(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2018 年 6 月 21 日 (21.06.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/107365 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/109690

(22) 国际申请日: 2016 年 12 月 13 日 (13.12.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大基因研究院(BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 邹远强(ZOU, Yuanqiang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 薛文斌(XUE, Wenbin); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 肖亮(XIAO, Liang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 李晓平(LI, Xiaoping); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 余靖宏(YU, Jinghong); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 刘传(LIU, Chuan); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司(XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) **Title:** ANAEROSTIPES CACCAE AND APPLICATIONS THEREOF

(54) **发明名称**: 粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)及其应用

(57) **Abstract:** Provided are Anaerostipes caccae and applications thereof. Specifically provided are applications of Anaerostipes caccae in treating and/or preventing inflammation-related diseases. Also provided are a composition used for treating and/or preventing the inflammation-related diseases, comprising drugs, beverages, foods or animal feed compositions, and a method for alleviating the diseases of intestinal tracts of mammals, alleviating the reduction of the weights of the of the mammals and/or decreasing disease activity indexes of the mammals.

(57) **摘要**: 一种粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)及其应用，具体地，提供了粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)在治疗和/或预防炎症相关疾病的用途，还提供了一种用于治疗和/或预防炎症相关疾病的组合物，包括药品、饮料、食品，或动物饲料组合物等，以及改善哺乳动物肠道病变、减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)的方法。

WO 2018/107365 A1

粪厌氧棒杆菌(Anaerostipes caccae)及其应用

技术领域

本发明属于微生物学领域，具体地，本发明涉及粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae*)在治疗和预防炎症相关疾病中的应用，也涉及包含粪厌氧棒杆菌的组合物及其应用。

背景技术

溃疡性肠炎(UC)是属于炎症性肠病(IBD)的一种，根据炎症部位分为结肠炎和直肠炎，其发病机理尚未清楚，目前主要认为是遗传易感性、肠道菌群、肠粘膜的免疫反应引起的。国内外大量的研究表明，UC 的发病与肠道菌群的失衡关系比较密切。UC 的临床病理表现为腹痛、腹泻和黏液血便，且反复发作。

由于病理机制不明确，临床的治疗也缺乏特异性和针对性，目前，临床上针对 UC 病的用药主要有水杨酸类、糖皮质激素、免疫制剂。水杨酸类药物可以比较好的抑制前列腺素合成，清除氧自由基从而达到缓解炎症反应的目的，临床上治疗 UC 常见的水杨酸类西药主要是柳氮磺胺吡啶(SASP)，主要针对轻度、中度以及慢性 UC 患者；糖皮质激素是重症或者爆发性 UC 患者的首选用药，比如倍他米松；免疫抑制剂如环孢素可以通过抑制 T 细胞 IL-2 的产生，影响免疫反应的进展，从而对 UC 进行抑制。

上述三类药物均可以一定程度上对 UC 进行缓解，但是也都存在一定的副作用，水杨酸类的副作用是引发消化道反应、头痛、网织红细胞增多、精子减少及过敏反应引起的皮疹、肝毒性、白细胞减少、贫血等。糖皮质激素会导致机体代谢紊乱、水潴留等副作用，仅可作为应急用药，不能长期服用。免疫抑制剂治疗对药物依赖性较大，治疗周期长，容易引起肾毒性及二次感染，只能作为一种辅助治疗的手段。

因此本领域迫切需要开发一种的新的，无毒副作用的，用于治疗和预防炎症相关疾病的药物。

发明内容

本发明的另一目的是提供粪厌氧棒杆菌在治疗和/或预防炎症相关疾病的用途。

本发明的另一目的是提供一种有效的无毒副作用的，用于治疗和/或预防炎症相关疾病的药品、饮料、食品组合物，或动物饲料组合物。

本发明的另一目的是提供一种改善哺乳动物肠道病变的方法及其应用。

本发明的另一目的是提供一种减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)的方法及其应用。

本发明第一方面提供了一种粪厌氧棒杆菌，所述粪厌氧棒杆菌为粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae*)，保藏号为 GDMCC No.:60088。

在另一优选例中，所述的粪厌氧棒杆菌的 16s rDNA 的序列如 SEQ ID NO.:1 所示。

在另一优选例中，所述粪厌氧棒杆菌为 *Anaerostipes caccae* AF04-45。

在另有一优选例中，所述粪厌氧棒杆菌来自肠道、动物粪便、发酵池、和/或厌氧反应器。

本发明第二方面提供了一种组合物，所述组合物包括：(a)安全有效量的本发明第一方面所述的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物；以及(b)食品上可接受的载体或药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述组合物还包括生长因子(较佳地，牛奶生长因子)。

在另一优选例中，所述组合物选自下组：食品组合物、保健组合物、药物组合物、饮料组合物、饲料组合物、或其组合。

在另一优选例中，所述的组合物为口服制剂。

在另一优选例中，所述的组合物为液态制剂、固态制剂、半固态制剂。

在另一优选例中，所述的组合物的剂型选自下组：粉末剂、散剂、片剂、糖衣剂、胶囊剂、颗粒剂、悬浮剂、溶液剂、糖浆剂、滴剂、舌下含片、或其组合。

在另一优选例中，所述的食品组合物包括乳液制品、溶液制品、粉末制品、或悬浮液制品。

在另一优选例中，所述的食品组合物包括乳品、乳粉、或乳液。

在另一优选例中，所述的液态制剂选自下组：溶液制品或悬浮液制品。

在另一优选例中，所述组合物含有 1×10-1×10^{15} cfu/mL 或 cfu/g *Anaerostipes caccae* AF04-45，较佳地 1×10^{4}-1×10^{10} cfu/mL 或 cfu/g *Anaerostipes caccae* AF04-45，按所述组合物的总体积或总重量计。

在另一优选例中，所述的组合物中，含有 0.0001-99wt%，较佳地 0.1-90wt% 所述的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物，以所述组合物的总重量计。

在另一优选例中，所述的组合物为单元剂型(一片、一粒胶囊或一小瓶)，每个单元剂型中所述组合物的质量为 0.05-5g，较佳地为 0.1-1g。

在另一优选例中，所述的组合物还含有其它益生菌和/或益生元。

在另一优选例中，所述的益生菌选自下组：乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、或其组合。

在另一优选例中，所述的益生元选自下组：低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)、寡聚糖、或其组合。

在另一优选例中，所述组合物还含有有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）。

在另一优选例中，所述有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）选自下组：半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸及其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素 C（抗坏血酸）、维生素 E、或其组合。

在另一优选例中，所述有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）的重量比为 0.1－2%，较佳地，0.5-1.5%，更佳地，0.5－1%，以所述组合物的总重计。

在另一优选例中，以组合物 1g 计，所述有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）的含量为 1mg－20mg，较佳地，5mg－15mg，更佳地，5mg－10mg。

本发明第三方面提供了一种本发明第一方面所述粪厌氧棒杆菌、或本发明

第二方面所述组合物的用途，用于制备药物或制剂，所述药物或制剂用于预防和/或治疗炎症相关疾病。

在另一优选例中，所述炎症相关疾病选自下组：炎症性肠病、类风湿性关节炎、或其组合。

在另一优选例中，所述炎症相关疾病选自下组：溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎、或其组合。

在另一优选例中，所述制剂包括微生态制剂。

本发明第四方面提供了一种本发明第一方面所述粪厌氧棒杆菌、或本发明第二方面所述组合物的用途，用于制备药物或制剂，所述药物或制剂用于选自下组的一种或多种用途：

(i) 减缓哺乳动物体重的下降；

(ii) 降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)；

(iii) 改善哺乳动物肠道病变。

在另一优选例中，所述哺乳动物包括人、啮齿动物(如大鼠、小鼠)。

在另一优选例中，所述减缓哺乳动物体重的下降指与模型组哺乳动物相比，实验组哺乳动物体重的降低幅度为不超过 15%，较佳地，不超过 10%，更佳地，不超过 5%，显著低于模型组哺乳动物体重的降低幅度。

在另一优选例中，所述减缓哺乳动物肠道的病变包括减缓结肠长度的缩短、和/或减轻结肠炎症反应。

本发明第五方面提供了一种本发明第二方面所述组合物的制法，包括步骤：

将本发明第一方面所述的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物与食品上可接受的载体或药学上可接受的载体混合，从而形成本发明第二方面所述的组合物。

在另一优选例中，所述制法还包括与生长因子混合的步骤。

在另一优选例中，所述制法还包括与有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）混合的步骤。

在另一优选例中，所述有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）选自下组：半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸及其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素 C（抗坏血酸）、维生素 E、或其组合。

在另一优选例中，所述制法还包括与益生菌、和/或益生元混合的步骤。

在另一优选例中，所述的益生菌选自下组：乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、或其组合。

在另一优选例中，所述的益生元选自下组：低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)、寡聚糖、或其组合。

在另一优选例中，所述生长因子为牛奶生长因子。

在另一优选例中，所述生长因子选自下组：维生素类物质、嘌呤类物质、嘧啶类物质、或其组合。

在另一优选例中，所述组合物为口服制剂。

本发明第六方面提供了一种生产方法，包括步骤：

(a)在适合培养的条件下，对本发明第一方面所述的粪厌氧棒杆菌进行培

养，从而获得培养产物；

(b)任选地，从所述培养产物分离粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物；和/或

(c)任选地，将上一步骤获得的培养产物或粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与食品上可接受的载体或药学上可接受的载体混合，从而制得本发明所述的组合物。

在另一优选例中，在步骤(c)之前，还包括将上一步骤获得的所述培养产物或所述粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与生长因子混合的步骤。

在另一优选例中，所述生长因子为牛奶生长因子。

在另一优选例中，所述生长因子选自下组：维生素类物质、嘌呤类物质、嘧啶类物质、或其组合。

在另一优选例中，在步骤(c)之前，还包括将上一步骤获得的所述培养产物或所述粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）混合的步骤。

在另一优选例中，在步骤(c)之前，还包括将上一步骤获得的所述培养产物或所述粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与益生菌和/或益生元混合的步骤。

本发明第七方面提供了一种改善哺乳动物肠道病变的方法，给所述对象施用本发明第二方面所述的组合物。

在另一优选例中，所述的施用包括口服。

在另一优选例中，所述的施用剂量为 0.01-5g/50kg 体重/天，较佳地，0.1-2g/50kg 体重/天。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人。

本发明第八方面提供了一种减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)的方法，给所述对象施用本发明第二方面所述的组合物。

在另一优选例中，所述的施用包括口服。

在另一优选例中，所述的施用剂量为 0.01-5g/50kg 体重/天，较佳地，0.1-2g/50kg 体重/天。

在另一优选例中，所述的对象包括哺乳动物，如人。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45 培养 48h 菌落的图片。

图 2 显示了粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45 在显微镜下的革兰氏染色图片（1000 倍）。

图 3 显示了 Control 组、模型组、VSL#3 和 AF04-45 治疗组小鼠的体重的变化。

图 4 显示了 Control 组、模型组、VSL#3 和 AF04-45 治疗组小鼠的 DAI 指数的变化。

图 5 显示了 Control 组、模型组、VSL#3 和 AF04-45 治疗组小鼠结肠的长度。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究和实验，意外地发现，粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae*)具有预防和/或治疗炎症相关疾病(如炎症性肠病（如溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎）、类风湿性关节炎)的作用，将含有粪厌氧棒杆菌的活性组合物饲喂食实验对象，发现该组合物能够减缓体重降低，降低疾病活动指数(DAI)，改善肠道病变，可有效减轻炎症相关疾病(如炎症性肠病（如溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎）、类风湿性关节炎))等病症。在此基础上完成本发明。

如本文所用，术语“含有”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此，术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

如本文所用，术语“生长因子”包括牛奶生长因子，具体地，包括维生素类物质、嘌呤类物质、嘧啶类物质、或其组合的营养物质。

其中，所述维生素类物质包括(但并不限于)：维生素 C、维生素 E、维生素 A、维生素 A 前体、维生素 B_6、维生素 D_3、维生素 K、叶酸、或其组合；

所述嘌呤类物质包括(但并不限于)：嘌呤核苷，其中所述嘌呤核苷包括嘌呤核苷的 5’-磷酸酯；所述嘌呤核苷的 5’-磷酸酯选自下组：肌苷酸(肌苷-5’-磷酸酯；IMP)、鸟苷酸(鸟苷-5’-磷酸酯；GMP)、黄苷酸(黄嘌呤核苷-5’-磷酸酯；XMP)、腺苷酸(腺苷-5’-磷酸酯；AMP)、或其组合；

所述嘧啶类物质包括所有含嘧啶结构的物质。

如本文所用，术语“控制哺乳动物体重下降”、“减缓哺乳动物体重下降”可互换使用，是指哺乳动物在进行溃疡性肠炎模型构建过程中由于炎症的不断严重，实验动物的体重也随之下降，体重下降的百分比为下降体重占原始体重的百分比。体重下降的程度越高，疾病越严重，本发明的粪厌氧棒杆菌在对哺乳动物溃疡性肠炎治疗过程中可以控制实验动物的体重下降，减缓疾病的症状。

疾病活动指数(DAI)

如本文所用，术语“疾病活动指数”是指结合患者（患病动物）的体重下降百分率、大便粘稠度和大便出血情况 3 种情况进行综合评分。

粪厌氧棒杆菌及其应用

如本文所用，术语“粪厌氧棒杆菌”、“*Anaerostipes caccae*”、“本发明的粪厌氧棒杆菌”可互换使用。在一个优选例中，所述菌株为*Anaerostipes*

caccae AF04-45，保藏号为GDMCC No.:60088，分离自人（较佳地，健康女性）的粪便中，具体地，分离自成年女性的肠道中。粪厌氧棒杆菌的生理特性如下：粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae* AF04-45) 37℃厌氧培养2天的菌落为淡黄色，凸起，较粘稠，不透明，近圆形，边缘整齐，直径约2-3mm；显微镜下放大1000倍粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae* AF04-45)的菌体为杆状，革兰氏阴性，不产芽孢和鞭毛。粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae* AF04-45)为过氧化氢酶阴性，氧化酶阴性，严格厌氧，在0.3%的胆盐中4h的存活率高达100%。能发酵多种碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、甘露醇、山梨醇等，主要产生乳酸、丁二酸、戊酸、3-甲基丁酸、柠檬酸等，并且本发明的粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae* AF04-45)对表4所示的20种抗生素均比较敏感。

本发明提供了粪厌氧棒杆菌在治疗和/或预防炎症相关疾病(如炎症性肠病（如溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎）、类风湿性关节炎)的应用。受试者用DSS(葡聚糖硫酸钠)进行诱导造模，菌株 *Anaerostipes caccae* AF04-45 具有选自下组的一个或多个用途：(i)减缓该受试者的体重降低；(ii)改善肠道病变程度；(iii)降低疾病活动指数(DAI)。根据本发明的一个优选例，采用C57bl/6 小鼠作为试验小鼠，用 DSS(葡聚糖硫酸钠)进行诱导造模，从而获得溃疡性肠炎(UC)模型小鼠，经 *Anaerostipes caccae* AF04-45 来治疗的 UC 模型小鼠，与未接受治疗的对照组(模型组)相比，其体重降低幅度减缓，并且各种与炎症相关疾病(如炎症性肠病)相关的指标也得到改善，如改善肠道病变程度(包括减缓结肠长度的缩短、和/或减轻结肠炎症反应)、降低疾病活动指数(DAI)等。因此，所述菌株能够用以预防和/或治疗炎症相关疾病(如炎症性肠病（如溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎）、类风湿性关节炎)。

组合物及其应用

本发明还提供了一种组合物，较佳地，所述组合物包括食品组合物、保健组合物、药物组合物、饮料组合物、或饲料组合物，优选地，为药物组合物。所述组合物包括有效量的粪厌氧棒杆菌，在一个优选例中，所述组合物还包括生长因子(如牛奶生长因子)。在一个优选例中，所述组合物还包括选自下组的益生菌：乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、或其组合；和/或选自下组的益生元：低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)、寡聚糖、或其组合。在一个优选例中，所述组合物还包括选自下组的有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）：半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸及其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素 C（抗坏血酸）、维生素 E、或其组合。以组合物的总重计，所述有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）的重量比为 0.1—2%，较佳地，0.5-1.5%，更佳地，0.5—1%。

在一优选例中，所述的组合物为液态制剂、固态制剂、半固态制剂。

在一优选例中，所述的液态制剂选自下组：溶液制品或悬浮液制品。

在一优选例中，所述的组合物的剂型选自下组：粉末剂、散剂、片剂、糖衣剂、胶囊剂、颗粒剂、悬浮剂、溶液剂、糖浆剂、滴剂、舌下含片、或其组

合。

本发明的组合物可以以口服液、片剂、针剂、口崩片、冻干粉制剂或胶囊的任一种形式给药，优选肠溶剂型（如胶囊），在本发明中，如无特别说明，本发明所用的赋形剂、药物允许的媒介和载体主要是根据适合菌或其代谢产物特性和所需的特定给药方式进行选择，有利于菌或其代谢产物顺利通过胃而被给药者吸收。这些物质可根据给药途径进行选择。

本发明的组合物可进一步包含那些通常用于药物制剂的赋形剂中任何附加的赋形剂，为的是例如稳定组合物自身，或使其容易地分散或赋予其适宜的味道。

在所述赋形剂当中，菊粉、果糖、淀粉、低聚木糖、二氧化硅、缓冲试剂以及风味剂是合适的实例。

本发明中药物制剂可进一步包含辅助的活性组份。

乳糖、麦芽糊精、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、明胶、硅酸钙、细结晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁或矿物油等都可用作本发明中药物组合物的载体、赋形剂或稀释剂等。

此外，本发明的药物组合物可进一步包括润滑剂、润湿剂、乳化剂、悬浮液稳定剂、防腐剂、甜味剂和香料等。本发明的药物组合物可通过多种公知的方法以肠衣制剂生产，以便于药物组合物的活性成分即微生物能顺利通过胃而不被胃酸所破坏。

另外，本发明的微生物可以常规方法制备的胶囊形式使用。例如，标准赋形剂和本发明的冷干微生物混合制成小球药丸，然后将药丸装填入明胶胶囊中。此外，本发明的微生物和药物允许使用的赋形剂如液体胶、纤维素、硅酸盐或矿物油等混合制作悬浮液或分散液，这种悬浮液或分散液可装入软的明胶胶囊中。

本发明的药物组合物可制成肠衣片供口服使用。本申请中的术语-“肠衣”，包括所有常规药物允许使用的包衣，这些包衣不被胃酸降解，但在小肠中能充分分解并快速释放出本发明的微生物。本发明的肠衣能在合成胃酸如pH=1 的 HCl 溶液中在 36-38℃维持 2 小时以上，并优选在合成肠液如 pH=7.0 的缓冲液中在 1.0 小时内分解。

本发明的肠衣为以每片约 16-30mg 进行包衣，较佳地 16-25mg，更佳地 16-20mg 进行包衣。本发明中肠衣厚度为 5-100μm，理想的厚度为 20-80μm。肠衣成分选自已公开知晓的常规聚合物。

本发明优选的肠衣由纤维素乙酸邻苯二甲酸酯聚合物或偏苯三酸酯聚合物以及异丁烯酸的共聚物(例如，含有 40%以上异丁烯酸和含有甲基纤维素邻苯二甲酸羟丙酯或其酯类衍生物的异丁烯酸的共聚物)制备。

本发明中肠衣所使用的纤维素乙酸邻苯二甲酸酯的粘度为约 45-90cp，乙酰含量 17-26%，邻苯二甲酸含量 30-40%。用于肠衣中的纤维素乙酸偏苯三酸酯粘度为约 5-21cs，乙酞含量 17-26%。纤维素乙酸偏苯三酸酯由 Eastman 科达公司生产，可用于本发明中的肠衣材料。

用于本发明肠衣中的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯，分子量一般为 20,000-130, 000 道尔顿，理想分子量为 80, 000-100, 000 道尔顿，羟丙基含量

为 5-10%，甲氧基含量为 18-24%，邻苯二甲酰基含量为 21-35%。

用于本发明肠衣中的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯为 HP50，由日本 Shin-Etsu Chemidnl Co. Ltd.生产。HP50 含有 6-10%羟丙基，20-24%甲氧基，21-27%的丙基，其分子量为 84，000 道尔顿。另一种肠衣物质为 HP55，HP55 含有 5-9%的羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯，18-22%甲氧基，27-35%的邻苯二甲酸，其分子量为 78，000 道尔顿。

本发明肠衣如下制备：使用常规方法将肠衣溶液喷雾到核心上。该肠包衣方法中所有溶剂为醇类(如乙醇)、酮类(如丙酮)、卤代烃化合物(如二氯甲烷)、或其组合物。将软化剂如二-正丁基邻苯二甲酸酯和三乙酸甘油酯加入到肠衣溶液中，其比例为 1 份包衣物对约 0.05 份或约 0.3 份软化剂。喷雾方法优选连续执行，所喷雾的料量可根据包衣所采用的条件进行控制。喷雾压力可随意调节，一般而言，能在平均 1-1.5 巴压力下获得理想的结果。

说明书中“药物有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。比如，在本发明中，可制备含有 1×10-1×10^{15}cfu/ml 或 cfu/g (特别的，可含有 1×10^{4}-1×10^{10}cfu/ml 或 cfu/g；更特别地，可含有 1×10^{6}-1×10^{10}cfu/ml 或 cfu/g)的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物的制剂。

当用于制备药物组合物时，所用的粪厌氧棒杆菌或其代谢产物的有效剂量可随施用的模式和待治疗的疾病的严重程度而变化。适用于内服的剂量形式，包含与固态或液态药学上可接受的载体密切混合的约 1×10-1×10^{15}cfu/ml 或 cfu/g (特别的，可含有 1×10^{4}-1×10^{10}cfu/ml 或 cfu/g；更特别地，可含有 1×10^{6}-1×10^{10}cfu/ml 或 cfu/g)的活性粪厌氧棒杆菌或发酵产生的活性成分。可调节此剂量方案以提供最佳治疗应答。例如，由治疗状况的迫切要求，可每天给予若干次分开的剂量，或将剂量按比例地减少。

所述的粪厌氧棒杆菌或其代谢产物可通过口服等途径给予。固态载体包括：淀粉、乳糖、磷酸二钙、微晶纤维素、蔗糖和白陶土，而液态载体包括：培养基、聚乙二醇、非离子型表面活性剂和食用油(如玉米油、花生油和芝麻油)，只要适合粪厌氧棒杆菌或其代谢产物特性和所需的特定给药方式。在制备药物组合物中通常使用的佐剂也可有利地被包括，例如调味剂、色素、防腐剂和抗氧化剂如维生素 E、维生素 C、BHT 和 BHA。

从易于制备和给药的立场看，优选的药物组合物是固态组合物，尤其是片剂和固体填充或液体填充的胶囊。口服给药是优选的。

将本发明组合物施用给所述个体，每天给药 1 次或多次。给药剂量单位表示其形式上能分开且适用于人类或其他所有哺乳动物个体的剂量。每一单位含有药物允许的载体和有效治疗量的本发明微生物。给药量随病人的体重和炎症相关疾病(如炎症性肠病（如溃疡性肠炎、胃炎、普通肠炎）、类风湿性关节炎)、心血管疾病(如高血压、高血脂，冠心病)的严重程度、所包括的补充活性组份和所使用的微生物而变化。此外如可能，可分开给药，并且如需要可连续给药。因此，所述给药量不会对本发明造成限制。此外，本发明中的“组合物”不仅意味着药品而且表示可作为功能性食品和健康补充食品。在一个优选例中，所述组合物包括：饮料、食品、药品、动物饲料等。

在本发明的一个优选例中，还提供了一种食品组合物，它含有有效量的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物，以及余量的食品上可接受的载体，所述的食品组

合物的剂型选自固体、乳品、溶液制品、粉末制品、或悬浮液制品。在一优选例中，所述食品组合物还可含有生长因子(如牛奶生长因子)。在一优选例中，所述组合物还包括选自下组的益生菌：乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、或其组合；和/或选自下组的益生元：低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)、寡聚糖、或其组合。在一个优选例中，所述组合物还包括选自下组的有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）：半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸及其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素 C（抗坏血酸）、维生素 E、或其组合。

在一优选例中，所述组合物的配方如下：

1×10-1×10^{15}cfu/mL 的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物；以及食品上或药学上可接受的载体，和/或赋形剂。

在另一优选例中，所述组合物的配方如下：

1×10^{4}-1×10^{10}cfu/mL 的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物；以及食品上或药学上可接受的载体，和/或赋形剂。

微生态制剂

微生态制剂是一种包含益生菌及代谢产物的生物制剂或者是可以增加益生菌的膳食补充剂，可以通过调节、维持肠道内微生态平衡，达到提高人体健康水平的目的。主要包括益生菌、益生元和合生元。

在本发明中，所述微生态制剂包括(a)安全有效量的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物；以及(b)食品上可接受的载体或药学上可接受的载体。在一优选例中，所述制剂还包括生长因子(如牛奶生长因子，较佳地，包括维生素类物质、嘌呤类物质、和/或嘧啶类物质)。在一个优选例中，所述制剂还包括选自下组的益生菌：乳酸菌、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌、或其组合；和/或选自下组的益生元：低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、低聚木糖(XOS)、低聚乳果糖(LACT)、大豆低聚糖(SOS)、菊粉(Inulin)、寡聚糖、或其组合。在一个优选例中，所述组合物还包括选自下组的有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）：半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基羟基茴香醚、二丁基甲基甲苯、生育酚、竹叶抗氧化物、D-异抗坏血酸及其钠盐、抗坏血酸钠、抗坏血酸钙、磷脂、维生素 C（抗坏血酸）、维生素 E、或其组合。

粪厌氧棒杆菌的生产方法

通常，粪厌氧棒杆菌可以用常规方法制得。

在本发明中，提供了一种能够大规模生产粪厌氧棒杆菌的方法，具体地，包括如下步骤：

(a)在适合培养的条件下，对本发明所述的粪厌氧棒杆菌进行培养，从而获得培养产物；

(b)任选地，从所述培养产物分离粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物；和

(c)任选地，将上一步骤获得的培养产物或粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与食品上可接受的载体或药学上可接受的载体混合，从而制得组合物。

改善哺乳动物肠道病变的方法

在另一优选例中，所述方法包括：摄取本发明的药物组合物、食品组合物、饮料组合物、或其组合。所述实验对象包括哺乳动物，如人。

在另一优选例中，所述方法包括：摄取本发明的药物组合物、食品组合物、或动物饲料，或其组合。所述实验对象为动物，较佳地为鼠类，兔类。

减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)的方法

在另一优选例中，所述方法包括：摄取本发明的药物组合物、食品组合物、饮料组合物、或其组合。所述实验对象包括哺乳动物，如人。

在另一优选例中，所述方法包括：摄取本发明的药物组合物、食品组合物、或动物饲料，或其组合。所述实验对象为动物，较佳地为鼠类，兔类。

菌种保藏

本发明的菌种粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45（与保藏名称相同)已于 2016 年 10 月 13 日保藏在广东省微生物菌种保藏中心，地址：广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼，保藏号：GDMCC No.:60088。

本发明的主要优点包括：

(a) 本发明的粪厌氧棒杆菌能够显著改善与炎症相关疾病(如炎症性肠病)相关的指标(如减缓体重下降、改善肠道病变程度(包括减缓结肠长度的缩短、减轻结肠炎症反应等)、降低疾病活动指数(DAI)等)。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York：Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989)中所述的条件，或按照《微生物:实验手册》(James Cappuccino 和 Natalie Sherman 编,Pearson Education 出版社)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

如无特别说明，实施例所用的材料和试剂均为市售产品。

VSL#3，购自美国 Sigma-Tau。

Anaerostipes caccae DSMZ 14662，购自德国微生物菌种保藏中心，保藏号为 DSMZ 14662。

实施例1：粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45（简称AF04-45）的分离鉴定

1.1 分离培养

分离样品来自于深圳一位健康女性的新鲜粪便样品，分离培养基为厌氧PYG培养基（购自环凯微生物科技公司），培养基成分如表1-1、表1-2：

表1-1 PYG培养基成分

组分	含量（1L）

蛋白胨	5g
胰化酪蛋白	5g
酵母粉	10g
牛肉膏	5g
葡萄糖	5g
K_2HPO_4	2g
醋酸钠	5g
Cysteine-HCl·H_2O	0.5g
血红素	5mg
无机盐溶液	40ml
刃天青	1mg
蒸馏水	950ml

表1-2 无机盐溶液的配方

无机盐组分	含量（1L）
$CaCl_2$·2 H_2O	0.25g
$MgSO_4$·7 H_2O	0.5g
K_2HPO_4	1g
KH_2PO_4	1g
$NaHCO_3$	10g
NaCl	2g

按照以上成分配制好培养基，115℃高压灭菌25min，固体培养基需要转入厌氧箱中进行平板的倾倒，晾干备用。

新鲜粪便立即转移至厌氧箱中，取约0.2g悬浮于灭菌的PBS（磷酸盐缓冲液）中，充分吹打分散，然后进行梯度稀释涂布，平板放置在厌氧箱中37℃培养3-5天，厌氧气体组成为氮气：氢气：二氧化碳 = 90：5：5。待平板长出肉眼可见的菌落，挑取单个菌落进行划线分纯，并对分纯的单菌进行保藏和鉴定。

1.2 16S rDNA鉴定

提取单菌的基因组 DNA，以 DNA 作为模板进行 16S rDNA 扩增，采用 16S rDNA 的通用引物（8F-AGAGTTTGATCATGGCTCAG（SEQ ID NO.:2）和 1492R-TAGGGTTACCTTGTTACGACTT（SEQ ID NO.:3））（购自生工生物工程(上海)股份有限公司），扩增条件是 95℃预变性 4min，然后 95℃变性 30s，57℃退火 40s，72℃延伸 1min30s，30 个循环。扩增的 PCR 产物进行纯化，3730 测序，获得每株菌的 16S rDNA 全长序列。其中 AF04-45 的 16S rDNA 序列长度为 1399 bp，如 SEQ ID NO.:1 所示。通过在 NCBI 的数据库比对，可以得出 AF04-45 同数据库中参考菌株 *Anaerostipes caccae*（粪厌氧棒杆菌）DSMZ 14662（购自德国微生物菌种保藏中心，保藏号为 DSMZ 14662）的 16S rDNA 相似度最高为 100%。通过 16S rDNA 鉴定，基本可以确认 AF04-45 属于粪厌氧棒杆菌。

AF04-45的16S rDNA序列为SEQ ID NO.:1，如下所示：

```
gaagcattta ggattgaagt tttcggatgg atttcctata tgactgagtg gcggacgggt      60
gagtaacgcg tggggaacct gccctataca gggggataac agctggaaac ggctgctaat     120
accgcataag cgcacagaat cgcatgattc agtgtgaaaa gccctggcag tataggatgg     180
tcccgcgtct gattagctgg ttggtgaggt aacggctcac caaggcgacg atcagtagcc     240
ggcttgagag agtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg     300
cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgagtga     360
```

```
agaagtattt cggtatgtaa agctctatca gcagggaaga aaacagacgg tacctgacta      420
agaagccccg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtagggggc aagcgttatc      480
cggaattact gggtgtaaag ggtgcgtagg tggcatggta agtcagaagt gaaagcccgg      540
ggcttaaccc cgggactgct tttgaaactg tcatgctgga gtgcaggaga ggtaagcgga      600
attcctagtg tagcggtgaa atgcgtagat attaggagga acaccagtgg cgaaggcggc      660
ttactggact gtcactgaca ctgatgcacg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac      720
cctggtagtc cacgccgtaa acgatgaata ctaggtgtcg gggccgtaga ggcttcggtg      780
ccgcagcaaa cgcagtaagt attccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa      840
ggaattgacg gggacccgca caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa      900
gaaccttacc tggtcttgac atcccaatga ccgaacctta accggttttt tctttcgaga      960
cattggagac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt     1020
cccgcaacga gcgcaacccc tatctttagt agccagcatt taaggtgggc actctagaga     1080
gactgccagg gataacctgg aggaaggtgg ggacgacgtc aaatcatcat gccccttatg     1140
gccagggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgaagtc gtgaggcgaa     1200
gcaaatccca gaaataacgt ctcagttcgg attgtagtct gcaactcgac tacatgaagc     1260
tggaatcgct agtaatcgtg aatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac     1320
acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tcagtgaccc aaccgcaagg     1380
agggagctgc cgaaggtgg                                                  1399
```

（SEQ ID NO.:1）

1.3 AF04-45的微生物特征和生理生化特征

（1）菌落形态

AF04-45在PYG平板上37℃培养2天的菌落为淡黄色，凸起，较粘稠，不透明，近圆形，边缘整齐，直径约2-3mm（图1）。

（2）菌体显微形态

显微镜下放大1000倍AF04-45的菌体为杆状，革兰氏阴性，不产芽孢和鞭毛（图2）。

（3）生理生化特征

AF04-45为过氧化氢酶阴性，氧化酶阴性，严格厌氧，在0.3%的胆盐中4h的存活率高达100%。AF04-45的底物利用情况API 20A实验结果如下表2：

表2

编号	反应	结果	编号	反应	结果
1	吲哚产生	−	11	明胶水解	−
2	脲素（脲酶）	−	12	七叶灵	−
3	葡萄糖	+	13	甘油	−
4	甘露醇	+	14	纤维二糖	−
5	乳糖	w	15	甘露糖	+
6	蔗糖	+	16	松叁糖	−
7	麦芽糖	+	17	棉籽糖	−
8	柳醇	w	18	山梨醇	+
9	木糖	+	19	鼠李糖	−
10	阿拉伯糖	−	20	海藻糖	−

实施例2 粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45的生物活性物质

AF04-45的生物活性物质主要考察短链脂肪酸（SCFA）和有机酸产生情况。

（1）样品预处理

将AF04-45培养48h，取1ml菌液进行12000r/min离心5min，取上清，准备进行短链脂肪酸（SCFA）和有机酸的检测。

（2）SCFA的测定

短链脂肪酸的测定采用外标法，选用乙酸、丙酸、丁酸、戊酸进行标准曲线的制作。采用安捷伦气象色谱仪(GC-7890B, Agilent)，选用HP-INNOWax(Cross-Linked PEG)，30m×0.25mm×0.25um的毛细柱进行分析，检测器为氢火焰离子检测器，GC参数设置为柱温：180～200℃；气化室温度：240℃；检测温度：210℃；进样量：2μL；载气流量：N_2，50mL/min；氢气流量：50 mL/min；空气流量：600～700 ml/min。

测定得出SCFA产量为：乙酸 2.24 mmol/L，丁酸37.31 mmol/L。

（3）有机酸的测定

有机酸的检测标准品选用：3-甲基丁酸，戊酸，奎宁酸，乳酸，草酸，丙二酸，苯甲酸，马来酸，丁二酸，反富马酸，苹果酸，己二酸，酒石酸，莽草酸，柠檬酸，异柠檬酸和L-抗坏血酸。仍然采用安捷伦气象色谱仪(GC-7890B, Agilent)，色谱柱选用122-5532G DB-5ms (40m × 0.25mm × 0.25um)，柱温：270～290℃；进样口温度：250℃；气体流量: 0.86 ml/min。测得粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45有机酸的含量详见下表3：

表3

有机酸	3-甲基丁酸	戊酸	奎宁酸	乳酸	草酸	丙二酸
含量（mmol/L）	0.37	0.38	0	10.33	0	0
有机酸	苯甲酸	马来酸	丁二酸	反富马酸	苹果酸	己二酸
含量（mmol/L）	0	0	0.45	0.02	0	0.05
有机酸	酒石酸	莽草酸	柠檬酸	异柠檬酸	L-抗坏血酸	
含量（mmol/L）	0	0	0.33	0	0.11	

实施例3 粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45的抗生素敏感情况

考察AF04-45对20种抗生素的敏感情况，将AF04-45培养至对数生长期，取100ul菌液进行平板（PYG培养基）涂布，涂抹均匀后贴上抗生素药敏片，37℃厌氧条件下培养48h。测量抑菌圈的直径，其结果详见表4。

表4

抗生素	抑菌圈直径（cm）	抗生素	抑菌圈直径（cm）
青霉素	2.0	头孢曲松钠	2.8
苯唑西林	0.7	头孢哌酮	2.8
氨苄西林	3.0	丁胺卡那(阿米卡星) Δ	1.2
羧苄西林	2.2	庆大霉素	1.2
卡那霉素	0.7	复达欣(头孢他啶) (头	1.5

		孢噻甲羧肟) Δ	
头孢氨苄	1.8	新霉素	1.1
头孢唑林	2.8	四环素	3.6
头孢拉定	2.0	多西环素	4.0
哌拉西林	2.6	美满霉素(二甲胺四环素)(米诺环素) Δ	4.0
头孢呋辛	2.6	红霉素	3.0

结果显示，AF04-45对这20种抗生素均比较敏感。

实施例4 粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45对溃疡性肠炎的缓解情况

4.1 灌胃菌株的准备

（1）AF04-45的培养：将AF04-45培养至稳定期（约24h），离心，收集菌体，使用PBS（PBS添加0.05%的半胱氨酸盐酸盐）进行悬浮，调整菌浓至10^9cfu/ml，备用。

（2）VSL#3的准备：溶解VSL#3（购自美国Sigma Tau）的菌粉至PBS（磷酸盐缓冲液）中，同样调整菌浓至10^9cfu/ml，备用。

4.2 试验小鼠的准备

（1）小鼠品系：实验小鼠采用C57bl/6小鼠（购自湖北医学实验动物中心），8周龄，体重21g±2g，小鼠饲养环境为SPF级，适应性喂养1周进行造模。

（2）造模方法：UC模型小鼠采用DSS造模法，持续给小鼠饮用0.15%的DSS（葡聚糖硫酸钠，分子量36000-50000）（购自美国MPBiomedicals）7天。

（3）实验分组：试验小鼠共48只，每组12只小鼠，包括模型组、AF04-45治疗组、VSL#3阳性药组、Control组（空白对照组），具体如下所示：

模型组：0.15%的DSS诱导7天，并灌胃PBS

AF04-45治疗组：0.15%的DSS诱导7天，并灌胃AF04-45益生菌（PBS悬浮的活菌，10^9cfu/ml）

VSL#3阳性药组：0.15%的DSS诱导7天，并灌胃VSL#3益生菌（PBS悬浮的活菌，10^9cfu/ml）

Control组：正常饲喂，不进行DSS诱导

4.3 实验过程

按照小鼠分组情况进行DSS诱导和灌胃干预，干预方法采用边造模边治疗，每天记录小鼠体重、饮食和饮水情况，同时观察小鼠的粪便性状及粪便隐血情况，分别在第1天、第3天、第5天和第7天计算小鼠的疾病活动指数（DAI），DAI评分详见表5。实验持续7天，益生菌和PBS的日灌胃量为200ul。实验结束后处死小鼠，所有小鼠取血、脱颈、取结肠、拍照、称重、量取结肠长度。结

肠组织保存于-80℃冰箱和多聚甲醛中。

表5

体重下降（%）	大便性状	大便隐血	积分
0	正常	正常	0
1-5			1
5-10	松散	隐血阳性	2
10-15			3
>15	稀便	肉眼血便	4

DAI指数等于体重、大便性状以及大便隐血三个积分之和。

4.4 实验结果

（1）小鼠的体重的变化

实验过程小鼠的体重记录见表6和图3。

表6

分组	第1天(g)	第3天(g)	第5天(g)	第7天(g)
Control	26.45±1.35	26.53±1.41	27.07±1.81*	27.77±1.93*
AF04-45组	26.21±1.12	25.29±1.32	23.90±1.49	22.88±2.08▲
VSL#3	26.91±1.25	25.38±1.31	23.79±1.58	22.75±1.89▲
模型组	26.67±1.12	25.01±1.36	23.32±1.54	21.10±1.86

表6的数据显示，随着DSS的诱导，小鼠的体重呈现下降趋势，到第5天后，DSS诱导的小鼠（模型组）相比Control组小鼠的体重出现显著的变化（*P<0.001），体重的下降是UC严重程度的一个指标之一，其中模型组的体重下降的最严重，在第7天AF04-45组小鼠和VSL#3组小鼠的体重显著高于模型组（▲P<0.05），说明AF04-45可以有效减缓UC小鼠体重的下降。

（2）小鼠的疾病活动指数（DAI）

DAI指数等于体重、大便性状以及大便隐血三个积分之和，分别计算小鼠在第1、3、5、7天的DAI指数，结果如表7和图4所示。

表7

分组	第1天(g)	第3天(g)	第5天(g)	第7天(g)
Control	2.0±0.6	2.2±0.6	2.1±0.6**	1.8±0.5**
AF04-45组	2.1±0.6	3.2±0.6	6.0±0.7	7.0±0.6*
VSL#3	2.4±0.5	3.4±0.7	6.1±0.7	7.4±0.5*

模型组	2.3±0.5	3.6±0.5	6.9±0.5	8.5±0.9

随着DSS诱导，小鼠的DAI指数逐渐上升，到第7天小鼠的DAI值达到最高，Control组由于未进行DSS诱导，其DAI指数维持稳定，第5天和第7天的DAI同DSS诱导的小鼠（模型组）DAI存在显著性差异（**P<0.01）。在AF04-45和VSL$^{\#}$3的干预下，小鼠的疾病活动情况有一定的改善，第7天，AF04-45组和VSL$^{\#}$3组的DAI指数明显低于模型组（*P<0.5）。说明AF04-45可以明显改善UC的疾病症状，同时AF04-45组小鼠在第7天的DAI指数显著低于VSL$^{\#}$3组，由此可见，AF04-45对UC小鼠的疾病控制的更好。

（3）小鼠结肠长度的变化

实验结束后处死小鼠并进行解剖，取出小鼠的结肠组织，测量其长度。由于DSS诱导的UC模型，小鼠在结肠组织会发生一系列病变导致结肠缩短，因此结肠的长度变化也是评判小鼠溃疡性肠炎的严重程度的指标之一。通过测量各组小鼠的结肠长度结果如表8和图5所示。

表8

组别	结肠长度（cm）
Control	8.32±0.48**
模型组	5.08±0.62
VSL$^{\#}$3组	6.23±0.58*
AF04-45组	6.27±0.72*

结果显示，造模7天小鼠的结肠缩短比较严重，相对于模型组，正常小鼠的结肠长度要长于UC造模的模型小鼠（**P<0.01），通过AF04-45和VSL$^{\#}$3的干预，可以显著减缓小鼠的结肠缩短（*P<0.05）。说明AF04-45在控制UC小鼠结肠病变有良好的效果。

实施例5 含粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45的食品组合物

原料配比如表9。

表9

原料	质量百分比(%)
Anaerostipes caccae AF04-45	0.5
牛奶	90.0
白糖	9.0
维生素C	0.5

按照上述配方比例混合牛奶、白糖，搅拌至完全混合，预热，20Mpa压力均质，90℃左右杀菌5-10分钟，冷却至40-43℃，混入保护剂维生素C，接种1-100×10^{6}cfu/g的*Anaerostipes caccae* AF04-45菌，即制成含*Anaerostipes caccae* AF04-45菌的食品组合物。

实施例6 含*Anaerostipes caccae* AF04-45的药物组合物

原料配比见表10。

表10

原料	质量百分比(%)
Anaerostipes caccae AF04-45	1.0%
乳糖	2.0%
酵母粉	2.0%
蛋白胨	1.0%
纯净水	93.5%
维生素C	0.5%

按照比例将乳糖、酵母粉、蛋白胨以纯净水混合均匀，预热到60-65℃，20Mpa压力均质，90℃左右杀菌20-30分钟，冷却至36-38℃，混入保护剂维生素C，接入*Anaerostipes caccae* AF04-45活菌(1-50×10^6cfu/mL)，36-38℃发酵至pH值为6.0，离心，冷冻干燥至水份含量小于3%，即制备*Anaerostipes caccae* AF04-45菌冷冻干燥物。称取0.5克*Anaerostipes caccae* AF04-45冷冻干燥物与麦芽糊精等量混合后装入胶囊中，即制成含*Anaerostipes caccae* AF04-45的药物组合物。

实施例 7 含粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45 的药物的制备

7.1 菌液准备：将*Anaerostipes caccae* AF04-45（1×10^9cfu/ml）进行厌氧培养，厌氧培养基采用实施例1的PYG培养基，经过37℃厌氧发酵2-3天。

7.2 生长因子制备：将脱脂牛奶、酪蛋白进行混合、离心、超滤获得牛奶生长因子粗提物（含有维生素类物质、嘌呤类物质、和/或嘧啶类物质的营养物质）。

7.3 药物剂型制作：将5体积生长因子和1体积的保护剂维生素C加入到100体积的AF04-45发酵的菌液中，充分搅拌混匀，然后加入淀粉辅料（如麦芽糊精），从而制备得到含粪厌氧棒杆菌*Anaerostipes caccae* AF04-45的药物。

菌种保藏

本发明的菌种粪厌氧棒杆菌 *Anaerostipes caccae* AF04-45 (与保藏名称相同)已于 2016 年 10 月 13 日保藏在广东省微生物菌种保藏中心，地址：广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼，保藏号：GDMCC No.:60088。

本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1.一种粪厌氧棒杆菌，其特征在于，所述粪厌氧棒杆菌为粪厌氧棒杆菌(*Anaerostipes caccae*)，保藏号为GDMCC No.:60088。

2．一种组合物，其特征在于，所述组合物包括：(a)安全有效量的权利要求1所述的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物；以及(b)食品上可接受的载体或药学上可接受的载体。

3．如权利要求2所述的组合物，其特征在于，所述的组合物还含有其它益生菌和/或益生元。

4．如权利要求2所述的组合物，其特征在于，所述组合物还含有有助于保持粪厌氧棒杆菌活力的物质（如保护剂）。

5．一种权利要求1所述粪厌氧棒杆菌、或权利要求2所述组合物的用途，其特征在于，用于制备药物或制剂，所述药物或制剂用于预防和/或治疗炎症相关疾病。

6．一种权利要求1所述粪厌氧棒杆菌、或权利要求2所述组合物的用途，其特征在于，用于制备药物或制剂，所述药物或制剂用于选自下组的一种或多种用途：

(i) 减缓哺乳动物体重的下降；

(ii) 降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)；

(iii) 改善哺乳动物肠道病变。

7．一种权利要求2所述组合物的制法，其特征在于，包括步骤：

将权利要求1所述的粪厌氧棒杆菌和/或其代谢产物与食品上可接受的载体或药学上可接受的载体混合，从而形成权利要求2所述的组合物。

8．一种生产方法，其特征在于，包括步骤：

(a)在适合培养的条件下，对权利要求1所述的粪厌氧棒杆菌进行培养，从而获得培养产物；

(b)任选地，从所述培养产物分离粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物；和/或

(c)任选地，将上一步骤获得的培养产物或粪厌氧棒杆菌菌体和/或其代谢产物与食品上可接受的载体或药学上可接受的载体混合，从而制得组合物。

9．一种改善哺乳动物肠道病变的方法，其特征在于，给所述对象施用权利要求2所述的组合物。

10．一种减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数(DAI)的方法，其特征在于，给所述对象施用权利要求2所述的组合物。

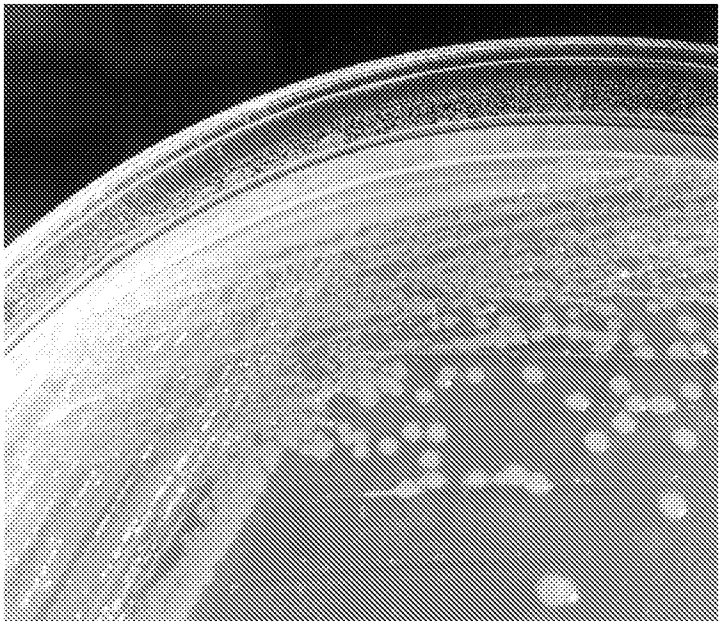


图 1

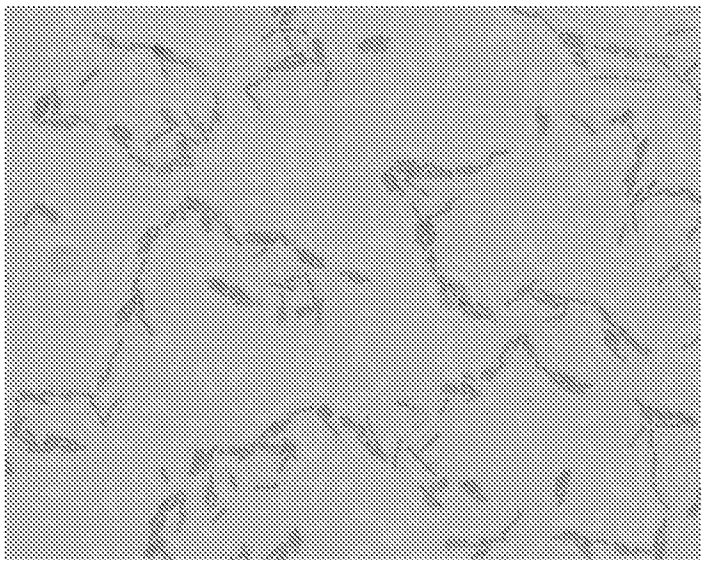


图 2

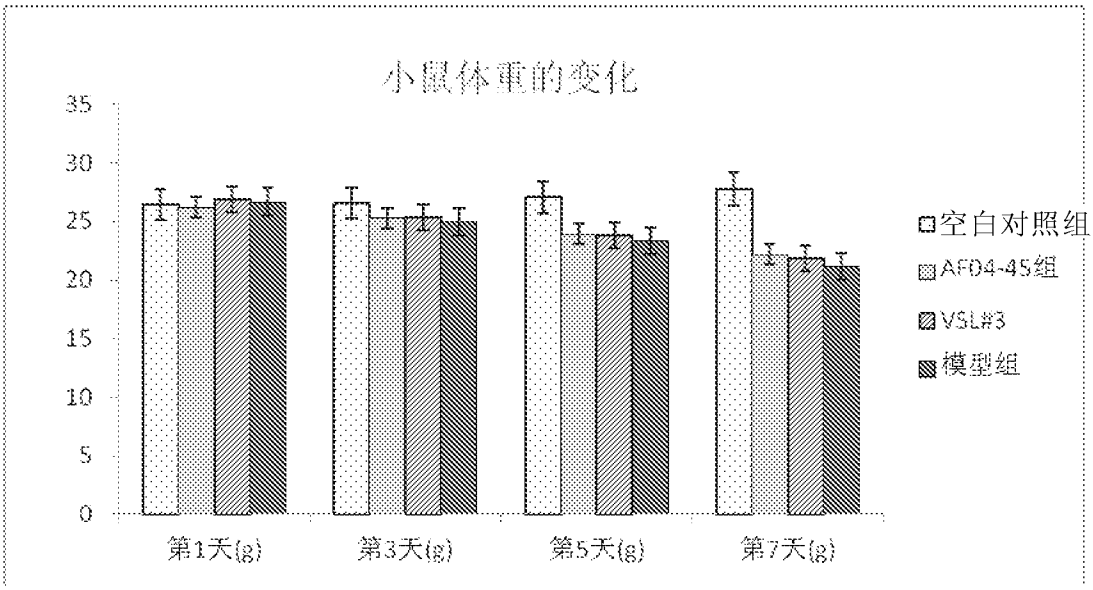

小鼠体重的变化
35
30
25
20
15
10
5
0
第1天(g)
第3天(g)
第5天(g)
第7天(g)
空白对照组
AF04-45组
VSL#3
模型组

图 3

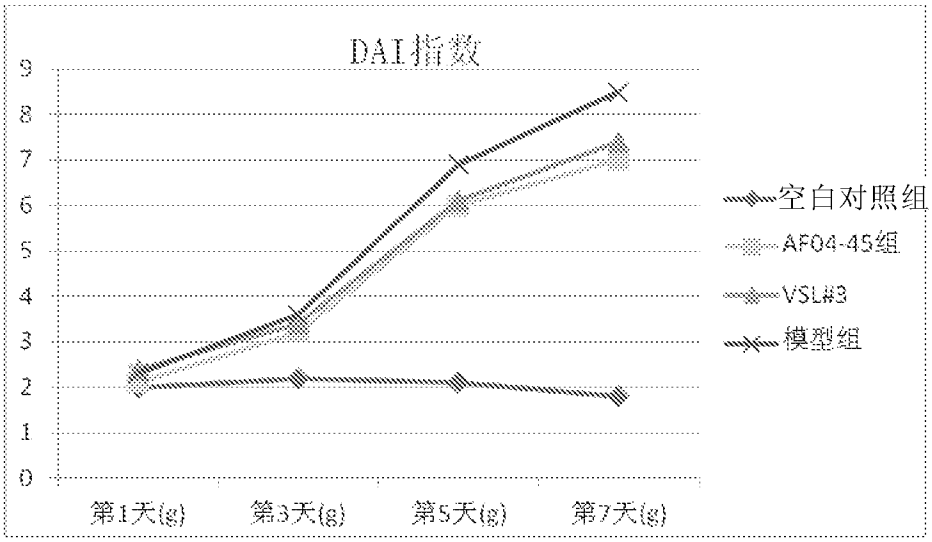

DAI指数
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
第1天(g)
第3天(g)
第5天(g)
第7天(g)
空白对照组
AF04-45组
VSL#3
模型组

图 4

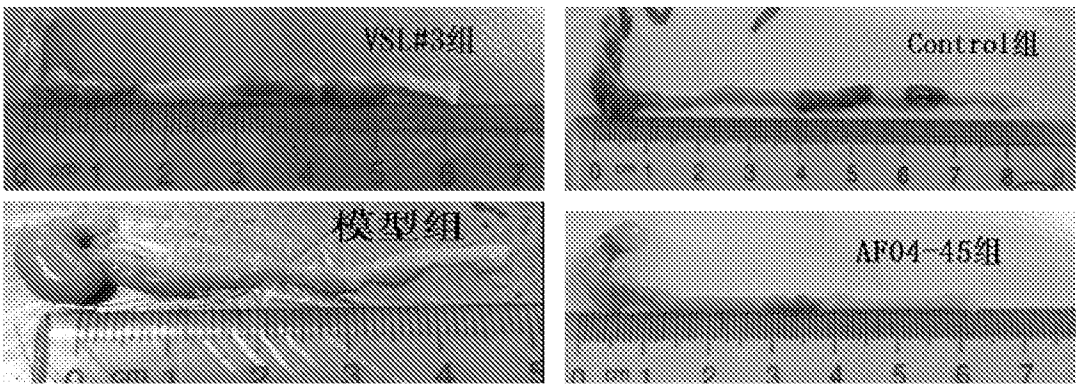

VSL#3组
Control组
模型组
AF04-45组

图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/109690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i; A61K 35/74 (2015.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

USTXT; EPTXT; CNTXT; CNABS; DWPI; WOTXT; CNKI; EBI; NCBI; GenBank; GOOGLE; ISI Web of knowledge; Springer link: 深圳华大基因, 粪厌氧棒杆菌, anaerostipes caccae, GDMCC 60088, 益生菌, 益生元, 炎症, 肠炎, IBD, UC, colitis, 丁酸, 乳酸, lactic acid, 高剂量

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104160014 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO et al.) 19 November 2014 (19.11.2014), claims 1, 4, 11, 12 and 18, and description, paragraphs [0006], [0054] and [0059]	1-10
X	WO 2004085628 A1 (ROWETT RESEARCH INSTITUTE) 07 October 2004 (07.10.2004), claims 6, 14 and 16-19	1-10
X	CN 102325464 A (UNIVERSIEIT GENT) 18 January 2012 (18.01.2012), description, paragraph [0007]	1-10
A	CN 103079582 A (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 01 May 2013 (01.05.2013), entire document	1-10
A	ATARASHI, Koji et al. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. SCIENCE. 21 January 2011 (21.01.2011), vol. 331, pp. 337-341	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
06 July 2017	01 August 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yanqing Telephone No. (86-10) 61648130

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/109690

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:9-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 9 relates to a method for improving intestinal lesions in a mammal, claim 10 relates to a method for reducing the loss of body weight in a mammal, and/or reducing the disease activity index of a mammal, according to the criteria set out in Rule 39.1(iv), they relate to subject matter for which an international search is not required. The search and review in the international search report is made on the basis of the subject matter for preparing the corresponding pharmaceutical composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/109690

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104160014 A	19 November 2014	EP 2785828 A4	29 July 2015
		US 9642881 B2	09 May 2017
		WO 2013080561 A9	08 August 2013
		US 2016193257 A1	07 July 2016
		US 2016193256 A1	07 July 2016
		EP 2785828 A1	08 October 2014
		WO 2013080561 A1	06 June 2013
		US 9649345 B2	16 May 2017
		CA 2892588 A1	06 June 2013
		HK 1204008 A1	06 November 2015
		JP 2015500792 A	08 January 2015
		US 2014341921 A1	20 November 2014
WO 2004085628 A1	07 October 2004	EP 1606394 A1	21 December 2005
		CA 2519204 A1	07 October 2004
		US 2007258953 A1	08 November 2007
		GB 0307026 D0	30 April 2003
		WO 2004085628 A8	02 December 2004
		AU 2004223657 A1	07 October 2004
CN 102325464 A	18 January 2012	CA 2750070 C	23 May 2017
		CA 2750070 A1	26 August 2010
		US 2012027734 A1	02 February 2012
		EP 2398338 B1	03 December 2014
		HK 1167577 A1	31 July 2015
		GB 0903016 D0	08 April 2009
		ES 2526872 T3	16 January 2015
		US 8697052 B2	15 April 2014
		DK 2398338 T3	05 January 2015
		EP 2398338 A1	28 December 2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/109690

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		WO 2010094789 A1	26 August 2010
CN 103079582 A	01 May 2013	US 2016143960 A1	26 May 2016
		JP 2016128408 A	14 July 2016
		EP 2575835 A2	10 April 2013
		US 9415079 B2	16 August 2016
		JP 5853063 B2	09 February 2016
		JP 6115971 B2	19 April 2017
		JP 2013528565 A	11 July 2013
		US 2016151430 A1	02 June 2016
		US 9642882 B2	09 May 2017
		US 2017112915 A1	27 April 2017
		JP 5592958 B2	17 September 2014
		US 2015320805 A9	12 November 2015
		CA 2837679 A1	08 December 2011
		US 2017007691 A1	12 January 2017
		US 2013149339 A1	13 June 2013
		US 9662381 B2	30 May 2017
		US 9433652 B2	06 September 2016
		US 2017087197 A1	30 March 2017
		ES 2610146 T3	26 April 2017
		EP 2575835 B1	19 October 2016
		DK 2575835 T3	30 January 2017
		WO 2011152566 A2	08 December 2011
		EP 3178483 A1	14 June 2017
		JP 2014237690 A	18 December 2014
		US 9421230 B2	23 August 2016
		WO 2011151941 A1	08 December 2011
		WO 2011152566 A3	02 February 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/109690

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US 2015143557 A1	21 May 2015

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2016/109690

A. 主题的分类

C12N 1/20(2006.01)i; A61K 35/74(2015.01)i; A61P 29/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

USTXT;EPTXT;CNTXT;CNABS;DWPI;WOTXT;CNKI;EBI;NCBI;GenBank;GOOGLE;ISI Web of knowledge;Springer link:深圳华大基因，粪厌氧棒杆菌，anaerostipes caccae，GDMCC 60088，益生菌，益生元，炎症，肠炎，IBD，UC，colitis，丁酸，乳酸，lactic acid，高剂量

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 104160014 A (国立大学法人东京大学等) 2014年 11月 19日 (2014-11-19) 权利要求1、4、11、12、18，说明书第0006、0054、0059段	1-10
X	WO 2004085628 A1 (ROWETT RESEARCH INSTITUTE) 2004年 10月 7日 (2004-10-07) 权利要求6、14、16-19	1-10
X	CN 102325464 A (根特大学) 2012年 1月 18日 (2012-01-18) 说明书第0007段	1-10
A	CN 103079582 A (国立大学法人东京大学) 2013年 5月 1日 (2013-05-01) 全文	1-10
A	ATARASHI, Koji等. "Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species" SCIENCE, 第331卷，2011年 1月 21日 (2011-01-21), 第337-341页	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 7月 6日	2017年 8月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	张艳青
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)010-61648130

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/109690

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 9-10
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求9涉及一种改善哺乳动物肠道病变的方法，权利要求10涉及一种减缓哺乳动物体重的下降、和/或降低哺乳动物的疾病活动指数的方法，均属于细则39.1（4）规定的不必进行检索的主题。本次检索报告基于其用于制备相应的药物组合物的主题进行了检索与评述。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/109690

检索报告引用的专利文件			公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
CN	104160014	A	2014年 11月 19日	EP	2785828	A4	2015年 7月 29日
				US	9642881	B2	2017年 5月 9日
				WO	2013080561	A9	2013年 8月 8日
				US	2016193257	A1	2016年 7月 7日
				US	2016193256	A1	2016年 7月 7日
				EP	2785828	A1	2014年 10月 8日
				WO	2013080561	A1	2013年 6月 6日
				US	9649345	B2	2017年 5月 16日
				CA	2892588	A1	2013年 6月 6日
				HK	1204008	A1	2015年 11月 6日
				JP	2015500792	A	2015年 1月 8日
				US	2014341921	A1	2014年 11月 20日
WO	2004085628	A1	2004年 10月 7日	EP	1606394	A1	2005年 12月 21日
				CA	2519204	A1	2004年 10月 7日
				US	2007258953	A1	2007年 11月 8日
				GB	0307026	D0	2003年 4月 30日
				WO	2004085628	A8	2004年 12月 2日
				AU	2004223657	A1	2004年 10月 7日
CN	102325464	A	2012年 1月 18日	CA	2750070	C	2017年 5月 23日
				CA	2750070	A1	2010年 8月 26日
				US	2012027734	A1	2012年 2月 2日
				EP	2398338	B1	2014年 12月 3日
				HK	1167577	A1	2015年 7月 31日
				GB	0903016	D0	2009年 4月 8日
				ES	2526872	T3	2015年 1月 16日
				US	8697052	B2	2014年 4月 15日
				DK	2398338	T3	2015年 1月 5日
				EP	2398338	A1	2011年 12月 28日
				WO	2010094789	A1	2010年 8月 26日
CN	103079582	A	2013年 5月 1日	US	2016143960	A1	2016年 5月 26日
				JP	2016128408	A	2016年 7月 14日
				EP	2575835	A2	2013年 4月 10日
				US	9415079	B2	2016年 8月 16日
				JP	5853063	B2	2016年 2月 9日
				JP	6115971	B2	2017年 4月 19日
				JP	2013528565	A	2013年 7月 11日
				US	2016151430	A1	2016年 6月 2日
				US	9642882	B2	2017年 5月 9日
				US	2017112915	A1	2017年 4月 27日
				JP	5592958	B2	2014年 9月 17日
				US	2015320805	A9	2015年 11月 12日
				CA	2837679	A1	2011年 12月 8日
				US	2017007691	A1	2017年 1月 12日
				US	2013149339	A1	2013年 6月 13日
				US	9662381	B2	2017年 5月 30日
				US	9433652	B2	2016年 9月 6日
				US	2017087197	A1	2017年 3月 30日
				ES	2610146	T3	2017年 4月 26日
				EP	2575835	B1	2016年 10月 19日
				DK	2575835	T3	2017年 1月 30日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/109690

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利			公布日（年/月/日）
		WO	2011152566	A2	2011年 12月 8日
		EP	3178483	A1	2017年 6月 14日
		JP	2014237690	A	2014年 12月 18日
		US	9421230	B2	2016年 8月 23日
		WO	2011151941	A1	2011年 12月 8日
		WO	2011152566	A3	2012年 2月 2日
		US	2015143557	A1	2015年 5月 21日