

Настоящее изобретение относится к применению гидрофобных лактобактерий и/или бифидобактерий для приготовления пищевой композиции, предназначенной для предупреждения или лечения нарушений, опосредованных и/или ассоциированных с эндотоксином. Данное изобретение также относится к полученной из них композиции.

Предпосылки изобретения

Было обнаружено, что токсины, вызывающие сепсис, ассоциированы с патогенными бактериями, вирусами, растениями и ядом. В числе хорошо описанных бактериальных токсинов находятся эндотоксины или липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий. Эти молекулы представляют собой гликолипиды, которые повсеместно распространены в наружной мембране всех грамотрицательных бактерий, которые, как полагают, ответственны за грамотрицательный сепсис. Этот тип сепсиса является чрезвычайно распространенным состоянием и часто смертельным.

Для лечения сепсиса был предпринят ряд подходов. Эти подходы, в том числе, включают в себя применение антител к ЛПС, применение антител к фактору некроза опухоли, применение растворимого рецептора ФНО, применение растворимого рецептора интерлейкина-1 (ИЛ-1). Хотя каждый подход имеет некоторую эффективность, итоги оказались неутешительными.

Другие предприняли попытку разработать и изучить белки, которые связывают ЛПС/эндотоксин, и иллюстративные сообщения об этих попытках представлены в Rustici, A. et al. *Science* (1993) 259:361-364; Matsuzaki, K. et al. *Biochemistry* (1993) 32:11704-11710; Hoess, A. et al. *EMBO J* (1993) 12:3351-3356; и Elsbach, P. et al. *Current Opinion in Immunology* (1993) 5:103-107. Фактически при попадании ЛПС в кровь он может связаться с белком, называемым липополисахаридсвязывающим белком (ЛСБ). Было высказано предположение, что ингибирование ЛСБ, например антителом против ЛСБ, терапевтически приемлемо для лечения сепсиса, опосредованного эндотоксином. (Заявка на международный патент PCT/US 90/04250, поданная 30 июля 1990). Кроме того, работа некоторых лабораторий показала, что липопроотеины, главным образом липопроотеины высокой плотности (ЛПВП), связывают и нейтрализуют ЛПС (Skarnes et al., 1968, *J. Bacteriology* 95:2031; Flegel et al., 1993, *Infect. Immunol.* 61(12):51(40)) и что эти частицы могут составлять ЛПС-нейтрализующую активность плазмы.

Прежние способы лечения заболеваний, опосредованных эндотоксином и/или ассоциированных с ним, были ретроспективными (т.е. после развития клинической стадии заболевания) и были ограничены химиотерапевтическим вмешательством.

Профилактические меры не были достигнуты такими способами лечения.

Таким образом, в данной области существует необходимость в эффективном средстве для нейтрализации грамотрицательного эндотоксина (т.е. ЛПС) для предупреждения или облегчения симптомов сепсиса и септического шока.

Гидрофобные лактобактерии и бифидобактерии по настоящему изобретению предоставляют дополнительные соединения, обладающие способностью связывать эндотоксины и ослаблять/предупреждать их действия.

Краткое изложение существа изобретения

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению, по меньшей мере, одного штамма лактобактерии и/или бифидобактерии, клеточная поверхность которых обладает гидрофобными свойствами, для приготовления композиции, предназначенной для профилактики или лечения заболеваний, опосредованных и/или ассоциированных с эндотоксином.

На самом деле, неожиданно было обнаружено, что некоторые лактобактерии и бифидобактерии, главным образом с гидрофобной поверхностью, обладают способностью связывать эндотоксины. Следовательно, это позволяет использовать их в качестве эффективных средств для предупреждения эндотоксического шока и сепсиса кишечного происхождения, бактериальной транслокации, некротического энтероколита, воспалительного заболевания кишечника, кишечных инфекций, хронической эндотоксинемии, ассоциированной или вызванной катаболическим и системным воспалением.

Предпочтительно гидрофобные лактобактерии или бифидобактерии имеют процент гидрофобности (%Г) по меньшей мере 80 и более предпочтительно от 85 до 100%Г.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения данный штамм выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

В другом аспекте данное изобретение относится к выделенному штамму лактобактерии или бифидобактерии, имеющему гидрофобные свойства клеточной поверхности, выбранному по его способности связывать эндотоксины или коагрегировать с грамотрицательными бактериями.

В следующем аспекте данное изобретение предлагает пищевую композицию для человека или домашнего животного для предупреждения или лечения заболеваний, опосредованных и/или ассоциированных с эндотоксином, содержащую, по меньшей мере, штамм лактобактерии и/или бифидобактерии, обладающих вышеупомянутыми характеристиками, связанных со съедобной основой или фармацевтической основой.

Данная композиция полезна для снижения чрезмерного роста бактерий в тонкой кишке и уменьшения поступления эндотоксина из кишечника во внутреннюю среду, часто встречающегося нарушения у домашних животных, что может, например, стать причиной случаев диареи, истощения и кишечного и системного воспаления.

В последнем аспекте данное изобретение относится к способу профилактики или лечения заболеваний, опосредованных и/или ассоциированных с эндотоксином, включающему в себя этап употребления с приемом пищи человеком или кормления животного композицией, содержащей, по меньшей мере, штамм лактобактерий и/или бифидобактерий, клеточная поверхность которых обладает гидрофобными свойствами, связанных со съедобной основой или фармацевтической основой.

Подробное описание изобретения

На всем протяжении описания "NCC" означает Коллекцию культур Нестле (Nestle) (Nestle Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Switzerland).

В отношении первого объекта данного изобретения рассматривается применение по меньшей мере одного штамма лактобактерий и/или бифидобактерий, клеточная поверхность которых обладает гидрофобными свойствами, для приготовления композиции, предназначенной для профилактики или лечения заболеваний, опосредованных и/или ассоциированных с эндотоксином.

Фактически неожиданно было обнаружено, что некоторые лактобактерии и бифидобактерии, главным образом с гидрофобной поверхностью, обладают способностью связывать эндотоксины.

В действительности бактериальный штамм по данному изобретению обладает способностью связывать эндотоксины на гидрофобной клеточной стенке и, следовательно, удалять этот провоспалительный продукт грамотрицательных бактерий, который, кроме прочего, может перемещаться из просвета кишки в кровь и тем самым запускать воспалительные реакции и в более серьезных случаях эндотоксический шок.

Лактобактерии или бифидобактерии по данному изобретению были выбраны из числа штаммов, подходящих для потребления животными, с точки зрения процента их гидрофобности (%Г), как описано у A.G. Zavaglia et al., Journal of Food protection. Vol. 61, No. 7, 1998, p. 865-873.

Предпочтительно бактериальный штамм по данному изобретению имеет %Г по меньшей мере 80 и более предпочтительно от 85 до 100%Г.

Определение гидрофобности клеточной поверхности осуществляли с помощью МATH метода, как описано ранее (Perez, P.F. et al., 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26).

Вкратце, 2 мл бактериальной суспензии (приблизительно 10^8 КОЕ/мл, PBS) экстрагировали 0,4 мл ксилола путем интенсивного перемешивания их в течение 120 с. Фазам давали возможность разделиться декантацией и измеряли A_{600} водной фазы. Гидрофобность клеточной поверхности (%Г) подсчитывали по формуле $G\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$ где A_0 и A представляют собой поглощение до и после экстракции ксилолом соответственно.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения бактериальный штамм может быть выбран из группы, состоящей из *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *lactis*, *Bifidobacterium* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный штамм может представлять собой, например, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, CNCM I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (ранее CIDCA 533, CNCM I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

Среди различных штаммов, выбранных в соответствии с настоящим изобретением, в качестве примера следующие штаммы были депонированы по Будапештскому договору в Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France: *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463, 2.02.2001 под ссылкой номером CNCM I-2623 и *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 и NCC 235, 12.10.99 под ссылкой номером CNCM I-2333 и CNCM I-2335 соответственно. *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 был депонирован 15.03.99 под ссылкой номером CNCM I-2168.

Штамм *Bifidobacterium lactis* (Bb12) (ATCC 27536) предоставлен Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Voegelé Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Danemark). Гидрофобность этого штамма составляет 89 %Г.

Бактериальный штамм по настоящему изобретению может быть использован для приготовления композиций, предназначенных для улучшения здоровья человека или животного, в частности для профилактики или лечения нарушений, связанных с эндотоксинами у человека и домашних животных. Бактериальный штамм может быть использован как эффективное средство, например, для профилактики эндотоксического шока и сепсиса кишечного происхождения, бактериальной транслокации, некротического энтероколита, воспалительного заболевания кишечника, кишечных инфекций и хронической эндотоксинемии, ассоциированной или вызванной катаболическим или системным воспалением.

Бактериальный штамм по данному изобретению может быть использован в жизнеспособном или инактивированном виде.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения штамм лактобактерий используют в присутствии его ферментированной питательной среды. Указанная среда, например, может быть стерилизована как сама, так и с пищей, экструдирована или высушена распылением, подвергнута охлаждению или застabilизирована для хранения.

Бактериальный штамм может быть использован таким образом, чтобы количество, доступное для индивидуума, соответствовало примерно 10^3 - 10^{14} КОЕ в день. Это количество зависит от веса индивидуума и предпочтительно составляет примерно 10^9 - 10^{12} КОЕ/день для людей и 10^7 - 10^{10} КОЕ/день для домашних животных.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к выделенному штамму лактобактерий или бифидобактерий, имеющих гидрофобные свойства клеточной поверхности и обладающих способностью связывать эндотоксины или коагрегировать с грамотрицательными бактериями.

Способность бактериального штамма по настоящему изобретению связывать эндотоксины может быть легко измерена с использованием эндотоксинов, меченных ФИТЦ, измерения связывания радиоактивно меченного эндотоксина с бактериальными клетками, причем в этом случае молекулярная структура эндотоксина не изменяется по сравнению с возможными модификациями, которые может претерпевать молекула после конъюгации с ФИТЦ (см. примеры).

Предпочтительно определяют способность бактериального штамма удалять эндотоксин из раствора, в котором воспроизводят количество эндотоксина, обнаруженного в кишечнике человека. Например, микроанализом уровни эндотоксинов были определены для определения 2-кето-3-дезоксиктоната группы в липополисахариде грамотрицательных бактерий (Karkhanis Y D, et al., Analytical Chemistry (1978) 85: 595-601). Предпочтительно отбирали бактерии, удаляющие более 30% эндотоксина, содержащегося в данных растворах. Негидрофобные бактерии, испытанные в данном исследовании, не обладали способностью изменять начальное содержание эндотоксина (см. примеры).

Такие бактериальные штаммы могут быть использованы как описано выше, и, в частности, в качестве эффективного средства для профилактики, например, эндотоксического шока и сепсиса кишечного происхождения, бактериальной транслокации, некротического энтероколита, воспалительного заболевания кишечника, кишечных инфекций, хронической эндотоксемии, ассоциированной или вызванной каталитическим и системным воспалением.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к пищевой композиции для человека или домашних животных, содержащей, по меньшей мере, выделенный штамм лактобактерий и/или бифидобактерий, где указанный штамм, имеющий вышеуказанные характеристики, ассоциирован со съедобной подложкой или фармацевтической основой.

Указанный штамм может быть выбран как описано выше.

Предпочтительно лактобактерии или бифидобактерии можно применять в качестве дополнения к стандартной диете или как компонент питательно полноценной пищи для человека или домашнего животного.

Пищевые композиции для человека или домашнего животного могут содержать, по меньшей мере, штамм лактобактерий и/или бифидобактерий, как описано выше, так, чтобы количество, доступное для индивидуума, могло соответствовать примерно 10^3 - 10^{14} КОЕ в день. Это количество зависит от веса индивидуума и предпочтительно составляет примерно 10^9 - 10^{12} КОЕ/день для людей и 10^7 - 10^{10} КОЕ/день для домашних животных.

Пищевой продукт для человека может быть, например, в форме питательного состава, состава для младенцев, продуктов на основе молока, молочных продуктов, продуктов на основе злаков. Для приготовления такого пищевого продукта или композиции описанный выше бактериальный штамм может быть включен в пищевые продукты, такие как пищевые продукты на основе зерна, в сухое молоко, йогурт, в частности, в процессе их производства.

В одном варианте осуществления изобретения может быть приготовлен питательный состав, содержащий источник белка и по меньшей мере один бактериальный штамм по данному изобретению. В качестве источника белка предпочтительно использовать диетические белки. Диетическими белками могут быть любые подходящие диетические белки, например, животные белки (такие как молочные белки, белки мяса и яичные белки), растительные белки (такие как белки сои, пшеницы, риса или гороха), смеси свободных аминокислот или их комбинация. Главным образом предпочтительны молочные белки, такие как казеин, сывороточные белки и соевые белки. Данная композиция также может содержать источник углеводов и источник жиров.

В том случае, когда питательный состав включает в себя источник жира, данный источник жира предпочтительно обеспечивает примерно от 5 до 55% энергии данного питательного состава, например приблизительно от 20 до 50% энергии. Липидами, составляющими источник жира, могут быть любые подходящие жиры или смеси жиров. В частности, подходят растительные жиры, например соевое масло, пальмовое масло, кокосовое масло, сафлоровое масло, подсолнечное масло, кукурузное масло, канола,

лецитин и подобное. Также, если требуется, могут быть добавлены животные жиры, такие как молочные жиры.

В том случае, когда питательный состав включает в себя источник углеводов, данный источник углеводов предпочтительно обеспечивает примерно от 40 до 80% энергии данного питательного состава. Могут быть использованы любые подходящие углеводы, например сахароза, лактоза, глюкоза, фруктоза, сухой кукурузный сироп и мальтодекстрины и их смеси.

Также, если требуется, могут быть добавлены пищевые волокна. Имеется большое количество видов волокон. Подходящие источники волокна, среди прочих, могут включать в себя сою, горох, овес, пектин, гуаровую смолу и аравийскую камедь. При использовании волокна предпочтительно составляют примерно до 5% энергии данного питательного состава. В питательный состав могут быть включены подходящие витамины и минералы обычным способом, в соответствии с подходящими руководствами. Если требуется, в питательный состав могут быть включены один или более эмульгаторов пищевых сортов; диацетилвиннокислые эфиры моно-диглицеридов, лецитин и моно- и диглицериды. Аналогично этому могут быть включены подходящие соли и стабилизаторы.

Предпочтительно питательный состав предназначен для применения энтерального, например в виде порошка, жидкого концентрата или напитка, готового к употреблению.

Данный питательный состав может быть приготовлен любым подходящим образом. Например, питательный состав может быть приготовлен путем смешивания вместе источника диетического белка, источника углеводов и источника жира в соответствующих количественных соотношениях. При использовании в смесь могут быть включены эмульгаторы. В этот момент могут быть добавлены витамины и минералы, но их обычно добавляют позже, чтобы избежать разрушения нагреванием. Любые жирорастворимые витамины, эмульгаторы и подобное могут быть растворены в источнике жира до смешивания. Затем можно смешать воду, предпочтительно воду, которую подвергли обратному осмосу, с получением жидкой смеси. Подходящая температура воды составляет примерно от 50 до 80°C для улучшения распределения ингредиентов. Для образования жидкой смеси могут быть использованы коммерчески доступные разжижители. Жидкую смесь затем гомогенизируют, например, в два этапа.

Затем жидкая смесь может быть термически обработана для уменьшения бактериальной нагрузки. Например, жидкая смесь может быть быстро нагрета до температуры в интервале примерно от 80 до 150°C примерно в течение от 5 с до 5 мин. Это может быть выполнено посредством острого пара, автоклавирования или с помощью теплообменника, например пластинчатого теплообменника. Жидкую смесь затем можно охладить примерно до температуры от 60 до 85°C, например, быстрым охлаждением. Затем жидкую смесь можно снова гомогенизировать; например в два этапа примерно при 7-40 МПа на первом этапе и примерно при 2-14 МПа на втором этапе. Гомогенизированная смесь затем может быть дополнительно охлаждена для добавления каких-либо компонентов, чувствительных к нагреванию, таких как витамины и минералы. В этот момент удобно стандартизировать pH и содержание сухих веществ гомогенизированной смеси.

Если требуется получение порошкообразного питательного состава, гомогенизированную смесь переносят в подходящий сушильный аппарат, такой как распылительная сушилка или сублимационная сушилка, и превращают в порошок. Содержание влаги в данном порошке должно составлять менее чем примерно 5 вес.%.

Если необходимо получить жидкий состав, гомогенизированную смесь предпочтительно поместить в подходящие емкости в асептических условиях. Асептическое заполнение емкостей может быть проведено предварительным нагреванием гомогенизированной смеси (например, приблизительно до 75-85°C) и затем введением пара в гомогенизированную смесь для повышения температуры примерно до 140-160°C, например приблизительно до 150°C. Затем гомогенизированная смесь может быть охлаждена, например, быстрым охлаждением, до температуры примерно 75-85°C. Гомогенизированная смесь затем может быть гомогенизирована, дополнительно охлаждена, примерно до комнатной температуры, и помещена в емкости. Подходящая аппаратура для проведения асептического заполнения подобного рода коммерчески доступна. Жидкий состав может быть в виде готового для кормления состава, имеющего содержание сухих веществ примерно от 10 до 14 вес.%, или может быть в форме концентрата; в большинстве случаев содержание сухих веществ составляет примерно от 20 до 26 вес.%. К жидким составам могут быть добавлены ароматизаторы так, чтобы данные составы доставлялись в виде удобных, ароматизированных, готовых к употреблению напитков.

В другом варианте осуществления изобретения обычный пищевой продукт может быть обогащен бактериальным штаммом в соответствии с настоящим изобретением. Например, ферментированное молоко, йогурт, свежий сыр, сычужное молоко, кондитерские плитки, хлопья или плитки из злаков для завтрака, напитки, молочные порошки, продукты, основанные на сое, немолочные ферментированные продукты или пищевые добавки для клинического питания.

В следующем варианте осуществления изобретения, может быть приготовлена питательно полноценная пищевая композиция для домашнего животного. Композиция может быть в форме порошкообразного, в форме сухого, полусырого или сырого, охлажденного или застabilизированного для хранения пищевого продукта для домашних животных. Композиция также может быть диетическим дополнением

для домашнего животного или фармацевтической композицией. Эти пищевые продукты для животных могут быть получены обычным способом. Помимо бактериального штамма, эти корма для домашних животных могут включать в себя любой один или более источников крахмала, источник белка и источник липида.

Подходящими источниками крахмала, например являются злаки и бобовые, такие как кукуруза, рис, пшеница, ячмень, овес, соя и их смеси. Подходящие источники белка могут быть выбраны из любого подходящего источника животного или растительного белка, например, мясо и мука, мясо домашней птицы, мясо рыбы, концентраты соевого белка, молочные белки, глютен и подобное. Для более старых животных предпочтительно, чтобы источник белка содержал белок высокого качества. Подходящие источники липидов включают в себя различные сорта мяса, животные жиры и растительные жиры. Более того, если требуется, в корм для домашнего животного также могут быть включены различные другие ингредиенты, например, сахар, соль, специи, приправы, витамины, минералы, вкусовые вещества, жиры и подобное.

Для сухих кормов для животных подходящим процессом является экструзионная термообработка, хотя могут быть использованы выпекание и другие подходящие способы. При экструзионной обработке сухой корм для животных обычно поставляется в виде гранул. При использовании пребиотиков пребиотики могут быть дополнительно смешаны с другими ингредиентами сухого корма для животных до обработки. Подходящий способ описан в европейской патентной заявке № 0850569; раскрытие которого включено в качестве ссылки. При использовании пробиотического микроорганизма данный организм лучше всего наносить на сухой корм для животных или включать в него. Подходящий способ описан в европейской патентной заявке № 0862863; раскрытие которого включено в качестве ссылки.

Для сырых кормов, для производства продуктов, имитирующих мясо, может быть использован способ, описанный в патентах США 4781939 и 5132137. Раскрытие этих патентов приведено в качестве ссылки. Также могут быть использованы другие способы для производства порционных продуктов, например, приготовление в паровой печи. Альтернативно, формованные продукты могут быть получены путем эмульгации подходящего мясного сырья с получением мясной эмульсии, добавления подходящего желатинизирующего агента и нагревания мясной эмульсии перед наполнением консервных банок или других емкостей.

Количество пребиотиков в корме для животных предпочтительно составляет примерно 20 вес.%, главным образом примерно 10 вес.%. Например, пребиотик может содержать примерно от 0,1 до примерно 5 вес.% корма для животных. Для животных кормов, в которых в качестве пребиотика используют цикорий, содержание цикория может составлять примерно от 0,5 до примерно 10 вес.% пищевой смеси; более предпочтительно примерно от 1 до примерно 5 вес.%.

При использовании пробиотического микроорганизма предпочтительно корм для животных содержит примерно от 10^4 до примерно 10^{10} клеток пробиотического микроорганизма на грамм корма для животного; более предпочтительно примерно от 10^6 до примерно 10^8 клеток пробиотического микроорганизма на грамм. Корм для животного может содержать примерно от 0,5% до примерно 20 вес.% смеси пробиотического микроорганизма; предпочтительно примерно от 1 до примерно 6 вес.%, например примерно от 3 до примерно 6 вес.%.

Корма для животных могут содержать другие активные вещества, такие как жирные кислоты с длинной цепью. Подходящие жирные кислоты с длинной цепью включают в себя альфа-линолевую кислоту, гамма-линолевую кислоту, линолевую кислоту, эйкозопентановую кислоту и докозагексановую кислоту. Жиры рыб являются подходящим источником эйкозопентановых кислот и докозагексановой кислоты. Масло огуречника аптечного, масло семян черной смородины и масло примулы вечерней - подходящие источники гамма-линолевой кислоты. Сафлоровые масла, подсолнечные масла, кукурузные масла и масла соевых бобов являются подходящими источниками линолевой кислоты. При необходимости корма для домашних животных дополняют минералами и витаминами так, чтобы они были питательно полноценными.

Дополнительно, если требуется, бактериальный штамм может быть инкапсулирован, например, в сахарную оболочку, жировую оболочку или полисахаридную оболочку.

Количество корма, потребляемого животным для получения благоприятного воздействия, будет зависеть от размера животного, вида животного и возраста животного. Однако в большинстве случаев количество корма для комнатного животного, обеспечивающего дневное количество примерно 10^3 - 10^{14} КОЕ по меньшей мере одного штамма лактобактерий или бифидобактерий, было бы достаточно. Например, предпочтительно дают примерно 10^9 - 10^{10} КОЕ/день собакам или 10^7 - 10^{10} КОЕ/день кошкам.

Композиция по данному изобретению главным образом предназначена для профилактики или лечения инфекций, связанных с грамотрицательными бактериями, с бактериями, выделяющими эндотоксин, такими как *Helicobacter spp.*, *Salmonella spp.*, а также избыточного бактериального роста в тонкой кишке (SIBO), которые все клинически могут проявляться в виде диареи, при кишечных или системных воспалительных состояниях, или катоболизме и нарушении питания.

В соответствии с последним аспектом, данное изобретение предлагает способ профилактики или лечения нарушений, опосредованных эндотоксином и/или связанных с ним, включающий в себя этап

приема пищи человеком или кормления животного композицией, содержащей, по меньшей мере, штамм лактобактерий и/или бифидобактерий, которые обладают гидрофобными свойствами клеточной поверхности, связанный с проглатываемой подложкой или фармацевтической основой.

В частности, этот способ может быть предназначен для профилактики или лечения инфекций, связанных с грамотрицательными бактериями, бактериями, продуцирующими эндотоксин, такими как *Helicobacter spp.*, *Samonella spp.*, а также избыточного бактериального роста в тонкой кишке (SDBO), клинически все они могут проявляться в виде диареи, кишечных или системных воспалительных состояний или катаболизма и нарушения питания.

Следующие примеры даны только с целью иллюстрации объекта изобретения настоящей заявки, а не для ограничения. Все проценты даны по массе, если не указано другое. Данным примерам предшествует краткое описание фигур.

Описание чертежей

Фиг. 1 - гистограммы для штамма *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, CNCM 1-2333) показывают связывание ФИТЦ-ЛПС. А: контроль без ФИТЦ-ЛПС. В: инкубирование с 50 мкл/мл ФИТЦ-ЛПС. Было исследовано по меньшей мере 16000 случаев.

Фиг. 2 - влияние альбумина на связывание ФИТЦ-ЛПС лактобактериями и бифидобактериями. А: штамм *Bifidobacterium bifidum* NCC 200 (ранее CIDCA 538, CNCM 1-2334). В: штамм *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623). С: штамм *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, CNCM I-2333).

Фиг. 3 - кинетика роста и связывания ФИТЦ-ЛПС для штамма *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, CNCM 1-2333). Средние значения из двух независимых экспериментов.

Фиг. 4 - связывание ЛПС штаммом бифидобактерий, определенное с помощью микроанализа для выявления 2-кето-3-дезоксиктоната (КДО) в липополисахариде. Начальная концентрация раствора составляла 100 мкг/мл. Прямоугольники показывают конечную концентрацию после инкубирования раствора с гидрофобными бактериальными штаммами NCC 189 и NCC 251 (CNCM I-2168) по сравнению с негидрофобным штаммом бактерий (NCC 200 (CNCM I-2334)).

Фиг. 5 - провоспалительная активность (IL-8 (нг/мл)) раствора ЛПС, предварительно инкубированного с гидрофобными бактериями, на эпителиальных клетках человека HT-29. Контрольные образцы DMEM, молоко человека (НМ) 2%, ЛПС (2,5 мкг/мл) в отдельности, отдельно штамм *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (1.5e8 КОЕ/мл) были протестированы на фоновую стимулирующую активность. Тестируемые растворы ЛПС + молоко человека (источник SCD14) сравнивали с раствором, содержащим ЛПС 2,5 мкг/мл + НМ 2% предварительно инкубированным со штаммом *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (1.5e8 КОЕ/мл).

Примеры

Пример 1. Отбор штамма лактобактерий по данному изобретению.

Отбор гидрофобных бактерий изначально был основан на % распределения бактериальных клеток между органической (гидрофобной) и водной фазой. Определение гидрофобности клеточной поверхности проводили с использованием МATH способа, как описано ранее (Perez, P.F. et al., 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26). Вкратце, 2 мл бактериальной суспензии (около 10⁸ КОЕ/мл, PBS) экстрагировали 0,4 мл ксилола путем их интенсивного перемешивания в течение 120 с. Фазы оставляли для разделения декантацией и измеряли A₆₀₀ водной фазы. Гидрофобность клеточной поверхности (%Г) рассчитывали по формуле $\Gamma\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$, где A₀ и A представляют собой оптические плотности до и после экстракции ксилолом соответственно.

Впоследствии лактобактерии и бифидобактерии отбирали по их способности удалять эндотоксин из раствора, в котором воспроизведено количество эндотоксина, обнаруженное в кишечнике человека. Уровни эндотоксина исследовали с помощью микроанализа для выявления 2-кето-3-дезоксиктоновых групп в липополисахариде грамотрицательных бактерий (Karkhanis Y.D, et al., Analytical Chemistry (1978) 85:595-601).

Отбирали бактерии, удаляющие более 30% содержания эндотоксина из этих растворов. Негидрофобные бактерии, тестируемые в этом исследовании, не обладали способностью изменять первоначальное содержание эндотоксина.

Пример 2. Действие лактобактерий в качестве поглотителя эндотоксина *in vitro*.

Взаимодействие между ЛПС из *Escherichia coli* и лактобактериями, несущими различные свойства клеточной поверхности, изучали с применением отобранных бактерий с гидрофобностью более 80% и несколькими негидрофобными «негативными» контролями, взаимодействие с флуоресцентно меченым эндотоксином, проводили методом проточной цитометрии.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования

Штамм *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623) был получен из Nestec collection (Lausanne, Switzerland). Штаммы *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, I-2333) и *Bifidobacterium bifidum* NCC 200 (ранее CIDCA 538, (CNCM I-2334)) были получены из коллекции Centro de Investigacion y Desarrollo en Criotecnologia de Alimentos (La plata, Argentina). Замороженные суспензии

(-80°C), стабилизированные 10% (об./об.) глицерина, реактивировали однократно в MRS бульоне перед экспериментами. Все выращивания бактерий проводили при 37°C в анаэробных условиях (BBL GasPak Plus).

ФИТЦ-ЛПС связывание

Липополисахарид и липополисахарид, меченный ФИТЦ, были получены из серотипа 0111:B4 *Escherichia coli* (Skelly, R.R et al., 1979, Infect. Immun. 23: 287-293) и приобретены фирмой Sigma. Исходные растворы, содержащие 1000 мкг/мл, готовили в дистиллированной воде и соответственно разводили.

Бактериальные культуры трижды промывали PBS и суспензии стандартизировали до 10^7 КОЕ/мл. 400 мкл перемешивали с различными количествами ФИТЦ-ЛПС или ЛПС с получением ряда концентраций от 0 до 50 мкг/мл в реакционной смеси. Инкубирования проводили при 4 или 37°C в течение 30 мин, а затем клетки промывали дважды PBS и фиксировали 1% параформальдегидом (об./об.) в течение 30 мин при 4°C. Проточную цитометрию проводили с использованием сине-зеленого возбуждающего света (FACScan™).

Гидрофобность клеточной поверхности

Определение гидрофобности клеточной поверхности проводили с использованием MATH метода, как описано ранее (Perez, P.F. et al., 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64: 21-26). Вкратце, 2 мл бактериальной суспензии (около 10^8 КОЕ/мл, PBS) экстрагировали 0,4 мл ксилола путем их интенсивного перемешивания в течение 120 с. Данные фазы оставляли для разделения декантацией и измеряли A_{600} водной фазы. Гидрофобность клеточной поверхности (%Г) рассчитывали по формуле $H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$, где A_0 и A представляют собой оптические плотности до и после экстракции ксилолом соответственно.

Результаты

Гидрофобности клеточных поверхностей исследуемых штаммов показаны в табл. 1. Для штаммов *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623) и *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM I-2333) значения составили 93 и 96% соответственно, тогда как штамм *Bifidobacterium infantis* NCC 200 (CNCM I-2334) не являлся гидрофобным и показал значения около 3%.

Таблица 1

Гидрофобности исследуемых штаммов
Средние значения по меньшей мере 3 определений

Штамм	Гидрофобность %
NCC 2463 (CNCM I-2623)	93±3
NCC 189 (CNCM I-2333)	96±3
NCC 200 (CNCM I-2334)	3±2

Инкубирование штамма NCC 189 с 50 мкг/мл ЛПС, меченным ФИТЦ, отчетливо сдвигает популяцию бактерий в флуоресцентную зону. Случаи, соответствующие расположению с правой стороны диаграммы (маркер M1) представляют 90% сканированной популяции (фиг. 1В). Для суспензий, инкубированных без ФИТЦ-ЛПС, только 2% случаев различаются связывающей способностью.

Табл. 2 (ниже) показывает, что связывание ФИТЦ-ЛПС зависит от дозы. Было обнаружено 5 и 15% ФИТЦ (+) клеток для штаммов NCC 200. С другой стороны, штамм NCC 189 показывает около 95% ФИТЦ (+) клеток. Насыщение происходит около 10 мкг/мл ФИТЦ-ЛПС. Добавление альбумина, липид-связывающего вещества отчетливо уменьшает соотношение ФИТЦ (+) во всех исследуемых штаммах (фиг. 2). Однако штамм CIDCA 536 показывает около 30% ФИТЦ (+) клеток в присутствии 0,4% альбумина и 50 мкг/мл ФИТЦ-ЛПС (фиг. 2С). Более того, для этого штамма было обнаружено 10% ФИТЦ (+) клеток с концентрацией альбумина вплоть до 3%. Двухвалентные катионы (Ca^{2+} 0,9 мМ и Mg^{2+} 0,5 мМ) не изменяли связывание (данные не показаны).

Процент ФИТЦ (+) бактерий при различных концентрациях ФИТЦ-ЛПС
Проанализировано по меньшей мере 30000 случаев

ФИТЦ-ЛПС (мкг/мл)	Штамм	
	NCC 189	NCC 200
0	0,1	0,2
1	88,1	0,7
10	92,1	5,2
20	92,8	5,9
30	93,9	3,7
40	94,7	4,6
50	94,8	4,6

Связывание ФИТЦ-ЛПС для штамма *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (ранее CIDCA 536, CNCM I-2333) строго зависело от стадии роста (фиг. 3). Бактерии, собранные на стационарной фазе, показывают высокое соотношение ФИТЦ (+) клеток. Эти значения поразительно снижались во время лаг-фазы и прогрессивно восстанавливались во время роста. Не было обнаружено различий между связыванием при 4 и 37°C.

В итоге, в штаммах с высокой гидрофобностью выявляются ФИТЦ (+) клетки, которые достигают около 95% для штамма NCC 189. Негидрофобный штамм NCC 200 никогда не достигает значений выше 5%. Эти результаты показывают, что связывание ЛПС коррелирует с гидрофобностью клеточной поверхности.

Данные результаты четко указывают на то, что гидрофобные бактерии связывают эндотоксин, меченный ФИТЦ, и, следовательно, становятся флуоресцирующими. Как определено проточной цитометрией, при концентрации 10 мкг/мл эндотоксина более 90% гидрофобных клеточных культур становятся флуоресцирующими; напротив, менее 10% негидрофобных бактериальных клеток стали прозитивными при сходных концентрациях эндотоксина.

В тех случаях, когда гидрофобные культуры вводили в среду, содержащую эндотоксин в ряду концентраций от 30 до 90 мкг/мл, бактериальные культуры в концентрации от 10^7 до 10^8 бактерий на мл удаляли по меньшей мере 20% имеющегося эндотоксина. Эти данные были подтверждены с использованием радиоактивно меченного эндотоксина.

Пример 3. Эксперименты на иммунокомпетентных клетках человека.

Было изучено подавление провоспалительной реакции, вызываемой эндотоксином, в иммунокомпетентных клетках человека при наличии в культуральной системе гидрофобных штаммов в сравнении с негидрофобными бактериями.

Гидрофобные *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM I-2333) и негидрофобные *Bifidobacterium infantis* NCC 200 (CNCM I-2334) культивировали в растворе, содержащем определенное количество эндотоксина, как описано для метода с КДО (см. пример 1) (фиг. 4).

Наличие эндотоксина после инкубации с бактериальной суспензией отчетливо уменьшалось под действием гидрофобного штамма, тогда как для негидрофобного штамма изменения не наблюдались.

Пример 4. Функциональные изучения гидрофобных бактерий.

Материалы и методы

Промытые бактерии ресуспендировали в DMEM с высоким содержанием глюкозы (AMIMED) и предварительно инкубировали с ЛПС из *Escherichia coli* 0111: B4 (Sigma) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. После центрифугирования 200 мкл супернатанта или ресуспендированного бактериального осадка использовали для стимуляции эпителиальных клеток HT-29.

После 20-часового культивирования при 37°C супернатант клеточной культуры HT-29 исследовали на наличие IL-8 с использованием методики ELISA.

Результаты

Результаты представлены на фиг. 5. Провоспалительная активность ЛПС значительно снижалась в тех случаях, когда ЛПС предварительно инкубируют с гидрофобными бактериями. После центрифугирования супернатант, добавленный к культуре эпителиальных клеток человека (в присутствии молока человека, поскольку стимуляция ЛПС зависит от наличия sCD14), существенно уменьшился по отношению к супернатанту, который предварительно не инкубировали с гидрофобными бактериями.

Пример 5. Состав для младенцев.

Для получения состава для младенцев готовят следующую смесь, содержащую на 100 мл состава: от 0,5 до 5%, предпочтительно 2% пептидов, от 0,2 до 10%, предпочтительно 4% жира, от 1 до 25%,

предпочтительно 8% нелевановых углеводов (включая лактозу 65%, мальтодекстрин 20%, крахмал 15%), и по меньшей мере 10^6 КОЕ/мл следующих штаммов: *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM I-2333), *Bifidobacterium bifidum* CNCM I-2335, *Bifidobacterium adolescentis* CNCM I-2168, в сочетании с незначительным количеством витаминов и олигоэлементов до соответствия ежедневным потребностям и от 0,01 до 2%, предпочтительно 0,3% минералов и от 50 до 90%, предпочтительно 75% воды.

Пример 6. Применение гидрофобных лактобактерий по данному изобретению в молочных продуктах.

Один штамм или более *Bifidobacterium bifidum* (CNCM I-2333), *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (CNCM I-2335) или *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM I-2168) по настоящему изобретению может быть использован для производства ферментированных молочных продуктов, подобных йогурту.

Для этого готовят 1 л молочного продукта, содержащего 2,8% жиров и дополненного 2% порошка снятого молока и 6% сахара, пастеризуют при 96°C в течение 30 мин и температуру снижают до 42°C. Прекультуру незагущенного штамма *Streptococcus thermophilus* и невязкого штамма *Lactobacillus bulgaricus* реактивировали в стерильной MSK культуральной среде, содержащей 10% восстановленного молочного порошка и 0,1% промышленного дрожжевого экстракта.

Прекультуру одного штамма или более также реактивировали в среде, содержащей 10% восстановленного молочного порошка и 0,1% промышленного дрожжевого экстракта с 1% сахарозы. Пастеризованный молочный продукт затем инкубировали с 1% каждого из реактивированных культуральных предшественников и этот молочный продукт затем оставляли для брожения при 32°C до достижения значения pH 4,5. Данным способом получают ферментированные молочные продукты, подобные йогурту, и хранят при 4°C.

Пример 7. Сухой корм для собак.

Кормовую смесь составляют примерно из 58 мас.% кукурузы, примерно 5,5 мас.% кукурузного глютена, примерно 22 мас.% мяса цыпленка, 2,5% сушеного цикория, молока, ферментированного штаммами *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623) так, чтобы соответствующее количество для собак составляло около 10^9 - 10^{10} КОЕ/день, и соли, витамины и минералы, составляющие остаток.

Заправляемую смесь заправляли в прекондиционер и увлажняли. Увлажненный корм затем заправляли в устройство для экструзионной обработки и желировали. Желированное вещество, выходящее из устройства для экструзионной обработки, продавливали через матрицу и подвергали экструзии. Экструдат режут на части, подходящие для кормления собак, высушивают примерно при 110°C в течение, приблизительно, 20 мин и охлаждают для формирования гранул.

Этот сухой корм для собак может улучшить здоровье домашнего животного и, в частности, предупредить нарушения, связанные с эндотоксинами у комнатных животных.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный штамм лактобактерий, обладающий гидрофобными свойствами клеточной поверхности, где процент гидрофобности (%Г) составляет по меньшей мере 80% и более предпочтительно от 85 до 100%, отобранный по его способности связывать эндотоксины или коагрегировать с грамотрицательными бактериями.

2. Штамм по п.1, где лактобактерий связывают по меньшей мере 30% эндотоксина из раствора, концентрации в котором сходны с содержанием эндотоксина в кишечнике.

3. Штамм по п.1 или 2, выбранный из группы, состоящей из *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*.

4. Штамм по любому из пп.1-3, представляющий собой *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM I-2623).

5. Выделенный штамм бифидобактерий, обладающий гидрофобными свойствами клеточной поверхности, где процент гидрофобности (%Г) составляет по меньшей мере 80% и более предпочтительно от 85 до 100 %, отобранный по его способности связывать эндотоксины или коагрегировать с грамотрицательными бактериями.

6. Штамм по п.5, где бифидобактерий связывают по меньшей мере 30% эндотоксина из раствора, концентрации в котором сходны с содержанием эндотоксина в кишечнике.

7. Штамм по п.5 или 6, выбранный из группы, состоящей из *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

8. Штамм по любому из пп.5-7, представляющий собой *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (CNCM I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC 27536).

9. Пищевая композиция для человека или комнатного животного, содержащая по меньшей мере один штамм лактобактерий и/или бифидобактерий по любому из пп.1-8, связанный со съедобной основой или фармацевтической основой.

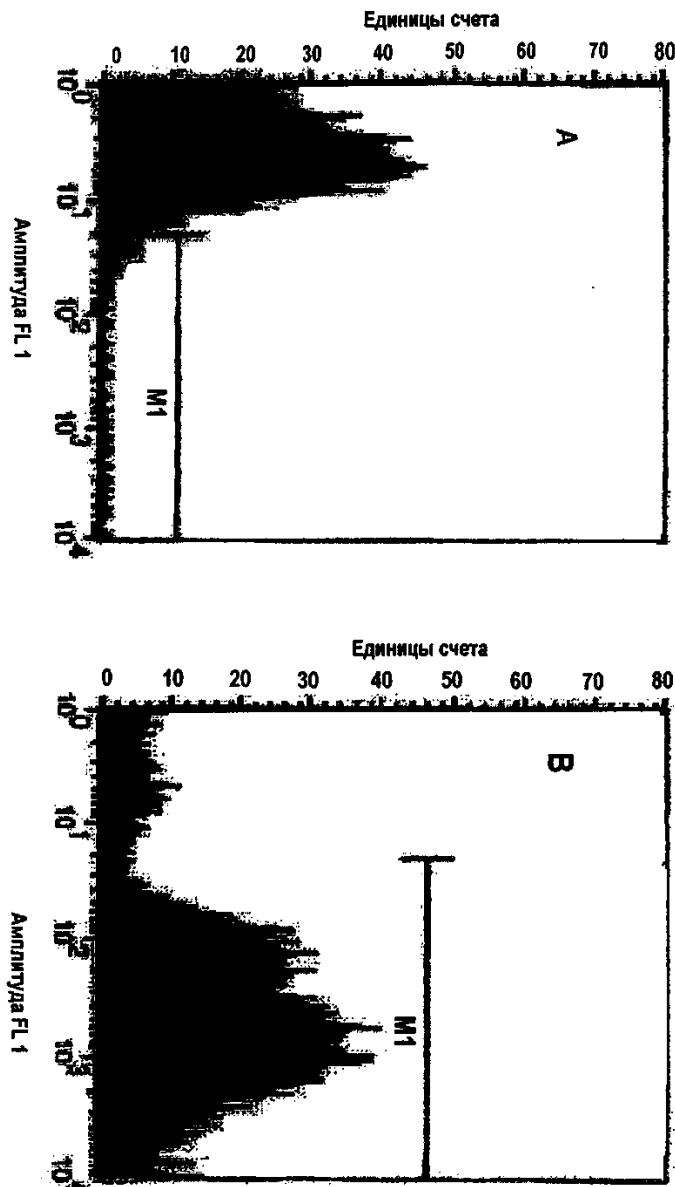
10. Композиция по п.9, содержащая указанный штамм в его жизнеспособной или инактивированной форме.

11. Композиция по любому из пп.9 или 10, где количество лактобактерий, доступное для индивидуума, соответствует примерно 10^3 - 10^{14} КОЕ в день.

12. Применение композиции по любому из пп.9-11 для ослабления, предупреждения или лечения нарушений, опосредованных эндотоксином и/или ассоциированных с ним.

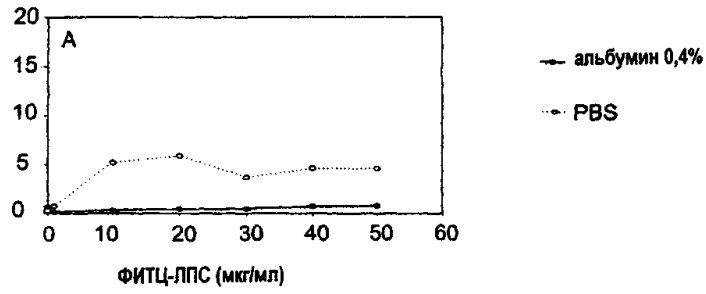
13. Применение по меньшей мере одного штамма по любому из пп.1-8 для получения композиции, предназначенной для профилактики или лечения нарушений, опосредованных эндотоксином и/или ассоциированных с ним.

14. Применение по п.13, где лактобактерий применяют таким образом, чтобы количество, доступное индивидууму, составляло примерно 10^3 - 10^{14} КОЕ в день.

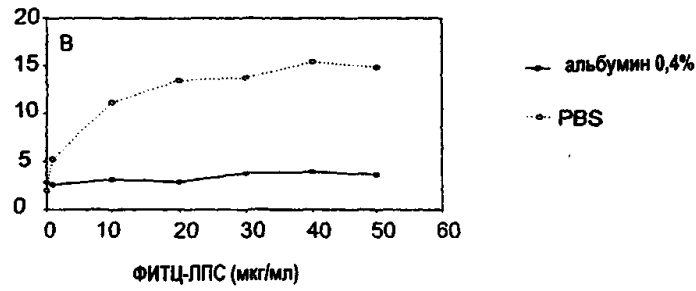


Фиг. 1

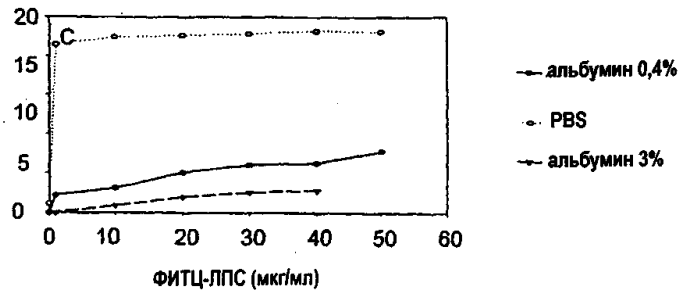
Процент ФИТЦ (+) клеток



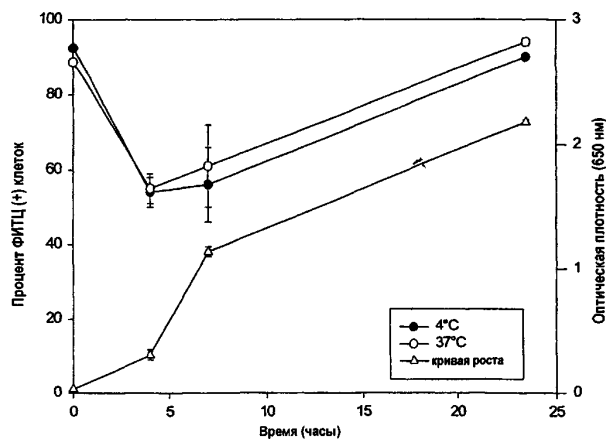
Процент ФИТЦ (+) клеток



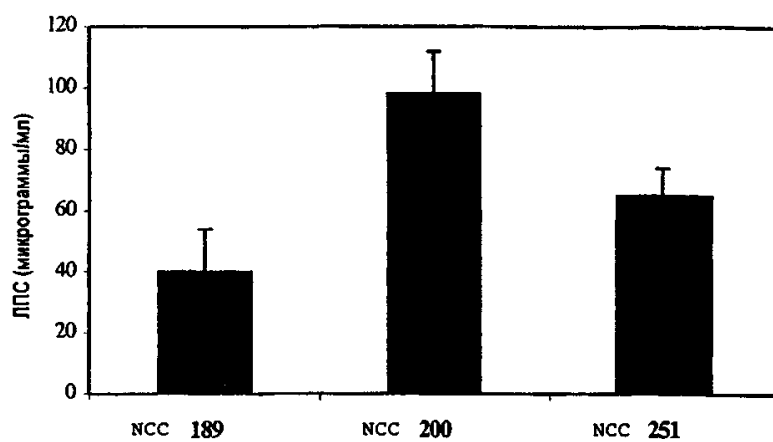
Процент ФИТЦ (+) клеток



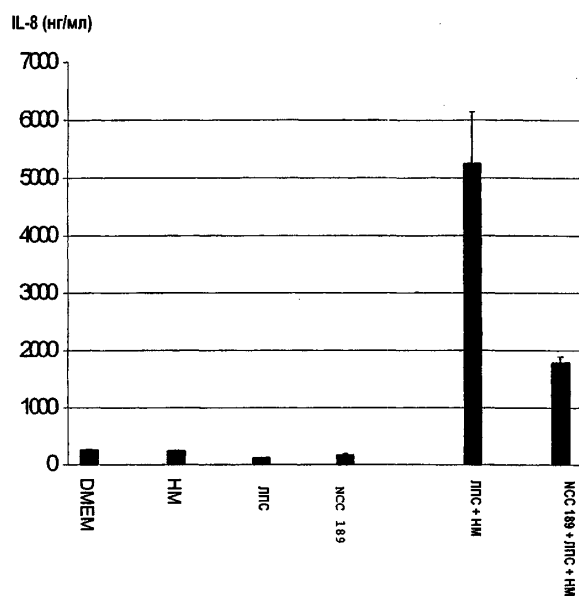
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

