

Изобретение касается применения липополисахаридов (ЛПС) для лечения кишечных воспалительных процессов. Далее под липополисахаридами (ЛПС) следует понимать липополисахариды (ЛПС), встречающиеся в природе, а также их синтетические или полусинтетические варианты.

Липополисахариды (ЛПС) состоят из липидного компонента, липоида А, и полисахаридной части, ковалентно связанной с этим мембранным доменом. Полисахаридная область состоит из терминальной О-специфической цепи, субструктуры, включающей до 50 повторяющихся олигосахаридных единиц, как правило от двух до восьми мономеров, и липоида А, связанного с областью ядра

О-цепь - область ядра - липоид А

О-специфическая цепь отличается чрезвычайно высокой изменчивостью структуры у различных видов. Часть липоида А отвечает за описанное ниже биологическое воздействие. Биологическое воздействие моделируют путем изменения ацилирующего образца липоида А. Это достигается благодаря агонистическому воздействию, которое чаще всего наблюдается у встречающихся в природе вариантов ЛПС, (например, в *Salmonella friedenaui* или *Salmonella abortus equi*), а также антагонистическому воздействию вариантов ЛПС, симбиотических с растениями микроорганизмов или синтетических производных (C. Alexander und E.Th. Rietschel, Biospektrum 4,99 5 Jahrgang 1999, S. 275-281). Достаточно подробное описание ЛПС можно также найти в работе Wiese A, Brandenburg, K.; Ulmer A.J.; Seydel, U.; Muller-Leoennies.S., The dual role of lipopolysaccharide as effector and target molecule. Biol. Chem 380, S 767-784

Липополисахариды являются сильнодействующими стимуляторами врожденного иммунитета, который создают граммотрицательные бактерии. Они связываются с TLR-/CD14-рецепторами на мононуклеарных клетках и индуцируют формирование секреции, соответственно:

провоспалительных цитокинов, например TNF α , MIF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 и IL-18, различных колониестимулирующих факторов;

различных липидных медиаторов; и видов, восстанавливающих кислород.

При этом ЛПС способствуют быстро возникающей, не зависящей от антител, активации комплементного каскада при освобождении анафилатоксина C5a и C3a. Человеческие Т-лимфоциты стимулируются для пролиферации и для выработки IL-2 и IFN (Alexander and Rietschel, 1999). При дальнейшем ходе воспалительной реакции индуцируется образование протеинов острой фазы.

С помощью этих механизмов липополисахариды активируют неспецифический иммун-

ный ответ, благодаря чему могут быть лучше устранены микроорганизмы, вирусы и раковые клетки. Как следствие индуцированной ЛПС выработки цитокинов и липидных медиаторов индуцируется также сам процесс, например воспаление, лихорадка и сепсис. Агонистические ЛПС также называют эндотоксинами из-за токсического воздействия ЛПС при сепсисе.

Применение ЛПС-антагонистов для лечения сепсиса и ЛПС-агонистов для усиления иммунологического уничтожения опухоли описано в различных публикациях (Grimminger et al., Internist 38, 541-552, 1997, Ikawa et al., J Nare Cancer Inst 14, ; 195-1201,1954).

Воспаления могут возникать как следствие повреждения тканей при механическом или химическом повреждении, как реакция на инфекцию, а также как результат иммунологических патологических реакций (аутоиммунные заболевания и хронические воспалительные заболевания). Острые воспаления приходят в состояние покоя путем устранения разрешающих факторов, а также лизируемых клеток при повреждении тканей или возбудителей при инфекциях. Хронические воспаления встречаются тогда, когда не может быть устранено вызывающее его явление, либо когда иммунный ответ становится автономным, и при этом развивается также аутоиммунное заболевание с воздействием на гомологичные антигены или на всю кишечную флору.

Основное явление при всех воспалительных реакциях - это поступление лейкоцитов в очаг воспаления. Мобилизованные лейкоциты выделяют провоспалительные вещества, вещества, повышающие проницаемость и токсичные вещества, либо вызывают выделение этих веществ другими клетками (такими как цитокины, энзимы, медиаторы, простагландины, кислородные радикалы). Это приводит к усилению кровотока, а также к активизации и к повышению пропускной способности иммунных клеток, которые участвуют в устранении возбудителя и выводе продуктов распада. Различные факторы роста - среди них также цитокины - способствуют пролиферации тканевых клеток и, тем самым, процессу заживления.

В ходе воспалительного процесса разрушаются также здоровые клетки, что приводит к повреждениям тканей, которые при хронических воспалениях останавливаются в росте и, как следствие, вызывают перерождение тканей [Gemsa und Resch, 1997]. Воспаления слизистой оболочки кишечника приводят к проникновению аллергенов и антигенов продуктов питания через стенку кишечника. Следствием является повышенный иммунный ответ против этих эпителиев. Активирующиеся при этом Т-лимфоциты циркулируют в лимфатическую систему и возвращаются обратно в области слизистых или кожи [Kantele et al., 1986], [Czerkinsky et al., 1987], [Wenneras et al., 1994], [Holmgren et al.,

1989], [Sztein et al., 1994], [Kantele et al., 1999]. Если там они наталкиваются на подобные или перекрестно реагирующие эпитопы, это может привести к локальным или системным аллергическим реакциям, например пищевой аллергии, сопровождаемой крапивницей, астмой, аллергическим ринитом или нейродермитом. При этом существует прямая взаимосвязь между кишечным воспалением, повышенной проницаемостью и аллергическими заболеваниями [Hollander, 1999], [Ima, 1997], [Fink, 2002], [Nekam, 1998a], [Nekam, 1998b], [Pena, 1998], [Salminen et al., 1996], [Majamaa and Isolauri, 1997], [Dupont et al., 1989], [Malin et al., 1996]. Подробное описание можно найти в литературе, указанной в списке. Поэтому устранение кишечного воспаления имеет большое значение для этиотропной терапии, когда кишечные воспалительные реакции участвуют в патогенезе аллергических заболеваний.

При инфекциях с грамотрицательными бактериями липополисахариды являются важным разрешающим фактором острого воспаления. Поэтому до сих пор считалось, что ЛПС должны усиливать воспалительные процессы.

В настоящее время совершенно неожиданно было установлено, что ЛПС, экстрагированные из микроорганизмов или полученные синтетическим или полусинтетическим путем, представляют собой превосходное средство для лечения кишечных воспалительных процессов.

ЛПС можно экстрагировать из всех грамположительных микроорганизмов, а также получить их синтетические производные.

Эффективная доза вещества составляет приблизительно от 0,05 нг/кг/д до 100 мкг/кг/д, предпочтительная доза для приема при оральном применении составляет приблизительно 1 нг/кг/д - 10 мкг/кг/д. Поскольку при оральном приеме в отличие от парентерального приема, ЛПС отличаются меньшей токсичностью, оральное применение получило большое терапевтическое распространение, причём побочные явления при оральном приеме до сих пор не выявлены даже при более высоких дозировках.

Применение ЛПС осуществляют предпочтительно орально или ректально, например, в форме растворов, порошков, гранулированных препаратов, таблеток, капсул, драже, суппозиторий или клизм. Благодаря этому ЛПС можно доставлять к эффективным местам слизистой оболочки, поскольку ЛПС-продуцирующие или -сверхпродуцирующие, непатогенные кишечные бактерии вводятся орально. Трансдермальное, топическое или парентеральное применение также допустимо, однако последнее имеет строго ограниченное терапевтическое применение.

При применении в виде раствора следует выбирать в качестве основы пептоноподобный водный растворитель с амфифильными водорастворимыми веществами, например производными жирных кислот или липидов, который,

в частности, благодаря водорастворимым веществам с липофильными компонентами дает хорошее мицелирование как условие растворимости. То же самое соблюдается при твердых формах применения для осуществления необходимой солюбилизации и биоразложения в слизистой оболочке кишечника. Получение фармацевтических форм осуществляется обычным способом, хорошо известным специалистам, и соответствует стандартным методам.

При применении ЛПС используют имеющийся в торговле агонистический ЛПС из *Escherichia coli*, предпочтительно штамм Laves 1931, обладающий такой активностью в чувствительности к стимуляции TNF α -синтеза в моноцитах, которую можно сравнить с рекомендуемым ЛПС из *Salmonella fredenau*. Точный механизм, который обеспечивает действие, ингибирующее воспаление, пока еще не известен.

Однако фармакологическое действие ЛПС, как следует из литературы (Alexander et al, Wiese et al), зависит от части липоида A, в частности, от его ацилирования, а не от O-цепи или области ядра. Отсюда, можно допустить, что подобным образом эффективны все ЛПС с идентичным или подобным липоидом A - образцом ацилирования и что все они имеют соответствующее агонистическое фармакологическое действие.

Орально вводимый ЛПС в значительном объеме действует как ингибирующий воспаление.

При исследовании мышей, у которых на основе иммунологических дефектов (IL-10 -/- делеция) развивались четко выраженные кишечные воспаления [MacDonald T.T., 1994], ЛПС ингибировали воспаление, что было доказано не только клинически, но и гистологически.

При исследованиях на мышках, у которых на основе химического повреждающего фактора обнаруживали кишечную воспалительную реакцию, ЛПС ингибировали эту воспалительную реакцию, что также было доказано не только клинически, но и гистологически.

Далее изобретение более подробно поясняется на примерах:

Пример 1.

Препаративная изоляция ЛПС

ЛПС можно экстрагировать различными методами из грамотрицательных бактерий. Ниже представлен предпочтительный метод.

Для извлечения ЛПС-содержащей фракции эффективных веществ из *E. coli* предпочтительно культивируют *E. coli* серотипа 02:K1:H6 (предпочтительно штамм Laves 1931) в течение пяти дней при 37°C до плотности роста от 3×10^8 колониеобразующих единиц/мл на среде на основе мясных пептонов. Однако можно также применять другие питательные среды, другие грамотрицательные микроорганизмы и другие плотности роста. С помощью известного спосо-

ба из выросшей культуры путем термического лизиса и многократной фильтрации получают безбелковый и бесклеточный экстракт, который диализируют через воду с 1 кД-мембраной и лиофилизируют. Кроме того, термолизированную биомассу можно центрифугировать при 3900 г в течение 20 мин и лиофилировать надосадочную жидкость. После достаточного диализа через воду с 1кД-мембраной фильтрат сушат и лиофилизируют.

Представленный способ изоляции липополисахаридов соответствует способу, описанному Westphal et al [Westphal et al., 1952]. Лиюфилизат суспендируют в смеси вода-фенол (55%-45%) и гомогенизируют, фазы разделяют центрифугированием при 2000 г. Водную фазу диализируют через воду, как описано выше, суживают и лиофилизируют.

Лиюфилизат растворяют в воде до концентрации около 10-40 мг/мл и центрифугируют с ультразвуком при 55000 г 3 раза по 22 ч. Путем лиюфилизации осадка получают ЛПС-L31, который далее может быть сужен (например путем гель-фильтрации).

Пример 2. Ингибирование кишечных воспалительных реакций при аутоиммунных заболеваниях.

Следующие эксперименты проводили при условиях двойного контрольного испытания на мышцах Интерлейкин 10 α -делеции [MacDonald T. T., 1994]. Две группы по 5 мышей в возрасте четырех недель получали вместо питья в течение 21 дня либо Placebo (пептон крупного рогатого скота), либо соответственно Placebo + 14 нг/мл липополисахарида из лизированного *Escherichia coli*, штамм Laves 1931 (LPS-137, Verum). В ходе лечения следили за характеристической веса. Возрастание веса в группе Verum было существенно больше, чем в группе Placebo. К тому же в группе Placebo наблюдали более частые клинические признаки колита, например покраснение анального отверстия, мягкий стул и трансанальное кровотечение.

После трехнедельного лечения выделяли кишечник и определяли криптоиндекс. Криптоиндекс представляет собой измерение дегенерации и соответственно гиперплазии стенки кишечника. Кроме того, измерялось воспаление: чем выше значение, тем сильнее воспаление. Verum-мыши имели криптоиндекс 4,75, Placebo-мыши - 8,0. Из этого следует, что у мышей, которых лечили ЛПС-L131, наблюдалось значительно меньшее воспаление, чем у Placebo-мышей. У мышей IL-10 α -делеции обнаружено хроническое воспалительное кишечное заболевание человека неизвестной модели.

Результаты показывают, что LPS-L31 снижает воспаления на основе иммунологического патологического управления (аутоиммунные заболевания).

Пример 3. Ингибирование кишечных воспалительных реакций как следствие повреждающего воздействия.

В следующем эксперименте 2 группам по 6 мышей Balb-c (возраст 2 месяца) при условиях двойного контрольного испытания в течение 1 недели давали вместо питья либо Placebo (пептон крупного рогатого скота), либо соответственно Placebo + 14 нг/мл ЛПС- L31 (Verum). После лечения в течение одной недели все мыши получали в течение 5 дней 2,5% DSS, чтобы вызвать воспаление путем химического повреждения. Затем следовало новое лечение Placebo или Verum в течение 6 дней. Возрастание веса в группе Verum было существенно больше, чем в группе Placebo. Криптоиндекс в группе Verum был значительно ниже, чем в группе Placebo, т.е. ЛПС-1-131 снижал кишечное воспаление. К тому же в группе Placebo наблюдали более частые клинические признаки колита, например покраснение анального отверстия, мягкий стул и трансанальное кровотечение.

Пример 4. Определение влияния ЛПС на образование TNF α

Исследование стимуляции секреции TNF α в мононуклеарных клетках проводили, как описано в публикации [Thomsen and Loppnow, 1995]: Мононуклеарные клетки изолировали из крови здорового донора с помощью градиентного центрифугирования через Ficoll®, промывали и инкубировали в питательной среде (RPMI 1640). Клетки инкубировали 24 ч с ЛПС в контрольном растворе, собирали, помещали в 2% плодную сыворотку козленка и хранили для анализа цитокинов при 20°C. Определение TNF α осуществляли с помощью коммерческого твердофазного иммуносорбентного теста (ELISA) с анти-TNF α антителами. Через 24 ч после добавления 1 мкг/мл ЛПС-1.31 измеряли концентрацию TNF α 1851 пк/мл. 1 мкг/мл рекомендованного ЛПС из *Salmonella friedel* индуцировало в отдельном промежутке времени 1976 пг/мл TNF α . Из этого следует, что ЛПС-L131 представляет собой агонистический ЛПС, который по своей активности не отклоняется от известных ЛПС-форм. При этом можно ожидать, что все агонистические ЛПС-формы являются эффективными при кишечных воспалениях. В частности, антагонистическое воздействие не является необходимым для сохранения активности, которая описывается в литературе (Alexander et al., Wiese et al).

Список литературы

Alexander C, Rietschel ET (1999) Bakterielle Lipopolysaccharide - Hochaktive Stimulatoren der angeborenen Immunität. Biospektrum 5: 275-281

Czerkinsky C, Prince SJ, Michalek SM, Jackson S, Russell MW, Moldoveanu Z, McGhee JR, Mestecky J (1987) IgA antibody-producing cells in peripheral blood after antigen ingestion: evidence

for a common mucosal immune system in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2449-2453

Dupont C, Barai E-, Molkhou P, Raynaud F, Barbet JP, Dehennin L (1989) Food-induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk-sensitive enteropathy and atopic dermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 8: 459-465

Fink MP (2001) Leaky gut hypothesis: a historical perspective (editorial). *Crit Care Med* 18:579-580

Gemsa D, Resch K (1997) Entzündung. In *Immunologie*, Gemsa D, Kalden JR, Resch K (eds) pp 135-158. Georg Thieme Verlag: Stuttgart

Grimminger F, Mayer K, Seeger W (1997) Gibt es eine gesicherte Immuntherapie bei der Sepsis? *Internist* 38: 541-552

Hollander D (1999) Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* : 410-416

Holmgren J, Fryklund J, Larsson H (1989) Gamma-interferon-mediated down-regulation of electrolyte secretion by intestinal epithelial cells: a local immune mechanism? *Scand J Immunol* 30: 499-503

Ikawa M, Koeptli JB, Mudd SG, Niemann C (1954) An agent from *E.coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. *J. Natl Cancer Inst* 14: 1195-1201

Kantele A, Arvilommi H, Jokinen I (1986) Specific immunoglobulin-secreting human blood cells after peroral vaccination against salmonella typhi. *J Infect Dis* 153: 1126-1131

Antele A, Zivny J, Hakkinen M, Elson CO, Mestecky J (1999) Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. *J. Immunol* 162: 5173-5177

Ma TY (1997) Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease (44099) *P S E BM* 214: 318-327

MacDonald T.T. (1994) Gastrointestinal inflammation. Inflammatory bowel disease in knockout mice. *Curr Biol* 4: 261-263

Majamaa H, Isolauri E (1997) Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J. Allergy Clin Immunol* 99: 179-185

Malin M, Isolauri E, Pikkarainen P, Karikowski R, Isolauri J (1996) Enhanced absorption of macromolecules - A secondary factor in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 41: 1423-1428

Nekam K (1998a) Management of food allergy. *Allergy* 53: 122-124

Nekam KL (1998b) Nutritional triggers in asthma. *Acta Microbiol Immunol Hung* 45: 113-117

Pena AS (1998) Food allergy, celiac disease and chronic inflammatory bowel disease in man. *Vet O* 20: 49-52

Salminen S, Isolauri E, Salminen E (1996) Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut

mucosal barrier: Successful strains and future challenges. *Int J Microbiol* 70: 347-358

Sztejn MB, Wasserman SS, Tacket CO, Edelman R, Hone D, Lindberg AA, Levine MM (1994) Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of *Salmonella typhi*. *J Infect Dis* 170:1508-1517

Thomsen A, Loppnow H (1995) Cytokine production by mononuclear cells following stimulation with a peptide-containing, endotoxin-free *Escherichia coli* extract. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 45: 657-661

Wennergren C, Svennerholm AM, Czerkinsky C (1994) Vaccine-specific T cells in human peripheral blood after oral immunization with an inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Infect Immun* 62: 874-879

Westphal O, Lüderitz O, Bister F. (1952) Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z.Naturforsch, B: Chem Sci* 7: 148-155

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение ЛПС и/или их производных вариантов для перорального или ректального лечения кишечных воспалительных процессов.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что используют агонистический ЛПС.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что используют ЛПС из *E.coli*.

4. Применение по пп.1-3, отличающееся тем, что используют ЛПС из серотипа 02:K1:H6 *E.coli*.

5. Применение по пп.1-4, отличающееся тем, что используют ЛПС из серотипа 02:K1:H6 *E.coli*, штамма Laves 1931.

6. Применение по пп.1-5, отличающееся тем, что дозировка при оральном приеме составляет от 0,05 нг/кг/д до 100 мкг/кг/д, предпочтительно 1 нг/кг/д до 10 мкг/кг/д.

7. Применение по пп.1-6, отличающееся тем, что оно осуществляется при кишечных воспалительных процессах на основе инфекционных реакций.

8. Применение по пп.1-6, отличающееся тем, что оно осуществляется при кишечных воспалительных процессах, вызываемых повреждающими воздействиями, в частности химическими повреждениями.

9. Применение по пп.1-6, отличающееся тем, что оно осуществляется при кишечных воспалительных процессах на основе аутоиммунных заболеваний.

10. Применение по пп.1-6, отличающееся тем, что оно осуществляется при колитах различного происхождения или при аллергических реакциях на основе кишечных воспалений.

