



(51) МПК

A61K 31/405 (2006.01)

A61K 31/455 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/405 (2006.01); A61K 31/455 (2006.01); A61K 9/00 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014148239, 14.06.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.06.2013Дата регистрации:
15.06.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.06.2012 DE 10 2012 011 890.2

(43) Дата публикации заявки: 10.08.2016 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 15.06.2018 Бюл. № 17

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.01.2015(86) Заявка РСТ:
EP 2013/062363 (14.06.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2013/186355 (19.12.2013)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ВЕТЦИГ Георг (DE),
ЗЕГЕРТ Дирк (DE)

(73) Патентообладатель(и):

КОНАРИС РИСЕРЧ ИНСТИТЮТ АГ
(DE)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2009/131537 A1, 29.10.2009. WO
97/28801 A1, 14.08.1997. WO 98/02148 A2,
22.01.1998. WO 97/28801 A1, 14.08.1997.
Büller N1 et al, The effect of
L-tryptophan on hemorrhagic shock induced
bacterial translocation, J Surg Res. 2005
Feb;123(2):194-9 (реферат) [найдено
2017.11.08]. Найдено из Интернет: URL:
(см. прод.)

(54) Фармацевтическая композиция, содержащая никотиновую кислоту и/или никотинамид, и/или триптофан, для положительного воздействия на кишечную микробиоту

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине. Описана фармацевтическая композиция, содержащая никотиновую кислоту, никотинамид, триптофан или родственные соединения для положительного воздействия на кишечную микробиоту. Фармацевтическая композиция

частично или полностью высвобождается в тонком кишечнике или толстом кишечнике для положительного воздействия на кишечную микрофлору. 3 н. и 17 з.п. ф-лы, 7 ил., 3 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15680378>.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 31/405 (2006.01)*A61K 31/455* (2006.01)*A61K 9/00* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/405 (2006.01); *A61K 31/455* (2006.01); *A61K 9/00* (2006.01)(21)(22) Application: **2014148239, 14.06.2013**(24) Effective date for property rights:
14.06.2013Registration date:
15.06.2018

Priority:

(30) Convention priority:
15.06.2012 DE 10 2012 011 890.2(43) Application published: **10.08.2016** Bull. № 22(45) Date of publication: **15.06.2018** Bull. № 17(85) Commencement of national phase: **15.01.2015**(86) PCT application:
EP 2013/062363 (14.06.2013)(87) PCT publication:
WO 2013/186355 (19.12.2013)Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**WAETZIG Georg (DE),
SEEGERT Dirk (DE)**

(73) Proprietor(s):

KONARIS RISERCH INSTITYUT AG (DE)(54) **PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING NICOTINIC ACID AND/OR NICOTINAMIDE AND/OR TRYPTOPHAN FOR POSITIVELY INFLUENCING THE INTESTINAL MICROBIOTA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine. Pharmaceutical composition containing nicotinic acid, nicotinamide, tryptophan or related compounds for positively influencing the intestinal microbiota is described.

EFFECT: pharmaceutical composition is partially or entirely released into the small intestine or large intestine for positively influencing the intestinal microbiota.

20 cl, 7 dwg, 3 tbl, 6 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к новой фармацевтической композиции, содержащей никотиновую кислоту и/или никотинамид, и/или триптофан, для положительного воздействия на кишечную микробиоту, где данная фармацевтическая композиция специфично высвобождается (например, селективно высвобождается) в тонком кишечнике и/или толстом кишечнике.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Многие воспалительные заболевания стенки кишечника вызваны или подвергаются влиянию изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и кишечником. Такие кишечные воспаления, например, воспалительные заболевания кишечника (IBD), такие как болезнь Крона или язвенный колит, встречаются у людей, а также и у других млекопитающих (например, хронический идиопатический колит у собак). Эти заболевания основаны на сложных иммунологических процессах, которые не полностью понятны. Однако ухудшенные взаимодействия кишечной микробиоты и ее изменения также могут быть этиологическими факторами при целом ряде других заболеваний. Примеры включают атопические заболевания, такие как атопическая экзема, аллергические состояния или астму (см., например, Bisgaard et al. 2011, J. Allergy Clin. Immunol. 128:646; Iebba et al. 2011, Dig. Dis. 29:531; Abrahamsson et al. 2012, J. Allergy Clin. Immunol. 129:434; Candela et al. 2012, BMC Microbiol. 12:95; Olszak et al. 2012, Science 336:489), а также метаболические заболевания с воспалительным компонентом, такие как атеросклероз с возникающими в результате коронарными заболеваниями сердца, ожирение или диабет (Ott et al. 2006, Circulation 113:929; Koren et al. 2011, PNAS 108 Suppl 1:4592; для обзора см. Caesar et al. 2010, J. Intern. Med. 268:320; и Vrise et al. 2010, Diabetologia 53:606).

Несмотря на то, что известна связь между кишечной микробиотой и разными заболеваниями, не было понятно как воздействовать на микробиоту так, чтобы положительно повлиять на ассоциированные заболевания.

Никотиновую кислоту (ниацин, витамин B3), никотинамид (амид никотиновой кислоты) и/или L-триптофан в течение десятилетий использовали для терапии заболеваний, связанных с недостаточностью ниацина (например, пеллагры). Известно, что пеллагра может сопровождаться воспалением кишечника, интенсивность которого уменьшается после введения ниацина, где терапевтическим принципом является устранение недостаточности витамина, вызывающей воспаление кишечника (Segal et al. 1986, Int. J. Colorectal Dis. 1:238; и Clayton et al. 1991, Eur. J. Pediatr. 150:498).

Также известно, что никотиновая кислота имеет улучшающий здоровье эффект на холестериновые липопротеины в крови (отношение HDL (липопротеин высокой плотности) / LDL (липопротеин низкой плотности) и размер везикул LDL; Wahlberg et al. 1990, J. Intern. Med. 228:151; Seed et al. 1993, Atherosclerosis 101:61; Elam et al. 2000, JAMA 284:1263; McKenney et al. 2001, Am. J. Cardiol. 88:270).

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является предложение новых форм лечения для терапии и/или профилактики заболеваний человека и животных, ассоциированных с изменениями кишечной микробиоты и/или ухудшенным взаимодействием между кишечной микробиотой и кишечником.

Согласно данному изобретению вышеупомянутая проблема решается посредством фармацевтической композиции, которая содержит никотиновую кислоту, никотинамид, триптофан или другое описанное здесь соединение, которая, как считается, оказывает положительное влияние на кишечную микробиоту. В предпочтительных воплощениях

никотиновую кислоту и/или никотинамид, и/или триптофан вводят для местного воздействия на слизистую кишечника и кишечную микробиоту. Например, активное вещество готовят для селективного введения в терминальный отдел подвздошной кишки или толстую кишку, где находится кишечная микробиота, которую необходимо модифицировать. В настоящем изобретении также рассматриваются другие активные вещества, которые превращаются в организме животного (например, в организме человека) в никотиновую кислоту и/или никотинамид, и/или триптофан.

Соответственно, предложены фармацевтические композиции, которые содержат никотиновую кислоту (ниацин, витамин В3) и/или никотинамид, и/или триптофан. Эти три вещества, индивидуально или в комбинации (комбинации двух или трех) друг с другом, оказывают противовоспалительное и/или положительное влияние на микробиоту в тонком кишечнике и/или толстом кишечнике. Эта композиция подходит для перорального введения с контролируемым и/или отсроченным высвобождением активного ингредиента для специфичной локальной или местной эффективности в терминальном отделе подвздошной кишки и/или в толстой кишке. Примеры состояний, которые лечат, включают терапию или профилактику воспалительных заболеваний тонкого кишечника, воспалительных заболеваний толстого кишечника, профилактику карциномы толстой кишки и терапию или профилактику других заболеваний, которые возникают в результате изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и кишечником. Данная композиция также подходит для (нео)ректального введения в толстую кишку или илеоанальный карман для локальной и/или местной терапии воспалительных заболеваний толстого кишечника или паучита.

Изобретение также включает способы лечения одного или более чем одного из описанных здесь заболеваний и состояний с использованием описанной здесь фармацевтической композиции. Кроме того, согласно изобретению предложено применение описанной здесь фармацевтической композиции для изготовления лекарственного средства для лечения одного или более чем одного из описанных здесь заболеваний и состояний.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показано предупреждение интенсификации колита, индуцированного DSS (декстрансульфат натрия), у мышей, дефицитных по ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2), посредством никотинамида или триптофана. Верхний ряд: гистопатология толстой кишки (гематоксилин-эозиновое окрашивание в сутки 10 после введения DSS; шкала масштаба: 100 мкм (а)), потеря массы в процентах (б) и балльная оценка диареи (в) у стимулированных DSS нормальных в отношении ACE2 (ACE2+/y) и дефицитных по ACE2 (ACE2-/y) мышей, которым давали носитель или никотинамид (NAM) в питьевой воде. Введение NAM начиналось за 3 суток до введения DSS. Нижний ряд: гистопатология толстой кишки (гематоксилин-эозиновое окрашивание в сутки 7 после стимуляции DSS; планка: 100 мкм (г)), потеря массы в процентах (д) и повреждение крипт толстой кишки (е) у стимулированных DSS нормальных в отношении ACE2 (ACE2+/y) и дефицитных по ACE2 (ACE2-/y) мышей, которые получали нормальное питание (контроль) или триптофан-дипептидное питание (Trp+).

Все значения представляют собой средние значения со стандартной ошибкой для 3-10 мышей на группу.

*: P меньше 0,05; **: P меньше 0,01.

На Фиг. 2 показано развитие индекса активности болезни Крона (CDAI) у трех пациентов с недели (нед.) 0 до недели 4 при введении никотинамида (2 раза по 600 мг

ежесуточно).

На Фиг. 3 показаны гистологические балльные оценки слизистой толстой кишки мышей, стимулированных декстрансульфатом натрия (DSS) для развития колита, и которых лечили либо никотиномидом (NAM), вводимым через зонд в воде, либо композицией минитаблетки NAM с контролируемым высвобождением, подмешанной в корм, либо 5-аминосалициловой кислотой, вводимой через зонд в виде суспензии в 0,5% метилцеллюлозе.

На Фиг. 4 показаны данные по индексу активности заболевания (DAI) у мышей, стимулированных декстрансульфатом натрия (DSS) для развития колита, которых лечили (1) никотиномидом (NAM), вводимым через зонд в воде, или (2) контрольными гранулами, смешанными с пищей, или (3) композицией гранул NAM с контролируемым высвобождением, смешанной с пищей, в трех дозах, или (4) композицией гранул 5-аминосалициловой кислоты (гранулы 5-ASA) с контролируемым высвобождением, смешанной с кормом. *, p меньше 0,05 по сравнению с контрольными гранулами; **, p меньше 0,01 по сравнению с контрольными гранулами; ***, p меньше 0,001 по сравнению с контрольными гранулами; ###, p меньше 0,001 по сравнению с такой же дозой NAM в воде.

На Фиг. 5 показано содержание миелопероксидазы (MPO) гомогенатов ткани толстой кишки от мышей, стимулированных декстрансульфатом натрия (DSS) для развития колита, и которых лечили (1) никотиномидом (NAM), вводимым через зонд в воде, или (2) контрольными гранулами, смешанными с пищей, или (3) композицией гранул NAM с контролируемым высвобождением, смешанной с кормом, в трех дозах, или (4) композицией гранул 5-аминосалициловой кислоты (гранулы 5-ASA) с контролируемым высвобождением, смешанной с кормом. *, p меньше 0,05 по сравнению с контрольными гранулами; ***, p меньше 0,001 по сравнению с контрольными гранулами.

На Фиг. 6 показано относительное количество основных типов бактерий Bacteroidetes и Firmicutes в образцах кала 5-8 мышей на группу до и после 12 суток питания с отсутствием триптофана, никотиновой кислоты или никотиномада (корм, не содержащий Trp/Nia/NAM). Корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, включал: 1) контрольные гранулы без NAM или 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA), (2) композицию гранул NAM с контролируемым высвобождением, смешанную с питанием, в трех дозах или (3) композицию гранул 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA) с контролируемым высвобождением, смешанную с кормом.

На Фиг. 7 показаны процентные анализы сходства (SIMPER) состава микробиоты в образцах кала 5-8 мышей на группу до и после 12 суток питания с отсутствием триптофана, никотиновой кислоты или никотиномада (корм, не содержащий Trp/Nia/NAM). Корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, включал: 1) контрольные гранулы без NAM или 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA) или (2) композицию гранул NAM с контролируемым высвобождением, смешанную с кормом, в трех дозах или (3) композицию гранул 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA) с контролируемым высвобождением, смешанную с кормом. Размножение неклассифицируемых Bacteroidales и представителей рода Paraprevotella Bacteroidales визуализируется заштрихованными частями столбиков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сутью изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая одно, два или более чем два активных вещества, выбранных из никотиновой кислоты, никотиномада, триптофана, соединения, которое превращается в организме животного

(например, в организме человека) в никотиновую кислоту, никотинамид или триптофан, никоти нам идаден и нди нуклеотида (NAD), никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADP), промежуточного соединения в биосинтезе NAD или NADP и дипептида триптофана, для положительного воздействия на кишечную микробиоту, где указанная

5 фармацевтическая композиция предназначена для отсроченного высвобождения так, что она высвобождается (например, частично высвобождается, селективно высвобождается) в нижнем отделе тонкого кишечника, в толстой кишке или в обеих.

Авторы изобретения обнаружили, что никотиновая кислота и/или никотинамид, и/или триптофан проявляют противовоспалительный эффект путем воздействия на

10 кишечную микробиоту (совокупность всех микроорганизмов в кишечнике, в частности, бактерий) таким образом, что они изменяют картину секреции противомикробных пептидов в кишечнике. Кишечная микробиота, измененная после введения фармацевтической композиции по изобретению, имеет меньший эффект, стимулирующий воспаление, или является противовоспалительной, таким образом, вызывая и/или

15 поддерживая явное ослабление симптомов IBD (воспалительные заболевания кишечника), таких как болезнь Крона или язвенный колит, у человека или у других животных (например, хронический идиопатический колит у собак). Кроме того, здесь было впервые продемонстрировано, что фармацевтические композиции, которые высвобождают по меньшей мере часть их активного вещества в пораженной области

20 желудочно-кишечного тракта, имеют значительно лучшую эффективность, чем фармацевтическая композиция, которая в значительной степени абсорбируется до достижения пораженной области.

Таким образом, выражение «положительно воздействующий на кишечную микробиоту» в том виде, как она здесь используется, относится к вызову изменения

25 кишечной микробиоты, которое имеет положительное воздействие на состояние здоровья, особенно на одно или более чем одно из описанных здесь заболеваний и состояний. Например, положительные воздействия ассоциированы с уменьшением числа патогенных бактерий, уменьшением отношения патогенных бактерий к полезным бактериям, увеличением разнообразия микробиоты, уменьшением уровня воспаления, которое микробиота индуцирует в кишечнике, и частичным или полным обращением

30 патологических изменений в энтеротипе микробиоты (например, энтеротипы, ассоциированные с *Bacteroides*, *Prevotella* и *Ruminococcus*). Бактерии, обычно считающиеся патогенными при воспалительных заболеваниях кишечника, включают, например, *Enterobacteriaceae* (например, *Escherichia coli*) с инвазивными свойствами или факторами

35 вирулентности, сульфид-продуцирующие *Desulfovibrio* spp. и *Fusobacterium* spp. с инвазивными свойствами. Бактерии, обычно считающиеся полезными, включают виды родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и *Faecalibacterium*, такие как *L. casei*, *L. plantarum* и *F. prausnitzii*. Для недавнего обзора микробиоты кишечника при воспалительных заболеваниях кишечника см. Manichanh et al. 2012, Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 9:599.

40 В статье Hashimoto et al. (Nature 2012, 487:477), опубликованной после даты приоритета данной заявки, и содержание которой включено сюда посредством ссылки, приведено дополнительное доказательство, касающееся описанного здесь изобретения. Hashimoto et al. показали, что неправильное поглощение триптофана у мышей приводит к значительно повышенной тяжести колита, индуцированного раздражающим веществом

45 - декстрансульфатом натрия (DSS). Добавка в пищу триптофана или никотинамида предотвращала это усиление колита. Hashimoto et al. продемонстрировали, что повышенная чувствительность к тяжелому колиту была обусловлена измененным микробиомом кишечника, который, при трансплантации другим мышам, также

увеличивал тяжесть колита у реципиентов. Обнаружили, что вредное изменение микробиома кишечника обусловлено значительно пониженным количеством определенных противомикробных пептидов (AMP), особенно альфа-дефенсинов, экспрессия которых в эпителиальных клетках терминального отдела подвздошной кишки контролировалась, главным образом, сигнализацией mTOR, индуцированной триптофаном или никотиномидом.

Поскольку хроническое воспаление кишечника сильно увеличивает риск развития карциномы толстой кишки (для обзора см., например, Ullman & Itzkowitz 2011, *Gastroenterology* 140:1807), применение композиции по изобретению также является профилактикой карциномы толстой кишки в случае хронического или рецидивирующего воспаления кишечника.

Было показано, что терапевтическое вмешательство путем установления или восстановления нормальной микробиоты кишечника или посредством дополнения полезных бактерий является эффективным в разнообразных моделях заболеваний и при соответствующих заболеваниях человека. Например, Olszak et al. (*Science* 2012, 336:489) недавно продемонстрировали, что патологическое накопление инвариантных естественных Т-киллеров в пораженных заболеванием органах безмикробных мышинных моделей IBD или астмы может быть предотвращено колонизацией новорожденных мышей нормальной микробиотой. Исследования продемонстрировали благоприятные эффекты определенных пре-, про- или синбиотиков при разных заболеваниях. Например, лактобациллы могут снижать уровни холестерина в крови при ожирении, но данный механизм все еще не полностью ясен (см. обзор Caesar et al. 2010, *J. Intern. Med.* 268:320). При воспалительных заболеваниях кишечника в ограниченном числе клинических исследований были успешно использованы некоторые пробиотики, подобные VSL#3 (смесь *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*). По-видимому, дополнение по меньшей мере несколькими штаммами бактерий обычно является необходимым для обеспечения значимой терапевтической пользы. Недавним примером очевидной эффективности комплексного бактериального вмешательства является успешное применение трансплантации кала против *Clostridium difficile* (van Nood et al. 2013, *New Engl. J. Med.* 368:407).

Поскольку патологические изменения кишечной микробиоты также могут быть причиной множества других заболеваний, возникающих из-за атопических расстройств, а также метаболических заболеваний с воспалительным компонентом, терапия и/или профилактика таких заболеваний также находится в пределах объема данного изобретения. В частности, следующие заболевания являются примерами таких показаний:

- заболевания кожи: аллергия, атопическая экзема, псориаз;
- заболевания легкого: муковисцидоз, астма, ХОБЛ (хроническая обструктивная болезнь легких);
- заболевания сосудов: коронарная болезнь сердца, атеросклероз, атеросклероз;
- заболевания эндокринной системы: диабет, ожирение.

Изобретательское, специфичное, местное применение никотиновой кислоты и/или никотиномада, и/или триптофана (и родственных активных веществ) для местного влияния на слизистую кишечника и кишечную микробиоту, кишечные воспаления и прямая терапия слизистой кишечника возникают в результате описанного здесь понимания ранее неизвестной и неожиданной роли данных соединений. Это применение значительно отличается от традиционных применений активных веществ, где данные

вещества поглощаются, и предполагается, что они действуют системно. Вследствие их нового противовоспалительного эффекта и/или их эффекта, модифицирующего кишечную микробиоту, никотиновая кислота и/или никотинамид, и/или триптофан (и другие описанные здесь соединения) являются, таким образом, подходящими в качестве

5 активных веществ для лечения воспалительных заболеваний тонкого кишечника и/или толстого кишечника. Конкретные состояния включают лечение кишечных воспалений, профилактику карциномы толстой кишки и терапию или профилактику других заболеваний, которые возникают в результате изменений кишечной микробиоты и/или

ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и кишечником.

10 Предпочтительно, эти активные вещества используются в фармакологической композиции, которая защищает максимально возможное количество активного вещества от абсорбирования организмом в верхнем отделе тонкого кишечника и скорее осуществляет высвобождение (например, контролируемое высвобождение и/или отсроченное высвобождение) в терминальном отделе подвздошной кишки или в толстой

15 кишке, где находится кишечная микробиота, подлежащая модификации (например, активное вещество селективно высвобождается в терминальном отделе подвздошной кишки и/или в толстой кишке).

В частности, описанные здесь активные вещества, таким образом, подходят для использования в лекарственных средствах с местным высвобождением (например,

20 контролируемым или отсроченным высвобождением) для терапии болезни Крона, язвенного колита, паучита, других хронических заболеваний толстого кишечника или воспалений толстого кишечника, воспаления в отключенной кишке, инфекционного энтерита, диареи, ассоциированной с приемом антибиотиков, такой как диарея, ассоциированная с *C. difficile*, инфекционного колита, дивертикулита и воспалений,

25 которые формируются под воздействием облучения, антибиотиков, химиотерапевтических агентов, фармацевтических продуктов или химических соединений, а также для профилактики карциномы толстой кишки и для терапии или профилактики других заболеваний, которые возникают в результате изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной

30 микробиотой и кишечником.

Заявленные вещества одинаково пригодны для терапии или профилактики заболеваний с аналогичным генезисом и у человека, и у других млекопитающих, в частности у домашних и полезных животных. Примерами таких животных являются, без объективного ограничения, собаки, кошки, лошади, верблюды или коровы.

35 Активные вещества, т.е. никотиновая кислота и/или никотинамид, и/или триптофан, могут быть использованы в любой форме, доступной на рынке, например, произведенные Merck KGaA. Триптофан можно использовать в виде одиночной аминокислоты или дипептида, например, в виде дипептида Gly-Trp.

Помимо никотиновой кислоты, никотинамида и триптофана в описанном здесь изобретении могут быть использованы другие родственные соединения в качестве

40 активных веществ. Например, подходящими являются соединения, которые превращаются в организме человека или животного в один из этих агентов (например, посредством гидролиза, метаболизма), такие как сложные эфиры никотиновой кислоты. Кроме того, можно использовать промежуточные соединения в синтезе

45 никотинамидадениндинуклеотида (NAD) или NAD фосфата (NADP), такие как N-формилкинуренин, L-кинуренин, 3-гидрокси-L-кинуренин, 3-гидроксиантранилат, 2-амино-3-карбоксимуконата полуальдегид, хинолинат и бета-никотинат D-рибонуклеотида. Другие примеры включают NAD и NADP.

Фармацевтические композиции, которые содержат никотиновую кислоту и/или никотинамид, и/или триптофан (или одно из других описанных выше веществ), можно вводить перорально с замедленным высвобождением активного вещества или также посредством ректального способа применения (например, клизмы или суппозитории).

5 Местом доставки активного вещества для ингибирования воспалительного процесса предпочтительно являются нижние части тонкого кишечника и/или толстая кишка, и оно, таким образом, фундаментально отличается от способов применения, которое, например, для терапии пеллагры, преследует цель максимального поглощения и метаболизма в организме и, таким образом, достижения системного эффекта. Кроме
10 того, способ введения согласно изобретению и дозировка согласно изобретению минимизируют вероятность проявления побочных эффектов, например, как описано в связи с системным введением никотиновой кислоты.

Термин «нижний отдел тонкого кишечника» в том виде, как он здесь используется, относится ко второй половине тонкого кишечника, и «терминальный отдел подвздошной
15 кишки» представляет собой вторую половину подвздошной кишки.

В данном отношении настоящее изобретение также включает комбинированные препараты, такие как комбинации никотиновой кислоты и/или никотинамида с ацетилсалициловой кислотой и/или антагонистами простагландина D2, такими как ларопипрант, которые уменьшают типичные для никотиновой кислоты побочные
20 эффекты. Состав и дозировка таких комбинаций известна специалисту в данной области. Кроме того, применение никотинамида вместо никотиновой кислоты, который является предпочтительным согласно данному изобретению, минимизирует вероятность проявления побочных эффектов.

Для того чтобы получать вводимые перорально композиции активного вещества, оказывающего противовоспалительный и/или модифицирующий эффект на кишечную
25 микробиоту в терминальном отделе подвздошной кишки и/или в толстой кишке, преимущественным и инновационным, таким образом, является применение способов контролируемого и/или отсроченного высвобождения. В отличие от традиционных (в некоторых случаях также с отсрочкой) способов высвобождения для оптимального
30 добавления, например, в случае пеллагры, в определенных воплощениях настоящего изобретения частично или по существу избегается поглощение в желудке и в верхних частях тонкого кишечника.

Для того чтобы лечить болезнь Крона или язвенный колит, подходят пероральный и/или ректальный способы (например, в виде клизмы) применения. Для того чтобы
35 лечить паучит в случае язвенного колита, предпочтительным является ректальное применение (например, в виде клизмы). Оно также может быть поддержано пероральным введением описанных выше пероральных композиций, например, препаратов с отсроченным высвобождением. Для симптоматической терапии любой другой формы колита могут быть выбраны и пероральное, и ректальное применения
40 для терапевтической модификации кишечной микробиоты. Пероральное применение является предпочтительным для профилактики карциномы толстой кишки, в частности, в случае язвенного колита, и для терапии и/или профилактики других заболеваний, которые частично или по существу возникают в результате изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и
45 кишечником.

Для перорального введения особенно подходят особые лекарственные формы, которые контролируют и/или откладывают высвобождение активного вещества благодаря специальным галенам (так называемые формы с контролируемым

высвобождением, медленным высвобождением или отсроченным высвобождением). Такие лекарственные формы могут представлять собой простые таблетки и также покрытые таблетки, например, пленочные таблетки или драже. Таблетки обычно являются круглыми или двояковыпуклыми. Также являются возможными таблетки продолговатой формы, которые позволяют делить таблетку. Кроме того, возможными являются гранулы, сфероиды, пеллеты или микрокапсулы, которыми заполняют пакетики или капсулы, когда это целесообразно.

Термин «отсроченное высвобождение» предпочтительно относится к фармацевтической композиции, которая высвобождает активные ингредиенты после периода задержки. В определенных воплощениях задержка является достаточной для того, чтобы по меньшей мере часть активных веществ в композиции высвободилась в нижнем отделе тонкого кишечника (например, в терминальном отделе подвздошной кишки) и/или в толстой кишке.

Термин «контролируемое высвобождение» предпочтительно относится к фармацевтической композиции или ее компоненту, который высвобождает или доставляет один или более чем один активный ингредиент на протяжении длительного периода времени. В определенных воплощениях данный период времени является достаточным для того, чтобы по меньшей мере часть активных веществ в композиции высвободилась в нижнем отделе тонкого кишечника (например в терминальном отделе подвздошной кишки) и/или в толстой кишке.

Задержка преимущественно достигается, например, посредством покрытий, устойчивых к желудочному соку и растворяющихся в зависимости от pH, посредством технологий на основе микроцеллюлозных или мультиматриц (ММХ), посредством применения матриц на основе разных носителей или комбинации этих методик. Примеры включают пленочные покрытия, которые содержат акриловые и/или метакрилатные полимеры в разных смесях для контролируемого и/или отсроченного высвобождения. Например, активное(-ые) вещество(-а) может содержаться в традиционной матрице из микрокристаллической целлюлозы или желатина, или матрице, приготовленной с использованием технологии ММХ, которая покрыта веществом, которое обеспечивает отсроченное высвобождение активного вещества. Предпочтительным является введение активного вещества в капсулы большого объема (например, из желатина, имеющие объем 0,68 мл), которые покрывают посредством известных способов. Подходящими покрытиями являются нерастворимые в воде воска и полимеры, такие как полиметакрилаты (например, номенклатура продукции с торговым наименованием Eudragit[®], в частности Eudragit[®] S и Eudragit[®] L, Evonik Industries AG, Эссен, Германия), и нерастворимые в воде целлюлозы (например, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза). Когда это целесообразно, в веществе покрытия также могут содержаться водорастворимые полимеры (например, поливинилпирролидон), водорастворимые целлюлозы (например, гидроксипропилметилцеллюлоза или гидроксипропилцеллюлоза), полисорбат 80, полиэтиленгликоль (PEG), лактоза или маннит.

Например, комбинация соединений Eudragit[®] S и L (например, Eudragit[®] L/S 100) осуществляет контролируемое высвобождение активных веществ согласно изобретению при pH больше 6,4, что имеет место в терминальном отделе подвздошной кишки. Также допустимы другие применения препаратов Eudragit[®] и их смесей (соединения L, S и R) для упаковки активного вещества и, следовательно, может достигаться местное применение в выбранных частях всего желудочно-кишечного тракта посредством контролируемого высвобождения при определенных значениях pH.

Фармацевтическая композиция также может содержать другие вещества фармацевтических эксципиентов, такие как связующие вещества, наполнители, глиданты, смазки и агенты, регулирующие текучесть. Эти соединения согласно изобретению могут быть приготовлены, когда это целесообразно, совместно с другими активными веществами и с эксципиентами, традиционными в фармацевтических композициях, например, с тальком, аравийской камедью, лактозой, крахмалом, стеаратом магния, маслом какао, водными и неводными носителями, липидными компонентами животного или растительного происхождения, производными парафина, гликолями (в частности, полиэтиленгликолем), разными пастификаторами, диспергирующими агентами, эмульгаторами и/или консервантами.

Для получения клизм или суппозиторий для ректального применения, препараты активного вещества можно растворять в подходящем растворителе и дополнительно перерабатывать в клизмы или суппозитории согласно известным фармацевтическим способам.

Содержание активного вещества в конечной лекарственной форме составляет 1-3000 мг, предпочтительно 100-1000 мг, в случае перорального введения; клизмы и/или суппозитории могут содержать количество активного вещества от 10 мг до 5000 мг. В зависимости от интенсивности и тяжести воспалительного заболевания, лекарственные формы вводятся один раз или несколько раз в сутки или согласно другой схеме дозировке, которая должна быть выбрана лечащим врачом.

Термины «лечение», «лечить» и «проведение лечения» в том виде, как они здесь используются, относятся к обращению, уменьшению интенсивности, откладыванию начала или ингибированию развития заболевания или расстройства, или одного или более чем одного его симптома, как здесь описано. В некоторых воплощениях лечение можно вводить после развития одного или более чем одного симптома. В других воплощениях лечение можно назначать в отсутствие симптомов. Например, лечение можно назначать чувствительному индивиду до начала симптомов (например, в свете истории симптомов и/или в свете генетических или других факторов чувствительности). Лечение также можно продолжать после устранения симптомов, например, для предупреждения или откладывания их рецидива.

Термины «профилактика» и «предупреждать» в том виде, как они здесь используются, относятся к задержке начала или к уменьшению вероятности развития заболевания или расстройства, или одного или более чем одного его симптома по сравнению с не подвергавшейся лечению контрольной популяцией.

Другим описанным здесь аспектом изобретения является эффективное применение заявленных лекарственных средств на основе генетических и/или микробиологических данных и специфических потребностей индивидов, подлежащих лечению. Новое понимание генетической предрасположенности индивидов ко всем типам заболеваний (в частности, также к заболеваниям, при которых ухудшается взаимодействие между кишечной микробиотой и кишечником) и фармакогенетики указывает на то, что доказательная персонализированная медицина, включающая генетические анализы релевантных генов риска и также генов, которые кодируют, например, рецепторы клеточной поверхности, белки-транспортёры, ферменты метаболизма или белки трансдукции сигнала, которые взаимодействуют с лекарственным средством и/или с его метаболитами, и/или с его работающими позднее эффекторами, может давать информацию и улучшения в отношении типа применения, способа применения, времени применения, дозы и/или схемы дозировки описанных здесь лекарственных средств. Индивиды, которые могут получать пользу от данного персонализированного лечения

включают индивидов с пониженным сывороточным триптофаном, измененной экспрессией В°АТ1 (например, в эпителиальных клетках кишечника) и полиморфизмами В°АТ1. Это аналогичным образом применимо к анализам кишечной микробиоты, особенно когда образец кала указывает на изменение микробиоты. Настоящее изобретение, таким образом, также включает применение подходящих способов на основе генетических и/или микробиологических анализов для идентификации индивидов, особенно чувствительных к лекарственным средствам согласно изобретению, и/или для адаптации применения лекарственных средств согласно изобретению к индивидуальным обстоятельствам. Это также прямо включает применение разных веществ (никотиновая кислота и/или никотинамид, и/или триптофан) в разных способах введения, в зависимости от генетических и микробиологических характеристик индивида. Для этих целей можно использовать лабораторные анализы и/или подходящие наборы для анализов и также способы измерения, устройства и/или наборы для применения лечащим врачом, пользователем и/или пациентом, например, для отбора образцов кала или для анализа подходящих параметров в крови, моче или других жидкостях организма.

ПРИМЕРЫ

Существуют различные возможности полезного развития и дальнейшего развития идей настоящего изобретения. С этой целью делается ссылка на приведенные ниже примеры, которые репрезентативно описывают изобретение.

Пример 1:

Новые данные и открытия, не опубликованные на время подачи приоритетной заявки, позднее опубликованные Hashimoto et al. (Nature 2012, 487:477), поддерживают идеи настоящего изобретения и вкратце описаны здесь с целью иллюстрации: известно, что экспрессия транспортера нейтральных аминокислот В°АТ1 (который транспортирует триптофан) на поверхности эпителиальных клеток кишечника связана с присутствием ангиотензин-превращающего фермента 2 (Kowalczyk et al. 2008, FASEB J. 22:2880; Camargo et al. 2009, Gastroenterology 136:872). Дефектный ACE2 приводит к заболеванию, связанному с аминокислотной недостаточностью (так называемая болезнь Хартнапа), картина заболевания которого аналогична пеллагре, и которое можно лечить путем усиленной подачи триптофана и никотинамида. Мышиная модель теперь продемонстрировала, что мыши без функционирующего ACE2 (генотип: Ace2^{-/-}) страдали от существенно более сильных искусственно индуцированных кишечных воспалений, чем мыши с нормальным генотипом (Ace2^{+/+}), когда им давали вещество декстрансульфат натрия (DSS). Достаточно интересно то, что можно было уменьшать данный эффект до значения, характерного для генетически нормальных мышей, путем профилактического и постоянного введения никотинамида (NAM) или путем скармливания дипептидов триптофана (которые поглощаются посредством транспортера, отличного от В°АТ1, который здесь не доступен). Сопровождающие данные обобщены на Фиг. 1 и поддерживают настоящее изобретение относительно содержания открытий и формулы изобретения для применения у человека и животного с точки зрения мышиной модели.

Пример 2:

Для анализа изменения кишечной микробиоты при подаче никотинамида, геномную ДНК выделяют из образцов кала согласно предшествующему уровню техники и подвергают количественному измерению, и варибельную область гена бактериальной 16S рРНК амплифицируют, где ампликоны получают при использовании подходящих маркеров с целью идентификации. После высокопроизводительного пиросеквенирования ампликонов все полученные последовательности подвергают контролю качества и

анализируют многоэтапным сравнением последовательности с рекомендованными базами последовательностей бактериальных ДНК. Выявляют корреляции и оценивают различия полученных репрезентативных профилей кишечной микробиоты в образцах кала обработанных и необработанных индивидов при сопоставлении с наблюдаемыми и измеренными симптомами заболевания и релевантными генетическими факторами индивидов.

На Фиг. 2 показано развитие индекса активности болезни Крона (CDAI), т.е. активности заболевания, рассчитанной согласно признанному стандарту на основе различных параметров заболевания от трех пациентов, которые страдали от болезни Крона, и которых лечили приготовленным традиционным способом никотинамидом в высокой дозе в течение 4 недель (2×600 мг ежедневно). Значение CDAI меньше 150 эквивалентно ремиссии. Все три пациента, страдающих от болезни Крона, демонстрировали явный ответ на введение никотинамида, причем у двух из них ремиссия достигалась в пределах периода терапии.

Лежащий в основе механизм и полезный эффект никотинамида, описанный Hashimoto et al. 2012 (Nature 487:477) для модели мышинного колита (см. Пример 1), соответствуют клиническому улучшению у пациентов-людей с болезнью Крона в ответ на добавление никотинамида, наблюдаемому в этом примере.

Пример 3:

Неожиданно оказалось, что, хотя экспрессия ACE2 в слизистой кишечника пациентов, страдающих от болезни Крона и язвенного колита, и не отличается значимо от значений у здоровых индивидов (данные не показаны), экспрессия V^oAT1 в воспаленных частях слизистой снижалась очень сильно и статистически значимо (значение Р меньше 0,05) (см. Таблицу 1). Кроме того, контрольные образцы от пациентов, страдающих от кишечных воспалений разного генезиса (так называемые контроли специфичности заболевания), не демонстрировали значимых отклонений от госпитализированных нормальных людей (HN). Это свидетельствует против заболевания, связанного с общей, неспецифичной недостаточностью или недостаточностью аминокислот, и в пользу специфичных эффектов никотиновой кислоты, никотинамида и/или триптофана (и родственных соединений) в лечении IBD, которые вновь наблюдали в настоящем изобретении.

	Болезнь Крона		Язвенный колит		Все образцы IBD	Все образцы IBD с воспалением	Все образцы IBD без воспаления	Образцы других кишечных заболеваний с воспалением	Образцы других кишечных заболеваний без воспаления
	С воспалением	Без воспаления	С воспалением	Без воспаления					
Отклонение относительно HN	-8,77	-1,55	-31,02	-2,15	-5,44	-18,43	-1,92	-1,52	-1,01
Значение Р	0,0002	0,2772	0,0000	0,0207	0,0000	0,0000	0,0485	0,1093	0,3632

Таблица 1: экспрессия мРНК V^oAT1 по отношению к базовому значению (из образцов госпитализированных нормальных контролей, HN, т.е. пациентов без кишечного воспаления).

Недостаточность транспортера триптофана, наблюдаемая у пациентов с IBD, наблюдаемая в этом примере, соответствует ситуации у мышей с усугубившимся колитом из-за недостаточности транспортера триптофана (Hashimoto et al. 2012, Nature 487:477; см. Пример 1).

5 Пример 4:

Для того чтобы охарактеризовать преимущество композиций с контролируемым высвобождением для направленной доставки никотинамида к эпителию кишечника, провели исследование для подтверждения концепции в модели колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS), у мышей. Индуцированный DSS колит представляет собой стандартизированную модель колита для оценки эффективности лекарственного средства-кандидата для воспалительных заболеваний кишечника человека. В качестве контрольного лечения, обычно эффективного при колите, индуцированном DSS, использовали 5-аминосалициловую кислоту (5-ASA). 5-ASA является почти нерастворимой при физиологическом pH и поэтому ее вводили в виде суспензии в 0,5%-й метилцеллюлозе.

Из-за видоспецифичных различий в желудочно-кишечном тракте в показателях длины, времени прохождения и pH среды, композиции с контролируемым высвобождением адаптировали для организма, который подлежал лечению. На основе параметров мышинного желудочно-кишечного тракта (Koopman et al. 1978, Lab. Anim. 12:223; McConnell et al. 2008, J. Pharm. Pharmacol. 60:63) получали специфичную для мышей композицию для исследования для подтверждения концепции у мышей.

Получали минитаблетки с контролируемым высвобождением с использованием порошка, состоящего из смеси 99% NAM и 1% стеарата магния (оба от Caelo, Hilden, Германия) в качестве смазки. После смешивания порошок характеризовали в показателях сыпучести порошка (угол естественного откоса; меньше 35°) и распределения по размеру (лазерная дифракция; главная фракция частиц: 100-200 мкм) для обеспечения хорошей сыпучести порошка. Затем получали минитаблетки на ротационном прессе и покрывали пленкой из нерастворимого в воде полимера Kollidon SR 30 D (BASF, Ludwigshafen, Германия) для контроля высвобождения NAM посредством диффузии NAM через пленку. Композиция для покрытия была следующей: Kollicoat SR 20 D (49,9%), глицерина моностеарат 60 (0,743%), пропиленгликоль (0,743%), красный железоксидный краситель (0,4%), полисорбат 80 (0,314%) и вода для доведения до 100%.

Моностеарат глицерина 60 (Caelo) нагревали с половиной объема воды до 80°C и эмульгировали с Ultraturrax (IKA, Staufen, Германия). Затем добавляли красный железоксидный краситель (Caelo) и диспергировали в течение еще 5 мин (первая емкость). Дисперсии полисорбата 80 (Caelo), пропиленгликоля (Caelo) и полимера объединяли во второй емкости и перемешивали с использованием магнитной мешалки. Холодную (меньше 30°C) эмульсию из первой емкости объединяли с дисперсией полимера из второй емкости, и добавляли остальную воду. Дисперсию перемешивали в течение 1 ч перед фильтрованием (меньше 500 мкм). Минитаблетки покрывали в аппарате псевдоожижения (Mycrolab, Hüttlin, Schopfheim, Германия) при размере партии 50 г со скоростью подачи жидкости примерно 1 мл/мин и давлением распыления 70 кПа. Перед распылением таблетки предварительно нагревали потоком в объеме 8 м³ при 45°C. Во время распыления объемный ток увеличивали до 16 м³ при 45°C. Наблюдали температуру продукта примерно 38°C. После распыления таблетки ожижали с использованием 16 м³ в течение еще 10 мин при 45°C для отверждения. На последнем

этапе процесса нагревание выключали, и слой таблеток охлаждали до менее 30°C для того, чтобы избежать слипания. Таблетки покрывали с использованием 6,2 плюс/минус 0,04 мг/см². Высвобождение лекарственного средства определяли на приборе с лопастями (DT6, Erweka, Neusenstamm, Германия) согласно Европейской Фармакопее при 50 об./мин. Фосфатный буфер (рН 4) использовали в качестве среды для растворения, так как у мышей ожидается слабокислый желудочно-кишечный сок примерно с этим значением рН (McConnell et al. 2008, J. Pharm. Pharmacol. 60: 63-70). Концентрацию лекарственного средства определяли посредством поглощения в УФ (ультрафиолетовая область спектра) при 262 нм. Непокрытые таблетки демонстрировали мгновенное высвобождение лекарственного средства из-за крошечного размера таблеток и высокой водорастворимости никотинамида. С использованием покрытия Kollidon SR высвобождение лекарственного средства было оптимизировано для покрытия целевых площадей в тонком кишечнике мышей (лаг-период по меньшей мере 15 мин, постоянное высвобождение лекарственного средства в течение 3 ч). Минитаблетки гомогенно смешивали с пищевым порошком, не содержащим триптофан/ниацин, при использовании минимального количества стерильной воды формировались пеллеты приблизительно 2 см длины и 1 см диаметра, их замораживали в аликвотах для однократного применения при -20°C для хранения и оттаивали каждые сутки для кормления мышей.

Самцов мышей C57B L/6J (не содержащих специфических патогенов; Taconic Europe, Ry, Дания) отбирали в испытательный комплекс в возрасте 6-7 недель и акклиматизировали в течение 2-х недель. Кормом на протяжении фазы акклиматизации служил Altromin 1324, произведенный Altromin (Lage, Германия). После 2-х недель акклиматизации корм заменяли на сделанный на заказ корм без триптофана или никотиновой кислоты, или никотинамида (корм, не содержащий Trp/Nia/NAM), который был изготовлен Ssniff (Soest, Германия). В сутки смены корма начинали схему лечения, как определено ниже. И корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, и обработку вводили до умерщвления мышей. После 12 суток получения корма, не содержащего Trp/Nia/NAM, мышей стимулировали 1,5% DSS (MP Biomedicals, Illkirch, Франция) в питьевой воде в течение 4-х суток и затем умерщвляли.

Схему обработки осуществляли с использованием четырех групп по 10 мышей в каждой, которых обрабатывали следующим образом:

Группа 1: ежедневное пероральное зондовое введение 0,25 мл носителя (стерильная вода).

Группа 2: ежедневное пероральное зондовое введение 0,25 мл раствора никотинамида (Кат. №4488; Caelo) в стерильной воде (6 мг/мл; конечная доза: примерно 60 мг/кг массы тела).

Группа 3: минитаблетки NAM с контролируемым высвобождением, гомогенно диспергированные в корме (конечная доза: примерно 60 мг/кг массы тела на основе потребления пищи 2,5 г на мышь в сутки).

Группа 4: ежедневное пероральное зондовое введение 0,25 мл 5-аминосалициловой кислоты (5-ASA; Кат. № A3537, Sigma-Aldrich, Brondby, Дания), суспензированной в 0,5% метил целлюлозе (Кат. № M7140, Sigma-Aldrich) в концентрации 15 мг/мл (конечная доза: примерно 150 мг/кг массы тела).

Готовили свежие растворы доз из тех же исходных растворов каждые сутки непосредственно перед введением.

Непосредственно перед изменением питания, перед индукцией колита DSS и перед умерщвлением у каждого животного отбирали свежие образцы кала, эквивалентные двум фекальным комкам, для анализов микробиома. Образцы кала немедленно

мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Мгновенное замораживание проводили для сохранения соотношений между разными бактериями с разными ростовыми характеристиками при условиях окружающей среды.

5 Непосредственно после умерщвления животных толстую кишку промывали 0,9%-м физиологическим раствором, и подготавливали образцы по типу «швейцарского рулета» (Moolenbeek and Ruitenberg 1981: Lab. Anim. 15: 57). Вкратце, очищенную толстую кишку продольно вскрывали, связывали так, чтобы ворсинки смотрели наружу, и образующуюся трубку фиксировали в формальдегиде и заливали в парафин согласно стандартным методикам. Препарат по типу «швейцарского рулета» обеспечивает
10 продольную и количественную гистологическую оценку всей слизистой толстой кишки на том же самом предметном стекле со срезом. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином согласно стандартным методикам. Образцы оценивались двумя независимыми исследователями вслепую, и им давали балльную оценку согласно следующей системе, основанной на трех параметрах:

15 Тяжесть воспаления: 0, редкие воспалительные клетки в собственной пластинке; 1, повышенное число гранулоцитов в собственной пластинке, отек под слизистой; 2, скопление воспалительных клеток, распространяющихся в подслизистый слой; 3, пронизывающее стенку распространение воспалительного инфильтрата.

Повреждение крипт: 0, интактные крипты; 1, потеря базальной трети; 2, потеря
20 базальных двух третей; 3, потеря всей крипты; 4, изменение поверхности эпителия с эрозией; 5, конфлюэнтная эрозия.

Изъязвление: 0, отсутствие язв; 1, 1 или 2 очага изъязвлений; 2, 3 или 4 очага изъязвлений; 3, конфлюэнтное или обширное изъязвление.

Максимальная гистологическая балльная оценка составляла 3 плюс 5 плюс 3 равно
25 11.

Гистологическая оценка вслепую всей слизистой толстой кишки была выбрана в качестве грубого ожидаемого результата терапевтического эффекта заявленных композиций NAM.

Гистологические балльные оценки четырех групп показаны на Фиг. 3 и выражены в
30 виде средних значений и стандартных отклонений. Использовали лишь оптимальным образом законсервированные и приготовленные образцы и срезы толстой кишки (число животных в следующем тексте представлено в скобках). Балльные оценки были следующими:

группа 1 (водный контроль): 6,25 плюс/минус 1,39 (n равно 8);
35 группа 2 (NAM в воде): 5,14 плюс/минус 1,07 (n равно 7);
группа 3 (таблетки NAM с контролируемым высвобождением): 3,38 плюс/минус 0,92 (n равно 8);
группа 4 (5-ASA): 6,50 плюс/минус 1,60 (n равно 8).

В то время как NAM в питьевой воде индуцировал лишь тенденцию к уменьшению
40 балльной оценки гистологического воспаления по сравнению с водным контролем (p равно 0,1), наблюдали высокосignificant различие как между таблетками NAM с контролируемым высвобождением и группой водного контроля (p меньше 0,001), так и, что важно, между NAM в воде и NAM с контролируемым высвобождением (p меньше 0,01). Интересно, что контрольное лечение 5-ASA (которая снижает интенсивность
45 нормального индуцированного DSS колита и широко используется для терапии воспалительных заболеваний кишечника у человека) не могло уменьшить интенсивность индуцированного DSS колита в отсутствие триптофана или ниацина (Фиг. 3). Данные открытия поддерживают идею настоящего изобретения о том, что благоприятные

воздействия NAM на кишечную микробиоту и на колит не оптимально используются при системной доставке посредством перорального зондового питания, но, вместо этого, оптимально используются посредством композиций с контролируемым высвобождением в кишечнике, и что первичный эффект NAM оказывает на местное окружение в кишечнике.

Пример 5:

Для того чтобы далее охарактеризовать композиции с контролируемым высвобождением для направленной доставки никотинамида к кишечному эпителию, провели второе исследование для подтверждения концепции на модели индуцированного декстрансульфатом натрия (DSS) колита у мышей. В этом втором и большем исследовании для подтверждения концепции композицию гранул NAM с контролируемым высвобождением тестировали в трех разных дозах. В качестве контрольного лечения, обычно эффективного при индуцированном DSS колите, использовали гранулы с контролируемым высвобождением, содержащие 5-аминосалициловую кислоту (гранулы 5-ASA; PENTASA, Ferring Pharmaceuticals, Saint-Prex, Швейцария).

Композиция NAM с контролируемым высвобождением представляет собой гранулят из 25% никотинамида, 70% двухосновного фосфата кальция и 5% повидона К30. Средний размер частиц составлял 234 мкм. Гранулят затем покрывали пленкой с этилцеллюлозой 7, с достижением 30%-го увеличения массы и среднего размера частиц 640 мкм. Фильтрация удаляла частицы с размером меньше, чем 355 мкм. В контрольных гранулах NAM был заменен эквивалентным количеством двухосновного фосфата кальция.

Самцов мышей C57B L/6J (не содержащих специфических патогенов, Charles River Laboratories, Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Франция) забирали в испытательный комплекс в возрасте больше 12 недель и акклиматизировали в течение 1,5 месяцев для того, чтобы обогатить и стабилизировать их микробиоту. Кормом на протяжении фазы акклиматизации был корм А4, произведенный SAFE (Scientific Animal Food and Engineering, Augy, Франция). После акклиматизации корм заменяли сделанным на заказ кормом без триптофана или никотиновой кислоты, или никотинамида (корм, не содержащий Trp/Nia/NAM), который был изготовлен Ssniff (Soest, Германия). Корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, поставляли в виде порошка, который использовали для получения пищевых пеллетов либо без гранул, либо с контрольными гранулами без NAM или 5-ASA, либо с гранулами NAM, либо с гранулами 5-ASA. Гранулы равномерно распределяли в корме. Формировали пищевые пеллеты приблизительно 2 см длины и 1 см диаметра с использованием минимального количества стерильной воды, замораживали в аликвотах для однократного применения при -20°C для хранения и оттаивали каждые сутки для кормления мышей. Содержание гранул пищевых пеллетов было определено следующим образом с расчетом на основе массы тела 30 г и ежесуточного потребления пищи 3 г.

Гранулы 5-ASA (целевая доза 5-ASA: 150 мг/кг массы тела; содержание 5-ASA: 52%): 4,5 мг 5-ASA требовалось на 3 г пищи; 8,65 мг гранул требовалось на 3 г пищи; 2,88 г гранул добавляли на кг пищи. Фиксированные дозы для других гранул рассчитывали аналогичным образом.

Гранулы NAM (целевые дозы NAM: 30, 60 или 120 мг/кг массы тела; содержание NAM: 19,1%): для 30 мг/кг NAM, 1,57 г гранул на кг пищи; для 60 мг/кг NAM, 3,14 г гранул на кг пищи; для 120 мг/кг NAM, 6,28 г гранул на кг пищи.

Контрольные гранулы добавляли в пищу в том же самом соотношении, что и гранулы

NAM в дозовой группе 120 мг/кг, т.е. 6,28 г гранул на кг пищи.

В сутки, в которые корм сменили на корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, с гранулами или без них, начинали схему лечения с пероральным зондовым кормлением для групп 1 и 2, как определено ниже. И корм, не содержащий Trp/Nia/NAM, с гранулами или без них, и лечение посредством зондового кормления вводили до умерщвления мышей. После 12 суток кормления кормом, не содержащим Trp/Nia/NAM, мышей стимулировали 1,5% DSS (TDB Consultancy, Упсала, Швеция) в питьевой воде в течение пяти суток и умерщвляли после еще двух суток, на протяжении которых им давали нормальную питьевую воду.

Данную схему лечения осуществляли с использованием семи групп по 10 мышей в каждой, которых лечили следующим образом:

Группа 1: ежедневное пероральное зондовое кормление 0,1 мл носителя (стерильная вода).

Группа 2: ежедневное пероральное зондовое кормление 0,1 мл раствора NAM (Sigma-Aldrich, Brondby, Дания) в стерильной воде (18 мг/мл; конечная доза: примерно 60 мг/кг массы тела).

Группа 3: контрольные гранулы в корме (содержание гранул, соответствующее группе 6).

Группа 4: гранулы NAM в корме (конечная доза: 30 мг/кг массы тела).

Группа 5: гранулы NAM в корме (конечная доза: 60 мг/кг массы тела).

Группа 6: гранулы NAM в корме (конечная доза: 120 мг/кг массы тела).

Группа 7: гранулы 5-ASA в корме (конечная доза: 150 мг/кг массы тела).

Каждые сутки получали свежие растворы доз из тех же самых исходных растворов непосредственно перед введением.

Непосредственно перед сменой корма, перед индукцией колита DSS и перед умерщвлением у каждого животного отбирали свежие образцы кала, эквивалентные двум фекальным комкам, для анализов микробиома. Образцы кала немедленно мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C. Мгновенное замораживание проводили для сохранения соотношений между разными бактериями с разными ростовыми характеристиками при условиях окружающей среды.

С начала стимуляции DSS мышей ежедневно отслеживали на их общее состояние здоровья и релевантные параметры для индекса активности заболевания (DAI), а именно диарею и видимую кровь в кале. После умерщвления осуществляли макроскопическую бальную оценку воспаления толстой кишки. DAI, который имеет теоретический максимум 9, рассчитывали согласно Melgar et al. 2005 (Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 288:G1328). Данные по DAI, обобщенные в Таблице 2 и на Фиг. 4, показывают, что, аналогично данным Примера 4, NAM в воде демонстрировал лишь незначимую тенденцию к улучшению в этой экспериментальной ситуации, тогда как композиция NAM с контролируемым высвобождением (гранулы NAM) вызвала высокосignificant и дозозависимое уменьшение DAI. Важно то, что группа, которую лечили гранулами NAM, получающая 60 мг/кг NAM, имела значимо меньший DAI, чем группа, получающая 60 мг/кг NAM в воде (Таблица 2).

Гранулы 5-ASA демонстрировали незначимую тенденцию в отношении терапевтической эффективности.

Группа	DAI	Статистическая значимость
Вода	5,70 ± 0,24	не применимо
NAM в воде (60 мг/кг)	5,40 ± 0,25	не значимо по сравнению с водой
Контрольные гранулы	5,00 ± 0,25	не применимо
Гранулы NAM (30 мг/кг)	3,56 ± 0,35	p равно 0,03 по сравнению с контрольными гранулами
Гранулы NAM (60 мг/кг)	2,11 ± 0,35	p меньше 0,01 по сравнению с контрольными гранулами; p меньше 0,001 по сравнению с NAM в воде (60 мг/кг)
Гранулы NAM (120 мг/кг)	1,90 ± 0,23	p меньше 0,001 по сравнению с контрольными гранулами
Гранулы 5-ASA (150 мг/кг)	4,67 ± 0,42	не значимо по сравнению с водой или контрольными гранулами

Таблица 2: данные по индексу активности заболевания (DAI) и их статистическая оценка.

Количество миелопероксидазы (МРО), фермента, содержащегося в гранулах полиморфоядерных нейтрофильных гранулоцитов, является количественным тканевым маркером рекрутинга нейтрофилов и позволяет опосредованно количественно оценивать острое воспаление толстой кишки, опосредованное нейтрофилами, при колите, индуцированном DSS.

Для анализа содержания МРО в мышинной ткани толстой кишки репрезентативные образцы ткани толстой кишки анализировали с использованием набора ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) для МРО мыши от Нусcult (Кат. № НК210; Нусcult Biotech; CliniSciences, Нантер, Франция) согласно рекомендациям изготовителя.

В то время как NAM в воде демонстрировал лишь незначимую тенденцию к уменьшению уровня МРО, значимое снижение уровней МРО наблюдали в группах мышей, которые получали гранулы NAM в дозах 60 и 120 мг/кг, вновь указывая на значимый терапевтический эффект NAM только при введении в виде композиции с контролируемым высвобождением (Таблица 3, Фиг. 5).

Группа	МРО	Статистическая значимость
Вода	236,41 ± 9,1	не применимо
НАМ в воде (60 мг/кг)	219,71 ± 12,16	не значимо по сравнению с водой
Контрольные гранулы	240,25 ± 5,18	не применимо
Гранулы NAM (30 мг/кг)	234,61 ± 21,96	не значимо по сравнению с контрольными гранулами
Гранулы NAM (60 мг/кг)	212,42 ± 10,08	p меньше 0,05 (p равно 0,036) по сравнению с контрольными гранулами
Гранулы NAM (120 мг/кг)	202,76 ± 4,97	p меньше 0,001 по сравнению с контрольными гранулами
Гранулы 5-ASA (150 мг/кг)	232,69 ± 6,73	не значимо по сравнению с водой или контрольными гранулами

Таблица 3: Количественная оценка и статистический анализ уровней миелопероксидазы (МРО) в толстой кишке.

Пример 6:

Поскольку результаты обоих исследований на животных, описанных в Примерах 4 и 5, свидетельствовали о значимой терапевтической эффективности композиций NAM с контролируемым высвобождением, кишечный микробном мышей из исследования, описанного в Примере 5, анализировали с использованием точно таких же методологии и оборудования (филогения на основе 16S рДНК и секвенирование 454 меток), как описано Hashimoto et al. 2012 (Nature 487:477). Из пяти групп, которые получали гранулы с контролируемым высвобождением (группы 3-7), слепым способом выбирали восемь животных перед проведением анализа параметров заболевания, описанных в Примере 5. Сравнивали образцы кала от всех этих мышей перед вмешательством в кормление (нормальная, не способствующая развитию колита флора в качестве контрольной точки) и после 12 суток питания, не содержащего Trp/Nia/NAM (непосредственно до стимуляции DSS, см. Пример 5).

На Фиг. 6 показано, что 12 суток питания, не содержащего Trp/Nia/NAM, приводило к кардинальному переключению преобладающей филой от Bacteroidetes до Firmicutes. Это могло быть частично и дозозависимо предотвращено гранулами NAM с контролируемым высвобождением. Гранулы 5-ASA с контролируемым высвобождением демонстрировали тенденцию в том же направлении (Фиг. 6). Кроме того, более подробные процентные анализы сходства (SIMPER) бактериальных групп показали то, что контролируемое высвобождение NAM индуцировало размножение неклассифицируемых Bacteroidales и рода Paraprevotella (Фиг. 7; заштрихованные части колонок).

Полезные симбионты из порядка Bacteroidales принадлежат преимущественно представленным в кишечнике млекопитающих родам и являются важными для переваривания пищи, поскольку они гидролизуют пищевые полисахариды и превращают их в короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA), которые могут использоваться хозяином. Большинство геномов, гомологичных геномам, обнаруженным в группе Bacteroidales, размножающихся при обработке гранулами NAM с контролируемым высвобождением, принадлежало к таким продуцентам SCFA. Особенно релевантно то,

что превалирование данных полезных симбионтов и образующихся в результате уровней кишечных SCFA снижается при человеческих воспалительных заболеваниях кишечника (Frank et al. 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:13780). Было показано, что размножение такой микробиоты посредством пре- или пробиотиков, а также увеличение уровня их SCFA продуктов является терапевтически эффективным при колите грызунов, индуцированном DSS (Osman et al. 2006, BMC Gastroenterol. 28; 6:31; Maslowski et al. 2009, Nature 461:1282). Кроме того, было показано, что Bacteroidales секретируют иммуномодулирующие углеводные структуры (полисахарид А), которые могут подавлять воспалительные ответы (Mazmanian et al. 2008, Nature 453:620).

В заключение, NAM с контролируемым высвобождением в кишечнике приводит к дозозависимому увеличению количества полезной микробиоты и уменьшает колит.

Приведенные выше примеры служат для объяснения изобретения, но не предназначены для того, чтобы ограничивать его объем.

(57) Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, содержащая активное вещество, выбранное из никотиновой кислоты, никотинамида, триптофана, сложных эфиров никотиновой кислоты, дипептида триптофана или их комбинации, для положительного воздействия на кишечную микробиоту, где указанная фармацевтическая композиция селективно высвобождает активное вещество для местного воздействия в терминальном отделе подвздошной кишки, толстой кишке или в обеих, достигаемого посредством перорального введения указанной композиции, приготовленной с контролируемым высвобождением активного вещества, или посредством ректального введения указанной композиции, где положительное воздействие на кишечную микробиоту относится к вызову изменения кишечной микробиоты, которое имеет положительное воздействие на состояние здоровья, где положительное воздействие на состояние здоровья ассоциировано с уменьшением числа патогенных бактерий, уменьшением отношения патогенных бактерий к полезным бактериям, увеличением разнообразия микробиоты, уменьшением уровня воспаления, которое микробиота индуцирует в кишечнике, и частичным или полным обращением патологических изменений в энтеротипе микробиоты.

2. Фармацевтическая композиция, содержащая активное вещество, выбранное из никотиновой кислоты, никотинамида, дипептида триптофана или их комбинации, для положительного воздействия на кишечную микробиоту, где указанная фармацевтическая композиция селективно высвобождает активное вещество для местного воздействия в терминальном отделе подвздошной кишки, толстой кишке или в обеих, достигаемого посредством перорального введения указанной композиции, приготовленной с контролируемым высвобождением активного вещества, или посредством ректального введения указанной композиции, где положительное воздействие на кишечную микробиоту относится к вызову изменения кишечной микробиоты, которое имеет положительное воздействие на состояние здоровья, где положительное воздействие на состояние здоровья ассоциировано с уменьшением числа патогенных бактерий, уменьшением отношения патогенных бактерий к полезным бактериям, увеличением разнообразия микробиоты, уменьшением уровня воспаления, которое микробиота индуцирует в кишечнике, и частичным или полным обращением патологических изменений в энтеротипе микробиоты.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2 для перорального введения, в частности приготовленная для перорального введения, с отсроченным высвобождением активных

ингредиентов для специфичной местной эффективности в терминальном отделе подвздошной кишки и/или в толстой кишке.

4. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, приготовленная для перорального введения, с контролируемым высвобождением активных ингредиентов для специфичной местной эффективности в терминальном отделе подвздошной кишки и/или в толстой кишке.

5. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, содержащая никотинамид.

6. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2 для перорального введения с отсроченным высвобождением активного вещества для терапии или профилактики воспалительных заболеваний тонкого кишечника и/или заболеваний толстого кишечника, и/или для профилактики карциномы толстой кишки, и/или для терапии или профилактики заболеваний, которые возникают из-за изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и кишечником.

7. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2 для нео(ректального) введения в толстую кишку или илеоанальный карман для терапии воспалительных заболеваний толстого кишечника или паучита.

8. Фармацевтическая композиция по п. 7, приготовленная для нео(ректального) введения в толстую кишку или илеоанальный карман.

9. Фармацевтическая композиция по п. 8 для применения в терапии или профилактике воспалительных заболеваний толстого кишечника или паучита.

10. Фармацевтическая композиция по п. 6, характеризующаяся тем, что она приготовлена для перорального введения с содержанием активного вещества 1-3000 мг на конечную лекарственную форму.

11. Фармацевтическая композиция по п. 10, характеризующаяся тем, что она приготовлена для перорального введения с содержанием активного вещества 100-1000 мг на конечную лекарственную форму.

12. Фармацевтическая композиция по п. 7, характеризующаяся тем, что она приготовлена для ректального введения для локальной терапии воспалений в прямой кишке или илеоанальном кармане.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 8, 9 и 12, характеризующаяся тем, что она приготовлена для ректального применения с содержанием активного вещества 10-5000 мг на конечную лекарственную форму.

14. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, характеризующаяся тем, что ацетилсалициловая кислота и/или антагонисты простагландина D2 содержатся дополнительно к никотиновой кислоте и/или никотинамиду.

15. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2

(а) для применения в терапии или профилактике воспалительного заболевания кишечника,

(б) для применения в профилактике карциномы толстой кишки или

(в) для применения в терапии или профилактике заболеваний органов тела, которые возникают в результате изменений кишечной микробиоты и/или ухудшенного взаимодействия между кишечной микробиотой и кишечником.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15 для применения в терапии или профилактике воспалительного заболевания кишечника.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит или болезнь Крона.

18. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2, содержащая дипептид триптофана.

19. Фармацевтическая композиция по п. 1 или 2 для применения в положительном

воздействию на кишечную микробиоту.

20. Применение фармацевтической композиции по п. 1 или 2 для положительного воздействия на кишечную микробиоту, где положительное воздействие на кишечную микробиоту относится к вызову изменения кишечной микробиоты, которое имеет

5 положительное воздействие на состояние здоровья, где положительное воздействие на состояние здоровья ассоциировано с уменьшением числа патогенных бактерий, уменьшением отношения патогенных бактерий к полезным бактериям, увеличением разнообразия микробиоты, уменьшением уровня воспаления, которое микробиота индуцирует в кишечнике, и частичным или полным обращением патологических

10 изменений в энтеротипе микробиоты.

15

20

25

30

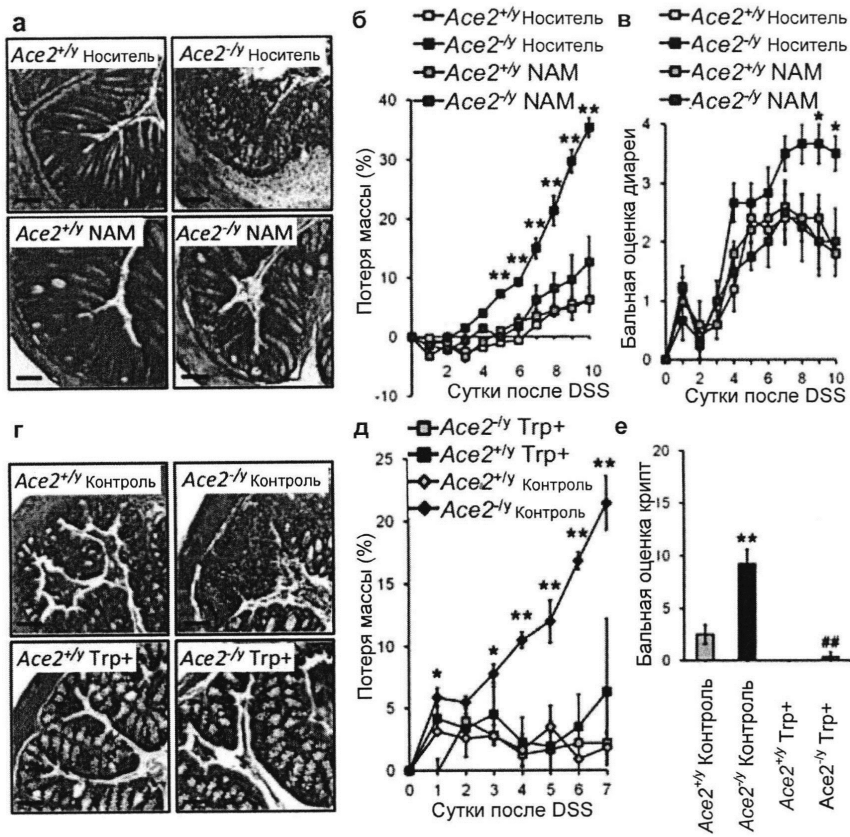
35

40

45

1

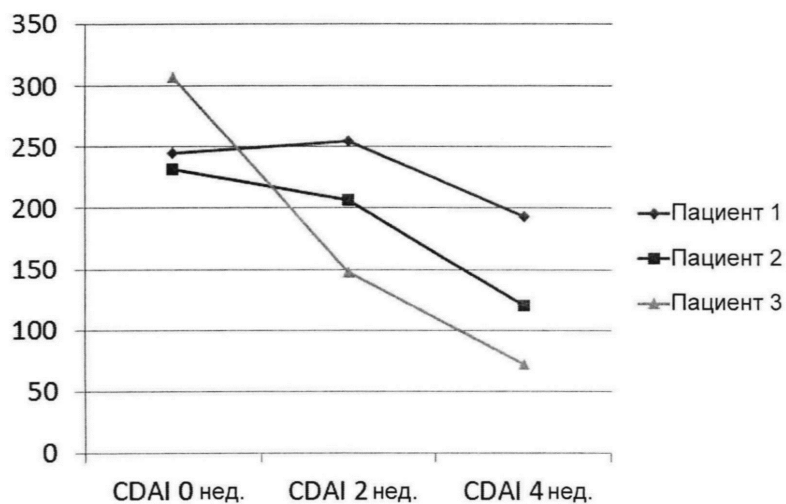
1 Фармацевтическая композиция, содержащая
никотиновую кислоту и/или никотинамид,
и/или триптофан, для положительного воздействия
на кишечную микробиоту



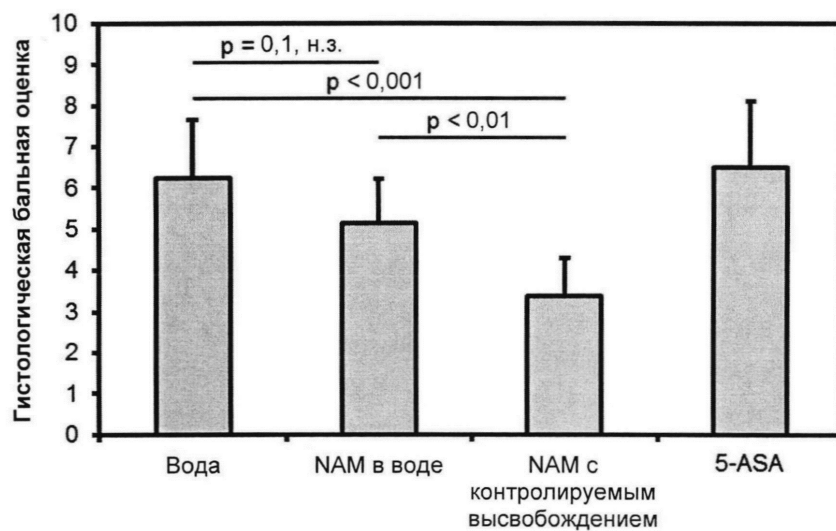
Фиг. 1

2

2 Фармацевтическая композиция, содержащая
никотиновую кислоту и/или никотинамид,
и/или триптофан, для положительного воздействия
на кишечную микробиоту

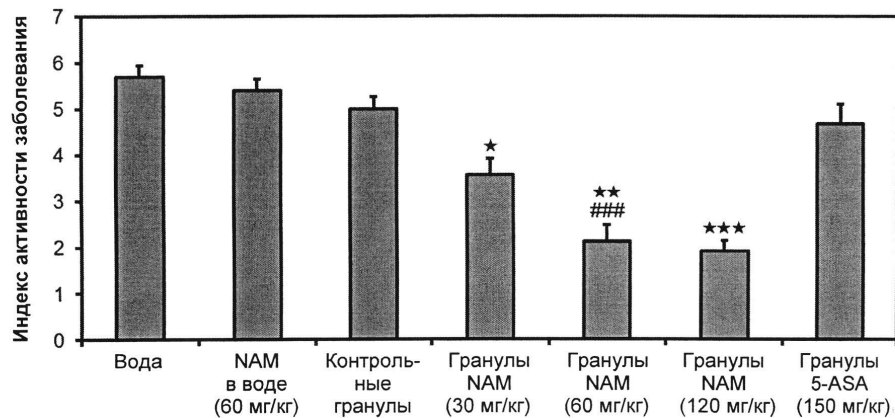


Фиг. 2.

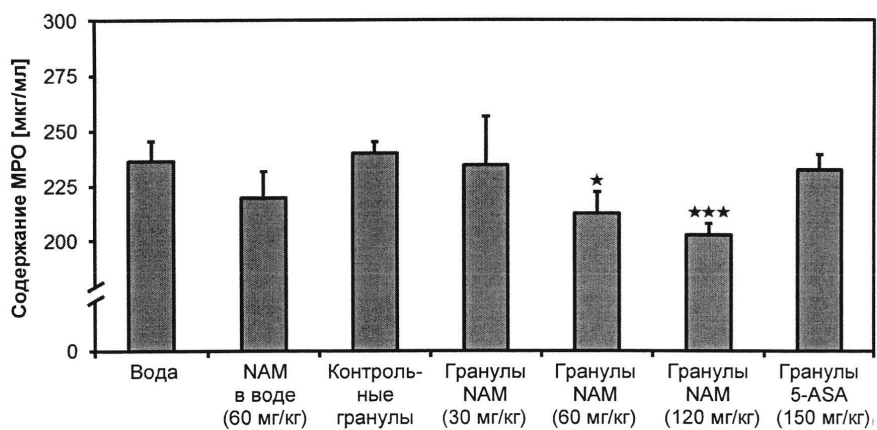


Фиг. 3.

3 Фармацевтическая композиция, содержащая
никотиновую кислоту и/или никотинамид,
и/или триптофан, для положительного воздействия
на кишечную микробиоту



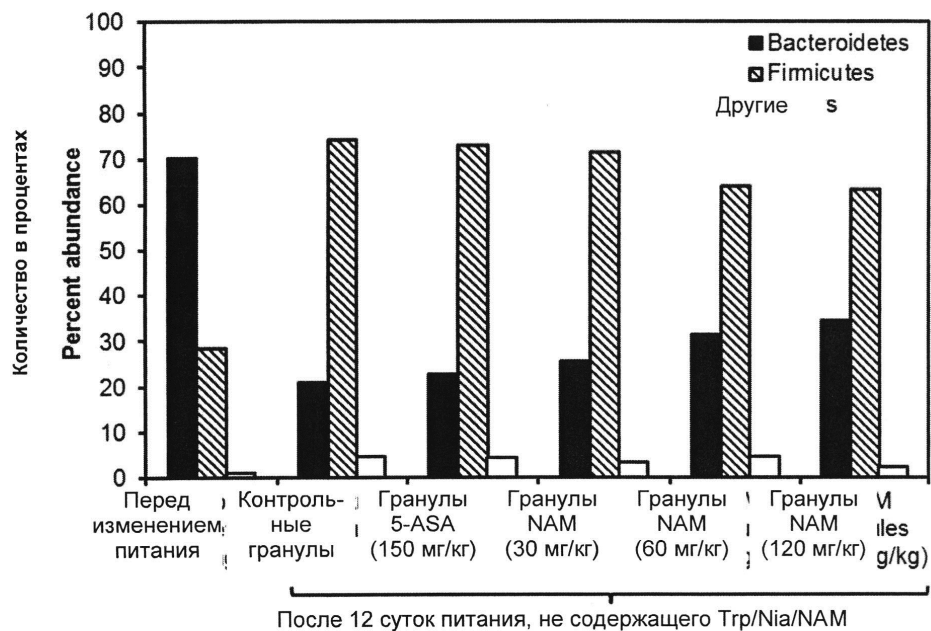
Фиг. 4.



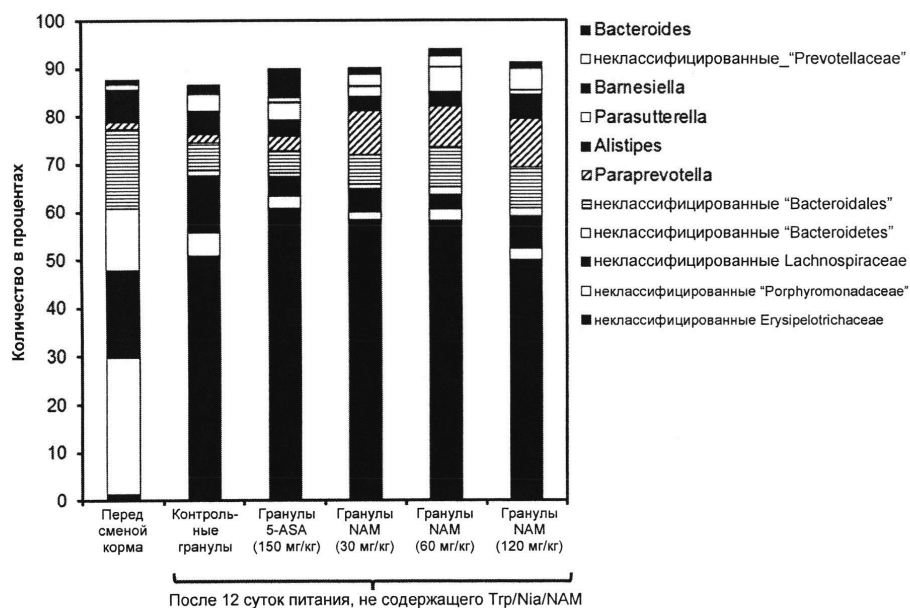
Фиг. 5.

4

Фармацевтическая композиция, содержащая
никотиновую кислоту и/или никотинамид,
и/или триптофан, для положительного воздействия
на кишечную микробиоту



Фиг. 6.



Фиг. 7.