



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119421944 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 11

(21) 申请号 202280089646.4

(22) 申请日 2022.12.08

(30) 优先权数据

2021/0210 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/US2022/081195 2022.12.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/108080 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40页

序列表(电子公布)

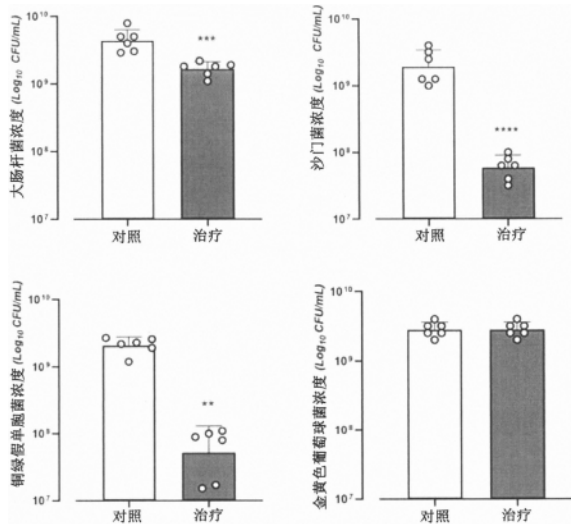
PCT/RO/134表1页 附图19页

(54) 发明名称

凝结芽孢杆菌菌株、其组合物及使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种新的凝结芽孢杆菌菌株,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,其包括单独的新的凝结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感染和疾病的用途和其他用途。



1. 一种凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 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所述的凝结芽孢杆菌菌株, 其与SEQ ID NO:3具有至少97%的同一性。

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

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

5. 根据权利要求1所述的凝结芽孢杆菌菌株, 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, 其包括权利要求1至5中任一项所述的凝结芽孢杆菌菌株, 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的凝结芽孢杆菌菌株。

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中任一项所述的凝结芽孢杆菌菌株, 其用于以下用途: 预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道感染、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中任一项所述的凝结芽孢杆菌菌株。

14. 根据权利要求6到11中任一项所述的微生物组合物, 其用于以下用途: 预防或治疗阴道感染、泌尿道感染、胃肠道感染、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中任一项所述的凝结芽孢杆菌菌株。

17. 根据权利要求1-5中任一项所述的凝结芽孢杆菌菌株, 其用作益生菌的用途, 其中

任选地一种或多种所述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结合。

18. 根据权利要求1至5中任一项所述的凝结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、心血管健康和/或皮肤健康的药物中的用途。

凝结芽孢杆菌菌株、其组合物及使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 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,其包括单独的新的凝结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鉴定施用后定植能力增强的杆菌菌株通常是麻烦的过程,因此重要的是选择最佳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。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] 凝结芽孢杆菌在各种食品中有着悠久的历史。几十年来,世界各地广泛消费了许多凝结芽孢杆菌菌株(Endres等人,2009年)。在食品诸如酸奶、牛奶、酸菜、泡菜和其他乳制品中可以发现这种细菌,所有这些食品中凝结芽孢杆菌的含量从 5×10^9 CFU/g(Sudha等人,2016)到 9.38×10^{10} (Endres等人,2011)不等。据报道,几种芽孢杆菌在蜂蜜中常见,包括巨大芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)和短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)(Alippi,1995;Alippi等人,2004年;Gilliam,1979;Gilliam&Valentine,1976;Snowdon&Cliver,1996)。这种用于益生菌的细菌物种起源于印度,那里的许多制造商生产凝结芽孢杆菌作为食品成分,用于出口并在欧洲和美国重新贴标(Cutting,2011)。为了评估凝结芽孢杆菌的安全性,对其基因组进行了研究,发现其不含任何有害基因(Salvetti等人,2016)。由于凝结芽孢杆菌的无害性质,美国食品和药物管理局(FDA)和欧盟食品安全局(EFSA)已报告该细菌是安全的,并将其列入公认安全(GRAS)和合格安全推定(QPS)名单(欧洲食品安全局,2017)。在100种已知芽孢杆菌属的物种中的一些非病原菌株,包括凝结芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌,被认为对所有年龄段的人食用都是安全的(Nithya&Halami,2012年)。关于凝结芽孢杆菌的文献综述显示,没有与益生菌相关的不良事件,这巩固了耐受性和安全性良好的研究结果。因此,凝结芽孢杆菌可以被认为是安全的益生菌,食用对宿主有益。

[0014] 从土壤到海水、沉积物、稻田、蜂蜜、鱼类、牛奶和干制食品等各种栖息地中都发现了巨大芽孢杆菌(Alfoldi,1957;Alippi&Reynaldi,2006;Padgham和Sikora,2007;Pelletier&Sygusch,1990;Vary et al.,2007;VonTersch和Carlton,1983;Scholle等人,2003;Kotb,2014)。对从蜂蜜中分离出的微生物的进一步定性分析表明,最常见的芽孢杆菌种类之一是巨大芽孢杆菌(Alippi,1995;Alippi等人,2004年;Snowdon&Cliver,1996;Tysset,Durand&Talierno,1970年)。已有补充研究在鱼类中分离出巨大芽孢杆菌

(Sumathi等人,2017)。Afrilasari等人,2015也成功从鲶鱼消化道中分离出巨大芽孢杆菌,并鉴定该菌株为PTB 1.4。巨大芽孢杆菌的无害性质使得该细菌被列入合格安全推定(QPS)名单(欧洲食品安全局,2017)。已通过基因组分析证实,巨大芽孢杆菌菌株ATCC 14581与巨大芽孢杆菌MIT411几乎相同(>99%)。加拿大卫生部表示,该有机体对人类健康或环境无害;对环境和加拿大人的接触是中等的。因此,可以得出结论,巨大芽孢杆菌菌株ATCC 14581对人类健康或环境无害(加拿大卫生部,2018)。

[0015] 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

[0016] 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,本发明涉及单独的凝结芽孢杆菌菌株CGI314或与其他菌株诸如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)和克劳氏芽孢杆菌(*Bacillus clausii*)菌株CSI08(在相应的PCT申请PCT/US2022/xxxxx中公开,并要求爱尔兰专利申请第2021/0209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进行定植的能力,因此它们适合于治疗或预防例如诸如阴道、泌尿道、胃肠道、鼻窦、咽、食管、口腔和/或身体的其他具有例如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(包括乳酸、苯甲酸和琥珀酸)、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,包括乳酸、苯甲酸和琥珀酸以支持皮肤健康,保护黏膜和其他上皮组织免受毒性剂,降低便糖的发生率,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、炎性肠病、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和组合物用于粪移植的用途。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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,其包括单独的凝结芽孢杆菌菌株CGI314或与其他芽孢杆菌菌株诸如巨大芽孢杆菌菌株和/或克劳氏芽孢杆菌菌株的组合,所述组合物具有基本相同的性质,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、泌尿道感染和胃肠道疾病。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。

[0023] 本发明包括治疗和/或预防的方法以及各种其他方法,所述方法可包括向受试者(例如哺乳动物受试者、包括人类患者的人等)提供本发明的凝结芽孢杆菌菌株或组合物,以及向受试者施用所述菌株或组合物的步骤。在实施方式中,本发明涉及组合物,例如组合物用于治疗疾病或感染或其他病症的用途。在实施方式中,本发明涉及如本申请全文(包括其权利要求)所述的凝结芽孢杆菌菌株或其组合物在制备用于治疗以下中的用途: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、清洁和解毒、代谢健康,心血管健康和/或皮肤健康的药物中,和/或本申请中所描述的其他治疗或其他应用原因。

[0024] 附图

[0025] 在附图中:

[0026] 图1显示按进化枝排列的芽孢杆菌属的物种的系统发育树(16S)。

[0027] 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(*gyrB*)。

[0028] 图3示出在具有0.4% TSA琼脂覆盖层(固体培养基)的MRS琼脂平板上,凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*) CGI314对肠、皮肤和泌尿道机会致病菌的抗微生物活性。A-大肠杆菌(*E. coli*); B-肠炎沙门菌(*S. enteritidis*)和C-金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)。

[0029] 图4示出在液体TSB培养基中,凝结芽孢杆菌CGI314对肠道、皮肤和泌尿道机会致病菌的抗微生物活性。病原体:大肠杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌。(浓度 $\text{Log}_{10}\text{CFU/ml}$)

[0030] 图5示出在24hr时观察到凝结芽孢杆菌CGI314(Fortispore)对大肠杆菌的最强抗微生物活性。(a)凝结芽孢杆菌MTCC5856(**Lactospore®**) (b)凝结芽孢杆菌CG314(Fortispore) (c)凝结芽孢杆菌6086(BC30™)接种在MRS琼脂上以对抗大肠杆菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。

[0031] 图6示出在48hr时观察到Fortispore对肠炎沙门菌的最强抗微生物活性。(a) **Lactospore®** (b) Fortispore (c) BC30™接种在MRS琼脂上以对抗肠炎沙门氏菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。

[0032] 图7示出在24hr时没有观察到凝结芽孢杆菌对铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)的抗微生物活性 (a)凝结芽孢杆菌MTCC5856(**Lactospore®**) (b)凝结芽孢杆菌CG314 (c)凝结芽孢杆菌6086(BC30™)接种在TSA琼脂上以对抗铜绿假单胞菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。

[0033] 图8示出在24hr时使用MRS琼脂在对抗金黄葡萄球菌的凝结芽孢杆菌中检测到有限的抗微生物。(a) 接种在TSA琼脂上的凝结芽孢杆菌对抗金黄葡萄球菌,0.4%TSA琼脂覆盖平板。(b) 接种在MRS琼脂上的凝结芽孢杆菌对抗金黄葡萄球菌,0.4%TSA琼脂覆盖板。

[0034] 图9示出凝结芽孢杆菌 (Fortispore) 和鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) 的总抗氧化能力。

[0035] 图10示出DE111、凝结芽孢杆菌 (Fortispore)、克劳氏芽孢杆菌CSI08 (Munispore)、巨大芽孢杆菌MIT411 (Renuspore) 和鼠李糖乳杆菌的总抗氧化能力。

[0036] 图11示出Fortispore对HT-29细胞系的粘附,以粘附细菌的百分比测量,可忽略不计。

[0037] 图12示出Fortispore对HT-29-MTX细胞系的粘附,以粘附细菌的百分比测量,可忽略不计。

[0038] 图13示出凝结芽孢杆菌菌株对HT-29细胞系的粘附的研究。

[0039] 图14示出凝结芽孢杆菌菌株对HT-29-MTX细胞系的粘附的研究。

[0040] 图15示出使用划线法和过夜TSB肉汤法,在24h或48h时,在凝结芽孢杆菌CGI314中不存在酪蛋白分解活性。

[0041] 图16示出在37°C下孵育24h后,使用 **EnzCheck®** 试剂盒, Fortispore对酪蛋白衍生物的蛋白水解活性低于阳性对照蛋白酶K。

[0042] 图17示出使用划线法和过夜TSB肉汤法,在24h或48h时,在凝结芽孢杆菌CGI314、凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 和凝结芽孢杆菌MTCC5856 (**Lactospore®**) (从左至右) 中不存在酪蛋白分解活性。

[0043] 图18示出对酪蛋白表现出低蛋白酶活性的凝结芽孢杆菌Fortispore。

[0044] 图19示出在37°C孵育24h后,通过 **EnzCheck®** 试剂盒测定的凝结芽孢杆菌菌株的酪蛋白分解活性的定量分析。

[0045] 图20示出Fortispore UTH发酵乳的FAA谱。示出了蛋氨酸、丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、赖氨酸、顺乌头酸的相对浓度(白色条(左)代表对照)。

[0046] 图21示出Fortispore UTH发酵乳的FAA谱。示出了琥珀酸、乳酸、苯甲酸、异柠檬酸的相对浓度(白色条(左)表示对照)。

[0047] 图22比较了Fortispore与Lactospore和BC30在乳酸、琥珀酸和苯甲酸生产中的作用(从左至右:对照、BC30、Lactospore、Fortispore)。

[0048] 图23比较了Fortispore与Lactospore和BC30在氨基酸生产中的作用(从左至右:对照、BC30、Lactospore、Fortispore;还显示了蛋氨酸、脯氨酸、色氨酸、赖氨酸的相对浓度)。

[0049] 图24示出与对照相比,在基本培养基中温育后24小时, **Fibersol®** (F) 使Fortispore的浓度(CFU/mL)显著增加了1 \log_{10} 。

[0050] 图25示出**Fibersol®** (F) 显著增加了基本培养基中Fortispore的浓度(CFU/mL),而在BC30和Lactospore的生长中没有观察到显著性。

[0051] 图26示出与对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加TSB培养基中的Fortispore的浓度(CFU/mL)。

[0052] 图27示出与对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加TSB培养基中DE111、Fortispore、BC30、大肠杆菌和肠炎沙门菌的浓度(CFU/mL)。

[0053] 图28示出与对照相比, **Fibersol®** (F) 没有显著增加50%TSB培养基中Fortispore的浓度(CFU/mL)。

[0054] 图29示出在50%TSB培养基中24小时后, **Fibersol®** (F) 使DE111的产量(CFU/mL)显著增加1 \log_{10} 。

[0055] 图30示出与BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加Fortispore的浓度(CFU/mL)。

[0056] 图31示出与BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加DE111、Fortispore和BC30的浓度(CFU/mL)。

[0057] 图32示出与50%BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加Fortispore浓度(CFU/mL)。

[0058] 图33示出与50%BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®** (F) 没有示出显著增加DE111、Fortispore和BC30的浓度(CFU/mL)。

具体实施方式

[0059] 基因型鉴定

[0060] 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。

[0061] WGS DNA组成

[0062] 全基因组测序(WGS)由康奈尔大学进行,包括组装和注释。生物信息学分析在康奈尔大学和鹿园益生菌和酵素有限公司(Deerland Probiotics and Enzymes(Kennesaw GA, USA))完成。申请人进行了gyrB基因多态性的鉴定。

[0063] 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。使用gyrB基因多态性进行基因测序分析,这是用于原核生物物种鉴别的成熟方法(Bavykin等人,2014;Wang等人,2007)。代表性基因组由NCBI审查和策划,并与UniProtein Consortium协调(NCBI,2016;Uniprot,2016)。使用R软件包的SequinR与UniProt Consortium分析相结合,用于比较当前请求保护的凝结芽孢杆菌CGI314与其他参考菌株的全基因组序列(WGS)和GyrB序列(下表1至3)。

[0064] 凝结芽孢杆菌CGI314的基因型、gyrB, & 16S rRNA的鉴别

[0065] CGI314被分离,并且基因组被认为是成功的。

[0066] CGI314的基因组大小(3.0Mbp)短于之前测序的凝结芽孢杆菌菌株(3.4Mbp)(Upadrasta等人,2016)。GC%(47.3%)与之前测序的凝结芽孢杆菌菌株的GC%(46.5%)一致(Upadrasta等人,2016)。

[0067] 表1

[0068] CGI314全基因组测序指标

	菌株	重叠群数量	总长度(nt)	GC (%)	N50 (nt)	平均覆盖率(x)
[0069]	凝结芽孢杆菌 CGI314	210	3,028,595	47.30	29,700	71

[0070] 表2

[0071] gyrB基因距离矩阵

	凝结芽孢杆菌亚种	ATCC 7050	BC-30	IS-2	MTCC 5856
[0072]	CGI314	99.9%	95.2%	95.2%	95.2%

[0073] 表3

[0074] 全基因组序列比较

	凝结芽孢杆菌亚种	登录号	%GC	序列长度
[0075]	CGI314	JABBFU000000000.1	47.30%	3,028,595
	ATCC7050	NZ_CP009709.1	46.90%	3,366,995
	BC-30	JPSK01000000	46.39%	3,458,616
	IS-2	JZDH01000000	46.41%	3,446,692
	MTCC 5856	NZ_CP011939.1	46.23%	3,694,837

[0076] 16S rRNA

[0077] 与四个参考菌株相比,CGI314的全基因组测序(WGS)和16S rRNA分析显示,与凝结芽孢杆菌菌株ATCC 7050相比,16S rRNA的平均核苷酸同一性(ANI)得分为99.9%。CGI314的基因组大小(3.0Mbp)和GC含量(47.30%)与四个参考菌株相当。

[0078] 进一步的保藏和登录号

[0079] 将凝结芽孢杆菌菌株CGI314(Fortispore)的基因组序列数据存入至NCBI GenBank数据库中,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/nucleotide/JABBFU000000000.1>。

[0080] 将克劳氏芽孢杆菌菌株CSI08(Munispore)的基因组序列数据存入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 sequencing pro-Nucleotide-NCBI\(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/Alkalihalobacillus_clausii_strain_CSI08_whole_genome_shotgun_sequencing_pro-Nucleotide-NCBI(nih.gov))。

[0081] 将巨大芽孢杆菌菌株MIT411(Renspore)的基因组序列数据存入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/nucleotide/Priestia_megaterium_strain_MIT411-whole_genome_shotgun_sequencing_pro-Nucleotide-NCBI(nih.gov))。

[0082] 系统发育定位由迪兰益生菌和酶有限公司完成。

[0083] 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产生基于计算的模型, 进一步证实凝结芽孢杆菌CGI314是ATCC 7050的近亲缘类群。

[0084] 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比例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 (Bavtlin等人, 2004; Wang等人, 2007) 支持使用gyrB序列作为分类学标志物的有效性, 因为它们的碱基置换率及其与DNA-DNA杂交分析的显著且可靠的相关性 (Dauga等人, 2002; Kasai等人, 1998; Wang等人, 2007)。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。

[0085] 使用邻接法 (NJ) (Saitou&Nei, 1987) 进行系统发育分析, 将凝结芽孢杆菌CGI314与凝结芽孢杆菌ATCC 7050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。凝结芽孢杆菌CGI314已归入凝结芽孢杆菌组。

[0086] 定义

[0087] “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。

[0088] “益生菌”是指有活力的微生物补充剂, 其通过在肠道、泌尿道或阴道起作用而对患者产生有益的影响。术语“一种或多种益生菌”可指活体微生物, 当以足量施用时, 可为宿主带来健康益处。含有益生菌的食物和食物添加剂可以帮助恢复肠道微生物区系的健康平衡。此外, 补充肠道菌群的益生菌可促进健康的肠道平衡。

[0089] “益生元”在本文中用作底物, 其对益生菌以及服用益生菌的个体患者具有有益作用。合适的益生元可选自菊糖、寡糖和/或维生素。

[0090] 本文使用的“受试者”包括患有与微生物失衡有关的任何临床症状的人, 以及预防性使用细菌制剂的人。任选地, 受试者是人。

[0091] “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。

[0092] “顽强生长 (hardy growth)”是指细菌表现出极好生长。

[0093] 缩写“CFU”表示菌落形成单位。

[0094] 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。

[0095] 根据第一方面, 本发明包括单独的凝结芽孢杆菌菌株CGI314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可以包括但不限于克劳氏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可以包括克劳氏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。

[0096] 如所附权利要求中所述, SEQ ID NO:1包括凝结芽孢杆菌CGI314的gyrB。

[0097] 如所附权利要求中所述, SEQ ID NO:2包括凝结芽孢杆菌CGI314的16S rRNA。

[0098] 如所附权利要求中所述, SEQ ID NO:3包括凝结芽孢杆菌CGI314的组装的全基因组序列。

[0099] 本文要求保护的凝结芽孢菌株, 与SEQ ID NO:1和/或2具有至少97%的同一性; 或与SEQ ID NO:3有至少97%的同一性, 具有以下性质:

- [0100] 凝结芽孢杆菌CGI314
- [0101] 该菌株示出胆汁稳定性。
- [0102] 该菌株示出酸稳定性。
- [0103] 该菌株示出耐热性。
- [0104] 该菌株产生以细菌素形式存在的天然抗菌物质。
- [0105] 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。
- [0106] 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。
- [0107] 发现该菌株对酸和胆汁表现出稳定性。
- [0108] 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(包括胃肠道感染),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。
- [0109] 在另一优选的实施方式中,提供了一种药物组合物,其包括单独的凝结芽孢杆菌CGI314或与具有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克劳氏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,将细菌菌株配制成药物制剂,以使益生菌菌株易于施用。
- [0110] 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。
- [0111] 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。
- [0112] 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)。
- [0113] 优选地,根据本发明,在药物中采用的益生菌的细菌浓度为 10^6 - 10^{13} 。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 凝结芽孢杆菌CGI314,基本由约 10^6 -约 10^{13} CFU,诸如约 10^9 凝结芽孢杆菌CSI08组成,由约 10^6 -约 10^{13} CFU,诸如约 10^9 凝结芽孢杆菌CSI08组成和/或以约 10^6 -约 10^{13} CFU,诸如约 10^9 凝结芽孢杆菌CSI08为特征。在实施方式中,本发明的组合物包括凝结芽孢杆菌CGI314(例如约 10^9 CFU)与巨大芽孢杆菌MIT411和/或克劳氏芽孢杆菌CSI08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,在本发明的组合物和/或用途或方法中,凝结芽孢杆菌CGI314是孢子形式,或者不是孢子形式。

[0114] 在某些实施方式中,包括凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314的组合物中。

[0115] 在某些实施方式中,包括凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314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凝结芽孢杆菌CGI314的组合物中。

[0116] 递送系统

[0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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多剂量容器中施用。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。

[0125] 适用于口服使用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。

[0126] 用于口腔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口剂。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 用于口服的片剂、胶囊和锭剂以及用于口服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。

[0130] 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)。

[0131] 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。

[0132] 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约按重量计1%至约按重量计99%。在其他实施方式中,这类制剂中的活性组分可包括约按重量计0.1%至约按重量计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。

[0133] 施用途径

[0134] 菌株凝结芽孢杆菌CGI314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。

[0135] 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、肌肉、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。

[0136] 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。

[0137] 实施例1

[0138] 凝结芽孢杆菌CGI314(下文称为Fortispore)的表征

[0139] 凝结芽孢杆菌CGI314(Fortispore)在使用0.4% TSA琼脂覆盖的固体MRS琼脂中对大肠杆菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌具有显著的抗微生物活性。

[0140] 然而,在固体培养基中没有观察到对铜绿假单胞菌的抗微生物活性。Fortispore对固体环境中的肠道、泌尿和皮肤病原体具有抗微生物活性。

[0141] 表4

[0142] 凝结芽孢杆菌CGI314对肠道、皮肤和泌尿道机会致病菌(固体培养基)的抗微生物活性总结

[0143] 益生菌菌株	抑制区直径(mm)			
	大肠杆菌	沙门肠炎杆菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
Fortispore (CGI314)	28.60 ± 4.10	33.40 ± 4.28	20.67 ± 0.58	-

[0144] 抗微生物活性以抑制区(mm) ± 标准偏差表示。

[0145] 图3示出在具有0.4% TSA琼脂覆盖层(固体培养基)的MRS琼脂平板上,凝结芽孢杆菌CGI314对肠、皮肤和泌尿道机会致病菌的抗微生物活性。A-大肠杆菌(E.coli); B-肠炎沙门菌(S.enteritidis)和C-金黄色葡萄球菌(S.aureus)。

[0146] Fortispore对液体TSB培养基中的大肠杆菌、沙门菌和铜绿假单胞菌具有显著的抗微生物活性。然而,在液体TSB培养基中没有观察到对金黄色葡萄球菌的抗微生物活性。

[0147] 表5

[0148] Fortispore对肠道、皮肤和泌尿道机会致病菌(液体培养基)的抗微生物活性总结

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

[0150] 检测到抗微生物活性(+),未观察到抗微生物活性(-)。

[0151] 图4示出在液体TSB培养基中,凝结芽孢杆菌CGI314对肠道、皮肤和泌尿道机会致病菌的抗微生物活性。病原体:大肠杆菌、沙门菌、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)和金黄色葡萄球菌。对照分别代表病原体的生长情况;处理代表在凝结芽孢杆菌CGI314存在下的病原体的生长情况。**p<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0152] Fortispore具有控制肠道和泌尿道中机会致病菌的存在的潜力,其中半液体到液体的情况将是常见的。此外,Fortispore具有防止机会致病菌在干燥环境(诸如人类皮肤)

中传播的潜力。

[0153] Fortispore比竞争者凝结芽孢杆菌益生菌具有更高的抗微生物活性。

[0154] 使用琼脂扩散法,比较了凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 与凝结芽孢杆菌 MTCC5856(**Lactospore®**)和凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 对人类皮肤和肠道的以下机会致病菌和动物源性致病菌的抗微生物活性:

[0155] 大肠杆菌25922,

[0156] 肠炎沙门菌13076,

[0157] 金黄葡萄球菌RF122,和

[0158] 铜绿假单胞菌DSM3227

[0159] 已证明,与BC30™和**Lactospore®**相比,凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 在24h对大肠杆菌的抗微生物活性和在48h对肠炎沙门菌的抗微生物活性更强。Fortispore可能具有更高的潜力来控制可能存在于人类肠道或皮肤上的机会致病菌和动物源性致病菌的存在:

[0160] Fortispore对大肠杆菌的高抗微生物活性。

[0161] Fortispore在48hr时对肠炎沙门菌的高抗微生物活性。

[0162] 未检测到凝结芽孢杆菌对铜绿假单胞菌的抗微生物活性。

[0163] 使用TSA琼脂,凝结芽孢杆菌对金黄葡萄球菌的有限抗微生物活性。

[0164] 抗微生物活性一对大肠杆菌的高抗微生物活性:

[0165] 使用MRS琼脂测试,凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 对大肠杆菌具有最强抗微生物活性。凝结芽孢杆菌MTCC5856(**Lactospore®**)和凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 具有有限的抗微生物活性。

[0166] 表6

[0167] 凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 菌株对大肠杆菌的抑制区更大。

	对大肠杆菌的抑制区直径(mm)		
	代表 1	代表 2	代表 3
[0168] Fortispore	10 ± 0	9.5 ± 0.7	9 ± 1.4
Lactospore®	2.5 ± 0.7	-	3 ± 0
BC30™	4.5 ± 0.7	5 ± 1.4	4.5 ± 0.7

[0169] 数值表示平均抑制±标准偏差 (n=2)。

[0170] 图5示出在24hr时观察到凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 对大肠杆菌的最强抗微生物活性。(a) 凝结芽孢杆菌MTCC5856 (**Lactospore®**) (b) 凝结芽孢杆菌CG314 (Fortispore) (c) 凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 接种在MRS琼脂上以对抗大肠杆菌,0.4% TSA 琼脂覆盖平板。

[0171] Fortispore抑制肠道和泌尿道条件致病菌大肠杆菌的生长。

[0172] 抗微生物活性-48hr时对肠炎沙门菌的高抗微生物活性:

[0173] 24h时,凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 对肠炎沙门菌的抗微生物活性最强。然而,48h时,凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 对该病原体的抗微生物活性最强。

[0174] 表7

[0175] 在48小时时,凝结芽孢杆菌CGI314(Fortispore)菌株对肠炎沙门菌获得较大的抑制区。

	在24h, 对肠炎沙门菌的抑制区直径(mm)		
	代表1	代表2	代表3
Fortispore	6.5 ± 2.1	4.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7
Lactospore®	3.5 ± 0.7	-	-
BC30™	10 ± 0	9 ± 1.4	6 ± 1.4
在48h, 对肠炎沙门菌的抑制区直径(mm)			
Fortispore	11 ± 1.4	13.5 ± 2.12	8 ± 1.4
Lactospore®	4 ± 1.4	-	-
BC30™	10 ± 0	9.5 ± 0.7	7 ± 1.41

[0176] 数值表示平均抑制±标准偏差(n=2)。

[0177] 图6示出在48hr时观察到Fortispore对肠炎沙门菌的最强抗微生物活性。(a) Lactospore® (b) Fortispore (c) BC30™接种在MRS琼脂上以对抗肠炎沙门氏菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。

[0178] Fortispore抑制了已知影响肠道的动物源性致病菌沙门菌的生长。

[0179] 抗微生物活性—未检测到凝结芽孢杆菌对铜绿假单胞菌的抗微生物活性:

[0180] 使用琼脂扩散法,未观察到凝结芽孢杆菌对铜绿假单胞菌的抗微生物活性。

[0181] 图7示出在24hr时没有观察到凝结芽孢杆菌对铜绿假单胞菌的抗微生物活性 (a) 凝结芽孢杆菌MTCC5856(Lactospore®) (b) 凝结芽孢杆菌CG314 (c) 凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 接种在TSA琼脂上以对抗铜绿假单胞菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。

[0182] Fortispore不释放对皮肤病原体铜绿假单胞菌的抗微生物剂。然而,在液体培养基中,Fortispore显示出对铜绿假单胞菌的潜在活性(见表5和图7)。

[0183] 抗微生物活性-使用MRS琼脂,凝结芽孢杆菌对金黄葡萄球菌的有限抗微生物活性:

[0184] 使用TSA琼脂,没有证据表明凝结芽孢杆菌菌株对金黄葡萄球菌具有抗微生物活性。然而,使用MRS琼脂,凝结芽孢杆菌6086 (BC30™) 和凝结芽孢杆菌CGI1314 (Fortispore) 确实表现出对该病原体的轻微活性。

[0185] 表8

[0186] 使用MRS琼脂在24小时检测到三种凝结芽孢杆菌菌株对金黄葡萄球菌的狭窄抑制区。

	对金黄葡萄球菌的抑制区直径(mm)		
	代表1	代表2	代表3
Fortispore	3.5 ± 0.7	2.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7
Lactospore®	-	-	-
BC30™	4 ± 1.4	3 ± 1.4	5.5 ± 2.1

[0187] 数值表示平均抑制±标准偏差(n=2)。

[0188] 图8示出在24hr时使用MRS琼脂在对抗金黄葡萄球菌的凝结芽孢杆菌中检测到有限的抗微生物。(a) 接种在TSA琼脂上的凝结芽孢杆菌对抗金黄葡萄球菌,0.4% TSA琼脂覆盖平板。(从左至右:BC30、CGI314、Lactospore)。(b) 接种在MRS琼脂上的凝结芽孢杆菌对抗

金黄葡萄球菌,0.4% TSA琼脂覆盖板。(从左至右:CGI314、BC30、Lactospore)。

[0191] Fortispore可以在干燥表面(诸如皮肤)上对皮肤病原体诸如金黄葡萄球菌释放有限量的抗微生物剂。

[0192] Fortispore是潜在的抗氧化益生菌:

[0193] 比较了凝结芽孢杆菌和鼠李糖乳杆菌的抗氧化活性。Fortispore具有比鼠李糖乳杆菌更高的抗氧化活性。

[0194] 图9示出凝结芽孢杆菌和鼠李糖乳杆菌的总抗氧化能力。结果显示了Trolox当量的平均浓度,单位为纳摩尔(nmole)/ml (n=3) ±标准误差。**p值=0.0014。

[0195] Fortispore中增加的Trolox当量浓度水平可以中和并清除自由基,并防止对细胞的氧化损伤。

[0196] 在所有迪兰(Deerland)孢子中,Fortispore的抗氧化活性的量是第二高。

[0197] 比较了Fortispore凝结芽孢杆菌与巨大芽孢杆菌MIT411、克劳氏芽孢杆菌CSI08、DE111枯草芽孢杆菌和鼠李糖乳杆菌的总抗氧化活性。Fortispore具有高抗氧化活性,高于鼠李糖乳杆菌。

[0198] 图10示出DE111、本发明的凝结芽孢杆菌、克劳氏芽孢杆菌CSI08、巨大芽孢杆菌MIT411和鼠李糖乳杆菌的总抗氧化能力。结果显示了Trolox当量的平均浓度,单位为纳摩尔/g (n=3) ±标准误差。

[0199] Fortispore中增加的Trolox当量浓度水平可以中和并清除自由基,并防止对细胞的氧化损伤。

[0200] Fortispore(繁殖体,非孢子形式)不粘附于肠上皮细胞系。

[0201] 评估了凝结芽孢杆菌菌株(CGI314)对体外肠上皮模型的粘附能力。37°C时,凝结芽孢杆菌菌株CGI314对HT-29细胞系的粘附可忽略不计。37°C时,凝结芽孢杆菌CGI314对产生黏液的细胞系HT-29-MTX的粘附能力可忽略不计。

[0202] 图11示出Fortispore对HT-29细胞系的粘附可忽略不计。

[0203] 图12示出Fortispore对HT-29-MTX细胞系的粘附可忽略不计。

[0204] Fortispore菌株不粘附于肠黏液或上皮细胞。

[0205] 评估了各种凝结芽孢杆菌菌株(CGI314,BC30TM,Lactospore®)对体外肠上皮模型的粘附能力。37°C时,凝结芽孢杆菌菌株CGI314、BC30TM、Lactospore®对HT-29细胞系的粘附可忽略不计。37°C时,凝结芽孢杆菌BC30TM对产生黏液的细胞系HT-29-MTX的粘附能力高于凝结芽孢杆菌CGI314和Lactospore®。

[0206] 图13示出凝结芽孢杆菌菌株对HT-29细胞系的粘附的研究。

[0207] 图14示出凝结芽孢杆菌菌株对HT-29-MTX细胞系的粘附的研究。

[0208] 凝结芽孢杆菌菌株(液体培养物,非孢子形式)不粘附于肠黏液或上皮细胞。

[0209] Fortispore表现低的酪蛋白分解活性

[0210] Fortispore在脱脂乳琼脂平板上的酪蛋白分解活性呈阴性。通过使用采用荧光标记的酪蛋白衍生物的商业试剂盒来评估Fortispore酪蛋白分解活性的定量分析。Fortispore表现低的胞外蛋白酶活性。

[0211] 图15示出使用划线法和过夜TSB肉汤法,在24h或48h时,在凝结芽孢杆菌CGI1314中不存在酪蛋白分解活性的研究。

[0212] 图16示出在37℃下孵育24h后,使用**EnzCheck®**试剂盒,Fortispore对酪蛋白衍生物的蛋白水解活性低于阳性对照蛋白酶K。误差线表示标准偏差(n=3)。

[0213] Fortispore对酪蛋白表现低的蛋白酶活性。

[0214] 在迪兰(Deerland)菌株中,Fortispore对酪蛋白衍生物表现低的胞外蛋白酶活性。

[0215] 图17示出使用划线法和过夜TSB肉汤法,在24h或48h时,在凝结芽孢杆菌CGI1314、凝结芽孢杆菌6086(BC30™)和凝结芽孢杆菌MTCC5856(**Lactospore®**)中不存在酪蛋白分解活性。

[0216] 图18示出在迪兰(Deerland)菌株中,对酪蛋白表现出低蛋白酶活性的Fortispore凝结芽孢杆菌。

[0217] 图19示出在37℃孵育24h后,通过**EnzCheck®**试剂盒测定的凝结芽孢杆菌菌株的酪蛋白分解活性的定量分析。显著性用a、b和/或c表示,多个字母表示结果与多于一个组无显著差异(P<0.05)。误差棒表示标准偏差。

[0218] 与比较物(**Lactospore®**和BC30™)相比,Fortispore对酪蛋白表现高的蛋白酶活性。

[0219] Fortispore的多样碳水化合物谱

[0220] Fortispore可代谢一系列的单糖、二糖、糖醇、胺糖和多糖。

[0221] 使用商业API 50 CH试纸测试,Fortispore对49种碳水化合物中的22种的代谢呈阳性。这些碳水化合物主要是单糖诸如D-核糖、D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖、D-甘露糖和双糖诸如海藻糖、麦芽糖和纤维二糖等。此外,Fortispore还能代谢属于糖基化对苯二酚(熊果苷, (arbutin))、生氰糖苷(苦杏仁苷, (amygladin))和醇β-葡萄糖苷(水杨苷, (Salicin))的化合物。

[0222] 表9

[0223] 使用API 50 Ch条,由凝结芽孢杆菌(Fortispore、BC30™、**Lactospore®**)有效发酵的碳水化合物列表

[0224]	碳水化合物		碳水化合物	
		凝结芽孢杆菌 CGI1314		凝结芽孢杆菌 CGI1314
	1-阿拉伯糖	+	苦杏仁苷	+
	D-核糖	+	熊果苷	+
	D-木糖	+	七叶苷柠檬酸铁	+
	D-半乳糖	+	水杨苷	+
	D-葡萄糖	+	D-纤维二糖	+
	D-果糖	+	D-麦芽糖	+
	D-甘露糖	+	D-蜜二糖	-
	L-鼠李糖	-	D-海藻糖	+
	D-甘露醇	+	阿米登	+
	D-山梨糖醇	+	龙胆二糖	+
	甲基-AD-吡喃葡萄糖苷	+	D-阿拉伯糖醇	(+)
	N-乙酰葡萄糖胺	+	葡萄糖酸钾	+

[0225] 这些数据表明, Fortispore可以帮助消化肠道中的这些化合物。

[0226] Fortispore对D-山梨糖醇和淀粉阿米登 (Amidon) 呈强阳性, 而其他两个竞争者菌株 (BC30TM和Lactospore®) 对这些呈阴性或弱阳性。

[0227] 表10

[0228] 使用API 50 Ch条, 由凝结芽孢杆菌 (Fortispore、BC30™、Lactospore®) 有效发酵的碳水化合物列表

[0229]	碳水化合物			碳水化合物		
	凝结芽孢杆菌 6086 (BC30TM)	凝结芽孢杆菌 MTCC5856 (Lactospore®)	凝结芽孢杆菌 CGI1314	凝结芽孢杆菌 6086 (BC30TM)	凝结芽孢杆菌 MTCC5856 (Lactospore®)	凝结芽孢杆菌 CGI1314
	1-阿拉伯糖	+	+	苦杏仁苷	+	+
	D-核糖	+	+	熊果苷	+	+
	D-木糖	+	+	七叶苷柠檬酸铁	+	+
	D-半乳糖	+	+	水杨苷	+	+
	D-葡萄糖	+	+	D-纤维二糖	+	+
	D-果糖	+	+	D-麦芽糖	+	+
	D-甘露糖	+	+	D-蜜二糖	+	-
	L-鼠李糖	+	+	D-海藻糖	+	+
	D-甘露醇	-	+	阿米登	(+)	-
	D-山梨糖醇	(+)	-	龙胆二糖	+	+
	甲基-AD-吡喃葡萄糖苷	+	+	D-阿拉伯糖醇	-	(+)
	N-乙酰葡萄糖胺	+	+	葡萄糖酸钾	+	+

[0230] 这些数据表明, Fortispore可以帮助消化肠道中的这些化合物。

[0231] Fortispore具有酯酶、肽酶、磷酸酶和葡萄糖苷酶活性:

[0232] 使用API ZYM试剂盒, Fortispore的酯酶、肽酶、磷酸酶和半乳糖苷酶活性呈阳性, 这表明:

[0233] 在适当的脂质源的存在下, Fortispore通过酯酶的作用产生游离脂肪酸的可能性很高。

[0234] 半乳糖苷酶增加了Fortispore的碳水化合物分解代谢的潜力, 因为它们对各种寡糖、乳糖神经酰胺、乳糖和许多糖蛋白具有活性。

[0235] 催化亮氨酸、缬氨酸和半胱氨酸底物水解的氨肽酶类。

[0236] 事实上, 计算机(in silico)分析已经鉴定了编码酯酶、肽酶和半乳糖苷酶的基因。

[0237] 表11

[0238] 使用API ZYM试剂盒的Fortispore的酶谱

		凝结芽孢杆菌 CGI1314 (Fortispore)
酯酶活性	酯酶 (C4:0)	+
	酯酶 (C8:0)	+
脂肪酶活性	脂肪酶 (C14:0)	-
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	-

[0240] 该研究证实了Fortispore对寡糖的水解能力, 并表明其具有分解脂肪和肽以释放

游离氨基酸的潜力。

[0241] 这些数据表明, Fortispore可以帮助消化肠道中的这些分子。

[0242] 凝结芽孢杆菌的酶谱显示了肽酶和酯水解能力,并证实了寡糖降解能力:

[0243] 使用API ZYM试剂盒,所有凝结芽孢杆菌的酯酶、肽酶、磷酸酶和半乳糖苷酶活性均呈阳性,这表明:

[0244] 在适当的脂质源的存在下,凝结芽孢杆菌通过酯酶的作用产生游离脂肪酸的可能性很高。

[0245] 半乳糖苷酶增加了凝结芽孢杆菌的碳水化合物分解代谢的潜力,因为它们对各种寡糖、乳糖神经酰胺、乳糖和许多糖蛋白具有活性。

[0246] 催化亮氨酸、缬氨酸和半胱氨酸底物水解的氨肽酶类。

[0247] 表12

[0248] 使用API ZYM试剂盒的Fortispore的酶谱

[0249]

		凝结芽孢杆菌 CG11314 (Fortispore)	凝结芽孢杆菌 MTCC5856 (Lactospore®)	凝结芽孢杆菌 6086 (BC30 TM)
酯酶活性	酯酶 (C4:0)	+	+	+
	酯酶 (C8:0)	+	+	+
脂肪酶活性	脂肪酶 (C14:0)	-	-	-
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	-	-	-

[0250] 该研究表明,使用商业API ZYM试剂盒,凝结芽孢杆菌菌株对几种酶的水解能力没

有差异。

[0251] Fortispore通过糖酵解和蛋白酶代谢释放游离氨基酸

[0252] 代谢组学分析揭示了Fortispore发酵和对乳碳水化合物和蛋白质的蛋白水解能力,产生了一系列氨基酸。

[0253] 利用UHT乳模型分析了Fortispore的碳水化合物发酵和蛋白水解能力。在Fortispore中,GC-MS分析共鉴定出38种游离氨基酸 (FAA) 化合物,其中10种具有统计学意义。鉴定的一些羧酸与碳水化合物代谢途径有关,这证实了在Fortispore中存在有活性的乳糖/半乳糖/葡萄糖摄取和酶代谢系统。此外,也有证据表明在Fortispore中存在活性蛋白水解系统,因为释放了一些与肽酶活性相关的氨基酸和与苯丙氨酸的进一步分解代谢相关的苯甲酸。

[0254] 表13

[0255] 使用FAA方法通过GC-MS分析的具有统计学意义的化合物与潜在前体一起列出

化合物	潜在肽酶/前体
丙氨酸	氨肽酶 PepN
脯氨酸	Pep P/ PepX
蛋氨酸	MAP/ PepM
赖氨酸	氨肽酶 PepN
色氨酸	氨肽酶
琥珀酸	乳糖/葡萄糖
乳酸	乳糖/葡萄糖
顺-乌头酸	乳糖/葡萄糖
异柠檬酸	乳糖/葡萄糖
苯甲酸	苯丙氨酸

[0257] 总体而言,酶学和代谢组学数据表明,Fortispore具有活性碳水化合物代谢酶,因为产生的大多数化合物来自糖酵解途径(乳中碳水化合物的转化)。此外,有证据表明,来自Fortispore发酵的UHT乳中含有潜在的活性氨肽酶、裂解酶和脱羧酶,可产生羧酸并释放氨基酸。

[0258] Fortispore通过糖酵解和蛋白酶代谢释放游离氨基酸

[0259] 柱状图中表示游离氨基酸分析(平均+SEM)

[0260] 图20示出Fortispore UTH发酵乳的FAA谱。P-值 $\leq 0.005 = **$ 和P-值 $\leq 0.01 = *$ 。白色条表示对照。

[0261] 图21示出Fortispore UTH发酵乳的FAA谱。P-值 $\leq 0.005 = **$ 和P-值 $\leq 0.01 = *$ 。白色条表示对照。

[0262] 与竞争者凝结芽孢杆菌菌株相比,Fortispore在生产有益于皮肤健康的化合物方面效率略高。

[0263] Ganeden Biotech将凝结芽孢杆菌6086 (BC30TM) 作为抗衰老益生菌销售,因为它能产生最大量的天然来源的L+乳酸、细菌素、过氧化氢、酶和其他代谢物。乳酸因其抗微生物活性和水合作用而与抗衰老、抗痤疮有关。琥珀酸还与抗炎、抗微生物和水合作用有关。苯甲酸与抗微生物活性有关。

[0264] 图22比较了Fortispore与Lactospore和BC30在乳酸、琥珀酸和苯甲酸生产中的作用。显著性用a、b和/或c表示,多个字母表示结果与多于一个组无显著差异($P < 0.05$)。误差棒表示标准偏差。

[0265] 我们的结果表明,Fortispore在乳酸生产方面略高于BC30™,并且在琥珀酸和苯甲酸生产方面更胜一筹。

[0266] 与竞争者凝结芽孢杆菌菌株相比,Fortispore可产生有益于皮肤健康的氨基酸。

[0267] 将Fortispore与Lactospore®和BC30进行比较。我们的结果表明,Fortispore在产生蛋氨酸、脯氨酸、赖氨酸和色氨酸方面优于BC30™和Lactospore®。

[0268] 蛋氨酸是一种含硫氨基酸,可以改善皮肤的色泽和弹性,促进头发健康并强化指甲。脯氨酸有助于降低炎症,从而促进免疫系统的健康。它还有助于触发抗炎化合物和基因的级联,从而帮助恢复。赖氨酸是一种必需氨基酸,具有多种益处,包括预防唇疱疹、减轻焦虑和促进伤口愈合。色氨酸与缓解抑郁和焦虑有关。

[0269] 图23比较了Fortispore与Lactospore和BC30在氨基酸生产中的作用。显著性用a、b和/或c表示,多个字母表示结果与多于一个组无显著差异($P < 0.05$)。误差棒表示标准偏差。

[0270] Fortispore蛋白质组学分析鉴定具有潜在益生菌益处的蛋白质。

[0271] 将Fortispore的胞外分泌物送至质谱仪以鉴定益生菌菌株释放的蛋白质。共检测到28种蛋白质,其中6种具有潜在的益生菌益处。

[0272] 表14

[0273] Fortispore蛋白质组学鉴定具有潜在益生菌益处的蛋白质

目的蛋白	潜在角色
水解酶 Nlp/P60	参与蛋白质或脂肪的降解
丝氨酸蛋白酶	参与蛋白质的消化-切割肽键
[0274] 肽酶 M23	参与蛋白质的消化 抗微生物特性-细菌细胞壁的溶解
伴侣蛋白 GroEL	参与蛋白质折叠
肽	参与蛋白质的消化
葡聚糖蔗糖酶	参与淀粉和蔗糖的分解

[0275] 这些数据证实了先前的体外研究结果,表明Fortispore可以帮助消化蛋白质和碳水化合物,并对病原体具有抗微生物特性。

[0276] 在基本培养基中存在Fibersol®的情况下,Fortispore的生长增加。

[0277] 图24示出与对照相比,在基本培养基中温育后24小时,Fibersol®使Fortispore的浓度(CFU/mL)显著增加了 $1 \log_{10}$ * $p < 0.05$

[0278] 与竞争者凝结芽孢杆菌菌株相比,在基本培养基中存在Fibersol®的情况下,Fortispore的生长显著增加。

[0279] 图25示出**Fibersol®**显著增加了基本培养基中Fortispore的浓度(CFU/mL),而在BC30和Lactospore的生长中没有观察到显著性。使用图基(Tukey)方法的单因素ANOVA进行统计分析。 $**p\text{-值} < 0.01$ 。

[0280] 在TSB培养基中存在**Fibersol®**的情况下, Fortispore的生长没有增加。

[0281] 图26示出与对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加TSB培养基中的Fortispore浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**不能增加Fortispore在丰富培养基中的生长,可能是因为它们它们在TSB培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0282] 在TSB培养基中存在**Fibersol®**的情况下,比较了Fortispore、BC 30、DE111和病原体的生长情况。

[0283] 图27示出与对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加TSB培养基中DE111、Fortispore、BC30、大肠杆菌和肠炎沙门菌的浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**不能增加DE111、Fortispore、BC30、大肠杆菌和肠炎沙门菌在丰富培养基中的生长,很可能是因为它们它们在TSB培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0284] 在50%TSB培养基中存在**Fibersol®**的情况下, Fortispore的生长没有增加。

[0285] 图28示出与对照相比, **Fibersol®**没有显著增加50%TSB培养基中Fortispore的浓度(CFU/mL)。

[0286] 在50%TSB培养基中存在**Fibersol®**的情况下,比较了Fortispore、BC 30和DE111的生长情况。

[0287] 图29示出在50%TSB培养基中24小时后, **Fibersol®**使DE111的产量(CFU/mL)显著增加 $1 \log_{10}$ 。 $***p < 0.0001$ 。与对照相比, **Fibersol®**没有示出在50%TSB培养基中显著增加Fortispore和BC30的浓度(CFU/mL)。

[0288] 在添加到BHI培养基中存在**Fibersol®**的情况下,没有观察到Fortispore的显著生长。

[0289] 图30示出与BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加Fortispore的浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**没有增加Fortispore在丰富培养基中的生长,很可能是因为它们它们在BHI培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0290] 在BHI培养基中存在**Fibersol®**的情况下,比较了Fortispore、BC 30和DE111的生长。

[0291] 图31示出与BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加DE111、Fortispore和BC30的浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**没有增加DE111、Fortispore、BC30在丰富培养基中的生长,很可能是因为它们它们在BHI培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0292] 在50%BHI培养基中存在**Fibersol®**的情况下,没有观察到Fortispore的生长增加。

[0293] 图32示出与50%BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加Fortispore浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**没有增加Fortispore在丰富培养基中的生长,很可能是因为它们它们在BHI培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0294] 在50%BHI培养基中存在**Fibersol®**的情况下,没有观察到Fortispore、BC 30和DE111的生长增加。

[0295] 图33示出与50%BHI培养基中的对照相比, **Fibersol®**没有示出显著增加DE111、Fortispore和BC30的浓度(CFU/mL)。与基本培养基不同, **Fibersol®**没有增加DE111、Fortispore、BC30在丰富培养基中的生长,很可能是因为它们它们在BHI培养基中的营养物质下达到最大生长。

[0296] 实施例2

[0297] 评估对肠上皮的体外模型的粘附能力

[0298] 细胞系:人结肠直肠癌细胞系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/ml青霉素、100 μ g/l链霉素和2 μ g/ml两性霉素B的低葡萄糖DMEM培养基,在37°C、5%CO₂气氛中增殖。

[0299] 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。

[0300] 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。

[0301] 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°C下储存直至使用。悬浮液在制备后2周内使用。

[0302] 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°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)。

[0303] 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的胰蛋白酶/EDTA溶液和50 μ l的PBS,并在37°C下轻轻摇动(~100rpm)孵育10min。向对照孔中加入五十微升胰蛋白酶/EDTA溶液。

[0304] 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。

[0305] 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PetriFilm™(克劳氏芽孢杆菌CSI08,巨大芽孢杆菌MIT411)上。平板在37°C下孵育48h后计数,PetriFilm在37°C下孵育24h后计数。

[0306] 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。

[0307] 表15

[0308] 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

	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
[0309]	平均	12.10	20.68	19.68
	平均值的标准误差	0.7710	3.005	2.197

[0310] 表16

[0311] 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

[0312]	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 ⁵
	平均	0.2578	1.499	0.8033
	平均值的标准误差	0.02035	0.2983	0.1781

[0313] 结论

[0314] 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。

[0315] 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。

[0316] 实施例3

[0317] 凝结芽孢杆菌CGI314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:

[0318] 研究干预

[0319] 每天施用含有 1×10^9 CFU的凝结芽孢杆菌CGI314和枯草芽孢杆菌DE111®的益生菌1,

[0320] 益生菌组合,其包含约(和大于) 0.5×10^9 CFU的枯草芽孢杆菌DE111®、约 0.5×10^9 CFU的巨大芽孢杆菌MIT411、约(和小于) 0.5×10^9 CFU的凝结芽孢杆菌CGI314、约 0.5×10^9 CFU的克劳氏芽孢杆菌CSI08;每日施用总量 2×10^9 芽孢杆菌孢子

[0321] 安慰剂:每天施用大米麦芽糊精

[0322] 研究了适应症

[0323] 胃肠道稳态与免疫系统。

[0324] 研究描述

[0325] 招募并筛选年龄在18-65岁的健康成年人参与本研究。符合条件的参与者以1:1:1的比例随机分配到两个实验组中的一个或对照组,并接受45天的治疗和2周的随访,以评估新型益生菌菌株在健康成人中的安全性和有效性。

[0326] 出于本研究的目的,研究产品被包装在与每日剂量一致的单个胶囊中。每粒胶囊包含300mg成分:

[0327] 益生菌配方1:凝结芽孢杆菌CGI314和枯草芽孢杆菌DE111® (1×10^9 CFU总量), ~4.17mg;低水分大米麦芽糊精,292.23mg;中链甘油三酯,3.6mg。

[0328] 益生菌混合物(cocktail): 2×10^9 CFU芽孢杆菌孢子,包括枯草芽孢杆菌DE111® (约(和大于) 0.5×10^9 CFU),2.1mg;巨大芽孢杆菌MIT411(0.5×10^9 CFU),2.1mg;克劳氏芽孢杆菌CSI08(约 0.5×10^9 CFU),2.1mg;凝结芽孢杆菌CGI314(约(和小于) 0.5×10^9 CFU),2.1mg;低水分大米麦芽糊精,288mg;中链甘油三酯,3.6mg。

[0329] 安慰剂由与研究产品相同的所有成分组成,但不含益生菌。安慰剂是单个胶囊,相当于每日剂量。每粒胶囊包含300mg成分:安慰剂:低水分大米麦芽糊精,296.4mg;中链甘油三酯,3.6mg。

[0330] 表17总结了4个益生菌组和安慰剂组从基线到治疗期结束的肠-脑轴问卷得分的变化。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

响具有临界显著性的结果(p-值在0.05和0.10之间)。这会影响两个项目: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(Kruskal Wallis)检验;观察到的p-值为0.111(乏力)和0.123(食欲变化)。

[0331] 简言之,所有测试症状的肠-脑轴问卷评分变化的平均值均为负值,这意味着在治疗期结束时,症状的强度降低(参与者受这些症状的困扰变少)。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,但观察到乏力和食欲变化项目的临界显著性。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。

[0332] 表17

[0333] 从基线到治疗期结束的肠-脑轴问卷项目得分的变化情况:益生菌组与安慰剂组的成对比较(事后ANOVA:邓尼特(Dunnet)t-检验)

[0334]

	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
悲伤变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.42 (-1.00; 0.17)	-0.44 (-1.02; 0.14)
P-值 vs 安慰剂	0.236	0.192
气恼变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.33 (-0.94; 0.27)	-0.35 (-0.95; 0.25)
p-值 vs 安慰剂	0.453	0.405
乏力变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.08 (-0.57; 0.74)	-0.02 (-0.67; 0.63)
p-值 vs 安慰剂	0.993	1.000
食欲变化变化 ^a		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.33 (-1.01; 0.34)	-0.04 (-0.54; 0.46)
p-值 vs 安慰剂	0.390	0.999
呼吸困难/呛噎变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.21 (-0.61; 0.19)	-0.16 (-0.56; 0.24)
p-值 vs 安慰剂	0.505	0.709
心跳加速/加快变化 ^a		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.33 (-0.92; 0.25)	0.08 (-0.35; 0.51)
p-值 vs 安慰剂	0.176	0.968
睡眠问题变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.04 (-0.66; 0.57)	-0.15 (-0.76; 0.46)
p-值 vs 安慰剂	0.999	0.926
注意力问题变化		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.13 (-0.42; 0.67)	-0.02 (-0.56; 0.51)

	p-值 vs 安慰剂	0.944	1.000
	精神紧张/压力变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.00 (-0.71; 0.71)	-0.14 (-0.85; 0.56)
	p-值 vs 安慰剂	1.000	0.963
	愤怒/紧张变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.04 (-0.63; 0.54)	-0.35 (-0.93; 0.23)
	p-值 vs 安慰剂	0.999	0.372
	头疼变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.17 (-0.76; 0.42)	-0.03 (-0.61; 0.55)
[0335]	p-值 vs 安慰剂	0.892	1.000
	肌肉疼/痛变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.33 (-0.17; 0.84)	0.13 (-0.37; 0.63)
	p-值 vs 安慰剂	0.293	0.912
	僵硬变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.08 (-0.33; 0.50)	0.17 (-0.24; 0.58)
	p-值 vs 安慰剂	0.965	0.692
	头晕变化		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.13 (-0.49; 0.24)	0.00 (-0.36; 0.36)
	p-值 vs 安慰剂	0.807	1.000

[0336] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*邓尼特T-检验的p值(成对比较)

[0337] 表17示出单个益生菌组和安慰剂组之间成对比较的95%置信区间和p-值的平均差异。与安慰剂相比,从基线到治疗期结束,包含益生菌的研究产品在肠-脑轴得分变化方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0338] 表18示出单个益生菌组和安慰剂组之间成对比较的95%置信区间和p-值的平均差异。与安慰剂相比,在基线或治疗期结束时,包含益生菌的研究产品的肠-脑轴项目得分的总和均没有表现出统计学上的显著差异。

[0339] 表18

[0340] 在基线和在治疗期结束的肠-脑轴问卷项目得分的总和:益生菌组与安慰剂组的成对比较(事后ANOVA:邓尼特t-检验)

[0341]	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
--------	---------------------	---------------------

[0342]	肠-脑轴项目得分的总和 在基线时			
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.43 4.71)	(-3.86; 4.27)	-0.02 (-4.30; 4.27)
	p-值 vs 安慰剂	0.997		1.000
	肠--脑轴项目得分的总和 在治疗期结束时			
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-1.00 2.62)	(-4.62; 2.24)	-1.34 (-4.92; 2.24)
	p-值 vs 安慰剂	0.899		0.762

[0343] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*邓尼特T-检验的p值(成对比较)

[0344] 表19示出单个益生菌组和安慰剂组之间成对比较的95%置信区间和p-值的平均差异。与安慰剂相比,从基线到治疗期结束,包含益生菌的研究产品在HDL、LDL、TC或TG变化方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0345] 表19

[0346] ITT人群中从基线到治疗期结束的胆固醇和甘油三酯的变化:益生菌组与安慰剂组的成对比较(事后ANOVA:邓尼特t-检验)

	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)	
[0347]	HDL 变化 [mmol/L]		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.00 (-0.12; 0.11)	0.00 (-0.12; 0.11)
	p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000
	LDL 变化 [mmol/L]		
	平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.05 (-0.34; 0.23)	-0.08 (-0.37; 0.21)
	p-值 vs 安慰剂	0.972	0.888
TC 变化 [mmol/L]			
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.01 (-0.41; 0.43)	-0.01 (-0.43; 0.41)	
p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000	
TG 变化 [mmol/L]			
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.17 (-0.62; 0.28)	-0.03 (-0.48; 0.42)	
p-值 vs 安慰剂	0.762	0.999	

[0348] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0349] 表20示出单个益生菌组和安慰剂组之间成对比较的95%置信区间和p-值的平均差异。与安慰剂相比,从基线到治疗期结束,包含益生菌的研究产品在HDL、LDL、TC或TG相对变化方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0350] 表20

[0351] ITT人群中从基线到治疗期结束的胆固醇和甘油三酯的相对变化:益生菌组与安慰剂组的成对比较(事后ANOVA:邓尼特t-检验)

	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)
HDL 相对变化 [%]		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-0.56 (-7.87; 6.76)	-0.58 (-7.89; 6.74)
p-值 vs 安慰剂	0.999	0.999
LDL 相对变化 [%]		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-2.45 (-12.19; 7.30)	-4.37 (-14.12; 8.62)
p-值 vs 安慰剂	0.926	0.632
TC 相对变化 [%]		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	0.87 (-6.37; 8.11)	-0.40 (-7.64; 6.84)
p-值 vs 安慰剂	0.995	1.000
TG 相对变化 [%]		
平均差异 vs 安慰剂 (95% CI)	-5.70 (-35.29; 23.89)	6.40 (-23.18; 35.99)
p-值 vs 安慰剂	0.970	0.955

[0353] N*=ITT人群中包括的参与者人数,*邓尼特T-检验的p值(成对比较)

[0354] 表21显示了参与者日记1中报告至少一天出现临床相关感染的人数比例。表22显示了临床相关感染天数的描述性统计数据以及克鲁斯卡尔-沃利斯检验(p*-值)和使用Holm校正的曼-惠特尼(Mann-Whitney)U检验(p-值)的结果。

[0355] 表21

[0356] 参与者日记1中报告的临床相关感染患者比例(N=123)

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

[0357] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0360] 表22

[0361] 参与者日记1中报告的临床相关感染的天数(N=123)

	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)	安慰剂 (N* = 24)
[0362] 胃肠道感染 (p* = 0.081)	25	25	24
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.1 (0.4): 0 - 2
P-值 vs 安慰剂	0.434	0.434	/
[0362] 呼吸道感染 (p* = 0.212)	25	25	24
平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.6): 0 - 3	0.6 (2.2): 0 - 11	1.2 (2.4): 0 - 8
p-值 vs 安慰剂	0.142	0.236	/
泌尿道感染 (p* = 0.754)	25	25	24
平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.6): 0 - 3	0.2 (0.6): 0 - 2	0.2 (0.8): 0 - 4
p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000	/

[0363] 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。

[0364] 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。

[0365] 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。

[0366] 表23显示了参与者日记2中报告至少一天出现胃肠道感染的个体症状的人数比例。表24显示了患有胃肠道感染症状的天数的描述性统计数据以及克鲁斯卡尔-沃利斯检验(p*-值)和使用Holm校正的曼-惠特尼U检验(p-值)的结果。

[0367] 表23

[0368] 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)	益生菌混合物 (N* = 25)	安慰剂 (N* = 24)
[0369] 食欲不振 (%)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
腹泻 (%)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
便秘 (%)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	3/23 (13.0)
呕吐 (%)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)
气体 (%)	0/24 (0.0)	2/25 (8.0)	2/23 (8.7)
肠鸣音 (%)	0/24 (0.0)	0/25 (0.0)	0/23 (0.0)
痉挛/胃痛(%)	1/24 (4.2)	1/25 (4.0)	2/23 (8.7)
腹胀 (%)	1/24 (4.2)	0/25 (0.0)	1/23 (4.3)

[0370] N*=ITT人群中包括的参与者人数

[0371] 表24

[0372] 参与者日记2中报告的胃肠道感染症状的天数 (N=118)。

	凝结芽孢杆菌 (N* = 25)	益生菌混合物 (N* = 25)	安慰剂 (N* = 24)
食欲不振(p* = 0.389)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (0.2): 0 - 1
p-值 vs 安慰剂	0.921	1.000	/
腹泻 (p* = 0.705)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (0.2): 0 - 1
p-值 vs 安慰剂	0.921	1.000	/
[0373] 便秘 (p* = 0.013)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.4 (1.5): 0 - 7
p-值 vs 安慰剂	0.212	0.260	/
呕吐 (p* = 0.389)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (0.2): 0 - 1
p-值 vs 安慰剂	0.921	1.000	/
气体 (p* = 0.660)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.1 (0.3): 0 - 1	0.3 (1.3): 0 - 6
p-值 vs 安慰剂	0.577	0.863	/
肠鸣音(p* = 1.000)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0	0.0 (NC): 0 - 0
p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000	/
痉挛/胃痛 (p* = 0.705)	24	25	23
[0374] 平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.6): 0 - 3	0.0 (0.2): 0 - 1	0.2 (0.9): 0 - 4
p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000	/
腹胀 (p* = 0.718)	24	25	23
平均 (SD): 最小 - 最大	0.1 (0.6): 0 - 3	0.0 (NC): 0 - 0	0.6 (2.7): 0 - 13
p-值 vs 安慰剂	1.000	1.000	/

[0375] 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。

[0376] 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均没有参与者报告该症状。然而, 进一步的分析 (经Ho1m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。

[0377] 疗效结果:治疗期

[0378] 在基线时,各治疗组参与者的胃肠道健康没有检测到显著差异。参与者被随机分配到5个治疗组,因此这样的结果是预期的。

[0379] 与基线得分相比,在治疗期结束时,肠-脑轴问卷中的项目得分较低,这意味着在治疗期结束时,参与者受这些症状的困扰变少。包括安慰剂组在内的所有治疗组均可观察到这种情况。

[0380] 治疗组的肠-脑轴项目评分变化(治疗结束时减去基线)没有检测到显著差异。与安慰剂组相比,包含益生菌的研究产品在肠-脑轴得分变化方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0381] 治疗组之间的肠-脑轴项目评分改善没有检测到显著差异。与安慰剂组相比,包含益生菌的研究产品在肠-脑轴得分改善方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0382] 治疗组之间的肠-脑轴问卷的所有项目得分总和没有检测到显著差异。与安慰剂相比,在基线或治疗期结束时,包含益生菌的研究产品的肠-脑轴项目得分的总和均没有表现出统计学上的显著差异。

[0383] 各治疗组之间的胆固醇和甘油三酯变化(从基线到治疗期结束的绝对和相对变化)没有检测到显著差异。与安慰剂相比,从基线到治疗期结束,包含益生菌的研究产品在HDL、LDL、TC或TG变化(绝对和相对)方面均没有表现出统计学上的显著差异。在PP人群中也观察到了相同的结果。

[0384] 在治疗期结束时,所有治疗组的细胞因子(TNF α 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 和IL6)水平均低于定量限(LOQ)。对于细胞因子IL13,报告了一些高于LOQ的值,但未观察到治疗组之间的统计学显著差异。

[0385] 在治疗期结束时,与基线值相比,在巨大芽孢杆菌组未检测到重金属(镉、铅、汞、铜、镍、锌和砷)水平的显著变化。在PP人群中也观察到了相同的结果。

[0386] 与安慰剂相比,包含益生菌的研究产品在出现胃肠道感染症状的天数方面均没有表现出统计学上的显著差异。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。

[0387] 与安慰剂相比,包含益生菌的研究产品在出现呼吸道感染症状的天数方面均没有表现出统计学上的显著差异。然而,各治疗组之间在流浓鼻涕的天数方面存在统计学上的显著差异($p^*=0.018$),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。

[0388] 然而,进一步的事后分析(成对比较vs安慰剂)并未示出任何显著差异。

[0389] 与安慰剂相比,包含益生菌的研究产品在出现泌尿感染症状的天数方面没有表现出统计学上的显著差异。

[0390] 在粪便规律方面,各治疗组之间未检测到统计学上的显著差异。

[0391] 在整个治疗期以及治疗期的第6周和第7周,对于粪便稠度,即便溏的比例在各组之间检测到显著差异。然而,进一步的事后分析(成对比较vs安慰剂)并未示出任何显著差异,这可能是由于样本量较小。益生菌混合物组的参与者便溏所有粪便中的比例最小。

[0392] 疗效结果:随访期

[0393] 各组间仅便秘天数检测到显著差异 ($P=0.013$)。然而,进一步的事后分析(成对比较vs安慰剂)并未示出任何显著差异,这可能是由于样本量较小。

[0394] 包含益生菌的研究产品在出现呼吸道感染症状的天数方面没有表现出统计学上的显著差异。

[0395] 包含益生菌的研究产品在出现泌尿道感染症状的天数方面均没有表现出统计学上的显著差异。

[0396] 在粪便规律和粪便稠度方面,各治疗组之间均未检测到显著差异。

[0397] 安全结果

[0398] 总共报告了17起AE(不良事件)。每个研究产品报告了1至5个ADE,最常见的是胃食管反流(3个AE)、皮疹(2个AE)和眩晕(2个AE)。没有报告SAE(严重不良事件)。

[0399] 因果关系评估显示,报告的AE与研究产品之间没有关系。

[0400] 总之,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,这是随机分组的所预期的。

[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-脑轴和粪便稠度方面显示出一些有利的趋势,然而,为了科学地证明所研究产品的功效,需要进行更大样本量的进一步研究,需要一个磨合期来确定每个参与者的基线粪便稠度,并使用有效的问卷来确定肠-脑轴领域。

[0405] 参考文献

[0406] 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

[0407] Afrilasari W, Widanami, 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.

[0408] Alippi, A. (1995). Detection of *Bacillus* larvae spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. *Microbiology SEM*, 11, 343-350.

[0409] 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.

[0410] 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

[0411] 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

[0412] 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

[0413] Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214-220. doi:10.1016/j.fm.2010.03.007

[0414] 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

[0415] 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

[0416] 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

[0417] Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, A., 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

[0418] 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

[0419] 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

[0420] 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.

- [0421] Gilliam,Martha,and Diane K.Valentine. (1976) "Bacteria Isolated from theIntestinal 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.
- [0422] 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
- [0423] 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
- [0424] 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
- [0425] Ivanovics,G.&Alfoldi,L. (1957) .Bacteriocinogenesis in Bacillus megaterium.J,gen.Microbiol.16,522
- [0426] 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
- [0427] 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
- [0428] 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
- [0429] 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
- [0430] 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
- [0431] 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

[0432] 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

[0433] 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

[0434] 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

[0435] 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

[0436] 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

[0437] 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

[0438] 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

[0439] 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

[0440] 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.

[0441] Pelletier,A.&Sygush,J(1990) .Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1.Appl Environ Microbiol 56,844-848

[0442] 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/CI 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

[0443] Rochí n-Medina, J.J., Ram í rez-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

[0444] 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>

[0445] Scholle MD, White CA, Kunnimalaiyaan M, Vary PS (2003) "Sequencing and Characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B 1551." *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 11, pp. 6888-6898., doi:10.1128/aem.69.11.6888-6898.2003.

[0446] 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/s 13197-017-2807-1

[0447] Snowdon, Jill A, and Dean O Cliver. (1996) "Microorganisms with Honey." *International Journal of Food Microbiology*.

[0448] 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).

[0449] 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

[0450] 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

[0451] 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

[0452] 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

[0453] 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.

[0454] 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

[0455] 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.

[0456] 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

[0457] 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.

[0458] 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。

[0459] 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±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±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。

[0460] 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。

[0461] 本文引用的所有参考文献均以其整体并入本文作为参考。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。

关于微生物保藏的说明

申请人或代理人档案号 PPI24171201GB	国际申请号 PCT/US2022/081195
--------------------------	-------------------------

关于微生物保藏的说明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

[0001]

微生物保藏的说明(1)	
A.对说明书第 <u>4</u> 页, 第 <u>17-25</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明	
B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/>	
保藏单位名称 <u>农业研究机构培养物保藏中心-NRRL</u>	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) <u>美国</u>	
保藏日期 <u>2023-02-27</u>	保藏号 <u>NRRL B-68256</u>
C.补充说明(必要时) 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>	
<u>凝结芽孢杆菌 CGI314(Bacillus coagulans CGI314)</u>	
D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的)	
<u>指定所有国家</u>	
E.补充说明(必要时)	
下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”)	

由受理局填写
本页已经和国际申请一起收到
授权官员

由国际局填写
国际局收到本页日期
授权官员

按进化支排列的芽孢杆菌属的物种的系统发生树 (16S)

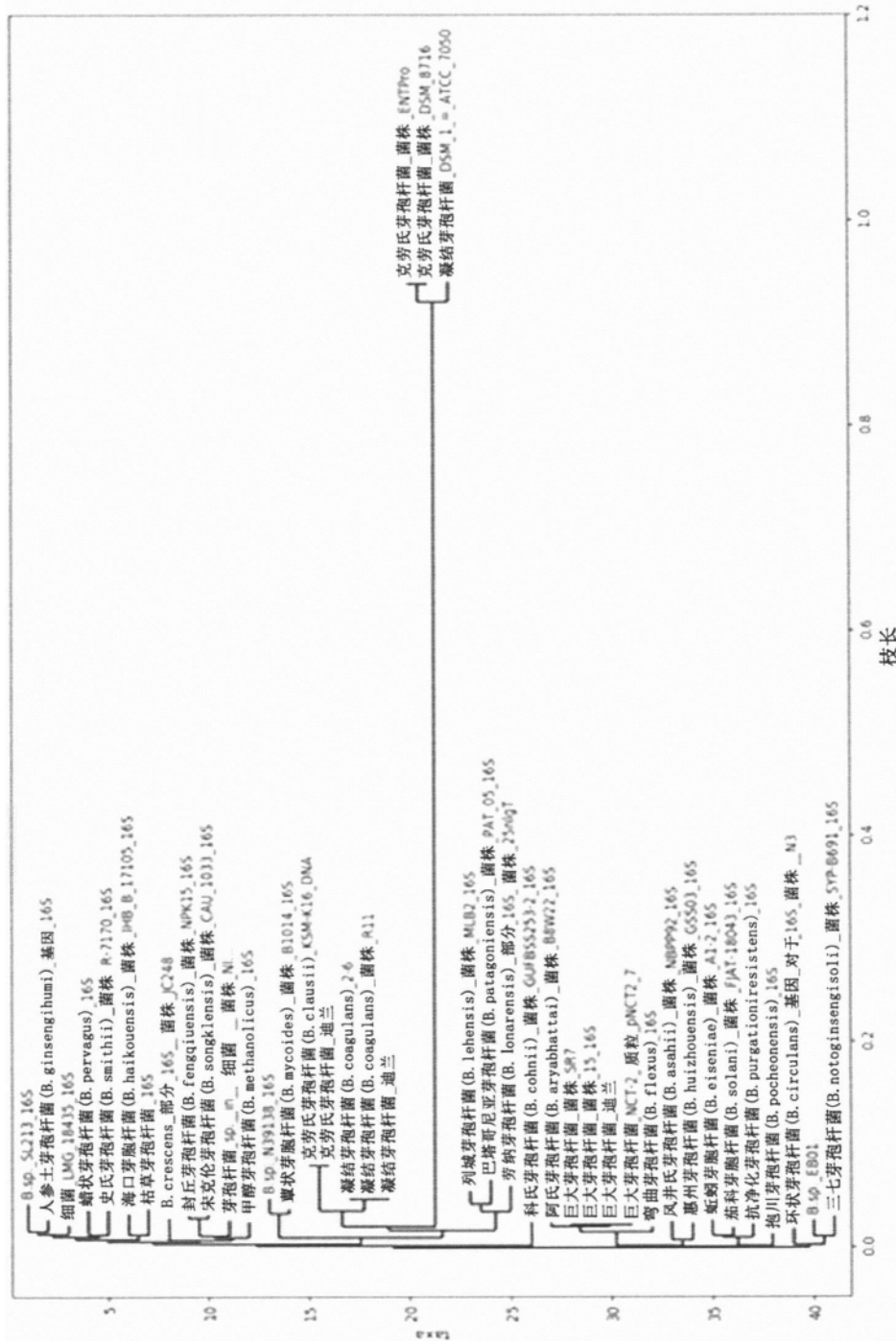


图1

按进化支排列的芽孢杆菌属的物种的系统发育树 (gyrB)

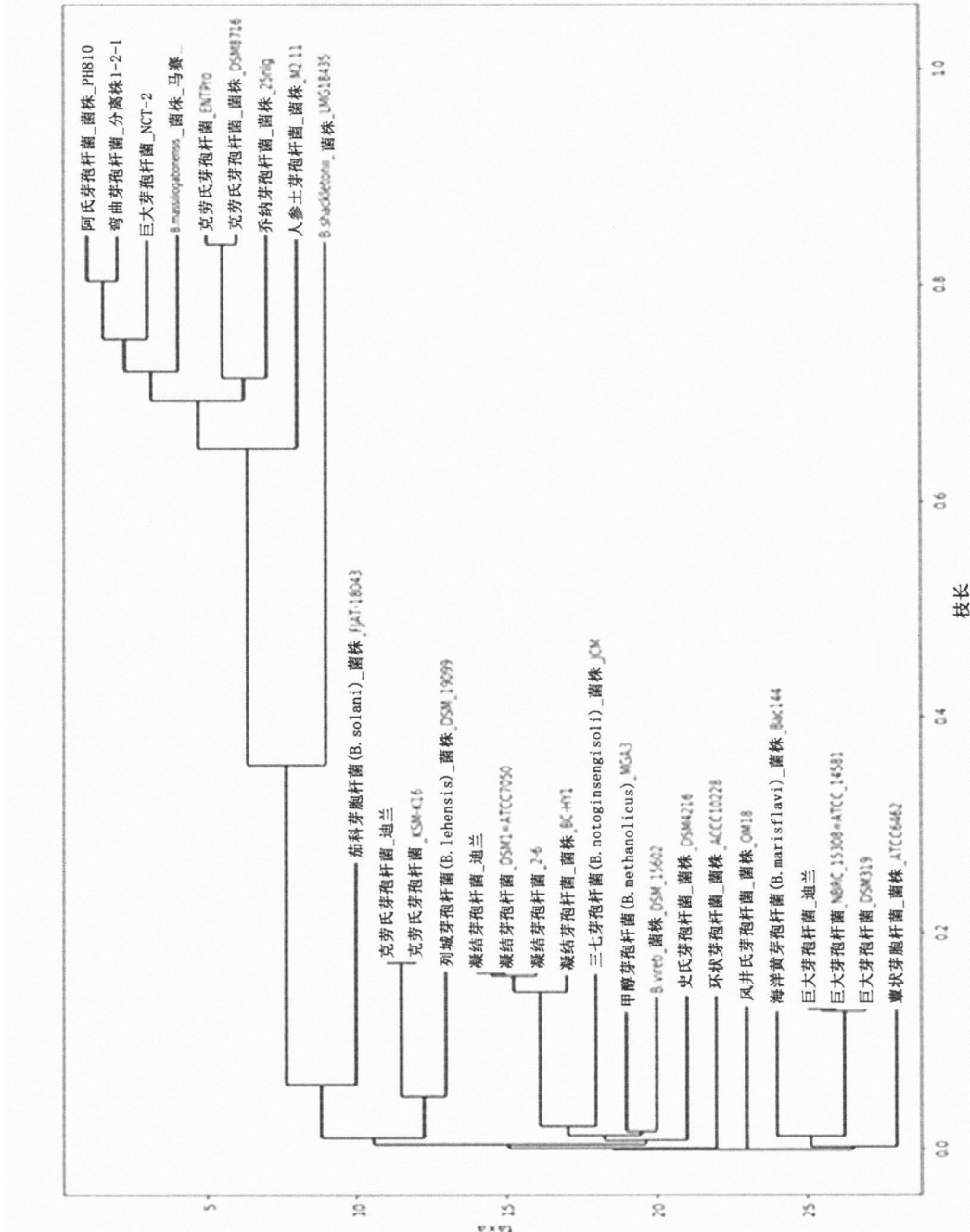


图2

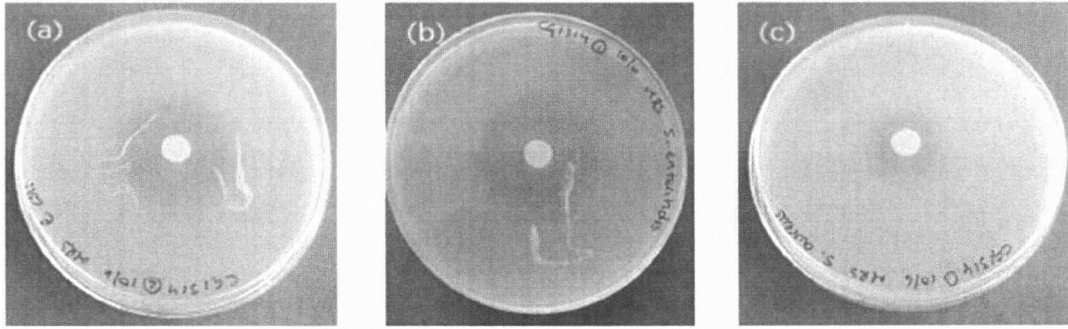


图3

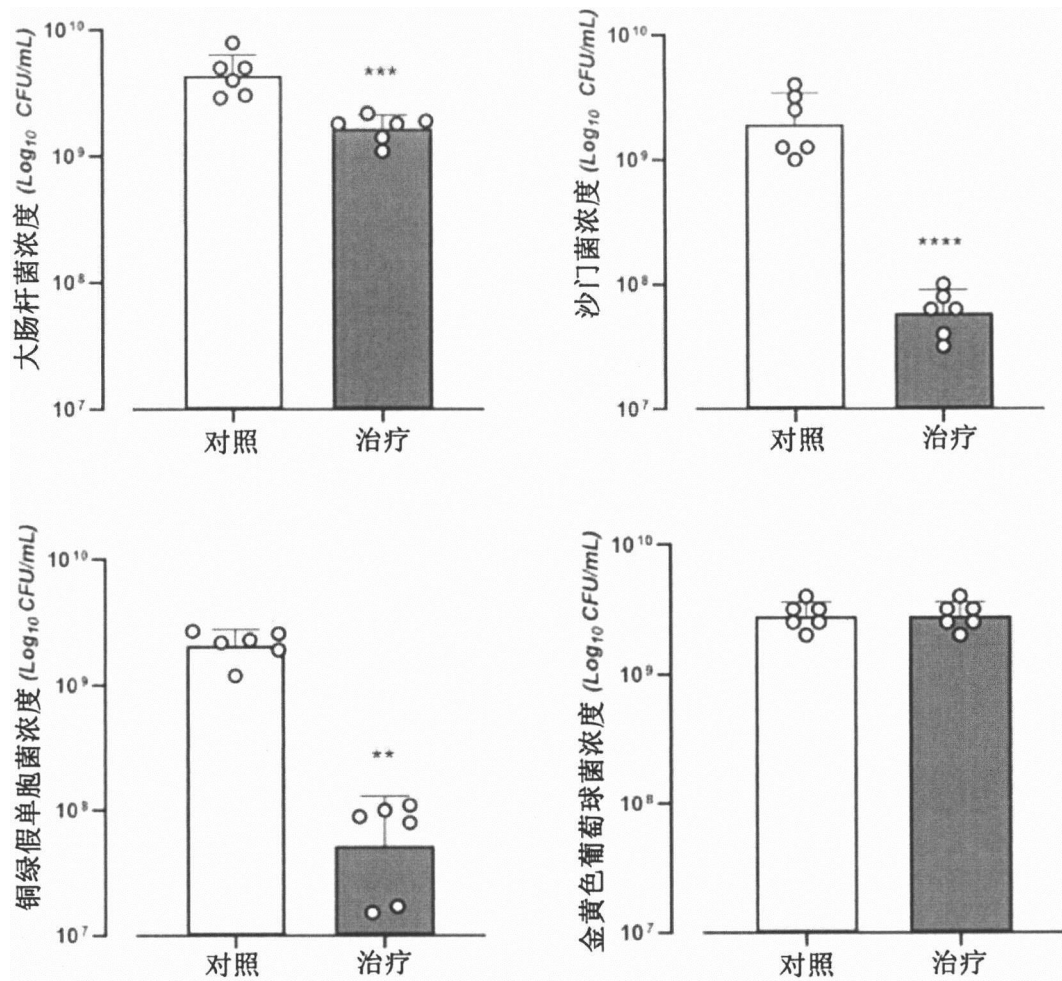


图4

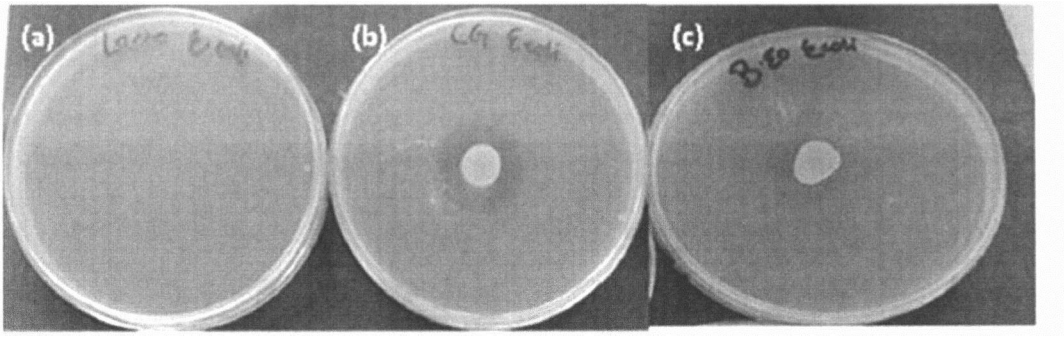


图5

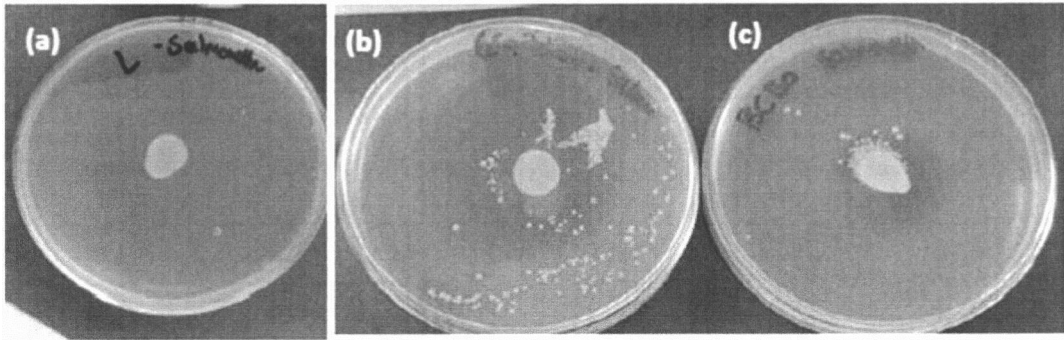


图6

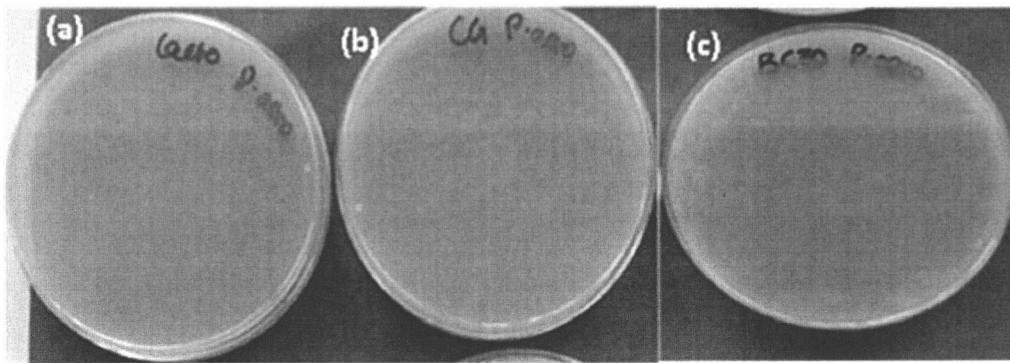


图7

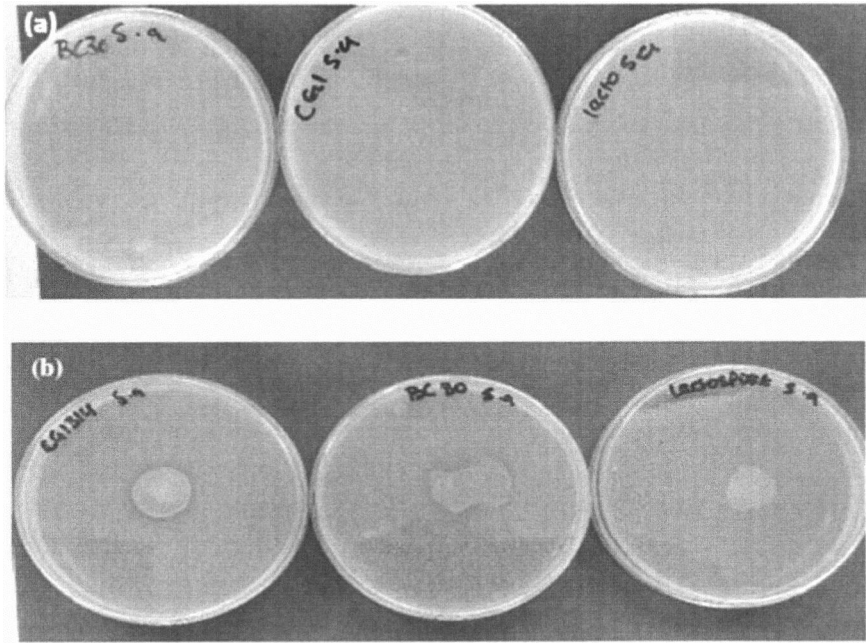


图8

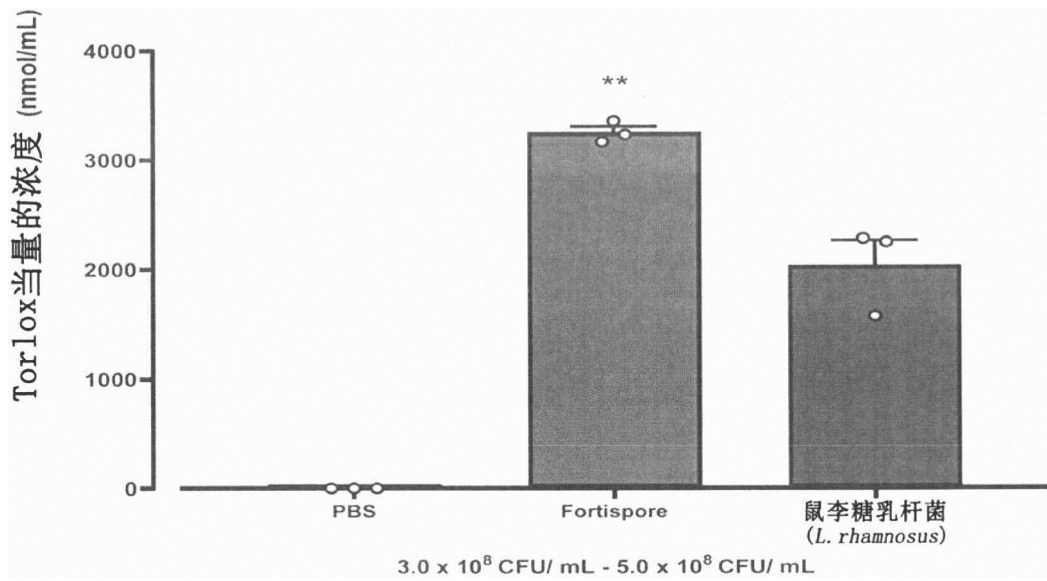


图9

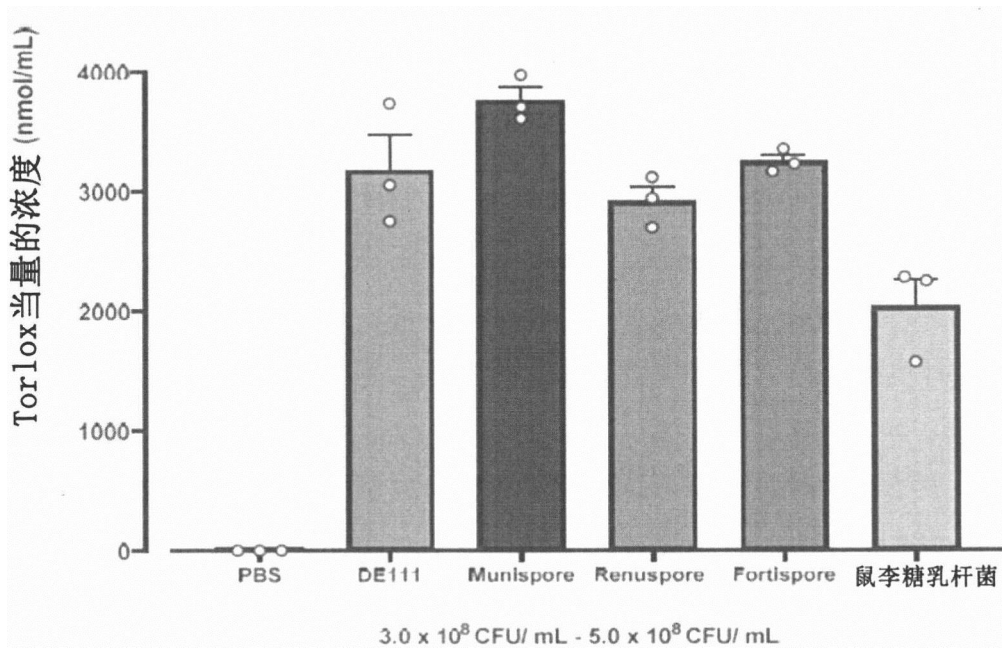


图10

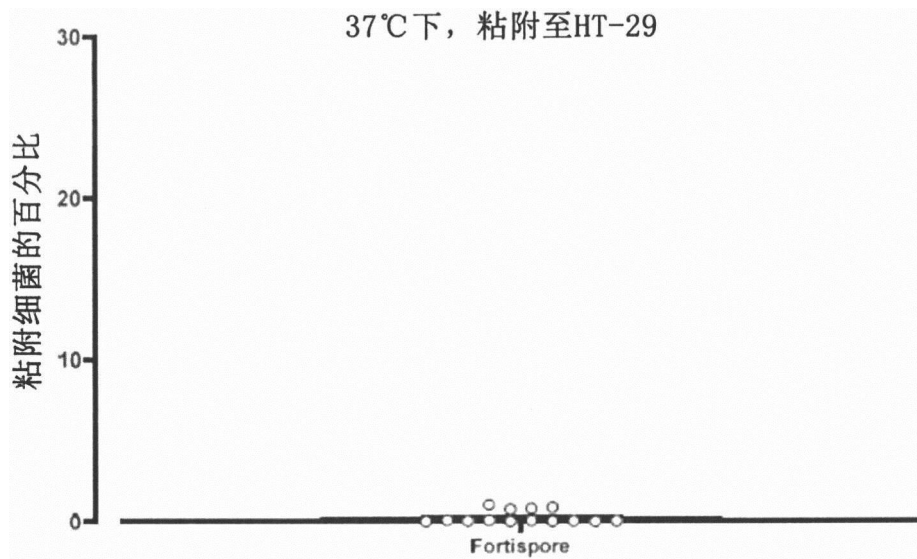


图11

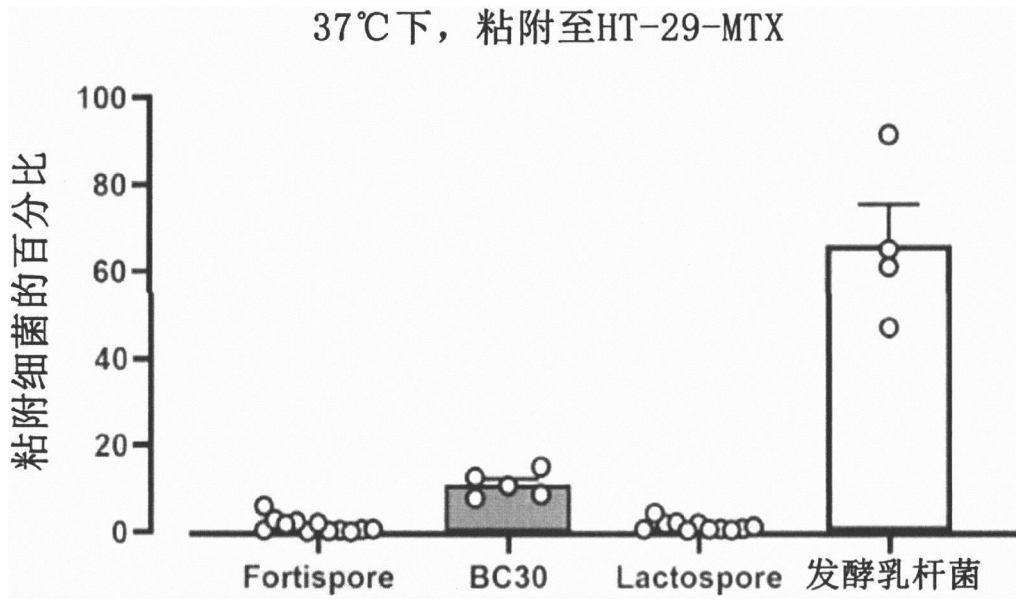


图14

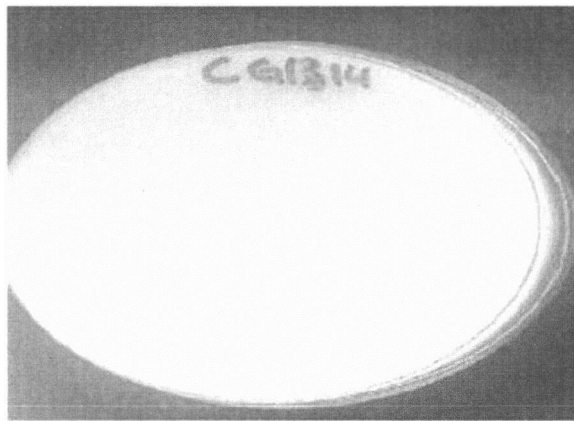


图15

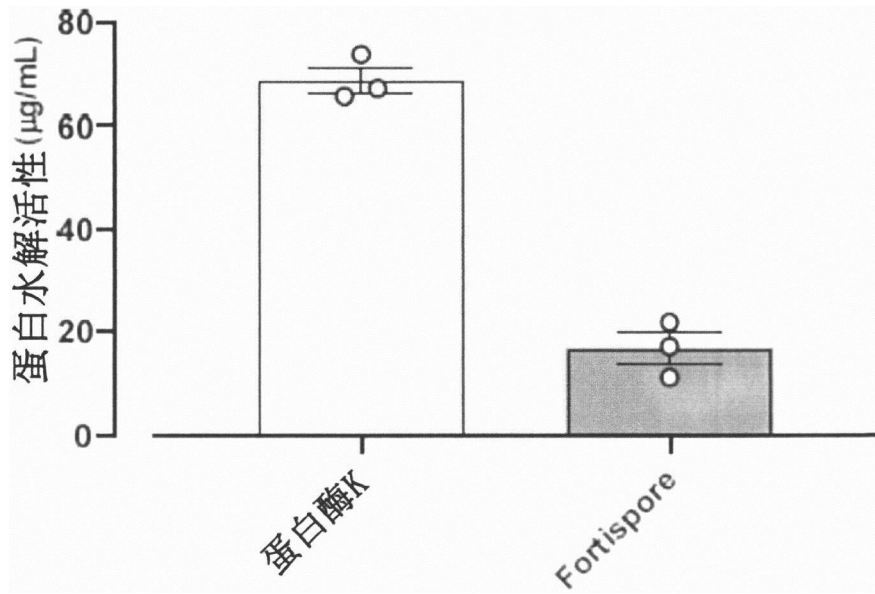


图16

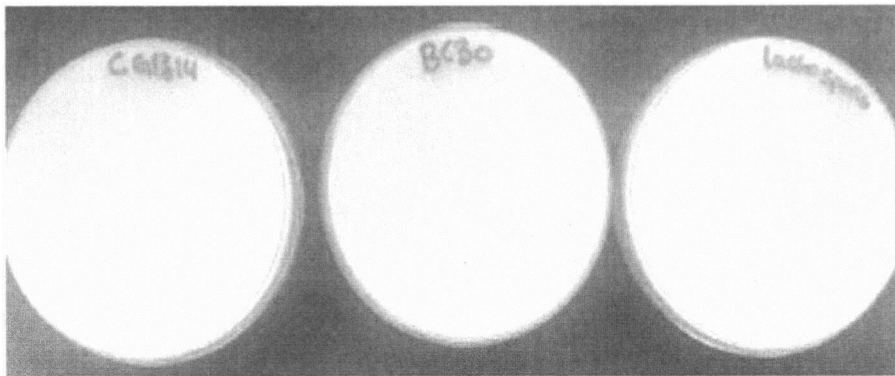


图17

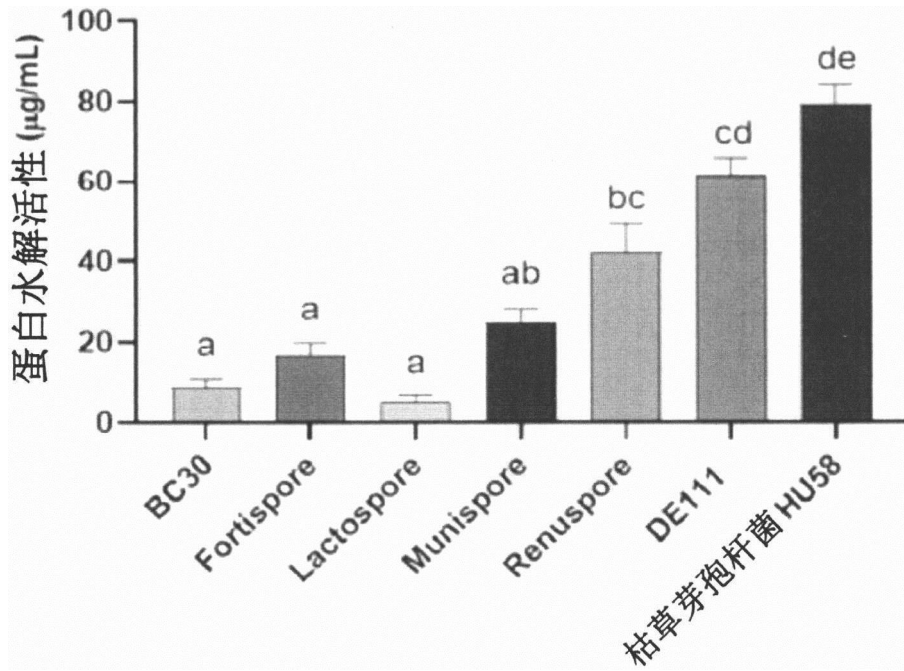


图18

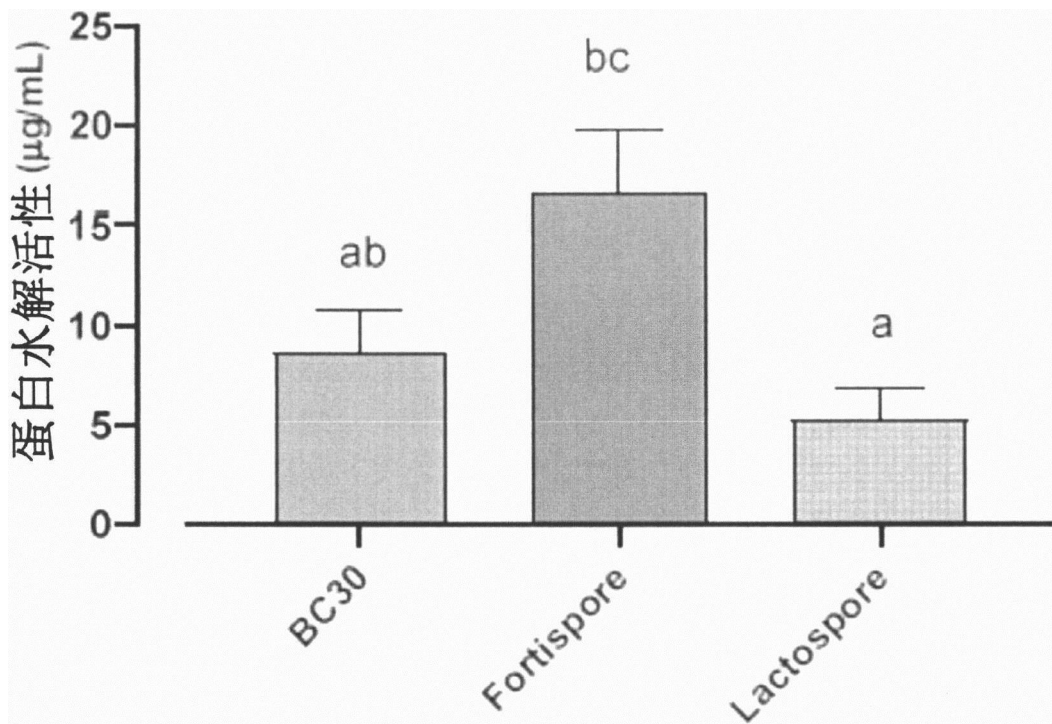


图19

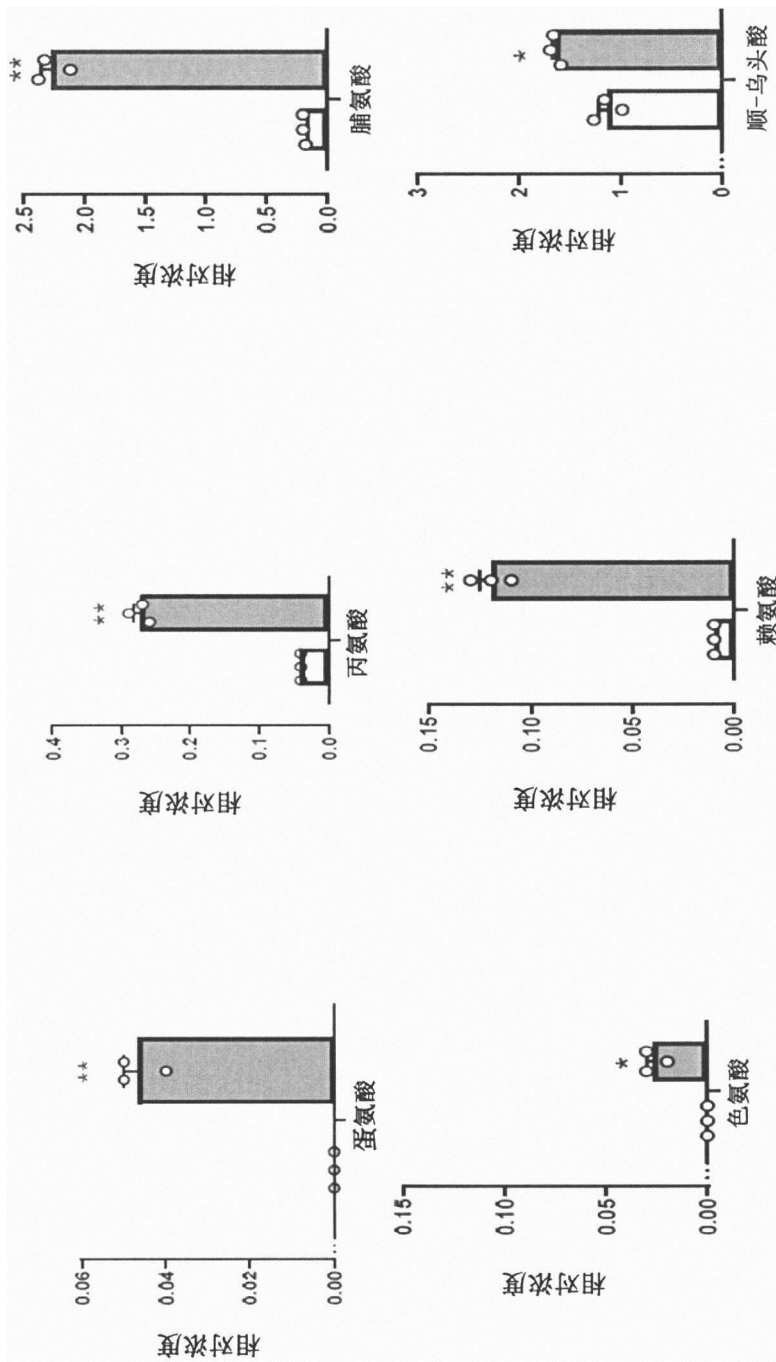


图20

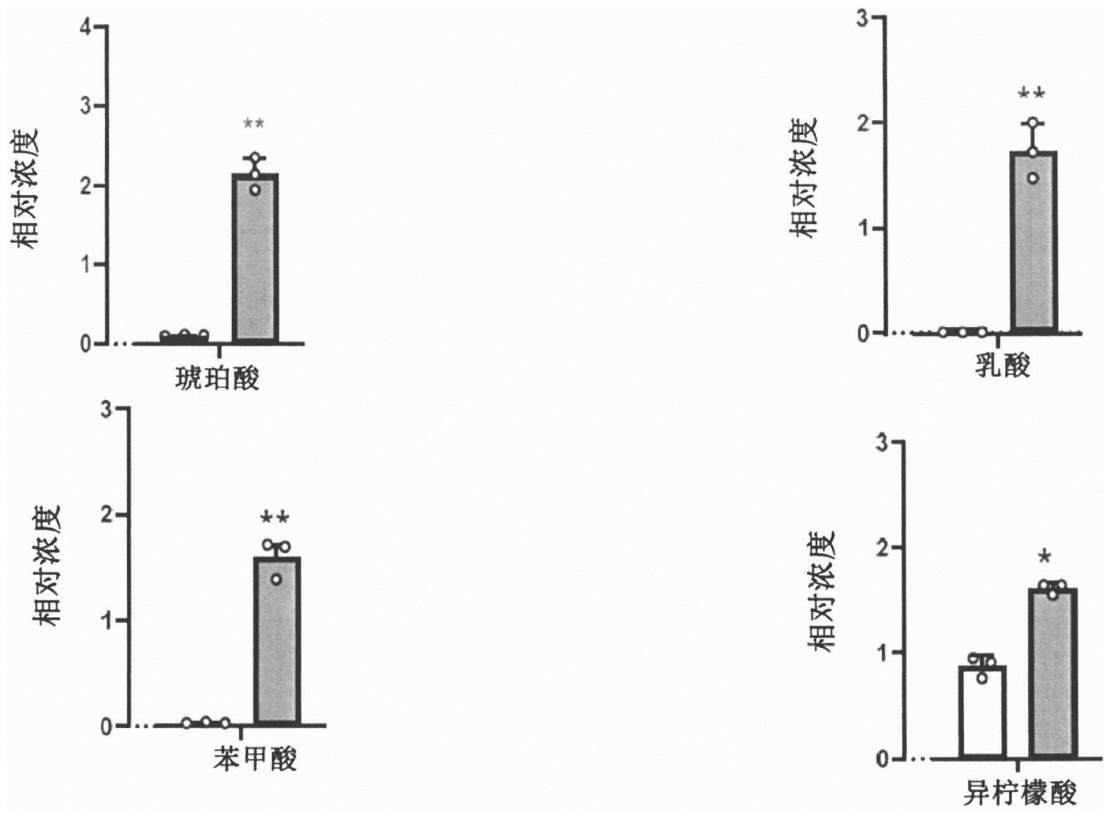


图21

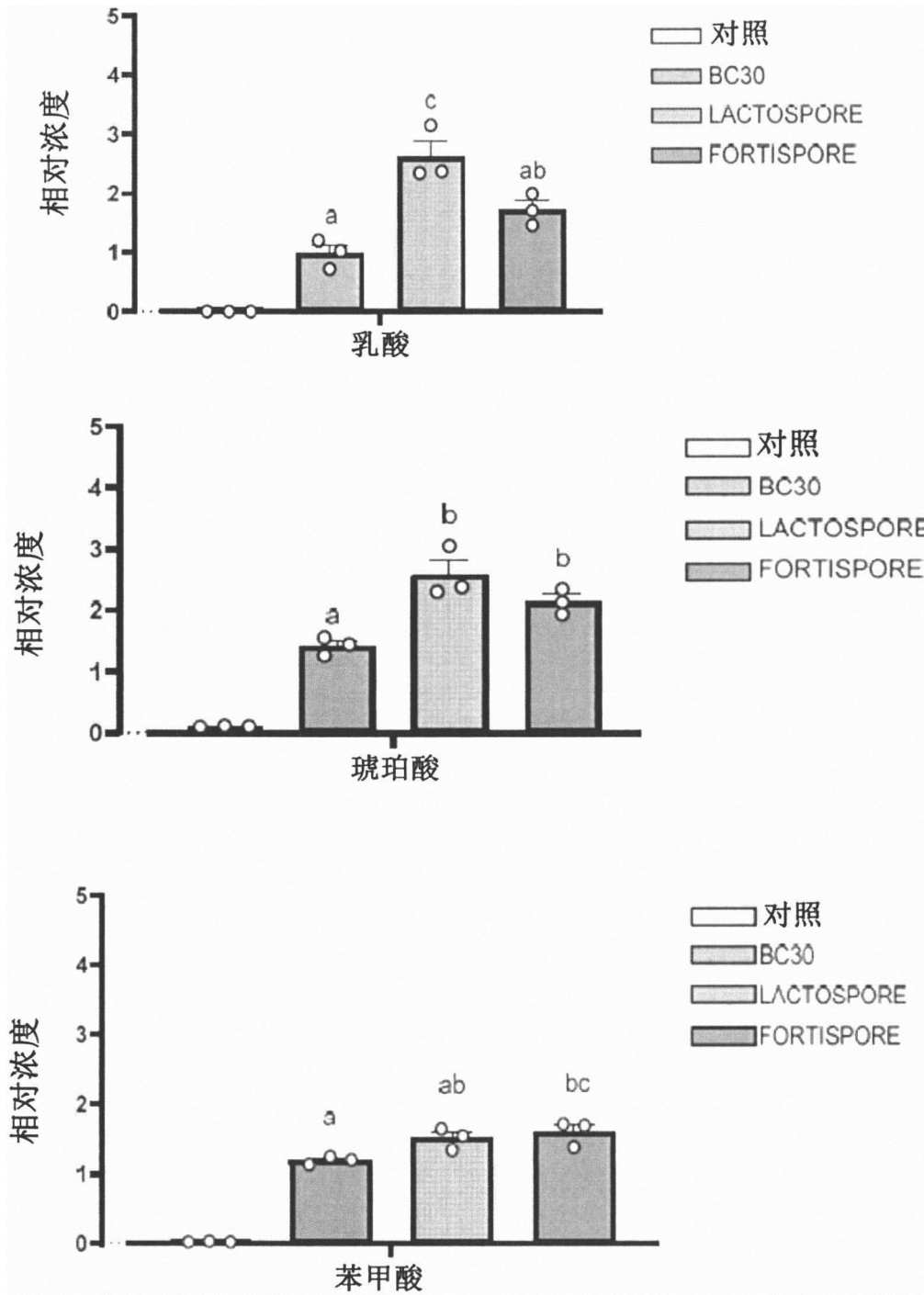


图22

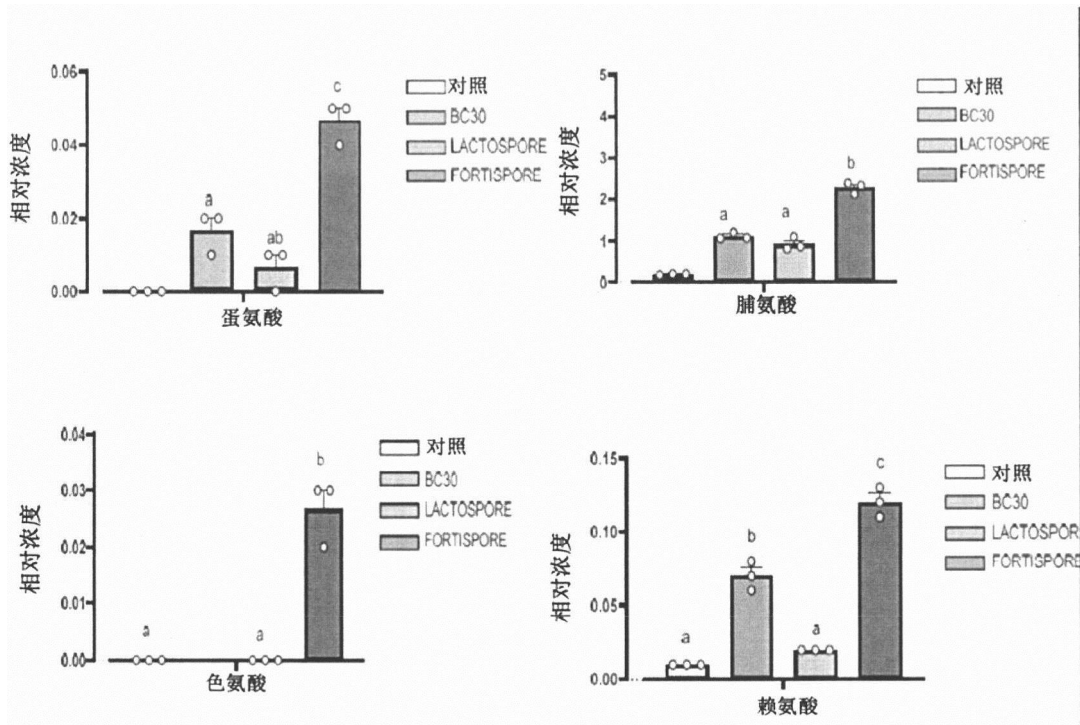


图23

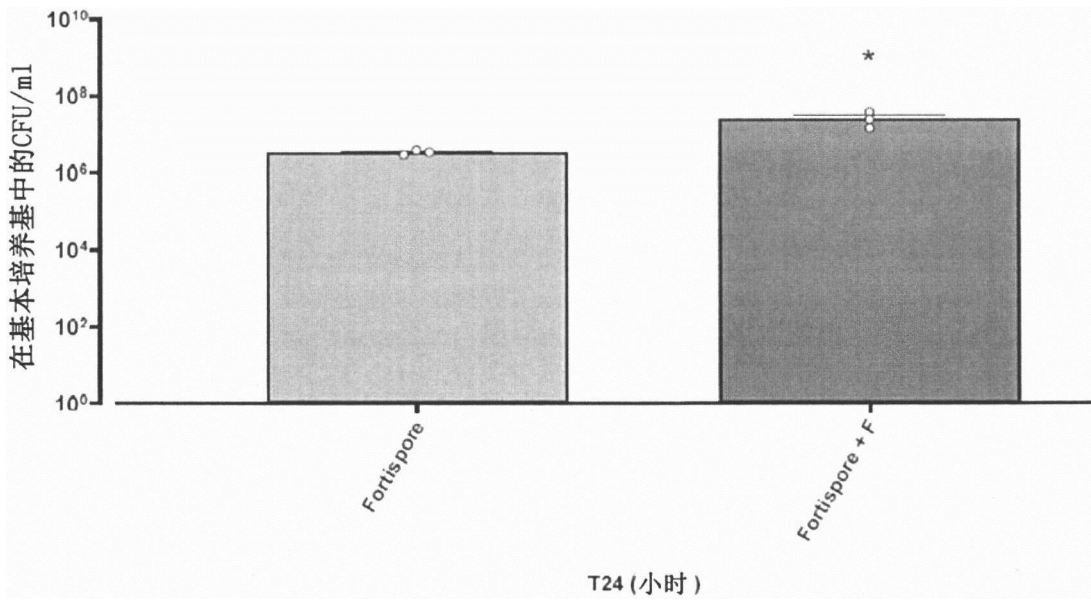


图24

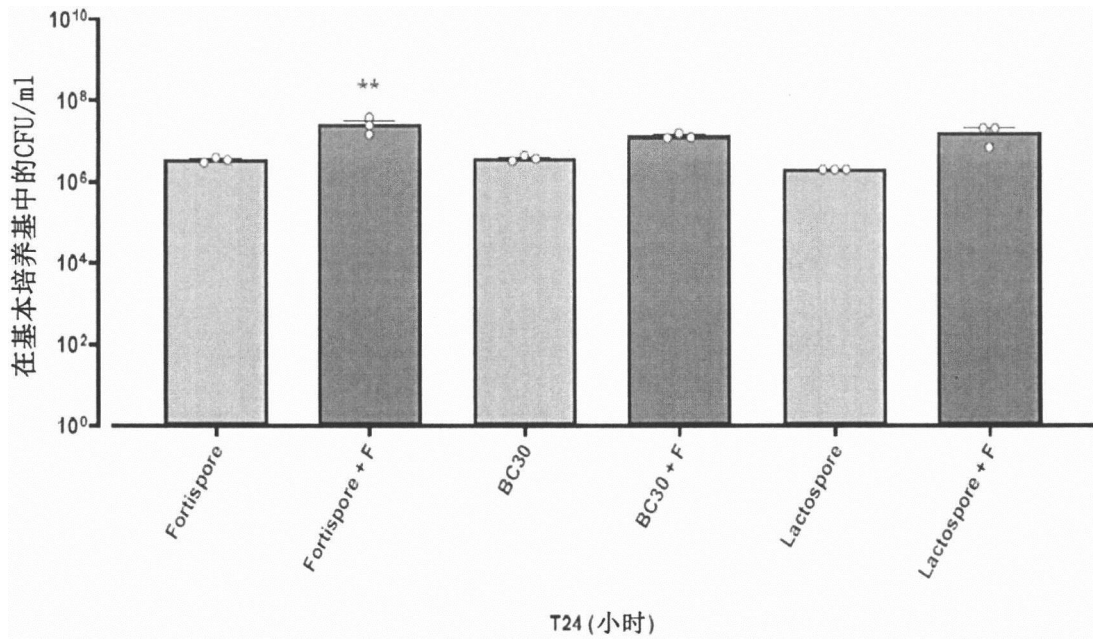


图25

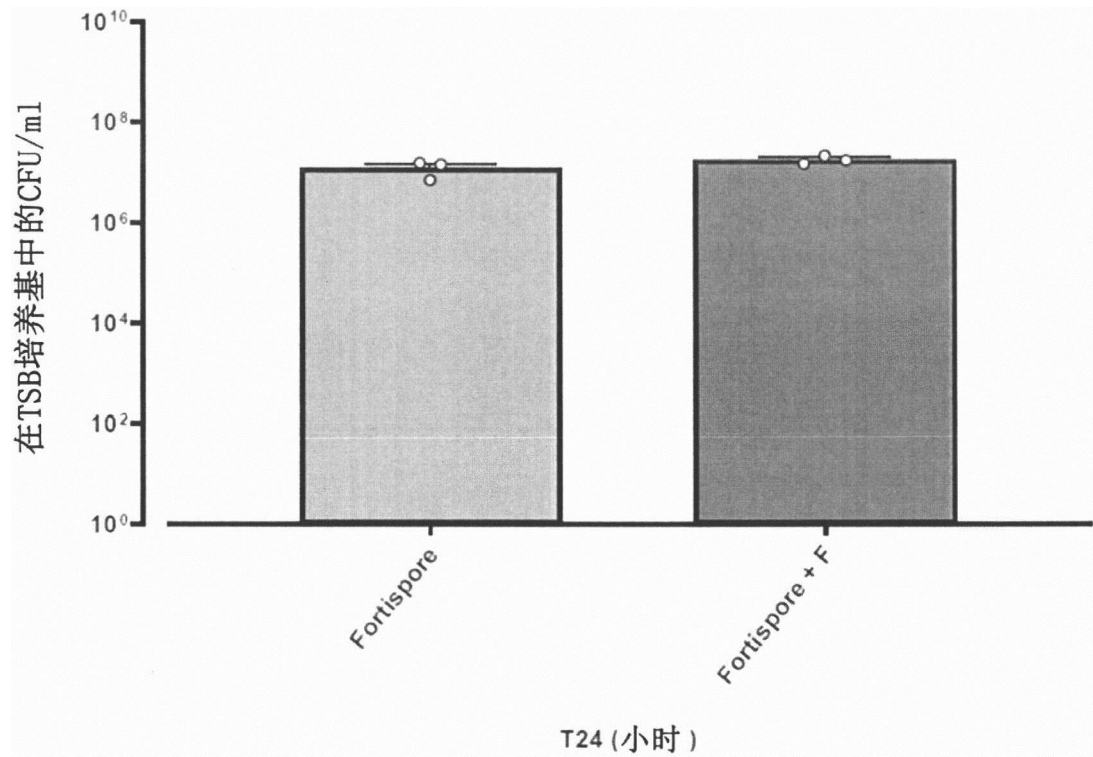


图26

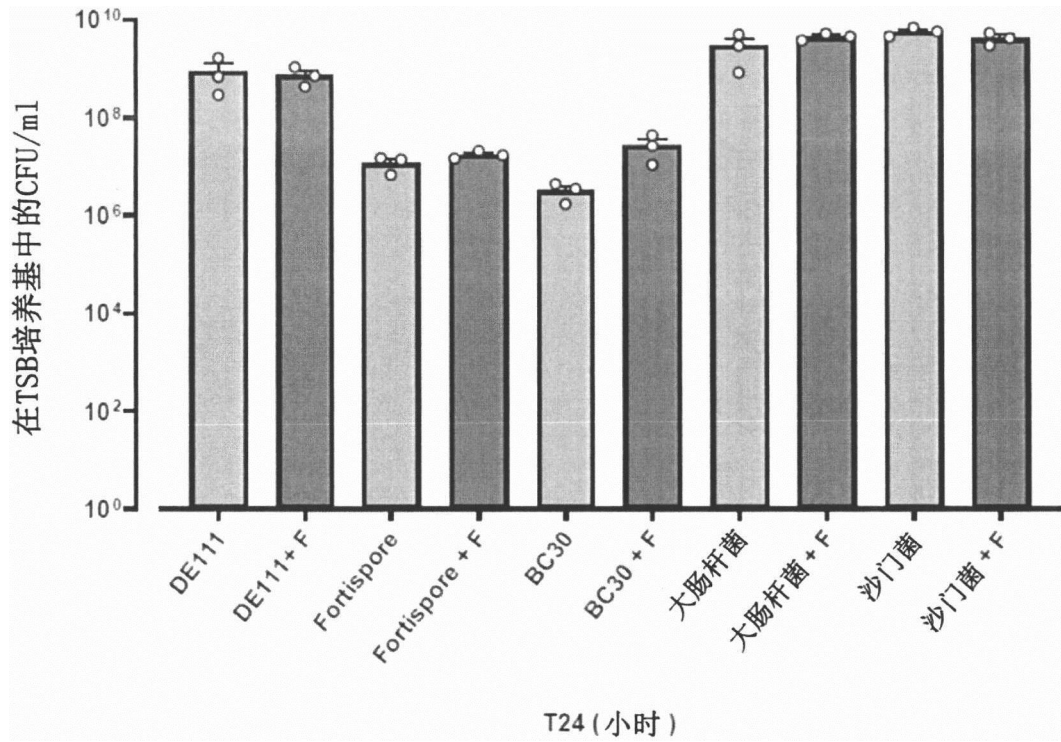


图27

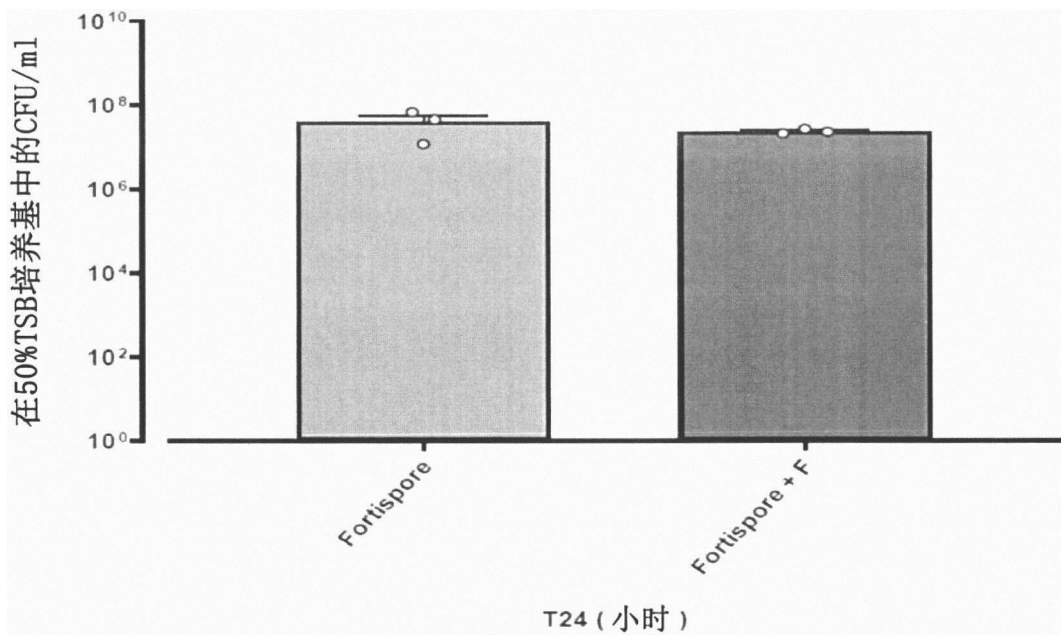


图28

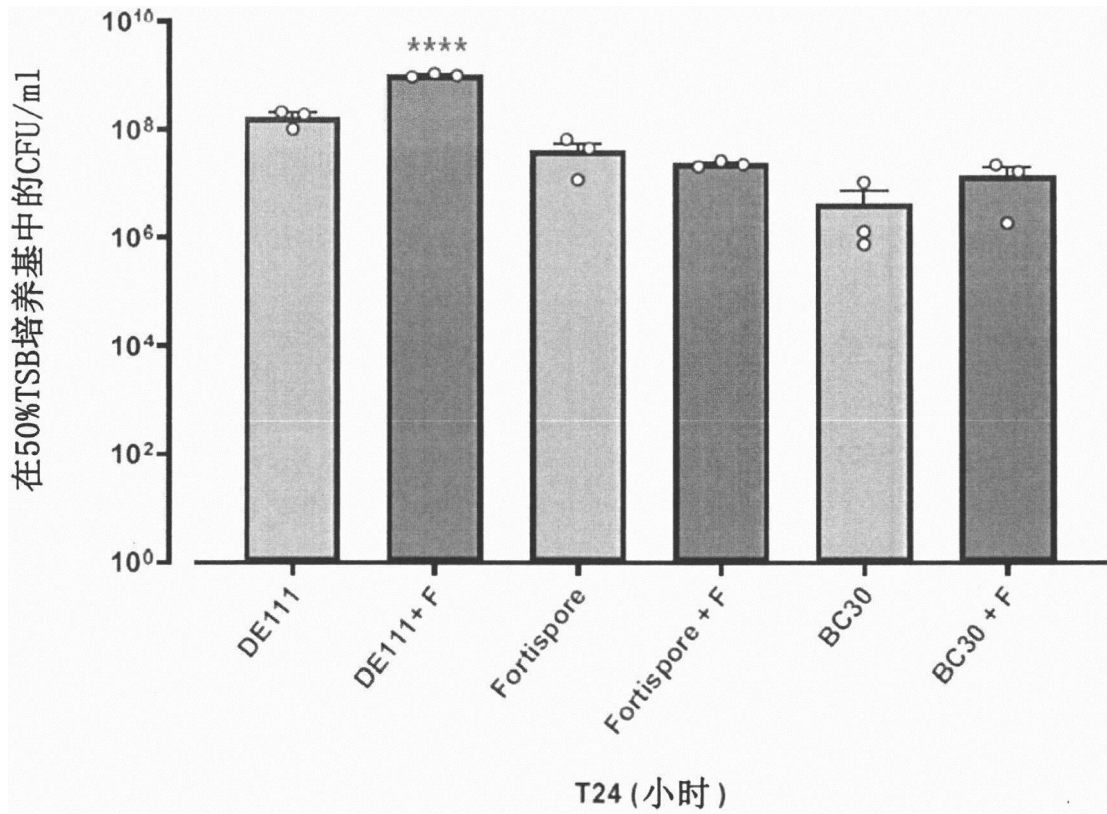


图29

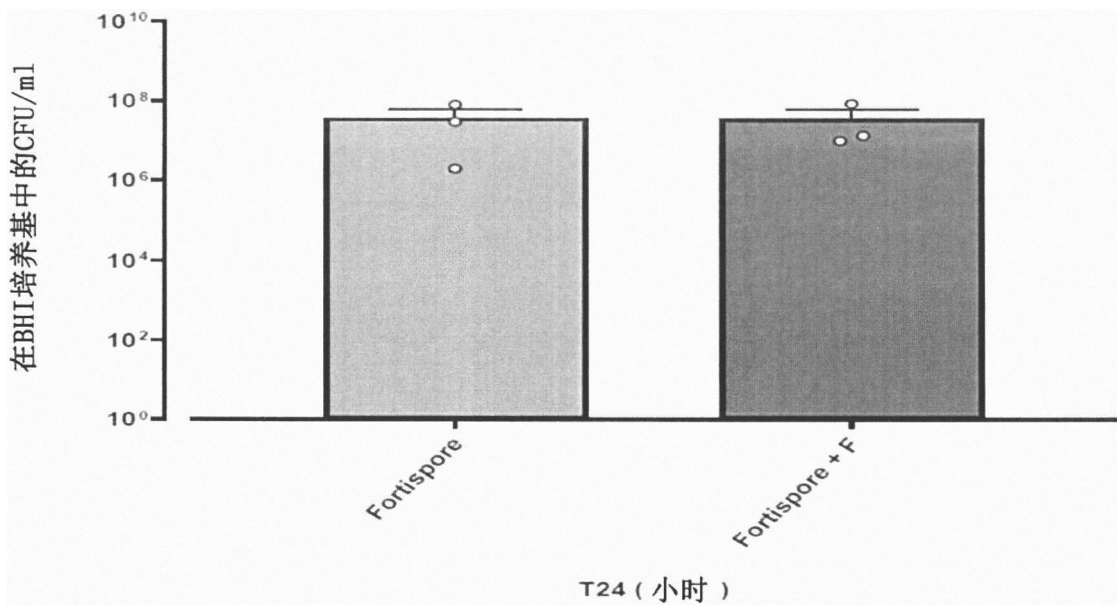


图30

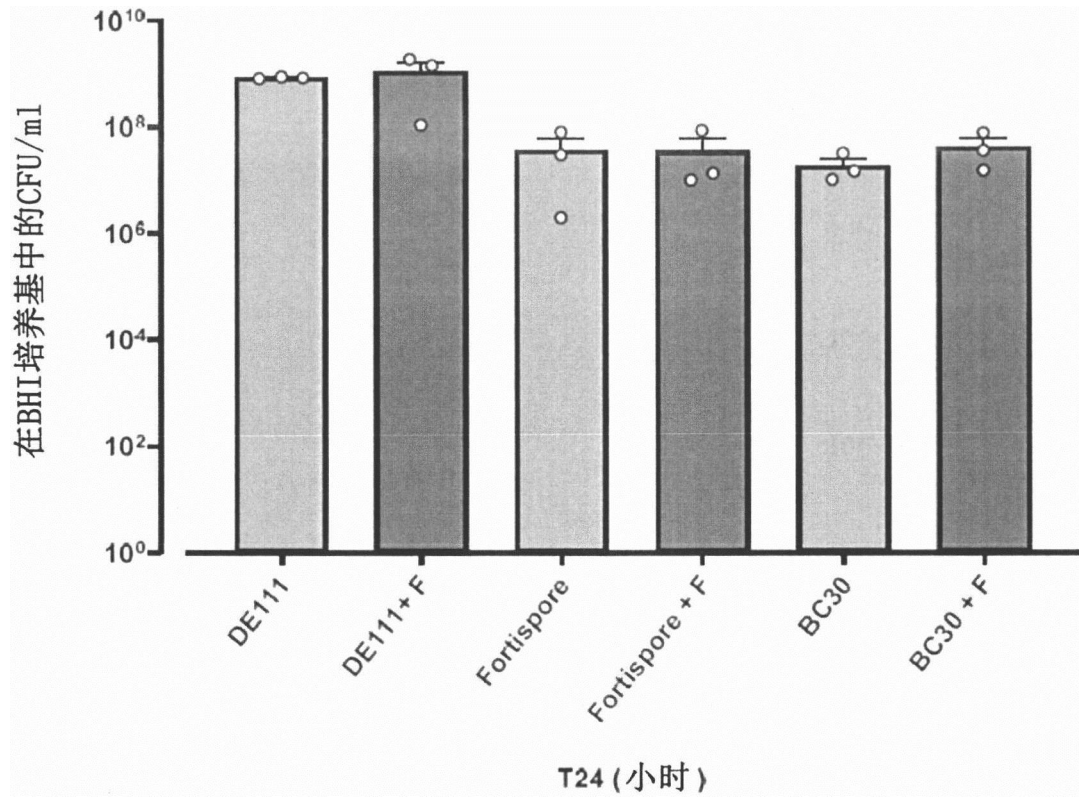


图31

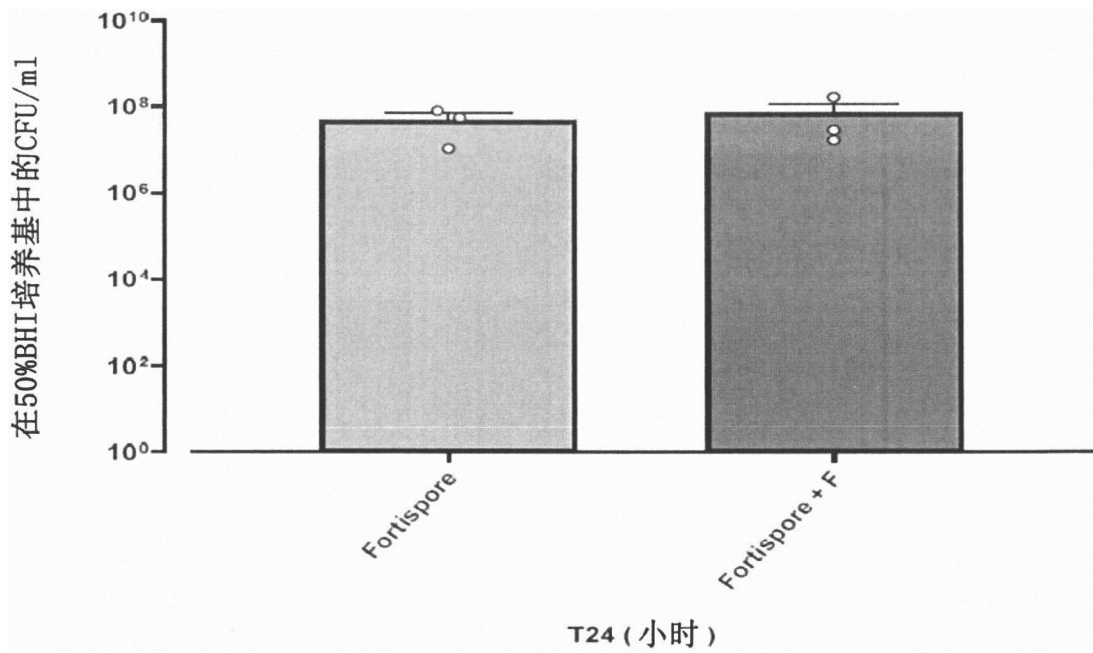


图32

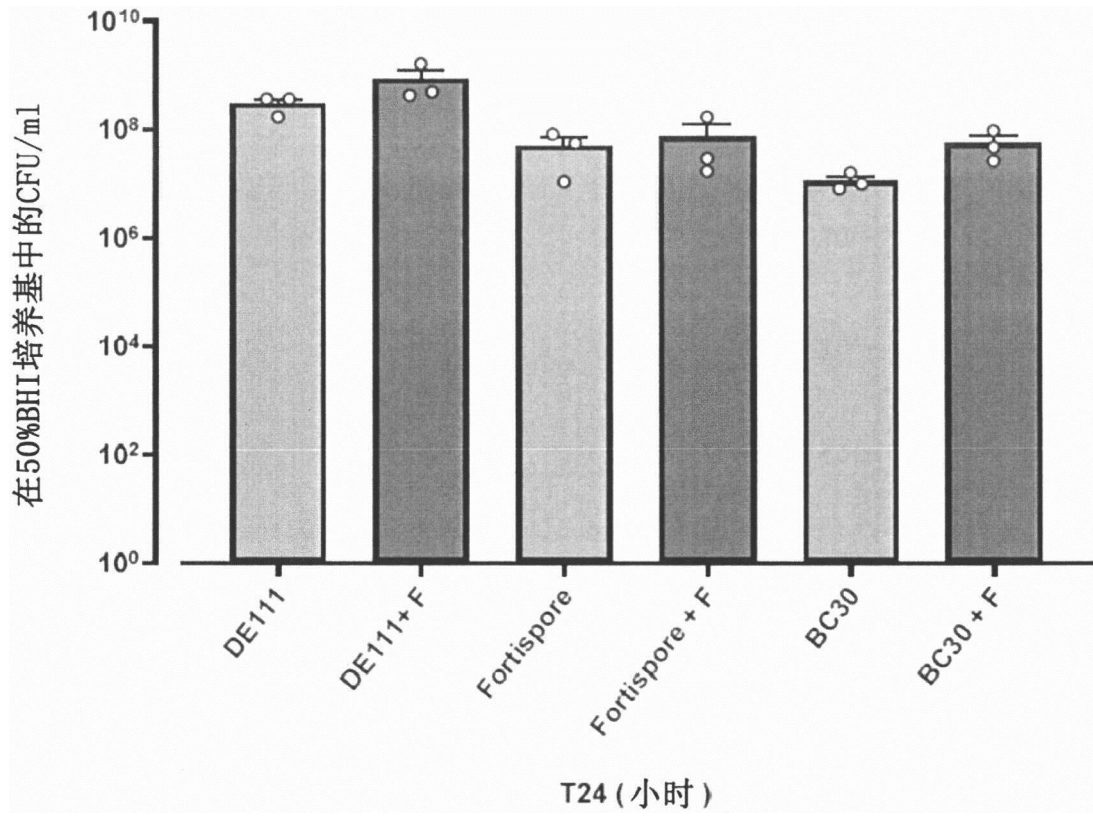


图33