

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.03.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.03.1999 11.03.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/99104922 1999/99104924**

(33) Země priority: **EP EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/EP00/01798**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/53202**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3269

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 35/74

C 12 N 1/20

A 23 L 1/29

A 23 C 9/152

//(C 12 N 1/20, C 12 R 1:225)

(71) Přihlašovatel:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S. A., Vevey,
CH;**

(72) Původce:

Reniero Roberto, Le Mont-Pelerin, CH;
Bruessow Harald, La Tour de Peilz, CH;
Rochat Florence, Montreux, CH;
Von der Weid Thierry, Paudex, CH;
Blum-Sperisen Stéphanie, Lausanne, CH;
Neeser Jean-Richard, Savigny, CH;
Servin Alain, Chateney-Malabry, FR;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Bakterie mléčného kvašení

(57) Anotace:

Bakterie mléčného kvašení, náležející k rodu *Lactobacillus*, které mají schopnost zabránit kolonizaci střev patogenními bakteriemi, vyvolávajícími průjemová onemocnění a zabránit infekci spitheliálních střevních buněk rotaviry. Součástí řešení tvoří také použití uvedených bakterií pro výrobu požitelného nosiče pro léčení a/nebo prevenci poruch, spojených s průjemovým onemocněním.

CZ 2001 - 3269 A3

Bakterie mléčného kvašení

Oblast techniky

Vynález se týká nového mikroorganismu rodu *Lactobacillus*, vhodného pro prevenci průjmu, vyvolaného patogenními bakteriemi nebo rotaviry. Vynález se zvláště týká použití uvedeného mikroorganismu pro přípravu požitelného nosiče a prostředku, který tento nosič obsahuje.

Dosavadní stav techniky

Organismy, které produkují kyselinu mléčnou jako svou hlavní metabolickou složku, jsou již dlouhou dobu známy. Tyto bakterie se vyskytují v mléce, v živých nebo v rozkládajících se rostlinách a také ve střevech člověka i jiných živočichů. Tyto mikroorganismy se souhrnně označují jako bakterie mléčného kvašení a představují značně nehomogenní skupinu, která zahrnuje například rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* a podobně.

Bakterie mléčného kvašení jsou využívány jako fermentační činidla pro konzervaci potravin při využití nízkého pH a působení fermentačních produktů, vytvářených v průběhu fermentace k inhibici růstu nežádoucích typů bakterií. K tomuto účelu se využívají bakterie mléčného kvašení pro výrobu nejrůznějších potravin, jako jsou sýry, jogurty a další fermentované výrobky z mléka.

V současné době se věnuje bakteriím mléčného kvašení zvýšená pozornost vzhledem k tomu, že bylo prokázáno, že

po požití mají některé kmeny těchto bakterií velmi cenné vlastnosti u člověka i u jiných živočichů. Zvláště specifické kmeny rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, mají schopnost kolonizovat střevní sliznici a napomáhat tak udržování dobrého zdravotního stavu u člověka i u jiných živočichů.

V patentovém spisu EP 768 375 se popisují specifické kmeny rodu *Bifidobacterium*, které mohou být implantovány do střevní flóry a mohou lnout ke střevním buňkám. Tyto mikroorganismy mohou napomáhat modulaci imunitního systému a mohou kompetitivně bránit přilnutí pathogenních bakterií na střevní buňky, čímž mohou napomáhat udržení dobrého zdravotního stavu.

V posledních několika letech byl výzkum zaměřen na potenciální použití bakterií mléčného kvašení jako probiotických prostředků. Probiotické prostředky jsou životaschopné mikrobiální prostředky, které podporují zdravotní stav jednotlivce zachováváním přírodní střevní mikroflóry. Mikrobiální prostředky je možno uznat za probiotické prostředky při znalosti příslušných mikroorganismů a způsobů jejich účinku. Při podání těchto prostředků dochází k přilnutí bakterií na střevní sliznici, ke kolonizaci střevní sliznice těmito bakteriemi a tím i k zábraně přilnutí škodlivých mikroorganismů na tuto sliznici. Zásadním předpokladem pro působení probiotických bakterií je skutečnost, že se tyto bakterie musí dostat na střevní sliznici v životaschopné formě, takže nesmí dojít k jejich narušení v horní části zažívací soustavy, zvláště působením nízké hodnoty pH, která převažuje v žaludku.

V mezinárodní patentové přihlášce WO 97/00078 se popisuje specifický kmen *Lactobacillus* GG, ATCC 53103 jako probiotický prostředek. Uvedený mikroorganismu je zvláště možno použít při prevenci a léčení přecitlivělosti na různé potraviny tak, že se mikrobiální kmen podává společně s potravinou, která byla hydrolyzována pepsinem a/nebo trypsinem. Uváděný kmen *Lactobacillus* je schopen přilnout na střevní sliznici a kolonizovat ji, přičemž produkuje enzym proteázu, takže proteiny, obsažené v potravinách, jsou dále hydrolyzovány proteázami, vylučovanými specifickým kmenem *Lactobacillus*. Při uváděném postupu mohou být bílkoviny vstřebávány ve střevě, přičemž nevyvolávají již žádnou alergii.

Mimo to patentový spis EP 577903 uvádí použití bakterií mléčného kvašení, které mají schopnost nahradit *Helicobacter pylori*, který je uznávanou příčinou vzniku žaludečních vředů, takže při použití bakterií mléčného kvašení je možno bránit vzniku žaludečního vředu nebo léčit již vzniklé vředy, spojené s působením *Helicobacter pylori*.

V mezinárodní přihlášce WO 99/29833 se popisuje určitý kmen LMG P 17806, který obsahuje 3 plasmidy definovaného rozměru. Tento kmen se uvádí jako mikroorganismus, schopný chránit střevní buňky před invazí *Salmonella typhimurium*.

Je zřejmé, že vzhledem k cenným vlastnostem určitých kmenů bakterií mléčného kvašení by bylo žádoucí mít k dispozici další kmeny s příznivým účinkem na organismus člověka a/nebo jiných živočichů.

Vynález si klade za úkol navrhnout další bakteriální kmeny s novými vlastnostmi, které by byly příznivé pro člověka a/nebo jiné živočichy.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří nový mikroorganismus mléčeného kvašení, náležející do rodu *Lactobacillus* a schopný bránit kolonizaci střev pathogenními bakteriemi, vyvolávajícími průjmy a současně zabránit infekci střevních epitheliálních buněk rotaviry. Ve výhodném provedení je kmen *Lactobacillus* schopný přilnout ke střevní sliznici hostitele a kolonizovat ji.

Podle dalšího výhodného provedení mohou kmeny *Lactobacillus* růst v přítomnosti až 0,4 % žlučových solí, takže mohou snadno projít zažívací soustavou ve v podstatě účinném stavu.

Podle dalšího výhodného provedení se bakterie mléčného kvašení zvolí ze skupiny, tvořené *Lactobacillus rhamnosus* nebo *Lactobacillus paracasei*, s výhodou *Lactobacillus paracasei* a zvláště *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

Mikroorganismy podle vynálezu jsou grampozitivní, jsou negativní na katalázu, negativní na arginin a produkci NH_3 z argininu a také na produkci oxidu uhličitého. Uvedené mikroorganismy produkují kyselinu L(+) mléčnou, jsou schopné růst v přítomnosti žlučových solí v koncentraci až 0,4 % a jsou schopné v podstatě zabránit infekci epitheliálních buněk rotaviry.

Nové mikroorganismy je možno použít pro přípravu celé řady požitelných nosičů, jako je mléko, jogurt, tvaroh, fermentované mléko, výrobky na bázi fermentovaného mléka, výrobky na bázi fermentovaných obilovin nebo na bázi práškového mléka, výživy pro kojence a podobně, přičemž mikroorganismy mohou být obsaženy v nosiči v množství přibližně 10^5 cfu/g až 10^{11} cfu/g. Pro účely vynálezu znamená zkratka cfu „jednotky, vytvářející kolonie“, tato hodnota je definována počtem bakteriálních buněk při počítání buněk na agarových plotnách“.

Součástí podstaty vynálezu tvoří rovněž potravinářský nebo farmaceutický výrobek, který obsahuje alespoň jeden kmen *Lactobacillus* se svrchu uvedenými vlastnostmi.

Při přípravě potravinářských prostředků podle vynálezu se uloží alespoň jeden kmen *Lactobacillus* podle vynálezu do vhodného nosiče v množství přibližně 10^5 cfu/g až 10^{11} cfu/g, s výhodou 10^6 cfu/g až 10^{10} cfu/g a zvláště 10^7 cfu/g až 10^9 cfu/g.

V případě farmaceutického prostředku je možno tento prostředek připravit ve formě tablet, kapalných bakteriálních suspenzí, sušených doplňků pro perorální podání, vlhkých doplňků pro perorální podání, prostředků pro podání sondou v suchém nebo vlhkém stavu, přičemž množství kmene *Lactobacillus* v těchto prostředcích může být až 10^{12} cfu/g, s výhodou 10^7 až 10^{11} cfu/g a zvláště 10^7 až 10^{10} cfu/g.

Účinnost nového mikroorganismu na střevní sliznici samozřejmě závisí na jeho dávce. To znamená, že čím vyšší množství nového mikroorganismu se přivádí spolu s potravou nebo jako farmaceutický prostředek, tím vyššího ochranného a/nebo léčebného účinku mikroorganismu je možno dosáhnout. Vzhledem k tomu, že nové mikroorganismy nemají žádné škodlivé účinky pro člověka ani pro jiné živočichy a často jsou náhodně izolovány z kojenecké stolice zdravých kojenců ve vysokém množství, je možno tyto mikroorganismy použít i ve vysokém množství k zajištění kolonizace střevní sliznice těmito mikroorganismy.

Vynález bude dále osvětlen v souvislosti s přiloženými výkresy.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněno schéma vyšetření buněčné kultury na ochranné účinky bakteriálních kmenů proti rotavirům.

Na obr. 2 je znázorněno okyselení různých růstových prostředí působením *L. casei* CNCM I-2116, označovaným ST11.

Na obr. 3 je znázorněno přežívání kmene *L. casei* ST11 při teplotě 10 °C v průběhu 30 dnů.

Na obr. 4 je znázorněna indukce mRNA cytokinů IL-12 a IL-10 u myších buněk, odvozených od kostní dřeně po inkubaci těchto buněk se sériovým ředěním ST11.

Na obr. 5 je znázorněna diferenciací Th2, prokázána snížením produkce IL-4.

Na obr. 6 je znázorněno schéma výsledků pokusů na buněčné kultuře, v pokusu byly užity buňky ST11, které byly sledovány na inhibici přilnutí pathogenních bakterií *E. coli* na epitheliální buňky.

Na obr. 7 jsou schématicky znázorněny výsledky pokusů na buněčné kultuře, v tomto případě byl supernatant kultury ST11 užít k inhibici přilnutí pathogenních bakterií *E. coli* na epitheliální buňky.

Na obr. 8 jsou schématicky znázorněny výsledky pokusu na buněčné kultuře, v tomto případě byly buňky ST11 z buněčné kultury použity ke sledování inhibice invaze *Salmonella typhimurium* do epitheliálních buněk.

Na obr. 9 jsou schématicky znázorněny výsledky pokusu v buněčné kultuře, při pokusu byl použit supernatant kultury ST11 k inhibici invaze *Salmonella typhimurium* do epitheliálních buněk.

V průběhu extenzivních studií, které vedly ke zjištění bakteriálních kmenů podle vynálezu, došlo k vyšetření velké řady kojeneckých stolic a k izolaci různých bakteriálních kmenů z tohoto materiálu. Získané kmeny pak byly postupně sledovány na svou schopnost bránit infekci epitheliálních buněk rotaviry a pathogenními bakteriemi, o nichž je známo, že vyvolávají průjemová onemocnění.

Několik rodů bakterií, a to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* bylo seriově vyšetřeno na inhibiční vlastnosti. Zkoušky byly prováděny se třemi serotypy rotaviru, představujícími hlavní původce virových průjemových onemocnění u člověka, jde o serotypy G1, G3 a G4, současně byly prováděny také zkoušky s pathogenními kmeny *E. coli* a *Salmonella typhimorium* jako reprezentativními pathogenními mikroorganismy, vyvolávajícími průjemová onemocnění.

Různé bakterie mléčného kvašení byly pěstovány ve vhodných živných prostředích, jako MRS, Hugo-Jago nebo M17 při teplotách 30 až 40 °C podle optimální růstové teploty pro jednotlivé organismy. Po dosažení stacionárního růstu byly bakterie izolovány odstředěním a uvedeny do suspenze ve fyziologickém roztoku chloridu sodného. Mezi různými zkouškami byly bakteriální buňky uloženy ve zmrazeném stavu při teplotě -20 °C.

Zkoušky na rotavirus

Zásobní vzorky rotaviru byly připraveny infekcí souvislých buněčných kultur. Rotavirus byl inkubován před infekcí. Buněčný materiál byl infikován 20 dávkami, jichž je zapotřebí pro infekci tkáňové kultury. Aby bylo možno stanovit ochranné účinky proti rotaviru, bylo použito dvou postupů. Při jednom postupu byly různé bakteriální kmeny podrobeny zkouškám na přímou interakci s rotavirem, kdežto při druhém postupu byly bakterie sledovány na svou interakci s buněčnými receptory pro rotavirus. Při prvním uvedeném postupu se suspenze bakterií uváděly do styku s různými kmeny rotavirů a vzorky byly inkubovány ve vhodném prostředí. Pak byla směs viru a bakterií nanesena

na souvislou buněčnou kulturu buněk nediferenciovaného lidského adenomu tlustého střeva HT-29 a kultura byla dále inkubována. Pak byla sledována replikace viru. Při druhém typu zkoušek byla bakteriální suspenze inkubována nejprve s buněčnou kulturou buněk nediferenciovaného lidského adenomu tlustého střeva HT-29 a až potom byl přidán virus. Po další inkubaci byla opět sledována replikace viru. Replikaci rotaviru je možno snadno prokázat histoimunologickým barvením proteinů rotaviru v infikovaných buňkách. Inhibiční efekt na rotaviru byl průkazný v případě, že počet infikovaných buněk v buněčné kultuře, naočkované rotavirem a zkoumanou bakterií byl snížen o 90 % ve srovnání s buňkami, které byly naočovány pouze rotavirem.

Z 260 různých původně izolovaných bakteriálních kmenů bylo možno prokázat pouze u devíti kmenů podstatnou inhibici replikace rotaviru. Bylo prokázáno, že všechny bakterie je možno zařadit do rodu *Lactobacillus*, subsp. *rhannosus* nebo *paracasei*. Jeden z kmenů, který byl označen *Lactobacillus casei* ST11, byl uložen v souladu s Budapeštskou úmluvou pod přístupovým číslem NCC 2461 (I-2116). Bylo prokázáno, že tento kmen je velmi účinný při prevenci infekce lidských buněk rotavirem. Mimo to tento kmen velmi dobře roste, jak je možno prokázat okyselením v různých prostředích. Uvedený kmen také dobře přežívá v průběhu skladování při nízkých teplotách přibližně 10 °C, takže je možno jej velmi dobře zařadit do potravinářských výrobků nebo farmaceutických prostředků, které mají být uloženy v chladničce.

Zkoušky na antibakteriální vlastnosti

Aby bylo možno stanovit antibakteriální vlastnosti nových kmenů, byl podle jednoho postupu kmen *Lactobacillus* podle vynálezu podroben zkouškám na svou schopnost zabránit přilnutí pathogenních bakterií, vyvolávajících průjem ke střevním buňkám nebo zabránit průniku těchto bakterií do střevních buněk. K tomuto účelu byly střevní buňky uvedeny do styku s pathogenními bakteriemi a s kmeny *Lactobacillus* podle vynálezu a byla sledována míra adheze nebo invaze. Při druhém postupu byl supernatant buněčné kultury kmenů *Lactobacillus* podle vynálezu přidáván spolu s pathogenními mikroorganismy ke střevním buňkám a byla sledována míra adheze nebo invaze pathogenního organismu. V průběhu pokusů bylo možno prokázat, že kmeny *Lactobacillus* i supernatant kultury tohoto kmene byly velmi účinné při prevenci adheze i invaze, což prokazuje, že metabolické látky, které jsou novými mikroorganismy vylučovány, mají patrně protiprůjmový účinek v případě invaze pathogenních bakterií.

Kromě svrchu uvedených zjištění bylo rovněž možno prokázat, že zcela neočekávaně uvedené kmeny mají také antialergické vlastnosti tím, že zřejmě ovlivňují syntézu různých mediátorů imunitního systému.

Obvykle se uznává, že humorální imunitní odpověď a alergické reakce jsou zprostředkovány buňkami $CD4^{+}T$, které nesou fenotyp typu 2 ($Th2$). Buňky $Th2$ jsou charakterizovány produkcí velkého množství interleukinu 4, IL-4, jde o cytokin, nezbytný pro sekreci IgE, což je

hlavní skupina protilátek, které se účastní vzniku alergických reakcí.

Diferenciace buněk Th2 je nepříznivě ovlivňována IFN- γ , což je specifický cytokin, který je tvořen výlučně podskupinou Th1 buněk CD4⁺ T. K indukci buněk Th1 přitom dochází působením interleukinu 12, IL-12. Naproti tomu IL-10, jiný cytokin, má silný inhibiční účinek na proliferaci buněk Th1 a pravděpodobně tedy hraje úlohu při potlačování reakce imunitního systému.

Souhrnně tedy mají jak IL-12, tak IL-10 silné modulační účinky na vývoj buněk CD4⁺ T tak, že ovlivňují vývoj podskupiny Th1. IL-12 je klíčovým řídícím cytokinem pro indukci diferenciace Th1 a vyvolává inhibici tvorby Th2. Hlavní cestu pro inhibici buněk Th2 je tedy možno pozorovat ve stimulaci syntézy IL-12.

Je známo, že některé složky gramnegativních bakterií, například LPS indukují velké množství IL-12 u některých buněk, například makrofágů a dendritických buněk. Bylo také prokázáno, že gramnegativní bakterie mohou silně ovlivnit diferenciaci buněk CD4⁺ T směrem k fenotypu Th1.

Mikroorganismus ST11, jako příklad kmenů *Lactobacillus* podle vynálezu, byl podroben zkouškám na svou potenciální úlohu při indukci cytokinů, účastnících se řízení diferenciace buněk CD⁺ T. Zvláště byl sledován účinek ST11 na fenotyp Th2 u buněk CD4⁺ T v průběhu jejich diferenciace.

Schopnost ST11 indukovat syntézu kódové mRNA pro uvedené dva řídící cytokiny u myších buněk, odvozených od kostní dřeně, byla srovnávána se schopností 4 jiných kmenů *Lactobacillus* a s kontrolním kmenem gramnegativní bakterie *E. coli* K12. Množství mRNA bylo měřeno semikvantitativně pomocí RT-PCR po 6 hodinách inkubace buněk se seriovým ředěním bakterií v množství 10^9 až 10^7 cfu/ml.

Přestože všechny kmeny *Lactobacillus* byly schopné indukovat transkripci IL-12 mRNA do určitého stupně, kmen ST11 vyvolává nejsilnější indukci vzhledem k tomu, že bylo možno prokázat silný PCR signál i při nejnižší dávce těchto bakterií. Ve skutečnosti byla schopnost ST11 indukovat transkripci IL-12 mRNA tak silná jako uvedená schopnost v případě *E. coli*. Indukce pro IL-10 mRNA byla obecně slabší než pro IL-12 mRNA vzhledem k tomu, že pouze při vyšší dávce bakterií bylo možno prokázat signál. Platí však, že ST11 je kmenem, vyvolávajícím nejsilnější indukci IL-10 mRNA ve srovnání s ostatními kmeny bakterií mléčného kvašení a s kontrolním kmenem *E. coli*.

Je tedy možno kmen ST11 považovat za kmen, který vyvolává účinnou indukci cytokinů, řídících imunitní systém a účastnících se diferenciací buněk $CD4^+$ T. Vzhledem k silné indukci IL-12 by tento kmen mohl vyvolávat inhibici odpovědi Th2 a vzhledem ke své měřitelné indukci IL-10 by uvedený kmen mohl bránit zánětlivé odpovědi.

Kromě svrchu uvedených zjištění bylo také zkoumáno, zda má kmen ST11 inhibiční účinek na buňky $CD4^+$ T v

průběhu diferenciaci Th2 nebo zda má kladný účinek na funkce Th1. Byl použit běžně užívaný systém pro zkoušky na diferenciaci buněk v kultuře, v němž byly prekurzorové buňky $CD4^+$ T polyklonálně aktivovány a modulovány tak, aby došlo k diferenciaci Th1 nebo Th2. Tyto zkoušky byly prováděny v závislosti na přídatných podnětech v živném prostředí kultury. Diferenciaci Th1/Th2 byla indukována v průběhu prvních sedmi dnů primární kultury, pak byly buňky znovu stimulovány dva dny v sekundární kultuře, obsahující pouze živné prostředí, načež byly stanoveny specifické fenotypy Th1 nebo Th2 měřením typu produkovaného cytokinu v supernatantu (IFN- γ nebo IL-4).

Je známo, že prekurzorové buňky $CD4^+$ T myši kmene BABL/c se přednostně diferencují na fenotyp Th2 (v supernatantu sekundární kultury je možno prokázat vysoké množství IL-4 a malé množství IFN- γ) po aktivaci za neutrálních podmínek v přítomnosti samotného živného prostředí v primární kultuře. Tento fenotyp mohl být zcela zaměněn na fenotyp Th1 (vysoké množství IFN- γ , nízké množství IL-4) po přidání blokující monoklonální protilátky proti IL-4 v primární kultuře.

Aby bylo možno prokázat potenciální úlohu kmene ST11 při inhibici Th2, byl aktivován čištěný prekurzor buněk $CD4^+$ T myši kmene BALB/c v přítomnosti buněk z kostní dřeně jako přídatných buněk v průběhu primární kultury. Tyto buňky byly společně pěstovány buď v samotném živném prostředí nebo v přítomnosti 1 mg/ml LPS nebo v přítomnosti 10^8 cfu/ml kmene ST11 nebo v přítomnosti 10^8 cfu/ml jiného kmene *Lactobacillus*. Po uvedené době byly buňky promyty a buňky $CD4^+$ T byly znovu čištěny a restimulovány v sekundární kultuře pouze v živném

prostředí. Po dvou dnech byly měřeny cytokiny, produkované diferenciovanými buňkami $CD4^+$ T. Jak bylo možno očekávat, měly buňky, diferenciované pouze v přítomnosti živného prostředí převažující fenotyp Th2. Přidáním ST11 k primární kultuře silně pozměnilo tuto diferenciaci ve smyslu Th2, jak bylo možno prokázat osminásobným poklesem produkce IL-4. Tato inhibice měla podobný rozsah jako inhibice, pozorovaná u buněk, k jejichž diferenciaci došlo v přítomnosti LPS. Na druhé straně jiné kmeny *Lactobacillus* neměly žádný měřitelný vliv na množství IL-4. Je zajímavé, že po přidání ST11 k primární kultuře, nedošlo k vzestupu koncentrace IFN- γ .

Je tedy možno shrnout, že kmen ST11 specificky snižuje produkci IL-4 buňkami $CD4^+$ T při jejich diferenciaci ve smyslu Th2, avšak prokazatelně nesnižuje sekreci IFN- γ . Skutečnost, že ST11 nezvyšuje produkci IFN- γ , může být způsobena schopností tohoto kmene indukovat IL-10 s tím důsledkem, že může být zachována jen nízká zánětlivá reakce přes účinnost proti Th2.

Je tedy možno prokázat, že kmen ST11 je kmen *Lactobacillus*, který potlačuje Th2, takže je tento kmen možno velmi dobře využít jako bakterii s antialergickým a probiotickým účinkem.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Prostředí a roztoky:

MRS (Difco)

Hugo-Jago (Trypton Difco 30 g/l, extrakt z kvasnic Difco 10 g/l, laktóza Difco 5 g/l, dihydrogenfosforečnan draselný 5 g/l, extrakt z hovězího masa Difco 2 g/l, agar Difco 2 g/l)

M17 (Difco)

M199 (Seromed)

Ringerův roztok (Oxoid)

PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 1,15 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l)

bujón s tryptózou a fosfátem (Flow)

roztok trypsinu a EDTA (Seromed)

Lidský rotavirus Wa (serotyp G1) a opičí rotavirus SA-11 (serotyp G3) byly získány od P.A. Offit, Children's Hospital of Philadelphia, U.S.A. Virus DS-1xRRV byl získán od A. Kapikian, NIH Bethesda U.S.A. Lidský rotavirus Hocht, serotyp 4, byl získán od P. Bachmann, University of Munich, SRN. E. coli DAEC C 1845 byl získán od Washington University, Seattle a E. coli JPN15 byl získán od Center for Vaccine Development of the University of Maryland, USA. Kmen Salmonella typhimurium SL1344 byl získán z Department of microbiology, Stanford University, CA, USA).

Příklad 1

Izolace bakterií mléčného kvašení ze stolice novorozenců

Čerstvé stolice byly odebrány z plen 16 zdravých novorozenců ve stáří 15 až 27 dnů. Vždy 1 g čerstvé

stolice byl přepraven do laboratoře za anaerobních podmínek a v průběhu 2 hodin byla provedena mikrobiologická analýza seriovým ředěním v Ringerově roztoku a nanesením na plotny se selektivním živným prostředím. Pro izolaci bakterií mléčného kvašení byl použit agar MRS s antibiotiky (fosfomycin 80 µg/ml, sulfamethoxazol 93 µg/ml, trimethoprim 5 µg/ml) a plotny byly inkubovány 48 hodin při teplotě 37 °C. Kolonie byly náhodným způsobem izolovány a čištěny. U izolovaných kolonií byla provedena fyziologická a genetická charakteristika.

Příklad 2

Zkoušky kmenů v buněčné kultuře na účinnost proti rotaviru

Několik bakteriálních rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* bylo podrobeno zkouškám na účinnost proti rotaviru v buněčné kultuře, v níž byl proveden test na inhibici. Rod *Lactococcus* byl představován kmenem *Lc. lactis*, a to *Lc. lactis* subsp. *lactis* a *cremoris*. Zkouškám bylo podrobeno celkem 30 kmenů. Z rodu *Streptococcus* byl použit *S. thermophilus* s celkem 45 kmeny. Rody *Leuconostoc* a *Propionibacterium* byly zastoupeny šesti kmeny, kdežto *Enterococcus* a *Staphylococcus* byly zastoupeny celkem 17 kmeny.

Celkem bylo podrobeno zkouškám na inhibiční účinnost proti rotaviru 260 bakteriálních kmenů.

Postup 1:

30 µl bakteriální suspenze s průměrným obsahem

3×10^6 bakterií bylo smíseno se 70 μl prostředí M199, doplněného 10 % bujonu s tryptózou a fosfátem (Flow) a 5 % roztoku trypsinu a EDTA (Seromed) v případě buněk HT-29 bylo použito ředění 1:4, mimo to bylo přidáno 100 μl viru v prostředí M199 s doplňky. Směs bakterií a viru byla inkubována 1 hodinu při teplotě 4 °C a 1 hodinu při teplotě 37 °C. Buňky nediferenciovaného lidského adenomu tlustého střeva HT-29, rostoucí v souvislé vrstvě na mikrotitrační plotně s 96 vyhloubeními, byly 3x promyty fyziologickým roztokem chloridu sodného s fosfátovým pufrům o pH 7,2. Pak byla na buňky nanесena směs viru a bakterií a mikrotitrační plotny byly inkubovány 18 hodin v inkubátoru s atmosférou CO_2 (Heraeus). Replikace viru byla prokazována dále uvedeným způsobem.

Postup 2:

30 μl svrchu uvedené bakteriální suspenze bylo smíseno se 70 μl prostředí M199, doplněného 10 % bujonu s tryptózou a fosfátem (Flow) a 5 % roztoku trypsinu a EDTA (Seromed), v případě buněk HT-29 bylo užito ředění 1:4. Materiál byl přímo nanесen na vrstvu buněk na mikrotitrační plotně. Po inkubaci 1 hodinu při teplotě 100 μl bylo k buňkám na mikrotitrační plotě přidáno 100 μl viru v prostředí M199, doplněném svrchu uvedeným způsobem. Inkubace pokračovala 18 hodin v inkubátoru s atmosférou CO_2 (Heraeus). Replikace viru pak byla stanovena dále uvedeným způsobem.

Replikace rotaviru byla prokazována histoimunologickým barvením proteinů rotaviru v infikovaných buňkách, jak bude dále popsáno.

Jeden den po infekci bylo živné prostředí slito z mikrotitračních ploten a buněčný materiál byl fixován 10 minut absolutním ethanolem. Ethanol byl slit a plotny byly 3krát promyty pufrem PBS. Pak bylo do každého vyhloubení přidáno 50 μ l séra proti rotaviru (převážně proti proteinu VP6), produkovaného králíky (získanými z ISREC University of Lausanne) po zředění v poměru 1:2000 v PBS a vzniklá směs byla inkubována 1 hodinu při teplotě 37 °C, přičemž plotny byly překryty, aby nedošlo k vyschnutí vyhloubení. Pak bylo antisérum slito a plotny byly 3krát promyty PBS. Pak bylo přidáno 50 μ l antiséra (v ředění 1:500 v PBS) proti králičímu imunoglobulinu G (IgG), produkovaného u koz a byla provedena vazba na peroxidázu (GAR-IgG-PO, Nordic). Pak bylo do každého vyhloubení přidáno 100 μ l následující směsi substrátů: 10 ml 0,5 M tris-hydrochloridu o pH 7,8, 1 ml peroxidu vodíku (30% Suprapur v ředění 1:600 ve vodě, Merck) a 200 μ l 3-amino-9-ethylkarbazolu (0,1 g/10 ml ethanolu, uložený po podílech 200 μ l při teplotě -80 °C, A-5754, Sigma). Plotny byly inkubovány alespoň 30 minut při teplotě místnosti. Pak byl substrát slit a vyhloubení byla naplněna 200 μ l vody k zastavení reakce. Infikované buňky pak byly počítány v invertním mikroskopu (Diavert, Leitz).

Bylo zřejmé, že s rotavirem se dostává do interakce jen velmi malé množství bakteriálních kmenů. Pouze 9 kmenů z původně vybraných 260 bakteriálních kmenů mělo schopnost vyvolat inhibici replikace rotaviru. *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (ST11) měl velmi vysokou účinnost proti rotaviru, serotyp 1, rotaviru SA-11, serotyp 3 a a rotaviru Hochi, serotyp 4.

Příklad 3

Pěstování buněk Caco-2

Pro zkoušky na inhibici (pathogenních) bakterií byla užita buněčná linie Caco-2 jako model střevních buněk. Tato buněčná linie má vlastnosti střevních buněk, jako jsou například polarizace, exprese střevních enzymů, produkce určitých strukturních polypeptidů a podobně.

Buňky byly pěstovány buď na plotnách z plastu s plochou 25 cm² (Corning) nebo na sterilizovaných skleněných plotnách se 6 vyhloubeními o velikosti 22 x 22 mm (Corning) při zkouškách na adhezi nebo na skleněných plotnách s 24 vyhloubeními (Corning) pro zkoušky na inhibici.

Po druhém dnu v kultuře bylo prostředí DMEM každý den vyměněno. Před použitím bylo živné prostředí doplněno 100 U/ml penicilinu/streptomycinu, 1 µg/ml amphoterinu a 20 % FCS po inaktivaci 30 minut při teplotě 56 °C. Buněčný materiál byl pěstován při teplotě 37 °C v atmosféře, obsahující 90 % vzduchu a 10 % oxidu uhličitého. Buňky byly přeočkovány každých 6 dnů. Buněčný materiál byl oddělen od stěn vyhloubení působením PBS s 0,25 % trypsinu a 3 mM EDTA o pH 7,2. Pro neutralizaci účinku trypsinu byl k získané buněčné suspenzi přidán stejný objem FCS, směs byla odstředěna 10 minut při 1000 otáčkách za minutu a usazenina byla znovu použita k pěstování. Přibližně $3,5 \times 10^5$ buněk bylo přeneseno do nové lahve pro pěstování kultur a pěstováno až do dosažení souvislé vrstvy buněk.

Příklad 4

Pěstování bakterií

ST11

Tento bakteriální kmen byl uložen při -20°C v prostředí MRS s obsahem 15 % glycerolu. Kmen byl pěstován za anaerobních podmínek v MRS a 2krát přenesen do nového živného prostředí v intervalu 24 hodin před použitím k inhibičním zkouškám. Při provádění zkoušek byla užita koncentrace 2×10^9 cfu/ml.

Supernatant byl oddělen odstředěním 1 hodinu při 20 000 otáčkách za minutu a získaný supernatant byl podroben zkouškám na přítomnost bakterií.

E. coli

2 kmeny E. coli, a to E coli DAEC C 1845 (Diffuse Adhesion E. coli) a E. coli JPN15 (EPEC, Enteropathogenic E. coli) byly použity k provedení zkoušek.

První pasáž po roztátí byla uskutečněna na agaru CFA-Müller Hinton, který je vhodný pro expresi faktorů pro adhezi bakteriemi.

Před každým pokusem byly bakteriální buňky inkubovány při teplotě 37°C a vždy po 24 hodinách byl buněčný materiál přenesen do nového živného prostředí. Tento postup byl dvakrát opakován. Vzhledem k tomu, že kmen JPN15 obsahuje gen pro odolnost proti ampicilinu, bylo toto antibiotikum použito pro selekci uvedeného kmene v průběhu růstu.

Salmonella

K pokusům byl použit také mikroorganismus *Salmonella typhimurium* kmen SL1344, který byl před použitím pěstován v živném prostředí LB.

Příklad 5

Zkouška na inhibici *E. coli*

Po druhé pasáži do nového prostředí byly patogenní kmeny bakterií označeny radioizotopy, byl použit C^{14} -acetát v množství 10 $\mu\text{Ci/ml}$ v prostředí LB. Inkubace kmenů v tomto živném prostředí byla prováděna 18 hodin při teplotě 37 °C.

Bakteriální suspenze pak byla odstředěna 15 minut při 1041g, tak aby byl odstraněn supernatant se zbylým C^{14} -acetátem. Usazenina byla uvedena do suspenze a promyta PBS a buňky byly znovu uvedeny do suspenze v koncentraci 10^8 buněk/ml v 1% sterilní mannóze, o níž je známo, že vyvolává inhibici nespecifické adheze.

Různé bakteriální kmeny patogenních bakterií *E. coli* byly uvedeny do styku se souvislou vrstvou buněk Caco-2 při teplotě 37 °C ve směsi 90 % vzduchu a 10 % oxidu uhličitého na 3 hodiny. Tytéž pokusy byly provedeny při použití supernatantu, získaného odstředěním po dobu 40 minut při 20 000 otáčkách za minutu.

Při kontrolním pokusu byly pathogenní bakterie uvedeny do styku se souvislou vrstvou Caco-2 bez současného přidání ST-11 nebo supernatantu kultury.

Po třech hodinách inkubace bylo živné prostředí vyměněno a souvislá vrstva byla třikrát promyta PBS. Při každém promytí byl roztok PBS 20krát promíchán tak, aby bylo možno v podstatě vyloučit jakoukoliv nespecifickou adhezi. Pak byly buňky rozrušeny přidáním 1 ml uhličitanu sodného a inkubovány 40 minut při teplotě 37 °C. Po homogenizaci byl podíl 250 µl materiálu zředěn 5 ml scintilační kapaliny (Hionic-fluor Packard) a výsledek byl sledován na počítači (Packard 2000). Procentuální adheze pathogenních buněk na buňky Caco-2 byla vypočítána ve srovnání s kontrolou, která byla považována za 100 %. Obdobným způsobem byla sledována invaze, jak bude uvedeno v příkladu 6.

Příklad 6

Zkouška na inhibici v případě bakterií *Salmonella*

Salmonella jsou bakterie, které napadají epitheliální buňky a množí se v nich. Při stanovení inhibiční účinnosti kmene ST11 byl kmen *Salmonella typhimurium* SL1344 inkubován svrchu uvedeným způsobem v prostředí, obsahujícím ^{14}C -acetát, načež byl podroben zkouškám podle příkladu 5.

Po inkubaci byly buňky Caco-2 promyty PBS k odstranění všech buněk, které nepřilnuly. Pak bylo přidáno prostředí, obsahující 20 µg/ml gentamycinu a inkubace pokračovala 1 hodinu při teplotě 37 °C. Gentamycin je antibiotikum, které neproniká do střevních buněk, takže všechny extracelulární organismy uhynou, kdežto organismy, které se již dostaly do střevních buněk přežívají. Po dvojím promytí buněk PBS byly buňky

rozrušeny přidáním sterilní destilované vody a pak byla měřena radioaktivita způsobem, popsaným v příkladu 4.

Výsledky pokusů 5 a 6 jsou znázorněny na obr. 6 až 9. Je zřejmé, že buňky kmene ST11 i supernatant této kultury byly velmi účinné při prevenci adheze i invaze do střevních buněk v případě pathogenních mikroorganismů, vyvolávajících průjemová onemocnění.

Příklad 7

Vlastnosti ST11

Kmen ST11 byl inkubován v simulované žaludeční šťávě. Simulovaná žaludeční šťáva byla připravena tak, že byl suspendován pepsin v množství 3 g/l ve sterilním 0,5% roztoku chloridu sodného a pH bylo upraveno na 2,0 až 3 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Kmen ST11 byl pěstován na svrchu uvedených prostředích v různém množství a byla stanovena odolnost mikroorganismů.

Získané výsledky jsou shrnuty v následující tabulce I.

Tabulka I

pH	cfu/ml při T0	cfu/ml při T 1 min	cfu/ml při T 15 min	cfu/ml při T 30 min	cfu/ml při T 60 min
2,0	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$7,0 \times 10^3$
3,0	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$

ST11 má následující vlastnosti, jak je definováno postupy pro rody bakterií mléčného kvašení, Ed. B.J.B. Wood a W.H. Hozapfel, Blackie A&P.

- bakterie jsou grampozitivní,
- negativní na katalázu,
- negativní na NH_3 formu argininu
- negativní na produkci CO_2 ,
- produkují kyselinu L(+)mléčnou,
- rostou v přítomnosti žlučových solí do koncentrace až 0,4 %.

Příklad 8

Růst ST11 za různých podmínek

Kmen ST11 byl inkubován při 37 °C v prostředí na bazi rajčat (4 % rajčat v prášku po rehydrataci v destilované vodě), prostředí je doplněno sacharózou v množství 0, 0,5, 1 nebo 2 % nebo sojovým peptonem v množství 0,5 % nebo glukózou v množství 0,5 % na různé časové období. Výsledky jsou znázorněny na obr. 2.

Kmen ST11 byl dále přidán v množství 2,5 % do prostředí, obsahujícího 3 % rýžové mouky, 2 % pšeničné mouky a 3 % sacharózy a směs byla inkubována při teplotě 37 °C až do dosažení pH 4,4. Po zchlazení byl produkt balen, popřípadě za přidání vitamínu C a uložen při teplotě 10 °C.

Příklad 9

Indukce syntézy mRNA pro IL-12 a IL-10 u myších buněk v přítomnosti ST11. Buňky kostní dřeně byly izolovány ze stehenní kosti a z lýtkové kosti bez patogenních myší C57BL/6 ve stáří 8 týdnů a byly inkubovány v koncentraci 2×10^6 buněk/ml v prostředí RPMI (Gibco) s obsahem 10 % fetálního séra skotu, 1 mM L-glutaminu, 12 mM hepes, 0,05 mM 2-merkaptetoethanolu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml

streptomycinu (všechny složky od Gibco) celkem 12 hodin při teplotě 37 °C v atmosféře s 5 % oxidu uhličitého. Buňky, které nepřilnuly, byly odstraněny trojím promytím teplým živným prostředím a zbývající lnoucí buňky byly odebrány a inkubovány v koncentraci 10^6 buněk/ml celkem 6 hodin v přítomnosti nebo nepřítomnosti bakterií. Před tím bylo stanoveno, že 6 hodin představuje optimální časové období pro syntézu mRNA pro cytokiny u myších buněk při odpovědi na LPS. Bakterie byly přidány v různé koncentraci od 10^9 do 10^7 cfu/ml. Bakterie byly pěstovány a uloženy tak, jak bylo uvedeno svrchu.

Na konci období 6 hodin byl buněčný materiál oddělen odstředěním a rozrušen při použití reakčního balíčku TRIzol (GibcoBRL, číslo katalogu 15596-018) podle instrukcí výrobce. Celková RNA byla izolována vysrážením isopropanolem a byla provedena reverzní transkripce do cDNA po dobu 90 minut při teplotě 42 °C při použití 20 U reverzní transkriptázy (Superscript II, BRL) v reakčním objemu 40 µl s obsahem 200 mM Tris o pH 8,3, 25 mM KCl, 1 µg/ml oligo d(T)₁₅ (Boehringer Mannheim), 1 mM DTT (Boehringer Mannheim), 4 mM každého z dNTP (Boehringer Mannheim) a 40 U/ml Rnasin (Promega). Primery pro PCR a použité podmínky jsou popsány v publikaci Kopf a další, Journal of Experimental Medicine 1996, 1 září, 184(3): 1127-36. Množství cDNA bylo ve vzorcích upraveno při použití primerů, specifických pro provozní gen (-2-mikroglobulin). Produkty PCR byly odděleny na 2% agarózovém gelu a jednotlivé pásy byly analyzovány v ultrafialovém světle.

Jak je znázorněno na obr. 4, bylo možno pro ST11 prokázat nejsilnější indukci mRNA pro IL-12 a IL-10, tato

indukce byla srovnatelná s indukcí pro pozitivní kontroly *E. coli*. Rozdíly jsou nejzřejmější při nejnižších koncentracích bakterií 10^7 cfu/ml.

Příklad 10

Potlačení syntézy IL-4 působením ST11

Buňky $CD4^+$ T byly čištěny ze sleziny specifických bezpathogenních myši BALB/c při použití balíčku MiniMACS (Miltenyi Biotec, č. katalogu 492-01). Buňky $CD4^+$ T byly pěstovány v koncentraci 2×10^5 buněk/ml v prostředí RPMI, obsahujícím 10 % fetálního séra skotu, 1 mM L-glutaminu, 12 mM hepes, 0,05 mM 2-merkaptoethanolu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu, buňky byly aktivovány v průběhu 1 týdne zesíťením s monoklonálními protilátkami CD3 (klon 2C11) a CD28 (klon 37.51, Pharmingen), vázanými na plotnu. V průběhu této primární kultury byly buňky $CD4^+$ T pěstovány společně s buňkami kostní dřeně, izolovanými svrchu uvedeným způsobem jako přídatnými buňkami a s 10^8 cfu/ml ST11 nebo 10^8 cfu/ml Lal nebo 1 mg/ml LPS nebo v samotném živném prostředí. Po této době byly buňky promyty a buňky $CD4^+$ T byly znovu čištěny s použitím balíčku MiniMACS a restimulovány v sekundární kultuře, obsahující pouze živné prostředí. Cytokiny, produkované buňkami $CD4^+$ T po diferenciaci, byly měřeny v supernatantech po dvou dnech při použití zkoušky ELISA (balíčky Endogen a Pharmingen).

Získané výsledky jsou znázorněny na obr. 5. Buňky, u nichž došlo k diferenciaci pouze v přítomnosti živného prostředí, měly převažující fenotyp Th2, což se projevovalo vysokou koncentrací IL-4. Přidáním ST11 k primární kultuře silně ovlivnilo diferenciaci Th2

vzhledem k tomu, že došlo k osminásobnému poklesu produkce IL-4. Tato inhibice přibližně odpovídala inhibici, kterou bylo možno pozorovat u kultur buněk, k jejichž diferenciaci došlo v přítomnosti LPS. Na druhé straně druhý kmen *Lactobacillus* neměl žádný prokazatelný vliv na koncentraci IL-4. Je zajímavé, že po přidání ST11 k primárním kulturám nedošlo k vzestupu koncentrace IFN- γ .

Z toho, co bylo svrchu uvedeno je zřejmé, že kmeny *Lactobacillus* podle vynálezu je možno dobře využít pro výrobu potravinových a/nebo farmaceutických nosičů při využití cenných vlastností těchto mikroorganismů.

Příklad 11

Kmen ST11 byl podroben klinickým zkouškám u komunity na předměstí Guatemala City tak, aby bylo možno sledovat vliv tohoto kmene na přenos a vznik průjemových onemocnění na začátku období dešťů, tomuto onemocnění je vystavena většina dětí v oblasti. Do studie bylo zahrnuto celkem 203 dětí ve stáří 35 až 70 měsíců, těmto dětem byla podána po dobu 29 dnů cílová dávka 10^{10} životaschopných mikroorganismů ST11 nebo bylo podáno placebo. Děti, které byly vybrány k těmto pokusům, měly typické znaky snížené hmotnosti a malé výšky, tak jak je to charakteristické pro podvyživené děti.

Před začátkem pokusu u předškolních dětí byla vyhodnocena in vitro i in vivo bezpečnost. Zkoušky in vitro prokazovaly odolnost proti antibiotikům, obdobnou pro podobné kmeny, používané pro potravinářské účely, přičemž nebyla prokázána žádná schopnost tvorby

biogenních aminů, schopnosti degradovat mucin nebo dekonjugovat žlučové soli. Při klinických zkouškách, zahrnujících 42 dospělých dobrovolníků, jimž byl podán ST11 nebo placebo, byl kmen ST11 dobře znášen a nevyvolával žádné nepříznivé účinky při sledovaných parametrech, jako byly plynatost, počet stolic denně a jejich konzistence, při sledování bílkovin v krevním séru nebylo možno pozorovat žádné změny, které by ukazovaly na potenciální zánětlivou reakci.

Vzorky kmene a placebo byly uloženy do sáčků v Nestlé Product Technology Center manufacturing facility v Konolfingenu ve Švýcarsku a byly ve zmrazeném stavu dopraveny do Guatemaly. V každém z 10g sáčků byl uložen nosič, ochucený čokoládou a 0,2 g ST11 (10^{10} cfu) nebo v případě placebo 0,2 g práškového mléka. Nosič, ochucený čokoládou obsahoval kakakový prášek, cukr, sojový lecithin, vanilku a skořici. Sáčky byly uloženy při teplotě 4 až 6 °C do dvou hodin před použitím. Před použitím byly sáčky rozpuštěny ve 100 ml vody, dodané Nestlé a prosté jakéhokoliv bakteriálního znečištění.

Podle použitého protokolu byl průjem definován jako výskyt tří nebo většího počtu kapalných nebo netvarovaných stolic v průběhu 24 hodin. Průjmová epizoda byla definována jako jev, prokazující průjmové onemocnění (trojí vyprázdnění řídké stolice v průběhu 24 hodin). Celkové trvání v hodinách bylo počítáno od první do třetí zaznamenání stolice a pak až do vzniku první tvarované stolice nebo do období 24 hodin bez jakékoliv stolice. V případě dítěte bylo zapotřebí, aby před novou průjmovou epizodou uplynulo 48 hodin od konce předchozího průjmu. V případě kratšího období byl průjem považován za

pokračování téže epizody a bylo pak vyhodnoceno celkové trvání. Šlo například o dítě, u kterého se vyskytlo větší množství dokumentovaných epizod v průběhu pozorování po dobu 29 dnů. Intenzita epizody se určuje podle celkového počtu řídkých stolic. Závažnost epizody zahrnuje také přítomnost krve, hlenu nebo hnisu ve stolici, popřípadě se současnými dalšími příznaky, jako je horečka a zvracení. V případě více než 7 stolic za 24 hodin nebo v případě nutnosti intervence v léčebném zařízení nebo nemocnici se rovněž epizoda považuje za závažnou.

V případě, že byla diagnostikována epizoda průjmového onemocnění, byl vzorek průjmové stolice odebrán na mikroskopické pozorování a na pěstování k identifikaci patogenních bakterií při této epizodě. Vzorek byl sledován na antigen rotaviru, Giardia a E. histolytica v případě dysenterie a na bakteriální patogeny včetně Shigella, Salmonella, Aeromonas, Plesiomonas shigelloides, E. coli a také V. cholerae.

V průběhu sledování byly odebírány vzorky také na sledování životaschopnosti mikroorganismu v průběhu období podávání. Bylo možno prokázat, že mikroorganismus zůstává životaschopný v sáčkích v průběhu celé studie, takže také na konci celého pokusu bylo možno po rekonstituci ve vodě prokázat v sáčku 10^{10} životaschopných buněk mikroorganismu.

Studie potvrdily, že probiotický mikroorganismus může snížit výskyt průjmových onemocnění ve srovnání s kontrolní skupinou, jíž bylo podáno placebo přibližně o 30 %. Avšak také kontrolní skupina měla nižší počet průjmových epizod než normální populace, které nebyl

podán ani mikroorganismus ani placebo. To je zčásti možno vysvětlit tím, že dětem byla podávána bohatší výživa a voda, která nebyla znečištěna bakteriemi. Avšak vzhledem k tomu, že studie byla provedena přímo v terénu, je zcela zřejmé, že ST11 může snížit výskyt průjemových onemocnění.

Zastupuje:

14.01.02
PV 2001-3269
~~3278~~

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Bakterie mléčného kvašení, náležející k rodu *Lactobacillus*, v y z n a č u j í c í s e t í m, že mají schopnost zabránit kolonizaci střev pathogenními bakteriemi, vyvolávajícími průjemová onemocnění a zabránit infekci epitheliálních střevních buněk rotaviry.
2. Kmen *Lactobacillus* podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je schopen přilnout ke střevní sliznici hostitelského organismu a kolonizovat ji.
3. Kmen *Lactobacillus* podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je schopen růstu v přítomnosti až 0,4 % žlučových solí.
4. Kmen *Lactobacillus* podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se volí ze skupiny *Lactobacillus rhamnosus* nebo *Lactobacillus paracasei*.
5. Kmen *Lactobacillus* podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o *Lactobacillus paracasei*.
6. *Lactobacillus paracasei* podle nároku 5, kterým je *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461).
7. Použití kmene *Lactobacillus* podle některého z nároků 1 až 7 pro výrobu požitelného nosiče.

8. Použití podle nároku 7, při němž je kmen *Lactobacillus* obsažen v nosiči v množství 10^5 až 10^{12} cfu/g nosiče.
9. Použití supernatantu nebo kultury kmene *Lactobacillus* podle některého z nároků 1 až 6 pro výrobu poživatelného nosiče.
10. Použití podle některého z nároků 7 až 9, při němž je nosičem potravinový výrobek ze skupiny mléko, jogurt, tvaroh, sýr, fermentované mléko, fermentované produkty na bazi mléka, zmrzlina, fermentované produkty na bazi obilovin, práškové mléko nebo kojenecká výživa.
11. Použití podle některého z nároků 7 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se nosič užije pro léčení a/nebo profylaxi poruch, spojených s průjemovým onemocněním.
12. Potravinový nebo farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje alespoň jeden kmen *Lactobacillus* podle některého z nároků 1 až 6 nebo supernatant kultury tohoto kmene.
13. Potravinový nebo farmaceutický prostředek podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se volí ze skupiny mléko, jogurt, tvaroh, sýr, fermentované mléko, fermentované produkty na bazi mléka, zmrzlina, fermentované produkty na bazi obilovin, práškové mléko nebo kojenecká výživa, tablety, kapalně bakteriální suspenze, sušené perorální doplňky, vlhké perorální doplňky nebo suché nebo vlhké prostředky pro výživu sondou.

Zastupuje:

Fig. 1

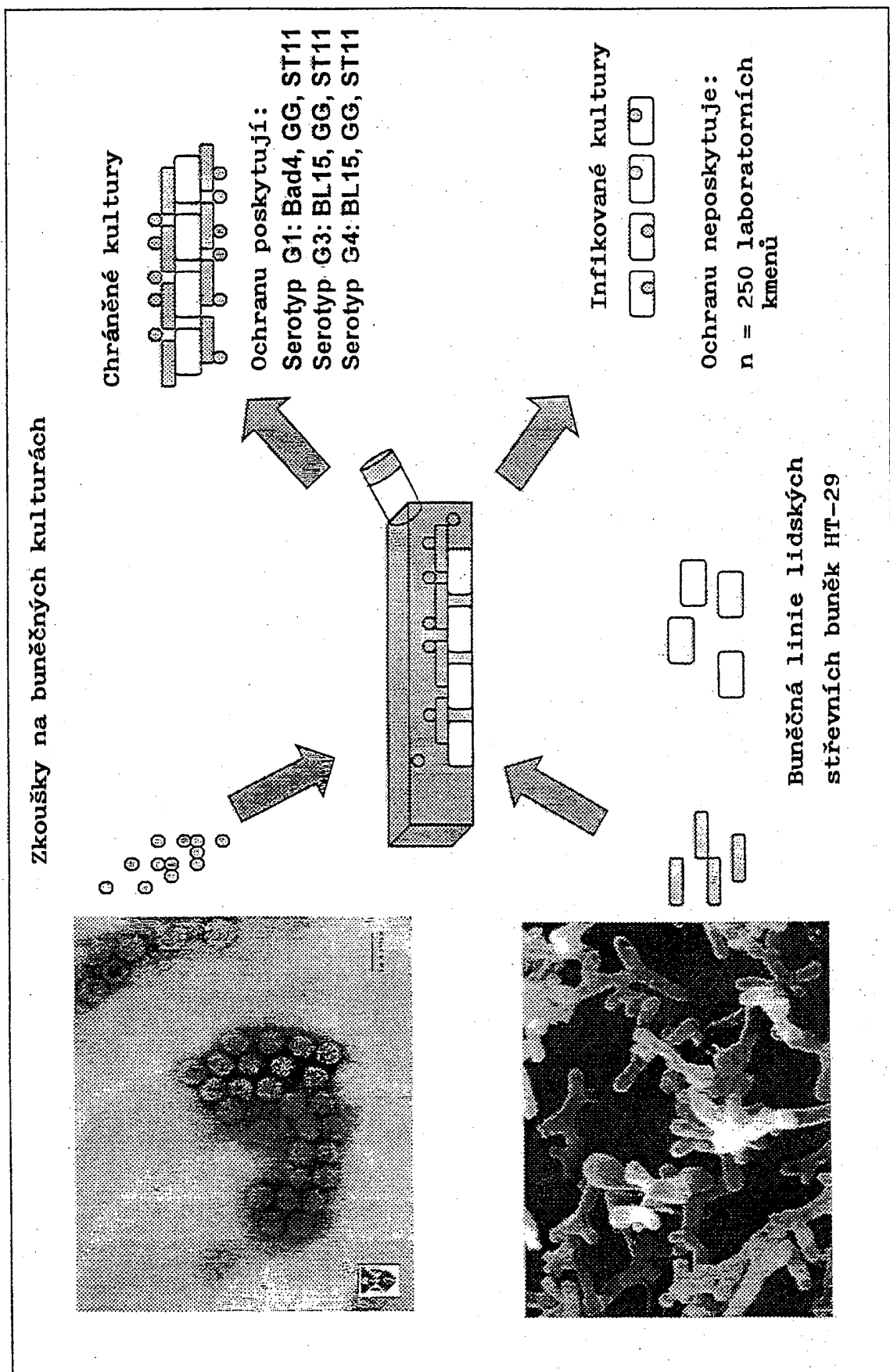
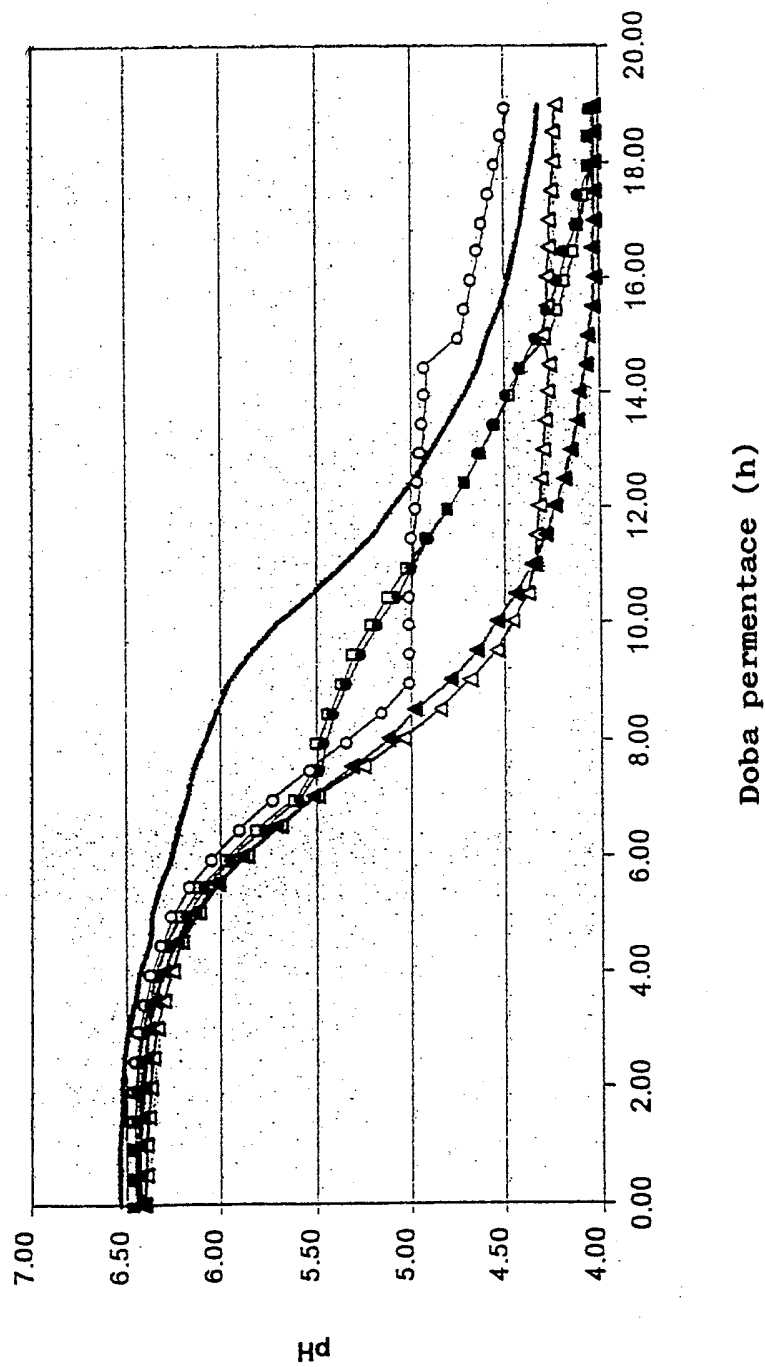


Fig. 2

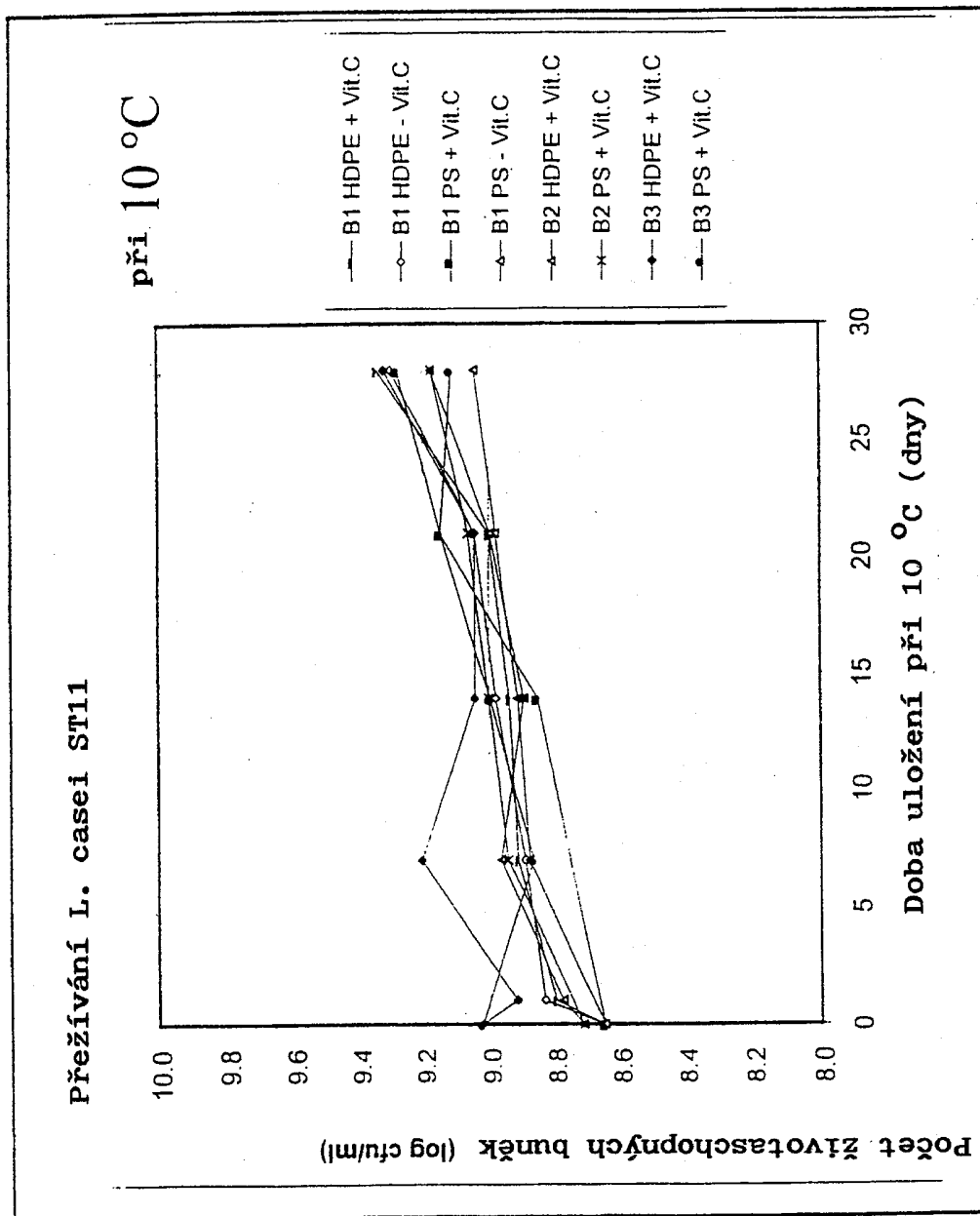
Okyselení různých růstových prostředí L. casei ST11



14.01.02
TV 2001-3269
3277

Fig. 3

Přežívání v obilném nápoji

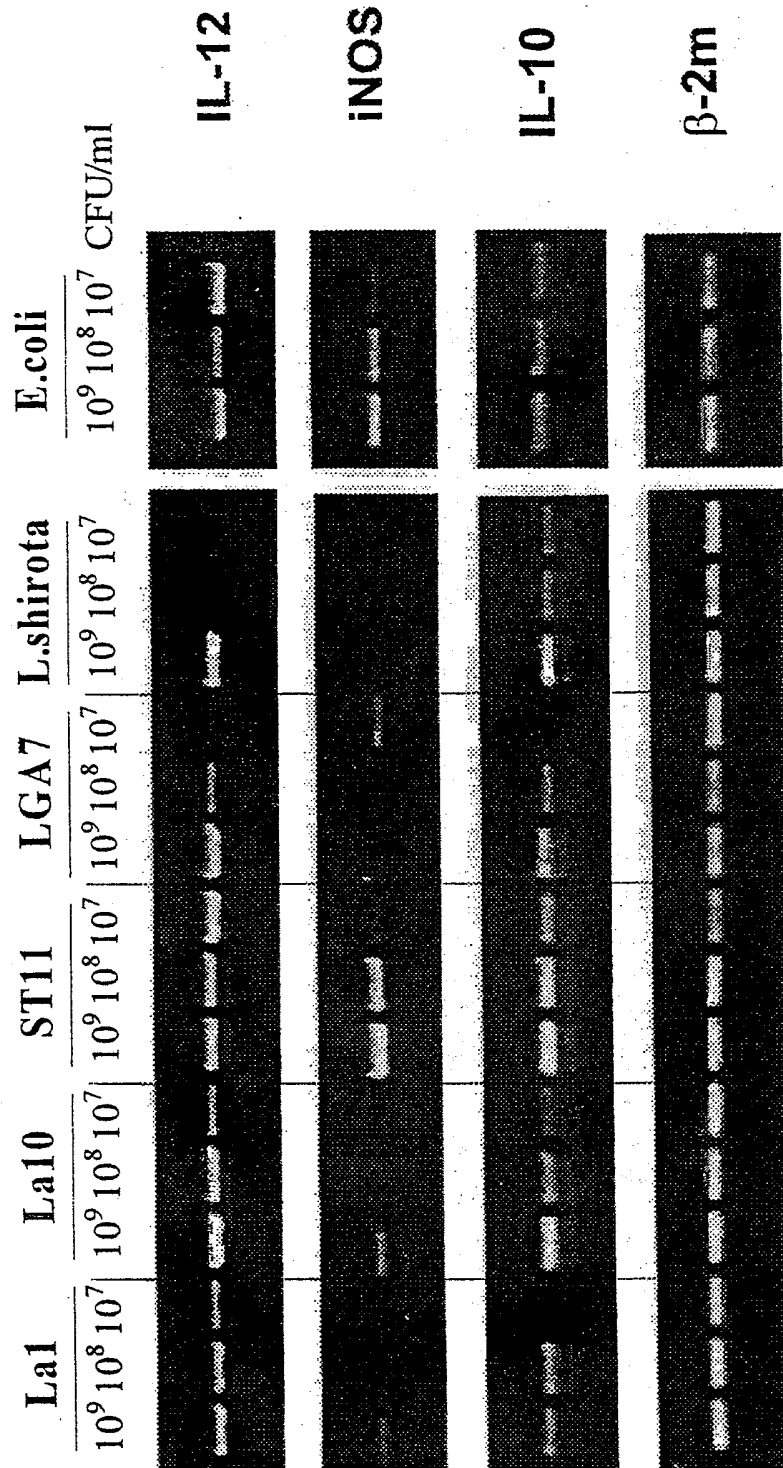


HDPE: Polyethylen s vysokou hustotou

PS: polystyren

Vit C: vitamin C

Fig. 4 Indukce mRNA cytokinu laboratorními kmeny u myších makrofágů



14.01.02
TV 2001-3269
3278

5/9

Uvolňování cytokinu IN IVD 980916
(ELISA 981103 & 980925)

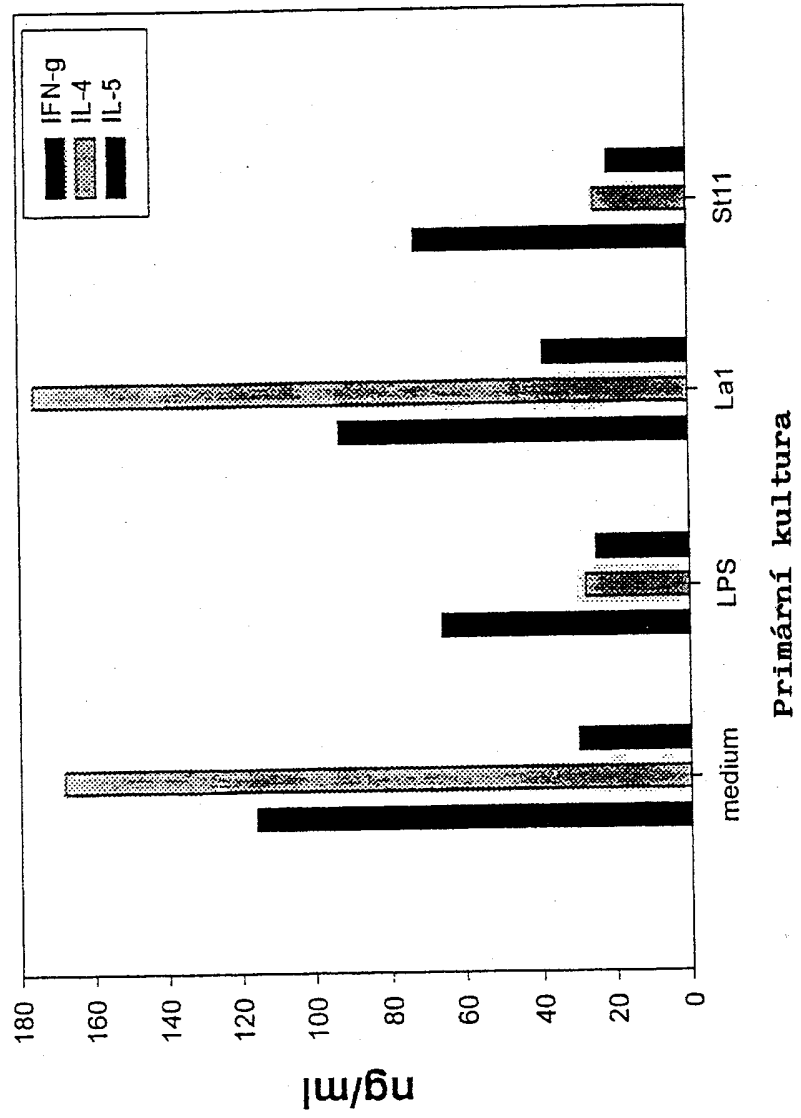


Fig. 5

14.01.02

PV 2001-3269

3278

6/9

Inhibice adheze enterovirulentního *E. coli* v průběhu styku
s bakteriální kulturou NCC2461

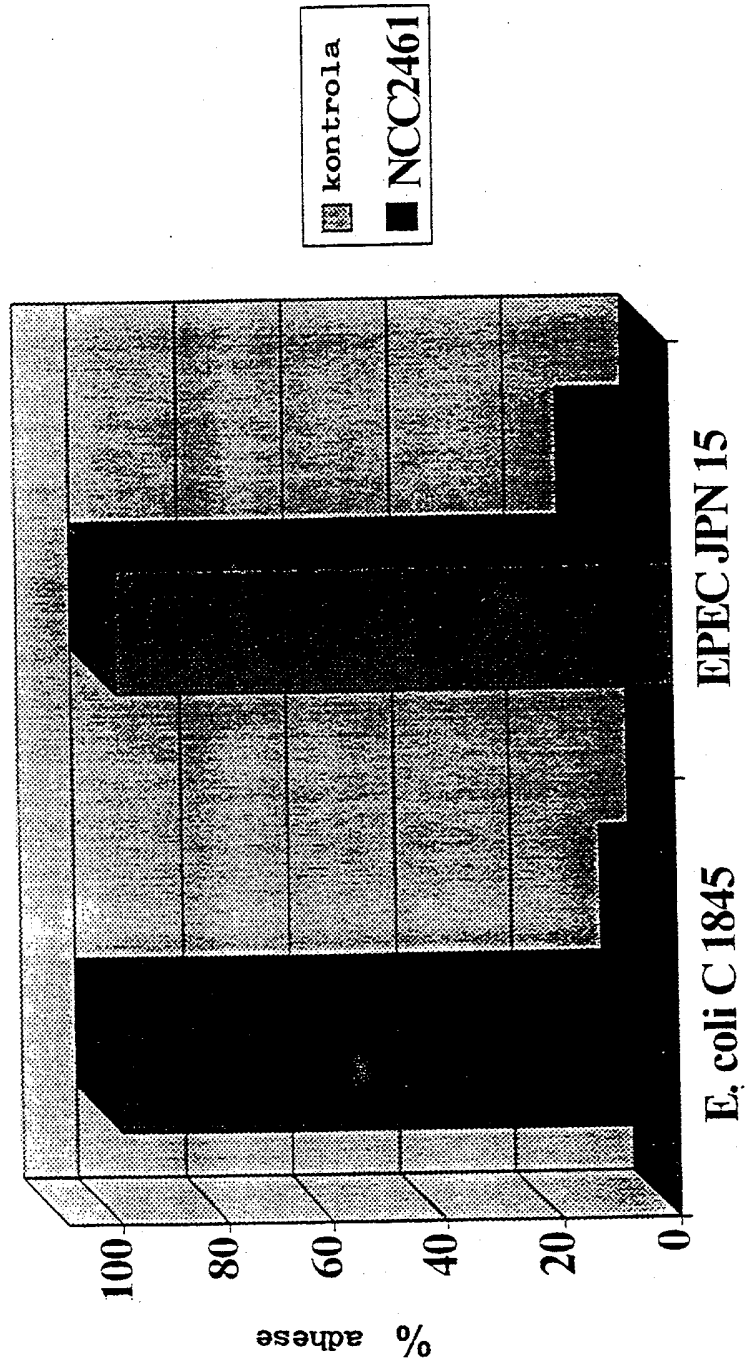


FIG - 6

14.01.02
PV 2001-3269
3278

7/9

Inhibice adheze enterovirulentního *E. coli* v průběhu styku
se supernatantem NCC2461

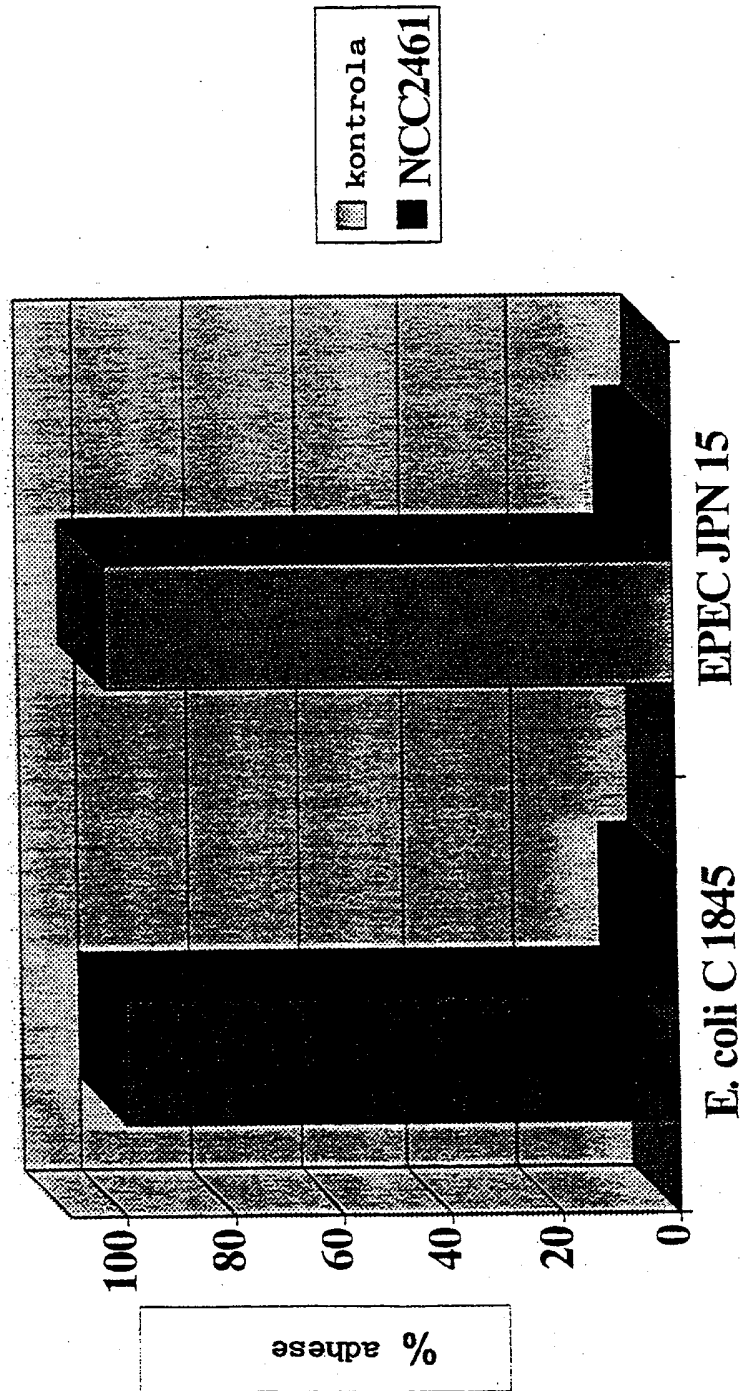


FIG - 7

14.01.02
7V 2001 - 3269
3278

8/9

Inhibice invaze Salmonella v průběhu styku
s bakteriální kulturou NCC2461

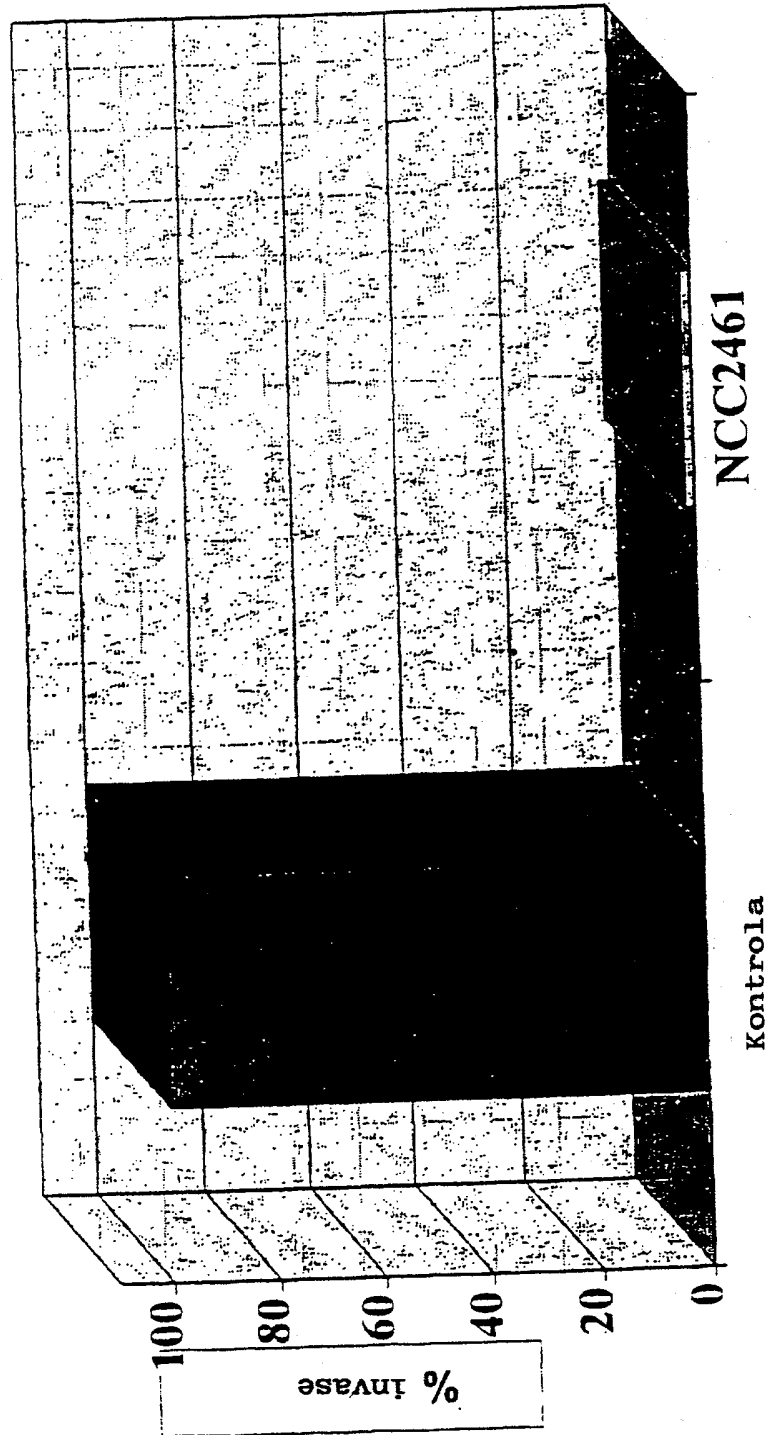


FIG - 8

14.01.02
PV 2001-3269
3278

9/9

Inhibice invaze Salmonella typhimurium v průběhu styku
se supenatantem NCC 2461

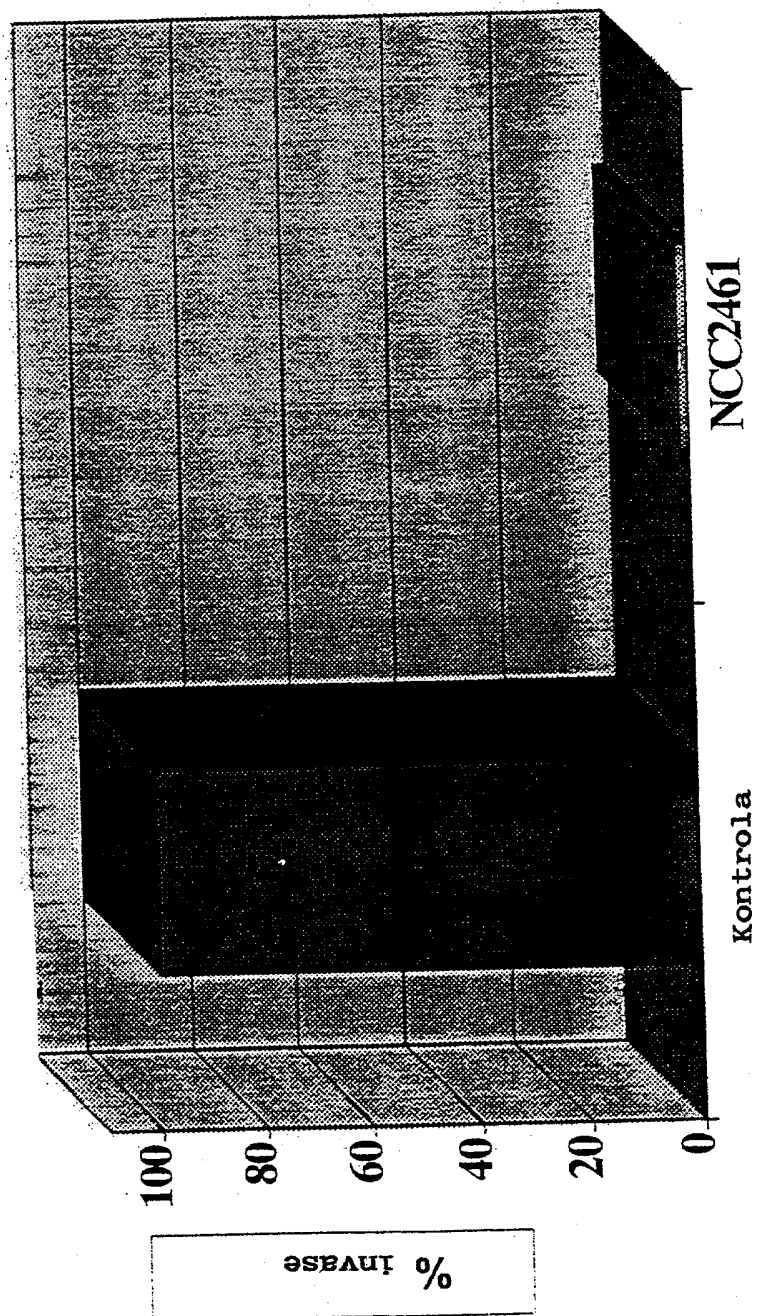


FIG - 9