



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102481322 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 30

(21) 申请号 201080029643. 9 *A61K 9/50* (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 04. 30 *A61K 9/51* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *A61P 1/16* (2006. 01)
61/174, 740 2009. 05. 01 US *A61P 3/04* (2006. 01)
A61P 3/06 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日 *A61P 9/10* (2006. 01)
2011. 12. 29 *C12N 1/04* (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据 *C12N 1/20* (2006. 01)
PCT/CA2010/000660 2010. 04. 30 *C12N 9/78* (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据 *C12N 11/02* (2006. 01)
W02010/124387 EN 2010. 11. 04 *C12N 11/04* (2006. 01)

(71) 申请人 微制药有限公司
地址 加拿大魁北克

(72) 发明人 S·普拉卡什 M·L·琼斯
C·马尔托尼

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111
代理人 杨颖 张一军

(51) Int. Cl.
A61K 35/74 (2006. 01)

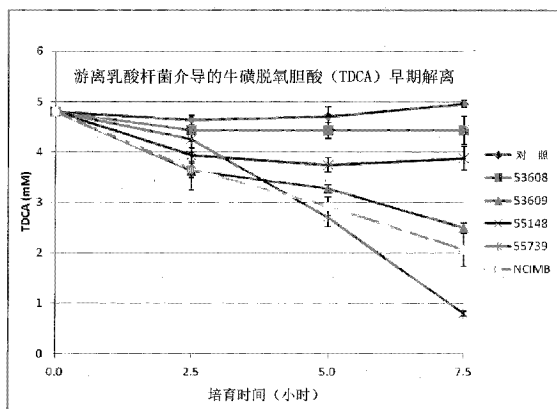
权利要求书 6 页 说明书 34 页 附图 7 页

(54) 发明名称

预防和治疗退化性疾病的细菌组合物

(57) 摘要

这里提供了一种降低血清胆固醇, 血脂, 脂肪体, 或动脉粥样硬化指数或用于预防或治疗动脉粥样硬化, 心血管疾病或脑血管疾病的口服组合物, 包括一种高 bsh 活性的细菌、或其分离物或上清液, 其中高 bsh 活性的细菌在 1 小时和 5 小时的时间段内测量时, 分别能降解超过 50 μmol 甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA) / 克 / 小时和超过 2 μmol 牛磺脱氧胆酸 (TDCA) / 克 / 小时, 或者在 30 分钟的时间段内测量时能降解超过 65 μmol GDCA / 克 / 小时和超过 7 μmol TDCA / 克 / 小时。



1. 一种口服组合物,包括:

一种高 bsh 活性的细菌、或其菌株或上清液,该高 bsh 活性的细菌在 1 小时和 5 小时的时间段测量时,分别能降解超过 $50 \mu\text{mol}$ 甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA)/克/小时和超过 $2 \mu\text{mol}$ 牛磺脱氧胆酸 (TDCA)/克/小时,或者在 30 分钟的时间段内测量时能降解超过 $65 \mu\text{mol}$ GDCA/克/小时和超过 $7 \mu\text{mol}$ TDCA/克/小时。

2. 权利要求 1 中所述口服组合物,其中高 bsh 活性的细菌在 30 分钟的时间段内测量时,降解 GDCA 的效率为大于 300 微摩尔/克/小时,并以大于 40 微摩尔/克/小时的速度降解 TDCA。

3. 权利要求 1 中所述口服组合物,其中高 bsh 活性的细菌在 30 分钟的时间段内测量时,降解 GDCA 的效率大于 2000 微摩尔/克/小时,并以大于 500 微摩尔/克/小时的速度降解 TDCA。

4. 权利要求 1 中所述口服组合物,其中高 bsh 活性的细菌在 30 分钟的时间段内测量时,降解 GDCA 的效率大于 15000 微摩尔/克/小时,并以大于 2000 微摩尔/克/小时的速度降解 TDCA。

5. 权利要求 1 到 4 中任一个口服组合物,其中还包括一种载体。

6. 权利要求 1 到 5 中任一个口服组合物,其中所述细菌是活的。

7. 权利要求 1 到 6 中任一个口服组合物,其中所述细菌是游离态的。

8. 权利要求 1 到 7 中任一个口服组合物,其中所述细菌为乳酸菌 (*Lactobacillus*), 双歧杆菌 (*Bifidobacteria*), 片球菌 (*Pediococcus*), 链球菌 (*Streptococcus*), 肠道球菌 (*Enterococcus*), 或明串珠菌 (*Leuconostoc*)。

9. 权利要求 8 中所述口服组合物,其中所述乳酸菌为罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)。

10. 权利要求 9 中所述口服组合物,其中罗伊氏乳杆菌为罗伊氏乳杆菌 (NCIMB 701359), 罗伊氏乳杆菌 (NCIMB 701089), 罗伊氏乳杆菌 (ATCC 55148), 罗伊氏乳杆菌 (ATCC23272), 罗伊氏乳杆菌 (NCIMB 702655), 罗伊氏乳杆菌 (LMG 18238), 罗伊氏乳杆菌 (CCUG 32271), 罗伊氏乳杆菌 (CCUG 32305), 罗伊氏乳杆菌 (CCUG 37470), 罗伊氏乳杆菌 (CCUG 44001) 或罗伊氏乳杆菌 (CCUG 44144)。

11. 权利要求 1 到 10 中任一个口服组合物,其中细菌浓度为 10^6 - 10^{12} CFU/克。

12. 权利要求 1 到 11 中任一个口服组合物,其中所述高 bsh 活性细菌在包括一种碳源、一种氮源、pH 为 4-7、且收集时间为 12 到 24 小时的发酵条件下生长。

13. 权利要求 12 中的口服组合物,其中碳源包含麦芽糖,蔗糖,糊精,一种山梨糖醇和葡萄糖的组合,或一种菊粉和葡萄糖的组合。

14. 权利要求 12 中的口服组合物,其中碳源包含麦芽糖。

15. 权利要求 12 中的口服组合物,其中氮源包含 (i) 酵母提取物和麦芽提取物,酵母提取物和牛肉膏提取物,或酪蛋白水解产物和麦芽提取物;和 (ii) 蛋白胨或胰蛋白胨。

16. 权利要求 15 中的口服组合物,其中氮源还包括半胱氨酸。

17. 权利要求 15 或 16 中的口服组合物,其中蛋白胨指 3 号蛋白胨。

18. 权利要求 1 到 17 中任一口服组合物,其中所述细菌被固定在一种聚合物中。

19. 权利要求 18 中的口服组合物,其中聚合物包含海藻酸钠 (alginate), 壳聚糖

(chitosan), 琼脂糖 (agarose), 果胶 (pectin), 琼脂胶 (agarpectin), 京尼平 (genipin), 或纤维素 (cellulose)。

20. 权利要求 1 到 19 中任一口服组合物, 其中所述细菌是被封装在半渗透聚合物微胶囊或纳米胶囊中。

21. 权利要求 20 中的口服组合物, 其中所述微胶囊或纳米胶囊包含海藻酸盐 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APA) 膜, 海藻酸盐 / 壳聚糖 / 海藻酸盐 (ACA) 膜或海藻酸盐 / 京尼平 / 海藻酸盐 (AGA) 膜。

22. 权利要求 20 中的口服组合物, 其中所述微胶囊或纳米胶囊包含海藻酸盐 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 果胶 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APPPA) 膜, 海藻酸盐 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 果胶 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 果胶 (APPPP) 膜, 海藻酸盐 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 壳聚糖 / 多聚-左旋-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APCPA) 膜, 海藻酸盐-甲醛合胍共聚物-海藻酸盐膜 (A-PCMG-A), 羟甲基丙烯酸酯 (hydroxymethylacrylate)-甲基丙烯酸酯 (methyl methacrylate) (HEMA-MMA) 膜, 多层 HEMA-MMA-MAA 膜, 聚丙烯腈聚氯乙烯 (PAN-PVC) 膜, 丙烯腈 / 甲基丙烯磺酸钠 (AN-69) 膜, 聚乙二醇 / 聚环五硅氧烷 / 聚二甲基硅氧烷 (PEG/PD5/PDMS) 膜或聚 N, N-二甲基丙烯酰胺 (PDMAAm) 膜。

23. 权利要求 20 的口服组合物, 其中所述微胶囊或纳米胶囊包含中空纤维 (hollow fiber), 硝酸纤维素 (cellulose nitrate), 聚酰胺 (polyamide), 脂质复合物多聚物 (lipid-complexed polymer), 一种硅酸 (siliceous) 包裹的囊泡 (vesicle), 纤维素硫酸盐 (cellulose sulphate) / 海藻酸钠 / 聚亚甲基-合-胍 (CS/A/PMCG), 醋酸邻苯二甲酸纤维素, 海藻酸钙, k-型卡拉胶-刺槐豆胶凝胶珠 (Locust bean gum gel beads), 结冷胶-黄原胶珠, 聚乳酸 / 聚羟基乙酸共聚物, 卡拉胶, 淀粉聚酸酐, 淀粉聚甲基丙烯酸酯, 氨基酸聚合物, 或肠溶衣聚合物 (enteric coating polymers)。

24. 权利要求 20 的口服组合物, 其中所述聚合物构成的微胶囊或纳米胶囊对胃肠道环境有抵抗性。

25. 权利要求 1 到 24 中任一口服组合物, 其中所述组合物是经过冻干, 加热干燥, 喷雾干燥或冷冻干燥的。

26. 权利要求 25 中的口服组合物, 其中所述组合物是用包含 0.2% 到 10% 麦芽糖糊精 (maltodextrin) 和 0.05% 到 0.33% 酵母提取物, 0.05% 到 2.5% 菊粉和 0.1% 酵母提取物, 或 0.3% 菊粉的冷冻保护剂进行冻干的。

27. 权利要求 1 到 26 中任一口服组合物, 其中所述组合物被制成湿的。

28. 权利要求 27 中的口服组合物, 其中所述组合物是存储在液体中的, 其中液体存储环境包括一种最终保存溶液其中包含 2.5% 到 10% 生长培养基, 50% 到 99.99% 酸奶酪或其他发酵牛奶, 50% 到 99.99% 培养物上清或 5% MRS。

29. 权利要求 1 到 28 中任一口服组合物, 其中所述组合物经过在防冻溶液中进行速冻。

30. 权利要求 29 中的口服组合物, 其中所述防冻溶液包含终浓度 0.2% 到 10% 麦芽糖糊精和 0.05% 到 0.33% 酵母提取物, 0.05% 到 2.5% 菊粉, 0.5M 海藻糖, 0.5M 果糖, 0.5M 乳糖, 0.5M 麦芽糖或 50% 到 99.99% 消耗培养基 (spent media)。

31. 权利要求 1 到 30 中任一口服组合物, 其中载体包括营养补充物, 食品, 饮料, 功能性食品或保健品。

32. 权利要求 1 到 30 中任一口服组合物,其中所述载体包含一种胶囊,药丸,凝胶胶囊,液体,或可溶性薄膜。

33. 权利要求 1 到 32 中任一口服组合物,其中所述组合物还包含甘油三酯降低剂。

34. 权利要求 33 中的口服组合物,其中所述甘油三酯降低剂包括鲨烯合成酶抑制剂,微粒体甘油三酯转移蛋白抑制剂,他汀类药物,胆汁酸螯合剂 (BAS),胆固醇吸收抑制剂,贝特类药物 (fibrate) 或其他 PPAR α 激动剂,双重 PPAR 激动剂,脂肪酶 (lipase) 抑制剂,蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 抑制剂,胰腺肽 YY₃₋₃₆,重组体或其他大麻素 (cannabinoid) 受体拮抗剂,或 5-HT_{2c} 激动剂如洛卡西林 (lorcaserin)。

35. 权利要求 1 到 34 中任一口服组合物,其中所述组合物还包括一种促进 HDL 增加或限制 HDL 减少的成分。

36. 权利要求 35 中任一口服组合物,其中所述成分包括一种他汀类药物,胆汁酸螯合剂 (BAS),胆固醇吸收抑制剂,贝特类药物或其他 PPAR α 激动剂,双重 PPAR 激动剂,脂肪酶抑制剂,酪氨酸蛋白磷酸酶 1B 抑制剂,胰腺肽 YY₃₋₃₆,重组或其它大麻素受体拮抗剂或 5-HT_{2c} 激动剂如洛卡西林。

37. 权利要求 1 到 36 中任一口服组合物,其中所述组合物还包含一种胆固醇降低剂。

38. 权利要求 37 的口服组合物,其中所述胆固醇降低剂包括一种胆汁酸螯合剂 (BAS),他汀类药物,依泽替米贝 (ezetimibe), α -亚麻酸 (linolenic acid), Ω -3,6,9,二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid) (EPA),二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid) (DHA),贝特类药物 (fibrates),可溶性纤维,多酚 (polyphenol), γ -谷维素橙皮素代谢产物 (oryzanol hesperetin metabolite),植物营养素 (phytochemical),其它益生菌 (probiotic),洋车前子 (psyllium),植物甾醇 (phytosterol),植物甾烷醇 (phytostanol),维他命 (vitamin),抗氧化剂 (antioxidant) 或抗生素 (antibiotic)。

39. 权利要求 34,36,或 38 中任一口服组合物,其中所述他汀类药物包括洛伐他汀 (Lovastatin),普伐他汀 (Pravastatin),辛伐他汀 (Zocor),氟伐他汀 (Fluvastatin),美伐他汀 (Mevastatin),匹伐他汀 (Pitavastatin),西立伐他汀 (Cerivastatin),辛伐他汀 (Simvastatin),罗苏伐他汀 (Rosuvastatin) 或阿托伐他汀 (Atorvastatin)。

40. 权利要求 34,36 或 38 中任一口服组合物,其中所述 BAS 包括考来烯胺 (colestyramine),考来替泊 (colestipol) 或考来维仑 (colesevelam)。

41. 权利要求 36,38 或 40 中任一口服组合物,其中所述贝特类 (fibrate) 药物包括安妥明 (cloffbrate),苯扎贝特 (bezafibrate),吉非贝齐 (gemfibrozil) 或诺贝特 (fenofibrate)。

42. 权利要求 1 到 41 中任一口服组合物,其中所述组合物还包含一种保护 bsh 活性的试剂。

43. 权利要求 42 中口服组合物,其中所述保护 bsh 活性的试剂包括菊粉,海藻糖,麦芽糖糊精,酵母提取物,聚乙二醇,甘油,脂质,乳化脂肪,乳制品 (dairy product),葡萄糖,果糖,蔗糖,聚糖,低湿休眠 (anhydrobiosis),多聚烷醇 (polycosanol),聚乙二醇 (PEG),一种植物固醇 (sterol),一种植物烷醇 (stanol) 或一种 Ω -脂肪酸。

44. 权利要求 43 中口服组合物,其中所述多聚烷醇包括二十八烷醇 (octacosanol),三十烷醇 (triacontanol),山嵛醇 (behenyl alcohol),二十四烷醇 (lignoceryl

alcohol), 蜡醇 (ceryl alcohol), 1-二十七烷醇 (heptacosanol), 1-二十九烷醇 (nonacosanol), 1-三十二烷醇 (dotriacontanol), 或三十四烷醇 (geddyl alcohol)。

45. 权利要求 1 到 44 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包含用于调节脂肪因子 (adipokines) 或与肥胖相关激素 (hormones of obesity) 的试剂。

46. 权利要求 45 中的口服组合物, 其中所述用于调节脂肪因子 (adipokines) 或与肥胖相关激素 (hormones of obesity) 的试剂包括瘦素 (leptin), 饥饿素 (ghrelin), 抵抗素 (resistin), 脂联素 (adiponectin), chemerin, IL-6, 内脂 (visfatin), 视黄醇结合蛋白 4 (retinol binding protein 4) 或纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1)。

47. 权利要求 1 到 46 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包含一种降血糖药 (hypoglycemic agent)。

48. 权利要求 47 中的口服组合物, 其中所述降血糖药包括二甲双胍 (metformin), 罗格列酮 (rosiglitazone), 吡格列酮 (pioglitazone), 格列苯脲 (glyburide), 格列齐特 (gliclazide), 格列美脲 (glimepiride), 格列吡嗪胆汁 (glipizidebile) 格列苯脲 (glibenclamide), 阿卡波糖 (acarbose), 米格列醇 (miglitol), 伏格列波糖 (voglibose), 西他列汀 (sitagliptin), 那格列奈 (nateglinide) 瑞格列奈 (repaglinide), 米格列奈 (mitiglinide), 阿格列汀 (Alogliptin), 沙格列汀 (saxagliptin), 维格列汀 (vildagliptin) 或大帕格里弗洛嗪 (dapagliflozin)。

49. 权利要求 1 到 48 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包括一种治疗药物用于降低促炎性细胞因子 (pro-inflammatory cytokines) IL-1 α/β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, 干扰素 (IFN)- γ , 肿瘤坏死因子 (TNF)- α , 或增加抗炎性细胞因子 (anti-inflammatory cytokines) IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11。

50. 权利要求 1 到 49 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包括维生素 B12。

51. 权利要求 1 到 50 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包括共轭亚麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA)。

52. 权利要求 1 到 51 中任一口服组合物, 其中所述组合物还包括罗伊氏菌素 (reuterin) 和或罗伊氏菌细胞周期蛋白 (reutericyclin)。

53. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物在降低一个动物血清胆固醇中的应用。

54. 权利要求 53 所述应用用于增加所述动物中血清高密度脂蛋白 (serum high density lipoproteins, HDL-C) 或限制动物血清高密度脂蛋白的下降。

55. 权利要求 53 所述应用用于降低所述动物的血清甘油三酸酯 (triglycerides)。

56. 权利要求 53 所述应用用于降低所述动物的动脉粥样硬化 (atherosclerotic) 风险因子, 该因子选自血清高胱氨酸 (homocystine), 纤维蛋白原 (fibrinogen), C-反应蛋白 (C-reactive protein), 脂蛋白 a, 尿酸 (uric acid), 基质金属肽酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9), 纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 或它的抗原, 组织纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA), 肿瘤坏死因子 (TNF) α , IL-6, P-选择素 (selectin), 单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 可溶性 CD40 配体 (sCD40L), 细胞间粘附分子

1(inter-cellular adhesion molecule 1, ICAM-1), 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO), 脂联素, 瘦素, 脂蛋白相关磷脂酶 A(lipoprotein-associated phospholipaseA), 和胰岛素 (insulin)。

57. 权利要求 53 的应用用于生产和递送维他命 B12 给所述动物。

58. 权利要求 53 的应用用于生产和递送共轭亚麻油酸给所述动物。

59. 权利要求 53 中的方法用于生产和递送罗伊氏菌素和或罗伊氏菌细胞周期素给所述动物。

60. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物在降低一个动物的致动脉粥样硬化指数中的应用。

61. 权利要求 60 的应用其中致动脉粥样硬化指数 (AI) 至少根据以下方程式中的一种计算得来: $AI = \text{Log}(\text{甘油三酸酯} / \text{HDL-C})$ 或 $AI = \text{TC} - \text{HDL-C} / \text{HDL-C}$ 。

62. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物预防或治疗动物体内动脉粥样硬化或由动脉粥样硬化引起的退化性 (degenerative) 紊乱中的应用。

63. 权利要求 62 的应用其中所述退化性紊乱包括脑血管疾病, 中风 (stroke), 血管疾病, 冠心病 (coronary artery disease), 心肌梗塞 (myocardial infarction), 血栓 (thrombosis), 心绞痛 (angina), 不稳定型心绞痛 (unstable angina), 间歇性跛行 (intermittent claudication), 短暂性脑缺血发作 (transient ischemic attack) 或肾功能衰竭 (renal failure)。

64. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物在降低动物身体脂肪总量或治疗肥胖或肥胖前期中的应用。

65. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物在预防或治疗动物体内代谢疾病或代谢紊乱中的应用。

66. 权利要求 65 中的应用, 其中所述代谢疾病或代谢紊乱包括高脂血症 (hyperlipidemia), 高血糖 (hyperglycemia), 高脂蛋白血症 (hyperlipoproteinemia), 糖耐量受损 (impaired glucose tolerance) (IFT), 胰岛素抵抗 (insulin resistance), 糖尿病前期 (pre-diabetes), I 型糖尿病 (type I diabetes), II 型糖尿病 (type II diabetes) 或代谢综合征 (metabolic syndrome)。

67. 能够降低胆汁酸的剂量的权利要求 1 到 52 中任一口服组合物在预防或治疗动物中伴有下列病症的肝脏疾病中的应用: 高浓度血清或肝脂质 (hepatic lipid) 和甘油三酯, 肝脏炎症, 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD), 酒精性脂肪性肝病 (AFLD), 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 肝硬化 (liver cirrhosis), 脂肪肝 (liver steatosis), 肝纤维化 (liver fibrosis), 异常高血清丙氨酸转氨酶 (ALT), 谷草转氨酶 (AST), 谷氨酰胺转移酶 (GGT), 或碱性磷酸酶 (Alk-P) 水平, EB 病毒 (Epstein-Barr virus), 肝炎, 自身免疫性肝炎, 肝肉芽瘤疾病, 胆管炎 (cholangitis), 肝细胞癌 (hepatocellular cancer), 胆管癌 (cholangiocarcinoma) 或肝脏代谢性疾病 (metabolic liver disease)。

68. 权利要求 53 到 67 中任一个应用, 其中所述组合物每天服用 1 到 4 次。

69. 权利要求 53 到 68 中任一个应用, 其中所述动物为人类。

70. 制备高 bsh 活性细菌的过程, 包括在包含有碳源, 氮源和 pH4 到 7 的培养基中培养产生 bsh 的细菌, 并且在 12 到 24 小时后收集细菌。

71. 权利要求 70 的过程,其中所述碳源包含麦芽糖,蔗糖,糊精,山梨醇和葡萄糖混合物或菊粉和葡萄糖混合物。

72. 权利要求 70 的过程,其中所述碳源为麦芽糖。

73. 权利要求 70 的过程,其中所述氮源包含 (i) 酵母提取物和麦芽提取物,酵母提取物和牛肉膏提取物,或酪蛋白水解产物和麦芽提取物;和 (ii) 蛋白胨或胰蛋白胨组成。

74. 权利要求 73 中的过程,其中所述氮源为半胱氨酸。

75. 权利要求 73 或 74 中的过程,其中所述蛋白胨为 3 号蛋白胨。

76. 权利要求 70 到 75 中任一过程,还包括用一种冷冻保护剂对游离的或微囊包裹的细菌进行冷冻干燥,其中所述冷冻保护剂包含 0.2%到 10%麦芽糖糊精和 0.05%到 0.33%酵母提取物,0.05%到 2.5%菊粉和 0.1%酵母提取物,或 0.3%菊粉。

77. 权利要求 70 到 75 中任一过程,进一步包括在液体存储环境中储存高 bsh 活性的游离的或微囊包裹的细菌,所述液体存储环境包括一种含 2.5%到 10%生长培养基,50%到 99.99%酸奶酪或其他发酵牛奶,50%到 99.99%培养物上清或 5% MRS 的防护溶液。

78. 权利要求 70 到 77 中任一过程,进一步包括在摄氏零下 80 度以下的条件下速冻所述组合物和冷冻防护剂,其中冷冻防护剂包含终浓度 0.2%到 10%麦芽糖糊精和 0.05%到 0.33%酵母提取物,0.05%到 2.5%菊粉,0.5M海藻糖,0.5M果糖,0.5M乳糖,0.5M麦芽糖或 50%到 99.99%消耗培养基。

预防和治疗退化性疾病的细菌组合物

[0001] 相关专利申请

[0002] 本申请案主张 2009 年 5 月 1 日递交的同时在案的美国临时专利申请案 No. 61/174,740 之利益及优先权,其整体揭示内容全文以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本公开是关于一种改良的高 bsh 活性细菌口服组合物,其分离物或上清液,及制备此改良组合物的加工过程。本公开也涉及本改良口服组合物的方法及用途,包括降低血清胆固醇、血脂、体脂肪或动脉粥样硬化指数,并预防和治疗动脉粥样硬化、心血管或脑血管疾病。

技术背景

[0004] 高胆固醇血症及冠状动脉疾病

[0005] 在西方国家冠状动脉疾病 (CAD) 是主要致死原因,是最常见的心脏病及最常见的猝死原因。临床及流行病学证据已经证实高血清胆固醇与 CAD 有密切关联。在表面上健康的人群中,血清胆固醇与冠状风险间有一个指数关系,在中年期,胆固醇水平每增加 1%, CAD 风险就增加 2% -3%。

[0006] 预计 1.07 亿美国成人总血清胆固醇水平是 5.18mmol/l (200mg/dL) 以上,其中大约 0.37 亿达到 6.22mmol/l (240mg/dL) 或更高水平。在成人中,总胆固醇水平达到 6.22mmol/l (240mg/dL) 或更高被认为有患心血管相关疾病的高风险,而当总胆固醇水平在 5.18 和 6.22mmol/l 之间时,被认为是高风险的临界线。根据国家胆固醇教育计划 (NCEP) 的推荐规范,任何治疗的首要目标是降低 LDL 胆固醇水平 (2002 年 NCEP 专家小组第三份报告)。新的指导方针现在开始考虑采用其他风险因素,例如年龄,家族史,吸烟,高血压,低高密度脂蛋白 (HDL) 及糖尿病,来评估需要接受治疗的胆固醇截断水平。因此首要预防措施中 LDL 目标依赖于患者短期或长期时间内 CAD 相关疾病的绝对风险。目前根据 NCEP 最近修订的推荐规范,另外有 0.36 亿美国公民应被视为高胆固醇。目前,不到一半的适合接受调整血脂治疗的患者正接受此类治疗,而接受治疗的患者中只有三分之一可以到达他们预期的 LDL 胆固醇目标。

[0007] 动脉粥样硬化的发病机理

[0008] LDL 胆固醇升高参与动脉粥样硬化和 CAD 是有据可查的。动脉粥样硬化的发生是由于包括载脂蛋白 B (例如,LDL 胆固醇) 在内的载脂蛋白滞留在动脉中,随着时间的推移,滞留在动脉中的载脂蛋白被修饰 (如,聚合或氧化),并发生一连串生物反应,那会发展成一个不良性炎症反应 (Tabas et al. 2007)。详细来说,单核细胞进入内皮下膜,分化成巨噬细胞吞噬滞留的被修饰的脂蛋白变成载有胆固醇的泡沫细胞,最终,炎性细胞进入病变区域并促成上述提及的不良性炎症反应,在已建立的病变中继续增加脂蛋白的滞留量会加快反应进程。细胞因子和生长因子介导的反应进程会引起平滑肌细胞迁移,并形成胶原纤维帽 (成熟的动脉粥样硬化斑块),最有可能作为一个瘢痕样反应来阻隔病变 (Tabas

et al. 2007)。然而,随着病变的发展,巨噬细胞的死亡,导致大面积细胞坏死,包括细胞外碎片,胆固醇晶体,蛋白酶及血栓性物质。此时,纤维帽变薄,斑块破裂或发生侵蚀,这可能会导致急性血栓性血管病变,例如心肌梗塞和中风。

[0009] 高密度脂蛋白 (HDL) 在“胆固醇逆向运输”中起关键作用,通过这种运输途径过量的胆固醇被从肝外细胞运送回肝脏以排出体外。在外周组织中,研究认为 HDL 通过各种机制移除细胞胆固醇,包括 HDL 载脂蛋白与细胞表面结合位点或受体相互作用 (Ta11, 1998)。卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (LCAT) 把吸收的胆固醇转化为胆固醇酯的作用,进而可以增加 HDL 的吸收能力。返回肝脏后,胆固醇被代谢成胆汁盐并排出体外。LDL 和 HDL 是维持机体胆固醇平衡的主要因素,高 HDL : LDL 比例与人类 CAD 低发病率非常相关。

[0010] 高血清甘油三酯水平也同样是动脉粥样硬化和 CAD 发病的风险因素,具体原因包括致动脉粥样硬化的乳糜微滴及 VLDL 残留物的增加,血清甘油三酯和 HDL 间的逆相关性,以及可能导致的 LDL 增加,这种归咎于残留物引起的肝脏 LDL 受体减少以及更高密度、更致动脉粥样硬化的 LDL 形成,也归咎于血清甘油三酯与溶解纤维蛋白 / 凝血系统间的相互作用。由于在甘油三酯水平升高和患动脉粥样硬化心血管疾病风险间有多重联系,因此高甘油三酯血症的筛查对判断患者患动脉粥样硬化心血管病的风险很重要。

[0011] 动脉粥样硬化中的免疫反应

[0012] 动脉粥样硬化的发病机理包括血脂异常,血管内皮细胞功能异常,及慢性炎症过程。已表明有几种介质参与动脉粥样硬化细胞间信号传递,包括小分子如一氧化氮,脂质介质如二十烷类和甾醇类,及细胞因子。炎症反应是由细胞因子即参与细胞到细胞的信号传递的糖蛋白介导的,它们由上皮中巨噬细胞及树突细胞做为对一种抗原或外源物刺激作出反应时产生。这种免疫反应在早期脂质条纹的形成中起作用,那时内皮细胞被激活并表达趋化因子和粘附分子从而引起单核细胞 / 淋巴细胞招募及渗透到内皮下膜。它也在不良临床血管事件的发生时起作用,那时斑块中被激活的细胞分泌可以降解细胞外基质和削弱纤维状帽的基质蛋白酶,引起破裂和血栓形成。最近发现,胃肠上皮细胞表面的钟状受体 (TLR) 与炎症反应诱导有关,其有助于启动起始信号来产生促炎性细胞因子 (Tobias and Curtiss, 2007)。

[0013] 特别强调的是,在动脉粥样硬化中,促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子对病原性 (先天的或适应性的) 和调控性免疫机制的贡献。细胞因子可以区分为那些本质上具有促炎性作用机制的,包括肿瘤坏死因子 (TNF- α), 白介素 -12, IL-18 及干扰素 γ , 和那些具有抗炎性作用机制的,包括 IL-4, IL-10, IL-13 及内源性 IL-1 受体拮抗剂 IL-1ra。作为对细胞因子的局部环境做出的反应, CD4⁺ 细胞分化成 Th1 (促炎性) or Th2 (抗炎性) 家系, Th1 和 Th2 细胞的首要诱导产物分别是 IL-12 和 IL-10。参与 Th1 过程的细胞因子包括 IL-2, IFN- γ 和 TNF, 而参与 Th2 过程的细胞因子包括 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 及 IL-13。超过 30 个白细胞介素家族主要成员已被鉴定,它们大多数在动脉粥样硬化形成中起作用。具体地,它们赋有主要抗动脉硬化 (IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11) 和促动脉硬化两种属性 (IL-1, IL-2, IL-6, IL-18)。调节这些白细胞介素是动脉粥样硬化的免疫治疗的最直接实用的方法。一般认为当上皮细胞 TLRs 识别非共生微生物标志时肠道细菌引发炎症反应,并且细胞因子信号可能被转化成增高的动脉粥样硬化风险。因此维持肠道内平衡需要共生微生物群落并通过用 TLRs 识别它们的非炎性标志。最新研究表明通过投递释放在盐水或发

酵牛奶中的共生细菌（嗜酸乳酸杆菌）可以很大程度地减少肠道内促炎性细胞因子的产生（Urbanska et al. 2009）。这项研究表明当嗜酸乳酸杆菌随盐水或发酵牛奶口服时，IL-6, IL-12, TNF- α , 及 IFN- γ 水平减少（只公布 IL-6 的数据）(Prakash and Urbanska 2007)。

[0014] 除了促炎性细胞因子和抗炎性细胞因子，高灵敏度 C 反应蛋白 (CRP) 可以说是最重要的冠状动脉疾病风险的血清炎症标志物。最近研究表明 CRP 本底水平升高的患者，患心血管疾病、糖尿病和高血压的风险增加。一个对 700 个护士的临床研究表明，那些摄入反式脂肪酸水平处于最高四分之一组的个体血 C 反应蛋白水平比那些处于最低四分之一组的个体高 73% (Lopez-Garcia, 2005)。其它研究已表明 CRP 以互补依赖的方式加剧缺血性坏死，并且 CRP 抑制剂可作为一种安全有效的针对心肌梗塞和脑梗塞的治疗方式 (Pepys et al. 2006)。

[0015] 代谢综合征

[0016] 血脂异常、动脉粥样硬化和慢性炎症通过代谢综合症与其它退化性疾病相关联。代谢综合症的特点是在个体中有一组代谢风险因子，并增加个体发展成动脉粥样硬化、心血管疾病、脑血管疾病和糖尿病的风险。这一系列体征和症状影响着每五个人中的一个，并随年龄的增加发病率增加。一些研究表明在美国此发病率达到总人口的 25% (Ford et al., 2002)。症状及特征包括：空腹高血糖症——2 型糖尿病或空腹血糖受损，血糖耐受性受损或胰岛素抗性；高血压；中心型肥胖（也被称为内脏，男性模式或苹果型肥胖），主要围绕在腰部的脂肪堆积导致的肥胖。

[0017] 非酒精性脂肪肝 (NAFLD)

[0018] 非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 被认为是代谢综合症在一种在肝脏中的表现，NAFLD 的定义为不是由于饮酒过度引起的肝脂肪炎症，NAFLD 与肥胖，异常血脂症，胰岛素抗性 (IR) 及 II 型（非胰岛素依赖性）糖尿病紧密相关。NAFLD 涵盖代谢脂肪肝病整个幅度，特别是未进行组织学定义的。NAFLD 在临床上最慢性的极端可以表现为简单的脂肪变性（脂肪肝），也可以发展成炎症性或纤维化脂肪肝，这种情况下它被称为 NASH。但是即使 NAFLD 的稳定形式也可能带有尚未鉴定的病状，因为通常脂肪肝的功能有效率低于非脂肪肝的。NASH 可能代表以小叶炎症脂肪变性为特征的中间阶段。已知 NAFLD 影响全球总人口的 10-39%，平均 25% 的发生率 (Angulo 2002)。

[0019] 有几种与 NAFLD 相关的风险因素，这些因素包括平时生活习惯及例如肥胖症、高血糖症、2 型糖尿病及高甘油三酯血症一类的疾病。另外，NAFLD 也与中心型肥胖症及内脏肥胖症密切相关。遗传及种族因素也与 NAFLD/NASH 有关。因此未来几十年，这些机体紊乱会显著增加慢性肝病的负担。

[0020] 高胆固醇血症和血脂异常的治疗及预防

[0021] 降低人体胆固醇水平的方法有调节饮食、改变生活习性、及运动和药物治疗。对于大多数个体来说仅仅调节饮食是不够的，研究表明完全去除饮食中的胆固醇和限制饮食中的脂肪含量为不到日常摄热量的百分之十，联合抗压力治疗和有氧运动，经过 5 年治疗，结果粥样动脉硬化斑块只有 4% 的退缩 (Ornish et al. 1990)。

[0022] 另外还可选择一些已经被推荐用于降低 LDL 胆固醇的饮食，例如可溶性纤维，植物甾醇类和甾烷醇，和大豆蛋白。最近研究报告表明每天 5-10g 可溶性膳食纤维可以降低大约 5% 的 LDL 胆固醇 (Third Report of the NCEP Expert Panel 2002)。报道中的关

于 HDL 胆固醇的影响很小、没有、或者不一致；但是看来可能要求调整胆固醇及胆汁代谢途径，因为大量研究表明减少饮食摄入或增强胆固醇分解代谢导致 HDL 水平降低，除非联合使用影响肝脏酶类的降胆固醇药物。而且尚未表明不溶性纤维显著影响循环中的胆固醇水平。动物及人实验表明植物固醇及甾醇类降低血浆总胆固醇和低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇水平。数据表明每日 2-3g 剂量的植物源性甾醇类和植物酯类可降低 6-15% 的 LDL 胆固醇水平而对甘油三酯或 HDL 胆固醇水平没有显著影响 (Hallikainen and Uusitupa, 1999)。此外，证明 HDL 没有减少或没有统计意义上的显著减少的研究经常包括正在接受可以改变肝脏酶促反应途径的如他汀类药物治疗的患者。研究已表明，在低饱和脂肪酸和胆固醇饮食中的大豆蛋白可降低大约 5% 的 LDL 胆固醇，但是剂量要求还未知 (Jenkins et al. 2000)。

[0023] 他汀类药物可以显著降低内源性胆固醇的合成，通过抑制 HMG-CoA 还原酶，和上调肝脏中低密度脂蛋白受体含量，导致 LDL-C 减少 20-30%。他汀类药物的功效已经通过大量临床实验充分地评价 (Pedersen et al. 1994)。然而，他汀类药物显现出罕见的但可能会很严重的副作用，其中最主要的是心肌病，这有可能会发展成致命的横纹肌溶解症和多神经病变 (Gaist et al. 2001; Gaist et al. 2002; Omar and Wilson 2002; Staffa et al. 2002)。

[0024] 研究表明，贝特类药物治疗会为患低 HDL 胆固醇 - 高甘油三酯血脂异常症的高危病人提供长期的疗效 (Goldenberg et al. 2008)。但是，贝特类药物也有一些副作用，包括增加患胆结石、心肌病的风险，及肠胃不适 (Sgro and Escousse, 1991)。

[0025] 烟酸已经使用了很长一段时间了，每天 1-2g 的剂量，可降低甘油三脂及减少 LDL-C。有趣的是，有实验表明，维生素 B3 在这样的水平可以也提高 HDL-C，并已经用于治疗 HDL-C 水平低、有患心脏病风险的患者。可惜的是，定期服用此类药物会伴有身体不适和严重的副作用，包括脸部及全身潮红。

[0026] 胆汁酸螯合剂 (BAS) 从 19 世纪 60 年代就在临床上用于降低 LDL 胆固醇，胆汁酸螯合剂遵医嘱率或按规定服药率低导致药效低，部分是由肠胃副作用引起的 (Probstfield and Rifkind, 1991)。

[0027] 益生菌

[0028] 有报道表明，益生菌与一系列临床相关的健康益处有关。各种乳酸菌菌株已在动物及人体内进行过充分的研究，有安慰剂对照的临床试验表明 *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* 及 *S. boulardii* 可以有效减少急性腹泻的持续时间 (Huang et al. 2002)。*L. rhamnosus* GG 有助于婴儿降低院内腹泻和轮状病毒肠胃炎的风险 (Szajewska et al. 2001)。Aso 等人的研究表明，*L. casei* Shirota 可以增加成年直肠癌患者体内 T 辅助细胞和 NK 细胞的百分比，并对浅表性膀胱癌的复发有保护作用 (Aso et al., 1995)。另外，有研究表明，筛选的乳酸杆菌菌株可以显著性抑制通过化学诱变的肠内肿瘤 (McIntosh et al. 1999)。乳酸杆菌已被用于患有严重急性胰腺炎的患者以预防败血症。Rayaes 等人的一项涉及肝移植患者的随机研究表明，与术后标准抗生素治疗相比，喂食活的 *L. plantarum* 细胞可显著减少术后感染 (Rayaes et al. 2002)。作为一种预防过敏症的方法，Lodinova-Zadnikova 等进行一项随机对照试验，研究用非致病性 *Escherichia coli* Nissle 1917 在刚出生时形成菌落的效果，经过 10-20 年的研究后，与对照主体相比，接种了 *E. coli* 菌株的个体中致病性细菌的群落显著减少，过敏症的发病率也显著降低。益生菌

也已被作为一种治疗方案来治疗炎症性肠内疾病 (IBD), 例如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎及结肠袋炎。

[0029] *L. reuteri* 是自然产生的肠道细菌中最普遍存在的成员之一, 已有实验证明 *L. reuteri* 的宿主专一性菌株对人类和动物的一种微生物混合物和化学相关疾病有广谱保护作用 (Dobrogosz, 2005)。然而, 传统的益生菌治疗包括服用细菌, 希望某些细菌可以在严酷的胃环境中存活下来, 并移生在肠内并在其中无限繁殖和生存。由于受酸性、免疫反应、及胆汁浓度等因素影响, 很少的细菌在十二指肠、空肠或回肠中生存。细菌必须存在与小肠的十二指肠或空肠中才能有降低胆固醇, 尤其是胆汁酸的作用。

[0030] 发明概述

[0031] 本发明人已经发现胆汁盐水解酶 (bsh) 高活性细菌提供了一种改进的药剂用于减少血清胆固醇、血脂、体脂肪和动脉粥样硬化指数, 并可用于预防和治疗动脉粥样硬化、心脑血管疾病。

[0032] 因此, 一方面, 本项说明提供了一种口服组合物, 包括一种高度 bsh 活性细菌, 及其菌株或上清液; 其中高 bsh 活性的细菌在 1 小时和 5 小时的时间段内测量时, 分别能降解超过 $50 \mu\text{mol}$ 甘氨脱氧胆酸 (GDCA)/克/小时和超过 $2 \mu\text{mol}$ 牛磺脱氧胆酸 (TDCA)/克/小时, 或者在 30 分钟的时间段内测量时能降解超过 $65 \mu\text{mol}$ GDCA/克/小时和超过 $7 \mu\text{mol}$ TDCA/克/小时。在一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 300 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 40 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。在另一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 2000 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 500 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。在另一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 15000 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 2000 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。

[0033] 在一个实施方案中, 这种细菌是乳酸杆菌 (*Lactobacillus*), 双歧杆菌 (*Bifidobacteria*), 片球菌 (*Pediococcus*), 链球菌 (*Streptococcus*), 肠球菌 (*Enterococcus*), 或明串珠菌 (*Leuconostoc*)。在另外一个实施方案中, 乳酸杆菌是罗伊氏乳杆菌, 可选择 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), *Lactobacillus reuteri* (ATCC55148), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 702655), *Lactobacillus reuteri* (LMG 18238), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32271), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32305), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 37470), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44001) or *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44144)。在另外的实施方案中, 此组合物还包含一种载体。

[0034] 在另外的实施方案中, 细菌的浓度是 10^6 - 10^{12} 菌落形成单位 (CFU)/克。

[0035] 本项公布中的细菌可选择容纳在一种聚合物, 或一种微胶囊, 或一种纳米囊中。

[0036] 在另外一个实施方案中, 此处描述的口服组合物培养在发酵的环境中, 包括碳源, 氮源, PH4-7, 可选择 5, 及培养时间为 12-24 小时, 可选择 12-16 小时。在一个实施方案中, 碳源包括麦芽糖、蔗糖、糊精 (dextrin)、山梨醇 (sorbitol) 和葡萄糖组合、或菊粉 (inulin) 和葡萄糖组合。在另外的实施方案中, 氮源包括 (i) 酵母膏 (yeast extract) 和麦芽膏 (malt extract), 酵母膏和牛肉膏 (beef extract), 或水解酪蛋白 (casein hydrolysate) 和麦芽膏; 和 (ii) 蛋白胨 (peptone) 或胰蛋白胨 (tryptone)。

[0037] 在另外的实施方案中,此处描述的口服组合物在冻干保护剂的作用下冻干。在一个实施方案中,冻干保护剂包括终浓度为 0.2% -10%的麦芽糖糊精 (maltodextrin) 和 0.05% -0.33%的酵母膏,或 0.05-2.5%菊粉和 0.05-0.1%酵母膏。在一个实施方案中,冻干保护剂包括终浓度为 2-4%麦芽糖糊精和 0.1%酵母膏,0.3%菊粉 (inulin) 和 0.1%酵母膏,或 0.3%菊粉。

[0038] 在另一个实施方案中,此处描述的口服组合物储存在液体中,所述液体的存储条件包括一个最终保护溶液,其中包含 2.5-10%生长培养基,50-99.99%酸奶 (yogurt) 或其它发酵牛奶,50-99.99%培养基上清液或 5% MRS。

[0039] 在另外一个实施方案中,此处描述的口服组合物在一种冷冻保护剂溶液中被快速冷冻,例如 0.2-10%麦芽糖糊精,可选择 1-3%麦芽糖糊精,和 0.05-0.33%酵母膏,可选择 0.1-0.2%酵母膏,0.05-2.5%菊粉,可选择至少 0.2%菊粉,0.5M 海藻糖 (Trehalose), 0.5M 果糖,0.5M 乳糖,0.5M 或 50-99.99%麦芽糖,可选择 50%消耗培养基 (spent media)。

[0040] 另一方面,本项公开中的口服组合物还包含一种降甘油三酯剂,一种用于增加 HDL 或限制 HDL 减少的药剂,一种降胆固醇剂,一种保护 bsh 活性的药剂,一种用于调节脂肪因子或肥胖激素的药剂,一种降血糖剂,或一种用于减少促炎性细胞因子 IL-1 α / β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , 或用于增加抗炎性细胞因子 IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11 水平的治疗剂。

[0041] 本项公开的另一方面是,本发明人提供了这种口服组合物的使用方法和用途,可用于降低血清胆固醇、血脂、体脂肪、或动脉硬化指数,和用于在一种动物,任意一种哺乳动物,如人类中预防和治疗动脉粥样硬化、心血管或脑血管疾病。

[0042] 这里也提到了生产高度 bsh 活性细菌的流程,包括在发酵条件下培养细菌,在冻干保护剂作用下冻干细菌,液体条件下存储细菌及在冷冻保护剂作用下快速冷冻细菌。

[0043] 在接下来的详细描述中,本项公开的其他特点及优势将变得显而易见。但是,应该了解当在说明本项公布的优选实施方案时,详细描述及具体实例只通过图解的形式给出,因为通过这些详细描述,在本项公开的精神和范围内的各种改变和修改对那些熟悉这方面的人来说会变得显而易见。

[0044] 附图概述

[0045] 现在将用相关的图示来描述本项公布的实施方案,其中

[0046] 图 1 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 和 NCIMB 701359) 在一段时间内降解 TDCA。本实验进行一式三份,误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0047] 图 2 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 和 NCIMB 701359) 在一段时间内降解 GDCA。本实验进行一式三份,误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0048] 图 3 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 和 *Lactobacillus fermentum* 菌株在一段时间内降解 TDCA。本实验进行一式三份,误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0049] 图 4 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (LabMet, NCIMB 701359) 和 *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) 在一段时间内降解 GDCA。本实验进行一式三份,误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0050] 图 5 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (LMG 9213, NCIMB 11951, ATCC 23272, NCIMB 702656, NCIMB 701359, 和 NCIMB 701089) 在一段时间内降解 TDCA。本实验进行一式三份, 误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0051] 图 6 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (LMG 9213, NCIMB 11951, ATCC 23272, NCIMB 702656, NCIMB 701359, and NCIMB 701089) 在一段时间内降解 GDCA。本实验进行一式三份, 误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0052] 图 7 表示三种 bsh 活性 *Lactobacillus reuteri* 菌株: Lr010: *Lactobacillus reuteri* (LabM et), Lr052: *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), 和 Lr050: *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 沉降区域的大小。

[0053] 图 8 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) 在一段时间内降解 TDCA。本实验进行一式三份, 误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0054] 图 9 表示游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) 在一段时间内降解 GDCA。本实验进行一式三份, 误差线代表一个平均数的标准偏差。

[0055] 图 10 表示一组典型的微胶囊形态学显微照片, 包括使用不同的冻干保护剂条件以微胶囊: 冻干保护剂 = 7 : 3 的比例, 用生理盐水, 1M 海藻糖和 10% 脱脂牛奶冷冻干燥和再水化微胶囊中的 *Lactobacillus* 后的微胶囊形态。

[0056] 详细说明

[0057] 本发明人已经证明高度 bsh 活性细菌提供了一种改良的口服组合物, 用于降低血清胆固醇、血脂、体脂肪及动脉硬化指数, 及用于预防和治疗动脉粥样硬化和心脑血管疾病。

[0058] 组合物

[0059] 因此, 提供了一种口服组合物用于降低血清胆固醇, 血脂, 体脂肪或动脉硬化指数, 或用于预防或治疗动脉粥样硬化, 心血管或脑血管疾病, 此组合物包括一种高度 bsh 活性细菌, 及其菌株或上清; 其中高 bsh 活性的细菌在 1 小时和 5 小时的时间段内测量时, 分别能降解超过 $50 \mu\text{mol}$ 甘氨酸脱氧胆酸 (GDCA) / 克 / 小时和超过 $2 \mu\text{mol}$ 牛磺脱氧胆酸 (TDCA) / 克 / 小时, 或者在 30 分钟的时间段内测量时能降解超过 $65 \mu\text{mol}$ GDCA / 克 / 小时和超过 $7 \mu\text{mol}$ TDCA / 克 / 小时。在一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 300 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 40 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。在另一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 2000 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 500 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。在另一个实施方案中, 在 30 分钟的时间段内测量时, 这种高度 bsh 活性细菌可降解 $> 15000 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 2000 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr。

[0060] 在一个实施方案中, 此组合物还包括一种载体。

[0061] 此处用到的高度 bsh 活性细菌指的是这种细菌, 在 1 小时和 5 小时的时间段内测量时, 分别可以降解 $> 50 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和降解 $> 2 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr; 或者在 30 分钟的时间段内测量时, 可降解 $> 65 \mu\text{mol}$ GDCA/g/hr 和 $> 7 \mu\text{mol}$ TDCA/g/hr, 也可以选择, 在 30

分钟的时间段内测量时,也可降解 $> 300 \mu\text{mol GDCA/g/hr}$ 和 $> 40 \mu\text{mol TDCA/g/hr}$,或者在 30 分钟的时间段内测量时,可降解 $> 2000 \mu\text{mol GDCA/g/hr}$ 和 $> 500 \mu\text{mol TDCA/g/hr}$,或者在 30 分钟的时间段内测量时,可降解 $> 15000 \mu\text{mol GDCA/g/hr}$ 和 $> 2000 \mu\text{mol TDCA/g/hr}$,并且根据实例中描述的方法,本领域内的技术人员可以很容易得到或识别这些细菌。在一个实施方案中,使用 HPLC 测量 GDCA 和 TDCA 的降解情况。Scalia 1988 and Jones et al. 2003 描述过使用 HPLC 检测胆汁盐的方法。

[0062] 此处用到的“菌株”这个术语指的是从细胞培养物或发酵产物中分离的成分,比未加工的样品更纯或更有活性。此处用到的“上清液”是指通过沉淀或离心后,沉淀物的上层液体。

[0063] 在一个实施方案中,高度 bsh 活性细菌是活的细菌,此处用到的“活的细菌”这个术语是指一种有营养代谢和废物排泄特征的细菌类生物量。在一个实施方案中,这种活的细菌是益生菌,此处用到的“益生菌”这个术语是指一种活的微生物,当达到足够数量时可以有有益宿主健康。

[0064] 这种高度 bsh 活性细菌可以是乳酸杆菌 (*Lactobacillus*), 双歧杆菌 (*Bifidobacteria*), 片球菌 (*Pediococcus*), 链球菌 (*Streptococcus*), 肠球菌 (*Enterococcus*), 或明串珠菌 (*Leuconostoc*)。在一个实施方案中,这种乳酸杆菌是罗伊氏乳杆菌,可以是 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB701359), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 702655), *Lactobacillus reuteri* (LMG 18238), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32271), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32305), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 37470), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44001) or *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44144)。

[0065] 在其他实施方案中,罗伊氏乳杆菌粘附到胃肠上皮细胞,竞争或抑制其他细菌要粘附或结合的细胞表面蛋白。

[0066] 在一个实施方案中,此处描述的这种口服成分中的细菌浓度为 10^6 - 10^{12} 菌落形成单位 (CFU)/克,可以是 10^8 - 10^{12} CFU/g。在其他实施方案中,此处提到的这种组合物包括 10^6 - 10^{14} CFU,可以是 10^8 - 10^{13} CFU。

[0067] 此处用到的“bsh”或“胆汁盐水解酶”是指一种由细菌产生的可以水解胆汁盐的酶类。

[0068] 这种高度 bsh 活性细菌可以在发酵条件下生长,发酵条件可以提高生物质的产出和 bsh 活性。在一个实施方案中,这种发酵条件包括接种到一种含有碳源,氮源,PH 4-7 的培养基,及培养时间 12-24 小时。在一个详细的实施方案中,发酵条件的 PH 为 5。在另一个实施方案中,培养时间 12-16 小时。

[0069] 在一个实施方案中,碳源包括麦芽糖,蔗糖,葡聚糖,山梨糖和葡萄糖组合,或菊粉和葡萄糖组合。在一个实施方案中,碳源是麦芽糖。在一个实施方案中,碳源被添加成终浓度为 2%,例如,如果使用菊粉和葡萄糖,每种添加的浓度是 1%,总碳源终浓度就为 2%。

[0070] 在另一个实施方案中,氮源包括 (i) 酵母膏和麦芽膏,酵母膏和牛肉膏,或水解酪蛋白和麦芽膏;和 (ii) 蛋白胨或胰蛋白胨。在一个实施方案中,氮源还包括半胱氨酸。蛋白胨可以是任意一种蛋白胨,包括但不限于,3 号蛋白胨,鱼蛋白胨,大豆蛋白胨,肌间质蛋

白胨 (proteose peptone) 和酪蛋白胨。在一个具体实施方案中, 蛋白胨是 3 号蛋白胨。在一个实施方案中, 蛋白胨被添加成终浓度为 2.5%, 例如, 使用一种蛋白胨, 酵母和麦芽膏为氮源, 添加 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母膏和 1% 麦芽膏成终浓度为 2.5%。在另外一个实施方案中, 牛肉膏替代麦芽膏, 酪蛋白替代任意一种蛋白胨或酵母膏。另外的实施方案中, 添加 0.01-0.05% 的半胱氨酸, 可选择 0.01%。

[0071] 在一个实施方案中, 高度 bsh 活性细菌是游离细菌, 此处用到的“游离细菌”这个术语指的是不被固定在聚合物中或包裹在人造细胞微胶囊中。

[0072] 在另外的实施方案中, 高度 bsh 活性细菌被包含或固定在聚合物中, 可选择一种天然聚合物。天然聚合物包括, 但不限于, 藻朊酸盐 (alginate), 壳聚糖, 琼脂糖, 果胶, 琼脂胶, 京尼平 (genipin), 和纤维素。在一个实施方案中, 高度 bsh 活性细菌被固定在一个薄膜上。

[0073] 在另外的实施方案中, 这种高度 bsh 活性细菌被胶囊化, 胶囊化是一种术语, 包括的方法有宏胶囊 (macroencapsulation) 化, 微囊化, 纳米囊化。“微囊化”和“纳米微囊化”这些术语是指属于胶囊化的一类方法, 其中包括制造小型, 微型或纳米型封装胶囊。胶囊化和微囊化是众所周知的技术, 微囊剂是小的球形容器, 或 1-999 μ m 范围内的涂层组织 (coated tissues), 及 1-999nm 范围内的纳米囊。然而宏胶囊 (macrocapsules) 是大一些的平板或中空纤维膜化容器。宏胶囊, 微囊及纳米囊必须包含一个单元环境, 能够支持细胞新陈代谢和增殖, 因为其中容纳的单元可以提供包藏功能。

[0074] 人工细胞微胶囊技术或者纳米包囊技术是一种将生物活性物质封装入专门的极薄的半渗透聚合物薄膜的技术 (见例子, Chang and Prakash, 1997; Chang, 1964)。制备人工细胞的方法在相关的技术领域已经有很好的文件记录。人工细胞膜是领域内技术人员随意选择或专门为每个特定治疗器械设计的, 因为一位技术人员可以为用途要求所必需的膜性能的人工细胞制剂设计多个不同的薄膜。不同薄膜的使用顾及到渗透性, 质量转移, 机械稳定性, 缓冲性能, 生物相容性和其他特征的变化。一种平衡需要在胶囊膜的各种物理性质中维持以便支持截留细胞的生存。

[0075] 微胶囊可以使用 Prakash 和 Jones 在编号为 2007-0116671 美国专利申请公开里的技术为本发明的细菌制备, 此技术以引用的方式并入本文中。

[0076] 薄膜的物质运输特性很重要因为分子的流入速率对细胞的存活是必要的, 而代谢废物的流出速率最终决定了截留细胞的生存力。任何阻碍物都可能应用于酶制剂应用领域。通常理想的胶囊渗透性是由截留分子量 (MWCO) 决定的, 而且是与应用相关的。MWCO 是指允许通过胶囊薄膜微孔分子的最大分子量 (Uludag et al. (2000) Adv. Drug Deliv. Rev. 42 :29-64)。便于移植, 截留分子量必须足够高以允许营养物质的通过, 但也要足够低以拒绝抗体和其他免疫系统分子。截留分子量的可选范围在 3000D 到 950,000D 之间 (Chang and Prakash, 1998)。口服微胶囊的截留分子量必须允许有害代谢物从血浆通入微胶囊, 并且必须促进改变了的分子随后的排除或者提供它的储藏 (Uludag et al., 2000)。由于目前公开的细胞为口服摄入, 技术人员可以选择性地使用一种允许营养通过但能阻碍抗体和其他免疫分子的保持器, 比如一种截留分子量为 3000D 到 950000D 的半透膜 (Chang and Prakash, 1998)。作为选择, 范围的下限可能为 :2000D, 4000D, 5000D or 10,000D, 而上限可能为 :900,000D, 750,000D or 500,000D。

[0077] 用于细胞疗法最常见的薄膜类型是基于单褐藻酸盐聚合物膜；但是，以其他的物质也可能使用，比如各种蛋白质，多聚血红蛋白和脂类 (Uludag et al., 2000 ;Prakash and Jones, 2002)。另一种构成膜成分的方法是用一种生物可降解的合成聚合物比如聚乳酸，聚乙酸和聚酸酐。通常使用的膜包括中空纤维膜，海藻酸盐-多聚赖氨酸-海藻酸盐 (APA) 膜，硝酸纤维素，聚酰胺，脂质聚合物和脂囊泡。已建立且有发展前景的活细胞封装和酶封装聚合物包括海藻酸盐-多聚赖氨酸-海藻酸盐 (APA)，海藻酸盐-聚亚甲基合胍-海藻酸盐 (A-PMCG-A)，甲基丙烯酸 β 羟乙酯-甲基丙烯酸甲酯 (HEMA-MMA)，多层 HEMA-MMA-MAA，聚苯胺-聚氯乙烯 (PAN-PVC)，聚丙烯腈 / 甲基丙烯磺酸钠 (AN-69)，聚乙二醇 / 聚 2,4,6,8,10-环五硅氧烷 / 聚二甲基硅氧烷 (PEG/PD₅/PDMS)，聚 N,N-二甲基丙烯酰胺 (PDMAAm)，硅酸封装和硫酸纤维素 / 海藻酸钠 / 聚亚甲基二胍 (CS/A/PMCG)。其他有用的材料包括但不限于纤维醋法酯，海藻酸钙和 k-卡拉胶-槐豆胶凝胶珠，兰胶-黄原胶微球，聚乳酸-聚甘醇酸共聚合物，卡拉胶，淀粉聚酸酐，淀粉聚甲基丙烯酸酯，多聚氨基酸，肠溶衣聚合物。

[0078] 薄膜的设计，用以应用在口服活细胞疗法，必须考虑到几个主要因素以至于将微生物死亡最少化并使治疗效力最大化。为保证它们的效力，用于口服的人工胶囊包裹的细胞必须设计成能保护胶囊内的活性物质以避免胃里的酸性环境和肠免疫反应引起的免疫球蛋白的释放。

[0079] 一种有用的构成是用多聚赖氨酸 (PLL) 封装海藻酸钙微珠形成海藻酸盐-多聚 L-赖氨酸-海藻酸盐 (APA) 微胶囊。在 APA 薄膜微胶囊里，海藻酸盐构成核芯并给细胞提供基质，且 PLL 结合在海藻酸盐芯上。PLL 对海藻酸盐的结合是 PLL 里面的许多长链烷氨基从聚酰胺主链上在许多方向延伸出来并且通过静电相互作用力与各种海藻酸盐发生作用的结果。这种互相之间交联的结果产生了一种稳固结合物的薄膜以减少海藻酸盐薄膜的孔隙并形成一种免疫保护屏障。

[0080] 另外，海藻酸盐 / 多聚 L-赖氨酸 / 果胶 / 多聚 L-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APPPA)，海藻酸盐 / 多聚 L-赖氨酸 / 果胶 / 多聚 L-赖氨酸 / 果胶 (APPPP)，和海藻酸盐 / 多聚 L-赖氨酸 / 壳聚糖 / 多聚 L-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APCPA) 薄膜都可用于封装。当考虑到对膜渗透性更精确的调控时，这些多层薄膜组分在 GI 稳定性测试中表现很好，提供了增加的对完全溶于水，稀酸碱和离子螯合剂存在情况下的阻力。

[0081] 多种方法可用于制备包含治疗所需的活细胞的人造细胞。比如，为了制备传统的海藻酸盐-多聚赖氨酸-海藻酸盐 (APA) 薄膜，活细胞如细菌细胞悬浮在 1.5% 的天然海藻酸盐聚合物基质中。粘性的聚合物-细菌悬液使用注射泵通过 23-gauge 的针头。通过 16-gauge 的同轴心针头出来的灭菌压缩空气用来风切从 23-gauge 的针头出来的小液滴。将液滴在温和搅拌的冰浴的固化化合物溶液，比如 CaCl₂ (1.4%)，中凝胶化 15 分钟。在 CaCl₂ 溶液中凝胶化后，微珠用 HEPES (0.05%，pH 7.20) 洗涤，涂上多聚赖氨酸 (0.1%，10 分钟)，再次用 HEPES (0.05%，pH 7.20) 洗涤。然后，合成的胶囊通过与海藻酸盐的反应 (0.1% for 10min) 涂上一层膜，并且用适当的化学物质清洗以使其里面的核心内容溶解。这一步往往用 3.00% 的柠檬酸盐 (3.00% 于 1 : 1HEPES 盐缓冲液，pH 7.20) 洗浴。形成的微胶囊可以在最少的溶液 (10% 细胞营养素加 90% 水) 中储藏在 4℃。

[0082] 因此，在一个实施方案中，高度活性细菌封装于半渗透性聚合物微胶囊 (1-999 μ m) 或纳米胶囊 (1-999nm) 中。在一个实施方案中，半渗透聚合物微胶囊或纳米胶

囊包含海藻酸盐 / 多聚-L-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APA), 海藻酸盐 / 壳聚糖 / 海藻酸盐 (ACA), 海藻酸盐 / 京尼平 / 海藻酸盐 (AGA) 薄膜。在另一个实施方案中, 微胶囊或纳米胶囊包括海藻酸盐 / 多聚-L-赖氨酸 / 果胶 / 多聚-L-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APPPA), 海藻酸盐 / 多聚-L-赖氨酸 / 果胶 / 多聚-L-赖氨酸 / 果胶 (APPPP), 和海藻酸盐 / 多聚-L-赖氨酸 / 壳聚糖 / 多聚-L-赖氨酸 / 海藻酸盐 (APCPA), 海藻酸盐-聚亚甲基合胍-海藻酸盐 (A-PMCG-A), 甲基丙烯酸 β 羟乙酯-甲基丙烯酸甲酯 (HEMA-MMA), 多层 HEMA-MMA-MAA, 聚苯胺-聚氯乙烯 (PAN-PVC), 聚丙烯腈 (AN-69), 聚乙二醇 / 聚 2,4,6,8,10-环五硅氧烷 / 聚二甲基硅氧烷 (PEG/PD₅/PDMS), 或聚 N,N-二甲基丙烯酰胺 (PDMAAm) 薄膜。在另一实施方案中, 微胶囊或者纳米胶囊包括中空纤维, 硝酸纤维素, 聚酰胺, 脂质聚合物, 脂囊泡, 硅酸封装, 硫酸纤维素 / 海藻酸钠 / 聚亚甲基二胍 (CS/A/PMCG), 邻苯二甲酸乙酸纤维素, 海藻酸钙, k-卡拉胶-槐豆胶凝胶珠, 兰胶-黄原胶微珠, 聚乳酸-聚甘醇酸共聚合物, 卡拉胶, 淀粉聚酸酐, 淀粉聚甲基丙烯酸酯, 氨基酸聚合物, 肠溶衣聚合物。

[0083] 在另外的实施方案中, 聚合微胶囊或者纳米胶囊能耐肠胃内的条件, 比如 pH 1-8 和 / 或胆汁 [1-30mmol]。

[0084] 这里公开的口服组合物可选择性地冻干, 高温干燥, 喷雾干燥或冷冻干燥。除此之外, 这利口服组合物可选择性地湿化制备。

[0085] 在一种实施方案中, 这里描述的口服组合物是用冻干支持剂冻干以确保长久生存和提高 bsh 活性。典型的冻干支持剂包括但不限于, 终浓度为 0.2% 到 10% 的麦芽糖糊精和 0.05% 到 0.33% 的酵母提取物或者 0.05-2.5% 的菊粉和 0.05 到 0.1% 的酵母提取物。在一实施方案中, 冻干支持剂包括终浓度为 2-4% 的麦芽糖糊精和 0.1% 的酵母提取物, 0.3% 菊粉和 0.1% 酵母提取物, 或者 0.3% 菊粉。

[0086] 另一实施方案中, 这里描述的口服组合物储存在液体中以确保生存力和提高 bsh 活性。典型的液体储存条件包括但不限于, 一种终浓度的防腐液或保护溶液包含 2.5-10% 生长液 (如此所述), 50-99.99% 的酸奶或其它发酵牛奶, 55-99.99% 的培养上清液或 5% M RS。

[0087] 另外一种实施方案中, 这里描述的口服组合物是瞬间冻存的以确保生存力和提高 bsh 活性。典型的瞬间冷冻条件包括但不限于, 一种终浓度的冷冻保护剂溶液包含 0.2-10% 麦芽糖糊精, 可选择 1-3% 麦芽糖糊精和 0.05 到 0.33% 酵母提取物, 可选择 0.1-0.2% 酵母提取物, 0.05 到 2.5% 菊粉, 也可选择至少 0.2% 的菊粉, 0.5M 海藻糖, 0.5M 果糖, 0.5M 乳糖, 0.5M 麦芽糖或 50-99.99%, 以及选择性地 50% 的消耗培养基。

[0088] 这里使用的术语“载体”指的是一种可接受载体以促进给患者摄入。比如, 一种促进口服的可接受的载体包括但不限于, 一种补充物, 食品, 饮料, 功能保健食品或营养品, 或者赋形剂。“营养食品”是指一种从食品 (或者往往用来制作食品的原料, 比如植物, 动物或其他生物有机体) 中分离或纯化出的产品, 并被认为有保健的功效, 比如一种药学的、生理学的或预防的效果。“功能食物产品”意思是它是一种食品, 是作为一种日常饮食来消耗的, 且具有保健功效, 比如药学的、生理学的或预防的效果, 除了供应营养的基本营养学功能。

[0089] 在另一实施方案中, 载体包括一种胶囊, 药片, 凝胶胶囊, 液体, 或者可溶性膜。

[0090] 在这里公开的以降低血清胆固醇、血脂、体脂肪、或动脉粥样硬化指数或者用以预防或治疗动脉粥样硬化、心血管或脑血管疾病的口服组合物进一步可选择地包括其它相对

这些适应症的试剂或药物。因此,在一个实施方案中,口服组合物进一步包括三酸甘油酯降低药剂,可选择鲨烯合酶抑制剂、微粒体甘油三酸酯转移蛋白抑制剂、他汀类药物、胆汁酸螯合剂、胆固醇吸收抑制剂、纤维酸类和其 PPAR α - 受体激动剂、双重 PPAR 激动剂、酯酶抑制剂、蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 1B 抑制剂、胰腺肽 YY₃₋₃₆、重组和其它大麻受体拮抗剂或者 5-HT_{2c} 激动剂、比如洛卡西林 (lorcaserin)。在另一实施方案中,组合物进一步包括一种增加高密度脂蛋白 (HDL) 或限制 HDL 减少的药剂,可选择有,他汀类药物,胆汁酸螯合剂,胆固醇吸收抑制剂,纤维酸类和其他 PPAR α - 受体激动剂,双重 PPAR 激动剂,酯酶抑制剂,蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 1B 抑制剂,胰腺肽 YY₃₋₃₆, 重组和其他大麻受体拮抗剂或者 5-HT_{2c} 激动剂,比如洛卡西林 (lorcaserin)。在另一个实施方案中,口服组合物进一步包括脱胆甾醇药,可选择的有,胆汁酸螯合剂 (BAS),他汀类药物,依泽替米贝, α - 亚麻酸, ω -3,6,9 二十碳五烯酸 (EPA),二十二碳六烯酸 (DHA),纤维酸类,可溶纤维,多酚, γ - 谷维素皮素代谢物,植物营养素,其他益生菌素,车前纤维,植物甾醇,植物脂烷醇,维生素,抗氧化剂或抗生素。他汀类药物可选择于一组药物包含洛伐他汀,普伐他汀,斯伐他汀,氟伐他汀,美伐他汀,匹伐他汀,西伐他汀,辛伐他汀,瑞舒伐他汀和阿托伐他汀。BAS 可以是考来烯胺,考来替泊或者考来维仑。纤维酸类可以是安妥明,苯扎贝特,吉非罗齐或非诺贝特。在另外的实施方案中,口服组合物进一步包括一种保护 bsh 活性的药物,可选择的有,菊粉,海藻糖,麦芽糖糊精,酵母提取物,聚乙二醇,甘油,脂类,乳化脂,乳制品,葡萄糖,果糖,蔗糖,多聚糖,低湿休眠剂 (anhydrobiosis),甘蔗原素 (polycosanol),聚乙二醇 (PEG),植物甾醇,植物固醇,或者 ω 脂肪酸。甘蔗脂肪醇 (批 olycosanol) 可以是二十八烷醇,三十烷醇,二十二烷醇,二十四烷醇,二十六烷醇,1- 二十七烷醇,1- 二十九烷醇,1- 三十二烷醇或 geddy1 醇 (geddy1 alcohol)。在另外的实施方案中,口服组合物进一步包括一种调节脂肪因子或肥胖激素的药剂,可选择有,立普婷,胃饥饿素,抵抗素,脂联素,趋化素,白介素 (IL-6),内脂素,视黄醇结合蛋白 4 或纤溶酶原激活物抑制剂 -1。在另一种实施方案中,口服组合物进一步包括一种降血糖药,可选择有,甲福明,罗格列酮,匹格列酮,格列苯脲,格列齐特,格列美脲,格列吡嗪 (Glipizidebible),格列本脲 (Glibenclamide),阿卡波糖,米格列醇,弗格列波糖,西他列汀,那格列奈,瑞格列奈,米格列奈,匹格列酮,沙格列汀,维达列汀和达格列净。进一步的实施方案中,口服组合物还包括能够降低促炎性细胞激素 IL-1 α / β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α 或者提高抗炎细胞激素 IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11 的水平的治疗剂。

[0091] 在另外一种实施方案中,口服组合物进一步包括维生素 B12。在另一实施方案中,口服组合物进一步包括共轭亚油酸 (CLA)。在另一实施方案中,口服组合物进一步包括罗伊氏菌素 (reuterin) 和 / 或罗伊氏菌细胞周期蛋白 (reutericyclin)。

[0092] 方法和使用

[0093] 本说明书包括这里公布的口服组合物的方法和使用。在一个实施方案中,这里提供了一种治疗的方法,包括给其中所需的动物服用这里公布的口服组合物。所提供的还有这里公布的用于动物治疗的口服组合物的用法。进一步提供的是这里提及的口服组合物在治疗用药物制备的用法。还有提供的是这里公开的口服组合物在治疗中的用法。

[0094] 这里描述的成分对降低需治疗动物的血清胆固醇有作用。因此,在一方面,目前这个专利申请说明书提供了一种降低需治疗动物的血清胆固醇的方法,包括服用胆汁酸以降

低这里公布的口服组合物。也提供了一种公布于此的可降低需治疗动物血清胆固醇的口服组合物的用法。还提供的是一种公布于此的可口服组合物在制备可降低需治疗动物血清胆固醇的药剂的用法。进一步提供的是一种公布于此的用以降低需治疗动物血清胆固醇的口服组合物。

[0095] 在一实施方案中,需治疗的动物积累在血清和/或组织里的胆固醇增高,导致病理或有过多胆固醇作为一个危险因素。胆固醇失调包括家族性高胆固醇血症或遗传性胆固醇失调,胆固醇代谢的基因产物缺陷如 7- α -羟化酶,和各种黄瘤。血清胆固醇水平的提高可能预示着动脉粥样硬化,胆汁性肝硬变,家族性高脂血症,高胆固醇膳食,甲状腺机能减退,心肌梗塞,肾病综合症和非受控型糖尿病。“过多的胆固醇”指的是在标准(正常)的胆固醇范围之外。标准的胆固醇水平是低于 200mg/dL。最高临界点是 200-239mg/dL 并且任何超过 240mg/dL 都是高的。国家胆固醇教育计划 NCEP 第 3 次胆固醇报告包括“完整汇报”和“药物治疗”部分。这提供了用他汀类药物,胆汁酸螯合剂,饮食等等的胆固醇治疗例子的回顾,而且涉及胆固醇水平和危险因素(如见表 IV. 1-1VI. 1-1 ;VI. 1-2, VI. 1-3)。在此描述的组合物由于能减少胆汁水平而与胆汁酸螯合剂相似。NCEP 报告提供了涉及其它危险因素存在下的药物治疗的用法指导。存在两种类型的胆固醇,HDL 胆固醇(有时叫有益胆固醇)和 LDL 胆固醇(有时叫有害胆固醇)。“胆固醇过多”也可由 LDL 断定的。比如,对于存在多种危险因素(2 个或更多)的个体,当 LDL 胆固醇: $> 100\text{mg/dL}$ (以减少 LDL 胆固醇到 $< 100\text{mg/dL}$ 为目标),至少 130mg/dL(以减少 LDL 胆固醇到低于 130mg/dL 为目标),至少 160mg/dL(以减少 LDL 胆固醇到低于 130mg/dL 为目标)时,药物也是可选择地考虑的。此外,对于有 0-1 个危险因子的个体,当 LDL 胆固醇至少 190mg/dL(以减少 LDL 胆固醇到低于 160mg/dL 为目标)时,药物治疗也是可选择考虑的。正常值随着年龄而增高,而绝经前女性相比于同年龄男性其水平稍微低点。

[0096] 在另一个实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也可增加、或限制动物血清高密度脂蛋白(HDL-C)的减少。在另外的实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也能减少动物的血清甘油三酯。在另外一个实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也可减少动物动脉粥样硬化的危险因素。动脉粥样硬化的危险因素,包括但不限于血清高胱氨酸,纤维蛋白原,C 反应蛋白,脂蛋白(a),尿酸,基质金属蛋白酶 9,纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)或它的抗原,组织纤溶酶原激活物(tPA),TNF- α , IL-6, P-选择素,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),可溶性 CD40 配体(sCD40L),细胞间粘附分子-1(ICAM-1),髓过氧化物酶(MPO),脂联素,瘦素,脂蛋白相关性磷脂酶 A 和胰岛素。

[0097] 在另外一个实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也可产生和输送维生素 B12 给动物。在另一个实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也产生和输送共轭亚麻酸(CLA)给动物。在另一实施方案中,降低血清胆固醇的方法和用法也产生和输送 reuterin 和 reutericyclin 给动物。

[0098] 描述于此的口服组合物也对减少需治疗动物的甘油三酯有效。因此,在一方面,此说明书提供了一种降低需治疗动物的血清甘油三酯的方法,包括服用公布于此的能降低胆汁酸水平的有效剂量的口服组合物。这里还提供了一种公布于此的口服组合物的用途,用于减少需治疗动物血清甘油三酯。还提供了公布于此的一种口服组合物在制备可减少需治疗动物血清甘油三酯的药物上的用途。还进一步提供的是一种公布于此的适用于减少需治

疗动物血清甘油三酯的口服组合物。

[0099] 在另一方面,此专利说明书提供了一种降低动物致动脉粥样硬化指数的方法,包括给动物服用此说明书提及的能有效降低胆汁酸水平的剂量的的一种口服组合物。也提供了能降低胆汁酸水平的有效剂量的本说明书里的组合物在降低动物致动脉粥样硬化指数的应用。还提供了能降低胆汁酸水平的有效剂量的本说明书里的组合物在制备可降低动物致动脉粥样硬化指数的药物中的应用。进一步提供的是能降低胆汁酸水平的有效剂量的本说明书里的口服组合物用于降低动物致动脉粥样硬化指数。致动脉粥样硬化指数是用表一所示的至少一个方程式计算的。

[0100] 再一方面,说明书提供了一种预防或治疗动物中的动脉粥样硬化或动脉粥样硬化导致的退行性疾病的方法,包括给动物服用本说明书所示的能有效降低胆汁酸水平的剂量的口服组合物。也提供的是本说明书所示的口服组合物的胆汁酸降低剂量的的一种用途,用于预防或治疗动脉粥样硬化或动脉粥样硬化导致的退行性疾病。还提供的是本说明书里的胆汁酸降低剂量的口服组合物在制备预防或治疗动脉粥样硬化或动脉粥样硬化导致的退行性疾病的药物的应用。进一步提供的是用于动脉粥样硬化或动脉粥样硬化导致的退行性疾病的预防或治疗中的说明书里的口服组合物的胆汁酸降低剂量。退行性疾病包括但不限于脑血管疾病,中风,血管疾病,冠状动脉疾病,心肌梗塞,血栓症,心绞痛,不稳定型心绞痛,间歇性跛行,短暂性脑缺血,或者肾衰竭。

[0101] 术语“预防或治疗”指的是减少不正常状况的可能性或者改善这种状况。

[0102] 在另一方面,本说明书提供了一种降低动物总体脂肪或治疗肥胖或肥胖前期的方法,包括给动物服用胆汁酸降低剂量的本说明书所示口服组合物。也提供的是一种降低动物总体脂肪或治疗肥胖或肥胖前期的口服组合物的胆汁酸降低剂量的用途。还提供的是胆汁酸降低剂量的说明书所示的口服组合物在制备降低动物总体脂肪或治疗肥胖或肥胖前期药物中的用途。进一步提供的是胆汁酸降低剂量的口服组合物,用于降低动物总体脂肪或治疗肥胖或肥胖前期。用于此的术语“肥胖”指的是一种疾病、医疗健康状况或失调而且定义为体质指数 (BMI) > 30。而 BMI 在 25-30 之间为肥胖前期。

[0103] 在另外一个方面,此说明书为动物代谢性疾病或失调的预防和治疗提供了一种方法,包括给动物服用说明书所示胆汁酸降低剂量的口服组合物。也提供的是说明书所示胆汁酸降低剂量的口服组合物在预防和治疗动物代谢性疾病或失调的应用。还提供的是说明书所示胆汁酸降低剂量的口服组合物在制备用于动物代谢性疾病或失调的预防和治疗药物中应用。进一步提供的是说明书所示胆汁酸降低剂量的口服组合物,用于预防和治疗动物代谢性疾病或失调。代谢性疾病和失调包括但不限于高血脂,高血糖,高脂蛋白血症,糖耐量受损,胰岛素抗性,糖尿病前期,一型糖尿病,二型糖尿病和代谢综合征。

[0104] 在另一方面,本说明书提供了一种用于与动物中高血清或肝脏脂质和甘油三酯浓度,肝炎,非酒精性脂肪肝病 (NAFLD),酒精性脂肪肝病 (AFLD),非酒精性脂肪性肝炎 (NASH),肝硬化,脂肪肝,肝纤维化,异常高的血清 ALT、AST、GGT、或 Alk-P 水平,EB 病毒,肝炎,自身免疫性肝炎,肝肉芽肿性病,胆管炎,肝细胞癌,胆管癌,代谢性肝病有关的肝脏疾病或失调的预防或治疗的方法,包括给动物服用说明书所示胆汁酸降低剂量的口服组合物。也提供的是说明书所示胆汁酸有效降低剂量的口服组合物的用途,用于预防或治疗与动物中高血清或肝脂和甘油三酯浓度,肝炎,非酒精性脂肪肝病 (NAFLD),酒精性脂肪肝病

(AFLD), 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 肝硬化, 脂肪肝, 肝纤维化, 异常高的血清 ALT、AST、GGT、或 Alk-P 水平, 巴尔病毒, 肝炎, 自身免疫性肝炎, 肝肉芽肿性病, 胆管炎, 肝细胞癌, 胆管癌, 代谢性肝病有关的肝脏疾病或失调。还提供的是说明书所示胆汁酸有效降低剂量的口服组合物在制备用于预防或治疗与动物中高血清或肝脂和甘油三酯浓缩物, 肝炎, 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD), 酒精性脂肪肝病 (AFLD), 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 肝硬化, 脂肪肝, 肝纤维化, 异常高的血清 ALT、AST、GGT、或 Alk-P 水平, EB 病毒, 肝炎, 自身免疫性肝炎, 肝肉芽肿性病, 胆管炎, 肝细胞癌, 胆管癌, 代谢性肝病有关的肝脏疾病或失调的药物中的应用。进一步提供的是说明书所示胆汁酸有效降低剂量的口服组合物用于预防或治疗与动物中高血清或肝脏脂质和甘油三酯浓度, 肝炎, 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD), 酒精性脂肪肝病 (AFLD), 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH), 肝硬化, 脂肪肝, 肝纤维化, 异常高的血清 ALT、AST、GGT、或 Alk-P 水平, EB 病毒, 肝炎, 自身免疫性肝炎, 肝肉芽肿性病, 胆管炎, 肝细胞癌, 胆管癌, 代谢性肝病有关的肝脏疾病或失调。

[0105] 其它药剂或疗法可以与公布于此的口服组合物一起摄入或结合使用。因此, 在一个实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用一种甘油三酯降低药剂, 可选择的有, 鲨烯合酶抑制剂, 微粒体三酰甘油转移蛋白抑制剂, 他汀类, 胆汁酸螯合剂, 胆固醇吸收抑制剂, 纤维酸类和其他 PPAR α - 受体激动剂, 双重 PPAR 激动剂, 酯酶抑制剂, 蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 1B 抑制剂, 胰腺肽 YY₃₋₃₆, 重组和其它大麻受体拮抗剂或者 5-HT_{2c} 激动剂, 比如洛卡西林 (lorcaserin)。在另一实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用增加 HDL 或限制 HDL 减少的药剂, 可选择的有, 他汀类, 胆汁酸螯合剂, 胆固醇吸收抑制剂, 纤维酸类和其他 PPAR α - 受体激动剂, 双重 PPAR 激动剂, 酯酶抑制剂, 蛋白质酪氨酸磷酸酯酶 1B 抑制剂, 胰腺肽 YY₃₋₃₆, 重组和其它大麻受体拮抗剂或者 5-HT_{2c} 激动剂, 比如洛卡西林 (lorcaserin)。在另一实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用一种降胆固醇药, 可选的有, 胆汁酸螯合剂 (BAS), 他汀类药物, 依泽替米贝, α - 亚麻油酸, ω -3, 6, 9 二十碳五烯酸 (EPA), 二十二碳六烯酸 (DHA), 纤维酸类, 可溶纤维, 多酚, γ - 谷维素皮素代谢物 (gama-oryzanol hesperetin metabolites), 植物营养素, 其它益生菌, 车前纤维 (psyllium), 植物甾醇, 植物脂烷醇, 维生素, 抗氧化剂或抗生素。他汀类药物包括但不限于洛伐他汀, 普伐他汀, 斯伐他汀, 氟伐他汀, 美伐他汀, 匹伐他汀, 西伐他汀, 辛伐他汀, 瑞舒伐他汀和阿托伐他汀。BAS 包括但不限于考来烯胺, 考来替泊或者考来维仑。纤维酸类可以是安妥明, 苯扎贝特, 吉非罗齐或非诺贝特。在另一种实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用一种保持 bsh 活性的药剂, 可选的有, 菊粉, 海藻糖, 麦芽糖糊精, 酵母提取物, 聚乙二醇, 甘油, 脂类, 乳化脂, 乳制品, 葡萄糖, 果糖, 蔗糖, 多聚糖, 低湿休眠剂 (anhydrobiosis), 甘蔗原素 (polycosanol), 聚乙二醇 (PEG), 植物甾醇, 植物固醇, 或者 ω 脂肪酸。甘蔗原素可以是二十八烷醇, 三十烷醇, 二十二烷醇, 二十四烷醇, 二十六烷醇, 1- 二十七烷醇, 1- 二十九烷醇, 1- 三十二烷醇或 geddy1 醇。在另外的实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用一种调节脂肪因子或肥胖激素的药剂, 可选择有, 立普婷, 胃饥饿素, 抵抗素, 脂联素, 趋化素, 白介素 (IL-6), 内脂素, 视黄醇结合蛋白 4 或纤溶酶原激活物抑制剂 -1。在另一种实施方案中, 公布于此的方法和用法进一步包括服用一种降血糖药, 可选择有, 甲福明, 罗格列酮, 匹格列酮, 格列苯脲, 格列齐特, 格列美脲, 格列吡嗪胆汁 (glipizidebile), 格列苯脲 (glibenclamide), 阿卡波糖, 米格列醇, 弗格列波糖, 西他

列汀,那格列奈,瑞格列奈,米格列奈,匹格列酮,沙格列汀,维达列汀和达格列净。进一步的实施方案中,口服组合物进一步包含降低促炎性细胞激素 IL-1 α/β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alpha, 或者提高抗炎细胞激素 IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11 的水平的治疗剂。

[0106] 用于此的术语“动物”指的是动物界的任何成员,可以选择的是,哺乳动物比如人类。

[0107] 这里描述的服用“有效剂量”或者药剂的“胆汁酸降低剂量”定义为在剂量上有效的数量并且在一段时间里必须达到预期的结果。高 bsh 活性的细菌组成的有效量是根据动物的比如疾病状态,年龄,性别和体重等因素选择性调整的。给药方案需快速调整以提供最优的治疗应答。例如,多个分剂量可以每天服用或者剂量可以根据治疗情况的紧急程度按比例地减少。在一实施方案中,组合物可以每天服用或使用 1 到 4 次。

[0108] 此组合物可用已知的药学上可接受的可以给患者服用的组合物的制备方法来制备,以使得有效数量的细胞与药学上可接受赋形剂形成一种混合物。适合的赋形剂描述于例如雷氏药学大全 (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA 2003-20th Edition) 和美国药典 (The National Formulary (USP 24N F19) published in 1999)。

[0109] 细菌的培养和制备方法

[0110] 这里也提供了制备高 bsh 活性细菌的方法包括在发酵条件下培养产 bsh 菌以维持高 bsh 活性产物。适合的发酵条件在上文部分已经做了描述。例如,发酵条件可选择的包括碳源,氮源,PH4-7 和收集时间为 12-24 小时。在一个实施方案中,碳源为一种糖类,可选择的包括麦芽糖,蔗糖,糊精,山梨糖醇和葡萄糖的混合物或菊粉和葡萄糖的混合物。在一特定的实施方案中,碳源是麦芽糖。在另一个实施方案中,氮源包括:(i) 酵母膏和麦芽膏,酵母膏和牛肉膏,或者酪蛋白水解物和麦芽膏;(ii) 蛋白胨或胰蛋白胨。在另一实施方案中,氮源进一步包括半胱氨酸。在一特定的实施方案中,蛋白胨是 3 号蛋白胨。典型的碳源和氮源浓度如上文部分所述。

[0111] 在另外的实施方案中,方法进一步包括用描述于此的冻干保护剂来冻干游离的或装入微胶囊的细菌混合物。在一个实施方案中,冻干保护剂包括终浓度为 0.2% 到 10% 的麦芽糖糊精和 0.05% 到 0.33% 的酵母提取物或者 0.05-2.5% 的菊粉和 0.05 到 0.1% 的酵母提取物。在一实施方案中,冻干支持剂包括终浓度为 2-4% 的麦芽糖糊精和 0.1% 的酵母提取物,0.3% 菊粉和 0.1% 酵母提取物,或者 0.3% 菊粉。

[0112] 在一个替代的实施方案中,本方法进一步包括在液体贮藏条件下储存高 bsh 活性的游离或装入微胶囊的细菌混合物。在一个实施方案中,液体贮藏条件包括终浓度的防腐液包含 2.5-10% 生长液(如此所述),50-99.99% 的酸奶或其他发酵牛奶,55-99.99% 的培养上清液或 5% MRS。

[0113] 在另一个实施方案中,本方法进一步包括在描述于此的冷冻保护剂溶液里瞬间冻存游离或装入微胶囊的细菌混合物。在一个实施方案中,冷冻保护剂溶液包括终浓度为 0.2-10% 麦芽糖糊精,可选择 1-3% 麦芽糖糊精和 0.05 到 0.33% 酵母提取物,可选择 0.1-0.2% 酵母提取物,0.05 到 2.5% 菊粉,也可选择至少 0.2% 的菊粉,0.5M 海藻糖,0.5M 果糖,0.5M 乳糖,0.5M 麦芽糖或 50-99.99%,可选择地 50% 消耗培养基 (spent media)。这

里使用的瞬间冻结指的是将混合物放于低于 -80°C 的温度,例如,将游离或装入微胶囊的混合物放在诸如温度为 -196°C 的液氮里,或者在极低的温度下如 -130°C 冻结混合物,或者使用干冰。

[0114] 以上说明书大体描述了目前所公开的。更完整的理解可通过以下特定的例子获得。这些例子为图表做了单独地描述并且不打算限制说明书的范围。形式上的改变和等同物的替代物随着情形建议或给予更好的方式而考虑。

[0115] 下面非限制性的例子为本说明作例证。

实施例

[0116] 通过游离 *Lactobacillus reuteri* 菌株对 TDCA 和 GDCA 的离解 (图 1 和图 2)

[0117] 结果

[0118] 图 1 和图 2 显示通过 HPLC 检测到的用 0.4g 游离 *Lactobacillus reuteri* (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 和 NCIMB 701359) 在一个体外分析试验中在一段时间内离解牛黄脱氧胆酸和甘胺脱氧胆酸。HPLC 检测的 *Lactobacillus reuteri* 菌株 NCIMB 701359 和 ATCC 55739 有最高 bsh 活性。应该考虑到分析试验的“精确度”的局限性 (使用量 0.4g 和在 2.5 小时时间段内采样);然而,和本实验的其它菌株相比,这些菌株表现出显著更高的 bsh 活性,由于在 2.5h 内不能检测 GDCA 的水平,bsh 活性差别实际上更大,因为底物量变得有限。

[0119] 材料和方法

[0120] 细菌和培养条件

[0121] 将从 ATCC (53609, 53608, 55148 和 55739) 获得的四种 *Lactobacillus reuteri* 菌株和 NCIMB 701359 在 37°C 培养在无菌的 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 液体培养基中 20 小时。离心分离生长培养基,收集细菌细胞用于下列 bsh 试验。

[0122] BSH 活性检测

[0123] 为了测量 BSH 活性,在添加有浓度均为 5mM (添加 GDCA 和 TDCA 的 20ml MRS 含有 0.4g 细菌细胞) 的甘胺脱氧胆酸钠和牛黄脱氧胆酸钠的 100% MRS 中加入收集的细菌。细菌然后被孵育在厌氧反应液体培养基中,最低转速 (100rpm), 37°C 培养,每隔 2.5h 取上清处理以确定结合的胆汁盐浓度。简言之,10000g, 3min 离心分离以去除细菌细胞之后,用 5 μl 6N HCl 酸化 500 μl 样品。然后在上清中加入 500 μl 含有 4mM GCA (甘氨酸) 的甲醇作为内标准。样品漩涡混匀 10min, 1000g 离心 15min。HPLC 分析之前,用 0.22 μM 的过滤器过滤样品。按照 Jones et al. 2003. 的描述用 HPLC 分析胆汁盐。

[0124] 胆汁盐 HPLC 分析

[0125] 按照 Jones et al. 2003. 的描述用 HPLC 分析胆汁盐。用反相 C-18 色谱柱: LiChrosorb RP-18, 5 μm , 250x 4.6mm 进行分析。HPLC 系统包括两个 ProStar 210 溶剂输送构件,一个 ProStar 320UV-VIS 检测器,一个 ProStar 410 自动进样器和 Galaxie 色谱数据系统 (型号 1.9.3.2)。用 o-磷酸将甲醇和 50mM 醋酸钠缓冲液的混合液 (70 : 30, v/v) pH 调为 4.3 以作为流动相,其流动速率是 1.0ml/min。检测器设置为 210nm,所有检测都在室温进行。

[0126] 通过游离 *Lactobacillus reuteri* 和 *Lactobacillus fermentum* 对 TDCA 和 GDCA9

的离解 (图 3 和图 4)

[0127] 结果

[0128] 图 3 和图 4 显示通过 HPLC 检测到的用 0.4g 游离 *Lactobacillus reuteri* (Lab Met, NCIMB701359) 和 *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) 在一个体外分析试验中在一段时间内离解牛黄脱氧胆酸和甘胺脱氧胆酸。*Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 比 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 或 *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) 有更高的 bsh 活性;甚至于 1/8 的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 细胞数量在体外表现出比 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 有更高的 bsh 活性。

[0129] 材料与方法

[0130] 细菌和培养条件

[0131] 本研究使用的细菌菌株是 *L. reuteri* (LabMet, NCIMB 701359) 和 *L. fermentum* (ATCC 11976)。细菌被培养在无菌的 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 液体培养基 37°C, 20h。离心分离生长培养基, 收集细菌细胞便于后续 BSH 试验。

[0132] BSH 活性检测

[0133] 在添加有浓度均为 5mM 的甘胺脱氧胆酸钠和牛黄脱氧胆酸钠 (添加 GDCA 和 TDCA 的 20ml MRS 含有 0.4g/0.05g 细菌) 的 100% MRS 中加入收集的细菌以检测 BSH 活性。然后 37°C 厌氧孵育细菌, 每隔 3h 取上清处理以确定反应管中结合的胆汁盐浓度。简言之, 10000g, 3min 离心分离以去除细菌细胞, 5 μ l 6N HCl 酸化 500 μ l 样品。然后在上清中加入 500 μ l 含有 4mM GCA (甘氨酸) 的甲醇作为内标准。样品漩涡混匀 10min, 1000g 离心 15min。HPLC 分析之前, 用 0.22 0.22 μ M 的过滤器过滤样品。HPLC 分析胆汁盐是按照 Jones et al. 2003. 的描述进行的。

[0134] 胆汁盐 HPLC 分析

[0135] HPLC 分析胆汁盐是按照 Jones et al. 2003. 的描述进行的。分析是在反相 C-18 色谱柱中: LiChrosorb RP-18, 5 μ m, 250x 4.6mm。HPLC 系统包括两个 ProStar 210 溶剂输送构件, 一个 ProStar 320UV-VIS 检测器, 一个 ProStar 410 自动进样器和 Galaxie 色谱数据系统 (型号 1.9.3.2)。用 o-磷酸将甲醇和 50mM 醋酸钠缓冲液 (70 : 30, v/v) pH 调为 4.3 以作为流动相, 其流动速率是 1.0ml/min。检测器设置为 210nm, 所有检测都在室温进行。

[0136] 通过游离的 *Lactobacillus reuteri* 菌株使 TDCA 和 GDCA 离解 (图 5 和图 6)

[0137] 结果

[0138] 图 5 和图 6 显示通过 HPLC 检测到的用 0.2g 游离 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702656, NCIMB 11951, ATCC23272 和 LMG 9213) 在一个体外分析试验中在一段时间内离解牛黄脱氧胆酸和甘胺脱氧胆酸。HPLC 检测的 NCIMB 701359, NCIMB 701089 和 ATCC 23272 菌株具有最高 bsh 活性, 仍然限于本研究精确度的限制。

[0139] 材料和方法

[0140] 细菌和培养条件

[0141] 本研究使用的细菌菌株是 *L. reuteri* NCIMB 701359, *L. reuteri* NCIMB 701089, *L. reuteri* NCIMB 702656, *L. reuteri* NCIMB 11951, *L. reuteri* ATCC 23272, 和 *L. reuteri* LMG 9213。挑选单克隆接种, 1% 培养液传代 2 次。无菌 deMan, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco)

液体培养基 37℃培养细菌 20h。离心分离生长培养基,收集细菌细胞用于下列 BSH 试验。

[0142] BSH 活性检测

[0143] 在添加有浓度均为 5mM(添加 5mM GDCA 和 5mM TDCA 的 MRS 20ml 含有 0.2g 细菌)的甘胺脱氧胆酸钠和牛黄脱氧胆酸钠的 100% MRS 中加入 0.2g 收集的细菌以检测 BSH 活性。细菌然后被孵育在厌氧反应液体培养基中,37℃培养,每隔 1h,3h,5h,7h 取上清处理以确定反应管中结合的胆汁盐浓度。简言之,10000g,3min 离心分离以去除细菌细胞,5 μ l 6N HCl 酸化 500 μ l 样品。然后在上清中加入 500 μ l 含有 4mM GCA(甘氨酸)的甲醇作为内标准。样品漩涡混匀 10min,1000g 离心 15min。HPLC 分析之前,用 0.45 μ M 的过滤器过滤样品。按照 Jones et al. 2003. 的方法进行 HPLC 分析胆汁盐。

[0144] 高 bsh 活性 *L. reuteri* 和胆固醇减少

[0145] 材料和方法

[0146] 通过上文材料和方法部分描述的 TDCA 和 GDCA 标准 HPLC 试验来计算乳酸杆菌的 bsh 活性。通过用从模拟肠道内含物除去的 GDCA 或者 TDCA 终点浓度减去基线值,以计算 xDCA 去除率。产生的 DCA 量或者去除的 xDCA 量除以使用的微胶囊量,再乘以使用的模拟肠道内含物的体积,然后除以从基线到终点以小时计算消耗的时间。方程式为:减少的 xDCA 量=产生的 DCA 量(μ mol)或者减少的 xDCA 量/微胶囊量(g)/h。

[0147] 结果

[0148] 表 2 显示临床前期或临床上检测的 *Lactobacillus reuteri* bsh 活性,其被表示为在 5h 的时间段内和 30min 时间段内检测的速度(μ mol DCA/g/hr)。虽然,*Lactobacillus reuteri* (LabMet) 在临床前期显示能降低胆固醇,但需要高剂量的 *Lactobacillus reuteri* 和高服用频率。在临床前期研究中,更具 bsh 活性的在临床前研究中能降低胆固醇的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 在人类临床试验中被确认显著降低胆固醇。推测高 bsh 活性率是其产生效果的原因,有大量证据支持这一观点:高口服用量的游离细胞需要 bsh 活性达到一个阈值水平。显然,分别在 1h 和 5h 时段内测量时能够以 $> 50 \mu$ mol GDCA/g/h, $> 2 \mu$ mol TDCA/g/h 速度离解 GDCA 和 TDCA 的微生物当以 10^6 - 10^{12} 数量摄入时足够降低胆固醇。鉴于这种原因,推测具有更高 bsh 活性的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089) 能降低胆固醇,且在临床前期和临床试验中效果很好。另外,用检测 TDCA 和 GDCA 的 HPLC 试验同样来检测 bsh 活性;然而,平均速率是在 30 分钟的时间段内计算的。这就提供了保真酶促反应率的精确确定,因为 xDCA 离解曲线在 0 到 30min 内更显直线,而且反应不受随后低量底物的限制。

[0149] 试验和方法与上文描述的 HPLC 试验相同。

[0150] 微胶囊封装的高 bsh 活性 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 在叙利亚金仓鼠 F1B 中的效果和安全性(表 3)

[0151] 结果

[0152] 表 3 显示在诱导成高胆固醇血症的 F1B 仓鼠中填喂微胶囊封装的或游离 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 后与对照值相比的终点脂质百分比变化。在这一模型中,虽然各组之间总胆固醇减少相近,游离的微生物导致更大的 LDL-C 下降,较小的 HDL-C 下降,更多的甘油三酯去除。这就导致了在总体动脉粥样硬化指数上显著差异,并且表明尽管从更好的摄入和存活的角度来看微胶囊封装有一定的优势,摄入游离的高 bsh 活

性细菌也有好处,因为可以达到更好的脂质谱。

[0153] 材料和方法

[0154] 38 个 7-8 周大小的 Bio F1B 叙利亚金仓鼠全部买自 Biobreeders, USA。刚买来时给予一周的驯化。每个动物分别被圈养在单独的笼子中,温度和湿度控制在恒温和恒湿,12h 的白天黑夜交替,食物和水提供充足、随意摄取。动物驯化后称重,收集血液以估计下文描述的脂质基线。

[0155] 喂食含 0.05% 胆固醇的试验食物五周以诱导高胆固醇血症。消耗的食物和增加的体重每周监测。四周、五周诱导后收集血液,分析脂质水平。此外,开始前(五周诱导),评估安全标记物。诱导的最后几天,收集粪样本,检测胆汁酸含量。

[0156] 五周喂养高胆固醇血症诱导食物后,排除不表现高胆固醇的动物(5 个动物)。依据血清 LDL 水平将剩余的动物成批随机分为 3 个治疗组,将各组的平均重量调为相同(每组 $n = 11$)。随机分组之后,灌胃给药治疗动物 6 周。

[0157] 治疗阶段,继续喂养高胆固醇试验食物。每周监测食物摄取量和体重,每两周检测一次血脂水平。六周的治疗后,收集终点粪便样本,二氧化碳处死动物。心脏穿刺收集血液以分析终点脂质、安全标记物和血液学分析。尸体剖检期间,收集每组代表性动物的肝脏以进行组织学分析。

[0158] 含有较低 bsh 活性的微胶囊封装的 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 的酸奶在降低脂质上的功效和安全性(表 4)

[0159] 表 4 显示 6 周治疗期间,轻度高胆固醇血症的实验对象摄取微胶囊包埋型 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 后空腹血脂百分变化。结果显示血清胆固醇有些变化,血清甘油三酯水平下降。

[0160] 材料和方法

[0161] 本研究检测了含较低 bsh 活性微胶囊封装的 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 的益生菌酸奶组分中在和人类退行性疾病有关健康参数方面的功效。

[0162] 我们预测益生菌产品的摄取可以诱导几种由于年龄增加引起的衰弱性疾病的风险标记物良性转变,与传统治疗相比也可以在高血脂症个体中带来脂质的有益变化。

[0163] 本研究的设计是一多阶段/清洗,随机双盲对照试验,其中受试者在 6 周期间接受对照酸奶或实验酸奶,然后在进行下一阶段前清洗 6 周。

[0164] 将总共 30 个年龄在 18-60 岁之间、血浆 LDL-C130-260mg/dl、TG 水平低于 400mg/dl、和体质指数(BMI)为 22-32kg/m² 的健康男女随机分组。

[0165] 在严格监督下,在临床研究设施中,将已知精确组分的代谢用饮食提供给受试者。饮食营养充足且能提供 100% 所需能量。另外,治疗阶段受试者每天接受一个试验酸奶。

[0166] 在每个临床阶段开始和结束的时候,收集 12h 空腹血样本。在第一天和第二天获得的血样本用以检测不同研究指标的基线水平,而最后一天获得的血样本用以检测血清脂质水平最终值。

[0167] 含有降低脂质的高 bsh 活性的微胶囊封装的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 的酸奶在降低脂质上的功效和安全性(表 5 和表 6)

[0168] 结果

[0169] 表 5 和表 6 显示,高胆固醇血症受试者在 6 周的治疗阶段摄取较高 bsh 活性的

Lactobacillus reuteri (NCIMB 701359) 后空腹血脂百分比变化。结果显示总的和 LDL 胆固醇以及 ApoB 均表现出显著的下降, 正如通过 bsh 活性值 (26.4 $\mu\text{mol GDCA/g/h}$ 和 182.6 $\mu\text{mol TDCA/g/h}$) 可以预测的。这一随机双盲的平行组研究具有很强的统计功效并有很好的对照, 因此, 胆固醇下降缘于益生菌组成成分。

[0170] 材料和方法

[0171] 本研究检测了含有高 bsh 活性的微胶囊封装的 Lactobacillus reuteri (NCIMB 701359) 的酸奶对人类退行性疾病有关的健康参数的影响。

[0172] 目的是评估摄取含有海藻酸盐-多聚-L-赖氨酸-海藻酸盐 (APA) 微胶囊封装的高胆汁盐水解酶 (bsh)-活性 Lactobacillus reuteri (NCIMB 701359) 的酸奶剂型在高胆固醇血症成人中对血浆脂质水平的影响, 并获得摄取 6 周试验产品和对照产品后高胆固醇血症成人的血浆 LDL-胆固醇浓度的相对变化。

[0173] 本实验包括一个多中心 (5 个中心) 双盲实验随机平行组安慰剂对照实验。受试者被指示按照加拿大健康饮食建议, 以试图帮助减少肥胖的风险和心脏疾病。研究持续 10 周, 包括 2 周清洗期, 2 周准备阶段, 6 周治疗阶段。在清洗期, 受试者仅仅遵守健康建议。在准备阶段, 使用安慰剂。在整个治疗阶段, 使用治疗产品或安慰剂产品。

[0174] 将总共 120 个年龄在 18-60 岁之间、LDL-胆固醇 > 3.4 mmol/L、TG 水平 < 4.0 mmol/L、和体质指数 (BMI) 为 22-32 kg/m² 的健康男女随机分组, 根据方案评估了 109 名受试者。

[0175] 在每个临床阶段开始和结束的时候, 收集 12h 空腹血样本。在第一天和第二天获得的血样本用以检测不同研究指标的基线水平, 而最后一天获得的血样本用以检测血清脂质水平终值。

[0176] 鉴定高 bsh 活性菌 (图 7 和表 7)

[0177] 结果

[0178] MRS-TDCA 板沉淀区筛选试验表明, 作为一种确定 bsh 活性的方法, TDCA 平板接种非常粗糙而不足以鉴别高 bsh 活性胆固醇降低候选益生菌。可以看出, 更高 bsh 活性菌落有更大的沉淀区域; 然而, 在 DCA 沉淀物高密度集中的情况下, TDCA 板单独筛选不能识别最高 bsh 活性微生物作为潜在候选菌。鉴于这种原因需要更高分辨率的试验, 如 HPLC 试验, 用 glyco- 和 tauro- 结合物来定量 bsh 活性。

[0179] 图 7 显示三种 bsh 活性 Lactobacillus reuteri 在 MRS-TDCA 板上无氧生长 24h。每种微生物的沉淀区大小和沉淀物密度很不同。

[0180] 表 7 显示在培养液浸润的过滤盘上厌氧生长 24h 后, 在 MRS-TDCA 板上测量脱氧胆酸 (DCA) 沉淀直径 (mm)。其值为 3 个 MRS-TDCA 琼脂平板上测得的平均值。表 7 和表 2 结果的比较表明沉淀区域试验不是总能区分高 bsh 活性细菌, 很明显, LR050 比 LR052 的沉淀区更大, 但是事实上, HPLC 表明 LR052 bsh 活性更高。

[0181] 材料和方法

[0182] Lactobacillus 培养菌在 MRS 培养基中 37°C 过夜生长。预先称重的 Eppendorf 离心 500 μl 菌液。去除上清, 称重沉降物。用 MRS 重悬沉淀颗粒物以得到同样 1 : 10 w/v 比率, 双份 10 μl 培养液加到不同 MRS-TOCA 琼脂板上的过滤片上。平板在 37°C 无氧孵育后检测。

[0183] 通过游离 Lactobacillus reuteri 菌株将 TDCA 和 GDCA 的离解 (图 8 和图 9)

[0184] 结果

[0185] 图 8 和图 9 显示,用 0.2g 游离 *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG 32271, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) 在一个体外分析试验中在一段时间内离解牛黄脱氧胆酸和甘胺脱氧胆酸。结果表明 ATCC55148, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, CCUG 32271, CCUG32305, CCUG 37470, CCUG 44001 和 CCUG 44144 菌株用 HPLC 检测的 bsh 活性非常高。

[0186] 材料和方法**[0187] 细菌和培养条件**

[0188] *Lactobacillus reuteri* 菌株被培养在无菌的 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) 液体培养基 37°C, 20h。离心分离生长培养基, 收集细菌细胞用于下面 BSH 试验。

[0189] BSH 活性检测

[0190] 在添加有浓度均为 5mM 的甘胺脱氧胆酸钠和牛黄脱氧胆酸钠 (添加 GDCA 和 TDCA 的 20ml MRS 含有 0.2g 细菌细胞) 的 100% MRS 中加入收集的细菌以检测 BSH 活性。然后在最低转速 (100rpm) 下, 37°C 厌氧孵育细菌, 每隔 2.5h 取上清处理以确定反应管中结合的胆汁盐浓度。简言之, 10000g, 3min 离心分离以去除细菌细胞, 5ul6N HCl 酸化 500 μ l 样品。然后在上清中加入 500 μ l 含有 4mM GCA (甘氨酸) 的甲醇作为内标准。样品漩涡混匀 10min, 1000g 离心 15min。HPLC 分析之前, 用 0.22 μ M 的过滤器过滤样品。

[0191] 胆汁盐 HPLC 分析

[0192] HPLC 分析胆汁盐是按照 Jones et al. 2003. 的描述进行的。分析是在反相 C-18 色谱柱中: LiChrosorb RP-18, 5 μ m, 250x 4.6mm。HPLC 系统包括两个 ProStar 210 溶剂输送构件, 一个 ProStar 320UV-VIS 检测器, 一个 ProStar410 自动进样器和 Galaxie 色谱数据系统 (型号 1.9.3.2)。用磷酸将甲醇和 50mM 醋酸钠缓冲液 (70 : 30, v/v) pH 调为 4.3 以作为流动相, 其流动速率是 1.0ml/min。检测器设置为 210nm, 所有检测都在室温进行。

[0193] 实施例 2- 高 BSH 活性**[0194] 通用材料和方法**

[0195] 细菌接种和生长: 在 MRS 琼脂平板上用无菌木棒挑取甘油冷冻细菌储藏品。37°C 厌氧孵育过夜, 在无菌条件下, 用金属环挑取 *L. reuteri* NCIMB 701359 单克隆菌落, 转移到含有 10mL MRS 的管中。37°C 培养孵育过夜便于实验用。

[0196] *L. reuteri* NCIMB 701359 的微胶囊型封装: 用 200 μ m 大小的管口, 8% 细胞和 1.75% 浓度的海藻酸钠制备微胶囊。包埋过程如下: 第一, 将 CaCl₂ 排出海藻酸钠微球; 第二, 用 0.85% (w/v) NaCl 洗涤海藻酸钠微球 10min; 第三, 用 0.1% (w/v) ϵ -PLL 包埋海藻酸钠微球 20min; 第四, 0.85% (w/v) NaCl 洗涤海藻酸钠-PLL 微胶囊 10min; 第五, 0.1% (w/v) 海藻酸钠包埋海藻酸钠-PLL 微胶囊 20min; 最后 0.85% (w/v) NaCl 洗涤海藻酸钠-PLL-海藻酸钠微胶囊 10min。

[0197] 冰冻和冷冻干燥游离细胞 BSH 试验: 将冰冻游离细胞化冻, 离心, 洗脱, 加入 (0.05g) 到 20ml 的含有 5mM TDCA 和 5mM GDCA 的 MRS。将冻干游离细胞 (0.15g) 加入到含有 5mM TDCA 和 5mM GDCA 的 20ml MRS。30min 后取出样本, HPLC 分析。对照组是培养基本身, 以及在 MRS 中生长的新制备的微胶囊。

[0198] [00145] 微胶囊包埋的 BSH 试验 :在解冻和洗脱过的微胶囊剂 (依据相对活性,样品在 0.3g 到 2.5g 之间) 中加入含有 5mM TDCA 和 5mM GDCA 的 20ml M RS。30min 后取出样本, HPLC 分析。对照组是培养基本身, 以及在 MRS 中生长的新制备的微胶囊。0.3g 的微胶囊包含 0.03g 的游离细胞沉淀。

[0199] BSH 活性的 HPLC 试验 :分析是在流速为 1.0ml/min 反相 C-18 色谱柱 (LiChrosorb RP-18, 250x 4.6mm, 5 μ m) 中。比率 70 : 30 的甲醇和 50mM 醋酸钠缓冲液混合物为流动相 (磷酸将 pH 调为 4.3), 检测器设置为 210nm。根据样品中每小时每克微胶囊 GDCA 和 TDCA 离解量计算 bsh 活性。

[0200] A. 通过发酵提高 bsh 活性 (表 8-10)

[0201] 材料和方法

[0202] 基于碳源和氮源的 bsh 活性的提高 :按照上述通用方法培养 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 细胞。在含有不同碳源和氮源的改良 MRS 培养基上接种 1% *L. reuteri* NCIMB 701359。接种培养菌在 37°C 孵育 24h。孵育后, 在 0.05g 或 0.1g 细胞颗粒中加入含有 5mM TDCA 和 5mM GDCA 的 20ml MRS。0.5h 和 1.5h 后移除样本, HPLC 分析。MRS 被用作为对照生长培养基。按照上述通用方法执行 HPLC 分析。

[0203] BSH 活性的提高依赖于 pH 和收集时间 :用上文描述的通用方法培养 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 细胞。在含有碳源和氮源的生长培养基上接种 1% *L. reuteri* NCIMB 701359, 加入 NaOH 或 HCl 将 pH 调到 5, 6 和 6.8。37°C 孵育 12h 到 48h 收集在不同 pH 条件下生长的接种培养菌。孵育后, 在 0.05g 或 0.1g 细胞颗粒中加入含有 5mM TDCA 和 5mM GDCA 的 20ml MRS。0.5h 和 1.5h 后移除样本, 按照上述通用方法进行 HPLC 分析。对照组生长在没有改良的 MRS 培养基中。

[0204] 结果

[0205] 最佳结果是来自于改良 MRS 中发酵的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的碳源—麦芽糖—提高了 bsh 活性和产量。GDCA 和 TDCA 分别以 2, 253 (μ mol/g/h) 和 173 (μ mol/g/h) 速率被离解, 维持产量在 0.015g/m (表 8)。最佳结果是来自于改良 MRS 中发酵的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的碳源 (麦芽糖) 提高了 bsh 活性和产量。来自于这种碳源 (麦芽糖) 发酵的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的氮源的最佳结果是 :蛋白胨 No. 3, 酵母提取物, 麦芽提取物, 和半胱氨酸的联合使用能提高 GDCA (μ mol/g/h) 离解, TDCA (μ mol/g/h) 离解 (HPLC) 和产量 (g/ml)。GDCA 和 TDCA 分别以 21, 185 (μ mol/g/h) 和 2, 323 (μ mol/g/h) 速率离解, 维持产量在 0.013g/ml (表 9)。上述提到的培养基 (麦芽糖 + 蛋白胨 No. 3 + 酵母提取物 + 麦芽提取物 + 半胱氨酸) 或 MRS 中发酵的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的最佳收集时间和最佳初始 pH 是 :收集时间在 12-20h, pH 为 5 时能提高 GDCA (μ mol/g/h) 离解、TDCA (μ mol/g/h) 离解 (HPLC)、和产量 (g/ml) (表 10)。

[0206] 这些结果表明 :包括碳源、氮源、pH 和收集时间在内的控制条件在 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 中获得高 bsh 活性和细胞产量 ;这些条件创造出高活性产品, 其在辅助剂或功能保健类食品中在保质期内维持了高 bsh 水平, 且商业化制备成本效益好。这一数据表明 :具有 bsh 生成机制的益生菌细胞在组合培养基和为达到酶活性的治疗水平和生物量的商业可行性水平的控制条件下容易发酵。该方法在使商业可行性 bsh 活性益生菌

降低脂质和其他应用方面是有用的。

[0207] B. 通过冷冻干燥提高 bsh 活性 (表 11 和图 10)

[0208] 材料和方法

[0209] 高 BSH 活性的冷冻干燥储存条件:按上述常用方法制备含有 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的微胶囊。按微胶囊和冻干保护溶剂 7 : 3 的比率储存微胶囊,其中冻干保护溶剂:1M 海藻糖,10%麦芽糖糊精,1%菊粉,10%麦芽糖糊精和 0.33%酵母提取物,1M 海藻糖和 0.33%酵母提取物,1%菊粉和 0.33%酵母提取物,10%麦芽糖糊精,1%水解酪蛋白和 10%脱脂牛奶。在每个标本中,包含微胶囊和冻干保护溶剂的悬浮液储存在 4°C 下 0,1,2,3,4,5,6 周。每个时间点,用生理盐水水化含有不同冻干保护剂的冷冻干燥微胶囊存样。上述用微胶囊的 bsh 试验被用以准备样品,按照上述通用方法进行 HPLC 分析。

[0210] 按上述通用方法准备游离 *reuteri* NCIMB 701359。在游离细胞悬浮液中加入冻干保护剂到终浓度为:10%麦芽糖糊精和 0.33%酵母提取物。在每个标本中,冷冻干燥的悬浮液储存在 4°C 或 RT 下 0,1,2,3 个月。每个时间点,用生理盐水再水化含有不同冻干保护剂的冷冻干燥细胞的存样。上述分析冷冻干燥材料的 bsh 的试验被用以准备样品,按照上述通用方法进行 HPLC 分析。

[0211] 结果

[0212] 来自 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 冻干燥保护剂的最佳结果是:10%麦芽糖糊精和 0.33%酵母提取物,1%菊粉和 0.33%酵母提取物,和 1%菊粉 (表 11) 能提高 bsh 活性。

[0213] 结果表明冻干保护剂能维持 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的高 bsh 活性;冻干保护剂在再水化时保持了微胶囊形态学特征 (图 10),且在保质期内在辅助剂或功能保健类食品中维持高 bsh 水平,且商业化制备成本效益好。这一数据表明:具有产生 bsh 活性机制的游离或微胶囊包埋的益生菌细胞容易被冻干保护剂冷冻干燥以维持酶活性治疗水平。该方法使冷冻干燥 bsh 活性益生菌商业化可行用于降低脂质和其他应用方面。

[0214] C. 液态存储提高 BSH 活性 (表格 12)

[0215] 材料和方法:

[0216] 相对 BSH 活性的液体储存条件:依照上面描述的传统的方法,制备包含 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 在内的微胶囊。微胶囊被存储在微胶囊对保护液 1 : 1 比率的保护液中,防腐液如下:5%生长介质,10%生长介质,20%生长介质,10% MRS 培养基,酸奶酪 (yogurt),培养液上清,1%麦芽糖 (maltose),0.85%盐水,1%麦芽膏,1%菊粉 (inulin),10%山梨醇 (sorbitol),0.33%酵母膏,1%菊粉和 0.33%酵母膏和 1M 果糖 (fructose)。制备好的微胶囊分成小样在 4 度条件下在保护液中短期储存 4 天。包括每个保护液的微胶囊样本从储存介质中双份取出,并用生理盐水清洗。上面描述的微胶囊的 BSH 分析方法被用于制备用上述普通方法进行高效液相色谱 (HPLC) 分析的样品。

[0217] 结果:

[0218] 就液态存储条件下存储 4 天后的 BSH 活性检测结果而论,*Lactobacillus reuteri* NCIMB701359 在酸奶酪 (1 : 1),5%生长介质 (1 : 1),10%生长介质,20%生长介质 (1 : 1),上清培养液 (1 : 1),和 10% MRS (1 : 1) 液体存储介质中可以得到最佳效果 (表 12)。

[0219] 这些结果说明液态存储条件能够维持 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 的高 BSH 活性；生产较高活性产品的这些条件，在临时的液态存储过程中也能维持高 BSH 水平，并且在商业加工中成本效益好。这些数据表明特殊的存储条件对液态存储介质促使酶活性达到治疗水平是有益的。这一加工过程在短期存储过程中维持 BSH 活性是有用的，并且使生产 BSH 活性益生菌来降低脂肪和用于其它代谢疾病的商业生产工程切实可行。

[0220] D. 通过速冻 (flash freezing) 提高 BSH 活性 (表 13)

[0221] 材料和方法

[0222] 包含 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 在内的微胶囊样品经过以上的常规方法制备用于速冻存储条件对 BSH 活性影响的研究。微胶囊被存储在微胶囊对冷冻保护剂 1 : 1 比率的冷冻保护剂中，冷冻保护剂如下：1M 海藻糖，1M 果糖，1% 菊粉，1M 麦芽糖，1M 乳糖，1M 蔗糖，10% PEG8000，0.85% 生理盐水，10% 脱脂牛奶，10% 淀粉或 10% 果糖寡聚糖苷。包含微胶囊和冷冻保护剂的混合液缓慢经由无菌注射器滴入液氮中形成球状颗粒悬浮于液氮表面。速冻形成的球状颗粒从液氮中分离出来，部分个体存储于 -80°C。分别在立即和存储 3 周以后，从存储介质中取出包含冷冻保护剂的微胶囊球状颗粒，并用生理盐水冲洗。根据上面提到的传统方法，前面用于进行 BSH 试验的微胶囊样品同样被制备用来进行 HPLC 分析。

[0223] 大量的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 依据上面常规的方法进行样品制备。大量的细胞收集物被重悬于细胞对消耗培养基 1 比 1 比率的消耗培养基中。重悬的细胞混合液缓慢经由无菌注射器滴入液氮中形成球状颗粒悬浮于液氮表面。速冻形成的球状颗粒从液氮中分离出来存储于 -80°C。从存储介质中取出两份包含消耗培养基的冷冻保护剂的球状颗粒细胞。根据上面提到的传统方法，前面用于进行 BSH 试验的大量细胞样品同样被制备用来进行 HPLC 分析。

[0224] 结果

[0225] *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 中添加冷冻保护剂取得了很好的效果。当考虑到在速冻 3 个星期后或紧接着速冻之后的微胶囊形态完整性和 / 或存留 BSH 活性的百分比，包括按游离或微胶囊封装的细菌对冷冻保护剂 1 : 1 比率，其中冷冻保护剂中包含显示的浓度 (表 13) 的麦芽糖糊精和酵母提取物，菊粉，海藻糖，果糖，蔗糖，乳糖，麦芽糖和消耗培养基。

[0226] 这些结果表明：在进行液氮速冻冻存的时候，冷冻保护剂能使胶囊封装的 *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 获得高 BSH 活性和维持良好的微胶囊形态，因此可以制备补充品或功能性食品形式的在长保质期内具有高 bsh 水平的产品，并在商业加工中成本效益好。这些数据表明：游离的或微胶囊封装的具有高 BSH 活性的益生菌细胞容易在几种冷冻保护条件下制备，并且在液氮中速冻可以使胶囊达到酶活治疗水平和极好的微胶囊形态。这个过程有利于制备商业上可行性 BSH 活性益生菌用于降低脂肪和其它应用中。

[0227] 虽然本说明书用现在认为是优选的实施例来描述，但是应该明白公开的并不局限于已经描述过的例子。相反，本专利说明意在涵盖不同种类的修饰和包含于附加权利要求的精神和范畴内的等同安排。

[0228] 所有的公开出版物、专利和专利申请在此通过相同程度的引用结合到文中，好像每篇单个的论文或专利申请都是特定的和单独的提及而通过引用结合到文中。

[0229] 表格 1:两个用于确定动脉粥样硬化 (atherogenic) 指数 (AI) 的常用的方程式, 所述指数代表动脉粥样硬化的风险和用于患者在动脉粥样硬化风险发展中的预后指标。

[0230] 动脉粥样硬化指数 (AI) = $\text{Log}(\text{甘油三酸酯} / \text{HDL-胆固醇})$

[0231] 动脉粥样硬化指数 (AI) = $(\text{TC} - \text{HDL-胆固醇}) / (\text{HDL-胆固醇})$

[0232] 表格 2:高效液相色谱 (HPLC) 测量游离 (free) *Lactobacillus reuteri* 的 BSH 活性, 结果表示为每克每小时含有 DCA 微摩尔数 ($\mu\text{mol DCA/g/hr}$)。牛磺脱氧胆酸 (Taurodeoxycholic acid) = TDCA, 甘氨酸脱氧胆酸 (Glycodeoxycholic acid) = GDCA, 脱氧胆酸 (Deoxycholic acid) = DCA。

[0233]

| | TDCA ($\mu\text{mol DCA/g/hr}$) 平均速率 (0-5h) | GDCA ($\mu\text{mol DCA/g/hr}$) 平均速率 (0-1h) | TDCA ($\mu\text{mol DCA/g/hr}$) 平均速率 (0-0.5h) | GDCA ($\mu\text{mol DCA/g/hr}$) 平均速率 (0-0.5h) |
|--|---|---|---|---|
| 游离 <i>L. reuteri</i> (LabMet) | 1.5 | 47.8 | 7.2 | 65.3 |
| 游离 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) | 26.4 | 182.6 | 44.0 | 372.0 |
| 游离 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701089) | 77.5 | 424.0 | 93.0 | 805.0 |

[0234] 表格 3:F1B 仓鼠诱发高胆固醇血症 (hypercholesterolemia) (0.5% 饮食的胆固醇 (cholesterol)) (5 周) 和随后用微胶囊化的 (microencapsulated) 或游离 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) ($n = 33$) 填喂法处理 (6 周) 后的脂质端点值 (相对对照的百分比变化)

[0235]

| | LDL-C (%) | 总胆固醇 (%) | HDL-C (%) | TG (%) | AI (%) |
|--|-----------|----------|-----------|--------|--------|
| 微胶囊封装的 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) | -23.60 | -16.83 | -11.11 | -5.05 | -11.27 |
| 游离 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) | -27.43 | -16.94 | -6.26 | -11.63 | -18.53 |

[0236] 表格 4:轻度高胆固醇血症的人类受试者在接受 APA 微胶囊封装的较低 BSH 活性的 *Lactobacillus reuteri* (LabMet) 进行为期 6 周的治疗后空腹血脂水平 (相对于对照) 的百分比变化 ($n = 30$, 根据试验设计)

[0237]

| | LDL-C (%) | 总胆固醇 (%) | HDL-C (%) | TG (%) |
|--------------------------------------|-----------|----------|-----------|--------|
| 微胶囊状封装 <i>L. reuteri</i> (LabMet) | -0.07 | -3.63 | -2.37 | -12.51 |

[0238] 表格 5: 轻度高胆固醇血症的人类受试者在接受高 bsh 活性微胶囊封装的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 超过 6 周治疗后空腹血脂水平相对空白对照剂 (placebo) 的差异百分比 (n = 109, 根据试验设计)

[0239]

| 微胶囊封装的 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) | | | | |
|--|---------------|--------|--------------|--------|
| 脂质参数 | 百分比变化 (3 wks) | P 值 | 百分比变化(6 wks) | P 值 |
| TC | -2.89 | 0.2321 | -4.86 | 0.0501 |
| LDL-C | -3.83 | 0.1660 | -9.23 | 0.0061 |
| HDL-C | +0.14 | 0.9697 | +0.49 | 0.9101 |
| TG | -23.69 | 0.0275 | +21.05 | 0.0869 |
| ApoB-100 | -3.84 | 0.2056 | -6.66 | 0.0405 |

[0240] 表格 6: 高风险和风险非常高的高胆固醇血症的人类受试者在接受 APA 微胶囊封装的高 bsh 活性的 *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) 6 周的治疗后空腹血脂水平相对安慰剂对照的百分比变化 (n = 65)

[0241]

| 微胶囊封装 <i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) | | |
|---|---------------|--------|
| 脂质参数 | 百分比变化 (6 wks) | P 值 |
| TC | -5.53 | 0.101 |
| LDL-C | -10.22 | 0.024 |
| HDL-C | -0.19 | 0.97 |
| TG | +11.09 | 0.54 |
| ApoB-100 | -10.69 | 0.0082 |

[0242]

[0243] 表格 7 :在培养液浸润的过滤盘上厌氧生长 24h 后,在 MRS-TDCA 板上测量脱氧胆酸 (DCA) 沉淀直径 (mm)。其值为 3 个 MRS-TDCA 琼脂平板上测得的平均值。

[0244]

| | Lr010 | Lr050 | Lr052 |
|-------|-------|-------|-------|
| 2days | 12.6 | 17.3 | 17 |
| 3days | 13 | 20 | 18 |
| 4days | 13.2 | 20.3 | 18.2 |

[0245] 表格 8 :*Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 在不同碳源存在下增加 GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解 (deconjugation), TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解 (HPLC) 和修饰的 MRS (酵母提取物 (yeast extract)+牛肉膏提取物 (beef extract)+蛋白胨 (peptone) 3 号) 下发酵 (fermented) 产量 (yield) (g/ml) 的实验结果。

[0246]

| | 酵母提取物 + 牛肉膏提取物 + 蛋白胨 3 号 | | |
|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| | GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | Yield (g/ml) |
| 蔗糖 (Sucrose) | 950 | 117 | 0.012 |
| 木糖 (Xylose) | 225 | 75 | 0.008 |
| 菊粉 (Inulin) + 葡萄糖 (Glucose) | 2050 | 825 | 0.008 |
| 乳糖 (Lactose) | 145 | 18 | 0.011 |
| 糊精 (Dextrin) | 1640 | 180 | 0.01 |
| 山梨糖醇 (Sorbitol) + 葡萄糖 | 1889 | 689 | 0.009 |
| 葡萄糖 (MRS) | 957 | 57 | 0.014 |
| 麦芽糖 (Maltose) | 2253 | 173 | 0.015 |

[0247] 表格 9: *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 在不同氮源存在下增加 GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解, TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解 (HPLC) 和在碳源 (麦芽糖) 存在下发酵产量 (g/ml) 的实验结果

[0248]

| 麦芽糖 (碳源) + | 酵母提取物 + 牛肉膏提取物 | | | 酪蛋白酸水解产物) + 麦芽提取物 | | | 酵母提取物 + 麦芽提取物 | | |
|------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------|
| | GDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | TDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | Yield (g/ml) | GDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | TDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | Yield (g/ml) | GDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | TDCA ($\mu\text{mol}/$ g/h) | 产量 (g/ml) |
| 3 号蛋白胨 | 2253 | 173 | 0.015 | 2156 | 167 | 0.018 | 3322 | 933 | 0.018 |
| 胰蛋白胨 | | | | 843 | 514 | 0.014 | 1013 | 67 | 0.015 |
| 鱼蛋白胨 | | | | 680 | 80 | 0.005 | 1067 | 107 | 0.015 |
| 豆蛋白胨 | | | | 367 | 67 | 0.012 | 689 | 78 | 0.018 |
| 3 号蛋白胨 + 半胱氨酸 | | | | | | | 21185 | 2323 | 0.013 |
| 胰蛋白胨 + 半胱氨酸 | 6271 | 1271 | 0.014 | | | | | | |
| 胨间质蛋白胨 + 半胱氨酸 | | | | | | | 2786 | 671 | 0.014 |
| 酪蛋白蛋白胨 + 半胱氨酸 | 6271 | 1414 | 0.014 | | | | | | |
| 鱼蛋白胨 + 半胱氨酸 | 8415 | 1446 | 0.013 | | | | | | |
| 豆蛋白胨 + 半胱氨酸 | 1779 | 179 | 0.019 | | | | | | |

[0249]

[0250] 表 10 :Lactobacillus reuteri NCIMB 701359 在不同起始 pH 和不同收获时间条件下增加 GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解, TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) 离解 (HPLC) 和在生长培养基 (麦芽糖 + 3 号蛋白胨 + 酵母提取物 + 麦芽提取物 + 半胱氨酸) 或 MRS 培养基存在下发酵产量 (g/ml) 的实验结果

[0251]

| | 生长培养基 pH 5 | | | 生长培养基 pH 6 | | | 生长培养基 pH 6.8 | | | MRS 培养基 pH 6.8 | | |
|-----|------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------|
| | GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | TDC A ($\mu\text{mol/g/h}$) | OD (600 nm) | GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | TDC A ($\mu\text{mol/g/h}$) | OD (600 nm) | GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) | OD (600 nm) | GD CA ($\mu\text{mol/g/h}$) | TDC A ($\mu\text{mol/g/h}$) | OD (600 nm) |
| 12h | 19350 | 3475 | 3.12 | 15775 | 3063 | 3.09 | 18752 | 2288 | 2.69 | 201 | 0 | 1.20 |
| 16h | 19078 | 3772 | 3.18 | 16163 | 3547 | 3.06 | 18173 | 2448 | 2.60 | 168 | 0 | 1.62 |
| 20h | 17750 | 3463 | 3.21 | 18013 | 3001 | 3.02 | 15765 | 2175 | 2.72 | 186 | 0 | 1.57 |
| 24h | 19187 | 3711 | 3.10 | 18860 | 3048 | 2.99 | 16362 | 2362 | 2.66 | 483 | 33 | 1.63 |
| 36h | | | | | | | | | | 961 | 80 | 1.82 |
| 48h | | | | | | | | | | 1704 | 339 | 1.77 |

[0252]

[0253] 表格 11 :Lactobacillus reuteri NCIMB 701359 在按微胶囊对冻干保护剂 7 比 3 比率的冻干保护剂中保藏 2、3 周和 5、6 周的 BSH 活性保留百分比平均值

[0254]

| 冻干保护剂溶液 (在冷冻干燥和再水化后维持微胶囊形态) | 4 度冷冻干燥保藏后 BSH 活性保留百分比 | |
|---|------------------------|-------------------------------------|
| | 2 周和 3 周 | 5 周和 6 周 |
| 游离细胞: (终浓度: 10% 麦芽糖糊精+ 0.33% 酵母提取物) | | 100% (1, 2, 3 months at 4°C and RT) |
| 微胶囊: 1M 海藻糖 (7:3) (终浓度 0.3M) | 70.4% | 67.4% |
| 微胶囊: 10%麦芽糖糊精(7:3) (终浓度 3%) | <25% | <25% |
| 微胶囊: 1% 菊粉 (7:3) (终浓度 0.3%) | 83.1% | 85.3% |
| 微胶囊: 10%麦芽糖糊精+ 0.33% 酵母提取物 (7:3) (终浓度 3% + 0.1%) | 100% | 100% |
| 微胶囊: 1M 海藻糖 + 0.33% 酵母提取物 (7:3) (终浓度 0.3M + 0.1%) | 69.2% | 65.2% |
| 微胶囊: 1% 菊粉 + 0.33% 酵母提取物 (7:3) (终浓度 0.3% + 0.1%) | 75.2% | 80.5% |
| 微胶囊: 10%麦芽糖糊精+ 1% 酪蛋白水解产物 (7:3) (终浓度 3% + 0.3%) | <25% | <25% |

[0255] 表 12 :液态存储条件下存储 4 天后的 BSH 活性保留百分比

[0256]

| 存储条件 | 4 度条件下短期存储 4 天后的 BSH 活性保留百分比 |
|--|------------------------------|
| 微胶囊: 酸奶酪 (3:97) | 87.1% (1 wks) |
| 微胶囊: 酸奶酪(3:97) | 54.6% (4 wks) |
| 微胶囊: 酸奶酪(3:97) | 53.5% (6wks) |
| 微胶囊: 酸奶酪(1:1) | 96.0% |
| 微胶囊: 5% 生长培养基 (1:1) (终浓度 2.5%) | 92.6% |
| 微胶囊: 10%生长培养基(1:1) (终浓度 5%) | 92.4% |
| 微胶囊: 20%生长培养基 (1:1) (终浓度 10%) | 88.2% |
| 微胶囊: 100% 培养物上清 (1:1) (终浓度 50%) | 87.0% |
| 微胶囊: 10% MRS (1:1) (终浓度 5%) | 81.5% |
| 微胶囊: 1% 麦芽糖 (1:1) (终浓度 0.5%) | 22.0% |
| 微胶囊: 1% 麦芽提取物 (1:1) (终浓度 0.5%) | <15% |
| 微胶囊: 1% 菊粉 (1:1) (终浓度 0.5%) | <15% |
| 微胶囊: 10% 山梨糖醇 (1:1) (终浓度 5%) | <15% |
| 微胶囊: 0.33% 酵母提取物 (1:1) (终浓度 0.165%) | <15% |
| 微胶囊: 1% 菊粉 + 0.33% 酵母提取物 (1:1) (终浓度 0.5% + 0.165%) | <15% |
| 微胶囊: 1M 果糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | <15% |
| 微胶囊 | <15% |
| 微胶囊: 0.85% 生理盐水 (1:1) (终浓度 0.425%) | <15% |

[0257]

[0258] 表 13:Lactobacillus reuteri NCIMB 701359 微胶囊在液氮速冻并于零下 80 度保藏 3 周后的冷冻保护结果:显微镜观察微胶囊形态(完整性保留百分比)和 HPLC 分析 BSH 活性(BSH 活性保留百分比)

[0259]

| 冷冻保护条件 | 完整性保留百分比 | BSH 活性保留百分比 | |
|---|----------|---------------|-----------|
| | 微胶囊形态 | 速冻并解冻(thaw)后 | 速冻后存储 3 周 |
| 幼粒细胞: 细胞 + 100% spent media (1:1) (终浓度 50%) | | 100% | |
| 微胶囊: 1% 麦芽糖糊精 + 0.23% 酵母提取物 (1:1) (终浓度 0.5% + 0.115%) | | 77.8% | |
| 微胶囊: 2% 麦芽糖糊精+ 0.23% 酵母提取物(1:1) (终浓度 1% + 0.115%) | | 100% | |
| 微胶囊: 10% 麦芽糖糊精+ 0.33% 酵母提取物(1:1) (终浓度 5% + 0.165%) | | 100% | |
| 微胶囊: 1% 菊粉 (1:1) (终浓度 0.5%) | 100% | 98.5% | 90.3% |
| 微胶囊: 1M 海藻糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | 98.3% | 100% | 88.3% |
| 微胶囊: 1M 果糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | 98.2% | <50% | <50% |
| 微胶囊: 1M 蔗糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | 97.1% | 97.7% | 93.3% |
| 微胶囊: 1M 乳糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | 95.0% | 100% | 92.3% |
| 微胶囊: 1M 麦芽糖 (1:1) (终浓度 0.5M) | 90.0% | 94.2% | 92.1% |
| 微胶囊: 10% FOS (1:1) (终浓度 5%) | 70.0% | 未测试 (由于形态学结果) | |
| 微胶囊: 10% PEG8000 (1:1) (终浓度 5%) | 28.1% | 未测试 (由于形态学结果) | |
| 微胶囊: 10% 脱脂牛奶 (1:1) (终浓度 5%) | 25.5% | 未测试 (由于形态学结果) | |
| 微胶囊: 10% 淀粉 (1:1) (终浓度 5%) | 24.4% | 未测试 (由于形态学结果) | |
| 微胶囊: 0.85% 生理盐水 (1:1) (终浓度 0.425%) | 12.0% | 未测试 (由于形态学结果) | |

[0260] 参考文献列表

[0261] Angulo, P. " Nonal coholic fatty liver disease. " N.Engl.J.M ed. 346, 1221(2002).

[0262] Aso, Y. et al., " Preventive Effect of A Lactobacillus-Casei Preparation on the Recurrence of Superficial Bladder-Cancer in A Double-Blind Trial, " European Urology 27(2), 104(1995). Chang, T. M. S. Semipermeable microcapsules. Science 146, 524-525(1964).

[0263] Chang, T. M. & Prakash, S. Artificial cells for bioencapsulation of cells and genetically engineered E. coli. For cell therapy, gene therapy, and removal of urea and ammonia. Methods Mol. Biol. 63, 343-358(1997).

[0264] Chang, T. M. & Prakash, S. Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells. Mol. Med. Today 4, 221-227(1998).

[0265] Dobrogosz, W. J. " Enhancement of human health with Lactobacillus reuteri :A probiotic, immunobiotic and immunoprotective," NUTRAfoods 4, 15(2005).

[0266] Ford, E. S. et al. Prevalence of metabolic syndrome among US adults:

findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. JAMA 287(3):356(2002).

[0267] Gaist, D. et al., "Lipid-lowering drugs and risk of myopathy: A population based follow-up study," 12(5), 565(2001).

[0268] Gaist, D. et al., "Statins and risk of polyneuropathy-A case-control study," 58(9), 1333(2002). Goldenberg, I., M. Benderly, and U. Goldbourt, "Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate," 4(1), 131(2008).

[0269] Hallikainen, M. A. and M. I. J. Uusitupa, "Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects," 69(3), 403(1999).

[0270] Huang, J. S. et al., "Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis," Dig. Dis. Sci. 47(11), 2625(2002).

[0271] Jenkins, D. J. A. et al., "The effect on serum lipids and oxidized low-density lipoprotein of supplementing self-selected low-fat diets with soluble-fiber, soy, and vegetable protein foods," 49(1), 67(2000).

[0272] Jones et al. "Method for Bile Acid Determination by High Performance Liquid Chromatography". J Med Sci 2003; 23(5): 277-280.

[0273] Lodinova-Zadnikova, R. and U. Sonnenborn, "Effect of preventive administration of a nonpathogenic Escherichia coli strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants," Biol. Neonate 71(4), 224(1997).

[0274] Lopez-Garcia, E. "Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction". The Journal of Nutrition 135(3): 562(2005). McIntosh, G. H., P. J. Royle, and M. J. Playne, "A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats," Nutr. Cancer 35(2), 153(1999).

[0275] Omar, M. A. and J. P. Wilson, "FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis," 36(2), 288(2002).

[0276] Ornish, D. et al., "Can Life-Style Changes Reverse Coronary Heart-Disease," 336(8708), 129(1990).

[0277] Pedersen, T. R. et al., "Randomized Trial of Cholesterol-Lowering in 4444 Patients with Coronary Heart-Disease-the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)," 344(8934), 1383(1994).

[0278] Pepys, M. B. et al., "Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease". Nature 440: 1217(2006).

[0279] Prakash, S. and Jones M. L. Engineering Artificial Cells for Therapy. 7-22-2002. Sarawak, Malaysia, 2nd World Engineering Congress.

[0280] Ref Type: Conference Proceeding

[0281] Prakash, S. and Urbanska A. M. (2007). Fermented milk product and uses

thereof. W02007/140613.

[0282] Probstfield, J. L. and B. M. Rifkind, " The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial :design, results, and implications, " 40 Suppl 1, S69-S75(1991).

[0283] Rayes, N. et al., " Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination :a controlled trial in liver transpl ant recipients, " Transplantation 74(1),123(2002).

[0284] Scalia"Simultaneous determination of free and conjugated bile acids in human gastric juice by HPLC". J of Chrom, 431(1988)259-269.

[0285] Sgro, C. and A. Escousse, " Side-Effects of Hypolipidemic Drugs, " 46(5), 351(1991).

[0286] Staffa, J. A. , J. Chang, and L. Green, " Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis, " 346(7),539(2002).

[0287] Szajewska, H. et al., " Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants, " J. Pediatr. 138(3),361(2001).

[0288] Tabas, K. J. Williams, and J. Boren, " Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis -Update and therapeutic implications, " 116(16),1832(2007).

[0289] Tall, A. R. " An overview of reverse cholesterol transport, " 19 Suppl A, A31-A35(1998). " Third Report of the National Cholesterol Education Program(NCEP)Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults(Adult Treatment Panel III)final report, " 106(25), 3143(2002).

[0290] Tobias, P. S. , L. K. Curtiss, " Toll-like receptors in atherosclerosis, " Biochem Soc Trans. 35(6)1453(2007).

[0291] Uludag, H. , De Vos, P. , & Tresco, P. A. Technology of mammalian cell encapsulation. Adv. Drug Deliv. Rev. 42,29-64(2000).

[0292] Urbanska A. M. , Bhathena J. , Martoni C. , Prakash S. "Estimation of the Potential Antitumor Activity of Microencapsul ated Lactobacillus acidophilus Yogurt Formulation in the Attenuation of Tumorigenesis in Apc(Min/+)Mice". Dig. Dis. Sci. (2009)54 :264-273.

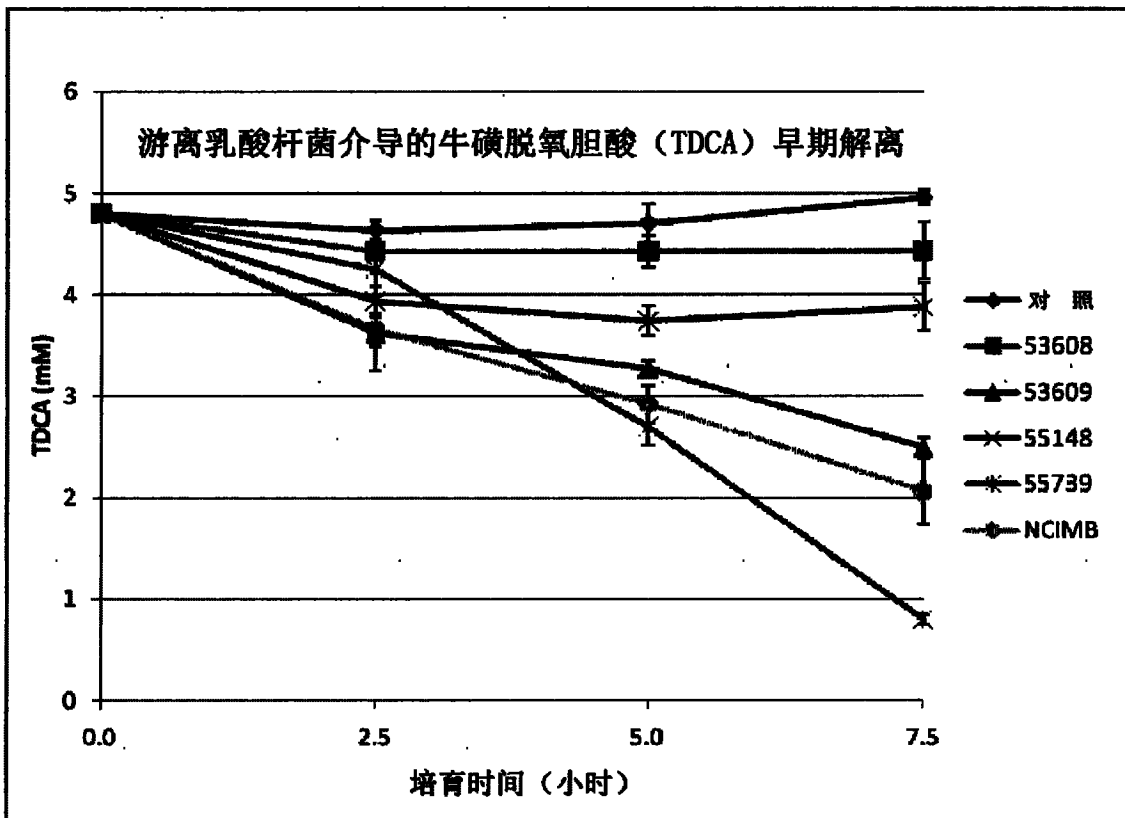


图 1

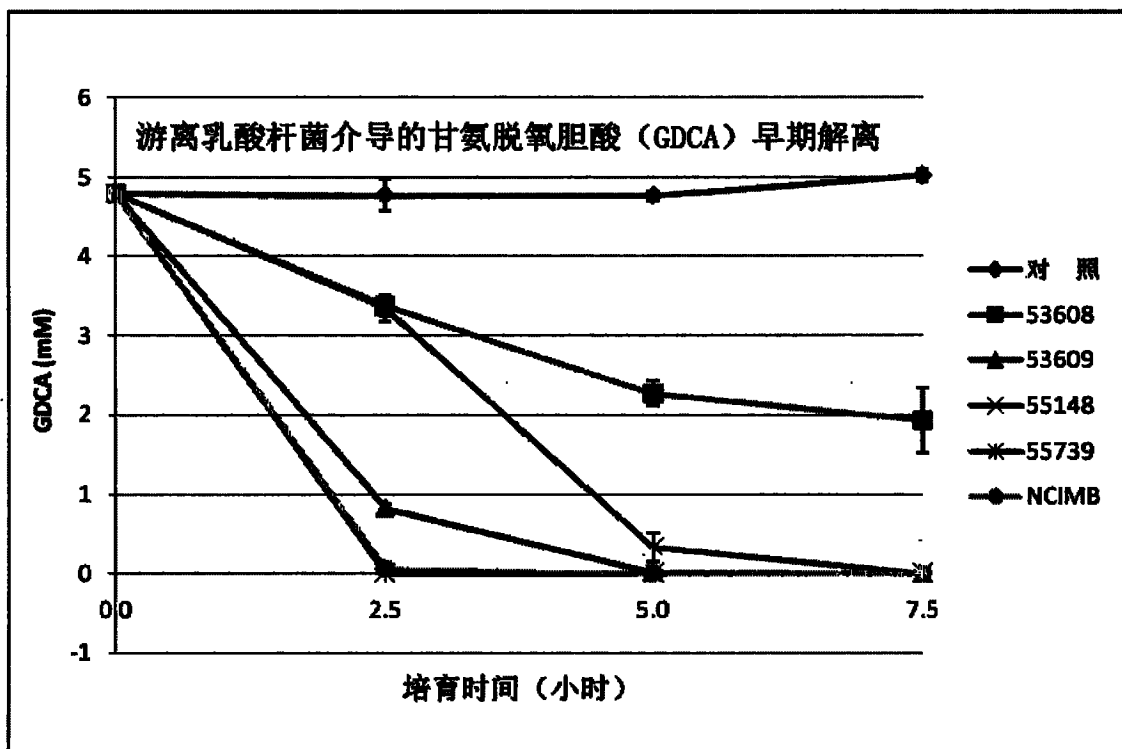


图 2

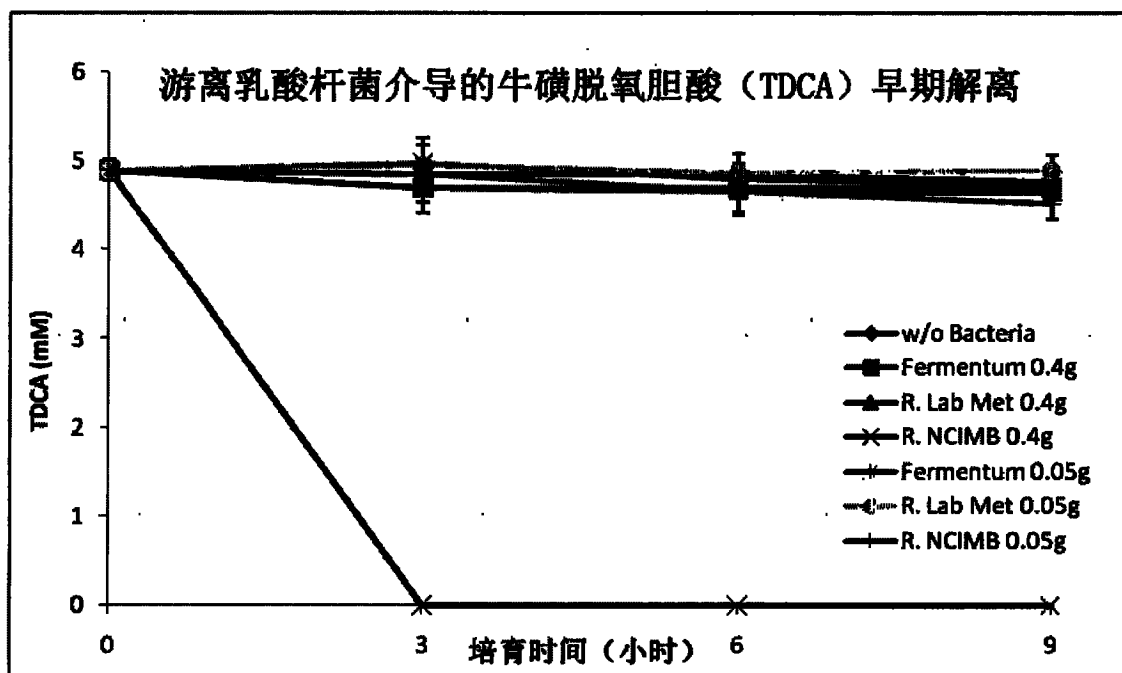


图 3

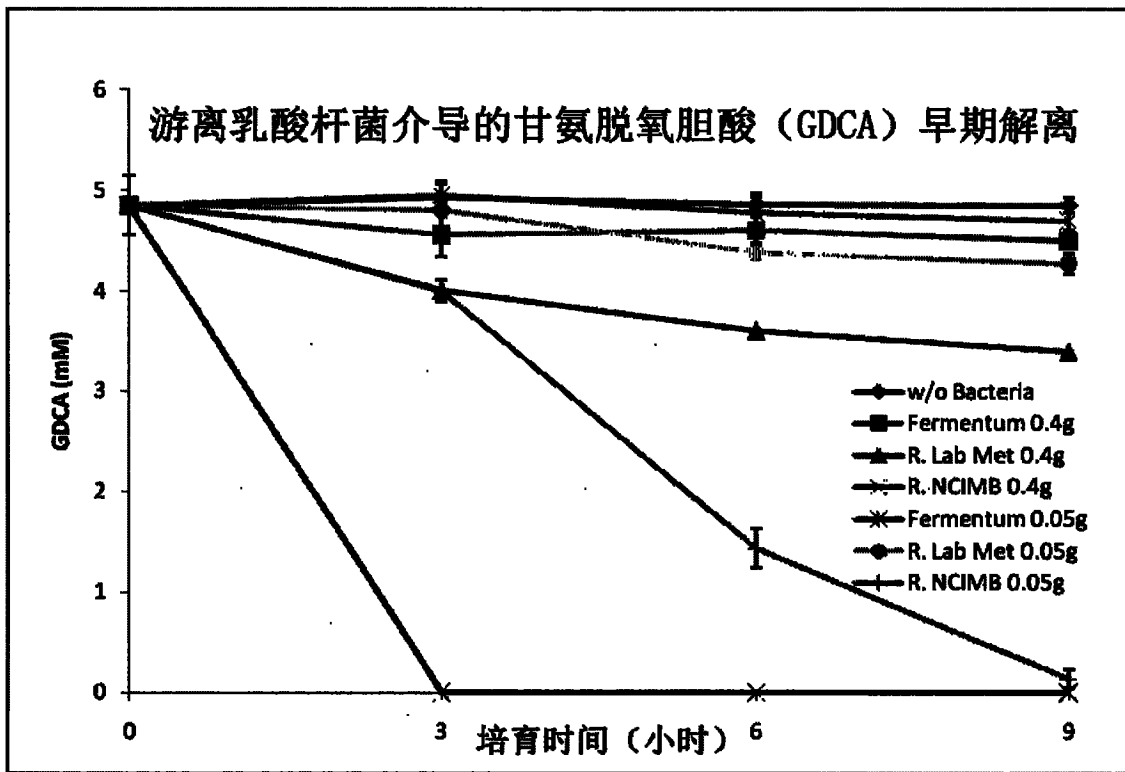


图 4

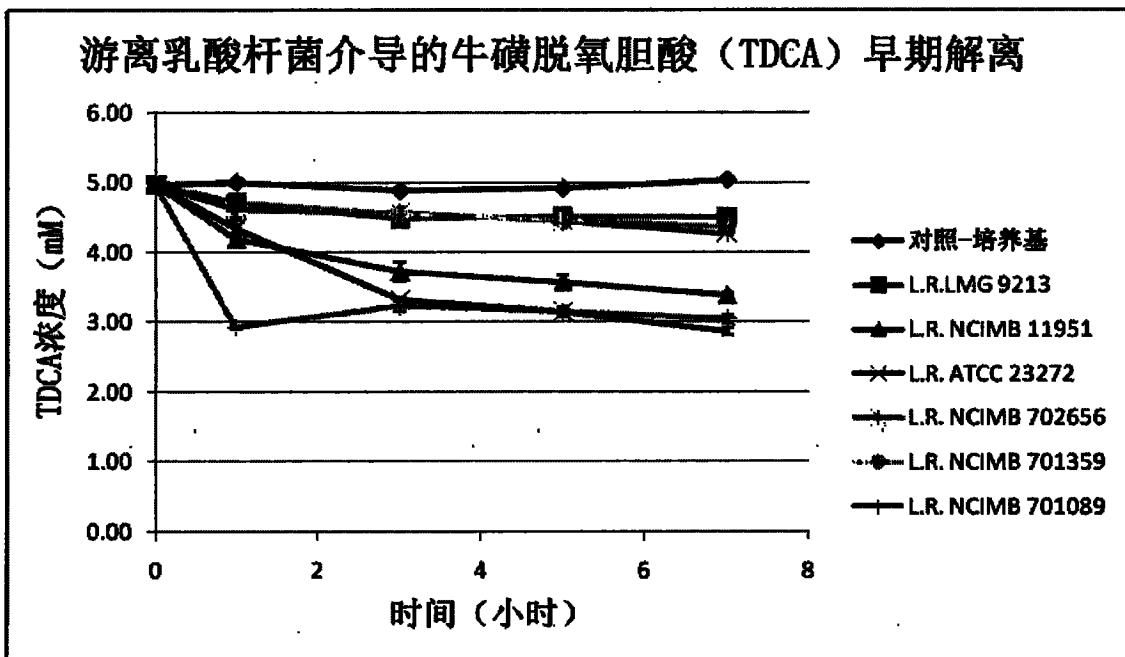


图 5

游离乳酸杆菌介导的甘氨脱氧胆酸 (GDCA) 早期解离

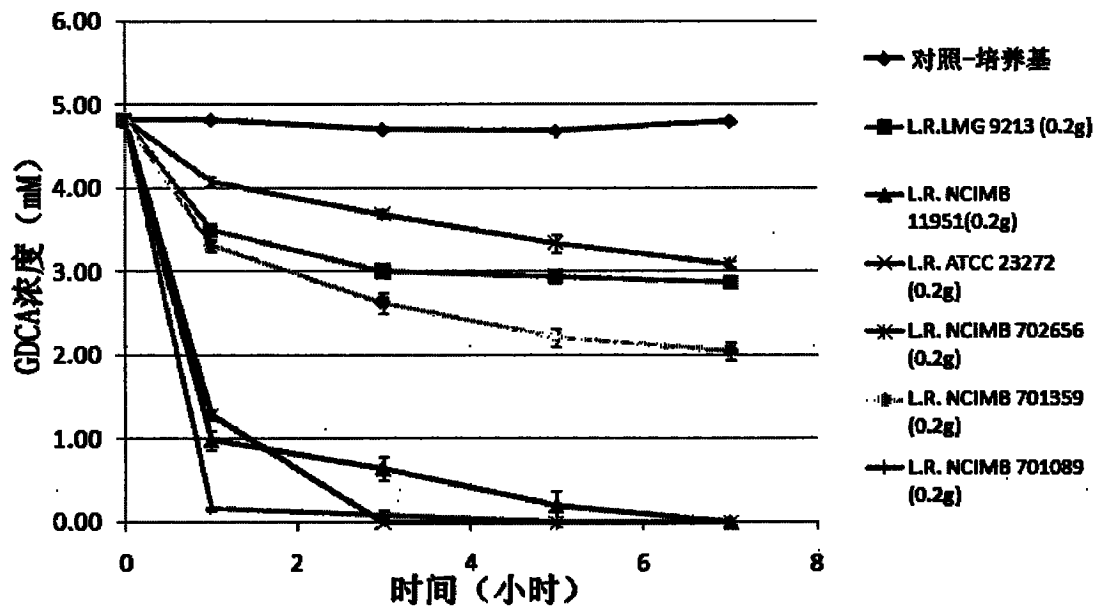


图 6

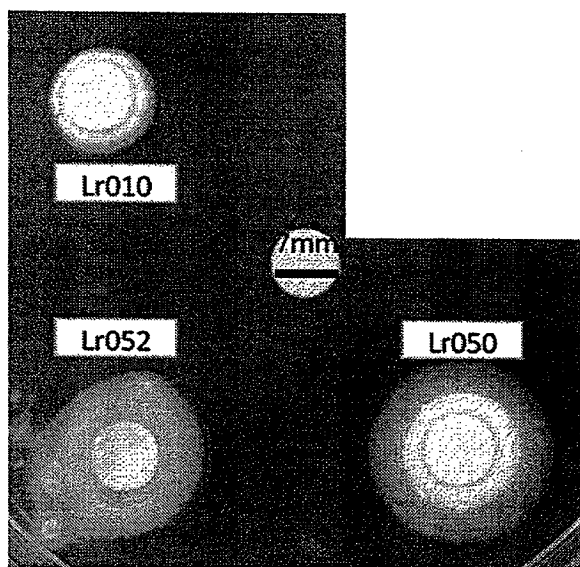


图 7

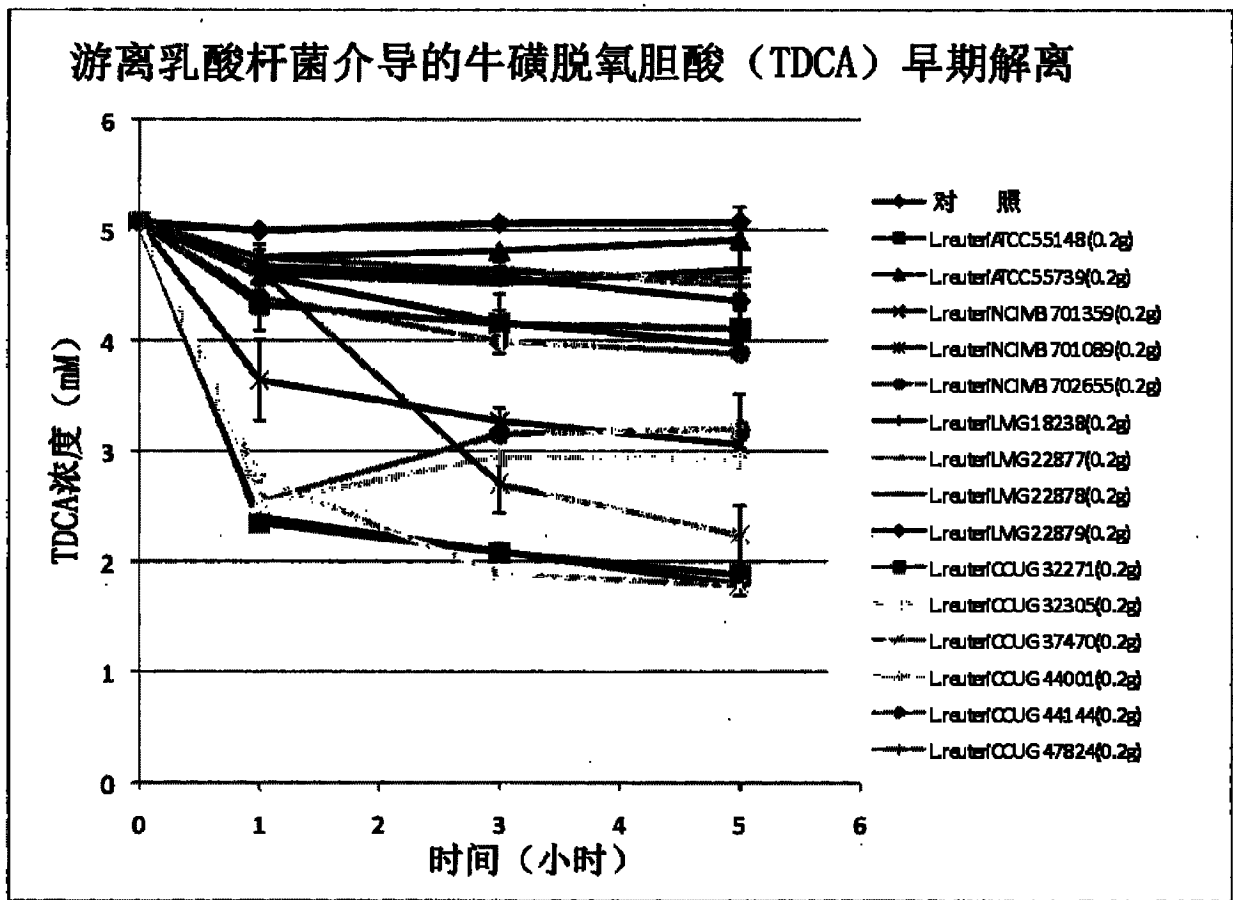


图 8

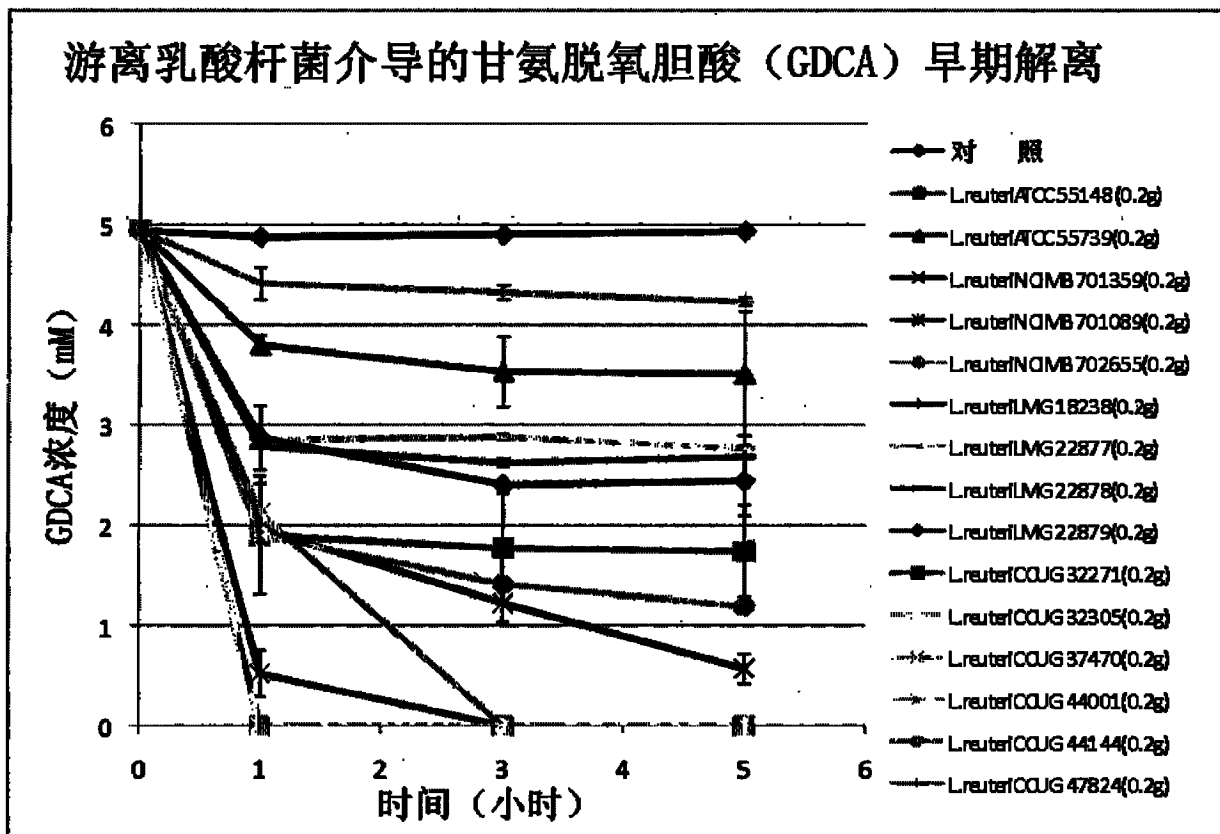


图 9

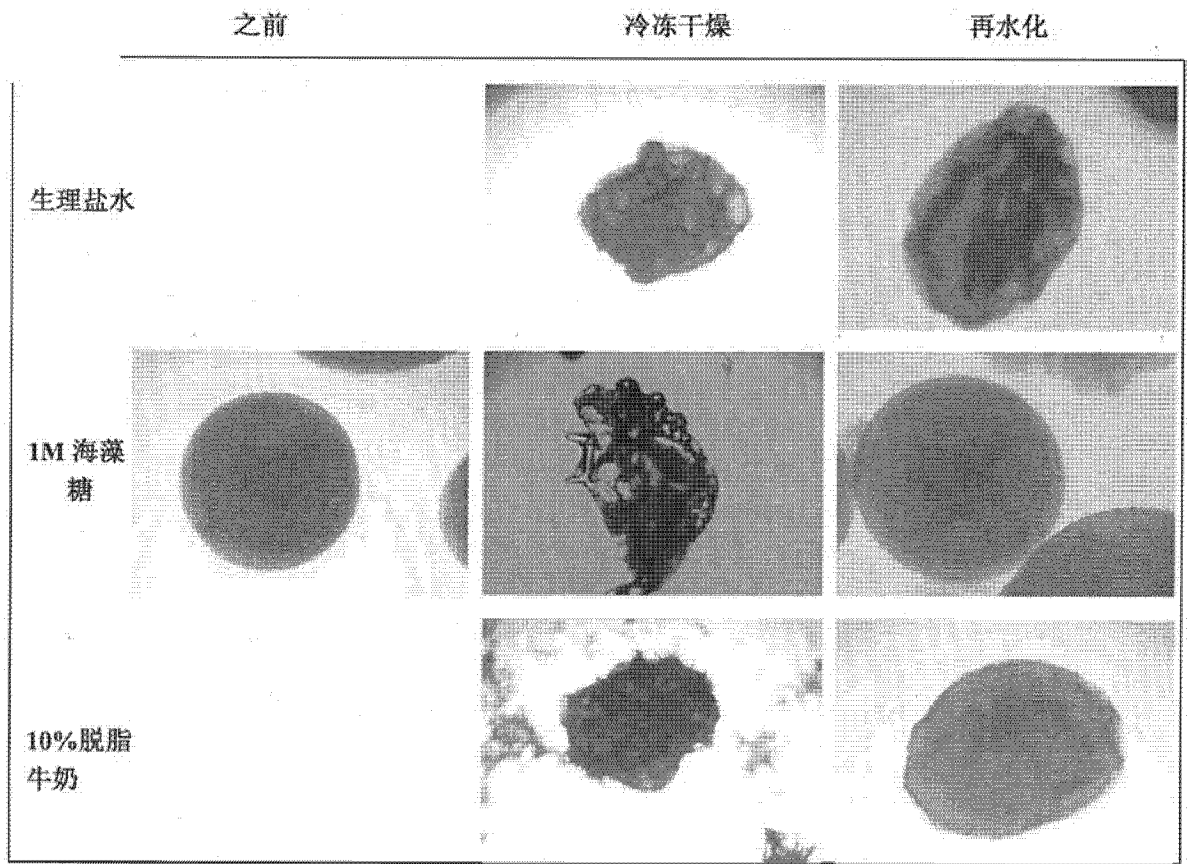


图 10