



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 224 017** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) МПК⁷ **C 12 N 1/20, A 61 K 35/74, A 61 L 15/36// (C 12 N 1/20, C 12 R 1:25)**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
 ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ
 ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

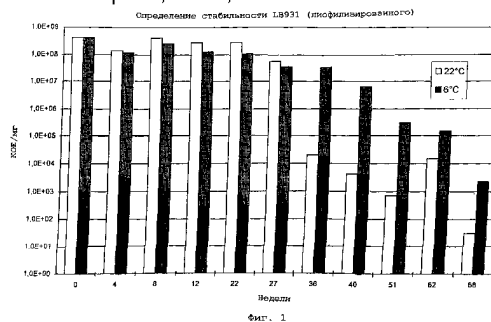
(21), (22) Заявка: 2000125275/13 , 05.03.1999
 (24) Дата начала действия патента: 05.03.1999
 (30) Приоритет: 06.03.1998 SE 9800749-5
 (43) Дата публикации заявки: 27.03.2003
 (46) Дата публикации: 20.02.2004
 (56) Ссылки: US 5705160 A, 06.01.1998. WO 9729762 A1, 21.08.1997. WO 9309793 A1, 27.05.1993. SU 1491884 A1, 07.07.1989. УЛЬЯНОВА И.П. и др. Использование ацилакта для лечения неспецифического вагинита у женщин с гиперпластическими процессами шейки матки. Медицинские аспекты микробной экологии. - М., 1994, ч. II, вып. 7/8, с. 170-171.
 (85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 06.10.2000
 (86) Заявка РСТ: SE 99/00336 (05.03.1999)
 (87) Публикация РСТ: WO 99/45099 (10.09.1999)
 (98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: ХОКАНССОН Эва Гран (SE), ФОРСГРЕН-БРУСК Улла (SE), АНДЕРССОН Рольф (SE), ХОЛЬМ Стиг Е. (SE), ХОКАНССОН Стеллан (SE)
 (73) Патентообладатель: СКА ХАЙДЖИН ПРОДАКТС АБ (SE)
 (74) Патентный поверенный: Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **ШТАММ LACTOBACILLUS PLANTARUM DSM 11918 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И/ЛИ ЛЕЧЕНИЯ МОЧЕПОЛОВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

(57) Изобретение относится к биотехнологии и медицине. Штамм *Lactobacillus plantarum* LB931 помещен на хранение в германское хранилище микроорганизмов, Брауншвейг, Германия. Ему был присвоен депозитный номер DSM 11918. Соответственно LB931 предназначен для лечения и/или профилактики мочеполовых инфекций. Включение LB931 в фармацевтические композиции и в предметы индивидуального ухода, такие как предметы женской гигиены, пеленки и гигиенические салфетки, имеет преимущества. Штамм обладает повышенной устойчивостью, легко переносит длительное хранение при комнатной температуре,

сохраняя высокую жизнеспособность клеток и адгезию к клеткам вагинального эпителия. 3 с. и 5 з.п.ф-лы, 4 ил., 8 табл.



RU 2 224 017 C2

RU 2 224 017 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 224 017** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl. 7 **C 12 N 1/20, A 61 K 35/74, A 61 L 15/36//C 12 N 1/20, C 12 R 1:25)**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2000125275/13 ,
05.03.1999

(24) Effective date for property rights: 05.03.1999

(30) Priority: 06.03.1998 SE 9800749-5

(43) Application published: 27.03.2003

(46) Date of publication: 20.02.2004

(85) Commencement of national phase: 06.10.2000

(86) PCT application:
SE 99/00336 (05.03.1999)

(87) PCT publication:
WO 99/45099 (10.09.1999)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25,
str.3, OOO "Juridicheskaja firma
Gorodisskij i Partnery", pat.pov.
N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: KhOKANSSON Ehva Gran (SE),
FORSGREN-BRUSK Ulla
(SE) , ANDERSSON Rol'f (SE), KhOL'M
Stig E. (SE), KhOKANSSON Stellan (SE)

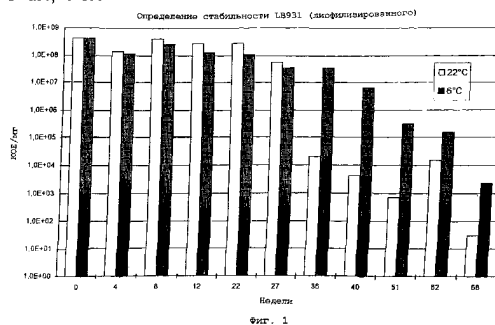
(73) Proprietor:
SKA KhAJDzhIN PRODAKTS AB (SE)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **STRAIN LACTOBACILLUS PLANTARUM DSM 11918 AND ITS USING FOR PROPHYLAXIS AND/OR TREATMENT OF UROGENITAL INFECTIONS**

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology, medicine, microbiology. SUBSTANCE: strain Lactobacillus plantarum LB 931 is placed for storage in German microorganisms storage, Braunschweig, Germany at deposit number DSM 11918. The strain LB 931 is designated for treatment and/or prophylaxis of urogenital infections. Addition of LB 931 to pharmaceutical compositions and individual care subjects, such as female hygiene subjects, diapers and hygienic napkins show some advantages. The strain elicits the enhanced stability, tolerates prolonged storage easily at room temperature and retains high cells viability and adhesion to

vaginal epithelium cells. EFFECT: valuable medicinal properties of strain. 8 cl, 4 dwg, 8 tbl, 7ex



RU 2 224 017 C2

RU 2 224 017 C2

Изобретение относится к новому штамму *Lactobacillus*, который обладает ценными фармацевтическими характеристиками. Данное изобретение также относится к фармацевтическим композициям и продуктам для индивидуального ухода, включающим этот штамм, а также к применению этого штамма для профилактики мочеполовых инфекций.

Предпосылки создания изобретения

(Все цитаты в нижеприведенном описании включены в качестве ссылки)

Обычная бактериальная флора в урогенитальной области состоит из сложной экосистемы, включающей более чем 50 различных видов бактерий (Hill et al., *Scand. J. Urol. Nephrol.* 1984; 86 (suppl.): 23-29). В нормальной флоре преобладают бактерии, принадлежащие к роду *Lactobacillus* (LB), которые представляют собой грамположительные палочки, приспособленные к окружающей среде во влагалище фертильных женщин (способных к деторождению). Эти бактерии также вносят вклад в поддержание специфической среды и экологического баланса во влагалище.

Кроме сложной системы взаимодействия многочисленной бактериальной флоры влагалища и остальной мочеполовой области необходимо рассматривать различные физические условия, которые могут влиять на рост и адгезивные свойства бактерий. Некоторые штаммы LVS ингибируют рост потенциально патогенных бактерий посредством различных механизмов. В результате метаболизма LB происходит образование органических кислот, главным образом молочной и уксусной кислот, которые вносят вклад в снижение pH вагинальной жидкости, что является нежелательным для многих других видов. LB могут также продуцировать растворимые вещества, которые непосредственно ингибируют рост потенциально патогенных бактерий и дрожжей. Они могут также продуцировать перекись водорода, которая является токсичной для бактерий, утративших фермент каталазу, таких как грамотрицательные анаэробные палочки и *Enterobacteriaceae*. Эти характеристики ингибирования могут в значительной степени варьировать между различными штаммами LB (Hooton et al., *JAMA* 1990; 265:64-69).

Слабость естественной защитной системы может позволить потенциально патогенным микроорганизмам вызывать клиническую инфекцию, например, в связи с лечением лекарственными препаратами, плохим индивидуальным уходом, или изменениями в микрофлоре кожи или слизистых мембран. В нормальной флоре влагалища преобладают LB, и pH окружающей среды имеет значения ниже 4,5. Дрожжи и энтеробактерии присутствуют в ограниченном количестве или отсутствуют (Redondo-Lopez et al., *Rev. Inf. Dis.* 1987; 12:856-872). Изменения в вагинальной бактериальной флоре могут происходить в связи с различными патогенными состояниями. Во влагалище и устье уретры женщин, страдающих от рецидива инфекций мочевыводящего тракта, присутствует повышенное количество энтеробактерий, а также флора их мочеполовой системы содержит пониженное количество *Lactobacilli* (Marrie et al., *J. Clin. Microbiol.* 1976, 8, 67-72). Известно

также, что частота инфекций увеличивается в связи с антибиотическим лечением других инфекций (Stamey, *Rev. Inf. Dis.* 1987; 9 (suppl. 2): 195-208; Reid et al., *Curr. Opin. Inf. Dis.* 1991; 4:37-41). Кроме того, было продемонстрировано, что дети, имеющие историю с частыми случаями антибиотического лечения, более склонны к приобретенным инфекциям мочевыводящего тракта (Marild et al., *Ped. Inf. Dis.* 1990; 22:43-47).

При бактериальных вагинозах количество LB уменьшается, а значение pH увеличивается. Кроме того, преобладают виды *Bacterioides*, *Gardnerella vaginalis* и *Mobiluncus* (Redondo-Lopez, supra). Вагинит, связанный с повышенным количеством энтеробактерий, часто является ощутимой проблемой в связи с лечением антибиотиками. Обычное пероральное введение пенициллина приводит к накоплению этого вещества в вагинальной жидкости (Sjoberg et al., *Obstet. Gynecol.* 1990; 75:18-21), что сопровождается колонизацией энтеробактерий и дрожжей (Sjoberg et al., *Gynecol. Obstet. Invest.* 1992; 33:42-46). Исследования на обезьянах (*Macaca fascicularis*) показали, что вагинальное введение амоксициллина ухудшает способность естественной бактериальной флоры ингибировать колонизацию патогенной для мочевого тракта *E. Coli* (Herthelius et al., *Infection* 1988; 16:263-266).

В течение беременности состав вагинальной флоры может влиять на заболеваемость утробного плода и ребенка. Наличие стрептококка группы B (GBS) в фекальной и вагинальной флоре является распространенным (до 30% всех беременных женщин). Эти бактерии обычно не составляют угрозы для здоровья женщин. Однако GBS могут вызывать серьезные инфекции у новорожденных детей. В этих случаях бактерии переносятся вертикально от матери к ребенку до или во время родов. Другие бактерии также могут переноситься таким образом и вызывать инфекции у детей. Существует прочная связь между бактериальным вагинозом и преждевременными родами (Martius et al. *Arch. Gynecol. Obstet.* 1990; 247:1-13). Механизмы этого явления не известны. Было показано, что изменения в вагинальной флоре в сторону преобладания грамотрицательных видов увеличивают количество фермента фосфолипазы A₂, который в свою очередь может инициировать синтез простагландинов, начиная с арахидоновой кислоты (Bejar et al., *Obstet. Gynecol.* 1981; 57:479-482). Вагинальная флора также продуцирует большие количества эндотоксина (Sjoberg et al., *Obstet. Gynecol.* 1991; 77: 265-266), который может индуцировать эндогенный синтез простагландинов (Romero et al., *Obstet. Gynecol.* 1989; 73:31-34), возможно, опосредованный интерлейкинами.

Теоретически положительные характеристики LB объясняют их применение в коммерческих препаратах, предназначенных для дополнения и усиления вагинальной флоры. Успех был переменным, и зачастую имеющиеся в распоряжении препараты содержали гораздо более низкие количества LB, чем было установлено. Кроме того, некоторые препараты были загрязнены

(Hughes et al., Obstet. Gynecol. 1990; 75(2):244-248). Для дополнения и улучшения нормальной бактериальной флоры в мочеполовой области посредством добавления LB необходимо тщательно выбрать бактериальный штамм, который будет использоваться. Подходящий для этих целей штамм LB должен удовлетворять следующим критериям:

1. Штамм LB должен продуцировать большие количества растворимых веществ, способных ингибировать рост энтеробактерий, стрептококков группы В, стафилококков и дрожжей.

2. Штамм LB должен иметь способность переноситься на кожу и слизистые поверхности мочеполовой области.

3. Штамм LB должен быть способным к адгезии на слизистых поверхностях мочеполовой области.

4. Штамм LB должен обладать способностью переносить хранение в течение длительного периода времени, и должна существовать возможность индуцировать штамм в различных видах препаратов.

5. Штамм LB должен обладать способностью сохранять свои жизнеспособность и характеристики в торговых изделиях или препаратах при использовании.

6. Штамм LB не должен быть чувствительным к спермицидным препаратам, содержащим моноксинол-9.

7. Штамм LB должен быть выделен из мочеполового тракта женщин.

8. Штамм LB должен допускать существование человеческой мочеполовой LB флоры.

Следовательно, существует потребность в штаммах, удовлетворяющих этим требованиям.

Краткое описание изобретения

Был выделен новый штамм *Lactobacillus plantarum*, обозначаемый LB931, который удовлетворяет требованиям, перечисленным выше. Этот штамм хранится в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Германская коллекция микроорганизмов), Брауншвейг, Германия. Ему присвоен депозитный номер DSM11918. Соответственно LB931 может быть использован для лечения и/или профилактики мочеполовых инфекций. Включение LB931 в фармацевтические композиции и в предметы индивидуального ухода, такие как пеленки и гигиенические салфетки, имеет преимущества.

Определения

В данном документе термин "LB" относится к бактериям рода *Lactobacillus*.

В данном документе термин "мочеполовая область" относится к промежности, уретре и влагалищу.

В данном документе термин "абсорбирующее изделие" относится к продуктам, подходящим для абсорбции жидкостей тела, таких как кровь или моча. Примерами таких изделий являются предметы женской гигиены, защитные прокладки, применяющиеся при недержании, и пеленки.

В данном документе термин "GBS" относится к стрептококку группы В.

В данном документе термин "молочнокислые бактерии" относится к бактериям, продуцирующим молочную кислоту, таким как бактерии, принадлежащие

к родам *Lactobacillus* и *Lactococcus*.

Термин "КОЕ" обозначает колониобразующие единицы.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к новому штамму *Lactobacillus plantarum*, обозначаемому LB931 (DSM11918). Этот бактериальный штамм является полезным для профилактики и/или лечения мочеполовых инфекций, так как он ингибирует рост большого количества патогенных микроорганизмов. Этот штамм является устойчивым и легко переносит длительные периоды хранения при комнатной температуре. Соответственно продукты, содержащие LB931, имеют длительный период хранения. Этот штамм может быть легко перенесен на кожу и вагинальный эпителий человека. LB931 устойчив к терапевтическим концентрациям некоторых антибиотиков и спермицидных веществ.

Были исследованы характеристики ингибирования LB931. Примерами бактериальных видов, которые успешно ингибируются, являются *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* группы В. Следовательно, LB931 является полезным для лечения и/или профилактики инфекций, вызванных этими микроорганизмами.

Как отмечено выше, настоящее изобретение также предоставляет ряд фармацевтических композиций, предпочтительно подходящих для наружного введения, включающих LB931 наряду с фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами и/или разбавителями. Как правило, такие носители должны быть нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях. Обычно при получении таких композиций используют сочетание терапевтического агента с буферами, загустителями, гелеобразующими агентами, такими как глицерин, полиэтиленгликоль и т.д. Могут быть включены антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, полипептиды с низким молекулярным весом (менее чем 10 остатков), белки, углеводы, включающие глюкозу, сахарозу и декстрины, и другие стабилизаторы и эксципиенты. Фармацевтические композиции могут быть в виде мазей, кремов, жидких растворов, свечей или капсул.

Настоящее изобретение также относится к абсорбирующим изделиям, включающим LB931. Такие изделия включают пронизываемый внешний слой, который предназначен для тесного контакта с кожей владельца, предпочтительно не пронизываемый для жидкости подкладочный слой, который предназначен для удаленного расположения от владельца при использовании, и абсорбирующую структуру, расположенную между внешним слоем и подкладочным слоем. В некоторых случаях между внешним слоем и абсорбирующей структурой может быть расположен дополнительный слой в виде, например, ваты или подобного материала. Микроорганизмы, проявляющие антагонистические свойства, могут быть расположены в различных частях абсорбирующего изделия, например, во внешнем слое, в абсорбирующей структуре абсорбирующего изделия, между двумя слоями абсорбирующего изделия, в неплотно

вставленном продукте абсорбирующего изделия, или каким-либо другим образом.

Настоящее изобретение теперь будет описываться со ссылкой на прилагаемые фигуры, в которых:

фиг. 1 представляет собой диаграмму, демонстрирующую стабильность высушенного из замороженного состояния LB931 при комнатной температуре (+22°C) и при +6°C;

фиг. 2 представляет собой диаграмму, демонстрирующую стабильность LB931, внедренного в абсорбирующее изделие;

фиг. 3 и 4 показывают количество LB931, перенесенное на устье уретры и кожу промежности молодых девушек после применения прокладок для трусиков, включающих LB931.

Настоящее изобретение теперь будет описываться со ссылкой на следующие примеры:

Пример 1: Выделение и идентификация *Lactobacillus plantarum*, штамм LB931

Бактериальные образцы брали у здоровых женщин. Из этих образцов выделяли бактериальные штаммы и эти штаммы анализировали на основе их способности ингибировать рост энтеробактерий (данные не показаны). Лучший штамм, выделенный у здоровой беременной женщины, классифицировали как *Lactobacillus plantarum* в соответствии с набором для тестирования API 50 CH (API systems, BioMerieux, FR), с преобладанием LB931. Затем этот штамм идентифицировали с помощью ДНК-анализа методом SDS-PAGE (электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) на приборе BCCM/LMG (Бельгия) как *Lactobacillus plantarum-pentosus-paraplantarum*.

ПРИМЕР 2: Ингибирующая способность штамма LB931

Целью этого эксперимента являлась наглядная иллюстрация способности штамма LB931 ингибировать рост других бактерий. LB931 выращивали в среде MRS (Merck, DE) при температуре 37°C в 5% CO₂ в течение ночи. Один мл, содержащий 10⁸ бактерий, добавляли к 25 мл расплавленного 2% агара в среде MRS. Смесь выливали в чашку Петри, оставляли застывать и инкубировали, как описано выше, в течение 24 ч. Еще 25 мл агара-M17 (Merck, DE) выливали на поверхность первого слоя и плашки оставляли при комнатной температуре на 4 ч. Были также приготовлены такие же агарные плашки, не содержащие LB931, которые использовали в качестве контроля.

Индикаторные бактерии выращивали отдельно в TY-среде (Holm et al., APMIS 1967; 69, 264) при 37°C на воздухе. Культуры переносили в поддон Bertani из 25 отделений, каждое отделение содержало 0,25 мл (10⁹ бактерий/мл). Из каждого из этих поддонов бактерии переносили и фиксировали на агарные плашки, содержащие *Lactobacillus*, с помощью стальной репликаторной булавки Стира (Steers et al., J. Antibiot. Chemother. 1979, 9, 307). Эти плашки инкубировали при 37°C в течение ночи. Плашки считывали и устанавливали а) растут ли индикаторные бактерии; или б) рост индикаторных бактерий ингибируется; или с) рост индикаторных бактерий не наблюдается. Также определяли

pH каждой из плашек.

Результаты тестов взаимного влияния показаны в таблице I.

Результаты показывают, что *Lactobacillus plantarum*, LB931, ингибирует или предотвращает рост большого числа бактериальных штаммов и в основном не влияет на другие штаммы *Lactobacillus*.

ПРИМЕР 3: Способность LB931 к сохранению жизнеспособности в различных препаратах а) LB931, растворенный в суспензии равных частей снятого молока и 0,9% NaCl.

LB931 растворяли в снятом молоке, содержащем 0,9% NaCl. Растворенные бактерии затем инкубировали при разных температурах. Количество бактерий непрерывно регистрировали путем подсчета клеток. Результаты приведены ниже в таблице II.

Результаты демонстрируют, что LB931 является стабильным в смеси снятого молока и NaCl в течение одного месяца при +4°C.

б) Препараты LB931 в снятом молоке высушивали из замороженного состояния в соответствии со стандартными методами. Полученный порошок хранили в чашках Петри при комнатной температуре и при +6°C. Число бактерий определяли через 7 и 25 дней соответственно. Результаты приведены ниже в таблице III.

Число бактерий в высушенном из замороженного состояния порошке определяли также каждые четыре недели вплоть до 68 недель. Результаты представлены на фиг. 1. Из этой фигуры очевидно, что LB931 является стабильным как при комнатной температуре, так и при +6°C в течение 22 недель. Через год при +6°C жизнеспособными являются более чем 10⁵ КОЕ/мг LB931.

с) Определяли способность LB931 к выживанию в синтетической моче, pH 6,6. Синтетическая моча содержала моно- и дивалентные катионы и анионы, а также мочевины, и была приготовлена в соответствии с описаниями в Geigy, Scientific Tables, vol. 2, 8: th ed. 1981 p. 53. К стерильной синтетической моче добавляли питательную среду для микроорганизмов. Питательную среду готовили в соответствии с данными по составу среды Хука и среды FSA. К 1 мл синтетической мочи добавляли 10³ бактерий LB931 и образцы инкубировали в течение 18 ч при 32°C. После инкубации число бактерий составляло >10⁵/мл. LB931 является способным к выживанию и росту в синтетической моче.

д) Исследовали способность LB931 выживать на абсорбирующем изделии (прокладки для трусиков). Суспензию LB931 (150 мкл) добавляли к абсорбирующему изделию, и затем это изделие хранили в непроницаемой упаковке в течение 9 месяцев. Результаты показаны на фиг. 2. Большое количество бактерий выживало в течение семи месяцев.

е) Наконец, тестировали характеристики LB931 в течение периода роста и хранения. LB931 культивировали в среде MRS и каждый третий день в течение трех месяцев производили новый посев. После этого исходный образец LB931 и последний посев сравнивали в тесте API, PGFE и в тесте взаимного влияния. Два образца были

идентичными во всех тестах. Это показывает, что LB931 является очень стабильным после хранения и нескольких посевов в питательной среде.

Пример 4: Перенос LB931 на кожу промежности и устье уретры женщин

Для изучения переноса LB931 на промежность при использовании прокладок для трусиков проводили следующие исследования. Тестируемыми субъектами были женщины от 12 до 60 лет, и тесты проводили в подходящее время между менструальными периодами. Тестируемые продукты производились из традиционных прокладок для трусиков, включающих проницаемый для жидкости внешний слой, не проницаемый для жидкости нижний подкладочный слой и между ними абсорбирующий слой; из 100-200 г/м² химической целлюлозной массы. На абсорбирующую сторону тестируемого продукта распыляли суспензию бактерий LB931 в количестве 10⁹ колониеобразующих единиц на продукт.

Для того чтобы определить наличие LB931 в промежности 13 тестируемых субъектов, проводили так называемый мажковый тест. Бактерии собирали путем трения стерильной палочки с ватным наконечником, которую обмакивали в стерильный раствор хлорида натрия, об определяемый участок кожи. Определяли наличие LB931 и других LB на коже промежности и в устье уретры. Такие тесты проводили среди тестируемых субъектов для того, чтобы установить контрольный образец. После этого тестируемые субъекты носили прокладки для трусиков в течение 5 ч утром. Прокладки для трусиков удаляли и снова определяли наличие добавленных молочнокислых бактерий и природных молочнокислых бактерий соответственно, непосредственно после удаления прокладок для трусиков. Этот образец обозначали как образец 1. Еще через 4-5 ч брали следующий образец и обозначали его как образец 2. Тип молочнокислых бактерий определяли, используя Rogosa-агар с ванкомицином для LB931, и плашки с Rogosa-агаром, инкубированные анаэробно, для других LB. Следующие определения производили с помощью API (BioMerieux, FR) и PFGE (гель-электрофорез в градиенте пульсирующего поля). Результаты приведены в таблице IV. LB931 обнаруживается на коже промежности и в устье уретры у всех женщин после использования прокладок для трусиков, на которые был распылен LB931.

Пример 5: Перенос LB931 на кожу промежности и устье уретры у девочек.

В исследование были включены тринадцать молодых девочек от 3 до 12 лет. Бактериальные образцы из кожи промежности и устья уретры получали вначале путем обмакивания ватного тампона в среду MRS, затем осторожного трения палочки по коже или эпителиальной поверхности. В конце тампон погружали в пробирку, содержащую среду MRS. Образцы получали в соответствии со следующей схемой:

Образец 0: Контрольный образец получали вечером до начала исследования по содержанию бактерий LB931. Вечер, день 1; надевали прокладки для трусиков.

Образец 1: Утро, день 2. Новые прокладки для трусиков носили в течение дня.

Образец 2: Образец брали вечером до необязательной ванны и перед наложением новой прокладки для трусиков. Вечер, день 2.

Образец 3: Такая же процедура, как и для образца 1. Утро, день 3.

Образец 4: Такая же процедура, как и для образца 2. Вечер, день 3.

Образец 5: Такая же процедура, как и для образца 1. Утро, день 4.

Образец 6; Образец брали вечером до необязательной ванны. Ночью прокладки для трусиков не носили. Вечер, день 4;

Образец 7: Образец брали утром на 5 день. В течение дня прокладки для трусиков не носили.

Образец 8: Последний образец брали вечером на 5 день.

Результаты представлены на фиг. 3 (устье уретры) и фиг.4 (кожа промежности). Результаты показывают, что LB931 может переноситься с абсорбирующего изделия.

ПРИМЕР 6: Чувствительность к антибиотикам и спермицидным агентам

Значения MIC для *Lactobacillus plantarum* LB931 определяли, используя E-тест (Brown et al. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 27:185-190). Результаты приведены в таблице V.

Чувствительность к антибиотическим веществам определяли также с помощью системы SIR. В таблице VI, приведенной ниже, Ч обозначает чувствительность, а У обозначает устойчивость.

LB931 является чувствительным к некоторым антибиотикам, которые обычно назначают для лечения инфекций мочевыводящего тракта, но, кроме того, LB931 является устойчивым к, например, налидиксиновой кислоте и норфлоксацину. LB931 является также устойчивым к ванкомицину.

Тесты MIC также проводили по отношению к спермицидному агенту тергитолу. LB931 выращивали на MRS агаре в 5% CO₂, 37°C в течение 48 ч. Бактерии высевали в 3 мл среды MRS и инкубировали 10 ч в таких же условиях, как описано выше. 1,5% Культуры повторно высевали в 3 мл среды MRS и инкубировали в тех же условиях в течение 18 ч. NP-9 Тергитол (Sigma, US), лот 47F0002, разбавляли средой MRS, имеющей температуру 37°C (пониженной вязкости), получая 40% исходный раствор. Используя этот исходный раствор, готовили растворы объемом 3 мл, имеющие следующие концентрации: 0%, 5%, 10%, 20%, 30% и 40%. К каждому раствору добавляли 10 мкл бактериальной культуры. Контрольный раствор перемешивали и добавляли к плашкам с MRS агаром. Плашки инкубировали в 5% CO₂, при 37°C в течение 48 ч для определения клеточной плотности. Остальные растворы инкубировали без перемешивания в 5% CO₂, при 37°C в течение 18 ч. Раствор, содержащий 30% и 40% NP-9, разбавляли средой MRS при 37°C (пониженной вязкости). Все растворы энергично перемешивали; разбавляли стерильным 0,9% NaCl и добавляли к плашкам с MRS агаром. Плашки инкубировали в 5% CO₂, при 37°C в течение 48 ч для определения КОЕ/мл.

Результаты приведены в таблице VII.

Вносимое количество LB931 составляло 1,0•10⁷ КОЕ.

Эти результаты показывают, что LB931

хорошо выживает в растворе тергитола NP-9 с концентрацией до 40%.

ПРИМЕР 7: Адгезия LB931 к клеткам вагинального эпителия

а) Приготовление суспензии LB931

LB931 выращивали на MRS агаре (в 5% CO₂, 37°C; 48 ч). Культуру вносили в 3 мл среды (в 5% CO₂, 37°C; 8 ч). 2% Полученной культуры повторно вносили в 10 мл среды MRS (в 5% CO₂, 37°C; 18 ч). Полученную культуру центрифугировали в течение 8 мин при 20°C и при 2000 об/мин в съемном роторе (820хг). Полученный клеточный осадок промывали в 5 мл молочнокислого буфера (10 мМ молочная кислота, рН 4,5, 0,15М NaCl). Бактерии разбавляли молочнокислым буфером так, чтобы OD₅₀₀ составляло приблизительно 1,0 (приблизительно 10⁸ КОЕ/мл).

б) Получение клеток вагинального эпителия:

Клетки вагинального эпителия собирали с помощью стерильной ватной палочки и переносили в 4 мл молочнокислого буфера или PBS в маленькой пробирке. Содержимое пробирки перемешивали и ватную палочку удаляли. Пробирку центрифугировали при 700 об/мин при 20°C в течение 8 мин в съемном роторе Jouan CR.-12 (≈ 100хг), и полученный осадок промывали в 3 мл молочнокислого буфера или PBS. Клетки считали в гематцитометре и концентрацию доводили до 10⁵-10⁶ клеток/мл с помощью молочнокислого буфера или PBS. 25 мкл суспензии клеток размазывали на покровном стекле микроскопа для контроля процедуры промывания (см. ниже).

с) Адгезивный тест

0,5 мл Суспензии LB931 и 0,5 мл клеточной суспензии быстро смешивали в пробирке Эппендорфа емкостью 1,5 мл. Контрольный образец получали путем смешивания 0,5 мл клеточной суспензии и 0,5 мл буфера. Пробирки центрифугировали при 20°C и 2000 об/мин (≈ 720хг), и затем инкубировали 1 ч при 37°C. После инкубации пробирки центрифугировали 8 мин при 20°C и 700 об/мин (≈ 90хг). Осадки промывали в 1 мл молочнокислого буфера или PBS. В конце образцы суспендировали в 400-500 мкл молочнокислого буфера или PBS.

д) Анализ

25 мкл Суспендированного осадка оставляли высушиваться на воздухе на покровном стекле для микроскопа, затем подвергали фиксации и

Gram-окрашиванию. Из каждого образца анализировали 50 эпителиальных клеток. Считали число LB931, прилипших к этим клеткам, и результаты разделяли на 5 групп (0-10, 11-30, 31-50, 51-100, >100 бактерий/клетку).

Результаты приведены в таблице VIII.

Результаты отчетливо демонстрируют, что бактерии LB931 прилипают к клеткам вагинального эпителия независимо от того, когда эти клетки были взяты.

Формула изобретения:

1. Штамм *Lactobacillus plantarum* DSM 11918 в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции или адсорбирующего изделия, используемых для профилактики и/или лечения мочеполовых инфекций, таких, как колонизация энтеробактерий.

2. Штамм по п.1, где абсорбирующим изделием является пеленка, гигиеническая салфетка, защитные прокладки для трусиков или защитные прокладки, применяющиеся при недержании.

3. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения мочеполовых инфекций, таких, как колонизация энтеробактерий, содержащая культуру молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* и фармацевтически приемлемый носитель и/или разбавитель, отличающаяся тем, что она содержит биомассу молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus plantarum* DSM 11918 в количестве от 1.10⁴ до 10¹¹ КОЕ/мл.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где количество *Lactobacillus plantarum* DSM 11918 составляет от 1.10⁵ до 10⁹ КОЕ/мл.

5. Фармацевтическая композиция по п.3, представляющая собой суспензию, спрей, гель, крем, порошок, капсулы или вагинальный вкладыш.

6. Фармацевтическая композиция по п.3, где указанный фармацевтически приемлемый носитель представляет собой снятое молоко.

7. Абсорбирующий продукт, такой, как предмет женской гигиены, пеленка, гигиеническая салфетка, защитные прокладки для трусиков или защитные прокладки, применяющиеся при недержании, отличающийся тем, что он содержит биомассу молочнокислых бактерий штамма *Lactobacillus plantarum* DSM 11918 в количестве от 1.10⁴ до 10¹¹ КОЕ/мл.

8. Абсорбирующий продукт по п.7, где количество *Lactobacillus plantarum* DSM 11918 составляет от 1.10⁵ до 10⁹ КОЕ/мл.

Таблица 1

Индикаторные бактериальные виды	Ингибирование	
	%	кол. инг./общее кол-во
Коагулаза- отрицательные staphylococci	90	9/10
Streptococcus sp. Группы В	100	19/19
Lactobacillus sp.	7	1/14
Klebsiella sp.	100	50/50
E. coli	100	50/50
Proteus sp.	100	50/50

Таблица II

Температура (°C)	Число бактерий (кое)			
	0 день	2 день	5 день	32 день
4	$7,8 \times 10^{10}$			$2,2 \times 10^{10}$
20	$1,8 \times 10^{10}$		$2,2 \times 10^{10}$	
27	$1,8 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^9$	
37	$1,8 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^9$	$1,0 \times 10^5$	

Таблица III

Температура (°C)	Число бактерий (кое)		
	0 день	7 день	25 день
6	$4,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^5$
22	$4,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,4 \times 10^{10}$

<u>Антибиотическое вещество</u>	Таблица V <u>MIC мкг/мл</u>
Ампициллин	0,19
Цефотаксим	0,094
Цефуроксим	0,38
Гентамицин	0,25
Имипенем	0,016
Метронидазол	>32
Эритромицин	0,25
Ванкомицин	>256
Пиперацин/Тазобактам	2
Тетрациклин	2
Триметоприм	0,016
Бензилпенициллин	0,5

RU 2224017 C2

RU 2224017 C2

Таблица VI

Антибиотическое вещество	Зона (мм)	Показание
Цефадроксил	24	ч
Клиндамицин	35	ч
Три/сульфаметоазол	43	ч
Цефтазидим	35	ч
Амикацин	30	ч
Азтреонам	0	у
Мецеллинам	0	у
Налидиксиновая кислота	0	у
Нетилмицин	0	у
Нитрофуантин	36	ч
Норфлоксацин	0	у
Тобрамицин	32	ч
Мециллинам/ампициллин	41	ч
Цефипиром	47	ч
Оксациллин	0	у
Цефалотин	22	ч

Таблица VII

Тергитол NP-9

Кое/мл LB931

0%	$2,6 \times 10^9$
1%	$2,5 \times 10^9$
5%	$2,5 \times 10^9$
10%	$1,6 \times 10^9$
20%	$1,4 \times 10^9$
30%	$1,0 \times 10^9$
40%	$6,9 \times 10^7$

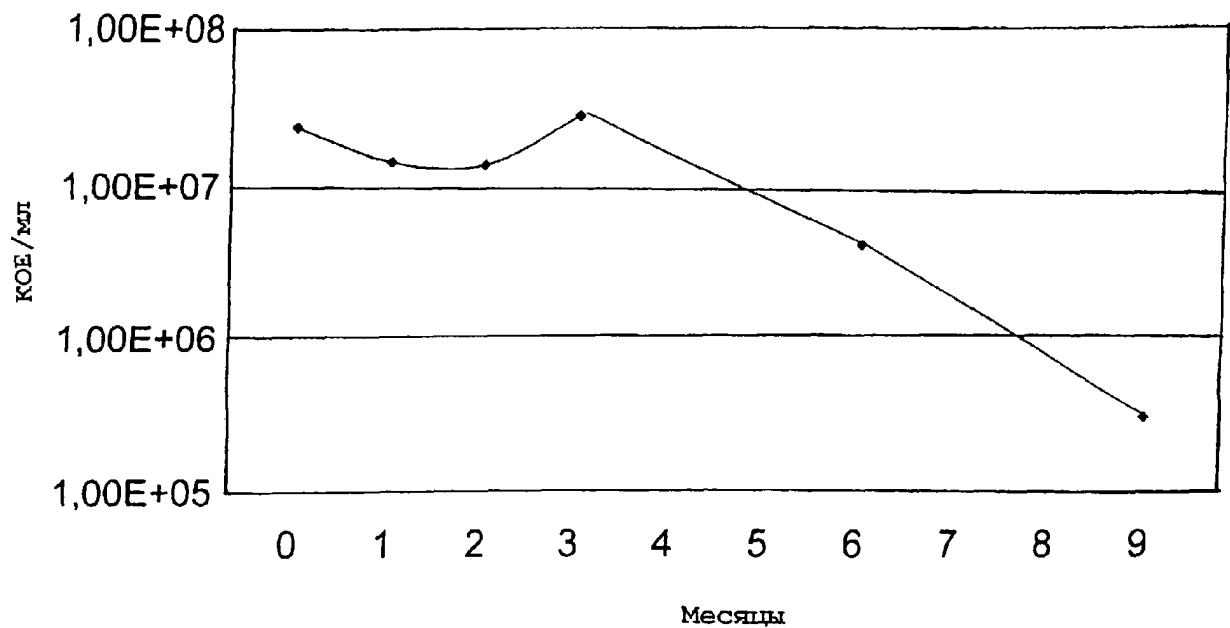
Таблица VIII

Число тестируемых субъектов: 5					
Момент взятия образца: до менструации (дм); овуляция (ов)					
Образцы эпителиальных клеток	Прилипшие LB931/эпителиальную клетку				
	0-10	11-30	31-50	51-100	>100
(дм) инкубирование с LB931, рН 4,5	17,2*	24,8	14,4	15,6	28,0
(дм) инкубированные контрольные клетки, рН 4,5	99,6	0,4			
(ов) инкубированные с LB931, рН 4,5	8,4	22,8	19,2	20,0	29,6
(ов) инкубированные контрольные клетки, рН 4,5	98,4	1,6			

* значения даны в процентах

Стабильность LB931, пропитывающего абсорбирующее изделие

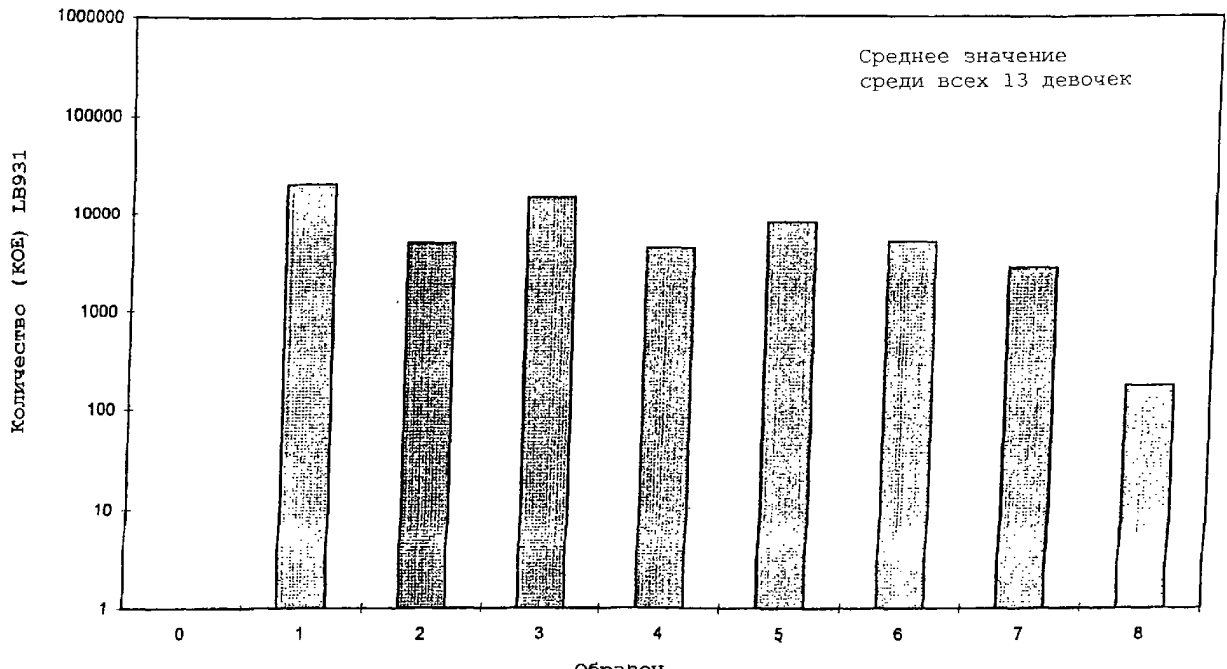
"Soft Normal"



Фиг. 2

Среднее количество LB931 в течение периода день/ночь

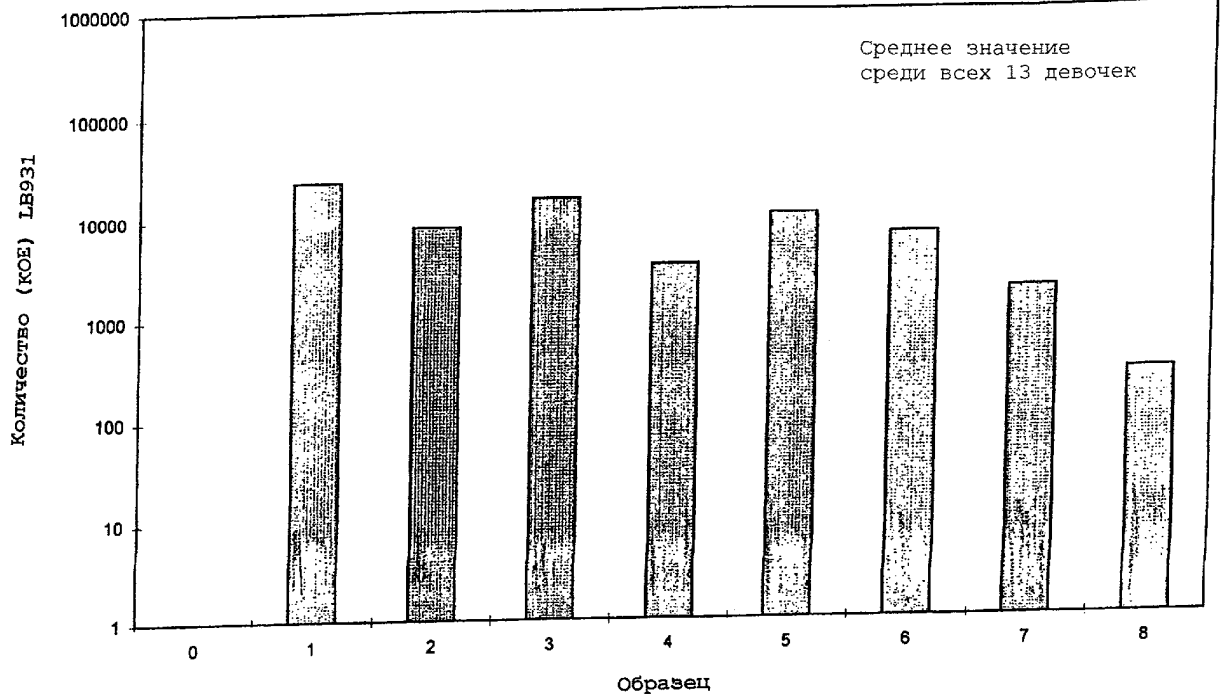
(уретра)



Образец
Фиг. 3

Среднее количество LB931 в течение периода день/ночь

(промежность)



Образец
Фиг. 4

RU 2224017 C2

RU 2224017 C2