

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 03148382.8

[51] Int. Cl.

A61K 36/06 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 9 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1275603C

[22] 申请日 2003.6.30 [21] 申请号 03148382.8

[30] 优先权

[32] 2002.6.28 [33] US [31] 10/184,749

[71] 专利权人 欧亚生物科技有限公司

地址 英国曼岛道格拉斯

[72] 发明人 张令玉

审查员 程心旻

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 陈文平

权利要求书 5 页 说明书 27 页 附图 2 页

[54] 发明名称

用于 HIV 感染者的口服组合物

[57] 摘要

本发明涉及能对人类免疫缺陷病毒感染者产生有益健康效果的含有酵母细胞的口服组合物。本发明还涉及制造该生物组合物的方法和使用该组合物的方法。

1. 一种用于 HIV 感染者的含有活化酵母细胞的生物组合物, 其中所述酵母细胞通过包含任何顺序的下列步骤的方法制备:

(a) 在频率为 7845 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第一电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(b) 在频率为 7879 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第二电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(c) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 325 - 366 mV/cm 的第三电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(d) 在频率为 12842 ± 0.5 MHz 和场强为 386 - 412 mV/cm 的第四电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(e) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 290 - 320 mV/cm 的第五电磁场或电磁场组中培养酵母细胞。

2. 一种用于 HIV 感染者、含有活化并调理的酵母细胞的生物组合物, 其中所述酵母细胞通过包含任何顺序的下列步骤的方法制备:

(a) 在频率为 7845 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第一电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(b) 在频率为 7879 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第二电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(c) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 325 - 366 mV/cm 的第三电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(d) 在频率为 12842 ± 0.5 MHz 和场强为 386 - 412 mV/cm 的第四电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(e) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 290 - 320 mV/cm 的第五电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

在上述五个步骤最后一步完成后, 还包含任何顺序的下列步骤:

(f) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 380 - 420 mV/cm 的第六电磁场或电磁场组中, 在含有野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中

培养酵母细胞；以及

(g) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 340 – 380 mV/cm 的第七电磁场或电磁场组中，在含有野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中培养酵母细胞。

3. 一种用于 HIV 感染者、含有活化并调理的酵母细胞的生物组合物，其中所述酵母细胞通过包含如下步骤的方法制备：在任何顺序的下述电磁场存在下，在含有野山楂汁、酸枣汁、五味子汁和大豆汁的液体培养基中培养权利要求 2 的活化并调理的酵母细胞：

(h) 频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 210 – 450 mV/cm 的第八电磁场；和

(i) 频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 120 – 400 mV/cm 的第九电磁场或电磁场组。

4. 权利要求 1、2 或 3 的生物组合物，其中所述活化的、或活化并调理的酵母细胞是酵母属的细胞。

5. 权利要求 1、2 或 3 的生物组合物，其中所述活化的、或活化并调理的酵母细胞是酿酒酵母菌株 AS2.558 的细胞。

6. 权利要求 1、2 或 3 的生物组合物，其中所述活化的、或活化并调理的酵母细胞的浓度为每毫升 10^3 个细胞。

7. 权利要求 1、2 或 3 的生物组合物，其中所述活化的、或活化并调理的酵母细胞是干燥的。

8. 含有权利要求 2 或 3 的活化并调理的酵母细胞的组合物，其中所述活化并调理的酵母细胞被包装为固体剂型。

9. 权利要求 8 的组合物，其中每个固体剂量形式含有 5×10^5 到 7×10^5 个酵母细胞。

10. 一种用于 HIV 感染者的药物组合物，其含有权利要求 2 或 3 的活化并调理的酵母细胞和药物可接受的载体。

11. 一种用于 HIV 感染者的饮食补充剂，其含有权利要求 2 或 3 的活化并调理的酵母细胞和选自下组的一种或多种成分：维生素、氨基酸、金属螯合物、植物提取物、着色剂、增味剂和防腐剂。

12. 一种用于 HIV 感染者的营养组合物, 其含有权利要求 2 或 3 的活化并调理的酵母细胞和选自下组的食物: 果汁饮料、茶饮料、乳制品、大豆制品和稻米制品。

13. 一种制备含活化酵母细胞的生物组合物的方法, 所述方法包括任何顺序的下列步骤:

a) 在频率为 7845 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第一电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

b) 在频率为 7879 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第二电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

c) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 325 - 366 mV/cm 的第三电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

d) 在频率为 12842 ± 0.5 MHz 和场强为 386 - 412 mV/cm 的第四电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

e) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 290 - 320 mV/cm 的第五电磁场或电磁场组中培养酵母细胞。

14. 一种制备含有活化并调理的酵母细胞的生物组合物的方法, 所述方法包括任何顺序的下列步骤:

a) 在频率为 7845 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第一电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

b) 在频率为 7879 ± 0.5 MHz 和场强为 270 - 310 mV/cm 的第二电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

c) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 325 - 366 mV/cm 的第三电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

d) 在频率为 12842 ± 0.5 MHz 和场强为 386 - 412 mV/cm 的第四电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

e) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 290 - 320 mV/cm 的第五电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

在上述五个步骤最后一步完成后, 还包含任何顺序的下列步骤:

f) 在频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 380 - 420 mV/cm 的第六

电磁场或电磁场组中，在含有野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中培养酵母细胞；以及

g) 在频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 340 – 380 mV/cm 的第七电磁场或电磁场组中，在含有野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中培养酵母细胞。

15. 一种制备含活化并调理的酵母细胞的生物组合物的方法，所述方法包括在所述顺序的下述电磁场存在下，在含有野山楂汁、酸枣汁、五味子汁和大豆汁的液体培养基中培养按权利要求 13 的方法制备的活化并调理的酵母细胞：

(h) 频率为 10141 ± 0.5 MHz 和场强为 210 – 450 mV/cm 的第八电磁场；和

(i) 频率为 12866 ± 0.5 MHz 和场强为 120 – 400 mV/cm 的第九电磁场或电磁场组。

16. 权利要求 14 或 15 的方法，其还包括在培养步骤后干燥所述活化并调理的酵母细胞。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述干燥步骤包括 (i) 在不超过 65 °C 的温度下干燥一段时间使酵母细胞休眠；和 (b) 在不超过 70 °C 的温度下干燥一段时间以将水分含量减低到 5 % 以下。

18. 权利要求 2 或 3 的生物组合物在制备用于减轻人的 HIV 感染和/或艾滋病严重程度的药中的应用。

19. 权利要求 2 或 3 的生物组合物在制备用于提高患有 HIV 感染和/或艾滋病的人体内 CD4⁺ 细胞计数的药中的应用。

20. 权利要求 2 或 3 的生物组合物在制备用于延长 HIV 感染的人生存时间的药中的应用。

21. 权利要求 13、14 或 15 的方法，其中生物组合物中的所述酵母细胞为酵母属的细胞。

22. 权利要求 13、14 或 15 的方法，其中生物组合物中的所述酵母细胞为酿酒酵母细胞。

23. 权利要求 18 的应用，其中生物组合物中的所述酵母细胞为酿

酒酵母细胞。

24. 权利要求 19 的应用，其中生物组合物中的所述酵母细胞为酿酒酵母细胞。

25. 权利要求 20 的应用，其中生物组合物中的所述酵母细胞是酿酒酵母细胞。

用于 HIV 感染者的口服组合物

1. 发明领域

本发明涉及可以对人免疫缺陷病毒感染者产生有益健康效果的含有酵母细胞的口服组合物。本发明还涉及制造这种口服组合物的方法以及这种组合物的使用方法。

2. 发明背景

2.1 艾滋病

艾滋病 (AIDS, 获得性免疫缺陷综合症) 自 1981 年美国首次报道以来, 已成为一种世界性的主要流行病。艾滋病是由人免疫缺陷病毒 (HIV) 引起的。HIV 通过杀死或破坏机体免疫系统的细胞进行性地破坏机体抵抗感染和某些癌症的能力。免疫系统减弱的结果是, 许多艾滋病病人患上了威胁生命的机会病菌感染, 如肺炎、视网膜炎和曲霉病。

截止 2000 底, 估计全世界有 3610 万人 - 3470 万成年人和 140 万 15 岁以下儿童 - 感染了 HIV 或患有艾滋病。这些人中 70% 以上 (2530 万) 生活在非洲撒哈拉周边地区, 还有 16% (580 万) 生活在南亚和东南亚。仅 2000 年, HIV/AIDS 相关疾病就造成全世界大约 300 万人死亡, 包括大约 50 万 15 岁以下的儿童 (UNAIDS. Report on the global HIV/AIDS epidemic: December 2000)。

在美国, 每年有约 4 万新的 HIV 感染发生, 感染者约 70% 为男性, 30% 为女性。截止 2000 年底, 美国有大约 322,685 人患艾滋病。艾滋病是美国 25 - 44 岁人群中的第五大致死原因。见美国疾病预防控制中心 (CDC) 的报告: HIV/AIDS Surveillance Report 2000; 12(no.2):1-44。据中国的首届全国艾滋病会议 (2001) 报道, 艾滋病已在中国迅速传播, 感染人数以每年 30% 的速度增长。中国 13 亿人口中估计有 60 万 HIV 感染者。

据估计, 美国艾滋病相关的年死亡人数从 1995 年到 1999 年下降了大约 67%, 从 1995 年的 50,877 例死亡到 1999 年的 16,767 例死亡 (美国疾病预防控制中心, HIV and AIDS – United States, 1981-2001, MMWR 2001; 50:430-434)。美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了一些治疗 HIV 感染的药物。第一类药物称为逆转录酶抑制剂 (包括核苷和非核苷类似物), 它们阻断病毒复制的早期阶段。该类药物包括 AZT (也称为齐多夫定或 ZDV)、ddC (扎西他滨)、ddI (二脱氧肌苷)、d4T (stavudine)、3TC (拉米夫定)、delvaridine (Rescriptor)、奈韦拉平 (Viramune) 和 efavirenz (Sustiva)。第二类被批准用于艾滋病治疗的药物称为蛋白酶抑制剂, 它们在病毒生命周期的晚期阻断其复制。它们包括 Invirase (沙奎那韦)、Norvir (ritonavir)、Crixivan (indinavir)、Viracept (nelfinavir) 和 Agenerase (amprenavir)。由于 HIV 能对任何这些药物产生抗性, 医务人员必需采用联合治疗来有效抑制病毒。现有的抗逆转录病毒药物不能治愈感染 HIV 的人或艾滋病病人。另外, 它们都有可能很严重的副作用。一些核苷逆转录酶抑制剂可能造成红细胞或白细胞贫乏, 特别是在疾病晚期服用时更是如此。有些还可能引起胰腺的炎症和疼痛的神经损伤。蛋白酶抑制剂最常见的副作用包括恶心、腹泻和其他胃肠道症状。

虽然这些药物在许多情况下对抑制疾病有效, 但这些药物的昂贵费用是中国和非洲撒哈拉周边地区 (半数以上 HIV 阳性人群生活在这里) 对付艾滋病流行的主要障碍。

虽然化疗药物对治疗 HIV 感染和艾滋病是有效的, 一直以来需要找出能更有效和经济地控制这种疾病而副作用更小的治疗形式和途径。本发明提供了一种用含酵母的口服组合物进行艾滋病治疗和 HIV 感染控制的替代途径。

2.2 基于酵母的组合物

已有酵母和其成分被开发用于食物补充剂或者药物。但没有现有技术方法使用在电磁场中培养的酵母来生产对 HIV 感染者具有有益效果

的产品。以下是酵母和其成分现有应用的一些例子：

美国专利 6,197,295 公开了一种可以用作食物补充剂的富含硒的干酵母产品。酵母株 *Saccharomyces boulardii* sequela PY 31 (ACTT 74366) 在硒盐存在下培养，其含有 300 到约 6000ppm 的细胞内硒。还公开了该含硒酵母产品与化疗药物联合给药减少肿瘤细胞生长的方法。

美国专利 6,143,731 公开了一种含有来自酵母的全 β - 葡聚糖的食物添加剂，给予动物或人时，能提供膳食纤维来源、粪便膨胀剂、短链脂肪酸来源，降低胆固醇和 LDL 水平并提高 HDL 水平。

美国专利 5,504,079 公开了一种利用具有高免疫生物活性的改性酵母葡聚糖刺激免疫应答的方法。这种改性葡聚糖由酵母属酵母的细胞壁制成，可以通过各种途径给药，包括例如口服、静脉、皮下、表皮和鼻内途径。

美国专利 4,348,483 公开了一种制备具有高细胞内铬含量的铬酵母产品的方法。该方法包括让酵母细胞在控制的酸性 pH 值下吸收铬，然后加入营养物诱导该酵母细胞生长。该酵母细胞经干燥用作饮食补充剂。

这里引述这些文献并不是承认任何这些所引述的文献为相关的现有技术，或承认所引述的文献对本申请权利要求的专利性有实质性影响。所有关于这些文献的日期或内容的陈述都是以申请人现有信息为基础的，并不等于承认这些文献的日期或内容的正确性。

3. 发明内容

本发明涉及用于 HIV 感染者和/或艾滋病患者的生物组合物或口服组合物。在一种实施方案中，本发明提供含有能对 HIV 感染者和/或艾滋病患者产生有益健康效果的活酵母的生物组合物。在另一实施方案中，本发明提供制备这种生物组合物的方法，以及使用该生物组合物的方法。

具体讲，本发明的方法包括在一系列电磁场存在下培养酵母细胞，使酵母细胞呈代谢活性。所用的电磁场各自以五个频率范围之一和一个

宽范围的场强确定。起始酵母细胞是市场上有售的和/或公众可以获得的,例如(但不限于)卡尔斯伯根糖酵母(*Saccharomyces carsbergensis*)。本发明制备生物组合物的方法还包括在电磁场存在下在植物提取物和动物胃液中调理或驯化所述活化酵母细胞。

所述制备方法可包括在电磁场存在下在大规模培养中扩大活化并调理酵母细胞的数量,采取质量控制措施和包装。本发明的药物组合物包括活化并调理的酵母细胞和一种或多种药物可接受的赋形剂或载体。可以向所述生物组合物中加入其他成分如维生素和/或香味剂,以形成本发明的口服组合物。这种额外的载体和成分可以提高口服组合物的有益健康效果、药理特性和感官特性。在制造过程中,被活化或被活化并调理的酵母细胞可以被干燥或保持低温,并保存一段时间。

本发明的生物或口服组合物由相关主体摄食或者用作待掺入相关主体食物中的添加剂。本发明包括含有被活化并调理酵母细胞的饮食补充剂和营养组合物。优选所述主体是人。

在各种实施方案中,本发明的生物或口服组合物用于在 HIV 感染主体中产生有益健康效果。具体讲,本发明的生物组合物可以减缓口服接受该组合物的哺乳动物中 HIV 病毒的生长。本组合物还可用于延长 HIV 感染和/或 AIDS 患者的存活时间。

4. 附图简述

图 1: 酵母细胞的活化和调理。1. 酵母细胞培养物; 2. 容器; 3. 电磁场源; 4. 电极。

图 2: 酵母细胞的大规模繁殖。5. 第一容器; 6. 第二容器; 7. 第三容器; 8. 酵母细胞培养物; 9. 电磁场源。

5. 发明详细描述

本发明涉及可对 HIV 感染者和/或爱滋病患者产生有益健康效果的生物组合物。本发明提供该生物组合物的制备方法以及使用该生物组合物的方法。

在一个实施方案中，本发明提供含有酵母的生物组合物。与传统的酵母用作食物成分的应用不同，本发明的酵母细胞不是主体的主要营养来源，酵母细胞也不是用作物质的载体，如金属盐的载体。本发明的酵母在口服或与食物一起由主体摄取时是活的。虽不拘于任何理论或机制，发明人相信本发明的培养条件激活和/或扩增了酵母细胞中的某种基因或一组基因的表达，使得酵母细胞可以高效地刺激动物的免疫系统，包括特异的和非特异的免疫反应，其结果表现为在被治疗主体中观察到整体的健康效益。使用本发明的生物组合物所提供的有益健康效果已在人类患者中证实，有些表现为 CD4⁺ 细胞计数和胃肠功能的改善。

在另一实施方案中，本发明提供制备本发明生物组合物中的酵母细胞的方法。起始材料是易于从市场上获得或从公共微生物保藏机构获得的普通酵母细胞。本发明的方法包括可重复应用来激活酵母细胞的一套培养条件。本发明方法中所用培养条件的关键特征是施用于生长中的活酵母细胞培养物的具有确定频率范围和场强的一系列交替的电磁场。该方法还包括调理或驯化被活化的活酵母细胞以适应主体胃的酸性环境的步骤。这些方法中使用的电磁场可以在各种规模下重复设置，从而使得甚至可以大规模制造本发明的生物组合物。通过小心控制培养条件，可以将普通的酵母细胞可重复地、成常规地转变成本发明的酵母细胞。

在又一实施方案中，本发明提供口服组合物的制造方法，所述口服组合物含有本发明的被活化并被调理的酵母和其他成分，包括但不限于，药物可接受的载体或赋形剂、维生素、草药提取物、矿物质、氨基酸、调味剂、着色剂或防腐剂。

在又一实施方案中，本发明的生物组合物可以添加到主体食用的食物中。如相关领域技术人员所知，可以使用许多方法将本发明的生物或口服组合物与食物混合，而保持酵母细胞存活。在一个具体的实施方案中，就在食用前将含有本发明活酵母细胞的培养液直接加入到食物中。也可以在食用前将干酵母粉配制然后直接加入到食物中。

在各种实施方案中，本发明的口服组合物可以由主体直接摄取或直接喂给主体。例如，主体可以直接饮用含有活化并调理酵母细胞的培养

液或其提取部分。含有干酵母细胞的口服组合物也可以以固体剂型给予主体。

虽然不是必需的，本发明的生物或口服组合物可以与其他治疗形式如（但不限于）化疗药物和疫苗联合或交替使用。因为本发明的生物组合物是口服给药的，专业医护人员的帮助在该组合物的给药中一般不是必需的。

在下面的 5.1 节中描述本发明的酵母细胞和其制造方法。5.2 节中描述本发明生物组合物在患 HIV 和/或爱滋病的主体中的应用。

5.1 酵母细胞培养物的制备

该生物组合物中的酵母细胞是在交变电磁场的存在下、在合适的培养基中，在一段时间内培养多个酵母细胞而制备的。该方法包括第一个步骤 - 活化酵母细胞，和第二个步骤 - 调理或驯化已活化的酵母细胞。活化过程包括在一组特定频率和场强的五个电磁场中培养酵母细胞。该活化过程使酵母孢子发芽，酵母细胞生长并分裂。调理过程包括在电磁场存在下、在含植物提取物和动物胃液的培养基内进一步培养已活化的酵母细胞。活化并调理的酵母细胞可以在合适的条件下干燥后以干细胞的形式储存。活化并调理的干酵母细胞日后可以用于本发明生物组合物的大规模生产培养过程。本发明的各种培养过程可以是批次过程，也可以是连续过程。

5.1.1 酵母

在各种实施方案中，酵母属(*Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、*Crebrothecium*、地霉菌属(*Geotrichum*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、克勒克酵母属(*Kloeckera*)、油脂酵母属(*Lipomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、红冬孢酵母属(*Rhodospiridium*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、球拟酵母属(*Torulopsis*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)和维克氏酵母属(*Wickerhamia*)等属类的酵母可用于本发明。通常优选用于食品加工的真菌。

酵母菌株的非限定性例子包括：酵母属菌株 AS2.311；栗酒裂殖酵

母(*Schizosaccharomyces pombe* Linder) AS2.214、AS2.248、AS2.249、AS2.255、AS2.257、AS2.259、AS2.260、AS2.274、AS2.994、AS2.1043、AS2.1149、AS2.1178、IFFI 1056; 清酒酵母(*Saccharomyces sake* Yabe) ACCC2045; 葡萄汁酵母(*Saccharomyces uvarum* Beijer) IFFI 1023、IFFI 1032、IFFI 1036、IFFI 1044、IFFI 1072、IFFI 1205、IFFI 1207; 鲁氏酵母(*Saccharomyces rouxii* Boutroux) AS2.178、AS2.180、AS2.370、AS2.371; 酿酒酵母卵形变种(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen Var. *ellipsoideus*) ACCC2043、AS2.2、AS2.3、AS2.8、AS2.53、AS2.163、AS2.168、AS2.483、AS2.541、AS2.559、AS2.606、AS2.607、AS2.611、AS2.612; 卡尔斯伯根糖酵母(*Saccharomyces carlsbergensis* Hansen) AS2.162、AS2.189、AS2.200、AS2.216、AS2.265、AS2.377、AS2.417、AS2.420、AS2.440、AS2.441、AS2.443、AS2.444、AS2.459、AS2.595、AS2.605、AS2.638、AS2.742、AS2.745、AS2.748、AS2.1042; 橙黄红酵母(*Rhodotorula aurantiaca* (Saito) Ladder) AS2.102、AS2.107、AS2.278、AS2.499、AS2.694、AS2.703、AS2.704 和 AS2.1146; 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen) ACCC2034、ACCC2035、ACCC2036、ACCC2037、ACCC2038、ACCC2039、ACCC2040、ACCC2041、ACCC2042、AS2.1、AS2.4、AS2.11、AS2.14、AS2.16、AS2.56、AS2.69、AS2.70、AS2.93、AS2.98、AS2.101、AS2.109、AS2.110、AS2.112、AS2.139、AS2.173、AS2.182、AS2.196、AS2.242、AS2.336、AS2.346、AS2.369、AS2.374、AS2.375、AS2.379、AS2.380、AS2.382、AS2.393、AS2.395、AS2.396、AS2.397、AS2.398、AS2.399、AS2.400、AS2.406、AS2.408、AS2.409、AS2.413、AS2.414、AS2.415、AS2.416、AS2.422、AS2.423、AS2.430、AS2.431、AS2.432、AS2.451、AS2.452、AS2.453、AS2.458、AS2.460、AS2.463、AS2.467、AS2.486、AS2.501、AS2.502、AS2.503、AS2.504、AS2.516、AS2.535、AS2.536、AS2.558、AS2.560、AS2.561、AS2.562、AS2.576、AS2.593、AS2.594、AS2.614、AS2.620、AS2.628、AS2.631、AS2.666、AS2.982、AS2.1190、AS2.1364、AS2.1396、IFFI 1001、IFFI 1002、IFFI 1005、IFFI 1006、IFFI 1008、IFFI 1009、IFFI 1010、IFFI 1012、IFFI 1021、IFFI 1027、

IFFI 1037、IFFI 1042、IFFI 1045、IFFI 1048、IFFI 1049、IFFI 1050、IFFI 1052、IFFI 1059、IFFI 1060、IFFI 1062、IFFI 1202、IFFI 1203、IFFI 1209、IFFI 1210、IFFI 1211、IFFI 1212、IFFI 1213、IFFI 1215、IFFI 1220、IFFI 1221、IFFI 1224、IFFI 1247、IFFI 1248、IFFI 1251、IFFI 1270、IFFI 1277、IFFI 1289、IFFI 1290、IFFI 1291、IFFI 1292、IFFI 1293、IFFI 1297、IFFI 1300、IFFI 1301、IFFI 1302、IFFI 1307、IFFI 1308、IFFI 1309、IFFI 1310、IFFI 1311、IFFI 1331、IFFI 1335、IFFI 1336、IFFI 1337、IFFI 1338、IFFI 1339、IFFI 1340、IFFI 1345、IFFI 1348、IFFI 1396、IFFI 1397、IFFI 1399。优选的酵母菌株包括但不限于酿酒酵母 AS2.501、AS2.502、AS2.503、AS2.504、AS2.535、AS2.558、AS2.560、AS2.561、AS2.562。

通常，本发明可用的酵母菌株可以从私人或公共实验室培养物中获得，或者从公共菌种保藏中心获得，如美国典型培养物保藏中心（ATCC），美国弗吉尼亚州，马纳萨斯，大学路 10801 号，邮编 20110-2209；以及中国科学院微生物研究所中国微生物保藏管理委员会中国普通微生物保藏管理中心（CGMCC），中国北京海淀区 2714 信箱，邮编 100080。

下述第 6 和第 7 节中给出了使用酿酒酵母菌株 AS2.558 的本发明的非限定性实施例。

虽然优选使用纯酵母菌株，但并不限于以纯酵母菌株开始制备本发明的酵母细胞。该生物组合物中的酵母细胞可以通过不同种或菌株的酵母细胞混合培养获得。酵母细胞混合物的成分可以用本领域熟知的标准酵母鉴定技术来确定。

在本发明的各种实施方案中，应用了酵母处理、转移和储存的标准技术。当该生物组合物用于人类消费时，在无菌条件或干净的环境中实施本发明的生产方法是必需的。这里描述的生产方法可以采用本领域的标准操作，以符合产品安全 and 质量控制的行政要求。

5.1.2 电磁场

本文使用的术语“交变电磁场”、“电磁场”或“EM 场”是同义词。

本发明可用的电磁场可以通过本领域熟知的各种方法产生。图 1 是示范装置的说明图。电磁波源 (3) 产生具有所需频率和场强的电磁场。该电磁波源由一个或多个能产生电磁波的信号发生器组成, 所述电磁波优选为正弦波, 优选频率范围为 7000MHz-13000MHz。这样的信号发生器为本领域所熟知。也可以使用能够产生较窄频率范围信号的信号发生器。如果需要, 可以用信号放大器来增强输出信号, 由此增加电磁场的强度。

电磁场可以通过多种方式作用于培养物, 包括将酵母细胞紧靠与电磁波源相连的信号发射器放置。一般将酵母细胞置于由非电导体材料制成的容器中, 这些材料包括塑料、树脂、玻璃和陶瓷, 但不仅限于此。

在一个实施方案中, 由浸没于酵母细胞培养物 (1) 中的电极 (4) 形式的信号发射器施加电磁场。在优选的实施方案中, 一块金属板置于绝缘容器底部 (2), 形成一个电极; 另一个电极由多个置于容器内部的金属线或金属管组成, 它们的排列使电磁场的能量能够均匀分布于培养物中。优选铜制电极。在垂直设置的培养容器中, 金属线或金属管的末梢位于距离容器底部 3-30 厘米的位置(即距底部为容器高度的 2%至 10%)。所用电极线的数目取决于培养物的体积和电极线的直径。例如, 10 升或 10 升以下的培养物可以使用 2 到 3 条直径在 0.5-2.0 毫米之间的电极线。对于 10-100 升的培养物, 电极线或管的直径可以为 3.0-5.0 毫米。对于 100-1000 升的培养物, 电极线或管的直径可以为 6.0-15.0 毫米。对于 1000 升以上的培养物, 电极线或管的直径可以为 20.0-25.0 毫米。

5.1.3 酵母细胞的活化

根据本发明, 制备本发明活化酵母细胞的方法包括在一组五个交变电磁场中培养酵母细胞。

培养过程首先是将 1 毫升所选的酵母菌株接种物(例如 5.1.1 节中描述的酵母细胞中的一种)以约 10^5 细胞/毫升的细胞密度接种于 100 毫升培养基中。例如, 可以使用酿酒酵母 AS2.558 菌株。本发明的所有培养过程优选在无菌条件下进行。初始培养物可以为更大规模的培养提供菌

种。培养物的温度保持在 28℃到 32℃的范围，培养 22 到 30 小时后再置于电磁场中，典型的情况是在 30℃培养 27 小时。

培养过程优选在溶解氧浓度为 0.025 到 0.08 mol/m³ 的条件下进行，更优选 0.04 mol/m³。氧气水平可以通过本领域所知的任何常规方法来控制，包括搅拌和/或发泡，但不仅限于此。

最优选该培养过程在含有能被酵母细胞吸收的养分源的液体培养基中进行。表 1 提供了本发明中用来培养酵母细胞的一种示例性的培养基。

表 1

培养基成分	数 量
甘油	20 g
维生素 B2	40 μg
维生素 B3	40 μg
维生素 B6	30 μg
维生素 B12	30 μg
维生素 E	20 μg
维生素 H	20 μg
KH ₂ PO ₄	0.20 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.22 g
NaCl	0.30 g
CaSO ₄ · 2 H ₂ O	0.3 g
CaCO ₃ · 5 H ₂ O	4.0 g
蛋白胨	2.5 g
高压蒸汽灭菌水	1000 ml

通常，糖类等碳水化合物，例如蔗糖、葡萄糖、果糖、右旋糖、麦芽糖、木糖等以及淀粉，可以单独或联合作为培养基中可吸收碳的来源使用。培养基中碳水化合物的精确用量部分取决于培养基中的其它成分，但通常介于培养基重量的约 0.1%到 5%之间，优选大约 0.2%到 2%，

最优选约 0.8%。这些碳源在培养基中可以单独或联合使用。可以掺入培养基中的无机盐包括能够提供钠、钙、磷酸根、硫酸根、碳酸根等离子体的常规盐。营养性的无机盐的非限制性实例有 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 CaCO_3 、 MgSO_4 、 NaCl 和 CaSO_4 。

需要注意的是，表 1 中提供的培养基的成分不是限定性的。该方法的规模可以根据需要按比例增减，并应该在无菌条件下进行。考虑到操作的和经济上的因素，例如培养的规模和培养基成分的本地供应等，本领域技术人员可以对培养基进行各种不同的改进。

在一个实施方案中，一组五个电磁场作用于酵母细胞培养物，每个电磁场具有在一给定范围内的不同频率组和在一给定范围内的不同场强组。

第一个电磁场的频率范围在 $7845 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围在 270 到 310mV/cm 之间，可以通过本领域所知的任何方法作用于培养物，如 5.1.2 节中描述的设备。酵母培养物置于第一个电磁场中约 10-12 个小时，优选 12 个小时。

第二个电磁场的频率范围在 $7879 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围在 270 到 300 mV/cm 之间。酵母培养物置于第二个电磁场中约 22-28 个小时，优选 25 个小时。

第三个电磁场的频率范围在 $12141 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围在 325 到 366 mV/cm 之间。酵母培养物置于第三个电磁场中约 22-25 小时，优选 21 小时。

第四个电磁场的频率范围在 $12842 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围在 386 到 412 mV/cm 之间。酵母培养物置于第四个电磁场中约 18-26 个小时，优选 22 个小时。

第五个电磁场的频率范围在 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围在 290 到 320 mV/cm 之间。酵母培养物置于第五个电磁场中约 12-20 个小时，优选 15 个小时。

在次优选的实施方案中，酵母细胞可以按照不同顺序在这五个电磁场中培养。在其它实施方案中，磁场特征在上述范围内的一组电磁场可

以用来激活酵母细胞。从一个电磁场切换到另一个电磁场时，酵母细胞可以在同一个容器中、使用同一套电磁波发生器和发射器。活化的酵母细胞可以通过本领域所知的多种方法从培养物中回收，并在低于约 0℃ 到 4℃ 的温度储存。从液体培养物中回收的活化的酵母细胞可以经干燥处理以粉末的形式保存。优选每克酵母细胞粉末中所含酵母细胞数量大于约 10^{10} 个。

5.1.4 酵母细胞的调理

根据本发明，通过在有动物胃提取物（例如胃液）的条件下培养活化的酵母细胞，可以对其性能加以优化。上述动物的生理学特点应与将服用此生物组合物的主体相似。该额外的调理或驯化过程使活化的酵母细胞可以适应并耐受主体胃中的酸性环境。调理或驯化本发明活化酵母细胞的方法包括在至少一组两个交变电磁场存在下在上述物质中进行培养。

培养过程开始时，将每克含约 10^{10} 个细胞的干燥的活化酵母约 10 克（按 5.1.3 节中所述方法制成）接种于 1000 毫升的调理培养基中。培养中的相同数目的酵母细胞也可以作为接种物。每 1000 毫升调理培养基中含大约 700 毫升动物胃液和约 300 毫升野山楂汁。该方法的规模可根据需要按比例增减。该调理过程在无菌条件下进行。

动物的胃液可以从新鲜屠宰动物的胃内容物中获得。该动物在洁净的环境中饲养，并喂以标准饲料，优选无菌饲料。例如，将 120 天的猪的胃内容物与 2000 毫升蒸馏水混合，无搅拌、静置 6 小时。取上清液作为调理培养用的胃液。猪的胃液可以对多种哺乳动物包括人类使用的酵母细胞进行调理。其它收集胃液的方法包括将混合物离心或过滤以去除碎屑和/或微生物。通过以上方法获得的胃液可以储存于 4℃。这些收集步骤和储存在无菌条件下进行。

野山楂汁是野山楂果实的提取物。将果实切片，风干，优选水分小于约 8%（如果需要可以使用商用干燥器），粉碎干果实至小于约 20 目，每 500 克粉碎的野山楂与 1500 毫升水混合。将混合物无搅拌地静置 6

小时，收集上清液作为调理过程用的野山楂汁。其它收集山楂汁的方法包括将混合物离心或过滤。在无菌条件下进行收集和储存步骤。

将被活化的酵母细胞置于第一个电磁场中进行培养。该电磁场可以利用 5.1.2 节中描述的设备或本领域所知的其它方法施加。该电磁场的频率范围是 $10141 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围是 380 到 420mV/cm。温度保持在 28℃到 32℃，典型温度是 30℃。酵母培养物置于该第一个电磁场中约 36 到 42 小时，优选 38 小时。

然后，将活化的酵母细胞置于第二个电磁场中进行培养，其电磁场特性为：频率 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强约 340 到 380 mV/cm。温度保持在 28℃到 32℃，典型温度是 30℃。酵母培养物置于第二个电磁场中约 18 到 28 小时，优选 22 小时。

在次优选的实施方案中，酵母细胞可以按照不同顺序置于上述电磁场中进行培养。在其它实施方案中，磁场特性在上述范围内的一组电磁场可以用来调理酵母细胞。从一个电磁场切换到另一个电磁场时，酵母细胞可以在同一个容器中、使用同一套电磁波发生器和发射器。活化的酵母细胞可以通过本领域所知的多种方法从培养物中回收，并在低于约 0℃到 4℃的温度下储存。

活化并调理的酵母细胞可以在生物组合物中直接使用，或作为大规模生产的初始培养物。从液体培养物中回收的活化的酵母细胞可以经干燥处理以粉末的形式储存。优选该粉末中酵母细胞的数量大于约每克 10^{10} 个。

5.1.5 大规模生产

本发明还包括生产本发明生物组合物的方法。按 5.1.3 和 5.1.4 节方法制备的活化并调理的酵母细胞经过大规模繁殖，制成本发明的生物组合物。该方法包括在一个或多个电磁场中培养酵母细胞一段时间，用新鲜培养液稀释生长中的酵母细胞，并重复此过程。该方法可以是批次的也可以是连续的。

在一个优选的实施方案中，安装一套三个容器 (5, 6, 7)，每个容

器中有一组电极可以产生 5.1.2 节中所述的电磁场，并各含 1000 升培养基，见图 2。培养基包含列于表 2 中的可被酵母细胞吸收的营养物质。

表 2

材料	数 量
野山楂汁	300 升
酸枣 汁	300 升
五味子汁	300 升
大 豆 汁	100 升

野山楂汁是新鲜野山楂果实的提取物。将果实洗净、风干或用商用干燥器干燥至水分含量小于约 8%。将干燥的果实粉碎至小于约 20 目，按照每 500 克粉碎果实 2 升水的比例与水混合，在 28℃到 30℃条件下连续搅拌 12 小时。混合物经 200g 离心 10 分钟，收集上清液，按上述方法使用。这些步骤在无菌条件下进行。

酸枣汁是新鲜酸枣树果实的提取物。将果实洗净、干燥至水分含量小于约 8%。将干燥的果实粉碎至小于约 20 目，按照每 500 克粉碎果实 2 升水的比例与水混合，在 28℃到 30℃条件下连续搅拌 12 小时。混合物经 200g 离心 10 分钟，收集上清液，按上述方法使用。这些步骤在无菌条件下操作。

五味子汁是中国五味子属(*Schisandra chinensis*)植物新鲜浆果的提取物。将果实洗净、干燥至水分含量小于约 8%。将干燥的果实粉碎至小于约 20 目，按照每 500 克粉碎果实 2 升水的比例与水混合，在 28℃到 30℃条件下连续搅拌 12 小时。混合物经 200g 离心 10 分钟，收集上清液，按上述方法使用。这些步骤在无菌条件下进行。

大豆汁的制备是将大豆洗净、干燥至水分含量小于约 8%。将干燥的大豆粉碎至小于约 20 目，按照每 30 公斤粉碎大豆 130 升水的比例与水混合，在 28℃到 30℃条件下连续搅拌 12 小时。混合物经 200g 离心 10 分钟，收集上清液，按上述方法使用。

将活化并调理的酵母细胞分阶段培养，其中在每个阶段，将细胞置于至少一组两个电磁场中：

(h) 频率范围为 $10141 \pm 0.5\text{MHz}$ 、场强为 $210 - 450 \text{ mV/cm}$ 的电磁场；
和

(h) 频率范围为 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ 、场强为 $120 - 400 \text{ mV/cm}$ 的电磁场。
可以在无菌条件下在三个容器中进行培养。

将活化并调理的酵母细胞接种于第一个容器中。将按照 5.1.3 节和 5.1.4 节方法制备的酵母干粉约 1000 克加入 1000 升培养基中。每克酵母干粉约含约 10^{10} 个酵母细胞。也可以使用液体培养基中等量的酵母细胞替代脱水酵母细胞。

第一个容器 (5) 中，酵母细胞被置于一组两个电磁场中。第一个电磁场，可以通过 5.1.2 节中的设备施加，频率范围是 $10141 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围是 420 到 450mV/cm 。酵母培养物置于第一个电磁场中约 16 小时。然后，将酵母培养物置于第二个电磁场中约 12 小时，该磁场的频率范围是 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围是 360 到 400mV/cm 。将酵母细胞从第一个容器转移至第二个容器中，该容器内有约 1000 升培养基。实际上首批酵母培养物被新鲜培养基稀释了约 50%。

第二个容器 (6) 中，酵母细胞再被置于一组两个电磁场中，频率与第一个容器中的电磁场频率相似，但场强略低。第一个电磁场的场特性如下：频率范围 $10141 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围 320 到 350mV/cm 。酵母培养物置于该电磁场中约 14 小时。然后，酵母培养物被置于第二个电磁场中约 10 小时。该电磁场的频率范围是 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围是 230 到 270mV/cm 。将第二个容器中的酵母细胞转移至第三个容器中，该容器内有另外 1000 升培养基。第二批酵母培养物再次被新鲜培养基稀释了约 50%。

在第三个容器 (7) 中，酵母细胞仍被置于一组两个电磁场中，频率与在第一个容器和第二个容器中所用的电磁场频率相似，但是场强较低。第一个电磁场的场特性如下：频率范围 $10141 \pm 0.5\text{MHz}$ ，场强范围 210 到 250mV/cm 。酵母培养物置于该电磁场中约 24 小时。其后，酵母

培养物被置于第二个电磁场中约 12 小时。该电磁场的频率范围是 $12866 \pm 0.5\text{MHz}$ ；场强范围约是 120 到 150mV/cm 。

此阶段最后的酵母细胞培养物可以直接作为本发明的生物组合物使用，或用于制成本发明中所包含的其它组合物。能够加强组合物保健作用、药理学特性和/或感官特性的其它成分也可以加入其中。为了保持组合物的生物存活力和新鲜程度，后续和包装工艺优选在低于室温的温度下进行，更优选 0°C 到 4°C 。在本发明的一个实施方案中应用了质量控制和包装的标准方法，口服组合物包装在盛装液体的容器中，每个容器内约 30 毫升或 100 毫升的活酵母细胞培养物。酵母细胞的浓度为每毫升至少 1×10^3 个细胞。

在另一个实施方案中，活化并调理的酵母细胞可以按照下述方法干燥。首先将酵母细胞培养物在 75 到 100g 条件下离心 10 到 20 分钟，去除上清液。该含水量最高 85% 的沉淀物在第一个干燥器中干燥 5 分钟，温度不超过 $60 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，使酵母细胞迅速进入休眠状态。然后将酵母细胞在第二个干燥器中干燥约 8 分钟，温度不超过 $65 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，以进一步去除水分。将该含水量最高 12% 的干燥酵母细胞冷却至室温。用标准制药方法将干燥酵母细胞以不同固体剂型进行包装，每个剂量形式中含预定量的干燥物质。优选每克干燥物中含至少 1×10^6 个酵母细胞。

通常将活性成分与液态载体或细粉末状固态载体均匀、密切混合，制成组合物。

5.1.6 优选实施方案

在一个优选实施方案中，本发明提供一种制备含活化并调理酵母细胞的生物组合物的方法，所述方法包含任何顺序的下列步骤：

- (a) 在频率为 7845MHz 和场强为 295mV/cm 的第一电磁场或电磁场组中培养酵母细胞；
- (b) 在频率为 7879MHz 和场强为 281mV/cm 的第二电磁场或电磁场组中培养酵母细胞；
- (c) 在频率为 10141MHz 和场强为 343mV/cm 的第三电磁场或电磁

场组中培养酵母细胞;

(d) 在频率为 12842MHz 和场强为 403mV/cm 的第四电磁场或电磁场组中培养酵母细胞;

(e) 在频率为 12866MHz 和场强为 302mV/cm 的第五电磁场和电磁场组中培养酵母细胞;

在上述五个步骤最后一步完成后, 以任何顺序进行下列步骤:

(f) 在频率为 10141MHz 和场强为 386mV/cm 的第六电磁场或电磁场组中, 在含野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中培养酵母细胞;

(g) 在频率为 12866MHz 和场强为 356mV/cm 的第七电磁场或电磁场组中, 在含野山楂汁和哺乳动物胃液的液体培养基中培养酵母细胞。

本发明包括上述方法结束后获得的活化并调理的酵母细胞。酵母细胞优选为酿酒酵母 AS2.558 菌株。这些酵母细胞可以用于下述方法, 进一步增加活化并调理的酵母细胞数量。

在另一个优选实施方案中, 本发明提供一种大规模生产含活化并调理酵母细胞的生物组合物的方法, 所述方法包括在含野山楂汁、酸枣汁、五味子汁和大豆汁的培养基中, 在一组或多组电磁场中培养用本节上文所述优选实施方案制备的活化并调理的酵母细胞。

活化并调理的酵母细胞分三个阶段培养。在第一个容器(5)中, 酵母细胞被置于一组两个电磁场中。第一个电磁场, 频率是 10141MHz, 场强是 442mV/cm, 施加于培养物 16 小时。酵母培养物置于第二个电磁场中 12 小时, 该磁场的频率是 12866MHz, 场强是 384mV/cm。将酵母细胞从第一个容器转移至第二个容器中, 该容器内有相同体积的培养基。因此实际上培养物稀释了约 50%。

第二个容器(6)中, 酵母细胞再被置于一组两个电磁场中, 其频率与第一个容器中的电磁场频率相似, 但场强略低。第一个电磁场的场特性如下: 频率 10141MHz, 场强 335mV/cm。酵母培养物置于该电磁场中约 14 小时。然后, 酵母培养物被置于第二个电磁场中约 10 小时。该电磁场的频率是 12866MHz, 场强是约 252mV/cm。将第二个容器中的酵母细胞转移至第三个容器中, 用新鲜培养基再次稀释约 50%。

在第三个容器(7)中,酵母细胞仍被置于一组两个电磁场中,其频率与在第一个容器和第二个容器中所用的电磁场频率相似,但是场强较低。第一个电磁场的场特性如下:频率 10141MHz,场强 227mV/cm。酵母培养物置于该电磁场中约 24 小时。其后,酵母培养物被置于第二个电磁场中,其频率是 12866MHz,场强是 146mV/cm。将酵母培养物置于该第二电磁场中约 12 小时,然后收获酵母细胞。

5.2 使用方法

5.2.1 制剂

本发明的生物组合物含有按上述制备的活化并调理的活酵母,并可以任选地含有药物可接受的载体或赋形剂、和/或其他成分。可以加入在本发明生物组合物中的其他成分可包括(但不限于)草药提取物、维生素、氨基酸、金属盐、金属螯合物、着色剂、增味剂、防腐剂等。

在一个实施方案中,适于口服给药的本发明组合物可以呈独立的单元如胶囊、扁囊剂、或片剂(每个单元含有预定量的活化并调理的酵母细胞),呈粉剂或颗粒剂,或者为水性液体、非水性液体中的溶液或悬液,水包油乳液或油包水乳液。一般而言,这些组合物这样制备的:将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀地紧密地混合,然后需要时将产品成型,转变呈所希望的形式。这种产品可以用作药物或饮食补充剂,这取决于剂量和其使用的环境。

本发明的口服组合物还可以包含粘合剂(如预胶凝玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);粘合或填充剂(乳糖、戊聚糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(如马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或润湿剂(如十二烷基硫酸钠)。这些片剂或胶囊可以按本领域熟知的方法进行包衣。

用于口服给药的液体制剂可以是例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或者它们可以是用于在临用前用水或其他事宜载体配制的干产品。用于重配干产品的液体的温度应低于 65℃。这种液体制剂可以用药物可接受的添加剂按常规方法制备,所述添加剂如为悬浮剂(如山梨糖醇浆、纤

纤维素衍生物或氢化食用脂肪); 乳化剂(如卵磷脂或阿拉伯胶); 非水载体(如扁桃油、油性酯、乙醇或分馏植物油); 和防腐剂(如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或山梨酸)。如下所述, 这些制剂还可以制成类似食品的形式, 适当时含有缓冲盐、矫味剂、着色剂和增甜剂。

可以使用任何剂型来为主体提供有效剂量的生物组合物。剂型包括片剂、胶囊剂、分散剂、悬浮剂、溶液、胶囊等。一般而言, 由于易于服用, 片剂和胶囊剂为最有利的口服剂量单位形式, 其中使用如上所述的固体药物载体。可以通过任选地与一种或多种辅助成分一起压制或模制来制备片剂。可以将自由流动形式如粉末或颗粒的干燥活化并调理的酵母细胞任选地与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、表面活性剂或分散剂混合, 然后在适当的机器中压缩来制备片剂。优选本发明组合物是含有500-700毫克粉末形式的活酵母细胞(每克含 4×10^5 个细胞)的胶囊。在另一实施方案中, 优选的制剂形式是细胞悬液, 其中含有至少 4×10^3 个酵母细胞/毫升。

在另一实施方案中, 可以直接将含有被活化并调理的酵母细胞的生物组合物加入到食物中, 使得在正常饮食中摄取有效量的酵母细胞。可以使用任何本领域技术人员熟知的方法向天然或加工食品中加入或掺入生物组合物, 只要活化并调理的酵母细胞保持存活即可。优选, 本发明的营养组合物在例如约0-4℃的条件下制备和保存。这里所用的术语“食物”广义地指任何供动物食用、用于支持动物(包括人)正常或加速生长的液体或固体材料。许多种类的食品或饮料, 如(但不限于)果汁、草药提取物、茶饮料、乳制品、大豆制品(如豆腐)和稻米产品, 都可以用于形成含有本发明活化并调理酵母细胞的营养组合物。

5.2.2 在患 HIV 和/或 AIDS 的主体中的应用

本发明还提供本发明生物组合物的使用方法。在一个实施方案中, 本发明的生物组合物用作治疗 HIV 感染和/或艾滋病的药物。在另一实施方案中, 本发明的生物组合物用作饮食补充剂、保健食品或保健饮品。所述方法包括给予有需要的主体以有效量的生物组合物。所述生物组合

物可以以液体或固体形式口服给药，或通过饲管肠内给药。这里所用的术语“有效量”指足以对患 HIV 和/或 AIDS 的主体提供治疗或有益健康效果的量。

根据本发明，所述生物组合物可以在患 HIV 和/或 AIDS 的主体中产生有益健康效果。优选所述主体是人类。有需要的主体是被诊断患有 HIV 感染和/或 AIDS 的主体，可以有或没有继发性并发症，可以是该疾病的任何阶段。这里所用的术语“AIDS”（艾滋病）包括每立方毫米血液中少于 200 CD4⁺ T 细胞的所有感染 HIV 的人。（健康成人一般 CD4⁺ 细胞计数为 500 - 1200/mm³）。HIV 感染的主体可以通过检测其血液中是否存在 HIV 抗体来诊断，抗体的检测方法是本领域已知的，例如 ELISA 和蛋白质印迹分析。许多晚期 HIV 患者罹患机会性细菌、病毒、真菌和原生动物感染，这些机会感染经常是严重的，有时是致命的，但通常不会感染健康人。机会感染的非限定性例子包括白色念珠菌、烟曲霉、新型隐球菌、卡润氏肺孢子虫和巨细胞病毒。艾滋病病人共有的机会感染症状包括咳嗽、气短、癫痫发作和协调缺如、吞咽困难或痛苦、精神错乱和健忘等精神症状、严重持续性腹泻、发热、视力丧失、恶心、异常痉挛、以及呕吐、体重减轻和极度疲劳、严重头痛和昏迷。这些患者还可能易于患上各种癌症，特别是由病毒引起的癌症如卡波西肉瘤和宫颈癌，或淋巴瘤。

所述主体可以是有 HIV 感染并正在同时接受其他形式的抗 HIV 感染和/或 AIDS 治疗的人。继发感染和推荐的治疗因依据 CD4⁺ 细胞计数判断的疾病严重程度的不同而不同。当 CD4⁺ 计数大于 500/mm³ 时，一般推荐个体化的联合抗逆转录病毒疗法。当 CD4⁺ 计数为 200 - 500/mm³ 时，带状疱疹、鹅口疮、皮肤感染、细菌性窦和肺感染以及肺结核的危险增加，对 CD4⁺ 计数小于 350/mm³ 的推荐联合抗逆转录病毒疗法。对 CD4⁺ 计数为 50 - 200/mm³ 的，PCP 和其他机会感染的危险增加，推荐联合抗逆转录病毒疗法。PCP 的预防（TMP-SMX, 氨苯砒，或气溶胶喷他脒）以及 CD4⁺ 计数小于 100/mm³ 时弓形体病的预防是必要的。当 CD4⁺ 计数低于 50/mm³ 时，包括 MAC 和 CMV 的机会感染危险增加，需要预防

MAC (阿奇霉素、克拉霉素或利福布汀)。

所述主体可以是还未被诊断为 HIV 感染者和/或 AIDS 患者,但由于家庭因素和/或环境因素(如输血、毒品滥用、与 HIV 感染者的性接触)对 HIV 感染和/或 AIDS 易感或属高危人群的主体。所述主体还可以是显示 HIV 感染相关性特征的主体,例如有 CD4⁺T 细胞计数降低(低于 500/mm³; 免疫缺陷)和伴随淋巴结增大的类似流感的疾病。

所述主体可以是已进行过治疗并且疾病症状正在减退或临床看来已无 HIV 和/或 AIDS 症状的 HIV 感染者和/或 AIDS 病人。本发明的组合物可以作为任何其他治疗形式如(但不限于)化疗和免疫疗法的辅助治疗。例如,正在接受一种和多种化疗或免疫治疗药物,如核苷和非核苷类似物、逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂,的病人可以使用本发明的生物组合物。可以与本发明生物组合物一起使用的 HIV 药物的例子包括 AZT(也称为齐多夫定或 ZDV)、ddC(扎西他滨)、ddI(二脱氧肌苷)、d4T(stavudine)、3TC(拉米夫定)、delvaridine (Rescriptor)、奈韦拉平(Viramune)、efavirenz (Sustiva)、Invirase(沙奎那韦)、Norvir(ritonavir)、Crixivan(indinavir)、Viracept(nelfinavir)和 Agenerase(amprenavir),以及它们的组合。本发明的生物组合物也可以在其他治疗方法结束后使用。

根据不同的主体,治疗效果和有益健康效果可以是抑制或延缓 HIV 感染在体内的扩散、延迟机会感染和某些肿瘤的发生、减轻 HIV 感染和/或 AIDS 的症状、改善 HIV 感染和/或 AIDS 主体的存活几率、延长主体的预期寿命、改善主体的生活质量和/或减低成功治疗(手术和/或化疗)后复发的几率。与 HIV 感染和/或艾滋病有关的一些症状为精力缺乏、体重减轻、频繁发热和出汗、持续或频繁的真菌感染(口腔或阴道)、持续的皮疹、疱疹感染、妇女盆腔炎性疾病、以及短期记忆丧失。

特别是,本发明提供一种减轻主体(如人)中 HIV 感染和/或 AIDS 严重性的方法,包括给所述主体口服本发明的生物组合物。疾病的严重性可以通过本领域中已知的许多方法来确定,例如测定循环病毒载量、CD4⁺T 细胞计数,或者通过主体表现的症状来判断。本发明还提供一种延长患 HIV 感染和/或 AIDS 主体(如人类患者)的存活时间的方法,包

括给该主体口服本发明的生物组合物。

给予主体的有效剂量还因所治疗的疾病和疾病的严重程度而不同。剂量，可能还有给药频率，还根据个体患者的年龄、体重和个体反应而变化。一般，活化并调理酵母细胞的总日剂量范围为约 5×10^4 到约 6×10^5 ，一次和分多次口服给药。例如，优选的口服日剂量为每日两个胶囊（每个胶囊含 500 - 700mg 的活酵母细胞）。作为饮食补充剂，口服日剂量应为约 5×10^4 到约 6×10^5 。一个疗程应该至少为 13 周。对于本领域技术人员显而易见的是，有时需要使用这些范围之外的剂量。可以持续使用这些酵母细胞直到 HIV 感染和/或 AIDS 症状的严重性降低或得到了控制，或到 HIV 感染和/或 AIDS 已部分或完全消退。另外，营养学家、饮食学家、临床医生或主管治疗的内科医生如何以及何时根据个体病人的反应中止、调节或终止使用作为药物或饮食补充剂的生物组合物。

本发明生物组合物对 HIV 感染和/或 AIDS 的发生和进展的效果可以用本领域技术人员已知的方法监测，包括但不限于测定病毒载量、CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞等。

通过以下实施例进一步描述本发明，该实施例详细描述了已进行的临床试验，以研究本发明活化并调理酵母细胞的有效性和安全性。

6. 实施例

在北京第二传染病医院进行的包含 20 名 HIV 感染者或 AIDS 病人的小型临床试验中对本发明的口服组合物进行了试验。临床医生是徐莲芝、吴昊和张可。根据 1995 年建立的中国国家艾滋病临床标准选择病例。这 20 名患者中，10 名为 HIV 感染者，其他 10 名患有 AIDS；12 名为男性，8 名为女性。年龄范围为 12 到 45 岁；平均年龄为 28 ± 17 。16 名因性交感染了 HIV，其中 9 名为同性恋；其余 4 名是通过输血感染病毒的。这些患者没有接受过其他形式的治疗。

口服组合物是用酿酒酵母 AS2.558 如上述 5.13 到 5.15 节所述制备的。活化并调理的酵母细胞的浓度大于 1×10^3 /毫升。每位患者每天 3 次接受 30 毫升的该口服组合物，在每餐前 30 分钟服用。患者每天接受治

疗，共进行3个月。检查患者的下列临床特征：嗜睡、食欲、脱发、腹泻、体重增加/减轻；和安全性指标：肺和胃恶性病变、呕吐、胃疼、发热、恶心、皮疹、肝肾功能和血液学参数。同时监测 CD4⁺细胞和 CD8⁺细胞。

根据基于疾病症状临床观察、CD4⁺细胞计数和其他临床参数的积分确定疗效。利用基于临床观察的积分，如果治疗后的积分（n2）与治疗前积分（n0）之比小于或等于 0.67，视为治疗有效；如果治疗后积分（n2）与治疗前积分（n0）之比大于 0.67，视为治疗无效。为了计算积分，根据每微升患者血液中 CD4⁺细胞计数大于或小于 50 将患者分为两组。对于每微升 CD4⁺细胞计数大于 50 的患者，如果该细胞计数增加或者维持在每微升 50 以上，该治疗视为有效；如果该细胞计数在每微升 50 上下波动，该治疗视为无效；如果该细胞计数下降到每微升 50 以下，该疾病恶化。对于 CD4⁺细胞计数低于每微升 50 的患者，如果该细胞计数增加或保持在每微升 30 以上，该治疗视为有效；如果该细胞计数在每微升 30 上下波动，该治疗视为无效；如果该细胞计数下降到每微升 30 以下，该疾病恶化。

在三个月的试验期间和在试验结束时，患者没有表现出由本发明口服组合物引起的任何副作用。在试验前后分别检查肝肾功能以及 15 项血液学参数，发现一切正常。试验结果示于表 3 和表 4 中。

表 3: 治疗前细胞计数低于每毫升 50 的 8 名患者的 CD4⁺细胞计数: 治疗后 1 个月和治疗后 3 个月

患者序号	治疗前 (每微升)	治疗后 1 个月 (每微升)	治疗后 3 个月 (每微升)	治疗前后细胞计数的变化
1	2	1	1	- 1
7	45	136	93	48*
10	6	30	8	2
11	17	16	11	- 6
12	3	2	0	- 3
14	8	11	26	18*
17	7	9	10	3*
20	3	6	12	9*

*表示治疗有效。

表 4: 治疗前细胞计数高于每微升 50 的 12 名患者的 CD4⁺细胞计数: 治疗后 1 个月和治疗后 3 个月

患者序号	治疗前 (每微升)	治疗后 1 个月 (每微升)	治疗后 3 个月 (每微升)	治疗前后细胞计数的变化
2	73	107	43	-30
3	266	328	405	135*
4	269	434	349	80*
5	250	433	395	145*
6	243	187	180	-63
8	390	389	447	57*
9	378	338	293	-85
13	248	212	303	55*
15	333	226	389	56*
16	140	231	199	59*
18	274	151	326	52*
19	448	460	512	64*

*表示治疗有效

基于从 CD4⁺细胞计数大于每微升 50 的 12 名患者获得的上述结果, 9 个病例有效 (75%), 3 个病例无效 (25%)。对于 CD4⁺细胞低于每微升 50 的患者, 本发明口服组合物对 4 个病例有效 (50%), 对 4 个病例无效 (50%)。

表 5: 显示基于治疗前、治疗过程中和治疗后进行的有关胃肠功能如食欲和腹泻的临床观察的积分

患者序号	治疗前 (n0)	治疗后 1 个月 (n1)	治疗后 3 个月 (n2)
3	6	6	2
4	5	5	1
5	6	6	1
6	4	4	2
7	5	2	0
8	6	2	0
10	5	4	0
11	6	5	3
12	4	4	1
13	2	2	1
14	6	6	0
17	4	1	0
20	4	0	0
总计	63	48	11

治疗后总积分与治疗前总积分之比 ($n2/n0$) 为 0.18, 小于 0.67。在此试验中, 15 例显示临床可观察的症状, 13 例显示胃肠功能相关的症状如食欲不振和腹泻, 这些症状在治疗后得到了明显的改善。该治疗还对减轻嗜睡有效。在治疗前, 6 名患者有嗜睡报告。治疗后, 这些患者报告有明显的改善。

总之, 本发明的口服组合物显示三个月后能够提高 HIV 感染者的 $CD4^+$ 细胞计数和/或改善胃肠功能。

本发明并不限于所述具体实施方案的范围, 它们只是本发明每个方面的举例说明, 功能等同的其他方法和成分也在本发明的范围之内。实

际上，在前述说明书和附图基础上，除文中显示和描述的内容外，本发明的各种改变对本领域技术人员是显而易见的。这种改变也应在所附权利要求的范围之内。

本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请引入本说明书中作为参考，这相当于具体地、单个地指明每篇单独的出版物、专利或专利申请引入本说明书作为参考。

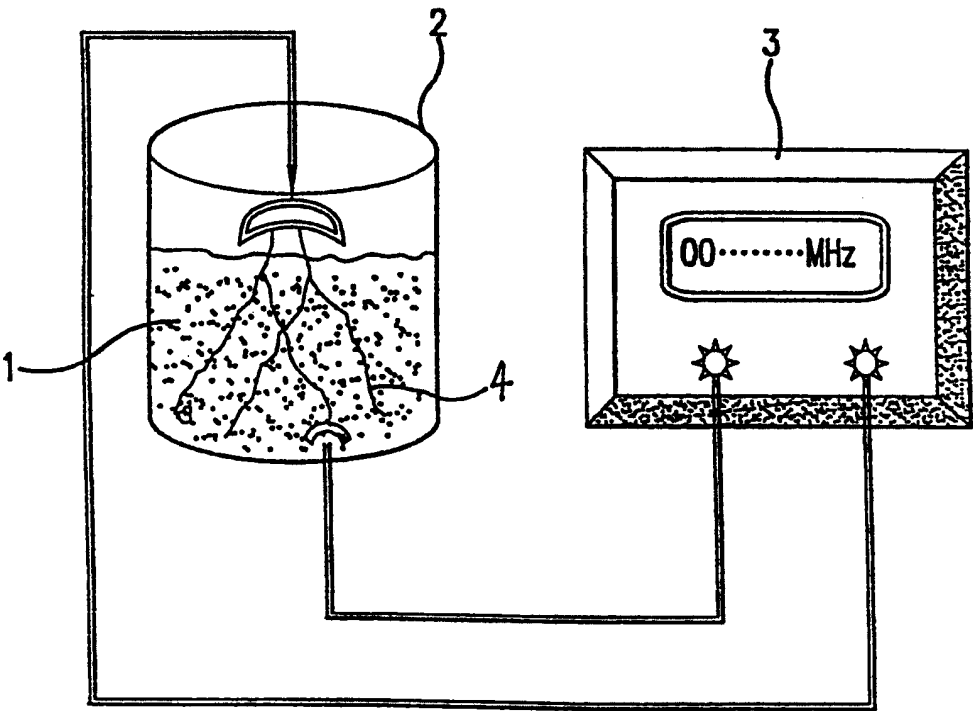


图 1

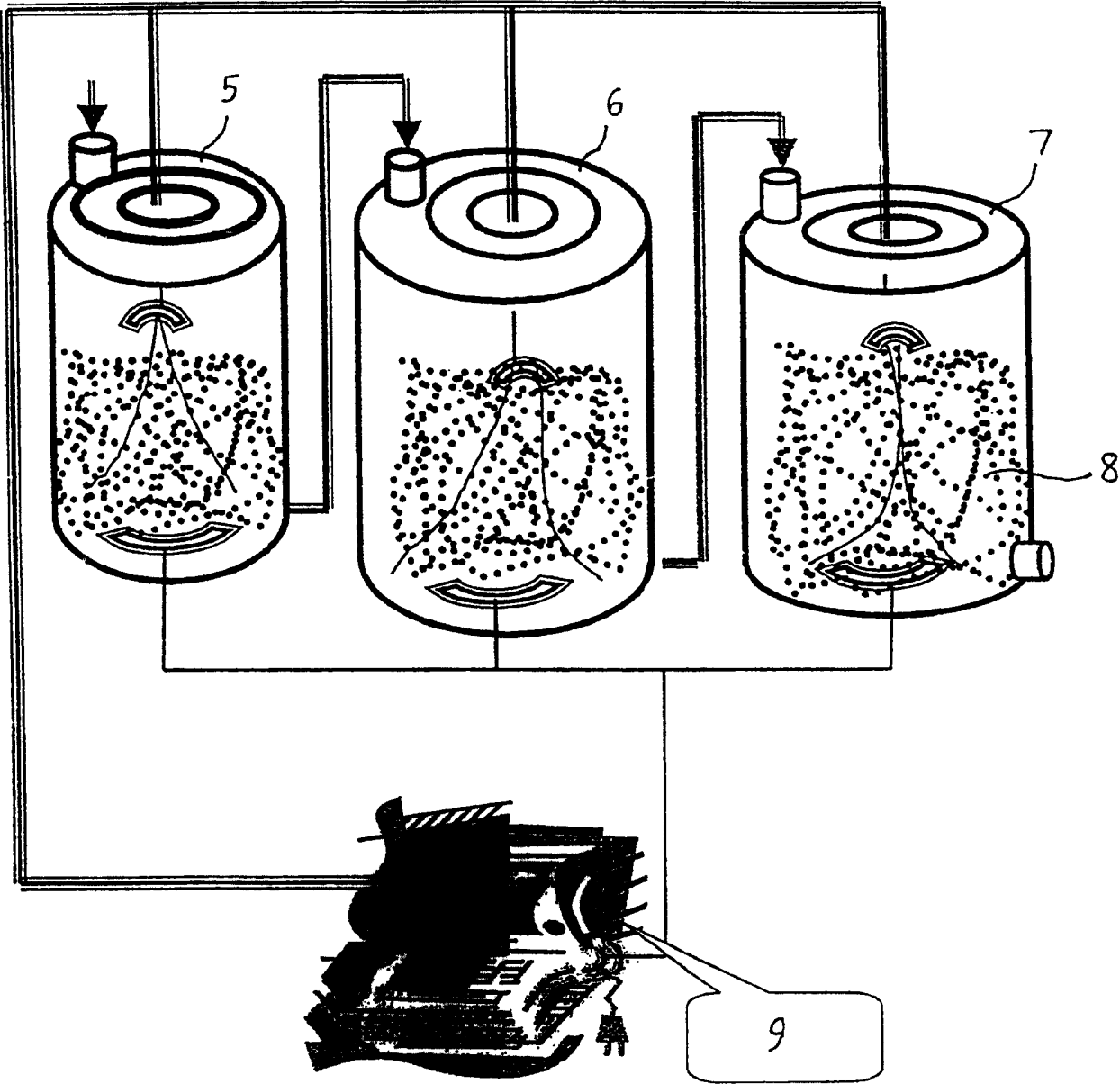


图 2