



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011150659/10, 27.05.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.05.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
27.05.2009 IT RM2009A000270

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2013 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2003033681 A2, 24.04.2003 . WO 2007003917 A1, 11.01.2007 . EP 1481681 A1, 01.12.2004 . RU 2007106038 A, 27.10.2008 . ШЕНДЕРОВ Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Том I: Микрофлора человека и животных и ее функции. - М.: Издательство ГРАНТЬ, 1998, с. 131-138

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 27.12.2011

(86) Заявка РСТ:
IB 2010/001290 (27.05.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/136891 (02.12.2010)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

МОНЬЯ, Джованни (ИТ),
СТРОЦЦИ, Жан Паоло (ИТ),
МОНЬЯ, Лука (ИТ)

(73) Патентообладатель(и):

Пробиотикал С.п.А. (ИТ)

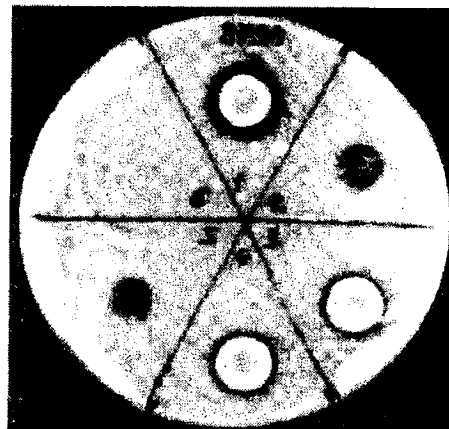
(54) БАКТЕРИОЦИН-ПРОДУЦИРУЮЩИЙ LACTOBACILLUS PENTOSUS И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ПИЩЕВЫХ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЯХ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Предложен штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980, продуцирующий бактериоцин. Штамм применяют в качестве лекарственного средства для борьбы с грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, *E.coli*, уменьшения или ингибирования их присутствия. Также предложено применение штамма для

профилактического или куративного лечения гастроэнтерита или гастроэнтероколита, инфекций, вызванных вышеуказанными бактериями. Штамм может быть использован в составе фармацевтической композиции для применения в качестве лекарственного средства. Также штамм используют в пищевой композиции для применения в качестве технологической добавки для добавления к заквасочной культуре для получения молочных продуктов. Группа

изобретений обеспечивает ингибирование
грамотрицательных бактерий, предпочтительно
E. coli. 8 н. и 7 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.



ФИГ. 1

RU 2 5 4 7 5 9 9 C 2

RU 2 5 4 7 5 9 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)*A61K* 35/74 (2015.01)*A61P* 1/00 (2006.01)*A61P* 31/00 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011150659/10, 27.05.2010

(24) Effective date for property rights:
27.05.2010

Priority:

(30) Convention priority:
27.05.2009 IT RM2009A000270

(43) Application published: 10.07.2013 Bull. № 19

(45) Date of publication: 10.04.2015 Bull. № 10

(85) Commencement of national phase: 27.12.2011

(86) PCT application:
IB 2010/001290 (27.05.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/136891 (02.12.2010)

Mail address:

191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

MOGNA Giovanni (IT),
STROZZI Gian Paolo (IT),
MOGNA Luca (IT)

(73) Proprietor(s):

Probiotal S.p.A. (IT)

(54) **BACTERIOICIN PRODUCING LACTOBACILLUS AND USING IT IN FOOD AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS**

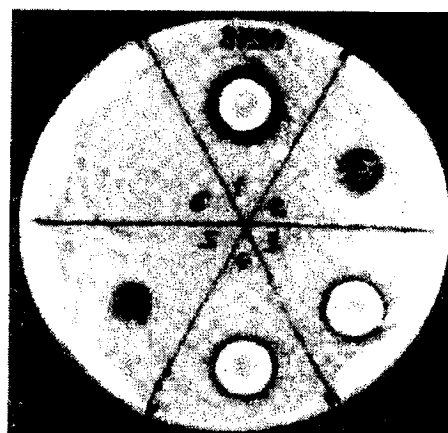
(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to biotechnology. Presented is the bacteriocin producing strain *Lactobacillus pentosus* DSM 21980. The strain is used as a therapeutic agent for controlling gram-negative bacteria, preferentially Enterococci, Coliform bacteria, *E. coli*, reducing or inhibiting the presence thereof. What is also presented is using the strain for the preventive or curative treatment of gastroenteritis or gastroenterocolitis, infections caused by the above bacteria. The strain can be used as an ingredient of the pharmaceutical composition used as a therapeutic agent. Besides, the strain is used as an ingredient of the food composition applicable as a processing additive added to a starter culture for producing dairy products.

EFFECT: group of inventions provides inhibiting

the gram-negative bacteria, preferentially *E. coli*.
15 cl, 4 dwg, 3 tbl



ФИГ. 1

Настоящее изобретение относится к выбранному штамму *Lactobacillus pentosus* для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

5 В частности, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей указанный штамм *Lactobacillus pentosus* для получения пищевой или фармацевтической композиции для борьбы с грамотрицательными бактериями, уменьшения или ингибирования присутствия грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*.

10 Кроме того, настоящее изобретение относится к применению указанного выбранного штамма *Lactobacillus pentosus* для получения лекарственного средства для борьбы с грамотрицательными бактериями, уменьшения или ингибирования присутствия грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*; в частности для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

Наконец, настоящее изобретение относится к применению указанного выбранного штамма *Lactobacillus pentosus* для получения технологической добавки для добавления к заквасочной культуре для получения молочных продуктов.

Известно, что *E.coli* является примером широко распространенных
20 грамотрицательных бактерий, ответственных за большое число бактериальных инфекций, время от времени даже тяжелых, таких как, например, бактериальный цистит, гастроэнтерит и гастроэнтероколит.

В общем случае инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, лечат, используя лекарственные средства, такие как, например, антибиотики.

25 Однако со временем некоторые грамотрицательные бактерии развивают определенную степень резистентности к обычно используемым лекарственным средствам, и это иногда ограничивает их применение и получаемые результаты.

Кроме того, в обычной медицинской практике бактериальные инфекции лечат немедленно, полагаясь на фармакологическую терапию, которая эффективна настолько,
30 насколько это возможно. Данный подход часто выбирают, не имея возможности дожидаться микробиологических тестов, которые выявляют, какая бактерия вовлечена и к какому антибиотику она чувствительна.

Субъект, таким образом, действует эмпирически, вводя известный антибиотик, который, как предполагается, является наиболее эффективным в отношении данного
35 семейства бактерий, которые, как предполагается, лежат в основе инфекции.

Однако, вышеописанный подход предполагает введение значительного количества лекарственных средств, например антибиотиков, не зная заранее, приведет ли такая терапия к решению проблемы и последующему выздоровлению. Кроме того, не следует игнорировать возможные побочные эффекты, связанные с введением антибиотиков,
40 которые, как хорошо известно, также воздействуют на бактериальную флору, которая является положительной и полезной для организма.

Следовательно, желательно иметь терапевтическое средство для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, которое можно использовать в качестве альтернативы традиционным лекарственным
45 средствам или в комбинации с традиционными лекарственными средствами, чтобы преодолеть недостатки, проистекающие из иногда беспорядочного применения антибиотиков.

Известно, что микроорганизмы способны активировать ряд защитных систем, таких

как, например, система, регулируемая продуцированием бактериоцинов.

Термин "бактериоцины" используется для обозначения белковых соединений, продуцируемых как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями и обеспечивающих ингибирующее действие против бактериальных штаммов, которые отличаются от штамма-производителя, но тесно связаны с ним.

Бактериоцины представляют собой белки, продуцируемые молочными бактериями, и они демонстрируют заметную противомикробную активность, ввиду чего они вызывают растущий интерес, прежде всего в клиническом и технологическом/пищевом секторах.

Поскольку рассматривается применение в клиническом секторе, бактериоцины представляют собой адекватную альтернативу антибиотикам.

В пищевом секторе бактериоцины можно использовать как биоконсерванты для контроля и удержания нежелательной бактериальной популяции, ответственной за интоксикации и повреждение пищевой матрицы, например в молочных продуктах.

Следовательно, применение бактериоцинов в пищевом и фармацевтическом секторах может быть технологически правильным и эффективным инструментом для использования в продуцировании того, что определено как продукты "высокого качества", которые хранятся в течение продолжительных периодов времени без каких-либо изменений и в полной сохранности, таким образом сохраняя присущие им сенсорные характеристики.

Наконец, адекватное применение бактериоцинов в качестве противомикробных веществ включает применение бактериоцин-продуцирующих бактериальных культур в качестве диетических пробиотиков.

Таким образом, остается необходимость идентифицировать и выбрать штаммы молочных бактерий, которые способны бороться, посредством бактерицидного действия, и/или уменьшать или ингибировать, посредством бактериостатического действия, присутствие грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*.

В частности, остается необходимость идентифицировать и выбрать штаммы молочных бактерий, которые способны бороться, уменьшать или ингибировать широкий спектр грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*, таким образом обеспечивая возможность их адекватного использования в пищевом или фармацевтическом секторе в качестве полной или частичной замены традиционных антибиотиков.

Кроме того, остается необходимость идентифицировать и выбрать штаммы молочных бактерий, которые можно использовать вместе в смеси благодаря отсутствию, в каждом выбранном штамме, ингибирующего действия против других бактерий, включенных в смесь, или уже присутствующих в кишечной бактериальной флоре в кишечнике.

Заявитель идентифицировал и выбрал штамм *Lactobacillus pentosus*, который может обеспечивать подходящий ответ для вышеуказанных потребностей.

По этой причине объектом настоящего изобретения является штамм *Lactobacillus pentosus*, депонированный в DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) в Германии под номером DSM 21980, для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

Еще одним объектом настоящего изобретения является композиция, содержащая указанный *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 для изготовления пищевой или

фармацевтической композиции для борьбы с грамотрицательными бактериями, уменьшения или ингибирования присутствия грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение указанного штамма *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 для получения лекарственного средства для борьбы с грамотрицательными бактериями, уменьшения или ингибирования присутствия грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*; в частности для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

Еще одним объектом настоящего изобретения является применение указанного штамма *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 для получения технологической добавки для добавления к заквасочной культуре для получения молочных продуктов.

Другие предпочтительные воплощения настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания, которое следует далее.

В Таблице 1 показан экспериментальный тест, в котором исследовали ингибирующую активность группы бактериальных штаммов против *E.coli*. В Таблице 1 это показано следующим образом: (-) нет ореола (нет ингибирования); (+) ореол 1-2 мм → (*) многочисленные колонии *E.coli* внутри пятна; (++) ореол 3-5 мм → (**) несколько колоний *E.coli* внутри пятна; (+++) ореол более 5 мм → (***) нет колоний *E.coli* (максимальное ингибирование).

В Таблице 2 показан тест по ингибированию.

В Таблице 3 показан тест на желудочную резистентность.

На Фиг.1 показан тест по ингибированию роста *E.coli* ATCC 8739 штаммом *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

На Фиг.2 показан тест по ингибированию роста *E.coli* ATCC 10536 штаммом *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

На Фиг.3 показан тест по ингибированию роста *E.coli* ATCC 35218 штаммом *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

На Фиг.4 показан тест по ингибированию роста *E.coli* ATCC 25922 штаммом *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

Заявитель идентифицировал и выбрал штамм *Lactobacillus pentosus* из натуральной силосованной кукурузы, используя методику выделения *Lactobacillus*, известную специалистам в данной области.

Штамм депонирован в DSMZ в Германии, 14.11.2008, Probiotal S.p.A., Novara - Italy, под следующими регистрационным номером: *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01). Штамм DSM 21980 был депонирован в соответствии с Будапештским Договором.

В предпочтительном воплощении *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) показан для профилактического или куративного лечения рекуррентных (периодически повторяющихся) инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

В другом предпочтительном воплощении *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) показан для профилактического или куративного лечения гастроэнтерита или гастроэнтероколита, предпочтительно для профилактического или куративного лечения диаретических приступов и последующего обезвоживания, тошноты, диареи, абдоминальных спазмов, сопровождающихся лихорадкой и физической слабостью.

Выбранный и выделенный штамм был охарактеризован и классифицирован на основании профиля ферментации сахара (API 50 CHL bioMérieux). Вид был подтвержден вид-специфической ПСР(полимеразная цепная реакция)-амплификацией (Torriani S., Felis

G.E., Dellaglio F., Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Appl Environ Microbiol.* Aug 2001; 3450-3454).

Штамм биотипировали, используя методику PFGE (гель-электрофореза в пульсирующем поле) (Tynkkanen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M. Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl And Environ Microb.* Sept. 1999; 3908-3914).

Заявитель протестировал анти-*E.coli* активность вышеупомянутой *Lactobacillus pentosus* DSM 21980, которую помещали в прямой контакт со следующими *E.coli*: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739 и ATCC 25922.

Однако, чтобы получить сравнимые результаты, также тестировали другие штаммы пробиотических молочных бактерий, как изложено ниже.

1) *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, присутствующий в качестве единственного микробного ингредиента двух разных имеющихся в продаже продуктов, а именно Реутерина (Reuterin, Noos) и Reuflor (Italchimici).

Продукты, упомянутые в (1), анализировали в качестве контрольного положительного образца, предоставляя известной способности штамма ATCC 53608, присутствующего в этих двух композициях, продуцировать бактериоцин (называемый реутерин), который является активным против грамотрицательных бактерий.

Очевидно, что, для того, чтобы избежать какого-либо непосредственного воздействия эксципиентов, присутствующих в композициях из двух продуктов, микроорганизм ATCC 53608 сначала выделяли, затем культивировали в культуральной жидкости, после чего подвергали анализу.

2) *L. rhamnosus* DSM No. 21981 (LR06) в качестве другого интересующего штамма.

3) *Lactobacillus fermentum* CNCM 1-789 (LF5), активный против вагинальной *Candida*, и по этой причине считающийся хорошим кандидатом для "редуцирования" бактериоцинов с широким спектром действия.

4) *Lactobacillus rhamnosus* GG, ATCC 53103, один из пробиотиков, наиболее известных и наиболее исследованных в мире в качестве эффективный кишечных колонизаторов.

5) *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 и LMG P-21023. Четыре вышеупомянутых штамма, LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 и LMG P-21023, обладают способностью продуцировать бактериоцины (называемые плантарицины) с антибактериальным действием. Сравнение штамма по настоящему изобретению и 4 штаммов *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 и LMG P-21023 призвано продемонстрировать количество продуцируемых бактериоцинов при одинаковых эксплуатационных режимах.

6) *Lactobacillus casei* sub. *paracasei* LPC08, DSM 21718, используемый в качестве отрицательного контрольного образца.

7) *Lactobacillus acidophilus* DSM 21717 (LA02), используемый в качестве отрицательного контрольного образца.

8) *Lactobacillus lactis* sub. *cremoris* DSM 19072 (NS01), используемый в качестве продуцента низина, который известен как бактериоцин с широким спектром действия (например эффективный против *Listeria* и *Clostridia*).

9) *Streptococcus thermophilus* DSM 18616 (FP4), используемый в качестве отрицательного контрольного образца.

Целевые штаммы представляют собой *E.coli*: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739 и ATCC 25922, в лиофилизированной форме и имеющие загрузку по меньшей мере

1×10^8 КОЕ/г.

Каждый штамм *E.coli* восстанавливали 1 мл физиологического раствора (0,8% NaCl) и использовали в соотношении 100 мкл на чашку Петри, содержащую 12-15 мл агаризованной LaptG культуральной среды. 1 литр LaptG культуральной жидкости

содержит: бакто-пептон 15 г, бакто-триптон 10 г, глюкозу 10 г, дрожжевой экстракт 10 г, Tween 80 1 г, дистиллированную воду до 1000 мл, pH 6,5-6,6. Для твердофазной среды (агаризованной) добавляют 15 г бакто-агара.

Обе среды (бульон и агар) стерилизуют при 121°C/15 минут (Font De Valdez, G, and coll.: Influence of the recovery medium on the viability of injured freeze-dried lactic acid bacteria

Milchwissenschaft 40 (9) 518-520 (1985).

Чашки Петри готовили с горячей агаризованной LaptG средой и оставляли затвердевать в ламинарном боксе. Затем 100 мкл целевого штамма равномерно распределяли по поверхности LaptG среды, используя стерильный шпатель. Перед инкубированием, таким образом полученные чашки Петри сушили в ламинарном боксе.

Результаты анализа по ингибированию показаны в Таблице 1.

Lactobacilli культивировали в жидкой среде MRS (бульон) и бульоне LaptG, в то время как *Lactococci* культивировали в жидкой среде M17 (бульон) и бульоне LaptG.

Ингредиенты и композиции культуральных сред известны специалистам в данной области.

Все бактерии инокулировали со скоростью 1%, начиная с маточной культуры, и инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов в термостатированной бане.

В конце инкубирования измеряли конечное значение pH бульонной культуры (смотри колонку в Таблице 1).

Важным является определить количество молочной кислоты, продуцируемое отдельными бактериями, так как желательно подтвердить, что указанная кислотность не является единственным параметром, ответственным за ингибирование роста *E.coli*.

В конце инкубирования аликвоту каждой бульонной культуры центрифугировали при 5000 об/мин 5 мин с получением истощенной культуральной жидкости и осадка клеток. Истощенную культуральную жидкость фильтровали, используя шприцевые фильтры с размером пор 0,22 мкм, и также подвергали тестированию. Затем клеточный осадок промывали один раз стерильной водой, чтобы удалить остатки культуральной среды. Промытый клеточный осадок затем ресуспендировали в физиологическом растворе так, чтобы получить мутность 0,5 согласно шкале Макфарланда. Данное значение позволяет начинать с первоначального количества клеток, которое является одинаковым для всех протестированных бактерий.

Перед анализом ингибирования положение соответствующих пятен, которые будут подвергаться тестированию, помечают на дне чашек Петри, приготовленных с целевым штаммом на основе агара LaptG.

10 мкл каждой бактериальной бульонной культуры наносят пятном на поверхность чашки, засеянной целевым штаммом.

Указанное ниже также было подвергнуто анализу:

а) Промытые бактериальные суспензии. Данные в Таблице 1 (смотри колонку промытых клеток) показывают, что продуцирование бактерицина происходит в процессе репликационного метаболизма тестируемых бактерий. Это указывает на то, что штамм DSM 21980, к которому относится настоящее изобретение, способен бороться с *E.coli*, ингибировать и/или уменьшать рост *E.coli*. Следовательно, лиофилизированный штамм DSM 21980, будучи восстановленным и находясь в состоянии осуществлять свой основной метаболизм, будет способен бороться с *E.coli*, ингибировать и/или уменьшать

рост *E.coli*.

б) Истощенные культуральные жидкости, полученные от различных бактерий. Данные в Таблице 1 (смотри колонку отфильтрованного бульона) показывают, сколько бактериоцина присутствует в культуральной жидкости. Данные показывают, что бактериоцин является экзогенным, активным и присутствует в достаточных количествах, чтобы ингибировать *E.coli*.

в) Культуральные жидкости MRS, M17 и LaptG, подкисленные путем добавления молочной кислоты до достижения pH, близкого к конечному pH культуральных жидкостей (3,9-4,5). Данные в Таблице 1 (смотри нижние 4 строки) показывают, что влияние ингибирования *E.coli* осуществляется в значительной степени благодаря продуцированию бактериоцинов, а не pH среды.

г) Стерильная вода.

Таким образом полученные чашки инкубируют в термостате при 37°C/24 часов.

В конце инкубирования наблюдается однородный рост целевого штамма по всей чашке, за исключением участков, где присутствует бактериоцин. Данные показаны в Таблице 1. В качестве подтверждения результатов, показанных в Таблице 1, ниже приведен практический пример тестирования ингибирования роста *E.coli* штаммом *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

На четырех изображениях, показанных ниже (Фиг.1-4), можно заметить, что:

- чашка Петри, содержащая агаризованную среду LaptG, содержит часть целевого штамма *E.coli*, распределенную по ее поверхности;

- символы и черные линии разграничивают секторы, принадлежащие различным типам тестируемых образцов;

- "пятно" состоит из 10 мкл каждого тестируемого образца. Следует отметить, что в случае образца, состоящего из полных бульонных культур, пятно выглядит более мутным по сравнению с остальными участками чашки, указывая на то, что произошло размножение бактерий;

- ореол ингибирования, темный участок, присутствующий в каждой чашке в секторах 1-2-3-4-5, где целевой штамм не размножается из-за действия бактериоцина, прямо пропорционален его количеству.

Различные секторы описаны ниже.

Сектор 1: эффект ингибирования полной бульонной культурой (клетки плюс культуральная среда LaptG) штамма *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

Сектор 2: эффект ингибирования отфильтрованным бульоном штамма *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980, после того как самому штамму позволили расти.

Из присутствия темного ореола можно сделать вывод, что продуцируемый бактериоцин является экзогенным, потому что он секретируется клетками.

Продуцируемый бактериоцин остается активным в культуральной жидкости.

Сектор 3: эффект ингибирования полной бульонной культурой (клетки плюс культуральная среда LaptG) штамма *L. rhamnosus* DSM 21981 (LR06).

Сектор 4: эффект ингибирования полной бульонной культурой (клетки плюс культуральная среда LaptG) штамма *L. reuteri* ATCC 53608.

Сектор 5: эффект ингибирования отфильтрованным бульоном LaptG, в котором рос штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS 01), затем значение pH было нейтрализовано до 6,8 добавлением 0,1 н. соды, чтобы исключить возможность того, что действие, оказываемое на мишень, определялось исключительно кислотностью среды (культуральной жидкости).

Сектор 6: эффект ингибирования культуральной жидкостью LaptG как таковой. В

данном случае образование ореола не наблюдается, так как культуральная жидкость не имеет ингредиентов с ингибирующим действием.

Четыре изображения относятся к испытаниям, проведенным в одних и тех же рабочих условиях, но с использованием каждый раз другого штамма *E.coli*: *E.coli* ATCC 8739 (Фиг.1), ATCC 10536 (Фиг.2), ATCC 35218 (Фиг.3) и ATCC 25922 (Фиг.4).

На основании вышеописанных испытаний можно сделать вывод, что штамм *L. pentosus* DSM 21980 (LPS 01) показал отличную ингибирующую способность против всех штаммов *E.coli*, ATCC 8739, ATCC 10536, ATCC 35218 и ATCC 25922, благодаря его способности продуцировать более эффективный бактериоцин в значительных количествах.

На основании результатов, представленных выше, можно сделать вывод, что штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) имеет широкий спектр действия, так как он способен бороться, ингибировать и уменьшать рост всех четырех протестированных штаммов *E.coli*.

Кроме того, на основании результатов, показанных в Таблице 1 и на Фиг.1-4, можно сделать вывод, что штамм *L. pentosus* DSM 21980 (LPS 01) способен бороться, посредством бактерицидного действия, и/или уменьшать или ингибировать, посредством бактериостатического действия, присутствие грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*.

Кроме того, заявитель протестировал штамм *L. pentosus* DSM 21980 (LPS 01), к которому относится настоящее изобретение, против других пробиотических штаммов, взятых отдельно, а именно *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021 (LP01). Целью данного теста являлось подтверждение того, может ли продуцирование бактериоцина штаммом *L. pentosus* DSM 21980 (LPS 01) каким-либо образом ингибировать другие бактерии *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021 (LP01) во время их роста из-за присутствия бактериоцина.

Соответственно, проводили тест, в котором штаммы *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021 (LP01) пересекались точно так же, как в анализе с патогеном *E.coli*, описанном выше.

Данные, относящиеся к используемым штаммам *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01); *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021 (LP01), показаны в Таблице 2.

В Таблице 2 отсутствие ореола (отсутствие ингибирования) представлено как (-).

Как можно видеть из Таблицы 2, ни одна из бактерий не продемонстрировала ингибирующих способностей против других перекрестных пробиотических бактерий.

Штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) не оказывает негативного влияния на другие штаммы пробиотических бактерий или полезную бактериальную флору.

Предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к композиции, содержащей штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01), для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к композиции для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения рекуррентных инфекций (периодически повторяющихся инфекций), вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями и *E.coli*.

Предпочтительно, указанная композиция показана для профилактического или куративного лечения гастроэнтерита или гастроэнтероколита. Еще более предпочтительно она показана для профилактического или куративного лечения диарейных приступов и последующего обезвоживания, тошноты, диареи, абдоминальных спазмов, сопровождающихся лихорадкой и физической слабостью.

В вышеупомянутых композициях штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) может быть живым или убитым, или, альтернативно, могут присутствовать его клеточные компоненты.

В предпочтительном воплощении штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) в форме живых или убитых бактерий, или, альтернативно, их клеточных компонентов, можно использовать для изготовления диетической композиции, которая имеет эффективное применение в качестве технологической добавки в молочной промышленности. Указанную диетическую композицию добавляют к заквасочной культуре для получения молочных продуктов.

В предпочтительном воплощении вышеупомянутые композиции также могут содержать штамм *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и/или штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) вместе со штаммом *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01).

Композиции содержат штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) в виде живых или убитых бактерий или его клеточные компоненты в количестве от 1×10^6 до 1×10^{11} КОЕ(колониеобразующих единиц)/г на общую массу композиции, предпочтительно от 1×10^8 до 1×10^{10} КОЕ/г.

В предпочтительном воплощении вышеупомянутые композиции содержат штамм живых или убитых бактерий или их клеточные компоненты в количестве от 1×10^6 до 1×10^{11} КОЕ/доза, предпочтительно от 1×10^8 до 1×10^{10} КОЕ/доза. Дозы могут составлять, например, 1 г, 3 г, 5 г и 10 г.

Композиции также могут содержать добавки и эксципиенты, которые приемлемы с диетической и фармацевтической точки зрения.

Композиции могут включать витамины, например фолиевую кислоту, витамин B₁₂, рибофлавин, пиридоксальфосфат, витамин Е и аскорбиновую кислоту; антиокислители, например полифенолы, флаваноиды, проантоцианидины и катехины; аминокислоты, например глутамин и метионин; минералы, например селен, медь, магний и цинк; активные вещества растительного происхождения, предпочтительно в форме сухого экстракта, такого как клюквенный экстракт, экстракт эхинацеи, экстракт семян грейпфрута, экстракт хвоща, толокнянки, розмарина и прополиса.

В предпочтительном воплощении композиции также содержат по меньшей мере одно вещество, обладающее пребиотическими свойствами в количестве от 1 до 30% по массе на общую массу композиции, предпочтительно от 5 до 20% по массе.

Указанные пребиотические вещества включают фрукто-олигосахариды (FOS), ксило-олигосахариды (XOS), галакто-олигосахариды, инулин, арабино-галактаны и глюко-олигосахариды.

В предпочтительном воплощении штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) индуцируют для получения бактериоцина в крупном масштабе через стимуляцию анти-*E.coli* бактериоцина. Полученный бактериоцин экстрагируют из крупномасштабного продуцирования, описанного выше, так, чтобы получить бактериоцин по настоящему изобретению как таковой. Последний можно использовать в вышеописанных композициях, для борьбы (посредством бактерицидного действия) и/или снижения или ингибирования (посредством бактериостатического действия) присутствия

грамотрицательных бактерий, предпочтительно энтерококков, колиформных бактерий и *E.coli*.

Кроме того, проводили тесты на резистентность к желудочному соку, чтобы оценить способность штамма *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS 01) достигать кишечника в количестве, достаточно большом, чтобы колонизировать кишечную стенку. Тесты осуществляли в соответствии с методами, известными в данной области техники, и указанными в прилагаемом перечне литературы (ссылки 1-5). Тесты проводили, принимая штамм *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 за положительный контроль, так как он представляет собой штамм, принадлежащий семейству *Plantarum*, происходящему из человека, способный колонизировать кишечник. Кроме того, тестировали штамм *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG), так как он является хорошо исследованным, хорошо охарактеризованным пробиотическим *Lactobacillus*. Данные приведены в Таблице 3.

В Таблице 3 показан процент выживаемости пробиотических штаммов в двух разных типах желудочных соков и секрети поджелудочной железы, смоделированный после разного времени контакта (5', 30' и 60') при 37°C.

Результаты выживаемости в отношении к желчной секреции получали путем сравнения числа колоний, растущих в культуральной среде с добавлением желчных солей или человеческой желчи или без их добавления.

На основании данных, представленных в Таблице 3, можно сделать вывод, что штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) демонстрирует хорошую выживаемость при желудочно-кишечном транзите, полностью сравнимую с выживаемостью контрольного штамма *Lactobacillus plantarum* DSM 9843. Следовательно, штамм *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) способен пройти желудочно-кишечный барьер и колонизировать кишечный тракт.

Данные, представленные в Таблице 1, на Фиг.1-4, в Таблице 2 и Таблице 3, являются подтверждением применения штамма *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS01) в пищевом или фармацевтическом секторе в качестве полной или частичной замены традиционных антибиотиков в профилактическом или куративном лечении инфекций, вызванных граммотрицательными бактериями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желудочный сок человека - Met. Int. 006 (DAS)

Ссылка: Del Piano M., Morelli L, Strozzi GP, Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso S.: Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis. 2006 Dec; 38 Suppl 2:S248-55. Обзор.

2. Искусственный желудочный сок - Met. Int. 022 (DAS)

Ссылка: Charteris WP. et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 1998 May; 84 (5):759-68.

3. Искусственный сок поджелудочной железы - Met. Int. 023 (DAS)

Ссылка: Charteris WP. et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 1998 May; 84 (5)759-68.

Del Piano M., Strozzi GP, Barba M.; Allesina S.; Deidda F. Lorenzini P, Morelli L.; Carmagnola S.; Pagliarulo M.; Balzarini M.; Ballare M.; Orsello M.; Montino F.; Sartori M.; Garelo E.; Capurso L. In Vitro Sensitivity of Probiotics to Human Pancreatic Juice. Journal of

Clinical Gastroenterology. 2008 August 5.

4. Желчь человека - Met. Int. 024 (DAS).

Ссылка: Del Piano M., Morelli L., Strozzi GP., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., S. Capurso: Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis. 2006 Dec;38 Suppl 2:S248-55. Review.

5. Желчные соли - Met. Int. 024 (DAS).

Ссылка: Charteris WP. et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 1998 May; 84 (5):759-68.

Таблица 1					
Тестируемый штамм	Культуральная среда	Конечное значение pH. бульон-ной культуры	Полный образец 10 мкл бульон-ной культуры	Промытые клетки	Отфильтрованный бульон
15 L. pentosus LPS01 DSM21980	MRS	3.87	+++	+++	**
	LaptG	3.98			**
L. rhamnosus LR06 DSM 21981	MRS	4.04	++	++	*
	LaptG	4.40	+		*
L. reuteri ATCC 55730	MRS	4.15	-/+	+	*
	LaptG	4.33	+		*
20 L. rhamnosus GG	MRS	4.12	-	-	-
	LaptG	4.50	-		-
L. fermentum LF5	MRS	4.12	++	+	-/*
	LaptG	4.23	++		-/*
L. plantarum LP02	MRS	4.00	+++	++	*
	LaptG	4.02	++		*
25 L. plantarum ID 094	MRS	3.96	++	++	*
	LaptG	3.89	++		*
L. plantarum LP01	MRS	3.87	++	++	*
	LaptG	3.94	++		*
L. plantarum ID 126	MRS	3.79	++	++	*
	LaptG	3.86	++		*
30 L. casei sub. paracasei LPC08	MRS	4.48	-	-	-
	LaptG	4.95	-		-
L. acidophilus LA02	MRS	3.94	-	-	-
	LaptG	3.66	-		-
L. lactis sub. cremoris NS01	MRS	4.35	+	+	-
	LaptG	4.05	+		-
35 S. thermophilus FP4	MRS	4.86		-	
	LaptG	4.23			-
Reuterin ATCC 53608			+		
Reuflor™			+		
	бульон MRS	4.06	-		
	бульон M17	4.02	-		
	бульон LaptG	3.90	-		
40	H ₂ O	/	-		

Таблица 2			
	LR06	LPS01	LP01
LR06	-	-	-
LPS01	-	-	-
LP01	-	-	-

Таблица 3					
Штамм	Оцениваемые параметры			% выживаемости	
	Время контакта (минуты)			5'	30'
				60'	

5	Lactobacillus pentosus DSM 21980 (LPS01)	Желудочный сок человека	84	55	36	
		Искусственный желудочный сок	90	26	15	
		Искусственная секреция поджелудочной железы	93	86	72	
		Желчь человека (в культуральной среде)				85
10	Lactobacillus plantarum DSM 9943	Желудочный сок человека	81	61	40	
		Искусственный желудочный сок	88	30	20	
		Искусственная секреция поджелудочной железы	89	83	79	
		Желчь человека (в культуральной среде)				97
15	Lactobacillus rhamnosus ATCC53103	Желудочный сок человека	88	60	25	
		Искусственный желудочный сок	90	30	19	
		Искусственная секреция поджелудочной железы	88	80	73	
		Желчь человека (в культуральной среде)				84
20		Желчные соли (в культуральной среде)				55

Формула изобретения

1. Штамм *Lactobacillus pentosus* LPS 01, продуцирующий бактериоцин, депонированный 14.11.2008 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ с регистрационным номером DSM 21980.

2. Применение штамма *Lactobacillus pentosus* LPS 01, депонированного 14.11.2008 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ с регистрационным номером DSM 21980 в качестве лекарственного средства для борьбы с грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиморфными бактериями, *E.coli*, уменьшения или ингибирования их присутствия.

3. Применение штамма *Lactobacillus pentosus* LPS 01, депонированного 14.11.2008 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ с регистрационным номером DSM 21980 для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, *E. coli*.

4. Применение по п.3 для профилактического или куративного лечения рецидивирующих инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, *E. coli*.

5. Применение штамма *Lactobacillus pentosus* LPS 01, депонированного 14.11.2008 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ с регистрационным номером DSM 21980 для профилактического или куративного лечения гастроэнтерита или гастроэнтероколита.

6. Применение по п.5 для профилактического или куративного лечения приступов диареи с последующим обезвоживанием, тошноты, диареи, абдоминальных спазмов с лихорадкой и слабостью.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая штамм *Lactobacillus pentosus* LPS 01 по п.1, для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, *E.coli*.

8. Фармацевтическая композиция по п.7 для применения в качестве лекарственного средства для профилактического или куративного лечения рецидивирующих инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, E.coli.

5 9. Композиция по любому из пп.7 и 8 для профилактического или куративного лечения гастроэнтерита или гастроэнтероколита.

10. Композиция по любому из пп. 7-9 для профилактического или куративного лечения приступов диареи с последующим обезвоживанием, тошноты, диареи, абдоминальных спазмов с лихорадкой и слабостью.

10 11. Пищевая композиция, содержащая штамм *Lactobacillus pentosus* LPS 01 по п.1, для применения в качестве технологической добавки для добавления к заквасочной культуре для получения молочных продуктов.

12. Композиция по любому из пп.7-10, содержащая штамм *Lactobacillus rhamnosus* DSM 21981 (LR06) и/или штамм *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021 (LP01).

15 13. Применение штамма по п.1 для изготовления лекарственного средства для борьбы с грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, E.coli, уменьшения или ингибирования их присутствия.

14. Применение по п.13 для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, предпочтительно энтерококками, колиформными бактериями, E.coli.

20 15. Применение штамма по п.1 для получения технологической добавки для добавления к заквасочной культуре для получения молочных продуктов.

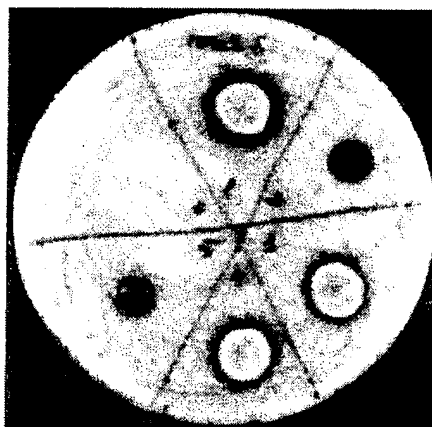
25

30

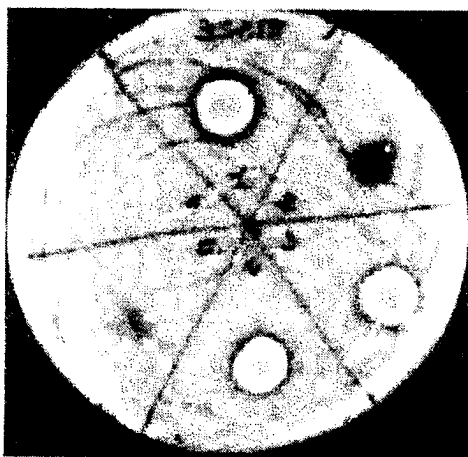
35

40

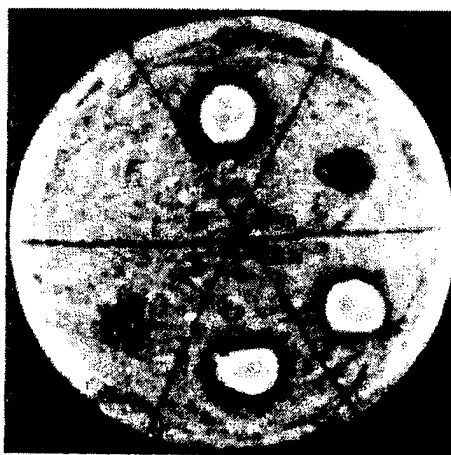
45



фиг. 2



фиг. 3



фиг. 4