



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

A 23 C 9/123

A 61 K 31/715

A 61 K 35/20

A 61 K 35/74

A 61 K 36/15

C 12 R 1/225 (2006.001)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 112471 A

(22) Заявено на 09.03.2017

(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 09.2 на 2018

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) рег. №

(71) Заявител(и):

"ЛАКТИНА" ООД, 1720 БАНКЯ, ул. "София"
101

(72) Изобретател(и):

"ЛАКТИНА" ООД

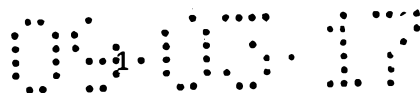
(74) Представител по индустриална
собственост:Лиляна Любомирова Христова, 1000 София, пл.
"Славейков" 11, ет. 1, офис 5

(86) № на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) ИМУНОМОДУЛИРАЩ СИНБИОТИЧЕН СЪСТАВ

(57) Изобретението се отнася до имуномодулиращ синбиотичен състав, по-специално пробиотичен бактериален състав, допълнително обогатен с пребиотик и биологично- активни вещества, повлияващи благотворно здравето на човека при профилактика и/или терапия на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт в т.ч. при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво. По-специално, съставът включва пробиотична компонента от живи клетки на биологически чиста култура от бактериален шам, избран от групата на *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* LBB-06- НБПМК 8918, *Lactobacillus helveticus* LLH-108- НБПМК 8760, *Lactobacillus acidophilus* LLA-10- НБПМК 8242, *Lactobacillus rhamnosus* LLR-L1-НБПМК 8769 и *Lactobacillus fermentum* LLF-01- НБПМК 8781 или техни комбинации, пребиотик- арабиногалактан и коластра. Използваните щамове млечно-кисели бактерии са подбрани така, че в комбинация помежду си и в комбинация с останалите компоненти- пребиотика и коластрата, дават висока преживяемост, постигат специфичния пробиотичен ефект и гарантираната антимикробна активност срещу човешки патогени, както адхезионните и имуномодулиращите свойства на състава. Несмилаемите диетични растителни фибри от арабиногалактан, благодарение на своята имуномодулираща (антивирусна и антитуморна) активност съчетано в синбиотичната формула формират защитен слой около пробиотиците и контролират тяхното освобождаване в чревния тракт. Обогатената мултифункционална формула на синбиотичния състав съгласно изобретението, включваща богата на пролин полипептиди (4.5%) и съдържание на IgG (минимум 20%) коластра, доставя необходимите имунни, растежни фактори и балансирана комбинация от витамини, и минерали. Прилаганият орално синбиотичен състав демонстрира имуномодулиращ ефект, изразен в повишаване % на активираните NK (natural killer) клетки в периферната кръв и понижаване нивата на противовъзпалителни цитокини във фекални проби, а при пациенти със синдром на раздразненото черво (IBS) в намаляване на фекалния калпротектин до редукция или дори изчезване на клиничната симптоматика.



ИМУНОМОДУЛИРАЩ СИНБИОТИЧЕН СЪСТАВ

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до имуномодулиращ синбиотичен състав, по-специално пробиотичен бактериален състав, допълнително обогатен с пребиотик и биологично-активни вещества, повлияващи благотворно здравето на човека при профилактика и/или терапия на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт в т.ч при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

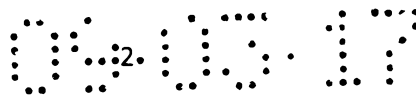
10 ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Имунната система се явява сложна многокомпонентна система, състояща се от няколко подсистеми, които защитават организма на гостоприемника от инфекциозни агенти и туморни клетки. Имунната система осъществява контрола и е отговорна по подходящ начин да атакува патогенните агенти, да ги разпознава и отстранява от организма.

15 Поддържайки придобития имунитет, имунната система непрекъснато повишава и имунния си отговор по отношение възможната бързина за унищожаване на чуждия антиген в организма.

От друга страна стомашно-чревния тракт съдържа богата флора от над 500 различни видове бактерии, важни за неговото здраве. При изменение на обичайното състояние на здравето, някои бактерии, могат да се увеличат прекомерно и да предизвикат инфекции и отслабване на имунитета. Отслабването и дисбаланса на естествената защитна система може да позволи на потенциално патогенните микроорганизми да предизвикат клинични инфекции. Поддържането на баланса на стомашно-чревния тракт е от особено значение за човека и той е отговорен за правилното функциониране и хранене на всяка клетка от организма. Млечнокиселите бактерии се явяват един инструмент за обогатяване на 25 стомашно-чревния тракт с ползотворни бактерии.

Млечнокиселите бактерии, през последните години, се използват за превенция или съпътстващи лечението средства на имунни заболявания. Известно е от WO 2015/046407 профилактично средство под формата хранителен състав, и като медикамент, съдържащо 30 млечнокисели бактерии, по-специално щамове *Lactobacillus helveticus*, предназначено за профилактика на имунни заболявания посредством инхибиране пролиферацията на имунните растежни клетки IL-10 / IL-12. (свързани с ентерит, ревматоиден артрит, имунни заболявания, като хепатит).



Известен е също така от EP2482826 състав, съдържащ арабиногалактан предназначен за подпомагане на адаптивния имунен отговор срещу чужди антигени вследствие ваксиниране и прилаган под формата на функционални състави или диетични добавки.

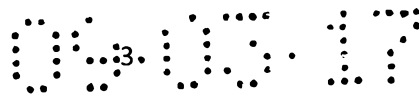
Известен е още от RU 2 599 544 и сух таблетен състав на млечна основа за орално и/или перорално приложение, съдържащ сухо обезмаслено мляко и/или суха суроватка и/или суха лактоза от 20-50%; подсладящи агенти от 10-30%; пълнители-сухи плодове от 5-20%; лифилизирани пробиотични култури избрани от *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* и/или *Bifidobacterium adolescentis* и/или *Lactobacillus acidophilus* и/или *Lactobacillus casei*, и/или *Lactobacillus rhamnosus* общо от 0-20%; биологично активни вещества (БАВ) в т.ч арабиногалактан и витаминен комплекс от 0-5%; олигозахариди от 0-20% и структурообразуващи вещества 0-5% .

От BG 65 614 е известен синбиотик, представляващ смес от монокултури *Lactobacillus acidophilus* , *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* и инулин и в даден случай пчелен прашец или пчелно млечице в описани количества.

Известен е също от CZ 28707 и млечен пробиотичен ферментирал продукт с положително въздействие върху реологията на продукта, съдържащ 1-10 % коластра, 1-2 % пробиотична култура от *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecium* и *L. acidophilus*, 0, 01-4% киселомлечна или сметаново-кефирна култура, 1-7% пребиотик избран от фруктоолигозахарид или инулин и до 100% козе/краве мляко.

Недостатък на описания млечен пробиотичен продукт е неговата недостатъчна биологична ценност на избраните пробиотични култури, както и недостатъчната им преживяемост при попадане в стомашно-чревния тракт.

Проблемът, който трябва да се реши е разширяване на асортиментите на функционалните млечни продукти, но и създаване на принципно нова форма на продукт с имуномодулиращо действие, който да обогатява и балансира стомашно-чревния тракт с млечнокисели бактерии със специфично пробиотично действие и с техните продукти от жизнената им дейност, както и същевременно да осигурява условия за развитие, размножаване и повишаване ефекта на пробиотика.

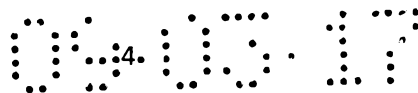


ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Тези проблеми се решават съгласно изобретението с имуномодулиращ синбиотичен състав- активна формула на основата на пробиотик, съдържащ живи клетки на биологически чиста култура от бактериален щам, избран от групата на:

- 5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB -06-NBIMCC 8918,
Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760,
Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242,
Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769 и
Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781 или техни комбинации, както и пребиотик под
- 10 формата на несмилаеми диетични фибри, изолирани от кора на сибирска лиственица – полизахаридът арабиногалактан (*Arabinogalactans* от *Larix gmelinii*) и първично мляко, отделяно от женските бозайници по време на лактация - коластра, богата на пролинсъдържащи пептиди с имуномодулиращ ефект (мин. 4.5 % PRPs) и IgG (мин. 20 %), където количеството в mg на компонентите, е съответно:
- 15 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB -06-NBIMCC 8918 от 30 до 120 mg;
Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760- от 55 до 220,
Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242- от 55 до 220,
Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769- от 55 до 220,
Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781- от 55 до 220,
- 20 Арабиногалактан - от 100 до 400 и
Коластра - от 50 до 200.
- Всеки бактериален щам на пробиотика от състава притежава активност в границите от 10^8 до 10^{10} CFU бактерии/гр .

- Новоизолираният *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB-06- NBIMCC 8918
- 25 представлява млечен изолат, под формата на Грам /+/, каталазоотрицателни средно дълги до дълги пръчки, аеротолерантни, с интензивен растеж при 45°C, но не и при 15°C, не продуцира CO₂ от глюкоза, образува метакронатинови гранули в зависимост от възрастта на културата, с интензивен растеж на млечна среда с образуване изключително на D (-) млечна киселина при 24-часова ферментация. Културата не поддържа добър растеж на MRS agar.
- 30 Другият новоизолиран щам *Lactobacillus fermentum* LLF-01, изолиран от слюнка на здрав човек, представлява Грам /+/, каталазоотрицателни пръчки с ясно изразен полиморфизъм, аеротолерантни, с интензивен растеж на 37°C, и по-слаб на 15°C, продуцира CO₂ от глюкоза,



с интензивен растеж на млечна среда с образуване на 40 % D (-) и 60 % L (+) млечна киселина при 24-часова ферментация. Културата поддържа добър растеж на MRS агар.

Въглехидратен метаболизъм на щамовете:

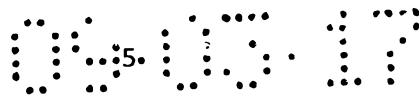
Наименование на монокултурата	Ферментира	Не ферментира
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB-06	глюкоза, фруктоза, маноза, лактоза	глицерол, еритрол, арабиноза, рибоза, ксилоза, адонитол, β метил-ксилозид, галактоза, сорбоза, рамноза, дулцитол, инозитол, манитол, сорбитол, α метил-D-манозид, α метил-D-глюкозид, N ацетил глюкозамин, амигдалин, арбутин, ескулин, салицин, целобиоза, малтоза, мелибиоза, захароза, трехалоза, инулин, мелизитоза, рафиноза, amidон, гликоген, ксилитол, β гентобиоза, тураноза, ликсоза, тагатоза, фукоза, арабитол, глюконат, кето глюконат
Lactobacillus fermentum LLF-01	рибоза, галактоза, глюкоза, фруктоза, маноза, лактоза, мелибиоза, захароза, рафиноза, глюконат	глицерол, еритрол, арабиноза, ксилоза, адонитол, β метил-ксилозид, сорбоза, рамноза, дулцитол, инозитол, манитол, сорбитол, α метил-D-манозид, α метил-D-глюкозид, N ацетил глюкозамин, амигдалин, арбутин, ескулин, салицин, целобиоза, малтоза, трехалоза, инулин, мелизитоза, amidон, гликоген, ксилитол, β гентобиоза, тураноза, ликсоза, тагатоза, фукоза, арабитол, кето глюконат

- 5 Останалите монокултури съответно на щам Lactobacillus helveticus LLH-108- NBIMCC 8760, Lactobacillus acidophilus LLA-10- NBIMCC 8242 и Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- NBIMCC 8769 са известни и участвуват в други разработени състави.

Щамовете притежават технологична стабилност с доказана добра преживяемост по време на лиофилизация, както и запазена висока жизнеспособност по време на съхранение, което от своя страна гарантира правилното протичане на процесите храносмилане и поддържане баланса на чревната перисталтика.

- 10 С оглед постигане на продукт с целящите свойства, щамовете са селектирани по критерия: – антимикробна активност, - преживяемост в симулиран чревен сок, - ин-витро адхезия към човешка клетъчна линия и - имуномодулираща активност. Щамовете не са
- 15 генно модифицирани и са без доказана преносима антибиотична резистентност.

Методът за получаване на синбиотичния състав съгласно настоящото изобретение се състои в следното. Всяка една от петте вида бактерии се култивира поотделно в подходящата



за вида хранителна среда на основата на мляко или бульонна среда, последвано от лиофилизиране и смилане. Предпочитаните инградиенти за такава среда са обезмаслено мляко, дрождев екстракт, пептон от казеин, месен екстракт, D-глюкоза. Към средата се добавят соли като сулфатни (магнезиев и манганов) и буфери, като натриев ацетат, натриев фосфат, калиев фосфат. Оптималното съдържание на обезмаслено мляко варира между 12-18% (w/v). Количеството на дрождевия екстракт варира от 0,06 % (w/v) до 0,5 %. В даден случай, добавянето на суха (MRS) среда в количества 0,1-1,0% (w/v) оказва също благоприятен ефект върху биологичната активност на лактобацилите.

Предпочитаните инградиенти на средата с добавен сух MRS включват D-глюкоза, пептон от казеин, месен екстракт и дрождев екстракт, както и Tween-80, ди-амониев хидроген цитрат, CH_3COONa , MgSO_4 и MnSO_4 . Към основната среда се добавя и буферно-активираща смес, представляваща воден разтвор на CH_3COONa , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 и дрождевият екстракт е в количество от 0,2 % (v/v) до 2,0 %, по-специално 0,5 % (v/v). Така описаните и подбрани компоненти на средата се смесват и разтварят във вода.

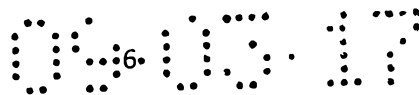
След пълното разтваряне и хомогенизиране на използваните инградиенти, средата се довежда до pH 6.6-6.8 и се стерилизира на температурен режим 107°C за 3 мин. Преди инокулиране културалната среда се охлажда до температура 38°C. Количеството на инокулиращата култура варира от 1 до 5 % (v/v) от общото количество на културалната среда. Ферментацията се извършва при температура 37°C в продължение на 16-24 ч. Получената активна култура в края на ферментационния процес се смесва с протектираща среда, съдържаща 10 % сухо обезмаслено мляко и 10 % захароза и се лиофилизира. Получената суха култура се смилва и съхранява на -20 °C до момента на смесване. Получената смес се хомогенизира и подлага съответно на капсулиране, дозиране в сешетни форми или таблетирание. За изготвяне на таблетки, получената бактериална смес се оситнява, пресява и последователно се прибавят пресети останалите инградиенти и помощни вещества. Прилага се по 2 капсули/ таблетки или 1 саше за доза от един до два пъти дневно. Употребата може да бъде неограничено време. Съхранява се на хладно и сухо място.

Съгласно друг аспект, настоящото изобретение се отнася до пробиотичен бактериален състав с имуномодулиращо действие, съдържащ ефективно количество от живи клетки на биологически чиста култура от бактериален щам, избран от групата на:

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* LLB -06- НБПМК 8918,

Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760,

Lactobacillus acidophilus LLA-10- N НБПМК 8242,



Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769,

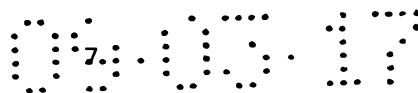
Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781, или техни комбинации, при описаните количества в mg съгласно настоящото изобретение.

Съгласно друг следващ аспект, настоящото изобретение се отнася до бактериален щам
5 *Lactobacillus fermentum* LLF-01, регистриран в НБПМК под № 8781 от 21.05.2013 и щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB -06, регистриран в НБПМК под № 8918 от 01.02.2016 продуценти на бактериален състав с имуномодулиращо действие.

Съгласно още един следващ аспект, настоящото изобретение се отнася до използването на имуномодулиращ синбиотичен бактериален състав, пробиотичен
10 бактериален състав, щам *Lactobacillus fermentum* LLF-01 НБПМК № 8781 и щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB -06/НБПМК № 8918, за получаване на продукт под формата на хранителна добавка и/или фармацевтичен продукт, предназначен за профилактика и/или съпътстващ терапията на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт (имуномодулатор на ниво мукозна имунна система и вродена имунна система), както и за
15 нормализиране и балансиране функцията на стомашночревния тракт в т.ч след продължителен прием на антибиотици, при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

Предимствата на изобретението се основават на свойствата на използваните щамове лактобацили, (в т.ч самостоятелно на новоизолираните), подбрани така, че в комбинация
20 помежду си и в комбинация с останалите компоненти- пребиотици и коластрата, да дават висока преживяемост, да постигат специфичния пробиотичен ефект и гарантирана антимикробна активност срещу човешки патогени, адхезионни и имуномодулиращи свойства. Мултибактериалната формула комбинира по уникален начин щамове с: -широк спектър на антимикробна активност, като ги прави естествени антагонисти на потенциални
25 патогенни бактерии; - добра транзитна толерантност, като позволява на щамовете да преживеят пасажа през различните отдели на гастроинтестиналния тракт и да достигнат жизнени и активни до тяхното прицелно място на действие в долните отдели на тънките черва; и – висока адхезионна способност, като гарантира трайно колонизация на чревния тракт и взаимодействие на микроорганизмите с мукозната повърхност, както и осигурява
30 имуномодулиращата им активност.

Несмилаемите диетични растителни фибри от арабиногалактан, благодарение на своята имуномодулираща (антивирусна и антитуморна) активност съчетано в синбиотичната формула формират защитен слой около пробиотиците и контролират тяхното



освобождаване в чревния тракт. Обогатената мултифункционална формула на синбиотичния състав съгласно изобретението, включваща богата на пролин полипептиди (4.5%) и съдържание на IgG (минимум 20%) коластра, доставя необходимите имунни, растежни фактори и балансирана комбинация от витамини и минерали.

- 5 Полученият състав съгласно настоящото изобретение е с висока активност в границите от 10^8 до 10^{10} CFU бактерии/гр от състава и трайност на готовия продукт до 24 месеца.

Прилаганият орално синбиотичен състав при здрави хора, демонстрира имуномодулиращ ефект като повишава % на активираните (natural killer) NK клетки в периферната кръв и понижава нивата на противовъзпалителни цитокини (IL-6 и IFN- γ) във фекални проби, а при

10 пациенти със синдром на раздразненото черво (IBS), намалява възпалителната активност, изразена в намаляване на фекалния калпротектин и предизвиква редукция или дори

изчезване на клиничната симптоматика.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

- 15 ФИГ. 1: Преживяемост на щамове лактобацили в симулиран чревен сок;
- ФИГ. 2: Адхезионна способност на щамове лактобацили спрямо човешка колоректална аденокарциномна клетъчна линия HT-29 (AACC HTB 38);
- ФИГ. 3: Имуномодулираща активност на монокултурите по отношение на TNF- α получена от Balb/c мишки;
- 20 ФИГ. 4: Имуномодулираща активност на монокултурите по отношение на IL-6 получена от Balb/c мишки;
- ФИГ. 5: Имуномодулираща активност на монокултурите по отношение на IL-10 получена от Balb/c мишки;
- ФИГ. 6: Имуномодулираща активност по отношение секрецията на TNF- α , IL-6 и IL-10,
- 25 получени от Balb/c мишки на пробиотичния състав и синбиотичния състав;
- ФИГ.7: Фекален калпотротектин (ФКП) на синбиотичния състав при пациенти със синдром на раздразненото черво (IBS).

ПРИМЕРНИ ИЗПЪЛНЕНИЯ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

30 ПРИМЕР 1.

A/ Състав на активната формула на основата на пробиотик, съдържаща активната монокултура на щама лактобацил *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в mg.



Компонент/ пример	1. A.1.	1.A.2	1.A.3
-------------------	---------	-------	-------

Активна бактериална смес

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB-06	30	60	120
--	----	----	-----

5

В/ Състав на активната формула на основата на пробиотик, съдържаща активната монокултур на щама лактобацил Lactobacillus fermentum в mg.

Компонент/ пример	1. B.1.	1.B.2	1.B.3
-------------------	---------	-------	-------

Активна бактериална смес

Lactobacillus fermentum LLF-01	55	110	220
--------------------------------	----	-----	-----

10

С/ Състав на активната формула на основата на пробиотик, съдържаща петте активни монокултури.

Активната бактериална смес в една доза съдържа следните компоненти : сух лиофилизат

15 активни монокултури на пет щама лактобацили в mg както следва:

Компонент/ пример	1.C.1.	1.C.2	1.C.3	1.C.4
-------------------	--------	-------	-------	-------

Активна бактериална смес

Lactobacillus delbrueckii subsp.	30	60	75	120
----------------------------------	----	----	----	-----

bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918

20

Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760	55	110	137.5	220
--	----	-----	-------	-----

Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242	55	110	137.5	220
--	----	-----	-------	-----

Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769	55	110	137.5	220
--	----	-----	-------	-----

Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781	55	110	137.5	220
--	----	-----	-------	-----

Общо/mg	250	500	625	1000
---------	-----	-----	-----	------

25 Всяка една от петте монокултури от лактобацилите се култивира поотделно, като за целта се приготвят необходимите хранителни среди, характерни за дадения щам и вид, след което същите се лиофилизират и смилат.

Култивирането на всяка монокултура протича в предварително приготвена течна хранителна среда (културална среда), към която са разтворени и ресуспендирани основните

30 компоненти, стимулиращи ферментационния процес на съответната монокултура.

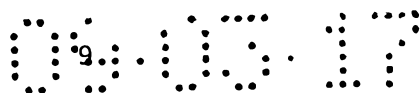
Получаване на чиста култура от Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918 и Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760.

100 л възстановено сухо обезмаслено мляко /14 % сухо вещество/ с добавка на 0.1 %

35 дрождев екстракт и 2.0 л буферно активираща смес представляваща воден разтвор на

CH₃COONa, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄ и дрождевия екстракт се стерилизират при

107°C за 3 мин. Средата се охлажда до 37°C и се инокулира с 4 л опреснена лабораторна



култура. Инкубира се във ферментор при 37°C в продължение на 16 часа при рН 5,6 – 5,7 при автоматичен режим. Получената култура се охлажда до 4°C, смесва се с 10 л протектираща среда, съдържаща 10 % сухо обезмаслено мляко, 10 % захароза и се лиофилизира. Получената суха култура се смилва и се съхранява на -20 °С до момента на смесване.

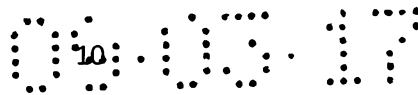
Получаване на чиста култура от *Lactobacillus rhamnosus* LLR –L1- НБПМК 8769, *Lactobacillus acidophilus* LLA-10- НБПМК 8242 и *Lactobacillus fermentum* LLF-01- NBIMCC 8781.

100 л възстановено сухо обезмаслено мляко /14 % сухо вещество/ с добавка на 0.1 % дрождев екстракт, 0.1 % (w/v) MRS бульон и 2.0 л буферно активираща смес представляваща воден разтвор на CH_3COONa , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 и дрождев екстракт се стерилизират при 107°C за 3 мин. Средата се охлажда до 37°C и се инокулира с 4 л опреснена лабораторна култура. Инкубира се във ферментор при 37°C в продължение на 16 часа при рН 5.6 – 5.7 при автоматичен режим. Получената култура се охлажда до 4°C, смесва се с 10 л протектираща среда, съдържаща 10 % сухо обезмаслено мляко, 10 % захароза и се лиофилизира. Получената суха култура се смилва и се съхранява на -20 °С до момента на смесване.

ПРИМЕР 2

20 Примерен синбиотичен състав в една доза на капсули, съдържащ активната формула на основата на про-, -пребиотик и коластра в mg както следва:

Компонент/ пример	2.1.	2.2	2.3	2.4
Синбиотичен състав				
25 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК8918	30	60	75	120
<i>Lactobacillus helveticus</i> LLH-108- НБПМК8760	55	110	137.5	220
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LLA-10- НБПМК8242	55	110	137.5	220
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LLR-L1- НБПМК 8769	55	110	137.5	220
<i>Lactobacillus fermentum</i> LLF-01- НБПМК 8781	55	110	137.5	220
30 Arabinogalactans (от <i>Larix gmelinii</i>)	100	200	250	400
Коластра ASP60-201- (от крава, съдържаща мин. 20 % IgG и мин. 4.5 % PRPs)	50	100	125	200
35 Общо/ mg	400	800	1000	1600



Получената многокомпонентна смес от лиофилизираните монокултури се смесва с останалите компоненти от пребиотика арабиногалактан и коластрата в съотношения съгласно настоящото изобретение, хомогенизира се и е подходяща за дозиране на необходимата орална форма. Полученият състав се разпределя в стомашно-устойчиви веган капсули, избрани от DR caps TM, Capsugel, предназначени за орален прием.

5

Всяка капсула съдържа 250 млн. живи бактерии към момента на производство, полученият състав е стабилен със срок на годност 24 месеца.

ПРИМЕР 3

10 Синбиотичен състав на готов продукт, лиофилизирана култура за 1000 гр готов продукт в гр, както следва:

Компонент/ пример

<u>Синбиотичен състав</u>		<u>3.1.</u>
	Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06-NBIMCC 8918	75
15	Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760	137.5
	Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242	137.5
	Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769	137.5
	Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781	137.5
20	Arabinogalactans (Ametis JSC, от Larix gmelinii)	250
	Коластра ASP60-201- (от крава, съдържаща мин. 20 % IgG и мин. 4.5 % PRPs	125

25

ПРИМЕР 4

4.а. Резултати от проведените изпитвания върху активните монокултури лактобацили.

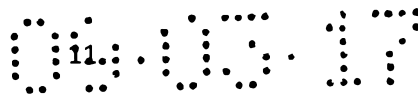
Щамове лактобацили са изпитани за: - антимикробна активност, - преживяемост в симулиран чревен сок, - In vitro адхезия към човешка клетъчна линия и - имуностимулираща активност, като изявилите се рекордьори от всички изпитвани щамове са представени съответно на Фиг 1- 5 и са селектирани за синбиотичния състав съгласно настоящото изобретение.

30

Преживяемостта на отделните щамове е доказана в симулиран чревен сок, като активност с брой клетки в началото на изпитването и след 2 часа в 0.3% жлъчни соли рН 7, резултатите са представени на фиг.1 .

35

Антимикробната активност е представена на табл. 1 и изпитвана срещу човешки патогени Staphylococcus aureus, Escherichia coli и Candida albicans по метода на ямките с две моделни



системи бульон и мляко с кисели (А) и неутрализирани (N) безклетъчни супернатанти от експоненциални култури лактобацили, като индикираните резултати с (++)- проявяват силна инхибиция, а (+)- значима и (-) – липса на инхибиция.

5 Адхезионната способност на монокултурите е тествана спрямо човешка колоректална аденокарциномна клетъчна линия HT-29 (AACC HTB 38), като е направено количествено определяне на броя адхезирали клетки cfu/ml на рекордърите *Lactobacillus helveticus* LLH-108 и *Lactobacillus fermentum* LLF-01, чиято висока адхезия ги определя като потенциални колонизатори на чревния тракт. Резултатите са представени на Фиг. 2.

10 Имунomodулиращите свойства на монокултурите са подложени на тест за сравнителна имунomodулираща активност по отношение секрецията на цитотоксични сигнални пептиди от спленцити по отношение на TNF- α , IL-6 и IL-10, получени от Balb/c мишки, съгласно съответно фиг. 3-5. Намалването на секрецията на противовъзпалителните цитокини TNF- α и IL-6, и стимулиране секрецията на антивъзпалителния цитокин IL-10 влияе в посока на локалния имуен толеранс и благоприятства чревната среда, която е

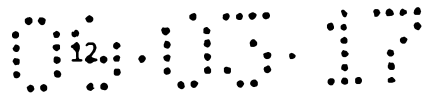
15 непрекъснато под атака на различни хранителни антигени и микроорганизми. За определянето са използвани топлинно инактивирани клетки, получени от експоненциална култура на съответните лактобацили. Убити клетки с определена концентрация (1×10^8 cfu/ml) се инкубират съвместно със спленцити, изолирани от далаци на Balb/c мишки (на възраст 6-8-седмици) за 20 ч /37°C. Супернатантите, получени при третиране на

20 спленцитите са използвани за определяне концентрацията на произведените цитокини TNF- α , IL-6 и IL-10, посредством ензимен имуноанализ (ELISA kits).

4.6. Резултати от тестовете на активната пробиотична компонента и активната пробиотична компонента с добавен арабиногалактан и коластра.

25 Получената пробиотична компонента, съдържаща смес от петте щама лактобацили, както и пробиотичната компонента с добавен арабиногалактан и коластра, получени съответно съгласно изобретението (пример 1.С и примери 2) са подложени на тест за сравнителна имунomodулираща активност по отношение секрецията на цитотоксични сигнални пептиди от спленцити по отношение на TNF- α , IL-6 и IL-10, получени от Balb/c мишки, съгласно фиг.

30 6. Добавянето на арабиногалактан и коластра съществено понижава синтезата на противовъзпалителния цитокин IL-6 в сравнение с чистия пробиотик.



Определянето на имуномодулиращите свойства на пробиотичната компонента и синбиотичната смес е проведено както по-горе при оценката на отделните монокултури. Лактобацилите в пробиотичната компонента са представени в еднакво съотношение.

5 4.в Резултати от тестовете на синбиотичния състав съгласно изобретението върху здрави хора, доказващи имуномодулиращ ефект.

Полученият синбиотичен продукт, дозиран в капсули съгласно изобретението, съдържащ 5 –те щама лактобацили, арабиногалактан и коластра е тестван по отношение следните компоненти на имунната система- естествени клетки убийци (NK) в периферното кръвообращение, тест върху противовъзпалителни цитокини IL-6 и IFN- γ във фекални проби при 20 здрави доброволци (7 мъже и 13 жени) на средна възраст 35 ± 2 (19-66) години след 21-дневен прием на синбиотичния състав при режим на приемане 2 капсули /400mg сутрин и 2 капсули /400mg вечер. Кръвните проби са тествани за тотални и активирани NK клетки посредством цитометрия (FACS Calibur, BD, USA) с моноклонални антитела (anti CD3 FITC, anti –CD16/56 PE, anti-HLA-DR PE Cy5, BD, USA). Един грам от фекалните проби се хомогенизират в 1000 ml фосфатен буфер. Получените супернатанти от фекалните екстракти след центрофугиране са тествани за наличие на цитокините IL-6 и IFN- γ посредством ензимен имуноанализ (Human ELISA kits, Gen Probe Diaclone SAS, FR). Резултатите преди и след прием на синбиотичния състав по отношение NK клетки са представени в табл. 2, а цитокините IL-6 и IFN- γ , като концентрация в pg/ml са представени съответно на табл. 3. Прилагането на синбиотичния продукт отчита имуномодулиращ ефект след орален прием на синбиотика съгласно настоящото описание, изразен в статистически достоверното повишаване % на NK клетки в периферната кръв и понижаване на нивата на противовъзпалителните цитокини IL-6 и IFN- γ във фекалните проби.

25 4.с. Резултати от тестовете на синбиотичния състав съгласно изобретението върху пациенти със синдром на раздразненото черво (IBS).

Полученият синбиотичен продукт, дозиран в капсули съгласно изобретението, съдържащ 5 –те щама лактобацили, арабиногалактани и коластра е тестван по отношение компонентите на имунната система- маркера за оценка на чревното възпаление- фекален калпотротектин (ФКП) от фекални проби при 20 пациенти с IBS (6 мъже и 14 жени) на средна възраст 37 ± 2 (24-52) години след 21-дневен прием на синбиотичния състав при режим на приемане 2 капсули /400mg сутрин и 2 капсули /400mg вечер.

ФКП е изследван чрез имунохроматографски тест за количествено определяне на калпротектин в човешки фекални проби (Quantum Blue, Buehlmann Laboratories AG, Switzerland). Крайният резултат се представя в микрограма на грам фецес ($\mu\text{g/g}$). Чувствителността на теста е в границите $30 \mu\text{g/g} - 300 \mu\text{g/g}$. Нормалните нива на ФКП при това изследване са под $50 \mu\text{g/g}$ с посочване на „сива зона“ до $60 \mu\text{g/g}$.

Резултатите преди и след прием на синбиотичния състав съгласно описанието по отношение ФКП са представени съответно на фиг. 7, като е отчетено статистически достоверно намаляване на възпалителната активност след приема на синбиотика, изразено в намаляване на ФКП и редукция, дори изчезване на клиничната симптоматика.

10

Таблица № 1 - Антимикробна активност на активните монокултури

Вид Щам	Тест микроорганизъм		
	<i>Staphylococcus aureus</i> NBIMCC 3703	<i>Escherichia coli</i> NBIMCC 3702	<i>Candida albicans</i> NBIMCC 74
<i>Lb. bulgaricus</i> LLB-06	A ⁺ ; N ⁺	A ⁺ ; N ⁺	-
<i>Lb. helveticus</i> LLH-108	A ⁺ ; N ⁺	A ⁺	-
<i>Lb. acidophilus</i> LLA-10	A ⁺ ; N ⁺	A ⁺	-
<i>Lb. rhamnosus</i> LLR-L1	A ⁺ ; N ⁺	A ⁺	A ⁺
<i>Lb. fermentum</i> LLF-01	A ⁺ ; N ⁺	A ⁺	-

Таблица № 2- Имуномодулиращ ефект на синбиотичния състав съгласно изобретението върху здрави хора по отношение НК клетки

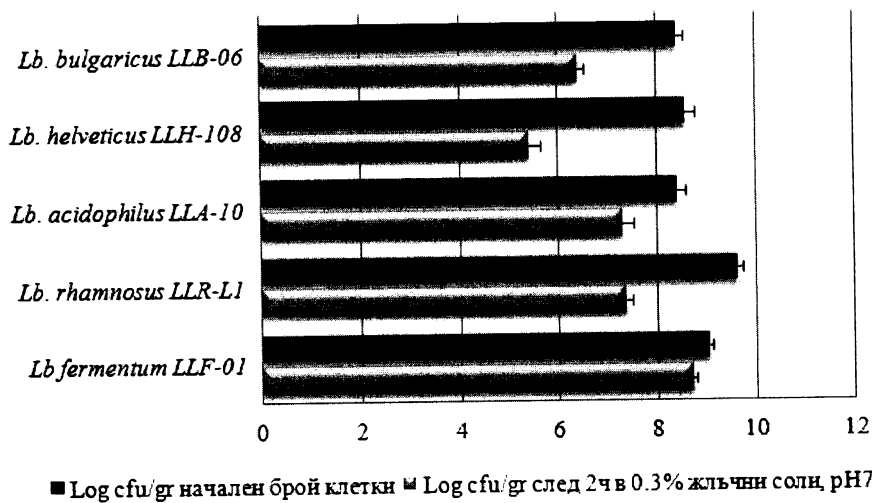
Здрави индивиди			
	Преди прием на синбиотик	След прием на синбиотик	Статистическа разлика, p
Общ процент на НК клетки	16.1±1.2 (8.1-25.5)	14.6±1.2 (5.1-25.7)	0.073
Активирани НК клетки носещи (HLA- DR+)	4.9±0.6 (1.3-9.9)	7.1±0.7 (2.6-13.5)	<u>0.03</u>

15

Таблица №3- Имуномодулиращ ефект на синбиотичния състав съгласно изобретението върху здрави хора по отношение IL-6 и IFN- γ

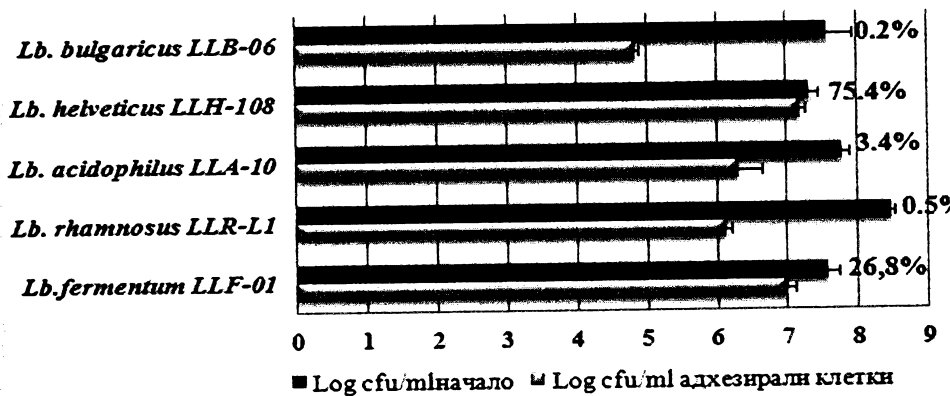
Здрави индивиди			
	Преди прием на синбиотик	След прием на синбиотик	Статистическа разлика, p
IL-6, pg/ml	5.6±0.2 (3.9-6.75)	3.1±0.1 (2.3-5.5)	<u>0.000</u>
IFN γ , pg/ml	73.2±2.6 (55.5-92.5)	43.6±3.9 (28.3-99)	<u>0.000</u>

Преживяемост в симулиран чревен сок

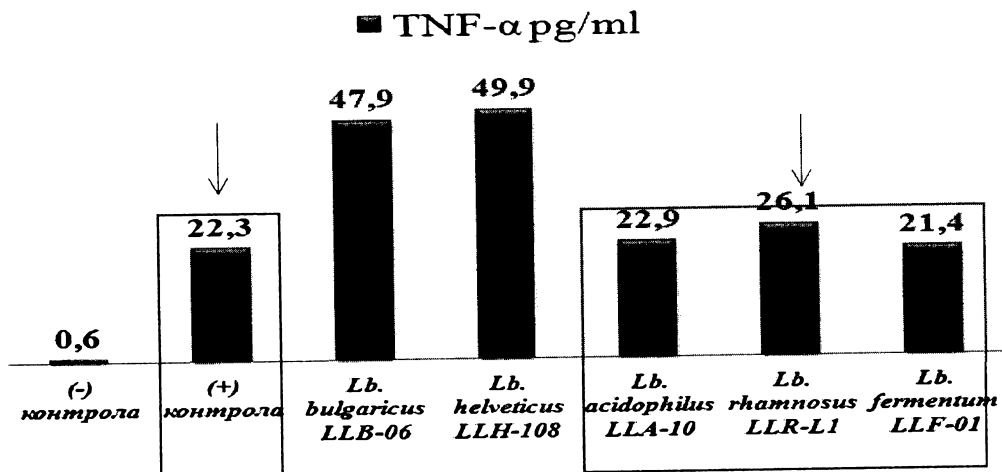


Фиг 1

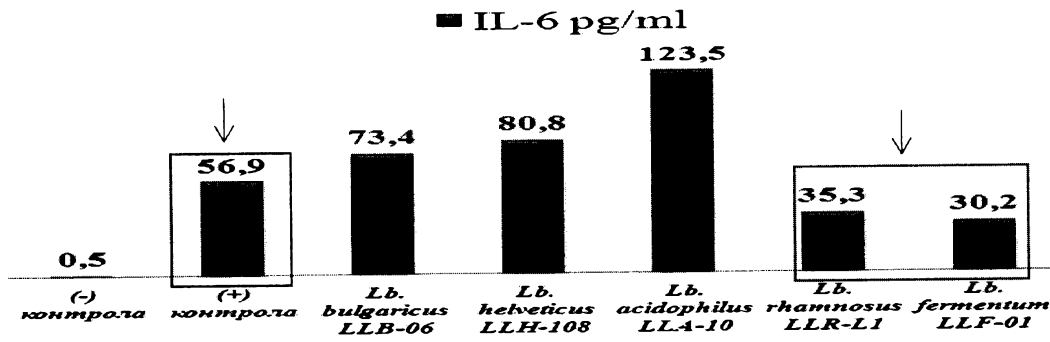
Адхезия към HT-29 клетъчна линия (%)



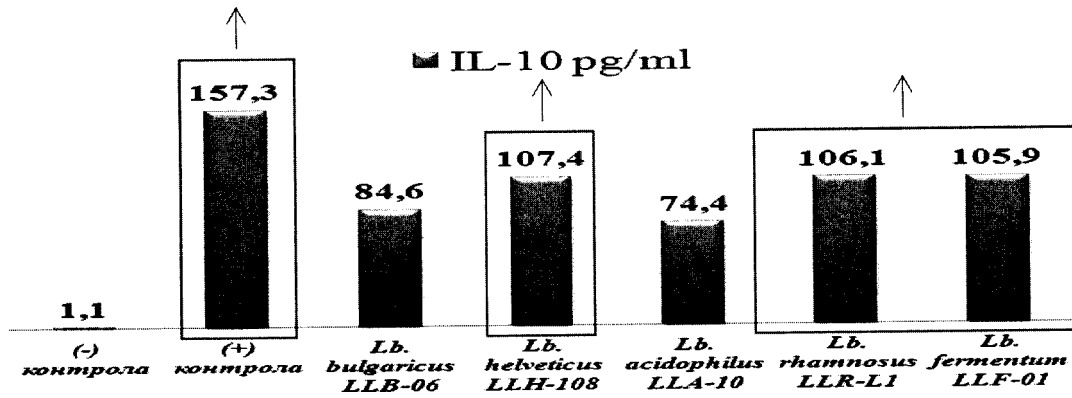
Фиг 2



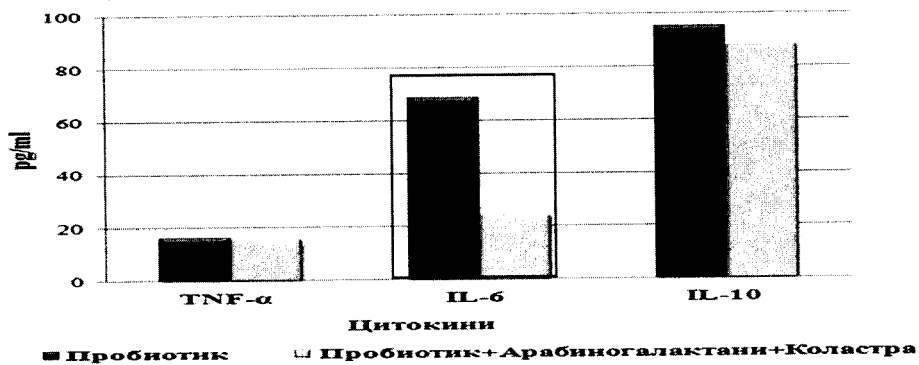
Фиг.3



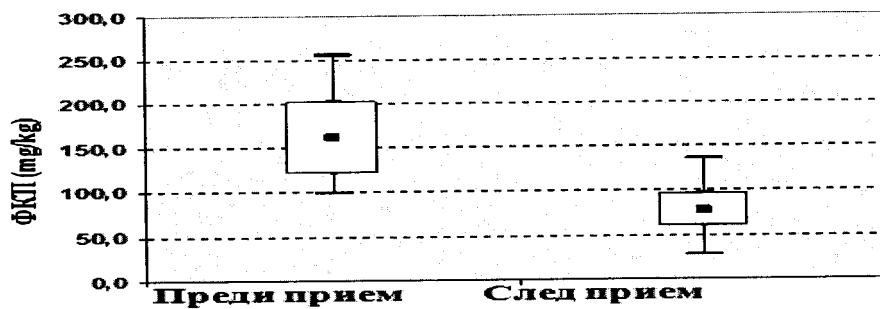
Фиг.4



Фиг.5



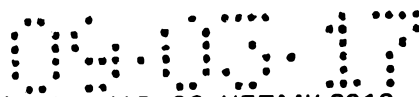
Фиг.6



Фиг.7

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Имуномодулиращ синбиотичен състав съдържащ про-, пребиотик и коластра, **характеризиращ се с това, че съдържа пробиотична компонента** състояща от живи
5 клетки на биологически чиста култура от бактериален щам, избран от групата на:
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918,
Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760,
Lactobacillus acidophilus LLA-10- -НБПМК 8242,
Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- -НБПМК 8769 и
10 Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781 или техни комбинации и пребиотик-
арабиногалактан.
2. Имуномодулиращ синбиотичен състав съгласно претенция 1, **характеризиращ се с
това че** количеството в mg на компонентите, е съответно:
15 Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918 - от 30 до 120,
Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760 - от 55 до 220,
Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242 - от 55 до 220,
Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769 - от 55 до 220,
Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781 - от 55 до 220,
20 Арабиногалактан- от 100 до 400 и
коластра - от 50 до 200.
3. Имуномодулиращ синбиотичен състав, съгласно претенция 1, **характеризиращ се с
това, че** арабиногалактанът е получен от кора на сибирска лиственица (*Larix
25 gmelinii*).
4. Имуномодулиращ синбиотичен бактериален състав, съгласно претенция 1, **характеризиращ се с това, че** коластрата съдържа поне 4.5% пролин-съдържащи пептиди и поне 20% IgG.
30
5. Имуномодулиращ пробиотичен състав, **характеризиращ се с това, че съдържа** живи клетки на биологически чиста култура от бактериален щам, избран от групата на:



Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918,

Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760,

Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242,

Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769,

5 Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781 или техни комбинации.

6. Имунотодулиращ пробиотичен състав съгласно претенция 5, **характеризиращ се с това, че съдържа** ефективно количество бактериална смес от:

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918,

10 Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК 8760,

Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242,

Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769 и

Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781.

15 7. Имунотодулиращ пробиотичен бактериален състав съгласно претенция 5 и 6, **характеризиращ се с това, че** количеството в мг на компонентите от бактериалната смес , е съответно:

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06- НБПМК 8918 - от 30 до 120,

Lactobacillus helveticus LLH-108- НБПМК - от 55 до 220,

20 Lactobacillus acidophilus LLA-10- НБПМК 8242 - от 55 до 220,

Lactobacillus rhamnosus LLR-L1- НБПМК 8769 - от 55 до 220,

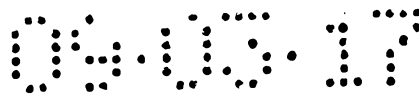
Lactobacillus fermentum LLF-01- НБПМК 8781 - от 55 до 220.

25 8. Имунотодулиращ пробиотичен бактериален състав съгласно претенции от 1 до 7, **характеризиращ се с това, че** притежава активност в границите от 10^8 до 10^{10} CFU бактрии/гр от състава.

9. Щам Lactobacillus fermentum LLF-01, регистриран в НБПМК под № 8781 от 21.05.2013.

30 10. Щам Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LLB -06, регистриран в НБПМК под № 8918 от 01.02.2016.

11. Използване на имунотодулиращ синбиотичен състав, съгласно претенции 1-4, за получаване на продукт под формата на хранителна добавка и/или фармацевтичен продукт, предназначен за профилактика и/или съпътстващ терапията на



възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт, както и за нормализиране и балансиране функцията на стомашночревния тракт в т.ч след продължителен прием на антибиотици, при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

5

12. Използване на имуномодулиращ пробиотичен бактериален състав, съгласно претенции 5-8 , за получаване на продукт под формата на хранителна добавка и/или фармацевтичен продукт, предназначен за профилактика и/или съпътстващ терапията на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт, както и за нормализиране и балансиране функцията на стомашночревния тракт в т.ч след продължителен прием на антибиотици, при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

10

13. Използване на щам *Lactobacillus fermentum* LLF-01 НБПМК № 8781, съгласно претенция 9 , за получаване на продукт под формата на хранителна добавка и/или фармацевтичен продукт, предназначен за профилактика и/или съпътстващ терапията на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт, както и за нормализиране и балансиране функцията на стомашночревния тракт в т.ч след продължителен прием на антибиотици, при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

15

20

14. Използване на щам *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LLB -06, регистриран в НБПМК под № 8918, съгласно претенция 10, за получаване на продукт под формата на хранителна добавка и/или фармацевтичен продукт, предназначен за профилактика и/или съпътстващ терапията на възпалителни и имунни заболявания на гастроинтестиналния тракт, както и за нормализиране и балансиране функцията на стомашночревния тракт в т.ч след продължителен прием на антибиотици, при симптоми на чревна дисбиоза и синдром на възпаленото черво.

25

30