



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119746** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

A61K 31/445 (2006.01)
A23L 33/17 (2016.01)
A61K 36/605 (2006.01)
A61K 36/70 (2006.01)
A61K 36/815 (2006.01)
A61K 36/77 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 08899**
(22) Дата подання заявки: **13.02.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **12.08.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **13155586.4**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **18.02.2013**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **EP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.01.2016, Бюл.№ 1**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **12.08.2019, Бюл.№ 15**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/EP2014/052802, 13.02.2014**
(72) Винахідник(и): **Пумарола Сеґура Серхіо (ES), Антолін Мате Марія Кармен (ES), Льюіс Пахес Марія (ES), Калво Торрас Марія де лос Анхелес (ES)**
(73) Власник(и): **Пумарола Сеґура Серхіо, с/Тavern, 17-19, E-08006 Barcelona, Spain (ES)**
(74) Представник: **Крилова Надія Іванівна, реєстр. №30**

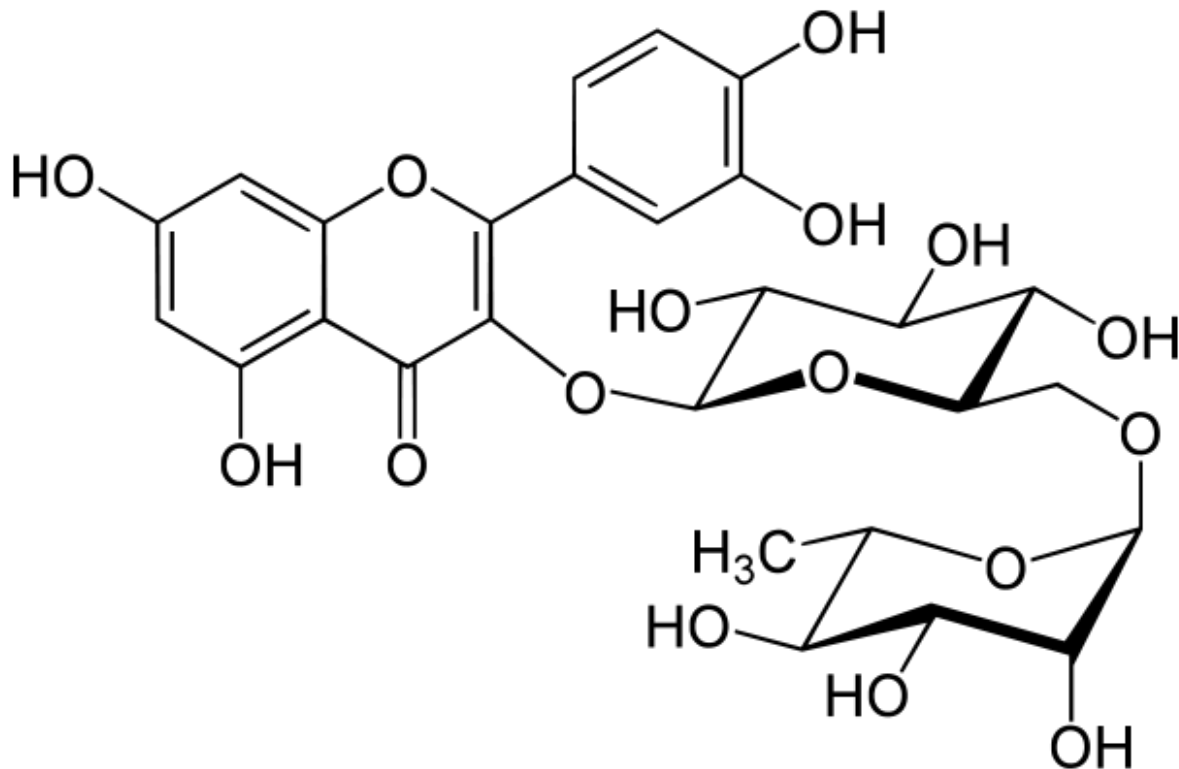
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
EP 2255822A1 (INST MATERIA MEDICA CAMS [CN]), 01.12.2010
GOMEZ LIVIA ET AL., "D-Fagomine lowers postprandial blood glucose and modulates bacterial adhesion", BRITISH JOURNAL OF NUTRITION (20120601), vol. 107, no. 12, doi:10.1017/S0007114511005009, ISSN 1475-2662, pages 1739-1746
TORRES J. ET AL., "D-Fagomine, an iminosugar with physiological effects on postprandial blood glucose and bacterial adhesion", ANNALS OF NUTRITION AND METABOLISM: EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION, METABOLIC DISEASES AND DIETETICS, S. KARGER AG, SWITZERLAND (20110101), vol. 58, no. Suppl. 3, ISSN 0250-6807, page 131
HEEJUNG KIM ET AL., "Metabolic and Pharmacological Properties of Rutin, a Dietary Quercetin Glycoside, for Treatment of Inflammatory Bowel Disease", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL (20050901), vol. 22, no. 9, doi:10.1007/S11095-005-6250-Z, ISSN 1573-904X, pages 1499-1509
SHEN YUPING ET AL., "Validated reversed phase-high performance liquid chromatography-diode array detector method for the quantitation of Rutin, a natural immunostimulant for improving survival in aquaculture practice, in toonea sinensis folium.", MEDLINE, US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US (201201), Database accession no. NLM22438663
WO 2011/117362 A1 (BIOGLANE S L N E [ES]; PUMAROLA SEGURA SERGIO [ES]; TORRES SIMON JOSEP), 29.09.2011
WO 2012/007577 A1 (BIOGLANE S L N E [ES]; TORRES SIMON JOSEP LLUIS [ES]; AMEZQUETA PEREZ), 19.01.2012
CN 101810276 A (JIANZHONG ZHENG), 25.08.2010
CN 1663448 A (SHANGHAI INST TECHNOLOGY [CN]), 07.09.2005
WO 2010/029313 A1 (SUMMIT CORP PLC [GB]; WILSON FRANCIS XAVIER [GB]; NASH ROBERT JAMES [GB]), 18.03.2010

(54) **D-ФАГОМІН ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ, ВИКЛИКАНИХ ПІДВИЩЕНОЮ АКТИВНІСТЮ ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ**

(57) Реферат:

UA 119746 C2

Винахід стосується біологічно активних домішок або функціональних агентів з імуностимулюючою здатністю для вмикання механізмів вродженої імунної відповіді на рівні слизової оболонки та, більш докладно кажучи, застосування сполуки D-фагоміну як імуностимулюючого агента вродженої імунної відповіді у слизовій оболонці та у запобіганні або у профілактиці запальних процесів або захворювань, пов'язаних з підвищеною активністю гуморальної імунної відповіді. Також винахід стосується композиції, що містить D-фагомін, для зазначеного вище застосування.



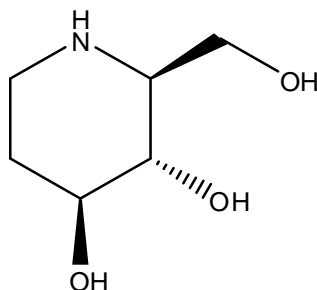
Винахід стосується біологічно активних харчових добавок або функціональних агентів з імуностимулюючою властивістю для запуску механізмів імунної відповіді на рівні слизової оболонки та, більш докладно кажучи, застосування сполуки D-фагоміну як імуностимулюючого агента вродженої імунної відповіді у слизовій оболонці та для запобігання або профілактики клінічних запальних процесів, субклінічних хронічних запальних процесів або захворювань, пов'язаних з умовно-патогенними мікроорганізмами. Винахід також стосується композиції, яка містить D-фагомін для зазначеного вище застосування.

Біологічно активні харчові добавки є продуктами, отриманими або виділеними з природних або харчових джерел, які, на додаток до власної харчової цінності, також є корисними для здоров'я осіб, що їх вживають або запобігають чи уповільнюють перебіг певних розладів або хвороб. Це є причиною того, що споживачі все частіше вимагають цей вид продуктів та їх дослідження та розробка стає все більш та більш важливою для харчової, ветеринарної та фармацевтичної промисловості.

Дослідження в галузі біологічно активних харчових добавок та функціональних продуктів харчування здійснюють у різних напрямках, як-то в напрямку визначення та отримання мікроорганізмів, які можуть бути корисними для здоров'я хазяїна та звичайно відомі, як пробіотики, або видалення природних сполук або речовин, присутніх у природних або харчових продуктах, які корисно впливають на здоров'я споживача.

Однією з таких природних сполук з доведеною корисною дією на здоров'я є D-фагомін.

D-фагомін (2R, 3R, 4R)-2-гідроксиметилпіперидин-3,4-діол є природним іміноциклітолом, тобто полігідроксильованим піперидином, який вперше було отримано з гречаного насіння рослини *Fagopyrum esculentum* Moench та потім з інших рослинних джерел, як-то шовковиця (*Morus alba*, Moraceae), китайська дереза (*Lyceum chinense*), *Castanospermum australe*, а також з листя *Xanthocercis zambesiaca* та *Morus bombycis*. Формулу D-фагоміну (2R, 3R, 4R)-2-гідроксиметилпіперидин-3,4-діолу наведено нижче.



Вважається, що серед інших функцій, D-фагомін також знижує рівень глюкози в крові після вживання їжі без стимулювання інсулінової секреції (Gomez L. et al. Br. J. Nutr. 2012 Jun; 107(12):1739-46), тому цю сполуку було рекомендовано як корисний дієтичний інгредієнт або функціональний харчовий компонент для зниження ризиків для здоров'я, пов'язаних з надмірним споживанням швидкорозчинних вуглеводів.

У Міжнародній патентній публікації WO2011117362 описано здатність D-фагоміну пригнічувати прилипання бактерій до поверхні слизової оболонки. Оскільки таке прилипання є важливою необхідною умовою для бактеріальної колонізації та інфекції, вважають, що D-фагомін є цінним агентом для запобігання та/або коад'ювантного лікування бактеріальних інфекцій. Крім того, у цьому документі також зазначено, що D-фагомін також є корисним у запобіганні дисбалансу бактеріальної мікрофлори, спричиненого кишковими патогенними бактеріями або патогенними бактеріями дихальних шляхів та ротової порожнини. Це є результатом прилипанням D-фагоміну до шкідливих бактерій, як-то певні штами роду *Escherichia*, *Salmonella* або *Streptococcus*, та відсутністю такого прилипання до бактерій, які корисні для здоров'я, як-то *Lactobacilli* або *Bifidobacteria*. У цьому сенсі корисні для здоров'я бактерії є більш схильними до заселення у слизову оболонку, ніж шкідливі.

Проведені дослідження (Gomez L, et al) також підтверджують, що D-фагомін не виявляє протимікробної активності, що є ознакою того, що при існуванні певної дії на прилипання деяких бактерій, життєздатність цих бактерій не порушується у разі наявності D-фагоміну. Інші документи попереднього рівня техніки також стосуються біологічної функції D-фагоміну та його N-алкілованих похідних (Castillo J.A. et al.: "Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine; N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays" ("Фруктоза-6-фосфат-альдолаза в органічному синтезі: отримання D-фагоміну, N-алкілованих похідних та попередні біологічні аналізи") Organic letter 2006 Vol. 8 (26): 6067-6070). Castillo J.A et al зазначили, що D-фагомін та N-алкіловані похідні C₄, C₆, C₈, C₉ та Ph-CH₂ не виявляють протимікробної активності.

Було виявлено нову біологічну функцію D-фагоміну. Зокрема те, що D-фагомін має здатність до запуску механізмів вродженої імунної відповіді на рівні слизової оболонки. Покращення дії механізмів вродженої імунної відповіді допомагає пацієнтам зменшити інфекції, викликані потенційними патогенними мікроорганізмами, розташованими поруч зі слизовою оболонкою та запобігає їх виникненню. Крім того, це покращення природних механізмів захисту вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки дозволяє уникнути небажаної підвищеної активності гуморальної імунної відповіді, яка є другою важливою системою захисту проти мікроорганізмів. Ця гуморальна імунна відповідь, здійснення якої відбувається за рахунок адаптивної імунної системи звичайно є більш потужною та системною, а її підвищена активність сприяє виникненню випадків хронічних субклінічних запалень.

Поліпшення вродженої імунної відповіді має відношення не тільки до підтримання контролю над бактеріями, але й до підтримання контролю над вірусами та іншими паразитами.

Вважається, що мікроорганізми підтримують належний рівень активності нашої вродженої імунної системи. Було припущено, що неприродний розвиток імунної системи та зокрема вродженої імунної системи призводить до збільшення чутливості до автоімунних захворювань. З цією аномальною відповіддю, наприклад, пов'язані такі хвороби, як глютеїнова хвороба, хвороба Крона та виразковий коліт. Відсутність або недостатність вродженої імунної відповіді сприяє появі підвищеної активності гуморальної імунної відповіді, яка може призвести до появи неконтрольованих руйнівних автоімунних відповідей. Взагалі було виявлено більш, ніж 100 різних видів автоімунних захворювань, включаючи бронхіальну астму, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, псоріатичний та ревматоїдний артрит, цукровий діабет тощо.

Також вважається, що хронічне безсимптомне запалення, отримане внаслідок змінення взаємодії між хазяїном та кишковою мікробіотою, підсилює дію гуморальної запальної відповіді та вважається причиною, регулюючою швидкість розвитку метаболічного синдрому та інших захворювань, як-то ожиріння, гіпертонії, цукрового діабету другого типу, стеатозу печінки, хвороби Альцгеймера або раку (як-то раку молочної залози чи раку товстого кишечника).

Отже дуже цікаво буде знайти нові шляхи природного підсилення вродженої імунної відповіді на місцевому рівні слизової оболонки з одночасним зменшенням ризику появи небажаної сильної гуморальної імунної відповіді.

Вроджена імунна система є першою лінією захисту організму та охоплює клітини та механізми неспецифічного захисту хазяїна від інфекції інших організмів. Це означає, що клітини цієї вродженої системи впізнають та реагують на патогени загальним шляхом та на відміну від адаптивної імунної системи, ця система не надає хазяїну довготривалого або захисного імунітету. Вроджені імунні системи створюють негайний захист проти інфекції за рахунок дії різних типів клітин, як-то мастоцити, фагоцити, фагоцитів (макрофаги, нейтрофіли та дендритні клітини), базофіли, еозинофіли та природні клітини-кілери (NK - клітини), а також шляхом біохімічного механізму, як-то системи комплементу.

Головні функції вродженої імунної системи хребетних тварин охоплюють:

а) Залучення імунних клітин до інфікованих ділянок шляхом продукування хімічних факторів, включаючи спеціалізовані хімічні посередники, які мають назву цитокінів.

б) Активацію каскаду реакцій комплементу для визначення бактерій, активації клітин та сприяння виведення загинувших клітин або комплексів антитіл.

в) Визначення та усунення чужорідних речовин, присутніх в органах, тканинах, крові та лімфі дією спеціалізованих білих клітин крові.

г) Активацію адаптивної імунної системи процесом, відомим, як антиген-презентація.

е) Дія як фізичного та хімічного бар'єру для інфекційних агентів.

В основі заявлених винаходів знаходиться отриманий винахідниками доказ вивільнення цитокінів, як-то TNF- α , присутніми у слизовій оболонці клітинами вродженої імунної системи у разі появи D-фагоміну.

Підсилення вродженої імунної відповіді у слизовій оболонці являє собою природний механізм захисту проти патогенів, оскільки він підтримує природний захист, який уникає вмикання більш потужної, агресивної та системної відповіді адаптивної імунної системи проти патогенів, здатних уникати природної захисної дії слизової оболонки або ховатися від неї. Наявність "активованої" вродженої імунної системи дозволяє уникнути вмикання механізмів критичної відповіді проти пристосованих до середовища певних патогенних бактерій, які з часом стають причиною хронічних безсимптомних запальних процесів.

Стислий опис фігур.

Фіг. 1 є зображенням відновлення штаму 434 E.coli зі слизової оболонки товстого кишечника. Також було застосовано негативний контроль без додавання E.coli до досліджуваної композиції. Як позитивного контролю було застосовано зразок, який містив E.coli, але не містив D-фагомін.

Також додатково було здійснено перевірку трьох різних зразків *E. coli* з трьома різними дозами D-фагоміну (50, 500 та 5000 мкг/мл). Отримані результати виявили наявність дозозалежної антиадгезивної властивості D-фагоміну проти *E.coli*.

Фіг. 2 є зображенням вивільнення TNF-альфа присутніми у слизовій оболонці товстого кишечника клітинами вродженої імунної системи. Вимірювання TNF здійснювали у супернатанті. Як і на Фіг. 1, було застосовано негативний контроль без додавання до досліджуваної композиції *E.coli* та як позитивного контролю було застосовано зразок, який містив *E.coli*, але не містив D-фагомін. Так само було здійснено перевірку трьох різних зразків *E. coli* з трьома різними дозами D-фагоміну (50, 500 та 5000 мкг/мл). Отримані результати виявили наявність здатності D-фагоміну стимулювати вивільнення TNF-альфа та що у цьому вивільненні менша доза є більш ефективною. Це є прямим показником того, що D-фагомін має імуностимулюючу дію, спрямовану до вродженої імунної системи, яка допомагає імунній системі визначати та атакувати мікроорганізми на рівні слизової оболонки.

Перший аспект винаходу стосується сполуки D-фагоміну або її фармацевтично прийнятної солі або її солі, прийнятної для ветеринарного або харчового застосування, для застосування як імуностимулюючого агента вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки та як агента для запобігання запальних процесів, пов'язаних з надлишковою активацією гуморальної імунної відповіді.

Імуностимуляція вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки є корисною, тому що вона знижує частоту випадків виникнення більш потужних та потенційно шкідливих гуморальних імунних відповідей. Отже D - фагомін допомагає у запобіганні виникнення автоімунних захворювань, як-то цукровий діабет, псоріаз, метаболічний синдром, хвороба Крона, глютеїнова хвороба, ревматична поліміалгія або ревматоїдний артрит та зменшує розвиток хвороб, пов'язаних з аномальною гуморальною запальною відповіддю, як-то метаболічний синдром та інші захворювання, як-то ожиріння, гіпертонія, цукровий діабет другого типу, стеатозу печінки, хвороба Альцгеймера або рак (як-то рак молочної залози або товстого кишечника).

Необмежені приклади прийнятних для застосування у контексті винаходу солей D-фагоміну охоплюють тартратні, гемітартратні, цитратні, геміцитратні, гідрохлоридні, малатні або ацетатні солі.

Було виявлено, що D-фагомін створює імуностимулюючу відповідь вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки, яка є першим бар'єром, який зустрічає патогени у процесі зараження. D-фагомін активує відповідь вродженої імунної системи на рівні всіх типів слизової оболонки, а саме слизової оболонки ротової порожнини, стравоходу, шлунку, кишечника, товстого кишечника, носової порожнини, бронхів, уретри або матки.

У окремому бажаному втіленні активація відповіді вродженої імунної системи відбувається у слизовій оболонці носової порожнини та така активація є корисною як коад'юванта для покращення дії назальної вакцини, ефективною проти бактерій, як-то *Streptococcus pneumoniae* або вірусів, як-то вірус грипу. У іншому окремому бажаному втіленні активація відповіді вродженої імунної системи відбувається у слизовій оболонці кишечника та така активація є корисною як коад'юванта для покращення дії вакцини перорального застосування, ефективною проти певних мікроорганізмів, як-то вібріони, збудники туберкульозу або поліовіруси.

У найбільш бажаному втіленні активація відповіді вродженої імунної системи відбувається у слизовій оболонці товстого кишечника та застосування D-фагоміну є особливо цікавим для запуску вродженої імунної відповіді, локалізованої на рівні товстого кишечника з різних причин. Першою причиною є те, що товстий кишечник є однією з ділянок, багатою на бактерії з більш вираженою їх концентрацією та також однією з ділянок, в якій присутні мікроорганізми з більшою умовно-патогенною дією, включаючи розповсюджену у людині *E. coli*. У цьому сенсі, товстий кишечник також є одною з найбільш чутливих та найбільш сприятливих до інфекції ділянок організму, отже важливо, щоб вроджена імунна система була активована та була під контролем на цьому рівні шлунково-кишкового тракту. Другою причиною є те, що хоча інший вид вуглеводів може мати подібний тип імуностимулюючої активності вродженої імунної системи, але вони звичайно не досягають товстого кишечника, оскільки споживаються або руйнуються кишковими бактеріями під час транзиту через шлунково - кишковий тракт. На відміну від цих сполук, D-фагомін є імуноцукром, який не метаболізується кишковими бактеріями, отже він є здатним досягати товстого кишечника, в якому він може здійснити свою імуностимулюючу функцію на місцевому рівні та навіть з дуже низькими концентраціями.

Хоча наявність D-фагоміну з концентраціями у 5000 мкг/мл або менше є достатньою для отримання імуностимулюючої дії вродженої імунної системи у слизовій оболонці, насправді було несподівано виявлено, що чим меншою була застосована концентрація D-фагоміну, тим більш ефективною була вроджена імунна відповідь. Фактично, у бажаному втіленні D - фагомін

застосовують з концентраціями у 500 мкг/мл або менше та у більш переважному втіленні цю сполуку застосовують з концентраціями у 50 мкг/мл або менше. Було виявлено несподіване зростання продукування цитокіну TNF- α у разі застосування D-фагоміну з концентраціями у 50 мкг/мл або менше та це продукування цитокіну TNF- α є прямим показником активації вродженої імунної системи саме внаслідок її імуностимулювання.

Регулярне споживання D-фагоміну як агента, здатного підтримувати вроджену імунну систему у "тривожному стані", сприяє профілактиці та запобіганню виникнення запальних процесів, пов'язаних з умовно-патогенними мікроорганізмами. Зокрема воно може бути дуже корисним у запобіганні випадків хронічного або підгострого запалення, спричиненого бактеріями, здатними уникати дії імунної системи шляхом утворення біоплівки, які можуть ховати колонії від цієї дії. Цей випадок має тенденцію до полегшення інфекції та запуску імунних відповідей не тільки на рівні слизової оболонки, але й також на серозному рівні. Існування цього типу серозних відповідей є джерелом хронічного запального стану.

У окремому та бажаному втіленні за винаходом D-фагомін сприяє запобіганню запальних процесів, пов'язаних з бактеріями, вибраними з гамма-протеобактерій, як-то *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* або з бактерій роду *Streptococcus*, як-то *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae* або *Enterococcus faecalis*.

У бажаному втіленні винаходу D-фагомін є корисним у запобіганні запальних процесів, пов'язаних з надлишковою активацією гуморальної відповіді певними патогенними штамми *Escherichia Coli*, які мають дуже сильну тенденцію уникати дії імунної системи шляхом утворення біоплівки або іншим шляхом та спричиняють хронічні клінічні та безсимптомні запальні процеси.

Інший аспект винаходу стосується композиції, що містить D-фагомін або його фармацевтично прийнятну сіль або її сіль, прийнятну для ветеринарного або харчового застосування та принаймні одну домішку для застосування як імуностимулюючого агента вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки та як агента для застосування у запобіганні запальних процесів, пов'язаних з умовно-патогенними мікроорганізмами.

Необмежені види солей D-фагоміну, які можуть бути застосовані у композиції за винаходом охоплюють тартратні, гемітартратні, цитратні, геміцитратні, гідрохлоридні, малатні або ацетатні солі.

Композиція за винаходом може знаходитися у твердій формі або у формі рідкої, бажано водної композиції.

У випадку застосування у вигляді рідкої або бажано водної композиції D-фагомін знаходиться у концентрації 5000 мкг/мл або менше, переважно 500 мкг/мл або менше та більш переважно 50 мкг/мл або менше.

D-фагомін у композиції за винаходом може мати природне або синтетичне походження та може існувати у формі збагаченого екстракту, отриманого з природного джерела. У разі існування у вигляді такого екстракту, D-фагомін переважним чином отримують шляхом екстракції або харчового виробництва з насіння рослин *Fagopyrum esculentum* або *Fagopyrum tataricum*, з листя рослин *Morus bombycis* або *Morus alba*, коріння рослини *Lycium chinense*, з коріння та листя рослини *Xanthocercis zambesiaca*, плодів *Angylocalyx pinaertii*, листя *Barbarea nitida*, насіння *Castanospermum australe* або коріння *Lonchocarpus latifolius*.

У окремому бажаному втіленні композиція за винаходом містить D-фагомін у вигляді екстракту з насіння *Fagopyrum esculentum*.

Композицію за винаходом може бути отримано у вигляді композиції для фармацевтичного, ветеринарного або харчового застосування та останнє є більш переважним типом композиції.

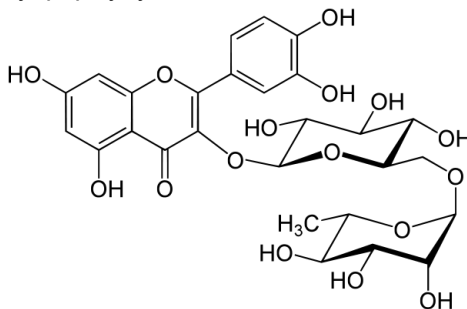
У бажаному втіленні фармацевтична композиція є рідиною для полоскання рота, гелем, рідким лосьйоном для чищення зубів, зубною пастою, жувальною гумкою, очищувальним засобом для зубів та ротової порожнини або кремом для фіксації зубних протезів. У більш бажаному втіленні фармацевтична композиція є жувальною гумкою.

Крім того, також можливо застосування D-фагоміну у вигляді частини харчової композиції для людини, тварин та кормового продукту. Харчова композиція за винаходом також може бути присутньою як домішки, яку додають до складу їжі чи напою для отримання функціонального харчового продукту або напою. У цій формі її може бути додано до рідких харчових продуктів або концентратів або порошоків, як-то до молока та до рідких подібних до молока продуктів, різних напоїв, включаючи соки, безалкогольні, алкогольні, спортивні напої тощо. Особливо корисним є отримання композиції D-фагоміну за винаходом як частини продукту для годування немовлят, переважно як частини молочної суміші першого рівня. Також, у разі отримання композиції D-фагоміну з гречки (*Fagopyrum esculentum*), її очищений екстракт може бути частиною пива, безалкогольного пива, напою, подібного до чаю або молока, йогурту, макаронів,

печива, бісквітів, злакових батончиків, набухлих зерен, хліба, млинців, тортів, кремів, десертів, сухих сніданків тощо. Харчову композицію або харчову домішку також можна отримати природним шляхом, наприклад, від домашньої худоби, такої як корова або іншої тварини, яка виробляє в молоці D-фагомін. Це може бути досягнуто годуванням тварини рослинами

5 *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum*, *Morus alba* або очищеним D-фагоміном.

У іншому втіленні композиція за винаходом також містить рутин або інші флавонолові поліфеноли (тобто гесперидин). Рутин є глікозидом, який займає проміжне положення між флавонолом кверцетином та дисахаридом рутинозою (α -L-рамнопіранозил-(1 \rightarrow 6))- β -D-глюкопіраноза) та має наступну формулу:



10 У разі перорального введення рутину, він має тенденцію бути стійким у верхній частині кишечника, але швидко піддається деглікозилюванню з вивільненням кверцитину у товстому кишечнику (Kim H. et al. "Metabolic and pharmacological Properties of rutin, a dietary quercetin glycoside for treatment of inflammatory bowel disease" ("Метаболічні та фармакологічні властивості рутину, харчового кверцетинового глікозиду для застосування у лікуванні запальної хвороби кишечника"), Pharmaceutical research, 2005, Vol. 22 № 9). Вважають, що кверцитин має протизапальну дію, особливо у лікуванні хронічних запальних станів, як-то запальної хвороби кишечника, отже застосування рутину у композиції за винаходом є джерелом кверцитину, який надає синергетичний ефект у лікуванні та у запобіганні запалень, особливо на рівні товстого кишечника, в якому, з одного боку, виникає вивільнення кверцитину, а з іншого боку, застосований D-фагомін є здатним досягнути цього місця з наданням своєї імуностимулюючої дії. Наявність рутину допомагає певним чином тримати під контролем запущену шляхом дії D-фагоміну імунну відповідь.

Крім того, зазначено що рутин, як і d-фагомін, є присутнім у гречці звичайній (*Fagopyrum esculentum*), а також у татарській гречці (*Fagopyrum tataricum*), в якій звичайно присутні більші кількості рутину, ніж у *F. esculentum*. У цьому сенсі, у бажаному втіленні за винаходом, композицію за винаходом отримують зі збагаченого D-фагоміном та рутином екстракту *Fagopyrum esculentum*.

Додаткові цілі, переваги та ознаки цього винаходу стануть очевидними для фахівців в даній галузі після вивчення опису або можуть бути вивчені при практичному застосуванні винаходу. Наступні приклади наведено як ілюстрації та не призначено для обмеження цього винаходу. Крім того, винахід також охоплює всі можливі комбінації описаних тут особливих та бажаних втілень.

ПРИКЛАДИ

35 Приклад 1: Біологічна активність D-фагоміну у зразку товстого кишечника людини.

Метою цих досліджень було визначення дій "ex vivo" D-фагоміну на адгезивні властивості *E. Coli*, спрямовані до зразків слизової оболонки товстого кишечника людини та їх можливого впливу на вивільнення медіаторів запалення з діапазоном доз як показника активації вродженої імунної відповіді.

40 Застосований спосіб полягав у інкубуванні штаму *E.coli* з отриманими хірургічним шляхом зразками слизової оболонки товстого кишечника. Наміром дослідників було збереження цілої структури зразків слизової оболонки, включаючи численні клітинні популяції, як-то популяції епітеліальних та імунокомпетентних клітин (макрофагів, дендритних клітин, плазматитів та лімфоцитів) зі збереженням першонаочної структури та потрібного для клітинної взаємодії розташування всіх цих клітин. Іншими словами, було застосовано підхід, призначений імітувати умови слизової оболонки товстого кишечника in vivo.

Планом досліджень було передбачено перевірку доз, які містили 0, 50, 500 та 5000 мкг/мл D-фагоміну.

У цих дослідженнях були застосовані патогенні штами *E coli*, головними відмінностями яких від інших непатогенних штамів цього мікроорганізму була пов'язана з ними здатність уникати дії імунної системи.

Матеріали та способи.

Культура органу: Зразки макроскопічно нормальної слизової оболонки товстого кишечника було отримано хірургічним шляхом від пацієнтів, які зазнали колектомію внаслідок лікування раку товстого кишечника. Вільні від захворювання ділянки зібрали у крижаному фізіологічному розчині та негайно перенесли до лабораторії відділення досліджень травлення лікарні Vall d'Hebron у Барселоні. Після промивання фізіологічним розчином слизову оболонку відокремили від м'язового шару, та шматочки масою 25-30 мг розмістили поверхнею дорігори у культуральні лунки з розміром дна у 500 мкм та діаметром 15 мм (Netwell culture systems, Costar, Cambridge, MA) та розташували таким чином, щоб епітеліальна поверхня знаходилася більшою частиною зверху. Фільтри розташували над лунками, які містили 1,5 мл середовища RPMI (CanSera, Rexdale, Ontario, Canada), збагаченого 10 % ембріональною телячою сироваткою (FCS; Gibco-BRL, Eggenstein, Germany), 2 mM глютаміном та антибіотиками: 100 Од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 50 мкг/мл гентаміцину (всі отримані від Normon, Madrid, Spain). Цю кількість середовища застосували лише для збереження вологості поверхні, а не для її занурення.

Зразки, отримані шляхом біопсії інкубували при температурі 37°C в атмосфері, яка містила 95 % O₂+5 % CO₂ та протягом години стимулювали PMA (форбол-12-міристат-13-ацетат) та лоніміцином (100/1000 нг/мл), отриманими від Sigma.

Потім середовище замінили свіжим середовищем RPMI 1640 (без глюкози), збагаченим 10 % ембріональною телячою сироваткою та бікарбонатом натрію з концентрацією 24 мМ/л.

Далі до експлантатів обережно додали штам *E. coli* (10⁸ КУО/мл) та фагомін (50, 500 та 5000 мкг/мл) та після чотирьохгодинного інкубування культури тканин з *E.coli* супернатанти відібрали для вимірювання відновлення *E.coli*, вивільнення TNF-α, LDH (життєздатності) та pH. Потім тканини промили, гомогенізували та піддали аналізу на відновлення *E.coli* та LDH-аналізу (дослідження життєздатності тканин).

Штами бактерій: Патогенний еталонний штам *E. coli* (CECT 434, (Migula 1895) Castellani та Chalmers 1919) було отримано від Dr. Maria Angeles Calvo (лабораторія мікробіології ветеринарного факультету Незалежного Університету Барселони (Іспанія)).

Інокулят *E.coli*: За добу перед початком експерименту з тканинами, штам *E.coli* інокулювали у середовищі Luria Bertani (отриманому в аптеці лікарні Vall d'Hebron Незалежного Університету Барселони (Іспанія)) з температурою 37 °C в аеробних умовах протягом доби. У день експерименту бактерії зібрали у стаціонарній фазі та здійснили підрахунок кількості клітин у бактеріальній суспензії із застосуванням оптичної густини з поглинанням з довжиною хвилі 600 нм та до лунок з культурою тканин додали бактерії з відповідним розведенням.

Промивання тканин: Для кількісного аналізу лише прикріплених бактерій *E.coli* в кінці культивування, тканини відновили та промили 2 мл фізіологічного розчину у орбітальному змішувачі при низькій швидкості протягом 2 хв. Після промивання кожну тканину гомогенізували у 1 мл фізіологічного розчину та отримали розведення, необхідні для кількісного аналізу відновлення *E.coli* у твердому селективному середовищі на основі агару.

Відновлення *E.coli* в кінці експерименту: Супернатант та тканинне відновлення *E.coli* піддали кількісному аналізу одразу після експерименту шляхом культивування у селективному до ентеробактерій (*Enterobacteriaceae*) твердому середовищі. Для кожного зразка було здійснено принаймні 3 різних розведення. Підрахунок кількості колоній для кожного зразка було здійснено вручну через 24 години по тому. Результати було нормалізовано до стандартного розміру у 30 мг.

Кількісний аналіз TNF-α: Концентрацію TNF-α у супернатантах вимірювали із застосуванням наявної у продажу системи ІФА-аналізу для людського цитокіну TNF-α (Ready to Set, e-Bioscience). Концентрації було виражено у пікограмах (TNF-α) на 30 мг тканини.

Життєздатність тканини товстого кишечника: Для оцінки життєздатності тканини було обчислено активність вивільнення у супернатант LDH (лактатдегідрогенази). Цей спосіб було перевірено Finnie (Gut 1995). Потім було обчислено співвідношення активності LDH у супернатанті до загальної активності LDH у тканинних гомогенатах, яке було застосовано для оцінки відсотка життєздатних тканин. Зразки тканин гомогенізували у буфері Tris/HCl (100 мМ/л, pH 7,4) та супернатанти дослідили на наявність LDH із застосуванням способу спектрофотометричного аналізу. Життєздатність тканин оцінювали у вигляді вивільнення LDH на міліграм тканини.

Статистичний аналіз: Результати на графіках наведені у вигляді середніх значень із зазначенням стандартної похибки середнього значення (SEM) або індивідуальних даних.

РЕЗУЛЬТАТИ

Відновлення *E. coli* у тканині наприкінці експерименту:

Результати відновлення E.coli у зразках тканин наведені в Таблиці 1 та на Фіг. 1:

Таблиця 1

		Контроль Ec	Fag 50	Fag 500	Fag 5000
E.coli × 10 ⁶	1	8,2	4	2,4	1,6
Відновлення у тканині	2		4,4	0,8	1,6
E.coli × 10 ⁶	1	7,45	4,12	2,21	1,4
Стандартизовані 30 мг	2		4,31	0,9	1,55
Середня величина		7,45	4,22	1,56	1,47
SEM			0,09	0,65	0,07
Середній % від контролю		100,0 %	56,6 %	21,0 %	19,8 %
% SEM від контролю		1,3 %	8,7 %	1,0 %	1,3 %

Fag 50, Fag 500, Fag 5000 - зразки E. coli з трьома різними дозами D-фагоміну (50, 500 та 5000 мкг/мл).

- 5 Як може бути чітко видно, виявлено, що збільшена присутність E.coli у тканині товстого кишечника у контрольному зразку та наявність прикріплених до тканини бактерій зменшується після зростання концентрації D-фагоміну. Іншими словами можна зробити висновок, що D-фагомін має антиадгезивну дію, спрямовану проти прикріплення E.coli до епітелію товстого кишечника. Ця дія стає більш ефективною при збільшенні концентрації D-фагоміну.

Вивільнення цитокіну:

- 10 Результати досліджень вивільнення цитокіну наведені в Таблиці 2 та Фіг. 2:

Таблиця 2

		Контроль B	Контроль Ec	Fag 50	Fag 500	Fag 5000
TNF-альфа/мл	1	12,9	0,7	106,2	20,7	13,8
	2	25,2	0,4	98,8	18,6	5,7
Mг(маса тканини)	1	31,2	33,0	29,1	32,6	34,3
	2	26,5	33,6	30,6	26,2	31,0
TNF-альфа (1,5 мл)	1	18,6	0,9	164,2	28,6	18,1
Стандартизовані 30 мг	2	42,8	0,5	145,4	31,9	8,2
Середнє значення		30,7	0,7	154,8	30,3	13,2
SEM		8,5	0,1	6,7	1,2	3,5

Контроль B - контроль без E.coli

Контроль Ec - контроль з E.coli

- 15 Отримані результати чітко демонструють, що наявність D-фагоміну має стимулюючу дію на вивільнення TNF-альфа як порівняно до контролю з E.coli, так і порівняно до контролю без E.coli. Крім того, слід зазначити, що вивільнення TNF-альфа також залежить від концентрації D-фагоміну. Було цікаво бачити те, що застосування найменшої концентрації D-фагоміну призводило до більш ефективного вивільнення цитокіну. Вивільнення TNF-альфа при застосуванні дозування у 50 мкг/мл було несподівано ефективним, оскільки воно у 5 разів перевищувало подібне вивільнення у разі застосування дози у 500 мкг/ мл та приблизно у 8 разів перевищувало подібне вивільнення у разі застосування дози у 500 мкг/ мл.

- 20 Стисло кажучи, цей аналіз виявив, що D-фагомін є показником активації вродженої імунної відповіді дозозалежним чином та що цей показник є більш ефективним у випадку застосування низьких концентрацій у 50 мкг/ мл або менше.

Контроль життєздатності:

- 25 Результати дослідження життєздатності тканини товстого кишечника наведені в Таблиці 3:

Таблиця 3

	LDH (життєздатність)	pH
Контроль В	93,25 %	7,71
Контроль Ес	94,16 %	7,62
Fag 50	88,20 %	7,65
Fag 500	91,47 %	7,59
Fag 5000	83,88 %	7,65

Отримані результати свідчать про те, що спільне культивування з *E.coli* або фагоміном не впливає на життєздатність тканин.

5 Приклад 2: Композиції, що містять D-фагомін.

Було отримано наступні композиції з D-фагоміном:

Напій з додаванням D-фагоміну (50 мг) та рутину (500 мг).

Таблетки з додаванням D-фагоміну (50 мг) та рутину (500 мг).

10 Бісквіти, зроблені з борошна гречки (*Fagopyrum esculentum*), яка у природному стані містить D-фагомін та рутин з додаванням композиції пребіотиків, які містять рослинні волокна, FOS (фруктоолігосахаридів) та XOS (ксилоолігосахаридів).

Гречане (*Fagopyrum esculentum*) безалкогольне пиво, яке має 8 млн⁻¹ D-фагоміну та 50 млн⁻¹ рутину.

15 Продукт для харчування дітей на основі коров'ячого молока, який вживали з гречкою з вмістом 10 млн⁻¹ D-фагоміну

Позбавлена цукру жувальна гумка з D-фагоміном (50 мг), призначена для стимулювання вродженої імунної відповіді у слизовій оболонці ротової порожнини та для запобігання виникнення карієсу та захворювань пародонта.

20 Льодяник з D-фагоміном (20 мг), призначеним для коад'ювантного лікування бактеріальної інфекції у горлі або у кишечнику.

Пігулка, мікроінкапсульована композиція, яка містить D-фагомін (50 мг) та рутин (500 мг) для застосування як домішок для отримання продуктів функціонального харчування або фармацевтичних композицій для покращення біологічного засвоєння речовин у товстому кишечнику.

25 Спрей для носа з D-фагоміном (10 мг) коад'ювантної дії для назальних вакцин, призначений для застосування у процесах імунізації проти *Streptococcus pneumoniae*, вірусу грипу тощо.

Порошковий препарат для перорального застосування, який містить 50-100 мг D-фагоміну для коад'ювантної дії у процесах кишкових інфекцій разом з пробіотиками (лактобацили, біфідобактерії).

30

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб запобігання аутоімунним захворюванням та захворюванням, пов'язаним з патологічною гуморальною запальною відповіддю, шляхом стимуляції вродженої імунної системи на рівні слизової оболонки, що включає введення суб'єкту сполуки D-фагоміну у формі його фармацевтично прийнятної солі або солі, прийнятної для ветеринарного або харчового застосування.

2. Спосіб за п. 1, де вроджена імунна система знаходиться на рівні слизової оболонки порожнини рота, слизової оболонки стравоходу, слизової оболонки шлунка, слизової оболонки кишечника, слизової оболонки товстої кишки, слизової оболонки носа, слизової оболонки бронхів, слизової оболонки уретри або слизової оболонки матки.

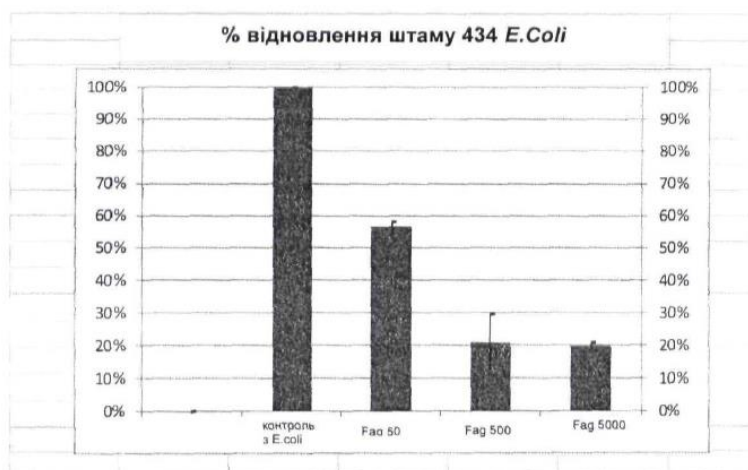
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, де аутоімунні захворювання та захворювання, пов'язані з патологічною гуморальною запальною відповіддю, є вибраними із групи, що включає: глютену хворобу, хворобу Крона та виразковий коліт, бронхіальну астму, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, псоріатичний та ревматоїдний артрит, цукровий діабет, метаболічний синдром, ожиріння, гіпертонію, стеатоз печінки, хворобу Альцгеймера та рак.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, в якому D-фагомін використовують у формі його фармацевтично прийнятної солі або солі, прийнятної для ветеринарного або харчового застосування, у складі фармацевтичної, ветеринарної або харчової композиції.

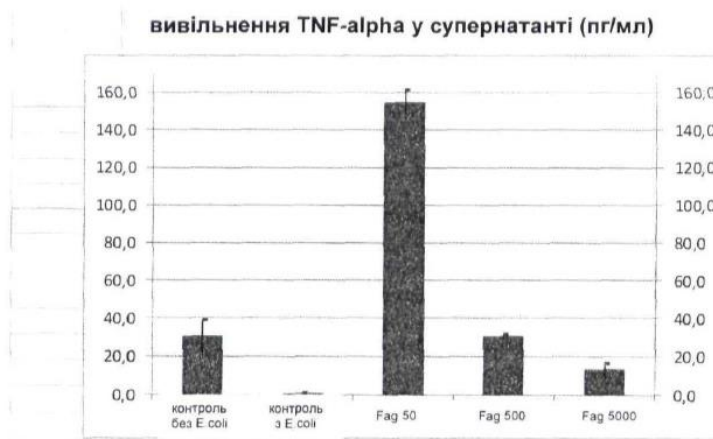
5. Спосіб за п. 4, де композиція являє собою тверду або водну композицію.

6. Спосіб за п. 5, де водна композиція містить D-фагомін в концентрації, що дорівнює або менше 5000 мкг/мл.

7. Спосіб за п. 6, де водна композиція містить D-фагомін в концентрації, що дорівнює або менше 50 мкг/мл.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 4-7, де D-фагомін знаходиться у вигляді збагаченого екстракту з природного джерела або хімічної речовини тонкого органічного синтезу.
- 5 9. Спосіб за п. 8, де природним джерелом D-фагоміну є насіння *Fagopyrum esculentum*, *Fagopyrum tataricum* листя *Morus bombycis* або *Morus alba*, коріння *Lycium chinense*, коріння і листя *Xanthocercis zambesiaca*, плоди *Angylocalyx pinaertii*, листя *Baphia nitida*, насіння *Castanospermum austral* та коріння *Lonchocarpus latifolius*.
10. Спосіб за будь-яким з пп. 4-9, де композиція додатково містить рутин.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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