

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2008年6月5日 (05.06.2008)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2008/064521 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/003224

(22) 国际申请日: 2006年11月30日 (30.11.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 一泰医药研究(深圳)有限公司(PHARMAPEP RESEARCH & DEVELOPMENT (SHENZHEN) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市高新区中区高新中一道生物孵化器大楼2-413, Guangdong 518057 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 卢放根(LU, Fanggen)

[CN/CN]; 中国广东省深圳市高新区中区高新中一道生物孵化器大楼2-413, Guangdong 518057 (CN)。

(74) 代理人: 深圳创友专利商标代理有限公司(SHEN-ZHEN TRUER IP); 中国广东省深圳市福田区上步路佳兆业中心B座2201室, Guangdong 518031 (CN)。

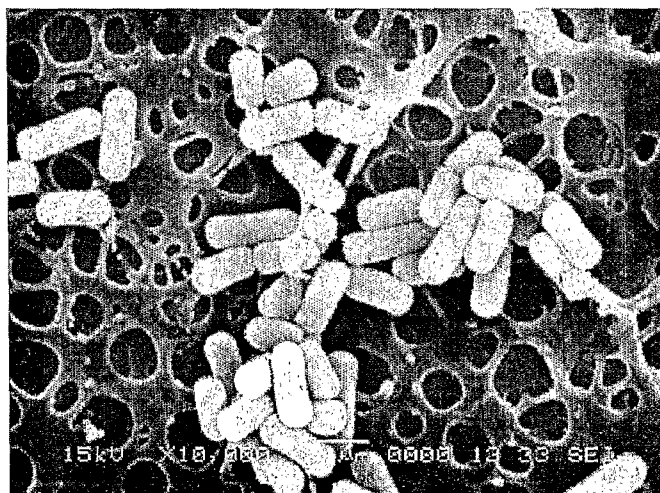
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY,

[见续页]

(54) Title: LACTOBACILLUS FERMENTUM CMS-H002 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 发酵乳杆菌CMS-H002及其应用



(57) Abstract: A strain of *Lactobacillus fermentum* CMS-H002, with the accession number CCTCC No. M 206110. The use of the strain, the pharomic composition, food product and additive comprising the strain. The strain of *Lactobacillus fermentum* CMS-H002 in the present invention could be used to treat the rectal or colonic inflammatory conditions, such as ulcerative colitis effectively.

(57) 摘要:

本发明公开了一种发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 其保藏号为 CCTCC No. M 206110。本发明还公开了上述菌的应用以及含有所述菌的药物组合物、食品、保健品及食品添加剂。本发明的发酵乳杆菌 CMS-H002 能有效治疗溃疡性结肠炎等直肠或结肠炎性疾病。

WO 2008/064521 A1



KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明。

发酵乳杆菌 CMS-H002 及其应用

技术领域

本发明涉及微生物技术领域，特别是涉及发酵乳杆菌的新的菌株以及该菌株的应用。

背景技术

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是慢性非特异性溃疡性结肠炎的简称，为一种原因未明的直肠和结肠慢性炎性疾病。UC 的发病是复杂的、多环境、多因素相互作用的结果，对它的研究很多，但其病因与发病机理仍未完全明确。主要临床表现是腹泻、粘液脓血便、腹痛和里急后重。病情轻重不等，多反复发作或长期迁延呈慢性经过，常常出现并发症，甚至癌变。本病可发生于任何年龄，以 20—50 岁为多见。男女发病率无明显差别。UC 在西方国家相当常见，患病率高达 35~100/105。中国发病率较欧、美低，且轻型病例多见，但近二十年来本病的发病率有上升趋势，国内有关 UC 的报道也明显增加。

对于该病的治疗，近年来主要采用内科综合治疗，控制急性发作，减少复发，防止并发症。现阶段治疗的药物包括肾上腺糖皮质激素，适用于暴发型或重型患者，可控制炎症，抑制自体免疫过程，减轻中毒症状，有较好疗效。另外柳氮磺吡啶 (简称 SASP) 也常作为首选药物，适用于轻型或重型经肾上腺糖皮质激素治疗已有缓解者，疗效较好。这些药物虽然具有较为理想的疗效，但具有较大的毒副作用，因此期待能开发出更为安全的替代治疗方案。

最新研究表明，菌群失调是溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 的重要病因之一。益生菌在 UC 治疗中的作用因其安全性优越、毒副作用小的特点而被日益重视，但目前所报道的益生菌治疗 UC 的疗效尚无法达到理想状态。选择最佳的菌株成为益生菌治疗 UC 的关键。

发明内容

本发明的目的就是为了解决以上问题，提供一种能有效治疗直肠或结肠炎性疾病特别是溃疡性结肠炎的新的发酵乳杆菌菌株及其在制备药物等方面的应用。

本发明的再一目的是提供含有上述新的发酵乳杆菌菌株的药物组合物、

食品、保健品及食品添加剂。

为实现上述目的，本发明采用了以下技术方案：

本发明公开了一种发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002，其保藏号为 CCTCC No. M 206110。

本发明还公开了上述发酵乳杆菌在制备用于治疗直肠或结肠炎性疾病的药物中的应用。

所述直肠或结肠炎性疾病优选为溃疡性结肠炎。

本发明还公开了一种药物组合物，该药物组合物包括药学有效剂量的上述发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002，或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。

本发明还公开了一种食品，所述食品含有上述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002，或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。

优选的，所述食品为饮料。

本发明还公开了一种保健品，该保健品包含上述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002，或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。

本发明还公开了一种食品添加剂，所述食品添加剂包含上述的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002，或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。

本发明的发酵乳杆菌 CMS-H002，是一种分离的全新的菌株，该菌株对溃疡性结肠炎能减轻腹泻、出血、体重减轻等症状，也能减轻肠道粘膜的损伤及炎性细胞浸润，效果优于柳氮磺吡啶 (SASP)；并且作为一种益生菌安全性优越、毒副作用小。该菌株能够安全、有效地治疗溃疡性结肠炎等直肠或结肠炎性疾病。

保藏信息：

菌株名称：发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002

保藏日期：2006年10月23日

保藏单位：中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)

保藏编号：CCTCC No. M 206110

附图说明

图1为本发明发酵乳杆菌 CMS-H002 菌液涂片镜下形态 (Gram's 染色，

×1000)。

图 2 为本发明发酵乳杆菌 CMS-H002 扫描电镜结果(×10000)。

图 3 为本发明发酵乳杆菌 CMS-H002 透射电镜结果(×12000)。

图 4 为实施例 2 中实验前后各实验组小鼠体重变化结果图。

图 5 为实施例 2 中各组小鼠死亡率情况结果图。

图 6 为实施例 2 中各组小鼠结肠长度结果图。

图 7 为实施例 2 中各组小鼠 DAI 积分曲线结果图。

图 8 为实施例 2 中各组小鼠组织学损伤评分结果图。

图 9a-1 为实施例 2 中各组小鼠的结肠病理切面图 (HE ×400), 其中:

a 为正常对照组结肠粘膜; b 为模型组结肠粘膜;

c 为阴性对照组结肠粘膜; d 为阳性对照组结肠粘膜;

e 为治疗一组结肠粘膜; f 为治疗二组结肠粘膜;

g 为治疗三组结肠粘膜; h 为治疗四组结肠粘膜;

i 为治疗五组结肠粘膜; j 为高剂量 0501 灌肠组结肠粘膜;

k 为高剂量 c120 灌肠组结肠粘膜; l 为治疗六组结肠粘膜。

具体实施方式

本发明的新的菌株: 发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 已经于 2006 年 10 月 23 日在位于中国武汉市的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 进行了保藏, 保藏号为 CCTCC No. M 206110。

本发明的新菌株发酵乳杆菌 CMS-H002 可从健康婴幼儿粪便或成人十二指肠液中分离得到。该菌株对溃疡性结肠炎能减轻腹泻、出血、体重减轻等症状, 也能减轻肠道粘膜的损伤及炎性细胞浸润, 效果优于柳氮磺吡啶 (SASP)。该菌株能够有效治疗溃疡性结肠炎等直肠或结肠炎性疾病。

利用本发明的发酵乳杆菌 CMS-H002 可以制备成药物组合物。该药物组合物含有药学有效剂量的发酵乳杆菌 CMS-H002, 或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。此外, 所述药物组合物还可以含有合适的药物载体。本发明的药物组合物可以为胶囊、溶液或可饮用悬浮液、袋装粉剂等形式, 每一单一剂量一般含有发酵乳杆菌 CMS-H002 菌株约为 $10^8 \sim 10^{11}$ 细胞。

利用本发明的发酵乳杆菌 CMS-H002 还可以制备成食品、保健品或食品添加剂的形式。所述食品、保健品或食品添加剂含有发酵乳杆菌 CMS-H002,

或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。这些食品、保健品或食品添加剂可用于防治溃疡性结肠炎等直肠或结肠炎性疾病，提高使用者的健康水平。本发明的食品可以是含有本发明发酵乳杆菌 CMS-H002 活菌的饮料的形式，也可以是含有所述活菌的乳制品、发酵乳、酸豆奶等形式。

下面通过具体的实施例对本发明作进一步详细的描述。

实施例 1

发酵乳杆菌 CMS-H002 的分离鉴定及其生物学特性

1、材料

试剂：牛肉粉（北京奥博星生物责任有限公司，批号：20040607）、蛋白胨（北京奥博星生物责任有限公司，批号：20040615）、乙酸钠（广东省台山市化工厂，批号：20030401）、硫酸镁（河南省焦作市化工三厂）、硫酸锰（河南焦作市化工厂，批号：981014）、酵母浸粉（北京奥博星生物技术责任有限公司，批号：20030825）、柠檬酸铵（湖南湘中精细化学品厂，批号：20030409）、葡萄糖（湖南师大化学试剂厂，批号：20040208）、吐温-80（西安富力化学厂，批号：021125）、磷酸氢二钾（河南省焦作市化工三厂，批号：20010404）、冰醋酸（广东汕头市西陇化工厂，批号：050414）琼脂粉（北京奥博星生物责任有限公司，批号：040415），X-gal(inalc)，API 20A 生化鉴定条（法国酶里埃），API 50 CHL 生化鉴定条（法国酶里埃）

实验仪器：厌氧培养盒（法国 梅里埃）、日本岛津 GC2010 型气相色谱检测仪(GC)、氢焰离子检测器(FID)、DB-5MS 色谱柱、日本岛津 UV-2501PC、JSM5600-LV 型扫描电镜、日立 H-600 型透射电镜、

MRS-X-gal 培养基的制备：

MRS 培养基配方：牛肉粉 10 克/升、蛋白胨 10 克/升、乙酸钠 5 克/升、硫酸镁 0.5 克/升、硫酸锰 0.2 克/升、酵母浸粉 5 克/升、柠檬酸铵 2 克/升、葡萄糖 20 克/升、吐温-80（1 克/升）、磷酸氢二钾 5 克/升、琼脂粉 15 克/升。按配方配置 MRS 培养基后，以乙酸调节 pH 值分别至 4.5、5.4、6.8。

配制 X-gal 溶液(20mg/ml)以直径 0.22um 一次性过滤器过滤除菌，取 50ul 铺于 MRS 固体培养基上涂布均匀备用。

2、发酵乳杆菌 CMS-H002 的分离、纯化：

无菌棉签挑取健康婴幼儿粪便标本，或胃镜室取十二指肠液，置 MRS

液体培养基以厌氧盒快速运送至实验室，35℃孵育 2—3h，使细菌适应培养基的环境，然后 10 倍系列稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 等几个稀释度，各取 0.1ml 铺于 MRS 固体培养基，以 L 型玻棒涂布均匀，35℃厌氧培养 48~72h。挑取典型菌落于 MRS 液体培养基厌氧环境培养 24h，行 Gram's 染色。显微镜下观察形态，选取镜下形态为 Gram's 染色阳性杆菌的菌液，划线接种于 MRS 固体培养基平板。厌氧培养 48h，根据平板上菌落形态特征及镜下观察菌体的染色特性、大小、球杆状和分布情况，判断是否纯化。如果细菌不纯，则继续挑取单菌落划线接种于 MRS 固体培养基平板进一步分离纯化，反复多次分离传代，得到纯化的菌株。

3、菌落特征：

发酵乳杆菌 CMS-H002 在 MRS 固体培养基平皿厌氧培养 48h 后，呈现圆形、白色、凸起、直径约 2-4mm、边缘整齐的湿润菌落。

4、显微镜下形态：

发酵乳杆菌 CMS-H002 菌液涂片：呈革蓝氏染色阳性杆菌，以短杆状杆菌居多，单个或成对，见图 1。

5、耐氧试验

发酵乳杆菌 CMS-H002 在 MRS 固体培养基平皿有氧培养 48h 后，呈现圆形、白色、凸起、直径约 2-4mm、边缘整齐的湿润菌落。

6、发酵乳杆菌 CMS-H002 的生化鉴定

API 20A 是一种厌氧菌鉴定系统，有 21 个测定，能快速、简便地对厌氧菌进行生化鉴定。API 20A 试验条是由 20 个含干燥底物的小管所组成。将菌悬液分装到管内而重新组成这些底物。在 35~37℃培养 24 或 48 小时之后，所产的代谢物由酸度 (pH) 指示剂或加入试剂而呈现出来。可根据读表判断反应结果；用分析谱索引或鉴定软件予以鉴定。

API 50 CHL 是用于乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 和相关菌的鉴定，它是由 49 种可发酵碳水化合物的 API 50 CH 试验条组成的简易培养基。以测定菌制成悬液接种试验条的每一个小管。当培养时，由于发酵塘水化合物产酸，pH 下降，使指示剂变色。结果构成菌株的生化图谱，并用于鉴定或分型。

按 API 20A 和 API 50 CHL 厌氧菌鉴定卡说明书操作：将发酵乳杆菌 CMS-H002 的细菌悬液接种于鉴定卡的反应孔中。35℃微需氧培养 48h，根据颜色反应(紫→黄)判断结果，进行编码，查编码检索本或电脑软件。

API20A 生化鉴定结果显示：发酵乳杆菌 CMS-H002 可发酵葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、木糖、甘露糖、棉子糖，编码为：46504202，81.5%符合发酵乳杆菌。结果见表 1。

表 1: 发酵乳杆菌 CMS-H002 API20A 生化鉴定结果

底物	结果
色氨酸	-
脲素	-
葡萄糖	+
甘露醇	-
乳糖	+
蔗糖	+
麦芽糖	+
柳醇	-
木糖	+
阿拉伯糖	-
明胶	-
七叶灵	-
甘油	-
纤维二糖	-
甘露糖	+
松叁糖	-
棉子糖	+
山梨醇	-
鼠李糖	-
海藻糖	-
接触酶	-

API 50 CHL 生化鉴定结果显示：发酵乳杆菌 CMS-H002 可发酵核糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蜜二糖、蔗糖、棉子糖，编码为：44514002，符合发酵乳杆菌。

7、MRS-X-gal 培养基显色反应

将分离纯化鉴定后的发酵乳杆菌 CMS-H002 接种于 MRS-X-gal 培养基上，厌氧培养 48h，取出平皿放置于空气中，几分钟后观察菌落显色情况。

结果表明，菌落在 MRS-X-gal 平皿上呈淡蓝色。

8、发酵乳杆菌 CMS-H002 的电镜检查

扫描电镜:

发酵乳杆菌 CMS-H002 经固定, 并经梯度脱水、梯度置换、喷铂金镀膜, 之后于电镜观察, 细菌表面光滑、完整, 形态均一, 呈短棒状, 两头钝圆, 无芽孢, 见图 2。

透射电镜:

发酵乳杆菌 CMS-H002 经固定, 并经梯度脱水、包埋、切片, 醋酸铀、硝酸铅双重染色, 之后于透射电镜观察, 细菌形态规则, 胞壁结构完整, 无肿胀及出芽, 胞质均匀, 未发现异常颗粒, 未见病毒、支原体等外源因子, 见图 3。

9、质粒检测

收集菌泥按常规方法抽提质粒, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测发酵乳杆菌 CMS-H002 是否存在质粒。检测结果未见质粒。

10、遗传特点

收集发酵乳杆菌 CMS-H002 的菌泥并按常规方法抽提 DNA, 用乳酸杆菌的特异性引物进行乳酸菌 16s rDNA 的 PCR 扩增, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 可见 400bp 处有一亮带与目标片段大小相同。

11、代谢产物的测定

(1) 标准液的制备:

醇和挥发性脂肪酸 (VFA) 标准液的制备: 将甲酸 37 μ l、乙酸 57 μ l、丙酸 74 μ l、异丁酸 93 μ l、丁酸 92 μ l、异戊酸 109 μ l、戊酸 108 μ l、己酸 125 μ l、乙醇 100 μ l、丙醇 5 μ l、异丁醇 5 μ l、丁醇 10 μ l、异戊醇 0.5 μ l、戊醇 0.5 μ l 加蒸馏水定容至 100 ml, 即为 10mmol/L 的标准液。

非挥发性脂肪酸 (NVFA) 标准液的配制: 将乳酸 84 μ l、苯乙酸 60mg、琥珀酸 60mg 加蒸馏水至 100 ml, 即为 10mmol/L 的标准液。

(2) VFA 制备: 选用偏磷酸法

取标准液或培养物 1 ml 加偏磷酸 0.5 ml, 调整 pH 值在 2.0 以下, 37 $^{\circ}$ C 匀化 2h, 10000 转/分, 4 $^{\circ}$ C 离心 2min, 取上清 1 μ l 用于进样分析。

(3) NVFA 制备: 选用甲醇硫酸法

取标准液或培养物 2ml 加 50%硫酸 0.2 ml, 调整 PH 值在 2.0 以下, 取硫酸酸性培养物 1ml, 加入甲醇溶液 1ml 和 50%硫酸 0.1 ml, 将样品煮沸 5 分钟或室温下过夜, 加入氯仿 0.5ml, 混匀后静置片刻, 1000 转/分, 4 $^{\circ}$ C 离心

2min, 取氯仿层 1 μ l 用于进样分析。

(4) 标本及标准品中各物质的分析:

分别取提取后的样品和标准品 1 μ l 进样分析, 由日本岛津 GC2010 型气相色谱检测仪 (GC) 检测各物质的保留时间并以标准品作为样本中该物质的定量标准。

结果表明, 发酵乳杆菌 CMS-H002 的 VFA 主要为乳酸, 出峰时间为 7.467 秒。NVFA 主要为乙酸, 还有少量琥珀酸, 出峰时间为 7.947 秒。

实施例 2

发酵乳杆菌 CMS-H002 灌肠对小鼠溃疡性结肠炎的疗效观察

对于经 5% DSS 诱导 Balb/c 小鼠溃疡性结肠炎模型, 分别给予生理盐水、SASP、发酵乳杆菌 CMS-H002、双歧杆菌 0501、c120 等保留灌肠, 观察各组小鼠的体重、死亡情况、大便性状、便血情况、结肠长度、DAI 积分以及肠黏膜病理改变等。结果表明: 发酵乳杆菌 CMS-H002 能够减轻小鼠的腹泻、出血、体重减轻等症状, 也能减轻肠道黏膜的损伤及炎性细胞浸润等, 作用均明显好于模型组、SASP 组、双歧杆菌各组。能有效治疗小鼠溃疡性结肠炎。

一、实验材料和方法:

1、实验材料:

1. 1 实验动物: Balb/c 小鼠, SPF 级, 雄性, 6-8 周龄, 体重 20 \pm 2 克, 购于湖南农业大学东创实验动物科技服务部, 饲养于清洁级动物房。

1. 2 主要试剂: 乙酸钠 (广东省台山市化工厂、批号 20030401)、硫酸镁 (河南省焦作市化工三厂)、硫酸锰 (河南焦作市化工厂、批号 981014)、蛋白胨 (北京奥博星生物技术责任有限公司、批号 20040615)、酵母浸粉 (北京奥博星生物技术责任有限公司、批号 20030825)、柠檬酸铵 (湖南湘中精细化学品厂、批号 20030409)、葡萄糖 (湖南师大化学试剂厂、批号 20040208)、牛肉粉 (北京奥博星生物技术责任有限公司、20040607)、吐温-80 (西安富力化学厂、批号 021125)、磷酸二氢钾 (河南省焦作市化工三厂、批号 20010404)、琼脂 (北京奥博星生物技术责任有限公司)、柳氮磺胺吡啶片 (SASP, 上海福达制药有限公司、批号 041207)、DSS (分子量 5000, Sigma 公司)。

2、 实验方法:

2.1 实验细菌: 发酵乳杆菌 CMS-H002 及双歧杆菌 (0501 菌株和 c120 菌株), 其中双歧杆菌 (0501 菌株和 c120 菌株) 是本实验室从健康婴幼儿粪便和成人十二指肠液中分离、鉴定所得。三种菌分别在 MRS 培养基中厌氧培养 24 小时后收集菌落, 用分光光度计计数后, 用无菌生理盐水稀释为 1×10^9 CFU/ml、 1×10^7 CFU/ml、 1×10^5 CFU/ml 后备用。

2.2 动物模型: 给 Balb/c 小鼠 5% DSS 溶液自由饮用 7 天造成急性溃疡性结肠炎模型。益生菌(发酵乳杆菌 CMS-H002 及双歧杆菌 0501 菌株和 c120 菌株)、生理盐水、SASP 等灌肠均从饮用 DSS 前 2 天先开始进行, 每只小鼠每天灌肠一次, 每次 0.3ml/20g。

2.3 实验分组: 实验用 Balb/c 小鼠 120 只, 随机分成 12 组, 各组均为 10 只分组情况如下:

- A、正常对照组: 正常饮食, 无特殊处理
- B、模型对照组: 饮用 DSS 造模
- C、阴性对照组: 仅用无菌生理盐水灌肠
- D、阳性对照组: 用 SASP(20mg/ml)灌肠
- E、治疗一组: DSS 造模+ 1×10^5 CFU/ml 0501 菌液灌肠
- F、治疗二组: DSS 造模+ 1×10^7 CFU/ml 0501 菌液灌肠
- G、治疗三组: DSS 造模+ 1×10^9 CFU/ml 0501 菌液灌肠
- H、治疗四组: DSS 造模+ 1×10^9 CFU/ml c120 菌液灌肠
- I、治疗五组: DSS 造模+ 1×10^7 CFU/ml 0501 菌液灌胃
- J、高剂量 0501 组: 1×10^9 CFU/ml 0501 菌液灌肠
- K、高剂量 c120 组: 1×10^9 CFU/ml c120 菌液灌肠
- L、治疗六组: DSS 造模+ 1×10^9 CFU/ml CMS-H002 菌液灌肠

2.4 动物处理: 每日观察进食、活动等一般情况, 称量体重, 观察粪便性状及粪便隐血情况, 评估结肠炎严重程度。实验后第 9 天处死小鼠, 游离结肠和远端回肠, 取出肛门至盲肠末端的整个结肠和直肠段, 观察各组小鼠结肠的大体改变、测量整个结肠长度。用预冷生理盐水将结肠冲洗干净, 分别于结肠末端(距肛门 1cm)、结肠中段、结肠上段(距盲肠 1cm)处各剪取 1cm 长结肠, 福尔马林固定、石蜡包埋、切片, HE 染色, 观察病理改变。

2.5 损伤和炎症程度的评估

2.5.1 疾病活动情况的评估：每日观察小鼠的体重、大便性状和隐血情况按表 3 进行评分，得出每只小鼠的 DAI 积分。

表 3 DAI 评分表

体重下降(%)	大便性状*	大便隐血/肉眼血便	计分
0	正常	正常	0
1-5			1
5-10	松散	隐血阳性	2
10-15			3
>15	稀便	肉眼血便	4

*正常大便：成形大便； 松散大便：不黏附于肛门的糊状、半成形大便；稀便：可黏附于肛门的稀水样便

2.5.2 组织学损伤的评估：每个切片随机选取至少 27 个高倍视野(400 倍) 根据表 4 评分标准进行计分,取其平均值。

表 4 组织学损伤评分标准

评分	组织改变
0	正常结肠粘膜
1	隐窝缺损 1/3
1.5	隐窝缺损 1/2
2	隐窝缺损 2/3
3	隐窝完全破坏，固有层覆盖单层上皮伴轻度炎性细胞
4	粘膜糜烂溃疡伴显著的炎性细胞浸润

二、结果

1、体重改变

实验前各组小鼠体重差异无显著性，实验后模型组、阴性对照组、阳性对照组、治疗一、二、三、四、五组体重均明显下降，体重差（实验后与实验前的差值）与正常对照组的体重差比较有显著性差异（P<0.05），治疗六组体重稍有下降，与正常对照组的体重差比较无显著性差异（P>0.05），见图 4。

2、小鼠死亡情况

实验过程中共有 15 只小鼠死亡，其中死于下消化道出血 10 只，慢性肠穿孔 1 只，不明原因死亡 4 只。其中死于消化道出血和穿孔的共 11 只，分别为模型组 1 只、阴性对照组 1 只、阳性对照组 1 只、治疗二组 3 只、治疗三组 2 只、治疗四组 3 只。通过 χ^2 检验死于消化道出血和穿孔的各组小鼠死亡率没有统计学差异，见图 5。

3、粪便性状及便血情况

模型组、阴性对照组在饮用 DSS 3 天后部分小鼠出现粪便隐血阳性，饮用 DSS 4 天后部分小鼠出现稀糊状肉眼血便；阳性对照组各小鼠饮用 DSS 4 天后均开始出现肉眼血便；治疗一组、二组、三组、四组均在饮用 DSS 2 天后部分小鼠出现粪便隐血阳性，饮用 DSS 3 天后出现稀糊状肉眼血便；治疗五组在饮用 DSS 4 天后部分小鼠出现粪便隐血阳性，饮用 DSS 5 天后出现稀糊状肉眼血便；治疗六组饮用 DSS 3 天后有 2 只小鼠出现粪便隐血阳性，但一直未出现肉眼血便；正常对照组无改变。饮用 DSS 7 天时各组小鼠便血情况见表 5。

表 5 实验结束时各组小鼠便血情况

组 别	例数	出现单纯隐血阳性例数	出现肉眼血便例数	死亡例数
正常对照组(A)	10	0	0	0
模型对照组(B)	10	1	8	1
阴性对照组(C)	10	4	6	2
阳性对照组(D)	10	4	5	1
治疗一组(E)	10	1	7	0
治疗二组(F)	10	1	7	3
治疗三组(G)	10	0	7	5
治疗四组(H)	10	1	8	3
治疗五组(I)	10	3	6	0
高剂量 0501 灌肠组(J)	8	2	0	0
高剂量 c120 灌肠组(K)	8	3	0	0
治疗六组(L)	10	2	0	0

4、小鼠结肠长度改变

实验后饮用 DSS 的模型组、阴性对照组、阳性对照组、治疗一、二、

三、四、五、六组结肠均缩短，结肠长度与正常对照组比较有显著性差异，但治疗六组结肠长度长于模型组、阴性对照组、阳性对照组、治疗一、二、三、四、五组，与模型组、阴性对照组、阳性对照组比较有显著性差异，见图 6。

5、DAI 计分

治疗六组的 DAI 计分较模型组、阳性对照组明显降低，差异具有显著性 (P 均 <0.05)，见图 7。

6、组织病理学评分：

模型组、阴性对照组、阳性对照组及治疗一、二、三、四、五组结肠粘膜上皮细胞广泛缺失，腺体大多数不完整，炎症细胞广泛浸润，呈典型炎症改变。而治疗六组结肠粘膜腺体基本完整，局部有少量炎性细胞浸润或隐窝破坏，组织学评分治疗六组较模型组、阴性对照组、阳性对照组降低，有显著性差异 ($P<0.05$)，见图 8。各组小鼠结肠病理切片，见图 9a~1。

以上结果表明，发酵乳杆菌CMS-H002菌液灌肠对溃疡性结肠炎小鼠能减轻小鼠的腹泻、出血、体重减轻等症状，也能减轻肠道粘膜的损伤及炎性细胞浸润，较模型组和SASP灌肠组明显减轻。通过使用双歧杆菌菌液灌肠治疗DSS诱导的UC小鼠时，我们发现两株双歧杆菌菌液灌肠能够加重溃疡性结肠炎小鼠的腹泻、出血、和体重减轻，也加重其肠道粘膜的损伤及炎性细胞浸润，较模型组、阴性对照组损伤更严重。但两株双歧杆菌给未用DSS诱导的小鼠灌肠时，小鼠一般情况及肠粘膜病理检查与正常对照组没有差异，因此双歧杆菌或者双歧杆菌的某些菌株可能在UC的发病过程中加重了UC的结肠粘膜损伤。

权 利 要 求

- 1、一种发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 其保藏号为 CCTCC No. M 206110。
- 2、权利要求 1 所述的发酵乳杆菌 CMS-H002 在制备用于治疗直肠或结肠炎性疾病的药物中的应用。
- 3、根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于: 所述直肠或结肠炎性疾病为溃疡性结肠炎。
- 4、一种药物组合物, 其特征在于: 所述药物组合物含有保藏号为 CCTCC No. M 206110 的药学有效剂量的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。
- 5、一种食品, 其特征在于: 所述食品含有保藏号为 CCTCC No. M 206110 的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。
- 6、根据权利要求 5 所述的食品, 其特征在于: 所述食品为饮料。
- 7、一种保健品, 其特征在于: 所述保健品含有保藏号为 CCTCC No. M 206110 的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。
- 8、一种食品添加剂, 其特征在于: 所述食品添加剂含有保藏号为 CCTCC No. M 206110 的发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CMS-H002, 或其代谢产物、细胞碎片或分泌物。

1/4

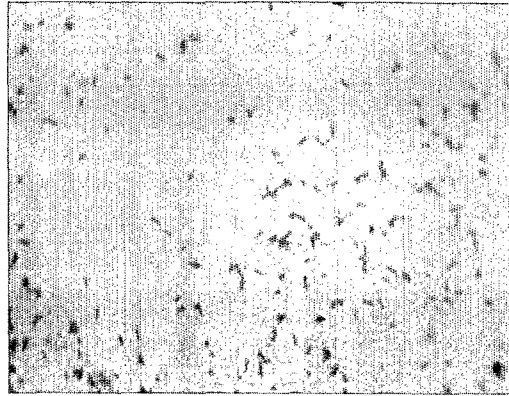


图 1

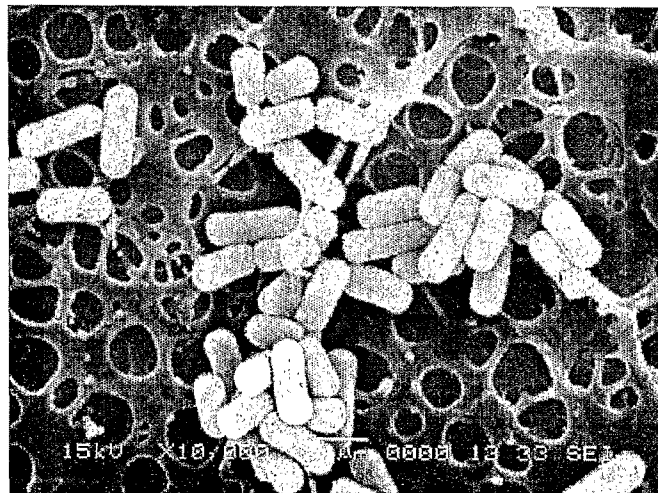


图 2

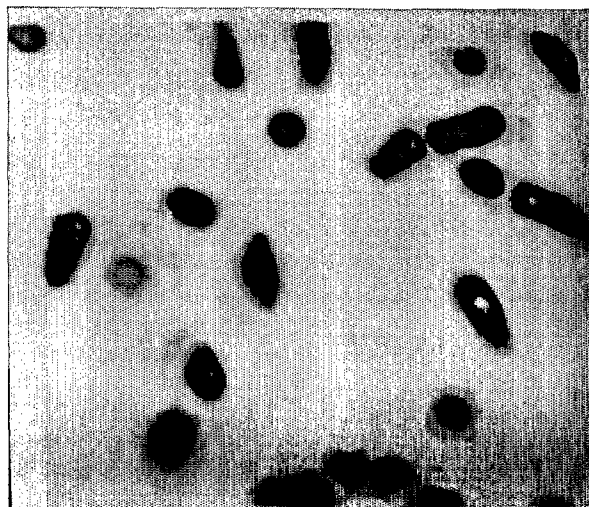


图 3

2/4

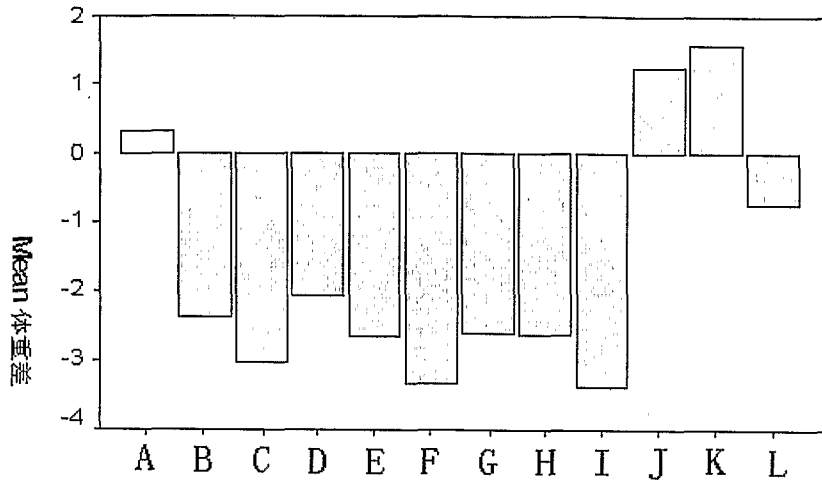


图 4

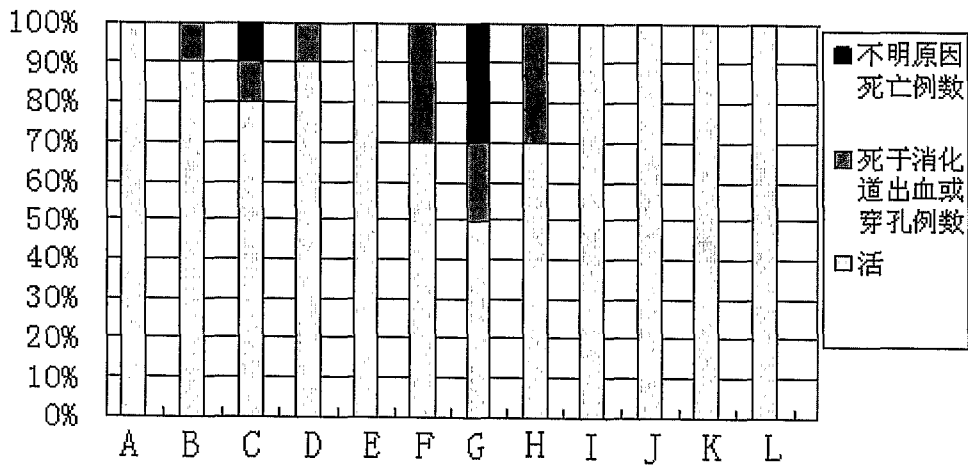


图 5

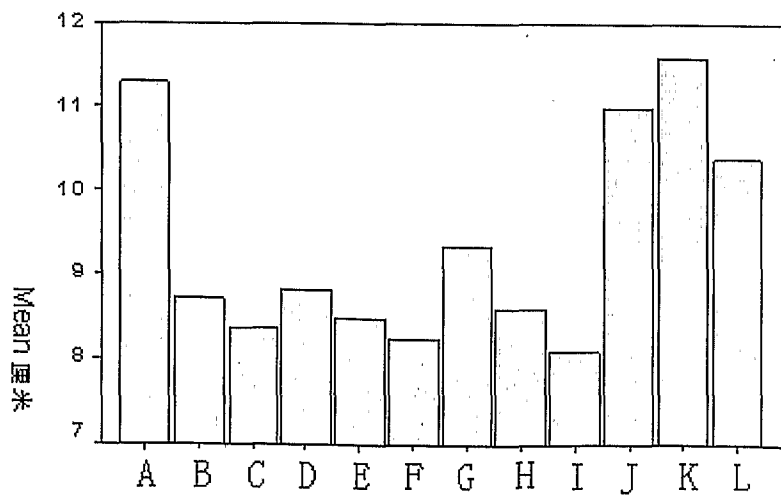


图 6

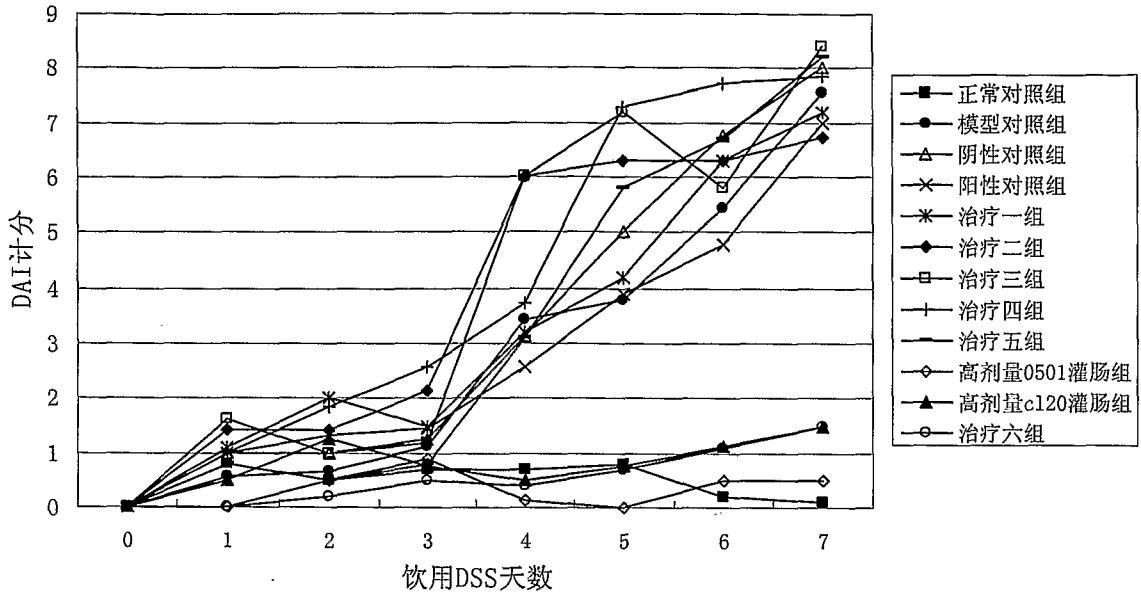


图 7

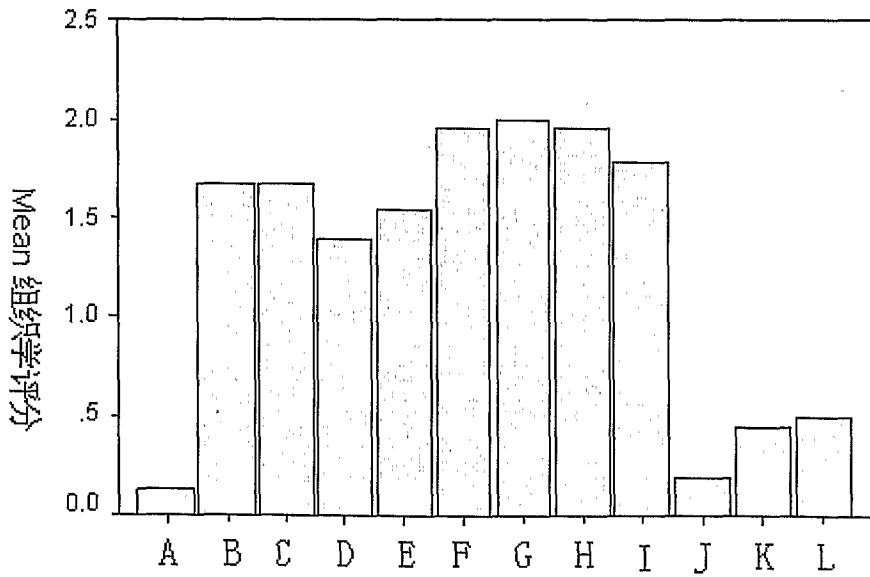


图 8

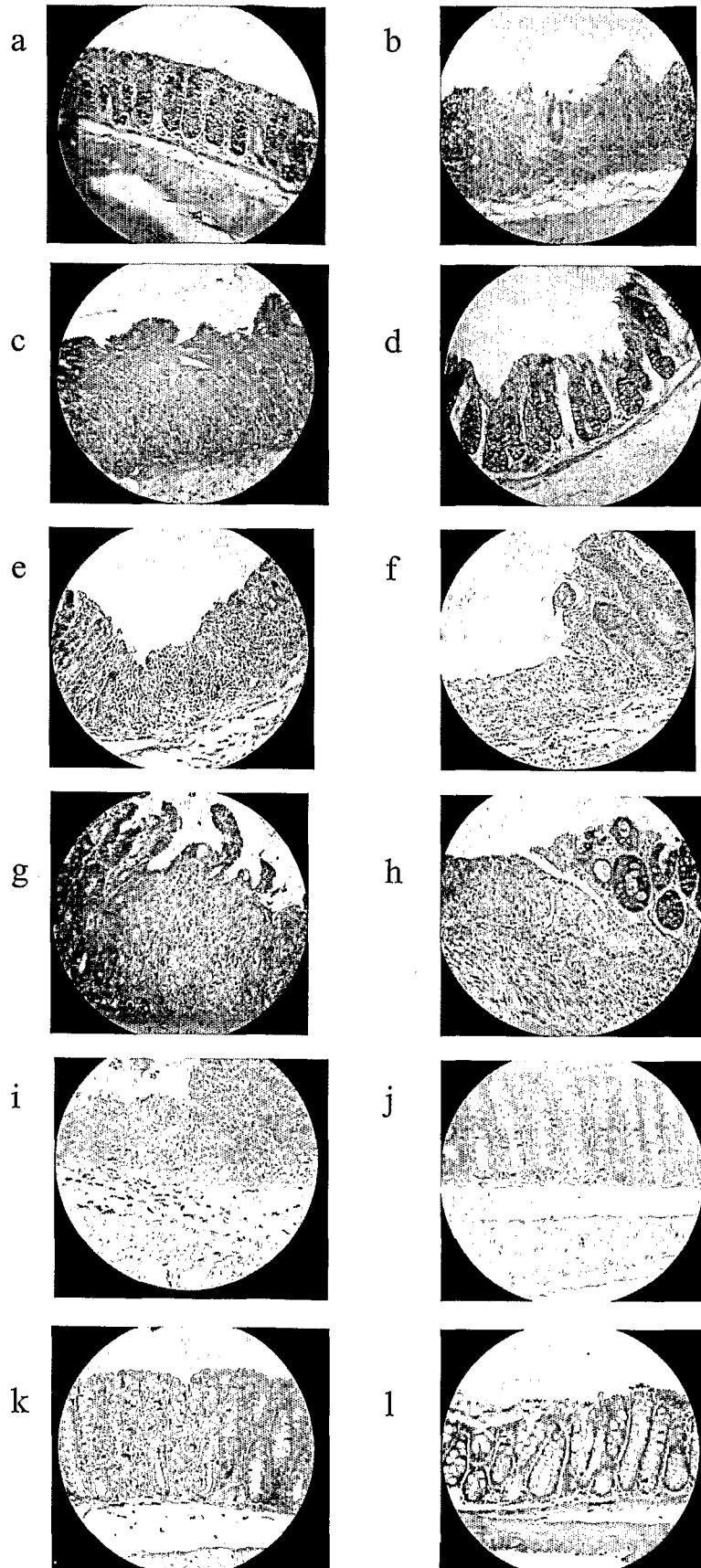


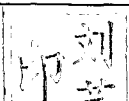
图 9a-1

申请人或代理人档案号 0610834	国际申请号 PCT/CN2006 / 0 0 3 2 2 4
--------------------	--------------------------------

关于微生物保藏的说明

(细则 13 之二)

A. 对说明书第 2 页, 第 25 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	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 中国武汉市武昌珞珈山武汉大学校内中国典型培养物保藏中心, 430072 China Center for Type Culture Collection(CCTCC), Luojia Hill, Wuhan 430072, China	
保藏日期 2006 年 10 月 23 日	保藏号 CCTCC No. M 206110
C. 补充说明 (必要时)	更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/>
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)	
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
<input checked="" type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到
授权官员 <u>刘芸</u> 

由国际局填写
<input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期
授权官员

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/003224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁸: C12N, A61K, A61P, A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI lactobacill+ fermentum ulcerative colitic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN1701116A (VRIB-N) 23.Nov. 2005 (23.11.2005) Claims 1-32, Examples 1-6	1-8
Y	WO03013558A1 (DSIM-I) 20.Feb. 2003 (20.02.2003) Abstract, Claims 1-11, Examples	1-8

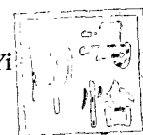
Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07.Mar. 2007 (07.03.2007)	Date of mailing of the international search report 12 · APR 2007 (12 · 04 · 2007)
--	--

Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer FENG YI Telephone No. 86-10-62085347
--	---



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/003224

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO03022255A2 (ACTI-N) 20.Mar. 2003 (20.03.2003) Abstract, Claims 1-28	1-8
A	CN86103736A (PION-N) 20.May 1987 (20.05.1987) Abstract, Claims 1-17, Tables 1-8	1-8
A	CN1853508A (KOYA-N) 01.Nov. 2006 (01.11.2006) Abstract, Claims 1-12, Examples 1-7	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/003224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family Members	Publication Date
CN1701116A	23.11.2005	WO2004022727A1	18.03.2004
		AU2003258366A1	29.03.2004
		EP1539927A1	15.06.2005
		JP2005537791T	15.12.2005
		US2006067921A1	30.03.2006
		KR20050057259A	16.06.2005
WO03013558A1	20.02.2003	AU2002329043A8	13.10.2005
WO03022255A2	20.03.2003	EP1432426A2	30.06.2004
		AU2002341384A8	20.10.2005
		US2004241149A1	02.10.2004
		MXPA04001999A	01.08.2004
CN86103736A	20.05.1987	EP0203586A	03.12.1986
		PT82659A	28.11.1986
		AU5791586A	04.12.1986
		JP62089625A	24.04.1987
		DK8602527A	30.11.1986
		ES8802274A	16.07.1988
CN1853508A	01.11.2006	US2006233774A	19.10.2006
		KR20060110382A	25.10.2006
		JP2006298917A	02.11.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.


PCT/CN2006/003224

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/20 (2006.01) i
A61K35/74 (2006.01) i
A61P1/04 (2006.01) i
A23L1/30(2006.01) i
C12R1/225(2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2006/003224

<p>A. 主题的分类</p> <p style="text-align: center;">参见附加页</p> <p>按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>IPC⁸: C12N, A61K, A61P, A23L</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT, CNKI lactobacill+ fermentum ulcerative colitic 发酵乳杆菌 溃疡 结肠</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN1701116A (VRI 生物医学有限公司) 23.11 月 2005 (23.11.2005) 权利要求 1-32, 实施例 1-6</td> <td>1-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO03013558A1 (DSIM-I) 20.2 月 2003 (20.02.2003) 摘要, 权利要求 1-11, 实施例</td> <td>1-8</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN1701116A (VRI 生物医学有限公司) 23.11 月 2005 (23.11.2005) 权利要求 1-32, 实施例 1-6	1-8	Y	WO03013558A1 (DSIM-I) 20.2 月 2003 (20.02.2003) 摘要, 权利要求 1-11, 实施例	1-8
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
Y	CN1701116A (VRI 生物医学有限公司) 23.11 月 2005 (23.11.2005) 权利要求 1-32, 实施例 1-6	1-8									
Y	WO03013558A1 (DSIM-I) 20.2 月 2003 (20.02.2003) 摘要, 权利要求 1-11, 实施例	1-8									
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “&” 同族专利的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>											
<p>国际检索实际完成的日期 07.3 月 2007 (07.03.2007)</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 12 · 4 月 2007 (12 · 04 · 2007)</p>									
<p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451</p>		<p>授权官员 冯怡 电话号码: (86-10)62085347</p> 									

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO03022255A2 (ACTI-N) 20.3 月 2003 (20.03.2003) 摘要, 权利要求 1-28	1-8
A	CN86103736A (海布雷德国际先锋公司) 20.5 月 1987 (20.05.1987) 摘要, 权利要求 1-17, 表 1-8	1-8
A	CN1853508A (韩国养药多股份有限公司) 01.11 月 2006 (01.11.2006) 摘要, 权利要求 1-12, 实施例 1-7	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/003224

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1701116A	23.11.2005	WO2004022727A1	18.03.2004
		AU2003258366A1	29.03.2004
		EP1539927A1	15.06.2005
		JP2005537791T	15.12.2005
		US2006067921A1	30.03.2006
		KR20050057259A	16.06.2005
WO03013558A1	20.02.2003	AU2002329043A8	13.10.2005
WO03022255A2	20.03.2003	EP1432426A2	30.06.2004
		AU2002341384A8	20.10.2005
		US2004241149A1	02.10.2004
		MXPA04001999A	01.08.2004
CN86103736A	20.05.1987	EP0203586A	03.12.1986
		PT82659A	28.11.1986
		AU5791586A	04.12.1986
		JP62089625A	24.04.1987
		DK8602527A	30.11.1986
		ES8802274A	16.07.1988
CN1853508A	01.11.2006	US2006233774A	19.10.2006
		KR20060110382A	25.10.2006
		JP2006298917A	02.11.2006

主题的分类

C12N1/20 (2006.01) i
A61K35/74 (2006.01) i
A61P1/04 (2006.01) i
A23L1/30(2006.01) i
C12R1/225(2006.01) i