



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1578670 B

(45) 授权公告日 2013. 09. 04

(21) 申请号 02821078. 6

(22) 申请日 2002. 08. 20

(30) 优先权数据

S2001/0780 2001. 08. 23 IE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004. 04. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IE2002/000121 2002. 08. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02003/018049 EN 2003. 03. 06

(73) 专利权人 韦斯特盖特生物有限公司

地址 爱尔兰多尼戈尔镇

(72) 发明人 M·A·福兰 D·布拉迪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 刘玥 徐雁漪

(51) Int. Cl.

A61K 38/17(2006. 01)

A61K 35/20(2006. 01)

A23L 1/03(2006. 01)

A61P 31/00(2006. 01)

(56) 对比文件

郭本恒. 乳品化学 1. 中国轻工业出版社, 2001, 第6页表1-3.

审查员 林峻凯

权利要求书4页 说明书15页 附图7页

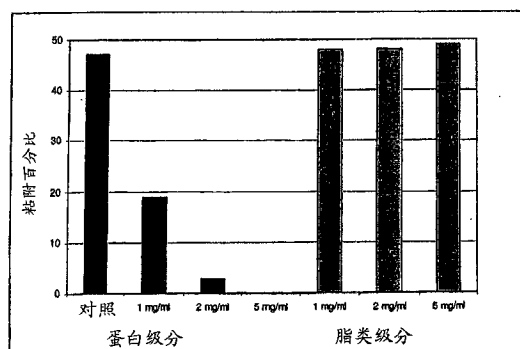
(54) 发明名称

乳清脱辅基蛋白在预防或治疗微生物或病毒感染中的用途

(57) 摘要

本发明涉及使用乳汁脱辅基蛋白或它的混合物, 预防或治疗由微生物或病毒引起的人体或动植物的感染。据信这一目的是通过抑制潜在病原体的粘附来达到的。更优选的是, 至少一种乳汁脱辅基蛋白或它的混合物, 同时或顺序地与下述二者或其中一种用药: 至少一种游离脂肪酸或其混合物或其甘油一酸酯; 和 / 或至少一种有机酸或其盐或酯或它们的混合物。活性制剂可以通过药理学上可接受的给药系统来输送, 包括非肠道使用的溶液、软膏、滴眼液、鼻用喷雾剂、阴道内用装置、外科敷料、医用食品或饮料、口服保健制剂和应用用于粘膜的药剂。

酶水解后乳清的蛋白和脂类级分对白色假丝酵母粘附抑制的比较



1. 乳清脱辅基蛋白混合物在生产可用于通过抑制潜在病原体粘附于人体或动物体表面内或表面上治疗或预防疾病的药物中的应用,其中所述乳清脱辅基蛋白混合物含有一种或多种脱辅基脂蛋白和一种或多种脱辅基糖蛋白,所述乳清脱辅基脂蛋白除去其结合的脂肪酸,以及所述乳清脱辅基糖蛋白除去其结合的碳水化合物部分。

2. 权利要求 1 中的应用,其中乳清脱辅基脂蛋白来自一种乳清脂蛋白,所述乳清脂蛋白选自  $\beta$ -乳球蛋白、脂肪滴膜和它们的混合物。

3. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物是通过以下方法制备的:用酶水解乳清或乳浆;将酶变性;分离富含脱辅基蛋白的级分,其中的乳浆是对乳汁进行机械搅拌用于破碎乳脂微滴获得奶油,和将酪蛋白沉淀为凝乳的步骤后所剩余的残留液体。

4. 权利要求 3 的应用,其中酶是脂酶。

5. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物是通过以下方法制备的:用酶水解乳清或乳浆,其中的乳浆是对乳汁进行机械搅拌用于破碎乳脂微滴获得奶油,和将酪蛋白沉淀为凝乳的步骤后所剩余的残留液体。

6. 权利要求 5 中的应用,其中酶是脂酶。

7. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中乳清来自母牛或山羊的乳汁。

8. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物还含有至少一种游离脂肪酸或其混合物;或所述游离脂肪酸的甘油一酸酯;或它们的混合物。

9. 权利要求 8 中的应用,其中脂肪酸是饱和的或不饱和的,具有含 C4-C24 偶数碳原子的烃链,或其混合物。

10. 权利要求 9 中的应用,其中不饱和脂肪酸具有 C14-C24 的烃链。

11. 权利要求 10 中的应用,其中不饱和脂肪酸选自棕榈油酸、油酸、亚油酸、 $\alpha$ -亚麻酸、 $\gamma$ -亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十四碳烯酸和其混合物。

12. 权利要求 9 中的应用,其中饱和脂肪酸具有 C4-C18 的烃链。

13. 权利要求 12 中的应用,其中饱和脂肪酸选自丁酸、异丁酸、琥珀酸、己酸,己二酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和其混合物。

14. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物进一步结合至少一种有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物。

15. 权利要求 14 中的应用,其中有机酸选自乙醇酸、草酸、乳酸、甘油酸、羟基丙二酸、羟基丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、丙二酸、戊二酸、丙烯酸、顺式丁烯酸、反式丁烯酸、柠檬酸和其混合物。

16. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物进一步结合一种抗氧化剂。

17. 权利要求 16 中的应用,其中抗氧化剂是  $\alpha$ -生育酚。

18. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物为肠胃外的输注的溶液形式,用于全身性治疗或防止感染。

19. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物为药膏的形式,用于防止或治疗皮肤感染的局部应用。

20. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物为阴道用乳膏或凝胶或药栓形式,用于防止或治疗白色假丝酵母的复发感染。

21. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物为外科用的敷料形式,用于防止或治疗感

染。

22. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中所述药物为用于眼、鼻、口、肠或生殖器的粘膜的形式。

23. 权利要求 22 中的应用,其中所述药物为滴眼液形式,用于防止或治疗眼部的感染。

24. 权利要求 22 中的应用,其中所述药物为鼻用喷雾剂的形式,用于抑制抗生素抗性生物体从携带者转移。

25. 权利要求 22 中的应用,其中所述药物为食品或饮料的形式,用作抵抗肠道感染的预防制剂。

26. 权利要求 22 中的应用,其中所述药物为口服保健制剂的形式,所述制剂是洁齿剂,用于增进牙齿卫生或作为口腔疾病的预防剂。

27. 权利要求 26 中的应用,其中所述口服保健制剂选自牙膏、口香糖,和漱剂。

28. 权利要求 5 中的应用,其中水解的乳清或乳浆的浓度范围为 0.5 — 25mg/ml。

29. 权利要求 1 或 2 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物的浓度范围为 0.5 — 10mg/ml。

30. 权利要求 29 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物的浓度范围为 3-7mg/ml。

31. 权利要求 8 中的应用,其中游离脂肪酸或其甘油一酸酯,或它们的混合物的浓度范围为 0.5 — 5mg/ml。

32. 权利要求 14 中的应用,其中有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物的浓度范围为 0.5 — 5mg/ml。

33. 权利要求 8 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物;以及游离脂肪酸或其甘油一酸酯,或它们的混合物,可同时用药或在 6 个小时内以任意顺序用药。

34. 权利要求 14 中的应用,其中乳清脱辅基蛋白混合物;以及有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物,可同时用药或在 6 个小时内以任意顺序用药。

35. 权利要求 8 中的应用,所述药物进一步结合至少一种有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物;游离脂肪酸或其甘油一酸酯或它们的混合物;以及有机酸或它的盐或酯或它们的混合物,可同时用药或相互间隔 6 个小时内以任意顺序用药。

36. 一种药物学上可接受的组合物,包括存在于药用载体中的乳清脱辅基蛋白混合物,其中所述乳清脱辅基蛋白混合物含有一种或多种脱辅基脂蛋白和一种或多种脱辅基糖蛋白,所述乳清脱辅基脂蛋白已除去其结合的脂肪酸,以及所述乳清脱辅基糖蛋白已除去其结合的碳水化合物部分。

37. 权利要求 36 中的组合物,其中乳清脱辅基脂蛋白来自一种乳清脂蛋白,所述乳清脂蛋白选自  $\beta$  -乳球蛋白、脂肪滴膜,和它们的混合物。

38. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物是通过以下方法制备的:用酶水解乳清或乳浆;将酶变性;分离富含脱辅基蛋白的级分,其中的乳浆是对乳汁进行机械搅拌用于破碎乳脂微滴获得奶油,和将酪蛋白沉淀为凝乳的步骤后所剩余的残留液体。

39. 权利要求 38 的组合物,其中酶是脂酶。

40. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物是通过以下方法制备

的;用酶水解乳清或乳浆,其中的乳浆是对乳汁进行机械搅拌用于破碎乳脂微滴获得奶油,和将酪蛋白沉淀为凝乳的步骤后所剩余的残留液体。

41. 权利要求 38 中的应用,其中酶是脂酶。

42. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其中乳清来自母牛或山羊的乳汁。

43. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其还含有至少一种游离脂肪酸或其混合物;或所述游离脂肪酸的甘油一酸酯;或它们的混合物。

44. 权利要求 43 中的组合物,其中脂肪酸是饱和的或不饱和的,具有含 C4-C24 偶数碳原子的烃链,或其混合物。

45. 权利要求 44 中的组合物,其中不饱和脂肪酸具有 C14-C24 的烃链。

46. 权利要求 45 中的组合物,其中不饱和脂肪酸选自棕榈油酸、油酸、亚油酸、 $\alpha$  亚麻酸、 $\gamma$  亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十四碳烯酸和其混合物。

47. 权利要求 44 中的组合物,其中饱和脂肪酸具有 C4-C18 的烃链。

48. 权利要求 47 中的组合物,其中饱和脂肪酸选自丁酸、异丁酸、琥珀酸、己酸,己二酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和其混合物。

49. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其进一步结合至少一种有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物。

50. 权利要求 49 中的组合物,其中有机酸选自乙醇酸、草酸、乳酸、甘油酸、羟基丙二酸、羟基丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、丙二酸、戊二酸、丙烯酸、顺式丁烯酸、反式丁烯酸、柠檬酸和其混合物。

51. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其进一步结合一种抗氧化剂。

52. 权利要求 51 中的组合物,其中抗氧化剂是  $\alpha$  -生育酚。

53. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其为肠胃外的输注的溶液形式,用于全身性治疗或防止感染。

54. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其为药膏的形式,用于防止或治疗皮肤感染的局部应用。

55. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其为阴道用乳膏或凝胶或药栓形式,用于防止或治疗白色假丝酵母的复发感染。

56. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其为外科用的敷料形式,用于防止或治疗感染。

57. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其为用于眼、鼻、口、肠或生殖器的粘膜的药物形式。

58. 权利要求 57 中的组合物,其为滴眼液形式,用于防止或治疗眼部的感染。

59. 权利要求 57 中的组合物,其为鼻用喷雾剂的形式,用于抑制抗生素抗性生物体从携带者转移。

60. 权利要求 57 中的组合物,其为食品或饮料的形式,用作抵抗肠道感染的预防制剂。

61. 权利要求 57 中的组合物,其为口服保健制剂的形式,所述制剂为洁齿剂,用于增进牙齿卫生或作为口腔疾病的预防剂。

62. 权利要求 61 中的组合物,其中所述口服保健制剂选自牙膏、口香糖,和漱剂。

63. 权利要求 40 中的组合物,其中水解的乳清或乳浆的浓度范围为 0.5 - 25mg/ml。

64. 权利要求 36 或 37 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物的浓度范围为 0.5 - 10mg/ml。

65. 权利要求 64 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物的浓度范围为 3-7mg/ml。

66. 权利要求 43 中的组合物,其中游离脂肪酸或其甘油一酸酯,或它们的混合物的浓度范围为 0.5 - 5mg/ml。

67. 权利要求 49 中的组合物,其中有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物的浓度范围为 0.5 - 5mg/ml。

68. 权利要求 43 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物;以及游离脂肪酸或其甘油一酸酯,或它们的混合物,可同时用药或在 6 个小时内以任意顺序用药。

69. 权利要求 49 中的组合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物;以及有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物,可同时用药或在 6 个小时内以任意顺序用药。

70. 权利要求 43 中的组合物,所述药物进一步结合至少一种有机酸或它的盐或酯,或它们的混合物,其中乳清脱辅基蛋白混合物;游离脂肪酸或其甘油一酸酯或它们的混合物;以及有机酸或它的盐或酯或它们的混合物,可同时用药或相互间隔 6 个小时内以任意顺序用药。

71. 权利要求 36 或 37 中的组合物,用于美容性皮肤护理。

72. 一种组合物,其包含:(a) 乳清脱辅基蛋白混合物,和 (b) 至少一种游离脂肪酸或其混合物,或所述游离脂肪酸的甘油一酸酯,或它们的混合物,其中所述乳清脱辅基蛋白混合物含有一种或多种脱辅基脂蛋白和一种或多种脱辅基糖蛋白,所述乳清脱辅基脂蛋白已除去其结合的脂肪酸,以及所述乳清脱辅基糖蛋白已除去其结合的碳水化合物部分。

73. 权利要求 72 的组合物,其中乳清脱辅基脂蛋白衍生自选自  $\beta$  - 乳球蛋白、脂肪滴膜,和它们的混合物的乳清脂蛋白。

74. 权利要求 72 或 73 的组合物,其中脂肪酸选自棕榈油酸、油酸、亚油酸、 $\alpha$  亚麻酸、 $\gamma$  亚麻酸、花生四烯酸、二十碳五烯酸、二十四碳烯酸、丁酸、异丁酸、琥珀酸、己酸、己二酸、辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和其混合物。

## 乳清脱辅基蛋白在预防或治疗微生物或病毒感染中的用途

[0001] 本发明涉及乳汁脱辅基蛋白在预防或治疗微生物或病毒对人体或动物体的感染的用途。更具体而言,这些乳汁脱辅基蛋白可以单独使用,或者与一种或多种短链有机酸(例如柠檬酸)和它们的盐或酯,和/或一种或多种游离脂肪酸和它们的单酯结合使用,来抑制潜在病原体的粘附和/或生长。

[0002] 发明背景

[0003] 乳汁(milk)是一种略带白色的液体,由生育后的成熟雌性哺乳动物的乳腺产生。哺乳动物是属哺乳纲的温血脊椎动物,包括人类。就本发明的目的而言,更优选的哺乳动物是指有蹄的、属反刍动物亚目的偶蹄类动物,例如牛、绵羊、山羊、鹿和长颈鹿。本发明中,来自牛和山羊的乳汁是乳汁脱辅基蛋白的优选来源,这仅仅是因为这些来源的乳汁在商品规模上较易获得。

[0004] 乳清是在奶制品工业中常用的一个词汇,用来描述悬浮有酪蛋白微团(micelles)和乳脂微滴(globules)的澄清液体基质。来自反刍动物的乳清含有乳糖;包括乳汁抗体、乳铁传递蛋白和酶类在内的多种蛋白;以及包括 $\beta$ -乳球蛋白在内的多种脂蛋白。乳清是乳汁脱辅基蛋白的优选来源。

[0005] 奶制品工业中,母牛的乳汁被加工以获得奶油或者奶酪两者中的一种。机械搅拌用于破碎乳脂微滴获得奶油,酪蛋白沉淀为凝乳,后者被进一步生产为奶酪。经过这些步骤后所剩余的残留液体通常称为乳浆(milk whey)。乳浆基本上就是乳清,只是脂蛋白的含量稍高,而脂蛋白主要来自于脂肪微滴膜。乳浆是乳汁脱辅基蛋白的优选来源。在这里,“乳清脱辅基蛋白”这个词意指包括来自于乳清或乳浆的乳汁脱辅基蛋白。

[0006] 乳清中含有多种不同的脂蛋白和糖蛋白,它们的特征在于都含有一个蛋白骨架,脂类和/或碳水化合物结合在蛋白骨架上。酶水解作用可去除蛋白骨架上的脂类和/或碳水化合物,以制备相应的脱辅基蛋白。尽管乳清脱辅基蛋白已经被分离出来,但是这类乳清脱辅基蛋白的医学用途仍然未知。

[0007] 脂类或脂肪,包括相同或不同的脂肪酸和甘油的三酯,也被称为三酰基甘油或甘油三酸酯。进一步水解可以断裂这些酯键,进而从三酰基甘油中释放出游离脂肪酸。Cynthia Q Sun等人报道,使用小牛胃脂肪酶原从乳脂中释放游离脂肪酸(Chemico-Biological Interactions 140(2002), pp185-198)。该作者报道了各种游离脂肪酸对肠道球菌和大肠菌群(coliform bacteria)的生长抑制特性,肠道球菌是一种革兰氏阳性的,大肠菌群是革兰氏阴性菌,但它在乳清脱辅基蛋白作用方面是静息的。

[0008] 已知游离脂肪酸显示出有效的抗微生物和抗病毒的活性。特别地, Schuster等人报道,亚油酸、亚麻酸、辛酸和己酸可以抑制龋齿生物体一变异链球菌,并可全面减少齿菌斑(牙科药理学与治疗(Pharmacology and Therapeutics in Dentistry) 5: pp25-33; 1980)。作者指出,革兰氏阴性菌最为敏感,而革兰氏阳性菌受影响最小。另外, Halldor Thormar等人(抗微生物药剂与化学疗法(Antimicrobial Agents and Chemotherapy); 1: 1987, pp27-31)综述了游离脂肪酸和其单酯的抗病毒特性,显示出多聚不饱和长链脂肪酸和中等链长的饱和脂肪酸(和它们的甘油一酸酯)具有抗衣壳病毒的功效,以及它们对

于无衣壳病毒的相对惰性,这种杀病毒剂的效果可能是通过病毒衣壳自身的去稳定来达到的。最近,R. Corinne Sprong 等人(抗微生物药剂与化学疗法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 4 :2001, pp1298-1301) 综述了游离脂肪酸的杀菌活性,发现 C10:0 和 C12:0 的脂肪酸是有效的杀菌剂。Gudmundur Bergsson 等人描述了 C10:0 和 C12:0 游离脂肪酸和它们的甘油一酸酯具有杀真菌的特性(抗微生物药剂与化学疗法 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 11 :2001, pp3209-3212)。

[0009] 许多潜在的病原细菌通常是皮肤、毛发和粘膜的共生生物,它们通过粘附在上皮细胞层的表面来拓殖 (colonise) 这些区域,但是正常情况下它们被存在于粘膜和汗液中的宿主分泌免疫系统所抑制。这些内源菌所引发的疾病的产生是宿主分泌免疫能力降低的结果,由于免疫能力的降低使得这些内源病原体发生增殖。

[0010] 通常认为病原菌粘附在宿主组织上是发病的第一个阶段,因此阻断粘附的能力可以有效地防止感染。这种粘附的机制各不相同,许多生物体采用既有特异的又有非特异的因素在内的多种形式。例如,葡萄球菌分泌一种细胞外磷壁酸质,它可以特异结合纤连蛋白;假丝酵母采用一种甘露蛋白糖萼;链球菌使用水不溶性的葡聚糖来拓殖牙齿。因为这些因素的多样性,很久以来人们都认为设计一种可以有效抑制广范的潜在病原物种的单一抑制剂是不可能的。

[0011] 很多情况下,已经开始尝试使用接种一些供体动物而得到的抗体,但是由于抗体固有的特异性,使得这些抗体的治疗应用被限制在只能针对产生这些抗体的物种中。

[0012] 在上文所有已发表的资料中,揭示了使用游离脂肪酸来抑制广谱的细菌、真菌和病毒的生长,但是还没有已知的已发表的资料揭示或者提示,在人体和动物体保健中,当游离脂肪酸与一种或多种乳汁脱辅基蛋白结合用药时,它们具有抑制潜在病原体的粘附和/或生长的功效。

[0013] 在医学和兽医学的感染护理中,常用的措施是运用有针对性的抗生物质来抑制感染原,感染原可以是真菌、细菌(二者都包含在“微生物”一词中)或病毒。在长期使用过程中,由于感染原抗药性的进化,使得许多抗生物质失去了药力。术后情况下,抗生素抗性的问题最为尖锐,因为此时感染原是皮肤和呼吸道的常见习居菌,如此一来,感染原可能长时间地暴露在常用的各种抗生素中,从而对这些物质逐渐产生抗性。在外科手术或监护过程中,大量的这些平时无害的感染原可能到处散布,当患者的免疫耐受性由于疾病或长期的医疗干预减弱的时候,就会产生感染;这种感染经常被称为医院感染。

[0014] 一个这种医院感染的例子通常称为 MRSA(甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌)。金黄色葡萄球菌是一种存在于许多个体的呼吸道中的常见习居菌,正常情况下它只是无症状地栖息于呼吸道中而不会导致感染。由于它的这种普遍存在的特性,据认为它曾暴露于许多常用的抗生物质,现存的株系可以抗包括甲氧苯青霉素在内的所有常用抗生素。万古霉素是在 MRSA 症中万古霉素是“最后求助的药物”,但最近已出现了抗万古霉素的株系。而且,万古霉素抗性的粪便肠球菌 (VREF) 是消化道的常见习居菌,可在外科手术过程中从肠道中散布出去,从而产生其他的医院感染。

[0015] 水平的基因转移 (horizontal gene transfer) 是一个生物学词汇,用于描述遗传抗性从一个物种向另一物种的潜在转移。抗生素抗性从诸如 VREF 的物种,向病原物种例如难辨梭菌(伪膜状结肠炎)的转移就是潜在的灾难性事件,也是引起医学行业极大关注的

事件。

[0016] 因此,急需新的抗微生物物质,用于治疗这种抗生素抗性感染和其他一些传统疗法无法治疗的感染,同时也急需新的抗病毒物质,用于治疗那些目前几乎还没有有效治疗方法的病毒感染。

[0017] 本发明的一个目的是延缓病原生物体的粘附,优选地阻断病原生物体的粘附,因而预防或治疗人体或动物体的微生物或病毒感染。

[0018] 本发明进一步的目的是,将延缓或阻断病原生物体的粘附与抑制其生长结合起来,从而达到更高的效用。

[0019] 本发明另一个进一步的目的是,通过使用良性物质例如乳清来达到这些效用,但并不只限于乳清,因为相比那些需要谨慎使用的攻击性的化学药物,良性物质更加有利于经常性地使用。

### 发明内容

[0020] 在第一个实施方案中,本发明涉及使用至少一种乳汁脱辅基蛋白来预防或治疗由微生物或病毒引起的人体或动物体的感染。据信这是通过抑制潜在病原物种的粘附来起作用的,但我们不希望束缚于此。尤其是,乳清蛋白骨架(准确地应称为乳清脱辅基蛋白,它是将结合的脂类和/或碳水化合物从乳汁脂蛋白和乳汁糖蛋白中去除后所残留的物质)对潜在病原体对人类上皮细胞的粘附显示出强有力的、广谱的抑制作用,这一点将在下文中给出例示。当用乳清作为来源,除去其结合的脂肪酸和/或碳水化合物部分,剩余的脱辅基蛋白是两性蛋白,可以抑制细菌或其他病原生物体对宿主细胞表面的粘附,因此防止疾病发生的第一个阶段。两性蛋白带有一个疏水的(脂溶性)末端和一个亲水的(水溶性)末端。许多微生物的细胞表面具有一个脂类或糖-脂分子层,两性蛋白的疏水端可被其吸引。通过这种方式,来自乳清的脱辅基蛋白包被了病原生物体的表面,设立了一个天然的分子屏障,这个分子屏障可以防止病原生物体(例如真菌、细菌或病毒颗粒)足够接近宿主表面从而建立粘附。

[0021] 优选地,上述的乳汁脱辅基蛋白与游离脂肪酸或它们的单酯(包括甘油一酸酯)结合使用。众所周知,游离脂肪酸和它们的甘油一酸酯是强有力的、广谱的抗微生物和抗病毒制剂,可以抑制微生物和病毒的生长。因此,至少一种乳汁脱辅基蛋白和至少一种游离脂肪酸或它的单酯同时或顺序地(任意顺序均可)用药,可以抑制广谱的微生物和病毒物种的生长以及粘附。通过水解乳清或乳浆得到的制剂同时包含乳汁脱辅基蛋白和游离脂肪酸。

[0022] 作为选择,上述的乳汁脱辅基蛋白可与短链有机酸或它们的酯或盐结合使用。因此,至少一种乳汁脱辅基蛋白和至少一种短链有机酸或它的酯或盐同时或顺序地(任意顺序均可)用药,可以抑制广谱的微生物和病毒物种的生长以及粘附。

[0023] 更加优选地是,上述的乳汁脱辅基蛋白可与游离脂肪酸和它们的单酯,以及短链有机酸和它们的盐和酯结合使用。因此,至少一种乳汁脱辅基蛋白;至少一种游离脂肪酸或它的单酯;和至少一种短链有机酸或它的酯或盐同时或顺序地(任意顺序均可)用药,可以抑制广谱的微生物和病毒物种的生长以及粘附。包含所有这三种成分的制剂可以通过水解乳清或乳浆制备。

[0024] 在本发明中,使用至少一种乳清脱辅基蛋白或它的混合物,任选地与至少一种游离脂肪酸或它的单酯或它的混合物,和 / 或任选地与至少一种短链有机酸或它的盐或酯或它们的混合物结合使用,在治疗胃肠道和口咽道、粘膜上皮细胞和皮肤的抗生素抗性感染中是有效的。

[0025] 虽然来自诸如 MRSA 和 VREF 的生物体的感染,以及许多病毒感染严重威胁着人类的健康,但是有一些表面上危害性较小的病原体,它们是常见的机体的共生物,长期而言它们又可能引发不适或者疾病。一个范例就是由变异链球菌引起的龋齿的产生。通常认为龋齿 是一种美容的问题,牙科行业也的确是如此对待龋齿问题的。然而有证据提示,口腔中变异链球菌的拓殖可能产生抗体,这些抗体在全身的循环中可能与心脏组织产生交叉反应,引起长期的心脏疾病以及对其他器官的自免疫损伤。

[0026] 本发明中,使用乳清脱辅基蛋白可以抑制变异链球菌的粘附,因而提供了一种可以有效预防龋齿并对由此对长期健康有益的添加剂 (adjunct)。

[0027] 白色假丝酵母是一种在很多个体中不显示症状的常见的皮肤和粘膜习居菌。假丝酵母拓殖粘膜,通过先粘附在粘膜上皮细胞的表面,从这里增殖然后渗透到细胞腔 (lumen) 内导致霉菌性口炎。从这些组织分泌的粘液的成分通常可以抑制粘附和增殖;在某些个体中,正常的分泌功能减弱,致病过程从而建立起来。在那些容易复发霉菌性口炎的个体中,使用乳清脱辅基蛋白 (粘附抑制) 和游离脂肪酸或它们的单酯和 / 或有机酸或它们的盐或酯 (均为生长抑制) 将提供适当的预防作用。

[0028] 常规的抗生素对病毒感染无效。虽然特殊的抗病毒药剂比如“无环鸟苷”是能得到的,例如用于治疗单纯疱疹,但是总的说来,这些药剂价格昂贵而且仅限于非常有限范围的病毒感染。尽管许多病毒感染具有全身效应,可是有些感染则表现出皮肤皮疹、水疱和溃疡的局部症状,这种局部症状经常会导致患者严重的不适感。局部使用包含乳清脱辅基蛋白和游离脂肪酸及其单酯的制剂,将会提供局部的抗病毒活性,当这种局部的活性做为全身性抗病毒治疗的辅助手段时,将会减轻外部的症状。

[0029] “Famvir”是无环鸟苷 (Smith Kline Beecham) 的专卖制剂,它被设计为一种全身性抗病毒药剂,口服治疗水痘带状疱疹 (带状疱疹) 的继发感染。原发性感染中,水痘病毒会导致水痘产生,并伴有大面积的皮肤发疹,充满脓液的疱囊破裂然后结疤。该感染会导致强烈的痒感,当用指甲搔刮时,伤口会留下大片的疤痕。痊愈后病毒可以保持休眠多年,还可能被环境压力或免疫应答情况再次激活,称为继发感染。继发感染即带状疱疹,其特征为剧痛的皮肤皮疹。使用本文描述的包含乳清脱辅基蛋白和游离脂肪酸及其单酯的局部制剂,将会减轻皮肤上的表面症状,是常规抗病毒疗法的有效辅助手段。相同地,其它造成浅层 (皮肤) 范围的感染,如风疹 (麻疹) 和疱疹 (感冒疮),也是局部用药适宜的临床指征。

[0030] 下文中描述的标准制剂是水解的乳清或乳浆,预期浓度范围为 0.5–25mg/ml 时,它可以有效抵抗病原生物体。当然可以理解的是,所需标准制剂的浓度将依赖于所遇到的病原生物体的数量以及它们的相对浓度。相同地,脱辅基蛋白的期望浓度范围;游离脂肪酸的期望浓度范围以及有机酸的期望浓度范围也将依赖于所遇到的病原生物体的数量和它们的相对浓度。

[0031] 游离脂肪酸

[0032] 游离脂肪酸是一种有机酸,包括一个烃链,其上至少有一个羧酸官能团,后者通常位于末端,尽管这并不是必须的。脂肪酸既可以是饱和的,即烃链上所有的碳碳键都是单键,也可以是不饱和的,即烃链上至少有一个碳碳双键或三键。优选的游离脂肪酸或它们的单酯是天然存在的,或者,是由天然存在的来源释放(例如水解)的游离脂肪酸或其单酯,天然存在的来源例如乳清、蛋黄和植物油,但不仅限于这些。

[0033] 优选地,有效的抗微生物和抗病毒的游离脂肪酸是饱和的或者不饱和的,包括含有偶数碳原子(C4-24)的烃链,或其混合物。

[0034] 适宜的不饱和游离脂肪酸为含C14-24的烃链,优选地选自棕榈油酸(C16:1)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、 $\alpha$ 和 $\gamma$ 亚麻酸(C18:3)、花生四烯酸(C20:4)、二十碳五烯酸(C20:5)和二十四碳烯酸(C24:1),其中括弧内的数字代表烃链中碳原子的数目,冒号后双键(或三键)的数目代表不饱和程度。

[0035] 适宜的饱和脂肪酸为含C4-C18的烃链,优选地选自丁酸或异丁酸(C4:0)、琥珀酸(C4:0)、己酸(C6:0)、己二酸(C6:0)、辛酸(C8:0)、癸酸(C10:0)、月桂酸(C12:0)、豆蔻酸(C14:0)、棕榈酸(C16:0)和硬脂酸(C18:0),它们可以有效地抗真菌和革兰氏阴性菌、大肠菌群和葡萄球菌。

[0036] 应当理解,游离脂肪酸或它们的单酯,无论是否天然存在,可以通过化学取代来修饰,这些化学取代包括但不限于:短链烷基化,例如甲基化或乙酰化;酯化作用;和许多其它衍生方法以修饰其抗微生物的效力,这种修饰后的游离脂肪酸也构成本发明的一部分。然而为了本发明的目的,优选地使用天然存在的、未经修饰的游离脂肪酸或其混合物或它们的单酯,优选它们的甘油一酸酯,例如由天然存在的脂肪贮存器所释放的甘油一酸酯,天然存在的脂肪贮存器选自乳清、蛋黄和植物油。

[0037] 乳清中脂类成分的水解提供了适宜的游离脂肪酸的混合物,由此可获得对微生物和病毒生长的广谱抑制作用,用于达到治疗或预防的目的。下表给出了乳清脂类中脂肪酸成分的典型细目分类。

[0038] 表1:乳清脂类中的脂肪酸成分

[0039]	丁酸	(C4:0)	4%
[0040]	己酸	(C6:0)	2.1%
[0041]	辛酸	(C8:0)	1.2%
[0042]	癸酸	(C10:0)	2.6%
[0043]	月桂酸	(C12:0)	3.0%
[0044]	豆蔻酸	(C14:0)	10.6%
[0045]	棕榈酸	(C16:0)	27%
[0046]	棕榈油酸	(C16:1)	2.3%
[0047]	硬脂酸	(C18:0)	12.8%
[0048]	油酸	(C18:1)	26%
[0049]	亚油酸	(C18:2)	2.3%
[0050]	亚麻酸	(C18:3)	1.6%
[0051]	水		平衡至 100%
[0052]	有机酸		

[0053] 适宜的有机酸,如果制剂中存在的话,包括一个短烃链(例如 C2-6),其上至少有一个羧酸官能团。“酸”这个词包括它们的盐或酯。烃链可以是饱和或者不饱和的,直链或者带有支链的,被取代或者未被取代的。适宜的有机酸包括乙醇酸、草酸、乳酸、甘油酸、羟基丙二酸、羟基丁二酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、酒石酸、丙二酸、戊二酸、丙烯酸、顺或反式丁烯酸和柠檬酸。有机酸当中柠檬酸是优选的,它是带有三个羧酸部分的三碳烃链。柠檬酸是在哺乳动物碳水化合物的代谢过程中产生的,它是一种弱有机酸,可以被碱性溶液(如氢氧化钠)所中和,产生钠盐-柠檬酸钠。它以这种盐的形式,低浓度地天然存在于机体内。如本发明中所示并要求保护的,当如上文所述在乳清脱辅基蛋白中加入柠檬酸钠时,对于特定细菌的体外培养物而言,脂肪酸的效用得到增强。

[0054] 抗微生物和抗病毒效用

[0055] 由于单独使用乳清脱辅基蛋白达到的粘附抑制所具有的多特异性特性,或者由于使用乳清脱辅基蛋白结合游离脂肪酸和/或有机酸达到的粘附抑制和生长抑制所具有的多特异性特性,所针对的潜在病原体的范围非常广泛。

[0056] 主要的革兰氏阳性细菌包括链球菌、乳酸菌、棒状杆菌、丙酸杆菌、放射菌、梭菌、杆菌和肠球菌。

[0057] 革兰氏阴性细菌中包括葡萄球菌、肠细菌、埃希氏菌、沙门氏菌和志贺菌,衣原体也是敏感的。

[0058] 真菌中,除包括毛癣菌属在内的皮肤真菌之外,白色假丝酵母已显示也是敏感菌。

[0059] 原生动物中有显著敏感性的包括内变形虫、贾第鞭毛虫和新型似隐孢菌。

[0060] “微生物”一词包含细菌、真菌和原生动物。

[0061] 主要的衣壳病毒颗粒包括,疱疹病毒(单纯疱疹病毒、水痘带状疱疹和埃-巴二氏病毒);痘病毒(正痘病毒和禽痘病毒);囊膜病毒(甲病毒、黄病毒、风疹病毒和瘟病毒);冠状病毒(支气管炎病毒);反转录病毒(人类 T 细胞白血病和人类免疫缺陷病毒);流感病毒,狂犬病毒,加利福尼亚脑炎病毒,拉沙病毒,副粘病毒,肺病毒和麻疹病毒。

[0062] 药物学和美容学上可接受的给药系统

[0063] 可给予包含药物学或美容学上有效剂量的至少一种乳清脱辅基蛋白,包含或不包含药物学或美容学上有效剂量的至少一种游离脂肪酸和它们的单酯和/或药物学或美容学上有效剂量的至少一种有机酸和它们的酯或盐的药物学上可接受的给药系统,以达到临床的疗效。

[0064] 药膏提供了一种有效的给药机制,以减轻病毒和细菌感染的皮肤表面症状,这些症状表现为皮肤皮疹、水泡和脓疱,其中包括疱疹、带状疱疹、痤疮和感染性皮炎。

[0065] 绷带和创伤敷料可以被浸渍,以达到活性物质在患处的持续释放。

[0066] 特别地在甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌的例子中,为排除已知携带者的污染,给药系统可以包括鼻用喷雾剂。采用皮肤洗液形式的给药系统可以排除皮肤和毛发的局部污染。

[0067] 给药系统可以包括滴眼液,用于治疗或防止眼部的感染。

[0068] 给药系统可以包括阴道用的乳膏或凝胶,例如水合和润滑的凝胶,或通常用于妇女保健的阴道药栓,可以预防白色假丝酵母的复发感染,同时可以保护妇女不受外部细菌和病毒疾病的感染。

[0069] 给药系统可以包括外科术后的创伤敷料,在创伤敷料中活性制剂分散在一个可以持续释放的多聚体中。该给药系统可以将由 MRSA 和其它抗生素抗性细菌所引起的医院感染降低到最小程度。

[0070] 给药系统还可以包括抗氧化剂赋形剂,可以通过非肠道用药或 IV 输注 (IV infusion) 的方式以达到全身性抗病毒和 / 或抗微生物的效果。

[0071] 可选地或者另外地,给药系统还可以包括奶状饮料或食品,其中的活性制剂可进行肠溶性包被以利于其由胃向肠道的转运,在肠道中活性制剂可以用做预防制剂,抵抗包括伪膜性肠炎在内的肠道感染。

[0072] 给药系统可以包括口服保健产品,例如口香糖、漱剂、牙膏和假牙粘合剂以及固定剂,以达到减轻龋齿和齿菌斑的效果,以及对齿龈炎、齿根骨膜炎和复发霉菌性口炎提供长期的保护。

[0073] 给药系统可以包括加工食品,其中活性制剂可预防微生物和 / 或病毒所引起的食物变质,以及预防由诸如沙门氏菌和弯曲菌生物体所引起的食物携带的疾病的可能性。

[0074] 附图简述:

[0075] 图 1 显示四次分别进行的分子大小排阻色谱法的层析图,分别标为 A、B、C 和 D。

[0076] A) 0 小时,处理前:在 280nm 波长 Rt 7.174 分钟处有一个前导进行峰,其下 330nm 波长有一个峰。330nm 的光吸收来自结合在大分子蛋白上的脂类部分,而这些大分子蛋白则构成了 280nm 的一级光吸收。

[0077] B) 处理开始后 2 小时:在 7.174 分钟处的一级峰已经降解,同时伴有在 Rt 9.7 和 10.6 分钟的两个延迟进行级分的光吸收增加。330nm 波长下的脂类级分已经降解,在两个延迟进行峰处 330nm 的光吸收没有可见的增加。

[0078] C) 8 小时:显示脂类级分进一步的降解,同时 280nm 下蛋白的两个延迟进行峰没有显著的变化。

[0079] D) 16 小时:持续保温,280nm 和 330nm 任一波长下未显示总谱图的改变。

[0080] 图 2 显示采用白色假丝酵母对口腔上皮细胞的粘附,以衡量待测物质乳清在酶水解作用前、后的效用。“对照”代表当无抑制物质存在时,所达到的总粘附的平均值 (36%)。水解前的乳清,当其浓度为 1mg/ml 和 2mg/ml 时,显示约 39% 的对照粘附抑制 (粘附值由 36% 下降为 22%)。5mg/ml 水解前的乳清可达到 45% 的粘附抑制。图中还给出相同浓度的酶水解后乳清的效用。浓度为 1mg/ml 时有效性明显比水解前的差,然而浓度为 2mg/ml 时,抑制作用为 62% (相比水解前的 39%),而当浓度为 5mg/ml 时,相比水解前的 45%,抑制作用达到 100%。

[0081] 图 3 显示单独采用标准制剂中的脂类和蛋白级分对假丝酵母粘附抑制的比较。“对照”粘附为 45%。1mg/ml 蛋白级分显示 19% 粘附 (即抑制 58%),浓度为 2mg/ml 时,粘附下降为 3% 即抑制 94%,而当浓度为 5mg/ml 时,粘附全部阻断。比较而言,脂类级分在任一浓度时均没有可见的粘附抑制效果。

[0082] 图 4 显示,采用图 3 所述的相同的脂类和蛋白级分,浓度分别为 10、8 和 6mg/ml 的脂类级分对于白色假丝酵母生长抑制特性的比较。脂类级分浓度增加时,其生长抑制特性呈累进式增加,当浓度为 10mg/ml 时,酵母培养物光密度降低,有可见的破坏。

[0083] 图 5 显示上述图 3 的蛋白级分对白色假丝酵母生长的效果。在检测的各浓度下,

蛋白级分没有产生明显的生长抑制。

[0084] 图 6 显示浓度为 0、1 和 5mg/ml 时,标准制剂对假丝酵母的生长抑制特性,最高浓度下达到 90%抑制。

[0085] 图 7 显示干涉 (intervention) 生长分析,其中在白色假丝酵母正常生长 5 小时后加入抑制物质。抑制物质浓度为 8 和 6mg/ml 时,加入后抑制作用立刻很明显。浓度较低时效果较缓慢,但是浓度为 4mg/ml 时,整体的抑制作用仍是有效的,浓度为 2mg/ml 时,仍有一些明显的抑制作用。

[0086] 图 8 显示浓度为 1、2 和 5mg/ml 时,标准制剂对假丝酵母的粘附抑制特性,其中酵母已暴露在待测物质中预处理 10 分钟,然后再暴露于口腔上皮细胞。1mg/ml 标准制剂的粘附抑制为 53%,而当浓度为 2 和 5mg/ml 时,没有粘附发生。本例中蛋白空白为 1mg/ml 小牛血清白蛋白,仅显示 13%粘附抑制(相对于标准制剂的 53%)。

[0087] 图 9 显示采用上述图 8 中同样的标准制剂预处理口腔上皮细胞 10 分钟,然后暴露于假丝酵母培养物中。1mg/ml 标准制剂的粘附抑制为 55%,而当浓度为 2 和 5mg/ml 时,粘附全部抑制。本例中蛋白空白为 1mg/ml 脱卵清的蛋白,显示 12%粘附抑制。

[0088] 图 10 显示相对磷酸盐缓冲液 (PBS) 空白对照,标准制剂对甲氧苄青霉素抗性金黄色葡萄球菌的生长抑制约为 50%。当在标准制剂中补充加入 2、4 和 5mg/ml 柠檬酸钠,较高浓度时生长逐渐被完全抑制。

[0089] 图 11 显示相对柠檬酸钠和 BSA,标准制剂对 MRSA 对口腔上皮细胞的粘附抑制特性。5mg/ml 标准制剂达到 98%的粘附抑制,而相同浓度的柠檬酸钠的粘附抑制约为 10%,蛋白空白则没有效果。

[0090] 图 12 显示在文中所述的检测条件下,引发龋齿的变异链球菌生物体的生长可被 5mg/ml 标准制剂抑制。

[0091] 图 13 显示变异链球菌粘附于羟基磷灰石小珠,羟基磷灰石小珠 在这里做为牙釉质的替代物。在检测条件下,0.8mg/ml 标准制剂可达到约 100%的粘附抑制。0.8mg/ml 柠檬酸钠影响该生物体的粘附约为 10%,而在这些检测条件下,小牛血清白蛋白作为蛋白空白可达到约 30%的抑制。

[0092] 方法和材料:

[0093] 乳清蛋白可从新鲜的全奶中提取,优选地从反刍动物的新鲜的全奶中提取,提取的方法包括首先采用离心分离奶油和脂肪。然后将上清酸化至 pH4.5,此 pH 值下酪蛋白沉淀。进一步离心将产生包含乳糖、乳清蛋白和溶解的矿物质的清澈上清。乳糖代表乳清固相的基本成分(可高达 50%),然后通过透析或超滤除去。结果“富含结合蛋白的”级分大约包含如下所示组分(v/v):

[0094]	β-乳球蛋白	56%
[0095]	α-乳白蛋白	11%
[0096]	γ-球蛋白	12%
[0097]	清蛋白	6%
[0098]	乳铁传递蛋白	4%
[0099]	粘蛋白	2%
[0100]	酶类	1%

[0101] 微量蛋白 1%

[0102] 蛋白结合脂类(脂肪) 7%

[0103] 这些蛋白中许多是复合脂蛋白或糖蛋白,并有基本的非蛋白大分子结合在其上,但是来自反刍哺乳动物的乳浆中的主要蛋白成分是 $\beta$ -乳球蛋白,它代表了最高达70%的乳浆和90%的初乳(分娩后首次泌乳)。 $\beta$ -乳球蛋白是一种脂蛋白,并有大量的异戊烯化合物即视黄醇结合在其上,但是脂类和脂肪酸构成了其非蛋白成分的基本部分。

[0104] 乳清蛋白的一个可供选择的方便来源是奶制品工业的乳浆粉末,它可从许多不同的来源获得商业化的商品。很多情况下,商品供应者已经除去乳糖成分,提供脂肪含量为6-10%的“富含结合蛋白的”物质,这种物质是本发明的优选来源物质。尽管一些商品供应者采用超高温(UHT)技术来增加液态乳浆的储藏期限,但是这种处理会使蛋白骨架变性,从而使其无法用于本发明所述的目的。当为本发明所述的酶水解作用而重新构成乳浆粉末时(在纯水中(通过反向渗透纯化的水)),若脂肪含量低于6%,可以通过向中添加乳脂来得到补充。

[0105] 标准化的低乳糖乳浆粉末的适宜商品来源是“Carbelac 80”,它是一种乳浆蛋白,浓缩自Carbery奶制品(Ballineen, County Cork, 爱尔兰)。

[0106] 生长抑制分析

[0107] 各种细菌或酵母的生长抑制可以通过以下方法得到示范,在含有或不含有待测物质的适宜介质中生长细菌或酵母生物体,待测物质为诸如乳清脱辅基蛋白、游离脂肪酸/单酯和/或有机酸/盐/酯;构建适宜的附带介质空白和对照的测试通式。采用微量滴定平板分析来增加测试点的数量,采用光密度决定法来测量生长。

[0108] 为了确保加入不同浓度的待测物质时不会引入稀释效果,测试溶液的制备方法,是在该细菌或酵母的适宜新鲜生长介质中溶解或悬浮合适量的待测物质。代表性地,测试溶液由浓度为20mg/ml的储液制备而来,而该储液的制备方法,举例来说,是在终体积为10ml的新鲜生长介质中溶解200mg待测物质。然后储液于6000rpm离心10分钟以除去悬浮的固体。再于无菌条件下以适当体积的储液和新鲜培养介质混合来稀释储液,举例来说,达到10、8、6、4、2mg/ml的测试浓度。

[0109] 在本发明中,由例如20mg/ml储液获得10mg/ml测试液的稀释步骤称为1:2稀释,这意味着一倍体积的储液以一倍体积的稀释液稀释,获得两倍体积的终体积。这里将采用这一约定指代本发明中所有稀释步骤。

[0110] 制备好的溶液预热至37°C。按要求在加入100 $\mu$ l制备好的接种物之前,迅速向每孔中加入100 $\mu$ l制备好的溶液。因此在测试孔中10mg/ml的测试浓度又进一步1:2稀释,所以“10mg/ml”实际上在测试孔中是5mg/ml。“Multiskan Ascent”配备自动的振摇循环,用于确保每个OD读数前培养物是均匀分布的。

[0111] 关于白色假丝酵母的生长抑制,采用“Nunc”96孔微量滴定平板(Nalge Nunc International,哥本哈根,丹麦),它的每个孔可容纳上述200 $\mu$ l的体积。测试点被重复测试四次。接种物由100 $\mu$ l新鲜长成的菌体或酵母组成,制备方法将在下文中描述。每孔中的终体积为200 $\mu$ l,由100 $\mu$ l适当稀释的待测物质和100 $\mu$ l新鲜介质中的接种物组成。

[0112] 接种后的平板置于“Multiskan Ascent”(LabSystems,赫尔辛基,芬兰)中保温的微量滴定平板读数器上,37°C放置最长达18小时,这段时间中孔内光密度的改变在600nm

每小时检测一次。生长周期结束时,结果取四次测试的平均值,并做图显示变化值。

[0113] 酵母:

[0114] 白色假丝酵母 12 小时(过夜)培养物,培养基为添加 5% (w/v) 葡萄糖的 Oxoid 酵母基本培养基(Oxoid 是商标),37°C 以新鲜培养基 1 : 10 稀释(一倍体积比十倍终体积)(v/v),每孔加入 100  $\mu$  l。

[0115] 白色假丝酵母生长最适 pH 为 4.0-4.5,这个 pH 范围对它的多数致病过程也是最适的。上述生长分析可做如下修正,用 50mM pH4.0 的乳酸钠缓冲液制备酵母基本培养基和测试溶液,以便更加准确地反应出体外的环境,标准制剂正是在这种体外环境中生效的。

[0116] 类似的方法可用来检测细菌(和真菌)的生长和生长抑制,包括相应的改性生长介质。举例来说,在变异链球菌和金黄色葡萄球菌的情况中,生长介质为 Oxoid 心脑血管灌流液(Oxoid 是商标)。

[0117] 粘附分析

[0118] 粘附及其抑制的检测要求选择合适的底物,以及粘附(或未粘附)该底物的生物体的计数方法。大多数潜在病原生物体粘附于粘膜上皮细胞,代表性粘膜上皮细胞的一个方便来源是从面颊内侧轻松地获得。口腔上皮细胞(BEC's)的获得是使用木质舌头压器刮擦口腔粘膜,具体方法如下。

[0119] 口腔上皮细胞的获得

[0120] 标准木质舌头压器如口腔临床检查所用,包裹于锡纸中并经过高压灭菌。含 0.9% (w/v) 氯化钠的 0.1M 磷酸钾溶液(即 PBS),将其 pH 调至 6.8 后,取 5.0ml 等分液置于无菌 25ml 样品瓶中。然后用舌头压器刮擦志愿者两颊内侧,将收集到的刮擦物转移至 PBS 容器中。收集的样品于 1000rpm 离心 3 分钟以沉淀口腔上皮细胞,而细菌和其他口腔碎屑遗留在悬液中。缓缓倒出这些试管中的上清,再加入 5ml 新鲜无菌 PBS,重悬并且重新离心口腔上皮细胞两次,得到“洗过的细胞”。

[0121] 有许多不同的方法可用来计数细菌和酵母,它们都为本领域的技术人员所熟知,这些方法包括各种平板计数、直接显微计数、放射-闪烁标记和荧光标记。任何有效的计数方法都是适宜的,假设该方法不会干扰生物体对所选定的底物的粘附能力。

[0122] 在下文给出的例子中,选择直接显微计数法来计数假丝酵母,荧光标记法计数细菌。然而更加重要的是,标准群体中未发生粘附的酵母和细菌也被计数了,这与致力于计数粘附细胞是显著不同的,因为底物通常干扰未发生粘附的酵母和细菌的计数。

[0123] 该技术的基础包括将标准化(已知)数量的酵母或细菌暴露于标准化的底物中(口腔上皮细胞的数量),给予 60 分钟保温时间使细胞发生粘附,然后将混合群体过滤通过 10  $\mu$  m 的尼龙网膜。网膜会截留口腔上皮细胞和那些粘附于其上的酵母或细菌,未发生粘附的酵母或细菌将冲洗通过网膜,在滤出液中它们可以被计数,并以原初未粘附群体的百分比来表示;发生粘附的酵母或细菌的百分比与之相反(inverse)。

[0124] 酵母和口腔上皮细胞的直接显微计数是采用带有刻度的血球计数载玻片来进行的,该法为本领域的技术人员所熟知。

[0125] 细菌的荧光标记是在粘附后进行的(标记滤出液中的那些细胞),采用诸如 BCECF/AM(Calbiochem Biosciences Inc., La Jolla, 加州)和 Syto 13(分子探针,俄勒冈州,美国)荧光染色剂。标记方法如染色剂厂商所述。荧光数量用荧光计(Fluorescan,

Lab-System, 赫尔 辛基, 芬兰) 来检测, 与存在的细菌数量有直接关系。

[0126] 下面这个常用方法可用于检测白色假丝酵母对口腔上皮细胞的粘附, 以及检测采用上述乳清脱辅基蛋白制剂后得到的粘附抑制。同一方法还适用于检测金黄色葡萄球菌对口腔上皮细胞的粘附抑制, 以及变异链球菌的粘附抑制, 区别仅在于变异链球菌的底物是粉末状的羟基磷灰石, 这种羟基磷灰石可从 Merck 购得, 用做牙釉质的替代物。

[0127] 白色假丝酵母的新鲜临床分离物是优选的, 由于许多典型菌种在菌种收集过程中丧失了其致病力。如果无法得到临床分离物, 白色假丝酵母典型菌株 ATCC 10231 可用来获得有代表性的结果 (ATCC 是指位于美国马里兰州的美国典型培养物保藏中心)。

[0128] 酵母常规培养于 Oxoid 麦芽抽提物琼脂上 (Oxoid 是商标)。Oxoid 酵母蛋白胨右旋葡萄糖抽提物流体用于液态培养物, 这些培养物是从新鲜的琼脂平板上接种而来, 然后在 37°C 振荡温育 10 小时。10 小时后, 离心收获酵母, 并以无菌的、pH6.8 的 PBS 清洗。

[0129] 清洗过的口腔上皮细胞和新鲜长成的、清洗过的酵母细胞均进行显微计数, 调整浓度使得酵母约为  $1 \times 10^5$ , 口腔上皮细胞约为  $1 \times 10^3$ 。当两种溶液以相同体积混合时, 将产生每个口腔上皮细胞对 100 个酵母细胞的比例。

[0130] 在检测待测物质的各种不同浓度时, 例如乳清脱辅基蛋白, 待测物质以所需浓度加入到 PBS (pH6.8) 中做为酵母或口腔细胞二者中任一个的终悬液。典型的是采用浓度为 5、2 和 1mg/ml 待测物质, 试验用来测定该制剂对于粘附抑制的有效性, 它是通过预对包被口腔上皮细胞或预包被酵母来达到粘附抑制的。在与两种悬液中的另一种混合以开始粘附之前, 仅给予 10 分钟作为预包被的时间。该制剂显示无论是预包被口腔上皮细胞或是预包被白色假丝酵母, 都可以有效地抑制粘附。因此, 通过在口腔上皮细胞表面或酵母表面中的任一方或两者都形成一个保护性的分子屏障, 可以达到更佳的抑制效用。尤其是, 预包被的口腔上皮细胞会防止粘附的建立, 而病原生物体的预包被, 在酵母的例子中, 可以防止一个已建立的群体向其它区域延伸。

[0131] 相同体积的两种溶液 / 悬液混合, 轻柔振荡温育 60 分钟, 然后将混合物滤过一个固定孔径为 10  $\mu$ m 的尼龙网膜。滤出液中酵母的数量经显微计数得到, 并以原初群体的百分比表示。当使用高致病力的临床分离物时, 达到高达 40% 的粘附并不罕见。

[0132] 实施例 1: 乳清游离脂肪酸和乳清脱辅基蛋白的制备

[0133] 无乳糖的乳浆粉末 (来自 Carbery 奶制品的 Carbelac 80) 做为起始原料。Carbelac80 是典型的 100% 乳浆, 典型的 Carbelac80 中脱脂乳含量为 0%, 蛋白 80%, 水分 5%, 脂肪 8% 以及粉尘 3%。该起始原料 30g 溶于 pH6.8、终体积为 1 升的磷酸盐缓冲液 (PBS)。向其中加入各种酯酶 (主要是脂酶, 但也有淀粉酶和蛋白酶) 的适当组合物 1g, 例如, “来自猪胰脏的二类酯酶粗提物” 可从 Sigma 获得。混合物于 37°C 温育 18 小时; 60°C 热处理 10 分钟灭活酶; 并喷雾干燥。

[0134] 其他适当的酯酶包括, 但不限于, 来自诺和诺德公司 (哥本哈根, 丹麦) 的商品 “Palatase” 和 “Novozyme”, 用时两种酶以 50 : 50 (w/w) 混合 1g 加入每 30g 无乳糖的乳浆中。

[0135] 如图 1 所示, 脱辅基蛋白和游离脂肪酸 / 甘油一酸酯的形成过程可用色谱法监测。采用 Sephacryl S-200 凝胶过滤 (分子大小排阻法) HPLC, 并以 PBS (pH6.8) 做为洗脱缓冲液, 会以精确的分辨率显示出酶水解过程中发生的主要事件。采用双波长来监测洗脱液是

有利的；在 280nm 显示蛋白，而在 330nm 波长显示结合在这些蛋白上的脂类 / 碳水化合物成分。Rt (保持时间) 7.174 分钟处的前导进行峰 (图 1A) 代表大蛋白的早期洗脱物，在蛋白峰下可见脂类成分的一个峰。水解过程中 (图 1B(2 小时) 和 1C(8 小时))，前导峰及它所结合的脂类 / 碳水化合物消失，同时伴有在 9.7 和 10.6 分钟的两个延迟进行级分的吸收值与浓度成比例的增加 (280nm)，这些是小蛋白和来自前导峰的脱辅基蛋白。图 1D 显示持续水解作用 (16 小时)，未见双波长中任一波长下峰对应 Rt 的进一步改变。

[0136] 采用以上概述的过程，经酶的典型组合物处理过的无乳糖乳浆 (或富含脱辅基蛋白和游离脂肪酸的组分) 将由以下“典型制剂”组成。

[0137]	成分	% (v/v)
[0138]	$\beta$ -乳球蛋白的脱辅基蛋白	25-35
[0139]	脂肪滴的脱辅基蛋白	5-15
[0140]	游离脂肪酸	15-25 (见表 1)
[0141]	残留脂类 (包括胆固醇)	5-15
[0142]	$\alpha$ -乳白蛋白的脱辅基蛋白	5-15
[0143]	$\gamma$ -球蛋白的脱辅基蛋白	6-10
[0144]	血清 (serum) 白蛋白	1-3
[0145]	$\alpha$ -生育酚	2-6
[0146]	柠檬酸钠	2-6
[0147]	磷酸钠	1-3

[0148] 脱辅基蛋白的制备过程可以通过以下方法促进，加入表面活性剂例如胆汁盐纯化成分，胆酸盐如胆汁酸，和 / 或加入适当的酶的辅因子如钙盐，和 / 或加入适当的缓冲液如柠檬酸钠。在一些应用中，例如 MRSA 的生长抑制，残留的柠檬酸钠也可促进生长抑制的特性，但不能促进粘附抑制。游离脂肪酸和它们的单酯的稳定性可通过加入抗氧化剂来增强，如  $\alpha$ -生育酚 (维生素 E)。

[0149] 乳浆中的  $\gamma$ -球蛋白 (免疫球蛋白) 成分可以通过免疫接种供体动物来控制。免疫接种过程已为大家所熟知，免疫球蛋白的特异性可以针对任何特定生物体来度身定制以及放大，通过在疫苗中采用该生物体的经过灭活的株系。尽管在本发明的范围内使用这种免疫乳浆失败，但是使用非免疫乳浆是优选的，其中的“天然” $\gamma$ -球蛋白对任何生物体都没有特定的特异性。

[0150] 如下面的例子所示，采用龋齿生物体变异链球菌、白色假丝酵母和甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌时，水解后的物质显示生长抑制和粘附抑制。

[0151] 下文所述以及例示的标准制剂包含 (v/v)：

[0152]	$\beta$ -乳球蛋白的脱辅基蛋白	32%
[0153]	脂肪滴膜的脱辅基蛋白	8%
[0154]	游离脂肪酸	22% (见表 1)
[0155]	残留脂类 (包括胆固醇)	8%
[0156]	$\alpha$ -乳白蛋白的脱辅基蛋白	10%
[0157]	$\gamma$ -球蛋白的脱辅基蛋白	8%
[0158]	血清 (serum) 白蛋白	2%

[0159]	$\alpha$ -生育酚	5%
[0160]	柠檬酸钠	3%
[0161]	磷酸钠	2%

[0162] 水解过程激活了粘附抑制的特性,而这种性质在激活前的乳浆中不存在。图 2 比较了水解前和水解后的乳清(后者即标准制剂)对于白色假丝酵母对口腔上皮细胞的粘附抑制效果。可观察到,尽管未水解的乳清显示一些粘附抑制,但是当水解后的乳清存在时,可见显著的、浓度依赖的粘附抑制,以至于当其浓度为 5mg/ml 时,未检测到白色假丝酵母的粘附。

[0163] 乳清脱辅基蛋白的分离:

[0164] 标准制剂可用氯仿进行分级分离:通过甲醇抽提过程来分离脂类和脱辅基蛋白成分。

[0165] 该过程采用在 pH6.8 的磷酸盐缓冲液中浓度为 10mg/ml 的标准制剂。将 1ml 该溶液加入到含有 5ml 氯仿和 2.5ml 甲醇的玻璃管中。混合物漩涡混匀 30 秒,然后振摇 30 分钟,之后静置直到溶剂层达到完全分离。用一个巴斯德吸液管移去上层的甲醇。每个溶剂级分等分后真空干燥。任何极性的复合物(蛋白)存在于极性溶剂(甲醇)级分,非极性的(脂肪酸)则保留在氯仿层中。干燥后的甲醇级分仅占其在 pH6.8 的磷酸盐缓冲液中原初体积的 1/10,干燥后的氯仿级分占其乙醇原初体积的 1/10,后者由于试验目的稀释于 PBS。

[0166] 图 3 显示富含脱辅基蛋白的级分和富含脂类的级分二者的粘附抑制特性,富含脱辅基蛋白的级分显示浓度依赖的粘附抑制,而富含脂类的级分则没有此效果。实际上,当浓度为 5mg/ml 时,未检测到白色假丝酵母的粘附。

[0167] 图 4 显示富含脂类的级分对白色假丝酵母的浓度依赖的生长抑制特性,而图 5 则显示了富含脱辅基蛋白的级分对其生长没有影响(实际上浓度为 10mg/ml 时,可见蛋白级分浓度的增加引起酵母生长的增加)。

[0168] 实施例 2

[0169] 采用上文方法和材料中所述的生长分析,评估标准制剂对白色假丝酵母新鲜临床分离物的生长抑制特性。该分析采用微量滴定格式,每个测试浓度都重复测试四次。酵母的生长在 600nm 下监测超过 20 小时,结果如图 6 所示。相对于加入 0mg/ml 标准制剂的对照,标准制剂(5mg/ml)显示几乎 90% 的生长抑制。1mg/ml 的标准制剂的结果介于二者之间。

[0170] 采用相似的分析过程,不同之处是在酵母正常生长 5 小时后加入待测物质,此处称为干涉分析。加入的标准制剂浓度范围为 0-8mg/ml。如此设定检测浓度是为了确保加入预热(至 37°C)的待测溶液时,所有孔中的稀释效果相近。对白色假丝酵母新鲜临床分离物的干涉分析结果见图 7,数据已经过处理,去除了 5 小时处由于加入待测物质而引起的光密度改变。在浓度为 8、6、4、和 2mg/ml 时,标准制剂对白色假丝酵母的生长抑制效果明显,而且该抑制效果在标准制剂加入后立即发生且十分显著,呈浓度依赖性。

[0171] 实施例 3

[0172] 标准制剂除了抑制生长外还抑制粘附。粘附分析方法在上文方法和材料中已描述过。采用与实施例 2 中相同的制剂,其对相同的白色假丝酵母新鲜临床分离物对口腔上皮细胞的粘附抑制效果示于图 8 和图 9。

[0173] 图 8 中,在加入口腔上皮细胞前,酵母细胞已暴露于标准制剂 10 分钟。图 9 中,在加入酵母悬液前,口腔上皮细胞已暴露于标准制剂 10 分钟。

[0174] 这两个分析中的“对照”代表在测试条件下无抑制物质存在时所达到的粘附;分别为 41%和 35%。在假丝酵母的预处理中加入 1mg/ml 标准制剂可降低粘附至 20% (53%抑制),而在口腔上皮细胞预处理中加入相同浓度的标准制剂可降低粘附至 16% (55%抑制)。在酵母和口腔上皮细胞的预处理中同时加入 2mg/ml 和 5mg/ml 标准制剂,在本测试条件下显示 100%粘附抑制。

[0175] 图 8 中的“蛋白空白”是小牛血清白蛋白,图 9 采用脱卵清的蛋白,浓度均为 1mg/ml,均用来意指标准制剂的效果不“简单地”是由于蛋白浓度而引起的效果。

[0176] 实施例 4

[0177] 标准制剂抗甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 粘附和生长的效用见图 10 和 11。

[0178] MRSA 常规在血琼脂培养基上进行次培养,其单克隆接种于 Oxoid 心脑灌流液试管,见上文方法和材料所述。8 小时后,接种物用于生长和粘附分析,方法见上文所述。

[0179] MRSA 对游离脂肪酸 / 甘油一酸酯不如其它生物体那样敏感,加入柠檬酸盐,如标准制剂中所含,对有效抑制这一特定生物体的生长是至关重要的。

[0180] 图 10 显示 5mg/ml 标准制剂的效果,标准制剂中含有逐渐增加浓度的柠檬酸三钠 (0、2、4 和 5mg/ml),当 4 或 5mg/ml 柠檬酸三钠加入到 5mg/ml 的标准制剂中时,可达到完全的生长抑制。柠檬酸三钠加入到测试溶液中,测试溶液如“生长分析”方法中所述在生长介质中制备。特别地是,如上文所述,标准制剂的储液 (浓度为 20mg/ml) 与相同体积的柠檬酸三钠溶液 (浓度为 20mg/ml) 混合。因此,在包含 10mg/ml 标准制剂和 10mg/ml 柠檬酸三钠的溶液中,达到 1 : 2 的稀释。在上文中已解释过,在检测孔中这一组合制剂是 5mg/ml 标准制剂和 5mg/ml 柠檬酸三钠。当然相同的是,20mg/ml 标准制剂的储液可以与相同体积的 16mg/ml 或 8mg/ml 柠檬酸三钠溶液混合,从而分别获得补充有 4mg/ml 和 2mg/ml 柠檬酸三钠的标准制剂,如图 10 所示。

[0181] MRSA 粘附于口腔上皮细胞,此处采用它们的模式与白色假丝酵母试验中所述的模式相似。尽管柠檬酸钠自身对 MRSA 对口腔上皮细胞的粘附没有作用,但是如图 11 所示,在本测试条件下,5mg/ml 标准制剂 (未加入柠檬酸钠) 可达到几乎完全的粘附抑制。小牛血清白蛋白用作“蛋白空白”,此物质对 MRSA 对口腔上皮细胞的粘附没有作用。

[0182] 实施例 5

[0183] 变异链球菌生物体被认为是龋齿的病原物,因为它贪婪地粘附在牙釉质的表面。碳水化合物的发酵作用导致乳酸的分泌,致使局部 pH 降低从而引起牙釉质分解以及龋齿的发作。

[0184] 图 12 显示 5mg/ml 标准制剂对变异链球菌生长的效果。此试验采用上文所有生长分析中所描述的模式。5mg/ml 标准制剂可完全抑制变异链球菌生物体的生长,并长达整个分析的 15 小时。在同一时间段中,加入 pH6.8 磷酸盐缓冲液而不是标准制剂的对照的生长,显示出预期的对数增长。

[0185] 在检测变异链球菌的粘附抑制时,Merck 产的羟基磷灰石粉末用作牙釉质的替代物。测试过程如上文方法和材料所述,除了以下少许修正:1ml 新鲜培养物,调整其在 600nm

的光密度为 0.1, 加入 5mg 唾液包被的羟基磷灰石小珠; 允许粘附 1 小时; 然后低速离心沉淀粘附有细菌的羟基磷灰石。上清中留有的细菌数是原初未粘附群体的百分数, 表示为原初群体的一个百分比; 其倒数是粘附抑制的百分比。

[0186] 图 13 显示标准制剂的粘附抑制效果是剂量依赖的; 浓度为 0.8mg/ml 时达到几乎完全的抑制。此实施例中, 小牛血清白蛋白还是用作“蛋白空白”, 在此测试系统中, 0.8mg/ml BSA 显示约 30% 的抑制效果, 而柠檬酸钠显示约 10% 粘附抑制。

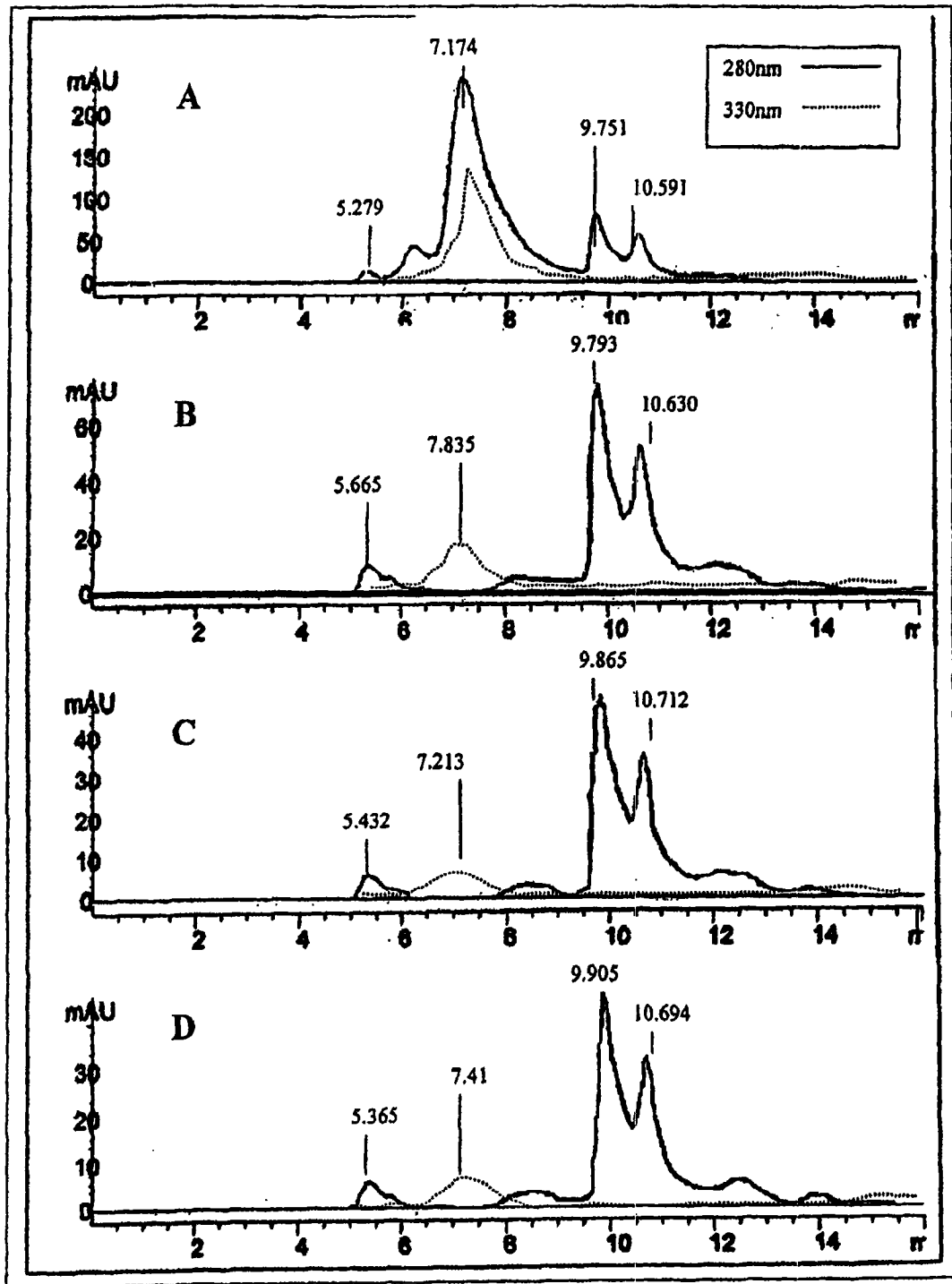


图 1 :分子大小排阻色谱法显示酶水解乳清

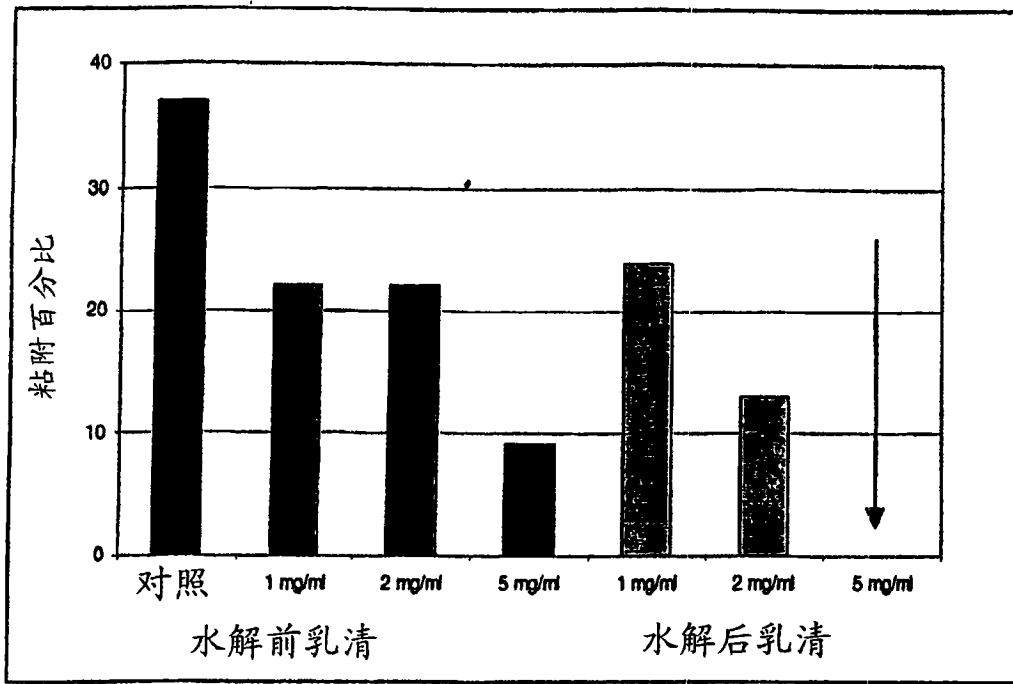


图 2:酶水解前、后的乳清对白色假丝酵母的粘附抑制

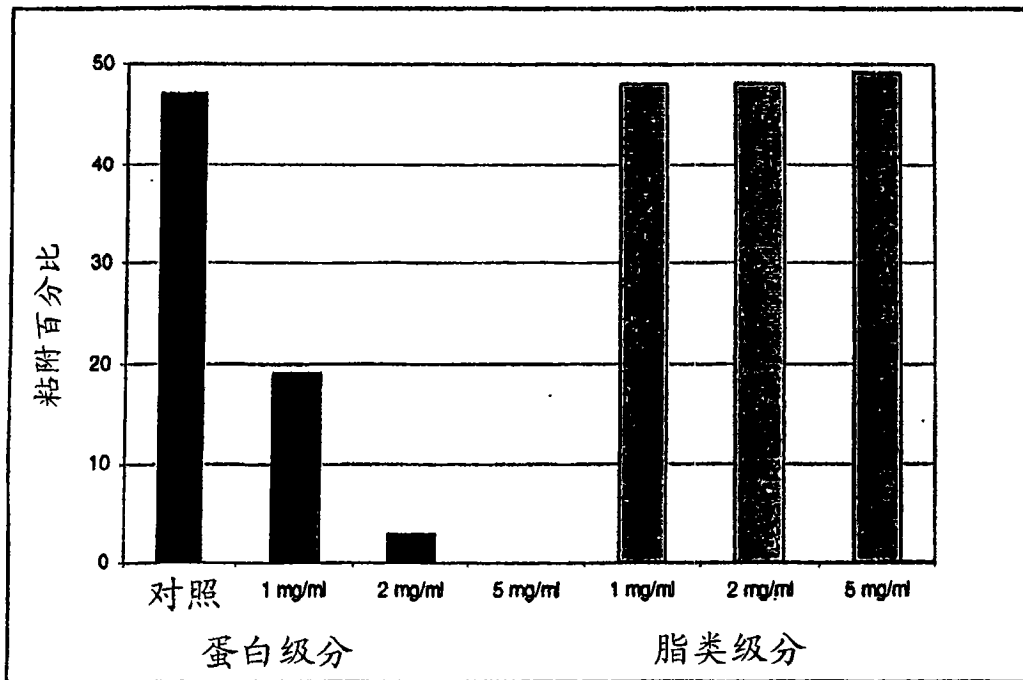


图 3:酶水解后乳清的蛋白和脂类部分对白色假丝酵母粘附抑制的比较

图 4: 酶水解后乳清的脂类级分对白色假丝酵母的生长抑制

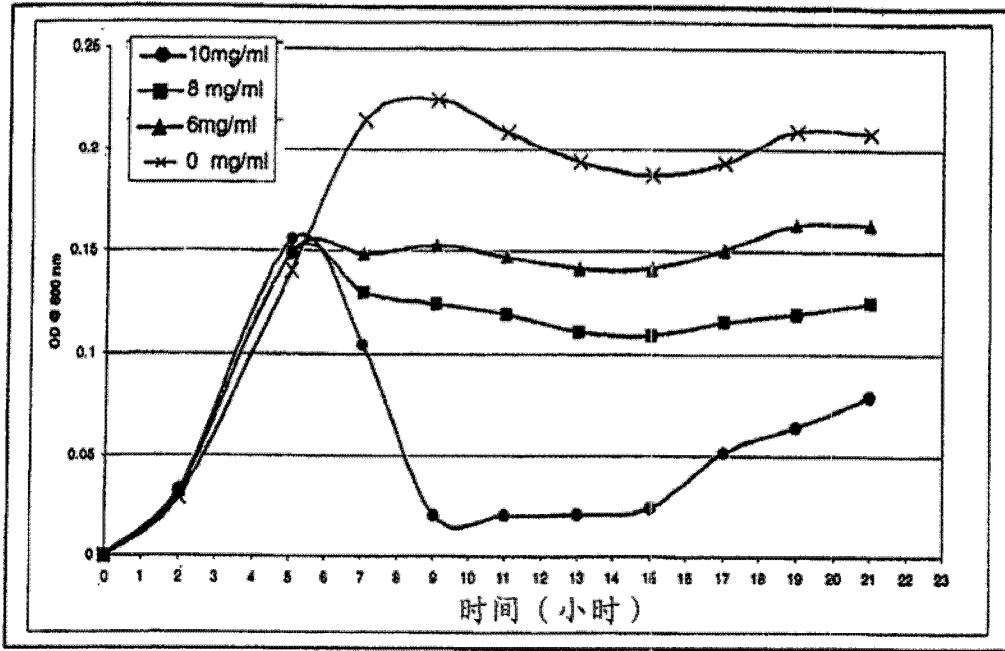
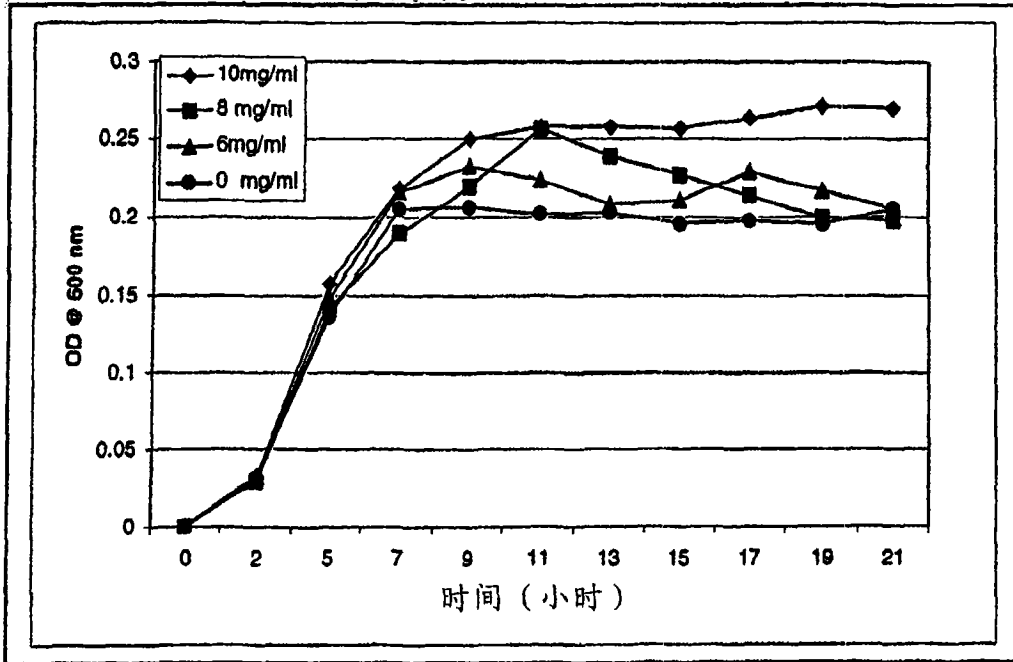


图 5: 酶水解后乳清的蛋白级分对白色假丝酵母的生长抑制



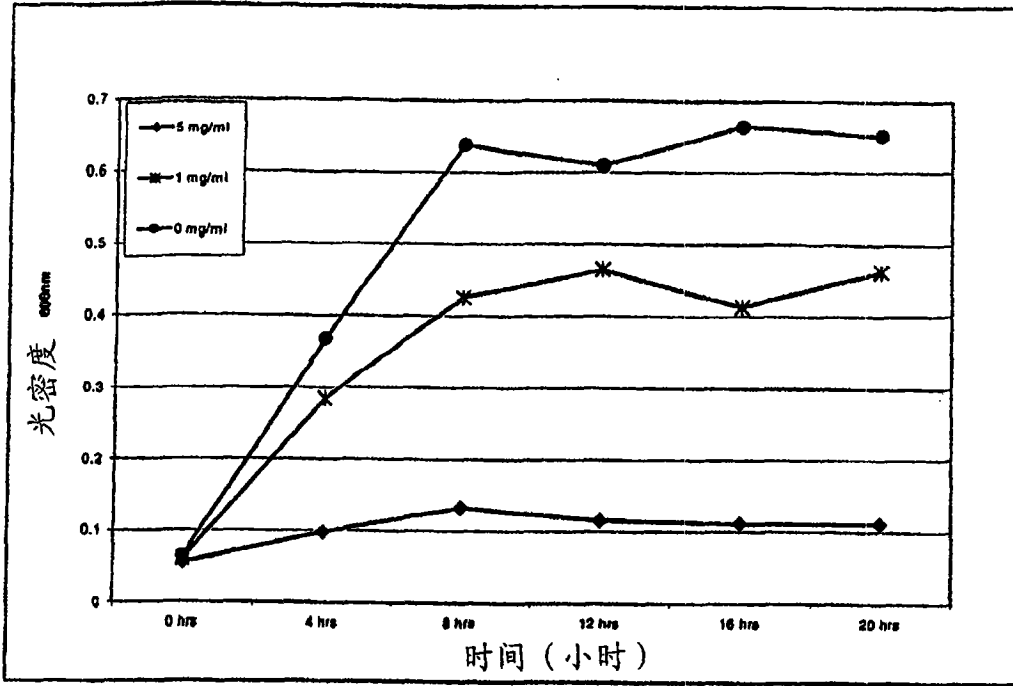


图 6 :标准制剂对白色假丝酵母的生长抑制

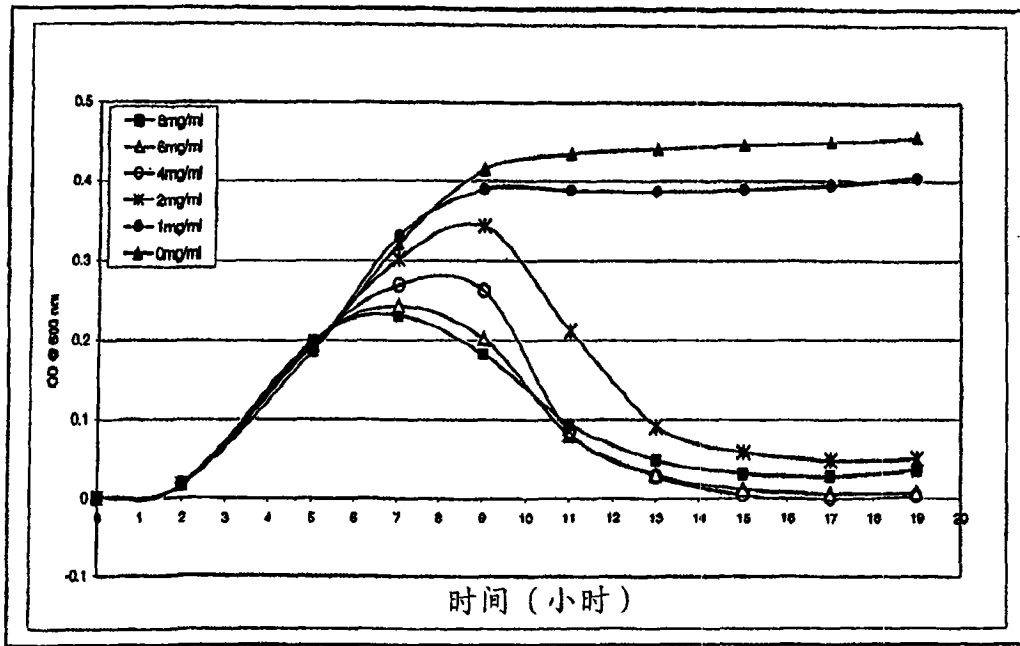


图 7 :白色假丝酵母生长抑制的干涉分析 (5 小时处)

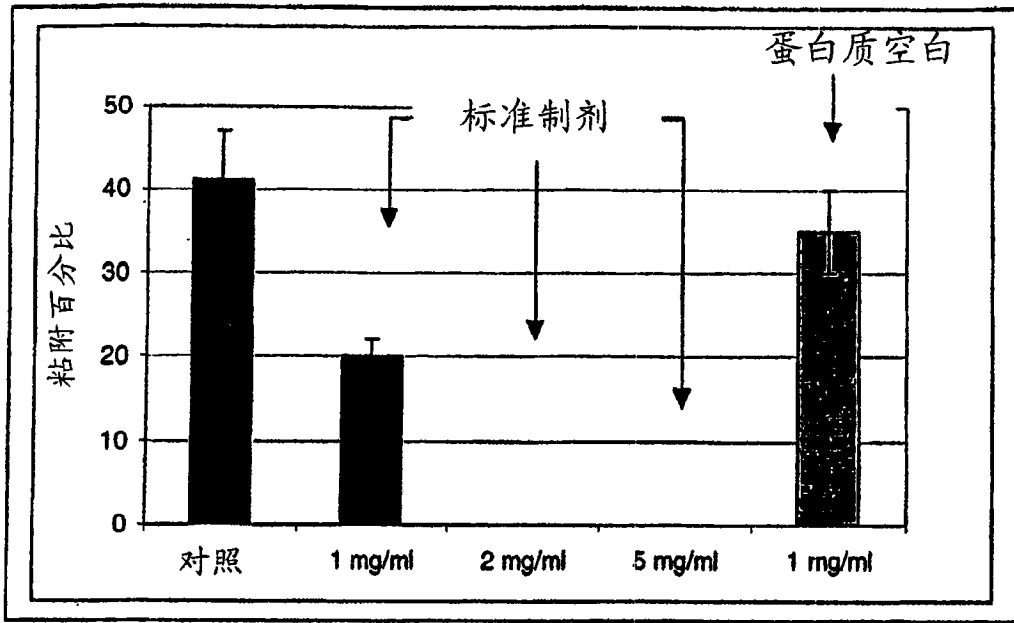


图 8 :标准制剂预处理的白色假丝酵母的粘附抑制

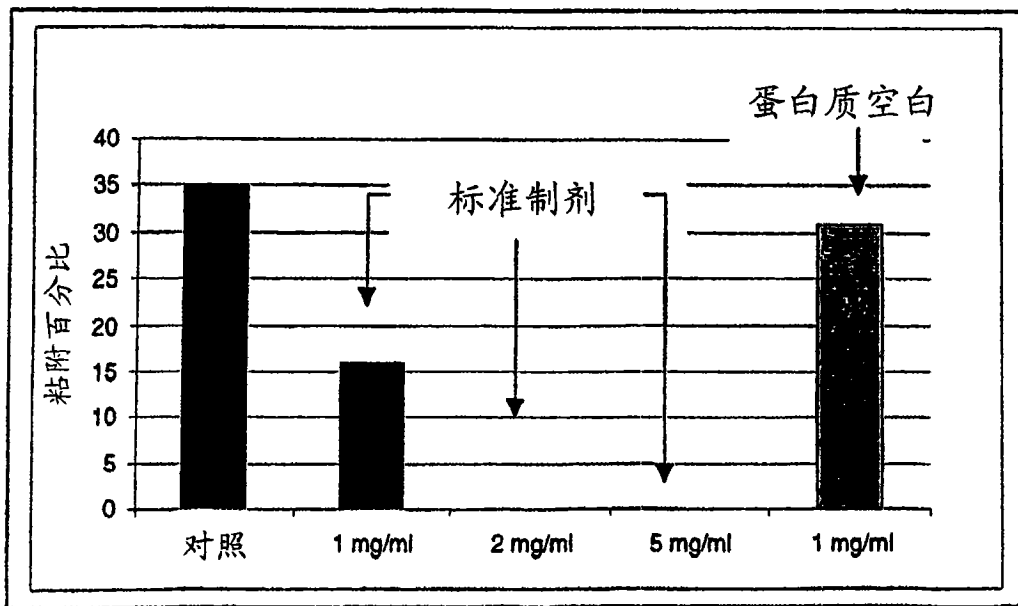


图 9 :标准制剂预处理口腔上皮细胞后,酵母的粘附抑制

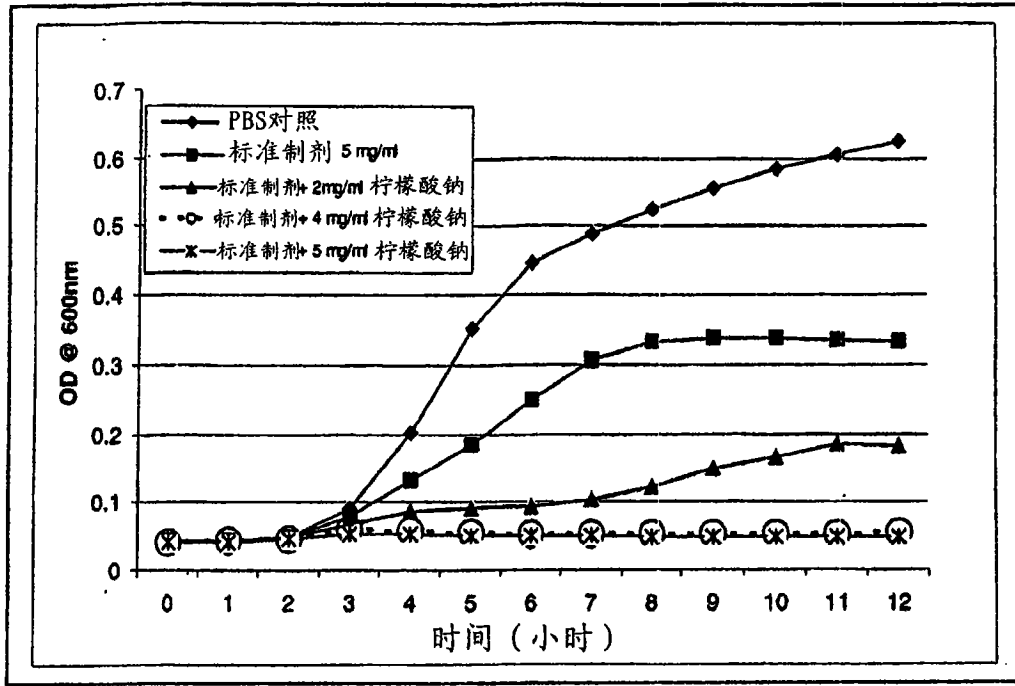


图 10 :补充柠檬酸钠后标准制剂对甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌的生长抑制

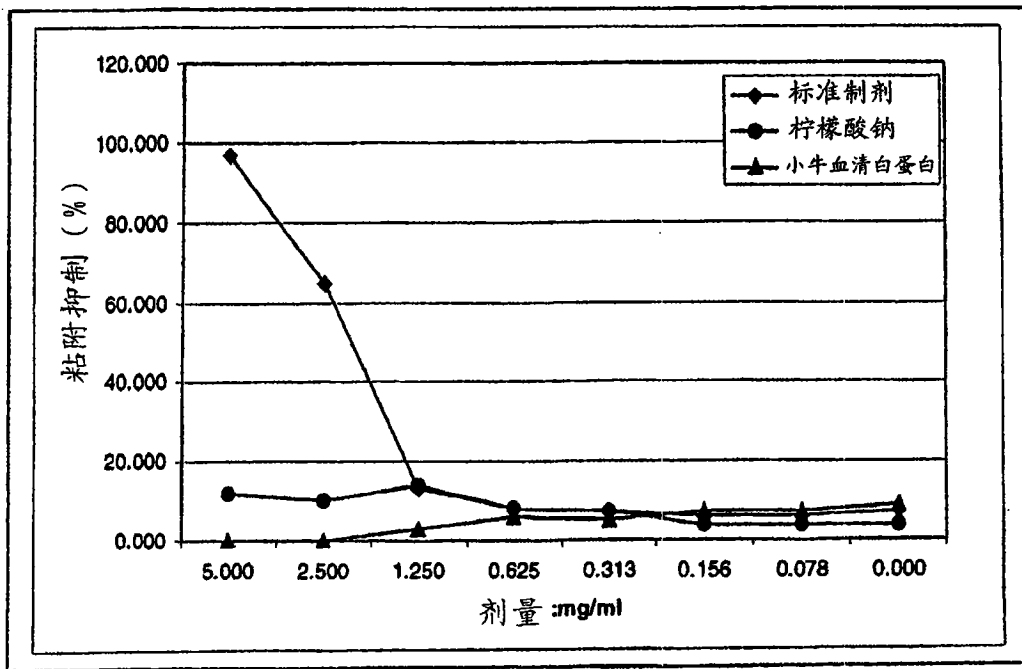


图 11 :甲氧苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌对口腔上皮细胞的粘附抑制

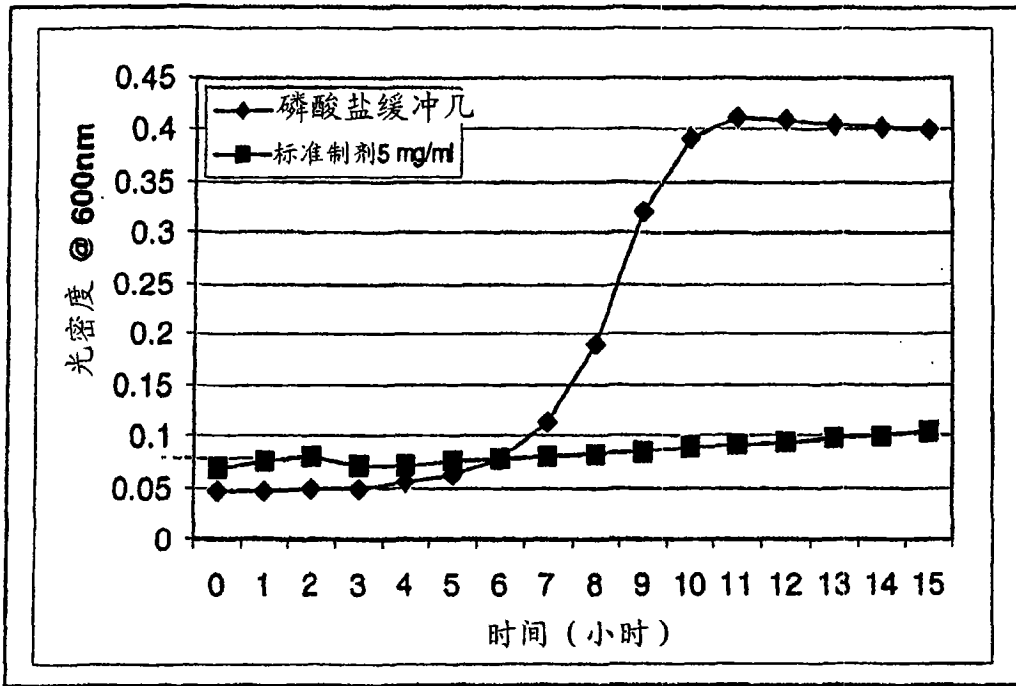


图 12 :标准制剂对变异链球菌的生长抑制

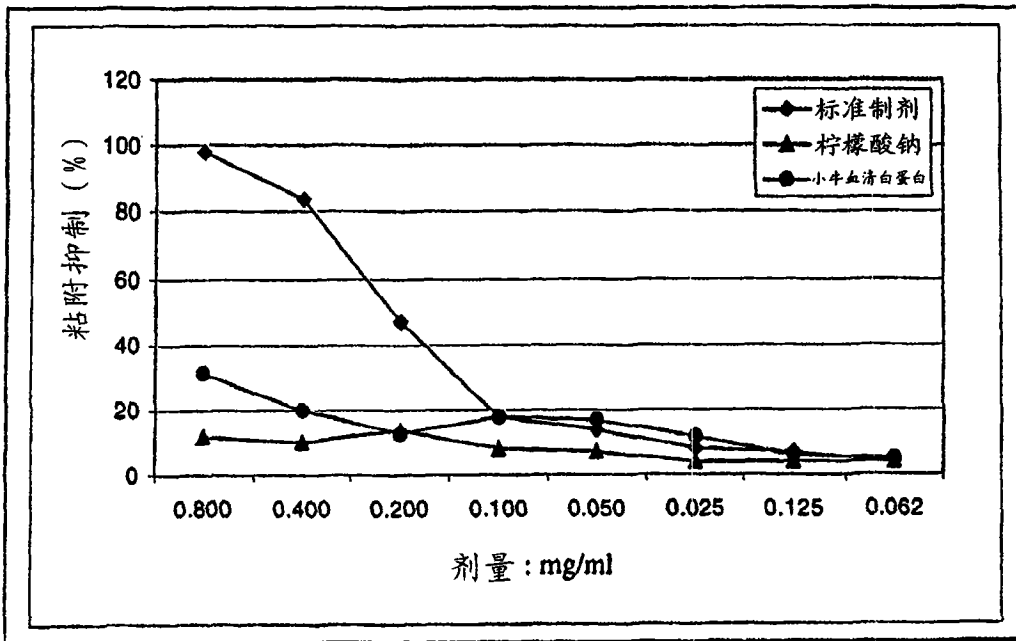


图 13 :标准制剂对变异链球菌对羟基磷灰石小珠的粘附抑制