



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101420966 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200780012933. 0

CN 1674875 A, 2005. 09. 28,

(22) 申请日 2007. 03. 09

CN 1527702 A, 2004. 09. 08,

CN 1674875 A, 2005. 09. 28,

(30) 优先权数据

061110973. 2 2006. 03. 10 EP

061112822. 9 2006. 04. 20 EP

孙建琴等. 母乳低聚糖及益生元与婴幼儿营养和健康. 《国外医学. 儿科学分册》. 2003, 第30卷(第02期),

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 10. 10

孙建琴等. 母乳低聚糖及益生元与婴幼儿营养和健康. 《国外医学. 儿科学分册》. 2003, 第30卷(第02期),

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NL2007/050094 2007. 03. 09

审查员 董海鹏

(87) PCT申请的公布数据

W02007/105945 EN 2007. 09. 20

(73) 专利权人 纽崔西亚公司

地址 荷兰佐特尔梅

(72) 发明人 C·贝尔曼 J·克诺尔

M·S·阿列斯 B·施塔尔 G·伯姆

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 31/702(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005147697 A1, 2005. 07. 07,

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

不可消化的糖用于在出生后给予婴儿最佳开始的用途

(57) 摘要

本发明涉及包含水溶性、不可消化的糖的用于孕妇的食品或添加剂。所述组合物用于改善孕妇的菌群和 / 或免疫系统, 改善婴儿的免疫系统, 以及改善出生后婴儿的肠道菌群。

1. 水溶性、不可消化的糖用于制备一种组合物的用途,其中所述水溶性、不可消化的糖包含反式半乳糖寡糖,并且其中将所述组合物施用给怀有婴儿的孕妇用于

- i. 改善出生后婴儿的肠道菌群发育;
- ii. 加强出生后婴儿的免疫系统和 / 或预防出生后婴儿的免疫系统相关疾病。

2. 权利要求 1 的用途,其中将所述组合物施用给怀有婴儿的孕妇用于预防出生后婴儿中选自变态反应、湿疹、哮喘、鼻炎、枯草热、鼻结膜炎、喘鸣、肠道感染、阴道感染、呼吸道感染、腹泻、便秘、痉挛和肠道炎症中的至少一种疾病。

3. 水溶性、不可消化的糖用于制备一种组合物的用途,其中所述水溶性、不可消化的糖包含反式半乳糖寡糖,并且其中将所述组合物施用给怀有婴儿的孕妇用于

- i. 加强出生前婴儿的免疫系统。

4. 权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述糖以 0.5g/ 天至 50g/ 天的剂量,在预产期前给药至少 2 周。

5. 权利要求 1-3 中任一项的用途,

- 用于促进出生后婴儿肠道细菌定植,和 / 或
- 提高出生后婴儿结肠和 / 或粪便中双歧杆菌和 / 或乳杆菌占总细菌的百分比。

6. 权利要求 1-3 中任一项的用途,其中所述水溶性、不可消化的糖还包含选自果聚糖和果寡糖的水溶性、不可消化的糖,优选菊粉。

## 不可消化的糖用于在出生后给予婴儿最佳开始的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种组合物,其通过向孕妇施用而促进婴儿健康。

### 背景技术

[0002] 对母亲而言,婴儿在妊娠期间发育良好以及在出生时获得最佳开始是尤其重要的。因此,孕妇通常摄取旨在改善未出生儿童的生长和发育的营养组合物。

[0003] 长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)已被描述为能够促进未出生儿童的大脑发育。据此,孕妇(以及哺乳期妇女)可摄取具有LC-P UFA的营养组合物。EP705539描述了这样的组合物。

[0004] EP1296694涉及对变态反应进行预防,并特别涉及通过在出生前和出生后,给处于患特异性疾病高风险的儿童施用益生菌、存在于健康肠道菌群中的有益微生物对特异性疾病进行一级预防。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明人已发现,给孕妇施用水溶性、不可消化的糖能够改善未出生婴儿的免疫系统。发现未出生婴儿存在于肠细胞和单核细胞的细胞膜中的受体CD14和TLR2表达增强。

[0007] 此外,还发现,与没有摄取本发明的糖的母亲所分娩的婴儿的肠道菌群发育情况相比,摄取了本发明的糖的母亲所分娩的婴儿的肠道菌群发育状况得以改善。

[0008] 本发明人已发现,婴儿的肠道菌群发育之所以得到改善是源于摄取了本发明的糖的母亲肠道和/或阴道菌群得到改善。摄取本发明的糖后,母亲胃肠道中的双歧杆菌和乳杆菌的生长受到促进。随后,通过交叉定植,母亲的阴道菌群也有益地朝向高含量和多样化的双歧杆菌和乳杆菌变化。出生期间,新生儿的肠道首先受到母体阴道和肠道微生物菌群的接种。因此,母亲有益的阴道和肠道菌群可导致婴儿在生命的第一阶段获得改善的菌群。

[0009] 作为免疫系统被促进以及由双歧杆菌属(Bifidobacterium)和乳杆菌属(Lactobacillus)控制的最佳肠道菌群的结果,婴儿不仅发生免疫相关疾病(例如特异性疾病)的机会降低,而且发生胃肠道疾病(例如感染、肠道炎症、腹泻或便秘)的机会也降低。

[0010] 另一方面,令人惊讶地发现施用这一不可消化的糖有益地影响了孕妇和/或婴儿的免疫系统。发现分娩前的儿童免疫系统在出生后经激发出现更快的Th1应答。结果,发生免疫相关疾病(例如特异性疾病)的机会被进一步降低。

[0011] 优选实施方式的详细描述

[0012] 本发明提供了水溶性、不可消化的糖用于制备用于

[0013] i) 改善出生后婴儿的肠道菌群发育;

[0014] ii) 加强出生前婴儿的免疫系统;和/或

[0015] iii) 加强出生后婴儿的免疫系统和/或预防出生后婴儿的免疫系统相关疾病

[0016] 的组合物的用途,其中将所述组合物施用给怀有所述婴儿的孕妇。

[0017] 本发明还提供了水溶性、不可消化的糖用于制备用于

[0018] i) 加强孕妇的免疫系统；

[0019] ii) 改善孕妇的肠道菌群；和 / 或

[0020] iii) 改善孕妇的阴道菌群；

[0021] 的组合物的用途，其中将所述组合物施用给孕妇。

[0022] 水溶性、不可消化的糖

[0023] 用于本发明的方法中的组合物包含水溶性、不可消化的糖。本发明中所用术语“不可消化的”指通过存在于人上消化道（小肠和胃）中的酸或消化酶的作用在肠中不会被消化，但却可被人的肠道菌群发酵的糖。单糖和双糖（例如葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖和乳糖）是可消化的。本申请中所用术语“可发酵的”指通过胃肠道下部（例如，结肠）中的微生物能够被转化成较小分子（尤其是短链脂肪酸和乳酸）的能力。本发明的糖是水溶性的，其可采用 L. Prosky et al, J. Assoc. Anal. Chem 71 :1017-1023, 1988 所公开的方法进行确定。

[0024] 优选地，本发明的糖具有至少 2 个且优选低于 100 个单糖单位，优选低于 60，更优选低于 40，最优选低于 10 的聚合度 (DP)。优选地，本发明的水溶性、不可消化的糖是包含半乳糖的糖。具有相对较低聚合度的糖具有改良的乳杆菌和 / 或双歧杆菌发酵能力，且不表现出增加粘性的技术劣势。

[0025] 包含水溶性、不可消化的半乳糖的糖

[0026] 优选地，本发明的糖为含有水溶性、不可消化的半乳糖的糖（下文中称作“GAL-oligo”），其优选地包含占所述糖的单糖单位总数至少 50% 的半乳糖单位。与其他水溶性、不可消化的糖相比，GAL-oligo 具有改善的双歧杆菌产生效应 (bifidogenic effect)。人母乳同样包含高浓度的 GAL-oligo，且喂食人母乳的婴儿的肠道菌群在双歧杆菌方面比喂食标准婴儿配方奶的婴儿更加丰富。优选地，本发明的 GAL-oligo 含有占存在于所述糖中的单糖单位总数至少 60%（更优选至少 65%）的半乳糖单位。

[0027] 优选地，本发明的 GAL-oligo 包含至少两个末端糖单位，其中至少一个末端糖单位选自葡萄糖和半乳糖；且至少一个末端糖单位选自半乳糖和岩藻糖。优选地，GAL-oligo 中至少 75%（优选 100%）的糖是  $\beta$ -连接的。

[0028] 术语“末端糖”指结合于另一糖单位的糖（例如，半乳糖、葡萄糖、果糖或岩藻糖）。本发明的 GAL-oligo 优选地含有不超过 4 个末端糖，优选不超过 2 个。在一个优选的实施方式中，所述 GAL-oligo 包含至少一个末端半乳糖和选自至少末端葡萄糖和一个末端岩藻糖的糖。更优选地，本发明的 GAL-oligo 包含至少一个末端半乳糖和至少一个末端葡萄糖。优选地，本发明的 Gal-oligo 含有 2 个末端糖单位且具有 2-60 的聚合度 (DP)。

[0029] 优选地，所述 GAL-oligo 选自反式半乳糖寡糖、半乳糖寡糖、乳-N-四糖 (lacto-N-tetraose (LNT))、乳-N-新四糖 (lacto-N-neotetraose (neoLNT))、岩藻糖基乳糖、岩藻糖化 LNT 以及岩藻糖化 neoLNT。优选地，所述 GAL-oligo 是唾液酸化的。优选地，所述 GAL-oligo 选自唾液酸乳糖、唾液酸岩藻糖基乳糖、唾液酸乳糖胺以及唾液酸化 -LNT 和唾液酸化 -neo-LNT，更优选唾液酸乳糖。在一个特别优选的实施方式中，本发明的方法包括施用反式半乳糖寡糖 ([半乳糖]<sub>n</sub>-葡萄糖；其中 n 是介于 1 和 60 之间的整数，即 2、3、4、5、6、...、59、60；优选地，n 选自 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)。优选地，所述反式半乳糖寡

糖的糖是  $\beta$ -连接的。反式半乳糖寡糖 (TOS) 例如存在于以商标 Vivinal™ (Borculo Domo Ingredients, 荷兰) 进行销售的组合物中。其它适当的 TOC 来源是 Cup-oligo 和 Bi<sup>2</sup>muno。

#### [0030] 不同的水溶性、不可消化的糖

[0031] 为了获得关于肠道菌群和 / 或婴儿免疫系统或肠道菌群 ( 的改善 ), 孕妇阴道菌群和 / 或免疫系统 ( 的改善 ) 的更佳效果, 本发明的组合物优选地包含两种在结构上互不相同的, 不同的水溶性、不可消化的糖。每一种水溶性、不可消化的糖都可用肠道和 / 或阴道菌群和 / 或肠道不同位置中的不同种类的微生物进行发酵, 从而导致菌群的改善和细菌更加多样化。

[0032] 本发明提供了优选地包含水溶性、不可消化的糖 A 和水溶性、不可消化的糖 B 的组合物。糖 A 和糖 B 具有不同的糖苷键、不同的聚合度和 / 或不同的单糖组成。优选地, 糖 A 是 GAL-oligo。

[0033] 根据本发明的优选实施方式, 糖 A 中选自葡萄糖、果糖和半乳糖的至少一个单糖单位的百分比要比糖 B 中相同单糖单位的百分比高至少 40%, 优选至少 50%、更优选至少 75%, 甚至更优选至少 90%。单糖单位多样性的增加能够刺激更为广泛的肠道 ( 有益 ) 细菌群, 从而使菌群得以改善。所述糖中单糖单位的百分比可简单地通过用存在于所述糖中的各单糖单位 ( 例如, 葡萄糖 ) 的数量除以存在于所述糖中的单糖单位的总数计算。

[0034] 优选地, 水溶性、不可消化的糖 A 和 B 具有介于 2 和 200 之间的聚合度 (DP)。优选地, 至少 80wt%, 更优选至少 95wt%, 最优选至少 98wt% 累积重量的水溶性、不可消化的糖 A 和 B 具有低于 100, 更优选低于 60, 最优选低于 40 的聚合度 (DP)。较低的 DP 可有益地降低粘度并增加不可消化的糖的可发酵性。优选地, 至少 50wt%, 更优选至少 75wt% 累积重量的水溶性、不可消化的糖 A 和 B 具有 2-8 的 DP。通过使用具有高重量百分比的具有低 DP 的糖, 将提高可发酵性和对乳酸细菌和双歧杆菌的生长的刺激效应。

[0035] 根据本发明的优选实施方式, 水溶性、不可消化的糖 A 的 DP 比水溶性、不可消化的糖 B 的 DP 要低至少 5 个, 优选至少 10 个, 甚至更优选至少 15 个单糖单位。包括聚合度增加的糖能降低渗透负载, 并导致沿结肠的发酵延长, 从而同样在结肠的更末端部分改善对有益细菌的刺激。优选地, 水溶性、不可消化的糖 A 具有 2-10 ( 更优选 2-8 ) 的 DP。优选地, 水溶性、不可消化的糖 B 具有 11-100 的 DP。具有不同 DP 的水溶性、不可消化的糖 A 和 B 可具有相同或略有不同的单糖组成, 优选为不同的单糖组成。

[0036] 在本发明的优选实施方式中, 水溶性、不可消化的糖 A 的至少一种糖苷键占存在于糖 A 中的总糖苷键的百分比, 比在水溶性、不可消化的糖 B 中相同糖苷键的百分比高至少 40%, 优选至少 50%, 甚至更优选至少 75%。本发明中所用术语“糖苷键”指通过脱水在两个环状单糖单位的环之间形成的 C-O-C 键。糖苷键多样性的增加刺激更广范围的有益细菌。糖苷键之间的区别在于其在单糖单位的不同编号位置共价结合碳原子, 和 / 或其形成  $\alpha$  或  $\beta$  键。出现在水溶性、不可消化的糖中的不同糖苷键的实例有  $\beta$  (1,3)、 $\alpha$  (1,4)、 $\beta$  (2,1)、 $\alpha$  (1,2) 和  $\beta$  (1,4) 键。优选地, 水溶性、不可消化的糖 A 中的糖苷键包含至少 40% ( 更优选至少 75% ) 的  $\beta$  (1,4) 糖苷键。水溶性、不可消化的糖 B 中的糖苷键优选包含至少 40% ( 更优选至少 75% ) 的  $\beta$  (2,1) 糖苷键。

[0037] 在一个优选实施方式中, 本发明的组合物含有 Gal-oligo 与选自由果聚糖 ( 例如, 菊粉 ) 组成的组的水溶性、不可消化的糖的组合, 更优选具有介于 2 和 10 之间的平均 DP 的

GAL-oligo 与选自果聚糖和果寡糖的水溶性、不可消化的糖的组合,最优选反式半乳糖寡糖和菊粉的组合。

[0038] 优选地,糖 A 和糖 B 的重量比为 3/97 至 97/3,更优选 5/95 至 95/5。以充分相对比例存在的糖 A 和 B 将对菌群具有更佳的效果。最优选地,糖 A 与 B 的重量比为 2/3 至 95/5。更优选略微过量的糖 A (优选 GAL-oligo 和 / 或寡糖),因为这将对菌群具有更佳的效果。

#### [0039] 长链多不饱和脂肪酸 (LC-PUFA)

[0040] 优选地,本发明的组合物额外包含长链多不饱和脂肪酸和 / 或长链多不饱和脂肪酰基链 (LC-PUFA)。在本发明中,术语 LC-PUFA 涉及 20 或更多个碳原子长以及至少两个不饱和键的脂肪酸或脂肪酰基链。优选地,所述组合物包含选自二十碳五烯酸和 / 或酰基链 (EPA)、二十二碳六烯酸和 / 或酰基链 (DHA) 和花生四烯酸和 / 或酰基链 (AA) 的 LC-PUFA。在一个实施方式中,所述组合物包含 DHA。在另一个实施方式中,所述组合物包含 AA。更优选地,所述组合物包含 DHA 和 AA。LC-PUFA 有益地增强待出生婴儿的免疫系统。因此,与单独施用水溶性、不可消化的糖相比,给孕妇施用包含水溶性、不可消化的寡糖和 LC-PUFA 的组合物对婴儿免疫系统具有改善的效果。

[0041] EPA/DHA 的重量比优选为 1 或更低,更优选低于 0.5。LC-PUFA 可以游离脂肪酸、以甘油三酯的形式、以磷脂的形式、或以一或多种上述形式的混合物提供。本发明的组合物优选地包含以磷脂形式存在的 AA 和 DHA 中的至少一种。优选地,DHA 与 AA 的重量比介于 0.1 和 20 之间,更优选介于 0.5 和 5 之间。

[0042] 优选地,所述组合物包含每日剂量 50 至 3000mg (更优选 100 至 1500mg,最优选 200 至 500mg) 的 LC-PUFA。

#### [0043] 其他成分

[0044] 在一个优选的实施方式中,所述组合物额外地包含益生菌。在本发明中,益生菌是指这样的微生物,其在施用后能够对于宿主产生有益效果。益生菌对孕妇的肠道菌群、阴道菌群和 / 或免疫系统以及她们待出生的婴儿具有有益效果,因此水溶性、不可消化的糖和益生菌的组合将对二者的肠道菌群和 / 或免疫系统具有上佳的效果。优选地,所述益生菌选自乳杆菌属和双歧杆菌属。更优选地,所述益生菌选自嗜酸乳杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*) 类群、鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、类干酪乳杆菌 (*L. Paracasei*)、植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、路氏乳杆菌 (*L. reuteri*)、发酵乳杆菌 (*L. fermentum*)、婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*)、动物双歧杆菌乳制品亚种 (*B. animalis* subsp. *lactis*)、短双歧杆菌 (*B. breve*)、长双歧杆菌 (*B. longum*) 和双歧双歧杆菌 (*B. bifidum*)。甚至更优选地,所述益生菌是类干酪乳杆菌和 / 或短双歧杆菌,因为施用水溶性、不可消化的糖能够在相同程度上对大多数种类的乳杆菌和双歧杆菌类群进行刺激,但对短双歧杆菌和类干酪乳杆菌的刺激程度较低。由于双歧杆菌在婴儿肠道菌群中比乳杆菌更具有统治地位,所以短双歧杆菌是最优选的。优选地,益生菌在每日剂量中含每种不同的益生菌  $1 \times 10^6$  菌落形成单位 (cfu) 至  $1 \times 10^{13}$  cfu,更优选  $1 \times 10^7$  至  $1 \times 10^{11}$ ,最优选  $1 \times 10^8$  至  $1 \times 10^{10}$ 。

[0045] 所述组合物额外地包含对孕妇有益的维生素和矿物质。通常,包含维生素和矿物质的添加剂会被孕妇出于自身或胎儿的利益而摄取。在本发明中的组合物中包括这些维生素和矿物质方便地降低了孕妇待摄取的组合物的量。优选地,所述组合物包含选自叶酸、

维生素 B1、维生素 B2、维生素 B6、维生素 A、维生素 D、铁、锌和碘的至少一种成分，更优选至少三种成分，最优选至少六种成分。优选地，这些成分在每日剂量中含推荐的每日供给量 (RDA) 的 25-100%，更优选介于 45-100%。优选地，维生素 A 以  $\beta$ -胡萝卜素进行补充。

#### [0046] 组合物

[0047] 可以棒 (bar)、胶囊、片剂、液体或粉末的形式给孕妇施用包含所述水溶性、不可消化的糖的组合物。

[0048] 优选地，所述组合物是基于乳的液体，其包含脂肪、蛋白质和可消化的碳水化合物。优选地，所述基于乳的液体的脂肪含量低于 2g/1 以保持待消耗的卡路里数量较低。优选地，这一基于乳的液体可被包装成体积为 50 至 1000mL (更优选 60 至 500mL，最优选 75 至 125mL) 的容器或菱角包 (tetrapack) 中。优选地，所述组合物是水活度低于 0.8 (优选低于 0.65) 的棒，即可咀嚼的固体。优选地，所述组合物为粉末，其被包装在包含 1 至 10g (更优选 1.5 至 7g，最优选 2 至 5g) 的粉末的小药囊中。

#### [0049] 剂量

[0050] 在本发明的方法中，优选地将本发明的糖以介于 0.5g/天和 50g/天 (优选介于 3g/天和 25g/天，最优选介于 6g/天和 12g/天) 的量施用给孕妇。优选地，按每日一份施用这一每日剂量。优选地，将这一每日剂量分成 2 或 3 或 4 份，每天分别使用 2、3 或 4 次。

[0051] 优选地，可在预产期 (due delivery) 之前给孕妇施用所述组合物至少 2 周，更优选至少 6 周，最优选至少 12 周。

#### [0052] 应用

[0053] 当下文中涉及特定的治疗方法时，所述方法包括给孕妇施用有效量的上面所描述的组合物或施用有效量的至少水溶性、不可消化的糖，这还涉及至少一种水溶性、不可消化的糖用于制备用于所述目的组合物的用途。两种本发明的用词方式同样被诸如本发明的组合物可用于某种目的或本发明的组合物的施用可用于某种目的这样的措辞所涵盖。

[0054] 本发明提供了用于改善婴儿肠道菌群和 / 或免疫系统的方法，所述方法包括向怀有所述婴儿的孕妇施用本发明的组合物 (即，包含水溶性、不可消化的糖的组合物)。

[0055] 在一个实施方式中，婴儿的免疫系统得到加强。在本发明中加强免疫系统涉及免疫系统的改善、刺激和 / 或增强。优选地，所述改善、刺激和 / 或增强是相对于对照组而言的，其在本发明的上下文中指相对于未摄取水溶性、不可消化的糖的孕妇。本发明人观察到施用水溶性、不可消化的糖可将新生儿免疫系统引向 Th1 应答和 / 或改善 Th1/Th2 平衡。发现在分娩前未出生儿童的免疫系统是通过增强受体 CD14 和 TLR2 所激发的。

[0056] 在一个实施方式中，给孕妇施用水溶性、不可消化的糖被用于预防婴儿中特异性疾病的发生。在一个实施方式中，给孕妇施用所述组合物以在婴儿中预防变态反应 (即，食物变态反应)、湿疹 (即，特应性皮炎)、哮喘、鼻炎、枯草热、鼻结膜炎和 / 或喘鸣 (最优选变态反应和 / 或特应性皮炎) 的发病和 / 或降低其严重性。湿疹 (即，特应性皮炎) 的特征为干燥和 / 或发红和 / 或瘙痒的皮肤。

[0057] 在一个实施方式中，给孕妇施用水溶性、不可消化的糖被用于改善婴儿的肠道菌群。施用本发明的组合物可被包括在用于在出生后增强结肠和 / 或粪便中的双歧杆菌和 / 或乳杆菌占存在于婴儿菌群和 / 或粪便中的总细菌的百分比的实施方式中。富含双歧杆菌和 / 或乳杆菌的菌群可加强婴儿的免疫系统并增进胃肠健康。与其母亲在妊娠期未摄取

包含水溶性、不可消化的糖的本发明的组合物的婴儿的胃肠健康相比,改善的胃肠健康涉及胃肠感染的发生率降低、肠道感染的持续时间更短、胃肠炎症的发生率和严重性降低、腹泻的发生率和 / 或严重性降低、便秘的减少、或痉挛的减少。在本发明的上下文中,“加强”或“加强的”以及“改善”和“改善的”是相对于其母亲在妊娠期未摄取包含水溶性、不可消化的糖的本发明的组合物的婴儿而言的或是相对于未摄取包含水溶性、不可消化的糖的本发明的组合物的孕妇而言的。加强的免疫系统将对特异性疾病和 / 或呼吸道感染具有预防作用。在一个实施方式中,给孕妇施用本发明的组合物被用于在出生后的婴儿中预防选自变态反应(即,食物变态反应)、湿疹(即,特异性皮炎)、哮喘、鼻炎、枯草热、鼻结膜炎、喘鸣、肠道感染、阴道感染、呼吸道感染、腹泻、便秘、痉挛和肠道炎症的疾病和 / 或降低其严重性。在一个实施方式中,给孕妇施用本发明的组合物被用于预防出生后婴儿的选自肠道感染、呼吸道感染、腹泻、便秘、痉挛和 / 或肠道炎症的疾病。

[0058] 本发明还包括具有指明在使用所述组合物之后孕妇能够给予其婴儿出生后的最佳开始,例如,关于肠道定植、肠道菌群、菌群组合和 / 或免疫系统(例如免疫防御或加强的或改善的或增强的或被刺激的免疫性)的文字的、包含本发明的组合物的包装。

[0059] 在一个实施方式中,施用本发明的组合物用于改善孕妇的免疫系统。

[0060] 在一个实施方式中,施用包含水溶性、不可消化的糖(优选包含两种不同的水溶性、不可消化的糖)的本发明的组合物被用于加强孕妇的免疫系统、肠道菌群和 / 或阴道菌群。在一个优选的实施方式中,施用优选包含两种不同的水溶性、不可消化的糖的本发明的组合物被用于增强孕妇肠道和 / 或阴道中乳杆菌和 / 或双歧杆菌占总细菌的百分比。由于在妊娠期间阴道菌群紊乱经常发生,因此这是至关重要的,且病原体的过度生长和阴道微生物微环境的破坏可通过乳杆菌的稳定定植而得以预防。

[0061] 实施例

[0062] 实施例 1 临床实验

[0063] 对总共 33 位妊娠的健康志愿者进行具有平行组设计的 CA 预期性、双盲、随机化、安慰剂对照研究。她们从妊娠第 25 周开始接受实验添加剂或安慰剂直至分娩。所述实验添加剂是基于不可消化的寡糖,并包含 3g GOS(来自 Vivinal GOS, Borculo Domo, 荷兰)+菊粉(RaftilinHP, Orafti, 比利时)(9:1 的 wt/wt 比)以及 3g 可消化的麦芽糊精。这一添加剂每天摄取 3 次。对照组添加剂由 6g 可消化的麦芽糊精组成。

[0064] 在进行第一次添加剂施用前,在妊娠第 25 周采集粪便样本。在最后一次分娩前的标准化常规医院检查之后采集第二次粪便样本。在分娩时,从胎盘脐静脉采集一份脐带血样本。在分娩后的第 5 天、20 天和 6 个月采集新生儿的粪便样本。

[0065] 通过 FISH 和实时 PCR 分析母体和新生儿粪便样本的微生物菌群。可使用 FACS 分析和用有丝分裂原和变应原进行体外刺激检测对脐带血(CB)进行表型表征。

[0066] 可使用本领域公知的方法测定以下参数:

[0067] a) 先天免疫应答

[0068] NKT 细胞、单克隆 T 细胞受体的频率(即, Va24JaQ TCR 的同源 N- 区域、To11 样受体表达细胞的定量(TLR2、TLR4);粒细胞计数。NK 细胞活性。

[0069] b) 适应性免疫应答

[0070] 采用四色细胞计量术进行淋巴细胞亚群分析。在非刺激细胞中与 TH1/TH2 相关



的 mRNA 细胞因子和趋化因子受体模式 (TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-4、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、TGF  $\beta$ 、CD25、CD45RA、CD45RO、CTLA-4、CCR3、CCR4、CCR5、CXCR3) 的表征通过实时 RT PCR 和之后使用 ConA/PHA 和 LPS 离体进行全血刺激进行测定。对在 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup>T 细胞亚群中产生 TH1/TH2- 细胞因子的比例分析进行了确定。

[0071] 从 28 位分娩者获得胎盘脐带 (cortical) 血样本,并用伴刀豆球蛋白 A(Con A)/(PHA)、脂多糖 (LPS)、葡萄球菌肠毒素 B(SEB)、 $\beta$ -乳球蛋白 (BLG)、来自 *Dermatophagoides pteronyssinus* 的主要屋尘螨变应原 (Der p1)、卵清蛋白 (Ova) 刺激 24 小时。

[0072] 用适当稀释的抗人 CD4、CD8、CD45RA、CD45RO、CD25、CD69、CCR4、CCR5、CD14、CCR1、CCR2、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CRTH2 的 FITC-、PE-、PC5- 或 APC- 标记的单克隆抗体和适当的同种型对照对 CB T 淋巴细胞 (50  $\mu$  l 全血样本) 进行染色。染色后,污染的红细胞被裂解。对 CD4<sup>+</sup>T 辅助细胞 (Th) 群中趋化因子受体 (CKR<sup>+</sup>) 和表达 CKR<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 的淋巴细胞的百分比,以及 CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 群中表达 CKR<sup>+</sup> 的细胞的百分比进行分析。在 CD8<sup>+</sup>T 细胞毒性 (Tc) 和 CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> 淋巴细胞群中进行相同的分析程序。对 CXCR4, 确定其平均荧光强度 (MFI)。测定 T 调节细胞上 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> 表达。

#### [0073] 全 CB 刺激分析

[0074] 在 RPMI-1640 中将肝素化的 CB 稀释 1-5 倍。在 24- 孔培养板中用伴刀豆球蛋白 A(ConA50  $\mu$  g/mL)、 $\beta$ -乳球蛋白 (100  $\mu$  g/mL BLG)、卵清蛋白 (100  $\mu$  g/mL OVA)、脂多糖 (0.1  $\mu$  g/mL LPS)、葡萄球菌肠毒素 B(0.1  $\mu$  g/mL SEB)、*Dermatophagoides pteronyssinus*(10  $\mu$  g/mL Der p1) 或单独用培养基刺激 1mL 经稀释 CB 等分试样。将细胞于 37°C、在 5% CO<sub>2</sub> 气氛中温育 24 小时或 48 小时,并将上清液储存于 -80°C 用于细胞因子分析。

#### [0075] 多重分析

[0076] 用人多重化、基于颗粒的流式细胞分析对培养物上清液中的细胞因子进行定量。无须进一步稀释即可对上清液中的 TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-10、GM-CSF、G-CSF 浓度进行直接测定。为测定 IL-6、IL-8、MCP-1 和 MIP-1 $\beta$ , 将上清液按 1:10 进行稀释于 RPMI 中。相对于阴性对照,对细胞因子表达的差异进行测定并将浓度标准化为从全血计数获得的淋巴细胞 (对于 IL-2) 和总白细胞 (对于所有其他细胞因子) 的数目 (pg/mL/10E3 个细胞)。

[0077] 尽管在补充开始之前,在母体微生物菌群组合中存在大的个体内变异,总细菌负载以及每毫升双歧杆菌和乳杆菌的细胞中值数在两组之间没有差异。但是,在使用包含 GOS 和菊粉的添加剂进行补充后,在孕妇粪便菌群中观察到总双歧杆菌和乳杆菌所占百分比增加。参见表 1。在母亲粪便样本中,在补充前和补充后,在两组中最常见的种类是链状双歧杆菌 (*B. catenulatum*)、婴儿双歧杆菌和嗜酸乳杆菌。

[0078] 在分娩后第 5 天,来自实验组母亲所生婴儿的粪便中含有 7.4% 的乳杆菌 (n = 17, s. e. 3.0);而在分娩后第 5 天,来自对照组母亲所生婴儿的粪便仅含有 2.4% 的乳杆菌 (n = 16, s. e. 0.9)。

[0079] 婴儿的组内比较表明从第 20 天至第 182 天,安慰剂组中乳杆菌的数量明显增加 [p = 0.038 ;pW]。这一结果可通过 FISH 分析 [p = 0.018 ;pW] 进行确认。从第 20 天至第 182 天,安慰剂组中对嗜酸乳杆菌表现为阳性的新生儿的百分比有所增加 [p = 0.016]。这一区

别可通过 qPCR 分析进行确认 ( $p = 0.012$ )。

[0080] 在实验组中,对脐带血的 FACS 分析揭示在  $CD14^+$  单核细胞上  $TLR2^+$  的平均荧光强度水平明显降低 ( $p < 0.05$ )。改变的  $CD14^+$  和  $TLR2^+$  表达水平表明,分娩前新生儿免疫系统在分娩后指向了更快速的 Th1 应答。

[0081] 表 1 使用 GOS 和菊粉的混合物 (实验组) 或麦芽糊精 (对照组) 的孕妇粪便中的双歧杆菌和乳杆菌的百分比

[0082]

	实验组 双歧杆菌的平均数 (s. e.) % <sup>a</sup>	实验组 乳杆菌的平均数 (s. e.) % <sup>a</sup>	对照组 双歧杆菌的平均数 (s. e.) % <sup>a</sup>	对照组 乳杆菌的平均数 (s. e.) % <sup>a</sup>
T = 1 <sup>b</sup>	13.0(1.7) <sup>c</sup>	8.6(2.0)	18.5(4.1)	5.4(1.9)
T = 2 <sup>b</sup> T = 2	24.1(2.6) <sup>cd</sup>	9.9(1.7)	14.7(3.5) <sup>d</sup>	7.8(1.9)

[0083] a 采用 FISH 对双歧杆菌进行定量,通过实时 PCR 对乳杆菌进行定量。

[0084] bt = 1 : 在妊娠第 25 周,进行补充之前 ;t = 2 : 在分娩前进行最后一次医院检查时。

[0085] c 统计学显著差异,  $p < 0.05$ , 在 t = 1 和 t = 2 之间。

[0086] d 统计学显著差异,  $p < 0.05$ , 在实验组和对照组之间。

[0087] 为检测母体益生菌补充是否影响胎儿的免疫性,进行广泛的表型淋巴细胞亚群分析。CB  $CD4^+$ T 辅助 (Th) 细胞和  $CD8^+$ T 细胞毒性 (Tc) 细胞主要表达初始 ( $CD45RA^+$ ) 表型 (>84%), 而表达  $CD45RO^+$  少于 13%。 $CD4^+/CD8^+$  的比例以及  $CD4^+CD45RA^+$ 、 $CD8^+CD45RA^+$ 、 $CD4^+CD45RO^+$  和  $CD8^+CD45RO^+$  的百分比在出生前组和安慰剂组之间不存在明显的差异。与  $CCR7^+$  (87.3%) 细胞的高频率不同,所有其它的 CKR 都以非常低的频率在  $CD4^+$  和  $CD8^+$  细胞上表达。CXCR4 的 MFI 在  $CD4^+$  和  $CD8^+$  亚群上均高,而 CXCR3 仅在  $CD8^+$  细胞上以高的频率进行表达。对  $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+CD45RA^+$  和  $CD8^+CD45RA^+$  CB T 细胞亚群中的 CKR<sup>+</sup> 淋巴细胞的频率,以及在不同  $CD4^+$  和  $CD8^+$  亚群中 Th1/Th2 比例 (CXCR3/CCR4 和 CCR5/CCR4) 的分析,在两组之间未表现出明显的差异。两组中,早期活化标记物 CD69 以及晚期活化标记物 CD25 以类似的水平在不同的  $CD4^+$  亚群上表达 (数据未显示)。未观察到表达  $CD25^{\text{高}}$  的  $CD4^+$ T 细胞亚群的频率存在差异 (中值 :1.5Vs1.4 ; $p = 0.683$ )。

[0088] 对由有丝分裂原和变应原刺激了 24 小时的全 CB 培养物产生的衍生自白细胞的细胞因子谱进行的比较分析揭示了细胞因子表达的典型模式。当分析通过不同刺激 (除 G-CSF 外 (对 Der p1、BLG 和 OVA 而言  $p < 0.03$ )) 诱导的细胞因子浓度时,在两个补充组之间未观察到明显的区别。

[0089] 这些结果表明,采用水溶性、不可消化的糖进行补充能够导致孕妇的肠道微生物菌群中双歧杆菌和乳杆菌的百分比增加。这导致出生期间婴儿肠道的乳杆菌和 / 或双歧杆菌接种情况以及出生后定植情况的改善。尤其,出生后短时期内乳杆菌的存在很重要,因为乳杆菌具有使结肠酸化的高的能力,由此使得随后的肠道环境更加适于双歧杆菌而较不适合肠病原体。此外,这些结果表明这样的补充能够改善未出生婴儿以及出生期间和出生后婴儿的免疫系统。

[0090] 实施例 2

- [0091] 包装于 100mL 容器中的 100mL 基于液体乳的组合物包含：
- [0092] -8.1g 反式半乳糖寡糖，(来自 Vivinal GOS)
- [0093] -0.9g 果聚糖 (来自 RaftilineHP)
- [0094] -750mg 鱼油和月见草油，包含
- [0095] ◇ 300mg DHA
- [0096] ◇ 42mg EPA
- [0097] ◇ 8.4mgAA
- [0098] ◇ 8.4mg 二十二碳五烯酸 (DPA)
- [0099] ◇ 15mg γ 亚油酸 (GLA)