



(51) МПК
A61K 31/567 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/567 (2023.08); A61K 31/19 (2023.08); A61K 31/593 (2023.08); A61K 33/06 (2023.08); A61P 19/00 (2023.08)

(21)(22) Заявка: 2020133327, 19.03.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.03.2019

Дата регистрации:
28.12.2023

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.03.2018 SE 1850304-5

(43) Дата публикации заявки: 19.04.2022 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 28.12.2023 Бюл. № 1

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.10.2020

(86) Заявка РСТ:
SE 2019/050246 (19.03.2019)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2019/182501 (26.09.2019)

Адрес для переписки:
191036, г. Санкт-Петербург а/я 24
"НЕВИНПАТ", Поликарпов Александр
Викторович

(72) Автор(ы):

**ФЕНДРИКС Ларс (SE),
ВАЛЛЕНИУС Вилле (SE)**

(73) Патентообладатель(и):

ЭПИСИТ ФАРМА АБ (SE)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20140030352 A1, 30.01.2014. EP 1270007 B1, 26.05.2004. EP 252004 A, 07.01.1988. US 20070292493 A1, 20.12.2007. WEBLING, D. D'A. et al. The Effect of Bile, Bile Acids and Detargents on Calcium Absorption in the Chick. *Biochem. J.*, 1965, vol. 97, pp. 408-421. WEBLING DD et al. Bile salts and calcium absorption. *Biochemical Journal*, vol. 100, no. (см. прод.)

(54) **Композиция для применения в лечении состояний, вызванных недостатком кальция**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области фармацевтики и раскрывает применение композиции, содержащей гликохолевую кислоту (GCA), представляющую собой желчную кислоту, или ее соль и по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из группы, состоящей из масляной кислоты или ее соли и олеиновой кислоты или ее соли, в качестве лекарственного

препарата в лечении и/или предупреждении недостаточности всасывания кальция. Техническим результатом изобретения является синергическое повышение всасывания кальция по сравнению с эффектом двух индивидуальных компонентов по отдельности - желчной кислоты и жирной кислоты. 12 з.п. ф-лы, 6 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

3, 1966, pp. 652-660. RU 2552324 C2, 10.06.2015.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/567 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/567 (2023.08); A61K 31/19 (2023.08); A61K 31/593 (2023.08); A61K 33/06 (2023.08); A61P 19/00 (2023.08)

(21)(22) Application: **2020133327, 19.03.2019**(24) Effective date for property rights:
19.03.2019Registration date:
28.12.2023

Priority:

(30) Convention priority:
19.03.2018 SE 1850304-5(43) Application published: **19.04.2022** Bull. № 11(45) Date of publication: **28.12.2023** Bull. № 1(85) Commencement of national phase: **19.10.2020**(86) PCT application:
SE 2019/050246 (19.03.2019)(87) PCT publication:
WO 2019/182501 (26.09.2019)Mail address:
**191036, g. Sankt-Peterburg a/ya 24 "NEVINPAT",
Polikarpov Aleksandr Viktorovich**

(72) Inventor(s):

**FENDRIKS Lars (SE),
VALLENIUS Ville (SE)**

(73) Proprietor(s):

EPISIT FARMA AB (SE)(54) **COMPOSITION FOR USE IN TREATMENT OF CONDITIONS CAUSED BY CALCIUM DEFICIENCY**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention discloses the use of a composition containing glycocholic acid (GCA), which is a bile acid, or a salt thereof, and at least one fatty acid selected from the group consisting of butyric acid or a salt thereof and oleic acid or its salts, as a medicinal

product in the treatment and/or prevention of calcium malabsorption.

EFFECT: synergistic increase in calcium absorption compared to the effect of two individual components separately — bile acid and fatty acid.

13 cl, 6 dwg, 6 ex

Область техники изобретения

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль, по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль.

Композиция также может содержать кальций и витамин D и предназначена для применения в качестве лекарственного препарата, главным образом для лечения и/или предупреждения нарушений, связанных с недостаточностью усвоения кальция кишечником.

Предпосылки изобретения

Подсчитано, что в 2003 году глобальная эпидемия ожирения затронула более чем 1,5 миллиарда человек, при этом заболеваемость во всем мире постоянно растет. Рост числа случаев ожирения связан с увеличением числа случаев сопутствующих заболеваний (например, диабета 2 типа, гиперлипидемии, гипертонии, ишемической болезни сердца, инсульта, астмы, дегенеративных проблем в суставах спины и нижних конечностей, некоторых форм рака, депрессии и т.д.). По оценкам, в Западной Европе ожирение приводит к смерти приблизительно 320000 человек в год. Таким образом, уменьшение средней продолжительности жизни из-за ожирения является значительным. По сравнению с индивидом с нормальным весом 25-летний индивид с морбидным ожирением потеряет в среднем 12 лет жизни.

Бариатрическая операция в последние десятилетия стала единственным долгосрочным эффективным методом лечения для морбидного ожирения. Согласно систематическим обзорам у пациентов с ожирением эффективная потеря веса достигается после бариатрической операции. У значительного большинства пациентов с диабетом, гиперлипидемией, гипертонией и обструктивным апноэ во сне после оперативного вмешательства наблюдается заметное улучшение, а иногда и полное устранение нарушений. Наиболее распространенной формой бариатрической операции в Швеции является лапароскопическое шунтирование желудка с гастроэюноанастомозом по Ру (RYGB). Новой перспективной методикой бариатрической операции является рукавная гастрэктомия (SG).

Как правило, послеоперационное восстановление после лапароскопической бариатрической операции проходит быстро. Быстрая потеря веса обычно происходит в течение первых 6-12 месяцев и стабилизируется приблизительно через два года после оперативного вмешательства. Жизнь после обходного желудочного анастомоза означает изменение режима потребления пищи в виде меньших и более частых приемов пищи.

Из-за изменения маршрута желудочно-кишечного тракта с переднекишечным исключением прохождения пищи через желудок и двенадцатиперстную кишку, а также из-за быстрой доставки непереваренной пищи из задней кишки в тощую кишку, т.е. пищевую петлю, снижается усвоение питательных микроэлементов. Шунтированный желудок выделяет меньше соляной кислоты и внутреннего фактора Касла (IF), что отрицательно влияет, например, на усвоение железа и витамина B12. Поэтому всем пациентам после RYGB рекомендуется пожизненный прием витамина B12, а также добавки поливитаминов и микроэлементов. Добавки железа рекомендуются женщинам до менопаузы, а также другим пациентам с недостатком железа.

Активное усвоение кальция, индуцированное витамином D, в норме происходит в проксимальном отделе тонкой кишки, т.е. в двенадцатиперстной кишке и первой половине тощей кишки. Следовательно, пациентам с RYGB рекомендуется пожизненный прием витамина D и добавок кальция. Из-за изменения маршрута тонкой кишки после RYGB двенадцатиперстная кишка исключена из пути прохождения питательных элементов. Недавно было показано, что коактиватор рецептора витамина D, белок

теплового шока (Hsp) 90β, а также как наиболее важный транспортный белок кальция TRPV6, индуцированный витамином D, подвергаются отрицательной регуляции в слизистой оболочке пищеварительной системы после RYGB (Elias et al.). В соответствии с этим также было показано, что у пациентов после RYGB, в отличие от пациентов

5 после вертикальной ленточной гастропластики (VBG), также наблюдалось зависимое от процедуры понижение минеральной плотности костной ткани (BMD). Таким образом, добавки кальция и витамина D после RYGB, по-видимому, имеют важное значение для предотвращения риска дальнейшего снижения BMD и будущих остеопоротических переломов у этих пациентов.

10 Недавно введенная в практику операция SG (рукавная гастрэктомия) эффективна как для похудения, так и для улучшения метаболизма, однако после резекции желудка следует резкое снижение общего выхода желудочной кислоты и сокращение времени прохождения полостного содержимого к дистальному отделу тонкой кишки. Функционально это состояние частично имитирует эффект желудочного шунтирования

15 и, таким образом, снижает способность слизистой оболочки реагировать на витамин D и, в свою очередь, снижает всасывание кальция. Действительно, процедура SG ассоциирована с признаками изменения минерального обмена костей, что указывает на риск деминерализации костей в долгосрочной перспективе (Crawford et al.).

После SG, как и после RYBP, пациентам назначают добавку витамина D и кальция.

20 Однако не доказано, может ли такая добавка предупредить потерю BMD. Существуют данные, указывающие на то, что это может быть не так. Например, у значительной части пациентов с RYGB, которые получали добавки кальция и витамина D, развился вторичный гиперпаратиреозидизм (SHPT) с повышенным уровнем PTH и пониженным уровнем кальция, что указывает на то, что всасывание кальция в кишечнике все еще

25 может быть недостаточным, несмотря на добавки (Hewit S et al.). Также было обнаружено, что у пациентов, получавших добавки, наблюдалось заметное повышение уровня C-концевого телопептида (CTX) через 18 месяцев после оперативного вмешательства, что указывает на повышение обмена костной ткани. Есть также недавние данные, показывающие, что всасывание кальция в кишечнике (фракционное всасывание

30 кальция) серьезно нарушается и снижается на примерно 80% после RYGB, даже в случае если уровни витамина D были оптимизированы (Schafer A L et al.). Следовательно, добавки кальция и витамина D по текущим схемам лечения не эффективны.

Кроме того, существует еще одна группа пациентов с общим понижением минеральной плотности костной ткани (BMD), и/или с общим понижением усвоения

35 кальция, и/или у которых имеется патологическое состояние костей, например, остеопороз, вызванный недостатком кальция, на который может произвести благотворный эффект увеличение усвоения кальция, индуцированное витамином D. Помимо добавок витамина D и кальция манифестное заболевание, связанное с минерализацией костей, в настоящее время лечится преимущественно с помощью

40 гормональной добавки PTH для системного применения или фармакологическими ингибиторами костной резорбции (такими как бисфонфонаты, аналоги эстрогена, антитела, нацеленные на механизмы резорбции и т.д.). Схемы лечения, направленные на восстановление способности к всасыванию кальция кишечником, немногочисленны или часто оказываются нефункциональными.

45 В патенте US 8563053 раскрыта композиция, содержащая наносостав из активных ингредиентов, включающих *Lepidium Sativum*, кальций, витамин D и антиоксидант для лечения состояния костей. Другим примером является патент WO2013/049595, в котором раскрыты способы и композиции для лечения метаболических нарушений путем

регуляции уровня желчных кислот.

В связи с вышеизложенным в области техники существует потребность в поиске решений вышеупомянутых проблем, особенно понижения усвоения кальция, индуцированного витамином D, и понижения минеральной плотности костной ткани (BMD) у пациентов, перенесших операцию на желудке, т.е. у пациентов после RYGB и SG.

Краткое описание изобретения

Целью настоящего изобретения является решение указанной выше проблемы и представление композиции, содержащей по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль и по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль. Композиция также может содержать кальций и витамин D. Композиция предназначена для применения в качестве лекарственного препарата.

В связи с настоящим изобретением неожиданно было показано, что композиция, содержащая по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль, по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль, синергически индуцирует экспрессию коактиватора $Nsp90\beta$ рецептора витамина D и сопровождается последующим повышенным всасыванием кальция по сравнению с эффектом двух индивидуальных компонентов по отдельности, желчной кислотой и жирной кислотой, соответственно. Следовательно, представлена композиция, содержащая таким образом все четыре компонента, по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль, по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль, кальций и витамин D.

Ранее было описано, что потеря костной массы может быть связана с нарушением всасывания кальция, вызванным пониженной активацией механизмов всасывания кальция, зависимых от витамина D, опосредованных белком теплового шока 90β (Elias et al.). Таким образом, результаты настоящего изобретения будут полезны пациентам, перенесшим бариатрическую операцию, и в целом любому пациенту, страдающему от состояний, которые могут быть облегчены с помощью повышенного всасывания кальция.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено лечение и/или предупреждение недостаточности всасывания кальция.

Недостаточность всасывания кальция может возникнуть, например, после с шунтирования желудка с гастроеюноанастомозом по Ру (RYGB). Чтобы компенсировать это и поддерживать уровень кальция в плазме крови на нормальном уровне, одним из компенсаторных механизмов, который обычно наблюдается после RYGB, является увеличение выработки паратиреоидного гормона (PTH) (Hewitt et al.). Операция на щитовидной железе является еще одной хирургической процедурой, которая может вызвать недостаточность всасывания кальция, отрицательно влияя на функцию паращитовидных желез и выработку ими паратиреоидного гормона (PTH). В литературе есть сообщения о том, что сочетание этих двух процедур, RYGB и операции на щитовидной железе, может привести к серьезному понижению уровня кальция в плазме крови и появлению симптомов гипокальциемии. Механизмом этого, по-видимому, является неспособность компенсировать пониженное всасывание кальция в кишечнике за счет увеличения выработки PTH. В некоторых случаях комбинированных операций на RYGB и щитовидной железе оказалось чрезвычайно трудным лечить гипокальциемию (Goldenberg et al.). Путем введения композиции, описанной в данном документе, уровень кальция может быть повышен. Это представляет особый интерес для пациентов, у которых понижение всасывания кальция вызывает понижение уровня кальция в плазме крови или понижение минерализации костей.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено лечение и/или предупреждение остеопороза, вызванного недостатком кальция, состояний, характеризующихся нарушением всасывания, вызванных недостатком кальция, или поражений костей, вызванных недостатком кальция, у млекопитающего. Кроме того, композиция может применяться для лечения и/или предупреждения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD), вызванной недостатком кальция, у млекопитающего. Композиция также может применяться для лечения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD) у пациентов с шунтированием желудка с гастроеюноанастомозом по Ру (RYGB) или пациентов после рукавной гастрэктомии (SG).

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, как определено в данном документе, где указанная по меньшей мере одна кислота выбрана из первичных желчных кислот и вторичных желчных кислот и их солей. Желчная кислота выбрана с условием, что желчная кислота не является таурохолевой кислотой или ее производным.

Другим аспектом изобретения является композиция, где указанная по меньшей мере одна жирная кислота является насыщенной или ненасыщенной, например, указанная по меньшей мере одна жирная кислота представляет собой короткоцепочечную жирную кислоту (SCFA), среднецепочечную жирную кислоту (MCFA), длинноцепочечную жирную кислоту (LCFA) или жирную кислоту с очень длинной цепью (VLCFA). В частности, короткоцепочечная жирная кислота представляет собой масляную кислоту, или среднецепочечная жирная кислота представляет собой олеиновую кислоту.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция для применения содержит витамин D, где витамин D представлен в основном витамином D3.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой композицию, где указанный кальций присутствует в виде карбоната кальция, цитрата кальция или фосфата кальция или их смеси.

В одном аспекте настоящего изобретения количество кальция и витамина D композиции представлено как рекомендуемая суточная норма потребления (RDI) или меньшее количество. Композиция может дополнительно содержать по меньшей мере одно из среды-носителя, вспомогательного вещества, смазывающего вещества, ароматизатора, подсластителя, разрыхлителя, связующего вещества и разрыхлителя.

Композиция, как определено в данном документе, составлена для пероральной доставки, парентеральной доставки, внутривенной инфузии или инъекции. Композиция может находиться в жидкой форме или твердой форме; композиция может быть составлена в виде жевательной таблетки, шипучей таблетки, порошка, пилюли, таблетки или капсулы.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция представляет собой пищевую добавку или добавку к рациону.

В аспекте настоящего изобретения композиция для применения содержит жирную кислоту, представляющую собой масляную кислоту или ее соль, указанную желчную кислоту, представляющую собой гликохолевую кислоту или ее соль, и витамин D, представляющий собой витамин D3.

Краткое описание графических материалов

Настоящее изобретение будет более полно понятно из следующего подробного описания, взятого в сочетании с прилагаемыми графическими материалами, на которых: на фигуре 1 показано, что экспрессия белка теплового шока (Hsp) 90 β , коактиватора

рецептора витамина D, синергетически индуцируется в культуре клеток Caco-2 путем добавления вместе желчной кислоты GCA и бутирата жирной кислоты в течение 48 ч., но не GCA или бутират по отдельности. GCA добавляли в концентрации 1×10^{-4} М и
 5 бутират в концентрации 5×10^{-4} М. *** $P < 0,001$; GCA + бутират по сравнению с контролем, непарный t-критерий.

На фигуре 2 показаны результаты вестерн-блоттинга и показано, что витамин D обладает эффектом повышения экспрессии белка клаудина-2 в культивируемых клетках Caco-2 дозозависимым образом, облегчая тем самым "пассивное" всасывание кальция.
 10 Подавление коактиватора витамина D Hsp90 β специфическим ингибитором гелданамицином также подавляет экспрессию клаудина-2, очевидно посредством подавления активности витамина D, показывая тем самым, что Hsp90 β важен также для "пассивного" всасывания кальция.

На фигуре 3 показано влияние присутствия витамина D3 на поглощение кальция.

15 На фигуре 4 показано влияние желчной кислоты, жирной кислоты и витамина D3 на поглощение кальция (без градиента).

На фигуре 5 показано влияние желчной кислоты, жирной кислоты и витамина D3 на поглощение кальция (с градиентом).

20 На фигуре 6 показано влияние желчной кислоты, жирной кислоты и витамина D3 на усвоение кальция.

Подробное описание изобретения

Далее будут описаны некоторые иллюстративные варианты осуществления для того, чтобы обеспечить более полное понимание принципов работы и функции настоящего изобретения. Для специалистов в данной области будет очевидно, что описанные
 25 иллюстративные варианты осуществления не являются ограничивающими, и что объем настоящего изобретения определяется формулой изобретения.

Как указано выше, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей

- а) по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль,
- б) по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль,
- 30 в) кальций и
- д) витамин D.

Композиция предназначена для применения в качестве лекарственного препарата.

Неожиданно было обнаружено, что в соответствии с настоящим изобретением композиция, содержащая по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль, по
 35 меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль, витамин D и кальций, синергически индуцирует экспрессию коактиватора Hsp90 β рецептора витамина D.

Посредством индукции экспрессии коактиватора рецептора витамина D, витамин D-индуцированный транспорт кальция может быть существенно увеличен, т.е. нормализован у пациентов, страдающих недостатком кальция, таких как пациенты
 40 после RYGB и пациенты после SG.

Hsp90 β оказывает хорошо известное стимулирующее действие на белок TRPV6, который представляет собой белок, участвующий в активном трансклеточном транспорте кальция. Однако активный транспорт кальция не зависит от композиций, представляющих интерес. Вместо этого, в соответствии с настоящим изобретением,
 45 Hsp90 β активирует увеличение пассивного (параклеточного) прохождения кальция, зависимое от витамина D. Это важная особенность настоящего изобретения: кроме витамина D в композицию должен быть включен также кальций как таковой для получения трансэпителиального градиента концентрации, необходимого для параклеточного транспорта.

Принимая во внимание вышеописанную индукцию коактиватора Hsp90 β рецептора витамина D, композиции по настоящему изобретению можно применять в лечении любого пациента, страдающего от состояний, которым может помочь повышенное всасывание кальция. В подобных патологических состояниях, например, остеопорозе, который может быть вызван недостатком кальция вследствие нарушенного всасывания, существует необходимость предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD). Среди млекопитающих есть индивиды, подверженные таким состояниям. Например, композиции по настоящему изобретению подходят для лечения пациентов, таких как люди пожилого возраста, страдающих остеопорозом, вызванным недостатком кальция.

Композиции по настоящему изобретению в одном варианте осуществления подходят для лечения и/или предупреждения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD) у пациентов с шунтированием желудка с гастроеюноанастомозом по Ру (RYGB) или пациентов после рукавной гастрэктомии (SG).

Композиции в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере одну "желчную кислоту" или ее соль, по меньшей мере одну "жирную кислоту" или ее соль, а также кальций и витамин D.

Фраза "желчная кислота", используемая в данном документе, включает и те кислоты, которые встречаются в природе в живых организмах, а также и те, которые являются синтетическими желчными кислотами. Встречающиеся в природе желчные кислоты могут являться как первичными желчными кислотами, которые синтезируются в печени, так и вторичными желчными кислотами, которые являются результатом жизнедеятельности бактерий в кишечнике. Встречающиеся в природе желчные кислоты также могут являться конъюгированными желчными кислотами, что означает то, что желчная кислота конъюгирована по карбоксильной группе с фрагментом либо глицина, либо таурина, и это может иметь место как для первичной, так и для вторичной желчных кислот.

К первичным желчным кислотам относятся холевая кислота (CA) и хенодезоксихолевая кислота (CDCA), и соответствующими конъюгированными формами являются гликохолевая кислота (GCA) и таурохолевая кислота (TCA), а также гликохенохолевая кислота (GCDCA) и таурохенодезоксихолевая кислота (TCDCA), соответственно. В частности, первичными желчными кислотами, представляющими интерес для настоящего изобретения, являются холевая кислота (CA) и хенодезоксихолевая кислота (CDCA) и их соответствующие конъюгированные формы - гликохолевая кислота (GCA) и гликохенохолевая кислота (GCDCA), соответственно.

Ко вторичным желчным кислотам принадлежат дезоксихолевая кислота (DCA), литохолевая кислота (LCA), урсодезоксихолевая кислота (UDCA) и гиодезоксихолевая кислота (HDCA), а соответствующими конъюгированными формами являются гликодезоксихолевая кислота (GDCA), тауродезоксихолевая кислота (TDCA), гликолитохолевая кислота (GLCA), тауролитохолевая кислота (TLCA), гликурсордесоксихолевая кислота (GUDCA), тауроурсодезоксихолевая кислота (TUDCA), гликогиодезоксихолевая кислота (GHDCA) и таурогиодезоксихолевая кислота (THDCA), соответственно. В частности, интерес для настоящего изобретения представляют дезоксихолевая кислота (DCA), литохолевая кислота (LCA), урсодезоксихолевая кислота (UDCA) и гиодезоксихолевая кислота (HDCA), и их соответствующими конъюгированными формами являются гликодезоксихолевая кислота (GDCA), гликолитохолевая кислота (GLCA), гликурсордесоксихолевая кислота (GUDA) и

гликогиодезоксихолевая кислота (GHCA), соответственно.

Конъюгированные желчные кислоты более кислые, чем неконъюгированные желчные кислоты, и поэтому их часто называют "солями желчных кислот". Различные желчные кислоты являются основными составляющими "желчи" у многих организмов, однако набор специфических разновидностей желчных кислот, например у разных животных, может варьироваться в широких пределах. Синтетическая желчная кислота представляет собой, например, обетихоловую кислоту (OCA) (6-альфа-этил-хенодезоксихолевая кислота).

Любая ссылка на желчную кислоту, используемую в данном документе, включает ссылку на желчную кислоту или ее соль. Термин "желчная кислота" также может использоваться взаимозаменяемо с терминами "желчные кислоты", "соль желчной кислоты", "соли желчных кислот" и "желчная кислота/соль желчной кислоты". Подразумевается, что композиции содержат по меньшей мере одну желчную кислоту и могут, например, содержать две или больше желчных кислоты. По меньшей мере одна желчная кислота, подлежащая применению, может быть выбрана из первичных желчных кислот и вторичных желчных кислот и их солей. В физиологических условиях пищевые жиры расщепляются в просвете верхних отделов кишечника на жирные кислоты и моноглицерин, которые затем всасываются слизистой оболочкой. После бариатрической операции и при других состояниях с пониженной способностью к расщеплению липидов в просвете концентрация свободных жирных кислот в верхних отделах кишечника будет нефизиологически низкой.

Отсюда следует, что композиция в соответствии с настоящим изобретением содержит по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль, где указанная по меньшей мере одна жирная кислота является насыщенной или ненасыщенной. Ненасыщенные жирные кислоты могут иметь цис- или транс-конфигурацию. Указанная по меньшей мере одна жирная кислота представляет собой, например, короткоцепочечную жирную кислоту (SCFA <6 атомов углерода в алифатическом хвосте), например бутират, среднецепочечную жирную кислоту (MCFA, 6-12 атомов углерода в алифатическом хвосте, линейную или разветвленную), например насыщенную каприловую кислоту (8 атомов углерода) и лауриновую кислоту (12 атомов углерода), длинноцепочечную жирную кислоту (LCFA; 13-21 атом углерода), например, ненасыщенную пальмитолеиновую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, а также насыщенную пальмитиновую кислоту и стеариновую кислоту или жирную кислоту с очень длинной цепью (VLCFA, >21 атома углерода). Подразумевается, что композиции содержат по меньшей мере одну жирную кислоту и могут, например, содержать две или больше жирные кислоты. По меньшей мере одна жирная кислота или ее соль, используемые в композиции, могли представлять собой любую жирную кислоту или ее соль, доступные и известные специалисту в данной области.

Описанная в данном документе композиция содержит витамин D. Термин витамин D подразумевает группу витаминов и включает холекальциферол (витамин D3), альфакальцидол, кальцитриол. Описанная в данном документе композиция включает витамин D, который присутствует в виде витамина D3 или по меньшей мере состоит в основном из витамина D3. В другом аспекте настоящего изобретения кальций присутствует в виде соли, в виде соли Ca^{2+} , например, в виде цитрата кальция, карбоната кальция или любой соли фосфата кальция.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена композиция, где количество кальция и витамина D в композиции представлено как рекомендуемая суточная норма потребления (RDI), меньшее или большее количество. Рекомендуемая суточная норма

потребления кальция составляет 1000 мг/день (миллиграмм/день) для взрослого, а для некоторых людей, например пожилых и молодых, рекомендуются поднимать до уровня не более 1300-2500 мг/день, а рекомендуемая суточная норма потребления витамина D составляет 600 МЕ/день, что соответствует 15 (мкг) для взрослого, для лиц пожилого

5 возраста рекомендуется поднимать до уровня не более 800 МЕ/день (20 мкг).
Композиция по настоящему изобретению может содержать рекомендуемую суточную норму потребления витамина D или содержать меньшее или большее его количество, и не более 50000 МЕ/день, что соответствует 1250 мкг/день, в зависимости от назначения композиции, т.е. в зависимости от того, сколько раз в день будет осуществляться прием

10 композиции.
Количество кальция может присутствовать в композиции в диапазоне 100-2500 мг, например в диапазоне 200-2000, например в диапазоне 300-1500 мг, например в диапазоне 400-1000 мг, например 400-800 мг или 400-600 мг. Количество кальция может присутствовать в композиции в количестве, составляющем приблизительно 300, 400,

15 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500 мг. Количество витамина D, например витамина D3, может присутствовать в количестве 5-1250 мкг, например, в диапазоне 10-1000 или 20-800, как например, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 мкг и в нижнем диапазоне, составляющем приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 мкг.

20 Количество витамина D и кальция в композиции можно корректировать для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического или профилактического ответа).

Количество указанной по меньшей мере одной желчной кислоты в композиции присутствует в диапазоне, дающем внутрикишечную концентрацию, составляющую

25 от приблизительно 1×10^{-7} до 1×10^{-3} М, что соответствует от приблизительно 0,001 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, например от 0,1 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг, например 2-40 мг/кг, например 4-30 мг/кг, например 6-20 мг/кг, например 8-15 мг/кг, например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18 мг/кг. Что касается витамина D и

30 кальция, то композиция может быть скорректирована с учетом указанной по меньшей мере одной желчной кислоты для обеспечения оптимального требуемого ответа при однократной дозе или многократных дозах.

Количество указанной по меньшей мере одной жирной кислоты в композиции присутствует в соответствующем количестве в диапазоне от 0,5 г до приблизительно 20 г/день, например 1-18, например 3-15 г, например 5-12 г, 7-10. Указанные диапазоны

35 соответствуют рекомендуемой суточной дозе потребления незаменимых жирных кислот. Композиция может быть скорректирована с учетом количества жирной(-ых) кислоты (-от) для обеспечения оптимального требуемого ответа при однократной дозе или многократных дозах. При выборе солей желчных кислот и жирных кислот необходимо

40 учитывать несколько аспектов, например: растворимость, возможная токсичность и побочные эффекты, вкусовые качества пероральных композиций, а также их статус в отношении того, считаются ли они пищевыми добавками или фармацевтическими

препаратами. В одном аспекте настоящего изобретения композиция содержит

а. по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль в количестве, обеспечивающем

45 внутрикишечную концентрацию от приблизительно 1×10^{-7} до 1×10^{-3} М;

б. по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль в количестве от 0,5 г до приблизительно 20 г;

с. кальций в количестве 100-2500 мг и

д. витамин D в количестве 800-2500 мг.

Пример композиции включает:

а) по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль, выбранную из первичных желчных кислот, холевой кислоты (CA) и хенодезоксихолевой кислоты (CDCA), и их соответствующих конъюгированных форм - гликохолевой кислоты (GCA) и гликохенохолевой кислоты (GCDCA) соответственно, или их соответствующих вторичных желчных кислот - дезоксихолевой кислоты (DCA), литохолевой кислоты (LCA), урсодезоксихолевой кислоты (UDCA) и гиодезоксихолевой кислоты (HDCA), и их соответствующих конъюгированных форм -глихидезоксихолевой кислоты (GDCA), глихолитохолевой кислоты (GLCA), гликурсодезохолевой кислоты (GUDA) и гликогидезоксихолевой кислоты (GHDCА), соответственно, в количестве, обеспечивающем внутрикишечную концентрацию от приблизительно 1×10^{-7} до 1×10^{-3} М;

б) по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из короткоцепочечной жирной кислоты (SCFA <6 атомов углерода в алифатическом хвосте), например бутират, среднецепочечной жирной кислоты (MCFA, 6-12 атомов углерода в алифатическом хвосте, линейной или разветвленной), например насыщенной каприловой кислоты (8 атомов углерода) и лауриновой кислоты (12 атомов углерода), длинноцепочечной жирной кислоты (LCFA; 13-21 атом углерода), например, ненасыщенной пальмитолеиновой кислоты, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, а также насыщенной пальмитиновой кислоты и стеариновой кислоты или жирной кислоты с очень длинной цепью (VLCFA, >21 атома углерода) или ее соли в количестве от 0,5 г до приблизительно 20 г;

с) кальций в количестве 100-2500 мг и

д) витамин D, например витамин D3, в количестве 800-2500 мг.

Эта композиция предназначена для приема один раз в день. Соответствующие корректировки могут быть сделаны для получения композиции для введения дважды, трижды и т.д. в день. Композиция, как определено выше, предназначена для применения в качестве лекарственного препарата.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция составлена для пероральной доставки. Композиция не ограничивается составом для пероральной доставки, но также может быть составлена для парентеральной доставки, внутривенной инфузии или инъекции. При составлении композиции для перорального введения композицию может быть доставлена до приема пищи, перед приемом пищи и/или после приема пищи, постпрандиально. Например, композиция может быть введена до, во время и/или после еды.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция представлена в жидкой или твердой форме. В случае если композиция составлена в виде твердой формы, она может быть составлена в виде жевательной таблетки, шипучей таблетки, порошка, пилюли, жидкости, геля, таблетки или капсулы. Для составления вышеупомянутых твердых форм в такие твердые формы могут быть включены другие хорошо известные носители. Такие носители хорошо известны специалисту в данной области и включают, например, растворители, дисперсионные среды, покрытия, ароматизаторы, антибактериальные и противогрибковые средства, а также изотонические средства и т.п. физиологически совместимые вещества. Примеры таких носителей включают одно или несколько из воды, физиологического раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также их комбинации. Часто предпочитают использовать изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

В другом аспекте настоящего изобретения представлен способ предупреждения и/или лечения остеопороза, вызванного недостатком кальция, состояний, характеризующихся нарушением всасывания, вызванного недостатком кальция, или патологических состояний костей, вызванных недостатком кальция, или потери минеральной плотности костей, вызванной недостатком кальция, или для лечения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD) у индивидов с шунтированием желудка с гастроэюноанастомозом по Ру (RYGB), или у индивидов после рукавной гастрэктомии (SG) у млекопитающего, например индивида-человека, посредством введения композиции, содержащей по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль и по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль нуждающемуся в этом индивиду. С помощью введения композиции, как указано выше, индуцируют экспрессию коактиватора Hsp90 β рецептора витамина D, что повышает усвоение кальция, индуцированное витамином D.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к добавке к рациону или пищевой добавке, содержащей композицию, которая содержит желчную кислоту или ее соль и жирную кислоту или ее соль, а также, необязательно, кальций и витамин D. Также в такую добавку естественным образом могут вводиться другие традиционные для добавок к рациону или пищевых добавок компоненты.

В одном аспекте настоящего изобретения добавка к рациону содержит другие питательные микроэлементы, такие как железо, магний, цинк, медь и витамины, например, витамин А, витамин D или витамин Е и другие традиционные ингредиенты. Такие традиционные компоненты известны специалисту в данной области, и их примерами являются наполнители, связующие вещества, увлажнители, разрыхляющие средства, буферные средства, вспомогательные вещества, вспомогательные средства, антиоксиданты, консерванты.

В одном аспекте настоящего изобретения композиция содержит

- a) по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль;
- b) по меньшей мере одну жирную кислоту или ее соль;
- c) кальций;
- d) витамин D и необязательно
- e) еще один компонент, выбранный из группы питательных микроэлементов, например, компонентов, выбранных из группы, состоящей из железа, магния, цинка, меди и витаминов, например, витамина А, витамина D или витамина Е; и необязательно
- f) один или несколько компонентов, выбранных из наполнителей, связующих веществ, увлажнителей, разрыхляющих средств, буферных средств, вспомогательных веществ, вспомогательных средств, антиоксидантов, консервантов.

В одном варианте изобретения композиция содержит

- a) гликохолевую кислоту (GCA) в качестве по меньшей мере одной желчной кислоты или ее соль;
- b) олеиновую кислоту или масляную кислоту в качестве по меньшей мере одной жирной кислоты или их соль;
- c) кальций;
- d) витамин D и необязательно
- e) еще один компонент, выбранный из группы питательных микроэлементов, например, компонентов, выбранных из группы, состоящей из железа, магния, цинка, меди и витаминов, например, витамина А, витамина D или витамина Е; и необязательно
- f) один или несколько компонентов, выбранных из наполнителей, связующих веществ, увлажнителей, разрыхляющих средств, буферных средств, вспомогательных веществ,

вспомогательных средств, антиоксидантов, консервантов.

В частности, по меньшей мере одна желчная кислота (a) представляет собой гликохолевую кислоту (GCA), и по меньшей мере одна жирная кислота (b) представляет собой масляную кислоту, вместе с компонентами от c) до f).

5 В частности, по меньшей мере одна желчная кислота (a) представляет собой гликохолевую кислоту (GCA), и по меньшей мере одна жирная кислота (b) представляет собой олеиновую кислоту, вместе с компонентами от c) до f).

10 Композиция может быть предназначена для применения в качестве добавки к рациону. Добавка к рациону или пищевая добавка могут содержать, в дополнение к описанной выше композиции, другие витамины и питательные микроэлементы, которые оказывают благоприятный эффект в отношении состояния здоровья человека.

Вышеописанные аспекты в отношении композиции по настоящему изобретению, как также раскрыто в формуле изобретения, также применимы в отношении аспекта добавки к рациону и пищевой добавки.

15 Специалисту в данной области должны быть понятны дополнительные признаки и преимущества настоящего изобретения, основанные на вышеописанных вариантах осуществления. Соответственно, настоящее изобретение не должно ограничиваться тем, что конкретно показано и описано в примерах или фигурах.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрено
20 применение по меньшей мере одной желчной кислоты или ее соли, по меньшей мере одной жирной кислоты или ее соли, одного или нескольких витаминов D и кальция или их соли в изготовлении лекарственного препарата для лечения и/или предупреждения остеопороза, вызванного недостатком кальция, воспалительных состояний и состояний, характеризующихся нарушением всасывания, вызванных недостатком кальция,
25 поражений костей, вызванных недостатком кальция, или потери минеральной плотности костной ткани (BMD), вызванной недостатком кальция, или для лечения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD) у индивидов с шунтированием желудка с гастроэюноанастомозом по Ру (RYGB), или у индивидов после рукавной гастрэктомии (SG), или у индивидов, получавших лечение
30 с помощью других подобных хирургических методов. Эффекты и особенности вышеуказанного аспекта настоящего изобретения аналогичны описанным выше. Описанные в данном документе композиции предназначены для применения в качестве лекарственного препарата в лечении описанных выше заболеваний и нарушений.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения представлены композиции,
35 содержащие по меньшей мере одну желчную кислоту или ее соль и по меньшей мере одну жирную кислоту или соль, где указанная по меньшей мере одна желчная кислота представляет собой одну из вышеупомянутых желчных кислот и указанная по меньшей мере одна жирная кислота представляет собой одну из упомянутых выше жирных кислот.

40 Экспериментальная часть

Целью экспериментов является изучение путей улучшения усвоения кальция, индуцированного витамином D, в проксимальном отделе тонкой кишки, например, у пациентов, перенесших операцию RYGB или SG. Сказанное выше проверяется введением определенной желчной кислоты (или желчи человека) и жирной кислоты для того,
45 чтобы вызвать экспрессию коактиватора Hsp90 β рецептора витамина D. Посредством индукции Hsp90 β экспрессия транспорта кальция, индуцированного витамином D, может быть существенно увеличена, т.е. нормализована у пациента любого типа, нуждающегося в повышении усвоения кальция, например, у пациентов после RYGB, а возможно также

у пациентов после SG.

Клеточная линия Caco-2

Клеточная линия Caco-2 представляет собой непрерывную линию гетерогенных клеток эпителиальной колоректальной аденокарциномы человека, разработанную 5 Институтом исследований рака Слоуна-Кеттеринга. Клетки происходят из толстой кишки или толстого кишечника с карциномой, однако в случае если эти клетки культивируются в определенных условиях они становятся дифференцированными и поляризованными, что делает их фенотип морфологически и функционально похожим на энтероциты, которые выстилают тонкий кишечник.

10 Обнаружено, что клетки Caco-2 экспрессируют плотные контакты, микроворсинки и ряд ферментов, а также переносчики, которые обычно являются характерными свойствами таких энтероцитов: пептидазы, эстеразы, Р-гликопротеин, переносчики захвата аминокислот, желчные кислоты, карбоновые кислоты и т.д. Микроскопически культуры клеток Caco-2 неоднородны, и эта теория подтверждается характерными 15 свойствами клеток, показывающими различающиеся статистически значимые результаты различных исследований по всему миру. Клетки Caco-2 обычно используются не как отдельные клетки, а как слитный монослой на фильтре-вставке для культуры клеток. Такой способ культивирования приводит к дифференцировке клеток с образованием монослоя поляризованных эпителиальных клеток, который обеспечивает физический 20 и биохимический барьер для прохождения ионов и небольших молекул. Монослойная культура Caco-2 является широко используемой моделью слизистой оболочки тонкого кишечника человека для исследования всасывания перорально вводимых лекарственных средств *in vitro*.

Культура клеток Caco-2

25 Клетки Caco-2 после пассажа или приблизительно 45 (количество раз, когда они делились) (Sigma-Aldrich, Стокгольм, Швеция) культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (Life Technologies Invitrogen AB, Лидинго, Швеция) с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (Life Technologies), 1% заменимой аминокислотой (NEAA) (Life Technologies), 100 МЕ/мл пенициллина-стрептомицина (пен.-стреп.) (Life 30 Technologies). Клетки инкубировали при 37°C с 5% CO₂, и культивировали в колбе для культивирования клеток (BD Falcon®, VWR Internationals, Стокгольм, Швеция), и среду меняли каждую неделю в понедельник, среду и пятницу.

Клетки культивировали в течение приблизительно 1 недели, прежде чем они были отделены (0,25% трипсин-EDTA, Life Technologies) и высевали в 6-луночные планшеты 35 с полупроницаемыми фильтрующими вставками (размер пор 3 мкм, BD Biosciences, Ле Пон-де-Кле, Франция), 200000 клеток/лунка. При слиянии культуральную среду заменяли на свободную от FBS как в верхнем, так и в нижнем отделении лунки, а в нижнем отделении также была добавлена смесь из 10 мкл/мл инсулина, 0,55 мкг/мл переносимого вещества и 6,7 нг/мл селена (ITS, Life Technologies) для установления полярности клеток 40 и структурной дифференциации (6-7). Перед экспериментом монослой клеток культивировали в течение 14 дней.

Затем клетки стимулировали в течение 24 ч. или 48 ч. с помощью 10 мМ жирной кислоты и желчи или желчных кислот человека или их комбинации в верхних "просветных" отсеках (обработанные клетки), а остальные оставляли в качестве 45 контроля (необработанные клетки). Желчные кислоты присутствовали в составе желчи.

Анализ вестерн-блот

Для сбора белка клетки соскребали в буфер для лизиса в растворе, блокирующем протеинкиназу (1% Triton x-100, EDTA; этилендиаминтетрауксусная кислота),

содержащем буфер ингибитора протеинкиназы (10 мМ калий-фосфатный буфер, pH 6,8, 10 мМ 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS: Boehringer Mannheim, Мангейм, Германия) и таблетка коктейля с ингибитором протеазы Complete (Roche Diagnostics AB, Стокгольм, Швеция). После встряхивания несколько раз на льду обломки клеток удаляли центрифугированием (10000 x g в течение 10 мин. при 4°C) и содержание белка анализировали в супернатанте с использованием способа Брэдфорда.

Образцы разбавляли в буфере SDS, и нагревали при 70°C в течение 10 мин. перед тем, как их загружали в 10% Bis-Tris гель NuPage, и проводили электрофорез с использованием буфера MOPS (Invitrogen AB, Лидинг, Швеция). На одну полосу каждого геля наносили предварительно окрашенные стандарты молекулярной массы (SeeBlue, NO VEX, Сан-Диего, Калифорния, США). После электрофореза белки переносили на поливинилдифторидную мембрану (Amersham, Бакингемшир, Великобритания), которую инкубировали с антителами Hsp90β (abcam; ab80159, Кембридж, Великобритания) и вторичным антителом козы против IgG кролика (Санта-Круз), конъюгированным со щелочной фосфатазой, и в качестве субстрата использовали CDP-Star (Tropix, Бедфорд, Массачусетс, США) для идентификации иммунореактивных белков посредством хемилюминесценции. Изображения захватывали с помощью охлаждаемой ПЗС-камеры Chemidox XRS и анализировали с помощью программного обеспечения Quantity One (BioRad laboratories, Геркулес, Калифорния, США).

Усвоение и транспорт Ca²⁺

Клетки Caco-2 культивировали на проницаемом носителе в течение 11-14 дней, незначительно модифицированном в соответствии с Giuliano A. R. и Wood R.J. В день эксперимента измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление и подсчитывали только количество препаратов со значениями от 400 до 900 Ом/см². Тестируемые вещества помещали в верхнее отделение и их эффект считывали через 24-48 ч. Поток Ca²⁺ измеряли с помощью жидкостной сцинтилляции, сравнивая нижний отсек с верхним.

Эксперимент 1

В этом эксперименте клетки Caco-2 тестировали с масляной кислотой в качестве жирной кислоты (альтернативное название бутират), гликохолевой кислотой в качестве желчной кислоты (GCA) или комбинацией масляной кислоты и GCA.

Клетки выращивали до слияния и затем инкубировали со средой-носителем, масляной кислотой, желчной кислотой или комбинацией желчной кислоты и масляной кислоты в течение 48 ч. Затем клетки собирали, общие клеточные белки экстрагировали и анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Экспрессия Hsp90β представлена нормализованной по отношению к экспрессии нерегулируемого контрольного белка GAPDH. Влияние конъюгированной желчной кислоты GCA на экспрессию Hsp90β в культивируемых клетках Caco-2 с добавлением масляной кислоты в качестве жирной кислоты и без нее представлено на фигуре 1.

Результаты показывают, что GCA сама по себе не влияла на Hsp90β, однако в сочетании с масляной кислотой наблюдалось заметное и весьма значимое повышение экспрессии белка Hsp90β по сравнению с контрольными клетками, обработанными средой-носителем.

Эксперимент 2

Клаудин-2 является пермиссивным белком с плотными контактами, который увеличивает всасывание кальция в дистальных отделах тонкой кишки параклеточным

путем, обычно называемое "пассивным" всасыванием кальция. На фигуре 2 показано, что витамин D обладает эффектом повышения экспрессии белка клаудина-2 в клетках Caco-2 в зависимости от дозы, что облегчает "пассивное" всасывание кальция.

5 Подавление коактиватора витамина D Hsp90 β специфическим ингибитором гелданамицином также подавляет экспрессию клаудина-2, очевидно посредством подавления активности витамина D, показывая тем самым, что Hsp90 β важен также для "пассивного" всасывания кальция. Следовательно, фасилитация экспрессии Hsp90 β в тонком кишечнике должна также оказывать положительный эффект в отношении пассивного всасывания кальция в тонком кишечнике человека. Клетки Caco-2
10 культивировали в тех же экспериментальных условиях, что и в эксперименте 1. Витамин D добавляли в концентрациях 10 мкМ (низкая доза) или 100 мкМ (высокая доза). Гелданамицин добавляли в концентрации 0,5 мкМ.

Эксперимент 3

15 В данном эксперименте клетки Caco-2 культивировали и выращивали до эпителий-образного слияния в течение 14 дней. Следующие эксперименты выполняли в соответствии с Giuliano A. R. и Wood R.J. Эффект 10 нМ 1,25(OH) $_2$ -витамина D3 в отношении транспорта кальция тестировали в течение последних 48 ч. Поток тестировали без градиента кальция (Ca $^{2+}$), при этом концентрация кальция составляла
20 1,8 мМ на каждой стороне слоя клеток. Таким образом был подтвержден активный транспорт витамина D. Результат представлен на фигуре 3.

Эксперимент 4

25 В данном эксперименте клетки Caco-2 культивировали и выращивали до эпителий-образного слияния в течение 12 дней. Затем клетки выращивали еще в течение 4 дней в присутствии 0,1 мМ GCA, или в присутствии 0,5 мМ бутирата, или в присутствии комбинации GCA и бутирата.

Эффект 10 нМ 1,25(OH) $_2$ -витамина D3 в отношении транспорта кальция тестировали в течение последних 48 ч. Поток тестировали без градиента кальция (Ca $^{2+}$), при этом концентрация кальция составляла 1,8 мМ на каждой стороне слоя клеток.

30 Результат представлен на фигуре 4 (где указаны средние значения \pm SEM).

35 Эксперимент показывает активный транспорт через слой эпителия Caco-2. Можно сделать вывод о том, что скорость транспорта имеет тот же порядок величины, что и при использовании только 1,25(OH) $_2$ -витамина D3, и что отсутствует дополнительный эффект от комбинации желчной кислоты с жирной кислотой в отсутствие градиента кальция.

Эксперимент 5

40 В данном эксперименте клетки Caco-2 культивировали и выращивали до эпителий-образного слияния в течение 12 дней. Затем клетки выращивали еще в течение 4 дней в присутствии только витамина D3, или в комбинации с 0,5 мМ бутирата, или в комбинации с 0,1 мМ GCA, или в комбинации с GCA и бутиратом, или 0,1 мМ ТС А, или в комбинации как с ТС А, так и с бутиратом.

Эффект 10 нМ 1,25(OH) $_2$ -витамина D3 в отношении транспорта кальция тестировали в течение последних 48 часов. Поток тестировали с градиентом кальция (Ca $^{2+}$) с 40 мМ на апикальной стороне и 1,8 мМ на базолатеральной стороне.

45 Эффект измеряли с помощью теста Краскалла-Уоллиса, сопоставляя с тестом множественного сравнения Данна. Результат представлен на фигуре 5 (где указаны средние значения доверительных интервалов \pm 95%). Из этого можно сделать вывод, что повышенное усвоение кальция достигается за счет комбинации витамина D, GCA

и бутирата. Однако можно также сделать вывод о том, что усвоение витамина D, ГСА и бутирата не было достигнуто.

Эксперимент б

В данном эксперименте клетки Caco-2 культивировали и выращивали до эпителий-образного слияния в течение 12 дней. Затем клетки выращивали еще в течение 4 дней в присутствии только витамина D3, или в комбинации с 0,5 мМ бутирата, или в комбинации с 0,1 мМ ГСА, или в комбинации как с ГСА, так и с бутиратом, или в комбинации с ГСА и олеиновой кислотой.

Эффект 10 нМ 1,25(OH)₂-витамина D3 в отношении транспорта кальция тестировали в течение последних 48 часов. Поток тестировали с градиентом кальция (Ca²⁺) с 40 мМ на апикальной стороне и 1,8 мМ на базолатеральной стороне.

Эффект измеряли с помощью теста Краскалла-Уоллиса, сопоставляя с тестом множественного сравнения Данна. Результат представлен на фигуре б (средние значения доверительных интервалов ±95%). В данном документе можно сделать вывод о том, что повышенное усвоение кальция достигается с помощью комбинации витамина D, ГСА и бутирата, при этом повышенное усвоение также достигается с помощью витамина D, ГСА и олеиновой кислоты.

Литературные источники:

Elias et al., Bone Mineral Density and expression of vitamin D receptor-dependent calcium uptake mechanisms in the proximal small intestine after bariatric surgery, Br J Surg. 2014 Nov; 101(12): 1566-75).

Crawford et al. 'Increased bone turnover in type 2 diabetes patients randomized to bariatric surgery vs. medical therapy at 5 years', Endocrine practice, 2018, DOL10.4158/EP-2017-0072).

Hewit S et al.. Secondary hyperparathyroidism, vitamin D sufficiency and serum calcium 5 years after gastric bypass and duodenal switch, Obes Surg. 2013, Mar; 23(3):384-90).

Schafer A L. et al.. Intestinal Calcium Absorption Decreases Dramatically After Gastric Bypass Surgery Despite Optimization of Vitamin D Status. J Bone Miner Res. 2015, Aug; 30(8): 1377-85).

Giuliano A. R., & Wood R.J. ('Vitamin D-regulated calcium transport in Caco-2 cells: unique in vitro model', Am. J. Physiol. 260 (Gastrointest. Liver Physiol. 23): G207-G212,1991).

Goldenberg D et al.. Thyroidectomy in patients who have undergone gastric bypass surgery. Head Neck. 2018 Jun; 40(6): 1237-1244.

(57) Формула изобретения

1. Применение композиции, содержащей гликохолевую кислоту (ГСА), представляющую собой желчную кислоту, или ее соль и по меньшей мере одну жирную кислоту, выбранную из группы, состоящей из масляной кислоты или ее соли и олеиновой кислоты или ее соли, в качестве лекарственного препарата в лечении и/или предупреждении недостаточности всасывания кальция.

2. Применение по п. 1 в лечении и/или предупреждении остеопороза, вызванного недостатком кальция, состояний, характеризующихся нарушением всасывания, вызванных недостатком кальция, или поражений костей, вызванных недостатком кальция, у млекопитающего.

3. Применение по п. 1 в лечении и/или предупреждении остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD), вызванной недостатком кальция, у млекопитающего; или для лечения остеопороза посредством предупреждения потери минеральной плотности костной ткани (BMD) у пациентов с шунтированием желудка с гастроеюноанастомозом по Ру (RYGB) или пациентов с

рукавной гастрэктомией (SG).

4. Применение по п. 1 или 2, где указанная композиция дополнительно содержит витамин D.

5 5. Применение по п. 4, где указанный витамин D состоит в основном из витамина D3.

6. Применение по п. 1 или 4, где указанная композиция дополнительно содержит кальций.

7. Применение по п. 6, где указанный кальций представлен в виде карбоната кальция, цитрата кальция, или фосфата кальция, или их смеси.

10 8. Применение по п. 4 или 6, где количество кальция и витамина D в композиции представлено как рекомендуемая суточная норма потребления (RDI) или меньшее количество.

15 9. Применение по п. 1 или 6, где композиция содержит по меньшей мере одно из среды-носителя, вспомогательного вещества, смазывающего вещества, ароматизатора, подсластителя, связующего вещества и разрыхлителя.

10. Применение по п. 1 или 6, где композиция составлена для пероральной доставки, парентеральной доставки, внутривенной инфузии или инъекции.

11. Применение по любому из пп. 1 или 6, где композиция представлена в жидкой форме или твердой форме.

20 12. Применение по п. 11, где композиция составлена в виде жевательной таблетки, шипучей таблетки, порошка, пилюли, таблетки или капсулы.

13. Применение по п. 1 или 6, где указанная композиция представляет собой пищевую добавку или добавку к рациону.

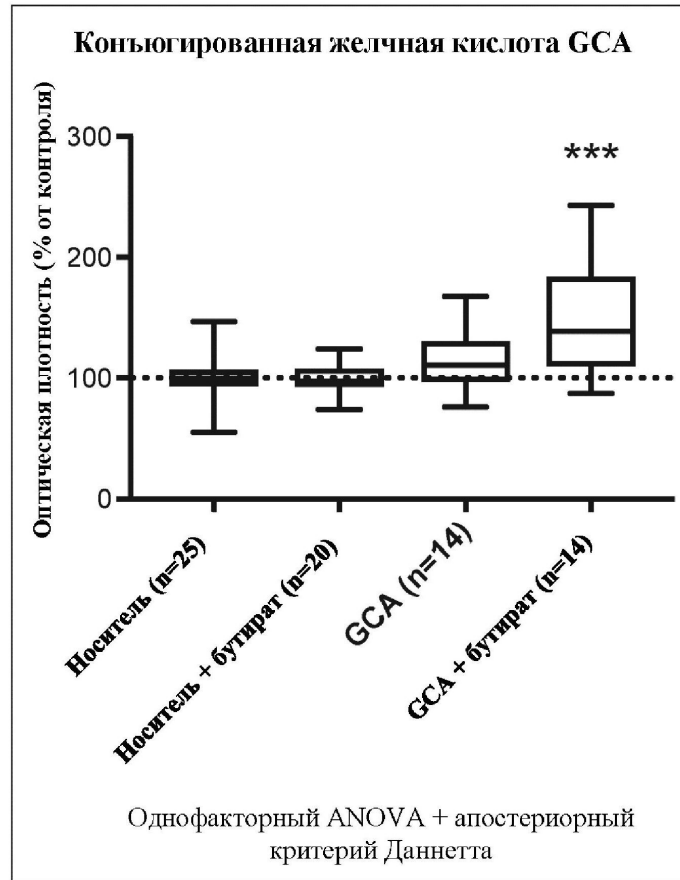
25

30

35

40

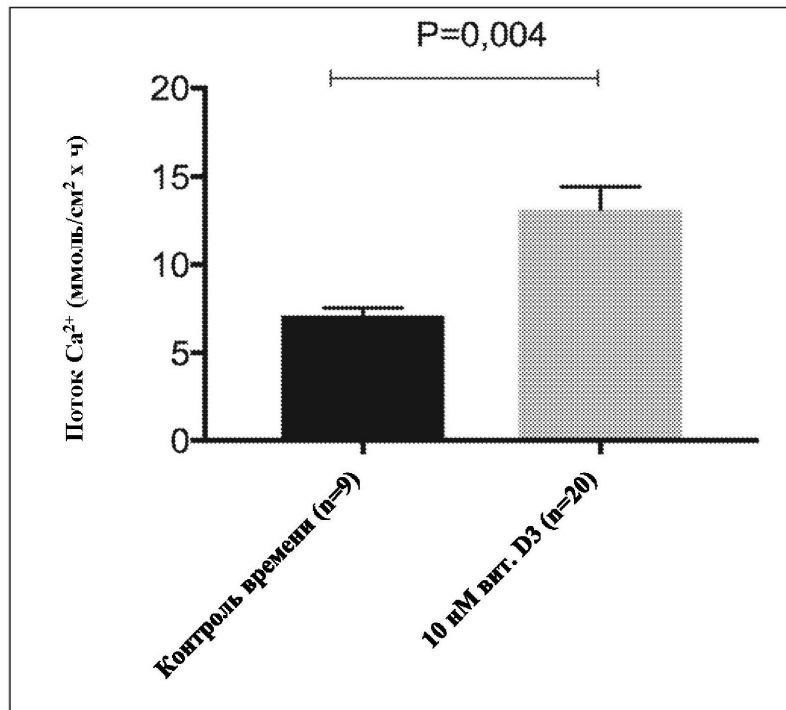
45



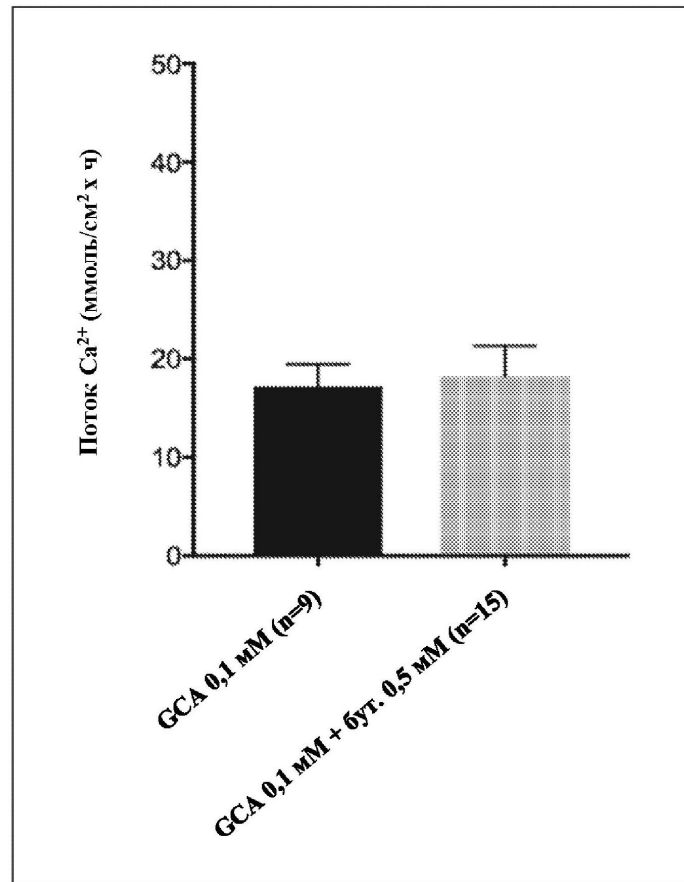
Фигура 1



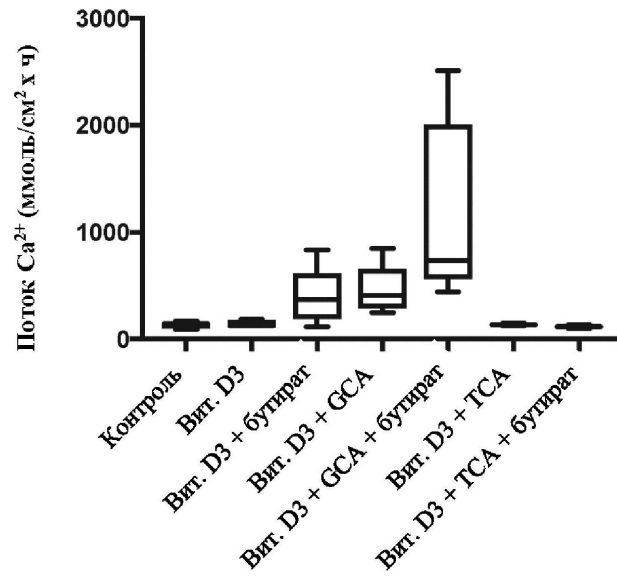
Фигура 2



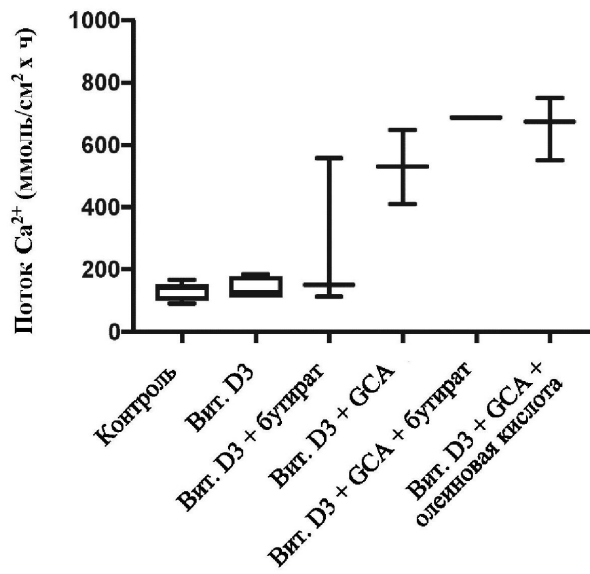
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6