



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108913615 A

(43)申请公布日 2018. 11. 30

(21)申请号 201810653382.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.10.08

C12N 1/20(2006.01)

(30)优先权数据

A23L 33/135(2016.01)

1117313.5 2011.10.07 GB

A23L 33/21(2016.01)

(62)分案原申请数据

A23K 10/18(2016.01)

201280054515.9 2012.10.08

A61K 35/741(2015.01)

(83)生物保藏信息

A61P 37/00(2006.01)

NCIMB 14029 2004.10.21

A61P 1/14(2006.01)

C12R 1/01(2006.01)

(71)申请人 4D制药研究有限公司

地址 英国阿伯丁郡

(72)发明人 丹尼丝·凯利

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书1页 说明书31页

序列表2页 附图24页

(54)发明名称

用作用于营养和医药应用的益生菌剂的细菌

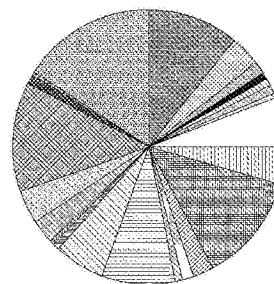
(57)摘要

本发明的第一个方面涉及用于以下应用的人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种: • 调节被试者的免疫系统; • 治疗免疫失调; • 治疗肠失调; • 改善肠道菌群; • 调节被试者的先天性免疫系统; • 调节被试者的适应性免疫系统; • 调节被试者的食欲; • 促进调节性T细胞和免疫耐受性; • 促进被试者的消化道健康; 和/或 • 保持被试者的免疫稳态。本发明的另一个方面涉及包含人罗斯拜瑞氏菌的组合物。

亚系统菌分布



亚系统菌分布



亚系统菌分布

亚系统菌分布图
图例: 1. 细菌, 2. 真菌, 3. 原生动物, 4. 病毒, 5. 藻类, 6. 植物, 7. 动物, 8. 其他
1. 细菌: 1.1. 革兰氏阳性菌, 1.2. 革兰氏阴性菌, 1.3. 放线菌, 1.4. 螺旋体, 1.5. 蓝藻, 1.6. 其他
2. 真菌: 2.1. 酵母菌, 2.2. 霉菌, 2.3. 其他
3. 原生动物: 3.1. 阿米巴, 3.2. 纤毛虫, 3.3. 其他
4. 病毒: 4.1. 噬菌体, 4.2. 其他
5. 藻类: 5.1. 蓝藻, 5.2. 其他
6. 植物: 6.1. 被子植物, 6.2. 裸子植物, 6.3. 蕨类植物, 6.4. 苔藓植物, 6.5. 其他
7. 动物: 7.1. 哺乳动物, 7.2. 鸟类, 7.3. 爬行动物, 7.4. 两栖动物, 7.5. 鱼类, 7.6. 无脊椎动物, 7.7. 其他
8. 其他: 8.1. 原生生物, 8.2. 其他

1. 与以登录号NCIMB 14029保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同源性或具有至少95%的16S rRNA同一性的细菌菌株在制备用于治疗的药物中的用途。

2. 药物组合物,其包括与以登录号NCIMB 14029保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同源性或具有至少95%的16S rRNA同一性的细菌菌株以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

3. 营养补充剂,其包括与以登录号NCIMB 14029保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同源性或具有至少95%的16S rRNA同一性的细菌菌株以及营养学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

4. 益生菌剂组合物、饲料、食品产品、膳食补充剂或食品添加剂,其包括与以登录号NCIMB 14029保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同源性或具有至少95%的16S rRNA同一性的细菌菌株。

5. 与以登录号NCIMB 14029保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同源性或具有至少95%的16S rRNA同一性的细菌菌株在制备用于增加被试者食欲的药物中的用途。

6. 根据权利要求1或权利要求5所述的用途或权利要求2-4中任一项所述的药物组合物、营养补充剂、益生菌剂组合物、饲料、食品产品、膳食补充剂或食品添加剂,其中所述细菌菌株属于人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)。

7. 药物组合物,其包括人罗斯拜瑞氏菌细菌物种以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

8. 营养补充剂,其包括人罗斯拜瑞氏菌细菌物种以及营养学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

9. 包含人罗斯拜瑞氏菌细菌物种的益生菌剂组合物。

10. 包含人罗斯拜瑞氏菌细菌物种的饲料、食品产品、膳食补充剂、营养补充剂或食品添加剂。

作用于营养和医药应用的益生菌剂的细菌

[0001] 本申请是基于中国专利申请第201280054515.9号的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种及其各种营养和治疗应用。

背景技术

[0003] 人类的肠道(被认为最初在子宫内是无菌的)在出生后立即被暴露在大量的母体和环境微生物中。随后消化道(gut)中的集群和演替过程在生命的最初几年内一直在不断变化发展中,之后这些微生物群变得成熟并且相对稳定(1)。人类消化道微生物群包括大于500种不同的种系型,它们基本分属于两个主要的细菌门:拟杆菌门(*Bacteroidetes*)和厚壁菌门(*Firmicutes*)(2)。由人类消化道中的细菌集群所引起的成功的共生关系产生了广泛多样的代谢功能、结构功能、保护功能和其它有益的功能。细菌集群后的消化道的增强的代谢活性可确保膳食成分(即使是难以消化的)得到消化并释放副产物,从而为宿主提供重要的营养来源。相似地,人们已经很好地认识到了消化道微生物群的免疫学重要性,并且通过在免疫系统受损的无菌动物中引入共生细菌来使免疫系统功能性重建,从而证实了该免疫学重要性(3-5)。

[0004] 与肠分泌型IgA的产生(其受到微生物集群本身的影响(6,7)

[0005] 形成强烈对比的是,T细胞的发育和分化似乎需要特定的共生微生物集群。梭菌属细菌(特别是产生孢子的分节丝状菌(*SFB*))似乎是肠Th1、Th17和Tregs成熟的主要驱动力(8,9)。然而,近来的研究显示,在无菌小鼠中,通过促进Tregs的表达,包括那些ASF(*altered Schaedler flora*)在内的其它消化道细菌可以诱导重新产生Tregs,而脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的单一集群则可以修正Th1/Th2的失衡(5,10)。

[0006] 本发明致力于阐明其它能够调节消化道代谢活性和/或在免疫调节过程中发挥作用的消化道常驻细菌。

发明内容

[0007] 本发明以厚壁菌门的一员——人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种的活性为重点。申请人的研究证明,该细菌物种在免疫调节和消化道代谢活性中发挥了重要作用,并且对食欲和饱腹感基因具有影响。下文将更详细地描述参与集群和适应鼠消化道的细菌基因的作用,以及对所述细菌的集群产生应答的宿主基因的作用。

[0008] 所附权利要求记载了本发明的各方面,以及优选实施方案。

[0009] 本发明的第一个方面涉及一种用于调节被试者的免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0010] 本发明的另一个方面涉及一种用于治疗以下失调的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种,所述失调选自炎症性疾病、免疫失调和肠失调。

[0011] 本发明的另一个方面涉及一种用于通过恢复免疫稳态 (immune homeostasis) 来促进消化道健康的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0012] 本发明的另一个方面涉及一种用于改善被试者的肠道菌群的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0013] 本发明的另一个方面涉及一种用于调节被试者的先天性免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0014] 本发明的另一个方面涉及一种用于调节被试者的适应性免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0015] 本发明的另一个方面涉及一种用于促进被试者的调节性T细胞 (Tregs) 和免疫耐受性的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0016] 本发明的另一个方面涉及一种用于调节被试者的食欲的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0017] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于调节被试者的免疫系统的药物中的应用。

[0018] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于治疗被试者的以下失调的营养补充剂或药物中的应用,所述失调选自炎症性疾病、免疫失调和肠失调。

[0019] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于改善被试者的肠道菌群的营养补充剂或药物中的应用。

[0020] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于调节被试者的先天性免疫系统的营养补充剂或药物中的应用。

[0021] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于调节被试者的适应性免疫系统的营养补充剂或药物中的应用。

[0022] 本发明的另一个方面涉及人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种在制备用于调节被试者的食欲的营养补充剂或药物中的应用。

[0023] 本发明的另一个方面涉及一种治疗被试者的以下失调的方法,所述失调选自炎症性疾病、免疫失调和肠失调,所述方法包括对所述被试者施用营养学或药理学有效量的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0024] 本发明的另一个方面涉及一种改善被试者的肠道菌群的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种的组合物。

[0025] 本发明的另一个方面涉及一种调节被试者的先天性免疫系统的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种的组合物。

[0026] 本发明的另一个方面涉及一种调节被试者的适应性免疫系统的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种的组合物。

[0027] 本发明的另一个方面涉及一种调节被试者的食欲的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种的组合物。

[0028] 本发明的另一个方面涉及一种用于医疗的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0029] 本发明的另一个方面涉及一种药物组合物,其包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia*

hominis) 细菌物种和药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0030] 本发明的另一个方面涉及一种营养补充剂, 包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种和营养学可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0031] 本发明的另一个方面涉及一种益生菌剂组合物, 包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0032] 本发明的另一个方面涉及一种饲料、食品产品、营养补充剂、膳食补充剂或食品添加剂, 其包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0033] 本发明的另一个方面涉及一种制备根据本发明所述的药物组合物的方法, 所述方法包括将人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种与药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0034] 本发明的另一个方面涉及一种制备根据本发明所述的营养补充剂的方法, 所述方法包括将人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种与营养学可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0035] 本发明的另一个方面涉及一种用于保持被试者的免疫稳态的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0036] 在非限制性的多个方面, 本申请提供了以下示例性实施方案:

[0037] 实施方案1. 一种用于调节被试者的免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0038] 实施方案2. 根据实施方案1所述的细菌物种, 其用于调节被试者的适应性免疫系统。

[0039] 实施方案3. 根据实施方案1所述的细菌物种, 其用于调节被试者的先天性免疫系统。

[0040] 实施方案4. 一种用于保持被试者的免疫稳态的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0041] 实施方案5. 一种用于治疗被试者的免疫失调的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种。

[0042] 实施方案6. 根据实施方案5所述的细菌物种, 其中所述免疫失调选自溃疡性结肠炎、结肠袋炎、其它自身免疫性疾病、变态反应, 所述其它自身免疫性疾病包括类风湿性关节炎、牛皮癣、多发性硬化, 所述变态反应包括乳糜泻、特异反应性皮炎和鼻炎。

[0043] 实施方案7. 一种用于治疗被试者的失调的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) 细菌物种, 所述失调选自炎症性疾病、免疫失调和肠失调。

[0044] 实施方案8. 根据实施方案7所述的细菌物种, 其中所述失调选自肠易激综合征 (IBS)、结肠炎、炎症性肠病 (IBD), 包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎、结肠袋炎、功能性消化不良、功能性便秘、功能性腹泻、功能性腹痛、功能性气胀病、上腹痛综合征、餐后不适综合征、胃食管反流病 (GERD)、自身免疫性疾病、特异反应性疾病、坏死性小肠结肠炎、其它感染、以及它们的组合, 所述功能性腹泻包括抗生素相关腹泻、旅行者腹泻和小儿腹泻, 所述自身免疫性疾病例如糖尿病、关节炎、多发性硬化和牛皮癣变态反应, 所述特异反应性疾病例如特异反应性皮炎。

[0045] 实施方案9. 一种用于改善被试者的肠道菌群的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia*

hominis)细菌物种。

[0046] 实施方案10.一种用于调节被试者的食欲的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0047] 实施方案11.一种用于促进被试者的消化道健康的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0048] 实施方案12.一种用于促进被试者的免疫系统的调节性T细胞和免疫耐受性机制的人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0049] 实施方案13.根据实施方案1至12中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种调节至少一种转移基因或趋化性基因的诱导和/或表达。

[0050] 实施方案14.根据实施方案13所述的细菌物种,所述细菌物种上调至少一种转移基因或趋化性基因的表达,并且其中所述基因选自 *MobA*和*MobL*。

[0051] 实施方案15.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种调节选自*FlaA1*、*FlaA2*、*FlaA3*和*FlaB*中的至少一种基因。

[0052] 实施方案16.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种调节以下至少一者的表达:乙酰辅酶A乙酰基转移酶、3-羟基酰基辅酶A脱氢酶、丁酰辅酶A脱氢酶、电子转移黄素蛋白β亚基、电子转移黄素蛋白α亚基。

[0053] 实施方案17.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种下调选自*Agt*、*Cartpt*、*Cck*、*Cxcl12*和*Gcg*中的至少一种基因的表达。

[0054] 实施方案18.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种激活结肠或回肠中的至少一种免疫应答基因。

[0055] 实施方案19.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种通过调节T-细胞调节相关的基因的诱导和/或表达而激活适应性免疫应答。

[0056] 实施方案20.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种上调升结肠中的选自*Ly6g6c*和*Ly6g6e*中的至少一种基因的表达。

[0057] 实施方案21.根据前述实施方案中任意一项所述的细菌物种,所述细菌物种调节选自*Tlr5*、*Tlr1*、*Vnn1*、*Defb37*、*Pla2g*、*Muc16*、*Itln*、*Sprrla*、*Cldn4*、*Pmp22*、*Crb3*、*Magi3*、*Marveld3*、*Mpp7*、*Defcr20*、*Pcgf2*、*Ltbp4*、*lgsf8*和*Tcfe2a*中的至少一种基因的表达。

[0058] 实施方案22.人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种用于制备用于调节被试者的免疫系统的药物的应用。

[0059] 实施方案23.根据实施方案22所述的细菌物种的应用,其用于制备用于调节被试者的先天性免疫系统的药物。

[0060] 实施方案24.根据实施方案22所述的细菌物种的应用,其用于制备用于调节被试者的适应性免疫系统的药物。

[0061] 实施方案25.人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种用于制备用于保持被试者的免疫稳态的药物的应用。

[0062] 实施方案26.人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种用于制备用于治疗被试者的免疫失调的药物的应用。

[0063] 实施方案27.一种调节被试者的免疫系统的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)细菌物种的组合物。

[0064] 实施方案28.一种激活被试者的先天性免疫系统的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种的组合物。

[0065] 实施方案29.一种激活被试者的适应性免疫系统的方法,所述方法包括对所述被试者施用包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种的组合物。

[0066] 实施方案30.一种治疗被试者的免疫失调的方法,所述方法包括对所述被试者施用药学有效量的人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0067] 实施方案31.根据实施方案1至21中任意一项所述的细菌物种,或者根据实施方案27至30中任意一项所述的方法,或者根据实施方案22至26中任意一项所述的应用,其中所述被试者为哺乳动物,优选为人。

[0068] 实施方案32.一种用于医药的人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0069] 实施方案33.一种药物组合物,其包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种和药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0070] 实施方案34.一种营养补充剂,其包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种和营养学可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0071] 实施方案35.一种益生菌剂组合物,其包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0072] 实施方案36.一种饲料、食品产品、膳食补充剂、营养补充剂或食品添加剂,其包含人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种。

[0073] 实施方案37.一种制备根据实施方案32所述的药物组合物的方法,所述方法包括将人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种与药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0074] 实施方案38.一种制备根据实施方案33所述的营养补充剂的方法,所述方法包括将人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种与营养学可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

具体实施方式

[0075] 如上文所述,本发明的一个方面涉及用于以下一种或多种应用的人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)细菌物种:

- [0076] • 治疗免疫失调;
- [0077] • 治疗肠失调;
- [0078] • 改善肠道菌群;
- [0079] • 调节被试者的先天性免疫系统;
- [0080] ● 调节被试者的适应性免疫系统;
- [0081] ● 促进Tregs和免疫耐受性;
- [0082] ● 调节被试者的食欲;
- [0083] ● 促进被试者的消化道健康;和/或
- [0084] ● 保持被试者的免疫稳态。

[0085] 人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)

[0086] 人罗斯拜瑞氏菌是一种近来报道的属于厚壁菌门内的系统发生簇XIVa的消化道

共生厌氧菌,它属于人类消化道的优势组细菌,并且还是丁酸的主要生产者(11)。本申请人阐明了该细菌的全基因组序列和注释。进一步的研究调查了具有人罗斯拜瑞氏菌单一集群的无菌小鼠中的细菌和宿主的转录组应答。本文描述了参与集群和适应鼠消化道的细菌基因的作用,以及对所述细菌的集群产生应答的宿主基因的作用。

[0087] 申请人的实验表明,人罗斯拜瑞氏菌的活性是高度特异的。研究显示,罗斯拜瑞氏菌属(*Roseburia*)的重要的基因组迥然不同,这表明了功能多样性。的确,令人出乎意料的是,实验显示来自梭菌属簇XIVa的细菌(包括肠道罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*)、人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)、和直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*),它们均为丁酸生产者)可对消化道细胞产生迥然不同且独特的作用。

[0088] 在一个优选的实施方案中,所述细菌物种是根据布达佩斯条约中的条款,于2004年10月21日以阿伯丁大学罗维特营养与健康研究所(Greenburn Road,Aberdeen,AB21 9SB,Scotland,UK)的名义在国家食品工业与海洋细菌保藏中心(NCIMB)NCIMB公司(Ferguson Building,Craibstone Estate,Bucksburn,Aberdeen,UK,AB21 9YA)保藏的菌株,登录号为NCIMB 14029^T *Roseburia hominis* A2-183^T (DSM= 16839^T)。

[0089] 所述细菌物种优选为文献“Duncan,S.H.,Aminov,R.I.,Scott,K. P.,Louis,P.,Stanton,T.B.,&Flint,H.J. (2006) Int.J.Syst.Evol. Microbiol.56:2437-2441”中所述的人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)。

[0090] 在一个优选的实施方案中,所述细菌物种为活细菌种群的形式、冻干细菌种群的形式、无生命细菌种群的形式、或它们的细胞组分的形式。优选地,当所述细菌物种为无生命细菌种群的形式时,其选自热灭活细菌、经辐射细菌和被溶解的细菌。

[0091] 在一个优选的实施方案中,所述细菌物种为活细菌种群的形式、或其细胞组分的形式。

[0092] 在一个优选的实施方案中,所述细菌物种是分离的形式。如本文所用,术语“分离的”是指从其天然环境中分离出来的。

[0093] 在一个优选的实施方案中,所述细菌物种为生物学上纯的形式。如本文所用,术语“生物学上纯的”是指基本上不含其它生物物种的实验室培养物。优选地,所述细菌物种为单一生物物种培养物的形式。

[0094] 本发明还包括本文所述的细菌物种或菌株的突变体的应用。如本文所述,术语“突变体”包括与参考菌株的多核苷酸序列具有至少 93%同源性、优选至少96%同源性、更优选98%同源性,但在细菌基因组的其它序列中包含突变的衍生细菌菌株。突变体可以通过使本发明的菌株的遗传物质发生改变的基因工程技术、或使本发明的菌株的遗传物质与其它分子重组的基因工程技术获得。通常,为了获得这样的突变体菌株,本领域技术人员可以使用标准突变技术,例如UV辐射或暴露于诱变化学制品。

[0095] 如本文所用,术语“突变”包括包含至少一个碱基改变的天然或诱导突变,所述碱基改变包括删除、插入、颠换和本领域技术人员已知的其它改变,包括在亲本核苷酸序列或氨基酸序列中引入的但与该亲本序列保留至少50%同源性的遗传改变。优选地,包含一个或多个突变的序列与亲本序列具有至少60%、优选至少75%、更优选 85%的同源性。如本文所用,序列“同源性”可以利用本领域技术人员已知的标准技术确定。例如,可以利用在线同源性算法“BLAST”程序确定同源性,所述程序在<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

上对公众开放。

[0096] 本发明还包括本文所述的细菌物种或菌株的同源生物的应用。如本文所用,术语“同源生物”是指具有与亲本细菌菌株的核苷酸序列有一定程度的序列同一性或序列同源性的核苷酸序列(下文称为“同源序列”)的细菌菌株。在本文中,术语“同源”是指与目标核苷酸序列具有一定同源性的个体。在本文中,术语“同源性”可以与“同一性”等同。

[0097] 在本文中,同源序列包括这样的核苷酸序列,其可以与亲本细菌菌株的核苷酸序列(目标序列)至少50%、60%、70%、75%、80%、85%或90%相同,优选至少95%、97%、98%或99%相同。

[0098] 可以通过眼睛或(更通常)利用现有的序列比对程序协助进行同源性比较。这些市售的计算机程序可以计算两个或多个序列之间的%同源性。

[0099] 可以对邻接序列(contiguous sequence)计算%同源性,即,将一个序列对准另一个序列,并且将一个序列中的各个氨基酸与另一个序列中的相应氨基酸进行直接比较,一次一个残基。这称为“非间隙”比对。通常,该非间隙比对只对残基数目较少的序列进行。

[0100] 虽然这是一个非常简单一致的方法,但未能考虑到(例如)在一对其它方面相同的序列中,一个插入或删除会导致之后的氨基酸残基比对失败,因此当进行总体比对(global alignment)时,可能导致%同源性大大降低。

[0101] 因此,计算最大%同源性首先需要产生最佳比对,其考虑到间隙处理。进行这种比对的合适的计算机程序为Vector NTI (Invitrogen 公司)。能够进行序列比对的软件的例子包括但不限于(例如)BLAST 包(参见Ausubel等的“Short Protocols in Molecular Biology”,1999,第四版-第18章)、BLAST 2(参见文献“FEMS Microbiol Lett 1999 174 (2):247-50”、“FEMS Microbiol Lett 1999 177 (1):187-8”),FASTA(参见文献“Altschul et al 1990 J.Mol.Biol.403-410”)和AlignX。至少BLAST、BLAST 2和FASTA可以离线和在线搜索(参见“Ausubel et al 1999,pages 7-58to 7-60”)。

[0102] 优选地,对至少20个邻接核苷酸、优选至少30个邻接核苷酸、优选至少40个邻接核苷酸、优选至少50个邻接核苷酸、优选至少60个邻接核苷酸、优选至少100个邻接核苷酸进行核苷酸序列同一性程度的确定。优选地,可以对整个序列进行核苷酸序列同一性程度的确定。

[0103] 传统的基于表型特征的细菌鉴定通常不如基于基因型的鉴定方法那么精确。对细菌16S rRNA基因序列的比对成为优选的基因技术,其通过利用BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)与已知的细菌DNA序列进行比较,使得能够鉴定新的菌株。16S rRNA基因序列在细菌中是普遍的,因此可以测量很多不同的细菌之间的关系。通常,除了在包括种和亚种水平的多个水平上对菌株进行分类以外,比较16S rRNA序列使得可以对细菌的所有主要的门在属的水平上对生物进行区分。已经确定了大量菌株的16S rRNA基因序列。GenBank(最大的核苷酸序列数据库)具有超过2亿个保藏的序列,其中超过90,000个为16S rRNA基因。这意味着可以将未知菌株的序列与已有的之前已经保藏的很多序列进行比较。

[0104] 如本文所用,术语“16S rRNA同一性”是指与已知细菌菌株的百分比同一性。在一个优选的实施方案中,细菌菌株与以上述登录号保藏的菌株具有至少99.5%的16S rRNA同一性。

[0105] 本发明还包括突变株,其可以得自上文提及的保藏菌株,本发明还包括与以上述登录号保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同一性和/或至少99.5%的16S RNA同一性的菌株。

[0106] 在本发明的内容中,术语“DNA-DNA同一性”是指在其核苷酸序列的基础上,DNA的两个或多个单独的股彼此的接近程度。通常,以它们的%同一性进行测量。在一个优选的实施方案中,细菌菌株与以上述登录号保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同一性。

[0107] 在一个高度优选的实施方案中,细菌菌株与以上述登录号保藏的菌株具有至少70%的DNA-DNA同一性和至少99.5%的16S rRNA 同一性。

[0108] 治疗应用

[0109] 本发明的另一个方面涉及用于医药的人罗斯拜瑞氏菌细菌物种。

[0110] 更具体而言,所述人罗斯拜瑞氏菌细菌物种用于治疗被试者的以下失调,所述失调选自炎症性疾病、免疫失调和肠失调。

[0111] 如本文所用,术语“药物”包括用于人类和动物应用的人用药物和兽用药物。此外,本文所用的术语“药物”是指可提供治疗和/ 或有益效果的任何物质。本文所用的术语“药物”不必要被限制为需要上市许可证的物质,而是可以包括能够在化妆品、营养品、食品(包括例如食料和饮料)、益生菌培养物、营养补充剂和天然药物中使用的物质。此外,本文所用的术语“药物”包括被设计为加入动物饲料(例如家畜饲料和/或宠物饲料)中的产品。

[0112] 在本发明的一个优选的实施方案中,失调选自肠易激综合征(IBS)、结肠炎、炎症性肠病(IBD),包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎、结肠袋炎(pouchitis)、功能性消化不良、功能性便秘、功能性腹泻(包括抗生素相关腹泻、旅行者腹泻和小儿腹泻)、功能性腹痛、功能性气胀病、上腹痛综合征、餐后不适综合征、胃食管反流病(GERD)、自身免疫性疾病(例如糖尿病、关节炎、多发性硬化和牛皮癣变态反应)、特异反应性疾病(例如特异反应性皮炎)、坏死性小肠结肠炎、其它感染、以及它们的组合。

[0113] 在一个特别优选的实施方案中,所述失调为炎症性疾病。优选地,宿主被试者中的前炎症基因的表达被下调。这些研究的更多细节在下文中描述。

[0114] 更优选地,所述炎症性疾病为结肠炎,更优选为克罗恩氏病和溃疡性结肠炎或结肠袋炎。

[0115] 在一个特别优选的实施方案中,肠失调为IBS。IBS的确切的病理生理学还有待阐明。近来的研究报道了在IBS患者中发生粘膜炎症和肠道菌群的变化,并且报道了与肠感染相关的疾病。

[0116] 在一个特别优选的实施方案中,肠失调为IBD。优选地,在宿主被试者中增强了屏障基因的表达。这些研究的更多细节在下文中描述。

[0117] 在一个特别优选的实施方案中,肠失调为克罗恩氏病。

[0118] 在一个特别优选的实施方案中,失调为免疫失调。

[0119] 优选地,免疫失调选自溃疡性结肠炎、结肠袋炎、其它自身免疫性疾病(包括风湿性关节炎、牛皮癣、多发性硬化)、变态反应(包括乳糜泻、特异反应性皮炎和鼻炎)。

[0120] 在一个实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌细菌物种被用于调节被试者的免疫系统。已知细菌物种的免疫调节是高度物种特异性的(8)。特别地,簇XIVa和簇VI细菌的免疫调节作用非常复杂,并且不依赖于丁酸的产生(41)。

[0121] 在一个优选的实施方案中,调整了被试者的先天性免疫系统。

[0122] 在另一个优选的实施方案中,以免疫调节的方式调整了被试者的适应性免疫系统(不是免疫激活,因此减轻了炎症)。

[0123] 本发明的另一个方面涉及用于改善被试者的肠道菌群的人罗斯拜瑞氏菌细菌物种。

[0124] 肠道菌群是指生活在宿主动物的消化道(digestive tract)内的微生物。这些微生物发挥广泛多样的代谢功能、结构功能、保护功能和其它有益的功能。如本文所用,“改善肠道菌群”是指增加宿主肠内的微生物数目和/或种类,和/或增强所述微生物在代谢功能、结构功能、保护功能和其它有益功能方面的活性。

[0125] 优选地,人罗斯拜瑞氏菌集群在结肠和/或回肠中,更优选集群在结肠中。

[0126] 在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌调节至少一种转移基因或趋化性基因的表达。

[0127] 更优选地,人罗斯拜瑞氏菌下调至少一种转移基因或趋化性基因的表达。更加优选地,所述转移基因或趋化性基因选自MobA和 MobL。

[0128] 在另一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌调节选自FlaA1、FlaA2、Fla3和FlaB中的至少一种基因的表达。

[0129] 在炎症性肠病中存在对FLA型蛋白的特异性血清抗体。因此,在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌被用于治疗炎症性肠病。

[0130] 在另一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌调节以下一者或多者的表达:乙酰辅酶A乙酰基转移酶、3-羟基乙酰基辅酶A脱氢酶、丁酰辅酶A脱氢酶、电子转移黄素蛋白β亚基、和电子转移黄素蛋白α亚基。

[0131] 本发明的另一个方面涉及用于调节被试者的先天性免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌细菌物种

[0132] 如本文所用,术语“先天性免疫系统”(也称为非特异性免疫系统)包括以非特异的方式为宿主提供直接防御以抵抗其它有机体感染的细胞和机制。这意味着先天性系统的细胞以非特异性的方式识别病原体并作出应答,但其不为宿主提供长期的免疫或保护性免疫,这与适应性免疫系统不同。

[0133] 如本文所用,术语“调节先天性免疫系统”是指诱导先天性免疫系统的活性,和/或增加相对于基线水平活性的活性水平,从而促进免疫稳态。

[0134] 先天性免疫功能丧失或调节异常与多种身体器官(包括消化道)的炎症性疾病的风险的提高有关,其中先天性免疫功能丧失或调节异常由失去上皮屏障、先天性免疫肽(例如防御素、趋化因子和细胞因子)引起,或由TLR信号通路的缺陷引起。所述疾病包括炎症性肠病。因此,在一个高度优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌用于治疗炎症性肠病。

[0135] 在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌调节选自Tlr5、Tlr1、Vnn1、Defb37、Pla2g、Muc16、ltln、Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3、Magi3、Marveld3、Mpp7、Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、lgsf8和Tcfe2a中的至少一种基因的表达。这些基因中的很多是消化道屏障基因并且是抗微生物的,因此它们能够降低消化道病原体的侵染力,并且还能够降低活病原体的数目。

[0136] 本发明的另一个方面涉及用于调节被试者的适应性免疫系统的人罗斯拜瑞氏菌

细菌物种。

[0137] 如本文所用,术语“适应性免疫系统”(还称为特异性免疫系统)是指消除或防止病原体生长的高度特异性的、系统性的细胞和过程。适应性免疫应答为脊椎动物的免疫系统提供识别和记忆特定病原体的能力(从而产生免疫性),以及在每次遭遇病原体时发动强烈攻击的能力。

[0138] 如本文所用,术语“调节适应性免疫系统”是指诱导适应性免疫系统的活性,和/或通过增加相对于基线水平活性的活性水平来促进免疫稳态。优选地,以免疫调节的方式调整适应性免疫系统(不是免疫激活,因此减轻了炎症)。

[0139] 与适应性免疫系统相关的缺陷和失调(特别是与T细胞的功能相关的),与多种炎症性疾病和自身免疫性疾病有关。与Th1、Th2 和Th17相关的T细胞应答,与特异反应性疾病、炎症性疾病和自身免疫性疾病有关。改善或增加调节性T细胞(Tregs)群体的治疗对控制由Th1、Th2和Th17细胞过度应答引起的疾病是重要的。

[0140] 在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌激活结肠或回肠中的至少一种免疫应答基因。

[0141] 在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌通过调节与T细胞调控相关基因(更优选结肠中的)的表达来调节适应性免疫系统。更优选的是,人罗斯拜瑞氏菌诱导调节性T细胞(Tregs)。Treg数目的增加会抵抗其它效应T细胞的作用,所述其它效应T细胞例如为引起炎症病状、自身免疫性病状和变态反应性/特异反应性病状的 Th1、Th17和Th2。因此,人罗斯拜瑞氏菌的所述性质可以用来解决 Teff/Treg细胞平衡缺失的很多疾病,例如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。

[0142] 在一个特别优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌上调升结肠中选自Ly6g6c和Ly6g6e中的至少一种基因的表达。Ly6g6c和Ly6g6e 耗尽会增加消化道和呼吸道的感染风险,并且与诸如嗜中性白细胞减少症等疾病相关。因此,在一个优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌用于治疗嗜中性白细胞减少症。

[0143] 本发明的另一个方面涉及用于保持被试者的免疫稳态的人罗斯拜瑞氏菌细菌物种。如本文所用,“保持免疫稳态”是指自我调节机体的免疫系统以维持响应于变化条件的口服耐受性或免疫稳定性。口服耐受性是指健康消化道对食物和共生细菌的正常免疫应答。这些在乳糜泻和诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎等炎症性肠病中缺失。因此,在一个特别优选的实施方案中,人罗斯拜瑞氏菌用于治疗乳糜泻和诸如克罗恩氏病和溃疡性结肠炎等炎症性肠病。

[0144] 本发明的另一个方面涉及用于调节被试者的食欲的人罗斯拜瑞氏菌细菌物种。

[0145] 如本文所用,“调节食欲”是指调节(即,增强或降低)宿主进食的欲望的能力。优选地,人罗斯拜瑞氏菌通过下调与食欲抑制相关的基因来对宿主的食欲产生刺激作用。优选地,人罗斯拜瑞氏菌下调选自Agt、Cartpt、Cck、Cxcl12和Gcg中的至少一种基因的表达。更优选地,人罗斯拜瑞氏菌下调饱腹感激素Cck和Gcg的表达。

附图说明

[0146] 本发明的细菌物种还可以用于预防应用。在预防应用中,对易感或有风险感染特定疾病的患者施用足以至少部分降低发生疾病的风险的量的本发明的细菌物种或组合物。

将该量定义为“预防有效量”。精确的量取决于患者的特定因素(例如患者的健康和体重状态)的值。

[0147] 以如下附图的方式进一步描述本发明,其中:

[0148] 图1示出人罗斯拜瑞氏菌在升结肠中的丰度和定位。(A)人罗斯拜瑞氏菌集群的小鼠升结肠示出了细菌与宿主上皮之间的密切联系,采用的是A2-183FISH探针,原始放大x630。(B)利用人罗斯拜瑞氏菌特异性引物的PCR显示,集群后粪便DNA具有强的阳性信号,而GF动物的粪便对任何细菌的存在均是阴性的。(C)实时定量PCR分析显示人罗斯拜瑞氏菌的集群水平/mg粪便。

[0149] 图2示出了人罗斯拜瑞氏菌基因组的序列和注释。(A)人罗斯拜瑞氏菌圆形基因组图谱,其上在引物所针对的区域中标示出了PCR实验的定位。该基因组图谱的轨迹(track)为(从外轨迹0开始):轨迹0-(蓝色)由带编号的刻度线标出的实时定量PCR实验;轨迹1-(淡蓝色)正向CDS;轨迹2-(淡蓝色)反向CDS;轨迹3-(蓝色)rRNA;轨迹4-(绿色)tRNA;轨迹5-(红色)实时定量PCR所针对的STS标记区域;图像1-GC含量;图像2-GC偏好。(B)人罗斯拜瑞氏菌基因组的功能注释。

[0150] 图3鉴定了人罗斯拜瑞氏菌在集群且适应于鼠消化道之后所差异表达的不同转录本。(A)从小鼠盲肠内容物中分离出的细菌RNA,它们在cDNA合成时被dCTP-Cy3或dCTP-Cy5标记,并且与引入染料交换的微阵列玻片杂交。当倍数变化 >2 且 $P<0.05$ 时认为数据是显著的。微阵列分析揭示了50种差异表达的基因(体内vs体外)。(B)对参与接合/转移传递的基因的实时定量PCR验证。(C)对参与移动性与趋化性的基因的实时定量PCR验证。(D)上升消化道内容物的蛋白质印记(Western blot),所述上升消化道内容物在14d时用亲和纯化的Fla2抗体免疫染色(泳道1:分子量阶梯(ladder);泳道2-6:来自动物1-5的消化道内容物;泳道7-8:空;泳道9-10:人罗斯拜瑞氏菌生物质(阳性对照))。人罗斯拜瑞氏菌的照片示出了鞭毛(黑色箭头)。(E)对参与丁酸代谢的基因的实时定量PCR验证。(F)对人罗斯拜瑞氏菌在体外暴露于人肠上皮细胞过程中的转录本的实时定量PCR分析。实时定量PCR的结果是三次重复实验的平均值,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

[0151] 图4鉴定了在单一集群有人罗斯拜瑞氏菌之后的鼠消化道中所差异表达的不同转录本。(A)集群有人罗斯拜瑞氏菌的小鼠相对于GF的差异表达基因的Affymetrix微阵列分析。棒状图代表在14天和28天之后较高表达和较低表达的基因的数目。(B)由在14天和28天时,GF和集群有人罗斯拜瑞氏菌的小鼠之间的具有功能意义的差异表达的基因制得的热点图。列代表独立的阵列,行代表感兴趣的特定基因。Z-得分描述了与平均值的距离的测量值(以标准偏差计)。用颜色强度示出各个基因的相对值,绿色代表较高表达,红色代表较低表达。(C)集群有人罗斯拜瑞氏菌的小鼠和GF小鼠之间所显示出的显著不同的基因的实时定量PCR验证。实时定量PCR结果是三次重复实验的平均值,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

[0152] 图5示出T细胞标记物在结肠中的表达和定位。在GF和用人罗斯拜瑞氏菌处理的小鼠的固有层中,对标记有anti-Ly6G(A)、anti-CD3(B)和anti-CD11b(C)的固有层细胞进行免疫荧光实验和分析。* $P<0.05$ 。

[0153] 图6示出在结肠炎的实验模型中人罗斯拜瑞氏菌的抗炎症作用。每周对IL-10KO小鼠施用三次,持续14周。(A)与野生型小鼠相比,未处理的IL-10KO小鼠的所有基因都强烈升

高,而在用人罗斯拜瑞氏菌处理的动物中,差异基因表达较低。实时定量PCR结果是三次重复实验的平均值,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。(B)在研究结束时,未处理的IL-10K0小鼠和用人罗斯拜瑞氏菌处理的 IL-10K0动物的体重。(C) IL-10K0和用人罗斯拜瑞氏菌处理的 IL-10K0动物的升结肠(苏木精/伊红染色)。原始放大 $\times 100$ 。

[0154] 图7示出了IL-10、IL-17和IFN- γ 的mRNA水平的实时定量PCR分析。对升结肠组织进行实时定量PCR以测量T细胞标记物。实时定量PCR结果是三次重复实验的平均值,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

[0155] 图8示出GF小鼠与人罗斯拜瑞氏菌单关联对体重组成的影响。进行了干体重和脂质胴体(carcass)分析。(A)人罗斯拜瑞氏菌关联小鼠的干胴体重显著重于GF动物。(B)进一步的胴体脂质分析显示,在14d时,总脂肪也显著高于用人罗斯拜瑞氏菌处理的小鼠。

[0156] 图9示出来自簇XIVa(厚壁菌门)的三种细菌菌株的基因表达数据的比较结果,所述三种菌株为人罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia hominis*)、直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)、和肠道罗斯拜瑞氏菌(*Roseburia intestinalis*)。

[0157] 图10示出了人罗斯拜瑞氏菌诱导A20(一种具有有效抗炎症活性的NF- κ B信号通路的负调控因子),而其它细菌菌株没有效果。与直肠真杆菌(一种相关的细菌)不同,人罗斯拜瑞氏菌的鞭毛蛋白部分(人罗斯拜瑞氏菌的FLA1)也诱导A20。更具体地,图10显示了直肠真杆菌、人罗斯拜瑞氏菌、直肠真杆菌的FLA、人罗斯拜瑞氏菌的FLA1、EAV9、SV1400的FLA相对于对照的A20诱导倍数。

[0158] 图11示出了由RAST确定的人罗斯拜瑞氏菌A2-183的亚系统类别分布(Subsystem Category Distribution),其显示了各自类别的功能亚系统和基因的数目。

[0159] 图12示出了由RAST确定的食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌(*R. inulinivorans*) DSM 16841A2-183的亚系统类别分布,其显示了各自类别的功能亚系统和基因的数目。

[0160] 图13示出由RAST确定的肠道罗斯拜瑞氏菌L1-82的亚系统类别分布,其显示了各自类别的功能亚系统和基因的数目。

[0161] 图14示出由RAST确定的肠道罗斯拜瑞氏菌M50/1的亚系统类别分布,其显示了各自类别的功能亚系统和基因的数目。

[0162] 图15示出由RAST确定的直肠真杆菌ATCC 33656的亚系统类别分布,其显示了各自类别的功能亚系统和基因的数目。

[0163] 人罗斯拜瑞氏菌偏好集群于结肠

[0164] 在连续数天中给健康成年C3H/HeN无菌(GF)小鼠填喂人罗斯拜瑞氏菌三次以进行接种。利用包含3%抗坏血酸和2%半胱氨酸的接种培养基保护细菌使其不暴露于氧气,从而实现了成功集群。用荧光原位杂交(FISH)对消化道组织的分析表明,人罗斯拜瑞氏菌集群于回肠和结肠中,但在结肠中发现了远远更多的数目。也发现了细菌与结肠粘膜具有紧密的联系(图1A)。利用人罗斯拜瑞氏菌特异的引物进行的PCR进一步对集群进行了验证和定量,集群数目接近 1×10^{10} 细菌/g粪便(图1B和1C)。所测试的GF动物的粪便对于任何细菌的存在是阴性的。

[0165] 人罗斯拜瑞氏菌基因组揭示出独特的促进宿主相互作用的基因

[0166] 阐明了人罗斯拜瑞氏菌A2-183的全基因组序列(图2A),其由单一的3,592,125-bp的染色体所代表(图2B)。利用RAST平台进行的自动和人工基因组注释显示存在4个核糖体

操纵子、66个 RNA和3,273个预测蛋白。最大的一组基因属于碳水化合物亚系统类别(271个基因),它们编码参与碳水化合物代谢的蛋白;之后为蛋白质代谢亚系统类别(197)和氨基酸及其衍生物亚系统类别(175)(图2B)。其它重要的功能类别包括移动性与趋化性(49)、以及休眠和孢子形成(12)。比较基因组分析确定,在全细菌基因组中,在基因组结构和功能方面关系最接近的是直肠真杆菌(*Eubacterium rectale*)(12),考虑到这些生物具有接近的分类学关联性(11,13),因此这并不意外。对这两个具有1,095个基因的基因组的比较重建表明,它们大约有25%的基因不同。特别地,这些差别包括编码用于与宿主相互作用的重要功能的基因。例如,编码IV型鞭毛组装蛋白 PilB和PilC的移动性与趋化性基因存在于直肠真杆菌中,但不存在于人罗斯拜瑞氏菌中,然而,鞭毛基体杆蛋白FlgC、鞭毛钩-基体复合物蛋白FlhE、鞭毛蛋白FlaB和鞭毛马达开关蛋白FlhG对于人罗斯拜瑞氏菌是独特的。这两个细菌基因组的不同还在于42个碳水化合物基因,这反映了它们相异的营养需要。

[0167] 人罗斯拜瑞氏菌通过上调转移基因和趋化性基因来响应于消化道环境

[0168] 为了确定人罗斯拜瑞氏菌响应于宿主和饮食而差异表达的基因,利用6,000种得自小插入片段(small-insert-size)测序文库的PCR 片段进行了微阵列检测。之后对42种差异表达的基因进行了实时定量PCR验证,如图2B所示,这些基因簇集在人罗斯拜瑞氏菌基因组的特定区域。为了区分消化道环境和饮食成分的作用,在以下四种不同的实验条件下分离了细菌RNA:(i)体内,从单相关小鼠的盲肠中分离;(ii)体外,从在培养基中生长的细菌中分离;(iii)体外,从在饮食成分的存在下生长的细菌中分离;(iv)从培养在Caco-2 和HT-29融合细胞的表面上的细菌中分离。

[0169] 鉴定了50种差异表达的基因(体内vs体外)(图3A)。最令人惊奇的发现是,在体内被非常高度上调的基因参与接合/转移传递,它们为mobA-和mobL-样基因(图3B)。在转录研究中存在这些基因是令人惊奇的,因为在亚系统类别特征中,没有已鉴定的基因被指定为与噬菌体、原噬菌体、转座因子和质粒有关。该基因检测和定位中的不同可能是由于亚系统类别注释的公认的局限性所导致的。饮食化合物的刺激作用非常不显著,这表明消化道环境本身是那些参与水平基因转移的基因的主要诱导物。

[0170] 其它由消化道环境诱导的亚系统包括膜转运(特别是镁转运)和移动性与趋化性,所述的移动性与趋化性包括多种甲基接收趋化蛋白和鞭毛操纵子基因(图3C)。人罗斯拜瑞氏菌具有多种鞭毛蛋白基因(flaA1、flaA2、flaA3和flaB),并且有趣地是,如利用人罗斯拜瑞氏菌特异性鞭毛蛋白抗体进行的细菌(分离自体内集群的小鼠)蛋白质印记检测所示(图3D),在小鼠消化道环境中生长促进了鞭毛蛋白在该细菌中的表达。这与之前的报道一致,之前的报道表明只有某些种类的厚壁菌在体内产生鞭毛蛋白(14)。

[0171] 不令人惊奇的是,人罗斯拜瑞氏菌在消化道环境中表达分解代谢基因主要受饮食化合物的影响(图3E)。相关的基因包括乙酰辅酶A乙酰基转移酶、3-羟基酰基辅酶A脱氢酶、丁酰辅酶A脱氢酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶[ATP]。虽然对这些基因的调节主要受饮食的驱动,但是在之后的取样点中,宿主的作用也是明显的。出乎意料的是,宿主环境下调了一些参与宿主源物质(例如葡糖醛酸)代谢的基因,这在粘膜蛋白聚糖的碳水化合物链中是常见的。

[0172] 为了进一步研究宿主适应对人罗斯拜瑞氏菌转录组(transcriptome)的影响,进行了对人肠上皮细胞(Caco-2和HT-29)的体外刺激。其表明,通过适应于小鼠消化道而诱

导的接合/转移传递基因mobA/mobL蛋白1,也在这两种细胞系中增加(图3F)。与体内的数据一致,在Caco-2细胞中鞭毛蛋白基因MotA被下调。参与丁酸代谢的基因在两种细胞系中不同,在Caco-2细胞中观察到下调,而在HT-29细胞中观察到上调。

[0173] 人罗斯拜瑞氏菌主要在结肠中影响T细胞通路

[0174] 人罗斯拜瑞氏菌在GF小鼠中的集群与消化道基因表达增加有关,这在结肠中增加最多(图4A)。差异表达在集群后第28天最显著,其中有159种基因上调,143种基因下调。在第14天,回肠中的差异表达的基因数目与升结肠相似,有79种基因上调,119种基因下调。在第28天,回肠中的差异表达非常低,这与减少的集群水平一致。如热点图分析所示的重要转录本的清晰分离所示(图4B),转录本组的(transcriptomic)响应在这两个时间点是不同的。Affymetrix数据的阳性的实时定量PCR验证在图4C中示出。

[0175] 回肠和升结肠中在第14天受到影响的大多数通路被归为细胞分化、细胞周期调控和组织重塑类别。重要的是,免疫应答是升结肠中在第28天受到诱导的主要通路组。在所述类别中,36个受到显著影响的通路主要参与T细胞功能,包括IL-10信号通路、辅助性T细胞的ICOS通路、以及CTLA-4对T细胞功能的调节。参与这些通路的基因显示出被上调和下调,因此,人罗斯拜瑞氏菌的存在会显著影响这些通路,而对T细胞分化的精确网状功能性影响还需要进一步的研究。然而,利用实时定量PCR确定了IL-10、CD3 ϵ 和IL-13的增加、以及IFN- γ 的表达改变(图7),这表明人罗斯拜瑞氏菌集群可以帮助Treg和Th2细胞分化通路。进行了基因本体学分析,以在差异调节的基因的功能分类方面获得其它的信息。在人罗斯拜瑞氏菌集群小鼠的结肠中,用于“肌动蛋白聚合”的GO-过程(GO:0030041)(Arpc3、Capg、Cdc42ep5和Rhoc)在第28天被上调(图8)。T细胞活化和效应物功能需要免疫突触上的肌动蛋白聚合。利用实时定量PCR进一步确定了基因诱导(图4C)。总的来说,该数据表明,人罗斯拜瑞氏菌通过阳性地影响T细胞调节而积极影响适应性免疫应答。

[0176] 与这些结果相关的是,升结肠中的Ly6家族成员受到诱导。特别地,在第28天,Ly6g6c的GPI-锚定基因产物被上调了25倍,相关基因Ly6g6e被上调了2倍。大多数造血细胞表达Ly6家族的一个或多个成员,所述造血细胞包括嗜中性白细胞和浆细胞样树突细胞。此外,已经提出了Ly6在T细胞活化、分化和成熟中的可能的作用(15)。

[0177] 免疫细胞化学证实了Ly6G⁺、CD11b⁺和CD3⁺细胞在人罗斯拜瑞氏菌集群小鼠中增多(图5)。与示出T细胞通路主要由Treg应答主导的数据一致的是,在接种了人罗斯拜瑞氏菌的小鼠的结肠中CD3⁺FoxP3⁺双阳性T细胞在统计学上显著性地增多。显然,人罗斯拜瑞氏菌(作为单一细菌物种)的集群,诱导了CD3⁺FoxP3⁺细胞群体显著性增多,特别是在这些小鼠的结肠中。

[0178] 人罗斯拜瑞氏菌调节回肠和结肠中的先天性免疫应答基因,并且减轻IL10K0小鼠中的结肠炎

[0179] 人罗斯拜瑞氏菌在升结肠中的存在可显著诱导参与先天性免疫和消化道屏障功能的基因。用于“先天性免疫应答”的GO-过程(GO:0045087)被上调并且包括TLR-相关基因Tlr5、Tlr1和Vnn1。Tlr5的上调是很有意思的(特别是考虑到在消化道结群过程中人罗斯拜瑞氏菌的鞭毛基因被相应地诱导并且存在鞭毛蛋白),并且可以推断该先天性信号通路在介导其它先天性和适应性免疫应答中的作用。最近证明了有鞭毛病原体中的TLR5信号通路和CD4⁺T细胞应答之间的配合(16)。相似地,已经证明了TLR2在促进脆弱拟杆菌

(*Bacteroides fragilis*)的集群、Treg增殖和免疫稳态中的作用(17)。

[0180] 其它在结肠中受到人罗斯拜瑞氏菌影响的先天性免疫基因包括抗菌肽Defb37、Pla2g3、Muc16和Itln、以及消化道屏障功能基因Sprr1a、Cldn4、Pmp22、Crb3和Magi3。响应于人罗斯拜瑞氏菌而在回肠中显示出上调的先天性免疫基因包括Defcr20、Pcgf2、Ltbp4、Igsf8和 Tcfe2a。有趣的是,Pcgf2负调节不同细胞因子、趋化因子和趋化因子受体的表达,并且可以在控制消化道组织响应于所述共生细菌的炎症反应中发挥重要作用。有趣的是,发明人还显示了人罗斯拜瑞氏菌对NF- κ B通路(GO:0043124)的负调节,其(像多形拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*)那样(19))可以通过下调该炎症级联反应而有助于免疫稳态。

[0181] 由于在单相关小鼠中对炎症通路的控制以及对Treg诱导的积极效果,使用了IL-10敲除小鼠模型检测人罗斯拜瑞氏菌的治疗效果。从出生20天断奶开始对小鼠施用一周三次($\sim 50\mu\text{l}$, 10^{10} CFU),持续14周。基因表达一系列的前炎症生物标记物显示,与野生型小鼠相比,未经处理的IL-10KO小鼠的所有被研究的基因都显著提高,基因诱导为4-至49-倍(图6A)。与未经处理的小鼠相比,在经人罗斯拜瑞氏菌处理的小鼠中,前炎症基因诱导显著较低,这表明经口施用人罗斯拜瑞氏菌具有强的治疗效果。在该研究的最后,与未经处理的动物相比,经人罗斯拜瑞氏菌处理的动物的体重也较重,该效果在雄性中具有统计显著性(图6B)。最后,组织学分析显示,在未经处理的IL-10KO中,升结肠中存在几处炎症,而经人罗斯拜瑞氏菌处理的动物具有外观较健康的结肠粘膜。

[0182] 人罗斯拜瑞氏菌集群影响饱腹感基因和身体构成

[0183] 还证实了人罗斯拜瑞氏菌在单相关小鼠中的重要代谢活性。在人罗斯拜瑞氏菌集群之后,G0-过程“响应于食物的负调节”(GO:0032096)、“食欲的负调节”(GO:0032099)、和“儿茶酚胺分泌的调节”(GO:0050433)均在升结肠中下调。由该数据推断,人罗斯拜瑞氏菌对宿主食欲发挥了刺激作用。参与这些过程的基因为Agt、Cartpt、Cck和Cxcl12,倍数变化为2-至12-倍。特别地,Cck作为饥饿抑制剂在消化和饱腹感中发挥主要作用。在所述消化道位点Gcg也显示出下调。

[0184] 为了确定这些基因变化是否与食物摄取和身体构成有生理关联性,进行了干胴体重和构成分析。有趣的是,与GF动物相比,人罗斯拜瑞氏菌相关小鼠的干胴体重显著较重,并且在第14天,差别最易辨别。进一步的胴体脂质分析显示,在第14天,经人罗斯拜瑞氏菌处理的动物的总脂肪也显著较高。这些发现不仅与最近的数据一致,其中所述数据揭示了厚壁菌通过饮食发酵在能量采集中的作用,这些发现还支持消化道细菌实际上能够调节脑-消化道轴和食欲调节激素的观点。

[0185] 讨论

[0186] 宿主-微生物互利共生的长期的共同进化可能驱动了消化道中的具有重要功能的细菌物种的选择,它们中的大多数在其它生态系统中不是高度代表性的。目前,关于微生物群落中的每个成员对肠功能的贡献,特别是与粘膜免疫系统发展的关系,仅有有限的信息。

[0187] 最近,利用基于大肠杆菌(*E. coli*) (HA 107)的可逆集群模型的研究证明,对IgA的免疫诱导作用需要数量为每克内容物约 10^8 CFU的活细菌(20)。最近,在小鼠消化道中研究了SFB和脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)的特定功能,从而确定了它们各自对T细胞生物学的贡献,并且显示了这两种细菌是Treg和Th17细胞的有效诱导物(5,8,9)。虽然已经注意到簇XIVa厚壁菌存在于ASF中,而这也影响T细胞分化(10),但之前没有报道过簇

XIVa厚壁菌中每个成员的作用。

[0188] 在本文中,申请人证明了无菌小鼠消化道与厌氧细菌人罗斯拜瑞氏菌(其为厚壁菌门的一个成员)的第一个成功的单相关。像罗斯拜瑞氏菌这样的极度氧敏感细菌需要严格的厌氧培养技术,这使得难以进行功能表证。申请人在无菌小鼠中建立了稳定的人罗斯拜瑞氏菌单克隆,并且产生了完整的带注释的基因组序列,从而揭示了其代谢组织、生理学和共生性质。发现人罗斯拜瑞氏菌在集群之后的转录响应可归因于宿主消化道环境和饮食。宿主驱动的作用主导人罗斯拜瑞氏菌在单关联之后的响应。这些包括基因传递、膜运输、趋化性与移动性亚系统。参与代谢传递的基因的显著上调支持这样的观点:消化道环境高度有利于消化道微生物之间的水平基因转移。因此,该环境可以加速对细菌生存、集群和具有重要功能的基因在消化道生态系统中的散布。

[0189] 对于病原菌而言,已经很好地阐明了移动性和鞭毛装置在宿主集群中的作用,但对鞭毛蛋白在共生细菌中的作用还知之甚少。体外实验揭示了宿主肠环境对鞭毛蛋白基因表达的刺激作用。宿主的 TLR5受体感知鞭毛蛋白信号(24),并且很多病原鞭毛蛋白结构引起强烈的前炎症应答(24)。由TLR5介导的响应于常驻性有鞭毛共生菌的信号通路可能对于体内稳态而言是重要的,因为在小鼠中检测到 TLR5的删除会导致自发性结肠炎(25)。因此,人罗斯拜瑞氏菌鞭毛蛋白在体内增强的表达具有潜在价值。其它的研究显示,大肠杆菌鞭毛蛋白突变体具有比野生型有鞭毛菌株更好的集群优势,这可能是由于缺乏由TLR5信号通路所导致的先天性识别(26,27)。申请人说明了对于某些厚壁菌,鞭毛蛋白上调是对消化道集群的天然响应。人罗斯拜瑞氏菌鞭毛蛋白在体内维持表达,并且与持续的集群、没有明显的炎症和T细胞扩增等调控型表型存在关联。因此,通过TLR5,共生菌鞭毛蛋白结构可以促进直接免疫耐受性应答。基于TLRKO和人罗斯拜瑞氏菌鞭毛蛋白突变体的另外的数据将会进一步阐明共生菌鞭毛蛋白在与免疫稳态的关系中的重要性,虽然其它信号通路部分(例如丁酸通路)也可以有助于免疫调节,但所观察到的人罗斯拜瑞氏菌在IL-10KO小鼠中的保护作用支持上述假设。

[0190] 已经确定了人罗斯拜瑞氏菌在促进小鼠结肠中的消化道屏障功能和先天性免疫力中的明确作用。紧密连接、间隙连接和粘着连接限制了细菌移位至上皮下层(28)。克罗恩氏病和溃疡性结肠炎的特征均是失去屏障功能和紧密连接的完整性。有趣的是,IBD中的消化道微生物群生态失调与厚壁菌减少有关(1,29)。有关人罗斯拜瑞氏菌积极地增强屏障基因的发现的表明,它们在IBD患者中的缺失在功能上有重要意义。激活紧密连接复合物并不是人罗斯拜瑞氏菌特有的,其它的共生菌,例如多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*),也可以增强粘膜屏障功能(18,30),这暗示了这些细菌有机会成为人IBD的益生菌剂。

[0191] 人罗斯拜瑞氏菌对消化道免疫系统的作用是受人关注的。注意到最强的作用是在升结肠中,并且诸如Ly6g6c等基因被显著上调,以及参与T细胞调节和分化的通路和参与免疫突触上的肌动蛋白聚合的通路(它们与T细胞活化和效应子功能有关)也被显著上调。虽然Treg基因响应于人罗斯拜瑞氏菌集群的表达不是非常强,但最受影响的T细胞通路包括与IL-10、ICOS和CTLA-4(它们均与支持 Treg的分化有关)有关的那些通路。重要的是,申请人能够证明在这些小鼠的结肠中CD3⁺FoxP3⁺细胞显著增加。这些发现对能够驱动Treg分化的其它梭菌物种的最新数据进行了补充。显然,人罗斯拜瑞氏菌能够促进粘膜T细胞扩增,

并且影响T细胞分化。

[0192] 有趣的是,注意到与回肠相比,在结肠中具有强的免疫作用,尤其是在用人罗斯拜瑞氏菌进行单集群之后的第28天。在第14天的转录本组数据表明,一些免疫引发是在该时间点回肠中得以开始的。因此,在第28天在升结肠中对不同T细胞亚类的作用可以反映细胞由回肠到肠系膜淋巴结再到结肠的运输和归巢过程。

[0193] 人罗斯拜瑞氏菌集群的其它有趣的生物效应为调节影响对食物的响应的基因,以及控制食欲。特别地,饱腹感激素Cck和Gcg显著降低。Cck对食物摄取的作用通过迷走神经传入通路介导。这是主要的神经通路,通过该通路,有关摄取营养的信息会到达中枢神经系统,从而影响消化道功能和进食行为。Cck作用于迷走神经系统,从而降低刺激食欲和进食的分子的表达,以及增加抑制进食和降低食欲的分子的表达(Npy2r和Cartpt,在本研究中均下调两倍)。到目前为止,没有报道Cck、Gcg和共生细菌之间存在联系,然而,脂肪酸和蛋白质均为Cck和Gcg的有效诱导物(31)。人罗斯拜瑞氏菌产生短链脂肪酸,例如具有少于6个碳的脂肪族尾巴的丁酸;据报道,该代谢活性可降低对血浆Cck(据观察具有较长链的脂肪酸)的刺激作用(32)。有趣的是,胴体重分析显示,人罗斯拜瑞氏菌存在时体重和脂质含量确实均显著增加,这与在常规化的无菌小鼠中观察到的体重增加(33)是一致的。由于之前还没有报道过Cck和Gcg的参与作用,本研究所发现的是否对饱腹感激素的降低有直接的作用还有待观察。然而,重要的是要认识到,此前已经显示了微生物群集群与从饮食中获取能量之间的联系,其一部分是通过释放SCFA实现的(34)。考虑到人罗斯拜瑞氏菌是主要的丁酸生产者,如用人罗斯拜瑞氏菌处理之后所观察到的,该机制可能也有助于代谢效率。

[0194] 总而言之,鼠科动物消化道与人罗斯拜瑞氏菌之间的单关联导致了显著的双向基因表达事件,这些事件与细菌的膜运输、此消化道适应性细菌的趋化性与移动性、以及所伴随的宿主的先天性和适应性免疫系统的激活等方面的改变是一致的。该代谢活性细菌还对食欲和饱腹感基因起到重要的作用,其中所述食欲和饱腹感基因与集群的小鼠的体重增加相关联。

[0195] 组合物

[0196] 本发明的其它方面涉及包含上文所述的细菌物种和药学可接受的赋形剂、载体或稀释剂的组合物。合适的赋形剂、稀释剂、载体在下文中描述。

[0197] 所述组合物可以为任意组合物,但优选为可经口施用、经肠内施用或经直肠施用的组合物。例如,组合物可以为可食用组合物。“可食用”是指经批准用于人或动物消费的物质。

[0198] 本发明的另一个方面涉及包含上文所述的细菌物种的益生菌剂组合物。

[0199] 如本文所用,术语“益生菌剂”是指对宿主的健康或康乐具有有益效果的微生物细胞制备物或微生物细胞成分。(参见文献“Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al” Probiotics: how should they be defined” Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-110”)。

[0200] 优选地,益生菌剂组合物为具有代谢活性的(即,活的和/或冻干的)、或经热灭活、辐射或被溶解的无生命的益生菌的经口施用组合物。益生菌剂组合物可以包含其它成分。本发明的益生菌剂组合物可以经口施用,即,片剂、胶囊或粉末的形式。密封产品对人罗斯拜瑞氏菌是有利的,因为其为厌氧菌。可以包括其它成分(例如,如维生素C)作为除氧剂。诸

如这样的益生菌基质 (prebiotic substrate) 可改善在体内的集群和生存。可供选择地, 本发明的益生菌剂组合物可以作为食物或营养产品 (例如基于奶或乳清的发酵乳制品) 经口施用, 或者作为药物产品经口施用。

[0201] 所述益生菌的合适的每日计量为约 1×10^3 至约 1×10^{11} 集落形成单位 (CFU), 更优选约 1×10^7 至约 1×10^{10} CFU, 更优选约 1×10^6 至约 1×10^{10} CFU。

[0202] 在一个优选的实施方案中, 相对于组合物的重量, 组合物含量为约 1×10^6 至约 1×10^{11} CFU/g, 优选约 1×10^8 至约 1×10^{10} CFU/g 的所述细菌物种和/或其细胞成分作为活性成分。计量可以为 1g、3g、5g 和 10g。

[0203] 通常, 益生菌剂任选与至少一种合适的益生菌化合物组合。益生菌化合物通常为不可消化的碳水化合物, 例如寡聚糖或多糖、或糖醇, 它们在上消化道中不会被消化或吸收。已知的益生菌包括商业产品, 例如菊糖 (inulin) 和反式低聚半乳糖 (transgalactooligosaccharides)。

[0204] 优选地, 相对于组合物的总重量, 本发明的组合物含量为约 1 重量% 至约 30 重量%, 优选 5 重量% 至 20 重量% 的益生菌。优选的碳水化合物选自: 低聚果糖 (或 FOS)、短链低聚果糖、菊糖、低聚异麦芽糖、果胶、低聚木糖 (或 XOS)、低聚壳聚糖 (或 COS)、 β -葡聚糖、阿拉伯胶改性的抗性淀粉、葡聚糖、D-塔格糖、阿拉伯树胶纤维、角豆胶、燕麦、和柑橘纤维。特别优选的益生菌为短链低聚果糖 (以下简称 FOSs-c.c); 所述 FOSs-c.c 为不可消化的碳水化合物, 通常通过转化甜菜糖而获得, 其包含蔗糖分子并且该蔗糖分子上连接有三个葡萄糖分子。

[0205] 饲料/产品

[0206] 本发明的又一个方面涉及包含上文所述的细菌物种的食物产品、膳食补充剂、营养品、营养配方、饮料、和药物, 以及它们的应用。

[0207] 在一个优选的实施方案中, 所述组合物还包含至少一种其它种类的其它食品级细菌, 其中该食品级细菌优选选自由乳酸菌、双歧杆菌、丙酸杆菌或其混合物组成的组。

[0208] 本发明的一个方面涉及包含上述细菌物种的食品产品, 术语“食品产品”旨在包括所有可以为固体、胶状或液体的消费品。合适的食品产品可以包括例如功能性食品产品、食品组合物、宠物食品、家畜饲料、健康食品、饲料等。在一个优选的实施方案中, 食品产品为健康食品。

[0209] 如本文所用, 术语“功能性食品产品”是指不仅能够为消费者提供营养效果, 还能够提供其它有益效果的食物。因此, 功能性食品是具有掺入其中并赋予该食品特定的功能 (例如医学或生理学益处) 的组成或成分 (例如本文所述的那些) 的普通食品, 而不是仅具有纯粹的营养效果。

[0210] 可用于本发明的特定的食品产品的例子包括人类食用的基于奶的产品、即食点心、用于与 (例如) 奶或水重新组合的粉末、巧克力奶饮料、麦芽饮料、即食小菜、方便小菜或速溶饮料、或宠物或家畜食用的用于全部膳食或部分膳食的食物组合物。

[0211] 在一个优选的实施方案中, 本发明的组合物为用于人、宠物或家畜的食品产品。所述组合物可以用于选自由狗、猫、猪、牛、马、山羊、绵羊或家禽组成的组中的动物。在一个优选的实施方案中, 所述组合物为用于成年物种, 特别是成年人的食品产品。

[0212] 在本发明中, “基于奶的产品”是指任何具有可变的脂肪含量的液体或半固体的奶

或基于乳清的产品。基于奶的产品可以为例如未经任何加工的牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂奶、全奶、由奶粉调配的奶、和乳清,或者可以为经加工的产品,例如酸乳酪、凝结的奶(curdled milk)、凝乳(curd)、酸奶、全脂酸奶、酪乳、和其它酸奶制品。另一个重要的组包括奶饮料,例如乳清饮料、发酵乳、炼乳、婴幼儿奶;增香乳、冰淇淋;含奶食品,例如糖果。

[0213] 本发明的另一个方面涉及包含上文所述的细菌物种的饲料或动物饲料。

[0214] 本发明的组合物可以或能够成为食品补充剂,本文还称为膳食补充剂或营养补充剂或食品添加剂。因此,本发明的另一个方面涉及包含一种或多种根据本发明的细菌菌株的膳食补充剂或食品添加剂。

[0215] 根据本发明的细菌物种和益生菌剂组合物还可以用于动物营养(例如猪营养),特别是用于断奶早期和生长育肥期。期望益生菌剂通过(例如)提高饲料转化率而增强免疫功能、降低和防止感染疾病、有利地改变微生物群组成、以及改善动物的生长和性质。

[0216] 稀释剂、赋形剂和载体

[0217] 如上文所述,本发明还涉及包含上文所述的细菌物种的组合物及其应用,所述组合物更优选药物组合物或营养补充剂。细菌物种通常以与药学或营养学可接受的载体、赋形剂或稀释剂(特别是用于人类治疗的)的混合物的形式施用。药物组合物可以在人类医疗或兽医医疗中用于人类或动物应用。

[0218] 这种用于本文所述的各种不同形式的药物组合物的合适的赋形剂的例子可以参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients,第二版,(1994),A Wade和PJ Weller编”。

[0219] 在药学领域中,用于治疗应用的可接受的载体或稀释剂是公知的,例如在“Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack出版公司(A.R. Gennaro编,1985)”中有所描述。

[0220] 合适的载体的例子包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨糖醇等。合适的稀释剂的例子包括乙醇、甘油和水。

[0221] 可以根据想用的给药途径和标准药学实践来选择药物载体、赋形剂或稀释剂的种类。作为载体、赋形剂或稀释剂,或除了载体、赋形剂或稀释剂以外,药物组合物可以包含任何合适的粘结剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂(solubilising agent)。

[0222] 合适的粘结剂的例子包括淀粉、明胶、诸如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖等天然糖类、玉米甜味剂、诸如阿拉伯树胶、黄芪胶或海藻酸钠等天然和合成树胶、羧甲基纤维素、以及聚乙二醇。

[0223] 合适的润滑剂的例子包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、醋酸钠、氯化钠等。

[0224] 可以在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至增香剂。防腐剂的例子包括苯甲酸钠、山梨酸、对羟基苯甲酸的酯。还可以使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0225] 营养学可接受的载体、稀释剂和赋形剂包括适合人或动物消耗的那些、以及在食品工业中用作标准的那些。通常的营养学可接受的载体、稀释剂和赋形剂是本领域技术人员所熟知的。

[0226] 施用

[0227] 本发明的组合物可以适于经口、经直肠、经阴道、经肠外、肌内、覆膜内、动脉内、鞘内、支气管内、皮下、皮内、静脉内、鼻内、口腔或舌下等施用途径。优选地,本发明的组合物

适于经口、经直肠、经阴道、经肠外、鼻内、口腔或舌下施用途径。

[0228] 对于经口施用,特别的使用形式由压制片剂、丸剂、片剂、胶囊剂(gellule)、滴剂、和胶囊组成。

[0229] 其它的施用形式包括由无菌或可灭菌溶液制得的溶液或乳液,其可以静脉注射、动脉注射、鞘内注射、皮下注射、皮内注射、覆膜内注射、或肌内注射。本发明的药物组合物还可以为栓剂、阴道栓剂、悬浮剂、乳剂、洗剂、软膏、乳膏、凝胶、喷雾剂、溶液或扑粉的形式。

[0230] 使用皮肤衬片进行另一种透皮施用的方式。例如,活性成分可以混入由聚乙二醇或液体石蜡的水乳浊液组成的乳膏中。还可以根据需要将细菌菌株混入由白蜡或白软石蜡基与所述稳定剂和防腐剂组成的软膏中。

[0231] 可以将组合物配制成单剂量的形式,即,配制成包含单剂量(或多个或部分单剂量)的分离的部分的形式。

[0232] 剂量

[0233] 本领域技术人员可以不需要过度试验而容易地确定一种即食组合物的合适的剂量以施用于被试者。通常,医生会确定对于单个患者而言最合适的实际剂量,这取决于多种因素,包括所采用的特定细菌菌株的活性、该菌株的代谢稳定性和作用时长、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、施用方式和时间、排泄率、联合用药、特定条件的严格度、以及经历治疗的个体。本文所公开的剂量是一般案例的典型。当然可以有个别的案例,其中较高或较低的剂量是有利的,这也在本发明的范围之内。

[0234] 在人类中,通常有效的每日剂量为大约 1×10^3 至大约 1×10^{11} CFU,更优选大约 1×10^7 至大约 1×10^{11} CFU,更加优选 1×10^6 至大约 1×10^{10} CFU。

[0235] 组合

[0236] 在特别优选的实施方案中,本发明的组合物与一种或多种其它活性剂组合施用。在该情况中,本发明的组合物可以与一种或多种其它活性剂连续、同时或顺序施用。

[0237] 以以下非限制性例子的方式进一步描述本发明。

[0238] 例子

[0239] 材料和方法

[0240] 细菌生长条件

[0241] 人罗斯拜瑞氏菌A2-183^T(=DSM 16839^T=NCIMB 14029^T) 在无氧条件下在合成YCFA或复合M2GSC培养介质上生长。培养物由冷冻储存物接种于Hungate管中,并且在37℃下孵育过夜。之后,在MACS-MG-1000无氧工作站(Don Whitley Scientific)中,在80%N₂, 10%CO₂, 和10%H₂中,在37℃下使细菌在M2GSC琼脂平板上生长 48小时。通过向YCFA培养基中加入0.5% (w/v) 的III型来自猪胃的粘蛋白(Sigma-Aldrich),研究了粘蛋白的作用。对于无菌小鼠的集群而言,在37℃下、YCFA培养介质中使人罗斯拜瑞氏菌生长过夜。将培养物旋转下来,并且在1mL YCFA培养介质中将球团重悬,补充2%的半胱氨酸(w/v, Sigma-Aldrich)和3%的抗坏血酸(w/v, Sigma-Aldrich)。

[0242] 动物实验

[0243] 在位于朱昂萨斯(Jouy-en-Josas)的INRA无菌啮齿动物繁育基地(法国朱昂萨斯的INRA的Micalis研究院的ANAXEM平台)中进行无菌动物实验。所有动物实验均得到当地伦

理委员会的批准。将18只无菌C3H/HeN雄性小鼠分成对照组(N=8)和处理组(N=10),并单独关入塑料隔离器中。用灭菌商购饲料(R03-40;UAR)随意喂养小鼠。在第0天,通过填喂法给予处理组的动物100 μ L人罗斯拜瑞氏菌培养物,并给予对照组动物100 μ L YCFA培养介质。在第14天和第28天,处死4只对照动物和5只人罗斯拜瑞氏菌处理的动物。在罗维特营养和健康研究所(位于英国苏格兰的阿伯丁)进行C57/BL6IL-10K0实验。从实验的开始,对野生型小鼠(N=8)、IL-10K0(N=12)和IL-10K0+ *R. hominis* (N=11)分析14周。简而言之,以109cfu/天的剂量每周施用人罗斯拜瑞氏菌3次。

[0244] 将回肠、升结肠和降结肠分成4等份,并转移至RNAlater (Ambion)、中性福尔马林缓冲液(Sigma-Aldrich)或液氮中。将整个盲肠和横结肠转移至RNAlater中。还评价了IL-10K0小鼠的组织病理学。

[0245] 组织培养实验

[0246] 除非特别说明,否则所有细胞培养试剂均由Sigma-Aldrich提供。将1.5mL补充有热灭活胎牛血清(Gibco)、青霉素、链霉素、两性霉素B和L-谷氨酰胺的DMEM(high glucose, HEPES)培养基中的2x10⁵Caco-2细胞或HT29细胞接种至6孔transwell板(Corning)的上部小室中。下部小室含有3.0mL相同的培养基。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中孵育细胞直到细胞覆盖后的第3天,用Hanks'溶液清洗以去除抗生素和FCS,使细胞在补充有L-谷氨酰胺、亚硒酸钠和转铁蛋白的DMEM中下落,持续24小时,不使用抗生素。之后在37 $^{\circ}$ C下将transwell插入物(transwell insert)转移至无氧工作站中的无氧培养盒中。各个插入物的上部小室填满无氧DMEM细胞培养基,下部小室填满充氧DMEM。

[0247] 以3,500xg离心5分钟从而收集指数生长期的人罗斯拜瑞氏菌A2-183培养物。将球团洗涤并重悬于0.8mL无氧DMEM中。将100微升的细菌悬浮液(108CFU/mL)加入实验孔中。在对照孔中加入相同量的培养基而没有细菌细胞。包含细菌细胞的另外的对照在没有Caco-2细胞或HT29细胞的条件下孵育。

[0248] 在2小时或4小时的孵育之后,收集细菌和真核细胞。将非附着和附着的细菌吸出并储存在RNAlater中。通过接种在YCFA平板中来测试人罗斯拜瑞氏菌的生存力。从孔中收集Caco-2细胞或HT-29细胞并且也储存在RNAlater中。

[0249] 人罗斯拜瑞氏菌文库构建

[0250] 利用UltraCleanTM微生物DNA分离试剂盒(Mo Bio Laboratories Inc)分离用于小片段文库构建和焦磷酸测序的人罗斯拜瑞氏菌染色体DNA,并且利用Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Promega)分离用于fosmid文库的高分子量DNA。利用凝胶电泳检测DNA的完整性。

[0251] 利用Nebulizer试剂盒(Invitrogen)机械剪切DNA,并且利用凝胶电泳分级。将所需大小的DNA片段从凝胶中切割出来,利用Wizard[®] SV Gel和PCR产物纯化系统(Promega)纯化。利用DNA终止子末端修复试剂盒(Lucigen)完成末端修复。利用CloneSmart[®] LCamp试剂盒(Lucigen)克隆1.5-3.5kb的片段,并且利用pJAZZ[®]-OC载体(Lucigen)构建4-8kb的文库。利用CopyControlTM Fosmid文库制备试剂盒(Epicentre Biotechnologies)构建Fosmid文库。利用自动克隆选择器(BioRobotics BioPick, Genomic Solutions)挑选克隆,并且保存在含有70 μ L 2xLB培养基(补充有10%的甘油和相应的抗生素)的384孔微量滴定板中。细胞在37 $^{\circ}$ C下震荡生长过夜,并储存在-80 $^{\circ}$ C下。

[0252] 测序、整合和注释

[0253] 利用1 μ L克隆生物质和位于pSMART-LCAmp的克隆位点周围的 SL1和SR2引物进行PCR,从而产生用于小片段文库测序的模板。利用Multiscreen PCR产物纯化过滤板(Millipore)纯化PCR产物。利用Wizard® SV 96质粒DNA纯化系统(Promega)从pJAZZ®-OC克隆中分离重组DNA。利用FosmidMAX™ DNA纯化试剂盒(Epicentre)分离Fosmid DNA。利用CEQ8000(Beckman Coulter)和ABI 3770(Applied Biosystems)DNA测序仪完成对得自具有不同大小插入片段的*R. hominis* WGS文库的DNA片段的末端测序。还利用454 GS20(454Life Sciences)和454FLX测序仪(Roche)对人罗斯拜瑞氏菌基因组DNA进行了测序。将Sanger和454数据与MIRA版本3 (http://chevreux.org/projects_mira.html; (35))进行了整合。将RAST 注释途径(annotation pipeline) (<http://rast.nmpdr.org>; (36))用于自动和人工基因组注释、以及比较基因组分析。将人罗斯拜瑞氏菌A2-183 的注释的基因组序列提交给GenBank,登录号为CP003040。

[0254] 微阵列分析

[0255] 细菌微阵列

[0256] 利用RNeasy迷你试剂盒从小鼠盲肠内容物中分离细菌RNA,并进一步用MICROBEnrich™试剂盒(Ambion)、MICROBExpress™细菌 mRNA富集试剂盒(Ambion)、和MessageAmp™ II-细菌RNA扩增试剂盒(Applied Biosystems)处理。在cDNA合成过程中利用dCTP-Cy3或 dCTP-Cy5标记RNA (CyScribe第一链cDNA标记试剂盒;Amersham)。利用CyScribe GFX纯化试剂盒(Amersham)纯化标记产物。利用 MicroGrid II TAS (BioRobotics),将从RA8文库的6000个克隆中扩增出的PCR产物以一式两份的方式排列在包被有氨基硅烷的显微镜玻片 (Corning)上。将看家基因*rpoD*和*gyrA*的扩增片段任意分布在阵列上以作为对照。在GeneTAC杂交站(Genomic Solutions)中进行微阵列杂交。交换染料标签以进行第二次杂交,分离的RNA纯化物也进行了标记并且也杂交两次,以确保再现性以及获得具有统计显著性的结果。对于每个比较,总计杂交了4个玻片,每个扩增的克隆总共12个杂交点。利用GeneTAC LS IV(Genomic Solutions)和GeneTac Integrator 软件3.0.1版本,以双通道测量了荧光。对点的强度进行了log变换,并且路易斯归一化进行了局部加权回归法(Loess)标准化,以去除探针标记和杂交效率中的差异。对log-比率值使用了单一样本t-检验以检测差异表达。当倍数变化>2且P<0.05时,认为数据具有显著性。

[0257] 小鼠微阵列分析

[0258] 将回肠和升结肠组织从RNAlater中移出,并且在Trizol (Invitrogen) 中裂解。采用标准氯仿/异丙醇步骤分离RNA。利用RNeasy试剂盒(Qiagen)进一步纯化总RNA,其包括无RNA酶活性的DNA酶I (RNase-free DNase I) (Qiagen) 消化步骤。使用Agilent 2100生物分析仪(Agilent Technologies)确定RNA的完整性。利用单循环靶标标记试剂盒(One-Cycle Target Labeling Kit) (Affymetrix)将总RNA加工成生物素标记的cRNA。在医学科学微阵列核心设备学院(位于英国的阿伯丁大学),在基因芯片自动孵育工作站450(Affymetrix)上进行与基因芯片小鼠基因组阵列(Affymetrix)的杂交。用Affymetrix基因芯片扫描仪3000(Affymetrix)扫描芯片。利用基因芯片操作软件(GCOS) (Affymetrix)进行图像质量分析。用免费开放的软件包R (<http://www.r-project.org>)和Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>)进行进一步的数据分析。利用Bioconductor包limma提供的适中F-检验,检测差异表达。当使用Benjamini和Hochberg错误发现方法 (Benjamini and

Hochberg false discovery method) $P < 0.05$ 时,认为数据是显著的。对于两个时间点中的每一个分别进行统计分析。将所有差异表达的基因 ($P < 0.05$) 输入 MetaCore 分析软件 (GeneGo, St Joseph, MI) 以生成通路图谱。利用基于常识的标准通路和内源代谢通路进行完整通路富集分析。在利用超几何分布计算得到的 p -值的基础上,将相关的完整通路分级。 P -值表示的是,考虑到实验中的基因数目对在图谱上完整的所有基因集内的图谱中的基因数目的比值,来自输入列表的给定数目的基因与图谱中的特定数目的基因偶然相匹配的概率。利用 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) (其为原始网络可用程序的扩展版本 (37)),进行基于数据的功能说明的基因本体分析 (GO)。将显著不同的转录本 ($P < 0.05$) 划分到 GO 类别“生物学过程”,以揭示对于特定 GO 项目而显著富集的基因表达模式。将微阵列数据提交至美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 基因表达综合数据库 (登录号 GSE25544; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)。

[0259] RT-PCR 分析

[0260] 利用在线工具 Primer3Plus 设计细菌 PCR 引物 (38), 并且从 Sigma-Aldrich 购买。利用 7500 快速实时定量 PCR 系统 (Applied Biosystems), 用 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 进行实时定量 PCR 分析。用以下程序进行 PCR: 95°C , 一个循环, 10 分钟; 之后 95°C , 40 个循环, 每个循环 15 秒; 以及 60°C , 1 分钟; 最后进行融解步骤。所有样品一式三份进行实验。由于 GyrA 在不同样品间的差异低, 因此将其用作参照基因以进行标准化。

[0261] 对于宿主基因表达, 利用高容量 cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems), 用随机引物将 $2\mu\text{g}$ 分离自回肠和升结肠中的真核总 RNA 反转录成 cDNA。利用 7500 快速实时定量 PCR 系统 (Applied Biosystems), 用 QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒 (Qiagen) 和 QuantiTect Primer Assays (Qiagen) 进行实时定量 PCR 分析。以下为 PCR 循环条件: 95°C , 一个循环, 5 分钟; 之后 95°C , 40 个循环, 每个循环 10 秒; 以及 60°C , 30 秒; 最后进行融解步骤。所有样品一式三份进行实验。由于 Hprt 在不同样品间的差异低, 因此将其用作参照基因以进行标准化。利用学生 t 检验在基数为 2 的对数级上分析所有 RT-PCR 数据, 使得不等方差的显著性界限 (significance cut-off) 为 $P < 0.05$ 。将差异转换回去以计算倍数变化。

[0262] 蛋白质印记

[0263] 按照文献 Duck 等 (39) 中所述的方法制备免疫纯化的兔抗人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*) Fla2 多克隆抗体。简而言之, 利用于弗氏完全佐剂中的合成多肽免疫新西兰雌性白兔, 并且加强免疫多次。对于人罗斯拜瑞氏菌 Fla2, 使用了肽 261-275 (C-AQYNDDAKSVLEILK-COOH) 和肽 58-71 (C-GLNKASRNSQDGIS-CONH₂)。在免疫之后, 将所述多肽偶联至 1 mL 经活化的琼脂糖珠子上, 从而制备免疫亲和柱, 利用该免疫亲和柱纯化抗体。

[0264] 对于蛋白质印记, 在含有 8M 尿素的 Laemmli 缓冲液中悬浮升结肠消化道内容物。在相同的缓冲液中稀释人罗斯拜瑞氏菌生物物质 (阳性对照)。将 30 μL 各样品上样至 NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen) 的孔中, 进行电泳。之后进一步用 WesternBreeze 化学发光免疫检测系统 (Invitrogen) 处理。在抗体稀释剂中将 Fla2 抗体稀释为 1:1000, 并且在 4°C 下孵育过夜, 之后在室温下与碱性磷酸酶偶联的抗兔抗体孵育 1 小时。利用 Fuji LAS3000 图像系统完成检测。

[0265] 干体重和脂质胴体分析

[0266] 将小鼠去除内脏的胴体称重,冷冻干燥至恒重,之后粉碎以进行分析。如之前所述的利用氯仿/甲醇(2:1v/v)提取(1:100w/v)以确定脂质含量(40)。

[0267] FISH分析

[0268] 利用通用细菌探针Eub338和新设计的人罗斯拜瑞氏菌A2-183特异性探针对消化道组织切片进行FISH分析。

[0269] 将在中性福尔马林缓冲液中固定的组织包埋入Technovit 8100 (Heraeus Kulzer)中。利用旋转切片机(Leica/Reichert Autocut)切割两微米切片。每张玻片在组织的100 μ m、200 μ m和300 μ m处取三个切片,使得每个动物取9个切片。

[0270] 通过连续在50%(v/v)、80%和96%乙醇中孵育来使玻片脱水,在室温下干燥。所使用的16S rRNA FISH探针为通用细菌探针Eub338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT;Cy3)和新设计的人罗斯拜瑞氏菌A2-183 特异性探针(GTACATTACATACTCTGTCACTG;FITC),已经用一系列的肠细菌分离物广泛地检测了这些探针的特异性。将10微升溶于100 μ L杂交缓冲液中的探针(30ng/ μ L)应用于脱水的样品,并且在探针的特定温度下孵育。在50 $^{\circ}$ C下在清洗缓冲液中清洗玻片30分钟,浸入冰-冷却的水中以去除残留的清洗缓冲液,在压缩空气流下干燥。用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI;Vector Laboratories公司)进行复染色,并且用荧光用Vectashield封固剂(Vector Laboratories公司)封固玻片以防止荧光衰减。利用Leica DM RBE荧光显微镜(Leitz GMBH)使细菌可视化,并且用Penguin 600CL相机(Pixera)和Viewfinder 3.0软件(Studio Lite)照相。利用复消色差系统(Leica)恢复高倍放大图像(x63)。

[0271] 免疫荧光

[0272] 在连续冷冻切片(8 μ m)上进行T细胞标记物免疫定位检测。在-20 $^{\circ}$ C下在预冷甲醇中将切片固定30分钟(Ly6G FITC、CD3FITC、CD11b FITC,均为1:50(BD Biosciences)),或者,对于双标记的FoxP3 (1:500,Abcam)和CD3FITC(1:100,BD Biosciences),在RT下在1%多聚甲醛(PFA)中固定2分钟,之后在含0.01%Triton X的PBS中固定3分钟。用含10%溶于PBS(pH 7.4)的相关预免疫血清的10%BSA (Sigma)封闭所有切片。在RT下,将经甲醇固定的组织与第一抗体孵育1小时。在4 $^{\circ}$ C下,将经PFA固定的切片与抗体孵育过夜。利用 Alexa 山羊抗兔549(1:1000,分子探针)使FoxP3可视化。切片用DAPI 复染标记,并且用Vectashield(Vector Laboratories)封固。为了对阳性细胞进行定量,利用上述图像软件和显微镜设置对每个小鼠切片检验至少5个视野。

[0273] 组织学

[0274] 在室温下,将组织样品在Carnoy固定剂(60%(v/v)乙醇、30%(v/v)氯仿和10%(v/v)冰醋酸)中固定3小时,同时不断搅拌。将样品转移至70%乙醇中并且保存在室温下,直到将其定向以进行横向切割并且利用Technovit 8100(Heraeus Kulzer)、根据制造商的说明将其包埋在冷固化树脂中。利用Technovit 3040(Heraeus Kulzer)将包埋的组织封固在Histobloc上。利用配有玻璃刀(TAAB Laboratories Equipment公司)的旋转切片机(Leica Autocut)切割4微米切片。利用标准苏木精/伊红方法将组织切片染色,利用配有x10和x20目镜的Zeiss Axioskop显微镜进行检测。利用QImaging相机和Image Pro Plus软件拍摄图像。

[0275] 罗斯拜瑞氏菌相关物种和菌株的基因组比较

[0276] 申请人得到了人罗斯拜瑞氏菌A2-183的全基因组序列,其由 3,592,125-bp的单一染色体表征。利用RAST平台进行的自动和人工基因组注释揭示,存在有4个核糖体操纵子,66个RNA和3,273个预测蛋白。在图11-15中分别示出了人罗斯拜瑞氏菌A2-183、食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌DSM 16841、肠道罗斯拜瑞氏菌L1-82、肠道罗斯拜瑞氏菌 M50/1和直肠真杆菌ATCC 33656的亚系统类别分布。

[0277] 此信息示出了各个功能性亚系统中的基因数目(示于括号中) 差异。这些基因在介导宿主对各个细菌的应答中非常重要。重要的是,在各菌株之间,这些基因在数目和功能上均不同。结果总结如下:

- [0278] 人罗斯拜瑞氏菌A2-183
- [0279] 细胞壁和荚膜 (57)
- [0280] 膜运输 (24)
- [0281] 移动性与趋化性 (49)
- [0282] 调节和细胞信号途径 (16)
- [0283] 休眠和孢子形成 (12)
- [0284] 碳水化合物 (271)
- [0285] 直肠真杆菌ATCC 33656
- [0286] 细胞壁和荚膜 (41)
- [0287] 膜运输 (13)
- [0288] 移动性与趋化性 (16)
- [0289] 调节和细胞信号途径 (9)
- [0290] 休眠和孢子形成 (6)
- [0291] 碳水化合物 (172)
- [0292] 肠道罗斯拜瑞氏菌L1-82
- [0293] 细胞壁和荚膜 (35)
- [0294] 膜运输 (36)
- [0295] 移动性与趋化性 (15)
- [0296] 调节和细胞信号途径 (10)
- [0297] 休眠和孢子形成 (17)
- [0298] 肠道罗斯拜瑞氏菌M50/1
- [0299] 细胞壁和荚膜 (28)
- [0300] 膜运输 (37)
- [0301] 移动性与趋化性 (17)
- [0302] 调节和细胞信号途径 (10)
- [0303] 休眠和孢子形成 (17)
- [0304] 碳水化合物 (201)
- [0305] 食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌DSM 16841
- [0306] 细胞壁和荚膜 (69)
- [0307] 膜运输 (26)
- [0308] 移动性与趋化性 (14)

[0309] 调节和细胞信号途径(9)

[0310] 休眠和孢子形成(17)

[0311] 碳水化合物(160)

[0312] 在contig 1中发现的>3000个基因的序列同一性百分数揭示了人罗斯拜瑞氏菌的细菌基因组与直肠真杆菌、肠道罗斯拜瑞氏菌和食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌的细菌基因组之间的不同

[0313] 在不同罗斯拜瑞氏菌物种和相关物种直肠真杆菌(与人罗斯拜瑞氏菌的关系最近)的基因组之间进行比较。

[0314] 人罗斯拜瑞氏菌参照基因组585394.12

[0315] 直肠真杆菌基因组ATCC336556 515619.3

[0316] 肠道罗斯拜瑞氏菌基因组L1-82166486.4

[0317] 肠道罗斯拜瑞氏菌基因组M50/1166486.5

[0318] 食葡萄糖罗斯拜瑞氏菌DSM16841 622312.3

[0319] 不同罗斯拜瑞氏菌物种间的潜在基因的同源性百分数为0%至大约90%的序列同一性。很多基因是假定的,并且它们在菌株间不同。大量的存在于人罗斯拜瑞氏菌基因组中的基因在其它罗斯拜瑞氏菌物种的基因组中是缺失的。

[0320] 人罗斯拜瑞氏菌具有924个在其它罗斯拜瑞氏菌物种的基因组中未发现的基因(0%的同源性),这表明人罗斯拜瑞氏菌的25%的基因组是独特的。此外,其它基因之间的低的同源性(<10-70%)表明,很多其它基因的功能也似乎具有差异。

[0321] 所述信息提供了引人注目的证据,其证明从基因组和功能角度来看,这些细菌迥然不同,并且除了通过它们的系统发生关联性以外,无法将它们分组,所述系统发生关联性通常基于保守的16S核糖体基因,该基因是一种在所有的细菌中发现的原核生物DNA的保守片段。16S rRNA基因序列被用于细菌系统发生和分类学研究(共享的遗传标记)。

[0322] 与宿主应答和免疫相关的功能性为细菌菌株特异的

[0323] 图9示出了来自簇XIVa(厚壁菌门)的三种细菌菌株的基因表达数据的比较结果,所述三种菌株为人罗斯拜瑞氏菌、直肠真杆菌、和肠道罗斯拜瑞氏菌。数据显示了由系统发生上相关的细菌菌株在暴露于人上皮细胞之后所表达的独特基因的数目。利用含有56,000种基因的Affymetrix人微阵列确定基因表达。该差别反映了它们各自的基因组的不同。

[0324] 这些实验与在说明书其它地方所述的利用小鼠微阵列的实验相似,不同在于使用了特定的人微阵列。**GeneChip®** Human Genome U133Plus 2.0Array是第一个且最全面的人类全基因组表达阵列。**Affymetrix GeneChip®** Human Genome U133Plus 2.0Array (HG-U133 Plus 2.0)微阵列包含1,300,000种独特的寡聚核苷酸特征,所述的寡聚核苷酸特征覆盖了超过47,000种转录本和变体,所述的转录本和变体依次代表大约39,000种已被表征的人类基因。用于评价由不同共生细菌诱导的信号途径应答的细胞系包括人结肠细胞系Caco-2细胞和 HT-29细胞、以及细菌,包括人罗斯拜瑞氏菌、直肠真杆菌和肠道罗斯拜瑞氏菌,它们与肠病原体肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)作为比较。

[0325] 簇XIVa细菌的功能差异-人罗斯拜瑞氏菌与直肠真杆菌之间的比较

[0326] 图10示出了人罗斯拜瑞氏菌可诱导A20(一种具有有效抗炎症活性的NF- κ B信号通路负调控因子),而其它细菌菌株没有效果。与相关细菌直肠真杆菌不同,人罗斯拜瑞氏菌

的鞭毛蛋白部分也诱导 A20。

[0327] 除非特别说明,否则细胞培养试剂均由Sigma-Aldrich提供。将培养在补充有10%胎牛血清(FBS)(Gibco,UK)、200mM L-谷氨酰胺、和1%抗生素/抗真菌剂的Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)中的Caco-2(ECACC Cat No.860102002)和HT29(ATCC)细胞系接种于6孔transwell板(Corning)中。在37℃、5%CO₂环境中孵育细胞直到细胞覆盖后的第3天,利用Hanks'溶液清洗以去除抗生素和FCS,使细胞在补充有L-谷氨酰胺、亚硒酸钠和转铁蛋白的DMEM中下落,持续24小时,不使用抗生素。之后在37℃下将transwell插入物转移至无氧工作站中的无氧培养盒中。各个插入物的上部小室填满无氧DMEM细胞培养基,下部小室填满充氧DMEM。

[0328] 在指数生长期,以3,500xg离心5分钟,从而收集标准YCFA和M2培养介质中的人罗斯拜瑞氏菌A2-183和直肠真杆菌ATCC336556培养物,以及培养在LB液体培养基中的肠炎血清型的肠沙门氏菌(*Salmonella enteric serovar enteritidis*)。洗涤球团并重悬于无氧DMEM中。将100微升的细菌悬浮液(10⁸CFU/mL)加入实验孔中。在对照孔中加入相同量的培养基而没有细菌细胞。在没有Caco-2细胞或HT29细胞的条件下孵育包含细菌细胞的另外的对照。

[0329] 在2小时和4小时的孵育之后,收集细菌和真核细胞。将非附着和附着的细菌吸出并储存在RNAlater中。从孔中收集Caco-2细胞或HT-29细胞并且也储存在RNAlater中。

[0330] 用于确定A20荧光素酶基因表达的荧光素酶检验

[0331] 利用Fugene®6转染试剂(Roche,UK),用携带有荧光素酶报告基因和GFP报告基因的质粒转染HT29细胞,所述荧光素酶报告基因在A20启动子pLuc-A20和pLuc-A20 Δ NF-κB(在A20启动子区域的3个核苷酸处发生突变)的控制下,所述GFP报告基因在A20启动子pCAGGS-GFP\A20和pLuc-GL2\NF-κB的控制下。48小时之后,用活的人罗斯拜瑞氏菌、直肠真杆菌和肠炎沙门氏菌、以及肠炎沙门氏菌和人罗斯拜瑞氏菌的重组鞭毛蛋白(Fla 1)(100ng/ml)刺激细胞,持续9、12和24小时。利用克隆至合适的载体中的全长序列,并且在大肠杆菌JM109、BL21和Rosetta中表达,从而产生重组鞭毛蛋白。利用Dual-Glo®荧光素酶检验系统(Promega,UK)和Envision 2102多标记微孔板检测仪确定荧光素酶(萤火虫-f-Luc和海肾-r-Luc)的活性。通过标准化至海肾对照,获得了荧光素酶报告蛋白的相对活性。

[0332] 本发明所述方面的不脱离本发明的范围和精神的各种变型和改变对本领域技术人员来说是显而易见的。虽然结合特定的优选实施方案描述了本发明,但应当理解所要求保护的发明不应被不适当地限定为所述特定的实施方案。的确,对相关领域的技术人员显而易见的是,所述实施本发明的方式的各种变型旨在包括在所附权利要求的范围内。

[0333] 参考文献

[0334] 1.Spor,A.,Koren,O.,&Ley,R.(2011)Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome.Nat.Rev. Microbiol.9:279-290.

[0335] 2.Eckburg,P.B.,Bik,E.M.,Bernstein,C.N.,Purdom,E.,Dethlefsen,L.,Sargent,M.,Gill,S.R.,Nelson,K.E.,&Relman,D.A.(2005) Diversity of the human intestinal microbial flora.Science 308: 1635-1638.

[0336] 3.Macpherson,A.J.,Hunziker,L.,McCoy,K.,&Lamarre,A.(2001) IgA responses

in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes. Infect.* 3:1021-1035.

[0337] 4. Macpherson, A.J., Martinic, M.M., & Harris, N. (2002) The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. *Cell Mol. Life Sci.* 59:2088-2096.

[0338] 5. Mazmanian, S.K., Liu, C.H., Tzianabos, A.O., & Kasper, D.L. (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122:107-118.

[0339] 6. Chung, H. & Kasper, D.L. (2010) Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 455-460.

[0340] 7. Macpherson, A.J. (2006) IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308:117-136.

[0341] 8. Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De, P.M., Brandi, G. et al. (2009) The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*. 31:677-689.

[0342] 9. Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S.V. et al. (2009) Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139:485-498.

[0343] 10. Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D., & Macpherson, A.J. (2011) Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity*.

[0344] 11. Duncan, S.H., Aminov, R.I., Scott, K.P., Louis, P., Stanton, T.B., & Flint, H.J. (2006) Proposal of *Roseburia faecis* sp. nov., *Roseburia hominis* sp. nov. and *Roseburia inulinivorans* sp. nov., based on isolates from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2437-2441.

[0345] 12. Mahowald, M.A., Rey, F.E., Seedorf, H., Turnbaugh, P.J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R.K. et al. (2009) Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* 106:5859-5864.

[0346] 13. Aminov, R.I., Walker, A.W., Duncan, S.H., Harmsen, H.J., Welling, G.W., & Flint, H.J. (2006) Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to *Roseburia* spp. or *Eubacterium rectale*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6371-6376.

[0347] 14. Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J.I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host. Microbe* 3:213-223.

[0348] 15. Mallya, M., Campbell, R.D., & Aguado, B. (2006) Characterization of the

five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. *Protein Sci.* 15: 2244-2256.

[0349] 16. Letran, S.E., Lee, S.J., Atif, S.M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A.F., & McSorley, S.J. (2011) TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen. *J Immunol.* 186:5406-5412.

[0350] 17. Round, J.L., Lee, S.M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T.A., & Mazmanian, S.K. (2011) The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science* 332: 974-977.

[0351] 18. Hooper, L.V., Wong, M.H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P.G., & Gordon, J.I. (2001) Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291:881-884.

[0352] 19. Kelly, D., Campbell, J.I., King, T.P., Grant, G., Jansson, E.A., Coutts, A.G., Pettersson, S., & Conway, S. (2004) Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat. Immunol.* 5:104-112.

[0353] 20. Hapfelmeier, S., Lawson, M.A., Slack, E., Kirundi, J.K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M.L., Endt, K. et al. (2010) Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. *Science* 328: 1705-1709.

[0354] 21. Elkins, C.A., Moser, S.A., & Savage, D.C. (2001) Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. *Microbiology* 147:3403-3412.

[0355] 22. Louis, P., McCrae, S.I., Charrier, C., & Flint, H.J. (2007) Organization of butyrate synthetic genes in human colonic bacteria: phylogenetic conservation and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:240-247.

[0356] 23. Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., & Narayanan, S. (2011) Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. *Microb. Pathog.*

[0357] 24. Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., & Adere, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.

[0358] 25. Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R. et al. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin. Invest* 117: 3909-3921.

[0359] 26. De, P.M., Gaboriau-Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F., & Cerf-Bensussan, N. (2011) Trade-off between bile resistance and nutritional competence drives *Escherichia coli* diversification in the mouse gut. *PLoS*

Genet.7:e1002107.

[0360] 27. Giraud, A., Arous, S., De, P.M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J. C., Rakotobe, S., Lindner, A.B., Taddei, F., & Cerf-Bensussan, N. (2008) Dissecting the genetic components of adaptation of *Escherichia coli* to the mouse gut. *PLoS Genet.* 4:e2.

[0361] 28. Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M. et al. (2010) The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* 137:3835-3845.

[0362] 29. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59-65.

[0363] 30. Ukena, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G. et al. (2007) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2:e1308.

[0364] 31. Geraedts, M.C., Troost, F.J., Tinnemans, R., Soderholm, J.D., Brummer, R.J., & Saris, W.H. (2010) Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa. *Ann. Nutr. Metab* 56:308-313.

[0365] 32. McLaughlin, J., Grazia, L.M., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.J., & Thompson, D.G. (1999) Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* 116:46-53.

[0366] 33. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., & Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027-1031.

[0367] 34. Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., & Backhed, F. (2010) A role for the gut microbiota in energy harvesting? *Gut* 59:1589-1590.

[0368] 35. Chevreux, B., Wetter, T., & Suhai, S. (1999) Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)* 99:45-56.

[0369] 36. Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M. et al. (2008) The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75.

[0370] 37. Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., & Lempicki, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4:3.

[0371] 38. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J.A. (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic*

Acids Res.35:W71-W74.

[0372] 39.Duck,L.W.,Walter,M.R.,Novak,J.,Kelly,D.,Tomasi,M.,Cong, Y.,&Elson, C.O.(2007) Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease.Inflamm.Bowel.Dis.13:1191-1201.

[0373] 40.Olivera,L.,Canul,R.R.,Pereira-Pacheco,F.,Cockburn,J.,Soldani, F., McKenzie,N.H.,Duncan,M.,Olvera-Novoa,M.A.,&Grant,G. (2003) Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal,protein isolate(globulins),or starch.J Agric.Food Chem.51:319-325.

[0374] 41.Sokol H.,et al,PNAS,October 28,2008,Vol 105,No 43,16731-16736.

序列表

<110> 4D制药研究有限公司 (4D Pharma Research Limited)

<120> 用作用于营养和医药应用的益生菌剂的细菌

<130> P043712PCT

<140> PCT/GB2012/052495

<141> 2012-10-08

<150> GB 1117313.5

<151> 2011-10-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)

<400> 1

Ala Gln Tyr Asn Asp Asp Ala Lys Ser Val Leu Glu Ile Leu Lys

1 5 10 15

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> 人罗斯拜瑞氏菌 (*Roseburia hominis*)

<400> 2

Gly Leu Asn Lys Ala Ser Arg Asn Ser Gln Asp Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 通用细菌探针Eub338

<400> 3

gctgcctccc gtaggagt 18

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 人罗斯拜瑞氏菌A2-183-特异性探针

<400> 4

gtacattaca tactctgtca gtg 23

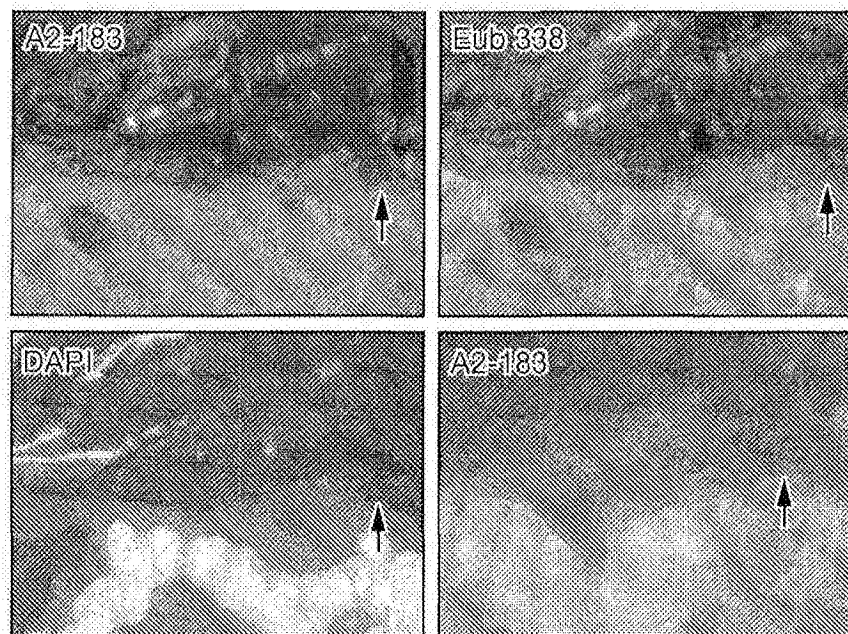


图1A

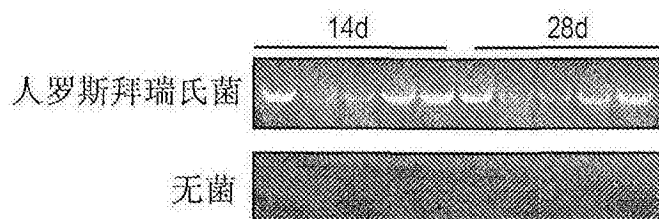


图1B

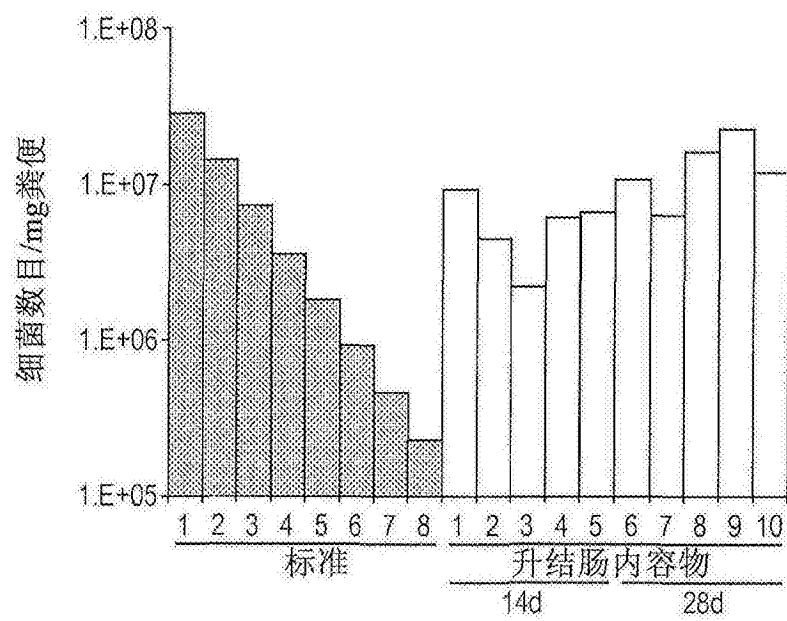


图1C

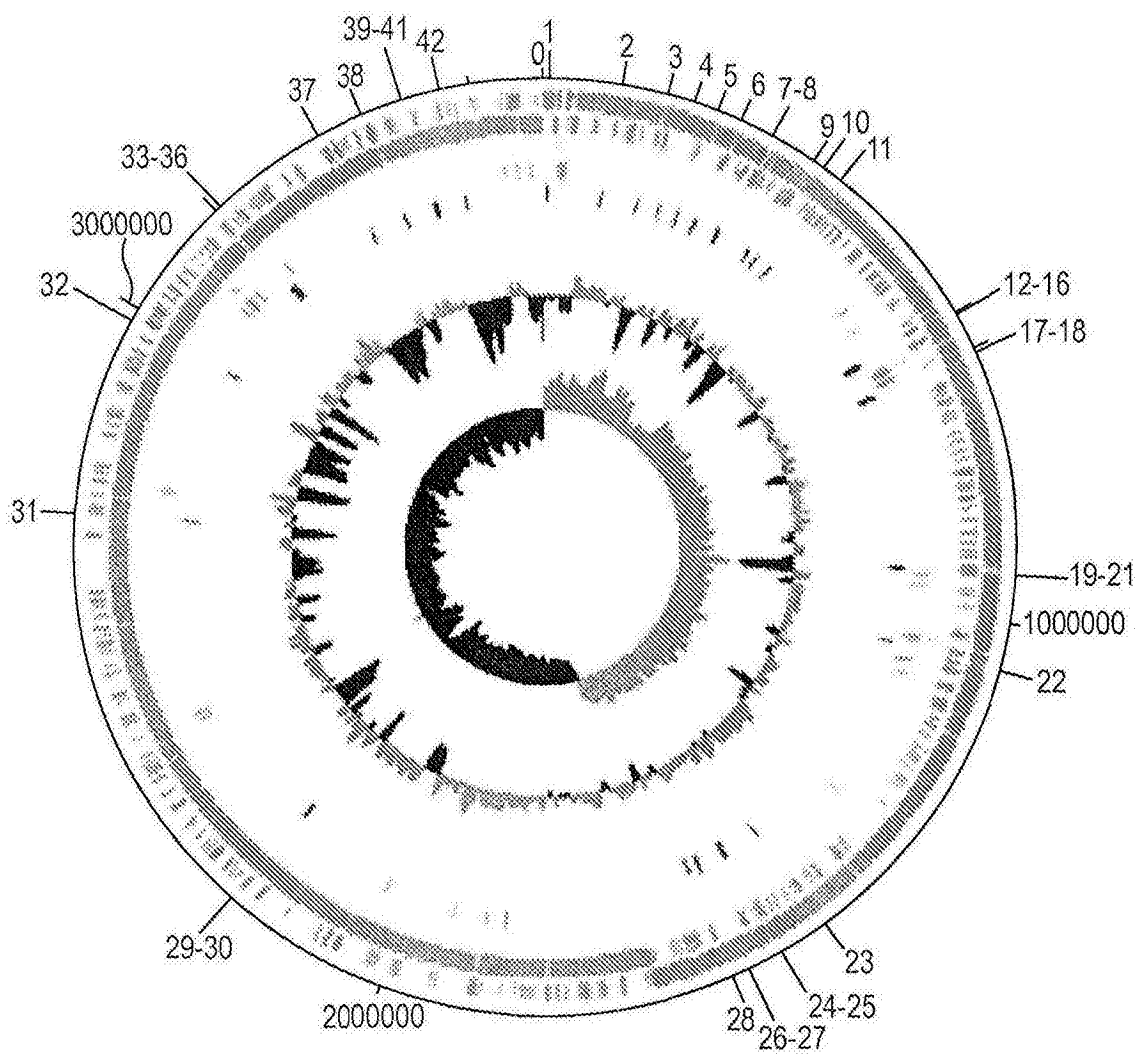


图2A

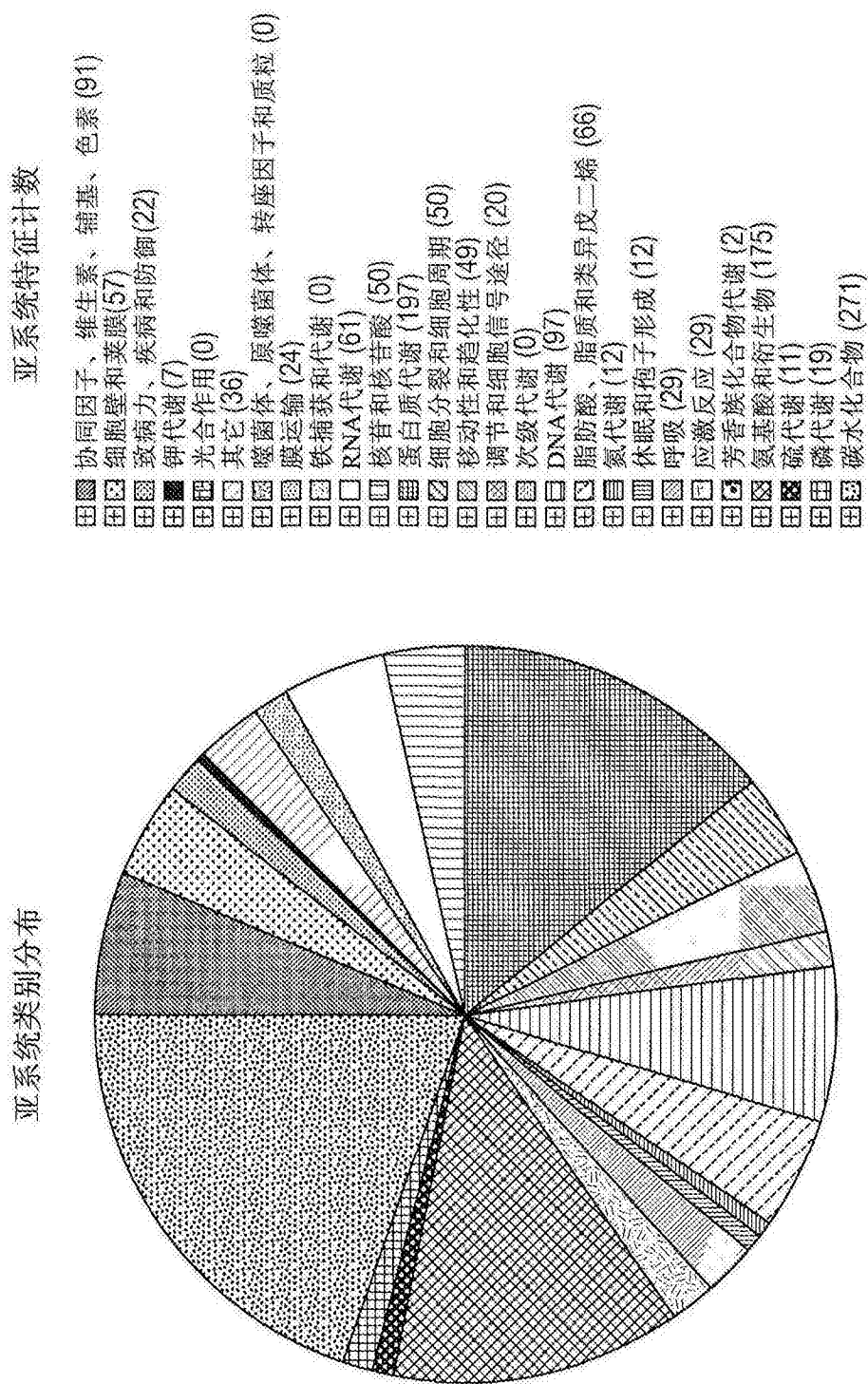


图2B

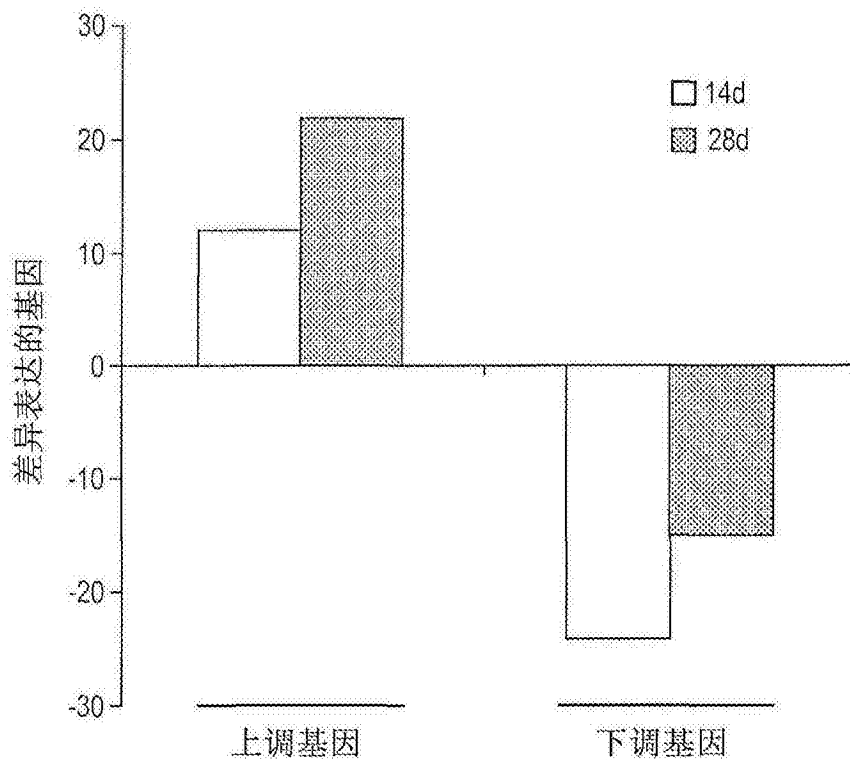


图3A

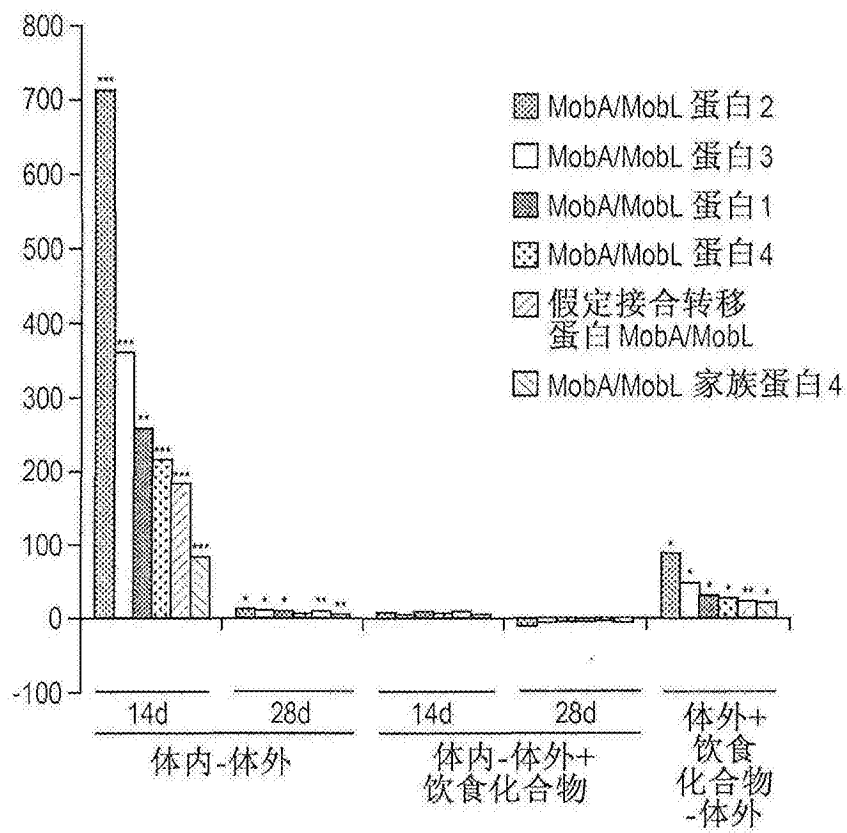


图3B

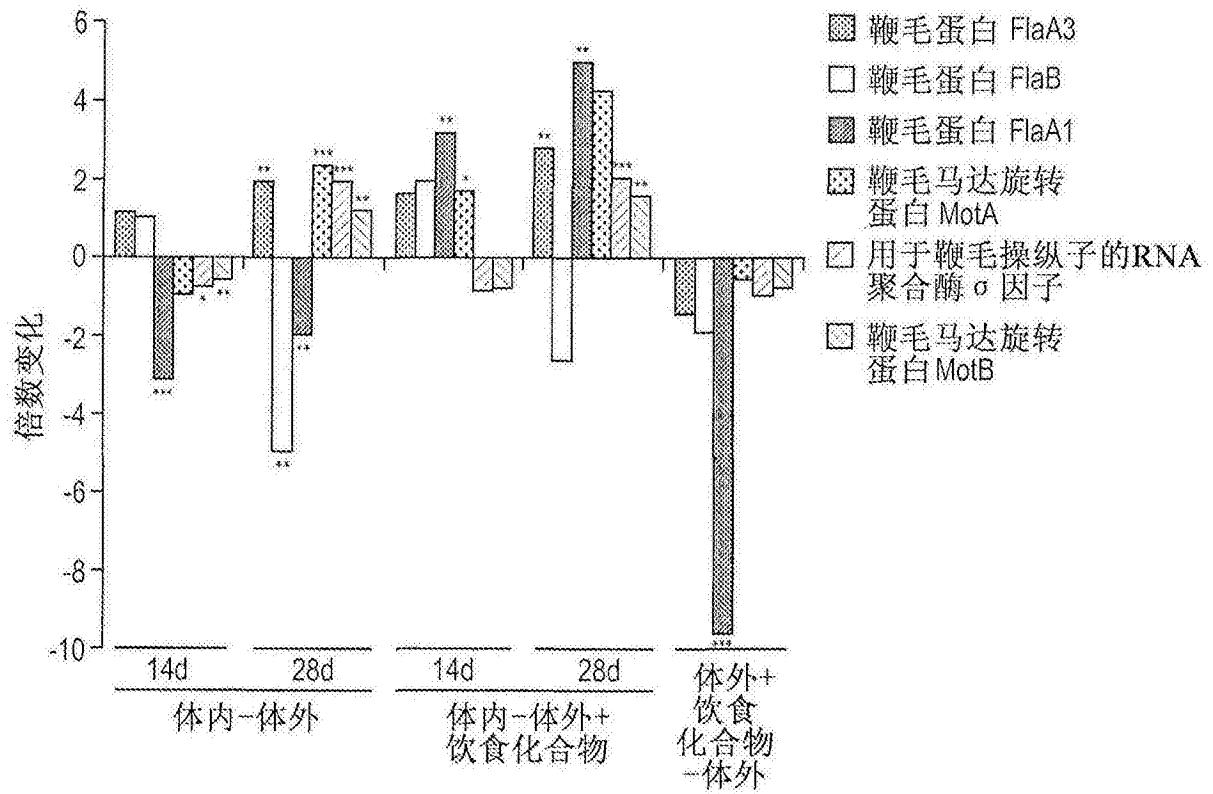


图3C

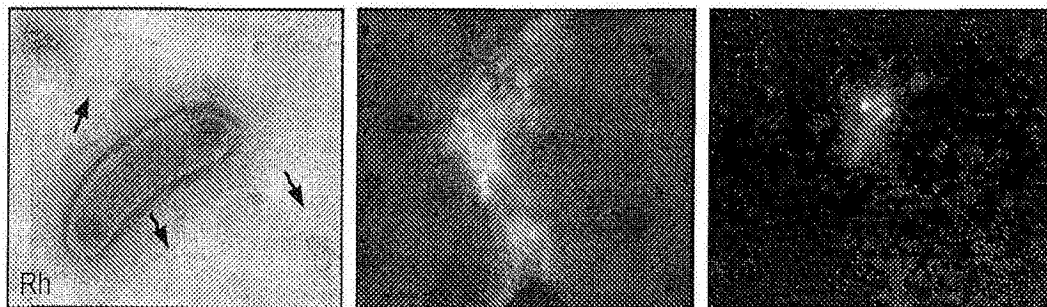
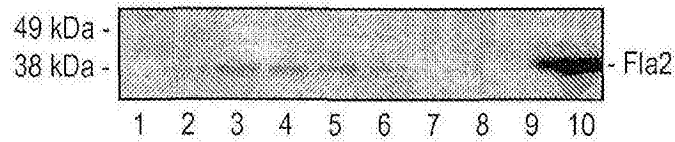


图3D

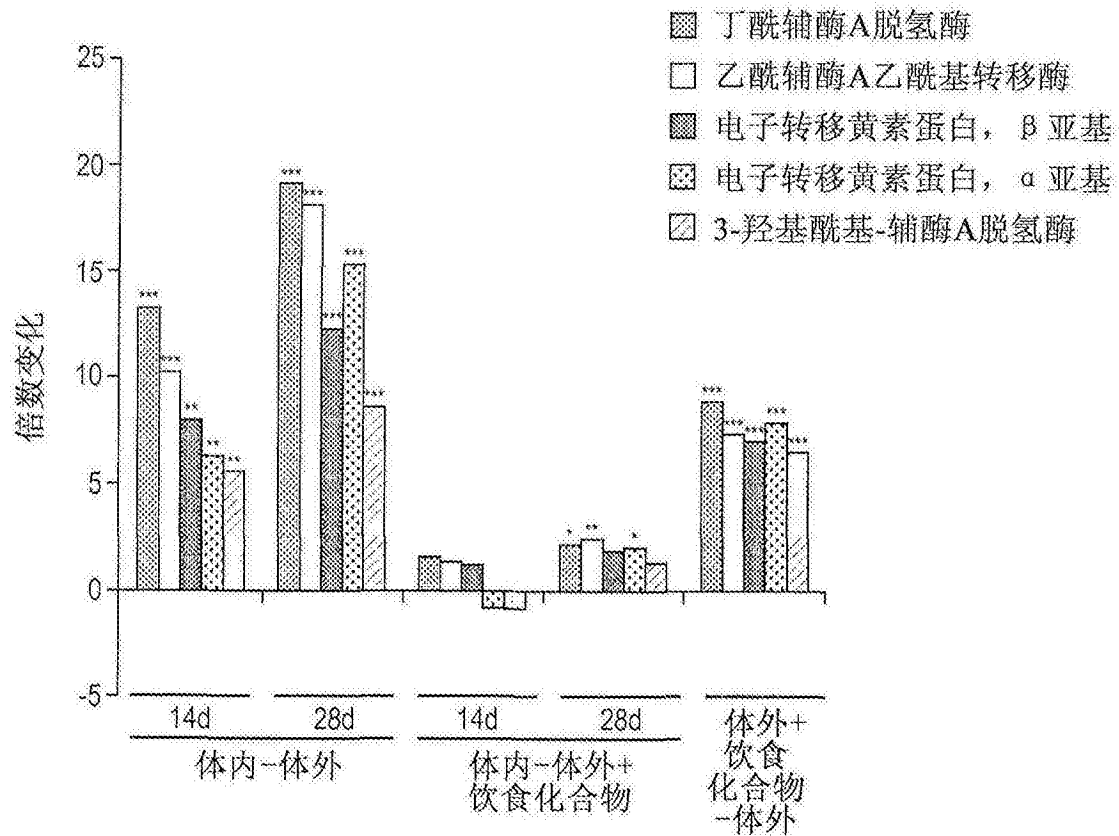


图3E

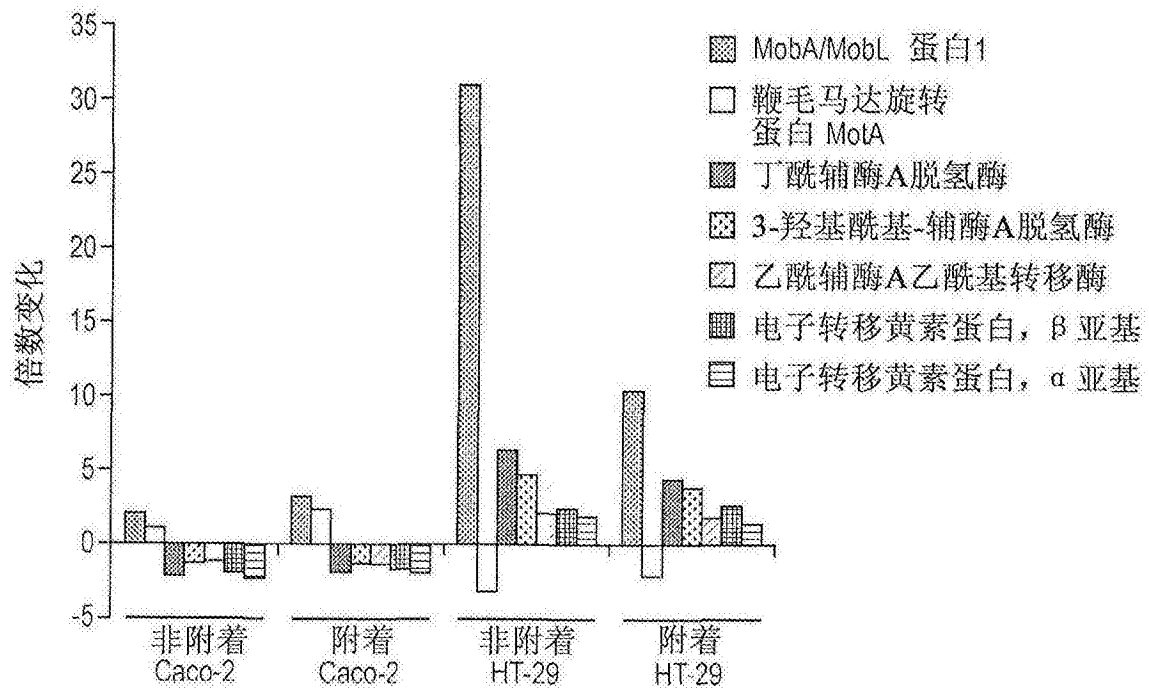


图3F

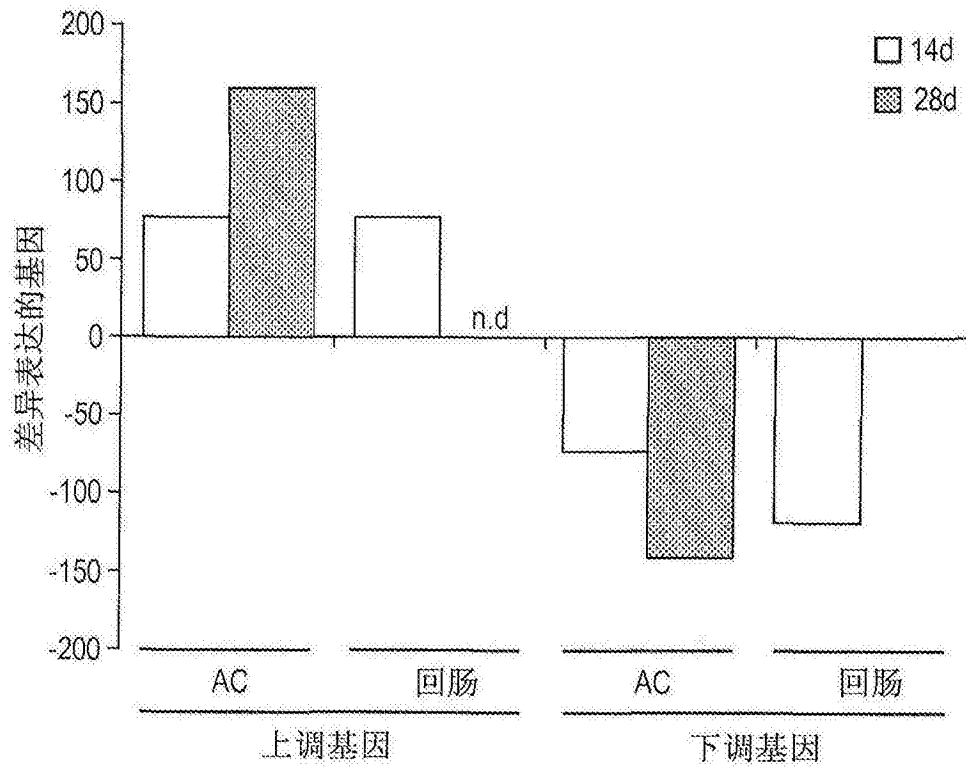


图4A

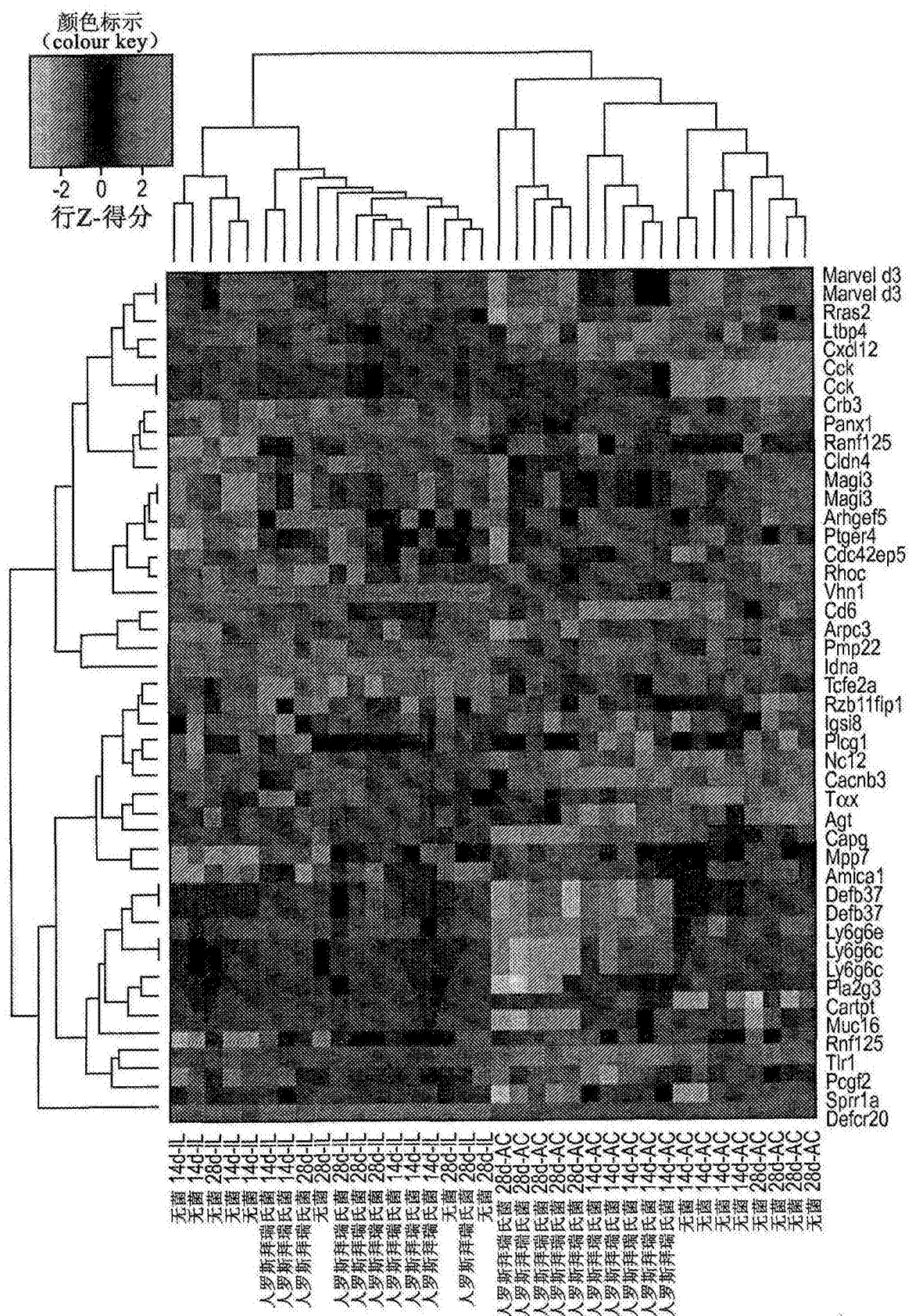


图4B

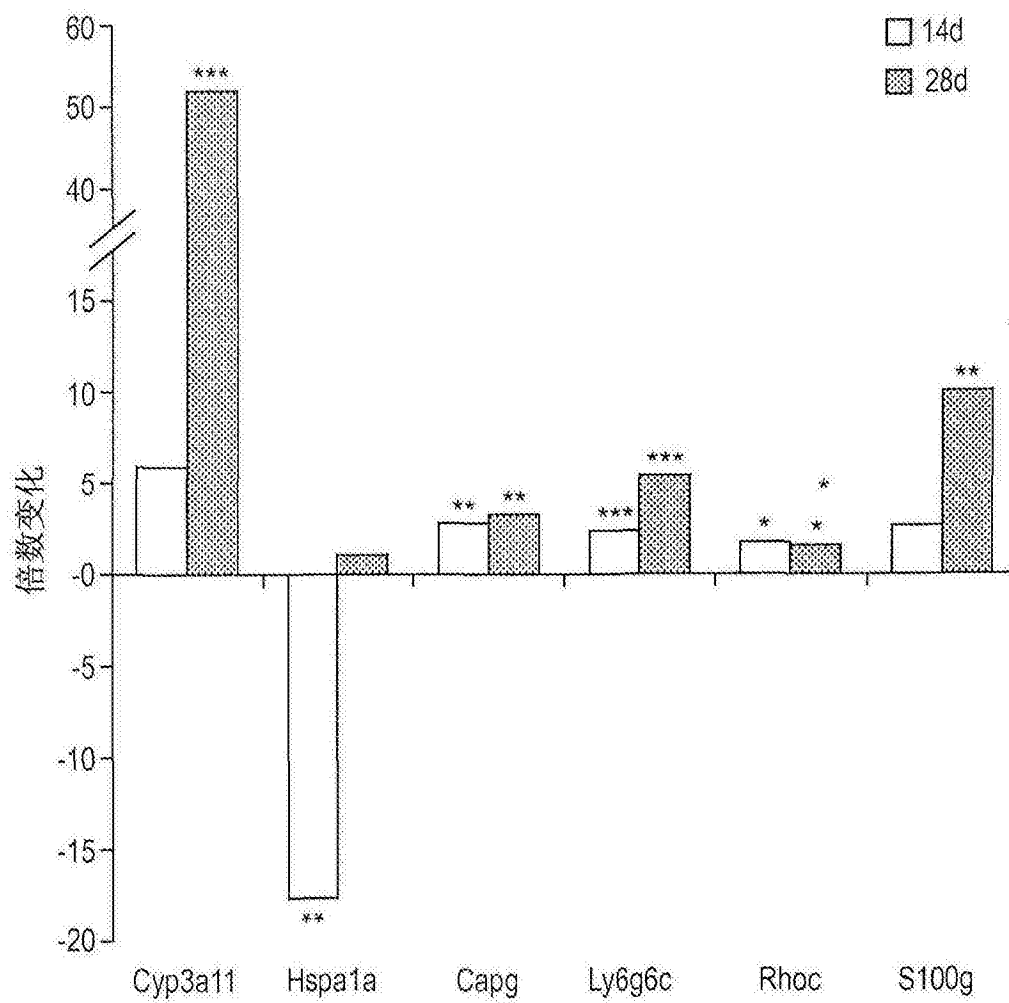


图4C

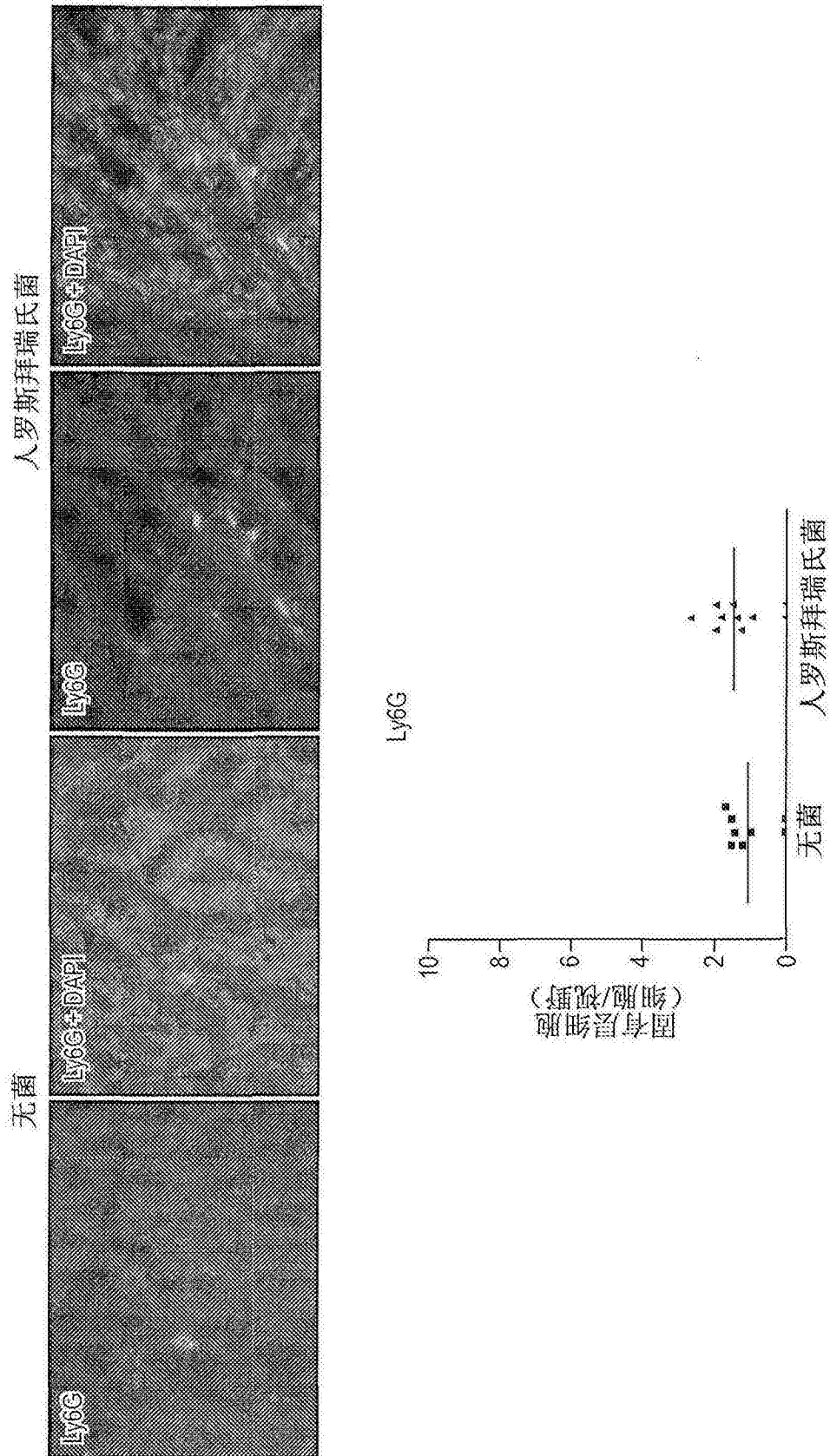


图5A

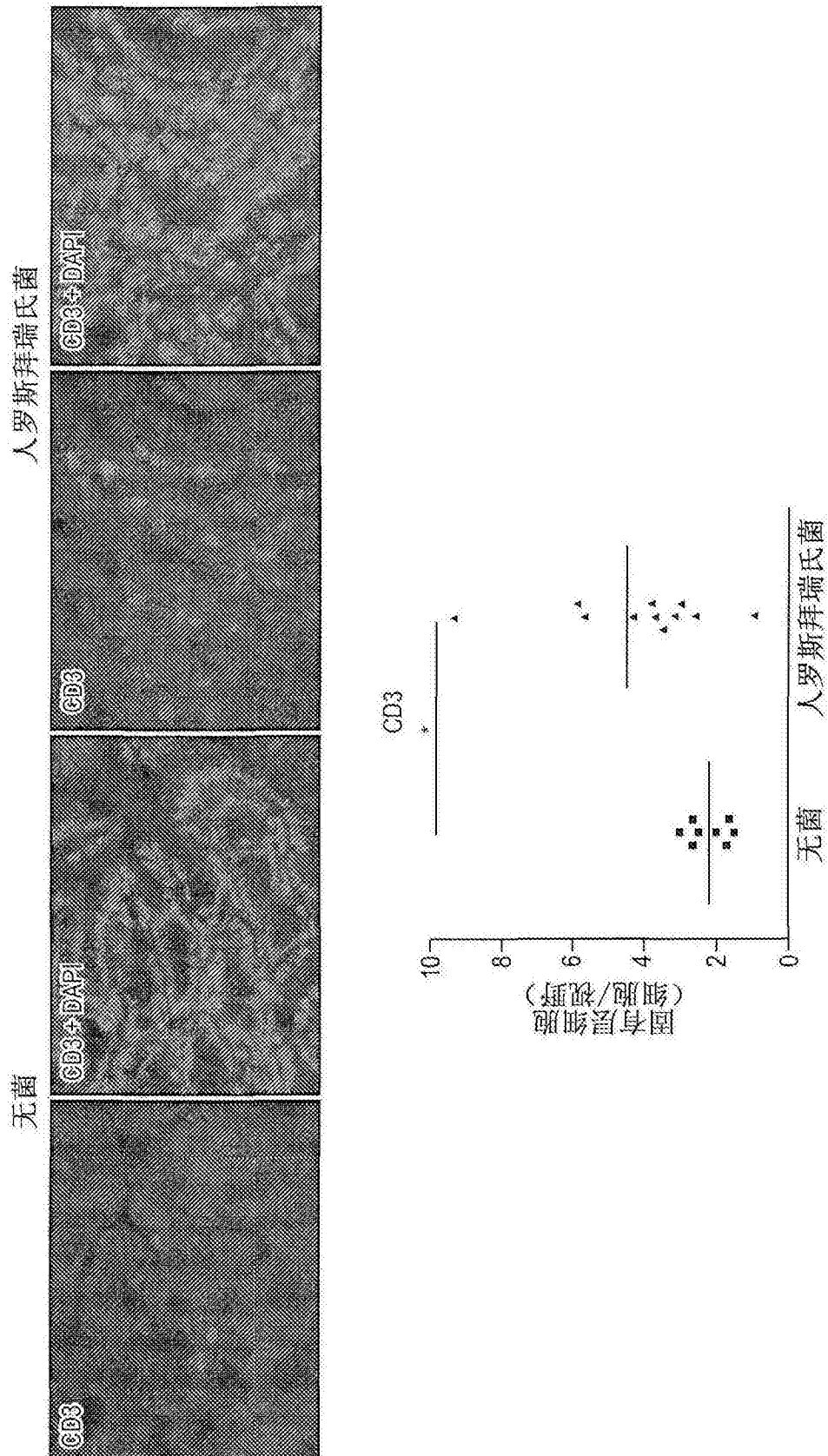


图5B

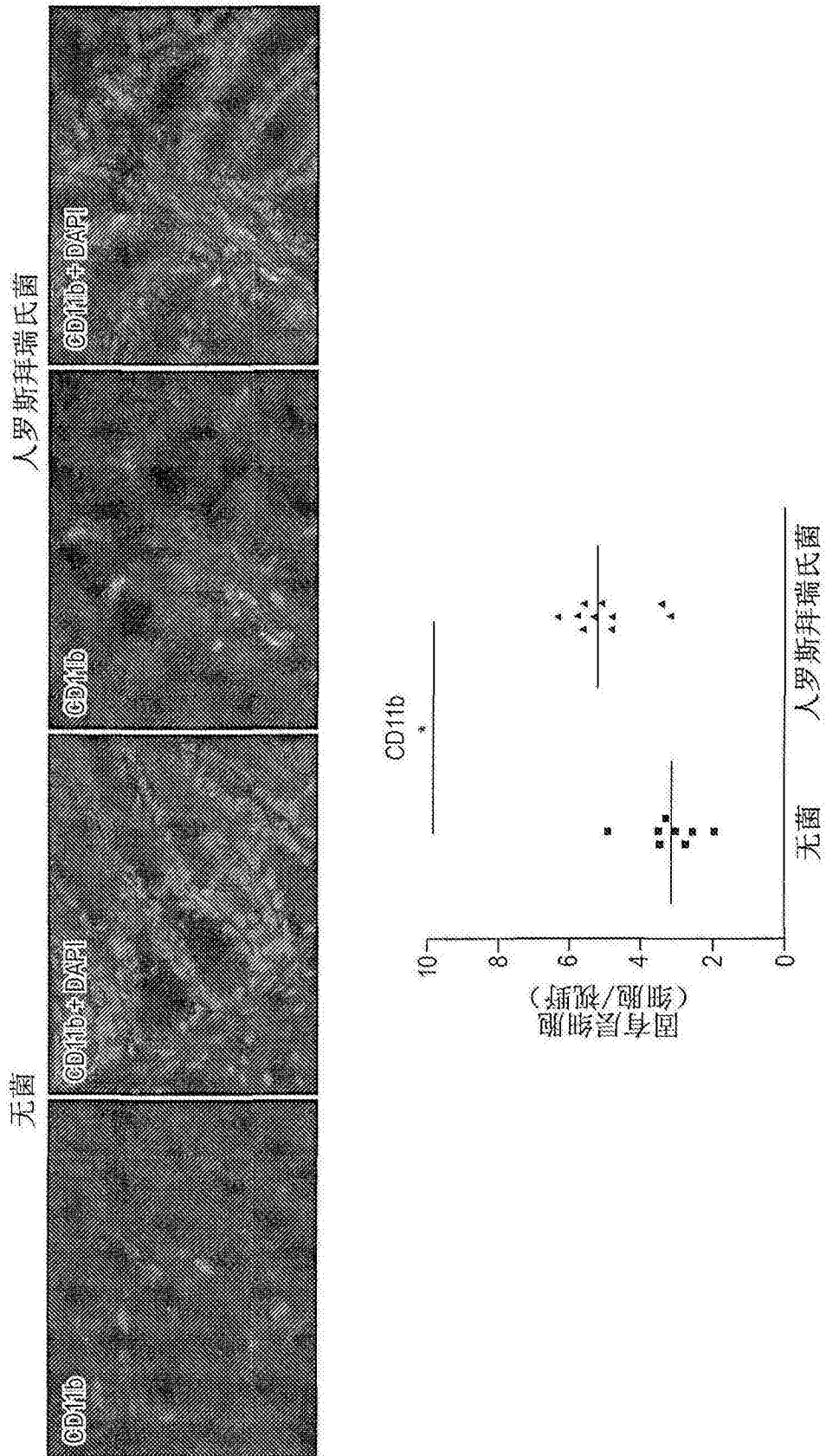


图5C

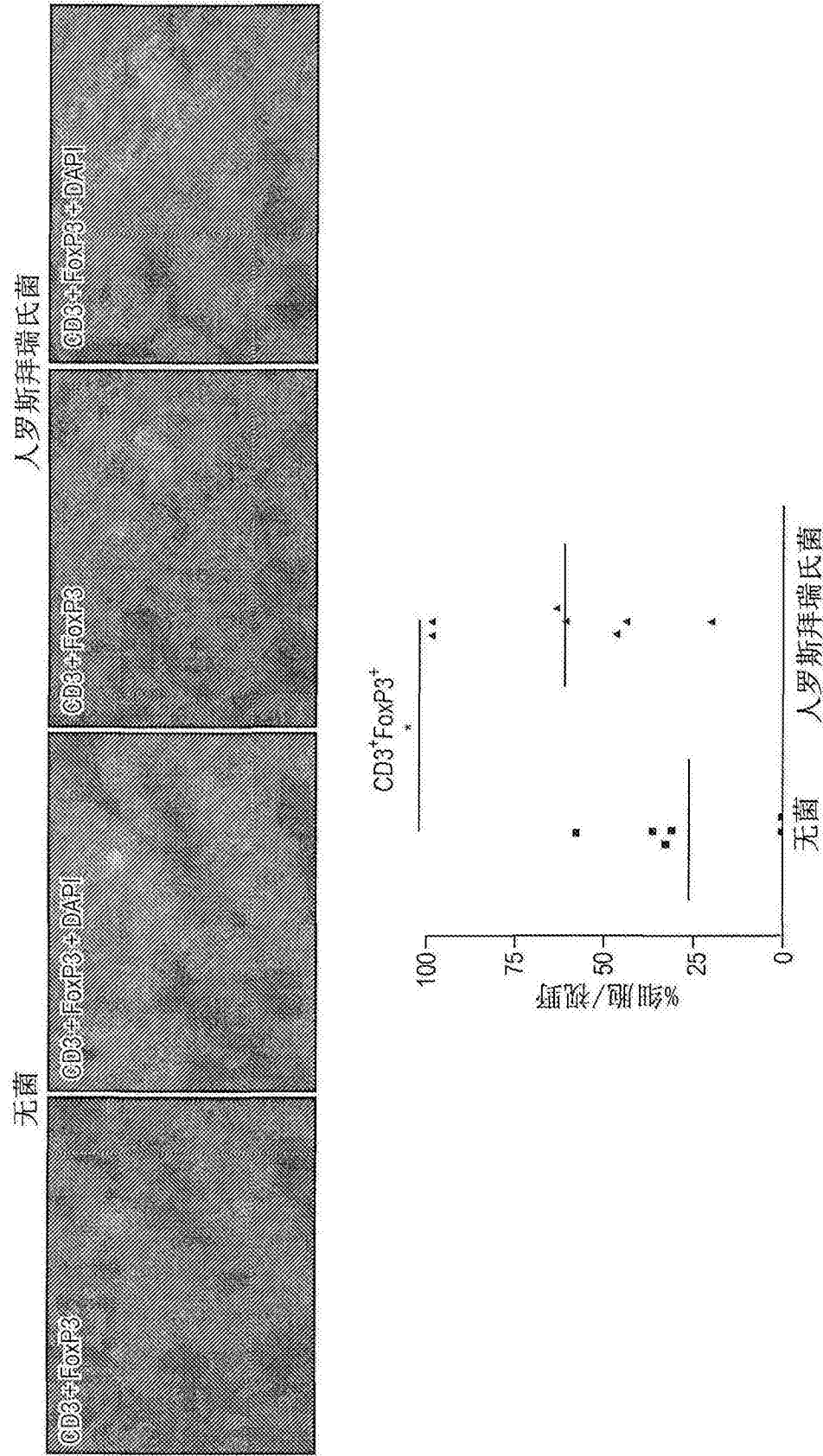


图5D

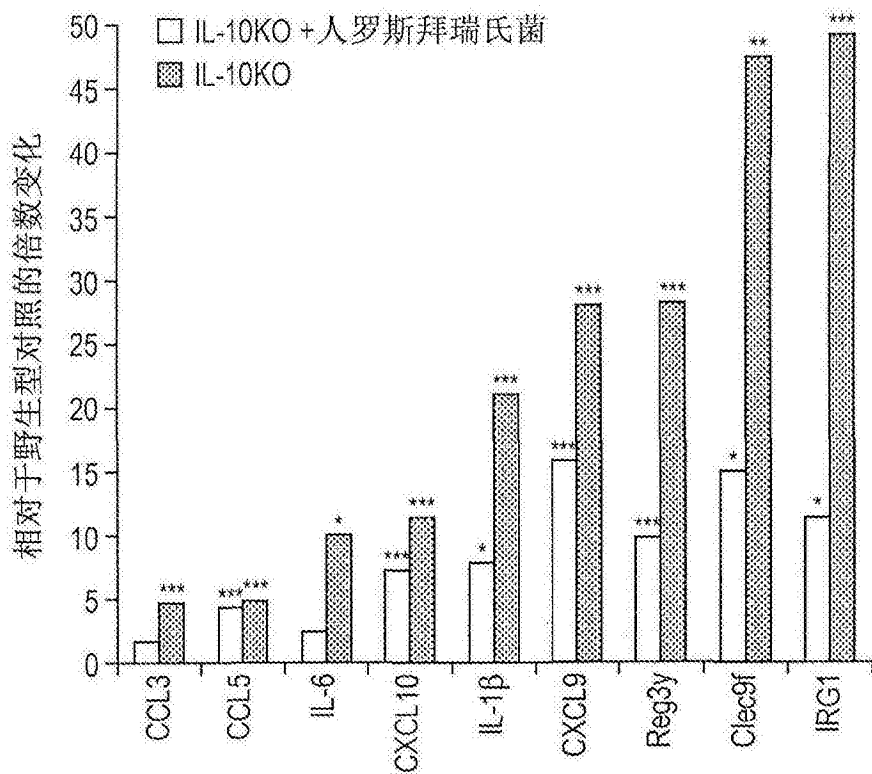


图6A

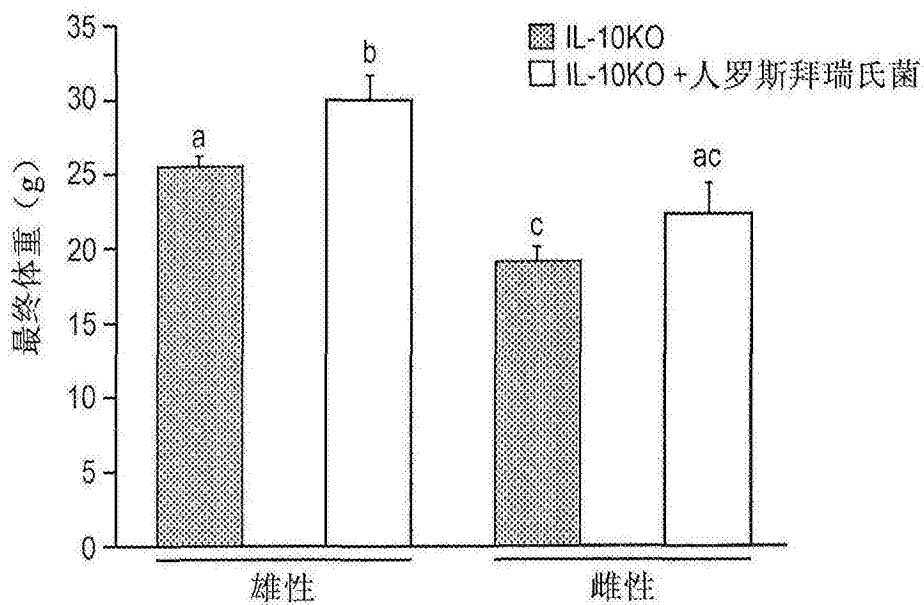


图6B

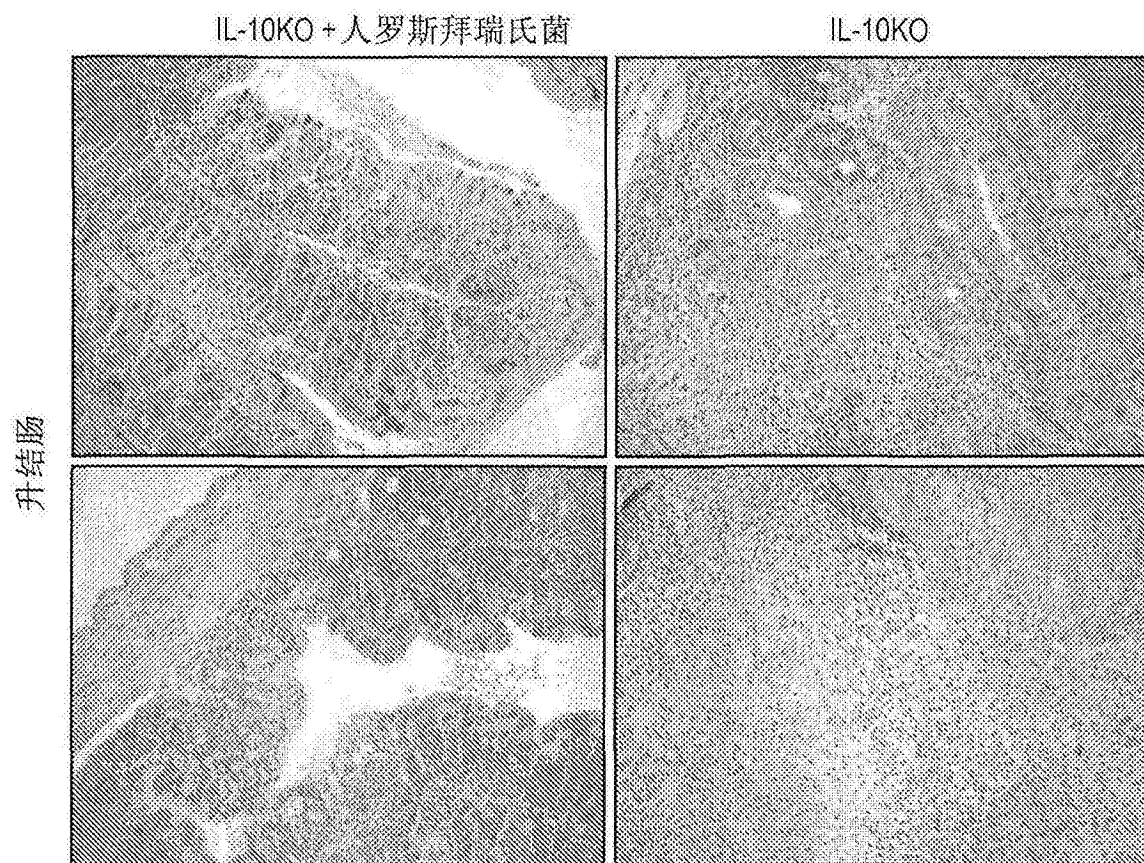


图6C

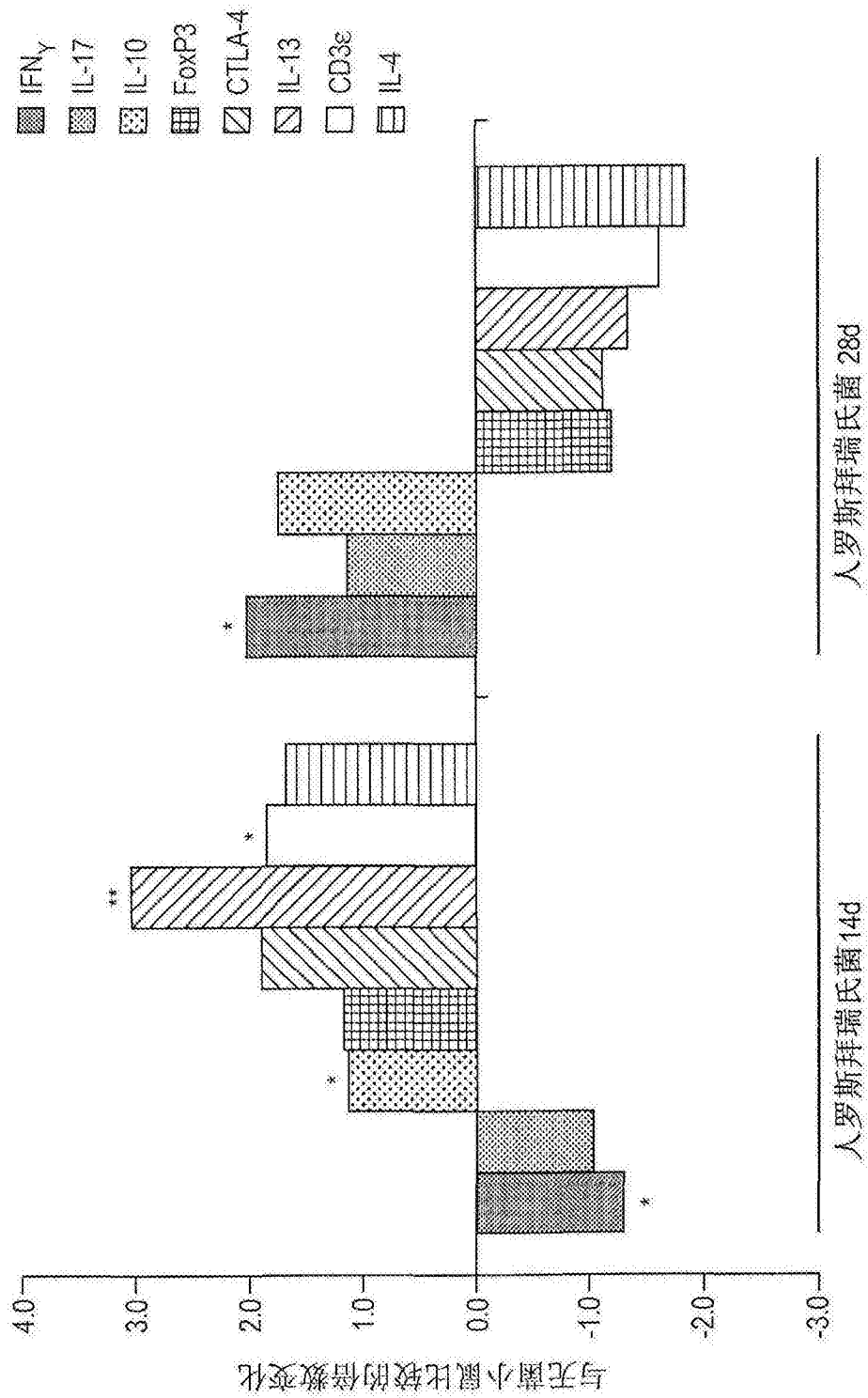


图7

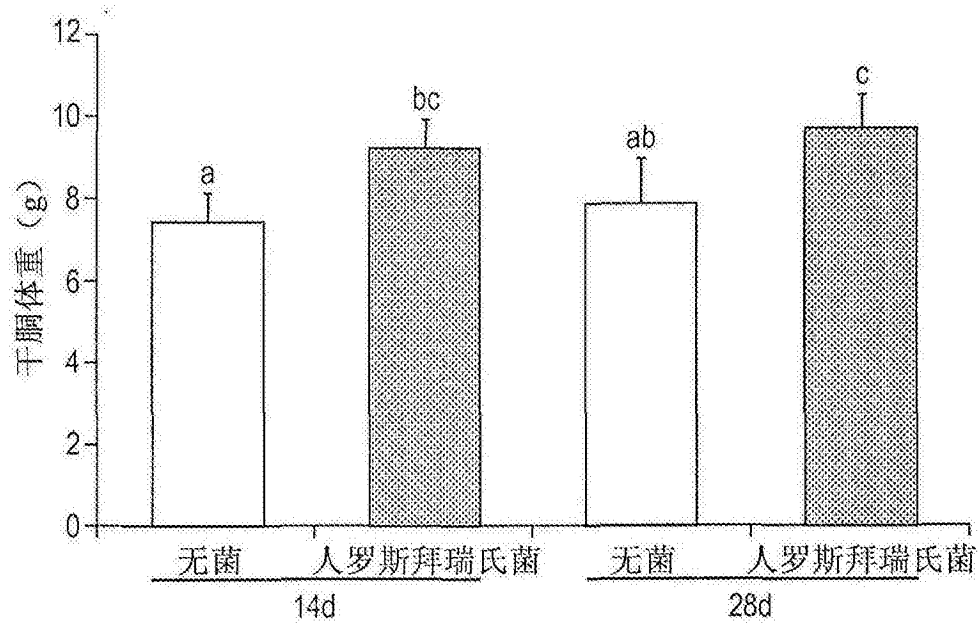


图8A

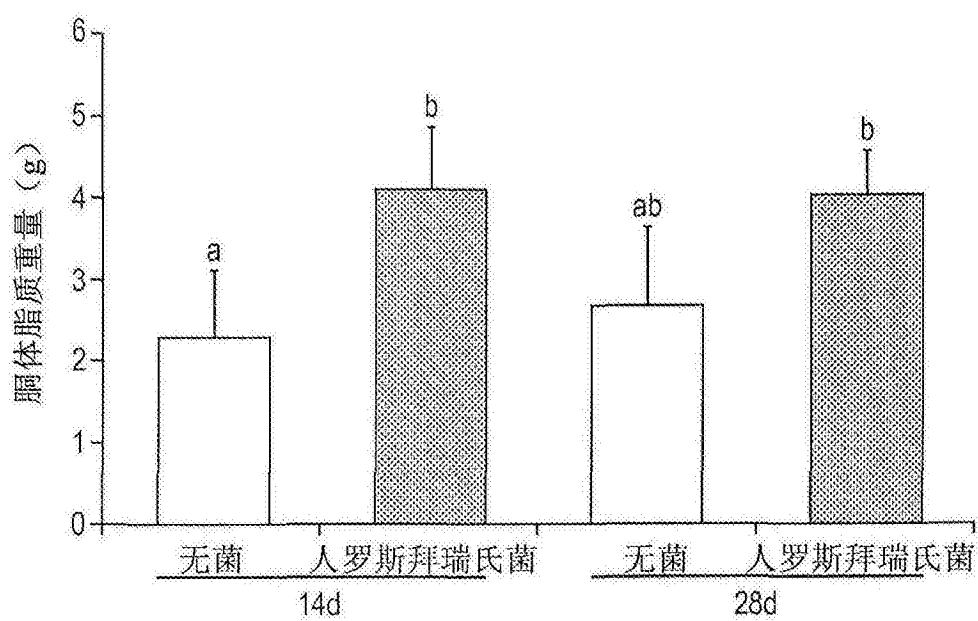


图8B

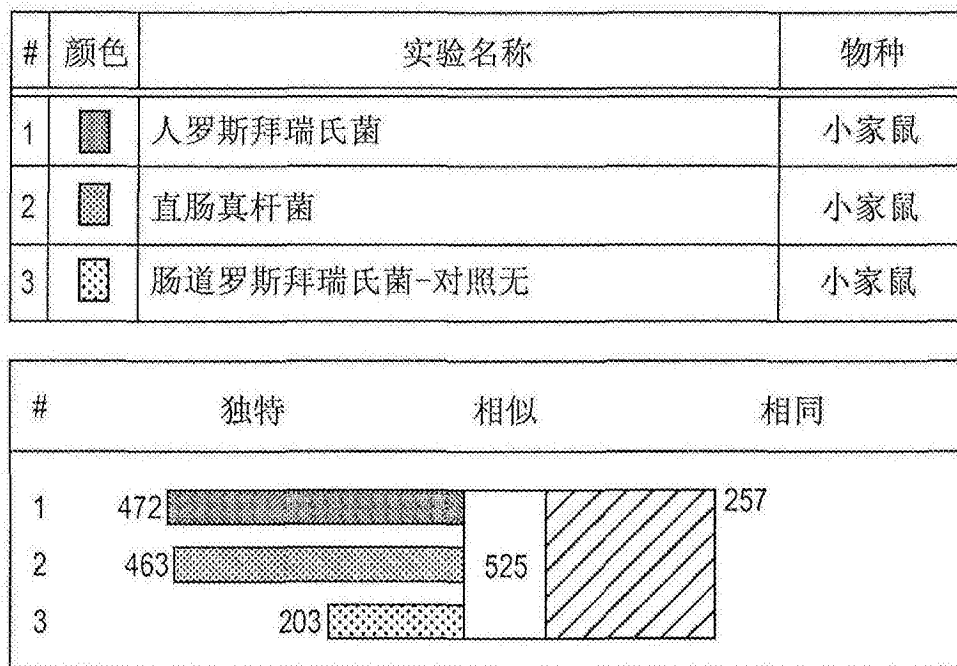


图9

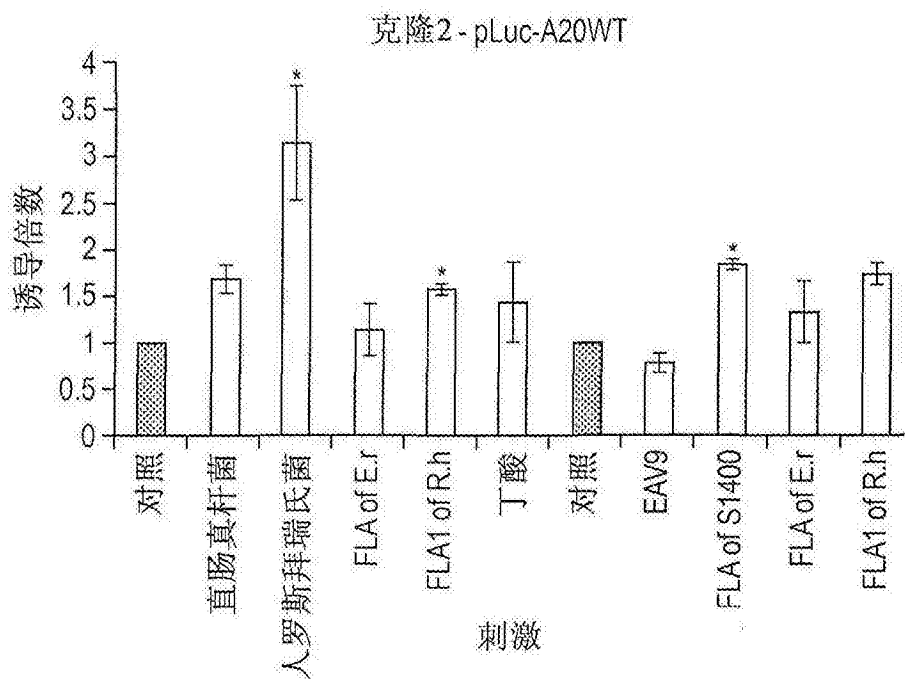


图10

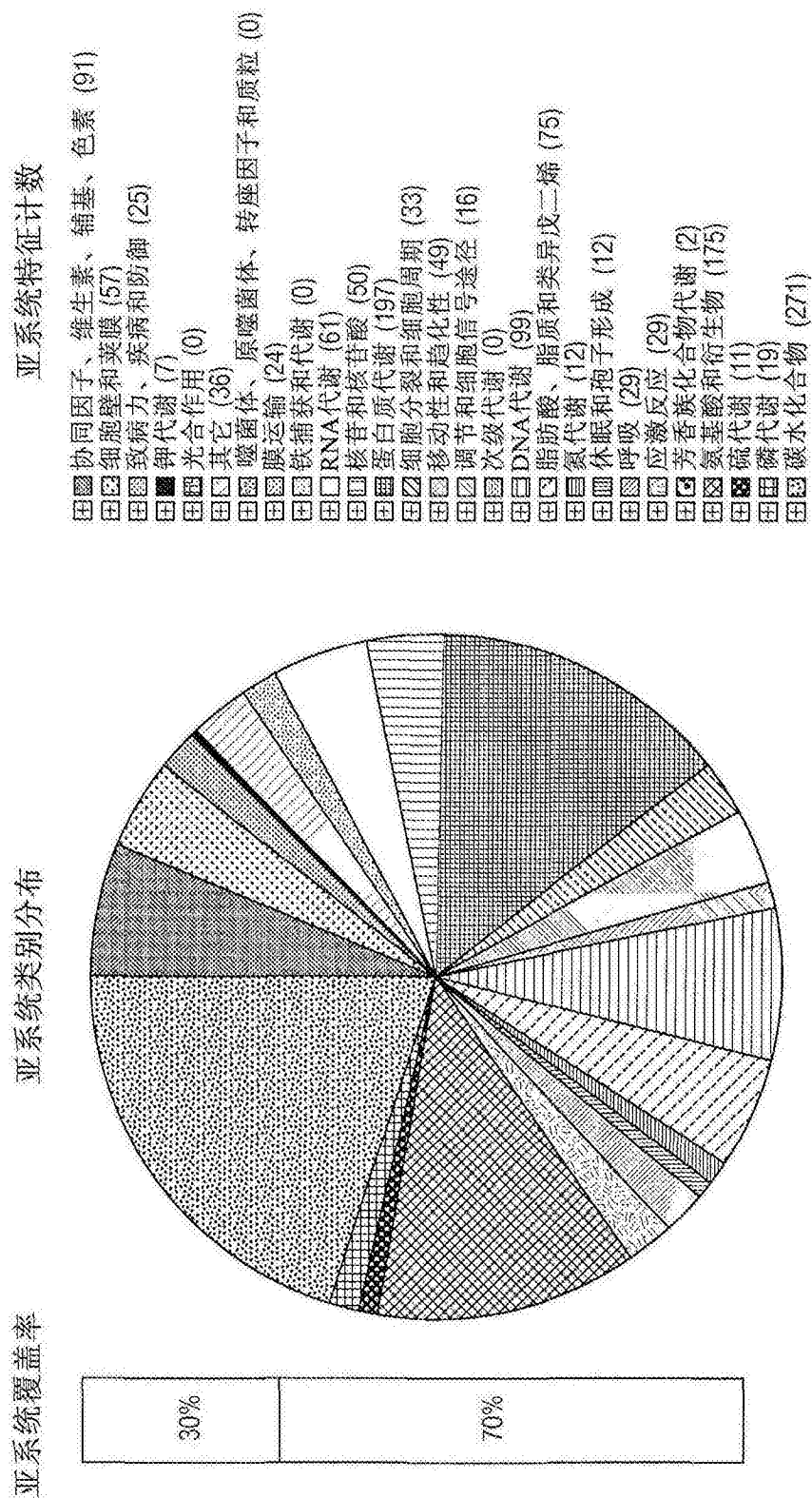


图11

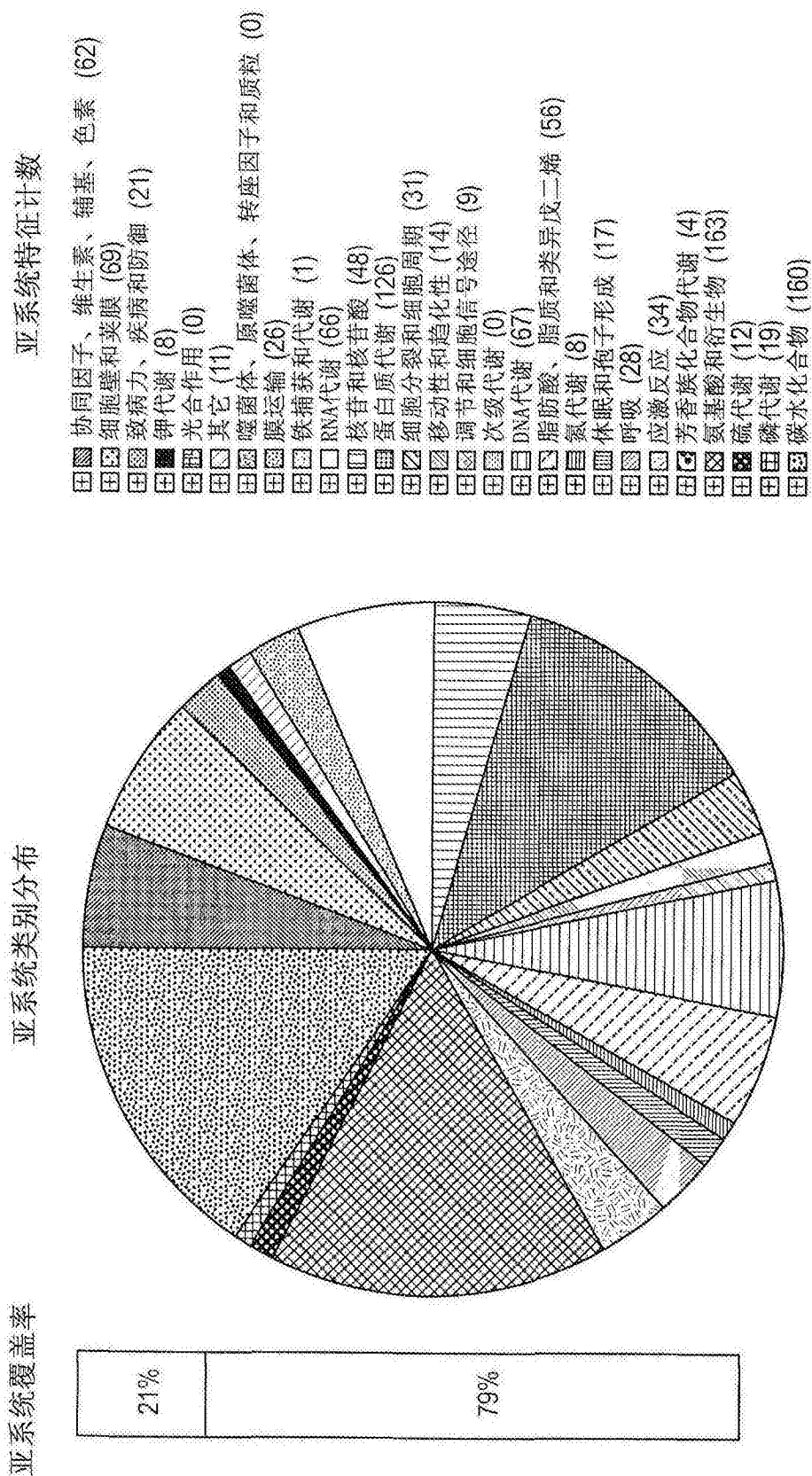


图12

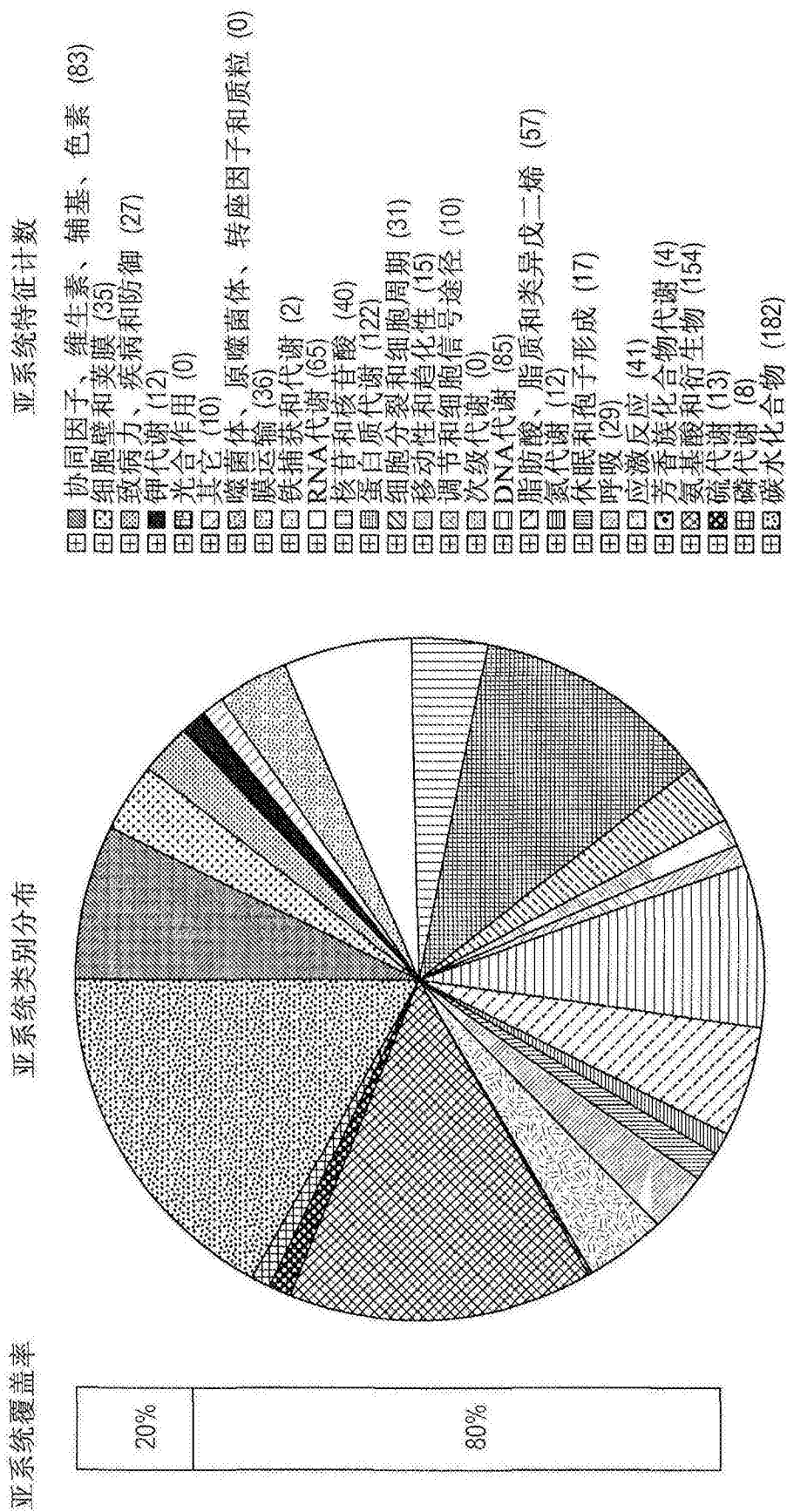


图13

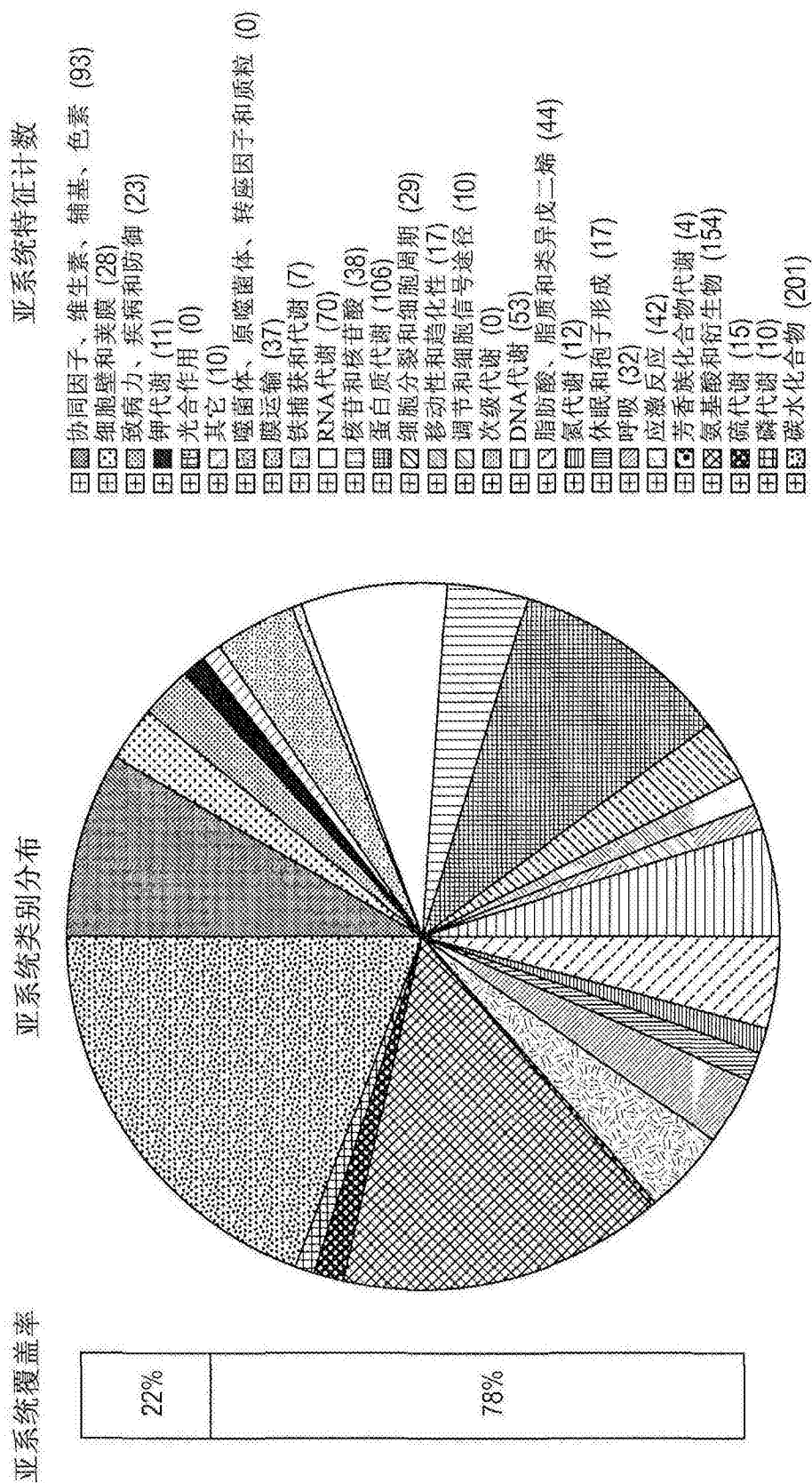


图14

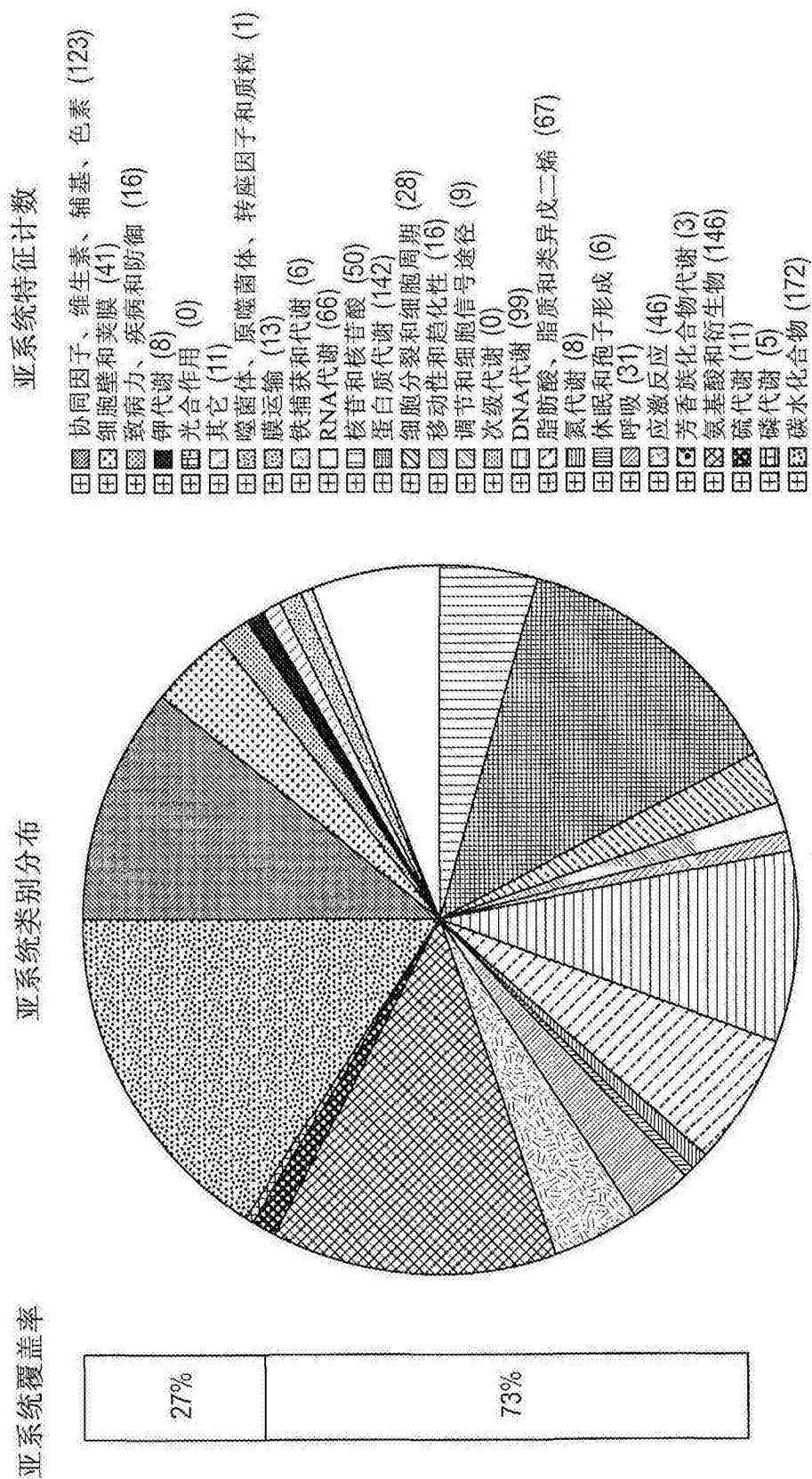


图15