

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201690464** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2016.08.31**

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2014.09.05**

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ МИКРООРГАНИЗМЫ, ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ, ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ ИЛИ НИАЦИНА В КИШЕЧНИКЕ И/ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В КИШЕЧНИКЕ**

(31) **MI2013A001467**

(32) **2013.09.06**

(33) **IT**

(86) **PST/IB2014/064285**

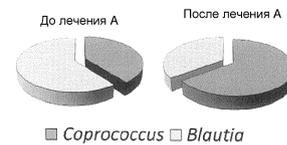
(87) **WO 2015/033305 2015.03.12**

(71) Заявитель:  
**СОФАР С.П.А. (IT)**

(72) Изобретатель:  
**Биффи Андреа, Росси Руджеро, Фьоре Вальтер, Гульельметти Симоне Доменико (IT)**

(74) Представитель:  
**Поликарпов А.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей бактерии, для увеличения образования масляной кислоты, фолиевой кислоты или ниацина и/или для уменьшения образования янтарной кислоты в кишечнике. Более того, настоящее изобретение относится к применению указанной композиции для лечения и/или предотвращения бутират- и/или сукцинат-зависимого патологического состояния кишечника, в частности для лечения и/или предотвращения воспаления кишечника, диареи, язвенного колита или кишечных колопатий.



**201690464**  
**A1**

**201690464**  
**A1**

**ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ МИКРООРГАНИЗМЫ, ДЛЯ  
УВЕЛИЧЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ, ФОЛИЕВОЙ  
КИСЛОТЫ ИЛИ НИАЦИНА В КИШЕЧНИКЕ И/ИЛИ УМЕНЬШЕНИЯ  
ОБРАЗОВАНИЯ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ В КИШЕЧНИКЕ**

Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей бактерии, для увеличения образования масляной кислоты, фолиевой кислоты или ниацина в кишечнике и/или уменьшения образования янтарной кислоты в кишечнике.

Более того, настоящее изобретение относится к применению указанной композиции для лечения и/или предотвращения бутират- и/или сукцинат-зависимого патологического состояния кишечника, в частности, для лечения и/или предотвращения воспаления кишечника, диареи, язвенного колита или кишечных колопатий.

Кишечная микробиота, также известная под устаревшим на настоящий момент названием кишечная флора, представляет собой все микроорганизмы, представленные преимущественно бактериями, находящиеся в кишечнике в симбиозе с организмом хозяина.

Кишечная микробиота является очень сложной экосистемой, и состояние равновесия между различными микроорганизмами, составляющими кишечную микробиоту, крайне важно для благополучия и здоровья организма, поскольку микробиота существенно влияет на развитие и гомеостаз слизистой оболочки кишечника индивида-хозяина.

Иными словами, кишечная микробиота является настоящим органом. Действительно, качественные и/или количественные изменения в кишечной микробиоте индивида или так называемые дисбиоз или дисбактериоз могут приводить к нарушению кишечного гомеостаза, которое, в свою очередь, может обуславливать этиопатогенез большого числа патологических состояний.

В целях лечения состояния кишечного дисбиоза или, в любом случае, в целях поддержания гомеостаза кишечной микробиоты люди часто принимают препараты, определяемые как пробиотики или, согласно определению FAO/WHO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН /

Всемирная организация здравоохранения), «живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина». Сходным образом, также продемонстрирована медицинская эффективность парапробиотиков; их определяют как «нежизнеспособные микробные клетки (интактные или разрушенные) или необработанные клеточные экстракты, которые при введении в адекватных количествах (перорально или местно) приносят пользу здоровью хозяина» (Taverniti and Guglielmetti, 2011).

Понятно, что полезная активность микроорганизма будет варьировать в зависимости от его состава, и, в действительности, она часто штаммоспецифична.

На основании изложенного выше, сохраняется осязаемая потребность в определении возможных новых оздоравливающих и/или терапевтических эффектов микроорганизмов, в частности микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков или парапробиотиков, для расширения области их применения.

Например, в данной области сохраняется сильно осязаемая потребность в идентификации микроорганизмов, способных модулировать количество веществ, особенно полезных и лечебных для организма, таких как масляная кислота, фолиевая кислота и никотиновая кислота, в кишечнике.

Масляная кислота представляет собой короткоцепочечную жирную кислоту, образующуюся в толстой кишке человека физиологическим образом в результате ферментации пищевых волокон микробиотой.

Масляная кислота является основным источником энергии для клеток толстой кишки (колоноцитов) и, таким образом, представляет собой питательное вещество, необходимое для организма человека.

На уровне кишечника масляная кислота выполняет различные важные функции, например: она стимулирует обновление и физиологическое созревание колоноцитов; она играет ключевую роль в поддержании целостности слизистой оболочки и в процессах восстановления повреждений кишечника; она стимулирует реабсорбцию воды и натрия в толстой кишке; и она способствует снижению pH кишечника, создавая среду, неблагоприятную для развития патогенных бактерий.

У людей дефицит масляной кислоты может приводить к воспалительному колиту.

Сходным образом, янтарная кислота является двухосновной короткоцепочечной органической кислотой. Ее считают ульцерогенной, и она может приводить к серьезным повреждениям слизистой оболочки. Поэтому увеличение количества янтарной кислоты (сукцината) вредно для здоровья человека.

Фолиевая кислота (витамин B9 или M или фолацин) является очень важным витамином для всей популяции, особенно у взрослых старше 50 лет и у женщин детородного возраста, поскольку она влияет (непосредственно или, в большинстве случаев, посредством снижения уровней гомоцистеина в плазме) на многие жизненно важные процессы, такие как синтез, репарация и метилирование ДНК.

Дефицит фолиевой кислоты может приводить к макроцитарной анемии, которая может сопровождаться лейкопенией и тромбоцитопенией, изменениями на коже и слизистых оболочках и желудочно-кишечными расстройствами (нарушением всасывания и диареей).

Ниацин (или витамин PP, или витамин B3), то есть никотиновая кислота и никотинамид, важен, поскольку, среди прочего, он является необходимым компонентом коферментов NAD (никотинамидадениндинуклеотид) и NADH, и его дефицит приводит к патологическому состоянию, известному как пеллагра. Обычно это патологическое состояние начинается с проблем в пищеварительной системе, которые затем осложняются фотосенсибилизирующим дерматитом и психическими расстройствами с утомляемостью, депрессией и расстройствами памяти.

Настоящее изобретение отвечает на потребности предшествующего уровня техники, описанные выше, композицией, содержащей микроорганизмы, предпочтительно бактерии рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, способные (прямым и/или непрямым образом) увеличивать образование масляной кислоты, фолиевой кислоты, ниацина и/или их солей в кишечнике принимающего ее индивида.

Более того, заявитель совершенно неожиданно обнаружил, что композиция, содержащая микроорганизмы, предпочтительно рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, способна (прямым и/или непрямым образом) уменьшать образование янтарной кислоты и/или ее солей в кишечнике.

Таким образом, композиция по настоящему изобретению особенно полезна для лечения и/или предотвращения бутират- и/или сукцинат-зависимых патологических состояний кишечника.

Другие преимущества настоящего изобретения будут более очевидны из последующего подробного описания и из примеров, которые, тем не менее, приведены лишь в целях демонстрации и не являются ограничивающими.

Для лучшего понимания подробного описания к нему приложены Фиг. 1-4:

– на Фиг 1.1 показан результат статистического анализа, демонстрирующий увеличение популяции бактерий рода *Coprococcus* до и после лечения композицией по настоящему изобретению (A) и, наоборот, ее уменьшение до и после лечения плацебо (B);

– на Фиг 1.2 показан результат статистического анализа, демонстрирующий уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* до и после лечения композицией по настоящему изобретению (A) и, наоборот, ее увеличение до и после лечения плацебо (B);

– на Фиг. 2.1 показано увеличение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения композицией по настоящему изобретению;

– на Фиг. 2.2 показано процентное увеличение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения композицией по настоящему изобретению (A) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и процентное увеличение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения плацебо (B);

– на Фиг. 3 показан результат статистического анализа, демонстрирующий увеличение метаболизма никотиновой кислоты до и после лечения композицией по настоящему изобретению и его уменьшение до и после лечения плацебо;

– на Фиг. 4 показан результат статистического анализа, демонстрирующий увеличение биосинтеза фолиевой кислоты до и после лечения композицией по настоящему изобретению и отсутствие каких-либо изменений, в отличие от этого, до и после лечения плацебо.

Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, для увеличения прямого и/или непрямого образования масляной кислоты и/или ее солей, и/или фолиевой кислоты и/или ее солей, и/или ниацина и/или его солей в кишечнике и/или для уменьшения прямого и/или непрямого образования янтарной кислоты и/или ее солей в кишечнике.

В контексте настоящего изобретения образование в кишечнике означает высвобождение в среду любой молекулы, образованной при первичном или вторичном метаболизме любым кишечным микроорганизмом в любой области кишечника.

Кроме того, композиция по настоящему изобретению может также быть использована для уменьшения пролиферации патогенных микроорганизмов в кишечнике, и/или для поддержания целостности слизистой оболочки кишечника, и/или для стимуляции процессов восстановления повреждений кишечника, предпочтительно посредством увеличения прямого и/или непрямого образования масляной кислоты и/или ее солей в кишечнике и/или посредством уменьшения прямого и/или непрямого образования янтарной кислоты и/или ее солей в кишечнике.

Некоторые патогенные микроорганизмы, особенно чувствительные к композиции по настоящему изобретению, представляют собой, например, энтерогеморрагическую *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella spp.*

Описанные выше применения композиции по настоящему изобретению предназначены как для здорового индивида, так и для индивида с патологическим состоянием кишечника. В частности, в случае здорового индивида композиция по изобретению действует у этого индивида, после приема, поддерживая гомеостаз микробиоты и/или предотвращая ее изменение, и, таким образом, может также быть определена как пробиотическая композиция (или пробиотик).

Другой аспект настоящего изобретения относится к медицинскому применению композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, для лечения

и/или предотвращения бутират- и/или сукцинат-зависимого патологического состояния кишечника.

В контексте настоящего изобретения бутират- и/или сукцинат-зависимое патологическое состояние кишечника означает патологическое состояние, чувствительное к лечению масляной кислотой и/или ее солями и/или лечению янтарной кислотой и/или ее солями. Примерами указанных патологических состояний являются диарея, воспаление кишечника, язвенный колит, атрофия желудка, дивертикулы кишечника, стеноз, непроходимость и диабетическая нейропатия.

В особенно предпочтительном воплощении настоящего изобретения композиция содержит бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG.

Бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG был депонирован SOFAR S.p.A. в Национальной коллекции культур микроорганизмов в институте Пастера в Париже 5 мая 1995 г. под депозитарным номером CNCM I-1572. Сначала название депонированного штамма было следующим: *Lactobacillus casei* DG sub. *casei*.

В другом воплощении изобретения прямое и/или не прямое увеличение образования масляной кислоты и/или ее солей, и/или фолиевой кислоты и/или ее солей, и/или ниацина и/или его солей и/или прямое и/или не прямое уменьшение образования янтарной кислоты в кишечнике связаны с кишечной микробиотой, предпочтительно с бактериями рода *Coprococcus* и/или *Blautia*.

В особенно предпочтительном воплощении изобретения прямое и/или не прямое увеличение образования масляной кислоты и/или ее солей в кишечнике связано с бактериями рода *Coprococcus* и/или прямое и/или не прямое уменьшение образования янтарной кислоты в кишечнике связано с бактериями рода *Blautia*.

Таким образом, композиция, содержащая микроорганизмы, предпочтительно по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, более предпочтительно бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG, может также быть использована для изменения плотности бактериальной популяции рода *Coprococcus* и/или *Blautia* в кишечной микробиоте, предпочтительно для индукции увеличения бактериальной популяции рода *Coprococcus* и/или уменьшения бактериальной популяции рода

*Blautia*. Иными словами, прием композиции по настоящему изобретению изменяет количество бактерий рода *Coprococcus* и/или *Blautia* в кишечной микробиоте. В частности, после приема указанной композиции увеличивается количество бактерий рода *Coprococcus* и/или уменьшается количество бактерий рода *Blautia*.

Композиция, используемая в настоящем изобретении, содержит указанный микроорганизм, предпочтительно указанную по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, в живой или мертвой форме, в форме лизата или экстракта.

В одном воплощении изобретения композиция содержит приблизительно 15-30 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий, предпочтительно 20-25 миллиардов КОЕ бактерий.

Предпочтительно, композиция изготовлена для перорального введения. В частности, композиция изготовлена в твердой форме, предпочтительно в форме пилюль, капсул, таблеток, гранулярного порошка, твердых капсул, водорастворимых гранул, саше или пеллет.

Альтернативно, композицию по изобретению изготавливают в жидкой форме, например, в форме сиропа или напитка, или добавляют в продукты питания, например, в йогурт, сыр или фруктовый сок.

Альтернативно, композицию по изобретению изготавливают в форме, способной оказывать местное действие, например, в форме клизмы.

В одном воплощении изобретения композиция дополнительно содержит общепринятые эксципиенты для изготовления пробиотических и/или фармацевтических продуктов.

В другом воплощении изобретения композиция по изобретению может быть обогащена витаминами, микроэлементами, такими как цинк и селен, ферментами, пребиотическими веществами, такими как фруктоолигосахариды (FOS), галактоолигосахариды (GOS), инулин, гуаровая камедь или их комбинации.

Предпочтительно, в целях применения по настоящему изобретению композицию принимают один раз в сутки, более предпочтительно после пробуждения.

Альтернативно, ее также можно принимать вечером, предпочтительно после еды.

## ПРИМЕРЫ

### Лечение

Было проведено рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, перекрестное диетологическое исследование у здоровых индивидов.

Добровольцев отбирали по следующим критериям:

– критерии включения: здоровые мужчины и женщины в возрасте от 18 до 55 лет, давшие информированное согласие;

– критерии исключения: лечение антибиотиками в течение месяца до первого осмотра; эпизоды вирусного или бактериального энтерита в течение 2 месяцев до первого осмотра; язвы желудка или двенадцатиперстной кишки в течение 5 лет до первого осмотра; беременность или кормление грудью; недавние или предполагаемые случаи алкоголизма и приема наркотиков; другие состояния, не соответствующие протоколу исследования.

Пробиотическое диетологическое вмешательство проводили согласно перекрестному дизайну, как схематически показано в Таблице I ниже.

**Таблица I**



В предварительной фазе (4 недели) добровольцы соблюдали свою обычную диету, не употребляя пробиотические кисломолочные продукты (традиционный йогурт был, таким образом, разрешен), пробиотические пищевые добавки или пребиотические пищевые добавки.

В конце предварительного периода добровольцев рандомизировали для получения одной капсулы пробиотика или плацебо в сутки на протяжении 4-х недель.

Например, в качестве пробиотика для введения использовали Enterolactis Plus; он представляет собой 420 мг капсулы, содержащие 24 миллиарда КОЕ (колониеобразующих единиц) *Lactobacillus paracasei* штамма DG.

Плацебо представляло собой капсулы, идентичные по внешнему виду капсулам с пробиотиком, очевидно, без пробиотического агента.

Вкус и цвет активного вещества (то есть пробиотика) и плацебо были одинаковыми.

Продукт принимали утром натощак, по меньшей мере за десять минут до завтрака, или, если забывали, вечером перед отходом ко сну и, в любом случае, по меньшей мере через два часа после последнего приема пищи.

После первых четырех недель лечения добровольцы проходили четырехнедельный период выведения, идентичный предварительному периоду.

По завершении периода выведения добровольцы принимали по одной капсуле Enterolactis Plus или плацебо в сутки на протяжении четырех недель согласно перекрестному дизайну, описанному выше.

Таким образом, исследование включало 4 фазы, продолжительность каждой из которых составляла 4 недели:

- *предварительная фаза*: индивиды не получали ни лечения А, ни лечения В;
- *лечение 1*: индивиды получали лечение А или лечение В;
- *выведение*: индивиды не получали ни лечения А, ни лечения В;
- *лечение 2*: индивиды получали лечение А или лечение В.

Лечение А и В может представлять собой композицию по настоящему изобретению, в конкретном примере Enterolactis Plus, или плацебо. В начале лечения не было известно, что принимает индивид; последовательность приема становилась известной только в конце лечения при демаскировке.

### **Осмотр и сбор образцов**

Изначально каждого добровольца инструктировали по процедуре, которой необходимо было следовать, включавшей в общей сложности 5 визитов для каждого добровольца.

На первом визите наряду с персональными данными добровольцев получали информированное согласие. Добровольцы также получали общую информацию о проведении исследования и инструкции по изменению диеты в последующие 4 недели предварительного периода (запрет на употребление указанных ранее продуктов).

Через 4 недели добровольцы приходили на второй визит с образцом кала (образец T0), собранным за предыдущие 24 часа, в специальном контейнере, полученном на первом визите.

Для обеспечения оптимальной сохранности образцы кала хранили при комнатной температуре и доставляли в лабораторию в течение 24 часов.

Кроме того, на втором визите добровольцам давали пробиотический продукт (или плацебо) для приема на протяжении последующих 4-х недель. Более того, добровольцев инструктировали о том, как принимать продукт.

В конце 4-х недель приема продукта (или плацебо) добровольцы приходили на третий визит с еще одним образцом кала (образец T1), собранным за предыдущие 24 часа.

Во время третьего визита добровольцы заполняли анкету по возможным эффектам, как положительным, так и нежелательным, возникшим при употреблении продукта.

Затем добровольцев инструктировали по следующим 4 неделям, на протяжении которых они снова не употребляли указанные ранее продукты.

В конце этих 4-х недель добровольцы приходили на четвертый визит с образцом кала (образцом T2) и получали пробиотический продукт (или плацебо) для приема на протяжении последующих 4-х недель.

В завершение, после 4-х недель приема продукта (или плацебо) добровольцы приходили на пятый визит, принося последний образец кала (образец T3).

Во время этого последнего визита добровольцы заполняли анкету, аналогичную той, которую они получали во время третьего визита.

До анализа микробиоты все собранные образцы кала хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 7 суток.

### **Анализ фекальной микробиоты**

Фекальную микробиоту оценивали, анализируя нуклеотидную последовательность частей гена, кодирующего 16S рРНК бактериальной рибосомальной субъединицы. Конкретнее, применяли метагеномный способ, включающий, вкратце, следующие стадии:

- 1) выделение, количественное определение и нормализацию метагеномной ДНК из образцов кала;
- 2) амплификацию гипервариабельной области V3 бактериального гена, кодирующего 16S рРНК, посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция);
- 3) количественное определение продуктов ПЦР;
- 4) секвенирование амплифицированных продуктов;
- 5) биоинформатический анализ последовательностей.

Процедуры по стадиям 1 и 3 представляют собой методики, хорошо известные в уровне техники, и поэтому их проводят по протоколам, обычно применяемым в данной области. Например, эти методы описаны в лабораторных руководствах, таких как Sambrook *et al.* 2001 или Ausubel *et al.* 1994.

Стадию 2 амплификации области V3 генов 16S рибосомальной РНК проводили с применением методики амплификации ДНК, известной как ПЦР, используя Probio\_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 1) и Probio\_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3' (SEQ ID NO: 2) в качестве олигонуклеотидов (праймеров).

В частности, пара праймеров SEQ ID NO: 1 и 2 амплифицирует область V3 гена 16S рРНК.

Стадия 4 может быть проведена методиками, известными в данной области для этой задачи, например, методиками, основанными на методе Сэнгера, пиросеквенированием или методом секвенирования Ion Torrent Fusion Primers, примененным в конкретном примере настоящего изобретения согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы» научной статьи Milani *et al.* (2013).

В случае методики Ion Torrent праймеры разрабатывают и синтезируют таким образом, чтобы они содержали, на 5'-конце, одну из двух адаптерных последовательностей, используемых в данной конкретной методике

секвенирования ДНК. В данном случае адаптерные последовательности представляли собой SEQ ID NO: 1 и 2.

Условия проведения ПЦР были следующими:

- 5 минут при 95°C;
- 30 секунд при 94°C, 30 секунд при 55°C и 90 секунд при 72°C в течение 35 циклов;
- 10 минут при 72°C.

По окончании ПЦР целостность амплификата проверяли с помощью электрофореза.

Стадия 5 данного способа, необходимая для описания микробных сообществ, может быть проведена с применением многочисленных методик, известных в настоящее время для этой задачи. Конкретнее, применяли иерархическую кластеризацию, таксономический анализ и построение филогенетических дендрограмм с тепловыми картами согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы» научной статьи Milani *et al.* (2013); конкретнее, последовательности анализировали с использованием программного обеспечения QIIME.

### **Статистический анализ данных**

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Для выявления значимых различий данные анализировали с применением как параметрических (многофакторный и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для повторных измерений) и непараметрических (критерии Вальда-Вольфовица и Манна-Уитни) статистических методов.

Нормальность последовательности данных (важное допущение для ANOVA) оценивали с применением критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова.

### **Результаты лечения**

Исследование завершили в общей сложности 22 индивида (11 женщин и 11 мужчин).

Изначально в исследование были включены тридцать три индивида, но 11 из них вскоре прекратили принимать участие в исследовании по различным

причинам: прием антибиотиков (4), отказ продолжать принимать участие в исследовании (1), частые эпизоды диареи (1), прием других пробиотиков во время исследования (3), кардинальное изменение особенностей питания (1) и сезонный грипп с эпизодами диареи (1).

По завершении исследования и анализа результатов двух видов лечения проводили демаскировку, и стало известно, что лечение А представляло собой активное лечение, включавшее *Lactobacillus paracasei* DG, а лечение В представляло собой плацебо, идентичное по внешнему виду активному препарату, но не содержащее лактобацилл.

При анализе данных, полученных в исследовании, наблюдали высокую, с таксономической точки зрения, стабильность кишечной микробиоты участников исследования.

Фактически, было обнаружено следующее:

- два типа бактерий из 15 обнаруженных, а именно *Bacteroidetes* и *Firmicutes*, составляли более 90% последовательностей;
- 11 семейств из 131 обнаруженных составляли более 90% последовательностей; и
- 20 родов из 262 обнаруженных составляли более 90% последовательностей.

Более того, данное исследование подтвердило, что на низких таксономических уровнях (то есть на уровне семейств и родов) кишечная микробиота человека высоко вариабельна у разных индивидов.

Таким образом, экспериментальные данные продемонстрировали необходимость проведения перекрестных исследований в здоровой популяции для избегания невыявления возможных эффектов лечения пробиотиками или получения ложноположительных статических результатов из-за существенных индивидуальных различий.

При оценке изменений кишечной микробиоты, индуцированных двумя видами лечения, статистически значимое различие по родам присутствовало только в группе, получавшей лечение *Lactobacillus paracasei* DG (активное лечение). Конкретнее, наблюдали увеличение количества бактерий рода *Coprococcus*. Фактически, как видно на Фиг. 1.1, 2.1 и 2.2, наблюдали статистически значимое увеличение количества копрококков до и после

лечения *Lactobacillus paracasei* DG. В отличие от этого, в группе, получавшей лечение плацебо, было отмечено умеренное уменьшение их количества.

Более того, после лечения *Lactobacillus paracasei* DG наблюдали статистически значимое уменьшение количества бактерий рода *Blautia*. В отличие от этого, в группе, получавшей лечение плацебо, было отмечено незначительное увеличение их количества (Фиг. 1.1, 2.1 и 2.2).

На уровне кишечника копрококки являются одними из основных продуцентов бутирата.

Бутират является крайне важным соединением на уровне кишечника, поскольку, с одной стороны, он способствует восстановлению функциональной целостности слизистой оболочки кишечника и ее поддержанию с течением времени и, с другой стороны, оказывает важные противовоспалительные эффекты, до такой степени, что его используют как вспомогательное средство в лечебном питании при кишечных колопатиях (например, хронических воспалительных заболеваниях кишечника).

Более того, анализ их генома показывает, что эти бактерии могут использовать сукцинат в качестве субстрата для ферментации.

Эта информация крайне важна с учетом того факта, что представители рода *Blautia* образуют ацетат и сукцинат в качестве основных конечных продуктов ферментации глюкозы.

Сукцинат считают ульцерогенным фактором, который способен, таким образом, обострять состояние индивидов с язвенным колитом, поскольку он, вероятно, ответственен за повреждение слизистой оболочки, присутствуя в первую очередь в активных фазах заболевания.

В завершение, после лечения пробиотиком, в данном случае после введения *Lactobacillus paracasei* DG, наблюдается увеличение количества бактерий, принадлежащих к роду *Coprococcus*, и, вследствие этого, увеличение концентрации бутирата в кишечнике.

В то же время, наблюдается уменьшение концентрации сукцината, который может быть ответственен за повреждение слизистой оболочки у индивидов с язвенным колитом, как прямое, поскольку после лечения пробиотиком, в данном случае после введения *Lactobacillus paracasei* DG, наблюдается уменьшение количества бактерий, принадлежащих к роду *Blautia*,

так и не прямое, поскольку увеличенная популяция копрококков способна дополнительно снижать концентрацию сукцината, используя его в качестве субстрата в своих ферментационных процессах.

В завершение, после лечения пробиотиком, в конкретном примере после введения *Lactobacillus paracasei* DG, отмечено увеличение концентрации масляной кислоты в кале индивидов с одновременным уменьшением концентрации других органических кислот, таких как янтарная кислота.

В конечном счете, данные по составу фекальной микробиоты были использованы в биоинформатическом анализе, направленном на виртуальную реконструкцию метагенома на основе известных бактериальных геномов (Okuda S, Tsuchiya Y, Kiriyaama C, Itoh M, Morisaki H. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. Nat Commun. 2012;3:1203); иными словами, было установлено *in silico* какие потенциальные гены присутствуют в рассматриваемой микробиоте и в каком количестве. Этот анализ позволил подтвердить предполагаемое увеличение количества кодирующих генов синтеза фолиевой кислоты и метаболизма никотиновой кислоты (Фиг. 3 и 4). Эти две молекулы являются важными витаминами для человека-хозяина (называемые витаминами B9 и B3, соответственно). В частности, витамин B9 является питательным фактором первостепенной важности, дефицит которого, особенно при определенных физиологических состояниях, таких как беременность, может приводить к серьезным последствиям для здоровья. Лечение пробиотиком, использованным в данном исследовании, может, таким образом, укреплять способность кишечной микробиоты к образованию фолиевой кислоты (витамина B9) с последующим полезным питательным эффектом для человека-хозяина.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, для увеличения прямого и/или непрямого образования масляной кислоты и/или ее солей, и/или фолиевой кислоты и/или ее солей, и/или ниацина и/или его солей в кишечнике и/или для уменьшения прямого и/или непрямого образования янтарной кислоты и/или ее солей в кишечнике.

2. Применение по п. 1 для уменьшения пролиферации патогенных микроорганизмов в кишечнике и/или для поддержания целостности слизистой оболочки кишечника, и/или для стимуляции процессов восстановления повреждений кишечника посредством указанного прямого и/или непрямого увеличения образования масляной кислоты и/или ее солей в кишечнике и/или посредством указанного прямого и/или непрямого уменьшения образования янтарной кислоты и/или ее солей в кишечнике.

3. Композиция, содержащая по меньшей мере одну бактерию рода *Lactobacillus* вида *paracasei*, для применения в лечении и/или предотвращении бутират- и/или сукцинат-зависимого патологического состояния кишечника.

4. Композиция по п. 3, где указанное патологическое состояние кишечника выбрано из диареи, воспаления кишечника, язвенного колита, атрофии желудка, дивертикулеза кишечника, стеноза, непроходимости и диабетической нейропатии.

5. Применение по п. 1 или 2 или композиция по п. 3 или 4, где указанные *Lactobacillus* представляют собой штамм *Lactobacillus paracasei* DG.

6. Применение по любому из пп. 1, 2 и 5, где указанное прямое и/или не прямое увеличение образования масляной кислоты и/или ее солей, и/или фолиевой кислоты и/или ее солей, и/или ниацина и/или его солей и/или указанное прямое и/или не прямое уменьшение образования янтарной кислоты в кишечнике связаны с кишечной микробиотой, предпочтительно связаны с бактериями рода *Coprococcus* и/или *Blautia*.

7. Применение по любому из пп. 1, 2, 5 и 6, где указанное прямое и/или не прямое увеличение образования масляной кислоты и/или ее солей в кишечнике связано с бактериями рода *Coprococcus*, и/или указанное прямое

и/или не прямое уменьшение образования янтарной кислоты в кишечнике связано с бактериями рода *Blautia*.

**8.** Применение по любому из пп. 1, 2, 5-7 или композиция по п. 3 или 4, где указанная по меньшей мере одна бактерия рода *Lactobacillus* вида *paracasei* представляет собой живую или мертвую бактерию или бактериальный лизат или экстракт.

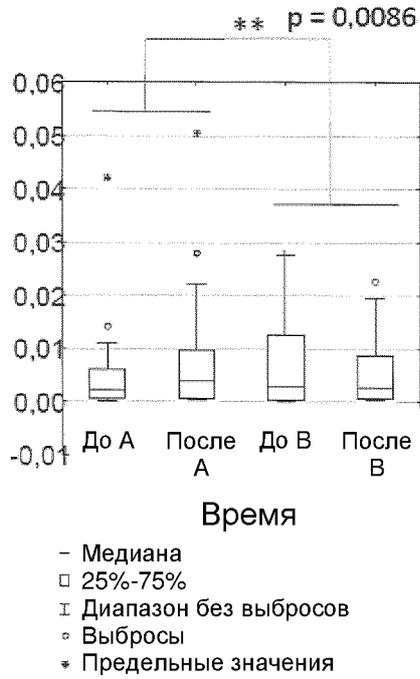
**9.** Применение по любому из пп. 1, 2, 5-8 или композиция по любому из пп. 3, 4, 8, где указанная композиция предназначена для перорального введения, предпочтительно в форме пилюль, капсул, таблеток, гранулярного порошка, твердых капсул, водорастворимых гранул, саше или пеллет.

**10.** Применение по любому из пп. 1, 2, 5-9 или композиция по любому из пп. 3, 4, 8, 9, где указанная композиция дополнительно содержит пищевые волокна, обладающие пребиотической активностью, предпочтительно FOS (фруктоолигосахариды), инулин или гуаровую камедь, или содержит другие вещества, такие как витамины, микроэлементы и/или ферменты.

Применение композиции, содержащей микроорганизмы, для увеличения образования масляной кислоты, фолиевой кислоты или ниацина в кишечнике и/или уменьшения образования янтарной кислоты в кишечнике

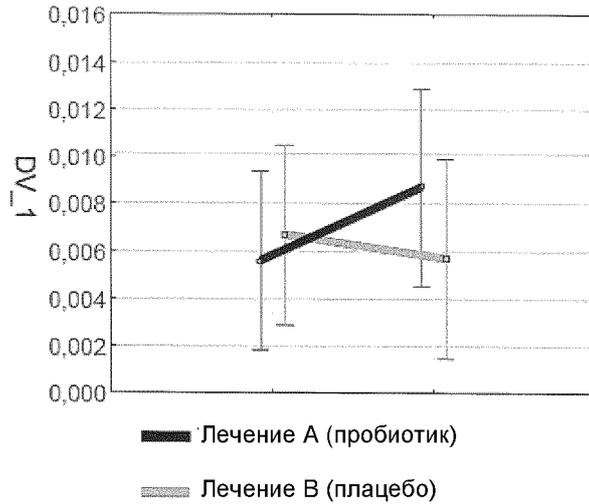
Фиг. 1.1

*Coprococcus ssp.*



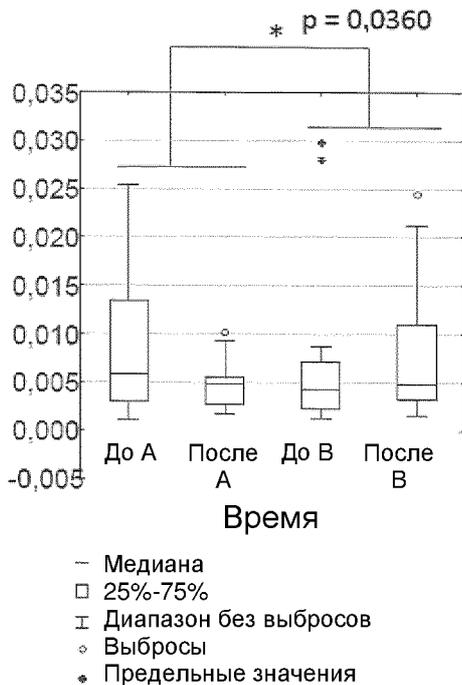
Лечение\*время ; невзвешенные средние  
Текущий эффект:  $F(1, 42) = 7,6014$ ;  
 $p = 0,00859$

Отклонение эффективной гипотезы  
Вертикальными отрезками обозначены 0,95  
доверительные интервалы



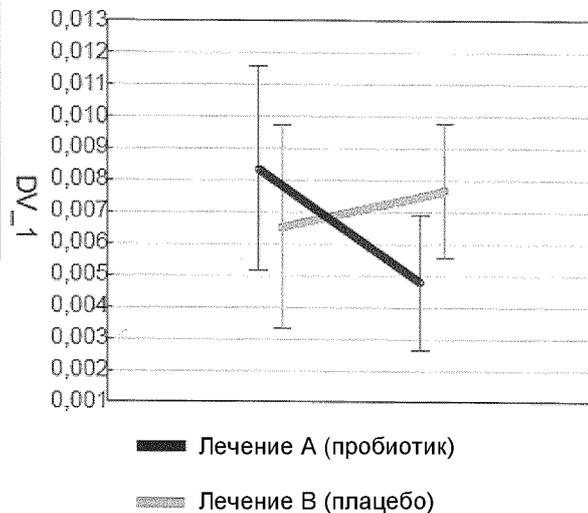
Фиг. 1.2

*Blautia ssp.*

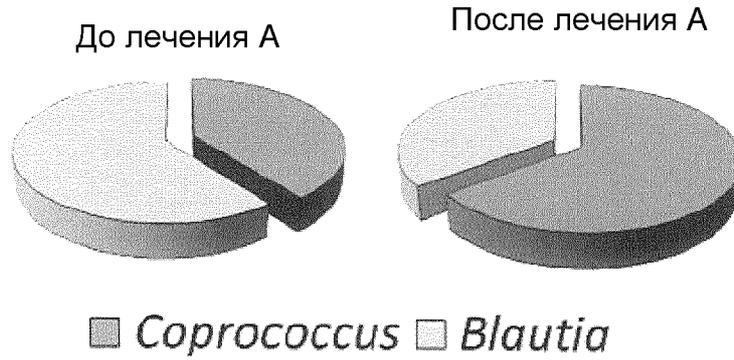


Лечение\*время ; невзвешенные средние  
Текущий эффект:  $F(1, 42) = 4,6960$ ;  
 $p = 0,03595$

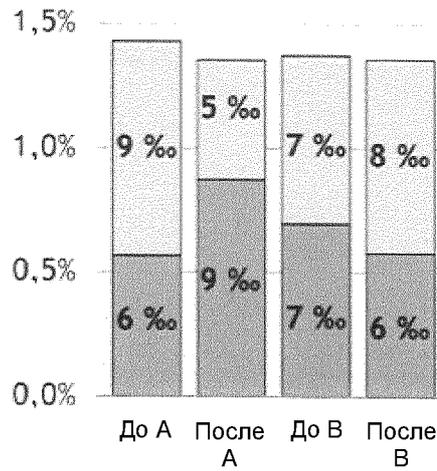
Отклонение эффективной гипотезы  
Вертикальными отрезками обозначены 0,95  
доверительные интервалы



Применение композиции, содержащей микроорганизмы, для увеличения образования масляной кислоты, фолиевой кислоты или ниацина в кишечнике и/или уменьшения образования янтарной кислоты в кишечнике



Фиг. 2.1

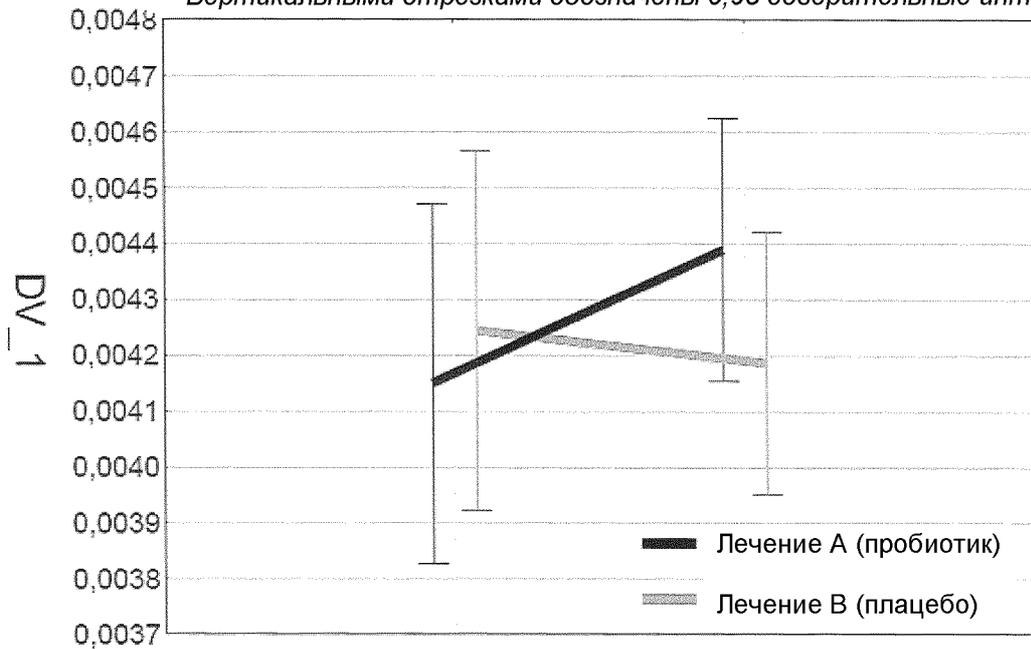


Фиг. 2.2

Фиг. 3

Лечение\*время ; невзвешенные средние  
Текущий эффект:  $F(1, 42) = 4,6182; p = 0,03744$   
Отклонение эффективной гипотезы

Вертикальными отрезками обозначены 0,95 доверительные интервалы



Метаболизм никотината и никотинамида

Применение композиции, содержащей микроорганизмы, для увеличения образования масляной кислоты, фолиевой кислоты или ниацина в кишечнике и/или уменьшения образования янтарной кислоты в кишечнике

Фиг. 4

