



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118575955 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202410761914.3

A23L 33/115 (2016.01)

(22) 申请日 2020.07.22

(30) 优先权数据

19187688.7 2019.07.23 EP

20175745.7 2020.05.20 EP

(62) 分案原申请数据

202080052648.7 2020.07.22

(71) 申请人 菲仕兰坎皮纳荷兰公司

地址 荷兰

(72) 发明人 R·J·J·范尼尔文

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int. Cl.

A23L 33/17 (2016.01)

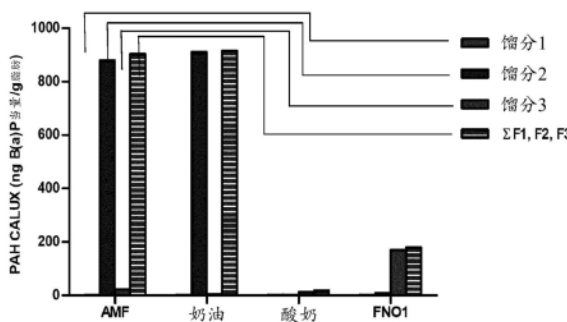
权利要求书2页 说明书22页 附图4页

(54) 发明名称

包含乳脂肪和免疫球蛋白的营养组合物

(57) 摘要

一种合成的营养组合物,其包含:反刍动物乳脂肪,其中该乳脂肪能够在芳香烃受体(AhR)活性测定中活化该AhR;和反刍动物免疫球蛋白。



1. 一种合成的营养组合物,其包含:
  - i. 反刍动物乳脂肪,其中该乳脂肪能够在芳香烃受体(AhR)活性测定中活化该AhR;和
  - ii. 反刍动物免疫球蛋白,该反刍动物免疫球蛋白的量在115 $\mu$ g与50mg/克干组合物之间;其特征不在于至少30%的反刍动物免疫球蛋白是非变性的;并且其中乳脂肪的量在10与60g脂肪/100克配方之间,其中反刍动物脂肪的量在如脂肪的总量确定的5wt%与90wt%之间。
2. 如权利要求1所述的营养组合物,其中该反刍动物乳脂肪是牛乳脂肪,并且该脂肪选自由全乳、奶油、和无水乳脂肪(AMF)组成的组;优选地其中该牛是母牛。
3. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该组合物处于干燥状态,包含至少70wt%的干物质,优选地至少80wt%的干物质,更优选地至少90wt%的干物质,最优选地至少92wt%的干物质。
4. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该免疫球蛋白选自由IgG、IgA、IgM、sIgA组成的组中的一种或多种,优选地其中该免疫球蛋白是IgG。
5. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该免疫球蛋白的生物活性在区分天然和变性免疫球蛋白的ELISA测定中确定。
6. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该乳脂肪在CaLux测定中活化该芳香烃受体。
7. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其进一步包含一种或多种选自由人乳寡糖(HMO)和不可消化的寡糖组成的组的寡糖;优选地其中HMO的量在0.01与5.0克/100克组合物之间,和/或其中不可消化的寡糖的量在0.1与25克/100克干组合物之间。
8. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其进一步包含益生菌。
9. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其进一步包含乳铁蛋白,优选地牛乳铁蛋白。
10. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其包含
  - i. 在10与60g/100克配方之间的脂肪,其中反刍动物脂肪的量在如脂肪的总量确定的5与90wt%之间;
  - ii. 在115 $\mu$ g-50mg/克组合物(干重)之间的反刍动物免疫球蛋白;
  - iii. 在 $10^6$ 与 $10^9$ cfu/克干产品之间的益生菌;
  - iv. 在0.1与25克/100克配方(干重)之间的不可消化的寡糖;
  - v. 在0.01与5.0克/100克干产品之间的HMO;
  - vi. 在0.1与20mg/克干产品之间的乳铁蛋白。
11. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该组合物是成分预混物,优选地生命早期营养预混物。
12. 如前述权利要求中任一项所述的营养组合物,其中该组合物选自由以下组成的组中的一种或多种:婴儿配方、后续配方和幼儿配方。
13. 如权利要求1至11中任一项所述的营养组合物,其中该组合物是早产儿配方或者成人或老年人配方。
14. 如权利要求1至13中任一项所述的营养组合物在早产儿配方、婴儿配方、后续配方

或幼儿配方中的用途。

15. 如权利要求1至13中任一项所述的营养组合物,其用于在治疗任何一种或多种选自以下组成的组的适应证中使用:肠屏障功能下降、坏死性小肠结肠炎(NEC)、肠易激综合征(IBS)、炎症性肠病(IBD)、非甾体抗炎药(NSAID)诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症;或用以治疗2型糖尿病。

## 包含乳脂肪和免疫球蛋白的营养组合物

[0001] 本申请是申请日为2020年7月22日的、发明名称为“包含乳脂肪和免疫球蛋白的营养组合物”的中国专利申请202080052648.7 (PCT/EP2020/070613)的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本文披露的发明涉及营养组合物领域。更特别地,本发明涉及一种包含反刍动物乳脂肪和反刍动物免疫球蛋白的营养组合物。

### 背景技术

[0003] 用于婴儿的营养组合物旨在尽可能类似于人乳,因为通常认为人乳是直到至少6个月龄的婴儿的理想营养源。尽管婴儿配方随着时间的推移已变得越来越好,但人乳与婴儿配方之间仍然存在重要的差异。

[0004] 乳脂肪和植物脂肪的组合已应用于生命早期营养产品中,因为这些是获得生命早期营养配方的正确脂肪酸组合物所必需的。但是,以植物脂肪为唯一脂肪源的生命早期营养产品更为常见。

[0005] 肠道含有身体最大的、在人与他(或她)的外部环境之间的界面。它预防食物和微生物组分渗漏到组织中,该渗漏可引起炎症和对食物的不良反应(食物过敏和不耐受)。当认为肠必须同时承担两种相反的功能时,其功能的复杂性是显而易见的;所需营养物质从肠腔选择性渗透到循环中和一般内部环境中,并且另一方面,要预防有害实体(包括微生物、管腔抗原、食物过敏原、和管腔促炎因子)的穿透。后一功能称为屏障功能。

[0006] 肠道屏障功能由四条主要防线构成:1)生物学屏障,其由负责定植抵抗的正常肠菌群(肠道微生物群)组成;2)免疫屏障,其由肠相关性淋巴样组织(GALT)、效应和调节性T细胞、产生IgA的B(血浆)细胞、第3组先天淋巴样细胞、以及固有层中的定居巨噬细胞和树突状细胞组成;3)机械屏障,其由粘液层和闭衬肠上皮细胞组成。上皮细胞通过名为“紧密连接”(TJ)的特定结构与外侧细胞膜最顶端部分(“吻合点”)尽可能最接近地接触,TJ使细胞相互连接并限制离子、分子和细胞通过细胞旁空间,以及4)除粘液和上皮层的物理屏障外,还存在化学屏障,其由消化分泌物、抗菌肽、以及衍生自上皮细胞和粘膜下的免疫细胞的其他细胞产物(细胞因子、炎症介质等)组成。

[0007] 老年人肠感染和主诉的数量增加。这通常与老年人屏障功能下降有关。但是,合并慢性疾病(例如2型糖尿病、或COPD)的情况下,老年人的肠屏障功能受损(Valentini等人,2014)。这可以部分地解释在老年人中见到的胃肠道不适和感染增加(Hall等人,2005;Man等人,2014)。

[0008] 事实上,对于像肠感染和腹泻、乳糜泻、炎症性肠病、肠易激综合征、(食物)过敏等肠障碍,以及对于像关节炎、肥胖症、以及1型和2型糖尿病等肠外障碍,已注意到肠屏障功能的下降(与衰老无关)(Bischoff 2011;2014;Turner 2009)。肠屏障功能与慢性病之间的联系至少部分地与微生物群组成和短链脂肪酸(SCFA)的产生减少有关。众所周知,SCFA增强上皮细胞的屏障功能(D' Souza等人2017;Bach Knudsen 2018)。SCFA是具有由1至6个碳

原子组成的短脂肪族尾 (aliphatic tail) 的脂肪酸。当膳食纤维、非淀粉多糖 (像GOS) 在结肠中发酵时产生SCFA。

[0009] 已知芳香烃受体 (AhR) 是二噁英的受体, 并已用于筛选食物中的这样的组分。该受体可在肠屏障功能和肠免疫监视中发挥作用 (Li2011)。AhR缺陷小鼠的屏障功能受损并且肠道细菌的易位增强 (Li2011)。AhR的配体典型地是微生物群衍生的色氨酸代谢物或在一些蔬菜 (像花椰菜和西兰花) 中发现的组分。也已经描述了一些AhR配体存在于母乳中。

[0010] 最近, 导致IL-22产生的AhR活化也与预防2型糖尿病有关 (Natividad 2018)。

[0011] 在糖尿病 (前期) 中, 已注意到产生几种短链脂肪酸 (SCFA) (主要是丁酸盐) 的肠细菌的减少。进一步地, 微生物群组成已与老年人中较高的血糖有关, 也与代谢综合征有关 (Wang等人, 2012; Zhang等人, 2013)。

[0012] 大多数可商购的反刍动物的乳为牛乳。牛乳含有许多具有免疫调节和抗菌特性的组分。自20世纪70年代以来, 已研究了牛免疫球蛋白 (bIg), 特别是牛IgG (bIgG) 对人体免疫和感染的潜在影响。

[0013] 牛乳、初乳和血清含有三种类型的免疫球蛋白: 免疫球蛋白G (IgG)、IgA和IgM。

[0014] 在牛乳中, IgG是主要存在的同种型, 尤其是在初乳中, 其次是IgA和IgM。IgA在乳和初乳中以分泌型IgA (sIgA) 存在。在成熟的乳中, IgG是主要的同种型, 而sIgA和IgM以低大约5-10倍的水平存在。成熟的乳中IgG的浓度为200-700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 左右。在初乳中, IgG的水平高得多, 在出生后前几天高达50-100 $\text{mg}/\text{ml}$ 。

[0015] 牛免疫球蛋白 (像IgG) 可与许多细菌和病毒 (包括人病原体) 结合, 从而预防细菌转移和肠上皮上细菌组分的渗漏、调节上皮紧密连接蛋白的表达、并抑制肠的炎症。

[0016] 在坏死性小肠结肠炎 (NEC)、肠易激综合征 (IBS)、炎症性肠病 (IBD)、非甾体抗炎药 (NSAID) 诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症的人和动物模型中, 已阐明了bIgG在与肠屏障功能下降相关的肠的炎症性反应中的潜在缓解作用、以及免疫球蛋白和初乳的作用。

[0017] 使用本领域已知的方法可从乳或初乳中分离或浓缩免疫球蛋白 (EP 2280999、W0 94/13148、W0 01/03515或来自Heino等人, Functional properties of native and cheese whey protein concentrate powders [天然和奶酪乳清蛋白浓缩粉的功能特性], International Journal of Dairy Technology [国际乳制品技术杂志], 第60卷, 第4期, 2007年11月, 第277-285页)。

[0018] 当生产婴儿配方或其他乳产品时, 出于安全原因, 立法要求加热配方, 从而导致制品中存在的免疫球蛋白变性, 因为免疫球蛋白对热敏感。它们在约70 $^{\circ}\text{C}$ 或更高的温度下开始变性。在酸性pH (<5.0) 下, 已知对变性的敏感性更高。

[0019] 为了用作人类食品中的活性、预防性成分, 必须摄入大量完整形式的牛免疫球蛋白, 并且这些牛免疫球蛋白必须能够在通过胃进入小肠、或甚至通过整个胃肠道 (GI) 时存活。

[0020] 令人惊讶的是, 据发现, 牛乳脂肪与植物脂肪的不同之处在于牛乳脂肪包含可以更有效地活化芳香烃受体 (AhR) 的其他配体。Ahr受体 (的活化) 与肠感染和腹泻、肠病、肠易激综合征、乳糜泻、以及食物过敏和非传染性疾病 (如2型糖尿病) 呈负相关。为了促进肠的屏障功能, 提供了包含反刍动物乳脂肪和免疫球蛋白的营养组合物, 优选地还含有一种或

多种人乳寡糖、益生元、或益生菌。这种组合物为肠的屏障功能提供了两倍或甚至三倍的支持：存在于乳脂肪中的AhR活化组分促进抗菌肽的产生并排泄到肠腔中，b) 提供功能完整的牛免疫球蛋白，像IgG，预防感染以及感染和/或细菌组分渗漏到粘膜导致的炎症和组织损伤的发生，以及任选地c) 通过施用不可消化的寡糖或益生元增加微生物群产生的短链脂肪酸。具有牛IgG的制剂优选地还含有可影响屏障功能的其他生物活性乳蛋白，例如乳铁蛋白或TGF- $\beta$ 。

[0021] 本发明的组合物对婴儿和幼儿特别有用，因为他们容易发生胃肠道感染。良好的肠屏障功能对于保护他们免受感染至关重要。本发明的组合物对于肠道受损的肠道健康削弱或其他肠道相关不适（像感染或炎症性障碍）的老年人也特别有用。额外地或可替代地，本发明的组合物可用于缓解2型糖尿病的影响。

### 发明内容

[0022] 因此，在第一方面，本发明涉及一种合成的营养组合物，其包含：

[0023] i. 反刍动物乳脂肪，其中该乳脂肪能够在芳香烃受体 (AhR) 活性测定中活化该 AhR；和

[0024] ii. 反刍动物免疫球蛋白；

[0025] 其特征在于至少30%的反刍动物免疫球蛋白是非变性的。

[0026] 本发明进一步涉及这种组合物在早产儿配方、婴儿配方、后续配方或幼儿配方、或可替代地在成人或老年人配制品中的用途。本发明还涉及这种组合物用以治疗任何一种或多种选自由以下组成的组的适应证的用途：肠屏障功能下降、坏死性小肠结肠炎 (NEC)、肠易激综合征 (IBS)、炎症性肠病 (IBD)、非甾体抗炎药 (NSAID) 诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症，或用以治疗2型糖尿病的用途。类似地，本发明涉及这种组合物，其用于在治疗任何一种或多种选自由以下组成的组的适应证中使用：肠屏障功能下降、坏死性小肠结肠炎 (NEC)、肠易激综合征 (IBS)、炎症性肠病 (IBD)、非甾体抗炎药 (NSAID) 诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症；或用以治疗2型糖尿病。

[0027] 定义

[0028] 关于给定疾病或障碍的术语“治疗”包括但不限于抑制疾病或障碍，例如阻止疾病或障碍发展；缓解疾病或障碍，例如引起疾病或障碍消退；或缓解由疾病或障碍引起或由其导致的病症，例如缓解、预防或治疗疾病或障碍的症状。

[0029] 关于给定疾病或障碍的术语“预防”意指预防出现疾病发展（如果尚未发病）、预防疾病或障碍在可能易患该疾病或障碍但尚未确诊患有该疾病或障碍的受试者中发生、和/或预防疾病/障碍进一步发展（如果已患病）。

[0030] 还应理解的是，本发明不限于本文描述的特定实施例和方法，因为具体的组分和/或条件当然可以变化。此外，本文所使用的术语仅出于描述本发明的特定实施例的目的而使用，并不旨在以任何方式进行限制。

[0031] 还必须注意，如说明书和所附权利要求中所使用的，单数形式“一个/种 (a/an)”和“该 (the)”包括复数个对象，除非上下文另外明确指出。例如，以单数形式提及的组分旨在包含多种组分。

[0032] 应当理解，在本披露内容中，除非另有说明，否则对重量和重量比率等的任何提及

均指的是干物质,特别是组合物的干物质。

[0033] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语一般具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的不同含义。

[0034] 如本文所使用的,术语“包含(comprising)”与“包括(including)”或“含有(containing)”同义,是开放式的,并且不排除额外的未叙述的一个或多个元素、一个或多个成分或一个或多个方法步骤;而术语“由……组成(consisting of)”是封闭式术语,不包括未明确叙述的任何额外的元素、步骤、或成分。

[0035] 如本文所使用的,术语“基本上由……组成(essentially consisting of)”是部分开放式术语,不排除额外的未叙述的一个或多个元素、一个或多个步骤、或一个或多个成分,只要这些额外的一个或多个元素、一个或多个步骤或一个或多个成分未对本发明的基础特性和新颖特性产生实质性影响。

[0036] 因此,如本文所使用的,术语“包含(comprising或comprise(s))”包括术语“由……组成”和术语“基本上由……组成”。因此,在本申请中,术语“包含(comprising或comprise(s))”意味着更具体地涵盖术语“由……组成”和术语“基本上由……组成”。

[0037] 在整个本申请中,在引用了出版物的情况下,这些出版物的披露内容通过援引以其整体特此并入本申请,以更充分地描述本发明所属的技术水平。

[0038] 如本文所使用的术语“受试者”是指人。除非明确指明一种性别,否则术语“受试者”是指男性和女性两者。人受试者可以是婴儿、少年、青少年、成人或老年人受试者。

[0039] 如本文所使用的,“向人施用组合物”包括喂养人(如儿童、小婴儿、或婴儿),它还包括人食用或饮用该组合物。优选的施用途径是口服施用。

[0040] 使用不同单位的常用缩写,例如,使用“mg”表示毫克,而“ $\mu\text{g}$ ”表示微克。

[0041] 如本文所使用的,术语“合成的营养组合物”或“合成组合物”是指人生产的营养组合物。“合成组合物”是人工制备的,并且优选地意指包含至少一种离体化学和/或生物学方式(例如通过化学反应、酶促反应)产生的化合物的组合物;或从产物的混合物中分离或浓缩的产物。浓度定义为相对于产物所在的总组合物的该产物的wt%增加(基于干物质)。合成组合物与天然存在的组合物不完全相同,即其不是由反刍动物产生的乳,如母牛乳、山羊乳或绵羊乳。此外,在一些实施例中,合成组合物可包含一种或多种营养上或药学上有活性的、不会对上述化合物的功效产生不利影响的组分。本发明的合成组合物的一些非限制性实施例也在下文进行了描述。

[0042] 蛋白的生物活性不仅取决于氨基酸的顺序(一级结构),而且还取决于其折叠的方式(3D结构)。如本文所使用的“非变性的”蛋白或“功能活性”蛋白意指蛋白不变性或不折叠(例如作为热处理的结果),并且其可以通过区分变性与完整免疫球蛋白的方法检测,如ELISA测定可区分巴氏杀菌UHT乳粉中的IgG(未检出)与原料乳中的IgG(检出)。如den Hartog等人(Den Hartog等人2014)所述,非变性的、功能完整的反刍动物免疫球蛋白可示出与致病菌或病毒结合。将这些免疫球蛋白与变性免疫球蛋白区分开来,该变性的免疫球蛋白不能与它们各自的抗原结合且不能具有功能活性(Ohnuki 2005)。如本文所使用的,免疫球蛋白被认为是“生物活性的”,同样可以称为完整的或功能完整的免疫球蛋白,换句话说,该免疫球蛋白是非变性的。

## 具体实施方式

[0043] 在第一方面,本发明提供一种合成的营养组合物,其包含:

[0044] i. 反刍动物乳脂肪,其中该乳脂肪能够在芳香烃受体 (AhR) 活性测定中活化该 AhR;和

[0045] ii. 反刍动物免疫球蛋白;

[0046] 其特征在于至少30%的反刍动物免疫球蛋白是非变性的。优选地,至少40%的反刍动物免疫球蛋白是非变性的,更优选地至少50% (例如60%)、特别优选地至少70%是非变性的,最优选地至少80%是非变性的。

[0047] 如在这方面使用的术语“反刍动物乳脂肪”是指来自反刍动物的乳的乳脂肪源,优选地牛乳脂肪。原则上乳脂肪源可以是任何可用的反刍动物乳脂肪源,如全乳、奶油、无水乳脂肪 (AMF) 或由干法分馏、临界CO<sub>2</sub>提取或本领域已知的其他分馏方法产生的乳脂肪馏分。然而,发现特别适合使用全乳和/或奶油作为乳脂肪源。优选地,该反刍动物乳脂肪是牛乳脂肪,并且该脂肪选自全乳、奶油、和无水乳脂肪 (AMF) 组成的组。更优选地,该牛是母牛。在一个实施例中,该乳脂肪是牛全乳或奶油。在一个实施例中,该反刍动物乳脂肪是牛全乳;在另一实施例中,该反刍动物乳脂肪是牛奶油;在仍另一实施例中,该反刍动物乳脂肪是牛AMF。用于从中获得反刍动物乳脂肪的反刍动物乳和反刍动物乳脂肪不应暴露于高温或酸性pH (pH<5.0),因为这将降低活化AhR受体的能力。在此上下文中,认为高于80°C的温度是高温,优选地温度不超过75°C,更优选地温度不超过74°C,特别优选地温度不超过72°C,最优选地温度不超过69°C。同样地,乳或乳脂肪暴露于高温的时间应尽可能短。因此,可应用常规技术以生产不同的乳脂肪源,像全乳,奶油,无水乳脂肪 (AMF),或由干法分馏、临界CO<sub>2</sub>提取或其他分馏方法产生的乳脂肪馏分。如果需要巴氏杀菌步骤 (例如为了满足法律要求),这是可能的,但应避免不必要的高温暴露,并且因此乳脂肪或乳脂肪源应尽可能保持在22°C以下的温度,优选地低于10°C,更优选地低于5°C。可替代地,反刍动物乳脂肪可以从新鲜乳中获得。

[0048] 应理解,如果在应用本发明的产品时有要求,用以处理乳脂肪或用以处理衍生乳脂肪的乳或本发明组合物的任何其他组分的温度和时间的组合应符合法定巴氏杀菌条件,例如,如在2004年4月29日欧洲议会和理事会关于食品卫生的法规 (EC) 第852/2004号中定义的。例如,法定巴氏杀菌条件包括以下处理,该处理涉及温度至少为60°C持续至少30分钟或涉及更高温度持续更短时间 (如至少72°C持续至少15秒) 或任何其他可产生等同作用的时间-温度条件的组合,该等同作用例如如通过在这种处理后立即进行的磷酸酶测试阴性所示出的。这样的测试和巴氏杀菌技术在本领域是为人熟知的。如果乳脂肪组分尚未与Ig组分组合,高于80°C的温度是可能的,持续有限的时间段 (秒),以满足监管要求。使用AhR测定法可以很容易地确定适当的条件,例如如实例1中披露的基于AhR的PAH CALUX®报告基因生物测定法。

[0049] 制备粉末 (例如全乳粉) 的工艺是本领域已知的,例如喷雾干燥或冷冻干燥,例如如Dairy Science and Technology 2<sup>nd</sup> Edition [乳业科技第2版] (P.Walstra, J.T.M.Wouters和T.J.Geurts,CRC Press Taylor&Francis [泰勒-弗朗西斯出版集团CRC出版社] 2006,第20章) 中描述的。这样的工艺是灵活的,并可在低于或高于80°C的温度下使用。

[0050] 本发明的组合物可以通过在液体或干燥状态下混合乳馏分和免疫球蛋白馏分来制备。如果以液体状态混合,则可使用本领域已知的方法进行干燥。反刍动物(例如牛)乳脂肪可应用于营养组合物中,其中该组合物中在5%与100%之间的总脂肪含量由牛乳脂肪制成,优选地该组合物中在10%与90%之间的脂肪由乳脂肪制成,更优选地该组合物中所有脂肪的20%至80%是牛乳脂肪,最优选地该营养组合物中所有脂肪的20%至60%是牛乳脂肪。在另一实施例中,本发明的组合物中的牛乳脂肪的量在该组合物中脂肪的总量的(即所有脂肪的)45%与55%之间。

[0051] 如这些实例中所示出,乳脂肪具有植物脂肪以外的其他配体以活化AhR。因此在一个实施例中,本发明的组合物优选地包含植物和反刍动物乳脂肪的混合物。与脂肪的总量相比,反刍动物乳脂肪的量低于90wt%,例如,低于80wt%,优选地低于65%,更优选地低于50wt%。与组合物中脂肪的总量相比,反刍动物乳脂肪的量为至少5wt%,例如,至少10wt%,优选地至少20wt%,更优选地至少30wt%,特别优选的是,与组合物中脂肪的总量相比,乳脂肪的量为至少40wt%。组合物中脂肪的量取决于目标群体。其可以是在5与50克/100克干组合物之间。优选地,其可以是在10与40克/100克干组合物之间,更优选地在15与35克之间。特别优选地,脂肪的总量在10与40克/100克干组合物之间,并且反刍动物脂肪的量在总脂肪的10wt%与90wt%之间。甚至更优选地,脂肪的总量在10与40克/100克干组合物之间,并且反刍动物脂肪的量在总脂肪的20wt%与80wt%之间。

[0052] 在本发明组合物的仍另一实施例中,免疫球蛋白的量在115 $\mu$ g与50mg/克干组合物之间;并且乳脂肪的量在10与60g脂肪/100克配方之间,其中反刍动物脂肪的量在如脂肪的总量确定的5wt%与90wt%之间。

[0053] 可使用本领域已知的方法测试免疫球蛋白的生物活性。在一个实施例中,该免疫球蛋白的生物活性在区分天然和变性免疫球蛋白的ELISA测定中确定。这样的方法可商购(参见例如<https://www.bethyl.com/>的子页product/E10-118/Bovine+IgG+ELISA+Quantitation+Set和<https://www.bethyl.com/>的子页product/E11-118/Bovine+IgG+ELISA+Kit),并且这样的方法先前已在WO 2008127105A1和WO 2011087364A1中进行了描述。典型地,反刍动物免疫球蛋白是热敏感的,并且热灭活导致ELISA检测丢失(例如Li等人2006,J Agric Food Chem[农业与食品化学杂志],54第739-746页;Godden等人,2006J.Dairy Sci[乳品科学杂志],89第3476-3483页;Ohnuki等人,2005,Animal Science Journal[动物科学杂志]76第283-290页)。

[0054] 在另一实施例中,免疫球蛋白的生物活性可以通过检测免疫球蛋白与人病原体或过敏原的结合来测试。例如,这已详细描述于Den Hartog等人2014、Ohnuki 2005和WO 2008127105A1。已知免疫球蛋白与人病原体或过敏原的结合在这些蛋白变性后(例如通过高温)减少或消失。

[0055] 免疫球蛋白(Ig)对热敏感。因此,为了使它们保持生物活性,包含Ig的乳馏分不暴露于高于80 $^{\circ}$ C的温度,优选地温度不超过75 $^{\circ}$ C,更优选地温度不超过74 $^{\circ}$ C,特别优选地温度不超过72 $^{\circ}$ C,最优选地温度不超过69 $^{\circ}$ C。同样地,乳或乳脂肪暴露于高温的时间应尽可能短。如上所指示,如果在本发明产品的应用中有要求,Ig馏分或衍生Ig的乳或本发明组合物的任何其他组分可符合法定巴氏杀菌条件。

[0056] 如本文所披露的本发明涉及反刍动物乳脂肪和反刍动物免疫球蛋白(也称为抗

体)。优选地所述反刍动物是母牛,优选地是牛(Bos)属的成员,更优选地该反刍动物是以下物种的反刍动物:大额牛(Gayal)、独龙牛(Bos frontalis)(家养白肢野牛)、野牦牛(Bos mutus)(牦牛)或家牛(Bos taurus)(家养牛)。在另一实施例中,该反刍动物是山羊或绵羊,优选地羊亚科(Caprinae)的成员,更优选地绵羊属(Ovis)或山羊属(Capra)的成员。在绵羊属中,优选的物种是绵羊(Ovis aries)(家养绵羊)。在山羊属中,优选的物种是家山羊(Capra aegagrus hircus)(家养山羊)。在另一实施例中,所述反刍动物是骆驼、驴、水牛、马或羊驼。最优选的反刍动物是母牛。

[0057] 在一个实施例中,本发明组合物中的免疫球蛋白选自由IgG、IgA、IgM、sIgA组成的组中的一种或多种,优选地其中该免疫球蛋白是IgG,更优选地IgG1,因为IgG1在牛乳中最丰富。在另一实施例中,该免疫球蛋白是IgA或sIgA。(s) IgA以高水平存在于人母乳中。

[0058] 在牛中,初乳是母牛在产小牛前和产小牛后不久(最长4天)首次产生的乳。初乳含有非常高水平的牛免疫球蛋白,高达50-100mg/ml(相对于正常的乳为1mg/ml左右)。IgG1是牛初乳中和乳中的主要免疫球蛋白同种型。初乳中的免疫球蛋白被小牛吸收到血液中以保护它们免受感染。初乳中的免疫球蛋白水平比正常的乳高约50-100倍。免疫球蛋白的另一个丰富源是血清,例如当屠宰反刍动物时采集的血清。

[0059] 如在本发明中使用的乳脂肪是在芳香烃受体(AhR)活性测定中活化AhR的乳脂肪。这样的报告子测定法在本领域中是已知的,例如如在实例1中和在Pieterse等人2013(Pieterse等人,2013,Environ Sci Technol[环境科学与技术].47(20)第11651-9页.doi:10.1021/es403810w)中描述的。例如,这样的测定法可以通过荷兰阿姆斯特丹的生物检测系统公司(BioDetection Systems BV)获取,可替代地,这样的人芳香烃受体(AhR)测定试剂盒可从美国宾夕法尼亚州的Indigo生物科学公司(Indigo Biosciences)获得(<https://indigobiosciences.com/at-indigo-kits-services/aryl-hydrocarbon-receptor/>)。在一个实施例中,使用Calux测定法确定芳香烃受体的活化,例如如实例1所述(见下文)。

[0060] 本发明的营养组合物优选地包含115 $\mu$ g-50mg反刍动物抗体(即免疫球蛋白)/克营养组合物。这些量表示为反刍动物抗体重量/总营养组合物重量(因此包括反刍动物抗体)。该营养组合物优选地包含200 $\mu$ g-20mg反刍动物抗体/克营养组合物,更优选地0.2-5mg反刍动物抗体/克营养组合物。这些范围是针对该组合物的干重。

[0061] 典型地,水样营养组合物具有较少量的反刍动物抗体/液体组合物的量。典型地,所谓的“液体配方”是通过将粉末溶于水而由干营养组合物制成的。典型地,比率为16.5克粉末在90ml水中,以获得100ml液体配方。

[0062] 因此,本发明的水样营养组合物包含0.16 $\mu$ g/ml-8.3mg/ml反刍动物抗体。这些量表示为反刍动物抗体重量/ml总营养组合物(因此包括反刍动物抗体)。水样营养组合物优选地包含在重构的营养组合物中的33 $\mu$ g/ml-3.3mg/ml反刍动物抗体,优选地33 $\mu$ g/ml-0.8mg/ml反刍动物抗体。在重构的组合物中的抗体的量是指根据随组合物提供的说明书,将组合物与液体(例如水)混合后,组合物中反刍动物抗体的总量。在确定抗体含量时,当相对于总组合物的重量,组合物含有至少75%的水(w/w)时,认为该组合物是水样的。这与凝胶剂的使用或组合物的粘度无关。

[0063] 根据本发明,干产品或干燥状态的产品包含至少70wt%的干物质,更优选地至少73wt%的干物质、或75wt%的干物质,更优选地至少77wt%的干物质、或80wt%的干物质,

更优选地至少82wt%的干物质或85wt%的干物质,更优选地至少87wt%的干物质、或90wt%的干物质,以及最优选地至少92wt%的干物质或95wt%的干物质或甚至超过98wt%的干物质。在一个实施例中,本发明的合成组合物是干产品。

[0064] 在仍另一实施例中,本发明营养组合物中的免疫球蛋白的量在115 $\mu$ g与50mg/克干组合物之间;并且乳脂肪的量在组合物中脂肪的总量的5与90wt%之间。

[0065] 组合物还可含有本领域已知的一种或多种益生元成分。合适的益生元的实例是具有短链或长链的果寡糖和/或半乳寡糖、菊粉、含有岩藻糖的寡糖、 $\beta$ 聚糖、胡萝卜粉、树胶、果胶、唾液酸寡糖、唾液乳糖、具有短链或长链的半乳糖、葡糖胺半乳糖和其他含有葡糖胺的寡糖和核苷酸。在优选的实施例中,本发明的组合物包含唾液乳糖和GOS。任选地,该组合物可进一步包含人乳寡糖和/或不可消化的寡糖,以诱导产生短链脂肪酸(SCFA)的微生物群。这些SCFA对促进屏障功能很重要,并且对预防肠黏膜中的(感染相关的)炎症也很重要。因此在另一实施例中,本发明的组合物进一步包含一种或多种选自由人乳寡糖(HMO)和不可消化的寡糖组成的组的寡糖。在一个实施例中,HMO的量在0.01与5.0克/100克组合物(干重)之间,优选地在0.1与4.0克/100克组合物之间。在另一实施例中,不可消化的寡糖的量在0.1与25克/100克干组合物之间,优选地在1与20克之间,更优选地在2与15克之间。在又另一实施例中,HMO的量在0.01与5.0克/100克组合物之间,并且不可消化的寡糖的量在0.1与25克/100克干组合物之间。

[0066] 人乳寡糖(HMO)是人乳的关键成分。它们是结构上和生物学上不同的一组复杂的难消化的碳水化合物。迄今为止,已鉴定出多于200种不同的寡糖,其大小从3至22个单糖单元不等。最常见的HMO是岩藻糖基化和非岩藻糖基化的中性寡糖。这些HMO的数量和结构在女性之间显著不同,并且取决于分泌腺和Lewis血型状况(L. Bode, J. Nutr. [营养学杂志] 136:2127-2130, 2006.)。已发现岩藻糖基化的HMO是最主要的组分(约77%),而唾液酸化的HMO占HMO总丰度的约16%。岩藻糖基化的HMO为中性分子,而唾液酸化的HMO为酸性。在一个实施例中,在本发明的组合物包含一种或多种HMO。

[0067] 人乳的HMO由各种单糖(即葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、N-乙酰葡糖胺)和唾液酸(N-乙酰神经氨酸)组成。岩藻糖是一种不寻常的分子,因为它具有L-构型,而体内的其他糖分子具有D-构型。HMO的结构是乳糖单元,其可以在非还原端处被一个或多个半乳糖和/或N-乙酰葡糖胺残基延长(核心结构)。HMO核心结构可以被一个或多个岩藻糖残基修饰(即岩藻糖基化的HMO)以及被一个或多个唾液酸单元修饰(即,唾液酸化的HMO)。HMO也可以被岩藻糖基化和唾液酸化。在一个实施例中,本发明的组合物中的HMO选自由以下组成的组中的一种或多种:核心HMO、唾液酸化的HMO和岩藻糖基化的HMO。在人乳中,最丰富的HMO是2'-岩藻糖基乳糖(一种中性三糖,由L-岩藻糖、D-半乳糖和D-葡萄糖单元组成,连接的Fuc( $\alpha$ 1-2)Gal( $\beta$ 1-4)Glc;CAS号41263-94-9),浓度为约2g/l(Adams等人;2018, Nutrafoods[营养食品]第169-173页)。优选的HMO为3'-唾液乳糖(3'SL);6'-唾液乳糖(6'SL);2'-岩藻糖基乳糖(2'FL);3-岩藻糖基乳糖(3-FL);乳糖-N-四糖(LNT)、乳糖-N-新四糖(LNnT)和二唾液乳糖-N-四糖(DSLNT);这些是优选的HMO。特别优选的营养组合物包括至少2'FL。在又另一实施例中,本发明的组合物包含至少0.05克6SL/100克组合物(干重)。在一个实施例中,本发明的组合物包含至少0.05克LNT/100克组合物(干重)。在仍另一实施例中,本发明的组合物包含至少0.05克LNnT/100克组合物(干重)。可以使用本领域技术人员已知的方法获得HMO。例

如,HMO可以从人乳中纯化。可使用本领域已知的方法进一步分离单个HMO,如使用毛细管电泳、HPLC(例如,具有脉冲安培检测的高效阴离子交换色谱;HPAEC-PAD)和薄层色谱法。参见,例如,美国专利申请号2009/0098240。可替代地,可以使用酶促方法合成HMO。生产HMO的另一方法是通过工程细菌中的生物合成。例如,WO 2012/112777披露了制备2'-FL的方法。可替代地,2'-FL可商购。

[0068] 在一个实施例中,本发明组合物中HMO的量在0.01与5.0克/100克之间、优选地在0.1-2克/100克组合物(干)之间,或在另一实施例中,当组合物为液体时,HMO的量在0.01与5.0克/100mL之间、优选地在0.1-2g/mL组合物之间。

[0069] 在其他实施例中,本发明的组合物包含一种或多种唾液酸寡糖,优选地该唾液酸寡糖选自以下组成的组中的一种或多种:二唾液乳糖-N-四糖、3'-唾液乳糖、6'-唾液乳糖、3'-唾液乳糖胺、6'-唾液乳糖胺、3'-唾液酸-3-岩藻糖基乳糖、唾液乳糖-N-四糖a、唾液乳糖-N-四糖b、唾液乳糖-N-四糖c、二唾液乳糖、3'-唾液酸化路易斯寡糖A、3'-唾液酸化路易斯寡糖X、二唾液乳糖-N-六糖I、二唾液乳糖-N-六糖II、sialyl Lea tetra、唾液乳糖-N-新四糖c、和二唾液乳糖-N-岩藻五糖II。唾液酸寡糖可以从乳、乳清或蛋中分离出来,或从此处衍生的组分产生。

[0070] 在根据本发明的方法的另一实施例中,该组合物包含基于组合物干重的0.25至20wt.%不可消化的寡糖,优选地其中这些不可消化的寡糖选自半乳寡糖(GOS)和果寡糖(FOS)中的一种或多种,更优选地,其中这些不可消化的寡糖是半乳寡糖。在其他实施例中,不可消化的寡糖的最小量是基于组合物干重的至少1wt%,如至少5wt%。在又另一实施例中,不可消化的寡糖的最大量是基于组合物干重的25wt%,优选地小于20wt%,更优选地小于15wt%。GOS中的主要成分是在还原端处具有末端葡萄糖的、包含一个或多个 $\beta$ -半乳糖单元的寡糖。这些半乳糖单元主要以 $\beta$ 1-4或 $\beta$ 1-6连接相连,尽管也可以发生 $\beta$ 1-2和 $\beta$ 1-3连接。在优选的实施例中,本发明的组合物包含半乳寡糖,并且该半乳寡糖包含2'半乳糖基乳糖(Gal $\beta$ 1-2Gal $\beta$ 1-4Glc)和3'半乳糖基乳糖(Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc)。在另一优选的实施例中,本发明的组合物包含半乳寡糖,并且该半乳寡糖包含3'半乳糖基乳糖(Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc)和6'半乳糖基乳糖(Gal $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-4Glc)。优选地,不可消化的寡糖的量在0.1与25克/100克干组合物之间。

[0071] 某些细菌菌株已引起了相当大的关注,因为发现如果摄入它们,它们对人类展现出有价值的特性。特别地,已发现乳杆菌属(Lactobacilli)和双歧杆菌属(Bifidobacteria)的特定菌株能够在肠粘膜定植、降低致病菌粘附到肠上皮的能力、具有免疫调节作用、并有助于维持健康。这样的细菌有时称为益生菌。

[0072] 尽管对负责这些有益活性的单个细菌物种知之甚少,但一般认为双歧杆菌属和乳杆菌属构成了有益肠道菌群的重要组分。双歧杆菌属和乳杆菌属在母乳喂养而非奶瓶喂养的儿童的肠中很丰富,并且是公认的有益共生细菌。它们的存在与较少的胃肠道和气道感染相关,并且迄今为止许多乳杆菌属和双歧杆菌属物种已被用作益生菌。这些细菌的生长是由母乳中存在的复杂的难消化的碳水化合物(人乳寡糖和益生元寡糖)促进的。益生元寡糖现在被公认为是婴儿配方的成分,用以促进双歧杆菌在婴儿肠中的生长。

[0073] 已开展了广泛的研究来鉴定新的益生菌菌株。例如,EP 0 199 535、EP 0 768 375、WO 97/00078、EP 0 577 903和WO 00/53200披露了乳杆菌属和双歧杆菌属的特定菌株

以及它们的有益作用。

[0074] 在一个实施例中,益生菌包含粪杆菌属(*faecalibacterium*)的细菌,优选地其包含普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzi*)。

[0075] 已有人提出向婴儿配方添加益生菌,以促进发生肠道定植,并促进“好”细菌(双歧杆菌属和乳杆菌属的物种)而不是有害细菌(病原体,如梭状芽孢杆菌属(*Clostridia*)等)的定植。因此,在又另一实施例中,本发明的组合物包含益生菌,即一种或多种益生菌。优选地,该益生菌是乳杆菌属菌株、双歧杆菌属菌株、链球菌属(*Streptococcus*)菌株、乳球菌属(*Lactococcus*)菌株、明串珠菌属(*Leuconostoc*)菌株、肠杆菌属(*Enterobacteriaceae*)菌株或肠球菌属(*Enterococcus*)菌株。更优选地,该益生菌是乳杆菌属菌株或双歧杆菌属菌株。

[0076] 在一个实施例中,该乳杆菌属菌株是鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)或副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)物种。在另一实施例中,该双歧杆菌属菌株是乳酸双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)或动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)物种。

[0077] 在又另一实施例中,优选的益生菌选自自由以下组成的组中的一种或多种:乳酸双歧杆菌(由科汉森(*Christian Hansen*)公司首次销售)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) (例如如由丹麦的科汉森公司以TH4的名称提供的)、副干酪乳杆菌鼠李糖GG(ATCC 53103) (例如如由芬兰的瓦利奥公司(*Valio Oy*)提供的)、和长双歧杆菌BB536(例如如由日本的森永乳业株式会社(*Morinaga Milk Industry Co.Ltd*)提供的)。

[0078] 在仍另一实施例中,本发明的组合物包含至少两种不同的益生菌。

[0079] 本发明组合物中的益生菌优选地以 $10^6$ 至 $10^9$ cfu/克干产品的量存在,优选地 $10^6$ 至 $10^8$ cfu/g干产品,以及甚至更优选地 $10^7$ 至 $5 \times 10^7$ cfu/克干产品。

[0080] 益生元相对于益生菌具有多项优势;主要的事实是,它们不是活的,这意味着它们可以被加工成范围比脆弱的益生菌更广泛的食物。此外,益生元在消费者摄入后并不存在益生菌存活的问题。由于益生元刺激肠道中已经存在的细菌的生长,可以将它们视为比需要施用外源性细菌的益生菌更“天然的”添加剂或成分。

[0081] 本发明的营养组合物还可以进一步包含乳铁蛋白,优选地牛乳铁蛋白。乳铁蛋白是一种在人乳中发现的具有抗菌活性的铁转运蛋白。如本文所使用的术语“乳铁蛋白”包括变性的乳铁蛋白和大的、具有生物活性的乳铁蛋白的片段(例如,乳铁蛋白片段)和未变性的或天然的乳铁蛋白。乳铁蛋白是属于铁转运蛋白或转铁蛋白家族的糖蛋白。在牛和其他哺乳动物的乳中发现,乳铁蛋白是乳清蛋白的次要蛋白组分。乳铁蛋白含有703个氨基酸,分子量为80千道尔顿,并且也在人乳中被发现。本发明组合物中的乳铁蛋白浓度优选地为至少约10mg/L,优选地至少约50mg/L。在一个实施例中,本发明组合物中的牛乳铁蛋白的量是从10mg/L至2000mg/L,优选地从50mg/L至2000mg/L,更优选地从100至1500mg/L。相比之下,人乳通常含有从约1390至约1940mg/L的乳铁蛋白。如与乳铁蛋白组合使用的以mg/L表示的量是指乳铁蛋白的量/升即用型产品。

[0082] 用于本文的乳铁蛋白的适当来源包括哺乳动物乳的分离物、浓缩物、或提取物或乳产品,包括人和牛乳。牛乳用于本文的优选的乳铁蛋白源,包括如本文所述的富集乳清蛋白浓缩物。适用于本文的乳铁蛋白的单个来源包括乳铁蛋白FD(80%乳铁蛋白),可从荷兰

的皇家菲仕兰公司(FrieslandCampina Ingredients)获得。

[0083] 本发明的营养组合物也称为本发明的组合物,特别适用于0至36个月龄的人受试者,特别是婴儿(根据进一步称为CODEX的食品法典委员会(CODEX Alimentarius, CODEX STAN 72-1981)确定的0-12个月龄的人)和36个月龄以下的幼儿。婴儿的营养组合物通常被称为婴儿配方。当作为婴儿配方使用时,如在本发明的各个实施例中所使用的组合物应含有处于CODEX所规定的量的各成分(如果需要,如按照个别国家的额外的法规所规定的)。可替代地,婴儿和幼儿配方的要求已在2015年9月25日的授权法规(EU)2016/127(补充法规(EU)第609/2013号)和委员会指令2006/141/EC中进行了描述。例如,可以在www.frieslandcampinaingredients.com/在app/uploads/2019/04/PDS\_ELN\_Essential®-Start-IF-110.pdf上找到符合EU、中国和Codex要求的婴儿配方的成分清单的实例。

[0084] 因此,在优选的实施例中,根据本发明的用于婴儿的营养组合物包含反刍动物乳脂肪和免疫球蛋白(如本文其他地方所定义)并进一步包含蛋白、碳水化合物、维生素、矿物质和微量元素以及其他符合CODEX以及必要时额外的国家法规规定的规格的物质。

[0085] 本发明的组合物适用于人受试者,例如幼儿(12-36个月龄的人,也被称为幼童(toddler)),并且该组合物是“用于幼儿的后续配方”(FUF-YC)——这种配方也可以称为“成长乳”、“成长配方”或“幼童乳”,或可替代地可以称为“幼儿配方”。这种配方包含如上所述的脂质、蛋白和可消化的碳水化合物,并且可以进一步包含维生素、矿物质和微量元素以及其他符合后续配方的CODEX标准(CODEX STANDARD FOR FOLLOW-UP FORMULA, CODEX STAN 156-1987)以及必要时额外的国家法规规定的规格的物质。因此,如在本发明的各个方面中使用的组合物选自由以下组成的组中的一种或多种:婴儿配方、后续配方和幼儿配方,优选地,该组合物是婴儿配方或后续配方,更优选地是婴儿配方。

[0086] 早产儿具有未成熟肠道和/或肠道屏障闭合渗漏相关的更多问题。因此,提供Ahr受体和免疫球蛋白的活化的本发明组合物可与早产儿特别相关,因为该组合物支持良好的肠道屏障功能,优选地当该组合物进一步包含一种或多种HMO时。因此,在又一实施例中,本发明的营养组合物是早产儿配方,即为早产小婴儿设计的配方,即妊娠不超过37周后出生的小婴儿。

[0087] 本发明的组合物可以是任何在本领域中适当的形式,例如,在一个实施例中,其为即用型液体,或者在另一实施例中,其为粉末形式,更优选地自由漂浮的粉末。

[0088] 本发明的组合物可以是预混物,例如可以用作像婴儿配方、后续配方、幼儿配方、或早产儿配方等配方的基础的预混物。在又一实施例中,本发明的营养组合物是成分预混物,优选地生命早期营养预混物。

[0089] 在又一实施例中,本发明的组合物包含

[0090] i. 在10与60g/100克配方之间的脂肪,其中反刍动物脂肪的量在如对脂肪的总量确定的5与90wt%之间;

[0091] ii. 在115 $\mu$ g-50mg/克组合物(干重)之间的反刍动物免疫球蛋白;

[0092] iii. 在 $10^6$ 与 $10^9$ cfu/克干产品之间的益生菌;

[0093] iv. 在0.1与25克/100克配方(干重)之间的不可消化的寡糖;

[0094] v. 在0.01与5.0克/100克干产品之间的HMO;

[0095] vi. 在0.1与20mg/克干产品之间的乳铁蛋白。

[0096] 例如,该组合物中的其他成分可以选自乳糖、碳水化合物、维生素、矿物质等。在另一实施例中,该组合物不含益生菌,换句话说,该组合物包含项目i.、ii.、iv.、v.和vi.。

[0097] 在另一方面,本发明涉及本发明的营养组合物在早产儿配方、婴儿配方、后续配方或幼儿配方中的用途。

[0098] 在又另一方面,本发明涉及本发明的营养组合物用以治疗任何一种或多种选自由以下组成的组的适应证的用途:肠屏障功能下降、坏死性小肠结肠炎(NEC)、肠易激综合征(IBS)、炎症性肠病(IBD)、非甾体抗炎药(NSAID)诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症。

[0099] 在又另一方面,本发明涉及本发明的营养组合物用以治疗患有2型糖尿病(T2D)的受试者的用途。

[0100] 疾病或适应症的治疗包括施用本发明的组合物以预防人患上所述疾病或适应症和/或减少疾病的症状。

[0101] 本发明的组合物也可用于成人或老年人配制品,即针对成年人、老年人或成人的食品。特别地,治疗或预防2型糖尿病、IBS或IBD。针对成人或老年人的配制品可以是可与其他食物(例如与乳产品或酸奶)组合的预混物的形式。可替代地,它可以是即食型产品,像丸粒、胶囊、条棒,例如谷物棒或巧克力棒;糖果。可替代地,在另一实施例中,该食品是液体。

[0102] 可以使用本发明的产品以支持人的肠屏障功能,例如用于预防或治疗腹泻或肠感染。所述用途可涉及生命早期营养配方以支持早产儿、婴儿和非常年幼的幼儿(0-3岁)的胃肠道的屏障功能,但也可涉及针对>3岁的人的营养配方用于预防和治疗肠屏障功能相关障碍如炎症性肠病、肠易激综合征、以及肠屏障功能相关慢性病如2型糖尿病的用途。

[0103] 本发明的营养组合物还可以非治疗性方式使用,用于减少与选自由以下组成的组相关的症状:肠屏障功能下降、坏死性小肠结肠炎(NEC)、肠易激综合征(IBS)、炎症性肠病(IBD)、非甾体抗炎药(NSAID)诱导的肠道损伤、和围手术期内毒素血症。在另一实施例中,本发明的营养组合物可以非治疗性方式使用,用于减少与2型糖尿病相关的症状。

## 附图说明

[0104] 在图1A-1C中示出了在去活化二氧化硅柱上分馏后加标标准品(A.PCB126标准品,B.PAH混合物标准品,C.I3C标准品)的PAH CALUX分析。

[0105] 在图2中显示了在3种牛乳产品和1种植物脂肪中确定的分馏的PAH CALUX活性(A.PCB126标准品,B.PAH混合物标准品,C.I3C标准品)。

[0106] 总PAH CALUX活性(馏分1、2和3中PAH活性的总和)在图3中示出。馏分1示出在左侧,馏分2是左起第二个,馏分3是右起第二个,并且产品中所有活性的总和示出在右侧。

[0107] AMF和奶油中的AhR-配体结合和后续PAH CALUX活性主要是由代谢不稳定的“正常的”AhR-配体的结合导致,而FN01中观察到的AhR-配体结合和后续PAH CALUX活性主要是由代谢不稳定的“天然的”AhR-配体(如吡啉衍生物和色氨酸代谢物)的存在导致。在酸奶中,仅观察到少量PAH CALUX活性。

[0108] 实例

[0109] 乳奶油和无水乳脂肪(AMF)由荷兰皇家菲仕兰公司生产。

[0110] 该乳奶油具有41.7wt%的脂肪%。乳奶油和AMF使用本领域已知的方法生产。

[0111] 酸奶获自超市(坎皮纳农场全酸奶(Campina Boerenland volle yoghurt),皇家

菲仕兰公司,荷兰)。

[0112] FN01是植物脂肪的混合物,获自荷兰沃莫维尔(Wormerveer)的洛德斯公司(Loders Croklaan)。

[0113] 免疫球蛋白作为乳清蛋白浓缩物(WPC)、乳血清蛋白浓缩物和/或最低限度热处理的牛乳(荷兰皇家菲仕兰公司)施用,该牛乳含有存在的所有免疫球蛋白同种型的混合物。

[0114] 实例1:乳脂肪活化AhR的证明

[0115] 使用基于AhR的PAH CALUX®报告基因生物测定法(荷兰阿姆斯特丹的生物检测系统公司(“BDS”))研究了乳脂肪、奶油、酸奶和FN01(植物脂肪共混物)中AhR-配体的存在情况。

[0116] PAH CALUX®生物测定法是一种芳香烃受体(AhR)反式活化生物测定法,其包含遗传修饰的H4IIE大鼠肝癌细胞系,该细胞系并入与二噁英反应元件(DRE)偶联的萤火虫荧光素酶基因作为检测能够结合Ah受体的化合物的存在的报告基因。PAH CALUX®生物测定法检测代谢稳定的AhR-配体(毒性AhR配体,如二噁英、呋喃和二噁英样PCB)、代谢不稳定的AhR-配体(多芳烃(PAH)和可代谢的天然的Ah-受体配体,如吡啉衍生物、色氨酸代谢物和槲皮素)。

[0117] 使用各种净化和分离技术区分不可代谢的毒性的Ah受体配体(二噁英(多氯二苯并二噁英或PCDD)、呋喃(多氯二苯并呋喃或PCDF)和二噁英样多氯联苯(d1-PCB))、可代谢的外源性Ah受体配体(多芳烃(PAH))和可代谢的天然的Ah受体配体(例如吡啉衍生物、色氨酸代谢物、槲皮素)。

[0118] 暴露于目的化合物的PAH CALUX®细胞不仅表达在正常环境下与Ah受体活化的DRE调节基因相关的蛋白,而且还表达荧光素酶。通过添加荧光素酶的适当底物,发出光。以相关参考化合物(用于PAH CALUX®生物测定的B[a]P)为基准,产生的光的量与配体特异性受体结合的量成正比。

[0119] 为了从牛乳产品(乳、酸奶、奶油)和植物脂肪(FN01)中获得AhR-配体,用己烷/DEE(97/3v/v)提取样品。提取后,使用8%去活化氧化铝柱(210ml戊烷洗脱)去除可提取的脂肪,然后在1.5%去活化二氧化硅柱上分离代谢稳定的AhR-配体(PCDD/F,d1PCB)、代谢不稳定的AhR-配体(PAH)和天然的代谢不稳定的AhR-配体(例如吡啉衍生物)。洗脱(1:15ml己烷;2:10ml己烷/DEE(85/15v/v);3:25ml DEE)后,收集3个馏分(馏分1:PCDD/F、PCB、非极性杀有害生物剂;馏分2:PAH、极性杀有害生物剂;馏分3:吡啉等)。使用含有PCB-126、PAH标准品、吡啉-3-甲醇(I3C)、3-吡啉-乙酸(3IAA)和色胺(TTAM)的加标样品,评价了组合的去活化氧化铝/去活化二氧化硅柱净化的提取和分离效率。将收集的馏分蒸发,并重新溶解在DMSO中。

[0120] 制备在DMSO中的净化/分离提取物的系列稀释液,并在PAH CALUX®生物测定中分析Ah受体信号传导。简言之,将PAH CALUX®细胞接种在96孔板中。24小时后,将细胞暴露(于最终DMSO提取物的系列稀释液,一式三份)4小时,然后裂解以测量荧光素酶活性。在每块96孔板上,还分析了各相应生物测定的完整校准曲线。在校准曲线中内插分析结果,用于确定Ah受体活性。最终Ah受体活性表示为pg B(a)P当量/克加工的脂肪。

[0121] 为了测试去活化二氧化硅分馏的效率,在去活化二氧化硅柱上分离加标标准品(PCB-126、PAH混合物、I3C/3IAA/TTAM混合物)。收集三个馏分并测试PAH CALUX活性。在图1

中,给出了加标标准品(PCB-126、PAH混合物、吡啶-3-甲醇(I3C))在1.5%去活化二氧化硅柱上分馏后的PAH CALUX分析结果。结果表明,应用的去活化二氧化硅柱将参考“天然的”AhR-配体I3C与代谢稳定的“毒性”AhR配体(PCB-126)和代谢不稳定的“正常的”AhR配体(PAH混合物)分离。代谢不稳定的“天然的”AhR-配体洗脱在馏分3中,而代谢不稳定的“正常的”AhR配体收集在馏分2中。发现代谢稳定的“毒性”AhR-配体PCB-126已洗脱在馏分1和2两者中,表明分馏不完全。

[0122] 表1脂肪源

产品代码	产品	加工的脂肪(g)
AMF	无水乳脂肪(牛)	0.2001
[0123] 奶油	奶油(牛)	0.2059
酸奶	酸奶(牛)	0.1384
FN01	植物脂肪	0.203

[0124] 在表1中,给出了获得并进一步处理以确定3种接受的乳产品和植物脂肪FN01中AhR-配体的PAH CALUX活性的可提取脂肪的量。为了确定代谢稳定的、“毒性的”、代谢不稳定的、PAH样的”和“代谢不稳定的、天然的”Ah-受体配体,使用去活化氧化铝柱去除脂肪,然后使用去活化二氧化硅分馏净化提取物。将针对4个分馏样品各获得的3个最终馏分溶解在DMSO中。使用在DMSO中的最终净化馏分的系列稀释液暴露PAH CALUX细胞4小时。在表2中,总结了分馏的乳产品和植物脂肪的PAH CALUX分析结果。在图2中,给出了测试的各个样品的分馏的PAH CALUX分析结果的图示。所有样品在馏分1中均未示出PAH CALUX活性,表明不存在“毒性”AhR-配体,如PCDD/F和d1PCB。相比之下,AMF和奶油分馏提取物的馏分2(“正常的”可代谢的AhR-配体,如PAH)示出了高PAH CALUX活性,而酸奶和FN01提取物仅在馏分3中示出了较低水平的PAH活性PAH CALUX活性,表明在所有样品中均观察到“天然的”可代谢的AhR-配体的存在,如吡啶衍生物和色氨酸代谢物。然而,如与其他三种分馏的样品提取物中观察到的活性相比,FN01提取物的馏分中的活性显著较高。

[0125] 表2提取、净化和分馏后接受分析的各个乳产品的PAH CALUX分析结果。

[0126]

产品代码	加工的产品 (g vet)	馏分	PAH CALUX 活性 (ng B(a)P当量/g脂肪)
AMF	0.2001	F1 - PCBs	<LOQ
		F2 - PAHs	880
		F3 - 吡啶类/天然物	22
奶油	0.2059	F1 - PCBs	<LOQ
		F2 - PAHs	910
		F3 - 吡啶类/天然物	5.4
酸奶	0.1384	F1 - PCBs	<LOQ
		F2 - PAHs	1.7
		F3 - 吡啶类/天然物	14
FN01	0.2030	F1 - PCBs	<LOQ
		F2 - PAHs	8.7
		F3 - 吡啶类/天然物	170

[0127] 在本实例中示出了,从牛乳产品和植物脂肪中提取AhR-配体,随后后续分离样品提取物中存在的代谢稳定的“毒性”、代谢不稳定的PAH和代谢不稳定的“天然的”AhR-配体,清楚地表明与FN01和酸奶相比,AMF、奶油中存在水平高得多的和不同类型的AhR-配体,如使用PAH CALUX®报告基因生物测定法确定的。在AMF和奶油中,PAH CALUX活性主要由代谢不稳定的“正常的”AhR-配体(如PAH)的存在导致。相比之下,FN01中的PAH CAUX活性主要由代谢不稳定的“天然的”AhR-配体(如吡啶衍生物和色氨酸代谢物)的存在引起。

[0128] 实例2

[0129] A) 人体研究: NSAID激发后通过营养组合物预防屏障功能障碍

[0130] B) 或使用ETEC作为模型,使用组合物,用相关标记测量屏障功能

[0131] 基础粉末测试产品的制备

[0132] 将新鲜全乳和脱脂乳按蛋白/脂肪比率标准化,并提供活性Ig。向其中添加预混矿物质、预混维生素和乳糖。将产品在75°C下热处理30s,在60°C下在MVR中蒸发,匀浆(120/30巴)并喷雾干燥。

[0133] 基础粉末参考产品的制备

[0134] 将预混矿物质、预混维生素+乳糖与脱脂乳混合。将产品加热至80°C,在该温度下保持2分钟,然后在DSI中在100°C下加热5s,随后在68°C下在MVR中蒸发。蒸发后注入植物脂肪共混物,随后匀浆(120/30巴)并喷雾干燥。

	基础粉末的组成 (g/100 g)	测试	参考
	蛋白[Nx6.25]	19,5	18,8
	脂肪	16,6	21,6
	脂肪中乳脂肪的量	16,4	0,3
[0135]	乳糖	55,4	51,2
	矿物质	4,3	4,2
	其他	2,2	2,2
	共混配方 (g/100 g)	测试	参考
	基础粉末测试产品	77,1	
	基础粉末参考产品		83,0
	半乳寡糖粉末 (GOS)	4,4	4,4
	葡萄糖浆	5,5	9,7
	脂肪共混粉末	10,0	0
[0136]	2'岩藻糖基乳糖	0,5	0,5
	乳铁蛋白	0,52	0,52
	核苷酸, 微量元素	1.16	1.16
	油/矿物质/维生素	0.81	0.76
[0137]	用90ml水重构15g粉末后, 该组合物包含:		
		测试	参考
	总 IG [mg/100 g]	28	29
[0138]	活性 IG [mg/100 g]	21	0
	乳脂肪[g/100 g]	12,6	0,2
	乳脂肪/总脂肪	70%	1%

[0139] 实例2A预防NSAID导致的肠屏障功能障碍

[0140] 为了评估本发明的营养组合物对肠屏障功能的影响, 在成年志愿者中进行了交叉研究。给予志愿者(七名健康成人) 该营养组合物持续1周的时间段, 然后摄入吲哚美辛持续5天, 基本上如在(Playford等人1999Gut[肠道]第44卷第653-8页)中所述。

[0141] 通过如下评估尿液中乳果糖/鼠李糖比率来评估肠屏障渗透性。禁食过夜后, 受试者排空其膀胱, 然后饮用含有在总共450ml水中的5g乳果糖、2g甘露醇和1g鼠李糖的标准化糖溶液(计算的渗透压为69osmol/kg水)。允许受试者在测试的第一个小时后无限摄入液

体,以确保有足够的尿排出量。收集尿液并在接下来的5h内合并,并记录总体积。使用乳果糖/鼠李糖比率作为肠损伤的指标。

[0142] 在初始基线渗透性评估和基线粪便样品采集后,志愿者以随机顺序接受营养组合物(例如,将18,75克粉末溶解于125ml,每日两次)或对照组合物,持续7天。在每个研究组的最后5天,他们还服用吡哌美辛50mg, tds。测试时间段结束时,重新评估肠渗透性,并采集另一粪便样品。研究的两个阶段之间留有2周的“洗脱”期。在这之后,志愿者接受相同的程序,但服用另一组合物,因此所有个体均接受本发明的营养组合物和对照组合物两者。

[0143] 使用粪便样品测量肠屏障功能标记,如在从粪便样品获得的粪便水中测量的。

[0144] 通过向0.4克粪便中添加3.6ml PBS和40 $\mu$ l蛋白酶抑制剂(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),兹韦恩德雷赫特市(Zwijndrecht),荷兰,P8340),涡旋至少30秒,并在4 $^{\circ}$ C下以3000x g离心10分钟,制备粪便水提取物。将粪便提取物储存在-80 $^{\circ}$ C下直至测量。

[0145] 为了评估肠屏障功能,根据生产商的说明(钙卫蛋白和 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶:安迪生物公司(R&D systems),连蛋白(zonulin):美艾利尔公司(Alere)),通过ELISA测量粪便水提取物中的粪便钙卫蛋白(人S100A8/S100A9)、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶(人SERPIN-A1)和连蛋白。

[0146] 在对照组中,吡哌美辛摄入5天预期引起乳果糖/鼠李糖比率的升高。共同施用本发明的营养组合物将导致较少的增加或无增加。

[0147] 实例2B:在ETEC激发模型中的效果

[0148] 本发明的营养组合物的效果也可以在成人志愿者的实验性ETEC感染模型中进行研究,如在例如ten Bruggencate 2016中所述。

[0149] 本研究招募了年龄18-55岁的健康成人,并排除在研究前3个月内使用抗生素、免疫抑制药物、抗酸剂、泻药、或止泻药,当前或之前有胃肠道基础疾病,或乳糖不耐受的个体。

[0150] 通过如下评估尿液中乳果糖/鼠李糖比率来评估肠屏障渗透性。禁食过夜后,受试者排空其膀胱,然后饮用含有在总共450ml水中的5g乳果糖、2g甘露醇和1g鼠李糖的标准化糖溶液(计算的渗透压为69osmol/kg水)。允许受试者在测试的第一个小时后无限摄入液体,以确保有足够的尿排出量。收集尿液并在接下来的5h内合并,并记录总体积。使用乳果糖/鼠李糖比率作为肠损伤的指标,该组合已被推荐用于评估肠病。

[0151] 通过此首次筛选后,获得非禁食血液样品。制备血清并分析针对致泻性大肠杆菌(E.coli)定植因子抗原II(CFAII)的特异性免疫原性表位的特异性IgG。此外,获得了新鲜的粪便样品,并通过qPCR分析致泻性大肠杆菌。由于可能对本研究中施用的大肠杆菌菌株具有抗性,从本研究中排除了以下个体的参与:由之前的ETEC感染诱导的可检测到针对CFAII免疫球蛋白滴度,或可检测到粪便致泻性大肠杆菌计数。本研究有2种主要结果:粪便致泻性大肠杆菌排泄和粪便排出。基于非配对数据的2侧统计检验( $\alpha=0.05$ (I类错误的几率)和 $\beta=0.20$ (II类错误的几率)),以及为了补偿退出现象(dropout),应包括30名参与者/组。参与者根据年龄、性别、粪便乳杆菌属和可检测到的针对CFAII的免疫球蛋白滴度(在筛选时确定)进行分层,并随机分配到MFGM或对照组。由未参与本研究的非盲人员执行分层和随机化。将每名参与者的随机化代码保存在密封的信封中,并在完成所有实验室和统计分析后揭开代码。

[0152] 进行了一项随机化、安慰剂对照、双盲、4周平行干预研究。指导参与者在整个研究

期间保持通常的体力活动模式和他们的习惯性饮食,但禁食乳制产品以及含有益生元和益生菌的产品。参与者接收在其纸质受试者日记中的乳制产品和富含益生元或益生菌的产品的列表。乳制食品不包括在饮食中,因为它们对每日总钙摄入有很大贡献。通过为参与者提供低钙大豆饮料来替代乳制产品。在整个研究期间,参与者每日两次饮用250mL的大豆乳饮料(例如自然生物公司(Bio Nature)的阿波罗豆乳(Alpro-Soya))。早餐和晚餐期间,在早晨(125mL)和晚上(125mL)饮用饮料。

[0153] 如上所述,在致泻性大肠杆菌激发前四天和致泻性大肠杆菌激发后24小时,通过评估尿液中乳果糖/鼠李糖比率来评估肠屏障渗透性。

[0154] 在致泻性大肠杆菌激发前两天和激发后2d,参与者在在线营养日记中定量报告摄取的所有食物和饮料。注明摄取的食物和饮料的重量。如果摄取量未知,则以家用度量(例如,一杯、一片)表示。例如使用计算机化的食物组成表[NEVO在线版本2011/3.0;RIVM(国家公共卫生和环境研究所(National Institute for Public Health and the Environment))],计算每个时间段的平均每日能量和主要营养素摄入。

[0155] 在整个研究期间,参与者被要求每日两次在他们125ml的大豆乳饮料中混合18,75克根据本发明的配方或如在实例2A(参考产品)中的高热处理的营养组合物,该高热处理的营养组合物含有相同量的卡路里、蛋白和糖(对照组)。

[0156] 在对干预产品的2周适应时间段后,参与者禁食至少4h,然后用活的但减毒的口服致泻性大肠杆菌菌株进行口服激发,如前所述(Bovee-Oudenhoven 2003;Ouweland 2014)。所使用的大肠杆菌菌株(E1392/75-2A)是先前产肠毒素06:H16 LT'/ST'菌株的不耐热/耐热(LT/ST)CFAII阳性变体。在致泻性大肠杆菌激发前(第21天)和激发后(第1、2、3、4、和14天),从匀浆的湿粪便样品中分离DNA,并如先前所述通过qPCR定量致泻性大肠杆菌(Ten Bruggencate等人2015)。

[0157] 在致泻性大肠杆菌激发前(第21天和第22天)和激发后(第1、2、3、4、和14天),采集24-h粪便样品。粪便样品在排便后立即在22°C下冷冻,并在冷冻条件下转运到实验室,称重,并匀浆;将等份试样储存在22°C下,用于后续分析。通过每日总粪便湿重排泄量(总粪便排出量)和通过如冻干后确定的粪便干重的百分比(粪便稠度)确定腹泻。

[0158] 在整个研究期间,参与者每日在在线日记中报告关于通过使用Bristol粪便量表(Heaton等人1991)的粪便稠度和关于粪便频率的信息。此外,在在线日记中,参与者根据经验证的胃肠道症状评定量表(GSRS)每日记录症状(Svedlund等人1988)。GSRS是由组合成以下5个症状群的15个项目组成的疾病特异性工具:反流、腹痛、消化不良、腹泻、和便秘。定义域“腹泻”由排便增加、稀便、和排便紧迫感组成。GSRS采用7分制李克特式(Likert-type)量表,其中1=无不适,2=轻微不适,3=轻度不适,4=中度不适,5=中重度不适,6=重度不适,7=极重度不适。

[0159] 由当地医院的合格工作人员在致泻性大肠杆菌激发前的一个时间点(第24天)和激发后的2个时间点(第3天和第14天)采集血液样品(10mL)。通过低速离心(在10°C下以3000g离心20min)制备血清,并储存在28°C下。如其他地方所述,通过直接ELISA确定血清中针对CFAII的特异性IgG的浓度(Bovee-Oudenhoven等人2003)。

[0160] 通过向0.4克粪便中添加3.6ml PBS和40 $\mu$ l蛋白酶抑制剂(西格玛奥德里奇公司,兹韦恩德雷赫特市,荷兰,P8340),涡旋至少30秒,并在4°C下以3000x g离心10分钟,制备粪

便水提取物。将粪便提取物储存在-80℃下直至测量。

[0161] 为了评估肠屏障功能,根据生产商的说明(钙卫蛋白和 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶:安迪生物公司,连蛋白:美艾利尔公司),通过ELISA测量粪便水提取物中的粪便钙卫蛋白(人S100A8/S100A9)、 $\alpha$ -1-抗胰蛋白酶(人SERPIN-A1)和连蛋白。

[0162] 在本研究中,本发明的营养组合物减少了ETEC激发后的腹泻症状(如通过排便频率、稀便、胃肠道症状评分降低证明的),并改善肠屏障(如通过粪便水提取物中屏障功能标记的减少和通过尿液中乳糖/鼠李糖比率证明的)。

[0163] 实例3:婴儿配方和生长乳的配制

[0164] 在表3中示出了婴儿配方和成长乳的实例。婴儿配方的剂量为约13g/100mL,成长乳的剂量为15g/100mL

[0165] 技术人员将理解,所有成分的确切的量可针对不同年龄组或为符合监管要求进行调整。

[0166] 表3婴儿配方和成长配方组合物

成分		婴儿配方	成长乳
陶瓷微滤(CMF)乳(液体)	kg 固体/100 kg	3-4	14-18
乳血清蛋白浓缩物	kg 固体/100 kg	14-16	17-21
奶油	kg 固体/100 kg	14-16	9-12

成分		婴儿配方	成长乳
乳糖	kg/100 kg	40-44	33-35
植物脂肪共混物	kg/100 kg	12-15	8-12
油/矿物质/维生素	kg/100 kg	2-4	1-3
半乳寡糖	kg/100 kg	4-5	4-6
核苷酸, 微量元素	kg/100 kg	1.1-1.9	0.5-2
乳清蛋白浓缩物	kg/100 kg	1.5-5	2-4
乳铁蛋白	kg/100 kg	0.1-0.5	0.1-0.5
HMO	kg/100 kg	0.1-0.5	0.1-0.6
总 IG	kg/100 kg	0.05 - 0.5	0.05 - 0.5
活性 IG	Kg/100 kg	0.02 - 0.4	0.02 - 0.4

[0169] 应理解,婴儿配制品的配方同样可用于后续配方。婴儿配方或后续配方可以使用本领域已知的技术制成粉末,前提是该组合物不经受高于80℃的温度。

[0170] 在一个实施例中,本发明涉及如在表3中指定的组合物。在另一实施例中,本发明涉及如在表3中指定的组合物,其中该半乳寡糖已用一种或多种其他不可消化的寡糖替代。

[0171] 参考文献

- [0172] Bach Knudsen KE, Lærke HN, Hedemann MS, Nielsen TS, Ingerslev AK, Gundelund Nielsen DS, Theil PK, Purup S, Hald S, Schioldan AG, Marco ML, Gregersen S, Hermansen K13. Impact of Diet-Modulated Butyrate Production on Intestinal Barrier Function and Inflammation. *Nutrients*. 2018 Oct 13; 10(10). pii: E1499. doi: 10.3390/nu10101499.
- [0173] Bischoff, S.C. (2011). "Gut health": a new objective in medicine? *BMC Medicine*, 9(1), 24. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-24>
- [0174] Bischoff, S.C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., ... Wells, J. (2014). Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 189. <http://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- [0175] Bovee-Oudenhoven IM, Lettink-Wissink ML, Van Doesburg W, Witteman BJ, Van Der Meer R. Diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of humans is inhibited by dietary calcium. *Gastroenterology* 2003; 125:469-76.
- [0176] D' Souza et al: Differing roles of short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. *Publication/Journal: PLOS One* Publication date: 2017 Volume/Issue: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180190> Pages: 1-22
- [0177] den Hartog G, Jacobino S, Bont L, Cox L, Ulfman LH, Leusen JHW, van Neerven RJJ. Specificity and Effector Functions of Human RSV-Specific IgG from Bovine Milk. *PLoS One* (2014) 9:e112047. doi:10.1371/journal.pone.0112047
- [0178] Hall, K.E., Proctor, D.D., Fisher, L., & Rose, S. (2005). American Gastroenterological Association future trends committee report: Effects of aging of the population on gastroenterology practice, education, and research. *Gastroenterology*, 129(4), 1305-1338. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.013>
- [0179] Heaton KW, Ghosh S, Braddon FE. How bad are the symptoms and bowel dysfunction of patients with the irritable bowel syndrome? A prospective, controlled study with emphasis on stool form. *Gut* 1991; 32:73-9.
- [0180] Li et al Exogenous stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via aryl Hydrocarbon Receptor Activation *Publication/Journal: Cell* Publication date: 2011 Volume/Issue: 147 Pages: 629-640.
- [0181] Godden S, McMartin S, Feirtag J, Stabel J, Bey R, Goyal S, Metzger L, Fetrow J, Wells S, Chester-Jones H. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *J Dairy Sci*. 2006 Sep; 89(9):3476-83.
- [0182] Li SQ, Zhang HQ, Balasubramaniam VM, Lee YZ, Bomser JA, Schwartz SJ, Dunne CP. Comparison of effects of high-pressure processing and heat treatment on immunoactivity of bovine milk immunoglobulin G in enriched soymilk under

equivalent microbial inactivation levels. *J Agric Food Chem.* 2006 Feb 8; 54(3): 739-46.

[0183] Man, A.L., Gicheva, N., & Nicoletti, C. (2014). The impact of ageing on the intestinal epithelial barrier and immune system. *Cellular Immunology*, 289(1-2), 112-118. <http://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.04.001>

[0184] Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, Michel ML, Chong-Nguyen C, Roussel R, Straube M, Jegou S, McQuitty C, Le Gall M, da Costa G, Lecornet E, Michaudel C, Modoux M, Glodt J, Bridonneau C, Sovran B, Dupraz L, Bado A, Richard ML, Langella P, Hansel B, Launay JM, Xavier RJ, Duboc H, Sokol H. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* 2018 Nov 6; 28(5): 737-749. e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.07.001.

[0185] Ohnuki H. and Otani H. Antigen-binding and protein G-binding abilities of immunoglobulin G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions 2005.76:283-290

[0186] Ouwehand AC, Ten Bruggencate SJ, Schonewille AJ, Alhoniemi E, Forssten SD, Bovee-Oudenhoven IM. *Lactobacillus acidophilus* supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Br J Nutr* 2014; 111:465-73.

[0187] Playford RJ, Floyd DN, Macdonald CE, Calnan DP, Adenekan RO, Johnson W, Goodlad R a, Marchbank T. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut* (1999) 44:653-8

[0188] Svedlund J, Sjodin I, Dotevall G. GSRS—a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sci* 1988; 33:129-34.

[0189] Ten Bruggencate SJ, Girard SA, Floris-Vollenbroek EG, Bhardwaj R, Tompkins TA. The effect of a multi-strain probiotic on the resistance toward *Escherichia coli* challenge in a randomized, placebo-controlled, double-blind intervention study. *Eur J Clin Nutr* 2015; 69(3): 385-91.

[0190] Ten Bruggencate SJ, Frederiksen PD, Pedersen SM, Floris-Vollenbroek EG, Lucas-van de Bos E, van Hoffen E, and Wejse PL Resistance to Diarrheagenic *Escherichia coli* in Healthy Adults in a Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study. *J Nutr* 2016; 146:249-55.)

[0191] Turner, J.R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(11), 799-809. <http://doi.org/10.1038/nri2653>

[0192] Valentini, L., Ramminger, S., Haas, V., Postrach, E., Werich, M., Fischer, A., ... Schulzke, J.-D. (2014). Small intestinal permeability in older adults. *Physiological Reports*, 2(4), e00281. <http://doi.org/10.14814/phy2.281>

[0193] Wang, J., Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55-60. <http://doi.org/10.1038/nature11450>

[0194] Zhang, X., Shen, D., Fang, Z., Jie, Z., Qiu, X., Zhang, C., ... Ji, L. (2013). Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS ONE*, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>.

PCB126-加标标准品

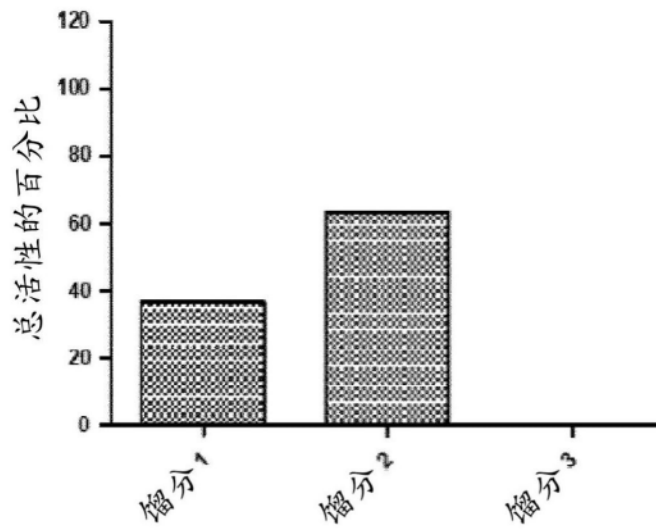


图1A

PAH 混合物-加标标准品

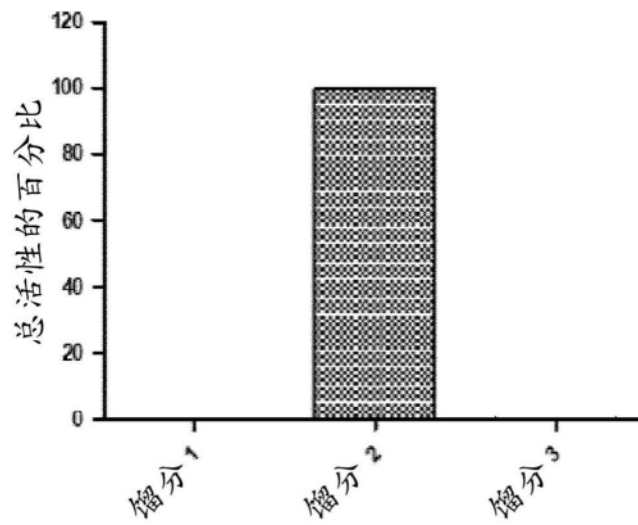


图1B

13C-加标标准品

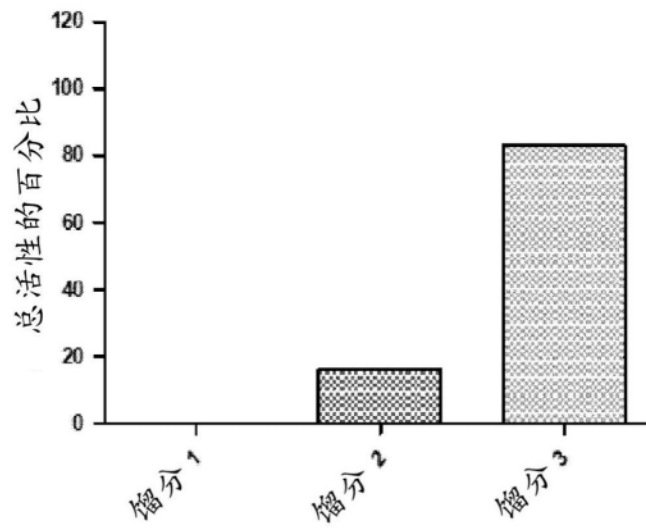


图1C

馏分 1  
(PCDD/F, PCB, 非极性杀有害生物剂)

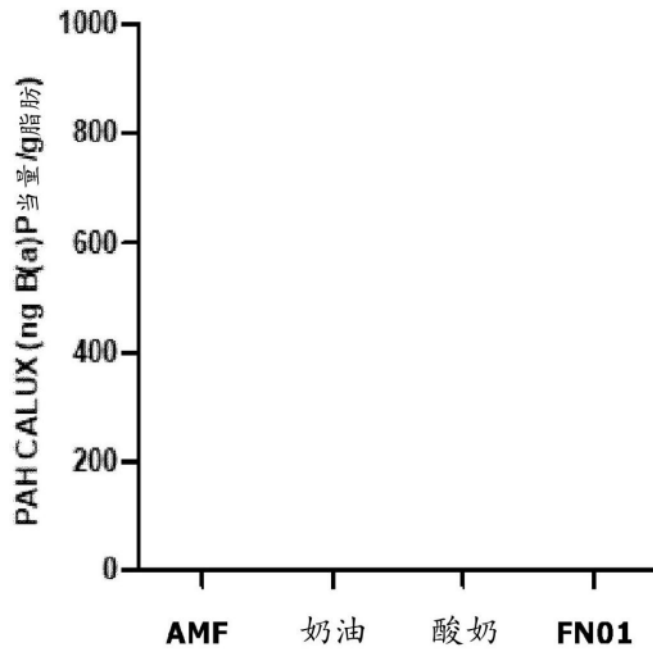


图2A

馏分 2  
(PAH, 极性杀有害生物剂)

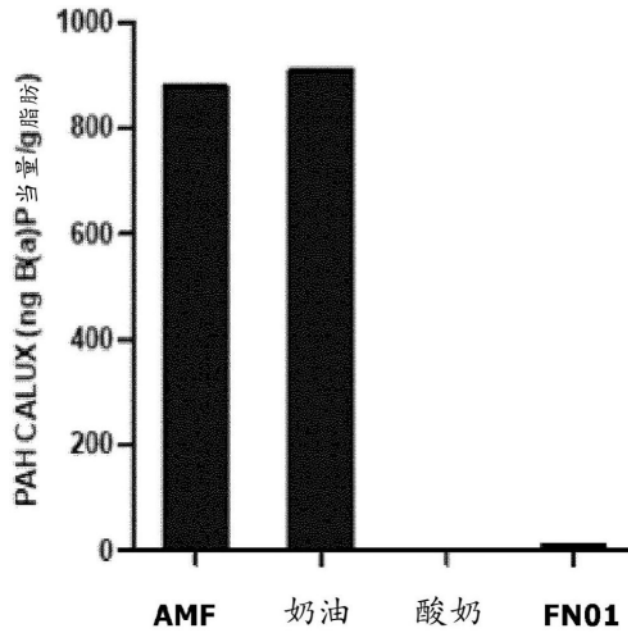


图2B

馏分 3  
(天然的AhR-配体 例如吡啉衍生物)

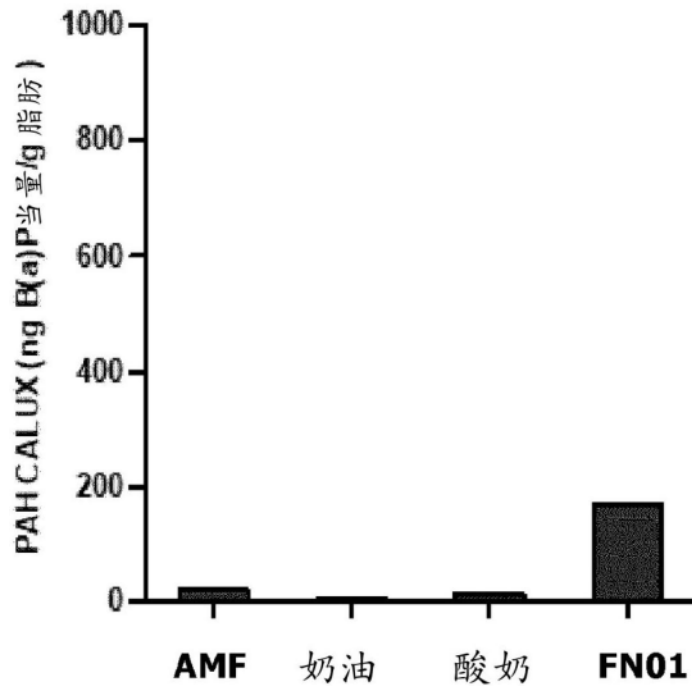


图2C

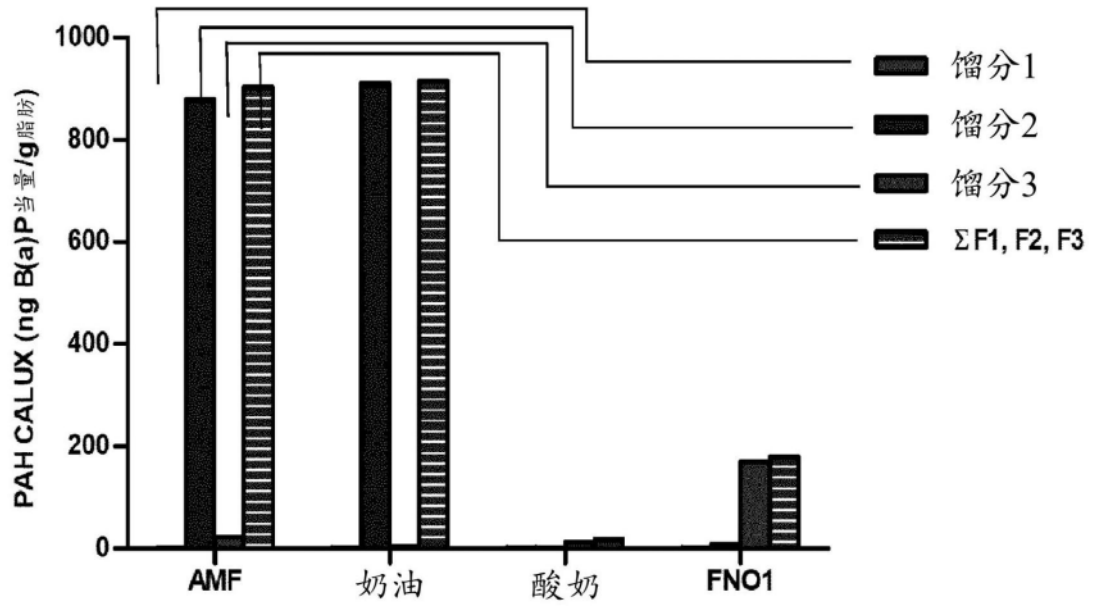


图3