



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.09.28

(21) Номер заявки
201591518

(22) Дата подачи заявки
2014.02.13

(51) Int. Cl. *A61K 31/445* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A61K 36/605 (2006.01)
A61K 36/70 (2006.01)
A61K 36/815 (2006.01)
A61K 36/77 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 36/04 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ D-ФАГОМИНА В КАЧЕСТВЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА ДЛЯ ВРОЖДЕННОЙ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ НА УРОВНЕ СЛИЗИСТОЙ И ДЛЯ КОНТРОЛЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, СВЯЗАННЫХ С ИЗБЫТОЧНОЙ АКТИВАЦИЕЙ ПРИ ГУМОРАЛЬНОМ ИММУННОМ ОТВЕТЕ

(31) 13155586.4

(32) 2013.02.18

(33) EP

(43) 2016.01.29

(86) PCT/EP2014/052802

(87) WO 2014/125013 2014.08.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПУМАРОЛА СЕГУРА СЕРХИО (ES)

(72) Изобретатель:
**Пумарола Сегура Серхио, Антолин
Мате Мария Кармен, Льюпис Пахес
Марта, Кальво Торрас Мария де лос
Анхелес (ES)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(56) WO-A1-2011117362
WO-A1-2012007577
CN-A-1663448
CN-A-101810276

GOMEZ LIVIA ET AL.: "D - Fagomine lowers postprandial blood glucose and modulates bacterial adhesion", BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, vol. 107, no. 12, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 1739-1746, XP009170085, ISSN: 1475-2662, DOI: 10.1017/S0007114511005009 abstract page 1743, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1 page 1745, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 1 table 2

TORRES J. ET AL.: "D-Fagomine, an iminosugar with physiological effects on postprandial

blood glucose and bacterial adhesion", ANNALS OF NUTRITION AND METABOLISM: EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION, METABOLIC DISEASES AND DIETETICS, S. KARGER AG, SWITZERLAND, vol. 58, no. Suppl. 3, 1 January 2011 (2011-01-01), page 131, XP009170086, ISSN: 0250-6807 the whole document

WO-A1-2010029313

EP-A1-2255822

HEEJUNG KIM ET AL.: "Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 22, no. 9, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 1499-1509, XP019370939, ISSN: 1573-904X, DOI: 10.1007/S11095-005-6250-Z cited in the application abstract page 1499, column 2, paragraph 2, page 1500, column 1, paragraph 2, page 1505, column 2, paragraph 2, page 1506, column 2, last paragraph

DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; January 2012 (2012-01), SHEN YUPING ET AL.: "Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of Rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in toonea sinensis folium.", XP002725521, Database accession no. NLM22438663 abstract & SHEN YUPING ET AL.: "Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of Rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in toonea sinensis folium.", PHARMACOGNOSY MAGAZINE JAN 2012, vol. 8, no. 29, January 2012 (2012-01), pages 49-53, ISSN: 0976-4062

(57) Изобретение относится к способу иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой и предупреждения воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального иммунного ответа, включающему введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли, либо композиции, содержащей любое из перечисленного. Также изобретение относится к способу профилактики аутоиммунных заболеваний и замедления прогрессирования заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, включающему

введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли, либо композиции, содержащей любое из перечисленного.

030688 B1

030688 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области, связанной с нутрицевтиками или функциональными средствами с иммуностимулирующей способностью в отношении запуска механизмов иммунного ответа на уровне слизистой. Более конкретно, оно относится к применению соединения D-фагомина в качестве иммуностимулирующего средства для врожденного иммунного ответа в слизистой и для предупреждения или профилактики воспалительных процессов, проявляющихся клинически, субклинических хронических воспалительных процессов или заболеваний, ассоциированных с оппортунистическими патогенами. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей D-фагомин, для вышеуказанного применения.

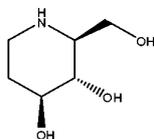
Предпосылки изобретения

Нутрицевтики представляют собой продукты, получаемые или выделяемые из природных или пищевых источников, которые оказывают благоприятное воздействие на здоровье индивидуумов, потребляющих их, или которые предупреждают или задерживают возникновение определенных нарушений или заболеваний, помимо своей основной питательной ценности. Это является причиной того, что среди потребителей возрастает потребность в данном виде продуктов, и того, что исследование и разработка в области, связанной с нутрицевтиками, становятся все более и более важными в пищевой, фармацевтической и ветеринарной отрасли.

Исследование в области, связанной с нутрицевтиками и функциональными продуктами питания, имеет несколько направлений, таких как идентификация и развитие микроорганизмов, которые могут приносить пользу для здоровья хозяина, общеизвестных как пробиотики, или выделение природных соединений или веществ, присутствующих в природных или пищевых продуктах, которые оказывают благоприятный эффект на здоровье лица, потребляющего их.

Одним из природных соединений, которые, как было доказано, оказывают благоприятные эффекты на здоровье, является D-фагомин.

D-фагомин, (2R,3R,4R)-2-гидрокси-метилпиперидин-3,4-диол, представляет собой природный иминоклилол, полигидроксилированный пиперидин, который был впервые выделен из семян гречихи *Fagopyrum esculentum* Moench, а позже из других растительных источников, таких как шелковица (*Morus alba*, Moraceae), годжи (*Lyceum chinense*), *Castanospermum australe*, листья *Xanthocercis zambesiaca* и листья *Morus bombycis*. D-фагомин, (2R, 3R, 4R)-2-гидрокси-метилпиперидин-3,4-диол, представлен приведенной ниже формулой:



Среди других функций D-фагомин, как сообщалось, снижает постпрандиальный уровень глюкозы в крови без стимуляции секреции инсулина (Gomez L. et al. Br. J. Nutr. 2012 Jun; 107(12): 1739-46). В связи с этим D-фагомин предлагался в качестве пригодного элемента рациона или компонента функциональных продуктов питания для снижения рисков для здоровья, связанных с избыточным потреблением быстроусвояемых углеводов.

В WO2011117362 раскрывается способность D-фагомина ингибировать адгезию бактерий к поверхности слизистой. Поскольку адгезия бактерий к слизистой является важным предварительным условием для колонизации и инфицирования, D-фагомин считают ценным средством для предупреждения и/или вспомогательного лечения бактериальной инфекции. Кроме того, в данном документе раскрывается, что D-фагомин также является пригодным для предупреждения дисбаланса микрофлоры, вызванного патогенными бактериями тонкого кишечника, ротовой полости или дыхательных путей. Этот эффект обусловлен тем фактом, что D-фагомин связывается с вредоносными бактериями, такими как определенные штаммы рода *Escherichia*, *Salmonella* или *Streptococcus*, но не с безопасными бактериями, такими как молочнокислые бактерии или бифидобактерии. В этом смысле, более вероятно имплантация в слизистую безопасных бактерий, чем патогенных бактерий.

Проведенное исследование (Gomez L, et al) также подтверждает, что D-фагомин не проявляет противомикробную активность, что означает, что хотя имеет место специфический эффект в отношении адгезии некоторых бактерий, присутствие D-фагомина не влияет на жизнеспособность этих бактерий. Другой документ из предшествующего уровня техники также относится к биологической функции D-фагомина и его N-алкилированных производных (Castillo J.A. et al.: "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine; N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays" Organic letter 2006 Vol. 8 (26): 6067-6070). Castillo J.A et al описывают, что D-фагомин и N-алкилированные C₄-, C₆-, C₈-, C₉- и Ph-CH₂-производные не проявляют противомикробную активность.

В настоящее время авторы настоящего изобретения обнаружили новую биологическую функцию D-фагомина. В частности, они обнаружили, что D-фагомин способен запускать механизмы врожденного иммунного ответа на уровне слизистой. Улучшение механизмов врожденного иммунного ответа помогает предупреждать и ослаблять инфекции, вызванные потенциально патогенными находящимися вблизи

слизистой микроорганизмами, у индивидуумов. Кроме того, такое улучшение природных механизмов защиты врожденной иммунной системы на уровне слизистой не допускает нежелательной избыточной активации гуморального иммунного ответа, который является вторым важным защитным механизмом от микроорганизмов. Указанный гуморальный иммунный ответ, который реализует адаптивная иммунная система, как правило, является более сильным и системным. Его избыточная активация способствует возникновению состояний хронического субклинического воспаления.

Улучшение врожденного иммунного ответа важно для удержания под контролем не только бактерий, но также вирусов и других паразитов.

Микроорганизмы, как считают, поддерживают надлежащий уровень активности нашей врожденной иммунной системы. Было выдвинуто предположение, что неправильное развитие иммунной системы, и в частности врожденной иммунной системы, приводит в результате к повышенной подверженности аутоиммунным заболеваниям. Целиакия, болезнь Крона и язвенный колит, например, были связаны с таким патологическим ответом. Отсутствие или дисфункция врожденного иммунного ответа способствуют избыточной активации гуморального иммунного ответа, что может привести в результате к неконтролируемым повреждающим аутоиммунным ответам. Выявлено до 100 типов аутоиммунных заболеваний, включая астму, рассеянный склероз, волчанку, псориаз и ревматоидный артрит и сахарный диабет.

Также хроническое субклиническое воспаление, являющееся результатом изменения взаимодействия между микрофлорой кишечника и организмом хозяина, как полагают, усиливает гуморальный воспалительный ответ и считается причиной, определяющей скорость прогрессирования метаболического синдрома и других заболеваний, таких как ожирение, гипертензия, сахарный диабет II типа, жировая дистрофия печени, болезнь Альцгеймера или рак (например, молочных желез, толстой кишки).

В связи с этим большой интерес вызывает обнаружение новых путей усиления естественным способом врожденного иммунного ответа на уровне локального участка слизистой при одновременном снижении риска возникновения нежелательного сильного гуморального иммунного ответа.

Врожденная иммунная система представляет собой защитный механизм организма первой линии и включает клетки и механизмы, которые осуществляют неспецифическую защиту хозяина от инфицирования другими организмами. Это означает, что клетки врожденной системы узнают патогены и отвечают на них характерным для определенного вида образом, но в отличие от адаптивной иммунной системы это не обеспечивает длительный или защитный иммунитет для хозяина. Врожденные иммунные системы обеспечивают немедленную защиту от инфекции. Они образуются посредством различных типов клеток, таких как мастоциты, фагоциты (макрофаги, нейтрофилы и дендроциты), базофилы и эозинофилы и натуральные киллеры (NK-клетки), а также посредством биохимического механизма, такого как система комплемента.

Основные функции врожденной иммунной системы позвоночных включают:

- a) рекрутинг иммунных клеток в места инфекции посредством выработки химических факторов, включая специализированные химические медиаторы, называемые цитокинами;
- b) активацию каскада реакций комплемента для идентификации бактерий, активации клеток и стимуляции очистки от погибших клеток или комплексов антител;
- c) идентификацию и удаление чужеродных веществ, присутствующих в органах, тканях, крови и лимфе, с помощью специализированных лейкоцитов;
- d) активацию адаптивной иммунной системы посредством процесса, известного как презентация антигена;
- e) выполнение роли физического и химического барьера для инфекционных агентов.

Настоящее изобретение основано на доказанных авторами настоящего изобретения данных о том, что клетки врожденной иммунной системы, присутствующие в слизистой, высвобождают цитокины, такие как TNF- α , в присутствии D-фагомина.

Активация врожденного иммунного ответа в слизистой представляет собой природный механизм защиты от патогенов, поскольку он поддерживает природный защитный механизм, который не допускает запуск более сильного, агрессивного и системного ответа адаптивной иммунной системы, направленного против патогенов, способных избежать или прятаться от природных защитных механизмов слизистой. Наличие "активированной" врожденной иммунной системы не допускает запуска механизмов острого ответа, направленных против определенных патогенных бактерий, настолько адаптировавшихся к среде, что вызывают хронические субклинические воспалительные процессы на протяжении длительного времени.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено выделение E.coli 434 из слизистой толстой кишки. Использовали отрицательный контроль без добавления E.coli к препарату. В качестве положительного контроля использовали образец с E.coli, но без D-фагомина. Кроме того, исследовали три разных образца, содержащих E. coli и D-фагомин в разных дозах (50, 500 и 5000 мкг/мл). Результаты показывают, что D-фагомин обладает свойствами дозозависимого подавления адгезии в отношении E.coli.

На фиг. 2 представлено высвобождение TNF-альфа клетками врожденной иммунной системы, при-

сутствующими в слизистой толстой кишки. TNF измеряли в надосадочной жидкости. Как и на фиг. 1, использовали отрицательный контроль без добавления *E.coli* к препарату и положительный контроль с *E.coli*, но без D-фагомина. В этом случае также исследовали три разных образца, содержащих *E.coli* и D-фагомин в разных дозах (50, 500 и 5000 мкг/мл). Результаты показывают, что D-фагомин способен стимулировать высвобождение TNF-альфа, и что чем меньше доза, тем более интенсивным является такое высвобождение. Это является прямым показателем того, что D-фагомин оказывает иммуностимулирующий эффект на врожденную иммунную систему, помогая иммунной системе выявлять и атаковать микроорганизмы на уровне слизистой.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложен способ иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой и предупреждения воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального иммунного ответа, включающий введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли.

В предпочтительном варианте реализации заявленного способа подразумевается врожденная иммунная система на уровне слизистой ротовой полости, слизистой пищевода, слизистой желудка, слизистой тонкой кишки, слизистой толстой кишки, слизистой носовой полости, слизистой бронхов, слизистой уретры или слизистой матки, наиболее предпочтительно врожденный иммунный ответ происходит на уровне слизистой толстой кишки.

В одном аспекте заявленного способа избыточная активация гуморального иммунного ответа вызвана оппортунистическими патогенами, включающими гамма-протеобактерии, в том числе *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, или стрептококки, в том числе *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, или *Enterococci faecalis*.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ профилактики аутоиммунных заболеваний и замедления прогрессирования заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, включающий введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой и предупреждения проявляющихся клинически или субклинических воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального иммунного ответа, включающий введение субъекту композиции, содержащей D-фагомин, или его фармацевтически приемлемую соль, или его пригодную для применения в ветеринарии соль, или его съедобную соль.

Предпочтительно композиция представляет собой твердую или водную композицию.

Согласно одному аспекту данного способа водная композиция содержит D-фагомин при концентрации, равной или меньше 5000 мкг/мл.

Согласно другому аспекту данного способа водная композиция содержит D-фагомин при концентрации, равной или меньше 50 мкг/мл.

Предпочтительно D-фагомин находится в форме обогащенного экстракта, полученного из природного источника, или химического продукта тонкого органического синтеза. Более предпочтительно природным источником D-фагомина являются семена *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, листья *Morus bombycis* или *Morus alba*, корни *Lyxium chinense*, корни и листья *Xanthocercis zambesiaca*, плоды *Angylocalyx pinaertii*, листья *Vaphia nitida*, семена *Castanospermum australe* и корни *Lonchocarpus latifolius*.

Предпочтительно композиция представляет собой фармацевтическую, пригодную для применения в ветеринарии или пищевую композицию. Еще более предпочтительно композиция дополнительно содержит рутин.

Согласно изобретению также предложен способ профилактики аутоиммунных заболеваний и замедления прогрессирования заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, включающий введение субъекту композиции, содержащей D-фагомин, или его фармацевтически приемлемую соль, или его пригодную для применения в ветеринарии соль, или его съедобную соль.

Преимущество иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой заключается в том, что она снижает частоту возникновения более сильных и потенциально повреждающих гуморальных иммунных ответов. В связи с этим D-фагомин помогает предупреждать возникновение аутоиммунных заболеваний, таких как сахарный диабет, псориаз, метаболический синдром, болезнь Крона, целиакия, полимиалгия или ревматоидный артрит, и замедлять прогрессирование заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, каким является метаболический синдром и другие заболевания, такие как ожирение, гипертензия, сахарный диабет II типа, жировая дистрофия печени, болезнь Альцгеймера или рак (например, молочных желез, толстой кишки).

Неограничивающими солями D-фагомина, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, являются соли тартрат, полутартрат, цитрат, полуцитрат, хлоргидрат, малат или ацетат.

D-фагомин, как было показано, вызывает иммуностимулирующий ответ в отношении врожденной иммунной системы на уровне слизистой, которая является первым барьером, с которым сталкиваются патогены во время инфекционного процесса. D-фагомин активировал ответ врожденной иммунной систе-

мы на уровне всех типов слизистой, а именно слизистой ротовой полости, слизистой пищевода, слизистой желудка, слизистой тонкой кишки, слизистой толстой кишки, слизистой носовой полости, слизистой бронхов, слизистой уретры или слизистой матки.

В особенно предпочтительном варианте осуществления активация ответа врожденной иммунной системы происходит в слизистой носовой полости. Активация врожденного иммунного ответа в слизистой носовой полости является полезной в качестве вспомогательного механизма для улучшения эффективности назальных вакцин, направленных против такой бактерии, как *Streptococcus pneumoniae*, или такого вируса, как *influenza*. В еще одном особенно предпочтительном варианте осуществления активация ответа врожденной иммунной системы происходит в слизистой тонкой кишки. Активация врожденного иммунного ответа в слизистой тонкой кишки является полезной в качестве вспомогательного механизма для улучшения эффективности пероральных вакцин, направленных против некоторых микроорганизмов, таких как штаммы вибрионов, возбудитель туберкулеза или полиовирус.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления активация ответа врожденной иммунной системы происходит на уровне слизистой толстой кишки. Применение D-фагомина по разным причинам является особенно интересным с точки зрения запуска врожденного иммунного ответа локально на уровне толстой кишки. Первая причина заключается в том, что толстая кишка является одной из областей тела с более высокой концентрацией и присутствием большего количества бактерий, а также одной из областей тела, где присутствует большее количество оппортунистических патогенов, включая *E. coli*, которая является широко распространенной у людей. В этом отношении толстая кишка также является одной из областей тела, более чувствительной к инфекции и с большей вероятностью возникновения инфекции, поэтому важно, чтобы врожденная иммунная система была активирована и находилась под надзором на этом уровне желудочно-кишечного тракта. Вторая причина заключается в том, что хотя другой вид углеводов может характеризоваться аналогичным видом иммуностимулирующей активности в отношении врожденной иммунной системы, они в обычных условиях не достигают толстой кишки, поскольку их поглощают или расщепляют бактерии тонкой кишки во время их прохождения по желудочно-кишечному тракту. И наоборот, D-фагомин представляет собой иминосахар, который не может быть метаболизирован бактериями тонкой кишки, и в связи с этим он способен достичь толстой кишки, где он может выполнять свою иммуностимулирующую функцию на локальном уровне, даже в очень низких концентрациях.

Фактически, хотя присутствие D-фагомина в концентрациях 5000 мкг/мл или менее является достаточным для того, чтобы вызвать иммуностимулирующий эффект в отношении врожденной иммунной системы в слизистой, при этом неожиданно наблюдали, что чем ниже концентрация D-фагомина, тем более сильным является врожденный иммунный ответ. Фактически, в предпочтительном варианте осуществления D-фагомин применяют в концентрациях 500 мкг/мл или менее. В еще более предпочтительном варианте осуществления D-фагомин применяют в концентрациях 50 мкг/мл или менее. При концентрациях 50 мкг/мл или менее выработка цитокина TNF- α неожиданно повышается. Выработка TNF- α является прямым показателем активации врожденной иммунной системы, то есть ее иммуностимуляции.

Регулярное потребление D-фагомина в качестве средства, способного поддерживать врожденную иммунную систему в состоянии "готовности", способствует профилактике и предупреждению воспалительных процессов, связанных с оппортунистическими патогенами. В частности, он может быть весьма пригодным для предупреждения состояний хронического или подострого воспаления, вызванных бактериями, способными ускользнуть от иммунной системы путем образования биопленок, которые могут скрывать колонии от иммунной системы. Этот вид состояний, как правило, облегчает инфицирование и запускает иммунные ответы не только на уровне слизистой, но также на уровне серозной оболочки. Наличие данного типа ответов в серозной оболочке является источником состояния хронического воспаления.

В конкретном и предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения D-фагомин способствует предупреждению воспалительных процессов, связанных с бактериями, выбранными из гамма-протеобактерий, таких как *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, или стрептококков, таких как *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, или *Enterococcus faecalis*.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения D-фагомин является пригодным для предупреждения воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального ответа определенными патогенными штаммами *Escherichia coli*, которые имеют значительную тенденцию ускользнуть от иммунной системы путем образования биопленок или с помощью других стратегий и вызывать хронический проявляющийся клинически и субклинические воспалительные процессы.

D-фагомин в композиции для использования с способами по настоящему изобретению может быть синтетическим или он может быть природного происхождения, в форме обогащенного экстракта из природного источника. В случае обогащенного экстракта из природных источников D-фагомин предпочтительно экстрагирован или получен в качестве пищевого продукта из семян *Fagopyrum esculentum* или *Fagopyrum tataricum*, листьев *Moms bombycis* или *Moms alba*, корней *Lycium chinense*, корней и листьев *Xanthocercis zambesiaca*, плодов *Angylocalyx pinaertii*, листьев *Vaphia nitida*, семян *Castanospermum australe*

или корней *Lonchocarpus latifolius*.

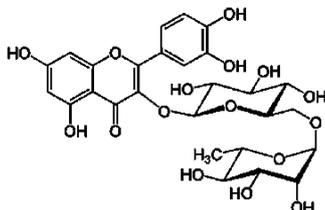
В особенно предпочтительном варианте осуществления композиция для использования в способах по настоящему изобретению содержит D-фагомин из экстракта из семян *Fagopyrum esculentum*.

Композиция для использования в способах по настоящему изобретению может быть составлена либо в виде фармацевтической, пригодной для применения в ветеринарии или пищевой композиции, при этом последняя является предпочтительным типом композиции.

В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жидкость для полоскания рта, гель, жидкий лосьон для чистки зубов, зубную пасту, жевательную резинку, очищающее средство для зубов и полости рта или крем для фиксации зубных протезов. В более предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой жевательную резинку.

Кроме того, D-фагомин возможно применять как часть продукта питания на основе питательной композиции, корма для домашних животных и кормового продукта. Пищевая композиция по настоящему изобретению также может быть представлена в виде пищевой или питьевой добавки для получения функционального продукта питания или функционального напитка. В этой форме она может быть добавлена в жидкие пищевые продукты, или концентраты, или порошки, такие как молоко и жидкие молокоподобные продукты, различные напитки, включая соки, безалкогольные напитки, спортивные напитки, спиртные напитки и т. п. Особенно полезно, чтобы композиция D-фагомина согласно настоящему изобретению была частью продукта питания для детей младшего возраста, предпочтительно частью детской смеси. Также, когда композиция D-фагомина получена из очищенного экстракта гречихи (*Fagopyrum esculentum*), она может быть частью пива, безалкогольного пива, чаеподобного напитка, молокоподобного напитка, йогурта, пасты, галет, печенья, злаковых батончиков, набухшего зерна, хлеба, блинов, тортов, кремов, десертов, блюд из зерновых продуктов для завтрака и др. Пищевая композиция или пищевая добавка по настоящему изобретению также может быть получена естественным способом, например, при содержании домашнего животного, такого как корова или другое животное, у которого D-фагомин вырабатывается в его молоке. Этого можно достичь с помощью кормления животного *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, *Moms alba* или очищенным D-фагомином.

В другом варианте осуществления композиция для использования в способах по настоящему изобретению также содержит рутин или другие полифенолы по типу флавонола в своем составе (т. е. гесперидин). Рутин, представляет собой гликозид между флавонолом кверцетином и дисахаридом рутинозой (α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозой) и имеет следующую формулу:



Когда рутин вводят перорально, он, как правило, стабилен в верхних отделах кишечника, но быстро подвергается дегликозилированию с высвобождением кверцетина на уровне толстой кишки (Kim H. et al. "Metabolic and pharmacological Properties of rutin, a dietary quercetin glycoside for treatment of inflammatory bowel disease" *Pharmaceutical research*, 2005, Vol. 22 № 9). Кверцетин, как сообщалось, обладает противовоспалительным эффектом, особенно при лечении хронических воспалительных состояний, таких как воспалительное заболевание кишечника, и в связи с этим использование рутина в композиции по настоящему изобретению в качестве источника кверцетина оказывает синергетический эффект в лечении и предупреждении воспаления, особенно на уровне толстой кишки, где, с одной стороны, высвобождается кверцетин, а с другой стороны, D-фагомин способен оказывать свой иммуностимулирующий эффект. Присутствие рутина в некоторой степени помогает удерживать под контролем иммунный ответ, запускаемый D-фагомином.

Более того, отмечают, что рутин, как и D-фагомин, присутствует в гречихе (*Fagopyrum esculentum*), а также в *Fagopyrum tataricum*, в которой обычно присутствуют большие количества рутина, чем в *F. esculentum*. В этом отношении в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения композицию по настоящему изобретению получают путем переработки из экстракта *Fagopyrum esculentum*, обогащенного D-фагомином и рутином.

Дополнительные цели, преимущества и признаки настоящего изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники при рассмотрении настоящего описания или станут известны при осуществлении на практике настоящего изобретения. Следующие примеры приведены в качестве иллюстрации и они не предполагаются как ограничивающие настоящее изобретение. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные комбинации конкретных и предпочтительных вариантов осуществления, описанных в данном документе.

Примеры

Пример 1. Биологическая активность D-фагомина в образце толстой кишки человека.

Целью данного исследования было определить "ex vivo" эффекты D-фагомина на адгезию *E. coli* к образцам слизистой толстой кишки человека и их возможное влияние на высвобождение медиаторов воспаления при применении диапазона доз, как показатель активации врожденного иммунного ответа.

Методика включала инкубирование штамма *E. coli* с образцами слизистой толстой кишки, полученными хирургическим путем. Целью было сохранить всю структуру образцов слизистой, включая множество клеточных популяций, таких как эпителиальные клетки и иммунокомпетентные клетки (макрофаги, дендрциты, плазмоциты и лимфоциты), так чтобы все из них сохранили свою исходную структуру и расположение для межклеточного взаимодействия. Другими словами, при данной методике, как предполагалось, имитировали "in vivo" условия слизистой толстой кишки.

Согласно дизайну исследования исследовали дозы 0, 50, 500 и 5000 мкг/мл D-фагомина.

Использовали патогенные штаммы *E. coli*. Основные отличия патогенных штаммов *E. coli* от других непатогенных связаны с их способностью избегать воздействия иммунной системы.

Материалы и способы

Культура органа. Образцы нормальной слизистой толстой кишки согласно макроскопической оценке получали во время хирургической операции от пациентов, которым проводили колэктомия по поводу рака толстой кишки. Участки, не пораженные заболеванием, собирали в ледяной физиологический раствор и немедленно передавали в лабораторию научно-исследовательского отделения по изучению органов желудочно-кишечного тракта госпиталя Hospital Vall d'Hebron (Барселона). После промывания физиологическим раствором слизистую отсекали от мышечного слоя и кусочки размером от 25 до 30 мг помещали поверхностью вверх в лунки для культивирования (лунки с диаметром 15 мм с расположенной у дна сеткой, диаметр отверстий которой составляет 500 мкм, Netwell culture systems, Costar, Кембридж, Массачусетс) и располагали таким образом, что эпителиальная поверхность была сверху. Фильтры подвешивали над лунками, содержащими 1,5 мл среды RPMI (CanSera, Rexdale, Онтарио, Канада), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS; Gibco-BRL, Эггенштайн, Германия), 2 mM глутамина и антибиотики: 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл гентамицина (все от Norgon, Мадрид, Испания). Данный объем был необходим только для поддержания влажности поверхности, но не для погружения ниже поверхности.

Биоптаты инкубировали при 37°C в атмосфере 95% O₂ + 5% CO₂ и стимулировали в течение 1 ч РМА (форбол-12-миристан-13-ацетатом) и лономицином (100/1000 нг/мл), оба из которых доступны от Sigma.

После этого среду заменяли свежей средой RPMI 1640 (без глюкозы), дополненной 10% FCS и бикарбонатом натрия при 24 ммоль/л.

Штамм бактерий *E. coli* (10⁸-8 КОЕ/мл) и фагомин (50, 500 и 5000 мкг/мл) аккуратно добавляли к эксплантатам. Через 4 ч. культивирования тканей с *E. coli* надосадочные жидкости собирали для количественного определения выделения *E. coli*, высвобождения TNF-α, LDH (жизнеспособности) и pH. В дополнение ткани промывали, гомогенизировали и анализировали в отношении выделения *E. coli* и LDH (для изучения жизнеспособности ткани).

Штаммы бактерий. Патогенный штамм *E. coli* (CECT 434, (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919), используемый для сравнения, был предоставлен доктором Maria Angeles Calvo (Микробиологическая лаборатория, Ветеринарный факультет, Автономный университет Барселоны, Испания).

Инокулят *E. coli*. За день до эксперимента с тканью штамм *E. coli* инокулировали в бульоне Луриа Бергани (аптечная служба, госпиталь Hospital Vall d'Hebron, Автономный университет Барселоны, Испания) при 37°C при аэробных условиях в течение 24 ч. В день эксперимента бактерии собирали в стационарной фазе, число клеток в бактериальной суспензии оценивали по оптической плотности с поглощением при 600 нм и добавляли бактерии в лунки с культурой ткани при надлежащем разведении.

Промывание ткани. Для количественной оценки только адгезированных бактерий *E. coli* в конце культивирования ткани извлекали и промывали 2 мл физиологического раствора в орбитальной мешалке на низкой скорости в течение 2 минут. После промывания каждую ткань гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора и готовили разведения для количественной оценки выделения *E. coli* в селективной твердой среде на основе агара.

Выделение *e. coli* в конце эксперимента. Выделение *E. coli* из надосадочной жидкости и ткани количественно оценивали непосредственно после эксперимента путем культивирования в селективных твердых средах для энтеробактерий. Выполняли по меньшей мере 3 разных разведения для каждого образца. Через 24 часа вручную подсчитывали число колоний. Результаты нормализовали по отношению к стандартному размеру 30 мг.

Количественная оценка TNF-α. Концентрацию TNF-α в надосадочных жидкостях измеряли с помощью доступной для приобретения системы для анализа ELISA для цитокина TNF-α человека (Ready to Set, e-Bioscience). Концентрацию цитокина выражали в пг (TNF-α) на 30 мг ткани.

Жизнеспособность ткани толстой кишки. Для оценки жизнеспособности ткани рассчитывали ак-

тивность высвобождения LDH (лактат-дегидрогеназы) в надосадочной жидкости. Данный способ был утвержден Finnie (Gut 1995). Отношение активности LDH в надосадочной жидкости к общей активности LDH в тканевых гомогенатах рассчитывали и использовали для оценки процента жизнеспособной ткани. Образцы ткани гомогенизировали в Tris/HCl (100 ммоль/л, pH 7,4) и надосадочные жидкости анализировали в отношении LDH с использованием спектрофотометрического метода. Жизнеспособность ткани определяли как высвобождение LDH на мг ткани.

Статистический анализ. Результаты выражены в виде среднего значения и SEM или в виде отдельных данных в графиках.

Результаты

Выделение *E. coli* в ткани в конце эксперимента.

Результат по выделению *E. coli* в образцах ткани представлен в табл. 1 и на фиг. 1.

Таблица 1

		Ес-			
		контроль	Фаг. 50	Фаг. 500	Фаг. 5000
E coli x 10 ⁶ Извлечение на ткань	1	8,2	4	2,4	1,6
	2		4,4	0,8	1,6
E coli x 10 ⁶ Стандартизован о к 30 мг	1	7,45	4,12	2,21	1,4
	2		4,31	0,9	1,55
Среднее значение		7,45	4,22	1,56	1,47
SEM			0,09	0,65	0,07
среднее значение, % по сравнению с контролем		100,0%	56,6%	21,0%	19,8%
SEM, % по сравнению с контролем			1,3%	8,7%	1,0%

Можно явно увидеть, что большее количество *E. coli* в ткани толстой кишки присутствует в контрольном образце, а количество присутствующих бактерий, адгезированных к ткани, снижается по мере повышения концентрации D-фагомина. Другими словами, можно сделать вывод, что D-фагомин обладает эффектом подавления адгезии в отношении *E. coli* в эпителии толстой кишки. Эффект подавления адгезии становится все более выраженным по мере повышения концентрации D-фагомина.

Высвобождение цитокинов.

Результаты по высвобождению цитокинов показаны в табл. 2 и на фиг. 2.

Таблица 2

		В-	Ес-	Фаг. 50	Фаг. 500	Фаг. 5000
		контроль	контроль			
TNF-альфа/мл	1	12,9	0,7	106,2	20,7	13,8
	2	25,2	0,4	98,8	18,6	5,7
мг (вес ткани)	1	31,2	33,0	29,1	32,6	34,3
	2	26,5	33,6	30,6	26,2	31,0
TNF-альфа (1,5 мл)	1	18,6	0,9	164,2	28,6	18,1
	2	42,8	0,5	145,4	31,9	8,2
Стандартизи- ровано к 30 мг						
Среднее значение		30,7	0,7	154,8	30,3	13,2
SEM		8,5	0,1	6,7	1,2	3,5

Результаты явно показывают, что присутствие D-фагомина оказывает эффект стимуляции высвобождения TNF-альфа либо относительно контроля с *E. coli*, либо относительно контроля без *E. coli*. Кроме того, примечательно то, что высвобождение TNF-альфа зависит от концентрации D-фагомина. Интересно наблюдать, что чем ниже концентрация D-фагомина, тем более интенсивным является высвобождение цитокинов. Высвобождение TNF-альфа при дозировке 50 мкг/мл является неожиданно интенсивным, поскольку она индуцирует высвобождение TNF-альфа в 5 раз более высокое по сравнению с таковым при дозе 500 мкг/мл и почти в 8 раз более высокое по сравнению с таковым при дозе 5000 мкг/мл.

Вкратце, данный анализ показывает, что D-фагомин индуцирует активацию врожденного иммунного ответа в дозозависимой форме, и что указанное индуцирование является более интенсивным при более низких концентрациях 50 мкг/мл или менее.

Контроль жизнеспособности

Результаты по жизнеспособности ткани толстой кишки представлены в табл. 3.

Таблица 3

	Жизнеспособность по LDH	pH
Холост. проба	93,25%	7,71
Ес	94,16%	7,62
Ес Fago 50	88,20%	7,65
Ес Fago 500	91,47%	7,59
Ес Fago 5000	83,88%	7,65

Результаты указывают на то, что совместное культивирование с *E.coli* или фагомином не влияет на жизнеспособность ткани.

Пример 2. Композиции, содержащие D-фагомин.

Получали следующие композиции с D-фагомином:

напиток для питья с добавлением D-фагомина (50 мг) и рутина (500 мг);

таблетка с добавлением D-фагомина (50 мг) и рутина (500 мг);

галеты, изготовленные из муки *Fagorum esculentum*, которая по природе содержит D-фагомин, рутин и препарат пребиотиков, включающий растительные волокна, FOS (фруктоолигосахариды) и XOS (ксилоолигосахариды);

безалкогольное пиво, изготовленное из *Fagorum esculentum*, с содержанием D-фагомина 8 ppm и рутина 50 ppm;

детская смесь на основе молока коров, которых кормили гречихой, содержание D-фагомина в которой составляло 10 ppm;

жевательная резинка, не содержащая сахара, с D-фагомином (50 мг) для стимуляции врожденного иммунного ответа в слизистой ротовой полости и предупреждения кариеса и заболеваний пародонта;

леденец с D-фагомином (20 мг) в качестве вспомогательного средства при бактериальных инфекционных процессах в горле или в кишечнике;

гранулированный микроинкапсулированный препарат с D-фагомином (50 мг) и рутином (500 мг) в качестве добавки для получения функциональных продуктов питания или фармацевтических составов для улучшения биологической доступности в толстой кишке;

назальный спрей с D-фагомином (10 мг) в качестве вспомогательного средства для назальных вакцин при процессах иммунизации против *Streptococcus pneumoniae*, вируса гриппа и т. д.;

пероральный порошковый состав, содержащий 50-100 мг D-фагомина, в качестве вспомогательного средства при инфекционных процессах в кишечнике, наряду с пробиотиками (*Lactobacillus*, *Bifidobacteria*).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой и предупреждения воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального иммунного ответа, включающий введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли.

2. Способ по п.1, где подразумевается врожденная иммунная система на уровне слизистой ротовой полости, слизистой пищевода, слизистой желудка, слизистой тонкой кишки, слизистой толстой кишки, слизистой носовой полости, слизистой бронхов, слизистой уретры или слизистой матки.

3. Способ по п.2, где врожденный иммунный ответ происходит на уровне слизистой толстой кишки.

4. Способ по п.1, где избыточная активация гуморального иммунного ответа вызвана оппортунистическими патогенами, включающими гамма-протеобактерии, в том числе *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, или стрептококки, в том числе *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* или *Enterococci faecalis*.

5. Способ профилактики аутоиммунных заболеваний и замедления прогрессирования заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, включающий введение субъекту соединения D-фагомина, или его фармацевтически приемлемой соли, или его пригодной для применения в ветеринарии соли, или его съедобной соли.

6. Способ иммуностимуляции врожденной иммунной системы на уровне слизистой и предупреждения проявляющихся клинически или субклинических воспалительных процессов, связанных с избыточной активацией гуморального иммунного ответа, включающий введение субъекту композиции, содержащей D-фагомин, или его фармацевтически приемлемую соль, или его пригодную для применения в ветеринарии соль, или его съедобную соль.

7. Способ по п.6, где композиция представляет собой твердую или водную композицию.

8. Способ по п.6, где водная композиция содержит D-фагомин при концентрации, равной или меньше 5000 мкг/мл.

9. Способ по п.8, где водная композиция содержит D-фагомин при концентрации, равной или меньше 50 мкг/мл.

10. Способ по любому из пп. 6-9, где D-фагомин находится в форме обогащенного экстракта, полученного из природного источника, или химического продукта тонкого органического синтеза.

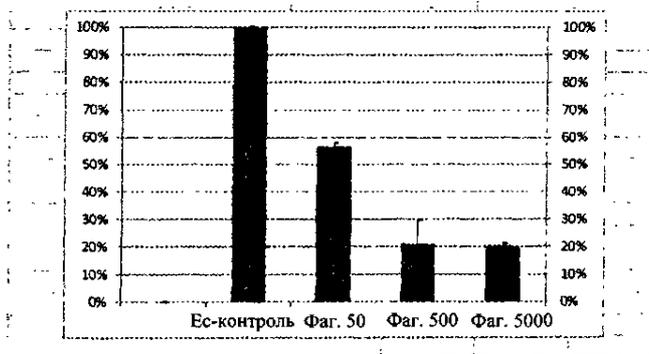
11. Способ по п.9, где природным источником D-фагомина являются семена *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, листья *Morus bombycis* или *Morus alba*, корни *Lycium chinense*, корни и листья *Xanthocercis zambesiaca*, плоды *Angylocalyx pinaertii*, листья *Vaphia nitida*, семена *Castanospermum austral* и корни *Lonchocarpus latifolius*.

12. Способ по любому из пп.6-11, где композиция представляет собой фармацевтическую, пригодную для применения в ветеринарии или пищевую композицию.

13. Способ по любому из пп.6-12, где композиция дополнительно содержит рутин.

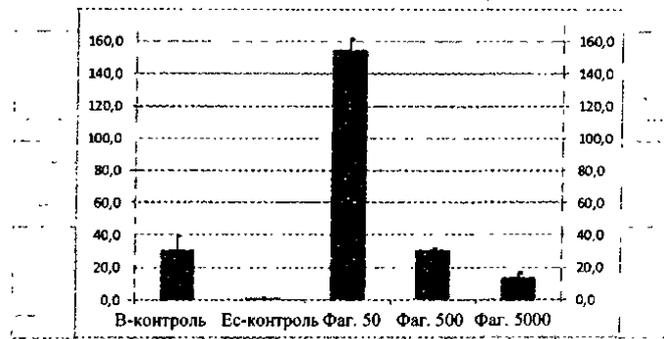
14. Способ профилактики аутоиммунных заболеваний и замедления прогрессирования заболеваний, связанных с патологическим гуморальным воспалительным ответом, включающий введение субъекту композиции, содержащей D-фагомин, или его фармацевтически приемлемую соль, или его пригодную для применения в ветеринарии соль, или его съедобную соль.

% выделения E. coli 434 в ткани относительно контроля



Фиг. 1

Высвобождение TNF-альфа в надосадочной жидкости пг/мл



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2