



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113661237 A

(43) 申请公布日 2021. 11. 16

(21) 申请号 202080026428.7

(22) 申请日 2020.04.02

(30) 优先权数据

62/827994 2019.04.02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/026280 2020.04.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/206050 EN 2020.10.08

(71) 申请人 宝洁公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 A·文卡塔拉曼 C·L·布鲁斯特

K·C·科扎克 L·李

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 彭昶

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 35/741 (2006.01)

A61K 35/744 (2006.01)

A61K 35/745 (2006.01)

A61K 35/747 (2006.01)

A61K 36/064 (2006.01)

权利要求书1页 说明书17页
序列表4页

(54) 发明名称

用以支持健康的大脑功能的组合物

(57) 摘要

本文描述了一种组合物,该组合物含有可增加IPA产量的益生菌和发酵物。该组合物包含一种或多种细菌、发酵物以及赋形剂、载体和/或稀释剂,该一种或多种细菌具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%同源性的核酸序列,该发酵物包含大豆粉、酵母和蛋白水解酶。该组合物可促进大脑健康和/或神经系统功能。

1. 一种组合物,所述组合物包含:(a)一种或多种细菌,所述一种或多种细菌具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%同源性的核酸序列;(b)发酵物,所述发酵物包含酵母;以及(c)赋形剂、载体和/或稀释剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述一种或多种细菌选自产芽胞梭状芽胞杆菌、厌氧消化链球菌、尸毒梭状芽胞杆菌、粗体梭状芽胞杆菌以及它们的组合。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述发酵物还包含一种或多种蛋白水解酶。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述发酵物还包含选自碳水化合物、大豆粉以及它们的组合的附加营养物质。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述发酵物还包含至少一种乳酸菌或双歧杆菌。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述乳酸菌或双歧杆菌选自嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌以及它们的混合物。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含 $1 \times E3$ 菌落形成单位(CFU)至 $1 \times E11$ CFU的所述一种或多种细菌。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含1mg至2g的所述发酵物。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种细菌在36℃下与所述发酵物厌氧体外温育24小时后产生至少5μg/mL的吲哚-3-丙酸(IPA)。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含活性成分。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含草本成分。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物为益生菌组合物。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述一种或多种细菌为产芽胞梭状芽胞杆菌。

14. 一种促进大脑健康的方法,所述方法包括向对其有需要的个体施用根据权利要求1所述的组合物。

15. 一种将抗氧化营养物质递送到大脑的方法,所述方法包括向对其有需要的个体施用根据权利要求1所述的组合物。

用以支持健康的大脑功能的组合物

技术领域

[0001] 本文描述了一种可支持健康的大脑和/或神经系统功能的组合物,该组合物包含可增加吲哚-3-丙酸产量的细菌和发酵物的组合。

背景技术

[0002] 遵循良好的营养实践可能具有挑战性。一些人寻求补充剂以提供额外的营养物质来改善他(她)们的健康与幸福,包括维持健康的大脑功能。大脑因高耗氧速率、高含量的多不饱和脂肪酸和局部高铁水平以及成比例的低抗氧化能力而特别易受氧化应激反应影响。已知氧化应激反应可导致神经形成减少和神经元死亡增多。已证实,认知损害与氧化应激反应有关,并且有效的抗氧化体系可保持老年人的认知功能。

[0003] 吲哚-3-丙酸(“IPA”)是神经保护性抗氧化剂,其可改善人类的心境、认知和/或维持人类健康的大脑功能和神经系统。IPA由结肠中的肠道菌群生成,并且穿过肠上皮和血脑屏障进入大脑。在大脑中,已证实IPA起到作为抗氧化剂的保护作用,从而保护神经元的结构和功能。据信IPA的抗氧化特性可在促进大脑健康中起关键作用。还众所周知的是,口服IPA可原位增大IPA水平(参见Kaufmann SHE,2018年,“Indole propionic acid:a small molecule links between gut microbiota and tuberculosis”,Antimicrob Agents Chemother,第62卷,第e00389-18页;Niebler G,NCT01898884:“Safety and Pharmacology Study of VP20629in Adults With Friedreich’sAtaxia”,2018年)。

[0004] 尽管越来越多的人认识到IPA对大脑健康的有益效果,但目前IPA仅以化学合成形式商业生产。然而,越来越多的消费者对理解产品成分(包括它们的来源)感兴趣,且更喜欢来自天然来源的补充剂。这些寻求天然营养来源的消费者可能不喜欢直接摄入化学合成的IPA。此外,除了IPA,其他吲哚衍生物诸如吲哚-3-乙酸、吲哚-3-丙烯酸和吲哚-3-乳酸也因提供积极的健康有益效果而出现。然而,化学合成形式的IPA仅递送纯IPA。

[0005] 因此,需要一种提供吲哚衍生物的组合的天然衍生方法,以便促进大脑健康,在该吲哚衍生物的组合中IPA是主要组分。

发明内容

[0006] 本文描述了一种组合物,该组合物包含:(a)一种或多种细菌,该一种或多种细菌具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%同源性的核酸序列;(b)发酵物,该发酵物包含大豆粉、酵母和蛋白水解酶;以及(c)赋形剂、载体和/或稀释剂。

[0007] 本文描述了一种组合物,该组合物包含:(a)一种或多种细菌,该一种或多种细菌具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%同源性的核酸序列;(b)发酵物,该发酵物包含酵母;以及(c)赋形剂、载体和/或稀释剂;其中该一种或多种细菌在36℃下与发酵物厌氧体外温育24小时后产生约5μg/mL至约80μg/mL的吲哚-3-丙酸(IPA)。

具体实施方式

[0008] 消费者正在寻找用IPA补充他(她)们的饮食以促进大脑和心理健康的 有效且天然的方式。本文描述了一种包含一种或多种细菌的组合物,该一种或多种细菌在与发酵物组合时可产生升高水平的IPA和其他吡啶衍生物。已令人惊讶地发现,当将某些发酵物添加到细菌中时,可显著增加IPA产量。具体地讲,已发现,包含酵母的发酵物可显著增加产芽胞梭状芽胞杆菌(*Clostridium sporogenes*)所产生的IPA。在一些方面,发酵物可包含酵母、大豆粉和蛋白水解酶。

[0009] 如本文所用,术语“施用”、“施予”和“施以”是指在可靠的医学实践中以提供治疗效果的方式向受试者递送组合物的任何方法。

[0010] 如本文所用,“厌氧条件”是指排除氧气的存在(例如,小于约1ppm游离氧,优选地小于约0.1ppm游离氧,更优选地约0至约1ppm游离氧)的任何生长或营养条件。

[0011] 如本文所用,缩写“CFU”(“菌落形成单位数”)是指通过琼脂板上的微生物计数表示的细菌细胞的数量,如本领域通常所理解的。

[0012] 如本文所用,“发酵”是指微生物代谢原料的过程。

[0013] 如本文所用,“发酵物”是指从发酵培养基中除去水后的分离固体。

[0014] 术语“微生物”和“微生物体”在本文中可互换使用,均指细菌。术语“菌群”、“微生物群”和“微生物群体”在本文中可互换使用,并且可指生活在受试者身体上或身体内的微生物生态群落。菌群可存在于受试者的很多部分(如果不是大部分的话)之上或之中。菌群的栖息地的一些非限制性示例可包括:身体表面、体腔、体液、肠道、结肠、皮肤表面和毛孔、阴道腔、脐部区域、结膜区域、肠区域、胃、鼻腔和鼻道、胃肠道、泌尿生殖道、唾液、粘液和粪便。

[0015] 如本文所用,“核酸序列”和“核苷酸序列”是指寡核苷酸或多核苷酸以及它们的片段或部分,并且是指基因组来源或合成来源的DNA或RNA,它们可以是单链或双链的并且表示有义链或反义链。核酸序列可由腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶(A、T、C、G和U)以及修饰形式(例如N6-甲基腺苷、5-甲基胞嘧啶等)组成。

[0016] 术语“受试者”是指任何动物受试者,包括人、实验室动物、牲畜和家养宠物。

[0017] 如本文所用,冠词“一个”和“一种”被理解为受权利要求书保护的或描述的一种或多种材料,例如,“活性成分”或“益生菌”。

[0018] 组合物可含有、由或基本上由下列因素组成:本文所述的本发明的基本要素和限制,以及本文所述或可用于旨在供受试者使用或食用的组合物中的任何附加或任选成分、组分或限制。

[0019] 在各个方面,组合物包含:一种或多种细菌菌株或菌种;包含酵母的发酵物;以及生理上、药学上或营养上可接受的赋形剂、载体和/或稀释剂。

[0020] 组合物可包含一种或多种细菌,该一种或多种细菌可产生IPA和/或吡啶衍生物(诸如吡啶-3-乙酸、吡啶-3-丙烯酸和吡啶-3-乳酸)。在一些方面,组合物可包含一种或多种细菌,该一种或多种细菌具有与编码苯乳酸脱水酶基因簇(*f1dL*、*f1dI*和*f1dABC*)的SEQ ID NO:1(表1)的核酸序列基本上同源的核酸序列。

[0021] 表1—DNA序列

[0022]	SEQ ID NO	核苷酸序列
--------	-----------	-------

[0023]

1	AATTCCTTTAACAGATACAGGTAATAAAGAGGCATGAACTAAA AAAATGCTTTGAAAAGAAGTTTGAATTAAGACAATCTATTTAAATTA ATAATAAATATATTTAAATTAACAATAAATATATTTAAATTAACAATAA ATCTATTTAAGGAGGCTTTTTTTATGGAAAACAATACAAATATGTTT AGTGGAGTAAAGGTTATTGAATTAGCAAATTTTATAGCTGCTCCAGC AGCAGGTAGATTTTTTGCTGATGGTGGTGCAGAGGTAATAAAAAATT GAATCACCTGCTGGAGATCCTTTAAGATATACTGCTCCTTCAGAAGG AAGACCATTAAGCCAAGAAGAAAAATACTACTTATGATTTGGAAAAT GCAAATAAAAAAGCAATAGTATTAAATCTTAAAAAGCGAAAAAGGTA AAAAGATATTACATGAAATGTTAGCAGAAGCAGATATATTATTAAC TAATTGGAGAACAAAGGCTTTAGTTAAACAAGGATTAGACTATGAA ACACTAAAAGAAAAATATCCTAAATTAGTTTTTGCACAAATAACTG GTTATGGTGAAAAAGGACCAGATAAAGATCTTCCAGGCTTTGATTAT ACTGCATTTTTTCGCTAGAGGCGGTGTTTCAGGTACTCTTTATGAAAA AGGAACTGTGCCTCCAAATGTTGTTCCAGGACTTGGAGACCATCAA GCTGGGATGTTTTTAGCAGCGGGTATGGCAGGAGCTTTATATAAAGC AAAAACAACAGGACAAGGAGATAAAGTAACAGTAAGTTTAATGCAT AGTGCTATGTATGGACTAGGTATTATGATACAAGCTGCTCAATATAA AGATCATGGATTAGTATATCCGATAAATCGTAATGAAACTCCAAATC CTTTTATAGTTTCATATAAATCTAAGGATGATTACTTTGTTCAAGTAT GTATGCCACCATATGATGTTTTCTATGATAGATTTATGACCGCTTTA GGAAGAGAAGATTTAGTTGGAGACGAAAGATACAATAAAATAGAA AATTTAAAAGATGGACGTGCTAAGGAAGTATACAGTATAATCGAAC AACAAATGGTTACAAAGACAAAGGATGAATGGGATAACATATTTAG AGATGCAGACATTCCATTGCTATCGCACAAACTTGGGAAGATTTAT TAGAAGATGAACAAGCTTGGGCAAATGATTATTTGTATAAGATGAA ATATCCAACAGGAAACGAAAGAGCATTAGTAAGACTTCCAGTATTC TTTAAAGAAGCAGGATTACCAGAATATAATCAATCACCACAAATAG CAGAAAATACTGTAGAAGTTTTAAAAGAAATGGGATATACAGAACA AGAGATTGAGGAATTAGAAAAAGATAAAGATATAATGGTAAGGAA GGAAAAATAATGGCAGACATTTATACTATGGGTGTAGACATAGGTT CAACTGCATCAAAAACAGTAGTATTAATAAATGGTAAAGAAATTGT AAGTCAAGCAGTAATAAGTGTAGGGGCCGGAACAAGTGGCCCCAAG AGAGCTATAGATTCTGTATTAAGATGCTAAATTATCCATTGAAGA TTTAGACTATATTGTATCCACTGGATATGGAAGAAATAGTTTCGATT TTGCTAACAAACAAATTTCTGAATTAAGTTGTCATGCAAAAGGGGTC TATTTGATAACAATAAAGCTAGAACAGTTATTGATATAGGCGGAC AAGATATTAAGTATTAATAATTAGCGGATAGTGGAAGACTTTTAAA CTTTATAATGAATGATAAATGTGCTGCAGGAACGGGACGATTTTTAG ATGTAATGTCTAGAGTAATAGAAGTTCCAGTTGATGAGTTAGGAAA AAAAGCATTAGAAAGCAAAAATCCTTGTAATATTAGTTCTACCTGTA CAGTATTTGCAGAGTCAGAAGTAATTTCTCAACTTGCAAGAGGAGTT AAAAGTGAAGATTTGATAGCAGGAATTTGTAAATCTGTAGCATCAA GAGTGGCTAGCCTTGCAAAGAGAGAGTGGTATAGAAGAATTAGTAGT TATGAGTGGAGGAGTAGCTAAAAATATAGGTGTAGTAAAGGCAATG GAAGCAGAATTGGGAAGAGACATATATATCTAAAAATTCTCAAT TAAATGGAGCATTGGGAGCAAGTCTATACGCTTATGAAAGTTTTCAA AAAGAAAGGAGCTAAAAACATGAGTGATAGAAATAAGGAAGTAA AGAAAAAAGGCAAAGCATTATCTTAGAGAGATTACTGCAAAGCAT
---	--

[0024]

TACAAAGAAGCTCTCGAAGCAAAAGAAAGGGGAGAAAAGGTTGGT
TGGTGTGCATCTAACTTCCCACAAGAAATAGCTACAACATTGGGGGT
AAAAGTTGTTTATCCAGAAAATCATGCAGCAGCTGTAGCAGCTAGA
GGGAATGGACAAAATATGTGTGAACATGCTGAGGCTATGGGTTTTT
CTAATGATGTATGTGGTTATGCAAGAGTAAATTTAGCTGTTATGGAC
ATAGGTCATAGTGAAGATCAACCAATACCTATGCCAGACTTTGTACT
TTGCTGTAATAACATTTGTAATCAAATGATTAAATGGTATGAGCATA
TAGCAAAAACCTTTAGATATACCAATGATTCTTATAGATATACCATAC
AATACAGAAAATACTGTTTCACAAGATAGAATTAAATATATTAGAG
CACAATTTGATGATGCAATAAAACAATTGGAAGAAATAACAGGCAA
AAAATGGGATGAAAATAAATTTGAAGAAGTTATGAAAATATCCCAA
GAAAGTGCAAAACAATGGTTAAGAGCAGCATCCTATGCAAAGTATA
AACCTTCACCATTTAGCGGATTTGATTTATTTAATCATATGGCTGTA
GCAGTTTGTGCAAGAGGTACACAAGAAGCTGCAGATGCATTTAAGA
TGTTAGCAGATGAATATGAGGAGAATGTAAAAACTGGAAAATCCAC
TTATAGGGGAGAAGAAAAACAACGTATATTATTTGAAGGGATTGCC
TGTTGGCCATATTTGAGACATAAATTAATAAGCTTAGTGAATATGG
TATGAACGTAACCTGCAACTGTATACGCAGAAGCCTTTGGTGTATAT
ATGAGAATATGGATGAATTAATGGCTGCTTATAATAAAGTTCCTAAT
TCAATTAGTTTTGAAAACGCATTAATAAATGAGATTAAATGCTGTTAC
AAGCACTAATACAGAAGGTGCTGTTATTCATATAAATAGAAGCTGT
AAATTATGGAGTGGATTTTTATATGAGCTAGCAAGAAGATTAGAAA
AGGAAACAGGAATTCCTGTAGTATCATTGATGGGGACCAGGCAGA
CCCAAGAAATTTCTCAGAAGCTCAATATGATACTAGAATTCAAGGA
CTTAATGAAGTAATGGTTGCTAAAAAGGAGGCTGAATAAGATGTCA
AATTCAGATAAATTTTTTAATGACTTTAAGGATATTGTAGAAAATCC
TAAAAAATATATAATGAAGCATATGGAACAACTGGACAAAAGGCT
ATAGGATGTATGCCATTATATACTCCTGAGGAACCTTGATTAGCTGC
TGGAATGTTTCCAGTAGGGGTATGGGGAAGCAATACAGAACTTCA
AAAGCTAAACATATTTCCCAGCATTTATTTGTTCAATATTACAAAC
AACATTGGAAAATGCATTAAATGGAGAATATGATATGTTATCTGGT
ATGATGATTACAAATTATTGTGATTCAATAAAATGCATGGGACAAAA
TTTTAACTAACCGTTGAAAATATTGAGTTTATCCCAGTAACAGTTC
CACAAAATAGAAAAATGGAAGCTGGAAAAGAGTTTTTAAAAAGTCA
ATATAAAATGAATATTGAGCAATTAGAAAAGATTTCTGGTAATAAA
ATAACAGATGAATCTTTAGAAAAAGCTATAGAAATATATGATGAAC
ACAGAAAAGTAATGAATGACTTTTCAATGTTAGCATCAAAATATCC
AGGTATAATAACACCAACTAAACGTAATTATGTTATGAAATCTGCTT
ATTATATGGATAAAAAAGAACATACTGAAAAAGTTAGACAATTAAT
GGATGAAATTAAAGCTATAGAACCAAACCATTTGAAGGAAAGAGA
GTTATAACTACAGGTATAATTGCAGATTCAGAAGATTTACTTAAAT
ATTAGAAGAAAATAATATAGCTATAGTTGGTGATGATATAGCACAT
GAATCTAGACAATATAGAACATTGACTCCAGAAGCGAACACACCAA
TGGATAGGTTAGCTGAGCAATTTGCTAATAGAGAATGTAGTACTTTA
TATGATCCTGAAAAGAAAAGGGGTCAATATATAGTAGAAATGGCTA
AAGAGAGAAAAGCAGATGGAATTATATTTTTCATGACAAAATTCTG
TGACCCAGAGGAATATGATTATCCACAAATGAAAAAGGATTTTGAA
GAAGCAGGCATTCCACATGTACTAATAGAACTGATATGCAAATGA
AAAATTATGAACAAGCTAGAACTGCAATTCAGGCTTTTTCAGAAAC

[0025]

ACTTTAATAAAAGTTTTCAATATTTACTGTAAACTTTATTAATTGAA ACATTGATTTCTCTTCTCTTTCTATAAAATAATATTTATATTTAAAAA AGTTATGTTTAGATGGATGAAAGGAAATCAATGTTTCATATAAATTAA CAAATTCATTAATATATTAGGAGGGATATAATGTTTTTCACAGAACA ACATGAACTTATTAGAAAATTAGCAAGAGATTTTGCAGAGCAGGAA ATAGAGCCTATTGCAGATGAAGTAGATAAAACTGCCGAGTTCCCTA AAGAAATTGTGAAAAAAATGGCCCCAAAATGGTTTTTTTGGGAATAAA AATGCCTAAAGAATATGGTGGAGCTG
--

[0026] 细菌包含与其他细菌具有特定程度的同源性或同一性的核酸序列。如本文所用，术语“同一性”、“同源性”和“同源”是指与其他核苷酸序列互补或共有相似性的程度。可存在部分同源性或完全同源性（即，相同序列）。与核酸序列部分互补（即“基本上同源”或“基本上相同”）的核苷酸序列是至少部分地抑制完全互补序列与靶核酸序列杂交的序列。

[0027] 在一些方面，本公开的细菌包含的核酸序列与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少约60%、至少约61%、至少约62%、至少约63%、至少约64%、至少约65%、至少约66%、至少约67%、至少约68%、至少约69%、至少约70%、至少约71%、至少约72%、至少约73%、至少约74%、至少约75%、至少约76%、至少约77%、至少约78%、至少约79%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的同源性或同一性。

[0028] 在一些方面，包含SEQ ID NO:1的核酸序列的细菌可以是益生菌或益生菌细菌。如本文所用，术语“益生菌”可意指一种或多种活微生物（例如，细菌或酵母），该一种或多种活微生物在适当施用时可赋予受试者健康有益效果。

[0029] 本公开的细菌的一些非限制性示例包括但不限于产芽胞梭状芽胞杆菌、厌氧消化链球菌 (*Peptostreptococcus anaerobius*)、尸毒梭状芽胞杆菌 (*Clostridium cadaveris*)、粗体梭状芽胞杆菌 (*Clostridium boltae*) 以及它们的组合。优选地，细菌为产芽胞梭状芽胞杆菌。

[0030] 组合物可包含发酵物。发酵物可使用本领域已知的任何发酵方法产生。特别合适的发酵方法进一步描述于美国专利6,806,069、美国专利6,864,231、美国专利6,942,856和美国专利7,138,113中，这些专利均以引用方式全文并入本文。

[0031] 在一些方面，发酵物可通过如下方式产生：(1) 在发酵培养基中发酵第一微生物，(2) 添加蛋白水解酶以破坏第一微生物的细胞壁，(3) 添加一种或多种第二微生物并发酵，(4) 加热以将微生物灭活，(5) 将混合物均质化，以及(6) 喷雾干燥以产生粉末发酵物。

[0032] 在一些方面，发酵物可通过如下方式产生：(1) 在发酵培养基中发酵第一微生物，(2) 添加蛋白水解酶以破坏第一微生物的细胞壁，(3) 添加一种或多种第二微生物，(4) 加热以将微生物灭活，(5) 将混合物均质化，以及(6) 喷雾干燥以产生粉末发酵物。

[0033] 在一些方面，可将第一微生物添加到可允许微生物生长和发酵的合适培养基（优选为水）中，以形成发酵培养基。第一微生物的CFU的数量可基于所使用微生物的类型而变化。优选地，第一微生物是酵母诸如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0034] 在一些方面，可添加附加的营养物质以进一步诱导微生物的生长和发酵。可将附加的营养物质作为单独成分添加到发酵培养基中，或者可将附加的营养物质添加到营养培养基中，然后将营养培养基添加到发酵培养基中。附加的营养物质可包括例如氨基酸、碳水

化合物、大豆粉、营养酵母诸如非活性面包酵母或非活性啤酒酵母、以及它们的组合。氨基酸的非限制性示例可包括谷氨酰胺、赖氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬氨酸、亮氨酸、缬氨酸、丙氨酸、精氨酸、甘氨酸以及它们的组合。碳水化合物可包括多糖、低聚糖、二糖、单糖以及它们的组合。合适的碳水化合物的非限制性示例可包括麦芽糖或阿拉伯树胶。

[0035] 在一些方面,发酵培养基可保持在促进最佳微生物生长的条件(诸如介于约32.2°C (90°F) 至约35°C (95°F) 之间)下。可允许第一微生物发酵足够长的时间,例如约4小时。

[0036] 在一些方面,可在第一微生物发酵后将一种或多种蛋白水解酶添加到发酵培养基中。合适的蛋白水解酶的非限制性示例可包括木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、胃蛋白酶或真菌蛋白酶。包含蛋白水解酶的一个优点是蛋白水解酶可有助于分解第一微生物的细胞壁。蛋白水解酶的量可根据发酵培养基中微生物的数量而变化。在一些方面,每500g微生物可添加约1g至约50g蛋白水解酶。

[0037] 在一些方面,可任选地将该一种或多种第二微生物添加到发酵培养基中。合适的第二微生物可包括乳酸菌和双歧杆菌,诸如嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、双歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*)、鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 以及它们的组合。优选地,在第一微生物发酵后添加第二微生物。在一些方面,发酵培养基可保持在合适的温度和条件下以允许第二微生物的生长和发酵。此类条件是本领域已知的。另选地,可在第一微生物发酵后添加第二微生物,但在灭活前不允许其进一步生长或发酵。

[0038] 在一些方面,可在发酵之后将发酵培养基中的微生物灭活。优选地,可通过提高发酵培养基的温度将微生物灭活。例如,可通过下列方式将微生物灭活:在搅拌下将发酵培养基加热至约65.6°C (150°F) 至约93.3°C (200°F)、优选地约71.1°C (160°F) 至约76.7°C (170°F),持续大约30分钟至约三小时。

[0039] 在一些方面,发酵培养基可在发酵之后均质化以便形成更均匀的产物。均质化的方法是本领域已知的,并且可例如通过均质化泵、剪切泵或共混机执行。

[0040] 在一些方面,发酵培养基中的细菌可通过例如离心与混合物分离。然后可将上清液脱水以形成粉末发酵物。

[0041] 优选的是,在发酵之后将发酵培养基脱水。用于将溶液脱水的方法是本领域熟知的,并且可包括冻干、喷雾干燥、露天干燥和转鼓式干燥。优选地,将发酵培养基喷雾干燥。在将发酵培养基脱水之后,形成粉末发酵物,然后可将该粉末发酵物掺入剂型或适于施用的其他形式中。

[0042] 在一些方面,可在脱水之前将稳定赋形剂或冷冻保护剂添加到发酵培养基或上清液中。在各个方面,术语“稳定赋形剂”和“冷冻保护剂”在本文中可互换使用。在一些方面,合适的冷冻保护剂可包括肌醇、山梨糖醇、甘露糖醇、海藻糖、葡萄糖、蔗糖、玉米糖浆、DMSO、所有类型的淀粉和/或改性淀粉、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)、麦芽糖或其他单糖和二糖。

[0043] 在一些方面,发酵物可包含酵母。在一些方面,发酵物可包含酵母和一种或多种蛋白水解酶。另选地,发酵物可包含酵母、一种或多种蛋白水解酶以及任选的附加营养物质,该附加营养物质选自碳水化合物、大豆粉以及它们的组合。优选地,发酵物可包含阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶以及它们的组合。在一些方面,可将菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶灭活。在一些方面,发酵物可含有有机成分。在一些方面,可将酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) 灭活。

[0044] 在一些方面,发酵物还可包含乳酸菌和/或双歧杆菌,诸如嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌以及它们的混合物。在一些方面,可将乳酸菌和/或双歧杆菌灭活。

[0045] 在一些方面,组合物可包含约1mg至约2g、另选地约10mg至约1.5g、另选地约25mg至约1g的发酵物。在一些方面,组合物可包含约1mg至约500mg、另选地约15mg至约250mg、另选地约50mg至约150mg的发酵物。

[0046] 在一个方面,组合物可包含约0.01%至约90%、另选地约0.1%至约85%、另选地约1%至约80%、另选地约2.5%至约75%、另选地约5%至约60%、另选地约10%至约50%、另选地约15%至约25%的发酵物,所有百分比均按组合物的重量计。

[0047] 在一些方面,组合物可包含约 $1 \times E3CFU/g$ 发酵物至约 $1 \times E13CFU/g$ 发酵物的细菌。

[0048] 在一些方面,细菌可产生至少约 $1\mu g/mL$ 的IPA、另选地至少约 $2.5\mu g/mL$ 的IPA、另选地至少约 $5\mu g/mL$ 的IPA。在细菌在 $36^\circ C$ 下与本文所述的发酵物厌氧体外温育之后,测量IPA的此类量或浓度。例如,在一些方面,在约12小时的时间段内、在约24小时的时间段内、在约36小时的时间段内、在约2天的时间段内、在约3天的时间段内、在约4天的时间段内、在约5天的时间段内、在约6天的时间段内、在约一周的时间段内等测量上文所公开的IPA产量。在特定方面,在约24小时的时间段内测量IPA。

[0049] 在一些方面,细菌在 $36^\circ C$ 下与发酵物厌氧体外温育24小时之后可产生约 $5\mu g/mL$ 至约 $80\mu g/mL$ 、另选地约 $6\mu g/mL$ 至约 $50\mu g/mL$ 、另选地约 $8\mu g/mL$ 至约 $25\mu g/mL$ 、另选地约 $10\mu g/mL$ 至约 $15\mu g/mL$ 的IPA。在一些方面,细菌在 $36^\circ C$ 下与发酵物厌氧体外温育24小时之后可产生约 $1\mu g/mL$ 至约 $80\mu g/mL$ 、另选地约 $1.5\mu g/mL$ 至约 $50\mu g/mL$ 、另选地约 $4\mu g/mL$ 至约 $25\mu g/mL$ 、另选地约 $6\mu g/mL$ 至约 $15\mu g/mL$ 的IPA。

[0050] 在一些方面,细菌可产生其他吡啶衍生物。如本文所用,“其他吡啶衍生物”是指色氨酸衍生的吡啶代谢物,包括吡啶-3-丙烯酸和吡啶-3-乳酸和吡啶-3-乙酸。

[0051] 在一些方面,组合物可包含赋形剂、载体和/或稀释剂。营养上可接受的赋形剂、载体或稀释剂包括但不限于适于供人类或动物食用的那些,以及标准用于食品行业的那些。典型的营养上可接受的赋形剂、载体或稀释剂是本领域技术人员所熟悉的。

[0052] 在一些方面,用于本文所述的各种不同组合物的此类合适赋形剂的示例可见于由A Wade和P J Weller编辑的“Handbook of Pharmaceutical Excipients”(第2版,1994年)。在一些方面,可接受的载体或稀释剂描述于例如“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., A.R. Gennaro编辑,1985年)中。此类合适的载体包括但不限于甲基纤维素、硬脂酸镁等。此类合适的稀释剂包括但不限于水、乙醇和甘油。

[0053] 药物赋形剂、载体或稀释剂的选择根据预期的给药途径和标准药物或营养实践来选择。在一些方面,除了赋形剂、载体或稀释剂之外,此类组合物还可包含附加成分。此类附加成分包括但不限于任何合适的粘结剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂、防腐剂、染料、调味剂和/或悬浮剂。

[0054] 合适的粘结剂的示例包括但不限于淀粉、明胶、天然糖以及它们的组合。此类天然糖包括但不限于葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂,以及天然和/或合成树胶诸如阿拉伯树胶、黄蓍胶或藻酸钠、羧甲基纤维素和聚乙二醇。合适的润滑剂的示例包括但不限于油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠以及它们的组合。在一些方面,防腐剂、稳定剂、染料和调味剂也在组合物中提供。防腐剂的示例包括但不限于

苯甲酸钠、山梨酸、对羟基苯甲酸的酯以及它们的组合。在一些方面，悬浮剂也可存在于组合物中。

[0055] 在一些方面，组合物可任选地包含一种或多种活性成分。活性成分可包括维生素、矿物质、益生元、聚糖（例如，作为将限制特定细菌/病毒与肠壁结合的诱饵）以及它们的组合。活性成分的非限制性示例可包括维生素C、维生素D、维生素E、维生素K1、维生素K3、维生素B1、维生素B3、叶酸、维生素B12、维生素B3、维生素B7、泛酸、钙、镁、铁、碘、锌、铜、锰、铬、钼、β-胡萝卜素、褪黑激素以及它们的组合。

[0056] 如本文所用，术语“益生元”可为通用术语，是指可影响受试者或宿主中微生物的生长和/或活性（例如，可允许菌群的组成和/或活性的特定变化）并且可赋予受试者健康有益效果的化学品和/或成分。益生元包括但不限于络合碳水化合物、络合糖、抗性糊精、抗性淀粉、氨基酸、肽、营养化合物、生物素、聚右旋糖、低聚果糖（FOS）、低聚半乳糖（GOS）、菊粉、木质素、车前子、甲壳质、脱乙酰壳多糖、树胶（例如瓜尔胶）、高直链玉米淀粉（HAS）、纤维素、β-葡聚糖、半纤维素、乳果糖、甘露低聚糖、甘露寡糖（MOS）、富含低聚果糖的菊粉、低聚果糖、低聚右旋糖、塔格糖、反式低聚半乳糖、果胶和低聚木糖（XOS）。在一些方面，包含抗氧化剂成分诸如例如维生素C作为益生元底物以充当氧气清除剂。诸如这些的益生元底物改善细菌在体内的定植和存活。在一些方面，益生元例如在结肠中选择性地发酵。

[0057] 在各个方面，益生元存在于食品（例如，阿拉伯树胶、瓜尔胶种子、糙米、米糠、大麦壳、菊苣根、洋姜、蒲公英叶、大蒜、韭葱、洋葱、芦笋、麦麸、燕麦麸、烘焙豆类、全小麦粉、香蕉）和母乳中。在一些方面，益生元以其他形式（例如，胶囊或饮食补充剂）施用。

[0058] 取决于具体的活性成分，活性成分的含量可高于、低于和/或等于每日营养推荐量（“RDA”）。许多营养化合物的示例性RDA值在21CFR101中列出，并且另外的RDA值也由美国国家科学院医学研究所（Institute of Medicine of the National Academy of Science）公布。在一些方面，活性成分以相对于组合物的总重量计约0.01重量%至约50重量%的量存在。在一些方面，活性成分可以约0.1重量%至约40重量%、另选地约1重量%至约30重量%、另选地约3重量%至约25重量%、另选地约5重量%至约20重量%的量存在。在一些方面，活性成分可以约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%或50%的量存在。

[0059] 组合物可任选地包含一种或多种草本成分。草本成分的非限制性示例可包括迷迭香（叶）、生姜、柠檬香脂、绿茶、圣罗勒、牛至、百里香、南非醉茄、假马齿苋、春黄菊、缬草以及它们的组合。在一些方面，组合物包含南非醉茄。在一些方面，草本成分可为全草本或植物部分、提取物、粉末、浓缩物或它们的组合。在一些方面，草本成分可为超临界提取物和/或水醇提取物。如本文所用，术语“超临界提取”是指其中可利用超临界流体从样品中提取疏水性化合物的技术。超临界流体的溶剂化能力随着压力和温度增加至其临界点以上而增强，从而产生用于分离疏水性分子的有效溶剂。在一些方面，可使用本领域技术人员已知的方法将草本成分发酵。发酵的草本成分可通过下列方式来制备：收集草本发酵液的上清液并通过本领域任何已知的方法诸如喷雾干燥将混合物干燥。培养基可含有选自以下物质的成分：研磨的有机大豆、酿酒酵母（有机酵母：活性和非活性的）、有机麦芽糖糊精、有机阿拉伯树胶、有机橘皮、有机柠檬皮、有机胡萝卜粉末、有机苜蓿粉末、乳酸杆菌（Lactobacilli）

(嗜酸乳杆菌 (*L.acidophilus*)、双叉乳杆菌 (*L.bifidus*)、鼠李糖乳杆菌 (*L.rhamnosus*)) 和酶(灭活的)以及它们的组合。发酵的草本成分可含有来自培养基的所有或一些成分。

[0060] 在一些方面,组合物可包含约0.1%至约10%、另选地约1%至约8%、另选地约2%至约6%的该一种或多种草本成分,所有百分比均按组合物的重量计。

[0061] 在一些方面,组合物可基本上不含抑制IPA产生的维生素、矿物质和/或草本植物。在一些方面,组合物可基本上不含维生素B2、硒和/或维生素B6。如本文所用,“基本上不含”意指包含按组合物的重量计小于约0.1%、另选地小于约0.05%、另选地小于约0.01%、另选地小于约0.001%。

[0062] 组合物可为本领域已知的任何剂型。剂型的一些非限制性示例可包括局部用剂型、胶囊、丸剂或片剂、软糖、软咀嚼剂、抛光咀嚼剂、小药囊、凝胶、液体、用于重构的散装粉末或由散装粉末制备的饮料等。在一些方面,可将组合物掺入食品和/或饮料的形式中。可掺有组合物的食品和饮料的非限制性示例可包括棒条、奶昔、果汁、饮料、冷冻食物产品、发酵食物产品和培养的乳制品(诸如酸奶、酸奶饮料、奶酪、乳酸菌饮料和开菲尔)。

[0063] 在一些方面,组合物可为饮食补充剂或药物组合物的形式。如本文所用,术语“饮食补充剂”是指旨在补充食品和水的饮食的组合物,其中该饮食足以维持生命。

[0064] 在一些方面,组合物可包含有效向受试者提供健康有益效果的量的该一种或多种细菌和发酵物。在一些方面,有效量是治疗有效量。

[0065] 在一些方面,组合物可被配制使得存在于组合物中的该一种或多种细菌一旦被递送到目标栖息地(例如,肠道)就可复制。在一个非限制性示例中,组合物被配制成为丸剂、粉末、胶囊、片剂、包肠溶衣剂型或包装,使得组合物具有至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47或48个月的储存寿命。在一些方面,将其他组分添加到组合物中以有助于组合物的储存寿命。在一些方面,一种或多种细菌可以允许在非天然环境中存活的方式配制。例如,肠道原生的细菌可能不会在富氧环境中存活。为了克服这种限制,细菌可配制在可减少或消除暴露于氧气的丸剂或包装中。用以延长细菌的储存寿命的其他策略可包括使用其他微生物(例如,如果细菌聚生体包含组合物,由此一种或多种菌株有助于一种或多种菌株的存活)。

[0066] 在一些方面,组合物可被配制可通过任何合适的途径施用给受试者的粉末、片剂、胶囊、包肠溶衣剂型(例如,用于递送到回肠/结肠)或丸剂。冻干制剂可在施用之前与盐水或其他溶液混合。

[0067] 在一些方面,组合物被配制用于口服施用。在一些方面,组合物被配制用于口服施用的粉末、片剂、胶囊、包肠溶衣剂型或丸剂。在一些方面,组合物被配制用于将细菌递送到受试者的回肠区域。在一些方面,组合物被配制用于将细菌递送到受试者的结肠区域(例如,上部结肠)。在一些方面,组合物被配制用于将细菌递送到受试者的回肠和结肠区域。

[0068] 肠溶衣可保护口服制剂(例如片剂或胶囊)的内容物免受胃酸影响,并提供向回肠和/或上部结肠区域的递送。肠溶衣的非限制性示例可包括pH敏感性聚合物(例如Eudragit® FS30D)、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、乙酸琥珀酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸琥珀酸酯(例如乙酸琥珀酸羟丙基纤维素)、聚乙酸乙烯苯二甲酸酯(PVAP)、甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸共聚物、紫胶、偏苯三酸乙酸纤维

素、藻酸钠、玉米醇溶蛋白、其他聚合物、脂肪酸、蜡、紫胶、塑料、植物纤维以及它们的组合。在一些方面，肠溶衣由pH敏感性聚合物形成。在一些方面，肠溶衣由Eudragit® FS30D形成。

[0069] 在一些方面，肠溶衣可被设计成在任何合适的pH下溶解。在一些方面，肠溶衣可被设计成在大于约pH 5.0的pH下，或在大于约pH 6.0的pH下，或在大于约pH 7.0的pH下溶解。在一些方面，肠溶衣可被设计成在大于约pH 5.0至约pH 7.0的pH下溶解。在一些方面，肠溶衣可被设计成在大于约pH 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5的pH下溶解。

[0070] 本文提供的制剂可包括向组合物中添加一种或多种试剂以增强微生物制剂的稳定性和/或存活。稳定剂的非限制性示例可包括遗传因子、甘油、抗坏血酸、脱脂奶、乳糖、吐温、藻酸盐、黄原胶、角叉菜胶、甘露糖醇、棕榈油、聚-L-赖氨酸(POPL)以及它们的组合。

[0071] 在一些方面，组合物可被配制成单位剂型，即含有单位剂量、或多剂量、或单位剂量亚单位的离散部分形式。例如，该一种或多种细菌在人类中的典型或常见的合适或有效剂量为约 $1 \times E3$ ($1 \times E3 = 1 \times 10^3 = 1 \times (10 \text{的} 3 \text{次幂})$) 至约 $1 \times E13$ 菌落形成单位(CFU)。在一些情况下，合适或有效剂量可为约 $1 \times E6$ CFU至约 $1 \times E11$ CFU。在特定情况下，合适或有效剂量可为约 $1 \times E7$ CFU至约 $1 \times E10$ CFU。在一些另外的方面，细菌的合适或有效剂量可为约 $1 \times E2$ CFU、 $1 \times E3$ CFU、 $1 \times E4$ CFU、 $1 \times E5$ CFU、 $1 \times E6$ CFU、 $1 \times E7$ CFU、 $1 \times E8$ CFU、 $1 \times E9$ CFU、 $1 \times E10$ CFU、 $1 \times E11$ CFU、 $1 \times E12$ CFU、 $1 \times E13$ CFU、 $1 \times E14$ CFU或 $1 \times E15$ CFU。

[0072] 该组合物可每天施用一次。另选地，组合物可每天服用两次、另选地每天服用三次、另选地每天服用四次。组合物可随餐服用或空腹服用。组合物可在早晨、中午、下午、晚上或夜间服用。组合物可在每天的相同时间服用，或者服用组合物的时间可变化。使用者可施用一种剂型/剂量组合物，在另一个示例中两种剂型/剂量组合物，在另一个示例中三种剂型/剂量组合物，在另一个示例中四种剂型/剂量组合物，并且在另一个示例中多于四种剂型/剂量组合物。在一些方面，剂量为约0.1毫克(mg)、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1.0mg、约2.0mg、约3.0mg、约4.0mg、约5.0mg、约6.0mg、约7.0mg、约8.0mg、约9.0mg、约10mg、约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约85mg、约90mg、约95mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg或约1克。在一些方面，剂量范围为约1mg至约500mg。

[0073] 在一些方面，组合物可包含益生元，并且组合物的剂量可为约50mg至约5g、另选地约100mg至约4g、另选地约250mg至约2g。

[0074] 在一些方面，相对于组合物的重量，组合物可包含量为约 $1 \times E3$ 菌落形成单位(CFU)/克(g)至约 $1 \times E13$ CFU/g的一种或多种细菌。在一些方面，一种或多种细菌可以约 $1 \times E5$ CFU/g至约 $1 \times E11$ CFU/g的量存在。在一些方面，一种或多种细菌可以约 $1 \times E6$ CFU/g至约 $1 \times E10$ CFU/g的量存在。在一些方面，一种或多种细菌可以约 $1 \times E8$ CFU/g至约 $1 \times E10$ CFU/g的量存在于组合物中。在一些方面，组合物可包含以约 $1 \times E1$ CFU/g、约 $1 \times E2$ CFU/g、约 $1 \times E3$ CFU/g、约 $1 \times E4$ CFU/g、约 $1 \times E5$ CFU/g、约 $1 \times E6$ CFU/g、约 $1 \times E7$ CFU/g、约 $1 \times E8$ CFU/g、约 $1 \times E9$ CFU/g、约 $1 \times E10$ CFU/g、约 $1 \times E11$ CFU/g、约 $1 \times E12$ CFU/g、约 $1 \times E13$ CFU/g、约 $1 \times E14$ CFU/g或约 $1 \times E15$ CFU/g的量存在的一种或多种细菌。

[0075] 适用于与本文所述的组合物一起使用的容器可包括例如罐、广口瓶、瓶子、具有摇

动器盖的瓶子、研磨机、小瓶、注射器、管、小袋、小药囊、袋、泡罩卡或折叠物。容器可由多种材料形成,该多种材料包括但不限于玻璃、塑料、聚合物、金属、合金、金属或合金箔、橡胶、硬纸板或纸材。容器还可包括密封剂,该密封剂可由适用于本领域的任何材料诸如树脂或聚合物形成。容器可包括防潮层和/或隔氧层以进一步增强益生菌在储存期间的活力。防潮层和隔氧层在制药和食品行业中是已知的。适用于本发明的阻隔层描述于授予Vadhar的美国专利6,716,499、授予Shah的美国专利6,524,720、授予Bonner等人的美国专利5,792,530和授予Bettie等人的美国专利4,977,004中。除了此类阻隔层之外或代替此类阻隔层,容器可包括氧气清除剂和/或干燥剂/吸收水分化合物。合适的氧气清除剂和干燥剂是本领域已知的,例如授予Yan等人的美国专利6,746,622、授予Ebner等人的美国专利6,387,461、授予Ebner等人的美国专利6,228,284以及授予Hekal的美国专利6,130,263。

[0076] 本文还描述了提供一种或多种健康有益效果的方法,该方法包括使用者口服本发明的组合物。在一些方面,该一种或多种健康有益效果可选自促进大脑健康;促进大脑的健康老化;通过大脑健康促进情感健康;向大脑递送抗氧化营养物质;管理大脑中的氧化应激反应;减弱和/或维持大脑中的氧化应激反应或总抗氧化能力;通过递送抗氧化剂来保护神经元;以及上述有益效果的任何组合。在一些方面,该一种或多种健康有益效果可选自促进大脑健康;促进大脑的健康老化;向大脑递送抗氧化营养物质;管理大脑中的氧化应激反应;以及上述有益效果的任何组合。

[0077] 本文还描述了增加对其有需要的受试者的胃肠道和/或血清中的IPA的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的组合物。

[0078] 本文还描述了用于通过减少对其有需要的受试者的神经炎症和神经退行性变来优化健康神经系统的肠脑轴的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的组合物。

[0079] 本文还描述了用于治疗、改善或预防患有疾病或处于患有疾病风险中的受试者的疾病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文所述的组合物。在一些方面,疾病可以是肠疾病、代谢紊乱、炎症病症或免疫障碍。在一些方面,疾病可以是代谢综合征、胰岛素抗性、胰岛素敏感症、前驱糖尿病、糖尿病、焦虑症、抑郁症、自闭症、高血压、肠易激综合征、代谢异常、应激相关病症、神经疾病(诸如帕金森氏病)、炎症肠病(IBD)、克隆氏病、心脏病或神经系统紊乱(诸如多发性硬化症)。

[0080] 发酵物测试

[0081] 将不同的发酵物组合物与产芽胞梭状芽胞杆菌(*C. sporogenes*)一起温育以评估对IPA产量的影响。在样品1-11中,将通过使发酵培养基(如表1中所述)或未发酵的对照培养基发酵制备的不同发酵物粉末与产芽胞梭状芽胞杆菌一起温育,并测量IPA产量。发酵物粉末得自Pharmachem Laboratories (Kearny, NJ)。样品10是阳性对照,其中产芽胞梭状芽胞杆菌与蛋白胨酵母葡萄糖培养基(可从Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 商购获得)一起温育。样品11是色氨酸对照,其中产芽胞梭状芽胞杆菌与含有色氨酸、维生素和痕量元素的溶液一起温育。将样品11用作对照以评估发酵物中的色氨酸(细菌的底物以产生IPA)对IPA产量的影响。样品11含有150 μ g/mL色氨酸,其对应于在样品1-9的发酵物粉末中测量的色氨酸的水平。据信,在培养基的发酵期间,产生色氨酸并且可在最终发酵物组合物中测量色氨酸。

[0082] 产芽胞梭状芽胞杆菌ATCC 15579在10mL蛋白胨酵母葡萄糖(“PYG”)培养基(可从Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)商购获得)中于36℃下厌氧生长24小时。将24小时培养物的10mL样品(大约 1×10^8 /mL)以 $10,000 \times g$ 离心5分钟。移除上清液,并将产芽胞梭状芽胞杆菌粒料重悬于10mL盐水中以洗涤细菌。然后将样品以 $10,000 \times g$ 离心5分钟。移除上清液,并将产芽胞梭状芽胞杆菌粒料重悬于10mL盐水中以形成种菌制剂。将10mL盐水添加到22个无菌玻璃管中的每一个无菌玻璃管中。一式两份,将1%(0.1克)发酵物添加到这些玻璃管中的一个玻璃管中。

[0083] 然后将100 μ l种菌制剂厌氧转移到这些玻璃管中的每个玻璃管中。将100 μ l产芽胞梭状芽胞杆菌厌氧转移到10mL PYG培养基中,作为阳性对照(样品10)。将100 μ l产芽胞梭状芽胞杆菌厌氧转移到含有150 μ g/mL色氨酸、1%维生素补充剂ATCC[®]MD-VS[™](可从ATCC(Manassas,VA)商购获得)和1%痕量矿物质补充剂ATCC[®]MD-TMS[™](可从ATCC(Manassas,VA)商购获得)的10mL基础培养基中,作为色氨酸对照(样品11)。然后,将玻璃管转移到厌氧室中的36℃箱中保持24-28小时。温育后,将所有管从室中取出并以 $8,000 \times g$ 离心。将上清液取出并通过0.2 μ m注射过滤器过滤到无菌玻璃管中。将0.5mL的每种上清液一式两份置于2.2mL深孔板中。然后将板密封并包裹在箔中,直到进行IPA分析。IPA根据下文所述的IPA测量方法来测量。

[0084] 表1汇总了来自该测试的结果。按照相同的方案在不同时间测试样品1-10和11;然而,为了便于比较,将数据一起示出。

[0085] 表1

[0086]	样品	培养基组分	平均 IPA (μ g/mL)	标准 偏差
	1	阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌	10.60	0.28
	2	阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶	9.76	0.28
	3	维生素 B2、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌	5.11	0.21
	4	维生素 B2、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和	4.97	0.04

[0087]

	非活性的]、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶		
5	硒、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌	1.96	0.08
6	硒、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶	1.73	0.01
7	维生素 A、维生素 C、维生素 D3、维生素 E、维生素 K、硫胺素、核黄素、烟酸、维生素 B6、叶酸、维生素 B12、生物素、泛酸、钙、铁、碘、镁、锌、硒、铜、锰、铬、钼、应力和能量支持共混物（有机五味子、有机玛卡、有机春黄菊）、激素支持共混物（有机贞洁树、有机红三叶草、有机树莓）、免疫支持共混物（欧洲接骨木提取物、有机刺五加、有机黄芪）、姜水-乙醇提取物、有机姜黄粉末、有机姜超临界提取物、有机姜黄超临界提取物、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌 ¹	0.66	0.02
8	维生素 B6、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶	0.663	0.11
9	维生素 B6、阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌	0.53	0.09
10（阳性对照）	蛋白胨酵母葡萄糖（“PYG”）培养基	4.74	0.67
11（色氨酸对照）	含有 150μg/mL 色氨酸、1%维生素补充剂 ATCC [®] MD-VS [™] 和 1%痕量矿物质补充剂 ATCC [®] MD-TMS [™] 的基础培养基	0.28	0.08

[0088] ¹以与可商购获得的Everyday Women's One Daily Multivitamin产品(New Chapter, Inc. (Brattleboro, VT)) 相同的方式制备的发酵物粉末。

[0089] 据发现,产芽胞梭状芽胞杆菌在与特定发酵物组合物一起温育后产生升高水平的IPA。样品1和2分别具有10.60μg/mL和9.76μg/mL的IPA水平,比样品11(色氨酸对照)高至少30倍。不受理论的限制,据信样品1和2中的发酵物组合物提供显著提高IPA产量的生长因子。

[0090] 实验设计中还包括阳性对照以确认来自先前文献的研究结果,即产芽胞梭状芽胞杆菌确实在生长培养基诸如PYG中产生IPA。在这种情况下,IPA产量为4.74μg/mL(实施例10),少于样品1和2中产生的IPA的一半。

[0091] 粪便材料测试

[0092] 将上述样品1中测试的发酵物组合物与产芽胞梭状芽胞杆菌一起在粪便材料中温育,以评估对IPA产量的影响。由于观察到样品1中的发酵物组合物与产芽胞梭状芽胞杆菌的纯培养物一起温育产生最高量的IPA,因此目的是确定产芽胞梭状芽胞杆菌与相同发酵物的温育在复杂粪便微生物群落的背景下是否仍产生升高水平的IPA。

[0093] 产芽胞梭状芽胞杆菌ATCC 15579在10mL PYG培养基中于36℃下厌氧生长24小时。将24小时培养物的10mL样品(大约1×E8/mL)以10,000×g离心5分钟。移除上清液,并将产

芽胞梭状芽胞杆菌粒料重悬于10mL盐水中以洗涤细菌。然后将样品以 $10,000 \times g$ 离心5分钟。移除上清液,并将产芽胞梭状芽胞杆菌粒料重悬于10mL盐水中以形成种菌制剂。

[0094] 将来自28名个体供体的粪便样品用于该测定中。先前已将样品各自等分为约1克,并在 -80°C 下冷冻。对于该测定,将来自每名供体的4管粪便等分试样解冻并添加到40mL盐水培养基中。将样品剧烈涡旋2分钟。由此,将10mL的每种粪便溶液等分到4个单独的无菌玻璃试管中并标记为“仅粪便”(样品12)、“粪便+产芽胞梭状芽胞杆菌”(样品13)、“粪便+发酵物”(样品14)和“粪便+产芽胞梭状芽胞杆菌+发酵物”(样品15)。“粪便+产芽胞梭状芽胞杆菌”管添加有100 μL 的如上制备的产芽胞梭状芽胞杆菌。“粪便+发酵物”管添加有0.1克发酵物。“粪便+产芽胞梭状芽胞杆菌+发酵物”添加有0.1克发酵物和100 μL 如上制备的产芽胞梭状芽胞杆菌。

[0095] 制备后,将样品转移到厌氧室中的 36°C 箱中保持24-28小时。温育后,将所有样品从室中取出并以 $8,000 \times g$ 离心。将上清液取出并通过0.2 μm 注射过滤器过滤到无菌玻璃管中。将0.5mL的每种上清液一式两份置于2.2mL深孔板中。然后将板密封并包裹在箔中,直到进行IPA分析。IPA根据下文所述的IPA测量方法来测量。

[0096] 表3汇总了来自该测试的结果。

[0097] 表3:粪便材料中的IPA产量

[0098]	样品	产芽胞梭状芽胞杆菌	粪便材料	发酵物	平均 IPA ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	12	否	是	无	0.18 ²
[0099]	13	否	是	A	0.25 ³
	14	是	是	无	2.51
	15	是	是	A	4.76

[0100] 2具有可检测IPA的4次平行测定的平均值。

[0101] 3具有可检测IPA的6次平行测定的平均值。

[0102] 据发现,在粪便材料中添加产芽胞梭状芽胞杆菌与来自上述样品1的发酵物的组合可产生升高水平的IPA。样品14(产芽胞梭状芽胞杆菌+粪便材料)具有2.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IPA水平。样品15(产芽胞梭状芽胞杆菌+粪便材料+发酵物)具有4.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平均IPA水平。预期来自上述样品2的发酵物在添加到存在产芽胞梭状芽胞杆菌的粪便样品中时表现相似。

[0103] IPA测量方法

[0104] 通过向100 μL 样品中添加300 μL MeOH使生物样品经受蛋白质沉淀。将样品涡旋并使用台式离心机诸如Beckman Coulter Allegra[®] X15R(转子SX4750A)或等同仪器以3000rpm离心10分钟,以将蛋白质和其他沉淀物制成粒料。将150 μL 上清液连同30 μL 10ng/mL 吡啶-3-丙酸-2,2-d₂(IPA-d₂)和150 μL 水转移到96孔深孔板中。对于其他基质(包括但不限于细菌细胞培养物滤液和发酵物)中的样品,用10%MeOH水溶液使样品经受1000倍稀释。将30 μL 10ng/mL IPA-d₂添加到300 μL 稀释样品中。分离/稀释的样品中的IPA和IPA-d₂在Waters Atlantis T3柱(得自Waters Corp.(Milford,MA))或等同柱(2.1mm $\times$ 50mm,3 μm 颗粒)上经受梯度高效液相色谱(HPLC)分析,0.1%甲酸水溶液作为流动相A,0.1%甲酸的乙腈溶液作为流动相B。通过串联质谱法在多反应监测(MRM)MS/MS条件(对于IPA来说,条件为

m/z 190.1→130.0,对于IPA-d2来说,条件为m/z 192.1→130.0)下操作来实现检测和定量。使用在10%MeOH水溶液中制备的IPA校准标准物(STD)通过绘制每种标准物的应答(峰面积IPA/峰面积IPA-d2)对浓度构建回归曲线。由二次($1/x^2$)回归曲线通过内插法确定样品中IPA的浓度。

[0105] 实施例

[0106] 下列实施例进一步描述和证明了本发明范围内的实施方案。这些实施例仅为了例证目的而给出并且不可被理解为是对本发明的限制,因为在不脱离本发明的实质和范围的情况下可能有许多变型。

[0107] 以下组合物可根据本发明制备:

成分	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
	重量%	重量%	重量%	重量%	重量%
产芽胞梭状芽胞杆菌 (1E11 CFU/g)	5.0	5.0	5.0	4.0	6.0
[0108] 发酵物 A	0	0	10.0	10.0	10.0
发酵物 B	15.0	10.0	0	0	0
微晶纤维素	10.0	50.0	83.5	84.5	82.5
羟丙基甲基纤维素	69.5	34.0	0	0	0
硬脂酸镁	0.5	1.0	1.5	1.5	1.5

成分	实施例6	实施例7	实施例8	实施例9
	重量%	重量%	重量%	重量%
产芽胞梭状芽胞杆菌 (1E11CFU/g)	5.0	5.0	5.0	5.0
发酵物A	15.0	0	10.0	0
发酵物B	0	10.0	0	10.0
微晶纤维素	70.0	42.0	74.0	10.0
羟丙基甲基纤维素	9.0	42.0	10.0	74.0
硬脂酸镁	1.0	1.0	1.0	1.0

[0110] 实施例1-9可根据以下方法制备。

[0111] 发酵物A可根据美国专利6,806,069中所述的发酵方法,通过发酵含有阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌和鼠李糖乳杆菌的发酵培养基来制备。

[0112] 发酵物B可根据美国专利6,806,069中所述的发酵方法,通过发酵含有阿拉伯树胶、大豆粉、酿酒酵母[活性和非活性的]、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶的发酵培养基来制备。

[0113] 所得的发酵产物可通过喷雾干燥脱水以形成粉末状发酵物。另选地,可将发酵产物喷入液氮中以产生冷冻珠。可通过冻干将冷冻珠干燥,然后研磨来以产生粉末状发酵物。

[0114] 可将粉末状发酵物称重并装载到粉末共混机诸如适当尺寸的“V”共混机中。然后将产芽胞梭状芽胞杆菌称重并装载到粉末共混机中。可将微晶纤维素(USP)和羟丙基甲基纤维素(USP,羟丙甲纤维素)(如果制剂中存在的话)分别筛分、称重并装载到粉末共混机中。可进行共混直至获得发酵物、产芽胞梭状芽胞杆菌和赋形剂的均匀共混物,通常混合可进行100-500转。可将硬脂酸镁(USP)筛分并装载到粉末共混机中。硬脂酸镁可通过共混通常少于100转而掺入发酵物粉末中。

[0115] 可将最终共混物装载到配备有胶囊抛光机的旋转封装器的粉末进料斗中。可将明胶或羟丙基甲基纤维素胶囊装载到胶囊料斗中。胶囊可填充有最终共混物并进行抛光。另选地,可将最终共混物装载到配备有小袋密封器的小袋填充器中,并且可装载小袋材料。可填充并密封小袋。

[0116] 组合

[0117] 1. 一种组合物,该组合物包含:(a) 一种或多种细菌,该一种或多种细菌具有与SEQ ID NO:1的核酸序列具有至少80%同源性的核酸序列;(b) 发酵物,该发酵物包含酵母;以及(c) 赋形剂、载体和/或稀释剂。

[0118] 2. 根据段落A所述的组合物,其中该一种或多种细菌选自产芽胞梭状芽胞杆菌、厌氧消化链球菌、尸毒梭状芽胞杆菌、粗体梭状芽胞杆菌以及它们的组合。

[0119] 3. 根据段落A或B所述的组合物,其中发酵物还包含一种或多种蛋白水解酶。

[0120] 4. 根据段落A-C中任一项所述的组合物,其中发酵物还包含选自碳水化合物、大豆粉以及它们的组合的附加营养物质。

[0121] 5. 根据段落A-D中任一项所述的组合物,其中发酵物还包含至少一种乳酸菌或双歧杆菌。

[0122] 6. 根据段落E中任一项所述的组合物,其中乳酸菌或双歧杆菌选自嗜酸乳杆菌、双歧双歧杆菌、鼠李糖乳杆菌以及它们的混合物。

[0123] 7. 根据段落A-F中任一项所述的组合物,其中组合物包含 $1 \times E3$ 菌落形成单位(CFU)至 $1 \times E11$ CFU的该一种或多种细菌。

[0124] 8. 根据段落A-G中任一项所述的组合物,其中组合物包含1mg至2g的发酵物。

[0125] 9. 根据段落A-H中任一项所述的组合物,其中该一种或多种细菌在36℃下与发酵物厌氧体外温育24小时后产生至少5μg/mL的吲哚-3-丙酸(IPA)。

[0126] 10. 根据段落A-I中任一项所述的组合物,其中组合物还包含活性剂。

[0127] 11. 根据段落A-J中任一项所述的组合物,其中组合物还包含草本成分。

[0128] 12. 根据段落A-K中任一项所述的组合物,其中组合物为益生菌组合物。

[0129] 13. 根据段落A-L中任一项所述的组合物,其中该一种或多种细菌为产芽胞梭状芽胞杆菌。

[0130] 14. 一种促进大脑健康的方法,该方法包括向对其有需要的个体施用根据段落A所述的组合物。

[0131] 15. 一种将抗氧化营养物质递送到大脑的方法,该方法包括向对其有需要的个体施用根据段落A所述的组合物。

[0132] 本文所公开的量纲和值不应理解为严格限于所引用的精确数值。相反,除非另外指明,否则每个此类量纲旨在表示所述值以及围绕该值功能上等等的范围。例如,公开为“40mm”的量纲旨在表示“约40mm”。

[0133] 本文所公开的作为范围端值的值不应被理解为严格限于所引用的精确数值。相反,除非另外指明,否则每个数值范围均旨在表示所引用的值和所述范围内的任何实数包括整数。例如,公开为“1至10”的范围旨在表示“1、2、3、4、5、6、7、8、9和10”,并且公开为“1至2”的范围旨在表示“1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9和2”。

[0134] 除非明确排除或以其他方式限制,本文中引用的每一篇文献,包括任何交叉引用

或相关专利或专利申请以及本申请对其要求优先权或其有益效果的任何专利申请或专利，均据此全文以引用方式并入本文。对任何文献的引用不是对其作为与本发明的任何所公开或本文受权利要求书保护的现有技术的认可，或不是对其自身或与任何一个或多个参考文献的组合提出、建议或公开任何此类发明的认可。此外，当本发明中术语的任何含义或定义与以引用方式并入的文献中相同术语的任何含义或定义矛盾时，应当服从在本发明中赋予该术语的含义或定义。

[0135] 虽然已举例说明和描述了本发明的具体实施方案，但是对于本领域技术人员来说显而易见的是，在不脱离本发明的实质和范围的情况下可作出各种其他变化和修改。因此，本文旨在于所附权利要求中涵盖属于本发明范围内的所有此类变化和修改。

序列表

[0001]	<110>	宝洁公司 Venkataraman, Arvind Brewster, Chelsay L. Kozak, Kimberly C. Li, Lijuan	
	<120>	用以支持健康的大脑功能的组合物	
	<130>	15496P	
	<160>	1	
	<170>	PatentIn 3.5版	
	<210>	1	
	<211>	4896	
	<212>	DNA	
	<213>	产芽胞梭状芽胞杆菌	
	<300>		
	<301>	Dickert, S., Pierik, A.J. and Buckel, W.	
	<302>	来自产芽胞梭状芽胞杆菌的(r)-苯乳酸脱水酶及其激活组分A的分子表征	
	<303>	Laboratorium fuer Mikrobiologie	
	<304>	44	
	<305>	1	
	<306>	49-60	
	<307>	2002-04-01	
	<308>	AF420489	
	<309>	2016-07-26	
	<400>	1	
		aattcccttt aacagataca ggtaaaatta agaggcatga actaaaaaaa tgctttgaaa	60
		agaagtttga attaagacaa tctattttaa ttaataataa atatattaaa ttaacaataa	120
		atatattaaa ttaacaataa atctatttaa ggaggctttt tttatggaaa acaatacaaa	180
		tatgttttagt ggagtaaagg ttattgaatt agcaaatttt atagctgctc cagcagcagg	240
		tagatttttt gctgatggtg gtgcagaggt aataaaaatt gaatcacctg ctggagatcc	300
		tttaagatat actgctcctt cagaaggaag accattaagc caagaagaaa atactactta	360
		tgattttggaa aatgcaaata aaaaagcaat agtattaaat cttaaaagcg aaaaaggtaa	420
		aaagatatta catgaaatgt tagcagaagc agatatatta ttaactaatt ggagaacaaa	480
		ggcttttagtt aaacaaggat tagactatga aacactaaaa gaaaaatata ctaaattagt	540
		ttttgcacaa ataactggtt atggtgaaaa aggaccagat aaagatcttc caggctttga	600
		ttatactgca tttttcgcta gaggcggtgt ttcaggtact ctttatgaaa aaggaactgt	660
		gcctccaaat gttgttccag gacttggaga ccatcaagct gggatgtttt tagcagcggg	720

	tatggcagga gctttatata aagcaaaaac aacaggacaa ggagataaag taacagtaag	780
	tttaatgcat agtgctatgt atggactagg tattatgata caagctgctc aatataaaga	840
	tcatggatta gtatatccga taaatcgtaa tgaaactcca aatcctttta tagtttcata	900
	taaatctaag gatgattact ttgttcaagt atgtatgcca ccatatgatg ttttctatga	960
	tagatttatg accgcttttag gaagagaaga tttagttgga gacgaaagat acaataaaat	1020
	agaaaattta aaagatggac gtgctaagga agtatacagt ataatcgaac aacaaatggt	1080
	tacaaagaca aaggatgaat gggataacat atttagagat gcagacattc catttgctat	1140
	cgcacaaact tgggaagatt tattagaaga tgaacaagct tgggcaaatg attatttgta	1200
	taagatgaaa tatccaacag gaaacgaaag agcattagta agacttccag tattctttaa	1260
	agaagcagga ttaccagaat ataatcaatc accacaaata gcagaaaata ctgtagaagt	1320
	tttaaaagaa atgggatata cagaacaaga gattgaggaa ttagaaaaag ataaagatat	1380
	aatggtaagg aaggaaaaat aatggcagac atttatacta tgggtgtaga cataggttca	1440
	actgcatcaa aaacagtagt attaaaaat ggtaaagaaa ttgtaagtca agcagtaata	1500
	agtgtagggg ccggaacaag tggccccaag agagctatag attctgtatt aaaagatgct	1560
[0002]	aaattatcca ttgaagattt agactatatt gtatccactg gatatggaag aaatagtttc	1620
	gattttgcta acaaacaaat ttctgaatta agttgtcatg caaaaggggt ctatttcgat	1680
	aacaataaag ctagaacagt tattgatata ggcggacaag atattaaagt attaaaatta	1740
	gcggatagtg gaagactttt aaactttata atgaatgata aatgtgctgc aggaacggga	1800
	cgatttttag atgtaatgtc tagagtaata gaagttccag ttgatgagtt aggaaaaaaa	1860
	gcattagaaa gcaaaaatcc ttgtactatt agttctacct gtacagtatt tgcagagtca	1920
	gaagtaattt ctcaacttgc aagaggagtt aaaactgaag atttgatagc aggaatttgt	1980
	aaatctgtag catcaagagt ggctagcctt gcaaagagaa gtggtataga agaattagta	2040
	gttatgagtg gaggagtagc taaaaatata ggtgtagtaa aggcaatgga agcagaattg	2100
	ggaagagaca tatatatatc taaaaattct caattaaatg gagcattggg agcaagtcta	2160
	tacgcttatg aaagttttca aaaagaaagg agctaaaaac atgagtgata gaaataagga	2220
	agtaaaagaa aaaaaggcaa agcattatct tagagagatt actgcaaagc attacaaaga	2280
	agctctcgaa gcaaaagaaa ggggagaaaa gggttggttg tgtgcatcta acttcccaca	2340
	agaaatagct acaacattgg gggtaaaagt tgtttatcca gaaaatcatg cagcagctgt	2400
	agcagctaga gggaatggac aaaatatgtg tgaacatgct gaggctatgg gtttttctaa	2460

[0003]	tgatgtatgt ggttatgcaa gagtaaattt agctgttatg gacataggtc atagtgaaga	2520
	tcaaccaata cctatgccag actttgtact ttgctgtaat aacatttgta atcaaagtat	2580
	taaatggtat gagcatatag caaaaacttt agatatacca atgattctta tagatatacc	2640
	atacaataca gaaaatactg tttcacaaga tagaattaaa tatattagag cacaatttga	2700
	tgatgcaata aaacaattgg aagaaataac aggcaaaaaa tgggatgaaa ataaatttga	2760
	agaagttatg aaaatatccc aagaaagtgc aaaacaatgg ttaagagcag catcctatgc	2820
	aaagtataaa ccttcaccat ttagcggatt tgatttattt aatcatatgg ctgtagcagt	2880
	ttgtgcaaga ggtacacaag aagctgcaga tgcatttaag atgttagcag atgaatatga	2940
	ggagaatgta aaaactggaa aatccactta taggggagaa gaaaaacaac gtatattatt	3000
	tgaagggatt gccgtttggc catatttgag acataaatta actaagctta gtgaatatgg	3060
	tatgaacgta actgcaactg tatacgcaga agccttttgg gttatatatg agaatatgga	3120
	tgaattaatg gctgcttata ataaagttcc taattcaatt agttttgaaa acgcattaaa	3180
	aatgagatta aatgctgtta caagcactaa tacagaaggt gctgttattc atataaatag	3240
	aagctgtaaa ttatggagtg gatttttata tgagctagca agaagattag aaaaggaaac	3300
	aggaattcct gtagtatcat ttgatgggga ccaggcagac ccaagaaatt tctcagaagc	3360
	tcaatatgat actagaattc aaggacttaa tgaagtaatg gttgctaaaa aggaggctga	3420
	ataagatgtc aaattcagat aaatttttta atgactttta ggatattgta gaaaatccta	3480
	aaaaatatat aatgaagcat atggaacaaa ctggacaaaa ggctatagga tgtatgccat	3540
	tatatactcc tgaggaactt gtattagctg ctggaatggt tccagtaggg gtatggggaa	3600
	gcaatacaga actttcaaaa gctaaaacat atttcccagc atttatttgt tcaatattac	3660
	aaacaacatt ggaaaatgca ttaaatggag aatatgatat gttatctggt atgatgatta	3720
	caaattattg tgattcatta aatgcatgg gacaaaattt taaactaacc gttgaaaata	3780
	ttgagtttat ccagtaaca gttccacaaa atagaaaaat ggaagctgga aaagagtttt	3840
	taaaaagtca atataaaatg aatattgagc aattagaaaa gatttctggt aataaaataa	3900
	cagatgaatc tttagaaaaa gctatagaaa tatatgatga acacagaaaa gtaatgaatg	3960
	acttttcaat gtagcatca aaatatccag gtataataac accaactaaa cgtaattatg	4020
	ttatgaaatc tgcttattat atggataaaa aagaacatac tgaaaaagtt agacaattaa	4080
	tggatgaaat taaagctata gaacaaaaac catttgaagg aaagagagtt ataactacag	4140

	gtataattgc agattcagaa gatttactta aaatattaga agaaaataat atagctatag	4200
	ttggtgatga tatagcacat gaatctagac aatatagaac attgactcca gaagcgaaca	4260
	caccaatgga taggttagct gagcaatttg ctaatagaga atgtagtact ttatatgatc	4320
	ctgaaaagaa aaggggtcaa tatatagtag aaatggctaa agagagaaaa gcagatggaa	4380
	ttatatTTTT catgacaaaa ttctgtgacc cagaggaata tgattatcca caaatgaaaa	4440
	aggatTTTga agaagcaggc attccacatg tactaataga aactgatatg caaatgaaaa	4500
[0004]	attatgaaca agctagaact gcaattcagg cTTTTcaga aacactTTaa taaaagTTTT	4560
	caatattTtac tgtaaactTT attaatTgaa acattgattt ctcttctctt tctataaaat	4620
	aatatttata tttaaaaaag ttatgttttag atggatgaaa ggaaatcaat gttcatataa	4680
	attaacaaat tcattaatat attaggaggg atataatgtt tttcacagaa caacatgaac	4740
	ttattagaaa attagcaaga gattttgcag agcaggaaat agagcctatt gcagatgaag	4800
	tagataaaac tgccgagttc cctaaagaaa ttgtgaaaaa aatggcccaa aatggtTTTT	4860
	ttggaataaa aatgcctaaa gaatatggtg gagctg	4896