УКРАЇНА

(19) UA (11) 115520 (13) C2

(51) МПК
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ЕКОНОМІЧНОГО РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2013 02550**

(22) Дата подання заявки: **13.09.2011**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.11.2017**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10176578.2, 61/412,964**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **14.09.2010, 12.11.2010**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **10.06.2013, Бюл.№ 11**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.11.2017, Бюл.№ 22**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT **PCT/EP2011/065877, 13.09.2011**

(72) Винахідник(и):
Кісс Герберт (AT),
Кніфель Вольфґанґ (AT),
Доміґ Конрад Дж. (AT),
Унґер Френк М. (AT),
Вернштейн Гельмут (AT)

(73) Власник(и):
ГСО ГЕЛС КЕА ҐМБГ,
Nibelungengasse 1-3/38, A-1010 Vienna, Austria (AT)

(74) Представник:
Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30

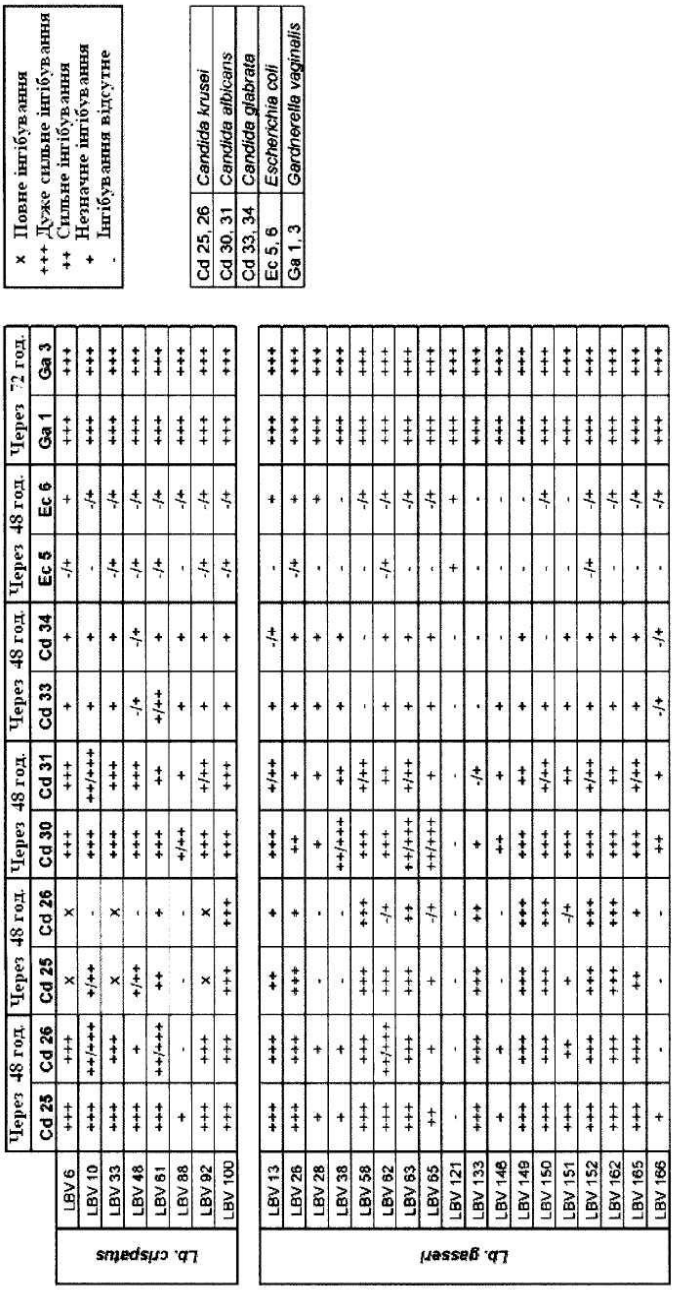
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2006/038869 A1, 13.04.2006
EHRSTROM S. ET. AL. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis / MICROBES AND INFECTION, ELSEVIER, PARIS, FR. - 01.09.2010. - vol. 12, № 10. - P. 691 - 699
BARRONS R. ET. AL. Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: A review / CLINICAL THERAPEUTICS, EXCERPTA MEDICA, PRINCETON, NJ, US. - 01.03.2008. - vol. 30, № 3. - P. 453 - 468
FALAGAS M. E. ET. AL. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis / CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION: THE OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. - 07.2007. - vol. 13, № 7. - P. 657 - 664
CZAJA CHRISTOPHER A. ET. AL. Phase I trial of a Lactobacillus crispatus vaginal suppository for prevention of recurrent urinary tract infection in women / INFECTIOUS DISEASES IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY, WILEY-LISS, NEW YORK, NY, US. - 01.01.2007. - vol. 2007. - P. 35387
HEMMERLING ANKE ET. AL. Phase 1 dose-ranging safety trial of Lactobacillus crispatus CTV-05 for the prevention of bacterial vaginosis / SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES. 09.2009. - vol. 36, № 9. - P. 564 - 569
KISS H. ET. AL. Vaginal Lactobacillus microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy / BJOG: AN INTERNATIONAL JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY. - 11.2007. - vol. 114, № 11. - P. 1402 - 1407
ANTONIO M. A. D. ET. AL. THE IDENTIFICATION OF VAGINAL LACTOBACILLUS SPECIES AND THE DEMOGRAPHIC AND MICROBIOLOGIC CHARACTERISTICS OF WOMEN COLONIZED BY THESE SPECIES / JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL. - 01.12.1999. - vol. 180, № 6. - P. 1950 - 1956

UA 115520 C2

(54) ДІЄТИЧНА АБО ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ НА ОСНОВІ ЛАКТОБАЦИЛ ДЛЯ ВАГІНАЛЬНОГО АБО ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ

(57) Реферат:

Винахід стосується дієтичної або фармацевтичної композиції, що містить комбінацію принаймні чотирьох автохтонних відносно до людини штамів *Lactobacillus crispatus* DSM 22566, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 22560, *Lactobacillus jensenii* DSM 22567, *Lactobacillus gasseri* DSM 22583 для перорального та вагінального введення; комбінації вказаних штамів та продукту, що містить вказані композиції.



Фіг. 1

Заявлений винахід стосується композицій для перорального та вагінального введення лактобацил людини та їх застосуванні у фізіологічному відновленні вагінальної флори, фізіологічному підтриманні флори Lactobacillus в умовах патологічної нестачі продукування лактобацил, лікуванні безсимптомного бактеріального вагінозу та у запобіганні передчасних пологів, спричинених бактеріальним вагінозом.

У здоровій жіночій піхві переважно мешкають різні види Lactobacillus, що відіграють важливу роль у захисті жінки від урогенітальної інфекції. Вони мають здатність прикріплюватися до вагінального епітелію, інгібуючи адгезію та зростання патогенів, руйнують живильні речовини, що в іншому випадку є доступними до патогенів та впливають на імунну відповідь хазяїна та мікрооточення [1,2]. Найголовнішим є те, що лактобацили метаболізують глікоген, що містять клітини зводу піхви (fornix vaginae) з отриманням молочної кислот и у вигляді кінцевого продукту. Отже, у здоровій піхві, значення pH сягає 4.0-4.5, при якому розвиток багатьох патогенів є неможливим.

Вважаючи те, що вагінальні інфекції є важливим механізмом захворювання, відповідального за передчасні пологи [3], зберігання природного, здорового балансу флори Lactobacillus у піхві є особливо важливим під час вагітності. Нестача лактобацил може зруйнувати мікробний баланс у піхві, що часто приводить до синдрому бактеріального вагінозу [4,5], який може бути пов'язаний з кількісним та якісним зсувом мікрофлори від лактобацил, що там звичайно зустрічаються до змішаної флори, де домінують анаеробні бактерії [6]. Згідно з Nugent et al. [7], бактеріальний вагіноз відрізняється повною втратою лактобацил та супутнім зростанням кількості грам-варіабельних та грам-негативних паличок, перш за все Gardnerella vaginalis, а також видів Bacteroides, Prevotella та Mobiluncus [4,5]. З іншого боку, втрата вагінальних лактобацил також робить невагітних жінок сприйнятливими до інфекції, яка може призвести до ендометриту або навіть до запальних захворювань тазових органів [8, 9].

Протягом менопаузи відбувається інволюція з жіночих статевих шляхів, яка, можливо, є невід'ємною частиною протягом строку біологічного життя, взаємопов'язаного з нейрогіпофізарними ендокринними осями [10]. Головним універсальним зміненням тут є піхвова атрофія [10]. Сухість піхви, печіння, свербіж та диспарейнія також є частими скаргами разом з дизурією, частим сечовипусканням та рецидивуючими інфекціями. Сечостатева атрофія протягом менопаузи пов'язана зі зниженням секреції естрогенів, що супроводжується вичерпанням лактобацил та посиленням колонізації патогенними мікроорганізмами, пов'язаними з бактеріальним вагінозом та інфекціями сечовивідних шляхів [11]. Естріолова терапія піхви у жінок після менопаузи зменшує колонізацію E. coli та збільшує кількість лактобацил, в результаті чого частота повторних сечових та статевих інфекцій значно знижується [12].

Певні види Lactobacillus, як було описано, заселюють піхву різним чином. Вважається, що протягом деякого часу у флорі здорової жінки дітородного віку домінують Lactobacillus acidophilus та Lactobacillus fermentum, після чого слідують Lactobacillus brevis, Lactobacillus jensenii та Lactobacillus casei [13]. У своїх дослідженнях лактобацильної піхвової флори [14], Vasquez et al. знайшли, що у вагінальній флорі більшості учасників досліджень домінували одиничні види Lactobacillus з присутністю інших видів, що демонструють широку індивідуальну мінливість. Видами, що найбільш часто зустрічалися, були L. crispatus, L. gasseri, L. Iners та L. jensenii. У інших дослідженнях, що проводили Reid et al., штамами Lactobacillus, які найчастіше виділяли були L. jensenii, L. acidophilus, L. casei та L. gasseri [15]. У недавніх дослідженнях, що проводили в Австрії, переважаючими видами Lactobacillus, виявленими шляхом вид-специфічної ПЛР були L. crispatus, L. gasseri, L. jensenii та L. Rhamnosus, яких застосовували для отримання результатів ДНК-фінгерпринтингу. Отже, L, crispatus, L. gasseri, L. jensenii та L. rhamnosus можна розглядати у якості переважаючих видів лактобацил у піхви [16].

Для усунення недоліків лактобацильної флори (та, отже, для захисних можливостей вагінальної флори), найбільш поширеним шляхом заміщення лактобацил є введення піхвових супозиторіїв, що містять лактобацили. Деякі автори вважають, що місцеве застосування лактобацил є безпечним та перспективним шляхом лікування для запобігання вагінозу та рецидивних інфекцій сечовивідних шляхів [17].

В той час, коли вагінальне введення є довготривалою та широко прийнятною практикою лактобацильного заміщення, пероральне застосування препаратів Lactobacillus являє собою новий концепт відновлення нормальної піхвової флори. Останні результати свідчать про те, що пробіотичні штами L. rhamnosus GR-1 (ATCC 55826) та L. reuteri RC-14 (ATCC 55845) можна приймати перорально на щоденній основі протягом двох місяців без будь-яких побічних проявів [18], що потім призвело до значного поліпшення мікрофлори піхви з точки зору збільшення присутності лактобактерій та зниження дріжджів та коліформних бактерій. У той час, як одна

група авторів дискутує про позитивний ефект з точки зору змін в слизовій оболонці або пробіотичних бактерій, що потрапляють до піхви з прямої кишки [18], інша група дослідників нещодавно показала за допомогою вид-специфічної ПЛР - ампліфікації, що L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 можуть бути доставлені у вагінальне середовище шляхом перорального введення [19].

Ці попередні висновки були обґрунтовані у рандомізованому, подвійному сліпому, плацебо-контрольованому дослідженні перорального введення лактобацил з метою поліпшення флори піхви жінок у постменопаузі. Жінки у постменопаузі з кількістю балів по шкалі Нугента, що дорівнювало 4-6 (що свідчить про нейтральну якість флори) були випадковим чином розподілені на дві групи на стадії збору початкових мазків з піхви. Протягом 14 діб, жінки у "групі втручання" отримували пробіотичні капсули, що містили 2.5 × 10^9 КУО (колонієутворюючих одиниць) кожного штаму ліофілізованих лактобацил L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 та жінки у контрольній групі отримували перорально раз на день плацебо. Останні вагінальні мазки були зібрані у першу добу після останнього введення пробіотиків. 21 з 35 суб'єктів (60 %) у групі втручання та 6 з 37 суб'єктів (16 %) у контрольній групі мали зменшення на щонайменш дві відмітки по шкалі Нугента (p=0.001). Середня різниця по шкалі Нугента між даними на початок та у кінці досліджень дорівнювала 3 у групі втручання та 0 у контрольній групі (p= 0.0001) [20]. У той час, як додавання L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 явно змінюють якість вагінальної флори від нейтральної до нормальної у 60 % жінок з " групи втручання ", одному пацієнту з цієї групи, що мав 8 балів по шкалі Нугента (показник бактеріального вагінозу) не вдалося поліпшити свій стан, незважаючи на пероральне застосування лактобацил. Це може свідчити про те, що введення самих тільки лактобацил втрачає терапевтичну ефективність у випадках бактеріального вагінозу. Звичайно, у терапевтичних дослідженнях, де ставили за мету лікування бактеріального вагінозу, застосовували пробіотичну комбінацію L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 у вигляді доповнення до хіміотерапії з метронідазолом або тинідазолом. Отже, у рандомізованих, подвійних сліпих плацебо-контрольованих дослідженнях приймали участь 125 жінок у пременопаузі, яким був поставлений діагноз бактеріального вагінозу. Суб'єкти були піддані лікуванню в метронідазолом (500 мг, двічі на день, від 1 до 7 днів досліджень) та випадковим чином розподілені для перорального отримання або L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 (1 × 10^9 КУО кожний) або плацебо (двічі на день від 1 до 30 дня досліджень). Первинним результатом було усунення бактеріального вагінозу (відсутність симптомів або ознак вагінозу) на 30 добу досліджень. З загальної кількості 106 суб'єктів, що закінчили лікування на 30 день досліджень, у групі з антибіотично-пробіотичним лікуванням відсоток суб'єктів, що вилікувалися сягав 88 % порівняно з 40 % у групі лікування з антибіотиком та плацебо (p<0.001). З суб'єктів, що залишилися, 30 % у групі плацебо мали бактеріальний вагіноз на відміну від жодного суб'єкту у пробіотичній групі, у той час, як 30 % у групі плацебо та 12 % у пробіотичній групі знаходилися у проміжній категорії. Таким чином, дослідження показали ефективне застосування лактобацил та антибіотику в усуненні бактеріального вагінозу у африканських жінок [21]. У подібних дослідженнях, що проводили у Бразилії, 64 жінки з діагнозом бактеріального вагінозу були випадковим чином розподілені для отримання одиничної дози тинідазолу (2 г), доповненої або двома капсулами плацебо або двома капсулами, що містили L. rhamnosus GR-1 та L. reuteri RC-14 (щоранково, протягом наступних чотирьох тижнів). У кінці лікування пробіотична група мала значно вищий рівень усунення бактеріального вагінозу (87.5 %), ніж група плацебо (50 %) (p=0.001). На додачу, згідно зі шкалою Нугента, більше жінок отримало оцінку " нормальних " вагінальних мікробіот у пробіотичній групі (75 % порівняно з 34.4 % у групі плацебо; p=0.011). Ці дослідження показали, що пробіотичні лактобацили можуть надати переваги жінкам, що знаходяться у інфекційному стані та приймають антибіотики. [22]. Сукупні результати клінічних досліджень свідчать про те, що у випадках бактеріального вагінозу покращення показників шкали Нугента не може бути досягнуто за допомогою прийнятних у обмежувальній частині Формули Винаходу препаратів при застосуванні самих лише пробіотиків без додавання антибіотиків або хіміотерапії. В даний час, автор заявленого винаходу винайшов нову пробіотичну композицію, що містить принаймні чотири штами Lactobacillus людського походження, яка здатна покращити вагінальну мікрофлору.

Нещодавно було несподівано знайдено, що у контрольованому дослідженні, пероральне двотижневе введення комбінації Lactobacillus crispatus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus jensenii та Lactobacillus gasseri, всупереч даним попередніх дослідників, що були отримані у відсутності антибіотиків, результати учасників по шкалі Нугента знизилися від середнього значення 8 (що свідчить про бактеріальний вагіноз) до середнього значення 6 (що свідчить про нейтральну якість мікрофлори).

Додатково, штами винаходу показали значне продукування зовнішньоклітинного перекису водню. Відомо, що перекис водню вбиває шкідливі мікроорганізми, тому це є важливою перевагою для композиції штамів лактобацил винаходу.

Отже, об'єктом заявленого винаходу є дієтична або фармацевтична композиція на основі мікробних культур, переважно ліофілізованих або рідких культур, як-то йогурт та інші ферментовані та/або неферментовані напої, що містять принаймні чотири автохтонні по відношенню до людини штами Lactobacillus, де вказані штами є вибраними від групи, що охоплює Lactobacillus crispatus LBV 88 (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus LBV 96 (DSM 22560), Lactobacillus jensenii LBV 116 (DSM 22567), Lactobacillus gasseri LBV 150N (DSM 22583), Lactobacillus crispatus LBV 10 (DSM 23744), Lactobacillus crispatus LBV 61 (DSM 23745), Lactobacillus jensenii LBV 8 (DSM 23746) Lactobacillus jensenii LBV 110 (DSM 23747), Lactobacillus rhamnosus LBV 69 (DSM 23748), Lactobacillus rhamnosus LBV 136 (DSM 23749), Lactobacillus gasseri LBV 162 (DSM 23750) та Lactobacillus gasseri LBV 62 (DSM 23751) разом з фармацевтично або харчувально прийнятними носіями, ад'ювантами та/або наповнювачами.

Вищезгадані дванадцять штамів були подані у DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganisms та Cell Cultures) на патентне зберігання.

Композиції відповідно до заявленого винаходу можуть містити додаткові харчові компоненти, що охоплюють, але без обмеження, принаймні один з наступних компонентів: вітаміни, антиоксиданти, як-то препарати на основі гранату або флавоноїдів сої, волокна (інулін та фруктоолігосахариди), мінеральні солі, фітопохідні, молоко (ферментоване або неферментоване молоко, в тому числі йогурт).

Препарат винаходу містить лактобацили людського походження. Ці лактобацили являють собою фізіологічну композицію.

Кожен з вищевказаних видів Lactobacillus є наявним з концентрацією у діапазоні 0.05 × 10^9 КУО/г - 30 × 10^9 КУО/г, переважно 0.5 × 10^9 КУО/г - 25 × 10^9 КУО/г.

Відповідно до бажаного втілення заявленого винаходу, композиція містить комбінацію штамів Lactobacillus, що складається з Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583). У цій бажаній композиції винаходу, Lactobacillus crispatus (DSM 22566) є наявним з концентрацією у діапазоні 3 × 10^9-22 x10^9 КУО/г, Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560) є наявним з концентрацією у діапазоні 3 × 10^9-22 × 10^9 КУО/г Lactobacillus jensenii (DSM 22567) є наявним з концентрацією у діапазоні 0,7 × 10^9-6 × 10^9 КУО/г, Lactobacillus gasseri (DSM 22583) є наявним з концентрацією у діапазоні 1 × 10^9-8 × 10^9 КУО/г.

У більш бажаному втіленні винаходу, композиції заявленого винаходу містять Lactobacillus crispatus (DSM 22566) з концентрацією 6 × 10^9 КУО/г, Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560) з концентрацією 6 × 10^9 КУО/г, Lactobacillus jensenii (DSM 22567) з концентрацією 1.2 × 10^9 КУО/г та Lactobacillus gasseri (DSM 22583) з концентрацією 1.8 × 10^9 КУО/г.

У іншому більш бажаному втіленні винаходу, композиція заявленого винаходу містить Lactobacillus crispatus (DSM 22566) з концентрацією 20 × 10^9 КУО/г, Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560) з концентрацією 20 × 10^9 КУО/г, Lactobacillus jensenii (DSM 22567) з концентрацією 4 × 10^9 КУО/г та Lactobacillus gasseri (DSM 22583) з концентрацією 6 × 10^9 КУО/г. Відповідно до бажаного втілення, дієтична або фармацевтична композиція заявленого винаходу має композицію, описану у Таблиці 1 або у Таблиці 2.

Таблиця 1

Композиція 1	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)
L. crispatus Lbv88 (DSM 22566)	15	1 × 10^9	1.5 ×10^9
L. rhamnosus LbV96 (DSM 22560)	15	1 × 10^9	1.5 × 10^9
L. jensenii LbV116(DSM 22567)	20	0.2 ×10^9	0.3 ×10^9
L. gasseri LbV 150N (DSM 22583)	9	0.3 × 10^9	0.45 × 10^9
Картопляний мальтодекстрин	161		
Нерозчинні харчові волокна	25		
Діоксид кремнію	5		
Загальна кількість	250		

Таблиця 2

Композиція 2	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)
L. crispatus Lbv88 (DSM 22566)	50	1×10^9	5×10^9
L. rhamnosus LbV96 (DSM 22560)	50	1×10^9	5×10^9
L. jensenii LbV116 (DSM 22567)	67	0.2×10^9	1×10^9
L. gasseri LbV150N (DSM 22583)	30	0.3×10^9	1.5×10^9
Картопляний мальтодекстрин	23		
Нерозчинні харчові волокна	25		
Діоксид кремнію	5		
Загальна кількість	250		

Бажані форми застосування композицій відповідно до винаходу є прийнятними для перорального або місцевого вагінального введення. Наприклад, пробіотичні бактерії для жінок можуть бути введені пероральним шляхом у вигляді капсул або (заповнені у саше) можуть бути розчинені у напої чи знаходитися у вигляді ферментованого молока (йогурту). При пероральному застосуванні, очікуються, що вони витримають прохід через ротову порожнину та дванадцятипалу кишку (демонструючи певну стійкість до кислоти та жовчі) та тимчасово колонізують кишечник. Невелика кількість цих бактерій попаде у піхву та (знову тимчасово) колонізує слизову оболонку піхви. Пробіотичні бактерії також можна застосувати загальноприйнятним чином у вигляді вагінальних капсул або супозиторіїв для прямого введення у піхву. Захисної лактобацильної дії проти потенційних патогенів у піхві досягають завдяки метаболічній активності цих лактобацил. Бактерії споживають глікоген та інші джерела глюкози та виробляють молочну кислоту. Отриманий таким чином низький pH є шкідливим для небажаних бактерій та грибів, тим самим захищаючи слизову оболонку піхви проти інфекцій. Отже, фармацевтичні композиції відповідно до винаходу можна застосувати або у вигляді супозиторіїв, вагінальних капсул для введення у піхву або у вигляді капсул, вкритих оболонкою, таблеток, саше, пігулок, гранул, фіалів для перорального застосування, а також у вигляді йогурту, йогуртових напоїв, ферментованого молока, соків та інших ферментованих напоїв та продуктів харчування.

Заявлений винахід також стосується дієтичної або фармацевтичної композиції на основі мікробних культур лактобацил, переважно ліофілізованих або рідких, як-то йогурт та інші ферментовані та/або неферментовані напої, що містять принаймні чотири штами Lactobacillus, автохтонні по відношенню до людини, вибрані з групи, що охоплює Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567), Lactobacillus gasseri (DSM 22583), Lactobacillus crispatus (DSM 23744), Lactobacillus crispatus (DSM 23745), Lactobacillus jensenii (DSM 23746) Lactobacillus jensenii (DSM 23747), Lactobacillus rhamnosus (DSM 23748), Lactobacillus rhamnosus (DSM 23749), Lactobacillus gasseri (DSM 23750) та Lactobacillus gasseri (DSM 23751) для застосування у лікуванні жіночих вагінальних та урогенітальних інфекцій, спричинених нестачею лактобацил, переважно вибраних з групи, що охоплює вагіноз або вагініт, хронічний бактеріальний вагіноз та хронічні дріжджові інфекції, хронічну інфекцію сечовивідних шляхів у період менопаузи, атрофічний вагініт або вагіноз та аналогічні інфекції, як-то небактеріальний вагіноз. Фактично, ці лактобактерії призначені для перорального або вагінального введення для фізіологічного відновлення вагінальної флори та для фізіологічного збереження лактобацил при патологічній нестачі продукування лактобацил.

Крім того, композиція відповідно до винаходу є особливо прийнятною для застосування у лікуванні або запобіганні безсимптомного та рецидивного бактеріального вагінозу у вагітних або у запобіганні передчасних пологів, спричинених бактеріальним вагінозом.

Також втілення заявленого винаходу представлені у вигляді інтеграторів, молочних продуктів, напоїв та/або харчових продуктів для людського харчування, що відрізняються тим, що вони містять вищезазначені дієтичні композиції.

Молочні продукти заявленого винаходу можуть охоплювати молоко, йогурт, сир, гомогенізовані продукти (на основі молока, сиру, фруктів), ферментовані або неферментовані (у тому числі сухе молоко, молоко, що не містить лактозу, молочні коктейлі) продукти, що містять пробіотики. Лікарський сир може бути отриманий шляхом додавання прийнятних пробіотичних мікроорганізмів у концентрованій підсушеній формі на певному етапі виробництва сиру з метою

забезпечення постачання дози необхідних для організму мікробів. Напої можуть являти собою напої швидкої дії або воду, що містить композицію відповідно до заявленого винаходу.

Вказані інтегратори, молочні або харчові продукти є особливо прийнятними для застосування у лікуванні або запобіганні безсимптомного або рецидивного бактеріального вагінозу, вульвовагінального кандидозу, передчасних пологів, спричинених бактеріальним вагінозом або рецидивних інфекцій сечовивідних шляхів.

Нарешті, винахід спрямовано на отримання комбінації чотирьох пробіотичних штамів, автохтонних по відношенню до людини, що являють собою Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583) для медичного застосування у лікуванні уражень сечостатевих шляхів у жінок.

Заявлений винахід описано тут тільки ілюстративно, без обмежувальної мети, відповідно до його бажаного втілення у наступних прикладах та у доданих Фігурах, де:

У Фіг. 1 наведена таблиця з результатами антимікробної дії 12 вибраних штамів відповідно до винаходу проти 5 конкурентних штамів різних патогенів, як-то Candida krusei, Candida albicans, Candida glabrata, Escherichia coli, Gardnerella vaginalis.

У Фіг. 2 та 3 наведені загальні середні концентрації лактобацил, доставлених у піхву у клінічних дослідженнях Прикладу 3.

Фіг. 4 показує змінення по шкалі Нугента та змінення від стану бактеріального вагінозу до нейтрального стану піхвової флори у клінічних дослідженнях Прикладу 3.

Фіг. 5 наводить аналіз концентрації лактобацил після перорального введення композиції лактобацил [Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583)] у клінічному дослідженні;

Фіг. 6 показує аналіз концентрації лактобацил у групі плацебо.

Приклад 1: Препарат пробіотичної композиції відповідно до винаходу.

Дванадцять бажаних вибраних штамів були подані у DSMZ для патентного зберігання (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). їх відібрали від початкового зразка у 168 колоній, отриманих від 84 жінок. При початковому відборі був отриманий 41 штам-кандидат для включення до складу товарного продукту (9 штамів L. rhamnosus, 6 штамів L. jensenii, 8 штамів L. crispatusta 18 штамів L. gasseri). На етапі другого відбору, відібрали 12 штамів, як-то: Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583), Lactobacillus crispatus (DSM 23744), Lactobacillus crispatus (DSM 23745), Lactobacillus jensenii (DSM 23746) Lactobacillus jensenii (DSM 23747), Lactobacillus rhamnosus (DSM 23748), Lactobacillus rhamnosus (DSM 23749), Lactobacillus gasseri (DSM 23750), Lactobacillus gasseri (DSM 23751) разом з фармацевтично або дієтично прийнятними ад'ювантами та/або наповнювачами.

Культури зразків, передані у DSMZ для повторної перевірки були знову переглянуті та відповідали початковим наданим культурам.

Композиції відповідно до винаходу застосовували у вигляді капсул.

Першим етапом отримання продукту у вигляді капсул було отримання ліофілізованих культур пробіотичних штамів, призначених для застосування (у бажаному втіленні винаходу, це були чотири штами Lactobacillus rhamnosus LBV 96 (DSM 22560), Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583)).

Наступними загальними кроками отримання ліофілізованої культури були: активування штаму (лабораторні суб-культивації), промислова ферментація, розділення бактеріальної біомаси, як правило, шляхом центрифугування або нанофільтрації, промивання та кріозахист біомаси, сублімація сушінням, подрібнення " пирога " та стандартизація кількості життєздатних клітин на грам.

Після отримання штамів проводили пілотне або промислове перемішування пробіотиків з іншими застосованими наповнювачами (у разі необхідності, може бути виконано відповідне попереднє перемішування мінорних компонентів).

Після отримання цієї кінцевої суміші проводили процес заповнення капсул за допомогою прийнятного лабораторного або промислового наповнювача. Машина може мати ручне керування або бути напівавтоматичною чи повністю автоматичною. Ці способи є добре відомі досвідченим фахівцям.

Активний препарат, застосований у клінічних дослідженнях, тобто композиція 1, наведений у наступній Таблиці 3:

Таблиця 3

Композиція 1	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)
L. crispatus Lbv88 (DSM 22566)	15	1×10^9	1.5×10^9
L. rhamnosus LbV96 (DSM 22560)	15	1×10^9	1.5×10^9
L. jensenii LbV116(DSM 22567)	20	0.2×10^9	0.3×10^9
L. gasseri LbV150N (DSM 22583)	9	0.3×10^9	0.45×10^9
Картопляний мальтодекстрин	161		
Нерозчинні харчові волокна	25		
Діоксид кремнію	5		
Загальна кількість	250		

Препарат відповідного продукту (розглянуто з п'ятиразовим перевищенням дози), тобто, композиція 2, детально наведено у наступній Таблиці 4:

Таблиця 4

Композиція 2	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)
L. crispatus Lbv88 (DSM 22566)	50	1×10^9	5×10^9
L. rhamnosus LbV96 (DSM 22560)	50	1×10^9	5×10^9
L. jensenii LbV116 (DSM 22567)	67	0.2×10^9	1×10^9
L. gasseri LbV150N (DSM 22583)	30	0.3×10^9	1.5×10^9
Картопляний мальтодекстрин	23		
Нерозчинні харчові волокна	25		
Діоксид кремнію	5		
Загальна кількість	250		

Була проведена оцінка стійкості чотирьох штамів Lactobacillus jensenii LbV 116 (DSM 22567), Lactobacillus rhamnosus LbV 96 (DSM 22560), Lactobacillus gasseri LbV 150N (DSM 22583) та Lactobacillus crispatus LbV 88 (DSM 22566) у стандартному, пастеризованому свіжому молоці.

Щоденною дозою молока вважали 167 мл (приблизний зміст склянки). Метою перевірки було гарантування наявності 2.5 млрд. життєздатних клітин у кінці строку зберігання. Заявлений препарат був визначений відповідно до продукту, що в даний час проходить клінічні випробування в лікарні університету Відня. Для першої оцінки було розглянуто п'ятиразове перевищення. Препарат детально наведений у наступній Таблиці 5:

Таблиця 5

Композиція 3	Дозова рецептура	Літрова рецептура	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО /дозу)
	мг/мл	мг/мл		
L. jensenii LbV 116 (DSM 22567)	20	119.76	1 млрд.	0.2 млрд.
L. rhamnosus LbV 96 (DSM 22560)	50	299.4	5 млрд.	1 млрд.
L. gasseri LbV150N (DSM 22583)	30	179.64	1.5 млрд.	0.3 млрд.
L. crispatus LbV 88 (DSM 22566)	50	299.4	5 млрд.	1 млрд.
Загальна кількість (порошку)	150	898.2		
Свіже пастеризоване молоко	167	1.000		

У наступній Таблиці 6 наведені попередні дані стійкості чотирьох штамів при зберіганні у молоці при 4 °C:

Таблиця 6

Зразок	pH	Кількість життєздатних клітин ((10^{9}КУО/дозу), нульова точка)	Стійкість при 4 °C					
			6 днів				6 днів	
			кількість життє-здатних клітин (10^9 КУО /дозу)	pH	час напів-життя (днів)	кількість життє здатних клітин (10^9 КУО /дозу)	pH	час напів-життя (днів)
Пробіотики у свіжому молоці	12.9	6.69	11.8	6.68	46.7	11.4	6.65	84.1

Середній термін зберігання пастеризованого молока промислового виробництва дорівнює 6 дням. У будь-якому випадку, дослідники вирішили визначити стійкість зі строком до 15 днів для того, щоб отримати більш повне уявлення про поведінку бактеріальних клітин у молоці.

Як можна припустити з вищенаведених даних, пробіотики винаходу є дуже стійкими у свіжому молоці промислового виробництва. Дані також свідчать про те, що проект можна здійснити тільки з невеликим перевищенням часу виробництва.

Іншим аспектом, який слід розглянути, є те, що pH залишається незмінним навіть після 15 днів зберігання при 4 °C. Це означає, що пробіотики у цих умовах не проявляють метаболічної активності, яка є, звичайно, бажаним аспектом.

Приклад 2: Порівняльні дослідження між пробіотичними мікроорганізмами відповідно до винаходу та промисловими продуктами.

Молекулярне типування вибраних штамів у порівнянні з рядом конкурентних штамів проводили за допомогою різних способів (ПЛР з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК (RAPD-PCR), ПЛР екстрагенних паліндромів GTG5, що повторюються (GTG5 REP-PCR), електрофорез в пульсуючому полі (PFGE)).

Дослідники перевірили наступні конкурентні штами, що є у продажу:

- Lactobacillus rhamnosus GR-1 (ATCC 55826) (продукт Ombe® - див. EP1137423)
- Lactobacillus reuteri RC-14 (ATCC 55845) (продукт Ombe® - див. EP1137423)
- Lactobacillus casei rhamnosus (Gynophilus®)
- Lactobacillus acidophilus (Gynoflor®)
- Lactobacillus gasseri (Doderlein Med®)
- Lactobacillus LN 40 (Ellen®)
- Lactobacillus fermentum LN 99 (Ellen®)
- Lactobacillus casei LN 133-2 (Ellen®)

Вибрані штами можна було відрізнити від всіх конкурентних штамів, перевірених за допомогою ПЛР з випадковою ампліфікацією поліморфної ДНК (RAPD-PCR) та праймеру 4. Електрофорез в пульсуючому полі (PFGE), проведений після рестрикції з ApaI або SmaI також показав відмінності між досліджуваними штамами (дані не представлені).

Тести з метою пояснення механізму антимікробної дії проводили, застосовуючи по два штами досліджуваного виду (Lactobacillus crispatus: LBV 10 (DSM 23744), LBV 88 (DSM 22566); Lactobacillus gasseri: LBV 162 (DSM 23750), LBV 150N (DSM 22583); Lactobacillus jensenii: LBV 110 (DSM23747), LBV 8 (DSM 23746); Lactobacillus rhamnosus: LBV 69 (DSM 23748), LBV 96 (DSM 22560)) до трьох патогенних вагінальних штамів (Gardnerella vaginalis Ga 3, Candida albicans Cd 30 та Candida glabrata Cd 34 - див. Таблицю 5) з застосуванням способу точкового нанесення на мазок.

У цих дослідженнях перевіряли антимікробну дію живих активних штамів лактобацил проти живих активних патогенних штамів. Спочатку паралельні мазки штамів лактобацил розмістили на чашці з агаром на відстані біля 2 см. При утворенні антимікробних субстанцій та вивільненні їх лактобацильними штамами, вони дифундують у середовище для зростання та утворюють антимікробну інгібіторну смугу, у яку наносили живі патогенні штами. У той же час, здійснювали точкове нанесення тих саме патогенних штамів також поза межами паралельних мазків у якості контролю зростання. Відсутність зростання або слабке зростання патогенних штамів у межах мазка порівняно з контролем зростання за межами мазка свідчить про утворення досліджуваними лактобацилами антимікробних субстанцій [23].

Спосіб точкового нанесення на мазок вимагає відповідного способу культивування, де лактобацили та патогенні штами демонструють добре зростання, що виявилося проблемою головним чином у вирощуванні Gardnerella vaginalis. В ході випробування декількох способів культивування Gardnerella vaginalis було виявлено, що нейтралізований MRS крохмальний агар (pH 6.7, 1 % крохмалю) був найкращим середовищем для зростання.

Таблиця 7

Позначення патогенних штамів

Позначення	Види
Ec5	Escherichia Coli LMG 9007
Ec 6	Escherichia Coli LMG 10266
Ga 1	Gardnerella vaginalis LMG 7832
Ga 3	Gardnerella vaginalis LMG 14325
Cd 25	Candida krusei
Cd 26	Candida krusei
Cd 30	Candida albicans IHEM 9863
Cd 31	Candida albicans IHEM 3243
Cd 33	Candida glabrata IHEM 4210
Cd 34	Candida glabrata IHEM 19237

Схема експерименту:

- Паралельні мазки штамів лактобацил розмістили на чашці з агаром на відстані біля 2 см (застосовуючи різні види середовищ для зростання у залежності від патогенних штамів, що були піддані перевірці: див. Таблицю 8).
- Інкубування мазків при 37 °C, 24 год., у анаеробних умовах.
- Точкове нанесення 5 мкл активних патогенних штамів між паралельними мазками та за межами мазків у якості контролю зростання з наступним інкубуванням (у різних умовах в залежності від патогенних штамів, що були піддані перевірці: див. Таблицю 8).
- Оцінка зростання (або інгібування) патогенних штамів та запис результатів. Культивування лактобацил:
- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища MRS (37 °C, 24 год., у анаеробних умовах).
- Фракціонування мазка у агарі MRS (37 °C, 48 год., у анаеробних умовах).
- Інокуляція колонії у 10 мл агару MRS (37 °C, 18 год., у анаеробних умовах).
- Нанесення паралельного мазка з цієї культури на чашки з агаром. Candida albicans та Candida glabrata:
- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища MRS (37 °C, 24 год., у аеробних умовах).
- Фракціонування мазка у агарі MRS (37 °C, 48 год., у аеробних умовах).
- Інокуляція колонії у 10 мл агару MRS (37 °C, 18 год., у аеробних умовах).
- Точкове нанесення 5 мкл середовища з цією культурою.

Candida krusei

- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища BHI (37 °C, 24 год., у аеробних умовах).
- Фракціонування мазка у агарі BHI (37 °C, 48 год., у аеробних умовах).
- Інокуляція колонії у 10 мл агару BHI (37 °C, 18 год., у аеробних умовах).
- Точкове нанесення 5 мкл середовища з цією культурою. Escherichia coli:
- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища BHI (37 °C, 24 год., у аеробних умовах).
- Фракціонування мазка у агарі BHI (37 °C, 48 год., у аеробних умовах).
- Інокуляція колонії у 10 мл агару BHI (37 °C, 18 год., у аеробних умовах).
- Точкове нанесення 5 мкл середовища з цією культурою. Gardnerella vaginalis.
- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища BHI (37 °C, 24 год., у анаеробних умовах).
- Точкове нанесення 5 мкл середовища з цією культурою.

Таблиця 8

Середовище для зростання та умови інкубування

Види	Агар	Інкубування
Candida albicans	MRS	37 °C 48 год., анаеробно
Candida glabrata	MRS	37 °C 48год., анаеробно
Candida krusei	MRS	37 °C 48год., анаеробно
Escherichia coli	BHI	37 °C 48год., анаеробно
Gardnerella vaginalis	крохмальний агар MRS (pH 6.7)	37 °C 48год., анаеробно

Деталізовані результати наведені у Фіг. 1.

Підсумки:

- Всі штами лактобацил та 5 конкурентних штамів показали сильне інгібування Gardnerella vaginalis.

- Всі лактобацили показали або не дуже виражене інгібування Escherichia coli або інгібування не було виявлено.

- Тести інгібування Candida albicans лактобацилами показали певні великі відмінності інгібіторної дії різних штамів. Головним чином, штами Lactobacillus rhamnosus спричинювали дуже сильне або повне інгібування зростання Candida albicans.

- Інгібування Candida glabrata лактобацилами було значно слабшим, ніж інгібування ними Candida albicans. У цьому випадку, інгібіторна дія була більш виражена у Lactobacillus rhamnosus.

- Помітні відмінності у силі інгібування також спостерігали у тестах на інгібування Candida krusei. Більшість лактобацил взагалі спричинювала дуже сильне інгібування штамів Candida krusei та знову штами Lactobacillus rhamnosus, як правило, мали трохи більшу інгібіторну дію, ніж представники інших трьох видів. У тестах на інгібування Candida krusei змінення сили інгібування, на відміну від інших тестів, спостерігали більш, ніж протягом вказаного часу. У деяких штамах були виявлені значні відмінності у силі інгібування через 48 годин та через 120 годин. У майже всіх випадках інгібіторна була менш вираженою через 120 годин, ніж через 48 годин.

Також, за допомогою способу точкового нанесення на мазок для більшості комбінацій з 12 вибраних штамів були досліджені спільні негативні взаємодії, спрямовані на зростання.

Матеріали та способи:

Культивування:

- Культивування культури, що зберігалася у замороженому стані при -80 °C у 2 мл середовища MRS (37 °C, 24 год., у аеробних умовах).

- Фракціонування мазка у середовищі MRS (37 °C, 48 год., у аеробних умовах).

- Інокуляція колонії у 10 мл у середовищі MRS (37 °C, 18 год., у аеробних умовах).

- Точкове нанесення 5 мкл середовища з цією культурою на чашки з агаром або перенесення 200 мкл бактеріальної суспензії до 4.5 мл м'якого агару.

Спосіб точкового нанесення з покриттям:

- Точкове нанесення 10 мкл бактеріальної суспензії від кожного з 11 штамів, призначених для порівняння, на агар MRS: інкубування при 37° C, 24 год.,у аеробних умовах.

- Перенесення 200 мкл бактеріальної суспензії штаму, що перевіряється (12 штамів) до 4.5 мл м'якого агару. Покриття чашок з агаром та точковим нанесенням, що відбулося попереднього дня проводили з застосуванням цієї бактеріальної суспензії у м'якому агарі. Інкубування проводили при 37° C, 24 год., у аеробних умовах.

- Оцінка та запис результатів взаємного інгібування через 24 год. та 48 год.

Силу взаємного інгібування оцінювали візуально по шкалі від - (відсутність інгібування) до +++ (дуже сильне інгібування), як показано у наступній Таблиці 9.

Таблиця 9

Взаємне інгібування 12 штамів лактобацил

		LBV10	LBV61	LBV88	LBV62	LBV150	LBV162
L. crispatus	LBV10		++	+	-	-/+	-
	LBV61	+		+	-	-	+
	LBV88	++	++/+++		+	+	+
L. gassen	LBV62	+	++	+		-	-
	LBV150	+/++	+	-	-		-
	LBV162	++	++		-		
L. jensenii	LBV8	-	+	-	-	-	-
	LBV110	+/++	+/++	+	-	-	-
	LBV116	+	++	+	-/+	-	-
L. rhamnosus	LBV9	+++	+++	+++	+	++	++
	LBV96	+++	+++	+++	+	+	++
	LBV136	+++	+++	+++	+	++	++

		LBV8	LBV110	LBV116	LBV69	LBV96	LBV136
L. crispatus	LBV10	+	-/+	-/+	+	+	+
	LBV61	-	-	-/+	+	+	+
	LBV88	+	-/+	-/+	+	+	+/++
L. gassen	LBV62	-	-	-	-	-/+	-/+
	LBV150	-	-	-	-	-	-
	LBV162	+	-	-/+	+	+	-
L. jensenii	LBV8		-	-	-	-	-
	LBV110	-		-	-/+	-	-
	LBV116	+	-		-/+	+	-
L. rhamnosus	LBV9	+/++	+	++		++	++
	LBV96	+	-/+	+	+/++		+/++
	LBV136	++	+	+/++	++	++	

LBV10: DSM 23744; LBV61: DSM 23745; LBV88: DSM 22566; LBV62: DSM 23751; LBV150N: DSM22583; LBV162: DSM 23751; LBV8: DSM 23746; LBV 110: DSM 23747; LBV116: DSM 22567; LBV69: DSM 23748; LBV96: DSM 22560; LBV136: DSM 23749.

Були встановлені великі відмінності інгібіторних дій 12 штамів між собою.

Три штами Lactobacillus crispatus або зовсім не виявили інгібіторної дії до штамів інших видів або вона була дуже слабкою. Проте, самі вони значно інгібувалися усіма іншими штамами.

Штами Lactobacillus jensenii та Lactobacillus gasseri головним чином інгібували штами Lactobacillus crispatus, у той час, як інгібіторна дія проти інших штамів була досить слабкою.

Найсильнішу інгібіторну дію показали штами Lactobacillus rhamnosus. Вони дуже сильно інгібували три штами Lactobacillus crispatus та сильно інгібували представників штамів Lactobacillus jensenii та Lactobacillus gasseri. Кожен штам також показав сильну інгібіторну дію проти обох інших штамів Lactobacillus rhamnosus.

Для бажаної комбінації Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583) взаємний вплив штамів між собою був мінімальним. В останніх умовах, тільки штам Lactobacillus crispatus DSM 22566 сильно інгібувався штамом Lactobacillus rhamnosus DSM 22560.

Приклад 3: Пілотні дослідження з композицією лактобацил [Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583)] заявленого винаходу.

В унікальних пілотних дослідженнях композицію лактобацил людини (вирощену з лактобацил людини) перевіряли in vivo. Ці лактобацили людини були отримані з дослідження з вагітними жінками. Протягом вагітності, лактобацили відіграють важливу роль у захисті жінки від вагінальних інфекцій, захищаючи плід шляхом підтримання здорової мікрофлори під час вагітності. Вагінальні інфекції у цей період пов'язують з викиднями, передчасними пологами та несприятливим результатом вагітності.

На сьогоднішній день доступними є дані дослідження дев'яти жінок (неовагіна (штучно створена під час пластичної операції піхва), відсутність зв'язку з черевною порожниною, відсутність матки); де лактобацили (композиція 1, Таблиця 1) вводили перорально, зі збиранням вагінальних зразків перед пероральним введенням, через один тиждень після щоденного перорального вживання та через один тиждень без пробіотичного лікування (перевірка довготривалості дії).

У Фіг. 2 та 3 показана загальна середня концентрація лактобацил: на початку досліджень рівні концентрації були низькими (середнє значення 3,07E+06; SD (стандартна похибка)+/-5,23E+07); після перорального вживання концентрація збільшилася (середнє значення 5,77E+07; SD 1,72E08); через один тиждень, вільний від лікування, рівні концентрації були вищими, ніж перед лікуванням (середнє значення 2.71E+07).

Фіг. 4 показує змінення по шкалі Нугента та змінення від стану бактеріального вагінозу (3 бали) до нейтрального стану вагінальної флори (2 бали): середній показник шкали Нугента перед застосуванням пробіотиків дорівнював 8 (SD 1.07), що означало 3 бали для вагінальної флори (бактеріальний вагіноз у клінічних умовах). Через один тиждень спостерігалося покращення результатів по шкалі Нугента до відмітки 6 (SD 0.79), що означало 2 бали (нейтральна флора, відсутність бактеріального вагінозу.) Через ще один тиждень цей клінічний мікробіологічний діагноз залишався незмінним та дорівнював 6 по шкалі Нугента (SD 1.79), 2 бали (SD 0.55).

Приклад 4: Проміжний аналіз поточних клінічних досліджень.

Здатність перорально введеного препарату чотирьох пробіотичних штамів лактобацил відповідно до винаходу [Lactobacillus crispatus (DSM 22566), Lactobacillus rhamnosus (DSM 22560), Lactobacillus jensenii (DSM 22567) та Lactobacillus gasseri (DSM 22583)] поліпшувати якість флори у неовагіні перевіряли у плацебо-контрольованих, подвійних сліпих дослідженнях (n=70), які на сьогоднішній день пройшла 31 жінка.

Протокол лікування був наступним:

- Перший мазок (культура, перевірка на шкалі Нугента та ПЛР-тест на анаеробні бактерії). Один тиждень перорального введення композиції лактобацил.
- Другий мазок (культура, перевірка на шкалі Нугента та ПЛР-тест на анаеробні бактерії). Один тиждень без пробіотиків.
- Третій мазок (культура, перевірка на шкалі Нугента та ПЛР-тест на анаеробні бактерії).

Фіг. 5 показує результати у вигляді концентрації лактобацил у піхві протягом досліджень (1: первинний мазок; 2: після перорального введення; 3: спостереження). Фіг. 6 наводить результати паралельного аналізу групи плацебо. Перші дані показують значне зростання концентрації лактобацил після першого тижня перорального введення. У групі плацебо зростання лактобацил відмічено не було.

Приклад 5: Порівняння між штамами лактобацил конкурентного продукту (Ellen) та штамами винаходу.

Штами лактобацил з обмежувальної частини Формули Винаходу, що позначені у наступному, як штами "Ellen":

- L. gasseri (LN40, Tam1, Lb311)
- L. fermentum (LN99, Tam2, Lb312)
- L. rhamnosus (casei) (LN 113-2, Tam3, Lb 313) Штами лактобацил винаходу:
- L. rhamnosus DSM22560 (LBV96, Lb322)
- L. crispatus DSM22566 (LBV88, Lb323)
- L. jensenii DSM22567 (LBV116, Lb324)
- L. gasseri DSM 22583 (LBV150N, Lb325) Експериментальні процедури:

Зі штамами "Ellen" проводили наступний аналіз, порівнюючи їх зі штамами винаходу:

a. Отримання культури від замороженого зразка (кріокультури).

b. Оцінка зростання у аеробній або анаеробній культурі.

c. Здатність знижувати значення pH (потенціал підкислення)

d. Стійкість до кислоти (до розчину HCl - стійкість до шлункового соку) є. Стійкість до солей жовчних кислот f. Утворення позаклітинного перекису водню (H_2O_2).

a. Всі штами, отримані від кріокультури, яку зберігали при температурі - 80 °C успішно підрощували у середовищі MRS. Всі застосовані для досліджень культури були не більш, ніж 24 - годинного віку.

b. Оцінка інтенсивності зростання у аеробній або анаеробній культурі є важливим критерієм вибору штамів. її основу складає фракціонована культура штамів мазка на чашках з агаром MRS, інкубована 48 год. при 37 °C в аеробних або анаеробних умовах. Діаметри колоній

оцінювали оптично (+++, ++, +) та були отримані цифрові фотографії чашок з агаром. Результати на основі двох аналізів наведені у наступній Таблиці 10.

Таблиця 10

Аероб.	Анаероб.	
+	+++	L. gasseri (LN40, Tam1, Lb311)
++	+++	L. fermentum (LN99, Tam2, Lb312)
+++	+++	L. rhamnosus (LN 113-2, Tam3, Lb 313)
+++	+++	L. rhamnosus DSM22560 (LBV96, Lb322)
+	+++	L. crispatus DSM22566 (LBV88, Lb323)
+	+++	L. jensenii DSM22567 (LBV116, Lb324)
++	+++	L. gasseri DSM 22583 (LBV150N, Lb325)

Обидва штами Lactobacillus rhamnosus (ELLEN LN 113-2 та L. rhamnosus DSM22560) зростали добре. В аеробних умовах спостерігалося трохи краще зростання штаму L. gasseri DSM 22583 порівняно зі штамом ELLEN L. gasseri LN 40.

c. Здатності 7 штамів понижувати рівень pH визначали після інкубування в анаеробних умовах протягом 48 год. при 37 °C у 10 мл середовища MRS (початковий pH = 5.8). Отримані у середовищі значення pH перевіряли тричі за допомогою стандартного pH-метру. Отримані результати здатності понижувати pH (арифметичні середні значення трьох вимірювань) наведені у наступній Таблиці 11.

Таблиця 11

pH 3.729	L. gasseri (LN40, Tam1, Lb311)
pH 4.186	L. fermentum (LN99, Tam2, Lb312)
pH 3.824	L. rhamnosus (LN 113-2, Tam3, Lb 313)
pH 3.657	L. rhamnosus DSM22560 (LBV96, Lb322)
pH 3.636	L. crispatus DSM22566 (LBV88, Lb323)
pH 3.946	L. jensenii DSM22567 (LBV116, Lb324)
pH 4.147	L. gasseri DSM 22583 (LBV150N, Lb325)

У той час, як штам ELLEN L. gasseri LN 40 був здатним зменшувати рівень pH нижче відповідного рівня штаму L. gasseri DSM 22583 (pH = 3.73 порівняно з pH 4.15), штами L. rhamnosus показали протилежний результат (LN 113-2: pH = 3.82 порівняно з DSM 22560 pH = 3.66). Найбільш значне зниження значення pH було досягнуто штамом L. crispatus DSM22566 (pH = 3.64).

d. Стійкість штамів Lactobacillus до дії кислоти тривалістю 3 год. перевіряли двічі у середовищі MRS зі значеннями pH, доведеними 1M соляною кислотою до 2, 2.5, 3, 3.5 та 4. Порції підкисленого середовища у 9.9 мл початкової культури у середовищі MRS піддали інокуляції зі 100 мкл та інкубували при 37 °C протягом 3 год. в анаеробних умовах. Визначення початкової кількості бактерій, що була присутня у кожному інокуляті проводили паралельно за допомогою способу чашкового підрахунку (проводили двічі, 37 °C, 48 год., анаеробні умови). Після 3 годин інкубування, за допомогою подібної процедури, були визначені значення чашкового підрахунку культур, інкубованих з різними значеннями pH. Стійкість обчислювали відносно відповідного підрахунку початкової кількості у чашці. Результати наведені у наступній Таблиці 12 у вигляді арифметичного середнього значення двох незалежних досліджень.

Таблиця 12

L. gasseri (LN40, Tam1, Lb311) початкова кількість/чашку 4.5×10^6	
pH 2.0	5.9×10^4
pH 2.5	5.0×10^5
pH 3.0	4.9×10^6
pH 3.5	6.9×10^6
pH 4.0	7.0×10^6
L. fermentum (LN99, Tam2, Lb312) початкова кількість/чашку 2.3×10^5	
pH 2.0	9.6×10^4
pH 2.5	3.5×10^7
pH 3.0	4.3×10^7
pH 3.5	3.2×10^7
pH 4.0	4.0×10^7
L. rhamnosus (LN 113-2, Tam3, Lb 313) початкова кількість/чашку 3.0×10^4	
pH 2.0	4.9×10^3
pH 2.5	5.6×10^3
pH 3.0	3.2×10^5
pH 3.5	5.2×10^5
pH 4.0	3.4×10^5
L. rhamnosus DSM22560 (LBV96, Lb322) початкова кількість/чашку 1.9×10^5	
pH 2.0	2.5×10^4
pH 2.5	8.6×10^5
pH 3.0	1.5×10^6
pH 3.5	2.1×10^6
pH 4.0	3.9×10^6
L. crispatus DSM22566 (LBV88, Lb323) початкова кількість/чашку 1.1×10^5	
pH 2.0	4.7×10^4
pH 2.5	8.0×10^4
pH 3.0	1.4×10^7
pH 3.5	1.2×10^7
pH 4.0	1.5×10^7
L. jensenii DSM22567 (LBV116, Lb324) початкова кількість/чашку 6.9×10^5	
pH 2.0	зростання відсутнє
pH 2.5	1.1×10^4
pH 3.0	6.4×10^5
pH 3.5	4.1×10^6
pH 4.0	1.1×10^7
L. gasseri DSM 22583 (LBV150N, Lb325) початкова кількість/чашку 1.1×10^4	
pH 2.0	2.2×10^5
pH 2.5	1.2×10^6
pH 3.0	1.9×10^6
pH 3.5	2.5×10^6
pH 4.0	1.4×10^6

Штам L. gasseri DSM 22583 показав найвищу стійкість до дії кислоти. Кількість бактерій цього штаму на чашці не тільки не зменшувалася, але навіть зростала при значеннях pH до 2.0. На відміну від штаму ELLEN L. rhamnosus LN 113-2, штам L. rhamnosus DSM 22560 показав підвищення кількостей бактерій/чашку при значеннях pH 2.5, 3.0, 3.5 та 4.0, показуючи зниження кількостей тільки при pH = 2.

Зниження pH є важливим механізмом дії, завдяки якому лактобацили знищують небажані мікроорганізми. Відносно стійкості у шлунковому соку та можливості зростати у кислому середовищі штами лактобацил винаходу показують явні переваги.

e. Стійкість до солей жовчних кислот досліджували за допомогою фракційних мазків 7 штамів на чашках з агаром MRS з різними концентраціями солей жовчних кислот (0 %; 0.1 %; 0.2 %; 0.3 %; 0.4 % та 0.5 % (B8756-100G, Bile Salts, Sigma). Рівень зростання досліджували візуально впродовж анаеробного інкубування протягом 48 год. при 37 °C з наступними оцінками: дуже добре зростання (+++), добре зростання (++), незначне зростання (+), відсутність зростання (-).

Результати стійкості до солей жовчних кислот (середнє за результатами двох визначень) наведені у наступній Таблиці 13.

Таблиця 13

Концентрація солей жовчних кислот (%)	LN40	LN99	LN113-2	LBV96	LBV88	LBV116	LBV150N
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0.1	+	++	++	++	++	+	++
0.2	-	-	+	+	+	+	+
0.3	-	-	-	-	-	-	-
0.4	-	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-	-	-

Всі штами винаходу показали кращу стійкість до солей жовчних кислот (0.2 %). Більш висока концентрація солей жовчних кислот у дванадцятипалій кишці є причиною смерті багатьох бактерій. Тут штами винаходу показали явні переваги, особливо важливі для перорального застосування.

f. Для визначення H_2O_2 були вибрані та застосовані два способи.

• 7 штамів лактобацил було перевірено на здатність виробляти H_2O_2 за допомогою напівкількісних H_2O_2 тестових стрічок (1.10081.0001, Merck). Після інкубування у середовищі MRS (48 год. при 37 °C в анаеробних умовах), культуру перемішували на ротаційному шейкері протягом 60 хв. в аеробних умовах. У Таблиці 14 наведені результати напівкількісного визначення продукування H_2O_2.

• Середовище на основі агару для визначення H_2O_2 отримали додаванням 0.25 мг/мл 3.3',5.5'-тетраметил-бензидину (TMB) (860336, Sigma) та 0.01 мг/мл пероксидази хріну (P8375-2KU, Sigma) до MRS-агару. 7 штамів лактобацил фракціонально засіяли штрихом у середовище та інкубували 5 днів в анаеробних умовах при 37 °C (Genbag Anaerob System, Biomerieux). Потім чашки піддали дії атмосферного повітря та через 30 та 60 хв. був проведений аналіз інтенсивності продукування H_2O_2 (поява блакитного забарвлення при контакті з киснем через утворення H_2O_2). Таблиця 15 наводить результати способу визначення продукування лактобацилами H_2O_2 з застосуванням агару.

Таблиця 14

Час вимірювання	LN 40	LN 99	LN 113-2	LBV 96	LBV 88	LBV 116	LBV 150N
0 хв.	0	0	0	0	0	0	0
60 хв.	0	0	0	0	0	1	3

0 = відсутність реакції;1 = 1 мг мг/л H_2O_2; 3 = 3 мг мг/л H_2O_2

Таблиця 15

Час аналізу	LN 40	LN 99	LN 113-2	LBV 96	LBV 88	LBV 116	LBV 150N
30 хв.	-	-	-	-	+	++	++
60 хв.	-	-	-	+	+++		+++

У той час, як жоден зі штамів ELLEN не показав помітного виробництва H_2O_2, штам L. rhamnosus LBV 96 (DSM22560) показав незначне та інші штами винаходу показали значне виробництво зовнішньоклітинної H_2O_2 (див. Таблиці 14 та 15). Завдяки тому, що перекис водню вбиває шкідливі мікроорганізми, це є важливою перевагою для композицій штамів лактобацил винаходу.

Джерела інформації:

1. Erickson KL, Hubbard NE. Probiotic immunomodulation in health and disease. J Nutr. 2000;130(2S Suppl):403-409.

2. Reid G, Cook RL, Bruce AW. Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. J Urol. 1987 Aug;138(2):330-5.

3. Goldenberg, R. L, J. C Hauth, and W. W. Andrews. 2000. Intrauterine infection and preterm delivery. N. Engl. J. Med. 342:1500-1507.

4. Spiegel, C. A., R. Amsel, D. Eschenbach et al. 1980. Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. N. Engl. J. Med. 303:601-607.

5. Spiegel, C. A. 1991. Bacterial vaginosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:485-502.

6. Forsum, U., E. Holst, P. G. Larsson et al. 2005. Bacterial vaginosis-a microbiological and immunological enigma. APMIS. 113:81-90.

7. Nugent, R. P., M. A. Krohn, and S. L. Hillier. 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J. Clin. Microbiol. 29:297-301.

8. Korn, A., G. Bolan, N. Padian et al. 1995. Plasma cell endometritis in women with symptomatic bacterial vaginosis. Obstet. Gynecol. 85:387-390.

9. Ness, R., S. Hillier, K. Kip et al. 2004. Bacterial vaginosis and risk of pelvic inflammatory disease. Obstet. Gynecol. 104:761-769.

10. Pandit L, Ouslander JG. Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. Am J Med Sci. 1997; 314(4):228-31.

11. Ginkel PD, Soper DE, Bump RC, Dalton HP. The vaginal flora in postmenopausal women: the effect of estrogen replacement therapy. Infect Dis Obstet Gynecol. 1993; 1 94-97.

12. Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infection. N Eng J Med. 1993; 329 (11):735-6.

13. Kandler, O., and N. Weiss. 1986. Genus Lactobacillus, pp. 1063-1065. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

14. Vasquez, A., T. Jakobsson, S. Ahrne, U. Frosum, and G. Molin. 2002. Vaginal Lactobacillus flora of healthy Swedish women. J. Clin. Microbiol. 40:2746-2749.

15. Reid, G., J. A. McGroarty, L. Tomeczek, and A. W. Bruce. 1996. Identification and plasmid profiles of Lactobacillus species from the vagina of 100 healthy women. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15:23-26.

16. H. Kiss, B. Kogler, L. Petricevic, I. Sauerzapf, S. Klayraung, K. Domig, H. Viernstein, W. Kneifel. Vaginal Lactobacillus microbiota of healthy women in the late first trimester of pregnancy BJOG 2007; 114: 1402-1407.

17. Uehara S, Monden K, Nomoto K, Seno Y, Kariyama R, Kumon H. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of Lactobacillus vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents. 2006;28 (1):30-4.

18. Reid G. Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce AW. Oral use of Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. fermentum GR-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2003; 35:131-134.

19. Morelli L, Zonenenschain D, Del Piano M, Cognein A. Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics. J. Clin. Gastroenterol. 2004; 38 (6): 107-10.

20. Petricevic L, Unger FM, Viernstein H, Kiss H. Placebo-controlled, double-blind trial of Lactobacillus orally administered to improve the vaginal flora of postmenopausal women. Eur J Obstet Gyn R B 2008; 141: 54-57.

21. Anukam K, Osazuwa E, Ahonkhai I, Ngwu M, Osemene G, Bruce AW, Reid G. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic L.rhamnosus GL-1 and L. reuteri RC-14: randomized, double blind, placebo controlled trial. Microbes and Infection, 2006, 8: 1450-54.

22. Martinez RCR, Francescini SA, Patta MC, Quintana SM, Gomes BC De Martinis ECP, Reid G. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), Lactobacillus rhamnosus GR-1, and Lactobacillus reuteri RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Can J Microbiol. 2009;55(2): 133-8.

23. JIN L, L. TAO, S.I. PAVLOVA, J-S. SO, N. KIWANUKA, Z. NAMUKWAYA and B.A.SABERBEIN: Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. Journal of Applied Microbiology. 2007; 102, 1107-115.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Дієтична або фармацевтична композиція на основі мікробних культур, переважно ліофілізованих або рідких, що містить комбінацію принаймні чотирьох автохтонних відносно до людини штамів *Lactobacillus crispatus* DSM 22566, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 22560, *Lactobacillus jensenii* DSM 22567, *Lactobacillus gasseri* DSM 22583 разом з фармацевтично або дієтологічно прийнятними ад'ювантами та/або наповнювачами.

2. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 1, де кожен з вказаних штамів присутній у концентрації в діапазоні $0{,}05\cdot10^9$-$30\cdot10^9$ КУО/г.

3. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 2, де кожен з вказаних штамів присутній у концентрації в діапазоні $0{,}5\cdot10^9$-$25\cdot10^9$ КУО/г.

4. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 1, де *Lactobacillus crispatus* DSM 22566 присутній у концентрації в діапазоні $3\cdot10^9$-$22\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 22560 присутній у концентрації в діапазоні $3\cdot10^9$-$22\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus jensenii* DSM 22567 присутній у концентрації в діапазоні $0{,}7\cdot10^9$-$6\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus gasseri* DSM 22583 присутній у концентрації в діапазоні $1\cdot10^9$-$8\cdot10^9$ КУО/г.

5. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 4, де *Lactobacillus crispatus* DSM 22566 присутній у концентрації $6\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 22560 присутній у концентрації $6\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus jensenii* DSM 22567 присутній у концентрації $1{,}2\cdot10^9$ КУО/г, *Lactobacillus gasseri* DSM 22583 присутній у концентрації $1{,}8\cdot10^9$ КУО/г.

6. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 4, що має наступний склад:

Композиція 1	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)
L. crispatus Lbv88 DSM 22566	15	$1\cdot10^9$	$1{,}5\cdot10^9$
L. rhamnosus LbV96 DSM 22560	15	$1\cdot10^9$	$1{,}5\cdot10^9$
L. jensenii LbV116 DSM 22567	20	$0{,}2\cdot10^9$	$0{,}3\cdot10^9$
L. gasseri LbV88150N DSM 22583	9	$0{,}3\cdot10^9$	$0{,}45\cdot10^9$
картопляний мальтодекстрин	161		
нерозчинні харчові волокна	25		
діоксид кремнію	5		
загальна кількість	250		

7. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 4, що має наступний склад:

Композиція 2	Кількість (мг/дозу)	Гарантована кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)	Початкова кількість життєздатних клітин (КУО/дозу)
L. crispatus Lbv88 DSM 22566	50	$1 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$
L. rhamnosus LbV96 DSM 22560	50	$1 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$
L. jensenii LbV116 DSM 22567	67	$0{,}2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^9$
L. gasseri LbV88150N DSM 22583	30	$0{,}3 \cdot 10^9$	$1{,}5 \cdot 10^9$
картопляний мальтодекстрин	23		
нерозчинні харчові волокна	25		
діоксид кремнію	5		
загальна кількість	250		

8. Дієтична або фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх пунктів, яка є прийнятною для перорального або для місцевого вагінального введення.

9. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 8 у вигляді супозиторіїв, капсул для вагінального введення або у вигляді капсул з покриттям, таблеток, саше, пігулок, гранул, ампул, для перорального застосування, йогурту, йогуртових напоїв, ферментованого молока, соків та інших ферментованих напоїв та харчових продуктів.

10. Дієтична або фармацевтична композиція за будь-яким з пп. 1-9, для застосування у лікуванні вагінальних інфекцій та інфекцій жіночих статевих органів та урогенітальних інфекцій, та інфекцій сечовивідних шляхів, спричинених нестачею бактерій *Lactobacillus*, переважно вибраних з вагінозу або вагініту, хронічного бактеріального вагінозу та хронічної дріжджової інфекції, хронічної інфекції сечового тракту у менопаузі, атрофічного вагініту або вагінозу та схожих інфекцій, таких як небактеріальний вагіноз.

11. Дієтична або фармацевтична композиція за п. 10 для застосування у лікуванні або запобіганні безсимптомному або рецидивному бактеріальному вагінозу у вагітних, або передчасних пологів, спричинених бактеріальним вагінозом.

12. Продукт, який **відрізняється** тим, що він містить дієтичну або фармацевтичну композицію за будь-яким з пп. 1-7.

13. Продукт за п. 12 для застосування у лікуванні або запобіганні безсимптомному або рецидивному бактеріальному вагінозу, передчасним пологам, спричиненим бактеріальним вагінозом та вульвовагінальним кандидозом.

14. Комбінація чотирьох пробіотичних штамів *Lactobacillus crispatus* DSM 22566, *Lactobacillus rhamnosus* DSM 22560, *Lactobacillus jensenii* DSM 22567 та *Lactobacillus gasseri* DSM 22583 для медичного застосування у лікуванні уражень урогенітального тракту у жінок.

		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 72 год.	
		Cd 25	Cd 26	Cd 25	Cd 26	Cd 30	Cd 31	Cd 33	Cd 34	Ec 5	Ec 6	Ga 1	Ga 3
Lb. crispatus	LBV 6	+++	+++	x	x	+++	+++	+	+	-/+	+	+++	+++
	LBV 10	+++	++/+++	+/++	-	+++	++/+++	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 33	+++	+++	x	x	+++	+++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 48	+++	+	+/++	-	+++	+++	-/+	-/+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 61	+++	++/+++	++	+	+++	++	+/++	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 88	+	-	-	-	+/++	+	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 92	+++	+++	x	x	+++	+/++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
Lb. gasseri	LBV 13	+++	+++	++	+	+++	+/++	+	-/+	-	+	+++	+++
	LBV 26	+++	+++	+++	+	++	+	+	+	-/+	+	+++	+++
	LBV 28	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+++	+++
	LBV 38	+	+	-	-	++/+++	++	+	+	-	-	+++	+++
	LBV 58	+++	+++	+++	+++	+++	+/++	-	-	-	-/+	+++	+++
	LBV 62	+++	++/+++	+++	-/+	+++	++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 63	+++	+++	+++	++	++/+++	+/++	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 65	++	+	+	-/+	++/+++	+	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 121	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++	+++
	LBV 133	+++	+++	+++	++	+	-/+	-	-	-	-	+++	+++
	LBV 146	+	+	-	-	++	+	+	-	-	-	+++	+++
	LBV 149	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	+++	+++
	LBV 150	+++	+++	+++	+++	+++	+/++	+	-	-	-/+	+++	+++
	LBV 151	+++	++	+	-/+	+++	++	+	+	-	-	+++	+++
	LBV 152	+++	+++	+++	+++	+++	+/++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 162	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 165	+++	+++	++	+	+++	+/++	+	+	-	-/+	+++	+++
	LBV 166	+	-	-	-	++	+	-/+	-/+	-	-/+	+++	+++

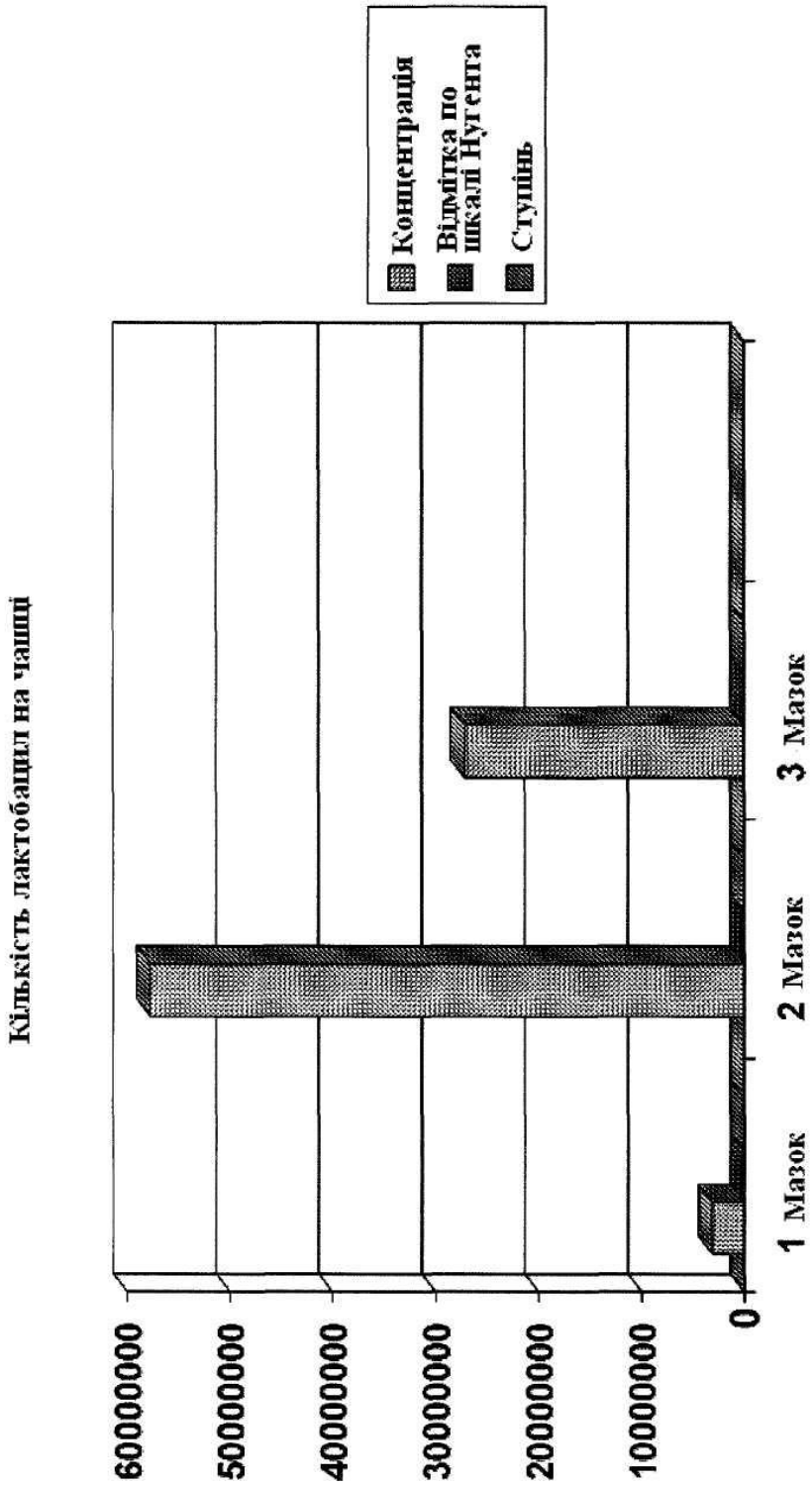
x Повне інгібування
+++ Дуже сильне інгібування
++ Сильне інгібування
+ Незначне інгібування
- Інгібування відсутне

Cd 25, 26	*Candida krusei*
Cd 30, 31	*Candida albicans*
Cd 33, 34	*Candida glabrata*
Ec 5, 6	*Escherichia coli*
Ga 1, 3	*Gardnerella vaginalis*

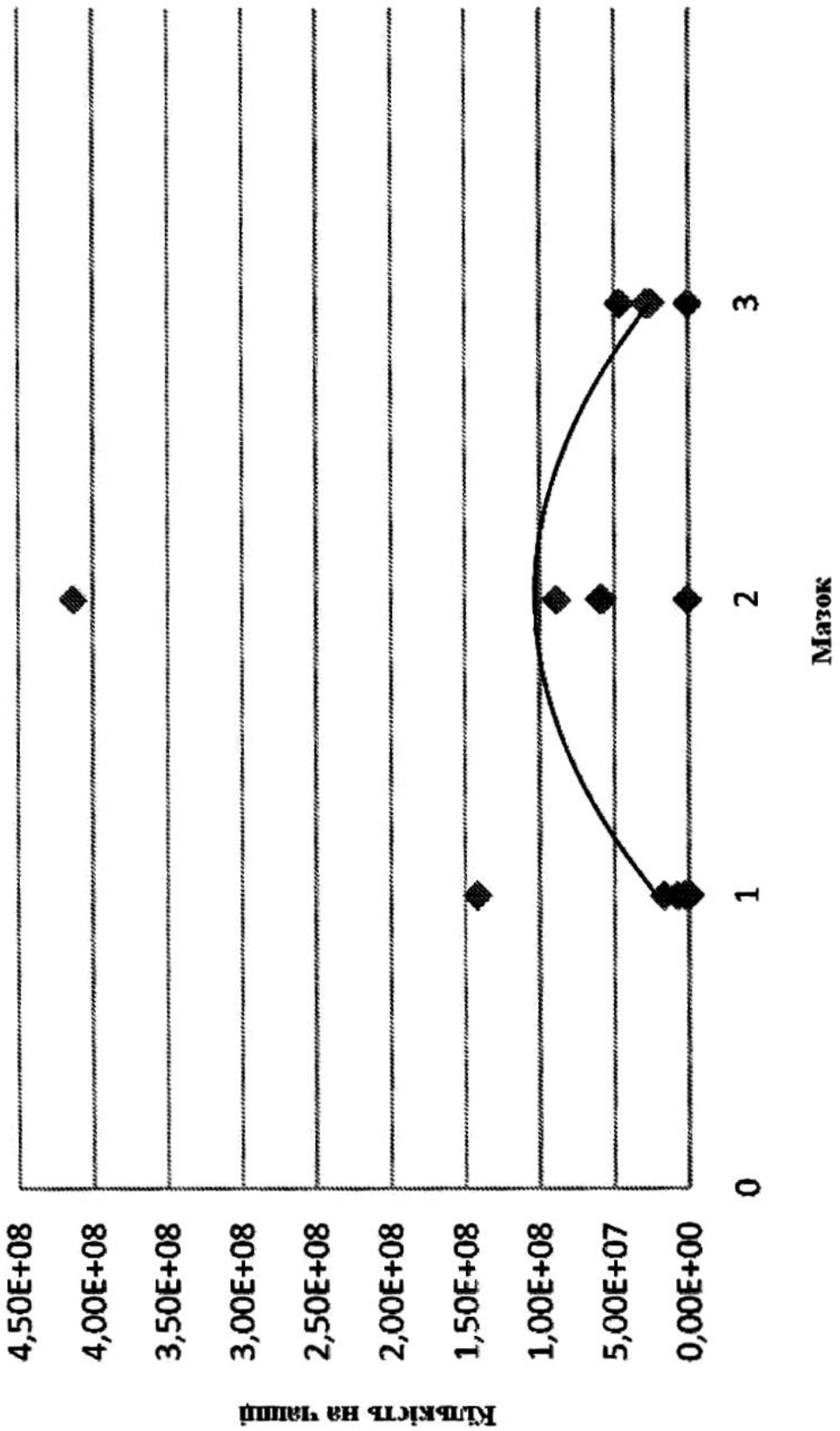
Фіг. 1

		Через 48 год.		Через 120 год.		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 48 год.		Через 72 год.	
		Cd 25	Cd 26	Cd 25	Cd 26	Cd 30	Cd 31	Cd 33	Cd 34	Ec 5	Ec 6	Ga 1	Ga 3
Lb. jensenii	LBV 2	+++	+++	++	++	+++	++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 3	++/+++	+	-	-	++	+	-/+	-/+	-	-	+++	+++
	LBV 8	x	x	+++	+++	+++	+/++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 110	x	x	+++	+++	+++	+++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 111	++	+++	x	+	+++	++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 116	+/++	-/+	-	-	++	+/++	+	+	-	+	+++	+++
Lb. rhamnosus	LBV 69	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+/++	+/++	-/+	+	+++	+++
	LBV 81	x	x	x	x	+++	+++	+	+	-/+	+	+++	+++
	LBV 96	+++	+++	x	+++	+++	+++	++	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 106	+++	x	+++	x	+++	+++	++	+/++	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 136	x	x	x	x	+++	+++	+/++	+/++	-/+	+	+++	+++
	LBV 143	x	x	x	x	+++	++	+	+	-/+	+	+++	+++
	LBV 147	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 153	x	x	x	x	+++	+++	+/++	+/++	-/+	-/+	+++	+++
	LBV 161	x	x	x	x	+++	+++	+/++	+/++	-/+	+	+++	+++
Конкуруючі продукти	LB 262	x	x	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+++	+++
	LB 263	x	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+++	+++
	LB 264	x	x	x	+++	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++
	LB 265	+++	+	+++	-	++/+++	++	+	+	+	+	+++	+++
	LB 266	+	+	-	-	+++	+	-	-	++	+	+++	+++

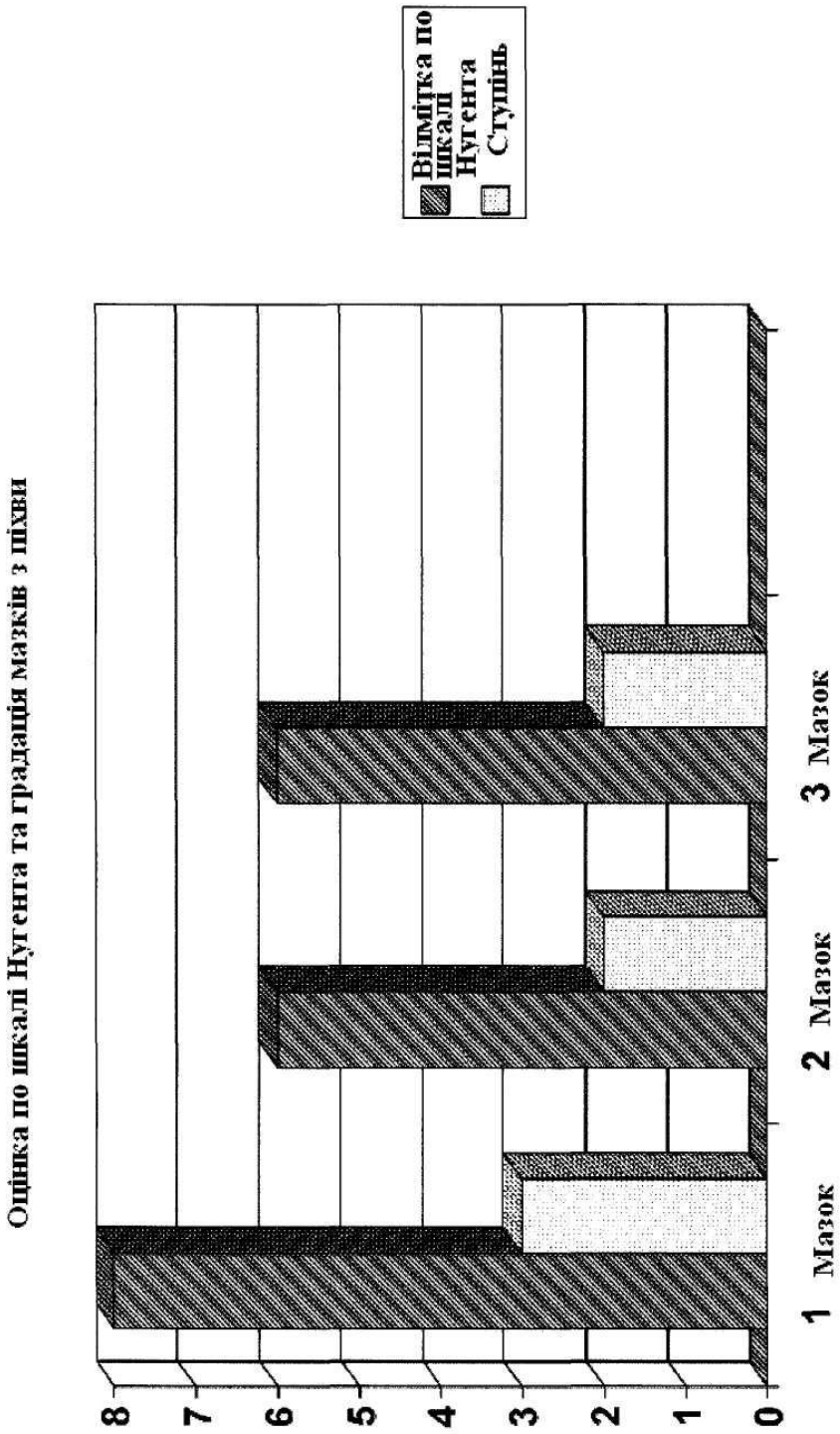
Фіг. 1 (продовження)


Кількість лактобацил на чашці
60000000
50000000
40000000
30000000
20000000
10000000
0
1 Мазок
2 Мазок
3 Мазок
Концентрація
Відмітка по шкалі Нугента
Ступінь

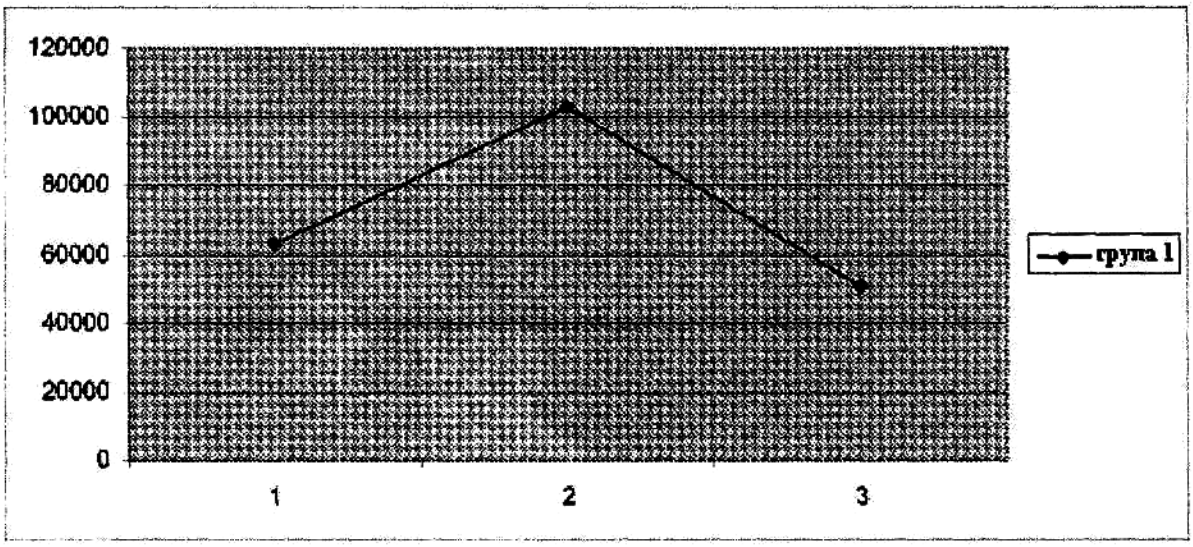
Фіг. 2


Кількість на чашці
4,50E+08
4,00E+08
3,50E+08
3,00E+08
2,50E+08
2,00E+08
1,50E+08
1,00E+08
5,00E+07
0,00E+00
0
1
2
3
Мазок

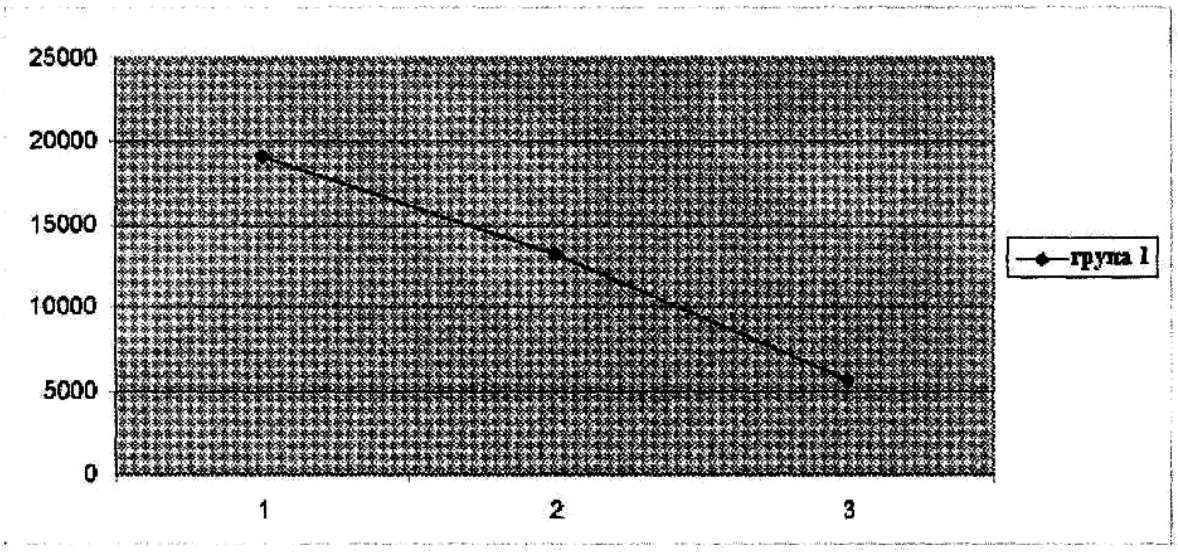
Фіг. 3


Оцінка по шкалі Нугента та градація мазків з піхви
Відмітка по шкалі Нугента
Ступінь
8
7
6
5
4
3
2
1
0
1 Мазок
2 Мазок
3 Мазок

Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601