

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292146** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.28

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(51) Int. Cl. *A61K 35/745* (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 3/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **ШТАММЫ БАКТЕРИЙ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D И СВЯЗАННЫХ С НИМ РАССТРОЙСТВ**

(31) **102020000006448**

(32) **2020.03.26**

(33) **IT**

(86) **PCT/IB2021/052523**

(87) **WO 2021/191855 2021.09.30**

(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., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к штаммам бактерий для применения в способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D и/или связанных с ними заболеваний, симптомов и/или расстройств. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим по меньшей мере один из указанных штаммов бактерий и по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 и/или витамин D2, и к их применению в способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D и/или связанных с ними заболеваний, симптомов и/или расстройств.

A1

202292146

202292146

A1

РСТ/IB2021/052523	МПК:	<i>A61K 35/745</i> (2015.01)	<i>A61P 9/00</i> (2006.01)
		<i>A61K 35/747</i> (2015.01)	<i>A61P 9/12</i> (2006.01)
		<i>A61P 3/02</i> (2006.01)	<i>A61P 25/00</i> (2006.01)
		<i>A61P 43/00</i> (2006.01)	<i>A61P 25/28</i> (2006.01)
		<i>A61P 3/04</i> (2006.01)	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
		<i>A61P 3/10</i> (2006.01)	

**ШТАММЫ БАКТЕРИЙ, ИХ КОМПОЗИЦИИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ
В СПОСОБАХ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА ВИТАМИНА D И
СВЯЗАННЫХ С НИМ РАССТРОЙСТВ**

Настоящее изобретение относится к штаммам бактерий для применения в способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболеваний, симптомов и/или расстройств, связанных с указанными дефицитом и/или недостаточностью витамина D. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим по меньшей мере один из указанных штаммов бактерий и по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 и/или витамин D2, и к их применению в способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D и/или связанных с ними заболеваний, симптомов и/или расстройств.

Витамин D представляет собой группу жирорастворимых прогормонов, состоящую из 5 различных витаминов: витамина D1, D2, D3, D4 и D5. Двумя важнейшими формами, в которых может находиться витамин D, являются витамин D2 и витамин D3, обе из которых обладают очень схожей биологической активностью. Помимо всасывания из пищи, витамин D вырабатывается на уровне кожи. Посредством этого механизма вырабатывается только витамин D3, но не витамин D2, который производится исключительно растениями и может потребляться человеком только с пищей. Действительно, холекальциферол (D3), образующийся из холестерина, синтезируется в организме животных, тогда как эргокальциферол (D2) имеет растительное происхождение.

При всасывании витамина D действуют процессы, аналогичные тем, которым подвергаются другие жирорастворимые витамины. Действительно, он встраивается внутрь мицелл, образующихся при контакте гидролизованных липидов с желчью; они поступают в кишечный эпителий, где встраиваются в хиломикроны, которые поступают в лимфообращение. Витамин D3 (холекальциферол), полученный в

результате воздействия солнечных лучей или с пищей, присутствует в пищевых продуктах и диетических добавках в биологически неактивной форме и может претерпевать две реакции гидроксирования, в результате которых он переходит в биологически активную форму кальцитриол (сокращенно $1,25(\text{OH})_2\text{D}$). В различных тканях холекальциферол претерпевает реакцию гидроксирования с образованием 25-гидроксихолекальциферола (сокращенно $25(\text{OH})_2\text{D}$), который проходит в общее кровообращение и связывается со специфичным белком-носителем (витамин D-связывающий белок, DBP). Форма $25(\text{OH})_2\text{D}$ является неактивным промежуточным соединением, для активации которого требуется последующее гидроксирование для осуществления его биологической функции. После достижения почек кальцифедиол ($25(\text{OH})_2\text{D}$) претерпевает реакцию гидроксирования, катализируемую ферментом $25(\text{OH})\text{D}$ -1 α -гидроксилазой, в которой образуется кальцитриол (1,25-дигидроксикальциферол, сокращенно $1,25(\text{OH})_2\text{D}$), который является активной формой витамина D₃.

Измерение сывороточной концентрации кальцифедиола ($25(\text{OH})_2\text{D}$) является инструментом диагностики для оценки состояния пациентов в отношении витамина D. Уровни витамина D₃ (форма $25(\text{OH})_2\text{D}$) в крови обычно выражают в наномоль (нмоль)/литр или нг/мл сыворотки крови. У человека состояния дефицита идентифицируют по значениям $25(\text{OH})_2\text{D}$ ниже 20 нг/мл сыворотки крови, при этом значения в диапазоне 20–30 в любом случае считают недостаточными.

Активная форма витамина D, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, является важным гормоном, регулирующим кальций в организме, и незаменима для поддержания гомеостаза кальция и костей. Она действует посредством связывания с рецептором витамина D (VDR), который относится к надсемейству ядерных рецепторов. Различные расстройства в результате нарушенной функции витамина D, в том числе дефицита витамина D, генетических дефектов витамин-D-активирующего фермента 25-гидроксивитамин D 1 α -гидролазы или рецептора витамина D (VDR), приводят к рахиту или остеомаляции, характеризующейся гипокальциемией, гипофосфатемией, вторичным гиперпаратиреозом и костными аномалиями в связи с нарушениями деминерализации. Кроме того, известно, что рецептор витамина D экспрессируется в тканях широкого спектра, не относящихся к метаболизму кальция и костей, и показано, что в результате этого витамин D модулирует *in-vitro* фундаментальные клеточные

процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и выживание различных клеточных линий.

В большинстве случаев активная форма $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ действует как «включатель», а неактивная форма $25(\text{OH})_2\text{D}$ — как «выключатель» системы контроля рецептора витамина D, хотя этот механизм прояснен еще не для всех тканей и органов, в которых присутствует рецептор витамина D. По всей видимости, активация ядерного рецептора витамина D (VDR) достигается посредством тонкого равновесия между концентрациями определенного числа эндогенных гормонов. Действительно, повышение или снижение продукции $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ в организме контролирует врожденный иммунный ответ. При воздействии повреждений и инфекций продукция $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ увеличивается, что, в свою очередь, приводит к образованию антимикробных пептидов и активации толл-подобного рецептора 2 (TLR2). Тем не менее, под действием некоторых механизмов обратной связи организм может ограничивать продукцию $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ до необходимого количества для надлежащей транскрипционной активации VDR. Достигая VDR, он транскрибирует ген фермента CYP24A1, который усиливает преобразование $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ в неактивные метаболиты. Активированный VDR также контролирует концентрацию $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ посредством ограничения транскрипции гена CYP27B1, который преобразует $25(\text{OH})_2\text{D}$ в $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

В результате дефицита витамина D организм подвергается повышенному риску развития остеопороза, сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета и злокачественного новообразования. Это состояние дефицита связано не только с недостатком витамина D в рационе, но и с дефицитом, связанным со снижением его всасывания. Например, такие виды терапии, которые вызывают снижение уровня холестерина в крови, могут приводить к снижению всасывания других стероидов и, следовательно, к снижению всасывания жирорастворимых витаминов, в том числе витамина D3.

Новейшие научные данные подтверждают важность витамина D и его правильного всасывания в поддержании гомеостаза кишечника и во взаимодействии между микробиотой и организмом-хозяином. Начальный состав кишечной микробиоты может оказывать значимое влияние на развитие иммунной системы. Изменения на раннем этапе этого процесса в момент динамических изменений в кишечнике младенца могут обладать долгосрочными эффектами для состояния здоровья. Неизвестно, влияет

ли и как влияет дефицит витамина D на состав кишечной микробиоты. С одной стороны, снижение потребления витамина D связано с различиями в составе фекальной микробиоты, но, с другой стороны, с учетом роли витамина D в развитии и функционировании T-регуляторных и дендритных клеток, состояние витамина D в организме-хозяине может модифицировать влияние кишечной микробиоты на иммунную систему. Таким образом, вновь появляющиеся данные позволяют предположить, что путь витамина D является потенциально важным модификатором влияния кишечной флоры на воспалительные расстройства. Например, у мышей, не имеющих рецептора витамина D (VDR), отмечается хроническое воспаление желудочно-кишечного тракта низкой степени. Кроме того, отсутствие VDR приводит к дополнительному воспалению в ответ на резидентную микробиоту, которая обычно не является патогенной. Также показано, что кишечный VDR может быть непосредственно вовлечен в подавление индуцируемой бактериями активации NF-κB. Колонизация бактериями-комменсалами оказывает влияние как на распределение, так и на экспрессию VDR в клетках кишечного эпителия, что позволяет предположить динамическое взаимодействие между бактериями и рецептором.

В настоящее время доступные виды терапии для лечения дефицита и/или недостаточности витамина D основаны главным образом на введении витамина D, предпочтительно витамина D₃ в форме холекальциферола, на потреблении пищевых продуктов, богатых витамином D, и на образе жизни, в частности физической активности и воздействии солнечных лучей. Тем не менее, вышеупомянутые виды терапии часто не позволяют эффективно и/или быстро устранить дефицит и/или недостаточность витамина D и обусловленные ими расстройства. Кроме того, показано, что виды терапии, направленные на снижение уровня холестерина в крови, могут также приводить к снижению всасывания других стероидов, таких как, например, жирорастворимые витамины, например витамины группы D.

Таким образом, сохраняется высокая потребность в обеспечении эффективного, полезного и обладающего преимуществами решения, обеспечивающего как можно большее сокращение латентного периода между введением препарата и эффектом (т. е. началом действия) для лечения дефицита и/или недостаточности витамина D и связанных с указанным дефицитом и/или недостаточностью/обусловленных ими расстройств у нуждающегося в этом субъекта и тем самым обеспечивающего новые терапевтические подходы, которые увеличивают всасывание в кровь и/или

биодоступность витамина D, в частности витамина D3 и/или витамина D2 у указанных субъектов. В частности, ощущается потребность в обеспечении эффективного, полезного и обладающего преимуществами решения для лечения дефицита и/или недостаточности витамина D у субъектов с проблемами всасывания стероидов, таких как, например, субъекты, получающие терапию для снижения уровней холестерина в крови. Наконец, также возникает потребность в терапевтических подходах, повышающих всасывание в кровь и/или биодоступность витамина D, в частности витамина D3 и/или витамина D2, которые не приводят к повышению уровня холестерина в крови.

В тематической статье Mitchell L. Jones et al (J. Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 98, no. 7, 1 July 2013) описано применение штамма-пробиотика *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 для повышения уровней 25-гидроксивитамина D (D3), при этом применение штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, не описано.

В результате интенсивной деятельности автора изобретения по исследованию и разработке, направленной на вышеупомянутые потребности, ему удалось разрешить их посредством обеспечения специфических изолированных штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei* (классификация изменена на *Lacticaseibacillus paracasei*), способных эффективно и/или с минимальным и сокращенным началом действия повышать всасывание в кровь и/или биодоступность витамина D, в частности витамина D3 и/или витамина D2 у нуждающихся в этом субъектов. Кроме того, благодаря вышеупомянутым специфическим изолированным штаммам бактерий автор изобретения разработал и усовершенствовал композиции, включающие в себя смесь, содержащую или альтернативно включающую в свой состав по меньшей мере один из указанных штаммов бактерий и по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 и/или витамин D2, как представлено в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения.

Преимущество вышеупомянутых специфических изолированных штаммов бактерий, предпочтительно штаммов бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus paracasei*, и композиций, включающих их в свой состав, которые являются предметом настоящего изобретения, состоит в том, что они не обладают значимыми побочными эффектами, и поэтому их можно вводить всем субъектам, в частности также субъектам педиатрической категории, пожилым людям, субъектам с гиперхолестеринемией и

беременным женщинам.

Наконец, композиции по изобретению эффективны, просты в приготовлении и экономически эффективны.

Эти и другие цели, которые будут очевидны на основании следующего ниже подробного описания и прилагаемой формулы изобретения, были достигнуты благодаря изолированным штаммам бактерий, предпочтительно штаммам бактерий, относящимся к виду *Lactobacillus paracasei*, смесям и композициям, включающим в свой состав указанные изолированные штаммы бактерий, являющиеся предметом настоящего изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 представляет собой схему количественного определения сывороточных уровней витамина D3 в виде распределения данных (панель А) и в виде среднего значения количественного определения каждой оцениваемой группы (панель В), выполненного в исследовании *in vivo*, представленном в экспериментальной части (А.2).

Фиг. 1-бис представляет собой схему количественного определения сывороточных уровней витамина D3 в исследовании *in vivo*, представленном в экспериментальной части (А.2). Статистические данные основаны на непарном t-критерии Стьюдента (****, P <0,0001; ***, P <0,001; **, P <0,01; *, P <0,05).

Фиг. 2: уровни экспрессии рецептора витамина D в слизистой оболочке подвздошной кишки для витамина D, измеренного в исследовании *in vivo*, представленном в экспериментальной части (А.2).

Фиг. 3 представляет собой схематическое изображение дизайна клинического исследования (экспериментальная часть(В)).

Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение свойств эмульгирования витамина D (холекальциферола) со штаммами бактерий-пробиотиков, относящихся к роду *Lactobacillus*, представленных *in vitro* в экспериментальной части (А.1).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Используемое в настоящем документе выражение «биодоступность» используется для указания введенного количества молекулы (например, витамина D), которое достигает системы кровообращения (уровни в крови или в сыворотке крови) в немодифицированном и/или модифицированном виде.

В контексте настоящего изобретения выражение «витамин D» используется для

указания всех видов витаминов группы D, таких как витамин D1, D2, D3, D4 и D5; предпочтительно витамина D2 и/или витамина D3, более предпочтительно витамина D3.

Выражение «витамин D2» используется для указания всех изоформ витамина D2, в том числе эргокальциферола (синоним: (3 β ,5Z,7E,22E)-9,10-секоэргоста-5,7,10(19),22-тетраен-3-ол) и эргостерина (биологический предшественник эргокальциферола при условии, что эргокальциферол переходит в эргокальциферол под действием ультрафиолетового света); предпочтительно витамин D2, который вводят субъекту, представляет собой витамин D2 в форме эргокальциферола.

Выражение «витамин D3» используется для указания витамина D3 во всех его изоформах, в том числе холекальциферола (синоним: холекальциферол или витамин D3), кальцифедиола (синоним: кальцидиол, 25-гидроксихолекальциферол или 25-гидроксивитамин D, сокращенно 25(OH)₂D), кальцитриола (синоним: 1 α ,25-дигидроксихолекальциферол или 1 α ,25-дигидроксивитамин D, сокращенно 1,25(OH)₂D) и 7-дегидрохолестерин (биологический предшественник холекальциферола при условии, что 7-дегидрохолестерин переходит в холекальциферол при воздействии ультрафиолетового излучения); предпочтительно витамин D3, который вводят субъекту, представляет собой витамин D3 в форме холекальциферола.

Используемое в настоящем документе выражение «международная единица» (МЕ) используется для указания единицы измерения количества вещества, которое вызывает определенный биологический эффект, признанный на международном уровне.

В контексте настоящего изобретения термин «субъект/ы» используется для указания субъектов-людей или животных, предпочтительно млекопитающих (например, домашних животных, таких как собаки, кошки, лошади, овцы или коровы). Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для применения в способах лечения субъектов-людей.

Выражение «терапевтически эффективное количество» используется для указания количества смеси, либо соединения, либо лекарственной формы, либо штамма бактерий, вызывающее биологический ответ или ответ на лекарственное средство в ткани, системе или у субъекта, которое находит и определяет специалист в данной области техники.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объект настоящего изобретения образует (I) изолированный штамм бактерий или его производное, относящийся к виду, входящему в род *Lactobacillus*, для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D2 и/или витамина D3, более предпочтительно витамина D3, у нуждающегося в этом субъекта (сокращенно штамм/ы для применения по изобретению или (I)), где указанный вид выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefirifaciens*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplanarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* и *Lactobacillus sanfranciscensis*; предпочтительно относящийся к виду, выбранному из группы, содержащей или состоящей из: *Lactobacillus paracasei* и *Lactobacillus plantarum*; еще более предпочтительно *Lactobacillus paracasei*.

Как сообщается в статье Zheng et al. Int. (J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020), классификация вида, относящегося к роду *Lactobacillus*, была изменена, например, классификация вида *paracasei* была изменена на *Lacticaseibacillus paracasei*, а вида *Lacticobacillus plantarum* — на *Lactiplantibacillus plantarum*.

В контексте настоящего описания, названия вида штаммов бактерий, относящегося к роду *Lactobacillus*, до упомянутого выше изменения классификации являются эквивалентными и используются взаимозаменяемо с названиями, идентифицирующими указанный вид после изменения классификации. Например, термины *Lacticobacillus paracasei* и *Lacticaseibacillus paracasei*, или *Lacticobacillus plantarum* и *Lactiplantibacillus palantarum* взаимно эквивалентны и используются взаимозаменяемо.

Объект настоящего изобретения образует (I) изолированный штамм бактерий или его производное, относящийся к виду, входящему в род *Bifidobacterium*, для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D2 и/или витамина D3, более предпочтительно витамина D3, у нуждающегося в этом субъекта (сокращенно штамм/ы для применения по изобретению или (I)), где указанный вид выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium asteroides*, *Bifidobacterium boum*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium coryneforme*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium denticolens*, *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium gallicum*, *Bifidobacterium gallinarum*, *Bifidobacterium indicum*, *Bifidobacterium inopinatum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium magnum*, *Bifidobacterium merycicum*, *Bifidobacterium minimum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium pullorum*, *Bifidobacterium ruminantium*, *Bifidobacterium saeculare*, *Bifidobacterium subtile*, *Bifidobacterium thermacidophilum*, *Bifidobacterium thermophilum* и *Bifidobacterium tsurumiense*; предпочтительно относящийся к виду, выбранному из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* и *Bifidobacterium bifidum*; еще более предпочтительно *Bifidobacterium bifidum*.

В частности, объект настоящего изобретения образует (I) изолированный штамм бактерий или его производное, относящийся к виду, выбранному из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, и их смесь (предпочтительно вид *Lactobacillus paracasei*), для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D2 и/или витамина D3, более предпочтительно витамина D3, у нуждающегося в этом субъекта (сокращенно штамм/ы для применения по изобретению или (I)).

Термин «изолированный штамм бактерий» используется для указания штамма бактерий, изолированного в соответствии со стандартными методами и оборудованием, известными специалистам в данной области техники.

В предпочтительном воплощении изобретения указанный (I) штамм бактерий по изобретению или его производное для применения в указанном способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D выбран из группы, содержащей по меньшей мере:

- (I.i) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] (товарный знак, зарегистрированный компанией SOFAR S.p.A.) и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 5 мая 1995 г. компанией SOFAR S.p.A. (сокращенно DG[®], или *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572, или (I.i)); указанный штамм первоначально был назван *Lactobacillus casei* DG[®] подв. *casei*; впоследствии его классификация была изменена на *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572: следует отметить, что он все еще и исключительно представляет собой тот же самый штамм бактерий независимо от названия *Lactobacillus casei* DG[®] или *Lactobacillus paracasei* DG[®];

- (I.ii) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] и депонированный в немецкой коллекции микроорганизмов (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)) под депозитарным номером DSM 26760 11 января 2013 г. (дата подачи заявления в DSMZ 20 ноября 2012 г.; дата подачи заявления на преобразование указанного оригинального депозита в депозит согласно Будапештскому договору 15 мая 2017 г.) компанией SOFAR S.p.A. (сокращенно LPC-S01[®], или *L. paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760, или (I.ii));

- (I.iii) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A),

- (I.iv) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под

депозитарным номером DSM 33232 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A),

- (I.v) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* B1BS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- (I.vi) изолированный штамм бактерий, относящихся к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234 (депонирован 31 июля 2019 г. компанией Sofar S.p.A.),

- (I.vii) изолированный штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708 (депонирован 4 декабря 2017 г. компанией Sofar S.p.A), и их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

В предпочтительном воплощении изобретения указанный (I) штамм бактерий по изобретению или его производное для применения в указанном способе лечения дефицита и/или недостаточности витамина D выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из: (I.i) штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572, (I.ii) штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760 и их смеси; предпочтительно (I.i) штамма *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

Все штаммы бактерий, упоминаемые в настоящем изобретении, были депонированы согласно условиям, соответствующим условиям Будапештского договора. Сторона, депонирующая штаммы бактерий, описанные и/или заявленные в настоящей заявке на патент, и их правообладатель выражают свое согласие на предоставление доступа ко всем вышеуказанным штаммам в течение всего срока действия патента.

Преимуществом обладает введение указанного штамма бактерий или его производного для применения в соответствии с настоящим изобретением (даже рассматриваемого по отдельности) (I.i–I.vii, предпочтительно I.i и/или I.ii) в

концентрации (или количестве), находящейся в диапазоне от 1×10^6 КОЕ/г или мл до 1×10^{12} КОЕ/г или мл в расчете на суточную дозу, предпочтительно от 1×10^8 КОЕ/г или мл до 1×10^{10} КОЕ/г или мл, более предпочтительно в концентрации, составляющей от около 1×10^9 КОЕ/г или мл до около 10×10^9 КОЕ/г или мл (произвольная единица флуоресценции/г или мл) (КОЕ: колониеобразующая единица).

В одном воплощении указанный штамм бактерий по изобретению (I.i–I.vii) или его производное, предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), способствует всасыванию, предпочтительно на уровне кишечника, и/или повышает биодоступность уровней витамина D в сыворотке крови (например, измеряемую как уровень витамина D3 в форме 25(OH)₂D) при введении субъекту, независимо от того, вводят ли этому субъекту также один или более витаминов группы D.

В предпочтительном воплощении указанный штамм бактерий по изобретению (I.i–I.vii) или его производное, предпочтительно I.i и/или I.ii, способствует всасыванию, предпочтительно на уровне кишечника, и/или повышает биодоступность уровней витамина D в сыворотке крови (например, измеряемую как уровень витамина D3 в форме 25(OH)₂D) при введении в сочетании/комбинации с витамином D, предпочтительно с витамином D3 и/или витамином D2, более предпочтительно с витамином D3 (холекальциферолом), где указанное введение указанного по меньшей мере одного штамма бактерий по изобретению (I) и витамина D (II) осуществляется одновременно или с задержкой по времени, предпочтительно одновременно в течение периода времени.

В контексте настоящего изобретения введение «одновременно в течение периода времени» (I) и (II) означает, что (I) и (II) вводят нуждающемуся в этом субъекту предпочтительно в один и тот же период времени в течение дня, в одной композиции или посредством двух отдельных композиций, либо с интервалом периода времени, находящимся в диапазоне от 5 минут до 60 минут.

В контексте настоящего изобретения введение «с задержкой по времени» (I) и (II) означает, что (I) и (II) вводят нуждающемуся в этом субъекту через интервал времени между ними посредством двух отдельных композиций, например, с интервалом периода времени, находящимся в диапазоне от 1 часа до 24 часов или от 2 дней до 14 или 30 дней. Например, указанный штамм бактерий (I) можно вводить ежедневно, при этом указанный по меньшей мере один витамин D (II) можно вводить 1 или 2 раза в неделю, или 1 раз в 2 недели, или 1 раз в месяц.

Объект изобретения образует композиция (сокращенно композиция по изобретению), содержащая смесь М (сокращенно смесь М по изобретению), содержащая или альтернативно состоящая из:

- (I) по меньшей мере одного штамма бактерий, относящегося к виду, выбранному из *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum* и их смеси (предпочтительно вид *Lactobacillus paracasei*), предпочтительно выбранный из группы штаммов бактерий, содержащей или альтернативно состоящей из:

- (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производного,
- (I.ii) *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] CNCM 26760 или его производного,
- (I.iii) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231 или его производного,
- (I.iv) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232 или его производного,
- (I.v) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233 или его производного,
- (I.vi) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234 или его производного,
- (I.vii) *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbIBS01 или его производного, и их смесь; и

- (II) по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), более предпочтительно витамин D3;

и возможно указанная композиция содержит по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент пищевого или фармакологического класса.

Ниже приведены дополнительные примеры воплощения композиции по изобретению в зависимости от изменения смеси М.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производное; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760 или его производное; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и (I.ii) штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или их производные; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производное или дополнительно смесь штаммов бактерий, содержащую (I.iii) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, (I.iv) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, (I.v) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* B1IBS01 DSM 33233, (I.vi) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и возможно (I.vii) *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 или их производные; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производное и (I.ii) *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или его производное и дополнительно смесь штаммов бактерий, содержащую (I.iii) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, (I.iv) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, (I.v) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* B1IBS01 DSM 33233, (I.vi) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234 и возможно (I.vii) *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 или их производные; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь М по изобретению может содержать:

- (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производное и дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий (или его производное), выбранный из: (I.iii) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, (I.iv) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, (I.v) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, (I.vi) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, (I.vii) *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 и их смеси; и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Указанная смесь M по изобретению может содержать:

- (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 или его производное и (I.ii) *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 или его производное и дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий (или его производное), выбранный из: (I.iii) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, (I.iv) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, (I.v) *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, (I.vi) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, (I.vii) *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 DSM 32708 и их смеси (или их производные); и

- (II) по меньшей мере один витамин D или D3, предпочтительно в форме холекальциферола;

или, альтернативно, состоять из них.

Преимущество состоит в том, что в указанной композиции по изобретению (I) и (II) и возможно добавки, предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, указанный по меньшей мере один штамм бактерий, предпочтительно вида *Lactobacillus paracasei*, присутствуют в концентрации, составляющей от 1×10^6 КОЕ/г или мл до 1×10^{12} КОЕ/г или мл композиции (количество относится к каждому штамму бактерий, присутствующему в композиции); предпочтительно в концентрации, составляющей от 1×10^8 КОЕ/г или мл до 1×10^{10} КОЕ/г или мл композиции, более предпочтительно в концентрации от около 1×10^9 КОЕ/г или мл (или ПЕФ/г или мл) композиции (КОЕ: колониеобразующая единица). Композиции в соответствии с настоящим изобретением могут содержать либо два, либо три, либо четыре, либо пять, либо шесть, либо семь различных штаммов бактерий в соответствии с настоящим изобретением (таких как, например, штаммы (I.i), (I.ii), (I.iii), (I.iv), (I.v), (I.vi) и (I.vii)); предпочтительно указанные штаммы бактерий содержатся в композиции по настоящему изобретению в

соотношении КОЕ около 1:1, 1:1:1, 1:1:1:1, 1:1:1:1:1, 1:1:1:1:1:1 или 1:1:1:1:1:1:1.

Преимущество состоит в том, что в указанной композиции по изобретению, содержащей (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D₃, указанный витамин D (II) присутствует в количестве, находящемся в диапазоне от 40 МЕ до $1,5 \times 10^6$ МЕ, предпочтительно от 500 МЕ до 1×10^6 МЕ, более предпочтительно от 1000 МЕ до 1×10^5 МЕ или от 1000 МЕ до 3000 МЕ, например, около 1600–2000 МЕ.

Указанное количество витамина D выражают в «МЕ», то есть в международных единицах, 1 МЕ витамина D равна 0,025 мкг и, таким образом, 1 мкг равен 40 МЕ.

Предпочтительно указанные (I) штаммы бактерий по настоящему изобретению (I.i–I.vii) или их производные, и то и другое «как таковое» или «как есть», и содержащиеся в композиции по изобретению, предпочтительно (I.i) и (I.ii), представляют собой жизнеспособные штаммы бактерий (пробиотики), такие как, например, жизнеспособные штаммы бактерий, присутствующие в продуктах пробиотиков или в живых биотерапевтических продуктах (сокращенно LBP, от англ. Live Biotherapeutic Products, такие как фармацевтические продукты, содержащие жизнеспособные штаммы бактерий).

«Пробиотики» определяют как живые микроорганизмы (т.е. штаммы бактерий), которые при введении в надлежащих количествах приносят пользу здоровью организма-хозяина (определение ФАО или ВОЗ).

В контексте настоящего изобретения выражение «производное» штамма бактерий по настоящему изобретению используется для указания на тиндализованный или инактивированный штамм бактерий, либо лизаты или экстракты штамма бактерий (парапробиотики), либо любое производное и/или компонент штамма бактерий, предпочтительно экзополисахарид, пристеночную фракцию, метаболиты или биопродукты метаболизма, образуемые штаммом бактерий (постбиотики), и/или любой продукт, полученный из штамма бактерий. Предпочтительно выражение «производное» штаммов бактерий по настоящему изобретению используется для указания на тиндализованный или инактивированный штамм бактерий.

Иными словами, выражение «производное» жизнеспособного штамма-пробиотика бактерий в контексте настоящего изобретения по существу используется для указания на парапробиотик или постбиотик.

В контексте настоящего изобретения выражение «парапробиотики» (Taverniti et al., The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept), *Genes Nutr* (2011) 6:261-274) используется для указания клеток бактерий (интактных или разрушенных) или неочищенных клеточных экстрактов, которые при введении (посредством перорального или местного пути) в надлежащем количестве приносят пользу здоровью организма-хозяина (аналогично жизнеспособным и культивируемым штаммам бактерий, из которых они получены). Примерами парапробиотиков являются штаммы бактерий, инактивированные нагреванием (например, тиндализованные штаммы бактерий), соникацией (ультразвуком), или лизаты штаммов бактерий, или экстракты штаммов бактерий.

В контексте настоящего изобретения термин «постбиотики» используется для указания на любое вещество, высвобождаемое или продуцируемое посредством метаболической активности жизнеспособного штамма-пробиотика бактерий, где указанные постбиотики при введении (посредством перорального или местного пути) в надлежащем количестве приносят пользу здоровью организма-хозяина (подобно жизнеспособному и культивируемому штамму бактерий, из которого они получены). Примерами постбиотиков являются экзополисахариды, пристеночные фракции, метаболиты или биопродукты метаболизма.

Композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М, содержащая или альтернативно состоящая из (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, дополнительно возможно содержит указанные по меньшей мере одну добавку и/или по меньшей мере один эксципиент фармацевтического или пищевого класса, т.е. вещество, не обладающее терапевтической активностью, подходящее для фармацевтического или пищевого применения. В контексте настоящего изобретения добавки и/или эксципиенты, приемлемые для фармацевтического или пищевого применения, содержат все вспомогательные вещества, известные специалистам в данной области техники для приготовления композиций в твердой, мягкой или жидкой форме, такие как, например, разбавители, растворители (в том числе вода, глицерин, этиловый спирт), солюбилизаторы, подкислители, загустители, подсластители, агенты, усиливающие вкус и аромат, красящие вещества, вещества, придающие сладость, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества (ПАВ), консерванты, стабилизаторы, рН-стабилизирующие буферные растворы и их смеси, например

лимонную кислоту, калия сорбат и/или натрия бензоат.

В соответствии с одним аспектом, помимо указанной смеси М по изобретению, содержащей (I) и (II), композиция по настоящему изобретению может содержать по меньшей мере один дополнительный активный компонент, выбранный из группы, содержащей или альтернативно состоящей из других жизнеспособных штаммов и/или парапробиотиков и/или постбиотиков и/или лизированных и/или тиндализированных и/или инактивированных штаммов бактерий, ферментов, веществ прямого или непрямого антацидного действия, пребиотиков, пробиотиков, относящиеся к семействам дрожжей и бактерий, иммуностимуляторов, противовоспалительных веществ, антидиарейных веществ, нутриентов, витаминов, предпочтительно группы А, В, С, Е, органических и/или неорганических солей магния, натрия, калия, хлора, селена, цинка, мелатонина, растительных экстрактов (лекарственные составы на основе растительного сырья), таких как, например, валериана, пассифлора, мята лимонная, боярышник, ромашка и хмель, антиоксиданты, такие как, например, глутатион, полифенолы, такие как ресвератрол и транс-ресвератрол, коэнзим Q10, астаксантин, ликопин, антирадикальных агентов, веществ, действующих на кишечную проницаемость, ПЭА (пальмитоилэтаноламид), вещества, действующие на целостность мембраны, глюкозаминогликаны (такие как предпочтительно гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат), коллаген.

Например, композиция по изобретению содержит указанную смесь М, содержащую или альтернативно состоящую из (I) и (II) и возможно добавки, например (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, могут дополнительно содержать по меньшей мере один пребиотик, предпочтительно выбранный из: инулина, фруктоолигосахаридов (FOS), галактоолигосахаридов (GOS) и их смеси.

Объект изобретения образует указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II) в соответствии с любым воплощением настоящего изобретения, предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, для применения в качестве лекарственного средства.

Объект изобретения образует указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II) в соответствии с любым воплощением настоящего изобретения, предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, для применения в профилактическом и/или радикального лечения дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства,

связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D2 и/или витамина D3, более предпочтительно витамина D3.

В контексте настоящего изобретения повышение всасывания и/или биодоступности витамина D используется для указания на повышение уровней витамина D в крови (или в сыворотке крови) у субъекта после введения штаммов бактерий для применения по изобретению или композиции по изобретению.

Предпочтительно в контексте настоящего изобретения всасывания и/или биодоступность витамина D оценивают в виде уровней витамина D3 в крови, в частности витамина D3 в форме 25(OH)₂D.

Оценка уровней витамина D3 в крови в форме 25(OH)₂D на настоящий момент является самым точным методом определения запаса витамина D в организме. Уровни витамина D3 в крови обычно выражают в ммоль/литр или нг/мл, например в нг витамина D3 в форме 25(OH)₂D на мл сыворотки крови. Уровни витамина D в крови оценивают с помощью методов анализа и оборудования, известных квалифицированным специалистам в данной области техники. Например, указанные методы анализа представляют собой не прямые или прямые методы. Непрямыми методами являются, например, иммунохимические или иммуноферментные методы, такие как ИФА (иммуносорбентный ферментный анализ) и радиоиммунологический анализ (РИА). Непрямыми методами являются, например, методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или масс-спектрометрии, такие как, например, жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ЖХ-МС), жидкостная хроматография, сопряженная с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), и газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией (ГХ-МС).

Предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением значения 25(OH)₂D в крови здорового человека предпочтительно составляют от 30 нг/мл до 80 нг/мл, тогда как у человека с недостаточными значениями 25(OH)₂D в крови они ниже 30 нг/мл, предпочтительно составляют от 10 до 30 нг/мл, при этом у человека с дефицитом 25(OH)₂D эти значения ниже 10 нг/мл (нг витамина D3 в форме 25(OH)₂D на мл сыворотки крови).

В одном воплощении указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), и/или указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, позволяет лечить заболевания, симптомы и/или

расстройства, связанные с дефицитом и/или недостаточностью витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, выбранные из: рахита, переломов костей, деформации костей, остеопороза, остеомалации, боли в костях, боли в суставах, ломкости костей, гипокальциемии, гипофосфатемии, костных аномалий в связи с нарушениями деминерализации.

В одном воплощении указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), и/или указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, позволяет лечить заболевания, симптомы и/или расстройства, связанные с дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, выбранные из: мышечной слабости, затруднения концентрации внимания, рецидивирующей повышенной утомляемости, когнитивных расстройств, психологических и эмоциональных расстройств, вторичного гиперпаратиреоза, потливости рук.

В одном воплощении указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), и/или указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, позволяет лечить заболевания, симптомы и/или расстройства, связанные с дефицитом и/или недостаточностью витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, выбранные из: сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, внезапной сердечной смерти, инсульта, фибрилляции предсердий и болезни периферических сосудов; ожирения, инсулинорезистентности, гипертензии и сахарного диабета; сахарного диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, гипертензии, нарушения функции почек, острого и/или хронического воспаления желудочно-кишечного тракта, изменений иммунной системы, рака (предпочтительно рака ободочной кишки, рака молочной железы, рака кожи, рака легкого и рака предстательной железы), аутоиммунных заболеваний, сезонной депрессии и других расстройств психики, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза, инфекций и/или воспалений дыхательной системы (например, вызванных коронавирусом).

Низкие уровни витамина D связаны с повышением уровней воспалительных цитокинов и значимо повышенного риска пневмонии и вирусных инфекций верхних дыхательных путей. Дефицит витамина D связан с повышением вероятности

тромботических эпизодов, которые часто наблюдаются при инфекциях SARS-CoV-2 (заболевание COVID-19).

Указанные (I) штаммы бактерий по настоящему изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) и (I.ii), и указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II), предпочтительно содержащая (i.i) и/или (I.ii) и/или витамин D3, предназначены для применения, как определено в настоящем изобретении:

- у субъектов с дефицитом и/или недостаточностью витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, или

- у субъектов педиатрической категории (от около 0 лет до 3 лет и/или от 3 лет до 12 лет), предпочтительно у субъектов педиатрической категории с дефицитом и/или недостаточностью витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, или

- у беременных субъектов, предпочтительно у беременных субъектов с дефицитом и/или недостаточностью витамина D, предпочтительно витамина D3 и/или D2, или

- у субъектов, получающих терапию, которая может привести к снижению всасывания жирорастворимых витаминов, таких как витамин D, предпочтительно витамин D3 и/или витамин D2, более предпочтительно витамин D3, таких как, например, субъекты, получающие терапию для снижения уровня холестерина в крови, приводящую к снижению всасывания стероидов, в том числе жирорастворимых витаминов, таких как витамин D.

Указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению и/или указанные композиции по изобретению, содержащие (I) и (II), можно готовить в твердой лекарственной форме, такой как таблетки, жевательные таблетки, капсулы, лепешки, гранулы, гранулы, растворимые в полости рта, пастилки, хлопья или порошок, пакетики-саше, батончики, в мягкой форме, такой как мягкий гель, крем, или в жидкой форме, такой как раствор, суспензия, дисперсия, эмульсия или сироп, или в виде пищевого продукта, такого как йогурт, сыр, фруктовый сок.

Указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению и/или указанные композиции по изобретению, содержащие (I) и (II), можно готовить в лекарственных формах для перорального (или гастроэнтерального), подъязычного (или трансбуккального), трансмукозального, ректального, кожного, ингаляционного (либо интраназального, либо перорального), парентерального применения (или введения), преимущество имеет лекарственная форма для перорального применения.

Композиция по изобретению, содержащая указанную смесь М, содержащую или альтернативно включающую в свой состав (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D₃, может представлять собой фармацевтическую композицию (или живые биотерапевтические продукты), композицию для медицинского изделия, композицию диетической добавки, пищевого продукта, или нового пищевого продукта, или пробиотика, пищевого продукта для специальных медицинских целей или косметическую композицию, например, для нанесения на кожу.

В контексте настоящего изобретения выражение «медицинское изделие» используется в значении, соответствующем Итальянскому Законодательному Декрету № 46 от 24 февраля 1997 г. или соответствующем Регламенту ЕС о новых медицинских изделиях (EU) 2017/745 (Европейский регламент о медицинских изделиях).

Указанный (I) штамм бактерий для применения по изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), или указанная композиция по изобретению, содержащая (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D₃, дополнительно могут быть предназначены для применения в качестве лекарственного средства для вспомогательной терапии дополнительных терапевтических подходов, предпочтительно фармакологического или пищевого типа, нацеленных на лечение дефицита витамина D, предпочтительно витамина D₃ и/или D₂, и связанных с ним заболеваний, симптомов и/или расстройств.

Объект настоящего изобретения образует способ профилактического или радикального лечения дефицита и/или недостаточности витамина D, предпочтительно витамина D₃ и/или D₂, и связанных с ним заболеваний, симптомов и/или расстройств, который обеспечивает введение максимального лечебного количества (или терапевтически эффективного количества в соответствии со знаниями врача) по меньшей мере одного штамма по настоящему изобретению (I.i–I.vii), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii), или композиции по изобретению, содержащей (I) и (II), предпочтительно (I.i) и/или (I.ii) и/или витамин D₃, нуждающемуся в этом субъекту.

В целях уточнения, для достижения цели настоящего изобретения компоненты (или активные компоненты) (I) и (II) смеси (M) по изобретению, такие как по меньшей мере один штамм бактерий (I), можно также вводить одновременно или по отдельности (предпочтительно в рамках временного интервала в диапазоне от 5 минут до 60 минут) и в любом порядке; предпочтительно (I) и (II) вводят субъекту одновременно, даже более предпочтительно в одной композиции, чтобы получить более быстрый эффект, а

также для простоты применения. При введении компонентов (I) и (II) смеси (M) по изобретению в виде одной композиции, указанная одна композиция соответствует композиции по настоящему изобретению.

Если не указано иное, выражение «композиция, или смесь, или другое, содержащее компонент в количестве, «включенном в диапазон от x до y» используется для указания на то, что указанный компонент может присутствовать в композиции, или смеси, или другого во всех количествах, присутствующих в указанном диапазоне, даже если оно не указано, включая крайние значения диапазона.

Как проиллюстрировано в экспериментальной части, введение субъекту витамина D и штамма бактерий по изобретению (I.i–I.vii или их производные), предпочтительно (I.i) *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или (I.ii) *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, такого как штаммы бактерий, относящиеся к виду *Lactobacillus paracasei*, повышает уровни витамина D в сыворотке крови указанного субъекта синергетическим или аддитивным/усиленным образом.

Кроме того, указанное введение витамина D и штаммов бактерий способно модулировать экспрессию рецептора витамина D VDR на уровне кишечника.

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения (FR-A №№):

FR-A1. Штамм бактерий для применения в способе профилактического или радикального лечения дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D,

где указанный штамм бактерий выбран из группы, содержащей:

- штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572
- штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760,
- штамм *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,
- штамм *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,
- штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BIIBS01 DSM 33233,
- штамм *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,
- штамм *Bifidobacterium bifidum* BbIBS01 DSM 32708, и их смесь;

или, альтернативно, состоять из них.

FR-A2. Штамм бактерий для применения в соответствии с FR-A1, где указанный дефицит витамина D представляет собой дефицит и/или недостаточность витамина D3 (холекальциферол) и/или витамина D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамина

D3.

FR-A3. Штамм бактерий для применения в соответствии с FR-A1 или 2, где указанный штамм бактерий вводят в сочетании/комбинации с витамином D, предпочтительно витамином D3, где указанное введение указанного штамма бактерий и витамина D представляет собой одновременное введение или введение с задержкой по времени.

FR-A4. Композиция, содержащая смесь M, содержащую:

- по меньшей мере один витамин D,
- по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, содержащей

или альтернативно включающей в свой состав:

- штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572
- штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760,
- штамм *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,
- штамм *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,
- штамм *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233,
- штамм *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,
- штамм *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708, и их смесь;

или, альтернативно, состоящую из них;

и возможно указанная композиция содержит

- по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или один приемлемый эксципиент фармацевтического или пищевого класса.

FR-A5. Композиция в соответствии с FR-A4, где указанный по меньшей мере один витамин D представляет собой витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамин D3.

FR-A6. Композиция для применения в соответствии с FR-A5, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и

- витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, состоит из них.

FR-A7. Композиция для применения в соответствии с FR-A5, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из: *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231, *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232, *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BbIBS01 DSM 33233, *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234, *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708 и их смесь; и

- витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, состоит из вышеуказанного.

FR-A8. Композиция в соответствии с любым из FR-A4-7, где указанная композиция предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

FR-A9. Композиция для применения в соответствии с FR-A8, где указанная композиция предназначена для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита витамина D и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D.

FR-A10. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из FR-A1 или композиция для применения в соответствии с FR-9, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбрано из: сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, внезапной сердечной смерти, инсульта, фибрилляции предсердий и болезни периферических сосудов; ожирения, инсулинорезистентности, гипертензии и сахарного диабета; сахарного диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, гипертензии, нарушения функции почек, острого и/или хронического воспаления желудочно-кишечного тракта, изменений иммунной системы, рака ободочной кишки, рака молочной железы, рака кожи, рака легкого и рака предстательной железы, аутоиммунных заболеваний, сезонной депрессии и других расстройств психики, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза.

Ниже представлены воплощения настоящего изобретения (FR-B №№):

FR-B1. Штамм бактерий для применения в способе профилактического или радикального лечения дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D3,

где указанный штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, классификация которого изменена на *Lacticaseibacillus paracasei*.

FR-B2. Штамм бактерий для применения в соответствии с FR-B1, где указанный

штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, выбранный из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 и названием *Lactobacillus casei* DG[®] подв. *casei*,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760,

и их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B3. Штамм бактерий для применения в соответствии с FR-B1 или 2, где указанный дефицит витамина D представляет собой дефицит и/или недостаточность витамина D3 (холекальциферол) и/или витамина D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамина D3.

FR-B4. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из FR-B1–3, где указанный штамм бактерий вводят в сочетании/комбинации с витамином D, предпочтительно витамином D3, где указанное введение указанного штамма бактерий и витамина D представляет собой одновременное введение или введение с задержкой по времени.

FR-B5. Композиция, содержащая

- смесь M, содержащую:

- по меньшей мере один витамин D, и

- по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*,

или, альтернативно, состоящую из них,

и возможно указанная композиция содержит

- по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или по меньшей мере один приемлемый эксципиент фармацевтического или пищевого класса.

FR-B6. Композиция в соответствии с FR-B5, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, выбран из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 и названием *Lactobacillus casei* DG[®] подв. *casei*,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

FR-B7. Композиция в соответствии с FR-B5 или 6, где указанный по меньшей мере один витамин D представляет собой витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамин D3.

FR-B8. Композиция в соответствии с FR-B6 или 7, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760; и

- по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, состоит из них.

FR-B9. Композиция в соответствии с любым из FR-B6–8, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760 и дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, состоящей из:

- штамма бактерий, относящегося к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированного как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231,

- штамма бактерий, относящегося к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированного как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232,

- штамма бактерий, относящегося к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* BfIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233,

- штамма бактерий, относящегося к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированного как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234,

- штамма бактерий, относящегося к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированного как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = BbfIBS01 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708, и

- по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, содержащей их.

FR-B10. Композиция по любому из FR-B5–9 для применения в качестве лекарственного средства.

FR-B11. Композиция для применения в соответствии с FR-B10, где указанная композиция предназначена для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита витамина D и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, у нуждающегося в этом субъекта;

предпочтительно где указанный витамин D представляет собой витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), более предпочтительно витамин D3.

FR-B12. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из FR-B1–4 или композиция для применения в соответствии с FR-B10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбрано из: сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, внезапной сердечной смерти, инсульта, фибрилляции предсердий и болезни периферических сосудов; ожирения, инсулинорезистентности, гипертензии и сахарного диабета; сахарного диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, гипертензии, нарушения функции почек, острого и/или хронического воспаления желудочно-кишечного тракта, изменений иммунной системы, рака ободочной кишки, рака молочной железы, рака кожи, рака легкого и рака предстательной железы,

аутоиммунных заболеваний, сезонной депрессии и других расстройств психики, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза.

FR-B13. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из FR-B1–4 или композиция для применения в соответствии с FR-B10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбраны из: рахита, переломов костей, деформации костей, остеопороза, остеомалации, боли в костях, боли в суставах, ломкости костей, гипокальциемии, гипофосфатемии, костных аномалий в связи с нарушениями деминерализации.

FR-B14. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из FR-B1–4 или композиция для применения в соответствии с FR-B10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбраны из: мышечной слабости, затруднения концентрации внимания, рецидивирующей повышенной утомляемости, когнитивных расстройств, психологических и эмоциональных расстройств, вторичного гиперпаратиреоза, потливости рук.

FR-B15. Штамм бактерий для применения в соответствии с любым из предшествующих FR-B или композиция для применения в соответствии с любым из предшествующих FR-B, где указанные нуждающиеся в них субъекты представляют собой субъектов педиатрической категории.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

(A.1.) ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

1. Цель

С учетом того, что всасывание витамина D, по-видимому, напоминает всасывание липидов, его лучшее эмульгирование в кишечнике может способствовать проникновению витамина D через мембрану энтероцитов. В то же время предполагается, что микроорганизм со свойствами растворения холекальциферола (витамина D3) может потенциально приводить к повышенным сывороточным уровням витамина D. С этой целью четыре штамма-пробиотика были подвергнуты скринингу на их способность к образованию стабильной суспензии витамина D3 в воде: *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 (новое название *Lacticaseibacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572), *Lactobacillus rhamnosus* GG (новое название *Lacticaseibacillus paracasei* GG), *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (новое название *Limosilactobacillus reuteri* DSM 17938) и *Lactobacillus acidophilus* LA5.

2. Материалы и методы

2.1 Штаммы бактерий и условия культивирования

Исследовали четыре штамма бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus* (семейство *Lactobacillaceae*): *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (*L. casei* DG[®], *Enterolactis*[®], SOFAR S.p.A.), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (штамм GG), *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 (штамм LA5).

Все штаммы культивировали в жидкой питательной среде Мана-Рогоза-Шарпа (MRS; Difco) при 37°C в течение ночи.

2.2 Оценка *in vitro* эмульгирования витамина D3 клетками бактерий-пробиотиков

Осадок клеток выделяли из жидкой культуры с помощью центрифугирования, дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ; pH 7,3) и ресуспендировали в ФСБ при оптической плотности ОП_{600 нм} = 5. Далее 100 мкл препарата DIBASE (50000 МЕ/2,5 мл холекальциферола в оливковом масле, Abiogen Pharma, Италия), соответствующие 2000 МЕ (2,5 мкг) холекальциферола, диспергировали в 1 мл суспензии бактерий и инкубировали на магнитной мешалке (500 об/мин) в течение 45 минут. Впоследствии после мягкого центрифугирования (2000 об/мин, 2 мин) с помощью иглы стерильного шприца отбирали 400 мкл водной фазы, расположенной под масляной фазой. Впоследствии экстрагировали холекальциферол (витамин D3) из водных образцов следующим методом: к образцу добавляли 400 мкл метанола и однократно экстрагировали смесь двумя объемами гексана. Гексановую фазу, полученную после центрифугирования (13000 об/мин, 3 мин) выпаривали до сухого состояния в атмосфере азота, и высушенный остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы для ВЭЖХ. Для анализа ВЭЖХ использовали объем 100 мкл.

2.3 Анализ ВЭЖХ

Холекальциферол (витамин D3) отделяли с использованием системы ВЭЖХ Poroshell 120 EC-C18 4,6 × 100 мм, колонка 2,7 мкм, содержащей модуль разделения Agilent (насосы 1260 Infinity II с автоматическим пробоотборником) и детектор 1260 Infinity II с переменной длиной волны (детектирование витамина D при 265 нм). Протокол хроматографии был составлен в соответствии с Goncalves et al. [Molecular nutrition & food research 2011, 55 Suppl 2, S303-311]. Сокращенно, подвижная фаза представляла собой 60% ацетонитрила, 38% метанола и 2% воды. Скорость потока составляла 1 мл/минута, и поддерживалась постоянная температура колонки (40°C).

Холекальциферол идентифицировали с помощью спектрального анализа и/или по времени удерживания и одновременного введения пробы относительно чистого стандартного образца. Количественное определение проводили с помощью программного обеспечения для ВЭЖХ Open Lab Agilent путем сравнения площади пика со стандартной кривой образца сравнения.

2.6 Статистический анализ

Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (среднее \pm SD). Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3. Результаты

Было проведено тестирование потенциальной способности четырех штаммов молочнокислых бактерий к образованию стабильной суспензии витамина D в воде. С этой целью клетки бактерий в ФСБ смешивали с раствором витамина D₃ в рафинированном оливковом масле (10: 1 об/об). Затем проводили анализ аликвоты водной фазы с помощью ВЭЖХ, чтобы количественно определить растворение холекальциферола в воде. Полученные результаты выявили значимое увеличение количества холекальциферола в водной фазе для штамма *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572, который показал большую способность к эффективному эмульгированию холекальциферола в воде относительно других штаммов (Фиг. 4). Статистические данные основаны на непарном t-критерии Стьюдента ($n=3$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

4. Вывод

Показано, что несколько видов семейства *Lactobacillaceae*, которые являются преобладающими представителями микробиоты многочисленных пищевых продуктов, продуцируют биологические ПАВ, которые представляют собой амфифильные молекулы различной химической природы (например, гликолипиды, фосфолипиды, липопептиды и другие полимеры), которые могут обладать детергентной, эмульгирующей, пенообразующей или диспергирующей активностью. Таким образом, можно предположить, что продуцирующие биологические ПАВ микроорганизмы, как только они попадают в кишечник, могут участвовать в эмульгировании витамина D, способствуя его контакту с эпителием и, следовательно, всасыванию. Продукцию биологических ПАВ также осуществляют микроорганизмы, общеизвестные как пробиотики, в частности представители семейства *Lactobacillaceae*, такие как *L.*

casei/paracasei, *L. rhamnosus* и *L. acidophilus*. В этом исследовании было отобрано четыре штамма *Lactobacillaceae* с хорошо раскрытыми документально свойствами пробиотиков для тестирования их способности *in vitro* к растворению холекальциферола в воде.

При проведении было выявлено значимое различие между тестируемыми бактериями и штаммом *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572, который значимо увеличивал количество холекальциферола в водной фазе. В частности, способность штамма *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 приблизительно в два раза превышала способность *L. rhamnosus* GG.

Молекулярная детерминанта эмульгирующей способности штамма *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 неизвестна, но можно предположить, что значимый вклад могут вносить особые богатые рамнозой гетероэктополисахариды (HePS), которые накапливаются на внешней поверхности *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572. Действительно, бактериальные макромолекулы HePS могут проявлять эффективные эмульгирующие свойства, направленные на различные гидрофобные молекулы, такие как неочищенные масла и углеводороды.

(A.2) ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VIVO*

Исследование *in vivo* на модели мыши по оценке влияния штамма бактерий вида *Lactobacillus paracasei* на биодоступность витамина D.

ПОДГОТОВКА ЖИВОТНЫХ И ТЕСТОВОГО МАТЕРИАЛА

Мыши (взрослые 8-недельные самцы линии Cd1) были адаптированы к содержанию в замкнутом пространстве и содержались на традиционном рационе питания. Мышей содержали в клетках и поддерживали контролируемые условия температуры окружающей среды ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) при 12-часовом цикле светлого/темного времени с предоставлением корма на регулярной основе и водопроводной воды без ограничений. Затем после одной недели акклиматизации животных случайным образом разделили на 6 экспериментальных групп по 6 мышей в каждой группе, и каждой группе случайным образом был назначен один из планируемых препаратов (таблица 1).

Таблица 1 — экспериментальные группы

Группа 1	Без препарата
Группа 2	Одна порция витамина D3
Группа 3	Добавка <i>L. paracasei</i> DG [®] (10 ⁸ кое/сутки) в течение одной недели
Группа 4	Добавка <i>L. paracasei</i> DG [®] (10 ⁸ кое/сутки) в течение одной недели с последующей дачей одной порции витамина D3
Группа 5	Добавление <i>L. paracasei</i> DG [®] (10 ⁸ кое/сутки) и витамина D3 в течение одной недели
Группа 6	Добавка витамина D3 в течение одной недели

Штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 (сокращенно *L. paracasei* DG[®]) пересевали на агар MRS и высевали отдельную колонию в жидкую питательную среду и инкубировали в течение 18 часов при 37°C в микроаэрофильных условиях. Затем полученную культуру центрифугировали, дважды промывали стерильным физиологическим раствором и ресуспендировали осадок клеток подходящим объемом водного раствора 20% сахарозы с 10% глицерином (масс/об). Затем измеряли оптическую плотность (ОП 600 нм) и разводили суспензию до ОП = 1,00. Затем суспензию делили на аликвоты по 150 мкл в каждой и замораживали аликвоты при -20°C до доставки на сухом льду в отдел молекулярной медицины университета Падуи. Десятичное количество аликвот на селективной среде позволяло количественно определить концентрацию живых клеток, равную $1,6 \times 10^9$ КОЕ/мл суспензии ($2,4 \times 10^8$ КОЕ/аликвота). Одновременно с этим в лаборатории ААТ подготовили аликвоты витамина D3 (холекальциферола), приобретенного у компании Sigma Aldrich.

Каждое животное получало специфичный препарат с помощью желудочного зонда.

На основании опубликованной ранее литературы было принято решение вводить мышам витамин D3 в рафинированном оливковом масле (DIBASE 50000 МЕ/2,5 мл) в количестве, равном 10000 МЕ на кг массы тела. С учетом средней массы тела мыши около 50 граммов готовили аликвоты витамина D3 по 25 мкл, каждая из которых содержала 500 МЕ витамина. Эти аликвоты использовали как для введения одной порцией, так и для ежедневного введения в течение одной недели. Мышам, получавшим штаммы бактерий-пробиотиков, вводили 10^8 КОЕ *L. paracasei* DG[®] один раз в сутки в течение одной недели.

Отдельные аликвоты штамма *L. paracasei* DG[®] и витамина D3 хранили при подходящей температуре в университете Падуи и использовали ежедневно для введения мышам, отбирая аликвоту 100 мкл *L. paracasei* DG[®], удаляя остальной остаток, и всю аликвоту витамина D3.

ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ ЖИВОТНЫМ

Мышей умерщвляли через 3 часа после окончания введения после анестезии флуораном и впоследствии собирали кровь с помощью пункции сердца и извлекали концевой отдел подвздошной кишки. Кровь центрифугировали, чтобы отделить сыворотку, которую затем замораживали до введения следующей дозы витамина D3 в форме 25-гидрокси-витамина D (сокращенно 25(OH)₂D или 25(OH)D). Концевой отдел подвздошной кишки промывали ФСБ, а затем подвергали сбору слизистой оболочки и последующему замораживанию в жидком азоте. Затем экстрагировали мРНК для количественного определения экспрессии рецептора витамина D на уровне слизистой оболочки.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОЗИРОВКИ ВИТАМИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Дозировку 25(OH)D в сыворотке крови экспериментальных и контрольных мышей определяли с помощью иммуносорбентного ферментного анализа (ИФА) (25OH Vitamin D total ELISA, Gentaur, г. Бергамо, Италия). Это определение позволяет правильно рассчитать состояние восполнения (запаса) витамина D в организме животного. Уровни в крови обычно выражают в нмоль/литр или нг/мл сыворотки крови. У человека состояния дефицита идентифицируют по значениям 25(OH)₂D ниже 20 нг/мл сыворотки крови, при этом значения в диапазоне 20–30 в любом случае считают недостаточными.

Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРА В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ

Концевой отдел подвздошной кишки промывали ФСБ, а затем подвергали сбору слизистой оболочки и последующему замораживанию в жидком азоте. Затем экстрагировали мРНК для количественного определения экспрессии рецептора витамина D на уровне слизистой оболочки. Что касается последовательности операций,

сначала выполняли экстракцию суммарной РНК из слизистой оболочки, затем обратную транскрипцию aliquоты 30 нг суммарной РНК до кДНК, а затем ее подвергали количественной ПЦР с праймерами на рецептор витамина D VDR (описаны Wu et al. 2010). Ниже представлен краткий обзор последовательностей праймеров:

- hVDR F 5'-GGACTGCCGCATCACCAA-3' (SEQ ID NO: 1)

- hVDR R 5'-TCATCTCCCGCTTCCTCT-3' (SEQ ID NO: 2)

Анализы с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) также проводили, используя «абсолютный» отрицательный контроль и ген «домашнего хозяйства» (например, β -актина) для нормализации полученных результатов.

ДОЗИРОВКА ВИТАМИНА D3 - РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано на Фиг. 1 (А и В) и Фиг. 1.бис, определение дозировки 25(OH)D с помощью анализа ИФА выявило значения сывороточной концентрации витамина, согласующиеся с описанными в литературе данными.

У контрольных мышей линии CD-1 после обычного рациона (группа 1) сывороточные уровни 25 (OH) D составляли от 36 до 71 нг/мл (среднее значение \pm стандартное отклонение 58 ± 13 нг/мл; Фиг. 1.бис).

Введение одной порции витамина D3 (группа 2) не приводило к значимому изменению сывороточных уровней 25(OH)D (25-гидроксивитамина D) ни в отсутствие, ни в присутствии одновременного введения штамма *L. paracasei* DG[®] (группа 4), так как обнаруженные в этом случае концентрации статистически значимо не отличались от уровней, обнаруженных в контрольной группе (без препаратов). Аналогичным образом, введение штамма *L. paracasei* DG[®] в монорежиме не приводило к значимым изменениям (группа 3), что указывает на отсутствие влияния штамма *L. paracasei* DG[®] как такового на биодоступность витамина D3 в этих условиях теста. С другой стороны, в случае ежедневного одновременного введения витамина D3 и штамма *L. paracasei* DG[®] в дозе около $2,0 \times 10^8$ КОЕ/сутки в течение 7 дней наблюдалось статистически значимое увеличение сывороточных уровней витамина D3. Такое наблюдение демонстрирует синергетическое действие штамма, преимущественно на уровне слизистой оболочки, на усиление повышенной биодоступности витамина. Такое предположение подтверждается на основании результатов контрольной группы, представленной введением витамина D3 в монорежиме в течение одной недели (группа б), которое не создает никаких статистически значимых изменений сывороточной

концентрации 25(OH)D. Вместо этого статистически значимое изменение биодоступности было выявлено в группе мышей, получавших ежедневное одновременное введение штамма *L. paracasei* DG[®] и витамина D3 в течение одной недели.

При более подробном рассмотрении сывороточный уровень 25(OH)D был незначительно, но статистически значимо выше после однократного добавления витамина D3 (группа 2; 67 ± 4 нг/мл) относительно ежедневного добавления суточной дозы витамина D3 (группа 6; 54 ± 6 нг/мл) в течение одной недели. Введение штамма бактерий *L. paracasei* DG[®] (группа 3; 56 ± 10 нг/мл) и витамина D3 в комбинации с однократным введением *L. paracasei* DG[®] (группа 4; 57 ± 6 нг/мл) (Фиг. 1.бис). В целом сывороточные уровни 25(OH)D у мышей во всех группах 1, 2, 3, 4 и 6 находились в диапазоне от 35 до 74 нг/мл (58 ± 10 нг/мл). Напротив, при комбинированном введении 10^8 КОЕ *L. paracasei* DG[®] с добавкой витамина D3 один раз в сутки в течение одной недели сывороточная концентрация 25(OH)D находилась в диапазоне от 84 до 89 нг/мл (группа 5; 88 ± 2 нг/мл) (Фиг. 1.бис), что соответствует приблизительно 50% повышению относительно контрольной группы.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D — РЕЗУЛЬТАТЫ

Как показано на Фиг. 2, количественное определение информационной РНК рецептора витамина D в слизистой оболочке исследуемых групп мышей показало, что введение штамма *L. paracasei* DG[®] в монорегиме в течение одной недели не приводило к изменениям уровня экспрессии рецептора относительно контрольной группы, не получавшей препарат. Введение однократной дозы витамина D3, с другой стороны, приводило к статистически значимому снижению уровней рецептора на уровне слизистой оболочки подвздошной кишки (группа 2). Еще более выраженное снижение наблюдалось при одновременном введении витамина D3 со штаммом *L. paracasei* DG[®] независимо от того, получали ли мыши витамин D3 в однократной дозе в конце периода применения штамма *L. paracasei* DG[®] (группа 4), или при ежедневном введении в комбинации со штаммом *L. paracasei* DG[®] в течение одной недели (группа 5), или при ежедневном введении витамина D3 в монорегиме в течение одной недели (группа 6).

При первом анализе данных и в соответствии с оценкой имеющихся экспериментальных групп, наблюдался синергетический эффект между введением витамина D3 и введением штамма *L. paracasei* DG[®], с учетом того, что введение обоих

препаратов усиливает эффект покрытия/гашения рецептора, наблюдаемый при введении витамина D₃ в монорежиме. Как уже описано в предыдущем параграфе, такое наблюдение показывает синергетический эффект между штаммом *L. paracasei* DG[®] и витамином D₃, который приводит к повышенной биодоступности витамина. Для проверки этого предположения была также проверена экспрессия рецептора в группе б, которая получала витамин D₃ в монорежиме в течение 7 дней. Этот тест показал отрицательный результат, что подтверждает гипотезу о синергетическом эффекте между штаммом *L. paracasei* DG[®] и витамином D₃.

ВЫВОДЫ

Уровни витамина D₃ (25(OH)D) в крови обычно выражают в нмоль/литр или нг/мл сыворотки крови. У человека состояния дефицита идентифицируют по значениям 25(OH)2D ниже 20 нг/мл сыворотки крови, при этом значения в диапазоне 20–30 в любом случае считают недостаточными.

Согласно имеющимся литературным данным, в модели на мышах требуется пролонгированное применение препаратов, даже более 4 недель, чтобы получить значимые сывороточные уровни витамина D у животных с дефицитом витамина D₃, индуцированным специальными диетическими вмешательствами.

На основании результатов настоящего исследования наблюдали, что синергетический эффект, связанный с одновременным введением витамина D₃ и штамма *L. paracasei* DG[®], может привести к следующим полезным эффектам для организма-хозяина:

А – прямой эффект, связанный с повышением биодоступности витамина D, выраженный в повышении уровней витамина D в сыворотке крови животных, получавших одновременное введение, относительно получавших витамин D₃ в монорежиме, независимо от продолжительности применения препаратов;

В – непрямой эффект, связанный с модификацией кинетики экспрессии рецепторов витамина D на уровне слизистой оболочки подвздошной кишки, например, приводящий к более быстрому извлечению витамина D на уровне кишечника.

В свете результатов, полученных вследствие введения дополнительных мероприятий путем внедрения экспериментальной группы б, получавшей витамин D₃ в монорежиме в течение по меньшей мере одной недели, авторы склоняются в сторону предположения А, которое приводит к одновременному введению витамина D₃ и

штамма *L. paracasei* DG[®] в качестве эффективного средства повышения биодоступности витамина D на сывороточном уровне.

(В) КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Назначение этого двойного слепого, поискового, рандомизированного, контролируемого одноцентрового клинического исследования состояло в оценке роли *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM-I1572) в облегчении и повышении желудочно-кишечного всасывания витамина D у участников педиатрической категории в возрасте от 3 до 12 лет с исходным сывороточным уровнем витамина D (25(OH) 2D) ≥ 10 нг/мл и ≤ 20 нг/мл. Ниже изложены цели клинического исследования.

ОСНОВНАЯ ЦЕЛЬ

Оценить различное всасывание витамина D (вит. D) у участников, получавших добавку вит. D в комбинации с пробиотиком, содержащим *L. casei* DG[®], и у участников, получавших добавку витамина D в монорежиме.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЦЕЛИ

Оценка:

- Консистенция стула и ежедневная частота дефекации с помощью переупорядоченных данных дневников участников;
- Извлечение штамма *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM-I 1572) в кале.

ПОИСКОВЫЕ ЦЕЛИ

- Модулирование микробиоты в кишечнике;
- Модулирование соответствующих метаболитов, в том числе короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК).

2. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ

Оценка эффективности добавления пробиотика, содержащего *L. casei* DG[®], к фиксированной дозе добавки вит. D, будет определена на основании вышеупомянутой основной цели.

Оценка основной цели будет проводиться посредством следующей первичной конечной точки:

- Изменения сывороточных уровней вит. D у детей, получавших ежедневно в течение 6 недель добавку лекарственной формы вит. D внутрь в комбинации с приемом внутрь пробиотика, содержащего *L. casei* DG[®], относительно детей с такими же

характеристиками и получавших в течение 6 недель такую же дозу добавки витамина D на протяжении всего периода применения препаратов в исследовании.

Другими второстепенными оценками эффективности будут следующие оценки
Дополнительные конечные точки:

– Изменения частоты дефекации и консистенции стула (оцениваемые на основании Бристольской шкалы оценки стула) с помощью данных, регистрируемых в дневнике пациента в течение периода применения препаратов, при этом обе оценки проводят в рамках каждой группы и между экспериментальными группами;

– Извлечение *L. casei* DG[®] в кале в конце периода применения препаратов относительно исходного уровня.

Оценка извлечения *L. casei* DG[®] в кале будет проведена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Поисковые конечные точки:

- Оценка изменений в индексах альфа- и бета-разнообразия и относительно таксономической распространенности между двумя группами исследования;

- Оценка изменений метаболитов, включая КЦЖК, между двумя группами исследования.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН

Это исследование представляет собой двойное слепое, поисковое, рандомизированное, контролируемое одноцентровое клиническое исследование. Назначение этого исследования состоит в оценке роли *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM-I1572) в облегчении и повышении желудочно-кишечного всасывания вит. D у участников педиатрической категории в возрасте от 3 до 12 лет с исходным сывороточным уровнем вит. D (25(OH) 2D) ≥ 10 нг/мл и ≤ 20 нг/мл. Исследование прежде всего предназначено для оценки различного всасывания вит. D между участниками в возрасте от 3 до 12 лет, которые ежедневно принимают внутрь лекарственную форму вит. D в комбинации с приемом внутрь пробиотика, содержащего *L. casei* DG[®], и группой участников, имеющих такие же характеристики и относящихся к такой же возрастной группе, которые принимали внутрь такую же суточную дозу и такую же лекарственную форму витамина D (прием осуществляется на основании действующих руководств). Всасывание вит. D определяют на основании оценки сывороточных уровней 25-гидроксивитамина D (25(OH)2D) на плановых визитах. В исследование требуется набрать приблизительно 46 соответствующих

критериям включения участников обоего пола (мальчики и девочки) в возрасте от 3 до 12 лет с сывороточными уровнями вит. D ≥ 10 нг/мл и ≤ 20 нг/мл.

Пациентов рандомизируют в одну из следующих экспериментальных групп:

- Группа исследуемого препарата: добавка в питьевых флакончиках, содержащая вит. D 1800 МЕ (45 мкг) и 8 млрд. живых клеток, содержащих штамм-пробиотик *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM- I 1572). Исследуемый препарат будут принимать ежедневно (1 питьевой флакончик в сутки) в течение 6 недель в указанных выше дозах (см. раздел 9.6 Учет препарата).

- Контрольная группа: добавка препарата сравнения состоит из питьевых флакончиков, содержащих только добавку витамина D 1800 МЕ (45 мкг). Препарат сравнения принимают ежедневно (1 питьевой флакончик в сутки) в течение 6 недель.

Исследуемый препарат и препарат сравнения готовят в виде лекарственной формы в питьевых флакончиках, имеющих одинаковую упаковку, цвет, массу, запах и вкус. Исследователи и родители/законные представители ребенка не осведомлены об экспериментальной группе, в которую назначен ребенок. Исследователь должен предоставить информацию о назначении исследования, характеристиках и введении препаратов пациентам и их родителям/законным представителям.

Оба исследуемых препарата (исследуемый препарат и препарат сравнения) принимают натощак, за 30–60 минут до еды, 1 питьевой флакончик ежедневно в течение 6 недель.

С учетом того, что эндогенная выработка вит. D значительно увеличивается за счет воздействия на участников солнечных лучей в летний период (в Италии это приблизительно конец мая – конец сентября), период набора участников в исследование ограничивается только зимне-весенними месяцами (с декабря по середину апреля). Таким образом, пациент, соответствующий критериям включения в исследование, включенный в середине апреля, будет получать препарат в течение 6 недель до конца мая. Таким образом, риск воздействия на участников солнечных лучей летом будет сведен к минимуму, что насколько возможно снизит систематическую ошибку, связанную с неправильной клинической интерпретацией сывороточных уровней вит. D.

Каждый потенциальный участник, соответствующий критериям включения в настоящее исследование, получает надлежащую информацию от исследователей, которые должны изложить ее языком, понятным для соответствующего возраста. В то

же время, исследователи предоставляют обоим родителям/законным представителям ребенка документ об информированном согласии, которые они должны подписать прежде, чем ребенок будет проходить какие-либо процедуры скрининга, нацеленные на оценку их включения в исследование.

В целом дизайн исследования включает 4 визита (Фиг. 3):

- V-1 (визит скрининга). Он является первым визитом исследования и может быть проведен в любой из 7 дней до следующего визита в исследовании (визита исходного уровня). В ходе этого визита исследователь гарантирует, что участник соответствует критериям включения/невключения: у участника берут образец крови для определения сывороточных уровней вит. D и других показателей крови и проводят объективное обследование (см. параграф 10.1 V-1 Визит скрининга и процедуры исследования).

- V0 (визит исходного уровня). Этот визит проводят после включения участника в исследование и после проведения всех процедур, запланированных на основании предыдущего визита (визита скрининга). Этот визит является визитом рандомизации, на котором каждый участник начнет получать препарат, который был ему назначен (см. параграф 10.2 V0 Визит исходного уровня и процедура рандомизации).

- V1 (неделя 3 ± 3 дня). Этот визит является промежуточным визитом исследования, который должен быть проведен приблизительно через 3 недели после исходного уровня. На этом визите проводятся те же лабораторные исследования и та же клиническая оценка, которые описаны для визита V-1 (визит скрининга)(см. параграф 10.3 V1 и промежуточные процедуры).

- V2 (неделя 6 ± 3 дня). Этот визит является последним визитом исследования и визитом окончания приема исследуемого препарата (6 недель после исходного уровня). На этом визите проводятся те же лабораторные исследования и та же клиническая оценка, которые описаны для визита V-1 (визит скрининга)(см. параграф 10.3 V2 и процедуры окончания исследования).

Мониторинг безопасности и переносимости, применения сопутствующих лекарственных средств и/или медицинских процедур проводится на протяжении всего исследования. В дополнение к этому требуется, чтобы родители/законные представители регистрировали любые нежелательные явления в дневнике пациента.

4. ПОПУЛЯЦИЯ ПАЦИЕНТОВ

В исследование включают детей обоего пола (мальчики и девочки) любой расы, в возрасте от 3 до 12 лет с сывороточными уровнями вит. D ≥ 10 нг/мл и ≤ 20 нг/мл.

5. КРИТЕРИИ ВКЛЮЧЕНИЯ

- соответствующими критериям включения считают детей в возрасте от ≥ 3 до ≤ 12 лет (пациенты не старше 12 лет на момент включения в исследование).
- Сывороточные уровни вит. D ≥ 10 нг/мл и ≤ 20 нг/мл на скрининге;
- Понимание пациентом исследования и письменное информированное согласие на участие в исследовании, предоставленное обоими родителями/законными представителями.

6. ИССЛЕДУЕМЫЕ ПРЕПАРАТЫ

- ИССЛЕДУЕМЫЙ ПРЕПАРАТ *L. casei* DG[®] (*L. paracasei* CNCM I-1572) в комбинации с витамином D, препарат включен в Регистр пищевых добавок Министерства здравоохранения (торговое название: Enterolactis D).

Класс: Диетическая добавка

Описание: Однодозовые питьевые флакончики с чашкой-резервуаром. Препарат должен быть объединен с жидкой фазой.

Основные компоненты:

- *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCMI-1572)
- Витамин D

Каждый питьевой флакончик содержит следующий состав:

Ингредиенты твердой фазы: *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCMI-1572); порошкообразный холекальциферол (витамин D3, среднепочечные триглицериды, гуммиарабик (аравийская камедь) (E 414), сахароза, крахмал, альфа-токоферол (E307), трикальцийфосфат (E341 iii)).

На суточную дозу (1 флакончик)

L. casei DG[®] 8 млрд. КОЕ

Витамин D3 45000 мкг/1800 МЕ

Ингредиенты жидкой фазы: Вода очищенная; фруктоза; подкислитель: лимонная кислота (E 330); вещество, усиливающее вкус и аромат; консервант: калия сорбат (E 202); консервант: натрия бензоат.

- ПРЕПАРАТ СРАВНЕНИЯ

Витамин D — препарат включен в Регистр пищевых добавок Министерства здравоохранения (торговое название: Витамин D).

Класс: Диетическая добавка

Описание: Однодозовые питьевые флакончики с чашкой-резервуаром. Препарат должен быть объединен с жидкой фазой.

Основные компоненты:

- Витамин D

Каждый питьевой флакончик содержит следующий состав:

Ингредиенты твердой фазы: Маннитол; инулин — фруктоолигосахариды; подсластитель: мальтитол (E 965); порошкообразный холекальциферол (витамин D3, среднецепочечные триглицериды, гуммиарабик (арабийская камедь) (E 414), сахароза, крахмал, альфа-токоферол (E307), трикальцийфосфат (E341 iii)).

На суточную дозу (1 флакончик)

Витамин D3 45000 мкг/1800 ME

Ингредиенты жидкой фазы: Вода очищенная; фруктоза; подкислитель: лимонная кислота (E 330); вещество, усиливающее вкус и аромат; консервант: калия сорбат (E 202); консервант: натрия бензоат.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Данные представляют с помощью описательной статистики. Как правило, категориальные переменные представляют в виде чисел и процентов, а непрерывные переменные после оценки нормального характера распределения путем применения критерия Колмогорова — Смирнова представляют в виде средних значений, стандартного отклонения (SD) или значения медианы с межквартильным размахом в зависимости от целесообразности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бактерий для применения в способе профилактического или радикального лечения дефицита и/или недостаточности витамина D (или гиповитаминоза D) и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, предпочтительно витамина D3,

где указанный штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, классификация которого изменена на *Lacticaseibacillus paracasei*.

2. Штамм бактерий для применения по п. 1, где указанный штамм бактерий относится к виду *Lactobacillus paracasei*, выбранный из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 и названием *Lactobacillus casei* DG[®] подв. *casei*,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760,

и их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

3. Штамм бактерий для применения по п. 1 или 2, где указанный дефицит витамина D представляет собой дефицит и/или недостаточность витамина D3 (холекальциферол) и/или витамина D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамина D3.

4. Штамм бактерий для применения по любому из п.п. 1-3, где указанный штамм бактерий вводят в сочетании/комбинации с витамином D, предпочтительно витамином D3, где указанное введение указанного штамма бактерий и витамина D представляет собой одновременное введение или введение с задержкой по времени.

5. Композиция, содержащая

- смесь M, содержащую или альтернативно состоящую из:

- по меньшей мере одного витамина D, и

- по меньшей мере одного штамма бактерий, относящегося к виду *Lactobacillus paracasei*,

и возможно указанная композиция содержит

- по меньшей мере одну приемлемую добавку и/или по меньшей мере один приемлемый эксципиент фармацевтического или пищевого класса.

6. Композиция по п. 5, где указанный по меньшей мере один штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, выбран из группы, содержащей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] и депонированный в Национальной коллекции культур микроорганизмов института Пастера в Париже под депозитарным номером CNCM I-1572 и названием *Lactobacillus casei* DG[®] подв. *casei*,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus paracasei*, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[™] и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 26760, и

- их смесь;

или, альтернативно, состоящей из них.

7. Композиция по п. 5 или 6, где указанный по меньшей мере один витамин D представляет собой витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), предпочтительно витамин D3.

8. Композиция по п. 6 или 7, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760; и

- по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, состоит из вышеперечисленного.

9. Композиция по любому из п.п. 6-8, где указанная смесь M содержит:

- штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм бактерий *Lactobacillus paracasei* LPC-S01[®] DSM 26760 и дополнительно по меньшей мере один штамм бактерий, выбранный из группы, состоящей:

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33231,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02 и депонированный в Deutsche

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33232,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis* подв. *lactis* B1BS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33233,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* Lp1BS01 и депонированный в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 33234,

- штамм бактерий, относящийся к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированного как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg = Bbf1BS01 и депонированного в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под депозитарным номером DSM 32708, и

- по меньшей мере один витамин D, предпочтительно витамин D3 (холекальциферол);

или, альтернативно, состоящей из вышеперечисленного.

10. Композиция по любому из п.п. 5-9 для применения в качестве лекарственного средства.

11. Композиция для применения по п. 10, где указанная композиция предназначена для применения в профилактическом и/или радикальном лечении дефицита витамина D и/или заболевания, симптома и/или расстройства, связанного с указанным дефицитом витамина D, у нуждающегося в этом субъекта;

предпочтительно где указанный витамин D представляет собой витамин D3 (холекальциферол) и/или витамин D2 (эргокальциферол), более предпочтительно витамин D3.

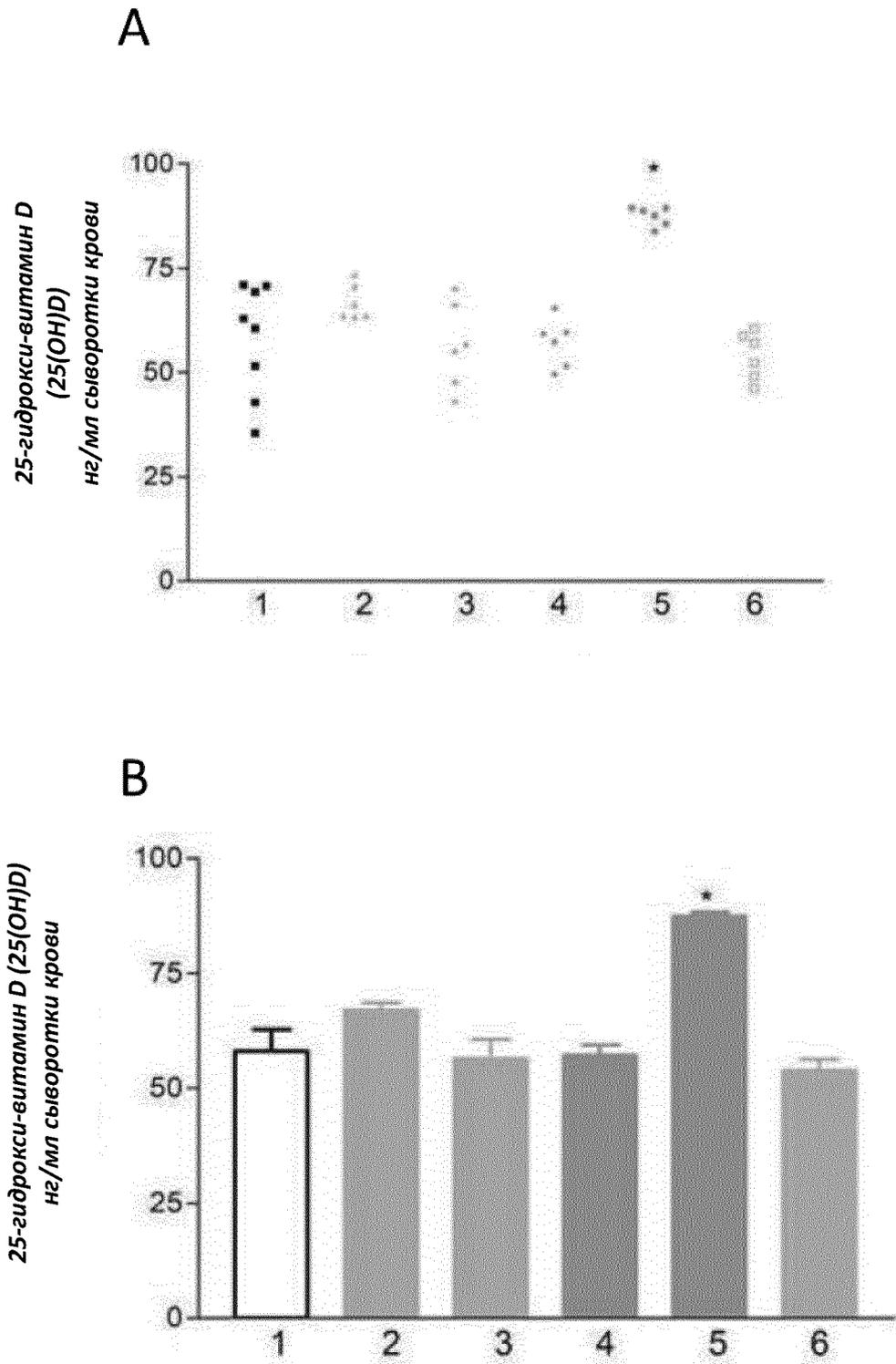
12. Штамм бактерий для применения по любому из п. п. 1-4 или композиция для применения по п. 10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбрано из: сердечной недостаточности, инфаркта миокарда, внезапной сердечной смерти, инсульта, фибрилляции предсердий и болезни периферических сосудов; ожирения, инсулинорезистентности, гипертензии и сахарного диабета; сахарного диабета, дислипидемии, метаболического синдрома, гипертензии, нарушения функции почек, острого и/или хронического воспаления желудочно-кишечного тракта,

изменений иммунной системы, рака ободочной кишки, рака молочной железы, рака кожи, рака легкого и рака предстательной железы, аутоиммунных заболеваний, сезонной депрессии и других расстройств психики, болезни Альцгеймера, рассеянного склероза.

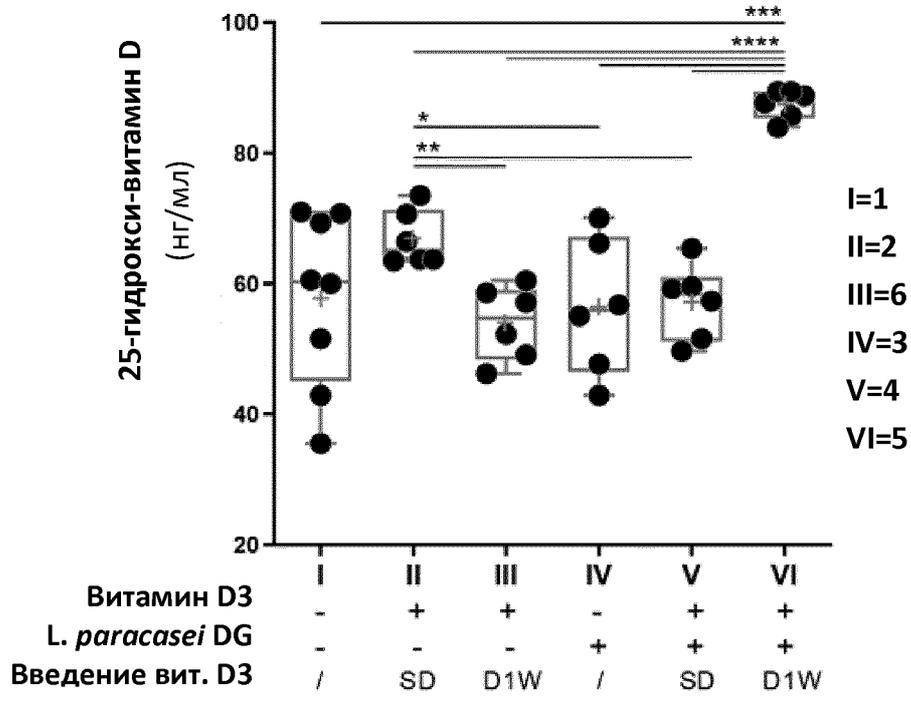
13. Штамм бактерий для применения по любому из п.п. 1-4 или композиция для применения в соответствии с 10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбраны из: рахита, переломов костей, деформации костей, остеопороза, остеомалации, боли в костях, боли в суставах, ломкости костей, гипокальциемии, гипофосфатемии, костных аномалий в связи с нарушениями деминерализации.

14. Штамм бактерий для применения по любому из п.п. 1-4 или композиция для применения по п. 10 или 11, где указанное заболевание, симптом и/или расстройство выбраны из: мышечной слабости, затруднения концентрации внимания, рецидивирующей повышенной утомляемости, когнитивных расстройств, психологических и эмоциональных расстройств, вторичного гиперпаратиреоза, потливости рук.

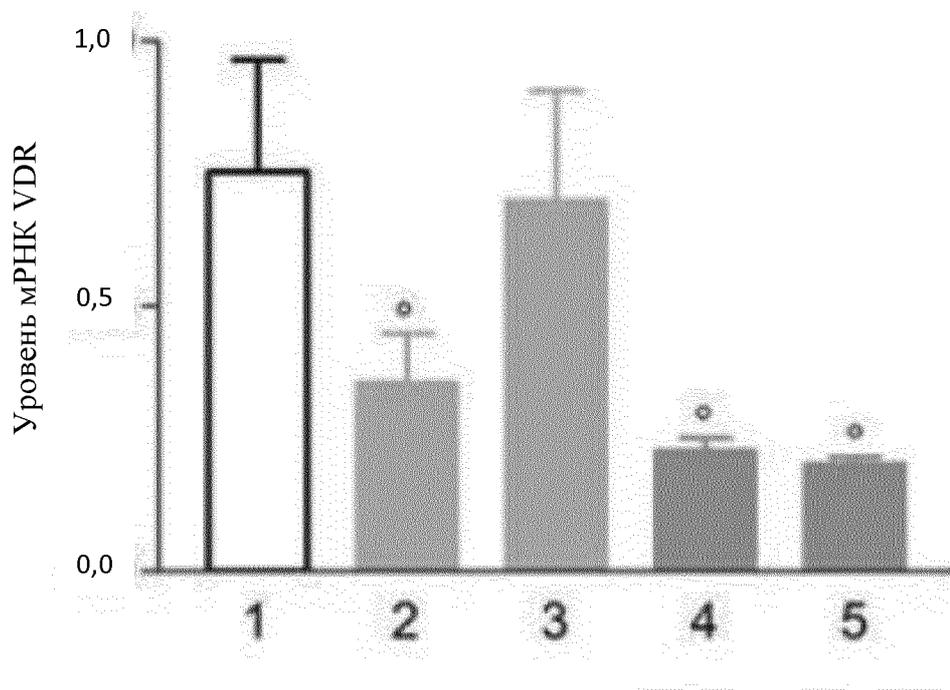
15. Штамм бактерий для применения по любому из п.п. 1-14 или композиция для применения по любому из п.п. 1-14, где указанные нуждающиеся в них субъекты представляют собой субъектов педиатрической категории.



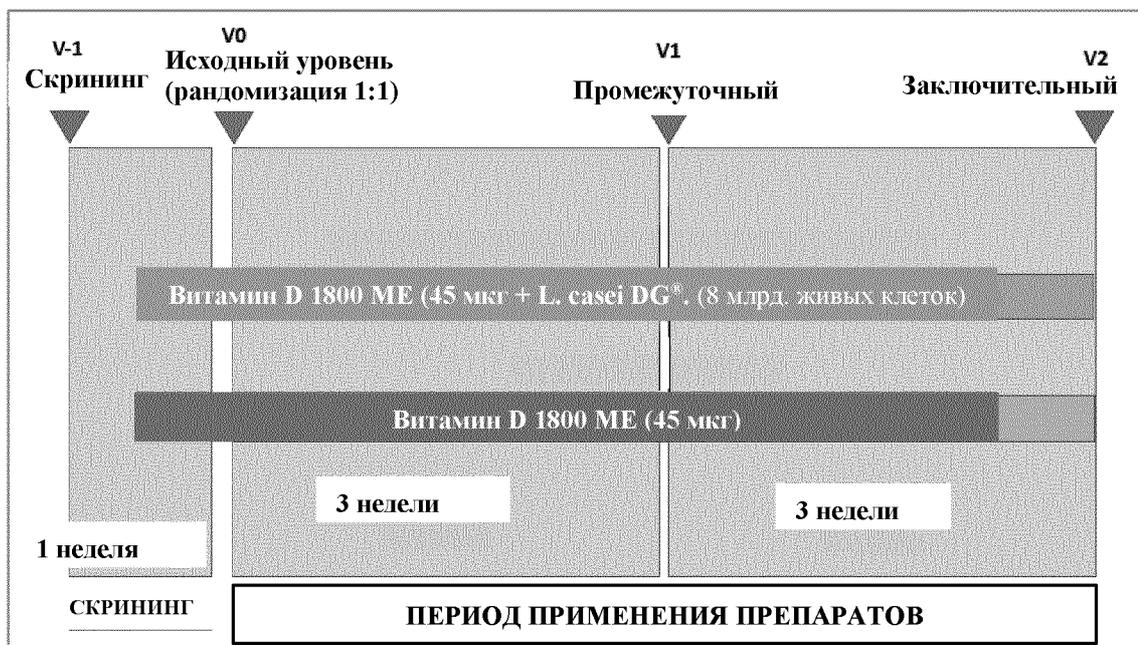
Фиг. 1



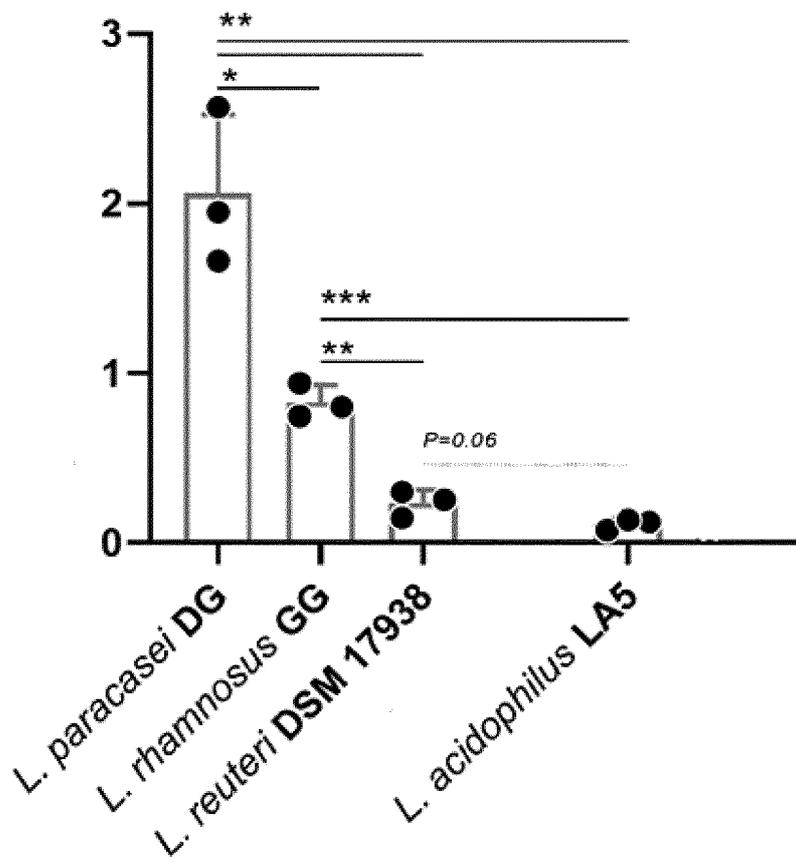
Фиг. 1.бис



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4