

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045003**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.10.26**

**(21)** Номер заявки  
**202091389**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.12.06**

**(51)** Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)  
*A61Q 19/00* (2006.01)  
*A61K 8/99* (2017.01)  
*A61P 17/00* (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ ПРОБИОТИКОВ И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 102017000141330

**(32)** 2017.12.06

**(33)** IT

**(43)** 2020.09.11

**(86)** PCT/IB2018/059694

**(87)** WO 2019/111189 2019.06.13

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ЛАК2БИОМ С.Р.Л. (IT)

**(72)** Изобретатель:  
Биффи Андреа (IT)

**(74)** Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

**(56)** US-A1-2005158291

US-A1-2013095086

US-A1-2010226892

I.-J. WANG ET AL.: "Children with atopic dermatitis show clinical improvement after Lactobacillus exposure", CLINICAL & EXPERIMENTAL ALLERGY : JOURNAL OF THE BRITISH SOCIETY FOR ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, vol. 45, no. 4, 1 April 2015 (2015-04-01), pages 779-787, XP055494867, UK, ISSN: 0954-7894, DOI: 10.1111/cea.12489, page 782, column 1, paragraphs 2,3

LUDIVINE CHAPAT ET AL.: "Lactobacillus casei reduces CD8+ T?cell-mediated skin inflammation", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 2520-2528, XP055494929, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/eji.200425139, page 2523, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 3

SILVIA BALZARETTI ET AL.: "The vaginal isolate Lactobacillus paracasei LPC-S01 (DSM 26760) is suitable for oral administration", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 6, 15 September 2015 (2015-09-15), XP055474499, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00952, page 7, column 2, page 8, column 1, paragraph 2

EP-A1-1322318

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пробиотики, предпочтительно на основе бактерий, в частности рода Lactobacillus, предназначенной для применения в целях профилактики и/или лечения заболеваний, поражающих кожу, в частности воспалительных заболеваний, в частности аутовоспалительных заболеваний дерматологической направленности, таких как атопический дерматит. Кроме того, композиция по изобретению пригодна для предупреждения и/или уменьшения повреждения кожи, индуцированного УФ-облучением, в частности старения кожи.

---

**B1**

**045003**

**045003**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пробиотики, предпочтительно на основе бактерий, в частности, бактерий рода *Lactobacillus*, для применения в целях профилактики и/или лечения заболеваний, поражающих кожу, в частности, воспалительных заболеваний, в частности, ауто-воспалительных заболеваний дерматологической направленности, таких как атопический дерматит. Кроме того, композиция по изобретению пригодна для предупреждения и/или уменьшения поражения кожи, вызванного УФ-излучением, в частности, старения кожи.

### Предшествующий уровень техники

Кожа человека колонизирована богатым микробиомом. Раньше считалось, что этот аспект представляет собой потенциальный источник инфекции, в то время как в настоящее время произошло осознание того факта, что микробиота человека в целом и, следовательно, микробиота кожи выполняет важные и полезные функции в организме хозяина не только вследствие ее способности противодействовать адгезии и развитию патогенов кожи, но и вследствие ее способности к "диалогу" и взаимодействию с иммунной системой.

Если дисбиоз происходит на уровне кожи, то пробиотики могут действовать как модуляторы и восстановить баланс микробиоты кожи.

Применение новых технологий в последнее десятилетие существенно облегчило таксономический анализ кожной микробиоты, бактериальная популяция которой может насчитывать примерно 1010 видов микроорганизмов, относящихся к более чем 25 филам (филы = таксономические ранги микроорганизмов), самыми представительными из которых являются актинобактерии (*Actinobacteria*), фирмикуты (*Firmicutes*) и протеобактерии (*Proteobacteria*). Различные кожные заболевания связаны с изменениями микробиома кожи.

Например, в случае угревой сыпи (акне) *P. acnes* (*Propionibacterium acnes*) считаются бактериями, ассоциированными, главным образом, с этим заболеванием; на самом деле при данном заболевании оптимальную среду для роста указанных бактерий обеспечивает повышенная продукция кожного сала (себум).

Традиционный подход к этим проблемам заключается в применении антибактериальных средств, т.е. в использовании топических (для местного применения) дезинфектантов и антибиотиков.

С одной стороны, антибиотики несомненно являются эффективными, но, помимо элиминации ими полезных бактерий, они несут с собой риск развития повышенной чувствительности организма и потенциально неблагоприятных побочных действий, особенно в случае длительного применения антибиотиков широкого спектра действия.

По этой причине заявитель обозначил как новое решение проблемы восстановления баланса микробиоты кожи - применение пробиотических композиций, основанное, в частности, на использовании бактерий, относящихся к роду *Lactobacillus*. Фактически заявитель обнаружил, что композиция, содержащая пробиотики, относящиеся к роду *Lactobacillus*, способна предупреждать или, во всяком случае, смягчать действие конкретно тех бактерий, которые являются опасными для кожи, таких как *P. acnes*, и, тем самым, способна

- 1) содействовать профилактике и/или лечению заболеваний, поражающих кожу;
- 2) стимулировать нормальный процесс заживления; и
- 3) поддерживать и/или улучшать нормальные процессы реэпителизации и/или рубцевания.

### Краткое описание фигур

Настоящее изобретение подробно описано ниже и проиллюстрировано в виде примера со ссылкой на прилагаемые фигуры, среди которых:

фиг. 1 графически показывает адгезию *P. acnes* в процентном отношении к живым, жизнеспособным клеткам, прикрепляющихся к кератиноцитам после

1А: предстимуляции путем контакта кератиноцитов с тестируемыми пробиотиками;

1В: совместной инкубации кератиноцитов с *P. acnes* и тестируемыми пробиотиками;

1С: инкубации кератиноцитов с тестируемыми пробиотиками после заражения эукариотических клеток патогеном.

Здесь и далее на всех фигурах LP125 обозначен штамм *Lactobacillus paracasei* DG CNCM 1-1572, а LC48 - *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760.

Если адгезию *P. acnes* в отсутствие стимуляции пробиотиками принять за 100, то ингибирующая способность тестируемых штаммов будет выражена как % снижения адгезии *P. acnes* по сравнению с положительным контролем. В частности, фиг. 1А показывает способность обоих пробиотических штаммов предупреждать адгезию *P. acnes* в указанных % (42 % для *L. casei* DG (LP125) и 35 % для *L. paracasei* LPC-S01 (LC48)).

Фиг. 1В показывает способность штамма *L. casei* DG (LP125) снижать адгезию на 17 %, в то время как штамм *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) показал 9 %. Смесь штаммов дала статистически значимое снижение адгезии *P. acnes*, которое составило 42 %, т.е. явно более высокий процент, чем наблюдаемый в случае отдельно взятых штаммов и при их суммарном действии.

Фиг. 1С показывает статистически значимый синергетический эффект смеси из 2 пробиотиков, которая показала способность к уменьшению адгезии *P. acnes* на 42 %. В отличие от этого, отдельные про-

биотики показали способность к снижению адгезии, составившему меньше половины уровня снижения адгезии их смесью - 18 % для *L. casei* DG (LP125) и 11 % для *L. paracasei* LPC-S01 (LC48).

Фиг. 2 графически показывает результаты анализа на цитокины IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-8 и TSLP в супернатантах клеток, выраженные в пикограммах (пг)/мл супернатанта и полученные посредством анализа ELISA.

### Раскрытие изобретения

Один аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей пробиотики, предпочтительно - один или более видов пробиотических бактерий, для применения в лечении и/или профилактике заболеваний и/или патологий, предпочтительно воспалительного типа, поражающих кожу, предпочтительно - дерматологического типа.

Указанные заболевания и/или патологии, поражающие кожу, выбраны из дерматита, предпочтительно ассоциированного с раздражением и/или экскориацией (поверхностное нарушение целостности кожи в результате расчесывания и т.п.); акне, инфекций, воспалений кожи, эритемы, язв, псориаза, атопического дерматита, отита, трещин на коже, свищей, геморроя и любого другого заболевания или повреждения при наличии или в отсутствие развивающегося воспалительного процесса и/или комбинаций, и/или осложнений, и/или последствий перечисленного.

Указанные заболевания и/или патологии, поражающие кожу, предпочтительно связаны или вызваны патогенами. То есть композиция особенно эффективна в применении не только для превентивных/профилактических целей, но и для лечебных/терапевтических целей, т.е. после заражения указанными патогенами.

Согласно предпочтительному аспекту настоящего изобретения композиция может также благоприятствовать/облегчать/стимулировать/ускорять процесс заживления ран и/или процессы реэпителизации и/или рубцевания.

Указанные патогены предпочтительно выбраны из бактерий, грибов, дрожжей, вирусов и комбинаций перечисленного.

Указанные патогены предпочтительно выбраны из бактерий, а указанные бактериальные патогены предпочтительно выбраны из рода *Propionibacterium*, предпочтительно вида *acnes*; рода *Staphylococcus*, предпочтительно *epidermis*, *aureus*, *warneri*, *ruogenes*, *mitis*; *Corynebacterium* ssp.; *Pseudomonas*, предпочтительно *aeruginosa*; *Acinetobacter*, предпочтительно *johnsonii*; *Streptococcus*, предпочтительно *ruogenes*; *Micrococcus* ssp. и *Brevibacterium* ssp.

Кроме того, композиция, содержащая пробиотики, предпочтительно один или более видов пробиотических бактерий, как подробно описано ниже, показана к применению для защиты кожи и/или губ, и/или конъюнктивы от УФ-излучения, УФ-А (УФ-лучей типа А (длинноволновых)) и/или УФ-лучей типа В (коротковолновых)). Другими словами, композиция показана к применению для профилактики и/или ослабления повреждения и/или последствий, вызванных/связанных с воздействием УФ-излучения, УФ-А и/или УФ-В. Композиция предпочтительно предназначена для предупреждения и/или замедления старения кожи.

С этой точки зрения композиция, содержащая пробиотики, предпочтительно один или более видов пробиотических бактерий, как подробно описано ниже, имеет косметическое назначение. Применение композиции предпочтительно связано/ обусловлено иммуномодулирующим действием пробиотиков, содержащихся в композиции, предпочтительно пробиотиков, как определено и описано ниже. Указанная иммуномодуляция включает модуляцию, предпочтительно снижение экспрессии по меньшей мере одного цитокина, выбранного из гемопоэтических цитокинов, предпочтительно факторов роста гемопоэза и/или CSF (колониестимулирующий фактор); первичных провоспалительных цитокинов, предпочтительно IL-1 и/или TNF (фактор некроза опухолей); противовоспалительных и/или иммуносупрессивных цитокинов, предпочтительно IL-10 и/или TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста-бета); вторичных провоспалительных цитокинов (хемокинов); цитокинов, регулирующих специфический иммунный ответ, предпочтительно IL-2; и комбинаций перечисленного. Указанная иммуномодуляция предпочтительно включает модуляцию, предпочтительно снижение экспрессии по меньшей мере одного цитокина, выбранного из IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-8, TSLP и их комбинаций.

В этой связи необходимо отметить, что цитокины являются неантигенспецифическими полипептидными медиаторами, действующими как коммуникационные сигналы между клетками иммунной системы и между последними и разными органами и тканями. Цитокины продуцируются различными типами клеток, и после высвобождения в организме они индуцируют специфические реакции в близлежащих клетках (паракринный эффект), в других, очень далеко лежащих, клетках (эндокринный эффект) или в клетках, которые создали их (аутокринный эффект). В частности, цитокины, продуцируемые клетками иммунной системы, такие как интерлейкины и хемокины, играют фундаментальную роль в регулировании и активировании механизмов защиты человека и в воспалительных процессах. Сложная сеть цитокинов поддерживает баланс между провоспалительными и противовоспалительными действиями. Дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными цитокинами, а также неконтролируемая продукция цитокинов, может привести к заболеваниям воспалительного типа, аллергиям или аутоиммунным пато-

логиям. TSLP (тимический стромальный лимфопоэтин) представляет собой белок, относящийся к семейству цитокинов: он играет важную роль в созревании популяций Т-клеток, активируя антигенпрезентирующие клетки. TSLP продуцируется, главным образом, негемопоезическими клетками, такими как фибробласты, эпителиальные клетки и различные виды стромальных клеток, и его экспрессия связана со многими патологическими состояниями, включая астму, воспалительный артрит, атопический дерматит, экзему, эозинофильный эзофагит и другие аллергические состояния.

В частности, заявитель показал, что, когда кератиноциты подвергаются действию пробиотиков, то последние способны проявлять иммуномодулирующее действие, что очевидно из оценки анализов на определение цитокинов в клеточном супернатанте. В частности, наблюдалось снижение экспрессии IL1 $\beta$ , IL10 и IL8 под действием отдельных пробиотических штаммов, в частности, штамма *L. rarascae* LPC-S01 (LC48). Эффект сдерживания экспрессии цитокинов становился более очевидным после стимуляции кератиноцитов липополисахаридом (LPS).

Что касается TSLP (тимический стромальный лимфопоэтин), то контакт с пробиотиками определяет снижение экспрессии этого индикатора по сравнению с исходной экспрессией (кератиноцитов, не стимулированных пробиотиком). LPS-предстимуляция кератиноцитов не приводила к повышению уровней TSLP: этого и следовало ожидать, поскольку известно, что другие молекулы являются более стимулирующими для Toll-подобных рецепторов LPS. Пробиотические штаммы - по отдельности и в виде смеси - показали себя более эффективными в вызывании экспрессии этого индикатора. Индикатор представляет значительный интерес, поскольку он сверхэкспрессируется при некоторых патологиях кожи, таких как атопический дерматит. Кроме того, этот цитокин считается ключевым медиатором на функциональной границе раздела между кератиноцитами и дендритными клетками.

Согласно предпочтительному аспекту изобретения композиция может применяться в процессах заживления ран и/или реэпителизации, и/или рубцевания поврежденной кожи и/или кожи, пораженной заболеваниями.

Таким образом, данные четко указывают на то, что пробиотики, в частности, тестируемые штаммы способны оказывать противовоспалительное и/или иммуномодулирующее действие на кератиноциты и, тем самым, на кожу.

В целом, с учетом описанного здесь действия, композицию на основе пробиотиков, раскрываемую здесь, можно использовать для восстановления баланса микробиоты кожи.

В контексте настоящего изобретения "кожа" означает первую линию защиты от внешней среды; в частности, эта защита реализуется за счет действия кератиноцитов, рассеянных в наружном слое кожи (эпидермис), где они могут индуцировать секрецию цитокинов и хемокинов для передачи сигнала тревоги в более глубокие слои кожи, генерируя, тем самым, ответную воспалительную реакцию. В процессе своего развития кератиноциты мигрируют из более глубоких слоев в более близкие к поверхности слои с нарастающим отложением кератина, который ответственен за защитное действие по отношению к нижележащим клеткам.

В контексте настоящего изобретения "старение кожи" означает полностью естественный и неизбежный физиологический процесс, который происходит у всех индивидуумов. С течением времени кожа подвергается структурным изменениям, вызываемым рядом факторов различного происхождения, которые служат причиной потери влаги кожей, появления мелких морщин, потери эластичности, гиперкератоза и образования гиперпигментированных пятен, называемых "возрастными пятнами".

Указанное старение предпочтительно может быть внутренним - или хронологическим - старением, которое в значительной мере зависит от генетических (или внутренних) факторов. Альтернативно, указанное старение кожи может быть внешним старением - или старением, вызываемым факторами окружающей среды, т.е. вызывается внешними факторами.

Вообще говоря, внутреннее старение обычно начинается после 25 лет. Оно обычно включает ряд изменений, которые в большинстве случаев приводят к истончению и/или изменению структуры кожи.

Внешнее старение предпочтительно вызывается агрессивным воздействием внешних агентов и/или факторов окружающей среды, предпочтительно выбранных из УФ-излучения (ответственного за фотостарение), курения сигарет, злоупотребления алкоголем, загрязненности, постоянного контакта с раздражающими веществами и комбинаций перечисленного.

Повреждение кожи и/или последствия, связанные с воздействием УФ-излучения, предпочтительно выбраны из эритемы, пигментации, кератоза, гиперкератоза, покраснения кожи, загара, ожогов, актинического фотостарения или солнечного эластоза, кортикальной катаракты, птеригия, реактивации орального герпеса, повреждения кожи любой природы, предпочтительно повреждения губ и/или конъюнктивы, меланомы кожи, плоскоклеточного рака кожи, базально-клеточного рака, плоскоклеточного рака роговицы или конъюнктивы, и/или комбинаций, и/или осложнений, и/или последствий перечисленного.

В контексте настоящего изобретения "восстановление баланса микробиоты кожи" означает восстановление качественного и количественного физиологического состава микробиоты кожи, понимаемого как весь набор микроорганизмов, присутствующих на коже, и восстановления, тем самым, физиологической кожной микробной экологии.

В контексте настоящего изобретения "проверочное (контрольное) заражение" означает любой экс-

периментальный тест или пробу, или испытание, включающее заражение микроорганизмами различных видов и последующую оценку изменений микробной нагрузки, обычно путем подсчета чашечным методом количества живых микроорганизмов через определенные интервалы времени.

В контексте настоящего изобретения "пробиотики" согласно определению, предложенному ФАО/ВОЗ, означают: "Живые микроорганизмы, которые при приеме их в адекватных количествах оказывают благоприятное влияние на здоровье хозяина". Другими словами, пробиотики - это микроорганизмы, которые, будучи взятыми в подходящих количествах, показывают способность к проявлению функций, которые полезны для организма.

Указанные микроорганизмы предпочтительно выбраны из бактерий, грибов, дрожжей и комбинаций перечисленного.

Согласно предпочтительному аспекту изобретения бактерии относятся по меньшей мере к одному роду, выбранному из *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* и *Enterococcus*. Более предпочтительно бактерии относятся к роду *Lactobacillus*.

Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Lactobacillus* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из

*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplanctarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis*

и их комбинаций.

Более предпочтительными являются *Lactobacillus* вида *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно - штамм *Lactobacillus paracasei* DG CCNCM 1-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01.

Оба штамма были выделены и депонированы компанией SOFAR S.p.A., в частности, бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG был депонирован в Национальной коллекции культур микроорганизмов (CNCM) Института Пастера (Париж) 05.05.1995 г. с номером депозита CNCM 1-1572. Штамм первоначально был назван *Lactobacillus casei* DG ssp. *casei*.

Бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 был депонирован в DSMZ с номером доступа DSM26760.

Указанные штаммы особенно эффективны в описанных здесь случаях применения, если они используются в ассоциации (сообществе) и/или комбинации, при этом они действительно показывают аддитивный или синергетический эффект.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Bifidobacterium* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. bourn*, *B. choerimum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* и *B. tsurumiense*; более предпочтительно выбранному из *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* и *Bacillus marinus*.

Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Propionibacterium* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из

*P. shermanii*,

*P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* и *P. thoenii*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Streptococcus* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*,

*Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus ratti*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* и *Streptococcus zooepidemicus*.

Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Lactococcus* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* и *L. taiwanensis*.

Согласно еще одному предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Aerococcus* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaequi* и *A. urinaehominis*.

Согласно следующему предпочтительному аспекту изобретения бактерии рода *Enterococcus* относятся по меньшей мере к одному виду, выбранному из

*Enterococcus*

*avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudocavium*, *Enterococcus raffinosus* и *Enterococcus solitarius*.

Согласно другому предпочтительному аспекту изобретения дрожжи относятся к роду *Saccharomyces*, более предпочтительно - к видам *Saccharomyces cerevisiae* и/или *Saccharomyces boulardii*.

Микроорганизмы - предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG® и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 - предпочтительно используются живыми, т.е. используются как пробиотики.

Альтернативно, микроорганизмы, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG® и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 - используются мертвыми или тиндализованными (т.е. подвергнутыми дробной стерилизации текучим паром).

В следующем варианте осуществления изобретения микроорганизмы - предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG® и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 - используются в виде лизата и/или экстракта, т.е. они используются как парапробиотик. Альтернативно, микроорганизмы - предпочтительно

бактериальный штамм *L. casei* DG® и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 - используются в виде бактериальных продуктов, супернатантов; производных, предпочтительно бактериальных производных, предпочтительно метаболитов; метаболических биопродуктов, постбиотиков, клеточных оболочек и компонентов перечисленного, экзополисахаридов или соединений, содержащих иммуногенные компоненты, предпочтительно выбранные из рибосом и гликопротеинов, производных иммуностимуляторов, таких как глюкозаны и другие полисахариды, липополисахариды и любой компонент супернатанта.

В большинстве случаев указанные микроорганизмы используются по отдельности или в виде комбинаций микроорганизмов (или консорциумов) любых видов, указанных в QPS (Квалифицированная презумпция безопасности) списке Европейского управления безопасности пищевых продуктов (EFSA).

В любом случае композиция по изобретению может содержать любой вид микроорганизмов, в ча-

стности, бактерии, показывающие пробиотические эффект/действие/функцию, и/или микроорганизмы, как определено выше, предпочтительно бактерии, которые способны стабильно колонизировать кожу, кишечник и/или другие части тела, отбирая пространство у патогенных микроорганизмов/бактерий и/или напрямую борясь с ними. Косметическая композиция и/или композиция для медицинских целей, как описано выше, предпочтительно содержит комбинацию описанных выше штаммов с другими микроорганизмами, как описано выше, предпочтительно выбранными из бактерий, грибов, дрожжей и их комбинаций.

Микроорганизмы, предпочтительно бактерии, присутствуют в минимальном количестве, достаточном для обеспечения временной колонизации кожи, кишечника и/или других частей тела. Указанное количество предпочтительно варьируется от  $10^6$  до  $10^{11}$  единиц микроорганизмов, более предпочтительно - от  $10^8$  до  $10^9$  единиц микроорганизмов, причем указанное количество предпочтительно представляет собой количество/дозу/сутки (ежедневно).

Композиция дополнительно содержит вспомогательные вещества (эксципиенты) и/или дополнительные фармацевтически приемлемые вещества и/или носители.

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно содержит также вещество, выбранное из плазмы, PRP (богатой тромбоцитами плазмы крови), заживляющих веществ, реэпителизирующих веществ, смачивающих агентов, увлажняющих агентов, смягчающих агентов, адсорбентов, анальгетических и флеботонических агентов, противовоспалительных средств, мышечных релаксантов, пептидных и/или белковых веществ, и/или белков, таких как коллаген; веществ, относящихся к соединительной ткани, таких как гликозаминогликаны, предпочтительно - хондроитина сульфат, и/или комбинаций перечисленного.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения изготовленная композиция предназначена предпочтительно для местного применения предпочтительно в виде крема, геля, масла, эмульсий, спреев, марлевых тампонов, патчей (пластырей), повязок, лосьонов, муссов, мазей, паст или жидких составов, в которые композиция предпочтительно добавляется непосредственно перед нанесением на кожу.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция используется для трансплантации микробиоты кожи. В контексте настоящего изобретения трансплантация кожной микробиоты означает введение, предпочтительно местное, микробиоты кожи (и/или ее части) здоровых субъектов, не страдающих кожными заболеваниями, для восстановления правильного баланса и, тем самым, лечения дисбиоза, который может присутствовать. Для этих целей композиция по изобретению предпочтительно содержит бактерии, предпочтительно бактериальный штамм *L. casei* DG® и/или бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, и необязательно также грибы, вирусы, пептиды, белковые и/или пептидные вещества, углеводы, витамины, микроэлементы или любое другое вещество, характеризующее микробиоту кожи и/или других частей тела. Для таких целей указанная композиция предпочтительно применяется в комбинации с аминокислотами, добавками, витаминами, микроэлементами, такими как цинк и селен; макро- и микронутриентами, ферментами и/или пребиотическими веществами, такими как фруктоолигосахариды (FOS), галактоолигосахариды (GOS), инулин, гуаровая камедь, и/или комбинациями перечисленного. В одном варианте осуществления настоящего изобретения изготавливается композиция для перорального приема предпочтительно в виде твердого состава, предпочтительно в виде пилюль, капсул, таблеток, гранулированного порошка, капсул с твердой оболочкой, растворяющихся во рту гранул, саше или пастилок.

Альтернативно, композиция изготавливается в виде жидкости, предпочтительно для приготовлений для немедленного приема.

Альтернативно, композиция имеет форму, способную оказывать местное действие, например, форму клизмы, крема, спрея, геля, патча (пластыря), лосьонов, муссов, мазей, паст или жидких составов, в которые композиция предпочтительно добавляется непосредственно перед нанесением на кожу.

Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения композиция по изобретению применяется в комбинации с аминокислотами, добавками, витаминами, микроэлементами, такими как цинк и селен; макро-и микронутриентами, ферментами и/или пребиотическими веществами, такими как фруктоолигосахариды (FOS), галактоолигосахариды (GOS), инулин, гуаровая камедь или комбинации перечисленного.

### Пример

Бактериальные штаммы и клетки.

Изобретение демонстрируется с помощью примера, использующего следующие бактериальные штаммы:

*L. casei* DG (*Lactobacillus paracasei* CNCM 1-1572);

*L. paracasei* LPC-S01;

*L. casei* DG + *L. paracasei* LPC-S01 (смесь 1:1).

Бактериальные штаммы культивировали в селективной питательной среде, состоящей из MRS (агаризованная среда, разработанная de Man, Rogosa, Sharpe), в течение 16 ч при 37°C. По достижении стационарной фазы роста отбирали образцы бактерий, который использовали для тестов. Их промывали несколько раз физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) и центрифугировали для удале-

ния отработанной культуральной среды. Использовали живые клетки в стационарной фазе роста, поскольку именно в этой фазе бактерии индуцируют меньший иммунный ответ.

Все тесты, описанные ниже, проводили трижды.

В экспериментах использовали нормальные кератиноциты кожи человека, поддерживаемые в культуре с подходящими добавками.

*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) CCUG 50865 (приобретенные из CCUG (Коллекция культур, Университет Гетеборга) культивировали в течение 16 ч при 37°C на питательной мясной среде (как жидкой, так и твердой), приготовленной согласно инструкции поставщика. Затем определяли концентрацию бактерий спектрофотометрией со снятием показаний при оптической плотности (O.D.) 600 нм и использовали для тестов на адгезию.

Тест на адгезию и заражение клеточной линии патогеном.

Кератиноциты высевали при 37°C в атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> в лунки планшетов для культивирования клеток и оставляли для роста до достижения конfluence (т.е. до общего количества примерно 10<sup>5</sup> клеток). Норма посева составила 2,5×10<sup>5</sup> клеток/0,32 см<sup>2</sup> (т.е. плотность клеток 7,8×10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>). В ходе эксперимента среду удаляли, клетки промывали средой, не содержащей антибиотика, а затем добавляли бактерии для тестов, которые проводились в соответствии с различными протоколами, описанными ниже.

1) Адгезия штаммов к кератиноцитам.

После определения количества кератиноцитов на лунку планшета добавляли штаммы *L. paracasei* при MOI (множественность инфекции) 1:10 (10<sup>5</sup> клеток и 10<sup>6</sup> КОЕ бактерий/лунку). Штаммы тестировали в соотношении 1:1 как по отдельности, так и в комбинации.

Бактерии оставляли в контакте с клетками, поддерживаемыми при 37°C, в условиях слабого встряхивания на 60 минут. По окончании инкубации среду удаляли, а клетки промывали стерильной средой для удаления бактерий, не прикрепившихся к монослою клеток.

Для расчета количества прикрепившихся бактерий клетки отделяли, лизировали и подсчитывали бактерии путем проведения суправитального окрашивания после посева на агаризованную среду MRS.

2) Тест на исключение адгезии.

После определения количества кератиноцитов в каждой лунке планшета штаммы *L. paracasei* добавляли к клеткам в соотношении 1:1 как по отдельности, так и в комбинации.

Бактерии оставляли в контакте с клетками, поддерживаемыми при 37°C, в условиях слабого встряхивания на 60 минут. По окончании инкубации среду удаляли, а клетки промывали стерильной средой для удаления бактерий, не прикрепившихся к монослою клеток.

Затем *P. acnes* (при MOI 1:10) приводили в контакт с клетками с последующей инкубацией в течение 60 минут при 37°C. По окончании инкубации культуральную среду удаляли и не прикрепившиеся бактерии удаляли путем промывания стерильной средой.

Для расчета количества *P. acnes*, прикрепившихся к кератиноцитам, клетки отделяли и лизировали и подсчитывали бактерии путем проведения суправитального окрашивания после посева на агар с 5 % овечьей крови в условиях анаэробноза в течение 48-72 ч при 37°C. Лунки с кератиноцитами, которые не инкубировались предварительно со штаммами *L. paracasei*, а были инокулированы только *P. acnes*, использовали в качестве положительного контроля адгезии *P. acnes* (контроль адгезии *P. acnes*), в то время как лунки с клетками, которые не инкубировались ни с какими бактериями, использовали в качестве отрицательного контроля (контроль стерильности).

3) Тест на адгезионную конкуренцию.

После определения количества кератиноцитов на лунку добавляли штаммы *L. paracasei* (как по отдельности, так и в соотношении 1:1) одновременно с *P. acnes*. Бактерии добавляли при общей MOI 1:10 и в соотношении пробиотик : патоген = 1:1.

Бактерии оставляли в контакте с клетками при 37°C в условиях слабого встряхивания на 60 минут. По окончании инкубации среду удаляли, а клетки промывали стерильной средой для удаления бактерий, не прикрепившихся к монослою клеток.

Для расчета количества *P. acnes*, прикрепившихся к кератиноцитам, клетки отделяли и лизировали и подсчитывали бактерии путем проведения суправитального окрашивания после посева на агар с 5 % овечьей крови в условиях анаэробноза в течение 48-72 ч при 37°C. Лунки с кератиноцитами, инокулированными только *P. acnes*, использовали в качестве положительного контроля (контроль адгезии *P. acnes*), в то время как лунки с клетками, которые не инкубировались ни с какими бактериями, использовали в качестве отрицательного контроля (контроль стерильности).

4) Тест на удаление прикрепившихся патогенов.

После определения количества кератиноцитов на лунку добавляли *P. acnes* (при MOI 1:10).

Бактерии оставляли в контакте с клетками, поддерживаемыми при 37°C, в условиях слабого встряхивания на 60 минут. По окончании инкубации среду удаляли и бактерии, не прикрепившиеся к монослою клеток, удаляли путем повторных промываний стерильной средой.

Затем штаммы *L. paracasei* (как по отдельности, так и в комбинации при соотношении 1:1) оставля-



ли в контакте с клетками, поддерживаемыми при 37°C, в условиях слабого встряхивания на 60 минут. По окончании инкубации среду удаляли, а клетки промывали стерильной средой для удаления бактерий, не прикрепившихся к монослою клеток.

Для расчета количества *P. acnes*, прикрепившихся к кератиноцитам, клетки отделяли и лизировали и подсчитывали бактерии путем проведения суправитального окрашивания после посева на агар с 5 % овечьей крови в условиях анаэробно-анаэробно-анаэробно в течение 48-72 ч при 37°C.

Кератиноциты, обработанные *P. acnes*, использовали в качестве положительного контроля (контроль адгезии *P. acnes*), в то время как кератиноциты, которые не были обработаны бактериями, использовали в качестве отрицательного контроля (контроль стерильности).

Тесты, проведенные как на отдельных штаммах в чистом виде, так и на смеси 1:1, повторяли дважды.

1) Адгезия штаммов к кератиноцитам - результаты.

Результаты этого теста показали способность штаммов (взятых отдельно, а также в комбинации) к адгезии к кератиноцитам. В частности, штамм *L. casei* DG показал более высокую способность к адгезии к кератиноцитам, чем штамм *L. paracasei* LPC-S01. Поэтому адгезионная способность, наблюдавшаяся в случае комбинации штаммов, может быть приписана предположительно содействию штамма *L. casei* DG.

Таблица 1

	Адгезия (N° бактерий – КОЕ/лунку)
<i>L. casei</i> DG	$139 \times 10^2 - 141 \times 10^2$
<i>L. paracasei</i> S01	$18,2 \times 10^2 - 21,8 \times 10^2$
Смесь 1:1	$98 \times 10^2 - 122 \times 10^2$
<i>Propionibacterium acnes</i>	$700 \times 10^2 - 2000 \times 10^2$

Тест на исключение адгезии (предварительная обработка эукариотических клеток пробиотиками и последующая инкубация с патогеном).

Результаты.

Как отмечалось выше, монослой кератиноцитов сначала вводили в контакт с пробиотиками, а затем (после удаления не прикрепившихся бактерий) в контакт с *P. acnes*, которые потом удаляли промыванием; после этого проводили количественную оценку остаточной жизнеспособности *P. acnes*.

В качестве отрицательного контроля служили эукариотические клетки без стимулирования их контактом с бактериями, в то время как в качестве положительного контроля использовали способность *P. acnes* прикрепляться (адгезировать) к кератиноцитам без предварительной обработки пробиотиками. Фиг. 1А показывает результаты, относящиеся к адгезии *P. acnes* в процентном отношении к живым, жизнеспособным клеткам, прикрепившимся после предварительного стимулирования кератиноцитов путем контакта с различными тестируемыми пробиотиками. Если принять за 100 адгезию *P. acnes* в отсутствие стимуляции пробиотиками, то ингибирующая способность испытуемых штаммов выражается как % снижения адгезии *P. acnes* по сравнению с положительным контролем.

Оба пробиотических штамма показали способность к предотвращению адгезии *P. acnes* в указанных % (42% для *L. casei* DG (LP125) и 35% для *L. paracasei* LPC-S01 (LC48)).

Тест на адгезионную конкуренцию (совместная инкубация эукариотических клеток с пробиотиками и с патогеном).

Результаты.

В ходе этих тестов снижение, если таковое имело место, адгезии *P. acnes* к кератиноцитам оценивали после одновременной обработки клеточной линии пробиотиками и патогеном с целью оценки возможного эффекта конкурентного ингибирования, проявляемого пробиотиками при совместной инкубации с *P. acnes*.

Кератиноциты, обработанные *P. acnes*, использовали в качестве положительного контроля, в то время как кератиноциты, которые не были обработаны бактериями, использовали в качестве отрицательного контроля (контроль стерильности).

Фиг. 1В графически показывает результаты, относящиеся к адгезии *P. acnes*, в процентном отношении к живым, жизнеспособным клеткам, прикрепившимся после совместной инкубации кератиноцитов с *P. acnes* и с различными тестируемыми пробиотиками. Как описано ранее, если принять за 100 адгезию *P. acnes* в отсутствие стимулирования пробиотиками, то ингибирующая способность тестируемых штаммов выражается как % снижения адгезии *P. acnes* по сравнению с положительным контролем.

В этом режиме взаимодействия между пробиотиками и патогеном штамм *L. casei* DG (LP125) показал способность к снижению адгезии на 17%, в то время как снижение адгезии штаммом *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) составило 9%. Комбинация штаммов дала статистически значимое снижение адгезии *P. acnes*, составившее 42%, т.е. значительно более высокий процент, чем тот, который наблюдался в случае отдельных штаммов, а также более высокий, чем их суммарный эффект.

Тест на удаление прикрепившихся патогенов (предварительная обработка эукариотических клеток патогеном и последующая инкубация с пробиотиком).

Результаты.

В ходе этих тестов любое снижение адгезии *P. acnes* к кератиноцитам оценивали после предварительной обработки клеточной линии патогеном и последующей инкубации с пробиотиками после удале-

ния не прикрепившегося патогена.

Кератиноциты, обработанные *P. acnes*, использовали в качестве положительного контроля, в то время как кератиноциты, которые не были обработаны бактериями, использовали в качестве отрицательного контроля (контроль стерильности).

Фиг. 1С графически показывает результаты, относящиеся к адгезии *P. acnes* в процентном отношении к живым, жизнеспособным клеткам, прикрепившимся после инкубации кератиноцитов с различными тестируемыми пробиотиками, после заражения эукариотических клеток патогеном. Как описано выше, если принять за 100 адгезию *P. acnes* в отсутствие пробиотиков, то ингибирующая способность тестируемых штаммов выражается как % снижения адгезии *P. acnes* по сравнению с положительным контролем.

В ходе этих тестов так же, как и в случае протокола совместной инкубации, наблюдался интересный статистически значимый синергетический эффект, связанный с комбинацией 2-х пробиотиков, которая показала свою способность к снижению адгезии *P. acnes* на 42%. В отличие от этого, отдельные пробиотики показали способность к снижению адгезии, процент которого составил менее половины процент снижения ее смесью пробиотиков: 18% в случае *casei* DG (LP125) и 1 % в случае *L. paracasei* LPC-S01 (LC48).

Тесты на иммуномодуляцию.

Тесты на иммуномодуляцию проводили с целью проверить, обладают ли пробиотические штаммы способностью модулировать высвобождение цитокинов человеческими кератиноцитами, подвергнутыми негативному стимулированию бактериальными липополисахаридами (LPS).

Нормальные человеческие кератиноциты высевали, как описано выше, в лунки планшета для культивирования клеток, и после достижения конfluence их использовали для экспериментов. В частности, клеточные монослои промывали и инкубировали в свежеприготовленной среде, не содержащей антибиотиков. Затем добавляли штаммы *L. paracasei*, *L. casei* DG (LP125) и *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) по отдельности и в комбинации в соотношении 1:1 при MOI (множественность инфекции) 1:10.

Бактерии оставляли в контакте с кератиноцитами на 120 минут при 37°C в условиях слабого встряхивания. В некоторых случаях клетки предварительно стимулировали (заражали в течение примерно 24 ч) липополисахаридом (LPS) при конечной концентрации 100 нг/мл.

По окончании инкубации среду удаляли, клетки промывали стерильной средой, чтобы удалить бактерии, которые не прикрепилась к клеткам, а затем выдерживали в культуральной среде в течение 24 ч при 37°C.

По окончании инкубации культуральную среду собирали для количественного определения продуцируемых цитокинов посредством ELISA-анализа (твердофазный иммуносорбентный анализ) (IL-10, IL-1β, IL-8, тимический стромальный лимфопоэтин [TSLP]), в то время как уровни циклооксигеназы-2 (COX-2) и активированного NF-κB, индуцируемого LPS или IL-1β, определяли вестерн-блоттингом на общих белках, экстрагированных из лизированных кератиноцитов.

Эти маркеры были выбраны по той причине, что они участвуют и в остром флогозе, и в аллергическом дерматите, а также в хроническом ассоциированном флогозе. В частности, IL-10 считается противовоспалительным, и его продукция обычно возрастает параллельно с продукцией мощных провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β. TSLP - это цитокин, который модулирует действие лимфоцитов и участвует в развитии хронического кератита.

Результаты.

Способность тестируемых штаммов стимулировать иммунный ответ кератиноцитов оценивали в соответствии с описанным выше протоколом. Тесты были направлены на определение цитокинов (IL-8, IL-1β и IL-10) и оценку активации 2-х маркеров - COX-2 и NF-κB.

COX-2 (циклооксигеназа-2) представляет собой индуцибельный маркер, продуцируемый ограниченным количеством типов клеток в ответ на специфический воспалительный стимул. Он сверхэкспрессируется в нескольких неоплазмах (новообразованиях), включая неоплазмы кожи. NF-κB (ядерный фактор-каппа-энхансер легкой цепи активированных В-клеток или ядерный фактор "каппа-би") представляет собой белковый комплекс с функцией транскрипционного фактора, продуцируемого всеми типами клеток в ответ на различные стимулы, включая стимулы воспалительной природы.

Культированные кератиноциты подвергали воздействию пробиотиков *L. paracasei*, *L. casei* DG (LP125) и *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) и комбинации двух штаммов в соотношении 1:1 в соответствии с процедурами, описанными выше. Затем проводили анализ клеточных супернатантов для определения цитокинов, уделяя особое внимание цитокинам противовоспалительного типа, которые удалось определить в кератиноцитах, находящихся в контакте с пробиотическими штаммами. Результаты анализа суммированы на фиг. 2 и графически показывают результаты анализа интерлейкинов IL-10, IL-1β и IL-8 в клеточных супернатантах, выраженные в пг (пикограммах)/мл супернатанта, полученного посредством теста ELISA.

Подробные оценки полученных результатов позволили сделать следующее заключение.

IL-1β (интерлейкин-1бета): уровни экспрессии в несколько нанограмм/мл супернатанта кератино-

цитов. Контакт с пробиотиками не привел к статистически значимому снижению экспрессии этого цитокина по сравнению с исходным уровнем экспрессии (кератиноцитов, не стимулированных пробиотиком). *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) показал умеренно положительное влияние по сравнению с *L. casei* DG (LP125), и один из всех был сравним по характеру влияния с комбинацией штаммов. Аналогичные выводы справедливы также и для случая с предварительной стимуляцией кератиноцитов липополисахаридом (LPS) для максимизации иммунного ответа.

IL-10: уровни экспрессии в несколько десятков пикограмм/мл супернатанта кератиноцитов. Контакт с пробиотиками привел к снижению экспрессии этого цитокина по сравнению с исходным уровнем экспрессии (кератиноцитов, не стимулированных пробиотиком). *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) показал умеренно положительное влияние по сравнению с *L. casei* DG (LP125) и был сравним по характеру влияния с комбинацией штаммов. Аналогичные выводы справедливы также и для случая с предварительной стимуляцией кератиноцитов LPS для максимизации иммунного ответа.

IL-8: уровни экспрессии в несколько нанограмм/мл супернатанта кератиноцитов. Контакт с пробиотиками привел к снижению экспрессии этого цитокина по сравнению с исходным уровнем экспрессии (кератиноцитов, не стимулированных пробиотиком). *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) показал положительное влияние по сравнению с *L. casei* DG (LP125) и был сравним по характеру влияния с комбинацией штаммов. В случае предварительной стимуляции кератиноцитов LPS для максимизации иммунного ответа оба пробиотика показали способность к положительному влиянию на контроль цитокина с аналогичным потенциалом как для пробиотиков, рассматриваемых по отдельности, так и их смеси.

TSLP (тимический стромальный лимфопоэтин): уровни экспрессии в несколько нанограмм/мл супернатанта кератиноцитов. Контакт с пробиотиками привел к снижению экспрессии индикатора по сравнению с исходной экспрессией (кератиноцитов, не стимулированных пробиотиком). Пробиотические штаммы как по отдельности, так и в комбинации показали свою эффективность в установлении требуемого уровня экспрессии этого индикатора. Индикатор представляет значительный интерес, так как он сверхэкспрессируется при некоторых патологиях кожи, таких как атопический дерматит. Кроме того, этот цитокин считается ключевым медиатором на функциональной границе раздела между кератиноцитами и дендритными клетками.

Оценка уровней экспрессии COX-2 позволила показать, что уровни экспрессии этого маркера, по-видимому, не претерпевают особых изменений после контакта кератиноцитов с пробиотиками по сравнению с исходными уровнями, за исключением умеренного сдерживающего действия при контакте с *L. paracasei* LPC-S01 (LC48). Обработка липополисахаридом (LPS) показала повышение уровней экспрессии COX-2 эукариотическими клетками, повышение, которое эффективно сдерживалось и ограничивалось действием пробиотиков. Присутствие *L. paracasei* LPC-S01 (LC48) устраняет экспрессию маркера в большей степени по сравнению с *L. casei* DG (LP125), в то время как комбинация 2-х пробиотических штаммов не проявляла, по-видимому, никакого действия.

Поскольку экспрессия IL-8 и COX-2 регулируется посредством транскрипционного фактора NF-κB, была проведена качественная оценка высвобождения NF-κB кератиноцитами, подвергнутыми воздействию пробиотиков. Результаты демонстрируют, что в отсутствие воспалительного стимула, представленного LPS, экспрессию маркера, по-видимому, невозможно обнаружить. Однако он активируется бактериальными липополисахаридами через фосфорилирование p65. Два пробиотических штамма проявили способность к сдерживанию экспрессии NF-κB, причем особое внимание было уделено *L. paracasei* LPC-S01 (LC48), присутствие которого как в виде отдельного штамма, так и в виде смеси с DG показало, что он особенно эффективен в сдерживании экспрессии LPS- индуцированного NF-κB.

Оценка снижения повреждения, вызванного УФ.

Способность пробиотического штамма LPC-S01 уменьшать повреждение, вызванное УФ-облучением, оценивалось на полной трехмерной 3D-модели *in vitro* реконструированной кожи, которая воспроизводит компартменты дермы (собственно кожи) и эпидермиса, что делает возможным исследование модификаций внеклеточного матрикса дермы и дифференцировку жизнеспособных слоев кожи (модель кожи полной толщины). Исследование рассматривается как оценка влияния штамма LPC-S01 на активацию инфламмосомы (мультибелковый комплекс, который приводит к запуску воспалительной реакции при контакте клетки с микроорганизмами) в ответ на УФ-облучение. Штамм LPC-S01 (LC48) наносили прямо на поверхность 3D-модели кожи, инкубировали в течение ночи и затем смывали физиологическим раствором для удаления избытка продукта. Ткань слегка поцарапали, а затем подвергли воздействию 1 MED (минимальной эритемогенной дозы) УФ для имитации нормального солнечного воздействия. Активацию воспаления тестировали спустя 4 и 24 ч после воздействия УФ-облучения. Ткань, обработанную физиологическим раствором и подвергнутую воздействию УФ-облучения, использовали в качестве положительного контроля. Физиологический раствор служил в качестве отрицательного контроля.

Гистоморфологический анализ с окрашиванием гематоксилином/эозином.

По окончании обработки ткани промывали физиологическим раствором и фиксировали в 10% формалине. В случае каждого образца биологические копии (n=3) включали в одни и те же парафиновые блоки, вырезали и собирали по 2 среза размером 5 мм из не идущих подряд участков ткани. Срезы тканей

окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологические образцы анализировали с помощью оптического микроскопа (увеличение 20X и 40X) и оценивали морфологические изменения в ткани и цитотоксический эффект.

Иммуноокрашивание NFκB.

Мечение NFκB позволяет оценить его транслокацию из цитоплазмы клетки в ядро; его транслокация фактически способна активировать воспалительный процесс. Мечение NFκB проводили с использованием техники иммуноокрашивания, известной в данной области. В частности, использовали первичное антитело Anti-NFκB (Abeam) и вторичное антитело, окрашенное флуорофором Alexa 555, и проводили контрастное окрашивание красителем DAPI, чтобы выделить ядра клеток. Изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении 40X.

Количественное определение интерлейкина IL-1β с помощью ELISA.

Антитела адсорбировали на планшете для ELISA, и образцы затем инкубировали. Вторичное антитело добавляли, чтобы сформировать "сэндвич". Количественная оценка базировалась на стандартной кривой. Данные получали посредством спектрофотометрических измерений.

Результаты уменьшения повреждения, вызванного УФ.

Спустя 4 ч после воздействия УФ-излучения необработанная ткань (положительный контроль) показала морфологию, которая осталась без изменений, но с клетками, поврежденными УФ-излучением в нижнем слое эпидермиса. Спустя 4 ч ткань, обработанная штаммом LPC-S01, не показала существенного изменения морфологии или общей архитектуры ткани либо ожогового повреждения в нижнем эпидермисе. Через 24 ч после воздействия УФ-излучения ткань показала типичные изменения эпидермиса, ассоциированные с ожогами, со сморщенными (как следствие пикноза) ядрами, эпидермисом и дермой с изменениями. Введение штамма LPC-S01 (LC48) не привело к улучшению в плане предупреждения морфологических изменений в ткани, индуцированных УФ-излучением.

В табл. 2 суммированы результаты количественной оценки транслокации NFκB спустя 4 ч после воздействия УФ-излучения.

Таблица 2

	Отрицательный контроль	Положительный контроль	LPC-S01 (LC48)
Число транслокаций	25,7	47,2	22,4

Спустя 4 ч после облучения положительный контроль показал большое число транслокаций NFκB, особенно в надбазальном слое эпидермиса.

Обработка пробиотиком LPC-S01 (LC48) способна ингибировать ядерную транслокацию NFκB в значительной степени по сравнению с положительным контролем. Кроме того, штамм LPC-S01 (LC48) также показал, что он способен снижать цитоплазматические уровни NFκB.

И, наконец, секреция IL-1β показала увеличение спустя 4, 8 и 24 ч после повреждения УФ-излучением. Введение пробиотика LPC-S01 (LC48) позволило

возвратить секрецию IL-1β к исходному состоянию через 4, 8 и 24 ч после лучевого повреждения. В частности, значительное уменьшение было отмечено спустя 8 и 24 ч после повреждения.

Таблица 3

## Секреция IL -1β

	NC 4ч	PC 4ч	S01 4ч	NC 8ч	PC 8ч	S01 8ч	NC 24ч	PC 24ч	S01 24ч
IL-1β (пг/мл)	2,12	2,74	2,10	2,49	3,18	1,92	3,13	4,78	3,44

Таким образом, пробиотик LPC-S01 (LC48) показал способность к предупреждению активации воспаления путем ингибирования транслокации NFκB в ядро клеток, подвергнутых повреждению, вызванному УФ-излучением. Кроме того, штамм S01 (LC48) напрямую показал эффект снижения уровней провоспалительного интерлейкина 1β через 4, 8 и 24 ч после поражения, вызванного излучением.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей пробиотические бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* DG CNCM 1-1572 и/или бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760, для профилактики или лечения заболеваний, или патологий, воспалительного типа, поражающих кожу, или для уменьшения или лечения симптомов, или последствий, ассоциированных с указанными заболеваниями/патологиями.

2. Применение композиции, содержащей пробиотические бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* DG CNCM 1-1572 и/или бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760 для стимулирования процесса заживления ран, или процессов реэпителизации, или рубцевания кожи.

3. Применение по п.1, где указанные заболевания или патологии, поражающие кожу, выбраны из

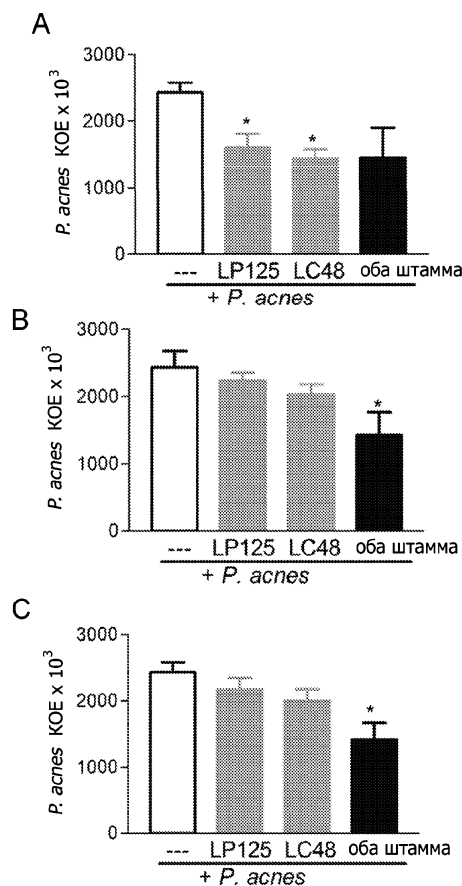
дерматита, ассоциированного с раздражением и/или эксфолиацией; акне, инфекций, воспалений кожи, эритемы, язв, псориаза, атопического дерматита, трещин на коже, свищей.

4. Применение композиции, содержащей пробиотические бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* DG CNCM 1-1572 и/или бактерии штамма *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM26760, для защиты кожи, губ или конъюнктивы от УФ-излучения, УФ-лучей типа А и/или УФ-лучей типа В; для предупреждения или ослабления повреждения, или последствий, вызванных/связанных с воздействием УФ-излучения, УФ-лучей типа А и/или УФ-лучей типа В, для предупреждения или замедления старения кожи.

5. Применение композиции по любому из пп.1-4, где указанные микроорганизмы являются живыми или мертвыми либо тиндализованными (т.е. подвергнутыми дробной стерилизации текучим паром), или используются в виде лизата и/или экстракта либо в виде бактериальных продуктов, или в виде супернатанта, или в виде производного, предпочтительно выбранного из метаболитов; метаболических биопродуктов, постбиотиков, клеточных оболочек и компонентов перечисленного; экзополисахаридов и соединений, содержащих иммуногенные компоненты, предпочтительно выбранные из рибосом и гликопротеинов, производных иммуностимуляторов, таких как глюкозаны и другие полисахариды, липополисахариды и любой компонент супернатанта.

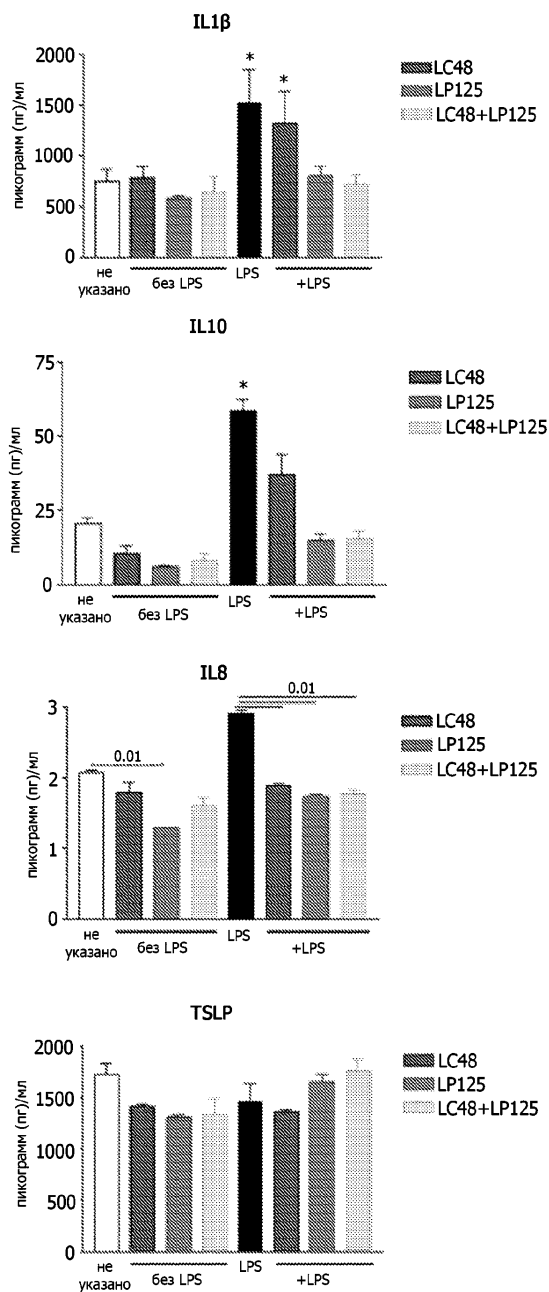
6. Применение композиции по любому из пп.1-5, где указанные микроорганизмы, предпочтительно указанные бактерии, присутствуют в количестве, варьирующем от  $10^6$  до  $10^{11}$  единиц микроорганизмов, предпочтительно - от  $10^8$  до  $10^9$  единиц микроорганизмов, причем указанное количество предпочтительно представляет собой количество/дозу в сутки.

7. Применение композиции по любому из пп.1-6, где композиция выполнена в виде крема, геля, масла, эмульсий, спреев, марлевых тампонов, патчей, повязок, лосьонов, муссов, мазей, паст или жидких составов для экстенпорального изготовления лекарственных средств по рецепту врача непосредственно в аптеке.



Фиг. 1

045003



Фиг. 2