

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041872**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.12.12**

(21) Номер заявки  
**202090769**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.05.04**

(51) Int. Cl. *A23L 33/135* (2016.01)  
*A23L 33/105* (2016.01)  
*A23L 33/15* (2016.01)  
*A23L 33/175* (2016.01)  
*A61K 8/49* (2006.01)  
*A61K 8/67* (2006.01)  
*A61K 8/97* (2017.01)  
*A61K 8/99* (2017.01)  
*A61K 35/742* (2015.01)  
*A61K 31/47* (2006.01)  
*A61K 31/7028* (2006.01)  
*A61K 31/198* (2006.01)  
*A61K 31/196* (2006.01)  
*A61K 31/33* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)  
*A61Q 90/00* (2009.01)

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ СМЕСЬ ПРОБИОТИКОВ С ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИМ ЭФФЕКТОМ**

---

(43) **2020.06.11**

(86) **PCT/RU2018/000292**

(87) **WO 2019/212379 2019.11.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ;  
ФАРБЕР СОФЬЯ БОРИСОВНА (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Фарбер Борис Славинович, Фарбер  
Софья Борисовна (RU), Мартынов  
Артур Викторович (UA)**

(74) Представитель:  
**Васильева Г.С. (RU)**

(56) VOMKO T.V. et al.: Immunotropic aspect of the Bacillus coagulans probiotic action. Royal Pharmaceutical Society, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 69 (2017), p. 1033-1040

US-A1-20060263344

US-A1-20130251695

LISITSKAYA T. et al.: Effect of biologically active substances formed by Bacillus coagulans on the growth of crops. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY, vol. XVII (2013), no.2, pp. 53-60

HUANG J.M. et al.: Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. Vaccine, 28 (2010), pp. 1021-1030

(57) Изобретение относится к биотехнологии, может быть использовано в пищевой промышленности, медицине и косметологии при профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с иммунодефицитами и респираторными вирусными инфекциями. Суть изобретения: в основу изобретения поставлена задача разработать фармацевтическую композицию с мощным иммуномодулирующим эффектом. Поставленная задача решается путем получения фармацевтической композиции, включающей смесь пробиотиков с иммуномодулирующим эффектом, отличающейся тем, что среди пробиотиков содержит в том числе модифицированные споры сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans*, поверхность которых ковалентно химически модифицирована с разными степенями модификации, а композиция также дополнительно содержит соединения группы бензилизохинолина или сырье, их содержащее, растительные экстракты с гликозидами, а также содержит как минимум два из следующих компонентов: гиббереллин, пара-аминобензойную кислоту; карнитин; ауксин или его производное. При этом степени модификации белково-полисахаридных антигенов спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* находятся в диапазоне от 0,1 до 15% в пересчете на белок. Предлагаемая фармацевтическая композиция, включающая смесь пробиотиков с иммуномодулирующим эффектом, дополнительно обладает способностью полностью предотвращать инфицирование рядом вирусов, в том числе гриппом, ротавирусом и коронавирусом, а также стимулировать иммунитет сильнее, чем отдельно взятые пробиотики.

---

**B1****041872****041872****B1**

### Область техники

Изобретение относится к биотехнологии, может быть использовано в пищевой промышленности, медицине и косметологии при профилактике и/или лечении заболеваний, связанных с иммунодефицитом и респираторными вирусными инфекциями.

#### Предшествующий уровень техники

Основная область применения пробиотиков - заболевания желудочно-кишечного тракта, поскольку эти микроорганизмы обладают антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных кишечных бактерий, обеспечивают восстановление нормальной микрофлоры кишечника, способствуют перевариванию компонентов пищи, продуцируют необходимые для организма вещества (карбоновые кислоты, витамины), стимулируют местный иммунитет. Кроме того, их можно применять при лечении других заболеваний - гинекологических, аллергических, сердечно-сосудистых и др.

Микроорганизмы, включаемые в группу пробиотиков, должны обладать:

резистентностью к хлористоводородной кислоте и желчи, что обеспечивает им возможность выжить при прохождении через верхние отделы пищеварительного канала;

способностью к адгезии на эпителиальных клетках кишечника;

способностью быстро размножаться, колонизируя кишечник;

способностью нормализовать состав кишечной микрофлоры;

способностью персистировать в кишечнике после проявления своих эффектов;

не иметь признаков патогенности;

сохранять жизнеспособность в фармацевтических препаратах, т.е. обладать устойчивостью к технологическим процессам при производстве препаратов и к хранению при комнатной температуре.

В наибольшей степени этим требованиям соответствуют микроорганизмы, способные образовывать споры.

Эффективность спорообразующих бактерий доказана в клинических исследованиях, причем, в связи с высокой устойчивостью этих бактерий она проявляется даже в большей степени, чем традиционных, неспоровых, форм пробиотиков. Так, указывается на то, что представители таких родов спорообразующих бактерий как *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus* подавляют кишечные расстройства более эффективно, чем классические пробиотики на основе лакто- и бифидобактерий. При этом продолжаются дебаты относительно того, споры или вегетирующие формы ответственны за пробиотическую активность.

Одним из наиболее перспективных спорообразующих микроорганизмов является спорообразующая лактобактерия *Bacillus coagulans*. В форме спор она хорошо переносит технологические процессы и хранение, не разрушается под влиянием желудочного сока и желчи. Попадая в двенадцатиперстную кишку, споры *Bacillus coagulans* могут прорасти в вегетирующие бактерии в просвете кишечника человека и оказывать свои пробиотические эффекты.

*Bacillus coagulans* входит не только в состав биодобавок. В последнее время на основе этой бактерии на мировом фармацевтическом рынке появился ряд препаратов с доказанной клинической эффективностью.

Эта бактерия депонирована в американской коллекции клеточных культур (ATCC, Rockville, MD): *Bacillus coagulans* Hammer NRS 727 (ATCC No. 1 1014), *Bacillus coagulans* Hammer strain C (ATCC No. 11369); *Bacillus coagulans* Hammer (ATCC No. 31284), *Bacillus coagulans* Hammer NCA 4259 (ATCC No. 15949), *Bacillus coagulans* штамм ATCC 7050. Очищенные бактерии *Bacillus coagulans* также доступны в коллекциях Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Germany) используя следующие номера классификатора: *Bacillus coagulans* Hammer 1915 (DSM No 2356), *Bacillus coagulans* Hammer 1915 (DSM No 2383, согласуется с ATCC No. 1 1014), *Bacillus coagulans* Hammer (DSM No. 2384, согласуется с ATCC No. 11369), and *Bacillus coagulans* Hammer (DSM No. 2385, согласуется с ATCC No. 15949). *Bacillus coagulans* также производится в промышленных масштабах такими производителями как Sabinsa Corporation (Piscataway, NJ) или K K Fermentation (Kyoto, Japan).

Спора *B. coagulans* располагается на одном из полюсов клетки и имеет форму эллипса, устойчива к нагреванию и другим неблагоприятным условиям внешней среды и способна прорасти из разбавленных растворов соляной кислоты и гидроксида натрия. Образует колонии около 2,5 мм в диаметре, которые имеют выпуклую форму, блестящие, не выделяющие каких-либо пигментов.

По биологическим свойствам она занимает промежуточное положение между двумя родами - *Bacillus* и *Lactobacillus*. Являясь спорообразующей бактерией, она одновременно производит молочную кислоту, не способна восстанавливать нитраты и не содержит оксидазы.

Ряд свойств объединяют *Bacillus coagulans* с представителями рода *Bacillus*. Это, прежде всего, способность образовывать споры и колонии. Для своего роста микроорганизм использует такие вещества как углеводы, пептоны, мясо и дрожжевой экстракт. Продуцирует кислоты из таких субстратов как арабиноза, ксилоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, мальтоза, сахароза и трегалоза. Не гидролизует крахмал, казеин, желатин. Не продуцирует сероводород и индол.

Однако имеются и характеристики, отличающие *Bacillus coagulans* от рода *Bacillus*. Так, бактерия *Bacillus coagulans* имеет преимущественно изогнутую форму и молочнокислые бактерии - изогнутые.

Как и *Bacillus coagulans* молочнокислые бактерии проявляют очень слабую подвижность. У *Bacillus coagulans* и у молочнокислых бактерий споры расположены в терминальном участке клетки, а не в центре, как у *Bacillus*. Они дают отрицательный оксидазный тест. Продуцирует правовращающую молочную кислоту из глюкозы, фруктозы, сахарозы и трегалозы. В отличие от большинства *Bacillus* не восстанавливает нитраты до нитритов. В ДНК *Bacillus* молярный процент пары гуанин-цитозин достигает 69%, а у *Lactobacillus* не превышает 53%.

В то же время споры *Bacillus coagulans* устойчивы к действию антибиотиков. Благодаря этому пробиотик можно применять вместе со стандартной химиотерапией, без риска подавления его активности.

В желудочно-кишечном тракте существуют защитные механизмы, препятствующие избыточному размножению и внедрению не свойственной ему микрофлоры. К их числу относят кислое содержимое желудка, желчные кислоты, целостность эпителия и щеточная каемка, иммунная защита.

Основное бактерицидное действие в желудочно-кишечном тракте человека осуществляют три фактора - желудочная секреция, соляная кислота и желчь. Кислая среда желудка (рН 3) и протеазы (пепсин) разрушают большую часть бактерий, попадающих с пищей. Экспериментальные и клинические исследования показали, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют до 90% своей активности до момента попадания в кишечник.

*Bacillus coagulans* в вегетирующей форме, по данным опытов *in vitro*, не выдерживает пребывания в среде с рН<3, хотя показано, что штамм *Bacillus coagulans* CNCMI-1061, используемый в качестве пробиотика у цыплят, сохраняет до 50% живых форм в кислой среде желудка. Однако в форме спор все бактерии рода *Bacillus*, в том числе и *Bacillus coagulans*, устойчивы к кислым значениям рН.

Для спор *Bacillus coagulans* кислотная активация не описана. Отмечается, что споры минуют желудок и прорастают только в двенадцатиперстной кишке.

Таким образом, тот факт, что *Bacillus coagulans* применяется в форме спор, обеспечивает его устойчивость к кислому содержимому желудка. Отмечается, что при попадании в желудок споры этого микроорганизма выдерживают длительное нахождение в кислой среде желудка и не перевариваются желудочным соком.

Желчь служит вторым барьером для микроорганизмов, поскольку содержит токсичные для микроорганизмов соли желчных кислот, которые составляют около 50% от ее состава. Устойчивость к действию желчных кислот является одним из основных критериев отбора микроорганизмов для применения в качестве пробиотиков.

Концентрация желчи 0,3% является критической и применяется для тестирования чувствительности к ней различных микроорганизмов-пробиотиков.

Другие негативные воздействия желчи - нарушения в ДНК за счет подавления процессов ее репарации, оксидативный стресс, снижение внутриклеточного рН, снижение внутриклеточного уровня кальция и железа (за счет их хелатирования).

Для *Bacillus coagulans*, даже не в спорной форме, показана достаточно высокая устойчивость к действию желчи.

Если *Bacillus coagulans* достаточно устойчив к действию первых двух факторов (кислоты и желчи), то возникновение анаэробных условий (при том, что он не является облигатным анаэробом) или, возможно, какие-либо другие неблагоприятные факторы, приводят к тому, что этот микроорганизм в дистальных отделах кишечника подвергается респоруляции, и в значительной степени именно в этой форме покидает организм человека.

Клинический опыт применения пробиотиков на основе *Bacillus coagulans* также указывает на то, что они безопасны, и их фармакологическая активность определяется только местным действием в просвете кишечника или иммунологическими механизмами, в том числе опосредованным попаданием бактерий или их спор в лимфатическую систему.

Важными аспектами в действии пробиотиков на основе спор микроорганизмов является установление факта прорастания спор и формирования вегетирующих форм, относительное количество вегетирующих форм, степень пролиферации, а также вопрос, какие формы проявляют биологическую активность - споры, вегетирующие микроорганизмы или их элементы (метаболиты, клеточная стенка).

Приведем выявленные в открытой печати данные о кинетике *Bacillus coagulans* в кишечнике человека. Данные литературы свидетельствуют о том, что в среднем время между приемом *Bacillus coagulans* и прорастанием спор составляет 4 ч. Пик накопления бактериальной массы наблюдается через 18 ч.

*Bacillus coagulans* выделяется из организма медленно - после последнего приема пробиотика споры в фекалиях обнаруживают в течение 7 дней. Этот феномен расценивают как большое клиническое преимущество, поскольку после последнего приема препарата его действие продолжается еще целую неделю, что позволяет быстро, в полном объеме, без риска осложнений и рецидивов восстановить функцию желудочно-кишечного тракта после перенесенного заболевания. Вместе с тем большое значение имеет тот факт, что *Bacillus coagulans*, в конце концов, покидают организм человека - это способствует восстановлению собственной, родной для человека микрофлоры, без риска внедрения в нее генетически чужеродных штаммов.

Таким образом, *Bacillus coagulans* относится к полурезидентным лактобактериям, выполнив в орга-

низме человека функцию пробиотика, она покидает организм. Это также является преимуществом данного микроорганизма, поскольку способствует восстановлению собственной, индивидуальной для каждого человека, микрофлоры, без риска внедрения в нее генетически чужеродных штаммов *Bacillus coagulans* обладают преимуществами по отношению к большинству других бактерий, применяемых в качестве пробиотиков. Он занимает промежуточное положение между родами *Bacillus* и *Lactobacillus*, являясь спорообразующей бактерией, продуцирующей молочную кислоту.

Эта бактерия в виде спор хорошо переносит технологические процессы, хорошо хранится, устойчива к действию антибиотиков и не разрушается под влиянием желудочного сока и желчи. Попадая в двенадцатиперстную кишку, споры созревают и начинают размножаться, оказывая пробиотические эффекты.

*Bacillus coagulans* относится к полурезидентным бактериям - выполнив в организме человека функцию пробиотика, он проходит фазу споруляции и медленно покидает организм, выделяясь с фекалиями в виде спор. Таким образом, он не нарушает индивидуальный состав микрофлоры кишечника.

*Bacillus coagulans* улучшает микробиологический состав кишечника, увеличивая количество облигатных микроорганизмов и вытесняя патогенную флору. Так, в исследованиях на лабораторных животных с экспериментальным бактериальным дисбиозом после введения *Bacillus coagulans* наблюдался эффект подавления роста патогенных микроорганизмов и возобновление функционирования, в т.ч. за счет восстановления ферментообразования, а также нормализация количества микробных клеток нормальной микрофлоры кишечника. Искусственно вызванные у животных патогенными микроорганизмами острые патологии кишечника также быстро устранялись применением *Bacillus coagulans*.

Исследование на мышах с ванкомицин-резистентными энтерококками показало, что применение *Bacillus coagulans* приводит к статистически достоверному уменьшению количества этих энтерококков в сравнении с нелечеными мышами. В этом опыте бактерии вводили в дозе 107 КОЕ на животное (или солевой раствор в контроле) один раз в день в течение 4 дней. В опытной группе количество ванкомицин-резистентных энтерококков после терапии *Bacillus coagulans* уменьшилось на 35% против 0% в контроле ( $P=0,03$ ). Опыт показал перспективность *Bacillus coagulans* для подавления колонизации кишечника мультирезистентными бактериями, и в перспективе - как средства терапии мультирезистентных колоний.

В отношении патогенной микрофлоры пробиотики в целом могут оказывать следующие эффекты:

1. Прямое антагонистическое, подавляющее, действие на определенные группы микроорганизмов. Механизмы - продукция веществ с антибактериальным действием; конкуренция за пищевые субстраты; конкуренция за места связывания.

2. Изменение метаболизма микроорганизмов - повышение или подавление ферментативных активностей.

3. Стимуляция иммунитета - повышение уровня антител, активности макрофагов. Рассмотрим, какие из этих механизмов действия свойственны *Bacillus coagulans* и какие, возможно, являются наиболее важными в осуществлении его пробиотических эффектов.

Считают, что ингибиторная активность *Bacillus coagulans* в отношении гнилостных бактерий частично определяется выделяемыми им бактериоцинами. *Bacillus coagulans* продуцирует коагулин - бактериоцин, относящийся к семейству педиоцинов. Он является пептидом, состоящим из 44 аминокислотных остатков, последовательность которых сходна с таковой педиоцинов. Коагулин и педиоцин различаются только по одной аминокислоте в С-терминальном участке. Его молекулярная масса находится в пределах 3-4 кДа. Этот бактериоцин кодируется приблизительно 14 кБ фрагментом в плазмиде pI4. Последняя довольно стабильно и независимо экспрессирует данный бактериоцин. Установлено подавляющее действие коагулина в отношении кишечных бактерий родов *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria* и *Pediococcus*. При этом пробиотик может проявлять как бактериостатическое, так и бактерицидное действие. Коагулин стабилен при температуре до 60°C, pH в интервале 4-8, не расщепляется под действием  $\alpha$ -амилазы, липазы или органических растворителей. Будучи пептидом, инактивируется протеазами.

Другой хорошо изученный бактериоцин из этого микроорганизма - лактоспорин-выделяется бактерией в меньшей концентрации и только при наличии в питательной среде или кишечнике болезнетворной бактерии-мишени. Антимикробная активность лактоспорина была также подтверждена в отношении мишени - *Micrococcus luteus* ATCC 10420 методом диффузии в агаре. Протеиновая природа лактоспорина подтверждена путем его инактивации протеолитическими ферментами. Хотя активность лактоспорина зависела от pH, он был стабилен к нагреванию. Изоэлектрическая точка лактоспорина находилась в пределах 3.5-4.0.

В целом отмечается, что бактериоцины *Bacillus coagulans* ингибируют как грамположительную, так и грамотрицательную флору, и некоторые гнилостные грибы рода *Fusarium*.

Присутствующая в кишечнике нормофлора также защищает организм от инвазии патогенных микробов. Сама она приобрела различные механизмы устойчивости к действию разрушающих факторов кишечника, например, путем образования капсулярных полисахаридов на поверхности клеточной стенки. Нормальная микрофлора колонизирует кишечник, занимая всю его свободную поверхность и, тем самым, делая физически невозможным присоединение патогенов. Мембранная флора посредством глико-

конъюгированных рецепторов соединяется с поверхностными структурами эпителия и усиливает выработку слизи, таким образом уплотняя цитоскелет эпителиоцитов. Доминантная флора конкурентно потребляет все необходимые питательные вещества, а также выделяет бактериоцины - вещества, подавляющие рост поступивших извне микроорганизмов.

Как отмечалось выше, *Bacillus coagulans* не остается в организме человека навсегда, а покидает его через 7 дней после последнего приема. Следовательно, он не нарушает природный микробиоценоз кишечника, который формировался в течение всей жизни конкретного человека.

В ряде клинических исследований показано, что пробиотики на основе *Bacillus coagulans* не только не подавляют нормальную флору кишечника, но и способствуют ее восстановлению при подавлении антибиотиками или в пожилом возрасте. Так, в исследовании с участием пожилых пациентов со сниженным содержанием бифидобактерий и ослабленной иммунной защитой применение *Bacillus coagulans* достоверно увеличилось в сравнении с исходными показателями популяции *Faecalibacterium prausnitzii* и бактерий рода *Bacillus*. Следует отметить, что этот вид действия сопровождался иммуностропным и противовоспалительным действием пробиотика, что, по-видимому, и определяло его позитивное влияние на нормоценоз.

Для *Bacillus coagulans* установлено иммуномодулирующее действие. Оно было доказано в ряде экспериментальных и клинических исследований.

Имуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* были изучены в экспериментах на мышах и крысах. Так было установлено, что введение в течение 14 дней порошка бактерий крысам массой тела около 200 г в дозе 1 г на животное вызывало достоверное повышение уровня лейкоцитов в крови в сравнении с группой контроля. При этом повышался процент нейтрофилов и лимфоцитов (табл. 1). После введения пробиотика у крыс также повышалась адгезия нейтрофилов к нейлоновым волокнам, что коррелировало с повышением числа нейтрофилов.

Таблица 1. Влияние введения *Bacillus coagulans* на состав лейкоцитов крови крыс

Лейкоциты, %	Группы животных	
	Интактный контроль	Введение <i>Bacillus coagulans</i>
Нейтрофилы	48.5 ± 5.39	67.8 ± 2.95*
Лимфоциты	35.83 ± 5.67	53.4 ± 2.19*
Моноциты	7.67 ± 1.36	2.8 ± 1.30
Базофилы	3.17 ± 0.98	2.4 ± 0.89
Эозинофилы	4.84 ± 1.16	3.6 ± 1.51

\* -достоверность различия по отношению к показателям интактного контроля (P<0.05)

Была выявлена способность *Bacillus coagulans* влиять на гуморальный иммунитет -вызывать повышение уровня антител в крови.

Стимулирующее действие пробиотика на клеточный иммунитет установлено у крыс и у мышей в ответ на воздействие Т-зависимого антигена. Предварительное введение пробиотика вызывало уменьшение толщины стопы крыс в динамике после введения вакцины VCG.

Выявлено достоверное повышение индекса фагоцитарной активности у мышей, что указывает на стимулирующее влияние *Bacillus coagulans* на неспецифическую иммунную реакцию.

Полученные данные указывают на то, что *Bacillus coagulans* обладает стимулирующим действием в отношении как клеточного, так и гуморального иммунитета.

В научной литературе обсуждается вопрос о том, за счет чего в большей степени пробиотики оказывают свое действие - благодаря активным компонентам клеточной стенки или метаболитам, выделяемым живыми бактериями. И тот, и другой механизмы в настоящее время экспериментально подтверждены. Приводятся данные исследования воздействия *Bacillus coagulans* на иммунную систему и на свободнорадикальные процессы в опытах *in vitro*, причем было оценено влияние, как метаболитов живых бактерий (супернатанта), так и изолированной клеточной стенки. Споры *Bacillus Coagulans* активировали нагреванием до 70°C в течение 30 мин и инкубировали в течение 2 суток при 37°C в питательной среде RPMI-1640. Путем центрифугирования получали супернатант живых бактерий, а для получения фрагментов клеточной стенки бактерии разрушали путем замораживания-оттаивания, затем центрифугировали и ресуспендировали осадок. Проведено изучение влияния бактерии на периферические кровяные мононуклеарные и на полиморфноядерные клетки.

Было установлено, что супернатант и клеточная стенка бактерий ингибировали спонтанное образование реактивных метаболитов кислорода в полиморфноядерных лейкоцитах человека. Клеточная стенка оказывала дозозависимое действие, а супернатант проявлял выраженное противовоспалительное действие в низких концентрациях. Присутствие супернатанта в соотношении 1:1000 уменьшало образование реактивных метаболитов кислорода на 20% (p<0.004), а клеточная стенка вызывала подобный эффект (уменьшение на 30%) при соотношении 1:10. Предварительная инкубация полиморфноядерных клеток с

супернатантом и клеточными стенками до воспроизведения оксидативного стресса ингибировала образование  $H_2O_2$ -индуцированного реактивного кислорода. Эффективными были разведения 1:10 и 1:100.

Изучение влияния на фагоцитоз проводилось иммунофлуоресцентным методом. Экспозиция полиморфноядерных лейкоцитов с супернатантом в разведении 1:10 достоверно увеличивала фагоцитоз на 40%, а с клеточными стенками в том же разведении - на 25%. Инкубация с супернатантом и клеточными стенками в этой концентрации увеличивала популяцию полиморфноядерных лейкоцитов в целом, причем ряд клеток в ней были фагоцитирующими, остальные - нет. Дальнейшее разведение приводило к снижению числа фагоцитирующих клеток.

Супернатант оказывал выраженное дозозависимое влияние на миграцию полиморфноядерных лейкоцитов, причем на оба типа миграции - спонтанную и направленную (вызванную хемотаксисом). Направленная миграция вызывалась тремя агентами - бактериальным пептидом f-MLP, провоспалительным интерлейкином IL-8 и лейкотриеном LTB-4. При разведении супернатанта 1:10 спонтанная миграция повышалась на 300%, клеточные стенки вызывали более слабое повышение - на 25%. Миграцию, вызванную пептидом, супернатант в разведении 1:10 повышал на 200%, клеточные стенки - на 25%. Миграция, вызванная интерлейкином-8, подавлялась клеточными стенками на 60%, а супернатантом - в несколько меньшей степени. Выраженной дозозависимости эффекта не наблюдалось. Миграция лейкоцитов под действием лейкотриена В-4 также достоверно, на 60%, подавлялась клеточными стенками бактерий при разведении 1:1000, а супернатант оказывал менее выраженное действие.

Отмечалось выраженное дозозависимое индуцирующее действие супернатанта и клеточных стенок на экспрессию клеток-киллеров. Достоверное увеличение отмечено при разведениях 1:400, 1:1600 и 1:6400. Повышение содержания маркера CD69 на 32% отмечалось при разведении супернатанта 1:400, и на 36% - при том же разведении клеточных стенок.

Влияния на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов не было установлено при 5-дневной инкубации. Это указывает на отсутствие у бактерии митогенного потенциала.

Изучение влияния *Bacillus coagulans* на продукцию цитокинов показало, что оба продукта вызывали подавление выработки IL-2, усиление продукции IL-4, IL-10 и особенно IL-6, незначительное увеличение продукции TNF- $\alpha$ , достоверное увеличение - INF- $\gamma$ .

Следовательно, *Bacillus coagulans* оказывает выраженное противовоспалительное действие, поддерживает основные механизмы природного иммунитета. Активность в опытах *in vitro* проявляют, как клеточная стенка бактерии, так и ее метаболиты. Проявление выявленных видов активности полезно не только с точки зрения защиты кишечника от болезнетворных микроорганизмов, но и в плане противовоспалительного действия, поддержания целостности эпителия и нормального пищеварения.

Однако с учетом того, что часть поступившего в кишечник *Bacillus coagulans* присутствует в виде спор, важным аспектом является его взаимодействие с элементами иммунной системы именно в этой форме. Данных о прямых экспериментах, указывающих на иммуномодулирующее действие спор *Bacillus coagulans*, не выявлено. Однако для наиболее тщательно изученных бактерий *Bacillus subtilis* (в ряду бактерий рода *Bacillus*) было показано, что их споры способны проникать в лимфоток. Так, указывается на то, что после 5-дневного введения мышам спор, их обнаруживали в пейеровых бляшках и лимфатических узлах. Считается, что споры бактерий этого рода, имея размеры около 2 мкм, могут быть захвачены М-клетками слизистой кишечника, которые осуществляют их передачу в пейеровы бляшки и далее в лимфатические узлы. При пероральном введении мышам споры вызывали системный иммунный ответ в виде IgG подкласса IgG2a и местную реакцию - высвобождение sIgA. Анализ мРНК цитокинов лимфоцитов иммунной системы кишечника указывает на раннюю индукцию интерферона- $\gamma$ , цитокина Th1, провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$ . В опытах *in vitro* макрофаги мышей эффективно фагоцитировали споры *B. subtilis* из среды культивирования. Споры могут прорасти внутри фагоцита и инициировать экспрессию генов, ответственных за вегетацию микроорганизма и синтез белка. Между тем, такие проросшие споры прекращали свой рост и примерно через 5 ч разрушались путем лизиса в фагосомах фагоцитов. Эти исследования весьма важны, поскольку они показывают, что споры могут взаимодействовать с лимфоидной системой кишечника, а это служит механизмом стимуляции иммунной системы и определяет один из механизмов действия пробиотиков.

Еще одним доказательством иммуномодулирующего действия *Bacillus coagulans* является его клинически выраженный эффект при артритах у животных и людей. Детально результаты контролируемого клинического исследования эффективности данного пробиотика при артритах представлены ниже (в разделе клинических исследований). Однако учитывая ведущую роль иммунных механизмов в развитии артрита, можно сделать вывод о проявлении *Bacillus coagulans* системных противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств. В последние годы был установлен иммуномодулирующий эффект *Bacillus coagulans* в условиях антибиотикоассоциированной диареи, связанной с *Clostridium difficile*. Данное заболевание - одно из осложнений, встречающееся у пациентов, принимающих антибиотики. В литературе имеется ряд доказательств эффективности при этом заболевании применения пробиотиков *Lactobacillus spp.* и *Saccharomyces boulardii*.

Молекулярный и иммунный механизм развития этого заболевания в настоящее время представляет-

ся следующим образом. *C. difficile* выделяет токсины (преимущественно токсин А), которые вызывают активацию трех факторов транскрипции. Ядерный фактор каппа-В (NF-κB) способствует продукции хемокинов и играет роль в апоптозе колоноцитов. Активаторный протеин-1 (AP-1) участвует в продукции интерлейкина-8 (IL-8), что вызвано стимуляцией токсином А колоноцитов. Важным моментом является цАМФ-связывающий белок, который необходим для синтеза простагландина E<sub>2</sub>, определяющего усиление секреции жидкости и возникновение диареи, а также стимуляцию продукции Fas-лиганда и апоптоза эпителиальных клеток кишечника.

*Bacillus coagulans* в экспериментальных исследованиях проявлял эффективность на модели колита у мышей, вызванного *Clostridium difficile*. *Bacillus coagulans* (или физиологический раствор) вводили мышам внутрь по  $2 \times 10^9$  КОЕ в течение 15 дней. Патологию вызывали путем введения смеси антибиотиков с 5 по 8 дни, клиндамицина на 10 день и культуры *C. difficile* по  $10^4$  КОЕ на 11 день эксперимента. Исследование показало, что в условиях введения *Bacillus coagulans* не происходило гибели мышей, а в группе контроля погибло 2 животных. На 12 день было выявлено достоверное ( $p = 0.0002$ ) различие между группами по числу мышей с нормальным стулом - 66,7% против 13,0% в контроле. На 16 день этот показатель составил соответственно 23 и 0%. Микроскопия кишечника показала, что введение мышам *Bacillus coagulans* существенно снижало выраженность патологических изменений в толстом кишечнике - повреждения крипт, отека, лейкоцитарной инфильтрации. Отмечено также уменьшение связывания ядерного фактора NF-κB и снижение содержания хемокина MIP-2 до 16,3 против 24,6 пг/2 см.

Подобные результаты были получены и в аналогичной постановке эксперимента при введении на 6-10 дни ванкомицина в дозе 50 мг/кг. Под действием *Bacillus coagulans* значительно лучшей была консистенция стула мышей. На 17 день он был нормальным у 88,9% животных опытной группы и ни у одного в контроле патологии. Значительно снижалась активность миелопероксидазы (маркера воспалительного процесса в кишечнике) - с 4,3 до 2,6 ед/2 см. Значительно лучшими были и показатели гистологических исследований, а также уровень хемокина кератиноцитов.

Эффекты *Bacillus coagulans* на иммунную систему при воздействии на Т-клетки аденовирусом и вирусом гриппа А были изучены на 10 здоровых добровольцах (средний возраст 44 года). Испытуемые принимали пробиотик в виде капсул 1 раз в сутки в дозе  $2 \times 10^6$  КОЕ в течение 30 дней. До приема пробиотика и по его окончании отбирали пробы крови добровольцев и в условиях *in vitro* определяли уровень цитокинов после экспозиции Т-клеток с аденовирусом и вирусом гриппа А. Было выявлено существенное увеличение выработки фактора некроза опухоли TNF-α в ответ на воздействие аденовируса и вируса гриппа А - на 250 и 1709% соответственно в сравнении с исходными показателями. Это указывает на иммуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* - повышение Т-клеточного ответа при вирусных инфекциях.

В ряде клинических исследований показано, что пробиотики на основе *Bacillus coagulans* не только не подавляют нормальную флору кишечника, но и способствуют ее восстановлению при подавлении антибиотиками или в пожилом возрасте. Так, в исследовании (см. разд. Клинический опыт) с участием пожилых пациентов со сниженным содержанием бифидобактерий и ослабленной иммунной защитой применение *Bacillus coagulans* достоверно увеличилось в сравнении с исходными показателями популяции *Faecalibacterium prausnitzii* и бактерий рода *Bacillus*. Следует отметить, что этот вид действия сопровождался иммуностропным и противовоспалительным действием пробиотика, что, по-видимому, и определяло его позитивное влияние на нормоценоз.

*Bacillus coagulans* оказывает иммуномодулирующее действие, стимулируя клеточный и гуморальный иммунитет.

Имуномодулирующим действием обладают метаболиты, выделяемые бактерией, ее клеточная стенка и споры.

На основании имеющихся в литературе данных можно сделать вывод о том, что, по-видимому, именно иммуномодулирующие свойства *Bacillus coagulans* играют решающую роль в его фармакологических эффектах. На это указывают важность иммунной системы в патогенезе многих заболеваний, достаточность даже небольших количеств стимулятора для оказания эффекта (без необходимости интенсивного размножения бактерии и колонизации кишечника), наличие экспериментальных доказательств проникновения бактерий и их спор в лимфатическую систему и взаимодействия с иммунокомпетентными клетками, а также местные и системные иммуностропные эффекты пробиотика.

Одним из путей повышения скорости наступления иммуномодулирующего и антивирусного действия спор *Bacillus coagulans* является усиление их адгезивных свойств к стенкам кишечника и активация их герминации (прорастания). С целью усиления адгезивных свойств и усиления фагоцитоза спор нами предложено ковалентно химически модифицировать их поверхность с приданием им избыточного негативного заряда. В результате такой модификации треть введенных спор будет поглощена макрофагами с соответствующими реакциями иммунитета. Кроме того, нерегулярная модификация поверхностных структур приводит к увеличению разнообразия поверхностных зарядов, являясь одновременно методом комбинаторного биоорганического синтеза, что значительно увеличит биодоступность спор для разных клеток иммунной системы. Такие структуры являются комбинаторными производными. Для проявления

антивирусных и пробиотических свойств *Bacillus coagulans* за счет антагонизма к болезнетворным бактериям через систему бактериоцинов бактерия должна также присутствовать в кишечнике в вегетативной форме. Чтобы увеличить процент герминации спор нами предложено использовать активаторы роста растений типа гиббереллина. Подобные соединения ранее не использовались для стимуляции герминации спор и нами исследованы впервые показано более, чем 10-кратное возрастание процента и скорости прорастания спор при добавлении в питательную среду указанных активаторов. Ковалентная модификация же поверхности спор никак не повлияла на их жизнеспособность.

#### Терминология

Используемый здесь термин "лекарственное средство" охватывает лекарственные средства для применения и для людей, и для животных в медицине и ветеринарии. Кроме того, термин "лекарственное средство", как здесь используется, означает любое вещество, которое обеспечивает терапевтический и/или благотворный эффект. Термин "лекарственное средство", как здесь используется, необязательно ограничивается веществами, для которых требуется разрешение продажи на рынке страны, а могут включать вещества, которые могут использоваться в косметических средствах, БАД, продуктах питания (в том числе пище и напитках, например), культурах пробиотиков, пищевых добавках и лекарственных средствах природного происхождения. Кроме того, термин "лекарственное средство", как здесь используется, охватывает продукт, предназначенный для включения в корм для животных, например, корм для домашнего скота и/или корм для любимых домашних животных. Как здесь используется, улучшение микробиоты кишечника" относится к увеличению количества и/или типа микроорганизмов, присутствующих в кишечнике хозяина, и/или увеличению активности указанных микроорганизмов в плане их метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Используемый здесь термин "врожденная иммунная система", также известный как неспецифическая иммунная система, включает клетки и механизмы, которые обеспечивают хозяину незамедлительную защиту от инфицирования другими организмами неспецифическим образом. Это означает, что клетки врожденной системы распознают патогены и отвечают на них генетически, но в отличие от адаптивной иммунной системы она не обеспечивает хозяину длительный или протективный иммунитет. Используемый здесь термин "регуляция врожденной иммунной системы" означает индуцирование активности врожденной иммунной системы и/или увеличение уровня активности относительно исходного уровня активности, так что она содействует иммунному гомеостазу. Используемый здесь термин "адаптивная иммунная система", иначе известный как "специфическая иммунная система", относится к высокоспециализированным системным клеткам и процессам, которые устраняют или предотвращают рост патогенов. Адаптивный иммунный ответ дает иммунной системе позвоночного возможность распознавать и вспоминать конкретные патогены (для формирования иммунитета), и поднимать в более сильные атаки каждый раз при встрече с патогеном. Используемый здесь термин "регуляция адаптивной иммунной системы" означает индуцирование активности адаптивной иммунной системы и/или стимулирование относительно исходного уровня активности. Предпочтительно адаптивная иммунная система подвергается модуляции в направлении иммунорегуляции (а не активации иммунной системы, следовательно, уменьшения воспаления). Дефекты и нарушения, связанные с адаптивной иммунной системой, в особенности, связанные с функционированием Т-клеток, связаны со многими воспалительными и аутоиммунными заболеваниями. Т-клеточные реакции, связанные с Th1, Th2 и Th17, связаны с топическими, воспалительными и аутоиммунными заболеваниями. Терапии, которые улучшают или увеличивают популяции регуляторных Т-клеток, важны для борьбы с заболеваниями, запускаемыми чрезмерными Т-клеточными реакциями, связанными с Th1, Th2 и Th17. Формы диареи, которые можно лечить профилактически и/или терапевтически в соответствии с изобретением, включают острую диарею и хроническую диарею. В определенных вариантах осуществления диарея, которую лечат в соответствии с изобретением, является диареей инфекционной природы, которая вызвана вирусным, бактериальным или паразитарным патогеном. В других вариантах осуществления диарея, которую лечат в соответствии с изобретением, является диареей неинфекционной природы.

Диарея неинфекционной природы может быть, например, диареей, вызванной пищевой непереносимостью, диареей, вызванной жирной диетой, диареей, вызванной алкоголем, диареей, вызванной психологическим фактором, диареей, вызванной введением лекарственного препарата, диареей, вызванной применением терапевтической процедуры, диареей, связанной с болезнью или с клиническим состоянием, или диареей, связанной с отменой лекарственного средства. Термин "пробиотический штамм" в данном описании предназначен для обозначения штамма живого микроорганизма, который оказывает благоприятное воздействие на здоровье хозяина. Как правило, хозяином является человек, однако можно допустить, что хозяином может быть другое млекопитающее, например собака, кошка, жвачное животное, а именно, овца, коза, теленок, корова, олень, верблюд, лошадь, кабан, в частности свиньи и поросята, leporids (заячьи), муридовы (мышинные) и грызуны семейства Caviidae (свинковые). Штаммом, тестируемым с использованием способа согласно изобретению, может быть любой штамм микроорганизма. В определенных вариантах осуществления тестируемым штаммом является дрожжевой штамм. В числе дрожжей, которые могут проходить тестирование, можно упомянуть, например, дрожжи рода *Saccharomyces*, в частности виды *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*, дрожжи рода *Kluveromyces*, в частности вид *Kluveromyces marxianus*. В других вариантах осуществления тестируемым штаммом



является бактериальный штамм. Тестируемый штамм предпочтительно выбирают из бактерий, признанных безопасными для людей и/или животных. В числе бактерий, которые могут проходить тестирование, можно упомянуть, например, бактерии рода *Bifidobacterium*, в частности виды *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* и *Bifidobacterium breve*; бактерии рода *Lactobacillus*, в частности виды *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus salivarius*; бактерии рода *Weisella*, в частности виды *Weisella cibaria*, *Weisella kimchii*, *Weisella thailandensis*; бактерии рода *Bacillus*, в частности виды *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus clausii*; бактерии рода *Lactococcus*, в частности вид *Lactococcus lactis*; бактерии рода *Enterococcus*, в частности виды *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*; бактерии рода *Streptococcus*, в частности вид *Streptococcus thermophilus*; бактерии рода *Escherichia*, в частности вид *Escherichia coli*. "Спорулирующая форма" бактерии обозначает форму бактерии, помещенной в неблагоприятные условия. Споры каждой из пробиотических бактерий согласно этому изобретению могут быть ковалентно химически модифицированы по поверхностным антигенам для увеличения адгезивных свойств. Таким образом, спорулирующая форма является устойчивой формой, которая позволяет бактерии противостоять неблагоприятным условиям среды, таким как, например, отсутствие питательных веществ, т.е., лимитирующая питательная среда, недостаток воды, широкое колебание значений pH или температуры, или прохождение через пищеварительный тракт. Неблагоприятные условия для клеток бактерий создают, например, не обновляя культуральную среду бактерий, прекращая поставку питательных веществ в культуральную среду, используя лимитирующую питательную среду, изменяя температуру, изменяя значение pH или их комбинацию. Способ получения клеток *Bacillus coagulans* также может содержать дополнительную стадию высушивания клеток для получения клеток *Bacillus coagulans* в сухой форме. Выражение "клетки *Bacillus coagulans* в сухой форме" означает, что биомасса, полученная в конце данного способа получения клеток *Bacillus coagulans*, содержит более 90% сухого вещества, предпочтительно более 95% сухого вещества. Высушивание представляет собой, например, сушку лиофилизацией, сушку способом вихревого напыления или сушку распылением.

#### Формы диарей.

"Острая диарея" означает диарею, симптомы которой продолжаются менее двух недель, а "хроническая диарея" означает диарею, симптомы которой продолжаются по меньшей мере две недели, предпочтительно по меньшей мере один месяц. Острая диарея включает, например, вирусный гастроэнтерит, бактериальный гастроэнтерит и пищевую интоксикацию (например, сальмонеллез, шигеллез, инфекции *Staphylococcus aureus*, инфекции *Bacillus cereus*, инфекции *Escherichia coli*). Хроническая диарея включает, например, синдром пониженного всасывания, гастроэнтеропатию (глутеновую энтеропатию, болезнь Уиппла, болезнь Крона и т.д.), моторную диарею (т.е. диарею в результате ускорения прохождения содержимого через кишечник), секреторную диарею (т.е. диарею, являющуюся результатом ускорения водно-электролитной секреции в тонком кишечнике и/или толстой кишке), осмотическую диарею (т.е. диарею, являющуюся результатом присутствия в желудочно-кишечном тракте растворенных веществ, которые плохо абсорбируются и вызывают осмотический эффект). Другие виды диареи, которые можно лечить с помощью пробиотического штамма согласно изобретению или клеток, полученных культивированием пробиотического штамма согласно изобретению, включают диарею, являющуюся результатом беспокойства или сильных эмоций, диарею, являющуюся результатом пищевой непереносимости (например, лактозы коровьего молока, сорбитола, глютена и т.д.), диарею, являющуюся следствием некоторых видов лечения, например лечения магнезией, радиотерапии или химиотерапии, или некоторых видов хирургического вмешательства, например, гастрэктомии или резекции подвздошной кишки, диарею, являющуюся следствием переполнения или раздражения желудка, кишечника, толстой кишки и т.д., диарею, являющуюся следствием отмены некоторых веществ, таких как героин, диарею, являющуюся результатом применения некоторых лекарственных средств, таких как антибиотики. Другие примеры диареи, которые можно лечить с помощью пробиотического штамма согласно изобретению или клеток, полученных культивированием пробиотического штамма согласно изобретению, включают диарею, сопровождающую приступ разлития желчи или несварения желудка, диарею, являющуюся результатом чрезмерного потребления некоторых послабляющих продуктов питания, и диарею бегунов. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления диарея, которую лечат с помощью пробиотического штамма согласно изобретению или клеток, полученных культивированием пробиотического штамма согласно изобретению, не является диареей, вызванной введением антибиотика, или в более общем смысле введением лекарственного средства. В других предпочтительных вариантах осуществления диарея, которую лечат с помощью пробиотического штамма согласно изобретению или клеток, полученных культивированием пробиотического штамма согласно изобретению, не является диареей инфекционного происхождения.

Ближайшим прототипом предлагаемого изобретения являются сладкие и оздоравливающие композиции, содержащие как минимум один пребиотик и один пробиотик (Патент США US 9,114,169 B2). К пробиотикам отнесены также *B. coagulans* и *S. boulardii*. Недостатком изобретения является отсутствие

значительного профилактического эффекта композиции в отношении респираторных вирусов, в частности - гриппа, обусловленных отсутствием ковалентно химически модифицированных спор *B. coagulans*. В то время, как в нашей заявке показано, что ковалентная модификация спор позволяет увеличить их иммуномодулирующее действие в несколько раз за счет увеличения их адгезии к рецепторам фагоцитов и эпителия кишечника, что увеличивает процент спор, подвергшиеся герминации. Также в нашей композиции присутствуют активаторы прорастания спор: гиббереллин, пара-аминобензойная кислота; карнитин; ауксин или его производное. Ранее данные вещества были известны как активаторы - стимуляторы роста растений, прорастания семян, но не были известны как активаторы прорастания спор бактерий, тем более в пищевой/ косметической композиции. Совместное применение модифицированных спор с активаторами прорастания значительно усиливают иммуномодулирующее и противовирусное действие композиции. Термостабильность всех компонентов позволяет включать их как горячие, так и в холодные напитки, зубные пасты и пищевые добавки. Кроме того, в состав композиции входят производные бензилизохинолина (папаверин) или содержащее их сырье (маковые зерна). Эти вещества обладают способностью ускорять рост пробиотиков, увеличивать степень колонизации кишечника, что позволяет сократить время наступления положительного иммуноотропного и противовирусного эффектов в несколько раз.

#### Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставлена задача разработать пищевую, косметическую и фармацевтическую композицию с мощным иммуномодулирующим и протективным противовирусным эффектом.

Поставленная задача решается за счет того, что предлагается в пищевую, косметическую и фармацевтическую композиции, содержащие смесь пробиотиков с иммуномодулирующим эффектом, дополнительно включать среди пробиотиков в том числе модифицированные споры сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans*, поверхность которых ковалентно химически модифицирована с разными степенями модификации ацилирующими и алкилирующими модификаторами, также данная композиция может дополнительно включать соединения группы бензилизохинолина или сырье, их содержащее, растительные экстракты с гликозидами, а также включать как минимум два из следующих компонентов: гиббереллин, пара-аминобензойную кислоту; карнитин; ауксин или его производное. При этом степени модификации поверхности спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* находятся в количестве до 300 % в пересчете на массу спор после высушивания. Также ковалентная химическая модификация спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* представлена ацилированием ангидридами или галогенангидридами дикарбоновых и поликарбоновых кислот. Также модификация спор может быть проведена через процесс алкилирования галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот. Также в другой реализации изобретения дополнительно в качестве пробиотиков композиция может содержать сапрофитный пробиотический гриб *S. boulardii* в количестве от 1 до 10 lg КУО /мл на одну дозу продукта. Композиция также может включать в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт солодки в количестве от 0,05 до 0,5% от массы продукта. В другой реализации изобретения композиция также может включать в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт стевии в количестве от 0,05 до 0,5%. Также композиция может включать в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт спирулины в количестве от 0,05 до 5% от массы продукта и/или экстракт люцерны в количестве от 0,05 до 5% от массы продукта. В другой реализации изобретения композиция отличающаяся тем, что количество пробиотической бактерии *B. coagulans* составляет от 1 до 10 lg КУО /мл на одну дозу продукта. Композиция также может отличаться тем, что сырье, содержащее соединения группы бензилизохинолина это измельченные зрелые маковые зерна либо экстракт зрелых маковых зерен либо папаверин. Также композиция может содержать в качестве активаторов прорастания спор гиббереллин в количестве 0,01-0,05% от массы продукта. Композиция другой реализации изобретения может содержать пара-аминобензойную кислоту в количестве 0,01-0,5% от массы продукта. Композиция другой реализации изобретения может содержать карнитин в количестве 0,1-1,0% от массы продукта. Также композиция может содержать ауксин или его производное в количестве 0,01-0,05% от массы продукта.

#### Примеры

Следующие примеры описывают некоторые варианты осуществления настоящего изобретения. Однако должно быть понятно, что данные примеры предоставляются только с целью иллюстрации и не ограничивают каким-либо образом объем данного изобретения.

Пример 1. Получение ковалентно химически модифицированных спор *B. coagulans* (КХМС)

Для получения спор может быть использован любой пробиотический штамм *B. Coagulans*.

1. Инокулируют культуру, например штаммы *Bacillus coagulans* MTCC 5856, *Bacillus coagulans* ATCC 31284, *Bacillus coagulans* NBRC 3887, *Bacillus coagulans* ATCC 7050 или любой другой в 1,0 л бульонной питательной среды дрожжевого экстракта с глюкозой и ацетатом (HiMedia, Мумбай, Индия) или бульонной питательной среды MRS, содержащей 0,5% Твина-80, или в среды на основе порошка кукурузного экстракта и инкубируют при 37°C в течение 24-48 ч;

2. После инкубации и накопления бактериальной биомассы в первом этапе снижают температуру культивируемой среды до 5°C и проводят инкубацию при этой температуре в течение 24-48 ч. При этом наблюдается полная споруляция всех бактерий в питательной среде за счет неблагоприятных для вегетативных форм бактерии температурных условий.

3. Питательную среду центрифугируют при 20g 2 ч, осадок спор отмывают дистиллированной водой двоекратно. Получают суспензию спор в соотношении сухого осадка к воде 1:100. В полученной суспензии, содержащей очищенные споры, определяют остаточный азот и пересчитывают на белок любым классическим методом, известным специалисту в данной области.

4. К суспензии спор добавляют сухой янтарный ангидрид в количестве до 300% от массы сухих спор (например, на 100 мг высушенных спор добавляют 300 мг янтарного ангидрида) и раствор перемешивают до полного растворения осадка янтарного ангидрида. Модификация более 300% сухой массы спор приводит к потере у спор жизнеспособности и способности прорастанию, они полностью гибнут. Вместо янтарного ангидрида могут быть использованы другие ангидриды и галогенангидриды карбоновых и поликарбоновых кислот. Вместо процесса ацилирования янтарным ангидридом могут быть использован процесс алкилирования с применением галогеналканов или галогенпроизводные карбоновых и поликарбоновых кислот. Модификация должна приводить к повышению общего негативного заряда споровой поверхности. Это усиливает адгезию спор к стенкам кишечника, усиливает фагоцитоз таких спор макрофагами и вызывает более активную иммунную реакцию в более короткие термины.

5. Далее модифицированный раствор спор лиофилизируют либо сушат на поддоне при температуре до 40°C и используют далее для получения композиции по заявляемому изобретению.

Пример 2. Получение композиции на основе ковалентно химически модифицированных спор *V. coagulans* (КХМСБ) для включения в пищевые, косметические и фармацевтические продукты

В любом смесителе для сухих веществ проводят изготовление композиции по предлагаемому изобретению. В смеситель вносят сухой КХМСБ с активностью 1-50 lg КУО/г, добавляют сухой лиофилизированный порошок *S. bouardii* в количестве от 1 до 50 lg КУО/г, добавляют экстракт солодки в количестве от 0,05 до 0,5% от общей массы композиции, добавляют экстракт стевии в количестве от 0,05 до 0,5% от общей массы композиции, добавляют экстракт спирулины в количестве от 0,05 до 5% от общей массы композиции, добавляют экстракт люцерны в количестве от 0,05 до 5% от массы продукта, добавляют измельченные зрелые маковые зерна или экстракт мака или папаверин в количестве от 0,05 до 5% от массы композиции, добавляют гиббереллин в количестве 0,01-0,05% от массы композиции, добавляют карнитин в количестве 0,1-1,0% от массы композиции. Также кроме гиббереллина и карнитина в композицию могут входить пара-аминобензойная кислот в количестве 0,01-0,5% от массы композиции и ауксин или его производное в количестве 0,01-0,05% от массы композиции. Смесь перемешивают в смесителе до однородности и используют в дальнейшем для получения пищевых и фармацевтических композиций, зубных паст и косметических кремов.

Определение скорости герминации спор *V. Coagulans* КХМСБ в виде суспензии количестве 0,1 г/1 мл дистиллированной воды наносят на поверхность шести чашек Петри со средой "Лакто". Аналогичную процедуру проводят с разными композициями КХМСБ (представлены в табл. 1) по 6 чашек Петри на один образец. В последнюю группу чашек Петри наносят немодифицированные споры. Через каждые 3 ч берут образец мазка, окрашивают по Грамму и определяют наличие и количество колониеобразующих единиц - вегетативных проросших форм *Bacillus coagulans* (БК). Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты определения скорости герминации КХМСБ в сравнении с немодифицированными спорами *Bacillus coagulans*

№ группы	Название и состав композиции	Время появления первых колоний, ч	Ig КУО/мл через 72 часа
1.	Лактовит-Форте (немодифицированные споры)	72±5	15±5
2.	КХМСБ (вариант с экстрактом маковых зерен)	36±2*	85±12*
3.	КХМСБ (вариант папаверин)	36±6*	90±16*
4.	КХМСБ (вариант экстракт мака, гиббереллин, карнитин)	24±4*	90±15*
5.	КХМСБ (только модифицированные споры)	48±3*	65±10*

\*P < 0,01, разница достоверна против контроля группы 1

Как видно из табл. 2, прорастание вегетативных форм БК из всех композиций ХКМСБ статистически достоверно более быстрое в сравнении с контролем. На 72 ч инкубации в контроле наблюдается только 15 lg КУО/мл БК, тогда как в опытных группах этот показатель от 6 до 9 раз выше. Это свидетельствует о том, что компоненты композиций ХКМСБ стимулируют герминацию спор БК и стимулируют дальнейший рост проросших бактерий. Отсутствие бензилизохинолинов (папаверина) в компози-

ции приводит к менее эффективной стимуляции роста БК, хотя и выше контроля ( $65 \pm 10$  lg КУО/мл).

Пример 3. Получение пищевых, косметических и фармацевтических продуктов на основе композиции из примера 2.

### Пищевые композиции

Изначально ядром продукта является композиция из примера 2, количество которой варьируется в продукте от 0,1 до 30% по массе продукта. Введение менее 0,1% не позволяет композиции проявить свои антивирусные и иммуномодулирующие свойства, более 30% активность продукта не увеличивается, что не рационально.

Композиция согласно изобретению может являться пищевой композицией, биоактивной пищевой добавкой или фармацевтической композицией. Пищевая композиция означает любой тип продукта, напиток или кондитерского изделия. Пищевая композиция, например, может быть напитком, брикетированным зерновым концентратом, жевательной резинкой, шоколадом, молочным продуктом, таким как, кисломолочный продукт, изготовленный путем сбраживания продукт растительного происхождения. Также предлагаемая композиция может быть введена в холодные и горячие напитки, сладкую пену в аэрозольных баллончиках, мороженое, печенья, йогурты, торты, конфеты, колбасы, сосиски, сухие смеси для питания детей, пивные напитки и слабоалкогольные напитки, зубные пасты, кремы. "Биоактивная пищевая добавка" обозначает пищевой продукт, целью которого является дополнение нормальной диеты. Биоактивная пищевая добавка представляет собой концентрированный источник питательных веществ или других веществ, обладающих питательным или физиологическим действием, отдельно или в комбинации. Биоактивная пищевая добавка поставляется на рынок в лекарственной форме, а именно в таких лекарственных формах, как капсула, таблетка, пилюля и других подобных формах, пакетиках с порошком, ампулах с жидкостью, флаконах, снабженных капельницей, и других подобных формах жидких или порошкообразных препаратов, которые предназначаются для приема в измеренных единицах небольшого количества. Также в композиции могут входить аминокислоты: глицин, аргинин, лизин, таурин, фенилаланин или их смеси и любые другие аминокислоты. Также в состав композиции могут входить витамины: аскорбиновая кислота, тиамин, рибофлавин, рутин, фолиевая кислота, цианокобаламин или их смеси, а также любой другой витамин. Композиция может содержать также экстракты зеленого или черного чая, или любой другой растительный экстракт, используемый в пищевой промышленности. Композиция согласно изобретению, например, подходит для ежедневного употребления клеток, полученных культивированием пробиотического штамма, в количестве от  $1 \cdot 10^8$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ, предпочтительно в количестве от  $1 \cdot 10^9$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ, в том случае, когда она предназначена для потребления человеком. Композиция согласно изобретению, например, подходит для ежедневного употребления клеток, полученных культивированием пробиотического штамма в количестве от  $1 \cdot 10^5$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ, предпочтительно в количестве от  $1 \cdot 10^6$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ, в том случае, когда она предназначена применения в ветеринарии. Термин КОЕ обозначает колониобразующую единицу. Пробиотики предпочтительно вводят в виде композиции для перорального приема, содержащей метаболически активные, т.е. живые и/или лиофилизированные или нежизнеспособные убитые нагреванием, облученные или лизированные, в форме спор или ковалентно химически модифицированных спор, пробиотические организмы. Пробиотическая композиция, описанная здесь, может быть введена перорально как таковая, т.е. в форме таблетки, капсулы или порошка. Дополнительно, пробиотическая композиция может быть введена перорально как пища или питательный продукт, такой как молоко или ферментированный молочный продукт на основе сыворотки или в виде фармацевтического продукта. В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, композиция представляет собой съедобный продукт, такой как молочный продукт, напиток, сок, суп или детское питание. Пробиотик может необязательно быть объединен с по меньшей мере одним пригодным пробиотическим соединением. "Пребиотик" обычно представляет собой неусваиваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид или спиртосахар, который не разрушается или всасывается в верхней части пищеварительного тракта. Известные промышленно применяемые пребиотики включают инулин, фрукто-олигосахариды, олигофруктозу или галакто-олигосахариды. Подразумевается, что термин "съедобный продукт" охватывает все потребляемые продукты, особенно пищевые продукты, и он может быть твердым, желеобразным или жидким. Этот термин охватывает как готовые продукты, так и продукты, которые производят посредством применения пробиотической композиции в качестве только закваски или в сочетании с общепринятыми заквасками или другими пробиотиками. Пищевые продукты могут, например, являться продуктами молочной промышленности или промышленности по производству напитков. Альтернативно, он может представлять собой природный продукт.

Изначально ядром продукта является композиция из примера 2, количество которой варьируется в продукте от 0,1 до 30% по массе продукта. Введение менее 0,1% не позволяет композиции проявить свои антивирусные и иммуномодулирующие свойства, более 30% активность продукта не увеличивается, что не рационально. В контексте настоящего изобретения "физиологически приемлемый разбавитель или эксципиент" означает любую среду или добавку, которая не влияет на эффективность биологической активности активного компонента (в данном случае дрожжевых или бактериальных клеток), и которая не

является слишком токсичной для пациента или субъекта при вводимых концентрациях. Физиологически приемлемый разбавитель или эксципиент может быть разбавителем или эксципиентом, подходящим для введения людям и/или животным (в частности млекопитающим). Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут вводиться с использованием любого эффективного сочетания дозировки и способа введения с целью получения желательного терапевтического эффекта. Точное количество, предназначенное для введения, может изменяться от пациента к пациенту, в зависимости от возраста, веса и общего состояния здоровья пациента, происхождения и тяжести диареи и т.д. Способ введения (оральный или парентеральный) может быть выбран в зависимости от происхождения диареи и/или в зависимости от возраста и/или состояния здоровья пациента. В качестве примера, изобретение имеет отношение к определенной выше фармацевтической композиции, предназначенной для ежедневного использования клеток, полученных культивированием указанного пробиотического штамма в количестве от  $1 \cdot 10^8$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ, предпочтительно в количестве от  $1 \cdot 10^9$  КОЕ до  $10^{10}$  КОЕ, в том случае, когда она предназначена для потребления человеком. Данное изобретение также имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции, предназначенной для ежедневного использования клеток, полученных культивированием указанного пробиотического штамма в количестве от  $1 \cdot 10^5$  КОЕ до  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ, предпочтительно в количестве от  $1 \cdot 10^6$  КОЕ до  $11 \cdot 10^{10}$  КОЕ, в том случае, когда она предназначена для применения в ветеринарии. Состав фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению может варьировать в зависимости от способа введения и дозировки, в которой будет использоваться композиция. После заключения в состав по меньшей мере с одним физиологически приемлемым разбавителем или эксципиентом, фармацевтическая композиция изобретения может находиться в любой форме, подходящей для введения млекопитающему, в частности человеку, например, в форме леденцов, таблеток, пилюль, покрытых сахаром, капсул, сиропа, мазей, инъеклируемых растворов, суппозитория и т.д. Специалист в данной области техники знает, как подобрать наиболее подходящие разбавители и эксципиенты для приготовления данного типа композиции. Таким образом, например, такие эксципиенты, как вода, 2,3-бутандиол, раствор Рингера, изотонические растворы хлорида натрия, синтетические моно- или диглицериды и олеиновая кислота часто используются при составлении инъекционных форм. Жидкие композиции, включая эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы, эликсиры и т.д., могут заключаться в состав в присутствии растворителей, солюбилизаторов, эмульгирующих веществ, масел, жирных кислот и других добавок, таких как суспендирующие вещества, консервирующие вещества, подсластители, ароматизирующие вещества, вещества изменяющие вязкость, окрашивающие вещества и т.д. Твердые композиции, предназначенные для введения пероральным путем, могут заключаться в состав в присутствии инертного эксципиента, такого как цитрат натрия, и необязательно таких добавок как связывающие вещества, увлажняющие вещества, разрыхлители, вещества, ускоряющие абсорбцию, смазывающие вещества и т.д. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению создается с целью немедленного высвобождения активного (действующего) компонента или активных компонентов, в частности дрожжевых клеток или бактериальных клеток, полученных культивированием пробиотического штамма. Альтернативно, фармацевтическая композиция может быть создана с целью продолжительного или адресного высвобождения активного компонента или активных компонентов или с целью защиты активного компонента или активных компонентов, например, от внутрижелудочной кислотности и ферментов. Для этой цели можно использовать покрытия, устойчивые к pH и/или к действию желудочных ферментов, покрытия, чувствительные к значению pH и/или активные ферментов, или биоадгезивные покрытия, которые прилипают к стенкам желудка или кишечника, или можно использовать системы инкапсуляции. Кроме того, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере один дополнительный активный фармацевтический ингредиент (т.е. в дополнение к дрожжевым или бактериальным клеткам, полученным культивированием пробиотического штамма). "Активный фармацевтический ингредиент" обозначает какое-либо соединение или вещество, введение которого оказывает терапевтическое или благоприятное воздействие на состояние здоровья или общее состояние пациента или субъекта, которому он вводится. Таким образом, активный фармацевтический ингредиент может быть активен в отношении предотвращения или лечения диареи путем введения фармацевтической композиции; может быть активен в отношении состояния или симптома, связанного с диареей (например, жара, рвоты или колик в животе); или может увеличивать доступность и/или активность активного компонента или активных компонентов фармацевтической композиции. Примеры активных фармацевтических ингредиентов, которые могут присутствовать в композиции настоящего изобретения, включают, без ограничения, противовоспалительные средства, антибиотики, жаропонижающие средства, противорвотные средства, антигистаминные средства, витамины, спазмолитические средства и т.д. В преимущественном варианте осуществления другой активный фармацевтический ингредиент не является штаммом *Bacillus coagulans* или клетками, полученными культивированием такого штамма, предпочтительно не является бактериальным штаммом или клетками, полученными культивированием такого штамма, более предпочтительно не является пробиотическим штаммом или клетками, полученными культивированием такого штамма. Примером фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению является композиция, содер-

жащая дрожжевые или бактериальные клетки, полученные культивированием пробиотического штамма, в качестве единственного активного фармацевтического ингредиента. Если они не определены иначе, все технические и научные термины, использованные в описании, имеют такое же значение, которое обычно понятно среднему специалисту в той области техники, к которой относится изобретение. Более того, все публикации, патентные заявки, все патенты и все другие ссылки, сделанные в описании, включаются в описание путем отсылки.

Таблица 3. Продукты, в которые перспективно включение нашей композиции

№ п/п	Продукт	Дополнительные специфические качества	Новые потребительские качества
1.	Напиток холодный (газированный, негазированный)	Активатор метаболизма и энергетики организма	Препятствует расстройству кишечника (в т.ч. от вирусных рота- и коронавирусных энтеритов), защищает от простудных заболеваний (в т.ч. гриппа), активизирует иммунитет, уменьшает или убирает аллергические реакции, улучшает усвоение основных пищевых компонентов (белков, углеводов, витаминов, жиров). Активирует метаболизм организма за счет стимуляции тканевого дыхания благодаря синергизму компонентов.
2.	Напиток горячий (кофе, чай)	Активатор метаболизма и энергетики организма	
3.	Брикетированный зерновой концентрат		
4.	Жевательная резинка	Препятствует нарушению микрофлоры полости рта и кариесу	
5.	Шоколад		
6.	Молочный продукт		
7.	Кисломолочный продукт		
8.	Сладкая пена в аэрозольных баллонах		
9.	Мороженое		
10.	Печенья		
11.	Конфеты		
12.	Йогурты		
13.	Торты		

14.	Сухие смеси для питания детей	Увеличивает набор веса, препятствует заболеваниям кишечника	
15.	Сухие белковые смеси для спортсменов	Увеличивает набор веса, препятствует заболеваниям кишечника	
16.	Колбасные изделия (колбасы, сардельки, сосиски)		
17.	Пивные напитки		
18.	Слабоалкогольные напитки	Компенсирует иммунодефицит, вызванный алкоголем иммуномодулирующим действием композиции	
19.	Зубные пасты		Предотвращает кариес, активизирует местный иммунитет в полости рта, защищает от ангины, скарлатины, стоматитов (в т.ч. вирусных), поддерживает в тонусе общий иммунитет
20.	Косметические кремы		Нормализует тонус кожи и местный иммунитет, способствует заживлению ран после солнечных ожогов
21.	Биодобавки (капсула, пастилка, таблетка,	Усиливает прибавку в весе (для спортсменов и	Средство для предотвращения вирусных
	пилюля и других подобных формах, пакетиках с порошком, ампулах с жидкостью, флаконах, снабженных капельницей)	для пациентов в фазе реабилитации), улучшает всасываемость продуктов питания	и микробных патологий на фоне иммунодефицита и средство для комплексной коррекции патологий, вызванных нарушениями функций иммунитета. Могут быть перспективны как средства спортивного питания со свойствами стимулировать метаболизм и энергетику (выносливость) организма.

### Зубные пасты и косметические кремы

Изначально ядром продукта является композиция из примера 2, количество которой варьируется в продукте от 0,1 до 30% по массе продукта. Введение менее 0,1% не позволяет композиции проявить свои противовирусные и иммуномодулирующие свойства, более 30% активность продукта не увеличивается, что не рационально. В некоторых вариантах выполнения могут регулироваться профили высвобождения пробиотиков для микроорганизмов, таких, но не ограничивающихся таковыми, как *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laevolacticus*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilacti*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus urinae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laevolacticus*, *Sporolactobacillus inulinus* и их смеси. Освежители дыхания также известны под следующими торговыми марками: Retsyn(ТМ), Actizol(ТМ) и Nutrazin(ТМ). Примеры композиций для борьбы с неприятным запахом также описаны в Патенте США 5300305 на имя Stapler и др., и в Публикациях Патентных Заявок №№ США 2003/0215417 и 2004/0081713, которые во всей своей полноте включены здесь ссылкой для всех целей. Ингредиенты для ухода за зубами (также известные как ингредиенты для ухода за полостью

рта) могут включать, но не ограничиваются таковыми, отбеливатели зубов, средства для удаления пятен, средства для очистки полости рта, отбеливающие агенты, десенсибилизирующие агенты, агенты для реминерализации зубов, антибактериальные агенты, антикариозные агенты, буферные агенты для нейтрализации кислот зубного налета, поверхностно-активные вещества и средства против зубного камня. Неограничивающие примеры таких ингредиентов могут включать гидролитические агенты, в том числе протеолитические ферменты, абразивы, такие как гидратированный диоксид кремния, карбонат кальция, бикарбонат натрия и оксид алюминия, другие активные компоненты для удаления пятен, такие как поверхностно-активные агенты, содержащие, но не ограничивающиеся таковыми, анионные поверхностно-активные вещества, такие как стеарат натрия, пальмитат натрия, сульфированный бутилолеат, олеат натрия, соли фумаровой кислоты, глицерин, гидроксированный лецитин, лаурилсульфат натрия, и хелатообразующие реагенты, такие как полифосфаты, которые обычно используются в качестве ингредиентов для борьбы с зубным камнем. В некоторых вариантах выполнения ингредиенты для ухода за зубами также могут включать пирофосфат тетранатрия и триполифосфат натрия, бикарбонат натрия, кислый пирофосфат натрия, триполифосфат натрия, силит, гексаметафосфат натрия. В некоторых вариантах выполнения предусмотрены пероксиды, такие как пероксид карбамида, пероксид кальция, пероксид магния, пероксид натрия, пероксид водорода и пероксиdifосфат. В некоторых вариантах выполнения предусмотрены нитрат калия и цитрат калия. Другие примеры могут включать казеин-гликомакропептид, кальциевое производное казеинового пептона - фосфат кальция, фосфопептиды казеина, фосфопептид казеина - аморфный фосфат кальция (СРР-АСР), и аморфный фосфат кальция. Другие дополнительные примеры могут включать папаин, криллазу, пепсин, трипсин, лизоцим, декстраназу, мутаназу, гликоамилазу, амилазу, глюкозооксидазу, и их комбинации. Дополнительные примеры могут включать поверхностно-активные вещества, такие как стеарат натрия, рицинолеат натрия и лаурилсульфат натрия, как поверхностно-активные вещества для использования в некоторых вариантах выполнения для достижения усиленного профилактического действия, и для того, чтобы сделать ингредиенты для ухода за зубами более приемлемыми в косметическом отношении. Поверхностно-активные вещества предпочтительно могут представлять собой моющие материалы, которые придают композиции моющие и вспенивающие свойства. Пригодными примерами поверхностно-активных веществ являются водорастворимые соли моносульфатов моноглицеридов высших алифатических кислот, такие как натриевая соль моносульфированного моноглицерида жирных кислот гидрированного кокосового масла, высшие алкилсульфаты, такие как лаурилсульфат натрия, алкиларилсульфонаты, такие как додецилбензолсульфонат натрия, высшие алкилсульфоацетаты, лаурилсульфоацетат натрия, сложные эфиры высших алифатических кислот и 1,2-дигидроксипропансульфоната, и в значительной степени насыщенные высшие алифатические ациламиды производных низших алифатических аминокарбоновых кислот, такие как имеющие от 12 до 16 атомов углерода в фрагментах алифатической кислоты, алкильных или ацильных радикалах, и тому подобные. Примерами упомянутых последними амидов являются N-лауроилсаркозин и натриевые, калиевые и этаноламмонийные соли N-лауроил-, N-миристоил- или N-пальмитоилсаркозина. В дополнение к поверхностно-активным веществам ингредиенты для ухода за зубами могут включать антибактериальные агенты, такие, но не ограничивающиеся таковыми, как триклозан, хлоргексидин, цитрат цинка, нитрат серебра, медь, лимонен и хлорид цетилпиридиния. В некоторых вариантах выполнения дополнительные антикариозные агенты могут включать фторид-ионы или фторсодержащие компоненты, такие как неорганические фторидные соли. В некоторых вариантах выполнения могут быть предусмотрены растворимые соли щелочных металлов, например фторид натрия, фторид калия, фторсиликат натрия, фторсиликат аммония, монофторфосфат натрия, а также фториды олова, такие как фторид двухвалентного олова и хлорид двухвалентного олова. В некоторых вариантах выполнения в качестве ингредиента также может быть включено фторсодержащее соединение, оказывающее благоприятное действие для ухода и гигиены полости рта, например, для уменьшения растворимости эмали в кислоте и защиты зубов от разрушения. Его примеры включают фторид натрия, фторид двухвалентного олова, фторид калия, фторид калия-двухвалентного олова (SnF<sub>2</sub>-KF), гексафторстаннат натрия, хлорфторид двухвалентного олова, фторцирконат натрия и монофторфосфат натрия. В некоторых вариантах выполнения включена мочеви-

#### Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы получения патентуемой фармацевтической композиции (ПФК) помимо способов, приведенных в примерах 1 и 2.

ПФК композицию можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой, подкожной, внутривенной инъекцией, в форме аэрозоля, глазным способом введения, в мочевого пузыря, местно и так далее. Например, способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники. Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого антимикробного ПФК, природы заболевания, частоты введения, способа введения, клиренса используемого агента из организма хозяина и тому подобного. Начальная доза может быть более высокой с последующими более низкими поддерживающими дозами. Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели, или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки, два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы. Во многих слу-



чаях для перорального введения будет необходима более высокая доза, чем для внутривенного введения ПФК могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения. Более конкретно, ПФК по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляционного применения, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. Как таковое, введение соединений может быть осуществлено различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, ректальное, парентеральное, внутривенное, внутримышечное, интратрахеальное введение и так далее. ПФК по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. ПФК по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом, или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например клопидогрелем, противовоспалительными агентами, и так далее). В фармацевтических лекарственных формах соединения могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения наши композиции могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, арабийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами. ПФК могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как соли, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. ПФК могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения. Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Кроме того, ПФК могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ, таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать наполнители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, расплавляющиеся при температуре тела, но твердые при комнатной температуре. Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая единица дозы, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит predetermined количество композиции, содержащей одно или более компонентов композиции по настоящему изобретению. Сходным образом, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать смеси компонентов по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде, нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо известны в данной области техники. Имплантаты изготавливают в форме микросфер, пластинок и так далее с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер, хорошо переносимый хозяином. Имплантат, содержащий ПФК по изобретению, располагают близко к очагу патологии, так чтобы локальная концентрация активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела. При использовании здесь термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных, при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению, которого, согласно вычислениям, достаточно для оказания желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемой смеси-композиции, и эффекта, который должен быть достигнут, и фармакодинамики используемой смеси у хозяина. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адьюванты, носители или разбавители, общедоступны. Кроме того, общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и тому подобное. Типичные дозы для системного введения варьируют от ОД мг до 1000 мг на кг массы тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект длительного высвобождения может

быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения, в т.ч. на основе ковалентной модификации бактериальных спор. Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретной структуры или смеси, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных структур/композиций обладают большей активностью, чем другие. Предпочтительные дозы данной композиции могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение физиологической активности ПФК. Один из интересующих способов представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток. Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных способов поддержания контакта, таких как выделение, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы разработаны для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами, опосредующими слияние мембран, такими как вирус Сендай или вирус гриппа и так далее. Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды будут обычно нейтральными или кислыми липидами, такими как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и тому подобное. Для получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al.(1991) J. Biol. Chem. 266:3361. Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую пептиды, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 с, пробирку помещают в теплую водяную баню при приблизительно 25-40°C и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой, такие как модифицированные микробные споры.

#### **Композиции с другими активными агентами**

Для применения в рассматриваемых способах ПФК по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими антимикробными и анти-вирусными агентами. Другие интересующие агенты также включают широкий спектр антиангинальных, гипотензивных, тромболитических, противовоспалительных средств, известных в данной области техники. Классы средств для терапии вирусной и микробной диареи, гриппа и его осложнений представлены в стандартизованных протоколах лечения данной патологии и могут комбинироваться с патентуемыми ПФК. В композицию ПФК по изобретению могут также быть включены цитокины, например интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12 и так далее. Далее настоящее изобретение описано следующими примерами, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.

Пример 4. Протективная антивирусная активность композиции, полученной в примере 2, на примере предупреждения смертности у мышей, инфицированных вирусом гриппа H1N1 (Калифорния\_2011).

Испытания проводили на 10 группах молодых белых лабораторных мышей по 10 в группе. Всем животным для создания иммунодефицита вводили внутрибрюшинно циклофосфамид однократно в дозе 100 мг/кг 2 раза в неделю: в группе А животным перорально давали по 0,2 мл воды вместо композиции КХМСБ ежедневно 1 раз в день 10 дней. Эта группа выступала в качестве позитивного контроля. Второй группе вводили КХМСБ (вариант с *S. boulardii*) в дозе 0,2 мл на животное перорально. С третьей по шестую группы вводили разные варианты КХМСБ. Седьмой группе вводили Лактовит форте (БК с витаминами), восьмой группе вводили Энтерол (*S. boulardii*), девятая группа принимала КХМСБ без *S. boulardii*, без бензилизохинолинов и без активаторов герминации (гиббереллина и др.). Десятая группа получала перорально стандартный антивирусный препарат ремантадин перорально в дозе 75 мг/кг ежедневно 1 раз в день. Через неделю приема циклофосфамида у животных развивался иммунодефицит по клеточному звену. После этого, всех животных инфицировали инокуляцией вируса гриппа H1N1 (Калифорния\_2011) в дозе 10 ед<sub>90</sub>/мышь интраназально по 0,1 мл. Основным критерием эффективности того или иного антигриппозного препарата является уровень смертности животных после инокуляции вируса. В контрольной группе № 9 уровень смертности составил 90%. Результаты исследований представлены в табл. 4.

Таблица 4. Результаты изучения профилактического антивирусного действия в отношении вируса гриппа H1N1 разных композиций на основе КХМСБ

№ группы	Название и состав композиции	Количество выживших животных после эксперимента, n=10	Процент выживших животных после эксперимента, %
1	Контроль – физ. раствор	1	10
2	КХМСБ (вариант с <i>S. Boulardii</i> и экстрактом маковых зерен)	10	100
3	КХМСБ (вариант <i>папаверин</i> )	10	100
4	КХМСБ (вариант <i>экстракт маковых зерен</i> )	9	90
5	КХМСБ (вариант <i>экстракт мака, S. boulardii, гиббереллин, карнитин</i> )	9	90
6	Все компоненты КХМСБ без <i>S. Boulardii</i> и без модифицированных спор <i>B. coagulans</i> , без пробиотиков, только растительные экстракты, папаверин и активаторы роста растений)	3	30
7	Лактовит-Форте	3	30
8	Энтерол	3	30
9	КХМСБ (только модифицированные споры)		
10	Ремантадин	5	50

$P < 0,01$ , разница достоверна для всех групп 2-10 против контроля группы 1

Как видно из табл. 4, наиболее эффективными композициями были варианты изобретения, содержащие в одном случае папаверин и в другом папаверин и *S. boulardii*. В обоих случаях все инфицированные животные выжили. Близкие результаты с 90% выживаемости наблюдались в группах 4-5 разных вариантов реализации композиций. Композиция, не включающая пробиотики (в т.ч. модифицированные споры) обладала слабой профилактической антигриппозной активностью (группа 6) и защищала только 30% животных от гибели. При этом чистые споры *S. boulardii* из препарата Лактовит-Форте обладал значительно меньшей профилактической антивирусной активностью (30% животных только выжило). Такая же картина наблюдалась и при использовании Энтерола, содержащего *S. boulardii*. Антигриппозный препарат Ремантадин смог защитить только 50% животных. Таким образом, для проявления максимальной профилактической антивирусной активности на фоне химического иммунодефицита необходимо применять композицию КХМСБ со всеми компонентами прописи. Без пробиотических компонентов, в частности модифицированных спор БК композиция утрачивает антивирусную профилактическую активность. Наличие в композиции также и *S. boulardii* позволило вообще предотвратить гибель животных. Механизмы такого профилактического эффекта пока остаются не выясненными.

Пример 5. Протективная антивирусная активность КХМСБ в отношении ротавирусов

Ротавирусная инфекция - инфекционное заболевание, вызванное ротавирусами. Является наиболее частой причиной диареи у детей. Для этого заболевания свойственно острое начало, умеренно выраженные симптомы гастроэнтерита или энтерита, частое сочетание кишечного и респираторного синдромов в начальном периоде болезни. Ротавирусную инфекцию часто неверно называют "кишечным гриппом", хотя ротавирус не имеет никакого отношения к вирусам гриппа.

В эксперименте использовали субсеротип В ротавируса штамм ИМИ В117 (Харьков, Украина). Данный штамм вызывает у крыс типичную диарею с жидким стулом, повышением температуры тела, изменением поведения (уменьшение подвижности), падением аппетита, ухудшением внешнего вида шерсти (становятся взъерошенными). Для фиксации указанных признаков каждую крысу помещали в малую клетку, дно которой устилали белой бумагой. Степень диареи фиксировали по степени загрязнения бумаги (в баллах от 1 до 10). Также фиксировали время проявления признаков вирусной диареи. Первым этапом эксперимента являлось создание иммунодефицитного фона для увеличения процента животных с вирусной диареей. Для этого каждому животному вводили два раза в неделю по 100 мг/кг веса циклосфамид внутривенно. Такая доза способна подавить клеточное звено иммунитета и блокировать начальный антивирусный ответ организма. После этого неделю животным давали перорально разные композиции КХМСБ одну неделю ежедневно 1 раз в день в дозе 0,5 мл (0,2 г сухой композиции).

Каждую композицию давали одной группе крыс, в каждой группе крыс было по 6 животных. Всего было 10 групп. В табл. 5 представлено распределение групп и результаты изучения профилактического антидиарейного эффекта, вызванного ротавирусом Б.

Каждому животному вводили 5 ед<sub>90</sub> вируса в культуральной среде на молоке (1:1) перорально.

Таблица 5. Результаты изучения профилактического антивирусного действия в отношении ротавируса Б разных композиций на основе КХМСБ

№ групп	Название и состав композиции	Количество животных с диареей (8-10 баллов*), (%), n=6	Время, которое длилась вирусная диарея, сутки	% эффективность**
1.	Контроль – физ. раствор	6	9	-
2.	Циклоферон	5 (17)	7 (22)	30
3.	КХМСБ (вариант с <i>S. Boulardii</i> и экстрактом маковых зерен)	0	0	100
4.	КХМСБ (вариант <i>папаверин</i> )	0	0	100
5.	КХМСБ (вариант <i>экстракт маковых зерен</i> )	0	0	100
6.	КХМСБ (вариант <i>экстракт мака, S. boulardii, гиббереллин, карнитин</i> )	0	0	100
7.	Все компоненты КХМСБ без <i>S. Boulardii</i> и без модифицированных спор <i>B. coagulans</i> , без пробиотиков, только растительные экстракты, папаверин и активаторы роста растений)	5 (17)	3 (67)	75
8.	Лактовит-Форте	3 (50)	5 (44)	72
9.	Энтерол	3 (50)	5 (44)	72
10.	КХМСБ (только модифицированные споры)	3 (50)	5 (44)	72

\*1 балл - единичные пятна на бумаге в клетках; 10 баллов - массивная диарея со сплошным загрязнением бумажной подстилки, а также комплекс клинических признаков вирусной диареи.

\*\*процент эффективности - среднее арифметическое от суммы процентов заболевших животных и процента уменьшения сроков заболевания по отношению к контролю.  $P < 0,01$ , разница достоверна для всех групп 2-10 против контроля группы 1 (метод Хи-квадрат)

Как видно из табл. 5, на одно из животных, принимавших КХМСБ, содержащую ковалентно модифицированные споры БК совместно с бензохинолиновыми алкалоидами, растительными экстрактами и активаторами герминации спор не заболели вирусным энтеритом и не проявляли никаких признаков диареи или вирусной инфекции. Менее эффективными были компонент КХМСБ без пробиотиков и составили 75% эффективности, препараты же Лактовит-Форте и Энтерол проявили только по 72% эффективности. Наименее эффективным был циклоферон (30%), применяемый перорально в дозе 30 мг/кг веса через день. Таким образом, наблюдается синергизм активности всех компонентов, входящих в композицию. Исключение из композиции либо ковалентно химически модифицированных спор БК либо остальных компонентов композиции приводит к потере эффективности. Кроме того, следует обратить внимание на более высокую степень защиты животных композициями КХМСБ против аптечных препаратов Лактовит-Форте (БК и витамины В12, В9) и Энтерол (*S. Boulardii*).

Пример 6. Протективная антивирусная активность КХМСБ в отношении коронавирусов

Респираторный коронавирус представлен штаммами ОС38, ОС43, а причиной энтерита наиболее часто становится штамм 229 Е. Название объясняется наличием особого кольца на поверхности вирусной частицы: на липидной оболочке, или суперкапсиде присутствуют пепломеры в форме булавовидных шипообразных выростов, напоминающих корону. Коронавирус способен провоцировать поражение: дыхательной системы; желудочно-кишечного тракта; нервной системы. Первичная репродукция в слизистой носоглотки и дыхательных путей, в результате возникает обильный насморк, а у детей бронхиты и пневмонии. В большинстве случаев люди встречаются с диареями и энтеритами, вызванными коронавирусами

В эксперименте использовали Alphacoronavirus 1 штамм ИМИ К105 (Харьков, Украина). Данный

штамм вызывает у крыс типичную диарею с жидким стулом, повышением температуры тела, изменением поведения (уменьшение подвижности), падением аппетита, ухудшением внешнего вида шерсти (становятся взъерошенными). Для фиксации указанных признаков каждую крысу помещали в малую клетку, дно которой устилали белой бумагой. Степень диареи фиксировали по степени загрязнения бумаги (в баллах от 1 до 10). Также фиксировали время проявления признаков вирусной диареи. Первым этапом эксперимента являлось создание иммунодефицитного фона для увеличения процента животных с вирусной диареей. Для этого каждому животному вводили два раза в неделю по 100 мг/кг веса цифловосфамид внутривенно. Такая доза способна подавить клеточное звено иммунитета и блокировать начальный анти-вирусный ответ организма. После этого неделю животным давали перорально разные композиции КХМСБ одну неделю ежедневно 1 раз в день в дозе 0,5 мл (0,2 г сухой композиции). Каждую композицию давали одной группе крыс, в каждой группе крыс было по 6 животных. Всего было 10 групп. В таблице 6 представлено распределение групп и результаты изучения профилактического антидиарейного эффекта, вызванного коронавирусом.

Каждому животному вводили 1 ед90 вируса в культуральной среде перорально.

Таблица 6 Результаты изучения профилактического антивирусного действия в отношении коронавируса разных композиций на основе КХМСБ

№ групп	Название и состав композиции	Количество животных с диареей (8-10 баллов*), (%), n=6	Время, которое длилась вирусная диарея, сутки	% эффективности**
1.	Контроль – физ. раствор	6	9	-
2.	Циклоферон	5 (17)	7 (22)	30
3.	КХМСБ (вариант с <i>S. Boulardii</i> и экстрактом маковых зерен)	0	0	100
4.	КХМСБ (вариант <i>папаверин</i> )	0	0	100
5.	КХМСБ (вариант <i>экстракт маковых зерен</i> )	0	0	100
6.	КХМСБ (вариант <i>экстракт мака, S. boulardii, гиббереллин, карнитин</i> )	0	0	100
7.	Все компоненты КХМСБ без <i>S. Boulardii</i> и без модифицированных спор <i>B. coagulans</i> , без пробиотиков, только растительные экстракты, папаверин и активаторы роста растений)	4 (33)	4 (55)	71
8.	Лактовит-Форте	2 (67)	5 (44)	55
9.	Энтерол	2 (67)	5 (44)	55
10.	КХМСБ (только модифицированные споры)	2 (67)	5 (44)	55

\* 1 балл - единичные пятна на бумаге в клетках; 10 баллов - массивная диарея со сплошным загрязнением бумажной подстилки, а также комплекс клинических признаков вирусной диареи.

\*\* процент эффективности - среднее арифметическое от суммы процентов заболевших животных и процента уменьшения сроков заболевания по отношению к контролю.  $P < 0,01$ , разница достоверна для всех групп 2-10 против контроля группы 1 (метод Хи-квадрат)

Как видно из табл. 6 ни одно из животных, принимавших КХМСБ, содержащую ковалентно модифицированные споры БК совместно с бензохинолиновыми алкалоидами, растительными экстрактами и активаторами герминации спор не заболели вирусным энтеритом, вызванным коронавирусом, и не проявляли никаких признаков диареи или вирусной инфекции. Менее эффективными были компонент КХМСБ без пробиотиков и составили 75% эффективности, препараты же Лактовит-Форте и Энтерол проявили только по 71% эффективности. Наименее эффективным был циклоферон (30%), применяемый перорально в дозе 30 мг/кг веса через день. Таким образом, наблюдается синергизм активности всех компонентов, входящих в композицию. Исключение из композиции либо ковалентно химически модифицированных спор БК либо остальных компонентов композиции приводит к значительному уменьше-

нию эффективности профилактики. Кроме того, следует обратить внимание на более высокую степень защиты животных композициями КХМСБ против аптечных препаратов Лактовит-Форте (БК и витамины В12, В9) и Энтерол (S. Boulardii).

Пример 7. Иммуномодулирующая активность КХМСБ в сравнении с препаратом Лактовит-Форте.

Для определения влияния препаратов КХМСБ на иммунитет мышей, животных группировали по схеме, описанной в примере 3, кроме группы с ремантадином. Всего было 9 групп. Всем животным вводили циклофосфамид (CFA) однократно в дозе 250 мг/кг для индукции иммунодефицита как показано в примере 3. Через неделю начинали давать образцы КХМСБ перорально в дозе 0,2 мл перорально (доза содержала 0,1 сухой композиции КХМСБ).

Hsp70, NO и проба на синтез цитокинов. Выделение мышинных перитонеальных макрофагов и Т-лимфоцитов селезенки, измерение продукции TNF проводили методом иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью ELISA Kit (Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit, PharMingen, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). NO. Макрофаги,  $10^6$  клеток / мл, культивировали в 24-луночных планшетах (BioRad, Hannover, EU) в среде 199 с индикатором pH метиленовым красным при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Среда была обогащена 25 мМ HEPES, 3% фетальной бычьей сывороткой. Супернатанты собирали через 21 ч и анализировали на NO<sub>2</sub>. Реагент Грисса (содержащий 1% сульфаниламида /0,1% нафтилэтилендиамин дигидрохлорида и 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1:1)) использовали для оценки NO<sub>2</sub>, который служил индикатором образования NO. После культивирования 100 мл каждого образца помещали в 96-луночный планшет со 100 мл реагента Грисса. Спустя 10 мин оптическая плотность измерялась на планшетном спектрофотометре (Stat Fax 303 plus, Awareness technology inc., USA) при 590 нм.

#### Определение способности лимфоцитов к экспрессии ИЛ-2

Селезеночные лимфоциты,  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл, культивировали в течение 72 ч в 24-луночных планшетах в среде 199 при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Среда была дополнена 25 мМ HEPES, 5% фетальной бычьей сыворотки и 5 мг/мл

фитогемагглютинина (ФГА). Концентрацию ИЛ-2 в супернатанте клеток, стимулированных ФГА, измеряли с помощью ELISA с использованием поликлональных антител кролей против мышинного ИЛ-2 (BioRad, AbD Serotec, Raleigh, NC, США) и козьих анти-кроличьих IgG, конъюгированных с Биотином (Антитела Agrisera, Vännäs, SWEDEN). После окрашивания ABTS, оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре (Stat Fax 303 plus, Awareness technology inc., USA) при 405 нм.

Статистическая значимость была рассчитана по t-критерию Стьюдента в модификации Бонферрони. В табл. 7 показаны результаты воздействия КХМСБ на иммунитет мышей.

Таблица 7. Влияние КХМСБ в сравнении с препаратом Лактовит-Форте на иммунитет мышей

Группы	Клетки, ткани, лимфоциты						
	ИЛ-2 продукция (ng/ml)		Макрофаги (TNF- $\alpha$ , )	Т клетки (TNF-b)	Продукция NO в мышинных макрофагах, $\mu\text{g/ml}$	Число макрофагов (в миллионах)	Число спленоцитов (в млн.)
	Селезеночные Т-лимфоциты	Плазма крови					
Контроль здоровые мыши	76 $\pm$ 7	164 $\pm$ 10	16 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2	10 $\pm$ 3	2.0 $\pm$ 0.1	126 $\pm$ 22
Контроль иммунодефицит после циклофосфана	12* $\pm$ 5*	32* $\pm$ 10*	3* $\pm$ 1*	8* $\pm$ 2	6* $\pm$ 2*	1.0* $\pm$ 0.1*	87* $\pm$ 12*
КХМСБ (вариант с S. Boulardii u)	87* $\pm$ 10*	178* $\pm$ 12	19 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	12 $\pm$ 4	1.3 $\pm$ 0.2	133 $\pm$ 20

экстракт маковых зерен)							
КХМСБ (вариант папаверин)	85* ± 10*	177* ± 12	18 ± 5	14 ± 2	13 ± 5	1.4 ± 0.3	135 ± 23
КХМСБ (вариант экстракт маковых зерен)	89* ± 11*	177* ± 14	19 ± 5	16 ± 3	12 ± 4	1.3 ± 0.2	129 ± 20
КХМСБ (вариант экстракт мака, <i>S. boulardii</i> , <i>гиббереллин</i> , <i>карнитин</i> )	87* ± 10*	179* ± 13	19 ± 5	16 ± 3	13 ± 5	1.4 ± 0.3	137 ± 23
Все компоненты КХМСБ без <i>S. Boulardii</i> и без модифицирова нных спор <i>B. coagulans</i> , без пробиотиков, только растительные экстракты, папаверин и активаторы роста растений)	50* ± 10	100* ± 10	7* ± 4*	8 ± 2*	10 ± 4	1.2 ± 0.1	106 ± 15
Лактовит- Форте	67* ± 9*	100* ± 9	12 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	1.0 ± 0.1	90 ± 10
Энтерол	69* ± 9*	98* ± 9	10 ± 2	9 ± 1	12 ± 1	1.2 ± 0.1	95 ± 12
КХМСБ (только модифицирова нные споры)	68* ± 8	100* ± 10	8 ± 4*	9 ± 1*	11 ± 1	1.1 ± 0.1	100 ± 14

\* Статистически достоверно отличается от обоих контролен, P < 0,05.

Как видно из табл. 7, наилучший результат восстановления иммунитета практически до нормальных уровней наблюдался во всех опытных группах 3-6, где применялись полноценные композиции КХМСБ на фоне СФА - иммунодефицита. При этом, уровень селезеночных Т лимфоцитов был статистически достоверно выше, чем в контроле. Единственным необъяснимым показателем, выходящим за рамки понятия иммуносупрессия выходит увеличение продукции ИЛ-2 спленocyтaми выше контроля в группе 5, где наблюдалась индуцированная иммуносупрессия. Мы связываем этот факт с неравномерным влиянием СФА на разные звенья иммунной системы и несинхронную их стимуляцию споровой формой *B. coagulans*. В отличие от композиции группы 3, группа 7 (без пробиотиков) хоть и стимулировала иммунитет против контрольной группы 2, но не восстанавливала его даже до уровня контрольной группы 1. Лактовит-Форте и Энтерол восстанавливали иммунитет практически до нормы аналогично как и химически модифицированные споры БК. Более высокие показатели влияния на иммунитет композиций КХМСБ № 3-5 объясняются синергизмом действия компонентов: стимуляцией герминацией спор гиббереллином и другими активаторами, стимуляцией деления микробных клеток и грибов папаверином и/или экстрактом мака, влиянием на иммунитет растительных экстрактов солодки, стевии и спирулины.

Основные преимущества предлагаемой нами композиции:

1. Мощный профилактический эффект в отношении вирусных инфекций (грипп, коронавирус, ротавирус) сопоставимый с действием специфических вакцин
2. Сильный иммуномодулирующий эффект
3. Быстрое наступление эффекта активации иммунитета уже через 8 ч (для немодифицированных спор *Bacillus coagulans* 72 ч)
4. Возможность введения нашей композиции в состав газированных напитков, холодного чая, мо-

роженного, сладкой пены в аэрозольных балончиках, кремов, зубных паст, косметических средств. Модификация поверхности спор приводит к повышению их устойчивости в окружающей среде и к консервантам.

5. Способность защищать продукт, содержащий споры *Bacillus coagulans* от прокисания и порчи длительное время, а прокисший продукт будет содержать полезные бактерии *Bacillus coagulans*, которые не принесут вреда организму.

6. Продукты на основе предлагаемой композиции способны стимулировать метаболизм и энергетику организма, что весьма актуально в спорте и в период реабилитации после тяжелых болезней, может быть полезным в спортивном питании. Данный эффект вызван синергизмом спор и экстрактов: спирулины, стевии, люцерны. Для люцерны доказан анаболический эффект и реальная польза при спортивных тренировках. Указанные экстракты не относятся к списку допингов.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, включающая смесь пробиотиков с иммуномодулирующим эффектом, отличающаяся тем, что среди пробиотиков содержит в том числе модифицированные споры сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans*, гидроксильные и аминокислотные группы белков и полисахаридов, поверхности которых ковалентно химически модифицированы с разными степенями модификации, а композиция также дополнительно содержит соединения группы бензилизохинолина или сырье, их содержащее, растительные экстракты с гликозидами, а также содержит как минимум два из следующих компонентов: гиббереллин, пара-аминобензойную кислоту, карнитин, ауксин или его производное.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что степени модификации поверхности спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* находятся в количестве до 15% в пересчете на массу спор.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что ковалентная химическая модификация спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* - это ацилирование ангидридами или галогенангидридами дикарбоновых и поликарбоновых кислот.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что ковалентная химическая модификация спор сапрофитной пробиотической бактерии *B. coagulans* - это алкилирование галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что дополнительно в качестве пробиотиков содержит сапрофитный пробиотический гриб *S. boulardii* в количестве от 1 до 10 lg КОЕ/мл на одну дозу композиции.

6. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что включает в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт солодки в количестве от 0,05 до 0,5% от массы композиции.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что включает в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт стевии в количестве от 0,05 до 0,5% от массы композиции.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что включает в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт спирулины в количестве от 0,05 до 5% от массы композиции.

9. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что включает в качестве растительного экстракта с гликозидами экстракт люцерны в количестве от 0,05 до 5% от массы композиции.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество пробиотической бактерии *B. coagulans* составляет от 1 до 10 lg КОЕ/мл на одну дозу композиции.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что сырье, содержащее соединения группы бензилизохинолина, это измельченные зрелые маковые зерна.

12. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что сырье, содержащее соединения группы бензилизохинолина, это экстракт зрелых маковых зерен.

13. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что соединение группы бензилизохинолина это папаверин.

14. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество гиббереллина составляет 0,01-0,05% от массы композиции.

15. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество пара-аминобензойной кислоты составляет 0,01-0,5% от массы композиции.

16. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество карнитина составляет 0,1-1,0% от массы композиции.

17. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что количество ауксина или его производного составляет 0,01-0,05% от массы композиции.

