



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 118 535** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 35/74, C 12 N 11/14**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **97104352/13, 20.03.1997**

(46) Date of publication: **10.09.1998**

(71) Applicant(s):
**Institut klinicheskoy i ehksperimental'noj
limfologii SO RAMN,
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vektor-Best"**

(72) Inventor(s):
**Borodin Ju.I.,
Burmistrov V.A.,
Gus'kov A.A.,
Rachkovskaja L.N.,
Repina V.V.,
Repin V.E.,
Saranina I.V.**

(73) Proprietor(s):
**Institut klinicheskoy i ehksperimental'noj
limfologii SO RAMN,
Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vektor-Best"**

(54) **COMPLEX BACTERIAL PREPARATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, medicine, veterinary science. SUBSTANCE: preparation has a carrier that is a sorbent and eubiotic cells immobilized on the indicated carrier. Eubiotic cells are used together with nutrient medium component at biotiter 10^8 - 10^{10} CFU/ml. Material exhibiting antacide property, developed meso- and macroporous structure and macropore volume $0.01 \text{ cm}^3/\text{g}$, not less, is used as a sorbent at the following quantitative ratio of components, wt. -%: eubiotic cells at titer 10^8 - 10^{10} CFU/ml 1.0-50.0, and

sorbent - the rest to 100%. Sorbent is a porous material based on aluminium oxide with hydrophilic-hydrophobic topochemistry of surface, for example, enterosorbent of type CYMC modified with carbon, or enterosorbent of type CIAЛ modified with organosilicon polymer. Bifido- or lactobacteria or their mixture are used as eubiotics. Complex preparation provides more effective prolonged curative-prophylaxis effect on organism of human or animals since it retains activity at all sites of gastroenteric tract. EFFECT: enhanced effectiveness of preparation. 5 cl, 2 tbl, 7 ex

RU 2 1 1 8 5 3 5 C 1

RU 2 1 1 8 5 3 5 C 1



(19) **RU** (11) **2 118 535** (13) **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 35/74, C 12 N 11/14**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **97104352/13, 20.03.1997**

(46) Опубликовано: **10.09.1998**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **DE, заявка, 3410650, кл. C 12 N 11/14, 1985. WO, заявка, 91/09608, кл. A 61 K 35/74, 1991. RU, патент, 2017486, кл. A 61 K 31/00, 1994.**

(71) Заявитель(и):

**Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест"**

(72) Автор(ы):

**Бородин Ю.И.,
Бурмистров В.А.,
Гуськов А.А.,
Рачковская Л.Н.,
Репина В.В.,
Репин В.Е.,
Саранина И.В.**

(73) Патентообладатель(ли):

**Институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН,
Закрытое акционерное общество "Вектор-Бест"**

(54) КОМПЛЕКСНЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к препаратам медицинского и ветеринарного назначения. Препарат включает носитель, представляющий собой сорбент и клетки зубиотиков, иммобилизованные на указанном носителе. Клетки зубиотиков используют совместно с компонентами питательной среды с биотитром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл. В качестве сорбента используют материал с антацидными свойствами, развитой мезо- и макропористой структурой и объемом макропор не менее $0,01 \text{ см}^3/\text{г}$ при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %: клетки зубиотиков с титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл 1,0 - 50,0, сорбент

остальное до 100%. Сорбент представляет собой пористый материал на основе оксида алюминия с гидрофильно - гидрофобной топохимией поверхности, например энтеросорбент типа СУМС, модифицированный углеродом, или энтеросорбент типа СИАЛ, модифицированный кремнийорганическим полимером. Из зубиотиков используют бифидо- или лактобактерии или их смесь. Комплексный бактериальный препарат обеспечивает более эффективное пролонгированное лечебно - профилактическое действие на организм человека или животного за счет сохранения активности препарата при введении в организм на всех участках желудочно - кишечного тракта. 4 з.п. ф-лы, 2 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к препаратам медицинского и ветеринарного назначения.

В настоящее время проблема дисбактериоза и кишечных дисфункций является по-прежнему актуальной, что обусловлено комплексом причин различного характера: ухудшение экологической ситуации, рост иммунодефицитных состояний, повышенная аллергия, грубые нарушения микробиоценоза в результате антибактериальной, гормональной или лучевой терапии, а также различных отрицательных социальных факторов и т.д. По данным научных исследований более 90% населения страдает теми или иными формами дисбактериозов и кишечных дисфункций. Это в свою очередь влечет за собой целый спектр заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, работой иммунной системы, синтезом витаминов и незаменимых аминокислот, их всасыванием, а также поступлением в организм микро- и макроэлементов, т.д.

Для профилактики и лечения многих патологических состояний, обусловленных нарушением эндозоологии, широкое распространение получили энтеросорбенты. Это различные типы активных углей, например карбактин, карболонг, микросорб, полифепан и т. д. (Сенов П. Л. Фармацевтическая химия. - М., "Медицина", 1978, с. 132-133; патент РФ N 2029546, МПК⁶ А 61 К 9/16, опубл. 27.02.95 г.), природные материалы и их аналоги (кристаллическая микроцеллюлоза, цеолиты, хитозаны, пектины и т.д.), синтетические минеральные сорбенты и другие материалы, которые используются для очищения организма от шлаков, радионуклидов, тяжелых металлов и токсинов. Энтеросорбенты снижают эффекты экзо- и эндотоксикозов.

Однако энтеросорбенты не устраняют причин, вызывающих эффекты экзо- и эндотоксикозов, как правило, они не селективны, работают в основном на избыток субстрата, могут оказывать негативное действие из-за сорбции нужных для организма метаболитов (витаминов, гормонов) и не обеспечивают активно нормализацию микробиоценоза.

Функции нормальной микрофлоры в организме являются жизненно важными и очень обширными: синтезирующая, регуляторная, десенсибилизирующая, дезинтоксикационная, ферментативная, защитная и иммуностимулирующая. Для нормализации микробиоценоза широкое распространение получили препараты живых бактериальных клеток: бифидобактерий (межд. заявка (WO) N 85/03848), МКИ А 23 С 9/12, опубл. 12.09.85 г.), лактобактерий (заявка ЕПВ N 0154614, МКИ А 23 С 9/123, опубл. 11.09.85 г.) и колибактерий и т.д.

Недостатком этих препаратов является довольно короткие сроки их хранения, если они находятся в жидкой форме или высокая стоимость, если они изготовлены в сухой форме, а также слабая устойчивость к инактивирующим факторам внешней среды и желудочно-кишечного тракта организма при применении.

Известен комплексный препарат, включающий пористый неорганический носитель и иммобилизованные на нем клетки микроорганизмов (заявка ФРГ N 3410650, МКИ С 12 N 11/14, опубл. 03.10.85 г.). В качестве носителей применяют сталактитовые подложки с двойной структурой пор. Подложки имеют сквозные макропоры, которые делают возможным свободный обмен жидкости и газа из внутренней части носителя в окружающую среду. Размер макропор лежит в пределах величины клеток микроорганизмов.

Недостатком данного препарата является то, что он не предназначен для использования в качестве медицинского или ветеринарного препарата в связи с отсутствием данных о влиянии сталактитового носителя с нанесенными на нем микроорганизмами на микробиоценоз желудочно-кишечного тракта организма человека или животного.

Известен комплексный фармацевтический препарат, включающий фармацевтически приемлемый носитель и иммобилизованные на нем микроорганизмы (межд. заявка (WO) N 91/09608, МКИ А 61 К 35/74, опубл. 11.07.91 г.). Носитель не нарушает жизнеспособности микроорганизмов. В качестве микроорганизмов используют штамм L1a *Streptococcus lactis*. Препарат предназначен для борьбы с патогенной микрофлорой кишечника человека и животных, вызывающей диарею и другие желудочно-кишечные

расстройства.

Недостатком препарата является то, что используемый в нем штамм L1a *Streptococcus lactis* влияет в основном на патогенную микрофлору кишечника человека и животных, т. е. проявляет антагонистические свойства, но слабо участвует в восстановлении микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Кроме того, отсутствуют данные об антацидных свойствах носителя, что свидетельствует о слабой защите носителем иммобилизованных клеток *Streptococcus lactis* при действии внутренней среды организма с низкими значениями pH.

Наиболее близким техническим решением (прототипом) является комплексный бактериальный препарат, включающий носитель и иммобилизованные на нем микробные клетки в концентрации на 1 мм^2 $2,1 \cdot 10^3$ - $1,0 \cdot 10^5$ (патент РФ N 2017486, МПК⁵ А 61 К 31/00, опубл. 15.08.94 г.). В качестве носителя используют активированный уголь в виде порошка с размером частиц менее 30 мкм, а в качестве микроорганизмов используют лактобактерии и кишечные палочки.

Недостатком препарата-прототипа является то, что активированный уголь, используемый в качестве носителя, является тонкопористым сорбентом с преобладанием микропор и высокой удельной поверхностью. Вследствие этого микробные клетки расположены на поверхности частиц сорбента и недостаточно защищены при неблагоприятном воздействии окружающей среды. Активированные углы активно поглощают низкомолекулярные гормоны, витамины и газы кишечника, что ухудшает работу перистальтики. Они быстро забиваются и работают преимущественно в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Кроме того, угли не обладают антацидными свойствами, что не способствует выживаемости нанесенных на них клеток при действии сред с низкими значениями pH. Препарат не предусматривает использование одновременно нескольких штаммов микроорганизмов разных видов, например, смеси бифидо- и лактобактерий, что значительно снижает эффективность действия препарата особенно при восстановлении микрофлоры желудочно-кишечного тракта.

В основу настоящего изобретения поставлена задача создания такого комплексного бактериального препарата, который обеспечивал бы более эффективное пролонгированное лечебно-профилактическое действие на организм человека или животного за счет сохранения активности препарата при хранении и при введении в организм на всех участках желудочно-кишечного тракта.

Указанная задача решается тем, что в комплексном бактериальном препарате, включающем носитель, представляющий собой сорбент и клетки эубиотиков, иммобилизованные на указанном носителе, согласно изобретению, клетки эубиотиков используют совместно с компонентами питательной среды с биотитром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл, а в качестве сорбента используют материал с антацидными свойствами, развитой мезо- и макропористой структурой и объемом макропор не менее $0,01 \text{ см}^3/\text{г}$, при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0-50,0

Сорбент - Остальное до 100%

Причем носитель-сорбент может быть изготовлен в виде порошка с размером частиц не более 0,1 мм или в виде гранул размером (0,1 - 5,0) мм или в виде таблеток, при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0 - 30,0

Носитель-сорбент - Остальное

Носитель-сорбент может быть изготовлен в виде пасты, при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 30,0-50,0

Носитель-сорбент - Остальное до 100%

В качестве сорбента используют пористый материал на основе оксида алюминия с гидрофильно-гидрофобной топохимией поверхности, например, энтеросорбент типа СУМС, модифицированный углеродом, или энтеросорбент типа СИАЛ, модифицированный

кремнийорганическим полимером.

В качестве эубиотиков используют бифидо- или лактобактерии или их смесь.

Носитель-сорбент представляет собой механически прочные частицы порошка или гранулы или таблетки, выполненные из оксида алюминия, поверхность которых модифицирована углеродом при получении сорбента типа СУМС (черного цвета) и кремнийорганическим полимером при получении сорбента СИАП (белого цвета). Сорбенты имеют невысокую удельную поверхность (до 300 м²/г) и развитую структуру мезо- и макропор. Размеры макропор сорбента соизмеримы с размерами микробных клеток, что позволяет заполнять макропоры указанными клетками. Регулированием процентного содержания углерода или кремнийорганического полимера в сорбенте с последующими окислительно-восстановительными его обработками обеспечивается получение носителя с заданными гидрофильно-гидрофобными и другими топомеханическими характеристиками. Сорбенты типа СУМС или СИАП не извлекают витамины и гормоны из организма и не нарушают перистальтику, что делает возможным их применение длительными курсами. Наличие в сорбенте оксида алюминия придает его поверхности определенные буферные антацидные свойства, что способствует лучшему сохранению активности и выживанию иммобилизованных на нем микробных клеток, например, при прохождении препарата через желудок (устраняет отрицательное влияние желудочного сока на микробные клетки) или при других неблагоприятных условиях (низких рН).

Макропористая структура носителя-сорбента, ячейки которого заполнены микробными клетками, также способствует защите этих иммобилизованных клеток от инактивирующих факторов внешней среды. Причем микробные клетки, находящиеся в порах, и клетки, находящиеся близко к или на внешней поверхности носителя-сорбента, отличаются по своим десорбционным способностям, и такая неоднородность свойств клеток обеспечивает пролонгированное действие препарата и способствует колонизации не только верхних, но и нижних отделов кишечника. Пористый носитель, являясь энтеросорбентом, снимает эффекты местного (а через него и общего) токсикоза, что способствует выживаемости бактерий препарата и микрофлоры кишечника, а также снижает нагрузку на органы детоксикации человека или животного. Отличительной особенностью предлагаемого препарата является наличие в нем компонентов питательной среды микробных клеток, что также способствует выживаемости и приживаемости указанных клеток в организме, например, в кишечнике.

Кроме того, при использовании в препарате в качестве микробных клеток бифидо- и лактобактерий или их смеси обеспечивается не только инактивирование патогенных микроорганизмов (за счет антагонистических свойств указанных бактерий), но и восстановление сильно сокращенной микрофлоры кишечника при дисбактериозе и других заболеваниях.

Ниже приведено обоснование количественного содержания компонентов в препарате. При свободном объеме пор сорбента менее 0,01 см³/г не обеспечивается достаточное количество иммобилизованных микробных клеток в препарате (менее 1%). Препарат с содержанием микробной биомассы менее 1 мас.% имеет низкий биотитр с преобладанием прочно связанных с сорбентом клеток, т.е. действует преимущественно как энтеросорбент.

Свободный объем пор используемых носителей-сорбентов на основе оксида алюминия составляет не более 1,0 см³/г, то есть количество микробной биомассы (клетки, компоненты питательной среды и вода), которое может быть размещено в порах сорбента, не превышает 1,0 см³ на 1 г сорбента, т.е. на сорбенте может быть иммобилизовано микробных клеток не более 50 мас.% (верхняя граница). Количество микробных клеток, введенных в препарат свыше 50 мас.%, будет находиться вне пор сорбента, т.е. в незащищенном состоянии.

Введение в препарат микробной биомассы с биотитром 10⁸ - 10¹⁰ КОЕ/мл обеспечивает ему оптимальную биологическую активность. Если исходная микробная биомасса имеет титр меньше 10⁸ КОЕ/мл, то препарат обладает недостаточной биологической активностью и при введении в желудочно-кишечный тракт проявляет слабый лечебно-профилактический

эффект. Титр исходной микробной биомассы более 10^{10} КОЕ/мл значительно увеличивает стоимость препарата без значительного увеличения лечебно-профилактического эффекта.

Ниже приведены примеры составов предлагаемого комплексного бактериального препарата.

5 Пример 1. Комплексный бактериальный препарат в виде порошка с размером частиц 50 - 100 мкм, мас. %:

Бифидобактерии с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0 - 20,0

Носитель-сорбент - Остальное до 100%

10 Пример 2. Комплексный бактериальный препарат в виде пасты с размером частиц сорбента 150 - 500 мкм, мас. %:

Лактобактерии с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 35,0-50,0

Носитель-сорбент в виде порошка - Остальное до 100%

15 Пример 3. Комплексный бактериальный препарат в виде гранул размером 0,5 - 5,0 мм, мас. %:

Смесь (1:1) бифидобактерий и лактобактерий с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 10,0 - 20,0

Носитель-сорбент в виде гранул - Остальное до 100%

20 Пример 4. Комплексный бактериальный препарат в виде таблеток, мас. %:

Бифидобактерии с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0 - 10,0

Носитель-сорбент в виде таблеток - Остальное до 100%

Пример 5. Технология получения готовых форм препарата.

25 По специальной технологии готовят исходные сорбенты типа СУМС (патент РФ N 2026733), в котором оксид алюминия модифицирован углеродом, или типа СИАЛ (заявка на патент РФ N 96112479 от 04.07.96 г.), в котором оксид алюминия модифицирован кремнийорганическим полимером, с требуемой пористой структурой, химической природой поверхности и размером частиц (или гранул, или таблеток).

30 Далее в реактор при комнатной температуре загружают в указанных выше концентрациях носитель-сорбент в виде порошка или гранул или таблеток и биомассу бифидо- или лактобактерий или их смесь с компонентом питательной среды при определенном соотношении (примеры 1 - 4) в зависимости от конечного продукта. Смесь периодически перемешивают в течении 30 - 60 минут для полной иммобилизации клеток на носитель с получением сухих форм препаратов при концентрации микробных клеток 1,0 - 25,0 мас. % от количества сорбента. Препарат в виде пасты получают при концентрации микробных клеток 30,0 - 50,0 мас. %.

35 Пример 6. Исследование воздействия внешних инактивирующих факторов внешней среды на биологическую активность препаратов в процессе их хранения.

40 Для обоснования защитного действия пористых сорбентов СИАЛ или СУМС на микробную биомассу препарата в процессе воздействия инактивирующих факторов внешней среды (температура, кислород воздуха, длительность воздействия и другие факторы) используют стандартную процедуру ускоренного хранения биопрепарата при температуре 37°C. Результаты биотитрования стандартным методом серийных разведений на питательных средах в колонийобразующих единицах (КОЕ) на 1 г препарата (КОЕ/г) приведены в таблице 1.

45 Анализ таблицы 1 показывает, что по результатам ускоренного теста на хранение заявляемые комплексные препараты имеют биологическую активность в 3 - 4 раза выше, чем комплексный препарат-прототип и на 1 - 2 порядка выше, чем другие препараты-аналоги.

50 Пример 7. Исследование воздействия инактивирующих факторов желудочно-кишечного тракта на активность препаратов

Для оценки защитного действия от инактивирующих факторов желудочно-кишечного тракта пористых сорбентов типа СИАЛ или СУМС на микробную биомассу, содержащуюся в заявляемом препарате, все исследуемые препараты подвергают воздействию искусственного желудочного сока (0,1 Н соляная кислота с добавками пепсина) в течение

40 минут с последующей нейтрализацией и определением биотитра стандартным методом серийных разведений на питательной среде.

Результаты биотитрования приведены в таблице 2.

Анализ таблицы 2 показывает, что после воздействия на исследуемые препараты искусственным желудочным соком заявляемый комплексный бактериальный препарат по сравнению с препаратом-прототипом имеет биологическую активность в 2 - 3 раза выше, а по сравнению с другими препаратами-аналогами - в 14 - 200 раз.

Таким образом, заявляемый комплексный бактериальный препарат обеспечивает более эффективное пролонгированное лечебно-профилактическое действие на организм человека или животного за счет сохранения активности препарата при хранении и при введении в организм на всех участках желудочно-кишечного тракта.

Промышленная применимость. Изобретение относится к биотехнологии, медицине и ветеринарии.

15 **Формула изобретения**

1. Комплексный бактериальный препарат, включающий носитель, представляющий собой сорбент, и клетки эубиотиков, иммобилизованные на указанном носителе, отличающийся тем, что клетки эубиотиков используют совместно с компонентами питательной среды с биотитром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл, а в качестве сорбента используют материал с антацидными свойствами, развитой мезо- и макропористой структурой и объемом макропор не менее $0,01 \text{ см}^3/\text{г}$ при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0 - 50,0

Носитель-сорбент - Остальное до 100%

25 2. Препарат по п.1, отличающийся тем, что носитель-сорбент изготовлен в виде порошка с размером частиц не более 0,1 мм, или в виде гранул размером 0,1 - 5,0 мм, или в виде таблеток при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 1,0 - 30,0

Носитель-сорбент - Остальное до 100%

30 3. Препарат по п.1, отличающийся тем, что носитель-сорбент изготовлен в виде пасты при следующем количественном соотношении компонентов препарата, мас. %:

Клетки эубиотиков с питательной средой и титром 10^8 - 10^{10} КОЕ/мл - 35,0 - 50,0

Носитель-сорбент - Остальное до 100%

35 4. Препарат по п.1, отличающийся тем, что в качестве сорбента используют пористый материал на основе оксида алюминия с гидрофильно-гидрофобной топохимией поверхности, например энтеросорбент типа СУМС, модифицированный углеродом, или энтеросорбент типа СИАП, модифицированный кремнийорганическим полимером.

40 5. Препарат по п. 1, отличающийся тем, что в качестве эубиотиков используют бифидо- или лактобактерии или их смесь.

45

50

Таблица 1

Исследование влияния процедуры ускоренного хранения на биологическую активность (биотитр) препаратов

N	Вид препарата	Исходный биотитр КОЕ/г	Биотитр препарата после хранения при 37°С		Кратность падения титра через 14 суток, (разы)
			7 суток	14 суток	
1	Жидкий концентрат бифидобактерий	$3,7 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^6$	450
2	Сухой концентрат бифидобактерий, коммерческий	$4,7 \cdot 10^8$	$5,1 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^6$	72
3	Бифидобактерии на активированном угле (прототип)	$1,6 \cdot 10^8$	$5,4 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	13
4	Бифидобактерии на СУМСе, заявляемый сухой препарат	$1,1 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^7$	3,1
5	Бифидобактерии на СИАЛе, заявляемый сухой препарат	$7,5 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$	3,8
6	Сухой концентрат лактобактерий, коммерческий	$6,3 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	52
7	Лактобактерии на СУМСе, заявляемый сухой препарат	$2,0 \cdot 10^8$	$7,4 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	6,4