



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111053789 A

(43)申请公布日 2020.04.24

(21)申请号 201911176703.9

A61P 37/02(2006.01)

(22)申请日 2019.11.26

A23L 33/00(2016.01)

(71)申请人 湖南营养树生物科技有限公司

地址 410000 湖南省长沙市高新开发区文  
轩路27号麓谷钰园B6栋101房

(72)发明人 肖宏 陈禧莹 杨涛 陈筠

(74)专利代理机构 合肥律众知识产权代理有限  
公司 34147

代理人 赵娟

(51)Int.Cl.

A61K 35/747(2015.01)

A61K 35/745(2015.01)

A61K 35/744(2015.01)

A61K 35/742(2015.01)

A61K 35/741(2015.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

调节免疫系统的方法和组合物

(57)摘要

本发明公开了调节免疫系统组合物,其制备方法包括以下步骤,S1:在培养基中培养微生物;其中微生物可以是乳酸杆菌,双歧杆菌,链球菌,芽孢杆菌,肠球菌,和克雷伯氏菌;S2:将所述微生物暴露于生物、化学或物理逆境下使微生物释放出应激产物到培养基中;S3:从所述培养基中除去微生物并将应激释放产物分离出来;S4:将所述应激释放产物使用过滤器滤分离,分离后,移除分子量超过10KDa的应激释放产物;得到小于10kDa的应激释放产物。调节免疫系统的方法,将有效剂量的0.5~10kDa的应激释放产物用于动物体上。

1. 调节免疫系统组合物,其特征在于:其制备方法包括以下步骤,

S1:在培养基中培养微生物;其中微生物可以是乳酸杆菌,双歧杆菌,链球菌,芽孢杆菌,肠球菌,和克雷伯氏菌;

S2:将所述微生物暴露于生物、化学或物理逆境下使微生物释放出应激产物到培养基中;

S3:从所述培养基中除去微生物并将应激释放产物分离出来;

S4:将所述应激释放产物使用过滤器滤分离,分离后,移除分子量超过10KDa的应激释放产物;得到小于10kDa的应激释放产物。

2. 根据权利要求1所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述S2中施以逆境步骤可以是以下方式的一种或多种的组合,

a、通过离心将微生物从培养基中分离出来,再将微生物重新置入非营养性的等渗溶液中;

b、加入抗生素制备敏感微生物;

c、在培养基中添加额外的微生物;

d、减少培养基的体积;

e、从培养基中去除营养物质;

f、改变培养基的pH值。

3. 根据权利要求2所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述非营养性等渗溶液包含0.9%氯化钠。

4. 根据权利要求2所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述非营养性等渗溶液是pH7.5 之为0.1M磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述微生物的菌体浓度为 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ CFU每毫升。

6. 根据权利要求1所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述微生物选用野外微生物。

7. 根据权利要求1所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述培养基中的pH值为7.5。

8. 根据权利要求1所述的调节免疫系统组合物,其特征在于:所述培养基中的培养温度为 $40 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

9. 调节免疫系统的方法,其特征在于:将小于10KDa的应激释放产物有效剂量的应激释放产物用于动物体上;在动物体中调节免疫应答包括:

a、通过激活巨噬细胞来刺激免疫反应,释放免疫刺激白细胞介素 IL-1,IL-6 和 TNF;

b、下调巨噬细胞的 CD-14 受体防止内毒素过度刺激导致 IL-1,IL-6 和 TNF 的过度产生及全身性相关炎症,心血管功能障碍,休克和死亡;

c、下调巨噬细胞的 CD-16 受体防止 IL-10 过度刺激导致终结巨噬细胞转化为细胞毒性表型,且具有过度破坏宿主细胞的可能性。

## 调节免疫系统的方法和组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于调节动物或人的免疫反应的方法和组合物;更特别地是本发明涉及通过给予由乳酸菌产生的应激反应因子(stress response factors;SRFs)来调控动物或人的免疫反应起到激活和调节循环巨噬细胞的作用。

### 背景技术

[0002] 研究发现乳酸菌因外界环境变化时会引起应激反应释放聚合物核酸,蛋白质和肽聚糖及其水解产物;而这些应激产物可以提高微生物因环境变化时的活性及存活率;因此,我们将这些应激产物添加到乳酸菌的储存环境中可以提高存活率之商业应用价值,同时这些应激产物由动物或人类的嘴巴、鼻子、口腔、肠道、甚至阴道等乳酸菌存在的地方释放出来时还能提升这些乳酸菌宿主的免疫系统;诱导的应激反应产物释放对于共生细菌是常见的,例如过度拥挤,营养缺乏和接触抗生素;研究发现这些应激低聚物其分子量 $< 10\text{kDa}$ 时,特别是在 $500\sim 3000\text{Da}$ 之间最容易被吸收,无毒性,并且都具有调节免疫系统的活性;巨噬细胞可以被活化而释放细胞因子,细胞因子的水平被认为是有助于对抗感染和下调因感染后过度激活免疫系统所产生细胞毒素的水平,而防止血管穿孔。

[0003] 当微生物试图侵入无菌组织时(例如从外耳到内耳,鼻子到鼻窦,阴道到子宫),遇到营养缺乏时会释放应激低聚物用于提醒宿主注意潜在病原菌渗透到无菌区域或无菌组织;作为哨兵细胞,巨噬细胞在血液和淋巴液中循环以及驻留在特定的内皮细胞,组织和器官中;他们是宿主的第一线防线,释放白细胞介素信号和破坏存在宿主的微生物和患病细胞。当免疫系统受到刺激时,二十个不同白细胞介素可以通过接收细胞释放,修饰,放大,限制和抑制信息。因此,巨噬细胞的信号对于启动和进行适当的免疫反应非常的关键。

[0004] 在感染过程中,细菌内毒素(脂多糖LPS),与巨噬细胞CD-14表面受体结合,上调和诱导释放更高水平的IL-1,IL-6和TNF;而这些信号会诱发发热,疲劳,心血管低血压,肾功能衰竭等“脓毒性休克”而造成死亡。有十几种不同种类与动物相关联的乳酸菌被发现在逆境时会释放应激反应因子;然而在不同测试物种中其反应因子聚合物的分佈及低聚物或单体含量皆不相同。如把分子量大于 $10\text{kDa}$ 的聚合物注射到小鼠体内时会产生如腹泻等毒性反应;而用人体周边血巨噬细胞测试 $0.5\text{kDa}$ 以下分子量低聚物并不会诱导释放外释放白细胞介素;然而,介于在 $0.5\sim 10\text{kDa}$ 分子量之间的低聚物部分除了不具毒性外还可以激活和调节巨噬细胞,藉以保护实验小鼠在注射致死剂量的内毒素后不致受到伤害;因此,并不是所有的细菌菌株,其所释放的低聚物都可以有效保护动物免受细菌的侵害。

[0005] 所以,研究认为介于 $0.5\sim 10\text{kDa}$ 分子量之间的低聚应激反应因子SRFs是一种天然来源的免疫调节剂,可以安全地用于保护动物和人类免受感染和过度刺激他们的免疫系统。此外,应激反应因子含有可用于调节的化合物表面受体在巨噬细胞上的表达,重新调校功能失调的免疫系统。

[0006] 免疫激活和释放调节因子可以藉由膳食或药物制剂广泛改善人类或动物的免疫反应;发酵产品(例如牛奶,奶酪,酸奶)含有活细菌,当转移到营养缺乏的口中环境时会释

放应激反应因子SRFs。如果制成可延长在口腔中的停留时间的产品型态时(如口含锭),会释放更多SRFs来激活和调节局部的免疫响应。

[0007] 技术检测分析表明了存在低聚SRFs以及当乳酸菌转移到唾液或环境中营养物质不利益菌生长时释放低聚SRFs可以有效激活及提升动物体的免疫系统效能;通过这一发现,对于开发一种的无菌、稳定、无需冷藏、并提供已知剂量之益生菌制剂提供生物学上的有效必要条件。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是关于人类健康提供口服药物,食品、局部外用制剂甚至注射药物以帮助预防感染。本发明的另一个目的是使用SRFs作为起始物和对于其他细菌的保护剂在食品中用于口服或肠胃外提供局部免疫刺激。

[0009] 为实现上述技术目的,本发明采用的技术方案如下:

[0010] 调节免疫系统组合物,其制备方法包括以下步骤,

[0011] S1:在培养基中培养微生物;其中微生物可以是乳酸杆菌,双歧杆菌,链球菌,芽孢杆菌,肠球菌,和克雷伯氏菌;

[0012] S2:将所述微生物暴露于生物、化学或物理逆境下使微生物释放出应激产物到培养基中;

[0013] S3:从所述培养基中除去微生物并将应激释放产物分离出来;

[0014] S4:将所述应激释放产物使用过滤器滤分离,分离后,移除分子量超过10kDa的应激释放产物;得到小于10kDa的应激释放产物。

[0015] 进一步限定,所述S2中施以逆境步骤可以是以下方式的一种或多种的组合,

[0016] a、通过离心将微生物从培养基中分离出来,再将微生物重新置入非营养性的等渗透溶液中;

[0017] b、加入抗生素制备敏感微生物;

[0018] c、在培养基中添加额外的微生物;

[0019] d、减少培养基的体积;

[0020] e、从培养基中去除营养物质;

[0021] f、改变培养基的pH值。

[0022] 进一步限定,所述非营养性等渗溶液包含0.9%氯化钠。

[0023] 进一步限定,所述非营养性等渗溶液是pH7.5之0.1M磷酸盐缓冲液。

[0024] 进一步限定,所述微生物的菌体浓度为 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ CFU每毫升。

[0025] 进一步限定,所述微生物选用野外微生物。

[0026] 进一步限定,所述培养基中的pH值为7.5。

[0027] 进一步限定,所述培养基中的培养温度为 $40 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

[0028] 调节免疫系统的方法,将有效剂量的0.5~10kDa的应激释放产物用于动物体上;在动物体中调节免疫应答包括:

[0029] a、通过激活巨噬细胞来刺激免疫反应,释放免疫刺激白细胞介素IL-1, IL-6和TNF,例如预防或对抗感染;

[0030] b、下调巨噬细胞的CD-14受体防止内毒素过度刺激导致IL-1, IL-6和TNF的过度产

生及全身性相关炎症,心血管功能障碍,休克和死亡;

[0031] c、下调巨噬细胞的CD-16受体防止IL-10过度刺激导致终结巨噬细胞转化为细胞毒性表型,且具有过度破坏宿主细胞的可能性,例如衬裡血管的内皮细胞和T细胞。

[0032] 本发明的有益效果:

[0033] 本发明教导了微生物体的选择和用来使他们产生低聚SRFs (0.5和3kDa之间最佳)最大值的条件;本发明教导了两种天然的改进条件:人对于食物或者牲畜对于饲料,其中皆富含各种微生物,瞬间高温杀菌的鲜奶含有每毫升约 $10^4$ CFU的微生物,发酵的乳制品(牛奶,酸奶,奶酪)每毫升含约 $10^6 \sim 10^8$ CFU对人群无害的微生物;通过进食转移这些微生物到营养较缺乏的口腔环境时,会释放一定数量的SRFs,如果可以通过凝胶化或增稠剂来增加食物在口腔中的停留的时间,可以提升免疫刺激的水平;研究认为这解释了经常食用发酵食品对于免疫刺激的好处,新鲜蔬菜含有高水平的无害细菌,通过在进食期间释放SRFs刺激口腔局部巨噬细胞。

### 具体实施方式

[0034] 为了使本领域的技术人员可以更好地理解本发明,下面通过实施例对本发明技术方案进一步说明。

[0035] 在正常和自然发生的应激下,乳酸菌可以释放名为应激反应因子(SRFs)的产物。而其小于10kDa分子量的产物并无毒,而其中0.5~10kDa低聚体可活化和调节巨噬细胞。

[0036] 可以使用本发明的组合物口服或肠胃外或局部刺激免疫系统,藉由激活巨噬细胞释放细胞因子,特别是IL-1,IL-6和TNF引发预防或减少感染的免疫反应;抵消巨噬细胞的潜在病理作用过度刺激局部炎症反应,例如类风湿性关节炎和其他自身免疫疾病;或全身性发炎反应,例如感染性休克。

[0037] 调节免疫系统组合物,其制备方法包括以下步骤,

[0038] S1:在培养基中培养微生物;其中微生物可以是乳酸杆菌,双歧杆菌,链球菌,芽孢杆菌,肠球菌,和克雷伯氏菌;

[0039] S2:将微生物暴露于生物、化学或物理逆境下使微生物释放出应激产物到培养基中;

[0040] S3:从培养基中除去微生物并将应激释放产物分离出来;

[0041] S4:将应激释放产物使用过滤器滤分离,分离后,移除分子量超过10KDa的应激释放产物;得到0.5~10kDa的应激释放产物。

[0042] 而较佳的作法是将微生物繁殖到一定的菌体浓度时,通过以下一种或多种方法制备应激反应因子SRFs,a、通过离心将微生物从培养基中分离出来,再将微生物重新置入非营养性的等渗透溶液中;b、加入抗生素制备敏感微生物;c、在培养基中添加额外的微生物;d、减少培养基的体积;e、从培养基中去除营养物质;f、改变培养基的pH值;以影响微生物对培养基中营养成分的生物利用率。

[0043] 对微生物施加逆境刺激的最佳方法是:在对数生长中期(每毫升约 $10^9$ CFU)将微生物由培养基中取出,并重新悬浮在5倍浓度之非营养性磷酸盐缓冲液中(pH7.5)在40℃下保持12小时,使用UV254nm监测应激反应因子SRFs的浓度;含有分子量大于10kDa的SRFs是具有毒性的,所以通过过滤手段除去大于10kDa的所有物质。因此上清可能进行过滤,以便删

除大于10kDa的所有SRFs并且在溶液中保留分子量小于10kDa的部分。另外,我们也可以藉由连续逆境刺激以获得更多的SRFs。

[0044] 而释放SRFs数量的多寡取决于:(1) 乳酸菌菌体浓度;最佳水平为 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ CFU每毫升;在更高的浓度,每个细胞释放的SRFs更少;(2) 细胞感受逆境刺激压力的严重程度,应激压力越大SRFs释放的越多;(3) 在同样条件下,筛选自野外的菌株释放的SRF比实验室菌株更多;(4) 培养基中的pH;pH值低于4.8时其释放量约为pH值为7.5的四分之一;(5) 培养基中的温度;可以在40°C观察到释放,最佳的温度大约40°C;(6) 时间;在逆境刺激后立即释放,除非上层液不断被移除,否则会在大约9到12小时内达到高原期。

[0045] 提供以下实施例以说明但不是限制本发明。

[0046] 实施例1:

[0047] 通过测量具有A254吸光值的化合物释放,我们从而近似观察到SRFs的释放, $2 \times 10^{10}$ CFU在37°C,0.1M磷酸盐缓冲液下(pH7.5),培养10小时后,来自三次实验平均吸光值.单位(AU)每ml  $\pm 50\%$ ,

	<i>L. acidophilus</i>	3000. AU/ml
	<i>L. caseii</i>	7000. AU/ml
	<i>L. fermentum</i>	3500. AU/ml
[0048]	<i>L. plantarum</i>	4000. AU/ml
	<i>P. acidolactici</i>	6500. AU/ml
	<i>E. faecium</i>	7000. AU/ml
	<i>K. pneumoniae</i>	8500. AU/ml

[0049] 实施例2:

[0050] *L. Caseii*在MRS培养基中繁殖,如实施例1中所述,产生小于10kDa应激反应因子SRFs的部分,其中A<sub>254</sub>=9.250或9250AU/ml在第一次接种培养后;第二次和第三次连续培养每隔16小时释放SRFs分别产生12000AU/ml和3250AU/ml。

[0051] 实施例3:来自*L. Caseii*的小于10kDaSRFs其制备方式见实施例2,并测试它们的活化巨噬细胞能力,并释放白细胞介素和通过选择性缺失巨噬细胞下调CD-14和CD-16表面受体。

[0052] 从志愿者人体收集加了抗凝血剂的外周血,通过离心分离白细胞。收集含有白细胞的血沉棕黄层(buffycoat)转移到微量滴定板的孔中每孔浓度 $10^5$ ;添加RPMI1640培养基在富含二氧化碳的环境下,37°C培养4小时,巨噬细胞会吸附在滴定板中而被分开,最终巨噬细胞的浓度为 $1 \sim 3 \times 10^6$ /ml。使用pH=7.5的磷酸盐缓冲盐水(PBS)或0.1M含有SRFs的磷酸盐溶液(pH=7.5)分批加入相当于于RPM培养基体积的十分之一,在上述培养条件下一起培养。在培养期间,取出等分试样在血球细胞计数器中计数活性巨噬细胞。

[0053] 白细胞介素IL-1 $\alpha$ , IL-6 $\alpha$ 和TNF $\alpha$ 。使用商业细胞因子试剂盒(R&D Systems,明尼苏达州明尼阿波利斯市)来做量测。表面受体的水平通过添加荧光剂来量测巨噬细胞CD-14和CD-16特异性单克隆抗体在FACScan流式细胞仪中测量荧光;数据通过Lysis-1程序进行分析。

< 10kDa SRFs	Interleukins (pg/ml)			Surface Receptors	
	IL-1 $\alpha$	IL-6 $\alpha$	TNF $\alpha$	CD-14	CD-16
Control	0	0	0	70	70
Total:					
800 AU/ml	25	35000	2250	60	60
[0054] 80 AU/ml	15	22000	1700	70	70
8 AU/ml	8	5000	8500	70	70
Oligomeric Fraction G-10:					
800 AU/ml	550	30000	2000	30	30
80 AU/ml	315	21000	1600	50	50
8 AU/ml	8	5000	900	60	60

[0055] Percentage of macrophages with highly expressed CD-14 and CD-16.

[0056] 任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。