



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104684565 A

(43) 申请公布日 2015.06.03

(21) 申请号 201280074571.9

代理人 刘晓东

(22) 申请日 2012.05.29

(51) Int. Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.01.07

A61K 35/747(2015.01)

A23L 1/30(2006.01)

A61L 29/08(2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/PL2012/000039 2012.05.29

A61L 29/16(2006.01)

A61P 19/06(2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/180585 EN 2013.12.05

A61P 31/04(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

C12R 1/225(2006.01)

(83) 生物保藏信息
DSM15693 2003.06.20

(71) 申请人 达努塔·克鲁谢夫斯卡
地址 波兰华沙

(72) 发明人 达努塔·克鲁谢夫斯卡

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

权利要求书3页 说明书35页
序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

在人类和兽医的预防和医疗中有用的、包含罗伊氏乳杆菌 DAN080 的纳米产品及其医疗用途

(57) 摘要

本发明涉及在人类和兽医的预防和医学中有用的纳米产品, 以及其医疗用途。本发明公开了保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株在医学中的用途。公开了包括保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的各种制剂形式作为治疗和预防剂在医学中的用途, 特别是作为抗微生物剂在医疗疾病的预防和治疗中的用途, 所述医疗疾病是由胃肠道、体表和其它系统(例如, 泌尿生殖系统、呼吸系统)的细菌、真菌和其它病原体引起的感染的结果发展起来的, 在脊椎动物中的用途或作为用于痛风(足痛风)的发展的治疗和预防 and / 或用于提高脊椎动物(特别是人类、其它哺乳动物或鸟类)的生物体中溶菌酶的活性的治疗和 / 或预防剂。还公开了包括保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的培养产物的医疗器械(例如, 导管和卫生用品)。

1. 保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) DAN080 菌株,其用于医药中。

2. 权利要求 1 的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,其为培养物、部分灭活的培养物;保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体、浓缩和干燥上清的形式,作为治疗和预防剂在医药中的用途,特别是作为抗微生物剂,在医疗疾病的预防和治疗中的用途,所述医疗疾病是因脊椎动物中胃肠道、体表和其它系统(例如,泌尿生殖系统、呼吸系统)的细菌、真菌和其它病原体引起的感染而发展起来的,或作为用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物(特别是人类、其它哺乳动物或鸟类)的生物体中溶菌酶的活性的治疗和/或预防剂。

3. 权利要求 1 中的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,其处于选自以下组的形式:保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的完整培养物;获取自保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物以及获取自包含保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的混合细菌培养物的液体、浓缩和干燥上清;和获取自原核和真核重组体的培养物的液体、浓缩和干燥上清,以及原核和真核重组体的完整培养物,在所述重组体中和/或自其中利用了基因,所述基因提供针对幽门螺旋杆菌和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性;分子量大约为:150 和/或 141 和/或 115 和/或 95 和/或 90 和/或 86 和/或 83 和/或 77 和/或 71 和/或 63 和/或 59 和/或 56 和/或 49 和/或 46 和/或 43 和/或 39 和/或 34 和/或 32 和/或 30 和/或 22kD 或更低的蛋白质/寡肽/肽,其纯化/分离自获取自保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的液体、浓缩和干燥上清,纯化/分离自保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的完整培养物,纯化/分离自包含保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的其它混合细菌培养物;和纯化/分离自原核和真核重组体的培养物,在所述重组体中和/或自其中利用了基因,所述基因提供针对幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性;或它们的混合物;在医疗疾病的预防和治疗中作为抗微生物剂的医药用途,所述医疗疾病是因脊椎动物中胃肠道、体表和其它系统(例如,泌尿生殖系统、呼吸系统)的细菌、真菌和其它病原体引起的感染而发展起来的。

4. 权利要求 1-3 中任一项的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,作为抗微生物剂、作为用于痛风(足痛风)的发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物生物体中溶菌酶的活性的治疗和/或预防剂的用途,其中所述脊椎动物是人类个体。

5. 权利要求 1-3 中任一项的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,作为抗微生物剂、作为用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物生物体中溶菌酶的活性的治疗和/或预防剂的用途,其中所述脊椎动物是家养动物、宠物、参与运动的动物、肉鸡、下蛋的母鸡、小鼠、大鼠、豚鼠、兔和其它实验动物,包括灵长类动物,与其年龄无关。

6. 权利要求 1-3 中任一项的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,作为抗微生物剂的用途,其中所述微生物是致病性细菌或真菌。

7. 权利要求 5 中的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,作为抗微生物剂的用途,其中所述致病性细菌是幽门螺旋杆菌。

8. 权利要求 1-7 中任一项的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,用于制

备组合物的用途,所述组合物用于调节需要这样的治疗的脊椎动物(包括人类、其它哺乳动物和鸟类)中胃、肠和GIT功能,或用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物生物体中溶菌酶的活性,所述组合物包含有效量的保藏号为DSM 15693的罗伊氏乳杆菌DAN080菌株,提供所需预防或治疗效果。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述组合物被设计用于杀死、抑制、调节和防止幽门螺旋杆菌和其它微生物的生长,或用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物生物体中溶菌酶的活性,和用于以获得所期望的预防或治疗结果所需的有效量和合适速率进行施用。

10. 根据权利要求8-9中任一项的用途,其中所述组合物被设计用于GIT紊乱、胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌的治疗、缓解或预防,或用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高需要这样的治疗的脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)个体生物体中溶菌酶的活性。

11. 根据权利要求10的用途,其中所述组合物被设计用于腹泻的治疗、缓解或预防。

12. 根据权利要求11的用途,其中腹泻的治疗、缓解或预防包括幽门螺旋杆菌生长的消除或稳定。

13. 根据权利要求10的用途,其中所述组合物被设计用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防和/或用于提高脊椎动物生物体中溶菌酶的活性。

14. 根据权利要求8-13任一项的用途,其中所述组合物是药物组合物,所述药物组合物任选地含有其它生物活性物质(例如,维生素,特别是D和E),特别是以纳米形式,以预防或治疗剂量,还包含药学上可接受的载体和/或其它添加剂,以及抗微生物壳聚糖盐,特别是 α -酮戊二酸盐、柠檬酸盐和乳酸盐。

15. 根据权利要求14的用途,其中所述药物组合物是以固体形式,分为含有治疗有效量的保藏号为DSM 15693的罗伊氏乳杆菌DAN080菌株的单剂量,其量为0.001至0.2g/kg体重/天。

16. 根据权利要求15的用途,其中所述药物组合物是以片剂或胶囊的形式。

17. 根据权利要求14的用途,其中所述药物组合物是以液体形式,分为含有治疗有效量的保藏号为DSM 15693的罗伊氏乳杆菌DAN080菌株的单剂量,其量为0.001至0.2g/kg体重/天。

18. 根据权利要求17的用途,其中所述药物组合物是以设计用作气雾剂、糊剂或湿敷剂的液体形式。

19. 根据权利要求8至13中任一项的用途,其中所述组合物是膳食补充剂、食品或饲料添加剂。

20. 根据权利要求19中的用途,其中所述膳食补充剂、食品或饲料添加剂是以固体形式和/或以饮料形式。

21. 根据权利要求19-20中任一项的用途,其中所述治疗有效量范围为0.001至0.2g/kg体重/天。

22. 用于插入身体血管、管道和/或腔内的导管,其用于人类和兽医的预防、诊断和医疗中,由塑料制成并涂有保护性润滑剂层,其特征在于,它具有能够与水形成凝胶的生物相容性聚合物的外纳米涂层,或者直接或者通过化学键合至所述导管材料并具有抗菌性质的

聚合物的纳米涂层而永久连接至所述塑料,其中所述纳米涂层的至少之一包括添加由保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株分泌的胞外代谢物,所述代谢物具有抗微生物和抗炎活性,以及任选添加纳米颗粒形式的维生素 D。

23. 根据权利要求 22 的导管,其特征在于,所述生物相容性聚合物是聚乙烯吡咯烷酮,并且由这种聚合物制得的纳米涂层具有大约 50,000 个 C-C 键 (10nm) 的厚度。

24. 根据权利要求 22 或 23 的导管,其特征在于,具有抗菌性质的所述聚合物是壳聚糖和小有机酸(优选 α -酮戊二酸)的盐。

25. 根据权利要求 22-24 中任一项的导管,其特征在于,选自包括显示抗微生物和抗炎活性的壳聚糖 α -酮戊二酸盐、壳聚糖柠檬酸盐、壳聚糖乳酸盐,小的二羧酸,银纳米颗粒和涂敷有保护性涂层的纳米粉末形式的维生素 D 和 E 及其组合的组中的额外活性剂,被分散于由生物相容性聚合物制成的纳米涂层中和 / 或分散于具有抗菌性质的聚合物中。

26. 导管插入试剂盒,其包含根据权利要求 22-25 中的导管和装有注射用水(无菌)的小瓶以及用于口服施用的应激降低剂,所述应激降低剂是 10^6 个细胞剂量的活的或热灭活的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物形式,用于导管插入期间和 / 或导管插入之前 8 小时进行每日施用,或在导管插入之前 15min 直接进入体腔。

27. 根据权利要求 26 的试剂盒,其特征在于,水的容器固定于所述导管的尖端,并具有将水和导管分开的分区,当所述导管从包装伸出外部时该分区被所述容器对着所述导管的旋转破坏。

28. 根据权利要求 1-7 中任一项的保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株,作为抗微生物剂用于制备卫生用品的用途,所述卫生用品的形式为敷料、尿布、卫生棉条、绷带、创可贴、卫生护垫、带护翼的卫生巾、内裤衬垫、化妆棉、用于昼夜使用的动物用包装和其它个人卫生用品。

29. 根据权利要求 28 的用途,其中所述用品设计为用于救援单位、包括消防救援的塑料保护器或灭火毯,旨在用于具有严重烧伤的患者或具有严重身体伤害的道路交通事故受害者。

30. 根据权利要求 29 的用途,其中所述塑料保护器或灭火毯涂敷有包括保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的纳米层。

31. 根据权利要求 30 的用途,其中所述保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株在与烧伤的或受伤的患者身体接触时以抗微生物有效量释放。

在人类和兽医的预防和医疗中有用的、包含罗伊氏乳杆菌 DAN080 的纳米产品及其医疗用途

发明领域

[0001] 本发明涉及一种在人类和兽医的预防和医疗中有用的纳米产品及其医疗用途。由本发明人——达努塔·克鲁谢夫斯卡 (DK) 分离和鉴定的新的微生物是该产品的来源。

[0002] 发明背景

[0003] 在健康人（以及健康动物）的整个一生里，微生物都存在于他/她的生物体中。在这些微生物中，细菌占优势，但是也存在真菌和原生动物。各种类型的微生物最集中地定殖于胃肠道、体表和其它系统（例如，泌尿生殖道或上呼吸道）的粘膜，并定居于粘膜表面。特定微生物群的个体种属/菌株以及所述微生物群作为一个整体履行它们维持健康的功能的机制尚未得到充分认识。胃肠道、皮肤和其它被微生物聚居的生态小环境 (niches) 的微生物群在微生物所履行的功能、组成和量上不同。因此，术语‘微生物群’应理解为是指栖息在身体的特定解剖和生理区域内的微生物的‘集群 (herd)’，其构成微生物的微生物组 (microbiom)。

[0004] 现在将详细讨论在人类胃肠道内突出的状况以提供也可以在活的生物体的其它微生物组中发现的各种相互关系和机制的解释。

[0005] 胃肠道微生物的共同相互作用具有共生共存的特点。基于消化系统的例子，该系统的微生物群刺激宿主免疫力，不仅在微生物水平（活的或死的），而且通过其胞内和胞外代谢物，抵抗对健康有害的其它微生物的锚定（主要是病原体）——通过对受体和底物的竞争，中和其它微生物的有毒的胞内和胞外代谢物，调节肠的发育和生理功能（不仅在消化功能的水平上），发酵难消化的、但能量上有用的底物，代谢聚糖和氨基酸并合成维生素。各种代谢疾病（例如，痛风）的发展中微生物群的复杂参与或功能障碍至今很少被考虑到。

[0006] 幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 是定殖于胃和十二指肠粘膜的微生物，导致若干医疗状况，包括胃炎和其它相关疾病，例如，胃和十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌、肠紊乱、胃肠道紊乱 (GIT) 和腹泻，实际上，其折磨生活在西方国家的现代社会中人类种属的每一个代表。这对于人类人口的 1/3 是主要的医疗问题，其具有越来越多的医疗、社会和经济后果。超过一千万美国人忍受由于幽门螺旋杆菌相关的胃炎带来的痛苦；尽管采用胃炎的最近的定义，受折磨的患者数量估计为一千四百万到两千五百万，包括那些还没有经历胃溃疡或癌症但已经充分经历了阳性疼痛症状者。尽管已知幽门螺旋杆菌在胃炎的发病机理、消化性溃疡和腺癌发展中的作用（参见：Hunt RH. The role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996 ;220 :3-9），但也表明幽门螺旋杆菌的某些菌株在自然界中可以作为共生体出现（参见：Misiewicz J. Is the only good *Helicobacter* a dead *Helicobacter*? *Helicobacter* 1997 ;2S :S89-S91）。

[0007] 美国国立卫生研究院估计在 20 世纪 90 年代上述胃炎和其它相关疾病（例如胃和十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌、肠紊乱、GIT 紊乱和腹泻）的治疗费用达到 200 亿美元。随着人口老龄化和胃炎发病率的不断增加，仅在美国，估计截至 2020 年，仅与这些医疗状

况相关的医疗费用将会超过 600 亿美元。

[0008] 目前,胃炎和其它相关疾病(例如胃和十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌、肠紊乱、GIT 紊乱和腹泻,其发展是幽门螺旋杆菌相关的)的治疗和预防方法通常基于降低胃中 HCl 的产生,或通常用抗生素杀死所有细菌。表 1 显示迄今为止治疗方法的有效性。

[0009] 表 1. 用于胃炎治疗的已知和常用的治疗策略。

[0010]

策略	抗生素	H ⁺ (质子)抑制剂
幽门螺旋杆菌胃定殖的减少	消除	效果不佳或缺乏效果
HCl 分泌的调节	缺乏效果	胃分泌的减少

[0011] 在消化系统中也存在有益乳酸菌(LAB),它们本身以及它们的产物被认为是天然健康改良性微生物群的一部分并且作为宿主和肠的健康的改进剂(参见:Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, et al. Two ant ioxidative lactobacili strains as promising probioticts. Int J Food Microbiol 2002 ;72 : 215-24)。

[0012] LAB 通常被认为是安全的(GRAS)细菌。尽管对一般健康状况具有优秀的效果,特别是对 GIT 的效果,但是 LAB 细菌在哺乳动物的母乳喂养期之后显示对 GIT 定殖的能力不足,并且通常对于鸟类的整个一生都是这样。这是由于,首先,母乳喂养期之后缺乏用于 LAB 生长的合适的底物,其次,细菌壁不能产生导致细菌粘附至 GIT 上皮或 GIT 粘膜的菌毛等的特性。

[0013] LAB 和幽门螺旋杆菌之间的抗生性(antibiosis)很少被用作治疗法,这是由于这样的治疗的低效率,因为 LAB 不能很容易地定殖于胃粘膜。

[0014] 目前,许多 LAB 可以在市场上买到,作为活的培养物提供,对于人类为食品添加剂并且对于动物为饲料添加剂,例如植物乳杆菌 299v 和其它。预计在消化系统中生长的 LAB 的产物对这些细菌的消费者将是有益的。这经常是矛盾的,因为活的 LAB 培养物可以良好地被宿主的抗菌化合物消除并杀死,其在胃和肠的上部实质上减少细菌生长。

[0015] 各种其它医疗紊乱也可以继发性地导致胃炎的发展。这样的医疗紊乱列于表 2 中。

[0016] 表 2. 医疗状况和导致胃炎或其它相关疾病(胃和十二指肠溃疡、胃癌、十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)的治疗方法。

[0017]

经典疾病	药物, 药物滥用, 过敏
<p>1 型糖尿病</p> <p>2 型糖尿病</p> <p>炎性肠病</p> <p>淋巴瘤</p> <p>原发性胆汁性肝硬化</p> <p>类风湿关节炎</p> <p>腹腔疾病</p>	<p>NSAID (非类固醇抗炎药)</p> <p>氨甲喋呤</p> <p>抗生素</p> <p>过多的甲状腺激素</p> <p>酒精</p> <p>固定</p> <p>维生素缺乏</p>

[0018] 在哺乳动物和鸡中,胃的正常运转是一个问题。特别是在强行喂食快速生长的动物、用非常非生理的饲料饲喂的情况下,胃不正确地发育并且发生许多健康紊乱问题,该问题引起各种形式的胃炎,其是动物生产效率下降的原因。为了防止这样的情况(其不仅给动物带来不必要的痛苦,而且提高农民的费用)发生,更好地理解 and 控制在脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)的新生后生活中胃粘膜的生理和病理过程(与胃肠道的幽门螺旋杆菌和其它病原体的存在有关)是有必要的。

[0019] 鉴于上述指出的、本领域已知的提供胃疾病和相关状况的预防和缓解的最新疗法的不便,以及鉴于在例如胃炎或胃溃疡相关的状况中 GIT 功能的治疗和校正的昂贵费用,存在开发用于人类和兽医医学以通过消除或调节胃肠道的幽门螺旋杆菌和其它病原体的生长来改善胃的功能发挥的新产品以及改善方法和组合物的强烈需要。

[0020] 痛风, [当它涉及大脚趾时] 也称为足痛风,是通常特征为急性性关节炎的反复发作的代谢疾病。该紊乱伴随患者经历严重的疼痛,其是由在关节组织和在许多器官(包括肾脏和尿道)中尿酸钠盐结晶形式的沉积的存在造成的。关节炎表现为红肿、触痛和肿胀,并且在一半的病例中,它影响大脚趾的跖趾关节。

[0021] 在痛风过程中也可能出现痛风石,这是在软组织中尿酸盐的沉积、肾结石(肾结石(nephrolithiasis))、肾病。血液中尿酸(结晶形式)水平的升高伴随其不仅在关节、尿道和周围组织而且在肌腱、韧带和软骨中的沉积。

[0022] 大约 20%的痛风患者具有形成在泌尿系统中的结石,肾结石(痛风肾病-肾髓质和肾锥体的实质组织)。尿道结石是由肾集合小管(tubuli colligens)、肾盂和输尿管中尿酸结晶的沉淀引起的。尿酸盐结石约占所有肾结石的 10%。

[0023] 最近,尿道结石已经在生活标准更高的国家中广泛发展。估计它影响了 5.2-15%的男性和 6%的女性。发病率的增加与生活方式的改变、营养模式的改变和肥胖普遍化有关。除了痛风,‘代谢综合征’涵盖了这样的疾病,如高血压病、与脂代谢平衡缺乏相关的疾病、2 型糖尿病、心血管疾病,其伴随结石的形成。营养模式,即饮食的量、组成和类型,影响食物代谢和营养物质向血管和淋巴流内的吸收。这些过程的结果是结石的形成,它们的化

学结构上有变化。因此,与饮食中富含草酸盐一起,结石是基于草酸钙形成的(75%的结石,鸟粪石 10-20%,尿酸 5-6%,胱氨酸 1%)。

[0024] 考虑到大约 50%的患有结石病的患者受到复发的痛苦,建议这种疾病的代谢和/或药理学预防(参见:Porena M, Guiggi P, Micheli C. Prevention of stone disease. *Urol Int.* 2007 ;79Suppl 1 :37-46)。

[0025] 晶体(crystals)的存在是生物体伴随尿液的尿酸排泄受损(清除降低)的结果,更少见的是尿酸过量产生的结果。当血清中的尿酸浓度(sUA)超过 6.8mg/dL 时,胞外流体中该酸是饱和的,其被定义为高尿酸血症的状态(参见:Becker MA, Ruoff GE. What do I need to know about gout? *J Fam Prac t.* 2010 ;59(6Suppl) :S1-8)。

[0026] 痛风的诊断是基于观察到关节液(fluid)中存在的特征晶体,以及基于血液和尿液的成像。

[0027] 应当强调的是,痛风影响高度发达国家约 1-2%的人口,在最近几十年里观察到呈向上趋势。尿酸代谢紊乱与先天遗传倾向、功能障碍/缺乏酶活性相关,也与平均寿命的增加、饮食习惯的改变等因素相关。高尿酸血症是成人和处于绝经后年龄的女性的疾病。

[0028] 在健康人(以及其它动物)的整个一生里,微生物都存在于他/她的生物体中。在这些微生物中,细菌占优势,但是也存在真菌和原生动物。各种类型的微生物最集中地定植于胃肠道、体表和其它系统(例如,泌尿生殖道或上呼吸道)的粘膜,并定居于粘膜表面。特定微生物群的个体种属/菌株以及所述微生物群作为一个整体履行它们维持健康的功能的机制尚未得到充分认识。胃肠道、皮肤和其它被微生物聚居的生态小环境的微生物群在微生物的所履行的功能、组成和量上不同。因此,术语‘微生物群’应理解为是指栖息在身体的特定解剖和生理区域内的微生物的‘集群(herd)’,其构成微生物的微生物组。

[0029] 胃肠道微生物的相互作用具有共生共存的特点。基于消化系统的例子,该系统的微生物群刺激宿主免疫力,不仅在微生物水平(活的或死的),而且通过其胞内和胞外代谢物,抵抗对健康有害的其它微生物的锚定(主要是病原体)——通过对受体和底物的竞争,中和其它微生物的有毒的胞内和胞外代谢物,调节肠的发育和生理功能(不仅在消化功能的水平上),发酵难消化的、但能量上有用的底物,代谢聚糖和氨基酸并合成维生素。痛风的发展中微生物群的复杂参与或功能障碍至今很少被考虑到。

[0030] 溶菌酶是一种由某些吞噬细胞(例如,巨噬细胞和多个核的白细胞)释放的水解酶,它在病原微生物的控制中发挥显著的作用。溶菌酶也由位于肠内膜的帕内特细胞产生。溶菌酶对革兰氏阳性微生物尤其有活性。细胞的吞噬活性涉及在溶菌酶的参与下降解细菌的细胞壁,更精确地——肽聚糖内糖苷键的裂解。

[0031] 尽管可能分离和完全鉴定溶菌酶,但是由于其高活性,该化合物的治疗应用是不可能的。在出版物 W0 89/11294 中,公开了二聚化形式的溶菌酶的可能治疗用途,表明其在人类和兽医医学的治疗应用中是有效性。

[0032] 痛风的治疗至今涉及施用降低疼痛的强度和持续时间的抗炎剂,以非类固醇抗炎药(NSAIDs)、类固醇或经典剂(classic agent)——秋水仙碱的形式,减轻疾病的症状。

[0033] 秋水仙碱具有抗炎活性并降低生物体中尿酸浓度水平。该药的缺点是其毒性作用。副作用包括腹泻、腹外部(abdominal integuments)的强烈疼痛和呕吐。为了抑制或大大减少痛风的发作,以减少的剂量维持秋水仙碱的施用,该减少的剂量不应促进副作用

的发展 ;但是,这并不能提供安全并且有效的治疗。

[0034] 秋水仙碱的代谢涉及细胞色素 CYP 3A4 系统的参与。CYP 3A4 抑制剂和糖蛋白 P, 例如,抗微生物抗生素和抗真菌药物,即克拉霉素、红霉素、酮康唑和环孢菌素,提高秋水仙碱的浓度。然后观察到秋水仙碱和抗生素之间的相互作用,并且由于这样的相互作用,用上述药剂的抗微生物治疗在痛风发展过程中是危险的(破坏横纹肌-横纹肌溶解症)(参见:[Finkelstein Y, Aks SE, Hutson JR, Juurlink DN, Nguyen P, Dubnov-Raz G, Pollak U, Koren G, Bentur Y. Colchicine poisoning:the dark side of an ancient drug. Clin Toxicol\(Phila\). 2010 ;48 \(5\) :407-14](#))。

[0035] 有时,备选地,施用具有抗炎活性的非类固醇药物,例如苯丁唑或吲哚美辛。但是,它们的缺点在于它们的副作用,例如骨髓损伤和内部出血。

[0036] 绝大多数痛风患者需要降低尿酸水平的长期治疗(尿酸盐降低疗法——ULT),其可以通过使用别嘌呤醇和丙磺舒实现。

[0037] 发作的治疗主要涉及秋水仙碱、非类固醇抗炎药和在特殊情况下糖皮质类固醇的施用。在具有增加的尿酸产生的患者中施用别嘌呤醇。

[0038] 高尿酸血症伴随沉积和晶体的发展。此外,致病细菌的吸附、它们的生长和泌尿系统的反复炎症的状态在高尿酸血症的状态下经常发生。

[0039] 对于矿物沉积的吸附,施用尿酸促排药物(例如,苯磺唑酮)和别嘌呤醇(抑制尿酸的合成)。由于这样的治疗,肾脏中的痛风石被溶解,而那些已经发展成不可溶解大小的结石则通过手术治疗消除(例如,激光)。

[0040] 在这样的情况下,存在提供可以支持预防作用、防止该危险性疾病的发展并增加所应用的饮食的有效性或甚至消除其应用的需要的药剂的强烈需求。

[0041] 在人类医学以及兽医医学和畜牧业中,正注意到由能够侵入并定殖特定解剖学或生理学定义的身体区域的微生物引起的不希望的现象和医疗状况的频繁发展,所述区域包括烧伤还包括一些医疗设备、器械和甚至假体所导致损伤的皮肤和伤口,所述微生物参与这样的不希望的作用的发病机制。

[0042] 给患者带来这样风险的医疗设备的一个代表性例子是导尿管。

[0043] 导管被广泛用于人类和兽医医学,以能够引流或施用流体或气体,并用于内窥镜、管和手术器械的插入。

[0044] 但是,除了不容置疑的好处,导管的使用也带来不希望的作用。

[0045] 尽管有保持无菌和卫生条件的努力,导管的使用增加了来自外部环境的病原体进入以及定殖于生物体特定部位/生态小环境的生物体自身天然微生物群(在导管放置部位变成病原性微生物群)的传播的风险。在导管插入区域中病原体的存在引起感染的发展(各种强度的感染)。

[0046] 此外,导管插入身体血管(vessel)、管道或腔内对患者来说是既痛苦又紧张的操作。另外,因组织与导管和流过导管的药剂的长期接触,可能会产生炎症并且经常还有过敏反应。

[0047] 根据目标用途,导管由各种塑料生产。由医疗聚氯乙烯(PVC)制得的已知导管——主要是 Nelaton 型,用于短期导管插入并保留在患者体内长达 3 天。这样的导管构成超过 80% 的所使用的导管。用于导管生产的其它聚合物是聚氨酯(PU)、硅或天然乳胶和它们的

衍生物。Folley 导管（带有固定装置）主要由硅制成，其中 Folley 导管是用于长期使用的医疗产品并可以保留在适当位置长达 3 个月。

[0048] 不幸的是，高质量的聚氨酯和硅导管大大贵于那些由 PVC 制成的导管，并且在目前不推荐使用天然乳胶，因为它可以引起过敏反应。

[0049] 与必须在人类和兽医医学中使用导管相关联的常见问题可由伴随具有泌尿问题的患者中导管插入的现象很好地解释。尽管在医学和健康护理中取得了进展，导管相关的尿道感染 (CAUTI) 仍然是最经常发生的医院感染之一。例如，在美国，每年有超过 1 百万住院患者由于 CAUTI 而需要治疗。

[0050] 永久留置导尿管是发生医院获得性尿道感染 (UTI) 的原因之一。在许多情况下，医院感染由多重耐药细菌菌株引起并需要用抗生素进行复杂和昂贵的治疗。

[0051] 在美国，每年在重症监护病房有超过 5 百万的患者被插入导管，在疗养院甚至数目更大。在波兰，每年使用 200,000 个导尿管。估计导管每插入一天，与短期导管使用相关的感染的风险是 5-6%。与持续超过 7 天的长期导管插入相关的感染通常由大量在导管表面形成生物膜的细菌菌株引起，并可以导致导管堵塞。

[0052] 生物膜由各种微生物产生，包括尿素分解细菌、非病原性共生体、永久并天然定植于上皮表面、病原体，包括引起泌尿生殖系统感染的微生物（例如，奇异变形杆菌）。尿酸分解细菌的共同特征是它们能够利用它们的环境（组织）中存在的尿素——主要作为存活所必需的氮源，所述使用涉及脲酶。脲酶（包括细菌脲酶），水解尿素为氨和二氧化碳。通过它们自身脲酶的方式的氮同化细菌的例子是生物膜形成细菌。

[0053] 尿素分解细菌，即便它们不是健康生物体中尿道感染的主要病因，通常与具有尿道紊乱的患者的感染相关。尿素分解细菌导致导管和其它医疗器械上的生物膜的形成和沉积的矿物化。由产生脲酶的微生物引起的尿道感染的结果包括肾结石，伴随尿液中矿物盐的超饱和：磷酸镁铵（鸟粪石）、磷酸钙、草酸盐和尿酸盐。在生理条件下，尿素并不含有指示沙或结石的形成的量的这些盐。

[0054] 受感染的肾结石形成与由以下属的微生物引起的尿道感染相关：变形杆菌属 (Proteus)、脲原体属 (Ureaplasma)、克雷伯氏菌属 (Klebsiella)、假单胞菌属 (Pseudomonas)、葡萄球菌属 (Staphylococcus)、普罗维登斯属 (Providencia) 和棒状杆菌属 (Corynebacterium)。

[0055] 这些感染的另一些不希望的作用是肾实质内的病理过程。细菌血症是导管插入中可能发生的严重并发症之一，其可以作为导管插入的结果发生。

[0056] 一般情况下，由于尿道感染的发病率取决于患者、病原微生物和医院环境的特征和状态。通常，很少有办法可以减少与宿主（生物体）相关的因子，因为它们中的大部分要么是患者（宿主）固有的、要么是细菌固有的。

[0057] 具有神经源性紊乱的患者的年龄、自我导管插入和总的或连续的失禁是医院获得性尿道感染的几个因子。这样的患者遭受与导管插入相关的感染的痛苦。在医院的情况下，重要风险因子涵盖了导管的类型、插入的持续时间、放置的类型和抗菌或防腐物质的使用。永久定植于尿道的微生物代表了引起导管插入相关感染的微生物的主要来源。在尿液样品中发现显著大量的细菌，它们之中以大肠杆菌菌株占优势。不考虑抗生素治疗，通常感染采取无症状的过程，而在 20% 的病例中是有症状的。出血指数 / 血液痕迹率（与导管插入相

关)也是高的,并且在每五个病例中有一个发生。百分之七十五的导管插入时间超过一年的患者发展成不同强度的 UTI 症状。

[0058] 两种性别的患者、特别是经历具有间歇性导管插入的长期治疗的老人通常也抱怨与治疗相关的身体和心理的并发症。

[0059] 导尿管通常由天然乳胶或合成聚合物制成。市场上现有的导管在形状、扩张方法和制成它们的材料方面不同。这些特征造成个体导管使用的操作步骤的不同。

[0060] 在现有技术中,已经尝试采取通过用化疗剂涂敷导管和用防腐剂或其他药剂(例如,抗凝血剂)浸渍来增强它们应用于人类和兽医医学中的可用性价值。第一个补救方法是在导管插入之前直接将水凝胶应用于导管表面上,以降低其摩擦系数和减少疼痛。它主要由聚乙烯吡咯烷酮(PVP)组成,通常与碘化物组合起防腐作用。但是,它需要额外的操作并且所施加的凝胶容易被漂洗掉,因此,防腐作用在时间上是有限的。更高级的涂层被永久地附着到导管表面并允许降低摩擦系数,不仅在插入过程中,而且在导管移除过程中。永久性水凝胶涂层也可以用作减慢表面定殖的抗微生物药物贮库。不过,与持久的导管插入相关的感染问题还没有得到完全解决。在生物体内长期放置导管的情况下,抗菌剂释放的过程应当受控并在整个导管插入期间缓慢进行以维持其杀菌性能,其还没有在足够程度上被实现。

[0061] 有许多已知的抗菌涂层应用于天然或聚合物的管上的方法。涂层技术也各异。由于涂层的高度生物相容性、低摩擦、降低的细菌粘附和涂层中掺入药物的可能性,水凝胶涂层技术是有利的。

[0062] 在 EP 1917959 中,已经公开了 α -酮戊二酸盐用于生产抗尿素分解细菌在泌尿生殖系统中引起的沉积和感染性结石形成的药剂。

[0063] 尽管进行了各项研究和努力以解决上述问题,但是整个临床界在等待一种解决方案,其能够让患者长期使用导管,特别是导尿管。

[0064] 因此,本发明的主要目的是提供一种用于人类医学的新一代治疗产品和改善的方法和组合物,以通过消除或调节胃肠道的幽门螺旋杆菌和其它病原体来改善胃的功能运转。

[0065] 本发明的进一步的目的是提供一种通过消除或调节胃肠道的幽门螺旋杆菌和其它病原体的方式用于改善脊椎动物(特别是哺乳动物和鸟类)的胃和 GIT 其余部分的功能的兽医产品和方法。

[0066] 本发明的目的还在于提供一种用于预防和治疗由脊椎动物(包括人类、其它哺乳动物和鸟类)的消化系统、体表和其它系统(例如泌尿生殖系统和呼吸系统)的细菌、真菌和其它病原体诱导的感染发展而来的医疗状况的新型抗细菌和/或抗微生物剂。

[0067] 本发明的又一个目的是提供一种在痛风和所谓代谢综合征的其它疾病的预防和治疗中有用的药剂,其确保高度发达国家人口的有益健康的改善并削减与这些疾病的流行相关的社会和经济成本。

[0068] 本发明的额外的目的是提供一种增强机体免疫系统的活性的药剂,从而增强免疫力,使得由病原微生物(特别是由病毒和细菌)诱导的疾病和副作用最小化。

[0069] 本发明的目的还在于提供专门的导管,其将是持久的、有功能的、同时适用于长期保留于患者体内并能够降低感染的风险。

[0070] 本发明的另一个目的是使用纳米技术来提供天然抗菌导管（包括导尿管）。

[0071] 本发明的另一个目的是使用纳米技术来提供天然抗微生物药物，其将会提供体液和组织的从导管表面上作用的内源性生物降解。

[0072] 新的技术方案的开发意外地实现了上述和其它目标，所述新的技术方案是基于新的微生物的分离和鉴定，该新的微生物是罗伊氏乳杆菌 DAN080，其按照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约，于 2003 年 6 月 20 日保藏在 DSMZ 保藏中心——Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE, 保藏号为：DSM 15693。

[0073] 本发明涉及罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物，罗伊氏乳杆菌 DAN080 的部分灭活的培养物，罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清，罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的干燥上清，其用于医疗用途，作为治疗剂或预防剂，特别是作为抗微生物剂用于预防和治疗由脊椎动物中细菌、真菌以及胃肠道、体表和其它系统（例如泌尿生殖系统、呼吸系统等或的各种代谢疾病的其它系统）的其它病原体引起的感染的作用发展而来的医疗状况。

[0074] 本发明的治疗剂或预防剂抗微生物剂选自以下组成的组，包括：罗伊氏乳杆菌 DAN080 的完整培养物，获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物和包括罗伊氏乳杆菌 DAN080 的混合细菌培养物的液体上清、浓缩上清和干燥上清，和获取自原核和真核重组体的培养物的液体上清、浓缩上清和干燥上清以及原核和真核重组体的完整培养物，其中和 / 或从中基因被利用，所述基因提供针对幽门螺旋杆菌和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性，以及分子量大约为：150 和 / 或 141 和 / 或 115 和 / 或 95 和 / 或 90 和 / 或 86 和 / 或 83 和 / 或 77 和 / 或 71 和 / 或 63 和 / 或 59 和 / 或 56 和 / 或 49 和 / 或 46 和 / 或 43 和 / 或 39 和 / 或 34 和 / 或 32 和 / 或 30 和 / 或 22kD 或更低的蛋白 / 寡肽 / 肽，从获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的液体 / 浓缩 / 干燥上清纯化 / 分离而来，和从罗伊氏乳杆菌 DAN080 的完整培养物纯化 / 分离而来，从包括罗伊氏乳杆菌 DAN080 的其它混合细菌培养物纯化 / 分离而来，和从原核和真核重组体的培养物纯化或分离而来，其中和 / 或从中基因被利用，所述基因提供针对幽门螺旋杆菌和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性，或其用于作为由细菌、真菌和胃肠道、体表和其它系统（例如脊椎动物的泌尿生殖系统、呼吸系统）的其它病原体引起的感染的作用发展而来的医疗状况的预防和治疗的混合物，或其它用于痛风（足痛风）发展的治疗和预防和 / 或用于提高脊椎动物（特别是人类、其它哺乳动物和鸟类）体内的溶菌酶活性的药剂。

[0075] 根据本发明，所述脊椎动物是人类个体。

[0076] 所述脊椎动物还是与其年龄无关的家养动物、宠物、参与运动的动物、肉鸡、下蛋的母鸡、小鼠、大鼠、豚鼠、兔和其它实验动物，包括灵长类动物。

[0077] 根据本发明，所述微生物是病原细菌或真菌。

[0078] 特别地，病原细菌是幽门螺旋杆菌。

[0079] 本发明还涉及本发明的抗微生物剂用于制备用于调节胃、肠和 GIT 的功能或用于治疗 and 预防痛风（足痛风）的发展和 / 或用于提高需要这样的治疗的脊椎动物（包括人类、其它哺乳动物和鸟类）体内溶菌酶的活性的组合物的用途，所述组合物包括有效量的药剂，其提供用于获得所需预防或治疗作用。

[0080] 特别地,根据本发明,所述组合物特别地被用于杀死、抑制、调节和阻止幽门螺旋杆菌或其它微生物的生长,或用于治疗 and 预防痛风(足痛风)的发展和/或用于提高脊椎动物(特别是人类、其它哺乳动物和鸟类)体内溶菌酶的活性,和以获得所需预防或治疗结果的有效量和足够速率进行施用。

[0081] 优选地,所述组合物旨在用于 GIT 紊乱、胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃癌和十二指肠癌的治疗、缓解或预防,或用于痛风(足痛风)发展的治疗和预防 and / 或用于提高需要所述组合物的个体(脊椎动物,包括人类、其它哺乳动物和鸟类)体内溶菌酶的活性。

[0082] 特别地,所述组合物是药物组合物,其任选地包含其它生物活性物质(例如,维生素,特别是维生素 D 和 E),特别是以纳米形式,乳酸和包括在罗伊氏乳杆菌 DAN080 的代谢物中的其它酸的盐(以预防或治疗剂量),和药学上可接受的载体和/或添加剂。

[0083] 优选地,所述药物组合物是固体形式,并且被分为包括治疗有效量的本发明治疗剂或预防剂的单剂量,以从 0.001 至 0.2g/kg 体重/天的量。特别地,所述组合物是以片剂或胶囊的形式。

[0084] 备选地,本发明的所述药物组合物是以液体形式并且分为包括治疗有效量的本发明的治疗剂或预防剂的单剂量,其量为从 0.001 至 0.2g/kg 体重/天,特别是在安瓿中。这样的组合物为液体形式,可作为气雾剂、糊剂(cataplast)或湿敷剂(moist compress)使用。

[0085] 特别优选地,按照本发明,罗伊氏乳杆菌 DAN080 的发酵产物以培养物、至少部分灭活的培养物和这些培养物的上清的形式被使用,所述培养物分别加工,用于调节胃、肠和 GIT 的功能,或用于痛风(足痛风)的发展的治疗和预防 and / 或用于提高脊椎动物(特别是人类、其它哺乳动物和鸟类)(即需要这样的治疗的脊椎动物,包括人类、其它哺乳动物和鸟类)体内溶菌酶的活性。

[0086] 尽管本发明是参考作用于幽门螺旋杆菌(作为存在于人类胃肠道内的病原体)的示例性影响进行讨论的,当口服(per os)施用时,新型细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的活培养物和上述衍生形式的被证实的生物活性允许本领域技术人员将根据本发明的方案用于预防和治疗人体和其它哺乳动物和鸟类的其它系统中的其它病原体影响下发展的病理状况,并以不同的施用途径。

[0087] 优选地,在本发明的另一个方面,所述组合物是膳食补充剂、食品或饮料。所述膳食补充剂、食品或饮料是以固体形式和/或以饮料形式。本发明的治疗和预防剂的优选量为从 0.001 至 0.2g/kg 体重/天。这样的膳食补充剂、食品或饮料任选地含有其它生物活性物质和维生素 D 和 E,特别是以纳米颗粒的形式,以预防性剂量。

[0088] 根据本发明的方案允许蛋白质和嘌呤化合物的正常代谢的恢复——这在痛风预防中极为重要,并对免疫系统具有刺激作用,特别是通过提高溶菌酶的活性和增强其抗微生物和抗病毒活性。

[0089] 如上面已经提到的,本发明还涉及特殊的导管。目前,已经意外地发现上述和其它目标可以由本发明的方案实现,基于用各种物质的纳米涂层涂敷导管的表面,主要在组合物中使用源自新的乳酸菌菌株的成分的至少一种纳米涂层,降低与导管的插入和移除相关的应激,并诱导患者的免疫应答,从而降低病毒和细菌感染的风险。

[0090] 令人惊讶的是,还观察到将纳米形式的特定维生素和 α -酮戊二酸盐掺入根据本

发明的导管的纳米涂层中提供了在预防与所述导管保持长期接触的组织的感染和炎症方面的协同作用。

[0091] 按照本发明的用于插入身体血管、管道和 / 或腔,用于人类和兽医的预防、诊断和医学,由塑料制成并涂有保护性润滑剂层的导管,具有能够与水形成凝胶的生物相容性聚合物的外纳米涂层,直接或者通过具有与所述导管材料化学键合并具有抗菌性质的聚合物纳米涂层而永久连接至所述塑料,其中所述纳米涂层的至少之一包括添加由罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株分泌的胞外代谢物,所述代谢物具有抗微生物和抗炎活性,以及任选添加纳米颗粒形式的维生素 D 和 E。

[0092] 根据本发明,所述生物相容性聚合物是聚乙烯吡咯烷酮,由这种聚合物制得的纳米涂层的厚度为大约 50,000 个 C-C 键 (10nm)。

[0093] 优选地,具有抗菌性质的所述聚合物是壳聚糖和小有机酸 (优选 α -酮戊二酸) 的盐。

[0094] 根据本发明,在生物相容性聚合物的纳米涂层中和 / 或具有抗菌性质的聚合物的纳米涂层中,分散有选自下述的额外活性剂:显示抗微生物和抗炎活性的壳聚糖 α -酮戊二酸盐、壳聚糖柠檬酸盐、壳聚糖乳酸盐,小的二羧酸,银纳米颗粒和涂敷有保护性涂层的纳米粉末形式的维生素 D 和 E 及其组合。

[0095] 本发明还涵盖了导管插入试剂盒,包括导管和装有注射用水 (无菌) 的小瓶和用于口服施用的应激降低剂,所述应激降低剂是以 10^6 个细胞剂量的活的或热灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物的形式,用于导管插入期间的日常施用,优选用于导管插入之前 8 小时口服施用,或用于在导管插入之前 15min 施用进入体腔。

[0096] 在根据本发明的试剂盒中,水的容器优选固定于所述导管的尖端,并且所述容器具有将水和导管分开的分区,通过将容器对着导管旋转并同时从包装中挤出,该分区被破坏。

[0097] 根据本发明的导管满足所有上述要求并且是用户友好的、导管插入的患者、医务人员和医疗对手可接受的。根据本发明,开发了用于由 PVC 和硅制成的导管上的纳米涂层。水凝胶纳米层永久地附着到聚合物表面,并且不仅降低摩擦系数,从而减少导管插入的患者所经历的疼痛,而且含有作为在与患者的身体组织接触时降低患者的与导管插入和移除有关的应激的药剂的添加剂。同时,相同的添加剂诱导与导管保持接触的组织中溶菌酶水平的升高,从而基于非常广谱的溶菌酶活性而降低病毒、细菌感染的风险。导管表面上新涂层的存在减少了导管表面上生物膜的形成。这种纳米涂层还含有以受控的方式缓慢释放的其它活性物质。

[0098] 根据本发明所应用的表面纳米工程化允许提供一种按需释放药物的涂层。例如,触发药物释放的信号之一可以是由细菌生长引起的环境 pH 的改变。这种靶向药物释放更加有效并显示更少的副作用。此外,通过精心选择合适的涂层组合物,获得具有各种目的、根据患者状态调整好的导管。带有化学键合药物 (例如,小的二羧酸) 的、由 PVP/ 壳聚糖盐制成的涂层的使用确保设定目标的实现。

[0099] 由于能够利用用于天然抗微生物剂递送的纳米技术作用于根据本发明的导管表面,本发明的导管可以确保在医疗护理中所预期的进步。涂有纳米涂层的导管对于患者来说使用更方便并且更安全。涂层减少了与导管的插入相关的疼痛并显著降低了感染的可能

性。此外,所有所使用的活性物质不会在患者中诱导任何不希望的副作用。

[0100] 由于本发明基于纳米技术的使用,纳米涂层的抗微生物性质的增强和活性物质的按需靶向释放使得导管上保护性涂层的作用得到最大化。最重要的是,鉴于所使用的化合物的性质消除了由经典抗生素诱导的在微生物中耐药的发展,根据本发明的导管将会给导管插入的患者减少疼痛并降低感染的数量。

[0101] 最后,本发明的新的治疗和预防剂还可以使用在用于个人卫生的敷料或卫生材料形式中,其用所述抗微生物剂进行了饱和以发挥所述药剂的抗微生物活性。

[0102] 特别地,本发明的新的治疗和预防剂有利地以涂层的形式(优选具有纳米层的形式)被用于旨在用于救援单位(包括消防救援单位)的塑料保护器和灭火毯上,专门针对重度烧伤患者和具有严重身体伤害的道路交通事故受害者。

[0103] 由于其显著的抗微生物活性,本发明的新的治疗和预防剂可以用于身体上的浅表(局部)应用,也可与不同吸收剂(包括液体吸收材料)一起使用。相应产品的非限制性的例子包括尿布、卫生棉条、绷带、创可贴、卫生护垫、带护翼的卫生巾、内裤衬垫、化妆棉、用于昼夜使用的动物用包装。这组制品可以由纤维、超薄(丝薄柔软)棉表层组成。掺入尿布的本发明的抗微生物剂可以帮助预防臀部皮疹、幼嫩肌肤的护理。这样的各种尺寸的、带有可调扣的尿布可用于儿童和成人。

[0104] 可以根据用于灭火毯的新的欧洲标准制造灭火毯。以更大的灵活性设计它们,采用专门挑选的材料涂敷或含有本发明的新的治疗和预防剂并调整以扑灭燃烧的物体或衣物。它们可以是完全不含石棉且不会磨损。取决于最终使用者的需求,灭火毯可以被包装进快速释放的柔性包裹中,但也可以被包装进容器。它们可以采取不同的尺寸,最大至180cm²。可以预见的是,使用时,表面的每平方厘米(e\centimeter)可以释放有效量的本发明的新的治疗和预防剂。

[0105] 本发明的该特定方面的好处是:当可能的悲惨的室内火灾发生时,它给可能需要初步重建烧伤手术的烧伤受害者提供即时的治疗处理。烧伤患者通常具有不同大小(整个身体表面区域的较小 vs 较大百分比)和严重程度的烧伤,其中一些需要焦痂切开术、筋膜切开术、初级切除、皮肤移植、截肢术、局部皮瓣、游离皮瓣覆盖、胸外科等,长期住院超过150天。如果没有立即预防还可能发生严重感染。

[0106] 从本发明可得到的进一步的目标和优点将在本发明下面的详细说明书中参考附图进行详细讨论,其中:

[0107] 图1——以图表形式呈现了平板扩散法的结果(具有菌株幽门螺旋杆菌 17874 的琼脂培养基 GAB-CAMP):1——获取自罗伊氏乳杆菌的培养物的非活性上清;2——非活性肉汤 MRS;3和4——由获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的活性上清的活性引起的抑制区;

[0108] 图2——示出了来自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的上清对于液体培养基(BHI肉汤)中幽门螺旋杆菌生长的作用;

[0109] 图3——呈现了分别在MRS肉汤中生长1、2、3、4、5、6、8和10小时后获得自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的上清的SDS-PAGE电泳图。数字1-20指罗伊氏乳杆菌释放入培养基的鉴定的蛋白;

[0110] 图4——示出了通过对由引物LacF和LacR扩增的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的PCR产

物进行变性梯度凝胶电泳实现罗伊氏乳杆菌 DAN080 的鉴定；

[0111] 图 5——显示了在胃内施用 DAN080 (罗伊氏乳杆菌 DAN080 的 10^6 个细胞) 之后在大鼠血液中溶菌酶的活性 (U/L) 和它们胃肠道中细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的存在之间的关系；DAN080P——热杀死的罗伊氏乳杆菌 DAN080 10^6 个细胞；ChAKG——壳聚糖 α -酮戊二酸盐；SF——盐水；

[0112] 图 6——显示了分离自肠神经系统的神经元活性和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物之间的关系；

[0113] 图 7a-7f——示出了对用罗伊氏乳杆菌 DAN080、灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080、壳聚糖 α -酮戊二酸盐处理的大鼠进行的旷野实验和对用罗伊氏乳杆菌 DAN080、灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080、壳聚糖 α -酮戊二酸盐和盐水处理的大鼠进行的旷野行为实验的结果。

[0114] 发明详述

[0115] 罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌分离自健康实验动物的胃肠道。该细菌是作为血琼脂固体培养基上的单集落被分离的。该培养基与来自健康小鼠的胃肠道的刮出物于 37°C 的温度孵育 24 小时。所分离的集落在肉汤 MRSB (Oxoid) 中、用于乳酸菌 (LAB) 的标准培养基上增殖。灭菌之前培养基的 pH 为 pH6.8。在 121°C 的温度下 15 分钟内进行灭菌，灭菌之后培养基的 pH : pH6.2。细菌培养的热条件保持在 $35 \pm 3^\circ\text{C}$ 的范围内。液体培养物的完全生长时间为 16 小时。细菌可以储存于确保存活的 -20°C 的温度。罗伊氏乳杆菌 DAN080 在室温 $+20$ 至 $+22^\circ\text{C}$ 至少存活 30 天，保持抑制其它微生物生长的能力。

[0116] 为了获得增强的抗微生物活性，将细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 在包含 AKG 的培养基上生长。

[0117] 培养基组成 : 0.5% 肉提取物 ; 0.5% 酵母提取物 ; 1% 蛋白胨 ; 0.3% NH_4Cl ; 0.4% K_2HPO_4 ; 0.4% KH_2PO_4 ; 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.005% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.1% Tween 80 ; 0.05L-半胱氨酸 HCl ; 0.0002 的以下每种维生素 : B1、B2、B6、B5、B12、B9。在如上面显示的条件灭菌后，向培养基中加入 23mmol/l 麦芽糖和，分别地，淀粉或葡萄糖，和 10mmol/l AKG。培养基的 pH 是 : pH 6.2。细菌在 37°C 孵育 16 小时。在 AKG 的存在下发生增强的细菌生长。在培养基中，发现从 4 至 6mmol/l 乙酸盐和乳酸盐，而在没有用 AKG 富集的培养基中为从 1 至 2mmol/l。

[0118] 根据生化活性鉴定罗伊氏乳杆菌 DAN080，其中通过实验评估了发酵碳水化合物的能力——Api 50CH 和 CHL 培养基，bioMerieux SA, Marcy l'Étoile, France。

[0119] 分类 : 罗伊氏乳杆菌

[0120] - 根据 API 系统的表型特征

[0121] CAT : 1053 1121 0000 000 000 0000000

[0122] API RID32s : 515 151 511 111 315 111 111 511 111 111 11 1

[0123] API 50CHL : 1111533111 5511111111 1411111155 5511151111 1111111311

[0124] Api ID32AN : 155 515 111 114 111 513 351 351111 312

[0125] 基因型特征 [SEQ. ID NO : 1, 2, 3] : 基于 DNA 分析和与罗伊氏乳杆菌核糖体 RNA 的 16S 基因序列的比较 (参见 : GenBank : EF187261.2 ; Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004 ; 42(7) : 3128-36 ;

Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. J Clin Microbiol. 1998 ;36(10) :2810-6)。以下引物可用于测序 [SEQ. ID NO :2,3]——引物 1 : TGGAACAGA TGCTAATACC GC(22bp) [SEQ. ID NO :2], 引物 2 :ATTAGATACC CTGGTAGTCC(20bp) [SEQ. ID NO :3]

[0126]

tggaacaga tgctaatacc gcataacaac aaaagccaca tggcttttgt
 ttgaaagatg gcttttagcta tcactctggg atggacctgc ggtgcattag
 ctagttggta aggtaacggc ttaccaaggc gatgatgcat agccgagttg
 agagactgat cggccacaat ggaactgaga cacgggtccat actcctacgg
 gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg gcgcaagcct gatggagcaa
 caccgctga gtgagaagg gtttcggctc gtaaagctct gttgttggag
 aagaacgtgc gtgagagtaa ctgttcacgc agtgacggta tccaaccaga
 aagtcacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatag taggtggcaa
 gcgttatccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gttgcttagg
 tctgatgtga aagccttcgg cttaacggaa gaagtgcac ggaaaccggg
 ccacttgagt gcagaagagg acagtggaaac tccatgtgta gcggtggaat
 gcgtagatat atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgc
 aactgacgct gaggctcgaa agcatgggta gcgaaacagga ttagataccc
tggtagtcc [SEQ. ID NO: 1] (659 bp)

[0127] 在罗伊氏乳杆菌 DAN080 生长的指定时间之后,离心培养物,并且液体上清、浓缩的上清和干燥的或冷冻干燥的上清是具有用于在体外和体内调节幽门螺旋杆菌和其它细菌生长的特定能力和活性的产物。从液体上清进行电泳分离之后,在预先确定的时间收集浓缩的上清和干燥的上清,观察到在 150-22kD 或更小范围内的分子量的特定蛋白,所述蛋白导致幽门螺旋杆菌的体内平衡和生长的调节。这些条带较弱,并且没有出现在获得自在与上述针对罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的指定时间不同的时间收集的液体上清、浓缩上清和干燥上清的电泳图中,并且液体上清、浓缩上清和干燥上清显示对体外以及体内的幽门螺旋杆菌和其它细菌的合适作用之一——体内平衡和生长的调节。

[0128] 对于罗伊氏乳杆菌的遗传鉴定,采用 Qiagen GmbH, Hilden, Germany 的 DNAesy™ 试剂盒从过夜培养的细菌分离全基因组 DNA。

[0129] 采用半巢式 PCR 进行 16S rDNA 的 340bp 片段的扩增(第一次运行 :94 30s, 61 60s, 68 60s, 35 个循环 ;第二次运行 :94 30s, 58 60s, 68 60s, 40 个循环),采用引物 [SEQ. ID NO :4,5,6] (参见 :Walter, J., Hertel, Ch., Tannock GW., Lis CM., Munro K., Hammes W.P. (2001) Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc i Weisella species in human faeces by using group specific PCR primers and denaturing

gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microb. 67, 2578-2585); 正向引物 3: AGCAGTAGGG AATCTTCCA (19bp) [SEQ. ID NO :4]; 反向引物 4: ATTYCACCGC TACACATG (18bp) [SEQ. ID NO :5]; 正向引物 5: ACAATGGACG AAAGTCTGAG TG (22bp) [SEQ. ID NO :6]。

[0130] 定义

[0131] 在本说明书中所使用的术语应当以它们常见的基本含义进行理解, 除非如下另外定义。

[0132] 如本文中所用, 术语‘杀死、抑制、调节和阻止幽门螺旋杆菌和其它微生物的生长’是指, 如通过根据本发明应用的某些参数的方式测量的, 罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的干燥上清的药理学、化学、机械和生理学特征。这样的参数是本领域技术人员已知的, 并在本发明的说明书中进一步被定义。

[0133] 如本文中所用, 术语‘通过消除或稳定幽门螺旋杆菌的生长而改善胃炎和其它相关疾病(如胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)’是指如通过根据本发明应用的某些参数的方式测量的胃、肠和 GIT 的化学和生理学特征。这样的参数是本领域技术人员已知的, 并在本发明的说明书中进一步被定义。

[0134] 在本发明的说明书中, 术语‘通过消除或稳定幽门螺旋杆菌的生长而改善胃炎和其它相关疾病(胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)’另外还指, 胃、肠和 GIT 功能的机械、化学和生理学特征的改变, 从而与没有对其施加预防和/或治疗的, 或没有根据本发明用任何罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的干燥上清施用的脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)进行比较来定义胃、肠和 GIT 的质量。如果这样的改变对于脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)是积极的, 这些改变就被认为是改善。

[0135] 在本发明的说明书中, 术语‘通过消除或稳定幽门螺旋杆菌的生长而改善胃炎和其它相关疾病(胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)’还可以是指胃、肠和 GIT 的当前机械、化学和生理学特征和幽门螺旋杆菌对它们的定殖方面的改变、修饰或其它作用。

[0136] 根据本发明的说明书和权利要求书所定义的含义, 术语‘药物组合物’是指本发明的治疗和/或预防有效的组合物, 其包含罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的干燥上清。

[0137] 本发明的说明书和权利要求书中所采用的术语‘治疗有效量’或‘有效量’或‘治疗有效’是指本发明抗微生物剂的这样的量, 当其用于特定条件和特定施用方案时会提供所述治疗和/或预防结果。该术语是指计算为产生希望的治疗和/或预防作用的活性材料的预定量。上述活性材料可以与合适的添加剂(例如, 其它微生物或稀释剂、或载体或施用媒介物(vehicle))组合。此外, 该术语是指在需要这种治疗的脊椎动物中足以减少, 并且最优选预防临床显著缺陷的量, 上述脊椎动物包括哺乳动物和鸟类。治疗有效量的建立在本领域技术人员的技能范围之内, 并且取决于根据本发明的产品的活性、活性位置、和需要

该治疗的脊椎动物的先天灵敏性,这样的脊椎动物包括哺乳动物和鸟类。备选地,治疗有效量足够引起宿主的临床显著状况的改善。

[0138] 如本文中所用,术语‘治疗’是指为了治愈的治疗,其可以从与胃炎、胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻有关的状况或状态中完全或部分恢复。

[0139] 如本文中所用,术语‘缓解’是指与胃炎、胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻有关的状况或状态的减少,即更不严重或更温和。

[0140] 如本文中所用,术语‘预防 (prevention)’或‘预防 (prophylaxis)’是指与胃炎、胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻有关的所定义状态的发展或爆发的完全或部分抑制。预防有效量的确定在本领域技术人员的技能范围之内,并且取决于根据本发明的产品的活性、活性位置和需要该治疗的个体脊椎动物的先天灵敏度,所述脊椎动物包括哺乳动物和鸟类。备选地,预防有效量是足够保护宿主免受与胃炎、胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻有关的状况。

[0141] 至于本发明的其它方面,正确理解以下术语是至关重要的:

[0142] “纳米涂层”是指已知的纳米凝胶(聚乙烯吡咯烷酮——PVP 或其它),其中所使用的聚合物化学键合至抗微生物活性的壳聚糖盐(各种比例和量的柠檬酸或乳酸或 α -酮戊二酸盐或其混合物)。

[0143] 抗微生物活性的壳聚糖盐(各种比例和量的柠檬酸或乳酸或 α -酮戊二酸盐或其混合物)还可以形成涂层,其可用已知的纳米凝胶涂敷(以非修饰的形式或用上述的抗微生物活性的壳聚糖盐修饰)。

[0144] 随后涂层可以形成维生素 D,备选地与抗微生物活性的壳聚糖盐(各种比例和量的柠檬酸或乳酸或 α -酮戊二酸盐或其混合物),和最终的水凝胶涂层(以非修饰的形式或用抗微生物活性的壳聚糖盐(各种比例和量的柠檬酸或乳酸或 α -酮戊二酸盐或其混合物)修饰)。

[0145] 还可能的是具有保藏号为 DSM 15693 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物和具有银或纳米凝胶的修饰的导管的独立分层(separate stratification),其中所述纳米凝胶在朝向导管活性部位的一侧上涂敷导管。

[0146] 新的治疗和预防剂的开发:在本发明的第一个方面,本发明涉及用于在各种医疗状况下幽门螺旋杆菌和其它细菌生长的治疗、缓解或预防的新的治疗和预防剂的开发。对于在各种医疗状况下幽门螺旋杆菌和其它细菌生长的治疗、缓解或预防的产品的效率(efficiency)所想到的状况是,但不限于,胃炎和其它相关疾病,例如,胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻。

[0147] 根据本发明,脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)的健康状态以及胃和肠和 GIT 的功能发挥的改善是由于给脊椎动物(包括哺乳动物和鸟类)施用足够量的并且任选地以足够速率能够诱导所希望的作用的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的干燥上清。

[0148] 改善经历了所述治疗的脊椎动物的健康状态以及胃和肠和 GIT 的功能发挥的改变与不是本发明抗微生物剂的接受者的脊椎动物的健康状态以及胃和肠和 GIT 的功能发

挥进行比较。如果它们有利于需要这样的治疗的脊椎动物（包括哺乳动物和鸟类），那么所述改变被认为是改善。

[0149] 根据本发明，罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的干燥上清用作所述新的治疗和预防剂。

[0150] 根据本发明的新的治疗和预防剂用于脊椎动物（包括哺乳动物和鸟类）的治疗——例如，与其年龄无关的人类、家养动物、宠物、参与运动的动物、肉鸡、下蛋的母鸡、小鼠、大鼠、豚鼠、兔和其它实验动物，包括灵长类动物。

[0151] 获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清、浓缩上清和干燥上清的施用：施用可以通过各种途径来完成，所述途径根据所治疗的脊椎动物的类型、需要上述新的治疗和预防剂进行治疗的脊椎动物的状况和治疗的特定指征来选择。

[0152] 根据一个方案，药剂以食品或饲料添加剂的形式施用，例如以固体形式和 / 或以饮料形式的膳食补充剂和 / 或成分。进一步的方案可以悬液或溶液的形式，例如下面进一步描述的饮料。合适的形式也可以是气雾剂、小球、栓剂、胶囊或片剂、可咀嚼的或可溶的、例如泡腾片、以及粉末和本领域技术人员已知的其它干燥的形式，例如颗粒剂，例如微粒剂。

[0153] 所述施用可以是肠胃外、直肠、阴道内、吸入和口服，以如上所述的饲料或食品添加剂的形式。用于肠胃外施用的媒介物包括氯化钠溶液、具有右旋葡萄糖的林格氏液、右旋葡萄糖和氯化钠溶液、具有乳酸盐的林格氏液或植物油。

[0154] 饲料和饲料添加剂还可以是乳化的。随后，治疗活性成分可以和与所述活性成分相容的药学上可接受的赋形剂混合。例如，合适的赋形剂是水、盐水、右旋葡萄糖、甘油、乙醇等，以及它们的组合。此外，如果需要的话，该组合物可以含有痕量的辅助物质，例如，润滑剂或乳化剂、pH 调节剂、缓冲剂，其增强活性成分的功效。

[0155] 可以提供各种形式的饲料或饲料添加剂，例如固体、液体、冻干或其它方式干燥的。它们可以包括稀释剂，作为例如具有各种 pH 范围和离子强度的各种缓冲剂（例如，Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐缓冲液），添加剂，例如白蛋白、明胶，去污剂（例如，Tween 20、Tween 80、普朗尼克 F68、胆盐），增溶剂（例如，甘油、聚乙二醇），抗氧化剂（例如，抗坏血酸、焦亚硫酸钠），防腐剂（例如，硫柳汞、苄醇、对羟基苯甲酸酯），填充物质或张力调节剂（例如，乳糖、甘露醇），聚合物，例如聚乙二醇、与金属离子形成复合物的聚合物、聚乳酸、聚乙醇酸、水凝胶等，或脂质体，纳米胶囊，微乳剂，胶束，单层或多层囊泡，红细胞影，原生质球或几丁质衍生物。

[0156] 饮料：在一个方案中，所述饲料或饲料添加剂是以饮料或其干制剂的形式通过任何公开的方法施用。

[0157] 所述饮料以罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的干燥上清或其混合物的形式，以及与水可溶性、营养学上可接受的载体（例如，矿物成分、维生素、碳水化合物、脂肪和蛋白）一起含有有效量的产品。如果并且当饮料以干燥形式提供时，所有这样的成分被以干燥的形式供给。以直接消费的形式供给的饮料还含有水。饮料的最终溶液还可以根据上面段落中提供的一般性建议具有受

控的张力和酸度,例如作为缓冲液。

[0158] 对于预防细菌和真菌的生长,pH 优选保持在 2-5 的范围内,特别是 2-4。还可以采用 pH 大约为 6-8 的灭菌的饮料。

[0159] 可以单独或与一种或更多的治疗有效组合物组合供给饮料。

[0160] 罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的干燥上清和本发明的其它上述形式的抗微生物剂用于制备用于预防、缓解或治疗胃炎和其它相关疾病(例如,胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)的组合物的用途。

[0161] 本发明的进一步的方面涵盖了组合物是药物组合物的用途。该药物组合物可以包括在所述方法中有用的药学上可接受的载体和/或添加剂,例如稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体,已经根据本发明公开了其用途。

[0162] 此外,如本文中所示,‘药学上可接受的载体’是本领域技术人员公知的,可以涵盖,但不限于,0.01-0.05M 磷酸盐缓冲液或 0.8% 的盐水。另外,这样的药学上可接受的载体可以是水性或非水性溶液、悬液和乳液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油(如橄榄油)和可注射的有机酯(如油酸乙酯)。水性载体包括水、醇/水性溶液、乳液或悬液,包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、具有右旋葡萄糖的林格氏液、右旋葡萄糖和氯化钠溶液、具有乳酸盐的林格氏液或植物油。还可以存在防腐剂和和其它添加剂,例如抗微生物剂和抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。

[0163] 本发明的又进一步的方面涵盖了组合物是膳食补充剂和/或固体食物和/或饮料形式的成分的用途。本发明的这样的组合物,例如药物组合物,或以食品或饲料供给的组合物,可以任选含有载体和/或一定量的第二或后续活性成分,其对胃炎和其它相关疾病(例如,胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)发挥作用。

[0164] 胃炎和其它相关疾病(例如,胃和十二指肠溃疡、胃和十二指肠癌、肠功能紊乱、GIT 紊乱和腹泻)的治疗和预防的改善因施用基于罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、部分灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的液体上清、罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的浓缩上清和罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物的干燥上清和本发明的其它上述形式的抗微生物剂的组合物而发生。治疗有效量大约为 0.0001-0.2g/kg 体重/天。

[0165] 用于施用的靶组:如本领域技术人员很容易理解的,根据本发明的新的治疗和预防剂、其使用方法和药物组合物特别适合用于施用给与其年龄无关的人类、家养动物、宠物、参与运动的动物、肉鸡、下蛋的母鸡、小鼠、大鼠、豚鼠、兔和其它动物(例如实验动物),包括灵长类动物、野生动物(生活在动物园里和/或外)。

[0166] 正在考虑推出萨拉米香肠或其它可销售产品,该产品显示特殊的促进健康的性质,通过涉及乳酸发酵菌的工艺流程制备,其中利用以下方面:

[0167] 1) 乳杆菌属的细菌——特别是罗伊氏乳杆菌 DAN080,显示特定的益生菌特征;

[0168] 2) 允许在产品:萨拉米香肠(或其它)中保留活细菌培养物的技术。这些细菌的发酵产品确保产品的优异风味质量,并且同时保持消费者胃肠道的细菌体内平衡。

[0169] 由于其特定的抗菌性质,该发酵产品:

[0170] - 减少由病原性细菌（包括幽门螺旋杆菌）的定殖，

[0171] - 保护胃肠道免受感染，

[0172] - 缓解感染的进程，包括幽门螺旋杆菌感染

[0173] - 延长产品的到期日

[0174] - 当用于护套（sheathing）的涂层时，在保存时保护产品免受污染。

[0175] 一般地，术语“益生菌（probiotics）”是指已被商业上用作食品和饲料的添加剂并且也已经发现它们用于药物工业的微生物。‘益生菌’的定义来自于二十世纪七十年代中期，当时选定的微生物用于动物的饲养。

[0176] 益生菌增强公共卫生状况，这种增强主要是由于保护人群免受系统性疾病和感染，并且还由于症状的减弱或这样的系统性疾病的作用的减弱所引起的。因此，关于益生菌的研究涉及在其内特定细菌株防止疾病发生的范围的评估，并且还解释它们健康促进作用的情况。

[0177] 作为一个高度组织的生态系统，消化系统由于肠微生物群、肠粘膜和免疫系统的保护性质而提供了针对病原性微生物的有效屏障。益生菌在细菌性胃肠道感染状态的补充治疗中享有极高的兴趣。目前，已经在许多涉及幽门螺旋杆菌感染的中心进行了深入的研究，所述感染在临床上的表现主要为胃和十二指肠溃疡，并导致发展成胃癌。考虑到在全球各个区域中幽门螺旋杆菌感染的流行性传播的事实，找到可以限制该过程的方法变得很重要。

[0178] 乳酸菌促进健康的活性主要由防止由不希望的微生物群定殖于粘膜（例如肠的）组成，其中由该细菌分泌并释放产物至胞外环境（这样的产物例如活性化合物：酸、过氧化氢（质子）、酶、细菌素或细菌降解产物：细胞壁的片段）影响其它微生物（包括病原性）的生长并因此协调消化系统的功能。乳酸菌代谢的后发酵产物还具有降解细菌毒素和真菌毒素（真菌代谢物）水平的能力。

[0179] 细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的特征还在于对发酵过程中发生的热应激作用的抗性。乳酸（给产品提供感官质量的因子）的产生应当由细菌维持在相对恒定的水平，而与其进行发酵和储存产品的温度无关。

[0180] 除其它事项外，乳杆菌属的独特细菌——罗伊氏乳杆菌 DAN080 旨在作为在冷盘肉类的生产中的益生菌销售。采用动物模型的初步研究的结果显示，这些微生物的发酵产物给小鼠的被感染（被引起胃肠道感染的幽门螺旋杆菌和其它细菌感染）的胃进行口服施用之后，明显减少感染的发生。该研究显示细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的耐热发酵产物改善了感染小鼠的免疫状况，并且同时保护胃免受进一步的定殖。体外研究所支持的这些观察结果可以推测，因细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的发酵产物的活性而引起的幽门螺旋杆菌分布的减少可以给具有胃溃疡风险的人、或患有溃疡性胃炎和十二指肠炎和胃肠道的其它感染的患者带来相似的作用。

[0181] 在实验室条件下观察到的细胞代谢物的这些特征能够推定罗伊氏乳杆菌 DAN080 可以用于生产萨拉米香肠和其它食品和饮料的技术。

[0182] 可以预见，在制造萨拉米香肠（或其它产品）之后，乳酸发酵细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的生命功能将得到维持。还可以预见，该创新的发酵过程将提高来自这样的萨拉米香肠的常量元素和微量元素（主要是钙和镁）的生物利用率。应当强调的是，活细菌的存

在将在不添加人工防腐剂的情况下大大延长萨拉米香肠（或其它产品）的耐久性。

[0183] 还应当指出，迄今为止在食品市场上，虽有现存的传统，但仍缺乏这类萨拉米香肠的生产，其具有能够协调肠功能并改善消费者的消化过程的能力。

[0184] 目前已经发现，相对于原生定居微生物的组成和量，营养习惯的改变和伴随的胃肠道水平上酶的缺乏（酶）伴随着天然微生物群的意外的重分组过程。取代在健康宿主或痛风发作后没有复发的宿主的天然、天生的微生物群，粘膜表面被各种强度、与天然不同的其它细菌物种定殖。这些‘新的’微生物，在定居新的微生态的同时，展露了它们自己的毒力因子。然后，根据毒力的程度，会发展局部 / 系统性感染和局部或系统性炎症。这些过程主要发生在胃肠道和泌尿生殖系统。

[0185] 维生素 D 的作用：当与健康个体的维生素 D3 的浓度相比时，在痛风患者中，1, 25(OH)2- 维生素 D3 的血液水平显著更低 ($p < 0.05$) (8.8mg/dL+/-0.2vs. 5.6+/-0.2mg/dL)，而在患有痛风的男性和没有足痛风的那些男性之间没有观察到 25(OH)- 维生素 D3 水平的差异。因此，很明显，在痛风患者中，尿酸本身可以直接通过抑制 1- 水解酶的活性而降低血液中 1, 25(OH)2- 维生素 D3 的水平（参见：Takahashi S, Yamamoto T, Moriwaki Y, Tsutsumi Z, Yamakita J, Higashino K. Decreased serum concentrations of 1, 25(OH)2-vitamin D3 in patients with gout. Adv Exp Med Biol. 1998 ;431 :57-60）。

[0186] 维生素 D 及其活性代谢物在生物体的防御反应中的作用涵盖了几个水平。

[0187] 在第一个水平上，是构成防止受伤和 / 或感染 / 侵入的物理屏障的上皮细胞。活性激素 1, 25(OH)2- 维生素 D 通过刺激编码间隙连接蛋白的基因、粘附基因、紧密连接基因来增强物理屏障，并增强细胞间通讯（蛋白：连接蛋白 43(connexin 43)、E- 钙粘蛋白(E-cadherin)、紧密连接蛋白(occludin)）。

[0188] 第二，维生素 D 对在先天性免疫力的抗微生物肽（包括 β - 防御素、cathelicidin LL-37）的合成中的上皮细胞有刺激作用。

[0189] 之后，维生素 D 刺激在巨噬细胞 / 中性粒细胞中合成的潜在活性抗微生物肽的表达，并提高巨噬细胞氧爆发的潜力。

[0190] 此外，它增强内毒素通过 LL-37 的中和作用。

[0191] 对于获得性免疫力，维生素 D 显示抑制作用，表现为它的抑制 T 淋巴细胞增殖的能力。它对依赖于由活化的 B 淋巴细胞中细胞因子和免疫球蛋白的产生的免疫力发挥抑制作用。它抑制 Th1 淋巴细胞的活性，并减少 Th1IF- γ 和 IL-2（抗体和细胞因子的刺激剂）的合成。这些淋巴细胞参与自身免疫背景的紊乱的发展（例如，1 型糖尿病、类风湿性关节炎、肠自身免疫性炎症、多发性硬化症）。

[0192] 维生素 E 的作用：在饮食，更精确地在肉和总蛋白的高消耗和水果、蔬菜和维生素 C 的降低消耗，与痛风发展的风险之间存在关系。较早前证实了富含嘌呤的红肉、海鲜、啤酒和高密度乙醇还有总蛋白、红酒和蔬菜增加痛风发展的风险；而最近乳制品已经被鉴定为保护剂。人类临床研究显示，抗氧化活性的维生素（维生素 E、维生素 C、 β - 胡萝卜素、维生素 A）不会如先前已经建议的显著抑制膝关节骨关节炎的过程。但是，鉴于饮食通常是不可避免地可获得的事实，可以认为即便是健康的轻微改善（其为营养改变的结果），也可以给人群的健康带来很大的影响。因为有证据显示营养因子等因子对足痛风过程的作用，它们不应当被轻视，而通常应当被普及（参见：Choi HK. Dietary risk factors for

rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2005 ;17(2) :141-6)。

[0193] 根据本发明,维生素 D 和 E 以市售纳米颗粒的形式使用。维生素 D 和 E 的纳米颗粒特征在于较高的生物利用度。但是,口服施用之后,在施用之后标准期间内所进行的血液中这些维生素水平的测量显示正常值或仅仅略微升高的值。在短于标准时间的时间内进行的测量证实了维生素 D 和 E 的升高的生物利用度。

[0194] 已知在痛风过程中,降解富含蛋白和嘌呤化合物的食物的肠道酶没有正常发挥功能。

[0195] 在 WO 1988/008450——“用于代谢物紊乱的基因治疗”的申请中,仅显示新的治疗是可能的,该治疗基于用于特征在于代谢物的积累或增加浓度的不希望状况的治疗和预防的重组体的治疗。该方案的发明人提出使用产生草酸氧化酶和草酸脱羧酶的重组体以防止草酸素质 (diathesis) 和肾结石的形成。除此之外,具有编码尿酸氧化酶基因的重组体对尿酸的代谢是有用的。这样的治疗是用来治疗和预防痛风和结石的形成的。Oxalobacter formigenes OxB(ATCC 35274)——天然定居于人类胃肠道的细菌,是作为插入该重组体的编码草酸脱羧酶和草酸氧化酶的基因的来源的微生物。尿酸氧化酶基因分离自猪的肝脏。

[0196] 尿酸代谢:在灵长类、鸟类和一些爬行动物中,尿酸是嘌呤代谢的最终产物。在人体内,腺嘌呤和鸟嘌呤被代谢为黄嘌呤。反过来,用黄嘌呤氧化酶氧化黄嘌呤后,根据以下反应形成尿酸:

[0197] 黄嘌呤 +H₂O → 尿酸 +H₂O₂

[0198] 超氧化物歧化酶将超氧化物阴离子 (O₂⁻) 转换为过氧化氢 (Lehninger, A. L.: 1975, Biochemistry, 2nd Edition., Worth Publishers, New York, pp. 740-741)。参与尿酸代谢的酶普遍存在于哺乳动物中,不包括人类。在这些动物中,尿酸盐在肾脏中被重新吸收并转运至肝脏,在肝尿酸氧化酶的参与下,尿酸盐在肝脏中被转换成可溶于水的尿囊素,而人类在遗传上倾向于肾结石的形成 (参见:Gutman AB, Yu T-F:Uric acid nephrolithiasis, 1968, Am. J. Med. 45 :756-779)。

[0199] 根据本发明,所述抗微生物剂选自以下的组:罗伊氏乳杆菌 DAN080 的完整培养物、获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的液体上清、浓缩上清和干燥或冷冻干燥上清,以及来自获取自原核和真核重组体培养物以及原核和真核重组体完整培养物包括罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物和液体上清、浓缩上清和干燥或冷冻干燥上清的混合细菌培养物,其中和/或从中基因被利用,所述基因提供针对幽门螺旋杆菌和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性;纯化/分离自获取自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的液体/浓缩/干燥上清、和纯化/分离自罗伊氏乳杆菌 DAN080 的完整培养物、和来自获取自原核和真核重组体的培养物以及原核和真核重组体的完整培养物的包括罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物和液体上清、浓缩的上清和干燥或冷冻干燥的上清的混合细菌培养物(在所述重组体中和/或从中基因被利用,所述基因提供针对幽门螺旋杆菌和其它细菌的特异性调节、抑制和体内平衡活性)的分子量大约为如下的蛋白/寡肽/肽:150 和/或 141 和/或 115 和/或 95 和/或 90 和/或 86 和/或 83 和/或 77 和/或 71 和/或 63 和/或 59 和/或 56 和/或 49 和/或 46 和/或 43 和/或 39 和/或 34 和/或 32 和/或 30 和/或 22kD 或更低,或在作为由细菌、真菌和胃肠道、体表和其它系统(例如脊椎动物的泌尿生殖系统和呼吸系统)的其它病原体引起的感染的结果发展而来的医疗状况的预防和治疗中有用的混合物,发现其

对于痛风的特殊用途。

[0200] 本发明是基于罗伊氏乳杆菌 DAN080, 任选地与其他细菌和遗传工程化产品组合在痛风的预防和治疗中的用途。

[0201] 与其它益生菌类似, 细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 的益生菌潜力基于通过胃肠道传代的可能性、抗微生物化合物的产生、与上皮粘蛋白 (mucin) (例如肠上皮) 粘附的程度、生物胺的产生、粘蛋白降解、药物敏感性模式来进行评估。

[0202] 在发酵 (其发生在胃肠道、泌尿生殖道、体腔和管道中) 过程中, 细菌释放大量最终酸性代谢物, 伴随 pH 的降低。该产物难以定量并且包括过氧化氢和双乙酰 (diacetyl), 其是调节环境中微生物关系的药剂 (抗菌作用)。细菌素在触发发酵的微生物群的选择中是很重要的。菌株 / 菌株们被形态学上和生化上以及分子学上 (鉴定) 鉴定和表征, 其中针对于在酸性环境中存活的能力 (在胆盐的存在下), 利用蛋白、淀粉、脂肪的能力, 生产过氧化氢的能力, 胆盐水解酶活性, 还有生产抑制在胃肠道中不希望的其它细菌生长的物质的能力, 和确定对抗微生物化合物的抗性。评估显示罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株的非感染性, 其是对免疫功能受损的动物进行测试的。

[0203] 革兰氏阳性细菌编码掺入到自己的细胞壁 (D-丙氨酸酯) 所需要的蛋白质。随着磷壁酸的参与, 这个过程对于细菌细胞及其对环境的酸性性质的耐受、其对抗微生物肽的抗性、其粘附性、生物膜的形成和其毒力的程度是重要的。D-丙氨酸残基的存在对于罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的功能发挥和它们在胃肠道中的存活是重要的。发现用过氧化氢酶处理、pH 的改变和加热高达 80°C 处理不会影响罗伊氏乳杆菌 DAN080 的杀菌活性。甚至用胰蛋白酶和蛋白酶 K 处理也不会影响这一特征。当已经发生培养基中的葡萄糖 (碳源) 和蛋白胨 (氮源) 的可用性增加时, 没有观察到抗微生物活性的降低。罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌还在 pH 3 中存活, 并且随后对胆酸和牛胆汁的活性均不敏感, 而仍然表现出胆盐水解酶活性和产生抗微生物化合物的能力。

[0204] 罗伊氏乳杆菌 (LR)——包括罗伊氏乳杆菌 DAN080, 是可以产生有害的初级和次级代谢物 (包括有机酸、双乙酰、CO₂) 和各种抗生素类物质 (例如, reuterin、reuterin、reutericyclin、钴胺素等) 的微生物。

[0205] LR 的一些菌株具有合成并释放细菌素的能力。这些之一是 Reuterin 6——一种细菌素, 其对于许多种属的细菌 (特别是那些革兰氏阳性细菌) 显示杀菌和抑菌两种活性。在 β -半乳糖苷酶的存在下 (由细菌细胞泄漏), 在具有少量活细胞的弱不透光 (poorly opaque) 的环境中裂解力是最强的。该细菌素对于革兰氏阴性细菌没有活性, 并且在产 reuterin 的罗伊氏乳杆菌的菌株中不存在。

[0206] Reuterin 6 具有 2.7kDa 的分子量并包括 67% 的疏水性和极性中性氨基酸, 其中没有发现羊毛硫氨酸。该分子的结构是环状的, 并且不能与 gaseicin A (相似分子量和氨基酸序列) 区分开。两种细菌素在杀菌力上不同。尽管它们引起细胞和脂质体的钾离子泄漏, 但泄漏的强度是不同的。结构上, 这两种细菌素主要是以 α 螺旋的形式, 区别在于存在的 D 和 L 构型的氨基酸的数量。Reuterin 6 在存在的所有 18 个丙氨酸残基中具有两个 D-丙氨酸, 而在 gaseicin 中只有一个这样的残基。区别在于它们的 D 或 L 构型的氨基酸残基的数量决定了 LR 的杀菌活性。

[0207] LR 显示抗微生物活性, 没有一个已知的细菌素或 reuterin 或其它有机酸具

有该活性。Reutericyclin 显示宽抑制谱的抗微生物活性。它的活性不会抑制革兰氏阴性微生物的生长;但是,具有与非突变体菌株不同的 LPS 结构的大肠杆菌突变体对 reutericyclin 的作用敏感。Reutericyclin 以剂量依赖的方式对细胞起作用。它不会破坏孢子,但是破坏发生孢子萌发的条件。向细菌培养基加入脂肪酸改变了 reutericyclin 的活性。Reutericyclin——作为一个分子,是疏水性的,具有负电荷和 3.49kDa 的分子量。结构上, reutericyclin 是 tetram 酸的衍生物(参见:A. Hölitzel, M. G. Gänzle, G. J. Nicholson, W. P. Hammes, and G. Jung, Angew. Chem. Int. Ed. 39 :2766-2768, 2000)。

[0208] Reuterin 的产量在甘油的存在下会增强。

[0209] Reuterin 是在甘油的存在下在厌氧发酵过程中主要由罗伊氏乳杆菌产生的抗微生物活性的物质。该物质的最大产量出现在静态阶段和对数细菌生长阶段。

[0210] 在甘油的存在下,罗伊氏乳杆菌合成 β -羟基丙醛 (HPA),其随后分泌至培养基中。已证实,在水溶液中, reuterin 作为 β -羟基丙醛的三种形式的混合物存在:单体的、水合的和二聚体的,三种形式保持平衡。

[0211] 该化合物是由 Talarico 和 Dobrogosz 首次分离、纯化和鉴定的。迄今为止,已经证实了 reuterin 的许多性质,主要是它不仅是细菌而且是真菌和原生动物的广谱生长有效抑制剂。已经研究了 reuterin 的活性机制超过 20 年,并且目前已知该化合物可以双重方式对微生物起作用。该物质可以通过与核糖核苷酸竞争 DNA 序列中的结合位点、或通过与该酶的不稳定的硫醇基反应而抑制细菌核糖核苷酸还原酶的活性(催化 DNA 合成的第一阶段的酶)。此外,发现 reuterin 可以进入与硫氧还蛋白(发挥许多酶(包括核糖核苷酸还原酶)的还原剂作用的蛋白)直接反应从而抑制该蛋白的酶促活性。Reuterin 是可溶于水的物质,在宽 pH 值范围内起作用,耐脂解酶和蛋白水解酶的处理。罗伊氏乳杆菌生长和生产 reuterin 的最佳条件是 37°C 的温度和 pH 4.6-5;该化合物还在相当低的温度和培养基的酸度环境中保持稳定。

[0212] LR 菌株在甘油和葡萄糖共发酵的过程中还产生钴胺素(维生素 B12)。

[0213] 遗传学:有可能构建转移至罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的穿梭载体(例如大肠杆菌-乳杆菌),使得所得到的转化体显示其活性,例如,抗微生物。

[0214] 存在在罗伊氏乳杆菌 DAN080 中克隆基因的可能性,(已知 β -半乳糖苷酶异二聚体在非罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的罗伊氏乳杆菌细胞中的克隆),并且推定这样的结构基因的表达必须与参与成熟(切割、环形式)和通过各种转运系统分泌到罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞外的蛋白的活性相关。还推定在罗伊氏乳杆菌 DAN080 中,存在对于细胞抗这样的强抑制剂(如 reuterin 6)的自我保护的重要机制。

[0215] 能够用罗伊氏乳杆菌 DAN080 将绿色荧光蛋白的连接基因构建入分泌载体,其导致能够发光(标记蛋白)的嵌合蛋白的释放。

[0216] 能够通过将 nisA 启动子(PnisA)和 nisRK DNA 片段连接入穿梭载体大肠杆菌-罗伊氏乳杆菌 pSTE32 中,使罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞适合于掺入乳酸链球菌素控制的基因表达(NICE)系统。在这样的嵌合质粒中,异源基因可能在乳酸链球菌素诱导下表达。

[0217] 至于根据本发明的导管,两种类型的聚合物被用作制备导管的基础材料:PVC 和硅。

[0218] PVC 是一种便宜的聚合物,其安全性已被证实了许多年。目前,采用新一代的增塑

剂,额外地增加了 PVC 的安全性。硅是一种昂贵的聚合物;但是,它的特征在于非常高的相容性。

[0219] 根据本发明,由 PVC 或硅制成的导管涂敷有由聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 制成的聚合物纳米涂层。仅与水接触,PVP 形成厚果冻溶液,其润滑聚合物表面。

[0220] 由 PVP 制成的聚合物涂层还可以被施加于由聚氨酯或天然乳胶制成的导管上。

[0221] 由于其生物相容性(没有毒性作用,包括对血细胞的降解作用——溶血,没有对宿主免疫系统的作用),PVP 被广泛用于药理学,用于旨在与血液接触的生物材料的生产。由 PVP 制成的纳米涂层的优点是该涂层耐微生物(包括病原性生物体)的活性。

[0222] 这样的涂层的唯一缺点是需要插入操作之前润湿导管;但是,当采用根据本发明的用于导管插入的试剂盒时,根据本发明在包装内很容易即可解决该问题。

[0223] 根据本发明,由 PVP 制成的纳米涂层被化学键合至抗微生物活性的聚合物,例如壳聚糖盐。这是从甲壳纲动物贝壳得到的聚合物。壳聚糖盐用于医学中的用途是已知的。它们是安全的、生物可利用的和生物可降解的。

[0224] 为了证明意想不到的协同作用,由壳聚糖盐和 PVP 制成的涂层被分别和组合检查。此外,个体涂层的组成用其它活性物质丰富,所述其它活性物质提高本发明导管的表面的活性谱,例如以纳米颗粒和/或银纳米颗粒形式的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物(保藏于 DSMZ——保藏号——DSM 15693——按照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约,于 2003 年 6 月 20 日)和维生素 D。

[0225] 固体聚合物涂层的形成可以通过两种方法证明——物理的和化学的,其基于通过共价键键合的共价聚合物链。聚合物链的物理锚定可以通过形成不连续的 PU 层的纳米涂层和应用 PVP 溶液实现。

[0226] 由于伦敦力 (London forces), PVP 链被部分浸在基础聚合物中,且部分地从其中伸出。该纳米涂层,具有大约 50,000 个 C-C 键 (10nm) 的厚度,当浸在水中时形成一种具有优异润滑性质的刷子。该原始技术早已发展了。

[0227] 备选地,在基础聚合物的表面上,通过由水凝胶吸收形成自由基的方法沉积希望的层。这样的自由基是非常活泼的并且容易‘捕获’其它化学物质而形成稳定的共价键。

[0228] 两种技术的应用是可能的,因为它们二者均提供所希望的涂层。

[0229] 测试在聚合物表面上所获得的纳米涂层,以评估它们的生物相容性、生物膜的发展和由微生物的定殖。还可检查它们针对猪组织的摩擦系数。评估利用专门构造的、经改进以满足本发明需要的装置来进行。最佳摩擦系数可确保导管的无痛插入,但没有任何滑出的风险。

[0230] 根据本发明的导管的外部纳米涂层的新性质是通过活性剂的物理和/或化学键合实现的。

[0231] 导管外部纳米涂层的活性剂是源自由本发明人鉴定的乳酸菌罗伊氏乳杆菌的新的 DAN080 菌株的成分,保藏于 2003 年 6 月 20 日——按照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约,在 DSMZ 保藏中心——Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, in Braunschweig, DE, 保藏编号为 :DSM 15693。

[0232] 已经意外地发现罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物是外部纳米涂层的希望的成分,或涂敷根据本发明的导管的层之一。

[0233] 生长的指定期限结束后,离心罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物,液体、浓缩上清和干燥上清是在体外和体内细菌生长调节方面的特定能力和活性的产物。采用液体上清进行电泳分离之后,在特定的时间收集浓缩的上清和干燥的上清,可视化特定的蛋白,所述蛋白具有在 150-22kD 范围内和更小的分子量,其在患者体内负责体内平衡和细菌生长的调节。这些蛋白,无论是以分离的和纯化的形式,还是以液体上清、浓缩上清和干燥上清的形式,在培养罗伊氏乳杆菌 DAN080 的培养物适当期限之后收集,独立地或与其他乳酸细菌(由本发明人——Danuta Kruszewska 分离并作为其财产)形成混合物,均赋予涂敷在根据本发明的导管上的纳米涂层以新的、意想不到的性质,所述性质提高患者的安全性和舒适性,同时对根据本发明的导管表面上的细菌生长显示体内平衡和调节作用。

[0234] 根据本发明公开的内容,罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物与其它已知的抗菌活性剂组合使用。罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌的分离、培养和罗伊氏乳杆菌 DAN080 胞外代谢物的收集、分离和纯化的方法在与本发明要求相同优先权日期的平行专利申请中公开了。

[0235] 除了罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物,维生素也可用作活性剂,特别是纳米形式的维生素 D 和 E,以增强患者的免疫机制,以及根据本发明作为减少微生物生长和生物膜形成的药剂,可以使用银纳米颗粒、小的二羧酸和壳聚糖盐。为了逐步释放上述活性剂,可以使用用于缓释的已知组合物,例如,可溶于用于涂敷水凝胶的生理流体中的组合物。考虑到扩散系数和 / 或在表面上的键合的程度,用于物质的缓释所使用的技术手段的选择取决于在调整至所预期的在患者体内放置导管的期限的时间中保留它们的性质的必要性。

[0236] 实验说明

[0237] 壳聚糖盐的制备:用于生产合适的壳聚糖盐的原材料是获取自 *Basinomyces*(香菇, Le 323) 的技术几丁质,根据 2009 年 10 月 12 日的出版物 PL 384836——“用于获得真菌壳聚糖的方法”,或获取自南极磷虾 (*Euphausia superba*) 的盾片。在脱矿物质化和脱蛋白化过程中从聚合物中除去残留的有机和无机污染物。对这样获得的部分几丁质进行化学分解过程以降低其聚合度至希望的水平。这允许获得具有类似脱乙酰水平和不同分子量的壳聚糖。在碱性脱乙酰化的过程中获得壳聚糖。通过改变反应时间和温度来修饰其性质。在水性环境中壳聚糖与有机酸反应获得盐。冷冻干燥这样获得的盐溶液。监测原材料和产品的性质的评估。

[0238] 为了获得(在实验室条件下)各种分子量和脱乙酰水平的壳聚糖,采用以下的操作:

[0239] 用于壳聚糖生产的原材料的制备:纯化技术级几丁质,修饰聚合物的分子量以获得具有各种聚合水平的几丁质。通过控制脱乙酰过程的参数获得所需性质的壳聚糖。

[0240] 测试在实验室条件下获得的壳聚糖盐的抗微生物性质。

[0241] 有助于快速评估其抗微生物活性的壳聚糖盐的生物测试允许其生产过程的最佳参数的监测、控制和选择,特别是应当修饰壳聚糖的脱乙酰水平和分子量的范围。

[0242] 考虑到导管的部位和它将会被使用的环境,在灭菌过程之后从最强生物活性的方面进行用于获得盐的方法的优化。

[0243] 多重耐药细菌菌株对所测试的聚合物的涂敷和未涂敷的表面的粘附:许多细菌的发病机制主要与这些生物体在定殖过程中不可逆地粘附至聚合物表面并产生胞外糖萼(glycocalyx)有关。

[0244] 粘附百分比被定义为从所测试的聚合物回收的 CFU 与培养物流体中标记细菌（多重耐药菌株）的 CFU 的比。

[0245] 与多重耐药微生物相关的壳聚糖盐的抗微生物活性：每个样品与所测试的菌株之一一起培养（CFU 10^3 ）。在 37°C 的温度孵育后的各个时间点（0、30、60 和 120min）收集样品、旋涡震荡并置于铺了固体琼脂培养基的平板上。在 37°C 的温度孵育微生物 48 小时后对 CFU 值计数。在孵育之前所取的样品中的 CFU 计数被用于计算 CFU 的减少。

[0246] 动物的研究是基于成年大鼠的非感染的动物模型。采用 ± 350 g 重的六个月大的 Sprague-Dawley 雌性大鼠（ $n = 90$ ）。将大鼠分成 9 个组。向大鼠（ $n = 36$ ；3 个组）尿道插入聚合物棒，其上覆盖有抗菌和润滑的涂层。浸渍过的棒分别由 PVC、聚氨酯和硅制成。另外三组动物（ $n = 36$ ）作为阴性对照，其中大鼠只有未涂敷的棒插入其尿道。随后两组（ $n = 12$ ）作为阳性对照，其中插入的棒涂敷纳米银和 PVP。剩下的大鼠（ $n = 6$ ）没有插入任何生物材料。

[0247] 使上述棒置于大鼠从腹膜腔到尿道。通过在暴露的膀胱下面刺穿来将它们插入在膀胱和尿道之间的部位。通过在尿道钻微孔之后，棒被以其圆形尖端朝向膀胱外壁的方式被固定。制成的棒的长度使得其不会从外尿道口伸出，从而能够研究结壳（encrustation）过程并避免棒被大鼠拉出或咬到。棒的直径必须是尿道直径的两倍小，并且棒的外尖端必须是圆形的。

[0248] 动物保持在兽医的监管之下。研究开始后的 7 至 14 天之后，处死大鼠。在无菌条件下获取尿液、血液、组织样品和棒。对尿液和血液样品进行微生物检查。

[0249] 在血清样品中，测量溶菌酶水平和防御素活性。

[0250] 分析棒的表面上微生物的定殖和由糖萼结壳的程度。

[0251] 鉴定分离的粘附到棒表面的生物体并表征它们的生化活性，包括确定它们对抗生素的敏感性。

[0252] 固定之前，分析组织的微生物的定居情况。形态学和免疫化学检查组织的固定样品并测定防御素的存在。

[0253] 从动物组织分离的微生物的特征：发现微生物与所测试的菌株相同（抗菌谱、整合子谱、脲酶活性——一致）。当在该研究中从动物的尿液和血液中分离的微生物的抗菌谱、整合子谱和脲酶活性被鉴定为与从导管的尖端或其它区段分离的微生物的那些相同时，作为与制成棒的聚合物有关的菌血症 / 菌尿症，并且其与活性部位接触的层被认为是该状态。

[0254] 定量测定

[0255] 通过传统方法对从血液、尿液、组织和聚合物棒分离的细菌进行计数：动物流体或匀浆组织（尿道 bioplates）的连续稀释液置于合适的培养基并在有氧和厌氧条件下、在 37°C 的温度培养 24 小时。计数细菌的数量并针对 1ml 的血液 / 尿液或 1g 的组织计算作为对取自单个动物的 bioplate 进行的 3 个测试所获得的平均值。培养聚合物棒获得的节段并通过定量技术的方式计数。在固体培养基（5% 绵羊血琼脂）上或另一种生长培养基上孵育样品，并在 37°C 孵育 24h 之后对所培养的集落进行计数。

[0256] 细菌鉴定系统：通常采用检测系统 API (bioMerieux, France)，RT-PCR 基于分离物的生化活性特征进行细菌的鉴定。

[0257] 分离物的毒力特征

[0258] 尿素分解细菌的脲酶活性的体外定量分析：在各种 pH 进行所检查的细菌的定量分析。根据制造商的建议 (Wako Chemical) 测量尿素转换成氨的速率。然后，脲酶活性表达为 1mg 的蛋白在水解后 1min 的 μmol 尿素在 0.1-20mg N-NH_4^+ /L 范围内用 NH_4Cl 获得标准曲线。

[0259] 作为用于检测类似菌株的标记的抗微生物敏感性谱

[0260] 确定最小抑制浓度 (MIC)。根据 CSLI 指南，在 Mueller-Hinton 琼脂上采用圆盘扩散法测试细菌。在两个测定中，将大肠杆菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、粪肠球菌 ATCC 29212 用作抗微生物敏感性测试的参考菌株。

[0261] 通过 PCR 分析整合子 / 转座子的存在

[0262] 无效治疗造成的细菌中选择性耐药提高的现象是健康护理的最大挑战之一。可移动整合子是多重耐药传播的机制之一。整合子能够在细菌基因组内以及水平地向和从整合子阳性的细胞转移。在本研究中，确定了分离自所测试的样品（尿液、血液、组织、聚合物棒）的细菌菌株中整合子的模式。以特定的引物通过 PCR 的方式分析定位于整合子盒中的抗性基因。

[0263] 整合子谱在比较被认为相同的分离物中是有用的工具。

[0264] 新的生物材料对先天性免疫应答的作用：在天然生理条件下，尿道是部分无菌的。该现象主要与先天性免疫应答，并且部分与抗微生物物质（例如，防御素、抗菌肽、乳铁蛋白和溶菌酶）有关。对于尿道免疫力，防御素和溶菌酶是最有名的和最重要的。采用 ELISA 测试测量在血清、尿液和组织样品中的溶菌酶水平，并且采用比浊法测量酶促活性。采用三明治 ELISA 测试测量匀浆的组织中选定的防御素。进行测试 RT-PCR 以分析在大鼠细胞群体中防御素的表达。

[0265] 新的生物材料的细胞毒性测量：极为重要的是，用于制作所插入的导管的材料是生物相容性的，因此，检查不同类型的表面和表面涂层。

[0266] 采用了许多针对相容性的测试，其允许确定一种结构和 / 或特定涂层是否会激活先天性免疫系统，所测试的材料是否诱导坏死和 / 或凋亡，该材料是否有细胞毒性，以及它是否干扰细胞增殖。这些测试在体内和在体外进行。上述测试的结果构成用于导管纳米涂层的合适材料的选择的基础，所述材料满足无毒性、诱导最少的细胞死亡、不引起或仅引起有限的炎症并且不引起明显的炎症的条件。在整个研究中，单独或与导管结合地，测试了用于导管生产的不同材料。

[0267] 几个测试用于评估生物材料的性能：

[0268] 1) 按照已建立的（外部）标准，基于 FDA Modified [ISO] Matrix (蓝皮书备忘录 #G95-1, 附件 A) 中提出的指南。

[0269] 2) 由本发明的所有者定义的标准化测试，以及 3) 旨在扩展涉及生物体对正在开发中的纳米结构的应答方面的知识的科学测试。

[0270] 导管插入测试：为了监测从纳米涂层（以生物材料涂敷的尿道导管）泄漏的材料毒性作用，对于在未涂敷和涂敷的尿道导管中所使用的每种生物材料，对两只兔子测试了 1、4 和 12 周。简而言之，涂敷或未涂敷用于导管的材料的 4 条纳米结构分别采用套管 (trocar) 插入左和右椎旁肌肉。监测兔子的毒性应答，并且在实验过程中周期性进行植入

部位的宏观评价。

[0271] 在实验结束时,处死动物,对植入部位进行宏观评价,并且进行照相记录用于后续评估。从材料植入部位收集血液和肌肉样品,并冷冻或固定在低聚甲醛中用于组织病理学检查。加工肌肉组织并用石蜡包埋,并制备切片和染色,并且对组织切片评估炎症、坏死、纤维化和肌肉组织和所测试的材料之间的毒性相互作用的其它指标。以下发现证实了罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌的胞外代谢物用作导管的外部纳米涂层的基础成分的有效性。

[0272] 对活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌培养物、热灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和壳聚糖 α -酮戊二酸盐对实验室动物的免疫系统的作用进行实验。

[0273] 四十八只 2 个月大体重 140-275g 的 SD 雌性大鼠用与动物的年龄足够匹配的饲料喂养,并随意饮水。实验前三天,所有动物在颈静脉插入导管。这项研究通过从大鼠取血样开始。随后,所述动物通过胃管胃内给药的方式施用 0.5ml 以下制剂:细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080——活细胞和死细胞的悬液、壳聚糖 AKG 悬液、盐水。第一次取血之后一百二十分钟从动物取第二次血样。从第二天开始,大鼠随后连续 7 天每天一次接受同样的制剂。十二只大鼠以在生理盐水中悬浮的 10^6 个细胞的剂量接受活细菌。后面 12 只动物也接受连续 8 天,每只 10^6 个罗伊氏乳杆菌 DAN080 的热灭活细胞。对于接下来 12 只大鼠,施用壳聚糖 AKG 悬液,并且第四组动物 ($n = 12$) 胃内给药以每次 0.5ml 生理盐水,连续施用 8 天。在第 8 天胃内给药施用最后一剂制剂之后,从动物的颈静脉取血。在同一天,在第一次取血之后 120 分钟第二次从所有大鼠取血。

[0274] 血液中的溶菌酶活性的确定是在指定密度的溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus*) 细胞悬液的存在下、基于吸光度值进行的,并且将该值与由 PBS 中的晶体溶菌酶 (Sigma-Aldrich) 和指定密度的溶壁微球菌细胞悬液的许多标准稀释物所绘制的吸光度曲线比较。孵育 15、30、45、60 分钟之后,于 540nm 波长测量吸光度。

[0275] 显示于图 3 中的所获取的关于胃内施用所测试物质之后大鼠血液中的溶菌酶活性 (U/L) 的结果证实了通过活的和热灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和通过壳聚糖 α -酮戊二酸盐 AKG 对大鼠免疫系统的刺激。

[0276] 溶菌酶是一种由某些吞噬细胞(例如,巨噬细胞和多个核的白细胞)释放的水解酶,其在病原微生物的控制中发挥显著的作用。溶菌酶也由位于肠内膜的帕内特细胞产生。溶菌酶对革兰氏阳性微生物尤其有活性。细胞的吞噬活性涉及在溶菌酶的参与下降解细菌的细胞壁,更精确地——肽聚糖内糖苷键的裂解。由罗伊氏乳杆菌 DAN080 的代谢物引入诱导的升高的溶菌酶活性刺激巨噬细胞活化或者抗原呈递至巨噬细胞。以这种方式,免疫系统的功能被增强,主要是非特异性的。这证实了罗伊氏乳杆菌 DAN080 的活细胞和死细胞均显示对许多病原体起作用的能力。这样的细胞没有被生物体的免疫系统识别为危险的。罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌、它们的胞外代谢物和壳聚糖 α -酮戊二酸盐的抗微生物活性被额外地增强,因为无论是活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 还是它们的代谢物还是壳聚糖 α -酮戊二酸盐均对溶菌酶的活性不敏感,并且在与溶菌酶接触时不被水解。

[0277] 在健康大鼠中通过阻断尿酸氧化酶 (EC 1.7.3.3) 的活性经过嘌呤代谢的抑制而诱导高尿酸血症。在添加一个月的抑制剂(氧嗪酸,尿酸,每日剂量分别为 0.4 和 0.6g)的饲喂后,在动物的肾脏形成沙子和结石(参见:Bluestone R, Waisman J, Klinenberg JR. Chronic experimental hyperuricemic nephropathy. Lab Invest. 1975 ;33(3) :

273-9)。该模型用作测试根据本发明导管的功能的效率。肾脏的导管插入可防止结石的结晶。

[0278] 上述事实已经证明在纳米涂层中包括维生素 D 是合理的。维生素 D 和其活性代谢物在生物体的防御反应中的作用涵盖几个水平。在第一水平上,是构成防止受伤和 / 或感染 / 侵入的物理屏障的上皮细胞。活性激素 1,25(OH)₂-维生素 D 通过刺激编码间隙连接蛋白的基因、粘附基因、紧密连接基因来增强物理屏障,并增强细胞间通讯(蛋白:连接蛋白 43、E-钙粘蛋白、闭合蛋白(occludin))。

[0279] 维生素 D 对在先天性免疫力的抗微生物肽(包括 β-防御素、抗菌肽 LL-37)的合成中的上皮细胞有刺激作用。

[0280] 之后,维生素 D 刺激在巨噬细胞 / 中性粒细胞中合成的潜在活性抗微生物肽的表达,并提高巨噬细胞氧爆发的潜力。此外,它增强内毒素通过 LL-37 的中和作用。

[0281] 对于获得性免疫,维生素 D 显示抑制作用,表现为它的抑制 T 淋巴细胞增殖的能力。它通过活化的 B 淋巴细胞基于细胞因子和免疫球蛋白的产生对免疫力发挥抑制作用。它抑制 Th1 淋巴细胞的活性,并减少 Th1IF-γ 和 IL-2(抗体和细胞因子的刺激剂)的合成。这些淋巴细胞参与自身免疫背景的紊乱的发展(例如,1 型糖尿病、类风湿性关节炎、肠自身免疫性炎症、多发性硬化症)。

[0282] 在与导管接触的具有产生抗微生物肽能力的粘膜部位,维生素 D 的存在对泌尿生殖系统、消化系统、生殖道、呼吸系统、血液和淋巴管的内腔衬里的上皮细胞的抗微生物活性具有刺激作用。在由革兰氏阴性细菌(主要引起泌尿生殖系统的感染)分泌 LPS 的情况下,维生素 D 通过刺激先天性免疫效应子细胞而降低内毒素的毒性作用,其增强中和 LPS 的抗微生物肽的产生。

[0283] 另一方面,维生素 D 可防止过敏反应,其可以由导管插入它的使用部位诱导产生。

[0284] 下面提到的实验证实加入罗伊氏乳杆菌 DAN080 的胞外代谢物的积极效果。

[0285] 基于用于评估抗焦虑作用的旷野实验进行行为测试,用于分析实验室大鼠在杀死的和活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的影响下的运动和探索性活动。

[0286] 有可能确定这些制剂对动物行为的一般概况(general profile)的作用。

[0287] 采用管子经胃内给药,三组动物以 10⁶的剂量和体积 1ml 的盐水施用热处理的和活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞三个月。从实验的第二个月开始,剂量加倍,并分成在早晨和在晚上施用制剂。行为测试以一个月间隔进行 3 次。

[0288] 1. 在实验的第一个月、第二个月和第三个月进行 3 次旷场实验。测试在 100cm x 100cm x 40cm(壁的高度)尺寸的塑料盒子中进行。盒子的正方形地板被线分成 25 个相等的正方形。在安静和明亮的房间的条件下进行测试。观察大鼠的个体行为。试验中每只大鼠从它的笼子里取出并置于盒子地板的中心。

[0289] a. 登记在观察的 3min 过程中大鼠通过的正方形的数量。

[0290] b. 在相同的盒子中和相同的条件下,对大鼠观察 3min 的动物身体撤回的数量。

[0291] c. 在相同的盒子中和相同的条件下,对大鼠观察 3min 的发生洗鼻子和清洁皮毛的数量。

[0292] 大鼠的水平活动通过穿过正方形的数量来进行测量。在施用所测试的制剂一个月之后,年轻的大鼠表现出高的运动活性。在该研究的第二个月和第三个月之间观察到该水

平活动的降低。与对照动物相比,最少移动的是施用活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌的大鼠,接着是那些接受热处理的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的大鼠 (** $p < 0.5$, Student' s t 检验, * $p < 0.5$, t 检验)。

[0293] 在实验过程中,所有动物随着时间的流逝并且——最有可能的是,随着衰老显示出向水平和垂直活动的逐渐降低的倾向。

[0294] 垂直活动通过动物身体撤回的发生数量来进行测量。

[0295] 在施用制剂的第一个月过程中,年轻的大鼠是移动的,并且那些施用活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞至少 3 个月的大鼠与对照组相比显示出活动有统计学上显著的不同 (* $p < 0.5$, t 检验)。而且,与对照组相比,注意到在已经接受死的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞 2 个月的大鼠的垂直活动也有统计学上显著的降低 (* $p < 0.5$, t 检验)。

[0296] 在接受活的和热处理的细胞 2 或 3 个月的动物组中,观察到与仅接受盐水的动物对照组所进行的相同活动相比,在发生洗鼻子和皮毛清洁的数量方面有统计学上显著的不同 (* $p < 0.5$, t 检验)。

[0297] 在对照组中,注意到向发生洗鼻子和皮毛清洁的数量增加的倾向(从第一个月至第三个月盐水施用的观察)。

[0298] 这些数据显示,在第二个月和第三个月施用罗伊氏乳杆菌 DAN080 之间的期间,该处理给大鼠施加了镇静的作用。所获得的结果如图 2a-c 所示,其中显示了穿过正方形的数量(图 7a)、大鼠身体撤回的数量(图 7b)和发生洗鼻子和皮毛清洁的数量。

[0299] 2. 旷场实验——社会行为。在相同的盒子中和相同的条件下,在该实验的第三个月期间进行该实验。唯一的不同是,来自 2 个不同笼子的 2 只大鼠被置于盒子中。根据上述计划分组,动物胃内给药接受相同的制剂。每对的行为观察 7min。

[0300] a. 在相同的盒子中和相同的条件下对一对大鼠进行 7min 观察动物身体撤回的数量实验。

[0301] b. 在相同的盒子中和相同的条件下对一对大鼠进行 7min 观察发生洗鼻子和清洁皮毛的数量实验。

[0302] c. 在相同的盒子中和相同的条件下对一对大鼠进行 7min 观察发生相互嗅探的数量实验。

[0303] 与对照组相比,发生身体撤回的数量显示出接受活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的动物的活动有统计学上显著的降低 (* $p < 0.5$, t 检验)。在接受活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的大鼠组中注意到的洗鼻子和清洁皮毛数和嗅探数的统计学上显著的降低 (** $p < 0.5$, Student t 检验)表明在施用所测试的制剂之后动物中引起的压力作用和焦虑的缺乏。

[0304] 同时,在所进行的所有实验中,没有注意到大鼠排便和排尿频率存在任何统计学上显著的不同。这表明大鼠在新的环境和 / 或新的条件下焦虑的降低。

[0305] 图 7d-7f 呈现了对每天以至少 10^6 个细胞 /ml 的剂量和体积 1ml 的生理盐水接受活的和热处理的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的大鼠进行行为测试的结果。在旷场实验中,通过检查大鼠身体撤回的数量(图 7d)、发生洗鼻子和清洁皮毛的数量(图 7e)和相互嗅探的数量(图 7f)测试了动物的社会行为。

[0306] 该实验还证实了与除消化道外的体腔的粘膜上皮细胞接触的上述测试因子的刺

激作用,其需要导管插入。

[0307] 图 3 示例了罗伊氏乳杆菌 DAN080 培养物的上清的电泳结果。

实施例

[0308] 实施例 1. 罗伊氏乳杆菌 DAN080 和其它乳酸发酵细菌的发酵产物在小鼠胃中对幽门螺旋杆菌定殖的影响。

[0309] 分成 4 组每组 12 只小鼠的 48 只小鼠 (BALB/cA) 参与了这项研究。

[0310] 第一组小鼠通过胃管连续 35 天每天施用制剂 1(定义 1)——0.5ml 由静止期中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和表 1-4 所列的其它乳酸菌的 10 小时培养物获得的中性上清混合物,具有抗幽门螺旋杆菌活性,其与 α -酮戊二酸钙 (30mM) 或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,或其它 α -酮酸盐组合,以液体形式或包含在烘焙产品或薯片中的形式施用。从实验的第 11 天开始,相同的小鼠在接下来的 2 周一周施用两次,第一次处理之后 1 小时,施用重悬于 BHI 中的 0.2ml 新鲜显微镜监测的幽门螺旋杆菌细胞 (10^8 个细胞 /ml) 亚培养物的部分。

[0311] 第二组小鼠通过胃管连续 35 天每天施用制剂 2(限制定义 2)——重悬于 MRSB 中的 0.2ml (10^8 个细胞 /ml) 的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和表 1-4 中所报道的其它乳酸菌细胞,或用烘焙产品或薯片施用,呈现抗幽门螺旋杆菌活性,其与 α -酮戊二酸钙 (30mM) 或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,或其它 α -酮酸盐组合,并随后,从实验的第 11 天开始根据感染方案用幽门螺旋杆菌感染小鼠,如针对第一组所述的。

[0312] 第三组小鼠通过胃管胃内给药连续 35 天每天施用制剂 3(定义 3)——重悬于 0.5ml MRSB 中的作为本发明人财产的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和其它乳酸菌的细胞,或用烘焙产品或薯片施用,呈现抗幽门螺旋杆菌活性,与由静止期中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和构成本发明人财产的其它乳酸菌获得的中性上清的混合物,和 α -酮戊二酸钙或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它 α -酮酸盐组合。

[0313] 第四组(阳性对照),用重悬于 BHI 中的 0.2ml 的新鲜显微镜监测的幽门螺旋杆菌细胞 (10^8 个细胞 /ml) 亚培养物通过胃管连续两周进行一周两次饲喂。

[0314] 结果如表 3-5 所示。

[0315] 在第 36 天,处死所有小鼠并对它们的胃检查粘膜中幽门螺旋杆菌的存在——表 3。

[0316] 表 3. 来自实验组第一 - 四组的小鼠的胃粘膜中幽门螺旋杆菌的存在。

[0317]

胃肠道的切片	之前的治疗之后以下组中幽门螺旋杆菌的定殖:			
	第一组	第二组	第三组	第四组
胃	-	-	-	+

[0318] 实施例 2. 罗伊氏乳杆菌 DAN080 和其它乳酸发酵细菌的发酵产物在野生动物中对尿素分解微生物群定殖的影响。

[0319] 来自动物园的野生动物的一组饮食 ($n = 10$),没有指示肠道上皮连续性的破坏的临床症状,由于营养和环境条件的快速和永久变化而持续暴露于应激之下,并因此暴露于尿素分解细菌的感染之下,用制剂 4(定义 4)——由静止期中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和表

1-4 所提到的其它乳酸菌的 10 小时细胞培养物获得的中性上清混合物,或包含在烘焙产品或薯片中,显示抗尿素分解细菌活性,与罗伊氏乳杆菌 DAN080 和构成本发明人财产的其它乳酸菌(具有抗尿素分解细菌活性)细胞组合,与 α -酮戊二酸钙(30mM)或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,或其它 α -酮酸盐组合,或与烘焙产品、薯片组合,连续补充 60 天。

[0320] 在将这样的添加剂引入饮食/饲料中之后,并且再观察 30 天,所述动物维持良好的健康和生活总体安宁,没有发烧、腹泻或发生感染的其它症状。

[0321] 实施例 3. 罗伊氏乳杆菌 DAN080 和其它乳酸发酵细菌的发酵产物对具有诊断为由痤疮丙酸杆菌引起的寻常痤疮、年龄 13-17 岁 ($n = 12$) 的年轻志愿者的背部和面部皮肤定殖的影响。

[0322] 在第一组中,志愿者 ($n = 4$) 连续 30 天一天两次服用由以下制成的制剂(限制定义 5):由静止期中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞的 10 小时培养物获得的中性上清和构成本发明人财产的其它乳酸菌培养物(呈现抗尿素分解细菌活性)的上清的混合物,并与 α -酮戊二酸钙或 α -酮戊二酸钠或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,与其它 α -酮酸盐一起,以软膏或湿敷的形式施用。

[0323] 第二组志愿者 ($n = 4$) 连续 30 天一天两次接受由以下制成的制剂(限制定义 6):表 1-4 中提到的罗伊氏乳杆菌 DAN080 和其它乳酸菌(呈现抗尿素分解细菌活性)的细胞,以软膏或湿敷的形式与 α -酮戊二酸钙或 α -酮戊二酸钠或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,与其它 α -酮酸盐组合。

[0324] 第三组志愿者 ($n = 4$) 连续 30 天一天两次施用由以下制成的制剂(缩小定义 7):罗伊氏乳杆菌 DAN080 和构成本发明人财产的其它乳酸菌(呈现抗尿素分解细菌活性)的细胞,与由静止期中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 的 10 小时培养物获得的中性上清和构成本发明人财产的其它乳酸菌(呈现抗尿素分解细菌活性)的培养物的上清的混合物组合,和 α -酮戊二酸钙或 α -酮戊二酸钠或壳聚糖 α -酮戊二酸盐,或其它,与其它 α -酮酸盐组合,以软膏或湿敷的形式施用。

[0325] 在该研究的过程中,在所有的志愿者中,观察到发生寻常痤疮的感染位点的治愈。在任何志愿者中均未形成新的痤疮病灶。在 15 天的观察过程中,在制剂的施用终止之后,没有观察到再次感染。

[0326] 表 8. 在感染的志愿者的背部和面部的皮肤中痤疮丙酸杆菌的存在(第一-三组)。

[0327]

皮肤	先前治疗之后痤疮丙酸杆菌的定殖		
	第一组	第二组	第三组
背部	-	-	-
面部	-	-	-

[0328] 意外地发现,所述制剂对尿素分解细菌的慢性、多孔裂缝状感染有效,包括脚、腋窝和腹股沟和表皮产物(如指甲、头发、蹄和角)的感染。所述制剂保护并减少以下形式的感染:脓疮和疖子、以及须疮、婴儿的剥脱性皮炎、丹毒、传染性脓疱、带状疱疹、毛囊炎、寻常痤疮、由痤疮丙酸杆菌引起难于治疗的红癣、手术和烧伤的感染和褥疮。由于其减少皮肤表面和皮肤产物的定殖的活性,由皮肤的 pH 的改变引起的难闻的气味和尿素分解细菌的恶臭的胞外代谢物在其表面上的存在变得被消除了。

[0329] 构成本发明人的财产的乳酸菌在 37°C 的温度、在微需氧条件下容易在液体或固体培养基 MRS (de Man Rogosa Sharpe) 上培养 24 小时。上述菌株显示其可被认为是有利于胃肠道定殖的特性。它们具有结合基质蛋白(特别是胶原蛋白和纤连蛋白)的能力,其有助于粘附至肠的上皮。这些细菌释放蛋白酶,所述蛋白酶导致牛奶蛋白的分解和牛奶中所含的糖的发酵,其促进微生物进入营养基质。此外,对于它们中的一些菌,菊糖可以作为碳源。因此,发酵这种难消化的果聚糖的同时,不管对尿素分解细菌偏离的其它生化活性,所述细菌参与局部肠道微生物群的调节。所有菌株在含有 20% 牛胆汁的培养基中存活一小时,在酸性条件下,在 pH 2.5 存活 2 小时,这意味着在口服给药之后它们可以完整地通过胃和小肠进入大肠。它们不对抗生素和化疗剂产生耐药性到它们会被取消作为可能定居在人类和动物胃肠道的微生物资格的程度。

[0330] 可以确认下面的细菌显示针对胃肠道、尿道、体表和呼吸系统的尿素分解病原体的活性:

[0331] - 罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌,其通过它们的胞外代谢产物对幽门螺旋杆菌和胃肠道的其它病原体具有杀菌作用(图 1)。

[0332] - 构成本发明人的财产的其它乳酸菌,其在它们的生长过程中保持将 α -酮戊二酸盐释放至环境中作为它们的代谢物之一的能力。反过来, α -酮戊二酸盐以合适的浓度(30mM)局部作用水解环境中存在的尿素,从而干扰其它细菌——尿素分解病原体的定殖过程,所述尿素分解病原体的生长依赖于微环境的 pH 并且不可能在例如胃的酸性 pH 中进行。。。。。

[0333] 在胃粘膜的区域内,这个现象不仅涵盖这样的细菌如幽门螺旋杆菌,而且涵盖奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、除头葡萄球菌 (*Staphylococcus capitis urealiticum*) (参见:Osaki T et al. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol.* 2008 ;57 :814-9 ;Brandi G et al. Urease-positive bacteria other than *Helicobacter pylori* in human gastric juice and mucosa. *Am J Gastroenterol.* 2006 ;101 (8) :1756-61), 其采用它们自身的脲酶用于尿素分解,从而给它们自己提供居住微生态。

[0334] 实施例 4. 体内活性测试

[0335] a) 溶菌酶活性:四十八只 2 个月大体重 140-275g 的 SD 雌性大鼠用与动物的年龄足够匹配的饲料喂养,并随意饮水。实验前三天,所有动物在颈静脉插入导管。这项研究通过从大鼠取血样开始。随后,所述动物通过胃管胃内给药的方式施用 0.5ml 以下制剂:细菌

罗伊氏乳杆菌 DAN080——活细胞和死细胞的悬液、壳聚糖 AKG 悬液、盐水。第一次取血之后一百二十分钟从动物取第二次血样。从第二天开始,大鼠随后连续 7 天每天一次接受同样的制剂。十二只大鼠以在生理盐水中悬浮 10^6 个细胞的剂量接受活细菌。以下 12 只动物也接受连续 8 天,每只 10^6 个罗伊氏乳杆菌 DAN080 热灭活的细胞。对于接下来 12 只大鼠,施用壳聚糖 AKG 悬液,并且第四组动物 ($n = 12$) 胃内给药以每次 0.5ml 生理盐水连续施用 8 天。在胃内给药施用最后一剂制剂之后第 8 天,从动物的颈静脉取血。对于同一天的第二次,在第一次取血之后 120 分钟从所有大鼠取血。

[0336] 血液中的溶菌酶活性的确定是在指定密度的溶壁微球菌细胞悬液的存在下、基于吸光度值进行的,并且将该值与由 PBS 中的晶体溶菌酶 (Sigma-Aldrich) 和指定密度的溶壁微球菌细胞悬液的一些标准稀释物所绘制的吸光度曲线比较。孵育 15、30、45、60 分钟之后,于 540nm 波长测量吸光度。

[0337] 结果:观察到活的和热灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细菌和壳聚糖 AKG 对大鼠免疫系统的刺激作用。图 5 显示了所述结果。

[0338] b) 罗伊氏乳杆菌 DAN080 的代谢物对猪的肠神经系统的神经元的作用:从体重 15kg 的 3-6 周大仔猪 ($n = 5$) 的小肠中段分离肠神经系统的神经元。用胰蛋白酶、2 型胶原酶和蛋白酶处理组织以获得神经元培养物。将所述神经元培养物平板接种于用于神经元的 Neurobasal A 培养基,用胎牛血清添加剂富集,或在罗伊氏乳杆菌 DAN080 的中和过的代谢物的存在下,以及两倍或四倍浓缩的代谢物样品。所述培养物在 37°C 、5% CO_2 的气氛下维持 6 天。

[0339] 结果:孵育 6 天后,在对照样品(在培养基中培养的神经元)中观察到 $53.7 \pm 2.7\%$ 的细胞存活。考虑到这一事实,相对专门在富集的 Neurobasal A 培养基中培养的神经元,确定在罗伊氏乳杆菌 DAN080 的代谢物存在下存活的神经元的指数。分离自小鼠胃的罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞通过它们的代谢物并未在统计学上显著降低分离自仔猪神经系统的神经元的存活率。罗伊氏乳杆菌 DAN080 细胞不会引起胃肠道的神经(结构)的退化。图 5 显示了所述结果。

[0340] 实施例 5. 体内溶菌酶活性测试

[0341] 四十八只 2 个月大体重 140-275g 的 SD 雌性大鼠用与动物的年龄足够匹配的饲料喂养,并随意饮水。实验前三天,所有动物在颈静脉插入导管。这项研究通过从大鼠取血样开始。随后,所述动物通过胃管胃内给药的方式施用 0.5ml 以下制剂:细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080——活细胞和死细胞的悬液、壳聚糖 AKG 悬液、盐水。第一次取血之后一百二十分钟从动物取第二次血样。从第二天开始,大鼠随后连续 7 天每天一次接受同样的制剂。十二只大鼠以在生理盐水中悬浮 10^6 个细胞的剂量接受活细菌。以下 12 只动物也接受连续 8 天,每只 10^6 个罗伊氏乳杆菌 DAN080 热灭活的细胞。对于接下来 12 只大鼠,施用壳聚糖 AKG 悬液,并且第四组动物 ($n = 12$) 胃内给药以每次 0.5ml 生理盐水连续施用 8 天。在第 8 天胃内给药施用最后一剂制剂之后,从动物的颈静脉取血。对于同一天的第二次,在第一次取血之后 120 分钟从所有大鼠取血。

[0342] 血液中的溶菌酶活性的确定是在指定密度的溶壁微球菌细胞悬液的存在下、基于吸光度值进行的,并且将该值与由 PBS 中的晶体溶菌酶 (Sigma-Aldrich) 和指定密度的溶壁微球菌细胞悬液的一些标准稀释物所绘制的吸光度曲线比较。孵育 15、30、45、60 分钟之

后,于 540nm 波长测量吸光度。

[0343] 结果:观察到活的和热灭活的细菌罗伊氏乳杆菌 DAN080 和壳聚糖 AKG 对大鼠免疫系统的刺激作用。图 5 显示了所述结果。

[0344] 实施例 6.

[0345] 采用表面纳米工程化的方法加工没有覆盖任何保护性涂层的、由 PVC(例如 Galmed PL) 制成的市售的导管。

[0346] 在基于壳聚糖 [盐] 预先形成中间层之后,通过在室温下浸在溶液中并空气干燥的已知方法沉积由 PVP 制成的纳米涂层,并任选地通过短期暴露于 UV 辐射和 / 或超声波进行交联。根据导管的预定用途,通过重复施加第一中间涂层来调节中间层的厚度。

[0347] 基于壳聚糖盐的中间涂层用选自涵盖以下组的活性物质富集:涂敷有保护性涂层的纳米粉末形式的罗伊氏乳杆菌 DAN080 热灭活培养物、壳聚糖 α -酮戊二酸盐、小的二羧酸、三氯生、银纳米颗粒和维生素 D 和 E。

[0348] 表面纳米工程化允许制备厚度大约为 50,000 个 C-C 键 (10nm) 的中间涂层。

[0349] 在生理 pH 的环境下,指定厚度的 PVP 聚合物纳米涂层在使用过程中完全溶解。PVP 层的逐步溶解逐渐显示出中间涂层,通过扩散活性物质从中逐渐释放。单个中间涂层保持其持续时间长达一周,阻止生物膜的形成、过敏的发展和炎症状态。

[0350] 在经受尿道导管插入的患者的身体中导管存在 7 天之后,在健康志愿者中没有观察到不希望的应答和反应。

[0351] 关于涂敷有水凝胶纳米涂层的导管的本研究首次显示了在降低 CAUTI 发生频率的可能性方面有希望的结果。

[0352] 甚至当导管由非侵入性材料制备时,这些材料被免疫系统的细胞识别为异物。根据本发明的具有目前披露的外纳米涂层的导管,在与患者的上皮细胞接触后,不会对上皮产生任何细胞毒作用。在本研究中所使用的纳米颗粒不会被宿主细胞识别为危险。当评估该新材料的潜在生物学作用时,包括将该抗菌纳米涂层暴露给肝脏组织,分析显示肝细胞对于导管插入到门静脉的集水区 (catchment area) 缺乏反应。针对所使用的材料提出了导管的相当多的改进。由于该天然抗菌涂层,涂敷有水凝胶的新一代导管特征在于较低的接触摩擦,并且以与传统抗生素疗法类似的方式减少了尿道炎症过程和感染。与传导导管相比,所述导管更便宜并且对患者更有利。

[0353] 实施例 7.

[0354] 根据本发明的试剂盒包括如上述实施例 6 中所述的导管、有注射用水 (无菌) 的小瓶和用于口服施用的应激降低剂,所述应激降低剂是以 10^6 个细胞的剂量的活的或热灭活的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物的形式,用于至少在导管插入期间进行日常施用。根据患者的状况,主治医师还可以要求在进行导管插入期间施用应激降低剂。建议应激降低剂的口服施用在导管插入之前 8 小时,或者在导管插入之前 15min 直接施用进入体腔。

[0355] 实施例 8.

[0356] 罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物的局部应用已经被测试用于浅表皮肤和烧伤伤口感染的预防。涉及罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物 (固定自壳聚糖钙或藻酸钙的膜) 的用途的研究调查了在大鼠烧伤伤口模型中这些膜的抗菌活性。一个多重耐药临床分离物、脲酶阳性绿脓杆菌作为指示菌株。掺入罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物 (平衡至 10^8 CFU/

mL 的细胞浓度) 的膜导致在该烧伤伤口模型中铜绿假单胞菌有 5-6log(10) 的降低。含有固定在冷冻干燥的壳聚糖钙或藻酸钙膜中的罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物的创伤敷料在 4℃ 下贮存六个月仍保持活性。这表明罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物和 / 或其副产物对铜绿假单胞菌烧伤感染的局部治疗表现出潜在的治疗活性。

[0357] (Rumbaugh KP et al. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 1999 ;67 :5854-5862) 的烧伤小鼠模型用于该研究中。将背部剃毛的麻醉小鼠置于温度 90℃ 的水浴中 10s 以烧伤颈部表面。随机选择的一组小鼠 (B 组) 在烧伤下直接注射 PBS, 并且第二组用 100u1 的 200-300CFU 铜绿假单胞菌感染 (BPs 组), 在用罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物初始感染后的第 3、4、5、7 和 9 天, 第二组的一半小鼠用罗伊氏乳杆菌 DAN080 菌株培养物处理 (用 100u1 在 MRS 肉汤中生长的 10^5 个 DAN080 细胞平衡) (BPs+DNA080 组)。在初始感染后的第 5、10、15 天, 处死小鼠并收集和加工来自烧伤区域的血样、皮肤、结缔组织和肌肉。组织学研究表明, 在第 5 天, 形成了含有炎症浸润的水肿、血管充血和坏死区域, 在 BPs 和 BPs+DAN080 组中的这些浸润比 B 组中更大。在第 10 天, B 组中的创伤修复过程显著比其它组高级。在 BPs+DAN080 组中, 坏死区域比 BPs 组的小鼠更小并且炎症浸润更加分散。在第 15 天, 与 BPs 组中的 38% 相比, BPs+DAN080 组中 62% 的小鼠显示细菌的清除。

[0001]

序列表

- <110> Danuta KRUSZEWSKA
- <120> 在人类和兽医的预防和医疗中有用的、
包含罗伊氏乳杆菌DAN080的纳米产品及其医疗用途
- <130> I/181800.WO
- <140> PCT/PL2012/000039
- <141> 2012-05-29
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 659
- <212> DNA
- <213> 乳杆菌属的种 (Lactobacillus spp.)
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| tggaacaga tgctaatacc gcataacaac aaaagccaca tggcttttgt | |
| ttgaaagatg gctttagcta tcactctggg atggacctgc ggtgcattag | 100 |
| ctagttggta aggtaacggc ttaccaaggc gatgatgcat agccgagttg | |
| agagactgat cggccacaat ggaactgaga cacggtccat actcctacgg | 200 |
| gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg gcgcaagcct gatggagcaa | |
| caccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc gtaaagctct gttgttgag | 300 |
| aagaacgtgc gtgagagtaa ctgttcacgc agtgacggta tccaaccaga | |
| aagtcacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatac taggtggcaa | 400 |
| gcgttatccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gttgcttagg | |
| tctgatgtga aagccttcgg cttaacgaa gaagtgcac ggaaccggg | 500 |
| ccacttgagt gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtggaat | |
| gcgtagatat atggaagaac accagtggcg aaggcggctg tctggtctgc | 600 |
| aactgacgct gaggctcga agcatgggta gcgaacagga ttagataccc | |
| tggtagtcc | 659 |
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> 乳杆菌属的种
- <400> 2
- | | |
|-------------------------|----|
| tggaacaga tgctaatacc gc | 22 |
|-------------------------|----|
- 参考文献: 左侧引物 (属特异性): LactoF (Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3128-36).
- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 乳杆菌属的种
- <400> 3
- | | |
|-----------------------|----|
| attagatacc ctggtagtcc | 20 |
|-----------------------|----|
- 参考文献: 右侧引物 806F (Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. J Clin Microbiol. 1998; 36(10):2810-6).

[0002]

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 乳杆菌属的种
 <400> 4
 agcagtaggg aatcttcca

19

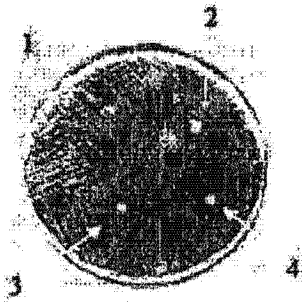
<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 乳杆菌属的种
 <400> 5
 attyacccgc tacacatg

18

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 乳杆菌属的种
 <400> 6
 acaatggacg aaagtctgag tg

22

参考文献: 引物3-5 (seg.4-6): Walter, J., Hertel, Ch.,
 Tannock GW., Lis CM., Munro K., Hammes W.P. (2001)
 Detection of Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc
 i Weisella species in human feces by using group
 specific PCR primers and denaturing gradient gel
 elektrophoresis. Appl. Environ. Microb. 67, 2578-2585



罗伊氏乳杆菌DNA080胞外代谢物的抗幽门螺旋杆菌活性
1- 非活性LAB代谢物
2- 非活性MRS肉汤
3和4- 由罗伊氏乳杆菌DNA080的干燥上清的作用引起的幽门螺旋杆菌菌株17874的抑制区

图 1

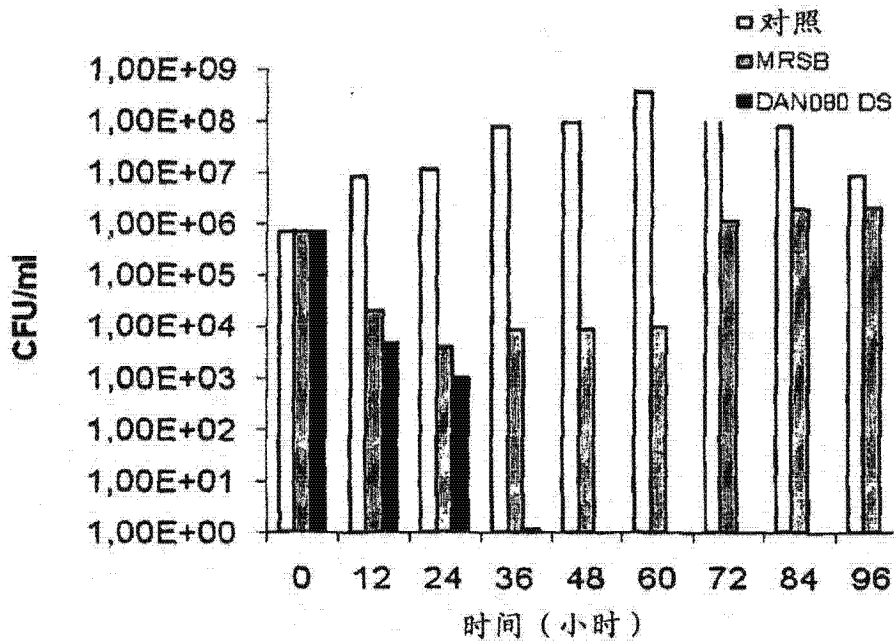


图 2

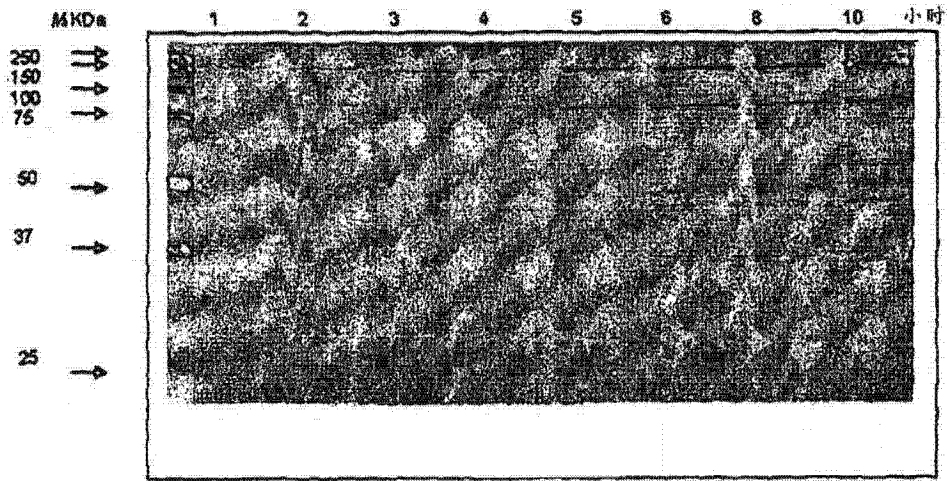


图 3

条带	分子量	1	2	3	4	5	6	8	10
1.	150	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	141				+	+	+	+	+
3.	115					+	+	+	+
4.	95			+	+	+	+	+	+
5.	90								+
6.	86	+	+	+	+	+	+	+	+
7.	83		+	+	+	+	+	+	+
8.	77				+	+	+	+	+
9.	71						+	+	+
10.	63								+
11.	59						+	+	+
12.	56						+	+	+
13.	49			+	+	+	+	+	+
14.	46		+	+	+	+	+	+	+
15.	43								+
16.	39								+
17.	34					+	+	+	+
18.	32								+
19.	30								+
20.	22								+

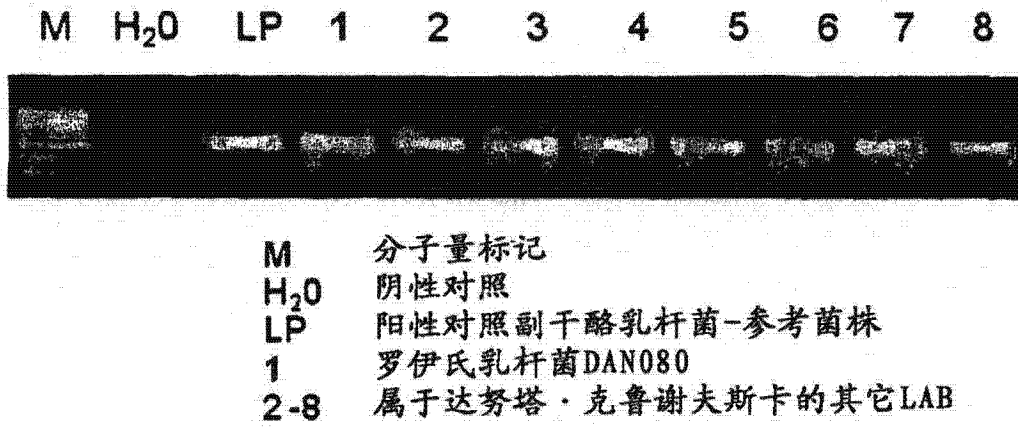


图 4

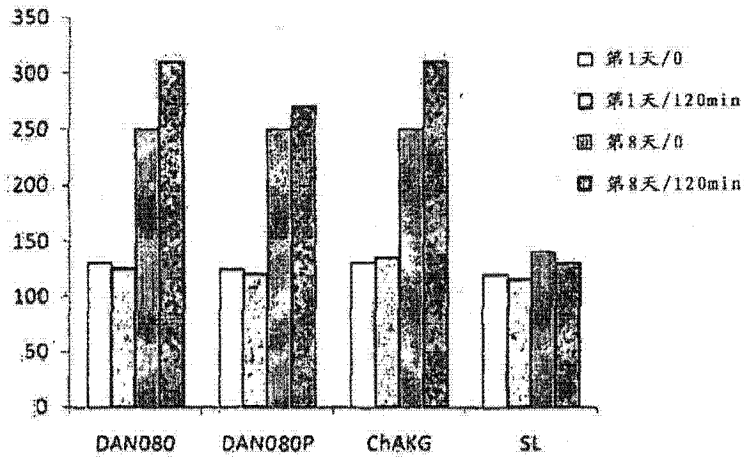


图 5

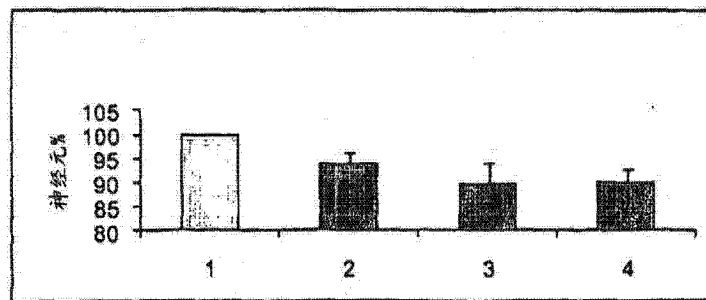


图 6

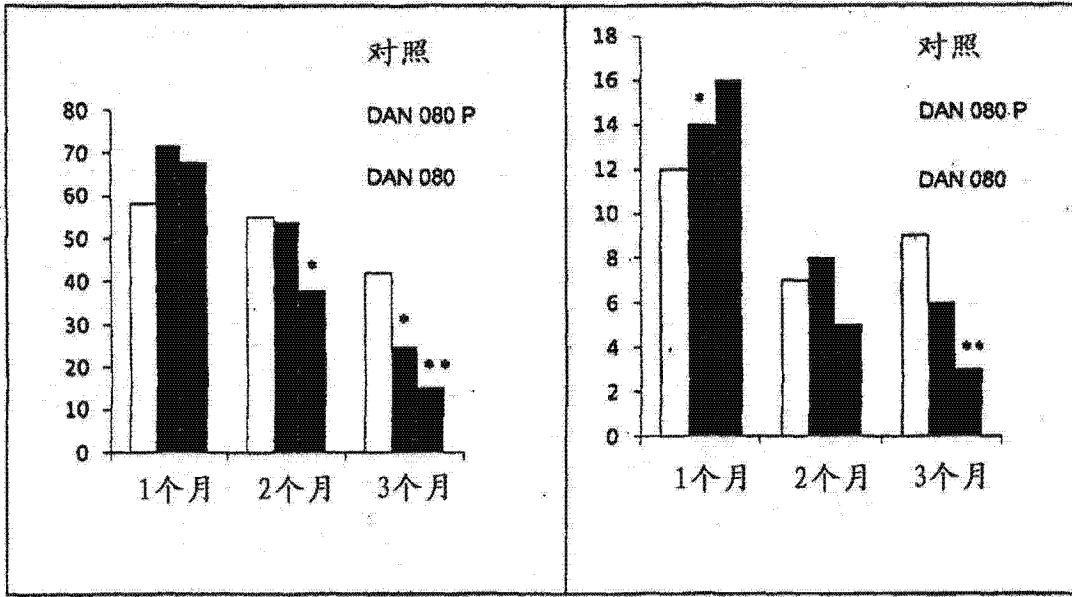


图 7a

图 7b

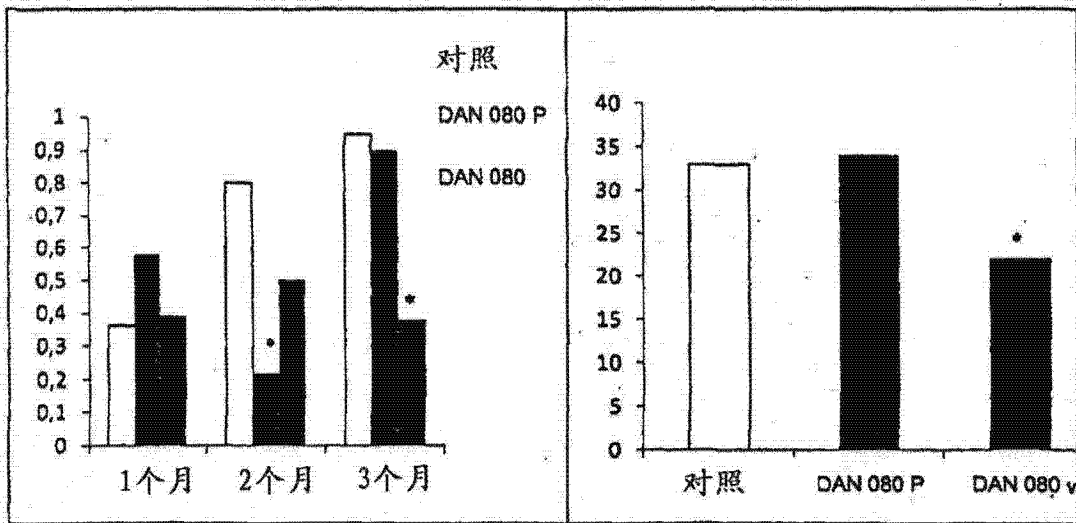


图 7c

图 7d

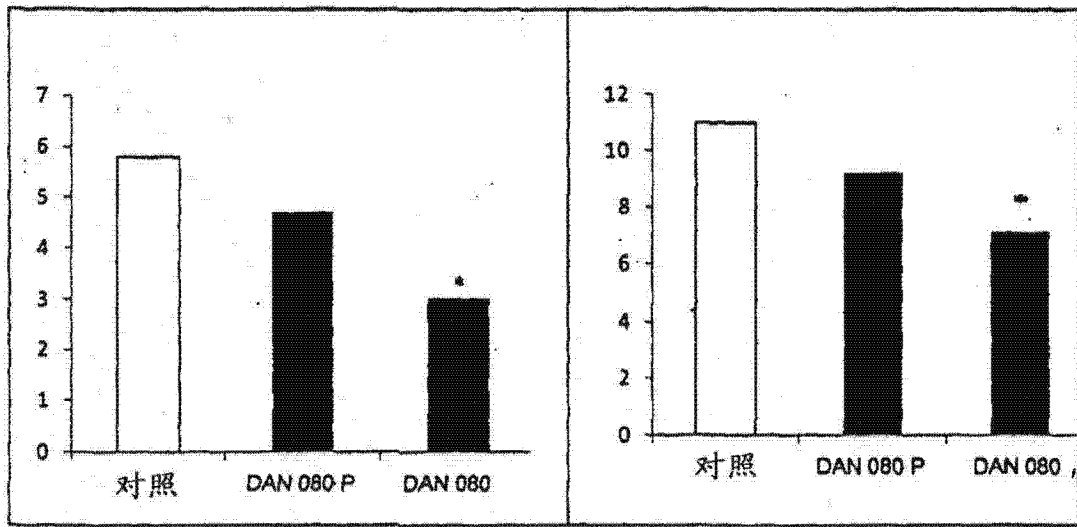


图 7e

图 7f