



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 9/08 (2018.08); A61K 9/28 (2018.08); A61K 9/48 (2018.08); A61K 35/747 (2018.08); A61P 1/04 (2018.08); A61P 29/00 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018112564, 09.04.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.04.2018

Дата регистрации:
17.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 09.04.2018

(45) Опубликовано: 17.12.2018 Бюл. № 35

Адрес для переписки:

119333, Москва, ул. Губкина, 3, Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Отдел
генетических основ биотехнологий, Даниленко
В.Н.

(72) Автор(ы):

Марсова Мария Викторовна (RU),
Климина Ксения Михайловна (RU),
Абилев Серикбай Каримович (RU),
Полужкова Елена Ульриховна (RU),
Даниленко Валерий Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
(ИОГен РАН) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ЕА 6037 В1, 25.08.2005. US
2003215429 А1, 20.11.2003. US 9579353 В2,
28.02.2017. US 2017333525 А1, 23.11.2017. WO
2012142605 А1, 18.10.2012. ЕА 6018 В1,
25.08.2005.

(54) Фармацевтическая композиция для терапии воспалительных заболеваний слизистых оболочек кишечника на основе штамма *Lactobacillus brevis* 47f, проявляющая местную противовоспалительную активность

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и представляет собой фармацевтическую композицию, включающую штамм *Lactobacillus brevis* 47f, обладающую противовоспалительной активностью в отношении клеток слизистой оболочки кишечника. Изобретение обеспечивает восстановление архитектоники эпителия тонкой

и толстой кишки, восстановление пролиферации клеток эпителия слизистой оболочки кишечника, продуцирование антиоксидантных веществ, приводящих к снижению уровня процессов свободнорадикального окисления, что помогает предотвратить развитие воспалительного процесса. 6 з.п. ф-лы, 4 пр., 6 табл., 4 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 9/08 (2018.08); A61K 9/28 (2018.08); A61K 9/48 (2018.08); A61K 35/747 (2018.08); A61P 1/04 (2018.08); A61P 29/00 (2018.08)

(21)(22) Application: 2018112564, 09.04.2018

(24) Effective date for property rights:
09.04.2018

Registration date:
17.12.2018

Priority:

(22) Date of filing: 09.04.2018

(45) Date of publication: 17.12.2018 Bull. № 35

Mail address:

119333, Moskva, ul. Gubkina, 3, Institut obshchej
genetiki im. N.I. Vavilova RAN, Otdel
geneticheskikh osnov biotekhnologij, Danilenko
V.N.

(72) Inventor(s):

Marsova Mariya Viktorovna (RU),
Klimina Kseniya Mikhajlovna (RU),
Abilev Serikbaj Karimovich (RU),
Poluektova Elena Ulrikhovna (RU),
Danilenko Valerij Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
uchrezhdenie nauki Institut obshchej genetiki
im. N.I. Vavilova Rossijskoj akademii nauk
(IOGen RAN) (RU)

(54) PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF INTESTINAL MUCOSA
INFLAMMATORY DISEASES ON THE BASIS OF LACTOBACILLUS BREVIS 47f STRAIN, MANIFESTING
A LOCAL ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the
pharmaceutical industry and is a pharmaceutical
composition comprising a strain of Lactobacillus brevis
47f, which has intestinal mucosa cell anti-inflammatory
activity.

EFFECT: invention provides for the restoration of

the architectonics of the epithelium of the small and
large intestine, the restoration of the proliferation of
epithelial cells of the intestinal mucosa, production of
antioxidant substances, leading to a decrease in the level
of free radical oxidation processes, which helps prevent
the development of the inflammatory process.

7 cl, 4 ex, 6 tbl, 4 dwg

Область техники

Изобретение относится к пробиотическим фармацевтическим композициям, обладающим противовоспалительным действием в отношении слизистой оболочки кишечника, и состоит из штамма *L. brevis* 47f, продуцирующего антиоксидантные вещества, подавляющие свободнорадикальные процессы. Фармацевтическая композиция может быть использована для лечения и предотвращения воспалительных процессов слизистой оболочки кишечника, в частности при сопровождении химио- и лучевой терапии онкологических заболеваний, в том числе и мукозита.

Уровень техники

Одним из наиболее распространенных и тяжело протекающих побочных действий противораковых препаратов является лекарственная энтеропатия, приводящая к тяжелым воспалительным процессам. Химиотерапия является важнейшим способом лечения больных со злокачественными новообразованиями и используется почти во всех клинических ситуациях, показания к ней постоянно расширяются, совершенствуются препараты, изучаются их комбинации и сочетания с хирургическим и лучевым методами. Противоопухолевые препараты действуют и на неопухолевые клетки и особенно на делящиеся. Например, на постоянно обновляющийся эпителий кишечника, что приводит к лекарственной энтеропатии, проявляющейся тяжелыми нарушениями водно-солевого обмена (диспепсия, обезвоживание, болевой синдром). Патоморфологически это проявляется картиной мукозита, представляющей собой воспалительные (эритематозные и эрозивно-язвенные) поражения слизистой рта, глотки, пищевода, кишечника и в целом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Воспаление слизистой кишечника проявляется в клинической симптоматике (боль, диарея, нарушения пищеварения, пищевая аллергия и т.п.), что приводит к увеличению продолжительности госпитализации, потребности в нутритивной поддержке и медикаментах, что существенно повышает расходы на лечение. [Телетаева Г.М. 2009. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея). Практическая Онкология. Т. 10. No 3: 158-167.]. Проявления лекарственной энтеропатии могут привести к летальному исходу в результате тяжелой нутритивной недостаточности и ее осложнений. Непереносимость химиопрепаратов из-за выраженных клинических проявлений мукозита кишечника ограничивает лечение (отсрочка или прерывание курсов химиотерапии, уменьшение доз лекарств, удлинение сроков госпитализации, увеличение расходов на сопроводительную терапию и нутритивную поддержку).

Воспалительный процесс приводящий к мукозиту происходит следующим образом. В норме бокаловидные клетки эпителия слизистой оболочки тонкого кишечника продуцируют гликопротеин муцин, который образует гелеобразную среду, защищающую орган от атаки кишечной микрофлоры. Некоторые из противоопухолевых препаратов, включая 5-фторурацил, вызывают нарушения в функционировании и апоптоз бокаловидных клеток, что и приводит к истончению муцинового слоя. Это позволяет бактериям (находящимся в просвете кишечника или адсорбированным на слизистой оболочке) взаимодействовать с рецепторами врожденного иммунитета (Toll-подобными рецепторами) на поверхности эпителиоцитов. В результате запускаются каскады внутриклеточных сигналов, конвергирующих к активации транскрипционного фактора NFkB - механизма индукции генов воспаления. Развитие воспаления сопровождается накоплением окисленных молекул ("кислородный взрыв") и повреждением клеток слизистой оболочки, приводящим к мукозиту. Таким образом, меры предотвращения мукозита должны быть направлены на ограничение процессов, приводящих к

воспалению, главным из которых является ограничение образования активных форм кислорода и свободнорадикального окисления биомолекул в клетках кишечника.

Основные процессы, приводящие к развитию мукозита кишечника, исследованы на экспериментальной модели с использованием 5-фторурацила (5-ФУ) [Song M.K., Park M.Y, Sung M.K.J. 2013. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. *Cancer Prev.* V.18: 322-329]. В клинической онкологической практике 5-ФУ применяется при лечении рака различной локализации: рак толстой и прямой кишки, рак молочной железы, пищевода, желудка, поджелудочной железы, и др. 5-ФУ является противоопухолевым препаратом из группы антиметаболитов, ведет к изменению структуры РНК и подавлению деления патологических опухолевых клеток (антагонист пиримидинов). 5-ФУ ингибирует процесс деления клеток путем блокирования синтеза ДНК (вследствие угнетения активности фермента тимидилатсинтетазы) и образования структурно несовершенной РНК (вследствие внедрения фторурацила в ее структуру). Цитотоксическое действие 5-ФУ проявляется не только в отношении опухолевых клеток, но и касается наиболее часто делящихся клеток эпителиальных тканей и костного мозга [Телетаева Г.М. 2009. Профилактика и лечение желудочно-кишечных осложнений лекарственной терапии (тошнота и рвота, мукозиты, диарея). *Практическая Онкология.* Т. 10.№ 3: 158-167.]

Одним из подходов для предотвращения тяжелого осложнения химиотерапии мукозита кишечника является использование противовоспалительных свойств пробиотиков - продуцентов веществ, обладающих антиоксидантной активностью [Probiotics as potential antioxidants: A Systematic Review // V. Mishra, et. al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 03/2015; 6914]

Показано, что ряд пробиотических компонентов микрофлоры кишечника обладает антиоксидантными (Probiotics and Oxidative Stress T. Kullisaar. E Songisepp and M. Zilmer. University of Tartu, Bio-competence Centre of Healthy Dairy products LCC, Estonia, 2012) Lin J, Zou Y, Cao K, Ma C, Chen Z (2016) The impact of heterologous catalase expression and superoxide dismutase overexpression on enhancing the oxidative resistance in *Lactobacillus casei*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43:703-711. doi: 10.1007/s10295-016-1752-8; Lyu C, Hu S, Huang J, Luo M, Lu T, Mei L, Yao S (2016) Contribution of the activated catalase to oxidative stress resistance and γ -aminobutyric acid production in *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol* 238: 302-310. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.023, антимутагенными и противоопухолевыми свойствами (Effects of *Lactobacillus* strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro. S.S. Choi, Y. Kim, K.S. Han, S. You, S. Oh and S.H. Kim. *Letters in Applied Microbiology* 42 (2006) 452-458). Пробиотические микроорганизмы, в частности лактобациллы, являются продуцентами антиоксидантных веществ: глутатионпероксидазы, цистеина, цистамина и различных низкомолекулярных тиолов (Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. Achuthan, AA.. et. al. // *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39, 7887-97; Probiotics as potential antioxidants: A Systematic Review IN. Mishra, et. al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 03/2015; 63(14); Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A et al (2016) Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 352:560-564. doi: 10.1126/science.aad3503).

Лактобациллы являются пробиотическими микроорганизмами и считаются безопасными (GRAS - generally regarded as safe), они широко используются в функциональных пищевых продуктах, биологически активных добавках, лекарственных средствах. Пробиотики, и лактобациллы в частности, все чаще используются в комбинированном лечении начальных стадий различных заболеваний (язвенного колита, синдрома воспаленного кишечника, аллергических заболеваний). Существует

большой интерес к пробиотикам - естественным симбионтам человека, синтезирующим биологически активные вещества, в том числе антиоксиданты (Tang W, Xing Z, Li C, Wang J, Wang Y (2017) Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. Food Chem 221:1642-1649. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.10.124); A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota. Marsova M.V., Abilev S.K., Poluektova E.U., Damlenko V.N. // World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34:27 doi.org/10.1007/s11274-018-2410-2).

Использование микроорганизмов, являющихся естественными симбионтами человека, в качестве источника антиоксидантов (АО), имеет ряд преимуществ перед другими способами повышения антиоксидантного статуса организма. В отличие от химических фармацевтических препаратов, применение пробиотиков позволяет поддерживать постоянную продукцию АО в физиологических дозах непосредственно в слизистой толстого кишечника, исключая воздействие желудочного сока и желчи и возможную модификацию АО молекул. Такой подход особенно перспективен при лечении воспалительных заболеваний кишечника, спровоцированных приемом токсичных лекарственных средств. (Probiotics as potential antioxidants: A Systematic Review // V. Mishra, et. al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 03/2015; 63(14); Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? Chapman, CM.; Gibson, GR.; Rowland, I. // Eur J Nutr. 2011, 50, 1-17; Antioxidative potential of lactobacilli isolated from the gut of Indian people. Achuthan, AA.. et. al. // Mol. Biol. Rep. 2012, 39, 7887-97; Kleniewska P, Hoffmann A, Pniewska E, Pawliczak R (2016) The influence of probiotic *Lactobacillus casei* in combination with prebiotic inulin on the antioxidant capacity of human plasma. Oxidative Medicine and Cellular Longevity: 1340903. doi: 10.1155/2016/1340903).

Среди литературных и патентных данных мы не обнаружили сведения о пробиотических средствах на основе лактобацилл, апробированных на экспериментальной модели 5-ФУ-индуцированного мукозита. На данный момент не существует фармацевтической композиции (ФК) на основе пробиотика для терапии и профилактики мукозита, индуцированного противоопухолевыми препаратами, в частности 5-ФУ.

Раскрытие изобретения

Рисунок 1. Воспаление тонкой кишки, сопровождающееся картиной мукозита, у мыши, получавшей 5-фторурацил.

Рисунок 2. Восстановление структуры эпителия тонкой кишки при введении ФК, включающей *L. brevis* 47, и последующим введением 5-фторурацила.

Рисунок 3. Мукозит толстой кишки в ответ на введение 5-фторурацила.

Рисунок 4. Защитный эффект ФК, против мукозита толстой кишки, вызванного введением 5-фторурацила.

Технический результат

Предлагаемая фармацевтическая композиция на основе штамма *L. brevis* 47f отличается:

1. Способностью восстанавливать нарушения архитектоники эпителия тонкой и толстой кишки (Пример 3, рисунок 1, 2, 3, 4)
2. Способностью восстанавливать пролиферацию клеток эпителия слизистой оболочки кишечника (Пример 3, рисунок 2).
3. Способностью продуцировать антиоксидантные вещества, приводящие к снижению уровня процессов свободнорадикального окисления, что помогает предотвратить развитие воспалительного процесса.

Перечисленные особенности предлагаемой фармацевтической композиции

установлены на модели мукозита - воспалительного процесса, индуцированного у мышей противоопухолевым препаратом 5-фторурацилом. В качестве препарата сравнения был использован гастропротектор Ребамипид (Маклеодз Фармасьютикалз, Индия), который по всем показателям уступал заявляемой ФК.

- 5 На модели экспериментального мукозита показано, что 5-фторурацил вызывает в слизистой оболочке кишечника мышей изъязвления, истончение ворсин, снижение количества бокаловидных (слизеообразующих) клеток, резкое падение пролиферативной активности энтероцитов. Происходит развитие мукозита. Применение штамма *Lactobacillus brevis* 47f в комбинации с 5-фторурацилом способствует восстановлению
- 10 нарушений структуры эпителия тонкой и толстой кишки, способствует пролиферации клеток эпителия слизистой оболочки кишечника, приводящей к восстановлению продуцирующих муцин бокаловидных клеток. Для определения антиоксидантной активности веществ, выделяемых штаммом *Lactobacillus brevis* 47f, в опытах на мышах использовали стандартный метод определения малонового диальдегида в крови и в
- 15 других тканях, являющегося индикатором свободнорадикальных процессов.

Характеристика свойств и источников выделения штамма, фармацевтической композиции

- Штамм *L. brevis* 47f выделен из фекалий здоровой женщины в возрасте 38 лет, которая на момент обследования была клинически здорова, не имела в анамнезе инфекционных
- 20 и соматических заболеваний желудочно-кишечного тракта и других систем органов, в 2010 г. Ферментирует различные сахара и спирты, фенотипически апатогенен, т.е. не обладает гемолитической, протеазной, ДНК-азной, РНК-азной и казеиназной активностью. Не является зоопатогенными, не является фитопатогенными, не представляет опасности по другим причинам.

- 25 Штамм *L. brevis* 47f при культивировании на твердой среде MRS в течение 48 часов образует колонии S-формы с диаметром 2 мм, выпуклые, гладкие, белого цвета с ровными краями. При культивировании в жидкой среде MRS в течение 18 и более часов происходит равномерное помутнение среды по всему ее объему, кроме зоны аэробноза, с образованием осадка. При микроскопировании обнаруживаются одиночные
- 30 грамположительные палочки правильной формы с округлыми концами, 2-5 мкм. Проявляет высокую антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно-патогенным штаммам микроорганизмов (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* I фазы 941, *Bacillus subtilis* 534, *E.coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* K₁ 5054).

- 35 Антиоксидантная активность штамма *Lactobacillus brevis* 47f была определена методом тролоксового эквивалента *in vitro* с использованием набора (Sigma-Aldrich), позволяющего регистрировать образование катион-радикала. Культуральная жидкость и бесклеточные экстракты показали радикал-инактивирующую способность от 1.87 до 2.23 mM в тролоксовом эквиваленте [M. Marsova, S. Abilev, E. Poluektova, V Danilenko / World Journal of Microbiology and Biotechnology (2018) 34:27]
- 40

- Штамм *L. brevis* 47f депонирован в ВКПМ (г. Москва) 26.03.2015 г. В-12237. Штамм *L. brevis* 47f представлен известной нуклеотидной последовательностью генома. Последовательность генома охарактеризована и депонирована в международную базу GenBank (LBHR00000000). Установлено наличие генов, отвечающих за синтез белков
- 45 антиоксидантов. (Пример 1)

Биотехнология производства и хранения ФК

Культура пробиотического штамма *L. brevis* 47f выращивается в ферментере при анаэробных условиях в среде MRS до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ, переносится в

защитную среду для высушивания (раствор, содержащий 1% желатина (желатин пищевой марки К-13 ГОСТ 11293-89), 10% сахарозы (сахар белый ГОСТ Р 53396-2009)), лиофилизируется, смешивается со вспомогательными веществами (магния стеарат - антислеживающий агент) и стерильно расфасовывается в кишечнорастворимые капсулы. Жизнеспособность штамма в составе ФК сохраняется неизменной в течение 18 месяцев (10^8 КОЕ). Более длительное хранение не тестировалось.

Исследование токсичности ФК

Определение различных видов токсичности было проведено при использовании различных доз штамма *L. brevis* 47f в составе ФК на беспородных белых мышах (10^6 - 10^{10} КОЕ), крысах линии Вистар (10^6 - 10^{10} КОЕ) и кроликах породы Шиншилла (10^9 - 10^{12} КОЕ) при внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения. Были проверены следующие виды токсичности: острая, хроническая, иммунотоксичность, мутагенность и тератогенность.

Полученные результаты позволяют отнести ФК при использовании в терапевтических дозах к нетоксичным лекарственным веществам.

Исследование фармакокинетики ФК

Исследования по изучению фармакокинетики (времени выведения из кишечника животных) проведены на 2-х видах животных: мышах линии BALB/c и на крысах линии Вистар. Препарат вводился перорально в течение 5 дней в дозе 10^8 КОЕ. После 5-го дня введения ФК ежедневно в течение 20 дней проводился забор фекалий для определения количества пробиотических бактерий при помощи ПНР с праймерами, специфичными для штамма *L. brevis* 47f. Показано, что ФК на основе штамма *L. brevis* 47f обнаруживаются в фекалиях крыс и мышей после 1 дня и на протяжении 20 дней после окончания внутрижелудочного введения. На 28-й день эксперимента ФК полностью выводится из организма экспериментальных животных (Пример 2).

Исследование противовоспалительной активности

Введение 5-фторурацила приводит к лекарственной энтеропатии, сопровождающейся картиной мукозита, что выражается в местных и общерезорбтивных проявлениях: нарушения архитектоники эпителия тонкой и толстой кишки, повреждение эпителиоцитов и торможение пролиферации камбиальных элементов (нарушение репарации эпителия), выраженными нарушениями водно-солевого обмена (диспепсия). В слизистой оболочке кишечника могут возникать изъязвления, лейкоцитарная инфильтрация, картина острой дистрофии эпителия: истончение ворсин, снижение количества бокаловидных (слизеообразующих) клеток, резкое падение пролиферативной активности энтероцитов. В крови регистрируется дисбаланс цитокинов.

У экспериментальных животных, мышей, мукозит вызывали введением 5-фторурацила внутрибрюшинно в объеме 250 мкл в 0,9% водном растворе NaCl (однократная доза 2 мг/кг). Этот препарат применяется в российских клиниках для лечения больных. ФК в дозе 10^8 КОЕ и препарат сравнения Ребамипид (Маклеодз Фармасьютикалз, Индия) вводили атравматичным зондом (пероральное введение). Вначале животные получали ФК в дни 3, 7 и 14, начиная с 21 дня вводили 5-фторурацил в течение двух дней подряд. Затем наблюдали поведение животных еще 14 дней (всего длительность эксперимента 35 дней). По окончании наблюдения мышей выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков, вскрывали, осматривали органы брюшной полости, иссекали участки тонкой и толстой кишки ножницами. Изучались изменения в морфофункциональных характеристиках кишечника по сравнению с контрольной группой и группами, получавшими препарат сравнения Ребамипид. (Пример 3)

ФК на основе штамма *L. brevis* 47f, вводимый в монотерапии, не вызывал отклонений показателей гомеостаза (клеточный и биохимический состав крови и мочи, морфология кишечника). В комбинации с 5-фторурацилом ФК проявляет защитный эффект, уменьшая проявления энтеропатии (нормализация физиологических отпавлений, сохранение структуры эпителия, поддержание пролиферации энтероцитов), нормализует макро- и микроскопическую картину мукозита (Рисунок 1-4). Препарат сравнения, Ребамипид, показал более слабую, по сравнению с ФК, протективную активность в отношении повреждения слизистой оболочки кишечника в ответ на 5-фторурацил. Ребамипид является гастропротектором. Оказывает цитопротекторное действие путем повышения содержания простагландина E2 (PGE2) в слизистой желудка, способствует активации ферментов, ускоряющих биосинтез высокомолекулярных гликопротеинов, и повышает содержание слизи на поверхности стенки желудка и кишечника.

Исследование антиоксидантной активности

Малоновый диальдегид (МДА) является интегральным показателем процессов свободнорадикального окисления, возникающего в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода, служит маркером оксидативного стресса в организме. Изучение концентрации МДА в крови и в других тканях позволяет оценивать уровень воспалительного процесса, с одной стороны, антиоксидантной защиты, с другой.

Исследование было проведено на модели мукозита, вызванного 5-фторурацилом у крыс линии Вистар и мышей линии BALB/c. Изучалось изменение уровня маркера оксидативного стресса МДА в плазме крови и тканях кишечника у животных, получавших фармацевтическую композицию, по сравнению с контрольной группой и группой, получавшей препарат сравнения Ребамипид. Применение 5-фторурацила повышало уровень МДА в плазме крови в 1,1-6,5 раз и в тканях кишечника в 1,2-13 раз, в зависимости от пола животных и получаемого лечения. На модели мукозита кишечника, индуцированного приемом 5-фторурацила показано, что ФК в дозе 10^8 КОЕ при пероральном введении, снижает концентрацию МДА в плазме крови и тканях кишечника лабораторных животных от 2-х до 3-х раз, (Пример 4).

Пример 1

Таблица 1 Гены, отвечающие за синтез белков антиоксидантов, присутствующих в геноме штамма *L. brevis* 47f

Название гена	Описание гена	Функция белка
<i>ghsF</i>	glutathione biosynthesis bifunctional fusion protein	Бифункциональный белок, совмещающий активности GshA и GshB
<i>gpo</i>	glutathione peroxidase	Переводит глутатион в окисленную форму
<i>gshR/gor</i>	glutathione reductase	Переводит глутатион в восстановленную форму
<i>cydC</i>	cysteine transporter subunit, membrane component, ATP-binding component of ABC superfamily	Транспорт глутатиона в клетку
<i>cydD</i>	cysteine transporter subunit, membrane component, ATP-binding component of ABC superfamily	Транспорт глутатиона в клетку
<i>trxA,B</i>	thioredoxin	Белок, сильный антиоксидант
<i>trxR</i>	thioredoxin reductase	Восстановление окисленного тиоредоксина
	Peroxidase	Пероксидаза катализирует восстановление перекиси
<i>tpx</i>	Peroxiredoxin	Белок, сильный антиоксидант

Пример 2

Изучение фармакокинетики ФК

Исследования по изучению фармакокинетики (времени выведения из кишечника животных) проведены на 2-х видах животных: мышах линии BALB/c и на крысах линии Вистар. Препарат вводился перорально в течение 5 дней в дозе 10^8 КОЕ. После 5-го дня введения ФК ежедневно в течение 20 дней проводился забор фекалий для определения количества пробиотических бактерий при помощи ПЦР с праймерами, специфичными для штамма *L. brevis* 47f.

Таблица 2 Видо- и штаммоспецифические праймеры, размеры специфических продуктов амплификации

Праймер		ПЦР продукт
F1Lbr_gpo	5' ATGAGTGGTCAACCGCTCAA 3'	394 пн
RLbr_gpo	5' GCTGTAACGCCGTCACAAT 3'	
F2Lbr_gpo	5' GGTCCAAGTTAATGGGGCA 3'	147 пн
RLbr_gpo	5' GCTGTAACGCCGTCACAAT 3'	

В таблице 3 приведены данные содержание ФК в фекалиях мышей-самок и мышей-самцов во время эксперимента.

Таблица 3 Наличие штамма *L. brevis* 47f в фекалиях мышей-самцов и самок, получавших ФК и контрольных групп, в различные дни эксперимента

Группы	Дни эксперимента*												
	1	2	4	6	8	12	16	18	20	24	26	28	30
Контроль 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ФК (мыши-самцы)	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
ФК(мыши-самки)	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0

*Для наглядности результатов приведены данные через каждые 2 и 4 дня.

В таблице 4 приведены данные содержание ФК в фекалиях крыс-самок и крыс-самцов во время эксперимента.

Таблица 4 Содержание *L. brevis* 47f в фекалиях крыс, получавших ФК и контрольных групп, в различные дни эксперимента

Группы	Дни эксперимента*												
	1	2	4	6	8	12	16	18	20	24	26	28	30
Контроль 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Контроль 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ФК (крысы-самцы)	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
ФК(крысы-самки)	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0

*Для наглядности результатов приведены данные через каждые 2 и 4 дня.

При внутрижелудочном введении ФК в дозе 1×10^8 КОЕ на одну особь 2-х видов животных показано, что ФК на основе штамма *L. brevis* 47f обнаруживаются в фекалиях крыс и мышей после 1 дня и на протяжении 20 дней после окончания внутрижелудочного введения. На 28-й день эксперимента ФК полностью выводится из организма экспериментальных животных.

Пример 3

Исследование противовоспалительной активности

Модель экспериментального мукозита разрабатывали на мышах BALB/c. Масса тела мышей перед началом экспериментов 20-22 г, возраст 10-12 недель. Животные получали 0,9% NaCl (контроль), 5-фторурацил (2 мг/кг), ФК (10^8 КОЕ) или препарат сравнения ребамипид (150 мг/кг). Последовательность воздействий: вначале вводили ФК (или препарат сравнения) в дни 3, 7 и 14, на 21-й день начинали введение 5-фторурацила (2 мг/кг) ежедневно на протяжении 2 дней. Контрольная когорта получала 0,9% NaCl в дни 3, 7 и 14. Физиологический раствор и 5-фторурацил вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл 1 раз в день. ФК или ребамипид вводили через зонд в пищевод в виде водной суспензии. Животных наблюдали 14 дней после начала введения 5-фторурацила. Общая продолжительность эксперимента 35 дней. В ходе эксперимента ежедневно отслеживали наличие диспепсических симптомов, измеряли вес животных.

Введение 5-фторурацила лабораторным мышам вызывает мукозит, сопровождающейся местными и общерезорбтивными проявлениями: нарушениями архитектоники эпителия тонкой и толстой кишки, повреждением эпителиоцитов и торможением пролиферации камбиальных элементов (нарушение репарации эпителия),

выраженными нарушениями водно-солевого обмена (диспепсия). Комбинированное применение ФК и 5-фторурацила предотвращает микроанатомические изменения. Сохраняется структура эпителиоцитов и присутствие бокаловидных клеток в слизистой оболочке толстой кишки, которые повреждаются данным противоопухолевым препаратом. Именно нарушение структуры и функций бокаловидных клеток, в которых образуется и транспортируется в апикальную зону защитный гликопротеин муцин, есть важный патогенетический механизм мукозита в ответ на 5-фторурацил. Следует полагать, что снижение интенсивности кислородного "взрыва" с помощью ФК благоприятно сказывается на состоянии бокаловидных клеток толстой кишки, за счет чего продукция и выведение муцина сохраняют защитную функцию слизистой оболочки кишки.

Таблица 5 Морфологические показатели и пролиферация клеток желудочно-кишечного тракта.

Показатель	Конт-роль	5-фторурацил	ФК 10 ⁸ КОЕ	Рибамипид	5-фторурацил +ФК	5-фторурацил+рибамипид
Высота ворсин, мкм	175±14	102±12*	166±16	176±14	149±11	130±16
Кол-во бокаловидных клеток на 100 эпителиоцитов	29±8	11±6*	21±6	22±4	21±6	20±5
Кол-во межэпителиальных лимфоцитов на 100 эпителиоцитов	20±4	27±7	25±3	26±3	24±4	23±2

*препарат сравнения.

Оценка пролиферации, приводящая к восстановлению эпителия слизистой оболочки кишечника, проводилась иммуногистохимическим методом. Для этого использовали моноклональные антитела Ki-67 к гистону Ki-67, имеющийся только в делящихся клетках. Гистон Ki-67 является индикатором нахождения клетки в фазе подготовки к делению и самого деления (стадии пролиферации). Индекс Ki-67 - соотношение Ki-67-позитивных клеток, то есть находящихся в стадии пролиферации, ко всем клеткам, и выражается в процентном соотношении.

Индекс пролиферации определяли путем подсчета количества Ki-67-позитивных клеток на 100 клеток эпителия слизистой оболочки кишечника с последующим вычислением показателя в процентах. В группе интактных животных экспрессия Ki-67 выявлена преимущественно в области крипт тонкого отдела кишечника; индекс пролиферации 84,3±2,3%. В толстом отделе кишечника у интактных мышей индекс пролиферации 54,3±3,4%. У животных, получавших 5-фторурацил, в тонком и толстом отделах кишечника выявлено значительное снижение пролиферативной активности покровного эпителия. Индекс пролиферации в тонком отделе кишечника составляет 14,3±0,4%, а в толстом отделе 2,5±0,2%. У мышей, получавших 5-фторурацил в комбинации с ФК на основе штамма *L. brevis* 47f с антиоксидантной активностью, наблюдается восстановление пролиферативного пула энтероцитов, индекс пролиферации составил 60±5,3% в тонком кишечнике и 45±2,7% в толстом отделе кишечника.

Пример 4

Исследование антиоксидантной активности на модели мукозита

Результаты проведенного исследования показали, что применение 5-фторурацила повышает уровень МДА в плазме крови в 1,1-6,5 раз и в тканях кишечника в 1,2-13 раз, в зависимости от пола животных и получаемого лечения. Уровень МДА в плазме крови

каждой группы животных в дни 3, 7 и 10 изменяется незначительно, в пределах погрешности. Применение ФК приводит к некоторому снижению базового уровня МДА в плазме крови, ребамипид не снижает его.

Сравнение эффектов ФК и ребамипида показало, что ФК в дозе 10^8 КОЕ/мышь снижает рост концентрации МДА в плазме крови самцов и самок при индуцированном 5-фторурацилом мукозите кишечника. При применении ФК финальная концентрация МДА в плазме крови и тканях кишечника самцов и самок на 60% ниже, чем при отсутствии лечения.

Таблица 6 Относительное изменение концентрации МДА в плазме крови и тканях кишечника.

Препарат	Относительное изменение концентрации МДА на 10-й день			
	Плазма		Ткани кишки	
	самцы	самки	самцы	самки
Раствор NaCl 0,9%	1	1	1	1
Раствор NaCl 0,9% + 5-FU	1,9	2,3	6,3	12
ФК	0,8	1	1,7	1,2
ФК + 5-FU	1,1	1,4	3,3	4,7
Ребамипид	1	1	1,2	1,1
Ребамипид + 5-FU	1,7	2	6,4	12

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, включающая штамм *Lactobacillus brevis* 47f, обладающая противовоспалительной активностью в отношении клеток слизистой оболочки кишечника.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, проявляющая активность, обусловленную ингибированием свободнорадикального окисления в пораженной слизистой оболочке кишечника антиоксидантными веществами.

3. Фармацевтическая композиция по п. 2, отличающаяся тем, что ингибирование воспалительного процесса происходит в слизистой оболочке кишечника.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1, отличающаяся тем, что может быть выполнена в твердой или жидкой форме.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, отличающаяся тем, что твердая форма представляет собой таблетку или капсулу.

6. Фармацевтическая композиция по п. 1, проявляющая противовоспалительную активность в отношении мукозита слизистой оболочки кишечника, индуцированного 5-фторурацилом.

7. Фармацевтическая композиция по п. 1, проявляющая противовоспалительную активность в отношении клеток слизистой оболочки как толстого, так и тонкого кишечника.

1

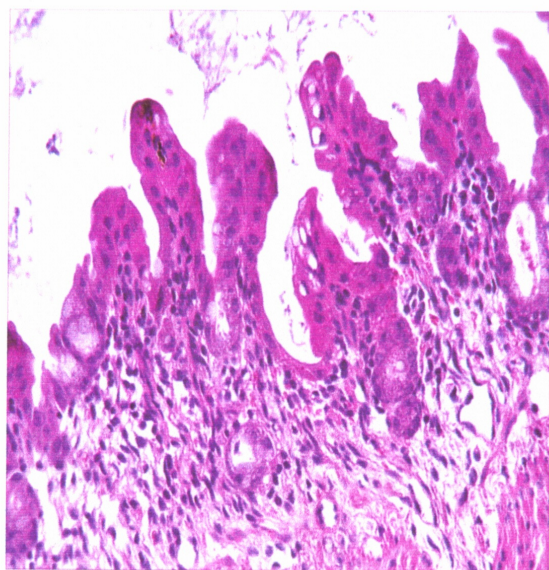


Рисунок 1

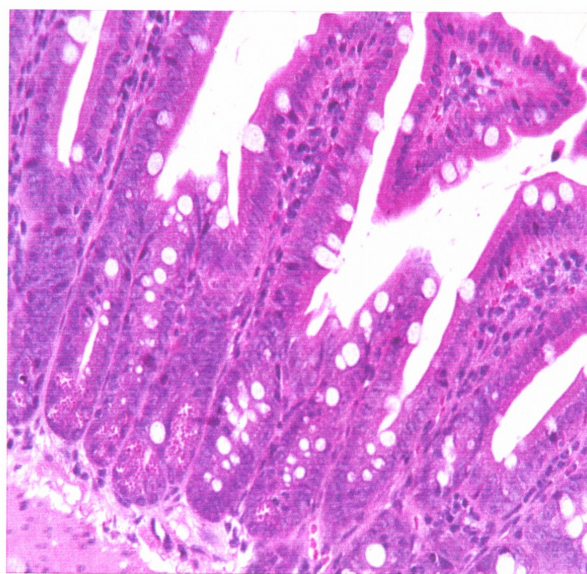


Рисунок 2

2

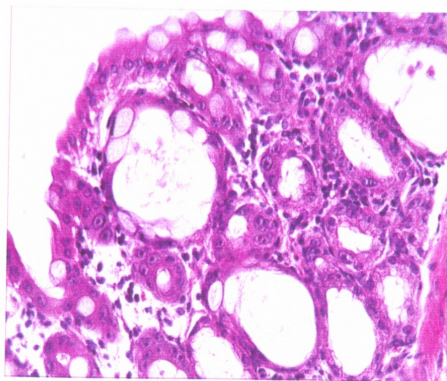


Рисунок 3

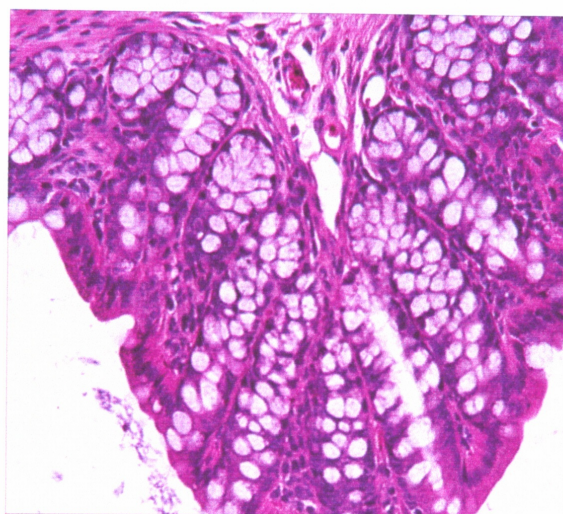


Рисунок 4