

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101160134 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 22

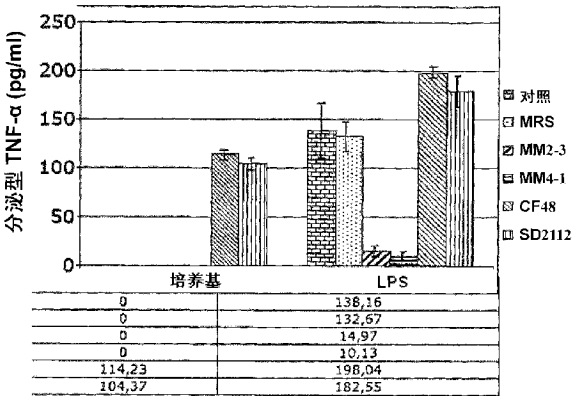
(21) 申请号 200680012099. 0
(22) 申请日 2006. 04. 12
(30) 优先权数据
11/107, 438 2005. 04. 15 US
(85) PCT申请进入国家阶段日
2007. 10. 12
(86) PCT申请的申请数据
PCT/SE2006/000434 2006. 04. 12
(87) PCT申请的公布数据
W02006/110088 EN 2006. 10. 19
(73) 专利权人 生命大地女神有限公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
(72) 发明人 埃蒙·康诺利
(74) 专利代理机构 北京乾诚五洲知识产权代理
有限责任公司 11042
代理人 付晓青 李广文
(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006. 01)
A61K 35/74 (2006. 01)

(56) 对比文件
WO 2004031368 A1, 2004. 04. 15, 全文, 说明书实施例 1-4.
WO 2004031368 A1, 2004. 04. 15, 全文, 说明书实施例 1-4.
S Ménard et al..Lactic acid
bacteria secrete metabolites retaining
anti-inflammatory properties after
intestinal transport. Gut. 2004, 53821-828.
审查员 周红涛

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

(54) 发明名称
用于减轻哺乳动物炎症的乳酸菌的选择和应用

(57) 摘要
本发明涉及选择出的乳酸菌的菌株, 所述菌株具有减轻诸如肠内疾病炎症的能力、以及选择这样菌株的方法和含有这样菌株的产品。



1. 一种路氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 菌株 MM4-1A, 其特征在于, 所述菌株的保藏号为 ATCC PTA-6475。
2. 一种如权利要求 1 所述的路氏乳杆菌菌株在制备用于对 TNF- α 抑制作用的药物中的用途。
3. 一种如权利要求 1 所述的路氏乳杆菌菌株在制备用于治疗患有炎性肠病的人类胃肠道的药物中的应用。
4. 一种对 TNF- α 抑制作用的药物, 其特征在于, 所述药物包括如权利要求 1 所述的路氏乳杆菌菌株。
5. 一种用于治疗患有炎性肠病的药物, 其特征在于, 所述药物包括如权利要求 1 所述的路氏乳杆菌菌株。

用于减轻哺乳动物炎症的乳酸菌的选择和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于筛选非致病抗炎菌株的方法的应用、和产品以及使用这样的菌株用于治疗 and 预防由某种细菌或其它炎症引起因素引起的不必要的炎症的方法。

背景技术

[0002] 单核细胞离开骨髓然后穿过外周血管直到它们到达胃肠道的黏膜 / 浆膜。这些假定的巨噬细胞是调节 GI 免疫系统所必需信号的相互作用和传播的关键因素。

[0003] 在胃肠道里,存在着具有一定水平的黏膜上皮组织里巨噬细胞对肠内腔和附着肠黏膜的细菌的免疫应答。在正常状态下,产生细胞因子信号来限制和遏制一个不必要的炎症应答。然而,当病原体或毒素出现在这些细胞的时候,它们构成第一道防线,且通过产生越来越多的致炎性细胞因子来起作用,它传播炎症应答直至威胁消除。与共生的(非威胁)细菌以及那些参与对病原体完全炎症应答的细菌的相互作用相关的细胞因子增殖,受到乳酸菌自身(包括表面抗原)和通过这些乳酸菌株产生的物质的介入,并且显然,共生菌丛和黏膜巨噬细胞具有广泛的相互作用以维持肠菌丛的平衡反应并且因此维持最佳的健康状态(Rook GA, Adams V, Hunt J, Palmer R, Martinelli R, Brunet LR. Mycobacteria and other environmental organisms as immunomodulators for immunoregulatory disorders. Springer Semin Immunopathol 2004 ;25 :237-255)。

[0004] 众所周知,不同的病菌能够造成诸如在胃肠道的炎症。诸如在胃和肠道的这样的炎症,通过被称为细胞因子的细胞间的信号蛋白进行调节,该细胞因子通过上皮组织里巨噬细胞和树突状细胞产生,以应答经病菌产生的抗原刺激物。一旦接触上皮组织和病菌或经它产生的内毒素的抗原之间的接触,例如 LPS,在上皮组织里的抗原递呈细胞(包括树突状细胞)传播信号给幼稚巨噬细胞,然后在称为 Th-1 型应答中应答,其中,致炎细胞因子包括巨噬细胞产生的 $\text{TNF } \alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-12。这些细胞因子依次刺激天然杀伤细胞、T-细胞和其它细胞以产生干扰素 γ (IFN γ),它是炎症的关键介体。IFN γ 导致炎症应答扩大并且上述反应会导致细胞毒性。幼稚巨噬细胞还能对抗原产生 Th-2 型应答。这种应答被 IFN γ 抑制。这些 Th-2 型细胞产生抗炎细胞因子例如 IL-4、IL-5、IL-9 和 IL-10。

[0005] 已知 IL-10 抑制 IFN γ 的产生并且因而抑制免疫应答。Th-1 和 Th-2 型细胞与它们各自所产生的细胞因子之间的平衡定义了对所给抗原的炎症反应的程度。Th-2 型细胞还可通过免疫系统刺激免疫球蛋白的产生。胃肠道里的抗炎活性,其中有减少的 $\text{TNF } \alpha$ 水平,与增强的上皮细胞(肠壁内层完整性)相互关联,并且因此减少了胃肠病原体和毒素引起的负效应。

[0006] 许多调查研究的结果表明 DNA 能够对肠上皮细胞发挥抗炎活性,或能够刺激免疫系统(Madsen et al. and Rachmilewitz et al, respectively, presentations at Digestive Disease Week, May 19-22, 2002, The Moscone Center, San Francisco)。

[0007] 炎症与哺乳动物许多种疾病有关,既包括外部的皮肤、眼等等,也包括内部的例如各种黏膜;在口腔、胃肠道、阴道里等等,而且在肌肉、骨关节和脑组织里。在胃肠道里有数

种与炎症有关的疾病,例如胃炎、溃疡和炎症性肠病 (IBD)。IBD 是一种造成发炎和肿胀的消化道或肠壁的慢性紊乱。当消化道因患有 IBD 变得发炎或肿胀时,形成疮疡(溃疡)并出血。这又能造成腹痛,水性腹泻,便血,疲乏,食欲降低,体重减轻,或发烧。因而,IBD 炎症导致患者的组织损害例如溃疡以及恶化患者的疾病。

[0008] IBD 两种最常见的形式是溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩氏病 (CD)。克罗恩氏病一种慢性的疾病,特征为从黏膜到浆膜整个肠壁复发性的炎性病变并且能够影响肠内许多场所。该疾病已经关系到肠内微生物菌群的失调和对正常肠内菌丛成分过度表达的炎性反应,并且目前这种反应使用一系列不同的药物治疗但效果不佳,其中之一是以抗 $\text{TNF } \alpha$ 治疗为基础用来降低在胃肠黏膜里的 $\text{TNF } \alpha$ 水平。因而,患有这样一种疾病的人形成理想的研究群和真正的目标群用于使用免疫调节、炎症消退的乳酸菌。

[0009] 小鼠自发性地发展成慢性结肠炎,该炎症不发生在无菌动物身上。小鼠结肠炎和人类克罗恩氏病相似,是一种胃肠道的慢性严重炎症疾病。克罗恩氏病通常发生在肠部,但可以发生在胃肠道的任意地方。这些情况需要肠道菌群的存在且均为 Th1 -介导 $-\text{IL-12}$ - 供养形式结肠炎。

[0010] 由于原因和症状的相似性,结肠炎小鼠模型和其它老鼠模型经常用来直接研究炎症反应的成分,以及,当同样的机理被设想用于人时,经常是可接受的作为模型使用以研究用于人类胃肠疾病的治疗。然而,有一些关于动物衍生模型对于人实用性的问题,因此在更多基于人类的系统中,需要具有可选的方法来研究人类机理,并且证实由其它模型产生的结果。在这里本发明目的是为了提供一种以人类细胞为基础来选择具有抗炎特征的乳酸菌,然后使用这样选择的乳酸菌用于预防和治疗各种炎症疾病的方法。

[0011] 路氏乳杆菌是一种动物胃肠道自然产生的寄居者之一,且常规地在健康动物肠内发现并且尽管低 pH 值,偶尔也在人的胃部发现。已知知道其具有抗菌活性。可参见,例如美国专利号 5,439,678、5,458,875、5,534,253、5,837,238 和 5,849,289。当路氏乳杆菌细胞在有丙三醇(甘油)存在的厌氧条件下生长时,它们产生称为无蛋白菌质(β -羟基-丙醛)的抗菌物质。已经知道包括路氏乳杆菌的某些乳酸菌菌株具有抗炎性质,参见美国专利申请 20040208863 和 20040067573。其它免疫调节活性也已经和各种其它乳酸菌有关。

[0012] 人体临床试验和动物研究已经显示乳酸菌可预防和改善慢性结肠炎的炎症。假定乳酸菌能够下调肠细菌诱导的致炎细胞因子反应,J. Pena (2003) 等人调查是否乳酸菌减少小鼠巨噬细胞株产生肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF } \alpha$)。研究表明:用鼠李糖乳酸菌 GG 和脂多糖培养的小鼠巨噬细胞,与对照组相比, $\text{TNF-} \alpha$ 的产生被显著抑制。

[0013] 同一组工作者调查研究了乳酸菌属是否能够有效地改善体内螺杆菌诱导的炎症。为此,在肝螺杆菌小鼠结肠炎模型中实行了路氏乳杆菌和副干酪乳杆菌的共同接种实验。与单独所给的肝螺杆菌的动物相比,在已经接受肝螺杆菌和乳杆菌属的雌性小鼠中观察到病理学数据的显著减少。在该模型里乳杆菌属益生菌效果显示为与不包括肝螺杆菌,但取决于 $\text{TNF } \alpha$ 表达转录后的调节。这些数据显示存在一种新的机制,通过该机制乳酸菌属可下调螺杆菌引发的促炎性细胞因子在巨噬细胞中产生。

[0014] 专利 W02004/031368A1 描述了选择出来的乳杆菌株,该菌株具有减少利用小鼠巨噬细胞测定 $\text{TNF-} \alpha$ 活性的哺乳动物体内幽门螺杆菌感染相关的胃肠道炎症的能力。

[0015] 专利申请 US20040057943A1 涉及一种能够在母乳和 / 或羊水中存活的棒状乳杆

菌、唾液乳杆菌、嗜酸乳杆菌、格氏乳杆菌和发酵乳杆菌的新益生菌菌株的选择工艺。

[0016] S. Menard (2003) 等人调查研究乳酸菌是否分泌在肠道运输后保持抗炎性质的代谢物。在有细菌条件培养基 (CM) 的情况下得出 LPS 结合 THP-1 幼单核细胞的分析以看看在 LPS-LBP 可识别 CD14 受体之前 LPS 是否必须结合 LPS 结合蛋白 (LBP)。这种结合作用由流式细胞计测量。研究表明双歧杆菌和嗜热链球菌 CM, 通过释放代谢物, 产生能越过肠壁的抗 TNF α 效应, 依赖与 THP-1 细胞相结合的 LPS 彻底抑制了 LDB。

[0017] 尽管已经知道几种乳酸菌减少炎症包括胃肠道炎症的能力不同, 但是以前并不知道这些不同可以通过利用基于人细胞模型能够很好地预言, 并且这样的模型优选地用来选择对人类有潜在效应的这种菌株。

[0018] 因此, 因此本发明的一个目的是为了提供乳酸菌菌株, 它使用人类细胞株来选择, 具有减轻炎症的能力, 例如由 IBD 引起的炎症。本发明进一步的目的是为了提供含有所述菌株的产品, 包括用于炎症治疗或预防的制剂, 例如和有关的 IBD 用于治疗人类和其它哺乳动物的制剂, 包括所述菌株生长的条件培养基和它的含蛋白提取物。因此, 本发明用于治疗导致患者组织损害例如溃疡和恶化病症的 IBD 炎症。

[0019] 其它目的和优点从以下说明和所附的权利要求中将会变得更加清楚。

发明内容

[0020] 本发明在这里提供了选择出来的新的乳酸菌菌株, 具有减轻炎症例如肠内疾病的能力, 以及一种选择这样菌株的方法和含有这样菌株的产品。

[0021] 附图简要说明

[0022] 图 1 是一幅条线图显示了乳酸菌条件培养基通过 LPS- 激活的单核细胞对 TNF- α 产物的作用。三组菌株和对照组培养 24 小时。

[0023] 图 2 是一幅条线图显示了乳酸菌条件培养基通过 LPS- 激活的单核细胞对 TNF- α 产物的作用。三组菌株和对照组培养 9 小时。

[0024] 图 3 是一幅条线图显示了乳酸菌条件培养基通过 LPS- 激活的原单核细胞对 TNF- α 产物的抑制。使用来自 CD- 缓解 (缓解) 和 CD- 激活 (激活) 的患者的原单核细胞。菌株和对照组培养 24 小时。

[0025] 图 4 是一幅条线图显示了乳酸菌条件培养基通过 LPS- 激活的原单核细胞对 TNF- α 产物的抑制。使用来自 CD- 激活患者的原单核细胞。菌株和对照组培养 24 小时。

[0026] 发明详细说明和优选实施方式

[0027] 本发明这里包括由于它们减轻炎症例如 IBD 的能力而选择的乳酸菌菌株。这样的菌株包括路氏乳杆菌 MM4-1 A, ATCC PTA-6475。诸如食物、营养添加剂和配方、药品或包括全部部件的医疗器械或来源于这些菌株的组分的产品, 可以通过本领域公知的方法制备, 并且通常包括已知的可吸收载体加上乳酸菌菌株, 或其衍生物。以前已知的菌株, 现在经鉴定具有良好的 TNF- α 降低能力, 例如鼠李糖乳杆菌 GGATCC 53103、路氏乳杆菌 MM2-3、ATCC PTA-4659 及其它, 也可用于上述配方中。

[0028] 使用适当细胞因子的模型系统被用来确定减轻或增强炎症的因素。在发明这里提供的是使用了一种以人类细胞为基础的测定方法。

[0029] THP-1 细胞是一种从白血病患者得到的人类单核细胞株, 并且保存在美国典型菌

种保藏地。这些来自人宿主细胞的起源使得它们特别相关于研究人类胃肠免疫系统和人共生细菌之间的相互作用。

[0030] 本发明的数据显示了经特定菌株路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 和路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 产生 TNF α 的强抑制作用,而且这种抑制由这两种特定菌株在对数 / 稳定生长期释放进入生长培养基的物质介导。反之,两种其它的路氏乳杆菌菌株,不仅仅无法抑制细胞对大肠杆菌毒素的炎症反应,而且还自己诱导炎症反应。这种惊人发现表明路氏乳杆菌菌株 ATCC PTA 4659 和路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 具有潜在的、无法预测的抗炎性能。

[0031] 为了证实这些发现可能的临床意义,进一步研究在从炎性肠病患者血液得到的细胞里进行,特别是克罗恩氏病 (CD)。

[0032] 为了研究乳酸菌和粘膜免疫细胞间的相互作用,我们考虑到分化的巨噬细胞是比未分化单核细胞更好的模型。这些分化的巨噬细胞更可能和体内胃肠道对乳酸菌反应的巨噬细胞群相似并且引起先天宿主免疫系统可调控的或炎症的变化。例如,经 THP-1 细胞应答内毒素产生的促炎性白细胞介素 -8 在分化诱导后显著增加 (Baqui et al., 1999) 以及进一步地经这些细胞产生的 TNF α 在分化后明显增加 (Klegeris et al., 1997)。

[0033] 本发明的特征通过参考下列实施例将会更加清楚地理解,但不应被解释为限制发明。

[0034] 实施例 1

[0035] 抗炎菌株的选择

[0036] 将 THP-1 细胞和来自所选的路氏乳杆菌菌株、路氏乳杆菌 ATCCPTA 4659、路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475、路氏乳杆菌 ATCC 55730 和路氏乳杆菌菌株 CF48-3 A 生长的对照培养基或条件培养基 (L-CM) 共同培养。条件培养基 (L-CM) 是路氏乳杆菌培养物中的每种培养 9 小时或 24 小时的无细胞上清液。THP-1 细胞受到对照培养基或细胞去除后 3.5 小时培养期间的大肠杆菌 - 衍生的 LPS (它导致了在正常炎症反应中 TNF α 的产生) 的刺激并且上清液使用 ELISA 技术分析测定 TNF α 水平。

[0037] 材料:

[0038] THP-1 白血病单核细胞株 (ATCC, 产品货号 TIB202)

[0039] RPMI 1640 培养基 (Gibco-Invitrogen)

[0040] 胎牛血清 (Gibco-Invitrogen)

[0041] 青霉素—链霉素溶液 (Sigma)

[0042] 大肠杆菌血清型 0127 :B8 脂多糖 (Sigma, 产品货号 L3137)

[0043] TNF α /TNF-SFII 人类 DuoSet ELISA Development 试剂盒 (R&D 系统, 产品货号 D Y210)

[0044] 方法:

[0045] 使用 THP-1 单核细胞株。往适合的孔里加入 5% (v/v) MRS 培养基和 5% (v/v) 乳酸菌条件培养基。乳酸菌条件培养基是来自 MRS 培养基中 24- 小时培养的乳酸菌种的上清液。然后条件培养基经快速真空干燥调节 pH 值并且颗粒 (pellet) 以相同体积的培养基重新悬浮。尽管潮湿箱被设计用来将液体蒸发减小到最少,但在培养 48 小时之后,在 24- 孔培养板里的细胞悬液体积减至约 475 μ l。

[0046] 往适合的孔里加入 100ng/ml 的大肠杆菌血清型 0127 :B8 脂多糖。在 37°C、潮湿、

5% CO₂ 的培养室培养。在培养 3.5 小时后,收集培养基放入 1.5ml 离心管。在 4℃ 下以 1500 RCF 离心 5 分钟。收集上清液。

[0047] 通过 ELISA (Quantikine TNF- α /TNF-SFII human DuoSet) 测试细胞因子表达。

[0048] 所用的培养基是在 RPMI 1640 的 10% FBS、2% 青霉素 - 链霉素。

[0049] 结果—实施例 1

[0050] 在缺少 LPS 的情况下,从路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 和路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 菌株的 24 小时 L-CM 的培养的 THP-1 细胞没有导致培养基 (图 1) 里 TNF- α 的产生。令人惊奇的是,来自路氏乳杆菌 ATCC 55730 和路氏乳杆菌菌株 CF48-3A 的 L-CM 刺激了 THP-1 细胞产生 TNF- α , 达到相似于那些单独利用 LPS 所观察到的水平。因此,路氏乳杆菌菌株在它们由休眠 THP-1 单核细胞刺激促炎症因子 TNF- α 产生的能力有差异。

[0051] 在 L-CM 不存在的情况下,把 LPS 添加到 THP-1 细胞导致在 3.5 小时培养期间产生 138 pg/ml TNF- α 。这是预期的 THP-1 细胞对内毒素的炎症应答。菌种生长培养基 (MRS) 的添加,作为 L-CM 添加的对照组,导致产生 132pg/ml TNF- α , 以及因而 MRS 无法干扰对 LPS 的应答。来自路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 或路氏乳杆菌 ATCC PTA6475 的 24- 小时 L-CM 的加入引人注目地将 LPS 刺激的 TNF- α 水平分别降低至仅为 14 和 10pg/ml。这表示 LPS 刺激的 TNF- α 产物分别有 89 和 92% 的抑制。相反地,在来自路氏乳杆菌 ATCC 55730 和路氏乳杆菌菌株 CF48-3A 的 24- 小时 L-CM 存在的情况下,与没有 LPS 存在是水平相比, LPS 仍然能够诱导 TNF- α 水平显著增长。尽管存在来自路氏乳杆菌 ATCC 55730 和路氏乳杆菌菌株 CF48-3A 的 L-CM, LPS- 刺激的 TNF- α 产物还是分别增长 50% 和 38%。

[0052] 来自路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 或路氏乳杆菌 ATCC PTA6475 的 9 小时 L-CM 完成的相似实验证明了对 LPS 刺激的 TNF- α 产物的抑制作用非常小分别为 52% 和 16%, 图 2) 但仍然存在。因此,路氏乳杆菌菌株较长时间的培养,在对数 / 稳定生长期收获 L-CM, 导致了抑制 TNF- α 产物的改进功效。

[0053] 实施例 2

[0054] 阴性选择制备单核细胞

[0055] 单核细胞分离试剂盒 II (Miltenyi Biotec, Inc. 12740 Earhart Avenue, Auburn, CA 95602 (800) 367-6227 ; <http://www.miltenyibiotec.com/index.php> ? , order number 130-091-153) 是一种用于分离来自人外周血单核细胞 (PBMC) 的未接触单核细胞的间接磁标系统。非单核细胞, 比如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、树突状细胞、和嗜碱细胞能使用一种对抗 CD3、CD7、CD16、CD19、CD56、CD123 和血型糖蛋白 A 的生物素共轭抗生素混合液, 和生物素抗体磁珠间接地磁性标记。在两个标记步骤之间, 不需要洗涤步骤。磁性标记的非单核细胞被在 MACS 分离器的磁场里的 MACS[®] 柱上保留而耗尽, 而未标记的单核细胞穿过柱。

相对富集的未标记单核细胞的分离由磁性标记细胞的耗尽而实现。富集的水平可以经流式细胞计评估或证实。

[0056] 试剂盒信息 :

[0057] 单核细胞分离试剂盒 II (序号 130-091-153)。试剂盒内容物 :Fc 受体封闭试剂 (1ml) ;生物素 - 抗体鸡尾酒 (1ml) ;抗生物素微珠 (2ml) ;不在试剂盒中提供的材料和设备 ;15ml Corning 离心管 ;冷冻离心机 ;移液管和移液管吸头 ;血清吸量管和吸量管吸头 ;

计时器 ;美天旎生物技术有限公司的 MACS[®] 质谱柱 ;美天旎生物技术有限公司的 MACS[®] 磁体 ;美天旎生物技术有限公司的 MACS[®] 柱架 ;Hausser 科学发射谱线血球计 ;操作缓冲液 (WB) :无菌 IX 磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4, Gibco 产品货号 10010023)+0.5% 牛血清蛋白 (BSA, Panvera 产品货号 P2489)+2mM 乙二胺四乙酸 (EDTA, Gibco 产品货号 15553-035)

[0058] 方法 (单核细胞分离试剂盒 II) :

[0059] 通过依靠血球计来测定细胞密度。转移细胞悬液进 15ml Corning 圆锥管。细胞在 4℃, 300 RCF 离心 10 分钟。使用 10ml 血清吸量管去除上清液。将细胞以每 10⁷ 总细胞中 30 微升 WB 重新悬浮。每 10⁷ 个总细胞中加入 10 μl Fc 受体封闭试剂。每 10⁷ 个总细胞中加入 10 μl 生物素 - 抗体鸡尾酒。在 4-8℃ 下混匀并培养 10 分钟。每 10⁷ 个总细胞中加入 30 μl WB。每 10⁷ 个总细胞中加入 20 μl 的抗生物素微珠。在 4-8℃ 下混合均匀且再培养 15 分钟。通过加入 10-20X 标记体积的 WB 冲洗细胞。在 4℃、300 RCF 下离心 10 分钟。使用 2ml 血清吸量管去除上清液。将沉淀细胞以每 10⁸ 个细胞中 500 微升 WB 重新悬浮。将 MACS MS 柱放到磁体上。

[0060] 用 500 μl WB 冲洗柱子。将细胞悬浮液装于柱中。让导液穿过并且进入收集管 (4min/ml)。用 3 x 500 μl WB 洗柱, 并且让导液穿过进入同一个收集管。

[0061] 通过把柱放进另一个管里洗脱捕获的细胞从而进入另一个收集管, 用吸液管吸取 1ml WB 滴入柱里, 然后使用由柱提供活塞产生的正压力吹洗细胞。以 2 秒 / 英尺的速率推进。

[0062] 以上方案中, 快速操作和仅采用冷溶液是重要的。在冰上操作需要增加 MACS 微珠的培养次数。在 4℃ ~ 8℃ 的冰箱里培养, 缓冲液和培养基不应含有 Ca²⁺ 或 Mg⁺。BSA 可用其它蛋白质例如明胶, 人血清白蛋白或胎牛血清替代。使用的抗凝血剂类型不影响该方案。更高的温度和较长的培养次数可导致非特异细胞标记。

[0063] 实施例 3

[0064] 原单核细胞生物鉴定

[0065] 原发性人类单核细胞从处于活性炎症 (CD- 激活) 状态或炎症已经消退的缓解 (CD- 缓解) 的 CD 患者血液中分离出。血液从 CD 患者身上抽出并且从周围血液单核细胞分离。外周血单核细胞使用实施例 2 中的方法富集。这些的悬液在 37℃、潮湿、5% CO₂ 培养箱内分化 48 小时。在这个过程之后, 细胞已经发展成巨噬细胞。然后生长培养基 (对照组) 或 L-CM 加入到外周血单核细胞或分化的巨噬细胞, 然后细胞用对照培养基或大肠杆菌 - 衍生的 LPS 刺激, 并且培养 3.5 小时。分析来源于这些培养物的上清液产生的 TNF-α。

[0066] 使用的材料 :

[0067] 初级外周血单核细胞 ;RPMI 1640 培养基 (Gibco-Invitrogen) ;胎牛血清 (Gibco-Invitrogen) ;青霉素 - 链霉素溶液 (Sigma) ;大肠杆菌血清型 0127 :B8 脂多糖 (Sigma, 产品货号 L3137) ;反式视黄酸 (CalBioChem, 产品货号 5 54720) ;TNF-α /TNF-SFII 人类 DuoSet ELISADevelopment 试剂盒 (R&D 系统, 产品货号 D Y210)。

[0068] 外周血单核细胞按照方案里描述的被分离出 :外周血单核细胞分离方案 (在实施例 2 中描述的) 和单核细胞阴性选择方案 (在实施例 2 中描述的)。把细胞悬浮液培养基 (PBS) 变成细胞培养基 (10% FBS、RPMI 1640 中 2% 青霉素 - 链霉素)。

[0069] 稀释细胞至 1.0×10^5 个细胞 /ml。把 500 μ l 细胞悬液放进一个 24-孔微孔板里的每个孔里。让细胞在 37℃、潮湿、5% CO₂ 培养箱内分化 48 小时。开始生物鉴定。把 5% (v/v) MRS 培养基和 5% (v/v) 乳酸菌条件培养基放入适合的孔中。乳酸菌条件培养基是来自 MRS 培养基中 24 小时培养的乳酸菌种上清液。然后条件培养基通过高速真空干燥装置调节 pH, 并且颗粒 (pellet) 以相同体积的培养基重新悬浮。尽管潮湿箱被设计用于液体蒸发减小到最少, 但在培养 48 小时之后, 在 24-孔板里的细胞悬液体积减至约 475 ~ 485 μ l。把 100ng/ml 的大肠杆菌血清型 0127 :B8 脂多糖加入适合的孔里。在 37℃、潮湿、5% CO₂ 培养箱内培养。在培养 3.5 小时后, 收集培养物进入 1.5ml 离心管。在 4℃、1500 RCF 下离心 5 分钟。收集上清液。通过 ELISA (Quantikine TNF- α /TNF-SFII 人类 DuoSet) 测试细胞因子表达。

[0070] 结果 - 实施例 3

[0071] 在 CD- 缓解患者的原单核细胞里, LPS 导致 TNF α 产生预期提高, 且这种提高当存在来自路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 的乳杆菌条件培养基时, 可被抑制 43%。在 CD- 激活患者的原单核细胞里, LPS- 刺激的 TNF- α 产物的水平稍微高点儿并且相同程度的被来自路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 的 L-CM 抑制 (图 3)。

[0072] 与培养基对照组相比较, 对源于 CD 活动患者原单核细胞中分化巨噬细胞 LPS 应答产生的 TNF α , 明显被路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 的乳杆菌条件培养基抑制 50%, 被路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 的乳杆菌条件培养基抑制 60% (图 4)。确定来自 THP-1 细胞, 从路氏乳杆菌 ATCC 55730 和路氏乳杆菌菌株 CF48-3A 得到的 L-CM 的数据无法抑制 TNF- α 的产生, 且相反地, 增加了 22% 和 30% TNF- α 的产生, 分别和相关对照组比较 (图 4)。

[0073] 这些数据证实了令人惊奇地发现: 路氏乳杆菌的不同菌株对单核细胞和分化巨噬细胞产生 TNF α 有不同的影响, 并且菌株路氏乳杆菌 ATCC PTA 4659 和路氏乳杆菌 ATCC PTA 6475 特别适合在患有炎性肠病的人类胃肠道使用。

[0074] 实施例 4

[0075] 条件培养基的使用

[0076] 使用实施例 1 的方法, 条件培养基选自一种有效降低 TNF α 的菌株, 在该实验中培养基来自路氏乳杆菌 ATCC PTA-4659。这种培养基通过在 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Sparks, MD) 里生长菌株大型生产。乳酸菌的过夜培养物被稀释至 1.0 OD₆₀₀ (表示大约 109 细胞 /ml) 并且进一步稀释 1 : 10 然后另外生长 24 小时。通过在 4℃、8500rpm 离心 10 分钟收集无细菌细胞的条件培养基。条件培养基从细胞颗粒分离并且然后过滤穿过 0.22 μ l 微孔过滤器 (Millipore, Bedford, Mass.)。条件培养基然后低压冻干和制剂, 使用标准方法, 生产片剂。该片剂被人类用作药物来有效治疗 IBD 引起的溃疡。

[0077] 实施例 5

[0078] 所选的抗炎路氏乳杆菌菌株的使用

[0079] 使用实施例 1 的方法, 条件培养基选自一个有效降低 TNF α 的菌株, 在该实验里培养基来自路氏乳杆菌 ATCC PTA-4659。路氏乳杆菌菌株然后低压冻干并且制剂, 使用标准方法, 生产胶囊。该胶囊被人类用作药物来有效降低 IBD 引起的 IBD 患者黏膜的炎症。

[0080] 实施例 6

[0081] 有效乳酸菌菌株产生的蛋白质的特性

[0082] 不同的有效乳酸菌条件培养基,包括路氏乳杆菌菌株 ATCC PTA4659 和路氏乳杆菌 ATCC PTA-6475 条件培养基,用不同的改性化合物处理以测定从细菌得到的推定免疫调控蛋白的性质。因而,条件培养基受到重复冻融,加热处理,采用 DNA 消化酶、蛋白酶、非活性蛋白酶消化。推定免疫调控蛋白以这种方式本质上确定成为一种或多种蛋白质或肽。为了测定推定蛋白质免疫调控蛋白的大小,条件培养基通过滤过分级并且测试滤液的功效。以这种方式,我们发现有效乳酸菌菌株条件培养基的活性成分分子量大约为 5kDa 或更小。

[0083] 虽然本发明结合具体的实施例进行了说明,要说明的是各种变化,修饰,和实施例是可能的,并且因此,所有这些变化,修饰和实施例也被认为在本发明的精神和范围之内。

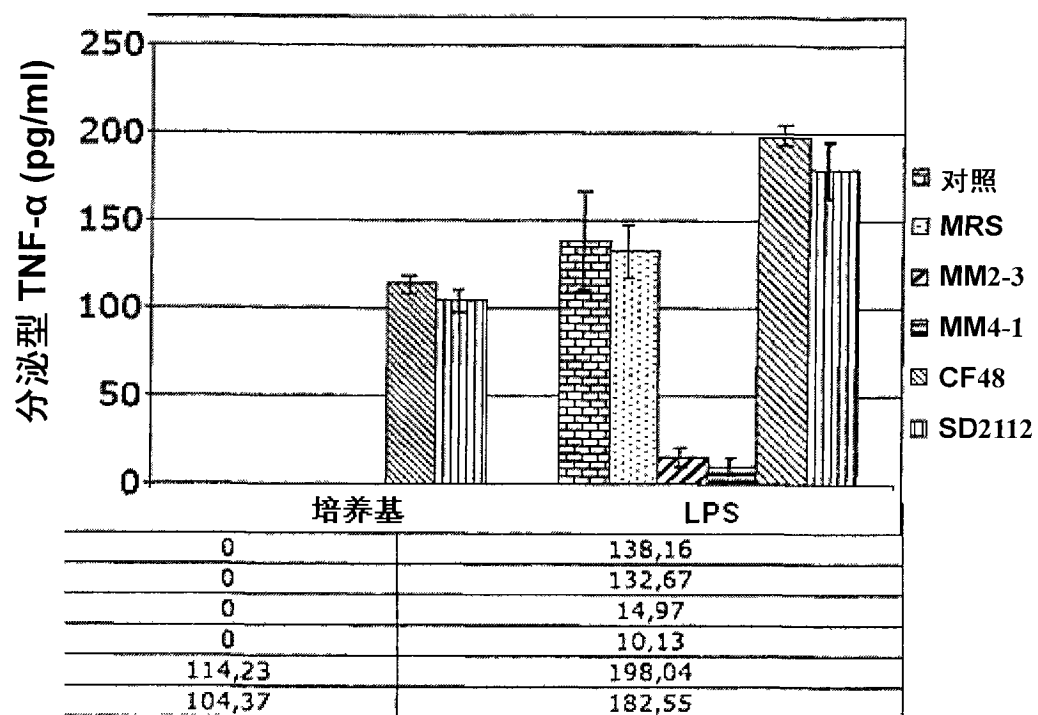


图 1

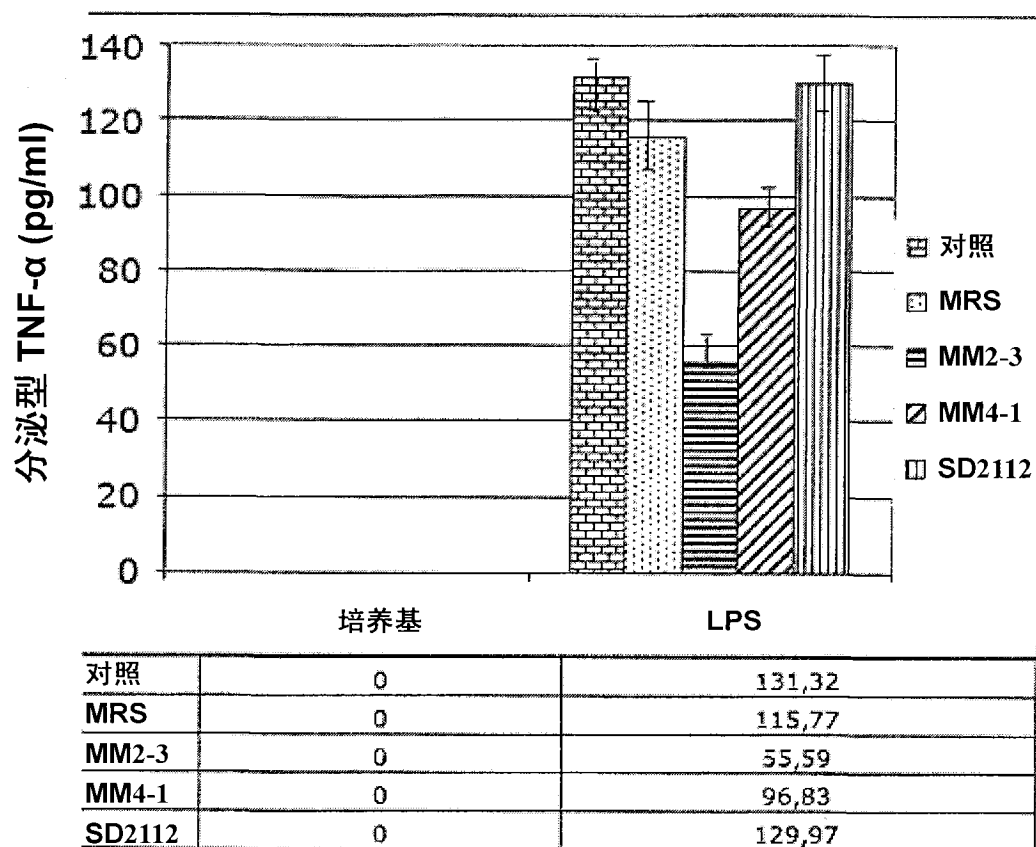
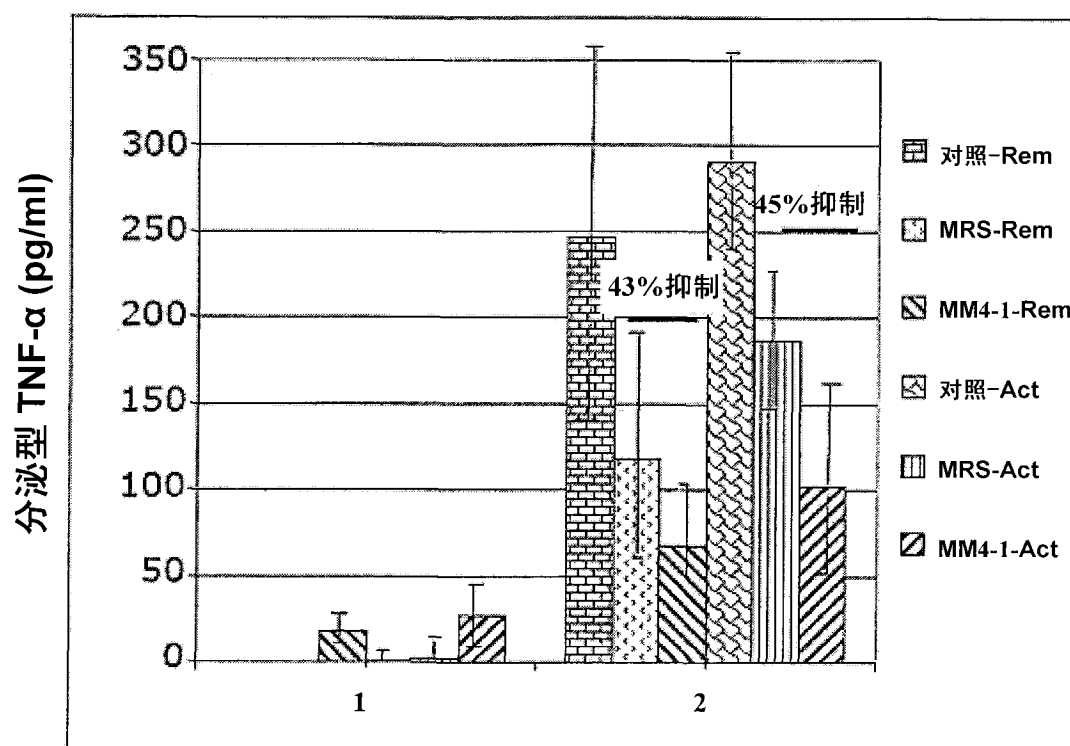


图 2



CD-R

	无 LPS 对照	LPS 对照
对照-Rem	0	246,5
MRS-Rem	0	118,2
MM4-1-Rem	17,82	67,84

CD-A

	无 LPS 对照	LPS 对照
对照-Act	0,93	290,73
MRS-Act	2,62	186,49
MM4-1-Act	27,3	102,04

TNF- α ELISA 的检出限: 15 pg/ml 到 1000 pg/ml

图 3

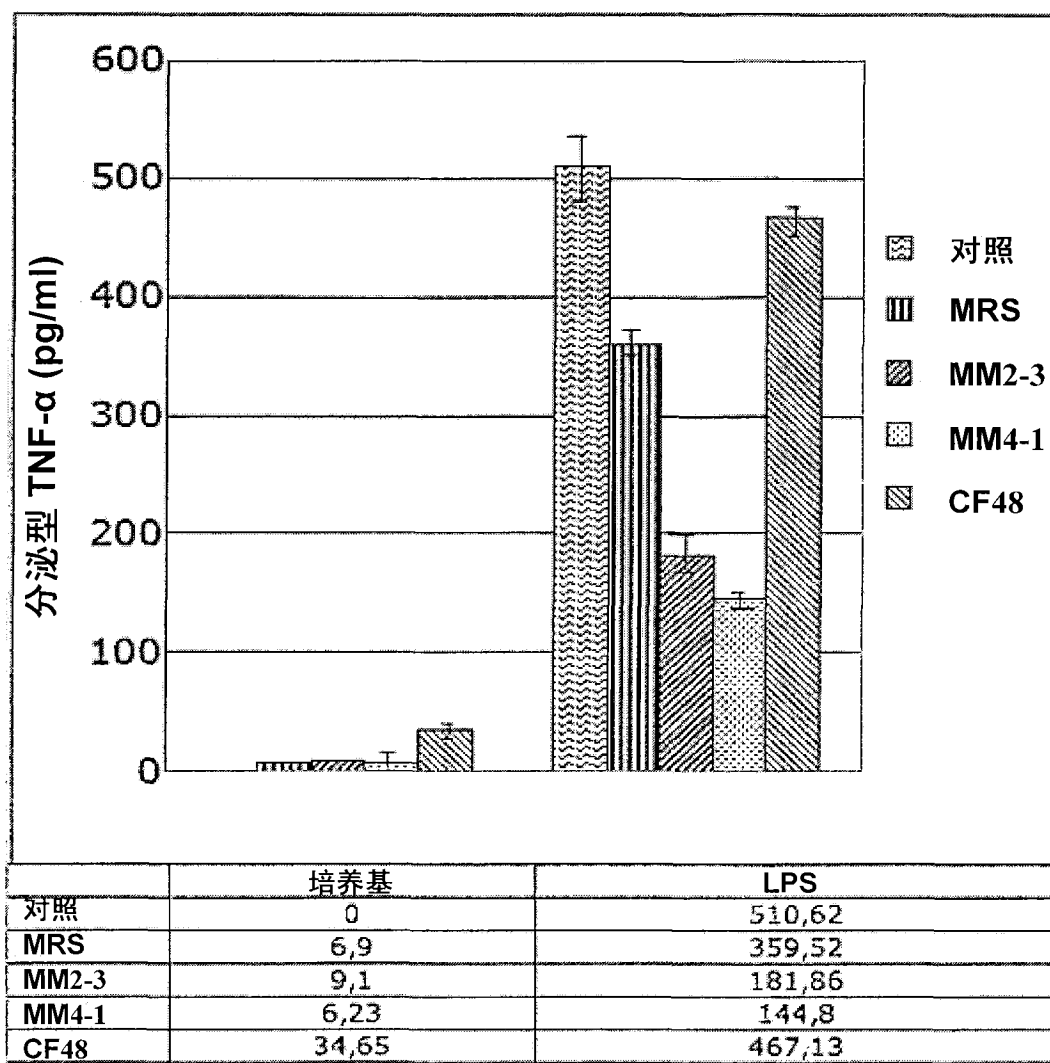


图 4