

## **ÖZET**

### **BIFIDOBACTERIUM LONGUM VE FONKSİYONEL GASTROİNTESTİNAL BOZUKLUKLAR**

- 5 Mevcut buluş genel olarak probiyotik bakteriler alanı ile ilgilidir. Özellikle, Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 gibi Bifidobacterium longum ve bunun hazmedilebilir bileşimlerde kullanımı ile ilgilidir. Mevcut buluşta tarif edilen bileşim fonksiyonel GI bozukluklarını tedavi etmek veya önlemek için kullanılabilir.

## İSTEMLER

1. Anksiyete bağlantılı fonksiyonel mide-bağırsak (GI) bozukluklarının tedavisinde ve /  
veya önlenmesinde kullanılmak üzere *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999'u  
5 içeren bileşim olup, burada fonksiyonel GI bozukluğu, irritabl bağırsak sendromu,  
fonksiyonel dispepsi, fonksiyonel kabızlık, fonksiyonel diyare, fonksiyonel abdominal  
ağrı, fonksiyonel şişkinlik, Epigastrik Ağrı Sendromu, Postprandiyal Distress  
Sendromu veya bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilmektedir.
2. Önceki istemlerden birine göre bileşim olup, burada bileşim, bir gıda bileşimi, bir  
10 evcil hayvan gıda bileşimi, bir diyet takviyesi, bir nutrasötik, bir beslenme formülü, bir  
içecek ve / veya bir tıbbi bileşimi içeren gruptan seçilmektedir.
3. Önceki istemlerden birine göre bileşim olup, burada bileşim ek olarak en az bir başka  
gıda sınıfı bakteri içermektedir, burada gıda sınıfı bakteriler tercihen laktik asit  
bakterileri, bifidobakteriler, propiyonibakteriler veya bunların karışımlarından oluşan  
15 gruptan seçilmektedir.
4. Önceki istemlerden birine göre bir bileşim olup, burada bileşim ayrıca en az bir  
prebiyotik içermektedir.
5. İstem 4'e göre bir bileşim olup, burada prebiyotik oligosakkaritlerden oluşan gruptan  
seçilmektedir ve isteğe bağlı olarak fruktoz, galaktoz, mannoz, soya ve / veya inülin  
20 içerir; diyet lifleri; veya bunların karışımlarını içermektedir.
6. Yukarıdaki istemlerden birine göre bir bileşim olup, burada bileşim içinde en az % 5,  
tercihen en az % 10, daha tercihen en az % 15 *Bifidobacterium longum* ATCC  
BAA-999 bulunması uygundur.
7. Önceki istemlerden birine göre bileşim olup, burada *Bifidobacterium longum* ATCC  
25 BAA-999'un en az % 80'i, tercihen en az % 90'ı, daha tercihen en az % 95'i, bileşim  
içinde çoğalmamaktadır.
8. Önceki istemlerden birine göre bileşim olup, burada bileşim günlük doz başına  $10^4$  ve  
 $10^{10}$  *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 hücresi içermektedir.
9. İstem 1 ila 8'den birine göre bileşim olup, buradaki bileşim, bileşimin kuru ağırlığının  
30 gramı başına  $10^2$  ila  $10^8$  hücre *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999  
içermektedir.
10. Önceki istemlerden birine göre bileşim olup, ayrıca hidrolize peynir altı suyu proteini

içeren bir protein kaynağı içermektedir.

- 11.** Önceki istemlerden birine göre toz halinde bileşim olup 0.2'den daha küçük, örneğin 0.19-0.05 aralığında, tercihen 0.15'ten küçük bir su aktivitesine sahiptir.

## TARİFNAME

### BIFIDOBACTERIUM LONGUM VE FONKSİYONEL GASTROİNTESTİNAL BOZUKLUKLAR

5

Mevcut buluş genel olarak probiyotik bakteriler alanı ile ilgilidir. Özellikle Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 olarak adlandırılan Bifidobacterium longum NCC3001 (ATCC BAA-999), ve bunun yutulabilir bileşimlerde kullanımı ile ilgilidir. Burada tarif edilen bileşim, anksiyete bağlantılı fonksiyonel gastrointestinal (GI) bozuklukları tedavi etmek veya önlemek için kullanılabilir.

Fonksiyonel GI bozukluklar (FGID'ler), irritabl bağırsak sendromu (IBS) ve fonksiyonel dispepsiye içine alan ve yüksek morbidite ile ilişkili kronik rahatsızlık ya da ağrı, şişkinlik ve IBS değişmiş bağırsak alışkanlıkları (ishal ve / veya kabızlık) durumlarında görülen bozukluklar grubudur.

Genel popülasyonda FGID'lerin yaygınlığı, % 15-% 30 arasında değişen oldukça yüksek bir orana sahiptir ve önemli derecede ekonomik yük getirmektedir. Sadece IBS için yıllık doğrudan maliyetlerin, önemli ölçüde ek dolaylı maliyetlere (örneğin işten çalışma vb.) sahip 8 sanayileşmiş ülkede yaklaşık US41 milyar ABD Doları civarında olduğu ileri sürülmüştür. FGID'ler için güncel tedaviler, hastalık patogenezinin yetersiz derecede anlaşılması ile tarihsel olarak ilişkili olan en iyi marjinal etkinliği göstermektedir.

IBS'nin kesin patofizyolojisi açıklığa kavuşmuştur.

Yakın zamandaki çalışmalar IBS hastalarında intestinal mikroflorada mukozal inflamasyon ve değişiklikler olduğunu ve bağırsak enfeksiyonları ile bir hastalık ilişkisi olduğunu tanımlamıştır.

Bazı probiyotiklerin anti-bakteriyel, anti-viral ve antienflamatuar özellikler sergiledikleri ve bağırsak mikrobiyota dengesini eski haline getirebildikleri gerçeği, IBS için uygun terapötik ajanlar haline gelebildiklerini ortaya koymuştur.

Bugüne kadar farklı probiyotiklerin IBS konularına etkisi üzerine çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmalar, probiyotik kullanımının IBS semptomlarında düzelme ile ilişkili olabileceğini, ancak tüm probiyotiklerin IBS'de eşit etkinliğe sahip olmadığını da ortaya koymaktadır.

Son zamanlarda yapılan bazı meta analizlerde, diğer probiyotiklerin etkinliği üzerine

yorum yapmak için yeterli veri bulunmadığı sonucuna varılmıştır. [Lynne V McFarland, et al., World J Gastroenterol 2008 May 7; 14(17): 2650-2661; Nourieh Hoveyda, et al., BMC Gastroenterology 2009, 9:15; E. Corazziari et al., "Approach to the Patient with Disorders of Intestinal Function", NeuroGastroenterologia, vol.12, no.1, 01 March 2006, p.42-43 (Lynne V McFarland ve ark., Dünya J Gastroenterol 2008 7 Mayıs; 14 (17): 2650-2661; Nourieh Hoveyda ve ark., BMC Gastroenterology 2009, 9:15; E. Corazziari ve ark., "Bağırsak Fonksiyonu Bozuklukları Olan Hastaya Yaklaşım", NeuroGastroenterologia, cilt.12, no.1, 01 Mart 2006, s.42-43)].

Sonuç olarak, bu buluşun amacı, tekniğin bilinen durumunu iyileştirmek ve özellikle tekniği, anksiyete bağlantılı fonksiyonel GI bozukluklarını tedavi etmek veya önlemek için kullanılabilen bir uygulama yönteminin istenmeyen yan etkiler olmaksızın etkili, halihazırda temin edilebilen, düşük fiyatlı ve bir alternatif bakteri suşunu içeren bir bileşim sağlamaktır.

Mevcut buluş sahipleri bu ihtiyacı ele almıştır. Bu amacı bağımsız istemlerin konusuyla başarabileceklerini gördüklerinde şaşırmışlardır. Bağımlı istemler, bu buluşun fikrini daha da geliştirmektedir.

Fonksiyonel GI bozukluklarına bağlı anksiyetenin tedavi edilmesinde ve / veya önlenmesindeki etkinliğin, kullanılan bakteri cinsi, türü ve türüne bağlı olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu buluşun bir uygulaması, irritabl bağırsak sendromu; fonksiyonel dispepsi; fonksiyonel kabızlık, fonksiyonel ishal; fonksiyonel karın ağrısı; fonksiyonel şişkinlik, Epigastrik Ağrı Sendromu, Postprandiyal Distress Sendromu veya bunların kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilen anksiyete bağlantılı fonksiyonel GI bozukluklarının tedavisinde ve / veya önlenmesinde kullanılmak üzere Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 içeren bir bileşimdir.

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999, mevcut buluşun amacına ulaşmasında özellikle etkili olduğu bulunan Bifidobacterium longum suşlarının bir türüdür.

Avantajlı olarak, Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 ticari olarak temin edilebilmektedir ve test edilmiştir ve örneğin gıda ürünlerine eklenmek üzere kabul edilebilir bulunmuştur. Bifidobacterium longum ATCC BAA-999, bebeklerde ve küçük çocuklarda enfeksiyöz diyarenin profilaksisi için bir Lactobacillus ile birlikte tanımlanmıştır (EP 1974735 A). Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 ve LC-PUFA içeren bebek formülü, bebeklerde veya küçük çocuklarda doğal immün savunmaların güçlendirilmesine yönelik olarak açıklanmıştır (WO 2004/112507). Bifidobacterium longum ATCC BAA-999'un FOS / GOS prebiyotik ile birlikte uygulanmasının, yeni doğanlarda kabızlık

vakalarını azalttığı bildirilmiştir. [Puccio et al., "Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live Bifidobacterium and prebiotics", Nutrition, Elsevier Inc., US, vol. 23, no. 1, 22 December 2006 (Puccio ve ark., "Canlı Bifidobacterium ve prebiyotik içeren, bebekler için yeni bir başlangıç maması klinik değerlendirmesi", Nutrition, Elsevier Inc., US, cilt 23, no. 1, 22 Aralık 2006)].

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999'un anti-enflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (WO 2007/093619).

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999), ticari olarak uzman tedarikçiden, örneğin Japonya'dan Morinaga Milk Industry Co. Ltd.'den BB536 ticari markasıyla elde edilebilir.

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999) herhangi bir uygun yöntemle göre kültürlenebilir. Ürünlere, örneğin, dondurularak kurutulmuş veya püskürtülerek kurutulmuş bir formda ilave edilebilir.

"Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999)" terimi, bakteri, bakteri parçaları ve/veya bakterinin fermente ettiği bir büyüme ortamını kapsamaktadır.

Kompozisyon herhangi bir bileşim olabilir, ancak tercihen oral, enteral veya rektal olarak uygulanacak bir kompozisyonudur.

Örneğin, bileşim yenilebilir bir bileşim olabilir.

"Yenilebilir" terimi, insan veya hayvan tüketimi için onaylanmış bir materyal anlamına gelmektedir.

Tipik olarak, bileşim, bir gıda bileşimi, bir evcil hayvan gıda bileşimi, bir diyet takviyesi, bir nutrasötik, bir beslenme formülü, bir içecek ve / veya bir tıbbi bileşimi içeren gruptan seçilebilir.

Mevcut buluşun bileşimi bir gıda bileşimi ise, bu, böyle bir bileşimin eczanelerde, ilaç depolarında, aynı zamanda kompozisyonların herkes tarafından kolayca bulunabileceği normal süpermarketlerde dağıtımına çıkarılması avantajına sahiptir.

Genel olarak gıda bileşimlerinin hoş tadı, ürünün kabul edilmesine katkıda bulunacaktır. Özellikle küçük çocuklar veya evcil hayvanların, genellikle sevilen bir tat ile kompozisyonları kolayca tüketme olasılığı daha yüksektir.

Mevcut buluşa uygun gıda ürünlerinin örnekleri, yoğurtlar, sütler, aromalı sütler, dondurma, tatlı yemeye hazır olanlar, örneğin su veya süt ile sulandırılmaya yönelik tozlar, çikolatalı sütli içecekler, malt içecekler, hazır yemekler; insanlar için hazır yemekler veya

içecekler veya evcil hayvanlar veya hayvancılık amaçlı tam veya kısmi bir beslenmeyi temsil eden gıda bileşimleridir.

Sonuç olarak, bir düzenlemede mevcut buluşa göre bileşim insanlar, evcil hayvanlar veya hayvancılık için amaçlanan bir gıda ürünüdür.

5 Bileşim, köpekler, kediler, domuzlar, sığırlar, atlar, keçiler, koyunlar veya kümes hayvanlarından oluşan gruptan seçilen hayvanlar için tasarlanabilir.

Tercih edilen bir uygulamada, bileşim yetişkin türler, özellikle insan yetişkinler için amaçlanan bir gıda ürünüdür.

Bu buluşun bileşimi ayrıca koruyucu hidrokolloidler (örneğin sakızlar, proteinler, 10 modifiye edilmiş nişastalar), bağlayıcılar, film oluşturuocu maddeler, kapsülleme ajanları / malzemeleri, duvar / kabuk malzemeleri, matris bileşikler, kaplamalar, emülsifiye ediciler, yüzey aktif maddeler, çözündürücü ajanlar (yağlar, yağlar, balmumları, lesitinler vb.), adsorbanlar, taşıyıcılar, dolgu maddeleri, yardımcı bileşikler, dağıtıcı maddeler, ıslatıcı maddeler, işleme yardımcıları (çözücüler), akan maddeler, tat maskeleye maddeleri, 15 ağırlıklandırma maddeleri, jelleştirici maddeler, jel oluşturma ajanları, antioksidanlar ve antimikrobiyalleri de ihtiva edebilir. Bileşim ayrıca, bunlarla sınırlı olmamakla birlikte, su, jelatin, herhangi bir adjuvan, jelatin, ligninsülfonat, talk, şekerler, nişasta, arap zımkı, bitkisel yağlar, polialkilen glikoller, tatlandırıcılar dahil olmak üzere geleneksel farmasötik katkı maddeleri ve katkı maddeleri, eksipyanlar ve seyreltici ajanlar, koruyucular, 20 stabilizatörler, emülsifiye edici maddeler, tamponlar, kayganlaştırıcılar, renklendiriciler, ıslatıcı maddeler, dolgu maddeleri ve benzerlerini içerebilir. Her durumda, söz konusu diğer bileşenler, hedeflenen alıcıya uygunluğu göz önüne alınarak seçilecektir.

Kompozisyon, besinsel olarak eksiksiz bir formül olabilir.

Buluşa göre bileşim bir protein kaynağı içerebilir.

25 Herhangi bir uygun diyet proteini, örneğin hayvan proteinleri (süt proteinleri, et proteinleri ve yumurta proteinleri gibi); bitkisel proteinler (soya proteini, buğday proteini, pirinç proteini ve bezelye proteini gibi); serbest amino asitlerin karışımları; veya bunların kombinasyonları kullanılabilir. Kazein ve peynir altı suyu gibi süt proteinleri ve soya proteinleri özellikle tercih edilmektedir.

30 Proteinler sağlam veya hidrolize olabilir veya sağlam ve hidrolize edilmiş proteinlerin bir karışımı olabilir. Örneğin inek sütüne alerji geliştirme riski taşıyan insan özneleri ve / veya hayvanlar için kısmen hidrolize edilmiş proteinlerin (%2 ila %20 arasında hidroliz derecesi) sağlanması arzu edilebilir.

Ayrıca, önceden hidrolize olmuş protein kaynakları genellikle daha kolay sindirilmektedir ve bozulmuş bir gastrointestinal yol tarafından emilmektedir.

Hidrolize proteinler gerekliyse, hidroliz işlemi arzu edildiği gibi ve teknikte bilindiği gibi gerçekleştirilebilir. Kısmen hidrolize proteinlerin (%2 ila 20 arasında hidroliz derecesi) sağlanması arzu edilebilir.

Örneğin, bir peynir altı suyu proteini hidrolizatı, bir veya daha fazla aşamada peynir altı suyu fraksiyonunun enzimatik olarak hidrolize edilmesiyle hazırlanabilir. Başlangıç malzemesi olarak kullanılan peynir altı suyu fraksiyonu esas olarak laktoz içermiyorsa, hidroliz işlemi sırasında proteinin daha az lizin blokajı yaşadığı bulunmuştur. Bu, lizin blokajının derecesinin, toplam lizin ağırlığının yaklaşık % 15'inden, örneğin, protein kaynağının beslenme kalitesini büyük ölçüde geliştiren, lizin ağırlığının yaklaşık % 10'undan daha azına, örneğin ağırlıkça yaklaşık % 7'den azına indirilmesini mümkün kılmaktadır.

Bileşim ayrıca bir karbonhidrat kaynağı ve bir yağ kaynağı içerebilir.

Bileşim bir yağ kaynağı içeriyorsa, yağ kaynağı tercihen bileşimin enerjisinin % 5 ila % 40'ını, örneğin enerjinin % 20 ila % 30'unu sağlamaktadır. Kanola yağı, mısır yağı ve yüksek oleik asit ayçiçeği yağı karışımı kullanılarak uygun bir yağ profili elde edilebilir.

Bileşime bir karbonhidrat kaynağı eklenebilir.

Karbonhidratların kaynağı, tercihen bileşimin enerjisinin % 40 ila % 80'ini sağlamaktadır. Sakaroz, laktoz, glikoz, fruktoz, mısır şurubu katıları, maltodekstrinler ve bunların karışımları gibi uygun herhangi bir karbonhidrat kullanılabilir. İstenirse diyet lifi de eklenebilir. Diyet lifleri, enzimler tarafından sindirilmemiş ince bağırsaktan geçer ve doğal bir madde ve laksatif olarak işlev görmektedir. Diyet lifi, çözünebilir veya çözünmez olabilir ve genellikle iki tipin bir karışımı tercih edilmektedir. Uygun diyet lifleri, soya, bezelye, yulaf, pektin, guar zımkı, kısmen hidrolize guar zımkı, arap zımkı, fruktooligosakkaritler, asidik oligosakkaritler, galaktooligosakkaritler, sialillaktoz ve hayvan sütlerinden türetilen oligosakkaritlerdir. Tercih edilen bir lif karışımı, kısa zincirli fruktooligosakkaritlere sahip bir inülin karışımıdır. Tercihen, eğer lif mevcutsa, lif içeriği tüketilen bileşimin 2 ila 40 g / l arasında, daha tercihen 4 ila 10 g / l arasındadır.

Bileşim ayrıca, USDA gibi Devlet organlarının tavsiyelerine uygun olarak eser elementler ve vitaminler gibi mineraller ve mikro-besinler de içerebilir. Örneğin, bileşim günlük verilen dozlarda aşağıdaki aralıklarda aşağıdaki mikro besinler içerebilir: - 300 ila 500 mg kalsiyum, 50 ila 100 mg magnezyum, 150 ila 250 mg fosfor, 5 ila 20 mg demir, 1 ila

7 mg çinko, 0.1 ila 0.3 mg bakır, 50 ila 200 µg iyot, 5 ila 15 µg selenyum, 1000 ila 3000 µg beta karoten, 10 ila 80 mg C Vitamini, 1 ila 2 mg Vitamin B1, 0.5 ila 1.5 mg Vitamin B6, 0.5 ila 2 mg Vitamin B2, 5 ila 18 mg niasin, 0.5 ila 2.0 µg Vitamin B12, 100 ila 800 µg folik asit, 30 ila 70 µg biyotin, 1 ila 5 µg Vitamin D, 3 ila 10 µg Vitamin E.

- 5 İstenirse bir veya daha fazla gıda sınıfı emülsiyonlaştırıcı; örneğin mono- ve di-gliseritlerin diasetil tartarik asit esterleri, lesitin ve mono- ve di-gliseritler bileşime dahil edilebilir. Benzer şekilde uygun tuzlar ve stabilizatörler dahil edilebilir.

Bileşim, örneğin süt veya su ile yeniden birleştirme için bir toz formunda, oral ve / veya enteral olarak uygulanabilir.

- 10 Mevcut buluşun tercih edilen bir uygulamasına göre, bileşim en az bir başka türde başka gıda sınıfı mikroorganizma içermektedir.

"Gıda sınıfı" mikroorganizmalar, gıdalarda kullanım için güvenli olan mikroorganizmalardır.

Gıda sınıfı mikroorganizmalar tercihen gıda sınıfı bakteri veya gıda sınıfı mayadır.

- 15 Gıda sınıfı bakterileri, laktik asit bakterileri, bifidobakteriler, propiyonibakteriler veya bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilebilir. Gıda sınıfı maya olarak, örneğin *Saccharomyces cerevisiae* ve / veya *Saccharomyces boulardii* kullanılabilir.

Gıda sınıfı bakteriler probiyotik bakteriler olabilir.

- 20 "Probiyotik", konakçıların sağlığı veya iyiliği üzerinde faydalı bir etkiye sahip mikrobiyal hücre preparatları veya mikrobiyal hücre bileşenleri anlamına gelmektedir. [Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10 (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. ve ark. "Probiyotikler: nasıl tanımlanmalıdır" Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107-10)].

- 25 Probiyotik bakteriler tercihen laktik asit bakterileri, bifidobakteriler, propiyonibakteriler veya bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilmektedir. Probiyotik bakteriler, yerleşik probiyotik özelliklere sahip herhangi bir laktik asit bakterisi veya bifidobakteri olabilir. Örneğin, bifidojenik bağırsak mikrobiyotalarının gelişimini de destekleyebilirler.

- 30 Uygun probiyotikler *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* ve *Saccharomyces* veya bunların karışımları, özellikle *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*,

Enterococcus faecium, Saccharomyces boulardii ve Lactobacillus reuteri veya bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilebilir; tercihen Lactobacillus johnsonii (NCC533; CNCM I-1225), Bifidobacterium longum (NCC490; CNCM I-2170), Bifidobacterium longum (NCC2705; CNCM I-2618), Bifidobacterium lactis (2818; CNCM I-3446),  
5 Lactobacillus paracasei (NCC2461; CNCM I-2116), Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC53103), Lactobacillus rhamnosus (NCC4007; CGMCC 1.3724), Enterococcus faecium SF 68 (NCIMB10415), ve bunların karışımlarından oluşan gruptan seçilebilir.

Mevcut buluşun tercih edilen bir uygulamasında, bileşim ayrıca en az bir prebiyotik içermektedir. "Prebiyotik", bağırsaklarda probiyotik bakterilerin gelişimini desteklemeyi  
10 amaçlayan gıda maddeleri anlamına gelmektedir.

Prebiyotikler bu şekilde bağırsaklarda bazı probiyotik bakterilerin, özellikle de probiyotik bakterilerin gelişimini destekleyebilir ve böylece Bifidobacterium longum ATCC BAA-999'un etkisini arttırabilir. Ayrıca, bazı prebiyotikler, örneğin sindirim üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir.

15 Tercihen prebiyotik, oligosakkaritlerden oluşan gruptan ve isteğe bağlı olarak fruktoz, galaktoz, mannoz, soya ve / veya inülin, diyet lifleri veya bunların karışımlarını içeren gruptan seçilebilir.

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999, hem canlı bakteri hem de inaktive edici replikasyonu olmayan bakteriyel türler olarak kullanılabilir.

20 "Çoğalmayan" ifadesi, klasik kaplama metotları ile canlı hücrelerin ve / veya koloni oluşturma birimlerinin tespit edilemeyeceği anlamına gelir. Bu klasik kaplama yöntemleri mikrobiyoloji kitabında özetlenmiştir: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology. 7th edition, Springer Science, New York, N.Y. 790 p (James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern gıda  
25 mikrobiyolojisi. 7. baskı, Springer Science, New York, NY 790 s.). Tipik olarak, yaşayabilir hücrelerin yokluğu şu şekilde gösterilebilir: agar plakaları üzerinde görünür koloni yok veya farklı büyüme bakteriyel preparatlarla ("replike olmayan" örnekler) inokülasyondan ve uygun koşullar altında inkübasyondan sonra sıvı büyüme ortamında türbidite yoktur (en az 24 saat boyunca aerobik ve / veya anaerobik atmosfer).

30 Bifidobacterium longum ATCC BAA-999'un en azından bir kısmının bileşimde canlı olması ve tercihen bağırsakta canlı kalması tercih edilmektedir. Bu sayede bağırsakta kalabilirler ve çoğalmalarıyla etkinliklerini arttırabilirler. Aynı zamanda, komensal bakteriler ve / veya konakçı ile etkileşime girerek de etkili olabilirler.

Örneğin, özel steril gıda ürünleri veya ilaçları için, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999'un kompozisyonda replikasyonu olmayan bir formda bulunması tercih edilebilir. Bu nedenle, bu buluşun bir uygulamasında, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999'un en azından bir kısmı, bileşim içinde çoğalmamaktadır.

5 Terapötik uygulamalarda, bileşimler hastalığın semptomlarını ve komplikasyonlarını en azından kısmen iyileştirmek veya durdurmak için yeterli bir miktarda uygulanmaktadır. Bunu gerçekleştirmek için yeterli bir miktar "terapötik olarak etkili bir doz" olarak tanımlanmaktadır. Bu amaç için etkili olan miktarlar, hastalığın şiddeti, hastanın ağırlığı ve genel durumu gibi teknikte uzman kişilerce bilinen bir dizi faktöre bağlı olacaktır.

10 Profilaktik uygulamalarda, buluşa göre bileşimler, bir hastalığa yakalanma riskini en azından kısmen azaltmak için yeterli bir miktarda belirli bir hastalığa yatkın veya başka bir şekilde risk altında olan bir hastaya uygulanmaktadır. Böyle bir miktar "profilaktik etkili bir doz" olarak tanımlanmaktadır. Yine, kesin miktarlar, hastanın sağlık durumu ve kilo gibi hastaya özgü bazı faktörlere bağlıdır.

15 Genel olarak, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 terapötik olarak etkili bir dozda ve / veya profilaktik etkili bir dozda uygulanacaktır.

*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 canlı bir formda mevcutsa, bu bakterilerin bağırsakları kolonize edip çoğaltabileceği göz önünde bulundurulduğunda herhangi bir konsantrasyonda teorik olarak etkilidir.

20 Bu buluşun bileşimi için, genellikle, bileşimin günlük dozunun, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999'un  $10^4$  ve  $10^{12}$  cfu (koloni oluşturma birimleri) arasında oluşması tercih edilmektedir. Uygun bir günlük *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 dozu,  $10^4$  ila  $10^{11}$  cfu, daha tercihen  $10^4$  ila  $10^{10}$  cfu'dur.

25 Mevcut buluşun bileşimi, bileşimin gram kuru ağırlığı başına  $10^2$  ve  $10^{10}$  cfu, tercihen  $10^2$  ila  $10^9$  koloni oluşturu birim, daha tercihen  $10^2$  ila  $10^8$  cfu *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 içerebilir.

İnaktif ve / veya replikasyonu olmayan *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 durumunda, bu buluşun bileşiminin, bileşimin kuru ağırlığının her bir gramı için, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 kopyalayıcı olmayan  $10^2$  ve  $10^{10}$  replikasyonu 30 olmayan hücreler içermesi tercih edilmektedir. Belirli bir uygun *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 dozu, bileşimin kuru ağırlığının her bir gramı için  $10^3$  ila  $10^8$  çoğalmayan, daha tercihen  $10^5$  ila  $10^8$  çoğalmayan hücredir.

Açıkçası, çoğalmayan mikroorganizmalar koloniler oluşturmamaktadır, sonuç olarak,

hücreler terimi, kopyalanan bakteriyel hücrelerin belirtilen miktarından elde edilen çoğalmayan mikroorganizmaların miktarı olarak anlaşılmalıdır. Bu, inaktive olan, yaşayamayan veya ölü olan veya DNA veya hücre duvarı materyalleri gibi fragmanlar halinde bulunan mikroorganizmaları içermektedir.

- 5 Bu buluşun bileşimi, 0.2'den daha küçük, örneğin 0.19-0.05 aralığında, tercihen 0.15'ten daha küçük bir su aktivitesine sahip olan toz formunda sağlanabilir.

Bileşim, rafa dayanıklı bir toz olabilir. Düşük su aktivitesi bu raf stabilitesini sağlamaktadır ve probiyotik mikroorganizmanın, örneğin *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999'un, uzun depolama sürelerinden sonra bile geçerli kalmasını sağlamaktadır. Su aktivitesi veya  $a_w$ , bir sistemdeki suyun enerji durumunun ölçümüdür. Aynı sıcaklıkta saf su ile bölünen suyun buhar basıncı olarak tanımlanmaktadır; bu nedenle, saf damıtılmış su, tam olarak bir su aktivitesine sahiptir.

Ek veya alternatif olarak, probiyotik mikroorganizma *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, kapsüllenmiş bir formda sağlanabilir.

- 15 Bakterilerin kapsüllenmesinin terapötik ve teknik avantajlara sahip olduğu bulunmuştur. Kapsülleme, bakterilerin hayatta kalmasını ve böylece bağırsağa ulaşan canlı bakterilerin sayısını arttırmaktadır. Dahası, bakteriler, bakterinin, hastanın sağlığı üzerindeki uzun süreli hareketine izin vererek yavaş yavaş serbest bırakılmaktadır. Bakteriler, örneğin FR2443247 (*Société des Produits Nestlé*) dokümanında tarif edildiği gibi mikro kapsüllenmiş olabilir.

- 20 Kısaca, bakteriler dondurularak veya spreyle kurutulularak bir jele dahil edilebilir.

Mevcut buluş sahipleri, bu buluşun bileşiminin, hipokampal BDNF ekspresyonunu önemli ölçüde arttırmak için başarılı bir şekilde kullanılabildiğini bulmaya özellikle şaşırmışlardır. BDNF (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör), eşsiz bir polipeptid büyüme faktörleri ailesinden bir büyüme faktörüdür. BDNF ve diğer nörotrofik faktörler, örn., NGF (sinir büyüme faktörü), NT-3 (nörotrofin-3) ve NT-4 (nörotrofin-4), sinir sisteminin sağlığı ve iyiliği için gereklidir.

Bu etki, fonksiyonel bağırsak bozukluklarına karşı gözlenen etkiyi açıklayabilir.

- "Fonksiyonel GI bozukluğu" terimi, semptomları açıklayabilen yapısal veya biyokimyasal bir neden olmaksızın kronik abdominal şikayetler ile karakterize edilen bir bağırsak rahatsızlıkları grubunu ifade etmektedir.

Fonksiyonel GI bozuklukları, teknikte uzman kişilerce iyi bilinmektedir ve Longstreth ve arkadaşları tarafından, örneğin *GASTROENTEROLOGY* 2006, 130: 1480-1491 dokümanında örnek olarak, orta veya alt gastrointestinal sisteme atfedilebilen semptomları

olan fonksiyonel gastrointestinal bozukluklar olarak tarif edilmiş ve tanımlanmıştır.

Fonksiyonel GI bozukluğu, irritabl bağırsak sendromu; fonksiyonel dispepsi; fonksiyonel kabızlık, fonksiyonel ishal; Fonksiyonel abdominal ağrı, fonksiyonel şişkinlik, Epigastrik Ağrı Sendromu, Postprandiyal Distress Sendromu veya bunların 5 kombinasyonlarından oluşan gruptan seçilebilir.

Bu buluşun konusu tarafından tedavi edilebilen veya önlenebilen fonksiyonel GI bozukluklar, anksiyeteye bağlı fonksiyonel GI bozukluklardır.

Anksiyete, tipik olarak huzursuzluk, korku ya da endişeyle ilişkili hoş olmayan bir duyguya yol açan psikolojik ve fizyolojik bir durumdur. Anksiyete örneğin strese verilen 10 normal bir tepkidir. Bir kişinin iş yerinde veya okulda zor bir durumla başa çıkmasına yardımcı olabilir, ancak - aşırı olduğunda- kaygı bozukluğu, anksiyeteye bağlı bir grup fonksiyonel GI bozukluklarına neden olmaktadır.

Buluş sahipleri, teori ile sınırlanmaksızın, mevcut buluşun bileşimlerinin etkili olduğu altta yatan mekanizmanın, muhtemelen büyük olasılıkla psikolojik faktörlerle ilişkili olan çift 15 yönlü mikrobiyal-bağırsak-beyin ekseninin modülasyonu ile ilişkili olduğuna inanmaktadır.

Mevcut buluşun diğer özellikleri ve avantajları aşağıdaki Örnekler ve Şekillerden kaynaklanmaktadır:

Şekil 1, bir karanlık kutu / parlak kutu testinin sonucunu göstermektedir: parlak kutuda harcanan toplam süre, parlak kutuya tekrar girmesinin gecikmesi ve *Trichuris muris* (Tm) ile 20 enfekte edilen farelerde düşmenin gecikmesi. Tm-orta ve Tm-B. longum, sırasıyla taze ortam (negatif kontrol) ve *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 ile tedavi edilen Tm ile enfekte edilmiş farelerdir; *L. rhamnosus* (L. rh) suşu ile tedavi edilen bir Tm grubu mukayese için gösterilmiştir.

Şekil 2, bir *Trichuris muris* (Tm) ile enfekte edilen farelerin beyin hipokampal bölgesinde in 25 situ hibridizasyonun sonuçlarını göstermektedir. TM-B. longum, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 ile tedavi edilen Tm ile enfekte edilmiş farelerdir; *L. rhamnosus* suşu ile tedavi edilen bir Tm grubu karşılaştırması için gösterilmiştir. 35S sinyallerinin ölçümü, otoradyografi ve görüntü analizi (sağ üst panel) ile yapılmıştır.

Şekil 3, *Trichuris muris* (Tm) ile enfekte edilen farelerde miyeloperoksidaz aktivite testi (sol 30 panel) ve mononükleer hücre infiltrasyonu (sağ panel) ile ölçülen kolonik inflamasyon üzerinde elde edilen sonuçları göstermektedir. Tm-orta ve Tm-B. longum, taze ortam (negatif kontrol) ve *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 ile tedavi edilen Tm ile enfekte olmuş farelerdir; *L. rhamnosus* suşu ile tedavi edilen bir Tm grubu karşılaştırması

için gösterilmiştir.

### **Örnekler:**

### **Araç ve yöntemler**

### **Bakteri kültürü koşulları:**

- 5 Probiyotikler (Karşılaştırma için *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 ve *L. rhamnosus* NCC4007), Man-Rogosa-Sharpe (MRS, BioMerieux) et suyunda (% 0.5 sistein ile bifidobakteriler) anaerobik koşullar altında büyütülmüştür. 37 °C'de 24 saat sonra, 600 nm'de optik yoğunluğun ölçülmesiyle bakteri sayısı tahmin edilmiştir (1 OD600 = 10<sup>8</sup> bakteri / mL). Bakteriyel hücreler 5000 x g'de 15 dakika boyunca 4 °C'de santrifüjleme ile
- 10 pellet haline getirilmiş ve ayrıca harcanan kültür ortamında 10<sup>10</sup> / mL'lik bir konsantrasyonda yeniden süspanse edilmiştir. 1 mL alikotlar, kullanılıncaya kadar dondurulmuştur.

### **Hayvanlar:**

- Erkek BALB/c veya AKR fareleri (Harlan, Kanada), 6-8 yaş arası alımlar olmuştur ve
- 15 McMaster Üniversitesi Merkez Hayvan Tesislerinde geleneksel olarak spesifik bir patojen içermeyen Birim içinde barındırılmıştır. Tüm deneyler McMaster Üniversitesi Hayvan Bakım Komitesinin onayı ile gerçekleştirilmiştir.

### **Tasarım:**

### **Kronik T. muris enfeksiyonu:**

- 20 Erkek AKR fareleri, T. muris (300 yumurta / fare) (n = 26) veya plasebo (n = 9) ile gavajlanmıştır. Enfekte edilen fareler daha sonra 10 gün boyunca 30. günden itibaren *L. rhamnosus*, *B. longum* ya da taze MRS ile günlük olarak temizlenmiştir. Enfekte edilmemiş fareler günlük 30 ila 40 günlük günden itibaren taze MRS ile temizlenmiştir. Probiyotik veya plasebo uygulamasının sonunda, fareler karanlık kutu / parlak kutu ve aşağıya çekilme
- 25 testlerine tabi tutulmuştur. Daha sonra fareler kurban edilmiş ve doku örnekleri alınmıştır. Kolon örnekleri histolojik analiz için formalin içine sabitlenmiş veya MPO tayini için donmuşlardır. Beyinler, sıvı nitrojen içine daldırılarak dondurulmuş ve in situ hibridizasyon için saklanmıştır.

### **Davranış testi:**

- 30 **Karanlık kutu / parlak kutu:**

Anksiyete davranışı, literatürde tarif edildiği gibi karanlık kutu / parlak kutu kullanılarak farelerde ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Kısaca, her bir fare, bir açıklık (10x3 cm)

ile daha küçük bir karanlık kutuya (30x15 cm) bağlanan ışıklı parlak kutunun (30x30 cm) ortasına yerleştirilmiştir. Parlak kutudaki her farenin loko-motor davranışı, bir dijital video kamera ile 10 dakika boyunca kaydedilmiş ve bir çevrim dışı analiz için bir bilgisayarda saklanmıştır. Karartılmış bir gözlemci tarafından parlak bir kutuda geçirilen toplam zaman, 5 parlak kutuyu yeniden girmek için gecikme (ilk girdiden sonra karanlık kutuda geçirilen süre) ve geçit sayısı (karanlık kutudan parlak kutuya geçiş sayısı) dahil olmak üzere çeşitli parametreler değerlendirilmiştir.

#### **Düşürme testi:**

Anksiyete davranışı, literatürde tarif edildiği gibi adım aşağı testi kullanılarak 10 değerlendirilmiştir. Kısaca, her bir fare, bir siyah zeminin ortasına yerleştirilmiş yükseltilmiş bir platformun (3 cm yüksekliğinde 7.5 cm) ortasına yerleştirilmiştir. Kaideden aşağı inme gecikmesi bir kronometre ile ölçülmüştür; testin maksimum süresi 5 dk olmuştur.

#### **Histoloji:**

Kolon örnekleri % 10 formalinde sabitlenmiş ve daha sonra hematoksilin-eozin ile 15 boyanmıştır. Slaytlar, akut ve kronik inflamatuvar infiltrat derecesine ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

#### **Miyeloperoksidaz aktivite testi:**

Akut intestinal inflamasyonu değerlendirmek için, daha önce tarif edildiği gibi donmuş dokularda mieloperoksidaz aktivitesi (MPO) testi yapılmıştır. MPO aktivitesi, bir 20 birim MPO'nun, oda sıcaklığında 1 dakika içinde 1 µmol hidrojen peroksiti suya dönüştürebilen enzimin bir miktarı olarak tanımlandığı, mg doku başına birim olarak ifade edilmektedir.

#### **CNS'de in situ hibridizasyon:**

Hipokampusta BDNF ve hipotalamusta CRH düzeyleri (paraventriküler nükleus), 25 önceden tarif edildiği gibi donmuş beyin kesitlerinde 35S etiketli RNA probuları kullanılarak in situ hibridizasyonlar ile değerlendirilmiştir (Whitfield ve ark., 1990; Foster ve ark., 2002). Kısaca, beyinler çıkarılmış ve -60 °C'de 2-metilbütan içinde daldırılarak hızla dondurulmuş ve -70 °C'de saklanmıştır. Kriyostat ile kesilmiş 12 µm kalınlığında koronal kesitler, jelatin kaplı slaytlar üzerine eritilerek monte edilmiş, kurutuldu ve -35 °C'de saklanmıştır. Doku 30 kesitleri% 4 formaldehit ile sabitlenmiş, 0.1 M trietanolamin-HCl içinde % 0.25 asetik anhidrit ile asetillenmiş, pH 8.0, dehidre edilmiş ve kloroform ile delipide edilmiştir. Antisens BDNF ribonükleotid probu (Dr. J. Lauterborn ve California Irvine Üniversitesi'nden Dr. C. Gall'in hediyesi) ve anti-sens CRH ribonükleotid probu (Dr. James

Herman hediyesi, Cincinnati Üniversitesi), sırasıyla  $\alpha$ -35S-UTP'e (spesifik aktivite > 1000 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA) sahip Riboprobe Sistemi (Promega Biotech, Burlington, ON) kullanılarak ve T3 ve T7 polimerazlar kullanılarak doğrusallaştırılmış plazmitten kopyalanmıştır. Radyo-etiketli problar bir hibridizasyon tamponunda (0.6 M NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, % 10 Dekstran sülfat, % 0.01 kesilmiş somon sperm DNA, % 0.05 toplam maya RNA, tip XI, % 0.01 maya tRNA, 1X Denhardt'ın çözümü) seyreltilmiş ve beyin bölümlerine (yaklaşık 500,000 CPM / kesit) uygulanmıştır. Slaytlar, gece boyunca 55 °C'de nemlendirilmiş bir odada inkübe edilmiştir. Proben spesifik olmayan bağlanmasını azaltmak için, slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 20 µg / ml RNaz çözeltisi içinde yıkanmış, ardından her biri 1XSSC'de 50 °C'de, 0.2XSSC'de 55 °ve 60 °C'de yıkanmıştır. Slaytlar kurutulmuş ve otoradyografi için hava ile kurutulmuştur. Slaytlar ve 14C plastik standartlar 5 gün boyunca filme (BioMax MR; Eastman Kodak, Rochester, NY) verilen röntgen kasetlerine yerleştirilmiş ve geliştirilmiştir (Kodak Medical X-Ray Processor). Beyin bölümlerinin ve standartlarının otoradyografik film görüntüleri, QCapture yazılımı (Qicam; Quorum Technologies Inc., Guelph, ON) ve bir Macintosh bilgisayar tabanlı görüntü analiz sistemi ile görüntü yazılımı ile 60 mm'lik bir Nikon lens ile bir katı hal kamera ile dijitalleştirilmiştir. (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). Film boyunca ışık geçirgenliği, monitörün yapısını özetleyerek ölçülmüştür. BDNF mRNA için, transmitans standartlara uygulanan Rodbard eğrisi kullanılarak radyoaktivite seviyelerine dönüştürülmüştür. CRH mRNA için, yoğunluk dilim özelliği, hem ışık geçirgenliğini hem de mRNA sinyalinin alanını ölçmek için kullanılmıştır. Hesaplanan DPM daha sonra entegre yoğunluk ölçümü üretmek için alanla çarpılmıştır. Resimler doğrudan yakalanan görüntülerden yapılmıştır.

### **İstatistiksel analiz:**

Veriler, ortalama 6 standart sapma ya da uygun olan çeyrek aralıklı medyalar olarak sunulmuştur. Veriler, iki yönlü ANOVA, test veya uygun olmayan eşleştirilmiş t-testi kullanılarak analiz edilmiştir. P < 0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

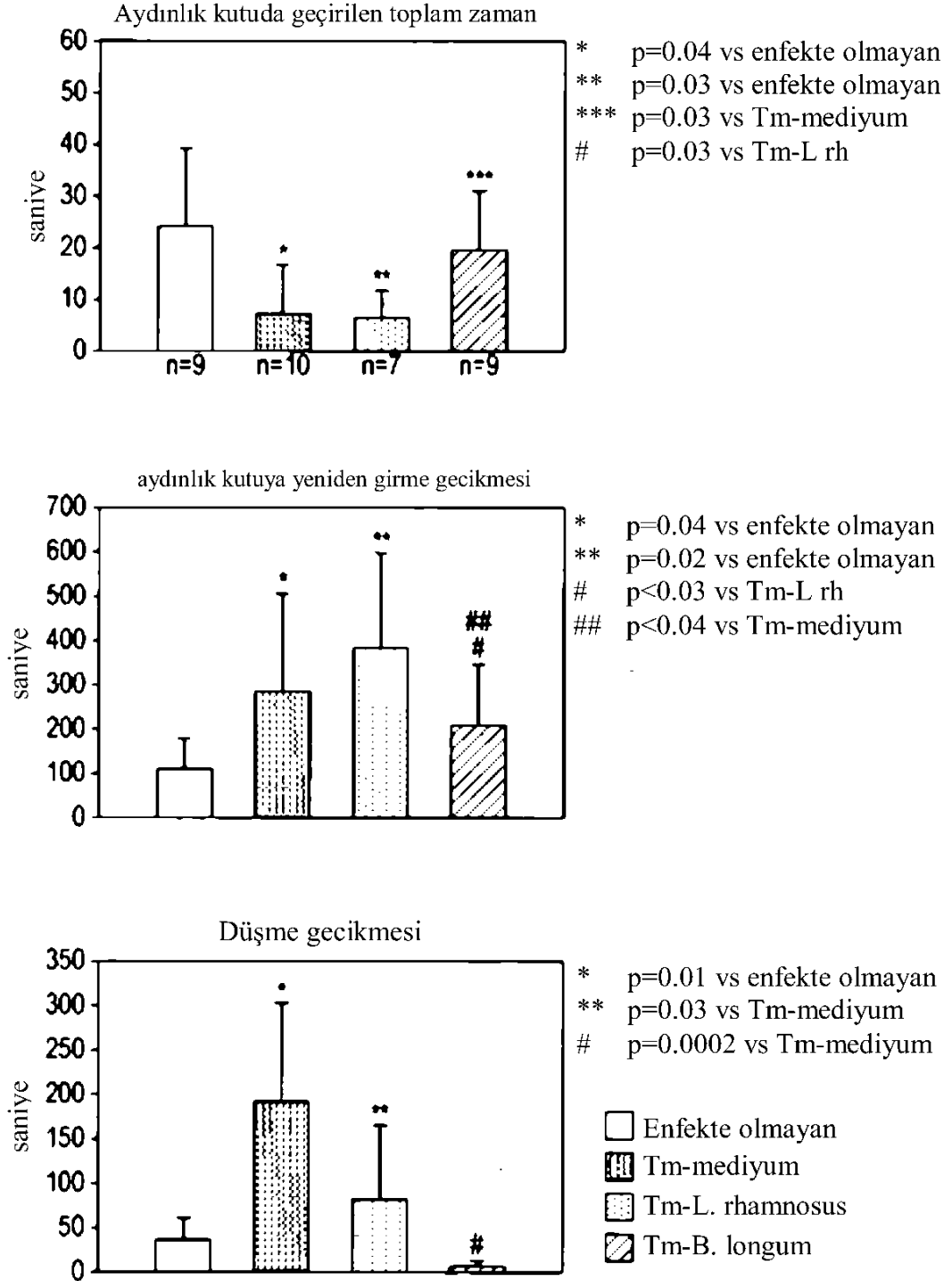
### **Sonuçlar:**

Parazit *Trichuris muris* ile kronik olarak enfekte olan fareler, iki davranışsal testte anksiyete benzeri davranışlarda bir artış göstermiştir: 1) Karanlık kutu/ parlak kutu testinde, enfekte olmuş hayvanlar, parlak kutuda harcanan zaman içinde bir azalma ve parlak kutuyu yeniden girmek için gecikme zammını göstermiştir; 2) Enfeksiyon kaidesinden düşme gecikmesini artırmıştır (Şekil 1). *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 ile tedavi ancak

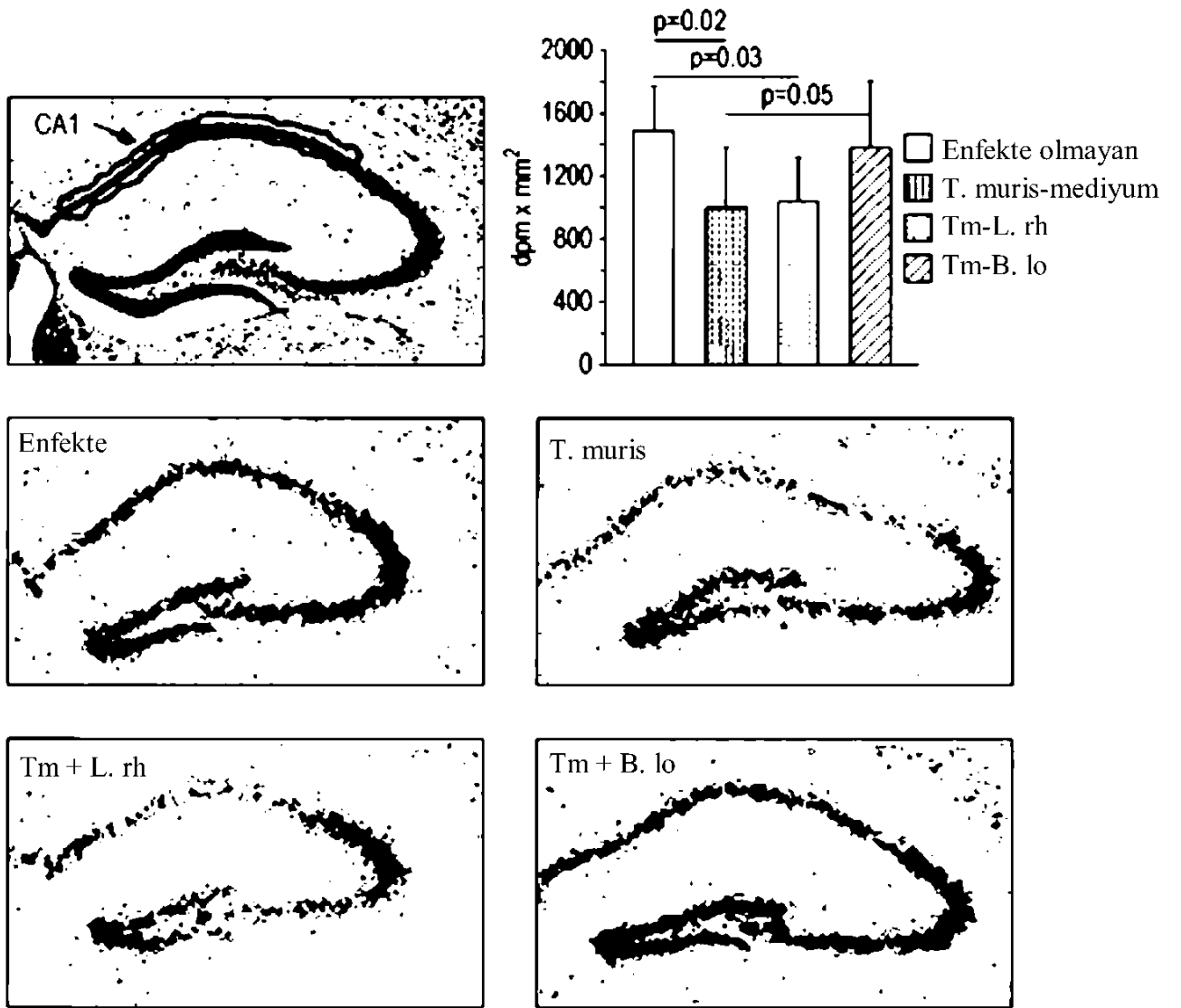
L. rhamnosus NCC4007 ile tedavi edilmeksizin, anksiyete benzeri davranışı normale doğru azaltmıştır. Davranış üzerindeki etki, sadece B. longum tarafından hipokampustaki BDNF seviyelerindeki Trichuris muris aracılı azalmanın normalleştirilmesi ile ilişkili olmuştur (Şekil 2). Aksine, B. longum ile birlikte L. rhamnosus ile yapılan tedavi, daha önce Trichuris muris enfeksiyonu ile uyarılan miyeloperoksidaz aktivitesinin ve mononükleer infiltrasyonun azalmasına neden olmuştur (Şekil 3); bu da davranışın normalleşmesinin bakterilerin antiinflamatuvar etkisinden bağımsız olduğunu göstermektedir.

## ŞEKİL 1

Anksiyete benzeri davranış



ŞEKİL 2



## ŞEKİL 3

## Kolonik Enflamasyon

