



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001127527/13, 02.03.2000

(24) Дата начала действия патента: 02.03.2000

(30) Приоритет: 11.03.1999 (пп.1-3) EP 99104922.2

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2003

(45) Опубликовано: 10.03.2005 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 9806411 A, 19.02.1998. EP 0577903 A, 12.01.1994. EP 0861905 A, 02.09.1998. ШЕНДЕРОВ Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т.И. - М., 1998, Грантъ, с.91-94.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 11.10.2001

(86) Заявка РСТ:
EP 00/01798 (02.03.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/53202 (14.09.2000)

Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):

РЕНЬЕРО Роберто (CH),
БРЮССОУ Гаральд (CH),
РОША Флоранс (CH),
ФОН ДЕР ВАЙД Тьерри (CH),
БЛУМ-СПЕРИЗЕН Стефани (CH),
НЕЗЕР Жан-Ришар (CH),
СЕРВЭН Ален (FR)

(73) Патентообладатель(ли):

СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ С.А. (CH)

(54) ШТАММ LACTOBACILLUS PARACASEI CNCM I-2116 (NCC 2461), ОБЛАДАЮЩИЙ СПОСОБНОСТЬЮ ПРЕДОТВРАЩАТЬ КОЛОНИЗАЦИЮ КИШЕЧНИКА ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ, ВЫЗЫВАЮЩИМИ ДИАРЕЮ, И ПРЕДОТВРАЩАТЬ ЗАРАЖЕНИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК КИШЕЧНИКА РОТАВИРУСАМИ, ПИЩЕВОЙ ПРОДУКТ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ДИАРЕЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, может быть использовано в пищевой промышленности и медицине при профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с диареей. Штамм Lactobacillus paracasei CNCM I-2116 (NCC 2461) способен прикрепляться к слизистой оболочке кишечника млекопитающего и расти в присутствии до 0,4% солей желчных кислот и предотвращать заражение эпителиальных клеток кишечника ротавирусами. Пищевой продукт характеризуется содержанием от $1 \cdot 10^5$ до

$1 \cdot 10^{12}$ КОЕ штамма L.paracasei I-2116 (NCC 2461)/г пищевого носителя, выбранного из молока, йогурта, творога, сыра, сухого молока, детского питания и т.п. Фармацевтическая композиция содержит эффективное количество КОЕ штамма L.paracasei CNCM I-2116 (NCC 2461) или надосадочной фракции его культуры и физиологически приемлемый носитель. Изобретение обеспечивает высокий уровень активности против SA-11 серотина 3 и ротавируса Nochi серотипа 4. 3 н.п. ф-лы, 9 ил., 1 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 247 569** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 35/74, C 12 N 1/20, A 23 C 9/152, A 23 L 1/29/(C 12 N 1/20, C 12 R 1:225)**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001127527/13, 02.03.2000**

(24) Effective date for property rights: **02.03.2000**

(30) Priority: **11.03.1999 (cl.1-3) EP 99104922.2**

(43) Application published: **20.07.2003**

(45) Date of publication: **10.03.2005 Bull. 7**

(85) Commencement of national phase: **11.10.2001**

(86) PCT application:
EP 00/01798 (02.03.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/53202 (14.09.2000)

Mail address:
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**

(72) Inventor(s):

**REN'ERO Roberto (CH),
BRJuSSOU Garal'd (CH),
ROShA Florans (CH),
FON DER VAJD T'erri (CH),
BLUM-SPERIZEN Stefani (CH),
NEZER Zhan-Rishar (CH),
SERVEhN Alen (FR)**

(73) Proprietor(s):

SOS'ETE DE PRODUIT NESTLE S.A. (CH)

(54) **STRAIN LACTOBACILLUS PARACASEI CNCM I-2116 (NCC 2461) ELICITING ABILITY TO PREVENT COLONIZATION OF INTESTINE WITH DIARRHEA-CAUSING PATHOGENIC MICROORGANISMS AND TO PREVENT INFECTION OF INTESTINE EPITHELIAL CELLS WITH ROTAVIRUSES, FOODSTUFF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PROPHYLAXIS AND/OR TREATMENT OF DIARRHEA-ASSOCIATED DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, food industry, medicine, microbiology.

SUBSTANCE: invention relates to the strain that can be used in prophylaxis and/or treatment of diarrhea-associated diseases. The strain *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461) is able to attach to mammal intestine mucosa tissue and to grow in the presence of bile acid salts in their concentrations up to 0.4% and to prevent infection of intestine epithelial cells by rotaviruses. A foodstuff comprises from 1×10^5 to 1×10^{12} CFU of

the strain *L. paracasei* I-2116 (NCC 2461)/g of a food carrier taken among milk, yogurt, curd, cheese, dry milk, children's nutrition and so on. Pharmaceutical composition contains the effective amount of CFU of the strain *L. paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461) or supernatant of its culture and physiologically acceptable carrier. Invention provides the high level of activity against SA-11 of serotype 3 and rotavirus HoChi of serotype 4.

EFFECT: valuable medicinal properties of strain.
4 cl, 9 dwg, 1 tbl, 11 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым микроорганизмам рода *Lactobacillus*, которые применимы для предотвращения (профилактики) диареи, вызванной как патогенными бактериями, так и ротавирусами соответственно. В частности, настоящее изобретение касается использования упомянутых микроорганизмов для приготовления пищевого носителя и содержащей их композиции.

Уровень техники

Организмы, вырабатывающие молочную кислоту в качестве основного метаболического компонента, известны уже в течение длительного времени. Такие бактерии могут быть обнаружены в молоке или на фабриках по переработке молока, соответственно в живых или разлагающихся растениях, а также в кишечнике человека и животных. Такие микроорганизмы, известные под общим названием "молочнокислых бактерий", представляют собой весьма неоднородную группу и включают, например, роды *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* и др.

Молочнокислые бактерии могут быть использованы в качестве ферментирующих агентов для консервирования пищевых продуктов, преимущества которых связаны с низким pH и действием продуктов ферментации, образующихся в результате их ферментационной активности по подавлению роста гнилостных бактерий. С учетом этого молочнокислые бактерии используют для приготовления различных пищевых продуктов, таких как сыр, йогурт и другие ферментированные молочные продукты.

Недавно молочнокислые бактерии стали объектом пристального внимания в связи с тем, что для некоторых штаммов были установлены ценные для человека и животных свойства, проявляемые после попадания в организм с пищей. В частности, для конкретных штаммов родов *Lactobacillus* или *Bifidobacterium* была установлена способность колонизировать слизистую кишечника и способствовать поддержанию хорошего самочувствия у человека и животного.

В этом отношении европейская патентная заявка EP 0-768375 описывает конкретные штаммы рода *Bifidobacterium*, которые способны имплантироваться в кишечную флору и могут соединяться с клетками кишечника. Было сообщено, что такие *Bifidobacterium* способствуют иммуномодуляции и способны по конкурентному механизму исключать адгезию патогенных бактерий на кишечных клетках, тем самым способствуя поддержанию здоровья субъекта.

В последние несколько лет исследования также были сосредоточены на возможном использовании молочнокислых бактерий в качестве пробиотических средств. Под пробиотическими средствами понимаются препараты живых микробов, которые способствуют здоровью субъекта за счет защиты нативной микрофлоры кишечника. Обычно микробный препарат может быть принят как пробиотический в том случае, когда активные микробы в его составе и характер их активности известны. Считается, что пробиотические средства присоединяются к слизистой кишечника, колонизируют пищеварительный тракт и тем самым предотвращают присоединение к нему опасных микроорганизмов. Ключевая предпосылка их действия состоит в том, что они должны достигать слизистой кишечника будучи активными и живыми, не подвергаясь разрушению в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, особенно под влиянием низких pH, характерных для желудка.

В связи с этим международная патентная заявка WO 97/00078 описывает конкретный штамм, обозначенный *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) в качестве такого пробиотического средства. В частности, данный микроорганизм используется в способе профилактики или лечения реакций гиперчувствительности пищевой этиологии таким образом, что его вводят реципиенту наряду с пищевым продуктом, который был подвергнут гидролитической обработке с помощью пепсина и/или трипсина. Выбранный штамм *Lactobacillus* описан как проявляющий адгезивные и колонизирующие свойства и обладающий протеазной системой таким образом, что входящий в состав вводимого пищевого продукта белковый материал дополнительно гидролизует под действием протеаз, секретируемых данным конкретным

штаммом

Lactobacillus. Обсуждаемый в указанном документе способ в конечном счете должен приводить в поглощению белкового продукта кишечником в таком виде, который не содержит существенного количества какого-либо аллергенного материала.

5 Кроме того, ссылка на европейскую патентную заявку EP 0-577903 сделана в связи с использованием таких молочнокислых бактерий, обладающих способностью вытеснять *Helicobacter pylori*, известной в качестве возбудителя развития язвенной болезни, при приготовлении носителя, предназначенного для лечения или профилактики язвенной болезни, связанной с действием *Helicobacter pylori*.

10 В международной патентной заявке WO 99/29833 описан конкретный штамм LMG-P-17806, несущий три плазмиды определенного размера. Описано, что данный штамм способен защищать клетки кишечника от инвазии сальмонеллой *Salmonella typhimurium*,

Учитывая возможность получения известных ценных свойств конкретных штаммов молочнокислых бактерий, в данной области техники имеется необходимость в
15 дополнительных штаммах молочнокислых бактерий, которые бы имели преимущества в обеспечении благополучного состояния человека и/или животного.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является представление дополнительных бактериальных штаммов, которые проявляют новые свойства, полезные для человека
20 и/или животного.

Указанная выше задача была решена путем представления новых микроорганизмов, а именно молочнокислых бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus*, свойствами которых является способность предотвращать колонизацию кишечника патогенными бактериями, вызывающими (диарею) понос, и предотвращать заражение клеток кишечного эпителия
25 ротавирусами. В соответствии с предпочтительным вариантом штаммы *Lactobacillus* способны соединяться со слизистой кишечника организма-реципиента и способны в существенной степени колонизировать ее.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом штаммы *Lactobacillus* способны расти в присутствии вплоть до 0,4% солей желчных кислот, благодаря чему они
30 смогут легко проходить по желудочно-кишечному тракту, по существу сохраняя свою активность.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом молочнокислую бактерию выбирают из группы, которая включает *Lactobacillus rhamnosus* или *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei*, а наиболее предпочтительно *Lactobacillus*
35 *paracasei* CNCM I-2116.

Как было показано, микроорганизмы по настоящему изобретению проявляют следующие свойства: они являются грамположительными, негативными по каталазе, негативными по NH_3 -образованию аргинина и негативными по выработке CO_2 . Они вырабатывают L(+)-молочную кислоту, способны расти в присутствии солей желчных кислот в
40 концентрации вплоть до 0,4% и могут в существенной степени предотвращать заражение эпителиальных клеток ротавирусами.

Новые микроорганизмы могут быть использованы для приготовления различных пищевых материалов-носителей, таких как молоко, йогурт, творог, ферментированное молоко, ферментированные молочные продукты, ферментированные продукты
45 переработки хлебных злаков, порошковое молоко, детское питание, и могут быть включены в состав носителей в количестве от примерно 10^5 КОЕ/г до примерно 10^{11} КОЕ/г. Для целей настоящего изобретения аббревиатура "КОЕ" должна соответствовать "колониобразующей единице", которая определяется как число бактериальных клеток, исходя из микробиологических подсчетов на агаровых пластинах.

50 Также настоящее изобретение представляет пищевой продукт или фармацевтическую композицию, содержащие, по крайней мере, один из штаммов *Lactobacillus*, обладающий указанными выше признаками.

Для приготовления пищевой композиции по настоящему изобретению, по крайней мере,

один из штаммов *Lactobacillus* по настоящему изобретению вносят в подходящий носитель в количестве от примерно 10^5 КОЕ/г до примерно 10^{11} КОЕ/г, предпочтительно от примерно 10^6 КОЕ/г до примерно 10^{10} КОЕ/г, более предпочтительно от примерно 10^7 КОЕ/г до примерно 10^9 КОЕ/г.

В случае фармацевтической композиции продукт может быть приготовлен в виде таблеток, жидких бактериальных суспензий, сухих пищевых добавок, влажных пищевых добавок, сухих пищевых тубиков или влажных пищевых тубиков и т.п. при количестве вносимых в их состав штаммов *Lactobacillus* в диапазоне вплоть до 10^{12} КОЕ/г, предпочтительно от примерно 10^7 КОЕ/г до примерно 10^{11} КОЕ/г, более предпочтительно от примерно 10^7 КОЕ/г до примерно 10^{10} КОЕ/г.

Активность новых микроорганизмов в кишечнике субъекта по сути своей зависит от дозы. Следовательно, чем больше новых микроорганизмов попадает вместе с указанным выше пищевым продуктом или фармацевтической композицией, тем сильнее защитная и/или терапевтическая активность микроорганизмов. Поскольку новые микроорганизмы не являются вредными для человека и животных и, в конечном счете, были выделены из детских испражнений, то значительное их количество может быть включено таким образом, чтобы значительная часть кишечника субъекта была колонизирована новыми микроорганизмами.

Краткое описание фигур

На фигуре 1 показана схема, отображающая скрининг клеточных культур в целях оценки противоротавирусных защитных свойств бактериальных штаммов.

На фигуре 2 показано подкисление культуры *L.casei* штамма CNMC I-2116 (обозначенного ST11) в различных питательных средах.

На фигуре 3 показана выживаемость *L.casei* штамма ST11 при 10°C , измеренная в течение 30 дней.

На фигуре 4 показаны параметры мРНК IL-12 и IL-10 в адherentных мышинных клетках, производных от клеток костного мозга, после инкубации этих клеток с различными разведениями ST11.

На фигуре 5 показан результат дифференцировки Th2, выражающийся в снижении выработки IL-4.

На фигуре 6 показана схема, иллюстрирующая результаты эксперимента по культивированию клеток, в котором культивируемые клетки ST11 используют в тесте на подавление адгезии патогенных бактерий *E.coli* к эпителиальным клеткам.

На фигуре 7 приведена схема, показывающая результаты эксперимента по культивированию клеток, в котором надосадочную фракцию культуры ST11 используют в тесте на подавление адгезии патогенных бактерий *E.coli* к эпителиальным клеткам.

На фигуре 8 показана схема, иллюстрирующая результаты эксперимента по культивированию клеток, в котором культивируемые клетки ST11 используют в тесте на подавление инвазии *Salmonella typhimurium* к эпителиальным клеткам.

На фигуре 9 показана схема, иллюстрирующая результаты эксперимента по культивированию клеток, в котором надосадочную фракцию культуры ST11 используют в тесте на подавление инвазии *Salmonella typhimurium* в эпителиальные клетки.

Подробное раскрытие изобретения

В ходе интенсивных исследований, приведших к настоящему изобретению, авторы исследовали детские испражнения и выделили из них ряд различных бактериальных штаммов. После этого штаммы были проанализированы по их способности предотвращать заражение эпителиальных клеток ротавирусами и патогенными бактериями, известными как вызывающие диарею.

Некоторые роды бактерий, включая *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, подвергали скринингу по их ингибирующей способности. По существу тесты проводили с тремя ротавирусными серотипами, представляющими основные этиологические группы возбудителей вирусной диареи человека (серотипы G1, G3 и G4), а также с патогенными

E.coli и *Salmonella typhimurium*, являющимися представителями патогенных микроорганизмов, вызывающих понос у пораженного субъекта.

Различные молочнокислые бактерии выращивали в подходящей культуральной среде, такой как MRS, Hugo-Jago или M17, при температуре от примерно 30 до 40°C, в соответствии с оптимальной для их роста температурой. По достижении фазы стационарного роста культуры бактерий собирали центрифугированием и ресуспендировали в физиологическом растворе NaCl. Между проведением различных тестов бактериальные клетки хранили замороженными (-20°C).

Тесты с ротавирусами

Различные вирусные штаммы были получены путем заражения монослоев слившихся клеток. Перед заражением проводили инкубацию ротавирусов. Клетки инфицировали 20 инфекционными для тканевых культур дозами. Для оценки противоротавирусных свойств использовали два способа. В соответствии с одним из них различные бактериальные штаммы анализировали по их непосредственному взаимодействию с ротавирусами, а в другом способе бактерии подвергали скринингу с целью нахождения таких штаммов, которые взаимодействуют с клеточными ротавирусными рецепторами. Первый способ включает контактирование каждой соответствующей суспензии бактерий с отдельным ротавирусным штаммом и инкубацию в подходящей культуральной среде. После этого смесь бактерий с вирусами наносили на монослой клеток недифференцированной клеточной линии HT-29 аденомы толстой кишки человека, после чего продолжали инкубацию. После этого оценивали размножение вирусов. Второй способ включает инкубацию соответствующей бактериальной суспензии сначала вместе с клеточным монослоем недифференцированной клеточной линии HT-29 аденомы толстой кишки человека и затем добавление вируса. После инкубации оценивали размножение вируса. Размножение ротавирусов можно легко оценить с помощью гистоиммунологического окрашивания ротавирусных белков в инфицированных клетках. Эффект по подавлению ротавирусов считается присущим данной бактерии тогда, когда число инфицированных клеток в культуре, зараженной ротавирусом вместе с указанной бактерией, снижается на 90% по сравнению с клетками, инокулированными только ротавирусом.

Из общего числа в 260 различных исходно выделенных бактериальных штаммов только для 9 удалось выявить существенное подавление размножения ротавирусов. Различные бактерии были идентифицированы как относящиеся к роду *Lactobacillus* вида *ghamosus* или *paracasei*. Один штамм, обозначенный как *Lactobacillus casei* ST11, который был депонирован в соответствии с Будапештским Договором с получением депозитарного номера NCC-2461 (I-2116), как было показано, является исключительно эффективным в предотвращении заражения клеток человека ротавирусом. Более того, данный конкретный штамм проявляет отличные ростовые качества, что можно видеть при подкислении различных культуральных сред. Этот штамм также характеризуется хорошей устойчивостью, на что указывает уровень выживаемости в ходе хранения при низких температурах на уровне примерно 10°C, что делает его отличным перспективным компонентом для включения в состав пищевых продуктов или фармацевтических композиций, для которых предусматривается хранение в условиях холодильника.

Тесты на антипатогенные бактерии

Для оценки антибактериальных свойств были выбраны следующие подходы. В соответствии с одним из способов культивируемые штаммы *Lactobacillus* по настоящему изобретению были исследованы на их способность предотвращать адгезию патогенных бактерий, вызывающих диарею, с клетками кишечника или инвазию в кишечные клетки соответственно. Для этого клетки кишечника контактировали с патогенными бактериями и культивируемыми штаммами *Lactobacillus* по настоящему изобретению с последующей оценкой уровня адгезии или инвазии соответственно. В соответствии со вторым способом надосадочную фракцию культуры клеток штаммов *Lactobacillus* по настоящему изобретению добавляли вместе с патогенными микроорганизмами к клеткам кишечника с последующей оценкой уровня адгезии или инвазии соответственно. В процессе

эксперимента можно видеть, что подтверждается исключительная эффективность культивируемых молочных бактерий и надосадочной фракции в предотвращении как адгезии, так и инвазии клеток кишечника: это указывает на то, что соединения-метаболиты, секретлируемые новыми микроорганизмами, по-видимому, обеспечивают противодиарейную

5 активность, направленную на патогенную бактерии.

В дополнение в сказанному выше неожиданно удалось установить, что штаммы также проявили противоаллергические свойства благодаря тому, что упомянутые штаммы участвуют в регуляции синтеза различных иммунных модуляторов.

В целом известно, что гуморальные иммунные ответы и аллергические реакции опосредуются Т-лимфоцитами CD4⁺ фенотипа Th2. Клетки Th2 характеризуются

10 выработкой высоких уровней интерлейкина-4 (IL-4) - цитокина, необходимого для секреции IgE, который представляет собой основной класс иммуноглобулинов, связанных с аллергическими реакциями.

Дифференцировка клеток Th2 нарушается γ -интерфероном цитокином, происходящим

15 от проявляющей эффект взаимного исключения популяции CD4-позитивных Т-клеток фенотипа Th1. Упомянутые клетки Th1, в свою очередь, интенсивно индуцируются интерлейкином-12 (IL-12). В противоположность этому другой цитокин - IL-10, - как было показано, обладает мощным эффектом супрессии в отношении пролиферации клеток Th1: следовательно, считается, что он участвует в иммуносупрессионных механизмах.

20 Таким образом, и IL-12 и IL-10 обладают мощным модулирующим действием в отношении дифференцировки Т-клеток CD4⁺ за счет влияния на развитие популяции Th1. IL-12 является ключевым регуляторным цитокином с точки зрения индукции дифференцировки Th1, что тем самым подавляет выработку ответов Th2. Основным механизмом подавления клеток Th2, следовательно, считается стимуляция синтеза IL-12

25 вспомогательными клетками.

Хорошо известно, что некоторые компоненты грамотрицательных бактерий, такие как липополисахариды (ЛПС), индуцируют высокие уровни IL-12 в адherentных ("прилипших") клетках, таких как макрофаги и дендритные клетки. Следовательно, было установлено, что грамотрицательные бактерии способны обуславливать существенный сдвиг

30 дифференцировки Т-клеток CD4⁺ в сторону фенотипа Th1.

Микроорганизм ST11, являющийся примером штамма *Lactobacillus* по настоящему изобретению, был протестирован на его возможное участие в индукции цитокинов, вовлеченных в регуляцию дифференцировки Т-клеток CD4⁺. В частности, было

35 исследовано влияние ST11 на фенотип Т-клеток CD4⁺, претерпевающих дифференцировку в направлении Th2.

В связи с этим способность ST11 индуцировать синтез мРНК, кодирующую эти два регуляторных цитокина в адherentных клетках, происходящих от костного мозга, сравнивали с 4 другими штаммами *Lactobacillus* и контрольными грамотрицательными

40 бактериями (*E.coli* K12). мРНК измеряли с помощью полуколичественной RT-PCR через 6 часов инкубации клеток с различными разведениями бактерий в диапазоне от 10⁹ до 10⁷ КОЕ/мл.

Хотя все штаммы *Lactobacillus* могут в некоторой степени индуцировать транскрипцию мРНК IL-12, штамм ST11, как было показано, оказывается наиболее мощным индуктором, потому что наиболее мощный сигнал в ПЦР может быть выявлен даже при наименьшей

45 дозе бактерий. Действительно, способность ST11 индуцировать транскрипцию мРНК IL-12 была такой же сильной, что и у *E.coli*. Индукция мРНК IL-10 была в целом слабее по сравнению с мРНК IL-12, поскольку только при наибольших дозах бактерий может быть выявлен сигнал. Однако ST11 был наиболее сильным индуктором мРНК IL-10 по

50 сравнению с другими молочными бактериями и контрольной *E.coli*.

Таким образом, считается, что ST11 будет индуктором иммунорегуляторных цитокинов, участвующих в дифференцировке Т-клеток CD4⁺. Его способность к интенсивной индукции IL-12 делает его вероятным средством подавления ответов Th2, а существенная индукция

им IL-10 может предотвращать воспалительные ответы.

В дополнение к указанным выше данным также анализировали, проявляет ли ST11 эффект по подавлению Т-клеток CD4⁺, претерпевающих дифференцировку в Th2, и положительное действие на функции Th1. Использовали хорошо отработанную систему культивируемых клеток, способных дифференцироваться, в которой Т-клетки-предшественники CD4⁺ активировали по поликлональному типу и направляли на дифференцировку в фенотип либо Th1, либо Th2, что зависело от типа костимулятора, включаемого в культуральную среду. Дифференцировку Th1/Th2 индуцировали в течение 7-дневной первичной культуры, после чего клетки повторно стимулировали в течение 2 дней во вторичной культуре, содержащей чистую питательную среду, а приобретение конкретного фенотипа (Th1 или Th2) оценивали путем определения типов цитокинов, секретируемых в надосадочную фракцию (γ-интерферон или IL-4).

Известно, что Т-клетки-предшественники CD4⁺ мышей генетического типа BALB/c предпочтительно дифференцируются в преобладающий фенотип Th2 (высокий уровень IL-4, низкий уровень γ-интерферона в надосадочных фракциях вторичной культуры) после активации в нейтральных условиях (только питательная среда в первичной культуре). Такой фенотип может быть полностью ревертирован в фенотип Th1 (высокий уровень γ-интерферона, низкий уровень IL-4) путем добавления в первичную культуру блокирующего моноклонального антитела, специфичного по отношению к IL-4.

Для изучения возможной роли ST11 в подавлении Th2 очищенные Т-клетки-предшественники CD4⁺ мышей BALB/c активировали в процессе первичного культивирования в присутствии адherentных клеток костного мозга, выполняющих функции вспомогательных клеток. Эти клетки культивировали совместно либо только в питательной среде либо в присутствии 1 мг/мл ЛПС, или 10⁸ КОЕ/мл ST11, или 10⁸ КОЕ/мл другого *Lactobacillus*. После этого клетки промывали, и Т-клетки CD4⁺ снова очищали и повторно стимулировали во вторичной культуре в "пустой" питательной среде. Цитокины, вырабатываемые дифференцированными Т-клетками CD4⁺, анализировали через 2 дня. Как и ожидалось, клетки, дифференцировавшиеся в присутствии только питательной среды, проявляли преобладающий фенотип Th2. Добавление ST11 в первичную культуру жестко изменяло результат Th2-дифференцировки, следствием чего являлось 8-кратное усиление выработки IL-4. Такое подавление было по уровню сходным с подавлением, наблюдаемом в культурах, происходящих от клеток, которые дифференцировались в присутствии ЛПС. Напротив, другие штаммы *Lactobacillus* не влияли в сколько-нибудь существенной степени на уровни IL-4. Интересно, что уровни γ-интерферона в результате добавления ST11 в первичные культуры не возрастали.

Таким образом, ST11 специфически нарушает выработку IL-4 Т-клетками CD4⁺, претерпевающими дифференцировку в Th2, но в существенной степени не увеличивает секрецию γ-интерферона. Тот факт, что ST11 не увеличивает выработку γ-интерферона, может объясняться его способностью индуцировать IL-10, следствием чего может являться поддержание низкой воспалительной активности, несмотря на его активность против Th2.

Следовательно, удалось показать, что ST11 является штаммом *Lactobacillus*, для которого характерно свойство эффективного противодействия Th2, что делает его прекрасным вероятным средством для использования в качестве бактерии, обладающей свойствами противоаллергического пробиотического средства.

Далее настоящее изобретение будет описано с помощью примеров, которые не должны восприниматься как ограничивающие, но как иллюстрирующие осуществимость изобретения

Культуральные среды и растворы

MRS (Difco)

Hugo-Jago (триптон Difco - 30 г/л, дрожжевой экстракт Difco - 10 г/л, лактоза Difco - 5 г/л, KН₂PO₄ - 5 г/л, мясной экстракт Difco - 2 г/л, агар Difco - 2 г/л)

M17 (Difco),

M199 (Seromed),
 физиологический раствор (Oxoid),
 ФСБ (NaCl - 8 г/л, KCl - 0,2 г/л, Na₂HPO₄ - 1,15 г/л, KH₂PO₄ - 0,2 г/л),
 триптозо-фосфатный бульон (Flow),
 раствор трипсина-ЭДТА (Seromed).

Ротавирус человека Wa (серотип G1) и обезьяний ротавирус SA-11 (серотип G3) были получены от P.A.Of fit. Children's Hospital of Philadelphia, США. Рекомбинантный вирус DS-1 xRRV был получен от A.Kapikian, NIH Bethesda, США. Серотип-4 ротавируса человека Hocht был получен от P.Bachmann, University of Munich, Германия. E.coli DAEC-C-1845 получили из Washington University, Seattle, а E.coli JPN15 получили из Center for Vaccine Development, University of Maryland, США. Salmonella typhimurium штамма SL1334 была получена из Department of Microbiology, Stanford University, CA, США.

Пример 1

Выделение молочнокислых бактерий из детских испражнений

Свежие фекалии были взяты из пеленок 16 здоровых детей в возрасте 15-27 дней. По 1 г свежих фекалий помещали в бескислородные условия для доставки в лабораторию, и микробиологический анализ проводили в течение 2 часов на материале серий разведений образца в физиологическом растворе путем высева на селективную среду. Агар MRS с антибиотиками (фосфомицин 80 мкг/мл, сульфаметоксазол 93 мкг/мл, триметоприм 5 мкг/мл), проинкубированный при 37°C в течение 48 часов, использовали для выделения молочнокислых бактерий. Колонии случайным образом вырезали и очищали. На материале изолятов определяли физиологические и генетические характеристики.

Пример 2

Тестирование штаммов в клеточной культуре на противоротавирусную активность

Некоторые роды бактерий, включая Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, были отобраны и протестированы на их представителей, которые проявляют противоротавирусную активность в тесте на ингибирование в клеточной культуре. Род Lactococcus был представлен единственным видом (L.lactis), включающим два подвида (L.lactis supsp. lactis и L.l.cremoris). Всего было протестировано 30 штаммов. Род Streptococcus был представлен единственным видом (S.thermophilus) с 45 штаммами. Роды Leuconostoc и Propionibacterium были представлены единственными видами (6 штаммов), в то время как роды Enterococcus и Staphylococcus были представлены двумя видами каждый, включая всего 17 штаммов.

Всего на активность по подавлению ротавирусов были протестированы 260 бактериальных штаммов.

1-й способ:

30 мкл бактериальной суспензии (содержащей в среднем 3×10^6 бактерий) смешивали с 70 мкл среды M199, дополненной 10% триптозо-фосфатного бульона (Flow) и 5% раствора трипсина-ЭДТА (Seromed) (в соотношении 1:4 в случае клеток HT-29), и 100 мкл вируса в дополненной среде M199. Смесь бактерий с вирусом инкубировали в течение 1 часа при 4 °C и в течение 1 часа при 37°C. Недифференцированные клетки аденомы толстой кишки человека HT-29, растущие до стадии слившегося монослоя на 96-луночных микротитровальных планшетах, трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ: pH 7,2). Смесь бактерий с вирусом добавляли к клеткам, и микротитровальные планшеты инкубировали в течение 18 часов в углекислотном инкубаторе (Heraeus). Размножение вируса оценивали в соответствии с описанным далее.

2-й способ:

30 мкл бактериальной суспензии (см. выше) смешивали с 70 мкл среды M199, дополненной 10% триптозо-фосфатного бульона (Flow) и 5% раствора трипсина-ЭДТА (Seromed) (в соотношении 1:4 в случае клеток HT-29), и вносили непосредственно в клетки на микротитровальных планшетах. После 1-часовой инкубации при 37°C к клеткам на микротитровальных планшетах добавляли 100 мкл вируса в дополненной среде M199. Инкубацию продолжали в течение 18 часов в углекислотном инкубаторе (Heraeus).

Размножение вируса оценивали в соответствии с описанным далее.

Размножение ротавирусов оценивали с помощью гисто-иммунологического окрашивания ротавирусных белков в инфицированных клетках в соответствии с описанным здесь далее.

5 Через день после инфицирования культуральную среду удаляли из микротитровальных планшетов, и клетки фиксировали абсолютным этиловым спиртом в течение 10 минут. Этанол удаляли, и планшеты трижды промывали в буфере ФСБ. После этого

50 мкл антиротавирусной сыворотки (в основном специфична в отношении белка VP6), сформированной кроликами (полученных от ISREC, University of Lausanne) и разведенной 10 1:2000 в ФСБ, добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 1 часа при 37 °C, накрыв покровным стеклом для предотвращения обсыхания лунок. После этого антисыворотку удаляли, и планшеты трижды промывали в ФСБ. Затем 50 мкл козьей антикроличьей иммуноглобулиновой-G (IgG) антисыворотки, соединенной с пероксидазой (GAR-IgG-PO; Nordic), добавляли в разведении 1:500 в ФСБ в каждую лунку, и планшеты 15 инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Сыворотку удаляли, и планшеты опять три раза промывали в ФСБ. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл следующей субстратной смеси: 10 мл 0,05 М Трис-гидрохлорида (pH 7,8), 1 мл H₂O₂ (30% Suprapur, разведение 1:600 в воде: Merck) и 200 мкл 3-амино-9-этилкарбазола (0,1 г на 10 мл этанола, хранение в 200-мкл аликвотах при -80°C; A-5754, Sigma). Планшеты инкубировали в течение по 20 крайней мере 30 минут при комнатной температуре. Субстрат удаляли, и лунки заполняли 200 мкл H₂O для остановки реакции. Очаги инфицированных клеток подсчитывали с помощью инверсионного микроскопа (Diavert, Leitz).

Только очень небольшое число бактериальных штаммов взаимодействовало с ротавирусами. Всего 9 из 260 исходно отобранных бактериальных клеток подавляли 25 размножение ротавирусов по крайней мере в одном из способов. *Lactobacillus paracasei* NCC-2461 (ST11) показала исключительно высокий уровень активности против ротавируса серотипа 1, ротавируса SA-11 серотипа 3 и ротавируса Nochi серотипа 4.

Пример 3

Культивирование клеток Caco-2

30 Для тестов на подавление (патогенных) бактерий клеточную линию Caco-2 использовали в качестве модели кишечника. Для этой клеточной линии характерны такие свойства кишечных клеток, как, например, поляризация, экспрессия кишечных ферментов, выработка специфичных структурных полипептидов и т.п.

35 Клетки культивировали на трех разных носителях, а именно на корнинговских пластмассовых чашках (25 см²: Corning) для роста и размножения, на обезжиренных и стерилизованных 6-луночных стеклянных планшетах (22 × 22 мм; Corning) для тестов на адгезию и на 24-луночных стеклянных планшетах (Corning) для тестов на ингибирование.

Со второго дня культивирования питательную среду (DMEM) заменяли ежедневно. 40 Перед использованием культуральную среду дополняли 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина, 1 мкг/мл амфотерина и 20% ПТС, инактивированной нагреванием до 56°C в течение 30 минут. Культивирование проводили при 37°C в атмосфере, содержащей 90% воздуха и 10% CO₂. Клетки расщепляли каждые шесть дней. Клетки отделяли от стенок лунок с помощью обработки ФСБ с 0,25% трипсина и 3 мМ ЭДТА 45 при pH 7,2. Для нейтрализации действия трипсина равный объем ПТС добавляли к полученной клеточной суспензии, смесь центрифугировали (10 минут при 1000 об/мин), и полученный осадок опять ставили в культуру. Примерно 3,5×10⁵ клеток переносили в новый сосуд для культивирования и культивировали до стадии слияния монослоя.

Пример 4

50 Культивируемые бактерии ST11:

Бактериальный штамм хранили при -20°C в культуральной среде MRS, содержащей 15% глицерина. Этот штамм культивировали при бескислородных условиях в MRS и дважды переносили в новую среду с интервалами в 24 часа перед использованием в тестах на

подавление. Для анализа использовали концентрацию 2×10^9 КОЕ/мл.

Надосадочную фракцию собирали центрифугированием в течение 1 часа при 20000 об/мин, и полученную надосадочную фракцию после этого проверяли на присутствие бактерий.

5 E.coli:

Использовали два штамма E.coli - E.coli DAEC-C-1845 (диффузная адгезионная E.coli) и E.coli JPN15 (ЕРЕС; энтеропатогенная кишечная палочка E.coli).

Первый пересев после оттаивания проводили на агар CFA -Muller Hinton, который пригоден для обеспечения экспрессии бактериальной адгезионных факторов.

10 Перед каждым экспериментом бактериальные клетки инкубировали при 37°C с переносом в новую среду, осуществляемым дважды по прошествии каждых 24 часов. Поскольку штамм JPN15 несет ген резистентности к ампициллину, то упомянутый антибиотик использовали для отбора в процессе роста.

Salmonella:

15 В экспериментах использовали Salmonella typhimurium штамма SL1334, которую до использования культивировали в среде LB.

Пример 5

Тест на подавление E.coli

20 После второго посева в новую питательную среду штаммы патогенных бактерий помечали радиоактивным изотопом с использованием ^{14}C -ацетата при дозе 10 мКи/мл в среде LB. Инкубацию штаммов в этой культуральной среде проводили в течение 18 часов при 37°C.

25 После этого бактериальную суспензию подвергали центрифугированию (1041 g, 15 минут) таким образом, чтобы удалить надосадочную фракцию с остатками ^{14}C -ацетата. Сгусток суспендировали и промывали в ФСБ, и клетки суспендировали при концентрации примерно 10^8 клеток на 1 мл в 1%-ной стерильной маннозе. Известно, что манноза подавляет неспецифическую адгезию.

30 Различные патогенные бактериальные штаммы (E.coli) приводили в контакт с монослоем клеток Caco-2 (37°C, 10% CO_2 , 90% воздуха) в течение 3 часов. Такой же эксперимент проводили с использованием надосадочной фракции (полученной путем центрифугирования при 20000 об/мин в течение 40 минут).

35 В качестве контроля патогенных бактерий контактировали с монослоем Caco-2 без одновременного добавления ST11 или культуральной надосадочной фракции соответственно.

40 После инкубации в течение 3 часов культуральную среду заменяли, и монослой трижды промывали в ФСБ. Каждый этап промывки включает 20x перемешивание в растворе ФСБ таким образом, чтобы удалить по существу всю неспецифическую адгезию. После этого клетки лизировали добавлением 1 мл карбоната натрия и 40-минутной инкубацией при 37 °C. После гомогенизации аликвоту (250 мкл) разводили в 5 мл сцинтилляционной жидкости (Hionic-fluor Packcard) и проводили подсчет (Packard-2000). Процент адгезии патогенных клеток с клетками Caco-2 подсчитывали как отношение к контролю, умноженное на 100% (уровень адгезии; или инвазии в примере 6).

Пример 6

45 Тест на подавление сальмонелл

Сальмонеллы - это бактерии, которые инвазируют эпителиальные клетки и размножаются в них. Для определения ингибиторной активности ST11 клетки Salmonella typhimurium штамма SL1334 инкубировали в соответствии с описанным выше в среде, содержащей ^{14}C -ацетат, и включали в эксперимент, описанный в примере 5.

50 После инкубации клетки Caco-2 промывали в ФСБ так, чтобы удалить все несоединившиеся клетки. После этого добавляли культуральную среду, содержащую гентамицин (20 мкг/мл), и инкубацию продолжали в течение 1 часа при 37°C. Гентамицин является антибиотиком, не проникающим в кишечные клетки, в результате чего все

внеклеточные микроорганизмы уничтожаются, в то время как сальмонеллы, уже проникшие в клетки кишечника, остаются живыми. После двукратной промывки клеток в ФСБ их лизировали добавлением стерильной дистиллированной воды, и уровень радиоактивности измеряли в соответствии с описанным в примере 4.

5 Результаты экспериментов 5 и 6 показаны на фигурах 6-9. Можно видеть, что культивируемые клетки ST11 и культуральная надосадочная фракция были исключительно эффективными в предотвращении адгезии и инвазии кишечных клеток патогенными микроорганизмами, вызывающими диарею.

Пример 7

10 Свойства ST11

ST11 инкубировали в модели желудочного сока. Модельный желудочный сок приготавливали путем суспендирования пепсина (3 г/л) в стерильном физиологическом растворе (0,5%; мас/об) с доведением pH до 2,0 и pH 3 соответственно с помощью

15 концентрированной HCl. ST11 культивировали при различных количествах указанной выше среды с определением резистентности микроорганизмов.

Полученные результаты суммированы ниже в таблице 1.

Таблица 1					
pH	КОЕ/мл при T=0	КОЕ/мл при T=1 мин	КОЕ/мл при T=15	КОЕ/мл при T=30	КОЕ/мл при T=60
2,0	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$3,7 \times 10^8$	$7,0 \times 10^3$
3,0	$2,0 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	$1,7 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$

ST11 обладает следующими свойствами в соответствии с определениями с помощью способов, описанных в "Genera of lactic acid bacteria", eds. B.J.B.Wood & W.H.Holzappel, Blackie A&P.:

- 25 - грамположительные;
- негативные по каталазе;
- негативные по NH_3 -образованию аргинина;
- негативные по выработке CO_2 ;
- выработка L(+)-молочной кислоты;
- 30 - рост в присутствии солей желчных кислот в концентрации вплоть до примерно 0,4%.

Пример 8. Рост ST11 при различных условиях

ST11 инкубировали при 37°C в среде на основе помидора (4% помидорного порошка, регидратированного дистиллированной водой), дополненной сахарозой (0, 0,5, 1 или 2%) или соевым пептоном (0,5%), или глюкозой (0,5%) в течение различных периодов времени.

35 Полученные результаты показаны на фиг.2. ST11 дополнительно добавляли в количестве 2,5% к культуральной среде, составленной рисовой мукой (3%), пшеничной мукой (2%) и сахарозой (3%), и инкубировали при 37°C до достижения pH 4,4. После охлаждения полученный продукт расфасовывали с добавлением витамина C или без него и хранили при 10°C.

Пример 9

Индукция синтеза мРНК IL-12 и IL-10 в адherentных клетках мыши ST11

Костномозговые клетки были выделены из бедренной и большеберцовой костей 8-недельных, свободных от конкретного патогена мышей линии C57BL/6, и проинкубированы при концентрации 2×10^6 клеток на 1 мл в культуральной среде RPMI (Gibco), содержащей 10% плодной телячьей сыворотки, 1 mM L-глутамин, 12 mM HEPES, 0,05 mM 2-меркаптоэтанол, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все реагенты от фирмы Gibco), в течение 12 часов при 37°C в атмосфере при 5% CO_2 . Неслившиеся клетки удаляли путем 3 последовательных промывок теплой культуральной средой, и оставшиеся слившиеся (адherentные) клетки собирали и инкубировали при

45 концентрации 10^6 клеток на 1 мл в течение 6 часов в присутствии или отсутствие бактерий. Ранее было установлено, что 6 часов соответствуют оптимальному отрезку времени для синтеза мРНК цитокинов в мышинных адherentных клетках в ответ на ЛПС. Бактерии

добавляли при различных концентрациях в диапазоне от 10^9 до 10^7 КОЕ/мл. Бактерии культивировали и хранили в соответствии с описанным выше.

По окончании 6-часового периода культивирования клетки выделяли центрифугированием и лизировали с использованием набора реагентов TRIzol (Gibco BRL, № по каталогу 15596-018) в соответствии с инструкциями производителя. Тотальную (общую) РНК выделяли путем преципитации изопропанолом и конвертировали в кДНК в реакции обратной транскрипции в течение 90 минут при 42°C с использованием 200 ед. обратной транскриптазы (Superscript II, BRL) в объеме реакции 40 мкл, содержащем 200 мМ Трис (рН 8,3), 25 мМ KCl, 1 мкг/мл олиго-д(T)₁₅ (Boehringer Mannheim), 1 мМ дитиотреитола (Boehringer Mannheim), по 4 мМ каждого из dNTP (Boehringer Mannheim) и 40 ед./мл Rnasin (Promega). Праймеры и условия ПЦР были использованы в соответствии с уже описанным у Kopf et al. (Journal of Experimental Medicine, 1996, 184 [3], 1127-1136). Количество кДНК нормализовали по образцам с использованием праймеров, специфичных для гена "домашнего хозяйства" (α_2 -микроглобулин). ПЦР-продукты разделяли в 2%-ном агарозном геле, и бэнды проявляли в УФ.

Как показано на фигуре 4, ST11 проявил наивысший уровень индукции мРНК IL-12 и IL-10, который сравним с уровнями, наблюдаемыми с использованием позитивного контроля (E.coli). Различия были наиболее отчетливыми при наименьших концентрациях бактерий (10^7 КОЕ/мл).

Пример 10

Подавление синтеза IL-4 действием ST11

Т-клетки CD4⁺ очищали из селезенки свободных от конкретного патогена мышей BALB/c с использованием набора MiniMACS от фирмы Miltenyi Biotec (№ по каталогу 492-01). Т-клетки CD4⁺ культивировали в концентрации 2×10^5 клеток на 1 мл в среде RPMI, содержащей 10% плодной телячьей сыворотки, 1 мМ L-глутамин, 12 мМ HEPES, 0,05 мМ 2-меркаптоэтанол, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и активировали в течение одной недели путем перекрестного сшивания со связанными на планшете моноклональными антителами, специфичными в отношении CD3 (клон 2C11) и CD28 (клон 37.51; оба антитела от Pharmingen). В процессе этого первичного культивирования Т-клетки CD4⁺ культивировали совместно с адherentными клетками костного мозга (выделенными в соответствии с описанным выше), взятыми в качестве вспомогательных клеток, а также 10^8 КОЕ/мл ST11 или 10^8 КОЕ/мл Lal, или 1 мг/мл ЛПС, или только культуральной среды. По прошествии указанного времени клетки промывали, и Т-клетки CD4⁺ очищали опять с использованием набора MiniMACS и повторно стимулировали во вторичной культуре, содержащей только питательную среду. Цитокины, вырабатываемые дифференцированными Т-клетками CD4⁺, анализировали в надосадочных фракциях через 2 дня с использованием "сэндвич"-варианта ТИФА (наборы реактивов от Endogen и Pharmingen).

Полученные результаты показаны на фигуре 5. Клетки, дифференцировавшиеся в присутствии только питательной среды, проявляли преобладающий фенотип Th2, характеризующийся высоким уровнем IL-4. Добавление ST11 к первичным культурам жестко модулирует результат Th2-дифференцировки, что приводит к 8-кратному снижению выработки IL-4. Это подавление имело тот же порядок, который наблюдается в культурах, происходящих от клеток, дифференцировавшихся в присутствии ЛПС. В противоположность этому другой штамм Lactobacillus не обладал выявляемым эффектом в отношении уровней IL-4. Интересно, что уровни γ -интерферона не возрастали после добавления ST11 к первичным культурам.

Как можно видеть из изложенного выше, штаммы по настоящему изобретению могут быть эффективно приготовлены для получения пищевого и/или фармацевтического носителя, сохраняющего преимущества ценных свойств микроорганизмов.

Пример 11

Штамм ST11 тестировали в клинических испытаниях в группе жителей предместий

Гватемалы по его способности влиять на передачу и распространение острой связанной с сезоном дождей диареи, поражающей большинство детского населения этого региона. Всего в анализ были вовлечены 203 ребенка в возрасте 35-70 месяцев, которые получали вместе с пищей дозу 10^{10} живых организмов (ST11) или не получали ее (плацебо) за период в 29 дней. Дети, отобранные и в экспериментальную, и в контрольную группы, соответственно имели характерные для соответствующего возраста признаки недостаточного веса и роста из-за недоедания.

Перед началом пищевых испытаний на детях дошкольного возраста была проведена оценка безопасности с помощью тестов *in vitro* и *in vivo*. Анализ *in vitro* выявил параметры резистентности к антибиотикам, сходные с таковыми у других молочных бактерий, используемых для приготовления пищевых продуктов, а также отсутствие возможного образования биогенных аминов и потенциала по разрушению муцина и деконъюгированию солей желчных кислот. В плацебоконтролируемом клиническом испытании, включавшем 42 взрослых добровольца, была установлена хорошая переносимость ST11 и отсутствие индукции каких-либо вредных эффектов в группе контролируемых возможных проявлений, таких как метеоризм, количество испражнений за сутки и консистенция испражнений; не отмечено повышения уровней белков острой фазы в сыворотке, которые могли бы иметь отношение к воспалительной реакции.

Образцы и плацебо были упакованы в пакетики в соответствии с технологией Nestle Product Technology Center в условиях фабрики в Конольфингене (Швейцария), после чего отправлены в Гватемалу в холодильнике. Каждая 10 г упаковка содержала ароматизированный шоколадом наполнитель и либо 0,2 г ST11 (10^{10} КОЕ), либо в случае плацебо 0,2 г сухого молока. Ароматизированный шоколадом наполнитель содержал какао-порошок, сахар, лецитин сои, ванилин и корицу. Упаковки хранили при 4-6°C вплоть до 2 часов до начала их использования. Перед использованием содержимое упаковки должно быть растворено в 100 мл воды, предоставляемой Nestle, которая лишена какого бы то ни было бактериального загрязнения.

В соответствии с применяемым протоколом, диарею диагностировали как наличие трех или большего числа жидких или бесформенных испражнений за 24 часа. Приступ диареи определяли как событие, подтверждающее наличие поноса (диареи) (три испражнения диарейного типа за 24 часа). Ее общую продолжительность в часах подсчитывали от момента первого из трех регистрируемых испражнений до появления первого оформленного испражнения или до 24-часового периода полного отсутствия дефекации. Наличие "нового" приступа у ребенка определяли по прошествии 48 часов после окончания предыдущего приступа. Если этого не происходило, то тот же самый приступ считался продолжающимся, и для оценки использовали величину его общей продолжительности. Отмечали детей, для которых было задокументировано два или большее число приступов диареи в течение 29-дневного периода наблюдений. Интенсивность приступа определяли по общему числу случаев слабого стула. Элементами тяжести приступа считали присутствие крови, слизи или гноя в испражнениях наряду с симптомами лихорадки и рвоты. Интенсивность в 7 испражнений за 24 часа или необходимость вмешательства профессионального врача в условиях клиники, центра здоровья или госпиталя также классифицировали как тяжелый приступ.

Когда приступ диареи диагностировали в условиях непосредственного обследования, то брали образец диарейного стула для микроскопического анализа и посева с целью идентификации возможных патогенов-возбудителей данного приступа. Образец диагностировали на ротавирусный антиген, лямблии и дизентерийную амёбу в том случае, когда образец был дизентерийным, а также на бактериальные патогены, включая *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas shigelloides*, *E.coli* и, возможно, холерного вибриона.

За период исследований образцы продуктов собирали с целью анализа жизнеспособности микроорганизмов, включая период введения. Можно было видеть, что микроорганизм сохранял жизнеспособность в упаковках в течение всего периода исследования так, что даже в конце исследования упаковки были способны дать по

10¹⁰ живых микроорганизмов после разведения в воде.

Исследование показало, что образец, содержащий пробиотический микроорганизм, может снижать распространение поноса по сравнению с контрольной группой (плацебо) примерно на 30%. Также контрольная группа уже проявляла сниженную частоту встречаемости поноса по сравнению с нормальной популяцией, не получавшей, соответственно ни образцов, ни плацебо. Это последнее наблюдение отчасти можно объяснить тем, что дети получали дополнительное полноценное питание и чистую воду. Однако поскольку анализ был проведен в полевых условиях, то можно сделать четкий вывод о том, что ST11 может надежно снижать распространение диареи in vivo.

Формула изобретения

1. Штамм *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461), обладающий способностью предотвращать колонизацию кишечника патогенными бактериями, вызывающими диарею, и предотвращать заражение эпителиальных клеток кишечника ротавирусами.

2. Пищевой продукт, характеризующийся тем, что он содержит от $1 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^{12}$ КОЕ штамма *Lactobacillus paracasei* 1-2116 (NCC 2461)/г пищевого носителя, выбранного из молока, йогурта, творога, сыра, ферментированного молока, ферментированных продуктов на основе молока, мороженого, продуктов на основе ферментированных хлебных злаков, сухого молока, детского питания.

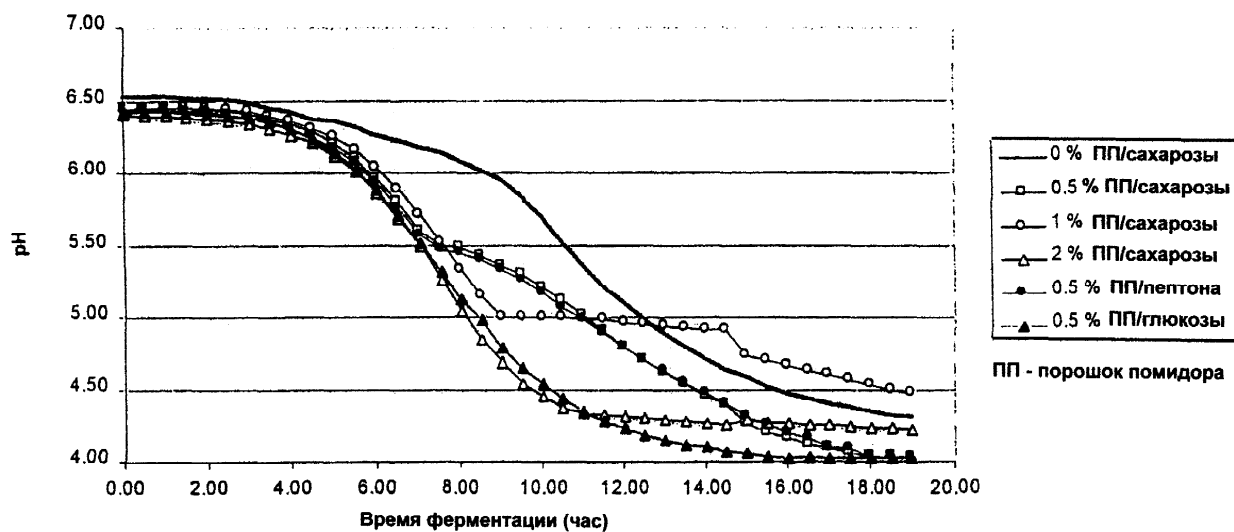
3. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с диареей, содержащая эффективное количество КОЕ штамма *Lactobacillus paracasei* CNCM I-2116 (NCC 2461) или надосадочной фракции его культуры и физиологически приемлемый носитель, выбранный из молока, йогурта, творога, сыра, ферментированного молока, ферментированных продуктов на основе молока, мороженого, продуктов на основе ферментированных хлебных злаков, сухого молока, детского питания, таблеток, жидких бактериальных суспензий, сухих пищевых добавок, влажных пищевых добавок, сухих пищевых тубиков или влажных пищевых тубиков.

Скрининг клеточных культур



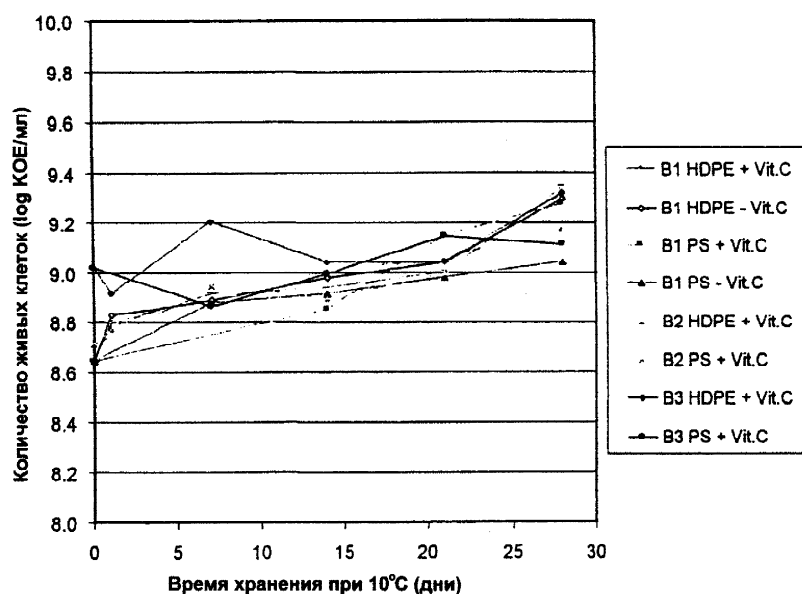
Фиг. 1

Подкисление *L.casei* ST11 в различных питательных средах



Фиг. 2

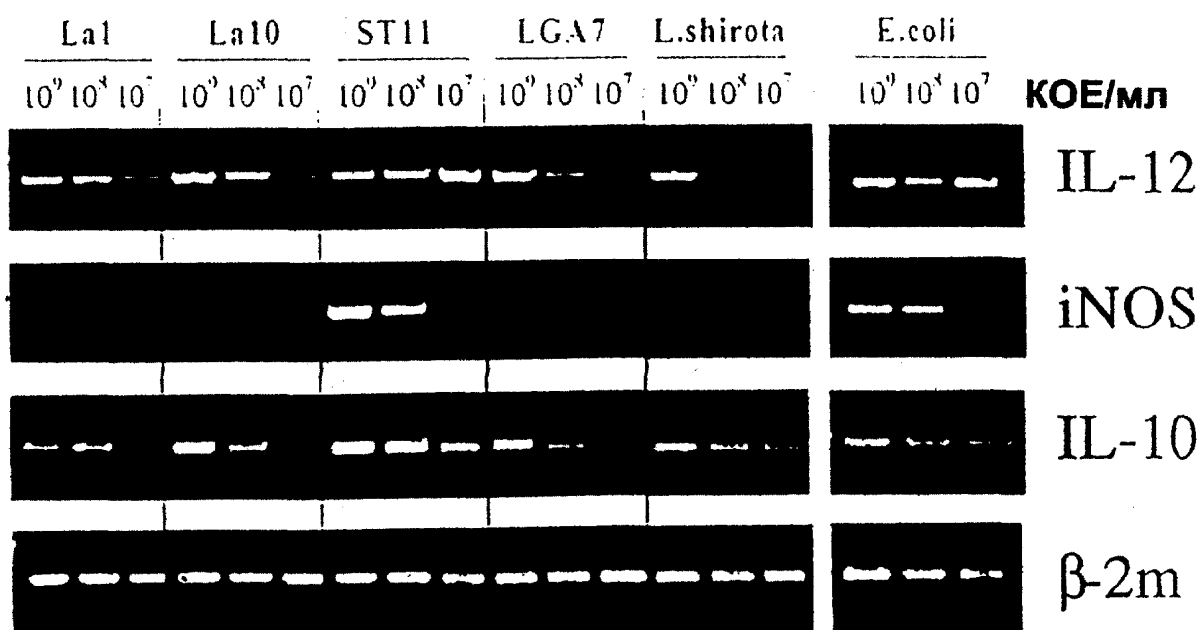
Выживаемость *Lb.casei* ST11 при 10°С



HDPE - высокомолекулярный полиэтилен PS: полистирен Vit C - витамин C

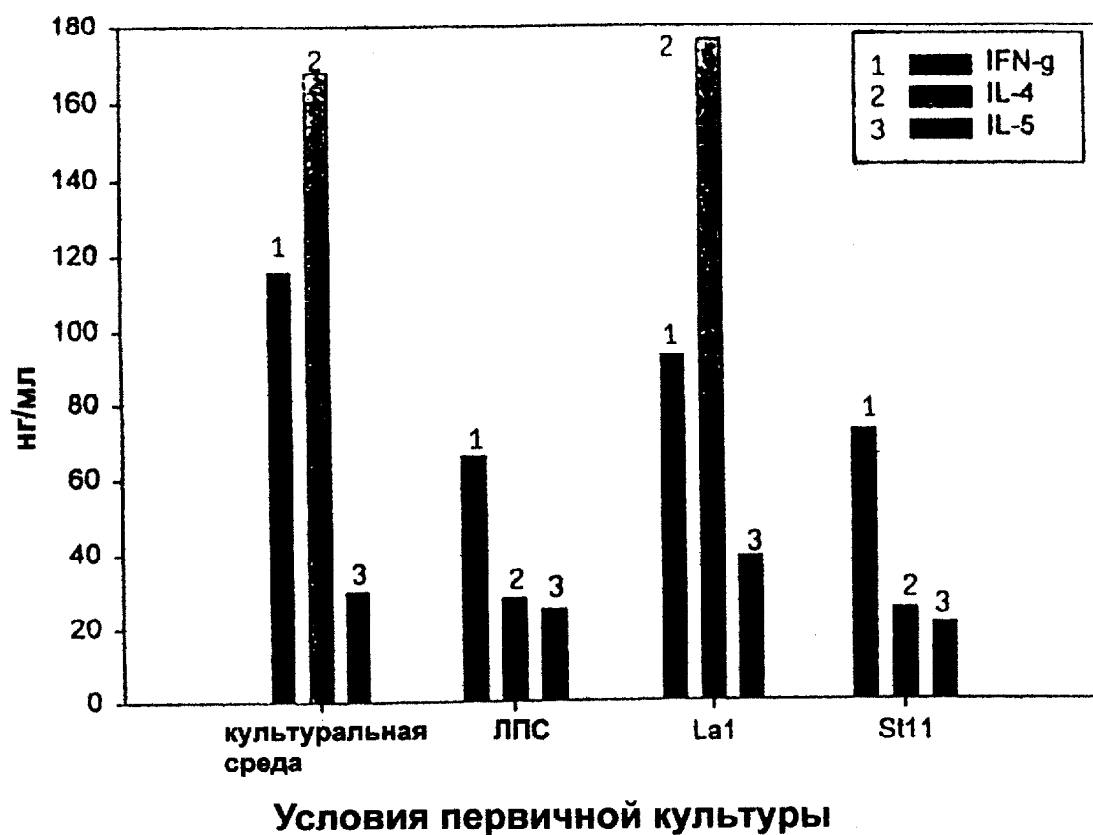
Фиг. 3

Индукция мРНК цитокинов молочнокислыми бактериями в макрофагах мышей



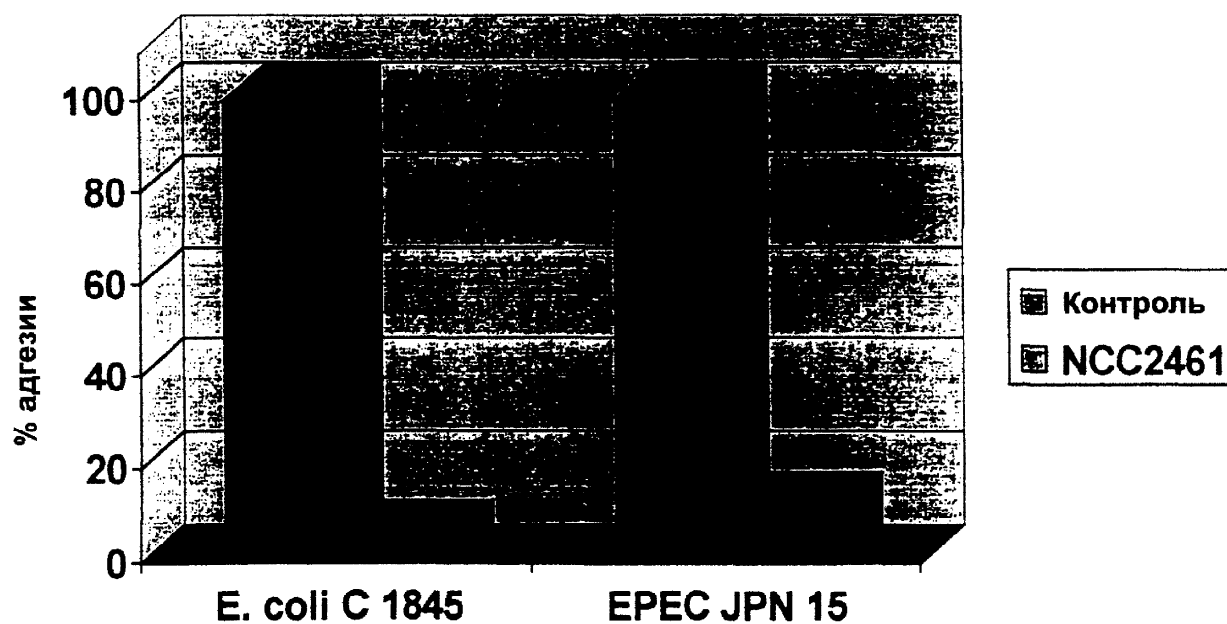
Фиг. 4

Секреция цитокинов у IVD 980916 (ТИФА 981103 и 980925)



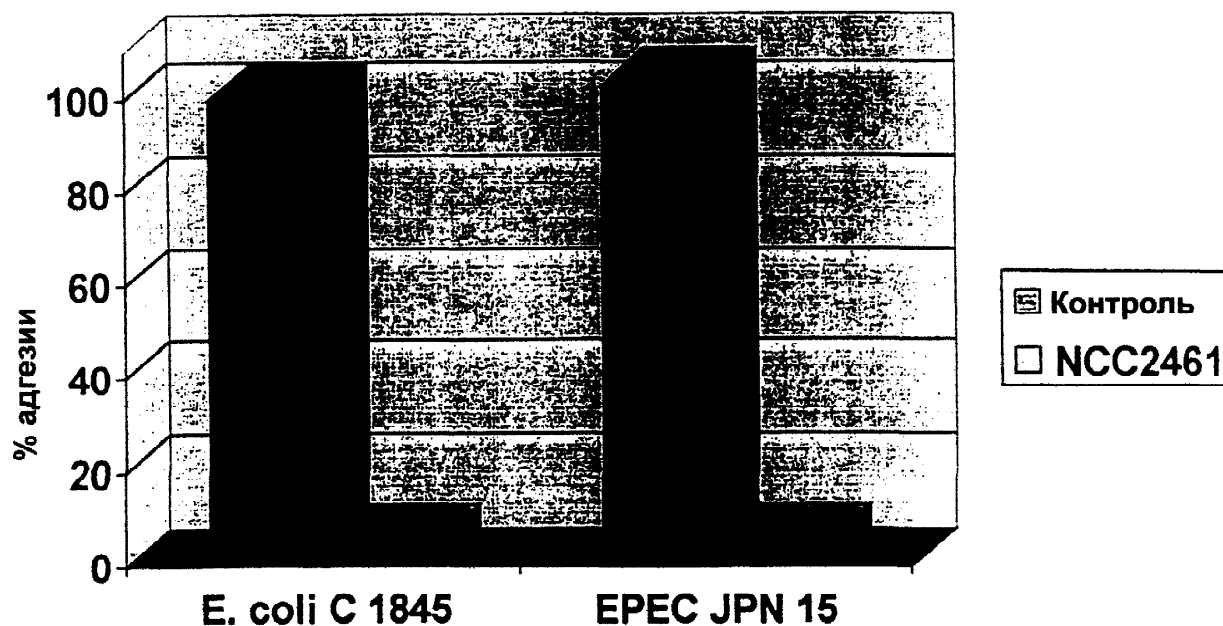
Фиг. 5

Подавление адгезии энтеровирулентной E.coli в процессе контакта с бактериальной культурой NCC2461



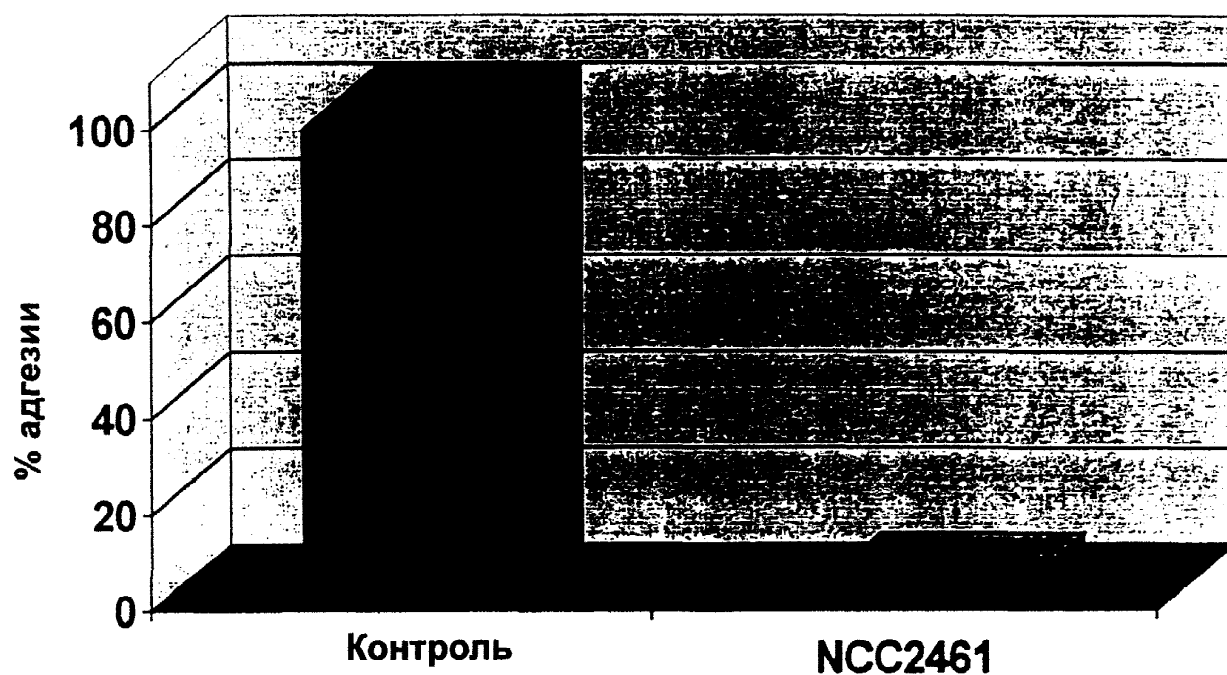
Фиг. 6

Подавление адгезии энтеровирулентной E.coli в процессе контакта с надосадочной фракцией NCC2461



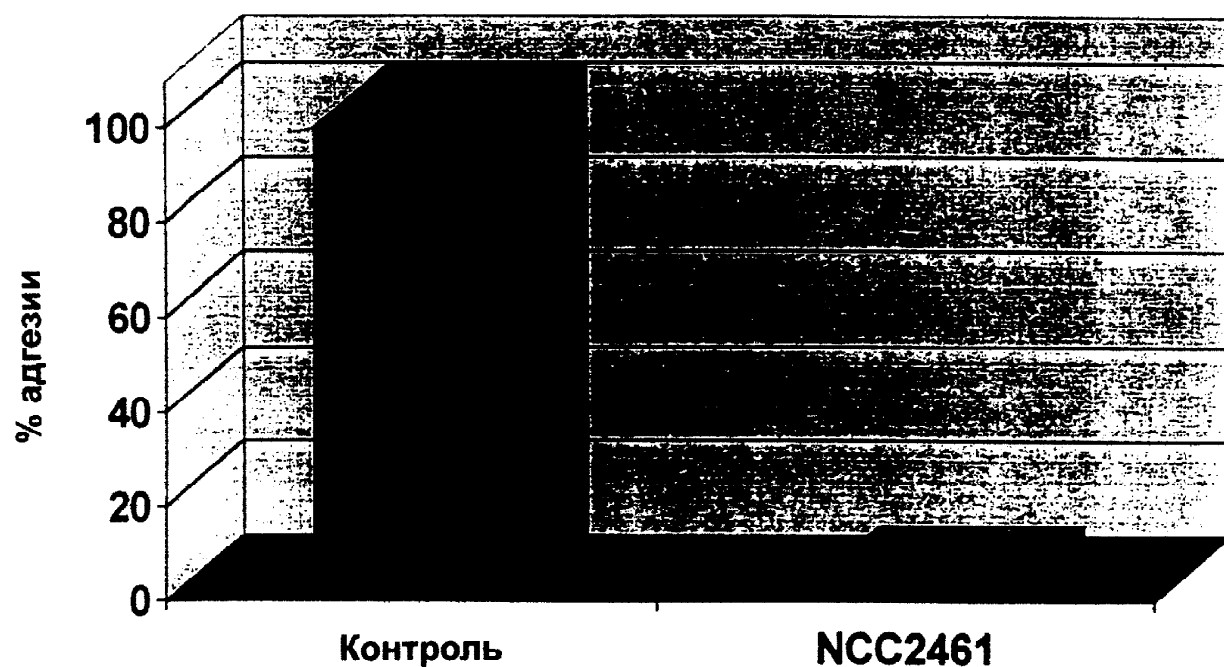
Фиг. 7

Подавление инвазии *Salmonella* в процессе контакта с бактериальной культурой NCC2461



Фиг. 8

Подавление инвазии *Salmonella typhimurium* в процессе контакта с надосадочной фракцией NCC2461



Фиг. 9