

ÖZET**MEMELİLERDE KEMİK KAYBININ ÖNLENMESİ VEYA TEDAVİ EDİLMESİNDE
KULLANIMA YÖNELİK LACTOBACILLUS REUTERI ATCC PTA 6475**

- 5 Mevcut buluş, insanlarda kemik kaybının önlenmesine yönelik etkili laktik asit bakteriyel suşları ve sunulan yöntemle göre seçilen suşların seçilmesine yönelik bir yöntemi içerir. Seçim yöntemi, değiştirilmiş bir mikrobiyal topluluğu normale yeniden kurabilen ve/veya dört spesifik SNP'nin (L reuteri JCM 1 1 12 genomuna ilişkin baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C) en az birini
- 10 barındırabilen suşlara bağlıdır.

İSTEMLER

1. Kemik kaybının önlenmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik *L reuteri* ATCC PTA 6475'tir.
2. Kemik kaybının önlenmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik *L reuteri* ATCC PTA 6475 içeren bir bileşiktir.
3. İstem 2'ye göre kullanıma yönelik bir bileşim olup, özelliği menopoz dönemindeki kadınlar, histerektomiye sahip kadınlar, diyabetliler, osteopenik bireyler, osteoporotik bireyler ve metabolik bozukluğu olan bireylerde kemik kaybının önlenmesinde kullanıma yönelik olmasıdır.
4. İstem 2'ye göre kullanıma yönelik bileşim olup, özelliği kırıktan sonra kemik onarımının geliştirilmesine kullanıma yönelik olmasıdır.
5. İstem 2'ye göre kullanıma yönelik bileşim olup, özelliği D vitamini veya bir hormon ile kombinasyon halinde, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik olmasıdır.
6. İstemler 2-5'ten herhangi birine göre kullanıma yönelik bileşim olup, özelliği bu bileşimin, bir farmasötik bileşim, bir gıda ürünü veya bir besin takviyesi olmasıdır.

TARİFNAME
MEMELİLERDE KEMİK KAYBININ ÖNLENMESİ VEYA TEDAVİ EDİLMESİNDE
KULLANIMA YÖNELİK LACTOBACILLUS REUTERI ATCC PTA 6475

5 BULUŞUN SAHASI

Mevcut buluş, genel olarak ilaç, farmakoloji ve besin takviyeleri ile ilgilidir. Daha ayrıntılı olarak buluş, memelilerde kemik kaybının önlenmesinde kullanıma yönelik laktik asit bakterisi ile ilgilidir.

10

BULUŞUN ALTYAPISI

50 yaşın üzerindeki (14 milyonu erkek) 40 milyondan fazla Amerikalı, düşük kemik yoğunluğu veya osteoporoz ve buna bağlı olarak artan kırık riskinden etkilenmektedir. Osteoporotik kırıkları olan kişiler, depresyon, bağımlılık ve artan ölüm oranına eğilimlidir. Yaşlanma, osteoporozun ana nedeniyken, hastalık, kullanmayı bırakma ve bazı ilaçlar, ayrıca yaşamın herhangi bir evresinde kemik kaybına neden olabilir.

İskelet, vücudun ağırlığını destekleyen, mezenkimal ve hematopoetik kök hücreleri barındıran ve bir kalsiyum deposu görevi gören oldukça organize bir sistemdir. Kemik yapısı, bir dış kortikal yoğun kabuk ve bir iç trabeküler kemik ağ örgüsü içerir. Egzersiz, trabeküler kemik mineral yoğunluğu (BMD) ve kemik hacim oranı (BVF), trabekül kalınlığı ve kortikal BMD ve kalınlığını artırabilir. Tersine, hastalık, kullanmayı bırakma ve (glukokortikoidler gibi) bazı ilaçlar, bu parametreleri azaltabilir ve hem erkeklerde hem de kadınlarda osteoporoza neden olabilir. Osteoporoz, kemik kütlede bir azalma (ortalamanın altında 2.5'ten fazla standart sapma (SD)) ve (azalan trabekül kalınlığı gibi) değiştirilmiş kemik mikro-yapısı ile tanımlanır. Azalan kemik kütlesi ile birlikte, artan kemik kırılma riski mevcuttur. Böylece, osteoporotik teşhisi konulduğu noktada, hasta, normal kemik yoğunluğuna sahip biri ile karşılaştırıldığında kırılma riskinde 16 kat artışa sahiptir. Kırıklar, depresyon, bağımlılık ve artan ölüm oranı (yaşlılar için 12 ayda %25'ten daha fazla) ile ilgilidir ve kalça kırıkları, yıllık 50,000'den fazla ölüm ile sonuçlanmaktadır (Ulusal Osteoporoz Vakfı (NOF) istatistiği). Osteoporoz, erkeklerde daha az görülmeyle birlikte, kalça kırıklarının %30'undan fazlası erkeklerde görülür ve ölüm oranı erkeklerde kadınlara göre daha fazladır. Mevcut durumda, osteoporozun doğrudan maliyetlerini karşılamak üzere ABD'de 20

milyar doların ve Avrupa Birliği'nde 30 milyar doların üzerinde harcamalar yapılmaktadır. Daha da endişe verici olarak, 2020 yılında ABD'de 50 yaşın üzerindeki 61 milyondan fazla kadın ve erkeğin düşük kemik yoğunluğu veya osteoporoza sahip olacağı (NOF istatistiği) ve bu nedenle etkili yeni tedaviler bulmasının bir öncelik olduğu tahmin edilmektedir. Aslında, 50 yaşın üzerindeki üç kadından biri, yaşamı boyunca osteoporoz ile ilişkili bir kırıkla karşılaşacaktır. Kırılma riskindeki bağlantılı artışı ile birlikte, kemik kaybı, metabolizma ve insülin sekresyonu üzerinde negatif etkilere sahip olabilir. Piyasadaki tüm uygun tedavilere rağmen, osteoporotik hastaların sayısı ABD ve dünya genelinde artmaktadır. Bunun, birinin erken yaşta risk altında olduğu farkındalığının eksikliği, artan yaşlı nüfus ve istenmeyen ilaç yan etkileri nedeniyle hastanın uyumsuzluğu dahil birkaç nedeni vardır. Ek olarak, geleneksel kemik kaybı tedavileri, her zaman etkili değildir. Mevcut durumda, düşük kemik yoğunluğu veya osteoporoza olan insanlara yönelik osteoporoz ilaçları yerine kullanılabilen herhangi bir alternatif veya doğal tedavi yoktur. Bu nedenle, doktorlar, hastalarında kemik yoğunluğunu artırmak üzere yeni yaklaşımlar aramakta ve şirketler farmakolojik kemik terapötik ilaçlarını geliştirmek üzere çalışmaktadır.

Bazı insanlarda, osteoporozun gelişme olasılığı daha yüksektir, birkaç risk faktörü aşağıdadır;

- *Kadın olmak
- *Yaşlılık
- *Ailede osteoporoz veya kırık kemik geçmişi
- *Kısa ve zayıf olmak
- *Kafkasyalı, Asyalı veya İspanyol/Latin gibi bazı ırk/etnik kökenler, buna rağmen Afro-Amerikalılar da risk altındadır
- *Kırık kemik geçmişi
- *Düşük seviyelerde seks hormonları
- *Menopoz dahil, kadında düşük östrojen seviyeleri
- *Adet görmeme (amenore)
- *Erkeklerde düşük seviyelerde testosteron ve östrojen
- *Diyet
 - Düşük kalsiyum alımı
 - Düşük D vitamini alımı
 - Aşırı protein, sodyum ve kafein alımı
- *Hareketsiz yaşam biçimi

*Sigara içme

*Alkol kullanımı

*Steroid ilaçları, bazı antikonvülsanlar ve diğerleri gibi bazı ilaçlar

*Anoreksiya nervoza, romatoid artrit, gastrointestinal hastalıklar ve diğerleri gibi bazı hastalıklar ve rahatsızlıklar

5

Menopoz çağındaki kadınlar, azalan östrojen seviyeleri nedeniyle menopoz süresi boyunca kemik kaybına eğilimlidir. Menopoz öncesinde dahi (menopozdan önce 2 ila 8 yıllık süre), östrojen seviyeleri düşmeye başlayabilir. Zamanla, çok fazla kemik kaybı, ilk olarak osteopeni (düşük kemik kütlesi) ve daha sonra osteoporozla neden olabilir.

10

Tip 1 diyabet (T1D) teşhisi, çocuklar ve yetişkinlerde artmaktadır. Tıbbi ilerlemeler hastanın ömrünü uzatırken, öglisemiye sürdürmek terapötik vijilans altında dahi zor kalır. Böylece, daha fazla T1D hastası (erkekler ve kadınlar), kemik kaybı dahil komplikasyonlar yaşar. Bu, hastaların, halihazırda artan bir kırık riski ile yaşlanmaya/menopoza girmeye başlaması anlamına gelir. İyileşmesi zor olabilen kırıklar meydana geldiğinde, uzun hastanede yatış gerektirir, hayat kalitesini düşürür ve ölüm oranını artırır. Kötü kemik sağlığı aynı zamanda tüm vücudu negatif olarak etkiler. Menopoz sonrası T1D diyabetli kadınlarda, diyabeti olmayan kadınlardan daha fazla osteoporotik kırıklar meydana gelir. T1D'ye sahip çocuklar, diyabeti olmayan çocuklardan daha düşük kemik mineral yoğunluğuna sahiptir. Böylece, kemik sağlığının korunması, T1D hastalarının genel yaşam kalitesi için kritiktir ve kemik iliği hücreleri ile kemik hücreleri iletişim kurduğundan kemik iliği bağışıklık/progenitör hücrelerini içeren terapötik/küratif tedavilerin en üst düzeye çıkarılması için önemlidir.

25

Tip 2 Diyabet (T2D) hastalarının osteoporotik kırık riski, aynı zamanda diyabetli olmayanlardan daha yüksektir.

Kemiğin güçlendirilmesi ve osteoporozun önlenmesi için iki önemli bileşenler 1) maksimum kemik yoğunluğuna erişilmesi ve 2) yetişkinlik ve yaşlanma sırasında kemik kaybının önlenmesidir. Kemik oluşturmak veya resorbe etmek üzere kemiğin dinamik olması ve çevresel işaretlere sürekli olarak adapte olması nedeniyle kemiğin yeniden yapılanması ortaya çıkar. Osteoblastlar (kemik oluşturan hücreler) ve osteoklastların (kemik resorbe eden hücreler) aktiviteleri aracılığıyla hedeflenen kemiğin yeniden yapılanması, kemiği, destek gereken yerlerde güçlü tutarken kandaki kalsiyum

35

seviyelerini kritik bir aralıkta sürdürür. Oluşturma ve rezorpsiyon aktiviteleri dengededir, net kemik kazancı veya kaybı yoktur, ancak oluşum azaldığında ve/veya rezorpsiyon arttığında, kemik kaybı meydana gelir.

- 5 Artan osteoklast aktivitesi, kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanır. Osteoklastlar, hematopoetik kök hücrelerden türetilir. Bu hücreler, doğru koşullar altında monosit/makrofaj soyundan hücrelerin, osteoklast prekürsörlerine gelişmesine neden olabilir. (Osteoblast yüzeylerinde bulunan) RANKL gibi faktörler ile daha fazla sinyal verilmesi, osteoklast olgunlaşmasını stimüle eder. Olgun osteoklastlar (katapsin K ve
- 10 TRAP5b dahil) kemik matris degradasyonunda dahil olan enzimleri ifade eder.

- Artan osteoblast aktivitesi, 1) soy seçimi, 2) olgunlaşma ve 3) ölüm dahil birkaç seviyede düzenlenebilen kemik oluşumu ile sonuçlanır. Kemik iliği stromal hücrelerinin (BMSC), osteoblastlar, adipositler ve diğer hücre tiplerine neden olmasından dolayı, bir
- 15 soy (adiposit) seçimi, bir diğeri (osteoblast) pahasına olabilir. Bu, yaşlanma, uzvun boşalması, hücre kültürü modelleri ve tip I (T1) diyabet ile tanınan kemik adipozitesi ile mineral yoğunluğu arasındaki karşılıklı ilişki ile desteklenir. Osteoblast aktivitesi, ayrıca ölüm/apoptoz ile düzenlenebilir. Osteoblast ölümünde bir artış, daha az kemik oluşturma hücresi ve bu nedenle kemik kaybı ile sonuçlanacaktır. Örnekler, kullanımı
- 20 bırakma/boşalmaya hızlı kemik adaptasyonunu içerir, bu, kemik kaybı, artan kemik iliği adipozitesi ve artan kemik hücresi ölümü ile sonuçlanır. Yaşlanma, ayrıca kemik hücresi apoptozunu artırır. Birçok faktör, aşağıdakileri içeren osteoblast regülasyonunun (soy, olgunlaşma, ölüm) birkaç veya tüm açılarının modüle edilmesine katkıda bulunur: TGF β , kemik morfojenik proteinleri (BMP'ler), paratiroid hormonu
- 25 (PTH) ve Wnt'ler gibi pozitif faktörler ve sitokinler gibi negatif faktörler.

- Bifosfonatlar, osteoporoza yönelik en yaygın tedavilerden biridir. Bu bileşikler, kemik mineraline dahil olur ve osteoklastlar aracılığıyla kemik katabolizmini inhibe eder ve kırıkların azaltılmasında etkilidir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin birçoğu, aç karnına
- 30 alınmalıdır ve azalan hasta uyumu ile sonuçlanan gastrik reflü ve bulantıya neden olabilir. Aynı zamanda, bu bileşiklerin kemik içinde bulunma süresinin uzunluğu ve kemiğin yeniden yapılanması ve gücü üzerindeki uzun süreli etkileri ile ilgili bir sorun mevcuttur. Selektif östrojen reseptör dönüştürücüler (SERM'ler), bir başka terapötik
- 35 tedavisi, osteoporozun ortaya çıkmasının önlenmesi veya yavaşlatılmasında faydalı

olarak çalışılmıştır, ancak, hormon replasmanının birkaç yıl boyunca uzun süreli kullanımı, kadınlarda meme kanseri riskini artırabilir, venöz trombozun (kan pıhtıları) etki alanını, daha önceden mevcut olan karaciğer hastalıklarının şiddetlenmesini ve hipertansiyonun yanı sıra artan endometriyal kanser riskini artırabilir. Amgen, RANKL/RANK sisteminin modifiye edilmesi aracılığıyla işe yarayan ve dolayısıyla osteoklast aktivitesini bastıran gelişmekte olan bir ilaca (osteoprotegrine benzer) sahiptir. İntermitent PTH tedavisi, bir anabolik tedavidir, ancak, intravenöz tedavi, pahalıdır ve sadece şiddetli osteoporotik hastalar için gösterilir. Birlikte ele alındığında, düşük kemik yoğunluğu teşhisi konulan birçok insanın, ne yapacağı ile ilgili kafasının karışması şaşırtıcı değildir. Birçok insan, uzun süreli etkilerden korktuğundan ilaç almak istemez. Ağırlık taşıma egzersizi ve yeterli kalsiyum alımı iki doğal yaklaşımken, hastalık, ilaçlar ve yaşlanmanın etkilerinin her zaman üstesinden gelemeyebilir.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

15

Buluş, istemler ile tanımlanır.

Mevcut buluşun başlıca amacı, özellikle menopoz dönemindeki kadınlarda, diyabetlilerde, örneğin yüksek enerji alımı ve düşük egzersiz sıklığına sahip genç erkekleri içeren osteopenikte kemik kaybını önleyebilen bir laktik asit bakteriyel suşu sağlamaktır.

20

Mevcut buluşun bir amacı, kemik kaybını önlemek üzere menopoz dönemindeki kadınlarda bu tür suşlar içeren ürünlerin kullanılmasıdır.

25

Mevcut buluşun bir amacı, kemik kaybını önlemek üzere bir histerektomiye sahip olan kadınlarda bu tür suşlar içeren ürünlerin kullanılmasıdır.

Bir başka amaç, kemik kaybını önlemek için bunlarla sınırlı olmamak üzere, metabolik bozukluk ve osteopenik erkekler dahil genç erkekler gibi erkeklerde bu tür suşlar içeren ürünlerin kullanılmasıdır.

30

Bir başka amaç, yan etkileri en aza indirebilen bu tür ilaçların dozunu azaltmak üzere kemik kaybı veya kemik oluşumuna yönelik terapiler ile kombinasyon halindeki bu tür ürünleri kullanmaktır.

35

Bir başka amaç, kırıktan sonra kemik onarımını geliştirmektir.

Burada, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesi ve aşağıdaki dört pozisyonun en az birince *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidin barındırılmasını içermek üzere, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesine yönelik bir yöntem açıklanır: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C.

10

Yöntem, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesi ve aşağıdaki dört pozisyonun en az birinde *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidin barındırılmasını içerir: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C.

15

Burada, ayrıca açıklanan, aşağıdaki dört pozisyondan en az birinde *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidi barındıran bir *Lactobacillus reuteri* seçilmesini içermek üzere, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik olarak bir *Lactobacillus reuteri* suşu gibi bir laktik asit bakteriyel suşuna yönelik bir yöntemdir: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C.

20

Yukarıda açıklanan yöntemlerin herhangi birinde, laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu nükleotidlerin dördünün tamamı gibi söz konusu dört nükleotidin en az üçü gibi söz konusu dört nükleotidin en az ikisini barındırır.

25

Burada ayrıca açıklanan, baz çifti 271 391'de C ile T, baz çifti 453 538'de G ile A, baz çifti 529 228'de G ile A ve baz çifti 599 338'de C ile T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin en az bir mutasyon barındırmaması sağlanarak, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesini içermek üzere, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesine yönelik bir yöntemdir.

30

Söz konusu yöntem, baz çifti 271 391'de C ile T, baz çifti 453 538'de G ile A, baz çifti 529 228'de G ile A ve baz çifti 599 338'de C ile T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin en az bir mutasyonu barındırmaması sağlanarak, *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşunun seçilmesini içerebilir.

Laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu dört mutasyonun herhangi biri gibi söz konusu dört mutasyonun en az üçü gibi söz konusu dört mutasyonun en az ikisini barındırabilir veya barındırmayabilir.

Buluş, kemik kaybının önlenmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik bir laktik bakteriyel suşunu sağlar. Laktik asit bakteriyel suşu, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik *L reuteri* ATCC PTA 6475'tir. Bu suş, 21 Aralık 2004 Budapeşte Anlaşması gereğinde tevdi edilen, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'nda (10801 Univ. Blvd., Manassas, Va.) kamu tarafından kullanılabilir.

Burada ayrıca, kemik kaybının önlenmesi veya tedavisinde kullanıma yönelik olarak, *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan ve aşağıdaki dört pozisyondan en az birinde *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidi barındıran bir laktik asit bakteriyel suşu açıklanır: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C.

Laktik asit bakteriyel suşu, *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe sahip olabilir ve aşağıdaki dört pozisyonun en az birinde *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidin barındırabilir: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de G ve baz çifti 599 338'de C.

Laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu nükleotidlerin dördünün tamamı gibi söz konusu dört nükleotidin en az üçü gibi söz konusu dört nükleotidin en az ikisini barındırabilir. burada ayrıca, baz çifti 271 391'de C ile T, baz çifti 452 538'de G ile A, baz çifti 529 228'de G ile A ve baz çifti 599 338'de C ile T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna

ilişkin en az bir mutasyon barındırmaması sağlanarak, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşu açıklanır.

- 5 Laktik asit bakteriyel suşu, baz çifti 271 391'de C ila T, baz çifti 453 538'de G ila A, baz çifti 529 228'de G ila A ve baz çifti 599 338'de C ila T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin en az bir mutasyonu barındırmaması sağlanarak, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe
10 sahip olabilir.

Laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu dört mutasyonun herhangi biri gibi söz konusu dört mutasyonun en az üçü gibi söz konusu dört mutasyonun en az ikisini barındırabilir veya barındırmayabilir.

15

Buluşa göre, laktik asit bakteriyel suşu, *L. reuteri* ATCC PTA 6475'tir.

Buluş ayrıca, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 olan bir laktik asit bakteriyel suşunu içeren bir bileşik sağlar.

20

Burada ayrıca, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan ve aşağıdaki dört pozisyondan en az birinde *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidi barındıran bir laktik asit bakteriyel suşu içeren bir bileşik açıklanır: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de
25 G ve baz çifti 599 338'de C.

- Laktik asit bakteriyel suşu, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe sahip olabilir ve aşağıdaki dört pozisyonun en az birinde *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin aynı nükleotidi barındırır: baz çifti 271 391'de C, baz çifti 453 538'de G, baz çifti 529 228'de
30 G ve baz çifti 599 338'de C.

Laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu nükleotidlerin dördünün tamamı gibi söz konusu dört nükleotidin en az üçü gibi söz konusu dört nükleotidin en az ikisini barındırabilir.

Burada ayrıca, baz çifti 271 391'de C ile T, baz çifti 453 538'de G ile A, baz çifti 529 228'de G ile A ve baz çifti 599 338'de C ile T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin en az bir mutasyonu barındırmaması sağlanarak, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna en az %95 benzerliğe sahip olan bir laktik asit bakteriyel suşu içeren bir bileşik açıklanır.

Laktik asit bakteriyel suşu, baz çifti 271 391'de C ile T, baz çifti 453 538'de G ile A, baz çifti 529 228'de G ile A ve baz çifti 599 338'de C ile T'den oluşan dört mutasyonun grubundan seçilen, laktik asit bakteriyel suşunun, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna ilişkin en az bir mutasyonu barındırmaması sağlanarak, *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) genomuna %97 gibi, örneğin %98, %99 gibi en az %96 benzerliğe sahip olabilir.

Laktik asit bakteriyel suşu, söz konusu dört mutasyonun herhangi biri gibi söz konusu dört mutasyonun en az üçü gibi söz konusu dört mutasyonun en az ikisini barındırabilir veya barındırmayabilir.

Buluşa göre, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yönelik laktik asit bakteriyel suşu, *L. reuteri* ATCC PTA 6475'tir.

Ayrıca buluşa göre, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 içeren bir bileşim, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yöneliktir.

Buluşun bir düzenlemesinde, bileşim, menopoz dönemindeki kadınlar, histerektomiye sahip kadınlar, diyabetliler, osteopenik bireyler, osteoporotik bireyler ve metabolik bozukluğu olan bireylerde kemik kaybının önlenmesinde kullanıma yöneliktir.

Buluşun yine bir diğer düzenlemesinde, bileşim, kırıktan sonra kemik onarımının geliştirilmesinde kullanıma yöneliktir.

Buluşun bir düzenlemesinde, D vitamini ile kombinasyon halinde yukarıda açıklanan bileşik, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesinde kullanıma yöneliktir.

Buluşun bir diğer düzenlemesinde, (hormon replasman tedavisinde kullanıma yönelik)

bir hormon ile kombinasyon halindeki yukarıda açıklanan bileşik, kemik kaybının önlenmesi veya tedavi edilmesine yöneliktir.

5 Buluşun bir düzenlemesinde, yukarıda açıklanan bileşik, (isteğe bağlı olarak en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekşiyan içeren) bir farmasötik bileşim veya (teknikte uzman kişi tarafından bilindiği üzere isteğe bağlı olarak en az bir gıdada kullanılabilir ekşiyan içeren) bir gıda ürünü veya gıda takviyesidir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

10

Şekil 1, jejunum ve ileumda kümelenen mikrobiyal topluluğunu gösterir.

Şekil 2, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile kemik kaybının bastırılmasını gösterir.

Şekil 3, farklı *L. reuteri* suşlarındaki kemik kaybı üzerindeki etkiyi gösterir.

15 BULUŞUN VE TERCİH EDİLEN DÜZENLEMELERİNİN DETAYLI AÇIKLAMASI

Kronik inflamatuvar hastalıklar, sıklıkla sistemik kemik kaybı ile bağlantılıdır. NIH onaylı özetle, onay numarası 1R21AT005472-01A1, McCabe, genel intestinal sağlığı iyileştiren tedavilerin kemik sağlığına fayda potansiyeli olduğunu öne sürer. McCabe ve
20 Britton, *L. reuteri* tedavisinin, ileumda TNF seviyelerini azalttığı ve dişi olmayan ancak sağlıklı erkek farelerde kemik hacmini artırdığını bulmuştur ve *L. Reuteri'nin*,nin, intestinal inflamasyonun bastırılması ve kemik oluşumunun artışı ile cinsiyete bağlı bir durumda kemik yoğunluğunu artırdığını ileri sürer. İntestinal inflamasyonu azaltan bir probiyotik bakterinin kullanımı aracılığıyla kemik kütlesinin artırılmasının yeni bir yoluna
25 sahip olduklarını ileri sürerler. Belirli spesifik olarak seçilen suşların, erkek ve dişilerin her ikisinde kemik kaybını önlemek üzere kullanıldığı mevcut buluştan farklı olarak, *L. reuteri*'nin anti-inflamatuvar özellikleri ile bağlantılı olarak kemik kaybının önlenmesinin değil, cinsiyete bağlı kemik oluşumunun artmasıdır.

30 Probiyotikler, tavuk kortikal kemiği kalınlığını artırabilir ve yaşlanan farelerdeki kemik kaybını azaltabilir. Narva vd., "Effects of bioactive peptide, valyl-prolyl-proline (VPP), and lactobacillus helveticus fermented milk containing VPP on bone loss in ovariectomized rats." içinde, *L. helveticus* fermente sütün kemik kaybını önlediğini, etkinin, valil-prolil-prolin peptidinden kaynaklanabildiğini açıklamıştır. Narva vd., ayrıca
35 "The effect of Lactobacillus helveticus fermented milk on acute changes in calcium

metabolism in postmenopausal women" içinde sütün *Lactobacillus helveticus* ile fermentasyonunun, kalsiyum metabolizması üzerinde pozitif bir akut etkiye sahip olduğunu açıklamıştır.

- 5 Yeo vd., "Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics" içinde prebiyotik ile takviye edilen soya sütüne dahil edilen probiyotiğin, örneğin osteoporozda potansiyel olarak bir besinsel tedavi olarak kullanılabildiğini ileri sürer.
- 10 Kim vd., "Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats" içinde *L. casei* 393 FMP'nin ovariyektomi yapılan sıçanlarda kemik kaybı üzerinde önleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir.

Bununla birlikte, tek başına veya kombinasyon halinde olmadan yukarıda geçen önceki
15 tekniğin herhangi biri, kemik kaybının önlenmesine yönelik etkili olan spesifik probiyotik suşların nasıl seçilebildiğini öğretmez.

Mevcut buluş, burada insanlarda kemik kaybının önlenmesine yönelik etkili bir laktik asit bakteriyel suşunu içerir. Yiyecekler, besinsel katkı maddeleri ve formülasyonlar gibi
20 ürünler, farmasötikler veya bu suşlardan türetilen hücreler veya bileşenlerin tamamını içeren tıbbi cihazlar, teknikte bilindiği gibi formüle edilebilir ve genel olarak, laktik asit bakteriyel suşu veya bunun türetilen bileşeni olarak bilinen bir yutulabilir takviye içerir.

Önceki tekniğe bağlı olarak, kemik kaybını önleyebilen bir suşun, intestinal sağlık veya
25 anti-inflamatuvar özellikleri üzerinde bunun genel etkisi ile bağlantılı olacağını düşünmek doğal olacaktır, bununla birlikte, buluşçular, bu özelliklerin, şaşırtıcı bir şekilde kemik kaybının önlenmesi üzerindeki etkililikte tahmini olmadığını bulmuştur. *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 ve *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4659, neredeyse aynı iki suştur, bunların her ikisi de anti-inflamatuvardır ve genel intestinal
30 sağlığı geliştirir. Bu suşların bu nedenle, aynı zamanda kemik kaybı üzerinde aynı etkiye sahip olacağını varsaymak doğaldır. Bununla birlikte, buluşçular, bu suşların, kemik kaybının önlenmesi üzerinde aynı etkiye sahip olmadığını göstermiştir ve bu gözleme bağlı olarak, örneğin *Lactobacillus reuteri* gibi laktik asit bakteriyel suşlarının seçilmesinin bir yolunun, kemik kaybının tedavisi ve/veya önlenmesine yönelik etkili
35 olacağını açıklamıştır.

Burada sunulan yöntem aracılığıyla spesifik olarak seçilen laktik asit bakterisi, kemik kaybını önlemek üzere insanlara uygulanabilir.

5 *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ve ATCC PTA 4659, kemik kaybını önleyebilen bakteriler için önemli olan dört SNP'de değişiklik gösterir. Bu SNP'ler, burada referans ile tam olarak dahil edilen Walter vd. (Walter et al. Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm; PNAS, vol. 108 p. 4645-4652)'de'de gösterilir. SNP analizine yönelik olarak, sıralama sonuçları, referans
10 genom üzerine (*L. reuteri* JCM 1112, GenBank erişim no AP007281, SEQ ID NO: 1) planlanmıştır. Yedi SNP, *L. reuteri* ATCC PTA 4659'da bulunmuştur ve bunların üçü, ayrıca *L. reuteri* ATCC PTA 6475'te (bp 567 368'de konumlandırılan SNP 4, bp 968 088'de konumlandırılan SNP 6 ve bp 1 358 460'ta konumlandırılan SNP 8, referans genom, *L. reuteri* JCM 1112'ye referans yapılır, GenBank erişim no AP007281, SEQ ID
15 NO: 1) bulunmuştur. Geri kalan dört benzersiz SNP (mevcut metin üzerine, buradan sonra sırasıyla SNP 1, SNP 2, SNP 3 ve SNP 5 olarak adlandırılır), *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile *L. reuteri* ATCC PTA 4659 arasındaki genomik farklılıkları oluşturur. Söz konusu dört SNP, aşağıdakilerde konumlandırılır:

- bp 271 391 (SNP 1),
- 20 • bp 453 538 (SNP 2),
- bp 529 228 (SNP 3) ve
- bp 599 338 (SNP 5),

(referans genom *L. reuteri* JCM 1112'ye referans yapılır, GenBank erişim no AP007281; SEQ ID NO: 1).

25

SNP 1, korunan hipotetik proteine yönelik bir gen kodlamada konumlandırılır (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224225>), SNP 2, bir klorid kanal proteinine yönelik bir gen kodlamada konumlandırılır (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224386>), SNP 3, bir ATP sentez gama alt
30 birimine yönelik bir gen kodlamada konumlandırılır (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224455>) ve SNP 5, bir DNA uyumsuzluk onarım proteini HexB'ye yönelik bir gen kodlamada konumlandırılır (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224511>). Bu buluşta dahil edilen SNP'ler, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile eşleşenlerdir, bunların dizisi, SNP 1, SNP 2, SNP 3 ve
35 SNP 5'in pozisyonlarında *L. reuteri* JCM 1112 ile aynı nükleotidlere sahiptir. Aşağıda

listelenenler, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile 4659 suşları arasında değişiklik gösteren nükleotidlerdir:

5 SNP 1) bir hipotetik proteine yönelik bir gen kodlama, burada nükleotid 267, bir C'den (ATCC PTA 6475 ve JCM 1112'deki gibi) bir T'ye kadar ATCC PTA 4659'da değiştirilmiştir.

SNP 2) bir klorid kanal proteine yönelik bir gen kodlama, burada nükleotid 373, bir G'den (ATCC PTA 6475 ve JCM 1112'deki gibi) bir A'ya kadar ATCC PTA 4659'da değiştirilmiştir.

10 SNP 3) ATP sentez gama alt birimine yönelik bir gen kodlama, burada nükleotid 296, bir G'den (ATCC PTA 6475 ve JCM 1112'deki gibi) bir A'ya kadar ATCC PTA 4659'da değiştirilmiştir.

SNP 5) bir HexB proteinine yönelik bir gen kodlama, burada nükleotid 1966, bir C'den (ATCC PTA 6475 ve JCM 1112'deki gibi) bir T'ye kadar değiştirilmiştir.

15 Burada açıklanan seçim yönteminde, bu SNP'lerin en az birinde, yukarıda açıklanan SNP'lere yönelik *reuteri* ATCC PTA 6475 ile aynı nükleotidleri barındırdığı suşlar aranır.

20 Mikrobiyota, kemik kaybında önemli bir rol oynar; kemik kaybından şikayet eden birçok hasta, bozulmuş intestinal mikrobiyataya sahiptir. GI borusunda normal mikrobiyal topluluğu yeniden kurabilen laktik asit bakterisi, şaşırtıcı bir şekilde kemik kaybının önlenmesinde daha etkilidir.

25 Burada kemik kaybının önlenmesi için etkili suşlar seçilerek, seçimin bir yöntemi açıklanır. Toplam gut mikrobiyal bileşiminin yeniden kurulabilmesi, şaşırtıcı bir şekilde ayrıca kemik kaybının önlenmesindeki işlev için önemlidir. Buluşçular, değiştirilmiş bir mikrobiyal topluluğu normale yeniden kurabilen ve/veya kemik kaybının önlenmesi için etkili olan dört spesifik SNP'nin en az birini barındırabilen suşları bulmuştur.

30 Kemik kaybının önlenmesi, bazı suşlar için benzersizdir ve genelde tüm laktik asit bakterileri için değildir. Etkili suşlar seçildiğinde, buluşçular, açık bir şekilde bu etkinin, anti-inflamatuvar özelliklere bağlı olmadığını gösterdiğinden, seçim kriteri olarak anti-inflamatuvar kapasiteyi kullanmak gerekli değildir. *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ve *L. reuteri* ATCC PTA 4659'un her ikisi de anti-inflamatuvar suşlardır, ancak *L. reuteri* ATCC PTA 6475, kemik kaybının önlenmesine yönelik olarak kullanıldığında çok daha etkilidir, *L. reuteri* ATCC PTA 4659, burada açıklanan seçim yöntemine göre

seçilmez. Burada açıklanan yöntemle göre seçilen spesifik laktik asit bakteriyel suşları, genel olarak kemik kaybının önlenmesine yönelik olarak kullanılabilir ve aşağıdaki düzenlemelerin, bu buluşun kapsamını sınırlamaması, ancak tercih edilen düzenlemeleri örneklendirmesi hedeflenir.

5

D vitamini, kemik sağlığı için çok önemlidir ve düşük D vitamini seviyelerine sahip insanlar, düşük kemik yoğunluğu veya kemik kütlesine sahiptir. Yeterli D vitamini almayan insanlar, kalsiyumu absorbe etmek üzere D vitamini gerekli olduğundan kemik kaybedebilir. Buluşçular, değiştirilmiş bir mikrobiyotanın, D vitamini eksikliği ve kemik kaybına yol açacağını, mevcut buluşa göre seçilen laktik asit bakterisinin uygulanmasının, mikrobiyotayı yeniden kuracağını ve böylece intestinal D vitamini absorpsiyonunu artıracığı ve D vitamini seviyelerini yeniden düzenleyeceğini görmüştür. Kemik kaybının önlenmesine yönelik olarak çok daha etkili bir yöntem/ürün elde etmek amacıyla D vitamini seçilen suşlar ile kombine etmek ayrıca bir opsiyondur.

15

T1D hastaları, kemik kaybı gibi komplikasyonlardan şikayetçidir. T1D'den şikayetçi hastalar, rahatsızlığın bir sonucu olarak değiştirilmiş bir mikrobiyotaya sahiptir. Burada açıklanan yöntemle göre seçilen laktik asit bakterisinin uygulanması, mikrobiyotayı yeniden kuracak ve kemik kaybını önleyecektir.

20

Gençlik ve yetişkinlik boyunca yüksek kemik yoğunluğu, yaşamın daha sonrasında osteoporoz gibi hastalıkların önlenmesine yardımcı olabilir. Bunun nedeni, osteoporoz bölgesi içindeki kemik yoğunluğuna ulaşmadan önce yüksek kemik yoğunluğunun daha yüksek derecede kemik kaybına izin vermesidir. Böylece, burada açıklanan yöntemle göre seçilen laktik asit bakteriyel suşlarının genç ve yetişkin insanlara uygulanması aracılığıyla kemik kaybını önlemek mevcut buluşun bir amacıdır, bu, kişilerin, yaşamın sonrasında osteoporozun ortaya çıkmasını önlemek üzere maksimum kemik yoğunluğu elde etmesine yardımcı olacaktır. Burada açıklanan yöntemle göre seçilen spesifik laktik asit bakterisi, kemik kaybından şikayetçi olanların yanı sıra sağlıklı alıcıda kemik kaybını önler.

30

Seçilen laktik asit bakterisinin uygulanması, hormon replasman terapisi ile kombine edilebilir. Bu tür bir kombinasyon, hormonların miktarını azaltabilir ve böylece kanser riskini düşürmek gibi yan etkileri azaltabilir.

35

Kemik kaybının önlenmesine yönelik olarak seçilen laktik asit bakterisi, tercihen osteoporoz geliştirmeye eğilimli olan menopoz dönemindeki kadınlar ve osteopenik erkeklere uygulanacaktır ve seçilen laktik asit bakterisinin uygulanması, kemik kaybını
5 önleyecektir ve böylece düşük kemik yoğunluğu ve osteoporozu önler.

Buluşçular, östrojen azalmasının, gut mikrobiyotasını değiştirdiği, burada açıklanan yöntemle göre seçilen laktik asit bakterisi ile tedavinin, bunlarla sınırlı olmamak üzere menopoz dönemindeki kadınlar ve histerektomiye sahip olan kadınlar, azalan östrojen
10 seviyelerinden şikayetli insanlarda mikrobiyatanın yeniden kurulacağını, sonuç olarak kemik kaybının önlendiğini görmüştür.

Burada açıklanan yöntemle göre seçilen laktik asit bakteriyel suşları, ayrıca kırık onarımını geliştirmek üzere kullanılabilir.

15 Örneğin kemik kaybını tedavi etmek üzere kullanılan bifosfonatlar ve hormon replasman terapisi gibi ilaçların yan etkilerini azaltmak amacıyla, ilaçları, seçilen laktik asit bakterisi ile kombine etmek ve böylece dozu azaltmak mümkündür, bu, yan etkileri en aza indirecektir.

20

ÖRNEK 1

L. reuteri ATCC PTA 6475'in ovx farelerindeki değiştirilmiş mikrobiyal toplulukları yeniden kurabilme çalışması.

25

Kontrol (ovx olmayan), ovx ve *L. reuteri* ile beslenen ovx'un intestinal mikrobiyal topluluklarında önemli değişiklikler mevcuttur.

Deney grupları ve doku koleksiyonu.

30

Ovx farelerinin ovariyektomi (ovx) ve *L. Reuteri*6475tedavisinin etkilerini ölçmek amacıyla, hayvanların üç deney grubu karşılaştırılmıştır. Kontrol fareleri, haftada üç defa araç kontrol gavajı alan ovx olmayan farelerdir. Ovx fareler, haftada üç defa araç kontrol gavajı almıştır. Ovx + *L. reuteri* 6475, dört haftada, haftada üç defa gece
35 boyunca 300 µl *L. reuteri* 6475 alan farelerdir. Deneyin sonunda, farelere ötanazi

yapılmıştır ve karın, duodenum, jejunum, ileum, proksimal ve distal kolonlardan doku numuneleri izole edilmiştir ve mikrobiyal ekoloji analizi için kaydedilmiştir.

DNA ekstraksiyonu

5

Murin intestinal dokusu, 360 µl Tampon ATL (Qiagen cat.#19076) içeren MoBio Ultra Clean Boncuklu Dışkı DNA Tüplerine (cat.# 12811-100-DBT) yerleştirilmiştir ve tam hızda 1 dakika Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products) üzerinde çözündürülmüştür. DNA, Qiagen DNeasy Kan ve Doku kiti (cat.# 69504) kullanılarak murin intestinal dokusundan çıkarılmıştır. Doku, ayrıca 40 µl proteinaz K (Qiagen, cat.# 19133) eklenmesi ve 1 saat 55°C'de inkübe edilmesi aracılığıyla bozulmuştur. DNA, Qiagen DNeasy Kan ve Doku kiti (cat.#69504) kullanılarak çıkarılmıştır. DNA verimi, Nanodrop 1000 kullanılarak ölçülmüştür.

15 PCR amplifikasyonu

Bakteriyel 16S dizileri, V3-V5 barkodlu primer seti ve Broad Enstitüsü tarafından İnsan Mikrobiyom Projesi için geliştirilen amplifikasyon protokolü kullanılarak murin intestinal dokusundan 454 dizilimi için büyütülmüştür. Barkodlu ileri primerler IDT DNA Technologies tarafından sentezlenmiştir ve ters primer Sigma tarafından sentezlenmiştir. Barkodlu ileri primerler, 96 gözlü plakalarda 4 µM çalışma konsantrasyonuna seyreltilmiştir; ters primer, 4µM nihai konsantrasyona her göze eklenmiştir. 25µl hacimde üç kopyalı reaksiyonlar, 400 µg murin intestinal DNA'sı, 2µl 4µM primerler ve IX Accuprime Tampon II'de 0.15 µl Accuprime HiFi Taq polimeraz içerecek şekilde hazırlanmıştır (Invitrogen, cat.# 12346086). Reaksiyonlar, 2 dakika 95°C denatürasyon akabinde 95°C x 20 saniye, 50°C x 30 saniye, 72°C x 5 dakikalık 30 döngü ile bir Eppendorf Pro alüminyum plaka termal döngüleyici içinde büyütülmüştür.

30 Amplifikasyon ürün saflaştırma

16S amplifikasyon ürünleri, Ampure Agencourt XP boncukları (Beckman Coulter, cat# A63880) kullanılarak saflaştırılmıştır. İlk olarak, her bir numune için üç kopyalı reaksiyonlar, 1.7ml mikrofüj tüpler içine kombine edilmiştir ve Ampure XP boncukları, 0.7X hacim oranında eklenmiştir. Vorteksten sonra, karıştırılan numuneler, oda

sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir, daha sonra boncukları ayırmak üzere manyetik bir stant üzerine yerleştirilmiştir (Invitrogen, cat.#123-21D). Boncuklar, %70 etanolün 200µl'lik 2 yıkaması ile üreticinin protokolüne göre yıkanmıştır. Boncuklar, 5 dakika 37°C'de kurutulmuştur ve DNA, 20µl 10µM Tris tamponu/0.1 µM EDTA ile ayrıştırılmıştır. Eluent, manyetik stant üzerinde boncuklardan ayrılmıştır, yeni bir 1.7ml mikrofuj tüpe aktarılmıştır ve Quant-It dsDNA yüksek duyarlılıklı analiz kiti (Invitrogen, cat# Q33120) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir numunenin eşit miktarları, daha sonra 454 dizileme için bir tüp içine toplanmıştır.

10 454 dizileme ve dizi analizi

454 dizileme, Titanyum kimyası kullanan GS Junior (Roche) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GS Jr. tarafından kullanılan standart filtrele ek olarak, geçen okumaları tanımlamak üzere, yanlışlıkla atılan dizilerin sayısını azaltmak üzere modifiye edilmiş bir ampikon işleme algoritması kullanılmıştır. 16S rRNA dizileri, MSU'da Ribozomal Veri Tabanı Projesi personeli tarafından *E. coli* 16S dizilerine hizalanmıştır ve *E. coli* 16S nükleotid pozisyonları 617 ila 900'de işlenmiştir. Sonraki işlem ve analiz (çeşitlilik ölçümleri dahil), MOTHUR v.1.21 kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://www.mothur.org/wiki/>). ANOSIM (benzerlik analizi) ve temel koordinat analizi, yazılım paketi PAST kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Beraberindeki şekiller ve tablo, iki veya daha fazla mikrobiyal topluluklar arasındaki benzersizlik seviyesinin ölçülmesine yönelik olarak Bray-Curtis yöntemini kullanır. Bu analizlerde, toplulukları türler düzeyinde görüntülediği düşünülen 0.03 operasyonel taksonomik birim (OUT) kesimini seçilir. Bu verilerden, ovariektomize edilmiş farelerin *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile tedavisinde, ileal ve jejunal mikrobiyal topluluklarda, iyileştirilen kemik sağlığı ile ilişkili olan önemli bir kaymaya neden olduğu sonucuna varılır. (tablo 1'de ovx+lacto).

Tablo 1: Bray-Curtis benzersizlik matrisi kullanılarak türler seviyesinde ANOSIM analizi,

30 ** istatistiksel anlamlılığı gösterir.

Doku	Karşılaştırma	R Değeri (p değeri)
Jejunum	wt-ovx-ovxlacto	0.3367 (0.0183)*
	wt-ovx	0,0443 (0,3633)
	wt-ovxlacto	0.6078 (0.0250)*

Doku	Karşılaştırma	R Değeri (p değeri)
İleum	ovx-ovxlacto	0.3297 (0.0712)
	wt-ovx-ovxlacto	0.2068 (0.0084)*
	wt-ovx	0.1710 (0.1180)
	wt-ovxlacto	0.2540 (0.0290)*
	ovx-ovxlacto	0.2209 (0.0206)*

Doğal suş, ovx ve *L. reuteri* ile tedavi edilen ovx'ın üç şekilde karşılaştırılması, mikrobiyal topluluklarda önemli kaymalar göstermiştir (tablo 1). Bu farklılıklar, büyük ölçüde *L. reuteri* tedavisinden sonra topluluklardaki önemli değişimlerden kaynaklanır.

- 5 Temel koordinat analizi doğal suş kontrol grubundan (üçgen Δ), ovx grubundan (daire •) ve *L. Reuteri* ile muamele edilmiş ovx grubundan (kare ■) mikrobiyal toplulukların analizini, toplulukların jejunum ve ileumda kümelenmesinin görselleştirilmesinde kullanılmıştır. Şekil 1, *L. reuteri* ile tedavi edilen ovx farelerinin, hem jejunum hem
- 10 gösterir. *Clostridiales* olarak sınıflandırılan birçok OTU, *L. reuteri* ile tedavi edilmiş Ovx topluluklarının diğer iki gruptan ayrılmasını sağlayan ana bakteri gruplarıdır.

ÖRNEK 2 (talep edildiği üzere buluşun parçası değildir)

- 15 ***L. reuteri* ATCC PTA 4659'in ovx farelerindeki değiştirilmiş mikrobiyal toplulukları yeniden kurabilme çalışması.**

Deney, örnek 1'deki gibi gerçekleştirilir, ancak *L. reuteri* ATCC PTA 6475 yerine *L. reuteri* ATCC PTA 4659 kullanılır.

20

L. reuteri ATCC PTA 4659 tedavisi, kontrole göre ovx topluluklarını yenileyemez.

ÖRNEK 3 (talep edildiği üzere buluşun parçası değildir)

- 25 ***Belirli SNP'lerin Tanımlanması***

***L. reuteri* Genomlarının Illumina Dizilimi**

Bu çalışmada kullanılan *L. reuteri* suşları, Qiagen Genomik-Tip Sistem kullanılması aracılığıyla hazırlanan MRS ortamı (Difco) ve genomik DNA'da büyütülen ATCC PTA 4659 ve 6475'tir. DNA, 500 bp'lik ortalama parça boyutu elde etmek üzere 20 dakika sonikasyon (130 W) ile parçalanmıştır, daha sonra ayrıca saflaştırılmıştır ve QIAquick PCR Saflaştırma Döndürme Kolonları (Qiagen) ile konsantre edilmiştir. 3' çıkıntılarını çıkarma ve 5' çıkıntılarını doldurma işlemi küt uçlu genomik parçalara neden olur. 3' ucuna terminal transferaz yoluyla bir adenin kalıntısı eklenmiştir ve ortaya çıkan parçalar Solexa adaptörlerine bağlanmıştır. Ürünler agaroz jel elektroforezi ile ayrılmıştır ve 150 ila 200 bp arasındaki bant, jelden çıkarılmıştır. DNA parçaları, bir QIAquick Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen) kullanılarak agaroz diliminden çıkarılmıştır. Adaptör ile modifiye edilmiş DNA parçaları, Solexa evrensel adaptör primerleri kullanılarak 18 döngülük bir PCR aracılığıyla zenginleştirilmiştir. DNA parçası kütüphanesi ölçülmüştür ve daha sonra küme oluşumu için 10-nM'lik bir çalışma stoğuna seyreltilmiştir. Adaptör ile bağlanan parçalar (2 nM), 5 dakika 0.1 M NaOH'de denatüre edilmiştir, daha sonra ayrıca 1 mL'lik önceden soğutulmuş hibridizasyon tamponundaki nihai 9 pM'lik bir konsantrasyona seyreltilmiştir ve Küme İstasyonu kullanılarak Solexa akış hücresi üzerine dahil edilmiştir. İzotermal amplifikasyonun ardından, kümeler, Solexa Küme İstasyonu aracılığıyla akış hücresi boyunca ölçülen, 0.1 M NaOH denatürasyonu ile tek zincirli hale getirilmiştir. Her bir kümenin tekli zincirlerini hazırlamak üzere bir Solexa adaptörünü tamamlayan bir dizilim primeri eklenmiştir. Hibridize edildikten ve fazla primer bir yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra, akış hücresi dizilim için hazırdır. Solexa Genom Analiz Edici II, akış hücresinin yüzeyine en fazla 36 sıralı floresan etiketli, 3'-OH bloke edilmiş nükleotit ve polimeraz akışı sağlayacak şekilde programlanmıştır, böylece sabit bir 36-bp okuma uzunluğu üretilir. Her baz birleştirme adımından sonra, akış hücresi yüzeyi, reaktanları uzaklaştırmak üzere yıkanmıştır ve daha sonra mikroskop objektifi ile görüntülenmiştir. Deneyler, her biri ortalama 30,000 küme içeren akış hücresi şeridi başına 300 kiremitli görüntü ("kiremitler") toplamıştır.

30

SNP Analizi

İki şeridin sıralama sonuçları, ayrı ayrı referans genom *L. reuteri* JCM 1112T (GenBank erişim no AP007281) üzerine planlanmıştır. Planlama yazılımı Maq versiyon 0.6.6 (<http://maq.sourceforge.net/maq-man.shtml>), planlamayı (varsayılan parametreler)

35

gerçekleştirmek üzere kullanılmıştır. SNP'ler, tanımlanmıştır ve MAQ yazılımı ile doğrulanmıştır ve SNP ve intergenetik SNP'lerin kodlamasına sınıflandırılmıştır. Kodlama SNP'leri, sinonim ve nonsinonim olarak tanımlanmıştır. SNP'ler, son olarak çevre bölgenin PCR amplifikasyonu, akabinde Sanger dizi belirlemesi aracılığıyla doğrulanmıştır.

ÖRNEK 4 (talep edildiği üzere buluşun parçası değildir)

Suşların seçim yöntemi

10

Kemik kaybının önlenmesi için etkili suşların seçimi, değiştirilen mikrobiyal topluluklarını yenileme kabiliyetine bağlıdır. Örnekler 1 ve 2'nin sonuçlarına bağlı olarak, *L. reuteri* ATCC PTA 6475, bu suşun, değiştirilmiş mikrobiyal toplulukları yenileme kabiliyetine sahip olmasına bağlı olarak seçilir. *L. reuteri* ATCC PTA 4659, örnek 2'nin sonuçlarına bağlı olarak seçilmez.

ÖRNEK 5 (talep edildiği üzere buluşun parçası değildir)

Suşların seçim yöntemi

20

Kemik kaybının önlenmesine yönelik etkili suşların seçimi, belirli SNP'lerin varlığına bağlıdır. Örnek 3'ün sonuçlarının bir neticesi olarak, aranan dört SNP'nin tamamını barındırması nedeniyle *L. reuteri* ATCC PTA 6475 seçilir. Bu SNP'lerin eksik olması nedeniyle *L. reuteri* ATCC PTA 4659 seçilmez.

25

ÖRNEK 6 (talep edildiği üzere buluşun parçası değildir)

Suşların seçim yöntemi

30

Kemik kaybının önlenmesi için etkili olan suşların seçimi, örnek 3 ve 4 ve 5'e dayanır, dört aranan SNP'den en az birini barındıran suşların yanı sıra, değiştirilmiş mikrobiyal toplulukları yenileme kapasitesi seçilir. Bu kriterle bağlı olarak *L. reuteri* ATCC PTA 6475 seçilir.

35

ÖRNEK 7

L. reuteri ATCC PTA 6475 ovx indüklü kemik kaybını baskılar

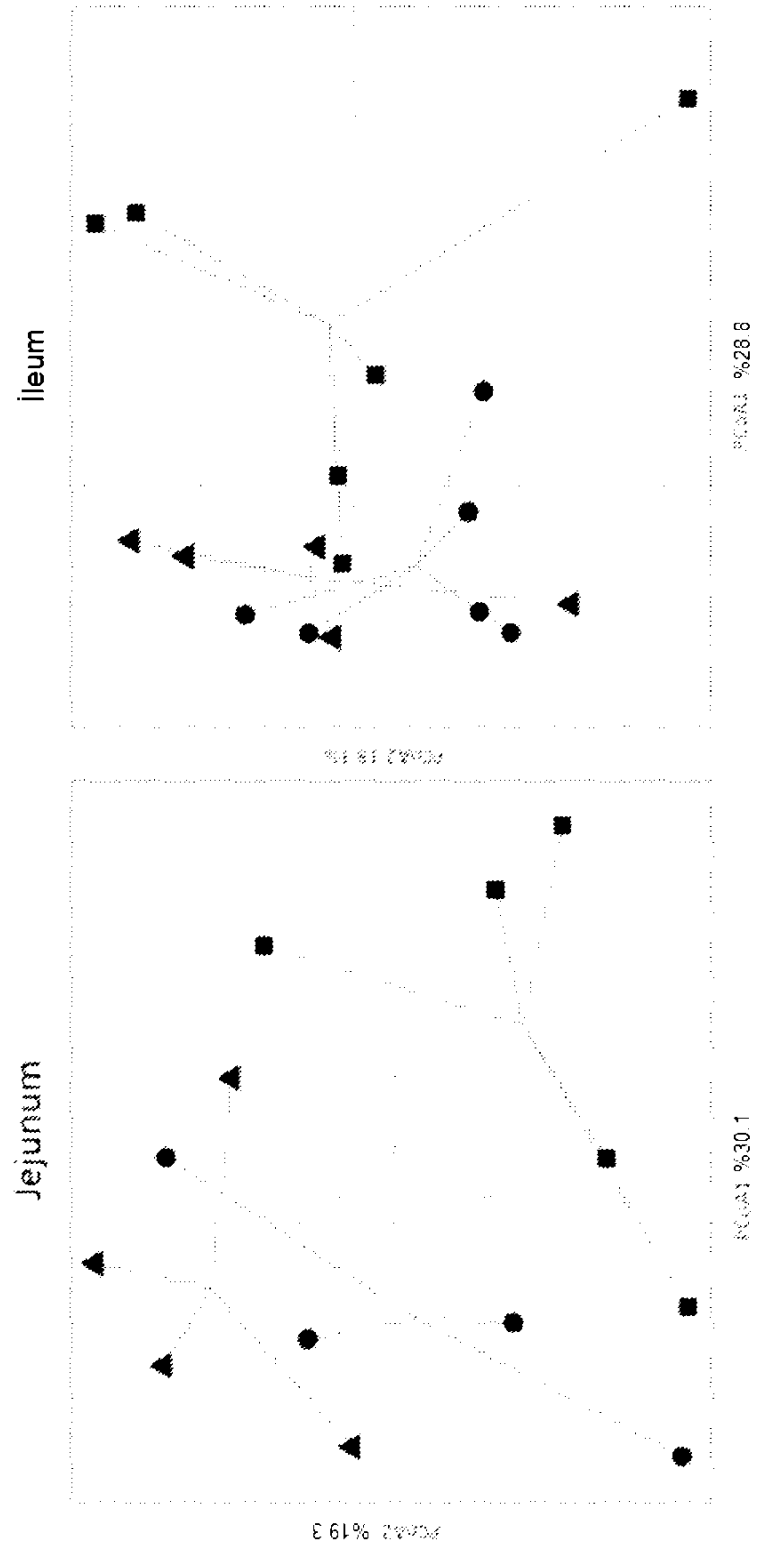
Bu çalışmada ovariektomize (ovx) BALB/c fareleri kemik kaybı için bir fare modeli olarak kullanılmıştır. Fareler (12 haftalık) ovariektomize edilmiştir ve iki gruba ayrılmıştır, birinci grup, dört hafta boyunca haftada üç kez *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile tedavi edilmiştir. Ovariektomize edilmemiş BALB/c, bir kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Distal femur kemik hacmi fraksiyonu (BV/TV) ve kemik TRAP5 RNA (HPRT'ye göre) ölçülmüştür. *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ile tedavi edilen fareler, kontrol grubu ile aynı kemik hacmi fraksiyonunu göstermiştir. Ayrıca, *L. reuteri* ATCC PTA 6475 tedavisi üzerine TRAP5'in (osteoklast fonksiyonunun bir markörü) taban çizgisine (kontrol grubu) döndüğü görülmüştür.

Şekil 2, *L. Reuteri* ATCC PTA 6475 tarafından kemik kaybının baskılanmasının neredeyse %100 olduğunu ve TRAP5 ekspresyonunun taban çizgisine geri döndüğünü gösterir.

ÖRNEK 8

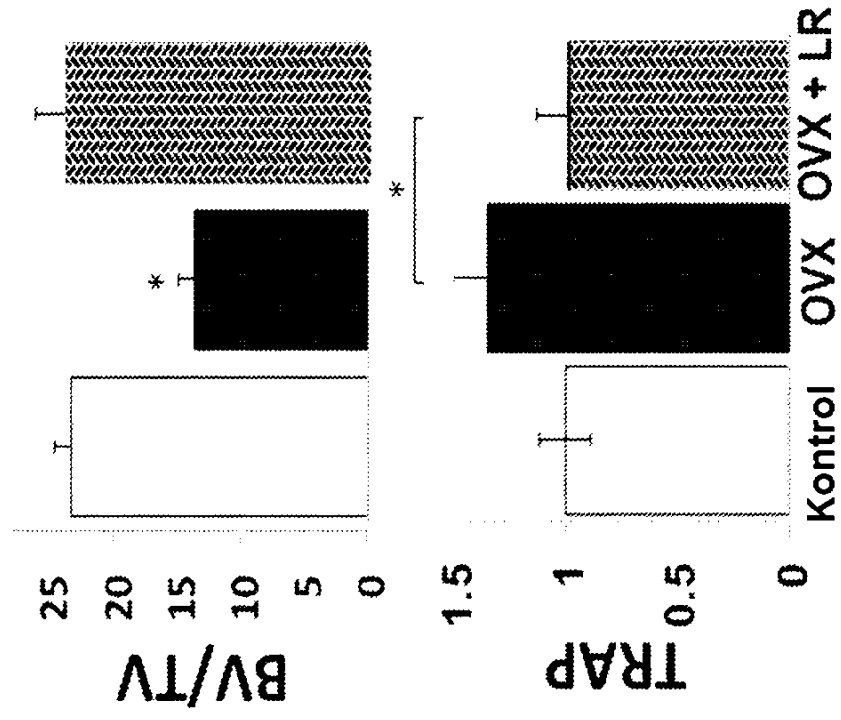
Seçilen L. reuteri ATCC PTA 6475, kemik kaybının baskılanmasında seçilmemiş L. reuteri ATCC PTA 4659'dan daha üstündür.

Bu deneyde hayvanlar, haftada üç defa *L. reuteri* ATCC PTA 6475 ve *L. reuteri* ATCC PTA 4659 suşları ile beslenirken aynı zamanda suşlar 28 gün boyunca sürekli olarak içme suyunda sağlanmıştır. Distal femur kemik hacmi fraksiyonu (BV/TV), μ CT aracılığıyla ölçülmüştür. *L. reuteri* ATCC PTA 6475, kemik kaybını baskılamıştır ve kontrol farelerinden ayırt edilememiştir (Şekil 3). *L. reuteri* ATCC PTA 4659, kemik kaybını, istatistiksel anlamlılığa ulaşan yeterli bir seviyeye indirmemiştir ($p < .01$). *L. reuteri* ATCC PTA 4659, seçilen suş *L. reuteri* ATCC PTA 6475 kadar etkili değildir.



Şekil 1

Şekil 2



Şekil 3

