

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292275 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.18

(51) Int. Cl. C12R 1/01 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.18

(54) ШТАММ CUTIBACTERIUM ACNES И ЕГО МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 102020000003233

(72) Изобретатель:

(32) 2020.02.18

Вергалито Франка, Лонго

(33) IT

Сормани Соня, Маньфико Ирене,

(86) PCT/EP2021/054083

Пьетранджело Лаура, Ди Марко

(87) WO 2021/165434 2021.08.26

Роберто Мария Антонио, Кутули

(71) Заявитель:

Марко Альфио, Вендитти Ноэми,

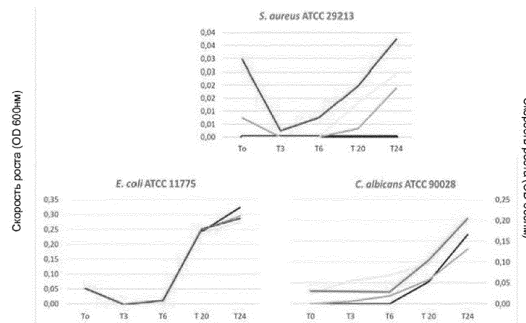
АЙЛЕНС ФАРМА С.Р.Л. (IT)

Петронио Петронио Джулио (IT)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается выбранного штамма бактерий Cutibacterium acnes и/или его клеточных стенок или постбиотиков данного штамма и его медицинского или пищевого применения. Изобретение также касается фармацевтических или пищевых композиций, содержащих данный штамм, его клеточные стенки или постбиотики, для профилактики или лечения воспалительных заболеваний типа дерматита или псориаза либо инфекций, особенно грибковых или бактериальных инфекций кожи или слизистых.



A1

202292275

202292275

A1

ШТАММ CUTIBACTERIUM ACNES И ЕГО МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается выбранного штамма из рода *Cutibacterium* вида *acnes* и его медицинского применения, а также фармацевтических и пищевых композиций, содержащих данный штамм.

Настоящее изобретение относится к области микробиологии и находит применение в области фармацевтики, косметики и питания.

В частности, изобретение касается выбранного штамма *Cutibacterium acnes* либо его постбиотиков и фрагментов клеточной стенки, которые посредством структурных компонентов микроорганизма и/или посредством выработки веществ способствуют росту клеток фибробластов. Штамм по изобретению, фрагменты его стенки и его постбиотики обладают противовоспалительным и антибактериальным действием. Предпочтительно выбранный бактериальный штамм или фрагменты его стенки предназначены для местного применения при лечении дерматологических заболеваний, инфекций или поражений кожи.

Уровень техники

В сущности воспаление – это биологическая реакция на вредные раздражители или повреждение тканей организма, которое может быть вызвано внешними причинами типа контакта с раздражающими веществами или микроорганизмами. Воспаление рассматривается как защитная реакция организма, направленная на устранение причины повреждения тканей, избавление от некротических тканей, поврежденных при первичном повреждении и воспалительном процессе, и запуск репарации тканей. В этой реакции организма участвуют иммунные клетки и молекулярные медиаторы.

В настоящее время воспаление лечат путем системного или местного введения нестероидных или стероидных противовоспалительных препаратов. Несмотря на широкое распространение противовоспалительных средств, все-таки остается некоторый риск того, что воспаление сохранится и после лечения противовоспалительными препаратами. Кроме того, противовоспалительная терапия не лишена побочных эффектов как при местном применении, так и при системном введении.

В последние годы возрастает количество побочных эффектов при местном применении вследствие злоупотребления или неправильного применения стероидных кремов, направленных на лечение воспаления кожи.

Поэтому в настоящее время существует потребность в новых препаратах, обладающих противовоспалительным действием, применение которых даже в течение

длительного времени не вызывает серьезных побочных эффектов.

Аналогичные проблемы возникают в области дерматологии и гинекологии при инфекциях кожи или слизистых оболочек.

Злоупотребление антибиотиками для местного применения при лечении кожных инфекций привело к возрастанию случаев устойчивости к местной антибиотикотерапии, вынуждая врачей назначать антибиотики второго поколения.

Поэтому в настоящее время существует потребность в новых препаратах, обладающих противовоспалительным и/или по возможности даже противомикробным действием, которые альтернативны коммерчески доступным лекарственным средствам.

Одна из задач настоящего изобретения заключается в получении препарата, обладающего противовоспалительным и по возможности антимикробным или противогрибковым действием, применение которого практически не вызывает побочных эффектов. Также желательно получить препарат, активно контролирующей микробиоту человека.

Другая задача изобретения заключается в получении нестероидного препарата, обладающего противовоспалительным действием, который специально предназначен для местного нанесения на кожу или слизистые оболочки типа слизистой оболочки влагалища.

Последнее в общем направлено против патогенных бактерий и/или грибов, действуя в зависимости от мишени либо как бактерицидное или бактериостатическое, либо как фунгицидное или фунгистатическое средство.

С другой стороны, при противостоянии патогенам достигается более быстрое восстановление условий гомеостаза за счет нормализации резидентного микробиома.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение исходит из того, что выбранный штамм бактерий из рода *Cutibacterium* вида *acnes* способствует пролиферации фибробластов и обладает способностью препятствовать росту большинства распространенных бактерий и грибов, особенно тех, которые поражают кожу человека.

В частности, выбранный штамм бактерий *Cutibacterium acnes*, как определено в п. 1 формулы, фрагменты его клеточной стенки либо содержащие его постбиотики или композиции, как определено здесь, проявляют регулирующее действие на иммунную систему в сочетании с улучшением ингибирующего действия на патогенные микроорганизмы кожи. Эти эффекты частично связаны с тем, что этот штамм препятствует прикреплению патогена к клеткам хозяина.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что живые или убитые бактерии

данного штамма либо их части типа фрагментов стенки по изобретению вырабатывают вещества или побочные продукты, которые способствуют росту и миграции клеток фибробластов. Это свойство дополнительно подтверждает применение данного штамма или вырабатываемых им веществ в качестве иммуномодулирующих средств и делает его подходящим кандидатом для применения в области дерматологии или гинекологии, особенно при лечении бактериальных или грибковых инфекций кожи, особенно заражения *Candida albicans* или бактериальных инфекций.

Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения предусмотрен штамм бактерий из рода *Cutibacterium* вида *acnes*, депонированный под номером доступа (или регистрационным номером) DSM 28251 в Международном депозитарии Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, либо его варианты, которые по сути происходят от данного штамма.

В одном аспекте изобретения предусмотрено медицинское применение вышеприведенного штамма бактерий *Cutibacterium acnes*, депонированного под номером доступа DSM 28251. В соответствии с этим аспектом данный штамм по изобретению предназначается для местного или системного введения.

Системное введение означает способ введения лекарственного средства, питания, включающего штамм по изобретению, в кровеносную систему с тем, чтобы он воздействовал на весь организм. Введение может осуществляться посредством энтерального, перорального или парентерального введения, например, посредством инъекции, инфузии или имплантации.

Местное введение или нанесение является предпочтительным способом введения *Cutibacterium acnes* DSM 28251 по настоящему изобретению. *Cutibacterium acnes* DSM 28251, постбиотики, фрагменты клеточной стенки и содержащие их композиции можно наносить на кожу в любых формах, пригодных для местного применения.

В другом аспекте изобретения предусмотрены штаммы или варианты бактериального штамма DSM 28251, определенного выше, которые в основном получены посредством спонтанной мутации, индуцированной мутации и отбора, гибридизации и отбора или другими методами генетических манипуляций и восходят к нему. В другом аспекте изобретения предусмотрены постбиотики данного штамма и их медицинское или пищевое применение.

Бактериальный штамм по настоящему изобретению может быть выделен и отобран из здоровой кожи среди множества штаммов, составляющих микробиом кожи.

В еще одном аспекте изобретения предусмотрен штамм бактерий *Cutibacterium acnes*, депонированный под номером доступа DSM 28251 в Международном депозитарии

Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, либо его варианты, в основном происходящие из данного штамма, для применения при профилактике или лечении воспалительных заболеваний или инфекций, в особенности кожи или слизистых оболочек.

Предпочтительно бактериальный штамм по изобретению находит применение в области дерматологии и гинекологии, к примеру, при лечении воспаления кожи или слизистых оболочек либо инфекций, вызванных бактериями, грибами или простейшими. В частности, вышеуказанный штамм эффективен при профилактике и/или лечении инфекций, особенно кожных.

Выбранный штамм по изобретению эффективен при лечении грибков, особенно дрожжей из рода *Candida* spp., особенно *Candida albicans*, или таких дерматофитов, как *Malassezia* spp., которые являются одними из самых распространенных возбудителей оппортунистических инфекций организма человека. Кроме того, выбранный штамм по изобретению применяется при лечении грибковых инфекций, устойчивых к существующим противогрибковым препаратам.

Изобретением также предусмотрено проктологическое применение *Cutibacterium acnes* DSM 28251, в особенности убитых нагреванием, постбиотиков или фрагментов стенки этого штамма либо их композиций для местного применения, особенно при лечении геморроя, анальных трещин или рубцов на коже.

В другом аспекте изобретения предусмотрены композиции гиалуроновой кислоты с фрагментами стенки бактерий *C. acnes* DSM 28251, в частности, для применения при лечении ран, ссадин, изъязвлений кожи, к примеру, пролежней.

В следующем аспекте изобретения предусмотрено косметическое применение вышеуказанного бактериального штамма для улучшения эстетического вида кожи типа покраснения или красных угрей.

В другом аспекте изобретения предусмотрено пищевое применение вышеуказанного штамма или полученных из него постбиотиков.

Краткое описание фигур

Далее изобретение будет описано подробно с привлечением прилагаемых фигур.

На фиг. 1 представлены гистограммы, показывающие размеры перегородок из примера 1, рассчитанные с помощью программного обеспечения Image J.

На фиг. 2 представлены гистограммы с площадью перегородок из примера 1, рассчитанные с помощью программного обеспечения Image J.

На фиг. 3 представлены гистограммы, показывающие влияние *in vitro* на кривые роста *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при добавлении в культуральные среды различных

концентраций убитых нагреванием *C. acnes* DSM 28251.

На фиг. 4 представлено получение супернатантов из *Staphylococcus aureus*, используемых в опыте из Примера 3.

На фиг. 5А и 5В представлены графики, показывающие выживаемость личинок *Galleria mellonella* после инъекции супернатантов из культур *S. aureus* ATCC ВАА1680 (А) и *S. aureus* ATCC 29213 (В), преинкубированных с составами при тестировании в течение 1 ч в соответствии с Примером 4. “Супернатант+форма А” означает супернатант, инкубированный с LimpiAD А, “Супернатант+форма D” – супернатант, инкубированный с составом LimpiAD D, “Супернатант+стенки” – супернатант, инкубированный с активными компонентами LimpiAD, “Супернатант” – положительный контроль, “Среда” – только культуральная среда (без бактериальной культуры), “Физраствор” – ложная обработка.

На фиг. 6А и 6В представлены графики, показывающие выживаемость личинок *Galleria mellonella* после инъекции супернатантов из культур *S. aureus* ATCC ВАА1680 (А) и *S. aureus* ATCC 29213 (В), преинкубированных с составами при тестировании в течение 4 ч в соответствии с Примером 4. “Супернатант+форма А” означает супернатант, инкубированный с LimpiAD А, “Супернатант+форма D” – супернатант, инкубированный с составом LimpiAD D, “Супернатант+стенки” – супернатант, инкубированный с активными компонентами LimpiAD, “Супернатант” – положительный контроль, “Среда” – только культуральная среда (без бактериальной культуры), “Физраствор” – ложная обработка.

На фиг. 7 представлена экспрессия целевых генов, “нормализованная” по контролям, выраженная в виде кратности повышения или снижения, как указано в примере 4.

На фиг. 8 представлены 5 графиков, показывающих сравнительные кривые роста штаммов *Staphylococcus aureus* (3 разных штамма), *Staphylococcus epidermidis* и *Candida albicans*, инокулированных супернатантами (плюс контроль без штаммов) от 7 известных штаммов *Cutibacterium acnes* и (сравнительного) штамма *Cutibacterium acnes* DSM 28251.

На фиг. 9 представлены 5 графиков, показывающих сравнительные кривые роста 3 штаммов *Staphylococcus aureus*, 1 штамма *Staphylococcus epidermidis* и 1 штамма *Candida albicans* в среде, инокулированной 7 различными известными штаммами *Cutibacterium acnes*, убитыми нагреванием, и штаммом *Cutibacterium acnes* DSM 28251 (сравнительный штамм, убитый нагреванием).

На фиг. 10 представлены 5 графиков, показывающих сравнительные кривые роста 3 штаммов *Staphylococcus aureus*, 1 штамма *Staphylococcus epidermidis* и 1 штамма *Candida*

albicans в среде, инокулированной фрагментами бактериальной стенки, полученными при гомогенизации и последующем градиентном разделении из 7 различных известных штаммов Cutibacterium acnes и штамма Cutibacterium acnes DSM 28251 (сравнительный фрагмент бактериальной стенки).

Сущность изобретения

В первом аспекте изобретения предусмотрен штамм, принадлежащий к роду Cutibacterium вида acnes, зарегистрированный под номером доступа DSM 28251 (ID 19-401) в Международном депозитарии Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, либо его варианты, в основном происходящие из данного штамма.

Изобретением также предусмотрены постбиотики, как определено в пунктах 2 и 3 формулы, и клеточные стенки, как определено в пунктах 4 и 5 формулы.

Вышеуказанный бактериальный штамм обладает как противовоспалительной активностью *in vivo*, так и по меньшей мере антимикробной активностью *in vitro*. Клеточные стенки или постбиотики из данного штамма тоже обладают этими активностями.

Вышеуказанные активности подтверждены экспериментальными тестами, проведенными авторами изобретения и представленными в следующих примерах. Эти тесты обеспечивают научную основу для применения вышеуказанного бактериального штамма в качестве противовоспалительного, иммуномодулирующего и противомикробного средства, особенно для местного применения.

В некоторых аспектах изобретения предусмотрены композиции, в особенности фармацевтические или пищевые композиции, содержащие штамм/стенки или постбиотики, как определено здесь.

В другом аспекте изобретения предусмотрено применение вышеуказанного штамма/стенок/постбиотиков в качестве лекарственных средств и их медицинское применение, в частности, как определено в пунктах 9-13 формулы.

Присущие выбранному бактериальному штамму свойства обеспечивают противовоспалительное действие, позволяющее врачам лечить широкий спектр заболеваний, в особенности таких, которые локализуются на коже или слизистых оболочках организма человека.

Кроме того, антибактериальные и/или бактериостатические свойства выбранного штамма делают его полезным при лечении инфекций, в особенности инфекций кожи и слизистых оболочек.

Выбранный штамм оказался эффективным против распространенных бактерий, в

особенности грамположительных бактерий, особенно кокков типа *Staphylococcus aureus*, или против *Escherichia coli* и грибков, к примеру, из рода *Candida*.

Штамм по настоящему изобретению охарактеризован генотипически и может быть идентифицирован четким и определенным образом по специфическим признакам, идентифицированным в геноме. Этот штамм возник спонтанно, без какого-либо прямого вмешательства или генетических манипуляций, и обладает соответствующими характеристиками для промышленного применения.

Для того, чтобы проверить и установить характеристики штамма DSM 28251 и исключить возможное совпадение этого штамма со штаммами, описанными на предшествующем уровне техники, проводилась характеристика генотипа в DSMZ.

В одном аспекте изобретения предусмотрено косметическое применение композиций для местного применения, как определено в пунктах 7 и 8 формулы, особенно для косметического лечения или профилактики чувствительной кожи, покраснения кожи, красных угрей, сухости кожи, в особенности лица человека.

В некоторых аспектах изобретения также предусмотрены штаммы или стенки клеток, или постбиотики штамма *C. acnes* DSM 28251 для медицинского применения при лечении:

- гинекологических заболеваний типа вагинита, вагинальных инфекций или воспаления, или
- проктологических заболеваний, к примеру, геморроя, анальных трещин или рубцов на коже или в перианальной области, или
- ранок, повреждений, ссадин, изъязвления кожи, к примеру, пролежней, или для заживления ран.

Определения в настоящем изобретении

“Штамм DSM 28251” означает штамм бактерий из рода *Cutibacterium* вида *acnes*, зарегистрированный 18 декабря 2013 г. (идентификационная ссылка в ULTIMO) и депонированный в соответствии с Будапештским договором 22 декабря 2019 г. с номером доступа DSM 28251 в Международном депозитарии Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, причем *Cutibacterium acnes* относится к грамположительным бактериям.

“Генетическая манипуляция” означает любое техническое вмешательство, направленное на управление процессом приобретения специфических генетических характеристик, выражающихся в соответствующих фенотипических признаках, причем техническое вмешательство включает (Sturley & Young, 1986): (i) скрещивание природных штаммов с последующим отбором; (ii) получение гибридов с последующим отбором; (iii)

трансформацию, то есть вставку экзогенной ДНК в хромосомы или в митохондриальный геном или в другие генетические элементы типа плазмид. В качестве дополнительного способа манипулирования можно еще добавить (iv) индуцированный случайный мутагенез, обычно с последующим отбором и/или получением гибридов (Nevoigt, 2008).

“Производный вариант” означает штамм – вариант штамма *Cutibacterium acnes*, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM 28251, который выводится из него по профилю микросателлитной ДНК или по отличительным генетическим признакам, выявляемым при секвенировании генома и сравнительном анализе.

“Культуральная среда” (синонимы: среда, питательная среда/культуральный бульон/питательный бульон) означает субстрат, содержащий все соединения (факторы), необходимые микроорганизмам, особенно бактериям типа грамположительных бактерий, для репликации клеток, приводящей к увеличению числа отдельных клеток и к росту популяции. Факторы, необходимые микроорганизмам для их роста в среде, в основном относятся к следующим категориям: источники углерода, а также источники азота (состоящие как из аммиака, так и из свободных аминокислот, которые также известны как FAN), витамины и соли (микроэлементы). Типичными источниками углерода являются патока из сахарного тростника, свекольная патока, экстракт ячменного солода и экстракт пшеничного солода.

Состав неживых/нежизнеспособных клеток, клеточных экстрактов, клеточных лизатов строго связан с уникальными метаболическими и физиологическими свойствами штамма DSM 28251.

“Постбиотики” – продукты нежизнеспособных бактерий, включая побочные продукты метаболизма, секретлируемые микроорганизмами типа штамма, депонированного в DSMZ под номером доступа DSM 28251, которые обладают биологической активностью в организме хозяина или при нанесении на ткани человеческого тела типа кожи.

Постбиотики также включают любые материалы из штамма *Cutibacterium DSM 28251*, преимущественно включая клеточную стенку, цитоплазму, цитоплазматическую мембрану, генетический материал (нуклеоид), рибосомы, которые могут высвободиться или выходить после лизиса бактерий. Постбиотики обеспечивают физиологические преимущества для хозяина и могут применяться для составления композиций для медицинского или косметического применения и для перорального и/или местного введения, как описано здесь.

Постбиотики из штамма *Cutibacterium DSM 28251* могут быть получены в соответствии с общей методикой/способом, включающим следующие стадии:

бактериальный штамм выращивают в среде или в бульоне, получая суспензию; суспензию центрифугируют в пробирках по стандартной технологии;

по окончании центрифугирования происходит расслоение суспензии: осадок, содержащий клетки, оседает на дно пробирки, а верхний слой содержит супернатант, который представляет собой надосадочную жидкость/культуральную среду;

затем супернатант удаляют, оставляя осадок на дне пробирки, который собирают и промывают водой, а затем ресуспенсируют в физиологическом (солевом) растворе, получая клетки, которые еще раз центрифугируют для удаления оставшейся культуральной среды, а клетки суспендируют в воде и подвергают механической обработке с помощью механического блендера типа Ultraturrax (механический лизис);

при механическом лизисе клеточной стенки высвобождается содержимое клеток и получается постбиотик (супернатант).

Конкретные воплощения этой процедуры описаны в следующем подробном описании и в примерах.

“Носитель” означает эксципиент, жидкий носитель, разбавитель или адъювант, который может и не присутствовать в композиции по изобретению.

“Пищевой продукт” означает такой продукт, который улучшает пищевой статус и может использоваться для поддержания или улучшения функциональной активности одного или нескольких органов или функциональности организма человека в физиологических пределах.

“Выбранный штамм бактерий” или “штамм”, как он упоминается здесь, означает штамм по изобретению, депонированный в DSMZ под номером доступа DSM 28251.

“Клеточная стенка” или “стенка бактериального штамма (по изобретению)” означает клеточную стенку штамма бактерий *Cutibacterium acnes*, депонированного под номером доступа DSM 28251. Стенка штамма по изобретению может быть разрушена на части или фрагменты.

Термин “фрагмент” означает часть стенки штамма DSM 28251 по изобретению. Фрагмент также может означать лизат клеточной стенки штамма DSM 28251. Фрагмент или лизат клеточной стенки штамма DSM 28251 можно получить стандартными или общими методами разрушения клеток, например, как описано ниже.

Бактерии в бульоне или культуральной среде промывают и удаляют липиды, как правило, с помощью экстрактора Soxhlet, а затем делипидированные бактерии суспендируют в воде и подвергают механическому лизису, например, с помощью механического блендера, к примеру, с помощью Ultraturrax, и обрабатывают содержимое сульфатом аммония для осаждения фрагментов бактериальной стенки.

Затем фрагменты можно очистить, например, путем промывания водой, получая фрагменты стенки.

Конкретный способ получения фрагментов стенки штамма *S. acnes* DSM 28251 описан в Примере 6.

Подходящая дезинтеграция/разрушение штамма или его стенки может осуществляться либо путем обработки штамма по изобретению механическими методами/методами лизиса, либо немеханическими методами/методами лизиса.

Разрушение штамма механическими методами/устройствами

Подходящие механические методы разрушения (лизиса) клеточной стенки данного штамма и получения фрагментов стенки включают твердотельные либо жидкостные методы среза.

Твердотельные методы среза включают использование шаровой мельницы, прессы X-press или прессы Хьюза. Жидкостные методы среза включают обработку ультразвуком и высоким давлением, включая пресс Хьюза или пресс Френча и/или гомогенизацию с помощью гомогенизатора или микрофлюидального гомогенизатора.

Метод шаровой мельницы (или истирания) обычно включает перемешивание суспензии штамма со стеклянными шариками.

Как правило, разрушение клеточной стенки методом шаровой мельницы проводится в шаровой мельнице, которая включает измельчительную камеру с рубашкой и вращающийся вал, проходящий через её центр. Вал снабжен мешалкой, передающей кинетическую энергию на шарики в камере, заставляя их сталкиваться друг с другом (Chisti & Moo-Young, 1986; Middelberg, 1995). Подходящие шарики могут быть диаметром 0,10-0,15 мм для эффективного разрушения бактерий. В крупных промышленных устройствах могут использоваться шарики диаметром 0,4-0,6 мм вследствие механизма отделения шариков от суспензии (Kula & Shutte, 1987). Подходящая скорость наконечника для разрушения бактерий составляет не менее 10 м^{-1} (Kula & Shutte, 1987). Концентрация клеток может составлять от 40 до 50% сырого веса бульона, вносимого в камеру.

Подходящие твердотельные методы среза также включают обработку ультразвуком и методы высокого давления, включая пресс Хьюза или пресс Френча, в которых замороженная суспензия клеток проталкивается через небольшое отверстие под высоким давлением (Engler, 1985).

Обработка ультразвуком включает использование ультразвука, т.е. звуковых волн с частотой обычно выше 15-20 кГц, которые могут разрушить клеточную стенку в суспензии. Подходящая акустическая мощность, к примеру, при обработке ультразвуком 5-30 мл 20%-й суспензии бактерий в стандартной жидкой среде, составляет 35-95 Вт.

С другой стороны, механическое разрушение может проводиться в гомогенизаторе с клапаном высокого давления путем пропускания клеточной суспензии штамма под высоким давлением через регулируемый выпускной клапан с ограниченным отверстием, как сообщалось в Engler, 1985. Как правило, основная конструкция гомогенизатора включает поршневой насос прямого вытеснения, который нагнетает клеточную суспензию через центр гнезда клапана сквозь поверхность гнезда. Регулировка усилия на клапане контролирует давление. Жидкость течет радиально через клапан и ударяется об ударное кольцо (Middelberg, 1995). Разрушение происходит в результате неспецифического разрыва клеточной стенки.

Типичным типом гомогенизатора является конструкция Manton-Gaulin APV (Middelberg, 1995). Например, в гомогенизаторе температура повышается на 21°C на каждые 10 МПа. Существует сильное влияние рабочего давления на процесс разрушения в гомогенизаторе. При повышении рабочего давления в гомогенизаторе можно уменьшить количество проходов клеточной суспензии через гомогенизатор для заданной степени разрушения (Chisti & Moo-Young, 1986; Bury et al., 2001).

В качестве оборудования для получения фрагментов клеточной стенки также можно использовать микрофлюидальный гомогенизатор. В этом аппарате два потока клеточной суспензии с высокой скоростью сталкиваются с неподвижной поверхностью, при этом потребляемая энергия почти мгновенно рассеивается в точке столкновения, что приводит к разрушению клеток (Middelberg, 1995; Agerkvist & Enfors, 1990). Время пребывания суспензии штамма в разрушительной камере Microfluidizer, которая является самой горячей частью устройства, составляет 25-40 мс. Охлаждение на месте может осуществляться путем погружения разрушительной камеры в ледяную баню (Sauer et al., 1989; Geciova, личный опыт). Доля разрушенных клеток возрастает с повышением давления и количества проходов.

Разрушение штамма немеханическими методами

Один немеханический метод основан на декомпрессии, возникающей при введении в клетки сжатого докритического или сверхкритического газа, вызывающего разрушение после сброса приложенного давления за счет расширения.

Другой метод немеханического разрушения клеточной стенки осуществляется посредством осмотического шока, когда суспензию клеток данного штамма разбавляют в жидкой среде/бульоне после уравнивания при высоком осмотическом давлении в стандартных условиях.

Альтернативным методом лизиса клеток является термолиз, который включает тепловую обработку клеток в стандартных условиях. Другой немеханический метод

лизиса клеток может осуществляться путем химической пермеабилзации, особенно с помощью вещества из числа антибиотиков типа бета-лактамных антибиотиков, к примеру, пенициллина, хелаторов типа ЭДТА, хаотропов типа мочевины, гуанидина, этанола, детергентов типа серии Triton X, додецилсульфата натрия, лаурилсаркозината натрия, растворителей типа толуола, ацетона, хлороформа, гидроксидов типа гидроксида натрия, гипохлоритов типа гипохлорита натрия и их смесей.

Лизис клеток данного штамма также может осуществляться путем ферментативного лизиса, например, при помощи протеазы и глюканазы для атаки сначала на маннопротеиновый комплекс клеточной стенки, а затем на глюкановый остов (Kitamura, 1982). Подходящим препаратом для лизиса стенки штамма является коммерческий продукт Zymolase-20T (Seikagaku America, Inc., Rockville, MD). Для лизиса пептидогликановых слоев также можно использовать лизоцим, так как он катализирует гидролиз β -1,4-гликозидных связей.

В предпочтительном воплощении фрагменты стенки штамма *S. acnes* DSM 28251 могут быть получены путем обработки бактериального штамма сульфатом аммония, предпочтительно при температуре ниже комнатной, например, в диапазоне от 10 до 2°C, и предпочтительно после обработки суспензию центрифугируют и собирают осажденные фрагменты.

Предпочтительно перед обработкой сульфатом аммония штамм *S. acnes* DSM 28251 высушивают и центрифугируют, необязательно с водой. Необязательно после центрифугирования супернатант, полученный при центрифугировании, нагревают, к примеру, при температуре от 40 до 95°C, предпочтительно при 75-85°C, а затем охлаждают, к примеру, холодной водой, предпочтительно при 3-15°C. После этого проводится стадия осаждения путем инкубации с раствором сульфата аммония в концентрации от 20 до 60% об./об., к примеру, при 2-10°C. Предпочтительно полученную после инкубации суспензию центрифугируют и собирают осажденные фрагменты.

Например, из бактериального осадка удаляют липиды путем обработки при помощи Soxhlet, используя органические растворители из числа эфира-этанола, хлороформа, метанола-хлороформа и их смесей, а затем высушивают, к примеру, в ламинарном боксе. После сушки осадок гомогенизируют за 2 стадии обработки Ultraturrax, предпочтительно по 1 минуте, с добавлением дистиллированной воды, предпочтительно в пропорции 1:2 по объему. После центрифугирования супернатант нагревают до 80°C, а затем охлаждают в холодной воде, предпочтительно при 3-15°C, и наконец на льду. После этого проводится стадия осаждения фрагментов путем инкубации с охлажденным 40% сульфатом аммония в течение 24 часов при 4°C. После инкубации

суспензию центрифугируют, а осажденные фрагменты собирают и лиофилизируют.

В некоторых воплощениях фрагменты клеточной стенки *Cutibacterium acnes*, депонированной под номером доступа DSM 28251, делипидируют, то есть обрабатывают с тем, чтобы либо удалить, либо значительно уменьшить липидный компонент клеточной стенки бактерий при помощи химических/биотехнологических методов. Например, *Cutibacterium acnes*, депонированные под номером доступа DSM 28251, делипидируют перед дроблением для получения фрагментов клеточной стенки.

Как правило, делипидированные фрагменты клеточной стенки штамма по изобретению содержат сахара и пептидные цепи, обычно связанные друг с другом в виде гликопептидов, образующих плотную сетку. Типичные сахара клеточной стенки включают N-ацетилмурамовую кислоту и N-ацетилглюкозамин.

Фармацевтические композиции

Бактериальный штамм DSM 28251 и полученные в основном из него штаммы либо фрагменты или постбиотики, полученные из него, оказываются чрезвычайно выгодными для промышленного применения при получении фармацевтических композиций, особенно для местного применения.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие бактериальный штамм, как определено выше, фрагменты или постбиотики, полученные из него, и фармацевтически или физиологически приемлемые эксципиенты.

Физиологически или фармацевтически подходящие носители, разбавители или эксципиенты можно выбирать, исходя из способа введения, для которого предназначается полученная при этом фармацевтическая композиция.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению охватывают любые композиции, полученные при смешивании штамма, как определено здесь, его фрагментов или постбиотиков по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемых носителей. Такие композиции подходят для фармацевтического применения у животных или человека.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению содержат терапевтически эффективное количество штамма, как определено выше, или его фрагментов/постбиотиков, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтические композиции необязательно могут содержать и другие активные ингредиенты. Термин “носитель” означает носитель, наполнитель, разбавители или адъювант, вместе с которым вводится терапевтический или активный ингредиент. Предусмотрены любые носители и/или эксципиенты, подходящие для той формы

препарата, которая желательна для введения, при применении вместе с описанными здесь штаммами/стенками/постбиотиками.

Носитель может принимать самые разные формы в зависимости от требуемой для введения формы препарата, напр., перорально или парентерально, в том числе внутривенно. При получении композиций для пероральных дозовых форм можно использовать любые из обычных фармацевтических сред, такие, к примеру, как вода, гликоли, масла, спирты, ароматизаторы, консерванты, красители и т.п. в случае жидких пероральных препаратов, таких, к примеру, как суспензии, эликсиры и растворы; или такие носители, как крахмалы, сахара, микрокристаллическая целлюлоза, разбавители, гранулирующие, смазывающие, связующие вещества, разрыхлители и т.п. в случае твердых пероральных препаратов, таких, к примеру, как порошки, твердые и мягкие капсулы и таблетки, причем твердые пероральные препараты более предпочтительны, чем жидкие препараты.

В некоторых воплощениях штамм/стенки/постбиотики по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента можно комбинировать в виде смеси с подходящим фармацевтическим носителем и/или наполнителем в соответствии со стандартными фармацевтическими методами составления лекарственных средств.

Композиции включают композиции, подходящие для парентерального, в том числе подкожного, внутримышечного и внутривенного, легочного, назального, ректального, топического или перорального введения. Подходящий способ введения в каждом конкретном случае будет частично зависеть от характера и тяжести подлежащего лечению заболевания и от природы активного ингредиента. Типичным способом введения является пероральное введение. Композиции для удобства могут быть представлены в стандартной дозовой форме и получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Предпочтительными являются композиции, пригодные для перорального, парентерального, местного, подкожного или внутрилегочного введения и в виде назальной или трансбуккальной ингаляции. Композиции могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации.

Фармацевтические композиции могут быть в виде таблеток, пилюль, капсул, растворов, суспензий, эмульсий, порошков, свечей и в виде составов с замедленным высвобождением.

При желании таблетки могут быть покрыты оболочкой стандартными водными или неводными методами. В некоторых воплощениях такие композиции и препараты могут содержать не менее 0,1% штамма. Конечно, содержание активного штамма/стенок/постбиотиков в этих композициях может варьироваться и обычно

составляет от 0,1% до 60% или от 0,5 до 20% от массы 1 единицы. Количество активного штамма/стенок/постбиотиков в таких терапевтически применимых композициях должно быть таким, чтобы получались терапевтически активные дозы. Штамм/стенки/постбиотики также можно вводить интраназально, например, в виде жидких капель или спрея.

Таблетки, пилюли, капсулы и т.п. также могут содержать связующие вещества типа трагакантовой камеди, гуммиарабика, кукурузного крахмала или желатина; наполнители типа дикальцийфосфата; разрыхлители типа кукурузного крахмала, картофельного крахмала, альгиновой кислоты; смазывающие вещества типа стеарата магния; и подсластители типа сахарозы, лактозы или сахарина. Если стандартной дозовой формой являются капсулы, то они могут содержать, наряду с материалами вышеуказанного типа, жидкие носители типа жирного масла. Различные другие материалы могут присутствовать в качестве оболочки или для изменения физической формы дозовых форм. Например, таблетки могут быть покрыты шеллаком, сахаром или тем и другим. Сироп или эликсир может содержать, наряду с активным ингредиентом, сахарозу в качестве подсластителя, метил- и пропилпарабены в качестве консервантов, красители и ароматизаторы типа вишневых или апельсиновых ароматизаторов. Чтобы предотвратить разрушение при прохождении через верхнюю часть желудочно-кишечного тракта, композиции могут иметь энтеросолюбильные покрытия.

В рамках изобретения предпочтительным является местное применение. Соответственно, в некоторых предпочтительных воплощениях композиции предназначены для местного применения. В этом применении композиции, содержащие штамм/стенки/постбиотики, как определено здесь, моно наносить на кожу человека.

Композиции для местного применения включают, без ограничения, мази, кремы, лосьоны, растворы, пасты, гели, палочки, липосомы, наночастицы, пластыри, повязки и раневые повязки. В некоторых воплощениях формы для местного применения содержат усилители проникновения.

Композиции для легочного введения включают, без ограничения, сухие порошкообразные композиции, состоящие из порошка штамма/фрагментов/постбиотика и порошка подходящего носителя и/или смазывающего вещества. Композиции для легочного введения можно вводить путем ингаляции из любого подходящего устройства для ингаляции сухих порошков, известного специалистам в данной области.

Как правило, композиции для местного применения могут содержать указанный выше бактериальный штамм в количестве от 0,00001% до 10%, от 0,0001% до 3%, от 0,1% до 2% от общей массы композиции.

Композиции для местного применения могут находиться в твердом, полутвердом или жидком виде. Подходящие составы в твердом виде включают кремы, гели, мази, пасты, притирания, кремы, пластыри.

Композиции для местного применения в жидком виде могут быть в виде лосьонов, гелей, суспензий, эмульсий.

В случае жидких или полужидких лекарственных форм бактериальный штамм можно разводить носителем в физиологически приемлемой жидком виде типа воды, спирта, водно-спиртового или глицеринового раствора либо смешивать с другими жидкостями, подходящими для местного применения.

В качестве примера: композиции по изобретению в жидком виде можно получать путем растворения или диспергирования бактериального штамма или его побочного продукта в воде и/или спирте. Жидкие композиции можно забуферивать до достижения удобного диапазона pH от 5 до 7, чтобы он был совместим с pH кожи, а затем отфильтровать и упаковывать в подходящие контейнеры типа бутылок или флаконов.

В одном воплощении формы для местного применения имеют вид кремов или эмульсий, содержащих бактериальный штамм в подходящем наполнителе.

В других воплощениях композиции по изобретению находятся в формах для системного введения, в частности, для перорального введения. В этих случаях композиции содержат бактериальный штамм, как определено выше, и один или несколько носителей или наполнителей, подходящих для системного введения.

Введение композиций проводится по таким методикам и в таких дозах, которые достаточны для ослабления заболеваний у субъектов.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции по настоящему изобретению обычно содержат действующее начало в дозовых единицах. Дозовая единица может содержать от 0,00001 до 1000 мг штамма/стенок/постбиотика на 1 единицу дозы для ежедневного введения.

В некоторых воплощениях эффективные количества в формах для местного применения будут зависеть от тяжести заболевания, расстройства или состояния, предшествующей терапии, состояния здоровья индивида и реакции на лекарство. В некоторых воплощениях дозы составляют от 0,001% до 60% от общей массы лекарственной формы.

При применении в комбинации с одним или несколькими другими активными ингредиентами штамм/стенки/постбиотика по настоящему изобретению и другой активный ингредиент могут применяться в меньших дозах, чем при использовании каждого из них по отдельности.

Касательно составов при самых разных способах введения: способы и составы для введения лекарственных средств приводятся в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, Gennaro et al., Eds., Mack Publishing Co., 1985; и в Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR ed., 20th Edition, 2000, Williams & Wilkins, PA, USA; и Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005; а также в Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 8th Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2005; которые включены сюда в качестве ссылки.

В некоторых воплощениях композиции по изобретению для перорального введения представляют собой пищевые, диетические или нутрицевтические продукты.

Примеры

Примеры воплощений и предпочтительных процедур по настоящему изобретению описаны ниже для иллюстрации изобретения.

Пример 1. Потенциальная миграция *in vitro* клеток фибробластов человека при стимуляции супернатантом, полученным из культуры бактерий штамма DSM 28251

Цель исследования

Один из механизмов действия супернатантов культуры бактериального штамма DSM 28251 объясняют действием постбиотиков. Термин постбиотики относится к побочным продуктам метаболизма микроорганизмов, особенно бактерий и/или пробиотиков. Как правило, постбиотики образуются под действием метаболической активности или ферментативных процессов бактерий типа пробиотиков (живых микроорганизмов, оказывающих благоприятное воздействие на организм хозяина при введении в подходящих количествах).

Постбиотики играют чрезвычайно важную роль в регуляции здоровья и поддержании здоровой микробиоты.

Одной из целей данного исследования является оценка действия постбиотиков на миграцию иммортализованных клеток фибробластов кожи человека, чтобы установить, способствуют ли супернатанты, полученные из культуры бактериального штамма DSM 28251, миграции этой линии клеток.

Исследуемые образцы

Супернатанты, полученные из культуры бактерий штамма DSM 28251.

Материалы и методы

Бактерии

Бактерии штамма DSM 28251 по изобретению культивировали в среде с экстрактом мозга и сердца (ВНІ) в течение ночи при 37°C, а затем для оценки действия постбиотиков центрифугировали супернатант после роста бактерий и затем фильтровали (0,45 мкм) для

удаления бактериальных клеток. Перед использованием высеивали аликвоту на агар с ВНИ и инкубировали 24 часа при 37°C для проверки на отсутствие роста микробов.

Линия клеток

Неонкогенные клетки фибробластов кожи человека содержали в культуральных флаконах на 25 см² в модифицированной Дюльбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 1% 200 мМ L-глутамин, пенициллина (100 ЕД/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% FBS. Клетки после промывки DPBS отделяли при комнатной температуре с помощью 0,25% раствора трипсина с ЭДТА, а затем наблюдали под инвертированным микроскопом до тех пор, пока не диспергировался весь слой клеток (обычно в пределах 5 минут). Клетки высеивали на микрочашки (диаметром 35 мм), содержащие специальные вставки (код. № 81176, Ibidi, Giemme, Италия). Специальная вставка состоит из двух лунок; когда обе лунки заполняются адгезированными клетками, то после удаления вставки образуется свободный от клеток промежуток (канал) размером около 500 мкм. Готовили суспензию клеток при плотности в $3-7 \times 10^5$ клеток/мл, вносили в обе лунки специальной вставки (по 70 мкл на лунку) и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением 1% 200 мМ L-глутамин, пенициллина (100 ЕД/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и 10% FBS. Через 24 часа при надлежащем прикреплении клеток удаляли специальную вставку стерильным пинцетом и заполняли микрочашку средой (2 мл).

Эксперимент для анализа миграции клеток

Клетки обрабатывали предварительно отфильтрованным супернатантом, полученным из культуры бактерий Aileens и разведенным 1:10 и 1:100 в DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко). Кроме того, в качестве контроля использовали фибробласты, обработанные средой ВНИ в разведении 1:10 и 1:100 с DPBS.

Затем клетки инкубировали 24 часа. Степень миграции клеток определяли по фотографиям с помощью цифрового окуляра микроскопа и измеряли с помощью программы для анализа изображений Image J (версия 1.45s, предоставленная Национальным институтом здравоохранения, США). Каждое изображение преобразовывали в негатив с помощью функции программного обеспечения, а затем проводили измерения. Эксперименты проводили в трех повторах, а результаты выражали в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. Для статистической значимости использовали t-критерий Стьюдента. Значения $p > 0,05$ считались статистически незначимыми.

Результаты

Полученные результаты показывают, что супернатанты бактериального штамма DSM 28251 в разведении 1:10 и 1:100 с DPBS способствуют миграции клеток (фиг. 1 и 2).

Кроме того, среда ВНИ, разведенная 1:10 и 1:100 в DPBS, не препятствует миграции фибробластов.

Пример 2. Действие убитых нагреванием бактерий штамма DSM 28251 на рост патогенных для человека микроорганизмов

Материалы и методы

Бактериальный штамм культивировали в среде с экстрактом мозга и сердца (ВНИ) в течение ночи при 37°C, а затем убивали нагреванием при 60°C в течение 1 часа.

Культуру промывали водой, чтобы отмыть от среды, и свободную от среды культуру разбавляли до 10^7 , 10^6 и 10^5 КОЕ/мл в среде Мюллера-Хинтона (МН) либо в среде Сабуро. Инокуляты *S. aureus* ATCC 29213 и *E. coli* ATCC 11775 по 10^5 клеток/мл культивировали в трех повторах в конечном объеме 150 мкл каждого разведения средой Мюллера-Хинтона убитой нагреванием культуры в 96-луночном планшете. Точно так же инокуляты *C. albicans* по 10^5 клеток/мл культивировали в трех повторах в разведениях средой Сабуро до 10^7 , 10^6 и 10^5 КОЕ/мл убитой бактериальной культуры. В качестве контролей готовили троекратные повторы всех разведений в обеих средах, а также контроли на рост штаммов из инокулятов по 10^5 клеток/мл штаммов *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* в конечном объеме 150 мкл среды Мюллера-Хинтона или Сабуро, соответственно. В каждой лунке измеряли оптическую плотность (OD) при длине волны 600 нм до (T0) и через 3, 6, 20 и 24 часа (T3, T6, T20, T24) после инкубации при 37°C. Отмечали рост по значениям OD для каждого штамма в среде с добавлением убитого нагреванием штамма и сравнивали с таковыми только в среде Мюллера-Хинтона или Сабуро.

Способность бактериального штамма DSM 28251 препятствовать росту или ингибировать рост микробов – бактерий и грибов, обычно встречающихся в коже человека (см. «Исследуемые штаммы бактерий»), тестировали спектрофотометрическим методом, описанным Hall et al.

Ингибирование роста микробов определяли в 96-луночных полистироловых планшетах. В серийные разведения стерилизованной тиндализацией смеси (от 10^7 до 10^5 КОЕ/мл) инокулировали исследуемые микроорганизмы, а также лишь одни микроорганизмы (контроль) и среды (холостые пробы). Все штаммы микробов тестировали в соответствии с рекомендациями CLSI (Института стандартов для клинических лабораторий) [3,4].

Через определенные интервалы (3, 6, 20 и 24 часа) проводили спектрофотометрические измерения при 600 нм. Результаты представляли в виде кривых роста (только микроорганизмы) и кривых ингибирования (микроорганизмы + разведения стерилизованной смеси). Каждый эксперимент проводили по восемь раз в трех повторах, а

результаты выражали в виде среднего значения \pm SD.

Исследуемые штаммы бактерий

– *Staphylococcus aureus*

– *Candida albicans*

– *Escherichia coli*

Результаты представлены на прилагаемой фиг. 3.

Как видно из фиг. 3, добавление бактерий штамма DSM 28251 по изобретению к культурам *S. aureus* в зависимости от дозы замедляет логарифмическую фазу роста.

Аналогичные результаты получены с *C. albicans*.

Эти экспериментальные данные подтверждают ингибирующее действие бактерий штамма DSM 28251 по изобретению.

Сравнительный тест только с культуральной средой (т.е. без штамма 28251).

Пример 3. Действие препаратов, содержащих штамм DSM 28251 по изобретению, на рост *C. albicans*

Материалы и методы

Исследуемые препараты

A) базовый состав (лишенный штамма DSM 28251)

B) состав с 1% штамма DSM 28251

C) состав с 2,5% штамма DSM 28251

D) состав с 2,5% штамма DSM 28251 (2×C40)

Базовый состав препаратов содержит воду, каприловый/каприновый триглицерид, глицерин, масло *Butyrospermum parkii*.

Процедура

Каждый препарат заключали в агаровую среду (20%) на 4-секторных чашках. На эти 4 сектора высевали различные разведения грибка (от 10^{-5} до 10^{-8} КОЕ/мл) и такие же разведения высевали на среды без препаратов в качестве контроля. После инокуляции чашки с препаратами инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Рост грибка на средах с препаратами сравнивали с контролем. Кроме того, регистрировали pH самой среды и среды с препаратами, чтобы проверить возможное влияние на состояние вирулентности при переходе *C. albicans* в неvirulentное состояние.

Результаты

В контроле наблюдалось четкое образование многочисленных колоний с типичной белой и мутной морфологией (2×10^9 КОЕ/мл).

При микроскопическом исследовании наблюдалась характерная морфология клеток патогенного микроорганизма с образованием грибковых гиф.

Для всех исследованных препаратов наблюдалось образование непрозрачной патины с несформировавшимися гифами, то есть два признака, связанные с переходом возбудителя из вирулентного состояния в невирулентное.

Кроме того, значение рН самой культуральной среды (S) было таким же, как и рН среды у препаратов; следовательно, изменения рН явно не задействованы в переключении фенотипа.

Выводы

У *C. albicans* наблюдались изменения морфологии колоний: в отсутствие препаратов отмечались типичные колонии молочного цвета, а в присутствии препаратов образовался однородный и полупрозрачный налет. Эти изменения также подтверждались и при микроскопии: без препаратов микроорганизм имел вид как дрожжей, так и плесени (наличие гиф), а в присутствии препаратов – только дрожжей.

Такое наблюдение свидетельствует об ингибирующем действии на рост *Candida albicans* препаратов, содержащих выбранный штамм по изобретению.

Пример 4. Ингибирующее действие препарата, содержащего штамм DSM 28251 (LimpiAD), на токсины/катаболиты, вырабатываемые *S. aureus*: тест на *Galleria mellonella* *in vivo* и анализ экспрессии генов

Введение

Исследовали потенциальное действие состава и действующего начала в качестве средств, способных снижать воздействие токсинов *S. aureus* на конкретную биологическую мишень.

S. aureus является одним из микроорганизмов, наиболее известных в этиологии и развитии атопического дерматита. Одним из основных механизмов его патогенеза является продукция широкого спектра токсинов.

Исследуемый состав LimpiAD содержит воду, каприловый/каприновый триглицерид, глицерин, масло *Butyrospermum parkii*.

С этой целью проводили анализ *in vivo* на личинках *Galleria mellonella*.

Большая восковая моль *Galleria mellonella* (*G. mellonella*) является модельным организмом, который уже прошел проверку для экспериментов с бактериальными инфекциями и для испытаний на фармакологическую токсичность. Он является важным инструментом для предварительного скрининга новых соединений и быстрого и надежного определения потенциального ингибирующего действия и поэтому должен сократить количество необходимых экспериментов на моделях у млекопитающих [6].

Личинки *G. mellonella* обеспечивают несколько способов легкой доставки патогена, как-то местное нанесение, пероральное введение и инъекции. Микроорганизм можно

ввести прямо в гемоцель личинки, при этом личинки получают известное количество патогена.

Другим преимуществом модели на *G. mellonella* является возможность определения экспрессии генов, связанных с иммунитетом и стрессом. Поэтому, чтобы исследовать действие препарата на личинки *G. mellonella*, инокулированные супернатантом *S. aureus*, мы проводили анализ методом кПЦР для оценки влияния LimpiAD на гены иммунитета и стресса у *G. mellonella*. Были выбраны гены, которые играют решающую роль в реакциях иммунитета насекомых на инфекции: фагоцитоз, регуляция цитокинов, клеточная адгезия и ингибиторы металлопротеиназ.

Материалы и методы

Исследуемые штаммы микроорганизмов и условия культивирования

Staphylococcus aureus ATCC BAA1680 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 культивировали в среде с экстрактом мозга и сердца с инкубацией при температуре 37°C в течение ночи.

Получение супернатантов: ночные культуры обоих штаммов *Staphylococcus* центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 минут. Оставшиеся бактериальные клетки удаляли при стерилизации фильтрованием (0,22 мкм) и разбавляли физраствором в соотношении 1:2. Разбавленные супернатанты смешивали (1:5 вес/об) с тремя различными препаратами (таблица 1):

- LimpiAD A (базовый состав, без активного компонента);
- LimpiAD D (с 2,5% активного компонента);
- только лишь активный компонент.

После инкубации препаратов в течение 1 ч и 4 ч получали супернатанты при центрифугировании и использовали их для инокуляции личинок *Galleria mellonella*. В качестве контроля использовали личинок, получавших супернатанты (без препаратов) или только культуральную среду (бульон с экстрактом мозга и сердца) в соотношении 1:2 (фиг. 5).

Оценка выживаемости личинок *G. mellonella* после инфицирования: отбирали личинок по весу и размеру и разбивали на экспериментальные группы, приведенные в таблице 1. Личинки инокулировали посредством инъекций с помощью многодозового дозатора, оснащенного инсулиновым шприцем (BD, Wellington) на 1 мл с ультратонкой иглой, через последнюю ложноножку личинки. После инокуляции личинки для каждого состояния инкубировали в чашках Петри при 35°C и наблюдали за выживанием в течение следующих 96 часов.

Таблица 1. Исследуемые вещества и количество инъецированных личинок *G. mellonella* для каждой группы

Исследуемое вещество	Количество личинок
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpAD A (1 ч)	20
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpAD A (4 ч)	20
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpAD D (1 ч)	20
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + LimpAD D (4 ч)	20
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + активный компонент (1 ч)	20
Супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 + активный компонент (4 ч)	20
Положительный контроль: супернатант ATCC BAA1680/ATCC 29213 1:2	20
Отрицательный контроль: ВН 1:2	20
Солевой раствор	20

Анализ экспрессии генов: кПЦР

Через 96 ч после обработки отбирали по 3 выживших личинки для каждой группы (контроль: солевой раствор; инфицированные: супернатант ATCC BAA1680; обработка супернатантом ATCC BAA1680 *S. aureus*). Экстрагировали РНК с помощью реагента TRI (Sigma Aldrich) по методике производителя. В экстрактах определяли РНК спектрофотометрически, а затем проводили обратную транскрипцию в кДНК, используя смесь для синтеза кДНК ReadyScript™ (Sigma Aldrich).

Названия, функции и последовательности праймеров, используемых при экспрессии генов, приведены в таблице 2. Определяли уровни экспрессии генов относительно контрольного гена EF1 в нормализованных образцах с помощью Rotor-Gene Q фирмы Qiagen и PowerSYBR® (Applied Biosystems). Условия ПЦР: 5 мин при 95°C, а затем 42 цикла по 5 сек при 95°C с отжигом на 10 сек и 20 сек при 72°C. Начальное снижение температуры на 1°C за цикл с 65°C для первых 5 циклов обеспечивало оптимальную амплификацию для всех локусов. Все эксперименты проводились в трех повторах для трех различных измерений [7].

Таблица 2. Праймеры, использовавшиеся для анализа экспрессии генов у личинок *Galleria mellonella*

Праймер	Процесс	Функция	Прямой праймер	Обратный праймер
EF1	фактор элонгации 1-альфа	служебный ген	AACCTCCTTACAGTGA ATCC	ATGTTATCTCCGTGCCA G
Impi	металлопротеиназа	целевой ген	TAGTAAGCAGTAGCAT AGTCC	GCCATCTTCACAGTAGC A
Glut	реакция на окислительный стресс	целевой ген	CCACACTGTGAGGCAA CATT	GTTTGCTTAGCACGGTC ACA
Cytk	регуляция цитокинов	целевой ген	CGAGCTAAAGACAGGC GATT	TCACCTGCGGTTGAATC ATA
Phag	фагоцитоз	целевой ген	ATTGCTAGCCAGGTTT AGGA	AGCTATTTGGCGGAAAC TCA

Получение супернатанта и используемых в опыте *S. aureus* представлено на фиг. 5.

Выживаемость личинок

В сравнении с контрольными группами супернатанты, преинкубированные в течение 1 часа с исследуемыми составами, были гораздо менее летальны.

Таким образом, повышение выживаемости личинок объясняется действием активных компонентов *S. aureus* ATCC BAA1680.

Точно так же после 4 часов инкубации активность базового состава А проявлялась на меньшем уровне, тогда как у состава D отмечалась большая выживаемость личинок.

Касательно штамма *S. aureus* ATCC 29213, у базового состава А также проявлялась меньшая активность, чем у других исследованных составов. При этом его активные компоненты вызывали большее повышение выживаемости личинок, чем у состава D при обработке как в течение 1 ч, так и 4 ч.

В целом эти результаты свидетельствуют о том, что активные компоненты могут препятствовать патогенезу, связанному с токсинами/катаболитами, вырабатываемыми *S. aureus* ATCC BAA1680. Более того, это действие отмечается уже после 1 ч инкубации для обоих штаммов, причем у штамма *S. aureus* ATCC 29213 интенсивность ингибирования оказалась тем выше, чем более длительным было предполагаемое взаимодействие с токсинами/катаболитами в супернатантах (фиг. 7-8).

Напротив, ген *18-wheeler* гипозэкспрессировался (99,98%) в инфицированной группе по сравнению с обработанной группой. Таким образом, преинкубация с LimpiAD значительно повышает экспрессию этого гена, участвующего в адгезии и миграции клеток.

Анализ экспрессии генов

Экспрессия двух генов, IMPI и GLUT, связанных с метаболическим стрессом, не менялась существенно по сравнению с контролем в обеих группах, как видно из фиг. 7. Таким образом, LimpiAD не изменяет экспрессию этих генов. Экспрессия двух генов, связанных с врожденным иммунитетом, была выражена по-разному в инфицированной группе и в обработанной группе. Ген СИТОК, регулирующий воспалительные цитокины (каскад NF-каппа В), гиперэкспрессировался (93,8%) в инфицированной группе по сравнению с обработанной группой. Таким образом, LimpiAD снижает экспрессию провоспалительных цитокинов.

Таблица 3. Экспрессия генов *G. mellonella* после обработки LimpiAD/инфицирования

Ген	Уровень экспрессии обработка/инфицирование	Экспрессия
IMPI	6,56%	гипозэкспрессия
GLUT	6,56%	гиперэкспрессия
СИТОК	93,08%	гипозэкспрессия
18-wheeler	99,08%	гипозэкспрессия

Заключение

Инфицирование патогенными штаммами *Staphylococcus aureus* считается вредным фактором при атопическом дерматите, так как эти микроорганизмы вырабатывают катаболиты, стимулирующие высвобождение воспалительных цитокинов и способствующие повреждению эпидермального барьера и проявлению характерных симптомов этого заболевания.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что компоненты LimpiAD снижают действие катаболитов, вырабатываемых *S. aureus*, на выживаемость инъецированных личинок *G. mellonella*.

Кроме того, обработка LimpiAD снижает экспрессию провоспалительных цитокинов и повышает экспрессию гена 18-wheeler, участвующего в адгезии и миграции клеток. Полученные данные по экспрессии генов метаболического стресса и иммунитета дают дополнительные свидетельства о механизме действия препарата LimpiAD.

Пример 5. Сравнительное исследование in vitro

Сравнительное исследование со стерилизованными *C. acnes* DSM 28251 в сравнении с другими штаммами кутибактерий на рост патогенных микроорганизмов кожи.

Цель исследования

Сравнивали ингибирующее действие убитых нагреванием бактерий *C. acnes* штамма DSM 28251 на колонизирующие кожу бактерии с действием 4 других штаммов того же вида (штаммы *Cutibacterium* с таким же составом пептидогликанов) и штамма *C. granulorum*, который очень близок с эволюционной точки зрения (филогенетическая близость).

Целью данного исследования была оценка того, обладает ли штамм *C. acnes* DSM 28251 особыми или лучшими свойствами в сравнении с другими филогенетически близкими видами.

Для этого были выбраны и исследованы (исследуемые штаммы) 4 штамма *Cutibacterium* spp. (три *Cutibacterium acnes* и один *Cutibacterium granulorum*), отличающиеся от штамма DSM 28251 либо по фенотипу, либо по филогенетическому расстоянию.

В данное исследование также включали два штамма *C. acnes* (DSM 30738 и 30753), характеристики которых неизвестны, хотя они принадлежат к тому же виду, что и штамм DSM 28251 по настоящему изобретению.

Исследуемые штаммы (из рода *Cutibacterium*)

<i>Cutibacterium</i> spp.	Состав пептидогликанов (типа муреинов)	Филотип	Филогенетическое расстояние от <i>C. acnes</i> DSM 28251 (гомология по 16S rDNA)
<i>C. acnes</i> DSM 28251	A3γ LL-Dpm-Gly	I	
1. <i>C. acnes</i> ATCC 11828	A3γ LL-Dpm-Gly	II	99,9%
2. <i>C. granulosum</i> DSM 20458/ATCC 11829	A3γ LL-Dpm-Gly	н/о*	94,0%
3. <i>C. acnes</i> DSM 1897	A3γ LL-Dpm-Gly	I	99,9%
4. <i>C. acnes</i> DSM 16379	A3γ LL-Dpm-Gly	I	99,9%
5. <i>C. acnes</i> DSM 30738	н/д*	н/д*	н/д*
6. <i>C. acnes</i> DSM 30753	н/д*	н/д*	н/д*

Н/о: не определен. Классификация по филотипам имеется только для штаммов *C. acnes*. Н/д: нет данных.

Патогенные микроорганизмы кожи

Исследовали ингибирующее действие вышеуказанных 6 штаммов *Cutibacterium* против следующих пяти микроорганизмов, которые являются хорошо известными и распространенными кожными патогенами:

- *S. aureus* ATCC 29213
- *S. aureus* ATCC BAA-1680
- *S. aureus* DSM 20491
- *S. epidermidis* ATCC 12228
- *Candida albicans* ATCC 90028.

Материалы и методы

Получение убитых нагреванием бактерий (*Cutibacterium*)

Исследуемые бактерии *Cutibacterium* убивали посредством тиндализации (дробной стерилизации).

Все штаммы *Cutibacterium* культивировали в среде ВНИ (экстракт мозга и сердца) при температуре 37°C до максимума экспоненциальной фазы роста согласно спектрофотометрическим показаниям (OD 600 нм). После этого среду удаляли центрифугированием и обрабатывали для получения супернатанта. Бактериальный осадок промывали солевым раствором (0,9% NaCl) до полного удаления остатков супернатанта, а затем разбавляли до концентрации 0,5 по МакФарланду ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл).

Титрованный инокулят подвергали тиндализации.

Процесс тиндализации включал нагревание при 80°C в течение 30 минут для уничтожения вегетативных форм, затем следовал период инкубации при 37°C в течение 24 часов для стимуляции прорастания оставшихся вегетативных клеток, не уничтоженных при термической обработке, а затем материал опять доводили до 80°C на 30 минут. Весь термический цикл повторяли 3 раза. Аликвоту тиндализованного материала высевали на

кровяной агар Columbia и инкубировали при 37°C в аэробных условиях в течение 24 часов для проверки отсутствия микробного роста и правильности проведения процесса. У тиндализованных бактериальных клеток инактивируется способность к репликации и активность ферментов, но сохраняется клеточная структура и клеточные стенки, поэтому они физиологически интактны и по этой причине иммунологически активны.

Оценка действия убитых штаммов на рост патогенных микроорганизмов

Способность убитых нагреванием штаммов *S. asnes* препятствовать росту и/или ингибировать рост исследуемых штаммов *Staphylococcus* и штамма *C. albicans* определяли спектрофотометрическим методом.

Штаммы, убитые нагреванием, тестировали в одной и той же культуральной среде (ВНІ с добавлением 20% препарата) по следующей методике.

Убитые нагреванием бактерии предварительно разбавляли до конечной концентрации 10^5 КОЕ/мл, а затем инокулировали патогенными микроорганизмами кожи следующим образом.

По 100 мкл активных культур исследуемых штаммов *S. aureus* ATCC ВАА-1680, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 и *C. albicans* ATCC 90028 в трех повторах вносили в лунки с каждым фрагментом. Каждый бактериальный штамм предварительно выращивали в среде ВНІ при 37°C до стадии экспоненциального роста и собирали клетки центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. Осадки ресуспендировали в свежей среде ВНІ, получая суспензии с концентрацией 1×10^5 КОЕ/мл. Эти суспензии вносили в качестве инокулята в лунки 96-луночных планшетов.

Готовили 96-луночные планшеты в трех повторах, каждый с экспериментальными контролями, т.е. самими инокулятами штаммов без добавленных фрагментов, и «холостыми пробами» данного эксперимента (среда ВНІ с каждым фрагментом) для спектрофотометрической калибровки.

Измеряли оптическую плотность при 600 нм (OD 600 нм) на считывающем устройстве VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) и принимали её за показатель роста в нулевое время (T_0) для каждого штамма и обработки. Последующие измерения проводили через 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 и 24 часа во время инкубации. Значения OD нормировали по холостым пробам и контролям, а затем проводили анализ для оценки тенденций роста у различных микробов с фрагментами стенки или без них (контроль). Результаты представляли в виде среднего значения \pm S.D. (стандартное отклонение) и строили кривые роста методом нелинейной регрессии по сигмоидальной функции, подходящей для роста бактерий. Проводили анализ с помощью программы GraphPad Prism версии 7.0a.

Результаты

На фиг. 9 представлены кривые роста патогенных микроорганизмов кожи в присутствии и в отсутствие (контроль) убитых нагреванием бактерий штаммов *Cutibacterium*. Первая же качественная оценка AUC показывает, что убитые нагреванием *C. acnes* DSM 28251 оказывают хорошее ингибирующее действие на микробный рост для всех исследованных патогенных микроорганизмов кожи.

В следующей таблице 2a представлены количественные значения AUC для каждого производного по всем исследованным микроорганизмам. Эти значения подтверждают то, что видно на фиг. 9, где убитые нагреванием бактерии штамма *C. acnes* DSM 28251 проявляют заметное влияние/ингибирующее действие на рост всех исследованных кожных микроорганизмов.

Таблица 2a. Значения площади под кривой (AUC) и относительные стандартные ошибки (светло-голубые) из кривых роста, представленных на фиг. 2, с убитыми нагреванием бактериями и без них (контроль). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон значений AUC: от наименьшего (темно-красный) до наибольшего (темно-зеленый) значения AUC.

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Контроль
S. aureus ATCC 29213	AUC	11,92	15,18	14,54	13,26	13,02	14,11	14,72	15,55
	SD	0,61	0,25	0,18	0,28	0,27	0,33	0,13	0,57
S. aureus ATCC BAA-1680	AUC	12,38	15,15	15,01	13,39	12,71	13,40	14,54	15,55
	SD	0,40	0,52	0,42	0,39	0,31	0,48	0,54	0,58
S. aureus DSM 20491	AUC	9,16	11,33	10,86	10,15	9,55	10,86	11,04	11,38
	SD	0,56	0,23	0,14	0,25	0,16	0,32	0,19	0,25
S. epidermidis ATCC 1228	AUC	14,83	16,37	16,67	15,58	15,20	15,88	15,60	17,62
	SD	0,55	0,18	0,34	0,51	0,24	0,11	0,44	0,98
C. albicans ATCC 90028	AUC	12,94	15,24	15,66	14,87	15,12	14,98	13,81	18,81
	SD	0,60	0,47	0,89	0,21	0,36	0,21	0,35	0,58

В следующей таблице 2b представлена степень снижения роста по сравнению с контрольными условиями. Эти данные подтверждают приведенные выше результаты и подчеркивают улучшение активности убитых нагреванием *C. acnes* DSM 28251 в сравнении с распространенными штаммами *C. acnes*.

Таблица 2b. Степень снижения роста относительно контрольных условий (без инокуляции убитых нагреванием бактерий). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон снижения: от наибольшего (темно-красный) до наименьшего (темно-зеленый) снижения роста (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
S. aureus ATCC 29213	23,344	2,379	6,495	14,727	16,270	9,260	5,338
S. aureus ATCC BAA-1680	20,386	2,572	3,473	13,891	18,264	13,826	6,495

S. aureus DSM 20491	19,135	0,439	4,148	10,415	15,719	4,148	2,560
S. epidermidis ATCC 1228	15,834	7,094	5,392	11,578	13,734	9,875	11,464
C. albicans ATCC 90028	31,207	18,979	16,746	20,946	19,617	20,362	26,582

Пример 6

Повторяли сравнительное исследование из примера 5, используя постбиотики/супернатанты всех штаммов *C. acnes* (вместо убитых нагреванием штаммов из примера 5).

Цель исследования

Сравнивали ингибирующее действие постбиотиков/супернатантов, полученных из тех же 6 штаммов *Cutibacterium* из примера 5, на те же самые патогенные микроорганизмы кожи из примера 5.

Целью данного исследования была оценка того, обладают ли постбиотики из штамма *C. acnes* DSM 28251 лучшим ингибирующим действием на патогенные микроорганизмы кожи, чем постбиотики из других штаммов *C. acnes* из примера 5.

Материалы и методы

Получение постбиотиков из *C. acnes* DSM 28251

Бактериальные супернатанты, полученные ранее из штаммов *Cutibacterium*, подвергали фильтрованию (фильтры на 0,22 мкм) для удаления клеточных остатков и проверяли на стерильность по отсутствию роста бактерий после посева аликвоты от каждого исследуемого супернатанта на кровяной агар Columbia и инкубации при 37°C в аэробных условиях в течение 24 часов.

Для того, чтобы исключить какие-либо помехи из-за образования кислых веществ, характерных для некоторых штаммов *Cutibacterium* spp., тщательно измеряли pH каждого супернатанта и при необходимости нейтрализовали 1M раствором гидроксида натрия.

Спектрофотометрическое определение действия постбиотиков на рост патогенных микроорганизмов

Способность постбиотиков, полученных из штаммов *C. acnes*, указанных в примере 5, препятствовать росту и/или ингибировать рост тех же самых штаммов *Staphylococcus* и штамма *C. albicans*, которые указаны в примере 5, определяли спектрофотометрическим методом.

Постбиотики тестировали в одной и той же культуральной среде из примера 5 (ВНИ с добавлением 20% препарата) по следующей методике.

Супернатанты разводили в пропорции 1:10 средой с ВНИ, а затем инкубировали с исследуемыми кожными микроорганизмами.

Вносили в лунки по 100 мкл активных культур патогенных кожных

микроорганизмов *S. aureus* ATCC BAA-1680, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 и *C. albicans* ATCC 90028 в трех повторах. Каждый бактериальный штамм предварительно выращивали в среде ВНИ при 37°C до стадии экспоненциального роста и собирали клетки центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. Осадки ресуспендировали в свежей среде ВНИ, получая суспензии с концентрацией 1×10^5 КОЕ/мл. Эти суспензии вносили в качестве инокулята в лунки 96-луночных планшетов.

Готовили 96-луночные планшеты в трех повторах, каждый с экспериментальными контролями, т.е. самими инокулятами штаммов, и «холостыми пробами» данного эксперимента (среда ВНИ с каждым фрагментом) для спектрофотометрической калибровки.

Измеряли оптическую плотность при 600 нм (OD 600 нм) на считывающем устройстве VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) и принимали её за показатель роста в нулевое время (T_0) для каждого штамма и обработки. Последующие измерения проводили через 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 и 24 часа во время инкубации. Значения OD нормировали по холостым пробам и контролям, а затем проводили анализ для оценки тенденций роста у различных микробов с фрагментами стенки или без них (контроль). Результаты представляли в виде среднего значения \pm S.D. (стандартное отклонение) и строили кривые роста методом нелинейной регрессии по сигмоидальной функции, подходящей для роста бактерий. Проводили анализ с помощью программы GraphPad Prism версии 7.0a.

Результаты

На фиг. 8 представлены кривые роста патогенных микроорганизмов кожи в присутствии и в отсутствие (контроль) постбиотиков из штамма *C. acnes* DSM 28251. Первая же качественная оценка AUC (площади под кривой) показывает, что постбиотики (супернатанты), полученные из штамма *C. acnes* DSM 28251, оказывают наибольшее ингибирующее действие на микробный рост для всех исследованных патогенных микроорганизмов.

В таблице 1a представлены количественные значения AUC для каждого супернатанта. Эти значения подтверждают то, что представлено на фиг. 1. Так, постбиотики/супернатанты *C. acnes* DSM 28251 ингибируют рост всех исследованных кожных бактерий сильнее, чем другие исследованные супернатанты с единственным исключением *C. albicans* ATCC 90028 (который ингибируется производным штаммом DSM 30738).

Таблица 1а. Значения площади под кривой (AUC) и относительные стандартные ошибки (светло-голубые) из кривых роста, представленных на фиг. 1, с бактериальными супернатантами и без них (контроль). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон значений AUC: от наименьшего (темно-красный) до наибольшего (темно-зеленый) значения AUC.

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Контроль
S. aureus ATCC 29213	AUC	1,86	5,24	3,35	3,916	3,29	4,11	3,63	14,58
	SD	0,07	0,3	0,51	0,06	0,14	0,61	0,58	1,02
S. aureus ATCC BAA-1680	AUC	2,16	5,23	5,96	3,89	3,36	4,16	4,09	14,61
	SD	0,34	0,33	0,81	0,06	0,52	0,61	0,52	1,02
S. aureus DSM 20491	AUC	1,86	4,87	3,34	3,35	3,27	3,51	3,57	7,57
	SD	0,07	0,15	0,52	0,53	0,138	0,387	0,575	1,12
S. epidermidis ATCC 1228	AUC	3,74	12,39	16,00	4,97	4,07	6,36	5,38	17,09
	SD	0,75	0,76	0,37	0,62	0,35	0,82	0,48	0,33
C. albicans ATCC 90028	AUC	8,37	22,35	23,74	8,37	8,70	7,19	7,79	30,47
	SD	0,67	0,21	1,22	0,56	0,15	0,44	0,35	0,46

В таблице 1b представлена степень снижения роста по сравнению с контрольными условиями под действием исследованных супернатантов. Эти данные также подтверждают приведенные выше результаты, а также подчеркивают, что действие супернатанта DSM 30738 на штамм *C. albicans* ATCC 90028 лишь немного сильнее, поэтому оно сравнимо с действием супернатанта *C. acnes* DSM 28251.

Таблица 1b. Степень снижения роста относительно контрольных условий (без инокуляции супернатантов). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон снижения: от наибольшего (темно-красный) до наименьшего (темно-зеленый) снижения роста (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
S. aureus ATCC 29213	87,22	64,05	77,01	73,14	77,45	71,80	75,09
S. aureus ATCC BAA-1680	85,24	64,18	59,23	73,40	76,99	71,54	72,00
S. aureus DSM 20491	75,44	35,70	55,92	55,79	56,82	53,63	52,88
S. epidermidis ATCC 1228	78,12	27,50	6,38	70,93	76,16	62,80	68,52
C. albicans ATCC 90028	72,52	26,65	22,09	72,54	71,46	76,40	74,43

Выводы

Первая же качественная оценка AUC показывает, что постбиотики (супернатанты) из штамма *C. acnes* DSM 28251 обладают наибольшим ингибирующим действием на микробный рост для всех исследованных патогенных микроорганизмов кожи.

Пример 7

Повторяли сравнительное исследование из примера 5, используя фрагменты клеточной стенки всех исследованных штаммов *C. acnes* (вместо убитых нагреванием

штаммов из примера 5).

Цель исследования

Целью данного исследования было сравнение ингибирующего действия фрагментов стенки из тех же 6 штаммов *Cutibacterium* из примера 5 на те же самые патогенные микроорганизмы кожи из примера 5.

Целью данного исследования была оценка того, обладают ли фрагменты стенки из штамма *S. acnes* DSM 28251 лучшим ингибирующим действием на патогенные микроорганизмы кожи, чем фрагменты бактериальной стенки из других штаммов *S. acnes* из примера 5.

Материалы и методы

Получение фрагментов стенки из *S. acnes* DSM 28251 и сравнительных штаммов *S. acnes*

Штамм *S. acnes* DSM 28251 и штаммы *Cutibacterium* ATCC 11829, DSM 16379, DSM 30738, DSM 30753 и DSM 1897 культивировали при 37°C в среде ВНИ и добавляли по 20%.

Культивирование проводили в периодических и масштабируемых системах в объеме от 5 до 1000 мл и продолжали до получения однородной клеточной массы (в среднем 2 дня при большом объеме инокулята). Затем полученные бактериальные осадки собирали и подвергали стандартизированной процедуре для получения фрагментов клеточной стенки, как описано ниже. В дальнейшем выделенные фрагменты будут обозначаться по каталожным кодам производных штаммов.

В частности, выделение фрагментов стенки проводили, как описано ниже.

Бактериальные осадки сначала подвергали процедуре делипидирования при помощи Soxhlet, используя органические растворители из числа эфира-этанола, хлороформа, метанола-хлороформа и их смесей, а затем высушивали в ламинарном боксе. После сушки осадки гомогенизировали за 2 стадии обработки Ultraturrax (каждая от 20 секунд до 10 минут) с добавлением дистиллированной воды в пропорции 1:2 по объему. После центрифугирования супернатант нагревали до 80°C, а затем охлаждали в холодной воде, предпочтительно при 3-15°C, и наконец на льду. После этого проводили стадию осаждения фрагментов путем инкубации с охлажденным 15-40% сульфатом аммония в течение 24 часов при 4°C. После инкубации суспензию центрифугировали, а осажденные фрагменты собирали и лиофилизировали.

Наконец, лиофилизованные образцы стерилизовали по специальной многостадийной процедуре (быстрое замораживание при -80°C, нагревание при 80°C, стерилизация УФ-излучением в течение 1 часа). После этого их использовали для

постановки эксперимента, как описано ниже.

Спектрофотометрическое определение действия постбиотиков на рост патогенных микроорганизмов

Действие фрагментов стенки, полученных из штаммов *S. asnes* (см. выше), по препятствованию росту и/или ингибированию роста тех же самых штаммов *Staphylococcus* и штамма *S. albicans*, которые указаны в примере 5, определяли спектрофотометрическим методом.

Фрагменты стенки тестировали в одной и той же культуральной среде из примера 5 (ВНІ с добавлением 20% препарата) по следующей методике.

Фрагменты стенки измельчали в порошок и эмульгировали в культуральной среде ВНІ при конечной концентрации 10 мг/мл. Аликвоты по 100 мкл вносили в лунки плоскодонных 96-луночных планшетов.

В лунки с фрагментами вносили по 100 мкл активных культур патогенных кожных микроорганизмов *S. aureus* ATCC ВАА-1680, *S. aureus* DSM 20491, *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 и *S. albicans* ATCC 90028 в трех повторах. Каждый бактериальный штамм предварительно выращивали в среде ВНІ при 37°C до стадии экспоненциального роста и собирали клетки центрифугированием при 3000 об/мин в течение 5 минут. Осадки ресуспендировали в свежей среде ВНІ, получая суспензии с концентрацией 1×10^5 КОЕ/мл. Эти суспензии вносили в качестве инокулята в лунки 96-луночных планшетов.

Готовили 96-луночные планшеты в трех повторах, каждый с экспериментальными контролями, т.е. самими инокулятами штаммов без добавления фрагментов, и «холостыми пробами» данного эксперимента (среда ВНІ с каждым фрагментом) для спектрофотометрической калибровки.

Измеряли оптическую плотность при 600 нм (OD 600 нм) на считывающем устройстве VICTOR Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) и принимали её за показатель роста в нулевое время (T_0) для каждого штамма и обработки. Последующие измерения проводили через 2, 4, 6, 8, 18, 20, 22 и 24 часа во время инкубации. Значения OD нормировали по холостым пробам и контролям, а затем проводили анализ для оценки тенденций роста у различных микробов с фрагментами стенки или без них (контроль). Результаты представляли в виде среднего значения \pm S.D. (стандартное отклонение) и строили кривые роста методом нелинейной регрессии по сигмоидальной функции, подходящей для роста бактерий. Проводили анализ с помощью программы GraphPad Prism версии 7.0a.

Результаты (с фрагментами стенки *S. asnes*)

На фиг. 10 представлены кривые роста кожных бактерий при культивировании с различными исследуемыми фрагментами стенки и без них (контроль). Исходя из предварительной качественной оценки параметра «площадь под кривой» (AUC) видно, что для большинства исследованных кожных микроорганизмов фрагменты DSM 28251 оказывают наибольшее ингибирующее действие на микробный рост.

А в следующей таблице 3а представлены результаты количественной оценки того же параметра AUC для всех исследованных кожных микроорганизмов. Рассчитанные значения AUC подтверждают гипотезу, сформулированную при качественной оценке. Фрагменты клеточной стенки бактерий DSM 28251 проявляют более сильное ингибирующее действие на рост бактерий, чем другие исследованные фрагменты.

Для более глубокого анализа ингибирования роста в таблице 3б приведены значения, представляющие степень снижения роста (%) относительно контрольных условий по каждому штамму, которые принимались за 100% скорости роста в данных конкретных экспериментальных условиях. Сравнение снижения степени роста согласуется с приведенным выше выводом о более сильном ингибирующем действии фрагментов штамма DSM 28251.

Хотя фрагменты, полученные из штамма *S. acnes* DSM 30738, проявляют значения ингибирования, близкие фрагментам из DSM 28251, у последнего степень ингибирования всегда была выше, а также были лучшие показатели в отношении штамма *S. aureus* ATCC BAA-1680 (82,43% для DSM 30738 против 94,95% для DSM 28251).

Таблица 3а. Значения площади под кривой (AUC) и относительные стандартные ошибки (светло-голубые) из кривых роста, представленных на фиг. 3, с фрагментами бактериальной стенки и без них (контроль). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон значений AUC: от наименьшего (темно-красный) до наибольшего (темно-зеленый) значения AUC.

		DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753	Контроль
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	AUC	0,20	1,13	2,23	6,63	2,89	0,70	3,19	11,73
	SD	0,11	0,15	0,24	0,22	0,16	0,15	0,28	0,26
<i>S. aureus</i> ATCC BAA-1680	AUC	0,57	1,66	1,09	3,87	1,53	1,99	1,99	11,34
	SD	0,31	0,088	0,11	0,32	0,16	0,20	0,082	0,31
<i>S. aureus</i> DSM 20491	AUC	0,36	1,47	1,35	5,40	2,14	0,39	2,72	11,26
	SD	0,35	0,16	0,16	0,32	0,28	0,15	0,24	0,23
<i>S. epidermidis</i> ATCC 1228	AUC	0,15	1,27	2,14	2,21	1,07	0,15	1,21	6,03
	SD	0,34	0,18	0,34	0,33	0,17	0,32	0,15	0,20
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	AUC	0,03	1,27	1,15	0,48	1,20	0,03	0,90	7,35
	SD	0,10	0,35	0,35	1,20	0,12	0,28	0,33	0,22

Таблица 3б. Степень снижения роста относительно контрольных условий (без инокуляции фрагментов). Цветовая шкала для каждого штамма обозначает диапазон снижения: от наибольшего (темно-красный) до наименьшего (темно-зеленый) снижения роста (%).

	DSM 28251	ATCC 11828	DSM 20458/ ATCC 11829	DSM 1897	DSM 16379	DSM 30738	DSM 30753
S. aureus ATCC 29213	98,29	90,38	80,99	43,44	75,32	94,02	72,83
S. aureus ATCC BAA-1680	94,95	85,36	90,39	65,89	86,49	82,43	82,41
S. aureus DSM 20491	96,82	86,96	88,03	52,02	80,96	96,54	75,84
S. epidermidis ATCC 1228	97,49	78,86	64,54	63,28	82,16	97,46	79,99
C. albicans ATCC 90028	99,63	82,67	84,34	93,46	83,61	99,54	87,70

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бактериальный штамм, а именно *Cutibacterium acnes*, который депонирован под номером доступа DSM 28251 в Международном депозитарии Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
2. Постбиотический продукт, включающий клеточные стенки и биологический материал, содержащийся в клетках бактериального штамма по п. 1, полученный посредством лизиса его клеточной стенки.
3. Постбиотический продукт по п. 2, при этом лизис клеточной стенки происходит посредством механического лизиса.
4. Фрагменты клеточной стенки бактериального штамма по п. 1.
5. Бактериальный штамм по п. 1, отличающийся тем, что он инактивирован, предпочтительно путем тиндализации.
6. Бактериальный штамм по п. 1 или постбиотический продукт по п. 2 или фрагменты клеточной стенки по п. 3 для применения в качестве лекарственного средства.
7. Композиция, содержащая эффективное количество штамма *Cutibacterium acnes*, депонированного под номером доступа DSM 28251 по п. 1, или его постбиотического продукта по п. 2 или фрагментов его клеточной стенки по п. 3 и физиологически приемлемый носитель.
8. Композиция по п. 7, при этом она представляет собой композицию для местного применения, предпочтительно в виде крема, пены, мази, пасты, порошка, геля, раствора, овоида, спринцовки или эмульсии.
9. Композиция по п. 7 для применения в качестве лекарственного средства.
10. Композиция по п. 7 для применения при лечении воспалительного или аллергического заболевания либо инфекции.
11. Композиция по п. 7 для применения при местном лечении воспалительного или аллергического заболевания кожи или слизистой.
12. Композиция для применения по п. 10 или 11 при профилактике или лечении бактериальной или грибковой инфекции кожи или слизистой.
13. Композиция для применения по п. 12, при этом кожное заболевание представляет собой экзему, атопический дерматит, угри, себорейный дерматит, розовые угри, псориаз, эритему, кожную сыпь.
14. Композиция для применения по п. 12 при грибковой инфекции кожи или слизистой, особенно инфекции *Candida*.
15. Композиция по п. 7 или 8 для применения при лечении гинекологического заболевания.

16. Композиция для применения по п. 15, при этом гинекологическое заболевание представляет собой вагинит, инфекцию или воспаление влагалища.

17. Композиция по п. 7 или 8 для проктологического применения при лечении геморроя, анальных трещин или рубцов на коже.

18. Композиция по п. 7 или 8 для применения при лечении ран, травм, ссадин, изъязвлений кожи или пролежней либо для лечения ран.

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 РСТ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Бактериальный штамм, а именно *Cutibacterium acnes*, который депонирован под номером доступа DSM 28251 в Международном депозитарии Leibniz-Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
2. Постбиотический продукт, включающий убитые нагреванием клетки или супернатант подвергнутых механическому лизису клеток или фрагменты клеточной стенки бактериального штамма по п. 1.
3. Постбиотический продукт по п. 2, при этом подвергнутые лизису клетки получают посредством механического лизиса клеточной стенки.
4. Фрагменты клеточной стенки бактериального штамма по п. 1.
5. Бактериальный штамм по п. 1, отличающийся тем, что он инактивирован, предпочтительно путем тиндализации.
6. Бактериальный штамм по п. 1 или постбиотический продукт по п. 2 или фрагменты клеточной стенки по п. 3 для применения в качестве лекарственного средства.
7. Композиция, содержащая эффективное количество штамма *Cutibacterium acnes*, депонированного под номером доступа DSM 28251 по п. 1, или его постбиотического продукта по п. 2 или фрагментов его клеточной стенки по п. 3 и физиологически приемлемый носитель.
8. Композиция по п. 7, при этом она представляет собой композицию для местного применения, предпочтительно в виде крема, пены, мази, пасты, порошка, геля, раствора, овоида, спринцовки или эмульсии.
9. Композиция по п. 7 для применения в качестве лекарственного средства.
10. Композиция по п. 7 для применения при лечении воспалительного или аллергического заболевания либо инфекции.
11. Композиция по п. 7 для применения при местном лечении воспалительного или аллергического заболевания кожи или слизистой.
12. Композиция для применения по п. 10 или 11 при профилактике или лечении бактериальной или грибковой инфекции кожи или слизистой.
13. Композиция для применения по п. 12, при этом кожное заболевание представляет собой экзему, атопический дерматит, угри, себорейный дерматит, розовые угри, псориаз, эритему, кожную сыпь.
14. Композиция для применения по п. 12 при грибковой инфекции кожи или слизистой, особенно инфекции *Candida*.
15. Композиция по п. 7 или 8 для применения при лечении гинекологического

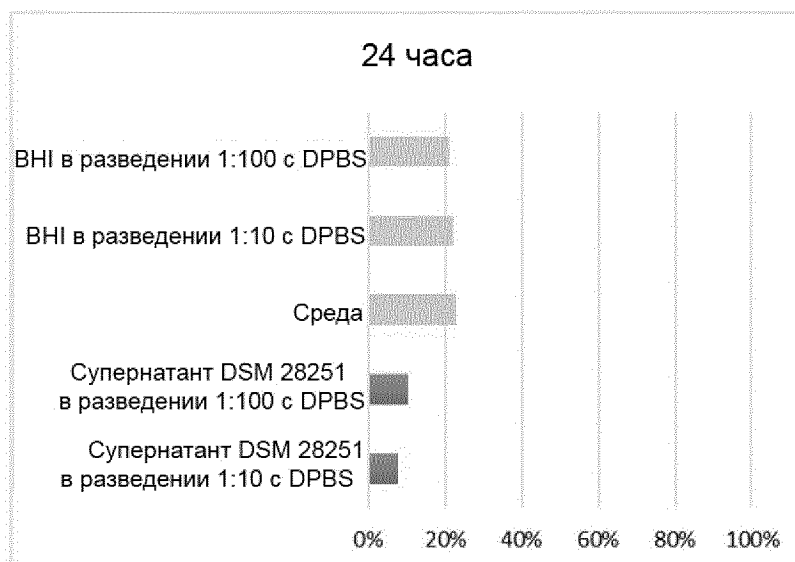
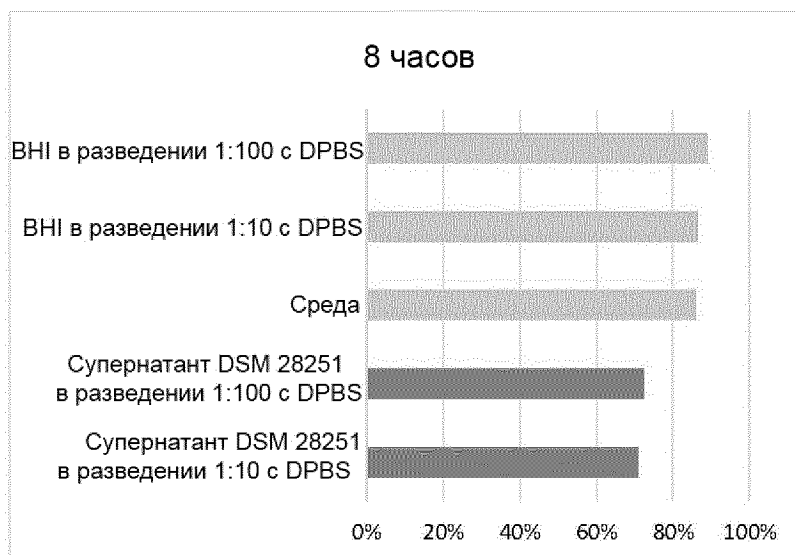
заболевания, а именно инфекции или воспаления влагалища.

16. Композиция для применения по п. 15, при этом гинекологическое заболевание представляет собой вагинит.

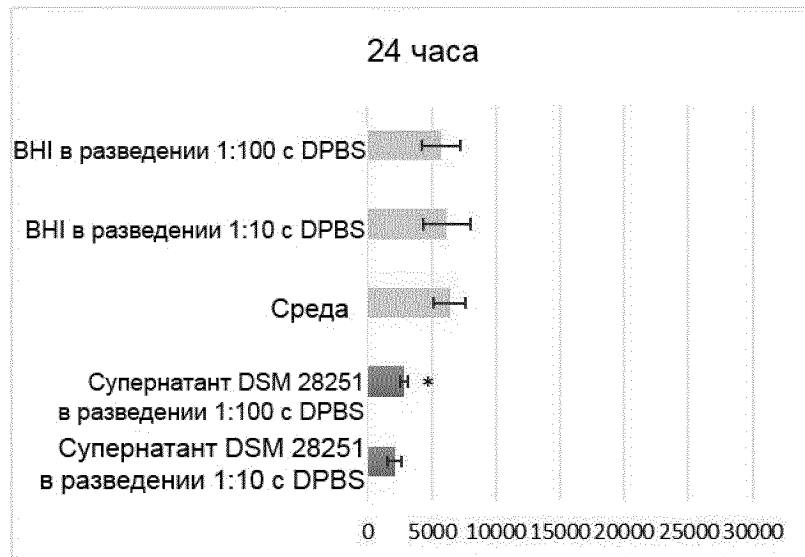
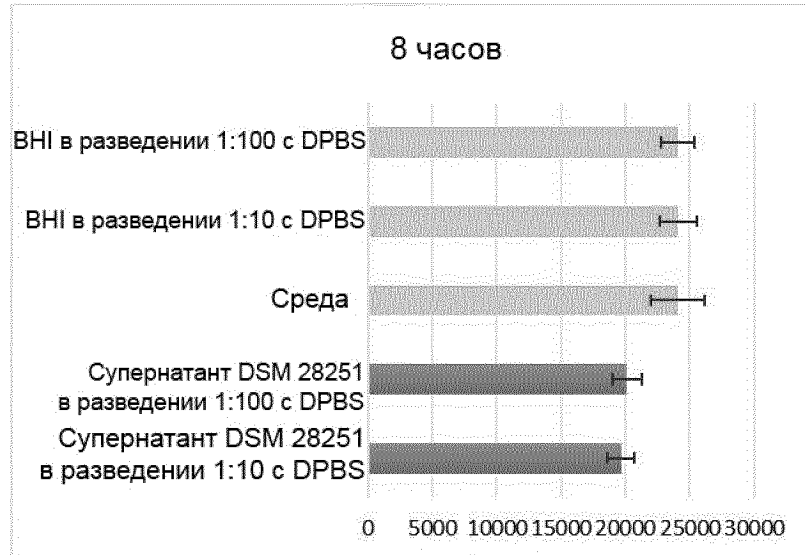
17. Композиция по п. 7 или 8 для проктологического применения при лечении геморроя, анальных трещин или рубцов на коже.

18. Композиция по п. 7 или 8 для применения при лечении ран, травм, ссадин, изъязвлений кожи, или пролежней либо для лечения ран.

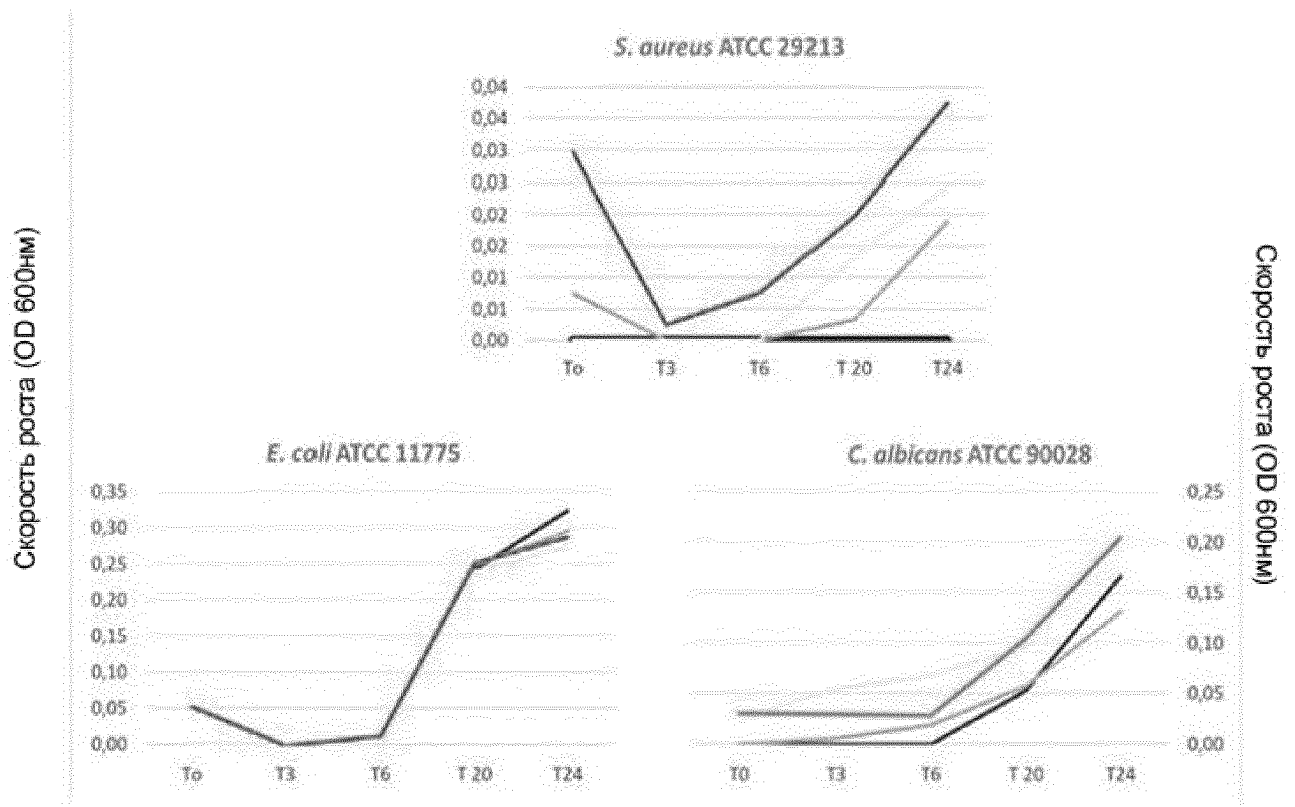
19. Постбиотический продукт, представляющий собой общую надосадочную жидкость/супернатант, получаемый в процессе ферментации бактериального штамма по п. 1.



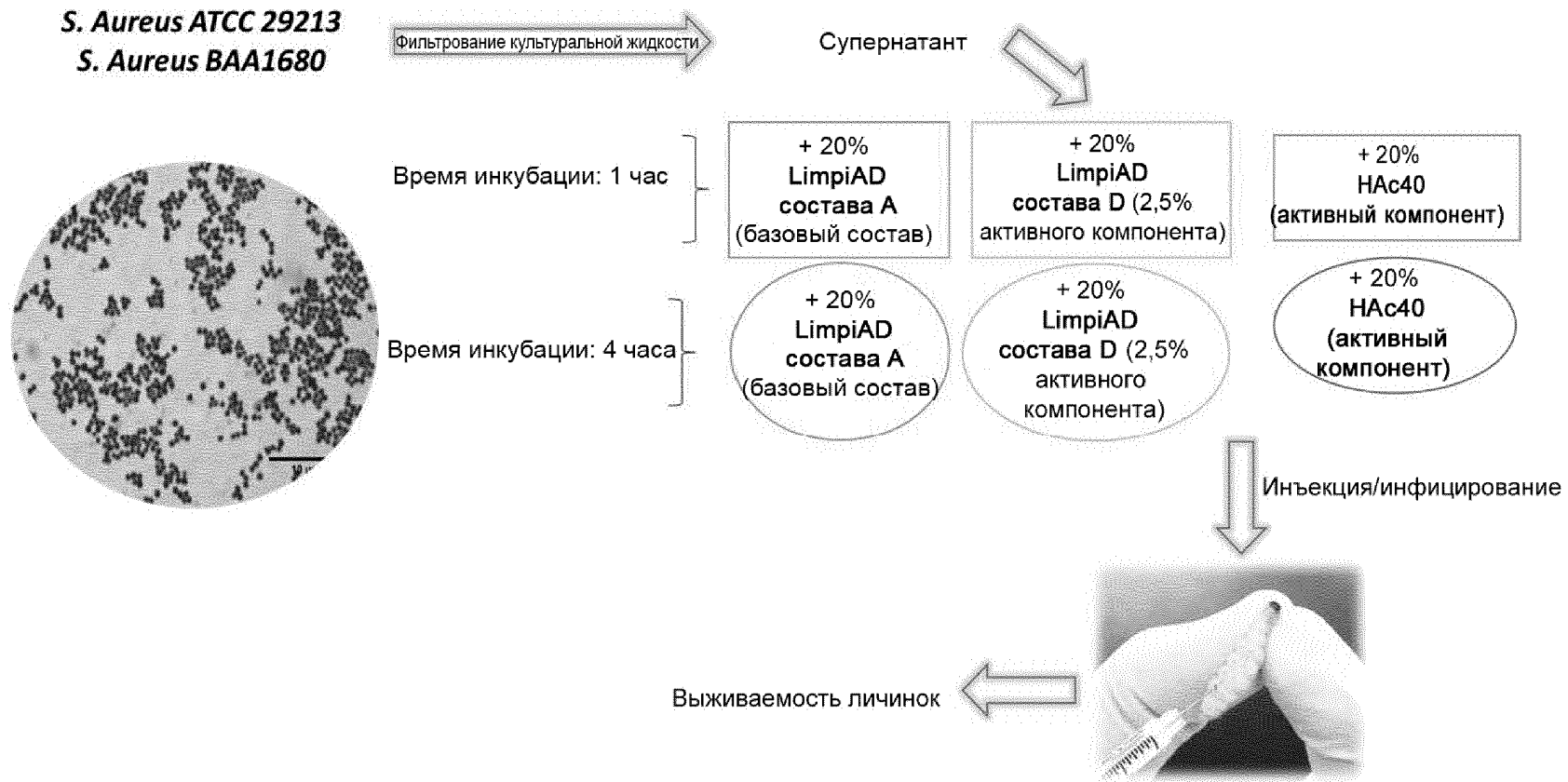
Фиг. 1



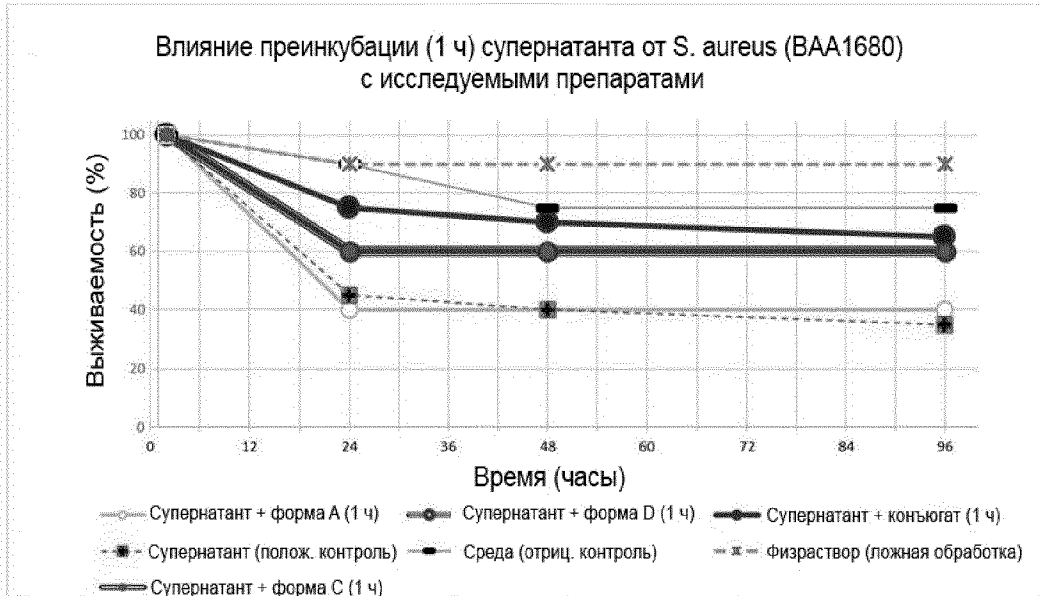
Фиг. 2



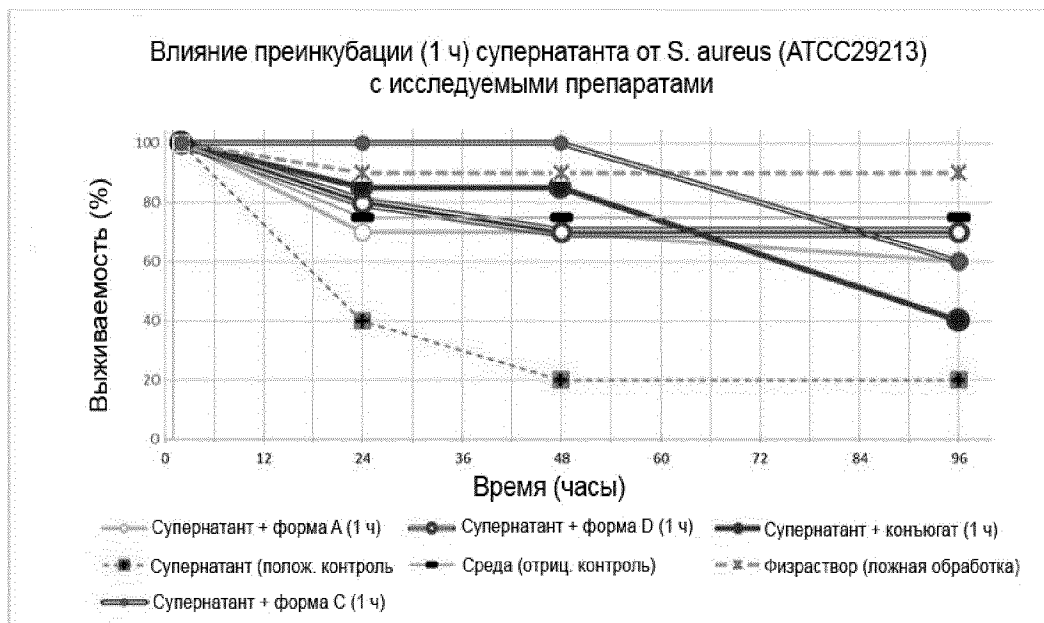
Фиг. 3



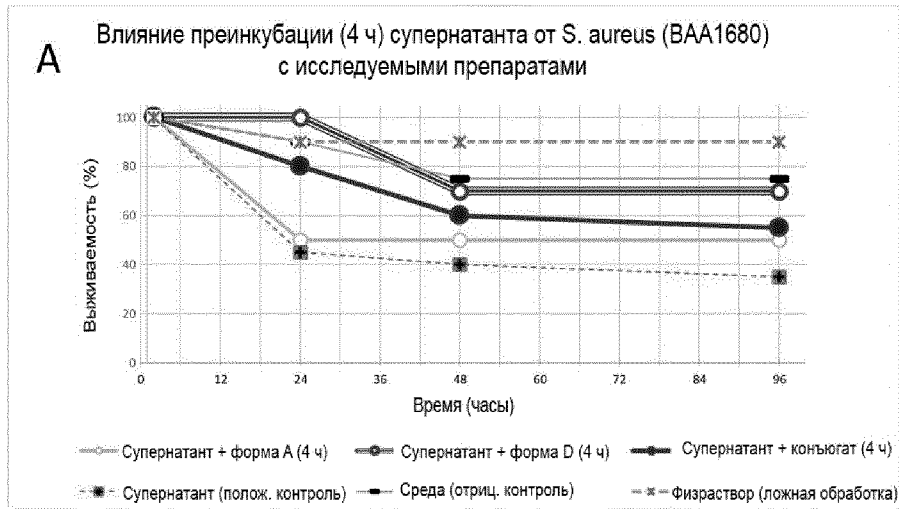
Фиг. 4



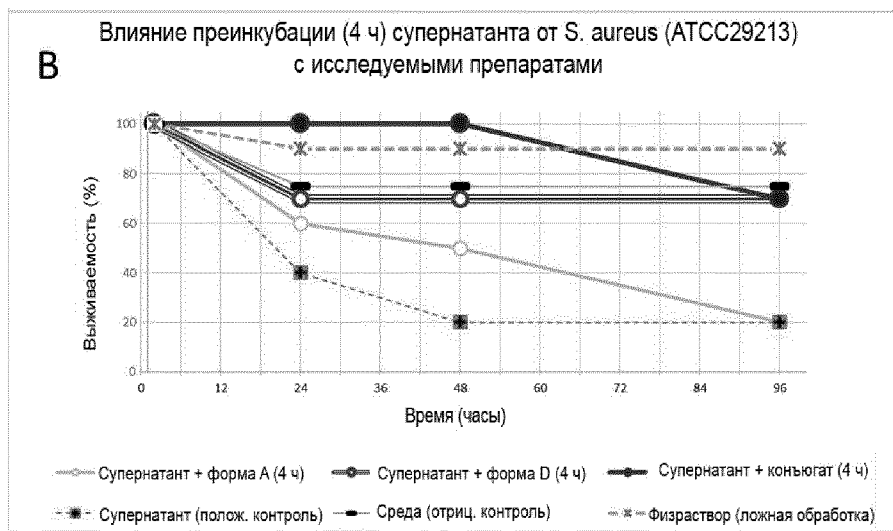
Фиг. 5А



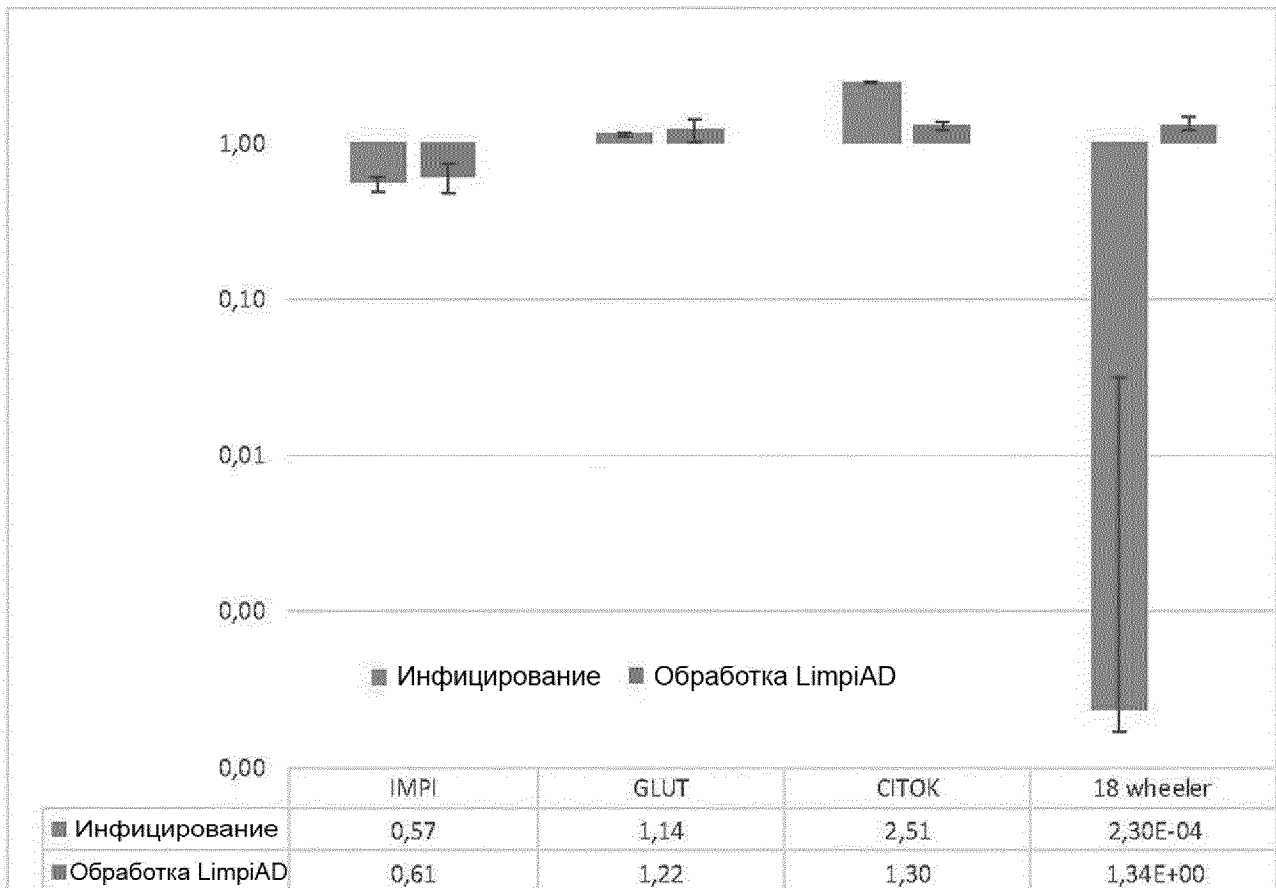
Фиг. 5В



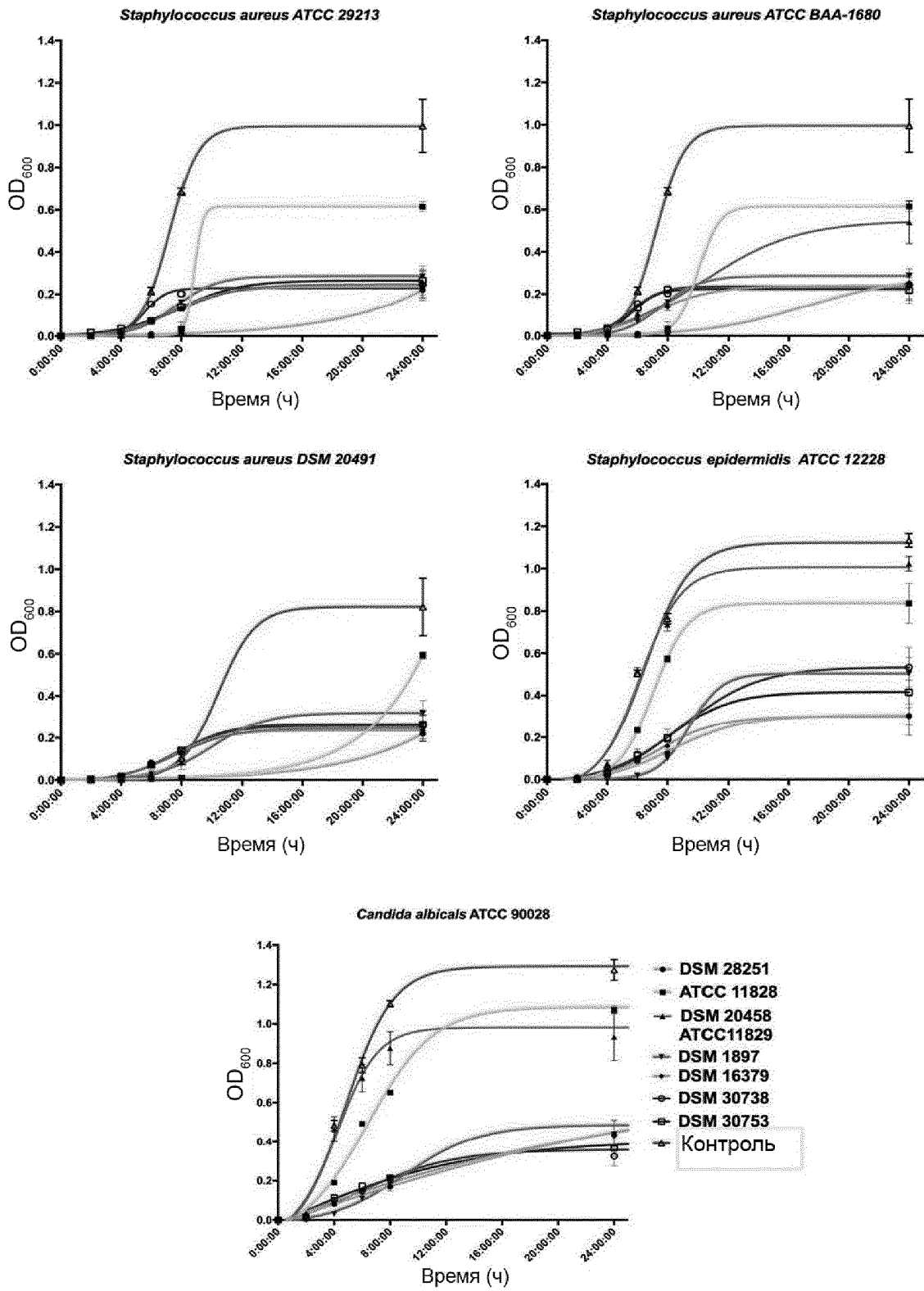
Фиг. 6А



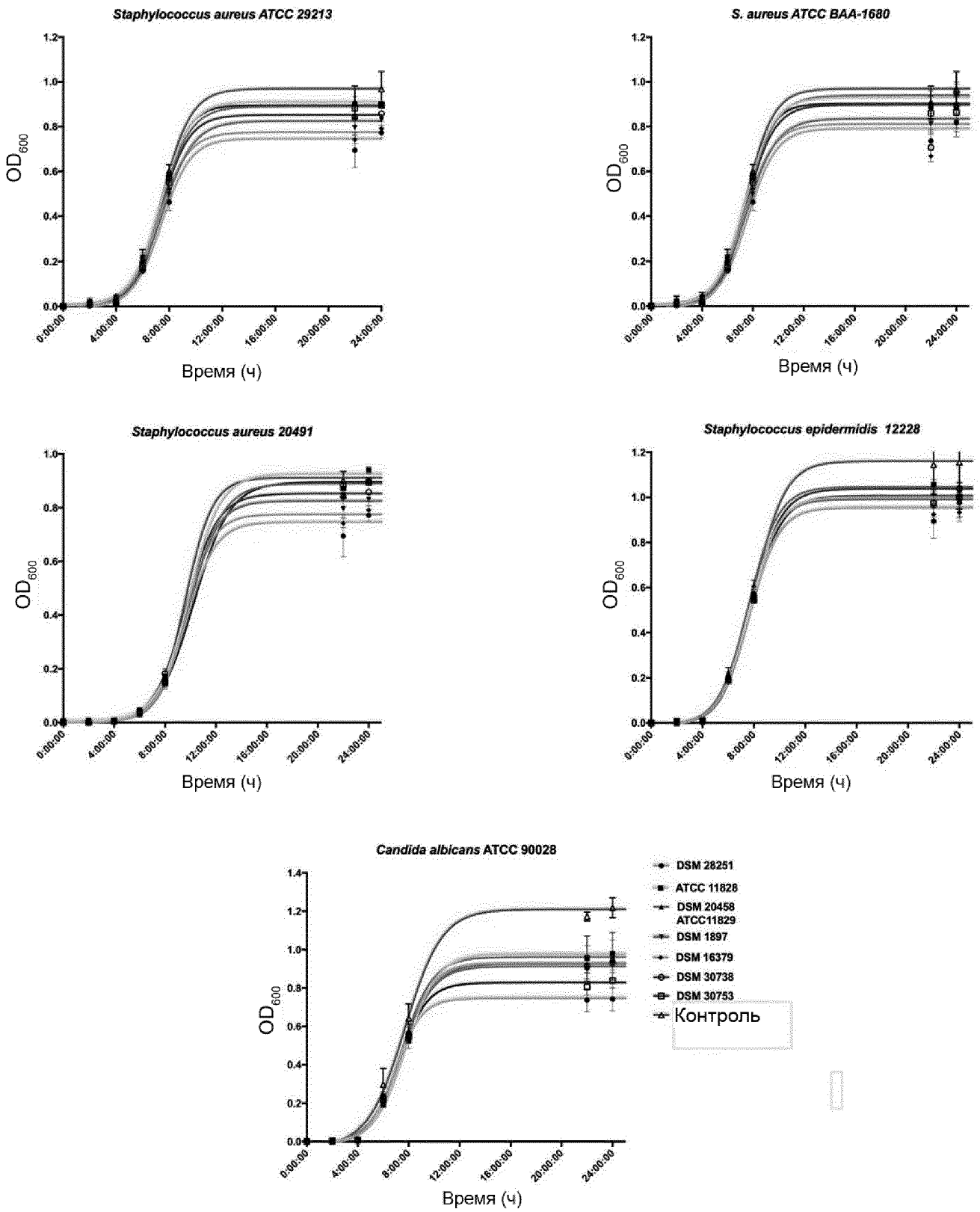
Фиг. 6В



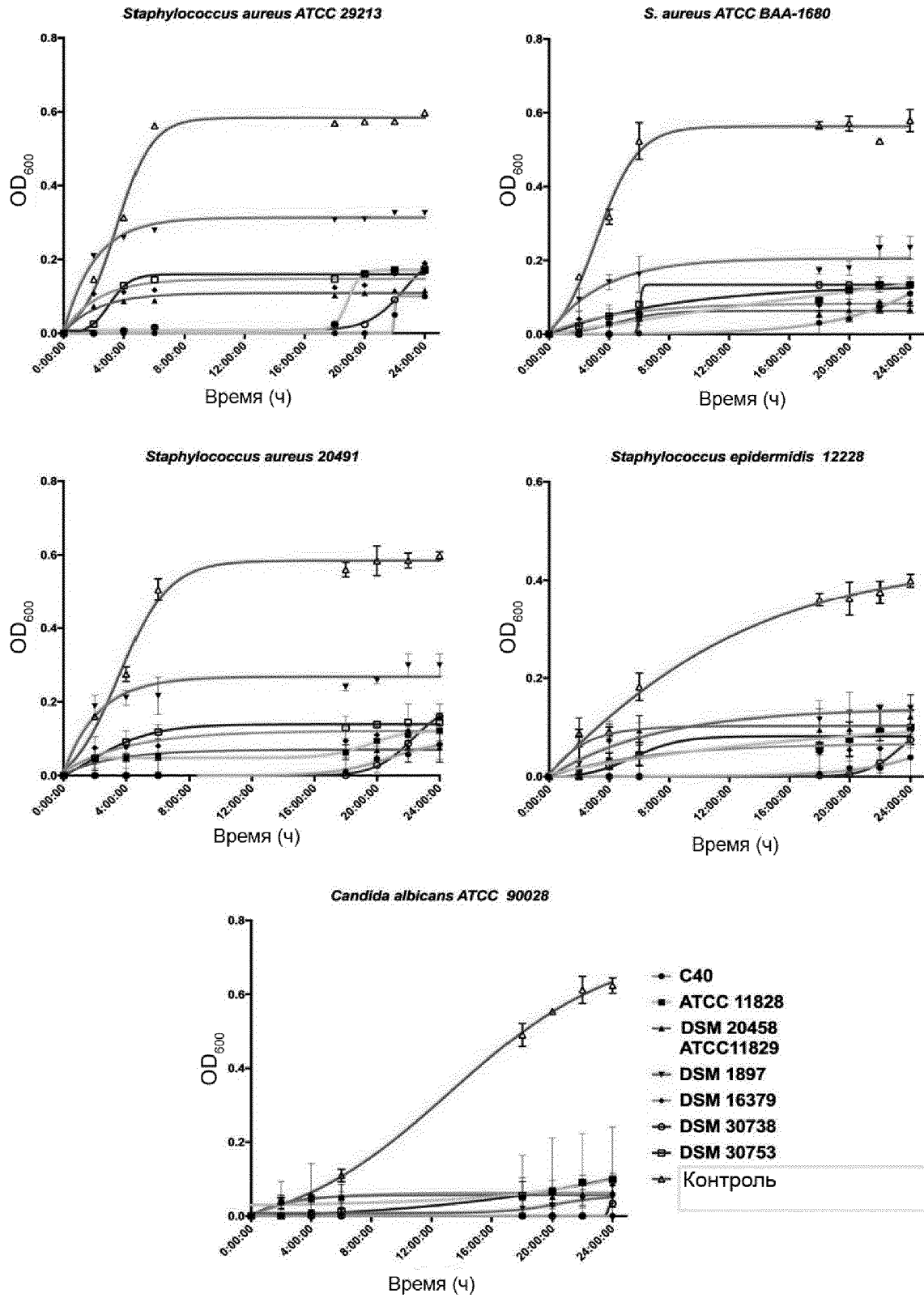
Фиг. 7



ФИГ. 8



Фиг. 9



Фиг. 10