



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113544255 A

(43) 申请公布日 2021.10.22

(21) 申请号 201980079368.2

(22) 申请日 2019.12.02

(30) 优先权数据

P201831166 2018.11.30 ES

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/ES2019/070821 2019.12.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/109646 ES 2020.06.04

(83) 生物保藏信息

DSM 32890 2018.10.09

(71) 申请人 西班牙高等科研理事会

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 Y·桑兹·赫兰兹

I·洛佩兹·阿尔梅拉

E·M·戈麦斯·德尔·普贾·维拉
努瓦

A·贝尼特斯-佩兹

M·罗曼尼·佩雷斯

(74) 专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所

(普通合伙) 33239

代理人 周积德

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/741 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

用于预防和治疗肥胖及其并发症的粪考拉
杆菌

(57) 摘要

本发明涉及菌株Phascolarctobacterium
faecium DSM 32890及其在调节食欲、和治疗和/
或预防超重或相关代谢和免疫学变化、特别是高
血糖、葡萄糖耐受不良、胰岛素抗性、血脂异常
(高甘油三酯血症、高胆固醇血症)、代谢综合征、
糖尿病和肠道和/或外周组织炎症中的用途。

1. 保藏号DSM 32890的Phascolarctobacterium faecium菌株。
2. 来源于根据权利要求1所述的菌株的菌株。
3. 根据权利要求1或2所述的菌株,其中所述菌株是遗传修饰的突变体。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的菌株,其中所述菌株为活细胞形式或非活细胞形式。
5. 从根据权利要求1至4中任一项所述的菌株获得的细胞组分、代谢物、分泌分子或其任意组合。
6. 组合物,包含:根据权利要求1至4中任一项所述的菌株;或根据权利要求5所述的细胞组分、代谢物、分泌分子或其任意组合;或它们的任意组合。
7. 根据权利要求6所述的组合物,还包含至少一种生物活性成分。
8. 根据权利要求6或7所述的组合物,还包含除根据权利要求1至4中任一项所述的菌株以外的至少一种微生物。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述微生物是肠道细菌或乳酸菌。
10. 根据权利要求6至9中任一项所述的组合物,其中所述组合物是药物组合物。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述组合物另外包含至少一种药学上可接受的载体和/或赋形剂。
12. 根据权利要求10或11所述的组合物,其中所述组合物以适合其口服、舌下、鼻、鞘内、支气管、淋巴、直肠、透皮、吸入或肠胃外给药的形式存在。
13. 根据权利要求6至9中任一项所述的组合物,其中所述组合物是营养组合物。
14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述营养组合物为食品、补充剂、保健品、益生菌或合生元。
15. 根据权利要求14所述的组合物,其中所述食物选自乳制品、植物产品、肉制品、零食、巧克力、饮料或婴儿食品。
16. 根据权利要求6至15中任一项所述的组合物,其中所述组合物具有每克或毫升最终组合物 10^3 a至 10^{14} 个菌落形成单位(cfu)的菌株浓度。
17. 根据权利要求1至4中任一项所述的菌株、或根据权利要求5所述的细胞成分、代谢物、分泌分子或其任意组合、或根据权利要求6至16中任一项所述的组合物作为药物的用途。
18. 根据权利要求1至4中任一项所述的菌株、根据权利要求5所述的细胞成分、代谢物、分泌分子或其任意组合、或根据权利要求6至16中任一项所述的组合物在用于预防和/或治疗超重、和/或肥胖症、或与它们相关的疾病中的用途。
19. 根据权利要求18所述的菌株、细胞成分、代谢物、分泌分子、组合物或其任意组合,其中与超重和/或肥胖相关的疾病选自心血管疾病、代谢综合征、糖尿病、高血糖症、胰岛素抗性、癌症、高血压、血脂异常、低血脂、半乳糖血症、苯丙酮尿症、谷甾醇血症、甲状腺功能亢进症和甲状腺功能减退症。
20. 根据权利要求1至4中任一项所述的菌株、根据权利要求5所述的细胞成分、代谢物、分泌分子或其任意组合、或根据权利要求13至16中任一项所述的组合物用于调节食欲的非治疗用途。

用于预防和治疗肥胖及其并发症的粪考拉杆菌

技术领域

[0001] 本发明属于制药和食品领域。具体地,本发明涉及保藏号DSM 32890的菌株、其细胞成分、代谢物和分泌分子、其组合物、和/或其任何组合。它特别涉及菌株*P.faecium*(粪考拉杆菌)DSM 32890在用于调节食欲、和治疗和/或预防超重和/或肥胖症以及相关代谢和免疫学变化、特别是高血糖症、葡萄糖耐受不良、胰岛素抗性、血脂异常(高甘油三酯血症、高胆固醇血症)、代谢综合征、糖尿病、肝脂肪变性、心血管疾病和肠道和/或外周组织炎症中的用途。

背景技术

[0002] 肥胖症是主要的公共卫生问题之一,因为其患病率高、并发症多,大大降低了生活质量并增加了死亡风险。这些合并症包括例如血脂异常、代谢综合征、糖尿病、心血管疾病、动脉粥样硬化、肝脂肪变性或脂肪肝、高血压以及饮食习惯的改变。

[0003] 肥胖是食物摄入和能量消耗之间长期不平衡的结果,导致体重增加和体内脂肪增加。能量平衡由长期和短期控制的神经内分泌系统调节。长期控制的关键激素是胰岛素和瘦素。胰岛素是葡萄糖摄取和调节脂肪组织正常功能和甘油三酯积累的最重要激素。对胰岛素敏感的正常脂肪组织是通过刺激脂蛋白脂肪酶和抑制脂肪分解来储存脂肪以响应胰岛素和其他激素(瘦素)的地方。然而,与肥胖相关的脂肪组织中脂肪酸的过度积累会降低胰岛素敏感性,从而促进其他器官和组织(肝脏、肌肉等)中甘油三酯形式的游离脂肪酸的积累,并导致对瘦素的产生或敏感性发生变化以及促炎细胞因子的合成增加,这反过来又导致发生相关疾病(代谢综合征、糖尿病、心血管疾病等)的风险更高。瘦素是一种激素/脂肪因子,主要由脂肪组织合成,基于能量储备和对胰岛素的反应。瘦素调节能量稳态,作用于中枢和外周神经系统的水平,减少能量摄入并增加能量消耗。然而,在肥胖受试者中,瘦素的外周浓度异常高并且对其产生抵抗和功能缺失。短期控制系统包括肠道激素,这是控制每餐摄入量和不同组织能量代谢的关键。这些激素由肠内分泌细胞(EEC)响应营养物和营养代谢物而释放,这些激素和营养代谢物到达肠腔,在那里它们被特定受体(例如:G蛋白偶联受体)检测到。在这些激素中,值得注意的是I细胞分泌的胆囊收缩素(CCK),主要位于近端肠道,而L细胞分泌的胰高血糖素样肽1(GLP-1)和肽YY(PYY),主要存在于肠道的远端区域。一旦释放,肠道激素不仅对远端器官(肝脏、白色和棕色脂肪组织)产生直接影响,从而控制能量代谢,但它们也通过神经和内分泌途径通过肠-脑轴在新陈代谢和饮食习惯的中央控制中充当中介。在提到的激素中,值得一提的是GLP-1,它在下丘脑水平抑制食欲并产生饱腹感,从而减少食物摄入;通过诱导胰腺中的胰岛素分泌和减少胰高血糖素合成来改善葡萄糖代谢;增加能量消耗;有助于减轻体重、减轻肝脏脂肪变性以及降低患糖尿病和心血管疾病的风险。PYY比GLP-1更稳定,同样通过诱导饱腹感起作用,从而有助于减少摄入量和体重。它还通过激活阿黑皮素原(POMC)和抑制中枢神经系统中的神经肽Y(NPY)来减少过度的食物消耗。然而,过量食用高能量食物会改变肠内分泌激素的合成及其功能,导致摄入增加和外周能量代谢发生变化,加重肥胖表型。

[0004] 肥胖通常与代谢并发症相关的低度慢性炎症状态有关,例如2型糖尿病、心血管疾病和脂肪肝。白色脂肪组织的炎症被认为是这些代谢变化的原因,其特征是免疫系统的促炎细胞普遍增加,如M1巨噬细胞(经典激活)和Th1淋巴细胞产生IFN γ 、T CD8⁺和B细胞。相反,观察到抗炎M2巨噬细胞、Th2淋巴细胞、2型先天淋巴细胞(ILC2)以及通常会控制炎症的调节性T细胞(Treg)减少。脂肪组织一直被认为是导致肥胖症代谢炎症和功能障碍的主要因素,但现在已知这种现象会影响多个器官,包括大脑、肌肉、肝脏、胰腺和肠道。最近的证据表明,与肠道相关的免疫系统和肠道中占主导地位的微生物,由于暴露于不健康的高热量饮食,导致肥胖相关的代谢炎症,肠道可能是代谢炎症的起源。

[0005] 在与肥胖相关的因素中,生活方式的改变包括增加高能量食物的摄入和减少体力活动,因此能量消耗减少被认为是肥胖流行的主要原因。基于低热量饮食和增加体力活动的预防和治疗策略是控制肥胖及其并发症的首选;然而,它们的长期效力往往有限。为此,需要替代生活方式改变的辅助佐剂以提高其有效性。此外,药理学策略,包括例如基于GLP-1受体激动剂的那些,都有副作用,部分原因是它们在用于治疗慢性疾病时会持续消耗。此外,药物疗法的有效性是有限的,因为它们基于单一的治疗目标,没有解决导致肥胖及其并发症的复杂机制。

[0006] 在人类的观察性研究中,肥胖及其合并症(2型糖尿病、血脂异常、心血管疾病、脂肪肝、代谢综合征等)与肠道微生物群的组成和功能的变化有关,这表明肠道微生物群可以在这些疾病中发挥重要作用。通过将疾病或健康个体的微生物群转移到新受试者并观察后者获得了供体的表型,这一假设得到了证实。这些实验证实,部分由于高热量饮食导致的微生物群改变导致肥胖及其代谢并发症的发生。这一证据导致针对肠道生态系统的干预策略的发展,例如使用益生菌,作为改善肥胖症治疗和预防的替代方法。由于它们在食品中的安全使用历史,最初开发的产品基于属于乳酸杆菌属和双歧杆菌属的细菌菌株。尽管如此,目前已知在人类肠道中天然存在的更高比例的其他细菌可能是更有效的替代品。与药理学策略不同,使用共生肠道细菌的优势在于能够通过各种作用机制发挥作用,调节内分泌和免疫系统,并且先验地不会造成不良影响。关于Phascolarctobacterium属可能的有益特性,一项已发表的大鼠研究表明,用于糖尿病的药物(小檗碱和二甲双胍)改变了微生物群并导致不同细菌群(芽孢杆菌、拟杆菌属、Blautia、Butyricicoccus和Phascolarctobacterium)的增加;这导致推测微生物群的这种整体改变可能是抗糖尿病药物作用模式的一部分,但没有提供直接证据。在一项对喂食高脂肪饮食和是否进行体育锻炼的大鼠进行的研究中,发现高脂肪饮食与厚壁菌门的减少和跑动能力降低有关,并且管状杆菌减少;这导致人们猜测,这一微生物群的变化可能是体育锻炼对脂肪肝产生积极影响的部分原因;然而,没有给出这方面的直接证据。没有先前的文件证明了嗜酸杆菌属的特定物种或菌株对本发明的变化和病理目的的有益作用。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及保藏号为DSM 32890的菌株、其细胞成分、代谢物和分泌分子、其组合物和/或其任何组合,以及用于调节食欲和治疗和/或预防超重和/或肥胖以及相关的代谢和免疫变化;具体而言,高血糖、葡萄糖耐受不良、胰岛素抵抗、血脂异常(高甘油三酯血症、高胆固醇血症)、代谢综合征、2型和妊娠糖尿病、脂肪肝变性和心血管疾病,以及肠道和/或外周组织炎症,以及肠道微生物群的相关变化。

[0009] 该专利的细菌对象以及衍生产品的主要有益效果之一是其减少炎症的细胞和体液介质的能力、炎症与肥胖相关并导致代谢功能障碍(例如胰岛素抵抗、代谢综合征和2型糖尿病)。

[0010] 如实施例所述,体外试验(实施例2)证明细菌在外周血单核细胞(PBMC)中诱导抗炎反应,因为它增加了抗炎细胞因子IL-4的产生,相对于促炎细胞因子IFN γ ,并就脂多糖LPS诱导的作用而言,降低经典单核细胞(CD14⁺⁺CD16⁻)的水平,脂多糖LPS是肥胖症炎症的诱导剂(表1)。与其他肠道细菌相比,这种抗炎作用可以在更大程度上有助于改善由肥胖的促炎状态引起的胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良(实施例2)。

[0011] 本发明的基本方面是粪便假单胞菌减少炎症和保护肠粘膜,减少肥胖相关的全身性炎症和体内代谢并发症的风险的能力。具体而言,在饮食诱导的肥胖模型(实施例3)中,粪症原虫减少了肥胖相关的肠道炎症,作用于先天免疫系统和后天免疫系统。例如,这种细菌通过减少上皮中第1组先天淋巴细胞(ILC1)的数量起作用,这些细胞在肥胖个体中增加,并通过产生IFN γ 促进肠道炎症(实施例3;图4a)。这些细胞产生的IFN γ 触发巨噬细胞向M1型(促炎表型)的巨噬细胞极化,后者与肥胖相关的炎症密切相关;然而,该细菌能够通过增加M2型巨噬细胞的水平来逆转饮食的影响,从而诱导抗炎作用(实施例3;图4b),其特征在肠固有层中M1/M2细胞比率(实施例3;图4c)的正常化。此外,粪症原虫减少与肥胖相关的炎症,诱导Th2样反应和Treg细胞产生(实施例3;分别为图4d和4e)。这种反应已经通过测量Gata3作为介导Th2反应的转录因子的水平和具有标记物CD25和FoxP3的调节性T细胞的水平来证明。Gata3的增加也表明ILC2细胞群可能增加,其特征是产生Th2型细胞因子,其在肥胖背景下具有抗炎作用。Gata3转录因子除了对造血干细胞(HSC)的ILC2发育必不可少之外,还在粘膜相关ILC3的子集中丰富。固有层中此类细胞(ILC3)的增加也有助于增加对肠粘膜和屏障功能的保护,这在肥胖时会发生改变,并可能导致全身炎症。*P. faecium*还降低上皮内淋巴细胞(IEL)水平并使自然/诱导的IEL比率正常化(图5),在肥胖时发生改变。IEL位于肠道上皮细胞之间,因此,它们在控制上皮完整性方面发挥着重要作用,并且它们表型的改变可导致肠道通透性的变化和肥胖症特征性炎症基调的激活。

[0012] 该专利的细菌对象还具有调节参与葡萄糖代谢和食欲调节的胃肠激素的产生的能力,例如GLP-1和PYY。*P. faecium*恢复小肠中PYY和GLP-1前体的表达,这在高热量饮食诱导的肥胖小鼠中发生了变化。这些激素通过促进饱腹感信号传递到参与控制摄入的大脑区域,并改善参与能量代谢的外周组织的功能(例如胰腺中胰岛素的分泌和脂肪组织中的能量消耗),直接负责恢复葡萄糖稳态并减少体重和食物摄入。这些影响将减少食物摄入以及脂质和葡萄糖代谢的变化,这些变化通常与肥胖有关,并且构成代谢综合征、2型和妊娠糖尿病以及心血管疾病发展之前的风险因素。

[0013] 因此,在一个方面,本发明涉及保藏号为DSM 32890的*Phascolarctobacterium faecium*,下文称为“本发明菌株”或“菌株DSM 32890”或“*P. faecium* DSM 32890菌株”。

[0014] *P. faecium*是从人类粪便中分离出来的。该菌株于2018年10月9日由西班牙国家研究委员会(CSIC)根据布达佩斯条约在Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture作为国际保藏机构保藏(莱布尼茨研究所DSMZ-德国微生物和细胞培养物保藏中心,Inhoffenstraße 7B,38124德国不伦瑞克)。指定的保藏编号为DSM 32890。

[0015] 根据NCBI数据库,本发明菌株的科学分类为Domain:Bacterium;门:厚壁菌门;类

别: Negativicutes; 订单: 酸氨基球菌; 科: 酸氨基球菌科; 属: 嗜酸杆菌; 种类: faecium。

[0016] 它是一种在健康人肠道中大量发现的细菌, 是一种革兰氏阴性厌氧菌, 呈杆菌形, 不形成孢子且不动; 它通常形成短杆菌, 但它的大小会因生长阶段而异, 并且可以延长。菌落是透明的, 质地不一致。它在严格的厌氧环境下在37°C下生长。细菌需要琥珀酸作为碳源才能生长并从该底物产生丙酸。

[0017] 本发明的另一方面涉及源自菌株P. faecium DSM 32890的菌株, 其中所述菌株保持或提高本发明通篇所述的能力。衍生的微生物可以通过本领域已知的诱变方法自然地或有意地产生, 例如但不限于原始微生物在诱变剂或应激剂存在下的生长, 或通过旨在修改特定基因的基因工程。根据一个优选的实施方案, 源自菌株P. faecium DSM 32890的菌株是遗传修饰的突变体。术语“突变菌株”或“衍生菌株”可以互换使用。

[0018] 可以以发挥所描述的效果的任何方式使用P. faecium DSM 32890菌株或其任何突变体或衍生物。根据本发明的一个优选实施方案, 菌株P. faecium DSM 32890为活细胞形式(可培养或不可培养), 或根据本发明的另一个优选实施方案, 该菌株以非活细胞的形式存在(通过本领域已知的任何技术例如但不限于加热、冷冻或紫外线辐射灭活的“死”细胞)。

[0019] 本发明的另一方面涉及从本发明的菌株或从包含本发明的至少一种菌株的微生物的组合获得的细胞组分、代谢物、分泌分子或其任何组合。

[0020] 细菌的细胞成分可包括细胞壁成分(例如但不限于肽聚糖)、核酸、膜成分或其他成分, 例如蛋白质、脂质和碳水化合物及其组合, 例如脂蛋白、糖脂或糖蛋白。代谢物包括细菌在其生长过程中, 其在工艺过程中的使用(例如但不限于食品或药品制造过程)、产品存储过程中或胃肠道运输过程中由于其代谢活性而产生或修饰的任何分子。这些代谢物的实例是但不限于有机和无机酸、蛋白质、肽、氨基酸、酶、脂质、碳水化合物、脂蛋白、糖脂、糖蛋白、维生素、盐、金属或核酸。

[0021] 分泌的分子包括细菌在其生长、其在技术过程中的使用(例如, 食品或药物制造)、产品储存或胃肠道转运过程中输出或释放到外部的任何分子。这些分子的例子是但不限于有机和无机酸、蛋白质、肽、氨基酸、酶、脂质、碳水化合物、脂蛋白、糖脂、糖蛋白、维生素、盐、金属或核酸。

[0022] 本发明的另一方面涉及一种组合物, 在下文中称为“本发明的组合物”, 其包含本发明的菌株和/或本发明的菌株的细胞组分、代谢物、分泌分子或其任何组合。

[0023] 以一般方式定义的组合物是至少由任何浓度的本发明菌株组成的一组组分; 或本发明菌株的细胞成分、代谢物、分泌分子中的至少一种或其任何组合; 或其组合。

[0024] 在优选的实施方案中, 本发明的组合物具有每克或毫升最终组合物 10^3 至 10^{14} 个菌落形成单位(cfu)的本发明菌株的浓度。

[0025] 在另一个特定的实施方案中, 本发明的组合物可以进一步包含与本发明的菌株和/或其细胞组分、代谢物或分泌的分子或其任何组合不同的至少另一种额外的微生物。例如, 但不限于, 可以是所述组合物的一部分的额外微生物选自以下组中的至少一个:

[0026] -至少一种肠道、食物或环境来源的乳酸菌或双歧杆菌。乳酸菌选自但不限于双歧杆菌属、乳杆菌属、乳球菌属、肠球菌属、丙酸杆菌属、明串珠菌属、魏氏菌属、片球菌属或链球菌属的细菌;

[0027] -拟杆菌属或均匀拟杆菌属的另一物种的至少一种菌株;

[0028] -肠道、食物或环境来源的原核生物的其他系统发育群、属或种的至少一种菌株，例如但不限于古细菌、厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、疣微菌门、梭杆菌门、甲烷杆菌门、螺旋菌门、纤维杆菌门、去铁杆菌属、奇异球菌属、栖热菌属、蓝细菌属、甲烷短杆菌、消化链球菌、瘤胃球菌、粪球菌、Subdoligranulum、Dorea、Bulleidia、厌氧杆菌、Gemella、Roseburia、链状杆菌、Dialister、厌氧菌、葡萄球菌、微球菌、丙酸杆菌、肠杆菌科、粪杆菌、拟杆菌、拟杆菌、拟杆菌、拟杆菌、拟杆菌、拟杆菌梭菌或分枝杆菌；

[0029] -至少一种真菌或酵母菌株，例如但不限于属于酵母菌属、念珠菌属、毕赤酵母属、德巴利酵母菌属、Torulopsis、曲霉属、根霉属、毛霉属或青霉属的一种。

[0030] 所述另外的微生物可以是与本发明的菌株对应的微生物的相同物种或不同物种的菌株或微生物分类群。包含组合物的细胞可以是无活力的或有活力的并且处于发育或生长状态的任何阶段（潜伏、指数、静止等），而不管其具有的形态。在特定的实施方案中，所述另外的微生物包括至少一种肠道细菌或一种乳酸菌。

[0031] 任选地，在另一特定实施例中，本发明的组合物还可包含至少一种生物活性成分（活性物质、活性成分或治疗剂），例如其他食物成分、植物产品和/或药物。

[0032] 术语“生物活性成分”是指在专利申请范围内具有生物活性的化合物，其可以改善或补充DSM 32890菌株的活性，包括食品成分或组分（例如但不限于：多不饱和脂肪酸、共轭亚油酸、益生元、纤维、瓜尔胶、葡甘露聚糖、壳聚糖、吡啶甲酸铜、钙等）、其他益生菌、植物、植物提取物或成分和药物。

[0033] 在特定的实施方案中，本发明的组合物是药物组合物。药物组合物是至少由任意浓度的本发明菌株组成的一组组分；或至少本发明菌株的细胞成分、代谢物、分泌分子或其任何组合，其在改善受试者的身体、生理或心理健康方面具有至少一种应用，这意味着他们总体健康状况的改善或疾病风险的降低。所述药物组合物可以是药物。

[0034] 在本发明中，术语“药物”的含义比“药物组合物”的含义更有限，因为“药物”必然意味着预防或治疗效果。本发明涉及的药物可以供人或兽用。“人用药物”是指具有治疗或预防人类疾病特性或可用于人类或给予人类以恢复、纠正或改变生理功能的任何物质或物质组合，具有药理作用、免疫或代谢作用、或建立医学诊断。“兽用药物”是指对动物疾病具有治疗或预防作用的任何物质或物质的组合，或者可以给予动物以恢复、纠正或改变其生理功能，发挥药理学、免疫作用或代谢作用，或建立兽医诊断的物质或物质组合。“兽药”也将被视为准备掺入饲料中的“加药饲料预混物”。

[0035] 除了其中所述药物组合物可能需要使用其他治疗剂的治疗功效的要求之外，可能还有其他基本原因迫使或推荐在很大程度上使用本发明的化合物和生物活性成分的组合，其中所述生物活性成分具有适当的活性以构成药物。所述本发明的化合物显然是指本发明的菌株，或由其衍生的菌株，或从本发明的菌株获得的细胞组分、代谢物、分泌分子或其任何组合。

[0036] 在特定的实施方案中，该药物组合物还至少包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0037] “载体”优选是惰性物质。载体的功能是促进其他化合物的掺入，允许更好的剂量和给药或使药物组合物具有一致性和形状。因此，载体是药物中用于将本发明药物组合物的任一组分稀释至一定体积或重量的物质；或者，即使不稀释所述组分，也能够允许更好的

剂量和给药或赋予药物稠度和形状。当呈递形式是液体时，药学上可接受的载体是稀释剂。

[0038] 术语“赋形剂”是指帮助本发明组合物的任何组分的吸收、稳定所述组分或帮助制备药物组合物的物质，其意义在于赋予其稠度或提供使其更愉快。因此，赋形剂可以具有将组分保持在一起的功能，例如淀粉、糖或纤维素，甜味的功能，着色的功能，保护药物的功能，例如将其与空气和/或水分隔离、填充片剂、胶囊或任何其他形式的呈现的功能，例如磷酸氢钙，为了促进组分在肠中的溶解及其吸收而进行崩解的功能，而不排除本文未提及的其他类型的赋形剂。因此，术语“赋形剂”定义为以加仑制剂形式包括的物质，其被添加到活性成分或其缔合物中以允许其制备和稳定性，改变其感官特性或确定药物组合物的理化特性及其生物利用度。“药学上可接受的”赋形剂必须考虑到药物组合物的化合物的活性，换言之，它与所述组分相容。

[0039] 此外，如本领域技术人员所理解的，赋形剂和载体必须是药理学上可接受的，换言之，赋形剂和载体被允许并被评估以使得不会对其施用的生物体造成伤害。

[0040] 药物组合物或药物可以任何临床允许的给药形式和治疗有效量存在。例如，它可以是适合于口服、舌下、鼻、鞘内、支气管、淋巴管、直肠、经皮、吸入或肠胃外给药的形式，优选适合于口服给药的形式。本发明的药物组合物可以配制成固体、半固体、液体或气体形式，例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球剂或气雾剂。适用于口服给药的形式选自包括但不限于滴剂、糖浆剂、凉茶、酏剂、混悬剂、临时混悬剂、可饮用小瓶、片剂、胶囊剂、颗粒剂、香囊剂、囊剂、丸剂、丸剂、锭剂或冻干形式的列表。在特定的实施方案中，本发明的组合物以适于口服、舌下、鼻、支气管、淋巴、直肠、透皮、吸入或肠胃外给药的形式呈现。

[0041] 在更特定的实施方案中，本发明的组合物以适于口服给药的形式存在。适于口服给药的形式是指可以允许其口服给药的物理状态。所述适于口服给药的形式选自包括但不限于滴剂、糖浆剂、凉茶、酏剂、混悬剂、临时混悬剂、可饮用小瓶、片剂、胶囊剂、颗粒剂、香囊剂、囊片、丸剂、丸剂、锭剂或冻干形式的列表。

[0042] “盖仑制剂形式”或“药物形式”是活性成分和赋形剂适应以构成药物的处置。它由制造商提供药物组合物的形式和其给药形式的组合定义。

[0043] 在本发明中，术语“治疗有效量”是指药物组合物的组分的量，当施用于哺乳动物，优选人时，足以在哺乳动物，优选人类中产生预防和/或治疗(如下所述)的所关注疾病或病理状况。治疗有效量将根据例如本发明菌株的活性、细胞成分、代谢产物、分泌的分子或其任何组合以任何形式的变化而变化；治疗有效量还将根据化合物的代谢稳定性和作用持续时间而变化；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给药方式和时间；排泄率，药物组合；特定疾病或病理状况的严重性；以及正在接受治疗的患者，但这可以由本领域技术人员根据他或她自己的知识和描述来确定。

[0044] 替代药物组合物，本发明的组合物也可以是营养组合物。

[0045] 本发明的术语“营养组合物”是指一种食物，无论向服用它的受试者提供营养，都以提供更好的健康状态和良好状态的方式有益地影响身体的一种或多种功能。因此，所述营养组合物可用于预防和/或治疗疾病或引起疾病的因素。因此，本发明的术语“营养组合物”可与功能性食品或用于特定营养目的的食品或药用食品同义使用。

[0046] 在特定的实施方案中，营养组合物是食物、补充剂、营养品、益生菌或共生物质。

[0047] 在更特定的实施方案中,食物选自乳制品、植物产品、肉制品、零食、巧克力、饮料或婴儿食品。乳制品选自源自发酵乳(例如但不限于酸奶或奶酪)或未发酵乳(例如但不限于冰淇淋、黄油、人造黄油、牛奶血清)的产品。植物产品是例如但不限于呈任何呈现形式、发酵或未发酵的谷物。饮料可以是例如但不限于任何果汁或未发酵的牛奶。

[0048] 与任何术语“膳食补充剂”、“营养补充剂”或“食品补充剂”同义的术语“补充剂”是旨在补充食物的“食物成分”。膳食补充剂的一些例子包括但不限于维生素、矿物质、植物药、氨基酸和食物成分,例如酶和腺提取物。它们不作为常规食品的替代品,也不作为餐食或食品饮食的唯一组成部分,而是作为饮食的补充。

[0049] 本发明中使用的术语“营养品”是指从食物中分离出来并以对健康有益的剂型使用的物质。

[0050] 本发明中使用的术语“益生菌”是指活的微生物,当以足够的量施用,可以促进宿主生物体的健康益处。

[0051] 本发明所用的术语“合生元”是指含有益生元和益生菌混合物的食品。作为一般规则,它们包含有利于生长和/或代谢活性并最终促进与其结合的益生菌的作用的益生元组分,例如但不限于低聚果糖或低聚半乳糖与双歧杆菌的结合。

[0052] 本发明的另一方面涉及本发明的菌株、或由其衍生的组分、或本发明的组合物在制备药物、营养组合物或食品中的用途。

[0053] 本发明的另一个方面涉及用作药物的*P. faecium* DSM 32890菌株、从本发明菌株获得的细胞成分、代谢物、分泌分子或它们的任何组合,或本发明的组合物。术语“药物”之前已经定义,并且它适用于本发明方面。如前文所述,该药剂可以是药物组合物或营养组合物。

[0054] 在另一方面,本发明涉及从本发明的菌株或本发明的组合物获得的本发明的菌株、细胞组分、代谢物、分泌分子或其任何组合,用于预防和/或治疗超重和/或肥胖症,或与之相关的疾病。

[0055] 如本发明中所理解的,术语“治疗”是指在受试者(优选为哺乳动物,更优选为人)中对抗由所关注的疾病或病理状况引起的效应。

[0056] (i) 抑制疾病或病理状况,换言之,阻止其发展;

[0057] (ii) 减轻疾病或病理状况,换言之,导致疾病或病理状况或其症状的缓解;

[0058] (iii) 稳定疾病或病理状况。

[0059] 本发明中理解的术语“预防”包括防止疾病的发作,换言之,防止疾病或病理状况出现在受试者(优选哺乳动物,更优选人)中,特别是当所述受试者具有病理状况的倾向时。

[0060] 术语“超重”是指特征在于受试者的体重指数(BMI)等于或大于25的病理学。BMI是个体体重和身高之间关联的量度。要计算BMI,使用以下公式:受试者的体重除以其身高的平方(Kg/m^2)。超重的特征是 $\text{BMI} \geq 25$ 至 < 30 。该计算方法仅对18岁以上的人有效,本领域技术人员公知,如果不使用修正系数,则不能适用于未成年人。所述校正因子的确定是本领域技术人员的常规做法。

[0061] 术语“肥胖”是指以受试者的BMI等于或大于30为特征的病理。考虑到 $\text{BMI} > 40$ 的受试者患有病态肥胖,将肥胖分为不同的级别。用于确定个体是否患有中心性肥胖的其他参数是绝对腰围(男性受试者 $> 102\text{cm}$ [向心性肥胖]为肥胖,女性 $> 88\text{cm}$ 为肥胖)或腰臀比(男性

受试者 >0.9 时肥胖,女性受试者 >0.85 时肥胖)。确定肥胖的另一种方法是测量体脂肪的百分比(男性受试者的体脂大约 $>25\%$ 时为肥胖,而女性受试者的体脂大约 $>30\%$ 时为肥胖)。

[0062] 在本发明中,“与超重和/或肥胖相关的疾病”被理解为由受试者遭受的超重或肥胖引起的疾病。与超重和/或肥胖相关的疾病的例子包括但不限于心血管疾病(例如心脏病、中风等)、代谢综合征、糖尿病(特别是2型糖尿病)、高血糖症、胰岛素抵抗、癌症(癌症的例子包括但不限于子宫内膜癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、胆囊癌、肾癌和结肠癌)、高血压、血脂异常、低血脂、半乳糖血症、苯丙酮尿症、谷甾醇血症、甲状腺功能亢进症和甲状腺功能减退症。

[0063] 因此,在特定的实施方案中,与超重和/或肥胖相关的疾病选自心血管疾病、代谢综合征、糖尿病、高血糖、胰岛素抵抗、癌症、高血压、血脂异常、低血脂、半乳糖血症、苯丙酮尿症、谷甾醇血症、甲状腺机能亢进和甲状腺机能减退。

[0064] 在本发明中,术语“心血管疾病”或“心脏病”是指影响心脏和血管的疾病,包括但不限于动脉粥样硬化、动脉瘤、心绞痛、中风、脑血管疾病、充血性心力衰竭、冠状动脉疾病、急性心肌梗死和外周血管疾病。

[0065] 在本发明中,术语“代谢综合征”是指包括一组使个体有患心脏病和2型糖尿病风险的病症的疾病。这些病症的例子包括但不限于动脉高血压、高血糖、高甘油三酯血液水平、低血液水平的高密度脂蛋白和腰部脂肪过多。慢性炎症和脂质代谢(血脂异常)和葡萄糖的变化是心血管病状的危险因素,因此,其治疗和预防可以防止另一组病状的发展。

[0066] 在本发明中,“糖尿病”被理解作为一种疾病,其特征在于由于身体不产生胰岛素或细胞不能使用胰岛素而具有高血糖水平。胰岛素是一种帮助葡萄糖进入细胞为细胞提供能量的激素。随着时间的推移,高血糖水平会导致心脏、眼睛、肾脏、神经、牙龈和牙齿出现严重问题。

[0067] 在本发明中,术语“高血糖症”是指血液中葡萄糖含量过高。测量血液中葡萄糖量的方法以及认为血液中葡萄糖过量所依据的葡萄糖值在现有技术中是众所周知的,并且其使用是本领域技术人员的常规实践。

[0068] 在本发明中,“胰岛素抵抗”被理解为在胰岛素作用下组织表现出降低的反应以具有循环葡萄糖的状况;尤其是肝脏、骨骼肌、脂肪组织和大脑。这种变化加上胰腺产生的胰岛素不足,会在一段时间后导致2型糖尿病的发展。

[0069] 在本发明中,“癌症”被理解作为一种疾病,其中异常细胞不受控制地繁殖并可以侵入附近的组织。术语“癌症”包括肿瘤,这是一种异常的组织块,当细胞增殖超过它们应有的数量或在适当的时候没有被破坏时就会出现,它们可以归类为良性(它们不会侵入附近的组织或扩散到身体的其他部位)或恶性(它们侵入附近的组织并扩散到身体的其他部位)。

[0070] 在本发明中,“高血压”被理解为相对于正常血压的血压水平持续或持续升高(收缩压的最高水平(最大值)在120-129mmHg之间,舒张压的最高水平(最小值)是80到84mmHg之间)。

[0071] 在本发明中,“血脂异常”被理解为血浆胆固醇或甘油三酯浓度的增加,或导致动脉粥样硬化发展的高密度脂蛋白浓度的降低。“低脂血症”被理解为血浆脂蛋白浓度降低,定义为总胆固醇(TC) $<120\text{mg/dl}$ ($<3.1\text{mmol/L}$)或与低密度脂蛋白(LDL)相关的胆固醇浓度 $<50\text{mg/dl}$ ($<1.3\text{mmol/L}$)。

[0072] 在本发明中，“半乳糖血症”被理解为一种遗传性疾病，其特征在于个体不能使用单糖半乳糖，这导致其在体内蓄积，在肝脏和中枢神经系统中产生损伤。

[0073] 在本发明中，“苯丙酮尿症”又称PKU，是指由于苯丙氨酸羟化酶缺乏而引起的先天性代谢变化，导致肝脏不能从苯丙氨酸代谢出酪氨酸。

[0074] 在本发明中，“谷甾醇血症”被理解为一种罕见的常染色体隐性甾醇贮积病，其特征是植物甾醇在血液和组织中的积累。临床表现包括黄色瘤、关节痛和早发性动脉粥样硬化。血液学表现包括溶血性贫血伴成口细胞增多症和巨血小板减少症。该疾病是由ABCG5 (2p21) 和ABCG8 (2p21) 基因的纯合或复合杂合突变引起的。

[0075] 在本发明中，“甲亢”被理解为甲状腺产生过多甲状腺激素的疾病，而“甲状腺功能减退”被理解为甲状腺不能产生足够的甲状腺激素来满足身体需要的疾病。

[0076] 在另一方面，本发明涉及本发明的菌株、从本发明的菌株获得的细胞组分、代谢物、分泌的分子或其任何组合，或本发明的组合物的非治疗用途，用于调节食欲和/或食物摄入量。

[0077] 在整个说明书和权利要求书中，“包括”一词及其变体并不旨在排除其他技术特征、添加剂、组件或步骤。对于本领域技术人员来说，从本发明的描述和实施例中可以部分地推导出本发明的其他目的、优点和特征。以下实施例和附图仅作为说明提供，并非用于限制本发明。

[0078] 附图简述

[0079] 图1. 对C57BL/6肥胖小鼠 (n=10/组) 施用*P. faecium*菌株 ($1 \times 10^{7-8}$ cfu/天) 14周对体重增加的影响。(a) 每周体重。(b) 治疗14周后体重增加。数据以克表示，带有平均值和标准误差。通过应用单向方差分析和随后的Tukey检验建立了统计学上的显著差异 ($p < 0.05$)。CD, 对照饮食; HFHSD, 高脂高蔗糖饮食; HFHSD+*P. faecium*, 高脂肪高蔗糖饮食+*P. faecium*。

[0080] 图2. 向C57BL/6肥胖小鼠 (n=10/组) 施用*P. faecium*菌株 ($1 \times 10^{7-8}$ cfu/天) 14周对基础血糖和葡萄糖耐量的影响。(a) 第8周和第10周的空腹血糖水平 (mg/dl)。(b) 葡萄糖耐量试验，在给予口服葡萄糖超负荷 (2g/Kg) 后15、30、60和120分钟测量血糖。显示了葡萄糖耐量测试结果的曲线下面积 (AUC)。数据用平均值和标准误差表示。通过应用单向方差分析和随后的Tukey检验建立了统计学上的显著差异 ($p < 0.05$)。CD, 对照饮食; HFHSD, 高脂高蔗糖饮食; HFHSD+*P. faecium*, 高脂肪高蔗糖饮食+*P. faecium*。

[0081] 图3. 对C57BL/6肥胖小鼠 (n=10/组) 施用屎粪杆菌菌株 ($1 \times 10^{7-8}$ cfu/天) 14周对摄入的影响。(a) 在第3、6、9和12周每只动物的相对摄入量 (kcal/天)。(b) 在治疗的第12周每只动物的每日摄入量 (kcal)。(c) 白色脂肪组织的大小 (克)。数据用平均值和标准误差表示。通过应用单向方差分析和随后的Tukey检验建立了统计学上的显著差异 ($p < 0.05$)。CD, 对照饮食; HFHSD, 高脂肪高蔗糖饮食。

[0082] 图4. 向C57BL/6肥胖小鼠 (n=10/组) 施用屎肠球菌菌株 ($1 \times 10^{7-8}$ cfu/天) 14周对炎症的影响。(a) 上皮细胞中ILC1细胞的百分比，(b) 具有M2表型 (抗炎) 的巨噬细胞百分比，(c) M1/M2巨噬细胞比率 (促炎/抗炎)，(d) 平均荧光强度 (MFI) Gata3转录因子和(e) 调节性T淋巴细胞 (Treg) 的百分比。数据用平均值和标准误差表示。通过应用单向方差分析和随后的Tukey检验建立了统计学上的显著差异 ($p < 0.05$)。CD, 对照饮食; HFHSD, 高脂肪高蔗糖饮食。

[0083] 图5.对C57BL/6肥胖小鼠(n=10/组)施用屎粪杆菌菌株($1 \times 10^{7-8}$ cfu/天)14周对上皮内淋巴细胞的影响。(a)诱导的上皮内淋巴细胞百分比(诱导的IEL)和(b)天然和诱导的上皮内淋巴细胞比率(nat/ind IEL)。数据用平均值和标准误差表示。通过应用单向方差分析和随后的Tukey检验建立了统计学上的显著差异($p < 0.05$)。CD,对照饮食;HFHSD,高脂肪高蔗糖饮食。

实施例

[0084] 实施例1.细菌菌株*P.faecium* G104(*P.faecium* DSM 32890)的分离和鉴定

[0085] 从健康志愿者的粪便中分离出不同的肠道细菌。使用1.25克粪便并在含有0.05%半胱氨酸(1:10稀释)的10mM磷酸盐缓冲液中稀释,其中NaCl浓度为130mM(PBS),并在Lab-Blender Stomacher 400(Seward Medical,London,35UK)中均质化。将所述稀释液接种在37.5mL小肠细菌培养基(IBM)中,其成分基于先前出版物中推荐的培养基(Gibson,G.R.,et al.,Appl.Environ.Microbiol.,54(1 1):2750-5,1988;Lesmes,U et al.,J.Agric.Food Chem.,56:5415-5421,2008),并且发明人设计了一些修改:

[0086] ■主要成分:蒸馏水(1600毫升),蛋白水(4克),碳酸氢钠(4克),氯化钙(0.02克),果胶(4克),木聚糖(4克),麦麸提取物(4克),阿拉伯半乳聚糖(2g)、阿拉伯胶(2g)、淀粉(10g)、酪蛋白(6g)、菊粉(2g)和NaCl(0.2g)。在121℃下高压灭菌60分钟,然后放置冷却过夜。

[0087] ■粘蛋白溶液:粘蛋白(8克)和蒸馏水(200毫升)。高压灭菌20分钟。

[0088] ■盐和和维生素:蒸馏水(100mL)、 K_2HPO_4 (0.08g)、 KH_2PO_4 (0.08g)、 $MgSO_4$ (0.02g)、氯化血红素(0.01g)和甲萘醌(0.002g)

[0089] ■半胱氨酸溶液:L-半胱氨酸-HCl(1g)、蒸馏水(100mL)

[0090] 将盐和和维生素的混合物与半胱氨酸溶液合并,加入6M KOH直至最终溶液变成半透明的棕色并过滤灭菌。通过混合主要成分、粘蛋白溶液、盐和和维生素以及半胱氨酸溶液,在无菌条件下制成2L的体积,获得最终的IBM。

[0091] 将在IBM培养基中稀释的50mL粪便在厌氧室(Whitley DG250 Workstation,Don Whitley Scientific)中在搅拌下发酵24小时,并保持pH值在6.9-7.0之间。将发酵24小时的IBM培养基过滤(孔径0.22 μ m)并用作含有0.5%去纤维蛋白血液的苛养厌氧琼脂(FAA)培养基琼脂平板的补充物,其中接种了发酵粪便的系列稀释液(0.1mL每个板中每个系列稀释液的接种量)。这种IBM发酵培养基补充剂含有肠道微生物群产生的底物,这种培养基富含肠道生态系统中存在的营养物质,可以在实验室条件下更好地回收本地细菌。接种的平板在厌氧室中在37℃下孵育72小时。

[0092] 在平板上生长72小时后的菌落中,分离到了*Phascolarctobacterium faecium* DSM 32890。它是通过使用引物27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(SEQ ID NO:1))和1401r(5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'(SEQ ID NO:2))对16S rRNA基因(1.26Kb)进行测序来鉴定的。DNA扩增后的反应用Illustra GFX PCR DNA和凝胶带纯化试剂盒(GE Healthcare)纯化,并在ABI 3730XL测序仪(Stabvida-Caparica-Portugal)中通过Sanger技术测序。通过比较NCBI数据库和BLASTn算法获得的序列,分离菌株(G104)与*Phascolarctobacterium faecium*菌株ACM 3679(部分序列,16S核糖体RNA)的鉴定结果具有99%的同一性。新菌株

Phascolarctobacterium faecium G104保藏在德国细胞培养物保藏中心,编号DSM 32890。

[0093] 用BLASTn算法鉴定,用寡核苷酸27F和1401r测序的16S序列如下:>16S G104部分序列(SEQ ID NO:3)

[0094] TCCGACTTCACGCAGGCGGGTTGCAGCCTGCGATCCGAACTGAGATCGGGTTTCTGGGGTTTGTCTCTGCCTCGCGGCTTCGTTCCCTCTGTTTCCGACCATGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCCTTCTCCAGGTTGTCCCTGGCAGTCTCCCATGAGTCCCCAACTTTACTTGCTGGTAACATAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTTTCTTTGTCCCCGAAGGGAAATCTCTATCTCTAGAGCGTTCAATCAATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCCGTACTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGGTCGATACCTCCTACACCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGATCTAATCCCGTTCGCTACCCTGGCTTTCGCATCTCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGGCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCCAATATCTACGCATTTACCGCTACACTGGGAATTCCTTTCTCTCTCTGCCTCAAGCCTAACAGTTTCCAGCGCCATACGGGGTTGAGCCCCGATTTTACGCTCGACTTATTAAGCCGCCTACATGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTCTGTTTACTACCGTCATTGCAATGCATTGTTACACACTGCACGTTTCGTCATAAACAACAGAGCTTTACAGACCGAAATCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCTACTGCTGCCATCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCATCGCCTTGGTAGTCCGTTACACTACCAACTAGCTAATCAGACGCAGGCCATCCTTTAGCGATAGCTTACTTGTAGAGGCCATCTTTCTTCATCTGCCATGCGGCACGATGATCACATCCGGTATTAGCACTCCTTTCGGAATGTTGTCCCCGTCTAAAGGGCAGGTTGCTACGCGTTACTCACCCGTTCCGCACTAAGAATTCTACCGAAATAA

[0095] 使用DSMZ培养物保藏中心推荐的培养基(培养基编号104b(PY+8g/1琥珀酸盐))优化该菌株的特定生长以用于未来的分析。

[0096] 对于1L培养基,5.0g胰蛋白胨、5.0g肉提取物、10.0g酵母提取物、2.00gK₂HPO₄、1.00mLTween80、40.0mL盐溶液(见下文)、1mg刃天青溶液、0.5gL-半胱氨酸-HCl×H₂O、8.0g琥珀酸钠、950.0mL蒸馏水、10.00mL氯化血红素溶液(见下文)和0.20mL维生素K1溶液(见下文)混合。

[0097] • 盐溶液:0.25gCaCl₂×2H₂O、0.50gMgSO₄×7H₂O、1.00gK₂HPO₄、1.00gKH₂PO₄、10.00gNaHCO₃、2.00gNaCl和1000.00mL蒸馏水。

[0098] • 血红素溶液:将50毫克的血红素溶解在1毫升的1NNaOH中;用蒸馏水定容至100mL。保持冷藏。

[0099] • 维生素K1溶液:将0.1mL维生素K1溶于20mL95%乙醇中,过滤除菌。冷藏并避光储存。

[0100] 溶解成分(半胱氨酸、血红素和维生素K1除外)并在121℃下高压灭菌20分钟。冷却后加入半胱氨酸、维生素K1和氯化血红素。将pH值调节至7.2并将培养基引入厌氧室以保证其在接种*P. faecium* G104之前处于缺氧状态。

[0101] 实施例2.基于其体外调节炎症的能力来选择*P. faecium*。

[0102] 进行体外测定以比较评估人类肠道来源细菌的免疫调节特性,并选择能够在经典单核细胞中诱导最大抗炎反应的菌株,因此在治疗肥胖相关炎症方面具有潜在的治疗价值。为此,不同细菌菌株的细胞悬液用作外周血单核细胞(PBMC)培养物中的刺激物,通过流

式细胞术测量经典单核细胞的数量和抗炎细胞因子IL-4相对于促炎细胞因子IFN γ 的水平。

[0103] PBMC的培养和刺激.

[0104] 从健康志愿者的全血中,使用Ficoll梯度(Ficoll Paque-Plus 17-1440-02, Bioscience)分离外周血单核细胞(PBMC)。用溶解红细胞的溶液(红细胞裂解缓冲液,RBC, Miltenyi Biotec., 西班牙)处理它们后,将它们重新悬浮在RPMI 1640培养基(Gibco, Barcelona, Spain)中,并补充有10%胎牛血清(Gibco, 西班牙巴塞罗那)、链霉素(100 μ g/mL, Sigma)、青霉素(100U/mL, Sigma)和L-谷氨酰胺(Sigma)。为了进行实验,将PBMC以 10^6 /mL的浓度在24孔平底聚苯乙烯板(Corning, 马德里, 西班牙)中在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下进行孵育。使用浓度为 10^7 cfu/mL的活细菌悬浮液作为刺激物。来自肠道沙门氏菌血清型鼠伤寒杆菌(Sigma Chemical Co, Madrid, 西班牙)的纯化脂多糖(LPS)用作阳性对照,浓度为1 μ g/mL,未处理的PBMC样品用作阴性对照。在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下,刺激时间为24小时。这段时间过后,收集细胞并离心,将细胞沉淀与上清液分离。每种类型的刺激在3个独立实验中一式三份进行测定。将培养物上清液分级并在-80 $^{\circ}$ C等分储存。

[0105] 通过流式细胞术表征细菌菌株对PBMC的免疫调节特性.

[0106] 通过流式细胞术分析受刺激的PBMC,以确定经典促炎单核细胞的水平,使用标记CD14和CD16。此外,还评估了单核细胞中的促炎细胞因子IFN γ 水平和抗炎细胞因子IL-4水平。为此,将细胞透化并固定(Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD-Bioscience),并用FACS溶液(PBS1X+BSA 0.2%)重悬。使用BD LSRFortessa测量标记物水平。

[0107] 对不同细菌菌株的比较评估使得可以得出结论,本发明的Phascolarctobacterium faecium DSM 32890是诱导最显著免疫调节作用的菌株,显示出相对于促炎性IFN γ (较高的IL-4/IFN γ),抗炎细胞因子IL-4的产生更高,并且相对于未处理和LPS处理的细胞,经典单核细胞(CD14⁺⁺CD16⁻)减少,后者是肥胖相关炎症及其并发症的诱导剂(表1)。

[0108] 表1:人肠道细菌对PBMC的免疫调节特性的体外表征.

细菌菌株	经典单核细胞	IL-4/IFN γ
未经处理	0.71(0.02)b	1.74(0.24)d
LPS	1.00(0.05)a	0.80 (0.05)e
<i>Alistipes indistinctus</i>	0.69(0.03)b	3.73(0.26)b
[0109] <i>Phascolarctobacterium</i>		
<i>faecium</i>	0.48(0.04)c	4.79(0.08)a
拟杆菌	0.70(0.06)b	3.55(0.20)b
<i>Eubacterium</i>		
<i>cylindroides</i>	0.75(0.04)b	1.61(0.10)d
<i>Eubacterium limosum</i>	0.93(0.03)a	1.39(0.07)d

[0110] 结果表示为经典单核细胞的相对水平和流式细胞术测量的IL-4/IFN γ 比值的平均值和标准误差。组间显著差异 ($P < 0.05$) 通过单向方差分析和Tukey事后检验确定。不同的字母表示实验组之间的显著差异 ($p < 0.05$)。

[0111] 实施例3.P.faecium在肥胖动物模型中的作用

[0112] 肥胖和取样动物模型的开发.

[0113] 将成年雄性C57BL/6小鼠 (6-8周, Charles River, Les Oncins, France) 保持在受控温度 (23°C)、相对湿度 (40-50%) 和12小时光/暗循环条件下喂食高脂肪 (45%Kcal) 高糖 (蔗糖) (17%Kcal) 高热量饮食 (HFHSD; D12451, 研究饮食, Brogaarden, 丹麦) 或对照饮食 (CD, 来自脂肪的10%Kcal, 不含蔗糖; D12450K, 研究饮食, Brogaarden, 丹麦) 14周。每天, 喂食HFHSD饮食的小鼠接受口服剂量的溶解在10%脱脂牛奶中的本发明的细菌菌株对象 [$(1 \times 10^7 - 1 \times 10^8)$ 菌落形成单位 (CFU)]。以相同的方式将载体 (10%脱脂牛奶) 给予肥胖表型 (HFHSD) 的对照组和瘦弱表型 (CD) 的对照组 (每组n=10只小鼠)。14周后, 颈椎脱臼处死小鼠, 取血、肠、肝、脑、腹股沟和附睾白色脂肪组织、棕色脂肪组织、粪便内容物和粪便标本。

[0114] 代谢表型的表征

[0115] 每周监测体重。空腹基础血糖 (第8周和第10周) 使用葡萄糖试纸 (Contour XT Bayer, Barcelona, Spain) 从大隐静脉的血液中测定, 并使用口服葡萄糖测试 (OGTT, 第10周) 测定口服葡萄糖耐量, 其中在给禁食4小时的小鼠口服葡萄糖超负荷 (2g/Kg) 后15、30、60和120分钟测量血糖。

[0116] 干预的细菌对象减少了饮食诱导的肥胖模型中的体重增加 (图1a和1b), 以及治疗14周后肥胖小鼠的肥胖 (图3c)。此外, 这种细菌改善了基础血糖 (图2a) 和口服葡萄糖耐量 (图2b)。

[0117] 对摄入量的影响

[0118] 每周在不同笼子中记录的摄入量(每笼5只动物)使我们能够以千卡路里为单位估计每只动物每天的食物摄入量(图3a)。通过在实验的第12周评估24小时的个体摄入量来确认观察到的差异。观察到的结果是,与肥胖组相比,施用细菌的动物组消耗的千卡热量减少(图3b)。食欲的调节似乎是所研究的细菌减轻体重和体脂的机制之一。

[0119] 对炎症的影响

[0120] 通过流式细胞术分析了*P. faecium*对肠道炎症的影响。为此,肠道经过消化阶段和机械处理,使上皮与固有层分离。将干净的切割组织与第一种预消化溶液(5mM EDTA、1mM DTT、100 μ g/mL链霉素和100U/mL青霉素的HBSS[Hank's Balanced Salt Solution])在37 $^{\circ}$ C下搅拌孵育30分钟。这个过程重复两次,用100 μ m过滤器过滤组织,从而获得肠上皮细胞。为了获得固有层的细胞,剩余的组织用消化溶液(0.5mg/mL胶原酶D、50U/mL DNase I、3mg/mL Dispase II、100 μ g/mL链霉素和100U/mL HBSS中的青霉素)在37 $^{\circ}$ C下搅拌30分钟。该过程重复两次并使用70 μ m过滤器过滤。

[0121] 获得的细胞悬液用来自不同细胞外和细胞内标记物的抗体处理。具体而言,在上皮中,确定1型先天淋巴样细胞(使用谱系标记,T-bet和IFN γ)。在固有层中,确定了M1巨噬细胞(F4/80、CD80和iNOS)、M2巨噬细胞(F4/80、CD80和iNOS)和Treg(CD3、CD4、CD8、CD25和Foxp3)的数量。将细胞在FACS溶液(含0.2%BSA的1 \times PBS)中稀释,并在BD LSRFortessa流式细胞仪(Becton Dickinson,NJ,USA)上进行分析。

[0122] 特别是,分析了上皮中先天淋巴细胞(ILC)的水平。这些细胞负责保护上皮屏障抵御病原体并维持组织稳态。然而,第1组ILCs(ILC1)可以通过产生IFN γ 促进组织炎症,并且它们在肥胖小鼠中增加。被评估的细菌能够减少ILC1的比例,从而减少这些细胞触发的炎症(图4a)。

[0123] 该菌株还减少了巨噬细胞向M1(促炎)表型的极化,该表型可由IFN γ 产生的增加诱导。相反,它增加了M2的水平,通过使M1/M2比率正常化(图4c)诱导抗炎反应(图4b)。

[0124] 此外,*P. faecium*通过诱导Th2/Treg型反应减弱肥胖的影响(图4d和4e)。通过测量作为介导Th2响应的转录因子Gata3的水平以及带有标记CD25和FoxP3的调节性T细胞的水平,评估了该响应。Gata3的增加也可能表明ILC2细胞比例的增加和ILC3细胞的发育。ILC2细胞的特征是产生Th2型细胞因子,在肥胖背景下具有抗炎作用。还已经在肠粘膜相关的ILC3细胞的亚组中描述了Gata3转录因子,其可以对其进行保护。

[0125] 最后,*P. faecium*能够逆转由高热量饮食引起的上皮内淋巴细胞(IEL)比例的增加,并使自然/诱导的IEL比率正常化(图5),这也有助于重建免疫稳态和肠道屏障,预防全身炎症。

序列表

<110> 西班牙高等科研理事会

<120> 用于预防和治疗肥胖及其并发症的粪考拉杆菌

<130> ES1641.1418

<150> P201831166

<151> 2018-11-30

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 引物27f(Primer 27f)

<400> 1

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<221>

<222>

<223> 引物140r(Primer 140r)

<400> 2

cggtgtgtac aagacc 17

<210> 3

<211> 1280

<212> DNA

<213> Phascolactobacterium faecium

<400> 3

tccgacttca cgcaggcggg ttgcagcctg cgateccgaac tgagatcggg tttctggggt 60
 ttgctctgcc tcgcggettc gettccctet gtttccgacc attgtagtac gtgtgtagcc 120
 caagacataa ggggcatgat gacttgacgt cateccccgcc ttctctcagg ttgtccctgg 180
 cagtctccca tgagtcccca actttacttg ctggtaacat aggatagggg ttgcgctcgt 240
 tgcgggactt aaccaacat ctacgacac gagctgacga cagccatgca ccacctgttt 300

tcttgtcccc gaagggaaat ctctatctct agagegttca atcaatgtca agccttggtta 360
aggttcttcg cgttgcgtcg aattaaacca catactccac cgcttgtgcg ggcccccgtc 420
aattcctttg agtttcaacc ttgcggccgt actccccagg cggggtactt attgcgtaa 480
ctccggcaca gaaggggtcg atacctcta cacctagtac ccatcgttta cggccaggac 540
taccggggta tctaattccc ttcgctacc tggttttcgc atctcagcgt cagacacagt 600
ccagaaaggc gccttcgcca ctggtgttcc tccaatata tacgcatttc accgctacac 660
tggaattcc cctttcctct cctgcaactca agcctaacag tttccagcgc catacggggt 720
tgagccccgc attttcacgc tcgacttatt aagccgcta catgctcttt acgccaata 780
attccggaca acgctcgcca cctacgtatt accgcggtg ctggcacgta gttagccgtg 840
gcttcctcgt ttactaccgt cattgcaatg cattgttca acactgcacg ttcgtcataa 900
acaacagagc ttacagacc gaaatccttc atactcaag cggcgttgct ccgtcagact 960
ttcgtccatt gcggaagatt cccaactgct gcttccgta ggagtttggg ccgtgtctca 1020
gtccaatgt ggccgttcat cctctcagac cggtactga tcctgcctt ggtagtcctg 1080
taactacca actagctaat cagacgcagg cccatccttt agcgatagct tacttgtaga 1140
ggcatcttt cttcatcctg ccatgcggca cgatgatcac atccggtatt agcactcctt 1200
tcggaatgtt gtccccgtct aaagggcagg ttgcctacgc gttactcacc cgttcgccac 1260
taagaattct accgaaataa 1280

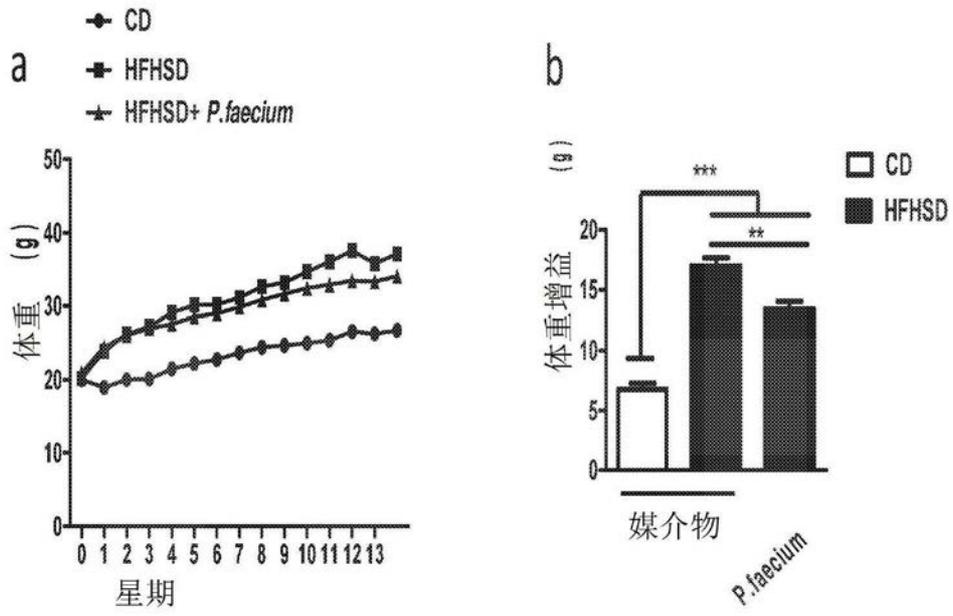


图1

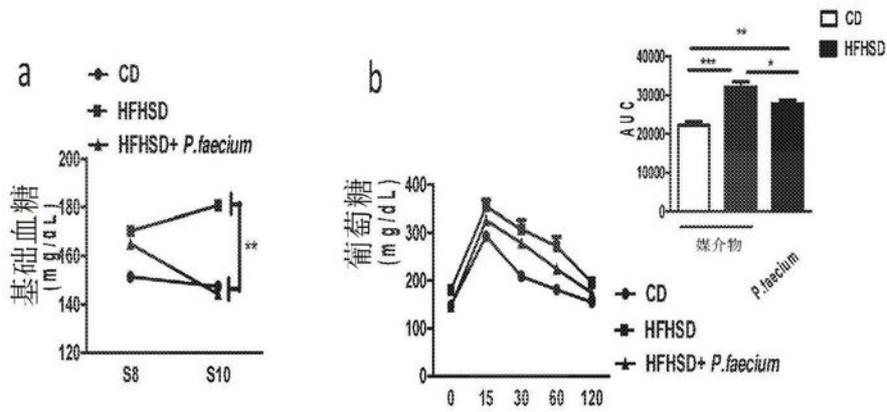


图2

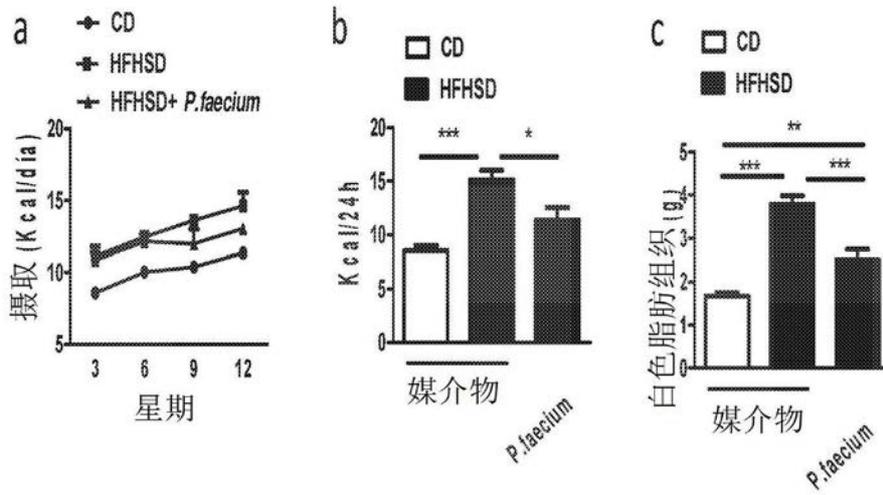


图3

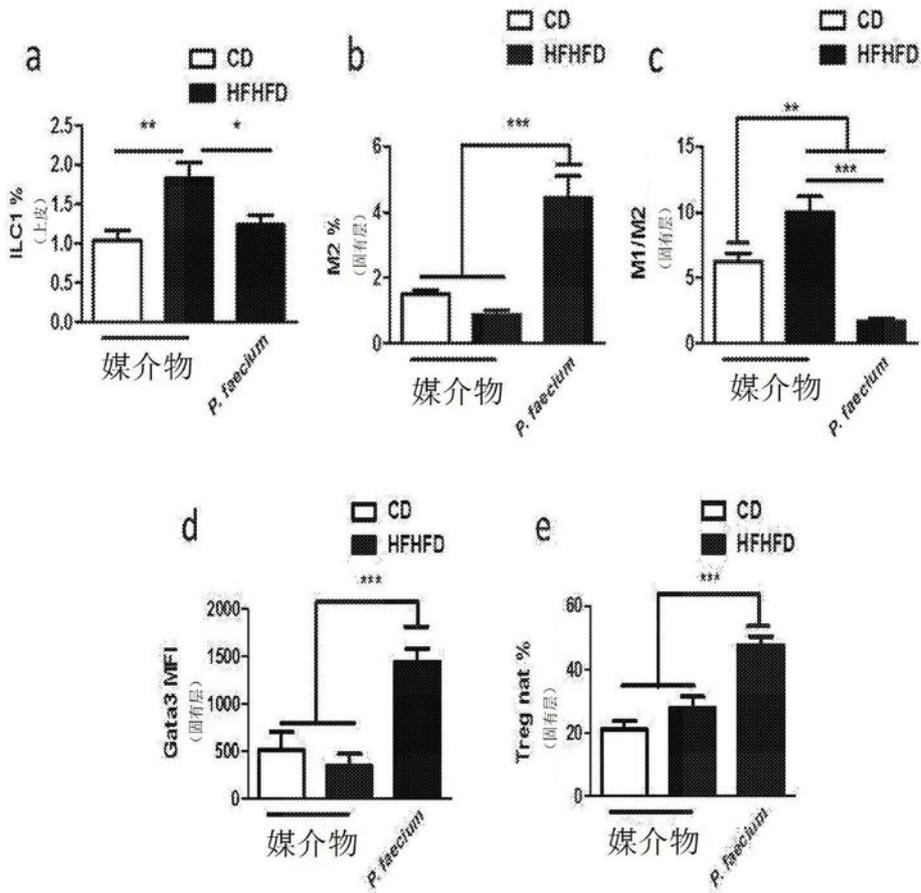


图4

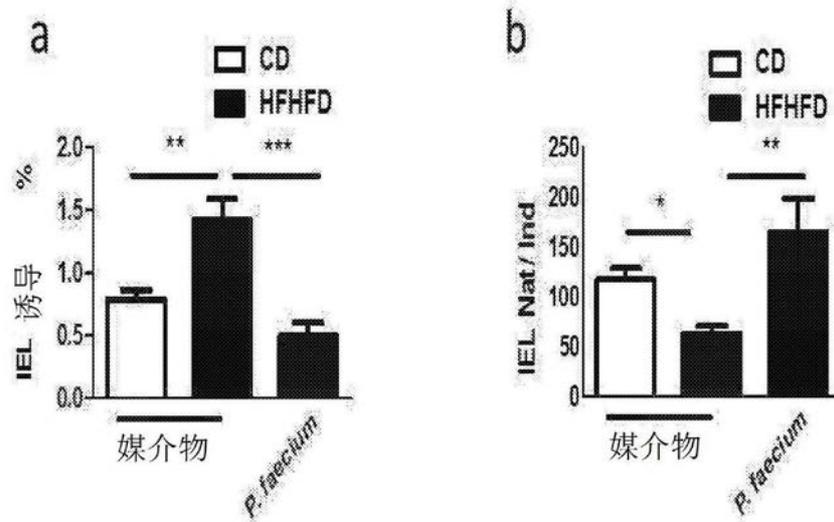


图5