



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110177561 B

(45) 授权公告日 2023.09.12

(21) 申请号 201880006818.0

DSM 15313 2002.11.27

(22) 申请日 2018.01.12

DSM 15312 2002.11.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

(73) 专利权人 普罗比公司

申请公布号 CN 110177561 A

地址 瑞典,伦德

(43) 申请公布日 2019.08.27

(72) 发明人 D·阿加德 I·拉佐阿伦  
L·N·拉尔森

(30) 优先权数据

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314  
专利代理人 程伟 程云

1700542.2 2017.01.12 GB

1709731.2 2017.06.19 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.CI.

2019.07.12

C12N 1/20 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/EP2018/050789 2018.01.12

CA 2908051 A1, 2014.10.09

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101325960 A, 2008.12.17

W02018/130667 EN 2018.07.19

EP 2581461 A1, 2013.04.17

(83) 生物保藏信息

WO 2016083450 A2, 2016.06.02

DSM 6594 1991.07.02

WO 2004076615 A2, 2004.09.10

DSM 13432 2000.04.06

WO 2007108763 A1, 2007.09.27

DSM 13434 2000.04.06

袁娟丽;蒋旭;胡帅;高金燕;陈红兵.乳糜泻  
研究进展.食品安全质量检测学报.2015,(第11  
期),全文.

DSM 32131 2015.09.02

审查员 熊壮壮

DSM 9843 1995.03.16

权利要求书1页 说明书27页 附图2页

DSM 6595 1991.07.02

DSM 15316 2002.11.27

(54) 发明名称

益生菌组合物和其用途

(57) 摘要

本发明涉及至少一种用于个体的乳杆菌(Lactobacillus)的益生菌菌株,其用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫(CDA),或用于预防和/或治疗乳糜泻(CD)。根据本发明使用的优选组合物是包含副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)与胚芽乳杆菌(Lactobacillus plantarum)的组合,尤其副干酪乳杆菌8700:2(DSM 13434)与胚芽乳杆菌HEAL 9(DSM 15312)的组合的组合物。

1. 至少包含副干酪乳杆菌*Lactobacillus paracasei*的益生菌菌株8700:2、其保藏编号为DSM 13434与胚芽乳杆菌*Lactobacillus plantarum*的益生菌菌株HEAL 9、其保藏编号为DSM 15312的组合用于制备药物的用途,所述药物用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫或乳糜泻,其中所述益生菌菌株存在于所述药物中的量是每天剂量 $1 \times 10^6$ 到 $1 \times 10^{12}$ 个CFU。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物是以下的组合物:至少包含副干酪乳杆菌*Lactobacillus paracasei*的益生菌菌株8700:2、其保藏编号为DSM 13434与胚芽乳杆菌*Lactobacillus plantarum*的益生菌菌株HEAL 9、其保藏编号为DSM 15312以及合适的赋形剂或载剂。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述载剂为食物和/或微量营养物。

4. 根据权利要求2或3所述的用途,其中所述组合物以胶囊、片剂或粉剂形式提供以用于口服投予。

5. 根据权利要求1所述的用途,所述药物呈冻干制剂形式。

## 益生菌组合物和其用途

[0001] 本发明涉及至少一种乳杆菌物种的益生菌菌株，其用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫(CDA)或乳糜泻(CD)的个体。

[0002] 本发明还提供用于这类用途的组合物和预防和/或治疗CDA和/或CD的方法，其涉及向个体投予有效量的所述益生菌菌株。

[0003] 介绍

[0004] 乳糜泻(CD)为影响小肠的肠粘膜的慢性免疫介导的病症。其由对麸质不耐受引起，所述麸质为在小麦、黑麦和大麦中发现的主要贮藏蛋白(Schuppan D等人《胃肠病学(Gastroenterology.)》2009;137(6):1912-33)。乳糜泻的典型症状和临床迹象包括腹部不适、腹胀和腹泻，随后伴有营养不良的迹象(例如体重减轻、贫血和骨质疏松)。然而，相当大部分的患者缺乏症状并且通过筛查来诊断(Ludvigsson JF,等人《内部医学杂志(Journal of Internal Medicine.)》2011;269(6):560-71)。目前，治疗由终身无麸质饮食(GFD)组成。

[0005] CD的病理生理学尚未完全理解，但提议为T细胞驱动的。在小肠中的麸质蛋白质消化之后，所得麦醇溶蛋白肽在某种程度上跨越上皮屏障并且由MHC-II结构上的抗原呈递细胞呈递，实现固有层中的麦醇溶蛋白特异性CD4+T-辅助( $T_H$ )1细胞和CD8+细胞毒性T( $T_C$ )细胞的活化。这引起数种细胞因子(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-21)的上调，确切地说，其中前两种通过骨髓成纤维细胞的活化引起典型的粘膜重塑和绒毛萎缩，而后者很可能涉及维持CD4+细胞的活性(Schuppan D,等人，同上)。在过去十年中，通过麦醇溶蛋白的先天免疫系统的伴随直接刺激已经显示为罹患疾病的额外重要因素。这目前归因于树突状细胞和巨噬细胞中的IL-15信号传导的上调，引起通过上皮内淋巴细胞IEL活化的粘膜损伤(Londei M,等人《分子免疫学(Molecular Immunology.)》2005;42(8):913-8)。

[0006] CD的全球患病率大致估计为1%，但在不同种族与地理位置之间大大不同。瑞典是受影响最严重的国家之一，估计患病率为1.5-3% (Ludvigsson JF,等人，同上)。尚未完全确定哪些过程有助于诱导这种对麦醇溶蛋白结构的功能失调反应，以及为什么疾病患病率在不同人群之间变化。CD中有明显的遗传组分，如由以下事实证明：几乎所有乳糜泻患者都是DR3-DQ2和/或DR4-DQ8单倍型的携带者(Sollid LM,等人《实验医学学报(The Journal of Experimental Medicine.)》1989;169(1):345-50)。此外，还发现许多其它影响较小的基因会影响疾病风险，其中大多数与适应性免疫反应的激活有关(Hunt KA,等人，《自然·遗传学(Nature Genetics.)》2008;40(4):395-402)。CD与其它几种自身免疫性疾病共享这些遗传风险性状，最重要的是1型糖尿病(T1D)，它在HLA-DQB1和HLA-DRB1基因座以及几个非HLA基因座中共享其主要的易感基因(Smyth DJ,等人《新英格兰医学杂志(New England Journal of Medicine.)》2008;359(26):2767-77)。然而，单凭遗传学无法解释CD，因为只有少数携带这些单倍型的人会罹患疾病。在过去几十年中，许多国家观察到的发病率迅速上升，也表明环境因素在某种程度上促成了发病机制。重要的研究领域包括婴儿喂养实践、母乳喂养(以及肠道微生物群的变异或紊乱)(De Palma G,等人，《进展：双歧杆菌(Bifidobacteria)和革兰氏阴性细菌(Gram-negative bacteria)有差异地影响乳糜泻促

炎性环境中的免疫反应(Advance:Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease.)》《白细胞生物学杂志(Journal of Leukocyte Biology.)》2010;87(5):765-78)。

[0007] 虽然以前认为肠活检是诊断CD的黄金标准,但已发现几种血清标志物,其组织型转谷氨酰胺酶自身抗体(tTGA)目前在临床实践中最常见,因为其具有高诊断灵敏度和特异性(van der Windt DA,等人《在具有腹部症状的患者中对乳糜泻进行诊断测试:系统审查(Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms:a systematic review.)》《美国医学会杂志(Jama.)》2010;303(17):1738-46)。此外,来自2012年欧洲儿科胃肠病学、肝脏病学和营养学会(ESPGHAN)的修订指南(Husby S,等人《用于诊断乳糜泻的ESPGHAN指南(ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease.)》《儿童胃肠病学和营养杂志(Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.)》2012;54(1):136-60)表明如果随后进行适当的进一步测试,那么tTGA含量显著升高可不需要活检以确认诊断。在大多数CD患者中,引入GFD后tTGA含量降低。

[0008] 在儿童中,这种降低也高度预测肠道粘膜的组织学改善(Bannister EG,等人,《美国胃肠病学杂志(American Journal of Gastroenterology.)》2014;109(9):1478-83),表明tTGA不仅可以用作二元诊断工具,还可以用作疾病活动性和膳食依从性的标志物。然而,这带来以下问题:如何管理被发现具有持续升高的tTGA含量的无症状患者,所谓的CD自身免疫(CDA),或者如果被证实具有正常肠活检特点那么更广泛地称为潜在CD。这些儿童罹患CD的风险增加(Liu E,等人,《新英格兰医学杂志》2014;371(1):42-9),目前没有任何治疗选项可用于减少或消除GFD以外的风险。

## 背景技术

[0009] 早期的研究表明,与健康对照和无症状的患者相比,活动性CD患者的微生物群由更大程度的革兰氏阴性病原体构成(Nadal I,等人,《患有乳糜泻的儿童十二指肠微生物群组成失衡(Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease.)》《医学微生物学杂志(Journal of Medical Microbiology.)》2007;56(Pt12):1669-74)。因此,后来的研究表明,这类微生物群响应于麦醇溶蛋白增强更高程度的炎症反应(De Palma G,等人,《进展:双歧杆菌和革兰氏阴性细菌有差异地影响乳糜泻促炎性环境中的免疫反应》《白细胞生物学杂志》2010;87(5):765-78)并且反之,某些双歧杆菌(Bifidobacterium)菌株影响麦醇溶蛋白的消化并且降低其免疫潜力(Laparra JM,等人,《双歧杆菌经由消化期间修饰毒性肽产生而抑制由肠上皮细胞中的麦醇溶蛋白诱导的炎症反应(Bifidobacteria inhibit the inflammatory response induced by gliadins in intestinal epithelial cells via modifications of toxic peptide generation during digestion.)》《细胞生物化学杂志(Journal of Cellular Biochemistry.)》2010;109(4):801-7)。

[0010] 最近公布的一些研究已经检验在已经临床体现的CD的情况下投予特异性双歧杆菌菌株的效果.Olivares等人(Olivares M,等人,《英国营养学杂志(The British Journal

of Nutrition.)》2014;112(1):30-40)除了GFD之外,随机分组最近诊断患有CD的36名儿童,这些儿童每日食用长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)CECT 7347或安慰剂治疗3个月。由于GFD的引入,难以了解对免疫参数的益生菌效果;所述研究未检验tTGA含量,但确实发现与安慰剂相比,治疗组中成熟T细胞总含量显著降低。此外,其还表明,与对照组相比,益生菌治疗组的儿童实现较大高度百分比增加。

[0011] 另外,Smecuol等人.《临床胃肠病学杂志(Journal of Clinical Gastroenterology.)》2013;47(2):139-47)每天用婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)或安慰剂治疗当前未用GFD的22名成人CD患者3周,并且评估肠渗透率、免疫参数和症状变化。与对照组相比,益生菌治疗组的参与者报告了胃肠症状的改善。然而,与长双歧杆菌CECT 7347不同,婴儿双歧杆菌(NLS)未能影响炎症标志物和肠道微生物群和宿主相关的防御机制。

[0012] 尽管以上关于特异性双歧杆菌菌株的研究都表明那些双歧杆菌菌株在CD中的一些有益作用,但其也强调进一步研究的需要。

[0013] 因此,尽管对CDA和CD进行了大量研究,但目前唯一可用的CD治疗是无麸质饮食(GFD)。因此,需要用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫(CDA)或用于预防和/或治疗乳糜泻(CD)的组合物和方法。

## 发明内容

[0014] 根据本发明,提供至少一种用于个体的乳杆菌物种的益生菌菌株,其用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫(CDA),或用于预防和/或治疗乳糜泻(CD)。

[0015] 我们用“用于预防和/或治疗”指在预防、延迟、降低严重程度和/或去除与CDA或CD相关的一种或多种症状和/或其它标志的个体中产生效果的用途。

[0016] 益生菌乳杆菌菌株

[0017] 乳杆菌物种的优选益生菌菌株选自:副干酪乳杆菌(*L.paracasei*) ;胚芽乳杆菌(*L.plantarum*) ;嗜酸乳杆菌(*L.acidophilus*) ;鼠李糖乳杆菌(*L.rhamnosus*) ;干酪乳杆菌(*L.casei*) ;罗伊氏乳杆菌(*L.reuteri*) ;短乳杆菌(*L.brevis*) ;卷曲乳杆菌(*L.crispatus*) ;保加利亚乳杆菌(*L.bulgaricus*) ;发酵乳杆菌(*L.fermentum*) ;唾液乳杆菌(*L.salivarius*) ;约氏乳杆菌(*L.johnsonii*) ;和乳酸乳杆菌(*L.lactis*)。

[0018] 优选地,至少一种乳杆菌物种的益生菌菌株是副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*) 和/或胚芽乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

[0019] 乳杆菌菌株寄存

[0020] 根据本发明使用的优选乳杆菌菌株已根据瑞典(Sweden)的Probi A.B., Sövegatan 41,Lund 22370的布达佩斯条约(Budapest Treaty)寄存,如下:-

物种	菌株	寄存编号	寄存日期	寄存者	寄存
[0021] 胚芽乳杆菌	HEAL 9	DSM 15312	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 19	DSM 15313	27/11/2002	Probi	DSMZ
	HEAL 99	DSM 15316	27/11/2002	Probi	DSMZ
	299	DSM 6595	02/07/1991	Probi	DSMZ
	299v	DSM 9843	16/03/1995	Probi	DSMZ
	GOS42	DSM 32131	02/09/2015	Probi	DSMZ
副干酪乳杆菌	8700:2	DSM 13434	06/04/2000	Probi	DSMZ
	O2A	DSM 13432	06/04/2000	Probi	DSMZ
鼠李糖乳杆菌	271	DSM 6594	02/07/1991	Probi	DSMZ

[0022] 优选地,副干酪乳杆菌菌株选自副干酪乳杆菌8700:2(DSM 13434)、副干酪乳杆菌O2:A(DSM 13432)中的一者或者者。

[0023] 优选地,胚芽乳杆菌的菌株选自以下中的一种或多种:胚芽乳杆菌HEAL 9(DSM 15312);胚芽乳杆菌HEAL 19(DSM 15313);胚芽乳杆菌HEAL 99(DSM 15316);胚芽乳杆菌299v(DSM 9843);和/或胚芽乳杆菌299(DSM 6595)。

[0024] 有利地,本发明提供用于个体的至少一种益生菌副干酪乳杆菌菌株和至少一种益生菌胚芽乳杆菌菌株的组合,其用于预防和/或治疗乳糜泻自身免疫(CDA)或用于预防和/或治疗乳糜泻(CD)。

[0025] 最优选地,所述组合是副干酪乳杆菌8700:2(DSM 13434)和胚芽乳杆菌HEAL 9(DSM 15312)。

[0026] 所述组合物可包含指定的一种或多种乳杆菌的益生菌菌株,但优选地其由指定的菌株组成,而没有另外有效量的任何其它乳杆菌或其它微生物的益生菌菌株。

[0027] 组合物和配制物

[0028] 优选将本发明的益生菌菌株冷冻干燥。

[0029] 本发明的益生菌菌株可以与合适的载剂、稀释剂或赋形剂作为固体或液体调配物一起提供,其可以是实施例中的医药调配物。

[0030] 合适的液体载剂的实例包括水和其它水性溶剂。

[0031] 合适的固体载剂的实例包括麦芽糖糊精、菊糖、马铃薯淀粉、玉米淀粉或其它植物淀粉、微晶纤维素(MCC)和糖醇。

[0032] 所述组合物可以是干发酵或非发酵组合物。在干燥的非发酵组合物的情况下,在个体摄取组合物后,在胃肠道中发生发酵。

[0033] 在使用中,本发明的益生菌菌株可以在向个体投予之前与液体或固体载剂混合。举例来说,个体可以在摄入之前将菌株与由水或一些其它水性溶剂组成的载剂或饮料混合。类似地,益生菌菌株可以与由一种或多种食物组成的载剂混合。优选的食物是无麸质产品,例如发酵或非发酵乳制品,例如酸奶、果汁;饮料、汤、植物类食物,例如豆制品、干粮棒、婴儿食物、婴儿营养品、婴儿配方食品、从出生开始的母乳替代品。

[0034] 婴儿或婴儿配方奶是本发明的乳杆菌菌株的益生菌的特别优选的载剂。其可以呈干燥粉末形式,以用于与水混合,然后将其以即食液体形式喂给婴儿。其通常由牛奶制成,并且含有乳清和酪蛋白。

[0035] 本发明的益生菌菌株还可以与一种或多种已知膳食补充剂的成分(例如微量营养素,例如维生素和矿物质)一起提供在组合物中。

[0036] 乳糜泻的典型症状和临床迹象包括腹部不适、腹胀和腹泻，其次是营养不良的迹象(例如，体重减轻、贫血和骨质疏松症)。考虑到与营养不良有关的风险，已公布新诊断出患有乳糜泻的儿童缺乏维生素D、锌和铁(Erdem等人，《新诊断出患有乳糜泻的儿童的维生素和矿物质缺乏症(Vitamin and mineral deficiency in children newly diagnosed with celiac disease.)》《土耳其医学科学杂志(Turk J Med Sci)》.2015;45(4):833-6 2015)。类似地，还发现新诊断出乳糜泻的成人和未治疗的CD患者的维生素B<sub>6</sub>和B<sub>12</sub>、维生素D、叶酸、锌、镁和铁的值也低于参考极限(Wierdsma等人，《维生素和矿物质缺乏症在新诊断出的乳糜泻患者中非常普遍(Vitamin and mineral deficiencies are highly prevalent in newly diagnosed celiac disease patients.)》《营养学(Nutrients.)》2013年9月30日；5(10):3975-92.doi:10.3390/nu5103975,Caruso等人，《乳糜泻的适当营养素补充(Appropriate nutrient supplementation in celiac disease)》2013《医学年鉴(Ann Med)》.2013年12月；45(8):522-31.doi:10.3109/07853890.2013.849383.Review, Schøsler等人，《症状和成年发病的腹腔疾病的发现在一个历史丹麦患者群组(Symptoms and findings in adult-onset celiac disease in a historical Danish patient cohort)》《斯堪的纳维亚胃肠病学杂志(Scandinavian Journal of Gastroenterology)》第51卷，ISS.3,2016)。在大多数情况下，一旦人被诊断患有CD或CDA，从饮食中去除麸质，恢复肠道的“健康”组织结构并且致使维生素和矿物质状态的正常化。然而，通过适应无麸质饮食来使粘膜炎症消退并不总是足以抵消矿物质缺乏症(Caruso等人.2013同上)。因此，使诊断患有CD/CDA或罹患CD/CDA的风险增加的人补充维生素和/或矿物质可以与根据本发明的益生菌乳杆菌一起使用。优选地，维生素和/或矿物质选自一种或多种维生素：A、B<sub>6</sub>、B<sub>12</sub>、D；和/或矿物质：铁、锌、镁。

[0037] 优选地，本发明的益生菌菌株组合物以用于口服投予的胶囊或片剂或粉剂的形式提供。棒包装在食物工业和制药业中使用的流行类型的单部分/单次剂量包装(参见[www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/](http://www.selo.com/packaging-machines/stick-packs/))。其对于消费者来说非常方便使用，并且通过含有预定量的本发明的益生菌组合物，确保根据本发明采取正确的剂量以达到所需的预防和/或治疗效果。

[0038] 优选地，在使用中，本发明的益生菌菌株以 $1 \times 10^6$ 到 $1 \times 10^{14}$ 个菌落形成单位(CFU)、优选 $1 \times 10^9$ 到 $1 \times 10^{11}$ 个CFU并且最优选 $1 \times 10^{10}$ 个CFU的每日量向个体投予。CFU的每日量优选以单次剂量或份量投予。

[0039] 待治疗的个体

[0040] 优选地，个体是人。有利地，人类个体是儿童。优选地，儿童小于18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1岁。有利地，本发明的组合物用于从出生开始投予，并且特别是从断奶开始投予，即婴儿不再完全用母乳喂养的时间点。

[0041] 鉴定有风险的个体

[0042] 优选地，个体缺乏CD的一种或多种症状，但是罹患CD的风险增加。

[0043] 理想地，通过存在一种或多种血清、免疫和/或遗传风险因素，将个体鉴定为处于增加的CD风险下。

[0044] 用于检测血清、免疫和/或遗传风险因素的存在的各种方法是技术人员所熟知的；但是为方便起见，本文提供特别合适的方法的实例。

- [0045] CDA和/或CD相关标志
- [0046] • 血清分型
- [0047] oDQ2阳性
- [0048] oDQ8阳性
- [0049] • 基因测试
- [0050] oDQ2.5<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×05/DQB1×02)
- [0051] oDQ2.2<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×02:01/DQB1×02:02)
- [0052] oDQ2.5<sub>反式</sub>单倍型,例如DQ2.2<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×02:01/DQB1×02:02) 与DQ7.5<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×05:05/DQB1×03:01)
- [0053] oDQ8<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×03/DQB1×03:02)
- [0054] oDQA1×05:01等位基因
- [0055] oDQA1×05:05等位基因
- [0056] oDQB1×03:02等位基因
- [0057] 通过免疫血清分型和/或遗传分析可以确定罹患乳糜泻的风险增加。免疫血清分型用于鉴定DQ2血清型标志物和/或DQ8血清型标志物的存在。基因组DNA的遗传分析可以通过使用序列特异性引物的序列特异性PCR (PCR-SSP) 或通过基因测序进行。序列特异性PCR方法包括:使用序列特异性引物的PCR (PCR-SSP) (Sacchetti L等人,《通过基于PCR的方法快速鉴定乳糜泻中的HLA DQA1×0501、DQB1×0201和DRB1×04等位基因 (Rapid Identification of HLA DQA1\*0501, DQB1\*0201, and DRB1\*04 Alleles in Celiac Disease by a PCR-Based Methodology.)》《临床化学 (Clin Chem.)》1997年11月;43(11): 2204-6.) ; 使用序列特异性引物和塔克曼探针 (TaqMan probe) 的定量实时PCR (qPCR) (Reinton等人,《用于检测DQA1×05、DQB1×02和DQB1×0302以辅助诊断乳糜泻的单步实时PCR检定 (A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1\*05, DQB1\*02 and DQB1\*0302 to aid diagnosis of celiac disease.)》《免疫学方法杂志 (J Immunol Methods.)》2006年10月20日;316(1-2):125-32。电子出版2006年9月18日) ; 使用序列特异性引物和熔融曲线分析的qPCR (Selleski等人,《通过实时PCR方法简化乳糜泻易感染的HLA-DQ等位基因确定 (Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method.)》Arq Gastroenterol.2015年4月至6月;52(2):143-6.doi:10.1590/S0004-28032015000200013.) ; PCR扩增随后与序列特异性寡核苷酸基因测序方法杂交包括用链终止双脱氧核苷酸、焦磷酸测序、使用合成法测序 (Illumina测序) 、使用连接法测序 (SOLID测序) 、纳米孔测序 (MinION) 、离子激流半导体测序和单分子实时测序 (太平洋生物科学 (Pacific Biosciences)) 进行桑格 (Sanger) 测序。
- [0058] 对应于DQ2或DQ8血清型的遗传标记包括:DQ2.5<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×05/DQB1×02) ; DQ2.2<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×02:01/DQB1×02:02) ; DQ2.5<sub>反式</sub>单倍型,例如DQ2.2<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×02:01/DQB1×02:02) 与DQ7.5<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×05:05/DQB1×03:01) ; DQ8<sub>顺式</sub>单倍型 (DQA1×03/DQB1×03:02) ; DQA1×05:01等位基因;DQA1×05:05等位基因;DQB1×03:02等位基因。
- [0059] 用于CDA和/或CD的免疫标志物包括:组织型转谷氨酰胺酶抗体含量,包括通过放射性配体结合检定 (Agardh等人,《在幼儿中使用放射性配体结合检定以测量组织型转谷氨酰胺酶自身抗体 (Using radioligand-binding assays to measure tissue

transglutaminase autoantibodies in young children.)》《儿科学报 (Acta paediatrica)》(Oslo, Norway: 1992). 2004; 93(8): 1046-51, Agardh等人,《通过组织型转谷氨酰胺酶自身抗体和HLA在诊断儿童期儿童1型糖尿病下预测沉默乳糜泻 (Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA.)》《小儿糖尿病 (Pediatric diabetes.)》2001; 2(2): 58-65.) ; IgA人肌内膜抗体 (Endomysial antibody; EMA) 含量, 包括在总血清 IgA缺乏症不存在下; 脱氨麦醇溶蛋白肽 (DGP IgA 和 IgG) 含量。

[0060] 优选地, 一种或多种风险因素是HLA-DQ2和/或HLA-DQ8。

[0061] 优选地, 一种或多种免疫风险因素是持续性组织型转谷氨酰胺酶 (tTGA) 阳性, 即在两个或更多个连续场合下的tTGA阳性测试。

[0062] tTG阳性可以通过tTG自身抗体的存在来显示, 优选IgA-tTGA和/或IgG-tTGA, 如本文所述。

## 附图说明

[0063] 图1: 显示与安慰剂组相比, 副干酪乳杆菌+胚芽乳杆菌菌株治疗组中平均tTGA-IgA含量随时间的变化。

[0064] 图2: 显示与安慰剂相比, 副干酪乳杆菌+胚芽乳杆菌治疗组中tTGA-IgG含量随时间的变化。

[0065] 实例

[0066] 以下材料、方法和实例体现本发明的各方面。

[0067] 材料和方法

[0068] 研究由遗传血清和免疫风险因素对具有增加的CD风险的个体的人群鉴定

[0069] 从CiPiS和瑞典TEDDY研究的参与者中招募参与者。TEDDY研究方案已在其它地方进行充分描述 (《年轻人 (TEDDY) 研究中的糖尿病的环境决定因素: 研究设计 (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design.)》《小儿糖尿病》2007; 8(5): 286-98)。简而言之, 在2004年与2010年期间, 这些中心的新生儿进行HLA基因分型, 如果携带以下基因型之一, 则视为符合条件: DR3-DQ2/DR4-DQ8、DR4-DQ8/DR4-DQ8、DR4-DQ8/DR8、DR3-DQ2/DR3-DQ2、DR4-DQ8/DR4b、DR4-DQ8/DR1、DR4-DQ8/DR13、DR4-DQ8/DR9或DR3-DQ2/DR9。在瑞典中心, 共筛查了48,140名儿童, 其中发现3,723名符合HLA条件。其中, 父母或主要看护人在总计2,525例病例中提供了参与研究的书面知情同意书。在TEDDY方案中, 每6个月收集一次血液样品, 并且每年从2岁开始对儿童进行tTGA筛查。在显示tTGA阳性后, 回顾性分析早期血液样品以确定血清转化的时间。在连续2次血样中测试呈阳性的参与者视为持续tTGA阳性, 并且裁定为CDA。所有确定结果均基于在英国布里斯托尔Southmead医院 (Southmead Hospital, Bristol, United Kingdom) 的欧洲参考实验室中进行的实验室分析。有关CD的进一步评估超出了TEDDY方案的范围。在瑞典, 进行肠活检的决定是视tTGA含量、症状程度和营养不良迹象而定基于逐案进行的。

[0070] 在CiPiS研究中, 2000年与2004年间在斯科讷 (Skåne) 出生的儿童使用脐带血的HLA基因分型和关于母体因素的问卷进行筛查。携带DQ2和/或DQ8的儿童视为处于HLA风险下。共邀请了6202名处于风险下的儿童, 以及7654名缺乏HLA风险的儿童作为对照。在3岁的

HLA风险组中的1620/6206(26.1%)名参与者和1815/7654(23.7%)名对照者中以及9岁的具有HLA风险的1910/5870(32.5%)名参与者和2176/7072(30.6%)名对照者中进行tTGA筛查。如果测试的tTGA呈阳性,参与者在至少3个月后重新测试以确认持续性tTGA阳性,之后他们被转诊到当地儿科诊所进行肠活检。2012年3月与2015年8月间,从这2个群组中不断邀请参与者。纳入判据如下:

- [0071] • 使用Bristol tTGA检定,在2个<30U/ml的连续样品中tTGA呈阳性。
- [0072] • 没有乳糜泻的诊断。
- [0073] • 在TEDDY方案中筛查的所有糖尿病相关自身抗体(GADA、IAA、IA-2A、ZnT8A)中呈阴性。
- [0074] • 没有通过远程方案参与TEDDY研究。

[0075] T1D相关自身抗体呈阳性的儿童被排除在本研究之外,以使对胰岛自身免疫的天然病史的影响降到最低。然而,应理解,T1D相关自身抗体构成罹患CD风险增加的血清标志物,并且因此可用于根据本发明的用途和方法鉴定用于预防性和/或治疗性治疗的优选个体。

#### [0076] 研究设计

[0077] 符合纳入判据的儿童被邀请参加初次会议,然后安排在大约3个月和6个月后进行随访问诊。参与者以1:1的比例随机分组为治疗组或对照组。在初次会议和第一次随访问诊时,每组分别提供含有乳杆菌或安慰剂的粉末状调配物,并且指示每天通过在100ml冷液体中溶解后摄入粉剂或在与水果/食物混合之后与餐食结合食用所述产品,每日一次,共6个月的时间,停止食用含有益生菌的任何其它食物产品,并且储存小袋冷藏(2-8°C)。还指示父母不要将粉剂加入热饮或热食中。每次问诊时,收集10ml静脉血和粪便样品。治疗组或对照组的分配对参与者、临床医生和实验室人员不知情。

#### [0078] 组织型转谷氨酰胺酶自身抗体分析-罹患CD的免疫风险因素

[0079] 如前所述,使用放射性配体结合检定(RBA)评估tTGA((Agardh D,等人,《小儿糖尿病》2001;2(2):58-65)(Agardh D等人,《在幼儿中使用放射性配体结合检定以测量组织型转谷氨酰胺酶自身抗体》《儿科学报》(Oslo,Norway:1992)。2004;93(8):1046-51)。简而言之,在35S-蛋氨酸(美国麻萨诸塞州沃尔瑟姆珀金埃尔默(Perkin Elmer,Waltham,MA,USA)存在下,使用TNT SP6偶联网织红细胞裂解物系统(美国威斯康星麦迪逊普洛麦格公司(Promega,Madison,WI,USA))通过体外转录和翻译cDNA合成人体组织型转谷氨酰胺酶(tTG)。分析IgG-tTGA和IgA-tTGA。对于IgG-tTGA分析,将35S-tTG稀释并且加入人血清中,并且在4°C下培育过夜。蛋白A琼脂糖(PAS)(美国加利福尼亚州卡尔斯巴德英杰公司赛默飞世尔科技(Invitrogen,Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA,USA))用于通过结合血清中的IgG来分离游离的和抗体结合的35S-tTG。将PAS和免疫沉淀的35S-tTG-血清加入96孔MultiScreenHTS DV过滤器板(德国达姆施塔特默克生命科学公司(Merck Life Science,Darmstadt,Germany))中,并且在板振荡器上培育,然后洗涤。加入OptiPhase Supermix闪烁混合物(珀金埃尔默)并且在MicroBeta Counter TriLux(珀金埃尔默)中测量反应性。类似地进行IgA-tTGA分析,除了使用山羊抗人类IgA-琼脂糖(默克生命科学公司)代替PAS。TGA含量以U/mL表示,其由含有大约2、4、8、16、31、63、125、250、500和1000U/mL的相应IgA-tTGA和IgG-tTGA的标准曲线计算。IgG-tTG和IgA-tTG阳性值的临限含量设定为

>4.0U/mL, 其表示398名成人血液供体的第99个百分位数 (Agardh D, 等人,《儿科学报》2004; 93 (8) : 1046-51)。当疑似为选择性IgA缺乏症时, 参与者作为其原始研究的一部分进行总IgA含量测试; 然而, 参与者中检测不到这种情况。

[0080] 乳杆菌培养物制剂和治疗产品的组成

[0081] 乳杆菌培养物由瑞典隆德的Probi AB制备。活性产品由冷冻干燥的副干酪乳杆菌8700:2 (DSM 13434) 与胚芽乳杆菌HEAL 9 (DSM 15312) 与麦芽糖糊精 (Glucidex IT-19, Roquette, 法国 (France)) 的组合以含有组合的 $1\times10^{10}$ 个CFU的粉末形式组成, 其中每个菌株同等表示。安慰剂由粉状麦芽糖糊精和酵母蛋白胨 (HYP-A, BioSpringer, 法国) 组成, 用于调节颜色和味道, 使两种测试产品 (益生菌和安慰剂) 在外观和味道上相同。指示参与者将产品储存在冰箱中, 并且每天早上食用一克一小袋产品。应当理解, 其为乳杆菌的总CFU, 而不是与产品功效相关的浓度 (即组合物的每单位质量或体积的乳杆菌的质量或数量)。

[0082] 流式细胞术分析

[0083] 单核细胞 (PBMC) 的分离

[0084] 使用亲水性多糖 (BD Vac ® CPT™ 细胞制备管NC FICOLL™ 4mL, 目录号362760, 美国新泽西州百克顿-迪金森公司 (Becton Dickinson, NJ, USA)) 通过密度梯度离心 (1800G) 将来自实例1中的群组的外周血单核细胞 (PBMC) 与全血分离。在收集血液样品后2-24小时内分离细胞。将吸出的间期单核层用具有L-谷氨酰胺的RPMI - 1640培养基 (GIBCO第21875034号, 瑞典哥德堡赛默飞世尔科技 (Gothenburg, Sweden)) 洗涤三次。将细胞在雅培 (Abbott) CELL\_DYN Ruby中计数成最终浓度为RPMI - 1640中的 $1\text{-}4\times10^6$ 个/mL的淋巴细胞 (即调节PBMC悬浮液的体积, 使得每毫升有 $1\text{-}4\times10^6$ 个淋巴细胞)。

[0085] 免疫染色方案

[0086] 总结

[0087] 计数后, PBMC用针对表面和细胞内结构的单克隆抗体染色。单克隆抗体 (表2) 用四种荧光染料、异硫氰酸荧光素 (FITC)、藻红蛋白 (PE)、多甲藻素 (Peridinin) 叶绿素蛋白 (PerCP) 和别藻蓝蛋白 (APC) 预标记。使用四色FACSCalibur®仪器 (美国加利福尼亚州BD生物科学事业部 (BD Biosciences, CA, USA)) 通过激光束分析染色细胞。FACSCalibur® 定义细胞群并且通过其大小、粒度和荧光强度的特征来计数细胞。光学检测器将光信号放大并且转换成电数据信号。在CellQuestPro®软件 (BD生物科学事业部) 中获取并且分析数据。

[0088] 表1: 用于流式细胞术分析的抗体。

抗体和荧光染料	供应商	目录号
CCR9 APC	R&D Systems, Inc., Abingdon, UK	FAB17991A
CD45RO APC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	559865
CD62L APC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	559772
IgG1 同型 APC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	555751
CD25 FITC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	555431

[0090]

CD3 FITC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	555332
CD38 FITC	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	340909
CCR4 PE	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	551120
CD8 PE	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	345773
CD45RA PE	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	555489
整合素 β7 PE	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	555945
CD19 PerCP	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	345778
CD4 PerCP	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	345770
CD8 PerCP	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	345774
CD3 FITC / CD16 + CD56 PE	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	342403
IgG2a 同型 FITC / IgG1 同型 PE / CD4 PerCP-Cy 5.5	美国加利福尼亚州 BD 生物科学事业部	340965
人类 IgG 同型对照	瑞典哥德堡赛默飞世尔科技	12000C
eBioscience™人类调节性 T 细胞染色试剂盒 (CD4、CD25、FoxP3)	AH 诊断 AB, Solna, Sweden	88-8999-40

[0091]

表2:流式细胞术分析中使用的抗体组合和浓度。

[0092]

直接染色					
管	混合面板	标签	在 100 μL 中 Mab 制备	稀释	获得、收集和门控的淋巴细胞数量
1	同型对照	FITC/PE/PerCP APC	5 μL 2,5 μL	1/20 1/40	3000
2	CD3 CD16+56 CD19	FITC PE PerCP	5 μL 5 μL 20 μL	1/20 1/5	10000
3	CD3 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 μL 0,4 μL 5 μL 20 μL	1/20 1/250 1/20 1/5	10000
4	CD3 CD45RA CD8 CD45RO	FITC PE PerCP APC	5 μL 0,4 μL 2,5 μL 20 μL	1/20 1/250 1/40 1/5	10000
5	CD3 CD8 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	5 μL 0,4 μL 5 μL 2,5 μL	1/20 1/250 1/20 1/40	10000
6	CD25 CD45RA CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 μL 0,4 μL 5 μL 20 μL	1/10 1/250 1/20 1/5	100000

[0093]	7	CD25 CCR4 CD4 CD45RO	FITC PE PerCP APC	10 μL 2,5 μL 5 μL 20 μL	1/10 1/40 1/20 1/5	50000
	8	CD25 CCR4 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 μL 2,5 μL 5 μL 2,5 μL	1/10 1/40 1/20 1/40	50000
	9	CD45 RA 整合素□7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	10 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/10 1/10 1/20 1/20	50000
	10	CD3 整合素□7 CD4 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
	11	CD3 整合素□7 CD8 CCR9	FITC PE PerCP APC	5 μL 10 μL 5 μL 5 μL	1/20 1/10 1/20 1/20	50000
	12	CD38 整合素□7 CD4 CD62L	FITC PE PerCP APC	10 μL 10 μL 5 μL 2,5 μL	1/10 1/10 1/20 1/40	50000
	<b>人类调节性 T 细胞染色试剂盒</b>					
	管	混合面板	标签	在 100 μL 中 Mab 制备	稀释	要获取的细胞 数量
	13	同型对照 IgG2a	PE	20 μL	1/5	3000
	14	CD4/CD25 FoxP3	FITC/APC PE	20 μL 混合物 20 μL	1/20 和 1/5 1/5	50000

## [0094] 阻断

[0095] 将PBMC分成两个管:管A用于在RPMI中以约 $2\text{-}4 \times 10^6$ 个淋巴细胞/毫升阻断PBMC;用于PBMC的管B用于未阻断的染色,通过加入RPMI稀释到约 $1\text{-}2 \times 10^6$ 个淋巴细胞/毫升。通过用正常人类IgG(1/34稀释)在2-8°C下避光培育15分钟来阻断管A中的PBMC。

## [0096] 直接染色(管1-12)

[0097] 根据上表的管1-12的抗体混合物在FACS管(BD Falcon,VWR目录号352052)中制备。将来自管A的阻断PBMC加入管9-11中,并且将来自管B的非阻断PBMC加入管1-8和12中。将FACS管1-12轻轻涡旋并且在2-8°C下避光培育30分钟。通过加入2ml冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.4,Gibco目录号10010-015,瑞典哥德堡赛默飞世尔科技),轻轻涡旋,离心(10分钟,400×g),并且丢弃上清液来洗涤染色的PBMC。通过再悬浮于200μl冷PBS-1%甲醛溶液(3份PBS,pH 7.4,Gibco目录号10010-015到1份4%甲醛溶液,Apoteket目录号34 24 36)中,并且在2-8°C下避光培育过夜来固定染色的PBMC。

## [0098] 用人类调节性T细胞染色试剂盒染色(管13-14)

[0099] 用来自管B的100μl非阻断PBMC制备FACS管13(参见上表)。制备FACS管14(参见上表)以用于用20μl的CD4FITC/CD25APC混合液和100μl的来自管A的阻断PBMC进行表面染色,轻轻涡旋,然后在2-8°C下避光培育30分钟。通过加入2ml冷的PBS,轻轻涡旋,离心(5分钟,400×g),并且丢弃上清液来洗涤管13和14中的PBMC。通过再悬浮于1ml固定/渗透溶液(一

份固定/渗透4×浓缩物和三份固定/渗透稀释剂)中,并且在2-8℃下避光培育过夜来固定管13和14中的PBMC。

[0100] 通过离心(10分钟,400×g),丢弃上清液,再悬浮于2ml 1×渗透缓冲液(一份10×渗透缓冲液和九份蒸馏水)中,轻轻涡旋,再次重复前述四个步骤,并且最后再次离心(10分钟,400×g)来洗涤并且渗透固定的PBMC(管13和14)。通过在2-8℃下避光培育15分钟,用2μl正常大鼠血清阻断管14中的渗透PBMC。通过将20μl大鼠IgG2a同型对照PE加入管13中并且将20μl抗人FoxP3PE加入管14中,然后在2-8℃下避光培育30分钟进行细胞内染色。将染色的PBMC用2ml PBS洗涤,轻轻涡旋,离心(10分钟,400×g),并且丢弃上清液,然后在流式细胞术分析之前将细胞再悬浮于200μl PBS中。

[0101] 流式细胞术分析

[0102] 百克顿-迪金森公司FACSCalibur®可以检测光学系统中单个粒子或细胞的6个不同参数。所述仪器将光散射和荧光强度转换成数字脉冲。前向散射(FSC)提供尺寸测量,并且侧向散射(SSC)提供细胞质粒度的测量。所述仪器具有四色荧光检测器:蓝色(488nm)激光器检测FL1、FL2和FL3,并且另外一个红色二极管激光器(635nm)检测FL4。

[0103] 在定期系统清洁仪器后,使用3色CalibrITE珠粒(BD第340486号)和CalibrITE APC珠粒(BD第340487号)和AutoCOMPTM软件进行校准检查,以设置光电倍增管(PMT)电压并且调整和优化检测器的荧光补偿(FL1;FL2、FL3和FL4)。CalibrITE珠粒具有精确的尺寸,并且用精确量的荧光染料标记,模拟未染色和染色的白细胞。AutoCOMP™软件生成CalibFile。所有单克隆抗体均使用Calib File仪器设置进行预滴定。CellQuest Pro软件用于运行BD FACSCalibur。根据上表测量每个管的3000-10000个获得的、收集的和门控的淋巴细胞。

[0104] 使用同型匹配的对照抗体(IgG2/IgG1/CD4同型(FITC、PE和PerCP-Cy 5.5)和IgG1同型(APC),美国加利福尼亚州BD生物科学事业部)来设置点图象限并且通过减去污染的非淋巴细胞来计算淋巴细胞群的百分比。在点图中鉴定和门控淋巴细胞,显示侧向散射(细胞质粒度)和FL1参数(FITC阳性强度)CD3+T细胞。然后在FSC和SSC点图中显示淋巴细胞的多色背门。围绕这些鉴定的淋巴细胞(淋巴细胞门)设置一个区域。从具有所关注的染色的单克隆抗体的不同双参数组合(FL1、FL2、FL3和FL4)的淋巴细胞门中显示新的点图,并且然后鉴定特征子组。象限设置在来自同型对照、阴性群体的两个参数点图中。以淋巴细胞门中象限群体的百分比报告子集。减去淋巴细胞门中未染色的阴性细胞。如本文所用的术语“白细胞”是指PBMC(即分离细胞的总群体)。

[0105] 具体地,从淋巴细胞门开始门控T细胞、CD4+(Th)或CD8+(Tc)细胞的子组。从这些门开始,将初始细胞门控为CD3+CD4/CD8+CD45RA+CD45R0-并且将记忆细胞门控为CD3+CD4/CD8+CD45RA-CD45R0+。将活化和分化的效应细胞和记忆细胞门控为D3+CD4/8+CD62L+、CD4+CD25+CD45RA+CD45R0+、CD4+CD25+CCR4+CD45R0、CD4+CD25+CCR4+CD62L+、CD8+CD45RA+CCR9+β7+、CD3+CD4+/CD8+β7+CCR9+、CD4+CD38+β7+CD62-。将B细胞定义为CD3-CD19+淋巴细胞。从淋巴细胞门开始,门控CD4+细胞,然后门控CD25+细胞。然后检验这一群体的FoxP3+细胞的表达。从CD4+CD25+门开始,测定具有最高CD25表达,CD4+CD25<sup>高</sup>的百分比。然后进一步检验CD4+CD25<sup>高</sup>淋巴细胞群的FoxP3表达。NK细胞从淋巴细胞门开始门控。从所述门开始,将NK细胞门控为CD3-CD16+/CD56+细胞。

[0106] 淋巴细胞检定区域含有>70%的淋巴细胞。CD3+T细胞的检定内分析显示3%的协

方差，并且CD3+T细胞的检定间分析显示5%的协方差。

[0107] 统计分析

[0108] 研究结果是乳糜泻自身免疫评估为tTG自身抗体血清含量的变化(由于体积不足而排除一个儿童)和6个月后B细胞、NK细胞和调节性T细胞亚群的外周免疫反应的变化。通过Fisher精确测试进行二元变量组之间的比较。连续与有序分类数据组之间的比较通过威尔科克森秩和测试(Wilcoxon Rank Sum test)进行，例如威尔科克森秩和测试用于比较在0个月、3个月和6个月时益生菌治疗组与安慰剂组之间的tTGA含量。为了比较每组中tTGA含量随时间的变化，使用连续变量的威尔科克森符号秩测试(Wilcoxon signed rank test)。以单独的数据集分析IgA-tTGA和IgG-tTGA的含量。同样，关于通过流式细胞术分析的参数从基线到3个月和6个月测量的变化，威尔科克森秩和测试应用于益生菌治疗组与安慰剂之间的比较。威尔科克森符号秩测试用于测量每组内3个月和6个月与基线的差异。t测试用于比较各组间的HLA分布。

[0109] 没有估算丢失的数据，即分析是针对观察到的情况。为了避免退出测试的影响并且限制治疗与那些完全遵守临床试验指令的儿童的比较，进行意向治疗分析和按方案分析。所有报告的p值均为双面的，并且未针对多样性(即标称值)进行调整。认为p值<0.05具有统计显著性。统计分析在StatXact版本10.1(美国马萨诸塞州剑桥市赛特尔(Cytel, Cambridge, MA, USA))中进行。

[0110] 结果-用副干酪乳杆菌和胚芽乳杆菌菌株治疗减少乳糜泻自身免疫(CDA)中的tTGA自身抗体

[0111] 共有118名儿童满足纳入判据，并且被邀请参与研究。其中，90名儿童及其看护人同意参与研究：1名来自CiPiS研究，并且其余89名来自TEDDY研究。其中十二名(13%)在初次问诊后离开了研究。由于血液样品种体积不足以进行tTGA分析，因此排除一名儿童。总共有77名(87%)儿童被纳入最终数据集；分别为益生菌治疗组40名(52%)和安慰剂组37名(48%)。表3中显示这些组的基线特征，并且表3A中显示HLA分布。均值和中值研究持续时间为188天和190天(Q1:176.5天,Q3:203天,扩散153-237天)。

[0112] 表3:研究开始时的基线特征(第一次问诊)。

	治疗 n = 40	安慰剂 n = 37	p 值
年龄, 岁, 均值	4.85	4.42	0.284 <sup>1</sup>
性别, n			0.172 <sup>2</sup>
男孩	22	14	
女孩	18	23	
体重, kg, 均值	22.0	20.8	0.182 <sup>1</sup>
身高, cm, 均值	114.0	110.8	0.243 <sup>1</sup>

[0114] <sup>1</sup>威尔科克森秩和测试,双面; <sup>2</sup>Fisher精确测试,双面

[0115] 表3A:研究人群的HLA分布。

HLA 型	益生菌组 n ( % )	安慰剂组 n ( % )	p 值
[0116]	DR3-DQ2/DR4-DQ8	10 (25.0)	16 (42.1)
	DR4-DQ8/DR4-DQ8	10 (25.0)	7 (18.4)
	DR4-DQ8/DR8/DQ4	4 (10.0)	2 (5.2)
	DR3-DQ2/DR3-DQ2	15 (37.5)	13 (34.2)
	DR4/DR1	1 (2.5)	0 (0.0) .

[0117] 表4:自身抗体(tTGA)含量,IgA和IgG。p值是每次问诊时治疗与安慰剂之间的比较。

	问诊 1	问诊 2 (约 3 个月)	问诊 3 (约 6 个月)
[0118]	<b>tTGA-IgA, 均值(中值)</b>		
	治疗	158.60 (4.71)	72.84 (3.07)
	安慰剂	12.96 (4.38)	21.98 (4.93)
	p 值 <sup>1</sup>	0.8912	0.3013
	<b>tTGA-IgG, 均值(中值)</b>		
	治疗	166.98 (1.57)	141.74 (1.64)
	安慰剂	8.00 (1.60)	14.26 (1.56)
	p 值 <sup>1</sup>	0.8480	0.9373

[0119] <sup>1</sup>威尔科克森秩和测试,双面

[0120] 3个月后,与基线含量(分别为p=0.046和p=0.034)相比,tTG-IgG含量在益生菌组中减少平均29.4±513U/mL,并且在安慰剂组中增加平均6.3±48U/mL,但在3个月后各组之间的IgA-tTG含量没有观察到显著差异。6个月后,益生菌组中的IgA-tTG(平均减少107.0±855U/mL;p=0.013)和IgG-tTG(平均减少84.7±748U/mL;p=0.062)的含量都减少,而安慰剂组正相反,这说明与基线相比,IgA-tTG(平均增加25.0±161SD U/mL;p=0.043)和IgG-tTG(平均增加56.2±349U/mL;p=0.008)的含量都增加。

[0121] 结果-用副干酪乳杆菌和胚芽乳杆菌菌株治疗降低了自然杀伤T细胞的比例,抵消了自然杀伤细胞比例的增加,并且减少了细胞毒性T细胞中CD62L的表达。

[0122] 在两个研究组中,使用流式细胞术分析来检验在基线和每次随访问诊时白细胞群的大小和活化状态的任何变化。

[0123] 表5显示,鉴定为CD3+CD56+细胞的自然杀伤(NK-T)细胞的百分比用乳杆菌治疗降低,并且在第二次随访问诊之前治疗组内(p=0.0297)和治疗组与安慰剂组之间(p=0.0079),降低具有统计学显著性。表6显示,在6个月的问诊之前,与益生菌组(p=0.0381)相比,在安慰剂组中鉴定为CD3-CD56+的自然杀伤(NK)细胞的百分比增加了统计学显著性。

[0124] 表7显示细胞毒性T细胞(CD3+CD8+)的数量仅在第一次随访问诊(3个月)时在安慰剂组中平均增加了1.74%(p=0.017)。表7A显示在第二次随访问诊(6个月)之前在安慰剂组中门控T<sub>H</sub>细胞(CD3+CD4+)的比例已平均减少了5.55%(p=0.039),而益生菌组没有观察到显著变化。

[0125] 进一步参看表7,表8和9中CD3+CD8+细胞表面上的CD62L的表达显示在第二次随访问诊时,与安慰剂相比,统计趋向于用益生菌治疗有更多CD62L<sup>低</sup>细胞毒性T细胞(p=

0.0815) 和更少CD62L<sup>高</sup>细胞毒性T细胞( $p=0.0729$ )。CD62L是细胞粘附分子L-选择素,其参与淋巴细胞与内皮细胞的相互作用,有助于进入次级淋巴组织。细胞表面上CD62L的存在指示初始状态(CD62L<sup>高</sup>),而当细胞已活化时,其从其表面(CD62L<sup>低</sup>)释放CD62L。表9A还显示在第二次随访问诊时安慰剂组中较少的CD3+CD8+CD62L<sup>低</sup>细胞(平均减少0.86%, $p=0.014$ ),而益生菌组没有观察到显著变化。

[0126] 进一步参看表7A,表9B显示安慰剂组中CD3+CD4+CD62L<sup>低</sup>细胞减少的趋势(平均减少5.55%, $p=0.039$ ),而益生菌组没有观察到显著变化。

[0127] 表5:NK-T细胞CD3+CD56+(淋巴细胞的NK-T细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
乳杆菌	N	33	39	38	32	31
	丢失	13	7	8	14	15
	分钟	0.10	0.10	0.10	-1.54	-3.67
	中值	0.44	0.45	0.44	-0.09	-0.16
	最大值	4.74	3.27	1.60	1.57	1.00
	均值	0.77	0.67	0.51	-0.12	-0.29
	标准	0.85	0.62	0.34	0.66	0.81
	P 值	NA	NA	NA	0.2082	0.0297
安慰剂	N	32	34	34	30	30
	丢失	12	10	10	14	14
	分钟	0.12	0.22	0.19	-0.95	-0.94
	中值	0.46	0.49	0.58	0.02	0.18
	最大值	1.26	1.30	2.35	0.97	1.72
	均值	0.55	0.59	0.69	0.04	0.13
	标准	0.30	0.33	0.40	0.41	0.52
	P 值	NA	NA	NA	0.6815	0.1082
P 值		0.4590	0.8238	0.0202	0.2316	0.0079

[0129] 表6:NK细胞CD3-CD56+(淋巴细胞的NK细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
乳杆菌	N	33	39	38	32	31
	丢失	13	7	8	14	15
	分钟	1.11	3.14	1.68	-26.45	-34.27
	中值	8.79	7.63	7.07	0.18	-1.61
	最大值	43.71	21.95	15.14	8.62	10.74
	均值	10.69	8.33	7.76	-2.01	-2.86
	标准	8.99	4.55	3.50	7.54	9.81
	P 值	NA	NA	NA	0.4559	0.2639
安慰剂	N	32	34	34	30	30
	丢失	12	10	10	14	14
	分钟	2.37	1.99	3.08	-11.55	-6.78
	中值	7.18	7.11	7.65	1.80	2.18
	最大值	26.01	27.77	47.42	9.55	21.41
	均值	8.33	8.44	10.62	0.66	2.68
	标准	5.52	5.02	8.32	4.29	6.55
	P 值	NA	NA	NA	0.1347	0.0606
P 值		0.2930	0.8842	0.2172	0.2194	0.0381

[0131] 表7:CD3+CD8+(CD3+淋巴细胞的细胞毒性T细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16
	分钟	19.23	20.42	24.06	-9.73	-4.15
	中值	33.62	33.22	34.56	0.93	1.14
	最大值	42.13	45.21	44.05	13.63	15.40
	均值	32.51	33.50	34.08	1.24	2.10
	标准	6.22	6.04	5.67	4.47	4.94
	P 值	NA	NA	NA	0.1122	0.0732
安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15
	分钟	17.62	17.33	17.47	-4.17	-14.04
	中值	32.39	33.08	31.86	1.12	0.31
	最大值	47.94	50.53	47.49	9.93	16.86
	均值	32.10	33.53	33.15	1.74	1.01
	标准	7.70	8.53	7.37	3.36	6.35
	P 值	NA	NA	NA	0.0171	0.6295
P 值		0.6181	0.9679	0.4206	0.4643	0.4136

[0133] 表7A:CD3+CD4+(CD3+白细胞的T辅助细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16
	分钟	2.13	1.21	4.73	-30.81	-38.10
	中值	14.95	13.71	11.75	-1.34	-3.01
	最大值	48.34	31.08	29.82	19.02	17.09
	均值	17.04	13.84	14.63	-2.47	-3.44
	标准	9.78	7.36	6.79	12.40	12.63
	P 值	NA	NA	NA	0.3176	0.2286
安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15
	分钟	1.06	6.40	0.93	-32.01	-31.93
	中值	14.04	13.30	13.35	0.04	-4.07
	最大值	50.33	35.42	29.26	11.53	14.57
	均值	19.01	15.61	14.20	-4.43	-5.55
	标准	12.82	8.00	7.13	11.98	12.61
	P 值	NA	NA	NA	0.2508	0.0386
P 值		0.8244	0.4243	0.8073	0.8649	0.6679

[0135] 表8:CD3+CD8+CD62L<sup>低</sup>(低表达CD62L的CD3+CD8+细胞或细胞毒性T细胞的CD62L<sup>低%</sup>占淋巴细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0136]	乳杆菌	N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17	
	分钟	12.93	11.02	12.99	-30.81	-22.56	
	中值	30.01	25.78	28.38	0.12	2.86	
	最大值	61.80	70.98	90.33	43.51	60.32	
	均值	32.53	32.12	33.72	0.89	3.66	
	标准	13.05	15.49	18.31	17.39	16.52	
	P 值	NA	NA	NA	1.0000	0.3495	
[0136]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15	
	分钟	8.59	10.38	13.17	-25.80	-21.86	
	中值	33.01	28.55	25.92	-2.69	-3.39	
	最大值	55.58	63.70	68.32	55.02	34.12	
	均值	32.15	31.07	28.73	-0.63	-3.25	
	标准	10.91	14.24	13.44	15.51	14.66	
	P 值	NA	NA	NA	0.5619	0.1622	
[0137]	P 值	1.0000	0.7983	0.3736	0.7692	0.0815	

[0137] 表9:CD3+CD8+CD62L<sup>高</sup>(CD3+CD8+细胞的CD62L<sup>高</sup>%或CD62L高表达的细胞毒性T细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0138]	乳杆菌	N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17	
	分钟	38.20	28.91	7.83	-43.45	-61.92	
	中值	69.75	73.68	71.19	-0.19	-2.72	
	最大值	87.07	88.73	86.80	31.37	22.56	
	均值	67.25	67.68	65.74	-0.87	-4.07	
	标准	13.13	15.42	18.30	17.46	16.37	
	P 值	NA	NA	NA	1.0000	0.2867	
[0138]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15	
	分钟	44.42	35.40	31.27	-56.01	-34.20	
	中值	66.93	71.24	73.51	3.18	3.26	
	最大值	91.41	89.62	86.56	25.80	21.86	
	均值	67.62	68.63	71.03	0.56	3.24	
	标准	10.91	14.31	13.40	15.51	14.65	
	P 值	NA	NA	NA	0.4846	0.1689	
[0139]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
	P 值		0.9554	0.8206	0.3001	0.7212	0.0729

[0140] 表9A:CD3+CD8+CD62L<sup>低</sup>(低表达CD62L的CD3+CD8+细胞或细胞毒性T细胞的CD62L低%占白细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0141]	乳杆菌	N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17	
	分钟	0.62	0.14	0.57	-3.63	-5.08	
	中值	2.53	2.11	2.43	-0.37	-0.10	
	最大值	10.30	14.95	7.67	12.94	4.87	
	均值	2.91	2.54	2.75	0.01	-0.01	
	标准	2.05	2.37	1.61	2.84	1.93	
	P 值	NA	NA	NA	0.2917	0.7922	
[0141]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15	
	分钟	0.20	0.63	0.23	-5.70	-4.99	
	中值	2.70	2.26	2.02	-0.31	-0.85	
	最大值	8.68	7.48	7.66	4.58	4.78	
	均值	2.98	2.62	2.24	-0.45	-0.86	
	标准	2.03	1.58	1.56	1.89	2.09	
	P 值	NA	NA	NA	0.2087	0.0143	
[0142]	P 值	0.7241	0.5793	0.1456	0.8460	0.0879	

[0142] 表9B:CD3+CD4+CD62L<sup>低</sup>(低表达CD62L的CD3+CD4+细胞或T辅助细胞的CD62L<sup>低</sup>%占白细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0143]	乳杆菌	N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17	
	分钟	0.35	0.31	0.63	-5.97	-5.16	
	中值	2.42	1.74	1.85	-0.47	-0.67	
	最大值	7.69	17.53	10.62	15.99	5.43	
	均值	2.83	2.45	2.59	-0.30	-0.18	
	标准	1.80	2.92	2.05	3.64	2.44	
	P 值	NA	NA	NA	0.1446	0.3330	
[0143]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15	
	分钟	0.27	0.61	0.13	-4.93	-6.83	
	中值	2.56	2.19	2.06	-0.23	-0.83	
	最大值	10.62	5.69	6.82	3.67	2.86	
[0144]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
	均值	3.25	2.41	2.31	-0.86	-0.91	
	标准	2.20	1.38	1.54	1.98	2.15	
	P 值	NA	NA	NA	0.0702	0.0506	
	P 值	0.4414	0.2857	0.6680	0.8336	0.4559	

[0145] 结果-用副干酪乳杆菌和胚芽乳杆菌菌株治疗可预防T辅助细胞(CD4+CD25+细胞)活化增加和CD4+CD25+FoxP3+细胞增加

[0146] 进一步的流式细胞术分析集中于T辅助细胞,鉴定为CD3+CD4+,CD4+T辅助细胞的亚群在两个研究组之间不同。

[0147] 表10显示在安慰剂组中,第二次随访问诊(6个月)的初始T<sub>H</sub>细胞群(CD4+CD45RA+CD45R0-)平均下降了4.73% (p=0.002)。表10还显示,与安慰剂相比,乳杆菌治疗预防细胞

与初始T细胞标志物CD45RA+/R0-的比例的这一降低(对于V1-V0,p=0.0532;对于V2-V0,p=0.0217)。相反地,表11示出记忆T<sub>H</sub>细胞群(CD4+CD45RA-CD45R0+)在第二随访诊(6个月)之前在安慰剂组中平均增加了3.07%(p=0.003)。表11还显示,与安慰剂相比,乳酸杆菌治疗预防细胞与记忆T细胞标志物CD45RA-/R0+的比例的这一增加(对于V1-V0,p=0.0650;对于V2-V0,p=0.0198)。

[0148] 表10A显示,第二随访诊(6个月)时的初始T<sub>C</sub>细胞(CD8+CD45RA+CD45R0-)群在安慰剂组中平均降低了2.17%(p=0.030),而益生菌组没有观察到显著变化。

[0149] 与安慰剂相比,乳杆菌治疗还可以预防记忆百分比(CD45R0+)T辅助细胞的增加(表12-15),并且可以预防表达CCR4的记忆T<sub>H</sub>细胞(CD4+CD45R0+CCR4+)百分比增加(安慰剂组平均增加7.63%,p=0.003;比较p=0.0110;表15A)。

[0150] 乳杆菌治疗预防CD4+CD38+CD62L-T辅助细胞的减少,所述细胞表达CD38胞外酶和糖蛋白细胞粘附分子而非L-选择素(CD62L),在第二次随访诊时呈现趋势(表16,p=0.0753)。治疗还预防在第二次随访诊时观察到的CD4+CCR9+β7+T辅助细胞减少(表17,p=0.0382)。B7(来自肠道归巢受体α4β7)在T细胞表面上的表达被认为是肠归巢细胞的特征。

[0151] 表18显示乳杆菌治疗在第二次随访诊前预防活化的T辅助细胞的比例增加,其中通过CD25鉴定活化,即白细胞介素-2受体α链。表18A显示,在第二次随访诊(6个月)前,安慰剂组中初始CD4+CD25+CD45RA+细胞的百分比平均下降5.72%(p=0.0179),而益生菌组未观察到显著变化。

[0152] 表19进一步显示在第二次随访诊前,乳杆菌治疗预防T调节性细胞的比例的增加,所述T调节性细胞被鉴定为具有高CD25阳性(CD25<sup>高</sup>)的CD4+细胞。

[0153] 表20显示在第二次随访前安慰剂组中CD4+CD25+FoxP3+细胞百分比增加的趋势(平均增加0.32%,p=0.0521),以及与安慰剂相比(p=0.0275),益生菌治疗的总体效果显著。

[0154] 表10:CD4+CD45RA+R0-(CD3+CD4+细胞或初始T辅助细胞的CD45RA+CD45R0-%占淋巴细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0155]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	38.93	48.45	49.57	-16.37	-14.55	
	中值	68.60	66.79	65.01	1.78	-0.59	
	最大值	80.51	83.83	78.37	26.60	17.89	
	均值	65.25	66.88	65.68	1.75	-0.08	
	标准	9.63	8.00	7.95	8.17	6.92	
	P 值	NA	NA	NA	0.3105	0.7457	
[0155]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
	丢失	13	12	10	17	15	
	分钟	42.72	46.64	47.24	-19.50	-28.78	
	中值	71.52	68.41	68.87	-1.72	-4.03	
	最大值	85.28	82.13	82.39	12.27	19.53	
	均值	69.70	67.91	65.87	-2.79	-4.73	
	标准	9.62	9.12	9.00	7.67	8.80	

[0156]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
		P 值	NA	NA	NA	0.0692	0.0017
		P 值	0.0420	0.4672	0.7901	0.0532	0.0217

[0157] 表10A: CD8+CD45RA+RO- (CD3+CD8+细胞或初始细胞毒性T细胞的CD45RA+CD45RO-%占白细胞的%)

[0158]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
		丢失	14	7	8	15	16
		分钟	0.85	0.52	1.96	-9.82	-9.82
		中值	5.23	5.39	5.79	-0.12	-0.26
		最大值	14.25	17.78	15.00	10.20	7.09
		均值	6.29	6.06	6.16	0.10	-0.58
		标准	3.61	3.62	3.07	5.13	4.34
		P 值	NA	NA	NA	0.9655	0.4016
[0158]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
		丢失	13	12	10	17	15
		分钟	0.94	2.03	0.59	-20.68	-20.47
		中值	5.57	4.67	4.70	-1.24	-1.71
		最大值	23.89	15.68	14.23	6.07	9.28
		均值	7.27	5.94	5.44	-1.88	-2.17
		标准	5.07	3.64	3.35	4.99	5.38
		P 值	NA	NA	NA	0.0731	0.0308
		P 值	0.6745	0.7197	0.2647	0.2156	0.1951

[0159] 表11: CD4+CD45RA-RO+ (CD3+CD4+细胞的CD45RA-CD45R0+%或记忆T辅助细胞%)

[0160]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
		丢失	14	7	8	15	16
		分钟	5.36	1.96	9.45	-15.41	-10.50
		中值	18.46	17.46	18.40	-0.25	0.05
		最大值	43.39	27.98	35.53	5.00	9.07
		均值	19.61	17.00	18.72	-1.95	-0.34
		标准	8.58	5.71	6.20	6.05	5.42
		P 值	NA	NA	NA	0.2336	0.8513
[0161]	安慰剂	N	31	32	34	27	29
		丢失	13	12	10	17	15

[0161]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
		分钟	0.84	0.28	0.31	-6.51	-5.91
		中值	14.89	14.47	17.85	0.23	3.82
		最大值	30.44	40.92	30.94	17.82	11.81
		均值	15.69	16.37	17.76	1.53	3.07
		标准	6.03	7.51	7.24	5.21	4.82
		P 值	NA	NA	NA	0.2220	0.0032
[0162]		P 值	0.0749	0.4463	0.6040	0.0650	0.0198

[0162] 表12: CD4+CD25+CD45R0+ (CD3+CD4+CD25+细胞的CD45R0+%或表达CD25的T辅助细胞的记忆细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0163]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	4.30	20.03	29.09	-54.63	-34.75	
	中值	49.80	48.33	49.82	0.54	4.67	
	最大值	79.94	81.02	75.62	38.33	22.71	
	均值	50.68	49.47	50.48	0.51	0.94	
	标准	17.76	14.48	11.69	15.44	12.57	
	P 值	NA	NA	NA	0.5814	0.4161	
[0163]	安慰剂	N	32	33	33	29	29
	丢失	12	11	11	15	15	
	分钟	1.36	4.51	21.47	-25.54	-26.73	
	中值	44.76	42.96	48.32	2.13	12.56	
	最大值	66.91	76.11	79.29	45.63	60.72	
	均值	41.87	44.75	52.11	3.18	11.75	
	标准	15.19	15.84	15.63	14.01	17.00	
	P 值	NA	NA	NA	0.2770	0.0006	
[0164]	P 值	0.0536	0.2195	0.7440	0.7690	0.0027	

[0164] 表13:CD4+CD25+CCR4+CD45R0+ (CD4+CD25+CCR4+细胞的CD45R0+%) (表达CD25和CCR4两者的T辅助细胞的记忆细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0165]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	0.00	50.16	48.73	-16.72	-30.75	
	中值	70.63	74.93	72.53	3.15	2.40	
	最大值	91.41	91.89	92.78	64.64	20.14	
	P 值	NA	NA	NA	0.1406	0.2367	
	安慰剂	N	32	33	33	29	29
	丢失	12	11	11	15	15	
[0166]	分钟	7.09	47.80	42.75	-23.37	-10.71	
	中值	68.36	72.43	75.77	2.30	6.65	
	最大值	91.72	87.69	97.06	53.46	57.05	
	均值	67.18	71.72	75.98	4.06	9.38	
	标准	15.39	9.70	11.15	12.95	13.82	
	P 值	NA	NA	NA	0.0760	0.0007	
	P 值	0.4407	0.4513	0.1512	0.9181	0.0825	

[0167] 表14:CD4+CD25<sup>高</sup>CD45R0+ (CD4+CD25<sup>高</sup>细胞的CD45R0+%或高表达CD25的T辅助细胞的记忆细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0168]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	3.80	21.34	25.97	-53.86	-39.60	
	中值	45.89	48.07	46.22	-0.95	-0.41	
	最大值	82.58	84.63	71.63	39.87	30.38	
	均值	48.43	46.67	47.65	-0.12	-0.29	
	标准	18.10	15.41	12.85	15.80	15.81	
	P 值	NA	NA	NA	0.7905	0.8872	
[0168]	安慰剂	N	32	32	33	28	29
	丢失	12	12	11	16	15	
	分钟	1.82	14.37	19.27	-35.46	-41.68	
	中值	41.13	40.76	44.30	0.45	7.78	
	最大值	73.40	77.40	93.43	44.43	63.66	
	均值	41.22	42.91	49.31	1.53	9.35	
	标准	17.19	16.16	18.32	16.54	21.65	
	P 值	NA	NA	NA	0.6456	0.0121	
[0169]	P 值	0.1316	0.2188	0.9315	0.7891	0.0456	

[0169] 表15:CD4+CD25<sup>高</sup>CCR4+CD45R0+ (CD4+CD25<sup>高</sup>CCR4+细胞的CD45R0+%或表达CCR4和高含量CD25的记忆T辅助细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0170]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	0.00	52.12	55.22	-19.05	-20.84	
	中值	75.68	79.65	78.81	0.47	3.97	
	最大值	97.30	92.41	95.63	70.53	28.18	
	均值	73.10	77.16	77.04	3.32	1.84	
	标准	17.86	9.84	10.22	16.78	11.65	
	P 值	NA	NA	NA	0.5136	0.3259	
[0171]	安慰剂	N	32	32	33	28	29
	丢失	12	12	11	16	15	
	分钟	9.93	45.90	34.09	-21.33	-22.60	
	中值	73.76	77.93	82.87	3.82	7.88	
	最大值	94.87	89.46	98.37	64.49	66.47	
	均值	71.24	75.47	81.30	4.20	10.67	
	标准	17.52	10.28	12.33	16.12	17.87	
	P 值	NA	NA	NA	0.2183	0.0011	
[0172]	P 值	0.6383	0.5311	0.0492	0.9790	0.0452	

[0172] 表15A:CD4+CCR4+CD45R0+ (在其表面上表达CDR4的记忆T辅助细胞%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0173]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	1.71	44.95	38.12	-33.51	-27.79	
	中值	65.03	70.17	66.43	1.27	0.50	
	最大值	90.03	90.63	86.20	64.29	17.88	
	均值	64.95	68.80	66.81	2.74	-0.32	
	标准	15.29	9.60	10.60	15.27	10.20	
	P 值	NA	NA	NA	0.1461	1.0000	
[0173]	安慰剂	N	32	33	34	29	30
	丢失	12	11	10	15	14	
	分钟	6.23	39.83	40.82	-19.87	-23.38	
	中值	65.73	68.45	69.99	3.22	5.86	
	最大值	84.23	90.04	90.64	33.60	41.56	
	均值	62.97	67.78	70.12	4.63	7.63	
	标准	15.11	10.42	11.82	12.77	13.92	
	P 值	NA	NA	NA	0.0920	0.0026	
[0174]	P 值	0.7338	0.7553	0.1900	0.5179	0.0110	

[0174] 表16:CD4+CD62L<sup>低</sup>CD38+(CD38+CD4+的CD62L<sup>低</sup>%或表达CD38和低含量的CD62L的T辅助细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0175]	乳杆菌	N	30	39	38	29	28
	丢失	16	7	8	17	18	
	分钟	1.30	1.42	0.94	-8.68	-6.11	
	中值	3.90	3.86	3.57	-0.15	0.64	
	最大值	10.53	20.90	23.76	7.98	19.44	
	均值	4.89	5.32	5.58	0.17	1.03	
	标准	3.03	4.01	4.45	3.87	5.00	
	P 值	NA	NA	NA	0.6740	0.5670	
[0175]	安慰剂	N	31	32	33	27	28
	丢失	13	12	11	17	16	
	分钟	1.08	1.03	1.33	-10.31	-12.08	
	中值	5.23	3.41	3.97	-1.11	-1.32	
	最大值	15.50	20.62	20.32	14.44	17.54	
	均值	6.52	5.50	5.31	-0.89	-1.29	
	标准	4.12	4.88	3.90	5.04	5.50	
	P 值	NA	NA	NA	0.1111	0.0735	
[0176]	P 值	0.1292	0.4923	0.9202	0.1856	0.0753	

[0176] 表17:CD4+CCR9+β7+(CCR9和整合素β7阳性的CD4+细胞的%)

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0177]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	0.72	0.41	0.52	-4.42	-2.67	
	中值	1.34	1.26	1.46	-0.13	0.21	
	最大值	5.96	5.62	5.40	1.40	4.32	
	均值	1.68	1.44	1.71	-0.41	0.06	
	标准	1.11	0.88	0.94	1.12	1.25	
	P 值	NA	NA	NA	0.0703	0.6227	
[0178]	安慰剂	N	32	31	34	27	30
	丢失	12	13	10	17	14	
	分钟	0.60	0.59	0.37	-7.10	-5.40	
	中值	1.65	1.61	1.42	-0.03	-0.33	
	最大值	8.71	2.68	3.31	1.24	1.79	
	均值	2.07	1.62	1.61	-0.46	-0.57	
	标准	1.62	0.63	0.74	1.75	1.36	
	P 值	NA	NA	NA	0.5342	0.0237	
[0179]	组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
	P 值		0.2378	0.0848	0.7900	0.4932	0.0382
[0180]	表18:CD4+CD25+(CD3+CD4+细胞的CD25+%或CD25阳性的T辅助细胞的%)						
组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0	
[0180]	乳杆菌	N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16	
	分钟	4.78	5.25	5.54	-8.36	-6.83	
	中值	8.82	9.85	8.83	0.13	-0.10	
	最大值	19.55	15.51	19.82	7.03	8.12	
	均值	9.80	9.84	9.57	0.16	-0.12	
	标准	3.65	2.21	2.99	3.44	4.21	
	P 值	NA	NA	NA	0.7151	0.8078	
[0181]	安慰剂	N	32	33	33	29	29
	丢失	12	11	11	15	15	
	分钟	3.03	4.53	4.70	-5.89	-6.79	
	中值	9.15	9.89	9.88	1.15	1.37	
	最大值	20.66	15.39	18.29	5.76	12.74	
	均值	9.76	10.02	10.60	0.66	1.60	
	标准	3.76	2.69	3.83	3.06	3.74	
	P 值	NA	NA	NA	0.1828	0.0121	
[0181]	表18A:CD4+CD25+总CD45RA+(其表面上表达CD25的初始CD4+细胞%)						

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
[0182]	乳杆菌 N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17
	分钟	3.05	11.46	10.09	-23.80	-21.93
	中值	28.76	35.65	30.19	0.78	-0.80
	最大值	57.29	56.58	59.50	32.86	18.99
	均值	31.03	33.89	31.67	1.48	-1.18
	标准	14.08	11.63	11.48	11.96	9.86
	P 值	NA	NA	NA	0.6554	0.5221
[0183]	安慰剂 N	32	33	33	29	29
	丢失	12	11	11	15	15
	分钟	19.96	15.04	12.36	-33.69	-32.45
	中值	39.71	35.61	35.89	-3.86	-3.76
	最大值	72.86	65.34	73.61	19.31	10.99
组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
[0184]	均值	38.69	37.03	33.75	-3.38	-5.72
	标准	12.72	14.35	13.59	11.28	11.09
	P 值	NA	NA	NA	0.1373	0.0179
	P 值	0.0316	0.4770	0.6121	0.1244	0.1930
[0185]	表19:CD4+CD25 <sup>高</sup> (CD25高度阳性的CD4+细胞的%,被视为T调节性细胞)。					
组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
[0185]	乳杆菌 N	32	39	38	31	30
	丢失	14	7	8	15	16
	分钟	1.83	2.12	2.22	-4.60	-4.14
	中值	3.93	4.52	4.30	0.52	0.08
	最大值	9.31	7.11	8.58	3.91	3.23
	均值	4.17	4.36	4.22	0.29	0.04
	标准	1.62	1.10	1.33	1.66	1.98
	P 值	NA	NA	NA	0.2260	0.8670
[0186]	安慰剂 N	32	33	33	29	29
	丢失	12	11	11	15	15
	分钟	1.25	2.03	1.56	-3.54	-3.35
	中值	4.04	4.38	4.63	0.38	1.06
	最大值	8.99	7.52	8.26	3.64	5.39
	均值	4.21	4.49	4.76	0.47	0.90
	标准	1.63	1.37	1.71	1.54	1.82
	P 值	NA	NA	NA	0.0846	0.0081
[0186]	P 值	0.8493	0.8332	0.1720	0.7831	0.1026
[0186]	表20:CD4+CD25+Foxp3+(T调节性细胞占白细胞的%)					

组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
[0187]	乳杆菌 N	31	39	38	30	29
	丢失	15	7	8	16	17
	分钟	0.22	0.18	0.17	-1.78	-2.11
	中值	1.62	1.74	1.50	0.04	-0.15
	最大值	3.58	2.88	3.22	2.10	1.30
	均值	1.55	1.67	1.45	0.11	-0.20
	标准	0.79	0.66	0.64	0.86	0.87
	P 值	NA	NA	NA	0.4995	0.3276
安慰剂	N	29	33	34	26	27
	丢失	15	11	10	18	17
组	统计	V0	V1	V2	V1-V0	V2-V0
[0188]	分钟	0.29	0.83	0.08	-0.84	-1.71
	中值	1.57	1.78	1.83	0.14	0.31
	最大值	2.75	3.43	3.78	1.32	2.32
	均值	1.54	1.74	1.82	0.19	0.32
	标准	0.64	0.54	0.85	0.64	0.91
	P 值	NA	NA	NA	0.1711	0.0521
		0.8515	0.9351	0.0326	0.6866	0.0275

[0189] 讨论

[0190] 在本研究中重要的主要发现是通过在正常饮食中持续乳糜泻自身免疫的儿童中使用乳杆菌菌株来延迟tTG自身抗体含量的增加(图1和2)。这给出了可靠的证据,证明益生菌补充剂对先前从未观察到的早期活动性乳糜泻自身免疫有抑制作用。表明只有无麸质饮食才能随时间有效降低tTG自身抗体的含量(Agardh D, 等人《儿科学报》2004;93(8):1046-51)。乳杆菌对乳糜泻自身免疫的影响进一步得到了T细胞调节中涉及的外周免疫反应的一致变化的支持,这种变化仅在安慰剂组的儿童中观察到。有趣的是,安慰剂组中发现的大多数淋巴细胞子组的差异与患有活动性乳糜泻的患者中的差异类似。

[0191] 安慰剂组中CD4+CD25+Foxp3+T细胞的增加在治疗组中保持不变,这可以通过两种乳杆菌菌株对活化的CD4+细胞的下调作用来解释。观察到安慰剂组中CD3+CD4+细胞的减少可被视为继发于肠粘膜内麸质敏感性淋巴细胞的区室化。此外,表达CD45RA的初始T<sub>H</sub>细胞减少,同时安慰剂组中表达CD45R0的效应细胞和记忆T<sub>H</sub>细胞的百分比更高,这在先前未经治疗的乳糜泻患者中观察到,并且由麸质活化的循环CD45+αβTcR+和γδTcR+淋巴细胞的更高百分比解释(Kerttula TO, 等人《临床实验免疫学(Clin Exp Immunol.)》1998;111(3):536-40)。通过发现在安慰剂组中也表达CCR4的CD45R0+细胞的百分比增加进一步加强了这种解释,表明已接触抗原的调节性T细胞再循环。CCR4是一种重要的趋化细胞素受体,其用于募集T细胞以观察炎症,并且其在分化的调节性T细胞上高度表达(Iellem A, 等人,《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol.)》2003;33(6):1488-96)。安慰剂组中CD4+CD25<sup>高</sup>CD45R0+CCR4+细胞和CD4+CD25+Foxp3+细胞的增加指示试图消除持续肠炎和对膳食麸质抗原的免疫反应,如前所述(Frisullo G, 等人,《人体免疫(Human Immunol.)》2009;70(6):430-5; Tiittanen M, 等人《临床实验免疫学》2008;152(3):498-507)。

[0192] 特别相关的第三个发现是安慰剂组中NK细胞随时间与持续乳糜泻自身免疫的外周变化,这在接受益生菌的儿童中未观察到。已发现NK细胞群和NK-T细胞群在活动性乳糜泻中的组织和外周中都有所减少(Dunne MR, 等人,《公共科学图书馆:综合(PLoS ONE.)》

2013;8(10):e76008)。这与我们的研究结果一致,其中我们发现益生菌组中NK细胞增加,而安慰剂组则没有。这进一步支持NK细胞在乳糜泻中的重要性,并且益生菌补充剂可以对NK细胞具有直接或间接的刺激作用,其反映为外周中自身免疫反应减少。

[0193] 结论

[0194] 总之,通过比较各组之间的免疫特征曲线,我们能够鉴定对乳糜泻自身免疫的明显抑制作用,反映为tTG自身抗体含量减少。通过自身免疫调节中涉及的T淋巴细胞与接受安慰剂的患有持续乳糜泻自身免疫的儿童中尤其可见的NK细胞的比例的外周变化的一致变化进一步加强了这种观察结果。这一新发现为人类自身免疫性疾病中的益生菌提供了潜在的治疗干预新领域。

[0195] 我们选择研究与CD病理学相关的免疫学变化而不受GFD的影响。用GFD治疗引起CD患者中几种免疫学标志物(例如tTGA)的快速变化。(Midhagen G,等人,《内部医学杂志》2004;256(6):519-24)和(Agardh D,等人,《临床和实验免疫学(Clinical and Experimental Immunology.)》2006;144(1):67-75)。因此,我们根据目前的诊断指南使用了<30U/ml的临界值,根据目前的诊断指南,显示tTGA含量显著升高可以作为无需肠活检的CD诊断的充分证据(Husby S,等人,《儿童胃肠病学和营养杂志》2012;54(1):136-60)。因此,事实是我们预计大多数参与者以低初始tTGA含量进入研究作为持续自身免疫的早期迹象,这是我们群体的固有成分。

[0196] 虽然IgA-tTGA和IgG-tTGA含量都是CD中的有效诊断测试,但由于更高的特异性和临床相关性,目前的临床建议主张在具有正常总IgA含量的儿童中使用IgA-tTGA(Husby S,等人,同上)。

[0197] 在本研究中,益生菌乳杆菌治疗组中IgA-tTGA含量的变化比起安慰剂组更显著地降低。实际上,这由两个用乳杆菌治疗的儿童反映,所述乳杆菌从邀请到第0次问诊前进到高含量,其在3个月和6个月之后显著降低其IgA-tTGA含量,这表明益生菌可能对某些患有CD自身免疫的儿童产生影响(数据未显示)。

[0198] 在本临床研究中使用的例示性益生菌乳杆菌胚芽乳杆菌HEAL 9和副干酪乳杆菌8700:2显示出对吃含麸质饮食的儿童的CD自身免疫的抑制作用。这指示乳杆菌菌株可以预防和/或延迟‘处于HLA风险’的个体的CD自身免疫,表明可能在CD中预防性应用益生菌乳杆菌。

[0199] 据我们所知,这是第一项评估和显示益生菌乳杆菌物种可能延迟或预防处于CD遗传风险的儿童罹患持续CD自身免疫的干预研究。其指示本发明的益生菌乳杆菌菌株可用于延迟和/或预防从CDA向CD的进展。

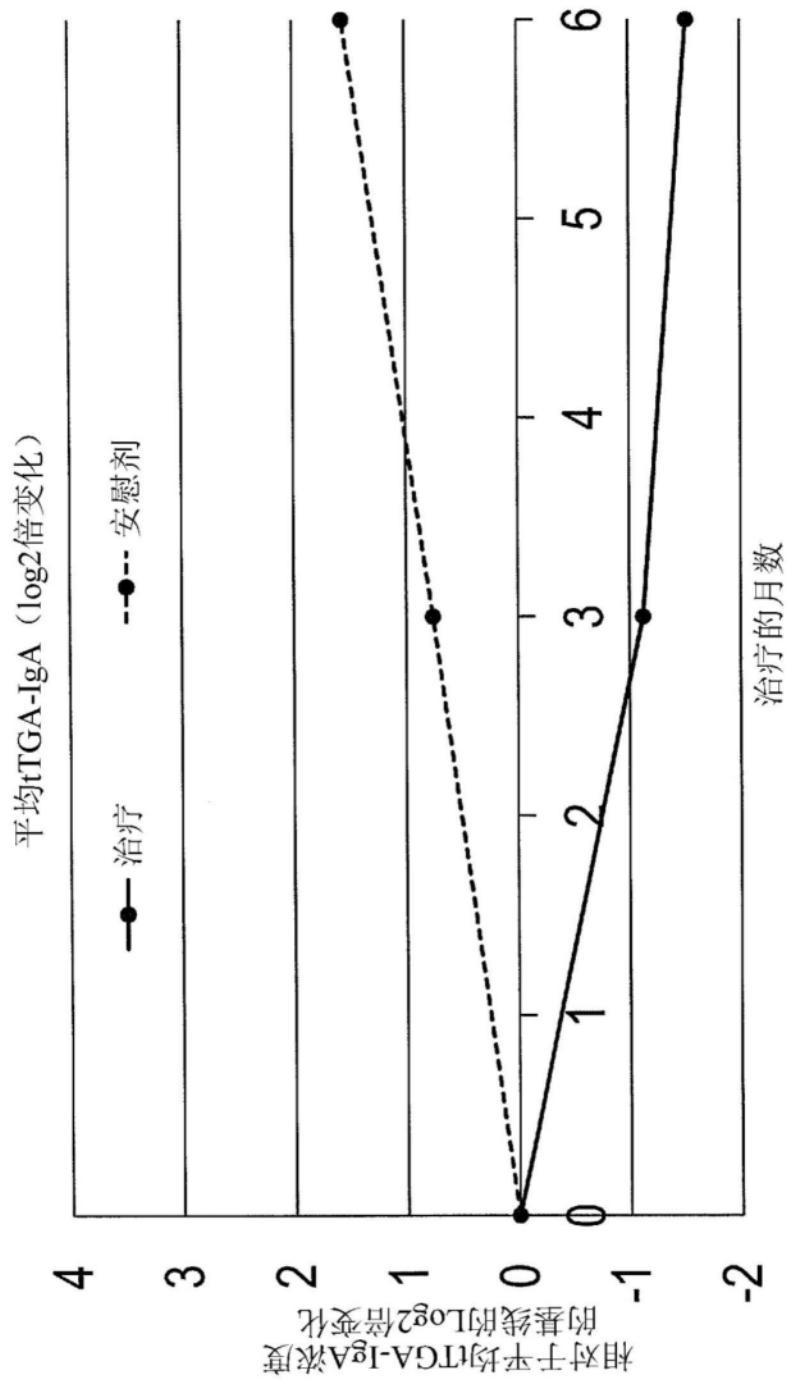


图1

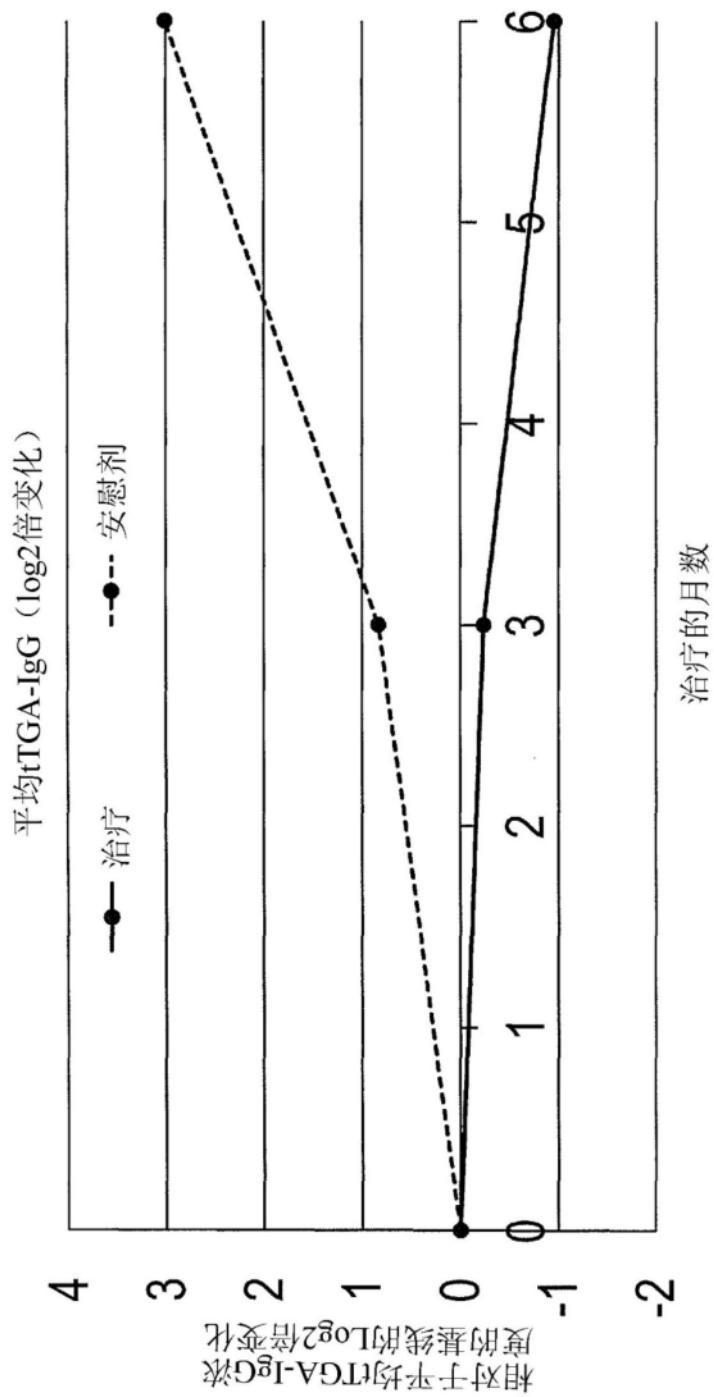


图2