

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290607** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.23

(22) Дата подачи заявки
2020.09.21

(51) Int. Cl. *A61K 35/745* (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 36/185 (2006.01)
A61K 36/605 (2006.01)
A61K 36/73 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ЭКСТРАКТОВ ЯГОД И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

(31) **102019000016850**
(32) **2019.09.20**
(33) **IT**
(86) **PCT/IB2020/058777**
(87) **WO 2021/053641 2021.03.25**
(88) **2021.05.20**
(71) Заявитель:
СОФАР С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:
Биффи Андреа, Фьоре Вальтер (IT)
(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к композициям В, содержащим смесь, содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из штаммов бактерий, относящихся к видам *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium animalis* подвид *Lactis*, и по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего полифенольную фракцию указанных ягод. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанным композициям В для применения в качестве иммуномодулирующих и противовоспалительных агентов.

A1

202290607

202290607

A1

РСТ/ВВ2020/058777

МПК: А61К 35/745 (2015.01) А61К 36/605 (2006.01)

А61К 35/747 (2015.01) А61К 36/73 (2006.01)

А61К 36/185 (2006.01) А61К 29/00 (2006.01)

КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ И ЭКСТРАКТОВ ЯГОД И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

Настоящее изобретение относится к композициям А, содержащим смесь, содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере двух штаммов бактерий, выбранных из группы, содержащей или альтернативно состоящей из штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*. Альтернативно настоящее изобретение относится к композициям В, содержащим смесь, содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*, и по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего полифенольную фракцию указанных ягод. Кроме того, настоящее изобретение относится к указанным композициям А и композициям В для применения в качестве иммуномодулирующих и противовоспалительных агентов.

За последние несколько десятилетий научное сообщество провело исследования по модификации кишечной микробиоты с целью получения полезных эффектов для здоровья человека. Хорошо известно, что кишечная микробиота является ключевым фактором, вносящим вклад в процесс пищеварения, продукцию витаминов, преобразование желчных кислот, образуя множество биоактивных компонентов из компонентов пищи. Например, короткоцепочечные жирные кислоты вырабатываются в результате ферментации волокон, конъюгированных посредством линолевой кислоты линолевыми кислот, энтеролактона энтеродиола и лигнана, при этом все они связаны с противоопухолевыми, противовоспалительными и другими эффектами, способствующими здоровью. Полезные бактерии в составе кишечной микробиоты также играют важную роль в иммунитете посредством модулирования локальных и системных иммунных ответов и могут предотвращать рост патогенных бактерий посредством конкурентных механизмов, известных как барьерный эффект. Хотя

видовой состав кишечных микроорганизмов крайне изменчив от одного человека к другому, для каждого отдельного взрослого человека он относительно постоянен и определяется главным образом генетическими факторами и колонизацией кишечника на ранних этапах жизни. Тем не менее на их состав могут оказывать значимое влияние различные факторы, такие как рацион питания и потребление продуктов-пробиотиков, либо продуктов-пребиотиков, либо живых биотерапевтических препаратов (сокращенно LBP - препараты на основе жизнеспособных штаммов бактерий).

Таким образом, сохраняется высокий интерес научного сообщества к композициям, способным обеспечивать полезные эффекты посредством взаимодействия с кишечной микробиотой, в частности композициям, способным оказывать противовоспалительные эффекты посредством модулирования ответа иммунной системы на воспалительные стимулы.

После фазы интенсивных исследований и разработки заявителем обнаружено, что композиции, содержащие определенные смеси по меньшей мере двух штаммов бактерий и/или композиции, содержащие по меньшей мере один или более штаммов бактерий и экстракт по меньшей мере одного вида ягод, содержащий полифенольную часть указанных ягод, способны к положительному модулированию ответов иммунной системы и к оказанию противовоспалительного действия, как подробно раскрыто в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения.

В контексте настоящего изобретения термин «ягоды» используется для указания на так называемые «дикорастущие ягоды» как категорию мелких мясистых сладких или кислых, пригодных в пищу плодов растений, произрастающих в условиях особенно влажного климата, на кислых почвах подлеска, в условиях полутени и холодного климата.

В контексте настоящего изобретения термины «ягоды» и «дикие ягоды» являются синонимами.

В контексте настоящего изобретения виды «ягод» или «диких ягод» включают в себя по меньшей мере один из следующих примеров: голубику или чернику (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюкву обыкновенную или клюкву (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), землянику лесную или землянику (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria* spp., либо *Fragaria ananassa*), бузину (*Sambucus nigra*), бруснику (*Vaccinium vitis-idaea*), ежевику (*Rubus ulmifolius*), малину обыкновенную (*Rubus idaeus*), малину ежевикоподобную (*Rubus*

leucodermis или *Rubus occidentalis*), смородину черную (*Ribes nigrum*), смородину красную (*Ribes rubrum*), шелковицу черную (*Morus nigra*), шелковицу красную (*Morus rubra*), шелковицу белую (*Morus alba*), кизил обыкновенный (*Cornus mas*), крыжовник (*Ribes uva-crispa*), барбарис (*Berberis vulgaris*), *Amelanchier ovalis*, *Amelanchier canadensis*, вишню магалебскую (*Prunus mahaleb*), вишню обыкновенную и вишню черную (*Prunus cerasus*), земляничное дерево (*Arbutus unedo*).

В частности,

- голубика (черника или голубика) представляет собой плод (синие или пурпурные ягоды) многолетних растений, относящихся по классификации к роду *Vaccinium*. Голубика высокая относится по классификации к виду *Vaccinium cyanococcus* (Rydb.), тогда как черника относится по классификации к видам *Vaccinium myrtillus* (L., 1753); кроме того, существует вид *Vaccinium angustifolium* (Aiton, 1789), общеизвестный как голубика, имеющая происхождение из восточной и центральной Канады и северо-восточной части Соединенных Штатов Америки; в контексте настоящего изобретения термин «голубика» предпочтительно используется для указания видов *Vaccinium myrtillus* и *Vaccinium angustifolium*;

- клюква (клюква обыкновенная, или медвежья ягода, или клюква крупноплодная) представляет собой плод из группы вечнозеленых полукустарников или стелющихся кустарников, относящихся по классификации к виду *oxycoccus* рода *Vaccinium*. В Великобритании клюква относится к автохтонному виду *Vaccinium oxycoccus* (L., 1753), или клюква обыкновенная, тогда как в Северной Америке клюква относится к виду *Vaccinium macrocarpon* (Aiton 1789), или медвежья ягода, или клюква крупноплодная; в контексте настоящего изобретения «клюква» предпочтительно используется для указания вида *Vaccinium macrocarpon*;

- земляника (земляника лесная или земляника) представляет собой плоды травянистого растения, относящегося по классификации к виду *Fragaria vesca* (L., 1753), или *Fragaria spp.*, или *Fragaria ananassa* (Duchesne) рода *Fragaria* семейства Rosaceae;

- бузина (бузина черная) представляет собой плод растения, относящегося по классификации к виду *Sambucus nigra* (L., 1753) рода *Sambucus* семейства Adoxaceae;

- ежевика представляет собой плод трех видов растений, относящихся к роду *Rubus*: *Rubus leucodermis* (Dougal. Ex Torr. & A.Gray 1840), имеющему происхождение с запада Северной Америки, *Rubus occidentalis* (L., 1753), имеющему происхождение с

востока Северной Америки, и *Rubus coreanus* (Miq. 1867), также известному как малина корейская, имеющему происхождение из Кореи, Японии и Китая;

- малина представляет собой плод растения, относящегося по классификации к виду *Rubus idaeus* (L., 1753) рода *Rubus* семейства Rosaceae.

В контексте настоящего изобретения для ссылки на вышеуказанные виды ягод используются итальянские или английские названия взаимозаменяемо.

Высокий интерес научного сообщества к полезным эффектам указанных ягод существует с конца 20-го века. Ягоды общеизвестны как питательные пищевые продукты, так как они содержат большие количества водорастворимых витаминов, минеральных веществ (калий, магний, цинк) и волокон. Тем не менее существует гипотеза, что содержащиеся в них полифенолы являются основным компонентом присущей им пользы, в частности, например, антиоксидантных и противовоспалительных свойств.

Ягоды богаты полифенолами, такими как, например, антоцианины, антоцианидины и/или проантоцианидины.

Проантоцианидины представляют собой класс полифенолов, присутствующих в различных разновидностях ботанических видов. Они представляют собой химически олигомерные повторы флавоноидов, такие как, например, олигомерные повторы катехина и эпикатехина и их сложных эфиров с галловой кислотой.

Антоцианины (или антоцианы) относятся к семейству флавоноидов и имеют происхождение от их соответствующих агликонов (антоцианидинов), от которых отличаются присоединением одной или более гликозидных групп (сахаров).

За последние два десятилетия для определения потенциальных полезных эффектов указанных ягод для здоровья человека выполнено значительное число исследований. Высокая антиоксидантная сила ягод может отчасти объяснять их защитную активность против дегенеративных процессов, связанных с окислительным стрессом и присутствием активных форм кислорода, что также является основной причиной защитной активности на уровне сердечно-сосудистой системы и антиканцерогенной активности, в целом свойственной присутствию полифенолов в пищевых продуктах. Кроме того, кроме значимых антиоксидантных эффектов, фенольные кислоты и ресвератрол (полифенол), содержащиеся в ягодах, отвечают за значительные метаболические эффекты. Значительное присутствие антоцианидинов (полифенолов) также вносит вклад в специфичное противовоспалительное действие на

уровне двигательной системы (мышечной и скелетной системы), пищеварительной системы, мочеполовой системы (мочевыводящей системы и половой системы), дыхательной системы, системы покровов тела, иммунной системы и системы кровообращения. Наконец, различные ягоды показали специфические виды антибактериальной и пребиотической активности в отношении предотвращения адгезии бактерий к уроэпителиальной поверхности, ингибирования биопленки, модификации экспрессии генов и структуры мембран, модификации кишечной микробиоты.

Выявлено, что смеси и композиции по изобретению (композиции (А) по изобретению и композиции (В) изобретению, как определено ниже) обладают противовоспалительными и иммуномодулирующими эффектами (соотношение IL-10:IL-12 $\gg 1$) и не проявляют никаких значимых нежелательных эффектов, следовательно, их можно вводить субъекту любого типа, включая беременных женщин, детей и лиц пожилого возраста.

Кроме того, смеси и композиции по изобретению эффективны, просты в получении и экономически эффективны для производства.

Эти и другие цели, которые станут яснее на основании последующего подробного описания, достигаются посредством штамма бактерий, композиций и смесей по настоящему изобретению благодаря их техническим характеристикам, представленным в описании и заявленным в прилагаемой формуле изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1a, 1b, 1c: ответ цитокинов IL-12, TNF- α и IL-10 после стимуляции отдельными штаммами бактерий группы (I.1) в присутствии или в отсутствие ЛПС (липополисахарид, воспалительный стимул), [*] = $p < 0,05$, [+] = $p < 0,01$, [\$] = $p < 0,001$;

Фиг. 2a, 2b, 2c: ответ цитокинов IL-12, TNF- α и IL-10 после стимуляции смесями штаммов бактерий группы (I.1), [+] = $p < 0,01$; данные выражены в пг/мл;

Фиг. 3: Ответы цитокинов IL-12, TNF- α и IL-10 после стимуляции смесями, содержащими штамм бактерий группы (I.1) и экстракт ягод, содержащий полифенольную фракцию; С: контроль (клетки BMDC, стимулированные только средой RPMI).

Фиг. 4: ответ цитокинов IL12, TNF- α и IL10 после стимуляции смесями из меньшей мере 1 или 2 штаммов бактерий группы (I.1) и экстракта ягод, содержащего полифенольную фракцию;

Фиг. 4а: ответы цитокинов IL12, TNF- α и IL-10 после стимуляции смесями из по меньшей мере 2 штаммов бактерий группы (I.1) и экстракта ягод, содержащего полифенольную фракцию; С: контроль (клетки BMDC, стимулированные только средой RPMI), [*] = $p < 0,05$, [+] = $p < 0,01$, [\$] = $p < 0,001$.

На Фиг. 4 и 4а полифенолы, экстрагированные из ягод, использованы в концентрации 50 мкг/мл; комбинации бактерий используют при конечной МИ (множественности инфекции) 5.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объект настоящего изобретения образует композиция (А) (сокращенно композиция (А) по изобретению), содержащая смесь (А) (сокращенно смесь (А) по изобретению), содержащую или альтернативно состоящую из по меньшей мере двух штаммов бактерий, выбранных из группы (I), содержащей или альтернативно состоящей из штаммов бактерий, относящихся к видам *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*, где указанные по меньшей мере два штамма бактерий выбраны из группы (I.i), содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708), *Lactobacillus paracasei* CF3 (DSM 32353), *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 53103), *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954), и где возможно указанная композиция (А) содержит по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] (зарегистрированный товарный знак компании SOFAR S.p.A.) был депонирован SOFAR S.p.A. в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572 5 мая 1995 г. компанией SOFAR S.p.A. (сокращенно DG[®] или *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572). Этот штамм был первоначально назван *Lactobacillus casei* DG[®] подвид *casei* CNCM I-1572; затем его классификация была изменена на *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572. Должно быть понятно, что этот штамм тем не менее представляет собой исключительно один и тот же штамм бактерий независимо от наименования *Lactobacillus casei* DG[®] CNCM I-1572 или *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур

(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) под номером доступа DSM 26760 15 мая 2017 г. компанией SOFAR S.p.A. (дата подачи заявления на перевод депонирования в депозит согласно Будапештскому договору, дата первоначального депонирования: 11 января 2013 г.) (сокращенно LPC-S01™, или *L. paracasei* LPC-S01™ DSM 26760). Должно быть понятно, что этот штамм тем не менее представляет собой исключительно один и тот же штамм бактерий независимо от наименования, используемого заявителем, *Lactobacillus paracasei* S01 DSM 26760 или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ DSM 26760.

Штамм бактерий, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg (или альтернативно MIMBb23SG), альтернативно называемый заявителем BbfIBLPC-S01™ или *B. bifidum* BbfIBS01, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 32708 4 декабря 2017 г. компанией SOFAR S.p.A. (сокращенно 23sg, либо *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, либо *B. bifidum* BbfIBLPC-S01™ DSM 32708). Должно быть понятно, что этот штамм тем не менее представляет собой исключительно один и тот же штамм бактерий независимо от внутреннего наименования MIMBb23sg, либо BbfIBLPC-S01™, либо BbfIBS01, используемого заявителем.

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* CF3, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353 4 августа 2016 г. компанией SOFAR S.p.A. ((сокращенно CF3 или *L. paracasei* CF3 DSM 32353).

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus rhamnosus* GG, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103 1 (сокращенно GG или *L. paracasei* GG DSM 53103).

Штамм бактерий, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis подвид lactis* Bb12, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 15954 (сокращенно Bb12 или *B. animalis подвид lactis*. Bb12 DSM 15954).

Все штаммы, упоминаемые в настоящем изобретении, были депонированы согласно Будапештскому договору.

В композиции (A) по изобретению смесь (A) по изобретению может содержать 2, 3, 4, 5 или 6 штаммов бактерий, выбранных из группы (I.i), как определено в настоящем изобретении.

Предпочтительно в указанной смеси (B), содержащей 2, 3, 4, 5 или 6 штаммов бактерий, выбранных из группы (I.i), отношение содержания штаммов бактерий в КОЕ друг к другу составляет 1:1, либо 1:1:1, либо 1:1:1:1, либо 1:1:1:1:1, либо 1:1:1:1:1:1.

В одном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы (I.ii), содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954) и их смесей.

В предпочтительном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760).

В предпочтительном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и *L. paracasei* DG (DSM I-1572).

В предпочтительном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760) и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы (I.iii), содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954) и их смеси.

В предпочтительном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, *L. paracasei* DG (DSM I-1572) и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы (I.iii), содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954) и их смеси.

В предпочтительном воплощении композиции (A) по изобретению смесь (A) содержит или альтернативно состоит из *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708), и *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), и *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572).

Например, композиция (A) по изобретению может содержать смесь (A), содержащую или альтернативно состоящую из *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) и по меньшей мере

одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954) и их смесей.

Объект настоящего изобретения образует композиция (В) (сокращенно композиция (В) по изобретению), содержащая смесь (В) (сокращенно смесь (В) по изобретению), содержащую или альтернативно состоящую из:

- по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, выбранных из группы (I), содержащей или альтернативно состоящей из штаммов бактерий, относящихся к видам *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis*, и

- по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод (сокращенно экстракт по изобретению); и где возможно указанная композиция (В) содержит по меньшей мере одну добавку или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

Указанную полифенольную фракцию указанных ягод предпочтительно получают в соответствии с описанным ниже способом экстракции по изобретению или альтернативно в соответствии со способами и с помощью оборудования, которые известны специалистам в данной области техники.

В контексте настоящего изобретения указанная полифенольная фракция указанного экстракта указанного по меньшей мере одного вида ягод содержит по меньшей мере один или более проантоцианидинов (типа А и/или типа В) и/или антоцианинов или антоцианидинов (например, мальвидин или пеонидин). Термины «антоцианины» и «антоцианы» являются синонимами, используемыми в контексте настоящего изобретения взаимозаменяемо.

Антоцианы (или антоцианины) находятся среди важнейших полифенольных соединений, присутствующих в ягодах по настоящему изобретению (например, в клюкве, голубике, малине или бузине). Антоцианы могут составлять до 5000 мг/кг массы свежих ягод. Агликонами (антоцианидинами), чаще всего встречающимися в природе, являются пеларгонидин, цианидин, дельфинидин, пеонидин, петунидин, мальвидин. Ягоды содержат около 15 различных антоцианов. Антоцианы обнаруживают в особенно высоких концентрациях в плодах (ягодах) растений рода *Vaccinium*, таких как клюква и голубика.

Антоцианы, присутствующие в ягодах растений рода *Vaccinium*, (т. е. в клюкве и голубике), такие как цианидин, дельфинидин, мальвидин, петунидин и пеонидин, предпочтительно присутствуют в указанных ягодах в связанном виде с гликозидным остатком, например, такие как цианидин-3-арабинозид, цианидин-3-галактозид, цианидин-3-глюкозид, дельфинидин-3-арабинозид, дельфинидин-3-галактозид, дельфинидин-3-глюкозид, мальвидин-3-арабинозид, мальвидин-3-галактозид, мальвидин-3-глюкозид, петунидин-3-арабинозид, петунидин-3-галактозид, петунидин-3-глюкозид, пеонидин-3-арабинозид, пеонидин-3-галактозид, пеонидин-3-глюкозид.

Другие ингредиенты, которые могут присутствовать в экстрактах ягод по настоящему изобретению, представляют собой сахараиды, органические кислоты и другие полифенолы, такие как флавоноиды и танины, а также витамины.

Что касается содержания полифенолов в экстрактах ягод по настоящему изобретению, между отдельными ягодами существуют различия. В частности, профиль клюквы отличается обогащением процианидином типа А; преобладающими антоцианидинами являются 3-О-моноголикозиды цианидина и пеонидина, кроме того, клюква также содержит значительные количества феноловой кислоты и флавоноидов. Напротив, голубика в целом богата антоцианидинами, в частности мальвидином, процианидинами В-типа и хлорогеновой кислотой. Другие экстракты ягод (т. е. земляники и бузины) характеризуются другим составом; т. е. около 10% бузины составляют моноголикозиды цианидина, а в землянике преобладают гликозиды эллагитаннинов и пеларгонидина.

Указанный по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод (экстракт по изобретению), может представлять собой один экстракт одного вида ягод или альтернативно один экстракт 2, или 3, или 4 видов ягод, либо альтернативно 2, или 3, или 4 экстракта, где каждый экстракт представляет собой экстракт только одного вида ягод, либо альтернативно 2, или 3, или 4 видов ягод. Предпочтительно экстракт по изобретению представляет собой только один экстракт только одного вида ягод. Примеры ягод, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения для получения указанного экстракта, представлены ниже в таблице 1 в экспериментальной части.

Указанный экстракт по меньшей мере одного вида ягод (например, клюквы, голубики, земляники или бузины), содержащийся в смесях или композициях по

настоящему изобретению, содержит или альтернативно состоит из полифенолов (например, проантоцианидинов (типа А и/или типа В) и/или антоцианинов и/или антоцианидинов) в процентах по массе, содержащихся в диапазоне от 50% до 95% по отношению к общей массе экстракта или сухого экстракта (например, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 98%); предпочтительно от 70% до 97%; более предпочтительно от 80% или 85% до 95%.

Уровни антоцианина в экстрактах по изобретению можно определять с помощью внешней калибровки, используя стандартные вещества.

Указанный по меньшей мере один вид ягод указанного экстракта по изобретению выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы или клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*), брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), ежевики (*Rubus ulmifolius*), малины обыкновенной (*Rubus idaeus*), малины ежевикоподобной (*Rubus leucodermis* или *Rubus occidentalis*), смородины черной (*Ribes nigrum*), смородины красной (*Ribes rubrum*), шелковицы черной (*Morus nigra*), шелковицы красной (*Morus rubra*), шелковицы белой (*Morus alba*), кизила обыкновенного (*Cornus mas*), крыжовника (*Ribes uva-crispa*), барбариса (*Berberis vulgaris*), *Amelanchier ovalis*, *Amelanchier canadensis*, вишни обыкновенной и вишни черной (*Prunus cerasus*), земляничного дерева (*Arbutus unedo*);

предпочтительно голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы или клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*) и их смесей;

более предпочтительно голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*) и клюквы или клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*).

Смесь (В) по изобретению композиции (В) может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 штаммов бактерий, выбранных из группы (I), как определено в настоящем изобретении.

Предпочтительно в указанной смеси (В), содержащей 2, 3, 4, 5 или 6 штаммов бактерий, выбранных из группы (I.i), отношение содержания штаммов бактерий в КОЕ друг к другу составляет 1:1, либо 1:1:1, либо 1:1:1:1, либо 1:1:1:1:1, либо 1:1:1:1:1:1.

В одном воплощении настоящего изобретения композиция (B) по изобретению, содержащая смесь (B), содержащую или альтернативно состоящую из

- по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, выбранных из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23SG (DSM 32708), *Lactobacillus paracasei* CF3 (DSM 32353), *Lactobacillus rhamnosus* GG (DSM 53103), *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954) и их смеси; и

- по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод; и где возможно указанная композиция (B) содержит по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

В одном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или состоит из штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и указанного по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод.

В одном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или состоит из штамма бактерий *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), а указанный по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод содержит или альтернативно состоит из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В одном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы (I.ii), содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), *L. paracasei* LPC-S01[™]

(DSM 26760), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954); а указанный по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод содержит или альтернативно состоит из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В предпочтительном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и штамма бактерий *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760) и по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В одном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или состоит из: штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и штамма бактерий *L. paracasei* DG® (CNCM I-1572) и указанного по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В предпочтительном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, штамма бактерий *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760) и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы (I.iii), содержащей или альтернативно состоящей из: *L. paracasei* DG® (CNCM I-1572), *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), *B. animalis* подвид *lactis* Bb12 (DSM 15954); и указанного по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из клюквы, голубики, земляники, бузины и

их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В предпочтительном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708), и штамма бактерий *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760), и штамма бактерий *L. paracasei* DG (DSM I-1572), и по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: клюквы, голубики, земляники, бузины и их смесей, более предпочтительно клюквы или голубики и их смесей.

В композиции (B) по изобретению вместе с по меньшей мере одним или со смесью штаммов бактерий, определенных в настоящем изобретении, предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и/или *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760) и/или *L. paracasei* DG® (CNCM I-1572), более предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760), указанный по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции (предпочтительно экстракт клюквы, голубики, земляники, бузины и/или их смесей, более предпочтительно экстракт клюквы или голубики и/или их смесей) присутствует в процентах по массе, содержащихся в диапазоне от 1% до 95% по отношению к общей массе композиции (например, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90%), более предпочтительно от 5% до 90%, еще более предпочтительно от 10% до 80%.

В предпочтительном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, выбранных из группы (I) или (I.i), предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и/или *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760) и/или *L. paracasei* DG® (CNCM I-1572), более предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760); и экстракта клюквы, содержащего или состоящего из полифенолов (т. е. проантоцианидинов и/или антоцианинов, и/или антоцианидинов, и/или другие полифенолов) в процентах по массе, содержащихся в диапазоне от 70% до 99% по отношению к общей массе экстракта (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 98%); предпочтительно от 80% до 97%; более предпочтительно от 85% до

95%. В предпочтительном воплощении композиции (B) по изобретению смесь (B) содержит или альтернативно состоит из: по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, выбранных из группы (I) или (I.i), предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и/или *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760) и/или *L. paracasei* DG® (CNCM I-1572), более предпочтительно *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708) и *L. paracasei* LPC-S01™ (DSM 26760); и экстракта голубики, содержащего или состоящего из полифенолов в процентах по массе, содержащихся в диапазоне от 70% до 95% по отношению к общей массе экстракта (например, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 98%); предпочтительно от 80% до 97%; более предпочтительно от 85% до 95%.

Количество на суточную дозу указанной композиции (A) или (B) указанного по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, содержащихся в указанной смеси (A) или (B) по изобретению представляет собой минимальное количество, достаточное для достижения временной колонизации кишечника, например количество штамма(ов), содержащееся в диапазоне от 10^5 КОЕ/г до 10^{12} КОЕ/г, предпочтительно от 10^7 КОЕ/г до 10^{11} КОЕ/г, более предпочтительно от 10^8 КОЕ/г до 10^{10} КОЕ/г, например 1×10^9 КОЕ или 5×10^9 КОЕ, по отношению к суточному приему (КОЕ/г: колониеобразующих единиц на грамм композиции (A) или (B) по изобретению). Указанные количества штамма(ов) бактерий может относиться к количествам каждого штамма бактерий в указанном суточном приеме или к общему количеству штаммов бактерий, содержащихся в указанном суточном приеме. Альтернативно указанные количества штамма(ов) бактерий могут относиться к количествам для каждого штамма бактерий в единицах дозы или к общему количеству штаммов бактерий, содержащихся в стандартных дозах, при этом единицу дозы можно вводить несколько раз в сутки (например, 2, либо 3, либо 4 раза в сутки).

В контексте настоящего изобретения штаммы бактерий могут представлять собой: бактерии-пробиотики (живые и жизнеспособные), тиндализованные бактерии, инактивированные бактерии (например, с помощью гамма-излучения или обработки ультразвуком), парaproбиотики, бактерии в форме лизата или экстрактов (например, экстракта клеточной стенки) или любое производное и/или компонент бактерий, предпочтительно гексополисахарид, пристеночную фракцию, метаболиты или биопродукты метаболизма, образуемые бактериями (постбиотики) и/или любой другой продукт бактериального происхождения, или могут быть получены из них.

Предпочтительно штаммы бактерий по настоящему изобретению представляют

собой штаммы-пробиотики бактерий, такие как «живые и жизнеспособные микроорганизмы, которые при введении в достаточных количествах придают полезные эффекты для здоровья организма-хозяина» (определение Организации ООН по продовольствию и сельскому хозяйству (FAO) и Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)).

Кроме штаммов бактерий по изобретению и, при его наличии, кроме указанного по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, композиция (A) и композиция (B) по изобретению возможно содержат указанную по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент фармацевтического или пищевого сорта, т. е. вещество, не обладающее терапевтической активностью, подходящей для фармацевтического или пищевого применения. В контексте настоящего изобретения «добавки и/или эксципиенты, приемлемые для фармацевтического или пищевого применения», включают все вспомогательные вещества, известные специалистам в данной области техники для приготовления композиций в твердой, мягкой или жидкой форме, такие как, например, разбавители, растворители (включая воду, глицерин, этиловый спирт), солюбилизаторы, подкислители, загустители, подсластители, усилители вкуса, красящие вещества, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, консерванты, pH-стабилизирующие буферные растворы и их смеси.

Кроме штаммов бактерий по изобретению и, при его наличии, кроме указанного по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, композиция (A) и композиция (B) по изобретению могут предпочтительно дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный компонент (компонент с целевой активностью против воспаления или связанной с воспалением), выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: аминокислот, витаминов группы A, B, C, D, E, K, органических и/или неорганических солей магния, цинка и селена, иммуностимулирующих веществ, мелатонина, валерианы, цветков пассифлоры, ароматизатора мяты лимонной, боярышника, ромашки аптечной, хмеля, антиоксидантов, противорадикальных агентов, веществ-пребиотиков (например, фруктоолигосахаридов (FOS), галактоолигосахаридов (GOS), инулина, гуаровой камеди, гликозаминогликанов (например, гиалуроновой кислоты, хондроитина сульфата), коллагена, веществ, действующих на серотонинергический путь (например, каннабиноидов), растительных экстрактов, ферментов и их комбинаций.

Композиции (A) и (B) по изобретению согласно различным воплощениям,

раскрытым в настоящем описании, могут находиться в твердой форме, такой как таблетка, жевательная таблетка, таблетка для растворения в полости рта или растворимая в полости рта, капсула, лепешка, гранулы, хлопья или порошок (гранулы или порошок для растворения в жидкости или гранулы, растворимые в полости рта), мягкой форме, такой как гелевая капсула, крем, или жидкой форме, такой как раствор, суспензия, дисперсия, эмульсия или сироп.

Композиции (А) и (В) по изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, можно включать в лекарственную форму для перорального (или желудочно-кишечного), подъязычного (или трансбуккального), трансмукозального, трансдермального и/или местного применения или введения, такого как ректальное, кожное, вагинальное; предпочтительно ее включают в лекарственную форму для перорального применения.

Композиции (А) и (В) по изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, могут представлять собой фармацевтическую композицию (*живые биотерапевтические препараты*, LBP), композицию медицинского изделия, пищевую добавку или пищевой продукт, либо композицию пищевого продукта для специальных медицинских целей (FSMP), либо новые пищевые продукты или продукты-пробиотики и/или косметическую композицию.

В контексте настоящего изобретения выражение «медицинское изделие» используется в значении, соответствующем Итальянскому законодательному декрету № 46 от 24 февраля 1997 г. или соответствующем новому Регламенту о медицинских изделиях (ЕС) 2017/745 (MDR).

Следующий объект настоящего изобретения образуют композиции (А) и (В) по изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, для применения в качестве лекарственного средства.

Композиции (А) и (В) по изобретению могут быть также предназначены для применения в качестве лекарственного средства в виде адъювантной терапии для дополнительных терапевтических подходов, предпочтительно фармакологического, пищевого или социально-поведенческого типа.

В одном воплощении композиции (А) и (В) по настоящему изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, предназначены для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента у нуждающегося в этом субъекта.

В контексте настоящего изобретения термин «иммуномодулирующий и/или иммуностимулирующий агент» используется для указания агента и/или вещества, способного изменять активность иммунной системы, предпочтительно способного к увеличению и усилению активности иммунной системы (например, посредством модулирования и/или стимуляции соответствующих провоспалительных и/или противовоспалительных цитокинов).

Предпочтительно композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению способны уменьшать продукцию провоспалительных цитокинов, предпочтительно IL-12 и TNF- α , и/или увеличивать продукцию противовоспалительных цитокинов, предпочтительно IL-10. В частности, композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению способны создавать соотношение IL12:IL10 больше 1 в присутствии воспалительного стимула.

На основании приведенного выше описания композиция (А) и композиция (В) по изобретению могут быть предназначены для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения заболеваний или симптомов и/или расстройств, вызванных или обусловленных/сопровождающихся увеличением содержания провоспалительных цитокинов и/или уменьшением содержания противовоспалительных цитокинов, предпочтительно заболеваний, поражающих: двигательную систему (мышечную и скелетную систему), пищеварительную систему, мочеполовую систему (мочевыводящую систему и половую систему), дыхательную систему, систему покровов тела, иммунную систему и/или систему кровообращения.

В частности, композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению имеют действительное применение для превентивного и/или излечивающего лечения заболеваний, обусловленных изменениями иммунной системы, в частности аутоиммунных заболеваний и аллергий, заболеваний, связанных с иммунодефицитом, заболеваний, поражающих кожу, таких как акне и/или атопический дерматит.

В одном воплощении композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, предназначены для применения в качестве противовоспалительного агента у нуждающегося в этом субъекта.

В одном воплощении композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, предназначены для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения

воспалительных заболеваний, расстройств и/или симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта у нуждающегося в этом субъекта, таких как *Helicobacter pylori*, пептическая язва или язва желудка, язва двенадцатиперстной кишки, хронического воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), такого как болезнь Крона и язвенный колит, микроскопического колита, дивертикулеза и дивертикулита.

В одном воплощении композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, предназначены для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения воспалительных скелетно-мышечных заболеваний, ревматологических заболеваний, воспалительных суставных и/или послеоперационных воспалительных заболеваний, предпочтительно для применения в способах лечения остеоартрита, ревматоидного артрита и анкилозирующего спондилита, в частности остеоартрита колена и остеоартрита суставов в целом.

В одном воплощении композиция (А) и композиция (В) по настоящему изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании, предназначены для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта (ФР ЖКТ), таких как синдром раздраженного кишечника (СРК) (СРК с диареей, СРК с запором, СРК с чередованием запора и диареи, неклассифицированного СРК), диспепсия, изжога, эзофагит, расстройства желудка и двенадцатиперстной кишки, СИБР (синдрома избыточного бактериального роста в тонком кишечнике), расстройств со слабовыраженными воспалительными состояниями, например у пожилых людей, при дивертикулезе.

Объект настоящего изобретения образует способ противовоспалительного или иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего лечения заболеваний и/или расстройств, определенных в настоящем изобретении, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества композиции (А) или композиции (В) по изобретению согласно различным воплощениям, раскрытым в настоящем описании.

В контексте настоящего изобретения выражение «субъекты» используют для указания субъектов-людей или субъектов-животных (например, домашних питомцев, таких как собаки или кошки, или других млекопитающих). Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для применения в способах лечения для субъектов-людей.

С целью уточнения, чтобы достичь цели настоящего изобретения, компоненты (или активные компоненты) смеси (А) или смеси (В) по изобретению, такие как штаммы бактерий и экстракт ягод по настоящему изобретению, можно также вводить по отдельности (предпочтительно в рамках временного интервала от 30 минут до 60 минут) и в любом порядке, но предпочтительно различные штаммы или штаммы и экстракт вводят субъекту одновременно, еще более предпочтительно в одной композиции, для получения более быстрого эффекта и простоты введения. При введении компонентов (или активных компонентов) смеси (А) или (В) по изобретению, таких как штаммы бактерий и экстракт ягод по настоящему изобретению, в одной композиции указанная одна композиция соответствует композиции (А) или (В) по настоящему изобретению.

Объект настоящего изобретения образует способ (сокращенно способ экстракции по изобретению) приготовления указанного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или включающего в свой состав полифенольную фракцию указанных ягод (как определено в контексте настоящего изобретения), включающий стадии:

- стадия 1: экстракция по меньшей мере одного вида ягод, предпочтительно ягод в форме порошка (или сушеных ягод), водой, включающая стадии:

- стадия 1.1: суспендирование по меньшей мере одного вида ягод или смеси видов ягод в воде до диспергирования в воде,

- стадия 1.2: смешивание указанной дисперсии стадии 1.1 с получением смеси стадии 1.2,

- возможная стадия 1.3: обработка указанной смеси стадии 1.2 ультразвуком с получением обработанной ультразвуком смеси стадии 1.3,

- стадия 1.4: центрифугирование указанной смеси стадии 1.2 или указанной обработанной ультразвуком смеси стадии 1.3 с получением смеси, содержащей водный супернатант, называемый водной фазой стадии 1, и твердый осадок стадии 1; за которой следует

- стадия 2 (например, после отделения указанной водной фазы и указанного твердого остатка стадии 1): экстракция твердого остатка стадии 1 спиртовым растворителем, предпочтительно метанолом, включающая стадии:

- стадия 2.1: суспендирование твердого остатка стадии 1 в спиртовом растворителе, предпочтительно метаноле, с получением дисперсии в спиртовом

растворителе,

стадия 2.2: смешивание указанной дисперсии стадии 2.1 с получением смеси стадии 2.2,

возможная стадия 2.3: обработка указанной смеси стадии 2.2 ультразвуком с получением обработанной ультразвуком смеси стадии 2.3,

стадия 2.4: центрифугирование указанной смеси стадии 2.2 или указанной обработанной ультразвуком смеси стадии 2.3 с получением смеси, содержащей спиртовой супернатант, называемый спиртовой фазой стадии 2, и твердый осадок стадии 2; за которой следует

- стадия 3: загрузка водной фазы стадии 1 на твердую фазу обращенно-фазовой хроматографии и экстракция путем элюирования кислым водным раствором (например, 0,01 М HCl) с получением элюата стадии 3, содержащего сахара и органические кислоты, и твердой фазы стадии 3, такой как остаточная твердая фаза обращенной фазы после экстракции стадии 3; элюат стадии 3 отбрасывают; за которой следует

- стадия 4: экстракция твердой фазы стадии 3 спиртовым растворителем, предпочтительно кислым водным раствором метанола (например, метанол, содержащий 0,1% HCl), с получением элюата стадии 4, содержащего полифенольную фракцию, и твердой фазы стадии 4, такой как остаточная твердая фаза обращенной фазы после экстракции стадии 4; за которой следует

- стадия 5: экстракция твердой фазы стадии 4 кетоновым растворителем (кетон), предпочтительно ацетоном, с получением элюата стадии 5, содержащего полифенольную фракцию, предпочтительно проантоцианидины и/или полифенолы, содержащиеся в волокнах ягод; за которой следует

- стадия 6: объединение элюата стадии 4 и элюата стадии 5 и удаление растворителя, например, с помощью выпаривания в вакууме, с получением экстракта (например, сухого экстракта) по меньшей мере одного вида ягод, содержащего полифенольную фракцию согласно настоящему изобретению (экстракта по изобретению).

После стадии 6 способ экстракции согласно изобретению может дополнительно включать стадию 7 определения содержания полифенолов экстракта по изобретению (например, сухого экстракта) способом качественного/количественного анализа, предпочтительно способом количественного определения Фолина - Чокальтеу или

любым другим подходящим способом, известным специалистам в данной области техники.

Предпочтительно экстракции стадии 1 и стадии 2 проводят в контейнерах с защитой от света, таких как, например, темные пробирки.

Стадию 1.1 суспендирования по меньшей мере одного вида ягод или смеси видов ягод в воде проводят с использованием ягод, определенных в настоящем изобретении, предпочтительно клюквы и/или голубики.

Стадию смешивания (стадии 1.1 и 2.1) предпочтительно проводят с помощью прибора с вихревой мешалкой в течение периода времени, составляющего от 1 минуты до 10 или 30 минут, предпочтительно от 1 минуты до 5 минут, при комнатной температуре. В настоящем изобретении выражение «комнатная температура» используется для указания температуры, содержащейся в диапазоне от 10 или 15 °C до 25 °C, предпочтительно 20 °C.

Стадию обработки ультразвуком (стадии 1.2 и 2.2) предпочтительно проводят в течение периода времени, составляющего от 5 минут до 30 или 60 минут, предпочтительно от 10 минут до 20 минут, при комнатной температуре.

Стадию центрифугирования (стадии 1.3 и 2.3) предпочтительно проводят при 2000–4000 оборотах, предпочтительно при 3000 оборотах, в течение периода времени, составляющего от 1 минуты до 30 или 60 минут, предпочтительно от 5 минут до 15 минут, при комнатной температуре. Цель обработки смеси ультразвуком состоит в том, чтобы способствовать большему разрушению ягод (или порошка ягод) и возможности большей экстракции находящегося в них полифенольного компонента.

Стадию 3 загрузки на твердую фазу обращенно-фазовой хроматографии предпочтительно проводят с использованием обращенно-фазового картриджа ТФЭ (ТФЭ: твердофазная экстракция), например, картриджа ТФЭ *Strata-X[®] Polymeric Reversed Phase*, который представляет собой обращенно-фазовый функционализированный полимерный адсорбент, обеспечивающий сильное удерживание нейтральных, кислых или основных соединений в условиях промывания агрессивными органическими фазами.

Стадию удаления растворителя (стадия 6) предпочтительно проводят с помощью выпаривания в вакууме, например с помощью роторного испарителя, при температуре, содержащейся в диапазоне от 30 °C до 50 °C или 60 °C, предпочтительно 40 °C.

Ягоды экстрагировали с использованием способа экстракции по изобретению

таким образом, чтобы удалить водорастворимую фракцию (в основном содержащую сахара и органические кислоты) и экстрагировать и объединить растворимую в метаноле фракцию (в основном содержащую полифенолы) и растворимую в ацетоне фракцию (содержащую полифенолы, такие как, например, проантоцианидины и антоцианины и/или антоцианидины, содержащиеся в волокнах ягод).

Объект настоящего изобретения образует указанный экстракт по меньшей мере одного вида ягод, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод (экстракт по изобретению), который может быть получен способом экстракции по изобретению, как определено выше (стадии 1–6 или стадии 1–7). Указанный экстракт по меньшей мере одного вида ягод (например, клюквы, голубики, земляники или бузины) содержит или альтернативно состоит из полифенолов в процентах по массе, содержащихся в диапазоне от 50% до 95% по отношению к общей массе экстракта (например, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или 98%); предпочтительно от 70% до 97%; более предпочтительно от 80% или 85% до 95%.

Объект настоящего изобретения образует композиция (B) (композиция (B) по изобретению), содержащая смесь (B) (смесь (B) по изобретению), содержащую или альтернативно состоящую из:

- по меньшей мере одного или смеси штаммов бактерий, выбранных из группы (I) или (I.i), как определено в настоящем изобретении, и
- по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод (экстракт по изобретению), который может быть получен способом экстракции по изобретению, как определено выше (стадии 1–6 или стадии 1–7); и где возможно указанная композиция (B) содержит по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

Если не указано иное, выражение «композиция, или смесь, или экстракт, или другое, содержащие компонент в количестве, содержащемся в диапазоне от x до y» используют для указания на то, что указанный компонент может присутствовать в композиции, либо смеси, либо экстракте, либо другом во всех количествах, находящихся в указанном диапазоне, даже включая, если не уточнено, крайние значения этого диапазона.

Выражение «терапевтически эффективное количество» относится к количеству

композиции, смеси и/или штамма бактерий, которое вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе, у млекопитающего или человека, рассматриваемого и определяемого индивидом, исследователем, ветеринарным врачом, врачом или другим клиническим или медицинским работником.

В контексте настоящего изобретения термин «новый пищевой продукт» используется в значении согласно Регламенту ЕС 2015/2283 от 25.11.2015.

Ниже представлена первая серия воплощений (FRa№) настоящего изобретения.

FRa1. Композиция В, содержащая смесь В, содержащую или альтернативно состоящую из:

- по меньшей мере одного штамм бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из

- штамма бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 32708,

- штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного компанией SOFAR S.p.A. в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760,

- штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* CF3, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353,

- штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus rhamnosus* GG, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103,

- штамма бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium animalis подвид lactis* Bb12, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 15954, и

- по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод; и где возможно указанная композиция (В) содержит по меньшей мере одну добавку или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

FRa2. Композиция В согласно FRa1, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и, кроме того, по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного компанией SOFAR S.p.A, Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760,

- *Lactobacillus paracasei* CF3, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353,

- *Lactobacillus rhamnosus* GG, депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103,

- *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 15954, и их смеси.

FRa3. Композиция В согласно FRa1 или FRa2, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и, кроме того, по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного компанией SOFAR S.p.A, Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760, и их смесь.

FRa4. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccus* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*), брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), ежевики (*Rubus ulmifolius*), малины обыкновенной (*Rubus idaeus*), малины

ежевикообразной (*Rubus leucodermis* или *Rubus occidentalis*), смородины черной (*Ribes nigrum*), смородины красной (*Ribes rubrum*), шелковицы черной (*Morus nigra*), шелковицы красной (*Morus rubra*), шелковицы белой (*Morus alba*), кизила обыкновенного (*Cornus mas*), крыжовника (*Ribes uva-crispa*), барбариса (*Berberis vulgaris*), *Amelanchier ovalis*, *Amelanchier canadensis*, вишни обыкновенной или вишни черной (*Prunus cerasus*), земляничного дерева (*Arbutus unedo*); голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*) и их смесей.

FRa5. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*) и их смесей; предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: голубики, клюквы и их смеси.

FRa6. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанная полифенольная фракция указанного экстракта по меньшей мере одного вида ягод содержит проантоцианидины и/или антоцианины и/или антоцианидины.

FRa7. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ DSM 26760.

FRa8. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572.

FRa9. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и, кроме того, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ DSM 26760 или *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, и где указанный

по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод, содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод, представляет собой экстракт голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*) или альтернативно клюквы обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод.

FRa10. Композиция В согласно любому из предшествующих FRa 1–9 для применения в качестве лекарственного средства.

FRa11. Композиция по любому из FRa 1–9 для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции провоспалительных цитокинов и/или увеличению продукции противовоспалительных цитокинов;

предпочтительно, где указанная композиция предназначена для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции цитокинов IL12 и/или TNF-α и/или увеличению продукции цитокинов IL10.

FRa12. Композиция В для применения согласно FRa10 или FRa11, где указанная композиция предназначена для применения в качестве противовоспалительного агента.

FRa13. Композиция В для применения согласно FRa12, где указанная композиция предназначена для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения воспалительных заболеваний, расстройств и/или симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта, выбранных из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Helicobacter pylori*, пептической язвы или язвы желудка, язвы двенадцатиперстной кишки, хронических воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), болезни Крона, неспецифического язвенного колита, микроскопического колита, дивертикулеза и дивертикулита.

FRa14. Композиция В согласно любому из FRa 1–9 для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения скелетно-мышечных воспалительных заболеваний, ревматологических заболеваний, воспалительных суставных и/или послеоперационных воспалительных заболеваний.

FRa15. Композиция В для применения согласно ОПа14, где указанная композиция предназначена для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения остеоартрита, ревматоидного артрита и/или анкилозирующего

спондилита; предпочтительно остеоартрита суставов и/или остеоартрита колена.

Ниже представлена вторая серия воплощений (FR№) настоящего изобретения.

FRb1. Композиция А, содержащая смесь А, содержащую или альтернативно состоящую из:

- штамма бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 32708, и

по меньшей мере один штамм бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

- штамм бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* DG® и депонированного компанией SOFAR S.p.A. в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- штамм бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760,

- штамм бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* CF3™ и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353,

- штамм бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus rhamnosus* GG и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103,

- штамм бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 15954, и их смесей;

и где возможно указанная композиция содержит по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

FRb2. Композиция А согласно FRb1, где смесь А содержит или альтернативно состоит из: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760.

FRb3. Композиция А согласно FRb1 или FRb2, где смесь А содержит или альтернативно состоит из: штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно

состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* CF3 DSM 32353, *Lactobacillus rhamnosus* GG DSM 53103, *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12 DSM 15954 и их смесей.

FRb4. Композиция А согласно FRb1, где смесь содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и штамма бактерий *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572.

FRb5. Композиция А согласно FRb4, где смесь содержит или альтернативно состоит из: штамма бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, штамма бактерий *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, *Lactobacillus paracasei* CF3 DSM 32353, *Lactobacillus rhamnosus* GG DSM 53103, *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12 DSM 15954 и их смесей.

FRb6. Композиция А согласно любому из предшествующих FRb, где смесь содержит или альтернативно состоит из штамма бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, штамма бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и штамма бактерий *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572.

FRb7. Композиция А по любому из FRb 1–6 для применения в качестве лекарственного средства.

FRb8. Композиция А согласно любому из FRb 1–6 для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции провоспалительных цитокинов и/или увеличению продукции противовоспалительных цитокинов;

предпочтительно, где указанная композиция предназначена для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции цитокинов IL12 и/или TNF-α и/или увеличению продукции цитокинов IL10.

FRb9. Композиция А для применения согласно FRb7 или 8, где указанная композиция предназначена для применения в качестве противовоспалительного агента.

FRb10. Композиция А для применения согласно FRb9, где указанная композиция предназначена для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения воспалительных заболеваний, расстройств и/или симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта, выбранных из группы, содержащей или альтернативно состоящей

из: *Helicobacter pylori*, пептической язвы или язвы желудка, язвы двенадцатиперстной кишки, хронического воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), болезни Крона, неспецифического язвенного колита, микроскопического колита, дивертикулеза и дивертикулита.

FRb11. Композиция А согласно любому из ОПа 1–6 для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения скелетно-мышечных воспалительных заболеваний, ревматологических заболеваний, воспалительных суставных и/или послеоперационных воспалительных заболеваний.

FRb12. Композиция А для применения согласно ОПа11, где указанная композиция предназначена для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения остеоартрита, ревматоидного артрита и/или анкилозирующего спондилита; предпочтительно остеоартрита суставов и/или остеоартрита колена.

В таблице 1 в качестве примера показано содержание антоцианинов/антоцианидинов в экстракте сухой голубики (порошок) и экстракта свежей голубики. Сокращения: Dp - дельфинидин, циклидин, Pt - петунидин, Pn - пеонидин, Mv - мальвидин, Pg - пеларгонидин, gal - галактозид, glc - глюкозид, ara - арабинозид.

Пик №	Антоцианы	Сухая голубика (порошок) [г/кг±S]	Свежая голубика [г/кг±S]
1	Dp-3-gal	0,09 ± 0,01	12,95 ± 0,86
2	Dp-пентоза-гексоза	n.q.	-
3	Dp-3-glc	0,45 ± 0,05	9,11 ± 0,43
4	Cy-3-gal	0,04 ± 0,01	8,69 ± 0,31
5	Dp-3-ara	0,18 ± 0,02	6,73 ± 0,39
6	Cy-3-glc	0,34 ± 0,03	12,92 ± 0,27
7	Pt-3-gal	0,07 ± 0,01	5,44 ± 0,39
8	Cy-3-ara	0,11 ± 0,01	6,00 ± 0,27
9	Pt-3-glc	0,45 ± 0,05	7,50 ± 0,87
10	Pn-3-gal	n.q.	n.q.
11	Pt-3-ara	0,21 ± 0,02	5,32 ± 0,42
12	Pn-3-glc	0,08 ± 0,01	7,75 ± 0,29
13	Mv-3-gal	0,11 ± 0,01	6,75 ± 1,22
14	Mv-3-glc	0,84 ± 0,10	6,35 ± 0,36
15	Mv-3-ara	0,64 ± 0,13	5,80 ± 0,59
16	Pn-pent	n.q.	-

17	Mv-pent	n.q.	-
----	---------	------	---

Таблица 1. n.q. = количественное определение не проводилось

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Иммуномодулирующую способность композиций (А) и (В) по изобретению тестировали с использованием модели дендритных клеток, изолированных из костного мозга мыши, т. е. *Bone Marrow-derived Dendritic Cells* (сокращенно BMDC).

МАТЕРИАЛЫ

(I) Штаммы бактерий:

- *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572), сокращенно DG;
- *L. paracasei* LPC-S01[™] (DSM 26760), сокращенно LPC-S01[™];
- *L. paracasei* CF3 (DSM 32353), сокращенно CF3;
- *L. rhamnosus* GG (DSM 53103), сокращенно GG;
- *B. bifidum* MIMBb23sg (DSM 32708), сокращенно 23SG;
- *B. animalis* подвид *Lactis* Bb12 (DSM 15954), сокращенно Bb12;

как определено в настоящем изобретении;

(II) Ягоды в качестве исходного материала способа экстракции согласно изобретению:

- «Дикая голубика, порошок, 3% полифенолов» (сокращенно 3% PP): производства компании Naturex, код продукта ОК705055, ботанические видовые названия *Vaccinium myrtillus* или *Vaccinium angustifolium*. Качественный анализ (методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)): содержание полифенолов >3% (от 3% до 5%, либо 10%, либо 20%, либо 30%, либо 40%, либо 50%) (площадь пика/площадь пика ВЭЖХ под кривой% или масс./масс.%), потеря в массе при высушивании <5,00%, размер частиц: >95% методом ситового анализа 30 меш (600 мкм) и >95% методом ситового анализа 100 меш (150 мкм), насыпная плотность 0,30–0,60 г/мл;

- «Дикая голубика, порошок, 50% волокон» (сокращенно 50% FB): производства компании Naturex, код продукта ОК705001, ботанические видовые названия *Vaccinium myrtillus* или *Vaccinium angustifolium*. Качественный анализ (методом ВЭЖХ): содержание полифенолов >3% (от 3% до 4%, либо 5 %, либо 6 %, либо 8 %, либо 10% масс./масс.%, содержание волокон >50%), потеря в массе при высушивании <5,00%, размер частиц: >60% методом ситового анализа 60 меш (250 мкм), насыпная плотность 0,30–0,60 г/мл;

- «Земляника, порошок, 100% плоды»: производства компании Naturex, код

продукта ON200003, ботаническое видовое название *Fragaria spp.* Качественный анализ (методом тонкослойной хроматографии (ТСХ)): потеря в массе при высушивании <3,00%, размер частиц: 100% до 1,4 мм включительно;

- «Клюква, 1% проантоцианидины» (сокращенно 1% РА): производства компании Naturex, код продукта CRANBERRY PE 1% PROANTHOCYANIDINS (сер.: EH711552), порошок, ботаническое видовое название *Vaccinium macrocarpon* (Ainton). Качественный анализ: содержание проантоцианидинов (в виде цианидинхлорида, метод 1200 Евр. фарм.) >1% по оценке методом ВЭЖХ (CQ-MO-467) (значение 1,92%), размер частиц: >90% методом ситового анализа 300 меш (сито (CQ-MO-018), потеря в массе при высушивании <6,00% (ИК баланс (CQ-MO-018) (значение 1,06%), (насыпная плотность после уплотнения) 0,4–0,8 г/мл (денситометр, CQ-MO-257), pH (раствор 1%) 3–6 (pH-метр CQ-MO-123);

- «Клюква, 1% проантоцианидины» (сокращенно 1% РА): производства компании Naturex, код продукта NUTRICRAN® 90S-06155 (сер.: EK036155), порошок, ботаническое видовое название *Cranberry red* (Ainton). Качественный анализ: содержание проантоцианидинов (РАС) >1,0% (метод вычитания CQ-MO-232 из CQ-MO-203) (значение 1,95% масс./масс.), размер частиц: 100% методом ситового анализа 30 меш и >95% методом ситового анализа 100 меш (ситовый анализ (LA-03-002-00), влага <5,00% (ИК баланс (CQ-MO-018), насыпная плотность 0,5–0,6 г/мл и насыпная плотность после уплотнения 0,6–0,8 г/мл (денситометр, CQ-MO-257), pH (раствор 1%) 3–6 (pH-метр (CQ-MO-123);

- «Клюква, 1,5% проантоцианидинов»: производства компании Naturex, код продукта PACRAN® EU-SP_06104 (сер. GK006104), порошок, ботаническое видовое название *Vaccinium macrocarpon* (Ainton), содержание проантоцианидинов >1,5% по оценке методом ВЭЖХ (вычитание CQ-MO-583 из CQ-MO-582) (значение 2,97%) (площадь пика/площадь под кривой ВЭЖХ% или масс./масс. %), потеря в массе при высушивании <6,00% (ИК баланс (CQ-MO-018), насыпная плотность после уплотнения 0,5–0,7 г/мл (денситометр, CQ-MO-257), размер частиц: 100% методом ситового анализа 80 меш, pH (1% раствор) 2,6–3,9 (pH-метр);

- «Клюква, 15% проантоцианидинов» (сокращенно 15% РА): производства компании Nutra, код продукта URO-std-Pur, порошок, ботаническое видовое название *Vaccinium macrocarpon* (Ainton), содержание проантоцианидинов 15,9% (BL-DMAC) (масс./масс. %), потеря в массе при высушивании 3,3%, размер частиц: 100% методом

ситового анализа 80 меш;

- «Бузина, сухой спрей плодов»: производства компании Irgona, код продукта 70120053, порошок, ботаническое видовое название *Sambucus nigra* (L.), содержание антоцианинов, выраженное в виде суа-3-glu (спектр в буферном растворе с pH 1,0) 88,5 г/кг, содержание полифенолов, выраженное в виде катехина (метод Фолина — Чокальтеу) 109,0 г/кг.

Содержание полифенолов в мг на 1 г порошка:

- голубика 3% РР: 74 мг/г;
- голубика 50% волокно: 51 мг/г;
- земляника: 115,5 мг/г;
- клюква 1% РА: 31,7 мг/г;
- клюква 15% РА: 158 мг/г;
- бузина: 122 мг/г.

МЕТОДЫ

(III) Штаммы бактерий, подготовка и условия выращивания:

Все штаммы *Lactobacillus*, используемые для этого исследования, культивировали в жидкой среде Де Мана - Рогоза - Шарпа (MRS) (Difco Laboratories Inc., Детройт, штат Мичиган, США). Штаммы *Bifidobacterium* культивировали в среде MRS с добавлением 0,05% L-цистеина гидрохлорида (Sigma-Aldrich) (сMRS). Бактерии инокулировали из замороженных в глицерине штаммов и дважды пересеивали в среде MRS или сMRS, используя инокулят 1: 100; штаммы лактобацилл инкубировали при 37 °C, тогда как бифидобактерии инкубировали при 37 °C в анаэробных условиях (система Naerocult A; Merck, Дармштадт, Германия). Клетки бактерий собирали из ночной культуры и промывали, используя стерильный фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) (для штаммов бифидобактерий использовали предварительно восстановленный цитратно-фосфатно-солевой буферный раствор (цФСБ)). Затем проводили сравнение общего числа клеток, определенного с помощью усовершенствованной счетной камеры Neubauer, с числом жизнеспособных клеток в суспензиях бактерий, используя проточный цитометр Accuri C6 (BD Biosciences, Милан, Италия) с окрашиванием клеток пропидиумйодидом. На основании числа жизнеспособных клеток каждый штамм бактерий ресуспендировали при известной концентрации с предварительно восстановленным цФСБ с добавлением стерильного глицерина (1:6 об./об.) и хранили при -80 °C в аликвотах. Жизнеспособность

бактериальных клеток контролировали путем разведения и посева на чашки Петри со средой MRS или cMRS с агаром аликвоты каждого штамма после одной недели хранения при -80 °C.

(IV) Экстракция полифенольной фракции из ягод

Способ экстракции ягод осуществляли, следуя методу Wrolstad (Wrolstad et al, *Handbook of analytical chemistry: pigments, colorants, flavour, texture and bioactive food components*, vol 2. Wiley, New Jersey, pp 473–475, 2005) с некоторыми модификациями, как описано в способе экстракции по настоящему изобретению.

В частности, 500 миллиграммов (мг) ягод в форме порошка, таких как *голубика*, *клюква*, *земляника* или *бузина*, диспергировали в 40 мл деионизированной воды (стадия 1) (темная пробирка для защиты от света), перемешивали на вихревой мешалке в течение 3 минут при температуре 20 °C. Затем водную дисперсию ягод обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут при температуре 20 °C и затем обработанную ультразвуком смесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут при температуре 20 °C с получением смеси, содержащей водный супернатант (водная фаза стадии 1) и твердый остаток (твердый остаток стадии 1). Водный супернатант извлекали (водная фаза стадии 1), и твердый остаток (твердый остаток стадии 1) экстрагировали во второй раз, используя 10 мл метанола (стадия 2; способ экстракции, подобный описанному для стадии 1), и получали спиртовой супернатант (спиртовая фаза стадии 2) и твердый остаток (твердый остаток стадии 1).

Разделение компонентов, содержащихся в водном супернатанте стадии 1 и в спиртовом супернатанте стадии 2, осуществляли посредством экстракции с использованием картриджа для твердофазной экстракции (ТФЭ). Более конкретно объем 6 мл водного супернатанта стадии 1 загружали на картридж ТФЭ (Strata-X[®], полимерная обращенная фаза, 200 мг/6 мл), и водорастворимую фазу, содержащую сахара и органические кислоты, элюировали, используя 0,01 н. HCl (5 мл) (стадия 3) в качестве подвижной фазы; элюат стадии 3, содержащий сахара и органические кислоты, отбрасывали. Затем спиртовой супернатант стадии 2 (10 мл) загружали на указанный картридж ТФЭ и элюировали полифенольную фракцию, используя в качестве подвижной фазы метанол, содержащий 0,1% HCl (5 мл) (стадия 4). Наконец, картридж ТФЭ элюировали с использованием ацетона (стадия 5), чтобы экстрагировать и выделить проантоцианидины и полифенолы, присутствующие в волокнах ягод в элюированной фракции.

Фракцию, элюированную в соответствии со стадией 4, и фракцию, элюированную с использованием ацетона в соответствии со стадией 5, объединяли и выпаривали с помощью роторного испарителя при температуре 40 °C с получением экстракта ягод, содержащего полифенольную фракцию согласно настоящему изобретению (сокращенно экстракт по изобретению).

Полученный экстракт по изобретению растворяли в метаноле, подкисленном HCl (0,05 mM), и полученный раствор анализировали для определения общего содержания полифенолов с помощью количественного определения методом Фолина - Чокальтеу.

Процент по массе (по отношению к общей массе экстракта) суммарных полифенолов, экстрагированных из вышеуказанных ягод способом экстракции по изобретению, был выше 90% (от 90% до 91%, либо 92%, либо 93%, либо 94%, либо 95%, либо 96%, либо 97%, либо 98%, либо 99%; анализ проводили методом Фолина - Чокальтеу.

Содержание полифенолов в мг на 1 мл экстракта (результаты выражены в эквивалентах галловой кислоты (GAE) с использованием калибровочной кривой, полученной с использованием стандартного образца галловой кислоты):

- голубика 3% PP: 36,93 мг/мл;
- голубика 50% волокно: 25,54 мг/мл;
- земляника: 57,80 мг/мл;
- клюква 1% PA: 15,85 мг/мл;
- клюква 15% PA: 78,99 мг/мл;
- бузина: 60,59 мг/мл.

Экстракты, полученные с использованием различных видов ягод, таких как голубика, клюква, земляника и бузина, хранили при -20 °C вплоть до момента использования в экспериментах по иммуномодуляции иммуномодулированию с дендритными клетками.

В день эксперимента *in vitro* с дендритными клетками, полученными из костного мозга (BMDC), экстракт растворяли в среде RPMI (среда для выращивания дендритных клеток) при концентрации 50 мкг/мл для конечного использования на основании количественного определения суммарного содержания полифенолов, проведенного с использованием отмеченного выше количественного определения методом Фолина - Чокальтеу.

(V) Количественное определение методом Фолина-Чокальтеу: анализ полифенольной фракции экстракта по изобретению.

Анализ проводили, используя систему жидкостной хроматографии, состоящую из хроматографа модели Alliance 2695 (Water, Милфорд, штат Массачусетс, США), оборудованного фотодиодно-матричным детектором модели 2998 (Waters). Разделение проводили путем пропускания через колонку C18 Kinetex ($150 \times 4,6$ мм, 2,6 мкм, Fenomenex) при 45 °C с минимальной скоростью потока 1,7 мл/мин. Элюенты представляли собой (А) 1% H_3PO_4 и (В) ацетонитрил/вода (35:65, об./об.). Градиент элюции был линейным, как указано: 0–15 мин, 14% В; 15–25 минут, от 14 до 20% В; 25–35 минут, от 20 до 32% В; 35–45 минут, от 32 до 50% В; 45–48 мин, от 50 до 90% В; 90% в течение 3 минут. Хроматографические данные регистрировали при длине волны от 200 до 700 нм и интегрировали при 520 нм (ACN) и 320 нм (Phe). Были получены калибровочные кривые от 2 до 50 мкг/мл для Су-, Др-, Рт-, Ре- и Мv-3-О-glc, Су- и Рт-3-О-gal и Рт-3-О-ага и хлорогеновой кислоты. Рабочий раствор разводили из исходного раствора, используя метанол, подкисленный 0,1% ТФУ. Каждый тест проводили в двух повторностях. Идентификацию отдельных пиков ACN подтверждали жидкостной хроматографией (ЖХ), сопряженной с масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением (ЭР-МС), как описано ранее Дель Бо и соавт. (Del Bo' C ET AL, J Agric Food Chem. 2010 Feb 24; 58(4):2491–7). Кратко, масс-спектрометр работал в режиме полного сканирования положительного иона в диапазоне 200 Да – 800 Да. Капиллярное напряжение было установлено на 3,5 кВ, напряжение на конусе - на 20 В, начальная температура при 130 °C и температура десольватации - при 350 °C. Данные регистрировали с помощью программного обеспечения Masslinx 4.0 (Micromass, Беверли, штат Массачусетс, США).

(VI) Получение дендритных клеток из костного мозга (BMDC)

BMDC (*bone marrow-derived dendritic cells*) были получены путем изоляции моноцитов, собранных из костного мозга большеберцовой и бедренной кости мышей 6–12-недельного возраста линии C57BL/6. После извлечения большеберцовые и бедренные кости обрабатывали в течение 2 минут EtOH и затем в течение 2 минут стерильным ФСБ. Моноциты были получены путем промывания большеберцовых и бедренных костей шприцами, содержащими стерильный ФСБ.

Извлеченные клетки центрифугировали в течение 10 минут при 1200 об/мин при 4 °C. Супернатант удаляли, и клеточный осадок снова промывали ФСБ и

центрифугировали в тех же условиях. Затем клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл среды RPMI 1640 (RPMI 1640: среда 1640 Онкологического института имени Розуэлла Парка), содержащей L-глутамин (4 мМ), термически инактивированную ФСТ (фетальной сыворотки телят) 10% об./об., пенициллин (100 Ед./мл), стрептомицин (100 мг/мл), 50 мМ 2-меркаптоэтанол с добавлением GMCSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) при конечной концентрации 15 нг/мл.

Клетки считали с использованием счетной камеры с сеткой Фукса - Розенталя и доводили их концентрацию до $3,5 \times 10^5$ клеток/мл, разделяли на аликвоты в чашки Петри, каждая из которых содержала 10 мл клеточной суспензии, и оставляли на 87 дней для дифференцировки в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMCSF) в количестве 15 нг/мл. Среду с GMCSF заменяли свежей средой на третий и пятый день дифференцировки. На 8-й день клетки извлекали из каждой чашки Петри, центрифугировали и ресуспендировали при концентрации 2×10^6 клеток/мл в полной среде RPMI без GMCSF.

(VII) Стимуляция дендритных клеток с композицией (А) или (В) по изобретению
Дендритные клетки (1×10^6 BMDC) помещали в контакт с:

(а) отдельными штаммами бактерий, перечисленными в параграфе (I) (Фиг. 1a, 1b, 1c);

(b) смесями из по меньшей мере 2 штаммов бактерий, перечисленных в параграфе (I) (композиции (А) согласно изобретению: DG+LPC-S01™, DG+MIMBb23sg, LPC-S01™+ MIMBb23sg, МИ, суммарная конечная МИ 5) (Фиг. 2a, 2b, 2c);

(с) смесями штамма бактерий, выбранного из штаммов, перечисленных в параграфе (I), и экстракта ягод, выбранных из видов ягод, перечисленных в параграфе (II), где экстракцию проводят согласно способу экстракции по изобретению с получением экстрактов, содержащих фенольную фракцию (композиции (В) согласно изобретению) (Фиг. 3);

(d) смесями по меньшей мере 2 штаммов бактерий, выбранных из штаммов, перечисленных в параграфе (I), и экстракта ягод, выбранных из видов ягод, перечисленных в параграфе (II), где экстракцию проводят согласно способу экстракции по изобретению с получением экстрактов, содержащих фенольную фракцию (композиции (В) согласно изобретению) (Фиг. 4).

Клетки стимулировали как в отсутствие, так и в присутствии

провоспалительных стимулов, полученных с использованием липополисахарида (ЛПС) из *Escherichia coli*, используемого в количестве 1 мкг/мл.

Стимуляцию BMDC (a), (b), (c), (d), как определено выше, и ЛПС проводили путем инкубации при 37 °C и 5% CO₂ в течение 20 часов. Затем супернатант собирали без извлечения клеток, присутствующих на дне лунки, и использовали для оценки продукции про- и противовоспалительных цитокинов IL12, TNF-α и IL10, используя иммуноферментный анализ ИФА.

В частности, проводили оценку следующих цитокинов:

- провоспалительный цитокин TNF-α (фактор некроза опухоли, альфа);
- противовоспалительный цитокин IL-10 (интерлейкин-10); и
- стимулирующий цитокин IL-12 (интерлейкин-12), ответственный за активацию адаптивного иммунитета.

Каждый эксперимент включал контрольное условие (т. е. BMDC, стимулированные только средой RPMI), контроль в присутствии MetOH-HCl (соответственно такому же количеству, которое присутствует в каждом тестируемом экстракте и всегда ниже, чем 0,1% об./об., по отношению к объему клеточной суспензии в каждой лунке) и ЛПС+MetOH-HCl.

Все штаммы тестировали как в отсутствие, так и в присутствии MetOH-HCl, с ЛПС или без него.

Количественное определение проводили в 96-луночных многолуночных планшетах, дно каждой лунки которых предварительно обрабатывали и покрывали 50 мкл ресуспендированного в ФСБ иммобилизующего антитела, специфичного к каждому цитокину, представляющему интерес (обработку продолжали в течение ночи при 4 °C). Затем планшеты промывали буферным раствором, содержащим 8 г/л NaCl, 1,44 г/л Na₂HPO₄, 0,24 г/л KH₂PO₄, 0,05% Твин 20, pH 7,4, и блокировали неспецифическое связывание 250 мкл ФСБ с добавлением 1% раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем планшеты промывали и добавляли супернатанты, соответствующие различным испытуемым образцам. Супернатанты разводили в растворе, состоящем из ФСБ с добавлением 1% БСА, в соотношении 1:2 для IL12, 1:10 для IL10 и 1:100 для TNF-α до конечного объема в лунках 50 мкл. Восемь разведений 1:2 стандартного раствора каждого цитокина добавляли в каждый планшет в двух технических повторностях для построения калибровочной кривой, требующейся для количественного определения

белков в супернатантах. После 2 часов инкубации при комнатной температуре планшеты промывали и обрабатывали 50 мкл вторичного антитела, конъюгированного с биотином, ресуспендированного при комнатной температуре в течение 2 часов. После промывания планшетов добавляли конъюгированный со стрептавидином фермент пероксидазу хрена, разведенный в детектирующем растворе, в конечном объеме 50 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 20 мин. После промывания планшеты дополнительно промывали дистиллированной водой и инкубировали с тетраметилбензидином (детектор активности пероксидазы, ТМБ), ресуспендированным в специальном растворе, и оставляли для инкубации еще на 20 минут при комнатной температуре для проявления колориметрической реакции, зависящей от ферментативной активности. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 2 М раствора H_3PO_4 для блокирования реакции и проводили считывание показаний оптической плотности при 450/630 нм с использованием спектрофотометра. Интенсивность окрашивания каждого образца сравнивали со стандартной кривой с получением количественного результата в показателях оптической плотности (ОП) и концентрации в пересчете на используемые разведения.

На предварительной стадии проводили эксперименты по оценке подходящего количества экстрактов для использования в контакте с BMDC в целях исключения потенциального влияния на дендритные клетки со стороны растворителя (MetOH–0,05 мМ HCl), используемого для получения экстракта ягод, содержащего полифенольную фракцию. После этих предварительных тестов было принято решение использовать в работе содержание экстракта ягод, содержащего полифенольную фракцию, в количестве 50 мкг/мл, что соответствует количеству менее 0,1% (об./об.) MetOH–HCl в контакте с дендритными клетками.

Что касается штаммов бактерий, проводили предварительную оценку для определения количества, используемого в контакте с BMDC.

На основании этих тестов было принято решение тестировать штаммы бактерий при МИ (множественности инфекции), равной 5, по отношению к количеству BMDC, что соответствует общему количеству бактериальных клеток 5×10^6 .

При использовании в отсутствие экстрактов штаммы бактерий добавляли с количеством MetOH–HCl, соответствующим присутствующему в 50 мкг/мл каждого испытуемого экстракта, чтобы иметь возможность объяснить увеличенный/синергетический эффект присутствием биоактивных компонентов в

ягодах, а не присутствием MetOH–HCl.

В экспериментах по совместной инкубации с ЛПС также всегда включали контрольный образец в присутствии MetOH–HCl.

Все эксперименты проводили в двух технических повторностях и в двух биологических повторностях.

(VIII) Статистический анализ

Статистические расчеты проводили, используя программу из программного обеспечения GraphPad Prism 5. Значения результатов анализировали с помощью непарных t-критериев Стьюдента, имеющих дисперсию, зависящую от другой случайной величины, с двусторонним распределением. Различия $P < 0,05$ считали значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

(IX) Оценка композиций (А) по изобретению

- II *B. bifidum* MIMBb23sg (23SG) при комбинировании с *L. paracasei* DG[®] (23SG+DG) или с *L. paracasei* LPC-S01[™] (23SG+LPC-S01[™]) снижает их стимулирующий ответ, как в отношении IL12, так и в отношении TNF- α .

- Кроме того, комбинация *B. bifidum* MIMBb23sg с *L. paracasei* LPC-S01[™] (23SG+LPC-S01[™]) индуцирует повышенную продукцию IL10 в отношении всех штаммов бактерий по отдельности (синергетический эффект).

Таким образом, комбинация *B. bifidum* MIMBb23sg и *L. paracasei* LPC-S01[™] (23SG+LPC-S01[™]) (композиция (А) согласно изобретению) характеризуется соотношением IL10:IL12 значительно выше 1 и потенциальным противовоспалительным эффектом (противовоспалительный иммуностимулирующий эффект).

(X) Оценка композиции (В) по изобретению

- Все экстракты ягод согласно изобретению показали способность модулировать иммунные ответы, индуцированные различными штаммами бактерий, тестируемыми по отдельности (Фиг. 3).

Экстракты ягод по отдельности были неспособны индуцировать ни IL-12, ни IL-10.

В частности, как экстракты голубики (3% PP и 50% FB), так и экстракты клюквы (1% PA и 15% PA) эффективны при снижении продукции IL12 на исходном уровне и в присутствии ЛПС (Фиг. 3).

Кроме того, экстракт голубики 50% FB наиболее эффективен при снижении IL12 и TNF- α (провоспалительные цитокины) для всех протестированных штаммов бактерий (Фиг. 3).

- Комбинация экстрактов ягод, содержащих полифенольную фракцию согласно изобретению (экстракты голубики 3% PP и 50% FB, экстракты клюквы 1% PA и 15% PA), с наилучшей комбинацией штаммов бактерий, такой как *B. bifidum* MIMBb23sg и *L. paracasei* LPC-S01™ (23SG+LPC-S01™), вносит вклад в дополнительное ингибирование продукции IL-12 (провоспалительный цитокин) даже в присутствии провоспалительных стимулов ЛПС (Фиг. 4 и 4а).

Кроме того, комбинация экстракта голубики 50% FB согласно изобретению или экстракта клюквы 1% PA с комбинацией штаммов бактерий *B. bifidum* MIMBb23sg и *L. paracasei* LPC-S01™ (23SG+LPC-S01™) вносит вклад в дополнительное ингибирование продукции TNF- α (провоспалительный цитокин) даже в присутствии провоспалительных стимулов ЛПС (Фиг. 4 и 4а).

ВЫВОДЫ

Композиции согласно изобретению, содержащие один или более штаммов бактерий (т. е. 23SG+LPC-S01™) и экстракты голубики или клюквы, содержащие полифенольную фракцию, обладают потенциальным противовоспалительным эффектом (противовоспалительный иммуностимулирующий эффект).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая смесь, содержащую или альтернативно состоящую из:

- по меньшей мере одного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или альтернативно состоящей из
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg, депонированного в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) под номером депонирования DSM 32708,
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572 компанией SOFAR S.p.A.,
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760,
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus paracasei* CF3, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353,
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Lactobacillus rhamnosus* GG, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103,
 - штамма бактерий, идентифицированного как *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депонирования DSM 15954, и
- по меньшей мере одного экстракта по меньшей мере одного вида ягод, содержащего или альтернативно состоящего из полифенольной фракции указанных ягод;

и где указанная композиция возможно содержит по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевого или фармакологического качества.

2. Композиция по п. 1, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и, кроме того, по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного компанией SOFAR S.p.A, Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760,

- *Lactobacillus paracasei* CF3, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 32353,

- *Lactobacillus rhamnosus* GG, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 53103,

- *Bifidobacterium animalis* подвид *lactis* Bb12, депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 15954,

и их смесей.

3. Композиция по п. 1 или 2, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит штамм бактерий *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и, кроме того, по меньшей мере один дополнительный штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®], депонированного компанией SOFAR S.p.A, Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под номером доступа CNCM I-1572,

- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™], депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760, и их смеси.

4. Композиция по любому из п. п. 1–3, где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы или клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесную или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), брусники (*Vaccinium vitis-idaea*), ежевики (*Rubus ulmifolius*), малины обыкновенной (*Rubus idaeus*), малины ежевикоподобной (*Rubus leucodermis* или *Rubus occidentalis*), смородины черной (*Ribes nigrum*), смородины красной (*Ribes rubrum*), шелковицы черной (*Morus nigra*), шелковицы красной (*Morus rubra*), шелковицы белой (*Morus alba*), кизила обыкновенного (*Cornus mas*), крыжовника

(*Ribes uva-crispa*), барбариса (*Berberis vulgaris*), *Amelanchier ovalis*, *Amelanchier canadensis*, вишни мараскиновой (*Prunus mahaleb*), вишни обыкновенной и вишни черной (*Prunus cerasus*), земляничного дерева (*Arbutus unedo*);

голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы или клюквы обыкновенной (*Vaccinium oxycoccus* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*) и их смесей.

5. Композиция по любому из п. п. 1–4, где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из:

голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*), клюквы обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccus* или *Vaccinium macrocarpon*), земляники лесной или земляники (*Fragaria vesca*, либо *Fragaria spp.*, либо *Fragaria ananassa*), бузины (*Sambucus nigra*) и их смесей, предпочтительно где указанный по меньшей мере один вид ягод выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из голубики, клюквы и их смеси.

6. Композиция по любому из п. п. 1–5, где указанная полифенольная фракция указанного экстракта по меньшей мере одного вида ягод содержит проантоцианидины и/или антоцианины и/или антоцианидины.

7. Композиция по любому из п. п. 1–6, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ DSM 26760.

8. Композиция по любому из п. п. 1–7, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572.

9. Композиция по любому из п. п. 1–8,

где указанный по меньшей мере один штамм бактерий содержит или альтернативно состоит из штамма *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708 и дополнительно штаммов *Lactobacillus paracasei* LPC-S01™ DSM 26760 или *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, и

где указанный по меньшей мере один экстракт по меньшей мере одного вида ягод содержит или альтернативно состоит из полифенольной фракции указанных ягод и представляет собой экстракт голубики или черники (*Vaccinium cyanococcus*, либо *Vaccinium myrtillus*, либо *Vaccinium angustifolium*) или альтернативно клюквы

обыкновенной или клюквы (*Vaccinium oxycoccos* или *Vaccinium macrocarpon*), содержащий или альтернативно состоящий из полифенольной фракции указанных ягод.

10. Композиция по любому из п. п. 1–9 для применения в качестве лекарственного средства.

11. Композиция по любому из п. п. 1–9 для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции провоспалительных цитокинов и/или увеличению продукции противовоспалительных цитокинов;

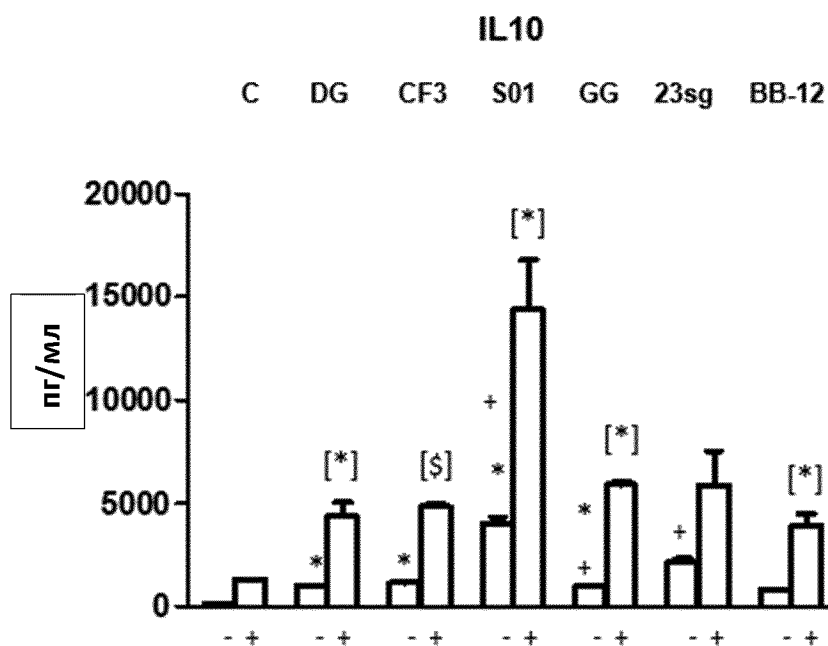
предпочтительно, где указанная композиция предназначена для применения в качестве иммуномодулирующего и/или иммуностимулирующего агента, способного к снижению продукции цитокинов IL12 и/или TNF- α и/или увеличению продукции цитокинов IL10.

12. Композиция для применения по п. 10 или 11, предназначенная для применения в качестве противовоспалительного агента.

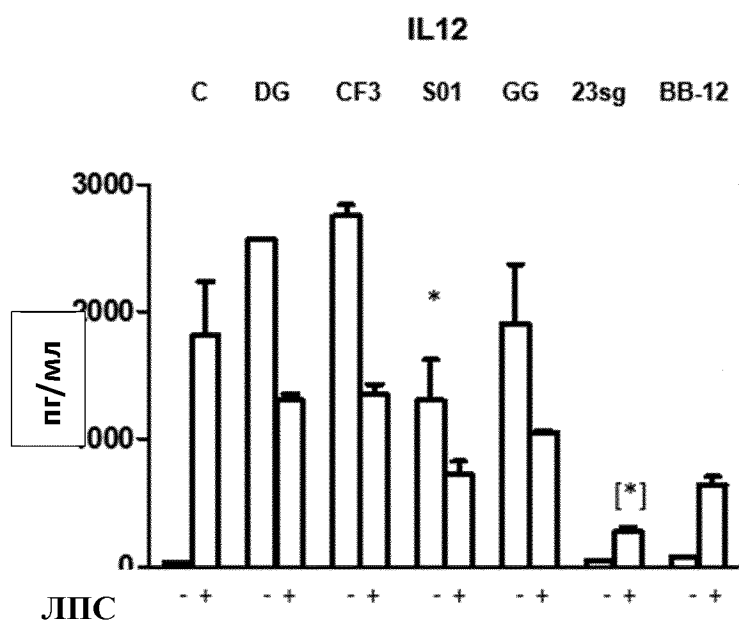
13. Композиция для применения по п. 12, предназначенная для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения воспалительных заболеваний, расстройств и/или симптомов желудочно-кишечного тракта, выбранных из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Helicobacter pylori*, пептической язвы или язвы желудка, язвы двенадцатиперстной кишки, хронических воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), болезни Крона, неспецифического язвенного колита, микроскопического колита, дивертикулеза и дивертикулита.

14. Композиция по любому из п. п. 1–9 для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения скелетно-мышечных воспалительных заболеваний, ревматологических заболеваний, воспалительных суставных и/или послеоперационных воспалительных заболеваний.

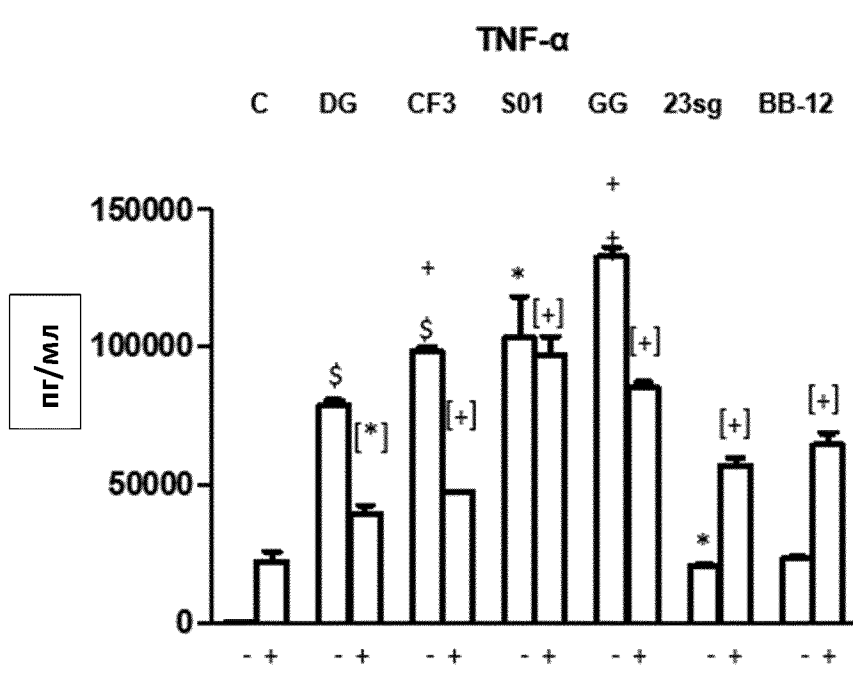
15. Композиция для применения по п. 14, предназначенная для применения в способе превентивного и/или излечивающего лечения остеоартрита, ревматоидного артрита и/или анкилозирующего спондилита; предпочтительно остеоартрита суставов и/или остеоартрита колена.



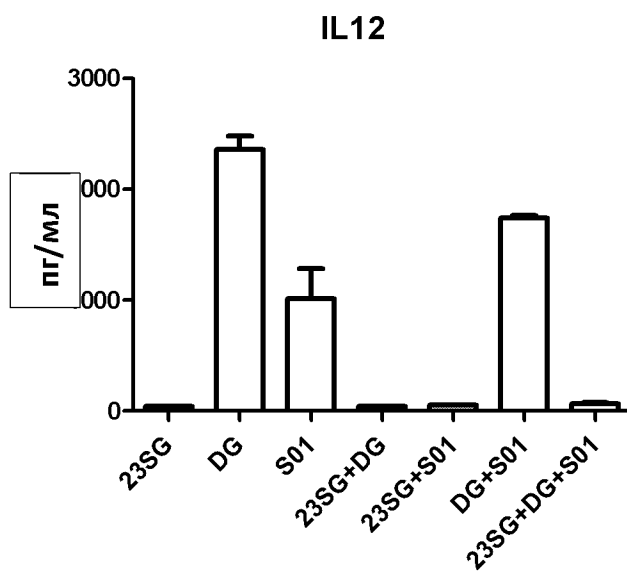
Фиг. 1a



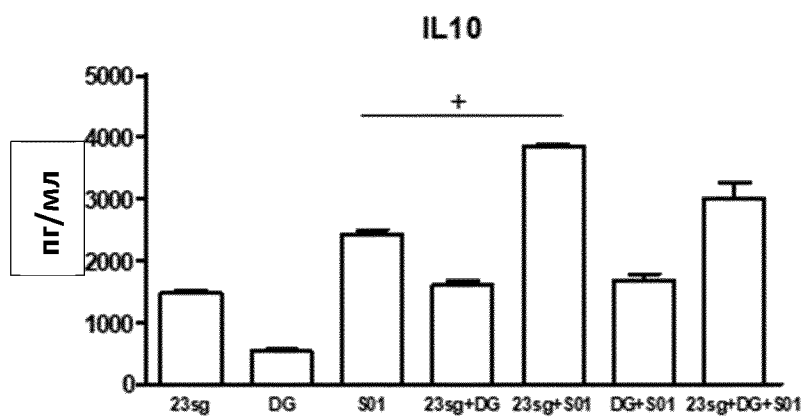
Фиг. 1b



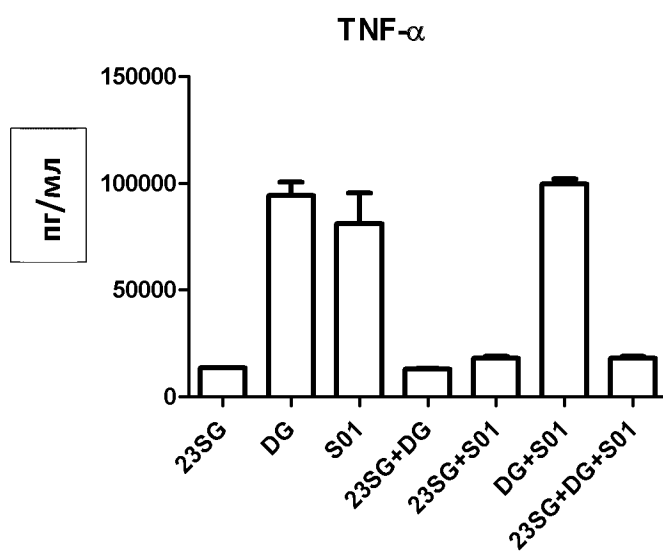
Фиг. 1с



Фиг. 2а



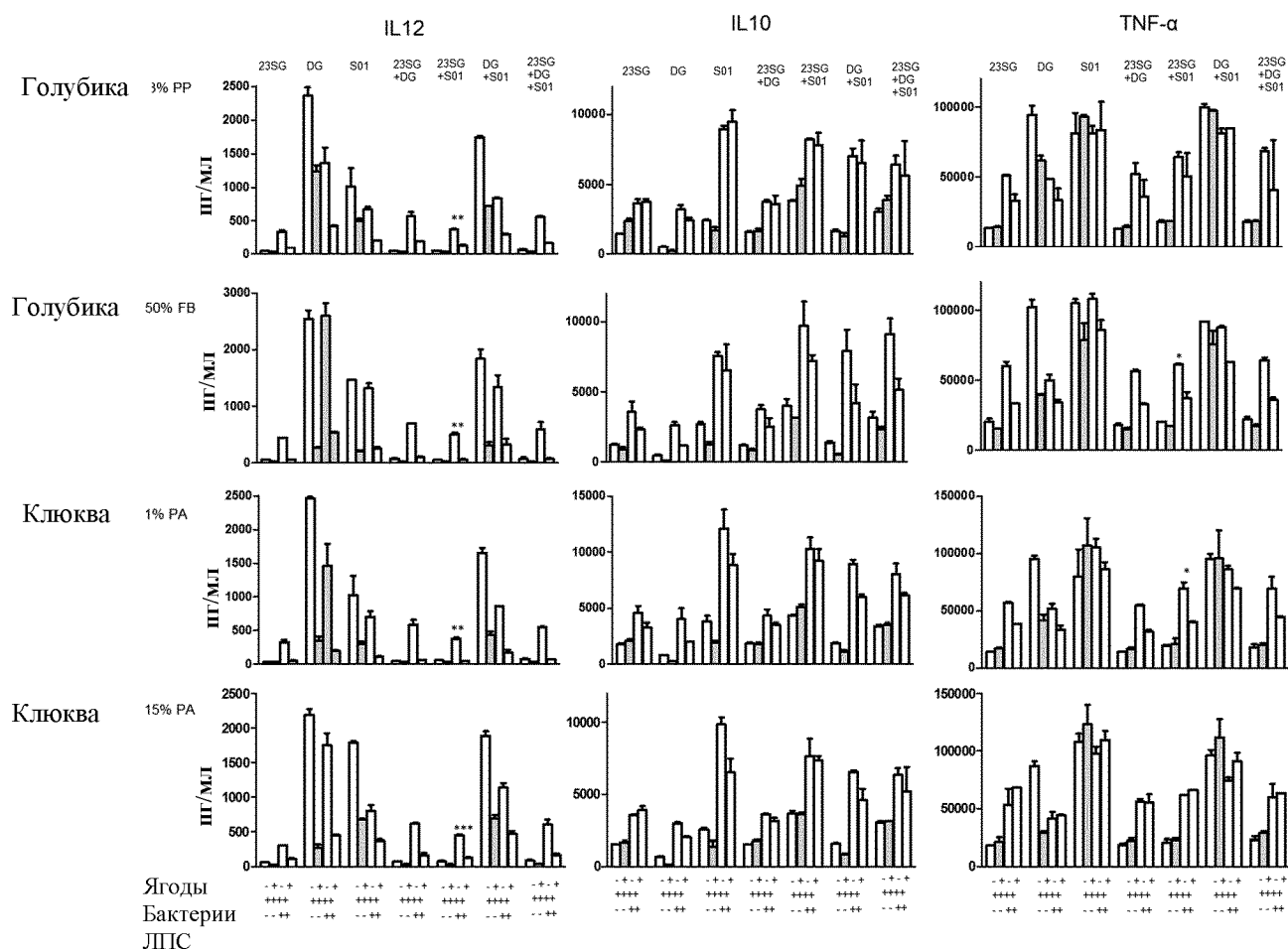
Фиг. 2b



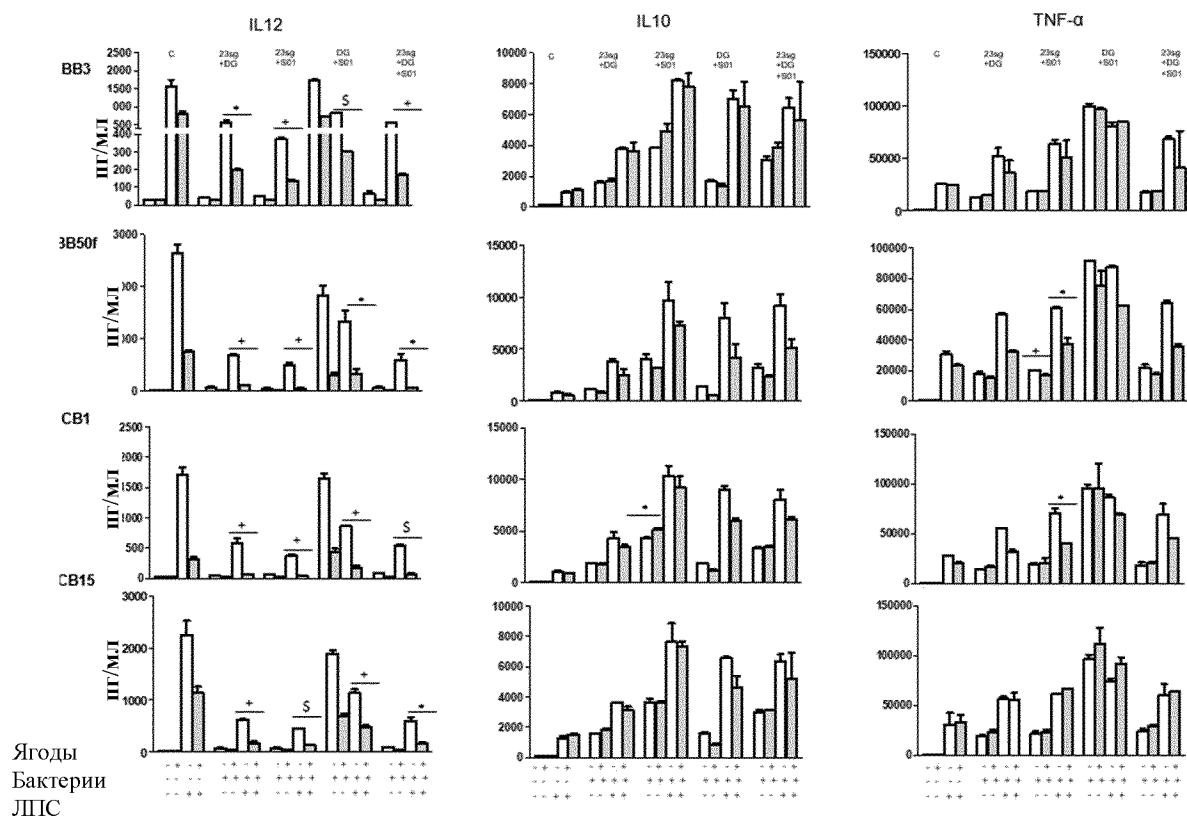
Фиг. 2с



ФИГ. 3



Фиг. 4



Фиг. 4а