

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**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/99104922**
(33) Země priority: **EP**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2002**
(Věstník č. 1/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/EP00/01795**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/53200**

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 3264

(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:

**Neeser Jean-Richard, Savigny, CH;
Reniero Roberto, Le Mont-Pelerin, CH;
Servin Alain, Chatenay-Malabry, CH;**

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kmeny Lactobacillus

(57) Anotace:

Nové mikroorganismy kmene Lactobacillus jsou užitečné v prevenci průjmu, způsobenému patogenními bakteriemi. Zejména je prospěšné užití uvedených mikroorganismů pro přípravu poživatelného nosiče a pro přípravu prostředku, obsahujícího tento nosič.

CZ 2001 - 3264 A3

Kmeny *Lactobacillus*

Oblast techniky

Vynález se týká nových mikroorganismů rodu *Lactobacillus*, které jsou užitečné při prevenci průjmu, zprostředkovaného pravděpodobně patogenními bakteriemi. Zejména se předkládaný vynález týká užití uvedených mikroorganismů pro přípravu požitelného nosiče a prostředku obsahujícího tento nosič.

Dosavadní stav techniky

Organismy, které jako hlavní metabolickou složku produkují kyselinu mléčnou, jsou dlouho známy. Tyto bakterie se mohou nacházet v mléce nebo v továrnách, které zpracovávají mléko, zejména v živých nebo odumřelých rostlinách, ale také ve střevě lidí a zvířat. Tyto mikroorganismy, shrnuté pod výrazem „bakterie kyseliny mléčné“, představují dosti nehomogenní skupinu a zahrnují, například, rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* apod..

Bakterie kyseliny mléčné byly využity jako fermentační činidla ke konzervaci potravy při nízkém pH a k působení fermentačních prostředků, vytvořených během jejich fermentační činnosti, k inhibici růstu ničících bakterií. Nakonec byly bakterie kyseliny mléčné užity pro přípravu různých druhů potravin jako je sýr, jogurt a další fermentované mléčné produkty.

Docela nedávno získaly bakterie kyseliny mléčné velký díl pozornosti, kdy bylo zjištěno, že některé kmeny mají po požití cenné vlastnosti pro člověka a zvířata. Zejména určité kmeny rodu *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium* vykazovaly schopnost kolonizovat střevní sliznici a pomáhat při udržování dobrého stavu člověka a zvířete.

S ohledem k tomu, EP 0 768 375 popisuje specifické kmeny Bifidobacteria, které jsou schopné implantace do střevní flóry a mohou ulpívat na střevních buňkách. Tyto Bifidobacteria jsou označovány jako pomáhající při imunomodulaci tím, že jsou schopná kompetitivního vyloučení adheze patogenní bakterie k střevním buňkám, tedy pomáhají v udržování zdraví jednotlivce.

Během posledních několika let byl výzkum také soustředěn na potenciální užití bakterií kyseliny mléčné jako probiotických činidel. Probiotika jsou považována za životaschopné mikrobiální přípravky, které napomáhají zdraví jednotlivce udržováním přirozené mikroflóry ve střevě. Mikrobiální přípravky mohou být běžně akceptovány jako probiotické v případě jejich účinných mikrobů a pokud způsoby jejich účinku jsou známy. Probiotika jsou míněny k připojení k střevní sliznici, kolonizaci střevního traktu a rovněž k předcházení připojení škodlivých mikroorganismů na střevní trakt. Rozhodující nezbytný předpoklad jejich účinku je v tom, že mohou dosahovat střevní sliznice ve vhodné a životaschopné formě a nejsou rozrušeny v horních částech trávicího traktu, zvláště účinkem nízkého pH, které převládá v žaludku.

V tomto ohledu, WO 97/00078 popisuje určitý kmen, který se nazývá Lactobacillus GG (ATCC 53103), jako probiotikum. Tento mikroorganismus je zejména obsažen ve způsobu prevence nebo léčení hypersenzitivních reakcí navozených potravou, kdy je podáván příjemci spolu s potravou, která podléhá hydrolýze působením pepsinu a/nebo trypsinu. Vybraný kmen Lactobacillus je popisován jako vykazující adhesivní a kolonizační schopnosti a mající systém enzymů proteáz, tak že bílkovinná látka obsažená v podávané potravě je dále hydrolyzována prostřednictvím proteáz, které jsou produkovány určitým kmenem Lactobacilla. Tento způsob, který je popisovaný v této

přihlášce, bude mít eventuelně za následek vzestup bílkovinné látky střeva, která nevykazuje podstatné množství alergenní látky.

Dále, v EP 0 577 903, je připraveno užití takových bakterií kyseliny mléčné, které mají schopnost náhrady *Helicobacter pylori*, který je uznanou příčinou vývoje vředu, v přípravě nosiče, určeného pro léčbu nebo profylaxi vředu, který je spojený s účinkem *Helicobacter pylori*.

Na základě znalosti cenných vlastností určitých kmenů bakterií kyseliny mléčné, jsou v oboru požadovány další kmeny bakterií kyseliny mléčné, které jsou prospěšné pro dobrý zdravotní stav člověka a/nebo zvířete.

Podstata vynálezu

Otázkou předkládaného vynálezu je tedy poskytnout další bakteriální kmeny, které vykazují nové vlastnosti, které jsou prospěšné pro člověka a/nebo zvířata.

Výše uvedená otázka byla vyřešena novými mikroorganismy, jmenovitě bakteriemi kyseliny mléčné, příslušející k rodu *Lactobacillus*, které mají schopnost předcházet kolonizaci střeva patogenními bakteriemi, které způsobují průjem.

Podle výhodného provedení, je kmen *Lactobacillus* schopný adheze ke střevní sliznici savců a může růst za přítomnosti více jak 4% žlučových solí.

Avšak, podle jiného výhodného provedení, je bakterie kyseliny mléčné vybrána ze skupiny, která sestává z *Lactobacillus rhamnosus* nebo *Lactobacillus paracasei*, výhodně *Lactobacillus paracasei* a výhodněji *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

Mikroorganismy, podle vynálezu, vykazují mimo jiné následující vlastnosti: jsou gram pozitivní, negativní na katalázu, negativní na tvorbu NH_3 formy argininu a negativní na produkci CO_2 , produkují L(+) kyselinu mléčnou, jsou schopné růstu za přítomnosti žlučových solí v koncentraci vyšší než 0,4% a mohou podstatně předcházet kolonizaci střevních buněk bakteriemi přivozujícími průjem, jako je patogenní E. coli, například enteropatogenní E. coli (EPEC) nebo salmonella, například salmonella typhimurium.

Nové mikroorganismy mohou být užity pro přípravu různých požitelných nosičů, jako je mléko, jogurt, tvaroh, fermentovaná mléka, fermentované produkty na basi mléka, fermentované produkty na basi obilovin, prášková mléka, výživa pro kojence a v nosiči mohou být obsaženy v množství od kolem 10^5 cfu/g až kolem 10^{11} cfu/g. Pro účel předkládaného vynálezu bude zkratka cfu označovat „jednotku tvořící kolonie“, která je definována jako množství bakteriálních buněk, jak ukazují mikrobiální počty na agarových plotnách.

Předkládaný vynález také poskytuje potravinový nebo farmaceutický prostředek, který obsahuje nejméně jeden z kmenů Lactobacilla, majícího výše uvedené vlastnosti a/nebo který obsahuje kulturu supernatantu, ve které rostou mikroorganismy nebo jejich frakce.

Pro přípravu potravinového prostředku, podle vynálezu, je začleněn ve vhodném nosiči nejméně jeden z kmenů Lactobacilla, podle vynálezu, v množství od kolem 10^5 cfu/g až kolem 10^{11} cfu/g, výhodně od kolem 10^6 cfu/g až kolem 10^{10} cfu/g, výhodněji od kolem 10^7 cfu/g až kolem 10^9 cfu/g.

V případě farmaceutického prostředku může být produkt připraven ve formě tablet, kapalných bakteriálních suspenzí, sušených orálních doplňků, vlhkých orálních doplňků, suchých

potravinových přípravků pro podávání sondou a vlhkých potravinových přípravků pro podávání sondou s obsahem množství kmenů *Lactobacilla* v rozmezí vyšším než kolem 10^{12} cfu/g, výhodně od kolem 10^7 cfu/g až kolem 10^{11} cfu/g, výhodněji od kolem 10^7 cfu/g až kolem 10^{10} cfu/g.

Činnost nových mikroorganismů ve střevě jednotlivce je přirozeně závislá na dávce. Čím více nových mikroorganismů je začleněno prostřednictvím požití výše uvedeného potravinového nebo farmaceutického prostředku, tím vyšší je ochranná a/nebo léčebná účinnost mikroorganismů. Jelikož nové mikroorganismy nejsou škodlivé lidem a zvířatům a mohou být eventuelně izolovány ze stolic dětí, může být jejich vysoké množství začleněno tak, že podstatně velká část střeva jednotlivce bude kolonizována novými mikroorganismy.

Avšak, podle jiného výhodného provedení, může být pro přípravu jednoho z výše uvedených požitelných nosičů použit supernatant kultury kmene *Lactobacilla*, podle vynálezu. Supernatant může být užit jako takový nebo může být sušen za podmínek, které neničí metabolické sloučeniny produkované mikroorganismy do kapalného prostředí, jako je například lyofilizace, a může být začleněn v nosiči. Za účelem snížit na minimum množství neznámých sloučenin v supernatantu, budou kmeny *Lactobacilla* výhodně růst v definovaném prostředí, prostředku, který je znám a neovlivní negativně hostitele, ve kterém je začleněn. Dále odborníci budou na základě svých obecných znalostí, popřípadě zbavovat supernatant nežádoucích produktů, například prostřednictvím chromatografie.

Během rozsáhlých studií, vedoucích k předkládanému vynálezu, zkoumali vynálezci stolice dětí a izolovali z nich různé bakteriální kmeny. Tyto kmeny byly následně zkoumány pro jejich schopnost předcházet kolonizaci epiteliálních buněk bakteriemi, které jsou známou příčinou průjmu.

Některé bakteriální rody, zahrnující *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*, byly sledovány pro jejich schopnosti zamezovat průjmu. Tyto zkoušky inhibiční schopnosti byly provedeny hlavně s patogenní *E. coli* a salmonellou typhimurium jako reprezentativními pro patogenní mikroorganismy, které způsobují průjem u jednotlivce.

Ve vhodném prostředí byly pěstovány různé bakterie kyseliny mléčné, v takovém jako je MRS, Hugo-Jago nebo M17 při teplotách od kolem 30° do 40°C, které odpovídají jejich optimální růstové teplotě. Po dosažení stacionárního růstu byly bakterie shromážděny centrifugací a znovu rozptýleny ve fyziologickém roztoku NaCl. Mezi jednotlivými zkouškami byly bakteriální buňky skladovány zmrazené (-20°C).

Pro stanovení antibakteriálních vlastností byly vybrány následující přístupy.

Podle jednoho zápisu, byly pěstované kmeny *Lactobacilla*, podle vynálezu, zkoušeny pro svoji schopnost zamezovat adhesi patogenních bakterií, způsobujících průjem, ke střevním buňkám nebo zamezovat jejich invasi do střevních buněk. Nakonec, byly střevní buňky přivedeny do styku s patogenními bakteriemi a pěstovanými kmeny *Lactobacilla*, podle vynálezu, a byla stanovena rychlost adheze nebo invase.

Podle druhého zápisu, byl supernatant buněčné kultury kmenů *Lactobacilla*, podle vynálezu, přidán spolu s patogenními mikroorganismy ke střevním buňkám a byla stanovena rychlost adheze nebo invase.

Může být zřejmé, že pěstované *Lactobacilly* a supernatant se prokázaly extrémně účinné při prevenci obojího, adheze a invase do střevních buněk, což prokazuje, že metabolické

sloučeniny, produkované novými mikroorganismy, jsou nejspíše odpovědné za činnost proti průjmu.

Dále se k výše uvedenému objevu ukazuje, že kmeny, podle vynálezu, kupodivu vykazují antialergenní vlastnosti, kdy uvedené kmeny mají dopad na syntézu různých imunologických mediátorů.

Je obecně uznáváno, že humorální imunitní odpovědi a alergické reakce jsou zprostředkovány $CD4^+$ T buňkami, které nesou fenotyp typu 2 (Th2). Th2 buňky jsou charakterizovány tvorbou vysokých hladin interleukinu 4 (IL-4) a cytokinu, požadovaného pro sekreci IgE, který je hlavní skupinou protilátek, začleněnou v alergických reakcích.

Diferenciace Th2 buněk je poškozována IFN- γ , příslušným cytokinem, který je produkovaný vzájemně se vylučující Th1 podskupinou $CD4^+$ T buněk. Uvedené Th1 buňky jsou na druhé straně silně indukované interleukinem 12 (IL-12). Naproti tomu IL-10, další cytokin, má silně rušivý dopad na proliferaci Th1 buněk a tudíž se uvažuje, že má úlohu v imunosupresivních reakcích.

Shrnuto, oba IL-12 a IL-10 mají silné modulační účinky na vývoj $CD4^+$ T buněk ovlivněním vývoje podskupiny Th1. IL-12 je klíčový regulační cytokin pro indukci diferenciace Th1 a tedy inhibuje tvorbu Th2 odpovědí. Hlavním způsobem inhibice Th2 buněk je tudíž spatřován ve stimulaci syntézy IL-12 pomocnými buňkami.

Je dobře známo, že některé složky gram negativních bakterií, jako je LPS, navozují vysoké hladiny IL-12 v adherentních buňkách, jako jsou makrofágy a dendritické buňky. Shodně se ukazuje, že gram negativní bakterie mohou silně ovlivnit diferenciaci $CD4^+$ T buněk směrem k Th1 fenotypu.

Mikroorganismy ST11, jako například kmeny *Lactobacilla*, podle vynálezu, byly zkoušeny pro potenciální úlohu v indukci cytokinů, zahrnutých v regulaci diferenciaci $CD4^+$ T buněk. Zejména byl studován účinek ST11 na fenotyp $CD4^+$ T buněk, podstupujících diferenciaci Th2.

V tomto ohledu byla schopnost ST11 indukovat syntézu mRNA, která kóduje tyto dva regulační cytokiny v myších adhrerentních buňkách získaných z kostní dřeně, srovnána se 4 dalšími kmeny *Lactobacilla* a s kontrolní gram negativní bakterií (*E. coli* K12). Po 6ti hodinové inkubaci buněk s různými ředěními v rozmezí od 10^7 až 10^9 cfu/ml byla mRNA měřena semikvantitativní RT-PCR.

Ačkoliv všechny kmeny *Lactobacilla* mohou indukovat transkripci IL-12 mRNA do určitého stupně, ST 11 se může ukazovat jako nejsilnější vyvolavatel, vzhledem k tomu, že může být detekován silný PCR signál dokonce při nejnižší bakteriální dávce. Ve skutečnosti byla schopnost ST11 indukovat transkripci IL-12 mRNA tak silná jako u *E.coli*. Indukce IL-10 mRNA byla obecně slabší než pro IL-12 mRNA, protože signál mohl být detekován pouze při vyšších bakteriálních dávkách. Nicméně, ST11 byl nejsilnějším vyvolavatelem IL-10 mRNA, jak srovnáno s jinými *Lactobacilly* a kontrolní *E.coli*.

ST11 se tedy zdá být schopný indukce imunoregulačních cytokinů, zahrnutých v diferenciaci $CD4^+$ T buněk. Jeho silná schopnost indukovat IL-12 z něho dělá kandidáta inhibice Th2 odpovědí a jeho měřitelná indukce IL-10 může předcházet zánětlivým odpovědím.

Dále bylo k výše uvedenému objevu určeno, který ST11 měl inhibiční účinek na $CD4^+$ T buňky, podléhající Th2 diferenciaci a který měl pozitivní účinek na funkce Th1. Byl užít dobře založený systém pro diferenciaci buněk v kultuře, kde prekursor

CD4⁺ T buněk byl polyklonálně aktivován a modulován, až došlo k diferenciaci Th1 nebo Th2, v závislosti na typu společného stimulu v živném prostředí. Th1/Th2 diferenciaci byla indukována během 7 denní primární kultury, poté byly buňky opět stimulovány po 2 dny v sekundární kultuře, obsahující samotné prostředí a přidavek specifického fenotypu (Th1 nebo Th2) byl stanoven měřením typů cytokinů, produkovaných v supernatantu (IFN- γ versus IL-4).

Je obecně známo, že prekursor CD4⁺ T buněk z myši BALB/c dosud především rozlišoval predominantní Th2 fenotyp ((vysoké IL-4, nízké IFN- γ v supernatantech dvoutýdenní kultury) po aktivaci za neutrálních podmínek (samotné prostředí v týdenní kultuře). Tento fenotyp mohl být kompletně navrácen do původního stavu k původnímu Th1 (vysoké IFN- γ , nízké IL-4) při přidání blokujících monoklonárních protilátek k IL-4 v týdenní kultuře.

Ke zkoumání potenciální úlohy ST11 na inhibici Th2, byly v týdenní kultuře aktivovány čištěné prekursory CD4⁺ T buněk z BALB/c myši za přítomnosti adherentních buněk z kostní dřeně jako pomocných buněk. Tyto buňky byly společně pěstovány buď v samotném prostředí nebo za přítomnosti 1mg/ml LPS nebo 10⁸ cfu/ml ST11 nebo 10⁸ cfu/ml jiného Lactobacilla. Po čase byly buňky promyty a CD4⁺ T buňky byly opět jednou čištěny a znovu stimulovány ve dvoutýdenní kultuře v samotném prostředí.

Cytokiny, produkované diferencovanými CD4⁺ T buňkami, byly měřeny po dvou dnech. Jak očekáváno, buňky, které byly diferencované za přítomnosti samotného prostředí, se ukázaly dominantní fenotypu Th2. Přidání ST11 do týdenní kultury silně ovlivňovalo výsledek Th2 diferenciaci, jak to vyplývá z 8-násobného snížení produkce IL-4. Tato inhibice byla podobnou veličinou jako ta, která byla pozorována v kulturách, získaných z buněk, které byly diferencovány za přítomnosti LPS. Naproti

tomu, další kmen *Lactobacilla* měl neměřitelný dopad na hladiny IL-4. Je zajímavé, že hladiny IFN- γ nebyly zvýšeny při přidání ST11 do týdenní kultury.

Shrnuto, ST11 specificky snižuje produkci IL-4 CD4⁺ T buňkami, které podléhají diferenciaci Th2, ale nevýznamně zvyšuje sekreci IFN- γ . Tato skutečnost, že ST11 nezvyšuje produkci IFN- γ , může být vztažena k jeho schopnosti indukovat IL-10 s důsledkem, že to může mít nízký zánětlivý dopad navzdory jeho činnosti proti Th2.

Následně se může zdát, že ST11 je jeden z kmenů *Lactobacilla*, které mají profil proti Th2, který je dělá výbornými kandidáty pro jejich užití jako bakterií s protialergickou a probiotickou činností.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje schéma, ilustrující výsledky pokusu na buněčné kultuře, ve které pěstované buňky ST11 jsou užity ve zkoušce pro inhibici adheze patogenní bakterie *E.coli* k epiteliálním buňkám.

Obr. 2 znázorňuje schéma, ilustrující výsledky pokusu na buněčné kultuře, ve které supernatant kultury ST11 je užit ve zkoušce pro inhibici adheze patogenní bakterie *E.coli* k epiteliálním buňkám.

Obr. 3 znázorňuje schéma, ilustrující výsledky pokusu na buněčné kultuře, ve které pěstované buňky ST11 jsou užity ve zkoušce pro inhibici invaze salmonelly *typhimurium* k epiteliálním buňkám.

Obr. 4 znázorňuje schéma, ilustrující výsledky pokusu na buněčné kultuře, ve které supernatant kultury ST11 je užit ve

zkoušce pro inhibici invaze salmonelly typhimurium k epiteliálním buňkám.

Obr. 5 znázorňuje acidifikaci kmene *L.casei* CNCM I-2116 (označované ST11) v různém růstovém prostředí.

Obr. 6 znázorňuje rychlost přežití kmene *L.casei* ST11 při 10°C, měřenou během 30ti dnů.

Obr. 7 znázorňuje složení mRNA pro IL-12 a IL-10 v myších adherentních buňkách, získaných z kostní dřeně, po inkubaci buněk s různými ředěními ST11.

Obr. 8 znázorňuje výsledek diferenciaci Th2 jako důsledek snížení produkce IL-4.

Vynález bude nyní popsán následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Prostředí a roztoky:

MRS (Difco)

Hugo-Jago (trypton 30g/l (Difco), extrakt z kvasinek 10 g/l (Difco), laktóza 5 g/l (Difco), KH_2PO_4 6 g/l, hovězí extrakt 2 g/l (Difco), agar 2 g /l (Difco))

M17 (Difco)

DMEM (Eagle prostředí v Dulbeccově modifikaci)

CFA (podle Ghosh a spol Journal of Clinical microbiology, 1993 31 2163-6)

Müller Hinton agar (Oxoid)

LB (Luria Bertami, Maniatis, A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor, 1992)

Antibiotika byla získána ze Sigma

C¹⁴ acetát (53,4 ci/mmol, Amersham International PLC)

PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.15 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l)

Roztok Trypsin-EDTA (Seromed)

FCS fetální telecí sérum (Gibco)

E.coli DAEC 1845 byla získána z (Washington University, Seattle) a E.coli JPN15 byla získána z (Center for Vaccine Development of the University of Maryland, USA). Kmen salmonella typhimurium SL 1344 byl získán z (Department of microbiology, Stanford University, CA, USA).

Příklad 1

Isolace bakterií kyseliny mléčné ze stolice dětí

Z plen 16ti zdravých dětí ve stáří 15 až 27 dní, byly sebrány čerstvé stolice. 1 g čerstvé stolice byl umístěn za anaerobních podmínek pro transport do laboratoře a během dvou hodin proběhly mikrobiální analýzy zkoumaných vzorků různými ředěními v Ringerově roztoku a očkováním na selektivní živné půdy. K izolaci bakterie kyseliny mléčné byl užit MRS agar plus antibiotika (phosphomycin 80 µg/ml, sulfamethoxazol 93 µg/ml, trimethoprim 5 µg/ml), které byly inkubovány po dobu 48 hodin při 37C. Kolonie byly náhodně vybrány a čištěny. Fysiologické a genetické charakteristiky byl provedeny na izolátech.

Příklad 2Kultivace buněk Caco-2

Pro inhibiční zkoušky byla jako střevní model užita buněčná linie Caco-2. Tato buněčná linie představuje význačné vlastnosti pro střevní buňky, takové jako je například polarizace, exprese střevních enzymů, produkce určitých strukturálních polypeptidů apod..

Buňky byl pěstovány na třech různých podložkách, jmenovitě na miskách z plastické hmoty 25 cm² (Corning) pro růst a množení, na odmaštěných a sterilizovaných skleněných plotnách se šesti vyhloubeními 22 x 22 mm (Corning) pro zkoušky adheze a na plotnách s 24 vyhloubeními pro inhibiční zkoušky.

Po druhém dni pěstování bylo živné prostředí (DMEM) denně měněno. Před užitím bylo živné prostředí doplněno s 100 U/ml penicilinu/streptomycinu, 1 µg/ml amphoterinu a 20% FCS, inaktivovanými při 56°C po dobu 30ti minut. Pěstování bylo provedeno při 37°C v ovzduší, které obsahovalo 90% vzduchu a 10% CO₂. Buňky byly děleny každých šest dní. Buňky byly sebrány ze stěn vyhloubení působením PBS s 0.25% trypsinu a 3 mM EDTA při pH 7.2. Pro neutralizační účinek trypsinu byl k získané buněčné suspenzi přidán odpovídající objem FCS, směs byla centrifugována (10 minut při 1000 otáčkách za minutu) a usazenina byla opět umístěna do kultury. Do nové kultivační lahve bylo přemístěno kolem 3.5×10^5 buněk, které byly kultivovány až do vzniku splývající monovrstvy.

Příklad 3Kultivace bakterií

ST11:

Bakteriální kmen E.coli byl skladován při teplotě -20°C v MRS prostředí, které obsahovalo 15% glycerolu. Kmen rostl za anaerobních podmínek v MRS a dvakrát byl během 24 hodin přenesen před užitím inhibičních zkoušek do nového prostředí. Pro zkoušku byla užita koncentrace 2×10^9 cfu/ml.

Supernatant byl shromážděn centrifugací při 20.000 otáčkách za minutu po dobu jedné hodiny a následně byl získaný supernatant zkoumán na přítomnost bakterií.

E.coli:

Byly užity dva kmeny E.coli DAEC C 1845 (Enteroinvasivní E.coli) a E.coli JPN 15 (EPEC; enteropatogenní E.coli).

První pasáž po rozmrazení byla provedena na CFA-Müller Hinton agaru, který je vhodný pro působení exprese adhesivních složek bakterií.

Bakteriální buňky byl před každou zkouškou inkubovány při 37°C a přemístěny do nového prostředí, což bylo provedeno dvakrát po 24 hodinách. Jelikož JPN15 obsahuje geny pro ampicilin, bylo uvedené antibiotikum užito pro selekci během růstu.

Salmonella:

Pro zkoušky byl použit kmen SL 1344 salmonelly typhimurium, který rostl před použitím v LB prostředí.

Příklad 4Inhibiční zkouška pro E.coli

Patogenní bakteriální kmeny byly po druhém přenosu do nového prostředí označeny radioizotopy za použití C^{14} -acetátu při 10 $\mu Ci/ml$ v LB prostředí. Inkubace kmenů v tomto prostředí proběhla během 18ti hodin při teplotě 37°C.

Bakteriální suspenze byla následně podrobena centrifugaci (1041 g, 15 minut), tak že se eliminoval supernatant se zbývajícím C^{14} -acetátem. Usazenina byla rozptýlena a promyta v PBS a buňky byly rozptýleny v 1% sterilní manose v koncentraci kolem 10^8 buněk/ml. Manosa je známá k inhibici nespecifické adheze.

Rozdílné bakteriální kmeny (E.coli) byly přivedeny do styku s monovrstvou buněk Caco-2 (37°C, 10% CO_2 , 90% vzduchu) po dobu 3 hodin. Byly provedeny ty samé zkoušky za použití supernatantu (získaného centrifugací při 20.000 otáčkách za minutu po dobu 40ti minut).

Kontrolní patogenní bakterie byly přivedeny do styku s Caco- monovrstvou bez současného přidání ST11 nebo kultury supernatantu.

Prostředí bylo po 3 hodinové inkubaci změněno a monovrstva byla třikrát promyta v PBS. Každé promytí zahrnovalo 20x míchání roztoku PBS tak jako hlavně eliminaci veškeré nespecifické adheze. Buňky byly poté rozrušeny přidáním 1 ml uhličitanu sodného a inkubovány po dobu 40ti minut při 37°C. Pevný podíl (250 μl) byl po homogenizaci zředěn v 5 ml scintilační kapaliny (Hionic-fluor Packard) a spočítán (Packard 2000). Procento adheze patogenních buněk k buňkám Caco-2 bylo

spočítáno proti kontrole, která byla nastavena na 100% (adhese nebo pro příklad 5 invase).

Příklad 5

Inhibiční zkouška pro salmonellu

Salmonelly jsou bakterie, které napadají epiteliální buňky a množí se tam. Pro určení inhibiční činnosti ST11 kmenu salmonella typhimurium, byl inkubován SL 1344 v prostředí s obsahem C^{14} -acetátu, jak popsáno výše, a byl podroben zkoušce popsané v příkladu 4.

Buňky Caco-2 byly po inkubaci promyty PBS k eliminaci všech neadherentních buněk. Následně bylo přidáno prostředí, které obsahovalo gentamycin (20 $\mu\text{g/ml}$) a inkubace trvala 1 hodinu při 37°C. Gentamycin je antibiotiku nepronikající střevními buňkami, tak že všechny extracelulární mikroorganismy byly usmrceny, kdežto salmonella, která již pronikla střevními buňkami, bude přežívat. Po promytí buněk dvakrát v PBS, byly buňky rozrušeny přidáním sterilní destilované vody a byla měřena radioaktivita, jak popsáno v příkladu 4.

Výsledky pokusů 4 a 5 jsou znázorněny na obr. 1 až 4. Může se zdát, že pěstované buňky ST11 a kultura supernatantu byly extrémně účinné v prevenci adheze a invase patogenními mikroorganismy, které způsobují průjem, do střevních buněk.

Příklad 6

Vlastnosti ST11

ST11 byl podroben inkubaci v napodobené žaludeční šťávě. Napodobená žaludeční šťáva byla připravena suspendováním pepsinu (3g/l) ve sterilním izotonickém roztoku chloridu

sodného (0.5% hmotnostních) a úpravou pH na 2.0, respektive na 3.0 koncentrovanou HCl. ST11 rostl v různých množstvích ve výše uvedeném prostředí a byla určována resistance mikroorganismů.

Výsledky jsou shrnuty v tabulce I níže.

Tabulka I

pH	Cfu/ml v čase 0	Cfu v čase 1 minuta	Cfu v čase 15 minut	Cfu v čase 30 minut	Cfu v čase 60 minut
2.0	2.0×10^9	1.8×10^9	1.2×10^9	3.7×10^8	7.0×10^3
3.0	2.0×10^9	1.9×10^9	1.7×10^9	1.7×10^9	8.4×10^8

ST11 měl následující vlastnosti, jak určeno podle způsobů popsaných pro druhy bakterií kyseliny mléčné (Vydavatel, B.J.B. Wood a W.H.Holzapfel, Blackie A&P).

-gram pozitivní

-negativní na katalázu

-negativní na tvorbu NH_3 formy argininu

-negativní na tvorbu CO_2

-negativní na produkci L(+) kyseliny mléčné

-rostou v přítomnosti žlučových solí při jejich koncentraci vyšší než 0.4%

Příklad 7

Růst ST11 za různých podmínek

ST11 byl inkubován při 37°C v prostředí na basi rajčat (4% rajčatový prášek rehydratovaný v destilované vodě) doplněném sacharózou (0, 0.5, 1 nebo 2%) nebo peptonem sóji (0.5%) nebo glukózou (0.5%) pro různá časová období. Výsledky jsou znázorněny na obr. 5.

ST11 byl dále přidán k prostředí, které sestávalo z rýžové mouky (3%), pšeničné mouky (2%) a sacharózy (3%), v množství 2.5% a bylo inkubováno při 37°C až bylo dosaženo pH 4.4. Po zchlazení byl produkt zabalen s přidáním vitamínu C nebo bez přidání vitamínu C a skladován při 10°C.

Obr. 5 znázorňuje údaje přežití ST11 při 10°C v obilné tekutině, zabalené v různých materiálech z plastické hmoty (HDPE High density polyethylene, PS polystyrene).

Příklad 8

Indukce syntézy IL-12 a IL 10 mRNA myších adherentních buněk prostřednictvím ST11

Buňky kostní dřeně byly izolovány z femuru a tibie 8 týdnů starých specifických myších C57BL/6 patogenů prostých a byly inkubovány v koncentraci 2×10^6 buněk/ml v RPMI prostředí (Gibco), které obsahovalo 10% fetálního hovězího séra, 1mM L-Glutaminu, 12mM Hepes, 0.05 mM 2-merkaptoetanolu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (všechna činidla z Gibco) po dobu 12ti hodin při 37°C v 5% CO₂ ovzduší. Neadherentní buňky byly vyloučeny třemi postupnými promytími teplým živným prostředím a zbývající adherentní buňky byly sebrány a inkubovány v koncentraci 10^6 buněk /ml po dobu 6ti hodin v optimálním čase pro syntézu cytokinu mRNA myších adherentních

buněk v odpovědi na LPS. Byly přidány bakterie v různých koncentracích v rozmezí od 10^9 až 10^7 cfu/ml. Bakterie byly pěstovány a skladovány jak udáno výše.

Nakonec 6ti hodinového kultivačního období byly buňky izolovány centrifugací a rozrušeny užitím reakčního balíčku TRIzol (GibcoBRL, Kat. č. 15596-018) podle výrobních instrukcí. Úplná RNA byla izolována precipitací izopropanolu a byla reversně transkribována do cDNA po dobu 90ti minut při 42°C za použití 200 U reversní transkriptázy (Superscript II, BRL) v reakčním objemu s obsahem 200 mM Tris pH 8.3, 25 mM KCl, 1 $\mu\text{g/ml}$ oligo d(T)₁₅ (Boehringer Mannheim), 1 mM DTT (Boehringer Mannheim), 4 mM každé dNTP (Boehringer Mannheim) a 40 U/ml Rnasin (Promega). Byly užity PCR priméry a podmínky, jak již bylo popsáno (Kopf a spol., Journal of experimental Medicine 1. září 1996; 184(3):1127-36). Množství cDNA bylo normalizováno ve vzorcích užitím primérů specifických pro geny (β -2-mikroglobulin). Produkty PCR byly odděleny na 2% agarovém gelu a pásy byly analyzovány pod UV zářením.

Jak znázorněno na obr. 7, ST11 vykazuje nejsilnější indukci IL-12 a IL-10 mRNA, která byla srovnatelná s hladinami, pozorovanými u pozitivní kontroly (E.coli). Rozdíly jsou nejlépe zřejmé při nejnižších bakteriálních koncentracích (10^7 cfu/ml).

Příklad 9

Suprese syntézy IL-4 prostřednictvím ST11

CD4⁺ T buňky ze sleziny specifických myších BALB/c patogenů prostých byly čištěny užitím balíčku MiniMACS (Miltenyi Biotec, Kat. č. 492-01). CD4⁺ T buňky byly pěstovány při koncentraci 2×10^5 buněk/ml v RPMI prostředí, které obsahovalo 10% fetálního hovězího séra, 1 mM L-glutaminu, 12 mM

Hepes, 0.05 mM 2-merkaptoetanolu, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu a buňky byly aktivovány během jednoho týdne protilátkami vázanými příčnými vazbami k plotnám z CD3 (klon 2C11) a CD28 (klon 37.51, obojí protilátky z Pharmingen). Během tohoto týdenního pěstování, byly buňky společně pěstovány s adherentními buňkami kostní dřeně (izolovanými jak popsáno výše) jako pomocnými buňkami a s 10^8 cfu/ml ST11 nebo 10^8 cfu/ml Lal nebo 1 mg/ml LPS nebo samotným prostředím. Po této době byly buňky promyty a $CD4^+$ T buňky byly jednou čištěny užitím MiniMACS balíčku a opět stimulovány ve dvoutýdenní kultuře, která obsahovala samotné prostředí. Cytokiny, produkovány diferencovanými $CD4^+$ T buňkami, byly měřeny po dvou dnech v supernatantech použitím sendvičové ELISA (balíčky z Endogen a Pharmigen).

Výsledky jsou znázorněny na obr. 5. Buňky, diferencované za přítomnosti samotného prostředí, ukazují dominantní Th2 fenotyp, který je charakterizovaný vysokými hladinami IL-4. Přidání ST11 k týdenním kulturám silně modulovalo výsledek diferenciaci Th2, jak vyplývá z osminásobného snížení produkce IL-4. Tato inhibice byla podobné velikosti jak bylo pozorováno v kulturách, získaných z buněk diferencovaných v přítomnosti LPS. Naproti tomu, jiný kmen *Lactobacilla* měl neměřitelný dopad na hladiny IL-4. Zajímavé je, že hladiny IFN-γ nebyly po přidání ST11 v týdenních kulturách zvýšeny.

Jak může být zřejmé, z výše uvedených kmenů, podle vynálezu, mohou být dobře připraveny potravinové a/nebo farmaceutické nosiče, které přinášejí výhodu cenných vlastností mikroorganismů.

Příklad 10

Kmen ST11 byl v klinické zkoušce zkoumán ve společnosti z okolí Guatemala City na svoji schopnost způsobit přenos

akutního průjmu v období dešťů, což bylo zkoušeno většinou na dětech v této oblasti. Celkem bylo ve studii zahrnuto 203 dětí ve věku od 35 měsíců do 70ti měsíců, které přijaly cílovou dávku 10^{10} životaschopných organismů (ST11) nebo žádnou dávku (placebo) během 29ti denního příjmového období. Děti, vybrané pro obojí vzorek a respektive placebo, měly typické nedostatky v hmotnosti vzhledem k věku a výšce vzhledem k věku, které jsou charakteristické pro podvýživu.

Před započítím příjmového pokusu u předškolních dětí bylo bezpečné provedení založeno na studiích *in vitro* a *in vivo*. *In vitro* studie vykazovaly typickou resistenci pro antibiotika podobnou typu u jiných *lactobacillů* užitých pro potravinové účely a žádný potenciál pro tvorbu biogenních aminů, pro degradaci hleny a pro dekonjugaci žlučových solí. V kontrolní klinické studii s placebem, která zahrnovala 42 dospělých dobrovolníků, byl ST11 dobře tolerován a nevyvolával žádné nežádoucí účinky. Mezi potenciálními projevy byly monitorovány plynatost, množství stolic za den a konzistence stolice. Hladiny proteinů akutní fáze nenasvědčovaly žádné potenciální zánětlivé reakci.

Vzorky a placebo byly zabaleny do sáčků v (Nestlé Product Technology Center manufacturing facility v Konolfingen, Švýcarsko) a odeslány zmrazené do Guatemaly. Každý 10g sáček obsahoval nosné prostředí s čokoládovým aroma a buď 0.2 g ST11 (10^{10} cfu) nebo v případě placebo 0.2 g mléčného prášku. Nosné prostředí s čokoládovým aroma sestávalo z kakaového prášku, cukru, sojového lecitinu, vanilinu a skořice. Sáčky byly skladovány při 4° až 6°C až do dvou hodin před použitím. Před použitím byly sáčky rozpuštěny ve 100 ml vody, poskytnutou Nestlé. Tato voda byla prostá jakékoliv bakteriální kontaminace.

Podle přiloženého zápisu byl průjem definován jako výskyt tří nebo více tekutých nebo neformovaných stolic během 24 hodinového období. Průjmová epizoda byla definována jako událost, při které došlo k evidenci průjmu (tři průjmovité stolice během 24 hodin). Její celkové trvání v hodinách bylo vypočítáno z okamžiku první ze tří označených stolic do objevení se první formované stolice nebo do období 24 hodin bez defekace. Pro dítě, které mělo „novou“ epizodu, uplynulo od konce předchozího období 48 hodin. Jestliže ne, pak to bylo hodnoceno jako pokračování té samé epizody a pro hodnocení byla užita celková doba trvání. Jeden z případů bylo dítě, které zakusilo jednu nebo více dokumentovaných epizod průjmu během 29 denního sledovaného období. Intenzita průjmových epizod byla založena na celkovém množství řídkých stolic. Složky vážnosti epizody zahrnují přítomnost krve, hlenu nebo hnisu ve stolicích, společně se symptomy horečky a zvracení. Jako vážnou klasifikovala epizodu také intenzita sedmi stolic během 24 hodin nebo potřeba zásahu zdravotnických odborníků na klinikách, ve zdravotnických střediscích nebo nemocnicích.

Pokud byly průjmová epizoda diagnostikována ze sledovaného systému, byl sebrán vzorek průjmovité stolice pro mikroskopické vyšetření a pěstování k identifikaci potenciálního etiologického patogena pro danou epizodu. Vzorek byl diagnostikován na antigen rotaviru, giardie a *E. histolytica*, v jednom případě na dysenterii, a na bakteriální patogeny, zahrnující *Shigellu*, *Salmonellu*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *shigelloides*, *E.coli* a možná *V. cholerae*.

Během období zkoumání byly vzorky sebrány ke zkoušce schopnosti mikroorganismů, obsažených během období podávání. Ukazuje se, že mikroorganismy zůstali životaschopné v sáčcích během celé studie, tak že také na konci studie byly sáčky

schopné dodat 10^{10} životaschopných mikroorganismů na rekonstituci s vodou.

Studie ukázaly, že vzorky, obsahující probiotické mikroorganismy, mohou snižovat výskyt průjmu na rozdíl od kontrolní skupiny (placebo), asi o 30%. Avšak, také kontrolní skupina již ukazovala snížené množství výskytu průjmu oproti běžné populaci, která nepřijala ani vzorek ani placebo. Tento novější objev může být zčásti objasňován na základě dětí, které přijímaly doplňkovou hodnotnou výživu a vodu prostou kontaminace. Nicméně, poněvadž studie byla provedena v terénu, může být snadno odvozeno, že ST11 může spolehlivě snižovat výskyt průjmu *in vivo*.

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kmen *Lactobacillus* ze skupiny bakterií kyseliny mléčné, příslušejících k rodu *Lactobacillus*, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e má schopnost předcházet kolonizaci střeva patogenními bakteriemi, které způsobují průjem.
2. Kmen *Lactobacilla*, podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je schopný adheze ke střevní sliznici hostitele.
3. Kmen *Lactobacilla*, podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je schopný růstu za přítomnosti více než 0.4% žlučových solí.
4. Kmen *Lactobacilla*, podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je vybrán ze skupiny, která sestává z *Lactobacillus rhamnosus* nebo *Lactobacillus paracasei*.
5. Kmen *Lactobacilla*, podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je *Lactobacillus paracasei*.
6. *Lactobacillus paracasei*, podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jde o *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461).

7. Použití kmene *Lactobacillus*, podle některého z předcházejících nároků, pro přípravu poživatelného nosiče.
8. Použití, podle nároku 7, při němž kmen *Lactobacillus* je obsažen v nosiči v množství od kolem 10^5 cfu/g až kolem 10^{12} cfu/g nosiče.
9. Použití supernatantu kultury kmenu *Lactobacillus* podle některého z nároků 1 až 6, pro přípravu poživatelného nosiče.
10. Použití podle některého z nároku 7 nebo 9, při němž nosičem je potravinový prostředek, vybraný z mléka, jogurtu, tvarohu, sýru, fermentovaných mlék, fermentovaných produktů na basi mléka, zmrzlin, fermentovaných produktů na basi obilovin, práškových mlék, kojenecké výživy.
11. Použití, podle některého z nároku 7 až 10, při němž nosič je užit pro léčení a/nebo profylaxi poruch, spojených s průjemem.
12. Potravinový nebo farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje nejméně jeden kmen *Lactobacilla*, podle některého z nároků 1 až 6, nebo supernatant nebo jeho kulturu.
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 je vybrán z mléka, jogurtu, tvarohu, sýru, fermentovaných mlék, fermentovaných produktů na basi mléka, zmrzliny, fermentovaných produktů na basi obilovin, práškových mlék, dětské výživy, tablet, kapalných bakteriálních suspenzí,

sušených orálních doplňků, vlhkých orálních doplňků, suchých potravinových přípravků pro podání sondou nebo vlhkých potravinových přípravků pro podání sondou.

Zastupuje:

30.10.01

PV 2001 - 3284

80716

1/8

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

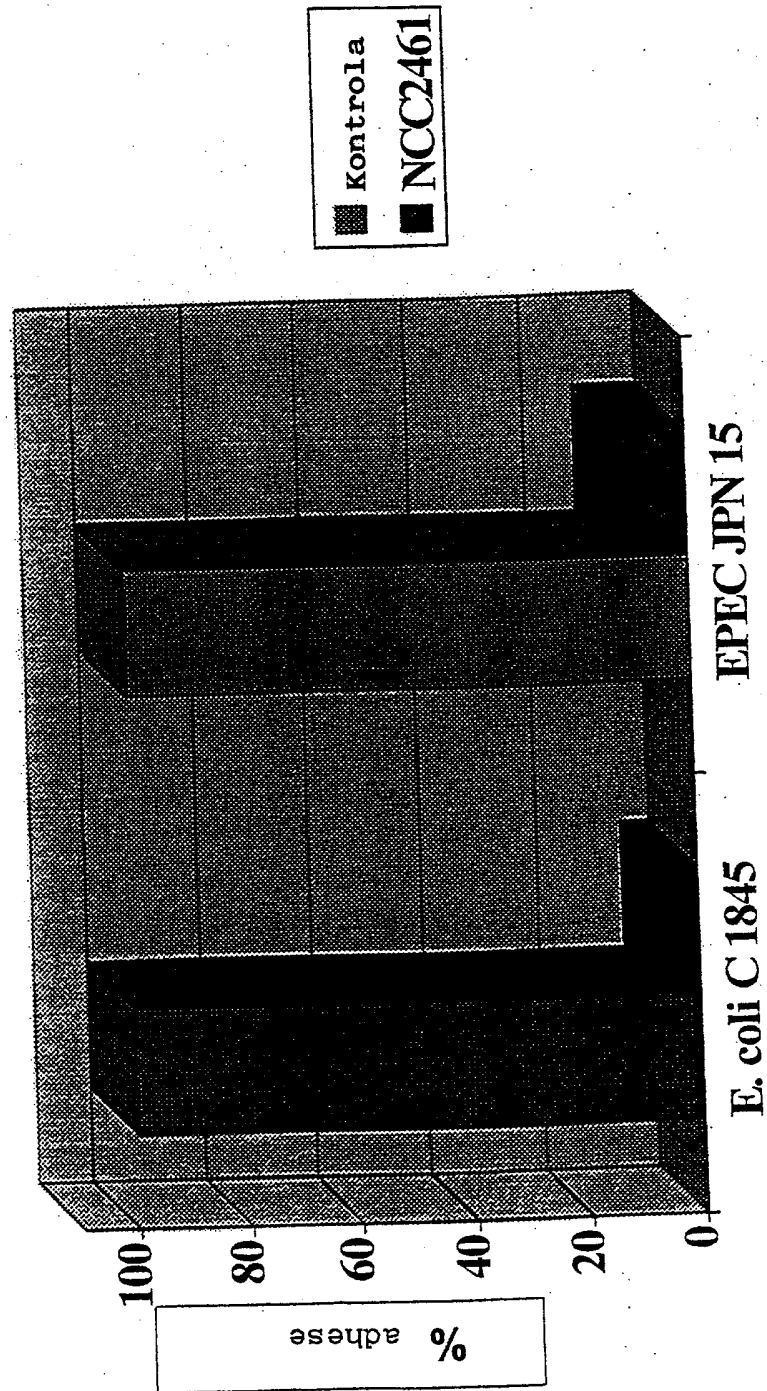


FIG - 1

30.10.01

FV 8001-3284
80418

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

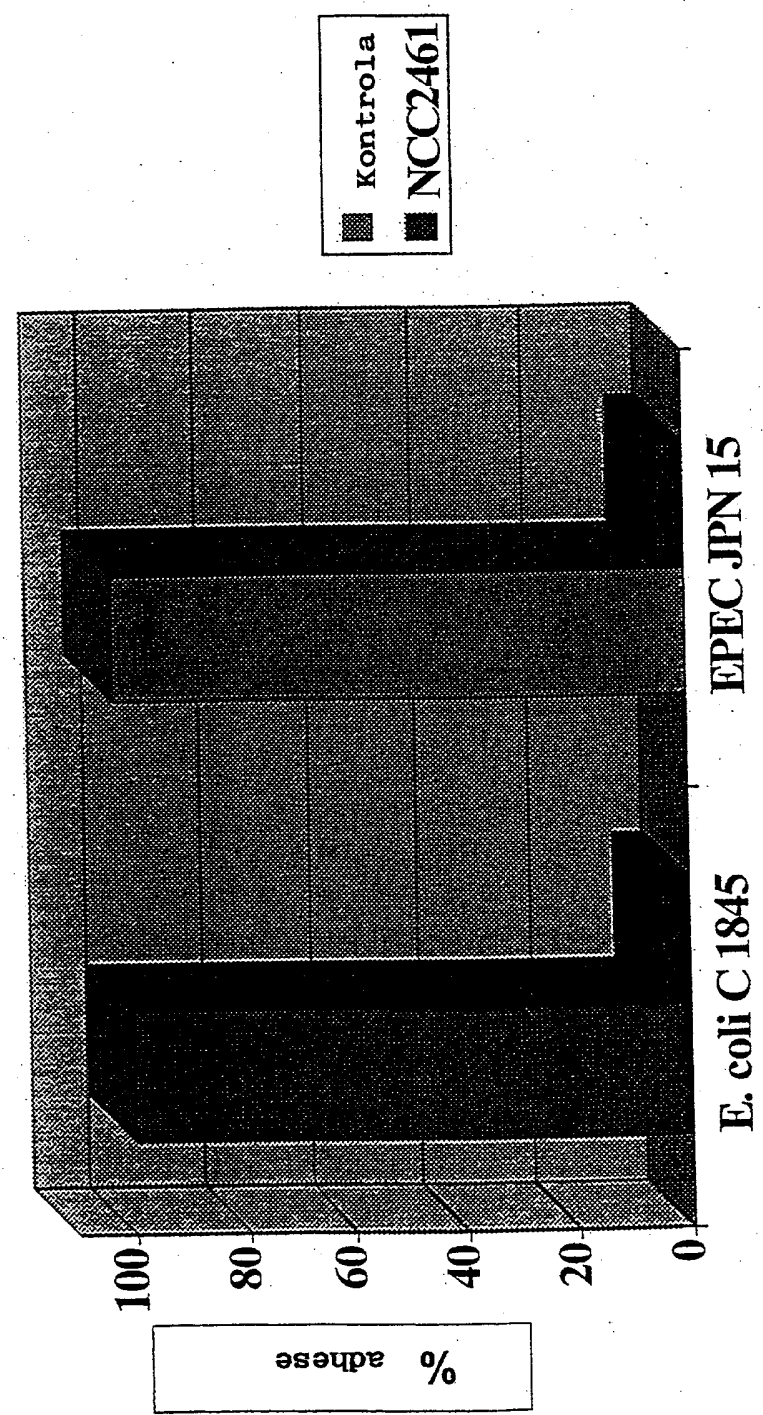


FIG - 2

Inhibice invaze *Salmonella typhimurium* v průběhu styku
s bakteriální kulturou NCC2461

3/8

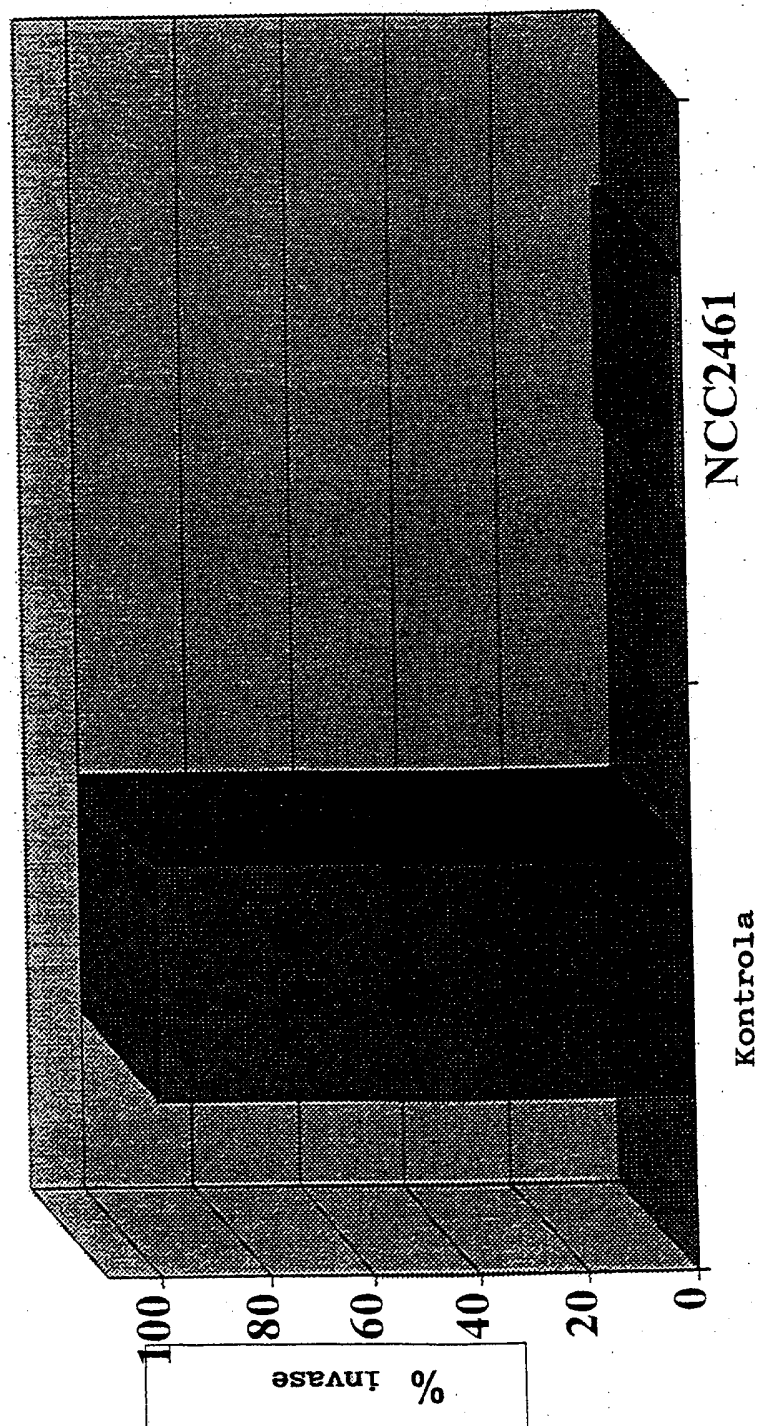


FIG - 3

30.10.01

PI 2001-3264

80415

30.10.01

PV 2001-3264

P0715

4/8

Inhibice invaze *Salmonella typhimurium* v průběhu
styku se supernatantem kultury NCC2461

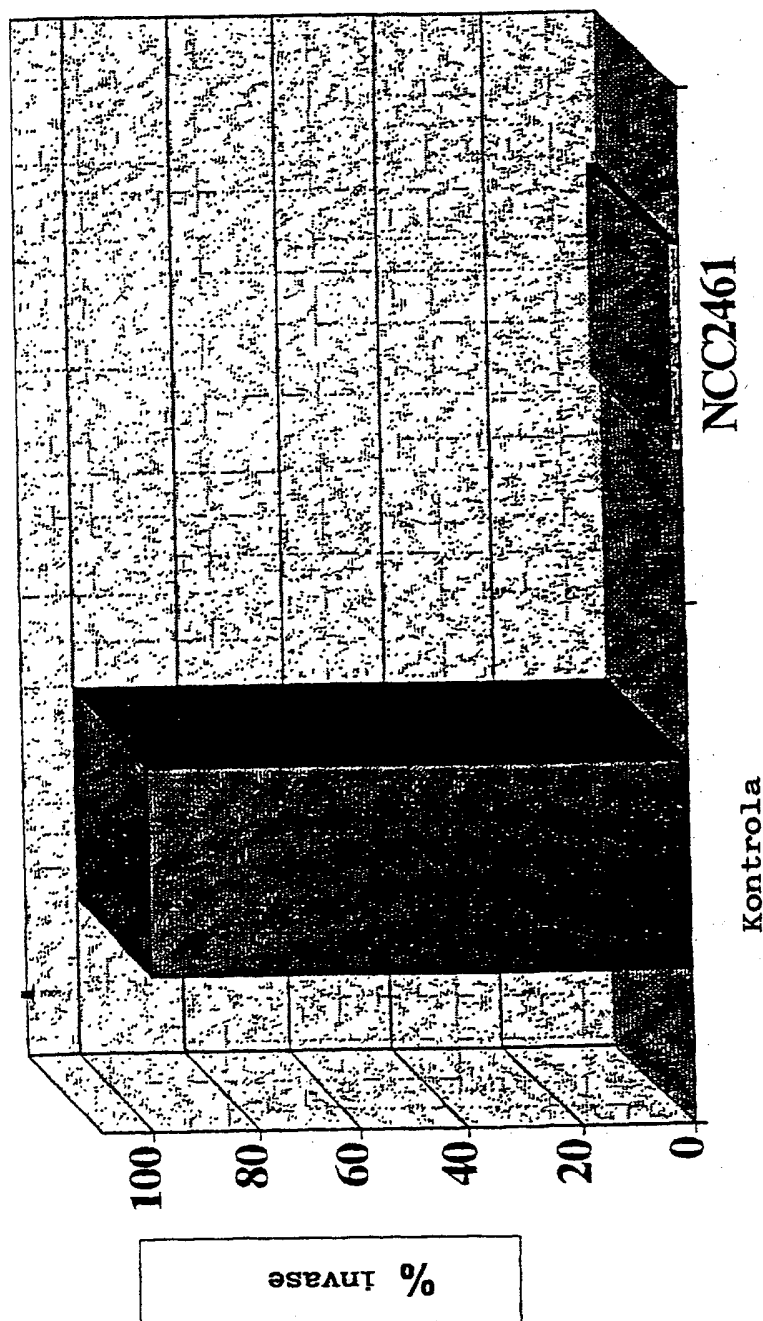


FIG - 4

Acidifikace L. casei ST11 v různých růstových prostředcích

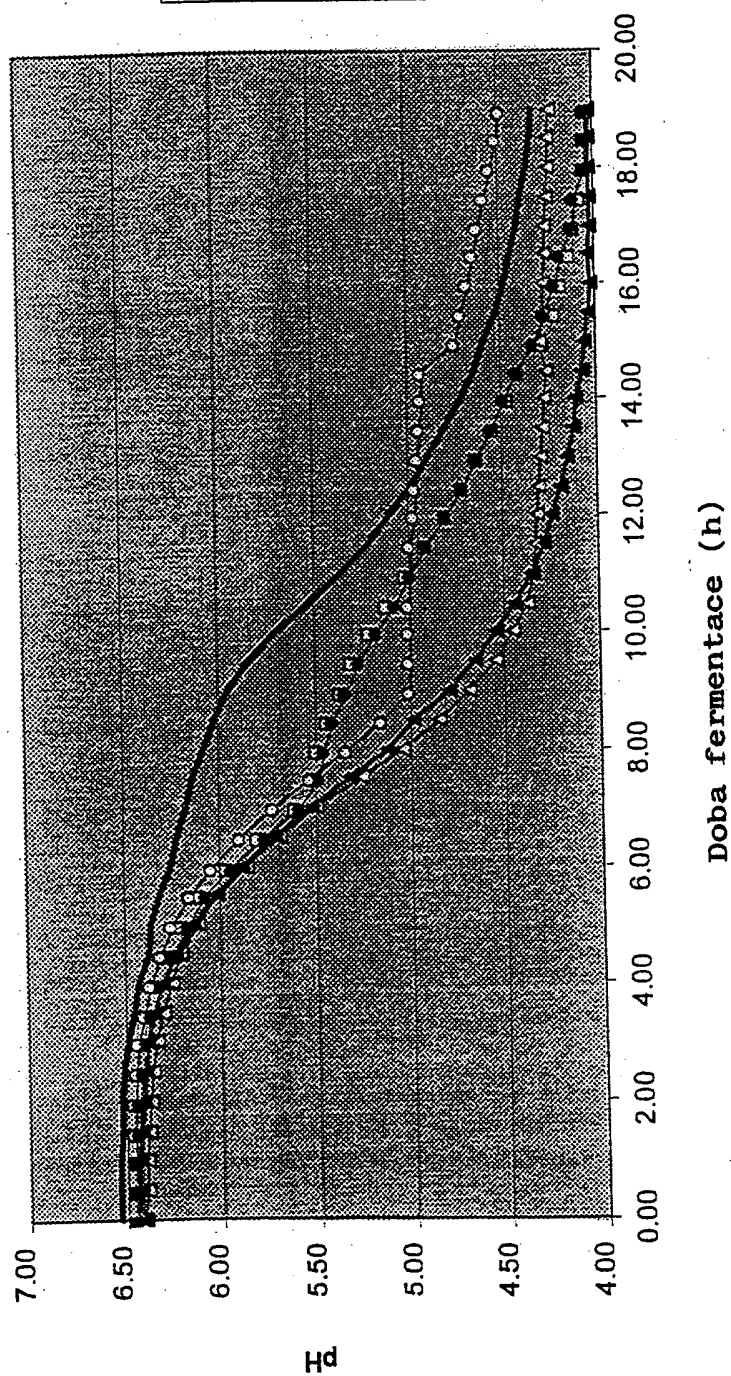


FIG - 5

30.10.01

5/8

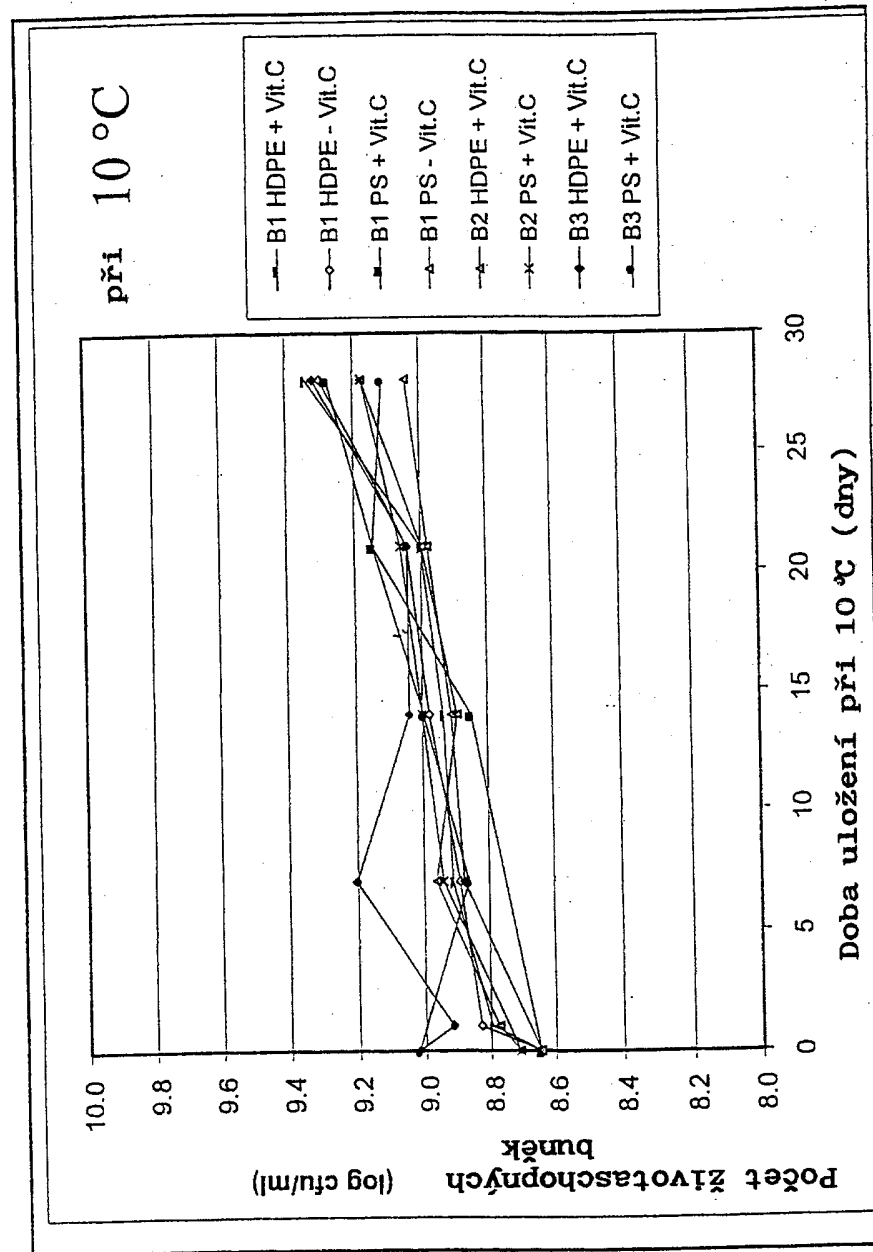
PV 2001-3264

80416

30.10.01

7V 2001-3264
80715

Přežívání L. casei ST11 v nápoji na bazi obilovin



HDPE: polyethylen s vysokou hustotou PS: polystyren Vit C: vitamin C

FIG - 6

Indukce mRNA pro cytokin působením *Lactobacillus* u myších makrofágů

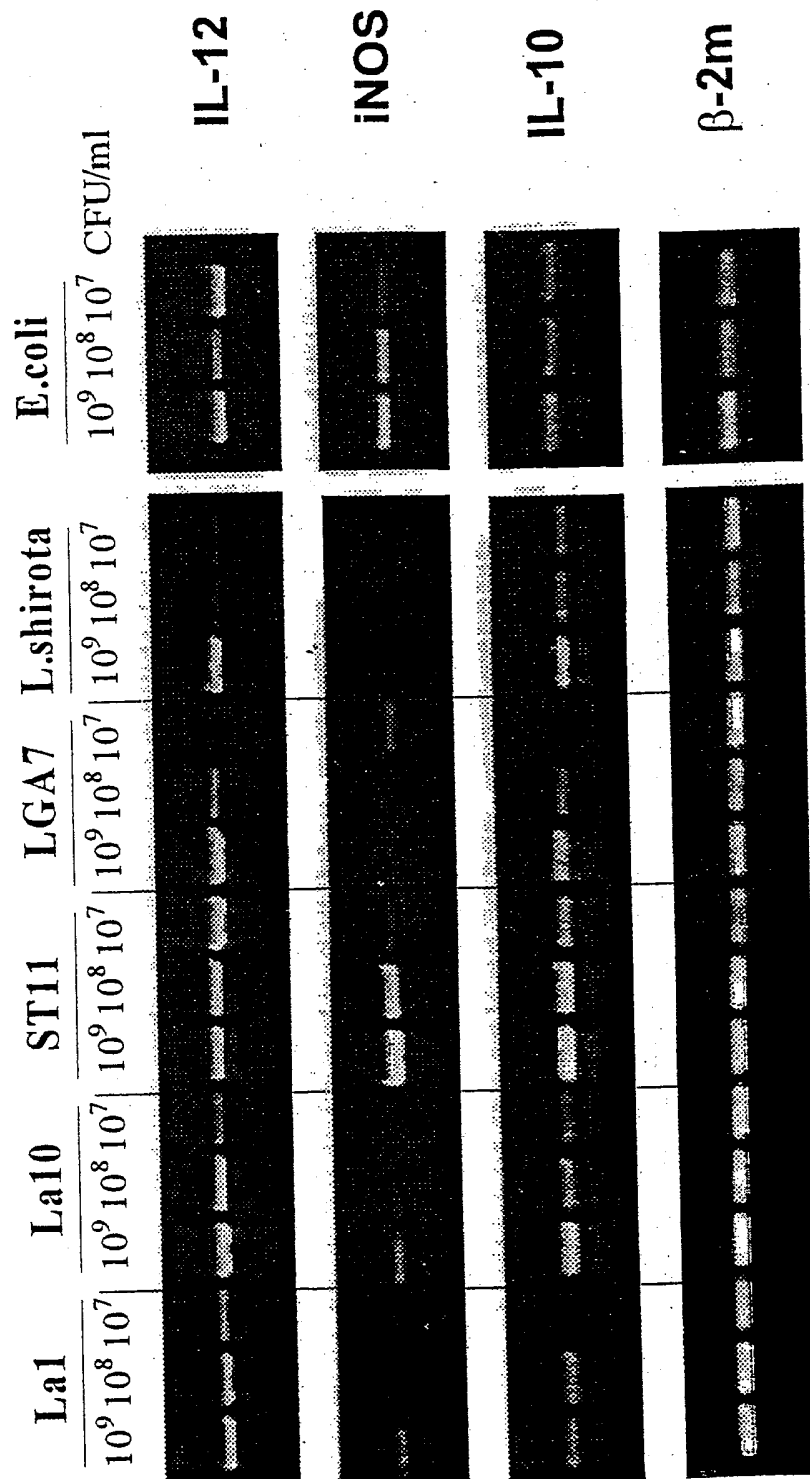


FIG - 7

30.10.01

PV 2001-3264
80415

30.10.01

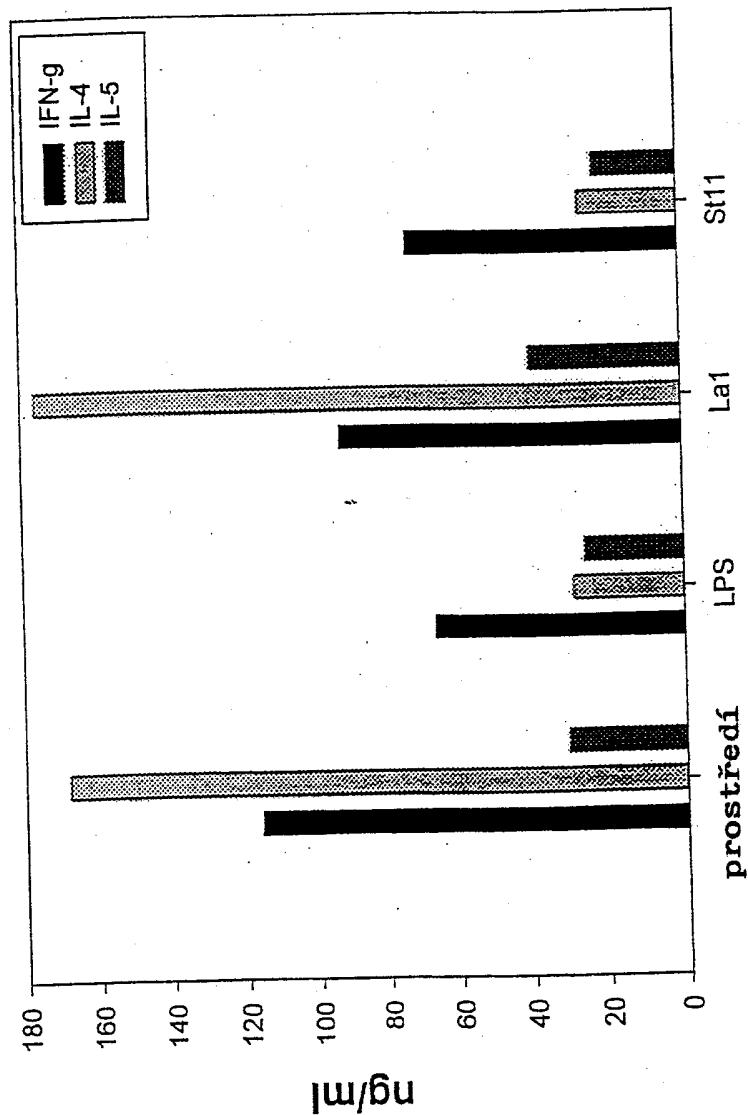
PV 2001-3284

80416

8/8

Suprese syntézy IL-4 kmeny Lactobacillus

(ELISA 981103 & 980925)



Primární podmínky kultury

FIG - 8