



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101896176 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200880120656. X

A61K 31/65(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 14

(30) 优先权数据

60/979, 845 2007. 10. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/079849 2008. 10. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02009/052106 EN 2009. 04. 23

(71) 申请人 佛罗里达大学研究基金公司

地址 美国佛罗里达州

(72) 发明人 J·诺伊

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈润杰

(51) Int. Cl.

A61K 31/22(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

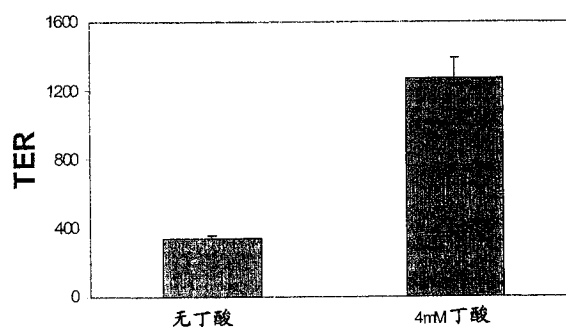
(54) 发明名称

改善胃肠道功能的制剂

(57) 摘要

本发明提供改善胃肠道功能的组合物及其用途。本发明的组合物和方法特别有益地适用于新生儿,因为它们可用于刺激未成熟肠的发育,以便提供增强吸收营养物的能力并且达到更强的屏障功能。

丁酸对 Caco-2 细胞中的 TER 的作用



1. 用于肠内施用的制剂,其中所述制剂包括蛋白质、多不饱和脂肪酸、短链脂肪酸和谷氨酰胺。

2. 根据权利要求 1 的制剂,其中所述长链多不饱和脂肪酸为 DHA。

3. 根据权利要求 1 的制剂,其中所述短链脂肪酸为丁酸。

4. 根据权利要求 1 的制剂,其进一步包括精氨酸。

5. 根据权利要求 1 的制剂,其包括蛋白质、DHA、丁酸和谷氨酰胺。

6. 根据权利要求 1 的制剂,其中所述蛋白质为乳清。

7. 根据权利要求 1 的组合物,其为低渗性的。

8. 根据权利要求 1 的组合物,其中所述组合物为最低肠内营养配方。

9. 用于促进胃肠道健康的方法,其中所述方法包括向患者施用用于肠内施用的制剂,其中所述制剂包括蛋白质、多不饱和脂肪酸、短链脂肪酸和谷氨酰胺。

10. 根据权利要求 9 的方法,其中所述长链多不饱和脂肪酸为 DHA。

11. 根据权利要求 9 的方法,其中所述短链脂肪酸为丁酸。

12. 根据权利要求 9 的方法,其中所述制剂进一步包括精氨酸。

13. 根据权利要求 9 的方法,其中所述制剂包括蛋白质、DHA、丁酸和谷氨酰胺。

14. 根据权利要求 9 的方法,其中所述蛋白质为乳清。

15. 根据权利要求 9 的方法,其中所述制剂为低渗性的。

16. 根据权利要求 9 的方法,其中所述组合物为最低肠内营养配方。

17. 根据权利要求 9 的方法,其中所述患者为新生儿。

18. 根据权利要求 9 的方法,其中所述患者重量低于 1250 克。

改善胃肠道功能的制剂

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2007 年 10 月 14 日申请的美国临时申请序列号 60/979,845 的权益,其全部内容、包括任何数字、表或图由此通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 肠起屏障功能的作用,它是先天性免疫系统的关键组分。只有单层的上皮细胞将腔内容物与身体粘膜固有层和机体内环境的效应子免疫细胞分离。破坏该单层上皮可导致高免疫活性上皮细胞 (subepithelium) 病理性暴露于腔内的大量微生物和抗原。屏障的破坏牵涉于急性疾病如多器官系统衰和引起败血症的细菌移位的发病机制。

[0005] 肠作为抗感染屏障的功能缺陷可以在所有年龄段的个体中发生。但是,年老和年幼的人特别易感。例如,由于喂养不耐受性以及坏死性小肠结肠炎 (NEC) 的恐惧,很多早产儿遭受一段“腔内饥饿 (luminal starvation)”的时期,这段时期内,这些婴儿通过胃肠道接受 (如果有的话) 极少的食物,主要通过静脉内途径、利用总胃肠外营养 (TPN) 来给以营养。具有 TPN 的肠内营养物的缺乏促使粘膜破坏、细菌移位以及全身性炎症倾向增加 (Huang Y, Li N, Liboni K, Neu J “谷氨酰胺通过非 $\text{NF-}\kappa\text{-B}$ 途径使 Caco-2 细胞中内毒素诱导的 IL-8 生成减少”, Cytokine. 2003 年 5 月 ;22(3-4) :77-88)。

[0006] 早产儿、尤其是极低出生体重的早产婴儿因为呼吸功能不全、温度调节和其它挑战通常也高度应激。最近十年的趋势是在出生后最初几周的疾病急性期通过胃肠外途径提供更多的氨基酸 (Liboni K, Li N, Neu J. “谷氨酰胺介导的改善 Caco-2 细胞中脂多糖诱发的 IL-8 生成的机理”, Cytokine. 2004 年 4 月 21 日 ;26(2) :57-65 ;Beierle EA, Chen MK, Hartwich JE, Iyengar M, Dai W, Li N, Demarco V, Neu J. “人工饲养小鼠仔鼠 : 杯子模型中小鼠仔鼠的发育”, Pediatr Res. 2004 年 8 月 ;56(2) :250-5.), 然后通过肠内途径向人奶或配方转换。这是不够的,因为在生命最初几周所提供的任何肠内营养通常是“最低肠内营养”(大致定义为 : 不满足生长的营养需求但给予某些益处的营养量,且通常少于总营养需求的 20%) 的形式 (Liboni, K, Li N, Scumpia PO, Neu J. “谷氨酰胺在人胎儿和成人肠上皮中通过 $\text{I}\kappa\text{B}/\text{NF-}\kappa\text{B}$ 调节 LPS 诱导的 IL-8 生成”, Journal of Nutrition 2005 年 2 月 ;135(2) :245-51 ;Liu Z, Li N, Neu J. “紧密连接、渗漏性肠和儿科疾病”, Acta Paediatrica 2005 ;94 :386-393 ;Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. “死亡或存活鼠李糖乳杆菌 GG 减少 Caco-2 细胞中肿瘤坏死因子- α 诱导的 IL-8 生成”, Journal of Nutrition 2005 年 7 月 ;135(7) :1752-6)。

[0007] 尽管通常被称为“营养性营养 (trophic nutrition)”,但是最低肠内营养与胃肠外营养 (PN) 一起既不会提供对肠明显的营养作用,也不会增强屏障功能 (Zhang L, Li N, desRobert C, Fang M, Liboni K, McMahon R, Caicedo R, Neu J. “鼠李糖乳杆菌 GG 减少胃造口术喂养的婴儿大鼠模型中脂多糖诱导的全身性炎症”, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2006 年 5 月, 42 :545-552 ;Neu, J. “窒息和缺氧 - 缺血作为坏死性小肠结肠炎的首要原因的‘猜想’”, Biol Neonate. 2005 ;87(2) :97-8 ;Neu J, Chen M, Beierle E “肠先天性免疫 : 它如何与坏死性小肠结肠炎的发病机制有关?”, Semin

Pediatr Surg. 2005 年 8 月 ;14(3) :137-44)。而且,清楚的是,TPN 的使用与医院获得性败血症显著相关 (Caicedo RA, Schanler RJ, Li N, Neu J. “发育中的肠生态系统:对于新生儿的含意”, Pediatr Res. 2005 年 10 月 ;58(4) :625-8), 医院获得性败血症部分是由肠细菌移位引起的 (Li N, Lassman BJ, Liu Z., Liboni, K., Neu, J. “在胃造口术喂养的大鼠仔鼠中蛋白质剥夺对生长和小肠形态学的作用并不被谷氨酰胺或谷氨酸盐改善”, J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2004 年 7 月 ;39(1) :28-33 ;Neu J, Zhang L. “极低出生体重婴儿的喂养不耐受性:它是什么和我们对此能做些什么?”, Acta Paediatr Suppl. 2005 年 10 月 ;94(449) :93-9)。

[0008] 尽管最近早期增加静脉内蛋白质摄取的趋势可以在蛋白质合成、减少分解代谢以及可能的甚至身体生长方面提供益处 (Beierle EA, Chen MK, Hartwich JE, Iyengar M, Dai W, Li N, Demarco V, Neu J. “人工饲养小鼠仔鼠:杯子模型中的小鼠仔鼠的发育”, Pediatr Res. 2004 年 8 月 ;56(2) :250-5 ;Neu J. “胃肠道成熟和喂养”, Semin Perinatol. 2006 年 4 月 ;30(2) :77-80), 但是这种实践不会提高或维持胃肠道屏障功能或胃肠道的优化生长, 它是调节其中肠介导的破坏和全身性炎症起作用的若干疾病过程的先决条件。这些包括 NEC、肝炎、慢性肺疾病以及脑室周围白质软化病的进展。

[0009] 因此, 非常需要出生后立刻服用的肠内辅助物 (adjunct), 其将减少对胃肠外营养的需求。增强肠生长且改善屏障功能的安全有效的“起动剂配方 (starter formula)”对患病低出生体重婴儿是需要的。这种制剂可用作早期积极性胃肠外营养和其它肠内营养物如人奶的辅助物。

[0010] 简述

[0011] 本发明提供改善胃肠道功能的组合物及其用途。本发明的组合物和方法特别有益地适用于新生儿, 因为它们可用于刺激未成熟肠的发育, 以便提供增强吸收营养物的能力并且达到更强的屏障功能。

[0012] 在一个具体的实施方案中, 本发明提供添加有谷氨酰胺 (GLN)、二十二碳六烯酸 (DHA) 和丁酸 (butyrate) 的低渗性、富含蛋白质的最低肠内营养配方。本发明的组合物尤其设计用于刺激更好的肠生长、增强肠屏障和控制肠源性炎症。

[0013] 依照本发明, 蛋白质通过促进肠蛋白质生长和防止分解代谢起作用 ;GLN 促进上皮内连接 (interepithelial junction) 完整性, 将粘膜应激反应减至最小且减少炎症 ;丁酸加强增殖、增强屏障功能并增加类高血糖素肽 2 (GLP-2, 高度肠营养 (intestinitrophic) 肽) 的肠分泌, 且 DHA 通过减少炎症应答起作用。

[0014] 当患者遭受炎症应激时, 含有高水平蛋白质、DHA、谷氨酰胺和丁酸但具有相对低的碳水化合物和脂肪浓度的本发明制剂可用于安全地防止肠屏障破坏、防止肠萎缩以及远端器官例如肝和脑的损伤。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 显示治疗 24 小时后由丁酸介导的早期融合 Caco-2 细胞跨上皮电阻抗的增加。

[0017] 图 2A-B 显示不同剂量的脂肪酸对 TNF α 诱发的 IL-8 生成的影响。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明提供促进肠生长并且改善屏障功能、用于低出生体重婴儿以及其他的安全

有效的组合物和方法。

[0020] 早产儿或危重病婴儿由于他们未成熟的胃肠道的易损性,经常通过静脉内途径施用延长的胃肠外营养(总胃肠外营养;TPN)。遗憾的是,延长的胃肠外营养与肠萎缩、细菌移位增加、败血症和全身性炎症有关,其可加重肝、肺和中枢神经系统损伤,导致终生残疾。

[0021] 用于解决这个问题的现有方法包括在出生后最初几周的疾病急性期通过胃肠外途径提供氨基酸、然后通过肠内途径向人奶或配方转换。这种方法是不够的,因为在生命最初几周所提供的任何肠内营养通常是最低肠内营养形式,其既不会对肠提供显著的营养效应也不会增强屏障功能。而且,TPN 的使用与医院获得性败血症显著相关。

[0022] 除了 Arg 和 / 或 Gin 或 Glu 之外,优选本发明的组合物具有少于 20% 重量的游离氨基酸,更优选该组合物具有少于 20% 的游离氨基酸,甚至更优选组合物具有少于 15% 的游离氨基酸,且该组合物还可以具有少于 10%、5% 或 1% 游离氨基酸。

[0023] 肠粘膜完整性与数种功能能力有关,包括消化、吸收、细菌或抗原移位,以及内腔微生物和 / 或毒素激励炎症应答、引起病理学如坏死性小肠结肠炎或全身性炎症的能力。

[0024] 在一个实施方案中,本发明提供用于极低出生体重婴儿的“起动剂”肠内营养配方,其在出生后即刻利用。有利地,该配方支持肠发育并减少对胃肠外营养的需要,后者是高发病率以及新生儿重症特别护理的昂贵成本的原因。

[0025] 在一个实施方案中,本发明的组合物可用作早期攻击性胃肠外营养和其它肠内营养物如人奶的辅助物。

[0026] 本发明解决了面对危重和 / 或过早出生婴儿的最重要问题之一。他们未成熟的胃肠道的易损性需要延长的胃肠外营养,其与肠萎缩、细菌移位增加、败血症和全身性炎症有关。反过来,这些条件可以加重肝、肺和中枢神经系统损伤,导致终生残疾。有利地,本发明可经由胃肠道利用。在优选的实施方案中,本发明的制剂利用辅助性营养剂,增强肠生长、屏障功能并调节肠源性炎症和应激反应。

[0027] 本文所述的方法和组合物特别可用于称重少于 1250 克的新生儿。这些新生儿具有很不成熟的胃肠道。新生儿专家不情愿利用他们的胃肠道来养育这些婴儿,相反,主要通过静脉内途径给予他们营养,而静脉内途径与重要的问题有关,如医院获得性败血症。这些婴儿的胃肠道可利用得越早,医院获得性败血症的风险就越低,他们在住院期间影响这些婴儿的约 30-40%,引起很高的发病率且显著增加住院成本。

[0028] 本发明的材料和方法具有其它用途,包括例如帮助所有年龄段的患者从肠道手术中恢复。

[0029] 本文特别示例的是添加有谷氨酰胺 (GLN)、二十二碳六烯酸 (DHA) 和丁酸的低渗性、富含蛋白质的最低肠内营养配方,其尤其设计用于刺激更好的肠生长、增强肠屏障和控制肠源性炎症。含有高水平的蛋白质、DHA、GLN 和丁酸但具有相对低的碳水化合物和脂肪含量的低渗性制剂,与含有通常大量营养物混合物的最低肠内营养制剂相比,可用于防止肠屏障破坏并防止肠萎缩。

[0030] 优选地,组合物的蛋白含量多于 2% 重量、多于 3% 重量、多于 5% 重量、多于 7.5% 重量和 / 或多于 10% 重量。

[0031] 优选地,碳水化合物含量少于 10% 重量、少于 7.5% 重量和 / 或少于 5% 重量。

[0032] 优选地,脂肪含量少于 10% 重量、少于 7.5% 重量和 / 或少于 5% 重量。

[0033] 高蛋白质、低脂肪和碳水化合物、低渗性配方中 GLN、DHA 和丁酸的组合,协同地用于增加粘膜量,且减少肠渗透性过高以及由于肠源性炎症引起的损伤。这些益处通过稳定粘膜屏障和减少肠源性炎症的组合来实现。

[0034] 本发明的组合配方是安全的,并且提供比用任何单个营养补充剂所观察到的更好的效果。

[0035] 本发明的制剂可用于提供以下优点:

[0036] 1. 高蛋白质,以提高肠营养性和屏障功能。

[0037] 2. 谷氨酰胺,以预防肠源性炎症且调节应激相关的细胞凋亡。

[0038] 3. $\omega 3$ 脂肪酸,例如 DHA,以防止肠源性炎症的传播。

[0039] 4. 短链脂肪酸,例如丁酸,以提高屏障功能。

[0040] 经由胃肠 (GI) 道的蛋白质摄取是肠粘膜生长的主要决定因素。在某些个体、包括早产儿和 / 或低出生体重婴儿中,膳食蛋白必须以充分的量通过肠内途径供应,以防止粘膜破坏和提高屏障功能。此外,谷氨酰胺 (GLN)、丁酸和 DHA 作为补充剂有益于增强肠屏障功能和预防肠源性炎症反应的传播,以及预防应激相关性远端器官细胞凋亡。

[0041] 本发明的蛋白质组分可以是例如乳清或酪蛋白。在优选的实施方案中,主要蛋白质组分为乳清。优选地,该蛋白质以约 0.5 至 1g/Kg/ 天提供。

[0042] 本发明制剂的谷氨酰胺组分可以作为单个氨基酸或作为例如二肽的一部分提供。在优选的实施方案中,谷氨酰胺在配方中作为单个氨基酸提供。在一个实施方案中,精氨酸也包括于制剂中。一个实施方案包括使用精氨酸-谷氨酰胺二肽。精氨酸和谷氨酰胺也可在配方中单独供应。谷氨酰胺的剂量可以是例如 0.3 至 0.7g/Kg/ 天。

[0043] 在一个实施方案中,本发明包括施用 $\omega 3$ 脂肪酸、尤其是长链多不饱和脂肪酸 (PUFA) 例如 DHA,以便通过下调促炎介质向婴儿小肠提供有益的作用。DHA 的剂量可以是例如 0.1 至 1g/Kg/ 天。花生四烯酸 (AA) 和 / 或二十碳五烯酸 (EA) 也可以依照本发明施用。DHA 与 AA 或 EA 的比率通常在 5 : 1 至 1 : 1 的范围内。

[0044] 短链脂肪酸 (SCFA) 可以在维持肠粘膜屏障中起作用。这些 SCFA 是碳水化合物的细菌代谢产物,并且可能是共生细菌或益生菌 (probiotics) 有益效应的部分原因。因此,SCFA 可以被看作是“益生菌”。目前的关注涉及将益生菌用于早产儿,部分基于向免疫缺陷宿主提供活细菌的安全考虑。依据本发明,丁酸可用于提供益生菌的益处而没有有害的副作用。丁酸的剂量可以是例如 100-800mg/Kg/ 天。

[0045] 依照本发明,较高的丁酸摄取可用于增加紧密连接蛋白质 (闭合蛋白 (claudin) 和闭锁蛋白 (occludin)) 表达以及减少对细胞旁 (paracellular) 标记物的离体渗透性。使用丁酸还下调小肠中的炎症应答,并且防止其传播至远端器官,以及某些由于炎症可在肝、肺和脑中观察到的病理学。

[0046] 本发明的制剂可用作早期攻击性胃肠外营养和其它肠内营养物如人奶的辅助物,其改善新生儿健康并且减少发病率以及与缺少肠内营养和长期胃肠外营养有关的成本。

[0047] 在进一步的实施方案中,本发明的制剂可用于改善肠道手术的创伤愈合以及减轻炎性肠疾病的症状。

[0048] 如下文详细描述,本发明制剂的功效已经在杯子胃造口术喂食模型的大鼠仔鼠中评价,以分步骤方式评价补充具有以下的“起动剂配方”的作用:1) 高蛋白质;2) GLN;3)

DHA ;和 4) 丁酸。已经在非炎性状态和炎性状态下就肠屏障功能、肠源性炎症、炎症传播和远端器官病理学方面评价了该制剂。

[0049] 关于本发明的大鼠研究证明了：

[0050] 1. 蛋白质剥夺 (25% 正常摄取) 与肠绒毛萎缩有关。

[0051] 2. GLN 和 GLU 都不能恢复这种作用,但是更多的蛋白质摄取与增加的肠闭合蛋白水平有关。

[0052] 3. 正常蛋白质配方 (其等同于当大鼠仔鼠由母鼠养育时所得的摄取量) 不防止 LPS 引发的肠 CINC 或 $\text{TNF } \alpha$ 生成。

[0053] 4. 但是,在蛋白质剥夺、用 LPS 治疗的大鼠中的 GLN 补充,减少了肠的 CINC (IL-8 的啮齿动物类形式 - 强效的嗜中性粒细胞化学引诱物) 生成。

[0054] 5. GLN 补充所导致的肠 CINC 生成减少与肠髓过氧化物酶和炎症形态学标记物的减少有关。

[0055] 6. GLN 诱发的肠 CINC 减少与较低的血浆 CINC 和 $\text{TNF- } \alpha$ 水平有关,表明这种作用可解释成炎症及对肠外器官的损害减少。

[0056] 7. 向 BBDP 大鼠 - 已知具有高渗透性肠、继而发展成糖尿病的品种 - 施用 NaB, 经由下调炎症应答而减少由糖尿病引起的死亡率,推定继发于维持改善的肠粘膜完整性。

[0057] 细胞培养研究支持 :GLN 剥夺：

[0058] 1. 减少跨上皮电阻抗,增加渗透性并减少闭合蛋白表达。

[0059] 2. 加重源于人类成人与胎儿细胞的 LPS 和 $\text{TNF } \alpha$ 引发的 IL-8 生成。源于人类胎儿的细胞 (H4) 比成人 (Caco-2) 源性细胞对 LPS 和 GLN 剥夺更敏锐。

[0060] 3. 在成人源性细胞中通过增加 $\text{I } \kappa \text{ B}$ 的蛋白分解起作用,允许更多 $\text{NF } \kappa \text{ B}$ 释放、核转运和 DNA 结合,但是在胎儿源性细胞中通过减少翻译激活 (减少 $\text{eIF- } \alpha$) 起作用,因此减少 $\text{I } \kappa \text{ B}$, 允许更多的 $\text{NF } \kappa \text{ B}$ 释放、核转运和 DNA 结合。

[0061] n-6 和 n-3LCPUFA 和丁酸的细胞培养研究：

[0062] 1. 显示 DHA 可以下调 $\text{TNF } \alpha$ 诱发的炎症。

[0063] 2. 显示 DHA 可以下调由 Toll 样受体配体 poly I:C 诱导的炎症应答。

[0064] 3. 显示丁酸明显增加 Caco-2 细胞的跨上皮电阻抗 - 细胞旁完整性的主要标记物。

[0065] 肠上皮细胞 GLN 剥夺研究,通过蛋白质印迹显示闭合蛋白 -1、闭锁蛋白和 ZO-1 蛋白表达减少,通过免疫荧光显微镜检查显示周围 (perijunctional) 闭合蛋白 -1 消失以及闭锁蛋白减少。透射电子显微镜检查揭示 :GLN 剥夺细胞在邻接细胞的顶端与侧缘 (apical lateral margin) 之间形成不规则的连接复合体。

[0066] 以下是例证用于实施本发明的规程的实施例。这些实施例不应被解释为限制。所有百分比以重量计,且所有溶剂混合物比例以体积计,除非另有说明。

[0067] 实施例 1

[0068] GLN 的营养价值可受粘膜上皮高极化性质的影响,从而当通过顶端 (apically) 或基底 (basally) 提供相同的浓度时 GLN 提供营养优势。比较了顶端对基底的 GLN 摄取动力学,发现没有显著不同或者没有导致显著分化差异。发现缺乏 GLN (介质不添加 GLN 和 GLN 合成酶抑制) 引起跨上皮电阻抗 (TER) 显著降低,渗透性增加。

[0069] 在体内观察到类似的作用。在 Caco-2 细胞培养物中,GLN 剥夺的作用当 GLN 合成

酶 (GS) 也被抑制时是最显著的,但是当用介质变化应激细胞培养物时,即使没有 GS 抑制也可以被诱导。

[0070] 如用碱性磷酸酶活性评价的 Caco-2 细胞的分化也明显依赖于 GLN。当 GLN 合成酶活性被 MS 抑制时,谷氨酸盐不会“援救 (rescue)”碱性磷酸酶的恢复;然而施用于细胞培养介质的 GLN 完全恢复了碱性磷酸酶活性。

[0071] 进行研究来评价在缺乏 GLN 时,谷氨酸盐、核苷酸单磷酸混合物、精氨酸或葡糖胺是否可以支持大鼠肠隐窝细胞 (IEC-6) 的增殖。结果显示,在缺乏外源性 GLN 时,谷氨酸盐、葡糖胺、精氨酸或核苷酸单磷酸获得与 GLN 相似的增殖。用谷氨酸盐、葡糖胺、精氨酸或核苷酸混合物处理的 GLN 合成酶抑制的细胞显示,在所有处理剂量下与用 GLN 处理的细胞相比增殖减少。这表明:用于使这些前体转化成 GLN 的活性 GLN 合成酶或对细胞增殖显示与 GLN 相同作用的化合物的必要性。

[0072] 实施例 2-GLN 和谷氨酸盐对 Caco-2 细胞细胞间连接形态学和紧密连接蛋白的作用

[0073] 利用“杯子中的仔鼠 (pup-in-a-cup)”大鼠模型,检查发育大鼠小肠中的蛋白质剥夺和 GLN 或 GLU 补充。四组 6-7 天龄的仔鼠通过胃造口术管喂养有或没有另外的 GLN 或谷氨酸盐 (GLU) 的 100% 或 25% 蛋白质 (相对于母鼠喂养的大鼠) 大鼠奶替代品 (RMS), 喂养 6 天。接受 100% 蛋白质 RMS 的仔鼠比接受 25% 蛋白质 RMS+GLN/GLU 补充的 3 组仔鼠经历更好的生长。因此,更好的生长可以用肠内蛋白质补充来实现,单独的 GLN 或 GLU 都不能挽救蛋白质剥夺的作用。

[0074] 绒毛大小是吸收能力的主要组分。接受 100% 蛋白质 RMS 的仔鼠中的绒毛高度和面积与给予其它 RMS 配方的 3 组仔鼠相比更大,然而绒毛高度和面积在接受有或没有 GLN 或 GLU 下 25% 蛋白质的各组之间没有差异。因此,蛋白质摄取对维持绒毛尺寸很关键。

[0075] 实施例 3- 高蛋白膳食对紧密连接蛋白质的作用

[0076] 紧密连接蛋白质在肠屏障的细胞旁渗透性中起不可缺少的作用,这些蛋白中的两种 - 闭合蛋白 (claudin) 和闭锁蛋白 (occludin) 使用蛋白质印迹法评价。紧密连接蛋白质闭合蛋白 -1 在喂养 100% 蛋白膳食的组中显著更高,而闭锁蛋白在 4 组中没有差异。

[0077] 实施例 4-CINC mRNA

[0078] 细胞因子诱导的嗜中性粒细胞化学引诱物 (CINC) 是啮齿动物趋化因子,其执行嗜中性粒细胞化学引诱物功能,类似于人类中的 IL-8。大量的这种促炎介质可以是有害的。肠内施用 LPS 显著增加肠 CINC。

[0079] 为了阐明膳食对小肠 CINC mRNA 的作用,进行了 RT-PCR。蛋白质剥夺和 LPS (仅仅 25% 蛋白质的组) 增加了 CINC mRNA 表达。GLN 补充使 CINC mRNA 减至与母鼠喂养的仔鼠类似的水平。密度测定法显示 25% 蛋白质喂养的大鼠肠与母鼠喂养的仔鼠相比具有显著更高的 CINC mRNA 水平,而 GLN 逆转了这种作用。但是, Glu 没有显示与 GLN 相同的作用。

[0080] 实施例 5-CINC 肽

[0081] 与母鼠喂养的仔鼠相比,被提供 100% 和 25% 蛋白质的 LPS 处理的仔鼠的肠 CINC 肽升高约 13 倍。GLN 和 Glu 分别使肠 CINC 肽减少 73% 和 80%。胃造口术喂养的、LPS 处理的仔鼠也具有更高水平的血浆 CINC 肽。GLN 而不是 Glu 减少了血浆 CINC 肽。

[0082] 实施例 6- 髓过氧化物酶反映在炎症位点嗜中性粒细胞渗入和活性

[0083] 胃造口术喂养的、LPS 处理的大鼠的肠髓过氧化物酶 (MPO) 活性的约 6 倍升高分别被 GLN 和 Glu 减少 92% 和 54%。

[0084] 大鼠仔鼠的研究证明了蛋白质消耗导致明显的肠萎缩,其不能用 GLN 或 GLU 挽救。但是,在第二组研究(炎症病症)中,蛋白质没有减少 LPS 诱导的肠 CINC 生成,但 GLN 减少 LPS 诱导的肠 CINC 生成。这表明营养物的联合(肠内蛋白和添加的 GLN)在防止肠萎缩(蛋白质作用)和减少炎症(GLN 作用)中可能具有协同作用。这些研究还支持肠内 GLN 的操作可以改变肠连接完整性,且这可能与肠炎症的引发和传播有关。

[0085] 实施例 7-丁酸对肠上皮内连接的作用

[0086] Caco-2 细胞的研究显示丁酸对肠上皮内连接具有显著的作用。图 1 显示在治疗 24 小时后由丁酸介导的早期融合 Caco-2 细胞跨上皮电阻抗的显著增加。

[0087] 实施例 8- ω 3 脂肪酸

[0088] 在于杯子模型的仔鼠中体内评价之前,在作为初始模型的肠上皮细胞培养中评价 ω 3 脂肪酸的作用。数据显示在肠上皮细胞中具有显著的抗炎作用。

[0089] 两种主要膳食 n-3 长链多不饱和脂肪酸 (PUFA)、二十碳五烯酸 (EPA, 20 :5n-3) 和二十二碳六烯酸 (DHA, 22 :6n-3) 的抗炎性质已经在临床上用于治疗炎症性疾病的症状 (Calder, P. C. “多不饱和脂肪酸和炎症”, Biochem. Soc. Trans., 2005. 33 :423-427)。

[0090] EPA 和 DHA 用作 n-3PUFA,且亚油酸 (LA, 18 :2n-6) 用作 n-6PUFA。H4 和 Caco-2 细胞分别用不同剂量的 EPA、DHA 和 LA 以及不同的组合预处理 24 小时。然后将 TNF- α (对于 H4, 1 μ g/L;对于 Caco-2 细胞, 50 μ g/L) 加至细胞培养基中,将细胞再培养 24 小时。用于 H4 细胞系的较低剂量反映它们对炎症刺激物敏锐的灵敏度。

[0091] 评价了不同剂量的脂肪酸对 TNF α 诱发的 IL-8 生成的作用,见于图 6A-B。

[0092] LCPUFA 研究的总结:

[0093] 1. H4(胎儿)细胞较 Caco-2(成人)细胞对 TNF- α 和 PUFA 刺激敏感得多。

[0094] 2. LA 和 EPA 显示在有和没有 TNF- α 刺激下在 H4 中较 Caco-2 细胞中对 IL-8 生成具有更大的抗炎作用。

[0095] 3. DHA 显示对 Caco-2 的抗炎作用,并没有加重 H4 细胞中 TNF- α 诱导的 IL-8 生成。这些研究表明:辅助性 DHA 补充而不是 LA 或 EPA 的价值。

[0096] 实施例 9-PUFA 对肠上皮中 Poly I:C 诱导的 IL-8 生成的作用

[0097] 为了测定 DHA 是否对非 TNF α 的炎症诱导物具有作用,对另一种 Toll 样受体的刺激进行评价。聚核糖肌苷酸-聚核糖胞苷酸 [poly(I:C)] 是实验上用于模仿病毒感染的合成双链 RNA。最近它已经被确定是 toll 样受体 3 (TLR3) 的关键性刺激物之一。还未报道 n-3PUFA 对肠上皮中病毒诱导的炎症的作用。

[0098] 二十二碳六烯酸 (DHA, 22 :6n-3) 用作 n-3PUFA,并且亚油酸 (LA, 18 :2n-6) 用作 n-6PUFA。分化的 Caco-2 细胞用不同剂量的 DHA 或 LA 预处理 24 小时。然后该细胞用 50 μ g/ml poly(I:C) 处理另外的 24 小时。收集培养介质,通过 ELISA 测量 IL-8 生成。第一实验确定 Poly(I:C) 对一种主要的促炎趋化因子 IL-8 刺激的作用。Poly(I:C) 使 IL-8 生成增加 10 倍。

[0099] 评价了 DHA 和 LA 对 poly(I:C) 诱导的 IL-8 生成的作用。DHA (100 μ M) 使 poly(I:C) 诱发的 IL-8 生成减少 75%。但是,剂量为 50 μ M 和 100 μ M 的 LA 没有显著减少

由 Poly IC 诱导的 IL-8 生成。

[0100] 这些结果显示：多不饱和脂肪酸、尤其是 DHA、n-3PUFA 抑制 Caco-2 肠细胞中 poly(I:C) 诱导的 IL-8 生成，表明 DHA 可在由肠上皮病毒感染引起的抗炎症应答中发挥重要作用。

[0101] 实施例 10- 用于肠内施用的营养组合物

[0102] 本发明组合物优选为用于肠内施用的营养组合物。即，它设计用于口服、胃内或经幽门使用。本发明组合物可以是婴儿配方或成人营养组合物，其可以是基于奶、基于大豆或基于其它食物来源。该组合物可以配制成粉末或液体营养组合物，用于为婴儿、儿科和成人人群体制备的配方。本发明组合物可通过包括可接受水平的维生素和矿物质配制成全营养膳食形式。该组合物可以是膳食产品形式，例如婴儿配方、代乳品和膳食替代品或膳食补充物。

[0103] 在一个实施方案中，新的婴儿配方为营养全面的。所谓术语“营养全面的”是指该组合物包含足够的营养物以在延长期内维持健康的人类生活。本发明的婴儿配方包含用于满足人类婴儿的营养需要即蛋白质和其它营养物例如维生素和矿物质的成分。

[0104] 本发明组合物可以包含氮源（即氨基酸和 / 或蛋白质），该氮源的量通常为约 1g 至约 10g 每 100kcal 总组合物，优选为约 2g 至约 6g 每 100kcal。维生素和矿物质在全营养组合物中的量通常足以满足 100% 的美国推荐的日摄取量 (RDI)，为约 500 至约 3,000kcal、优选为约 1,000 至约 3,000kcal。

[0105] 在本发明营养组合物的一个实施方案中，维生素和矿物质的量足以满足 100% 的 RDI，为约 500 至约 3,000kcal、优选为约 1,000 至约 3,000kcal。如本文所用的 RDI 是指在《Federal Register》，Vol. 58, No. 3, 星期三，1993 年 1 月 6 日，第 2227 页中公开的那些，如下：维生素 A：5,000 国际单位；维生素 C：60 毫克；硫胺：1.5 毫克；核黄素：1.7 毫克；烟酸：20 毫克；钙：1.0g；铁：18 毫克；维生素 D：400 国际单位；维生素 E：30 国际单位；维生素 B₆：2.0 毫克；叶酸：0.4 毫克；维生素 B₁₂：6 微克；磷：1.0g；碘：150 微克；镁：400 毫克；锌：15 毫克；铜：2 毫克；生物素：0.3 毫克；泛酸：10 毫克。

[0106] 在一个实施方案中，新的婴儿配方包含谷氨酰胺，其量少于配方重量的 0.1%。优选，配方中谷氨酰胺的量为配方重量的约 0.001% 至 0.098%，更优选为约 0.01% 至 0.098% 重量。

[0107] 在本发明方法中，该婴儿配方或膳食补充剂以足以提高胃肠道健康的量施用于婴儿。在优选的实施方案中，所述量为约 0.001 至约 10,000mg/kg 对象体重 / 天，更优选为约 0.01 至约 1000mg/kg / 天，进一步更优选为约 0.01 至约 50mg/kg / 天，甚至更优选为约 0.1 至约 10mg/kg / 天。或者，施用于婴儿的量为约 1mg 至约 10,000mg / 天，优选约 10mg 至约 1000mg，更优选为约 10mg 至约 500mg。

[0108] 除二肽之外存在的蛋白质来源可以是脱脂乳固体、脱脂乳固体和乳清蛋白质的组合、脱脂乳和 / 或乳清固体的部分水解物、大豆蛋白分离物或部分水解的大豆蛋白分离物。婴儿配方可以是以酪蛋白为主或以乳清为主。

[0109] 全营养组合物包含所有被认为在日常饮食中必不可少的维生素和矿物质，且这些物质应以营养上有效的量存在。本领域技术人员理解，已经确定某些已知对正常生理功能来说必需的维生素和矿物质的最低需要量。从业者也理解，需要提供适宜的额外量（超量）

的微生物和矿物质成分,以补偿在加工和贮藏此类组合物期间的部分损耗。

[0110] 选择用于本发明的婴儿配方的具体的维生素或矿物质化合物,需要考虑该化合物与所用的具体加工条件和储存期 (shelf storage) 相容性相关的化学性质。

[0111] 矿物质、维生素和其它任选存在于本发明组合物中的营养物的实例包括维生素 A、维生素 B₆、维生素 B₁₂、维生素 E、维生素 K、维生素 C、叶酸、硫胺、肌醇、核黄素、烟酸、生物素、泛酸、胆碱、钙、磷、碘、铁、镁、铜、锌、锰、氯化物、钾、钠、硒、铬、钼、牛磺酸和 L- 肉碱。矿物质通常以盐形式添加。除了相容性和稳定性考虑之外,特定的矿物质与其它维生素的存在和量将随预期的婴儿群体而略有改变。

[0112] 本发明的婴儿配方通常也包含乳化剂和稳定剂,如大豆卵磷脂、角叉菜胶等。

[0113] 本发明的婴儿配方可以任选地包含可具有有益作用的其它物质,例如乳铁蛋白、核苷酸类、核苷类、免疫球蛋白类等。

[0114] 本发明的婴儿配方是浓缩液体形式、液态即时消耗形式或粉末形式。当然,如果是粉末形式,则配方用水稀释成正常强度以形成即时消耗形式。

[0115] 本发明的液态婴儿配方的重量克分子渗透压浓度 (当即时消耗时) 可以是约 100 至 300mOsm/kg H₂O,更通常为约 200 至 300mOsm/kg H₂O。

[0116] 本发明的婴儿配方如有需要,可以通过本领域已知技术灭菌,例如热处理,如高压灭菌或干馏 (retorting) 等。

[0117] 本发明的婴儿配方可以以本领域已知的用于贮存营养产品的任何类型容器包装,例如玻璃、线条纸板、塑料、包层的金属罐等。

[0118] 本发明的婴儿配方在重建后是贮存稳定的。所谓“贮存稳定”是指即时消耗形式的配方保持在单一均相中 (即经目测不会分成多于一个相) 或增稠剂在冰箱贮存过夜后经目测不会以沉淀析出。由于该产品增稠的性质,本发明的配方也具有保持液态的优点 (即当在冰箱贮存过夜时不会胶化成实体团块)。

[0119] 本发明在期望的稳定性和物理特性方面提供商业上可接受的产物,该产物证明很少或没有可观察到的与美拉德反应有关的褐变效应副产物。此外,本发明组合物在重建后的可接受期间内 (或如果以液体形式制备在贮存期限内) 基本上是均质的。本发明特别可用于预防并治疗早产视网膜病变的婴儿配方制剂,尽管它可等同地适用于对以下选择群体特有的其它要素膳食:处于糖尿病视网膜病变、血管增殖性视网膜病变或异常血管化增殖等的风险或者疑似患有糖尿病视网膜病变、血管增殖性视网膜病变或异常血管化增殖等的选择群体。

[0120] 实施例 11 一具体组合物

[0121] 对于 5 盎司的食用份量,从营养的观点,本发明的组合物可包括例如 2.5-10 克蛋白质、少于 5 克脂肪、少于 10 克碳水化合物和 130-135 克 (通常 134 克) 水以及 GLN、DHA 和丁酸。在一个实施方案中,该组合物的组成如下:上述量的上述成分和任选的维生素、矿物质和营养素。在另一个实施方案中,该组合物可进一步包括适当的载体、防腐剂以及不会降低将组合物安全地施用于婴儿的能力的物质。因此,除 GLN、丁酸和 DHA 之外,该组合物可包括例如任何或所有下述物质 (其中百分比是示例性的):脱脂乳、乳清蛋白浓缩物、高山被孢霉 (*mortierella alpina*) 油 - 花生四烯酸 ARA 的来源 - 少于 1%、寇氏隐甲藻 (*cryptothecodinium cohnii*) 油 - 二十二碳六烯酸 DHA 的来源 - 少于 1%、维生素 A 棕榈酸

酯 - 少于 1%、维生素 D3 - 少于 1%、维生素 E 醋酸酯 - 少于 1%、维生素 K1 - 少于 1%、盐酸硫胺 - 少于 1%、核黄素 - 少于 1%、盐酸维生素 B6 - 少于 1%、维生素 B12 - 少于 1%、烟酰胺 - 少于 1%、叶酸 - 少于 1%、泛酸钙 - 少于 1%、生物素 - 少于 1%、抗坏血酸 - 少于 1%、氯化胆碱 - 少于 1%、肌醇 - 少于 1%、碳酸钙 - 少于 1%、氧化镁 - 少于 1%、硫酸亚铁 - 少于 1%、硫酸锌 - 少于 1%、硫酸锰 - 少于 1%、硫酸铜 - 少于 1%、氯化钾 - 少于 1%、柠檬酸钾 - 少于 1%、氢氧化钾 - 少于 1%、亚硒酸钠 - 少于 1%、牛磺酸 - 少于 1%、L- 肉碱 - 少于 1%、核苷酸类 - 少于 1%、腺苷 5' - 单磷酸 - 少于 1%、胞苷 5' - 单磷酸 - 少于 1%、鸟苷 5' - 单磷酸二钠 - 少于 1%、尿苷 5' - 单磷酸二钠 - 少于 1%。此外,在示例性的实施方案中,每份各种成分的量可以如下(其中应理解,所列出的量可以变化 50%或更多)。

[0122] 亚油酸 860.0mg

[0123] 维生素 A 300.0IU

[0124] 维生素 D 60.0IU

[0125] 维生素 E 2.0IU

[0126] 维生素 K 8.0mcg

[0127] 硫胺(维生素 B1) 80.0mcg

[0128] 核黄素(维生素 B2) 140.0mcg

[0129] 维生素 B6 60.0mcg

[0130] 维生素 B12 0.3mcg

[0131] 烟酸 1000.0mcg

[0132] 叶酸(Folacin) 16.0mcg

[0133] 泛酸 500.0mcg

[0134] 生物素 3.0mcg

[0135] 维生素 C(抗坏血酸) 12.0mg

[0136] 胆碱 24.0mg

[0137] 肌醇 6.0mg

[0138] 钙 78.0mg

[0139] 磷 43.0mg

[0140] 镁 8.0mg

[0141] 铁 1.8mg

[0142] 锌 1.0mg

[0143] 锰 15.0mcg

[0144] 铜 75.0mcg

[0145] 碘 10.0mcg

[0146] 硒 2.8mcg

[0147] 钠 27.0mg

[0148] 钾 108.0mg

[0149] 氯化物 63.0mg

[0150] 所有专利、专利申请、临时申请以及本文所提及或引用的出版物的全部内容、包括所有图和表通过引用并入本文,达到它们与本说明书明确的教义一致的程度。

[0151] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于例证性目的,本领域技术人员将想到根据这些实施例和实施方案进行各种变更或改变,而且这些变更或改变包括在本申请的精神和范围内。

丁酸对 Caco-2 细胞中的 TER 的作用

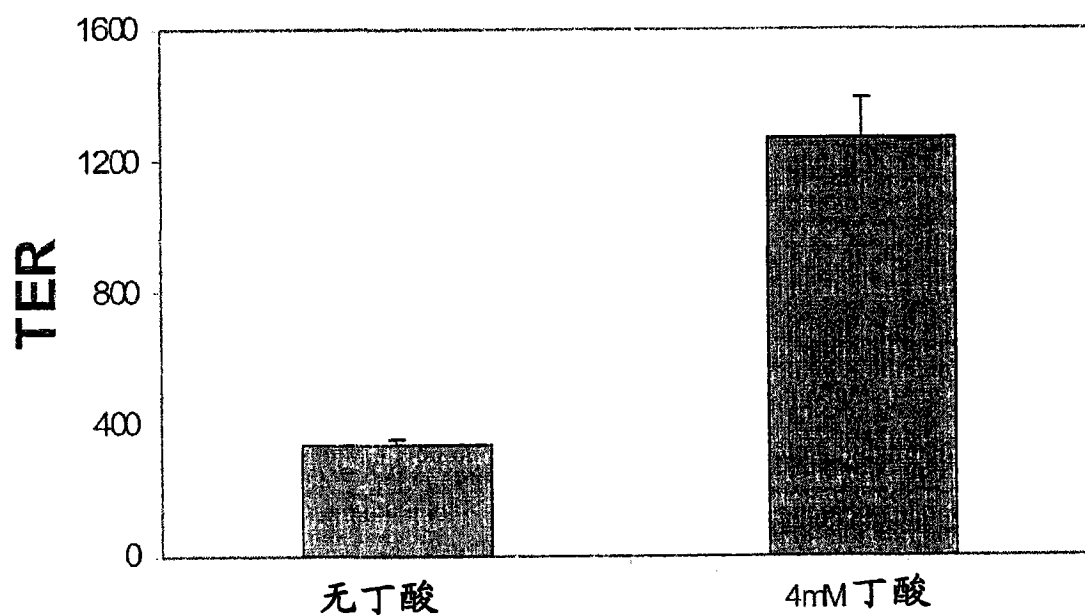


图 1

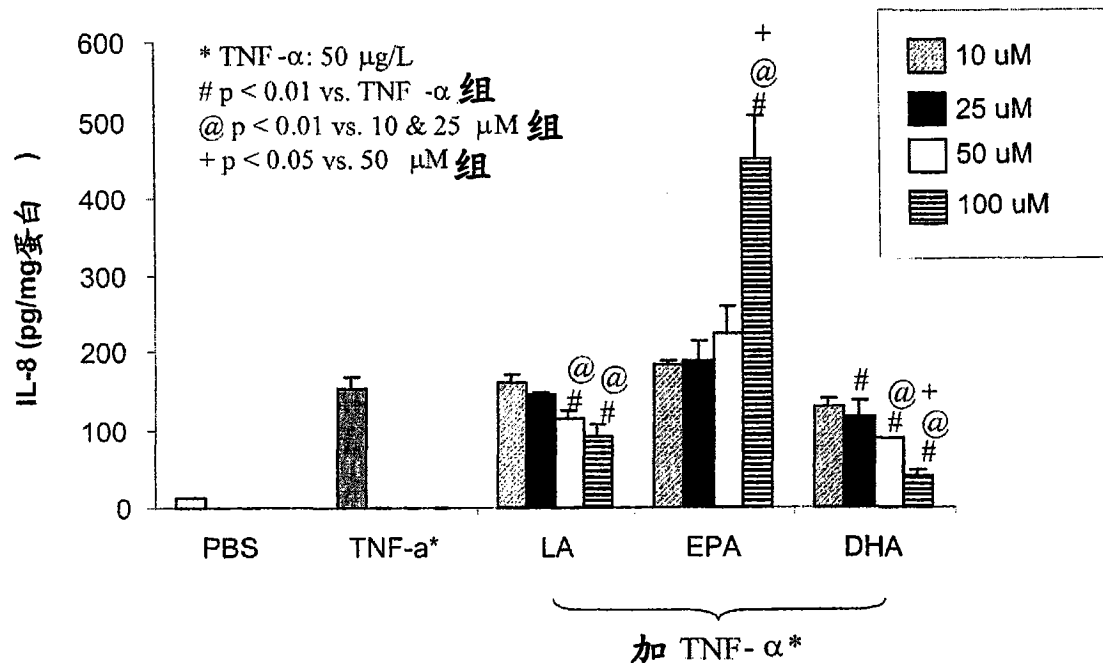
n-3/n-6 PUFA 对 Caco-2 细胞中 TNF- α 诱发的 IL-8 生成的剂量应答

图 2A

n-3/n-6 PUFA 对 H4 细胞中 TNF- α 诱发的 IL-8 生成的剂量应答

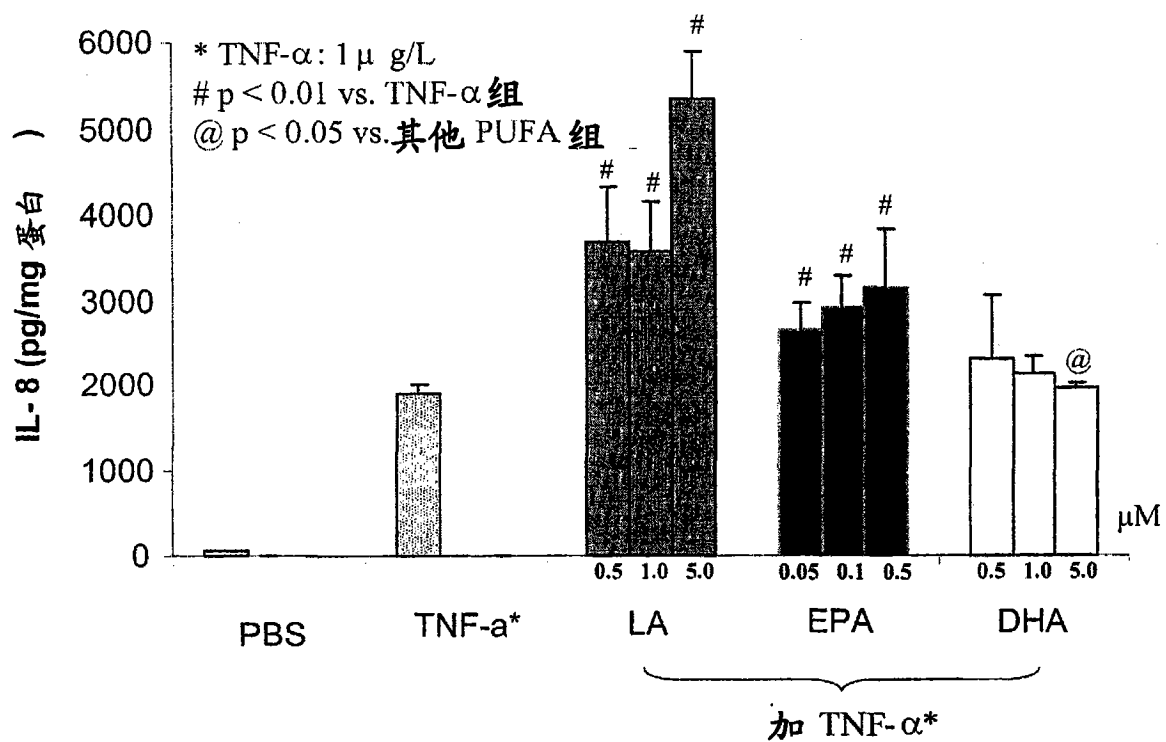


图 2B