

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 1/20
A61K 35/74
A23L 1/03
A23L 1/30
A23G 3/30
A61K 7/16
A61P 31/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 00809309.1

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1227354C

[22] 申请日 2000.6.16 [21] 申请号 00809309.1
[30] 优先权
[32] 1999.6.21 [33] IT [31] RM99A000400
[86] 国际申请 PCT/IT2000/000251 2000.6.16
[87] 国际公布 WO2000/078322 英 2000.12.28
[85] 进入国家阶段日期 2001.12.21
[71] 专利权人 艾蒂尔药物有限公司
地址 葡萄牙丰沙尔
[72] 发明人 C·德西蒙
审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 程金山
//(C12N1/20,C12R1 : 225)

权利要求书 4 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 乳酸细菌的组合及其用于预防和/或
治疗感染和炎症的用途

[57] 摘要

本公开是关于一种包括(a)由至少一个产 H₂O₂ 的乳酸细菌菌株构成的第一种成分; 和(b)由至少一个利用精氨酸的乳酸杆菌菌株构成的第二种成分的乳酸细菌的组合的。 本公开还是关于此组合用于制造用于预防和/治疗由细菌、病毒或真菌引起的, 特别是在口、阴道、尿道、鼻、眼和耳中的感染和炎症的食物增补剂, 卫生产品或药物制剂的用途的。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 乳酸细菌的组合, 包括:

- (a) 由一种属于卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分; 和
- (b) 由一种属于短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分。

2. 权利要求 1 的组合, 其中所述利用精氨酸的乳酸杆菌是根据布达佩斯条约于 1998 年 2 月 6 日在德国 Braunschweig, DSM-德意志微生物和细胞培养物保藏中心以保藏号 DSM11988 保藏的短乳杆菌 CD2 菌株。

3. 乳酸细菌的组合, 其由下列成分构成:

- (a) 由一种属于卷曲乳杆菌的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分; 和
- (b) 由一种属于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分。

4. 乳酸细菌的组合, 其由下列成分构成:

- (a) 由一种属于唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分; 和
- (b) 由一种属于短乳杆菌的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分, 其为根据布达佩斯条约于 1998 年 2 月 6 日在德国 Braunschweig, DSM-德意志微生物和细胞培养物保藏中心以保藏号 DSM11988 保藏的短乳杆菌 CD2 菌株。

5. 乳酸细菌的组合, 包括:

- (a) 由一种属于唾液乳杆菌的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分; 和

- (b) 由一种属于发酵乳杆菌的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分。
6. 根据权利要求 1、3、4 或 5 任一项的组合，其中成分 (a) 中的细菌的数目对成分 (b) 中的细菌的数目的比例是从 1: 100 到 100: 1。
7. 根据权利要求 6 的组合，其中所说的比例是从 1: 5 到 5: 1。
8. 根据权利要求 7 的组合，其中所说的比例是 1: 1。
9. 根据权利要求 1、3、4 或 5 的组合，在单位剂量单位中包括从 1×10^2 到 5×10^{11} 的成分 (a) 细菌和从 1×10^2 到 5×10^{11} 的成分 (b) 细菌。
10. 根据权利要求 9 的组合，包括 1×10^9 的成分 (a) 细菌和 3×10^9 的成分 (b) 细菌。
11. 根据权利要求 9 的组合，呈片剂、口含片、糖果、口香糖、明胶胶囊、阴道栓剂、栓剂和微灌肠剂的形式。
12. 根据权利要求 9 的组合，以丸剂、牙膏和凝胶、假牙粉、漱口剂、牙粉、喷雾剂、悬浮液和软膏剂的形式。
13. 食物增补剂、卫生产品或药物制剂，其包括根据权利要求 1、2、4 或 5 任一项的组合，还包括至少一种选自嗜酸乳杆菌、布赫内氏乳杆菌、干酪乳杆菌、链状乳杆菌、纤维二糖乳杆菌、卷曲乳杆菌、弯曲乳杆菌、戴尔布吕克氏乳杆菌、詹氏乳杆菌、莱希曼氏乳杆菌、小乳杆菌、植物乳杆菌、唾液乳杆菌、短乳杆菌、加氏乳杆菌、发酵乳杆菌、青春双歧杆菌、角双歧杆菌、双歧双歧杆菌、短双歧杆菌、链状双歧杆

菌、齿双歧杆菌、埃氏双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、植物双歧杆菌和嗜热链球菌的其它乳酸细菌菌株。

14. 包含权利要求 1-5 的组合的组合物，其还包括维生素、季胺碱、无机盐、抗氧化剂和抗斑剂。
15. 乳杆菌组合的用途，该用途是用于制造预防和/或治疗由细菌、病毒或真菌引起的感染和炎症的食物增补剂、卫生产品或药物制剂，其对病原物的生长具有抑制活性，其中所述乳杆菌组合包括（a）由一种属于卷曲乳杆菌的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分；和（b）由一种属于短乳杆菌的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分。
16. 乳杆菌组合的用途，该用途是用于制造预防和/或治疗由细菌、病毒或真菌引起的感染和炎症的食物增补剂、卫生产品或药物制剂，其对病原物的生长具有抑制活性，其中所述乳杆菌组合包括（a）由一种属于唾液乳杆菌的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分；和（b）由一种属于短乳杆菌的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分，其为根据布达佩斯条约于 1998 年 2 月 6 日在德国 Braunschweig, DSM-德意志微生物和细胞培养物保藏中心以保藏号 DSM11988 保藏的短乳杆菌 CD2 菌株。
17. 乳杆菌组合的用途，该用途是用于制造预防和/或治疗由细菌、病毒或真菌引起的感染和炎症的食物增补剂、卫生产品或药物制剂，其对病原物的生长具有抑制活性，其中所述乳杆菌组合包括（a）由一种属于唾液乳杆菌的产 H_2O_2 的乳酸细菌构成的第一种成分；和（b）由一种属于发酵乳杆菌的利用精氨酸的乳酸杆菌构成的第二种成分。
18. 权利要求 15-17 任一项的用途，其中感染和炎症在口、阴道、尿道、鼻、眼或耳中。

-
19. 权利要求 15 - 17 任一项的用途, 其中感染和炎症包括龈炎、牙周炎、阴道病、阴道炎和口疮。
20. 权利要求 15 - 17 任一项的用途, 用于制备治疗口腔的除臭剂、抗炎剂、抗龋剂和/或抗牙菌斑剂。
21. 根据权利要求 15 或 16 的用途, 其中所述利用精氨酸的乳酸杆菌是根据布达佩斯条约于 1998 年 2 月 6 日在德国 Braunschweig, DSM-德意志微生物和细胞培养物保藏中心以保藏号 DSM11988 保藏的短乳杆菌 CD2 菌株。

乳酸细菌的组合及其用于预防 和/或治疗感染和炎症的用途

本发明涉及一种乳酸细菌组合及其用于制造用于预防和/或治疗由细菌、病毒或真菌引起的，特别是在口、阴道、尿道、鼻、眼和耳中的感染和炎症的食物增补剂(food) supplement)、卫生产品或药物制剂。

乳酸细菌是通过葡萄糖发酵产生乳酸的革兰氏阳性细菌。依据惯例，嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)也被包括在此定义中。

众所周知，产 H_2O_2 的乳酸细菌的菌株可以充当身体管口和粘膜中细菌群落的调节者。已经证明产 H_2O_2 的乳酸细菌可以拮抗大肠埃希氏菌(*E. coli*)、*N. gonorrhoea*、*G. vaginalis*、*C. terchomatis*、*U. urealyticum* 和 *B. brevis*。然而，当用于医学实践时，这些细菌仅仅具有有限的益处。这可以从基于乳酸细菌的旨在治疗上述微生物(例如阴道炎)的制剂(例如阴道栓剂)没有被偏爱用抗生素或化学治疗药物治疗其患者的医生们十分尊重的事实看到。

就发明者所知，没有在机体管口和粘膜上的抗细菌或调节菌群的作用被归因于利用精氨酸的乳酸细菌。

令人惊讶的是现在已经发现通过加入一个或多个能够利用精氨酸的乳酸细菌菌株，产 H_2O_2 的乳酸细菌的活性被明显地加强。精氨酸形成在体液中发现的各种小肽的一部分，并也以游离精氨酸存在。许多细菌属利用它供自身的营养和生长。因此，利用精氨酸的乳酸细菌能够剥夺其它致病或潜在致病细菌一定量的精氨酸，这虽然不足以终止它们的生长，但是使得它们对乳酸细菌产生的 H_2O_2 的作用更加敏感。

因此，本发明提供一种包括(a)由至少一个产 H_2O_2 的乳酸细菌菌株构成的第一种成分，和(b)由至少一个利用精氨酸的乳酸细菌菌株构成的第二种成分的乳酸细菌组合。

在成分(a)中的乳酸细菌菌株优先地选自卷曲乳杆菌(*Lactobacillus*

crispatus)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*) 的种的菌株,而在成分(b)中的乳酸细菌的菌株选自短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、加氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)和发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) 的种的菌株。更加特别地,在成分(b)中的乳酸细菌是根据布达佩斯条约于 1998 年 2 月 6 日在德意志微生物细胞培养物保藏中心(DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)以保藏号 DSm 11988 保藏的短乳杆菌 CD2 (*Lactobacillus brevis* CD2) 菌株或者其突变体或衍生物。

成分(a)中细菌数目与成分(b)中细菌数目的比例优选地是 1: 100 到 100: 1, 并且更加特别地是 1: 5 到 5: 1, 最优选的比例是 1: 1。

本组合能够以包括 1×10^2 到 5×10^{11} 的成分(a)细菌和 1×10^2 到 5×10^{11} 的成分(b)细菌, 优选地 1×10^9 的成分(a)细菌和 3×10^9 的成分(b)细菌的单位剂型给药。

本组合还能够以片剂、口含片剂(sucking tablet)、糖果、口香糖、明胶胶囊、阴道栓剂、栓剂、微灌肠剂、以及丸剂、牙膏和凝胶、假牙粉、漱口药、牙粉、喷雾剂、悬浮剂和软膏剂。

根据本发明的又一个实施方案, 本组合还包括至少一个选自嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、布赫内氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、链状乳杆菌 (*Lactobacillus cateniforme*)、纤维二糖乳杆菌 (*Lactobacillus cellobiosus*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、弯曲乳杆菌 (*Lactobacillus curvatus*)、戴尔布吕克氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*)、詹氏乳杆菌 (*Lactobacillus jensenii*)、莱希曼氏乳杆菌 (*Lactobacillus leichmannii*)、小乳杆菌 (*Lactobacillus minutus*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、唾液乳杆菌 (*Lactobacillus salivarius*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、加氏乳杆菌 (*Lactobacillus gasseri*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*)、青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、角双歧杆菌

(*Bifidobacterium angulatum*)、双歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、链状双歧杆菌(*Bifidobacterium catenulatum*)、齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)、埃氏双歧杆菌(*Bifidobacterium eriksonii*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、植物双歧杆菌(*Bifidobacterium plantarum*)和嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)的其它乳酸细菌菌株。

本组合还可以包括维生素、季铵碱、无机盐、抗氧化剂和抗斑剂(anti-plaque agents)。

本发明还涉及包括：

(a) 由至少一个产 H_2O_2 的乳酸细菌菌株构成的第一种成分，和
(b) 由至少一个利用精氨酸的乳酸细菌菌株构成的第二种成分的乳酸细菌的组合用于制造预防和/或治疗由细菌、病毒或真菌引起的，特别是在口、阴道、尿道、鼻、眼和耳中的感染和炎症的食物增补剂、卫生产品或药物制剂的用途。这些感染和炎症包括由药物和/或物理因素(physical agent)引起的龈炎、牙周炎、粘膜炎和口炎、贝赫切特综合症(Behcet's syndrome)、口腔的横向角化症(diakeratosis)、舌炎、咽喉炎、涎腺炎、涎石病、天疱疮、扁平苔藓(Lichen planus)、斯耶格伦综合症(Sjogren's syndrome)、阴道病、阴道炎、尿道炎、前列腺炎、直肠炎、耳炎、结膜炎、鼻炎、鼻窦炎、粘膜白斑病、口疮、疱疹和口腔内幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)感染。

本组合还能够有利地用作口腔除臭剂、抗炎、抗龋和/或抗斑剂治疗口腔。

以下实施例用于更加详细地说明本发明的各个方面，但是不应该被以任何方式解释为限制本发明。

实施例 1

评价了产 H_2O_2 的乳酸细菌(成分 A)；利用精氨酸的乳酸细菌(成分 B)；和这两个菌株组合，特别是以 1: 1 的比例(组合 AB)对潜在致病细菌的抑制作用。

简要地，要被测试的乳酸细菌的培养物首先被调整到中性 pH，因为酸性 pH 自身抑制细菌生长。对悬浮液进行了过滤除菌，而此滤出液被用来浸渍许多圆盘吸水纸（每个圆盘 30 μ l 滤出液）。将这些圆盘和一块仅用 30 μ l 蒸馏水浸渍过的对照圆盘，放置在一块已经接种了 0.1 ml 的阴道加德纳氏菌（*Gardnerella vaginalis*）（一个引起阴道病的、从实验室分离的菌株）的选择性培养基的平板上。在 37℃ 温育 24 小时之后，通过测量圆盘周围的晕轮的直径的毫米数评价了病原菌生长的抑制作用。

第二个系列的测试是用变异链球菌（*Streptococcus mutans*）作为靶病原体进行的，这个种（species）是牙斑和龋齿的病原体。

鉴定细菌作为 H_2O_2 生产者通过经典的联苯胺过氧化物酶反应进行，这个反应通过蓝色显色显示产 H_2O_2 的细菌菌落。确定了精氨酸脱水酶（dehydrolase）的活性，从而评价乳酸细菌利用精氨酸的能力（M. C. Manca de Nadra, *Milchwissenschaft*, 37 (1982) pp. 669-670）。

从美国典型培养物保藏中心（The American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA）获得这些乳酸细菌。

<u>细菌菌株</u>	<u>抑制作用的晕轮（抗 <i>G. vaginalis</i> 活性, mm）</u>
H_2O_2 生产者（成分 A）	
卷曲乳杆菌（ATCC 39197）	75
唾液乳杆菌（ATCC 11741）	60
卷曲乳杆菌 + 唾液乳杆菌	63
精氨酸利用者（成分 B）	
短乳杆菌（ATCC 14869）	0
发酵乳杆菌（ATCC 14931）	2
短乳杆菌 + 发酵乳杆菌	0
组合 AB（A 对 B 的比例为 1: 1）	
卷曲乳杆菌 + 短乳杆菌	112

卷曲乳杆菌 + 发酵乳杆菌	100
唾液乳杆菌 + 短乳杆菌	117
唾液乳杆菌 + 发酵乳杆菌	104

细菌菌株	抑制作用的晕轮 (抗 <i>S. mutans</i> 活性, mm)
H ₂ O ₂ 生产者 (成分 A)	
卷曲乳杆菌 (ATCC 39197)	98
唾液乳杆菌 (ATCC 11741)	102
卷曲乳杆菌 + 唾液乳杆菌	99
精氨酸利用者 (成分 B)	
短乳杆菌 (ATCC 14869)	0
发酵乳杆菌 (ATCC 14931)	1
短乳杆菌 + 发酵乳杆菌	1
组合 AB (A 对 B 的比例为 1: 1)	
卷曲乳杆菌 + 短乳杆菌	118
卷曲乳杆菌 + 发酵乳杆菌	126
唾液乳杆菌 + 短乳杆菌	121
唾液乳杆菌 + 发酵乳杆菌	120

实施例 2

制备具有以下单位成分之口含片剂:

组合 AB 唾液乳杆菌 + 短乳杆菌，比例 1: 1	4000 百万
甘露醇	400 mg
糖精	5 mg
聚乙烯	50 mg
硬脂酸镁	15 mg
滑石粉	25 mg
二氧化硅	5 mg

将这些片剂给药给四位已被告知在前一周期间清洁其牙齿或使用口香糖的志愿者。这些受检者每日三片饭后服用一周，允许片剂在口内溶解。对牙斑指数和龈斑指数都进行了临床评价。

对于牙斑在六颗牙齿上使用了以下的评分系统（右侧的第一颗上白齿；左侧的上中切牙；左侧的上前白齿；左侧的第一颗下白齿；右侧的下中切牙；右侧的第一颗下前白齿）：

0-完全无斑

1-没有可见斑

2-可见斑

3-非常明显的斑

用以上提到的六颗牙齿的缘，采用以下的评分系统评价齿龈斑：

0-无炎症

1-轻微的炎症

2-中度的炎症，接触有流血

3-显著的炎症，有自发流血的趋势。

对这四位志愿者的六颗牙齿获得的组合数据如下：

受试者

牙斑指数

龈斑指数

	0	7 天	0	7 天
No. 1	8	2	7	1
No. 2	9	3	10	3
No. 3	15	5	6	2
No. 4	15	7	8	3

实施例 3

用每日六片口含片治疗四位有临床和组织学诊断的复发性口疮性溃疡的受检者十天，其成分在实施例 2 中给出。

在十天疗程后全部受到治疗的患者显示了此溃疡完全治愈，并且其中没有人在随后的一个月中患新溃疡。

正如常规的和本领域中的熟练人员所非常公知的，为了改善此细菌组合 AB 的味道与外观，可以加入适合的着色剂和甜味剂诸如糖精、薄荷油和木糖醇。

此组合 AB 可以丸剂、糖果、口香糖、明胶胶囊、牙膏和凝胶、假牙粉、漱口水、牙粉、片剂、阴道栓剂、栓剂、喷雾剂、悬浮液和微灌肠剂形式给药。

实施例 4

一种牙膏的制备

牙膏基料

百分组成：

二水磷酸钙	37.5%
甘油（85% 溶于水中）	30.0%
调味剂（薄荷油）	1.0%
羧甲基纤维素钠	1.0%
纯水	20.8%
糖精钠（1% 水溶液）	2.5%

十二烷基硫酸钠	2.0%
纯水	<u>5</u>
	<u>.2%</u>
	100.0%

重量组成:

二水磷酸钙	337.5g
甘油(85%溶于水中)	270.0g
调味剂(薄荷油)	9.0g
羧甲基纤维素钠	9.0g
纯水	187.2g
糖精钠(1%水溶液)	22.5g
十二烷基硫酸钠	18.0g
纯水	<u>48.8g</u>
	900.0g

将已经被挤压通过一个 50 目滤网的甘油加入二水合磷酸钙。允许此混合物进行水化作用,产生一种稠密均质的软膏。在这里加入调味剂(1%的薄荷油)。

将羧甲基纤维素钠在水中水化过夜(在纯水中 4.6%的浓度)。

将糖精钠的溶液加入所产生的稠密凝胶中。

将聚合体凝胶倾注到一个已经含有已用甘油水化的磷酸钙的研钵中,并剧烈地混合这些成分。

单独制备十二烷基硫酸钠在纯水中大约 28%的溶液。

此后,将此十二烷基硫酸钠溶液加入稠密的磷酸二钙软膏。

所产生的稠密均质的软膏,具有良好的流变学性质,将其混合数分钟,此后通过将其通过一个具有辊子的精制机而精制。这产生一种雪白的均质的具有宜人的薄荷芳香的软膏。

将 38.5 g 的冻干的乳酸细菌(唾液乳杆菌(L. salivarius) + 短

乳杆菌 (*L. brevis*), 1: 1; 10^{10} CFU/g) 通过一个 50 目的滤膜, 此后将其以小份地加入上述牙膏基料的剩余部分 (770 g)。所产生的均质软膏具有轻微地浅褐色颜色和薄荷味。

实施例 5

一种快速释放的阴道片剂的制备

通过湿式制粒法制备了用泡腾层包裹的阴道片剂。这些片剂每一粒重 2100 mg, 并含有 100 mg 的作为活性物质的乳酸细菌的组合。

每一片阴道片剂具有如下成分:

冻干并筛选的乳酸细菌 (每克 30×10^9 的短乳杆菌 (<i>L. brevis</i>), 30×10^9 的唾液乳杆菌 (<i>L. salivarius</i>) 和 90×10^9 的植物乳杆菌 (<i>L. plantarum</i>))	100.0mg
乳糖	1368.0mg
玉米淀粉	246.0mg
己二酸	192.0mg
碳酸氢钠	150.0mg
硬脂酸镁	30.0mg
硬脂酸	9.0mg
胶体二氧化硅	<u>5.0mg</u>
	2100.0mg