

УДК 571.27 579.61

## **ИНАКТИВИРОВАННАЯ БАКТЕРИАЛЬНАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СУСПЕНЗИЯ E. COLI – ДЕЙСТВУЮЩИЙ КОМПОНЕНТ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

**Александрова М.В., Радченко В.В., Липкин В.М.**

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва*

*Москва, Россия (117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10) [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru)*

---

*Обзор посвящён использованию инактивированной бактериальной суспензии клеток бактерии *Escherichia coli* (БКС *E. coli*) в качестве действующего компонента современных фармакологических препаратов. Освещена история вопроса, раскрываются механизмы действия этой группы препаратов через призму современных представлений об иммунитете и развитии воспалительных реакций. Приведён список целевых патологий и анализ опыта лечебного применения. Затронуты особенности биофармацевтического производства и приведены примеры положения некоторых лекарств в этом секторе фармрынка. Обосновывается перспективность разработки отечественных препаратов, имеющих в составе БКС *E. coli*. Работа может быть полезна для студентов и аспирантов биологических и медицинских специальностей, практикующих врачей и специалистов, занимающихся стратегическим планированием и выводом на российский рынок новых лекарственных препаратов.*

---

Ключевые слова: бактериальная культуральная суспензия, иммуномодулирующие препараты, местный иммунитет, воспалительная реакция.

## **INACTIVATED BACTERIAL CULTURE SUSPENSION E. COLI – IS AN ACTIVE CONSTITUENT OF THE PHARMACEUTICAL PRODUCTS**

**Alexandrova M.V., Radchenko V.V., Lipkin V.M.**

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow*

*Moscow, Russia (117997, Moscow, ul. Miklukho\_Maklaya 16/10) [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru)*

*The review is devoted to the utilization of the inactivated bacterial culture suspension *E. coli* (BCS *E. coli*) as an active constituent in the modern pharmaceutical products. The action mechanisms of the product group adjusted for the modern view of the immunity and inflammatory response progression are described in this paper. The list of the target diseases and the therapy application analysis are provided. The aspects of the biopharmaceutical manufacturing are mentioned and the examples of particular drug place in the pharmaceutical market sector are made. The development potential of the domestic medicines comprising BCS *E. coli* is established herein. The information provided may be useful for the biological and medical students and graduates, general practitioners and specialists, engaged in strategic planning, creation and introduction of the new medicines to the Russian market.*

Key words: bacterial culture suspension, immunomodulating drugs, local immunity, inflammatory reaction.

## **Введение**

Еще в начале XX века Безредка А. М. (французский микробиолог и иммунолог, ученик Мечникова) продемонстрировал, что поверхностно и местно применяемые инактивированные стафилококковые или стрептококковые фильтраты культур были значительно более эффективны в защите животных от последующего введения инфекции в летальной дозе, чем те же самые бактериальные суспензии культур, введенные парентерально (например, внутривенно). Из серии этих экспериментов становилось все более очевидным, что этот тип иммунитета представлялся в значительной степени независимым от формирования антител, т.к. защита животных происходила до истечения 24-часового периода после введения летальной дозы инактивированных нагреванием стафилококков. Кроме того, локальная обработка большей кожной поверхности (даже неповрежденных участков) фильтратом бактериальной культуры часто была достаточна для защиты организма подопытных животных от гибели. В то время результаты этих экспериментов были трудно объяснимы. Сегодня известно, что капсульные липополисахариды могут стимулировать устойчивые независимые Т-лимфоциты, но не длительный иммунитет. Липополисахариды и другие компоненты бактериальных клеток, очевидно, активируют врожденный иммунитет путем усиления фагоцитоза и убийства бактерий, что приводит в дальнейшем к стимуляции приобретенного иммунитета.

Идеи Безредки [1] получили дальнейшее развитие в работах Боннина [6]. Он использовал бактериальную культуральную суспензию (БКС) для лечения воспалительных поражений кожи, геморроя, воспаления анальных покровов и ректальных слизистых мембран. Следующей научной точкой отсчета было создание в 1922 году Боннин совместно с компанией «Др. Каде» (Берлин, Германия) мази (которая в дальнейшем получила коммерческое название «Постеризан»), содержащей бактериальную культуральную суспензию *E.coli* (БКС *E. coli*) для лечения геморроя.

## **Механизм действия бактериальной культуральной суспензии**

Сама по себе химическая природа БКС *E. coli* является «сигналом опасности» для организма. Возможности лечебного воздействия (эффекта ранозаживления и активации механизма регенерации тканей) объясняются следующими причинами:

1. Действие БКС *E. coli* увязывает врождённые и адаптивные пути ответа иммунной системы. Молекулярные компоненты БКС модифицируют различные популяции АПК (антиген-презентирующих клеток) и стимулируют Т-клетки. БКС является неспецифичным антигеном, но может оказывать влияние как на врожденный, так и на специфический иммунные ответы. Причина этого в том, что цитокины, продуцируемые макрофагами, кератиноцитами или дендритными клетками, принципиально антигеннеспецифичны, однако, они могут модифицировать экспрессию множества основных мембранных белков, играющих роль в клеточной коммуникации между АПК, с одной стороны, и Т-клетками, В-клетками или клетками-киллерами, с другой стороны.

2. Иммуномодулирующая способность *E. coli* зависит не только от эндотоксинов, присутствующих в клеточных стенках бактерий. Ряд компонентов, таких как порины, липопротеины, фибриллярные протеины, липид А или липополисахариды, являются сильными индукторами генной экспрессии многих цитокинов в различных типах клеток, включая макрофаги и нейтрофилы – ключевые элементы первой линии антимикробной защиты.

3. Дендритные клетки (функционально различные субпопуляции которых присутствуют в разных типах тканей) характеризуются способностью стимулировать Т-лимфоциты, следовательно, способны влиять на итог иммунного ответа, который особенно важен для процессов регенерации [2]. В частности, клетки Лангерганса, находящиеся в коже, представляют собой одни из наиболее специализированных типов клеток, презентующих антиген отдельным функционально отличным субпопуляциям Т-лимфоцитов [2]. Различные субпопуляции Т-лимфоцитов

вовлечены в иммунопатологический, а также иммунорегуляторный циклы. Поэтому БКС *E. coli* опосредованно может оказывать влияние на воспалительные процессы, развивающиеся вследствие геморроя и хронического анально-кожного повреждения.



**Рисунок. Схема действия бактериальной культуральной суспензии**

На современном фармакологическом рынке присутствует целый ряд препаратов, подобных «Постеризану», применяемых как в медицине, так и в ветеринарии. Компания «Др. Каде», имеющая более чем 125-летнюю историю, контролирует более 30 % рынка противогеморроидальных препаратов в Германии, Японии, ряде других стран. Объёмы продаж препаратов фирмы оцениваются в 45–50 млн. евро в год [9]. В России наиболее известны препараты колибактерин, бификол, PRO-SymbioFLOR, эксальб. Включая «Постеризан» и «Постеризан Форте», примерные объёмы

продаж препаратов на основе БКС *E.coli* в нашей стране приближаются к 45–50 млн. евро в год [8]. Стоит отметить, что БКС *E. coli* является общим действующим компонентом этих препаратов, большинство из которых принадлежит по международной Анатомо-Терапевтически-Химической системе классификации (АТХ) к группе иммуномодуляторов.

В иммуномодулирующем действии препаратов на основе БКС условно можно выделить два основных пути.

Во-первых, бактериальные компоненты БКС могут стимулировать активность АПК и кератиноцитов кожи и за счёт этого повышать цитокиновую секрецию фагоцитов [5] (рис.). Кератиноциты – одни из первых клеток, отвечающие на повреждение тканей (рану) или инфекцию высвобождением медиаторов, участвующих в воспалении. Является общепризнанным, что цитокины, такие, как TNF- $\alpha$  или интерлейкин-1b, определяют активированный статус Т-клеток. В этот процесс вовлечены такие важные костимулирующиеся белки (часто это рецепторы клеток, отвечающие за их взаимодействие и правильное восприятие сигналов), как B7, B7-1 или антигены CD40 [7]. Существуют данные о том, что БКС усиливает эффекты Т-клеточной активации, хотя не является прямым индуктором антиген-специфической активации. Это подтверждается экспериментальными наблюдениями относительно слабого местного ответа антител на БКС, но достаточно серьезного воздействия на медиаторные каскады и локальную (местную) пролиферацию Т-лимфоцитов. Целый ряд экспериментов на различных моделях: лимфоузлы кролика, смешанные культуры эпидермальных клеток Лангерганса и очищенных Т-клеток (или периферических мононуклеарных клеток крови), подтверждают такой вывод.

Во-вторых, воспаление кожи вызвано накоплением иммунокомпетентных клеток и сопровождается сложными клеточными взаимодействиями между ними и различными медиаторами воспаления. Цитокины и хемокины регулируют связи между клеточными элементами иммунной системы, тогда как липидные медиаторы оказывают влияние

непосредственно на секреторную и функциональную активность моноцитов, гранулоцитов, эозинофилов и базофилов, а также неиммунных клеток (тромбоциты, эндотелиальные клетки, тучные клетки, кератиноциты). Скоординированное взаимодействие цитокинов с иммунными клетками может оказывать на последние как стимулирующие, так и ингибирующие действие, которое в результате способно предотвратить повреждение ткани. Так, в процессе заживления раны тканевые макрофаги раны играют не только важную роль в элиминировании остатков повреждённых клеток путем фагоцитоза, но и контролируют уровень факторов роста и цитокинов (см. рис.). Сопутствующее фагоцитозу появление медиаторов (таких, как кислородные радикалы) вносит свой вклад в эффективное и успешное удаление болезнетворных микроорганизмов. Те же свободные радикалы могут воздействовать на регулирование сбалансированного иммунного ответа: чрезмерный синтез и высвобождение хемокинов, цитокинов или липидных медиаторов может вызвать необратимое повреждение ткани путем поддержания длительной активации местных иммуноцитов и не иммунных клеток. БКС индуцирует синтез лейкотриенов (медиаторы воспаления), гистамина и факторов хемотаксиса (таких, как интерлейкин-8, IL-8). Например, лейкотриены типа LTB<sub>4</sub> быстро привлекают нейтрофилы к воспаленным тканям, стимулируют их миграцию в кожу, вызывают агрегацию тромбоцитов, мобилизуют клеточные запасы кальция, индуцируют выпуск супероксид-радикалов и стимулируют хемотаксис и адгезию эозинофилов при аллергических реакциях кожи. Известно, что воспалительные процессы усиливаются вследствие чрезмерного выпуска этого липидного медиатора тучными клетками, гранулоцитами или моноцитами [4]. IL-8 – самый мощный хемоаттрактант для нейтрофилов и может быть продуцирован эндотелиальными клетками, фибробластами, кератиноцитами и эозинофилами. Высвобождение IL-8 индуцируется при контакте клеток с липополисахаридами. Цитокины TNF- $\alpha$  и интерлейкин-1b (IL-1b) также способствуют выпуску IL-8. IL-1b и TNF- $\alpha$  далее вызывают

активацию эндотелиальных клеток, которая облегчает миграцию нейтрофилов. Понятно, что все эти события порождают воспаление в окружающих тканях, которое в свою очередь может заново активировать миграцию клеток в поврежденную кожу (рис.).

Несмотря на осторожное отношение некоторых специалистов к иммуномодуляторам, в своё время были проведены клинические исследования, доказывающие терапевтические эффекты препаратов на основе БКС *E. coli* [6] (таблица).

В конце нужно отметить, что поскольку активный компонент этой группы лекарств – суспензия культуры бактерий *E. coli*, препараты технологичны и выгодны при биотехнологическом производстве. Кроме этого существует возможность значительного улучшения свойств лекарств путём введения в их состав рекомбинантных белков. Фактически это является новым подходом, очевидный плюс которого заключается в отсутствии необходимости очистки препарата рекомбинантного белка перед введением в лекарственную композицию. Подразумевается, что БКС *E. coli* будет получаться из клеток штамма-продуцента целевого белка, обладающего лечебным действием. Синергизм доказанных иммуномодулирующих свойств БКС и лечебного действия целевого белка очевидно приведёт к увеличению терапевтического эффекта нового препарата. Любое повреждение ткани инициирует события, сопровождающиеся увеличением активных форм кислорода в районе раны, и их нейтрализация в клетке является одним из главных условий быстрого заживления.

**Таблица.** Результаты клинических исследований двойным слепым методом мазей Постеризан и Постеризан Форте по сравнению с плацебо мазью или активным контролем

Тип исслед.	Кол-во пациентов, возраст	Диагноз	Период лечения	Препарат, доза	Развитие симптомов	Результаты (эф-ть)	Исслед. группа
Двойное слепое и плацебо	Получившие лечение n=99 плацебо n=102, 44-54 года	Перианальная острая или хрон. экзема с геморроем	14 дней	мазь Постеризан, 2 г/день перианально	Устойчивое выздоровление	препарат/ плацебо p=0,027	Heusinger J.F. (1990)

Двойное слепое и плацебо	Получившие лечение и плацебо n=108, 48-49 лет	Перианальная острая или хрон. экзема с геморроем	14 дней	мазь Постеризан, 2-3 г/день перианально	Устойчивое выздоровление	препарат/ плацебо p=0,0016	Heusinger J.F. (1991)
Двойное слепое и плацебо	Получившие лечение n=66 плацебо n=65, 45-60 лет	Геморрой с зудом и жжением	14 дней	мазь Постеризан, 2-3 г/день перианально	Уменьшение симптомов	препарат/ плацебо p=0,029	Heusinger J.F. (1996)
Двойное слепое и мазь с 0,25% ГК*	Получившие лечение n=87 плацебо n=87, 50-57 лет	Обостренная анальная экзема с воспалением	14 дней	Постеризан Форте, ГК мазь, 2x2-3 г/день перианально	Уменьшение симптомов	Постеризан Форте знач. лучше ГК мази p=0,0192	Heusinger J.F. (1994)
Двойное слепое и мазь с 0,25% ГК	Получившие лечение n=86 плацебо n=86, 47-48 лет	Обостренная анальная экзема с геморроем	14 дней	Постеризан Форте, ГК мазь, 3x1-2 г/день перианально	Уменьшение симптомов	Постеризан Форте значит. лучше ГК мази p=0,0363	Heusinger J.F. (1994)
Двойное слепое и плацебо с и без фенола	Постеризан Форте n=56 плацебо с фенолом n=86 плацебо без фенола n=62, 43-47 лет	Геморрой, анальная экзема, анальные трещины, криптит	14 дней	Постеризан Форте, 2x1-2 г/день перианально	Уменьшение симптомов	Постеризан Форте статистически значим p=0,005 Равная эф-ть обоих плацебо препаратов	Heusinger J.F. (1996)
Двойное слепое и актив. контроль (экстракт ромашки)	Получившие лечение n=40 плацебо n=40, 51-54 года	Мокнувшая анальная экзема	14 дней	Постеризан, 3x1г/день перианально	Уменьшение симптомов	Сравниваемая эф-ть статистически значима	Kreisel T, Kolt A. (1995)

\*ГК – гидрокортизон

Одним из наиболее широко представленных антиоксидантных белков в эпидермисе кожи является пероксиредоксин VI, ранозаживляющее действие которого подробно изучено. На использование пероксиредоксина VI в качестве основы лекарственных препаратов нами в 2011 году получен международный патент [3]. Нами разрабатывается препарат, характеризующийся совместным лечебным действием, обусловленным, с одной стороны, эффектами БКС *E. coli*, а с другой – ранозаживляющими свойствами пероксиредоксина VI.

### Заключение

Современные фармакологические препараты на основе инактивированной бактериальной культуральной суспензии *E. coli*

являются перспективной группой для лечения различных воспалительных патологий и технологической платформой для создания новых лекарств, содержащих биологически активные рекомбинантные белки.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК 16.512.11.2036 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (рук. Липкин В.М.).

### **Список литературы**

1. Besredka A. Antivirus Therapy in Infectious Diseases // Proc R Soc Med. 1929. V. 12. № 12. P. 1579-1598.
2. Everson M.P., McDuffie D.S., Lemak D.G., Koopman W.J., McGhee J.R., Beagley K.W. Dendritic cells from different tissues induce production of different T cell cytokine profiles // J Leukoc Biol. 1996. V. 59. № 4. P. 494-498.
3. Fesenko E.E., Novoselov V.I., Yanin V.A., Lipkin V.M., Shuvaeva T.M. Antioxidant pharmaceutical compound, method for producing polypeptide and method of cure // United States Patent №US8,003,345 B2. 2011.
4. Galli S.J., Maurer M., Lantz C.S. Mast cells as sentinels of innate immunity // Curr Opin Immunol. 1999. V. 11. P. 53-59.
5. Lane P.J.L., Brouck T. Developmental regulation of dendritic cell function // Curr Opin Immunol. 1999. V. 11. P. 308-313.
6. Posterisan® Posterisan® forte: basic research and clinical efficacy / BCS Ser. Berlin: Dr Kade International, 2001. 87p.
7. Watts T.H., DeBenedette M.A. T-cell co-stimulatory molecules other than CD28 // Curr Opin Immunol. 1999. V. 11. P. 286-293.
8. [http://www.cleandex.ru/articles/2010/04/27/Biotechnology\\_world\\_market\\_analyze](http://www.cleandex.ru/articles/2010/04/27/Biotechnology_world_market_analyze) (дата обращения 18.11.2011).
9. <http://reports.innovaro.com/reports/dr-kade-pharmazeutische-fabrik-gmbh-strategic-swot-analysis-review> (дата обращения 18.11.2011).

### **Рецензенты:**

Шуваева Татьяна Маратовна, д.х.н., в.н.с. лаборатории белков гормональной регуляции, учреждение Российской академии наук, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. г.Москва

Буздин А. А., д.б.н., с.н.с., руководитель отдела геномики и постгеномных технологий, учреждение Российской академии наук, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. г. Москва.