



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118546812 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 27

(21) 申请号 202410412456.2

(22) 申请日 2019.05.09

(30) 优先权数据

10-2018-0053279 2018.05.09 KR

(62) 分案原申请数据

201980043382.7 2019.05.09

(83) 生物保藏信息

KCTC 13509BP 2018.04.17

KCTC 13510BP 2018.04.17

KCTC 13511BP 2018.04.17

(71) 申请人 Ko 生物技术有限公司

地址 韩国

(72) 发明人 高光杓 金云基 张俞真 徐普揽

李濬哲 南泰旭 金因洙 李臻雨

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2016.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

权利要求书1页 说明书25页

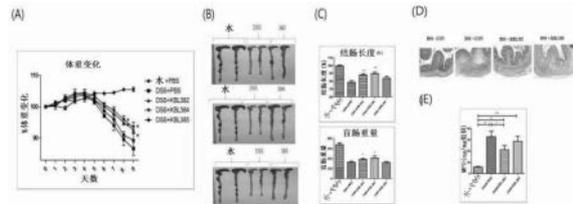
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

副干酪乳杆菌菌株及其用途

(57) 摘要

副干酪乳杆菌菌株及其用途。本发明涉及：新的人来源益生菌菌株，即副干酪乳杆菌(Lactobacillus Paracasei)KBL382、副干酪乳杆菌KBL384或副干酪乳杆菌KBL385；以及所述菌株用于改善肠健康和预防肠病的用途。根据本发明的菌株具有优异的抗炎和免疫调节功能，对肠道壁的紧密连接具有极好的增强作用，抑制肠炎引起的体重损失和结肠长度降低，从而表现出对肠炎的治疗作用，以及显著减轻特应性皮炎的症状。因此，所述菌株可用作益生菌物质，以增强抗炎作用、增强免疫力、改善肠健康功能以及减轻变应性疾病。



1. 副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) KBL385菌株,其登记号为KCTC13511BP。
2. 用于治疗或预防肠病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
3. 用于治疗或预防变应性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
4. 用于治疗或预防自身免疫病或炎性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
5. 用于预防或治疗肠病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
6. 用于预防或治疗变应性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
7. 用于预防或治疗自身免疫病或炎性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
8. 包含选自以下的至少一种的组合物用于制备炎性肠病或肠易激综合征的预防性或治疗性药物的用途:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。
9. 包含选自以下的至少一种的组合物用于制备特应性皮炎的预防性或治疗性药物的用途:根据权利要求1所述的菌株、所述菌株的培养物、以及所述菌株的裂解物。

## 副干酪乳杆菌菌株及其用途

[0001] 本申请是申请号为2019800433827、发明名称为“副干酪乳杆菌菌株及其用途”的中国专利申请的分案申请,该母案申请是2019年5月9日提交的PCT国际专利申请PCT/KR2019/005553进入中国国家阶段的申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)菌株及其用途。更具体地,本发明涉及用于减轻变应性症状、改善免疫调节、减轻炎症症状、减轻特应性皮炎和改善肠健康的健康功能性食品组合物;以及用于治疗或预防变应性疾病、自身免疫病、炎症疾病、特应性皮炎和/或肠病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株、副干酪乳杆菌KBL385菌株、所述菌株的菌体、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

### 背景技术

[0003] 益生菌(probiotic)是指具有抗菌活性和酶活性以帮助肠微生物平衡的微生物及其产生的产物。另外,益生菌也被定义为单一或多种菌株形式的当以干的细胞或发酵产物的形式提供给人或动物时改善肠道菌群的活菌。益生菌必须栖息在人肠道,必须是非病原性的和无毒性的,并且存活足够长的时间,直至它们到达肠。此外,益生菌必须保持生存力和活性,直至在所递送的食物中消耗为止,对用于预防感染的抗生素敏感,并且不具有抗生素抗性质粒。同样,益生菌必须对肠环境中的酸、酶和胆汁具有抗性。

[0004] 这些益生菌可包括,例如具有产生消化酶,例如淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶和磷酸酶的优异能力的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.);产生乳酸的乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.);以及在代谢过程中通过使用残留在牲畜粪便中的臭味产生物质(例如氨、硫化氢和胺)来防止臭味的光合细菌(photosynthetic bacteria)。

[0005] 特别地,已知芽孢杆菌属和乳杆菌属为非常有用的益生菌,因为它们包括产生多种抗菌物质的菌株。这些乳酸菌产生称为细菌素(Bacteriocin)的抗微生物肽,其具有与抗生素抗性机制无关的抗菌机制。细菌素具有这样的多态性特征:其分子量、生物化学特性和抗微生物范围以及针对宿主的机制变化甚大。Klaenhammer将细菌素定义为针对与细菌素产生细菌接近的物种具有直接的抗菌活性的蛋白质或蛋白质复合物。

[0006] 同时,肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹痛和/或与改变的肠运动或肠习惯相关的刺激为特征的症状,这样的症状无法用解剖学或生物化学的异常来解释。IBS的常见症状还包括尿急、气胀和排便不尽感。因此,可将IBS分类为功能性胃肠病症,包括这样的病症,例如功能性气胀、非心脏性胸痛、非溃疡性消化不良和慢性便秘或腹泻。特别地,在IBS的情况下,由于相关症状会影响患者的健康和正常功能方面二者,因此除腹痛和不适之外,该疾病对发病率和生活质量具有巨大影响。

[0007] 炎症肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是其中肠中异常慢性炎症反复改善和复发的病症,包括所有肠炎性疾病,例如克罗恩病(Crohn's disease)、溃疡性结肠炎或

白塞病 (Behcet's disease), 但不限于此。在药物开发领域中已经进行许多研究以治疗 IBS 和 IBD。在这方面, 通常使用多种抗抑郁剂, 即使其在临床试验中的效力是中等的并且由于显著的副作用使其临床效用受到限制。还证实血清素能药物具有针对总体 IBS 症状的效力。然而, 由于最近的数个安全问题, 这些药物的应用已经以多种方式受到限制。因此, 对开发用于 IBS 的新治疗剂的兴趣与日俱增。

[0008] 同时, 变态反应 (allergy) 是表现出对外来物质 (抗原、变应原) 的独特、改变的应答的生物化学现象。引起症状的外来物质称为变应原, 而由那些症状引起的疾病称为变应性疾病。变态反应是由抗原-抗体反应引起的在活体中的病理过程。一般而言, 存在四种类型的变态反应, 这取决于引发反应和补体参与的时期。其中的 1 型是过敏型 (即刻型), 其中靶器官主要是消化器官、皮肤和肺, 并且常见症状包括胃肠变态反应、荨麻疹、萎缩性皮炎、变应性鼻炎和支气管哮喘, 等。已知 1 型的病理机制如下: 当抗原接触附着于肥大细胞和嗜碱性白细胞的表面的 IgE 抗体时, 靶细胞被活化以分泌化学递质, 例如组胺、白三烯和 PAF, 并随后血管和平滑肌收缩。这样的机制通常可与 4 型 (迟发型) 组合。换言之, 由于肥大细胞等的多种变化, 可引起这样的过敏反应和变应性反应。导致脱颗粒的肥大细胞活化由以下引起: 抗原、抗 IgE、凝集素等与 Fc 受体的结合; 过敏毒素等的刺激; 或另一些药物如合成促肾上腺皮质激素 (例如钙离子载体、化合物 48/80 和可待因)。

[0009] 已知肥大细胞和血液中的嗜碱性粒细胞是在身体中引起多种变应性疾病, 例如变应性鼻炎、变应性皮炎、哮喘、食物变态反应和过敏性休克的主要细胞。这些细胞在其表面上具有针对 IgE 的受体 (FcRI), 所述 IgE 是引起变态反应的抗体, 并且所述细胞被变态反应引起物质 (抗原、变应原) 刺激而从所述细胞中分泌出其自身的多种变态反应引起物质 (Kim Ket al, Eur J Pharmacol, 581:191-203, 2008)。

[0010] 在变应性疾病中, 如对于公众广泛已知的特应性皮炎是一种影响新生儿或儿童并可能持续直至成年期的慢性复发性皮肤病。像哮喘或变应性鼻炎一样, 特应性皮炎是一种与产生 IL-4 和 IL-5 的 T 淋巴细胞的局部浸润相关的炎性皮肤病。IL-4 控制 T 辅助 2 (Th2) 表型的发生, 导致免疫球蛋白 (Ig) 的过度产生和嗜酸性粒细胞增多, 以及血清 IgE 水平的提高。发现对于针对食品和吸入性变应原的皮肤测试呈阳性的对象中的 80% 至 90% 患有特应性皮炎。

[0011] 存在用于治疗或预防变应性疾病, 包括特应性皮炎的不同治疗, 但尚未找到有效的治疗。一些基于药物的治疗是已知的, 但是甚至用于治疗的药物的短期施用也会产生耐受性, 并且长期施用可引起严重的副作用, 因此最近避开了变应性疾病的这样的基于药物的治疗。在这种情况下, 在不进行具有任何绝对、明显作用的治疗的情况下, 刺激性症状 (例如除变态反应之外的皮肤的发痒和发红) 通常无法改善。

[0012] WO 96/29083 和 EP 554418 公开了在肠中形成菌落的两种类型的乳杆菌菌株, 即植物乳杆菌 299v (*Lactobacillus plantarum* 299v) (DSM 6595) 和干酪乳杆菌鼠李糖亚种 271 (*Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* 271) (DSM 6594), 等。EP 415941 公开了用于制备营养物组合物的方法, 其包括用酶处理燕麦糊 (oat gruel), 然后将其与乳杆菌 (lactobacilli) 混合。美国专利号 7195906 公开了用于治疗炎性疾病, 尤其是胃肠炎症 (例如 IBD 和 IBS) 的从切除并经洗涤的人胃肠道分离的双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 菌株。

[0013] 然而, 尚未发现对改善肠健康, 例如对 IBD 和 IBS 的治疗以及对减轻变应性症状具

有优异作用的菌株,并且为了找到具有这样的作用的菌株,许多研究机构已经在开展工作。

[0014] 在这种情况下,本发明人基于益生菌的健康改善作用不是属和种的一般属性而是具有菌株特异性的事实(Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food,London Ontario,Canada, 2002),筛选了多种菌株,并鉴定了对免疫调节、抗炎活性、减轻变态反应、改善肠健康和治疗肠病具有优异作用的新菌株。然后,通过确定这些菌株的优异作用完成了本发明。

### 发明概述

[0016] 本发明的目的是提供可用于改善肠健康、治疗或预防肠病、改善免疫调节、治疗或预防自身免疫病、减轻变应性症状、减轻炎症症状、减轻和治疗特应性皮炎的新菌株。

[0017] 为了实现该目的,本发明提供了副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号.KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)。

[0018] 另外,本发明提供了食品组合物或食品添加剂组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0019] 本发明还提供了用于治疗或预防肠病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0020] 本发明还提供了用于治疗或预防变应性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0021] 本发明还提供了用于治疗或预防自身免疫病或炎症性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)、副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0022] 本发明还提供了用于治疗肠病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0023] 本发明还提供了用于治疗变应性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0024] 本发明还提供了用于治疗自身免疫病或炎症性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号

KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)、副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0025] 本发明还提供了用于预防或治疗肠病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0026] 本发明还提供了用于预防或治疗变应性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0027] 本发明还提供了用于预防或治疗自身免疫病或炎性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0028] 本发明还提供了包含选自以下的至少一种的组合物用于制备肠病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)、副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0029] 本发明还提供了包含选自以下的至少一种的组合物用于制备变应性疾病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0030] 本发明还提供了包含选自以下的至少一种的组合物用于制备自身免疫病或炎性疾病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

## 附图简述

[0032] 图1示出了确定通过本发明的KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株在PBMC中控制炎性细胞因子的作用的结果。

[0033] 图2示出了确定通过本发明的KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株在PBMC中控制T细胞分化标志物的基因表达的作用的结果。

[0034] 图3示出了根据本发明的KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株在PBMC细胞系(其为通过添加抗CD3抗体而活化的T细胞)中的施用,观察细胞因子(A) IL-2、(B) IFN- $\gamma$ 、(C) IL-4、(D) IL-13、(E) IL-17A和(F) IL-10的表达水平的变化的结果。

[0035] 图4示出了在向诱导肠炎的小鼠模型施用本发明的KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株中的每一种之后,通过(A) 体重变化、(B) 结肠长度变化、(C) 结肠长度变化和盲肠重量变化、(D) 结肠组织的H&E染色以及(E) 结肠组织中MPO(髓过氧化物酶)水平的变化确定对减轻肠炎的作用的结果。

[0036] 图5示出了通过肠道壁紧密连接相关基因(A)ZO1、(B)密蛋白3(Claudin3)和(C)MUC4的表达水平的变化来观察本发明的KBL382菌株和KBL385菌株的增强紧密连接的作用的结果。

[0037] 图6示出了对通过本发明的KBL382菌株与可商购获得的用于治疗肠炎的抗体英夫利昔单抗(A)恢复结肠长度和(B)改善体重损失的作用进行比较以确定通过本发明的KBL382菌株减轻肠炎的作用的结果。

[0038] 图7示出了通过向诱导了特应性皮炎的动物模型施用本发明的KBL382菌株观察(A)皮炎评分测量、(B)发痒减轻效果、(C)皮肤厚度降低效果和(D)血液中IgE浓度降低效果以确定通过KBL382菌株减轻特应性症状的作用的结果。

[0039] 发明详述和具体实施方式

[0040] 除非另外定义,否则本说明书中使用的所有技术、科学术语具有与本领域普通技术人员(“本领域技术人员”)所理解的相同的含义。一般而言,本说明书中使用的术语在本领域是公知的并且是常用的。

[0041] 本发明已经确定了来源于人体的微生物的免疫调节作用,并且发现了具有优异免疫调节作用的副干酪乳杆菌菌株,即KBL382(登记号KCTC13509BP)、KBL384(登记号KCTC13510BP)和KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)。对所述菌株的16s rDNA的分析表明,所述菌株是尚未为公众所知的新菌株。

[0042] 在一个实施方案中,本发明涉及副干酪乳杆菌KBL382、副干酪乳杆菌KBL384或副干酪乳杆菌KBL385的新益生菌菌株,并且所述菌株的特征在于分别包含SEQ ID NO:1至3的16s rDNA序列,如下。

[0043] <SEQ ID NO:1>副干酪乳杆菌KBL382菌株的16s rDNA序列

[0044] >KBL382

GCAGGTGGCGGGTGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGACC  
GAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAA  
GTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTTC  
TTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGTTGATCGGCCAC  
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAA  
TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAC  
TCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCA  
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCG  
GCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGGA  
ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC  
[0045] TGTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGC  
CGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG  
AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTCCCTTCGGGGGCA  
AAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGC  
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAAT  
CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC  
GCTAGTAATCGGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC  
CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGA  
GCGTCTAAGTGGCTCACGCCT

[0046] <SEQ ID NO:2>副干酪乳杆菌KBL384菌株的16s rDNA序列  
[0047] >KBL384

GCCAGTGGGGGGGTGCTATACATGCAGTCGAACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGC  
 ACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCT  
 TAAGTGGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATG  
 GTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA  
 GTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACAGAGGTTGATCGG  
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
 ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTCGGGTCGTA  
 AAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCA  
 ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
 TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  
 CTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT  
 GAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC  
 GGCTGTCTGGTCTGTAACAGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA  
 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCA  
 GTGCCGAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC  
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGC  
 GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGG  
 GGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGT  
 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAGTAAGA  
 CTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGAC  
 CTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGC  
 TAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGA  
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC  
 GCCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGC  
 GAGCCGTCTAAGGTGAACCAAAGTTTG

[0048]

[0049] <SEQ ID NO:3>副干酪乳杆菌KBL385菌株的16s rDNA序列  
 [0050] >KBL385

GCAGTTGGGGGGGAGCTATACATGCAGTCGACGAGTTCTCGTTGATGATCGGTGCTTGCAC  
 CGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTA  
 AGTGGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCCAAGAACCGCATGGTT  
 CTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTT  
 GGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCA  
 CATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACA  
 ATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCTTTCGGGTGTA  
 CTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAAGTGTGCGGCGTGACGGTATCCAACC  
 AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT  
 CCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC  
 GGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG  
 AACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGG  
 CTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC  
 CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTG  
 CCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAA  
 GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  
 GAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGC  
 AAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC  
 GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTG  
 CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
 GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAA  
 TCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATC  
 GCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC  
 CCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGA  
 GCCGTCTAAGTGTACAAAGTT

[0052] 本发明还确定了除抗炎和免疫调节作用之外, KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株各自还对肠道壁的紧密连接具有增强作用, 并且向诱导了肠炎的动物模型施用KBL382菌株、KBL384菌株和KBL385菌株显著减轻了由于肠炎引起的体重损失和结肠长度降低。此外, 还确定了向诱导了特应性皮炎的动物模型施用上述菌株中的KBL382菌株显著改善了皮炎评分、减轻了发痒症状、降低了皮肤厚度、以及显著改善了由于变应性反应引起的血液中IgE浓度。

[0053] 因此, 在另一个实施方案中, 本发明涉及食品组合物或食品添加剂组合物, 其包含有效量的选自以下的至少一种: KBL382菌株、KBL384菌株或KBL385菌株的菌体、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0054] 所述食品组合物或食品添加剂组合物可容易地用作有效改善肠健康和预防肠病的食品, 例如作为食品、食品添加剂、健康功能性食品组合物或功能性饮料的主要成分或次要成分, 但不限于此。

[0055] 所述食品组合物或食品添加剂组合物可容易地用作有效减轻变应性症状的食品,

例如作为食品、食品添加剂、健康功能性食品组合物或功能性饮料的主要成分或次要成分，但不限于此。

[0056] 此外，所述食品组合物或食品添加剂组合物可容易地用作有效减轻自身免疫病或炎性疾病的食品，例如作为食品、食品添加剂、健康功能性食品组合物或功能性饮料的主要成分或次要成分，但不限于此。

[0057] 术语“食品”是指包含至少一种营养物的天然或人工产品，并且更优选地，是指通过某些加工成为可食用的产品，通常涵盖所有的食品、食品添加剂、健康功能性食品和功能性饮料。

[0058] 可包含根据本发明的所述食品组合物作为添加剂的食品可包括例如不同类型的食品、饮料、口香糖、茶、复合维生素和功能性食品。另外，本发明的食品包括特殊营养食品（例如，调制乳类、幼儿/婴儿食品等），肉加工产品，鱼肉产品，豆腐类，凉粉类，面条类（例如，方便面类、亚洲面条类），面包类，保健品，调味食品（例如酱油、大酱、辣椒酱、混合酱），酱汁类，饼干类（例如小吃类），糖果类，巧克力类，口香糖类，冰淇淋类，乳制品（例如，发酵乳、乳酪），其他加工食品，泡菜，腌制食品（例如，各种泡菜类、酱菜），饮料（例如，水果饮料、蔬菜饮料、豆乳类、发酵饮料类）以及天然调味料（例如，方便面调料），但不限于此。所述食品、饮料或食品添加剂可以以常规方式制备。

[0059] 术语“健康功能性食品”是其中通过使用物理、生物化学或生物工程技术为其增加价值，以针对预定目的发挥和表现其功能的食品组，或者经设计以充分表现相关食品组合物的体内调节功能，例如在预防、防范疾病以及从疾病中恢复中的节律调节的加工食品。这样的功能性食品可包含食品科学上可接受的食物补充添加剂，并且可另外包含在其制造中通常使用的合适的载体、赋形剂和稀释剂。

[0060] 本发明中使用的术语“功能性饮料”统指减轻口渴或享受味道的饮品。除包含用于改善或预防所述肠病症状的组合物作为具有指定比率的基本成分之外，对其没有特别的限制，并且像常规饮料中一样，其中可包含多种矫味剂或天然碳水化合物作为另外的成分。

[0061] 除上述之外，包含用于改善所述肠病的症状或对其预防的根据本发明食品组合物的食品可包含多种营养物、维生素、矿物质（电解质）、矫味剂例如合成矫味剂和天然矫味剂、着色剂和填充物（乳酪、巧克力等）、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH调节剂、稳定剂、防腐剂、甘油、醇、如碳酸饮料中使用的碳化剂等，并且上述成分中的每一种可以单独地或彼此组合使用。

[0062] 在包含根据本发明的食品组合物的食品中，本发明的组合物可以以基于所述食品的总重量的0.001重量%至100重量%，并且优选1重量%至99重量%的量包含在内；在饮料的情况下，其可以以基于100ml的0.001g至10g，并且优选0.01g至1g的量包含在内。然而，对于出于健康和卫生目的或出于健康控制目的而长期摄取时，该量可低于上述范围；并且由于有效成分在安全性谱方面没有问题，因此其可以以高于所述范围的数量使用，并且其不限于上述量的范围。

[0063] 根据本发明的食品组合物可包含单独的或与可接受载体组合的KBL382菌株、KBL384菌株或KBL385菌株，或者可以以适合于被人或动物消耗的组合物的形式制备。即，可向不含益生菌或含有数种益生菌的食品添加所述组合物。例如，在制备本发明的食品中，可与根据本发明的菌株组合使用的微生物应适合于被人或动物消耗，并且在摄取时具有抑制

病原性的有害细菌或改善哺乳动物肠道中微生物平衡的益生菌活性,但不限于此。这样的益生菌微生物可包括,例如,酵母例如酵母菌属(*Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)和球拟酵母属(*Torulopsis*);真菌例如曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、毛霉属(*Mucor*)和青霉属(*Penicillium*);以及属于以下的属的细菌等:乳杆菌属、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、芽孢杆菌属、链球菌属(*Streptococcus*)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和片球菌属(*Pediococcus*)。合适的益生菌微生物特别地可包括例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、消化乳杆菌(*Lactobacillus alimentarius*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、香肠乳杆菌(*Lactobacillus farciminus*)、格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasserii*)、瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)以及乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)等。优选地,根据本发明的食品组合物可还包含具有优异的益生菌活性和对增强免疫力具有优异作用的益生菌微生物混合物以进一步增强其作用。可包含在本发明的食品组合物中的载体可包括例如增量剂、高纤维添加剂、包封剂和脂质,其在本领域是广泛公知的。本发明中副干酪乳杆菌的菌株可以是冻干的或包封的形式,或者是培养悬浮液或干粉的形式。

[0064] 本发明的组合物也可以以包含所述菌株的饲料添加剂或包含所述菌株的饲料的形式提供。

[0065] 本发明的饲料添加剂可以是干燥或液体制剂的形式,并且除所述KBL382、KBL384或KBL385菌株之外还包含其他非病原性微生物。可添加至饲料添加剂的微生物可包括,例如,可产生蛋白酶、脂肪酶和糖转化酶的枯草芽孢杆菌;在厌氧条件下例如在牛胃中具有生理活性和有机化合物可降解性的乳杆菌菌株;对提高牲畜的体重、乳产量和饲料的消化率显示出作用的丝状真菌(例如米曲霉(*Aspergillus oryzae*))(Slyter, L.L.J. *Animal Sci.* 1976, 43. 910-926);以及酵母,例如酿酒酵母(Johnson, D.E. et al. *J. Anim. Sci.*, 1983, 56, 735-739; Williams, P.E.V. et al, 1990, 211)。

[0066] 本发明的饲料添加剂除所述副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株或副干酪乳杆菌KBL385菌株之外,可另外包含至少一种酶制剂。另外的酶制剂可以是干燥或液体的形式,并且可包括例如脂肪分解酶(例如脂肪酶)、通过降解植酸来产生磷酸和肌醇磷酸的植酸酶、淀粉酶(即,水解包含在例如淀粉和糖原中的 $\alpha$ -1,4-糖苷键的酶)、磷酸酶(即水解有机磷酸酯的酶)、降解纤维素的羧甲基纤维素酶、降解木糖的木糖酶、将麦芽糖水解开成两个葡萄糖分子的麦芽糖酶、以及糖产生酶(例如通过水解蔗糖产生葡萄糖-果糖混合物的转化酶)。

[0067] 在本发明的副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株或副干酪乳杆菌

KBL385菌株作为饲料添加剂的用途中,可使用饲料的原料成分,例如花生、豌豆、甜菜、果肉、谷物副产物、动物肠粉和鱼粉粉末(어분 가루),包括多种谷物和大豆蛋白质。可将其加工或不进行加工,并且可不受限制地使用。该加工可包括这样的过程(但不限于此):装载饲料的原料成分并且可在针对给定出口的压力下将其压缩,并且对于蛋白质,可优选地使用挤压,通过挤压降解蛋白质以提高可用率。挤压具有通过热处理使蛋白质变性以及破坏抗酶因子的优点。此外,对于大豆蛋白质,其消化率可通过挤压以使抗营养物例如存在于大豆中的蛋白酶抑制剂中之一的胰蛋白酶抑制剂失活来提高。此外,挤压可促进蛋白酶对消化率的提高,从而增强大豆蛋白质的营养价值。

[0068] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗或预防肠病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株或副干酪乳杆菌KBL385菌株的菌体、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0069] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗或预防变应性疾病药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株或副干酪乳杆菌KBL385菌株的菌体、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0070] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗或预防自身免疫病或炎症性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株或副干酪乳杆菌KBL385菌株的菌体、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0071] 本发明的药物组合物可以以活菌、干菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物,或与可药用的载体或介质组合的组合物的形式提供。本文中可使用的载体或介质可包括溶剂、分散剂、包衣、增强剂、控释制剂(即缓释制剂)或至少一种惰性赋形剂,包括淀粉、多元醇、颗粒、微细纤维素、微晶纤维素(例如Celphere、Celphere珠)、稀释剂、润滑剂、黏合剂、崩解剂等。如果期望的话,可通过标准的水性或非水性技术对上述组合物的片剂进行包衣。可药用载体和用作可药用惰性载体的赋形剂,以及所述另外的成分的一些实例可包括例如黏合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、抗微生物剂和包衣剂,但不限于此。

[0072] 本发明可以以以下来表征:所述肠病选自腹胀、腹部不适、由病原微生物引起的感染性腹泻、胃肠炎、炎症性肠病、神经源性肠炎综合征、肠易激综合征、小肠微生物的过度生长和肠饲性腹泻,并且所述疾病还包括由肠屏障功能受损引起的那些。

[0073] 炎症性肠病(IBD)可包括克罗恩病、伴有白塞病的肠病变、溃疡性结肠炎、出血性直肠溃疡和结肠袋炎,并且是指包括克罗恩病和溃疡性结肠炎的疾病组。溃疡性结肠炎仅影响结肠。溃疡性结肠炎的炎症和溃疡限于结肠的四层中的最内两层,即黏膜和黏膜下层。克罗恩病的炎症和溃疡可扩散遍布小肠和大肠二者中肠壁的所有层。

[0074] 同时,肠易激综合征是不仅伴有持续复发性的腹部不适和疼痛(例如腹胀),而且还伴有肠习惯改变(例如腹泻和便秘)的一种慢性病症。心理因素或紧张的社交环境可加剧所述症状。

[0075] 在本发明中,变应性疾病可包括特应性皮炎、荨麻疹、变应性鼻炎、变应性结膜炎、哮喘、食物变态反应和过敏性休克,但不限于此。

[0076] 在本发明中,自身免疫病可包括例如类风湿性关节炎、狼疮、系统性硬皮病、特应性皮炎、银屑病、银屑病关节炎、哮喘、吉兰-巴雷综合征(Guillian-Barre syndrome)、重症肌无力、皮炎、多肌炎、多发性硬化、自身免疫性脑脊髓炎、结节性多动脉炎、桥本甲状腺炎、多发性硬化、颞动脉炎、青少年糖尿病、斑秃、天疱疮、口疮性口炎、自身免疫性溶血性贫血、韦氏肉芽肿病、舍格伦综合征、艾迪生病、克罗恩病以及白塞病,但不限于此。

[0077] 此外,本发明的炎性疾病总体地是指以炎症作为主要病变的病症,并且可包括例如水肿、结膜炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、慢性鼻窦炎、咽喉炎、扁桃体炎、支气管炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、结肠炎、痛风、湿疹、痤疮、特应性皮炎、接触性皮炎、脂溢性皮炎、强直性脊柱炎、风湿热、纤维肌痛、骨关节炎、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、肩周关节炎、腱炎、腱鞘炎肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、舍格伦综合征、重症肌无力、脓毒症、血管炎、滑囊炎、颞动脉炎和多发性硬化,但不限于此。

[0078] 已知可通过使调节性T细胞(Treg)活化或分化为T细胞来预防或治疗自身免疫病。Treg(CD4<sup>+</sup> T细胞的一种类型)通过维持对自身抗原的耐受性,在调节免疫系统和控制自身免疫病中发挥作用。称为Foxp3的转录因子特异性地参与调节性T细胞的发育、维持和功能,所述调节性T细胞通过分泌免疫抑制性细胞因子IL-10和TGF- $\beta$ 来调节免疫应答。

[0079] 另外,已知当T细胞向Th1细胞、Th2细胞和Th17细胞的分化率低并且T细胞向Treg细胞的分化率高时,可有效地抑制炎性应答。

[0080] 已知从脾T细胞分化的Th1细胞、Th2细胞和Th17细胞与以下转录因子和细胞因子的表达相关:在Th1细胞的情况下,T-bet、IFN- $\gamma$ 和IL-12;在Th2细胞的情况下,GATA3和IL-5;在Th17细胞的情况下,ROR $\gamma$ t、IL-17。

[0081] 本发明可以以下来表征:可通过选自以下机制中的至少一种来诱导由本发明的菌株减轻、治疗或预防自身免疫病或炎性疾病的作用:

[0082] i) 抑制选自炎性细胞因子IL-6、TNF、IL-1b、IL-8、IL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-13和IL-17A中的至少一种的表达或分泌;

[0083] ii) 提高抗炎和免疫调节细胞因子IL-10的表达或分泌;以及

[0084] iii) 提高参与抗炎活性和免疫调节的Treg的表达。

[0085] 除非另外提及,否则术语“治疗”是指逆转或减轻与所述术语一起使用的疾病或病症或者其一种或更多种症状,抑制疾病或病症的进展,或者预防疾病或病症。本发明中使用的术语“治疗”是指如上所定义的“治疗”动作。因此,哺乳动物中肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的治疗或治疗方案可包括以下中的一种或更多种:

[0086] (1) 抑制肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的发展,

[0087] (2) 阻止肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的传播,

[0088] (3) 减轻肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病,

[0089] (4) 预防肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的复发,以及

[0090] (5) 减轻肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的症状。

[0091] 用于预防或治疗肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的本发明的组合物可包含单独的或与可药用的载体、赋形剂或稀释剂中的至少一种组合的药学有效量的副干酪乳杆菌KBL382菌株、副干酪乳杆菌KBL384菌株、副干酪乳杆菌KBL385菌株。

[0092] 在本发明中,术语“有效量”意指足够高以提供期望的效果但是足够低以预防在医

学判断下严重的副作用的量。鉴于施用途径和施用目标,可适当地调节通过本发明的组合物施用于身体的微生物的量。

[0093] 本发明的组合物可以以每天一次或更多次施用于对象。单位剂量意指适合于单位施用于人对象和其他哺乳动物的物理上离散的单位,并且每个单位包含合适的药物载体和预定量的本发明的微生物以提供治疗作用。用于经口施用于成年患者的剂量单位优选地包含0.001g或更多的本发明的微生物,以及本发明的组合物的经口剂量是0.001g至10g,并且优选0.01g至5g/剂量。本发明的微生物的药学有效量为0.01g至10g/天。然而,剂量取决于患者疾病的严重程度和微生物以及一起使用的辅助有效成分而变化。另外,总每天剂量可分为数次,并根据需要连续施用。因此,以上剂量范围不以任何方式限制本发明的范围。

[0094] 此外,上文使用的术语“可药用”是指在生理上可接受的并且当施用于人时不引起变应性反应例如胃肠病症、头晕或类似反应的组合物。

[0095] 本发明的组合物可使用本领域已知的方法来配制,以使得可提供在施用于哺乳动物之后的活性成分的迅速、持续或延迟释放。剂型可以是散剂、颗粒剂、片剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂、软或硬明胶胶囊剂、无菌注射溶液剂或无菌散剂。此外,用于预防或治疗肠病的本发明的组合物可通过数种途径来施用,包括经口、经皮、皮下、静脉内或肌肉施用。活性成分的剂量可取决于多种因素来适当地选择,例如施用途径、患者的年龄、性别、体重和患者的严重程度。用于预防或治疗胃肠病的本发明的组合物可与具有预防或治疗肠病症状的作用的已知化合物组合施用。

[0096] 特别地,本发明的药物组合物可以以经肠溶包衣制剂的经口单位剂型提供。本文中使用的术语“肠溶包衣”包含可保留在胃中而不被胃酸降解并且可在肠道中充分崩解以在其中释放活性成分的任何已知的可药用包衣。本发明的“肠溶包衣”是指当在36°C至38°C下使人工胃液(例如pH1的HCl溶液)与之接触时可维持2小时或更多时间并且随后可优选地在人工肠液(例如pH 6.8的KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>缓冲溶液)中在30分钟内降解的包衣。

[0097] 本发明的肠溶包衣以约16mg至30mg,优选16mg至20mg或25mg或更少的量对一个核芯进行包衣。当本发明的肠溶包衣的厚度为5μm至100μm,并且优选为20μm至80μm时,作为肠溶包衣可获得令人满意的结果。肠溶包衣的材料可适当地选自已知的聚合物材料。合适的聚合物材料列出于许多已知文献[L.Lachman et al., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 3<sup>rd</sup> ed., 1986, pp. 365~373; H.Sucker et al., *Pharmazeutische Technologie*, Thieme, 1991, pp. 355-359; Hagers *Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, 4<sup>th</sup> ed., Vol. 7, pp. 739~742和766~778, (SpringerVerlag, 1971); 以及 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 13<sup>th</sup> ed., pp. 1689~1691 (Mack Publ., Co., 1970)]中,并且纤维素酯衍生物、纤维素醚、丙烯酸树脂与丙烯酸甲酯的共聚物以及马来酸与邻苯二甲酸衍生物的共聚物可包括在其中。

[0098] 本发明的肠溶包衣可使用其中将肠溶包衣溶液喷涂到核芯上的常规肠溶包衣方法来制备。用于肠溶包衣过程的合适的溶剂是醇,例如乙醇;酮,例如丙酮;卤化烃溶剂,例如二氯甲烷(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>),以及这些溶剂的混合溶剂。以1:约0.05至约0.3(包衣材料:软化剂)的比率向包衣溶液添加软化剂,例如邻苯二甲酸二正丁酯或三乙酸甘油酯。连续进行喷涂过程是合适的,并且可鉴于包衣条件来调节喷涂量。喷涂压力可进行多种调节,并且通常在约1巴至约1.5巴的喷涂压力下可获得令人满意的结果。

[0099] 在另一个实施方案中,本发明涉及所述菌株或组合物用于预防或治疗肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的用途,以及所述菌株或组合物用于制备肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的治疗剂的用途。

[0100] 具体地,本发明涉及用于预防或治疗肠病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0101] 另外,本发明涉及用于预防或治疗变应性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0102] 另外,本发明涉及用于预防或治疗自身免疫病或炎性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0103] 本发明还涉及包含选自以下的至少一种的组合物用于制备肠病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0104] 另外,本发明涉及包含选自以下的至少一种的组合物用于制备变应性疾病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0105] 另外,本发明涉及包含选自以下的至少一种的组合物用于制备自身免疫病或炎性疾病的预防性或治疗性药物的用途:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0106] 本文中使用的术语“预防”与避免、延迟、阻碍或妨碍疾病以减少疾病相关。

[0107] 本文中使用的术语“治疗”与护理患有疾病的对象以改善、治愈或者减轻疾病的症状或者减轻或停止疾病的进展相关。

[0108] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于预防或治疗肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的方法,其包括向需要预防或治疗所述疾病、或者需要缓解肠健康、变应性反应、免疫力或炎性反应水平降低的对象施用药学有效量的所述菌株或所述组合物。

[0109] 具体地,本发明提供了用于治疗肠病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0110] 另外,本发明提供了用于治疗变应性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干

酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0111] 另外,本发明提供了用于治疗自身免疫病或炎性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:副干酪乳杆菌KBL382菌株(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384菌株(登记号KCTC13510BP)或副干酪乳杆菌KBL385菌株(登记号KCTC13511BP)、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0112] 由于上文已经描述了用于预防或治疗所述肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的方法的药物组合物及其施用方法,因此本文中省略所述组合物与所述方法之间的重叠内容以避免本说明书的过度复杂性。

[0113] 同时,可向其施用用于预防或治疗所述肠病、变应性疾病、自身免疫病或炎性疾病的组合物的所述对象包括所有动物,包括人。例如,对象可以是动物,例如狗、猫或小鼠。

[0114] 在下文中,将通过实施例更详细地描述本发明。这些实施例仅用于举例说明本发明,并且对于本领域技术人员将显然的是,本发明的范围不应解释为受这些实施例的限制。

[0115] 实施例1.具有免疫调节功能的益生菌菌株的筛选

[0116] 使用白血病单核细胞THP-1细胞系和外周血单个核细胞(PBMC)筛选具有免疫调节功能的益生菌菌株。将分别来源于人肠道或阴道的菌株接种至以上两种细胞系,以使得细胞系:菌株的比率为1:100,并测量IL-10(指示炎症控制的一种主要细胞因子)与IL-6(指示炎性反应的一种主要细胞因子)的比率(IL-10/IL-6),以及IL-10与IFN- $\gamma$ (指示自身免疫反应的一种主要细胞因子)的比率(IL-10/IFN- $\gamma$ )。使用共计23种菌株进行筛选,如下:两种格氏乳杆菌菌株、一种罗伊氏乳杆菌菌株、五种鼠李糖乳杆菌菌株、两种发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)菌株、四种副干酪乳杆菌菌株、四种唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)菌株、一种植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)菌株、两种嗜酸乳杆菌菌株和两种乳酸乳球菌菌株。

[0117] 作为筛选的结果,最高的IL-10/IL-6值示于副干酪乳杆菌的3种菌株KBL382、KBL384和KBL385中。特别地,在这三种副干酪乳杆菌菌株中,KBL382在THP-1细胞系中的最高IL-10/IL-6值为2.22,而IL-10/IFN- $\gamma$ 值在外周血单个核细胞中为9,显示出非常高的免疫调节作用。下表1示出了本筛选中使用的23种益生菌菌株中3种副干酪乳杆菌菌株的测量的IL-10/IL-6值和IL-10/IFN- $\gamma$ 值的结果。因此,预测副干酪乳杆菌的3种菌株KBL382、KBL384和KBL385对改善肠健康具有高作用,并且对这些菌株进行了另外的实验。

[0118] [表1]

细胞系	菌株	IL-10/IL-6
THP-1	副干酪乳杆菌 KBL382	2.222168
	副干酪乳杆菌 KBL384	0.621436
	副干酪乳杆菌 KBL385	1.08215
PBMC	副干酪乳杆菌 KBL382	9.0295403
	副干酪乳杆菌 KBL384	7.4016942
	副干酪乳杆菌 KBL385	7.9818579

[0120] 实施例2.副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株对炎性细胞因子表达和T细胞分化调节的作用的验证(体外测试)

[0121] 为了验证来自所述副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株的免疫调节作用,在用副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株处理的THP-1细胞系中确定产生参与免疫调节的细胞因子的能力,而在用副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株处理的PBMC中确定T细胞分化的标志物基因是否表达。

[0122] 首先,将THP-1细胞系以 $1 \times 10^5$ 个细胞接种到24孔板的每个孔上,分化为成熟的巨噬细胞,并随后更换培养溶液。在3小时之后,将一个孔用作为阳性对照的浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS处理,以及将另一些孔用副干酪乳杆菌KBL382、KBL384或KBL385菌株处理,每孔基于活菌的数目为 $1 \times 10^7$ 个细胞;在24小时之后,收集培养溶液,并使用BD流式微珠阵列(Cytometric Bead Array, CBA)人炎症试剂盒(目录号551811)根据制造商的方法测量每种细胞因子的量。作为阴性对照(Cont),将孔用PBS缓冲液处理,并进行相同的实验程序。作为结果,如图1中所示,测量显示,与经LPS处理的组相比,用副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株处理的THP-1细胞系组具有显著更低量的炎性细胞因子IL-6、TNF、IL-1b和IL-8。在用KBL384菌株处理的情况下,确定IL-6显著低于用LPS处理的测试组,但是TNF、IL-1b和IL-8与用LPS处理的组没有显著差异。在IL-10的情况下,与用LPS处理的组相比,在用KBL382、KBL384和KBL385处理的组中未观察到任何显著的提高或降低,但是观察到与阴性对照组相比诱导了IL-10水平的总体提高。因此,结论为:副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株有效地显著抑制THP-1细胞中炎性细胞因子的产生,并进行后续实验以验证T细胞分化的模式。

[0123] 为了确定KBL382和KBL385菌株对T细胞分化的作用,将PBMC细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞接种到24孔板的每个孔上,并随后以 $5 \times 10^6$ 个细胞添加副干酪乳杆菌KBL382或KBL385菌株。作为对照,以基于活细胞的数目的 $5 \times 10^6$ 个细胞向每个孔添加大肠杆菌(E. coli 0157 EC4115),或者以 $500 \text{ng}/\text{ml}$ 的浓度添加LPS。已知大肠杆菌提高作为与炎症应答有关的T细胞效应细胞标志物的T-bet、GATA3和ROR  $\gamma$  t基因的表达,而己知LPS提高与炎症调节有关的Treg细胞标志物FOXP3基因的表达。将在以上条件下制备的PBMC细胞测试组孵育5天,且随后获得并收集细胞。为了确定基因表达水平,首先,使用easy-spin™(无DNA)总RNA提取试剂盒(Intron)提取RNA,并随后使用高性能RNA-to-cDNA试剂盒(ThermoFisher)合成cDNA。使用Rotor-Gene SYBR Green PCR试剂盒(Qiagen)使用Rotor-Gene® Q(Qiagen)设备根据制造商的方法针对合成的cDNA进行实时PCR,并测量以下的mRNA表达:作为Th1标志物(效应细胞标志物)基因的T-bet、作为Th2标志物基因的GATA3、作为Th17标志物基因的ROR  $\gamma$  t以及作为Treg细胞标志物基因的FOXP3。此时,测量B2M基因的表达水平作为内部对照,以校正每个测试组之间的相对基因表达水平。用于确定每个基因表达的引物的碱基序列如下。

[0124] B2M

[0125] 正向:5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3'' (SEQ ID No.4)

[0126] 反向:5'-GAT GCT TCT TAC ATG TCT CG-3' (SEQ ID NO.5)

[0127] T-bet

[0128] 正向:5'-CCC CAA GGA ATT GAC AGT TG-3' (SEQ ID No.6)

[0129] 反向:5'-GGG AAA CTA AAG CTC ACA AAC-3' (SEQ ID NO.7)

[0130] GATA3

[0131] 正向:5'-CTG CAA TGC CTG TGG GCT C-3' (SEQ ID NO.8)

[0132] 反向:5'-GAC TGC AGG GAC TCT CGC T-3' (SEQ ID No.9)

[0133] ROR  $\gamma$  t

[0134] 正向:5'-AAG ACT CAT CGC CAA AGC AT-3'(SEQ ID No.10)

[0135] 反向:5'-TCC ACA TGC TGG CTA CAC A-3'(SEQ ID NO.11)

[0136] FOXP3

[0137] 正向:5'-TCA AGC ACT GCC AGG CG-3'(SEQ ID NO.12)

[0138] 反向:5'-CAG GAG CCC TTG TCG GAT-3'(SEQ ID NO.13)

[0139] 作为结果,如图2中所示,确定了与大肠杆菌相比,副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株将作为炎性T细胞的效应细胞标志物的T-bet、GATA3和ROR  $\gamma$  t基因的表达水平维持在显著较低的水平,但使作为Treg细胞标志物的FOXP3的mRNA显著提高,以维持类似于LPS的免疫稳态。

[0140] 实施例3.副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株对T细胞免疫调节的作用的验证(体外测试)

[0141] 同时,为了验证副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株对T细胞的免疫调节作用,当T细胞在PBMC细胞中活化,以及随后用所述副干酪KBL382、KBL384和KBL385菌株进行处理时,验证炎性细胞因子的表达水平。

[0142] 将PBMC细胞以 $2 \times 10^5$ 个细胞接种到96孔板的每个孔上,用抗CD3抗体( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , ebioscience)使T细胞活化,并随后基于活细胞的数目,以 $1 \times 10^7$ 个细胞添加副干酪乳杆菌KBL382、KBL384或KBL385菌株使得“细菌:PBMC=50:1”。作为对照,基于活细胞的数目,以 $1 \times 10^7$ 个细胞向每个孔添加大肠杆菌K12(*Escherichia coli* K12)(ATCC 10798)。在将以上条件下制备的T细胞活化的PBMC细胞的测试组孵育3天之后,收集上清液,并使用BD流式微珠阵列(CBA)炎症试剂盒(目录号551811),根据制造商的方法测量每种细胞因子的量。

[0143] 作为结果,如图3中所示,在通过添加抗CD3抗体使T细胞活化的PBMC细胞系中,与仅用添加大肠杆菌菌株和PBS处理的测试组相比,副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株均使作为Th1的细胞因子的IL-2、分别作为IFN  $\gamma$  和Th2的细胞因子的IL-4和IL-13以及作为Th17的细胞因子的IL-17A的表达显著降低,同时与仅用PBS处理的测试组相比,在实验中使用的所有3种副干酪乳杆菌菌株中,抗炎细胞因子IL-10均显著提高;确定了与添加大肠杆菌的组相比,在3种中(尤其是KBL 382菌株)使IL-10显著提高。如上的实验结果得出这样的结论:所有副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株均使T细胞的炎性细胞因子显著降低并使抗炎细胞因子提高。

[0144] 实施例4.副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株对肠炎减轻作用的效果的验证(体内测试)

[0145] 本实施例是为了确定副干酪乳杆菌KBL382、KBL384和KBL385菌株是否即使在体内也显示肠功能改善作用。为此,将C57BL/6小鼠分成每组10只小鼠的组,并随后喂食其中具有溶解的2% DSS的自来水,持续9天,并由此诱导肠炎。同时,对照组中的小鼠每天用 $200 \mu\text{l}$ 的PBS经口施用,而测试组中的小鼠通过用 $200 \mu\text{l}$ 稀释于PBS中为 $2 \times 10^{10}$ CFU/mL的副干酪乳杆菌KBL382、KBL384或KBL385菌株中的每一种经口施用来每天提供,以使得每天施用的量可设置为 $4 \times 10^9$ CFU。然后,在其中通过DSS诱导肠炎的9天期间,每天测量对照组和测试组中小鼠的体重变化,并且在提供DSS之后的第9天,对小鼠进行尸检以测量结肠的长度。

[0146] 作为结果,如图4中所示,确定了对于体重变化,与未处理的对照组中的小鼠相比,

用KBL382、KBL384和KBL385菌株处理的组均显示出对减轻体重损失的显著作用;对于结肠长度变化,与对照组中的小鼠相比,在3种菌株的所有组中,结肠长度的降低幅度均显著提高。

[0147] 另外,进行H&E染色以测量KBL382和KBL385菌株的测试组中的炎症程度,并在组织中测量髓过氧化物酶(MPO)水平。在尸检之后,为了通过H&E染色检查结肠的病变,将结肠的远端部分在10%中性福尔马林溶液中固定,并随后以5 $\mu$ m的厚度对石蜡组织标本进行切片,用苏木精和伊红染色,并在光学显微镜下观察。此外,对于MPO测量,首先将结肠组织放入其中添加蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中,并用匀浆器破碎。在4 $^{\circ}$ C下以15,000 $\times$ g离心经破碎的组织10分钟之后,使用上清液根据ELISA试剂盒(Hycult Biotech, MPO, 小鼠, 目录.HK210-02)的方案,测量MPO。

[0148] 作为结果,如图4中所示,通过H&E染色结果确定了与对照组相比,施用两种菌株KBL382和KBL385的测试组均减轻了炎症,并且MPO的水平在KBL385测试组中略微降低而在KBL382测试组中显著降低。使用使用由此获得的结肠组织来确定对肠道壁的紧密连接的增强作用。

[0149] 实施例5. 副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株对增强肠道壁紧密连接的作用

[0150] 为了验证副干酪乳杆菌KBL382和KBL385菌株对增强肠道壁紧密连接的作用,在从实施例4中所分离的小鼠结肠组织分离的细胞中,比较并测量了参与肠道壁紧密连接的基因的mRNA表达水平。为了检查基因表达的量,首先使用easy-spin<sup>TM</sup>(无DNA)总RNA提取试剂盒(Intron)从组织中提取RNA,并随后用高性能RNA-to-cDNA试剂盒(ThermoFisher)合成cDNA。使用Rotor-Gene<sup>®</sup>Q(Qiagen),使用Rotor-gene SYBR green PCR试剂盒(Qiagen)以在体内测量作为肠道壁紧密连接标志物蛋白质的闭锁小带蛋白-1(zonula occluden-1, ZO-1)、密蛋白3和MUC-4的mRNA表达水平。测量次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HPRT)基因的表达水平作为对照,以使每个测试组之间的相对基因表达水平归一化。制备用于确定表达的引物,使其能够与每个基因特异性地结合,如下。

[0151] Zo-1

[0152] 正向:5'-ACC CGA AAC TGA TGC TGT GGA TAG-3'(SEQ ID No.14)

[0153] 反向:5'-AAA TGG CCG GGC AGA ACT TGT GTA-3'(SEQ ID No.15)

[0154] 密蛋白3

[0155] 正向:5'-CAG ACG TCC GTC AGT TTT CG-3'(SEQ ID No.16)

[0156] 反向:5'-CAT GGC TGC TGG ACT TGA AC-3'(SEQ ID No.17)

[0157] MUC-4

[0158] 正向:5'-GTC TCC CAT CAC GGT TCA GT-3'(SEQ ID No.18)

[0159] 反向:5'-TGT CAT TCC ACA CTC CCA GA-3'(SEQ ID No.19)

[0160] HPRT

[0161] 正向:5'-TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC-3''(SEQ ID No.20)

[0162] 反向:5'-GCT TTA ATG TAA TCC AGC AGG T-3''(SEQ ID No.21)

[0163] 作为结果,如图5中所示,发现与用仅PBS给药的对照组相比,用KBL382和KBL385菌株给药的小鼠中测量的3个基因的水平均提高,并由此恢复了肠道壁的紧密连接;因此,所

述菌株可用于治疗疾病,例如IBD和IBS。

[0164] 实施例6.用于肠炎的治疗性抗体与KBL382之间的肠炎减轻作用的比较

[0165] 英夫利昔单抗(产品名称Remicade)是用作自身免疫病的注射剂的治疗性重组抗体药物,例如类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、成人克罗恩病、儿童克罗恩病、银屑病和银屑病关节炎。该研究的目的是确定KBL 382菌株与英夫利昔单抗之间在体内减轻肠病症状方面作用的差异。

[0166] 为了作用的比较,在将C57BL/6小鼠分成8只小鼠的组之后,向小鼠喂食其中具有溶解的2%DSS的自来水,持续9天,从而诱导肠炎。同时,每天向对照组中的小鼠经口施用200 $\mu$ l的PBS,而每天向测试组中的小鼠经口施用稀释于PBS中为 $2 \times 10^{10}$ CFU/mL的200 $\mu$ l KBL382菌株,以使得每天施用的量可以设置为 $4 \times 10^9$ CFU。对于治疗性抗体施用组,在第3天施用一次英夫利昔单抗抗体,剂量为5mg/kg/小鼠。

[0167] 之后,在其中通过DSS诱导肠炎的9天期间,每天测量对照组和测试组中小鼠的体重变化,并且在提供DSS之后的第9天,对小鼠进行尸检以测量结肠的长度。

[0168] 作为结果,如图6(A)中所示,对于结肠长度变化,确定了与对照组中的小鼠相比,在KBL382菌株处理和施用英夫利昔单抗的组中,结肠长度的降低幅度显著提高。确定了KBL382菌株处理的组的提高结肠长度的作用类似于,准确地说高于施用英夫利昔单抗的组。

[0169] 对于体重的变化,如图6(B)中所示,与未处理的对照组中的小鼠相比,在KBL382菌株处理和施用英夫利昔单抗的组中,对体重降低的作用显著提高。确定了在施用英夫利昔单抗的组中,在施用之后5天期间减轻初始体重损失的作用优于KBL382菌株处理的组,但是之后通过英夫利昔单抗的改善作用降低,而经KBL382菌株处理的组对体重损失的作用提高,直至第9天两组之间显示出相似的作用。因此,对于所述菌株用于治疗炎性肠病和肠易激综合症的用途,确定了类似于可商购获得的治疗性抗体的治疗作用是可以预期的。

[0170] 实施例7.KBL382对减轻特应性病症的作用

[0171] 为了验证KBL382菌株的特应性减轻的作用,使用NC/Nga小鼠模型,即特应性皮肤病的动物模型。

[0172] 在将NC/Nga小鼠分为9只小鼠的组之后,将每只小鼠的背从下耳至上尾脱毛,并将小鼠放置24小时。然后,每周一次或两次将包含粉尘螨提取物(Dermatophagoides farinae extract,DFE)(屋尘螨(house dust mite,HDM)抗原)的软膏施加到经脱毛的部分上,持续7周,以使得可用100mg的DFE处理每只小鼠,并由此诱导特应性皮炎。自皮炎诱导的第三周起,每天向对照组中的小鼠经口施用200 $\mu$ l的PBS;每天以200 $\mu$ l向测试组中的小鼠经口施用稀释于200 $\mu$ l的PBS中为至少 $1 \times 10^9$ CFU/小鼠的KBL382菌株和鼠李糖乳杆菌KBL365菌株中的每一种。然后,在施用细菌的4周期间,每周测量对照组和测试组中小鼠的皮炎评分,并在施用细菌之后的第4周,测量小鼠的抓挠时间和皮肤厚度,以及在对小鼠进行尸检之后血液中的IgE浓度。

[0173] 7-1.皮炎评分的评价

[0174] 为了评价经DFE诱导的皮肤病变,通过以下方法测量皮炎评分。自施用菌株以来的第3周起,以1周的间隔通过照相监测皮肤状况,持续4周。检查皮肤的干燥、水肿、红斑/出血和糜烂/脱落(erosion/excoriation)四个指标。评价总评分,其中无病变为0分,轻度为1

分,中度为2分,以及重度为3分。

[0175] 作为结果,如图7(A)中所示,与其中诱导了特应性皮炎的对照组(阴性)和施用KBL365菌株的组相比,在用KBL382菌株给药的组中,皮炎评分显著降低。作为结果,证实了根据KBL382菌株的摄取减轻了特应性皮炎评分的作用。

[0176] 7-2.对减轻发痒症状的作用

[0177] 为了验证根据KBL382菌株的施用在患有由DFE诱导的特应性皮炎的小鼠模型中减轻发痒的作用,在4周菌株施用之后的10分钟期间测量小鼠的抓挠数目。

[0178] 作为结果,如图7(B)中可见的,显示了与PBS施用组相比,在施用KBL382的测试组中,抓挠的数目显著降低,这确定了通过施用KBL382菌株减轻了特应性皮炎的发痒症状。

[0179] 7-3.皮肤厚度的降低

[0180] 为了验证在将KBL382施用于患有由DFE诱导的特应性皮炎的小鼠模型之后降低皮肤厚度的作用,在施用所述菌株之后4周,用测径器测量小鼠的耳厚度和背皮肤厚度,并且观察到由于特应性皮炎引起的水肿症状的减轻。作为结果,如图7(C)中可见的,观察到与对照组和经KBL365施用的组相比,在用KBL382给药的测试组中,耳和皮肤的厚度显著降低。

[0181] 7-4.血液中IgE浓度的降低

[0182] 已经发现,随着特应性皮炎的临床严重程度的提高,患有特应性皮炎的患者中的IgE的浓度通常提高(Matsumoto M, J. Immunol. 1999)。因此,通过在施用菌株之后3周收集血液,从中分离血清并使用Mouse IgE ELISASet(目录号555248, BD OptEIA™)来测量显示为特应性皮炎出现的代表性血液因子IgE的浓度。作为结果,如图7(D)中所示,发现在经口施用KBL382的测试组中,血液中IgE的浓度显著降低,这指示在摄取KBL382之后治疗特应性皮炎的作用。

[0183] 以上已经详细描述了本发明的一些特定方面,并且对于本领域技术人员而言明显的是,这些特定方面仅是一些优选的实施方案,并且本发明的范围不限于此。因此,本发明的范围实质上由与所附权利要求书以及权利要求书的等同方案限定。

[0184] 保藏组织的名称:韩国生命工学研究院

[0185] 登记号:KCTC13509BP

[0186] 登记日期:20180417

[0187] 保藏组织的名称:韩国生命工学研究院

[0188] 登记号:KCTC13510BP

[0189] 登记日期:20180417

[0190] 保藏组织的名称:韩国生命工学研究院

[0191] 登记号:KCTC13511BP

[0192] 登记日期:20180417

[0193] 工业实用性

[0194] 根据本发明的副干酪乳杆菌KBL382(登记号KCTC13509BP)、副干酪乳杆菌KBL384(登记号KCTC13510BP)和副干酪乳杆菌KBL385(登记号KCTC13511BP)的菌株具有优异的抗炎和免疫调节功能,对肠道壁的紧密连接具有极好的增强作用,抑制肠炎引起的体重损失和结肠长度降低,从而表现出对肠炎的治疗作用,以及减弱细胞的变应性反应,以及显著减轻特应性皮炎的症状,并由此提供对变应性疾病的改善。因此,单一菌株可实现增强抗炎作

用、增强免疫力、改善肠健康功能以及减轻变应性疾病,并由此可用作益生菌物质。

[0195] 独立文本的序列列表

[0196] 附序列列表的电子文件

[0197] 本发明还涉及以下各项实施方案(它们对应于原申请的权利要求书):

[0198] 1. 副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) KBL382 菌株,其登记号为 KCTC13509BP。

[0199] 2. 根据实施方案1所述的菌株,其特征在于所述菌株包含SEQ ID NO:1的16s rDNA 序列。

[0200] 3. 副干酪乳杆菌KBL384菌株,其登记号为KCTC13510BP。

[0201] 4. 根据实施方案3所述的菌株,其特征在于所述菌株包含SEQ ID NO:2的16s rDNA 序列。

[0202] 5. 副干酪乳杆菌KBL385菌株,其登记号为KCTC13511BP。

[0203] 6. 根据实施方案5所述的菌株,其特征在于所述菌株包含SEQ ID NO:3的16s rDNA 序列。

[0204] 7. 食品组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0205] 8. 食品添加剂组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0206] 9. 根据实施方案7所述的食品组合物,其特征在于所述组合物是用于改善肠健康的健康功能性食品组合物。

[0207] 10. 用于治疗或预防肠病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0208] 11. 根据实施方案10所述的药物组合物,其特征在于所述肠病选自腹胀、腹部不适、由病原微生物引起的感染性腹泻、胃肠炎、炎性肠病、神经源性肠炎综合征、肠易激综合征、小肠微生物的过度生长和肠饲性腹泻。

[0209] 12. 根据实施方案7所述的食品组合物,其特征在于所述组合物是用于改善变应性症状的健康功能性食品组合物。

[0210] 13. 用于治疗或预防变应性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0211] 14. 根据实施方案13所述的药物组合物,其特征在于所述变应性疾病是特应性皮炎、荨麻疹、变应性鼻炎、变应性结膜炎、哮喘、食物变态反应或过敏性休克。

[0212] 15. 根据实施方案7所述的食品组合物,其特征在于所述组合物是用于减轻自身免疫病或炎性疾病的健康功能性食品组合物。

[0213] 16. 用于治疗或预防自身免疫病或炎性疾病的药物组合物,其包含有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0214] 17. 用于治疗肠病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下

的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0215] 18. 用于治疗变应性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0216] 19. 用于治疗自身免疫病或炎性疾病的方法,其包括向有此需要的对象施用治疗有效量的选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0217] 20. 用于预防或治疗肠病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0218] 21. 用于预防或治疗变应性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0219] 22. 用于预防或治疗自身免疫病或炎性疾病的用途的组合物,其包含选自以下的至少一种:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0220] 23. 包含选自以下的至少一种的组合物用于制备肠病的预防性或治疗性药物的用途:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0221] 24. 包含选自以下的至少一种的组合物用于制备变应性疾病的预防性或治疗性药物的用途:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0222] 25. 包含选自以下的至少一种的组合物用于制备自身免疫病或炎性疾病的预防性或治疗性药物的用途:根据实施方案1至6中任一项所述的菌株、所述菌株的培养物、所述菌株的裂解物以及所述菌株的提取物。

[0223] 国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约国际表格

[0224] 原始保藏证明

[0225] 根据第7条第1款发布

[0226] 致:Ko生物技术有限公司

[0227] Ko生物技术有限公司

[0228] 首尔冠岳区Gwanak-ro, 1, 08826

[0229] 韩国

	I. 微生物标识	
	保藏人提供的标识参考: <b>副干酪乳杆菌 KBL382</b>	国际保藏机构提供的登记号: <b>KCTC 13509BP</b>
	II. 科学说明和/或建议的分类名称	
[0230]	以上第 I 项中标明的微生物附随: <input type="checkbox"/> 科学说明 <input type="checkbox"/> 建议的分类名称 (用叉号标记适用项)	
	III. 收到和接受	
	本国际保藏机构接受以上第 I 项中标明的微生物, 其于 2018 年 4 月 17 日收到。	
	IV. 收到转换类型请求书	
	本国际保藏机构于 _____ 收到以上第 I 项标明的微生物, 并于收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
	V. 国际保藏机构	
	名称: <b>韩国典型培养物保藏中心</b>	有权代表国际保藏机构者、或经授
[0231]	地址: 韩国全罗北道井邑市 Ipsin-gil 181 韩国生命工学研究院 (KRIBB), 56212	权官员签字:  KIM, Cha Young, 主任  日期: <b>2018 年 4 月 17 日</b>

[0232] BP/4表 (KCTC表17) 单页国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约国际表格

[0233] 原始保藏证明

[0234] 根据第7条第1款发布

[0235] 致: Ko生物技术有限公司

[0236] Ko生物技术有限公司

[0237] 首尔冠岳区Gwanak-ro,1,08826

[0238] 韩国

[0239]	<b>I. 微生物标识</b>	
	保藏人提供的标识参考: <b>副干酪乳杆菌 KBL384</b>	国际保藏机构提供的登记号: <b>KCTC 13510BP</b>
	<b>II. 科学说明和/或建议的分类名称</b>	
	以上第 I 项中标明的微生物附随: [ ] 科学说明 [ ] 建议的分类名称 (用叉号标记适用项)	
	<b>III. 收到和接受</b>	
本国际保藏机构接受以上第 I 项中标明的微生物, 其于 <b>2018 年 4 月 17 日</b> 收到。		
<b>IV. 收到转换类型请求书</b>		
本国际保藏机构于 _____ 收到以上第 I 项标明的微生物, 并于 _____ 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。		
<b>V. 国际保藏机构</b>		
名称: <b>韩国典型培养物保藏中心</b>		
有权代表国际保藏机构者、或经授权官员签字:		
[0240]	地址: 韩国全罗北道井邑市 Ipsin-gil 181 韩国生命工学研究院 (KRIBB), 56212	
	KIM, Cha Young, 主任 日期: <b>2018 年 4 月 17 日</b>	

[0241] BP/4表 (KCTC表17) 单页国际承认用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约国际表格

[0242] 原始保藏证明

[0243] 根据第7条第1款发布

[0244] 致:Ko生物技术有限公司

[0245] Ko生物技术有限公司

[0246] 首尔冠岳区Gwanak-ro,1,08826

[0247] 韩国

I. 微生物标识	
保藏人提供的标识参考: <b>副干酪乳杆菌 KBL385</b>	国际保藏机构提供的登记号: <b>KCTC 13511BP</b>
II. 科学说明和/或建议的分类名称	
以上第 I 项中标明的微生物附随:	
[ ] 科学说明	
[ ] 建议的分类名称 (用叉号标记适用项)	
III. 收到和接受	
本国际保藏机构接受以上第 I 项中标明的微生物, 其于 <b>2018 年 4 月 17 日</b> 收到。	
IV. 收到转换类型请求书	
本国际保藏机构于 _____ 收到以上第 I 项标明的微生物, 并于 _____ 收到将原始保藏转换为根据布达佩斯条约保藏的请求书。	
V. 国际保藏机构	
名称: <b>韩国典型培养物保藏中心</b>	有权代表国际保藏机构者、或经授权官员签字:
地址: 韩国全罗北道井邑市 Ipsin-gil 181 韩国生命工学研究院 (KRIBB), 56212	KIM, Cha Young, 主任 日期: <b>2018 年 4 月 17 日</b>

[0249]

[0250] BP/4表 (KCTC表17)

单页

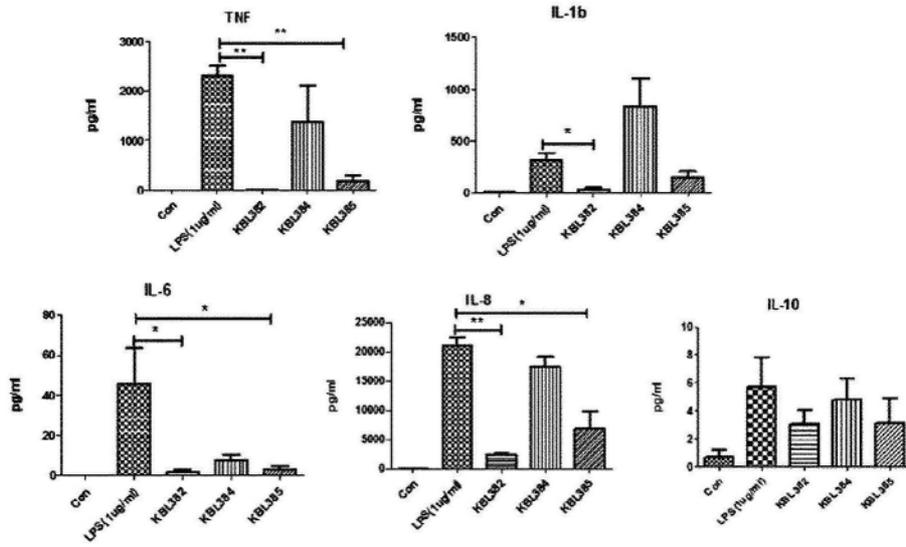


图1

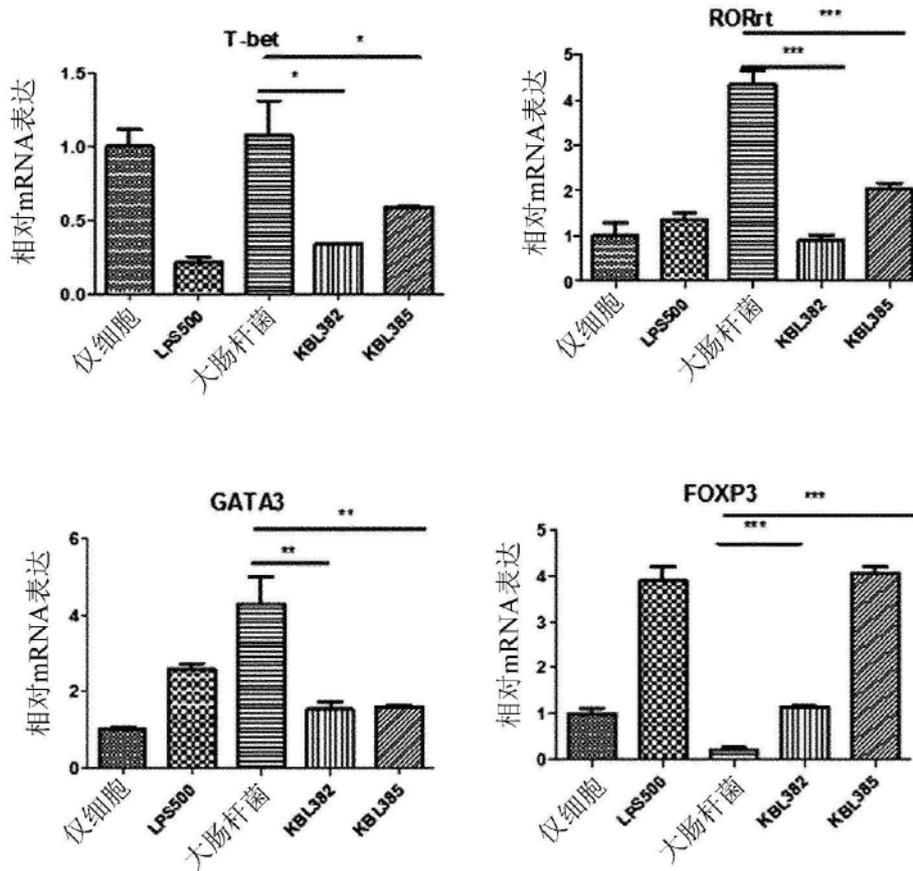


图2

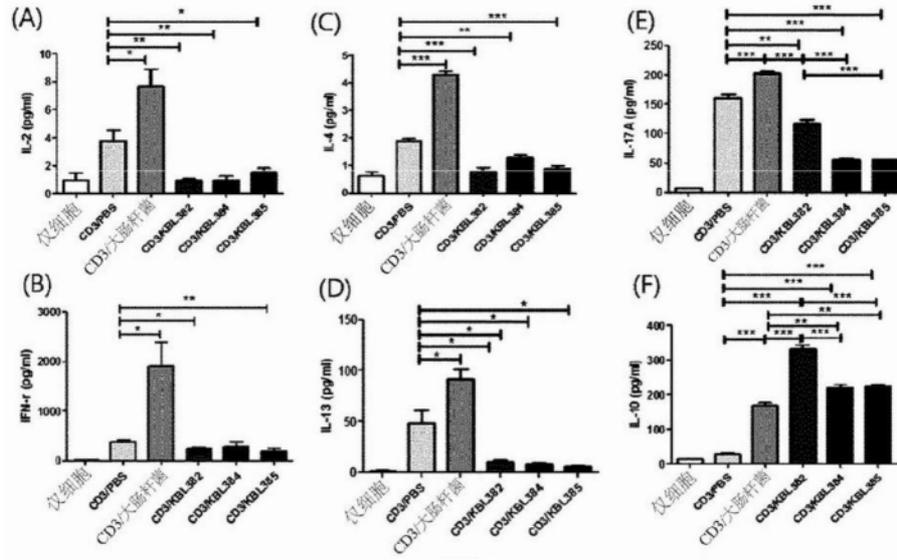


图3

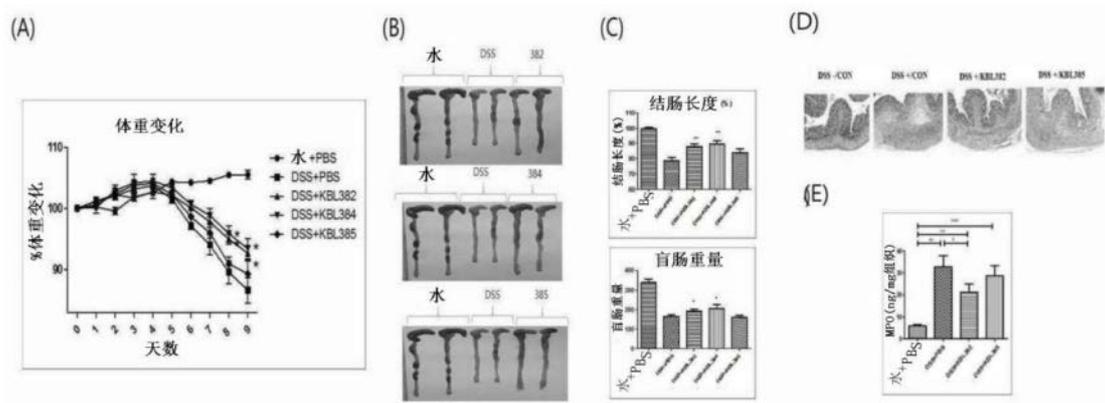


图4

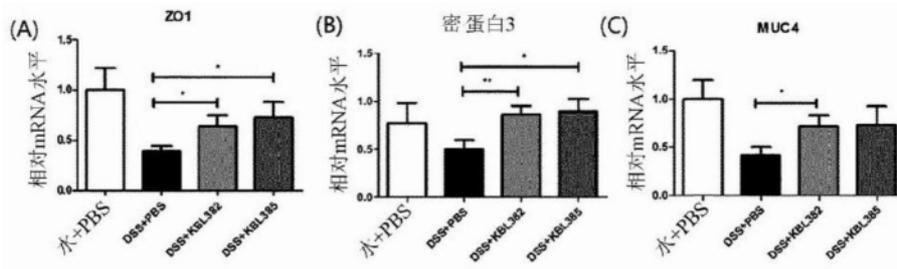


图5

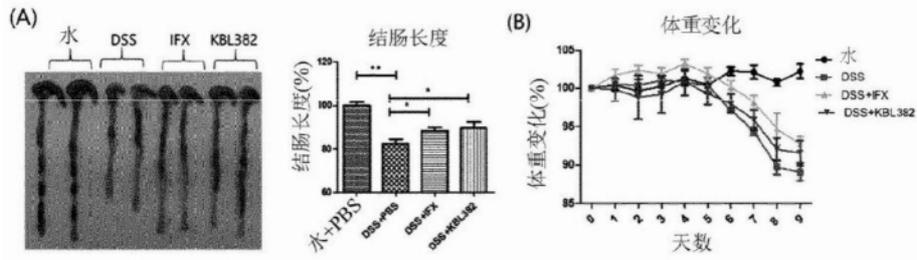


图6

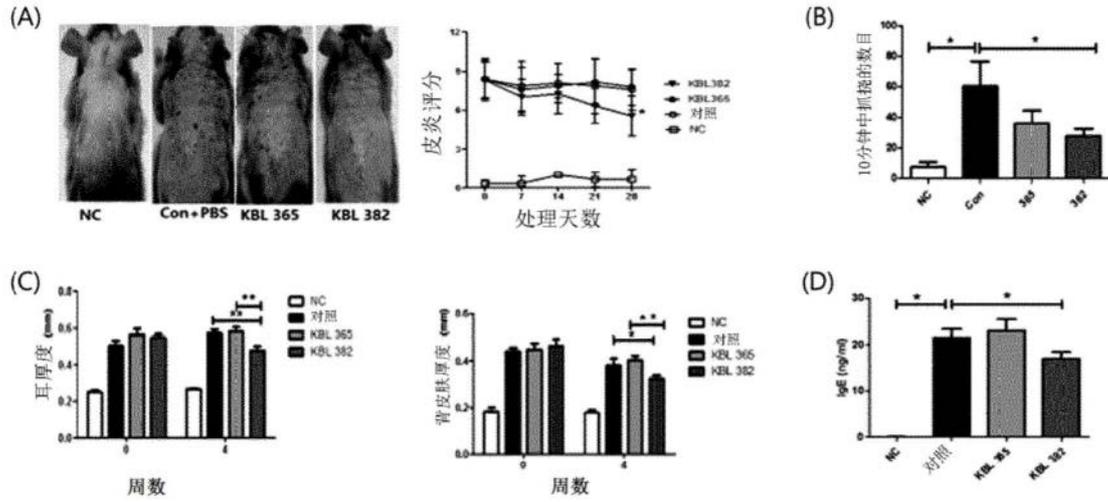


图7