

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 35/74
A61P 3/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 01821884.9

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 9 日 [11] 授权公告号 CN 1226039C

[22] 申请日 2001.11.12 [21] 申请号 01821884.9
[30] 优先权
[32] 2000.11.10 [33] SE [31] 0004124-4
[86] 国际申请 PCT/SE2001/002500 2001.11.12
[87] 国际公布 WO2002/038165 英 2002.5.16
[85] 进入国家阶段日期 2003.7.10
[71] 专利权人 普罗比公司
地址 瑞典隆德
[72] 发明人 玛丽-路易丝·约翰森
马雷克·纳鲁茨威茨
审查员 陈伊诺

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 乳杆菌属菌株在减少代谢综合征危险因素中的应用

[57] 摘要
本发明涉及乳杆菌属菌株尤其是植物乳杆菌 299(DSM6595) 或植物乳杆菌 299v(DSM9843) 在制备减少代谢综合征危险因素的药物中的用途，尤其是在制备升高血清中 HDL 胆固醇的水平，降低 LDL，胰岛素和 leptin 的水平以及降低高血压的药物中的用途，所述菌株可引起结肠中丙酸或乙酸量的升高。

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

1. 植物乳杆菌菌株在制备减少与代谢综合征有关的危险因子的药物中的用途，该菌株引起结肠中丙酸或乙酸量的升高，所述危险因子包括血压升高，血液中 HDL 水平降低，LDL 水平升高，胰岛素水平升高，以及 leptin 水平升高。

2. 权利要求 1 的植物乳杆菌菌株的用途，该菌株引起结肠中丙酸或乙酸量的升高，其中所述的植物乳杆菌菌株用于制备降低血清中 leptin 水平的药物。

3. 权利要求 1 或 2 的用途，其中所述植物乳杆菌菌株具有与肠粘膜结合的能力。

4. 权利要求 3 的用途，其中所述植物乳杆菌菌株属于这样一类菌株，通过 Pearson 积矩相关系数和使用算术平均值的不加权配对分组算法 (UPGMA; GelCompare 3.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析时，与保藏号为 DSM6595 的植物乳杆菌 299 菌株有高于 55 % 的限制性内切酶分析的相似性。

5. 权利要求 1 的用途，其中所述植物乳杆菌菌株属于这样一类菌株，通过 Pearson 积矩相关系数和使用算术平均值的不加权配对分组算法 (UPGMA; GelCompare 3.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium) 分析时，与保藏号为 DSM6595 的植物乳杆菌 299 菌株有高于 55 % 的限制性内切酶分析的相似性。

6. 权利要求 4 的用途，其中所述菌株是植物乳杆菌 299v, DSM9843。

7. 权利要求 1 的用途，其中所述菌株是植物乳杆菌 299v, DSM9843。

8. 权利要求 6 的用途，其中所述植物乳杆菌菌株与食物纤维结合使用。

乳杆菌属菌株在减少代谢
综合征危险因子中的应用

5

发明背景

代谢综合征由许多代谢疾病组成，多数代谢疾病促进动脉粥样硬化的发生和增加心血管疾病的危险。代谢综合征的主要构成是致动脉粥样化异常脂血症(atherogenic dyslipidemia)，血压升高，血浆葡萄糖升高，和前凝血
10 (protrombotic)状态。致动脉粥样化异常脂血症表现为甘油三酯升高，少量低密度脂蛋白(LDL)升高和高密度脂蛋白(HDL)降低。代谢综合征的机制尚未完全了解，但是患有该综合征的大多数病人表现出胰岛素水平升高和对胰岛素的细胞作用的抗性。

患有腹部肥胖症的病人经常显示出代谢综合征的许多危险因子。任何
15 病人其甘油三酯浓度超过 150mg/dl，就可怀疑患有代谢综合征。110-125mg/dl 的空腹血糖的中度升高是存在代谢综合征的另一个暗示。然而，在治疗该代谢综合征的异常脂血症中首先应该是降低致动脉粥样化的脂蛋白，例如 LDL，要做到这一点目前最有效的是用他汀类(statins)来进行
(Scott M. Grundy, Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic
20 syndrome, Am J Cardiol 1999; 83: 25F-29F)。

现有技术

以前的研究(见 WO99/07827)已经表明：添加有乳杆菌属菌株的饮食可有效地降低高胆固醇血症患者血液中的纤维蛋白原水平和胆固醇水平。

25 已经研究了含乳清蛋白的发酵奶对血清脂类的影响并在 J Dairy Sci 2000 Feb; 83(2):255-63 中报道。使用这种发酵奶 8 周后，高密度脂蛋白胆固醇水平显示出显著的升高。此外致动脉粥样硬化指数(atherogenic index)，也就是(总胆固醇-高密度脂蛋白胆固醇)/高密度脂蛋白胆固醇和收缩压显著地降低。所测试的菌株是干酪乳杆菌(lactobacillus casei)和嗜热链球菌
30 (streptococcus thermophilus)。

WO 96/29083 中涉及具有甘露糖-特异性粘附素的植物乳杆菌

(*Lactobacillus plantarum*)菌株,尤其是那些就 REA 而言与植物乳杆菌 299, DSM 6595 有高于 70%相似性的菌株,用于制备抑制表达甘露糖-特异性粘附素的病原菌与上皮细胞表面结合的药物组合物。其中植物乳杆菌 299v, DSM 9843 被描述为优选的菌株。这个菌株群似乎包括所有的已经从人肠粘
5 膜分离出的植物乳杆菌菌株。

附图说明

树状图显示的是不同受检的乳杆菌属菌株之间的相似性百分数,其基于 Pearson 积矩相关系数(product moment correlation coefficient)和 UPGMA
10 通过 REA -方法鉴定。

发明描述

我们发现在胆固醇水平中度升高的患者中,饮食中添加 ProViva,含果汁的功能性食用产品,发酵燕麦和植物乳杆菌 299v(DSM 9843)可显著地降
15 低 LDL 胆固醇和纤维蛋白原水平,胰岛素和 leptin 水平,还可降低收缩压,增加 HDL 胆固醇水平。这表明涉及代谢综合征的大多数危险因子确实受到了影响。

人们相信此种影响归因于消化道细菌的发酵,产生短链脂肪酸(SCFA)乙酸和丙酸。乙酸和丙酸被吸收进血液,进入肝脏以及进入代谢途径。据
20 推测 SCFA,主要是丙酸,或许是通过抑制血清中游离脂肪酸水平的升高和改善胰岛素敏感性来改善葡萄糖耐量和抑制胆固醇在肝脏中合成的。现在已经发现所述的 SCFA 还对 PPAR 的表达有影响,并且已经证明上调 PPAR 可增加 HDL 的主要成分 ApoA1 的产生。

先前的研究中,健康的成人志愿者服用含植物乳杆菌 299v 的果品饮料
25 (Johansson et al., Int J Food Microbiol 42(1998)29-38)显示出显著地提高短链脂肪酸尤其是丙酸和乙酸粪便中的浓度。这种影响可解释为 299v 刺激结肠的细菌菌群以制造乙酸和丙酸。然而,并不是所有的乳杆菌属菌株都引起这种短链脂肪酸的升高。在后来的研究中(Molin et al., 未付印的)已经表明鼠李糖乳杆菌 271(DSM 6594)以及嗜热链球菌菌株没有引起粪便中 SCFA 的
30 升高。已检测的嗜酸乳杆菌的菌株也是如此。

丙酸对胆固醇水平的影响也已经在临床试验中用丙酸衍生物异丁苯丙

酸证实(Zapolska Downar et al., Eur J Clin Invest 2000; 30: 1-3)。其除了减少细胞氧化应急因素和抑制单核细胞粘附内皮之外,还发现 HDL 胆固醇的水平升高了。

- 因而本发明涉及能引起丙酸或者乙酸的量在结肠升高的乳杆菌属的菌株在制备降低一个或多个与代谢综合征有关的危险因子的药物中的应用,所述的危险因子包括血压升高,血液中 HDL 水平降低,LDL 水平升高,以及胰岛素水平升高和 leptin 水平升高。

本发明尤其涉及具有能够降低血压,升高血液中 HDL,和降低 LDL,胰岛素水平以及 leptin 水平的乳杆菌属菌株的应用。

- 10 本发明所用优选的乳杆菌属菌株是植物乳杆菌。

- 本发明所用菌株的另一优选特性是能够与肠粘膜结合。看来有两种因素对于乳杆菌生态作用的发挥是关键的。首先是定居(colonise)肠道的能力,即最后活菌给药后其能以较高数量存活一段时间。这种特性对于乳杆菌抑制病原菌的生长和增殖的能力是重要的,但这还不足。第二是与肠上皮细胞或粘蛋白直接结合的能力。这可能是促进定居的因素之一,但并不是定居的必备条件。

乳杆菌属菌株已经显示出可增加肠粘蛋白的产生,并且人们相信所述的粘蛋白可中和病原体,改善细菌的增殖。优选本发明所用的乳杆菌属菌株还具有增加结肠中粘蛋白产量的能力。

- 20 本发明还涉及植物乳杆菌菌株在制备降低一或多个与代谢综合征有关的危险因子的药物中的应用,所述菌株属于这样一类菌株,其通过 Pearson 积矩相关系数和使用算术平均值的不加权配对分组算法(the unweighted pair group algorithm with arithmetic averages) (UPGMA; GelCompare 3.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium)分析时,与植物乳杆菌 299(保藏号: DSM 6595)有高于 55%的限制性内切酶分析的相似性,所述危险因子包括血压升高,血液中 HDL 的水平降低,LDL 水平升高,胰岛素水平升高和 leptin 水平升高。本发明优选用的菌株具有降低血压,升高血液中 HDL 水平,降低 LDL 水平,胰岛素水平和 leptin 水平的能力。55%和 70%相似性之间的界限是不明显的。大多数来自人肠粘膜的菌株具有不高于 70%的相似性,但是例如具有不高于 55%的相似性的植物乳杆菌 386 也已经从人肠道分离并且和该类的其它菌株具有相同的结合机制。
- 25
- 30

所述优选的植物乳杆菌菌株在图中显示, 即: 植物乳杆菌 299, 植物乳杆菌 299v, 植物乳杆菌 107, 植物乳杆菌 105, 植物乳杆菌 79, 植物乳杆菌 275, 和植物乳杆菌 386。ATCC 14917^T表示植物乳杆菌菌株的型。

植物乳杆菌 299 和 299v 菌株, 均从健康人的肠粘膜分离出, 已经分别
5 于 1991 年 7 月 2 日和 1995 年 3 月 16 日保藏在德意志微生物和细胞培养物保藏中心(the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), 保藏号为 DSM 6595 (299) 和 DSM 9843 (299v)。

本发明优选的是涉及植物乳杆菌 299v, DSM 9843 菌株的应用。

本发明所用细菌可以以用于药物或食物的常规载体给药以传递到肠
10 道, 例如可通过所研究的细菌发酵的生理学上可接受的基质, 以及尤其是基于淀粉或奶的各种食品, 还有惰性固体或液体物质(例如盐水或水)。适合的基质应该包括不能被胃肠道再吸收, 并且当用乳杆菌发酵时可形成羧酸的液体或固体纤维。适合的含淀粉的基质的实例可以是谷类, 例如燕麦和小麦, 玉米, 根类蔬菜(root vegetables)例如马铃薯和某些水果例如绿香蕉。
15 本发明所用优选的基质, 其还赋予该组合物良好的营养价值, 这些基质是基于例如 WO 89/08405 中描述的燕麦的营养液。检测显示如果食物纤维(dietary fiber)例如以燕麦粥或以葡聚糖(glucans)的形式提供, 可以改进乳杆菌属菌株的作用。

本发明尤其涉及与食物纤维组合的乳杆菌属菌株的用途。

20 本发明所用的细菌可以以任何合适的方式给药, 优选的是口服或直肠给药, 例如以灌肠剂的形式。它们还可通过将导管经胃插入肠内或直接插入肠内而肠内给药。

细菌应该以治疗有效剂量供给, 所述的剂量可以自 10^8 , 优选的是不低于 1×10^{10} CFU/d。

25 根据本发明所述的乳杆菌属菌株可以用于制备升高血清中 HDL 胆固醇水平的药物; 或制备降低高收缩压的药物; 或制备降低血清中胰岛素水平的药物; 或制备降低血清中 leptin 水平的药物。

实施例

30 实施例 1. 丙酸对 PPAR 基因体外表达的影响。

所进行的试验是研究短链脂肪酸对 PPAR 产生的影响。

人脐静脉内皮细胞, HUVEC, 如 Jaffe 等(Biology of Endothelial Cells, Boston, Martinus Nijhoff Publishers, 1984, p. 1-13)所述由脐带通过胶原酶消化获得。简而言之, 用 PBS 灌注脐带静脉以除去血细胞, 再灌注 0.1% 胶原酶(Ia 类型), 于 37℃ 放置 10 分钟。向悬浮的 HUVEC 添加 PBS, 离心并在潮湿的含 5%CO₂ 的空间条件下, 在填充培养基 199 的涂覆明胶的 25 ml 烧瓶中和 6-孔的组织培养板中于 37℃ 培养。将丙酸以 0.1mmol/l, 1.0mmol/l 和 10.0 mmol/l 的量加入到培养基中并测定该酸对 PPAR 表达的影响。

根据 Chomczynski 的方法使用 TRIZOL (Gibco BRL)从细胞中提取总 RNA。分离后, 通过在 1% 的琼脂糖凝胶上使用溴化乙锭染色进行凝胶电泳检测 RNA 样品的完整性。在波长为 260 nm 进行分光光度测定后计算出总 RNA 的浓度。将每种 RNA 样品(500 ng)与 1 U 的 DNase I(Boehringer Mannheim, Germany)于 37℃ 温育 15 分钟, 然后通过 75℃ 加热 3 分钟灭活 DNase I。将这种 DNase-处理过的 RNA (500 ng)溶解于 20μl 反应混合物中, 该反应混合物含有 2.5 mM 的 dATP, dTTP, dCTP 和 dGTP(Progamma, USA), 20 U 的 RNasin (Promega, USA), 100 pM 随机六聚体(Boehringer Mannheim, Germany)和 20 U 的 MMLV 逆转录酶(Boehringer Mannheim)。在 37℃ 温育 60 分钟, 然后将反应温度升高到 94℃ 温育 5 分钟以灭活酶, 最终温度降到 4℃。将等分试样的 cDNA (5μl 的 RT 混合物, 由 125 ng RNA 转录而来的 cDNA)溶解于 40μl 反应混合物中, 该反应混合物包含 10 x PCR 缓冲液(Mg²⁺ 终浓度为 1.5 mM, Boehringer Mannheim), 2.5 mM 的 dATP, dTTP, dCTP 和 dGTP, 10 pM 上游和下游引物(分别是 PPAR 和 GAPDH 组)和 1 U Taq 聚合酶(Boehringer Mannheim)。扩增方案是由 94℃ 初始变性 3 分钟, 接着于 94℃ 变性 30 秒, 于 57℃ 退火 1 分钟(对于 PPAR 和 GAPDH 均如此), 并且在 72℃ 延伸 1 分钟组成。对于半定量分析, PPAR 和 GAPDH cDNAs 扩增与 PCR 循环数的线性并系在预备试验中确定。

下面各组引物用于 PCR 扩增中:

PPAR

正义 5-GCCCCTCCTCGGTGACTTATC-3'

反义 5-ATGACCCGGGCTTTGACCTT-3'

GAPDH

正义 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'

反义 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGG-3'

将由 PCR 获得的扩增产物(长度为 454 bp 的 PPAR cDNA 和长度为 482 bp 的 GAPDH cDNA)在 3%琼脂糖凝胶上电泳分离。溴化乙锭染色的 PPAR 和 GAPDH cDNAs 的条带用 DS-34 Polaroid 照相机照相。利用 NIH Image 所提供的凝胶分析光密度测定带的强度。根据看家基因 GAPDH 的 mRNA 水平对所有 PPAR 信号进行校正,并以比例表示。

结果在下面表 1 中显示。

10 表 1.丙酸对人内皮细胞 PPAR mRNA 表达的影响

	丙酸的浓度, mmol/l		
mRNA 的升高, %	0.1	1.0	10.0
	29.3	47.2	89.7

数据表示为相对于 GAPDH mRNA (100%)的百分数。
在上面实施例 1 中如果用乙酸替换丙酸,可以获得相似的结果。

实施例 2. 对健康吸烟者的代谢危险因子的研究

15 研究其中包含 5x10⁷ cfu/ml 植物乳杆菌 299V 和 0.08 g/100 ml 燕麦纤维的一种 rosehip 饮料(由果汁和发酵的燕麦液组成,它们的体积比为 95:5(v/v)), ProViva(Skanemejerier, Malmo, Sweden)对血清中纤维蛋白原水平,胆固醇, leptin 和胰岛素水平的影响。将具有中度增高的纤维蛋白原和胆固醇水平的年龄为 35-45 岁的男女各 19 名健康的吸烟者随机分成两组, 20 A(n=18)组和 B(n=20)组。A 组每天服 400ml ProViva, 即早晨服 200ml, 晚上服 200ml, B 组给相同量的安慰剂(placebo)(为没有发酵燕麦的 rosehip 饮料)。该试验持续 6 周而在生活方式上他们没有差异。

在试验开始前和 6 周后抽取血液并测定血压。

25 给药 6 周后,观察到收缩压显著降低(p<0.001),见表 2。这种降低在较高基准收缩压的患者中最明显,而在安慰剂组没有检测到。表中所给数据是平均值± SD。

试验期间两组中 BMI 保持在大致相同的水平。

表 2. 给药 ProViva 前后的临床特征

参数	ProViva		安慰剂	
	给药前	给药 6 周后	给药前	给药 6 周后
受试者 n(女/男)	18 (7/11)	18 (7/11)	20 (12/8)	20 (12/8)
年龄, 岁	42.3± 2.8		40.1± 3.7	
BMI, kg/m ²	24.8± 4.8	25.2± 4.8	26.2± 4.2	26.3± 4.1
SBP, mm Hg	134± 20	121± 16*	127± 15	123± 18
DBP, mm Hg	89± 13	84± 16	87± 10	83± 11

* p < 0.001

血清中胆固醇和甘油三酯的水平使用酶试剂盒(CHOD-PAP, GPO-PAP)测定。在 Mg²⁺存在下用磷钨酸沉淀含有 apoB 的脂蛋白后, 测定 HDL 胆固醇。LDL 胆固醇在用聚乙烯基硫酸盐沉淀 LDL 后测定。实验室的方法是基
 5 于 Boehringer Mannheim 的检测试剂盒。使用葡萄糖氧化酶和 Analco (PAP) 的检测试剂盒测定葡萄糖, 血浆纤维蛋白原按照基于凝血酶时间的 Clauss 方法测定(bioMerieux 检测试剂盒)。胰岛素通过 Abbott Imx Insalin assag(Abbott Laboratories, Tokyo, Japan)测定, 并且通过 Human Leptin Ria 试剂盒(Linco Research Inc., Charles, MD, USA)定量血清中的 leptin。

10 观察到总的胆固醇和甘油三酯的血浆水平没有差异。然而, A 组患者中显示出 LDL 胆固醇下降 12 % 并且 HDL 胆固醇升高 10 %(见表 3)。

纤维蛋白原水平下降约 10 %。

还发现胰岛素水平显著地降低以及 leptin 浓度降低 37 %。

表 3. 给药 ProViva 对生化参数的影响

参数	ProViva		安慰剂	
	给药前	给药六周后	给药前	给药六周后
甘油三酯,mg/dl	121± 38	129± 48	141± 70	131± 67
胆固醇, mg/dl	216± 34	213± 33	212± 30	212± 41
LDL-胆固醇, mg/dl	138± 37	122± 36*	135± 35	129± 46
HDL-胆固醇, mg/dl	45± 8	50± 9*	47± 14	49± 15
葡萄糖, mg/dl	110± 22	110± 14	106± 13	109± 13
胰岛素, U/ml	11.1± 5.7	7.9± 4.3*	7.7± 4.7	7.6± 3.2
Leptin, ng/ml	13.0± 7.7	8.2± 4.6**	17.4± 6.4	18.3± 7.2
纤维蛋白原, mg/dl	380± 37	301± 33	362± 38	390± 46

* p < 0.05

** p < 0.001

实施例 3. 牛皮癣患者中代谢危险因子的研究

在该研究中, 给药用植物乳杆菌 299v, DSM 9843 发酵的浓缩的燕麦粥于具有复发牛皮癣的 6 个患者的组, 研究其对不同因子的影响。在开始
5 给药浓缩的燕麦粥(含有 1×10^9 cfu/ml 植物乳杆菌)前至少 6 周患者没有接受药疗。每个患者给药 50 ml/d, 共 12 周。

测定给药前和给药六周后 HDL 和 LDL 的水平。结果在下面表 4 中显示。

10 表 4. 给药植物乳杆菌 299v 后的 LDL 和 HDL 胆固醇的水平

	<i>L. pl.</i> 299v (1×10^9 cfu/ml), 50ml/d		安慰剂	
	给药前	给药 12 周后	给药前	给药 12 周后
LDL 胆固醇,mg/dl	149.2 $\pm$ 11	135.4 $\pm$ 8.5*	146.1 $\pm$ 7.2	139.5 $\pm$ 6.7
HDL 胆固醇,mg/dl	41.6 $\pm$ 8.3	52.5 $\pm$ 9.0**	43.8 $\pm$ 7.5	41.5 $\pm$ 6.7

* p < 0.05

** p < 0.001

通常牛皮癣患者具有低的 HDL 值并因此更有危险患代谢综合征。该研
15 究显示这和危险性可通过摄入植物乳杆菌 299v 得以降低。

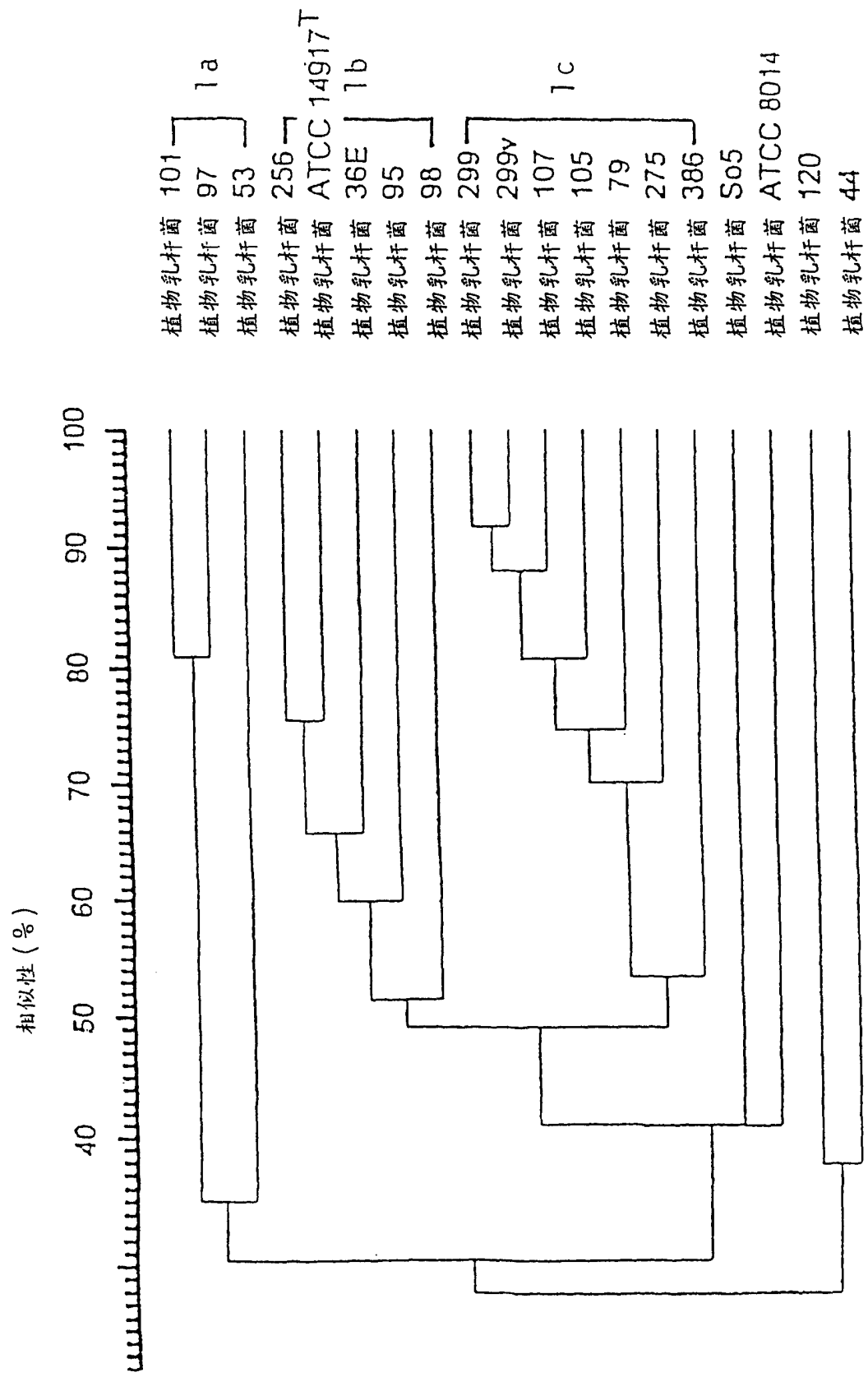


图 1