



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(51) МПК

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005101766/13, 26.06.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.06.2003(30) Конвенционный приоритет:  
26.06.2002 JP 2002-185897

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2005

(45) Опубликовано: 27.10.2008 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: JP 2000-239175 A, 05.09.2000. WO  
01/97822 A1, 27.12.2001. WO 02/16554 A1,  
08.02.2002.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
26.01.2005(86) Заявка РСТ:  
JP 03/08094 (26.06.2003)(87) Публикация РСТ:  
WO 2004/002501 (08.01.2004)Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег. № 517(72) Автор(ы):  
ЯМАМОТО Наюки (JP),  
ИСИДА Юю (JP),  
БАНДО Изуки (JP)(73) Патентообладатель(и):  
КАЛПИС КО., ЛТД. (JP)

## (54) ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКИЙ АГЕНТ, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОБЛЕГЧЕНИЯ АЛЛЕРГИИ И СПОСОБ ОБЛЕГЧЕНИЯ (УМЕНЬШЕНИЯ СИМПТОМОВ) АЛЛЕРГИИ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Противоаллергический агент включает в качестве активного ингредиента молочнокислую бактерию штамма, выбранного из *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитариум организмов под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитариум организмов под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитариум

организмов под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций. Способ уменьшения симптомов аллергии включает введение эффективной дозы данного противоаллергического агента нуждающемуся в этом субъекту. Способ уменьшения симптомов аллергии, связанной с повышенным уровнем IgE, также включает введение эффективной дозы данного противоаллергического агента нуждающемуся в этом субъекту. Противоаллергический агент вводят в продукт питания или смешивают с ним. Группа изобретений позволяет эффективно бороться с аллергией. 5 с. и 2 з.п. ф-лы, 3 табл., 6 ил.



(51) Int. Cl.

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 11/02** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005101766/13, 26.06.2003**

(24) Effective date for property rights: **26.06.2003**

(30) Priority:  
**26.06.2002 JP 2002-185897**

(43) Application published: **20.08.2005**

(45) Date of publication: **27.10.2008 Bull. 30**

(85) Commencement of national phase: **26.01.2005**

(86) PCT application:  
**JP 03/08094 (26.06.2003)**

(87) PCT publication:  
**WO 2004/002501 (08.01.2004)**

Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj, reg. № 517**

(72) Inventor(s):  
**JaMAMOTO Naojuki (JP),  
ISIDA Juu (JP),  
BANDO Izuki (JP)**

(73) Proprietor(s):  
**KALPIS KO., LTD. (JP)**

(54) **ANTIALLERGIC AGENT, ITS ADMINISTRATION FOR ALLERGY FACILITATION AND METHOD FOR FACILITATION (SYMPTOMS REDUCTION)**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: antiallergic agent contains as active ingredient stock lactobacillus, selected from Lactobacillus acidophilus CL0062 (deposited in the International Patent Depository of organisms numbered FERM BP-4980), Lactobacillus acidophilus CL92 (deposited in the International Patent Depository of organisms numbered FERM BP-4981) and Lactobacillus fermentum CP34 (deposited in the International Patent Depository of

organisms numbered FERM BP-8383), as well as their combinations. Method of allergic symptoms reduction consists in intake of effective dose of this antiallergic agent by a wanting person. If allergy is accompanied by high level of IgE, symptoms reduction method is also consists in intake of efficient dose of this antiallergic agent by a wanting person. Antiallergic shall be added to foodstuff or mixed with it.

EFFECT: creation of effective antiallergic medicine.  
7 cl, 3 tbl, 6 dwg, 5 ex

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к противоаллергическому агенту. Изобретение также относится к применению противоаллергических агентов для облегчения аллергии и способу уменьшения симптомов аллергии.

### 5 ПРЕДШЕСТВУЮЩАЯ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Количество пациентов, страдающих аллергией, увеличивается каждый год во многих странах, включая Японию, и сообщается о высокой частоте случаев аллергии у взрослых, один из трех в Японии. Аллергические заболевания делятся на четыре типа, типы I-IV, в зависимости от их механизма действия. Некоторые виды аллергического ринита, такие как  
10 поллиноз, бронхиальная астма и атопический дерматит являются аллергией типа I, опосредованной иммуноглобулином E (IgE), где повышение уровня антиген-специфического IgE в крови повышает риск развития аллергических симптомов.

Механизм развития аллергии I типа следующий. Когда антиген, такой как пыльца, домашняя пыль или клещи попадают в организм, образуются антитела IgE, специфические  
15 к такому антигену, которые связываются с тучными клетками или рецепторами Fcε на поверхности базофилов и сенсибилизируют субъект. Когда антиген затем проникает в тело, антиген связывается с антителом IgE с образованием комплекса. Это вызывает дегрануляцию, когда химические медиаторы в гранулах, такие как гистамин и лейкотриены, высвобождаются с развитием аллергических симптомов.

В последнее время аллергические заболевания лечат главным образом антагонистами химических медиаторов, такими как антигистамины и стероиды, используемые в качестве  
20 противовоспалительных агентов. Однако, оба из этих типов агентов обеспечивают только симптоматическую терапию и стероиды ингибируют общий иммунный ответ, приводя к побочным эффектам. Альтернативно, агенты для ингибирования высвобождения  
25 химических медиаторов путем ингибирования дегрануляции также используют, но не обнаружено фундаментальных терапевтических агентов для специфического снижения IgE антител, которые являются главным фактором развития аллергии.

Кроме того, для необходимого хронического введения желательными являются  
30 противоаллергические агенты, которые легко принимать и являющиеся высокобезопасными. Соответственно, требуются новые противоаллергические агенты, имеющие такие свойства.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Целью настоящего изобретения является обеспечение противоаллергического агента, который способен облегчать аллергический диатез путем снижения уровня IgE, который  
35 вовлечен в развитие аллергии типа I, который легко принимать и высокобезопасный, а также способа уменьшения аллергии.

С целью достижения вышеуказанной цели авторы настоящего изобретения создали модель на мышах, где уровень антиген-специфических IgE был значительно повышен без  
40 значительного повышения уровня IgG. Используя данную модель, авторы провели исследования эффекта снижения уровня IgE различными штаммами молочнокислых бактерий, которые могут влиять на кишечную иммунную систему, для обнаружения среди различных исследуемых молочнокислых бактерий определенных бактерий, имеющих особенно сильный ингибирующий эффект на продукцию IgE, таким образом создав настоящее изобретение.

В соответствии с настоящим изобретением обеспечивают противоаллергический агент, включающий в качестве активного ингредиента молочнокислую бактерию, выбираемую из  
45 группы, состоящей из молочнокислой бактерии вида *Lactobacillus acidophilus*, молочнокислой бактерии вида *Lactobacillus fermentum* и их комбинаций.

В соответствии с настоящим изобретением также обеспечивают противоаллергический  
50 агент, упомянутый выше, где указанная молочнокислая бактерия вида *Lactobacillus acidophilus* является бактерией штамма, выбираемого из группы, состоящей из *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированной в Международном Патентном Депозитариум организмов под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92

(депонированной в Международном Патентном Депозитории организмов под номером FERM BP-4981), и их комбинаций.

В соответствии с настоящим изобретением также обеспечивают противоаллергический агент, упомянутый выше, где указанная молочнокислая бактерия вида *Lactobacillus fermentum* является штаммом *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированным в  
5 Международном Патентном Депозитории организмов под номером FERM BP-8383).

В соответствии с настоящим изобретением, кроме того, обеспечивается противоаллергический агент, упомянутый выше, который снижает, при назначении перорально, уровень антиген-специфического IgE в крови в модели ринита у мышей, где  
10 уровень антиген-специфического IgE в крови был повышен путем назальной непрерывной антигенной стимуляции мыши.

В соответствии с настоящим изобретением также предлагается применение определенной молочнокислой бактерии, упомянутой выше, в получении лекарственного средства для уменьшения аллергии.

15 В соответствии с настоящим изобретением, кроме того, предлагается способ облегчения аллергии, включающий введение эффективной дозы противоаллергического агента, упомянутого выше, субъекту, нуждающемуся в таком облегчении.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показаны графики, представляющие изменения уровня иммуноглобулина в  
20 крови у мышей с повышенным IgE в примере 1.

Фиг. 2 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов снижения уровня OVA-IgE у мышей с повышенным IgE путем введения кисломолочного продукта, проводимых в примере 2.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов  
25 подавления уровня OVA-IgE у мышей с повышенным уровнем IgE путем введения кисломолочного продукта, проводимых в примере 3.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов подавления уровня OVA-IgE у мышей с повышенным IgE путем введения кисломолочного продукта, проводимых в примере 4.

30 Фиг. 5 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов подавления аллергических симптомов у людей путем введения кисломолочного продукта, проводимых в примере 5.

Фиг. 6 представляет собой график, показывающий результаты экспериментов  
35 подавления аллергических симптомов у людей путем введения кисломолочного продукта, проводимых в примере 5.

#### ВАРИАНТЫ ВОПЛОЩЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Противоаллергический агент по настоящему изобретению содержит в качестве  
40 активного ингредиента молочнокислую бактерию, выбираемую из группы, состоящей из молочнокислой бактерии вида *Lactobacillus acidophilus*, молочнокислой бактерии вида *Lactobacillus fermentum* и их комбинаций.

Молочнокислая бактерия вида *Lactobacillus acidophilus* может особенно предпочтительно быть штаммом *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированным в  
Международном Патентном Депозитории организмов Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan под номером хранения FERM BP-4980 от 4 марта 1994), штаммом  
45 *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированным в Международном Патентном Депозитории организмов под номером хранения FERM BP-4981 от 4 марта 1994), или их комбинацией. Молочнокислая бактерия вида *Lactobacillus fermentum* может особенно предпочтительно быть штаммом *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированным в Международном Патентном Депозитории организмов под номером хранения FERM BP-8383 от 23 мая 2002).  
50 Эти три бактериальных штамма хранятся по Будапештскому соглашению о международном депонировании микроорганизмов с целью процедуры Патентования. Все ограничения общественной доступности штамма *Lactobacillus fermentum* CP34 будут окончательно сняты после получения патента. Штаммы *Lactobacillus acidophilus* CL0062 и CL92 уже

являются общедоступными.

Штамм *Lactobacillus acidophilus* CL0062 имеет следующие бактериологические характеристики:

(Морфологические свойства)

- 5 1) форма клетки; палочка,  
2) подвижность; нет,  
3) образование спор; нет,  
4) окраска по Граму; положительная,

(Физиологические свойства)

- 10 1) продукция каталазы; отрицательная,  
2) продукция индола; отрицательная,  
3) восстановление нитрата; отрицательное,  
4) аэробный рост; факультативные анаэробы,  
5) рост при 15°C; нет,

- 15 6) образование DL-молочной кислоты из глюкозы путем гомомолочно-кислого брожения без образования газов,

7) образование кислот из углеводов

	Глюкоза; +	Мелибиоза; +
	Лактоза; +	Раффиноза; +
20	Манноза; +	Маннит; -
	Фруктоза; +	Сорбит; -
	Галактоза; +	Эскулин; +
	Сахароза; +	Салицин; +
	Арабиноза; -	N-ацетилглюкозамин; +
	Мальтоза; +	Амигдалин; +
25	Ксилоза; -	Гентиобиоза; +
	Рамноза; -	Мелизитоза; -
	Целлобиоза; +	Декстрин; +
	Трегалоза; +	Крахмал; -

Штамм *Lactobacillus acidophilus* CL92 имеет следующие бактериальные характеристики:

30 (Морфологические свойства)

- 1) форма клетки; палочка,  
2) подвижность; нет,  
3) образование спор; нет,  
4) окраска по Граму; положительная,

35 (Физиологические свойства)

- 1) продукция каталазы; отрицательная,  
2) продукция индола; отрицательная,  
3) восстановление нитрата; отрицательное,  
4) аэробный рост; факультативные анаэробы,  
40 5) рост при 15°C; нет,

6) образование DL-молочной кислоты из глюкозы путем гомомолочно-кислого брожения без образования газов,

7) образование кислот из углеводов

	Глюкоза; +	Мелибиоза; -
45	Лактоза; +	Раффиноза; +
	Манноза; +	Манит; -
	Фруктоза; +	Сорбит; -
	Галактоза; +	Эскулин; +
	Сахароза; +	Салицин; +
	Арабиноза; -	N-ацетилглюкозамин; +
50	Мальтоза; +	Амигдалин; +
	Ксилоза; -	Гентиобиоза; +
	Рамноза; -	Мелизитоза; -
	Целлобиоза; +	Декстрин; -
	Трегалоза; +	Крахмал; -

Штамм *Lactobacillus fermentum* CP34 имеет следующие бактериальные характеристики:  
(Морфологические свойства)

- 1) форма клетки; палочка,
- 2) подвижность; нет,
- 3) образование спор; нет,
- 4) окраска по Граму; положительная,

(Физиологические свойства)

- 1) продукция каталазы; отрицательная,
- 2) аэробный рост; факультативные анаэробы,
- 3) образование DL-молочной кислоты из глюкозы путем гомомолочно-кислого брожения без образования газов (+),
- 4) разложение углеводов

Арабиноза; -	Целлобиоза; -
Ксилоза; -	Лактоза; +
Мелибиоза; -	Трегалоза; -
Рамноза; -	Амигдалин; -
Рибоза; +	Раффиноза; -
Глюкоза; +	Мелизитоза; -
Манноза; -	Маннит; -
Фруктоза; +	Сорбит; -
Сахароза; +	Эскулин; -
Мальтоза; +	Салицин; -

Содержание вышеупомянутых молочнокислых бактерий в противоаллергическом агенте по настоящему изобретению особо не ограничено и может соответствующим образом быть установлено в зависимости от удобства получения и предпочтительной суточной дозировки. Например, когда агент находится в жидкой композиции, предпочтительное содержание бактерий составляет от  $1 \times 10^7$  клеток/мл до  $1 \times 10^{10}$  клеток/мл.

Противоаллергический агент по настоящему изобретению может необязательно содержать другие компоненты, в дополнение к молочнокислым бактериям. Примеры таких других компонентов могут включать добавки, такие как вспомогательные вещества или компоненты среды, которые будут обсуждены ниже.

Противоаллергический агент по настоящему изобретению может быть получен путем культивирования молочнокислых бактерий в среде.

Любая среда может быть использована для культивирования, если молочнокислые бактерии могут в ней расти; может быть использовано молоко животных, снятое молоко, молочная сыворотка, среда MRS, среда GAM, среда BL, Briggs Liver Broth или другая синтетическая среда. Температура для культивирования может составлять от 25°C до 50°C, предпочтительно от 35°C до 42°C. Время культивирования может составлять от 3 часов до 48 часов, предпочтительно от 8 часов до 12 часов. Культуральная среда может быть использована в качестве противоаллергического агента по настоящему изобретению с или без дальнейшей обработки. Например, бактериальные клетки, собранные с культивированной среды путем центрифугирования или фильтрования, их лиофилизированный продукт, их продукт, обработанный теплом, или измельченные бактериальные клетки могут быть использованы в качестве противоаллергического агента по настоящему изобретению. Кроме того, бактериальные клетки в вышеуказанных формах могут, кроме того, быть сформулированы (введены в состав) или смешаны с различными пищевыми веществами, такими как напитки, таблетки, пасты или хлеб, перед применением в качестве противоаллергического агента по настоящему изобретению.

Противоаллергический агент по настоящему изобретению может вводиться любым путем, но пероральное введение является предпочтительным. Доза может быть не ниже, чем  $2 \times 10^9$  клеток в день, предпочтительно  $2 \times 10^{10}$  клеток в день для перорального введения человеку. Данная доза агента может вводиться в однократной дозе или в виде множества доз в день.

Противоаллергический агент по настоящему изобретению эффективно подавляет уровень IgE, что будет продемонстрировано в примерах, и ожидается, что он будет высокобезопасным, т.к. активным ингредиентом данного агента являются бактериальные клетки, принимаемые в качестве еды.

5 Способ для облегчения аллергии в соответствии с настоящим изобретением включает стадию введения эффективной дозы противоаллергического агента, упомянутого выше, субъекту, нуждающемуся в таком облегчении. Субъектом могут быть животные, такие как человек или другие млекопитающие.

10 Противоаллергический агент по настоящему изобретению эффективно подавляет уровень IgE в живых организмах, его легко принимать и он является высокобезопасным. Следовательно, настоящий агент является применимым для облегчения аллергии, включающей избыточный уровень IgE.

#### Примеры

15 Далее настоящее изобретение будет объяснено более детально со ссылками на примеры, которые являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

#### Пример 1

(Получение мышей с повышенным IgE)

20 Самцов мышей BALB/c получали от Charles River Japan, и выращивали со свободным доступом к CE-2 (CLEA Japan, Inc.) в качестве питания. 10 мкг яичного альбумина (сокращенного как OVA ниже, производимого SIGMA CHEMICAL CO.) и 2 мг гидроксида алюминия (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) в качестве вспомогательного вещества, суспендировали в 300 мкл физиологического раствора. Десяти из  
25 вышеуказанных мышей в возрасте шести недель вводили интраперитонеально данную суспензию на первый день сенсibilизации и на 4 день для первичной сенсibilизации. Для вторичной сенсibilизации, нос каждой мыши смачивали раствором OVA антигена, содержащим 25 мг OVA/мл физиологического раствора в течение трех секунд и эту операцию смачивания повторяли три раза в качестве одного цикла. Два цикла смачивания проводили в день и ежедневное смачивание проводили с 10 дня по 16 день для получения  
30 мышей с повышенным IgE.

Образцы крови получали из глазных вен мышей с повышенным IgE на первый день и день 17 сенсibilизации и получали образцы сыворотки. OVA-специфические IgE (сокращенные как OVA-IgE ниже), общий IgE и общий IgG в образцах сыворотки измеряли в соответствии со способами, описанными ниже. Результаты показаны на фиг. 1(a)-1(c).

35 Из результатов, показанных на фиг. 1(a)-1(c) понятно, что повышение уровня общего IgE и OVA-IgE в крови было значительно выше, чем таковое уровня IgE в результате сенсibilизации. Соответственно, была создана модель аллергии мыши, где уровень IgE и антиген-специфического IgE в крови были повышены без изменений всей иммунной системы.

40 (Измерение OVA-IgE крови)

Уровень OVA-IgE в крови измеряли методом ELISA (сэндвич-методом). 100 мкл физиологического раствора, содержащего 10 мкг/мл овечьего поликлонального антитела против мышинового IgE (торговое наименование AAM11, производимое DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO.,LTD.) добавляли к каждой ячейке 96-луночного иммунопланшета  
45 (от CORNING INCORPORATED) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали три раза фосфатным буфером (содержащим 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, сокращенном как PBS ниже), покрывали 0,5% казеином-PBS и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. После промывания планшета три раза PBS 100 мкл 1/10 разведенного PBS образца сыворотки добавляли к каждой  
50 ячейке, и подвергали реакции в течение ночи при 4°C. После промывания планшета четыре раза PBS 100 мкл 0,5% раствора казеина-PBS, содержащего 10 мкг/мл OVA, который был биотинилирован с использованием набора для биотинилирования (производимого AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL INC.) (биотин-меченный OVA) добавляли к каждой

ячейке и подвергали реакции в течении 2 часов при комнатной температуре. После промывания планшета пять раз PBS, 100 мкл раствора PBS, содержащего 1 мкг/мл стрептавидин-пероксидазы (производимой SIGMA CHEMICAL Co.) и 0,5% казеина добавляли к каждой ячейке и подвергали реакции в течение 1 часа при комнатной

5 температуре. После промывания планшета пять раз 0,1% Твин 20 в PBS, 100 мкл 0,2 М лимоннокислого буфера (полученного путем смешивания 0,2 М лимонной кислоты и 0,2 М цитрата тринатрия и доведения pH до 5), содержащего 600 мкг/мл 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) (сокращенной как ABTS ниже, производимой BOEINGER MANNHEIM) и 0,006% перекиси водорода, добавляли к каждой ячейке и

10 накрывали в течение 3 часов при 37°C для окраски. После завершения реакции измеряли OD<sub>405</sub> и OD<sub>492</sub> и истинную оптическую плотность получали значение OD<sub>405</sub> - значение OD<sub>492</sub>.

Образец крови получали от мыши, которая получала инъекцию интраперитонеально 25 мг/мл OVA в физиологическом растворе пять раз (один раз в неделю). Из образца крови получали образец сыворотки как стандартную сыворотку. Данную стандартную сыворотку

15 разводили 1/10 PBS и полученное разведение далее пошагово разводили в два раза неиммунизированной сывороткой для получения рабочих разведений. Данные рабочие разведения подвергали измерениям значений окраски в соответствии с вышеуказанной методикой, для получения рабочей кривой. На основании данной рабочей кривой уровень OVA-IgE в образцах сыворотки получали, как относительные количества по отношению к

20 уровню OVA-IgE в стандартной сыворотке, расцениваемой как 1.

(Измерение общего IgE в крови)

50 мкл физиологического раствора, содержащего 10 мкг/мл овечьего поликлонального антитела против мышинового IgE (торговое наименование AAM11, производимого DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) добавляли к каждой ячейке 96-луночного

25 иммунопланшета (производимого CORNING INCORPORATED) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали три раза PBS, покрывали 0,5% казеином-PBS и инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. После промывания планшета три раза PBS, 50 мкл 1/25 разведения образца сыворотки в 0,5% казеине-PBS добавляли к каждой ячейке, и подвергали реакции в течение ночи при 4°C. После промывания планшета

30 четыре раза PBS, 50 мкл раствора PBS, содержащего 2 мкг/мл меченного биотином антитела против мышинового IgE (производимого YAMASA CORPORATION) и 0,5% казеина добавляли к каждой ячейке и подвергали реакции в течение 2 часов при комнатной температуре. После промывания планшета пять раз 0,1% Твин 20 в PBS, 50 мкл раствора PBS, содержащего 1 мкг/мл стрептавидин-пероксидазы и 0,5% казеина, добавляли к каждой

35 ячейке и подвергали реакции в течение 1 часа при комнатной температуре. После промывания планшета пять раз 0,1% Твин 20 в PBS 50 мкл 0,2 М лимоннокислого буфера (pH5), содержащего 300 мкг/мл ATBS и 0,006% перекиси водорода добавляли к каждой ячейке и накрывали в течение 20-30 минут при комнатной температуре для реакции. Затем измеряли OD<sub>405</sub>.

40 С другой стороны, мышиный анти-DNP-IgE (производимый YAMASA CORPORATION), вместо образцов сыворотки, растворяли в 0,5% казеине-PBS в различных концентрациях, и подвергали таким же процедурам, что указаны выше, для получения рабочей кривой. На основании этой рабочей кривой рассчитывали уровни общего IgE в образцах сыворотки.

(Измерение общего IgG в крови)

45 50 мкл физиологического раствора, содержащего 1 мкг/мл козьего антитела против мышинового IgE (H + L) (торговое наименование 62-6500, производимое ZYMED LABORATORIES, INC.) добавляли к каждой ячейке 96-луночного планшета (производимого CORNING INCORPORATED) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Планшет промывали три раза PBS, покрывали 0,5% казеином-PBS и инкубировали в течение 3 часов при

50 комнатной температуре. После промывания планшета три раза PBS, 50 мкл 1/1000 разведения образца сыворотки в 5% казеине-PBS добавляли к каждой ячейке и подвергали реакции в течение ночи при 4°C. После промывания планшета четыре раза PBS, 50 мкл раствора PBS, содержащего 2 мкг/мл антитела против мышинового IgG( $\gamma$ ), меченного

пероксидазой (производимого CAPPEL LABORATORIES, INC.), и 0,5% казеина добавляли к каждой ячейке, и подвергали реакции в течение 2 часов при комнатной температуре.

После промывания планшета пять раз 0,1% Твин 20 в PBS, 50 мкл 0,2 М лимоннокислого буфера (pH5), содержащего 300 мкг/мл ABTS и 0,006% перекиси водорода, добавляли к каждой ячейке и накрывали в течение 20-30 минут при комнатной температуре для реакции. Измеряли OD<sub>405</sub>.

С другой стороны, очищенный мышинный IgG (производимый CAPPEL LABORATORIES, INC.) вместо образцов сыворотки растворяли в 0,5% казеине-PBS в различных концентрациях и подвергали таким же процедурам, как описано выше, для получения рабочей кривой. На основании этой рабочей кривой рассчитывали уровень общего IgG в образцах сыворотки.

### Пример 2

(Сравнение эффекта различных молочнокислых бактерий)

Каждый из штаммов молочнокислых бактерий, показанных в таблице 1, заранее

культивировали в среде MRS в течение ночи при 37°C, и клетки собирали

центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. 9% (мас./об.) восстановленного снятого молока (содержащего 0,1% (мас./об.) экстракта дрожжей (производимого DIFCO)) сбраживали с собранными клетками при 37°C, пока молоко не сворачивалось. После сбраживания измеряли общее число клеток в каждом кисломолочном продукте. Результаты

показаны в таблице 1.

Таблица 1	
Штамм	Общее количество клеток (клетки/мл)
Lactobacillus acidophilus CL92 (BP-4981)	1,9 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus bulgaricus CP1812	1,5 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus fermentum CP34	5,3 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus helveticus CP790	2,4 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus johnsonii CP2551	2,7 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus plantarum CP2172	5,9 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus rhamnosus ATCC53103	1,0 x 10 <sup>8</sup>

Далее получали мышей с повышенным IgE таким же образом, как в примере 1 и OVA-IgE в крови измеряли на день 18 сенсibilизации таким же образом, как в примере 1. Мышей делили на группы по 10 мышей в группе с похожим средним уровнем OVA-IgE крови. Со

дня 19 по день 21 сенсibilизации различные кисломолочные продукты, показанные выше, несброженное 9% (мас./об.) восстановленное снятое молоко или несброженное 9%

(мас./об.) восстановленное снятое молоко, содержащее 750 мкг циклофосамида, вводили желудочно каждой группе мышей в дозах 1 мл в день в течение трех дней. На день 22

сенсibilизации образцы крови мышей были получены из глазных вен и получены образцы сывороток. Измеряли уровень OVA-IgE и общего IgG крови. В качестве контроля образец крови мыши, которая была таким же образом сенсibilизирована, но не получала

кисломолочного продукта или подобного, получали таким же образом и измеряли уровни OVA-IgE и общего IgG. Результаты показаны на фиг. 2.

Как показано на фиг. 2, в группах мышей, которым давали молоко, сброженное Lactobacillus acidophilus или Lactobacillus fermentum, достоверный ингибирующий эффект (p<0,01) на уровень OVA-IgE наблюдали по сравнению с группой, получавшей несброженное снятое молоко. Не наблюдалось достоверной разницы в уровне общего IgG в крови (не показано).

### Пример 3

Следовали методике примера 2, кроме того, что использовали штаммы молочнокислых бактерий, показанные в таблице 2. Результаты измерения общего количества клеток в каждом кисломолочном продукте показаны в таблице 2. Результаты измерений OVA-IgE в крови показаны на фиг. 3.

Таблица 2	
Штамм	Общее количество клеток (клетки/мл)

Lactobacillus acidophilus CL0062 (BP-4980)	4,4 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus gasseri CP2209	4,3 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus reuteri ATCC23272	9,6 x 10 <sup>8</sup>
Bifidobacterium breve CP2425	1,3 x 10 <sup>8</sup>

5 Как показано на фиг. 3, в группе мышей, которым давали молоко, сброженное Lactobacillus acidophilus, наблюдали достоверный ингибирующий эффект ( $p < 0,01$ ) на уровень OVA-IgE по сравнению с группой, получавшей несброженное снятое молоко. Не наблюдали достоверных различий в уровне общего IgG в крови (не показано).

10 Пример 4

(Подтверждение эффектов в более низкой дозе)

Штамм Lactobacillus acidophilus CL92 и штамм Lactobacillus fermentum CP34

соответственно прекультивировали в среде MRS в течение ночи при 37°C и клетки собирали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. Собранные клетки культивировали в среде MRS в течение ночи при 37°C и клетки собирали

15 центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. Количество клеток измеряли для каждого штамма и клетки суспендировали в 9% снятом молоке в концентрации 1 x 10<sup>6</sup> клеток на 1 мл для получения суспензий.

Далее, мышей с повышенным IgE получали таким же образом, как в примере 1, и OVA-IgE в крови измеряли на день 18 сенсibilизации таким же образом, как в примере 1.

20 Мышей делили на группы по 10 мышей в группе с похожим средним уровнем OVA-IgE крови. С дня 19 до 21 сенсibilизации вышеуказанные суспензии вводили желудочно каждой группе мышей в дозах 1 мл в день в течение трех дней. На день 22 сенсibilизации образцы крови мышей получали из глазных вен и получали образцы сыворотки. Измеряли уровни OVA-IgE и общего IgE в крови. Результаты показаны на фиг. 4.

Как показано на фиг. 4, в обеих группах мышей, получавших штамм Lactobacillus acidophilus CL92 или Lactobacillus fermentum CP34, наблюдали достоверный ингибирующий эффект на уровень OVA-IgE по сравнению с группой, которой давали несброженное снятое

30 молоко. Не наблюдали достоверной разницы в уровне общего IgG в крови (не показано).

Скорость снижения  $d$  уровня OVA-IgE, когда вводили каждую суспензию, получали по формуле  $d = 1 - (b/a)$ , где  $a$  представляет собой стандартное отношение уровня OVA-IgE при потреблении несброженного снятого молока и  $b$  представляет собой стандартное отношение OVA-IgE при потреблении каждой суспензии. Обозначая концентрацию клеток суспензии, вводимой мышам  $s$  (клеток/мл), и принимая, что  $s$  пропорциональна скорости

35 снижения  $d$ , количество клеток  $x$  (клетки/мл) в суспензии, требуемое для снижения уровня OVA-IgE наполовину, в данной экспериментальной системе получали по формуле  $x = (s \cdot 0,5)/d$ . Используя эту формулу, получали количество клеток  $x$  для каждого бактериального штамма, используемого в примерах 2 и 3. Результаты показаны в таблице 3.

40

Таблица 3	
Штамм	Требуемое количество клеток (клетки/мл)
Lactobacillus acidophilus CL92 (BP-4981)	1,0 x 10 <sup>6</sup>
Lactobacillus bulgaricus CP1812	2,0 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus fermentum CP34	1,4 x 10 <sup>6</sup>
Lactobacillus helveticus CP790	3,3 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus johnsonii CP2551	3,5 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus plantarum CP2172	7,0 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus rhamnosus ATCC53103	2,9 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus acidophilus CL0062 (BP-4980)	5,0 x 10 <sup>8</sup>
Lactobacillus gasseri CP2209	3,1 x 10 <sup>9</sup>
Lactobacillus reuteri ATCC23272	3,3 x 10 <sup>9</sup>
Bifidobacterium breve CP2425	1,1 x 10 <sup>9</sup>

50

Пример 5

(Клинический эффект у людей)

Тринадцать субъектам, страдающим от круглогодичного аллергического ринита (средний возраст  $22,9 \pm 6,1$ , 6 мужчин и 7 женщин), давали, после 2 недель периода наблюдения, 100 мл/день кисломолочного продукта, содержащего от  $8,0 \times 10^8$  до  $1,3 \times 10^9$  клеток/мл штамма *Lactobacillus acidophilus* CL92 в течение 4 недель. В интервалах оценивали опросники о субъективных симптомах и на основаниях ответов симптомы оценивали в соответствии с «Классификацией тяжести аллергического ринита» принятой Японским обществом аллергологии. Симптомы ринита диагностировали в периоды в соответствии с руководством Японского Общества Аллергологии. Образцы крови получали от субъектов с интервалами, и измеряли титры IgE в крови. Кроме того, во время периода исследования записывали самую низкую температуру дня. Тяжесть (степень) заложенности носа у субъекта, частота чихания и самая низкая температура дня в течение периода исследования показаны на фиг. 5 и 6.

В течение периода исследования наиболее низкая температура дня колебалась значительно от  $14^\circ\text{C}$  на первый день потребления (15 ноября) до  $3,7^\circ\text{C}$  в последний день потребления (13 декабря) более чем на  $10^\circ\text{C}$ . Даже в таких условиях, ухудшающих симптомы ринита, заложенность носа имела тенденцию к уменьшению через две недели после начала потребления (тест Вилкоксона:  $p < 0,1$ ), и значительное улучшение наблюдали через четыре недели после начала (тест Вилкоксона:  $p < 0,05$ ). Частота чихания также имела тенденцию к снижению через три недели после начала потребления (тест Вилкоксона:  $p < 0,1$ ). В течение периода потребления наблюдали тенденцию к снижению частоты чихания, ослабление отека внутренней носовой раковины и снижение титра общего IgE в крови.

#### Формула изобретения

1. Противоаллергический агент, включающий в качестве активного ингредиента молочнокислую бактерию штамма, выбранного из *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций.

2. Применение молочнокислой бактерии, выбранной из штамма *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций для облегчения аллергии.

3. Применение по п.2, где указанная аллергия является аллергическим ринитом.

4. Способ уменьшения симптомов аллергии, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективной дозы противоаллергического активного ингредиента, включающего молочнокислую бактерию, выбранную из штамма *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций.

5. Способ по п.4 уменьшения симптомов аллергии, связанной с повышенным уровнем IgE, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективной дозы противоаллергического активного ингредиента, включающего молочнокислую бактерию, выбранную из штамма *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4980), *Lactobacillus*

acidophilus CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций.

5 6. Противоаллергический агент для уменьшения симптомов аллергии, связанной с повышенным уровнем IgE, включающий в качестве активного ингредиента молочнокислую бактерию, выбранную из штамма *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4980),  
10 *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинацию.

7. Применение молочнокислой бактерии, выбранной из штамма *Lactobacillus acidophilus* CL0062 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под  
15 номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL92 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-4981) и *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонированного в Международном Патентном Депозитории организмов, под номером FERM BP-8383), а также их комбинаций для уменьшения симптомов аллергии введением в продукт питания или смешением с ним.

20

25

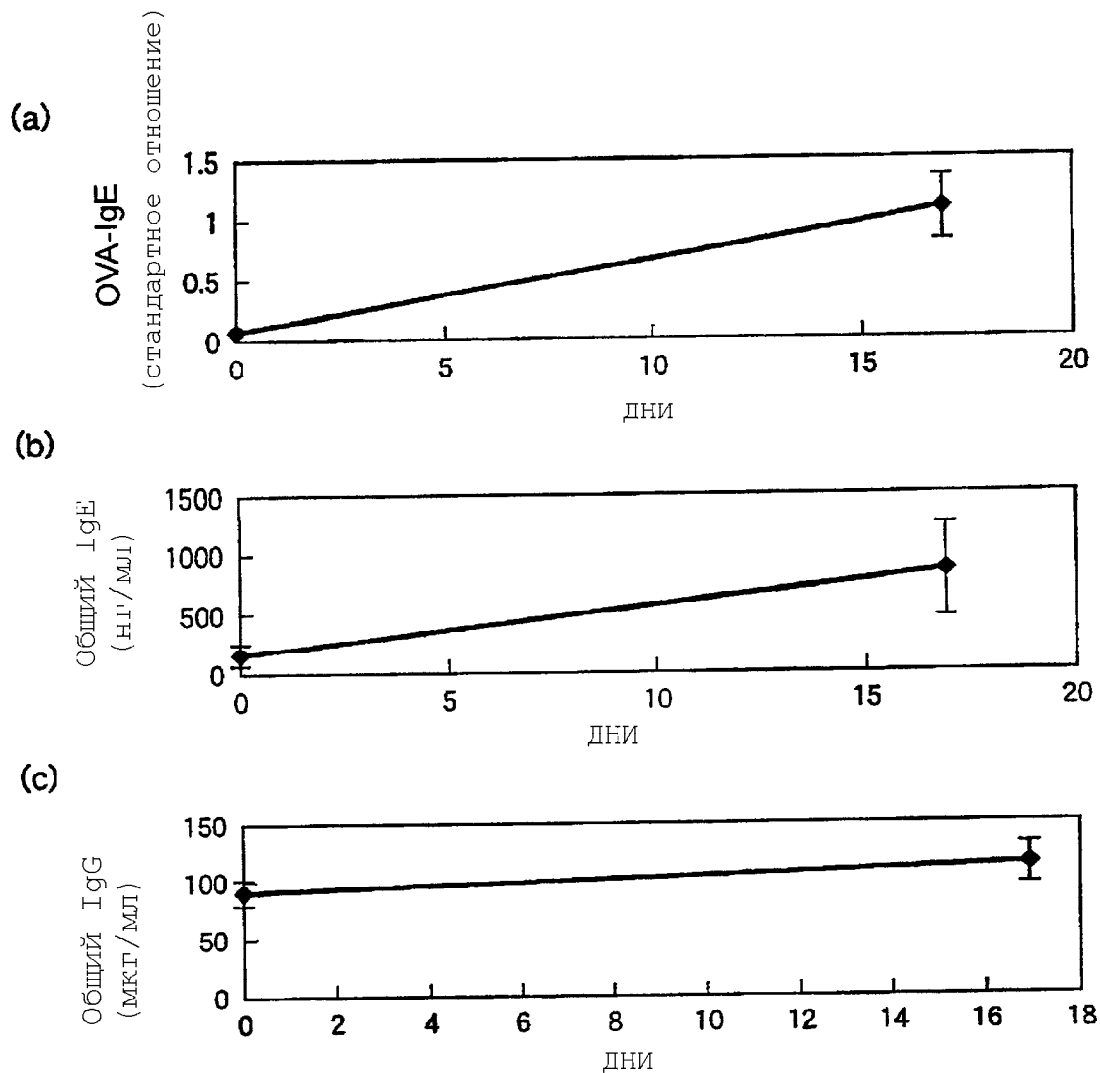
30

35

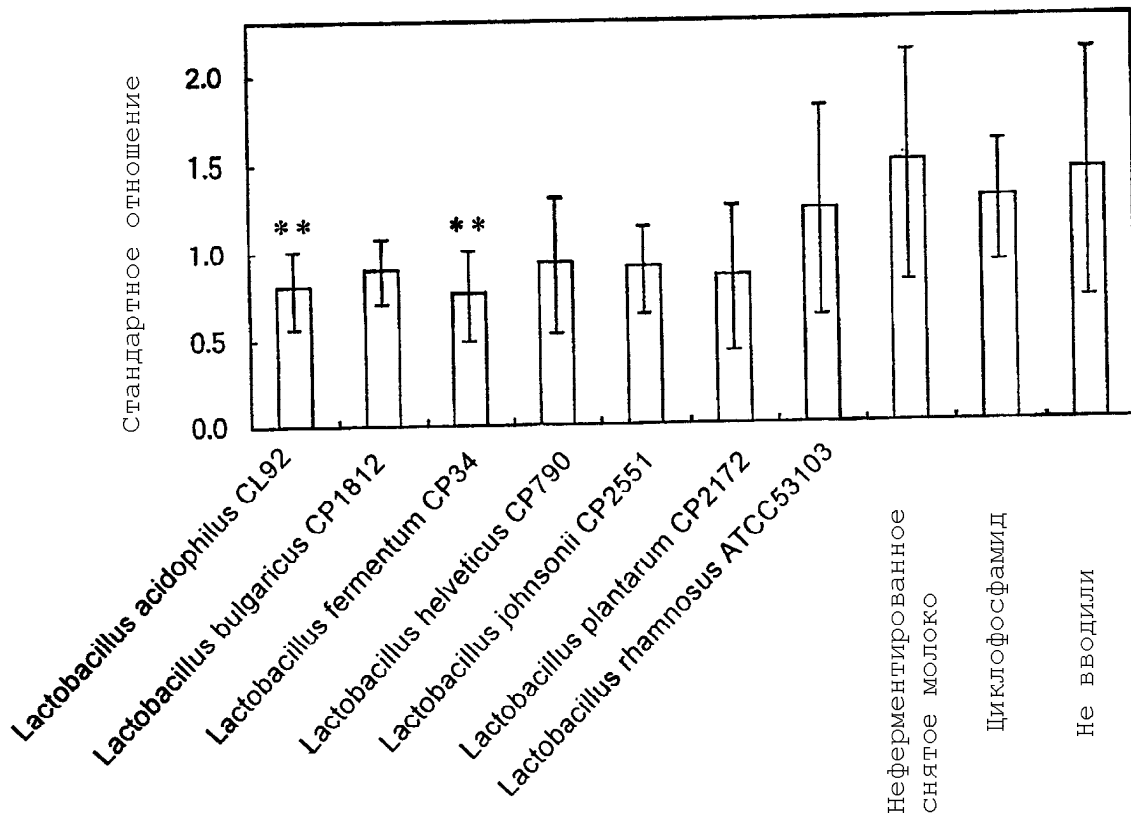
40

45

50

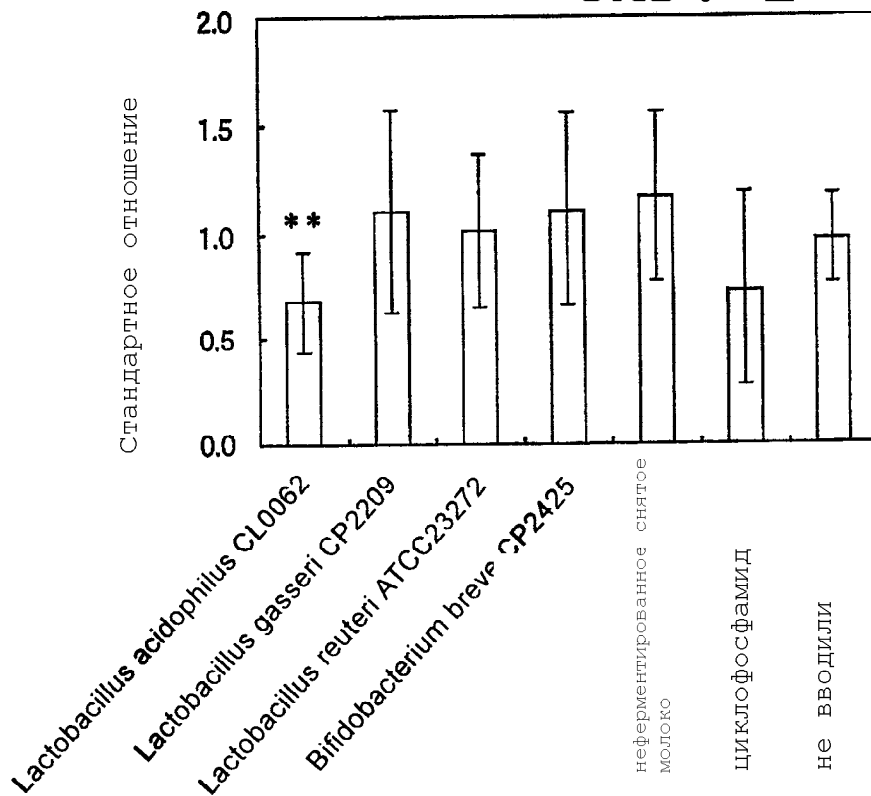


ФИГ. 1



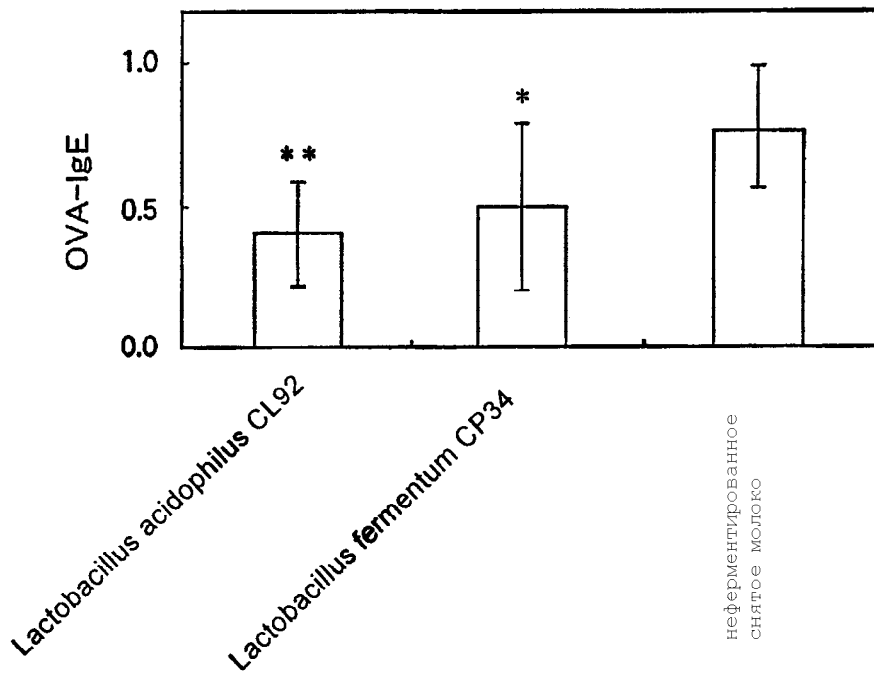
\*\* :  $p < 0.01$  по отношению к неферментированному снятому молоку

**ФИГ. 2**



\*\* :  $p < 0.01$  по отношению к неферментированному снятому молоку

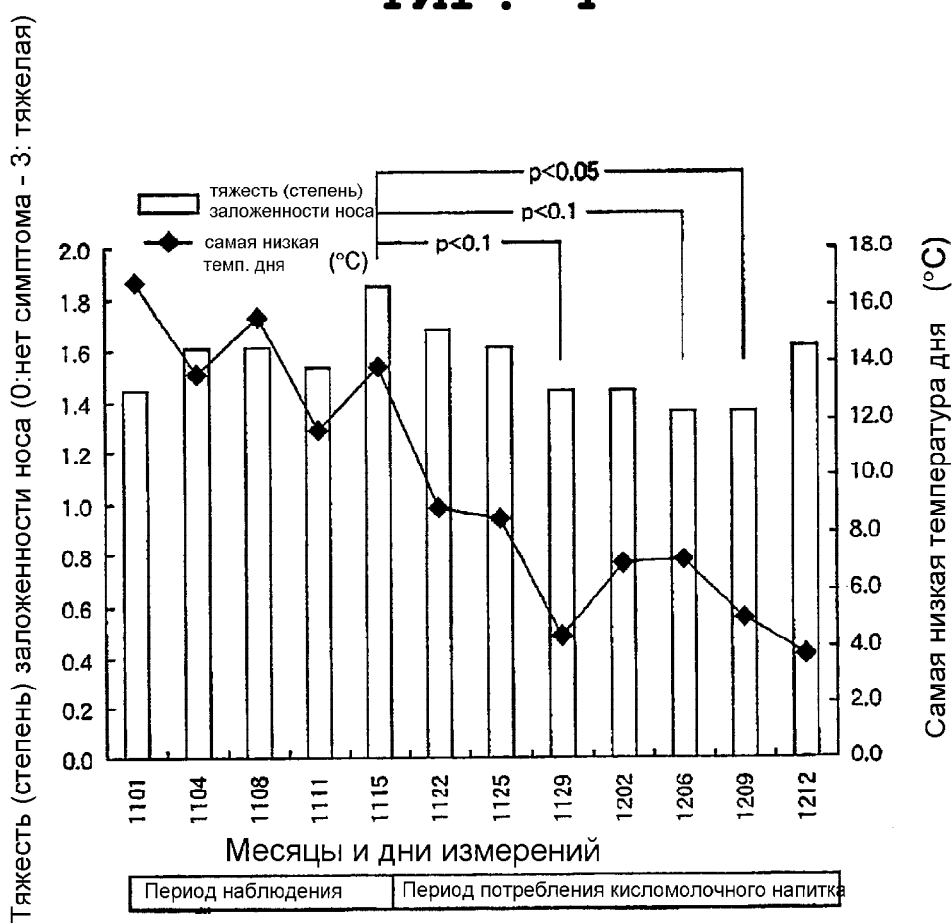
**ФИГ. 3**



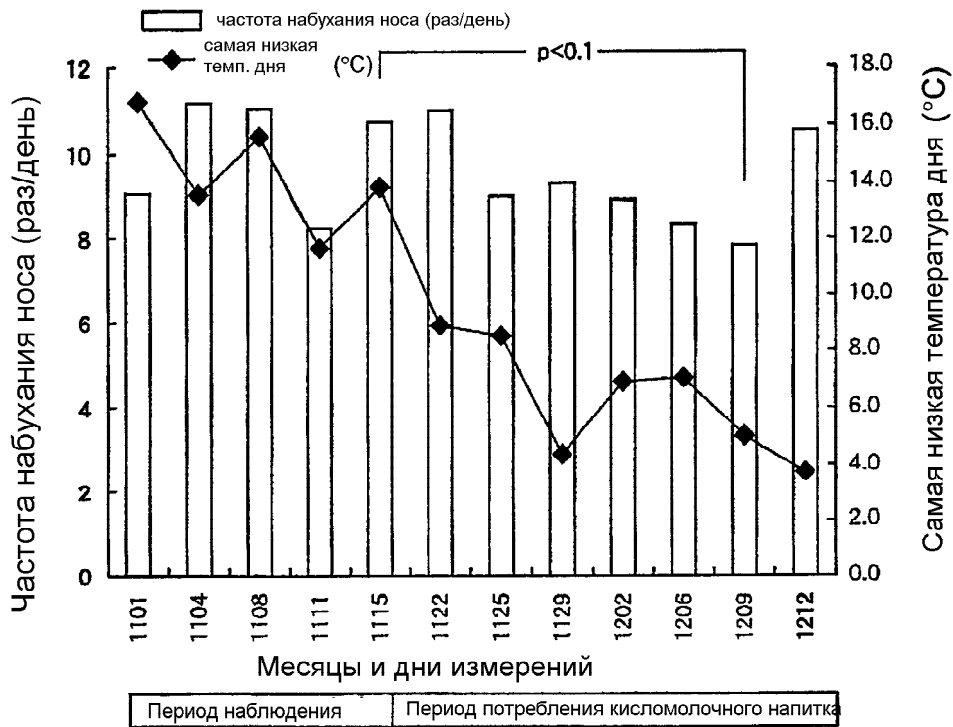
\*:  $p < 0.05$  по отношению к неферментированному снятому молоку

\*\* :  $p < 0.01$  по отношению к неферментированному снятому молоку

**ФИГ. 4**



**ФИГ. 5**



ФИГ. 6