

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MARCI
București

ROMÂNIA



(11) **121701 B1**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);
A61K 35/00 (2006.01);
A23L 1/29 (2006.01);
A23C 9/152 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2001 01020**

(22) Data de depozit: **02.03.2000**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.02.2008** BOPI nr. 2/2008

(30) Prioritate:
11.03.1999 EP 99104922.2

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **EP 00/01795 02.03.2000**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 00/53200 14.09.2000**

(73) Titular:
• **SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.,**
P.O.BOX 353, VEVEY, CH

(72) Inventatori:
• **NEESER JEAN-RICHARD,**
6, SENTIER DE COURTARAYE, CH-1073,
SAVIGNY, CH;

• **RENIERO ROBERTO,**
24, CHEMIN PAUDILLE, CH-1801,
LE MONT-PELERIN, CH;
• **SERVIN ALAIN, UFR DE SC. PH. PARIS**
XI, FACULTE DE PHARMACIE (DEP.
MICROB./IMMUNOL.), F-92296,
CHATENAY-MALABRY, FR

(74) Mandatar:
ROMINVENT S.A.,
STR. ERMIL PANGRATTI, NR. 35,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 0577903;
WO98/06411-A;
US 5837238

(54) **BACTERII DE LACTOBACILLUS, PENTRU PREVENIREA DIAREEI PROVOCATĂ DE BACTERII PATOGENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la noi bacterii din genul *Lactobacillus*, care sunt utile în prepararea unui suport ingerabil, pentru prevenirea diareei provocate de bacterii patogene.

Revendicări: 6
Figuri: 8

Examinator: biochimist EREMIA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 121701 B1

Prezenta invenție se referă la noi bacterii ale genului *Lactobacillus*, care sunt utile în prevenirea diareei provocate de bacterii patogene. În special, prezenta invenție se referă la utilizarea sus numitelor bacterii pentru prepararea unui suport ingerabil și a unei compoziții conținând aceleași microorganisme.

Organismele care produc acid lactic drept component metabolic major sunt cunoscute de multă vreme. Aceste bacterii pot fi găsite în lapte sau în fabricile care prelucreează laptele, în plantele vii sau putrezite, dar și în intestinul omului sau animalelor. Aceste microorganisme, cunoscute sub denumirea restrânsă de „bacterii ale acidului lactic”, reprezintă mai degrabă un grup neomogen care conține diferite genuri precum *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, etc.

Bacteriile acidului lactic au fost utilizate ca agenți de fermentare pentru conservarea hranei având avantajul unui pH scăzut și al acțiunii produșilor de fermentație generați în timpul activității fermentative ale acestora de a inhiba creșterea bacteriilor nocive. În acest scop, bacteriile acidului lactic au fost utilizate pentru prepararea de alimente diferite cum sunt brânza, iaurtul și alte produse fermentate din lapte ce se găsesc în magazinele de profil.

Foarte recent bacteriile acidului lactic au atras atenția în cel mai înalt grad prin aceea că, la anumite sușe, s-a descoperit că prezintă proprietăți prețioase pentru om și animale, în legătură cu ingerarea. În special, au fost găsite sușe specifice de *Lactobacillus* sau *Bifidobacterium* capabile să colonizeze mucoasa intestinală și să participe la menținerea stării de sănătate a omului și animalului.

În această privință, **EP 0768375** dezvăluie anumite sușe specifice din genul *Bifidobacterium*, care sunt capabile să ajungă să se implanteze în flora intestinală și să poată adera la celulele intestinale. Aceste *Bifidobacterii* sunt raportate că participă în procesul imunomodulator, fiind capabile de a exclude competitiv aderarea bacteriilor patogene la celulele intestinale, deci participă la menținerea sănătății individuale.

În timpul ultimilor câțiva ani cercetarea a fost de asemenea centrată pe folosirea bacteriilor acidului lactic ca agenți probiotici. Probioticii sunt considerați a fi preparate microbiene viabile care favorizează sănătatea individuală prin preservarea microflorei naturale din intestin. Un preparat microbial poate fi în mod obișnuit acceptat ca probiotic în cazul în care microbii eficace al acestuia și modul lor de acțiune sunt cunoscute. Probioticii sunt apreciați pentru că se atașează de mucoasa intestinală, colonizează tractul intestinal și, de asemenea, împiedică atașarea microorganismelor nocive pe acesta. O condiție prealabilă crucială pentru acțiunea lor constă în aceea că ei trebuie să atingă mucoasa intestinului într-o formă proprie și viabilă și să nu fie distruși în partea superioară a tractului gastro-intestinal, în special sub influența pH-ului scăzut ce predomină în stomac.

În legătură cu aceasta, **WO 97/00078** dezvăluie o sușe specifică, denumită *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) drept un astfel de probiotic. Microorganismul este în mod special utilizat într-o metodă de prevenire sau tratare a reacțiilor de hipersensibilitate induse de hrana în care el este administrat la un destinatar împreună cu materialul alimentar care a fost supus unui tratament de hidroliză cu pepsină sau tripsină. Sușa de *Lactobacillus* selectată este descrisă ca prezentând proprietăți de aderență și colonizare și deținând un sistem de proteaze-enzime, astfel încât materialul proteic conținut în aliment pentru a fi administrat este mai departe hidrolizat cu ajutorul proteazelor secretate de sușa specifică de *Lactobacillus*. Metoda discutată în acest document va conduce eventual la preluarea materialului proteic de către intestinul care nu mai prezintă nici o cantitate substanțială de material alergic.

Mai mult, în **EP 0577903** recomandarea este făcută pentru utilizarea unei astfel de bacterii a acidului lactic care are abilitatea de a înlocui pe *Helicobacter pylori*, cauza recunoscută a dezvoltării ulcerelor, în prepararea unui suport care să fie utilizat în viitor pentru tratamentul terapeutic sau profilactic al ulcerului asociat cu acțiunea lui *Helicobacter pylori*.

RO 121701 B1

În cunoașterea proprietăților valoroase ale sușelor speciale de bacterii ale acidului lactic se poate prevedea existența unei cerințe în domeniu pentru sușe bacteriene adiționale de acid lactic care sunt benefice pentru menținerea stării de sănătatea omului și/sau animalului.	1 3
În consecință, o problemă a prezentei invenții este aceea de a furniza sușe bacteriene adiționale care să prezinte proprietăți noi benefice pentru om sau animale. Problema de mai sus a fost rezolvată prin furnizarea de noi microorganisme, în principal bacterii ale acidului lactic, aparținând genului <i>Lactobacillus</i> având ca trăsături capacitatea de a preveni colonizarea intestinului cu bacterii patogene ce provoacă diareea.	5 7 9
Problema pe care o rezolvă invenția constă în furnizarea de noi bacterii producătoare de acid lactic aparținând genului <i>Lactobacillus</i> , capabile să prevină colonizarea intestinului cu bacterii patogene care provoacă diaree și utilizarea acestora pentru fabricarea unui compoziții alimentare sau farmaceutice ca material de suport ingerabil.	11 13
Bacteria producătoare de acid lactic aparținând genului <i>Lactobacillus</i> capabilă să prevină colonizarea intestinului cu bacterii patogene care provoacă diaree, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este reprezentată de <i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-2116, utilizată pentru fabricarea unui compoziții alimentare sau farmaceutice ca material de suport ingerabil.	15 17
În conformitate cu varianta preferată, sușele de <i>Lactobacillus</i> sunt capabile de aderare la mucoasa intestinală a mamiferelor și sunt capabile să crească în prezența a până la 0,4% săruri biliare.	19 21
În conformitate cu o altă variantă preferată, bacteria acidului lactic este selectată dintr-un grup constând din <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sau <i>Lactobacillus paracasei</i> , de preferat <i>Lactobacillus paracasei</i> și, cel mai de preferat, <i>Lactobacillus paracasei</i> CNCM I-2116.	23
S-a arătat ca microorganismele prezentei invenții etalează următoarele proprietăți: sunt gram pozitive, catalaze-negative, NH_3 din arginină negativ și producția de CO_2 negativă. Ele produc L(+) acid lactic, sunt capabile să crească în prezența sărurilor biliare într-o concentrație de până la circa 0,4% și pot preveni în mod esențial colonizarea celulelor intestinale de către bacteriile ce cauzează diareea cum sunt: <i>E. coli</i> patogenă, de exemplu <i>E. coli</i> entero-patogenă (EPEC) sau <i>Salmonella</i> , de exemplu <i>Salmonella typhimurium</i> .	25 27 29
Noile microorganisme pot fi folosite pentru prepararea unei varietăți de materiale suport ingerabile, cum ar fi de exemplu laptele, iaurtul, laptele prins, laptele fermentat, produse de fermentație pe bază de lapte, produse bazate pe cereale fermentate, pudre pe bază de lapte, formule pentru copii mici (sugari sau până la 7 ani) și pot fi incluse în suport în cantități de la circa 10^5 cfu/g până la 10^{11} cfu/g. Pentru scopul prezentei invenții prescurtarea cfu va desemna "o unitate formatoare de colonii" care este definită ca număr de celule bacteriene ce sunt găsite prin numărătoarea microbiologică a plăcilor de agar.	31 33 35 37
Prezenta invenție furnizează și compoziții alimentare sau farmaceutice conținând cel puțin una din sușele de <i>Lactobacillus</i> având caracteristicile de mai sus și/sau conținând supernatantul unei astfel de culturi, în care microorganismele au fost crescute sau a unei fracțiuni din aceasta.	39 41
Pentru prepararea unei compoziții conforme cu prezenta invenție cel puțin una din sușele de <i>Lactobacillus</i> corespunzătoare prezentei invenții este încorporată într-un suport convenabil, într-o cantitate de la circa 10^5 cfu/g la circa 10^{11} cfu/g, de preferat de la circa 10^6 cfu/g la circa 10^{10} cfu/g, cel mai preferabil de la circa 10^7 cfu/g la circa 10^9 cfu/g.	43 45
În cazul preparatului farmaceutic produsul poate fi realizat sub formă de tablete, suspensii bacteriene lichide, supliment (adaos) oral uscat, supliment oral umed, hrănire uscată prin tub sau hrănire umedă prin tub etc, în care cantitatea de sușe de <i>Lactobacillus</i> încorporată să fie în zona de până la 10^{12} cfu /g, de preferat de la circa 10^7 cfu/g la circa 10^{11} cfu/g, cel mai preferabil de la circa 10^7 cfu/g la circa 10^{10} cfu/g.	47 49

1 Activitatea noilor microorganisme în intestinul individului este în mod natural depen-
dentă de doză. Aceasta înseamnă că cu cât mai multe microorganisme noi sunt încorporate
3 pe calea ingerării materialului alimentar de mai sus sau a compoziției farmaceutice cu atât
mai mare este activitatea de protecție și/sau de vindecare a microorganismelor. Deoarece
5 noile microorganisme nu sunt dăunătoare pentru specia umană și animale, și au fost
eventual izolate din materiile fecale ale copiilor, o mare cantitate din acestea poate fi încorpo-
7 rată astfel încât în mod esențial o mare parte a intestinului individului va fi colonizată de către
noile microorganisme.

9 În afară de aceasta, în conformitate cu o altă variantă preferată, supernatantul culturii
unei sușe de *Lactobacillus* din prezenta invenție poate fi utilizat pentru prepararea unuia din
11 suporturile ingerabile descrise mai sus. Supernatantul poate fi utilizat ca atare sau poate fi
uscat în condiții care să nu distrugă compușii metabolici secretați de microorganisme în
13 mediu lichid, cum ar fi: uscarea prin înghețare și poate fi inclus în materialul transportator.
În vederea micșorării numărului de compuși necunoscuți din supernatant, sușele de
15 *Lactobacillus* vor fi crescute de preferință pe medii definite, compoziția acestora este cunos-
cută și nu afectează negativ gazda încorporată în el. Mai mult, persoanele care lucrează în
17 domeniu, bazat pe cunoștințele generale proprii, vor putea curăți opțional supernatantul de
producții nedorite, cum ar fi de exemplu cu ajutorul cromatografiei.

19 În timpul studiilor extinse care au condus la prezenta invenție, cercetătorii au inves-
tigat materiile fecale ale copiilor și au izolat o varietate de sușe bacteriene diferite din aces-
21 tea. Aceste sușe au fost ulterior examinate din punct de vedere al capacității lor de a preveni
colonizarea celulelor epiteliale cu bacterii care sunt cunoscute a fi cauza diareei.

23 Câteva genuri bacteriene cuprinzând *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* au
fost analizate pentru proprietățile lor de inhibare a diareei. Testele pentru proprietățile
25 inhibitoare au fost în mod esențial efectuate cu patogenii *E. coli* și *Salmonella typhimurium*
considerați a fi reprezentativi pentru microorganismele patogene ce provoacă diareea la un
27 individ afectat.

Diferitele bacterii ale acidului lactic au fost crescute pe medii convenabile, cum ar fi
29 MRS, Hugo-Jago sau M17 la temperaturi de la 30° la 40°C corespunzător temperaturii lor
optime de creștere. După atingerea stării de creștere staționară bacteriile au fost colectate
31 prin centrifugare și suspendate în soluție fiziologică NaCl. Între diferitele teste celulele bacte-
riene au fost conservate prin înghețare (-20°C).

33 Pentru evaluarea proprietăților anti-bacteriene au fost alese următoarele abordări.

În conformitate cu un protocol, sușele de *Lactobacillus* de cultură ale prezentei
35 invenții au fost examinate pentru capacitatea de a preveni aderarea la celulele intestinale a
bacteriilor patogene ce produc diareea sau invazia acestora în celulele intestinale. În acest
37 scop, celule intestinale au fost contaminate cu bacterii patogene și au fost evaluate sușele
de *Lactobacillus* de cultură din punct de vedere al ratei de aderare sau de invazie.

39 În conformitate cu cel de al doilea protocol, supernatantul din cultura celulară a
sușelor de *Lactobacillus* ale prezentei invenții a fost adăugat împreună cu microorganismele
41 patogene peste celulele intestinale și s-a evaluat rata de aderare sau de invazie.

Deci, a putut fi arătat că lactobaciliile de cultură și supernatantul s-au dovedit a fi
43 extrem de eficienți în prevenirea atât a aderării la, cât și a invaziei în celulele intestinale, indi-
când faptul că compușii metabolici secretați de noile microorganisme sunt probabil responsa-
45 bili de activitatea anti-diareică.

În plus față de cele menționate mai sus poate fi de asemenea arătat că, în mod sur-
47 prinzător, sușele manifestă și proprietăți anti-alergice, altfel spus, sușele au impact asupra
sintezei de diferiți mediatorii imunologici.

RO 121701 B1

În general, se recunoaște că răspunsurile imuno-umorale și reacțiile alergice sunt mediate de celulele T CD4⁺ purtătoare ale tipului de fenotip 2 (Th2). Celulele Th2 sunt caracterizate prin producerea de nivele înalte de interleukină 4 (IL-4), o citokină necesară pentru secreția de IgE, care este clasa de anticorpi majori implicați în reacțiile alergice.

Diferențierea celulelor Th2 este diminuată de IFN- γ , o citokină specială care provine din subsetul Th1 exclusiv comun al celulelor T CD4⁺. Așa numitele celule Th1 sunt una după alta puternic induse de interleukina 12 (IL-12). În contrast cu aceasta s-a demonstrat că IL-10, o altă citokină, are un impact puternic de reprimare asupra proliferării de celule Th1 și este deci desemnată să joace un rol în mecanismele imunosupresoare.

În rezumat, ambele citokine, IL-12 și IL-10, au puternice efecte modulatorie asupra dezvoltării celulelor T CD4⁺ prin influențarea dezvoltării subsetului Th1. IL-12 este o citokină reglatoare cheie pentru inducerea diferențierii Th1 și astfel inhibă generarea de răspunsuri Th2. O cale majoră de inhibare a celulelor Th2 este prin urmare văzută prin stimularea sintezei de IL-12 de către celulele accesorii.

Este bine cunoscut că unii componenți ai bacteriilor gram negative, cum ar fi LPS, induc nivele înalte de IL-12 în celulele aderente, cum ar fi macrofagele și celulele dendritice. S-a constatat, în mod consecvent, că bacteriile gram negative pot înclina puternic diferențierea celulelor T CD4⁺ spre fenotipul Th1.

Microorganismele ST11, ca exemplu de sușe de *Lactobacillus* din prezenta invenție, au fost testate pentru rolul potențial de inducere al citokinelor implicate în reglarea diferențierii celulelor T CD4⁺. În special, a fost studiat efectul ST11 asupra fenotipului celulelor T CD4⁺ ce parcurg diferențierea Th2.

În acest scop, capacitatea ST11 de a induce sinteza de mRNA codificând aceste două citokine reglatoare în celulele aderente de șoarece derivate din măduva osoasă a fost comparată cu alte 4 sușe de *Lactobacillus* și cu o bacterie gram negativă martor (*E. coli* K12). mRNA-ul a fost măsurat prin RT-PCR semi-cantitativ după 6 ore de incubare a celulelor cu diluții seriate de bacterii situate de la 10⁷ la 10⁹ cfu/ml.

Deși toate sușele de *Lactobacillus* au putut induce transcripția de mRNA IL-12 până la un anumit grad, ST 11 s-a demonstrat a fi cel mai puternic inductor, deoarece un puternic semnal PCR a putut fi detectat la cea mai scăzută doză bacteriană. De fapt, capacitatea lui ST11 de a induce transcripția de mRNA IL-12 a fost la fel de puternică ca cea de *E. coli*. Inducerea de mRNA IL-10 a fost în general mai slabă decât pentru mRNA IL-12, astfel că numai la dozele bacteriene cele mai înalte semnalul a putut fi detectat. Cu toate acestea, ST11 a fost inductorul cel mai puternic de mRNA IL-10 comparativ cu ceilalți *Lactobacilli* și cu martorul, *E. coli*.

Astfel, ST 11 este considerat a fi eficient în inducerea citokinelor imunoreglatoare implicate în diferențierea celulelor T CD4⁺. Capacitatea ei puternică de a induce IL-12 o desemnează drept candidat pentru inhibarea răspunsurilor Th2, iar inducerea moderată de IL-10 poate preveni răspunsurile inflamatorii.

În plus față de cele descrise mai sus, a fost de asemenea determinat dacă ST11 are un efect inhibitor asupra celulelor T CD4⁺ ce parcurg diferențierea Th2 și efectul pozitiv asupra funcțiilor Th1. Un sistem de cultură de celule diferențiate bine stabilit a fost utilizat, unde celule T CD4⁺ precursori au fost activate policlonal și modulate de a parcurge fiecare diferențierea spre Th1 sau Th2, dependent de tipul de co-stimuli suplimentați în mediul de cultură. Diferențierea Th1/Th2 a fost indusă în timpul celor 7 zile de cultură primară, după care celulele au fost restimulate pentru 2 zile într-o cultură secundară, conținând numai mediu de cultură, iar dobândirea fenotipului specific (Th1 sau Th2) a fost stabilită prin măsurarea tipurilor de citokine produse în supernatant (IFN- γ contra IL-4).

RO 121701 B1

Se știe că aceste celule T CD4⁺ precursorare de șoarece de origine BALB/c diferențiază preferențial spre fenotipul Th2 predominant (IL-4 ridicat, IFN-γ scăzut în supernatantul culturii secundare) după activarea în condiții neutre (mediu singur în cultura primară). Acest fenotip ar putea fi întors complet la paternul Th1 (IFN-γ ridicat, IL-4 scăzut) sub adăugarea de anticorpi monoclonali blocați la IL-4 în cultura primară.

Pentru a investiga rolul potențial al lui ST11 asupra inhibării Th2, celule precursorare T CD4⁺ de șoarece BALB/c au fost activate în prezența celulelor aderente de măduvă osoasă ca celule suplimentare în timpul primei culturi. Aceste celule au fost co-cultivate fie în mediu singur sau în prezența a 1 mg/ml LPS, sau a 10 cfu/ml ST 11, sau a 10 cfu/ml din alt *Lactobacillus*. După acest timp, celulele au fost spălate și celulelor T CD4⁺ au fost purificate încă odată și restimulate în cultura secundară pe mediu singur.

Citokinele produse prin diferențierea celulelor T CD4⁺ au fost măsurate după 2 zile. După cum era de așteptat, celulele diferențiate în prezența mediului singur au prezentat un fenotip Th2 dominant. Adăugarea de ST11 în cultura primară a modulat puternic rezultatul diferențierii Th2, conducând la o descreștere de 8 ori a producției de IL-4. Această inhibare a fost de o magnitudine similară cu cea observată în culturile derivate din celule diferențiate în prezența LPS. În contrast, o altă sușe de *Lactobacillus* n-a avut nici un impact măsurabil asupra nivelurilor de IL-4. Interesant, nivelele de IFN-γ n-au crescut după adăugarea de ST11 în cultura primară.

În rezumat, ST 11 diminuează specific producția de IL-4 prin celulele T CD4⁺ care parcurg diferențierea Th2, dar nu cresc în mod semnificativ secreția de IFN-γ. Faptul că ST 11 nu crește producția de IFN-γ poate fi datorat capacității sale de a induce IL-10 cu consecința că poate păstra un impact scăzut inflamator în ciuda activității sale anti-Th2.

În consecință, s-a putut arăta că ST 11 este o sușe de *Lactobacillus* care are un bun profil anti-Th2, ceea ce face din el un candidat excelent pentru utilizarea lui ca bacterie cu activitate probiotică, anti-alergică.

În continuare se prezintă 10 exemple de realizare a invenției în legătură cu fig.1...8, care reprezintă:

- fig. 1, o schemă ilustrând rezultatele experimentului de culturi celulare în care celulele ST 11 au fost folosite într-o încercare pentru inhibarea aderării bacteriilor *E. coli* patogene la celulele epiteliale;

- fig. 2, o schemă ilustrând rezultatele experimentului de culturi celulare în care supernatantul unei culturi de ST 11 au fost folosite într-o încercare pentru inhibarea aderării bacteriilor *E. coli* patogene la celulele epiteliale;

- fig. 3, o schemă ilustrând rezultatele experimentului de culturi celulare în care celulele unei culturi de ST 11 au fost folosite într-o încercare pentru inhibarea invaziei de *Salmonella typhimurium* în celulele epiteliale;

- fig. 4, o schemă ilustrând rezultatele experimentului de culturi celulare în care supernatantul unei culturi de ST 11 au fost folosite într-o încercare pentru inhibarea invaziei de *Salmonella typhimurium* în celulele epiteliale;

- fig. 5, acidificarea produsă de sușa *L. casei* CNCM I-2116 (denumită ST 11) pe diferite medii de creștere;

- fig. 6, rata de supraviețuire a sușei *L. casei* ST11 la 10°C măsurată pe parcursul a 30 de zile;

-fig. 7, modelul mRNA-ului pentru IL-12 și IL-10 în celule aderente de șoarece derivate din măduva osoasă după incubarea celulelor cu diluții seriate de STIL;

- fig. 8, consecința diferențierii Th2 ca rezultat al scăderii producției de IL-4.

Prezența invenției va fi acum descrisă pe calea exemplului fără a se limita la acestea.

RO 121701 B1

<i>Medii și soluții</i>	1
MRS (Difco),	
Hugo-Jago (Tryptone Difco 30 g/l, Yeast Extract Difco 10 g/l, Lactose Difco 5 g/l, KH_2PO_4 5 g/L, Beef Extract Difco 2 g/L, agar Difco 2 g/L)	3
M17 (Difco)	5
DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)	
CFA (conform lui Glosch și colab., Journal of Clinical Microbiology, 1993 <u>31</u> 2163-6)	7
Muller Hinton agar (Oxoid)	
LB (Lauria Bertami, Maniatis, A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor, 1992)	9
Antibioticele au fost obținute de la Sigma	
C^{14} -acetat (53,4 Ci/mMol, Amersham International PLC)	11
PBS (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, NaHPO_4 1,15 g/l, KH_2PO_4 0,2g/l)	
Soluție Trypsin-EDTA (Seromed)	13
FCS Fetal calf serum (Gibco)	
<i>E. coli</i> DAEC C 1845 a fost obținut de la Universitatea Washington, Seattle și <i>E. coli</i> JPN 15 a fost obținut de la Centrul pentru dezvoltarea vaccinului al Universității din Maryland, S.U.A. Sușa SL1344 de <i>Salmonella typhimurium</i> a fost obținută de la departamentul de microbiologie, Stanford University, CA, S.U.A.	15
Exemplul 1. Izolarea bacteriilor acidului lactic din materii fecale de copil mic	19
Au fost recoltate materii fecale proaspete de pe scutecele a 16 copii sănătoși, cu vârsta cuprinsă între 15 până la 27 de zile. O cantitate de 1 g din materiile fecale proaspete au fost plasate în condiții anaerobe pentru transportul la laborator și analizele microbiologice au fost făcute în 2 h de la eșantionare prin diluții seriate în soluție Ringer și etalare pe medii selective. Pentru a izola bacteriile acidului lactic a fost utilizat agar MRS plus antibiotice (fosfomicină 80 $\mu\text{g/ml}$, sulfametoxazol 93 $\mu\text{g/ml}$, trimethoprim 5 $\mu\text{g/ml}$) care a fost incubat la 37°C pentru 48 h. Coloniile au fost preluate la întâmplare și purificate. Caracterizarea fiziologică și genetică a fost efectuată pe izolate.	21
Exemplul 2. Cultivarea liniei celulare Caco-2	27
Pentru evaluarea inhibiției bacteriene (patogenă) linia celulară Caco-2 a fost utilizată ca model de intestin. Această linie celulară prezintă trăsături caracteristice de celulă intestinală cum sunt: polarizarea, expresia enzimelor intestinale, producerea de polipeptide cu o structură specială, etc.	23
Celulele au fost crescute pe trei suporturi diferite și anume plăci din plastic (Corning, de 25 cm) pentru creștere și propagare, pe plăci de sticlă de 6 well (Corning, 22 x 22 mm) degresate și sterilizate pentru testul de aderare și pe plăci de sticlă de 24 well (Corning) pentru testul de inhibare.	25
După a doua zi de cultură, mediul (DMEM) a fost schimbat zilnic. Înainte de utilizare mediul a fost suplimentat cu 100 U/ml penicilină/streptomicină, 1 $\mu\text{g/ml}$ amphotericină și 20% FCS inactivat la 56°C pentru 30 min. Cultura a fost efectuată la 37°C într-o atmosferă conținând 90% aer și 10% CO_2 . Celulele au fost desprinse la fiecare 6 zile. Celulele au fost detașate de pereții plăcilor prin tratare cu 0,25% tripsina și 3 mM EDTA în PBS la un pH de 7,2. Pentru neutralizarea efectului tripsinei un volum egal de FCS a fost adăugat la suspensia celulară obținută, amestecul a fost centrifugat (10 minute la 1000 rpm) și sedimentul a fost din nou pus în cultură. Circa $3,5 \times 10^5$ celule au fost transferate într-un nou flacon de cultură și cultivate până când un monostrat confluent a fost obținut.	29
Exemplul 3. Cultivarea bacteriilor	33
ST 11:	35
Sușa bacteriană a fost conservată la -20°C pe mediu MRS cu 15% glycerol. Sușa a fost crescută în condiții anaerobe pe mediu MRS și transferată de două ori pe medii noi la intervale de 24 h înaintea folosirii în testele de inhibare. Pentru acestea s-a utilizat o concentrație de 2×10^9 cfu/ml.	37

RO 121701 B1

Supernatantul a fost colectat prin centrifugare timp de 1 h la 20.000 rpm și produsul astfel obținut a fost ulterior verificat pentru prezența bacteriilor.

E. coli:

Două sușe de *E. coli* au fost utilizate: *E. coli* DAEC C 1845 (Diffuse Adhesion *E. coli*) și *E. coli* JPN15 (EPEC; Entero-Pathogenic *E. coli*).

Primul pasaj după dezghețare a fost efectuat pe mediu CFA - Muller Hinton agar, care este convenabil pentru realizarea expresiei factorilor de aderare ai bacteriei.

Înainte a fiecărui experiment celulele bacteriene au fost incubate la 37°C cu un transfer pe un mediu proaspăt ce s-a efectuat de două ori după 24 h fiecare. Deoarece JPN15 conține gena pentru rezistență la ampicilina, numitul antibiotic a fost folosit pentru selecție în timpul creșterii.

Salmonella:

Pentru experimente a fost utilizată sușa SL1344 de *Salmonella typhimurium*, care a fost crescută pe mediu LB înainte a folosirii.

Exemplul 4. Testarea inhibării pentru *E. coli*

După al doilea pasaj pe mediu proaspăt sușele de bacterii patogene au fost marcate cu radioizotopi folosind 10 $\mu\text{Ci/ml}$ C^{14} -acetat în mediu de cultură LB. Incubarea sușelor pe acest mediu a fost efectuată timp de 18 h la 37°C.

Suspensia bacteriană a fost ulterior centrifugată (la 1041 g, timp de 15 min) pentru a elimina supernatantul cu resturi de C^{14} -acetat. Sedimentul a fost suspendat și spălat în PBS, iar celulele au fost suspendate la o concentrație de circa 10 celule/ml în soluție de 1% manoză sterilă. Manoză este cunoscută pentru inhibarea aderării nespecifice.

Sușe bacteriene patogene diferite (*E. coli*) au fost puse în contact cu monostratul de celule Caco-2 (37°C, 10% CO_2 , aer 90%) pentru 3 h. Aceleași experimente au fost efectuate folosind supernatantul (obținut prin centrifugare la 27.000 rpm, timp de 40 min).

Drept martor s-au folosit bacterii patogene care au fost puse în contact cu monostratul de celule Caco-2 fără adăugare paralel de ST 11 sau de supernatantul respectivei culturi.

După 3 h de incubare mediu a fost schimbat și monostratul de celule a fost spălat de trei ori cu PBS. Fiecare pas de spălare a inclus un număr de 20 de rotiri ale soluției PBS astfel încât să se elimine în mod esențial tot ce reprezintă aderare nespecifică. Celulele au fost lizate după aceea prin adăugarea de 1 ml carbonat de sodiu și incubare timp de 40 min la 37°C. După omogenizare aliquot-ul (o cantitate mică de probă, de 250 μl) a fost diluat în 5 ml fluid de scintilație (Hionic-fluor Packcard) și supus numărătorii (Packard 2000) Procentajul de aderare al celulelor patogene la celulele Caco-2 a fost calculat în raport cu controlul, care a fost stabilit la 100% (aderare; sau invazie în cazul exemplului 5).

Exemplul 5. Test de inhibare pentru *Salmonella*

Salmonellele sunt bacterii care invadează celulele epiteliale și se multiplică în ele. Pentru determinarea activității de inhibare a ST 11, sușa SL1344 de *Salmonella typhimurium* a fost incubată după descrierea de mai sus pe mediu conținând ^{14}C -acetat și s-a procedat în continuare conform experimentului descris în exemplul 4.

După incubare, celulele Caco-2 au fost spălate cu PBS pentru eliminarea tuturor celulelor ne-aderente. Pe urmă s-a adăugat mediu conținând gentamicină (20 $\mu\text{g/ml}$) și incubarea a fost continuată timp de 1 h la 37°C. Gentamicină este un antibiotic care nu penetrează celulele intestinale astfel că toate microorganismele extracelulare au fost omorâte, în timp ce *Salmonella* care a invadat celulele intestinale va supraviețui. După spălarea celulelor de două ori cu PBS, celulele au fost lizate prin adăugare de apă distilată sterilă și radioactivitatea a fost măsurată conform descrierii din exemplul 4.

RO 121701 B1

Rezultatele experimentelor 4 și 5 sunt prezentate în fig. de la 1 la 4. Se poate vedea că celulele ST 11 din cultură și supernatantul culturii au fost extrem de eficiente în prevenirea aderării la celulele intestinale și a invaziei în celulele intestinale de către microorganismele patogene care cauzează diareea.

Exemplul 6. Proprietățile sușei ST 11

Sușa ST 11 a fost supusă incubăției în suc gastric simulat. Sucul gastric simulat a fost preparat prin suspendarea de pepsină (3 g/l) în soluție salină sterilă (0,5 % g/v) și ajustat la un pH de 2,0 și, respectiv, un pH de 3,0 cu HCl concentrat. Sușa ST 11 a fost crescută în cantități variate pe mediile de mai sus și s-a determinat rezistența microorganismelor.

Rezultatele sunt rezumate în tabelul de mai jos.

pH	cfu/ml la T = 0	cfu la T=1 min	cfu la T=15 min	cfu la T=30 min	cfu la 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	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$8,4 \times 10^8$

Sușa ST 11 are următoarele proprietăți așa cum sunt ele definite conform cu metodele dezvoltate în „Genurile de bacterii ale acidului lactic”, Ed. B.J.B. Wood and W.H. Holzappel, Blackie A&P.

- gram pozitivă,
- catalază negativă,
- NH_3 din arginină negativă,
- producția de CO_2 negativă,
- producere de L (+) acid lactic,
- creștere în prezență de săruri biliare în concentrații de până la 0,4%.

Exemplul 7. Creșterea sușei ST 11 în condiții diferite

ST 11 a fost incubat la 37°C pe mediu de cultură pe bază de roșii (pudră de roșii 4% rehidratată cu apă distilată) suplimentat cu zaharoză (0; 0,5; 1 sau 2%) sau peptonă soia (0,5%) sau glucoză (0,5%) pentru diferite perioade de timp. Rezultatele sunt prezentate în fig. 5.

Mai departe, ST 11 a fost adăugat într-o cantitate de 2,5% unui mediu compus din făină de orez (3%), făină de grâu (2%) și zaharoză (3%) și incubat la 37°C până ce s-a atins un pH de 4,4. După răcire produsul a fost împachetat cu sau fără adaus de vitamina C și depozitat la 10°C.

Fig. 5 prezintă date privind supraviețuirea sușei ST 11 la 10°C într-o băutură pe bază de cereale, ambalată în diferite materiale plastice (HDPE = polietilenă de înaltă densitate, PS = polistiren).

Exemplul 8. Inducerea sintezei de mARN IL-12 și IL-10 în celulele aderente de șoarece de către ST 11

Celule de măduvă osoasă au fost izolate din femur și tibie de șoarece în vârstă de 8 săptămâni C57BL/6 liber de patogen specific și incubate la o concentrație de 2×10^6 pe mediu RPMI (Gibco) conținând ser fetal de bovine 10%, L-Glutamină 1mM, Hepes 12 mM, 2-mercaptoethanol 0,05 mM, penicilină 100 U/ml și streptomycină 100 μg/ml (toți reactivii sunt Gibco) timp de 12 h la 37°C în atmosferă de CO_2 5%. Celulele ne-aderente au fost îndepărtate prin trei spălări consecutive cu mediu de cultură cald și celulele aderente rămase au fost recoltate și incubate la o concentrație de 10^6 celule/ml timp de 6 h în prezența sau absența bacteriei. S-a determinat anterior că perioada de 6 h reprezintă timpul optim de sinteză al mARN citokinei de către celulele aderente de șoarece ca răspuns la LPS. Bacteriile au fost adăugate în diferite concentrații situate între 10 până la 10 cfu/ml. Bacteriile au fost crescute și păstrate după indicațiile de mai sus (pagina 7).

RO 121701 B1

La sfârșitul perioadei de cultură de 6 h, celulele au fost izolate prin centrifugare și lizate folosind kitul de reactivi TRIzol (GibcoBRL, Nr. Cat. 15596-018) și instrucțiunile de utilizare. ARN-ul total a fost izolat prin precipitare cu izopropanol și revers transcris în cADN timp de 90 min la 42°C folosind revers transcriptază 200 U (Superscript II, BRL) într-un volum de reacție de 40 μ l conținând Tris 200 mM la un pH de 8,3, KCl 25 mM, 1 μ M/ml oligo d(T)₁₅ (Boehringer Mannheim), 1 mM DDT (Boehringer Mannheim), 4 mM din fiecare dNTP (Boehringer Mannheim) și 40 U/ml. Rnasin (Promega). Primerii PCR și condițiile folosite au fost cele descrise de Kopf și colaboratorii (*Journal of Experimental Medicine* 1996, sept.1; 184(3):1127-36). Cantitățile de cADN au fost normalizate în interiorul probelor folosind primeri specifici pentru gena house-keeping (β -2-microglobulin). Producții PCR au fost separate pe gel de agaroză 2% și benzile au fost analizate la UV.

Așa cum este arătat în fig. 7, ST 11 manifestă cea mai puternică inducere de mRNA IL-12 și IL-10, care a fost comparabilă cu nivelele observate la martorul pozitiv (*E.coli*). Diferențele sunt văzute cel mai bine la concentrațiile bacteriene cele mai scăzute (10⁷ cfu/ml).

Exemplul 9. Represia sintezei de IL-4 de către ST 11

Celule T CD4⁺ au fost purificate din splină de șoarece BALB/c liber de patogen specific folosind kitul MiniMACS de la Miltenyi Biotec (Nr. Cat. 492-01). Celulele T CD4⁺ au fost cultivate la o concentrație de 2x10⁵ celule/ml pe mediu RPMI conținând ser fetal de bovine 10%, L-Glutamină 1mM, Hepes 12 mM, 2-mercaptoethanol 0,05 mM, penicilină 100 U/ml și streptomycină 100 μ g/ml și activate timp de o săptămână prin lincare-încrucișată (cross-linking) cu anticorpi monoclonali plate-bound la CD3 (clona 2C11) și CD28 (clona 37.51), ambii anticorpi de la Pharmingen). În timpul acestei prime cultivări, celulele T CD4⁺ au fost co-cultivate împreună cu celule aderente de măduvă osoasă (izolate după cum s-a descris mai sus) drept celule accesorii și cu 10 cfu/ml ST 11, sau 10 cfu/ml Lai, sau 1 mg/ml LPS sau mediu simplu. După acest timp, celulele au fost spălate și celulele T CD4⁺ au fost purificate încă o dată folosind tehnologia kitului MiniMACS și restimulate în cultura secundară care conținea doar mediu singur. Citokinele produse de celulele T CD4⁺ diferențiate au fost măsurate în supernatant după 2 zile folosind tehnica ELISA intercalată (sandwich) (kituri de la Endogen și Pharmingen).

Rezultatele sunt prezentate în fig. 5. Celulele diferențiate în prezența mediului singur au etalat un fenotip Th2 dominant caracterizat prin nivele înalte de IL-4. Adăosul de ST 11 la culturile primare a modulat rezultatul diferențierii Th2, care s-a soldat cu o descreștere de 8 ori a producției de IL-4. Această inhibare a avut o magnitudine similară cu cea observată în culturile derivate din celule diferențiate în prezența LPS-ului. În contrast cu aceasta, cealaltă sușe de *Lactobacillus* nu au avut impact măsurabil asupra nivelelor de IL-4. Interesant, nivelele de IFN- γ nu au crescut după adăosul de ST 11 în culturile primare.

Așa cum putem vedea din cele prezentate mai sus, sușele prezentei invenții pot fi bine preparate pentru producția de căraș alimentară și/sau farmaceutic având avantajul proprietăților valoroase ale microorganismelor.

Exemplul 10. Sușa ST 11 a fost testată într-o clinică experimentală pe o comunitate din suburbiile City-ului din Guatemala cu privire la abilitatea de a influența transmisia și experiența bolii diareice acute din sezonul ploios trăită de cei mai mulți copii din această zonă. Un total de 203 copii, în vârstă de 35 până la 70 de luni au fost cuprinși în studiu și au primit o doză țintă de 10¹⁰ microorganisme viabile (ST 11) sau n-au primit nimic (placebo) pe o perioadă de alimentare de 29 de zile. Copii selectați atât pentru probe cât și pentru placebo aveau deficite tipice în greutatea și înălțimea caracteristică vârstei datorită subnutriției.

RO 121701 B1

Înainte de inițierea experimentului de hrănire al copiilor preșcolari, o evaluare de siguranță a fost efectuată bazată pe studii *in vitro* și *in vivo*. Studiile *in vitro* au arătat un model de rezistență la antibiotice similar cu cel al altor *Lactobacillus* folosiți în aplicațiile alimentare și lipsa unui potențial de formare a aminelor biogene, pentru degradarea mucin-ului și de-conjugarea sărurilor biliare. În studiul placebo controlat clinic în care au fost implicați 42 de voluntari adulți, ST 11 a fost bine tolerat și nu a indus nici un efect advers, printre manifestările potențiale monitorizate au fost balonarea, numărul de scaune per zi și consistența scaunului; nivelele de proteine din faza acută în ser nu a atins nimic legat de o reacție potențial inflamatoare.

Produsele mostre și placebo au fost ambalate în pungi după tehnologia produselor Nestle beneficiind de facilitățile de fabricație ale centrului din Konolfingen, Elveția și transportate cu vaporul în condiții de refrigerare în Guatemala. Fiecare pungă de 10 g a conținut dintr-un vehicul cu aromă de ciocolată și fiecare a avut 0,2 g de ST 11 (10^{10} cfu) sau, în cazul probelor placebo, 0,2 g de lapte praf. Vehiculul cu aromă de ciocolată a conținut din pudră de cacao, zahăr, lecitină soia, vanilie și scorțișoară. Pungile au fost depozitate de la 4 la 6°C până cu două ore înainte de a fi folosite. Înainte de folosire punga trebuia să fie dizolvată în 100 ml de apă furnizată de Nestle, care nu prezenta contaminare bacteriană.

În conformitate cu protocolul aplicat, diareea a fost definită drept producerea de trei sau mai multe evacuări fecale lichide sau fără formă pe durata a 24 h. Un episod diareic a fost definit ca un eveniment care prezintă dovada diareei (3 evacuări diareice în 24 h). Durata totală în ore a fost calculată de la momentul primului scaun din cele 3 menționate până la apariția primului scaun format sau a unei perioade de 24 h fără defecație. Pentru ca un copil să aibă un „nou” episod înseamnă 48 h care s-au scurs de la terminarea episodului anterior. Dacă nu, se consideră o continuare a aceluiași episod și durata totală a fost apoi utilizată pentru evaluare. Un caz considerat era cu al unui copil care avusese experiența unuia sau a mai multor episoade documentate de diaree de-a lungul perioadei de 29 de zile de observație. Intensitatea unui episod diareic a fost bazată pe numărul total de scaune proaste produse. Elementele de severitate ale episodului sunt date de prezența sângelui, mucus sau puroi din scaune, alături de simptome de febră și vomă. O intensitate de 7 scaune în 24 h sau necesitatea unei intervenții de către personalul medical într-o clinică, centru de sănătate sau spital este de asemenea clasificat drept un episod sever.

Când un episod diareic a fost diagnosticat prin sistemul de supraveghere, o probă de scaun diareic a fost colectată pentru examinare microscopică și cultură pentru a identifica potențialul agent etiologic pentru acel episod. Proba a fost diagnosticată pentru antigen rotaviral, *Giardia* și *E.histolytica* în caz de dizenterie și pentru patogeni bacterieni incluzând *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides*, *E. coli* și, posibil, *V. cholerae*.

În timpul perioadei de investigare mostre de produs au fost colectate pentru a examina viabilitatea microorganismelor incluse pe timpul perioadei de administrare. S-a demonstrat astfel că microorganismele au rămas viabile în pungi pe întreaga perioadă de timp studiată, iar la sfârșitul studiului pungile erau capabile să poarte 10^{10} microorganisme viabile după rehidratarea cu apă.

Studiul relevă că mostrele conținând microorganisme probiotice au putut descrește evenimentele diareice în contrast cu grupul de control (placebo) cu aproape 30%. În afară de aceasta, însuși grupul de control a prezentat deja o descreștere a numărului de evenimente diareice față de populația normală care nu a primit nici mostre și nici placebo. Ultima constatare poate fi explicată pe baza faptului că acești copii au primit o nutriție suplimentară valoroasă și apă ne contaminată. Oricum, deoarece studiul a fost efectuat pe o comunitate poate fi în mod clar constatat că ST 11 poate cu siguranță reduce producerea diareei *in vivo*.

RO 121701 B1

Revendicări

1

3

1. Bacterie producătoare de acid lactic aparținând genului *Lactobacillus*, capabilă să prevină colonizarea intestinului cu bacterii patogene care provoacă diaree, **caracterizată prin aceea că** este reprezentată de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116.

5

7

2. Utilizarea bacteriei definite în revendicarea 1 pentru fabricarea unei compoziții alimentare sau farmaceutice, ca material de suport ingerabil.

9

3. Utilizare în conformitate cu revendicarea 2, **caracterizată prin aceea că** tulpina de *Lactobacillus* este conținută în materialul de suport într-o cantitate cuprinsă între aproximativ 10^5 cfu/g și aproximativ 10^{12} cfu/g material de suport.

11

4. Utilizarea unui supernatant sau a unei culturi de tulpină de *Lactobacillus* definită în revendicarea 1 pentru fabricarea unui material de suport ingerabil.

13

5. Utilizare în conformitate cu oricare dintre revendicările 1 și 3, **caracterizată prin aceea că**, compoziția farmaceutică se administrează în tratamentul și/sau profilaxia tulburărilor însoțite de diaree.

15

17

6. Utilizare în conformitate cu oricare dintre revendicările 2 și 3, **caracterizată prin aceea că**, compoziția alimentară este selectată dintre lapte, iaurt, lapte prins, brânză, lapte fermentat, produse lactate fermentate, înghețată, produse fermentate pe bază de cereale, pudre pe bază de lapte, formule pentru sugari, tablete, suspensii bacteriene lichide, supliment oral uscat, supliment oral umed, produs uscat pentru alimentație prin sondă, produs umed pentru alimentație prin sondă.

21

RO 121701 B1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);
A61K 35/00 (2006.01);
A23L 1/29 (2006.01);
A23C 9/152 (2006.01)

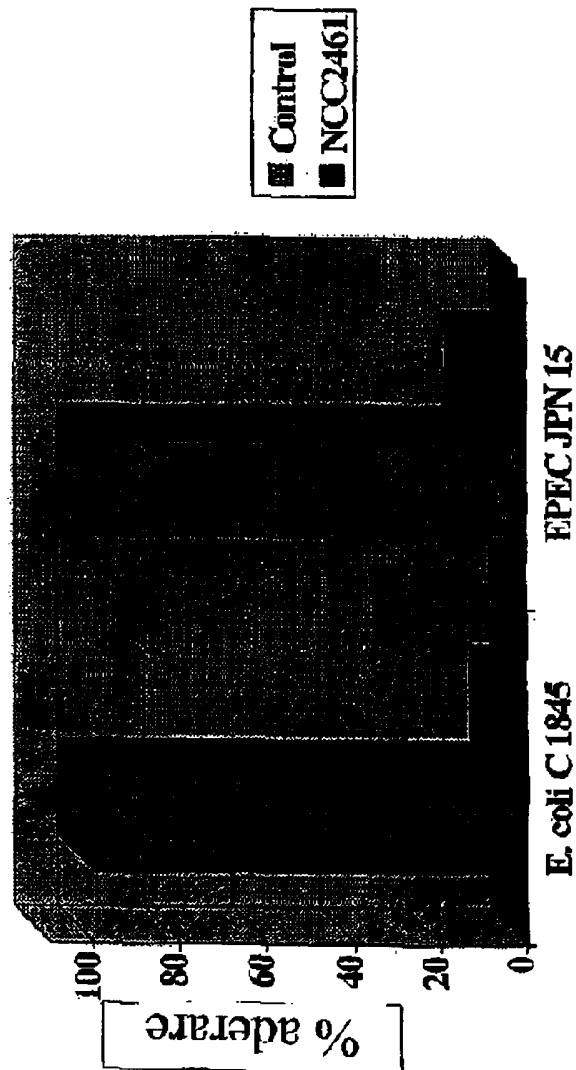


Fig. 1

RO 121701 B1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

A61K 35/00 (2006.01);

A23L 1/29 (2006.01);

A23C 9/152 (2006.01)

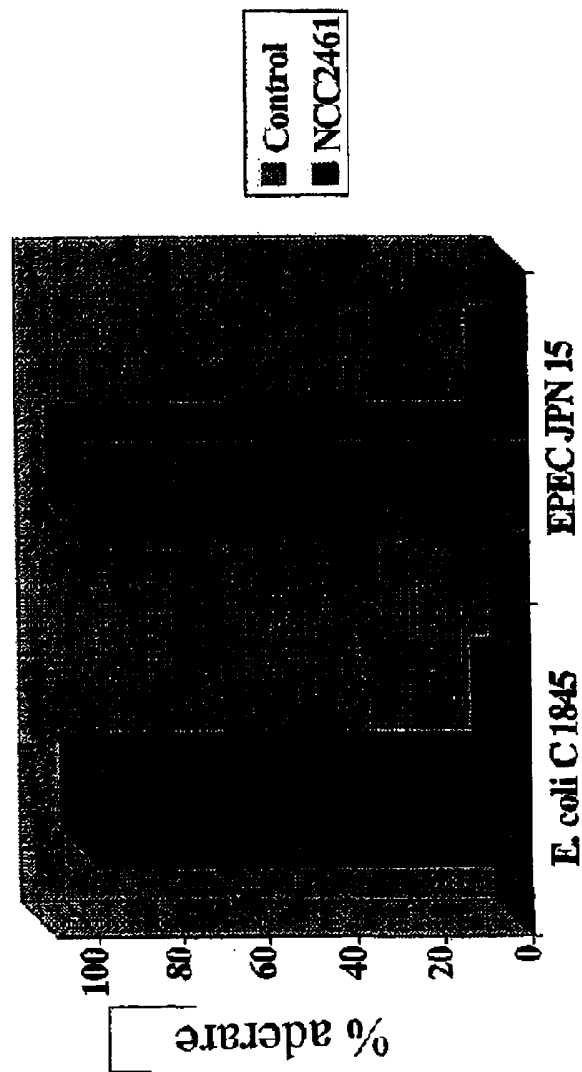


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

A61K 35/00 (2006.01);

A23L 1/29 (2006.01);

A23C 9/152 (2006.01)

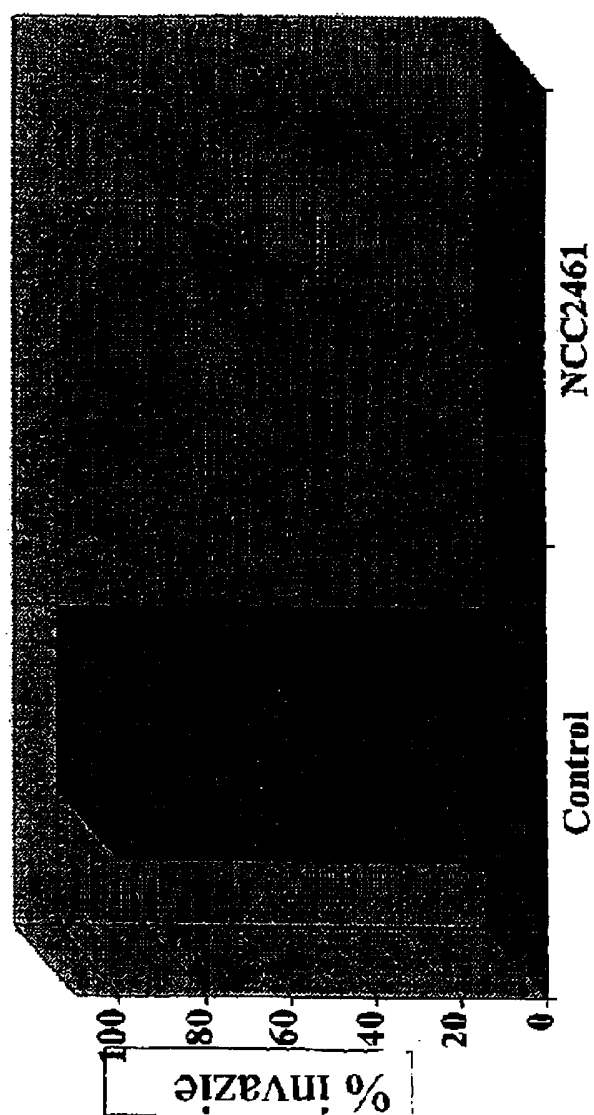


Fig. 3

RO 121701 B1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

A61K 35/00 (2006.01);

A23L 1/29 (2006.01);

A23C 9/152 (2006.01)

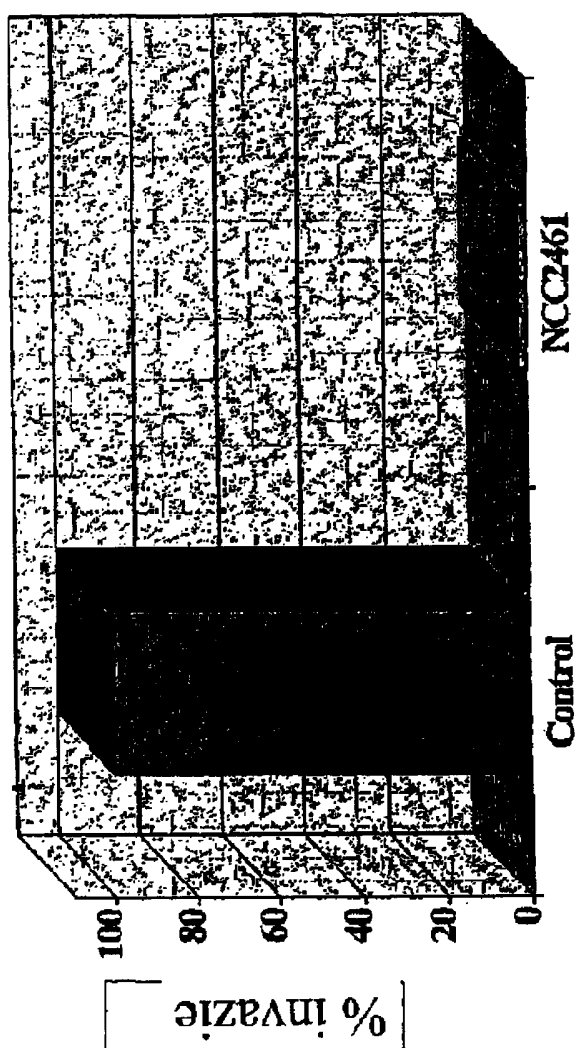


Fig. 4

RO 121701 B1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);
A61K 35/00 (2006.01);
A23L 1/29 (2006.01);
A23C 9/152 (2006.01)

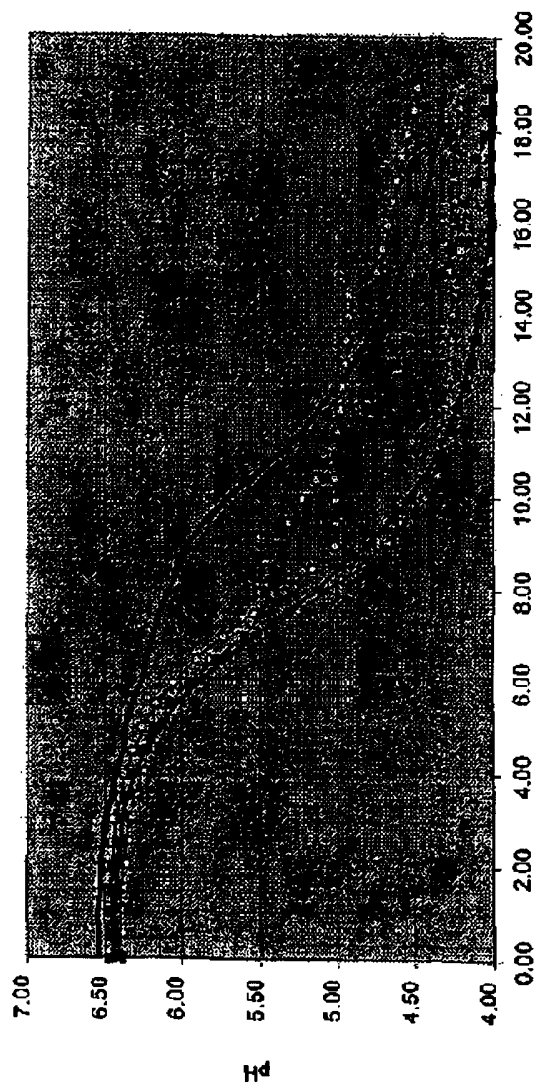


Fig. 5

RO 121701 B1

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

A61K 35/00 (2006.01);

A23L 1/29 (2006.01);

A23C 9/152 (2006.01)

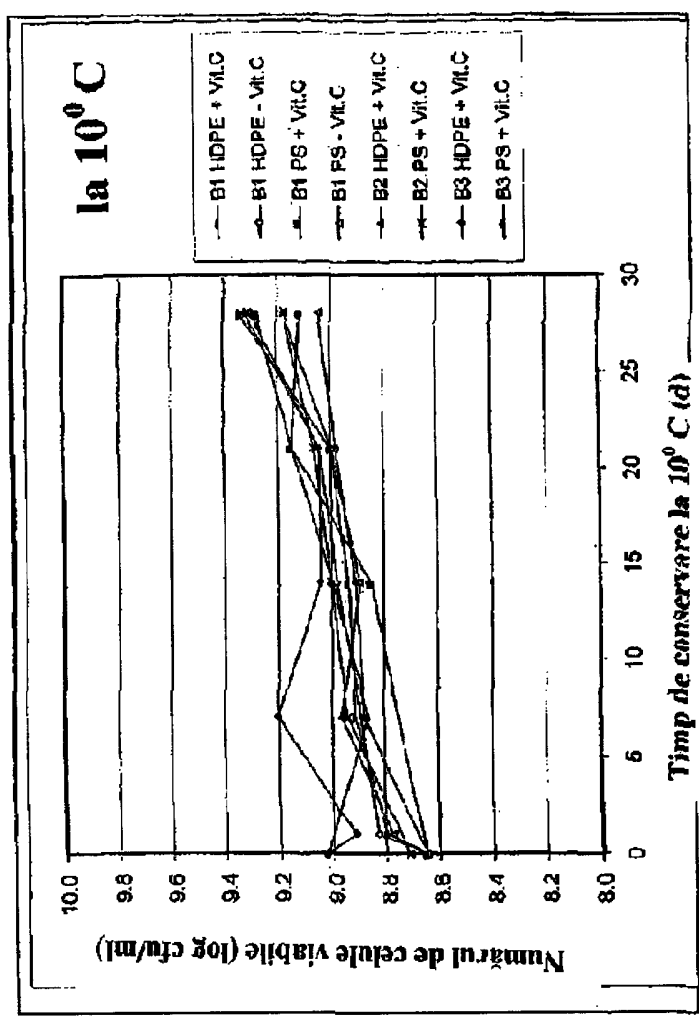


Fig. 6

(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01);
A61K 35/00 (2006.01);
A23L 1/29 (2006.01);
A23C 9/152 (2006.01)

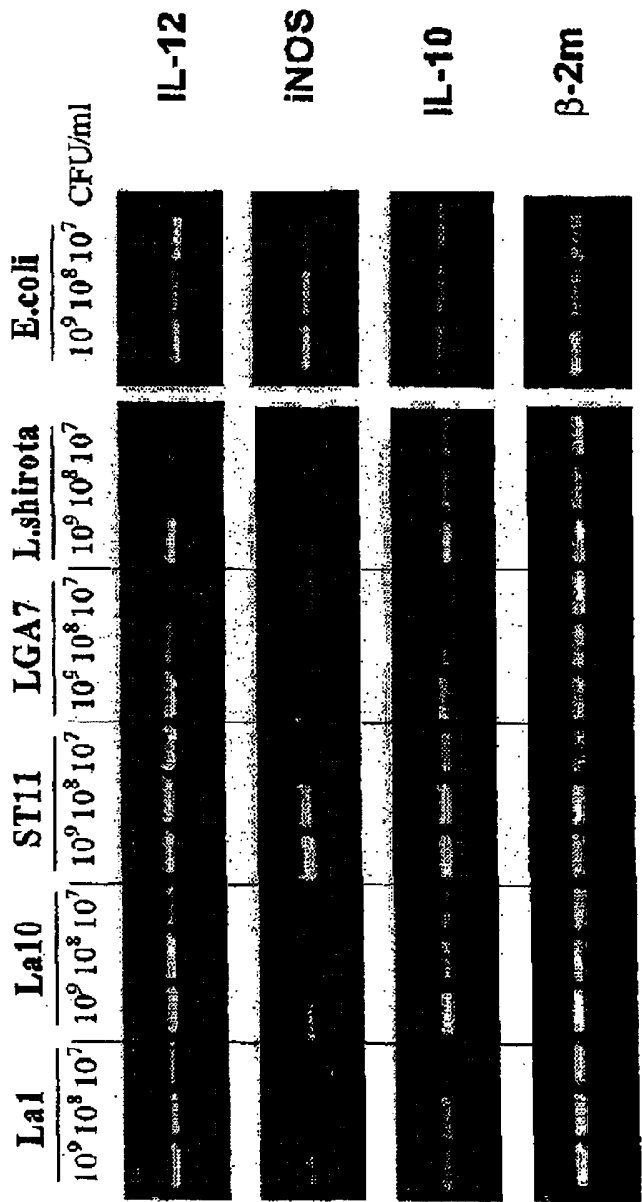


Fig. 7

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01);

A61K 35/00 (2006.01);

A23L 1/29 (2006.01);

A23C 9/152 (2006.01)

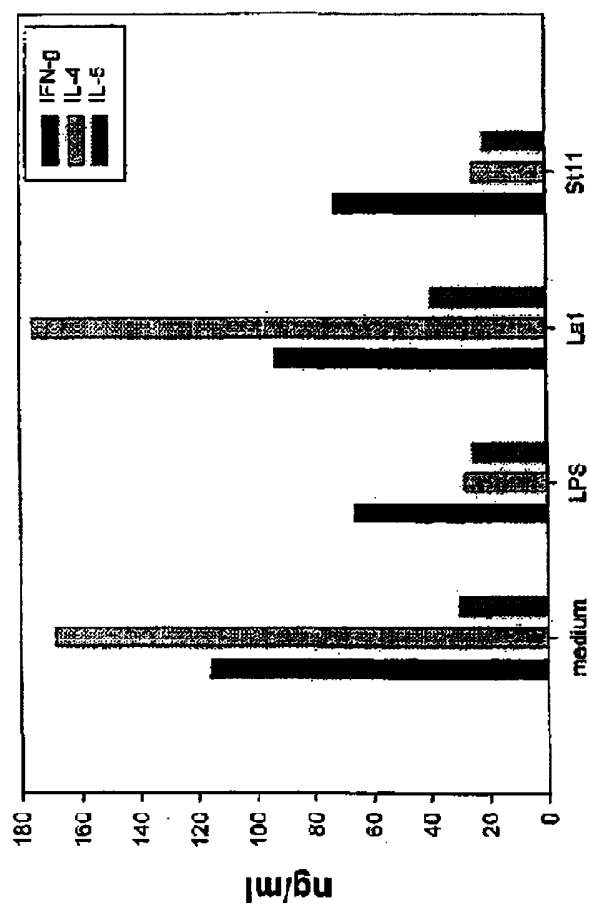


Fig. 8



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci