048] 其中当通过对所述片球菌属菌株观察的纸片扩散测定确定的抑制光晕小于牙龈卟啉单胞菌的抑制光晕时,认为所述片球菌属菌株具有耐受所述抗菌剂的能力,其中所述抗菌剂的浓度为观察牙龈卟啉单胞菌的抑制作用;并且

[0049] 其中所述片球菌属菌株和所述抗菌剂被配制成用于单独、顺序、伴随施用或混合施用。

[0050] 可替代地,此方面可以配制为片球菌属菌株组合抗菌剂的用途,其中片球菌属菌株具有耐受至少一种如上文所描述的抗菌剂的能力。

[0051] 耐受抗菌剂的乳酸菌菌株

[0052] 优选本文讨论的片球菌属菌株是分离的乳酸菌菌株。如本领域技术人员所理解的,术语“分离的”涉及乳酸菌菌株已经从其天然环境中分离-即所述乳酸菌菌株不存在于其天然环境中,因此它不含天然环境中存在的其它生物和物质。

[0053] 如本文所使用的,术语“耐受性”是指微生物在瞬时暴露于抗菌剂后存活的能力,无论是否遗传,这通常通过减慢必需的细菌过程来实现。文献中通常理解“耐受性”是指微生物在最小抑制浓度(MIC)没有变化的情况下存活的能力。然而,还可以理解为微生物对抗微生物剂的敏感性降低,其特征在于提高的最小抑制浓度(MIC),或抗微生物剂不再阻止微生物生长的情况。

[0054] 如本文所使用的术语“抗菌剂”是指破坏或抑制活组织中或活组织上的微生物生长的抗微生物剂。术语“抗微生物剂”在本发明中具有本领域的正常含义,即杀死微生物或抑制其生长的试剂。它们可以根据其主要作用的微生物,例如针对细菌(抗菌剂)和针对真菌(抗真菌剂)进一步分组。抗菌剂通常与抗生素不同,因为抗生素通常通过淋巴系统运输以破坏体内的细菌,以及与消毒剂不同,所述消毒剂消灭在非生物体上发现的微生物。

[0055] 基于实例2到实例3中描述的详细测定,技术人员通常能够重复测定以客观地确定具体菌株是否具有耐受抗菌剂的能力。具体地,实例2提供了确定菌株是否能够耐受抗菌剂的方法,其中耐受性表达为通过纸片扩散测定法确定的抑制光晕。例如,当通过对片球菌属菌株观察到的纸片扩散测定确定的抑制光晕小于牙龈卟啉单胞菌的所述抑制光晕时,认为所述片球菌属菌株具有耐受所述抗菌剂的能力,其中所述抗菌剂的浓度为观察牙龈卟啉单胞菌的抑制作用;

[0056] 在一些实施例中,当通过对片球菌属菌株的纸片扩散测定确定的抑制光晕的直径比对牙龈卟啉单胞菌确定的直径小至少1mm、2mm、3mm或4mm时,片球菌属菌株将被认为具有耐受抗菌剂的能力。在一个更具体的实施例中,对片球菌属观察到的抑制光晕的直径比对牙龈卟啉单胞菌确定的抑制光晕的直径小至少4mm。

[0057] 本发明提供的片球菌属菌株的特征在于具有耐受第一方面中描述的抗菌剂中的至少一种的能力。然而,重要的是要注意,除了这种能力之外,菌株还可以耐受其它相关的抗菌剂,如实例中所示。这意指第一方面中描述的特征可以被认为是限定可用于本发明目

的一组片球菌属菌株的关键特征或标记。

[0058] 通过所述实例,提供了不同的菌株,以便以比牙龈卟啉单胞菌更好的方式符合这种耐受抗菌剂的能力。对于所述菌株,通过详细描述的方法,鉴定和分离LAB池中的其它具有相同的耐受抗菌剂的能力的菌株是合理的。通过实例还证明,对抗菌剂的耐受性特征对于本发明的目的是有益的。因此,尽管已经用这种有益特征检验和鉴定了一些特定菌株,但没有理由将本发明的范围限制于这些菌株,因为本文合理地描述了获得其它良好菌株的方法的所有步骤。因此,本发明还提供了除在实例中使用的具有相同特征的菌株池。值得注意的是,并非所有LAB菌株都具有耐受抗菌剂的能力;因此,本发明提供了一种识别它们的方法。

[0059] 类似地,需要注意的是,实例2中公开的纸片扩散测定和测定条件的使用不限制本发明的范围。所述测定适用于检验菌株耐受抗菌剂的能力。本领域技术人员将选择抗菌剂的浓度和量,以根据待检验的抗菌剂检验菌株的耐受性。具体地,待使用的抗菌剂的浓度和量将是观察牙龈卟啉单胞菌抑制所必需的浓度和量。

[0060] 三氯生(CAS登记号3380-34-5) (TCS)是一种二苯基醚,并且可以被称为2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚、5-氯-2-(2,4-二氯苯氧基)苯酚或三氯生。TCS的分子式为C₁₂H₇C₁₃O₂,并且化学分子量为289.55。大多数商业上获得的TCS等级纯度超过99%,并且以固体形式获得,为具有几乎不可检测的芳香气味的白色至-米白色结晶粉末。三氯生对许多类型的细菌和某些类型的真菌有效,防止细菌繁殖和/或最终细胞死亡。它渗透细菌细胞壁并且靶向多个细胞质和膜位点,包含RNA合成和不同生物分子的产生。

[0061] 精油还可用作替代抗菌剂,具体地说是用于口腔护理。如本文所定义的“精油”(E0)是从植物或动物来源获得的油或其合成等同物,并且由若干种组分的复杂混合物构成,如单萜烯和倍半萜烯烃,单萜烯和倍半萜烯醇、酯、醚、醛、酮、氧化物等。

[0062] “精油的各个组分”是可以从油(天然)中分离的化合物或者可以是完全或部分化学合成的化合物。

[0063] 薄荷醇也可称为2-异丙基-5-甲基环己醇或5-甲基-2-(1-甲基乙基)环己醇,并且是合成制备的或由玉米薄荷油、胡椒薄荷油或其它薄荷油获得的有机化合物。

[0064] 桉树油是一种环醚和一种单萜,其在尤加利桉属植物的精油中特别丰富。桉油精也有多种同义词:1,8-桉油醇、1,8-桉叶素、桉油精、1,8-环氧-p-薄荷烷、1,8-氧化-对薄荷烷、桉树脑(eucalyptol)、桉树脑(eucalyptole)、1,3,3-三甲基-2-氧杂双环[2,2,2]辛烷、桉油醇、桉树脑(cineole)。

[0065] 百里酚(也称为2-异丙基-5-甲基苯酚)是甲基异丙基苯酚的天然单萜酚衍生物,与香芹酚异构体,在百里香油中发现,并且从百里香(普通百里香)和各种其它植物中提取,作为具有令人愉快的芳香气味和强大的防腐性能的白色结晶物质。

[0066] 水杨酸甲酯是由许多植物种类天然产生的有机酯,特别是冬青。水杨酸甲酯通常也称为2-羟基苯甲酸甲酯、白花油、冬青油或桦木油。

[0067] 在一个实施例中,片球菌属菌株进一步具有从双金刚胺组中耐受抗菌剂的能力。

[0068] “双胍类”是一类以其杀菌性能而闻名的化学相关化合物。这些化合物包含抗菌剂阿立哌啶和氯己定。阿立西定也可以称为1-[N’-[6-[[氨基-[[N’-(2-乙基己基)氨基甲酰亚胺基]氨基]亚甲基]氨基]己基]氨基甲酰亚胺基]-2-(2-乙基己基)胍。洗必泰是一种阳

离子聚双胍并且也可以称为(1E)-2-[6-[[氨基-[(E)-[氨基-(4-氯苯胺基)亚甲基]-氨基]亚甲基]氨基]己基]-1-[氨基-(4-氯苯胺基)亚甲基]胍。

[0069] 更具体地,片球菌属菌株具有耐受葡萄糖酸氯己定的能力。

[0070] 本发明人还发现,片球菌属菌株还可以具有抑制细菌病原体(即拮抗)生长的能力,尤其是口腔的病原体。这使得片球菌属菌株特别有用,可避免病原体的定植并且甚至抑制它们的生长,从而改善微生物群的特征。

[0071] 因此,在一个实施例中,片球菌属菌株进一步具有拮抗至少一种选自由以下组成的组的病原体的能力:核镰刀菌(*Fusarium nucleatum*)、密螺旋体(*Treponema denticola*)和普氏菌(*Prevotella denticola*)。具体地,片球菌属菌株具有拮抗这些病原体中的至少两种的能力。更具体地,片球菌属菌株具有拮抗核镰刀菌、密螺旋体和普氏菌的能力。

[0072] 在一个具体的实施例中,片球菌属菌株进一步具有拮抗福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)的能力。

[0073] 在一个具体的实施例中,片球菌属菌株进一步具有拮抗牙龈卟啉单胞菌的能力。

[0074] 基于本文所描述的详细测定(参见实例4的拮抗活性测定),技术人员通常能够重复此测定以客观地确定感兴趣的菌株是否拮抗病原体。拮抗活性测定的描述和条件不限制本发明的范围。所述测定适用于检验感兴趣的菌株拮抗病原体的能力。

[0075] 在具体实施例中,片球菌属菌株是乳酸片球菌菌株。更具体地,片球菌属菌株是保藏在西班牙典型培养物保藏中心的登录号为CECT 8633的乳酸片球菌。

[0076] 因此,本发明的一个方面涉及一种菌株,其属于乳酸片球菌种,所述乳酸片球菌种以登录号CECT 8633保藏在西班牙典型培养物保藏中心。

[0077] 本发明的另一方面提供了一种组合物,其包括 10^4 到 10^{12} cfu/g的至少一种片球菌属菌株的活细胞,其中片球菌属菌株至少具有第一方面所限定的特征(即耐受抗菌剂的能力)。

[0078] 本发明的组合物可以包括单一菌株或属于相同或不同物种的不同LAB菌株的组合。在具体实施例中,发现本发明的片球菌属菌株与植物乳杆菌菌株和/或短乳杆菌菌株组合。更具体地,包括本发明的片球菌属菌株的组合物,进一步包括保藏在西班牙典型培养物保藏中心的登录号为CECT 7481的植物乳杆菌菌株,以及保藏在西班牙典型培养物保藏中心的登录号为CECT 7480的短乳杆菌菌株。

[0079] 显然,通过使用保藏的菌株作为起始材料,本领域技术人员通常可以通过常规诱变或再分离技术获得其它变体或其突变体,其保留或增强形成本发明组合物的菌株的本文描述的相关特征和优点。因此,本发明还涉及本文公开的菌株的变体。如本文所使用的,术语菌株的“变体”或“突变体”是指主要通过突变从参考菌株X获得的任何天然存在的或特异性开发的菌株,其保持与菌株相似的耐受抗菌剂的能力。

[0080] 例如,如本文所设想的“变体”菌株的16S rRNA基因可以与本文公开的菌株的16S rRNA序列SEQ ID NO:1共享约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性。

[0081] 在另一个实施例中,变体与亲本菌株之间的相关程度被确定为当使用一种或多种限制性核酸内切酶通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析亲本和变体菌株的基因组时获得的相似程度。PFGE获得的相似度可以通过Dice相似系数来测量。在一些实施例中,变体与亲本菌

株之间的Dice相似系数为约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约99.1%、约99.5%、约99.6%、约99.7%、约99.8%、约99.9%、约99.99%、约99.999%、约99.9999%、约99.99999%或约99.999999%或更高但低于100%。

[0082] 在一个具体的实施例中,通过使用重组DNA技术获得突变体。在另一个实施例中,通过随机诱变获得突变体。因此,本发明的另一方面涉及获得乳酸片球菌突变体的方法,其中菌株是菌株CECT 8633,其中所述方法包括使用保藏的菌株作为起始材料并且进行诱变,并且其中所获得的变体或突变体进一步保留或增强至少保藏菌株耐受抗菌剂的能力。

[0083] 在具体实施例中,菌株已经在人工培养基中发酵并且在发酵后进行后处理,以获得细菌细胞,并且所得细菌细胞为液体培养基或固体形式。具体地,后处理选自由以下组成的组:干燥、冷冻、冷冻干燥、流化床干燥、喷雾干燥和在液体培养基中冷藏,并且更具体地说,是冷冻干燥。

[0084] 通过在合适的人工培养基中并且在合适的条件下培养(或发酵)细菌来生产本发明的菌株。用于微生物的表达“人造培养基”应理解为含有天然物质的培养基,以及任选的合成化学品,如可以再现血清的一些功能的聚合物聚乙烯醇。常用的合适的人工培养基是营养液体培养基,其含有包含碳源(例如葡萄糖)、氮源(例如氨基酸和蛋白质)、细菌生长所需的水和盐的元素。生长培养基可以是液体形式或通常与琼脂或其它胶凝剂混合以获得固体培养基。可以单独培养菌株以形成纯培养物,或者与其它微生物一起作为混合培养物,或者通过分别培养不同类型的细菌,并且然后将它们以所期望的比例组合。培养后,根据最终配制品,菌株可以用作纯化细菌,或可替代地,细菌培养物或细胞悬浮液可以原样使用或在适当的后处理后使用。在本说明书中,术语“生物质”应理解为培养后获得的细菌菌株培养物(或发酵作为培养的同义词)。

[0085] 在本发明的上下文中,术语“后处理”应理解为对生物质进行的任何处理,目的是获得可存储的细菌细胞。后处理的目的是降低生物质中细胞的代谢活性,并且因此减缓细胞有害反应的速度。作为后处理的结果,细菌细胞可以是固体或液体形式。在固体形式中,储存的细菌细胞可以是粉末或颗粒。在任何情况下,含有细菌细胞的固体和液体形式都不存在于自然界中,因此不是天然存在的,因为它们是一个或多个人工后处理过程的结果。在具体实施例中,后处理过程可能需要使用所谓的后处理剂中的一种或多种。在本发明的上下文中,表达“后处理剂”是指用于进行本文所述的后处理过程的化合物。在后处理剂中包含但不限于脱水剂、抑菌剂、冷冻保护剂(冷冻保护剂)、惰性填料(也称为冻干保护剂)、载体材料(也称为芯材料)等,它们可以单独使用或组合使用。

[0086] 有两种降低细菌细胞代谢活性的基本方法,并且因此有两种方法可以进行后处理。第一个是降低所有化学反应的速率,这可以通过使用冰箱、机械冷冻机和液氮冷冻机冷藏或冷冻来降低温度。可替代地,通过添加抑制细菌细胞生长的物质,即抑菌剂,缩写为Bstatic,可以降低所有化学反应的速率。

[0087] 进行后处理的第二种方法是从生物质中除去水,所述过程可以涉及使用冷冻干燥器升华水。从生物质中除去水的合适技术是干燥、冷冻干燥、喷雾干燥或流化床干燥。产生固体形式的后处理可以是干燥、冷冻、冷冻干燥、流化床干燥或喷雾干燥。

[0088] 后处理优选是冷冻干燥,其涉及通过在减压下升华从冷冻的细菌悬浮液中除去水。此过程由三个步骤组成:将产品预冷冻以形成冷冻结构,初步干燥以除去大部分水,并

且进行二次干燥以除去结合水。由于制备和分离冻干细菌培养物的工业过程的客观和预期的可变性,后者通常含有一定量的惰性填料,也称为冻干保护剂。它的作用是标准化产品中活益生菌的含量。使用市售冻干培养物中的以下惰性填料:蔗糖、甘蔗糖、乳糖、海藻糖、葡萄糖、麦芽糖、麦芽糖糊精、玉米淀粉、菊粉和其它药学上可接受的非吸湿性填料。任选地,其它稳定剂或冷冻保护剂如抗坏血酸也用于形成粘性糊状物,对其进行冷冻干燥。在任何情况下,可以将如此获得的材料研磨成合适的尺寸,包含研磨成粉末。

[0089] 乳酸菌与抗菌剂组合使用

[0090] 如上文所描述的,本发明的片球菌属菌株能够耐受抗菌剂,因此适合与抗菌剂组合使用。抗菌剂的实例包含但不限于三氯生、植物提取物和精油、双胍和十六烷基吡啶。

[0091] 在一个具体的实施例中,片球菌属菌株与三氯生组合使用。

[0092] 在另一个具体实施例中,片球菌属菌株与精油组合使用。它们的实例包括但不限于肉桂油、罗勒油、佛手柑油、快乐鼠尾草油、依兰油、橙花油、檀香油、乳香油、姜油、薄荷油、薰衣草油、绝对茉莉、天竺葵油波旁威士忌、留兰香油、丁香油、广藿香油、迷迭香油、紫檀油、檀香油、茶树油、香草油、柠檬草油、雪松油、香脂油、陈皮油、桧木油、Hiba油、银杏油、桉树油、柠檬油、橙油、甜橙油、石榴籽油、麦卢卡油、香茅油、冬青油和金盏花油。在更具体的实施例中,片球菌属菌株与选自由以下组成的组的精油组合使用:薄荷油、桉树油、百里香油和冬青油。

[0093] 在一个具体的实施例中,片球菌属菌株与“精油的各个组分”组合使用。“精油的单个组分”的实例包含但不限于百里香、牛至、姜黄素、1-香茅醇、 α -戊基肉桂醛、lyral、香叶醇、法呢醇、羟基香茅醛、异丁香酚、丁子香酚、樟脑、桉油精、芳樟醇、柠檬醛、百里酚、柠檬烯和薄荷脑。各个组分的其它实例包含倍半萜类化合物,其可以是精油中的活性化合物。含有15个碳的倍半萜化合物由三个5-碳异戊二烯单元生物合成形成。倍半萜化合物包括但不限于法呢醇、橙花叔醇、红没药醇、apritone、母菊奥、檀香醇、姜醇、胡萝卜醇和丁香烯。在更具体的实施例中,片球菌属菌株与精油的单个组分组合使用,所述精油选自由以下组成的组:薄荷醇、桉油精、百里酚和水杨酸甲酯。

[0094] 在一个具体实施例中,片球菌属菌株与双胍类,更特别是阿来西定或氯己定组合使用。阿立西定和氯己定主要用作其盐。根据本发明的氯己定盐包含但不限于氯己定棕榈酸酯、氯己定二磷酸酯、氯己定二葡萄糖酸盐、氯己定二乙酸盐、氯己定二盐酸盐、氯己定二氯化物、氯己定二氢碘化物、氯己定二高氯酸盐、氯己定二硝酸盐、氯己定硫酸盐、氯己定亚硫酸盐、氯己定硫代硫酸盐、氯己定二酸磷酸盐、氯己定二氟磷酸盐、氯己定二丙酸盐、氯己定二碘丁酸盐、氯己定二戊酸盐、氯己定二丙酸盐、氯己定丙二酸盐、氯己定琥珀酸盐、氯己定苹果酸盐、酒石酸氯己定、氯己定二甘醇酸盐、氯己定单硬糖酸盐、氯己定二乳酸盐、氯己定二- α -羟基异丁酸酯、氯己定二葡萄糖酸盐、氯己定二异硫酸盐、氯己定二苯甲酸盐、氯己定二甲酸盐、氯己定二氢化合物、氯己定二间苯二甲酸酯、氯己定二-2-羟基萘酸酯和盐酸氯己定。在一个更具体的实施例中,片球菌属菌株与氯己定,更具体地说是葡萄糖酸氯己定组合使用。

[0095] 本发明的菌株和抗菌剂可以被配制成用于单独、顺序、伴随施用或混合施用。

[0096] 本领域技术人员根据待治疗的病症确定施用方案和形式。抗菌剂和乳酸菌的施用可以分开施用(在施用片球菌属菌株与施用抗菌剂之间等待某一时间间隔)、顺序地(一个

接一个地)、同时(同步)或混合(一起)施用。在一个实施例中,本发明的抗菌剂和菌株在不长于12小时的时间间隔内施用。具体地,时间间隔不超过6小时。更具体地,时间间隔不超过1小时。更具体地,时间间隔不超过10分钟。在更具体的实施例中,治疗方案基于同时施用抗菌剂和菌株。一种典型的施用方案在于施用抗菌剂并且随后施用本发明的片球菌属菌株。在一些实施例中,抗菌剂和片球菌属菌株同时施用。当抗菌剂和乳酸菌同时向患者施用时,它们可以作为单独的形式或作为单一组合物的一部分施用。当产品以分开的剂型施用时,剂型可以在相同或不同的容器中。

[0097] 在具体的施用治疗中,待治疗的受试者被指示用含有抗菌剂(例如浓度为0.12% (w/v) 的氯己定)的漱口水漱口30-60秒。然后,将漱口水分开并且将含有乳酸菌的口服片剂放入口中并且使其缓慢熔融。

[0098] 如监督从业者认为合适的,施用可以是慢性的或间歇性的,具体地说是考虑到疾病状态的任何变化或任何不希望的副作用。“慢性”施用是指以连续方式施用组合物,而“间歇”施用是指通过中断进行的治疗。

[0099] 在非限制性实施例中,本发明的片球菌属菌株和组合物由牙科专业人员在急性治疗中使用,并且患者可以使用口腔护理产品进行维持治疗,所述口腔护理产品如口香糖、牙膏、漱口水、口腔喷雾剂、含片或口服可分散片剂,其包括本发明粉末形式的自成膜组合物或具有常见赋形剂的乳酸菌。牙科专业人员的施用可以例如通过注射器,具体地说是用钝头针施用本发明的组合物来进行。专业施用的其它非限制性实例是应用含有包括本发明组合物的凝胶的口腔夹板,或通过使用刷子将配制成清漆的组合物应用于牙齿表面。在如口臭、牙周炎、牙龈炎或龋齿等应用中,本发明的组合物也可以由患者自身应用。

[0100] 在一个具体实施例中,抗菌剂的浓度范围为0.05% (w/w) 到0.5% (w/w) 。更具体地,抗菌剂的浓度为0.05% (w/w) 到0.2% (w/w) 。更具体地,浓度为0.05% (w/w) 、0.1% (w/w) 、0.12% (w/w) 或0.2% (w/w) 。

[0101] 本发明的一个方面提供了一套部件,其包括:a)包括抗菌剂的第一小瓶;以及b)包括至少一种片球菌属菌株的第二小瓶。在具体实施例中,所述试剂盒进一步包括使用说明书,更具体地包括与剂量和/或施用方案有关的信息。

[0102] 个人护理产品

[0103] 在一个方面,本发明提供个人护理产品,其包括本发明的菌株和组合物以及可接受的赋形剂和/或载剂。术语“个人护理产品”是指用于个人卫生和/或美化(化妆品)的产品。

[0104] 如本领域技术人员所理解的,个人护理产品包括有效量的本发明菌株。有效量的片球菌属菌株将由本领域技术人员确定,并且将随着要实现的特定目标、所治疗患者的年龄和身体状况、潜在病症的严重性和最终配制品而变化。例如,在口腔健康产品中,一种或多种菌株的存在量为约 10^5 cfu/g到约 10^{12} cfu/g,具体地说是约 10^7 cfu/g到约 10^{11} cfu/g的量。术语“菌落形成单位”(“cfu”)定义为通过琼脂板上的微生物计数揭示的细菌细胞数。在具体实施例中,组合物包括 10^7 cfu/g- 10^{10} cfu/g。

[0105] 术语“赋形剂”在本说明书中广泛理解,包含与药物产品、兽医产品、药物、食品补充剂、医疗食品和个人卫生产品的活性组分一起配制的任何天然或合成物质。最合适的一种或多种赋形剂取决于最终配制品。

[0106] 可以利用本发明的个人护理产品的非限制性实例包含条皂、液体肥皂(例如洗手皂)、洗手液(包含冲洗和免洗酒精和水基手消毒剂)、棉签和垫、剃须膏、滑石粉、涂鸦纸、术前皮肤消毒剂、湿纸、清洁湿巾、消毒湿巾、沐浴露、痤疮治疗产品、抗真菌尿布疹霜、抗真菌护肤霜、洗发水、护发素、化妆品除臭剂、抗菌霜、身体乳液、护手霜、外用乳霜、须后乳液、爽肤水、口腔卫生用品、防晒乳液和婴儿用品,如但不限于清洁湿巾、婴儿洗发水、婴儿香皂和婴儿尿布疹膏。

[0107] 本发明还可以应用于伤口护理物品,如但不限于伤口愈合软膏、乳膏和乳液、伤口覆盖物、烧伤伤口霜、绷带、胶带和消毒带、以及医疗制品,如医用长袍、帽子、口罩、鞋套、手术滴等。

[0108] 在一个具体实施例中,个人护理产品是局部乳膏或凝胶。

[0109] 在本发明的各个非限制性实施例中,包括本发明组合物的个人护理产品可以进一步包括增稠剂和/或胶凝剂,如硬脂醇、阳离子羟乙基纤维素(Ucare; JR30)、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素(Klucel)、壳聚糖吡咯烷酮羧酸盐(Kytamer)、山醇、硬脂酸锌、乳化蜡,包含但不限于Incroquat和Polawax、丙烯酸的加成聚合物,如Carbopol(R) ETDTM 2020等树脂、瓜尔胶、阿拉伯树胶、丙烯酸酯/硬脂醇聚醚-20甲基丙烯酸酯共聚物、琼脂、藻酸盐、海藻酸、丙烯酸铵共聚物、海藻酸铵、氯化铵、硫酸铵、支链淀粉、绿坡缕石、膨润土、C9-15醇、醋酸钙、海藻酸钙、角叉菜胶、氯化钙、辛醇、卡波姆910、卡波姆934、卡波姆934P、卡波姆940、卡波姆941、羧甲基羟乙基纤维素、羧甲基羟丙基瓜尔胶、角叉菜胶、纤维素、纤维素胶、鲸蜡醇、十六醇、玉米淀粉、硬树胶、糊精、二苯并吡啶山梨醇、乙烯二氢化牛油酰胺、乙烯二酰胺、乙烯二硬脂酰胺、明胶、瓜尔胶、瓜尔胶羟丙基三甲基氯化铵、锂蒙脱石、透明质酸、水合二氧化硅、羟丁基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟乙基乙基纤维素、羟乙基硬脂酰胺-MIPA、异十六烷醇、异硬脂醇、刺梧桐树胶、海带、月桂醇、刺槐豆胶、硅酸铝镁、硅酸镁、三硅酸镁、甲氧基PEG-22/十二烷基二醇共聚物、甲基纤维素、微晶纤维素、蒙脱石、肉豆蔻醇、燕麦粉、油醇、棕榈仁醇、果胶、PEG-2M、PEG-5M、聚丙烯酸、聚乙烯醇、海藻酸钾、聚丙烯酸钾铝、角叉菜胶、氯化钾、硫酸钾、马铃薯淀粉、海藻酸丙二醇酯、丙烯酸钠/乙烯醇共聚物、羧甲基葡聚糖钠、角叉菜胶钠、硫酸纤维素钠、氯化钠、聚甲基丙烯酸钠、硅铝酸钠、硫酸钠、硬脂酸锌、硬脂酸锂、硬脂醇、牛脂醇、TEA-盐酸盐、黄蓍胶、十三烷醇、氨丁三醇镁铝硅酸盐、小麦粉、小麦淀粉、黄原胶、丙二醇、丙烯亚油酸、山嵛酸铝、辛酸铝、二亚油酸铝、二硬脂酸铝盐、二硬脂酸铝、蜂蜡、山嵛酸酰胺、丁二烯/丙烯腈共聚物、C29-70酸、山嵛酸钙、硬脂酸钙、小烛树蜡、巴西棕榈、地蜡、胆固醇、胆甾醇羟基硬脂酸酯、椰子醇、柯巴脂、二甘油硬脂酸苹果酸盐、二氢枞醇、二甲基月桂胺油酸盐、十二烷酸/鲸蜡硬脂醇/乙二醇共聚物、芥酸酰胺、乙基纤维素、甘油三乙酰基羟基硬脂酸酯、甘油基三乙酰基蓖麻油酸酯、二醇二山嵛酸酯、二醇二辛酸酯、二硬脂酸二硬脂酸酯、己二醇二硬脂酸酯、氢化C6-14烯烃聚合物、氢化蓖麻油、氢化棉籽油、氢化猪油、氢化鲱鱼油、氢化棕榈仁甘油酯、氢化棕榈仁油、氢化棕榈油、氢化聚异丁烯、氢化大豆油、氢化牛脂酰胺、氢化牛脂甘油酯、氢化植物甘油酯、氢化植物油、日本蜡、荷荷巴蜡、羊毛脂醇、乳木果油、月桂酰胺、脱氢松香酸甲酯、甲基氢化松香酸酯、松香酸甲酯、甲基苯乙烯/乙烯基甲苯共聚物、微晶蜡、褐煤酸蜡、褐煤蜡、肉豆蔻二十二醇、肉豆蔻酰十八烷醇、十八烯/马来酸酐共聚物、辛基十二烷基硬脂酰硬脂酸酯、油酰胺、油脂、蜡叶油椰蜡、氧化聚乙烯、地蜡、石蜡、季戊四醇氢化松香酸酯、季戊四醇四辛酸。

酯、季戊四醇松香酯、季戊四醇四棕榈酸酯、季戊四醇四山嵛酸酯、季戊四醇四油酸酯、季戊四醇四硬脂酸酯、眼用酐/甘油/缩水甘油基癸酸酯共聚物、眼用/偏苯三酸/二醇共聚物、聚丁烯、聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚二戊烯、聚乙烯、聚异丁烯、聚异戊二烯、聚乙烯醇缩丁醛、月桂酸聚乙烯酯、丙二醇二辛酸酯、丙二醇二丙酸酯、丙二醇二异壬酸酯、丙二醇二月桂酸酯、丙二醇二壬酸酯、丙二醇二硬脂酸酯、丙二醇二癸酸酯、PVP/econsene共聚物、PVP/十六烯共聚物、米糠蜡、司拉氯铵膨润土、司拉氯铵水辉石、硬脂酰胺、硬脂酰胺DEA-二硬脂酸酯、硬脂酰胺DIBA-硬脂酸酯、硬脂酰胺MEA-硬脂酸酯、硬脂酮、硬脂基芥酰胺、硬脂酸十八醇脂、硬脂醇硬脂酰氧基硬脂酸酯、合成蜂蜡、合成蜡、三羟基硬脂精、三异壬精、三异硬脂精、三异硬脂醇三聚亚油酸酯、甘油三月桂酸酯、三聚亚油酸、甘油三亚油酸酯、三肉豆蔻酸甘油酯、三油酰甘油酯、软脂酸甘油酯、三硬脂精、月桂酸锌、肉豆蔻酸锌、葵酸锌、松脂酸锌及其混合物。媒剂中使用的胶凝剂可以是天然胶凝剂，如天然树胶、淀粉、果胶、琼脂和明胶。通常，胶凝剂基于多糖或蛋白质。实例包含但不限于瓜尔胶、黄原胶、海藻酸(E400)、海藻酸钠(E401)、海藻酸钾(E402)、海藻酸铵(E403)、海藻酸钙(E404, 来自褐藻的多糖)、琼脂(E406, 从红海藻获得的多糖)、角叉菜胶(E407, 从红海藻获得的多糖)、刺槐豆胶(E410, 来自角豆树种子的天然树胶)、果胶(E440, 从苹果或柑橘果实获得的多糖)和明胶(E441, 通过动物胶原的部分水解制备)。

[0110] 在本发明的各个非限制性实施例中，用于个人护理产品的菌株和组合物可以进一步包括表面活性剂。表面活性剂可以是阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。非离子表面活性剂的实例包含聚乙氧基化物、脂肪醇(例如，ceteth-20(具有平均约20个环氧乙烷单元的聚环氧乙烷的十六烷基醚)和可从ICI Americas, Inc. (威明顿市, 特拉华州)获得的其它“BRIJ”(R)非离子表面活性剂)、椰油酰胺丙基甜菜碱、烷基酚、山梨糖醇的脂肪酸酯、脱水山梨糖醇或聚氧乙烯脱水山梨糖醇。合适的阴离子表面活性剂包含月桂基硫酸铵和月桂基醚磺基琥珀酸盐。在本发明的各个非限制性实施例中，个人护理产品可以包括水。

[0111] 在本发明的各个非限制性实施例中，用于个人护理产品的菌株和组合物可以进一步包括水凝胶，所述水凝胶包括例如化合物，如羟丙基甲基纤维素、阳离子羟乙基纤维素(U-护理聚合物)、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟甲基纤维素、羧甲基纤维素、聚环氧乙烷(聚氧乙烯树脂)和壳聚糖吡咯烷酮羧酸盐(Kytomer PC)。

[0112] 本发明的菌株和组合物还意指用于口腔健康应用。因此，在一个具体实施例中，个人护理产品是口腔护理产品，其包括本发明的菌株或组合物，以及药学赋形剂、或化妆品可接受的赋形剂或其它可食用组分。应理解，本发明的组合物将是有效量的。术语“口腔护理产品”是指用于保持口腔和牙齿清洁以防止牙齿问题的产品，最常见的是龋齿、牙龈炎、牙周(牙龈)疾病和口臭。在这种意义上，口腔卫生产品不是故意吞咽用于特定治疗剂的全身施用，而是保留在口腔中足够的时间以接触基本上所有牙齿表面和/或口腔组织以用于口服活动。这类产品的非限制性实例是牙膏、洁齿剂、牙粉、局部口腔凝胶、漱口水、假牙产品、口腔喷雾剂、口香糖、牙线、牙科带、喷砂粉、抛光膏、牙科清漆、裂缝密封剂、填充材料、口服乳膏或凝胶、糖果、锭剂、口服可分散片剂或条带、或可直接撒入口腔的粉末。

[0113] 在具体实施例中，口腔护理产品选自由以下组成的组：牙膏、口腔凝胶、口腔喷雾剂、漱口水或口腔分散片剂。

[0114] 口腔护理产品可以另外包括调味剂和掩味剂。用于口腔护理产品的这些试剂的非限制性实例包含肉桂醛、丁香酚、桉油精、薄荷醇、N-乙基-对薄荷烷-3-甲酰胺、茴香脑、薄荷油、留兰香油和玉米薄荷油。

[0115] 口腔护理产品可以任选地包含保湿剂、胶凝剂、研磨剂、氟化物源、脱敏剂、调味剂、着色剂、甜味剂、抗菌剂、结构化剂、表面活性剂、抗牙垢剂和抗牙菌斑剂。

[0116] 口腔护理产品还可以包括其它口服活性剂,如牙齿增白活性剂,包含漂白剂或氧化剂、如过氧化物、过硼酸盐、过碳酸盐、过氧酸、过硫酸盐、金属亚氯酸盐及其组合。在用于本发明的口腔护理活性物质中还可以考虑牙齿颜色改性物质。

[0117] 牙膏的配制品是本领域技术人员所熟知的。在牙膏组合物中,优选使用非离子(例如具有糖的脂肪酸酯)或两性(例如椰子衍生的甜菜碱)表面活性剂,因为阴离子表面活性剂对牙龈的脆弱上皮组织具有负面影响。在牙膏的情况下,特别优选使用碳酸氢钠来中和口腔酸度。另外,除了通常用于牙膏工业的补充剂之外,牙膏还可以含有如黄原胶、磨料二氧化硅填料和其它补充剂等增稠剂。优选地,将乳酸菌以其它形式包封或保护以引入牙膏中。

[0118] 如本领域技术人员所知,如本文所使用的,“漱口水”、“含漱剂”、“牙齿冲洗”、“口腔冲洗”或“口腔浴”是指通过口周肌肉的收缩和/或头部的运动被动地或围绕口腔保持在口腔中的液体组合物,并且可能是漱口,其中头部向后倾斜并且液体在嘴的后部起泡。通常,漱口水是一种抗菌溶液,旨在减少口腔中的微生物负荷,虽然其它漱口水可能由于其它原因,如用于其镇痛、抗炎或抗真菌作用。另外,一些冲洗剂可作为唾液替代品来中和酸,并且在口腔干燥症(口干)中保持口腔湿润。除水,如甘油或二醇等多羟基化合物(例如,丙二醇、非离子表面活性剂等)和其它添加剂可以包含改善外观、风味和保存。

[0119] 喷雾剂是与漱口水相同或相似的组合物,但是在喷雾瓶中分配,以方便地应用润湿和保护口腔所需的剂量,而不需要随后的冲洗。

[0120] 口服凝胶包含允许直接、稳定地应用于口腔的聚合物。关于这些聚合物,出于本发明的目的,优选使用通常称为聚卡波非和卡波姆的聚合物的组合,因为它们在极端温度条件下保持凝胶结构非常长时间稳定。凝胶还可以包含一定量的如山梨糖醇等天然非龋齿甜味剂。

[0121] 在另一个实施例中,个人护理产品是化妆品,其包括本发明的片球菌属菌株或组合物以及化妆品可接受的赋形剂。“化妆品产品”或“化妆品”是旨在用于清洁、美化、促进吸引力或改变外观而不影响身体结构或功能的产品。化妆品还可以具有治疗益处。

[0122] 术语“化妆品可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人皮肤接触而没有不适当的毒性、不相容性、不稳定性和过敏反应等的化合物、材料、组合物和/或剂型。在与化妆品配制品的其它组分相容的意义上,每种“化妆品可接受的”载剂、赋形剂等也必须是“可接受的”。用于化妆品配制品的合适载剂、赋形剂等可以在标准教科书中找到。

[0123] 化妆品的非限制性实例包含清洁垫、吉龙水、棉签、化妆棉、眼线笔、面巾纸、理发推子、唇彩、口红、乳液、化妆品、指甲锉、润发油、香水、剃须刀、剃须膏、保湿霜、爽身粉、卫生纸和湿巾(包含但不限于液体或粉底、液体或固体眼线笔、睫毛膏、乳白色眼影、着色粉末、“煎饼”型粉末、用于干燥或湿润等)。

[0124] 药物产品和食品补充剂

[0125] 在一个方面,将本发明的片球菌属菌株和组合物配制成药物产品。术语“药物产品”在本说明书中广泛含义,包含任何包括活性组分的组合物,在这种情况下,本发明的菌株优选地以组合物和任选的至少一种抗菌剂,以及药学上可接受的辅料的形式。此术语不限于药物。

[0126] 术语“药学上可接受的”是本领域公认的,并且包含在合理的医学判断范围内,适用于与受试者(例如人类)组织接触的化合物、材料、组合物、载剂,媒剂和/或剂型,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应、或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。在与配制品的其它组分相容的意义上,每种载剂、赋形剂等也必须是“可接受的”。合适的载剂、赋形剂等可以在标准药学文献中找到。可以用作药学上可接受的载剂的材料的一些非限制性实例包含:糖类,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石,可可脂和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲液;以及药物配制品中使用的其它无毒的相容性物质。

[0127] 赋形剂选自(但不限于)包括以下的组:填充剂/稀释剂/填充剂、粘合剂、抗粘附剂、崩解剂、涂料、抗结块剂、抗氧化剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂、表面活性剂和其它类别的药学和兽医学上可接受的赋形剂。

[0128] 填料选自但不限于包括以下的组:菊粉、低聚果糖、果胶、改性果胶、微晶纤维素、乳糖、淀粉、麦芽糖糊精、蔗糖、葡萄糖、果糖、甘露醇、木糖醇、非结晶山梨糖醇、碳酸钙、磷酸二钙、其它惰性无机和有机药理学上可接受的填料、以及这些物质的混合物。在口服混悬剂的剂型中,填充剂或稀释剂选自包括以下的组:植物油、油酸、油醇、液体聚乙二醇、其它药理学上可接受的惰性液体或这些物质的混合物。

[0129] 粘合剂以固体剂型使用,例如,将组分保持在片剂中,以确保可以形成具有所需机械强度的片剂和颗粒,并且给予低活性剂量片剂的体积。固体剂型如片剂的粘合剂是:乳糖、蔗糖、玉米(玉米)淀粉、改性淀粉、微晶纤维素、改性纤维素(例如羟丙基甲基纤维素(HPMC)和羟乙基纤维素)、其它水溶性纤维素醚、聚乙烯吡咯烷酮(PVP),也称为聚维酮、聚乙二醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、木糖醇和磷酸氢钙;其它合适的药理学上可接受的粘合剂,或这些物质的混合物。

[0130] 抗粘附剂用于降低粉末(颗粒)与冲头面之间的粘附力,并且从而防止粘在片剂冲头上。它们还用于帮助保护药片不粘。最常用的是硬脂酸镁。

[0131] 作为片剂和胶囊等固体剂型的崩解剂和超级崩解剂,使用以下物质,但不限于此:交联聚乙烯吡咯烷酮、羟基乙酸淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙和甲醛-酪蛋白、其它合适的药理学上可接受的崩解剂和超级崩解剂或其混合物。

[0132] 在固体剂型的情况下涂层,如用于胶囊填充的片剂和颗粒,保护组分免受空气中的水分变质,使大的、令人不愉快的味片更容易吞咽和/或在肠溶包衣的情况下确保完整通过胃液的强酸性介质(pH约为1),并且允许在十二指肠或回肠(小肠)中释放。对于大多数包衣片剂,使用纤维素醚羟丙基甲基纤维素(HPMC)薄膜包衣。偶尔使用其它涂料,例如合成聚合物和共聚物,如聚乙酸乙烯酯邻苯二甲酸酯(PVAP);丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物;

甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸的共聚物；虫胶、玉米蛋白玉米醇溶蛋白或其它多糖；蜡或蜡状物质，如蜂蜡、硬脂酸；高级脂肪醇，如十六烷基或硬脂醇；固体石蜡；甘油单硬脂酸酯；甘油二硬脂酸酯或其组合。胶囊用明胶或羟丙基甲基纤维素包衣。

[0133] 肠溶包衣控制药物释放速率并且确定药物在消化道中的释放位置。用于肠溶包衣的材料包含脂肪酸、蜡、虫胶、塑料和植物纤维及其混合物，还与其它上述涂层组合。

[0134] 抗结块剂是一种添加剂，置于粉末状或颗粒状材料中，以防止结块（结块）的形成，并且便于包装、运输和消费。作为固体剂型如片剂、胶囊或粉末的抗结块剂，使用以下物质：硬脂酸镁、胶体二氧化硅、滑石、其它药理学上可接受的抗结块剂或其混合物。

[0135] 润滑剂以固体剂型使用，具体地是以片剂和胶囊剂形式使用，以防止组分聚集在一起并且防止粘附在片剂冲头或胶囊填充机上以及硬胶囊中。作为润滑剂滑石或二氧化硅和脂肪，例如植物硬脂精、硬脂酸镁或硬脂酸及其混合物是片剂或硬明胶胶囊中最常用的润滑剂。

[0136] 添加甜味剂以使组分更加可口，特别是在固体剂型中，例如，咀嚼片，以及液体剂型，如止咳糖浆。甜味剂可以选自人造、天然或合成或半合成甜味剂；甜味剂的非限制性实例是阿斯巴甜、乙酰磺胺酸钾、环己基氨基磺酸盐、三氯蔗糖、糖精、糖或其任何混合物，

[0137] 香料可以用于掩盖任何剂型的令人不快的味道活性组分。调味剂可以是天然的（例如水果提取物）或人造的。例如，要改进：(1) 可以使用苦味产品，薄荷、樱桃或茴香；(2) 可以使用咸味产品，桃子或杏子或甘草；(3) 酸味产品，覆盆子；以及(4) 过甜的产品，香草。

[0138] 除赋形剂类的辅助物质外，本发明的配制品可以含有其它药理活性或营养物质，包含但不限于维生素，如药学上可接受的化学形式的维生素D（钙化醇）、盐或衍生物；药物和营养可接受的化学形式的矿物质；和L-氨基酸。关于本发明配制品的制备，是在本领域普通技术人员的范围内并且取决于最终的剂量配制品。例如但不限于，当最终剂型是口服固体剂型时，如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、口服混悬剂等。配制品的固体剂型的制备方法包含均质化：(1) 一种或多种活性组分，其包括有效量的至少一种或多种本发明的后处理益生菌；(2) 用一种或多种赋形剂形成均匀混合物，例如根据需要，用硬脂酸镁或其它润滑剂润滑，得到最终剂型的粉末。将这种均匀的粉末填充到普通的明胶胶囊中，或者可替代地填充到肠溶胶囊中。在片剂的情况下，它们通过直接压片或造粒制备。在第一种情况下，制备活性组分和合适的赋形剂的均匀混合物，如无水乳糖、非结晶山梨糖醇等。在第二种情况下，将片剂在颗粒形式的混合物上加工。通过配制品的活性组分与合适的填充剂、粘合剂、崩解剂和少量纯净水的制粒方法制备颗粒。将这样制备的颗粒过筛并且干燥，直到水含量<1% w/w。

[0139] 关于制备液体剂型（例如口服混悬剂）的方法，其涉及包括至少一种或多种本发明的后处理益生菌的制剂的一种或多种活性组分在惰性液体稀释剂（填充剂）中的有效量的均质化，所述惰性液体稀释剂如各种植物油：如向日葵、大豆或橄榄油；油酸；油醇；液体聚乙二醇如PEG 200、PEG 400或PEG 600；或其它惰性药理学上可接受的液体。所述方法进一步包括用选自包括以下的组的一种或多种方法处理均匀混合物：(1) 通过添加和均质化蜂蜡、胶体二氧化硅等悬浮稳定剂来稳定配制品；(2) 配制品变甜；通过添加和均化甜味剂；(3) 通过调味剂的添加和均质化来调味配制品。这种形式的配制品还可以含有通常用于本领域的其它赋形剂或组分。

[0140] 药品可以采用不同的形式或名称,具体取决于产品批准途径,也取决于国家。例如,药物是特定的药物产品。医疗食品是另一种特定的药物产品。在一些国家中,术语“医疗食品”或“用于特殊医疗目的的食品”是指特别配制的食品,并且旨在用于饮食管理具有独特营养需求的疾病,而单独的正常饮食是无法满足的。它们在如美国食品和药物管理局1988年孤儿药物法案修正案以及欧洲委员会指令1999/21/EC等法规中有所规定。医疗食品不同于更广泛的食品补充剂类别以及具有健康声明的传统食品。因此,在具体实施例中,将本发明的菌株配制成医疗食品。

[0141] 通常,片球菌属菌株和组合物(如本文公开的组合物)被认为是食品补充剂。食品补充剂,也称为膳食补充剂或营养补充剂,被认为是另一种特定的药物产品。这是一种用于补充饮食的制剂或产品,由通常用于食品中的化合物制成,其提供通常不在正常饮食中摄取的营养素或有益组分,或者可能不能以足够的量食用。大多数情况下,食品补充剂被认为是食品,但有时它们被限定为药物、天然保健品或营养保健品。在本发明的意义上,食品补充剂还包含营养保健品。食品补充剂通常“非处方”出售,即无需处方。如果食品补充剂采用药丸、胶囊、片剂或粉末的形式,其包括与药物中使用的赋形剂相同的赋形剂。然而,食品补充剂也可以采用强化有一些营养素(例如棒或酸奶)的食品的形式。因此,在具体实施例中,将本发明的菌株配制成食品补充剂。食品补充剂可以原样施用,可以与合适的可饮用液体混合,如水、酸奶、牛奶或果汁、或者可以与固体或液体食物混合。在这种情况下,食品补充剂可以是片剂或含片、丸剂、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、悬浮剂、小袋、糖果、棒、糖浆和对应的施用形式,通常以单位剂量的形式。

[0142] 本发明的菌株还可以包含在各种食品中,如乳制品(酸奶、奶酪、发酵乳、奶粉、乳基发酵品、冰淇淋、发酵谷物制品、乳基粉)、面包、条、涂抹物、饼干和谷物、饮料、不同类型的油或敷料。术语“食品”在本文中以其最广泛的含义使用,包含任何形式的呈现的任何类型的产品,其可以由动物摄取,但不包含药物和兽医产品。其它食品的实例是肉制品、巧克力涂抹物、馅料和糖霜、巧克力、糖果、烘焙食品、调味汁和汤、果汁和咖啡增白剂。特别感兴趣的食品是食品补充剂和婴儿配方奶粉。食品优选包括载体材料,如燕麦粥、乳酸发酵食品、抗性淀粉、膳食纤维、碳水化合物、蛋白质和糖基化蛋白质。在具体实施例中,本发明的菌株被包封或包被。

[0143] 本发明的另一方面涉及包括冷冻保护剂的固体组合物;冷冻干燥的生物质,其包括至少一种本发明的乳酸菌;和药学上可接受的载剂。药学上可接受的载体优选选自乳液、凝胶、糊剂、颗粒、粉末和树胶。本发明的另外方面提供口腔护理产品、药物组合物和可食用产品、膳食补充剂和化妆品组合物,其包括有效量的前述方面中限定的组合物。在具体实施例中,口腔护理产品是口香糖、牙膏、口腔喷雾剂、含片或口服可分散片剂。在具体实施例中,药物组合物、可食用产品或膳食补充剂是含片或口服可分散片剂。

[0144] 医疗应用和使用方法

[0145] 本发明的一个方面涉及用作药物的本发明的片球菌属菌株和组合物。可替代地,此方面可以配制成益生菌治疗方法,包括有需要时施用有效量的组合物,所述组合物包括至少一种如本发明第一方面所限定的分离的乳酸菌菌株。如本文所使用的术语“益生菌”是指活的微生物,当以足够的量施用时,赋予宿主健康益处。

[0146] 具体地,在人类宿主中发挥几种有益效果时,本发明的菌株可用于治疗与生态失

调或由病原体引起的疾病或病症。如本文所使用的，生态失调(也称为菌群失调)是体内或体内微生物失衡或适应不良的术语，如受损的微生物群。例如，人类微生物群的一部分，如皮肤菌群、肠道菌群、阴道菌群、口腔可以变得紊乱，通常共生的主要物种代表不足，并且通常竞争或含有的检验增加以填补空白。有益微生物的丧失、病态生物的扩张和多样性的丧失是涵盖生态失调的事件。生态失调可能由反复和不适当的抗生素或抗菌剂暴露等多种因素引起。因此，本发明的一个方面是与抗菌剂组合使用的本发明菌株，用于预防和/或治疗生态失调或与生态失调有关的病症。

[0147] 另一方面涉及本发明的组合物，其用于预防和/或治疗生态失调或与生态失调有关的病症。

[0148] 本发明的菌株特别适用于牙齿卫生。因此，在一个方面，本发明提供了与抗菌剂组合使用的本发明组合物和菌株，用于预防和/或治疗动物，包含人类的口腔病症。可替代地，此方面可以配制为本发明的菌株或组合物在制备用于预防和/或治疗动物(包含人)的口腔病症的药物中的用途。另外，本发明还提供了预防和/或治疗动物(包含人)口腔病症的方法，所述方法包括给有需要的动物施用本发明所限定的菌株或组合物。

[0149] 具体地说，所述口腔病症由口腔病原体引起。“由口腔病原体引起的口腔病症”的说明性非限制性实例是斑块相关疾病、龋齿、牙龈炎、牙周炎、念珠菌病、疱疹和溃疡、以及口臭、牙齿染色、敏感牙齿、种植体周围疾病等。

[0150] 在一个实施例中，片球菌属菌株及其组合物用于治疗和/或预防牙周病，包含但不限于牙龈炎、牙周炎和种植体周围疾病。具体地说，牙周病是牙龈炎或牙周炎。

[0151] 在另外的实施例中，片球菌属菌株和组合物用于治疗和/或预防念珠菌病。

[0152] 牙周治疗通常首先通过刮擦或超声波机械地去除龈下斑块；通过这种机械去除，生物膜中的细菌被释放并且被冲洗掉。在此治疗过程中，目前使用抗菌组合物，其设计用于防止革兰氏阴性细菌的再定植。然而，定期和广泛使用含有抗菌剂的组合物的缺点是这些产品的副作用和对共生微生物群的有害影响。

[0153] 在另一个实施例中，本发明的菌株和组合物可用于治疗皮肤病症。皮肤病症的实例包含但不限于指甲真菌感染；表面皮肤病症(例如，丹毒、开放性伤口感染、痤疮、脓肿、疖子、湿疹、皮炎、接触性皮炎、过敏性炎症、接触性病变、褥疮和糖尿病病变)。

[0154] 筛选方法

[0155] 本发明的一个方面提供了一种筛选和分离乳酸菌菌株的方法，其包括以下步骤：

[0156] i) 测定来自乳酸菌菌株候选物池的乳酸菌中的单独乳酸菌耐受抗菌剂的能力；以及

[0157] ii) 选择和分离耐受抗菌剂的能力高于牙龈卟啉单胞菌的乳酸菌菌株。

[0158] 在一个实施例中，耐受抗菌剂的能力表达为通过纸片扩散测定法确定的抑制光晕。

[0159] 在一个具体的实施例中，耐受抗菌剂的能力包括以下步骤：

[0160] i) 均匀地擦拭乳酸菌在0.1M的磷酸盐缓冲盐水中的悬浮液，其光学密度相当于在板中的营养培养基上的Mc Farland标准No.3，以获得汇合层；

[0161] ii) 将直径为6mm的纤维素纸片与营养培养基接触；

[0162] iii) 将抗菌剂添加到纤维素纸片中，其浓度可抑制牙龈卟啉单胞菌的生长；

- [0163] iv) 在厌氧或微需氧条件下于37°C孵育过夜；
[0164] v) 通过将板放置在平坦的规则上，在24小时或48小时后以毫米为单位测量抑制区域；
[0165] vi) 将结果表达为抑制光晕。

[0166] 本领域技术人员通常能够根据待测乳酸菌菌株的营养需求选择步骤i)-ii)的营养培养基。

[0167] 在一个实施例中，筛选和分离乳酸菌的方法用于筛选和分离用于个人护理的乳酸菌菌株。在一个具体实施例中，所述方法用于筛选和分离用于口腔护理的乳酸菌。

[0168] 在一个实施例中，用于测定耐受抗菌剂能力的乳酸菌菌株候选物池包括乳杆菌属或片球菌属的乳酸菌菌株。具体地，候选菌株是片球菌属菌株，更具体地是乳酸片球菌菌株。

[0169] 附图简单说明

[0170] 图1. 细菌对三氯生的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0171] 图2. 细菌对百里酚的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0172] 图3. 细菌对Listerine Original®的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0173] 图4. 细菌对Listerine Zero®的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0174] 图5. 细菌对氯己定的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0175] 图6. 细菌对葡萄糖酸氯己定的耐受性表达为通过纸片扩散测定法测定的以毫米(mm)为单位的抑制光晕(Inh)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2)；乳酸片球菌AB134(P.a.AB134)；乳酸片球菌CECT 8633(P.a.CECT 8633)；戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT8330)；口腔链球菌；唾液链球菌K12(S.s.K12)；和牙龈卟啉单胞菌。

[0176] 图7. 对于浸渍有20μl葡萄糖酸氯己定0.12%(v/v)的约6-mm纤维素纸片，观察到对于乳酸片球菌CECT8633、唾液链球菌K12(S.S.)和牙龈卟啉单胞菌(P.g.)的抑制光晕。

[0177] 图8. 唾液链球菌K12在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生

长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0178] 图9.口腔链球菌在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0179] 图10.短乳杆菌CD2在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0180] 图11.戊糖片球菌CECT8330在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0181] 图12.乳酸片球菌AB134在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0182] 图13.乳酸片球菌CECT8633在不存在(对照)或存在不同浓度的Listerine Zero®时的生长动力学(C,不含抗菌剂的对照;1:1,未稀释;1:2,2倍稀释;1:4,4倍稀释;1:8,8倍稀释)。X轴=以小时(h)为单位的时间(t)。

[0183] 图14.当通过液体培养基测定法测定时,乳酸菌菌株的存活率(S.r)表达为百分比(mm)。短乳杆菌CD2(L.b.CD2);乳酸片球菌AB134(P.a.AB134);乳酸片球菌CECT 8630(P.a.CECT 8630);戊糖片球菌CECT 8330(P.p.CECT 8330)口腔链球菌;唾液链球菌K12(S.s.K12)。

[0184] 图15.唾液链球菌K12、罗伊氏乳杆菌ATCC 55730和乳酸片球菌CECT8633的拮抗活性表达为相对于口腔病原体核粒梭形杆菌、齿垢密螺旋体和普氏菌的生长抑制(GI),以毫米为单位。

[0185] 图16.与研究开始相比,牙齿表面数量的减少显示出最差的牙龈指数评分(GI=3)。黑条表示遵循标准口腔护理程序(安慰剂组)的受试者组;白条表示遵循标准口腔护理程序加益生菌(益生菌组)的受试者组。Y轴=牙龈指数等于3的牙齿表面数(N t.surf.GI=3)。

[0186] 图17.病原体福赛斯坦纳菌和牙龈卟啉单胞菌浓度的变化(Δ 浓度=研究结束时的浓度-研究开始时的浓度表达为对数)。黑条表示遵循标准口腔护理程序(安慰剂组)的受试者组;白条表示遵循标准口腔护理程序加益生菌(益生菌组)的受试者组。

[0187] 实例

[0188] 实例1.乳酸片球菌CECT8633的分离与鉴定

[0189] 从0-9岁儿童的新鲜粪便中分离出乳酸菌候选物。将样品溶解在PBS缓冲液(pH 7.4)中,等分并且涂布在补充有各种抗生素组合的MRS上。菌株在微需氧条件下(5%CO₂)于37°C或30°C下培养。孵育时间取决于生长速度,但通常为24小时到3天。用相同的选择培养基进行单个菌株的分离,并且然后进行革兰氏染色以获得第一鉴定。一旦生长,通过在含有15%脱脂奶粉的PBS 0.1x中冷冻干燥来储存分离的菌株。

[0190] 通过测序16S rRNA基因执行物种水平的鉴定。细菌在MRS培养基(pH 6.4)上于37

℃在含有5%CO₂的气氛中培养过夜。进一步采集细菌,洗涤并且重悬于预裂解缓冲液(480μl EDTA 50mM pH 8.0;120μl溶菌酶10mg/ml)中,并且进一步于37℃下孵育60分钟。使用Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega)提取DNA。将预处理的细菌以14000g离心2分钟以除去上清液后,遵循Promega方案。简而言之,将细菌重悬于Nuclei Lysis溶液中并且于80℃下孵育5分钟,然后冷却到室温。将细胞裂解物在RNase溶液中于37℃孵育60分钟,并且通过添加蛋白质沉淀溶液并高速涡旋使蛋白质沉淀。冷却样品并且以15000g离心3分钟。将含有DNA的上清液转移到干净的1.5ml微量离心管中,并且通过倒置与600μl异丙醇混合。通过以15000g离心2分钟收集DNA并且小心地倒出上清液。通过轻轻颠倒管若干次,用600μl 70%乙醇洗涤DNA样品。在15000g离心2分钟后,通过抽吸除去乙醇。最后,通过于65℃下孵育1小时将DNA团粒重悬于100μl的再水化溶液中。样品储存在2℃-8℃。

[0191] 使用用于真细菌Eub27f和Eub1492r的通用引物通过PCR扩增16S rRNA。然后,使用试剂盒Qiaquick (Qiagen) 洗涤如上所述获得的DNA。使用引物27F、357F、907R和1492R,使用BigDye试剂盒v.3.1在Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) 中对每个样品进行四次连续测序反应。使用DNA Sequence Analysis v.5.2软件(Applied Biosystems)构建数据收集和色谱图,并且通过Chromas (Technelysium Pty Ltd.) 和BioEdit (Ibis Biosciences)的目测分析进行检查。

[0192] 使用核糖体数据库项目工具进行属鉴定,并且通过将获得的序列与来自借助于BLASTN的RefSeq数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>)和来自核糖体数据库项目(<http://rdp.cme.msu.edu/>)的已知生物的16S序列进行比较来进行物种鉴定。

[0193] 菌株CECT8633被鉴定为乳酸片球菌并且于2014年5月26日保藏于西班牙典型培养物保藏中心(Universitat de València,Campus de Burjassot,Edif.de Investigación, 46100 Burjassot,València,Spain)。保藏是可行的并且保持与其保藏物相关的所有特征。

[0194] 针对菌株CECT8633获得的16S rRNA序列对应于SEQ ID NO:1。

[0195] 实例2. 乳酸菌菌株对抗菌剂的耐受性(纸片扩散测定)

[0196] 将具有假定的益生菌性质的LAB菌株,即短乳杆菌、乳酸片球菌、戊糖片球菌、口腔链球菌和唾液链球菌接种在具有适当营养培养基的琼脂板中并且孵育以获得分离的菌落。牙龈卟啉单胞菌DSM20709用作与牙周病理学相关的病原体的实例。对于每种菌株,使用的营养培养基和大气条件最适合于其适当生长,如表1中总结的。

[0197] 表1:测定细菌的营养培养基和生长条件

[0198]

菌株	培养基	Ta	时间(小时)	大气
短乳杆菌CD2	MRS	37℃	24小时	5%CO ₂
乳酸片球菌CECT8633	MRS	37℃	24小时	5%CO ₂
乳酸片球菌AB134	MRS	37℃	24小时	5%CO ₂
戊糖片球菌CECT8330	MRS	37℃	24小时	5%CO ₂
口腔链球菌	BHI	37℃	24小时	5%CO ₂
唾液链球菌K12	BHI	37℃	24小时	5%CO ₂
牙龈卟啉单胞菌	羊血琼脂	37℃	48小时	厌氧

[0199] 对于每种微生物,分离的菌落用于制备磷酸盐缓冲盐水0.1M(PBS)中的悬浮液,其光密度等于Mc Farland标准No.3。通过使用无菌拭子均匀接种微生物,将悬浮液用于获得

对应营养培养基上的汇合的微生物层(表1)。

[0200] 在板中接种菌株后,立即放置6mm的纤维素纸片。根据表2,用不同的常规抗菌剂浸渍纸片:

[0201] 表2:用于研究乳酸菌耐受性的抗菌剂。

漱口水抗菌剂	溶剂	体积	浓度 (% v/v 或 mg/mL)		
			0.12%	0.06%	0.03%
洗必泰	二甲基甲酰胺	5 uL	0.12%	0.06%	0.03%
葡萄糖酸氯己定	PBS	20 uL	0.12%	0.06%	0.03%
三氯生	EtOH	5 uL	0.2 %	0.1%	0.05%
Listerine Zero®	PBS	20 uL	---	稀释 1:2	稀释 1:4
Listerine Original®	PBS	20 uL	---	稀释 1:2	稀释 1:4
百里酚	EtOH	5 uL	1.2 mg/mL	0.6 mg/mL	0.3 mg/mL

[0203] 使用的体积是纸片允许的最大量而不在培养基上扩散。证实溶剂在所用量下不能抑制细菌。根据表1的条件使微生物生长,并且根据微生物的相应最佳生长条件在24小时或48小时后测量抑制光晕(以毫米计)。结果一式三份获得。

[0204] 图1描绘了在不同浓度的三氯生存在下对每种微生物观察到的抑制。病原体牙龈卟啉单胞菌以及链球菌菌株被三氯生抑制。然而,短乳杆菌和属于片球菌属的菌株均未受到抑制。类似地,百里酚抑制牙龈卟啉单胞菌和链球菌菌株的生长,并且检验的最高浓度为1.2mg/mL,但不是短乳杆菌或片球菌属菌株(图2)。当用20微升未稀释的Listerine Original®(用醇)浸渍的纸片时观察到相同的效果(图3)。ListerineZero®还抑制了牙龈卟啉单胞菌和链球菌菌株及其对应的2倍稀释(图4)。短乳杆菌对ListerineZero®的存在耐受性高于牙龈卟啉单胞菌和链球菌的耐受性,因为在ListerineZero®的4倍和2倍稀释的存在下未观察到抑制。然而,与三氯生、百里酚和ListerineOriginal®相比,未稀释的ListerineZero®的存在对短乳杆菌具有抑制作用。如ListerineOriginal®所观察到的,没有一种片球菌属菌株被ListerineZero®的存在所抑制。

[0205] 如图5和图6所示,氯己定和葡萄糖酸氯己定是漱口水抗菌剂,显示出最高的抗菌效果,因为所有菌株在所检验的最高浓度下被抑制(0.12%,v/v)。与其它漱口水组分类似,牙龈卟啉单胞菌和链球菌是对氯己定具有最高敏感性的菌株,因为其在任何检验浓度下都被抑制。短乳杆菌被0.12%和0.06%的浓度抑制,但不是0.03%,因此显示出比牙龈卟啉单胞菌更高的耐受性,并且示出链球菌和片球菌菌株显示出对氯己定具有最大抗性的LAB。对于浸渍有氯己定的纸片周围观察到的抑制光晕分别为戊糖片球菌CECT8330、乳酸片球菌CECT8633和乳酸片球菌AB134的4mm、3mm和2mm,其中牙龈卟啉单胞菌的抑制光晕是9mm。因此,乳酸片球菌菌株对氯己定特别耐药。同样,片球菌属菌株显示出对葡萄糖酸氯己定具有最高抗性的菌株。图7清楚地说明了在葡萄糖酸氯己定0.12%存在下,与唾液乳杆菌K12和牙龈卟啉单胞菌相比,对乳酸片球菌CECT8633观察到的较低抑制光晕。

[0206] 总之,研究表明,对于病原体牙龈卟啉单胞菌以及来自链球菌属的益生菌,抗菌剂的抑制作用较高,其次来自片球菌属的乳酸杆菌益生菌对抗菌剂特别耐药,特别是那些属于乳酸片球菌种的益生菌。

[0207] 实例3:乳酸菌株对抗菌剂的耐受性(液体培养基测定)

[0208] 为了确定LAC的生长动力学是否会受到漱口水的影响,在液体培养基中研究了Listerine Zero®的抑制作用。如实例2中所述制备益生菌的过夜培养物。将分离的菌落用于在无菌0.1M PBS中制备细菌悬浮液,以达到对应于Mc.Farland标准0.5(约1.5E+08CFU/mL)的光密度。随后,制备100倍稀释液以获得约1.5E+06CFU/mL的浓度。将Listerine Zero®过滤0.22微米并且制备4次连续2倍稀释。

[0209] 将适合于根据表1(实例2)的每种微生物的适当生长的液体生长培养基(140微升)移液到96孔微量培养板中。然后,添加40微升漱口水稀释液,接着添加20微升含有1E+06CFU/mL的细菌悬浮液。还制备了没有益生菌和没有组分(但是PBS)的阳性对照的空白。通过在24小时和48小时测定含有益生菌的孔在550nm处的光密度(O.D.)并且减去具有相同浓度的漱口水但没有益生菌的孔的O.D.来评估细菌生长。通过下式计算48小时的存活率:

$$[0210] \text{存活率}(\%) = \frac{(OD_p - ODb) - (OD_m - ODmb)}{ODp - ODb} * 100$$

[0211] 其中OD_p是接种益生菌但不含漱口水的孔的光密度(阳性对照),

[0212] ODb是没有益生菌且没有漱口水的孔的光密度,

[0213] OD_m是益生菌和漱口水孔的光密度,并且

[0214] OD_{mb}是没有益生菌和漱口水的孔的光密度。

[0215] 条件一式三份进行研究。

[0216] 图8-图13描绘了益生菌菌株在不同浓度的Listerine Zero®下的生长动力学。结果证实,在所有检验浓度下,Listerine减少了链球菌菌株的生长。唾液乳杆菌K12仅能以1:4和1:8的稀释度生长,但与阳性对照(不含漱口水的益生菌)相比,其生长显著降低。只有当Listerine的漱口水稀释度达到原始浓度的8倍时,口腔链球菌才能生长。然而,即使在此浓度下,在24小时也未观察到生长,并且益生菌的量在48小时比阳性对照低约2倍。短乳杆菌的生长比率低于链球菌菌株,因为在接种培养基后48小时未观察到生长。然而,确认短乳杆菌CD2对漱口水的耐受性高于链球菌菌株,因为当漱口水未被稀释时它仅被完全抑制。当培养基中存在2倍、4倍和8倍稀释时,短乳杆菌CD2的浓度降低约50%。

[0217] 片球菌属菌株是对漱口水具有最高耐受性的益生菌。未稀释的Listerine®的存在完全抑制了戊糖片球菌CECT8330、乳酸片球菌AB134和乳酸片球菌CECT8633在24小时的生长。但是,乳酸片球菌AB134和乳酸片球菌CECT8633在48h后才能在这种漱口水的存在下生长。

[0218] 图14总结了48小时后不同菌株的存活率。可以清楚地看到,在未稀释的漱口水存在下,只有乳酸片球菌菌株CECT7780和CECT8633能够如何生长,并且当漱口水被稀释2倍时,短乳杆菌CD2和特别是戊糖片球菌CECT8330也能够如何生长。在所有浓度下,链球菌菌株的存活率始终低于其它益生菌菌株的存活率。

[0219] 实例4:对牙周病原体的拮抗活性

[0220] 检验了乳酸片球菌CECT8633对与牙龈炎、牙周炎和口臭广泛相关的病原体物种的拮抗能力,即核粒梭形杆菌、齿垢密螺旋体和普氏菌。病原体获自巴斯德研究所收集(分别为保藏代码CIP104988、CIP103919和CIP104478T)。

[0221] 乳酸片球菌CECT8633在MRS板上于37℃和5%CO₂下生长至汇合。将六毫米直径的

混合物圆柱体部分置于接种有核粒梭形杆菌和普氏菌的M20板上或接种齿垢密螺旋体的M71板上。M20板的培养基为30g胰蛋白胨、20g酵母提取物、0.5g半胱氨酸盐酸盐、5g葡萄糖和25mL氯化血红素溶液(0.1g氯化血红素,4mL三乙醇胺和96mL蒸馏水/升。M71板的培养基为15g胰蛋白胨、5g酵母提取物、8g磷酸氢二钠、1g碳酸铵、0.5g半胱氨酸盐酸盐、0.03mL巯基乙酸、0.05mL吐温80和250mL马血清/升。将板于37℃下在厌氧条件下孵育过夜。计算生长抑制活性(GI),从抑制区直径(IZD,mm)中减去圆柱直径(CD,mm),如下:GI=(IZD-CD)/2。

[0222] 将结果与唾液乳杆菌K12(BLIS Technologies Ltd.,New Zealand)和罗伊氏乳杆菌ATCC 55730(GumPeriobalance®(BioGaia,瑞典))进行比较,其在与乳酸片球菌CECT8633相同的条件下生长。

[0223] 结果如图15所描绘。乳酸片球菌CECT8633显示出抑制所检验的三种病原体生长的能力,这不是唾液链球菌和罗伊氏乳杆菌的情况,它们抑制了三种病原体中的两种。此外,乳酸片球菌CECT8633显示出比商业对照更高的抑制核粒梭形杆菌和齿垢密螺旋体生长的能力。

[0224] 实例5:临床疗效

[0225] 进行了一项双盲随机安慰剂对照临床试验,以评估LAB菌株的安全性及其作为益生菌改善与牙龈炎相关参数的功效。

[0226] 参加临床试验的受试者符合所有纳入和排除标准。纳入标准:18岁-55岁;男性或女性(平衡群体);不吸烟者(从不吸烟者或前吸烟者至少6个月);患有自然发生的牙龈炎的受试者定义为平均牙龈指数(GI)>1.3;在大多数部位没有>2mm的近端间附着损失。排除标准:上颌侧切牙,第一或第二前磨牙和第一磨牙或相邻牙齿的龋损和/或修复不足,干扰感兴趣部位的牙菌斑去除;目前正在接受牙科治疗的受试者;目前正在接受正畸治疗或戴咬合护理的受试者;患有任何全身性疾病或病症的受试者,其可能影响牙龈组织的反应或进行适当的斑块控制的能力(妊娠、糖尿病、定量和/或定性多形态核细胞缺陷、其它免疫系统病症等);具有可能干扰牙龈反应的药物的受试者;研究前2个月内抗生素或抗菌剂的受试者;在研究前2个月内使用益生菌产品进行口腔健康的受试者;对治疗产品的任何组分过敏或过敏的病史。

[0227] 在第0天,对所有受试者进行专业口腔卫生(规模和抛光)。提供氟化物牙膏以及每天刷牙两次的指示,以标准化口腔卫生习惯。

[0228] 受试者被随机分配到以下两种治疗之一:

[0229] 表3:研究治疗

	益生菌	安慰剂
组合物 (每片) :	益生菌混合物植物乳杆菌 CECT7481、短乳杆菌 CECT7480 和 乳酸片球菌 CECT8633) : 125 mg 瓜尔胶 (E-412) : 80.00 mg 山梨糖醇: 691.20 mg 氢化棉油: 18.32 mg 薄荷香精: 20.00 mg	海藻糖: 125 mg 瓜尔胶 (E-412) : 80.00 mg 山梨糖醇: 691.20 mg 氢化棉油: 18.32 mg 薄荷香精: 20.00 mg
[0230]	剂量: 2 片/天	2 片/天
施用途径:	口服	口服
盖仑形式 (Galenic form) :	口服分散片剂	口服分散片剂

[0231] 患者和兼性患者都不知道每个受试者分配的治疗方法。分散片剂具有相同的方面，并且含有它们的病例包含研究的代码和受试者的相应识别号。研究者向参与者提供了含有具有相同方面的片剂的病例。分配给每位志愿者 (Ao B) 的治疗方法已在注明日期的登记册中登记。只有在分析了数据后，或者是否有任何相关事件迫使打破致盲时，才会在研究结束时显示随机化。受试者食用相应的产品6周。口服分散片剂在口腔中缓慢熔融，每次刷牙完成一次(每天两次)。食用所述产品后，参与者在片剂消费后1小时内不得清洁牙齿或吃任何食物或饮料(水除外)。要求受试者通过每日填写调查表来遵守方案来报告片剂的摄入量。为了研究每位患者的依从性，将其与未使用的药片盒一起返回给检查者。

[0232] 主要终点是牙龈指数(GI)，根据Loe&Silness (1963) 方法的修改，探测部件未检测到出血 [Löe, H. 等人“怀孕期间的牙周病”。《斯堪的纳维亚牙科学报》1963, 第21卷, 第533-551页]。通过将每个牙齿的所有分数的总和除以检查的牙齿的总数来计算平均GI。

[0233] 在第0天(基线)，在专业口腔卫生(规模和抛光)之前确定牙龈指数(GI)。6周后确定相同的变量。

[0234] 在临床检查之前的第0天(基线)和第6周(研究结束)，收集龈上菌斑样品，每个象限一个(上颌左-右/下颌左-右)并且合并。使用留在原位10秒的无菌纸点获得龈上菌斑。合并取样的纸点并且转移到含有200μl Te缓冲液(10mm三[羟甲基]-甲胺氯化物, 1mm乙二胺四乙酸)的微量离心管中，并且储存在-20°C直至分析。执行基于Taqman探针的实时PCR，具有六种假定牙周致病菌的特异性引物(放线共生放线杆菌 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)；牙龈卟啉单胞菌；福赛斯坦纳菌；棱形杆菌属；口腔链球菌；直肠弯曲菌)。

[0235] 用SAS分析主要和次要变量。所有分析均在意向治疗(ITT)和按方案(PP)标准下进行。检查数据的正常性Shapiro-Wilks检验。如果数据是参数分布的，则组间主要和次要变量的差异将通过方差分析(ANOVA)确定。为了知道组间差异的确切性质，确定了事后检验(例如Duncan的多范围检验)。如果数据不是参数分布的，则通过非参数检验(Wilcoxon用于配对数据和Mann-Whitney用于独立数据)进行定量变量的比较。在所有假设检验中，零假设假设治疗组之间相等，并且当P值低于0.05时拒绝。这意指当α或I型误差<0.05时，考虑了显著差异。

[0236] 评估了五十九名患者的资格，并且随机分为益生菌组(n=30)或安慰剂组(n=29)。患者的基线特征总结在表4中：

[0237] 表4:研究人口的人口学特征

	益生菌 N = 30	对照物 N = 29	总计 N = 59
年龄 (岁)			
p 值= 0.7805 (威尔科克森秩和检验 (Wilcoxon Rank-sum Test))			
N	29	29	58
N 缺失	1*	0	1
平均值 (STD)	30.91 (12.20)	32.50 (13.62)	31.71 (12.84)
CI95% (平均值)	(26.27, 35.55)	(27.33, 37.68)	(28.33, 35.08)
范围 (最小值, 最大值)	(17.76, 55.33)	(17.70, 65.70)	(17.70, 65.70)
中位数	26.26	28.20	27.49
IQR (Q1, Q3)	(21.47, 38.36)	(21.34, 37.45)	(21.45, 38.36)
性别			
p 值= 0.7106 (检验 ChiSq)			
女性	19 (63.3%)	17 (58.6%)	36 (61.0%)
男性	11 (36.7%)	12 (41.4%)	23 (39.0%)

[0239] *缺少数据但在选择标准范围内

[0240] 94.2%的患者接受了至少75%的治疗、益生菌组89.7%、对照组100.0%。各组之间的治疗依从性没有差异。

[0241] 在第6周,益生菌组的GI评分为3 (“GI评分数=3”)的个体牙齿表面数量低于对照组(n=0(0.0%)对n=5(0.2%),p值=0.0418)。

[0242] 益生菌的基线和终点(基线-第6周)之间的变化量也显著高于对照组(标准治疗)(P<0.01,无论ITT或PP分析)(图16)

[0243] 含有益生菌的片剂的治疗与福赛斯坦纳菌以及牙龈卟啉单胞菌的水平显著降低相关(图17)。

[0244] 总之,与牙龈炎患者单独的专业口腔卫生相比,益生菌片能够减少呈现严重炎症的部位的数量。益生菌的使用也表现出显著的微生物影响,因为其与福赛斯坦纳菌和牙龈卟啉单胞菌的数量减少有关,病原体被广泛认为与牙龈炎过程有负相关,并且显示出与研究人群中测量的致病细菌中呈现严重炎症的部位数量最强的相关性。

[0245] 实例6:口服分散片剂的配制品

[0246] 口服分散片剂具有以下组成:

[0247] 125mg乳酸片球菌CECT8633

[0248] 1.3μg胆钙化醇(维生素D3)

[0249] 20mg薄荷香精

[0250] 80mg瓜尔胶

[0251] 689.53mg山梨糖醇

[0252] 9.35消光粉

[0253] 9.35硬脂酸镁

[0254] 所述配制品适合于在口腔中缓慢熔融。保质期结束时的益生菌浓度为每片1E+09CFU。

[0255] 可替代地,除了乳酸片球菌CECT8633外,片剂还包括植物乳杆菌CECT7481、短乳杆菌CECT7480。

[0256] 实例7:口服凝胶中的配方

[0257] 小瓶含有500mg的粉末,其含有以下组分:

[0258] 乳酸片球菌CECT8633(保质期末益生菌的最低浓度为 $6E+09CFU/小瓶$)

[0259] Clorofilin E141iii(4%,w/w)

[0260] 瓜尔胶(5.2%w/w)。

[0261] 实例8:口香糖中的配方

[0262] 口香糖含有以下组成:

[0263] 1340.68胶基(Health in gum PWD-03)

[0264] 125mg植物乳杆菌CECT7481、短乳杆菌CECT7480和乳酸片球菌CECT8633(比例1:1:1)

[0265] 31.52mg胶囊香精

[0266] 47.28mg粉末香精

[0267] 12.61mg液体香精

[0268] 24.0mg硬脂酸镁

[0269] 15.75mg二氧化硅

[0270] 1.89mg阿斯巴甜

[0271] 1.26mg乙酰磺胺酸钾

[0272] 实例9:牙膏中的配方

[0273] 牙膏配方由以下组成:

[0274] 125mg乳酸片球菌CECT8633

[0275] 0.12氯己定二葡糖酸盐

[0276] 1g木糖醇

[0277] 0.5ga-生育酚乙酸酯

[0278] 100g赋形剂

[0279] 可替代地,牙膏配方是:

[0280] 乳酸片球菌CECT8633在保质期结束时达到 $1E+09CFU$ 的终浓度。

[0281] 0.04g甘油酸

[0282] 0.16g氟化钠

[0283] 8g PEG-12

[0284] 0.8g沸石

[0285] 5.6g二氧化硅

[0286] 1.6g聚甘油-5-月桂酸酯

[0287] 0.8g木糖醇

[0288] 0.48g薄荷醇

[0289] 0.4g糖精钠

[0290] 0.4g苯甲酸钠

[0291] 0.24g桉树蓝桉

[0292] 0.08g环糊精

[0293] 0.96g羟丙基纤维素

[0294] 30.56g丁二醇

[0295] 实例10:漱口水中的配方

[0296] 漱口水结合了递送帽和小瓶中的组分。递送帽含有100mg冷冻干燥的益生菌菌株CECT8633(每个递送帽1-2E+09cfu)、硬脂酸镁(2.2mg)(在本说明书中称为例如抗结块剂和抗粘附剂)和二氧化硅(0.5mg)(在本说明书中称为抗结块剂)。所述小瓶含有10mL漱口水,其由含有0.092%的桉油精、0.042%的薄荷醇、0.06%的水杨酸甲酯、0.064%的百里酚和27%的乙醇(w/v)构成。

[0297] 通过推动帽,益生菌被释放在小瓶中所含的液体中。将组合物混合,并且然后用于漱口1分钟。

[0298] 实例11.乳酸菌的发酵和后处理

[0299] 用作原料的后处理生物质通过包含发酵和冷冻干燥步骤的制造方法获得。通过用乳酸片球菌菌株接种80mL MRS液体培养基来制备母体培养物。将接种的培养基于37°C下在微需氧条件下发酵48小时。所得培养物用于接种600升MRS液体培养基,其比例为每体积液体培养基体积约1%-2%的接种物。将得到的培养基冷却到3°C-5°C并且离心,以除去液体培养基中存在的大部分水。将冷冻保护剂添加到浓缩的培养物中,并且将所得混合物在-45°C冷冻干燥。

[0300] 参考书目参考文献

[0301] Castalanga M等人“口腔微生物组和牙周病和龋齿的免疫生物学”《免疫学快报(Immunology Letters)》214,第12卷,第22-38页。

[0302] Dann AB等人“三氯生:环境暴露、毒性和作用机制”《应用毒理学(Journal of Applied Toxicology)》2011,第31卷,第285-311页。

[0303] Flötra,L.等人“氯己定口洗的副作用”。《斯堪的纳维亚牙科研究期刊(Scand J Dent Res)》1971,第73卷,第119-125页。

[0304] Gruner,D.等人“用于治疗龋齿和牙周炎的益生菌:系统评价和荟萃分析”。《牙科学期刊(J Dent)》2016,第48卷,第16-15页。

[0305] Haffajee,AD.等人“破坏性牙周病的微生物病原体”

[0306] 牙周病学2000。1994,第5卷,第78-11页。

[0307] Hallstroem,H.等人“实验性牙龈炎中益生菌含片对炎症反应和口腔生物膜的影响”。《斯堪的纳维亚牙科学报(Acta Odontologica Scandinavica)》2013,第71卷,第828-833页。

[0308] Jin LJ等人“全球口腔疾病负担:新兴概念、管理和与系统健康的相互作用”口腔疾病2016

[0309] Laudenbach等人“常见的牙科和牙周疾病:评估和管理”《北美医疗诊所(Med Clin N Am)》2014,第98卷,第1239-1260页

[0310] Maekawa,T.等人“用益生菌短乳杆菌CD2局部治疗”抑制实验性牙周炎症和骨质疏松”《牙周病研究期刊(J Periodont Res)》214,第44卷,第785-791

[0311] Nadkerny PV等人“益生菌和氯己定含漱剂对牙龈炎临床炎症参数的疗效的比较

评价:随机对照临床研究”《印度牙周病学会期刊(J Indian Soc Periodontol)》2015,第16卷,第633-639页

[0312] Penala,S.等人“局部使用益生菌作为慢性牙周炎和口臭的洁治加根面平整的辅助手段的效果:随机对照试验”《药学实践与研究期刊(J Res Pharm Pract)》2016,第5卷第2期,第86-93页。

[0313] Szkaradkiewicz,A.K.等人“口服施用罗伊氏乳杆菌益生菌株对慢性牙周炎患者促炎性细胞因子反应的影响”。《Arch Immunol Ther Exp (Warsz)》2014,第62卷,第495-500页

[0314] Teughels,W.等人“罗伊氏乳杆菌益生菌治疗慢性牙周炎的临床和微生物学效应:随机安慰剂对照研究”《临床牙周病学期刊(J of clinical periodontology)》2013,第40卷,第1025-1035页。

[0315] Toivainen,A等人,“口服施用含片与鼠李糖乳杆菌GG和动物双歧杆菌亚种乳酸BB-12对唾液变形链球菌数量、牙菌斑数量、牙龈炎症和健康成人口腔微生物组的影响”。《临床口腔检查(Clin Oral Investig)》2015,第19卷,第77-83页。

[0316] Vlachojannis C等人“Listerine®及其组分及其混合物的抗菌活性的初步调查”,《植物疗法研究期刊(Phytotherapy research)》2015,第29卷,第1590-1594页

[0317] Vlachojannis C等人“Listerine®产品:有效性和安全性的最新进展”《植物疗法研究期刊》2016,第30卷,第367-373页

[0318] Yanine,N.等人“益生菌在牙周病中的作用:系统评价”。《临床口腔检查(Clinical oral investigations)》2013,第17卷,第1627-1634页

[0319] L.Dunn等人(《食品科学期刊(Journal of Food Science)》第81卷,2016年11月2日,第M438-M444页)

[0320] WO2017012905A1 (AB-BIOTICS)。

- [0001] 序列表
[0002] <110> AB生物有限公司
[0003] <120> 耐受抗菌剂的乳酸菌
[0004] <130> PD10144PC00
[0005] <160> 1
[0006] <170> PatentIn版本3.5
[0007] <210> 1
[0008] <211> 1422
[0009] <212> DNA
[0010] <213> 乳酸片球菌
[0011] <400> 1
[0012] gcagtcgacg acttccgtta attgattatg acgtgcttgc actgaatgag attttaacac 60
[0013] gaagtgagtg gcggacgggt gagtaacacg tggtaacct gcccagaagc agggataac 120
[0014] acctggaaac agatgctaatt accgtataac agagaaaaacc gcctggttt cttaaaaag 180
[0015] atggctctgc tatcaacttct ggatggaccc gcggcgcatt agctagttgg tgaggtaacg 240
[0016] gctcaccaag gcgatgtatgc gtagccgacc tgagaggta atcgccaca ttgggactga 300
[0017] gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtaggaaat cttccacaat ggacgcaagt 360
[0018] ctgatggagc aacgcccgt gagtgaagaa gggttcggc tcgtaaagct ctgttgttaa 420
[0019] agaagaacgt gggtgagagt aactgttcac ccagtgacgg tatttaacca gaaagccacg 480
[0020] gctaactacg tgccagcagc cgccgtataa cgttagtgcc aagcgttatc cggttattt 540
[0021] gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttta agtctaattgt gaaagccttc ggctcaaccg 600
[0022] aagaagtgc ttggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgg actccatgtg 660
[0023] tagcggtaaa atgcgtat atatgaaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggct 720
[0024] gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatgg tagcgaacag gattagatac cctggtagtc 780
[0025] catgccgtaa acgatgatta ctaagtgttgc gagggtttcc gcccttcagt gctcagct 840
[0026] acgcattaaag taatccgcct ggggagtgacg accgcaaggt tgaaactcaa aagaattgac 900
[0027] gggggccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttattcga agctacgcga agaaccttac 960
[0028] caggtcttgc catcttcgc caacctaaga gattaggcgt tcccttcggc acagaatgac 1020
[0029] aggtggtgca tgggtgtcgt cagctcgtt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga 1080
[0030] ggcgaaccct tattactagt tgccagcatt cagttggca ctctgttgc actgcccgt 1140
[0031] acaaaccgga ggaagggtgg gacgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac 1200
[0032] acacgtgcta caatggatgg tacaacgagt cgccaaaccg cgaggtttag ctaatcttt 1260
[0033] aaaaccattc tcagttcgga ctgtaggctg caactcgct acacgaagtc ggaatcgcta 1320
[0034] gtaatcgccg atcagcatgc cgccgtaat acgttcccg gcctgtaca caccccccgt 1380
[0035] cacaccatga gagttgtaa cacccaaagc cggtgggtt ac 1422

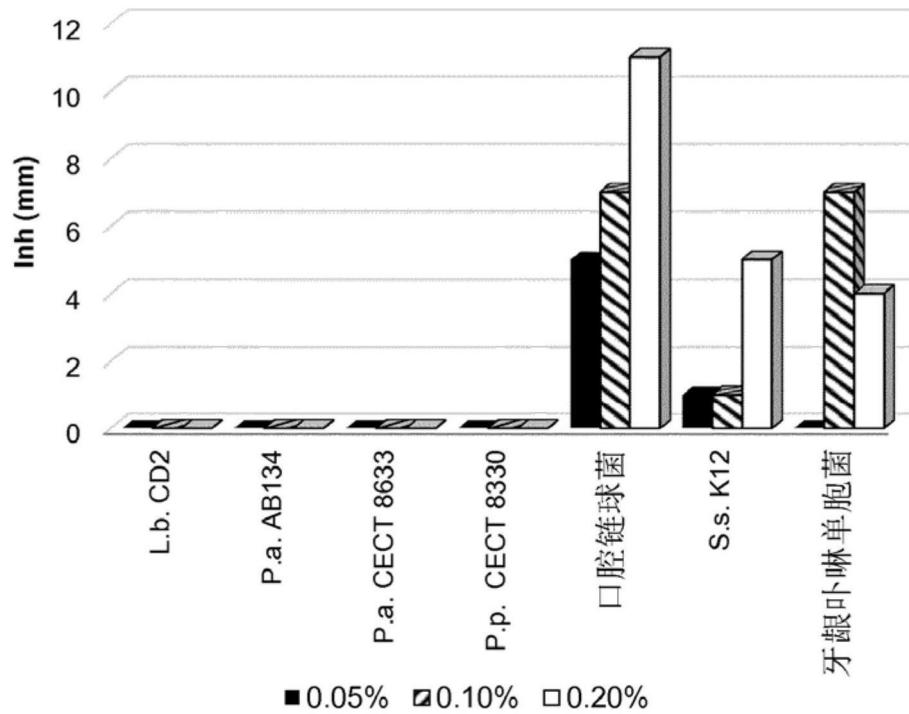


图1

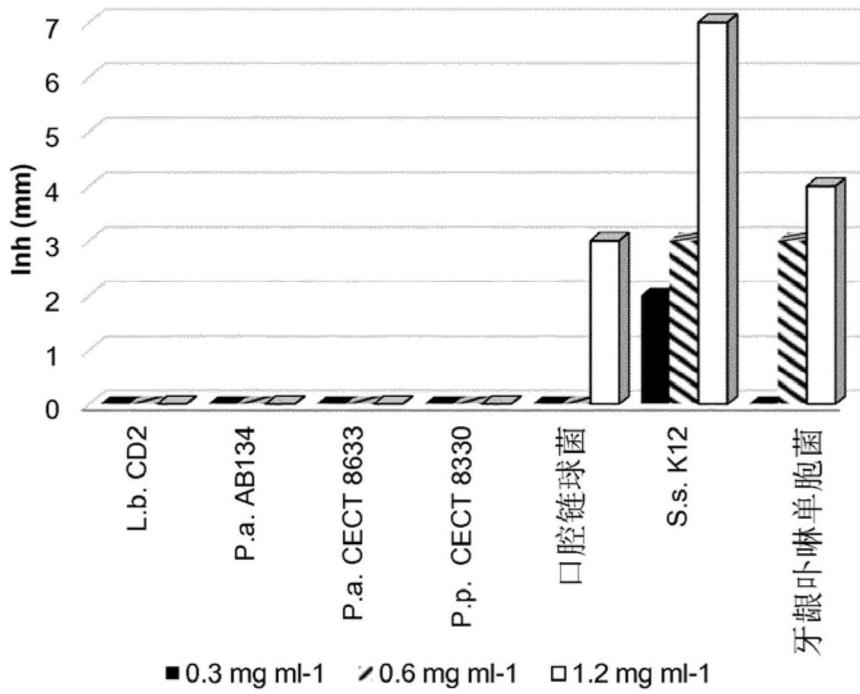


图2

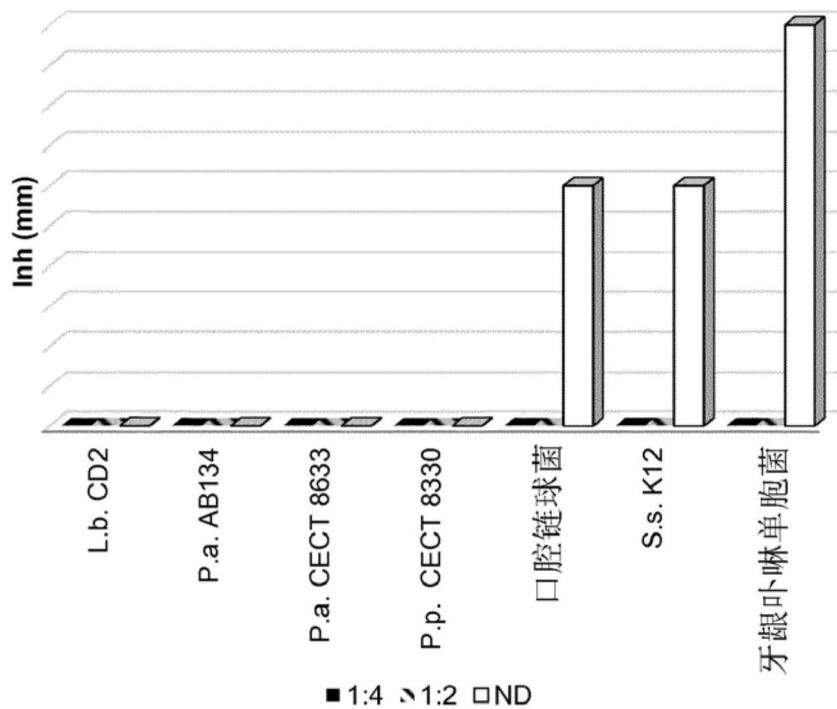


图3

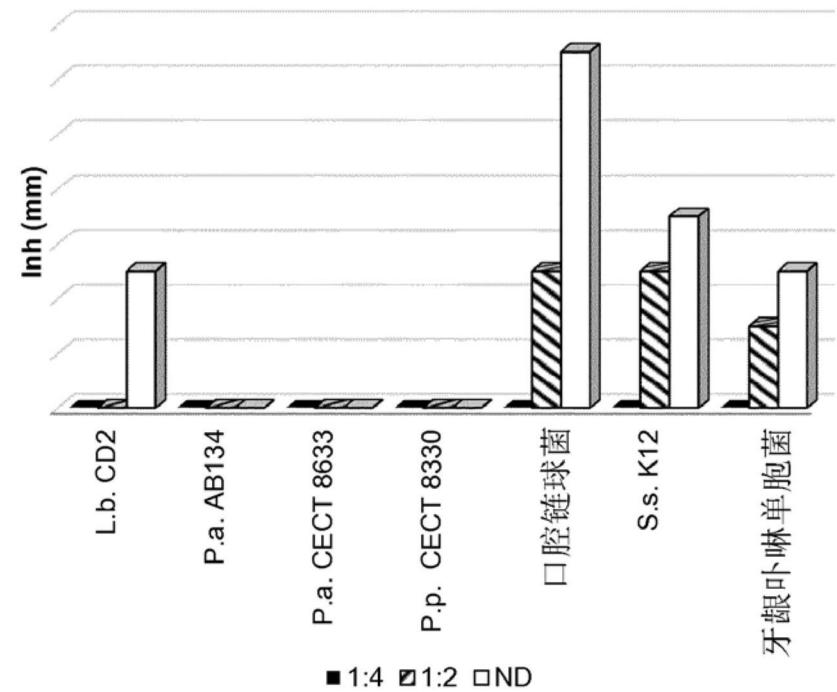


图4

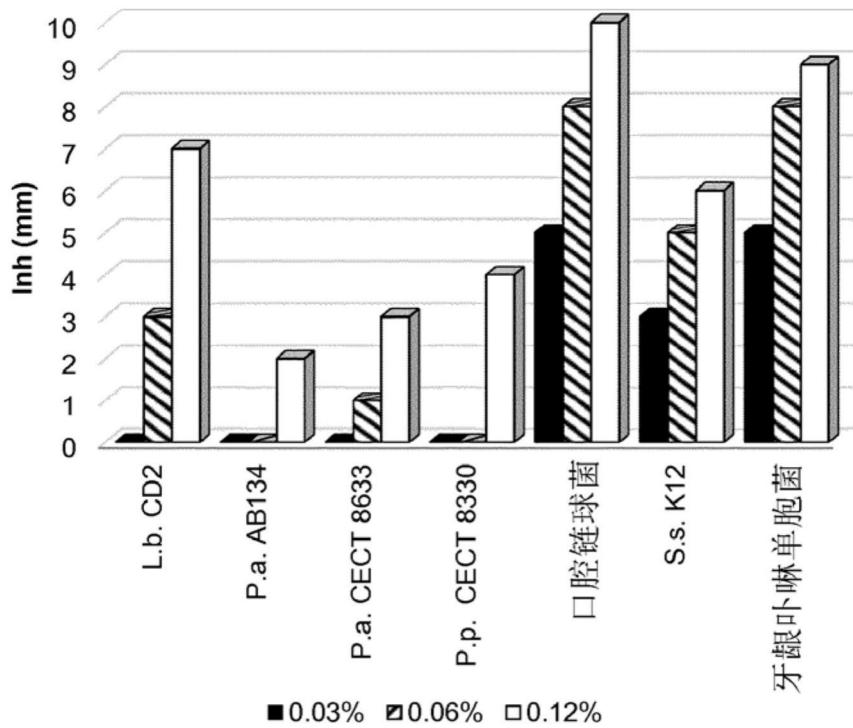


图5

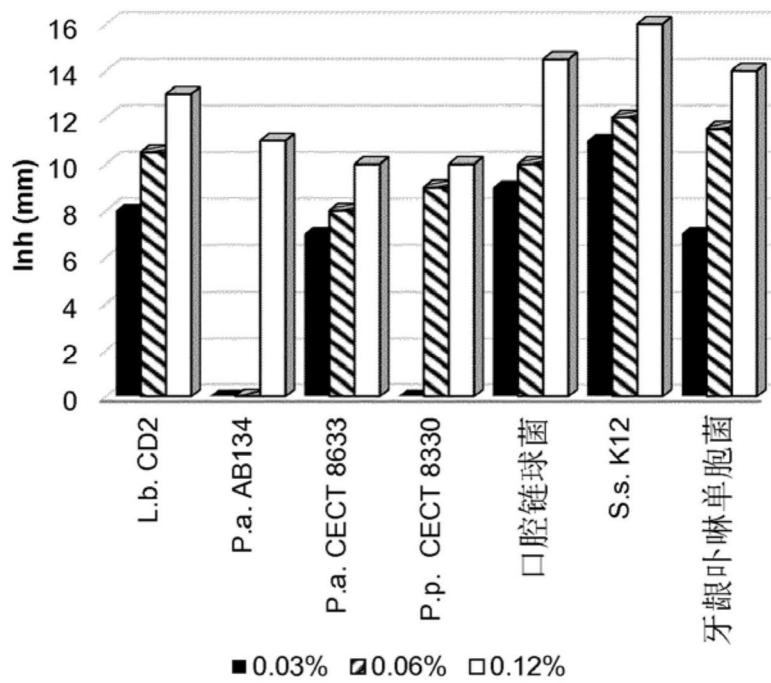


图6

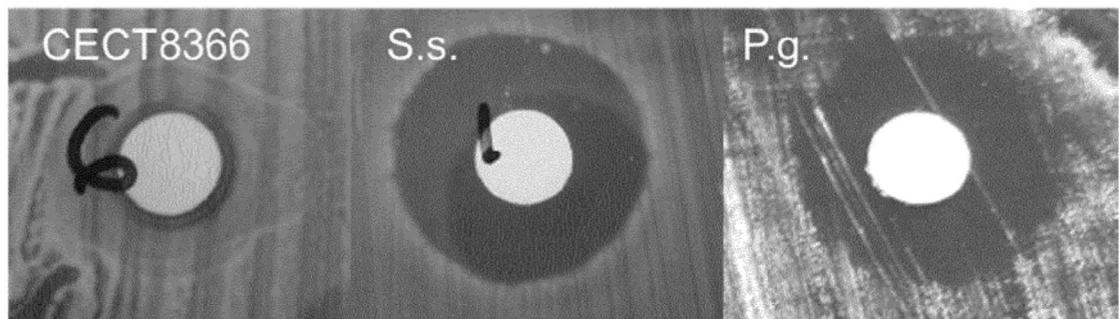


图7

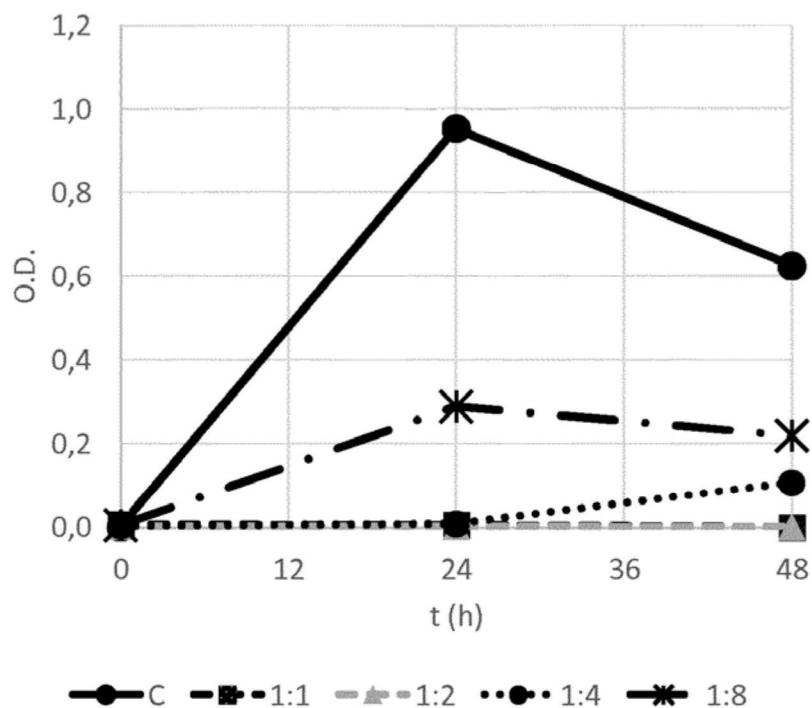


图8

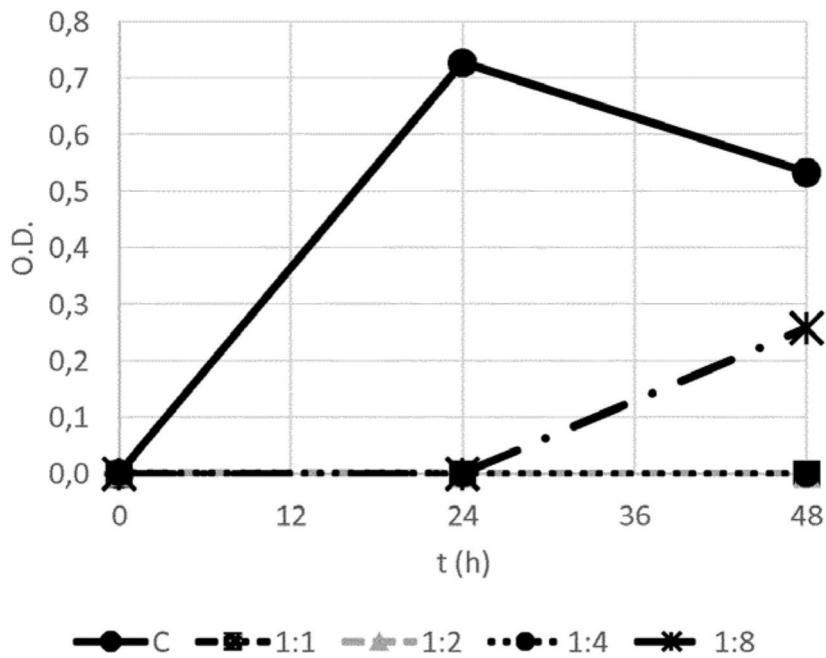


图9

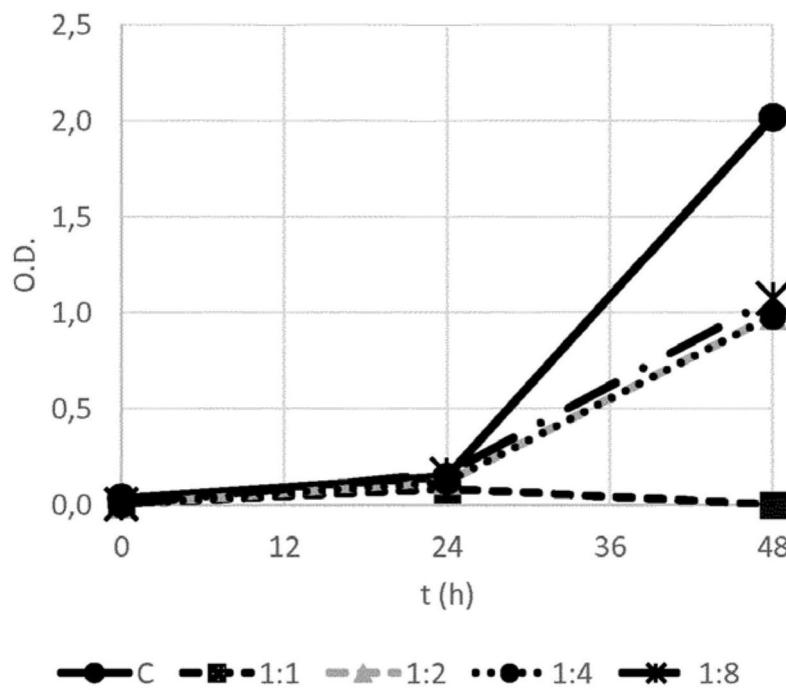


图10

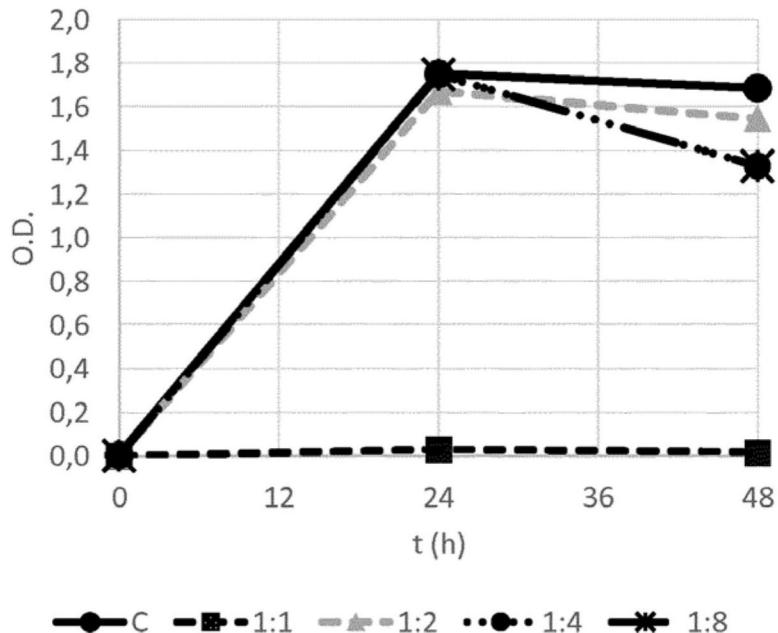


图11

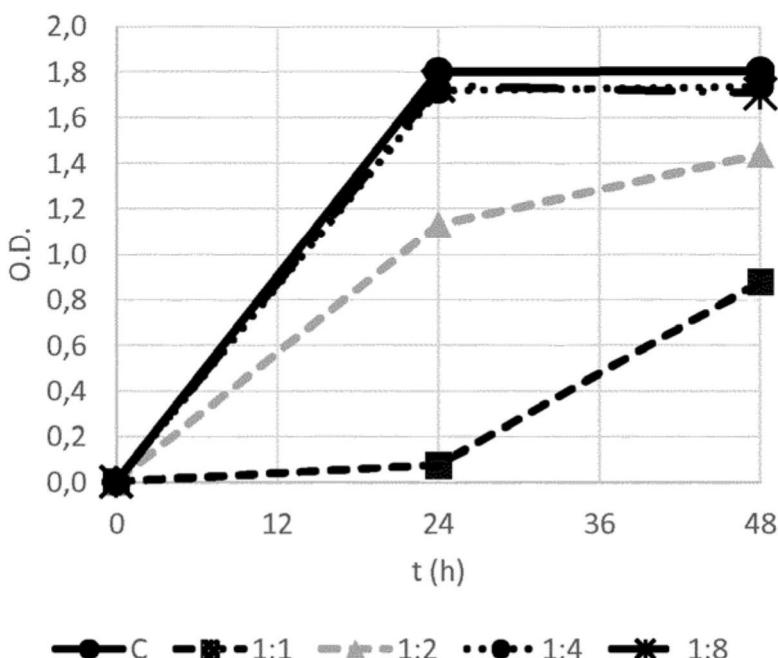


图12

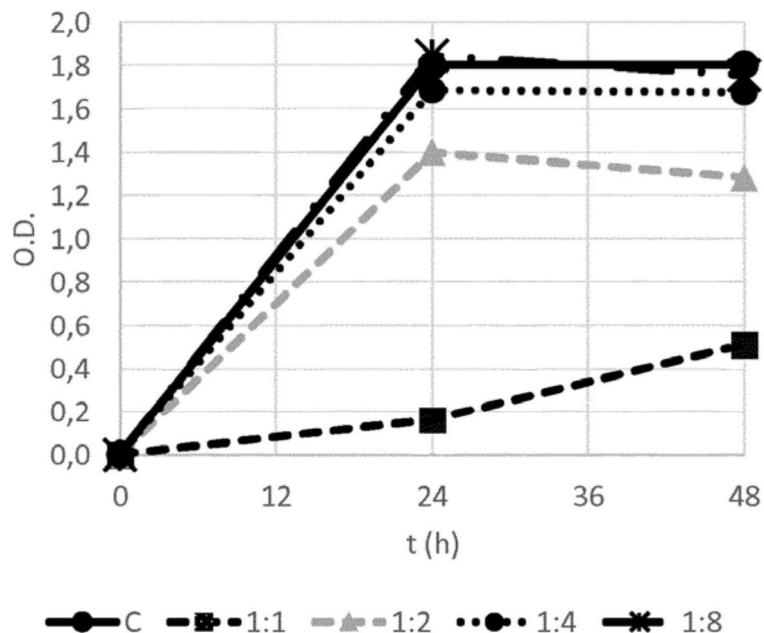


图13

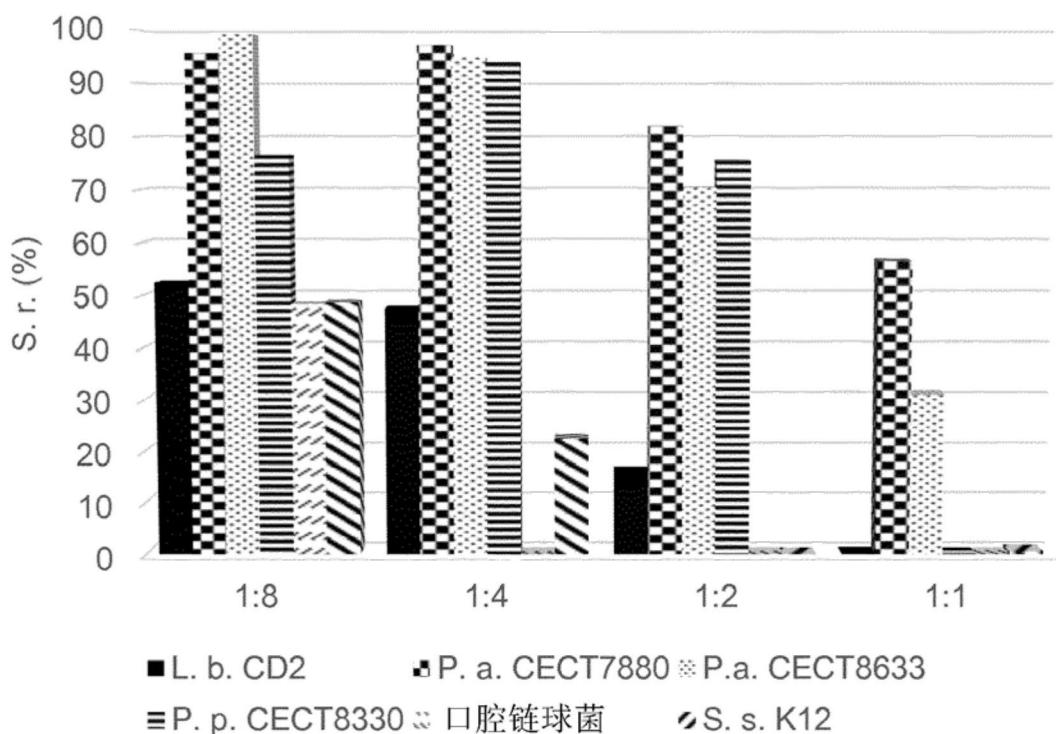


图14

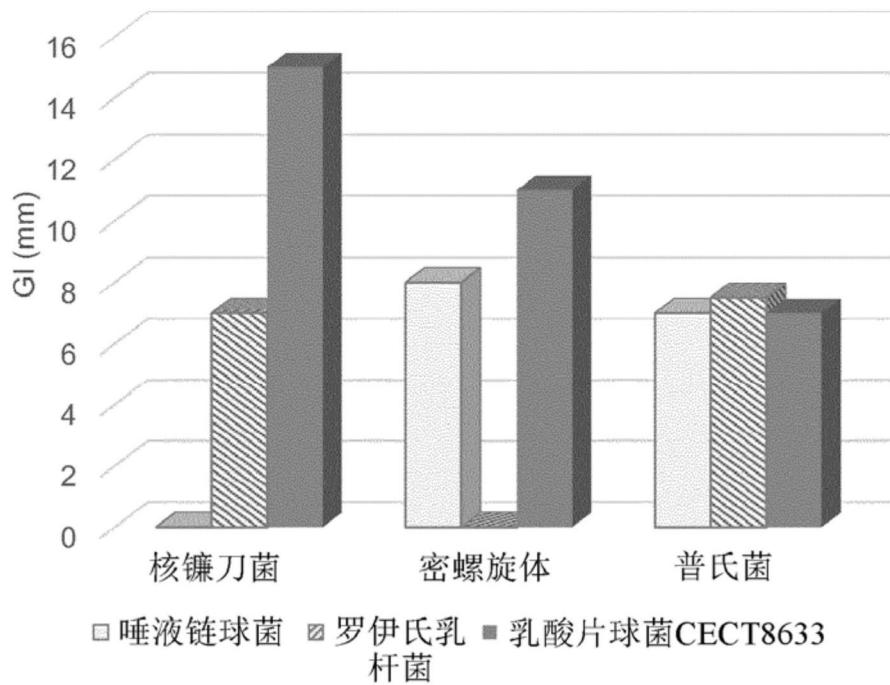


图15

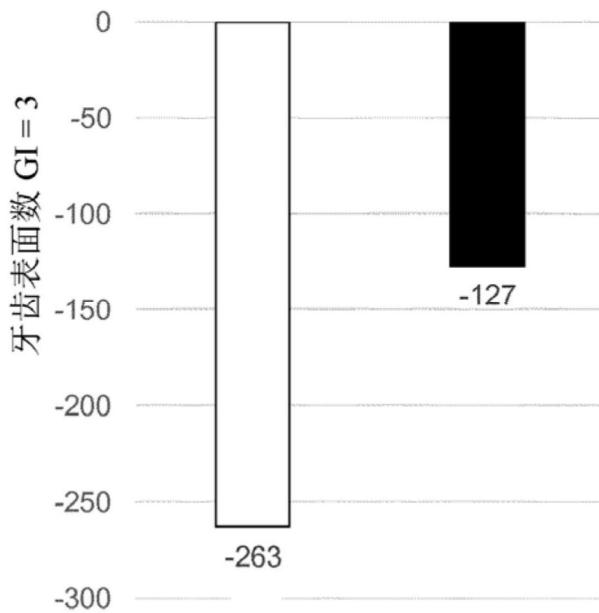


图16

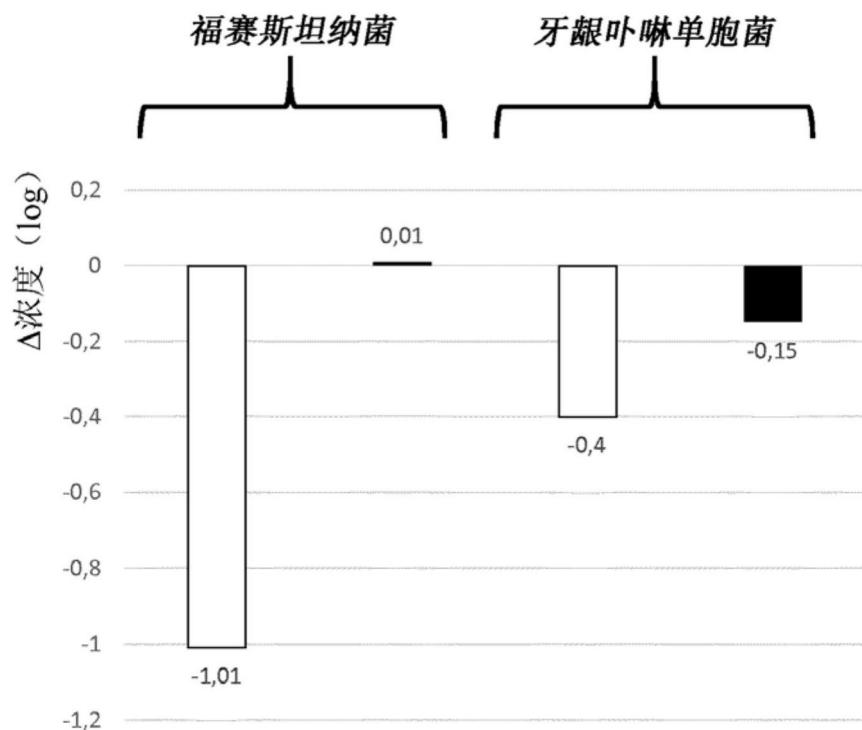


图17