



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 28 288 T2** 2004.04.08

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 817 640 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 28 288.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/SE96/00372**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 908 428.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/029083**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.03.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.09.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.01.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.04.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 35/74**
H04Q 7/30, F23D 17/00

(30) Unionspriorität:
9501056 23.03.1995 SE

(73) Patentinhaber:
Probi AB, Lund, SE

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**ADLERBERTH, Ingegerd, S-413 02 Göteborg, SE;
AHRNE, Siv, S-237 31 Bjärred, SE; JEPPSSON,
Bengt, S-222 47 Lund, SE; JOHANSSON,
Marie-Louise, S-226 46 Lund, SE; MOLIN, Göran,
S-224 67 Lund, SE; WOLD, Agnes, S-431 38
Mölnadal, SE**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON EPITHEL-ADHÄRENTE LACTOBAZILLEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf *Lactobacillus*-Stämme, welche die Fähigkeit zur Anhaftung an Oberflächen von Epithelzellen, insbesondere der menschlichen Schleimhaut, besitzen und die für die prophylaktische und/oder heilende Behandlung von bakteriellen Störungen verwendet werden können, die durch pathogene Bakterien, welche an den Epithelzellen in einer ähnlichen Weise anhaften, verursacht werden.

[0002] Die einheimische Mikrobiota ist eine der Hauptabwehrmechanismen, die den menschlichen oder tierischen Körper gegenüber einer Besiedlung durch eindringende Bakterien schützen. Immunosupprimierte, antibiotisch behandelte und parenteral ernährte Patienten unterliegen dem Risiko von infektiösen Erkrankungen, wie Sepsis, Meningitis oder Harnwegsinfekten, welche durch die Ausbreitung von Bakterien verursacht werden, die hauptsächlich von der normalen fäkalen Population abstammen. Ein Mechanismus bei diesem Vorgang kann die bakterielle Translokation sein, welche als Durchtritt von lebensfähigen Bakterien durch den Magen-Darm-Kanal zu den mesenterialen Lymphknoten und anderen Organen definiert ist.

[0003] Die Blutvergiftung, Sepsis, ist eine weitere allgemein verbreitete, chirurgische Komplikation in Verbindung mit der Abdominalchirurgie mit einer hohen Todesrate. Bakterien oder bakterielle Produkte können eine schlecht funktionierende Darmwand überwinden und andere, entfernte Organe, wie Lunge, Leber, Herz, etc., infizieren oder dort eine Funktionsstörung verursachen. Dies führt zu einer multiplen Organfehlfunktion oder zu der sogenannten Intensiverkrankung. Diese Patienten werden heute durch die Verabreichung von Antibiotika behandelt sowie durch eine chirurgische Behandlung des Abszesses, sofern dieser lokalisiert werden kann. Heutzutage werden Antibiotika vor einer Darmoperation routinemäßig verabreicht, um das Risiko von post-operativen Infektionen und der dadurch hervorgerufenen Erkrankungen zu reduzieren. Die Behandlung mit diesen Antibiotika ist jedoch verbunden mit der Zerstörung der normalen Darmflora und mit einem Überwachsen durch pathogenere Bakterien.

[0004] Diese Erkenntnisse haben zu einem verstärktem Interesse für mikrobielle Arten geführt, welche in vorteilhafter Weise die mikrobielle Balance des Wirtes beeinflussen können, zum Beispiel durch die Produktion von antimikrobiellen Komponenten oder durch kompetitives Wachstum. *Lactobacillus* gehört zu den am stärksten untersuchten Arten und in bestimmten Fällen wurde gezeigt, dass *Lactobacillus* einer Proliferation von Pathogenen entgegenwirken kann.

[0005] Bakterien, die den Darm besiedeln, können in dem besiedelnden Wirt Krankheiten hervorrufen, wie Diarrhoe in den Gedärmen, oder sie können sekundär normalerweise sterile Stellen besiedeln, wie die Harnröhre, wodurch eine Harnröhreninfektion verursacht wird. Ferner können die Blutbahnen besiedelt werden, was zu einer Sepsis führt.

[0006] Pathogene Bakterien unterscheiden sich von solchen, die keine Krankheit hervorrufen, durch den Besitz von sogenannten Virulenzfaktoren. Ein bedeutsamer Virulenzfaktor ist die Fähigkeit, sich an Kohlenhydrat-Rezeptormoleküle der Wirtszelle anzuheften. Dies ist ein wichtiger Schritt, da er sowohl eine Besiedlung ermöglicht sowie die Abgabe von Toxinen und anderen inflammatorischen Substanzen in direkter Nähe zu den Wirtszellen. Diese von anhaftenden Bakterien abgegebenen, toxischen Substanzen erreichen lokal sehr viel höhere Konzentrationen, als sie auftreten würden, wenn diese Substanzen abgegeben würden, zum Beispiel von Bakterien, die im Darmlumen vorhanden sind.

[0007] Bakterien, welche eine Harnwegsinfektion verursachen, umfassen *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Proteus*, die alle zu der Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. Eine Mehrheit von diesen Bakterien besitzen Fimbrien des Typs 1, was die Fähigkeit verleiht, sich an Mannose enthaltende Rezeptoren anzuheften, zum Beispiel an menschliche vaginale Epithelzellen sowie an das Harnschleimprotein, das Tamm-Horsfall-Protein. Bei Fimbrien des Typs 1 wurde gezeigt, dass sie einen Virulenzfaktor für die Blasenentzündung darstellen, was sowohl auf der erhöhten Fähigkeit in den Harntrakt aufzusteigen, wobei dies durch Bindung an vaginale und periurethrale Epithelzellen ermöglicht wird, als auch auf einem erhöhten irritativen Effekt beruhen kann, der durch Bindung an Epithelzellen in dem Harntrakt hervorgerufen wird. [Somit sind nur Bakterien mit Fimbrien des Typs 1 in der Lage, eine Cytokinreaktion, das ist eine Entzündung, in kultivierten Harnepithelzellen zu induzieren.]

[0008] Bakterien, welche eine Diarrhoe hervorrufen, umfassen *Salmonella* und *Shigella*, wobei aber die Diarrhoe bei jungen Kleinkindern auch mit einer übermäßigen Besiedlung von *Klebsiella* oder *Enterobacter* im Darm assoziiert ist. Es wurde bei der Maus gezeigt, dass Fimbrien des Typs 1 einen Virulenzfaktor für durch *Salmonella* verursachte Durchfallserkrankung darstellen. Es ist auch wahrscheinlich, dass Fimbrien des Typs 1 die Besiedlung von anderen Bakterien erleichtern und die Abgabe von toxischen Substanzen nahe dem Epithel fördern, wodurch die Diarrhoe verursacht wird.

[0009] Die EP-A2 0 199 535 beschreibt eine biologisch reine Kultur von *Lactobacillus acidophilus*, ATCC Beibehaltungsnummer 53 103, welches vom menschlichen Stuhl isoliert wurde und in der Lage ist, sich an Schleimhautzellen bei in vitro Tests anzuheften. *L. acidophilus* kann den oberen Teil des Magen-Darm-Kanals gut überwinden. Es wurde jedoch noch keine in vivo Anhaftung gezeigt.

[0010] Die WO 89/05849 beschreibt Milchsäurebakterien, die aus dem Magen-Darm-Kanal von Schweinen

isoliert wurden und unter anderem hinsichtlich der Anhaftung an gastro-intestinale Epithelzellen vom Schwein in vitro sowie mit einer Toleranz gegenüber Säure und Galle selektiert wurden. Diese Bakterien können für die Fermentation von Milch verwendet werden, die dann Ferkel gegeben werden kann, um eine i. a. E. coli-Diarrhoe zu verhindern oder zu behandeln.

[0011] Die WO 93/01823 bezieht sich auf ein Verfahren für die Isolierung von Stämmen von *Lactobacillus*, welche die Fähigkeit besitzen, sich in der menschlichen Darmschleimhaut in vivo zu etablieren und dort auch nach oraler Verabreichung für wenigstens 10 Tage zu verbleiben. Diese Anmeldung bezieht sich insbesondere auf zwei neue *Lactobacillus*-Stämme, die gemäß dem Budapester Abkommen bei DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH -, Braunschweig, Deutschland am 2. Juli 1991, hinterlegt worden sind, wobei es sich um

Lactobacillus plantarum 299

DSM 6595

Lactobacillus casei ssp. *Rhamnosus* 271

DSM 6594

handelt sowie um Varianten davon, welche für die Prophylaxe oder die Behandlung von bakteriellen Infektionen im Magen-Darm-Trakt verwendet werden können, wodurch insbesondere die Anwendung von Antibiotika bei chirurgischen Verfahren substituiert werden kann.

[0012] Die SE 463 598 bezieht sich auf eine Zubereitung für die vermehrte Anhaftung von Bakterien an den Magen-Darm-Kanal, wobei diese Zubereitung ein die Adhäsion förderndes Protein, nämlich das Adhäsins, enthält, das von *Lactobacillus* abstammt.

[0013] Die WO 90/09398 bezieht sich auf Produkte zur Hemmung der Adhäsion, des Wachstums und/oder des Überlebens von Pathogenen. Diese Produkte sind *Lactobacillus*-Metabolite, welche Pathogene hemmen, wie *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter* und *Streptococcus*-Stämme.

[0014] Die WO 93/09793 bezieht sich auf *Lactobacillus*- und Magermilch-Zusammensetzungen und Verfahren zur Verhinderung von mikrobiellen Urogenitalinfektionen. Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Fähigkeit von bestimmten Stämmen von hydrophoben oder hydrophilen *Lactobacilli* sich an uroepitheliale Zellen anzuheften, und der Wirkung von bestimmten antimikrobiellen Mitteln zu widerstehen, um so Urogenitalinfektionen zu verhindern. Der Mechanismus der Anhaftung umfasst hydrophobe oder hydrophile Interaktionen zwischen nichtproteinartigen Zellwandanhäufungen an *Lactobacillus* und proteinartigen Anhaftungen in der umgebenden Flüssigkeit.

[0015] Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass bestimmte Stämme von *Lactobacillus* sich an Agarosekügelchen mit D-Mannosebeschichtung anheften, wobei diese Fähigkeit mit einer Fähigkeit zur Agglutination von Erythrocyten in einer Mannoseempfindlichen Weise korreliert ist, sowie mit der Fähigkeit, sich an die menschliche Dickdarm-Epithelzelllinie HT-29 in einer Weise anzuheften, die durch Methyl- α -D-mannosid hemmbar ist. Eine Periodatbehandlung der HT-29 Zellen beseitigt die Mannose-empfindliche Anhaftung, womit die Kohlenhydratnatur des zellgebundenen Rezeptors bestätigt ist. Eine Proteinase K -Behandlung der Bakterien beseitigt auch die Anhaftung, was anzeigt, dass bei der Bindung Proteinstrukturen an der bakteriellen Zelloberfläche beteiligt sind. Es wird somit angenommen, dass der anheftende Teil von *Lactobacillus*, das Adhäsins, sich an Mannose enthaltende Rezeptoren an der Epithelzelloberfläche anhaften. Diese Anhaftung scheint mit der Fähigkeit von diesen Bakterien verbunden zu sein, pathogenen Bakterien entgegenzuwirken und die Wirtsverteidigungsmechanismen zu stimulieren.

[0016] Diese Anhaftung fördert insbesondere die Fähigkeit zur Reduktion der Translokation von pathogenen oder potentiell pathogenen Bakterien durch das intakte Darmepithel, wobei die Anhaftung der potentiell pathogenen Bakterien an die Epithelzelloberfläche direkt gehemmt wird. Dadurch wird die Fähigkeit reduziert, toxische und inflammatorische Substanzen an die Schleimhaut abzugeben. Der inflammatorische Schaden für den Darm, der durch nicht-spezifische Reizstoffe verursacht wird, wird durch Schaffung einer Mikroumgebung, die für die Rekonstruktion der Schleimhaut förderlich ist, reduziert. Eine direkte Assoziierung mit den Epithelzellen kann auch die Fähigkeit des Bakteriums fördern, mit dem Immunsystem zu interagieren. Diese *Lactobacillus*-Stämme können zum Beispiel die Aktivierung von Phagozyten fördern und antigen-präsentierende Zellen stimulieren, was zu einer erhöhten Immunität führt.

[0017] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Verwendung von *Lactobacillus plantarum* mit einem Mannose-spezifischen Adhäsins für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der Bindung von pathogenen Bakterien, welche Mannose-spezifische Adhäsine exprimieren, an Epithelzelloberflächen. Dadurch wird die Fähigkeit, toxische und inflammatorische Substanzen an die Schleimhaut abzugeben, reduziert.

[0018] Mannose-spezifische Adhäsine sind in einer Reihe von gram-negativen Bakterien beschrieben, wie bei Mitgliedern der Enterobacteriaceae-Familie, wie *E. coli*-, *Klebsiella*-, *Shigella*- und *Salmonella*-Arten, *Pseudomonas echinoides*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio parahaemolyticus*.

[0019] Der optimale Rezeptor für das Mannose-spezifische Adhäsins von *E. coli* wurde identifiziert und es ist bekannt, dass er die Sequenz Mannose- α 1-4-Mannose- β enthält, die in Glycoproteinen von Säugetieren auf-

tritt. Die exakte Rezeptorstruktur der Mannosespezifischen Adhäsine von anderen Enterobakterien-Arten ist bisher noch nicht identifiziert worden. Ferner wurde noch nicht die Rezeptorstruktur des Mannosespezifischen Adhäsins von *Lactobacillus plantarum* -Stämmen identifiziert. Es wird jedoch angenommen, dass der Rezeptor eine Man- α 1-2-Man -Sequenz enthält. Es ist wahrscheinlich, dass Mannose-spezifisches *L. plantarum* einen ausgeprägteren Hemmeffekt auf Bakterien ausübt, die an Mannose enthaltende Rezeptoren binden, im Vergleich zu der Wirkung auf Bakterien, die an andere Rezeptorstrukturen binden.

[0020] Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von *Lactobacillus plantarum* 299v, Hinterlegungsnummer DSM 9843, das sowohl ein Mannose-spezifisches Adhäsins als auch die Fähigkeit hat, die menschliche Schleimhaut zu besiedeln, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Harnwegsinfekts durch Hemmung der Anhaftung von pathogenen Bakterien, die Fimbrien vom Typ 1 exprimieren; insbesondere eines zu *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* oder *Escherichia coli* gehörenden Bakteriums, an menschliche Harnröhren-Epithelzellen.

[0021] Verwandte Stämme von *Lactobacillus plantarum* sind:

Lactobacillus plantarum 299

DSM 6595

Lactobacillus plantarum 79

Lactobacillus plantarum 105

Lactobacillus plantarum 107.

[0022] Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung von *Lactobacillus plantarum* 299v, Hinterlegungsnummer DSM 9843, in Kombination mit einem herkömmlichen Träger zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Hemmung der Bindung von pathogenen Bakterien, die Mannose-spezifische Adhäsine exprimieren, an die Epithelzelloberfläche für die prophylaktische oder heilende Behandlung von bakteriellen Störungen.

[0023] Zwei Faktoren scheinen für die Ausübung der ökologischen Wirkungen von *Lactobacilli* wichtig zu sein. Der erste Faktor ist die Fähigkeit, den Darm zu besiedeln. Dies bedeutet ein Überleben in hoher Zahl über einen bestimmten Zeitraum nach der letzten Verabreichung von lebenden Bakterien. Diese Eigenschaft mag für die Fähigkeit von *Lactobacilli* wichtig, aber nicht ausreichend sein, das Wachstum und die Proliferation von pathogenen Bakterien zu unterdrücken. Der zweite Faktor ist die Fähigkeit, direkt an Darmepithelzellen zu binden. Dies mag einer der Faktoren sein, welche die Besiedlung fördern, wobei er aber keine Voraussetzung für die Besiedlung ist. Die Fähigkeit zur Anhaftung an das Epithel garantiert nicht, dass der Stamm zur Besiedlung in der Lage ist.

[0024] Pathogene, enterische Bakterien, welche Mannose-spezifische Fimbrien vom Typ 1 exprimieren, gehören insbesondere zu *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella* und *Shigella* spp., z. B. *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* und *Escherichia coli*.

[0025] Die Fähigkeit zur direkten Anhaftung an Epithelzellen kann für die *Lactobacillus*-Stämme wichtig sein, um die Translokation und die Induktion einer Schleimhautentzündung durch pathogene Bakterien zu reduzieren, da die *Lactobacilli* die ökologische Nische nahe am Epithel besetzen. Eine direkte Verbindung mit dem Epithel befähigt die *Lactobacilli* auch, die Mikroumgebung zu verändern, welche direkt die Darmepithelzellen beeinflusst. Dadurch wird die Reparatur nach einer Schädigung, die durch irritierende Mittel hervorgerufen wird, gefördert.

[0026] Herkömmliche Träger für eine pharmazeutische Zusammensetzung für die prophylaktische oder heilende Behandlung von bakteriellen Störungen im Dann sind beispielsweise physiologisch akzeptable Substrate, die von dem fraglichen Bakterium fermentiert werden, sowie Nahrungsmittel von verschiedener Art, insbesondere auf Basis von Stärke oder Milch, aber auch inerte feste oder flüssige Substanzen, wie Kochsalzlösung oder Wasser. Ein mögliches Substrat sollte flüssige oder feste Fasern enthalten, die in dem Magen-Darm-Kanal nicht resorbiert werden und die bei der Fermentation durch *Lactobacillus* Carbonsäuren bilden. Ein Beispiel für ein geeignetes, Stärke enthaltendes Substrat stellen die Getreide dar, wie Hafer und Weizen, Mais, Wurzelgemüse, wie Kartoffeln, und bestimmte Früchte, wie grüne Bananen.

[0027] Ein bevorzugtes Substrat für die Zusammensetzung gemäß der Erfindung, welches der Zusammensetzung auch einen guten Nahrungswert verleiht, ist eine Nährlösung auf Basis von Haferschleim, wie dies zum Beispiel beschrieben ist in der WO 89/08405.

[0028] Der **Fig. 1** ist ein Dendrogramm, welches die Ähnlichkeit in Prozent zwischen den verschiedenen, getesteten Stämmen von *Lactobacillus* zeigt, die durch das REA-Verfahren auf Basis des Pearson-Produktmoment-Korrelationskoeffizienten und von UPGMA charakterisiert wurden.

Isolierung der *Lactobacillus*-Stämme

[0029] Die Stämme von *Lactobacillus* wurden aus der menschlichen Schleimhaut isoliert. Biopsien von verschiedenen Teilen vom Dickdarm wurden mittels Enteroskopie durchgeführt und Stücke der Darmschleimhaut

vom Dünndarm, das heißt vom Jejunum und von Ileum, wurden mit chirurgischen Verfahren entfernt. Die Schleimhautproben wurden sofort in ein Spezialmedium gegeben (0,9% NaCl; 0,1% Pepton; 0,1% Tween 80 und 0,02% Cystin; alle Werte beziehen sich auf Gewichtsprozent/Volumen), in einem Ultraschallbad für 3 Minuten homogenisiert und für 1 Minute gerührt, bevor sie auf Rogosa Agar (Difco Laboratorien, Detroit, Michigan, USA) angeordnet wurden. Die Platten wurden anaerob bei 37°C für 2 Tage (Gas Pak Anaerobic System, BBL) inkubiert. Eine von drei Kolonien wurde zufällig von jeder Platte gepickt und als Reinkulturen fünf- bis neunmal auf Rogosa-Agar angezogen und als dichte Kulturen in einem gefrorenen Puffer bei -80°C gehalten. Durch dieses Verfahren wurden die Stämme *Lactobacillus plantarum* 299 und 299v sowie 105, 275 und 386, *Lactobacillus fermentum* 8704 : 3, *Lactobacillus reuteri* 108, 8557 : 1, 8557 : 3, *Lactobacillus rhamnosus* 271 und *Lactobacillus agilis* 294 isoliert. In ähnlicher Weise wurden *Lactobacillus*-Stämme aus Ratten- und Schweinedärmen isoliert, das heißt *Lactobacillus reuteri* R2LC und 1063, 1068 beziehungsweise 1044.

[0030] Die *Lactobacillus*-Stämme wurden auf folgende Weise auch isoliert aus Nigerian ogi oder pito. Die Ursprungsprobe wurde in einem Ultraschallbad für 5 Minuten behandelt und auf einem Vortex für 2 Minuten gemischt, verdünnt und dann auf Rogosa-Agar (Difco) für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Zufällig gepickte Bakterienkolonien wurden getestet. Durch dieses Verfahren wurden die Stämme *Lactobacillus plantarum* 79 und 107, 125, 98, 53, 97M2, 97, 101, 120 und 44 erzielt.

[0031] *Lactobacillus*-Stämme wurden auch aus Silage isoliert, das heißt, *Lactobacillus plantarum* 36E, 256 und ATCC8014. So5 ist eine *Lactobacillus plantarum* -Starterkultur, die erzielt wurde von Sockerbolaget, Arlööv. *Lactobacillus reuteri* BR ist der kommerzielle Stamm, der in der BRA-Milch (Arla Ekonomisk Förening, Stockholm, Schweden) verwendet wird.

Identifizierung der Stämme

[0032] ATCC 14917^T und DSM 20016^T sind die Typenstämmen für *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus reuteri*. Ein Typenstamm definiert die Art und sollte mit einem ^T markiert werden. Alle anderen Stämme mit einer DNA : DNA Homologie von mehr als 70 % zu einem bestimmten Typenstamm werden dann als zu dieser bestimmten Art gehörig betrachtet.

[0033] In dem International Journal of Systematic Bacteriology (1995) 45: 670–675, Johansson, M-L, et al. wird die Klassifizierung von isolierten Stämmen mittels der Restriktionsendonukleaseanalyse der chromosomalen Gesamt-DNA beschrieben. Bei dem erzielten „Fingerprint“ werden genetische Gruppen oder Cluster gebildet, welche die Ähnlichkeit in dem Gesamtmuster beim Vergleich wiedergeben. Gemäß diesem Analyseverfahren konnten die *Lactobacillus plantarum* -Stämme in die verschiedenen genetischen Gruppen 1a, 1b, 1c aufgeteilt werden, wie dies in der **Fig. 1** zu erkennen ist. Die Stämme im Cluster 1 c haben alle eine Ähnlichkeit zu *L. plantarum* 299 von > 50 und die Stämme 299v, 107, 105 und 79 haben eine Ähnlichkeit von > 70%.

[0034] Die Stämme 299 und 299v, die beide aus einer gesunden menschlichen Darmschleimhaut isoliert wurden, wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zeltkulturen GmbH am 02. Juli 1991 beziehungsweise am 16. März 1995 hinterlegt und erhielten die Hinterlegungsnummern DSM 6595 (299) und DSM 9843 (299v).

Phänotypische Identifizierung

[0035] Die Stämme 299, 299v, 79, 105 und 107 sind Gram-positive, Katalase-negative Stäbchen, die auf Rogosa-Agar bei pH 5,5 wachsen und die Milchsäure anaerob aus Glucose bilden können. Die Fähigkeit der Stämme zur Fermentation von verschiedenen Kohlenhydraten ist in der Tabelle 1 gezeigt. Die Tests wurden mit API 50 CH gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt.

[0036] Die Stämme konnten phänotypisch als *Lactobacillus plantarum* identifiziert werden.

Tabelle 1

Fermentationsmuster der Stämme von *L. plantarum* 299, *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 107, *L. plantarum* 105 und *L. plantarum* 275 auf API 50 CH bei 30°C und 37°C.

	L. plantarum 299		L. plantarum 229v		L. plantarum 107		L. plantarum 105		L. plantarum 79	
	30° C	37° C	30° C	37° C	30° C	37° C	30° C	37° C	30° C	37° C
Glycerin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythrit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

β -Methyl-xylosid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Methyl-D-mannosid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
α -Methyl-D-glucosid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D-Tagarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Keto- gluconat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Keto- gluconat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Plasmidprofil

[0037] Die Stämme wurde hinsichtlich ihres Gehaltes an Plasmiden gemäß dem Verfahren getestet, das beschrieben ist von Chassy et al (1976). *Lactobacillus plantarum* 299, 299v, 79 und 105 hatten identische Plasmidprofile, das heißt fünf Plasmide von 4, 9, 15, 21 und > 30 MDa. *Lactobacillus plantarum* 107 hatte drei Plasmide von 4, 15 und 21 MDa.

Kultivierung von *Lactobacillus plantarum* 299

- Ein Inokulum aus einem Gefrierschrank von –80°C wurde hinzugegeben zu 50 ml *Lactobacillus* Carrying Medium (LCM, Efthymiou & Hansen, J. Infect. Dis., 110: 258-267, 1962) oder zu Rogosa,
- es wurde für 40 Stunden bei 37°C inkubiert,
- 50 ml wurden inokuliert in 500 ml LCM, für etwa 40 Stunden bei 37°C wurde inkubiert, 500 ml wurden in 5 Liter inokuliert,
- für etwa 25–30 Stunden bei 37°C wurde inkubiert,
- bei 10.000 Umdrehungen pro Minute wurde für 10 Minuten zentrifugiert,
- es wurde einmal in einer physiologischen Salzlösung gewaschen,
- das Pellet wurde in etwa 1 Liter der physiologischen Salzlösung gelöst.

[0038] Diese Menge war ausreichend für etwa 400–500 Liter Haferschleimsuppe. Die Kultivierungsmedien wurden nicht optimiert. Rogosa arbeitete besser als LCM, was Pufferfunktion zurückzuführen ist. 2wahrscheinlich auf eine bessere % Glucose wurde zu LCM hinzugefügt. Das gleiche Verfahren kann für die Herstellung der anderen *Lactobacillus*-Stämme verwendet werden.

Besiedlung von *Lactobacillus plantarum* in vivo

[0039] Um die Fähigkeit zur Besiedlung in vivo zu überprüfen, wurden zwölf gesunden Freiwilligen für 10 Tage 100 ml flüssige Haferschleimsuppe gemäß der Beschreibung in WO 93/01823 gegeben, die 8×10^7 Kolonie-bildende Einheiten (CFU)/g eines gefriergetrockneten *Lactobacillus*-Stammes enthielt. *Lactobacillus plantarum* 299 konnte in einer dominierenden Position auf der Darmschleimhaut 10 Tage nach Vollendung der Verabreichung gefunden werden.

[0040] Bei einem anderen Test wurde die Fähigkeit der Stämme *L. plantarum* 105 und 107 zur Besiedlung getestet. Eine gefriergetrocknete Zubereitung, die $1,5 \times 10^9$ CFU von jedem Teststamm enthielt, wurde einmal am Tag für 8 Tage gegeben. Biopsien wurden vom Rektum mit Beginn einen Tag nach Verabreichung und beendend 1 Tag und 8 Tage nach der Verabreichung genommen. Ferner wurden Biopsien aus dem Jejunum entnommen. Keine der verabreichten Stämme wurde auf Rogosa-Platten 8 Tage nach dem Ende der Verabreichung re-isoliert.

Hämagglutinationstest

[0041] Um zu untersuchen, ob die Adhäsine der *Lactobacillus*-Stämme den Adhäsinen für die Mannose enthaltenden Rezeptoren innerhalb der Enterobacteriaceae-Familie ähneln, beispielsweise auftretend in *E. coli*

-Stämmen, die mit Fimbrien vom Typ 1 assoziiert sind und an Dickdarm-Epithelzellen binden, wurden mit Erythrocyten von verschiedenem Ursprung Hämagglutinationstests durchgeführt.

[0042] Gewaschene Bakterien wurden mit 2×10^{10} /ml in PBS suspendiert und zweifache Verdünnungen der bakteriellen Suspensionen wurden auf Mikroskopträgern mit gleichem Volumina von 3% Erythrocytensuspensionen in PBS oder in PBS, das 100 mM von Methyl- α -D-mannosid enthielt, gemischt. Die Träger wurden in regulären Intervallen vorsichtig schräggestellt und die Agglutination wurde nach 15 Minuten mit dem nackten Auge beobachtet unter Verwendung eines Lichtmikroskops bei 250-fachen Vergrößerung. Der reziproke Wert der größten Verdünnung der Bakteriensuspension, die eine sichtbare Agglutination innerhalb von 15 Minuten zeigte, wurde als Agglutinationstiter bezeichnet.

[0043] Die Membran-gebundenen Glycoproteine der Erythrocyten enthalten Mannose, und E. coli mit Mannose-spezifischen Adhäsinen agglutinierte einen großen Bereich der Erythrocyten in einer Mannose-empfindlichen Weise.

[0044] Die L. plantarum -Stämme, die zu der genetischen Gruppe 1c gehören, agglutinierten die Erythrocyten vom Menschen, Meerschweinchen, Hühnchen, Katze, Hund, Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd und Schwein und seltener Schaf oder Rinderythrocyten. Mit Ausnahme der Schaf- und Rinderythrocyten wurden die Agglutinationen vollständig gehemmt oder stark reduziert durch Methyl- α -D-mannosid. Eine schwache Mannose-empfindliche Hämagglutination wurde in einigen Stämmen der 1 b Gruppe gesehen, wobei die anderen genetischen Gruppen negativ waren.

[0045] Die Mannose-empfindliche Hämagglutination (MSHA) von L. plantarum ähnelt der von E. coli, wobei aber einige Unterschiede beobachtet wurden. Hinsichtlich L. plantarum ergaben die Hühnererythrocyten die höchsten MSHA-Titer, während die Pferdeerythrocyten eine der am wenigsten aktiven Erythrocytenarten waren. Hinsichtlich E. coli zeigten andererseits die Pferdeerythrocyten die höchsten Titer und zwar etwas höher als die Hühnererythrocyten. Die Meerschweinchenerythrocyten zeigten eine vergleichsweise starke hämagglutinierende Aktivität mit L. plantarum sowie mit E. coli, während menschliche Erythrocyten eine geringe Aktivität im Vergleich zu anderen Erythrocytenarten für E. coli zeigten, aber vergleichsweise aktiv hinsichtlich der Agglutination mit L. plantarum waren.

Anhaftung an HT-29 Zellen

[0046] Verschiedene Lactobacillus-Stämme wurden für ihre Fähigkeit, sich an Darmepithelzellen der menschlichen Dickdarmkarzinom-Zelllinie HT-29 getestet (Verfahren beschrieben von Wold, A, et al, Infection and Immunity, Okt. 1988, S. 2531-2537). Zellen der menschlichen Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 wurden in Eagle's Medium kultiviert, das ergänzt war mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und 50 μ g/ml Gentamicin (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Mo, USA). Wenige Tage nachdem die Zellen den Zusammenfluss erreicht hatten, wurden sie mit EDTA-haltigem Puffer (0,54 mM) abgelöst, gewaschen und in Hank's balancierter Salzlösung (HBSS) bei 5×10^6 /ml suspendiert. Die Bakterien wurden geerntet, gewaschen und suspendiert in HBSS bei 5×10^9 /ml ($2 \times$ eine optische Dichte von 1,5 bei 597 nm). Die Zellen, Bakterien und HBSS wurden in einem Verhältnis von 1 : 1 : 3 gemischt und mit einer vertikalen Rotation für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit neutralem gepufferten Formalin (Histofix, Histolab, Göteborg, Schweden) fixiert. Die Zahl der Bakterien, die an jeder von wenigstens 40 Zellen angehaftet waren, wurden unter Verwendung eines Interferenzkontrastmikroskops bestimmt (500-fache Vergrößerung, Nikon Optophot, mit Interferenzkontrastausrüstung, Bergström Instruments, Göteborg, Schweden) und die Durchschnittszahl der Bakterien pro Zelle wurde berechnet. Um die Anhaftung zu hemmen, wurde 1,5% von verschiedenen Monosacchariden (Glucose, Mannose, Methyl- α -D-mannosid) bei dem Anhaftungstest eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 gezeigt, wobei die Überschriften neben dem Stamm und der genetischen Gruppe die folgenden sind:

- HT-29 VH ist der Durchschnittswert der Zahl der Bakterien/Zelle; die Zahl der Experimente ist in Klammern gezeigt;
- α -Methylmannosid, Mannose und Glucose beziehen sich auf den Durchschnittswert der Zahl der Bakterien/Zelle in Gegenwart von α -Methylmannosid, Mannose bzw. Glucose; die Zahl der Experimente ist in Klammern gezeigt;
- n ist die Zahl der gepaarten Werte bei dem Vergleich der Anhaftung mit und ohne α -Methylmannosid;
- d ist der durchschnittliche Unterschied mit und ohne α -Methylmannosid; positiv = Hemmung mit Mannosid;
- p ist der p-Wert für den Vergleich; Student's T-Test für gepaarte Werte.

Tabelle 2

Stamm	Genetische Gruppe	HAT-29 VH	α -Methyl-mannosid	Mannose Glucose	n	d	p
299v	L. plantarum 1c	11,2(9)	5,9(9)	8,3(4) 11,4(6)	9	5,3	0,004
299	L. plantarum 1c	10,7(8)	4,9(8)	11,6(3) 10,6(5)	8	5,8	0,002
79	L. plantarum 1c	11,7(8)	5,7(8)	6,8(3) 10,7(5)	8	5,9	<0,0001
105	L. plantarum 1c	10,8(7)	7,8(7)	9,8(2) 10,3(4)	7	3,0	0,15
107	L. plantarum 1c	10,3(7)	6,9(7)	10,8(2) 15,3(4)	7	3,4	0,01
386	L. plantarum 1c	5,8(4)	4,6(4)	7,0(4) 7,6(4)	4	1,2	0,59
275	L. plantarum 1c	1,6(3)	1,3(3)	2,9(3) 3,1(3)	3	0,3	0,52
36E	L. plantarum 1b	6,0(6)	6,6(6)	7,7(2) 3,5(2)	6	-0,6	0,58
256	L. plantarum 1b	4,9(6)	4,5(6)	7,7(3) 9,8(6)	6	0,4	0,74
125	L. plantarum 1c	8,7	2,9	- -	3	-	0,0036
ATCC14917	L. plantarum 1b	5,6(6)	6,2(3)	1,9(1) 9(1)	3	-0,6	0,70
So5	L. plantarum	1,3(1)	1,6(1)	3,5(1) 2,7(1)			
ATCC8014	L. plantarum	4,8(5)	1,0(1)	5,0(1) 5,0(1)			
98	L. plantarum 1b	0,2(5)	0(1)				
53	L. plantarum 1a	0,4(5)	0(1)				
97M2	L. plantarum	6,4(5)	7,7(2)		2	-0,2	0,70
97	L. plantarum 1a	1,2(4)	6,7(1)				
101	L. plantarum 1a	0,3(1)	1,0(1)	4,2(1) 3,8(1)			
120	L. plantarum	0(4)	0(1)				
44	L. plantarum	3,1(1)	6,7(1)	9,7(1) 6,5(1)			
8704:3	L. fermentum	2,8(3)	10,9(1)				

BR	<i>L. reuteri</i>	5,3(4)	13,6(1)		
108	<i>L. reuteri</i>	0,3(4)	0(1)		
1063	<i>L. reuteri</i>	2,5(4)	12,1(1)		
1068	<i>L. reuteri</i>	2,2(1)	3,3(1)		
1044	<i>L. reuteri</i>	1,7(4)	2,6(2)		
M90	<i>L. reuteri</i>	4,0(4)	1,3(1)	2,7(1)	4,0(1)
8557:1	<i>L. reuteri</i>	2,0(4)	4,1(1)		
8557:3	<i>L. reuteri</i>	0,8(4)	0,8(1)		
DSM20016T	<i>L. reuteri</i>	5,0(3)	13,8(1)		
R2LC	<i>L. reuteri</i>	0(3)	1,15(1)	0,3(1)	0,8(1)
294	<i>L. agilis</i>	0,7(3)	2,4(1)		
271	<i>L. rhamnosus</i>	0(2)			

[0047] Aus diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass die ersten fünf Stämme von *Lactobacillus* eine starke Anhaftung an HT-29 Zellen in vitro zeigen, wobei die Anhaftung durch den Zucker α -Methylmannosid gehemmt wird.

[0048] Dieser Anhaftungstest wurde mit *Lactobacillus plantarum* -Stämmen sowie mit fünf *Escherichia coli* -Stämmen wiederholt. Vier Wildtypstämme wurden aus der rektalen Flora von pakistanischen Kleinkindern isoliert und durch Biotypisierung als *E. coli* identifiziert gemäß der Beschreibung von Bettelheim, M.F. et al., J. Med. Microbiol. 2: 225–236, 1969. Die *E. coli* Stämme wurden über Nacht bei 37°C in einer statischen Luria-Nährlösung, die 0,1% CaCl_2 enthielt, kultiviert, um die Expression der Fimbrien vom Typ 1 mit Mannose-spezifischen Adhäsinen zu fördern. Der transformante Stamm *E. coli* 506 MS, der Fimbrien vom Typ 1 und Mannose-spezifische Adhäsine expremierte, wurde auf tryptischem Soja-Agar kultiviert, der 25 μg von Chloramphenicol/ml enthielt. Die *L. plantarum* -Stämme wurden auf Rogosa-Agar für 24 Stunden aerob bei 37°C kultiviert.

[0049] Um die Hemmung der Anhaftung zu testen, wurden die folgenden Monosacchariden mit einer Endkonzentration von 60 mM bei dem Anhaftungstest hinzugesetzt: D-Glucose (USB, Cleveland, Ohio, USA), Methyl- α -D-glucosid (Sigma), D-Mannose (Merck, USA), N-Acetylglucosamin (USB), N-Acetylgalactosamin (USB) und N-Acetylneuraminsäure (Sigma).

[0050] Die *L. plantarum* -Stämme 299 und 299v, die zuvor gezeigt hatten, dass sie menschliche Freiwillige besiedeln, zeigten eine Anhaftung an HT-29 Zellen in einem moderaten Ausmaß (etwa 10 Bakterien/Zelle). Dies ist auch richtig für alle, außer einem der anderen *L. plantarum* -Stämme, die zu der genetischen Gruppe 1c gehören. Methyl- α -D-Mannosid reduzierte die Anhaftung von diesen Stämmen um 45–73%. Ein geringeres Maß der Anhaftung (2–5 Bakterien/Zelle) wurde bei den Stämmen der Gruppe 1 b beobachtet. Deren Anhaftung wurde durch Methyl- α -D-Mannosid um 33–58% reduziert. Andere *L. plantarum* -Stämme, die nicht zu der genetischen Gruppe 1 b oder 1c gehörten, hafteten mit geringeren Zahlen an und diese Anhaftung wurde nicht durch Methyl- α -D-Mannosid gehemmt.

[0051] D-Mannose reduzierte auch die Anhaftung von *L. plantarum* 299 und 299v, aber in einem geringeren Maße als Methyl- α -D-Glucosid. Keines der getesteten Monosaccharide, das heißt D-Glucose, Methyl- α -D-glucosid, L-Fucose, Galactose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Acetylneuraminsäure, hemmte die Anhaftung von *L. plantarum* 299 oder 299v an HT-29 Zellen.

[0052] Die *E. coli* -Stämme mit Mannose spezifischen Adhäsinen hafteten in Mengen von 15–45 Bakterien/Zelle an. Die Anhaftung von *E. coli* 506 MS wurde in einem ähnlichen Maß (94%) sowohl durch Methyl- α -D-Mannosid als auch D-Mannose gehemmt.

[0053] Die Ergebnisse der Anhaftung der Bakterien an die HT-29 Zellen nach Inkubation in Gegenwart oder in Abwesenheit von 60 mM Methyl- α -D-Mannosid, gewaschen und berechnet als Durchschnittswerte von drei Experimenten (für *E. coli* 345, 253, 810 und 476 nur jeweils ein Experiment), sind in der folgenden Tabelle 3 gezeigt.

Bindung an D-Mannose, die an Agarose-Kügelchen immobilisiert ist

[0054] Die Tests für die Bindung der Bakterien an die Agarose-Kügelchen mit D-Mannose-Beschichtung wurden durchgeführt mit leichten Modifikationen gemäß Sanchez and Jonson (APMIS., 1990, 98: 353–357). Gewaschene Bakterien, suspendiert zu 10^{10} /ml in PBS, wurden auf Mikroskopträgern mit gleichen Volumina einer 1 : 4 Suspension in PBS von kommerziellen Agarose-Kügelchen, die kovalent gebundene D-Mannose enthielten (Agarose-p-aminophenyl- α -D-mannopyranosid, Sigma, St. Louis, USA) oder von reinen Agarose-Kügelchen (4% Perl-Agarose, PL-Biochemical, Milwaukee, Wis, USA) gemischt. Die Träger wurden für 2 Minuten schräggestellt und anschließend mit einem Interferenzkontrastmikroskop beobachtet (500-fache Vergrößerung, Nikon Optiphot). Die Beobachtung der Bakterien, die an die Mannose-beschichteten Kügelchen anhafteten und die nicht an reine Agarose-Kügelchen gebunden hatten, wurde als eine positive Reaktion betrachtet. Die Ergebnisse von diesen Tests sind in der Tabelle 3 gezeigt. Die Bindung an die Mannose-beschichteten Agarose-Kügelchen wurde wie folgt eingeschätzt:

- Kein Unterschied bei der Bindung im Vergleich mit Kontrollkügelchen ohne Mannose;
- + Bakterien bedeckten 50% oder mehr der Oberfläche der Kügelchen in einer dünnen Schicht;
- ++ Bakterien bedeckten die gesamte Oberfläche der Kügelchen in einer dicken Schicht; manchmal erschien dies als eine Mehrfachbeschichtung.

[0055] Eine Bindung an die mit D-Mannose-beschichteten Agarose-Kügelchen wurde bei allen *L. plantarum*-Stämmen beobachtet, die an HT-29 Zellen anhafteten und Erythrocyten in einer Mannose-empfindlichen Weise agglutinierten, dass heißt alle Stämme, die zu der Gruppe 1c gehören, sowie ATCC 14917^T, 256 und 36E von der Gruppe 1 b. Die meisten positiven Stämme reagierten stark mit den mit Mannosebeschichteten Agarose-Kügelchen. Schwache Reaktionen wurden beobachtet mit *L. plantarum* 275 und mit ATCC 14917^T und 256. Alle *L. plantarum*-Stämme, die hinsichtlich einer Mannose-empfindlichen Anhaftung negativ waren, waren auch negativ hinsichtlich den Mannose-beschichteten Kügelchen mit Ausnahme von *L. plantarum* 97, das zu der Subgruppe 1a gehört. Dieser Stamm hatte jedoch manchmal eine Mannoseempfindliche Anhaftung bei anderen Experimenten gezeigt.

[0056] *E. coli* 506 MS heftete in etwa dem gleichen Maß wie die stark positiven *L. plantarum*-Stämme an.

Tabelle 3

Stämme	genetische Gruppe	Anhaftung Bakterien/Zelle (Durchschnitt ± Standardabweichg.)			Bindung an mit Mannose beschichtete Agarose-Kügelchen
		HBSS	+ Methylmannosid	p	
<u>L. plantarum</u>					
97	1a	1,2 ± 0,9	1,5 ± 0,9		+
101	1a	0,5 ± 0,4	1,1 ± 0,8		-
53	1a	0,8 ± 0,4	2,0 ± 0,9		-
ATCC 1417 ^T	1b	5,2 ± 0,8	2,2 ± 0,7	0,070	+
256	1b	3,7 ± 0,3	1,8 ± 0,5	0,020	+
36E	1b	2,4 ± 1,8	1,6 ± 1,5	0,17	++
98	1b	0,6 ± 0,6	0,4 ± 0,2		-
299 (=DSM6595)	1c	8,1 ± 1,1	3,8 ± 0,5	0,029	++
299v(=DSM9843)	1c	11,7 ± 1,4	3,4 ± 0,5	0,017	++
107	1c	11,9 ± 1,7	3,7 ± 0,5	0,020	++
105	1c	13,3 ± 5,0	3,8 ± 0,4	0,093	++
79	1c	12,1 ± 3,5	3,3 ± 0,4	0,056	++

125	1c	8,7 ± 1,6	2,9 ± 1,7	0,0036	++
275	1c	2,9 ± 0,3	1,6 ± 0,2	0,038	+
386	1c	11,6 ± 2,8	4,1 ± 0,9	0,021	++
So5		2,2 ± 0,4	4,6 ± 2,2		-
ATCC 8014 ^T		2,7 ± 1,0	4,5 ± 1,5		-
120		0,9 ± 0,6	0,8 ± 0,7		-
44		1,4 ± 1,2	1,6 ± 0,2		-
<u>E. coli</u>					
345		18,4	0,7		
253		45,4	2,7		
810		26,2	0,5		
476		16,3	1,7		
SO6 MS		34,5 ± 8,9	2,6 ± 0,9	0,020	++

Metaperiodat-Oxidation und enzymatische Behandlung von Bakterien und HT-29 Zellen

[0057] Gewaschene Bakterien oder HT-29 Zellen wurden in 0,01 M Metaperiodat (Merck, USA) in 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 4,5, suspendiert. Die Bakterien wurden bei 37° C für 1 Stunde inkubiert, während die HT-29 Zellen bei Raumtemperatur für 15 oder 30 Minuten inkubiert wurden. Nach Inkubation wurden die Bakterien oder die Zellen abzentrifugiert, zweimal in PBS gewaschen und in HBSS resuspendiert. Die Kontrollinkubationen wurden durchgeführt mit 0,01 M Natriumiodat (Mallinckrodt Chemical Works, Saint Louis, Mo, USA) in dem gleichen Puffer wie oben oder mit Puffer allein.

[0058] Gewaschene Bakterien oder HT-29 Zellen wurden in PBS suspendiert, das 2 mg/ml Proteinase K (15 Einheiten/mg Sigma) enthielt, oder in PBS allein, und dann bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, gewaschen und resuspendiert, wie oben beschrieben.

[0059] Die Behandlung der HT-29 Zellen mit Periodat für 15 oder 30 Minuten führte zu einer Zeltzerstörung. Nur 5–10% der Zellen verblieben nach der Behandlung und dem folgenden Anhaftungstest. Die Mannose-empfindliche Anhaftung von *L. plantarum* an die Zellen, die zuvor für 15 Minuten behandelt wurden, blieb hoch ($p = 0,41$ in Relation zu der Pufferkontrolle), während die Zellen, die zuvor für 30 Minuten behandelt wurden, *L. plantarum* nicht in einer Mannose-empfindlichen Weise gebunden hatten ($p = 0,033$ in Bezug auf die Pufferkontrolle). Die Periodatbehandlung für 30 Minuten zerstörte fast die Anhaftung ($p = 0,0005$ in Bezug auf die Pufferkontrolle, $p = 0,0067$ in Bezug auf die Iodatkontrolle). Die Periodat-Oxidation der bakteriellen Zelloberflächen-Kohlenhydrate beeinflusst nicht stark die Bindung.

[0060] Die Behandlung von *L. plantarum* mit Proteinase K hob vollständig ihre Fähigkeit zur Anhaftung an HT-29 Zellen auf ($p = 0,0008$, Tabelle 5), während keine Reduktion in der Anhaftung von *E. coli* 506 MS beobachtet wurde nach Behandlung der Bakterien mit diesem Enzym. Die Proteinase K Behandlung der HT-29 Zellen zeigte keine klaren Effekte für die Anhaftung von *L. plantarum* 299v ($p = 0,36$), wobei eine Tendenz zur Reduktion der Anhaftung von *E. coli* 506 MS mit Fimbrien vom Typ 1 auftrat ($p = 0,15$, Tabelle 4).

[0061] Diese Experimente bestätigen, dass der zellgebundene Rezeptor eine Kohlenhydratnatur hat und das eine Proteinstruktur auf der bakteriellen Zelloberfläche bei der Anhaftung an diesen Rezeptor beteiligt ist.

Anhaftung von *Salmonella typhimurium* an HT-29 Zellen

[0062] *Salmonella* ist ein Hauptpathogen bei der Diarrhoe-Erkrankung. Viele *Salmonella*-Stämme tragen Fimbrien vom Typ 1, was mit einer Mannose-empfindlichen Hämagglutination nachgewiesen werden kann.

[0063] Ein *Salmonella*-Stamm, der von einem Patienten mit gastro-intestinaler Erkrankung abstammte, *Salmonella typhimurium* 11014, zeigte eine Mannose-empfindliche Agglutination der Erythrocyten und wurde für diesen Anhaftungstest ausgewählt. Der *Salmonella*-Stamm wurde mit einer fluoreszierenden Probe FITC (Fluoresceinisothiocyanat, Sigma) durch Inkubation der Bakterien und FITC in einem Carbonatpuffer, pH 9,6, über Nacht in der Kälte markiert. Die Bakterien wurden dreimal vor Verwendung bei dem Anhaftungstest gewa-

schen.

[0064] Für die Anhaftung wurden 0,1 ml HT-29 Zellen (5×10^6 /ml) mit 5×10^8 fluoreszierenden *Salmonella* und mit 5×10^8 nicht-markierten *Lactobacillus plantarum* 299 oder 299v gemischt. Die Mischung wurde für 30 Minuten mit vertikaler Rotation in der Kälte inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurden die anhaftenden Bakterien in einem Mikroskop, welches für den Fluoreszenznachweis ausgerüstet war, gezählt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

[0065] Tabelle 4. Haftung an HT-29 Zellen

	Zahl der Bakterien/Zelle
<i>Salmonella typhimurium</i> 11014	25
<i>Salmonella typhimurium</i> 11014 + 2,5% Methyl- α -D-mannosid	1
<i>Salmonella typhimurium</i> 11014 + <i>Lactobacillus plantarum</i> 299	7
<i>Salmonella typhimurium</i> 11014 + <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	12

[0066] Aus dieser Tabelle ergibt sich, dass der *Salmonella*-Stamm an die menschlichen Dickdarmzellen, dass heißt an die HT-29 Zellen, über einen Mannose-spezifischen Mechanismus gebunden hat. Diese Mannose-empfindliche Anhaftung konnte in einem hohen Maß durch *Lactobacillus plantarum* blockiert werden. Die Bakterien waren gleichzeitig in gleichen Mengen vorhanden.

[0067] Es ist wahrscheinlich, dass bei Zugabe des *Lactobacillus*-Stammes vor Zugabe des pathogenen Stammes die Stellen für die pathogenen Bakterien, welche die Mannosespezifischen Adhäsine tragen, besetzt werden, wodurch es für sie unmöglich wird, sich zu etablieren und eine Krankheit hervorzurufen.

[0068] Akutes Leberversagen zeigt eine hohe Sterberate und ein signifikanter Anteil an dieser Sterberate kann der hohen Häufigkeit einer Sepsis zugeordnet werden. Bei tödlich kranken oder immun-gefährdeten Patienten werden die meisten Infektionen durch die Patienten eigene Mikroflora hervorgerufen, und viele Patienten, die an Sepsis oder an einem multiplen Organversagen sterben, haben enterische Bakterien, für die kein septischer Focus identifiziert wird, was anzeigt, dass diese Infektionen ihren Ursprung im Darm haben. Aufgrund der hohen Frequenz an klinisch signifikanter, bakterieller Sepsis während einem schwerwiegenden Leberversagen wurde die Möglichkeit einer prophylaktischen Behandlung erörtert. Bei akutem Leberversagen oder nach einer großen Leberoperation gibt es eine starke bakterielle Translokation aus dem Darm, was einige der infektiösen Komplikationen, die bei diesen Zuständen gesehen werden, erklären kann. Um den Mechanismus herauszufinden und mögliche vorbeugende Maßnahmen aufzuzeigen, wurde das folgende Modell erstellt.

Test in Ratten

[0069] Wirkung von *Lactobacilli*-Ergänzung bei akutem Leberverletzungsversagen.

[0070] Das Ziel von diesem Experiment besteht in dem Studium der Wirkung einer rektalen Ergänzung von verschiedenen Stämmen von *Lactobacillus* auf das Maß der bakteriellen Translokation bei einem akuten Leberverletzungsmodell. Der Einfluss von solch einer Verabreichung auf die Zahl der Enterobacteriaceae im Dickdarm und im Blinddarm wurde auch untersucht.

[0071] Männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht im Bereich von 200–300 g wurden in 7 Gruppen von 6 Tieren aufgeteilt: normale, akute Leberverletzung als Kontrolle (ALI); ergänzt mit *Lactobacillus reuteri* R2CL (SR); ergänzt mit *Lactobacillus rhamnosus* 271 (SS); ergänzt mit *Lactobacillus plantarum* 299v (SP); ergänzt mit *Lactobacillus fermentum* 8704: 3 (SF) und ergänzt mit *Lactobacillus reuteri* 108 (ST). Alle Tiere erhielten normale Rattennahrung (R3, Lactamin AB, Stockholm) und Wasser ad libitum während des Experimentes und wurden in einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus und bei 22° Raumtemperatur gehalten. Die unterschiedlichen *Lactobacillus*-Stämme wurden rektal einmal am Tag über einen Zeitraum von 8 Tagen verabreicht. Die tägliche Ergänzung der *Lactobacillus*-Stämme betrug etwa 3×10^9 CFU pro Tier in 3 ml. Eine akute Leberverletzung wurde am achten Tag durch intraperitoneale Injektion von D-Galactoseamin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 1,1 g/kg Körpergewicht, induziert, was zu einem gesteigerten Hindurchtritt von Bakterien durch das Darmlumen zu entfernten Organen führt. Bei der akuten Leberkontrollgruppe wurde normale Kochsalzlösung täglich über einen Zeitraum von 8 Tagen ergänzt und die Leberverletzung wurde am achten Tag induziert. Proben wurden 24 Stunden nach Hervorrufen der Leberverletzung gesammelt. Unter Etherbetäubung wurde eine Laparotomie mittels eines medianen Einschnitts unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Portales Blut und Aortenblut wurde für die bakteriologischen Tests gesammelt. Proben von der Lobus caudatus der Leber und von mesenterischen Lymphknoten (MLN) wurden für die bakteriologischen Studien erzielt sowie zökale Inhalte und Dickdarminhalte für die bakterielle Zählung.

[0072] Bei der bakteriologischen Analyse wurden Gewebeproben in 5 ml steriles Transportmedium gegeben. Die Proben wurden in einem Ultraschallbad für 5 Minuten angeordnet und für 2 Minuten auf Chiltern (Terma-Glas, Schweden) geschüttelt. Eine totale aerobische Plattenzählung wurde durchgeführt durch Anordnung einer 1 ml Probe auf einem Gehirn-Herz-Infusionsagar BHI (Oxoid) und durch Inkubation bei 37°C für 3 Tage.

Die totale anaerobische Plattenzählung wurde durchgeführt durch Anordnung der Proben auf BHI und durch Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Nach 3 Tagen wurde die Zahl der Kolonien, die sich auf jeder Platte gebildet hatten, gezählt und hinsichtlich des Gewichtes des Ursprungsgewebes korrigiert. Gewebeprobe wurden ausgedrückt pro Gramm Gewebe. Alle Werte sind dargestellt als Durchschnittswert \pm SEM. Die Ergebnisse wurden statistisch unter Verwendung eines ungepaarten t-Tests nach Student überprüft. Ein Wahrscheinlichkeitsniveau von weniger als 0,05 wurde als signifikant betrachtet ($p < 0,05$).

Tabelle 5 Bakterielle Translokation an die Leber und MLN

Gruppe	Leber, CFU/g	MLN, CFU/g
ALI	5300 \pm 1750	4940 \pm 2060
SR	880 \pm 530*	-
SS	1460 \pm 990*	180 \pm 40*
SP	20 \pm 10**	-
SF	160 \pm 80**	70 \pm 30*
ST	930 \pm 850*	20 \pm 5*

* bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$

[0073] Die Vorbehandlung der Ratten mit *Lactobacillus plantarum* 299v reduzierte signifikant die bakterielle Translokation von dem Darm und verbesserte den Leberstatus.

[0074] Die bakterielle Mikroflora wurde untersucht, indem Proben vom Blinddarm- und Dickdarminhalt genommen wurden, die sofort in 5 ml steriles Transportmedium angeordnet wurden und anschließend in einem Ultraschallbad und, wie oben erwähnt, auf Chiltern geschüttelt wurden. Lebensfähige Enterobacteriaceae-Zählungen wurden erzielt auf Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Glucose-Agar VRBG (Oxoid), der aerob bei 37° C für 24 Stunden inkubiert wurde.

Tabelle 6 Enterobacteriaceae-Zahlen im Dickdarm und Blinddarm

Gruppe	CFU/g im Dickdarm	CFU/g im Blinddarm
Normal	4,1 ± 1,7	6,5 ± 0,3
ALI	6,8 ± 0,2	4,9 ± 0,1
SR	6,7 ± 0,2	5,1 ± 0,2
SS	5,1 ± 1,1	3,5 ± 1,1
SP	4,7 ± 1,0*	4,3 ± 0,2
SF	1,9 ± 1,2**	5,5 ± 0,2
ST	3,0 ± 1,4	4,3 ± 0,1

* bedeutet $p < 0,05$, ** bedeutet $p < 0,01$

[0075] Die obige Tabelle zeigt, dass die Enterobacteriaceae-Zahl im Dickdarm sowie im Blinddarm in allen Gruppen, die mit *Lactobacillus* ergänzt wurden, abnahm.

Klinischer Test

[0076] Pro Viva (Hagebutten-Suppe auf Basis von Hafer, der fermentiert wurde mit *Lactobacillus plantarum* 299v, Skånemejerierna Ekonomisk Förening, Malmö, Schweden) wurde 26 Kindern, die an akuter Gastroenteritis litten, im Krankenhaus von Szezecin, Polen, über einen mittleren Zeitraum von 5,5 Tagen verabreicht. Das Produkt wurde in einer Menge von 400 ml/Tag gegeben und zwar 200 ml am Morgen und 200 ml am Abend.

[0077] Vor der Behandlung hatten alle Kinder zwischen 3- und 9-mal lockeren Stuhl pro Tag, wobei dies nach der Behandlung auf eine Frequenz von 1–2 Stuhlgänge pro Tag reduziert war. Sechs Patienten zeigten Pathogene in den Stuhlkulturen vor der Behandlung und zwar *Salmonella* bei 3 Kindern, enteropathogenes *E. coli* bei 2 Kindern, *Enterobacter aeromonas* und *Giardia intestinales* bei jeweils 1 Kind. Nach der Behandlung wurden alle diese Pathogene nicht mehr in den Stuhlkulturen nachgewiesen. Alle Pathogene mit Ausnahme von *Giardia intestinales* zeigen Fimbrien vom Typ 1 und haften an Darmepithelzellen über einen Mannose-spezifischen Mechanismus. Es ist wahrscheinlich, dass die Fähigkeit von *Lactobacillus plantarum* 299v mit Pathogenen um die Bindungsstellen an den Mannose enthaltenden Glycoproteinen auf den Epithelzellen oder in der Schleimschicht zu konkurrieren, verantwortlich ist für das Verschwinden dieser Bakterien aus den Stuhlkulturen nach Verabreichung von *Lactobacillus plantarum*.

Schlussfolgerung

[0078] Das häufige Auftreten von Mannose-spezifischen Adhäsinen unter den Gramnegativen Bakterien, die im Darmtrakt verweilen, lässt vermuten, dass diese Adhäsine für die Darmbesiedlung wichtig sind. Ein Mannose-spezifisches Adhäsion wurde niemals zuvor in einer Gram-positiven Art, wie *Lactobacillus plantarum*, identifiziert. Es kann angenommen werden, dass die Fähigkeit zur Anhaftung an die Mannose enthaltenden Rezeptoren von Bedeutung für die ausgeprägte Besiedlungsfähigkeit dieses Bakteriums ist. Jedoch können auch Bakterien, denen die Fähigkeit zur Anhaftung an die Schleimhautrezeptoren fehlt, gute Besiedler des Darmtraktes sein, zum Beispiel der Stamm 271, der nicht an Darmepithelzellen anhaftet.

[0079] Die Fähigkeit zur Bindung an Mannose enthaltende Rezeptoren an dem Epithel verleiht wahrscheinlich dem *Lactobacillus plantarum* die spezielle Fähigkeit der Wirkung von pathogenen Bakterien entgegenzutreten. Zunächst ist es ein guter Besiedler des Darms. Zweitens konkurriert es mit den pathogenen Bakterien um die Rezeptorstellen, die wichtig sind für die Besiedlungsfähigkeit der pathogenen Bakterien, das heißt der Mannose enthaltenden Schleimhautrezeptoren. Drittens ist durch Bindung an die Rezeptoren, die auf den Darmepithelzellen vorhanden sind, *Lactobacillus plantarum* in der Lage, das Mikromilieu der Epithelzellen so-

fort zu beeinflussen. Der Wechsel in dem Mikromilieu, der durch Lactobacilli bewirkt wird, beeinflusst stärker die Epithelzellen, als wenn die Lactobacillus-Bakterien in einem entfernteren Ort von dem Epithel verweilen würden. Viertens ist durch Bindung an die Mannose enthaltenden Rezeptoren auf den Epithelzellen Lactobacillus plantarum in der Lage, die Anhaftung von pathogenen Bakterien zu verhindern, wodurch deren Fähigkeit zur Abgabe von toxischen oder anderen irritierenden Substanzen direkt auf die Epithelzellen reduziert wird, was oft eine Voraussetzung für die pathogene Wirkung dieser Bakterien darstellt.

Patentansprüche

1. Verwendung von Lactobacillus plantarum 299v, Hinterlegungsnummer DSM 9843, das sowohl ein Mannose-spezifisches Adhäsins als auch die Fähigkeit hat, menschliche Schleimhaut zu besiedeln, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Harnwegsinfekts durch Hemmung der Anhaftung von pathogenen Bakterien, die Fimbrien vom Typ 1 exprimieren, insbesondere eines zu Klebsiella, Enterobacter, Proteus oder Escherichia coli gehörenden Bakteriums, an menschliche Harnröhren-Epithelzellen.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1 von Lactobacillus plantarum 299v, Hinterlegungsnummer DSM 9843, in Kombination mit einem herkömmlichen Träger zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

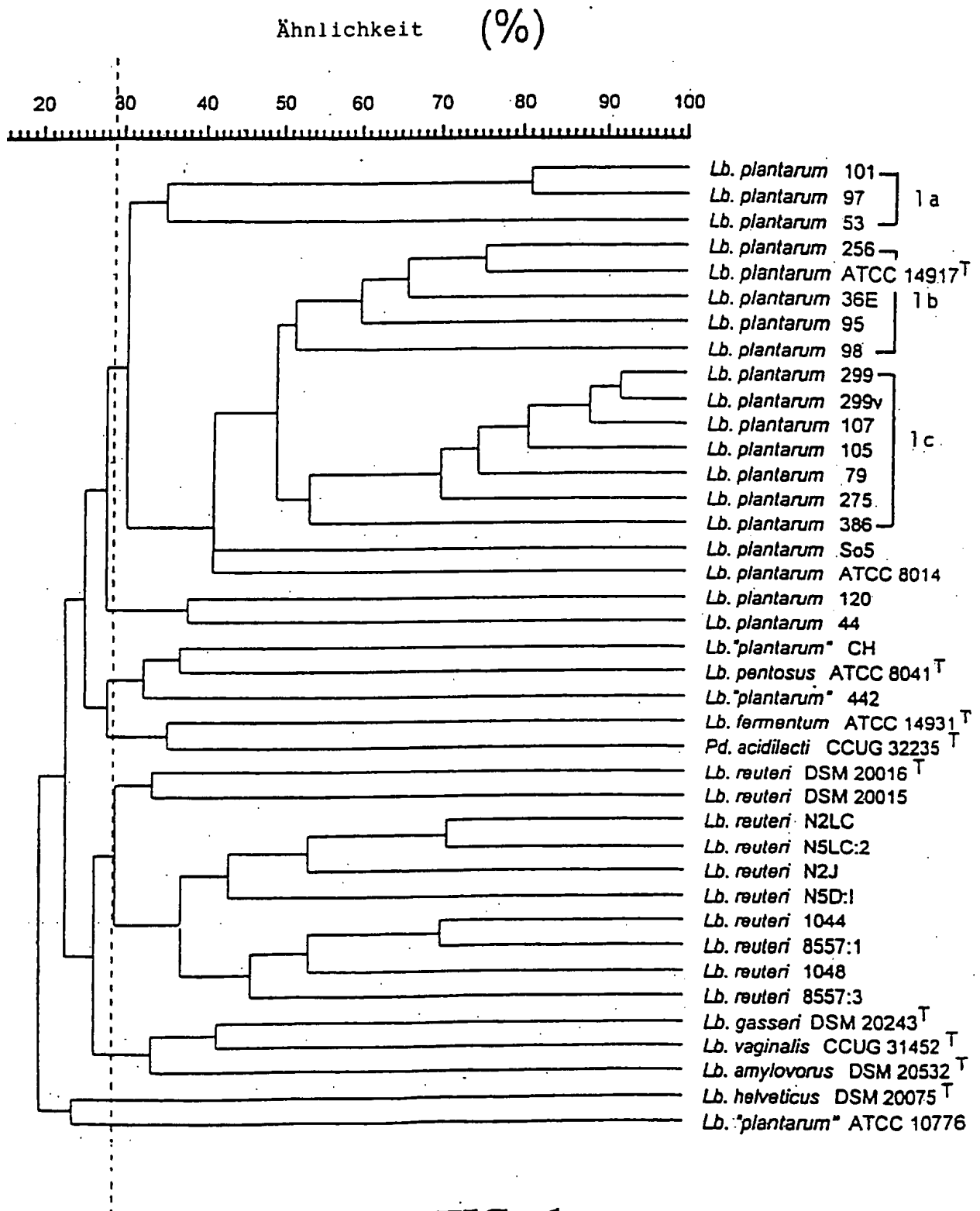


FIG. 1