

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040310**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.19

(21) Номер заявки
201991301

(22) Дата подачи заявки
2017.11.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/00* (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 15/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

**(54) УРОГЕНИТАЛЬНАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО УСТРОЙСТВА
НА ОСНОВЕ ПОДХОДЯЩИХ БИОХИМИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ ДЛЯ
СТАБИЛИЗАЦИИ КИСЛОТНОСТИ И РЕДОКС-СОСТОЯНИЯ ВАГИНАЛЬНОЙ
ЖИДКОСТИ**

(31) PCT/IB2016/057218

(32) 2016.11.30

(33) IB

(43) 2019.10.31

(86) PCT/IB2017/057547

(87) WO 2018/100533 2018.06.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОБИОСВИСС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Граф Федерико (CH)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) WO-A2-2009123982
WO-A2-2016020861
WO-A1-2005060937

R.A. VONGSA ET AL: "In vitro evaluation of nutrients that selectively confer a competitive advantage to lactobacilli", BENEFICIAL MICROBES, vol. 7, no. 2, 11 March 2016 (2016-03-11), pages 299-304, XP055391936, NL ISSN: 1876-2883, DOI: 10.3920/BM2015.0047 page 302, column 2, paragraph 3 – page 303, column 1, paragraph 1; figure 4

ROUSSEAU V ET AL: "Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms", ANAE, LONDON, GB, vol. 11, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 145-153, XP004807462, ISSN: 1075-9964, DOI: 10.1016/J.ANAEROBE.2004.12.002 page 152, column 1, paragraph 2 – column 2, paragraph 2

WO-A1-2006045474

SUJATHA SRINIVASAN ET AL: "Metabolic Signatures of Bacterial Vaginosis", MBIO, vol. 6, no. 2, 14 April 2015 (2015-04-14), pages e00204-15, XP055321509, DOI: 10.1128/mBio.00204-15 page 10, column 2, paragraph 4

K. L. SEIB ET AL: "Defenses against Oxidative Stress in Neisseria gonorrhoeae: a System Tailored for a Challenging Environment", MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, vol. 70, no. 2, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 344-361, XP055447159, US ISSN: 1092-2172, DOI: 10.1128/MMBR.00044-05 page 352, column 2, paragraph 2 - paragraph 3

US-A1-2015139969

(57) Изобретение относится к композициям для вагинального или, альтернативно, перорального введения и к применению таких композиций для стабилизации вагинальной или, альтернативно, кишечной кислотности и создания благоприятных условий для ингибирования патогенных микроорганизмов и роста лактобактерий в урогенитальном или, альтернативно, желудочно-кишечном тракте.

B1**040310****040310****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биохимической композиции урогенитальных композиций, стабилизирующих кислотность во влагалище и создающих в нем подходящие условия для ингибирования урогенитальных патогенов и для роста лактобактерий. Изобретение обеспечивает композиции для вагинального или, альтернативно, перорального введения и применение таких композиций для стабилизации вагинальной или, альтернативно, кишечной кислотности и создания благоприятных условий для ингибирования патогенов и роста лактобактерий в урогенитальном, или альтернативно, в желудочно-кишечном тракте. Эти композиции основаны на химически определенных ингредиентах, в них избегают обычно применяемых природных или плохо определенных питательных компонентов, и композиции могут быть связаны с вагинальными штаммами человека со специфическими противомикробными и/или противовоспалительными свойствами.

Кроме того, уделяют внимание правильному значению окислительно-восстановительного потенциала после вагинального введения такой композиции, в частности, в отношении ингибирования ассоциированных с бактериальным вагинозом (BV) патогенов типа *G. vaginalis*.

Наконец, также представлены композиции, содержащие средство для дополнительного подавления роста условно-патогенных дрожжей, таких как *Candida albicans*, без ущерба для роста лактобактерий.

Уровень техники

Хорошо известно, что полезные, хорошо переносимые непатогенные бактерии, так называемая человеческая естественная микробиота, в здоровом состоянии преобладают в кишечнике, влагалище и мочеиспускательном канале/мочевом пузыре, в то время как избыточный рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, таких как бактерии, дрожжи, вирусы и простейшие, часто приводит к дисбактериозным инфекциям в этих органах.

Термины "аэробные бактерии" и "анаэробные бактерии" обычно применяют для описания, соответственно, тех микроорганизмов, которым требуется воздух, и тех, которые не могут расти в присутствии воздуха.

Примечательно, что некоторые из непатогенных и патогенных бактерий, которые могут быть обнаружены во влагалище, могут быть определены как "нефакультативные анаэробы", т.е. они могут расти как в присутствии, так и в отсутствие воздуха и в основном не подвержены влиянию окислительных условий в среде для выращивания. Кишечная палочка (*E. coli*) и золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), которые, как известно, вызывают вагинальное состояние, обычно обозначаемое как "аэробный вагинит", представляют собой неограничивающие примеры таких нефакультативных анаэробных бактерий.

Другие микроорганизмы, которые могут быть обнаружены во влагалище, представляют собой "облигатные анаэробы", т.е. они не растут в присутствии свободного кислорода и могут фактически погибнуть в присутствии кислорода или в окислительных условиях.

Анаэробные организмы, такие как *Gardnerella vaginalis*, облигатный анаэроб, мигрирующий из промежности во влагалище или приобретенный в результате полового акта, могут вызывать дисбиоз с небольшим количеством симптомов, за которым следует полномасштабный бактериальный вагиноз (BV), представляющий собой наиболее распространенную вагинальную инфекцию. BV представляет собой серьезный риск преждевременных родов у беременных женщин и увеличивает риск инфекций, передаваемых половым путем (ссылка 1). В таких случаях вагинального дисбиоза или вагинальных инфекций, вызываемых анаэробами, pH вагинальной среды увеличивается от физиологических значений 3,5-4,5 до значений, достигающих 5-6 или даже выше. Это повышение pH представляет собой критическим клиническим параметром, применяемым при диагностике BV, и одной из основных причин рисков, связанных с BV. Ферментативное действие лактобактерий микробиоты Döderlein на метаболиты гликогена и другие углеводы, присутствующие во влагалище и дающие в основном молочную кислоту, а также, в меньшей степени, другие органические кислоты, приводит к низкому значению pH вагинальных жидкостей. Кроме того, некоторые штаммы грамотрицательной *E. coli*, происходящие из кишечника и мигрирующие сначала во влагалище, а затем в мочеиспускательный канал/мочевой пузырь, представляют собой наиболее частую причину уретрита/цистита у сексуально активных женщин. Эта же *E. coli* также может вызывать дисбиоз во влагалище, состояние, называемое аэробным вагинитом, которое также сопровождается нарушением микробиоты влагалища, снижением кислотности влагалища и увеличением соответствующего значения pH (ссылка 2).

Дрожжи *Candida*, которые умеют приспосабливаться и часто сосуществуют с лактобактериями, представляют собой другой патоген, вызывающий вагинальные инфекции, особенно во время беременности.

Candida представляет собой единственный дрожжевой организм, который ведет себя как факультативный анаэроб, т.е. он в своей основе не зависит от наличия или отсутствия воздуха и окислительных условий.

Эти инфекции обычно лечат с помощью противомикробного лечения, направленного против патогенов, которые должны быть успешно уничтожены в ходе такой терапии, по крайней мере, до определенной степени. Однако в течение 3-х месяцев после первичного лечения примерно в 70% слу-

чаев у пациента случается рецидив или реинфекция (ссылка 3), либо потому что патогены не были убиты надлежащим образом, либо из-за отсутствия защиты посредством восстановленной местной влагалищной микробиоты. Эта микробиота на самом деле часто повреждается в результате противомикробной терапии. Местная вагинальная микробиота, исторически называемая микробиотой Döderlein, чувствительна ко многим противомикробным средствам и, в частности к антибиотикам. Она часто бывает нарушена или даже уничтожена противомикробной терапией и поэтому не способна ингибировать размножение когда-либо присутствовавших условно-патогенных, часто патогенных, организмов. Как следствие, бактериальный вагиноз, который лечится антибиотиком узкого спектра действия, специфичным в отношении анаэробов, такой как клиндамицин, может привести к грибковой инфекции, поскольку микробиота влагалища, истощенная по лактобактериям, не может подавлять условно-патогенные дрожжи.

Возможность применения экзогенных *Lactobacillus* непосредственно во влагалище для лечения дисбиоза или инфекции влагалища уже была предложена врачом, который их обнаружил, самим Альбертом Додерлейном (Albert Döderlein), в своей новаторской книге в 1892 году (ссылка 4). Эта концепция с тех пор получила широкое развитие в научной и патентной литературе и недавно была всесторонне рассмотрена (ссылка 5).

WO 2009/123982 A2 относится к способам и композициям для заместительной терапии *Lactobacillus*, т.е. для колонизации слизистой оболочки влагалища желаемыми видами микроорганизмов путем контакта стенки влагалища с высушенной композицией живых микробных клеток.

WO 2016/020861 A1 относится к композициям пленки или губки и к способу профилактики и лечения вагинальных инфекций, где указанная пленка или губка содержит, по меньшей мере, мукоадгезивный полимер, по меньшей мере один пробиотик и/или пребиотик и по меньшей мере одно активное соединение, такое как противогрибковое или антибиотическое средство, в фармакологически эффективных количествах.

В последние годы авторы изобретения провели тщательные исследования о свойствах ранее неизвестных штаммов *Lactobacillus* человека вагинального происхождения, имеющих отношение к конкуренции с наиболее распространенными урогенитальными патогенами. В частности, авторы изобретения исследовали механизмы, включающие взаимодействие молочной кислоты, пероксида водорода и других агентов, которые, как было обнаружено, объясняют исключительно сильную и специфическую антибиотикоподобную активность, например *Lactobacillus gasseri* против патогенных *Gardnerella vaginalis* и *Prevotella bivia* (ссылка 6) и активность *L. jensenii* и *L. crispatus* против уропатогенной *E.coli* (ссылка 7). Подход, описанный в упомянутых работах и патентах (ссылка 8), имеет дополнительное преимущество применения штаммов, выделенных из того же тракта совершенно здоровых женщин, для терапевтического применения, направленного на урогенитальный тракт. Таким образом, возможные проблемы с переносимостью экзогенно вводимых штаммов *Lactobacillus* могут быть в значительной степени уменьшены по сравнению с применением таких штаммов, происходящих не от человека и не из урогенитального тракта здоровых молодых женщин. Для штаммов, происходящих не от человека, вопрос безопасности и переносимости для терапевтических средств, например, при урогенитальных применениях, а priori не ясен и поэтому должен оцениваться a posteriori.

Для обеспечения подходящих композиций для фармацевтически приемлемого носителя, авторы изобретения изучили различные составы, применяемые в пробиотических продуктах и/или описанные в литературе. В одном опубликованном подходе (ссылка 9) авторы изобретения утверждают, что применение обезжиренного молока, соответственно, препаратов и производных обезжиренного молока, называемых LGF (фактор роста *Lactobacillus*) или NGF (естественный фактор роста), способствует росту желаемых *Lactobacillus*, одновременно ингибируя рост нежелательных уропатогенов. Такие целевые факторы роста, которые можно применять для вагинальных приложений, также согласно тем же изобретателям были обнаружены в микробиологических средах роста. Фактически, среда MRS (DeMan-Rogosa-Sharp) представляет собой такую наиболее применимую среду роста для штаммов *Lactobacillus* (ссылка 10). Помимо минералов и витаминов, этот бульон содержит также пептоны, источники углерода и, в особенности азота, химически неопределенного состава. Другие авторы изобретения рекомендуют применять сложные белковые вещества, такие как обезжиренное молоко и альбумин, в матриксе для хранения вагинального лекарственного средства, содержащего штаммы *Lactobacillus* (ссылка 11).

На наш взгляд, хотя композиции, содержащие натуральные питательные вещества, такие как обезжиренное молоко или пептоны, могут быть полезны для специальных применений, они не подходят в качестве ингредиентов в фармацевтических композициях, содержащих *Lactobacillus*, для вагинальных применений. Это связано с тем, что, во-первых, они имеют биологическое (в особенности, животное) происхождение, и, во-вторых, эти натуральные ингредиенты часто имеют химически плохо определенный состав и, таким образом, они несут повышенный риск возникновения побочных эффектов у пациентов, как объяснено ниже. Кроме того, с точки зрения селективной эффективности эти NGF могут не достигать желаемого эффекта ингибирования роста уропатогенов. Не только штаммы *Lactobacillus*, но и многочисленные патогенные микроорганизмы могут расти в таком богатом ингредиентами (с белками, углеводами, витаминами, минералами и т.п.) составе, как обезжиренное молоко, после контакта и сме-

шивания с вагинальной жидкостью. Такие патогены, как *E.coli*, иногда растут быстрее в молоке, чем в питательном бульоне.

Принимая, что 2 патогена, обычно обнаруживаемых в урогенитальной микробиоте, *S. aureus* и *E.coli*, которые оба также разрастаются в несколько порядков в течение примерно 20 ч при инокуляции в среду, специфичную для *Lactobacillus*, такую как MRS (Табл. 1), схожие результаты были получены также с обезжиренным молоком (не показано далее).

Таблица 1. Показатели роста двух патогенов в бульоне MRS

Патоген	Время (часы)	OD 600 нм	pH	KOE/мл
<i>E.coli</i> CCOS 492	0	0,05	6,5	Прибл. 10^8
	20	3,05	5,1	$2,3 \times 10^{10}$
<i>S. aureus</i> CCOS 461	0	0,05	6,5	Прибл. 10^8
	20	3,1	5,2	$1,8 \times 10^{10}$

Даже начиная с относительно высокой концентрации 10^8 KOE/мл, эти патогенные микроорганизмы могут дополнительно нарастать в MRS на несколько logs, но останавливают рост примерно через 20 ч в конце из-за низкого pH, который они генерируют. Т.е. так называемая питательная среда, высокоспецифичная для *Lactobacillus*, также может способствовать росту опасных патогенов. Чтобы ингибировать рост таких патогенов, в композицию необходимо добавить эффективный и селективный ингибитор.

Поэтому, если у субъекта, в первую очередь, поселились здоровые штаммы *Lactobacillus*, присутствующие в достаточных количествах во влагалище, то может быть целесообразным вводить LGF, поскольку эти местные бактерии *Lactobacillus* могут их метаболизировать. Тем не менее, нецелесообразно вводить в дисбиотическое влагалище, уже инфицированное или с дефицитом полезных *Lactobacillus*, LGF любого вида или такие неспецифические факторы роста, поскольку они могут стимулировать рост присутствующих патогенов, вместо редких штаммов *Lactobacillus*. Дисбактериоз или инфекция могут даже усилиться при таком лечении LGF, риски которого следует избегать.

В заключение: препараты обезжиренного молока или компоненты питательной среды *Lactobacillus*, такие как MRS, могут при некоторых обстоятельствах поддерживать рост эубиотических, местных вагинальных *Lactobacillus*. Однако, как правило, они не подходят в качестве терапевтических ингредиентов фармацевтических композиций для применения в дисбиотическом влагалище, так как они имеют низкую селективность по отношению к *Lactobacillus* и не определены четко химически. Настоящее изобретение предназначено для преодоления этих недостатков.

Вследствие продуцирования молочной и различных алифатических кислот физиологической (т.е. вагинальной) микробиотой Döderlein, влагалищные жидкости имеют кислый pH, в среднем между 3,5 и 4,5, что, по-видимому, представляет собой оптимальным для вагинального гомеостаза, поскольку *Lactobacillus* spp. при этом pH все еще может расти, в результате чего подавляется большинство патогенных микроорганизмов и условно-патогенных микроорганизмов. При pH выше 4,5 патогенные микроорганизмы могут легко расти, однако при pH ниже 3,5 рост самих *Lactobacillus* Döderlein все более подавляется. Эта кислая вагинальная жидкость, возникающая в результате ферментации эндогенных углеводов, таких как метаболиты гликогена, под действием микробиоты Döderlein, представляет собой саму биохимическую основу защитного механизма влагалища от инфекций и имеет первостепенное значение для репродуктивного здоровья женщин (ссылка 12).

Принимая во внимание эти факторы, неудивительно, что в литературе имеются ссылки (например, ссылка 13), касающиеся включения неопределенного буферного pH-агента в вагинальную композицию. В другом применении (ссылка 14) рекомендуют композицию, которая содержит буферное средство (химически не определенное в упомянутой ссылке) для стабилизации степени кислотности влагалища в диапазоне pH 3,5-5,0.

Однако авторы настоящего изобретения обнаружили, что во всех случаях для предотвращения роста патогенов недостаточно только кислого pH. Эксперименты, проведенные в лабораториях изобретателей (приведены ниже в данном документе), показывают, что даже при pH ниже 5 соответствующие патогены, такие как *S. aureus* и *E.coli*, могут быстро расти. Применяемая среда содержала лактозу в качестве источника углерода и 15% MRS в качестве стимулятора начала роста.

В заключение: важность кислого pH влагалища не оспаривается в научном сообществе, и некоторые авторы признали полезность добавления буферного агента к фармацевтической композиции, разработанной для вагинального применения. Таким образом, диапазон pH должен быть четко определен в соответствии с физиологией в диапазоне от 3,5 до 4,5. Значение pH 4,5 на верхнем пределе физиологического диапазона выбрано намеренно, так как оно терпимо переносится пациентами. Более кислые значения pH около 4 или ниже могут вызвать дискомфорт, такой как зуд и жжение, поскольку вагинальный эпителий более чувствителен в случаях дисбактериоза и инфекций.

Кроме того, химический состав и дозировки буферного агента должны быть указаны в фармацевтическом рецепте, например, для капсулы. Наконец, буфер должен быть таким, чтобы он действовал сразу же после интравагинального введения, и его действие сохранялось, по меньшей мере, до следующего введения, т.е. от 12 до 24 ч.

Помимо кислого буфера и питательных факторов, изложенных в вышеприведенном разделе, есть также другие факторы, играющие роль в разработке эффективных пре- или про- или симбиотических композиций для вагинального применения. Одним из таких факторов представляет собой окислительно-восстановительный потенциал вагинальной жидкости после применения устройства.

Как мы покажем, это особенно актуально в случае бактериального вагиноза (BV), где патогены представляют собой облигатных анаэробов (*Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae*, ...). Окислительно-восстановительный потенциал действительно может влиять на рост этих вышеупомянутых патогенов.

Влияние окислительно-восстановительного потенциала на рост и выживание микроорганизмов в вагинальной флоре показано на фиг. 3 (согласно ссылке 22, Eschenbach et al 1985).

Наконец, грибок *Candida albicans* представляет собой другой потенциально опасный микроб, который очень часто встречается в качестве условно-патогенного компонента вагинальной микрофлоры. Авторы представят способ контроля роста грибов без ингибирования роста вагинальных лактобактерий.

Настоящее изобретение направлено на обеспечение решения, позволяющего выполнить эти задачи.

Раскрытие изобретения

В воплощении, настоящее изобретение относится к композиции для применения при лечении или профилактике урогенитальных инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами у субъекта-женщины, в которой композиция содержит эффективное количество каждого из следующего из следующего:

- а) буферное средство,
 - б) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
 - с) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
 - г) пребиотический полисахарид, поддающийся ферментации вагинальной микробиотой,
- в которой лечение или профилактика включает введение композиции интравагинально субъекту для стабилизации кислотности вагинальной жидкости субъекта при физиологическом значении около pH 4,5 или ниже.

В воплощении, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики урогенитальных инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами у субъекта-женщины, который включает интравагинальное введение субъекту, необязательно после противoinфекционного лечения урогенитальной инфекции, композиции с эффективным количеством каждого из следующего из следующего:

- а) буферное средство,
- б) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
- с) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
- г) пребиотический полисахарид, поддающийся ферментации вагинальной микробиотой, в котором лечение или профилактика включает интравагинальное введение композиции субъекту.

В другом воплощении, настоящее изобретение относится к способу стабилизации кислотности вагинальной жидкости субъекта при физиологическом значении около pH 4,5 или ниже, который включает интравагинальное введение субъекту композиции с эффективным количеством каждого из следующего:

- а) буферное средство,
 - б) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
 - с) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
 - г) пребиотический полисахарид, поддающийся ферментации вагинальной микробиотой,
- в котором лечение или профилактика включает введение композиции интравагинально субъекту.

В другом воплощении, настоящее изобретение относится к композиции, подходящей для перорального введения, имеющей pH в диапазоне от 4 до 5, в которой композиция содержит эффективное количество каждого из следующего:

- а) буферное средство,
- б) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
- с) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
- г) пребиотический полисахарид, ферментируемый вагинальной микробиотой.

Фигуры

Фиг. 1 - графическое представление данных, полученных в экспериментах по росту *Lactobacillus gasseri* KS 120.1 CNCM I-3218.

Фиг. 2 - графическое представление данных, полученных в экспериментах по росту *S. aureus* CCOS 461 с множественной лекарственной резистентностью.

Фиг. 3 - схематическое 2-мерное представление окислительно-восстановительного потенциала Eh и кислотности pH во влагалище в зависимости от состава вагинальной микробиоты (флоры) (согласно ссылке Eschenbach et al. 1985).

Настоящее изобретение предлагает композицию для применения для стабилизации pH вагинальной жидкости при физиологическом значении около 4,5 и, необязательно, окислительно-восстановительного потенциала вагинальной жидкости выше 150 мВ в течение достаточно продолжительного времени и для селективного стимулирования роста *Lactobacillus* spp. против роста патогенных микроорганизмов, в особенности, анаэробов, в качестве способа предотвращения, смягчения или лечения вагинальных и урогенитальных инфекций, таких как BV, вызываемых патогенными микроорганизмами, согласно прилагаемой формуле изобретения.

Композиция по настоящему изобретению может необязательно включать природное, химически определенное вещество в концентрации, ингибирующей *Candida*, но не бактерии *Lactobacillus*.

Кислотность и питательные вещества: композиции против факультативных анаэробных патогенов.

В этом способе применяют конкретные, биохимически четко определенные композиции фармацевтических препаратов для вагинального применения.

Композиция в контексте настоящего изобретения содержит следующие биохимические компоненты:

биохимическое буферное средство для поддержания pH композиции (in vitro и in vivo) в желаемом диапазоне от 4,0 до 5,0, предпочтительно 4,5, после нанесения и в течение до 12-24 ч после этого;

противопатогенный консервант биохимической природы, полностью совместимый с бактериальными компонентами микробиоты Döderlein (вагинальной);

биологический химически определенный источник углерода, выбранный для селективного стимулирования роста *Lactobacillus* spp.;

биологически пригодный, иначе химически чистый, источник азота, поддерживающий адекватный рост и пролиферацию *Lactobacillus* spp. (уже присутствующих или введенных); и,

необязательно, адекватный химически определенный источник серы, усваиваемый лактобактериями; окислительно-восстановительные модуляторы (оксиданты в сочетании с антиоксидантами в правильном соотношении);

химические соединения (органические и/или неорганические), выбранные из-за их специфической и направленной противoinфекционной активности против патогенных микроорганизмов различных видов, таких как паразиты и/или простейшие, и/или бактерии, и/или грибы, и/или вирусы, и некоторые минералы, витамины и др. необязательные компоненты, которые могут иметь отношение к росту выбранных видов *Lactobacillus* spp. или ингибированию нежелательных патогенов. Сорбат представляет собой неограничивающий пример противогрибкового средства, особенно против *Candida*.

Указанные ингредиенты могут быть единственными в композиции по настоящему изобретению или могут быть применены в комбинации с: пробиотическими штаммами *Lactobacillus* в качестве живых клеток или их лиофилизатов, их бесклеточных культуральных супернатантов или их тиндаллизатов, выбранных по их специфическим свойствам, включая, но не ограничиваясь этим, антибиотикоподобную активность в отношении урогенитальных патогенов, адгезию к вагинальным/уретральным эпителиальным клеткам, продуцирование H_2O_2 , молочной кислоты, а также соответствующих бактериоцинов и ферментов.

Сама композиция представляет собой подходящую галеновую форму в фармацевтически приемлемом носителе или системе доставки. Фактическая композиция может быть введена в виде лиофилизированного препарата, крема, пасты, жидкого геля или суппозитория, капсулы или таблетки/стилуса для кишечного, уретрального или вагинального применения. Альтернативно, лекарственный препарат может представлять собой капсулу или таблетку или суппозиторий, крем или гель (смазка) для вагинальной доставки.

Упомянутые выше пробиотические виды *Lactobacillus* должны применяться на практике в качестве способа введения в виде жизнеспособных цельных клеток, обычно в количестве между 10^5 и 10^{10} КОЕ или в виде бесклеточного супернатанта соответствующих культур в жидкой, полутвердой или лиофилизированной форме. Виды *Lactobacillus* предпочтительно выбирают из группы, состоящей из *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. iners*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. lactis* и *L. johnsonii*.

Напротив, способ согласно настоящему изобретению не включает применение таких сред, как натуральные молочные питательные вещества или компоненты животного происхождения, как предлагали ранее в других местах. В дополнение к тому факту, что эффективность указанных факторов роста нуждается в дальнейшем подтверждении в клинических исследованиях, такие питательные вещества и компоненты не подходят для фармацевтического внутривлагалищного или внутриуретрального применения по следующим медицинским причинам. Они могут содержать известные и неизвестные вещества белковой природы, обладающие аллергенным или раздражающим потенциалом для чувствительного эпителия влагалища и уретры и/или бактериальные споры, вирусы, прионы или их компоненты/метаболиты, которые могут пережить стерилизацию и стать потенциальной угрозой для здоровья пациента.

Те же соображения, подробно изложенные выше для оптимального состава пробиотической композиции, применяют аналогично для желудочно-кишечной (GI) среды. Несмотря на то, что желудочно-кишечный тракт по сравнению с урогенитальным трактом богат питательными веществами для резидентной микробиоты, а также для проживающих там патогенных микроорганизмов, концепция о том,

что пробиотический состав должен способствовать поддержанию оптимальной кислотности и окислительно-восстановительного состояния в желудочно-кишечном тракте, и, в то же время, должен способствовать росту здоровых пробиотических бактерий, одновременно подавляя рост патогенных микроорганизмов и условно-патогенных видов, остается в силе.

Однако при переносе фокуса с мочеполовой системы на желудочно-кишечный тракт, как на экосистему, необходимо учитывать два основных различия.

Во-первых, кислотность в желудочно-кишечном тракте, вследствие его природы и длины, не постоянна (ссылка 17). Следующие значения pH обычно измеряют у нормальных людей:

a. Желудок:	от 1,0 до 2,5
b. Проксимальная тонкая кишка:	6,6
c. Терминальная подвздошная кишка:	7,5
d. Слепая кишка:	6,4
e. Прямая кишка:	7,0

pH в кишечнике варьирует от 6 до 7, по сравнению со значениями от 3,5 до 5 в здоровом влагалище.

Другое отличие состоит в том, что основным продуктом кислой ферментации GI-микробиоты будет не молочная кислота, а целый ряд короткоцепочечных жирных кислот (SCFA), включая ацетат или бутират, которые составляют основной поток углерода из диеты через микробиота GI к хозяину и вносят важный вклад в метаболизм хозяина (ссылка 18).

Как следствие, пребиотические волокна, содержащиеся в композиции по изобретению для улучшения метаболизма штаммов микробиоты Döderlein, при применении в кишечнике будут полезны не только для *Lactobacillus* spp., но также, например, для бифидобактерий и других резидентных видов. Преимущественно композиция по изобретению содержит по меньшей мере два разных волокна, действующих на разных уровнях кишечника, так как микробиота желудочно-кишечного тракта в верхнем и нижнем кишечнике, соответственно, несколько отличается.

Способ по настоящему изобретению для уrogenитального применения может быть изменен без значительных изменений для перорального применения. Фактически, оптимальное значение pH перорального лекарственного препарата, содержащего пробиотики, - это уровень йогурта или простокваши, который находится в области около 4,5 (ссылка 19), такой же, как у здорового влагалища.

По этой причине описанные выше соображения и соответствующие эксперименты сохраняют свою актуальность при рассмотрении подходящего перорального состава, содержащего пробиотики. Как указывали выше, основное отличие состоит в выборе пребиотических волокон, так как для кишечника предпочтительно включать по меньшей мере два волокна.

Как применяют ниже, термин "композиция" относится к композиции для интравагинального введения, а также к композиции для перорального применения, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Композиция согласно настоящему изобретению может содержать следующие биохимические компоненты:

a) биохимическое буферное средство для поддержания pH композиции (in vitro и сразу после растворения in vivo) в желаемом диапазоне от 4 до 5, предпочтительно, 4,5;

b) противопатогенное консервирующее средство биохимической природы, полностью совместимое с бактериальными компонентами кишечной молочнокислой микробиоты;

c) биологически пригодный, иначе химически чистый, источник азота, поддерживающий адекватный рост и пролиферацию *Lactobacillus* spp. (уже присутствующий или введенный);

d) биологические, химически определенные источники углерода, выбранные для селективного стимулирования роста *Lactobacillus* spp. и ферментируемые в молочной кислоте, а также в SCFA; предпочтительно в сочетании с

e) биологически пригодным, иначе химически чистым источником серы, обеспечивающим адекватный рост и размножение *Lactobacillus* spp. (уже присутствующим или введенным);

f) компонентом, модулирующим окислительно-восстановительный потенциал во влагалищной жидкости, который может содержаться в композиции в присутствии или в отсутствие источника серы,

g) выбранными минералами и/или витаминами, окислителями/антиоксидантами и другими компонентами, которые могут иметь отношение к росту выбранных видов *Lactobacillus* spp. и ингибированию патогенов, и

h) пробиотическими штаммами *Lactobacillus* в виде живых клеток (или их лиофилизатов, их бесклеточных культуральных супернатантов или их тиндаллизатов), выбранными по их специфическим свойствам, включая, без ограничений, антибиотикоподобную активность в отношении уrogenитальных и/или кишечных патогенов, а также адгезию к кишечным, а также к вагинальным/уретральным эпителиальным клеткам, продуцирование H₂O₂, молочной кислоты, а также соответствующих бактериоцинов и ферментов.

В контексте настоящего изобретения термины "химически чистый" и "химически определенный" указывают на синтетическую среду или вещество, химический состав которых точно известен (ссылка

Textbook "Basic microbiology" 8th edition, W. A: Volk, J. C, Brown, 1997, pages 39-40).

Сложная (неопределенная) среда - это среда, в которой точное химическое строение среды неизвестно. Определенные среды обычно состоят из имеющихся в наличии чистых биохимических веществ; сложные среды обычно содержат сложные материалы биологического происхождения, такие как кровь или молоко или дрожжевой экстракт или экстракт говядины, точный химический состав которых явно не определен. Определенная среда представляет собой минимальную среду. Сама композиция может представлять собой подходящую галеновую композицию в фармацевтически приемлемом носителе или системе доставки. Фактическая композиция в жидкой (йогуртовые напитки), полутвердой (йогурт, сыр) или твердой форме, последняя включает также таблетки, капсулы, саше и палочки.

Ниже приведены предпочтительные воплощения изобретения.

a. Буферное средство.

Назначение такого ингредиента состоит в том, чтобы помочь поддерживать значение pH вагинальной жидкости после применения в физиологическом диапазоне pH от 4 до 5. Кислоты и их соли, имеющие в растворе такие желаемые свойства, например, органические кислоты, такие как алифатические кислоты: уксусная, пропионовая, масляная кислота и т.п. кислоты, дикарбоновые кислоты, такие как щавелевая, малоновая, янтарная кислота и т.п. кислоты, гидроксикислоты, такие как молочная кислота, лимонная кислота, дикарбоновые кислоты, такие как яблочная кислота и т.п. Также могут быть рассмотрены другие кислоты, которые обнаруживают в организме человека, такие как фосфорная кислота.

b. Противопатогенный консервант, совместимый с микробиотой Döderlein.

Специфика метаболизма молочнокислых бактерий заключается, как указывает само название, в выработке молочной кислоты. Это основная причина применения, как в традиционных, так и в промышленных пищевых продуктах, ферментации молочной кислоты для уничтожения потенциальных патогенных микроорганизмов, присутствующих в сырых питательных веществах, и для сохранения их в конце процесса ферментации посредством эффективного количества молочной кислоты (например, квашение капусты). Поскольку *Lactobacillus* spp., в особенности, вагинальные, хорошо переносят кислую среду, содержащую молочную кислоту, то это последнее соединение фактически представляет собой совместимый с Döderlein консервант. Молочная кислота, соответственно ее выбранные соли (кальций, магний, калий, натрий, аммоний и т.п.), включают в композиции для достижения этого эффекта.

c. Биохимически пригодный источник азота для поддержания и роста *Lactobacillus* spp.

В настоящее время большое внимание уделяется свойствам и применению так называемых пребиотиков, полисахаридов специфически метаболизируемых пробиотиками, такими как лактобактерии и бифидобактерии (см. следующий пункт).

Пребиотики широко применяют в сочетании с пробиотическими бактериями для получения так называемых симбиотиков, которые при пероральном приеме обеспечивают лучшее размножение пробиотических бактерий в желудочно-кишечном тракте. Однако в вагинальной среде доступность подходящих питательных веществ для уже присутствующих или экзогенно вводимых пробиотических бактерий ограничена сильнее, в особенности, в отношении необходимых источников азота (N-источников). Добавление подходящего органического и/или неорганического, химически определенного и чистого N-источника в фармацевтически подходящий носитель представляет собой существенный фактор, обеспечивающий рост и пролиферацию *Lactobacillus* spp. во влагалище.

Например, соли аммония (например, хлорид аммония, ссылка 15), мочевины, аминокислоты, такие как глутаминовая кислота и ей подобные (аргинин и т.п.), способные стимулировать рост лактобактерий и бифидобактерий, представляют собой такие химически определенные N-источники.

d. Биологический, химически определенный источник углерода для поддержания роста лактобактерий.

Очевидно, что для роста лактобактерий влагалища также необходим источник углерода (C-источник). Предпочтительно один такой источник, который представляет собой специфическое питательное вещество для *Lactobacillus* spp., а не для условно-патогенных или патогенных бактерий. Неперевариваемые углеводы, в особенности такие как: фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, гликоолигосахариды и другие, представляют собой примеры такого вещества. Присутствие этих так называемых пребиотиков создает как во влагалище, так и в кишечнике дополнительное дифференциальное конкурентное преимущество для роста *Lactobacillus* spp. по отношению к росту настоящих патогенов или условно-патогенных организмов.

Необязательно, другие компоненты присутствуют в композиции согласно изобретению, такие как источник серы, минералы, окислительно-восстановительные (окислительно-восстановительные) модуляторы и витамины.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит биологически пригодный, в других случаях химически чистый, источник серы, поддерживающий адекватный рост и пролиферацию *Lactobacillus* spp. (уже присутствующий или вводимый), которым может быть, без ограничения, органическое/неорганическое соединение, такое как сульфат, сульфит, сульфид, тиосульфат, серосодержащая аминокислота, такая как цистеин и метионин, цистеин (окисленный димер цистеина) и т.п.

Минимальная, химически определенная среда для роста различных *Lactobacillus* spp. была найдена

и опубликована (ссылка 18a). В дополнение к перечисленным выше компонентам, в условиях очень плохой доступности питательных веществ во влагалище может быть полезным рассмотреть также добавление к предпочтительным составам следующих компонентов: ионы металлов: например, Mg^{2+} и Mn^{2+} , антиоксиданты: например, витамин С, N-ацетилцистеин, тиосульфат, витамины: например, рибофлавин и никотиновая кислота; по отдельности или в комбинации друг с другом.

Пробиотики, такие как живые клетки, лиофилизаты, тиндаллизаты, супернатанты, сухие или жидкие, видов и штаммов с доказанной активностью в отношении инфекционных или воспалительных состояний влагалища и предпочтительно человеческого, урогенитального происхождения также представляют собой предпочтительные ингредиенты. Такие виды можно найти и выделить из микробиоты Döderlein здоровых молодых женщин, и во всем мире они представлены *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* и *L. iners*.

Соединения, обладающие активностью в отношении патогенов (бактерий, вирусов, грибов и тому подобного), которые, в намерении и понимания настоящего изобретения, такие, которые обычно способны ингибировать рост патогенных микроорганизмов без нарушения обмена веществ и роста пробиотических бактерий, также представляют собой предпочтительные ингредиенты. Цистеин, сорбат или тиосульфат, соответственно, представляют собой примеры таких подходящих противогрибковых соединений органического или неорганического происхождения.

Предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит биологически применимый окислительно-восстановительный модулятор, т.е. компонент, модулирующий окислительно-восстановительный потенциал в биологической жидкости. В контексте настоящего изобретения термин "окислительно-восстановительный модулятор" обозначает вещество или, по меньшей мере, пару веществ, способных снижать или увеличивать окислительно-восстановительный потенциал определенной биологической среды. Способ определения окислительно-восстановительного потенциала влагалища при бактериальном вагинозе приведен в ссылке 22.

Указанный окислительно-восстановительный модулятор может содержаться в композиции по настоящему изобретению в присутствии или в отсутствие источника серы, как определено выше.

Если присутствует окислительно-восстановительный модулятор, то композиция в соответствии с настоящим изобретением особенно подходит для лечения или предотвращения инфекций, вызываемых облигатными анаэробами, например, бактериального вагиноза (BV).

Предпочтительно окислительно-восстановительный модулятор выбирают из: серосодержащих окислительно-восстановительных систем, таких как тиосульфат/бисульфит натрия и глутатион в восстановленном состоянии (GSH) и в окисленном состоянии (GSSG), окислительно-восстановительных систем на основе кислорода, таких как хинон/гидрохинон, окислительно-восстановительных систем на основе азота, таких как соли нитритов/нитратов, окислительно-восстановительных систем на основе селена (селенит/селенат и селенид). Например, окислительно-восстановительный потенциал может быть повышен, чтобы стать определенно положительным (>150 mV, предпочтительно 200-300 mV) и ингибировать анаэробов, подобных *Gardnerella*.

Предпочтительно, в контексте настоящего изобретения по меньшей мере один штамм лактобактерий добавляют к композиции по изобретению, причем указанный штамм выбирают из группы, состоящей из *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* и *L. johnsonii*, более предпочтительно указанный штамм выбирают из группы, состоящей из *L. gasseri* KS 114.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3482, *L. crispatus* 116.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3483, *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. jensenii* KS 121.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3219, *L. Gasseri* 123.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3485, *L. Gasseri* 126.2, *L. crispatus* 127.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3486, и *L. acidophilus* KS 400, наиболее предпочтительно указанный штамм *Lactobacillus* выбирали из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 119.1 CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4 CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1 CNCM I-3218 и *L. gasseri* 124.3 CNCM I-3220.

Указанные выше штаммы бактерий были депонированы в соответствии с условиями Будапештского договора и сделаны доступными для общего пользования.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения буферное средство а) представляет собой кислоту или ее соль, выбранную из групп, включающих или, альтернативно, состоящих из таких органических кислот, как алифатические кислоты, включая уксусную, пропионовую, масляную кислоты, ди-

карбоновые кислоты, включая щавелевую, малоновую, янтарную кислоту, гидроксикислоты, такие как молочная кислота, лимонная кислота, дикарбоновые кислоты, такие как яблочная кислота.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения консервант б) представляет собой молочную кислоту или ее производное и/или ее соль.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения источник азота с) представляет собой соль аммония, мочевины, встречающуюся в природе или синтетическую аминокислоту, такую как глутаминовая кислота, и их смеси.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения источником углерода d) является неперева- риваемый углевод, такой как: фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, гликоолигосахариды и их смеси. Предпочтительно композиция согласно настоящему изобретению содержит, например, следующие ингредиенты на 1 мл раствора/суспензии ингредиентов. Фактический состав, например, таблетки или капсулы, получают умножением количества ингредиентов на 3:

Конечный pH раствора/суспензии: прил. 4,5	Lactobacillus-совместимый консервант	Са-лактат пентагидрат	10-30, предпочтительно 20 мг/мл
	Буферная система	Двухосновный цитрат магния	5-15, предпочтительно 10 мг/мл
	Источник углерода	α -гликоолигосахарид	15-30, предпочтительно 20 мг/мл
	Источник азота	Глутаминовая кислота	10-30 мг
	Источник серы	цистин	10-30 мг
		Вспомогательные вещества q.s.	150-250 мг

Изобретение включает следующие воплощения (E).

E1) Композиция для применения при лечении или профилактике урогенитальных инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами у субъекта-женщины, субъекты, в которых композиция содержит эффективное количество каждого из следующего:

- (a) буферное средство,
 - (b) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
 - (c) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
 - (d) пребиотический полисахарид, ферментируемый вагинальной микробиотой, и необязательно,
 - (e) антиоксидантный компонент,
- в которой лечение или профилактика включает введение композиции интравагинально субъекту для стабилизации кислотности вагинальной жидкости субъекта при физиологическом значении около pH 4,5 или ниже.

E2) Композиция для применения по E1, в котором вагинальная композиция представляет собой смазочный гель для личного применения.

E3) Композиция для применения в соответствии с E1 или E2, в которых антиоксидант выбирают из серосодержащих соединений, таких как N-ацетилцистеин, цистеин, метионин, тиосульфат натрия.

E4) Композиция для применения по любому из E1-E3, в которых один или несколько штаммов лактобактерий добавляют в композицию из группы, состоящей из *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. johnsonii* и *L. acidophilus* KS 400.

E5) Композиция для применения по любому из E1-E4, в которых один или несколько штаммов лактобактерий добавляют к композиции из группы, состоящей из *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. lactis* и *L. johnsonii*.

E6) Композиция для применения по любому из E1-E5, в которых указанный штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 109, *L. gasseri* KS 114.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3482, *L. crispatus* 116.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3483, *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. jensenii* KS 121.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3219, *L. jensenii* KS 122.1, *L. gasseri* 123.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3485, *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220, *L. gasseri* 126.2, *L. crispatus* 127.1, депонированной Me-

dinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3486, *L. jensenii* KS 130.1, *L. helveticus* KS 300, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 10 февраля 2005 года с номером доступа CNCM I-3360 и *L. acidophilus* KS 400.

E7) Композиция для применения по любому из E1-E6, в которых указанный штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220.

E8) Композиция для применения по любому из E1-E7, в которых композиция дополнительно включает эффективное количество терапевтически эффективного противомикробного средства, способного подавлять или уничтожать урогенитальные патогены.

E9) Способ лечения или профилактики урогенитальных инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами у субъекта-женщины, который включает интравагинальное введение субъекту, необязательно после противомикробного лечения урогенитальной инфекции, композиции с эффективным количеством каждого из следующего:

- (a) буферное средство,
- (b) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
- (c) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
- (d) пребиотический полисахарид, ферментируемый вагинальной микробиотой, и необязательно,
- (e) антиоксидантный компонент.

E10) Способ стабилизации кислотности вагинальной жидкости субъекта с физиологическим значением около pH 4,5 или ниже, который включает интравагинальное введение субъекту композиции с эффективным количеством каждого из следующего:

- (a) буферное средство,
- (b) консервант, полностью совместимый с вагинальной микробиотой,
- (c) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота, пригодный для потребления вагинальной микробиотой,
- (d) пребиотический полисахарид, ферментируемый вагинальной микробиотой, и необязательно,
- (e) антиоксидантный компонент.

E11) Способ по E9 или E10, в которых буферное средство (a) представляет собой кислоту или ее соль, выбранную из групп, включающих или, альтернативно, состоящих из органических кислот, таких как алифатические кислоты, включая уксусную, пропионовую, масляную кислоту, дикарбоновые кислоты, включая щавелевую, малоновую, янтарную кислоту, гидроксикислоты, такие как молочная кислота, лимонная кислота, дикарбоновые кислоты, такие как яблочная кислота.

E12) Способ по любому из E9-E11, в которых консервант (b) представляет собой молочную кислоту или ее производное и/или соль.

E13) Способ по E9-E12, в которых источник азота (c) представляет собой соль аммония, мочевины, природную или синтетическую аминокислоту, такую как глутаминовая кислота, и их смеси.

E14) Способ по любому из E9-E13, в которых источником углерода (d) представляет собой неперевариваемый углевод, такой как: фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, гликоолигосахариды и их смеси.

E15) Композиция, подходящая для перорального введения, имеющая pH в диапазоне от 4 до 5, в которой композиция включает эффективное количество каждого из следующего:

- (a) буферное средство,
- (b) консервант, полностью совместимый с желудочно-кишечной микробиотой,
- (c) чистый молекулярный или ионный биохимический источник азота,
- (d) пребиотический полисахарид, сбраживаемый желудочно-кишечной микробиотой, и необязательно,
- (e) антиоксидантный компонент.

E16) Композиция по E15, в котором антиоксидант (e) выбирают из серосодержащих соединений, таких как N-ацетилцистеин, цистеин, метионин, тиосульфат натрия.

E17) Композиция по E15 или E16, в которых в композицию добавляют по меньшей мере один штамм лактобактерий, причем указанный штамм выбирают из группы, состоящей из *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* и *L. johnsonii*.

E18) Композиция по любому из E15-E17, в которых в композицию добавляют по меньшей мере один штамм, причем указанный штамм выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 109, *L. gasseri* KS 114.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов 22 июля

2005 года с номером доступа CNCM I-3482, *L. crispatus* 116.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3483, *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. jensenii* KS 121.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3219, *L. jensenii* KS 122.1, *L. gasseri* 123.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3485, *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220, *L. gasseri* 126.2, *L. crispatus* 127.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3486, *L. jensenii* KS 130.1, *L. helveticus* KS 300, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 10 февраля 2005 года с номером доступа CNCM I-3360 и *L. acidophilus* KS 400.

E19) Композиция по любому из E15-E18, в которых указанный штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220 и *L. acidophilus* KS 400.

E20) Композиция для применения по любому из E1-E8, или композиция по любому из E15-E19, в которых буферный агент (а) представляет собой кислоту или ее соль, выбранную из групп, включающих или, альтернативно, состоящих из органических кислот, таких как алифатические кислоты, включая уксусную, пропионовую, масляную кислоту, дикарбоновые кислоты, включая щавелевую, малоновую, янтарную кислоту, гидроксикислоты, такие как молочная кислота, лимонная кислота, дикарбоновые кислоты, такие как яблочная кислота.

E21) Композиция для применения по любому из E1-E8 или E20, или композиция по любому из E15-E20, в которых консервант (b) представляет собой молочную кислоту или ее производное и/или соль.

E22) Композиция для применения по любому из E1-E8 или E20-E21, или композиция по любому из E15-E21, в которых источник азота (c) представляет собой соль аммония, мочевины, природную или синтетическую аминокислоту, такую как глутаминовая кислота, и их смеси.

E23) Композиция для применения по любому из E1-E8 или E20-E22, или композиция по любому из E15-E22, в которых источником углерода (d) представляет собой неперевариваемый углевод, такой как: фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, гликоолигосахариды и их смеси.

E24) Композиция для применения по любому из E1-E8 или E20-E23, или композиция по любому из E15-E23, имеющая pH от 4,3 до 4,6, после растворения/сuspensionирования твердых веществ до объема 3 мл, и которая включает следующие ингредиенты на одну дозу:

Са-лактат пентагидрат:	30-90, предпочтительно 60 мг
Двухосновный цитрат магния:	15-45, предпочтительно 30 мг
Пребиотическое волокно:	50-150, предпочтительно 100 мг
Глутаминовая кислота:	20-60, предпочтительно 40 мг
Цистеин/тиосульфат:	10-50, предпочтительно 30 мг
Вспомогательные вещества до 400-1100 мг:	q.s.

E25) Композиция для применения или композиция по E24, дополнительно включающая: лиофилизаты *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218 и/или *L. gasseri* 124.3 и/или *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484 и/или *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217 в общей сложности от 2 до 10 млрд. КОЕ, что составляет от 50 до 200 мг.

Примеры

Пример 1.

Состав различных сред роста и условия роста.

Предполагая полное растворение во влажной среде (объем: 2-5 мл), представлен ряд композиций, позволяющих сравнить рост *Lactobacillus* spp. и патогенов в тестовых условиях.

Контроль роста (положительный) для лактобактерий: MRS.

Обычная среда MRS ("Biolife") без регулировки pH обеспечивает оптимальный рост *Lactobacillus* spp. и была выбрана для этой цели.

Контроль роста (положительный) на патогены: TS.

Был выбран обычный триптический соевый (TS) бульон (BD, 211825) без регулировки pH.

Базовый контроль (отрицательный).

Разбавленный раствор указанной MRS (15% по объему), забуференный или не забуференный, был выбран для обеспечения выживания тестируемых лактобактерий и патогенов при низком уровне роста или ингибирования, соответственно.

Среда 17 (согласно изобретению):

оптимизированная тестовая композиция в соответствии со следующей таблицей, и предназначенная для стабилизации pH, а также для обеспечения роста *Lactobacillus* spp. и в то же время для ингибирования патогенов.

Среда 17	Функция	Вещество	Происхождение	Концентрация
	Консервант	Са-лактат пентагидрат	««Applichem»», A3670	20 мг/мл
	Буфер	Двухосновный цитрат аммония	««Sigma»», 09833	10 мг/мл
	Источник азота (аммоний, содержится в буфере)			
Конечный pH раствора: 4,56	Источник углерода	α -гликоолигосахарид	««Bio-Ecolians»», UCIB Solabia Group, AB020	20 мг/мл
	Содержит соединения серы	MRS-бульон	«Biolife» 4017292	15% по объему

Условия роста и процедура подсчета.

Все культуры выращивали при 37°C в анаэробных условиях без перемешивания.

Первую культуру получали из материала, хранившегося при -80°C, штриховой разводкой на чашках с агаром. После инкубации в течение не более 24 ч одну колонию из чашки применяли для инокуляции в 5 мл жидкой культуры и инкубировали в течение вплоть до 18 ч, а затем применяли для инокуляции в 25 мл каждой из различных сред для экспериментов по выращиванию культуры. Плотность исходных клеток регулировали так, чтобы она соответствовала оптической плотности 0,05 при 600 нм.

Все эксперименты были выполнены в двух повторностях.

Рост культур контролировали путем измерения оптической плотности при 600 нм, pH, посева серийных разведений на чашки с агаром (КОЕ/мл) и подсчета общего количества клеток с помощью гемато-цитометра (улучшенного по Нейбауэру).

Протестированные штаммы: Вагинальные *Lactobacillus* spp. и урогенитальные патогены.

Вагинальные протестированные штаммы включают все соответствующие виды *Lactobacillus* физиологической вагинальные микробиоты, т.е. *L. gasseri*, *L. crispatus* и *L. jensenii* и в особенности *L. gasseri* 120.1 CNCM I-3218, *L. gasseri* 124.3 CNCM I-3220, *L. crispatus* 119.4 CNCM I-3484 и *L. jensenii* 119.1 CNCM I-3217.

В качестве репрезентативных патогенов в этих экспериментах были выбраны:

а) грамотрицательные: уropатогенные *E.coli* CCOS 492, мультирезистентный клинический изолят человека из университетской больницы Цюриха, выделенный в 1976 году,

б) грамположительные: мульти-устойчивые *S. aureus*, CCOS 461, MRSA, клинический изолят человека, госпиталь в Оксфорде, Великобритания, изолированный в 1960 году.

Уropатогенные *E.coli* представляют собой наиболее распространенный штамм, вызывающий цистит. *S. aureus* связаны с вагинальными инфекциями типа называемых аэробным вагинитом (AV).

Комментарий.

Как упомянуто в названии этого раздела, закисляющие, консервирующие и питательные факторы были выбраны для применения против факультативных анаэробных патогенов. Они могут производить энергию как с использованием кислорода, например аэробы, или также анаэробно (ферментировать сахара до молочной кислоты). *E. coli* и *S. aureus* - представители этого класса бактерий.

Сравнительные композиции.

Ниже приводятся примеры композиций, которые, хотя и имеют состав, подобный среде 17, не в равной степени хорошо ингибируют рост упомянутых выше патогенов.

Пример 2а. Эффект незначительного повышения pH.

В качестве первого сравнительного примера приведена следующая среда 11:

Среда 11	Вещество	Происхождение	Концентрация
	Са-лактат в виде пентагидрата	«Applichem», A3670	20 мг/мл
	Двухосновный аммония цитрат	«Sigma», 09833	10 мг/мл
	Трехосновный аммония цитрат	«Sigma»	10 мг/мл
Конечный раствор: 5,00 pH	α -гликоолигосахарид	«Bio-Ecolians», UCIB Solabia Group, AB020	20 мг/мл
	MRS-бульон	«Biolife», 4017292	15% по объему

В этой среде изучали увеличение количества упомянутых выше патогенов в аналогичных экспериментальных условиях.

E.coli CCOS 492:

	Среда 11		100% MRS	
Время (ч.мин)	pH	Количество (КОЕ)	pH	Количество (КОЕ)
00.00	5,00	$1 \cdot 10^5$	6,35	$1 \cdot 10^5$
06.10	4,98	$8 \cdot 10^5$	5,53	$5 \cdot 10^7$
20.20	4,98	$4 \cdot 10^6$	5,01	$>1 \cdot 10^9$

S.aureus CCOS 461:

	Среда 11		100% MRS	
Время (ч.мин)	pH	Количество (КОЕ)	pH	Количество (КОЕ)
00.00	5,00	$1 \cdot 10^5$	6,35	$1 \cdot 10^5$
06.10	4,99	$1 \cdot 10^6$	5,69	$6 \cdot 10^7$
20.20	4,98	$4 \cdot 10^6$	5,05	$>1 \cdot 10^9$

Следовательно, увеличение pH 4,5 на половину единицы, до конечного значения 5,0, было достаточно, чтобы обеспечить рост патогенных микроорганизмов на более чем один log, патогенов, которые в противном случае ингибируются при pH 4,5.

Пример 2b. Эффект снижения концентрации лактата на 50%.

В качестве воплощения была приготовлена следующая среда 12 и наблюдали изменение количества E.coli в той же среде.

Среда 12	Вещество	Происхождение	Концентрация
	Са-лактат в виде пентагидрата	«Applichem», A3670	10 мг/мл
	Двухосновный аммония цитрат	«Sigma», 09833	10 мг/мл
	Трехосновный аммония цитрат	«Sigma»	10 мг/мл
Конечный pH раствора: 5,18	α -глико-олигосахарид	«Bio-Ecolians», UCIB Solabia Group, AB020	20 мг/мл
	MRS-бульон	«Biolife», 4017292	15% по объему

В этой среде, а также в TSA, взятой в качестве среды положительного контроля, изучали изменение количества упомянутых выше патогенных E.coli CCOS 492, в аналогичных экспериментальных условиях, как в примере 2а.

E.coli CCOS 492:

	Среда 12		TSA	
Время(часы.мин)	pH	Количество (КОЕ)	pH	Количество (КОЕ)
00.00	5,18	$1 \cdot 10^5$	6,7	$1 \cdot 10^5$
06.10	5,21	$4 \cdot 10^6$	6,1	$5 \cdot 10^7$
20.20	5,23	$8 \cdot 10^6$	5,5	$>1 \cdot 10^9$

Оказалось, что снижение концентрации лактата, как в среде 12 до половины значения среды 11, сопровождается значительным снижением ингибирующей способности по сравнению с последней, что приводит к увеличению количества патогенов почти на 2 log.

Таким образом, представляется, что точные концентрации активных компонентов (цитрат, лактат и

т.п.), приведенные в качестве примера для среды 17, предпочтительны для обеспечения их высокой ингибирующей активности.

Пример 2. Подробное обсуждение результатов для *L. gasseri* 120.1 CNCM I-3218.

Модель *in vitro* для тестирования эффекта применения фармацевтической композиции во влагалище, применяемой в данной заявке, представляет собой жидкую среду, содержащую ингредиенты композиции примерно в той же концентрации, что и после растворения во влагалище. Цель экспериментов *in vitro*, которые будут описаны ниже, заключалась в том, чтобы найти композицию питательной среды, которая позволяет устанавливать и поддерживать в течение однодневного периода физиологический pH 4,0-4,5. Кроме того, указанная среда должна позволить лактобактериям быстро заселиться и расти в ней, тогда как в то же время урогенитальные патогены должны быть подавлены.

Количество клеток *L. gasseri* KS 120.1 CNCM I-3218, выращенных в течение 19,4 ч на среде MRS, достигало 1×10^8 КОЕ/мл, самого высокого значения среди всех 3-х протестированных сред. Как и ожидалось, наблюдали явное снижение pH с 6,4 до 4,0. Этот контрольный эксперимент показывает хорошую пригодность применяемого инокулята и корректность кривых роста, наблюдаемых в других средах.

Сравнивая рост, полученный в среде 17 с контролем MRS, наблюдали слегка уменьшенный рост (0,4 log единиц). Поскольку среда 17 с ее относительно простым составом содержала только небольшое количество микроэлементов, то этот эффект был ожидаемым.

Сравнивая рост в среде 17 с ростом в 15%-ной среде MRS, наблюдали снижение конечного числа клеток между этими средами на уровне 4,9 log. Это ясно показывает, что дополнительные питательные вещества и компоненты, присутствующие в среде 17, действительно способствуют росту протестированного штамма *Lactobacillus*.

Кислотность: значения pH оставались на удивление стабильными, примерно равными 4,5, с начала эксперимента и до 20 ч после этого (изменяясь от 4,58 до 4,41), подтверждая тем самым достаточную силу буферной системы.

Вывод: представленная среда 17, составленная в соответствии с описанием настоящего изобретения, вызывает значительный рост инокулированной *Lactobacillus gasseri*, немного меньше, чем для чистой MRS, но определенно сильнее, чем для разбавленной (15%) MRS. pH системы остается постоянным при оптимальном целевом значении, равном приблизительно 4,5.

Пример 3. Подробное обсуждение результатов для *S. aureus* CCOS 461.

В этом случае проверяли гипотезу о том, что выбранная среда 17 способна ингибировать рост выбранного мультирезистентного патогена.

Количество клеток *S. aureus* CCOS 461, выращенных в течение 21,1 ч на среде TS, достигало самого высокого значения, 2×10^8 КОЕ/мл, среди всех 3 протестированных сред, начиная со значения 9×10^6 при $t=0$ ч. Также в этом случае наблюдали четкое падение pH с 7,0 до 4,8. Этот контрольный эксперимент указывает на хорошую пригодность примененного инокулята и корректность кривых роста, наблюдаемых в других средах.

Сравнивая увеличение числа клеток, полученных в среде 17, с положительным контролем TS, наблюдали сильное ингибирование *S. aureus* CCOS 461 до -5,2 логарифмических единиц. Что касается разбавленной MRS, то ингибирование также было высоким, составляя -4,4 logs.

Кислотность: даже в присутствии живого патогена значения pH снова остаются на удивление стабильными, равными около 4,5, с начала эксперимента и до 20 ч после этого с небольшим снижением (варьируя от исходного 4,59 до конечного 4,40).

Вывод: представленная среда 17, составленная в соответствии с описанием настоящего изобретения, вызывает значительное уменьшение количества инокулированного патогена *S. aureus* CCOS 461: по отношению к положительному контролю среды TS, но даже по отношению к разбавленной MRS. Среда 17 при этом демонстрирует противомикробное действие против этого возбудителя.

Пример 4. Резюме экспериментальных серий.

Результаты остальных штаммов, упомянутых выше в примере 2, будут представлены в виде таблицы вместе с двумя последними примерами и прокомментированы.

Предварительные замечания: Все 4 протестированные лактобактерии показали одинаковую тенденцию: хороший рост в среде 17, снижение роста на 15%-ном бульоне MRS и отличный рост в контрольной среде бульона MRS. Также наблюдали падение pH в незабуферной среде (15% MRS и чистая MRS).

Для всех 4 штаммов *Lactobacillus* и 2 патогенных микроорганизмов были подобраны величины pH, позволяющие поддерживать pH при значении 4,5, измерения подтверждают превосходную стабильность кислотности среды в течение до 20 ч или более продолжительного времени реакции.

Патогены *S. aureus* и *E.coli* также явно не могли расти в среде 17. Соответствующие концентрации клеток в этой среде резко снижались во времени.

Таблица Эксп.4. Значения pH в среде 17 и log (уменьшения или увеличения) количества клеток тестируемых организмов, выращенных на среде 17 (согласно изобретению) по сравнению со средой сравнения

Штамм	Время	Изменение КОЕ/мл на среде 17 против			Значение pH, среда 17	
		15% MRS	MRS	TSB	исходное	конечное
KS 119.4 CNCM I-3484	28,6 ч	0,57	-0,49		4,57	4,33
KS 119.1 CNCM I-3217	18,6 ч	1,12	-2,15		4,59	4,37
KS 120.1 CNCM I-3218	19,4 ч	4,94	-0,40		4,58	4,44
KS 124.3 CNCM I-3220	28,6 ч	0,44	-0,90		4,57	4,33
CCOS 461	21,1 ч	-4,44		-5,19	4,59	4,40
CCOS 492	22,1 ч	-5,70		-8,13	4,49	4,42

В таблице Эксп.4 суммированы различия в логарифмических числах в конце соответствующих экспериментов по росту. Наибольший эффект стимуляции роста наблюдали у *Lactobacillus gasseri* KS 120.1 CNCM I-3218 с почти 5 log увеличением уровней по сравнению с 15% MRS, тогда как самый слабый эффект был обнаружен у *Lactobacillus gasseri* KS 124.3 CNCM I-3220 с увеличением уровня log, равным всего 0,44.

Общий вывод: во время процесса ферментации среда 17 действительно стабилизировала pH на уровне от 4,5 до 4,3 для всех протестированных штаммов. Что касается штаммов *Lactobacillus*: они росли на среде 17 лучше, чем на 15%-ной среде MRS. В этой конкретной среде добавление цитрата аммония в качестве дополнительного источника азота и лактата кальция в качестве буферного вещества, а также применение для пробиотиков селективного источника углерода (в данном конкретном случае гликоолигосахарида) оказалось достаточным для дифференциального стимулирования роста тестируемых лактобактерий. С другой стороны, 2 протестированных патогена (*E.coli* и *S. aureus*) не росли на "Среде 17", а ингибировались ею.

Пример 5.

Из систематических экспериментов, приведших к подходящим средам, таким как описанная выше Среда 17, можно рассчитать количественный состав фармацевтической лекарственной формы (капсула, таблетка, ...) для внутривагинального применения. Как было упомянуто выше, это требует количественного учета объема вагинальной жидкости, количество которой, очевидно, варьирует в зависимости от возраста и состояния здоровья женщины. Исследования показали, что объем такой жидкости в среднем составляет около 3 мл (ссылка 16).

Таблица Эксп.5.1. Количественный состав пребиотической вагинальной капсулы согласно изобретению

Капсула #6	Вещество	Количество
	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат аммония	30 мг
	α -глико-олигосахарид	100 мг
Целевой pH во влагалище: 4,5	Глютаминовая кислота	40 мг
	Цистеин или цистин	20 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	200 мг
	Общая масса	450 мг

Таблица Эксп.5.2. Количественный состав вагинальной капсулы согласно изобретению

Таблетка #8	Вещество	Количество
	Лиофилизаты вагинальных штаммов <i>L. gasseri</i> 120.1 и 124.3 в концентрации 10^{11} КОЕ/г	100 мг
	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат аммония	30 мг
	Арабиногалактан	100 мг
Целевой pH во влагалище: приблизительно 4,5	Тиосульфат	30 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	270 мг
	Общая масса	600 мг

Таблица Эксп.5.3. Количественный состав вагинальной капсулы согласно изобретению

Таблетка #9	Вещество	Количество
	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат магния	30 мг
	Арабиногалактан	100 мг
Целевой pH в вагинальном препарате: приблизительно 4,5	Тиосульфат	30 мг
	Аспарагиновая кислота	60 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	270 мг
	Общая масса вспомогательных веществ/добавок	550 мг
	Лиофилизат <i>L. gasseri</i> KS 120.1 CNCM I-3218	50 мг
	Лиофилизат <i>L. jensenii</i> 119.1 CNCM I-3484	50 мг
	Лиофилизат <i>L. crispatus</i> KS 119.4 CNCM I-3217	50 мг
	Общая масса, включая лиофилизаты	700 мг

Таблица Эксп.5.4. Количественный состав перорального симбиотического препарата (саше) согласно изобретению

Саше #9	Вещество	Количество
	Са-лактат пентагидрат	100 мг
	Двухосновный цитрат магния	50 мг
	Альфа-гликоолигосахарид	1 000 мг
Целевой pH в пероральном препарате при растворении в 150 мл воды: 4,5	Арабиногалактан	1 000 мг
	Тиосульфат	30 мг
	Аспарагиновая кислота	60 мг
	Аланин	60 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	350 мг
	Общая масса вспомогательных веществ/добавок	2 650 мг
	Лиофилизат <i>L. gasseri</i> KS 120.1 CNCM I-3218	50 мг
	Лиофилизат <i>L. jensenii</i> 119.1 CNCM I-3217	50 мг
	Лиофилизат <i>L. crispatus</i> KS 119.4 CNCM I-3484	50 мг
	Общая масса, включая лиофилизаты	2 850 мг

Таблица Эксп.5.5. Количественный состав пребиотической вагинальной смазки согласно изобретению

Смазочный гель # 3	Вещество	Количество
	Молочная кислота	50 мг
Целевой pH готового геля = 4,5	Лимонная кислота	30 мг
	Глицерин	80 мг
	Карбомер	5mg
	Фруктоолигосахариды с короткой цепью	50 мг
	Тиосульфат	10 мг
	Глютаминовая кислота	10 мг
	NaOH 0,1 моль или HCl 0,1 моль для pH=4,5	q.s.
	Деионизированная вода	до 1 000 мг

Оптимизация редокс-потенциала вагинальной жидкости.

В приведенном выше примере 5.1, источник серы, добавляемый к M17, представляет собой цистеин или цистин, в примере 5.2 - натрия тиосульфат. Все 3 предоставленные выше композиции приводят, например, к значению pH в 2-5 мл соответствующего раствора, равному около 4,5. С точки зрения кислотности, питательных веществ, консервантов они выглядят очень похоже.

Вопрос, который мы сейчас поднимаем, заключается в том, эквивалентны ли они в отношении возложенной на них задачи, которая заключается в том, чтобы стимулировать рост лактобактерий во влагалище и подавлять рост патогенных микроорганизмов. Чтобы уточнить этот вопрос, мы должны сосредоточиться на конкретных патогенах; мы должны выбрать наиболее частую возникающую вагинальную инфекцию, как упомянуто выше, так называемый бактериальный вагиноз или BV, связанный с такими патогенами, как *Gardnerella vaginalis* или *Prevotella bivia*. В 1985 году Дэвид Эшенбах и его коллеги опубликовали исследовательскую работу (ссылка 22), в которой они изучали корреляцию между бактериальным вагинозом и вагинальным окислительно-восстановительным потенциалом в соответствии с pH.

С одной стороны, они подтвердили, как и ожидалось, что у 15 пациентов pH в диапазоне от 4,0 до 4,5 в основном, был связан со здоровой вагинальной микробиотой, тогда как при pH в диапазоне от 4,5 до 5,5 у пациентов наблюдали значительное присутствие анаэробов с небольшим количеством лактобактерий и симптомы BV. Новизна заключалась в том, что они также смогли показать сильную зависимость окислительно-восстановительного потенциала E_h во влагалище *in vivo* от состояния микробиоты: в то время как значения E_h у пациентов с BV находятся в диапазоне от +50 до -250 мВ, значения E_h здоровых влагалищ находятся в диапазоне выше 100-300 мВ. Они также обнаружили, что это не представляет собой характеристику индивидуальных женщин, а зависит только от состояния микробиоты. После успешного применения метронидазола все женщины с отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом вернулись к положительному потенциалу (и кроме того, pH тоже стал более кислым).

Интересно, что не было предпринято попыток терапевтического применения этого факта для производства вагинальных фармацевтических продуктов для лечения BV, которые гарантируют более высокий окислительно-восстановительный потенциал.

Мы исследовали эту возможность с помощью следующей экспериментальной процедуры.

Краткое описание процедуры тестирования.

Готовили среду, состоящую из 20 мг/мл Са-лактата, 10 мг/мл двухосновного цитрата аммония, 20 мг/мл *E.colians* и 15%-ного бульона MRS (соответствует описанной выше M17). После измерения окислительно-восстановительного потенциала и pH в эту среду добавляли несколько соединений (источников азота и серы) и определяли их влияние на pH и окислительно-восстановительный потенциал.

Краткое описание экспериментов.

Редокс-электрод ("Mettler Toledo" LE 501 ORP, подключенный к pH-метру MP230, "Mettler Toledo") применяли для измерения окислительно-восстановительного потенциала композиции среды до и после добавления тестируемых соединений. Окислительно-восстановительные значения регистрировали после того, как сигнал был стабильным в течение не менее 30 с. Кроме того, измеряли pH с применением стандартного pH-электрода, подключенного к pH-метру MP225 ("Mettler Toledo").

Перед каждой серией измерений окислительно-восстановительный электрод калибровали с помощью эталонного раствора ("Mettler Toledo", № 51350060, 220 мВ, pH 7 ($U_H=427$ мВ)).

Результаты анализа:

Состав	Концентрация	Вещество	pH	Окисл.- восстан. потенциал	Величина сравнения
1	20 мг/мл	Са-Лактат	4,67	235,0 мВ	236,2 мВ
	10 мг/мл	Цитрат аммония, двухосновный			
	15%	MRS-бульон			
	20 мг/мл	Ecolians			
	10 мг/мл	L-Глютаминовая кислота	4,48	310,8 мВ	
2	20 мг/мл	Са-Лактат	4,67	235,0 мВ	236,2 мВ
	10 мг/мл	Цитрат аммония, двухосновный			
	15%	MRS-бульон			
	20 мг/мл	Ecolians			
	10 мг/мл	L-Глютаминовая кислота	4,41	265,2 мВ	
	10 мг/мл	Цистин			
3	20 мг/мл	Са-Лактат	4,67	235,0 мВ	236,2 мВ
	10 мг/мл	Цитрат аммония, двухосновный			
	15%	MRS-бульон			
	20 мг/мл	Ecolians			
	10 мг/мл	L-Глютаминовая кислота	4,30	-103,0 мВ	
	10 мг/мл	Цистеин			
4	20 мг/мл	Са-Лактат	4,67	235,0 мВ	233,0 мВ
	10 мг/мл	Цитрат аммония, двухосновный			
	0%	MRS-бульон			
	20 мг/мл	Ecolians			
	10 мг/мл	L-Глютаминовая кислота	4,26	284,2 мВ	
	20 мг/мл	Na-Тиосульфат	4,21	-36,5 мВ	
5	20 мг/мл	Са-Лактат	4,48	237,8 мВ	234,9 мВ
	15 мг/мл	Цитрат аммония, двухосновный			
	0%	MRS-бульон			
	20 мг/мл	Ecolians			
	10 мг/мл	L-Глютаминовая кислота	4,27	301,3 мВ	
	20 мг/мл	Диметилсульфон	4,26	273,3 мВ	

Комментарии.

Был ли добавлен к раствору 15% MRS или нет, это практически не влияло на pH или Eh.

Добавление источника азота, глютаминовой кислоты, делает среду немного более кислой и более электроположительной/окислительной, достигая значения 300 мВ.

Соединения серы имеют в этой конкретной серии экспериментов наиболее выраженный эффект на окислительно-восстановительный потенциал и незначительное влияние на кислотность: сравните, например, состав 2 и состав 3, где цистеин и цистин взаимозаменяемы. С цистеином Eh уменьшается до -103,0 мВ, тогда как при том же количестве цистеина он увеличивается до 265,2 мВ. Уровень pH в этом случае изменяется лишь минимально, от 4,30 до 4,41.

Как цистин (окисленная димерная форма цистеина), так и МСМ (диметилсульфон) оба поддерживают высокий положительный окислительно-восстановительный потенциал, тогда как цистеин и тиосульфат вызывают восстановление вместо окисления раствора, достигая отрицательных значений -103 и -36 мВ.

Вывод заключается в том, что добавлением, например, цистеина или тиосульфата получают среду, благоприятную для размножения анаэробов, тогда как добавление цистина или диметилсульфона помогает создать среду, благоприятную для развития лактобактерий. Это представляет терапевтический интерес, так как мы можем таким способом выбирать не только то, какой pH, но также и какой окислительно-восстановительный потенциал лучше всего подходит для локальной борьбы с определенным патогеном. Таким образом, применяя надлежащий "окислительно-восстановительный модулятор", можно повысить эффективность композиции против BV согласно изобретению.

Вышеуказанные соображения применимы против патогенов BV (*Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium*), которые по своей природе представляют собой "облигатных анаэробов", т.е. микробов, которые не могут защитить себя от оксидантов, таких как, например, перекись водорода или другие окислители. Против этих патогенов, повышенный окислительно-восстановительный потенциал представляет собой дополнительное терапевтическое оружие, которое работает без повреждения или ингибирования вагинальных лактобактерий: причина в том, что лактобактерий, хотя и анаэробы, но представляют собой так называемые "аэроустойчивые" бактерии. Т.е. кислород и, в более общем случае, среда с высоким окислительно-восстановительным потенциалом (E_h), не препятствует их росту.

Выбор окислительно-восстановительного модулятора.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения термин "окислительно-восстановительный модулятор" означает вещество или, по меньшей мере, пару веществ, способных уменьшать или увеличивать окислительно-восстановительный потенциал определенной биологической среды. Предпочтительно окислительно-восстановительный модулятор е) выбирают из серосодержащих соединений пары цистеин/цистин, таких как N-ацетилцистеин, цистеин, метионин, хинон/гидрохинон, окислительно-восстановительной системы на основе селена (селенит/селенат, например, в форме натриевой соли), тиосульфата натрия/бисульфита, глутатиона в восстановленном состоянии (GSH) и в окисленном состоянии (GSSG). Например, если необходимо повысить окислительно-восстановительный потенциал так, чтобы он стал определенно положительным (> 150 мВ) и подавлял таких анаэробов, как *Gardnerella*, то для этой цели будет выбран цистин (окисленная форма), а не цистеин.

Конкретные примеры композиции против BV с повышенным окислительно-восстановительным потенциалом.

Пример 6.1. Пребиотическая композиция.

Таблица Эксп.6.1. Количественный состав пребиотической вагинальной капсулы против BV согласно изобретению

Капсула #10	Вещество	Количество
Целевой E_h в вагинальной жидкости: > 200 мВ	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат магния	30 мг
	α -гликоолигосахарид	100 мг
Целевой pH во влагалище: 4,5	Глютаминовая кислота	40 мг
Редокс-модулятор и источник S	Цистин	20 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	200 мг
	Общая масса	450 мг

Пример 6.2. Симбиотическая композиция против анаэробной вагинальной инфекции согласно изобретению

Таблица Эксп.6.2. Количественный состав симбиотической вагинальной капсулы против BV

Таблетка #11	Вещество	Количество
Штаммы с доказанной, выраженной активностью в отношении <i>Gardnerella</i>	Лиофилизаты вагинальных штаммов <i>L. gasseri</i> 120.1 и 124.3 в концентрациях 10^{11} КОЕ/г	Каждые 100 мг
Целевой окислительный потенциал во влагалище: > 200 мВ	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат магния	30 мг
	Аланин	40 мг
	Арабиногалактан	100 мг
Целевой pH во влагалище: approx. 4,5	Диметилсульфон (MSM)	30 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	140 мг
	Общая масса	600 мг

Эрадикация *candida albicans*.

Как упомянуто выше, *Candida* представляет собой микроб, часто встречающийся во влагалище, либо в виде условно-патогенного агента, либо как патоген, например, появляющийся после противоинфекционного лечения вагинальных инфекций, таких как бактериальный вагиноз. Особенность *Candida* заключается в том, что в отличие от анаэробных патогенов, вовлеченных в BV, они могут сосуществовать с лактобактериями, оказывая тем самым влияние только на состав вагинальной микробиоты. Состав флоры Döderlein в этих трех различных состояниях (отсутствие инфекции, BV или кандидоз) недавно был детально исследован и опубликован G. Donders и его сотрудниками (ссылка 23).

По вышеупомянутым причинам авторы считают, что было бы полезно, если это возможно, сформировать композицию, предназначенную для стимулирования лактобактерий, но в то же время, для ингибирования патогенных микроорганизмов, например, для оказания ингибирующего действия также и на дрожжи в целом и на *Candida albicans*, в особенности.

Было бы заманчиво применить для этой цели классический и безопасный противогрибковый препарат, такой как клотримазол, однако эта молекула обладает также бактерицидной активностью в отношении грамположительных бактерий, таких как лактобактерий (ссылка 24"). При поиске подходящей молекулы для нашей предполагаемой цели, мы нашли природную органическую кислоту (сорбиновую кислоту), которую широко применяют в качестве безопасного консерванта против дрожжей и плесени в пищевой и фармацевтической промышленности. Поэтому проблема заключалась в том, чтобы проверить, способна ли сорбиновая кислота (обычно доступная в виде сорбата натрия или калия) ингибировать *Candida* при концентрациях, которые не ингибируют вагинальные лактобактерии. Оптимальный для активности сорбата уровень pH составляет около 4,5, что идеально соответствует выбранному диапазону. Концентрация, которую на практике применяют для консервации против дрожжей и плесени, составляет 0,1% (ссылка 25).

С этой целью были проведены следующие эксперименты.

Краткое изложение процедуры тестирования.

Свежую ночную культуру тестируемых штаммов применяли для инокуляции тестируемой среды, дополненной различными концентрациями сорбата калия. Рост определяли путем измерения оптической плотности и pH в начале, через 6 ч и через 24 ч.

Условия роста:

Среда для ночной культуры:	Бульон MRS с Tween
Тестируемая среда:	Бульон MRS с Tween, разбавляют до 30%, pH доводят до 4,5 с помощью молочной кислоты
Тестируемый объем:	5 мл
Инкубация:	37°C, анаэробно, при встряхивании (120 rpm)
Плотность клеток для инокуляции:	приблизительно 10^7 КОЕ/мл
Концентрации сорбата калия:	0,00%, 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1,0%, 1,5% (масса/объем)
Параметры измерения:	pH, OD при 590 нм
Измерения при:	t= 0 ч, 6 ч и 24 ч

Протестированные бактериальные культуры.

Lactobacillus gasseri CCOS 960, *Lactobacillus gasseri* KS 121.1, *Lactobacillus crispatus* KS 116.1.

Получение культур.

Все культуры повторно активировали из криоконсервированных (-80°C) исходных растворов путем культивирования на агаре MRS в течение 1-3 дней. Отдельную колонию из этих чашек применяли для инокуляции 5 мл бульона MRS. После инкубации в течение ночи для проведения экспериментов применяли 10^7 КОЕ/мл.

Результаты анализа:

Штамм	Концентрация сорбата калия	OD			pH			Интерпретация
		0 ч	6 ч	24 ч	0 ч	6 ч	24 ч	
<i>Lactobacillus gasseri</i> KS 120.1	0.00%	0.51	0.84	1.26	4.71	4.57	4.27	0
	1.00%	0.54	0.78	0.97	5.16	5	5.07	1
	1.50%	0.53	0.73	0.72	5.31	5.26	5.26	1
	0.10%	0.08	0.23	0.44	4.5	4.5	4.5	0
<i>Lactobacillus gasseri</i> KS 119.1	0.50%	0.07	0.11	0.124	4.5	4.5	4.85	1
	1.00%	0.18	0.26	0.16	5.03	5.01	5.09	2
	1.50%	0.17	0.24	0.13	5.32	5.18	5.25	2
	0.10%	0.08	0.23	0.44	4.5	4.5	4.5	0
<i>Lactobacillus crispatus</i> KS 119.4	0.00%	0.72	1.36	1.36	4.73	4.5	4.37	0
	0.01%	0.7	1.36	1.47	4.71	4.42	4.35	0
	0.05%	0.6	1.16	1.24	4.69	4.43	4.32	0
	0.10%	0.68	1.34	1.24	4.7	4.48	4.44	0
	0.50%	0.67	1.24	1.15	4.97	4.73	4.77	0
	1.00%	0.65	1.13	0.96	5.8	5.01	5.08	1
	1.50%	0.64	0.99	0.76	5.32	5.2	5.26	1

Интерпретация:

0 - нет ингибирования,

1 - слабое ингибирование,

2 - сильное ингибирование.

Выводы.

Для сильного ингибирующего воздействия на рост тестируемых лактобактерий требовалась минимальная концентрация сорбата калия 1% (или 10 мг / мл), для небольшого ингибирования 0,5% или выше.

Согласно Крамеру и Ассадиану (ссылка 25), микробиостатическая концентрация для подавления роста патогенных бактерий и грибов значительно ниже (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*: 50-100 мкг/мл, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*. 200-500 мкг/мл, *Saccharomyces cerevisiae*: 50-100 мкг/мл).

Протестированные лактобактерии (*gasseri*, *crispatus* и *jensenii*), представляют собой стандартную флору Döderlein, поэтому они должны быть в состоянии поддерживать свой рост в присутствии сорбата калия в концентрациях вплоть до 0,1-0,2% (от 1,5 до 3 мг/мл).

Преобразовали в формулу капсулы, которая будет растворена примерно в 3 мл вагинальной жидкости, это соответствует добавлению в композицию от 3 до 6 мг сорбата калия (см. ниже).

Пример 7.1. Композиция против облигатных анаэробных патогенов, обладающая также активностью против *Candida*.

Таблица Эксп.7.1. Количественный состав пребиотической вагинальной капсулы согласно изобретению без лиофилизатов и содержащий сорбат в качестве противогрибкового ингредиента

Капсула #12	Вещество	Количество
	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат магния	30 мг
	α -гликоолигосахарид	100 мг
Целевой pH во влагалище: 4,5	Глютаминовая кислота	40 мг
	Цистин	30 мг
	К-сорбат	5 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	185 мг
	Общая масса	450 мг

Таблица Эксп.7.2. Количественный состав вагинальной капсулы согласно изобретению, содержащей лиофилизаты, а также сорбат калия в качестве противогрибкового средства

Таблетка #11	Вещество	Количество
	Лиофилизаты вагинальных штаммов <i>L.gasseri</i> 120.1 и 124.3 в концентрациях 10^{11} КОЕ/г	100 мг каждый
	Са-лактат пентагидрат	60 мг
	Двухосновный цитрат аммония	30 мг
	К-Сорбат	5 мг
	Аргинин	20 мг
	Арабиногалактан	100 мг
Целевой pH во влагалище: 4,5	Цистин	30 мг
	Вспомогательные вещества по мере необходимости	155 мг
	Общая масса	600 мг

Пример 7.3. Смазочная пребиотическая композиция с активностью против BV и *Candida*.

Таблица Эксп.7.3. количественный состав пребиотической вагинальной смазки согласно изобретению

Смазочный гель # 3	Вещество	Количество
	Молочная кислота (D- или рацемическая)	50 мг
Целевой pH конечного геля = 4,5	Лимонная кислота	30 мг
	глицерин	80 мг
	Карбомер	5 мг
	Фруктоолигосахариды с короткой цепью	50 мг
	MSM	20 мг
Целевой окислительный потенциал: > 150 мВ	Глютаминовая кислота	20 мг
	NaOH 0,1 моль или HCl 0,1 моль Для pH=4,5	q.s.
	Денонизированная вода	ad 1 000 мг

Процитированные ссылки

1. Krauss-Silva L., Almada-Horta A., Alves M.B., Camacho K.G., Moreira M.E.L., Braga A. 2014. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy and Childbirth* 14:107.
2. Donders G.G., Vereecken A, Bosmans E., Dekeersmaecker A, Salembier G., Spitz B. 2002. Definition of a type of abnormal vaginal microbiota that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG*. 109(1):34-43.
3. <http://www.patient.co.uk/doctor/bacterial-vaginosis-pro> (21.05.2015). Up to 70% of patients have a relapse within three months of successful treatment.
4. Döderlein A 1892. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Zbl. Bakteriologie*. 11: 699.
5. Spurbeck R.R., Arvidson C.G. 2011. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiology* 6(5): 567-582.
6. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin AL. 2006. Lactobacillus strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48 (3) 424-432.
7. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin AL. 2006. Vaginal Lactobacillus isolates inhibit uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 257 (1): 132-135.
8. EP 1812023 B1, F. Graf 6/2004, EP 2 561 880 B1, F. Graf 6/2004.
9. Reid et al, USP 5,645,830, 7/1997.
10. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23(1): 130-135.
11. Chrisope G et al, Gynelogix Inc WO 9846261 www.disknet.com/indiana_biobab/b028.htm (21.05.2015).
12. <http://www.cdc.gov/std/treatmentU2010/vaginal-discharge.htm>.
13. ELLEN AB, Darvitzky K et al, 2010, WO2010023222.
14. Procter&Gamble Co, Carella AM et al, 1997 WO9729763.
15. Laxmi N.P., Mutamed M.A., Nagendra P. S 2011. Effect of carbon and nitrogen sources on growth of *Bifidobacterium animalis* BB12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 and production of β -galactosidase under different culture condition. *International Food Research Journal* 18: 373-380.
16. Eschenbach D.A., Thwin S.S., Patton D.L., Hooton T.M., Stapleton AE., Agnew K., Winter C., Amalia Meier A, Walter E. Stamm W.E. 2000. Influence of the Normal Menstrual Cycle on Vaginal Tissue, Discharge, and Micromicrobiota. *Clinical Infectious Diseases* 30(6): 901-907.
17. Gut. 1988 Aug; 29(8): 1035-41.
Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects.
Evans DF, Pye G, Bramley R, Clark AG, Dyson TJ, Hardcastle JD.
18. Gut Microbes Volume 7, Issue 3, 2016 Special Issue: Gut Microbiota Metabolites in Health and Disease, Douglas J. Morrison & Tom Preston, pages 189-200.
- 18a. Maria Elli et al, EP1038951 A1, Societe Des Produits Nestle S.A.
19. <https://de.wikipedia.org/wiki/Joghurt>.
20. The Journal of Infectious Diseases, Volume 180, Issue 6, pp. 1950-1956. May A. D. Antonio¹, Stephen E. Hawes³ & Sharon L. Hillier¹.
21. Use and procurement of additional lubricants with male and female condoms: WHO/UNFPA/FHI360 - Advisory Note,

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, имеющей pH, равный от 4,3 до 4,6 после растворения/суспендирования твердых веществ в объеме 3 мл, и включающей следующие ингредиенты на одну дозировку:

- i) Са-лактат пентагидрат: 30-90 мг,
- ii) двухосновный цитрат магния: 15-45 мг,
- iii) пребиотическое волокно: 15-150 мг,
- iv) глютаминовая кислота: 20-60 мг,
- v) цистин или тиосульфат: 10-50 мг, и
- vi) вспомогательные вещества до 400-1100 мг: q.s.

в производстве интравагинального лекарственного препарата для лечения или профилактики урогенитальных инфекций, вызываемых патогенными микроорганизмами у субъекта-женщины, для стабилизации кислотности вагинальной жидкости субъекта при физиологическом значении около pH 4,5 или ниже.

2. Применение композиции по п.1, в котором композиция включает указанные ингредиенты в следующих количествах на одну дозировку:

- i) Са-лактат пентагидрат - 60 мг,
- ii) двухосновный цитрат магния: 30 мг,
- iii) пребиотическое волокно: 100 мг,
- iv) глютаминовая кислота: 40 мг,
- v) цистин или тиосульфат: 30 мг, и
- vi) вспомогательные вещества до 400-1100 мг: q.s.

3. Применение композиции по п.1, в котором композиция представляет собой смазочный гель для личного применения или капсулу, таблетку, суппозиторий, крем или гель.

4. Применение композиции по любому из пп.1-3, в котором композиция дополнительно включает один или несколько штаммов лактобактерий, выбираемых из группы, состоящей из *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. johnsonii* и *L. acidophilus* KS 400.

5. Применение композиции по любому из пп.1-4, в котором указанный штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 109, *L. gasseri* KS 114.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3482, *L. crispatus* 116.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3483, *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, *L. jensenii* KS 121.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3219, *L. jensenii* KS 122.1, *L. gasseri* 123.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3485, *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220, *L. gasseri* 126.2, *L. crispatus* 127.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3486, *L. jensenii* KS 130.1, *L. helveticus* KS 300, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 10 февраля 2005 года с номером доступа CNCM I-3360 и *L. acidophilus* KS 400.

6. Применение композиции по п.5, в которой указанный штамм *Lactobacillus* выбирают из группы, состоящей из *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217, *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218 и *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220.

7. Применение композиции по любому из пп.1-6, в котором композиция дополнительно включает эффективное количество терапевтически эффективного противомикробного средства, способного подавлять или уничтожать урогенитальные патогены, включая паразитов, простейших, бактерий, вирусы и/или грибы, предпочтительно противогрибковое средство, способное ингибировать или уничтожать грибы в урогенитальной области, более предпочтительно сорбиновую кислоту или ее соли.

8. Применение композиции по любому из предыдущих пп.1-7, в котором пребиотическое волокно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как: фруктоолигосахариды, галактоолигосахариды, гликоолигосахариды и их смеси.

9. Применение композиции по любому из пп.1-8, дополнительно включающей лиофилизаты:

i) *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218, и/или

ii) *L. gasseri* 124.3 и/или *L. crispatus* 119.4, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 22 июля 2005 года с номером доступа CNCM I-3484, и/или

iii) *L. jensenii* KS 119.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3217 в общей сложности от 2 до 10 млрд. КОЕ, что равнозначно от 50 до 200 мг.

10. Пребиотическая вагинальная смазка, включающая следующее:

i) молочная кислота: 50 мг,

ii) лимонная кислота: 30 мг,

iii) глицерин: 80 мг,

iv) карбомер: 5 мг,

v) фруктоолигосахариды с короткими цепями: 50 мг,

vi) тиосульфат: 10 мг,

vii) глютаминовая кислота: 10 мг,

viii) NaOH 0,1 М или HCl 0,1 М до pH 4,5 смазки.

11. Применение симбиотической вагинальной капсулы, включающей:

i) лиофилизаты вагинальных штаммов *L. gasseri* 120.1, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3218 и *L. gasseri* 124.3, депонированной Medinova AG в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) 4 июня 2004 года с номером доступа CNCM I-3220 в концентрациях 10^{11} КОЕ/г: 100 мг каждого,

ii) Са-лактат пентагидрат: 60 мг,

iii) двухосновный цитрат магния: 30 мг,

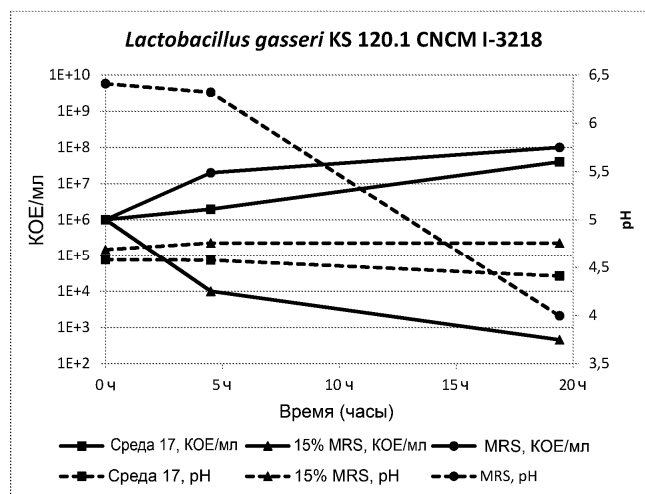
iv) аланин: 40 мг,

v) арабиногалактан: 100 мг,

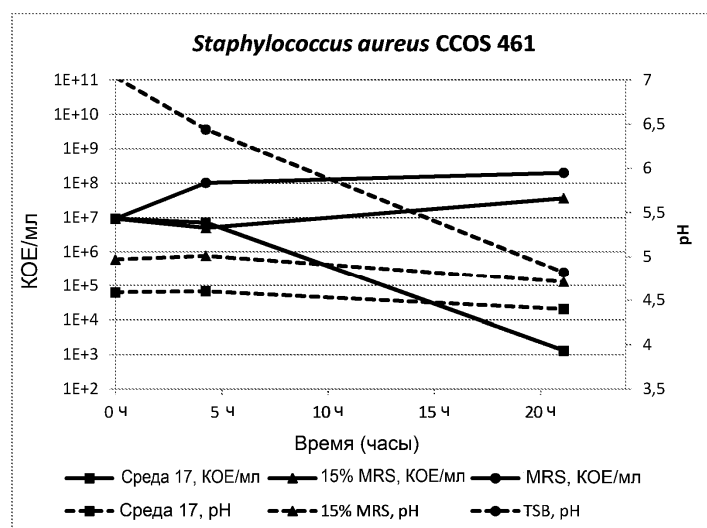
vi) диметилсульфон (MSM): 30 мг,

vii) вспомогательные вещества: 140 мг,

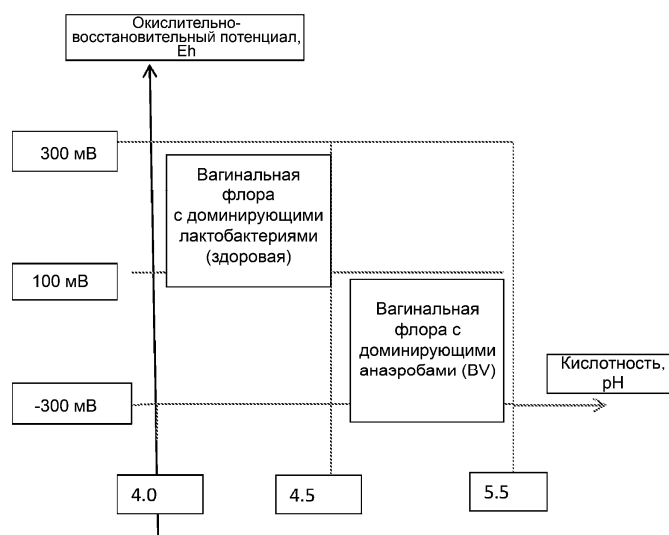
для производства лекарственного препарата для лечения бактериального вагиноза.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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