



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 429 291** (13) **C1**

(51) МПК
C12N 9/98 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009148627/10, 28.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.12.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2009

(45) Опубликовано: 20.09.2011 Бюл. № 26

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2007117728 А, 20.11.2008. RU
2003124078 А, 27.01.2005. RU 2006145899 А,
27.06.2008. RU 2004132705 А, 27.05.2005.

Адрес для переписки:

117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1,
ФГУП "ГосНИИгенетика"

(72) Автор(ы):

Бебуров Михаил Юрьевич (RU),
Дебабов Владимир Георгиевич (RU),
Яненко Александр Степанович (RU),
Синеокий Сергей Павлович (RU),
Честухина Галина Георгиевна (RU),
Леонова Татьяна Евгеньевна (RU),
Ларикова Галина Андреевна (RU),
Котлова Елена Константиновна (RU),
Воюшина Татьяна Львовна (RU),
Константинова Галина Евгеньевна (RU),
Выборная Татьяна Владимировна (RU),
Рыбаков Юрий Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой
выступает Министерство образования и
науки Российской Федерации (Минобрнауки
России) (RU),
Федеральное государственное унитарное
предприятие "Государственный научно-
исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов"
(ФГУП "ГосНИИгенетика") (RU)

(54) ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

(57) Реферат:

Пищеварительное средство представляет собой комплексный ферментный препарат, содержащий протеазу, продуцируемую бактериями *Bacillus licheniformis*, альфа-амилазу, продуцируемую бактериями *Bacillus amyloliquefaciens* и липазу, продуцируемую

дрожжами *Yarrowia lipolytica*. Соотношение компонентов (единицы активности) устанавливают соответственно равным 0,055: 0,85:1. Изобретение обеспечивает расширение арсенала пищеварительных средств высокой фармакологической активности на основе ферментов микробного происхождения. 5 табл.

RU 2 4 2 9 2 9 1 C 1

RU 2 4 2 9 2 9 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 9/98 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009148627/10, 28.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
28.12.2009

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2009**

(45) Date of publication: **20.09.2011 Bull. 26**

Mail address:

**117545, Moskva, 1-j Dorozhnyj pr-d, 1, FGUP
"GosNIIgenetika"**

(72) Inventor(s):

**Beburov Mikhail Jur'evich (RU),
Debabov Vladimir Georgievich (RU),
Janenko Aleksandr Stepanovich (RU),
Sineokij Sergej Pavlovich (RU),
Chestukhina Galina Georgievna (RU),
Leonova Tat'jana Evgen'evna (RU),
Larikova Galina Andreevna (RU),
Kotlova Elena Konstantinovna (RU),
Vojushina Tat'jana L'vovna (RU),
Konstantinova Galina Evgen'evna (RU),
Vybornaja Tat'jana Vladimirovna (RU),
Rybakov Jurij Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoroj
vystupaet Ministerstvo obrazovanija i nauki
Rossijskoj Federatsii (Minobrnauki Rossii) (RU),
Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predprijatje "Gosudarstvennyj nauchno-
issledovatel'skij institut genetiki i selektsii
promyshlennykh mikroorganizmov" (FGUP
"GosNIIgenetika") (RU)**

(54) DIGESTIVE AGENT OF MICROBIAL ENZYMES

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: digestive agent represents a complex enzyme preparation containing protease produced by *Bacillus licheniformis* bacteria, alpha amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens*

bacteria and lipase produced by *Yarrowia lipolytica* yeast. The ration (activity unit) is specified to be equal to 0.055:0.85:1 respectively.

EFFECT: extended range of digestive agents of high pharmacological activity of microbial enzymes.
6 tbl, 8 ex

Изобретение относится к микробиологии и медицине и касается мультиферментных лекарственных средств, применяемых для лечения нарушений пищеварения.

Значительный интерес к практическому использованию ферментов в медицине обусловлен важной ролью, которую они играют в биологических процессах, в частности в процессах пищеварения у человека и животных. Расщепление пищи происходит с помощью панкреатических ферментов, обладающих липолитической (липаза), протеолитической (протеаза) и амилалитической (альфа-амилаза) активностями.

Нарушения процесса пищеварения различной степени выраженности встречаются практически при всех заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), в первую очередь поджелудочной железы (ПЖ) - основного источника пищеварительных ферментов, а также при нарушениях функционирования желудка, различных отделов кишечника, желчного пузыря, ряде заболеваний щитовидной железы, СПИДе и т.д.

Ферментные препараты из различных источников широко используются для компенсации собственной недостаточности пищеварительных ферментов у человека (заместительной терапии). Применение пищеварительных ферментных препаратов не ограничивается компенсацией секреторной недостаточности. Такие препараты показаны и здоровым людям для улучшения переваривания пищи.

Современные препараты животного происхождения на основе панкреатина (препарата из поджелудочной железы свиней и крупного рогатого скота) содержат в своем составе протеазу, альфа-амилазу и липазу и представляют собой микрогранулы или таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой. Они показаны для применения при внешнесекреторной недостаточности поджелудочной железы: хроническом панкреатите, муковисцидозе; нарушении усвоения пищи для улучшения переваривания пищи у лиц с нормальной функцией ЖКТ в случае погрешностей в питании (употребление жирной пищи, большого количества пищи, нерегулярное питание) и при нарушениях жевательной функции, малоподвижном образе жизни, длительной иммобилизации.

В настоящее время широкое медицинское применение находят такие лекарственные препараты на основе панкреатина, как Мезим, Панзим, Панзинорм, Панкреатин (различных производителей), Фестал, Креон и др.

Главным недостатком всех лекарственных препаратов на основе панкреатина является их животное происхождение. Появление новых заболеваний (прионные и вирусные заболевания), передающихся от сельскохозяйственных животных к человеку, привело к тому, что препараты на основе панкреатина перестали отвечать требованию безопасности. Кроме того, панкреатин содержит смесь ферментов в определенном соотношении, зависящем от состава исходного сырья. Однако для лечения различных заболеваний необходимы ферментные препараты с разным соотношением активности протеазы, альфа-амилазы и липазы.

Альтернативой лекарственным препаратам на основе панкреатина являются индивидуальные ферментные препараты, получаемые из микроорганизмов. Они позволяют создавать препараты с необходимым соотношением отдельных ферментов, оптимальным для лечения различных случаев нарушения пищеварения. Но главное, применение ферментных препаратов микробного происхождения исключает для человека возможность заражения зоонозами.

Известна композиция для профилактики и лечения нарушения пищеварения у человека, содержащая ферменты из грибов - липазу из *Rhizopus delemar*, протеазу из *Aspergillus melleus* и амилазу из *Aspergillus oryzae* (РФ 2003124078).

Для лечения недостаточности поджелудочной железы предложено (РФ 2007117728 - ближайший аналог) использовать композицию, содержащую бактериальную липазу *Pseudomonas* или *Burkholderia*, грибную протеазу *Aspergillus melleus* и грибную амилазу *Aspergillus oryzae*.

5 Задача изобретения состоит в расширении арсенала пищеварительных средств на основе ферментов микробного происхождения.

Поставленная задача решена тем, что предложено пищеварительное средство, представляющее собой комплексный ферментный препарат, включающий протеазу, альфа-амилазу и липазу микробного происхождения, отличающееся тем, что в качестве протеазы используется протеаза, продуцируемая бактериями *Bacillus licheniformis*, в качестве альфа-амилазы используется амилаза, продуцируемая бактериями *Bacillus amyloliquefaciens*, а в качестве липазы используется липаза, продуцируемая дрожжами *Yarrowia lipolytica*, при следующем соотношении

15 компонентов (единицы активности): протеаза : альфа-амилаза : липаза 0,055:0,85:1.
Пример 1. Получение липазы с использованием штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ У-3260

1. Микробиологический синтез

20 Клетки выращивают при 30°C в течение 48 часов в пробирках на скошенной агаризованной среде YPD следующего состава (мас.%): пептон - 1, дрожжевой экстракт - 1, глюкоза - 2, агар - 2, вода - остальное.

Для приготовления посевного материала культуру смывают стерильной водой из расчета 10 мл на пробирку и засевают в колбы Эрленмейера объемом 750 мл, содержащие 50 мл жидкой среды YPD, из расчета 2 мл суспензии на 1 колбу и выращивают на круговой качалке при постоянном перемешивании (240 об/мин) при 28-30°C, рН 6,5-6,8, в течение 48 ч.

30 Процесс ферментации осуществляют в лабораторном ферментере Applikon (Donau Trading AG, Швейцария) объемом 3 л с начальным содержанием среды 1,2 л в течение 120 ч, интенсивность аэрации составляет 1,5 об/обхмин, скорость перемешивания 700 об/мин. Объем посевного материала - 10%. Состав ферментационной среды (мас.%): пептон - 2; дрожжевой экстракт - 2; глюкоза - 0,3; калий фосфорнокислый однозамещенный - 1,32; аммоний сернокислый - 0,5; калий фосфорнокислый двухзамещенный - 0,23; магний сернокислый - 0,05; кальций хлористый - 0,01; натрий хлористый - 0,01; оливковое масло - 5,0; детергент Твин 40 - 0,5 г; раствор витаминов - 1 мл/л; раствор микроэлементов - 1 мл/л; вода - остальное, рН - 6,8-7,0. Состав раствора витаминов (в мг/100 мл): пара-аминобензойная кислота (ПАБК) - 20; биотин - 2; рибофлавин - 20; тиамин - 40. Состав раствора

40 микроэлементов (в мг/100 мл): борная кислота - 50; медь сернокислая - 40; калий йодистый - 10; железо хлорное - 20; натрий молибденовокислый - 20; марганец сернокислый - 40; цинк сернокислый - 40. Через 4,5 часа после засева в ферментер вносят подпитку - 50%-ный раствор глицерина. Скорость подпитки до конца первых

45 суток составляет 40 мл/ч, далее до конца процесса культивирования 27,5 мл/ч.

Активность липазы определяют титриметрическим методом по гидролизу оливкового масла [European Pharmacopoeia 6.0, 2007-2008, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare]. Значения активности приводят в единицах F.I.P.

50 К концу ферментации (общее время 120 часов) липолитическая активность культуральной жидкости составляет 35000 ЕД/мл.

2. Выделение липазы

По окончании ферментации культуральную жидкость центрифугируют при 6°C

и 7000 об/мин в течение 30 мин и надсадочную жидкость подвергают ультрафильтрации тангенциального типа на мембране с отсекающим размером пор 30 кДа (процесс проводят при 4°C). К полученному концентрату добавляют пятикратный объем 3 мМ раствора хлористого кальция и вновь концентрируют до исходного объема (100±10) мл. Эту процедуру повторяют еще раз, достигая, таким образом, общей степени промывки в 25 раз.

Концентрат лиофильно высушивают и размалывают в лабораторной мельнице в течение 1,5 мин до однородного состояния. Удельная активность полученной субстанции липазы составляет 2400 ЕД/мг.

В табл.1 приведена липолитическая активность липазы при различных значениях рН при температуре 37°C. Из представленных результатов следует, что максимальную активность липаза проявляет при значениях рН 7,0-8,0.

Таблица 1	
рН	Активность, %
4	0,00
5	0,00
6	0,54
7	30,73
8	100,00
9	0,00

Пример 2. Получение липазы с использованием штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ У-3323

Получение липазы с использованием штамма дрожжей *Yarrowia lipolytica* ВКПМ У-3323 и ее выделение ведут по примеру 1.

Время приготовления посевного материала 24 часа, время ферментации 72 часа, липолитическая активность культуральной жидкости к концу ферментации составляет 37000 ЕД/мл.

Удельная активность полученной субстанции липазы составляет 2400 ЕД/мг.

Пример 3. Получение протеазы с использованием штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-10288

1. Микробиологический синтез

Клетки выращивают при 30°C в течение 48 часов в пробирках на скошенной агаризованной среде LB следующего состава (мас.%): пептон - 1, дрожжевой экстракт - 0,5, глюкоза - 0,2, агар - 1,5, вода - остальное.

Для приготовления посевного материала культуру смывают стерильной водой из расчета 10 мл на пробирку, засевают в колбы Эрленмейера объемом 750 мл, содержащие 50 мл жидкой посевной среды следующего состава (мас.%): фитопептон - 1, дрожжевой экстракт - 1, хлористый натрий - 0,25, мальтоза - 2, вода - остальное, из расчета 2 мл суспензии на 1 колбу и выращивают на круговой качалке при постоянном перемешивании (240 об/мин) при 28-30°C, рН 6,5-6,8 в течение 48 ч.

Процесс ферментации осуществляют в лабораторном ферментере Marubishi MDL150 (Marubishi Bioengineering Co. LTD, Япония) объемом 1 л с начальным содержанием среды 400 мл в течение 44 ч, температура культивирования 37°C, интенсивность аэрации составляет 1,0 об/обжмин, скорость перемешивания 700 об/мин. Объем посевного материала - 5%.

Состав ферментационной среды (мас.%): фитопептон - 1, дрожжевой экстракт - 1, кукурузная мука - 2, соевая мука - 2, натрий хлористый - 5, кальций хлористый - 1, глюкоза - 7, вода - остальное, рН до стерилизации 7,7-7,8 (доведение рН 10%

раствором NaOH), pH после стерилизации 6,8-6,9.

Активность протеазы определяют, используя метод F.I.P [European Pharmacopoeia 6.0, 2007-2008, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare]. Значения активности приводят в единицах F.I.P.

К концу ферментации протеазная активность культуральной жидкости составляет 120 ЕД/мл.

2. Выделение протеазы

По окончании ферментации культуральную жидкость, полученную в примере 3, центрифугируют при 6°C и 10000 об/мин в течение 30 мин. Центрифугат КЖ подвергают микрофльтрации в тангенциальном потоке через мембранный картридж 0,2 мкм, а затем ультрафльтрации тангенциального типа с использованием мембраны с отсекающим размером пор 10 кДа (процесс проводят при 4°C).

Полученный концентрат лиофильно высушивают и размалывают в лабораторной мельнице в течение 1,5 мин до однородного состояния. Удельная активность полученной протеазы составляет 4,5 ЕД/мг.

В табл.2 приведена протеолитическая активности протеазы при различных значениях pH при температуре 37°C. Из представленных результатов следует, что максимальную активность липаза проявляет при значениях pH 7,0-9,0.

Таблица 2	
pH	Активность, %
4,0	20
5,0	40
6,0	70
7,0	80
8,0	100
9,0	90

Пример 4. Получение протеазы с использованием штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-9608

Получение протеазы с использованием штамма *Bacillus licheniformis* ВКПМ В-9608 и ее выделение ведут по примеру 3.

Активность культуральной жидкости к концу ферментации составляет 50 ЕД/мл. Удельная активность полученной субстанции фермента - 4,5 ЕД/мг.

Пример 5. Получение альфа-амилазы с использованием штамма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-5144

1. Микробиологический синтез

В качестве продуцента альфа-амилазы используют штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-5144.

Клетки выращивают при 37°C в течение 72 часов в пробирках на скошенной агаризованной среде LB с эритромицином (pH 7,3) следующего состава (мас.%): триптон - 1,0, дрожжевой экстракт - 0,5, хлористый натрий - 0,5, эритромицин - 0,001, агар - 1,5, вода - остальное.

Для приготовления посевного материала культуру сначала из пробирки высевают при помощи микробиологической петли на чашки Петри со скошенной агаризованной посевной средой (pH 7,4) следующего состава (мас.%): триптон - 1,0, дрожжевой экстракт - 1,0, хлористый натрий - 0,25, эритромицин - 0,001, агар - 1,5, вода - остальное, и выращивают при температуре 37°C в течение 20 ч. Полученной культурой при помощи микробиологической петли из расчета две петли на колбу засевают колбы Эрленмейера объемом 750 мл, содержащие 100 мл среды для

выращивания инокулята (рН 7,4) следующего состава (мас.%): триптон - 1,0, дрожжевой экстракт - 0,5, хлористый натрий - 0,25, D-мальтоза - 2,0, вода - остальное, и выращивают на круговой качалке при постоянном перемешивании (240 об/мин) при температуре 37°C в течение 8 ч.

5 Процесс ферментации осуществляют в лабораторном ферментере Marubishi MDL 100 (Marubishi Bioengineering Co. Ltd) объемом 1 л, с начальным содержанием среды 380 мл, в течение 72 ч при следующем режиме: температура - 37°C; интенсивность аэрации - 1 об/(обжмин); перемешивание - 700 об/мин; рН - 7,0-7,4; содержание кислорода в среде -
10 не менее 10% от насыщения. При необходимости регулируют путем увеличения частоты вращения мешалки (до 900 об/мин). Объем инокулята - 5%. Состав ферментационной среды (мас.%): гидролизат картофельного крахмала - 10,0, кукурузный экстракт - 1,25, фосфат аммония двузамещенный - 1,213, пекарские прессованные дрожжи - 1,38, хлорид кальция - 0,115, сульфат калия - 0,43, сульфат магния семиводный - 0,022, сульфат меди пятиводный - 0,00058, хлорид натрия - 0,043, лактоза - 0,087, вода - остальное. Пекарские прессованные дрожжи предварительно разваривают в 70 мл дистиллированной воды на кипящей водяной бане в течение 30 минут и затем добавляют к остальным компонентам среды. Кукурузный экстракт и гидролизат картофельного крахмала готовят и стерилизуют отдельно от остальных компонентов среды и добавляют непосредственно в ферментер. В процессе ферментации осуществляют дополнительную подачу 50% раствора гидролизата крахмала: на 18 часу культивирования в ферментер добавляют 50 мл, на 20 часу - 30 мл и на 23 часу добавляют 80 мл.

25 Активность альфа-амилазы определяют с помощью метода йодометрического титрования [European Pharmacopoeia 6.0, 2007-2008, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare]. Значения активности приводят в единицах F.I.P.

30 К концу ферментации амилолитическая активность культуральной жидкости составляет 1200 ЕД/мл.

2. Выделение альфа-амилазы

По окончании ферментации культуральную жидкость, полученную в примере 5, центрифугируют при 6°C и 10000 об/мин в течение 30 мин.

35 Надосадочную жидкость подвергают микрофильтрации в тангенциальном потоке через мембранный картридж 0,2 мкм, а затем ультрафильтрации тангенциального типа с использованием мембраны с отсекающим размером пор 10 кДа (процесс проводят при 4°C). Полученный концентрат лиофильно высушивают и размалывают в лабораторной мельнице в течение 1,5 мин до однородного состояния.

40 Удельная активность полученной альфа-амилазы составляет 200 ЕД/мг.

В табл.3 приведена амилолитическая активность альфа-амилазы при различных значениях рН при температуре 37°C. Из представленных результатов следует, что максимальную активность липаза проявляет при значениях рН 6,5-6,7.

45

Таблица 3	
рН	Активность, %
4,0	0
5,0	20
6,0	90
6,5	100
6,7	100
7,0	90
8,0	30
9,0	20

50

Пример 6. Получение альфа-амилазы с использованием штамма бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291

Получение альфа-амилазы с использованием штамма *Bacillus amyloliquefaciens* ВКПМ В-10291 и ее выделение ведут по примеру 5.

Активность культуральной жидкости к концу ферментации составляет 1380 ЕД/мл. Удельная активность выделенного фермента - 200 ЕД/мг.

Пример 7. Оценка фармакологической активности заявляемого пищеварительного средства в экспериментах *in vivo* на крысах

Фармакологическую активность как отдельных ферментов, так и всей композиции оценивали в экспериментах *in vivo* на белых нелинейных крысах (масса 160-180 г, возраст 13-14 недель).

Для исследования действия ферментов выбраны модели, позволяющие иметь выраженный фармакологический эффект от действия ферментов, а именно модели пищевой нагрузки углеводами, белками и жирами.

Исследования проведены с ферментами, полученными по примерам 1, 3 и 5, выполненными в форме пелет, представляющих собой микрогранулы, покрытые кишечнорастворимой оболочкой.

Животным назначали диету, перенасыщенную жирами, углеводами и белками. Экспериментальные животные потребляли гомогенный корм следующего состава:

казеин	35%
подсолнечное масло в смеси со свиным жиром	40%
крахмал	15%
агар	2%
соли, витамины	4%
холиевая кислота	1%
тиоурацил	1%
холестерин	2%

Кроме этого, крысам дополнительно внутрижелудочно вводили 10% масляную эмульсию свиного жира в дозе 100 мг/кг и фарш из сырой говядины в дозе 500 мг/кг. Подобное кормление проводили в течение трех дней.

Сравниваемый комплексный ферментный препарат и препарат сравнения «Креон» вводили внутрижелудочно в дозе 100 мг/кг на четвертый день за час до введения свиного жира и фарша на фоне пищевой нагрузки. В 1 грамме пелет используемого препарата сравнения Креон 10000 содержание протеазы составляет 2750 ЕД, амилазы - 42710 ЕД, липазы - 50060 ЕД. При массе пелет в капсуле препарата, составляющей 250 мг, на содержание панкреатина приходится 150 мг. Остальные 100 мг в пелетах, дозированных в 1 капсулу Креона 10000, составляют вспомогательные вещества. Таким образом, доза 100 мг/кг пелет Креона соответствует введению животным 67 мг/кг панкреатина. В пересчете на активность отдельных ферментов эта доза составляет 275 ЕД/кг протеазы, 4271 ЕД/кг амилазы и 5006 ЕД/кг липазы.

Для испытаний на животных пелеты испытуемых ферментов липазы, протеазы и альфа-амилазы, полученных по примерам 1, 3 и 5 соответственно, смешивали с целью получения аналогичного по составу в части соотношения ферментной активности препарата: протеазы 275 ЕД/кг, амилазы - 4271 ЕД/кг, липазы - 5006 ЕД/кг (соотношение компонентов (единицы активности): протеаза : альфа-амилаза : липаза 0,055:0,85:1). При этом доза на введение животным составила 144 мг/кг на общую массу и 60,1% на массу ферментов.

Интактная группа крыс получала обычную виварную диету. Контрольной группе крыс вводили растворитель. Каждая группа включала по 10 животных одного пола (самцов массой 180 г).

В течение четвертого дня эксперимента опытные и контрольные животные индивидуально высаживались в обменные клетки итальянской фирмы "Tecniplast Gazzada" на 24 часа для сбора экскрементов (кала). При этом в кале общепринятыми методами определяли количество нейтрального жира, наличие жирных кислот, мыла, количество белка, наличие волокон и рН. Результаты эксперимента представлены в табл.4.

Как видно из табл.4, у группы контрольных интактных животных, получавших обычное виварное питание, наблюдается суточное выделение кала на уровне 8,4 г. Выделение жира находится на уровне 1,6 мг/г. Продукты неполного переваривания жиров, таких как жирные кислоты, и мыла отсутствуют или их количества находятся на пределе чувствительности методов анализа. Реакция рН каловых масс нейтральная - 7,2.

Влияние сравниваемых препаратов на копрограмму белых крыс							
Экспериментальная группа	Общее количество кала, г	Содержание нейтрального жира в кале, мг/г	Наличие жирных кислот, ±	Наличие мыла, ±	Содержание растворимого белка в кале, мг/г	Мышечные волокна, кол-во в поле зрения	Реакция, ед. рН
Интактные	8,4±0,1	1,6±0,2	-	-	27±6	2±1	7,1±0,1
Контроль без лечения	13,2±0,2	44±11	+++	+++	136±15	27±7	8,2±0,1
Лечение заявляемым средством	9,2±0,3	1,9±0,2	-	+	36±8	6±1	7,2±0,1
Лечение препаратом «Креон»	8,9±0,2	1,4±0,1	-	+	28±6	4±1	7,1±0,1

Группа контрольных животных с пищевой нагрузкой жирами и белками имеет выраженные отличия с повышением в 27 раз концентрации жиров и в 5 раз белков в каловых массах и увеличением их объема, повышается рН среды. Таким образом, наблюдается выраженное нарушение пищеварения вследствие недостатка переваривающей активности секретов желудка и кишечника.

При назначении животным комплексного препарата и препарата сравнения Креона в равноэффективных дозах показатели пищеварения приходят в исходное состояние. Различия между животными, получавшими препараты, и интактными животными находятся в пределах статистической погрешности и не носят значимого характера. Некоторое увеличение содержания солей жирных кислот (мыла) на уровне один плюс, видимо, можно рассматривать как недостаточность процесса всасывания в условиях перегрузки продуктами переваривания жиров.

Пример 8. Оценка фармакологической активности заявляемого пищеварительного средства в экспериментах *in vivo* на собаках

Для оценки фармакологической активности использовали пелетированный комплексный препарат, состоящий из пелет ферментов, полученных по примерам 2, 4 и 6.

В экспериментах использовали 6 собак массой 18-22 кг (2 собаки входили в опытную группу и 4 - в контрольную группу) для моделирования панкреатита. Панкреатит вызывали введением в проток поджелудочной железы раствора трипсина в дозе 0,2 мг/кг массы тела и последующей перевязкой протока. Пелетированный комплексный препарат назначали в капсулах в дозе 600 ЕД протеазы, 8000 ЕД

амилазы и 10000 ЕД липазы (соотношение компонентов (единицы активности): протеаза : альфа-амилаза : липаза 0,060:0,8:1) дважды в день перед едой и через 4 часа. Кал собирали, взвешивали, сушили в термостате при 60°C в течение суток. Затем его растирали и просеивали с целью освобождения от волос, опилок и песка. Содержание белка в кале определяли методом Кьельдаля. Данный метод широко применяется для оценки пищевых продуктов с расчетом количества белка по содержанию аминного азота в материалах. Наличие в кале нейтрального жира, жирных кислот и крахмала определяли общепринятыми методами.

В послеоперационный период и в ходе опыта масса тела собак практически не изменялась. Все животные полностью съедали оставленную им пищу. Характер стула был довольно постоянным. Кал обычно плотной консистенции, оформленный. Макроскопически непереваренные мышечные волокна определялись только в контрольной группе в течение первых 2 недель. Результаты экспериментов представлены в таблице 5.

Влияние препарата на копрограмму у контрольных и подопытных собак с подострым панкреатитом								
Сроки исследования, недели	Белок в кале (M±m)		Наличие крахмала, ±		Наличие нейтрального жира, ±		Наличие жирных кислот, ±	
	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт	Контр.	Опыт
Перед операцией	265,7±13,8	254,0±11,4	-	-	-	-	-	-
1	335,4±14,8	265,6±18,8	++	-	+++	-	+++	-
2	332,4±48,8	225,2±14,1	++	-	+++	-	+++	-
3	291,6±16,8	200,0±10,7	+	-	++	-	++	-
4	225,0±12,3	218,7±20,7	-	-	++	-	++	-

Как видно из таблицы, в контрольной группе собак наблюдалось достоверное увеличение количества белка в кале (~ на 30% по отношению к фону) в течение первых 2 недель. Также в кале тестировался крахмал, жирные кислоты и нейтральный жир. Затем содержание белка и крахмала снижалось, приближаясь к исходному уровню. Наличие нейтрального жира и жирных кислот тестировалось в кале контрольной группы собак на протяжении всего эксперимента. В опытной группе в течение всего эксперимента количество белка не превысило исходный уровень (кроме статистически недостоверного увеличения на первой неделе) и даже было ниже фоновых цифр. При сравнении опытной и контрольной групп видно, что в течение 1, 2 и 3 недели имеются достоверные различия в содержании белка в кале. В контроле количество белка превышало его уровень в опытной группе на 30-48%. Также в опытной группе в течение всего эксперимента крахмал и продукты неполного переваривания жиров, нейтральный жир и жирные кислоты отсутствовали или их количества находилось на пределе чувствительности методов анализа. Патогистологическое исследование подтвердило наличие у всех прооперированных собак подострого панкреатита.

Отчетливо показано энзимкомпенсирующее действие заявляемого препарата при нарушении пищеварения и дефиците панкреатических ферментов.

Таким образом, заявляемая композиция на основе ферментов микробного происхождения по фармакологической активности сопоставима с известным препаратом животного происхождения «Креон». Оптимум действия входящих в композицию ферментов находится в области нейтральных значений pH.

Формула изобретения

Пищеварительное средство, представляющее собой комплексный ферментный препарат, включающий протеазу, альфу-амилазу и липазу микробного происхождения, отличающееся тем, что в качестве протеазы содержит протеазу, продуцируемую бактериями *Bacillus licheniformis*, в качестве альфы-амилазы - амилазу, 5 продуцируемую бактериями *Bacillus amyloliquefaciens*, а в качестве липазы - липазу, продуцируемую дрожжами *Yarrowia lipolytica* при следующем соотношении компонентов (единицы активности): протеаза:амилаза:липаза = 0,055:0,85:1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50