

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

284 492

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1343-93**

(22) Přihlášeno: **02. 07. 93**

(30) Právo přednosti:
06. 07. 92 EP 92/92810516

(40) Zveřejněno: **16. 02. 94**
(Věstník č. 2/94)

(47) Uděleno: **08. 10. 98**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16. 12. 98**
(Věstník č. 12/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 1/20

A 23 C 9/127

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

(73) Majitel patentu:

Societe Des Produits Nestle S.A., Vevey, CH;

(72) Původce vynálezu:

Brassart Dominique, Bussigny, CH;

Donnet Anne, Saint-Legier, CH;

Link Harriet, Vevey, CH;

Mignot Olivier, Blonay, CH;

Neeser Jean-Richard, Savigny, CH;

Rochat Florence, Montreux, CH;

Schiffrin Eduardo, Crissier, CH;

Servin Alain, Chatenay-Malabry, FR;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Biologicky čistá kultura bakterií
mléčného kvašení a prostředek pro
léčebné nebo profylaktické použití**

(57) Anotace:

Biologicky čistá kultura bakterií mléčného kvašení, s afinitou k implantaci ve střevní flóře, se schopností lnout ke střevním buňkám, se schopností kompetitivně vyloučit patogenní bakterie ze střevních buněk a se schopností imunomodulace, kterými jsou bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus johnsonii* kmen CNCM I-1225 nebo *Bifidobacterium* ze skupiny *Bifidobacterium* breve CNCM I-1226, *Bifidobacterium infantis* CNCM I-1227 a *Bifidobacterium longum* CNCM I-1228. Prostředek pro léčení nebo profylaktické použití v žaludečním a střevním systému obsahuje biologicky čistou kulturu a požitelný nosič.

CZ 284 492 B6

Biologicky čistá kultura bakterií mléčného kvašení a prostředek pro léčebné nebo profylaktické použití

Oblast techniky

5 Vynález se týká biologicky čisté kultury bakterií mléčného kvašení, prostředků, které tento kmen obsahují a jsou určeny pro léčebné nebo profylaktické použití v žaludečním a střevním systému.

Dosavadní stav techniky

10 V EP 199 535 (Gorbach a Goldin) se navrhuje použití bakteriálního kmene, který byl v prvním přiblížení identifikován jako *Lactobacillus (L.) acidophilus*, pak však bylo prokázáno, že kmen má řadu znaků, které jsou podobnější znakům kmene *L. casei* subs. *ramnosus* (M. Silva a další, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31, č. 8, 1231 až 1233, 1987). Tento kmen dobře line k buňkám sliznice tenkého střeva a je vhodný pro léčebné použití. Kmen byl označen "kmen GG" a byl uložen do veřejné sbírky kultur ATCC (American Type Culture Collection) pod číslem 53103, a může být použit také spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem, zejména s potravinářskými produkty a především například spolu s výrobky z kyselého mléka nebo 15 okyseleného mléka typu jogurtu.

Jiné kmeny téhož typu byly již dlouho používány v analogických výrobcích k podobným účelům. Stále však přetrvává potřeba zvláště vhodných kmenů tohoto typu, které by bylo možno jasně identifikovat, které by měly nesporné výhody a obohatily by tak skupinu dostupných kmenů.

Vynález si klade za úkol navrhnout zvláště vhodný kmen pro uvedené použití.

20 Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří biologicky čistá kultura bakterií mléčného kvašení s afinitou k implantaci ve střevní flóře, se schopností lnout ke střevním buňkám, se schopností kompetitivně vyloučit patogenní bakterie ze střevních buněk a se schopností imunomodulace. Jde o bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus johnsonii* kmen CNCM I-1225 nebo o *Bifidobacterium* ze skupiny *Bifidobacterium breve* CNCM I-1226, *Bifidobacterium infantis* CNCM I-1227 a *Bifidobacterium longum* CNCM I-1228. 25

Podstatu vynálezu tvoří rovněž prostředek pro léčebné nebo profylaktické použití v žaludečním a střevním systému, který obsahuje biologicky čistou kulturu a požitelný nosič.

30 Uvedený kmen je zvláště určen pro podání u člověka nebo živočichů pro léčebné nebo profylaktické použití v žaludečním a střevním systému, a to zvláště jako protiprůjmový prostředek.

Kmen je možno podávat ve formě biologicky čisté kultury, například jako takové po zmrazení a/nebo po lyofilizaci. Kultura může obsahovat například 10^8 až 10^{10} životaschopných buněk (tento pojem bude dále zkracován cfu na základě anglického výrazu "colony forming units") na 35 1 g kapalné nebo zmrazené formy a 10^9 až 10^{11} cfu/g v případě lyofilizované formy.

Kmen je také možno podávat ve formě prostředku, který kulturu obsahuje, na požitelném nosiči, může jít zejména o farmaceutický nosič nebo o potravinářský produkt, například okyselené mléko, zvláště jogurt nebo práškové produkty na bázi mléka.

40 V jednom z výhodných provedení tvoří podstatu vynálezu kultura kmene bakterií mléčného kvašení, vybraná pro svou afinitu k implantaci v zažívací trubici myši nebo krys s lidskou střevní flórou.

V dalším výhodném provedení tvoří podstatu vynálezu kultura kmene bakterií mléčného kvašení, vybraná pro svou schopnost kompetitivně vyloučit patogenní bakterie, které jsou příčinou vzniku průjmu na základě infekce střevních buněk.

5 Z různých kmenů bakterií, které byly izolovány a podrobeny selekci, zejména z různých typů okyseleného mléka, zvláště komerčně dodávaných jogurtů nebo z běžně dodávaných kultur pro výrobu tohoto mléka nebo z výkalů kojenců, byly čtyři kmeny uloženy dne 30. června 1992 podle Budapeštské úmluvy do veřejné sbírky kultur Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue de Dr. Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francie.
10 Každému kmenu bylo přiděleno číslo, které je dále uvedeno v závorce za názvem tohoto kmene, jde o kmeny *Lactobacillus johnsonii* (dříve *acidophilus*) (CNCM I-1225), *Bifidobacterium breve* (CNCM I-1226), *Bifidobacterium infantis* (CNCM I-1227) a *Bifidobacterium longum* (CNCM I-1228).

Podrobnosti, týkající se morfologie a obecných vlastností těchto kmenů jsou dále uvedeny:

L. johnsonii CNCM I-1225

15 Morfologie:

- gram-pozitivní organismus, který je nepohyblivý a netvoří spory,
- jde o izolované, poměrně krátké a silně tyčinkovité formy.

Metabolismus:

- 20 - mikroaerofilní mikroorganismus s homofermentativním metabolismem, dávající vznik produkci kyseliny L(+) a D(-)-mléčné,
- dalšími vlastnostmi jsou kataláza (-), produkce oxidu uhličitého (-), hydrolýza argininu (-).

Fermentace cukrů:

25 Amygdalin (+), arabinóza (-), cellobióza (+), eskulin (+), fruktóza (+), galaktóza (-), glukóza (+), laktóza (+), maltóza (+/-), mannitol (-), mannóza (+), melibióza (-), raffinóza (+), ribóza (-), salicin (+), sacharóza (+) a trehalóza (+).

B. breve CNCM I-1226, *B. infantis* CNCM I-1227 a *B. longum* I-1228

Morfologie:

- gram-pozitivní mikroorganismus, který je nepohyblivý a nevytváří spory,
- jde o krátké tyčinky se zaoblenými konci a rozvětvením typu "V" nebo "Y".

30 Metabolismus:

- jde o anaerobní organismy s heterofermentativním metabolismem, který dává vznik převážně tvorbě kyseliny mléčné a kyseliny octové,
- další vlastnosti jsou kataláza (-), produkce oxidu uhličitého (-) a hydrolýza argininu (-).

Fermentace cukrů:

35 Vzhledem k tomu, že profil fermentace cukrů u těchto kmenů je velmi nestálý a není reprodukovatelný, dochází k trvalé fermentaci pouze u několika málo cukrů, zejména D-ribózy, laktózy a rafinózy.

Podrobnosti, týkající se zvláštních vlastností, pro které byly kmeny vybrány, budou dále uvedeny:

Implantace do střevní flóry

Gnotoxenické myši

- 5 Dvěma skupinám axenických myší (myši bez střevní flóry) byla implantována lidská střevní flóra vždy od odlišného dárce (gnotoxenické myši). Po několika dnech aklimatizace je střevní flóra těchto myší zcela srovnatelná se střevní flórou lidských dárců z funkčního, kvalitativního i kvantitativního hlediska.

- 10 Byla testována řada kmenů pro schopnost kolonizovat zažívací trubici těchto myší s lidskou flórou, to znamená na afinitu pro implantaci ve střevní floře uvedeného typu.

Bylo zjištěno, že většina kmenů není schopna této implantace ani po opakovaném očkování, přesto že například *L. johnsonii*, kmen CNCM I-1225, byl schopen proliferace a implantace v zažívací trubici, to znamená ve střevní floře myší obou uvedených skupin po jediném naočkování.

- 15 Tato kolonizace nebo implantace umožňuje, aby kmen byl ve výkalech přítomen v množství vyšším než 10^6 cfu/g. Tento obsah životaschopných bakterií ve výkalech je možno požadovat za nutný a/nebo dostatečný k tomu, aby metabolismus použitého kmene mohl modifikovat metabolismus hostitele.

- 20 Bylo také zjištěno, že tato implantace přetrvává tak dlouho, dokud není závažně porušeno životní prostředí živočichů.

Gnotoxenické krysy

- 25 Axenické krysy byly kolonizovány (gnotoxenické krysy) izolovaným kmenem (*Bacteroides thetaiotamicron* FI 1, veřejná sbírka Centre de Recherche Nestec SA, CH-1000, Lausanne, Švýcarsko). Jde o kmen ze střevní flóry zdravého dárce, který byl použit k simulaci produkce enzymů v úplné fekální floře. Došlo k velké kolonizaci střev těchto krys, takže uvedený kmen byl ve výkalech přítomen v množství přibližně 10^8 cfu/g.

Při pokusu o implantaci kmene *L. johnsonii*, CNCM I-1225, do této flóry došlo k dobré současné kolonizaci, takže i tento kmen byl pak ve výkalech přítomen v množství přibližně 10^8 cfu/g.

Lidští dobrovolníci

- 30 Jako srovnávací hodnota při těchto pokusech byl stanoven počet životaschopných buněk *L. bulgaricus*, který se objevuje ve výkalech zdravých dobrovolníků, kteří jedli tradiční jogurt, připravený fermentací kravského mléka běžně dodávanou kulturou *L. bulgaricus* a *S. thermophilus*.

- 35 Dobrovolníci nejedli žádný fermentovaný mléčný produkt po dobu tří po sobě následujících období tří týdnů až na jogurt, který jedli v průběhu druhého třítýdenního období.

V průběhu tří týdnů, v nichž dobrovolníci jedli jogurt, byla dávka tohoto jogurtu upravena tak, aby bylo požitó přibližně 10^{10} buněk *L. bulgaricus* denně, což odpovídá přibližně třem jogurtům s hmotností 120 g. V průběhu této doby obsahovaly výkaly dobrovolníků přibližně 10^5 cfu/g *L. bulgaricus*.

- 40 Podle vynálezu byly zkoušky prováděny obdobným způsobem, avšak jogurt byl připraven fermentací mléka při použití běžné kultury *S. thermophilus* a *B. bifidus*, kultury byly doplněny například kmenem *L. johnsonii* CNCM I-1225 v koncentraci téhož řádu.

Celkový počet životaschopných buněk uvedeného typu bakterií ve výkalech dobrovolníků byl stanoven před, v průběhu a po období požívání jogurtu. Před požíváním jogurtu byly nalezeny hodnoty 10^5 až 10^6 cfu/g, v průběhu požívání byly nalezeny hodnoty vyšší než 10^7 cfu/g a po období požívání jogurtu hodnoty 10^6 cfu/g.

- 5 V průběhu požívání jogurtu tedy došlo ke vzestupu celkového množství bakterií *Lactobacillus* ve výkalech. Kmen CNCM I-1225 byl nalezen u dobrovolníků ve velkém množství a v životaschopné formě. Byl však eliminován v několika málo dnech po přerušení užívání jogurtu.

Snížení enzymatické aktivity výkalů

Gnotoxenické krysy

- 10 Při pokusech, prováděných s gnotobiotickými krysami, tak jak byly svrchu uvedeny, byla stanovena účinnost fekální azoreduktázy a nitroreduktázy. Tyto enzymy byly zvoleny z toho důvodu, že se účastní produkce kancerogenních látek. Vysoká koncentrace těchto enzymů je tedy spojena se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny v tlustém střevě.

- 15 Bylo zjištěno, že fekální enzymatická účinnost gnotobiotických krys v přítomnosti *Bacteroides* vzrostla na 2,5 mikrogramů/h/mg bílkoviny pro azoreduktázu a na 4,2 mikrogramů/h/mg bílkoviny pro nitroreduktázu, kdežto v případě gnotobiotických krys v přítomnosti *Bacteroides* a současně při implantaci kmene CNCM I-1225 vzrostla tato enzymatická účinnost na 1,8 mikrogramů/h/mg bílkoviny pro azoreduktázu a na 3,5 mikrogramů/h/mg bílkoviny pro nitroreduktázu.

- 20 Mimo to bylo prokázáno, že u gnotobiotických krys se střevní flórou, tvořenou výlučně kmenem CNCM I-1225, není možno prokázat žádnou účinnost fekální azoreduktázy ani nitroreduktázy.

Jinak řečeno, přítomnost kmene CNCM I-1225 ve floře gnotobiotických krys vyvolává snížení produkce některých nežádoucích enzymů u těchto živočichů a tedy příznivou modifikaci v metabolismu hostitele.

- 25 Lidští dobrovolníci

Účinnost fekální nitroreduktázy byla stanovena svrchu uvedeným způsobem také u lidských dobrovolníků. Účinnost uvedeného enzymu byla stanovena v průběhu posledních dnů před počátkem období požívání jogurtu, připraveného například při použití kmene CNCM I-1225, v průběhu období požívání tohoto jogurtu a několik prvních dnů po přerušení požívání jogurtu.

- 30 Bylo zjištěno, že účinnost enzymu klesla z hodnoty 8,2 na 4,9 mikrogramů/h/mg bílkoviny v průběhu období požívání jogurtu, na této hodnotě zůstala ještě týden po skončeném požívání jogurtu a pak začala hodnota opět postupně stoupat.

Imunomodulace

Lidští dobrovolníci (fagocytární schopnost leukocytů)

- 35 Lidští dobrovolníci nejedli žádné fermentované mléčné produkty až na ty, které náležely do následujícího testu: 3 týdny požívání mléka, následující 3 týdny jogurt, připravený fermentací mléka smíšenou kulturou například běžně dodávaného *S. thermophilus* a *L. johnsonii* CNCM I-1225 a pak 6 týdnů mléko.

- 40 Fagocytární schopnost leukocytů v periferní krvi těchto dobrovolníků byla stanovena na počátku a na konci každého z uvedených období.

Při tomto stanovení byly izolovány z krve leukocyty a byly uvedeny do styku s fluorescenčními bakteriemi. Po fagocytóze bylo měřeno množství fluorescence z leukocytů fluorescenčními bakteriemi cytometrickou analýzou v průtokovém zařízení, které je běžně dodáváno pod názvem

Gacsan. Množství leukocytů v procentech s fagocytární účinností je pak možno ze získaných hodnot vypočítat a uvést jako fagocytární schopnost.

5 Fagocytární schopnost leukocytů v periferní krvi 36,5 % byla zjištěna na počátku prvního období, v němž bylo požíváno mléko. Na konci tohoto období a tedy na počátku požívání jogurtu byla stanovena hodnota 32,7 %. Na konci období, v němž byl požíván jogurt, byla naměřena hodnota 51,8 % a 6 týdnů poté, to znamená po 6 týdnech následného požívání mléka byla naměřena hodnota 51,4 %. Pravděpodobnost chyby (hodnota p) při stanovení tohoto vzestupu fagocytární schopnosti leukocytů k zajištění statistické významnosti uvedených hodnot je nižší než 0,1 %.

10 Lidští dobrovolníci (reakce na vakcínu)

16 zdravých dobrovolníků (pokusná skupina) plnilo následující program: dva týdny (týden 1. a 2.) požívali obvyklou stravu s výjimkou jakýchkoliv fermentovaných výrobků, následující tři týdny (týden 3. 4. a 5.) požívali smíšenou stravu se třemi jogurty s hmotností 125 ml denně, přičemž tyto jogurty byly připraveny fermentací mléka běžnou kulturou *S. thermophilus* a *Bifidobacterium bifidus* s přidavkem *L. johnsonii* CNCM I-1225 v množství 10^7 až 10^8 cfu/ml, a poslední dva týdny (týden 6. a 7.) byla podávána běžná strava bez jakýchkoliv fermentovaných produktů.

Kontrolní skupina 14 zdravých dobrovolníků současně plnila program, který spočíval v požívání obvyklé stravy bez jakýchkoliv fermentovaných produktů.

20 Ve dnech 1, 3 a 5 ve 4. týdnu byla dobrovolníkům z obou skupin podávána živá perorální vakcína (*Salmonella typhi* Ty21a) podle pokynů výrobce.

Všem dobrovolníkům byly odebrány krevní vzorky tři dny po počátku třetího týdne a jeden den a 10 dnů po počátku pátého týdne.

25 Stanovení koncentrace specifických protilátek typu IgA, produkovaných jako imunologická odpověď na antigenní lipopolysacharidy (LPS) ze *Salmonella typhi* bylo prováděno metodou ELISA.

Bylo prokázáno, že vzestup koncentrace specifických protilátek IgA, pozorovaný 15 dnů po vakcinaci ve srovnání s koncentrací, prokázanou 9 dnů před vakcinací je v obou skupinách statisticky významný (p větší než 0,001).

30 Avšak v případě, že se berou v úvahu rozsahy faktorů tohoto vzestupu <2 , >2 a <3 , >3 a <4 a >4 , získá se v těchto rozsazích distribuce 1, 6, 3 a 6 dobrovolníků z pokusné skupiny a 8, 3, 0 a 3 dobrovolníci z kontrolní skupiny. To znamená, že faktory vzestupu jsou statisticky významně vyšší v pokusné skupině ve srovnání s kontrolní skupinou (p = 0,04).

Adheze ke střevním buňkám

35 Byly provedeny zkoušky na adhezi různých kmenů bakterií mléčného kvašení ke střevním buňkám, a to zejména k lidským epiteliálním střevním buňkám Caco-2 (M. Pinto a další, Biol. Cell., 47, 323, 1983) a k sekrečním buňkám lidského střeva HT29-MTX, u nichž dochází k sekreci slizu (Lesuffleur a další, Cancer Res., 50, 6334 - 6343) in vitro v jednoduché souvislé vrstvě.

40 K tomuto účelu byly buňky pěstovány v lahvích z plastické hmoty s plochou 25 cm^2 (Corning) pro udržení buněčných linií a na sterilizovaných a tuku zbavených čtvercích skla s rozměrem 22 x 22 mm, uložených do ploten se šesti vyhloubeními (Corning) pro zkoušky na adhezi.

45 Při pěstování buněk Caco-2 a HT29-MTX je od druhého dne po naočkování nutno živné prostředí denně měnit. Jako živné prostředí se užije Eaglovo minimální základní prostředí v práškové formě, modifikované podle Dulbecca (prostředí DMEM).

Bakterie mléčného kvašení byly pěstovány za anaerobních podmínek na prostředí MRS ze zmrazené zásobní kultury. Očkování bylo prováděno z druhé subkultury.

5 Prostředí pro inkubaci buněk bylo připraveno smísením 50 % prostředí DMEM bez antibiotika a 50 % prostředí MRS, v němž bakterie rostly, toto prostředí obsahovalo 10^8 buněk *Lactobacillus* nebo *Bifido bacterium* (Chauvière G. a další, *FEMS Microbiol. Lett.*, 91, 213 - 218, 1992).

10 Při provádění zkoušky na adhezi bylo prostředí, obsahující bakterie, uloženo na střevní buňky a směs byla jednu hodinu inkubována za aerobních podmínek. Pak byly plotny s vyhloubeními pětkrát promyty vždy 20 kruhovými pohyby tak, aby bylo možno odstranit všechny bakterie, u nichž nedošlo k adhezi. Pak byly vrstvy střevních buněk fixovány postupně 10 minut v 70% methanolu, 10 minut v 95% methanolu a 15 minut ve 100% methanolu, a pak barveny barvením Gram nebo Giemsa. Stupeň adheze byl stanoven počítáním adhezujících bakterií pod mikroskopem.

15 Z velkého počtu zkoumaných kmenů měly čtyři svrchu uvedené kmeny velmi dobrou adhezi ke střevním buňkám, jak bylo prokázáno při svrchu uvedených zkouškách s použitím buněčné linie Caco-2.

Kmen *L. johnsonii* CNCM I-1225 Inul k buňkám Caco-2 v množství 150 ± 23 bakteriálních buněk na 100 buněk Caco-2. V případě, že se tento výsledek zaznamená jako +++++, je výsledek pro *B. breve* CNCM I-1226 +++++, výsledek pro *B. infantis* CNCM I-1227 ++++ a výsledek pro *B. longum* CNCM I-1228 rovněž ++++.

20 Při zkouškách na adhezi kmene *L. johnsonii* CNCM I-1225, například na buňky HT29-MTX, byly získány ještě přesvědčivější výsledky.

25 Bylo také neočekávaně prokázáno, že adheze buněk těchto kmenů nebo alespoň některých z nich je způsobena faktorem, které tyto buňky vylučují do svého vlastního živného prostředí, například MRS nebo mléka. To znamená, že v případě, že inkubace 1 hodinu spolu s buňkami Caco-2 byla prováděna v případě kmenů *L. johnsonii* CNCM I-1225, *B. breve* CNCM I-1226 nebo *B. longum* CNCM I-1228 bez přítomnosti jejich živného prostředí, bylo možno pozorovat podstatné snížení této adheze.

30 Mimoto v případě, že tato inkubace s použitím uvedených kmenů a jejich živného prostředí byla na buňkách Caco-2 prováděna tak, že prostředí bylo předem podrobena působení trypsinu, bylo opět možno pozorovat statisticky významné snížení adheze. To potvrzuje, že faktor, který je těmito kmeny vylučován do živného prostředí a který podporuje adhezi, má povahu bílkoviny.

Kompetitivní vyloučení patogenních bakterií

35 Byly prováděny zkoušky s různými kmeny bakterií mléčného kvašení na jejich schopnost kompetitivně vyloučit ze střevních buněk patogenní bakterie, zejména takové, které jsou příčinou průjemových onemocnění.

40 Zkoušky byly provedeny zvláště na schopnost vyloučit ze střevních buněk některé saprofytické kmeny *E. coli*, typické pro člověka i některé další živočichy, které se mohou stát virulentními a patogenními. Jde zejména o enterotoxinogenní *E. coli* (ETEC), enteroadherentní *E. coli* (DAEC) a enteropatogenní *E. coli* (EPEC). Mimoto byly provedeny zkoušky na vyloučení kmene *Salmonella typhi-murium*.

K provedení svrchu uvedených zkoušek byly použity následující kmeny:

- v případě ETEC byl použit kmen H10407, u nějž dochází k expresi CFA/1 (Collection of Professeur Joly, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Clermont-Ferrand 1, 63003 Clermont-Ferrand, Francie),
- 45 - v případě DAEC byl použit kmen C1845 (sbírka Dr. S. Bilge, Department of Microbiology, School of Medicine, G 3111 Health Sciences Building, University of Washington, Seattle, Washington 98195, USA),

- v případě EPEC byl použit kmen JPN15 pMAR7, u nějž dochází k expresi EAF a eae (sbírka Prof. J. Kaper, Center for Vaccine Development, University of Maryland, School of Medicine, 10 South Pine Street, Baltimore, Maryland, 21201, USA),

5 - v případě Salmonella typhi-murium byl použit kmen SL 1344 (Dr. B. Stocker, Stanford University, School of Medicine, Department of Microbiology a Immunology, Sherman Sairchild Science Building, D 333 Stanford, California 94305 - 5402, USA).

Adheze bakterií na buňky Caco-2 byla stanovena následujícím způsobem:

10 Souvislá jednotlivá vrstva buněk Caco-2 byla dvakrát promyta fyziologickým roztokem chloridu sodného s fosfátovým pufrům (PBS). Buňky E. coli, značené ¹⁴C, nebo buňky Salmonella, značené ³⁵S, byly uvedeny do suspenze v živném prostředí a v množství 10⁸ cfu/ml byly přidány 2 ml suspenze do každého vyhloubení, obsahujícího skleněný čtverec s buněčnou kulturou.

15 V případě E. coli byla inkubace prováděna za přítomnosti 1 % D-mannózy. Aby bylo možno stanovit vylučovací faktor nebo úroveň vylučování cizorodých buněk, to znamená podíl patogenních bakterií, jemuž bakterie mléčného kvašení zabránily v adhezi na buňky Caco-2, k níž by jinak došlo, byl do každého vyhloubení přidán 1 ml suspenze s obsahem 10⁸ cfu/ml značeného patogenního kmene a 1 ml suspenze, obsahující buď 10⁸ nebo 10⁹ cfu/ml zkoušené bakterie mléčného kvašení.

20 Desky byly inkubovány jednu hodinu při teplotě 37 °C v atmosféře 10 % oxidu uhličitého a 90 % vzduchu. Pak byly souvislé vrstvy buněk pětkrát promyty sterilním PBS. Lnoucí bakterie i střevní buňky pak byly rozpuštěny v 0,2 N roztoku hydroxidu sodného. Počet značených adheřujících bakterií byl vyhodnocen kapalinovou scintilací.

25 Z různých kmenů bakterií mléčného kvašení, které byly uvedeným způsobem zkoušeny na uvedenou vlastnost, to znamená na schopnost kompetitivně vyloučit patogenní bakterie, byly získány při použití svrchu uvedených čtyř kmenů podle vynálezu velmi dobré výsledky. Tyto výsledky jsou uvedeny v následující tabulce, v níž jsou v procentech shrnuty hodnoty pro vyloučení patogenních buněk, jichž bylo dosaženo při použití kmenů podle vynálezu a různých patogenních kmenů.

kmen CNCM	koncentrace cfu/ml	kompetitivní vyloučení v %			
		ETEC	DAEC	EPEC	Salmonella
I-1225	10 ⁹	78	79	83	86
	10 ⁸	50	53	53	42
I-1226	10 ⁹	80	68	83	88
	10 ⁸	55	53	55	41
I-1228	10 ⁹	47	47		
	10 ⁸	11			
I-1227	10 ⁹	58	46		
	10 ⁸	18			

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Biologicky čistá kultura bakterií mléčného kvašení, s afinitou k implantaci ve střevní flóře, se schopností lnout ke střevním buňkám, se schopností kompetitivně vyloučit patogenní bakterie ze střevních buněk a se schopností imunomodulace, kterými jsou bakterie mléčného kvašení
5 Lactobacillus johnsonii kmen CNCM I-1225 nebo Bifidobacterium ze skupiny Bifidobacterium breve CNCM I-1226, Bifidobacterium infantis CNCM I-1227 a Bifidobacterium longum CNCM I-1228.
2. Prostředek pro léčení nebo profylaktické použití v žaludečním a střevním systému,
10 **vyznačující se tím**, že obsahuje biologicky čistou kulturu podle nároku 1 a požitelný nosič.
3. Prostředek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že nosičem je farmaceuticky přijatelný nosič.
4. Prostředek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že nosičem je potravinářský produkt.
- 15 5. Prostředek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že jako potravinářský produkt obsahuje výrobky z kyselého mléka nebo jogurt.
6. Prostředek podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že obsahuje práškový produkt na bázi kyselého mléka nebo jogurtu.

20

Konec dokumentu
