



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86349** (13) **C2**

(51) МПК (2009)

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 11/02** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

**A61P 17/00**

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61P 43/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ПРОТИАЛЕРГІЧНИЙ АГЕНТ, ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ ДЛЯ ЗНИЖЕННЯ АЛЕРГІЇ ТА СПОСІБ ЗМЕНШЕННЯ СИМПТОМІВ АЛЕРГІЇ**

1

2

(21) a200500663

(22) 26.06.2003

(24) 27.04.2009

(86) PCT/JP03/08094, 26.06.2003

(31) 2002-185897

(32) 26.06.2002

(33) JP

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) ЯМАМОТО НАОЮКІ, ІСІДА ЮУ, БАНДО ІЗУКІ

(73) КАЛПІС КО., ЛТД

(56) WO A1 0137865, 31.05.2001.

DE U1 20202562, 23.05.2002.

WO A1 9514485, 01.06.1995.

JP A 9002959, 07.01.1997.

JP A 2000086524, 28.03.2000.

TAKASHI NAKAMURA ET AL.: 'Lactobacillus acidophilus L92 kabu no keiko toyo ga mouse kesseichu no ranpaku albumin tokuiteki IgE kotai revel ni oyobosu eikyo' JAPAN SOCIETY FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND AGROCHEMISTRY TAIKAI KOEN YOSHISHU vol. 2003, March 2003, page 75.

SEPP E ET AL: "Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants." September 1997 (1997-09), ACTA PAEDIATRICA (OSLO, NORWAY : 1992) SEP 1997, VOL. 86, NR. 9, PAGE(S) 956 - 961.

JP A 2000239175, 05.09.2000.

WO A1 0197822, 27.12.2001.

WO A1 0216554, 08.02.2002.

JP A 200095697, 04.04.1998.

JP A 10309178, 24.11.1998.

JP A 10114667, 06.05.1998.

(57) 1. Протиалергічний агент, що включає як активний інгредієнт молочнокислу бактерію штаму, вибраного з *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в Міжнародному

Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій.

2. Застосування молочнокислої бактерії, вибраної зі штаму *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій для полегшення алергії.

3. Застосування за п.2, де вказана алергія є алергічним ринітом.

4. Спосіб зменшення симптомів алергії, що включає введення суб'єкту, потребує такого зменшення, ефективної дози протиалергічного агента, що включає як активний інгредієнт молочнокислу бактерію, вибрану зі штаму *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій.

5. Спосіб за п.4 зменшення симптомів алергії, пов'язаної з підвищеним рівнем IgE, що включає введення суб'єкту, потребує такого зменшення, ефективної дози протиалергічного агента, що включає як активний інгредієнт молочнокислу бактерію, вибрану зі штаму *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в

(13) **C2**

(11) **86349**

(19) **UA**

Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій.

6. Протиалергічний агент для зменшення симптомів алергії, пов'язаної з підвищеним рівнем IgE, що включає як активний інгредієнт молочнокислу бактерію, вибрану зі штаму *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів

під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій.

7. Застосування молочнокислої бактерії, вибраної зі штаму *Lactobacillus acidophilus* CL-0062 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980), *Lactobacillus acidophilus* CL-92 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981) і *Lactobacillus fermentum* CP-34 (депонованого в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383), а також їх комбінацій для зменшення симптомів алергії введенням в продукт харчування або змішуванням з ним.

Даний винахід відноситься до протиалергічного агента. Винахід також відноситься до застосування протиалергічних агентів для полегшення алергії і способу зменшення симптомів алергії.

Кількість пацієнтів, що страждають алергією, збільшується кожний рік в багатьох країнах, включаючи Японію, і повідомляється про високу частоту випадків алергії у дорослих, один з трьох в Японії. Алергічні захворювання діляться на чотири типи, типи I-IV, в залежності від їх механізму дії. Деякі види алергічного риніту, такі як поліноз, бронхіальна астма і atopічний дерматит є алергією типу I, опосередкованою імунoglobulinом E (IgE), де підвищення рівня антигенспецифічного IgE в крові підвищує ризик розвитку алергічних симптомів.

Механізм розвитку алергії I типу наступний. Коли антиген, такий як пилок, домашній пил або кліщі попадають в організм, утворюються антитіла IgE, специфічні до такого антигену, які зв'язуються з тучними клітинами або рецепторами Fcε на поверхні базофілів і сенсibiliзують суб'єкт. Коли антиген потім проникає в тіло, антиген зв'язується з антитілом IgE з утворенням комплексу. Це викликає дегрануляцію, коли хімічні медіатори в гранулах, такі як гістамін і лейкотрієни, вивільняються з розвитком алергічних симптомів.

Останнім часом алергічні захворювання лікують головним чином антагоністами хімічних медіаторів, такими як антигістаміни і стероїди, що використовуються як протизапальні агенти. Однак, обидва з цих типів агентів забезпечують тільки симптоматичну терапію і стероїди інгібують загальну імунну відповідь, приводячи до побічних ефектів. Альтернативно, агенти для інгібування вивільнення хімічних медіаторів шляхом інгібування дегрануляції також використовують, але не виявлено фундаментальних терапевтичних агентів для специфічного зниження IgE антитіл, які є головним фактором розвитку алергії.

Крім того, для необхідного хронічного введення бажаними є проти алергічні агенти, які легко приймати і які є високобезпечними. Відповідно, потрібні нові протиалергічні агенти, що мають такі властивості.

Метою даного винаходу є забезпечення протиалергічного агента, який здатний полегшувати алергічний діатез шляхом зниження рівня IgE, який залучений до розвитку алергії типу I, який легко приймати, який є високобезпечним, а також забезпечення способу зменшення алергії.

З метою досягнення вищезгаданої мети, автори даного винаходу створили модель на мишах, де рівень антигенспецифічних IgE був значно підвищений без значного підвищення рівня IgG. Використовуючи дану модель, автори провели дослідження ефекту зниження рівня IgE різними штамами молочнокислих бактерій, які можуть впливати на кишкову імунну систему, для виявлення серед різних досліджуваних молочнокислих бактерій певних бактерій, які мають особливо сильний інгібувальний ефект на продукцію IgE, таким чином створивши даний винахід.

Відповідно до даного винаходу забезпечують протиалергічний агент, що включає, як активний інгредієнт, молочнокислу бактерію, вибрану з групи, що складається з молочнокислої бактерії виду *Lactobacillus acidophilus*, молочнокислої бактерії виду *Lactobacillus fermentum* і їх комбінацій.

Відповідно до даного винаходу також забезпечують протиалергічний агент, згаданий вище, де вказана молочнокисла бактерія виду *Lactobacillus acidophilus* є бактерією штаму, який вибирають з групи, що складається з *Lactobacillus acidophilus* CL0062 [депонованої в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4980], *Lactobacillus acidophilus* CL92 [депонованої в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-4981], і їх комбінацій.

Відповідно до даного винаходу також забезпечують протиалергічний агент, згаданий вище, де вказана молочнокисла бактерія виду *Lactobacillus fermentum* є штамом *Lactobacillus fermentum*. CP34 [депонованим в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером FERM BP-8383].

Відповідно до даного винаходу, крім того, забезпечується протиалергічний агент, згаданий вище, який знижує, при призначенні перорально, рівень антигенспецифічного IgE в крові в моделі риніту у мишей, де рівень антигенспецифічного

IgE в крові був підвищений шляхом назальної безперервної антигенної стимуляції миші.

Відповідно до даного винаходу також пропонується застосування певної молочнокислої бактерії, згаданої вище, в отриманні лікарського засобу для зменшення алергії.

Відповідно до даного винаходу, крім того, пропонується спосіб полегшення алергії, що включає введення ефективної дози протиалергічного агента, згаданого вище, суб'єкту, потребуючому такого полегшення.

На Фіг.1 показані графіки, які представляють зміни рівня імуноглобуліну в крові у мишей з підвищеним IgE в прикладі 1.

Фіг.2 являє собою графік, який показує результати експериментів зниження рівня OVA-IgE у мишей з підвищеним IgE шляхом введення кисломолочного продукту, що проводиться в прикладі 2.

Фіг.3 являє собою графік, який показує результати експериментів придушення рівня OVA-IgE у мишей з підвищеним рівнем IgE шляхом введення кисломолочного продукту, що проводиться в прикладі 3.

Фіг.4 являє собою графік, який показує результати експериментів придушення рівня OVA-IgE у мишей з підвищеним IgE шляхом введення кисломолочного продукту, що проводиться в прикладі 4.

Фіг.5 являє собою графік, який показує результати експериментів придушення алергічних симптомів у людей шляхом введення кисломолочного продукту, що проводиться в прикладі 5.

Фіг.6 являє собою графік, який показує результати експериментів придушення алергічних симптомів у людей шляхом введення кисломолочного продукту, що проводиться в прикладі 5.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом містить як активний інгредієнт молочнокислу бактерію, яку вибирають з групи, що складається з молочнокислої бактерії виду *Lactobacillus acidophilus*, молочнокислої бактерії виду *Lactobacillus fermentum* і їх комбінацій.

Молочнокисла бактерія виду *Lactobacillus acidophilus* може особливо переважно бути штамом *Lactobacillus acidophilus* CL0062 [депонованим в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan під номером зберігання FERM BP-4980 від 4 березня 1994], штамом *Lactobacillus acidophilus* CL92 [депонованим в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером зберігання FERM BP-4981 від 4 березня 1994], або їх комбінацією. Молочнокисла бактерія виду *Lactobacillus fermentum* може особливо переважно бути штамом *Lactobacillus fermentum* CP34 (депонованим в Міжнародному Патентному Депозитарії організмів під номером зберігання [FERM BP-8383 від 23 травня 2002]). Ці три бактерійні штами зберігаються відповідно до Будапештської угоди про міжнародне депонування мікроорганізмів з метою процедури Патентування. Всі обмеження суспільної доступності штаму *Lactobacillus fermentum* CP34 будуть остаточно зняті після отримання патенту. Штами *Lactobacillus acidophilus* CL0062 і CL92 вже є загальнодоступними.

Штам *Lactobacillus acidophilus* CL0062 має наступні бактеріологічні характеристики: (Морфологічні властивості)

- 1) Форма клітини; паличка,
- 2) Рухомість; ні,
- 3) Утворення спор; ні,
- 4) Забарвлення по Граму; позитивне (Фізіологічні властивості)
- 1) Продукція каталази; негативна
- 2) Продукція індолу; негативна,
- 3) Відновлення нітрату; негативне,
- 4) Аеробний ріст; факультативні анаероби,
- 5) Зростання при 15°C; ні,
- 6) Утворення DL-молочної кислоти з глюкози шляхом гомомолочнокислого бродіння без утворення газів,
- 7) Утворення кислот з вуглеводів

Глюкоза; +	Мелібіоза; +
Лактоза; +	Рафіноза; +
Маноза; +	Маніт; -
Фруктоза; +	Сорбіт; -
Галактоза; +	Ескулін; +
Сахароза; +	Саліцин; +
Арабіноза; -	N-ацетилглюкозамін; +
Мальтоза; +	Амигдалін; +
Ксилоза; -	Гентіобіоза; +
Рамноза; -	Мелізитоза; -
Целобіоза; +	Декстрин; +
Трегалоза; +	Крохмаль; -

Штам *Lactobacillus acidophilus* CL92 має наступні бактерійні характеристики: (Морфологічні властивості)

- 1) Форма клітини; паличка,
- 2) Рухомість; ні,
- 3) Утворення спор; ні,
- 4) Забарвлення по Граму; позитивне (Фізіологічні властивості)
- 1) Продукція каталази; негативна
- 2) Продукція індолу; негативна,
- 3) Відновлення нітрату; негативне,
- 4) Аеробний ріст; факультативні анаероби,
- 5) Зростання при 15°C; ні,
- 6) Утворення DL-молочної кислоти з глюкози шляхом гомомолочнокислого бродіння без утворення газів,
- 7) Утворення кислот з вуглеводів

Глюкоза; +	Мелібіоза; +
Лактоза; +	Раффіноза; +
Маноза; +	Маніт; -
Фруктоза; +	Сорбіт; -
Галактоза; +	Ескулін; +
Сахароза; +	Саліцин; +
Арабіноза; -	N-ацетилглюкозамін; +
Мальтоза; +	Амигдалін; +
Ксилоза; -	Гентіобіоза; +
Рамноза; -	Мелізитоза; -
Целобіоза; +	Декстрин; -
Трегалоза; +	Крохмаль; -

Штам *Lactobacillus fermentum* CP34 має наступні бактерійні характеристики: (Морфологічні властивості)

- 1) Форма клітини; паличка,
- 2) Рухомість; ні,
- 3) Утворення спор; ні,
- 4) Забарвлення по Граму; позитивне (Фізіологічні властивості)
- 1) Продукція каталази; негативна
- 2) Аеробний ріст; факультативні анаероби,
- 3) Утворення DL-молочної кислоти з глюкози шляхом гомомолочнокислого бродіння без утворення газів (+),
- 4) Розкладання вуглеводів

Арабіноза; -	Целобіоза; -
Ксилоза; -	Лактоза; +
Мелібіоза; -	Трегалоза; -
Рамноза; -	Амигдалін; -
Рибоза; +	Рафіноза; -
Глюкоза; +	Мелізитоза; -
Маноза; -	Маніт; -
Фруктоза; +	Сорбіт; -
Сахароза; +	Ескулін; -
Мальтоза; +	Саліцин; -

Вміст вищезазначених молочнокислих бактерій в протиалергічному агенті згідно з даним винаходом особливо не обмежений, і може відповідним чином бути встановлений в залежності від зручності отримання і переважного добового дозування. Наприклад, коли агент знаходиться в рідкій композиції, переважний вміст бактерій складає від  $1 \times 10^7$  клітин/мл до  $1 \times 10^{10}$  клітин/мл.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом може необов'язково містити інші компоненти, на додаток до молочнокислих бактерій. Приклади таких інших компонентів можуть включати домішки, такі як допоміжні речовини або компоненти середовища, які будуть обговорені нижче.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом може бути отриманий шляхом культивування молочнокислих бактерій в середовищі.

Будь-яке середовище може бути використане для культивування, якщо молочнокислі бактерії можуть в ньому рости; може бути використане молоко тварин, збиране молоко, молочна сироватка, середовище MRS, середовище GAM, середовище BL, Briggs Liver Broth або інше синтетичне середовище. Температура для культивування може складати від 25°C до 50°C, переважно від 35°C до 42°C. Час культивування може складати від 3 годин до 48 годин, переважно від 8 годин до 12 годин. Культуральне середовище може бути використане як протиалергічний агент згідно з даним винаходом з або без подальшої обробки. Наприклад, бактерійні клітини, зібрані з культивованого середовища шляхом центрифугування або фільтрування, їх ліофілізований продукт, їх продукт, оброблений теплом, або подрібнені бактерійні клітини можуть бути використані як протиалергічний агент згідно з даним винаходом. Крім того, бактерійні клітини у вищезгаданих формах можуть, крім того, бути приготовані або змішані з різними харчовими речовинами, такими як напої, таблетки, пасти або хліб, перед застосуванням як протиалергічний агент згідно з даним винаходом.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом може вводиться будь-яким шляхом, але пероральне введення є переважним. Доза може бути не нижчою, ніж  $2 \times 10$  клітин на день, переважно  $2 \times 10^{10}$  клітин на день для перорального введення людині. Дана доза агента може вводиться в однократній дозі або у вигляді множини доз на день.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом ефективно придушує рівень IgE, що буде продемонстровано в прикладах, і очікується, що він буде високобезпечним, оскільки активним інгредієнтом даного агента є бактерійні клітини, що приймаються як їжа.

Спосіб для полегшення алергії відповідно до даного винаходу включає стадію введення ефективної дози протиалергічного агента, згаданого вище, суб'єкту, потребуючому такого полегшення. Суб'єктом можуть бути тварини, такі як людина або інші ссавці.

Протиалергічний агент згідно з даним винаходом ефективно придушує рівень IgE в живих організмах, його легко приймати і він є високобезпечним. Отже, даний агент є застосовним для полегшення алергії, що включає надмірний рівень IgE.

#### Приклади

Далі даний винахід буде пояснений більш детально з посиланнями на приклади, які є тільки ілюстративними і не призначені для обмеження даного винаходу.

#### Приклад 1

(Отримання мишей з підвищеним IgE)

Самців мишей BALB/c отримували від Charles River Japan, і вирощували з вільним доступом до CE-2 (CLEA Japan, Inc.) як харчування. 10мкг яєчного альбуміну (скороченого як OVA нижче, що виробляється SIGMA CHEMICAL CO.) і 2мг гідроксиду алюмінію (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) як допоміжна речовина, суспендували в 300мкл фізіологічного розчину. Десяти з вищезгаданих мишей у віці шести тижнів вводили інтраперитонеально дану суспензію на перший день сенсibilізації і на 4 день для первинної сенсibilізації. Для повторної сенсibilізації, ніс кожної миші змочували розчином OVA антигену, що містить 25мг OVA/мл фізіологічного розчину протягом трьох секунд і цю операцію змочування повторювали три рази як один цикл. Два цикли змочування проводили на день і щоденне змочування проводили з 10 дня по 16 день для отримання мишей з підвищеним IgE.

Зразки крові отримували з очних вен мишей з підвищеним IgE на перший день і день 17 сенсibilізації і отримували зразки сироватки. OVA-специфічні IgE (скорочені як OVA-IgE нижче), загальний IgE і загальний IgG в зразках сироватки вимірювали відповідно до способів, описаних нижче. Результати показані на Фіг.1(a)-1(c).

З результатів, показаних на Фіг.1(a)-1 (c) зрозуміло, що підвищення рівня загального IgE і OVA-IgE в крові було значно вищим, ніж таке підвищення рівня IgE в результаті сенсibilізації. Відповідно, була створена модель алергії миші, де рівень IgE і антигенспецифічний IgE в крові були підвищені без змін всієї імунної системи.

(Вимірювання OVA-IgE крові)

Рівень OVA-IgE в крові вимірювали методом ELISA (сендвіч-методом). 100мкл фізіологічного розчину, що містить 10мкг/мл овечого поліклонального антитіла проти мишачого IgE (торгове найменування AAM11, що виробляється DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) додавали до кожної ямки 96-ямкового імунопланшета (від CORNING INCORPORATED) і інкубували протягом ночі при 4°C. Планшет промивали три рази фосфатним буфером (що містить 137мМ NaCl, 2,7мМ KCl, 8,1мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, і 1,5мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, скороченому як PBS нижче), покривали 0,5% казеїном-PBS і інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета три рази PBS 100мкл 1/10 розведеного PBS зразка сироватки додавали до кожної ямки, і піддавали реакції протягом ночі при 4°C. Після промивання планшета чотири рази PBS, 100мкл 0,5% розчину казеїну-PBS, що містить 10мкг/мл OVA, який був біотинізований з використанням набору для біотинілювання (що виробляється AMERICAN QUALEX INTERNATIONAL INC.) (біотин-мічений OVA) додавали до кожної ямки і піддавали реакції протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета п'ять разів PBS, 100мкл розчину PBS, що містить 1мкг/мл стрептавідин-пероксидази (що виробляється SIGMA CHEMICAL Co.) і 0,5% казеїну додавали до кожної ямки і піддавали реакції протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання планшета п'ять разів 0,1% Твін 20 в PBS, 100мкл 0,2М лимоннокислого буфера (отриманого шляхом змішування 0,2М лимонної кислоти і 0,2М цитрату тринатрію і доведення рН до 5), що містить 600мкг/мл 2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонові кислоти) (скороченої як ABTS нижче, що виробляється BOEHRINGER MANNHEIM) і 0,006% перекису водню, додавали до кожної ямки і накривали протягом 3 годин при 37°C для забарвлення. Після завершення реакції, вимірювали OD<sub>405</sub> і OD<sub>492</sub> і істинну оптичну густину і отримували значення OD<sub>405</sub> - значення OD<sub>492</sub>.

Зразок крові отримували від миші, яка отримувала ін'єкцію інтраперитонеально 25мг/мл OVA в фізіологічному розчині п'ять разів (один раз на тиждень). Із зразка кров отримувала зразок сироватки як стандартну сироватку. Дану стандартну сироватку розводили 1/10 PBS і отримане розведення далі покроково розводили в два рази неімунізованою сироваткою для отримання робочих розведень. Дане робоче розведення піддавали вимірюванням значень забарвлення відповідно до вищезгаданої методики, для отримання робочої кривої. На основі даної робочої кривої рівень OVA-IgE в зразках сироватки отримували як відносні кількості по відношенню до рівня OVA-IgE в стандартній сироватці, що розцінюється як 1.

(Вимірювання загального IgE в крові)

50мкл фізіологічного розчину, який містить 10мкг/мл овечого поліклонального антитіла проти мишачого IgE (торгове найменування AAM11, що виробляється DAINIPPON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) додавали до кожної ямки 96-ямкового імунопланшета (що виробляється CORNING

INCORPORATED) і інкубували протягом ночі при 4°C. Планшет промивали три рази PBS, покривали 0,5% казеїном-PBS і інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета три рази PBS, 50мкл 1/25 розведення зразка сироватки в 0,5% казеїні-PBS додавали до кожної ямки, і піддавали реакції протягом ночі при 4°C. Після промивання планшета чотири рази PBS, 50мкл розчину PBS, що містить 2мкг/мл міченого біотином антитіла проти мишачого IgE (що виробляється YAMASA CORPORATION) і 0,5% казеїну додавали до кожної ямки і піддавали реакції протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета п'ять разів 0,1% Твін 20 в PBS, 50мкл розчину PBS, що містить 1мкг/мл стрептавідин-пероксидази і 0,5% казеїну додавали до кожної ямки, і піддавали реакції протягом 1 години при кімнатній температурі. Після промивання планшета п'ять разів 0,1% Твін 20 в PBS 50мкл 0,2М лимоннокислого буфера (рН5), що містить 300мкг/мл ATBS і 0,006% перекису водню додавали до кожної ямки і накривали протягом 20-30 хвилин при кімнатній температурі для реакції. Потім вимірювали OD<sub>405</sub>.

З іншого боку, мишачий анти-DNP-IgE (що виробляється YAMASA CORPORATION), замість зразків сироватки, розчиняли в 0,5% казеїні-PBS в різних концентраціях, і піддавали таким же процедурам, що вказані вище, для отримання робочої кривої. На основі цієї робочої кривої розраховували рівні загального IgE в зразках сироватки.

(Вимірювання загального IgG в крові)

50мкл фізіологічного розчину, який містить 1мкг/мл козячого антитіла проти мишачого IgE (H+L) (торгове найменування 62-6500, що виробляється ZYMED LABORATORIES, INC.) додавали до кожної ямки 96-ямкового планшета (що виробляється CORNING INCORPORATED) і інкубували протягом ночі при 4°C. Планшет промивали три рази PBS, покривали 0,5% казеїном-PBS і інкубували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета три рази PBS, 50мкл 1/1000 розведень зразка сироватки в 5% казеїні-PBS додавали до кожної ямки і піддавали реакції протягом ночі при 4°C. Після промивання планшета чотири рази PBS, 50мкл розчину PBS, що містить 2мкг/мл антитіла проти мишачого IgG(γ), міченого пероксидазою (що виробляється CAPPEL LABORATORIES, INC.) і 0,5% казеїну додавали до кожної ямки, і піддавали реакції протягом 2 годин при кімнатній температурі. Після промивання планшета п'ять разів 0,1% Твін 20 в PBS, 50мкл 0,2М лимоннокислого буфера (рН5), що містить 300мкг/мл ABTS і 0,006% перекису водню додавали до кожної ямки і накривали протягом 20-30 хвилин при кімнатній температурі для реакції. Вимірювали OD<sub>405</sub>.

З іншого боку, очищений мишачий IgG (що виробляється CAPPEL LABORATORIES, INC.) замість зразків сироватки розчиняли в 0,5% казеїні-PBS в різних концентраціях і піддавали таким же процедурам, як описано вище, для отримання робочої кривої. На основі цієї робочої кривої розраховували рівень загального IgG в зразках сироватки.

Приклад 2  
(Порівняння ефекту різних молочнокислих бактерій)

Кожний з штамів молочнокислих бактерій, показаних в таблиці 1, заздалегідь культивували в середовищі MRS протягом ночі при 37°C, і клітини збирали центрифугуванням при 3000об./хв. протягом 10 хвилин. 9% (мас/об.) відновленого збираного молока (що містить 0,1% (мас/об.) екстракту дріжджів (що виробляється DIFCO)) зброджували із зібраними клітинами при 37°C поки молоко не згорталось. Після зброджування вимірювали загальне число клітин в кожному кисломолочному продукті. Результати показані в таблиці 1.

Таблиця 1

Штам	Загальна кількість клітин (клітини/мл)
Lactobacillus acidophilus CL92 (BP-4981)	$1,9 \times 10^8$
Lactobacillus bulgaricus CP1812	$1,5 \times 10^8$
Lactobacillus fermentum CP34	$5,3 \times 10^8$
Lactobacillus helveticus CP790	$2,4 \times 10^8$
Lactobacillus johnsonii CP2551	$2,7 \times 10^8$
Lactobacillus plantarum CP2172	$5,9 \times 10^8$
Lactobacillus rhamnosus ATCC53103	$1,0 \times 10^8$

Далі отримували мишей з підвищеним IgE таким же чином, як в прикладі 1 і OVA-IgE в крові вимірювали на день 18 сенсibilізації таким же чином, як в прикладі 1. Мишей поділяли на групи по 10 мишей в групі з схожим середнім рівнем OVA-IgE крові. З дня 19 по день 21 сенсibilізації різні кисломолочні продукти, показані вище, незброджене 9% (мас/об.) відновлене збиране молоко або незброджене 9% (мас/об.) відновлене збиране молоко, що містить 750мкг циклофосфаміду вводили шлунково кожній групі мишей в дозах 1мл на день протягом трьох днів. На день 22 сенсibilізації зразки крові мишей були отримані з очних вен і отримані зразки сироваток. Вимірювали рівень OVA-IgE і загальну IgG крові. Як контроль зразок крові миші, яка була таким же чином сенсibilізована, але не отримувала кисломолочного продукту або подібного, отримували таким же чином і вимірювали рівні OVA-IgE і загального IgG. Результати показані на Фіг.2.

Як показано на Фіг.2, в групах мишей, яким давали молоко, зброджене Lactobacillus acidophilus або Lactobacillus fermentum, достовірний інгібувальний ефект ( $p < 0,01$ ) на рівень OVA-IgE спостерігали, в порівнянні з групою, що отримувала незброджене збиране молоко. Не спостерігалось достовірної різниці в рівні загального IgG в крові (не показано).

#### Приклад 3

Відповідно до методики прикладу 2, крім того, що використовували штами молочнокислих бактерій, показані в таблиці 2. Результати вимірювання загальної кількості клітин в кожному кисломолочному продукті показані в таблиці 2. Результати вимірювань OVA-IgE в крові показані на Фіг.3.

Таблиця 2

Штам	Загальна кількість клітин (клітини /мл)
Lactobacillus acidophilus CL0062 (BP-4980)	$4,4 \times 10^8$
Lactobacillus gasseri CP2209	$4,3 \times 10^8$
Lactobacillus reuteri ATCC23272	$9,6 \times 10^8$
Bifidobacterium breve CP2425	$1,3 \times 10^8$

Як показано на Фіг.3, в групі мишей, яким давали молоко, зброджене Lactobacillus acidophilus, спостерігали достовірний інгібувальний ефект ( $p < 0,01$ ) на рівень OVA-IgE в порівнянні з групою, що отримувала незброджене збиране молоко. Не спостерігали достовірних відмінностей в рівні загального IgG в крові (не показано).

#### Приклад 4

(Підтвердження ефектів в більш низькій дозі)

Штам Lactobacillus acidophilus CL92 і штам Lactobacillus fermentum CP34 відповідно культивували в середовищі MRS протягом ночі при 37°C і клітини збирали центрифугуванням при 3000об./хв. протягом 10 хвилин. Зібрані клітини культивували в середовищі MRS протягом ночі при 37°C і клітини збирали центрифугуванням при 3000об./хв. протягом 10 хвилин. Кількість клітин вимірювали для кожного штаму і клітини суспендували в 9% збираному молоці в концентрації  $1 \times 10^6$  клітин на 1мл для отримання суспензій.

Далі, мишей з підвищеним IgE отримували таким же чином, як в прикладі 1 і OVA-IgE в крові вимірювали на день 18 сенсibilізації таким же чином, як в прикладі 1. Мишей ділили на групи по 10 мишей в групі з схожим середнім рівнем OVA-IgE крові. З дня 19 до 21 сенсibilізації вищезгадані суспензії вводили шлунково кожній групі мишей в дозах 1мл на день протягом трьох днів. На день 22 сенсibilізації зразки крові мишей отримували з очних вен і отримували зразки сироватки. Вимірювали рівні OVA-IgE і загальну IgE в крові. Результати показані на Фіг.4.

Як показано на Фіг.4, в обох групах мишей, що отримували штам Lactobacillus acidophilus CL92 або Lactobacillus fermentum CP34, спостерігали достовірний інгібувальний ефект на рівень OVA-IgE в порівнянні з групою, якій давали незброджене збиране молоко. Не спостерігали достовірної різниці в рівні загального IgG в крові (не показано).

Швидкість зниження d рівня OVA-IgE, коли вводили кожну суспензію, отримували по формулі  $d = 1 - (b/a)$ , де a являє собою стандартне відношення рівня OVA-IgE, при споживанні незбродженого збираного молока і b являє собою стандартне відношення OVA-IgE, при споживанні кожної суспензії. Позначаючи концентрацію клітин суспензії, що вводиться мишам s (клітин/мл) і приймаючи, що s пропорційна швидкості зниження d, кількість клітин x (клітини/мл) в суспензії, необхідну для зниження рівня OVA-IgE наполовину, в даній експериментальній системі отримували по формулі  $x = (s \cdot 0,5)/d$ . Використовуючи цю формулу, отримували кількість клітин x для кожного бактерійного штаму, що використовується в прикладах 2 і 3. Результати показані в таблиці 3.

Таблиця 3

Штам	Необхідна кількість клітин (клітини/мл)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL92 (BP-4981)	$1,0 \times 10^6$
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CP1812	$2,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus fermentum</i> CP34	$1,4 \times 10^6$
<i>Lactobacillus helveticus</i> CP790	$3,3 \times 10^8$
<i>Lactobacillus johnsonii</i> CP2551	$3,5 \times 10^8$
<i>Lactobacillus plantarum</i> CP2172	$7,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC53103	$2,9 \times 10^8$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CL0062 (BP-4980)	$5,0 \times 10^8$
<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2209	$3,1 \times 10^9$
<i>Lactobacillus reuten</i> ATCC23272	$3,3 \times 10^9$
<i>Bifidobacterium breve</i> CP2425	$1,1 \times 10^9$

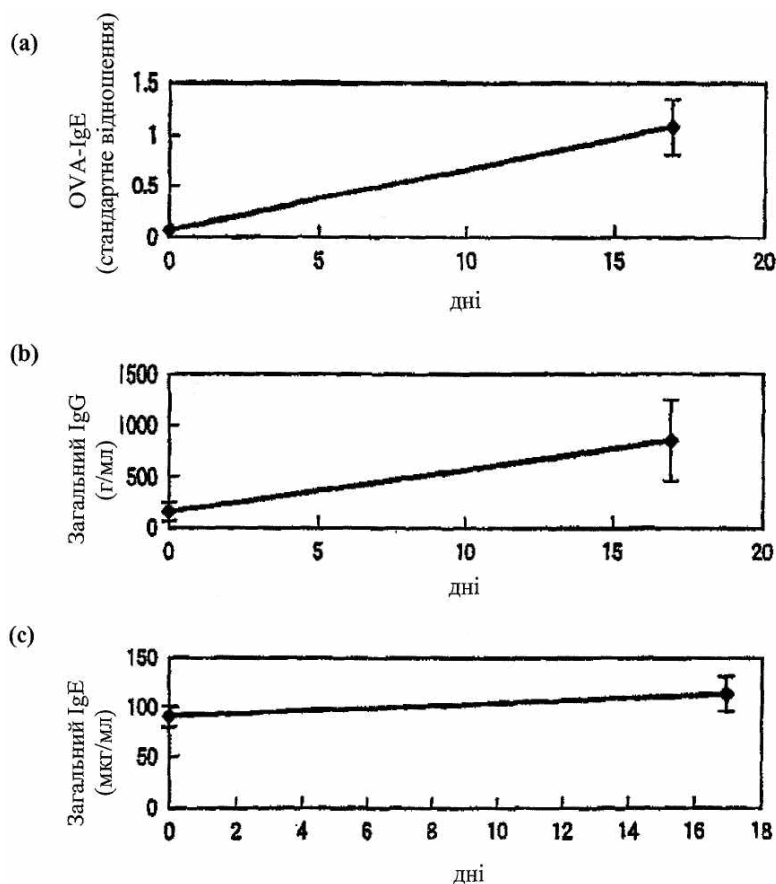
## Приклад 5

(Клінічний ефект у людей)

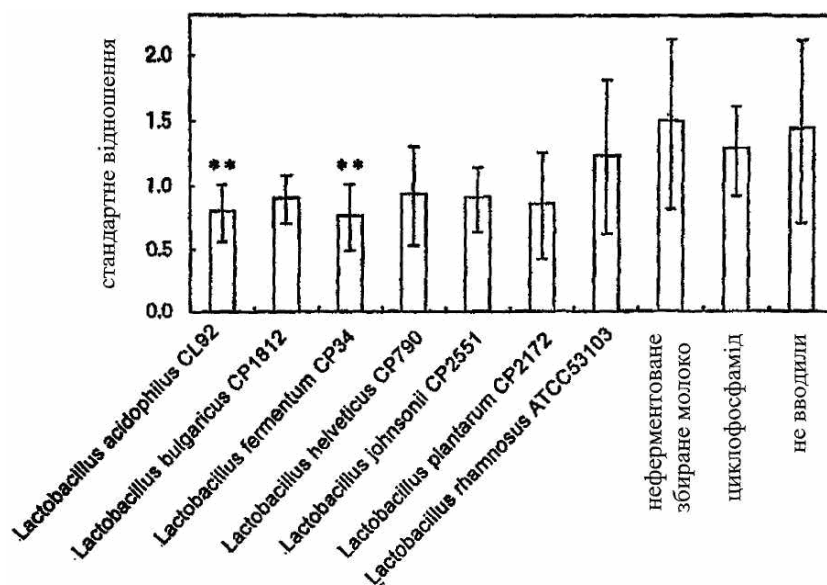
Тринадцяти суб'єктам, які страждають від цілорічного алергічного риніту (середній вік  $22,9 \pm 6,1$ , 6 чоловіків і 7 жінок) давали, після 2 тижнів періоду спостереження, 100мл/день кисломолочного продукту, що містить від  $8,0 \times 10$  до  $1,3 \times 10^9$  клітин/мл штаму *Lactobacillus acidophilus* CL92 протягом 4 тижнів. В інтервалах оцінювали анкети про суб'єктивні симптоми і на основах відповідей симптоми

оцінювали відповідно до «Класифікації тяжкості алергічного риніту» прийнятої Японським товариством алергології. Симптоми риніту діагностували в періоди відповідно до керівництва Японського товариства алергології. Зразки крові отримували від суб'єктів з інтервалами, і вимірювали титри IgE в крові. Крім того, під час періоду дослідження записували найнижчу температуру дня. Тяжкість (міра) закладеності носа у суб'єкта, частота чхання і найнижча температура дня протягом періоду дослідження показані на Фіг.5 і 6.

Протягом періоду дослідження, найбільш низька температура дня коливалася значно від  $14^\circ\text{C}$  на перший день споживання (15 листопада) до  $3,7^\circ\text{C}$  в останній день споживання (13 грудня) більш ніж на  $10^\circ\text{C}$ . Навіть в таких умовах, що погіршують симптоми риніту, закладеність носа мала тенденцію до зменшення через два тижні після початку споживання (тест Вілкоксона:  $p < 0,1$ ), і значне поліпшення спостерігали через чотири тижні після початку (тест Вілкоксона:  $p < 0,05$ ). Частота чхання також мала тенденцію до зниження через три тижня після початку споживання (тест Вілкоксона:  $p < 0,1$ ). Протягом періоду споживання спостерігали тенденцію до зниження частоти чхання, ослаблення набряку внутрішньої носової раковини і зниження титру загального IgE в крові.

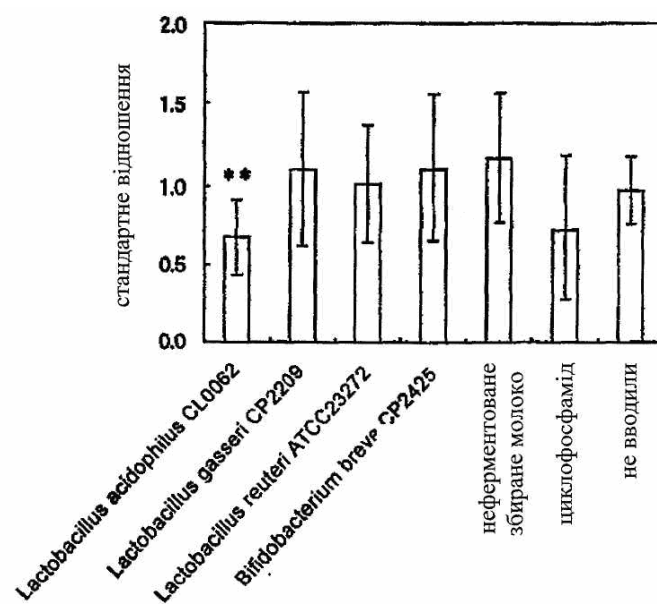


Фіг. 1



\*\*:  $p < 0.01$  по відношенню до неферментованого збираного молока

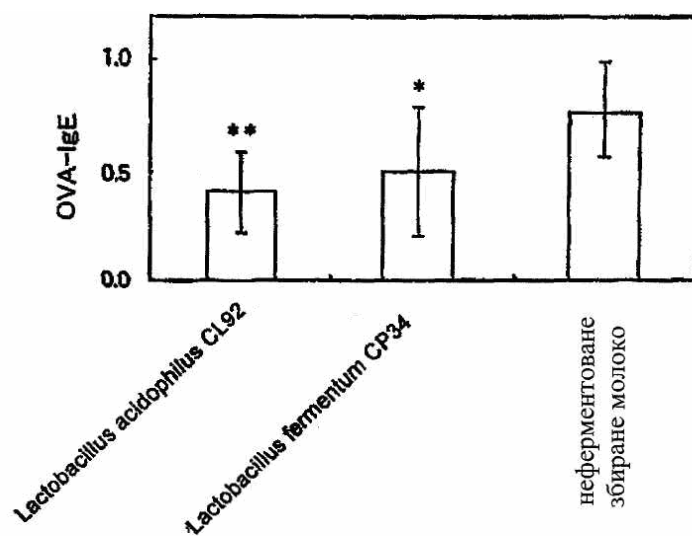
Фіг. 2



\*\*:  $p < 0.01$  по відношенню до неферментованого збираного молока

Фіг. 3

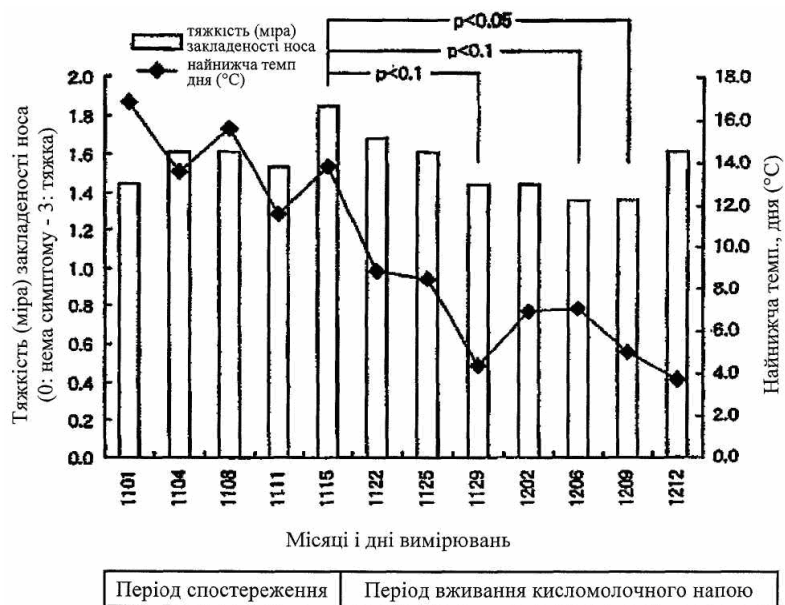




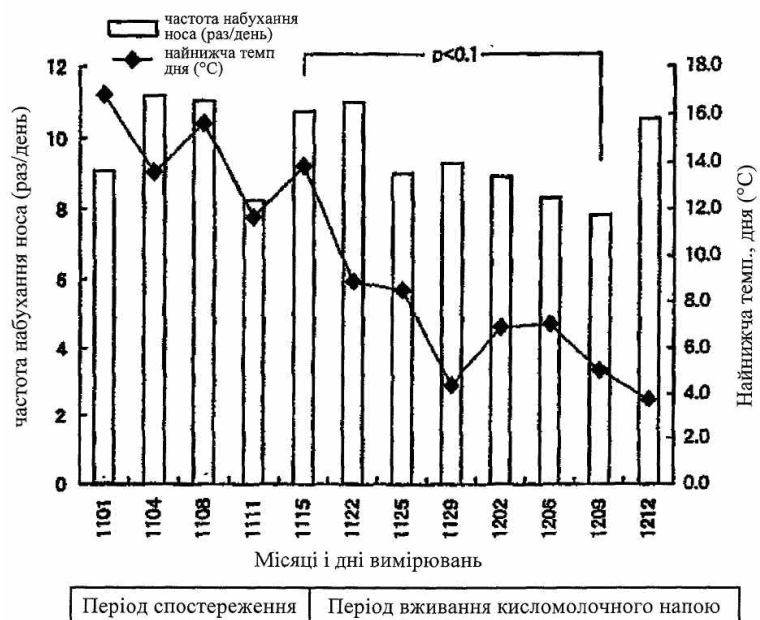
\*:  $p < 0.05$  по відношенню до неферментованого збираного молока

\*\* :  $p < 0.01$  по відношенню до неферментованого збираного молока

Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6