



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 35 670 T2 2008.04.30

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 143 985 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 35 670.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/IE00/00007

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 900 788.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/041707

(86) PCT-Anmeldetag: 17.01.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 20.07.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 17.10.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.07.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 30.04.2008

(51) Int Cl.⁸: A61K 35/74 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

990033 15.01.1999 IE

990782 20.09.1999 IE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Enterprise Ireland (trading as Bioresearch
Ireland), Dublin, IE; University College
Cork-National University of Ireland, Cork, Cork, IE

(72) Erfinder:

COLLINS, John Kevin, Doughcloyne, County
Cork, IE; O'SULLIVAN, Gerald Christopher,
Bishopstown, Cork, IE; O'MAHONY, Liam,
Ballintemple, Cork, IE; SHANAHAN, Fergus,
Kinsale, County Cork, IE

(74) Vertreter:

Mitscherlich & Partner, Patent- und
Rechtsanwälte, 80331 München

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON LACTOBACILLUS SALIVARIUS

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

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

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Stämmen von *Lactobacillus salivarius*.

[0002] Die Abwehrmechanismen, um den menschlichen Gastrointestinal-Trakt vor der Kolonisierung durch intestinale Bakterien zu schützen, sind hoch komplex und involvieren sowohl immunologische als auch nicht-immunologische Aspekte (V. J. McCracken und H. R. Gaskins, „Probiotics a critical review", Horizon Scientific Press, UK, 1999, Seite 278). Angeborene Abwehrmechanismen umfassen den niedrigen pH des Magens, Gallensalze, Peristaltik, Muzinschichten und anti-mikrobielle Verbindungen, wie beispielsweise Lysozym (D. C. Savage, „Microbial Ecology of the Gut", Academic Press, London, 1997, Seite 278). Immunologische Mechanismen umfassen spezialisierte lymphoide Aggregate, zu Grunde liegende M-Zellen, genannt Payers Patches, die über den Dünndarm und den Dickdarm verteilt sind (M. F. Kagnoff. Gastroenterol. 1993, 105, 1275). Luminale Antigene, die an diesen Stellen vorhanden sind, resultieren in der Stimulation geeigneter T- und B-Zellsubpopulationen mit der Einrichtung zytokeriner Vernetzungen und der Absonderung von Antikörpern in den gastrointestinalen Trakt (M. R. Neutra und J-P Kraehenbuhl, „Essentials of mucosal immunology", Academic Press, San Diego, 1996, Seite 29., M. E. Lamm. Ann. Rev. Microbiol. 1997, 51, 311). Zusätzlich kann die Antigen-Vorlegung über Epithelzellen zu den Intra-Epithel-Lymphozyten und zu den zu Grunde liegenden Lamina propria Immunzellen erfolgen (S. Raychaudhuri et al. Nat Biotechnol., 1998, 16, 1025). Daher investiert der Wirt wesentlich in die Immunabwehr des Gastrointestinal-Trakts. Da jedoch die gastrointestinale Schleimhaut die größte Oberfläche ist, über die der Wirt mit der äußeren Umwelt interagiert, müssen besondere Kontrollmechanismen vorhanden sein, um die Immunempfindlichkeit gegenüber den 100 Tonnen an Nahrungsmitteln zu regulieren, die durch den gastrointestinalen Trakt über eine durchschnittliche Lebenszeit bewältigt werden (F. Shanahan, „Physiology of the gastrointestinal tract", Raven Press, 1994, Seite 643.). Ferner wird der Darm durch über 500 Bakterienarten besiedelt, wobei 10^{11} – 10^{12} /g in dem Dickdarm beziffert werden. Daher müssen diese Kontrollmechanismen fähig sein, die nicht-pathogenen verbundenen Bakterien von invasiven Pathogenen zu unterscheiden, die dem Wirt erheblichen Schaden zufügen können. Tatsächlich trägt die intestinale Flora zur Abwehr des Wirtes bei, indem sie mit neu aufgenommenen, potentiell pathogenen Mikroorganismen konkurriert.

[0003] Der Konsum von nicht-pathogenen, oder probiotischen Bakterien, hat eine Steigerung der Immunparameter bei gesunden Freiwilligen ergeben. Beispiele dieser immunregulierenden Effekte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Immunsteigernde Effekte nach oralem Konsum von probiotischen Bakterien.

Beobachteter Effekt	Referenz
Erhöhte Makrophagen Phagozytose	10
Erhöhte natürliche Killerzellenaktivität	11
Erhöhte IFNy Serumwerte	12
Erhöhte B-Zell- und NK-Zell-Anzahlen	12
Förderung der IgA-Antworten	11, 13–15
Erhöhte DTH Antworten	16

[0004] Bakterien, die im menschlichen gastrointestinalen Trakt anwesend sind, können Entzündung begünstigen. Anomale Immunantworten auf die eigene lokale Mikroflora wurden in Zusammenhang mit bestimmten Krankheitszuständen gebracht, wie z. B. entzündliche Darmerkrankungen (Brandzeag P. et al. Springer Semin. Immunopathol., 1997, 18, 555). Antigene, die mit der normalen Flora zusammenhängen, führen für gewöhnlich zu immunologischer Toleranz und ein Defekt, diese Toleranz zu erreichen, ist ein Hauptmechanismus für Schleimhautentzündung (Stallmach A. et al., Immunol. Today, 1998, 19, 438). Nachweise für diesen Zusammenbruch der Toleranz umfassen ein Ansteigen der Antikörperwerte, die gegen die Darmflora bei Patienten mit IBD gerichtet sind.

[0005] Die WO-A-98/35014 beschreibt Stämme von *Lactobacillus salivarius*, die aus einem resezierten und gewaschenen menschlichen Gastrointestinal-Trakt isoliert wurden, der ein breites Spektrum an Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen inhibiert und der ein Produkt mit antimikrobieller Aktivität in einen zellfreien Überstand sekretiert.

Beschreibung der Erfindung

[0006] Das Immunsystem ist ausgelegt, um das Wirtsgewebe zu verteidigen und eindringende Pathogene zu

zerstören. Nachdem die Anwesenheit einer bakteriellen Zelle erkannt ist, werden die Zellen des Immunsystems aktiviert und eliminieren die bakterielle Bedrohung. Die Produktion von Entzündungsmediatoren fördert die zelluläre Aktivierung und die Zerstörung der Pathogene.

[0007] Überraschenderweise haben wir entdeckt, dass Stämme von *Lactobacillus salivarius* einen anti-entzündlichen Effekt *in vitro* und *in vivo* auslösen. Wir haben entdeckt, dass die Immunwahrnehmung von *Lactobacillus salivarius* zu der Unterdrückung von entzündlicher Aktivität führt. Der bewusste Konsum großer Mengen von *Lactobacillus salivarius* resultiert in der Unterdrückung von entzündlicher Aktivität. Die Erfindung ist daher von bedeutendem potenziellem therapeutischem Wert bei der Prophylaxe oder der Behandlung unerwünschter entzündlicher Reaktionen, wie beispielsweise entzündlicher Darmerkrankungen.

[0008] *Lactobacillus salivarius* ist ein symbiotischer Mikroorganismus, der ursprünglich aus der mikrobiellen Flora innerhalb des menschlichen Gastrointestinal-Trakts isoliert wurde. Das Immunsystem in dem Gastrointestinal-Trakt kann keine ausgeprägte Reaktion auf Bestandteile dieser Flora haben, da die resultierende entzündliche Aktivität auch Wirtszellen und Gewebefunktion zerstören würde. Daher existiert ein Mechanismus (einige Mechanismen), womit das Immunsystem symbiotische nicht-pathogene Bestandteile der gastrointestinale Flora im Gegensatz zu pathogenen Organismen erkennen kann. Dies stellt sicher, dass Schaden an Wirtsgeweben beschränkt wird und eine Abwehrsperrre weiter beibehalten bleibt.

[0009] Gemäß der Erfindung wird die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* menschlicher Herkunft bei der Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe und/oder Behandlung unerwünschter entzündlicher Aktivität zur Verfügung gestellt.

[0010] Gemäß der Erfindung kann die unerwünschte entzündliche Aktivität eine unerwünschte gastrointestinale entzündliche Aktivität sein, beispielsweise eine entzündliche Darmerkrankung, z. B. Morbus Crohn, eitrige Dickdarmentzündung, Reizdarmsyndrom, Pouchitis oder eine postinfektiöse Dickdarmentzündung.

[0011] Die entzündliche Aktivität kann auf Grund von gastrointestinalem Krebs oder einer systemischen entzündlichen Erkrankung, beispielsweise rheumatische Arthritis, auftreten.

[0012] In einem Fall ist die unerwünschte entzündliche Aktivität auf eine Autoimmunerkrankung zurückzuführen.

[0013] In noch einem anderen Fall kann die unerwünschte entzündliche Aktivität auf Krebs zurückzuführen sein.

[0014] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* in der Herstellung eines Medikaments für die Krebsprophylaxe zur Verfügung.

[0015] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* zur Verfügung, wobei der *Lactobacillus salivarius* in einer Formulierung enthalten ist.

[0016] Vorzugsweise umfasst die Formulierung ein weiteres probiotisches Material. Alternativ oder zusätzlich schließt die Formulierung ein prebiotisches Material ein.

[0017] Idealerweise umfasst die Formulierung einen aufnehmbaren Träger. Der aufnehmbare Träger kann ein pharmazeutisch verträglicher Träger sein, wie z. B. eine Tablette, eine Kapsel oder ein Pulver.

[0018] Vorzugsweise ist der einnehmbare Träger ein Protein und/oder ein Peptid, insbesondere Proteine und/oder Peptide, die reich an Glutamin/Glutamat; einem Lipid; einem Kohlendhydrat; einem Vitamin; einem Mineral und/oder einem Spurenelement sind.

[0019] Am stärksten bevorzugt ist der aufnehmbare Träger ein Lebensmittelprodukt, wie z. B. gesäuerte Milch, Joghurt, gefrorener Joghurt, Milchpulver, Milchkonzentrat, Streichkäse, Dressings oder Getränke.

[0020] In einer Ausführungsform ist der *Lactobacillus salivarius* bei mehr als 10^6 KBE pro Gramm, bezogen auf das Abgabesystem anwesend.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform schließt die Formulierung ein Hilfsmittel ein. Die Formulierung kann eine bakterielle Komponente umfassen. Die Formulierung kann alternativ oder zusätzlich eine Arzneimittlein-

heit umfassen. Die Formulierung kann auch eine biologische Verbindung einschließen.

[0022] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* bei der Herstellung eines Medikaments zur Verfügung, wobei der Stamm oder die Formulierung zur Verabreichung an Tiere bestimmt ist. Vorzugsweise ist das Tier ein Säugetier, am stärksten bevorzugt ein Mensch.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* zur Verfügung, wobei der *Lactobacillus salivarius* Veränderungen in einem immunologischen Marker bewirkt, wenn er in ein System eingeführt wird, das Zellen umfasst, die mit dem Immunsystem interagieren, und Zellen des Immunsystems.

[0024] Vorzugsweise sind die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, Epithelzellen. Am stärksten bevorzugt stellt der immunologische Marker ein Zytokin dar, insbesondere TNF α .

[0025] Vorzugsweise sind die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, und die Zellen des Immunsystems von übereinstimmender Herkunft.

[0026] In einer Ausführungsform sind die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, von gastrointestinaler, respiratorischer oder genitourinärer Herkunft.

[0027] In einer anderen Ausführungsform sind die Zellen des Immunsystems von gastrointestinaler, respiratorischer oder genitourinärer Herkunft.

[0028] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Stamms von *Lactobacillus salivarius* zur Verfügung, wobei der *Lactobacillus salivarius*-Stamm *Lactobacillus salivarius* der Subspezies *salivarius* ist. Vorzugsweise kommt der *Lactobacillus salivarius* aus dem resezierten und gewaschenen humangen Gastrointestinal-Trakt.

[0029] Vorzugsweise inhibiert der *Lactobacillus salivarius* ein breites Spektrum Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen. Am stärksten bevorzugt sekretiert er ein Produkt mit antimikrobieller Aktivität in einen zellfreien Überstand, wobei die genannte Aktivität nur von wachsenden Zellen produziert und von Proteinase K und Pronase E zerstört wird.

[0030] Ein besonders bevorzugter Stamm von *Lactobacillus salivarius* ist der *Lactobacillus salivarius*-Stamm UCC 118 oder ein Mutant oder Variante davon.

[0031] Eine Hinterlegung von *Lactobacillus salivarius*-Stamm UCC 118 wurde bei der NCIMB am 27. November 1996 gemacht, und es wurde die Zugangsnummer NCIMB 40829 erteilt. Der Stamm des *Lactobacillus salivarius* ist in der WO-A-98/35014 beschrieben.

[0032] Der *Lactobacillus salivarius* ist ein genetisch modifizierter Mutant oder er kann eine natürlich vorkommende Variante von *Lactobacillus salivarius* sein.

[0033] Vorzugsweise liegt der *Lactobacillus salivarius* in der Form von lebensfähigen Zellen vor. Alternativ kann der *Lactobacillus salivarius* in der Form von nicht lebensfähigen Zellen vorliegen.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0034] [Fig. 1](#) ist eine Graphik des *C. perfringens* Pegels in den Mäusen, die UCC 118 konsumieren, verglichen mit einer Placebogruppe ($p<0,05$). Die Ergebnisse sind als die gemittelten log-Werte \pm Standardfehler für jede Gruppe aufgetragen.

[0035] [Fig. 2](#) ist ein Säulendiagramm der Entzündungswerte für Mäuse, die UCC 118 konsumieren, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Die Resultate sind als das Mittel \pm Standardfehler für jede Gruppe aufgeführt.

[0036] [Fig. 3](#) ist eine Graphik der TNF α Werte über sechs Wochen, während die Patienten UCC 118 konsumieren. Die Ergebnisse sind als der gemittelte pg/ml TNF α Werte über jeden Zeitpunkt ($n=22$) aufgetragen.

[0037] [Fig. 4](#) ist eine Graphik der CDAI Werte für Patienten, die UCC 118 im Verlauf der probiotischen Zuführung konsumieren. Die CDAI Werte verringern sich von durchschnittlich 180 auf 160.

[0038] [Fig. 5](#) ist eine Graphik der Zytokinproduktion in vitro nach Aufnahme von UCC 118, die Ergebnisse sind in pg/ml ausgedrückt.

[0039] [Fig. 6](#) ist ein Säulendiagramm der extrazellulären TNF α , IL-1RA, IL-6, sIL-6R und IFN α Werte nach Aufnahme von Lactobacillus salivarius UCC 118.

[0040] [Fig. 7](#) ist eine Gen-Matrix mit spezifischen Gensequenzen für 268 Zytokine und in Beziehung stehenden Molekülen, um die Immunantwort auf UCC 118 zu untersuchen. Die untere Tafel stellt die Kontrollkultur dar, während die obere Tafel die Zytokingenexpression durch PBMCs nach Aufnahme von UCC 118 darstellt; und

[0041] [Fig. 8](#) ist ein Säulendiagramm der TNF α Werte in Anwesenheit von verschiedenen bakteriellen Stämmen.

Detaillierte Beschreibung

[0042] Wir haben Kriterien für die in vitro Selektion von probiotischen Bakterien entwickelt, die bestimmte in vivo Effekte auf ihre Wirte reflektieren, wie z. B. die Modulation der GIT Mikroflora und die Modulation der mukosalen Immunantwort, die zu der Produktion von sekretorischen Antikörpern führen, die spezifisch für den konsumierten Stamm sind. Wir haben entdeckt, dass Lactobacillus salivarius der Subspezies salivarius UCC 118 nicht nur die Passage durch den Gastrointestinal-Trakt überlebt und an humanen intestinalen Zellwänden anhaftet, sondern auch überraschenderweise entzündungshemmende Effekte besitzt.

[0043] Die übliche Verwendung von probiotischen Bakterien ist in der Form von lebensfähigen Zellen. Sie kann jedoch auch auf nicht lebensfähige Zellen ausgedehnt werden, wie z. B. abgetötete Kulturen oder Zusammensetzungen, die nützliche Faktoren enthalten, die durch die probiotischen Bakterien exprimiert wurden. Dies könnte thermisch getötete Mikroorganismen oder Mikroorganismen umfassen, die getötet wurden, indem sie einem geänderten pH ausgesetzt oder durch Druck beansprucht wurden. Mit nicht lebensfähigen Zellen ist die Produktherstellung einfacher, die Zellen können leicht in Arzneimittel eingearbeitet werden, und die Anforderungen an die Lagerung sind viel weniger beschränkt als bei lebensfähigen Zellen. Lactobacillus casei YIT 9018 bietet ein Beispiel der wirksamen Verwendung von durch Wärme getöteten Zellen als ein Verfahren zur Behandlung und/oder Verhinderung des Tumorwachstums, wie in US-Patent Nr. US4347240 beschrieben.

[0044] Es ist unbekannt, ob intakte Bakterien erforderlich sind, um einen entzündungshemmenden Effekt auszuüben, oder ob individuelle aktive Komponenten der Erfindung allein verwendet werden können. Entzündungsfördernde Komponenten von bestimmten bakteriellen Stämmen wurden identifiziert. Die entzündungsfördernden Effekte von Gram-negativen Bakterien werden durch Lipopolysaccharid (LPS) vermittelt. LPS allein induziert eine entzündungsfördernde Vernetzung, teilweise auf Grund dessen, dass sich LPS an den CD 14 Rezeptor auf Monozyten bindet. Es wird angenommen, dass Komponenten von probiotischen Bakterien wegen der Effekte der gesamten Zelle entzündungshemmende Aktivität besitzen. Nach Isolierung dieser Komponenten wird die Verarbeitung zu Arzneimittelqualität erwartet.

[0045] Die Erfindung wird aus den folgenden Beispielen klarer verständlich.

Beispiel 1:

Detaillierte Beschreibung der in vivo Darstellung der entzündungshemmenden Effekte von Lactobacillus salivarius insbesondere salivarius UCC 118.

Mausmodell der gastrointestinalen Entzündung

[0046] Anomale Immunantworten auf die indigene Mikroflora wurden mit bestimmten Krankheitszuständen impliziert, wie beispielsweise eine entzündliche Darmerkrankung (Brandzeag P., et al. Springer Semin. Immunopathol., 1997, 18, 555). Antigene, die mit der normalen Flora zusammenhängen, führen für gewöhnlich zu immunologischer Toleranz, und ein Defekt, diese Toleranz zu erreichen, ist ein Hauptmechanismus für eine Schleimhautentzündung (Stallmach A., et al. Immunol. Today, 1998, 19, 438). Nachweise für diese Toleranzstörung umfassen ein Ansteigen der Antikörperwerte, die gegen die Darmflora bei Patienten mit IBD gerichtet sind. Zusätzlich bleiben bestimmte Mausmodelle, denen zuvor eine entzündliche Verletzung in dem Gastrointestinal-Trakt zugefügt wurde, krankheitsfrei, wenn sie unter keimfreien Bedingungen untergebracht sind oder wenn sie mit Antibiotika behandelt werden (Kuhn R., et al. Cell, 1993, 75, 263, Panwala C.M., et al. J. Immunol.,

1998, 161, 5733).

[0047] C57BL/6 Interleukin-10 Knockout-Mäuse sind prädisponiert, in Anwesenheit einer enterischen bakteriellen Flora eine Enterocolitis zu entwickeln. Wenn sie unter keimfreien Bedingungen gehalten werden, entwickeln IL-10 Knockout-Mäuse keine Erkrankung (Kuhn R., et al. Cell, 1993, 75, 263). Da die Pathogenese dieser Erkrankung mit der enterischen Flora verbunden wurde, kann die Eliminierung von spezifischen Komponenten dieser Flora eine vorteilhafte Wirkung auf die Schwere dieser Erkrankung haben.

[0048] *Lactobacillus salivarius* supsp. *Salivarius* UCC 118 ist ein probiotisches Bakterium, das aus einem gesunden menschlichen Ileum isoliert wurde. Es ist für die gastrointestinale Besiedelung geeignet, da es viele Kriterien erfüllt, die für die Auswahl von probiotischen Stämmen festgelegt wurden. Diese umfassen Merkmale wie z. B. Gallentoleranz, Säurenresistenz und in vitro Anhaftung an menschliche Darmzellwände. Es wurden Einnahmetests bei gesunden Menschen durchgeführt, und eine beträchtliche Modifizierung der gastrointestinale Flora wurde beobachtet. Zusätzlich wurde UCC 118 durch das mukosale Immunsystem aufgenommen, was zur Produktion und Sekretion von UCC 118 spezifischen IgA führte.

[0049] Somit überlebt UCC 118 die Passage durch den Gastrointestinal-Trakt, moduliert die Darmflora und wird durch das mukosale Immunsystem aufgenommen. Der Einfluss dieses probiotischen Bakteriums bei der Modulation der Entzündungsreaktionen innerhalb des Gastrointestinal-Trakts wurde unter Verwendung eines Mausmodells mit Enterocolitis untersucht. Zusätzlich erforschten wir die Rolle von *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC 118 bei der Verringerung der Rate von neoplastischer Veränderung innerhalb des Gastrointestinal-Trakts.

[0050] Zwanzig IL-10 KO-Mäuse wurden 16 Wochen lang untersucht (zehn konsumierten probiotische Organismen in Milch, und 10 konsumierten unmodifizierte Milch). Es wurde wöchentlich eine fäkale mikrobielle Analyse durchgeführt, um die Ausscheidung von *Lactobacilli*, *Clostridium perfringens*, Bakteroiden, Koliformen, Bifidobakterien und Enterokokken auszuzählen. Bei der Opferung wurden Dünn- und Dickdarm mikrobiologisch und histologisch beurteilt.

[0051] Bei den Testtieren waren fäkale Coliformen- und Enterokokken-Werte deutlich reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. Bei der Opferung wurde eine bedeutende Reduzierung der *C. perfringens* Anzahlen bei den Testmäusen beobachtet ([Fig. 1](#)). In der Testgruppe gab es keine Todesfälle, verglichen mit zwei Toten durch heftige Colitis in der Kontrollgruppe. Lediglich eine Testmaus entwickelte ein Darm-Adenokarzinom, verglichen mit fünf in der Kontrollgruppe. Die Schleimhautentzündung der Testtiere erreichte durchweg ein geringeres Ausmaß als die der Kontrollmäuse ([Fig. 2](#)). Die Verringerung der Tumorhäufigkeit nach Konsum von UCC 118 kann mit dem verringerten Entzündungsgrad innerhalb des Gastrointestinal-Trakts zusammen hängen oder auf die Eliminierung von krebsfördernden Elementen der gastrointestinalen Flora zurückgeführt werden (Rumney C.J., et al. Carcinogenesis, 1993, 14, 79; Rowland I.R (1995). In: Gibson G.R. (ed). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, Seiten 155–174. Boca Raton CRC Press; Darveau D. Nat. Biotech., 1999, 17, 19).

[0052] Zusammenfassend resultiert der Konsum von *Lactobacillus salivarius* UCC 118 in einer bedeutenden Modulation der Darmflora und einer Verbesserung der Sterblichkeitsrate, Krebshäufigkeit und Krankenstand.

Beispiel 2:

Humantest mit UCC 118 bei Patienten mit aktivem Morbus Crohn.

[0053] Die entzündliche Darmerkrankung (IBD) umfasst eine Anzahl von entzündlichen Störungen des Gastrointestinal-Trakts, einschließlich sowohl des Morbus Crohn als auch der eitrigen Colitis.

[0054] Patienten, die an aktivem Morbus Crohn leiden, wurden mit UCC 118 behandelt. Kurz, UCC 118 wurde in einem fermentierten Milchprodukt sechs Wochen lang von 22 Patienten konsumiert. Mikrobiologische und immunologische Bestimmungen wurden nach Woche 0, Woche 1, Woche 3 und Woche 6 durchgeführt. Dies war kein placebokontrollierter Versuch.

[0055] Eine Anzahl von systemischen Zytokin-Pegeln wurde im Verlauf der Einnahme gemessen. Insbesondere der Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), einem entzündungsfördernden Zytokin, das in Zusammenhang mit der Pathogenese von vielen entzündlichen Krankheitszuständen, einschließlich entzündlicher Darmerkrankungen, gebracht wurde. Derzeitige Therapien für entzündliche Darmerkrankungen zielen besonders darauf hin,

die TNF α Werte zu reduzieren (Present D.H., et al. New Eng. J. Med., 1999, 340, 1398). Bei diesem Versuch reduzierten sich die systemischen TNF α Werte nach dem Konsum von UCC 118 ([Fig. 3](#)).

[0056] Zusätzlich wurden die Patienten bezüglich ihres Morbus Crohn-Aktivitätsindex (CDAI) im Verlauf der sechs Wochen langen Testperiode beurteilt. Dieser Index bewertet die allgemeine Gesundheit und das Wohlbefinden jedes Patienten ([Fig. 4](#)). Insgesamt verbesserte sich der Krankheitsaktivitätsindex leicht für die Mehrheit der Personen in dem Versuch. Dies sind Patienten mit gemäßigt aktiver Erkrankung, und es würde erwartet, dass ihre CDAI-Werte steigen. Nach der Behandlung mit UCC 118 jedoch stiegen die CDAI-Werte nicht an, sondern verbesserten sich tatsächlich von durchschnittlich 180 auf 160.

Beispiel 3: Detaillierte Beschreibung der in vitro Darstellung der Mechanismen, die den entzündungshemmenden Effekten von *Lactobacillus salivarius* insbesondere subspezies *salivarius* UCC 118 zu Grunde liegen.

[0057] Eine Anzahl von Methoden wurden für diese Studien verwendet, einschließlich ELISAs (extrazelluläre Proteinbestimmung), Durchflusszytometrie (intrazelluläre Proteinbestimmung) und cDNA Expressions-Matrizen (mRNA Expression). Insbesondere wurde die Untersuchung der Expression des Tumor Nekrose Faktors α als Ziel gesetzt auf Grund seiner klinischen Bedeutung, und die Unterdrückung der Produktion dieses Zytokins wurde auf die Einwirkung von UCC 118 hin unter Verwendung aller drei Methoden beobachtet.

[0058] Unter Verwendung eines Transwell-Assay-Systems mit Epithelzellen und peripheren mononuklearen Blutzellen wurden die extrazellulären Zytokinwerte durch ELISAs bestimmt. Nach der Co-Inkubation mit UCC 118 war die hergestellte Menge TNF α bedeutend verringert im Vergleich zu Kontrollkulturen. Darüber hinaus sanken die IL-1RA und IFN γ Werte, während die IL-6 und die löslichen IL-6 Rezeptorwerte stiegen ([Fig. 5](#)). Das intrazelluläre Einfärben für TNF α bestätigte die ELISAs Ergebnisse, da die TNF α Werte in der UCC 118 stimulierten Probe verglichen mit den Kontrollen geringer waren.

[0059] [Fig. 6](#) stellt die trizelluläre Anzeige dar, die auftritt. Die Co-Inkubation von PBMCs und *Lactobacillus salivarius*-Stamm UCC 118 resultiert in der Stimulation der TNF α Produktion. Hingegen resultiert die Co-Inkubation von PBMCs, *Lactobacillus salivarius*-Stamm UCC 118 und Epithelzellen (CaCo-2 Zellen) in einer bedeutenden Hemmung der TNF α Produktion. Somit liegt ein wesentlich unterschiedliches Anzeigmuster bei dem trizellulären Modell vor, verglichen mit Bakterien und PBMCs allein.

[0060] Gen-Matrizen erfassen die Menge von mRNA in einer Zellpopulation. Wir stimulierten die peripheren mononuklearen Blutzellen mit UCC 118 24 Stunden lang, und wir untersuchten den Effekt auf die Zytokingenexpression ([Fig. 7](#)). Es wurde eine beträchtliche Modifikation der Zytokingenexpression beobachtet. Es wurden z. B. Gene, die die entzündungsfördernden Zytokine IL-1 β und TNF α kodieren, abgeschaltet, während Gene, die die Th2-Typ Zytokine kodieren, beispielsweise IL-6, angereichert wurden.

[0061] In vitro Modelle haben gezeigt, dass UCC 118 fähig ist, Th2-Typ Zytokine (d. h. IL-6 und IL-6 löslicher Rezeptor) zu erzeugen, während die Produktion von entzündungsfördernden Zytokinen, wie z. B. TNF α und IL-1 β unterdrückt wird. Somit legen diese Ergebnisse nahe, dass der Konsum von UCC 118 vorteilhaft für Patienten wäre, die an entzündlichen Erkrankungen leiden, wie beispielsweise IBD.

Beispiel 4: Test für entzündungshemmende bakterielle Stämme

[0062] Eine Anzahl von Milchsäurebakterien, die aus dem menschlichen Gastrointestinal-Trakt isoliert wurden, wurde mit diesem neuartigen Matrix-System auf entzündungshemmenden Effekt untersucht. Alle Bakterienstämme wurden aus Glyzerin-Mischung bei -20 °C genommen und anaerob über Nacht in MRS Nährlösung inkubiert und in Antibiotika enthaltenden Medium gewaschen. Einlagige Epithelzellschichten wurden sechs Wochen lang wachsen gelassen, bevor PBMCs und bakterielle Zellen zugegeben wurden.

[0063] Die Ergebnisse dieser Stimulierung können in [Fig. 8](#) beobachtet werden. In Bezug auf die Kontrollkulturen unterdrückten zwei Bakterienstämme die TNF α Produktion. Die zwei Stämme *Lactobacillus salivarius*-Stamm UCC 118, der die Produktion von TNF α unterdrückt, sind der Gegenstand der WO-A-9835014. Der *Bifidobacterium longum* *infantis*-Stamm UCC 35624 ist der Gegenstand einer PCT Anmeldung, die gleichzeitig mit der vorliegenden Anmeldung eingereicht ist.

Entzündung

[0064] Entzündung ist die Bezeichnung, die verwendet wird, um die lokale Akkumulation von Flüssigkeit,

Plasmaproteinen und weißen Blutzellen an einer Stelle zu beschreiben, die einen physischen Schaden, eine Infektion erlitten hat oder wo eine permanente Immunreaktion auftritt. Die Kontrolle der Entzündungsreaktion kann durch eine Anzahl von Pegeln ausgeübt werden (zur Rückschau siehe Henderson B. und Wilson M. 1998. In „Bacteria-Cytokine interactions in health and disease. Portland Press, 79–130).

[0065] Die Kontrollfaktoren umfassen Zytokine, Hormone (z. B. Hydrokortison), Prostaglandine, reaktive Intermediate und Leukotrine. Zytokine sind biologisch aktive Proteine mit geringem Molekulargewicht, die bei der Erzeugung und Kontrolle von Immun- und Entzündungsreaktionen involviert sind, während sie auch die Entwicklung, Gewebereparatur und die Hämatopoese regulieren. Sie bilden ein Kommunikationsmittel zwischen Leukozyten untereinander und auch mit anderen Zelltypen. Die meisten Zytokine sind pleiotropisch und exprimieren mehrere biologisch überschneidende Aktivitäten. Zytokinkaskaden und Vernetzungen kontrollieren die Entzündungsreaktion eher als die Wirkung eines besonderen Zytokins auf einen besonderen Zelltyp (Array Ki, et al., Annu Rev Biochem 1990; 59:783–836). Ein Abnehmen der Entzündungsreaktionen resultiert in geringeren Konzentrationen der entsprechenden Aktivierungssignale und anderer Entzündungsmediatoren, was zu der Beendigung der Entzündungsreaktion führt. TNF α ist ein entscheidendes entzündungsförderndes Zytokin, da es eine Kaskade von Zytokinen und biologischen Effekten initiiert, die in den Entzündungszustand resultieren. Daher werden gegenwärtig Wirkstoffe, die TNF α inhibieren, bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen verwendet, z. B. Infliximab (Handelsmarke).

[0066] Man glaubt, dass entzündungsfördernde Zytokine eine Hauptrolle bei der Pathogenese vieler entzündlicher Erkrankungen spielen, einschließlich entzündlicher Darmerkrankungen (IBD). Aktuelle Therapien zur Behandlung von IBD haben als Ziel, die Werte dieser entzündungsfördernden Zytokine, einschließlich IL-8 und TNF α zu senken. Solche Therapien können auch eine wichtige Rolle bei der Behandlung von systemischen entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis, spielen.

[0067] In Anbetracht der entzündungshemmenden Eigenschaften von *Lactobacillus salivarius*, die wir entdeckt haben, können diese Stämme potenziell Anwendung bei der Behandlung eines Bereiches von entzündlichen Erkrankungen finden, insbesondere falls sie in Kombination mit anderen entzündungshemmenden Therapien verwendet werden, wie zum Beispiel nicht steroide entzündungshemmende Medikamente (NSAIDs) oder Infliximab (Handelsmarke).

Auto-Immunerkrankung

[0068] Das Immunsystem weist ein großes Repertoire von Spezifikationen auf, die durch B- und T-Zellen exprimiert werden. Einige dieser Spezifikationen werden auf körpereigene Komponenten gerichtet. Die Eigenerkennung wird normalerweise durch klonale Deletion und durch Inaktivierung der eigenreaktiven Lymphozyten kontrolliert. Es besteht jedoch ein konstanter Hintergrund von Autoimmunität mit Antikörpern auf viele Proteine, die im Serum gefunden werden. Ein Versagen in dem Selbst-Nichtselbst-Erkennungssystem resultiert in Auto-Immunität. Wenn Auto-Immunerkrankungen auftreten, schädigt die resultierende Immunabwehr das Gewebe, das das angreifende Antigen trägt. Immunkomplex-Deposition, Typ II Hypersensitivität und Zell-vermittelte Reaktionen sind die wichtigsten Mechanismen, durch die immunpathologischer Schaden auftritt. Beispiele von Auto-Immunerkrankungen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, systemischen Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, insulinabhängiger Diabetes mellitus, Myasthenia gravis und perniziöse Anämie. Wir haben entdeckt, dass *Lactobacillus salivarius* ein immunmodulatorisches Bakterium ist. Somit kann der Konsum von entweder als einzelner Komponente oder in Kombination mit anderen Bakterien durch Patienten, die an einer Auto-Immunerkrankung leiden, Organschaden verhindern und helfen, die normale Homeostase des Körpers wieder herzustellen.

Entzündung und Krebs

[0069] Die Produktion von multifunktionellen Zytokinen über ein breites Spektrum von Tumortypen legt nahe, dass bedeutende Entzündungsreaktionen bei Patienten mit Krebs ablaufen. Es ist gegenwärtig unklar, was für einen Schutzeffekt diese Reaktion gegenüber dem Wachstum und der Entwicklung von Tumorzellen in vivo hat. Diese Entzündungsreaktionen können jedoch einen tumortragenden Wirt nachteilig beeinflussen. Komplexe zytokine Interaktionen sind in der Regulation der Zytokinproduktion und der Zellproliferation in dem Tumor und dem normalen Gewebe involviert (McGee DW, et al., Immunology 1995 Sep;86(1):6–11, Wu S, et al., Gynecol Oncol 1994 Apr;53(1):59–63). Es ist seit langem bekannt, dass Gewichtsverlust (Cachexie) die häufigste einzige Todesursache bei Patienten mit Krebs ist (Inagaki J, et al., Cancer 1974 Feb;33(2):568–73) und beginnende Unterernährung eine schlechte Prognose darstellt (Van Eys J. Nutr Rev 1982 Dec;40(12):353–9). Damit ein Tumor wächst und sich ausbreitet, muss er die Bildung von neuen Blutgefäßen veranlassen und die

extrazelluläre Matrix abbauen. Die Entzündungsreaktion kann bedeutende Rollen bei den obigen Mechanismen spielen müssen, wodurch sie zur Verschlechterung des Wirtes und dem Fortschreiten des Tumors beiträgt. Aufgrund der entzündungshemmenden Eigenschaften von *Lactobacillus salivarius* können diese Bakterienstämme die Rate der malignen Zelltransformation reduzieren. Ferner können intestinale Bakterien aus diätischen Verbindungen Substanzen mit genotoxischer, karzinogener und tumorfördernder Aktivität herstellen, und Darmbakterien können fördernde Karzinogene zu DNA-reaktiven Stoffen aktivieren (Rowland I.R. (1995). Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson G.R. (ed). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and, pathology, pp 155–174. Boca Raton CRC Press). Im Allgemeinen haben Spezies von *Lactobacillus* geringe Aktivitäten, xenobiotisch Enzyme zu metabolisieren, verglichen mit anderen Populationen im Darm, wie zum Beispiel Bakterioide, Eubakterien und Clostridia (Saito Y. et al., *Microb. Ecol. Health Dis.*, 1992;5,105–110). Daher kann das Erhöhen der Anzahl von *Lactobacillus* Bakterien im Darm vorteilhaft die Werte dieser Enzyme verändern.

Prebiotika

[0070] Die Einführung von probiotischen Organismen wird durch die Aufnahme der Mikroorganismen in einem geeigneten Träger durchgeführt. Es wäre vorteilhaft, ein Medium bereitzustellen, das das Wachstum dieser probiotischen Stämme im Dickdarm fördern würde. Die Zugabe von einem oder mehreren Oligosacchariden, Polysacchariden oder anderen Prebiotika verstärkt das Wachstum von Milchsäurebakterien in dem Gastrointestinal-Trakt (Gibson, GR. Br. J. Nutr. 1998;80 (4):S209–12). Prebiotika beziehen sich auf jede nicht lebensfähige Nahrungsmittelkomponente, die speziell in dem Dickdarm durch indigene Bakterien fermentiert wird, von denen man annimmt, dass sie von positivem Wert sind, zum Beispiel Bifidobakterien, Laktobacilli. Arten von Prebiotika können jene einschließen, die Fructose, Xylose, Soja, Galaktose, Glukose und Mannose enthalten. Die kombinierte Verabreichung eines probiotischen Stammes mit einer oder mehreren prebiotischen Verbindungen können das Wachstum der verabreichten Probiotika *in vivo* verstärken, wodurch ein ausgeprägter Gesundheitsnutzen resultiert, und wird als synbiotisch bezeichnet.

Weitere aktive Zutaten

[0071] Dabei ist hervorzuheben, dass der *Lactobacillus salivarius* prophylaktisch verabreicht werden kann oder als eine Behandlungsmethode entweder allein oder mit anderen probiotischen und/oder prebiotischen Materialien, wie zuvor beschrieben. Zusätzlich können die Bakterien verwendet werden als ein Teil einer Prophylaxe oder einer Behandlungsstrategie unter Verwendung weiterer aktiver Materialien, wie zum Beispiel jener, die für die Behandlung von Entzündungen und/oder anderen Störungen verwendet werden, insbesondere jene des Gastrointestinal-Trakts. Solche Kombinationen können in einer einzelnen Formulierung verabreicht werden oder als getrennte Formulierung, die zur gleichen Zeit oder zu verschiedenen Zeiten verabreicht werden und die gleiche oder verschiedene Verabreichungswege verwenden.

[0072] Die Erfindung ist nicht auf die zuvor beschriebenen Ausführungsformen beschränkt, die im Detail variiert werden können.

Patentansprüche

1. Verwendung eines Stammes von *Lactobacillus salivarius* von humarer Herkunft bei der Herstellung eines Arzneimittels für die Prophylaxe und/oder Behandlung von unerwünschter entzündlicher Aktivität.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die unerwünschte entzündliche Aktivität eine unerwünschte gastrointestinale entzündliche Aktivität darstellt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität eine entzündliche Darmerkrankung darstellt.
4. Verwendung nach Anspruch 3, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität die Crohn-Krankheit darstellt.
5. Verwendung nach Anspruch 3, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität ulcerative Colitis darstellt.
6. Verwendung nach Anspruch 2, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität das Reizdarmsyndrom darstellt.

7. Verwendung nach Anspruch 2, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität Pouchitis darstellt.
8. Verwendung nach Anspruch 2, worin die gastrointestinale entzündliche Aktivität eine postinfektiöse Colitis darstellt.
9. Verwendung nach Anspruch 2, worin die entzündliche Aktivität auf gastrointestinalen Krebs zurückzuführen ist.
10. Verwendung nach Anspruch 1, worin die entzündliche Aktivität eine systemische entzündliche Erkrankung darstellt.
11. Verwendung nach Anspruch 10, worin die systemische entzündliche Erkrankung rheumatoide Arthritis darstellt.
12. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, worin die unerwünschte entzündliche Aktivität auf eine Autoimmunerkrankung zurückzuführen ist.
13. Verwendung nach Anspruch 1, worin die unerwünschte entzündliche Aktivität auf Krebs zurückzuführen ist.
14. Verwendung eines Stammes von *Lactobacillus salivarius* bei der Herstellung eines Arzneimittels für die Krebs-Prophylaxe.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin der *Lactobacillus salivarius* in einer Formulierung enthalten ist.
16. Verwendung nach Anspruch 15, worin die Formulierung ein anderes probiotisches Material einschließt.
17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, worin die Formulierung ein präbiotisches Material einschließt.
18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, worin die Formulierung einen aufnehmbaren Träger einschließt, wobei der aufnehmbare Träger bevorzugt einen pharmazeutisch verträglichen Träger, wie zum Beispiel eine Tablette, eine Kapsel oder ein Pulver, darstellt.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, worin der aufnehmbare Träger ein Protein und/oder ein Peptid, insbesondere Proteine und/oder Peptide darstellt, die reich an Glutamin/Glutamat; einem Lipid, einem Kohlenhydrat; einem Vitamin; einem Mineral und/oder einem Spurenelement sind.
20. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, worin der aufnehmbare Träger ein Lebensmittelprodukt, wie zum Beispiel gesäuerte Milch, Joghurt, gefrorener Joghurt, Milchpulver, Milchkonzentrat, Streichkäse, Dressings oder Getränke darstellt.
21. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, worin der *Lactobacillus salivarius* bei mehr als 10^6 KBE pro Gramm bezogen auf das Abgabesystem anwesend ist.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, worin die Formulierung jedwede(s) eine oder mehr von einem Adjuvans, bakteriellen Komponenten, einer Arzneimittelentität oder einer biologischen Verbindung einschließt.
23. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Stamm oder die Formulierung zur Verabreichung an Tiere bestimmt ist.
24. Verwendung nach Anspruch 23, worin das Tier einen Säuger, bevorzugt einen Menschen darstellt.
25. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der *Lactobacillus salivarius* Veränderungen in einem immunologischen Marker bewirkt, wenn er in ein System eingeführt wird, umfassend Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, und Zellen des Immunsystems.
26. Verwendung nach Anspruch 25, worin die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, Epithelzellen darstellen.

27. Verwendung nach Anspruch 25 oder 26, worin der immunologische Marker ein Cytokin darstellt, wobei das Cytokin bevorzugt TNF α darstellt.
28. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 27, worin die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, und die Zellen des Immunsystems von übereinstimmender Herkunft sind.
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 28, worin die Zellen, die mit dem Immunsystem interagieren, von gastrointestinaler, respiratorischer oder genitourinärer Herkunft sind.
30. Verwendung nach einem der Ansprüche 25 bis 29, worin die Zellen des Immunsystems von gastrointestinaler, respiratorischer oder genitourinärer Herkunft sind.
31. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius-Stamm Lactobacillus salivarius subsp. salivarius darstellt.
32. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius aus dem resezierten und gewaschenen humanen Gastrointestinaltrakt isoliert wird.
33. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius ein breites Spektrum Gram-positiver und Gram-negativer Mikroorganismen inhibiert.
34. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche worin der Lactobacillus salivarius ein Produkt mit antimikrobieller Aktivität in einen zellfreien Überstand sezerniert, wobei die genannte Aktivität nur von wachsenden Zellen produziert und von Proteinase K und Pronase E zerstört wird.
35. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Stamm von Lactobacillus salivarius den Stamm UCC 118 [NCIMB 40829] oder eine Mutante oder Variante davon darstellt.
36. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius eine genetisch modifizierte Mutante darstellt.
37. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius eine natürlich vorkommende Variante von Lactobacillus salivarius darstellt.
38. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius in der Form von lebensfähigen Zellen vorliegt.
39. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Lactobacillus salivarius in der Form von nicht lebensfähigen Zellen vorliegt.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

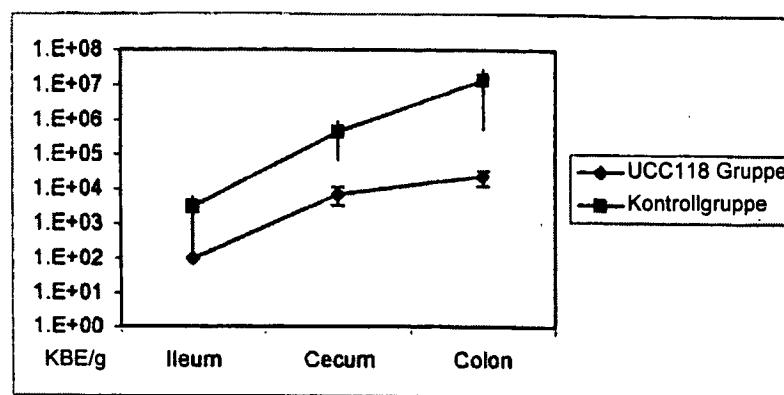


Fig. 1

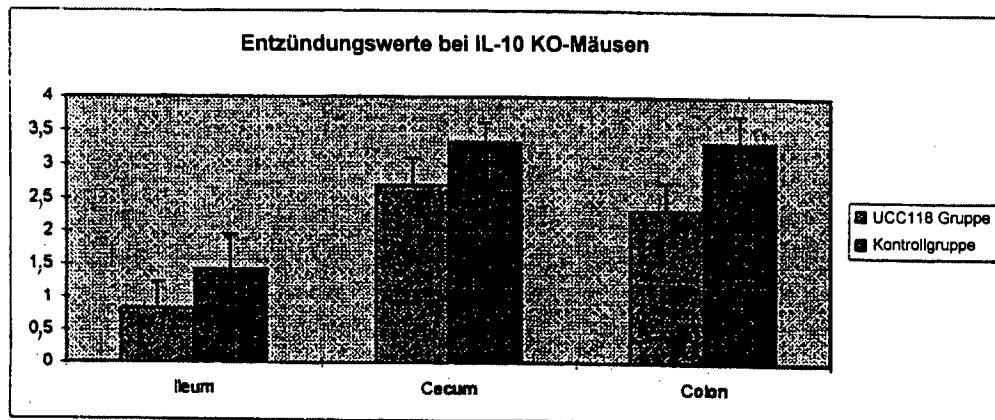


Fig. 2

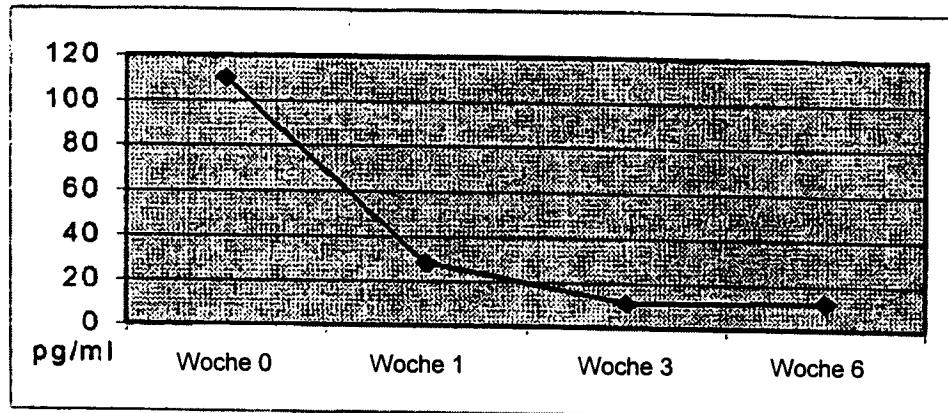


Fig. 3

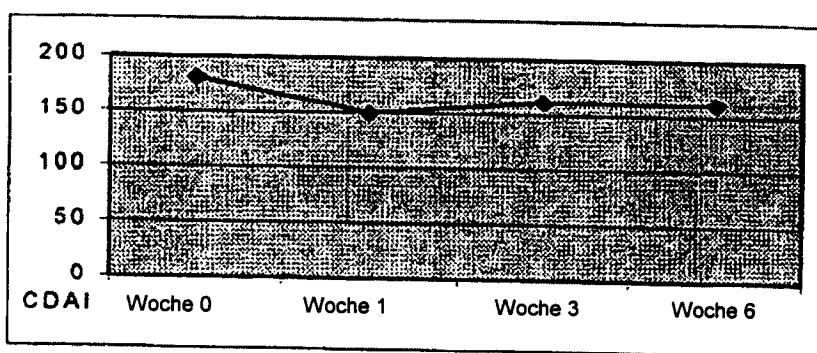


Fig. 4

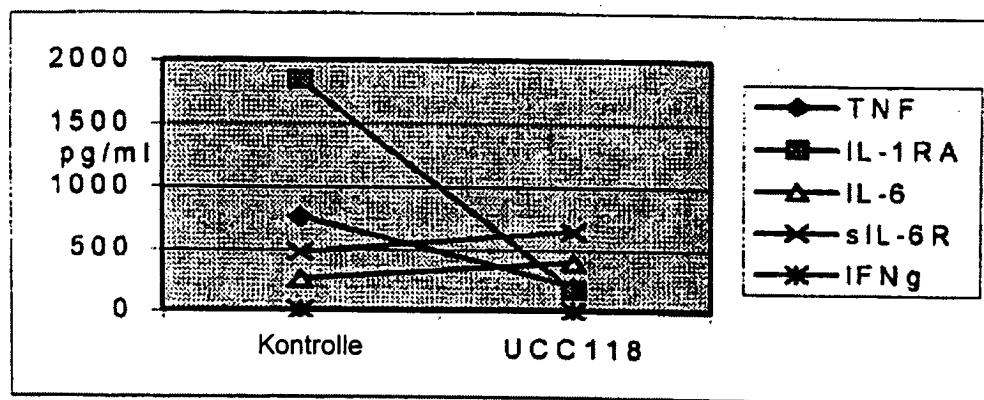


Fig. 5

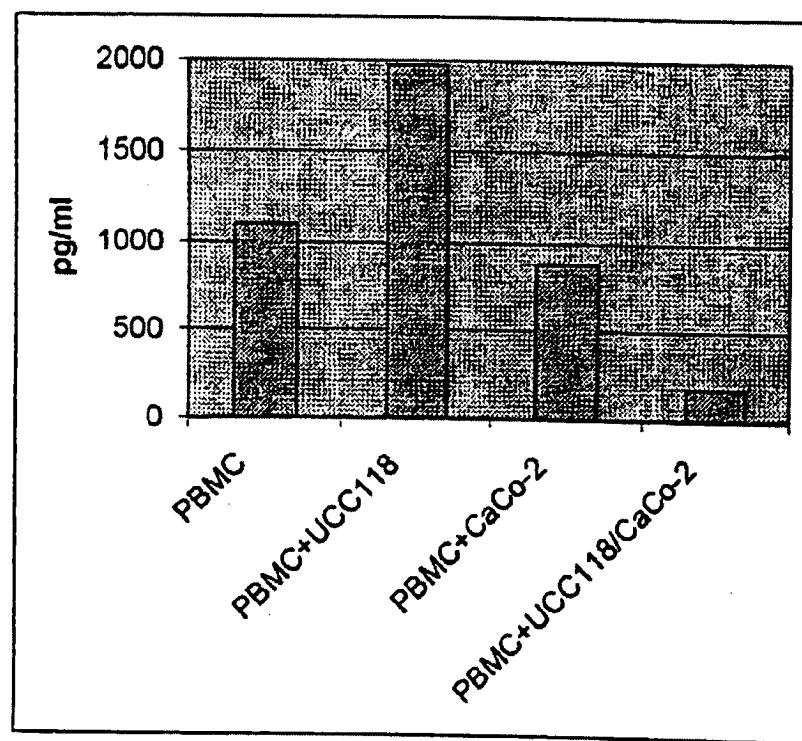


Fig. 6

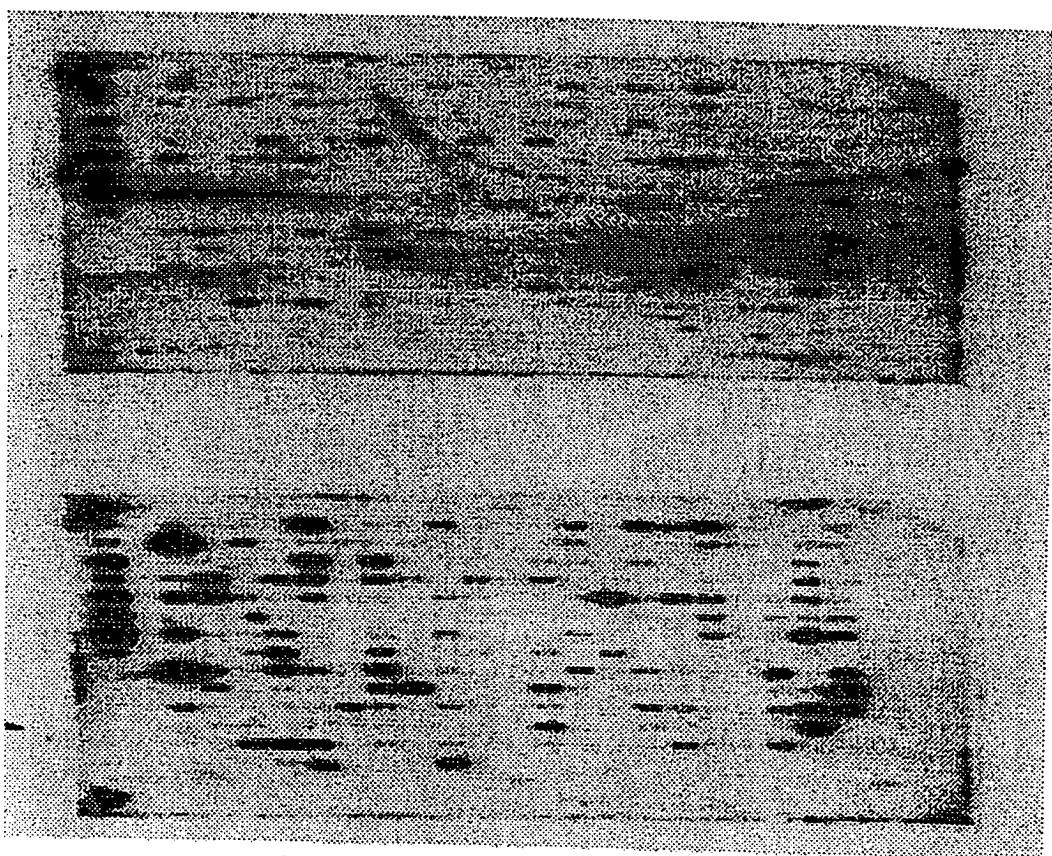


Fig. 7

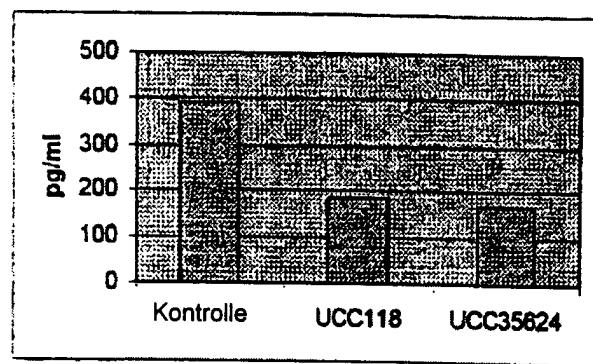


Fig. 8