# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- Дата публикации заявки (43)2020.04.07
- Дата подачи заявки (22)2014.09.05

- **(51)** Int. Cl. *C12Q 1/10* (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01) *C12Q 1/68* (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)
- (54) СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТОВ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ МИКРООРГАНИЗМЫ, НА КИШЕЧНУЮ МИКРОБИОТУ
- (31) MI2013A001473
- (32) 2013.09.06
- (33) IT
- (62)201690465; 2014.09.05
- (71) Заявитель: СОФАР С.П.А. (ІТ)

**(72)** Изобретатель:

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

(74)Представитель:

> Поликарпов А.В., Соколова М.В., Черкас Д.А., Путинцев А.И., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

Настоящее изобретение относится к способу определения пробиотической/парапробиотической активности композиции, содержащей микроорганизмы, в частности бактерии, основанному на оценке, посредством метагеномного анализа, качественных и/или количественных изменений в фекальной микробиоте после приема композиции. Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для осуществления указанного способа.





После лечения А





# СПОСОБ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТОВ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ МИКРООРГАНИЗМЫ, НА КИШЕЧНУЮ МИКРОБИОТУ

Настоящее изобретение относится к способу определения пробиотической/парапробиотической активности композиции, содержащей микроорганизмы, в частности бактерии, основанному на оценке качественных и/или количественных изменений в фекальной микробиоте после приема композиции. Более того, настоящее изобретение относится к набору для осуществления указанного способа.

Желудочно-кишечный тракт содержит множество популяций микроорганизмов, развивающихся и размножающихся в процессе развития каждого индивида и формирующих так называемую кишечную микробиоту или кишечную флору.

Таким образом, кишечная микробиота представляет собой очень сложную экосистему, и состояние равновесия между различными популяциями микроорганизмов, входящими в ее состав, или так называемый эубиоз, крайне важны 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 широкого спектра патологических состояний.

В целях лечения состояния кишечного дисбиоза или, в любом случае, в целях поддержания равновесия кишечной микробиоты, практика приема пробиотических/парапробиотических продуктов становится все более и более распространенной.

Согласно определению FAO/WHO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН / Всемирная организация здравоохранения), пробиотик представляет собой набор «живых микроорганизмов, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью хозяина».

В свете изложенного выше, преимущества, связанные с разработкой способа, позволяющего быстро и надежно оценивать эффекты экзогенной композиции,

содержащей микроорганизмы, на бактериальный состав кишечной микробиоты индивида, совершенно очевидны.

Фактически, на основании эффектов, оцениваемых таким способом, то есть на основании того, как прием композиции, содержащей микроорганизмы, количественно и/или качественно изменяет кишечную микробиоту, можно будет определить способность или неспособность указанной композиции поддерживать и/или обеспечивать благополучие и здоровье организма человека и, таким образом, ее соответствие или несоответствие одному из фундаментальных условий, позволяющих считать ее пробиотиком/парапробиотиком.

Настоящее изобретение соответствует указанным выше требованиям, обеспечивая способ определения, посредством молекулярного анализа, качественных и/или количественных изменений в составе фекальной микробиоты индивида после приема композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно бактерии, согласно рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу.

Фактически. впервые экспериментально заявитель продемонстрировал необходимость проведения перекрестных интервенционных исследований, особенно в здоровой популяции, для избегания невыявления возможных эффектов лечения, в частности лечения пробиотиками/парапробиотиками, или получения ложноположительных статистических результатов из-за существенных индивидуальных различий.

Способ по настоящему изобретению, помимо того, что он особенно полезен в целях определения эффектов композиции, содержащей микроорганизмы (то есть предполагаемого пробиотика/парапробиотика) на фекальную микробиоту, также полезна В целях подтверждения оздоравливающего эффекта известного пробиотика/парапробиотика на организм человека или в целях определения каких-либо новых специфических эффектов известного пробиотика/парапробиотика, например, ингибирования посредством изучения стимуляции и/или роста популяций микроорганизмов после приема композиции. Фактически, на основании основных видов активности, в которые вовлечены популяции микроорганизмов, рост которых подвержен стимуляции и/или ингибированию после приема композиции, можно будет определить ее возможные новые эффекты. Например, если после приема пробиотика согласно способу по настоящему изобретению обнаружено, что определенная бактериальная популяция выросла в количественном отношении и что эта бактериальная популяция имеет метаболизм, вовлеченный, главным образом, в образование, например, масляной кислоты, то может быть сделан вывод, что этот пробиотик можно принимать для увеличения количества масляной кислоты в кишечном тракте.

Другие преимущества способа по настоящему изобретению 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 показан результат статистического анализа, проведенного для оценки увеличения популяции бактерий рода *Coprococcus* (Фиг. 1.1) и уменьшения популяции бактерий рода *Blautia* (Фиг. 1.2) до и после лечения композицией по настоящему изобретению (А) и, в то же самое время, уменьшения популяции бактерий рода *Coprococcus* (Фиг. 1.1) и увеличения популяции бактерий рода *Blautia* (Фиг. 1.2) до и после лечения плацебо (В);
- на Фиг. 2.1 показано увеличение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения композицией по настоящему изобретению;
- на Фиг. 2.2 показано процентное увеличение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения композицией по настоящему изобретению (А) и процентное уменьшение популяции бактерий рода *Coprococcus* (темно серый) и процентное увеличение популяции бактерий рода *Blautia* (светло серый) до и после лечения плацебо (В);
- на Фиг. 3 показан результат статистического анализа, проведенного для определения усиления метаболизма никотиновой кислоты до и после лечения композицией по настоящему изобретению и его ослабления до и после лечения плацебо; и
- на Фиг. 4 показан результат статистического анализа, проведенного для определения увеличения биосинтеза фолиевой кислоты до и после лечения композицией по настоящему изобретению и отсутствия каких-либо изменений, в отличие от этого, до и после лечения плацебо.

Первый аспект настоящего изобретения относится к способу определения изменений в составе фекальной микробиоты индивида после приема композиции, содержащей микроорганизмы, и плацебо согласно рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу, включающему стадии:

- а) сбора информации о состоянии здоровья и/или особенностей питания указанного индивида до и/или во время, и/или после приема композиции или плацебо согласно рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу;
- б) получения по меньшей мере одного образца кала от индивида до и/или во время, и/или после приема композиции или плацебо согласно рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу;
- в) анализа микробиоты посредством метагеномного анализа, проводимого с использованием образца кала, полученного на стадии (б);
- г) сравнения, предпочтительно качественного и/или количественного, фекальной микробиоты индивида до и/или во время, и/или после приема композиции или плацебо согласно рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу.

В контексте настоящего изобретения термин «фекальная микробиота» означает совокупность популяций микроорганизмов, присутствующих в кале индивида и отражающих совокупность популяций микроорганизмов, присутствующих в кишечнике этого индивида. Таким образом, подразумевают, что термин «фекальная микробиота» является синонимом кишечной микробиоты.

В частности, микроорганизмы, включенные в композицию по настоящему изобретению, представляют собой бактерии, и/или дрожжи, и/или другие микроорганизмы, взятые по отдельности или в комбинации.

Композиция, содержащая бактерии, особенно предпочтительна для задач настоящего изобретения. В частности, бактерии принадлежат к роду, выбранному из: Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Propionibacterium, Streptococcus, Lactococcus, Aerococcus и Enterococcus. Более предпочтительно, указанная бактерия представляет собой бактерию рода Lactobacillus и/или Bifidobacterium.

В частности, Lactobacillus выбрана из: Lactobacillus paracasei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus amylolyticus, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus alimentarius, Lactobacillus aviaries, Lactobacillus brevis, Lactobacillus buchneri,

Lactobacillus casei, Lactobacillus cellobiosus, Lactobacillus coryniformis, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus curvatus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus farciminis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus mucosae, Lactobacillus panis, Lactobacillus collinoides, Lactobacillus paraplantarum, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pontis, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus sakei, Lactobacillus salivarius y Lactobacillus sanfranciscensis.

Особенно предпочтительными для задач настоящего изобретения являются бактерии, принадлежащие к виду *Lactobacillus paracasei*, более предпочтительно штамму *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. Исходно штамм был обозначен как *Lactobacillus casei* DG *sub.casei*.

В частности, бактерии рода Bifidobacterium выбраны из: Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium breve и Bifidobacterium longum.

Дрожжи предпочтительно представляют собой дрожжи рода Saccharomyces, более предпочтительно вида Saccharomyces cerevisiae.

В целом, микроорганизмы, включенные в композицию по настоящему изобретению, представляют собой отдельные микроорганизмы или комбинации любых видов микробов, указанных в перечне QPS (квалифицированная презумпция безопасности) EFSA (Европейское агентство по безопасности продуктов питания) (http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/3020.pdf).

Микроорганизмы композиции по настоящему изобретению предпочтительно являются живыми, и, таким образом, композиция может также быть определена как пробиотик. Альтернативно, микроорганизмы композиции являются мертвыми и/или представлены в форме лизата или экстракта, и поэтому композиция может также быть определена как парапробиотик. Таким образом, композиция по настоящему изобретению является также известным или предполагаемым пробиотиком или парапробиотиком.

В одном воплощении изобретения композиция содержит приблизительно 1-50 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов, предпочтительно 15-30, более предпочтительно 20-25 миллиардов КОЕ микроорганизмов.

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

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

Что касается приема композиции, то, как объяснено ранее, ее принимают, следуя рандомизированному, двойному слепому, плацебо-контролируемому перекрестному протоколу. Иными словами, во время приема ни исследователь, ни индивиды, включенные в исследование, не знают о том, какое лечение назначено (препараты неразличимы, двойной слепой протокол), и один и тот же индивид в разное время получает лечение как композицией, содержащей микроорганизмы, так и плацебо (перекрестный протокол), в случайной последовательности.

В одном воплощении изобретения указанный протокол включает следующие фазы: (1) предварительную фазу, в которой индивиды предпочтительно не принимают композицию, содержащую микроорганизмы, или плацебо; и/или (2) первую фазу лечения, в которой индивиды предпочтительно принимают композицию, содержащую микроорганизмы, или плацебо; и/или (3) фазу выведения, в которой индивиды предпочтительно не принимают композицию, содержащую микроорганизмы, или

плацебо; и/или (4) вторую фазу лечения, в которой индивиды предпочтительно принимают плацебо или композицию, содержащую микроорганизмы.

В фазе 2 и фазе 4 прием происходит случайным двойным слепым образом, как указано выше. Понятно, что индивид, принимающий плацебо в первой фазе, будет принимать композицию, содержащую микроорганизмы, во второй фазе, и наоборот.

Продолжительность разных фаз протокола предпочтительно одинакова. В частности, продолжительность по меньшей мере одной из этих фаз, предпочтительно всех фаз, составляет приблизительно четыре недели.

В контексте настоящего изобретения термин «выведение» означает период между двумя фазами приема композиции, содержащей микроорганизмы, или плацебо, в котором индивид не принимает ничего и, таким образом, в течение которого принятый ранее препарат должен быть «выведен», то есть период без лечения, направленный на устранение любых остаточных эффектов.

В одном воплощении изобретения композицию по настоящему изобретению принимают предпочтительно один раз в сутки, более предпочтительно сразу после пробуждения.

Альтернативно, также возможен вечерний прием, предпочтительно по меньшей мере через 3 часа после еды.

Стадию сбора информации о состоянии здоровья и/или питании индивида предпочтительно проводят, получая указанную информацию в анкете. Указанную анкету составляют специально для сбора данных о состоянии здоровья и/или особенностях питания индивида, у которого применяют способ по изобретению.

В частности, указанная анкета представляет собой стандартный лист, на котором сформулированы вопросы о состоянии здоровья и/или питании указанного индивида. Что касается состояния здоровья, индивид может отвечать, используя шкалы оценки, связанные с каждым вопросом. Шкала оценки предпочтительно представляет собой вербально-числовую шкалу (VNS), или визуально-аналоговую шкалу (VAS), или вербальную шкалу оценки (VRS). Что касается особенностей питания, индивиды могут отвечать, указывая продукты, которые они употребляют ежедневно, также указывая, по возможности, употребляемое количество.

Стадию сбора информации предпочтительно проводят в начале предварительной фазы и/или до и/или после первой фазы лечения и/или до, и/или после окончания второго лечения.

По меньшей мере один образец кала предпочтительно получают в начале и/или в конце первого лечения и/или в начале и/или в конце второго лечения.

Образец кала предпочтительно получают не ранее 48 часов до, предпочтительно не ранее 24 часов до его обработки или хранят при температуре, предпочтительно составляющей от +4°C до -20°C, более предпочтительно при -20°C, на протяжении периода, предпочтительно не превышающего 7-10 суток. До обработки или хранения при низкой температуре образец кала предпочтительно хранят при комнатной температуре.

Стадию анализа микробиоты посредством метагеномного анализа образца кала проводят с использованием нуклеиновых кислот, предпочтительно ДНК, выделенной из фекальной микробиоты.

В частности, анализ микробиоты посредством метагеномного анализа включает по меньшей мере одну и предпочтительно все из следующих стадий:

- выделение нуклеиновых кислот, предпочтительно ДНК, из образца кала; и
- молекулярное типирование фекальной микробиоты.

Выделение нуклеиновых кислот в целом и ДНК в частности из образца кала проводят с применением методик, известных каждому специалисту в данной области для этой задачи.

В одном воплощении изобретения типирование популяций микроорганизмов проводят, анализируя нуклеотидную последовательность по меньшей мере одной части гена, кодирующего субъединицу рибосомы, предпочтительно 16S субъединицу рибосомы, то есть гена, кодирующего молекулу 16S рРНК.

С этой целью ДНК, выделенную из образцов кала, амплифицируют с применением методик, известных в данной области, например, посредством ПЦР (полимеразная цепная реакция). Предпочтительно, амплификацию проводят с использованием пары олигонуклеотидов (праймеров); предпочтительно с использованием SEQ ID NO:1 (Probio\_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') и SEQ ID NO:2 (Probio\_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3') (Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turroni F, et al. (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. PLoS ONE 8(7): e68739).

Условия проведения ПЦР могут варьировать в зависимости от качества и количества нуклеиновой кислоты, которую желательно амплифицировать, и/или

используемых праймеров. В любом случае, определение условий ПЦР является рутинной процедурой для каждого специалиста в данной области.

Предпочтительно, части амплифицированной нуклеиновой кислоты затем секвенируют.

С этой целью специалист в данной области может применить любой известный метод. Предпочтительно, применяемые методы выбраны из секвенирования, основанного на методе Сэнгера, методов пиросеквенирования и метода секвенирования Ion Torrent.

В случае Ion Torrent предпочтительно использование праймеров, предпочтительно имеющих адаптерные последовательности на 5'-конце. В особенно предпочтительном воплощении настоящего изобретения адаптерные последовательности представляют собой SEQ ID NO:1 и 2.

После получения последовательностей и, таким образом, после типирования популяций микроорганизмов фекальной микробиоты определяют характеристики сообщества микроорганизмов, предпочтительно с применением программ иерархической кластеризации или таксономического анализа и/или построением филогенетических дендрограмм, предпочтительно с тепловыми картами. С этой целью для задач настоящего изобретения особенно предпочтительно программное обеспечение QIIME.

В завершение, данные, полученные в анализах по определению характеристик, предпочтительно анализируют статистическими методами параметрического и/или непараметрического типа.

Другой аспект настоящего изобретения относится к набору для осуществления способа по настоящему изобретению, включающему:

- идентификационный код набора;
- по меньшей мере одну пероральную форму композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно принадлежащие к виду *Lactobacillus paracasei*, более предпочтительно штамму *Lactobacillus paracasei* DG, в количестве от 1 до 50 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов, предпочтительно 15-30, более предпочтительно 20-25 миллиардов КОЕ микроорганизмов;
- по меньшей мере одну пероральную форму плацебо, не содержащую микроорганизмы;

где указанную композицию микроорганизмов принимают согласно рандомизированному, двойному слепому перекрестному протоколу с контролем указанным плацебо, и где указанную композицию, содержащую микроорганизмы, и указанное плацебо идентифицируют по коду.

Плацебо предпочтительно идентично по ощущениям и внешнему виду, то есть по форме, указанной пероральной форме композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно принадлежащие к виду *Lactobacillus paracasei*, более предпочтительно штамму *Lactobacillus paracasei* DG, но отличается от нее по составу. Пероральная форма плацебо не содержит микроорганизмы.

В одном предпочтительном воплощении изобретения набор содержит по меньшей мере 28 капсул, или таблеток, или пилюль, или буккальных таблеток, или твердых капсул, или саше, содержащих пероральную форму композиции, содержащей микроорганизмы, и предпочтительно равное число таблеток, или пилюль, или буккальных таблеток, или твердых капсул, или саше, содержащих пероральную форму плацебо.

Согласно предпочтительному воплощению изобретения указанная по меньшей мере одна пероральная форма представляет собой по меньшей мере одну капсулу, по меньшей мере одну таблетку, по меньшей мере одну пилюлю, по меньшей мере одну буккальную таблетку, по меньшей мере одну твердую капсулу, по меньшей мере одно саше или по меньшей мере одну пеллету.

Указанные пероральные формы идентифицируют по коду, например, цветовому коду, числовому коду, буквенному коду или буквенно-числовому коду. Для задач способа указанный код позволит понять, когда была принята композиция, содержащая микроорганизмы, а когда было принято плацебо, как описано ранее.

Пероральные формы идентичны по ощущениям и внешнему виду, то есть по форме, но различны по составу, поскольку одна из них содержит композицию, содержащую микроорганизмы, а другая содержит плацебо. Более того, каждую из двух форм идентифицируют по коду.

Таким образом, композиция, содержащая микроорганизмы, и плацебо, включенные в набор, неразличимы для любого индивида. Более того, композиция, содержащая микроорганизмы, и плацебо, включенные в набор, имеют однозначный идентификационный код, например, цветовой код, числовой код, буквенный код или буквенно-числовой код.

Соответствие этого кода природе вещества, то есть композиции, содержащей микроорганизмы, или плацебо, известно только изготовителю набора.

Согласно другому воплощению настоящего изобретения набор дополнительно содержит анкеты, составленные специально для сбора данных о состоянии здоровья индивида, который применяет способ по изобретению.

В частности, анкеты представляют собой стандартные листы, на которых сформулированы вопросы о состоянии здоровья и/или особенностях питания указанного индивида. Что касается состояния здоровья, индивид может отвечать, используя шкалы оценки, связанные с каждым вопросом. Шкала оценки предпочтительно представляет собой вербально-числовую шкалу (VNS), или визуально-аналоговую шкалу (VAS), или вербальную шкалу оценки (VRS). Что касается питания, индивиды могут отвечать, указывая продукты, которые они употребляют ежедневно, также указывая, по возможности, употребляемое количество.

Другой аспект настоящего изобретения относится к применению указанного набора в диагностических и/или терапевтических целях.

#### ПРИМЕРЫ

### <u>Лечение</u>

Было проведено рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое, перекрестное исследование с диетологическим вмешательством у здоровых индивидов.

Добровольцев отбирали по следующим критериям:

- критерии включения: здоровые мужчины и женщины в возрасте от 18 до
   55 лет, подписавшие форму информированного согласия;
- критерии исключения: лечение антибиотиками в течение месяца до осмотра; эпизоды вирусного или бактериального энтерита в течение 2 месяцев до первого осмотра; язвы желудка или двенадцатиперстной кишки в течение 5 лет до первого осмотра; беременность или кормление грудью; недавние или предполагаемые случаи алкоголизма и приема наркотиков; другие состояния, не соответствующие протоколу исследования.

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

Таблица І



На предварительной стадии (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 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, запах и цвет активного вещества (то есть пробиотика) и плацебо были одинаковыми.

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

После первых четырех недель лечения добровольцы проходили четырех недельный 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 проходили ни лечения Enterolactis Plus, ни лечения плацебо;
  - лечение 1: индивиды проходили лечение Enterolactis Plus или лечение плацебо;

- фаза выведения: индивиды не проходили ни лечения Enterolactis Plus, ни лечения плацебо;
- лечение 2: индивиды проходили лечение плацебо или лечение Enterolactis Plus, соответственно.

### 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 Т0), собранным за предыдущие 24 часа, в специальном контейнере, полученном на первом визите.

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

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

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

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

Затем добровольцев инструктировали по следующим 4-м 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 Т2) и получали пробиотический продукт (или плацебо) для приема на протяжении последующих 4 недель.

В завершение, после 4-х недель приема продукта (или плацебо) добровольцы приходили на пятый визит, принося последний образец кала (образец Т3).

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

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

### Анализ фекальной микробиоты

Фекальную микробиоту оценивали, анализируя нуклеотидную последовательность частей гена, кодирующего рРНК бактериальной рибосомальной субъединицы 16S. 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;
  - 3) количественное определение продуктов ПЦР;
  - 4) секвенирование амплифицированных продуктов;
  - 5) биоинформатический анализ последовательностей.

Процедуры на стадиях 1 и 3 представляют собой методики, хорошо известные в данной области, 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 pPHK.

Стадия 4 может быть проведена с помощью методик, известных в данной области для этой задачи, например, методик, основанных на методе Сэнгера, пиросеквенирования или метода секвенирования Ion Torrent Fusion Primers, примененным в конкретном примере настоящего изобретения согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы» научной статьи Milani *et al.* (2013).

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

последовательностей, используемых в данной конкретной методике секвенирования ДНК. В данном случае адаптерные последовательности представляли собой SEQ ID NO:1 и 2.

Условия проведения ПЦР были следующими:

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

По окончании ПЦР целостность амплификата проверяли с помощью электрофореза.

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

### Статистический анализ данных

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

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

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

### Результаты лечения

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

Изначально в исследование были включены тридцать три индивида, но 11 из них вскоре прекратили принимать участие в исследовании по различным причинам: прием антибиотиков (4), отказ продолжать принимать участие в исследовании (1), частые эпизоды диареи (1), прием других пробиотиков во время исследования (3),

кардинальное изменение особенностей питания (1) и сезонный грипп с эпизодами диареи (1).

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

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

Фактически, было обнаружено следующее:

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

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

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

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

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

На уровне кишечника копрококки являются одними из основных продуцентов бутирата.

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

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

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

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

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

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

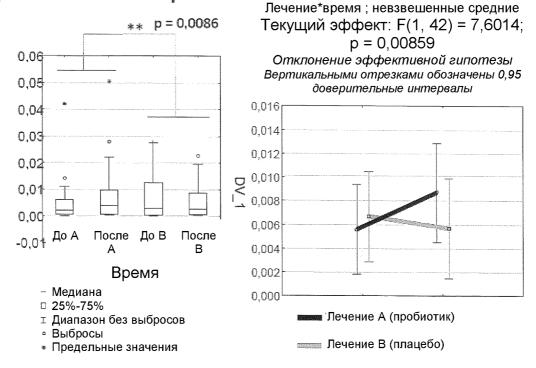
В конечном счете, данные по составу фекальной микробиоты были использованы в биоинформатическом анализе, направленном на виртуальную реконструкцию метагенома на основе известных бактериальных геномов (Okuda S, Tsuchiya Y, Kiriyama C, Itoh M, Morisaki H. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. Nat Commun. 2012;3:1203); иными словами, было установлено in silico какие потенциальные гены присутствуют в рассматриваемой микробиоте и в каком количестве. Этот анализ позволил подтвердить предполагаемое увеличение количества кодирующих генов синтеза фолиевой кислоты и метаболизма никотиновой кислоты (Фиг. 3 и 4). Эти две молекулы являются важными витаминами для человекахозяина (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.** Набор для определения изменений в составе фекальной микробиоты индивида после приема композиции, содержащей микроорганизмы, включающий:
  - идентификационный код набора;
- по меньшей мере одну пероральную форму композиции, содержащей микроорганизмы, предпочтительно вида Lactobacillus paracasei, более предпочтительно штамма Lactobacillus paracasei DG, в количестве от 1 до 50 миллиардов колониеобразующих единиц (КОЕ) микроорганизмов, предпочтительно 15-30, более предпочтительно от 20 до 25 миллиардов КОЕ микроорганизмов;
- по меньшей мере одну пероральную форму плацебо, не содержащую микроорганизмы;

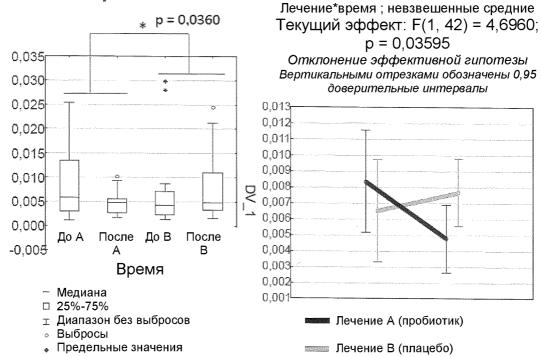
где указанную композицию микроорганизмов принимают согласно рандомизированному, двойному слепому перекрестному протоколу с контролем в отношении указанного плацебо, и где указанную композицию, содержащую указанные микроорганизмы, и плацебо идентифицируют по коду.

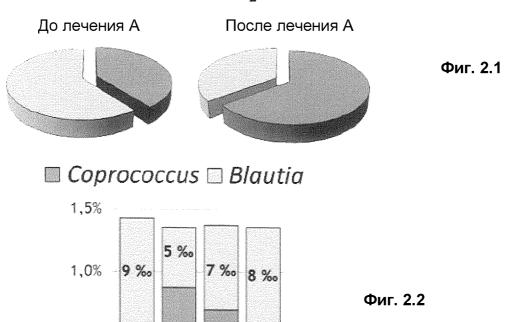
# Coprococcus ssp.



Фиг. 1.2

# Blautia ssp.





Фиг. 3

0.5%

0,0%

9 ‰

7 %

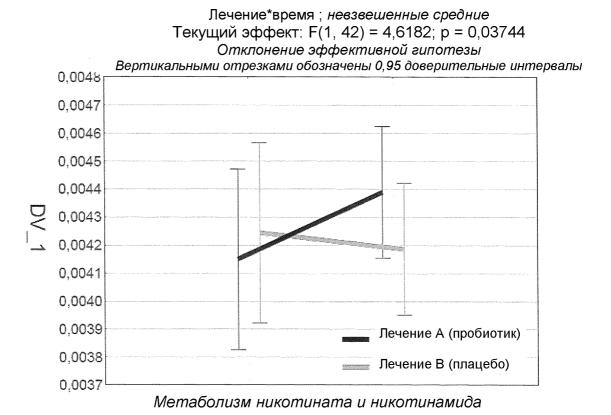
После До В

6 %

После В

6 ‰

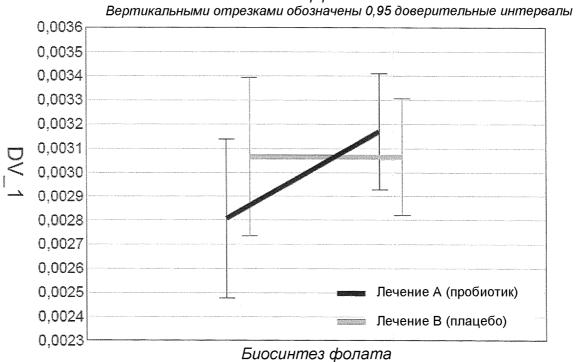
До А



Фиг. 4

Лечение\*время ; невзвешенные средние Текущий эффект: F(1, 42) = 4,8817; p = 0,03265

Отклонение эффективной гипотезы



# **PATENT COOPERATION TREATY**

# **PCT**

# **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

| Applicant's or agent's file reference  | FOR FURTHER see Form PCT/ISA/220   |   |
|--|--|---|
| 71S066212WO1   | ACTION   | as well as, where applicable, item 5 below.   |
| International application No.  | International filing date (day/month/ye  | ear) (Earliest) Priority Date (day/month/year)  |
| PCT/IB2014/064284  | 5 September 2014 (05-09-2014)  | 6 September 2013 (06-09-2013)   |
| Applicant  |  | •   |
| SOFAR S.P.A.   |  |   |
| This international search report has been paccording to Article 18. A copy is being tra  |  | g Authority and is transmitted to the applicant   |
| This international search report consists of   | f a total of6 sheets.  |   |
| X It is also accompanied by  | a copy of each prior art document cited  | in this report.   |
| x the international a a translation of the of a translation fur b. This international search r authorized by or notified to c. X With regard to any nucleo  2. Certain claims were four 3. Unity of invention is lack 4. With regard to the title, X the text is approved as sul | othis Authority under Rule 91 (Rule 43<br>otide and/or amino acid sequence dis<br>ond unsearchable (See Box No. II)<br>sing (see Box No III) | as filed, which is the language I search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)) account the rectification of an obvious mistake 6 bis(a)). closed in the international application, see Box No. I. |
|  | ned, according to Rule 38.2, by this Au  | hority as it appears in Box No. IV. The applicant<br>al search report, submit comments to this Authority  |
| 6. With regard to the <b>drawings</b> ,  |  |   |
| a. the figure of the <b>drawings</b> to be pu  | -  | 2.1   |
| X as suggested by the  | he applicant<br>s Authority, because the applicant faile   | t to suggest a figure   |
|  | s Authority, because the applicant faller<br>s Authority, because this figure better c   |   |
|  | published with the abstract  |   |

International application No.

PCT/IB2014/064284

| Box | No. I         | Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)  |
|-----|---------------|---|
| 1.  | With<br>inver | regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed<br>ntion, the international search was carried out on the basis of:   |
|     | a.            | (means)  on paper  X in electronic form   |
|     | b.            | (time)  X in the international application as filed together with the international application in electronic form subsequently to this Authority for the purpose of search   |
| 2.  |               | In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. |
| 3.  | Addit         | tional comments:  |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |
|     |               |   |

International application No PCT/IB2014/064284

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/10 A23L1/30

A61K35/74

C12Q1/68

C12R1/225

Relevant to claim No.

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

#### **B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q A23L A61K C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages

KORKEAMAEKI MIKA [FI]; VAAHTOVUO JUSSI

page 2, line 35 - page 10, line 36; claims

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| X | WO 2004/022727 A1 (VRI BIOMEDICAL LTD [AU]; CONWAY PARICIA LYNNE [AU]) 18 March 2004 (2004-03-18) the whole document   | 1-16 |
|---|--|------|
|   | page 2, line 25 - page 6; figures 10-16 pages 11,20 pages 23-39; examples 5,6,10 page 19, line 23 - page 22; example 4 see page 20, line 30 to page 21, line 8 pages 16,19 |      |
| Υ | WO 2007/071815 A1_(CYFLO OY [FI];  | 1-16 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

[FI]; MUNUKKA EV)

the whole document

28 June 2007 (2007-06-28)

Х See patent family annex.

-/--

Special categories of cited documents

1-21

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
- document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of mailing of the international search report

Date of the actual completion of the international search

Fax: (+31-70) 340-3016

14 January 2015

26/01/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040,

Authorized officer

Boiangiu, Clara

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

1

International application No
PCT/IB2014/064284

| C(Continua | tion). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  | PC1/1B2014/004204     |
|------------|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y          | US 2004/170617 A1 (FINEGOLD SYDNEY M [US]) 2 September 2004 (2004-09-02) the whole document paragraph [0007]; claims 1-17 paragraphs [0005] - [0012], [0050] - [0058]                   | 1-16                  |
| Y          | CN 1 840 206 A (UNIV SHANGHAI JIAOTONG<br>[CN]) 4 October 2006 (2006-10-04)<br>claims 1-10<br>the whole document  | 1-16                  |
| Y          | WO 2005/001109 A2 (NAT INST HEALTH [US]; NYAN DOUGBEH C [US]; COLEMAN WILLIAM G JR [US];) 6 January 2005 (2005-01-06) the whole document pages 3-5; claims 19-35 pages 7,8,11 - page 16 | 1-16                  |
| Y          | US 2010/112564 A1 (ZHAO LIPING [CN] ET AL) 6 May 2010 (2010-05-06) the whole document paragraphs [0008] - [0012], [0020] - [0026]; claims 1-11  | 1-16                  |
| Υ          | WO 2005/083122 A2 (STICHTING STREEKLABORATORIUM V [NL]; VAN ZWET ARIE ANTON [NL] ID VOOR) 9 September 2005 (2005-09-09) claims 5-10   | 1-16                  |
| Y          | US 2009/061446 A1 (NIIMI HIDEKI [JP] ET AL) 5 March 2009 (2009-03-05) sequence 21 the whole document paragraphs [0013], [0014], [0021] - [0032], [0043] - [0117] - [0119]; claims 1-9   | 16                    |
| Y          | WO 2006/050479 A2 (UNIV GEORGE MASON [US]; GILLEVET PATRICK [US]) 11 May 2006 (2006-05-11) the whole document claims 1-24   | 1-16                  |
|            |   |                       |

1

International application No
PCT/IB2014/064284

| C/Continue | tion). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  | , ,                   |
|------------|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| Y          | PLANT ET AL: "Association of lactobacillus spp. with Peyer's Patches in Mice", CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 8, no. 2, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 320-324, XP002990497, ISSN: 1071-412X, DOI: 10.1128/CDLI.8.2.320-324.2001 the whole document abstract; figures 1-4; tables 1,2                                       | 1-16                  |
| Y          | F. SAVINO ET AL: "Lactobacillus reuteri DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", PEDIATRICS, vol. 126, no. 3, 16 August 2010 (2010-08-16), pages e526-e533, XP055119050, ISSN: 0031-4005, DOI: 10.1542/peds.2010-0433 the whole document abstract   | 1-16                  |
| A          | "Example Cross-Over Study Design (A Phase II, Randomized, Double-Blind Crossover Study of Hypertena and Placebo in Participants with High Blood Pressure) Methods Study Design",  October 2012 (2012-10), XP055119522, Retrieved from the Internet: URL:http://prsinfo.clinicaltrials.gov/trainTrainer/Crossover-Design-Fiction-Manuscript.pdf [retrieved on 2014-05-22] the whole document | 1-16                  |

1

Information on patent family members

International application No PCT/IB2014/064284

| Patent document cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)  | Publication date   |
|--|---------------------|---|--|
| WO 2004022727 A1                       | 18-03-2004          | AT 426014 T BR 0314060 A CA 2497989 A1 CN 1701116 A DK 1539927 T3 EP 1539927 A1 ES 2324532 T3 JP 4455333 B2 JP 2005537791 A KR 20050057259 A NZ 538640 A US 2006067921 A1 US 2010074878 A1 WO 2004022727 A1 | 15-04-2009<br>19-07-2005<br>18-03-2004<br>23-11-2005<br>13-07-2009<br>15-06-2005<br>10-08-2009<br>21-04-2010<br>15-12-2005<br>16-06-2005<br>31-05-2007<br>30-03-2006<br>25-03-2010<br>18-03-2004 |
| WO 2007071815 A1                       | 28-06-2007          | EP 1963520 A1<br>FI 20051319 A<br>US 2009053756 A1<br>WO 2007071815 A1  | 03-09-2008<br>23-06-2007<br>26-02-2009<br>28-06-2007   |
| US 2004170617 A1                       | 02-09-2004          | NONE  |  |
| CN 1840206 A                           | 04-10-2006          | NONE  |  |
| WO 2005001109 A2                       | 06-01-2005          | NONE  |  |
| US 2010112564 A1                       | 06-05-2010          | CN 101240315 A<br>US 2010112564 A1  | 13-08-2008<br>06-05-2010   |
| WO 2005083122 A2                       | 09-09-2005          | AU 2005217124 A1<br>CA 2557543 A1<br>EP 1730302 A2<br>US 2007065851 A1<br>WO 2005083122 A2  | 09-09-2005<br>09-09-2005<br>13-12-2006<br>22-03-2007<br>09-09-2005   |
| US 2009061446 A1                       | 05-03-2009          | EP 1997886 A1<br>ES 2426038 T3<br>JP 4590573 B2<br>US 2009061446 A1<br>WO 2007097323 A1   | 03-12-2008<br>18-10-2013<br>01-12-2010<br>05-03-2009<br>30-08-2007   |
| WO 2006050479 A2                       | 11-05-2006          | CA 2587670 A1 EP 1815016 A2 EP 2280085 A2 ES 2391744 T3 US 2009197249 A1 US 2014179537 A1 WO 2006050479 A2  | 11-05-2006<br>08-08-2007<br>02-02-2011<br>29-11-2012<br>06-08-2009<br>26-06-2014<br>11-05-2006   |