



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119563016 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 04

(21) 申请号 202280089645.X

(22) 申请日 2022.12.08

(30) 优先权数据

2021/0209 2021.12.08 IE

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081161 2022.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/108055 EN 2023.06.15

(71) 申请人 迪兰益生菌和酶公司

地址 美国佐治亚州

(72) 发明人 约翰·迪顿

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258

专利代理师 卢兴旺

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/742 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

G12R 1/07 (2006.01)

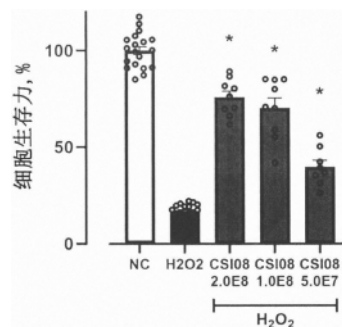
权利要求书2页 说明书42页
序列表(电子公布) 附图20页

(54) 发明名称

克劳氏芽孢杆菌菌株、其组合物及使用方法

(57) 摘要

本发明提供一种克劳氏芽孢杆菌菌株,其包括纯化的微生物群体,所述微生物群体包括一种或多种具有与SEQ ID NO:1具有至少97%的同一性的gyrB的细菌;和/或所述微生物群体包括一种或多种具有与SEQ ID NO:2具有至少97%的同一性的16S rRNA的细菌。任选地,克劳氏芽孢杆菌菌株与SEQ ID NO:3具有至少97%的同一性。使用克劳氏芽孢杆菌的组合物和方法也是本发明的一部分。



1. 一种克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) 菌株, 其包括纯化的微生物群体, 所述微生物群体包括一种或多种具有与SEQ ID NO:1具有至少97%的同一性的gyrB的细菌; 和/或所述微生物群体包括一种或多种具有与SEQ ID NO:2具有至少97%的同一性的16S rRNA的细菌。

2. 根据权利要求1所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 其与SEQ ID NO: 具有至少97%的同一性。

3. 根据权利要求1所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 其中, 所述纯化的微生物群体包括具有包含SEQ ID NO:2的16S核酸序列的细菌。

4. 根据权利要求1所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 其中, 所述纯化的微生物群体包括具有包含SEQ ID NO:1的gyrB核酸序列的细菌。

5. 根据权利要求1所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 其中, 所述纯化的微生物群体包括具有包括SEQ ID NO:2的16S核酸序列和具有包括SEQ ID NO:1的gyrB核酸序列的细菌。

6. 一种微生物组合物, 其包括根据权利要求1至5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 以及可食用的载体和/或稀释剂。

7. 根据权利要求6所述的微生物组合物, 其中, 所述组合物的单位剂量包括 10^6 - 10^{13} CFU的克劳氏芽孢杆菌菌株。

8. 根据权利要求6或7所述的微生物组合物, 其进一步包括黏膜粘附赋形剂。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的微生物组合物, 其还包括至少一种其他益生菌芽孢杆菌菌株。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的微生物组合物, 其中, 所述微生物组合物被配制成片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、溶液、混悬剂或乳剂。

11. 根据权利要求6至9中任一项所述的微生物组合物, 其中, 所述微生物组合物被配制为食品。

12. 根据权利要求1至5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 用于以下的用途: 预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道疾病, 改善免疫健康, 保护免受氧化应激, 清洁和脱毒, 代谢健康和心血管健康。

13. 一种预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道疾病, 改善免疫健康, 保护免受氧化应激, 清洁和脱毒、代谢健康和心血管健康的方法, 所述方法包括施用根据权利要求1至5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株。

14. 根据权利要求6到11中任一项所述的微生物组合物, 其用于以下的用途: 预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道疾病, 改善免疫健康, 保护免受氧化应激, 清洁和脱毒, 代谢健康和心血管健康。

15. 一种预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道疾病, 改善免疫健康, 保护免受氧化应激, 清洁和脱毒、代谢健康和心血管健康的方法, 所述方法包括施用根据权利要求6至11中任一项所述的微生物组合物。

16. 一种改善受试者体内微生物群系的方法, 所述方法包括向所述受试者施用包括益生菌的组合物, 其中所述益生菌包括根据权利要求1至5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株。

17. 根据权利要求1-5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株, 其用作益生菌的用途, 其

中任选地所述一种多多种细菌菌株与可接受的载体或一种或多种递送载体和任选的一种或多种佐剂组分在单一组合物或包括不同细菌菌株的混合物的分离的组合物中组合。

18. 根据权利要求1至5中任一项所述的克劳氏芽孢杆菌菌株在制备用于治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道疾病,改善免疫健康,保护免受氧化应激,清洁和脱毒、代谢健康和/或心血管健康的药物中的用途。

克劳氏芽孢杆菌菌株、其组合物及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) 菌株,其单独地或与其他芽孢杆菌菌株组合可用作益生菌或与益生元和合生元一起使用。本发明还涉及一种组合物,诸如药物组合物、乳制品、功能食品、营养制品、膳食补充剂和用于个人护理的产品,其包括单独的新的克劳氏芽孢杆菌菌株或与其他一种或多种菌株组合,以及所述菌株用于预防或治疗胃肠道、泌尿道、阴道和其他感染和疾病的用途和其他用途。

背景技术

[0002] 益生菌是用于施用的活的微生物或微生物混合物,用于改善患者的微生物平衡,特别是呼吸道和胃肠道的环境。杆菌(芽孢杆菌, *Bacillus*) 菌株已用于治疗呼吸道感染、预防腹泻以及治疗免疫相关的疾病(Elshagabee等人,2017)。

[0003] 正常的肠道菌群以各种细菌种类为主,其产生的物质有助于控制病原体的生长。生态失调(Dysbiosis)是一种以某些细菌种类减少和病原菌的生长增加为特征的病症。生态失调与牙周病、炎性肠病和慢性疲劳综合征的发生有关。一些研究表明,生态失调患者发生代谢和心脏疾患的风险可能会增加(Chan等人,2013)。

[0004] 通过施用益生菌杆菌,有可能使反复发作生态失调的男性和女性的肠道菌群再生。生态失调是常见的胃肠道问题。大肠杆菌引起的生态失调也是常见的问题(Chan等人,2013)。

[0005] 杆菌的存在对于维持肠道微生物生态系统是重要的。杆菌已被证明对病原菌诸如单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、沙门菌属的种 (*Salmonella* spp) 的生长具有抑制活性(Yilmaz等人,2005)。这种抑制作用可能是由于抑制性化合物(诸如有机酸、过氧化氢、细菌素或罗伊氏菌素(reuterin))的产生或对上皮的竞争性粘附(Abriouel等人,2010)。

[0006] 杆菌也已被检验用于治疗呼吸道感染(Marseglia等人,2007)。例如,已采用装配杆菌并刺激本土生物体来防止泌尿道感染的复发(Marseglia等人,2007)。还研究了杆菌在预防肠道感染中的作用。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 杆菌作为益生菌的重要性在文献中已有描述。

[0009] Hyronimus等人,2000公开了通过体外技术筛选许多杆菌菌株的益生菌活性,并评估了十三种所选菌株在人体中的定植能力。检测粘附至Caco-2细胞的菌株对pH 2.5和0.3%牛胆汁的抗性,以及对肠溶病原菌的抗微生物活性(Khochamit等人,2015)。杆菌除了具有良好的粘附性和生物治疗特性外,还示出具有GIT应激耐受性的首要条件(Thakur等人,2016)。

[0010] 本领域已知的杆菌的药物组合物在体内(即哺乳动物微生物生态系统)的重新定植方面不够有效,因此,需要发现这样的杆菌,即在以药物组合物、营养制品、乳制品、功能食品或吸收产品的形式施用,所述杆菌具有固有的重新定植能力。从土壤中分离的杆菌

可能具有在施用后在体内重新定植的能力,因为它们具有在人类微生物生态系统中存活的固有能力和在施用后定植能力增强的杆菌菌株通常是麻烦的过程,因此重要的是选择有用的测试系统来预测它们的体内定植能力。

[0011] 在文献中,报道的益生菌菌株的体外粘附似乎有很大的差异。这种变异确实反映了菌株之间的生物学差异,但当然也取决于实验条件。此外,在如何衡量粘附性方面似乎也存在差异。在某些情况下,可以认为体外实验仅作为通过粘附至上皮细胞评估体内定植能力的手段。

[0012] 尽管长期以来被认为是土壤微生物,芽孢杆菌属的物种已经以发酵产品或基于孢子的补充剂的形式使用了50多年(Cutting等人,2011)。杆菌在自然界中普遍存在,通过食物、水和空气持续进入健康人的胃肠道和呼吸道(Benno&Mitsuoka,1986)。它们是从肠道中分离出来的,并且可以达到 10^7 CFU/g,因此被认为是正常肠道微生物区系(microbiota)的主要成分之一(Lakshmi等人,2017)。最近,已经分离了克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)的菌株以提供更多的特异性功能,并且已经对其安全性进行了评估。克劳氏芽孢杆菌以前曾用于腹泻患者(Sudha等人,2013,Horosheva等人,2014)和患有复发性呼吸道感染的儿童(Marseglia等人,2007),未报告不良事件。虽然国家和菌株没有具体说明,但克劳氏芽孢杆菌已在全世界55个国家商业化(Nista等人,2004;Gabrielli等人,2009)。克劳氏芽孢杆菌的文献综述显示,没有与益生菌相关的不良事件,世界各地不同国家存在的细菌补充了其对人体食用安全性的叙述。

[0013] 总之,具有益生菌能力的杆菌菌株应该能够粘附其他合适的细胞,诸如细胞系Caco-2细胞。此外,还希望具有益生菌能力的杆菌菌株在体外显示出对其他细菌物种的抑制活性,在液体培养物中生长后产生酸和/或产生过氧化氢。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提供本申请中所述的菌株和组合物,诸如具有所需特性的合适的益生菌菌株(诸如杆菌菌株)的药物制剂或吸收产品。在实施方式中,本发明涉及单独的克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08或与其他芽孢杆菌菌株诸如巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)菌株MIT411(在相应的PCT申请PCT/US2022/xxxxx中公开,并要求爱尔兰专利申请第2021/0211号的优先权,其内容以其整体并入本文)和凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)菌株CGI314(在相应的PCT申请PCT/US2022/xxxxx中公开,并要求爱尔兰专利申请第2021/0210号的优先权,其内容以其整体并入本文)。在实施方式中,这些菌株具有相似或基本相同的有利特性,例如通过粘附于黏膜/表面进行定植的能力,因此它们适合于治疗或预防阴道、泌尿道、胃肠道、鼻窦、咽、食管、口腔和/或身体的其他具有黏膜的区域的感染或疾病,以及治疗或预防皮肤和/或身体其他具有上皮的区域的感染或疾病;免疫健康、保护免受氧化应激、清洁和脱毒、代谢健康和心血管健康等,诸如提供抗微生物活性、抗炎活性、抑制促炎反应、激活和/或激发免疫应答等,例如通过刺激巨噬细胞提供免疫保护,帮助例如在肠中的消化和/或发酵,产生支链氨基酸、必需氨基酸和B族维生素,维持健康的肠和/或皮肤,保护黏膜和其他上皮组织免受毒性剂,降低便秘的发生率,改善肠-脑轴,和治疗和/或预防生态失调及其影响,诸如如牙周病、炎症肠病、慢性疲劳综合征、代谢紊乱、心脏疾病、呼吸道感染、泌尿道感染、GI感染和腹泻;以及恢复正常和/或健康的菌群。在实施

方式中,本发明允许克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08和组合物用于粪便移植的用途。

[0015] 胃肠道疾病包括但不限于治疗个体的胃肠道紊乱(irregularity),其中所述个体具有在Bristol粪便量表上测量为1或2的肠蠕动每月至少一次24小时的发作(即治疗便秘);或者其中所述个体具有在Bristol粪便量表上测量为6至7的肠蠕动(倾向于腹泻)每月至少一次24小时的发作,其中所述个体的在Bristol粪便量表上测量为1或2(或6或7)的肠蠕动每月24小时的发作的频率减少。

[0016] 还包括在个体中恢复胃肠道规律性的方法,其中所述个体具有在Bristol粪便量表上测量为1或2;或6至7的肠蠕动每月至少一次24小时发作,其中所述个体在Bristol粪便量表上测量为3至5的肠蠕动的24小时周期的频率增加。

[0017] 本发明还包括用一种或多种含芽孢杆菌的组合物维持健康的肠道微生物区系。所述一种或多种含芽孢杆菌的组合物可用作胃肠道微生物区系的益生菌补充物,并可与肠道中的病原菌诸如大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门菌属的物种竞争或以其他方式抑制肠道中的病原菌诸如大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门菌属的物种。

[0018] 本发明的另一个目的是提供药物制剂,所述药物制剂通过使用黏膜粘附赋形剂粘附于黏膜而具有增加的定植能力。

[0019] 本发明的再一个目的是提供阴道制剂,所述阴道制剂具有抑制白色念珠菌(*Candida albicans*)和革兰氏阴性病原菌生长的增强的能力。

[0020] 本发明的另一个目的是提供组合物,诸如乳制品、营养制品和功能食品,其包括单独的克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08或与其他芽孢杆菌菌株诸如巨大芽孢杆菌菌株MIT411和/或凝结芽孢杆菌菌株CGI314的组合,在实施方式中,所述组合物具有基本相同的性质,在实施方式中具有在黏膜上定植的能力,因此适用于治疗或预防阴道感染、尿路感染和胃肠道疾病。本发明的组合物可以施用1剂量、1天、1天至1周、1天至1个月、1个月至45天、45天至2个月、3个月、6个月、1年或更长时间,包括确定的和/或落入这些范围内的任何时间段。

[0021] 附图

[0022] 在附图中:

[0023] 图1显示克劳氏芽孢杆菌CSI08的基因组分析。

[0024] 图2显示按进化枝排列的芽孢杆菌属的物种的系统发育树(16S)。

[0025] 图3显示按进化枝排列的芽孢杆菌属的物种的系统发育树(*gyrB*)。

[0026] 图4示出在巴氏杀菌过程中MuniSpore在PBS中的稳定性。

[0027] 图5示出克劳氏芽孢杆菌(*B. clausii*)CSI08孢子在0-、3-和24-小时时间点的pH生存性。

[0028] 图6示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在0-、3-和24-小时时间点的胆汁盐的生存性。

[0029] 图7示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子和鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)GG在体外模拟的胃和小肠消化条件下的存活。

[0030] 图8和9示出Muni spore(克劳氏芽孢杆菌CSI08)在液体培养物中的抗微生物活性。

[0031] 图10示出克劳氏芽孢杆菌CSI08和鼠李糖乳杆菌GG的总抗氧化能力。

[0032] 图11示出在暴露于H₂O₂的上皮之上的繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08的细胞保护作用。

[0033] 图12示出用10⁸和10⁹CFU/ml克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养,然后通过H₂O₂引起氧化应

激的秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) N2 的存活率。NGM 一对照喂养的线虫; 维生素 C-阳性对照。

[0034] 图13示出繁殖体细胞克劳氏芽孢杆菌CSI08对HT-29细胞生存力的影响。克劳氏芽孢杆菌CSI08与未处理细胞(培养基)比较。

[0035] 图14示出克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体细胞和孢子对HT-29-MTX的粘附。克劳氏芽孢杆菌CSI08与发酵乳杆菌 (*L. fermentum*) 比较。

[0036] 图15A和15B示出HT-29细胞系中克劳氏芽孢杆菌CSI08对LPS诱导的促炎反应的调节, 以及HT-29细胞与克劳氏芽孢杆菌CSI08及其CFS在未刺激条件 (LPS-) 下共孵育后的基因表达模式。

[0037] 图16示出活的和热灭活的克劳氏芽孢杆菌CSI08对LPS诱导的IL8基因表达的调节。

[0038] 图17示出对照HT-29s、暴露于LPS的细胞和在添加LPS之前用克劳氏芽孢杆菌CSI08处理的细胞的核组分中的NF- κ B水平。

[0039] 图18A和18B示出HT-29细胞系中克劳氏芽孢杆菌CSI08对PolyI·C触发的促炎反应的调节。在与克劳氏芽孢杆菌CSI08或其无细胞上清液 (CFS) 预孵育的HT-29细胞中, 暴露于PolyI·C 4小时后, 对IL-8、TNF- α 、IL-17C和CXCL10基因表达进行qPCR分析。

[0040] 图19示出CSI08的免疫刺激作用。被繁殖体细胞克劳氏芽孢杆菌CSI08或LPS攻击5小时的U937-衍生的巨噬细胞的细胞培养上清液中的细胞因子水平。

[0041] 图20示出在对照条件 (NGM) 下的秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 野生型N2菌株的寿命和用克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养的秀丽隐杆线虫野生型N2的寿命。

[0042] 图21示出在对照条件 (NGM) 下秀丽隐杆线虫daf-16突变体蠕虫的寿命和用克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养的秀丽隐杆线虫daf-16突变体的寿命。

[0043] 图22示出使用划线法, 克劳氏芽孢杆菌CSI08有轻微的酪蛋白分解, 以及巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 和克劳氏芽孢杆菌CSI08具有酪蛋白分解活性。

[0044] 图23示出由EnzCheck®试剂盒试验测定的蛋白水解活性。

[0045] 图24示出由RP-HPLC-FLD和RP-HPLC-MS测定的克劳氏芽孢杆菌CSI08过夜培养物中必需氨基酸和维生素的浓度。

[0046] 图25示出该研究设计的图形流程图。

[0047] 图26示出与安慰剂对照相比, 研究期间施用益生菌混合物 (cocktail) 在研究过程中显著降低了便糖的发生率。

[0048] 图27示出与安慰剂对照相比, 研究期间施用的任何治疗对硬便百分比没有影响。

[0049] 图28是箱线图, 示出研究第1天和第45天每个实验组的Chao1值分布。虚线连接成对样品。使用配对Wilcoxon检验来比较各组的分布。

[0050] 图29是箱线图, 示出研究第1天和第45天每个实验组的Chao1值分布。Wilcoxon检验用于比较每个实验组与安慰剂的分布。

[0051] 图30显示在Bray-Curtis相异度矩阵上执行的PCoA聚类。

具体实施方式

[0052] 基因型鉴定

[0053] 申请人与康奈尔大学 (Cornell University, (Ithaca NY, USA)) 合作进行基因组

测序和鉴定。

[0054] WGS DNA组成

[0055] 全基因组测序(WGS)由康奈尔大学进行。

[0056] 康奈尔大学获得了克劳氏芽孢杆菌分离株的全基因组序列,并对其进行了组装和注释。生物信息学分析在康奈尔大学和迪兰益生菌和酶有限公司(Deerland Probiotics and Enzymes(Kennesaw GA,USA))完成。克劳氏芽孢杆菌CSI08基因组的DNA核苷酸含量、碱基对长度和标志物序列如下所示(表1)。克劳氏芽孢杆菌CSI08的基因组大小(4.2Mbp)和GC%(44.6%),与先前测序的克劳氏芽孢杆菌菌株(分别为4.3Mbp和44.6%)一致([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid66692\[Organism:noexp\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid66692[Organism:noexp]))。

[0057] 表1

[0058] CSI08全基因组测序指标

[0059]	菌株	尝试	重叠群	总长度	GC (%)	N50 (nt)	平均覆
			数量	(nt)			盖率(x)
[0060]	克劳氏芽孢杆菌CSI08	1	52	4,264,753	44.66	281,140	41.0102

[0061] gyrB基因

[0062] 申请人进行了gyrB基因多态性的鉴定。gyrB基因编码DNA促旋酶亚基B。DNA促旋酶以ATP依赖的方式使闭合的环状双链DNA负向超螺旋,以维持染色体的欠缠绕状态。

[0063] 使用gyrB基因多态性进行基因测序分析,这是一种用于原核生物的物种鉴别的成熟方法(Bavykin等人,2004;Wang等人,2007),表明克劳氏芽孢杆菌CSI08与克劳氏芽孢杆菌群的亲缘关系最近(>99%)(表2)。

[0064] 表2

[0065] gyrB基因距离矩阵

[0066]	克劳氏芽孢杆菌亚种	B106	UBBC-07
	CSI08	99.983	98.952

[0067] 代表性基因组之前由NCBI审查和策划,并与UniProt Consortium协调(NCBI,2016;UniProt,2016)。使用R软件包的SequinR与UniProt Consortium分析相结合,用于比较克劳氏芽孢杆菌CSI08的全基因组序列(WGS)和GyrB序列以及两个参考序列(表3)的碱基对长度和GC含量。迪兰益生菌和酶有限公司进行的独立全基因组序列(WGS)分析鉴定出CSI08具有与克劳氏芽孢杆菌B106最相似的同源性。

[0068] 表3

[0069] 全基因组序列比较

[0070]	克劳氏芽孢杆菌亚种	登录号	G/C%	序列长度
	CSI08	JABBNL000000000.1	44.66%	4,264,753
	B106	GCA 002266625.1	44.63%	4,253,129
	UBBC-07	GCF 000981315.1	44.63%	4,197,324

[0071] 16S rRNA

[0072] 与两个参考菌株相比,当前请求保护的菌株(克劳氏芽孢杆菌CSI08)的全基因组测序和16S rRNA分析显示,当与克劳氏芽孢杆菌菌株B106(克劳氏芽孢杆菌B106的基因组序列已以登录号NFZ000000000存入GenBank中)相比时,16S rRNA的平均核苷酸同一性(ANI)得分>99%。CSI08的基因组大小(4.2MBP)和GC含量(44.6%)与两个参考菌株相当。

[0073] 进一步的保藏和登录号

[0074] 克劳氏芽孢杆菌UBBC07的全基因组序列已在DDBJ/ENA/GenBank中以登录号LATY000000000存储。

[0075] 将克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08(Munispore)的基因组序列数据存入至NCBI GenBank数据库,并使用NCBI原核生物基因组注释管线(NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline(PGAP))对基因组序列进行注释。基因组可公开获得,菌株的GenBank登录号为JABBNL000000000.1,并可通过以下链接获得:[Alkalihalobacillus clausii strain CSI08,whole genome shotgun sequenci-Nucleotide-NCBI\(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Alkalihalobacillus-clausii-strain-CSI08-whole-genome-shotgun-sequencing-Nucleotide-NCBI-nih.gov)。

[0076] 将巨大芽孢杆菌菌株MIT411(Renuspore)的基因组序列数据存入至NCBI GenBank数据库,并使用NCBI原核生物基因组注释管线(NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline(PGAP))对基因组序列进行注释。基因组可公开获得,菌株的GenBank登录号为JABBNK000000000.1,并可通过以下链接获得:[Priestia megaterium strain MIT411, whole genome shotgun sequencing pro-Nucleotide-NCBI\(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Priestia-megaterium-strain-MIT411-whole-genome-shotgun-sequencing-pro-Nucleotide-NCBI-nih.gov)。

[0077] 将凝结芽孢杆菌菌株CGI314(Fortispore)的基因组序列数据存入至NCBI GenBank数据库,并使用NCBI原核生物基因组注释管线(NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline(PGAP))对基因组序列进行注释。基因组可公开获得,菌株的GenBank登录号为JABBFU000000000.1,并可通过以下链接获得:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JABBFU000000000.1>。

[0078] 系统发育定位迪兰益生菌和酶有限公司

[0079] 基因组到基因组距离计算(GGDC)是一种数字黄金标准,与DNA-DNA杂交(DDH)一样可靠(Auch等人,2010)。GGDC在亚种划分中具有更强的辨别能力,随后被用于多重比对和系统发育分析的确证。GGDC产生了三个基于计算的模型,进一步证实克劳氏芽孢杆菌CSI08是克劳氏芽孢杆菌B106的近亲缘类群(表3)。

[0080] 尽管保守的16S rRNA序列是比较和研究细菌系统发育的成熟方法,但密切相关的物种之间的高百分比序列相似性限制了其有用性(Wang等人,2007)。在密切相关的细菌物种中,16S rRNA序列相似性的高比率是由于较慢的分子进化速率。过去的研究(Bavykin等人,2004年;Wang等人,2007)支持使用gyrB序列作为分类学生物标志物的有效性,因为它们的碱基替换率及其与DNA-DNA杂交分析的显著且可靠的相关性(Dauga等人,2002;Kasai等人,1998年;Wang等人,2007年)。gyrB编码DNA促旋酶B和在DNA复制中起重要作用的II型拓扑异构酶。促旋酶B亚基由gyrB基因编码。

[0081] 使用邻接(NJ)法(Saitou&Nei,1987)进行系统发育分析,将克劳氏芽孢杆菌CSI08与克劳氏芽孢杆菌B106置于一个进化枝中(图2)。这证实了所有先前的基因组同一性测定。克劳氏芽孢杆菌B106已归入克劳氏芽孢杆菌组。

[0082] 定义

[0083] “赋形剂”是指加入以形成最终制剂的部分的任何非活性成分。

[0084] “益生菌”是指有活力的微生物补充剂,其通过在肠道、泌尿道、阴道和/或受试者身体的其他区域中的作用而对受试者产生有益的影响。

[0085] “益生元”在本文中用作底物,其对益生菌具有有益作用,并因此对服用(例如施用)益生菌的受试者具有有益作用。合适的益生元可选自菊糖、寡糖和/或维生素。

[0086] 本文所用的“受试者”包括患有与微生物失衡有关的任何临床病症的人,以及为了健康或任何其他目的预防性使用细菌制剂的人,所述目的包括例如受益于施用本发明的克劳氏芽孢杆菌菌株(例如CSI08)。任选地,受试者是人、患者和/或哺乳动物。

[0087] “合生元产品”是指益生菌和益生元的组合,其具有协同作用,对患者具有有益的影响。

[0088] “顽强生长(hardy growth)”是指细菌表现出极好生长。

[0089] 缩写“CFU”表示菌落形成单位。

[0090] 本发明涉及能够在受试者体内再生菌群的益生菌杆菌菌株,其将在以下详细描述的过程中变得显而易见。

[0091] 根据第一方面,本发明包括单独的克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08或与具有基本相同特性的其他益生菌菌株的组合。这样的其他益生菌杆菌菌株包括但不限于凝结芽孢杆菌菌株和巨大芽孢杆菌菌株。这样的其他杆菌菌株还包括凝结芽孢杆菌菌株和巨大芽孢杆菌菌株,它们各自以各自的标题在同一天提交,它们的内容以其整体并入本文。

[0092] 如所附权利要求中所述,SEQ ID NO:1包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的gyrB。

[0093] 如所附权利要求中所述,SEQ ID NO:2包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的16S rRNA。

[0094] 如所附权利要求中所述,SEQ ID NO:3包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组装的全基因组序列。

[0095] 本文要求保护的克劳氏芽孢杆菌CSI08菌株,与SEQ ID NO:1和/或2具有至少97%的同源性;或与SEQ ID NO:3有至少97%的同源性,具有以下性质:

[0096] 为了测定本文公开的菌株的属和种,对全基因组进行测序。对菌株的数量和组成进行了鉴定和测定。

[0097] 该菌株显示具有很少或没有抗生素抗性,并且没有安全问题。

[0098] 发现该菌株对酸和胆汁表现出稳定性,并表现出耐热性。该菌株产生以细菌素形式存在的天然抗菌物质。

[0099] 根据第二方面,本发明的杆菌菌株适用于预防或治疗阴道感染、泌尿道感染和胃肠道疾病,以及改善免疫健康、保护免受氧化应激、清洁和脱毒、代谢健康和心血管健康的医学用途。

[0100] 在另一优选的实施方式中,提供了一种组合物诸如药物组合物,其包括单独的克劳氏芽孢杆菌CSI08或与具有相似和/或基本相同性质的其他益生菌菌株的组合,以及药学上可接受的载体和/或稀释剂。这样的其他益生菌杆菌菌株包括但不限于凝结芽孢杆菌菌株和巨大芽孢杆菌菌株。通过本领域技术人员已知的方法,将细菌菌株配制成组合物,诸如药物制剂,以使益生菌菌株易于施用。

[0101] 凝结芽孢杆菌已被证明能够缓解肠易激综合征的症状(Sudha等人,2018),改善肌肉整合素和细胞因子反应(Gepner等人,2017;Jager等人,2018),调节肠道微生物群系和免

疫应答 (Kimmel等人, 2010), 减少功能性肠气症状 (Kalman等人, 2009), 减少腹泻的发生和持续时间 (Dolin等人, 2009), 改善功能性腹痛和腹胀的症状 (Hun等人, 2009), 保护免受对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤 (Neag等人, 2020), 增强丁酸生成 (butyrogenesis) (Sasaki等人, 2020), 降低细菌性阴道病的严重程度 (Sudha等人, 2012), 以及降低胆固醇 (Sudha等人, 2012), 所有这些都都在体内进行。凝结芽孢杆菌还显示出诱导免疫应答和抗炎作用 (Jensen等人, 2017), 改善植物蛋白消化 (Keller等人, 2017), 粘附至Caco-2细胞 (Sharma& Kanwar, 2017), 改善溃疡性结肠炎患者的结肠微环境 (Sasaki等人, 2020), 减少HT-29细胞中由鼠伤寒沙门菌 (*S. typhimurium*) 引起的粘附、细胞毒性和细胞凋亡的的诱导 (Kawarizadeh等人, 2019), 从乳清蛋白中水解乳糖 (Liu等人, 2019), 以及增强t细胞应答 (Baron, 2009), 所有这些都都在体外进行。

[0102] 克劳氏芽孢杆菌已被证明可有效预防复发性呼吸道感染 (Marseglia等人, 2007), 减少腹泻的持续时间和严重程度 (Sudha等人, 2019), 所有这些都都在体内进行。克劳氏芽孢杆菌也被证明能够产生具有抗微生物和抗氧化能力的蛋白质水解产物 (Rochinmedina等人, 2017), 保护免受对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤 (Neag等人, 2020), 抑制艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 和蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 毒素诱导的细胞毒性作用 (Ripert等人, 2016), 所有这些都都在体外进行。

[0103] 巨大芽孢杆菌在体外和体内均具有免受氧化应激的保护作用 (Mazzoli等人, 2019)。巨大芽孢杆菌也被证明能够在酸性应激条件下适应并存活, 并螯合重金属, 所有这些都都在体外进行 (Ferreira等人, 2019)。

[0104] 在实施方式中, 本发明中采用的益生菌以 10^6 - 10^{13} CFU (菌落形成单位) 的细菌浓度使用, 例如作为日剂量, 包括所述范围中包含的任何量或范围。在实施方式中, 所采用的细菌的量为 10^7 - 10^{12} CFU, 或 10^8 - 10^{11} CFU, 或 10^9 - 10^{10} CFU, 或例如约 10^6 、约 10^7 、约 10^8 、约 10^9 、约 10^{10} 、约 10^{11} 、约 10^{12} 和/或约 10^{13} CFU的量, 以及包括所述量或介于所述量之间的任何量或范围。在实施方式中, 本发明的组合物包括约 10^6 -约 10^{13} CFU, 诸如约 10^9 克劳氏芽孢杆菌CSI08, 基本由约 10^6 -约 10^{13} CFU, 诸如约 10^9 克劳氏芽孢杆菌CSI08组成, 由约 10^6 -约 10^{13} CFU, 诸如约 10^9 克劳氏芽孢杆菌CSI08组成和/或以约 10^6 -约 10^{13} CFU, 诸如约 10^9 克劳氏芽孢杆菌CSI08为特征。在实施方式中, 本发明的组合物包括克劳氏芽孢杆菌CSI08 (例如约 10^9 CFU) 与巨大芽孢杆菌MIT411和/或凝结芽孢杆菌CGI314的组合。在实施方式中, 本发明的组合物以胶囊形式口服施用。在实施方式中, 克劳氏芽孢杆菌CSI08是孢子形式, 或者不是孢子形式。

[0105] 在某些实施方式中, 包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物可包括一种或多种干载体, 所述干载体选自由以下组成的组: 海藻糖、麦芽糊精、米粉、微晶纤维素、硬脂酸镁、肌醇、低聚果糖、低聚半乳糖、右旋糖、干乳制品等的。在某些实施方式中, 可以将干载体以按组合物重量计约1%至约95%的重量百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。

[0106] 在某些实施方式中, 包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物可包括一种或多种基于液体或凝胶的载体, 所述载体选自由以下组成的组: 水和生理盐溶液、尿素、醇及其衍生物 (例如, 甲醇、乙醇、丙醇、丁醇)、二醇 (例如, 乙二醇、丙二醇) 等; 天然或合成的调味剂和食品级着色剂, 均与生物体相容; 增稠剂, 选自由玉米淀粉、瓜尔胶、黄原胶等组成的组; 一种或多种孢子萌发抑制剂, 选自由高盐载体、对羟基苯甲酸甲酯、瓜尔胶、聚山梨醇酯、防腐剂

等组成的组。在某些实施方式中,可以将一种或多种基于液体或凝胶的载体以组合物的约0.6%至约95%重量/体积的重量/体积百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。在某些实施方式中,可以将一种或多种天然或合成的调味剂以组合物的约3.0%至约10.0%重量/体积的重量/体积百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。在某些实施方式中,可以将一种或多种着色剂以组合物的约1.0%至约10.0%重量/体积的重量/体积百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。在某些实施方式中,可以将一种或多种增稠剂以组合物的约2%重量/体积的重量/体积百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。在某些实施方式中,可以将一种或多种孢子萌发抑制剂以组合物的约1%重量/体积的重量/体积百分比添加到包括克劳氏芽孢杆菌CSI08的组合物中。

[0107] 递送系统

[0108] 合适的剂型包括片剂、胶囊剂、溶液剂、混悬剂、粉剂、胶剂和糖果。舌下递送系统包括但不限于舌下和舌上的可溶解片、液滴和饮料。可以使用可食用膜、亲水性聚合物、口服可溶解的膜或口服可溶解的条(oral dissolvable strip)。其他有用的递送系统包括口腔或鼻腔喷雾器或吸入器等。合适的剂型包括片剂、胶囊剂、溶液剂、混悬剂、粉剂、胶剂和糖果。舌下递送系统包括但不限于舌下和舌上的可溶解片、液滴和饮料。可以使用可食用膜、亲水性聚合物、口服可溶解的膜或口服可溶解的条。其他有用的递送系统包括口腔或鼻腔喷雾器或吸入器等。

[0109] 对于口服施用,益生菌可以进一步与一种或多种固体非活性成分组合,用于制备片剂、胶囊、丸剂、粉剂、颗粒剂或其他合适的剂型。例如,活性剂可以与至少一种赋形剂组合,所述赋形剂选自由以下组成的组:填充剂、粘结剂、保湿剂、崩解剂、溶解阻滞剂、吸收促进剂、润湿剂、吸收剂和润滑剂。其他有用的赋形剂包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸钙、甘露醇、木糖醇、甜味剂、淀粉、羧甲基纤维素、微晶纤维素、硅石(silica)、明胶、二氧化硅等。

[0110] 在某些实施方式中,根据本公开的方法施用的组合物的组分与一种或多种常规佐剂、载体或稀释剂一起,可以因此被置于药物组合物及其单位剂量的形式中。这些形式包括:固体,特别是片剂、填充胶囊剂、粉剂和丸剂形式;液体,特别是水溶液或非水溶液、悬浮液、乳液、酏剂;以及填充有该组合物的胶囊;用于口服的全部形式,用于直肠施用的栓剂,用于肠胃外施用的无菌注射溶液。这种药物组合物及其单位剂型可以包括常规比例的常规成分,具有或不具有另外的活性化合物或成分,并且这种单位剂型可以包括与所使用的预期日剂量范围相称的任何合适有效量的活性成分。

[0111] 根据本公开的方法施用的组合物的组分可以以多种口服和胃肠外剂型施用。对于本领域技术人员显而易见的是,在某些实施方式中,下列剂型可以包括本公开的化合物或本公开的化合物的药学上可接受的盐作为活性组分。

[0112] 为了制备根据本公开的方法施用的药物组合物,药学上可接受的载体可以是固体或液体。固体形式制剂包括粉剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和可分散颗粒剂。固体载体可以是一种或多种物质,其也可以用作稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、助悬剂、粘结剂、防腐剂、片剂崩解剂或包封材料。

[0113] 在粉末中,载体是细碎的固体,其与细碎的活性组分混合。在片剂中,活性组分与具有必要结合能力的载体以合适的比例混合,并压制成所需的形状和大小。

[0114] 在某些实施方式中,根据本公开的方法施用的粉剂和片剂优选可含有百分之五或

百分之十至约百分之七十的活性化合物。合适的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。术语“制剂”意指包括活性化合物与作为载体以提供活性组分在其中的胶囊的包封材料的制剂，活性组分(具有或不具有另外的载体)被载体包围，从而与载体结合。类似地，还包括扁囊剂和锭剂。包括片剂、散剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂。片剂、散剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可用作适于口服施用的固体形式。

[0115] 液体制剂包括但不限于溶液、悬浮液和乳液，例如水或水-丙二醇溶液。例如，肠胃外注射液体制剂可以配制为聚乙二醇水溶液中的溶液。在某些实施方式中，根据本公开的方法施用的化合物由此可以被配制用于肠胃外施用(例如，通过注射，例如，弹丸注射或连续输注)，并且可以以单位剂量存在，用于在安瓿、预填充注射器、小容量输注或具有添加的防腐剂的剂量容器中施用。所述组合物可以采取在油性或水性负载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并且可以含有配制剂诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者，活性成分可以是粉末形式，通过无菌固体的无菌分离或通过从溶液中冷冻干燥获得，例如在使用前用合适的负载体(例如无菌、无热原的水)配制。

[0116] 适用于口服的水溶液可以通过将活性组分溶解在水中并根据需要加入合适的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂来制备。适用于口服使用的水性混悬剂可以通过将细碎的活性组分分散在含有粘性物质的水中来制备，所述粘性物质诸如天然或合成的胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或其他公知的悬浮剂。

[0117] 用于在口腔中局部施用的组合物包括但不限于：在调味基质中包括活性剂的锭剂，所述调味基质通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶；在惰性基质诸如明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯胶中包括活性成分的软锭剂(pastille)；以及在合适的液体载体中包括活性成分的漱剂。

[0118] 通过常规方法，例如用滴管、移液管或喷雾器，将溶液或混悬液直接施用于鼻腔。所述组合物可以以单剂量或多剂量形式提供。在用于向呼吸道施用的组合物(包括鼻内组合物)中，化合物通常具有小的粒度，例如约5微米或更小的数量级。这种粒度可以通过本领域已知的方法获得，例如通过微粉化。

[0119] 药物制剂优选为单位剂型。在这种形式中，制剂被细分为包含适量活性组分的单位剂量。单位剂型可以是包装制剂，该包装包含离散量的制剂，诸如小瓶或安瓿中的包装片剂、胶囊和粉剂。此外，单位剂型可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身；或者它可以是适当数量的封装形式的这些中的任何一个。

[0120] 用于口服施用的片剂、胶囊和锭剂以及用于口服施用的液体是优选的组合物。用于鼻腔或呼吸道的溶液或悬浮液是优选的组合物。优选用于表皮局部施用的经皮贴剂。

[0121] 关于制剂和施用技术的进一步细节可以发现于最新版的Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co., Easton, PA)。

[0122] 在某些实施方式中，包括根据本公开的方法施用的组合物的本发明的组合物还可以包括一种或多种赋形剂，最优选一种或多种营养或药物赋形剂。含有一种或多种赋形剂并掺入一种或多种益生菌的组合物可通过本领域已知的方法制备。任选地，组合物可包括一种或多种佐剂、赋形剂、载体、缓冲剂、稀释剂和/或其他常规药物助剂。例如，益生菌可以与普通和常规的阻隔剂(barrier)、粘合剂、稀释剂和赋形剂一起配制成片剂、胶囊剂、粉

剂、混悬剂、用于口服施用的溶液、用于肠胃外施用(包括静脉内、真皮内、肌内和皮下施用)的溶液,以及用于施加于贴剂上以用于经皮施用的溶液。

[0123] 在某些实施方式中,包括根据本公开的方法施用的营养品组合物的营养品组合物可以包括药学上可接受的载体并且可以与药学上可接受的载体联合施用。在某些实施方式中,这类制剂中的活性组分可包括按重量计约1%至按重量计约99%。在其他实施方式中,这类制剂中的活性组分可包括按重量计约0.1%至按重量计约99.9%。“药学上可接受的载体”是指与制剂的其他成分相容并且对使用者无害的任何载体、稀释剂或赋形剂。有用的赋形剂包括但不限于微晶纤维素、硬脂酸镁、硬脂酸钙、任何可接受的糖(例如甘露醇、木糖醇)等,并且对于化妆品用途,可以使用水基或油基或其混合物,包括诸如乳剂。

[0124] 施用途径

[0125] 菌株克劳氏芽孢杆菌CSI08或包括本发明菌株的组合物可以通过任何途径施用,包括但不限于口服、舌下、口腔、眼、肺、直肠、阴道、尿道、输尿管和胃肠外施用,或作为口服或鼻腔喷雾剂(例如,雾化蒸气、液滴或固体颗粒的吸入)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌内、动脉内、腹腔内、鼻内、阴道内、膀胱内(例如至膀胱)、真皮内、经皮、局部或皮下施用。在本发明的范围内还考虑了将药物组合物以受控制剂的形式滴注到患者体内,并在稍后的时间发生药物的全身或局部释放。例如,药物可以位于储库中,用于控释到循环中,或用于释放到局部位置。

[0126] 本发明的药物组合物可以是适合于并配制用于上述任何途径的药物组合物,包括例如口服、直肠、支气管、鼻、肺、局部(包括颊和舌下)、经皮、阴道、尿道、输尿管或胃肠外(包括皮肤、皮下、肌内、腹腔内、静脉内、动脉内、脑内、眼内注射或输注)施用,或适于通过吸入或吹入施用的形式,包括粉末和液体气雾剂施用,或通过持续释放系统施用。持续释放系统的合适实例包括含有本发明化合物的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质可以是成形制品的形式,例如薄膜或微胶囊。

[0127] 结合以下实施例,可以进一步理解上述实施方式。此外,提供以下非限制性实施例来说明本发明。然而,本领域技术人员将理解,对于本发明的任何给定实施方式,可能需要改变过程,例如改变顺序或步骤。

[0128] 实施例

[0129] 实施例1

[0130] 克劳氏芽孢杆菌CSI08菌株的特性研究

[0131] 温度稳定性:

[0132] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在PBS(pH7.72)中45°C下稳定,以及75°C下30秒至3分钟内稳定,90°C处理3分钟后孢子数量有所减少。

[0133] 图4示出在巴氏杀菌过程中MuniSpore在PBS中的稳定性。数据代表平均值±SEM。孢子计数与0min相比。 $*p<0.0001$ 。

[0134] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在巴氏杀菌过程中以及在用于食品和饮料的其他生产方法中是稳定的。

[0135] 菌株示出胆汁稳定性,并且菌株示出酸稳定性。克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在酸性和胆汁盐条件下在营养肉汤培养基中24小时的生存性。在与酸性条件或胆汁盐条件的浓缩营养肉汤接触3小时后,克劳氏芽孢杆菌CSI08的总孢子计数没有显示出显著的生存力或浓

度降低。在最极端的条件 (pH1.2和0.45%胆汁盐浓度) 下,24小时后观察到计数显著减少。pH值和胆汁盐在这些浓度和暴露下,都大大超过了胃和肠道的条件。

[0136] 图5示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在0-、3-和24-小时时间点的pH生存性。

[0137] 图6示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在0-、3-和24-小时时间点的胆汁盐的生存性。

[0138] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子对1.2以上的酸性条件不敏感达24h,对胆汁盐浓度高达0.30%的抗性达24h。因此,克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子可以在低pH食物和饮料(例如果汁)以及胃和肠条件下存活。

[0139] 该菌株示出耐热性。克劳氏芽孢杆菌CSI08芽孢在PBS (pH7.72) 中45°C下稳定,并且75°C下30秒至3分钟内稳定,90°C处理3min后孢子数量有所减少。

[0140] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在巴氏杀菌过程中以及在食品和饮料的其他生产方法中是稳定的。

[0141] 研究了克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在体外模拟消化过程(胃期:0.3%胃蛋白酶,pH=3,进行2h;小肠期:0.1%胰酶,0.3%胆汁盐,pH7.5,进行2h)的生存性。暴露于简化的胃和小肠条件后,检测到克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子计数未减少。在小肠期鼠李糖乳杆菌数量减少。

[0142] 结果示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子能够在通过上消化道期间中有效地存活。

[0143] 图7示出克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子和鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) GG在体外模拟的胃和小肠消化条件下的存活。数据代表平均值±SEM。存活率与0h相比,*P<0.0001。

[0144] 该菌株产生以细菌素形式存在的天然抗菌物质。

[0145] 繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08对常见的肠道病原体大肠杆菌和沙门菌属具有活性,具有保护和恢复肠道微生物群落的潜力。

[0146] 繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08也被证明在液体培养基中对众所周知的皮肤和泌尿道病原体铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 具有抗微生物活性。

[0147] 表4

[0148] 抗微生物活性

条件	抑制能力		
	大肠杆菌	沙门肠炎杆菌	铜绿假单胞菌
[0149] 固体培养基	+	+	-
液体培养基	+	+	+

[0150] 表4克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子示出对常见病原体的抗微生物活性。检测到抗微生物活性(+),未观察到抗微生物活性(-)。

[0151] 繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08在液体培养基中对大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 和铜绿假单胞菌具有抗微生物活性。

[0152] 图8和9示出Munispore (克劳氏芽孢杆菌CSI08) 在液体培养物中的抗微生物活性。数值代表平均浓度 10^6 CFU/ml ± 标准偏差。*p<0.05,***p<0.0001。

[0153] 因此,繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08具有排挤细菌病原体并维持健康的肠道和皮肤微生物群系的潜力。

[0154] 抗氧化活性:比较了鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) GG (DI_AS_030) 与繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08的总抗氧化活性。

- [0155] 与鼠李糖乳杆菌GG相比,Munispore具有更高的抗氧化活性。
- [0156] 图10示出克劳氏芽孢杆菌CSI08和鼠李糖乳杆菌GG的总抗氧化能力。结果显示了Trolox当量的平均浓度,单位为纳摩尔(nmole)/g(n=3)±标准误差。
- [0157] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子中Trolox当量浓度水平的增加可以中和反应性氧化物质的影响。克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子中的抗氧化特性使该菌株能够充当抗氧化酶和分子的生产者,从而减轻氧化损伤。
- [0158] 因此,克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子是潜在的益生菌,具有很强的抗氧化特性。
- [0159] 使用细胞培养模型和氧化应激的体内秀丽隐杆线虫模型证实了繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08的抗氧化活性。
- [0160] 繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08减弱了过氧化氢诱导的上皮细胞(HT-29细胞系)中细胞生存力的降低。
- [0161] 繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08减弱了氧化应激后过氧化氢诱导的秀丽隐杆线虫N2存活率的降低。
- [0162] 图11示出在暴露于H₂O₂的上皮之上的繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08的细胞保护作用。数值为平均值±SEM。*P<0.0001 vs H₂O₂
- [0163] 图12示出用10⁸和10⁹CFU/ml克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养,然后通过H₂O₂引起氧化应激的秀丽隐杆线虫(C.elegans)N2的存活率。NGM-对照喂养的线虫;维生素C-阳性对照。数值是两个独立实验的平均值(n=100/条件)。*p<0.05 vs NGM(+H₂O₂)。
- [0164] 克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子在哺乳动物细胞系和宿主生物体中表现出氧化应激的逆转。
- [0165] 粘附能力和细胞毒性作用:繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08不影响肠上皮细胞(HT-29模型)的生存力。
- [0166] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体和孢子对产黏液细胞系HT-29-MTX具有显著的粘附能力。
- [0167] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体和孢子对非黏液产生肠上皮细胞系(HT-29)的粘附可忽略不计,图未显示。
- [0168] 图13示出繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08对HT-29细胞生存力的影响。克劳氏芽孢杆菌CSI08与未处理细胞(培养基)比较。数值为平均值±SEM。
- [0169] 图14示出克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体细胞和孢子对HT-29-MTX的粘附。克劳氏芽孢杆菌CSI08与发酵乳杆菌(L.fermentum)比较。数值为平均值±SEM
- [0170] 克劳氏芽孢杆菌CSI08不会对哺乳动物细胞生存力产生负面影响,并且可以粘附在肠壁上。
- [0171] 抗炎活性:在肠上皮的体外模型(HT-29细胞系)中研究了克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体及其无细胞上清液减弱LPS触发的促炎反应的能力。
- [0172] 用克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体而不是其上清液(CFS)预处理的HT-29细胞在暴露于LPS后,与促炎反应相关的基因表达的强烈抑制。
- [0173] 图15A和15B示出HT-29细胞系中由克劳氏芽孢杆菌CSI08对LPS诱导的促炎反应的调节。还显示了HT-29细胞与克劳氏芽孢杆菌CSI08及其CFS在未刺激条件(LPS-)下共孵育后的基因表达模式。\$p<0.05 vs LPS,#p<0.001与LPS,*p<0.0001 vs.LPS。

[0174] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体,而不是其无细胞上清液,可以减少由LPS在HT-29细胞中触发的促炎反应。

[0175] 热失活后,克劳氏芽孢杆菌CSI08部分保留了抑制由LPS在HT-29细胞中触发的促炎反应的能力。

[0176] 图16示出活的和热灭活的克劳氏芽孢杆菌CSI08对LPS诱导的IL8基因表达的调节。 $*p < 0.0001$ 。

[0177] 克劳氏芽孢杆菌CSI08可下调LPS诱导的HT-29细胞系中的NF- κ B活化。

[0178] 图17示出对照HT-29s、暴露于LPS的细胞和在添加LPS之前用克劳氏芽孢杆菌CSI08处理的细胞的核组分中的NF- κ B水平。根据t-检验,LPS与LPS+克劳氏芽孢杆菌 $*p < 0.001$ 。

[0179] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的免疫调节作用是通过Nf- κ B途径部分介导的。

[0180] 在肠上皮的体外模型 (HT-29细胞系) 中研究了繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08及其无细胞上清液减弱PolyI·C-触发的促炎反应 (病毒模拟物) 的能力。

[0181] 用CSI08及其上清液 (CFS) 预处理的HT-29细胞在暴露于PolyI·C后,与促炎反应相关的基因表达的显著抑制。

[0182] 图18A和18B示出HT-29细胞系中由克劳氏芽孢杆菌CSI08对PolyI·C-触发的促炎反应的调节。在与克劳氏芽孢杆菌CSI08或其无细胞上清液 (CFS) 预孵育的HT-29细胞中,暴露于PolyI·C后4小时,对IL-8、TNF- α 、IL-17C和CXCL10基因表达进行qPCR分析。 $\$p < 0.05$, $\&p < 0.01$; $\#p < 0.001$, $*p < 0.0001$ 。

[0183] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体及其无细胞上清液可降低由病毒模拟物PolyI·C触发的在HT-29细胞中的促炎反应。

[0184] 免疫作用:克劳氏芽孢杆菌CSI08可在U937衍生的巨噬细胞中激发强烈的免疫应答

[0185] 使用U937衍生的巨噬细胞的细胞模型研究了繁殖体克劳氏芽孢杆菌CSI08对先天性免疫系统的影响。

[0186] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的繁殖体刺激了强大的免疫应答,导致由巨噬细胞分泌高水平的促炎因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-18)、调节因子 (G-CSF、GM-CSF、IL-6) 和抗炎因子 (IL-10、IL-1RA、EGF)。

[0187] 图19示出CSI08的免疫刺激作用。U937衍生的巨噬细胞的细胞培养上清液中的细胞因子水平被繁殖体细胞克劳氏芽孢杆菌CSI08或LPS攻击5小时。数值为平均值 \pm SEM。 $*p < 0.05$, $\&p < 0.01$, $\%p < 0.001$; $\$p < 0.0001$ LPS或CSI08 vs NC (阴性对照)。 $++p < 0.05$; $+p < 0.0001$ CSI08 vs LPS。

[0188] 与对照条件-NGM培养基相比,克劳氏芽孢杆菌CSI08延长秀丽隐杆线虫N2蠕虫的寿命。这种影响是DAF-16依赖性的。

[0189] 图20示出在对照条件 (NGM) 下的秀丽隐杆线虫野生型N2菌株的寿命和用克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养的秀丽隐杆线虫野生型N2的寿命。两个独立分析的平均值 (n=100/复制/条件)。

[0190] 转录因子DAF-16 (FOXO的直系同源物) 介导克劳氏芽孢杆菌CSI08对秀丽隐杆线虫寿命的影响。

[0191] 数据表明克劳氏芽孢杆菌CSI08作为潜在的抗炎效应物或免疫激活剂的作用。

[0192] 图21示出在对照条件 (NGM) 下秀丽隐杆线虫daf-16突变体蠕虫的寿命和用克劳氏芽孢杆菌CSI08喂养的秀丽隐杆线虫daf-16突变体的寿命。两个独立分析的平均值 (n=100/复制/条件)。

[0193] 克劳氏芽孢杆菌CSI08在宿主生物体中表现出很强的免疫保护作用。

[0194] 克劳氏芽孢杆菌CSI08示出中度酪蛋白分解/蛋白酶活性。

[0195] 克劳氏芽孢杆菌CSI08在脱脂乳琼脂平板上的酪蛋白降解/酪蛋白分解活性呈弱阳性。

[0196] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的酪蛋白分解活性的定量分析使用采用荧光标记的酪蛋白衍生物的商业试剂盒评估。

[0197] 克劳氏芽孢杆菌CSI08显示中等蛋白酶活性 (鼠李糖乳杆菌作为阴性对照)。

[0198] 图22示出使用划线法,克劳氏芽孢杆菌CSI08有轻微的酪蛋白分解。该图还示出巨大芽孢杆菌和克劳氏芽孢杆菌CSI08具有酪蛋白分解活性。

[0199] 图23示出由EnzCheck®试剂盒试验测定的蛋白水解活性。数据代表平均值±SEM。

[0200] 克劳氏芽孢杆菌CSI08示出中度酪蛋白分解/蛋白酶活性

[0201] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的多样化碳水化合物同化谱:使用商业API 50CH试纸测试,克劳氏芽孢杆菌CSI08对49种碳水化合物中的20种呈阳性。

[0202] 这些碳水化合物主要是单糖诸如D-核糖、D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖和双糖诸如海藻糖、蔗糖、纤维二糖等。此外,克劳氏芽孢杆菌CSI08还能代谢属于生氰糖苷(苦杏仁苷(amygladin))、胺糖(氨基葡萄糖(glucosamine))和香豆素葡萄糖苷(七叶苷(aesculin))的化合物。克劳氏芽孢杆菌CSI08也能代谢多糖糖原,但代谢阿米登(Amidon)(淀粉)的能力较弱。

[0203] 表5

[0204] 由克劳氏芽孢杆菌CSI08发酵的碳水化合物

碳水化合物	克劳氏芽孢杆菌 CSI08	碳水化合物	克劳氏芽孢杆菌 CSI08
甘油	+	N-乙酰己糖胺	+
l-阿拉伯糖	+	苦杏仁苷	(+)
D-核糖	+	七叶苷柠檬酸铁	+
D-葡萄糖	+	D-纤维二糖	+
D-果糖	+	D-蔗糖	+
D-甘露糖	+	D-海藻糖	+
L-鼠李糖	+	D-柑籽糖	(+)
半乳糖醇	+	阿米登	(+)
D-甘露醇	+	糖原	(+)
D-山梨糖醇	+	D-塔格糖	+

[0206] 表5使用API 50Ch条有效发酵的碳水化合物列表。

[0207] 这些数据表明,克劳氏芽孢杆菌CSI08可以帮助消化肠道中的这些化合物。

[0208] 克劳氏芽孢杆菌CSI08是酯酶,并且具有磷酸酶和β-半乳糖苷酶:使用API ZYM试剂盒,克劳氏芽孢杆菌CSI08的酯酶、磷酸水解酶和β-半乳糖苷酶活性呈阳性,这表明

[0209] 克劳氏芽孢杆菌CSI08可以在适当的脂质源存在下通过酯酶的作用产生游离脂肪酸。

[0210] • β-半乳糖苷酶-催化乳糖水解为葡萄糖和半乳糖的酶,重要的是,负责形成低聚半乳糖(GOS),促进双歧杆菌(Bifidobacterium)和乳酸杆菌(Lactobacillus)物种的生长

[0211] • 磷酸水解酶催化磷酸盐的水解

[0212] • 未检测到有害酶活性(β-葡糖醛酸糖苷酶、α-糜蛋白酶和β-氨基葡萄糖苷酶)。

[0213] 表6

[0214] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的酶学特性

		克劳氏芽孢杆菌CSI08
酯酶活性	酯酶	+
	酯酶	+
脂肪酶活性	脂肪酶	-
肽酶活性	亮氨酸芳基酰胺酶	-
	缬氨酸芳基酰胺酶	-
	胱氨酸芳基酰胺酶	-
蛋白酶活性	胰蛋白酶	-
	α-糜凝乳蛋白酶	-
磷酸酶活性	酸性磷酸酶	-
	碱性磷酸酶	-
	磷酸水解酶	+
糖苷酶活性	α-半乳糖苷酶	-
	β-半乳糖苷酶	+
	β-葡萄糖醛酸酶	-
	α-葡萄糖苷酶	-
	β-葡萄糖苷酶	-
	β-氨基葡萄糖苷酶	-
	α-甘露糖苷酶	-
α-岩藻糖苷酶	-	

[0216] 表6使用API ZYM试剂盒的克劳氏芽孢杆菌CSI08的酶学特性

[0217] 这表明克劳氏芽孢杆菌CSI08具有分解乳糖和脂肪的潜在能力。这些数据表明,克劳氏芽孢杆菌CSI08可以帮助消化肠道中的这些分子。

[0218] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的蛋白质组学分析鉴定了具有潜在益生菌益处的蛋白质:

[0219] 将在TSB肉汤中生长24h的克劳氏芽孢杆菌CSI08的胞外分泌物送至质谱仪以鉴定由益生菌菌株释放的蛋白质。共检测到29种蛋白质,其中5种具有潜在的益生菌益处。

[0220] 表7

[0221] 克劳氏芽孢杆菌CSI08的蛋白质组学研究

目的蛋白	潜在角色
伴侣蛋白 GroEL	参与蛋白质折叠和保存
2,3-丁二醇脱氢酶	参与支链氨基酸的代谢-调味剂特性。
α -葡糖苷酶/ α -半乳糖苷酶	参与碳水化合物的消化
含胰蛋白酶样肽酶结构域的蛋白质	参与蛋白质的消化
C40 家族肽酶	参与蛋白质的消化

[0222] 这些蛋白

[0223] 这些数据证实了先前的体外结果,表明克劳氏芽孢杆菌CSI08能够如何有助于蛋白质和碳水化合物的消化,并能够有助于支链氨基酸的产生。

[0224] 克劳氏芽孢杆菌CSI08可以生产必需氨基酸和B族维生素:评估了克劳氏芽孢杆菌CSI08在液体培养基(TSB)培养期间合成必需氨基酸和维生素的能力。结果表明,由克劳氏芽孢杆菌CSI08产生几种氨基酸(丙氨酸、谷氨酰胺和谷氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、酪氨酸和苏氨酸)和两种B族维生素(泛酸/B5和氰钴胺/B12)。

[0225] 图24示出由RP-HPLC-FLD和RP-HPLC-MS相应地测定的克劳氏芽孢杆菌CSI08的过夜培养物中必需氨基酸和维生素的浓度。数值为平均值 \pm SEM。 $*p < 0.05$, $\&p < 0.01$, $\$p < 0.0001$ 。

[0226] 克劳氏芽孢杆菌CSI08可产生必需氨基酸和B族维生素

[0227] 实施例2

[0228] 评估对肠上皮的体外模型的粘附能力

[0229] 细胞系:将人结直肠腺癌细胞系HT-29和黏液分泌细胞系HT-29-MTX,使用补充有10%胎牛血清、2mM谷氨酰胺、100U/mi青霉素、100 μ g/ml链霉素和2 μ g/ml两性霉素B的低葡萄糖DMEM培养基,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂气氛中增殖。

[0230] 将细胞以5x10⁵细胞/孔的密度接种到24孔板上,并培养21-28天以完成成熟。培养基每2-3天更换一次。

[0231] 在实验之前,用0.5ml DPBS洗涤细胞两次。在第二轮洗涤后,从孔中完全吸出DPBS。

[0232] 孢子的制备:将十毫克的克劳氏芽孢杆菌CSI08、巨大芽孢杆菌MIT411和凝结芽孢杆菌CGI314孢子粉末称重于15ml Falcon管中,并重悬于10ml的不含抗生素的完全培养基中。将悬浮液等分并在-20 $^{\circ}$ C下储存直至使用。悬浮液在制备后2周内使用。

[0233] 粘附试验:将500 μ l的孢子悬浮液(1.3x10⁷-9.2x10⁷CFU/ml)加入到HT-29和HT-29-MTX细胞中,通过轻微的漩涡混合,并在37 $^{\circ}$ C的CO₂培养箱中孵育2.5h。制备不含哺乳动物细胞的对照孔,并以相同方式平行孵育(0.5ml的孢子悬浮液)。

[0234] 孵育后,用0.5ml PBS洗涤HT-29和HT-29-MTX细胞4次。之后,向孔中加入50 μ l胰蛋白酶/EDTA溶液和50 μ l PBS,并在37 $^{\circ}$ C下轻轻摇动(\sim 100rpm)孵育10min。向对照孔中加入五十微升胰蛋白酶/EDTA溶液。

[0235] 因此,将450 μ L的PBS添加到具有孢子的孔中,通过刮擦将孔的内容物转移到Eppendorf管中,并进行三轮剧烈振荡,每轮30秒。将对照孔的内容物转移到Eppendorf管中并进行一轮振荡。

[0236] 在PBS中制备系列稀释液(加上对照孔的稀释液),并铺在BC琼脂(凝结芽孢杆菌CGI314)或PetriFilmTM(克劳氏芽孢杆菌CSI08,巨大芽孢杆菌MIT411)上。平板在37 $^{\circ}$ C下孵育48h后计数,PetriFilm在37 $^{\circ}$ C下孵育24h后计数。

[0237] 实验进行两次或三次,每次实验进行三次技术重复。结果表示为平均值 \pm SEM。

[0238] 表8

[0239] 克劳氏芽孢杆菌CSI08、巨大芽孢杆菌MIT411和凝结芽孢杆菌CGI314孢子对HT-29-MTX细胞系的粘附

[0240]	对 HT-29-MTX 细胞系的粘附百分比	克劳氏芽孢杆菌 CSI08	巨大芽孢杆菌 MIT411	凝结芽孢杆菌 CGI314
	平均	12.10	20.68	19.68
	平均值的标准误差	0.7710	3.005	2.197

[0241] 表9

[0242] 克劳氏芽孢杆菌CSI08、巨大芽孢杆菌MIT411和凝结芽孢杆菌CGI314孢子对HT-29细胞系的粘附

[0243]	对 HT-29 细胞系的粘附百分比	克劳氏芽孢杆菌 CSI08	巨大芽孢杆菌 MIT411	凝结芽孢杆菌 CGI314
	平均	0.2578	1.499	0.8033
	平均值的标准误差	0.02035	0.2983	0.1781

[0244] 结论

[0245] 1. 上述结果表明,与非黏液分泌的细胞相比,孢子粘附于黏液分泌细胞系HT-29-MTX的能力更高,这可能是由于孢子的物理性质。

[0246] 2. 与克劳氏芽孢杆菌CSI08孢子相比,巨大芽孢杆菌MIT411和凝结芽孢杆菌CGI314孢子具有更高(但总体较低)的粘附非黏液产生细胞系HT-29的能力。

[0247] 实施例3

[0248] 克劳氏芽孢杆菌CSI08、巨大芽孢杆菌MIT411和芽孢杆菌混合物对健康成人的安全性、耐受性和胃肠道健康的评估:一项随机、双盲、安慰剂对照的试验。

[0249] 与含麦芽糊精的安慰剂对照进行比较,评估了每日施用 1×10^9 CFU克劳氏芽孢杆菌CSI08、 1×10^9 CFU巨大芽孢杆菌MIT411和益生菌混合物的安全性、耐受性和影响,所述益生菌混合物包括 0.5×10^9 CFU枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)DE111[®]、 0.5×10^9 CFU巨大芽孢杆菌MIT411、 0.5×10^9 CFU凝结芽孢杆菌CGI314、 0.5×10^9 CFU克劳氏芽孢杆菌CSI08(即枯草芽孢杆菌DE111[®]、巨大芽孢杆菌MIT411、凝结芽孢杆菌CGI314和克劳氏芽孢杆菌CSI08的总计数为 2.0×10^9 CFU)。共有98名研究参与者接受了45天的每日剂量,随后是2周的洗脱期。在整个45天内,每天保持一份问卷以记录上呼吸道、泌尿道和/或胃肠道不适

(complaint)的发生率和持续时间,并每天保持一份日记以记录粪便的规律性和粘稠度,从而记录依从性。在治疗期开始和结束时,收集粪便和血液样本进行微生物和血液学分析。在整个研究过程中,益生菌混合物显著降低了便溏的发生率。记录的呼吸、泌尿和胃肠道症状、排便频率和其他粪便粘稠度不受影响。施用期间和施用后,血液指标诸如肝肾功能无临床相关变化,未出现严重不良事件。在基线和治疗期结束时,通过对参与者进行的情绪问卷调查确定,包括悲伤、易怒、精力、食欲、紧张、压力、睡眠、心血管事件、疼痛和头晕在内的症状没有变化。同样,测量的炎性细胞因子、抗氧化剂水平、胆固醇、甘油三酯、游离氨基酸或矿物质未受影响。任何处理组的微生物区系的 α 或 β 多样性都没有负面变化。这些有希望的数据表明,这些治疗是安全且耐受性良好的,并且在更大的队列中进一步工作以确定这些潜在益生菌在选定的人口统计群体中的功效是合理的。

[0250] 益生菌是存在于人类肠道中的活微生物,具有低致病性或无致病性,并对宿主表现出有益作用。含有益生菌细菌的常见产品包括膳食补充剂和食品,诸如发酵乳制品、酸菜和意大利腊肠。益生菌补充剂在缓解各种疾病方面显示出积极的效果,诸如:抗生素相关腹泻、便秘、过敏和糖尿病。益生菌也表现出保护特性。

[0251] 益生菌补充剂可含有一种或多种对人体肠道产生不同影响的不同菌株。常见的益生菌菌株是乳酸生产菌诸如乳酸杆菌、双歧杆菌和链球菌(*Streptococcus*),这是由于它们对胃酸、胆汁盐和胰酶的耐受性。研究表明,乳酸菌在体外是致病性革兰氏阴性细菌(例如鼠伤寒沙门菌、艰难梭菌和大肠杆菌)定植的有效抑制剂。

[0252] 然而,并不是所有的益生菌补充剂都产生乳酸。枯草芽孢杆菌孢子已被用作人类和动物服用的益生菌、竞争性排斥剂和预防剂。所有四个杆菌菌株都是革兰氏阳性的,形成孢子的、杆状的细菌。在营养限制条件下,芽孢杆菌属的物种可以形成抵抗环境压力和营养缺乏的休眠内生孢子,使这些细菌成为益生菌补充剂的可行选择。

[0253] DE111、CSI08、CGI314和MIT411是益生菌的独特菌株。作为益生菌的芽孢杆菌菌株,它们能够抵抗恶劣的消化环境并在肠道中定植,从而支持健康的GI(胃肠)道。迄今为止,DE111作为益生菌食品成分和用于成人的益生菌胶囊在美国和加拿大销售。本试验中使用的其他三种芽孢杆菌益生菌CSI08、CGI314和MIT411目前未上市,在此要求保护。

[0254] 该试验旨在测定3种新型益生菌菌株的安全性,并评估其在降低健康成人的胃肠道问题和感染以及呼吸道感染的发生率和/或持续时间方面的功效。

[0255] 材料和方法

[0256] 受试者

[0257] 从2021年二月到七月,通过传单、海报和医师募集18-65岁的健康成人志愿者。纳入标准包括:愿意提供知情同意和整体健康状况良好。排除标准包括:存在任何先前已存在的不良事件(例如胃溃疡、克罗恩病、UC、糖尿病、肾病、HIV/AIDS、肝炎、癌症和器官移植接受者)、服用治疗消化不良(便秘、腹胀或腹泻)的药物,在随机分组前四周内使用抗生素,不愿意停用除本研究提供的益生菌补充剂以外的任何益生菌补充剂,已知免疫缺陷或使用免疫抑制药物,妊娠,产后6个月或哺乳期,在研究过程中计划怀孕的育龄妇女,参与另一项研究以及使用情绪药物(例如抗抑郁药、抗焦虑药、抗精神病药)。

[0258] 这项研究得到了斯洛文尼亚卢布尔雅那大学生物技术学院营养研究伦理委员会(University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Nutritional Research Ethics

Committee)的批准,并根据《赫尔辛基宣言》(Declaration of Helsinki)制定的指导方针进行。所有参与者都被告知研究的目的、要求和风险,并告知他们可以随时退出研究。参与者提供了他们的书面同意书,表明他们完全了解研究方案。

[0259] 实验设计

[0260] 本研究是一项双盲、安慰剂对照、随机、平行的试验。该研究通过斯洛文尼亚马里博尔大学临床中心(University Clinical Centre Maribor, Slovenia)进行,并由斯洛文尼亚CRO Vizera d.o.o.协调。参与者被随机分配到三个治疗组中的一个,或每天服用安慰剂。治疗组每日施用 1×10^9 CFU/剂的克劳氏芽孢杆菌CSI08、 1×10^9 CFU/剂的巨大芽孢杆菌MIT411和包括枯草芽孢杆菌DE111®、巨大芽孢杆菌MIT411、凝结芽孢杆菌CGI314和克劳氏芽孢杆菌CSI08的益生菌混合物,所述益生菌混合物总计数为 2.0×10^9 CFU/剂。安慰剂为大米麦芽糊精。

[0261] 随机分组方案由斯洛文尼亚的CRO Vizera d.o.o.执行,分配顺序在随机分组日之前在密封的不透明信封中,对研究人员和参与者隐藏。在评估基线特征(年龄、性别、身高、体重(通过数字秤))并收集初始粪便样品后,打开信封并将参与者分配到干预方案。研究人员收到了单独密封的信封,其中包含特定参与者的随机分组编号和治疗组之间的联系。密封的信封只有在紧急情况下才能打开。如果参与者的治疗在研究过程中被揭盲,则立即通知主办方。关于揭盲的信息必须记录在数据源文件和参与者的病例报告表(CRF)中。然后,参与者被要求每天在用餐结束时服用一粒胶囊。

[0262] 参与者访问研究中心3次,并与指定研究者进行了2次通话:第0次访视用于筛选目的(筛选访视),治疗期间2次访视,其中第1次访视为基线访视,其中进行了产品的随机分组,第2次访视为治疗结束访视。此外,患者在服用产品21天后(两次访视之间的通话)和第2次访视随访2周后(随访电话)与研究进行了电话交谈。研究的图形流程图如图25所示。

[0263] 在筛选、同意和随机分组后,参与者在任何治疗前提供血液和粪便样品。在45天的干预期结束时,研究参与者提供第二份粪便样品,并再次提供血液样品。

[0264] 图25示出研究设计的图形流程图。

[0265] 益生菌施用方案

[0266] 迪兰益生菌和酶有限公司(Kennesaw, Georgia, US)提供的研究产品为相同的长方形300mg胶囊,安慰剂在外观上无法区分。研究胶囊由未与研究人员或参与者接触的研究合作者提供,装在标有治疗代码的瓶中。

[0267] 研究方案

[0268] 参与者每天完成调查问卷,以根据Bristol粪便图表指数监测排便时间和粪便样品类型,以及是否有任何症状,包括:胃肠道不适、呼吸窘迫、泌尿道症状、头侧的、耳鼻喉、行为、呕吐、食欲不振、发热和表皮症状。如果在试验期间去看他们的家庭医生(GP)或开了任何药物,这也会被记录并报告。在基线和治疗期结束时,对参与者进行情绪问卷调查,以评估他们前一个月的体验。该问卷包括14种症状,包括悲伤、易怒、精力、食欲、紧张、压力、睡眠、心血管事件、疼痛和头晕,评分范围为1(无明显症状)至3(严重)。向研究人员报告任何不良事件。

[0269] 血样采集与制备

[0270] 对于安全血液,使用3-mL红盖血清促凝剂管(Greiner Bio-One, 454029)进行血液

采集。使用3.5mL SST II Advanced/gel黄盖瓶(Greiner Bio-One,454029)测定生化血液样本高密度脂蛋白和低密度脂蛋白、总胆固醇和甘油三酯。为了测定抗氧化剂和细胞因子,将全血收集到4-mL含锂肝素的试管(Greiner Bio-One,454029)中。通过2000G离心15min制备血浆样品。将上清液等分并储存在-80°C下用于后续分析。

[0271] LDL、HDL、总胆固醇和甘油三酯测定

[0272] 在斯洛文尼亚马里博尔大学临床中心进行了血液学和生物化学评估。安全血液用SysmexEN-1000运行,而LDL、HDL、总胆固醇和甘油三酯的生化测定根据制造商的说明进行,并用Abbott Allinity C进行分析。

[0273] 细胞因子定量

[0274] 根据制造商的说明书,通过夹心ELISA测定血清样品中IL-8和TNF- α 的浓度:人IL-8(CXCL8)ELISA试剂盒(ELH-IL8-1,RayBiotech)和人TNF α ELISA试剂盒(ELH-TNF α -1,RayBiotech)。在ELISA之前,使用试剂盒提供的稀释缓冲液将血清样品按1:2稀释。

[0275] 抗氧化活性测定

[0276] 根据制造商的说明,使用总抗氧化能力测定试剂盒(Sigma,Ireland)评估总抗氧化活性,并在340nm处测量吸光度。

[0277] 粪便收集

[0278] 使用Zymokit DNA/RNA Shield™粪便收集管(ZymoResearch,California,US)在治疗前的基线访视时收集粪便,并在第45天的最后访视时再次收集粪便。参与者被指示在排便后立即将含有样品的收集系统放置在冰上,并将样品运送给临床就诊的研究人员。

[0279] DNA提取及16S rRNA测序

[0280] 根据制造商的说明,使用ZymoBIOMICS DNA Miniprep试剂盒(Zymo Research,Irvine,CA,USA)从约200mg样品中提取总粪便DNA。简言之,将粪便样品置于包含750 μ l ZymoBIOMICS™裂解液的ZR BashingBead™裂解管中,并在BeadBug™ 6匀浆器(Benchmark Scientific,中国)中进行处理:以4350rpm的转速进行5x 1min的震荡,震荡周期之间有1min的间歇步骤。之后,将裂解管以10,000g离心1分钟。将四百微升上清液转移至收集管中的Zymo-Spin™III-F过滤器,并进一步以8,000g离心1分钟。将滤液与1,200 μ l的ZymoBIOMICS™ DNA结合缓冲液混合,转移至收集管中的Zymo-Spin™IICR柱,并以10,000g离心1分钟。三轮洗涤后,在100 μ l的ZymoBIOMICS™无DNase/RNase水中洗脱DNA,并根据方案使用Zymo-Spin™III-HRC过滤器进一步纯化。使用Qubit dsDNABR测定试剂盒(ThermoFisher Scientific)测定DNA浓度。

[0281] 数据生成

[0282] 按照16S宏基因组测序文库制备的Illumina指南(https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)进行文库制备。简言之,使用16S简并引物从每个样品中扩增靶标。同时,包括Illumina接头和条形码,以允许创建库。在产生双端(paired-end)250bp读段(reads)的Novaseq 6000机器上进行测序。使用QIIME2软件对测序数据进行质量控制。平均每个样品产生67万个读段对。使用QIIME2/DADA2和Silva132数据库进行ASV(也称为OTU)的分类学分类。

[0283] 统计分析

[0284] 测定每组 (arm) 25名参与者足以评估可能的不良事件的发生及性质,包括泌尿道、胃肠道和上呼吸道不适的发生和持续时间。在本研究中,使用描述性统计来评估这些结果。克鲁斯卡尔-沃利斯 (Kruskal-Wallis) 检验用于证实,在研究开始时,四个治疗组中任何这些个别症状的发生率,或在研究期间胃肠道、上呼吸道或泌尿道不适的发生率和持续时间,均无统计学上的显著差异。此外,在对三个益生菌产品组与安慰剂组进行成对比较时,使用经Holm校正的非参数曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U检验。

[0285] 对于胃肠道健康问卷和血液分析,使用方差分析 (单因素ANOVA检验) 比较各治疗组之间从基线到治疗期结束的个体症状评分变化的差异,并进行事后检验,评估三个治疗组中的每一个与安慰剂组之间的成对比较。

[0286] 对于测序数据,计算多个 α 多样性指数,包括Observed、Chao1、ACE、香农 (Shannon) 和辛普森 (Simpson) 指数。然后比较了实验组之间以及实验组与安慰剂的 α 多样性,以检测从基线到治疗后时间点的治疗差异或治疗内的差异。

[0287] 为了量化不同样品之间的成分相异性,计算了Bray-Curtis相异性指数,并将其用于创建多重聚类图 (multiple clustering plot)。该方法从多个维度整合 (collapse) 信息,以便于可视化和解释。使用配对Wilcoxon检验来比较各组的分布。

[0288] 进行差异丰度分析,以检测不同治疗和时间点之间属丰度的显著差异。将所有治疗的第1天样品与第1天安慰剂组进行比较,以确定基线时是否存在任何静息差异。对每组进行第45天与第1天的成对比较。还使用安慰剂组作为参照进行双因素分析,以检测与安慰剂组在第45天相对于第1天的反应相比,治疗反应在第45天相对于第1天的是否存在显著差异。

[0289] 结果

[0290] 参与者

[0291] 九十八名参与者完成了45天的干预 (图25)。筛选后,一名参与者拒绝参加,另一名参与者因怀孕而退出。研究中共报告了12例不良事件。其中包括胃食管反流 (3例AE (不良事件))、皮疹 (2例AE) 和眩晕 (2例AE)。一例皮疹病例报告为真菌性皮疹 (体癣),一例眩晕病例归因于使用经批准的联合用药。所有其他报告的AE仅发生一次,即:阴道炎症、粪便寄生虫 (可能与海外旅行有关)、右手腕扭伤 (right wrist spin)、金属味、下背部疼痛、皮脂腺炎症、肉芽肿、深褐色粪便和痤疮。

[0292] 因果关系评估显示,报告的AE与研究产品之间没有关系。

[0293] 整个研究过程中未报告严重不良事件。

[0294] 参与者基本信息

[0295] 表10

[0296] 用于研究的参与者基本信息

	安慰剂 N = 24	克劳氏芽孢杆菌 N = 24	巨大芽孢杆菌 N = 25	益生菌混合物 N = 25
[0297] 男性 (%)	7(29.2)	9(37.5)	7(28)	7(28)
女性(%)	17(70.8)	15(62.5)	18(72)	18(72)
平均年龄(SD)	40.5(12.3)	37.3(12.7)	40.6(9.6)	35(11.6)
年龄 (最小-最大)	22 - 63	19 - 65	23 - 58	18 - 60
平均身高(SD)	172(0.1)	172(0.1)	172(0.08)	171(0.09)
身高 (最小-最大)	152 - 189	158 - 192	160 - 186	155 - 190
平均体重(SD)	73.9(16.2)	70.7(16.1)	78.1(15.8)	70.2(14.7)
体重 (最小-最大)	52 - 112	48 - 106	45 - 120	50 - 101.5

[0298] 筛查访视时的胃肠道健康状况:

[0299] 表11

[0300] 基线处的胃肠道健康 (n=98)。(上个月您遇到以下问题的频率如何?)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N *= 25)
[0301] 腹泻(p = 0.499)	24	24	25	25
无问题或<1/月(%)	22(91.7)	24(100.0)	23(92.0)	24(96.0)
按月(%)	2(8.3)	0(0.0)	2(8.0)	1(4.0)
按周(%)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
按日(%)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
便秘(p = 0.771)	24	24	25	25

	无问题或<1/月(%)	12(50.0)	16(66.7)	16(64.0)	15(60.0)
	按月(%)	10(41.7)	6(25.0)	7(28.0)	8(32.0)
	按周(%)	1(4.2)	1(4.2)	1(4.0)	0(0.0)
	按日(%)	1(4.2)	1(4.2)	1(4.0)	2(8.0)
	便秘(p = 0.625)	24	24	25	25
	无问题或<1/月(%)	16(66.7)	18(75.0)	20(80.0)	20(80.0)
	按月(%)	6(25.0)	4(16.7)	4(16.0)	3(12.0)
	按周(%)	0(0.0)	1(4.2)	1(4.0)	2(8.0)
	按日(%)	2(8.3)	1(4.2)	0(0.0)	0(0.0)
	肠鸣音/胃鸣音(p=0.745)	24	24	25	25
	无问题或<1/月(%)	13(54.2)	16(66.7)	17(68.0)	18(72.0)
	按月(%)	8(33.3)	5(20.8)	5(20.0)	3(12.0)
	按周(%)	3(12.5)	2(8.3)	3(12.0)	4(16.0)
	按日(%)	0(0.0)	1(4.2)	0(0.0)	0(0.0)
	痉挛/胃痛(p=0.880)	24	24	25	25
	无问题或<1/月(%)	18(75.0)	17(70.8)	21(84.0)	18(72.0)
	按月(%)	4(16.7)	6(25.0)	2(8.0)	6(24.0)
	按周(%)	2(8.3)	0(0.0)	2(8.0)	1(4.0)
	按日(%)	0(0.0)	1(4.2)	0(0.0)	0(0.0)
	胀气(p = 0.153)	24	24	25	25
	无问题或<1/月(%)	12(50.0)	9(37.5)	7(28.0)	16(64.0)
	按月(%)	6(25.0)	9(37.5)	10(40.0)	5(20.0)
	按周(%)	4(16.7)	5(20.8)	3(12.0)	3(12.0)
	按日(%)	2(8.3)	1(4.2)	5(20.0)	1(4.0)
	腹胀(p = 0.136)	24	24	25	25
	无问题或<1/月(%)	12(50.0)	14(58.3)	9(36.0)	15(60.0)
	按月(%)	8(33.3)	7(29.2)	9(36.0)	8(32.0)
	按周(%)	3(12.5)	3(12.5)	4(16.0)	2(8.0)
	按日(%)	1(4.2)	0(0.0)	3(12.0)	0(0.0)
	便血(p = 0.393)	24	24	25	25
	无 (%)	23(95.8)	23(95.8)	24(96.0)	22(88.0)
	很少 (%)	0(0.0)	1(4.0)	2(8.0)	0(0.0)
	偶尔 (%)	1(4.2)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.2)
	经常 (%)	0(0.0)	0(0.0)	1(4.0)	0(0.0)

[0303] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*克鲁斯卡尔-沃利斯检验的p-值

[0304] 对于任何个体读数,组之间均无显著差异。

[0305] 粪便粘稠度和规律性

[0306] 研究参与者的平均肠蠕动频率(规律性)范围为0.33至2.16便次/天。各种时期和干预组的比较得出的结论是并不相同。与安慰剂治疗组或洗脱期相比,肠蠕动频率没有显著差异(表12)。

[0307] 表12

[0308] 与安慰剂相比,在45天的试验期间,治疗对粪便规律性没有影响

	安慰剂 (N = 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N = 24)	巨大芽孢杆菌(N = 25)	益生菌混合物 (N = 25)	
[0309]	每日粪便次数(p = 0.834)*				
	平均 (SD):	1.21 (0.41):	1.2 (0.39):	1.1 (0.3):	1.19 (0.45):
	最小-最大	0.36 -2.04	0.52 -2.13	0.51 -2.04	0.33 -2.16

[0310] *ANOVA检验的p-值

[0311] 粪便粘稠度报告为总治疗期内具有便溏的参与者的比例和具有硬便的参与者的比例。基线调查问卷显示,与对照组相比,研究组便溏或硬便/便秘的发生率没有差异(表2)。参与者被要求报告在过去的一个月里,他们便溏或硬便/便秘的频率。等级如下:0=从不,1=每月,2=每周,3=每天。

[0312] 图26示出与安慰剂对照相比,益生菌混合物在研究过程中显著降低了便溏的发生率。

[0313] 在前6周的研究过程中,与对照组相比,益生菌混合物显著降低了便溏的发生率(图26),这是通过重复测量单因素ANOVA确定的(治疗: $F_{(2,615,13.08)} = 20.07; P < 0.0001$;时间($F_{(5,15)} = 2.803, p = 0.055$)。在研究参与者中,益生菌组的25人中有16人报告在整个研究过程中没有出现便溏,而安慰剂组只有8人,克劳氏芽孢杆菌组有10人,巨大芽孢杆菌组有10人。

[0314] 图27显示,与安慰剂对照相比,任何治疗对硬便百分比均无影响。

[0315] 在整个研究过程中,任何治疗组对硬便百分比均无显著影响(图27) ($F_{(1,829,9.146)} = 2.831, P = 0.113$;时间($F_{(5,15)} = 1.121, p = 0.391$)。

[0316] 胃肠道症状的发生率和持续时间

[0317] 表13

[0318] 在研究过程中,参与者日记中报告的胃肠道不适症状的天数

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N *= 25)
[0319]				

[0320]	食欲不振 (p* = 0.233)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.3): 0 - 1	0.2 (1.0): 0 - 5	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0
	p-值 vs 安慰剂	/	0.589	0.434	0.434
	腹泻 (p* = 0.888)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.3): 0 - 1	0.4 (1.3): 0 - 6	0.1 (0.3): 0 - 1	0.2 (0.6): 0 - 3
	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	1.000	1.000
	便秘 (p* = 0.722)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.5 (2.4): 0 - 12	0.3 (1.4): 0 - 7	0.3 (1.4): 0 - 7	0.6 (2.2): 0 - 8
	p-值 vs 安慰剂	/	0.976	1.000	1.000
	呕吐 (p* = 0.713)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.3): 0 - 1	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (0.2): 0 - 1	0.0 (0.2): 0 - 1
	p-值 vs 安慰剂	/	0.611	1.000	1.000
	气体 (p* = 0.468)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.6 (1.5): 0 - 6	0.4 (1.1): 0 - 5	0.9 (1.7): 0 - 6	0.2 (0.6): 0 - 2
	p-值 vs 安慰剂	/	0.639	1.000	1.000
	肠鸣音(p* = 0.809)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.2 (0.6): 0 - 2	0.4 (1.6): 0 - 8	0.1 (0.3): 0 - 1	0.2 (0.7): 0 - 3
	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	1.000	1.000
	痉挛/胃痛 (p* = 0.391)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.5 (1.2): 0 - 5	0.5 (1.3): 0 - 5	0.3 (0.6): 0 - 2	0.1 (0.3): 0 - 1
	p-值 vs 安慰剂	/	0.987	1.000	1.000
	腹胀 (p* = 0.543)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	1.5 (5.1): 0 - 25	0.3 (1.1): 0 - 5	0.3 (0.7): 0 - 2	0.7 (2.1): 0 - 8
	p-值 vs 安慰剂	/	0.558	1.000	0.963

[0321] N* = ITT人群中包括的参与者人数, NC = 不可计算, p* = 克鲁斯卡尔-沃利斯检验的p-值, P = 曼-惠特尼U检验的p-值。

[0322] 克鲁斯卡尔-沃利斯检验显示, 各治疗组之间胃肠道感染症状的天数没有显著差异。与安慰剂相比, 包含益生菌的研究产品在出现胃肠道不适症状的天数方面没有表现出统计学上的显著差异。

[0323] 泌尿道症状的发生率和持续时间

[0324] 表14

[0325] 参与者日记中报告的泌尿道不适症状天数

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N *= 25)
[0326] 排尿时疼痛烧灼感(p* = 0.257)	24	24	25	25
平均 (SD): 最小 - 最大	0.2 (0.8): 0 - 4	0.0 (NC): 0-0	0.0 (NC): 0-0	0.0 (NC): 0-0
p-值 vs 安慰剂	/	0.635	1.000	1.000
更高频排尿 (p* = 0.744)	24	24	25	25
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0(NC): 0-0	0.0(NC): 0-0	0.2 (0.8): 0 - 4	0.1 (0.4): 0 - 2
p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.982	0.982
下腹或背部痉挛性压力 (p* = 0.254)	24	24	25	25
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0(NC): 0-0	0.0(NC): 0-0	0.2 (0.8): 0 - 3	0.1 (0.4): 0 - 2
p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.646	0.982

[0327] N*=ITT人群中包括的参与者人数,NC=不可计算,p*=克鲁斯卡尔-沃利斯检验的p-值,P=曼-惠特尼U检验的p-值。

[0328] 克鲁斯卡尔-沃利斯检验显示,各治疗组之间泌尿道感染症状的天数没有任何显著差异。与安慰剂相比,包括益生菌的研究产品在出现泌尿系感染症状的天数方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0329] 上呼吸道感染的发病率和持续时间

[0330] 表15

[0331] 参与者日记中报告的呼吸道不适症状天数

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
[0332] 发热(p* = 0.935)	24	24	25	25
平均 (SD): 最小 - 最大	0.2 (0.8): 0 - 4	0.3 (1.3): 0 - 6	0.2 (0.7): 0 - 3	0.3 (1.4): 0 - 7
p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.966	1.000
头痛(p* = 0.898)	24	24	25	25
平均 (SD): 最小 - 最大	1.0 (2.0): 0 - 7	0.9 (1.7): 0 - 6	0.6 (1.0): 0 - 4	0.4 (1.0): 0 - 4

	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.860	1.000
	鼻塞 (p* = 0.909)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小-最大	0.3 (1.0): 0 - 4	0.3 (1.1): 0 - 5	0.6 (2.2): 0 - 10	0.4 (2.0): 0 - 10
	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.689	1.000
	流鼻涕 (p* = 0.530)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.5 (1.6): 0 - 6	0.4 (1.2): 0 - 5	0.8 (2.1): 0 - 10	0.4 (2.0): 0 - 10
	p-值 vs 安慰剂	/	0.957	1.000	1.000
	咽喉痛 (p* = 0.142)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.5 (1.1): 0 - 4	0.2 (0.8): 0 - 4	0.4 (0.9): 0 - 3	0.6 (2.1): 0 - 10
[0333]	p-值 vs 安慰剂	/	0.539	0.870	1.000
	干咳 (p* = 0.868)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.6 (1.9): 0 - 8	0.1 (0.3): 0 - 1	0.4 (2.0): 0 - 10	0.1 (0.6): 0 - 3
	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	0.607	1.000
	湿性咳嗽 (p* = 0.395)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.4): 0 - 2	0.0 (NC): 0 - 0	0.4 (2.0): 0 - 10	0.4 (1.6): 0 - 8
	p-值 vs 安慰剂	/	0.459	1.000	0.983
	耳朵疼 (p* = 0.417)	24	24	25	25
	平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (0.2): 0 - 1
	p-值 vs 安慰剂	/	1.000	1.000	1.000

[0334] N*=ITT人群中包括的参与者人数,NC=不可计算,p*=克鲁斯卡尔-沃利斯检验的p-值,p=曼-惠特尼U检验的p-值。

[0335] 克鲁斯卡尔-沃利斯检验显示,各治疗组之间呼吸道感染症状的天数没有任何显著差异。与安慰剂相比,含有益生菌的研究产品在出现症状的天数方面没有表现出统计学上的显著差异。

[0336] 每日问卷分析

[0337] 表16总结了3个治疗组和安慰剂组在基线和研究结束时对情绪问卷的回答。显示了95%置信区间的平均值的变化。还提供了ANOVA综合检验 (p*-值) 和单样品T检验 (p-值) 的结果。肠-脑轴得分变化的正态性检验表明,数据不服从正态分布,这可能会影响具有临界显著性 (borderline significance) 的结果 (p-值在0.05和0.10之间)。这会影两个项目:乏力 (loss of energy) 和食欲变化。对这些项目进行了非参数克鲁斯卡尔沃利斯检验;观察到的p-值为0.111 (乏力) 和0.123 (食欲变化)。总体而言,在治疗期结束时,包括安慰剂组在内,评分的平均值强度降低 (参与者受这些症状的困扰较少)。因此,单样品T检验结果显示,在三分之一的测试 (共进行70次) 中,观察到肠-脑轴问卷得分具有统计学意义的变化。然而,包括安慰剂组在内的所有治疗组均可观察到这种情况。因此,ANOVA检验的结果显示,在治疗组之间未检测到肠-脑轴评分变化的显著差异,但观察到和食欲变化项目的临界显著性乏力。巨大芽孢杆菌组的参与者在这两个项目上经历了最大的变化。然而,未观察

到益生菌组与安慰剂成对比较的统计学上的显著差异(表16(下文))。

[0338] 表16

[0339] 在基线(N=98)和研究结束时(后(Post))的肠-脑轴问卷回答。(在过去30天内(包括今天),以下情绪或感觉对您造成了多大的困扰?)

[0340]

	安慰剂 (N *= 24)		克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)		巨大芽孢杆菌 (N *= 25)		益生菌混合物 (N *= 25)	
	基线	治疗后	基线	治疗后	基线	治疗后	基线	治疗后
悲伤 (p* = 0.264)								
分数总和	12	11	22	13	16	12	16	4
受影响的参与者的人数	9	9	14	11	11	8	11	4
气恼 (p* = 0.341)								
分数总和	21	14	28	20	25	16	28	12
受影响的参与者的人数	16	10	19	14	20	12	21	10
乏力 (p* = 0.076)								
分数总和	29	18	28	22	37	14	30	18
受影响的参与者的人数	19	14	17	15	21	10	20	11
食欲变化 (p* = 0.065)								
分数总和	8	7	12	12	19	6	7	5
受影响的参与者的人数	6	6	9	10	13	4	5	4
呼吸困难/呛噎 (p* = 0.129)								
分数总和	4	4	5	3	7	0	5	1
受影响的参与者的人数	4	3	3	3	5	0	5	1

心跳加速/狂跳 (p* = 0.744)								
分数总和	7	5	6	4	8	2	3	3
受影响的参与者的人数	6	3	4	3	5	2	3	3
睡眠问题 (p* = 0.915)								
分数总和	18	14	30	16	21	12	19	11
受影响的参与者的人数	12	10	15	11	15	10	14	8
注意力问题 (p* = 0.915)								
分数总和	18	8	28	15	20	8	16	5
受影响的参与者的人数	14	8	18	13	15	6	9	3
紧张/压力 (p* = 0.937)								
分数总和	27	17	27	18	24	13	32	18
受影响的参与者的人数	18	13	17	13	17	11	20	15
愤怒/紧张 (p* = 0.478)								
分数总和	17	11	19	13	19	9	23	8
受影响的参与者的人数	13	9	13	9	16	8	18	8
头痛 (p* = 0.511)								
分数总和	14	8	11	11	20	12	12	5
受影响的参与者的人数	10	6	8	8	13	10	10	4
肌肉酸痛/疼痛 (p* = 0.391)								
分数总和	13	6	9	8	12	5	11	7
受影响的参与者的人数	11	5	8	7	8	4	7	4
僵硬 (p* = 0.376)								
分数总和	8	2	9	5	12	2	6	4
受影响的参与者的人数	6	2	7	4	9	2	5	3
头晕 (p* = 0.732)								
分数总和	5	5	4	2	5	1	1	1
受影响的参与者的人数	4	3	3	2	4	1	1	1

[0342] N* = ITT人群中包括的参与者人数;得分:0-不困扰,1-轻度困扰,2-有些困扰,3-非常困扰。*ANOVA的p-值(综合检验)。

[0343] 胆固醇和甘油三酯水平

[0344] 在任何治疗之前,在研究开始时收集血样,并在45天治疗期结束时再次收集血样。组内治疗无显著影响,与高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、总胆固醇和甘油三酯浓度的基线相比,治疗也无任何显著影响(表17)。

[0345] 表17

[0346] 在基线和研究结束时的胆固醇和甘油三酯水平 (n=98)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
	HDL [mmol/L] (p = 0.749)			
	基线: 平均 (SD)	1.4 (0.2):	1.6 (0.3):	1.5 (0.4):
	结束后: 平均 (SD)	1.4(0.2)	1.5(0.3)	1.4(0.3)
	LDL [mmol/L] (p = 0.894)			
[0347]	基线: 平均 (SD)	3.3 (0.9):	3.5 (0.8):	3.7 (1.0):
	结束后: 平均 (SD)	3.3(0.9)	3.4(0.8)	3.7(1.0)
	TC [mmol/L] (p = 0.976)			
	基线: 平均 (SD)	5.3 (1.2):	5.6 (1.0):	5.9 (1.5):
	结束后: 平均 (SD)	5.0(1.1)	5.4(1.0)	5.6(1.2)
	TG [mmol/L] (p = 0.548)			
	基线: 平均 (SD)	1.0 (0.6):	1.0 (0.4):	1.8 (3.6):
	结束后: 平均 (SD)	1.2(0.7)	1.2(0.8)	1.7(2.6)

[0348] N*=ITT人群中包括的参与者人数,HDL=高密度脂蛋白,LDL=低密度脂蛋白,TC=总胆固醇,TG=甘油三酯。*ANOVA检验的p-值)

[0349] 血液细胞因子水平

[0350] 表18

[0351] 基线和研究结束时的IL-8和TNF α 水平 (n=98)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
	IL-8 [pg/mL] (p = 0.887)			
[0352]	基线: 平均 (SD)	99.65 (60.87):	105.4 (59.02):	100 (58.47):
	结束后: 平均 (SD)	94.17(70.96)	127(89.38)	120.3(82.96)
	TNF α [pg/mL] (p = 0.662)			
	基线: 平均 (SD)	445.2 (322.6):	490.7 (244.9):	358.7 (180.4):
	结束后: 平均 (SD)	452.7(345.3)	525.9(416.8)	473.2(331.4)

[0353] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*ANOVA的p-值(综合检验)

[0354] 在任何治疗之前,在研究开始时收集血样,并在45天治疗期结束时再次收集血样。组内治疗无显著影响,与IL-8或TNF α 的基线相比,治疗也无任何显著影响(表18)。

[0355] 血液抗氧化水平

[0356] 表19

[0357] 基线和研究结束时的抗氧化剂水平 (n=98)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
[0358]	Trolox 当量的浓度[纳摩尔/mL] (p = 0.831)			
	基线: 平均 (SD)	3898 (316.5):	3941 (319.8):	3855 (366.3):
	结束后: 平均 (SD)	3919(483.7)	4007(364.3)	3983(420.9)
				3943 (290):
				3916(361.5)

[0359] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*ANOVA的p-值(综合检验)

[0360] 在任何治疗之前,在研究开始时收集血样,并在45天治疗期结束时再次收集血样。组内治疗无显著影响,与抗氧化剂水平基线相比,治疗也无任何显著影响(表10)。

[0361] 代谢物水平

[0362] 表20

[0363] 基线和研究结束时的氨基酸水平 (n=98)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
天冬氨酸 [mg/L] (*p = 0.3752)				
基线: 平均 (SD)	1.947 (0.6):	1.427 (0.3):	1.382 (0.3):	2.183 (0.8):
结束后: 平均 (SD)	2.244 (1.1)	1.526 (0.6)	1.309 (0.5)	2.569 (1.0)
丝氨酸 [mg/L] (*p = 0.6652)				
基线: 平均 (SD)	16.891 (6.1):	11.094 (2.7):	15.203 (1.9):	14.255 (4.1):
结束后: 平均 (SD)	16.406 (4.3)	11.625 (3.5)	15.718 (5.5)	16.388 (4.5)
组氨酸 [mg/L] (*p = 0.8230)				
基线: 平均 (SD)	57.285 (14.6):	48.185 (8.7):	64.944 (12.2):	52.170 (11.1):
结束后: 平均 (SD)	59.280 (11.9)	51.156 (11.2)	71.494 (20.6)	59.894 (12.7)
精氨酸 [mg/L] (*p = 0.7104)				
基线: 平均 (SD)	28.951 (13.2):	21.006 (7.3):	25.925 (7.9):	21.759 (8.8):
结束后: 平均 (SD)	26.675 (11.3)	22.846 (8.8)	24.431 (11.6)	24.413 (11.1)
谷氨酰胺 [mg/L] (*p = 0.8118)				
基线: 平均 (SD)	18.254 (7.2):	10.970 (2.9):	16.626 (6.6):	15.973 (6.1):
结束后: 平均 (SD)	17.266 (6.0)	9.747 (3.3)	14.395 (6.7)	16.925 (6.2)
甘氨酸 [mg/L] (*p = 0.8067)				
基线: 平均 (SD)	17.272 (5.0):	12.164 (4.5):	20.620 (4.9):	14.508 (4.2):
结束后: 平均 (SD)	16.450 (4.1)	11.660 (3.2)	21.257 (8.0)	15.903 (3.5)
苏氨酸 [mg/L] (*p = 0.8875)				

[0364]

	基线: 平均 (SD)	12.658 (4.5):	9.641 (2.1):	12.005 (2.6):	11.847 (3.4):
	结束后: 平均 (SD)	12.939 (4.1)	9.574(2.3)	12.656(5.2)	13.365(3.7)
	丙氨酸 [mg/L] (*p = 0.5359)				
	基线: 平均 (SD)	27.476 (7.9):	19.316 (4.6):	25.346 (6.1):	23.329 (6.1):
	结束后: 平均 (SD)	25.796(7.3)	20.151(6.4)	25.924(9.5)	26.976(6.7)
	脯氨酸 [mg/L] (*p = 0.5683)				
	基线: 平均 (SD)	19.101 (6.3):	13.542 (3.8):	19.477 (3.0):	16.487 (4.7):
	结束后: 平均 (SD)	19.581(6.7)	14.221(3.6)	20.163(6.6)	20.570(5.8)
	酪氨酸 [mg/L] (*p = 0.4548)				
	基线: 平均 (SD)	10.617 (4.0):	7.542 (2.2):	11.594 (2.1):	9.326 (3.5):
	结束后: 平均 (SD)	10.337(2.7)	7.786(2.0)	11.759(3.4)	11.112(3.0)
	缬氨酸 [mg/L] (*p = 0.8116)				
	基线: 平均 (SD)	16.720 (4.2):	12.976 (2.9):	19.415 (3.1):	16.746 (4.4):
	结束后: 平均 (SD)	17.916(5.0)	13.512(4.3)	20.359(4.7)	19.411(3.9)
[0365]	蛋氨酸 [mg/L] (*p = 0.5286)				
	基线: 平均 (SD)	2.850 (1.0):	2.117 (0.5):	2.710 (0.4):	2.546 (0.8):
	结束后: 平均 (SD)	2.926(0.9)	2.280(0.7)	2.803(0.9)	3.037(0.7)
	赖氨酸 [mg/L] (*p = 0.3400)				
	基线: 平均 (SD)	22.722 (6.5):	17.765 (4.1):	20.404 (4.5):	22.181 (5.3):
	结束后: 平均 (SD)	24.508(6.5)	18.470(6.8)	20.734(6.6)	27.171(7.1)
	异亮氨酸 [mg/L] (*p = 0.9065)				
	基线: 平均 (SD)	6.354 (2.0):	4.684 (1.1):	6.754 (1.1):	6.236 (1.6):
	结束后: 平均 (SD)	6.955(2.2)	5.149(1.9)	7.321(1.8)	7.412(1.7)
	亮氨酸 [mg/L] (*p = 0.6745)				
	基线: 平均 (SD)	13.418 (5.2):	9.122 (2.3):	13.446 (2.0):	12.612 (3.9):
	结束后: 平均 (SD)	13.865(4.7)	9.694(3.6)	14.082(3.6)	15.162(3.6)
	苯丙氨酸 [mg/L] (*p = 0.6375)				
	基线: 平均 (SD)	8.701 (3.2):	6.138 (1.3):	9.376 (1.6):	7.864 (2.1):
	结束后: 平均 (SD)	8.586(2.1)	6.460(1.7)	9.870(2.5)	8.925(2.1)

[0366] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*ANOVA的p-值(综合检验)

[0367] 在任何治疗之前,在研究开始时收集血样,并在45天治疗期结束时再次收集血样。组内治疗无显著影响,与所测试氨基酸基线相比,治疗也无任何显著影响(表20)。

[0368] 表21

[0369] 在基线和研究结束时的矿物质水平(n=98)

	安慰剂 (N *= 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
[0370]	核黄素 [µg/L] (*p = 0.4222)			
	基线: 平均 (SD)	452 (16):	453 (12):	455 (27):
				453 (13):

	结束后: 平均 (SD)	451(16)	450(9)	450(12)	457(17)
	烟酸 B3 [$\mu\text{g/L}$] (*p=0.6467)				
	基线: 平均 (SD)	7(0.33):	7(0.42):	8(0.45):	7(0.9):
	结束后: 平均 (SD)	7(0.34)	7(0.46)	7(0.45)	7(0.3)
	泛酸 [$\mu\text{g/L}$] (*p=0.8899)				
	基线: 平均 (SD)	142(5):	144(6):	146(4):	140(4):
	结束后: 平均 (SD)	142(5)	143(6)	147(5)	141(3)
	叶酸 [$\mu\text{g/L}$] (*p=0.5073)				
	基线: 平均 (SD)	300(215):	286(112):	377(164):	275(139):
	结束后: 平均 (SD)	311(214)	283(112)	385(189)	250(106)

[0371] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*ANOVA的p-值(综合检验)

[0372] 在任何治疗之前,在研究开始时收集血样,并在45天治疗期结束时再次收集血样。组内治疗无显著影响,与矿物质水平基线相比,治疗也对任何无显著影响(表21)。

[0373] 微生物区系变化

[0374] 选择治疗前后采集的受试者样品进行全面的微生物区系分析。去除短读段和低质量读段后,保留了202,413个序列,平均每个样品2,736个序列,平均长度为440个核苷酸。使用ESPRIT-tree,在去除包含少于10个序列的OTU后,在95%和98%的相似性水平上保留了1,077个和1,618个OTU。

[0375] 图28是箱线图,显示第1天和第45天各实验组Chao1值分布。虚线连接成对样品。使用配对Wilcoxon检验来比较各组的分布。p-值小于0.05应视为具有统计学上的意义。

[0376] 图29是箱线图,示出第1天和第45天各实验组Chao1值分布。Wilcoxon检验用于比较每个实验组与安慰剂的分布。p-值小于0.05应视为具有统计学上的意义。

[0377] 图30显示在Bray-Curtis相异度矩阵上执行的PCoA聚类。每个治疗都在不同的标签中分开,而颜色和形状与时间点相关联。对于所有治疗,来自两个时间点的样品倾向于聚集在一起,并且在第1天的基线读数时,数据彼此没有显著差异。由于组内或组间的治疗效果,样品之间没有显著差异。

[0378] 表22

[0379] 参与者日记1中报告有呼吸道感染症状的人数比例(n=123)。

	凝结芽孢杆菌 (N *= 25)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N *= 25)	安慰剂 (N *= 24)
[0381] 发热 (%)	1/25 (4.0)	2/24 (8.3)	2/25 (8.0)	1/25 (4.0)	2/24 (8.3)
头疼 (%)	6/25 (24.0)	7/24 (29.2)	8/25 (32.0)	5/25 (20.0)	6/24 (25.0)
鼻塞 (%)	2/25 (8.0)	2/24 (8.3)	2/25 (8.0)	1/25 (4.0)	3/24 (12.5)
流浓鼻涕	0/25 (0.0)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	3/25 (12.0)	0/24 (0.0)
流清鼻涕(%)	2/25 (8.0)	3/24 (12.5)	5/25 (20.0)	1/25 (4.0)	3/24 (12.5)
咽喉痛 (%)	0/25 (0.0)	1/24 (4.2)	5/25 (20.0)	3/25 (12.0)	4/24 (16.7)
干咳 (%)	2/25 (8.0)	2/24 (8.3)	2/25 (8.0)	1/25 (4.0)	3/24 (12.5)
湿性咳嗽 (%)	0/25 (0.0)	0/24 (0.0)	1/25 (4.0)	2/25 (8.0)	2/24 (8.3)
耳朵疼 (%)	0/25 (0.0)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	1/25 (4.0)	0/24 (0.0)

[0382] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0383] 各治疗组之间仅在流浓鼻涕的天数方面存在显著差异(p*=0.018),这可能是由

于益生菌混合物组中仅有三名参与者报告了该症状,而其他四个治疗组中没有参与者报告该症状。然而,进一步的分析(经Holm校正的曼-惠特尼U检验和)中,比较了益生菌混合物组和安慰剂组之间流浓鼻涕的天数,没有显示出显著差异,这可能是由于样品量较小。

[0384] 表23

[0385] 参与者日记1中报告的临床相关感染者比例(n=123)。

	凝结芽孢杆菌 (N *= 25)	克劳氏芽孢杆菌 (N *= 24)	巨大芽孢杆菌 (N *= 25)	益生菌混合物 (N *= 25)	安慰剂 (N *= 24)
[0386] 胃肠道感染 (%)	0/25 (0.0)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	0/25 (0.0)	2/24 (8.3)
呼吸道感染 (%)	1/25 (4.0)	2/24 (8.3)	2/25 (8.0)	3/25 (12.0)	6/24 (25.0)
泌尿道感染 (%)	1/25 (4.0)	0/24 (0.0)	1/25 (4.0)	2/25 (8.0)	1/24 (4.2)

[0387] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0388] 克鲁斯卡尔-沃利斯检验显示,临床相关感染治疗组的天数没有任何显著差异。然而,在临床相关的胃肠道感染中观察到了具有统计学意义的临界结果。这可能是因为在四个益生菌治疗组中,没有参与者出现临床相关的胃肠道感染,而在益生菌治疗组中,总共观察到2天的此类感染,这可能是偶然发生的。

[0389] 尽管如此,与安慰剂相比,没有一种包括益生菌的研究产品显示出统计学上的显著差异。

[0390] 表24

[0391] 治疗期第6周和第7周所有粪便中便糖/硬便的比例(n=121)

	凝结芽孢杆菌 (N = 24)	克劳氏芽孢杆菌 (N = 23)	巨大芽孢杆菌 (N = 25)	益生菌混合物 (N = 25)	安慰剂 (N = 24)
[0392] 便糖(p = 0.033)*					
平均 (SD):	7% (10%):	4% (14%):	4% (10%):	2% (4%):	8% (19%):
最小-最大	0% - 26%	0% - 50%	0% - 40%	0% - 13%	0% - 91%
p-值 vs 安慰剂	0.591	0.150	0.271	0.186	/
硬便(p = 0.528)*					
平均 (SD):	22% (29%):	13% (27%):	9% (16%):	15% (27%):	14% (27%):
最小-最大	0% - 100%	0% - 100%	0% - 56%	0% - 100%	0% - 100%

[0393] *克鲁斯卡尔-沃利斯检验的p-值。如果 $P < 0.05$,则计算与安慰剂的个体比较(经Holm校正的曼-惠特尼U检验)。

[0394] 在整个治疗期以及治疗期的第6周和第7周内,便糖的比例在各组之间存在显著差异。然而,进一步的分析(经Holm校正的曼-惠特尼U检验)没有显示出显著差异,可能是由于样品量较小。益生菌混合物组的参与者便糖所有粪便中的比例最小。

[0395] 表25

[0396] 参与者日记2中报告有胃肠道感染症状的人数比例(n=118)

	凝结芽孢杆菌(N *= 25)	克劳氏芽孢杆菌(N *= 24)	巨大芽孢杆菌(N *= 25)	益生菌混合物(N *= 25)	安慰剂(N *= 24)
[0397] 食欲缺乏 (%)	0/24 (0.0)	0/23 (0.0)	0/23 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
腹泻 (%)	0/24 (0.0)	1/23 (4.3)	1/23 (4.3)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
便秘 (%)	0/24 (0.0)	0/23 (0.0)	0/23 (0.0)	0/25 (0.0)	3/23 (13.0)
呕吐 (%)	0/24 (0.0)	0/23 (0.0)	0/23 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
气体 (%)	0/24 (0.0)	1/23 (4.3)	1/23 (4.3)	2/25 (8.0)	2/23 (8.7)
肠鸣音 (%)	0/24 (0.0)	0/23 (0.0)	0/23 (0.0)	0/25 (0.0)	0/23 (0.0)
痉挛/胃痛(%)	1/24 (4.2)	1/23 (4.3)	0/23 (0.0)	1/25 (4.0)	2/23 (8.7)
腹胀(%)	1/24 (4.2)	1/23 (4.3)	0/23 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)

[0398] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0399] 组之间仅在便秘天数方面检测到显著差异 ($p^*=0.013$), 这可能是由于在参与者日记2中, 安慰剂组中仅有三名参与者报告了该症状, 而在其他四个治疗组中没有参与者报告该症状。然而, 进一步的分析 (经Holm校正的曼-惠特尼U检验) 中, 比较了单个益生菌组和安慰剂组的便秘天数, 没有显示出显著差异, 这可能是由于样品量较小。

[0400] 本研究探讨了新型益生菌, 即凝结芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌以及包含枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌和凝结芽孢杆菌的益生菌混合物的安全性和有效性。

[0401] 各治疗组参与者基线时的胃肠道健康状况在各研究组之间并无差异, 这是随机分组所预期的。

[0402] 研究的主要结果 (安全性) 已实现, 因为总共报告了17起AE, 无SAE。因果关系评估显示, 报告的AE与研究产品之间没有关系。

[0403] 与疗效相关的结果均未显示出任何统计学上的显著差异, 但由于每个研究组的样品量较小, 这并不令人惊讶。尽管如此, 仍观察到一些有利于活性产品的趋势, 特别是在肠-脑轴评分和便糖比例方面。

[0404] 总之, 益生菌产品在成人中使用是安全的, 并且在肠道-脑轴和粪便粘稠度方面显示了一些有利的数据。

[0405] 讨论

[0406] 在过去的几年里, 芽孢杆菌益生菌在维护肠道健康方面的应用得到了广泛的支持, 并推动了其临床应用。它们的有利作用与几种特性有关, 诸如抗微生物和免疫调节活性、细胞生长和分化的调节、细胞-细胞信号传导、细胞粘附、信号转录和转导、维生素的产生和对遗传毒性剂的肠道保护。

[0407] 该试验旨在评估三种益生菌治疗对健康成人的总体健康状况和胃肠道症状的影响。没有安全性或耐受性问题, 也没有不良事件。在没有任何胃肠道问题的健康个体中进行的这项小型研究中, 对粪便的规律性和粘稠度没有负面影响, 对悲伤、易怒、精力、食欲、紧张、压力、睡眠、心血管事件、疼痛和头晕也没有负面影响。事实上, 我们报道了由于施用益生菌混合物, 在整个干预期间便糖的发生率有所下降。

[0408] 参考文献

[0409] Abriouel, H., Franz, C., Omar, N., & Galvez, A. (2011). Diversity and applications of Bacillus bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews, 35(1), 201-

232.doi:doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x

[0410] Afrilasari W,Widanarni,Meryadini A(2016)“Effect of Probiotic Bacillus Megaterium PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora,Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish(Clarias Sp.)”HAYATI Journal of Biosciences,vol.23,no.4,pp.168-172.,doi:10.1016/j.hjb.2016.12.005.

[0411] Alippi,A.(1995).Detection of Bacillus larvae spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium.Microbiology SEM,11,343-350.

[0412] Alippi A,Reynaldi F,Lopez A,De Giusti M,Aguilar O(2004)“Molecular Epidemiology of Paenibacillus Larvae Larvae and Incidence of American Foulbrood in Argentinean Honeys from Buenos Aires Province.”Journal of Apicultural Research,vol.43,no.3 pp.135-143.,doi:10.1080/00218839.2004.11101124.

[0413] Baron,M.(2009).Original Research:A Patented Strain of Bacillus coagulans Increased Immune Response to Viral Challenge.Postgraduate Medicine,121(2),114-118.doi:10.3810/pgm.2009.03.1971

[0414] Benno,Y.,Suzuki,K.,Suzuki,K.,Narisawa,K.,Bruce,W.R.,&Mitsuoka,T.(1986).Comparison of the Fecal Microflora in Rural Japanese and Urban Canadians.Microbiology and Immunology,30(6),521-532.doi:10.1111/j.1348-0421.1986.tb02978.x

[0415] Chan,Y.K.,Estaki,M.,&Gibson,D.L.(2013).Clinical Consequences of Diet-Induced Dysbiosis.Annals of Nutrition and Metabolism,63(s2),28-40.doi:10.1159/000354902

[0416] Cutting,S.M.(2011).Bacillus probiotics.Food Microbiology,28(2),214-220.doi:10.1016/j.fm.2010.03.007

[0417] Dolin,B.(2009).Effects of a proprietary Bacillus coagulans preparation on symptoms of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome.Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,31(10),655.doi:10.1358/mf.2009.31.10.1441078

[0418] Elshaghabee,F.M.F.,Rokana,N.,Gulhane,R.D.,Sharma,C.,&Panwar,H.(2017).Bacillus As Potential Probiotics:Status,Concerns,and Future Perspectives.Frontiers in Microbiology,8.doi:10.3389/fmicb.2017.01490

[0419] Endres,J.,Clewell,A.,Jade,K.,Farber,T.,Hauswirth,J.,&Schauss,A.(2009).Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, Bacillus coagulans,as a food ingredient.Food and Chemical Toxicology,47(6),1231-1238.doi:10.1016/j.fct.2009.02.018

[0420] Ferreira,C.M.H.,Vilas-Boas,Â.,Sousa,C.A.,Soares,H.M.V.M.,&Soares,E.V.(2019).Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions.AMB Express,9(1).doi:10.1186/s13568-019-0796-3

- [0421] Gabrielli, M., Lauritano, E.C., Scarpellini, E., Lupascu, A., Ojetti, V., Gasbarrini, G., ... Gasbarrini, A. (2009). *Bacillus clausii* as a Treatment of Small Intestinal Bacterial Overgrowth. *The American Journal of Gastroenterology*, 104 (5), 1327-1328. doi:10.1038/ajg.2009.91
- [0422] Gepner, Y., Hoffman, J.R., Shemesh, E., Stout, J.R., Church, D.D., Varanoske, A.N., ... Ostfeld, I. (2017). Combined effect of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 and HMB supplementation on muscle integrity and cytokine response during intense military training. *Journal of Applied Physiology*, 123 (1), 11-18. doi:10.1152/jappphysiol.01116.2016
- [0423] Gilliam, Martha. (1979) "Microbiology Of Pollen And Bee Bread: The Genus *Bacillus*." *Apidologie*, vol. 10, no. 3, pp. 269-274., doi:10.1051/apido:19790304.
- [0424] Gilliam, Martha, and Diane K. Valentine. (1976) "Bacteria Isolated from the Intestinal Contents of Foraging Worker Honey Bees, *Apis Mellifera*: The Genus *Bacillus*." *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 28, no. 2, pp. 275-276., doi:10.1016/0022-2011(76)90137-3.
- [0425] Horosheva, T.V., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2014). Efficacy of *Bacillus* probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *JMM Case Reports*, 1 (3). doi: 10.1099/jmmcr.0.004036
- [0426] Hun, L. (2009). Original Research: *Bacillus coagulans* Significantly Improved Abdominal Pain and Bloating in Patients with IBS. *Postgraduate Medicine*, 121 (2), 119-124. doi:10.3810/pgm.2009.03.1984
- [0427] Hyronimus, B., Marrec, C.L., Sassi, A.H., & Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 61 (2-3), 193-197. doi:10.1016/s0168-1605(00)00366-4
- [0428] Ivanovics, G. & Alfoldi, L. (1957). Bacteriocinogenesis in *Bacillus megaterium*. *J. gen. Microbiol.* 16, 522
- [0429] Jensen, G., Cash, H., Farmer, S., & Keller, D. (2017). Inactivated probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30 induces complex immune activating, anti-inflammatory, and regenerative markers in vitro. *Journal of Inflammation Research*, Volume 10, 107-117. doi:10.2147/jir.s141660
- [0430] Kalman, D.S., Schwartz, H.I., Alvarez, P., Feldman, S., Pezzullo, J.C., & Krieger, D.R. (2009). A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group dual site trial to evaluate the effects of a *Bacillus coagulans*-based product on functional intestinal gas symptoms. *BMC Gastroenterology*, 9 (1). doi:10.1186/1471-230x-9-85
- [0431] Kawarizadeh, A., Nojoomi, F., Tabatabaei, M., Hosseinzadeh, S., & Farzaneh, M. (2019). The effect of *Bacillus coagulans* on cytotoxicity and apoptosis induced by *Salmonella typhimurium* in HT-29 cell culture. *Iranian Journal of*

Microbiology.doi:10.18502/ijm.v11i4.1468

[0432] Keller,D.,Dinter,R.V.,Cash,H.,Farmer,S.,&Venema,K. (2017) .Bacillus coagulans GBI-30,6086 increases plant protein digestion in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the small intestine(TIM-1).Beneficial Microbes,8(3) ,491-496.doi:10.3920/bm2016.0196

[0433] Khochamit,N.,Siripornadulsil,S.,Sukon,P.,&Siripornadulsil,W. (2015) .Antibacterial activity and genotypic-phenotypic characteristics of bacteriocin-producing Bacillus subtilis KKU213:Potential as a probiotic strain.Microbiological Research,170,36-50.doi:10.1016/j.micres.2014.09.004

[0434] Kimmel,M.,Keller,D.,Farmer,S.,&Warrino,D. (2010) .A controlled clinical trial to evaluate the effect of GanedenBC30 on immunological markers.Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,32(2) ,129.doi:10.1358/mf.2010.32.2.1423881

[0435] Kotb,E. (2014) .Purification and partial characterization of serine fibrinolytic enzyme from Bacillus megaterium KSK-07 isolated from kishk,a traditional Egyptian fermented food.Applied Biochemistry and Microbiology,51 (1) ,34-43.doi:10.1134/s000368381501007x

[0436] Lakshmi,S.G.,Jayanthi,N.,Saravanan,M.,&Ratna,M.S. (2017) .Safety assessment of Bacillus clausii UBBC07,a spore forming probiotic.Toxicology Reports,4,62-71.doi:10.1016/j.toxrep.2016.12.004

[0437] Liu,P.,Xie,J.,Liu,J.,&Ouyang,J. (2019) .A novel thermostable β -galactosidase from Bacillus coagulans with excellent hydrolysis ability for lactose in whey.Journal of Dairy Science,102(11) ,9740-9748.doi:10.3168/jds.2019-16654

[0438] Marseglia,G.L.,Tosca,M.,Cirillo,I.,Licari,A.,Leone,M.,Marseglia,A.,... Ciprandi,G. (2007) .Efficacy of Bacillus clausii spores in the prevention of recurrent respiratory infections in children:a pilot study.Therapeutics and Clinical Risk Management,3(1) ,13-17.doi:10.2147/tcrm.2007.3.1.13

[0439] Mazzoli,A.,Donadio,G.,Lanzilli,M.,Saggese,A.,Guarino,A.M.,Rivetti,M.,...Isticato,R. (2019) .Bacillus megaterium SF185 spores exert protective effects against oxidative stress in vivo and in vitro.Scientific Reports,9 (1) .doi:10.1038/s41598-019-48531-4

[0440] Neag,M.A.,Catinean,A.,Muntean,D.M.,Pop,M.R.,Bocsan,C.I.,Botan,E.C.,& Buzoianu,A.D. (2020) .Probiotic Bacillus Spores Protect Against Acetaminophen Induced Acute Liver Injury in Rats.Nutrients,12(3) ,632.doi:10.3390/nu12030632

[0441] Nista,E.C.,Candelli,M.,Cremonini,F.,Cazzato,I.A.,Zocco,M.A., Franceschi,F.,...Gasbarrini,A. (2004) .Bacillus clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment:randomized,double-blind,placebo controlled trial.Alimentary Pharmacology and Therapeutics,20(10) ,1181-

1188.doi:10.1111/j.1365-2036.2004.02274.x

[0442] Nithya, V., & Halami, P.M. (2012). Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Annals of Microbiology*, 63(1), 129-137. doi:10.1007/s13213-012-0453-4

[0443] Padgham, J., and R. Sikora. (2007) "Biological Control Potential and Modes of Action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne Graminicola* on Rice." *Crop Protection*, vol. 26, no. 7, pp. 971-977., doi:10.1016/j.cropro.2006.09.004.

[0444] Pelletier, A. & Sygush, J (1990). Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* Pl. *Appl Environ Microbiol* 56, 844-848

[0445] Ripert, G., Racedo, S.M., Elie, A.-M., Jacquot, C., Bressollier, P., & Urdaci, M.C. (2016). Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3445-3454. doi: 10.1128/aac.02815-15

[0446] Rochín-Medina, J.J., Ramírez-Medina, H.K., Rangel-Peraza, J.G., Pineda-Hidalgo, K.V., & Iribe-Arellano, P. (2017). Use of whey as a culture medium for *Bacillus clausii* for the production of protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity. *Food Science and Technology International*, 24(1), 35-42. doi:10.1177/1082013217724705

[0447] Salvetti, E., Orrù, L., Capozzi, V., Martina Am Lamontanara A, Keller D, Cash H, Felis G, Cattivelli L, Torriani S, Spano G. (2016) Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30,6086 as a case study. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:4595. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7416-9>

[0448] Scholle MD, White CA, Kunnimalaiyaan M, Vary PS (2003) "Sequencing and Characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 11, pp. 6888-6898., doi:10.1128/aem.69.11.6888-6898.2003.

[0449] Sharma, S., & Kanwar, S.S. (2017). Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3504-3511. doi:10.1007/s13197-017-2807-1

[0450] Snowdon, Jill A, and Dean O Cliver. (1996) "Microorganisms with Honey." *International Journal of Food Microbiology*.

[0451] Sudha, M., Radkar, N., & Maurya, A. (2012). Effect of Supplementation of Probiotic *Bacillus coagulans* Unique IS-2 on Hypercholesterolemia Subjects: A Clinical Study. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 6(2).

[0452] Sudha, M.R., Yelikar, K.A., & Deshpande, S. (2012). Clinical Study of

Bacillus coagulans Unique IS-2 (ATCC PTA-11748) in the Treatment of Patients with Bacterial Vaginosis. Indian Journal of Microbiology, 52(3), 396-399. doi: 10.1007/s12088-011-0233-z

[0453] Sudha, M.R., Bhonagiri, S., & Kumar, M.A. (2013). Efficacy of Bacillus clausii strain UBBC-07 in the treatment of patients suffering from acute diarrhoea. Beneficial Microbes, 4(2), 211-216. doi:10.3920/bm2012.0034

[0454] Sudha, M.R., Jayanthi, N., Aasin, M., Dhanashri, R., & Anirudh, T. (2018). Efficacy of Bacillus coagulans Unique IS2 in treatment of irritable bowel syndrome in children: a double blind, randomised placebo controlled study. Beneficial Microbes, 9(4), 563-572. doi:10.3920/bm2017.0129

[0455] Sudha, M.R., Jayanthi, N., Pandey, D., & Verma, A. (2019). Bacillus clausii UBBC-07 reduces severity of diarrhoea in children under 5 years of age: a double blind placebo controlled study. Beneficial Microbes, 10(2), 149-154. doi: 10.3920/bm2018.0094

[0456] Sumathi C, Nandhini A, Padmanaban J (2017) "Antagonistic Activity of Probiotic Bacillus megaterium against Streptococcus mutans." International Journal of Pharma and Bio Science, vol. 8, no. 1, doi:10.22376/ijpbs.2017.8.1.p270-274.

[0457] Thakur, K., Tomar, S.K., & De, S. (2016). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. Microbial Biotechnology, 9(4), 441-451. doi: 10.1111/1751-7915.12335

[0458] Tysset, C., Durand, C., and Taliergio, Y.P. (1970) Contribution to the study of the microbial contamination and the hygiene of commercial honey. Rec. Med. Vet. 146, 1471-1492.

[0459] Vary, P.S., Biedendieck, R., Fuerch, T., Meinhardt, F., Rohde, M., Deckwer, W., & Jahn, D. (2007). Bacillus megaterium--from simple soil bacterium to industrial protein production host. Applied Microbiology and Biotechnology, 76(5), 957-967. doi:10.1007/s00253-007-1089-3

[0460] von Tersch, M.A. and Carlton, B.C. (1983) Bacteriocin from Bacillus megaterium ATCC 19213: comparative studies with megacin A-216. Journal of Bacteriology 155, 866-871.

[0461] 本发明并不局限于本文所述的实施方式,可以在不脱离本发明范围的情况下进行修改或改变。


[0462] 在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用的术语“一(a)”、“一个(an)”、“所述(the)”和类似的指代应被解释为涵盖单数和复数两者,除非在本文中另有说明或与上下文明显矛盾。除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的列举仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独数值的速记方法,并且每个单独数值被并入说明书中,如同其在本文中被单独引用一样。术语“约”的使用旨在描述在高于或低于所述值约±10%的范围内的值;在其他实施方式中,这些值可以在高于或低于所述值约±5%的范围

内;在其他实施方式中,这些值可以在高于或低于所述值约 $\pm 2\%$ 的范围内;在其他实施方式中,这些值可以在高于或低于所述值约 $\pm 1\%$ 的范围内。上述范围旨在通过上下文加以明确,并不意味着进一步的限制。本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序执行,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。除非另有说明,否则本文提供的任何和所有示例或示例性语言(例如“诸如”)的使用仅旨在更好地阐述本发明,而不是对本发明的范围进行限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必不可少的。

[0463] 尽管在前面的说明书中,已经结合本发明的某些实施方式描述了本发明,并且为了说明的目的提出了许多细节,但是对于本领域的技术人员来说,显而易见的是,本发明可以有附加的实施方式,并且在不脱离本发明的基本原理的情况下,可以对本文所描述的某些细节进行相当大的改变。

[0464] 本文引用的所有参考文献均以其整体并入作为参考。在不脱离本发明的精神或基本属性的情况下,本发明可以以其他特定形式实施,因此,应当参考所附权利要求而不是前述说明书来指示本发明的范围。

克劳氏芽孢杆菌CSI08的基因组分析



微生物
方案

处理实验室:
 614 Interchange Blvd
 Newark, DE 19711
 www.charlesriver.com/accugenix
 DE-CustomerSupport@cr.com
 电话 +1 302.292.8656

Accugenix®
AccuGENX-ID® 报告
 SOP-GEN-017

客户:	迪兰益生菌	账号: 601043 (DLZ1)
地址:	美国, 佐治亚州, 肯尼索, 柯布国际大街3800号, 邮编30152	
Accugenix C#:	CJ031259-20180417157	ID请求表 #: 311356
客户样品ID:	CS103	到期日: 2018-04-17

Accugenix数据库检索结果-BacSeq

鉴定: 克劳氏芽孢杆菌

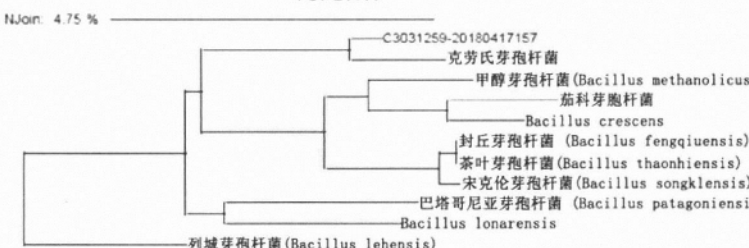
置信水平: 种

序列比对

比对: 535 CJ031259-20180417157

- 1.67 % 537 克劳氏芽孢杆菌 (Bacillus clausii)
- 5.70 % 537 巴塔哥尼亚芽孢杆菌 (Bacillus patagoniensis)
- 6.26 % 535 甲醇芽孢杆菌 (Bacillus methanolicus)
- 6.54 % 535 Bacillus lonarensis
- 7.10 % 535 封丘芽孢杆菌 (Bacillus fengquiensis)
- 7.10 % 535 茶叶芽孢杆菌 (Bacillus thaonhiensis)
- 7.10 % 535 宋克伦芽孢杆菌 (Bacillus songklensis)
- 7.10 % 535 茄科芽孢杆菌 (Bacillus solani)
- 7.20 % 535 Bacillus crescens
- 7.30 % 534 列城芽孢杆菌 (Bacillus lehensis)

邻接进化树



不适合体外诊断应用

第1页, 共1页

制备: Dayna Lawren at Newark, DE, United States on 2018-04-17 09:15:51
 审核: Robert Stevens at Newark, DE, United States on 2018-04-17 09:18:40
 QA批准: Kristina Conroy at Newark, DE, United States on 2018-04-17 10:01:39
 根据FDA法规CFR 21第11部分, 本文件已由上述人员以电子方式签署

Rev. 2017. 5. 22 EH

图1

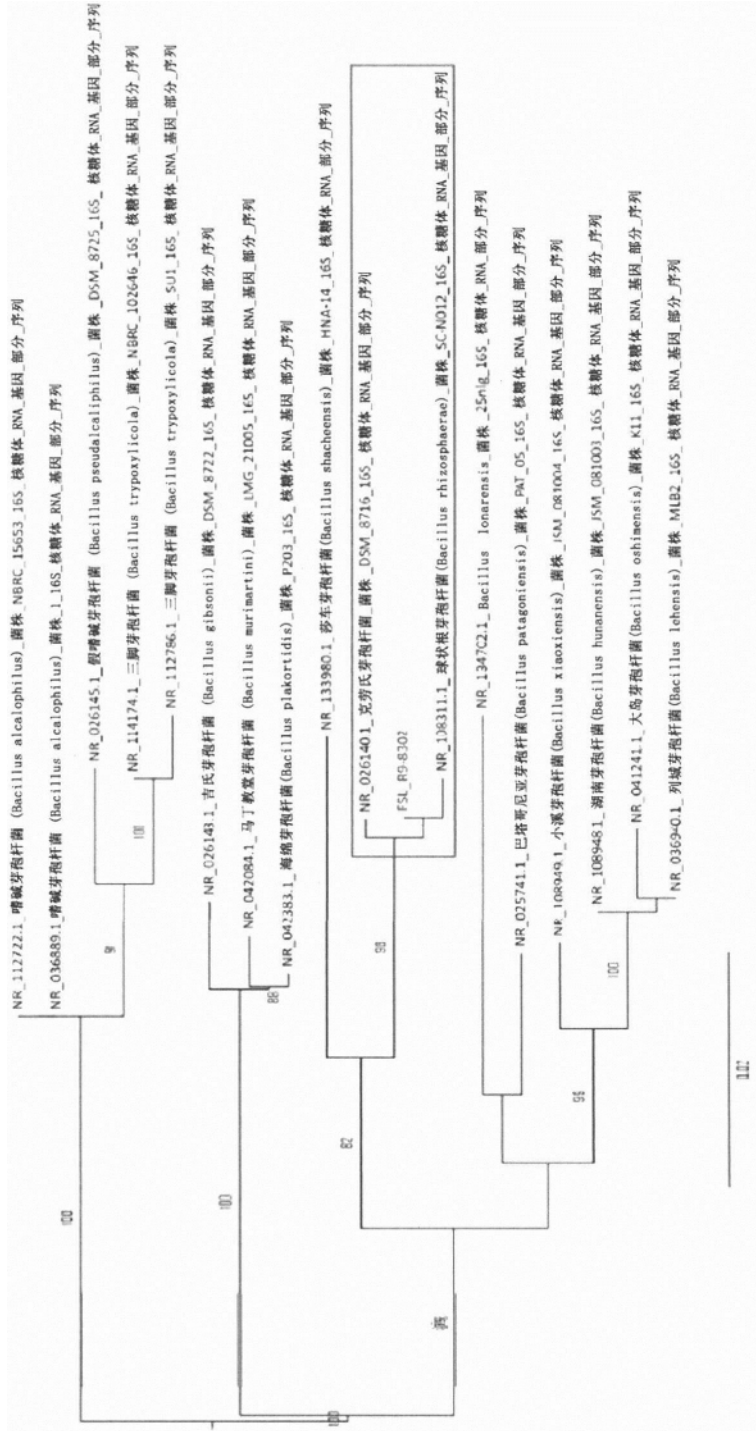


图2

按进化支排列的芽孢杆菌属的物种的系统发育树(*gyrB*)

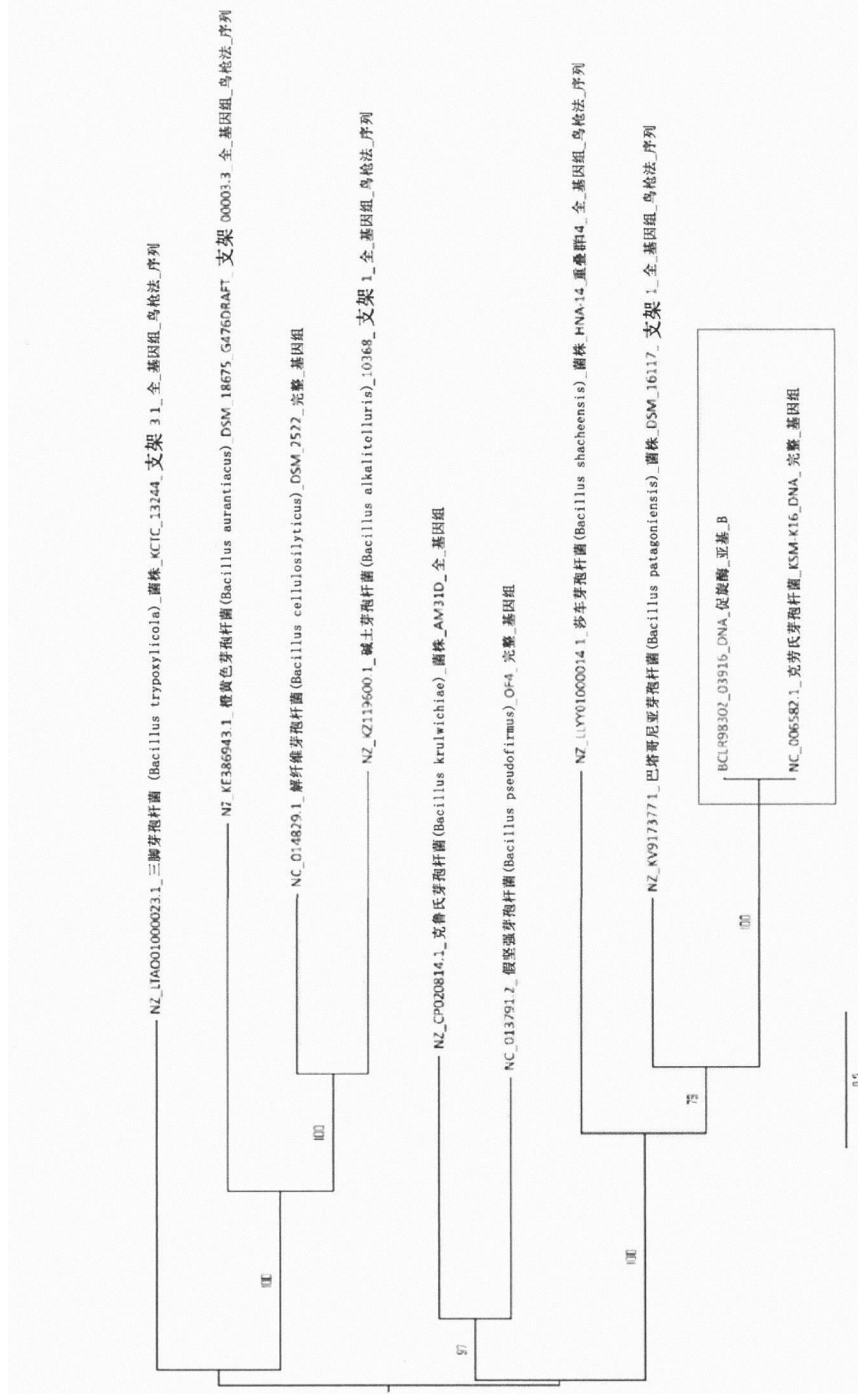


图3

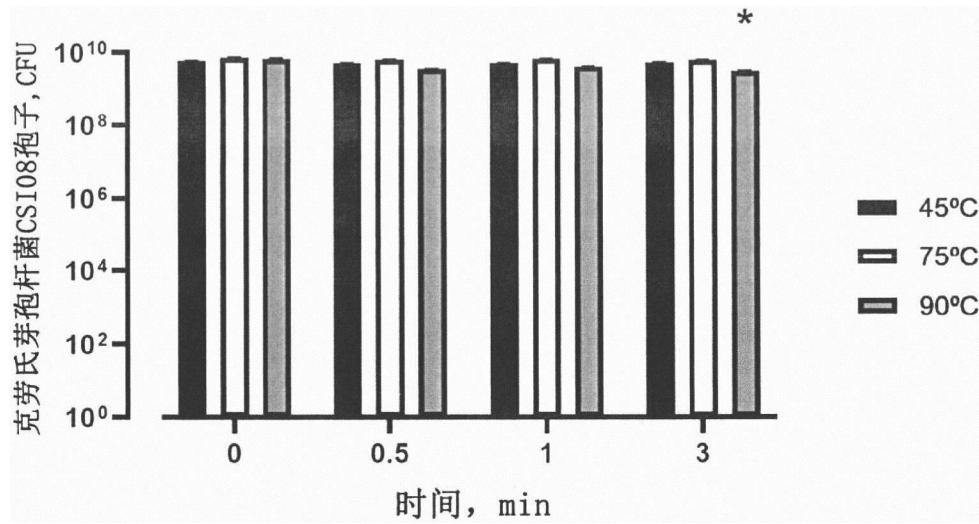


图4

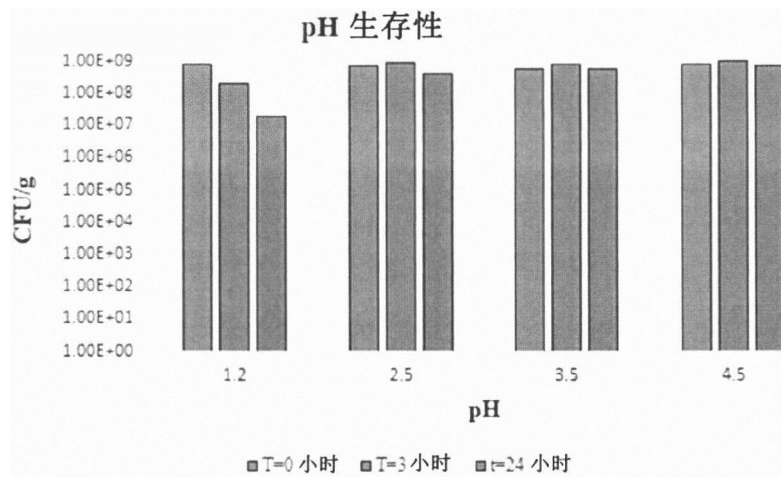


图5

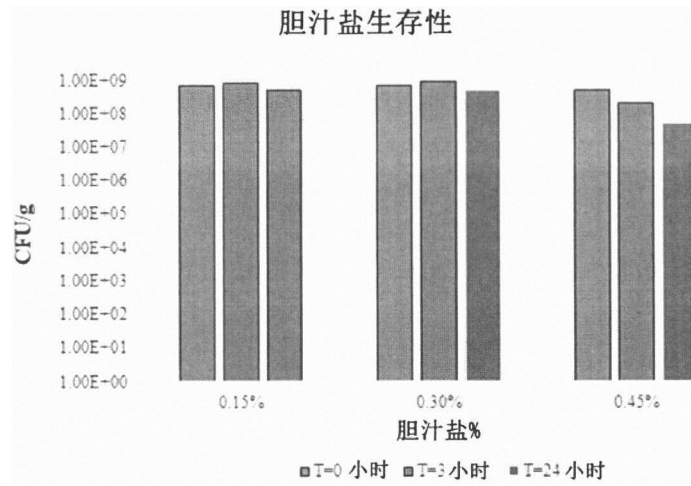


图6

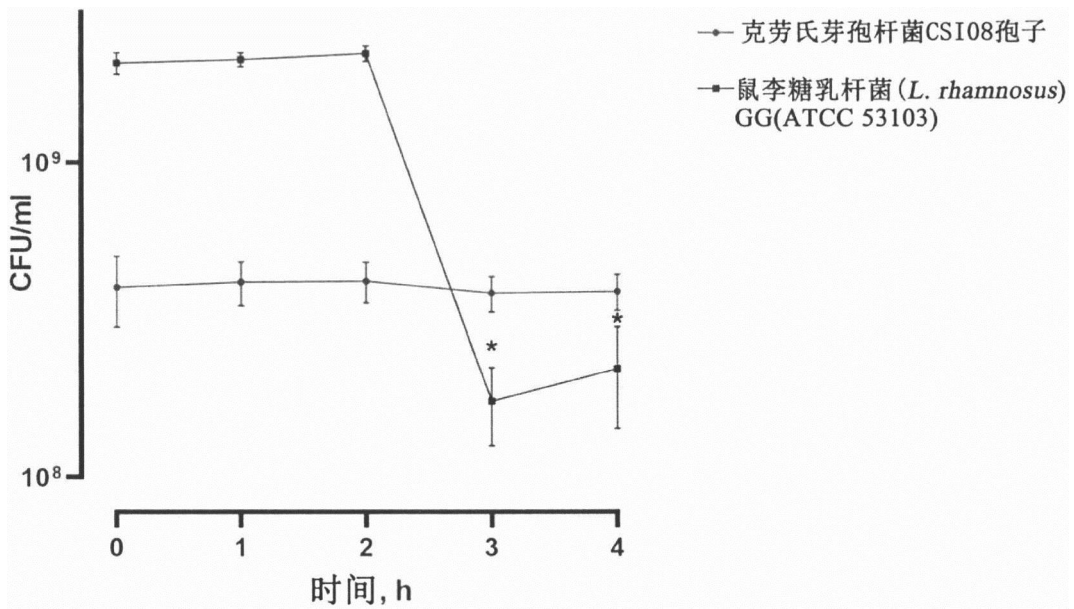


图7

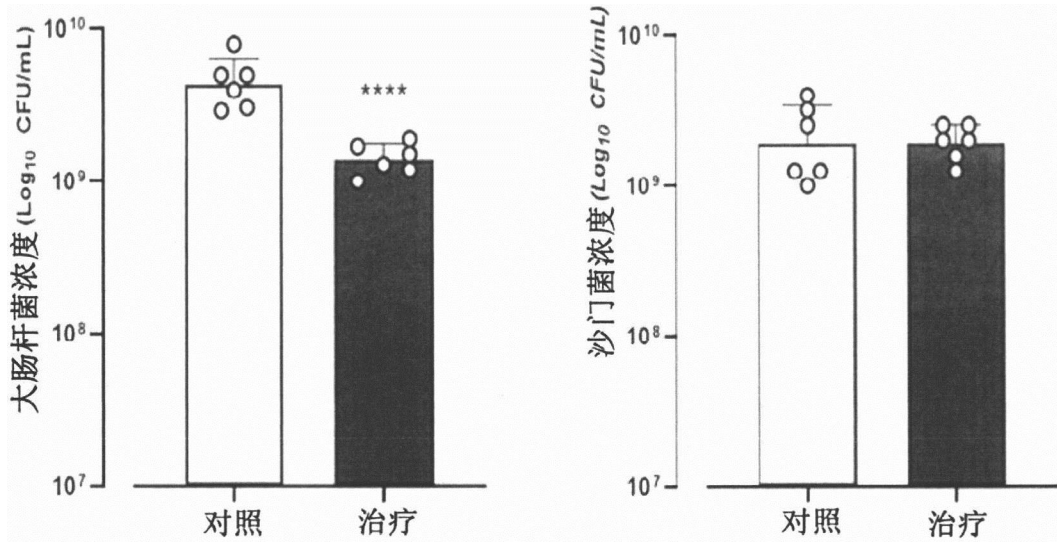


图8

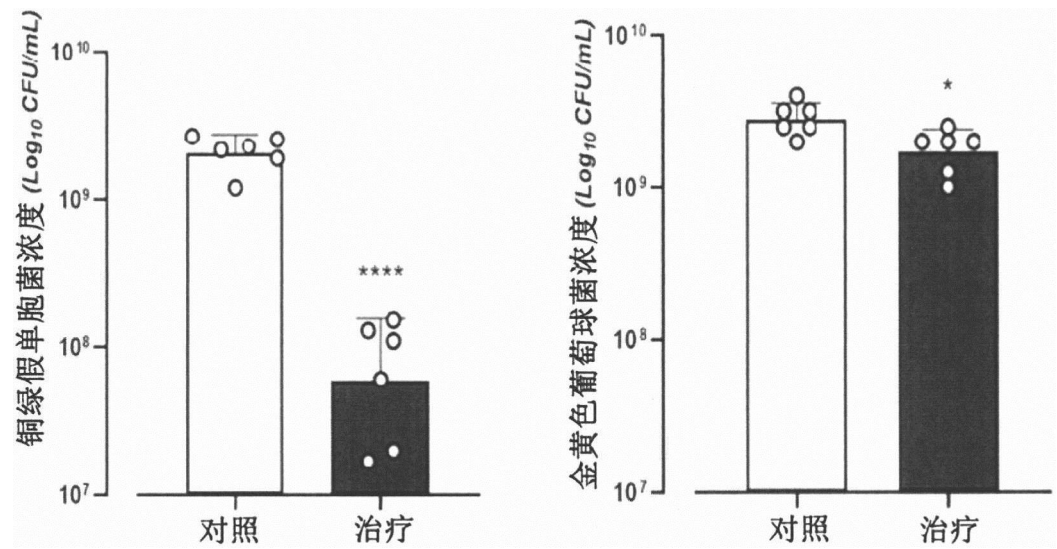


图9

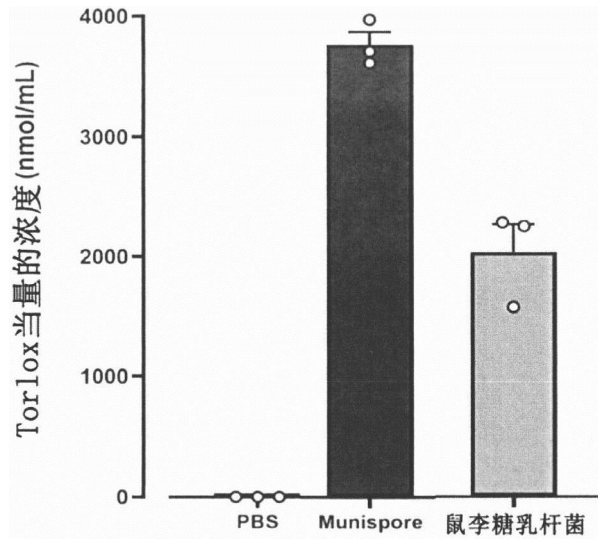


图10

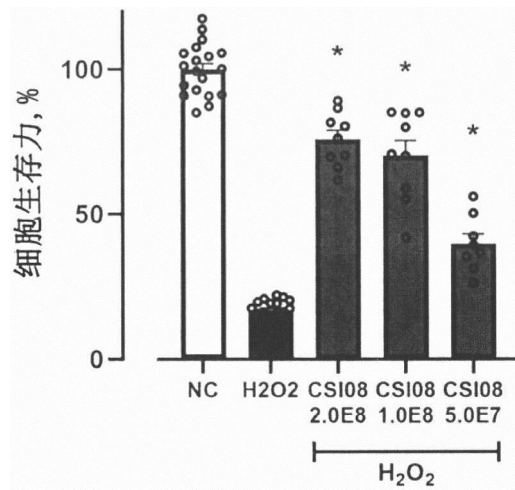


图11

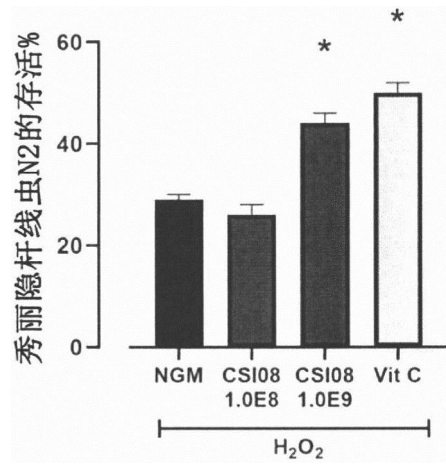


图12

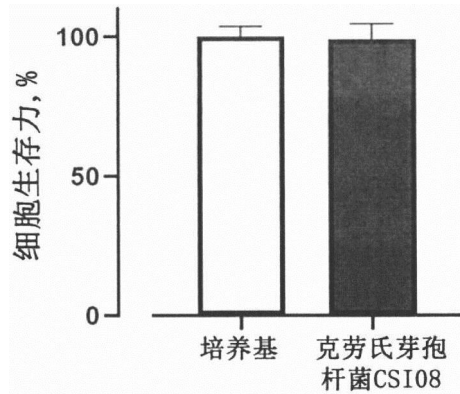


图13

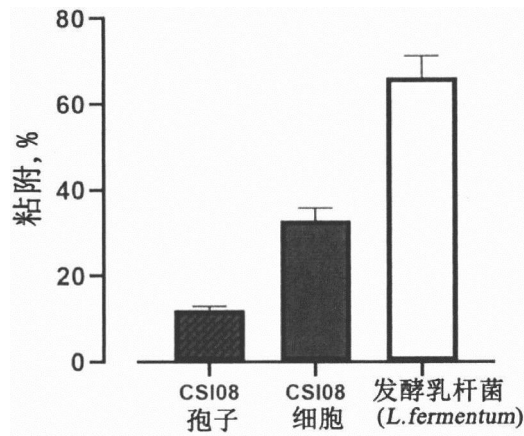


图14

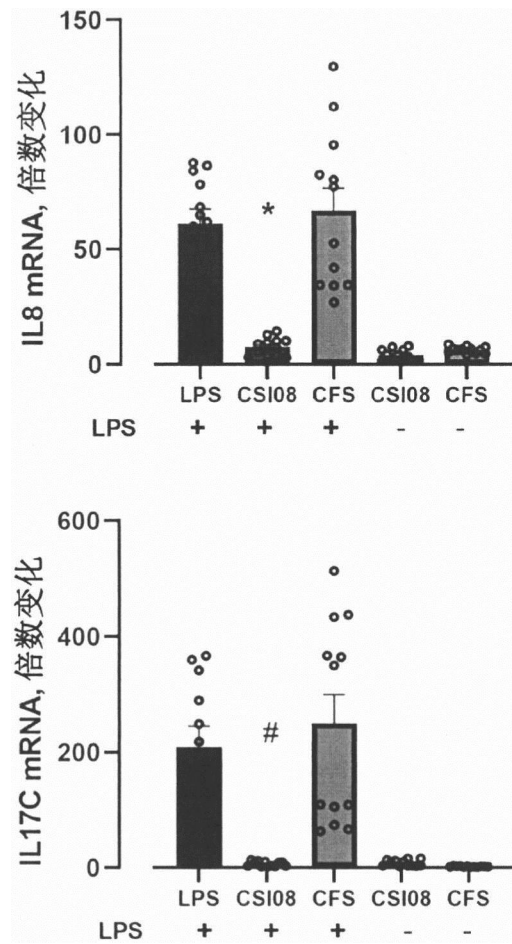


图15A

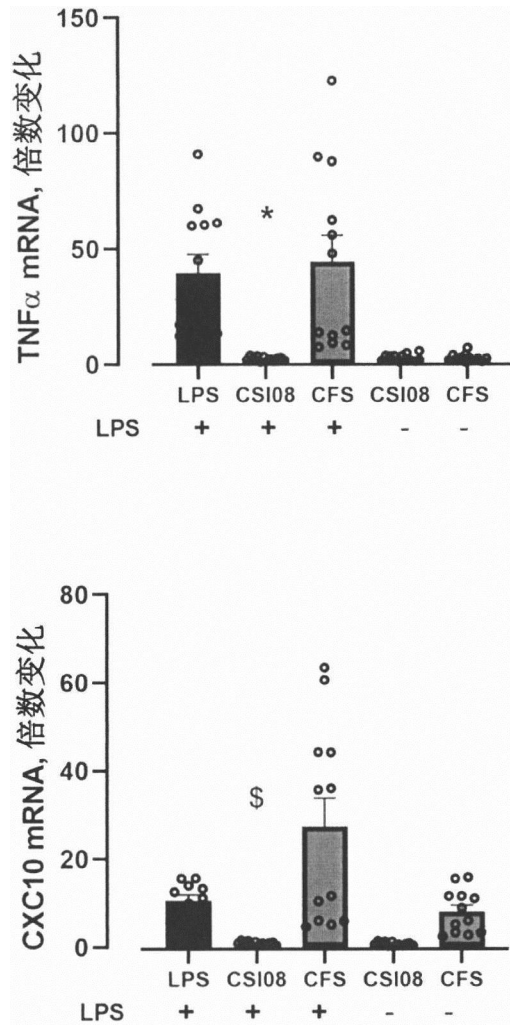


图15B

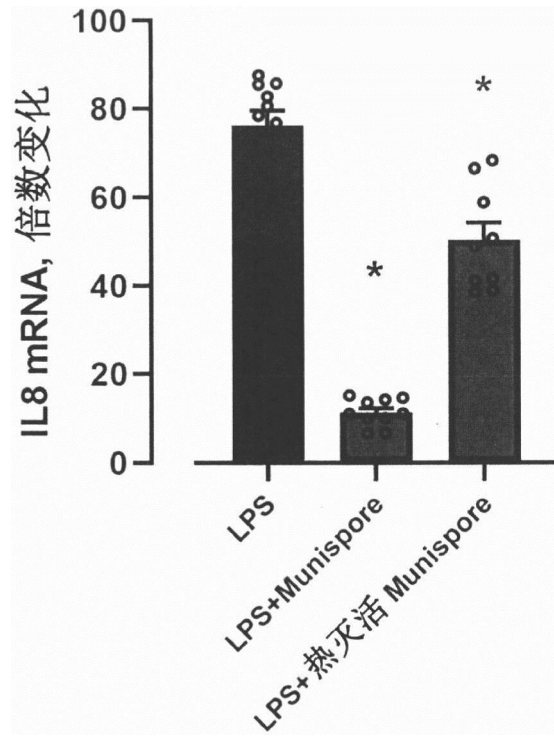


图16

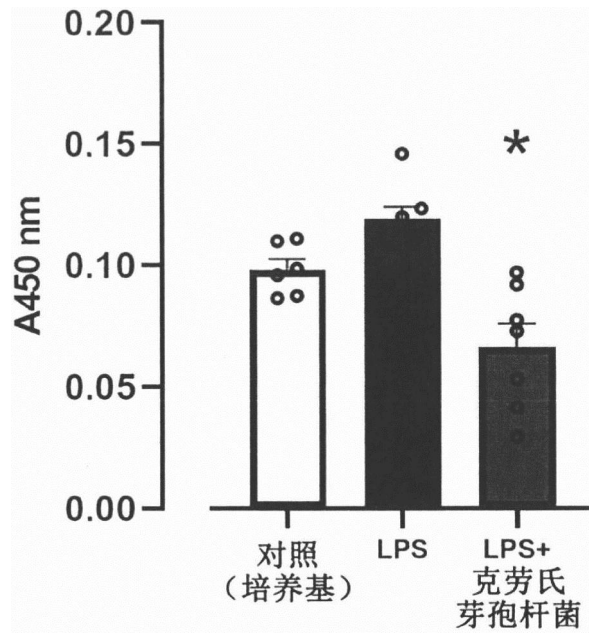


图17

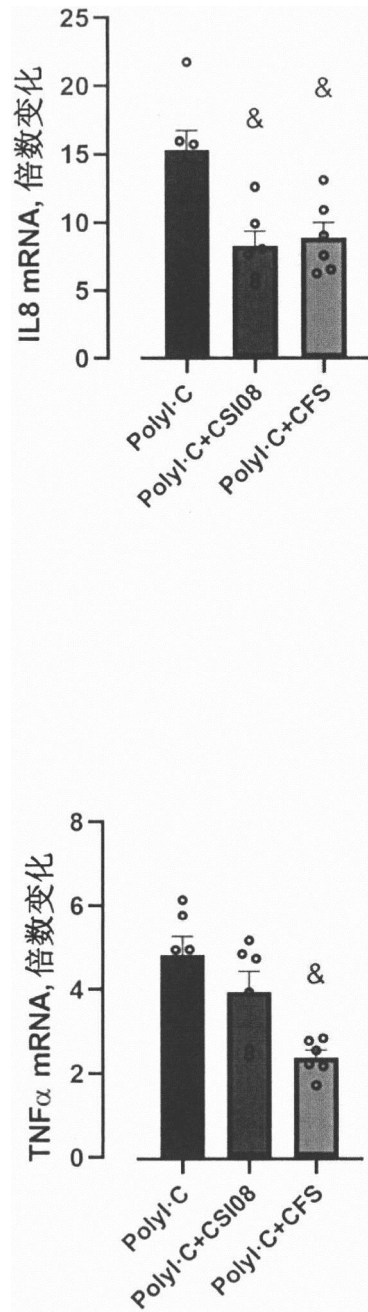


图18A

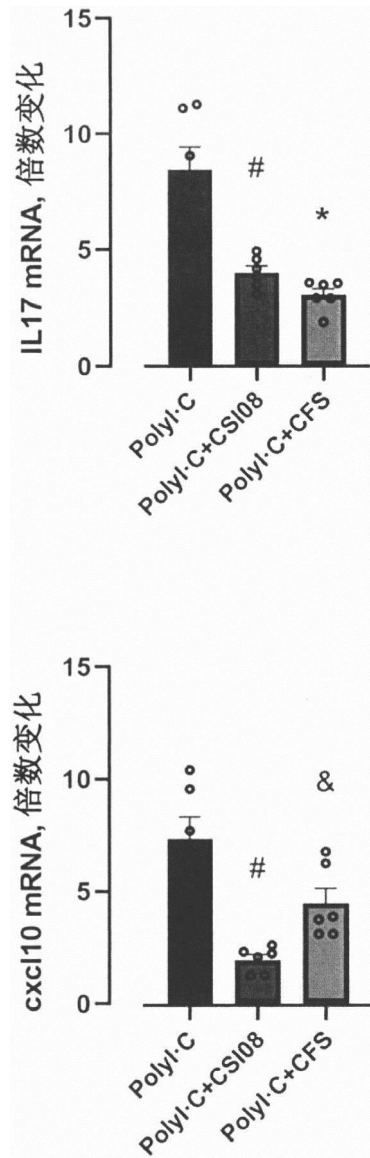


图18B

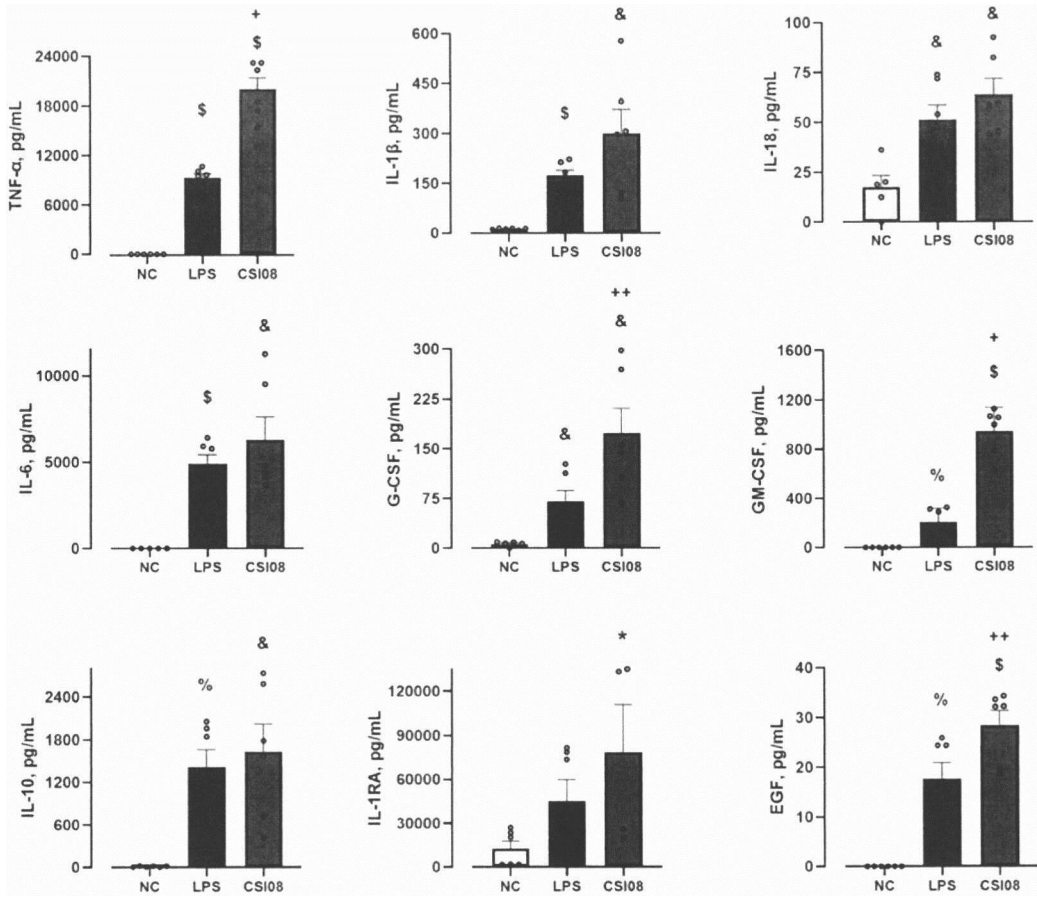


图19

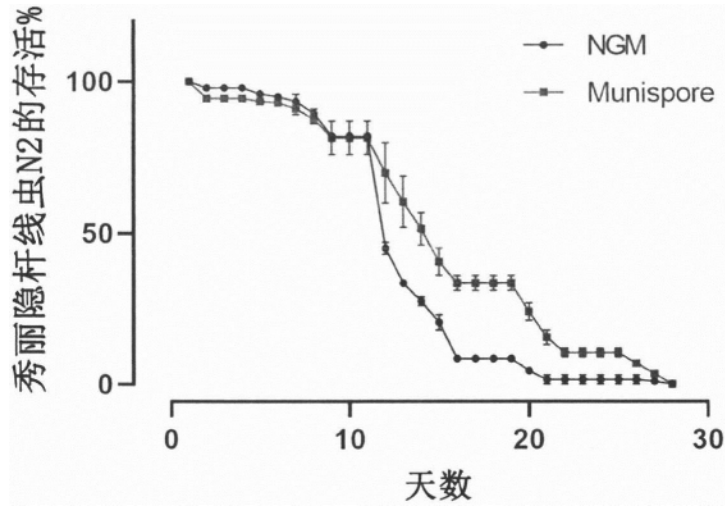


图20

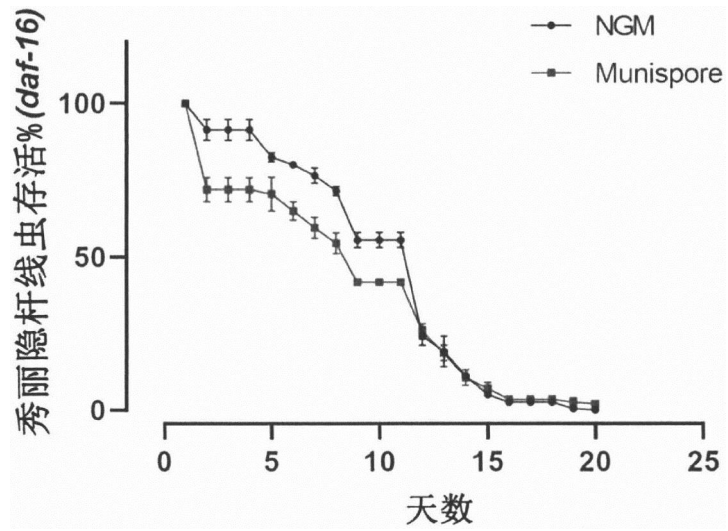


图21

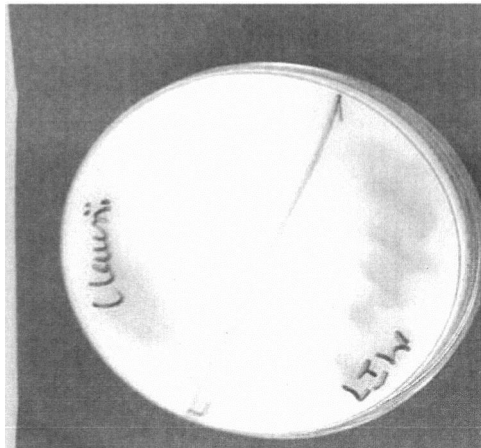


图22

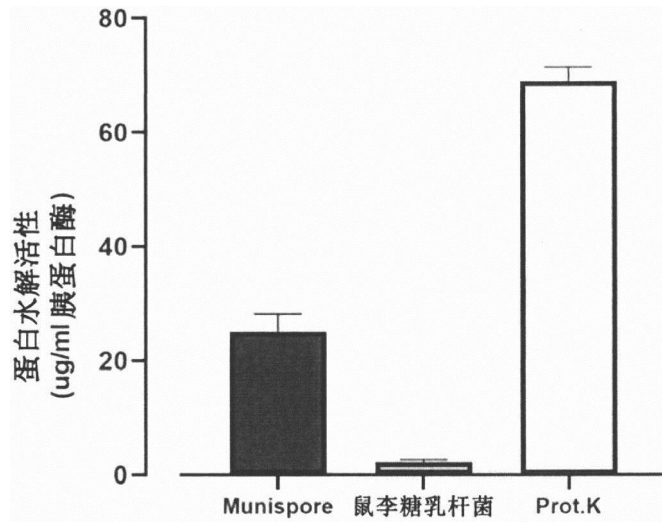


图23

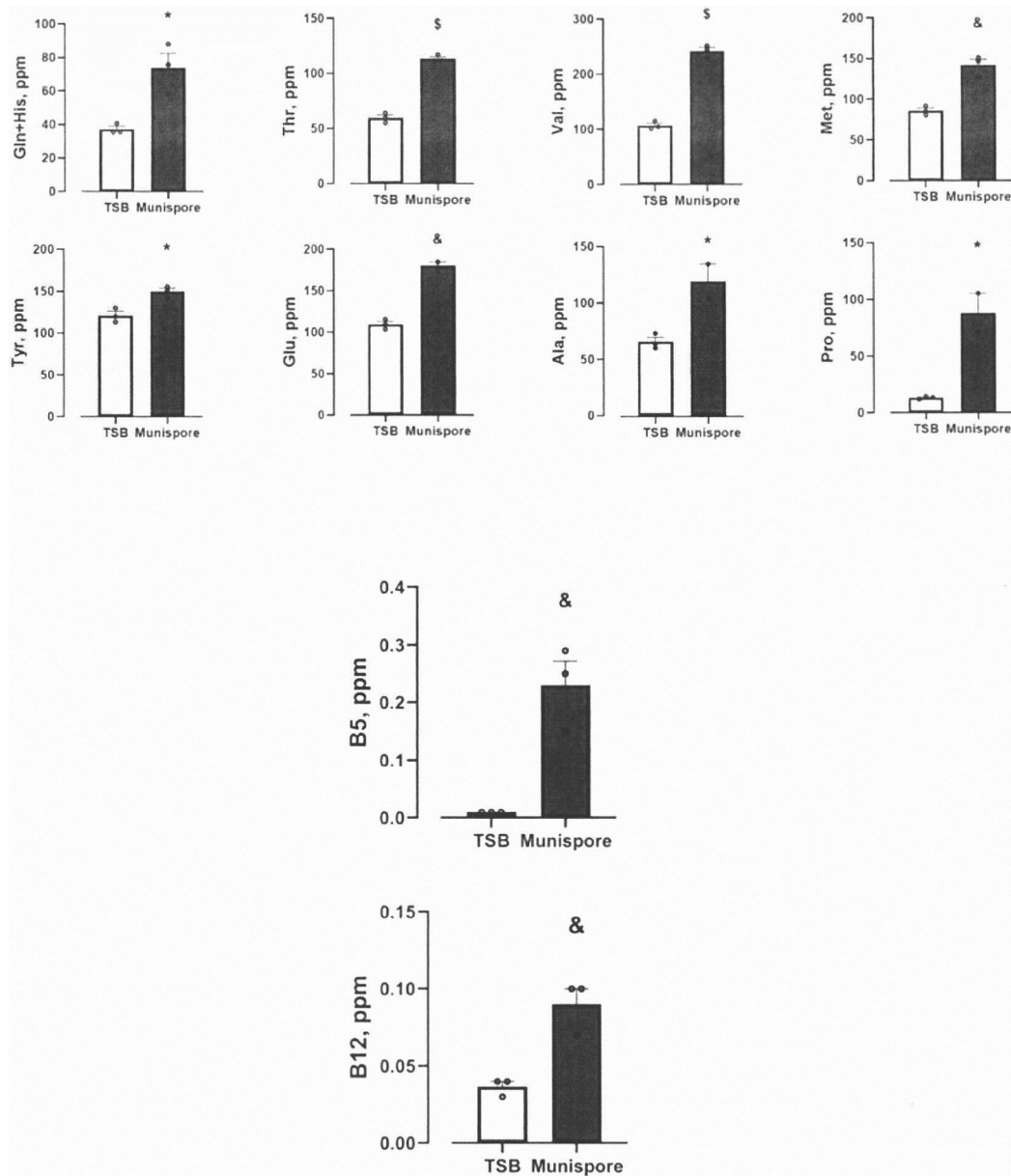


图24

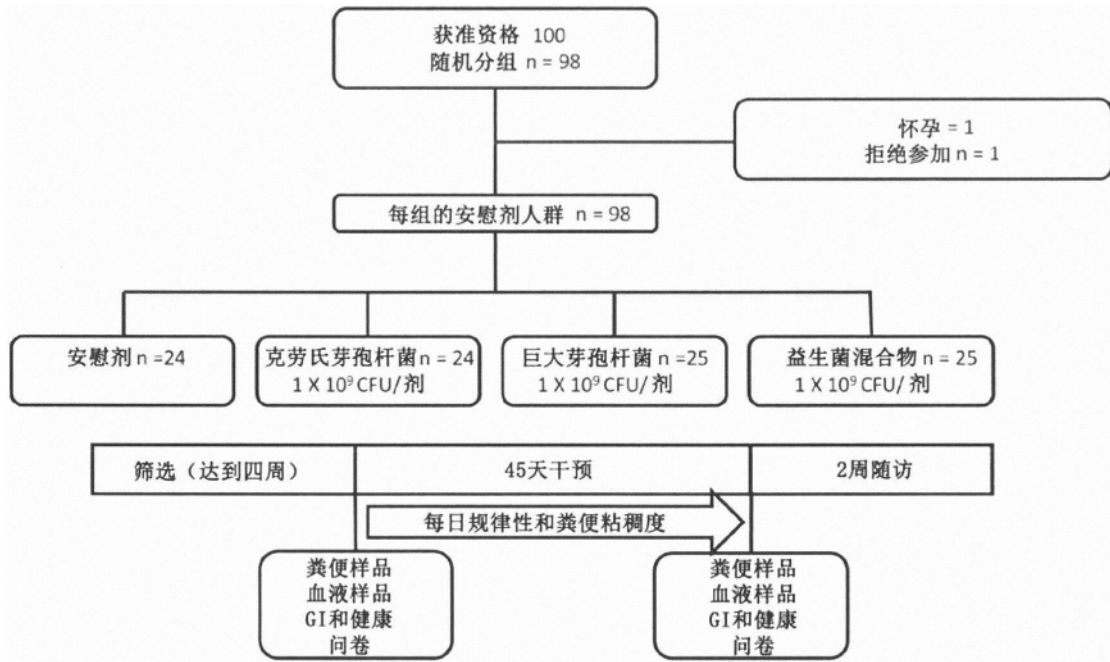


图25

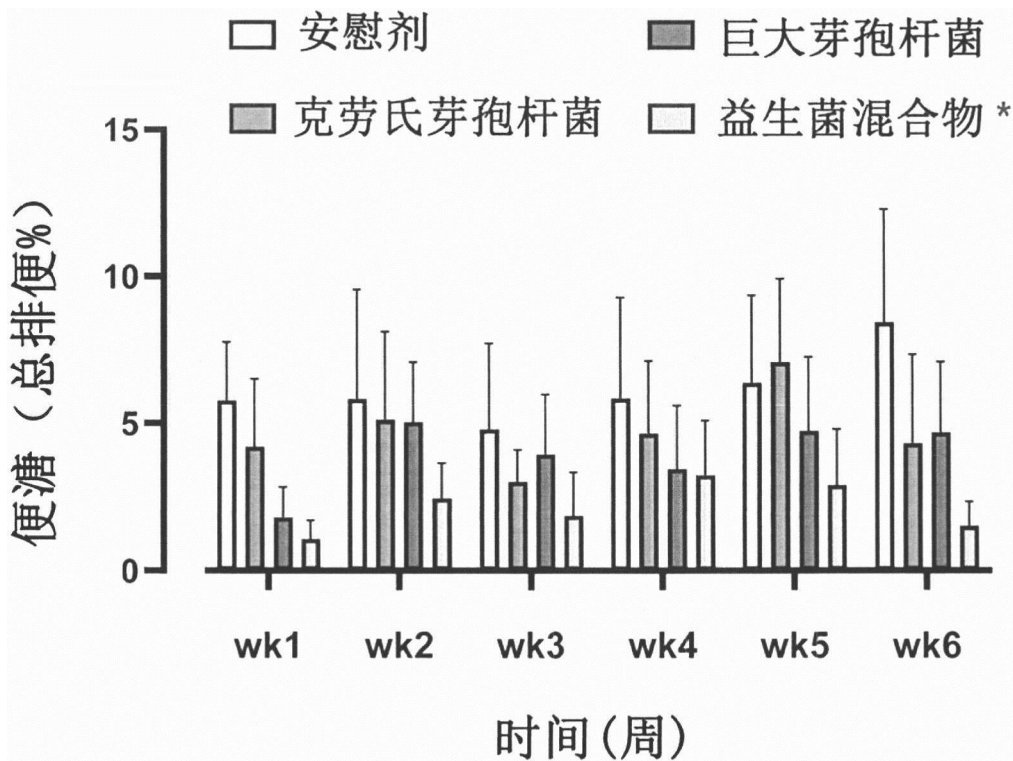


图26

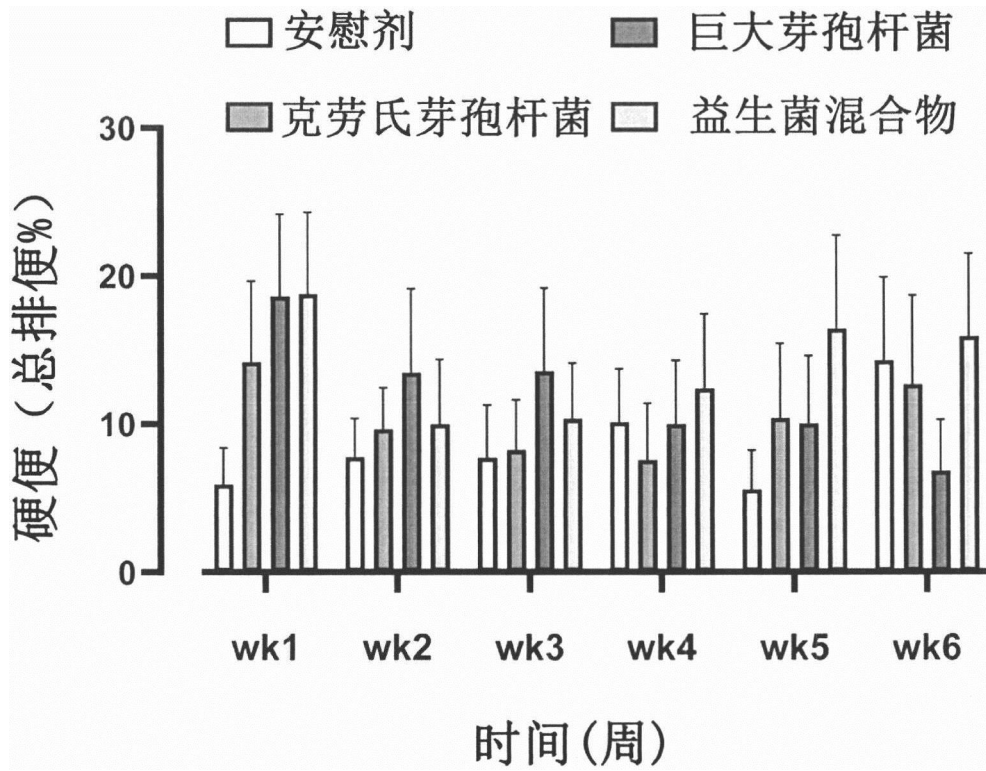


图27

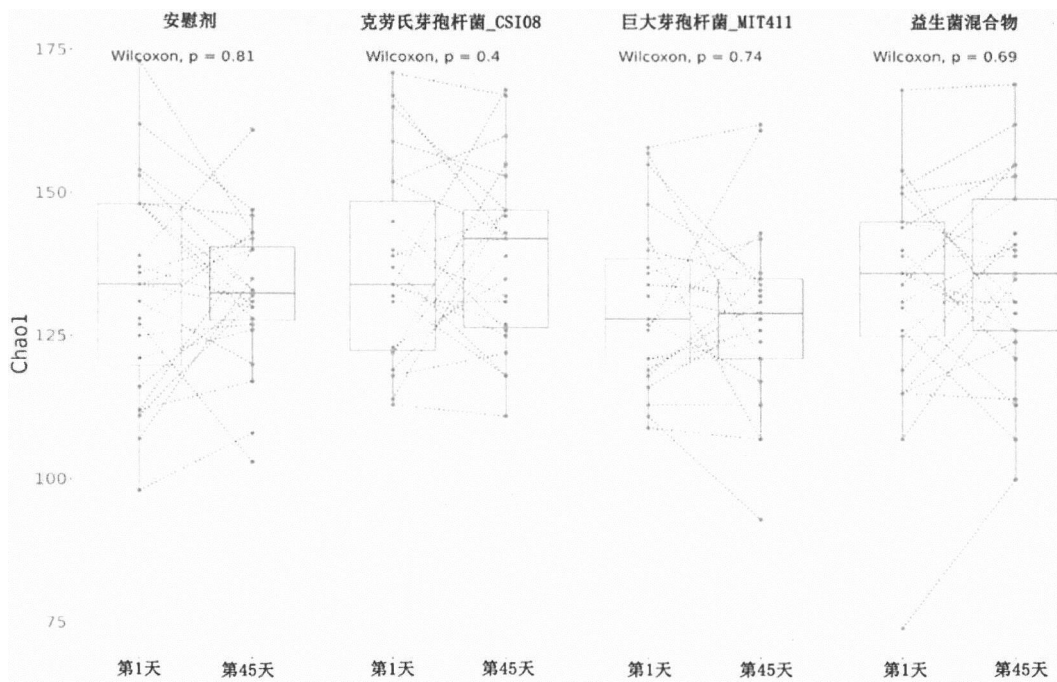


图28

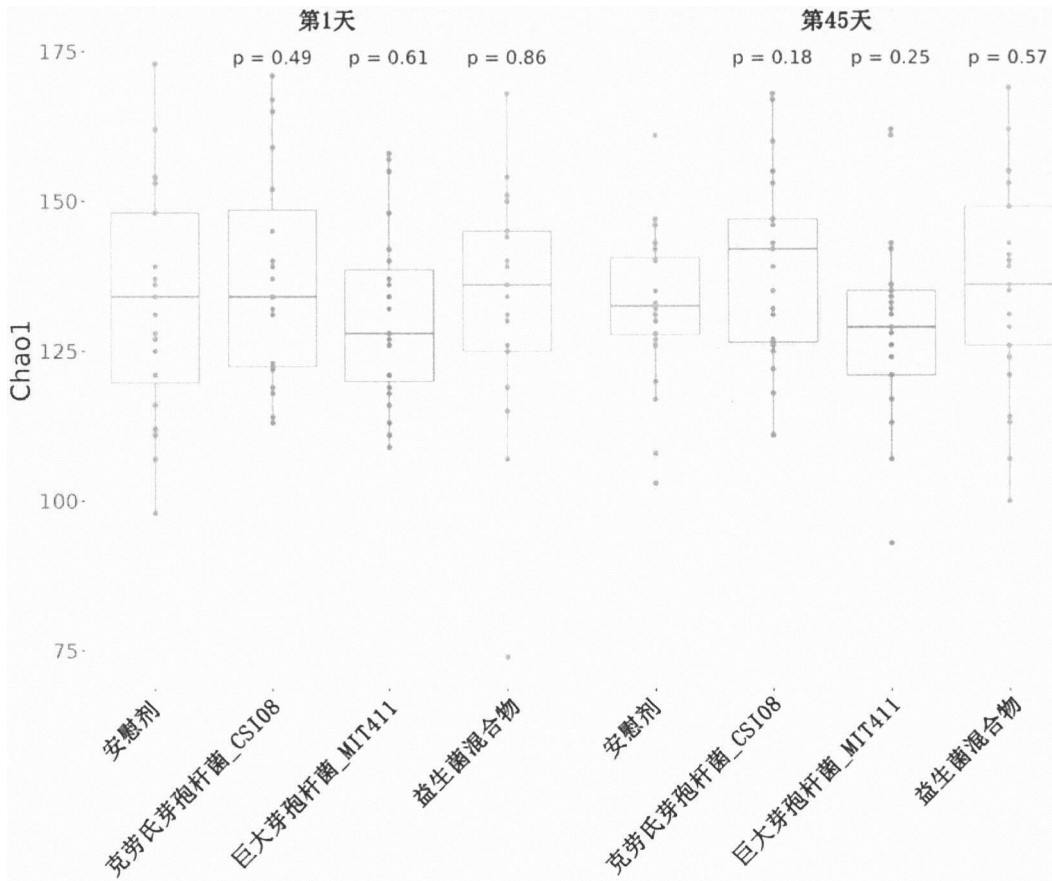


图29

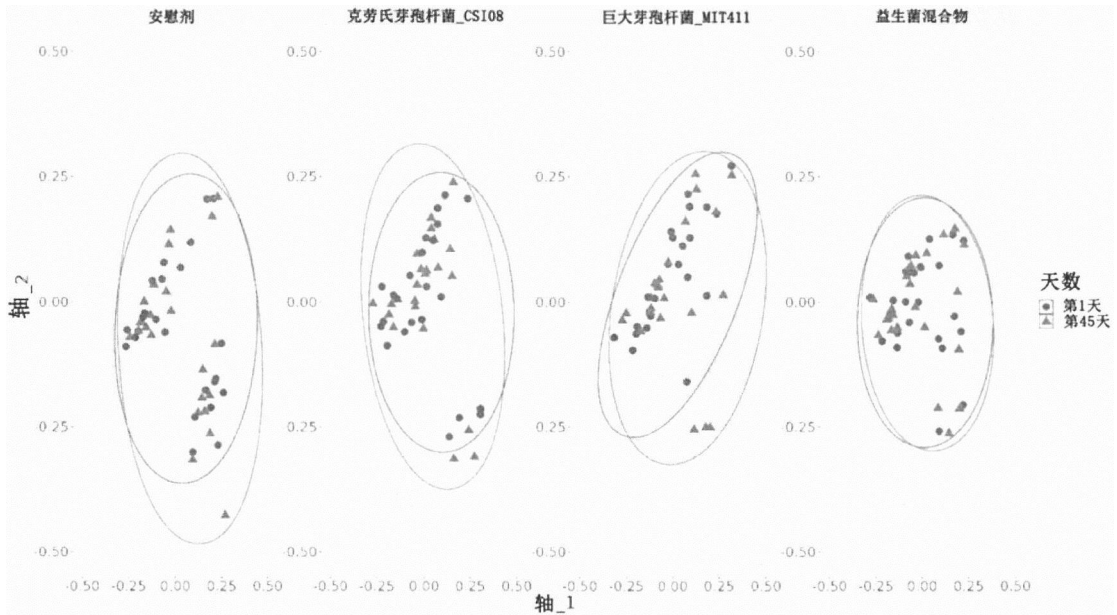


图30