

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036534**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.20

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

(21) Номер заявки
201690464

(22) Дата подачи заявки
2014.09.05

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ ЛАКТОБАЦИЛЛУС PARACASEI DG, В ЛЕЧЕНИИ И/ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИИ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ, ЧУВСТВИТЕЛЬНОГО К ЛЕЧЕНИЮ МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И/ИЛИ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

(31) **MI2013A001467**

(32) **2013.09.06**

(33) **IT**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/IB2014/064285**

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

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СОФАР С.П.А. (IT)

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

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

(56) MANUEL OLIVEIRA ET AL.: "Lactobacillus paracasei Reduces Intestinal Inflammation in Adoptive Transfer Mouse Model of Experimental Colitis", CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 23, no. 5, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1077-13, XP055086843, ISSN: 1740-2522, DOI: 10.1128/IAI.69.4.2277-2285.2001 page 10, column 2, paragraph 2 - page 11, column 2, paragraph 1

LOMBARDO L.: "New insights into Lactobacillus and functional intestinal disorders", MINERVA GASTROENTEROLOGICA E DIETOLOGICA, EDIZIONI MINERVA MEDICA, TORINO, IT, vol. 54, no. 3, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 287-293, XP009117218, ISSN: 1121-421X page 290, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 3

WO-A1-0054788

FRANCESCA VALERIO: "Effects of Probiotic Lactobacillus paracasei-enriched Artichokes on Constipated Patients", J CLIN GASTROENTEROL, 10 September 2010 (2010-09-10), pages 49-43, XP009174008, abstract

WO-A1-2015000972

WO-A1-2014137211

(57) Изобретение относится к применению композиции, содержащей бактерии, для лечения и/или предотвращения бутират- и/или сукцинатзависимого патологического состояния кишечника, в частности для лечения и/или предотвращения воспаления кишечника, диареи, язвенного колита или кишечных колопатий.

B1

036534

036534

B1

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 сукцинатзависимого 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 парaproбиотиков; 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 парaproбиотиков, 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 сукцинатзависимых 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 *Sorghosoccus* до и после лечения композицией по настоящему изобретению (А) и, наоборот, ее уменьшение до и после лечения плацебо (В);

на фиг. 1.2 показан результат статистического анализа, демонстрирующий уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* до и после лечения композицией по настоящему изобретению (А) и, наоборот, ее увеличение до и после лечения плацебо (В);

на фиг. 2.1 показано увеличение популяции бактерий рода *Sorghosoccus* (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 *Sorghosoccus* (темно-серый) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* (светло-серый) до и после лечения композицией по настоящему изобретению (А) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Sorghosoccus* (темно-серый) и процентное увеличение популяции бактерий рода *Blautia* (светло-серый) до и после лечения плацебо (В);

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.

Краткое описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG, в лечении и/или предотвращении патологического состояния, чувствительно-го к лечению масляной кислотой и/или ее солями и/или лечению янтарной кислотой.

В одном воплощении указанные патогенные микроорганизмы выбраны из энтерогеморрагической *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella* spp.

В еще одном воплощении указанный штамм *Lactobacillus paracasei* DG представляет собой живую или мертвую бактерию или бактериальный лизат или экстракт.

В одном воплощении указанная композиция содержит 15-30 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ), предпочтительно 20-25 миллиардов КОЕ бактериального штамма *Lactobacillus paracasei* DG.

В еще одном воплощении указанная композиция предназначена для перорального введения предпочтительно в форме пилюль, капсул, предпочтительно твердых капсул, таблеток, гранулярного порошка, водорастворимых гранул, саше или пеллет.

В еще одном воплощении указанная композиция изготовлена в жидкой форме, предпочтительно в форме сиропа или напитка, или добавлена в продукты питания, предпочтительно в йогурт, сыр или фруктовый сок, или изготовлена в форме, способной оказывать местное действие, предпочтительно в форме клизмы.

В еще одном воплощении 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.

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 поврежденных 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 сукцинатзависимого патологического состояния кишечника.

В контексте настоящего изобретения бутират- и/или сукцинатзависимое 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 *Sorgosoccus* 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 *Sorgosoccus* 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 *Sorgosoccus* и/или *Blautia* в кишечной микробиоте, предпочтительно для индукции увеличения бактериальной популяции рода *Sorgosoccus* и/или уменьшения бактериальной популяции рода *Blautia*. Иными словами, прием композиции по настоящему изобретению изменяет количество бактерий рода *Sorgosoccus* и/или *Blautia* в кишечной микробиоте. В частности, после приема указанной композиции увеличивается количество бактерий рода *Sorgosoccus* 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 ниже



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 10 мин 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 ч, в специальном контейнере, полученном на первом визите.

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

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 ч.

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°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 мин при 95°C ;
- 30 с при 94°C ;
- 30 с при 55°C и 90 с при 72°C в течение 35 циклов;
- 10 мин 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 33 индивида, но 11 из них вскоре прекратили прини-

мать 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 высоковариабельна 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 язвеногенным 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., Kiriya M., 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 фолие-

вой кислоты и метаболизма никотиновой кислоты (фиг. 3 и 4). Эти две молекулы являются важными витаминами для человека-хозяина (называемые витаминами В9 и В3 соответственно). В частности, витамин В9 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 В9) с последующим полезным питательным эффектом для человека-хозяина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей бактериальный штамм *Lactobacillus paracasei* DG, в лечении и/или предотвращении патологического состояния, чувствительного к лечению масляной кислотой и/или ее солями и/или лечению янтарной кислотой.

2. Применение по п.1, где указанные патогенные микроорганизмы выбраны из энтерогеморрагической *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella* spp.

3. Применение по любому из пп.1 и 2, где указанный штамм *Lactobacillus paracasei* DG представляет собой живую или мертвую бактерию или бактериальный лизат или экстракт.

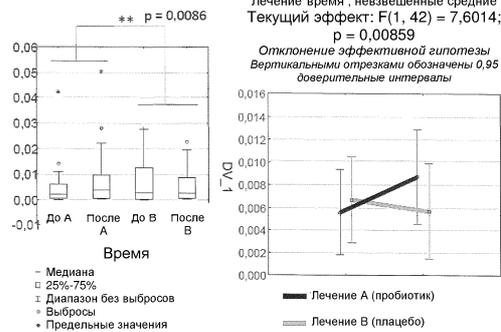
4. Применение по любому из пп.1 и 2, где указанная композиция содержит 15-30 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ), предпочтительно 20-25 миллиардов КОЕ бактериального штамма *Lactobacillus paracasei* DG.

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

6. Применение по любому из пп.1-4, где указанная композиция изготовлена в жидкой форме, предпочтительно в форме сиропа или напитка, или добавлена в продукты питания, предпочтительно в йогурт, сыр или фруктовый сок, или изготовлена в форме, способной оказывать местное действие предпочтительно в форме клизмы.

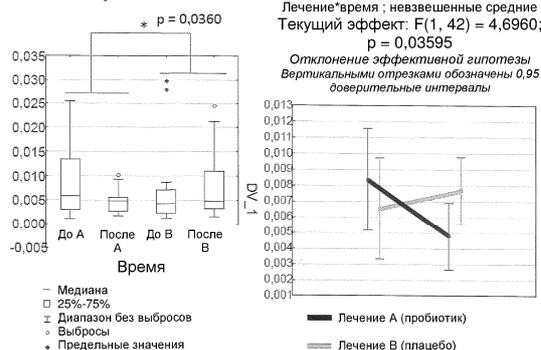
7. Применение по любому из пп.1-6, где указанная композиция дополнительно содержит пищевые волокна, обладающие пребиотической активностью, предпочтительно FOS (фруктоолигосахариды), инулин или гуаровую камедь или содержит другие вещества, такие как витамины, микроэлементы и/или ферменты.

Coprococcus ssp.

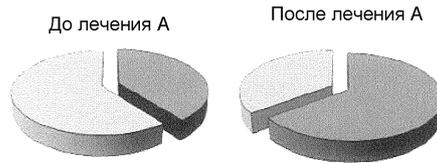


Фиг. 1.1

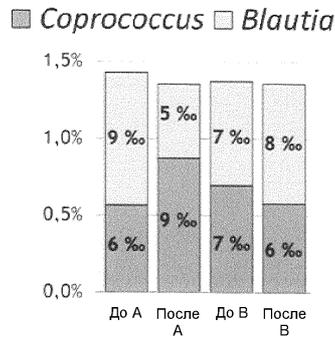
Blautia ssp.



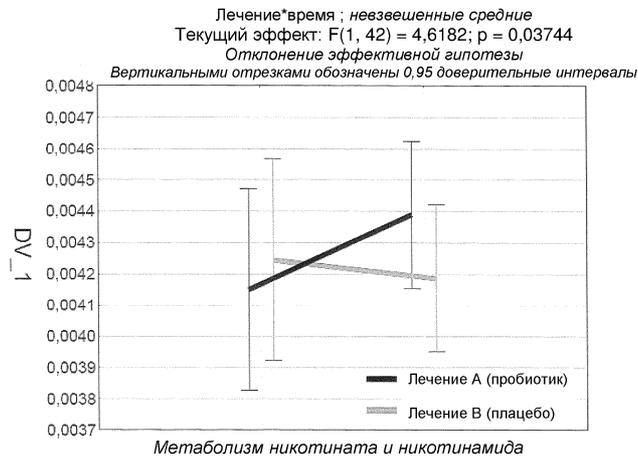
Фиг. 1.2



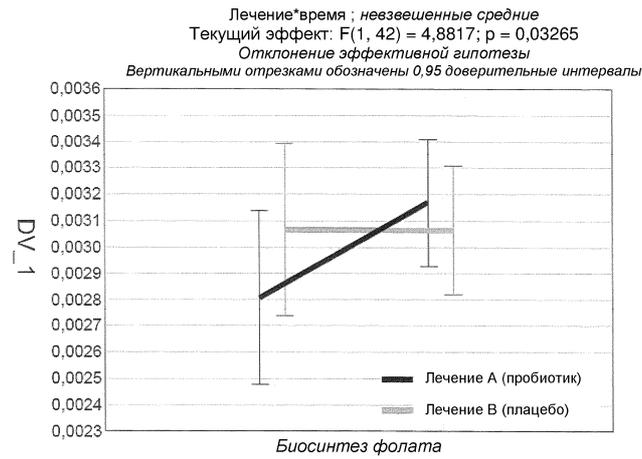
Фиг. 2.1



Фиг. 2.2



Фиг. 3



Фиг. 4

