



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.16

(21) Номер заявки
201591979

(22) Дата подачи заявки
2014.04.30

(51) Int. Cl. **A61K 9/20** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61P 1/12 (2006.01)

(54) ШТАММЫ БАКТЕРИОФАГА, СПОСОБНЫЕ ВЫЗЫВАТЬ ЛИТИЧЕСКУЮ ИНФЕКЦИЮ АДГЕЗИВНО-ИНВАЗИВНОГО ШТАММА ESCHERICHIA COLI, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **13305568.1**

(32) **2013.04.30**

(33) **EP**

(43) **2016.04.29**

(86) **PCT/EP2014/058840**

(87) **WO 2014/177622 2014.11.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕРРИНГ Б.В. (NL); ИНСТИТУТ
ПАСТЕР (FR)**

(72) Изобретатель:
**Данглас Паскаль (CH), Дебарбье
Лоран (FR)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) WO-A1-0193904
WO-A2-0211549
WO-A2-2012036580
DOGAN BELGIN ET AL.: "Multidrug resistance is common in Escherichia coli associated with ileal Crohn's disease", INFLAMMATORY BOWEL DISEASES JAN 2013, vol. 19, no. 1, January 2013 (2013-01), pages 141-150, XP009172811, ISSN: 1536-4844, abstract

SHENG HAIQING ET AL.: "Application of bacteriophages to control intestinal Escherichia coli 0157: H7 levels in ruminants", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 72, no. 8, August 2006 (2006-08), pages 5359-5366, XP009172812, ISSN: 0099-2240, abstract

WEGRZYN GRZEGORZ ET AL.: "Modulation of the susceptibility of intestinal bacteria to bacteriophages in response to Ag43 phase variation - a hypothesis", MEDICAL SCIENCE MONITOR: INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH JUN 2002, vol. 8, no. 6, June 2002 (2002-06), pages HY15-HY18, XP009172813, ISSN: 1234-1010, abstract

LUSIAK-SZELACHOWSKA M. ET AL.: "Escherichia coli bacteriophages in human stool of patients with gastrointestinal tract diseases", GASTROENTEROLOGIA POLSKA 2008 PL, vol. 15, no. 2, 2008, pages 87-90, XP009172818, ISSN: 1232-9886, abstract

ROLHION NATHALIE ET AL.: "Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease", INFLAMMATORY BOWEL DISEASES, WILLIAMS AND WILKINS, HAGERSTOWN, MD, US, vol. 13, no. 10, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 1277-1283, XP009137421, ISSN: 1078-0998, DOI: 10.1002/IBD.20176 [retrieved on 2007-05-02], abstract

MAURA DAMIEN ET AL.: "Intestinal colonization by enteroaggregative Escherichia coli supports long-term bacteriophage replication in mice", ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 14, no. 8, Sp. Iss. SI, August 2012 (2012-08), pages 1844-1854, XP055047555, cited in the application, abstract; figures

MURUGANANTHAN ARAVINTH U. ET AL.: "Clinical Risk Factors for Crohn's Disease Postoperative Recurrence are Reflected in Alterations in Mucosally Adherent Microbiota at Surgical Resection", GASTROENTEROLOGY, vol. 142, no. 5, Suppl. 1, May 2012 (2012-05), page S679, XP002727902, & DIGESTIVE DISEASE WEEK (DDW); SAN DIEGO, CA, USA; MAY 19-22, 2012, abstract

WO-A1-2013045863

(57) Согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания кишечника субъекта, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм Escherichia coli, содержащая (1) по меньшей мере один штамм бактериофага, способный вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма Escherichia coli, (2) фармацевтически приемлемый носитель. Согласно изобретению предложены также способы лечения воспалительного заболевания кишечника субъекта, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм Escherichia coli, включающие введение субъекту по меньшей мере одного штамма бактериофага, способного вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма Escherichia coli. Согласно изобретению предложены

также новые штаммы бактериофагов, способные вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, и их варианты, имеющие такую же литическую активность.

034195 B1

034195 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области терапии бактериофагами для применения в лечении воспалительных заболеваний кишечника.

Предшествующий уровень техники

Бактериофаги являются вирусами, которые инфицируют бактерии в результате специфического взаимодействия.

Болезнь Крона (CD), также известная как регионарный энтерит, является воспалительным заболеванием кишечника, которое может поражать часть желудочно-кишечного тракта от ротовой полости до ануса, вызывая широкое разнообразие симптомов. Она вызывает главным образом абдоминальную боль, диарею, рвоту или потерю веса, но может вызывать также осложнения за пределами желудочно-кишечного тракта, такие как кожная сыпь, артрит, воспаление глаза, усталость и потеря концентрации.

Хотя точная причина CD еще неизвестна, представляется, что причиной этого заболевания является совокупность факторов окружающей среды и генетической предрасположенности. Считается, что CD является аутоиммунным заболеванием, при котором иммунная система организма атакует желудочно-кишечный тракт, вызывая воспаление; она классифицируется как тип воспалительного заболевания кишечника (IBD).

У пациентов с CD наблюдается аномальная экспрессия родственной карциноэмбриональному антигену молекулы клеточной адгезии 6 (CEACAM6) на апикальной поверхности эпителия подвздошной кишки, и обусловленные CD поражения подвздошной кишки колонизируются патогенными адгезивно-инвазивными *Escherichia coli* (AIEC).

Для болезни Крона не существует известного фармацевтического или хирургического лечения. В частности, ни IBD в целом, ни CD в частности не могут быть вылечены антибиотиками (с целью уничтожения патогенных *E. coli*). Возможности лечения ограничиваются контролем симптомов, поддержанием ремиссии и предупреждением рецидива.

Краткое изложение сущности изобретения

Согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, содержащая:

(1) по меньшей мере один штамм бактериофага, способный вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага; и

(2) фармацевтически приемлемый носитель.

В одном из воплощений настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция содержит комбинацию по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

В еще одном воплощении изобретения указанным адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* в указанной композиции является штамм LF82, 07081, 07082, 07076 или 06075.

Согласно еще одному воплощению изобретения указанным воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона, неспецифический язвенный колит или рецидив поражений подвздошной кишки после хирургической операции.

В еще одном воплощении изобретения указанная хирургическая операция представляет собой операцию по удалению по меньшей мере части тонкой кишки у пациентов с болезнью Крона.

В еще одном воплощении изобретения указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также способ лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, включающий введение по меньшей мере одного штамма бактериофага, способного вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага.

Согласно одному из воплощений изобретения указанный способ включает введение комбинации по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

Согласно еще одному из воплощений изобретения указанным адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является штамм LF82 или штамм, указанный в табл. 1.

В еще одном воплощении изобретения указанным воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

В еще одном воплощении изобретения указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В еще одном воплощении изобретения указанное введение осуществляют перорально.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P1 (CNCM I-4694), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P1 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P2 (CNCM I-4695), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P2 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P3 (CNCM I-4696), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P3 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P4 (CNCM I-4697), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P4 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P5 (CNCM I-4698), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P5 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P6 (CNCM I-4699), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P6 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P8 (CNCM I-4700), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении изобретения указанный вариант штамма бактериофага P8 имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Подробное описание изобретения

Для целей настоящего изобретения вариант штамма бактериофага считается имеющим такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага, если он демонстрирует, по меньшей мере, "+" против по меньшей мере одного из штаммов AIEC LF82, 07081, 07082, 07076 и 06075 в "Анализе *in vitro* инфективности бактериофагов в штаммах AIEC", описанном в примере 3 ниже. В предпочтительном воплощении вариант считается имеющим такую же литическую активность, если он демонстрирует, по меньшей мере, "+" против всех пяти штаммов AIEC LF 82, LF 06075, LF 07076, LF 07081 и LF 07082 (штаммы AIEC LF 06075, LF 07076, LF 07081 и LF 07082 также упоминаются сокращенно в данном описании как 06075, 07076, 07081 и 07082 соответственно). Эти штаммы AIEC депонированы Университетом Лилля 2 (Universite Lille 2 - Droit et Same, 42 Rue Paul Duez, 59000 Lille (Франция)) во Французской национальной коллекции при Институте Пастера под инвентарными номерами CNCM I-4712 (LF 82), CNCM I-4713 (LF 06075), CNCM I-4714 (LF 07076), CNCM I-4715 (LF 07081) и CNCM I-4716 (LF 07082).

Для целей настоящего изобретения вариант одного из штаммов бактериофагов P1-P6, P8 и CLB_P2 считается имеющим такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага, если он имеет по меньшей мере 80%-ную идентичность последовательности по меньшей мере по 70% длины, предпочтительно по меньшей мере 90%-ную идентичность последовательности по меньшей мере по 80% длины и более предпочтительно полную идентичность последовательности по меньшей мере по 90% длины (определенную с помощью алгоритма BLAST) с основным капсидным белком бактериофага wV8 (для вариантов P1-P6), или бактериофага RB69 (для вариантов P8), или бактериофага JS98 (для вариантов CLB_P2), как описано ниже в разделе "Идентификация основных капсидных белков".

Согласно изобретению предложена фармацевтическая композиция, содержащая (1) по меньшей мере один штамм бактериофага, способный вызывать литическую инфекцию в адгезивно-инвазивном штамме *Escherichia coli*, и (2) фармацевтически приемлемый носитель, для лечения воспалительного заболевания кишечника.

Согласно изобретению предложен также способ лечения воспалительного заболевания кишечника, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, по меньшей мере одного штамма бактериофага, способного вызывать литическую инфекцию в адгезивно-инвазивном штамме *Escherichia coli*,

осуществляя тем самым лечение субъекта.

Выражение "адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli* (AIEC)", использованное в данном документе, следует понимать как относящееся к штамму *E. coli*, имеющему средний потенциал инвазии, которое равно или выше 0,1% в клеточной культуре кишечной линии клеток I-407. Другими словами, штамм AIEC обладает способностью заражать культуру кишечных клеток I-407 с индексом инвазии, который равен или превышает 0,1% от первоначального инокулята (принятого за 100%) при тестировании в соответствии с анализом инвазии, описанным ниже в разделе "Анализ инвазии" (смотри также Darfeuille-Michaud et al. (2004), *Gastroenterology* 127:412-421).

Не являющимися ограничивающими примерами штаммов AIEC являются LF82, LF82SK (депонированные университетом Оверни (Universite d'Auvergne, 49 Boulevard François Mitterrand, 63001 Clermont-Ferrand (Франция)) во Французской национальной коллекции при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4723), штаммы, перечисленные в табл. 1 в данном описании ниже, и штаммы, перечисленные в следующем списке (Darfeuille-Michaud et al. (2004), *Gastroenterology* 127:412-421, особенно страница 417, табл. 2): LF31, LF71, LF123, LF138, LF9, LF15, LF28, LF50, LF65, LF119, LF128, LF130, LF73, LF100, LF110, LF134, LF105, LF49-2, LB11 и LF45-2. В одном воплощении адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является LF82, 07081, 07082, 07076 или 06075, в частности LF82.

В одном воплощении адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli* присутствует в ободочной кишке субъекта. В другом воплощении адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli* присутствует в подвздошной кишке субъекта. В еще одном воплощении адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli* присутствует в одном или более отделах (тонкого и/или толстого) кишечника субъекта.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P1, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4694, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P2, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4695, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P3, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4696, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P4, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4697, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P5, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4698, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P6, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4699, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же

литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой P8, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4700, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном воплощении по меньшей мере один штамм бактериофага представляет собой CLB_P2, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4675, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

В одном аспекте предусматривается, что фармацевтическая композиция содержит более чем один

штамм бактериофага, именуемый также "коктейлем бактериофагов". Коктейль бактериофагов по настоящему изобретению содержит любую комбинацию из двух или более P1, P2, P3, P4, P5, P6, P8 и CLB_P2, и их вариантов, имеющих такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики. Предпочтительно бактериофаги в коктейле бактериофагов, предназначенном для лечения конкретного субъекта или группы субъектов, будут выбирать на основе штамма AIEC или штаммов AIEC, идентифицированных и отобранных для противодействия.

Не являющимися ограничивающими примерами воспалительных заболеваний кишечника являются болезнь Крона (CD), неспецифический язвенный колит (UC), хроническое воспалительное заболевание кишечника (хроническое IBD), такое как, но без ограничения, микроскопический колит, глютенная болезнь и васкулит. В одном воплощении IBD представляет собой CD или UC. В другом воплощении воспалительным заболеванием кишечника является рецидив поражений подвздошной кишки после хирургической операции (такой как хирургическая операция по удалению по меньшей мере части тонкой кишки у пациентов с CD). Рецидив может быть измерен по шкале Рутгерта (Rutgeerts).

В одном воплощении IBD вызвана не бактериальной инфекцией. Это воплощение основано на том наблюдении, что IBD является аутоиммунным заболеванием, которое обычно не считается бактериальным заболеванием. Тем не менее, бактериальная инфекция может сопутствовать IBD, но необязательно быть агентом, являющимся причиной. Это наблюдение дополняет неожиданное решение по настоящему изобретению, а именно применение терапии бактериофагами для лечения заболевания, которое не вызвано бактериями.

По этой причине могут существовать, в качестве примера, штаммы AIEC у членов семьи субъектов, страдающих IBD, хотя эти члены семьи не страдают этим заболеванием. Аналогично, штаммы AIEC могут быть обнаружены у субъектов, которые не страдают IBD и не являются родственниками субъектов, страдающих IBD, как можно видеть из табл. 1, приведенной ниже.

Следует иметь в виду, что термин "лечение", использованный в данном документе, охватывает уменьшение одного или более симптомов, характерных для данного заболевания; снижение скорости прогрессирования заболевания; выздоровление после болезни, излечение заболевания, сохранение ремиссии и профилактику, такую как предупреждение рецидива.

"Субъектом" в данном документе может быть субъект мужского или женского пола. Субъектом может быть человеческое существо или любое другое млекопитающее.

Доза и режим введения фармацевтической композиции по изобретению обязательно будут зависеть от терапевтического эффекта, который должен быть достигнут (например, лечение IBD), и могут варьировать в зависимости от конкретных штаммов бактериофагов в композиции, пути введения и возраста и состояния индивидуального субъекта, которому нужно вводить лекарственное средство.

Дозировка для людей может содержать дозу бактериофага от 10^4 до 10^{11} бляшкообразующих единиц (БОЕ). Требуемая доза может быть представлена в виде одной дозы в сутки или в виде множества субдоз, вводимых через соответствующие интервалы времени.

В контексте настоящего изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к фармацевтически приемлемым, нетоксичным носителям, наполнителям или разбавителям, которые определены как носители, обычно используемые для приготовления фармацевтических композиций для введения животному или человеку.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные агенты и возможно другие терапевтические агенты. Вспомогательные агенты, также называемые вспомогательными ингредиентами, охватывают агенты, традиционно используемые в данной области, такие как, без ограничения, агенты, образующие матрицу, загустители, связывающие вещества, смазывающие вещества, агенты, регулирующие pH, защитные агенты, агенты, повышающие вязкость, агенты, способствующие растеканию, разрыхлители, включая нешипучие и шипучие разрыхлители, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, увлажняющие агенты, красители, корригенты, агенты, маскирующие неприятный вкус, подсластители, консерванты и т.д. Помимо того, что вспомогательные агенты являются фармацевтически приемлемыми, они должны быть "приемлемыми" в смысле совместимости с другими ингредиентами композиции, включая бактериофаг.

Фармацевтические композиции и пути введения включают те из них, которые пригодны для перорального (включая трансбуккальное, сублингвальное и интраорбитальное), ректального, назального, местного (включая трансдермальное), глазного, ушного, вагинального, бронхиального, легочного или парентерального (включая подкожное, внутримышечное, внутривенное, интрадермальное, интраперитонеальное, интраплевральное, интравезикулярное и интратекальное) введения или введения посредством имплантата. Фармацевтическая композиция или путь введения могут быть адаптированы для обеспечения прицельного эффекта штамма бактериофага по изобретению. В конкретном воплощении фармацевтическую композицию по изобретению вводят перорально. Композиции могут быть приготовлены любым способом, известным в области фармации. Такие способы включают стадию приведения штамма бактериофага по изобретению в контакт с фармацевтически приемлемым носителем и возможно с одним или более вспомогательными агентами.

Фармацевтические композиции, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц дозирования (лекарственных форм), таких как пилюли, таблетки, драже или капсулы, или в виде порошка или гранул, или в виде раствора или суспензии. Фармацевтическая композиция может быть также представлена в виде болюса или пасты. Композиции могут быть также переработаны в суппозиторий или клизму для ректального введения.

Для парентерального введения подходящие композиции включают водные и неводные стерильные инъекции. Композиции могут быть представлены в однодозовых или многодозовых контейнерах, например в запаянных флаконах или ампулах, и могут храниться в подвергнутом сублимационной сушке (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например воды, перед использованием.

Для трансдермального введения могут быть предусмотрены, например, гели, пластыри или спреи.

Композиции или препараты, подходящие для легочного введения, например, путем назальной ингаляции, включают тонкие пыли или туманы, которые могут быть генерированы посредством дозирующих аэрозолей под давлением, небулайзеров или инсуффляторов.

Изобретение также охватывает набор, содержащий фармацевтическую композицию по изобретению и инструкции по использованию композиции для применения, описанного здесь выше, возможно вместе с упаковочным материалом.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P1, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4694, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P2, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4695, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P3, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4696, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P4, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4697, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P5, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4698, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P6, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4699, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Согласно изобретению предложен также штамм бактериофага P8, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4700, или его вариант, где вариант имеет такую же литическую активность, предпочтительно такую же литическую активность и такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

Примеры

Изобретение дополнительно описано в приведенных ниже примерах, которые никоим образом не предназначены для ограничения объема изобретения, который заявлен.

Методы

Анализ инвазии.

Линию клеток Intestine-407 (I-407), получаемую из человеческой эмбриональной тощей кишки или подвздошной кишки, использовали в качестве модели недифференцированных кишечных эпителиальных клеток. Она была приобретена в Flow Laboratories (Flow Laboratories Inc., Mc Lean, VA).

Клетки Intestine-407 высевали в 24-луночные планшеты для культуры ткани (Polylabo, Strasbourg, France) при плотности 4105 клеток на лунку и инкубировали в течение 20 ч. Клеточные монослои промывали дважды PBS (забуференный фосфатами физиологический раствор) (pH 7,2). Бактериальную инвазию эпителиальных клеток измеряли, используя анализ с защитой гентамицином (Falkow et al. (1987), Rev. Infect. Dis. 9 (Suppl. 5):S450-455). Каждый монослой инокулировали в 1 мл клеточной культуральной среды, не содержащей антибиотиков, с множественностью инфицирования 10 бактерий на эпителиальную клетку. После инкубирования в течение 3 ч при 37°C с 5% CO₂ монослои промывали 3 раза PBS. Добавляли свежую клеточную культуральную среду, содержащую 100 мкг/мл гентамицина (Sigma, St. Louis, MO), в течение 1 ч, чтобы убить внеклеточные бактерии перед лизисом монослоев 1%-ным Triton

X-100 (Sigma) в деионизированной воде. Эта концентрация Triton X-100 не оказывала воздействия на жизнеспособность бактерий в течение по меньшей мере 30 мин. Образцы разбавляли и разливали по чашкам с агаром Mueller-Hinton для определения количества колониеобразующих единиц. Все результаты по инвазивной способности *E. coli* с использованием линии клеток Intestine-407 выражали в процентах внутриклеточных бактерий по сравнению с первоначальным инокулятом, принятым за 100%. Все анализы выполняли по меньшей мере 3 раза в отдельных экспериментах.

Идентификация основных капсидных белков.

Белки вириона получали путем кипячения 60 мкл суспензии 10^{11} БОЕ/мл каждого бактериофага в течение 10 мин. 20 мкл суспензии наносили на заводской 4-12% полиакриламидный гель. Гель окрашивали кумасси голубым и основные полосы иссекали, подвергали гидролизу трипсином и анализировали методом масс-спектрометрии на оборудовании для микросеквенирования Института Пастера.

Полученные массы пептидов сравнивали с информацией в базах данных по белкам, обеспечивая идентификацию наиболее близкого известного белка, т.е. wV8 для P1-P6, и RB69 для P8, и JS98 для CLB_P2 (смотри A. Villegas et al, Virology Journal 2009, 6:41, для характеристики wV8, и S. Zuber et al., Journal of Bacteriology 2007, 189:22, 8206, для характеристики RB69 и JS98).

Выравнивание последовательностей основного капсидного белка бактериофага

wV8 с последовательностями пептидов, полученными в результате
масс-спектрометрии основных капсидных белков бактериофагов P1-P6

```
wV8 : MLTNSSEKSRFFLADLTGEVQSIPTNYGYISNLGLFRSAPITQTTFLMDLTDWDVSLDDAVDRDSRKAE
P1 : FFLADLTGEVQSIPTNYGYISNLGLFR
P2 : SRFFLADLTGEVQSIPTNYGYISNLGLFRSAPITQTTFLMDLTDWDVSLDDAVDR
P3 :
P4 :
P5 :
P6 :
```

```
wV8 : TSAPERVQRQISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVRRAKLMKIRTKFDITREFLFMQ
P1 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
P2 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
P3 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
P4 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
P5 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
P6 : QISFFMMYFKEVESITPDEIQGVRRPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLFMQ
```

```
wV8 : ALKGKVVVDARGTLYADLYKQFDVEKKTIVYFDLDNPNADIDAAIEELRMHMEDEAKTGTVINGEEIHVV
P1 : ALK GTLYADLYK KTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
P2 : ALK GTLYADLYK TTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
P3 : ALK GTLYADLYK TTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
P4 : ALK GTLYADLYK TTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
P5 : ALK GTLYADLYK TTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
P6 : ALK GTLYADLYKQFDVEK TTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV
```

```
wV8 : VDRLFFSKLVKHKIRDAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGKFKDKR
P1 : VDR IRDAYLAQQTPLAWQQITGSLR FVQYNGK
P2 : VDRLFFSK IRDAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGK
P3 : VDR DAYLAQQTPLAWQQITGSLR FVQYNGK
P4 : VDR DAYLAQQTPLAWQQITGSLR FVQYNGK
P5 : VDR DAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGK
P6 : DAYLAQQTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYYGGVK
wV8 : GKVHTLVSIIDSVAATVGVGHAFPNVSMLEANNIFEVAYGPCPKMGYANTLGQELYVFEYEKDRDEGI
P1 : MGYANTLGQELYVFEYEKDR
P2 : MGYANTLGQELYVFEYEKDR
P3 :
P4 :
P5 :
P6 :
```

```
wV8 : DFEAHSYMLPYCTRPQLLVDRSDAKPD
P1 : PQLLVDR
P2 : PQLLVDR
P3 : PQLLVDR
P4 : PQLLVDR
P5 : PQLLVDR
P6 : PQLLVDR
```

Выравнивание последовательностей основного капсидного белка бактериофага RB69 с последовательностями пептидов, полученными в результате масс-спектрометрии основного капсидного белка бактериофага P8

```

RB69 : MTTIKTKAQLVDKWKELLEGELPEIANSKQAIIAKIFENQEKDFEVSPEYKDEKIAQAFGSFLTEAE
P8 :

RB69 : IGGDHGYNAQNIAAGQTSQAVTQIGPAVMGMVRRRAIPNLIAFDICGVQPMNSPTGQVFALRAVYGKDP
P8 :

RB69 : IAAGAKEAFHMPYAPDAMFSGQGAACKFPALAASTQTKVGDYIYTHFFQETGTVYLQASAQVTISSAD
P8 : EAFHMPYAPDAMFSGQGAACK

RB69 : DAAKLDAEIIKQMEAGALVEIAEGMATSI AELQEGFNGSTDNPNWEMGFRIDKQVIEAKSRQLKAAYS
P8 : AAYS

RB69 : IELAQDLRAVHGMADAELSGILATEIMLEINREVVDWINYSAQVGKSGMTNIVGSKAGVDFQDPID
P8 : IELAQDLR EVVDWINYSAQVGK AGVDFQDPID

RB69 : IRGARWAGESFKALLFQIDKEAVEIARQTGRGEGNFIIASRNVVNVLASVDTGISYAAQGLASGFNTD
P8 : IR WAGESFK QTGRGEGNFIIASR

RB69 : TTKSVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVGYKGANEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDPKNFQVPMGFKT
P8 : SVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVGYKGANEMDAGIYYAPYVALTPLR NFQVPMGFKT

RB69 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSIILNSLGNAYFRRVYVKGII
P8 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSIILNSLGN

```

Выравнивание последовательностей основного капсидного белка бактериофага JS98 с последовательностями пептидов, полученными в результате масс-спектрометрии основного капсидного белка бактериофага CLB_P2

```

JS98 : MKKNALVQKWSALLENEALPEIVGASKQAIIAKIFENQEQDILTAPEYRDEKISEAFGSFLTEAEI
CLB_P2 :

JS98 : GGDHGYDATNIAAGQTSQAVTQIGPAVMGMVRRRAIPHLIAFDICGVQPLNNPTGQVFALRAVYGKD
CLB_P2 : AVYGKD

JS98 : PIAAGAKEAFHMPYAPNAMFSGQGAETFEALAASKVLEVGIYSHFFETGSAHFQAVEAVTVDA
CLB_P2 : PIAAGAK
JS98 : GATDAAKLDAAVTALVEAGQLAEIAEGMATSI AELQEGFNGSTDNPNWEMGFRIDKQVIEAKSRQL
CLB_P2 :

JS98 : KASYSIELAQDLRAVHGMADAELSGILATEIMLEINREVIDWINYSAQVGKSGMTNTVGAAGVFW
CLB_P2 : ASYSIELAQDLR EVIDWINYSAQVGK AGVFW

JS98 : DFQDPIDIRGARWAGESFKALLFQIDKEAAEIIARQTGRGAGNFIIASRNVVNVLAAVDTSVSYAAQ
CLB_P2 : DFQDPIDIR WAGESFKALLFQIDKEAAEIIAR GAGNFIIASR

JS98 : GLGQGFNVDTTKAVFAGVLGGKYRVYIDQYARSDYFTIGYKGSNEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDP
CLB_P2 : AVFAGVLGGKYRVYIDQYAR GSNEMDAGIYYAPYVALTPLR

JS98 : KNFQVPMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPTAKRIQNGMPDIVNSLGLNGYFRRVYVKGII
CLB_P2 : NFQVPMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPTAKRIQNGMPDIVNSLGLNGYFR

```

Пример 1. Выделение штаммов AIEC.

Сто шестьдесят шесть (166) адгезивно-инвазивных штаммов *Escherichia coli* (*E. coli*), включая штамм *E. coli* LF82 (табл. 1), выделяли следующим образом: штаммы AIEC выделяли из свежих фекалий пациентов с CD, членов их семей и контрольных субъектов. Фекалии разводили десятикратными разведениями вплоть до 10^{-9} . Каждое разведение высевали на разную среду. После инкубирования колонии пересевали, идентифицировали и штаммы тестировали в отношении инвазионной способности.

Подробно, сразу после эмиссии свежие фекалии помещали в стерильный контейнер. Атмосферу делали анаэробной путем добавления увлажненного Anaerocult®. Образцы обрабатывали в день отбора проб. Примерно 1 г фекалий вносили в 9 мл цистеинированного раствора Рингера $1/4$ крепости в предварительно взвешенных пробирках; их снова взвешивали после внесения образца для определения его точной массы (первое десятикратное разведение). Делали восемь дополнительных десятикратных разведений, 0,1 мл каждого разведения высевали на разные неселективные и селективные среды и инкубировали в назначенных условиях: колумбийский кровяной агар (CS) и CSH агар, инкубирование в течение одной недели в анаэробных условиях; среда MRS, инкубирование в течение 48 ч в атмосфере, обогащенной CO₂; агар McConkey и Cetrimide, инкубирование в течение 48 ч на воздухе. Все инкубирования выполняли при 37°C. После инкубирования колонии подсчитывали, пересевали и идентифицировали по установленным фенотипическим критериям.

Контрольного субъекта выбирали по отношению к пациенту с CD исходя из условия, чтобы контрольный субъект был того же пола и возраста, как и пациент с CD, и имел размер семьи, подобный размеру семьи пациента с CD (для учета варьирования микрофлоры в семье).

Протокол был одобрен местным комитетом по этике в 2000 г. Пациенты были занесены в регистр EPIMAD, который был организован по соглашению между Национальным институтом здоровья и медицинских исследований (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) (INSERM) и Национальным институтом санитарного надзора (Institut National de Veille Sanitaire) (InVS), а также поддержан ассоциацией Франсуа Опети (François Aupetit Association), Лионским клубом северозападной Франции (Lyon's Club of Northwestern France), Ferring Laboratories, Французским национальным обществом гастроэнтерологии (Société Nationale Française de Gastroentérologie) и Больницей Лилльского университета (Lille

University Hospital).

Таблица 1

Штаммы АИЕС

Номер	Ссылка	Инвазия I-407 Среднее (%)	Инвазия I-407 SEM (%)	Культуральная среда ¹	Разведение	Уровень <i>E. coli</i> (log КОЕ/г) ²	Общее количество (log КОЕ/г) ₃
	LF82	1,29	0,8	McC	-4	5,7	5,9
<i>АИЕС, выделенные у пациента с CD</i>							
06259	C4-1	2,050	0,500	McC	-5	5,87	10,52
06254	C34-12	2,163	0,738	Cet	-2	2,91	10,14
06256	C34-2	0,550	0,170	McC	-7	7,91	10,14
06072	C39-1	0,2075	0,147	McC	-6	7,02	9,93
06073	C39-2	0,1374	0,097	McC	-6	7,02	9,93
06075	C39-4	0,2334	0,165	McC	-5	6,02	9,93
06076	C39-7	0,5900	0,417	Cet	-2	3,02	9,93
06087	C42-1	0,1095	0,055	McC	-5	5,82	9,58
06088	C42-2	0,1954	0,098	McC	-5	5,82	9,58
06089	C42-3	0,1930	0,097	Cet	-3	3,82	9,58
06398	C76-10	0,131	0,036	CS ana	-5	6,09	9,99
06011	C84-2	0,2580	0,129	McC	-6	6,96	9,23
06023	C97-1	0,1173	0,068	McC	-7	8,14	10,03
06024	C97-2	0,1303	0,075	McC	-6	7,14	10,03
06026	C98-1	0,1439	0,072	McC	-6	7,2	9,34
06027	C98-2	0,1122	0,065	McC	-6	7,2	9,34
06028	C98-4	0,2310	0,133	Cet	-2	3,20	9,34
06029	C99-1	1,0657	0,615	McC	-6	6,99	10,17
06030	C99-2	0,1613	0,081	McC	-6	6,99	10,17
06031	C99-3	0,2330	0,135	McC	-5	5,99	10,17
06033	C99-9	0,4667	0,269	Cet	-2	2,99	10,17
06150	C187-13	0,6675	0,472	CS ana	-7	7,93	9,97
06151	C187-14	1,0350	0,732	CS ana	-7	7,93	9,97
06152	C187-15	0,4375	0,253	CS ana	-7	7,93	9,97
06166	C190-1	0,2251	0,130	McC	-8	9,28	10,98
06167	C190-2	0,1247	0,072	McC	-8	9,28	10,98
06168	C190-3	0,1688	0,097	McC	-7	8,28	10,98
06169	C190-4	0,1373	0,079	McC	-6	7,28	10,98
06170	C190-6	0,7065	0,408	Cet	-3	4,28	10,98
06171	C190-8	0,5827	0,336	Cet	-2	3,28	10,98
06172	C190-7	0,5385	0,311	Cet	-2	3,28	10,98
06173	C190-12	0,5182	0,299	CS ana	-9	10,28	10,98
06280	C203-7	0,185	0,087	Cet	-3	3,96	9,94
06281	C203-9	0,393	0,023	Cet	-2	2,96	9,94
06283	C204-4	0,253	0,092	McC	-6	7,00	9,78
06271	C205-2	0,153	0,052	McC	-6	6,93	9,97
06278	C205-9	0,160	0,005	Cet	-2	2,93	9,97
06351	C215-8	0,548	0,397	Cet	-5	5,93	9,91
06352	C215-9	0,262	0,143	Cet	-5	5,93	9,91
06353	C215-12	1,960	1,340	Cet	-3	3,93	9,91
06354	C215-13	1,339	1,281	Cet	-3	3,93	9,91
06356	C215-10	2,260	1,540	Cet	-3	3,93	9,91
06357	C215-11	2,195	1,355	Cet	-3	3,93	9,91
06358	C215-1	1,110	0,590	McC	-6	7,93	9,91
06359	C215-2	1,523	0,928	McC	-6	7,93	9,91

06360	C215-3	0,165	0,064	McC	-4	4,93	9,91
06361	C215-4	0,315	0,135	McC	-3	3,93	9,91
06362	C215-5	0,980	0,720	McC	-3	3,93	9,91
07074	C43-1	1,5825	1,3675	McC	-6	7,26	9,66
07075	C44-1	0,1822	0,0755	McC	-5	6,01	9,91
07076	C44-2	0,5950	0,3350	McC	-5	6,01	9,91
07077	C44-3	0,1432	0,0486	McC	-4	5,01	9,91
07078	C44-4	0,3086	0,1764	McC	-4	5,01	9,91
07081	C44-9	0,5525	0,2675	Cet	-2	3,01	9,91
07082	C45-1	0,4675	0,0925	McC	-5	5,94	9,46
07086	C45-9	0,2110	0,0842	Cet	-2	2,94	9,46
07093	C50-2	1,3125	0,9375	McC	-5	5,99	7,69
07035	C66-2	0,6475	0,3125	McC	-7	8,01	9,53
07045	C71-1	0,2079	0,1226	McC	-5	5,95	10,58
07046	C71-2	0,2030	0,0719	McC	-4	4,95	10,58
07048	C71-5	0,2388	0,1382	Cet	-2	2,95	10,58
07051	C100-11A	0,6325	0,3425	MRS	-4	5,07	10,47
07003	C112-4	0,2513	0,0861	McC	-5	6,14	10,88
07006	C112-10	0,8913	0,1863	Cet	-2	3,14	10,88
07022	C121-8	0,1903	0,0448	Cet	-5	6,14	10,88
07101	C55-1	0,678	0,022	McC	-6	6,95	10,38
07103	C55-3	9,175	2,775	McC	-5	5,95	10,38
07107	C55-8A	4,425	0,075	Cet	-2	2,95	10,38
07111	C60-1	0,232	0,028	McC	-6	6,84	8,20
07113	C60-3	0,340	0,105	McC	-4	4,84	8,20
07126	C231-1	0,323	0,097	McC	-7	7,94	10,62
07127	C231-2	0,141	0,030	McC	-6	6,94	10,62
07128	C231-5	0,365	0,095	Cet	-3	3,94	10,62
07134	C233-1	0,645	0,090	McC	-3	3,98	6,18
07135	C233-3	1,510	0,390	McC	-2	2,98	6,18
07136	C233-2	2,090	0,260	McC	-3	3,98	6,18
07137	C233-11	1,108	0,168	CSH	-3	3,98	6,18
<i>АИЕС, выделенные у членов семьи пациентов с CD</i>							
06066	C22-9	0,2710	0,192	CS ana	-7	7,94	10,12
06381	C33-5	0,465	0,185	Cet	-2	2,90	9,46
06258	C35-5	0,873	0,428	McC	-6	7,64	10,14
06086	C41-7	0,1242	0,072	Cet	-2	2,91	10,14
06384	C47-2	0,180	0,010	McC	-6	7,07	9,62
06386	C47-4	0,121	0,047	McC	-5	6,07	9,62
06097	C64-2	1,4550	1,029	McC	-5	6,03	9,80
06099	C64-5	0,1175	0,068	Cet	-2	3,03	9,80
06100	C64-6	1,1225	0,794	Cet	-2	3,03	9,8
06006	C81-1	0,2850	0,202	McC	-5	5,96	9,64
06007	C81-2	0,3200	0,226	McC	-5	5,96	9,64
06016	C85-1	0,7540	0,435	McC	-7	8,01	10,16
06019	C85-5	1,4775	1,045	Cet	-2	3,01	10,16
06394	C87-7	0,130	0,030	MRS	-2	3,03	9,42
06020	C92-1	0,1253	0,072	McC	-5	6,09	9,64
06021	C92-2	0,1678	0,097	McC	-4	5,09	9,64
06022	C92-4	0,1229	0,071	McC	-2	3,09	9,64
06396	C95-1	4,975	2,575	McC	-6	7,1	9,75
06037	C102-1	0,6767	0,391	McC	-6	6,90	8,55
06040	C102-7	0,2342	0,135	CS ana	-6	6,9	8,55
06080	C107-2	0,5050	0,357	McC	-6	7,1	9,55
06042	C107-3	0,1900	0,110	McC	-6	7,1	9,55
06043	C107-5	1,7600	1,245	McC	-6	7,1	9,55
06045	C107-10	0,1975	0,140	Cet	-2	3,1	9,55
06046	C108-2	0,3925	0,278	McC	-6	7,12	10,54
06049	C108-10	0,2425	0,171	CS ana	-7	8,12	10,54
06057	C133-1	0,2475	0,175	McC	-6	6,98	10,49
06101	C133-4	0,1809	0,090	Cet	-2	2,98	10,49
06160	C189-2	1,3483	0,778	McC	-6	7,07	10,19
06164	C189-16B	0,3295	0,190	CSH	-8	8,07	10,19
06176	C191-4	0,3975	0,281	McC	-5	5,96	10,34

06177	C191-5	0,3185	0,225	McC	-5	5,96	10,34
06293	C207-6	0,175	0,111	Cet	-2	2,93	10,13
06295	C208-6	0,116	0,047	Cet	-2	2,91	10,57
06301	C211-1	0,285	0,242	McC	-2	2,87	10,07
06329	C218-2	0,649	0,439	McC	-6	6,88	10,06
06338	C218-13	0,208	0,047	Cet	-5	5,88	10,06
06341	C218-16	0,304	0,218	Cet	-4	4,88	10,06
07064	C225-1	0,1280	0,0058	McC	-4	4,90	10,10
07065	C225-2	0,8354	0,7146	McC	-4	4,90	10,10
07066	C225-5	0,9200	0,4150	McC	-6	6,87	9,49
07067	C225-6	1,0792	0,5977	McC	-5	5,87	9,49
07068	C226-1	0,1193	0,0334	McC	-5	6,06	10,58
07073	C227-4	0,2164	0,1568	Cet	-2	2,88	10,06
07120	C228-2	0,228	0,013	McC	-2	3,17	9,72
07121	C229-1	0,126	0,012	McC	-5	6,06	9,50
07122	C229-2	0,117	0,034	McC	-4	5,06	9,50
07123	C229-7	0,190	0,045	Cet	-5	6,06	9,50
07131	C232-5	0,190	0,122	Cet	-2	2,98	9,60
07138	C235-1	0,658	0,193	McC	-5	6,02	9,42
<i>АИЕС, выделенные у контрольных субъектов</i>							
06235	C174-6	2,833	2,468	Cet	-2	3,05	10,59
06242	C177-1	0,251	0,175	McC	-6	6,99	9,95
06103	C177-13	0,1461	0,073	CS ana	-7	7,99	9,95
06105	C177-2	0,1571	0,079	McC	-5	5,99	9,95
06106	C178-23	0,4527	0,261	CSH	-5	6,03	10,24
06108	C179-7	0,1103	0,064	Cet	-2	3,07	10,53
06142	C181-5	1,1525	0,815	Cet	-3	4,01	9,96
06143	C183-12	0,2117	0,122	CSH	-7	8,2	9,95
06121	C183-2	0,1867	0,108	McC	-4	5,2	9,95
06122	C183-5	1,1025	0,780	Cet	-2	3,20	9,95
06145	C184-17	0,1095	0,077	CSH	-5	6,09	9,64
06146	C185-22	0,3933	0,227	CSH	-5	5,88	9,88
06126	C185-1	0,6050	0,428	McC	-4	4,88	9,88
06135	C185-2	0,4500	0,318	McC	-5	5,88	9,88
06136	C185-3	0,4875	0,345	McC	-2	2,88	9,88
06137	C185-6	0,3125	0,221	Cet	-2	2,88	9,88
06127	C186-1	0,1063	0,053	McC	-6	6,86	10,04
06129	C186-4	0,4700	0,332	Cet	-3	3,86	10,04
06158	C188-15	0,1052	0,061	CS ana	-6	6,94	9,60
06196	C192-11	0,508	0,279	Cet	-2	2,92	9,44
06197	C195-1	0,206	0,157	McC	-5	5,95	9,72
06198	C195-2	1,806	1,363	McC	-4	4,95	9,72
06200	C195-6	2,498	1,482	Cet	-2	2,95	9,72
06201	C196-1	0,218	0,105	McC	-7	7,87	9,61
06204	C196-4	0,307	0,163	McC	-5	5,87	9,61
06212	C197-1	3,133	1,438	McC	-6	6,86	10,32
06213	C197-2	0,445	0,042	McC	-6	6,86	10,32
06216	C197-6	0,886	0,782	Cet	-2	2,86	10,32
06217	C198-1	0,143	0,112	McC	-6	7,07	10,03
06218	C198-2	0,113	0,096	McC	-6	7,07	10,03
06221	C199-3	5,367	3,132	McC	-4	5,06	9,79
06222	C199-4	1,353	0,942	McC	-3	4,06	9,79
06223	C199-5	2,980	2,122	McC	-3	4,06	9,79
06224	C199-6	5,398	2,837	McC	-3	4,06	9,79
06225	C200-1	0,538	0,277	McC	-3	4,06	9,79
07032	C222-1	0,1038	0,0783	McC	-6	7,14	10,88
07033	C222-2	1,2425	0,6575	McC	-6	7,14	10,88
07125	C230-1	0,300	0,055	McC	-5	6,0	10,2

¹ McC = Агар McConkey (bioMérieux),

Cet = Агар Cetrimide (bioMérieux),

CS ana = анаэробный колумбийский кровяной агар,

MRS = Агар Мана-Рогозы-Шарпа (Man Rogosa Sharp Agar) (Oxoid),

CSH = Агар Columbia SH.

² "Уровень E. coli относится к количеству штамма АИЕС в фекалиях.

³ "Общее количество" относится ко всем видам в фекалиях.

Культуральная среда CS ana имеет следующий состав (на 1 л среды):

39 г основы из колумбийского кровяного агара (Oxoid),
 5 г глюкозы,
 0,3 г цистеина гидрохлорида,
 5 г агара,
 pH 7,0 ± 0,2.

Смесь стерилизуют в течение 15 мин при 121°C. Непосредственно перед высеванием добавляют 5% лошадиной крови.

Культуральная среда CSH имеет следующий состав (на 1 л среды):

39 г основы из колумбийского кровяного агара (Oxoid),
 3 г цистеина гидрохлорида, pH 6,8 ± 0,2.

Смесь стерилизуют в течение 15 мин при 121°C. Непосредственно перед высеванием добавляют 2 мл стерильного раствора цитрата аммония (0,25 г/10 мл воды). После инкубирования бактерии, использующие цистеин (и высвобождающие сульфид), дают в результате черные колонии на этой среде.

Пример 2. Выделение фагов.

Фаги выделяли из сточных вод следующим образом: сточные воды фильтровали при 0,2 мкм и смешивали с равным объемом среды 2X Luria-Bertani (LB). Эту смесь инокулировали свежей культурой штамма LF82 и инкубировали на шейкере при 37°C в течение ночи. В колбу добавляли хлороформ (1/10 объем) и колбу помещали на шейкер на 1 ч. Среду центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Собирали 1 мл надосадочной жидкости и добавляли 1/10 об. хлороформа. После кратковременного перемешивания на вортексе пробирку Eppendorf центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин. Чтобы определить, присутствуют ли фаги в этом экстракте, каплю (10 мкл) надосадочной жидкости наносят на агаровую пластину LB и оставляют сушиться. Используя платиновую проволоку, посев на пластине делали штрихами от капли по остальной части пластины для выделения индивидуальных фагов. Наносили 1 мл растущей культуры штамма LF82, покрывая всю пластину; избыток удаляли и пластину инкубировали при 37°C в течение ночи. Одну или две бляшки собирали и ресуспендировали в 200 мкл SM буфера (10 mM TrisHCl pH7, NaCl 200 mM, желатина 0,03%). В каждую пробирку добавляли 20 мкл хлороформа и пробирку быстро перемешивали на вортексе и центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин. 10 мкл надосадочной жидкости наносили на пластину LB, оставляли сушиться и предыдущую процедуру повторяли по меньшей мере три раза. Сразу после того как большая часть выделенных бляшек стала гомогенной, добавляли 10 мкл последней ресуспендированной бляшки к 1 мл растущей культуры штамма LF82 при OD 0,1 при 600 nm. Пробирку с этой культурой инкубировали при 37°C в течение 2-4 ч до тех пор, пока не произойдет лизис. После добавления 1/10 об. хлороформа культуру переносили в пробирку Eppendorf, центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин и охлаждали до 4°C с получением первичного исходного раствора. Несколько разведений этого исходного раствора выдерживали при 4°C и использовали для инфицирования большего объема культуры, чтобы получить большее количество фагов. Были получены следующие 7 фагов:

vB EcoM LF82 P1 (в данном описании выше и ниже P1), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4694;

vB EcoM LF82 P2 (в данном описании выше и ниже P2), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4695;

vB EcoM LF82 P3 (в данном описании выше и ниже P3), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4696;

vB EcoM LF82 P4 (в данном описании выше и ниже P4), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4697;

vB EcoM LF82 P5 (в данном описании выше и ниже P5), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4698;

vB EcoM LF82 P6 (в данном описании выше и ниже P6), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4699; и

vB EcoM LF82 P8 (в данном описании выше и ниже P8), депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4700.

CLB_P2, депонированный во Французской национальной коллекции микроорганизмов при Институте Пастера под инвентарным номером CNCM I-4675, и его выделение описаны подробно в Maura et al. *Environmental Microbiology* (2012) 14(8), 1844-1854.

Фаги P1-P6 относятся к семейству бактериофагов wV8.

P8 относится к семейству бактериофагов RB69.

CLB_P2 относится к семейству бактериофагов JS98.

Классификация на семейства бактериофагов wV8, RB69 и JS98 сделана на основе последовательности основного капсидного белка.

Пример 3. Анализы *in vitro* в отношении инфективности бактериофагов в штаммах AIEC.

Анализ бляшкообразования проводили путем приведения в контакт последовательных разведений растворов бактериофагов (от неразведенного до разведения 10⁻⁸) с чашкой Петри, поверхность которой

была покрыта одной бактерией. После инкубирования в течение ночи при 37°C бляшки подсчитывали. Когда тестируемой бактерией был бактериальный хозяин (референсный хозяин), используемый для выделения бактериофагов, тогда считали, что анализ бляшкообразования дал эффективность 100%. Когда тестируемая бактерия не была первоначальным хозяином, тогда результаты выражали путем сравнения с референсным хозяином. Результат больше 80% (+++) означает, что бактерия является высокоэффективным хозяином по сравнению с референсным хозяином, результат от 0,1 до 80% (++) означает, что бактерия является эффективным хозяином, и результат ниже 0,1% (+), но выше 0 означает, что бактерия является умеренно эффективным хозяином, и, наконец, 0 (-) означает, что бактерия является totally устойчивой.

Результаты.

В табл. 2 показан результат для спектра хозяев из 8 фагов (выделенных/идентифицированных в примере 2) на 38 штаммах (из 166 штаммов, выделенных в примере 1, табл. 1).

Таблица 2

Протестированные штаммы и эффективная продуктивность посева (EOP), полученная для каждого бактериофага

Бактериальный штамм	Бактериофаг							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	CLB_P2
LF82	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
06023	-	-	-	-	-	-	-	++
06030	-	-	-	-	-	-	+	+++
06033	++	++	++	++	++	++	+	+++
06066	-	-	-	-	-	-	+++	-
06072	-	-	-	-	-	-	+	++
06073	-	-	-	-	-	-	+	+++
06075	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
06088	++	++	++	++	++	++	-	-
06089	++	++	++	++	++	++	-	-
06122	++	++	++	++	++	++	-	-
06150	-	-	-	-	-	-	+	-
06351	++	++	++	++	++	++	-	++
06353	+	+	+	+	+	+	-	-
06354	-	-	-	-	-	-	-	-
06356	++	+	+	+	+	+	-	-
06357	+	+	+	+	+	+	-	-
06358	++	+	+	+	+	+	-	-
06359	++	+	+	+	+	+	-	-
06361	+	++	+	+	+	+	+	-
06362	-	-	-	-	-	-	-	-
07045	-	-	-	-	-	-	-	-
07046	-	-	-	-	-	-	-	++

07048	-	-	-	-	-	-	-	-
07051	-	-	-	-	-	-	-	-
07075	-	-	-	-	-	-	-	-
07076	++	+++	++	+	+	+	+++	++
07077	-	-	-	-	-	-	-	-
07078	++	+++	+	+	+	+	+	++
07081	++	+++	++	+	+	++	+++	++
07082	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
07107	+++	++	+++	++	+++	+++	-	+++
07126	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++
07127	+++	++	+++	+++	++	++	-	++
07128	-	-	-	-	-	-	-	++
07134	-	-	-	-	-	-	-	-
07135	-	-	-	-	-	-	-	++
07136	-	-	-	-	-	-	-	-
07137	-	-	-	-	-	-	++	-

Таблица 3
Количество штаммов, инфицированных фагами

Эффективность	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P8	CLB_P2
+	3	5	6	9	9	8	8	0
++	10	8	8	6	6	7	1	13
+++	5	6	5	4	4	4	4	5
В сумме/38	18	19	19	19	19	19	13	18

Числа указывают количество штаммов, инфицированных одним бактериофагом.

Пример 4. Репликация бактериофагов в кишечнике мышей *in vivo*.

Репликацию бактериофагов в кишечнике мышей *in vivo* оценивали следующим образом.

Сначала был сконструирован штамм LF82, который несет на себе два устойчивых к антибиотикам гена, наделяющих соответственно устойчивостью к стрептомицину и канамицину. Этот новый бактериальный штамм был назван LF82SK, и его инвазивные свойства были определены как сходные с первоначальным штаммом LF82.

3 группы по 2 мыши в каждой:

группа 1: неколонизированные мыши + фаги;

группа 2: мыши, колонизированные LF82SK;

группа 3: мыши, колонизированные LF82SK, + фаги.

Стрептомицин (5 г/л) добавляли в питьевую воду всех животных за 3 суток до дня 0 и затем на всем протяжении эксперимента.

В день 0 мышам группы 2 и группы 3 вводили LF82SK, чтобы дать возможность штамму колонизировать мышиную кишку.

В день 4 мышам группы 1 и группы 3 вводили 200 мкл коктейля из бактериофагов P2 + P6 (вводимый через желудочный зонд раствор 10^8 БОЕ/мл) один раз утром и один раз в полдень. Бактериофаги P2 + P6 также добавляли в питьевую воду (10^8 БОЕ/мл). В день 5 утром мышей умерщвляли, чтобы оценить количество бактерий и бактериофагов в подвздошной кишке и в фекалиях.

Результаты.

Бактерии (*E. coli*):

группа 1: нет бактерий;

группа 2: в подвздошной кишке - 10^6 КОЕ/г органа; в фекалиях - 10^8 КОЕ/орган;

группа 3: в подвздошной кишке и фекалиях: все бактерии лизированы фагами.

Фаги:

группа 1: в подвздошной кишке - 10^6 БОЕ/г органа; в фекалиях - 10^7 БОЕ/орган;

группа 2: нет фагов;

группа 3: в подвздошной кишке - 10^6 БОЕ/г органа; в фекалиях - 10^{10} БОЕ/орган.

В фекалиях было в 100 раз больше фагов в группе 3, чем в группе 1, что свидетельствует о размножении фагов *in vivo*.

Пример 5. Репликация бактериофагов в кишечнике мышей *in vivo*.

Репликацию бактериофагов в кишечнике мышей *in vivo* оценивали следующим образом.

12 мышей распределяли на 3 группы по 4 мыши в каждой:

группа 1: неколонизированные мыши + фаги,
 группа 2: мыши, колонизированные LF82SK,
 группа 3: мыши, колонизированные LF82SK, + фаги.

Стрептомицин (5 г/л) добавляли в питьевую воду всех животных за 3 суток до дня 0 и затем на всем протяжении эксперимента.

В день 0 мышам группы 2 и группы 3 давали LF82SK, чтобы дать возможность штамму колонизировать мышиную кишку.

В день 4 в питьевую воду мышей группы 1 и группы 3 добавляли бактериофаги (коктейль из P2 + P6 + P8 по 10^8 БОЕ/мл каждого).

В день 5 мышей умерщвляли для оценки количества бактерий и бактериофагов в подвздошной кишке и в фекалиях. Брали по 100 мкл гомогенатов подвздошной кишки из трех групп для экстракции целой ДНК с использованием набора для очистки ДНК из ткани Maxwell® 16 от Promega.

Результаты.

Бактерии (*E. coli*):

группа 1: нет бактерий;

группа 2: в подвздошной кишке - $3,2 \cdot 10^6$ КОЕ/г органа; в фекалиях - $1,2 \cdot 10^9$ КОЕ/г фекалий;

группа 3: в подвздошной кишке и фекалиях: все бактерии лизированы фагами.

Фаги:

группа 1: в подвздошной кишке - $1,4 \cdot 10^6$ БОЕ/г органа; в фекалиях - $5,2 \cdot 10^6$ БОЕ/г фекалий;

группа 2: нет фагов

группа 3: в подвздошной кишке - $2,6 \cdot 10^6$ БОЕ/г органа; в фекалиях - $1,0 \cdot 10^9$ БОЕ/г фекалий;

В фекалиях было в 200 раз больше фагов в группе 3, чем в группе 1, что свидетельствует о размножении фагов *in vivo*.

ДНК, экстрагированную из срезов подвздошной кишки, использовали для выполнения количественной ПНП с использованием двух наборов праймеров. Один набор праймеров (SEQ ID NO: 30-31) служил для амплификации ДНК из "всех бактерий", присутствующих в образце, а второй набор (SEQ ID NO: 32-33) использовали для амплификации конкретно ДНК из бактерий "*E. coli*". После нормализации результаты выражали в виде соотношения *E. coli* и всех бактерий.

Группа 1: кПЦР-амплификации были успешными с праймерами всех бактерий, но не с праймерами *E. coli*. Соотношение не может быть рассчитано.

Группа 2: кПЦР-амплификации были успешными с обоими наборами праймеров. Среднее соотношение составляло 0,6 (60% от всех бактерий были бактериями *E. coli*).

Группа 3: кПЦР-амплификации были успешными с обоими наборами праймеров. Среднее соотношение составляло 0,1 (10% от всех бактерий были бактериями *E. coli*). Необходимо отметить, что одна мышь показала соотношение 0,4, тогда как три остальные показали намного меньшие значения (0,06; 0,0002; 0,002).

Как результат, бактериофаги были способны снижать уровень колонизации в подвздошной кишке бактерий LF82 по меньшей мере на один порядок величины у трех мышей из четырех.

Пример 6. Анализ инфективности бактериофагов *in vivo*.

Два коктейля фагов выбраны для тестирования у мышей дикого типа (WT) и у мышей CEACAM6, инфицированных штаммом LF82 *E. coli*, выделенным из пациентов с CD.

И мышам WT, и мышам CEACAM6, инфицированным штаммом LF82 *E. coli*, выделенным из пациентов с CD, бактериофаги вводят через пероральный зонд в СМС. Этот вид введения имеет много преимуществ: введение известного количества бактериофага и немедленная нейтрализация желудочной кислоты. Фаги ежедневно вводят мышам в течение всего исследования.

Мышей умерщвляли через 5 суток после введения LF82.

Главные критерии: количественное определение LF82 в подвздошной кишке и адгезивной флоры ободочной кишки мышей.

Второстепенные критерии:

оценка массы;

консистенция стула;

присутствие крови в кале (макро и био);

люминальная флора (обычная флора + LF82 + фаги);

после умерщвления: макроскопические и гистологические исследования, адгезивная флора подвздошной кишки и ободочной кишки + LF82 + фаги;

после умерщвления: макроскопические и гистологические исследования, адгезивная флора подвздошной кишки и ободочной кишки + LF82 + фаги.

Контролируют биологические параметры воспаления и выявляют транслокацию бактериофагов в брыжеечных лимфатических узлах (MLN), печени и селезенке;

Контролируют маркеры воспаления (МРО, провоспалительные цитокины IL-6, IL-12 и противовоспалительные цитокины IL-10). Выявляют транслокацию бактериофагов и АИЕС в MLN, печени и селе-

зенке.

Имеет место последующая элиминация бактериофагов со стулом мышей, получающих коктейль бактериофагов без штамма LF82.

Пример 7. Анализ коктейля из фагов на штамме LF82 *in vivo*.

Репликацию бактериофагов (коктейль из P2+P6+P8+CLB_P2) в кишке мышей *in vivo* оценивали следующим образом:

20 мышей были разделены на 2 группы по 10 мышей в каждой:

группа 1: мыши, колонизированные LF82SK;

группа 2: мыши, колонизированные LF82SK, + фаги

Стрептомицин (5 г/л) добавляли в питьевую воду всех животных за 3 суток до дня 0 и затем на всем протяжении эксперимента.

В день 0 мышам обеих групп давали LF82SK, чтобы дать возможность штамму колонизировать мышиную кишку.

В день 3 мышам группы 2 вводили через желудочный зонд бактериофаги (коктейль из P2+P6+P8+CLB_P2, по 10^8 БОЕ/мл каждого).

В день 4 и день 7 по 5 мышей из каждой группы умерщвляли для оценки количества бактерий и бактериофагов в подвздошной кишке, в ободочной кишке и в фекалиях. Брали 100 мкл гомогенатов подвздошной кишки и толстой кишки из двух групп для экстрагирования целой ДНК с использованием набора для очистки ДНК из ткани Maxwell® 16 от Promega.

Результаты.

Уровень LF82 в стуле.

В день 4 и день 7 уровни LF82 были следующие: в группе 1: $7 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^9$ КОЕ/г в группе 2: $8 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^8$ КОЕ/г.

Уровень фагов в стуле.

В день 4 и день 7 уровни фагов были следующие: в группе 1: нет в группе 2: $5 \cdot 10^9$; $6 \cdot 10^9$ БОЕ/г.

В присутствии коктейля фагов уровень LF82 в стуле был значительно ниже, чем в его отсутствии, что свидетельствует о том, что коктейль фагов был способен инфицировать LF82 внутри мышинной кишки.

Уровень LF82 в органах.

В день 4 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 1: 100% бактерий составляют E. coli (LF82);

в подвздошной кишке группы 2: 20% бактерий составляют E. coli (LF82);

в ободочной кишке группы 1: 40% бактерий составляют E. coli (LF82);

в ободочной кишке группы 2: 2% бактерий составляют E. coli (LF82).

В день 7 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 1: 100% бактерий составляют E. coli (LF82);

в подвздошной кишке группы 2: 50% бактерий составляют E. coli (LF82);

в ободочной кишке группы 1: 25% бактерий составляют E. coli (LF82);

в ободочной кишке группы 2: 10% бактерий составляют E. coli (LF82).

Уровни фагов в органах.

В день 4 уровни фагов были следующие:

в подвздошной кишке группы 1: нет;

в подвздошной кишке группы 2: $7 \cdot 10^8$ БОЕ/г;

в ободочной кишке группы 1: нет;

в ободочной кишке группы 2: $5 \cdot 10^{10}$ БОЕ/г.

В день 7 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 1: нет;

в подвздошной кишке группы 2: $7 \cdot 10^8$ БОЕ/г;

в ободочной кишке группы 1: нет;

в ободочной кишке группы 4: $2 \cdot 10^8$ БОЕ/г.

В день 2 и день 5 уровень LF82 снизился как в подвздошной кишке, так и в ободочной кишке в группе мышей, которым вводили фаги. Это свидетельствует о том, что фаги инфицируют LF82 в срезах кишки, а не только в стуле. К тому же, уровень фагов в день 7 остается таким же высоким, как и в день 2, что свидетельствует о том, что фаг может оставаться несколько дней в кишке после однократного первоначального введения.

Пример 8. Анализ инфективности бактериофагов *in vivo*.

Анализ инфективности бактериофагов (коктейль из P2 + P6 + P8) *in vivo* у мышей CEACAM6, инфицированных LF82SK, оценивали следующим образом.

48 мышей были разделены на 4 группы следующим образом:

группа 1: неколонизированные мыши (8 мышей);

группа 2: неколонизированные мыши + фаги (12 мышей);

группа 3: мыши, колонизированные LF82SK (16 мышей);

группа 4: мыши, колонизированные LF82SK, + фаги (12 мышей).

DSS (декстрана сульфат) 0,25% вносили в питьевую воду за 3 суток до дня 0 и затем на всем протяжении эксперимента.

Стрептомицин (5 мг) вводили через пероральный зонд всем животным за 1 сутки до дня 0.

В день 0 мышам группы 3 и группы вводили 4LF82SK, чтобы дать возможность штамму колонизировать мышиную кишку.

В день 1 каждой мыши группы 2 и группы 4 вводили фаги (коктейль из P2+P6+P8 по 10^7 БОЕ/мл каждого) один раз через пероральный зонд в СМС. Этот вид введения имеет много преимуществ: введение известного количества бактериофага и немедленная нейтрализация желудочной кислоты.

В день 1 4 мышей из группы 3 умерщвляли для оценки количества бактерий в подвздошной кишке, в ободочной кишке и в фекалиях до введения фагов.

В день 2 соответственно 4, 6, 6 и 6 мышей из групп 1, 2, 3 и 4 умерщвляли для оценки количества бактерий и бактериофагов в подвздошной кишке, в ободочной кишке и в фекалиях.

В день 5 соответственно 4, 6, 6 и 6 мышей из групп 1, 2, 3 и 4 умерщвляли для оценки количества бактерий и бактериофагов в подвздошной кишке, в ободочной кишке и в фекалиях.

По 100 мкл гомогенатов подвздошной кишки, толстой кишки и фекалий из четырех групп брали для экстракции целой ДНК с использованием набора для очистки ДНК из ткани Maxwell® 16 от Promega.

Вес, консистенцию стула и присутствие крови в кале контролировали ежедневно.

ДНК, экстрагированную из срезов подвздошной кишки, использовали для выполнения количественной ПНР с использованием одного набора праймеров (SEQ ID NO: 44-45) для амплификации специфического гена (pMT1) из LF82. Результаты выражали в виде количества копий этого гена на 1 г тканей.

LF82 pMT1 F (SEQ ID NO:44) CCATTCATGCAGCAGCTCTTT

LF82 pMT1 R (SEQ ID NO:45) ATCGGACAACATTAGCGGTGT

Результаты.

Значения представляют собой медианные значения, полученные для каждой группы мышей.

В группе 1 ни LF82, ни фаги не были обнаружены на всем протяжении эксперимента.

Уровень LF82 в стуле.

В день 1: уровень LF82 в группах 3 и 4 составлял $5 \cdot 10^9$ и $6 \cdot 10^9$ КОЕ/г соответственно.

В день 2, день 3 и день 5 уровни LF82 были следующие: в группе 3: $3 \cdot 10^9$; $5 \cdot 10^8$; $5 \cdot 10^7$ КОЕ/г; в группе 4: $5 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^5$; $5 \cdot 10^3$ КОЕ/г.

Уровень фагов в стуле.

В день 2, день 3 и день 5 уровни фагов были следующие:

в группе 2: $5 \cdot 10^5$ БОЕ/г; не обнаружено; не обнаружено;

в группе 4: $1 \cdot 10^9$; $1 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^6$ БОЕ/г.

В присутствии фагов уровень LF82 в стуле был значительно ниже, чем в их отсутствии. Вместе с тем, уровень фагов был значительно выше у мышей, колонизированных LF82, чем у мышей без LF82. И те, и другие данные подтвердили, что фаги могут инфицировать LF82 в кишке.

Уровень LF82 в органах.

В день 2 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 3: $2 \cdot 10^6$ копий pMT1/г;

в подвздошной кишке группы 4: $8 \cdot 10^4$ копий pMT1/г;

в ободочной кишке группы 3: $2 \cdot 10^7$ копий pMT1/г;

в ободочной кишке группы 4: $1 \cdot 10^5$ копий pMT1/г.

В день 5 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 3: $5 \cdot 10^4$ копий pMT1/г;

в подвздошной кишке группы 4: $8 \cdot 10^4$ копий pMT1/г;

в ободочной кишке группы 3: $6 \cdot 10^6$ копий pMT1/г;

в ободочной кишке группы 4: $2 \cdot 10^5$ копий pMT1/г.

Уровень фагов в органах.

В день 2 уровни фагов были следующие:

в подвздошной кишке группы 2: не обнаружено;

в подвздошной кишке группы 4: $8 \cdot 10^5$ БОЕ/г;

в ободочной кишке группы 2: $5 \cdot 10^4$ БОЕ/г;

в ободочной кишке группы 4: $5 \cdot 10^6$ БОЕ/г.

В день 5 уровни LF82 были следующие:

в подвздошной кишке группы 2: не обнаружено;

в подвздошной кишке группы 4: не обнаружено;

в ободочной кишке группы 2: не обнаружено;

в ободочной кишке группы 4: $2 \cdot 10^4$ БОЕ/г.

В день 2 уровень LF82 снизился как в подвздошной кишке, так и в ободочной кишке в группе мышей, которым вводили фаги. Это свидетельствует о том, что фаги инфицируют LF82 в срезах кишки, а не только в стуле. К тому же, уровень фагов в день 7 был значительно выше у мышей, колонизированных LF82, чем у мышей без LF82.

В день 5 уровень LF82 в подвздошной кишке был слишком низким, чтобы увидеть разницу между двумя группами, а в образцах ободочной кишки уровень LF82 еще снизился в группе мышей, которые получали фаги, по сравнению с группами мышей, которые не получали фаги. Вместе с тем, обнаружить фаги можно было только в ободочной кишке мышей, колонизированной LF82. Это свидетельствует о том, что эффект фагов в снижении LF82 может длиться несколько дней после первоначального введения.

Несмотря на высокий уровень колонизации LF82, наблюдаемый в этом эксперименте, признаков колита не наблюдалось ни в одной из групп.

Воплощения.

Настоящее изобретение относится, в частности, к следующим воплощениям.

1. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, содержащая:

(1) по меньшей мере один штамм бактериофага, способный вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага; и

(2) фармацевтически приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, содержащая комбинацию по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, где адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является штамм LF82, 07081, 07082, 07076 или 06075.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона, неспецифический язвенный колит или рецидив поражений подвздошной кишки после хирургической операции.

5. Композиция по п.4, где хирургическая операция представляет собой операцию по удалению по меньшей мере части тонкой кишки у пациентов с болезнью Крона.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

7. Способ лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, включающий введение по меньшей мере одного штамма бактериофага, способного вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага.

8. Способ по п.7, включающий введение комбинации по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

9. Способ по п.7 или 8, где адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является штамм LF82 или штамм, указанный в табл. 1.

10. Способ по пп.7-9, где воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

11. Способ по любому из пп.7-10, где указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

12. Способ по любому из пп.7-11, где введение осуществляют перорально.

13. Штамм бактериофага P1 (CNCM I-4694), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

14. Вариант штамма бактериофага P1 по п.13, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

15. Штамм бактериофага P2 (CNCM I-4695), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

16. Вариант штамма бактериофага P2 по п.15, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

17. Штамм бактериофага P3 (CNCM I-4696), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность,

как указанный штамм бактериофага.

18. Вариант штамма бактериофага P3 по п.17, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

19. Штамм бактериофага P4 (CNCM I-4697), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

20. Вариант штамма бактериофага P4 по п.19, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

21. Штамм бактериофага P5 (CNCM I-4698), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

22. Вариант штамма бактериофага P5 по п.21, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

23. Штамм бактериофага P6 (CNCM I-4699), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

24. Вариант штамма бактериофага P6 по п.23, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

25. Штамм бактериофага P8 (CNCM I-4700), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

26. Вариант штамма бактериофага P8 по п.25, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, содержащая:

(1) по меньшей мере один штамм бактериофага, способный вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага; и

(2) фармацевтически приемлемый носитель.

2. Композиция по п.1, содержащая комбинацию по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, где адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является штамм LF82, 07081, 07082, 07076 или 06075.

4. Композиция по любому из пп.1-3, где воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона, неспецифический язвенный колит или рецидив поражений подвздошной кишки после хирургической операции.

5. Композиция по п.4, где хирургическая операция представляет собой операцию по удалению по меньшей мере части тонкой кишки у пациентов с болезнью Крона.

6. Композиция по любому из пп.1-5, где указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

7. Способ лечения воспалительного заболевания кишечника, в одном или более отделах которого (тонком и/или толстом кишечнике) присутствует адгезивно-инвазивный штамм *Escherichia coli*, включающий введение по меньшей мере одного штамма бактериофага, способного вызывать литическую инфекцию указанного адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, который выбран из штаммов бактериофага P1 (CNCM I-4694), P2 (CNCM I-4695), P3 (CNCM I-4696), P4 (CNCM I-4697), P5 (CNCM I-4698), P6 (CNCM I-4699), P8 (CNCM I-4700) или CLB_P2 (CNCM I-4675) либо их вариантов, имеющих такую же литическую активность, как любой из указанных штаммов бактериофага.

8. Способ по п.7, включающий введение комбинации по меньшей мере из двух указанных штаммов бактериофага или их вариантов.

9. Способ по п.7 или 8, где адгезивно-инвазивным штаммом *Escherichia coli* является штамм LF82 или штамм, указанный в табл. 1.

10. Способ по пп.7-9, где воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона или неспецифический язвенный колит.

11. Способ по любому из пп.7-10, где указанный вариант имеет такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

12. Способ по любому из пп.7-11, где введение осуществляют перорально.

13. Штамм бактериофага P1 (CNCM I-4694), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

14. Вариант штамма бактериофага P1 по п.13, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

15. Штамм бактериофага P2 (CNCM I-4695), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

16. Вариант штамма бактериофага P2 по п.15, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

17. Штамм бактериофага P3 (CNCM I-4696), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

18. Вариант штамма бактериофага P3 по п.17, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

19. Штамм бактериофага P4 (CNCM I-4697), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

20. Вариант штамма бактериофага P4 по п.19, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

21. Штамм бактериофага P5 (CNCM I-4698), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

22. Вариант штамма бактериофага P5 по п.21, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

23. Штамм бактериофага P6 (CNCM I-4699), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

24. Вариант штамма бактериофага P6 по п.23, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

25. Штамм бактериофага P8 (CNCM I-4700), способный вызывать литическую инфекцию адгезивно-инвазивного штамма *Escherichia coli*, или его вариант, имеющий такую же литическую активность, как указанный штамм бактериофага.

26. Вариант штамма бактериофага P8 по п.25, имеющий такие же фенотипические характеристики, как указанный штамм бактериофага.

