

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034531**(13) **B9**

**(12) ИСПРАВЛЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К
ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(15) Информация об исправлении
Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.1

(48) Дата публикации исправления
2020.03.19, Бюллетень №3'2020

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.18

(21) Номер заявки
201690196

(22) Дата подачи заявки
2014.08.07

(51) Int. Cl. **A61K 35/74** (2015.01)
A23L 1/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БАКТЕРИИ PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS,
ИНДУЦИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ IL-10 THP-1 МАКРОФАГАМИ**

(31) 13382324.5

(32) 2013.08.09

(33) EP

(43) 2016.12.30

(86) PCT/EP2014/066970

(87) WO 2015/018883 2015.02.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АБ-БИОТИКС, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:
Кунье Кастельяна Хорди, Ласаро
Мальен Элизабет, Эспадалер Масо
Хорди (ES)

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

(56) KRUSZEWSKA: "Selection of lactic acid bacteria as probiotic strains", MIKROOEKOLOGIE UND THERAPIE, INSTITUTE FUER MIKROOEKOLOGIE, HERBORN, DE, vol. 29, 2002, pages 37-49, XP009122342, ISSN: 0720-0536, abstract, page 42, column 2, line 10 - line 19

BEATRICE VITALI ET AL.: "Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables", FOOD MICROBIOLOGY, vol. 31, no. 1, August 2012 (2012-08), pages 116-125, XP055095689, ISSN: 0740-0020, DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.027, abstract, page 121, column 2, line 8 - page 122, column 1, line 9

WO-A1-2005077391

US-A1-2012315249

JONGANURAKKUN B. ET AL.: "Pediococcus pentosaceus NB-17 for probiotic use", JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 106, no. 1, July 2008 (2008-07), pages 69-73, XP023612883, ISSN: 1389-1723, DOI: 10.1263/JBB.106.69 [retrieved on 2008-07-01], abstract

WO-A1-2007142596

(57) В изобретении предложена бактериальная композиция для снижения воспаления в кишечном тракте, содержащая от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток *Pediococcus pentosaceus*, обладающих способностью индуцировать образование интерлейкина-10 THP-1 макрофагами. В изобретении также предложено применение указанной бактериальной композиции в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

B9

034531

034531

B9

Настоящее изобретение относится к областям медицины, микробиологии и питания и, конкретно, к новой пробиотической композиции на основе клеток *Pediococcus pentosaceus*. Благодаря своим биологическим функциям композиция является особенно полезной в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

Предшествующий уровень техники

Чрезмерный плач является одной из наиболее частых причин посещения педиатров в первые двенадцать месяцев жизни младенца. Степень его частоты может достигать значений вплоть до 40%. Младенцы, чей плач продолжается более трех месяцев, подвержены риску неблагоприятных последствий в школьные годы, включая тревогу, агрессию, гиперактивность, аллергию, расстройства сна и еще большему риску плохого психического здоровья в последующие годы. Чрезмерный плач представляет собой серьезную проблему не только для младенцев, но также для родителей и, в общем, для качества жизни семьи. Чрезмерный плач приводит к крайней усталости родителей и имеет много опасных последствий, включая трудности с концентрацией внимания, потерю терпения, фрустрацию, чувство некомпетентности, страх навредить ребенку, раннее прекращение грудного вскармливания и сокращение личного общения со своим ребенком. Кроме того, в некоторых случаях фрустрация может приводить к некоторым видам опасных действий для остановки плача, таким как шлепание или трясение ребенка.

Несмотря на то что плач младенцев обычно ассоциируют с явно болезненными состояниями, чрезмерный приступообразный плач может проявляться без понятной причины у очевидно здоровых и сытых младенцев как результат различных состояний неизвестной этиологии (например, колики у младенцев). Нет единства мнений относительно происхождения таких состояний и того, как их следует определять. Однако было предположено, что они вполне могут быть вызваны нарушениями желудочно-кишечного тракта, такими как недоразвитие пищеварительного тракта, синдром раздраженной толстой кишки, пищевая гиперчувствительность, измененная микробиота пищеварительного тракта и газообразование.

Традиционно для ослабления плача и беспокойства, особенно у "младенцев с коликами", используют терапии различными лекарственными средствами. Одним из наиболее распространенных используемых лекарственных средств является симетикон, но результаты клинических испытаний являются неубедительными. Другие способы лечения, на основе дицикломина гидрохлорида или циметропия бромида, как было показано, являются более эффективными, но могут приводить к нежелательным побочным эффектам, которые ограничивают их применение, особенно у младенцев младше 6 месяцев.

В качестве альтернативы были предложены лекарственные средства из трав, хотя научные обоснования имеются в недостаточном количестве. Имеющаяся в продаже композиция ColiMil® (с растительными экстрактами из *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare* и *Melissa officinalis*), как было показано в двойном слепом плацебо-контролируемом клиническом испытании, снижает продолжительность плача. В то же время сообщалось, что экстракты *Mentha piperita* являются неэффективными для лечения колик у младенцев. Кроме того, в нескольких исследованиях, оценивающих растительные добавки, были выявлены некоторые неблагоприятные эффекты, включая рвоту, сонливость, запор и потерю аппетита.

Детские смеси, предназначенные для преодоления пищевых аллергий (т.е. смеси с низким содержанием лактозы или с частично гидролизованной белками молочной сыворотки), как сообщалось, сокращают эпизоды плача. Однако эти смеси могут принести пользу тем младенцам, чей чрезмерный плач ассоциирован главным образом с пищевыми аллергиями. В качестве возможного лечения также были предложены смеси с высоким содержанием клетчатки или обогащенные клетчаткой, но при сравнении со стандартной смесью не было обнаружено существенных различий в симптомах.

Если исходить из гипотезы, что аберрантная кишечная микрофлора может способствовать состояниям чрезмерного плача, возникает большой интерес к пробиотикам в качестве перспективного лечения. Пробиотики определяют как "живые микроорганизмы, которые при приеме внутрь в определенных количествах оказывают пользу для здоровья помимо неотъемлемого базового питания". Некоторые молочнокислые бактерии и виды из рода *Bifidobacterium* или *Lactobacillus* представляют собой пробиотики, что означает, что они, как было показано, оказывают определенную пользу для здоровья. Пробиотические бактерии должны отвечать нескольким требованиям, связанным с отсутствием токсичности, жизнеспособностью, адгезией и благоприятными эффектами. Эти свойства пробиотика зависят от штамма, даже среди бактерий одних и тех же видов. Поэтому важно обнаружить штаммы, проявляющие желательные пробиотические функции.

Было исследовано только несколько пробиотических композиций для лечения чрезмерного плача. Была исследована эффективность пробиотической смеси, содержащей *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bbi99 и *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, без удовлетворительных результатов в отношении характера плача (Mentula, S. et al. "Microbial composition and fecal fermentation and products from colicky infants - A probiotic supplementation pilot", *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008, vol. 20, no. 1, p. 37-47). В другом исследовании оценивали влияние на колики смеси, обогащенной альфа-лактальбумином и с добавленным пробиотиком (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*). Смесь снижала связанные с питанием побочные эффекты в желудочно-кишечном тракте, раздражимость и возбуждение, но различий в продолжительности плача не обнаруживали (Dupont, C. et al. "A-Lactalbumin-Enriched and Probiotic-Supplemented Infant

Formula in Infants with Colic: Growth and Gastrointestinal Tolerance" European Journal of Clinical Nutrition 2010, vol. 64, no. 7, p. 765-767). Благоприятные эффекты *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 в лечении связанного с коликами чрезмерного плача были раскрыты в WO 2007/142596. Эффективность этого штамма анализировали с благоприятными исходами в отношении плача младенцев (Savino, F. et al. "Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study", Pediatrics 2007, vol. 119, no.1: e124-e130; Savino, F. et al. "Lactobacillus reuteri DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", Pediatrics 2010, vol. 126, no. 3: e526-e533; Szajewska, H. et al. "Lactobacillus reuteri DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", Journal of Pediatrics, 2012, vol. 162, no. 2, p. 257-262), но не могли улучшить разнообразие кишечной микрофлоры (Roos, S. et al. "454 Pyrosequencing Analysis on Faecal Samples from a Randomized DBPC Trial of Colicky Infants Treated with Lactobacillus reuteri DSM 17938", PLoS ONE 2013, vol. 8, no. 2, e56710 1-5).

В недавней статье об исследовании кишечной микробиоты младенцев с коликами было предположено, что чрезмерный плач может быть вызван усилившимся воспалением из-за более высокого уровня патогенов и уменьшения противовоспалительных лактобактерий (De Weerth, C. et al. "Intestinal Microbiota of Infants With Colic: Development and Specific Signatures" Pediatrics 2013, vol. 131, Number 2, e550-e558).

В WO 2007/142596 раскрыто, что штамм *Lactobacillus reuteri* DSM17938 является полезным в лечении младенческих колик благодаря его способности поддерживать высокие количества противовоспалительного цитокина IL-10.

Pediococcus pentosaceus и *Pediococcus acidilactici* обычно применяют в ферментации растений и различных сортов мяса и добавляют в корма в качестве пищевых консервантов для ингибирования роста портящих пищу бактерий и отравляющих пищу патогенов. Однако полагают, что на рынке нет продуктов на основе *Pediococcus pentosaceus* для применения в качестве пробиотика у людей.

Выделенный из растений штамм *Pediococcus pentosaceus* был раскрыт как индуктор уровней секреции интерферона-гамма и интерлейкина IL-12 p70 и супрессор продуцирования IL-4 в клетках селезенки сенсibilizированной овальбумином мыши. Поэтому бактерии могли эффективно стимулировать иммунные активности и демонстрировали ингибирующие аллергию эффекты благодаря индуцированию таких провоспалительных цитокинов (Jonganurakkun, B. et al. "Pediococcus pentosaceus NB-17 for probiotic use", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, vol. 106, Issue 1, p. 69-73).

В этой же области в статье Igarashi T. 2010 раскрыто, что штамм *Pediococcus pentosaceus* (KKM122) интенсивно индуцирует продуцирование провоспалительного цитокина IL-12 (Igarashi T. "Study of the relationship between changes in lactic acid bacterial cell components and stimulation of IL-12 production under salt-stressed conditions", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74, p. 2171-2175).

В статье Vitali et al. 2012 раскрыто исследование 48 штаммов молочнокислых бактерий, принадлежащих к различным видам, на предмет их способности модулировать синтез 27 иммуномедиаторов (цитокинов, хемокинов и ростовых факторов). Среди таких иммуномедиаторов готовили анализ для выявления IL-10. Анализ выполняли с клетками Caco-2 и PBMC (моноклеональные клетки периферической крови), стимулированными LPS (липополисахарид). Результаты продемонстрировали, что были стимулированы некоторые хемокины. Иммуномедиаторы с провоспалительной активностью (IL-17, эотаксин и интерферон-гамма) были существенно стимулированы всеми штаммами, затем цитокин IL-1 бета, хемокин индуцированный интерфероном-гамма белок-10 (IP-10), цитокин IL-6 и хемокин макрофагальный воспалительный белок-1 альфа (MIP-1 альфа). Только некоторые штаммы увеличивали синтез цитокинов с противовоспалительной активностью. Среди протестированных штаммов штамм *Pediococcus pentosaceus*, выделенный из томата, стимулировал цитокины IL-1 бета, IL-4, IL-17 и интерферон-гамма, но не IL-10. Исходя из иммуномодулирующей активности, этот штамм не выбирали в исследование для дальнейшей характеристики в качестве нового кандидата в пробиотики (Vitali, B. et al. "Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables", Food Microbiology, 2012, 31(1), p. 116-125).

Таким образом, ясно, что чрезмерный приступообразный плач может иметь непосредственные и очень серьезные последствия как для родителей, так и для младенцев. Таким образом, требуются безопасные и эффективные композиции и лечения. В этой области пробиотики можно рассматривать в качестве перспективной альтернативы современным способам лечения, но необходимо дополнительное изучение.

Краткое изложение сущности изобретения

Таким образом, первый аспект изобретения относится к бактериальной композиции для снижения воспаления в кишечном тракте, содержащей от 10 до 10¹² КОЕ/г жизнеспособных клеток *Pediosoccus pentosaceus*, обладающих способностью индуцировать образование интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в способе, включающем следующие стадии:

а) обеспечение дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаги путем выращивания ТНР-1 моноцитов клеточной линии РНЕ88081201 в среде RPMI 1640 с 10% FBS и с фторбол-12-мириостат-13-ацетатом (РМА) до конечной концентрации 0,16 мкМ;

б) выращивание ТНР-1 макрофагов в среде RPMI 1640 с 10% FBS в 24-луночных планшетах для ELISA до конечной концентрации 10⁶ макрофагов/луночка;

в) инкубирование в течение 2,5 ч ТНР-1 макрофагов с липополисахаридом (LPS) в конечной концентрации 10 нг/мл и промывание ТНР-1 макрофагов средой на основе D-PBS;

г) приготовление культуры клеток *Pediosoccus pentosaceus* посредством выращивания их в течение ночи в среде MRS при 37°C в атмосфере с 5% CO₂;

д) добавление в лунки для ELISA 500 мкл среды RPMI 1640 с 10% FBS и подходящего количества разведения клеток *Pediosoccus pentosaceus* для получения конечного соотношения 25:1 (2,5×10⁷ КОЕ клеток *Pediosoccus pentosaceus*: 10⁶ ТНР-1 макрофагов);

е) инкубирование ТНР-1 макрофагов с клетками *Pediosoccus pentosaceus* в течение 2,5 ч при 37°C, а также без клеток *Pediosoccus pentosaceus* в таких же условиях в качестве отрицательного контроля;

ж) промывание ТНР-1 макрофагов средой D-PBS для удаления клеток *Pediosoccus pentosaceus*, затем добавление к ТНР-1 макрофагам среды RPMI 1640 с 10% FBS, дополненной 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ампициллина и 12 мкг/мл хлорамфеникола, инкубирование при 37°C при 5-7% CO₂ и отбор аликвот через 5 и через 24 ч;

з) центрифугирование аликвот и анализ супернатантов посредством проточной цитометрии для количественного определения интерлейкина-10;

и) вычисление нормированного увеличения концентрации интерлейкина-10 по формуле $(IL-10_{24ч} - IL-10_{5ч})/IL-10_{5ч}$; где IL-10_{5ч} и IL-10_{24ч} представляют собой концентрацию интерлейкина-10 через 5 и через 24 ч соответственно.

В одном воплощении изобретения в определенной выше бактериальной композиции продукция интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в присутствии клеток *Pediosoccus pentosaceus*, выраженная в виде нормированного увеличения, по меньшей мере в 2 раза больше продукции интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в отсутствие клеток *Pediosoccus pentosaceus*.

Согласно еще одному воплощению изобретения клетки *Pediosoccus pentosaceus* в указанной композиции обладают способностью к антагонизму в отношении грамположительных и грамотрицательных кишечных бактерий, причем способность к антагонизму определена посредством следующих стадий:

1) равномерное распределение патогенных штаммов в чашках, содержащих среду Oxoid, и выращивание до конфлюэнтности в CO₂-инкубаторе при подходящих для роста каждого патогена температурах и % CO₂;

2) приведение двух цилиндрических сегментов конфлюэнтной агаровой среды, равномерно засеянной клетками *Pediosoccus pentosaceus*, диаметром 6 мм в контакт с засеянной патогеном средой, при расположении как (а) ростовой стороны одного цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде, так и (б) неростовой стороны другого цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде; и инкубирование в течение ночи при 37°C;

3) измерение на следующий день зон ингибирования посредством размещения чашки с агаром на плоской линейке;

4) вычисление ингибирующей рост активности (GI) посредством вычитания диаметра цилиндра (CD) из диаметра зоны ингибирования (IZD), измеренных в сантиметрах, и деления этой разности на 2 по формуле $GI = (IZD - CD)/2$.

В одном воплощении изобретения указанные выше грамположительные бактерии включают бактерии, выбранные из *Clostridium difficile* и *Enterococcus faecalis*.

В одном воплощении изобретения указанные выше грамотрицательные бактерии включают бактерии, выбранные из *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*.

В еще одном воплощении изобретения клетки *Pediosoccus pentosaceus* в композиции по изобретению обладают способностью к антагонизму в отношении *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*.

Согласно еще одному воплощению изобретения *Pediosoccus pentosaceus* представляет собой *Pediosoccus pentosaceus* СЕСТ 8330.

В другом конкретном воплощении изобретения описанная выше бактериальная композиция дополнительно содержит от 10⁴ до 10¹² КОЕ/г клеток *Bifidobacterium longum* СЕСТ 7894.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение описанной выше бактериальной композиции в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

Подробное описание изобретения

Проблема, подлежащая решению настоящим изобретением, заключается в предложении новых композиций, полезных в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

Решение основано на новых штаммах *Pediococcus pentosaceus*, обнаруженных авторами настоящего изобретения, которые обладают важными биологическими функциями, полезными в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

Прежде всего, важно отметить, что бактерии, чаще всего используемые в пробиотических композициях, представляют собой бактерии рода *Lactobacillus* и *Bifidobacteria*. Таким образом, род *Pediococcus* является очень редким для применения в качестве пробиотика и еще более необычным для применения у детей.

Как упоминалось выше, в предшествующем уровне техники описано, что чрезмерный плач может быть вызван усилившимся воспалением из-за повышенного уровня патогенов и из-за уменьшения противовоспалительных лактобактерий. В нем также было описано, что *Lactobacillus reuteri* DSM17938 (имеющий происхождение из *L. Reuteri* ATCC 55730) является полезным в лечении колик у младенцев вследствие его способности поддерживать высокие количества противовоспалительного цитокина интерлейкина-10 (IL-10). Таким образом, похоже, что способность повышать количества IL-10 связана с уменьшением интенсивности плача.

Однако полагают, что в известном уровне техники не описан штамм *Pediococcus pentosaceus* с этим свойством. В сущности, в релевантном предшествующем уровне техники описаны штаммы *Pediococcus pentosaceus*, имеющие свойства, которые совершенно противоположны настоящему изобретению. Таким образом, способность индуцировать образование IL-10 не является внутренним или присущим свойством бактерий *Pediococcus pentosaceus*. Например, Igarashi T. 2010 раскрывает штамм *Pediococcus pentosaceus* (KKM122), который интенсивно индуцирует образование провоспалительного цитокина IL-12, таким образом вызывая воспаление, что является эффектом, противоположным эффекту настоящего изобретения. Кроме того, Vitali et al. 2012 раскрывает обширное исследование, которое дает возможность определения 27 иммуномедиаторов, включая IL-10. Однако только несколько штаммов увеличивали синтез цитокинов с противовоспалительной активностью, и хотя штамм *Pediococcus pentosaceus*, выделенный из томата, стимулировал цитокины IL-1 бета, IL-4, IL-17 и интерферон-гамма, он не оказывал воздействия на IL-10. Следует отметить, что анализ, использованный Vitali et al. 2012 для выявления IL-10, очень похож на анализ, описанный в настоящем изобретении, но, удивительно, штамм *Pediococcus pentosaceus*, обладающий способностью индуцировать IL-10, не идентифицирован у Vitali et al. 2012.

Таким образом, при поиске в предшествующем уровне техники бактерий, которые обладают этим свойством, *Pediococcus pentosaceus* не обнаруживают среди видов бактерий, имеющих это свойство. Таким образом, полагают, что в предшествующем уровне техники не описана бактериальная композиция, которая содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующая единица)/г клеток *Pediococcus pentosaceus*, которые имеют способность индуцировать образование IL-10 для снижения воспаления в кишечном тракте, как описано в настоящем документе.

Неожиданно авторами изобретения был обнаружен штамм *Pediococcus pentosaceus*, который имеет способность индуцировать образование IL-10. При поиске в предшествующем уровне техники невозможно было узнать, что бактерии *Pediococcus pentosaceus* имеют эти свойства.

Поэтому штамм *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 описан в настоящем описании изобретения. Кроме того, посредством способа скрининга, описанного подробно, вполне возможно идентифицировать и выделять штаммы *Pediococcus pentosaceus*, отличные от штамма CECT 8330, в пуле клеток *Pediococcus pentosaceus*, с такой же способностью индуцировать образование IL-10.

В настоящем изобретении описан штамм *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330. В изобретении описаны некоторые биологические свойства бактерий, которые являются значимыми для уменьшения интенсивности плача; т.е. способность индуцировать образование IL-10 в качестве наиболее значимого свойства. В настоящем описании изобретения посредством примеров продемонстрировано, что указанное свойство, вполне возможно, связано с уменьшением интенсивности плача у младенцев. Таким образом, хотя был идентифицирован один штамм *Pediococcus pentosaceus* с этим свойством (CEPT 8330), без ограничения теорией, нет основания ограничивать объем изобретения таким штаммом, поскольку все стадии способа получения других подходящих штаммов правдоподобно описаны в настоящем документе. Поэтому в изобретении также предложен пул штаммов *Pediococcus pentosaceus*, отличных от штамма CECT 8330, которые обладают таким же свойством. Не все штаммы, принадлежащие к виду *Pediococcus pentosaceus*, будут иметь способность индуцировать IL-10. В изобретении предложен способ для их распознавания.

Таким образом, на основе подробного анализа, описанного в настоящем документе (см. пример 1 в отношении анализа индуцирования IL-10), специалист обычно способен повторить этот анализ, чтобы объективно определить, удовлетворяет ли интересующий *Pediococcus pentosaceus* уровням IL-10 первого аспекта изобретения. Из клеток *Pediococcus pentosaceus*, которые удовлетворяют уровням индуцирования IL-10, в настоящем описании изобретения описан депонированный штамм *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330.

Новая бактериальная композиция, как описано в настоящем документе, является полезной в качестве пробиотической биодобавки для людей и особенно для младенцев. Полагают, что в предшествующем уровне техники не описаны клетки *Pediosoccus pentosaceus* для применения в уменьшении интенсивности плача у младенцев.

Термин "эффективное количество" при использовании в настоящем описании изобретения представляет собой количество колониеобразующих единиц (КОЕ) для каждого штамма в композиции, которое является достаточно высоким, чтобы существенно модифицировать состояние, подлежащее лечению, в положительную сторону, однако достаточно низким, чтобы избежать серьезных побочных эффектов (в разумном отношении польза/риск) в рамках здравого медицинского суждения.

В настоящем изобретении раскрыт способ скрининга и выделения новых клеток *Pediosoccus pentosaceus*, включающий следующие стадии:

1) анализ новых клеток *Pediosoccus pentosaceus* из пула клеток *Pediosoccus pentosaceus* на предмет их способности индуцировать образование IL-10, в соответствии со стадиями анализа индуцирования IL-10, описанного выше; и

2) отбор и выделение новых клеток *Pediosoccus pentosaceus* из пула, которые индуцируют образование IL-10, выраженное в виде нормированного увеличения, выше нормированного увеличения для отрицательного контроля, где нормированное увеличение определяют в соответствии со стадиями анализа индуцирования IL-10.

Специалисту ясно, что, поскольку авторами в настоящем описании изобретения были раскрыты релевантный анализ-тест и депонированный штамм СЕСТ 8330, который удовлетворяет уровням индуцирования IL-10, для специалиста будет представлять рутинную работу отбор других новых клеток *Pediosoccus pentosaceus*, удовлетворяющих критериям первого аспекта изобретения.

Термин "бактериальная композиция" следует понимать, согласно данному уровню техники, как композицию, содержащую некоторое количество бактериальных клеток, где от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г состоит из клеток *Pediosoccus pentosaceus* с интересующим свойством согласно первому аспекту. Бактериальная композиция может содержать добавки, такие как носители или эксципиенты. Затем бактериальную композицию упаковывают в подходящий контейнер.

Термин "КОЕ/г" относится к массе в граммах композиции как таковой, включая релевантные добавки, присутствующие в композиции. Он не включает массу подходящего контейнера, используемого для упаковки бактериальной композиции.

Первый аспект изобретения относится к бактериальной композиции, которая содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г клеток *Pediosoccus pentosaceus*, которые имеют способность индуцировать продукцию интерлейкина-10 клетками ТНР-1 макрофагов более высокую, чем продукция IL-10 клетками ТНР-1 макрофагов в отсутствие клеток *Pediosoccus pentosaceus*, где нормированное увеличение определяют посредством стадий, упоминаемых выше.

IL-10, также известный как фактор, ингибирующий синтез цитокинов человека (CSIF), представляет собой противовоспалительный цитокин, который ингибирует синтез ряда цитокинов, включая IFN(интерферон)-гамма, IL-2, IL-3, TNF (фактор некроза опухоли) и GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), продуцированный активированными макрофагами и Т-хелперами. Термин цитокин относится к небольшой сигнальной молекуле, используемой для сигнальной системы клеток. Цитокины можно классифицировать как белки, пептиды или гликопротеины. В данном случае IL-10 представляет собой белковый цитокин с иммуномодулирующими свойствами.

В конкретном воплощении продукция IL-10 клетками ТНР-1 в присутствии клеток *Pediosoccus pentosaceus*, выраженная в виде нормированного увеличения, по меньшей мере в 2 раза больше продукции IL-10 клетками ТНР-1 в отсутствие клеток *Pediosoccus pentosaceus*, если нормированное увеличение определяют посредством стадий, упоминаемых выше. В других конкретных воплощениях нормированное увеличение по меньшей мере в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или в 6 раз выше, чем контроль.

Дополнительно к способности индуцировать образование IL-10, клетки *Pediosoccus pentosaceus* обладают интересными антагонистическими свойствами против нежелательных членов бактериальных видов, обычно часто встречающихся у младенцев с чрезмерным плачем (см. пример 2). Термин "антагонизм" понимают в настоящем описании изобретения как ингибирование или ослабление бактериального роста. Таким образом, в другом конкретном воплощении клетки *Pediosoccus pentosaceus* бактериальной композиции обладают способностью к антагонизму в отношении грамположительных и грамотрицательных кишечных бактерий. В частности, грамположительные бактерии включают бактерии, выбранные из группы, состоящей из *Clostridium difficile* и *Enterococcus faecalis*. В другом конкретном воплощении грамотрицательные бактерии включают бактерии, выбранные из *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*. В другом конкретном воплощении клетки *Pediosoccus pentosaceus* обладают способностью к антагонизму в отношении *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*, где способность к антагонизму определяют посредством следующих стадий, на которых:

1) равномерно распределяют патогенные штаммы в чашках, содержащих среду Oxoid, и выращивают до конfluence в CO_2 -инкубаторе при подходящих для роста каждого патогена температурах и

% CO₂;

2) приводят два цилиндрических сегмента конфлюэнтной агаровой среды, равномерно засеянной клетками *Pediosoccus pentosaceus*, диаметром 6 мм в контакт с засеянной патогеном средой, располагая как (а) ростовую сторону одного цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде, так и (б) неростовую сторону другого цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде и инкубирования в течение ночи при 37°C;

3) измеряют на следующий день зоны ингибирования, размещая чашку с агаром на плоской линейке; и

4) вычисляют ингибирующую рост активность (GI) посредством вычитания диаметра цилиндра (CD) из диаметра зоны ингибирования (IZD), измеренных в сантиметрах, и деления этой разности на 2 по формуле $GI = (IZD - CD)/2$.

В конкретном воплощении клетки *Pediosoccus pentosaceus* представляют собой клетки от *Pediosoccus pentosaceus*, депонированной в Испанской коллекции типовых культур под регистрационным номером CECT 8330.

Pediosoccus pentosaceus CECT 8330.

Образец нового штамма *Pediosoccus pentosaceus* был депонирован в CECT (Coleccion Espanola de CultivosTipo) в Edificio 3 CUE, Pare Cientific Universitat de Valencia, Catedratico Agustin Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia (Spain) депозитором AB-Biotics S.A., расположенным в Edifici Eureka, office P1M1.1, Campus UAB, 08193-Bellaterra (Spain). Штамм депонирован под регистрационным номером CECT 8330 с датой депонирования 30 апреля 2013 г. Депонирование было выполнено согласно условиям Будапештского Договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Идентификационная ссылка, данная депозитором, представляла собой F3403.

Как показано в примерах ниже, *Pediosoccus pentosaceus* CECT 8330 демонстрирует следующие интересные свойства для уменьшения интенсивности чрезмерного плача у младенцев:

способность индуцировать образование IL-10, как показано в табл. 1, пример 1;

ингибирующая активность против всего исследованного спектра патогенов (табл. 2, пример 2). Штамм эффективно ингибирует не только грамположительные, но также и грамотрицательные бактерии. Это вызывает большой интерес, так как он обеспечивает защиту от бактерий, таких как *E.coli*, *Klebsiella* и *Clostridium* spp., которые аномально часто встречаются у младенцев, имеющих чрезмерный плач;

отсутствие продуцирования этанола и CO₂, вследствие чего не вызываются расстройства у младенцев.

Кроме того, штамм CECT 8330 имеет преимущество, заключающееся в том, что он является особенно полезным в качестве пробиотика. Пробиотические бактерии должны отвечать нескольким требованиям, связанным с отсутствием токсичности, жизнеспособностью, адгезией и благоприятными эффектами. Свойства каждого бактериального штамма являются уникальными и не могут быть экстраполированы на другие штаммы таких же видов. Поэтому важно обнаружить те штаммы, которые имеют лучшие показатели по всем требованиям к пробиотикам. Для того чтобы убедиться в том, что штамм CECT 8330 был способен преодолевать желудочно-кишечный (ЖК) тракт, разработали *in vitro* протокол, имитирующий его условия. Количественно определяли выживание после обработки лизоцимом, перекисью водорода, кислой средой и солями желчных кислот. Это подтверждающий эксперимент, так как штаммы выделяли из человеческих фекалий, используя очень слабые растворы, и их присутствие в фекалиях является высоким. Результаты показывают, что штамм способен выдерживать прохождение ЖК тракта.

Штамм CECT 8330 также анализировали на предмет его способности колонизировать кишечный тракт. Это является ключевым пунктом, так как подтверждает, что штамм может проявлять наблюдаемые биологические функции. В разработке эксперимента использовали клетки кишечной слизи и Caco-2, которые имитируют "якорные" участки для пробиотических штаммов в толстом кишечнике. Способность штамма к адгезии измеряли по сцинтилляции меченного тритием тимидина и сравнивали со способностью к адгезии штамма *Lactobacillus reuteri*, используемого в качестве контроля. Адгезия к клеткам слизи и адгезия к клеткам Caco-2 имели значения $1,40 \times 10^6$ и $4,5 \times 10^6$ КОЕ/см² соответственно (*L.reuteri*: $6,58 \times 10^6$ и $1,01 \times 10^6$ КОЕ/см²). Таким образом, результаты показывают, что CECT 8330 имеет хорошую адгезию к кишечному эпителию, сопоставимую с таковой у *L.reuteri*, что дает ему возможность оставаться в кишечном тракте и проявлять свои пробиотические эффекты.

Штамм CECT 8330 имеет хороший рост в промышленных условиях.

Кроме того, штамм CECT 8330 принадлежит к бактериальному виду, который имеет статус QPS (Andreoletti, O. et al. "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006", The EFSA Journal 2008. 923: p. 1-48). QPS ("Квалифицированная презумпция безопасности") представляет собой систему, разработанную европейским ведомством по безопасности пищевых продуктов для предоставления статуса таксономическим единицам с подтвержденной длительной историей очевидно безопасного применения.

Bifidobacterium longum CECT 7894.

В другом конкретном воплощении бактериальная композиция дополнительно содержит от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г клеток *Bifidobacterium longum* CECT 7894.

Образец нового штамма *Bifidobacterium longum* был депонирован в CECT (Coleccion Espanola de CultivosTipo) в Edificio 3 CUE, Pare Cientific Universitat de Valencia, Catedratico Agustin Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia (Spain) депозитом AB-Biotics S.A., расположенным в Edifici Eureka, office P1M1.1, Campus UAB, 08193-Bellaterra (Spain). Штамм депонирован под регистрационным номером CECT 7894 с датой депонирования 30 марта 2011 г. Депонирование было выполнено согласно условиям Будапештского Договора о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Идентификационная ссылка, данная депозитом, представляла собой Bif F2.

Штамм *Bifidobacterium longum* CECT 7894 также имеет интересные свойства для уменьшения интенсивности плача у младенцев, как показано в примерах:

способность индуцировать образование IL-10, как показано в табл. 1, пример 1;

ингибирующая активность против всего исследованного спектра патогенов (табл. 2, пример 2).

Штамм эффективно ингибирует не только грамположительные, но также и грамотрицательные бактерии. См. примечания для штамма CECT 8330;

отсутствие продуцирования этанола и CO₂, вследствие чего не вызываются нарушения у младенцев.

Как и в случае штамма *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330, *Bifidobacterium longum* CECT 7894 также анализировали на предмет его способности преодолевать желудочно-кишечный (ЖК) тракт. Результаты показали, что штамм способен выдерживать прохождение ЖК тракта.

Штамм CECT 7894 также анализировали на предмет его способности колонизировать кишечный тракт, следуя анализу, упоминаемому выше для *Pediococcus pentosaceus*. Адгезия к клеткам слизи и адгезия к клеткам Caco-2 для штамма CECT 7894 представляла собой $1,21 \times 10^5$ и $1,18 \times 10^6$ КОЕ/см² соответственно (*L.reuteri*: $6,58 \times 10^6$ и $1,01 \times 10^6$ КОЕ/см²). Таким образом, результаты демонстрируют, что CECT 7894 обладает хорошей адгезией к кишечному эпителию, сопоставимую с таковой у *L.reuteri*, что дает ему возможность оставаться в кишечном тракте и проявлять свои пробиотические эффекты.

Штамм CECT 7894 также имеет хороший рост в промышленных условиях.

Поэтому оба штамма, *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 и *Bifidobacterium longum* CECT 7894, имеют ряд общих функциональных свойств, что делает их подходящими для применения в уменьшении интенсивности плача у младенцев путем использования указанных штаммов отдельно или вместе в одной смеси. Среди прочих свойств оба штамма имеют способность индуцировать образование IL-10, и они эффективно ингибируют рост кишечных бактерий (грамположительных, а также грамотрицательных бактерий).

Кроме того, указанные штаммы имеют преимущество в том, что они не продуцируют газ. Гетероферментативные бактерии продуцируют CO₂ и этанол, а также молочную кислоту посредством ферментации глюкозы. Этанол мог бы воздействовать на моторику кишечника, вызывая вздутие живота, характерное для младенцев с коликами. CO₂ может вызывать метеоризм (скопление газа) и вздутие кишечника, также типичные для младенцев с коликами. Было описано более высокое присутствие гетероферментативных штаммов у младенцев с коликами. Напротив, штаммы по изобретению не продуцируют ни этанол, ни CO₂, таким образом не вызывая расстройства у младенцев в этом плане.

Для специалиста в данной области техники будет очевидно, что *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 и *Bifidobacterium longum* CECT 7894 являются эффективными при применении их по отдельности или при объединении в одной композиции. Их также можно вводить в двух разных композициях, вводимых одновременно, последовательно или отдельно через определенный период времени.

Принимая во внимание описанные выше свойства, бактериальная композиция вызывает физиологическое улучшение в вышеупомянутых причинах плача, что вызывает уменьшение интенсивности некоторых клинических симптомов, связанных с чрезмерным плачем. Таким образом, бактериальная композиция по изобретению является особенно полезной в уменьшении интенсивности плача у младенцев. Термин "чрезмерный плач" понимают в настоящем описании изобретения как сильный, постоянный и безутешный плач, проблематичный для нормального функционирования семьи, что означает плач по меньшей мере 60 мин в сутки (за 3 или более эпизодов), наблюдаемый в течение по меньшей мере 1 недели.

Термин "младенец" следует понимать в настоящем описании изобретения как очень молодого отпрыска человека или животного. При применении к людям термин считается синонимичным термину "малыш". Термин "ребенок" относится к человеку от рождения и до половой зрелости. "Ребенок" также описывает взаимосвязь с родителем в качестве синонимов "сын" и "дочь". Однако в настоящем описании изобретения, термины "младенец", "малыш" и "ребенок" считаются синонимами и применяются взаимозаменяемо.

В конкретном воплощении бактериальная композиция по изобретению является полезной в уменьшении интенсивности плача, ассоциированного с младенческими коликами. Термин "младенческие колики" понимают в настоящем описании изобретения как необъяснимый и безутешный плач ("капризный"), который вызывает страдание у родителей. Термин "капризный" представляет собой очень субъективный показатель из-за затруднения для родителей и терапевтов при классифицировании типа плача. Кроме того, характер чрезмерного плача (легко успокоить или нет) может свидетельствовать о коликах. Поэтому один из наиболее часто упоминаемых критериев включения младенцев с коликами основан на норме времени (т.е. основан на критериях Весселя), как, например, более 3 ч плача в сутки в течение по меньшей мере 1 недели (Savino, F. et al. 2010 supra).

В другом воплощении изобретения младенцы имеют возраст от трех недель до двенадцати месяцев.

Пилотное клиническое испытание с 20 младенцами проводили для оценивания эффективности и безопасности продукта на основе смеси штаммов СЕСТ 8330 и СЕСТ 7894 (см. пример 7). Плацебо и смесь штаммов вводили один раз в сутки (5 капель/сутки) в течение 14 суток. Как можно видеть на фиг. 3, смесь пробиотиков вызвала более значительное снижение среднесуточной продолжительности плача и продолжительности каждого эпизода. Неблагоприятные эффекты не наблюдали ни в группе плацебо, ни в группе пробиотиков, подтверждая, что смесь пробиотиков можно считать безопасной. Следовательно, смесь штаммов является полезной для улучшения характера плача.

Из релевантных свойств бактериальной композиции, раскрытых выше, вытекает, что введение бактериальной композиции также является полезным для лечения других состояний, характеризующихся расстройствами желудочно-кишечного тракта, ассоциированными с воспалением вследствие незрелости иммунной системы, для лечения кишечной гиперчувствительности и для компенсации избытка нежелательных бактерий в кишечнике.

Принимая во внимание упоминаемые выше свойства, штаммы СЕСТ 8330 и 7894 имеют лучшие показатели для изучаемых параметров, которые являются релевантными для чрезмерного плача при сравнении с имеющимися в продаже штаммами, известными в данной области техники. Как показано в примерах ниже, штамм СЕСТ 8330 демонстрировал лучшее нормированное увеличение, связанное с индукцией образования IL-10 по сравнению с таковым штамма *Lactobacillus reuteri*. Кроме того, штаммы по изобретению демонстрировали ингибирующую активность против всего исследованного спектра патогенов. Штаммы по изобретению эффективно ингибировали не только грамположительные, но также и грамотрицательные бактерии. Этого не было в случае *L.reuteri*, который неэффективно ингибировал рост *E.coli* и *B.vulgatus*. Это представляет большой интерес, так как аномальные количества бактерий, таких как *E.coli*, обычно присутствуют у младенцев, имеющих чрезмерный плач. Также заслуживает внимания то, что, в общем случае, СЕСТ 8330 и особенно СЕСТ 7894 более эффективно ингибировали рост почти всех патогенных бактерий по сравнению с *L.reuteri*. Кроме того, штаммы СЕСТ 8330 и СЕСТ 7894 не продуцировали газ, в то время как *L.reuteri* продуцировал газ.

Анализ для измерения индукции образования IL-10.

В рабочем примере 1 в настоящем описании изобретения предложено подробное описание анализа, подходящего для измерения индукции образования IL-10, как называют стадии (а)-(и) первого аспекта настоящего изобретения. Следует отметить, что описания и условия анализа индукции образования IL-10, раскрытого в стадиях (а)-(и) первого аспекта и в примере 1, не ограничивают объем изобретения. Анализ представляет собой какой-либо подходящий для тестирования способности клеток *Pediosoccus pentosaceus* индуцировать образование IL-10. Подробные условия этого примера 1 образуют в настоящем описании изобретения предпочтительный анализ для определения того, соответствуют ли интересующие клетки *Pediosoccus pentosaceus* критериям первого аспекта.

Таким образом, на основе подробного анализа, описанного в настоящем документе, специалист обычно способен повторить этот анализ, чтобы объективно определить, соответствуют ли интересующие клетки *Pediosoccus pentosaceus* индукции образования IL-10 по первому аспекту.

Когда используют описанный анализ, согласно первому аспекту уровни IL-10, образованного клетками THP-1 в присутствии клеток *Pediosoccus pentosaceus*, выраженные в виде нормированного увеличения, выше, чем у контроля. Контролем, как это понимают в настоящем описании изобретения и согласно первому аспекту, является нормированное увеличение IL-10, образованного клетками THP-1 в отсутствие клеток *Pediosoccus pentosaceus*. В конкретном воплощении уровни IL-10, образованного клетками THP-1 в присутствии *Pediosoccus pentosaceus*, по меньшей мере в 2 раза больше уровня контроля. В других конкретных воплощениях нормированное увеличение по меньшей мере в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз или в 6 раз выше, чем контроль.

Анализ для измерения способности к антагонизму против кишечных бактерий.

В рабочем примере 2 в настоящем описании изобретения предложено подробное описание анализа, подходящего для измерения способности клеток *Pediosoccus pentosaceus* к антагонизму в отношении кишечных бактерий, как его называют в одном воплощении изобретения. Следует отметить, что описания и условия анализа, раскрытые в примере 2, не ограничивают объем изобретения. Анализ представляет собой какой-либо подходящий для тестирования способности клеток *Pediosoccus pentosaceus* к антагонизму в отношении кишечных бактерий.

Таким образом, на основе подробного анализа, описанного в настоящем документе, специалист обычно способен повторить этот анализ, чтобы объективно определить, соответствуют ли интересующие клетки *Pediosoccus pentosaceus* бактериальному спектру, подробно описанному выше, т.е. способны ли к антагонизму в отношении *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*.

Композиции и формы для введения.

В конкретном воплощении изобретения бактериальная композиция, как она определена выше, представлена в форме, выбранной из группы, состоящей из пищевой добавки, лекарственного средства, детской смеси, съедобного продукта и пищевого продукта.

Бактериальная композиция по изобретению может быть получена в любой подходящей форме, которая не влияет отрицательно на жизнеспособность бактериальных клеток, образующих композицию по изобретению. Выбор эксципиентов и наиболее подходящих способов для изготовления, принимая во внимание конкретную задачу композиции, входит в сферу компетенции обычного специалиста в области фармацевтики и технологии пищевых продуктов.

Бактериальная композиция по изобретению может быть изготовлена в форме, в которой бактериальные клетки представляют собой только активный агент, или смешаны с одним или более другими активными агентами и/или смешаны с фармацевтически приемлемыми эксципиентами, или отвечающими требованиям добавками или ингредиентами в случае пищевого продукта. В конкретном воплощении изобретения композиция дополнительно содержит один или более дополнительных активных агентов. Предпочтительно дополнительный(е) активный(ые) агент или агенты представляют собой другие пробиотические бактерии, которые не являются антагонистическими к бактериальным клеткам, образующим композицию по изобретению. В зависимости от композиции, бактериальные клетки могут быть добавлены в виде очищенных бактерий, в виде бактериальной культуры, в виде части бактериальной культуры, в виде бактериальной культуры, которая была обработана после, и одни или вместе с подходящими носителями или ингредиентами. Также могут быть добавлены пребиотики.

Бактериальная композиция может быть представлена в форме фармацевтического продукта. Термин "фармацевтический продукт" в этом описании понимают в широком смысле, включающем любую композицию, которая содержит активный ингредиент - в этом случае бактериальные клетки - вместе с фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Термин "фармацевтический продукт" не ограничивают так, чтобы он относился к лекарственным средствам. Термин "фармацевтически приемлемый" при использовании в настоящем описании изобретения относится к соединениям, веществам, композициям и/или лекарственным формам, которые в рамках здравого медицинского суждения являются подходящими для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека) при отсутствии чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или другого осложнения, соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, эксципиент и так далее должен также быть "приемлемым" в смысле его совместимости с другими ингредиентами композиции. Подходящие носители, эксципиенты и так далее могут быть обнаружены в стандартных фармацевтических тестах.

Фармацевтический продукт может иметь разные формы или названия в зависимости от порядка утверждения продукции, а также в зависимости от страны.

Например, лекарственное средство представляет собой определенный фармацевтический продукт. Продукт лечебного питания считается в настоящем описании другим определенным фармацевтическим продуктом. Термины "продукт лечебного питания" или "пищевой продукт для специальных медицинских целей", применяемые в некоторых странах, относятся к продукту питания, специально изготовленному и предназначенному для диетотерапии заболевания, которое имеет особые пищевые потребности, которые не могут быть удовлетворены только обычным питанием. Они определяются в нормативных документах, таких как Food and Drug Administration's, 1988, Orphan Drug Act Amendments в Соединенных Штатах и Commission Directive, 1999/21/EC в Европе. Продукты лечебного питания отличаются от более

широкой категории пищевых добавок и от традиционных продуктов питания, которые имеют утверждение о пользе для здоровья. Таким образом, в конкретном воплощении композиция по изобретению представляет собой продукт лечебного питания.

Часто пробиотические бактериальные композиции, такие как композиция, раскрытая в настоящем описании изобретения, считаются пищевыми добавками. Пищевая добавка, также известная как диетическая добавка или питательная добавка, считается другим определенным фармацевтическим продуктом. Это препарат, предназначенный для добавления к диете и внесения питательных веществ или полезных ингредиентов, которые обычно не принимают внутрь при нормальной диете или которые не могут быть потреблены в достаточных количествах. В основном добавки к пище считаются пищевыми продуктами, но иногда их определяют как лекарственные средства, натуральные продукты для здоровья или нутрицевтические продукты. По смыслу настоящего изобретения пищевые добавки также включают нутрицевтики. Пищевые добавки обычно продаются "через прилавок", т.е. без рецепта. Если пищевая добавка имеет форму пилюли или капсулы, она содержит эксципиенты, которые представляют собой такие же, как применяемые в лекарственных средствах. Однако пищевая добавка также может иметь форму пищевого продукта, который обогащен несколькими питательными веществами (например, детская смесь).

Таким образом, в конкретном воплощении композиция по изобретению представляет собой пищевую добавку и, более конкретно, пищевую добавку для младенцев.

Композиция по изобретению может быть введена как таковая или смешанная с подходящей съедобной жидкостью или твердым веществом, лиофилизированной в форме таблеток, пилюль, капсул, пастилок, гранул, порошков, суспензий, саше, сиропов или обычно в форме стандартной дозы. Она также может быть представлена в форме монодоз лиофилизированной композиции, представленных вместе с отдельным контейнером с жидкостью, подлежащих смешиванию перед введением.

В случае младенцев очень раннего возраста введение ограничивают несколькими формами введения. Таким образом, в предпочтительном воплощении бактериальная композиция по изобретению представлена в форме масляной суспензии, которая подлежит введению как таковая или смешанная с жидкостью. Масляная суспензия содержит по меньшей мере одно пищевое масло, такое как оливковое масло, кукурузное масло, соевое масло, льняное масло, подсолнечное масло или рисовое масло. Масло присутствует в количестве по меньшей мере 70% мас./мас. В конкретном воплощении масляная суспензия также содержит по меньшей мере один эксципиент, который представляет собой эмульгатор, стабилизатор или противослеживающий агент в количестве 0,1-15% мас./мас. Подходящие агенты представляют собой диоксид кремния, силикагель, коллоидный диоксид кремния, осажденный диоксид кремния, тальк, силикат магния, лецитин, пектин, крахмал, модифицированные крахмалы, конжаковую камедь, ксантановую камедь, геллановую камедь, каррагинан, альгинат натрия, моно- или диглицериды жирных кислот, такие как глицеринмоностеарат или глицеринмоноолеат, и сложные эфиры моно- или диглицеридов с лимонной кислотой.

Масляную суспензию получают согласно методикам, хорошо известным специалистам в данной области техники, и с использованием известного оборудования. Заданное количество масла вводят в емкость, снабженную средствами для перемешивания и нагревания. Затем добавляют по меньшей мере один эксципиент при перемешивании и, если необходимо, с небольшим нагреванием до температуры от 20 до 50°C, чтобы избежать образования комков и агломератов, до полной гомогенизации. Суспензию охлаждают до комнатной температуры и постепенно добавляют бактериальные клетки в твердой форме при перемешивании до полной гомогенизации суспензии.

В частности, бактериальная композиция по изобретению представлена в форме пищевой добавки для младенцев в форме масляной суспензии. В конкретном воплощении масляная суспензия содержит подсолнечное масло и коллоидный диоксид кремния, предпочтительно в количестве 1 мас.%, и бактериальные клетки.

В другом воплощении масляная суспензия содержит подсолнечное масло и агент, выбранный из лецитина, моно- или диглицеридов жирных кислот, каррагинана и альгината натрия, и бактериальные клетки.

Бактериальная композиция по изобретению также может быть включена в целый ряд пищевых продуктов или съедобных продуктов, таких как молочные продукты в случае младенцев. Термин "съедобный продукт" используют в настоящем описании изобретения в его самом широком смысле, включающем любой тип продукта, в любой форме выпуска, который может быть принят внутрь животным; т.е. продукт, который является органолептически приемлемым. Термин "пищевой продукт" понимают как съедобный продукт, который также обеспечивает питание для организма. Особенно интересные пищевые продукты представляют собой пищевые добавки и детские смеси. Пищевой продукт предпочтительно содержит вещество-носитель, такое как каша из овсяной муки, кисломолочные ферментированные продукты, резистентный крахмал, пищевые волокна, углеводы, белки и гликозилированные белки. В конкретном воплощении бактериальные клетки по изобретению гомогенизируют с другими ингредиентами, такими как злаки или порошковое молоко, для составления детской смеси.

Таким образом, следует понимать, что бактериальная композиция по изобретению является полезной в лечении чрезмерного плача у младенцев независимо от формы композиции; т.е. независимо от то-

го, представляет ли она собой фармацевтический продукт, лекарственное средство, пищевой продукт, съедобный продукт, пищевую добавку или продукт лечебного питания.

Рост бактериальных клеток, мутанты и дозы.

Бактерии выращивают посредством их культивирования в подходящей среде и в подходящих условиях. Бактериальные клетки по изобретению можно культивировать одни для образования чистой культуры, или в виде смешанной культуры вместе с другими микроорганизмами, или культивируя бактерии разных типов раздельно и затем комбинируя их в желательных пропорциях. После культивирования получают суспензию клеток и используют как таковую или обработанную нужным способом, например концентрированием, обезвоживанием, сушкой распылением или лиофилизацией, для дальнейшего использования в изготовлении фармацевтических или пищевых продуктов. Иногда пробиотический препарат подлежит процессу иммобилизации или инкапсулирования для того, чтобы улучшить срок годности. В данной области техники известно несколько методик для иммобилизации или инкапсулирования бактерий.

Другой аспект изобретения относится к описанному в настоящем документе новому штамму или "его мутанту". Понятно, что, используя депонированный штамм в качестве исходного вещества, специалист в данной области техники может в рабочем порядке посредством методик обычно применяемого мутагенеза или реизоляции получать дополнительные его мутанты или производные, которые, по меньшей мере, сохраняют описанные в настоящем документе релевантные свойства и преимущества штамма, образующего композицию по изобретению. Таким образом, термин "его мутант" относится к мутантным штаммам, полученным с использованием депонированного штамма в качестве исходного материала. В одном воплощении мутант получают с использованием технологии рекомбинантных ДНК. В другом воплощении первого аспекта изобретения мутант получают посредством случайного мутагенеза. В конкретном воплощении первого аспекта изобретения вариант представляет собой встречающийся в природе вариант. Это можно альтернативно сформулировать как способ получения штамма, включающий применение одного из депонированных штаммов по настоящему описанию изобретения в качестве исходного штамма, получение мутантов депонированного штамма и выделение нового штамма, где мутант сохраняет важнейшие свойства депонированного штамма.

Эффективное количество бактериальных клеток будет определено специалистом в данной области техники и будет варьировать в зависимости от конкретной цели, которая должна быть достигнута, возраста и физического состояния пациента, подлежащего лечению, тяжести расстройства, лежащего в основе, и конечной композиции. При пероральном введении штаммы по изобретению присутствуют в композиции в количестве, дающем эффективную суточную дозу от 10^7 до 10^{12} КОЕ в соответствии с действующим законодательством, предпочтительно от 10^9 до 10^{11} КОЕ. Выражение "колониеобразующая единица" ("КОЕ") определяют как количество бактериальных клеток, которое выявлено микробиологическими подсчетами на чашках с агаром. При применении в форме композиции по изобретению различные штаммы имеют предпочтительно соотношение концентраций 1:1.

Основным является применение штаммов по изобретению в форме жизнеспособных клеток. Однако оно также может распространяться на нежизнеспособные клетки, такие как умерщвленные культуры или клеточные лизаты (полученные, например, под воздействием измененного pH, разрушения ультразвуком, облучения, температуры или давления среди других средств умерщвления или лизирования бактерий), или композиции, содержащие полезные факторы, продуцированные штаммами по изобретению.

Повсюду в описании и формуле изобретения слово "содержать" и его вариации не направлены на исключение других технических свойств, добавок, компонентов или стадий. Дополнительные задачи, преимущества и свойства изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники при изучении описания или могут быть узнаны посредством осуществления изобретения на практике. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные комбинации конкретных и предпочтительных воплощений, описанных в настоящем документе. Следующие примеры и графические материалы предложены в настоящем описании изобретения для иллюстративных целей и без намерения ограничить настоящее изобретение.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Паттерны гель-электрофореза в пульсирующем поле рестриктированной Sma-I (слева) и Not-I (справа) геномной ДНК, слева направо: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 (8330), двух штаммов *Pediococcus acidilactici* в качестве контролей (1, 2) и молекулярного маркера (М).

Фиг. 2. Паттерны гель-электрофореза в пульсирующем поле рестриктированной Xba-I (слева) и Spe-I (справа) геномной ДНК, слева направо: *Bifidobacterium longum* CECT 7894 (7894), *Bifidobacterium longum* CECT 4551 (4551) и молекулярного маркера (М).

Фиг. 3. Снижение среднесуточной продолжительности плача и продолжительности каждого эпизода. А) Снижение среднесуточной продолжительности плача (суммарные минуты плача в сутки). В) Снижение средней продолжительности каждого эпизода (минуты на эпизод). Результаты выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM) для n, равного 9 в группе с плацебо, и n, равного 11 в группе с пробиотической смесью. PLA соответствует группе с плацебо. PRO соответствует про-

биотической группе.

Примеры

Штамм *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 используют в качестве контроля в нескольких экспериментах.

Пример 1. In vitro оценивание способности индуцировать образование IL-10 на модели слизистой оболочки кишечника.

Изучали иммуномодулирующую способность бактериальных штаммов, происходящую от их взаимодействия с иммунной системой пищеварительного тракта (часто называемой лимфоидной тканью, ассоциированной с пищеварительным трактом - GALT). Более конкретно, была предпринята попытка тестировать, имеют ли бактериальные штаммы способность индуцировать образование противовоспалительного IL-10 для снижения воспаления в кишечном тракте. Молекулярной основой для этого является взаимодействие рецепторов клеточной поверхности пробиотиков с TLR-2 и TLR-4 (Toll-подобный рецептор), которое можно обнаружить на дендритных клетках, присутствующих в пейеровых бляшках.

Клеточная линия THP-1.

Выбранная модель представляла собой клеточную линию THP-1, которая экспрессирует TLR-2 и TLR-4. Эта модель чувствительна к бактериальным компонентам, подобным липополисахариду - LPS - (в качестве индуктора воспалительного ответа), и восприимчива к модулированию образования цитокинов, когда в среде есть молекулы, подходящие для индуцирования образования паттерна противовоспалительных цитокинов.

Термин "клеточная линия THP-1" согласно данному уровню техники относится к клеточной линии моноцитов человека, полученных от пациента с острым моноцитарным лейкозом. Ее используют для тестирования клеточных линий лейкоза в иммуноцитохимическом анализе белок-белкового взаимодействия и в иммуногистохимии.

Клеточную линию THP-1 получали из коллекции клеток Public Health England (номер в каталоге 88081201). На дату подачи настоящей заявки в каталоге продуктов для 88081201 от поставщика Public Health England (www.hpacultures.org.uk) по отношению к клеткам THP-1 указано: "Моноцитарный лейкоз человека. Получена из периферической крови мальчика в возрасте 1 года с острым моноцитарным лейкозом".

Среды и LPS.

Моноциты THP-1 выращивали в среде Мемориального Института Розуэлл Парка (RPMI) 1640 плюс 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). RPMI представляла собой стандартную среду, имеющуюся в продаже (RPMI 1640, ссылка 61870-010 от Gibco). FBS также была от Gibco.

Моноциты THP-1 дифференцировали в макрофаги путем добавления к среде роста 5 мг форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA, ссылка P8139 от SIGMA) до конечной концентрации 0,16 мкМ и инкубирования в течение приблизительно 72 ч.

Бактериальные штаммы выращивали в среде MRS. Это была стандартная имеющаяся в продаже среда Мана, Рогоза и Шарпа (MRS, Broth Oxoid ссылка CM0359).

THP-1 макрофаги стимулировали посредством LPS для индуцирования воспалительного ответа. Липополисахариды (LPS), также известные как липогликаны, представляют собой крупные молекулы, состоящие из липида и полисахарида, присоединенного ковалентной связью; они обнаруживаются на наружной мембране грамотрицательных бактерий, действуют в качестве эндотоксинов и вызывают сильные иммунные ответы у животных. LPS, используемый в данном исследовании, представлял собой стандартный липополисахарид, имеющийся в продаже (ссылка L4391 от Sigma).

Рост, инкубирования и измерение IL-10.

THP-1 макрофаги выращивали в среде RPMI 1640 плюс 10% FBS в 24-луночных планшетах для ELISA до конечной концентрации 10 макрофагов/лунка. Конечную концентрацию клеток вычисляли с использованием красителя трипанового синего и счетной камеры Нейбауэра.

THP-1 макрофаги инкубировали совместно с LPS (конечная концентрация 10 нг/мл) в течение 2,5 ч. Затем клетки промывали средой на основе забуференного фосфатом физиологического раствора Дульбекко (D-PBS, ссылка 14190-094 от Gibco). 500 мкл среды RPMI 1640 плюс 10% FBS добавляли в каждую лунку для ELISA.

Бактериальные штаммы предварительно выращивали в течение ночи в среде MRS при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Бактериальные штаммы, подходящим образом разбавленные до получения конечного соотношения 25:1 (2,5×10 КОЕ бактерий: 10 THP-1 макрофагов), добавляли в лунки. Концентрацию вычисляли с использованием счетной камеры Нейбауэра.

Затем THP-1 макрофаги инкубировали в течение 2,5 ч при 37°C в присутствии или в отсутствие (отрицательный контроль) бактериальных штаммов. Затем макрофаги промывали дважды средой D-PBS для удаления бактериальных штаммов. Затем добавляли среду RPMI 1640 плюс 10% FBS, дополненную гентамицином (50 мкг/мл), ампициллином (10 мкг/мл) и хлорамфениколом (12 мкг/мл), инкубировали при 37°C в атмосфере 5-7% CO₂ и аликвоты отбирали через 5 и через 24 ч.

Аликвоты центрифугировали и супернатанты анализировали на предмет IL-10 посредством точной цитометрии с использованием имеющегося в продаже набора Human IL-10 Flex Set (Bead B7 но-

мер по каталогу 558274 от BD Biosciencies), следуя инструкциям производителя.

Вычисления.

Для интерпретации результатов не использовали абсолютные значения. Наиболее информативным значением является выделение цитокинов, в данном случае концентрация IL-10, выраженная в виде нормированного увеличения, при получении величин через 5 и через 24 ч. Оно отражает то, что происходит в пищеварительном тракте, и обеспечивает стандартное значение, дающее возможность поперечного сравнения между экспериментами. Нормированное увеличение вычисляют по формуле, где IL-10_{5ч} и IL-10_{24ч} представляют собой концентрацию IL-10 в пг/мл через 5 или через 24 ч соответственно:

$$(IL-10_{24ч} - IL-10_{5ч}) / IL-10_{5ч}$$

Результаты.

Чем выше значение, тем сильнее индуцирование IL-10. Как показано в табл. 1, LPS-индуцированные THP-1 макрофаги индуцировали образование IL-10 в присутствии бактериальных штаммов, где индуцирование IL-10 является особенно сильным в присутствии штамма СЕСТ 8330. Индуцирование, вызванное СЕСТ 8330, немного сильнее, чем вызванное *L.reuteri*.

Таблица 1

Нормированные увеличения IL-10 у LPS-индуцированных THP-1 макрофагов.

"Отрицательный контроль" соответствует THP-1 макрофагам, инкубированным в отсутствие бактериальных штаммов

	IL-10 _{5ч} в пг/мл	IL-10 _{24ч} в пг/мл	Нормированное увеличение
СЕСТ 8330	30,83	140,18	3,54
СЕСТ 7894	23,87	57,43	1,40
<i>L. reuteri</i>	30,31	122,17	3,03
Отрицательный контроль	27,56	43,24	0,56

Пример 2. Способность к антагонизму против кишечных бактерий.

Задача заключалась в оценивании способности бактериальных штаммов к антагонизму в отношении нежелательных членов видов, обычно часто встречающихся у младенцев с чрезмерным плачем.

Протокол, используемый для выявления и оценивания этих способностей, известен как протокол Кэмпбелла. Эта методика вовлекает инкубирование бактерий для антагонизма в чашках Петри с цилиндрическими сегментами конфлюэнтной агаровой среды, равномерно засеянной пробиотическим штаммом. Измеряют ореол ингибирования роста вокруг цилиндрического сегмента.

Среда.

Патогенные штаммы выращивали в среде Oxoid. Это была стандартная имеющаяся в продаже среда Oxoid (Oxoid CM0359).

Инкубирование и измерение.

Патогенные штаммы распределяли равномерно в чашках, содержащих среду Oxoid, и выращивали до конфлюэнтности в CO₂-инкубаторе при подходящих для роста каждого патогена температурах и % CO₂. Затем два цилиндрических сегмента конфлюэнтной агаровой среды, равномерно засеянной пробиотическими штаммами, подлежащими тестированию, диаметром 6 мм, приводили в контакт с засеянной патогеном средой, ростовой стороной одного цилиндрического сегмента и неростовой стороной другого цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде и инкубируют в течение ночи при 37°C.

Вычисления.

На следующий день измеряли зоны ингибирования посредством размещения чашки с агаром на плоской линейке. Затем вычисляли рост ингибирующей активности (GI) посредством вычитания диаметра цилиндра (CD) из диаметра зоны ингибирования (IZD), измеренных в сантиметрах, и деления этой разности на 2 согласно формуле $GI = (IZD - CD)/2$. Ингибирующие способности штаммов по изобретению сравнивали с ингибирующей способностью имеющегося в продаже штамма *L.reuteri*. Конечную ингибирующую активность вычисляли в виде среднего значения величин GI для двух упоминаемых выше цилиндрических сегментов для каждого штамма.

Результаты.

Таблица 2

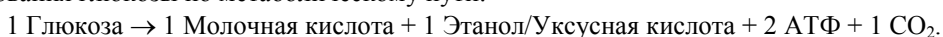
Рост ингибирующей активности (GI) пробиотических штаммов.
Результаты выражены в сантиметрах; "н.п." означает отсутствие ингибирования

Патогенный штамм	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CECT 8330	<i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7894	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Грамотрицательные бактерии			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10538	0,30	больше 0,6	н.п.
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC13048	0,08	больше 0,6	0,08
<i>Klebsiella oxytoca</i> KT 801	0,54	больше 0,6	0,13
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	0,21	больше 0,6	н.п.
Грамположительные бактерии			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,35	больше 0,6	0,08
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	0,25	0,29	0,38

Штаммы демонстрировали ингибирующую активность против всего исследованного спектра патогенов. Следовательно, штаммы эффективно ингибировали не только грамположительные, но также и грамотрицательные бактерии. Этого не было в случае *L.reuteri*, которая неэффективно ингибировала рост *E.coli* и *B.vulgatus*. Это вызывает большой интерес, так как аномальные количества бактерий, таких как *E.coli*, обычно присутствуют у младенцев, имеющих чрезмерный плач (De Weerth, C. et al., 2013 supra; Lehtonen, L. et al. "Intestinal Microflora in colicky and noncolicky infants: Bacterial Cultures and Gas-Liquid Chromatography", Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1994, vol. 19, p. 310-314). Также заслуживает внимания то, что в общем случае CECT 8330 и особенно CECT 7894 более эффективно ингибировали рост почти всех патогенных бактерий по сравнению с *L.reuteri*. Кроме того, необходимо также отметить, что оба штамма по изобретению обеспечивают защиту против *Klebsiella* и *Clostridium*, которые также являются часто встречающимися в кишечнике младенцев, имеющих чрезмерный плач (De Weerth, C. et al. 2013 supra; Lehtonen, L. et al. 1994 supra).

Пример 3. Отсутствие продуцирования газа.

Гетероферментативные бактерии продуцируют CO₂ и этанол, а также молочную кислоту путем ферментирования глюкозы по метаболическому пути:



Определяли продуцирование CO₂ штаммами. Как показано в формуле, продуцирование CO₂ также предоставляет информацию о продуцировании этанола. Продуцирование CO₂ определяли, используя способ с трубками Дархема, который основан на инкубировании пробиотического штамма в бульоне для гетероферментации в трубках, содержащих внутри меньшие и перевернутые трубки, где накапливается газ, когда он продуцируется (Pilone, G.J., et al., "Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine", Am. J. Enol. Vitic. 1991, vol. 42, p. 153-157).

Штаммы CECT 8330 и CECT 7894 не продуцировали газ. *L.reuteri*, используемая в качестве контроля, продуцировала газ.

Пример 4. Анализы токсичности.

В отличие от бактерий из рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, *Pediococcus pentosaceus* обычно не применяют в качестве пробиотика для потребления человеком. Таким образом, хотя пробиотический штамм CECT 8330 по настоящему изобретению принадлежит к виду, который имеет статус QPS, проводили дополнительные анализы токсичности, чтобы избежать любых факторов опасности.

Принимая во внимание высокую чувствительность малышей из-за недоразвития их пищеварительного тракта, было решено разработать более подходящую модель острой токсичности с использованием новорожденных крыс Wistar Han IGS CrI:WI (10 суток после рождения с диапазоном массы тела в начале эксперимента 18-23 г), чтобы гарантировать полную безопасность штаммов для младенцев.

Беременных самок получали в 19-е сутки беременности. После рождения приплоды регулировали до 4 самцов и 4 самок, смешивая крысят от всех матерей, чтобы избежать материнских эффектов и получить приплоды равного размера. Каждую лактирующую самку помещали с 4 самцами и 4 самками. Лактирующих самок кормили кормом SAFE A03 и водой неограниченно.

Методика эксперимента включала 4 группы: носитель - транслокация, носитель - клинические симптомы, СЕСТ 8330 - транслокация и СЕСТ 8330 - клинические симптомы.

Каждая группа содержала клетку с лактирующей самкой и приплод из 4 самцов и 4 самок. Продукт СЕСТ 8330 готовили ежедневно в конечной концентрации $0,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл композиции. Группа "носитель" получала воду вместо пробиотика. Всем новорожденным крысам вводили для лечения носитель или СЕСТ 8330 в течение 5 суток (с 0 до 4 суток исследования) посредством орогастрального катетера в фиксированном объеме 5 мл/кг ($2,5 \times 10$ КОЕ/кг в случае СЕСТ 8330). Пероральный путь выбирали для исследования, так как он представляет собой предполагаемый путь введения людям.

Наблюдения во время эксперимента: заболеваемость/смертность; масса тела; клинические симптомы (внешний вид крысенка, включая гидратацию и состояние тела; реакция на раздражитель; естественная активность - способность извиваться и, если положить на спину, - и цвет кожи).

Животных подвергали эвтаназии после двух разных периодов времени:

группы "транслокации" подвергали эвтаназии в 4 сутки эксперимента (последние сутки 5-дневного лечения);

группы "клинических симптомов" подвергали эвтаназии в 11-е сутки исследования (через одну неделю после последнего перорального приема).

Крысят подвергали эвтаназии путем обезглавливания и выполняли вскрытие трупов, включая осмотр интактного животного и всех его поверхностных тканей, с последующим внутренним осмотром торакальной и абдоминальной полостей. От животных, принадлежащих группе "транслокации", непосредственно после эвтаназии забирали печень и сохраняли при $2-4^{\circ}\text{C}$ до анализа бактериальной транслокации. Приблизительно 5 мг каждого образца печени гомогенизировали в 1 мл 0,01% желатина в PBS. 100 мкл этого гомогената высевали либо на чашки с McConkey, либо на чашки с MRS. Колонии подсчитывали после инкубирования при 37°C в течение 48 ч.

Во время исследования не наблюдали спонтанной смертности или связанных с токсичностью клинических симптомов. Не обнаружили различий в массах тел между контролем (носитель) и СЕСТ 8330, и поведение всех животных было нормальным. Кроме того, не наблюдали различий между контролем и группами СЕСТ 8330 по количеству животных, демонстрирующих транслокацию либо молочнокислых бактерий, либо энтеробактерий в печени.

Пример 5. Выделение штаммов.

Свежий стул собирали у детей в возрасте 0-9 лет и растворяли в буфере PBS (pH 7,4), отбирали аликваты и засевали на MRS, дополненную разными комбинациями антибиотиков. Штаммы культивировали в микроаэрофильных условиях (5% CO_2) при 37 или 30°C . Время инкубирования зависело от скорости роста, но обычно длилось от 24 ч до 3 суток. Окрашивание по Граму выполняли для получения первой идентификации. После выращивания выделенные штаммы хранили при лиофилизации в PBS $0,1 \times$ с 15% обезжиренным молочным порошком. Штаммы выращивали на чашках с агаровой средой MRS, дополненной 10 мкг/мл ванкомицина. Микроскопическое исследование выявило, что *Bifidobacterium longum* СЕСТ 7894 являются грамположительными бациллами, а *Pedococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 представляют собой грамположительные кокки.

Идентификацию рода и вида выполняли путем амплифицирования гена 16S рПНК (рибосомальная ПНК), как описано ранее (Bosch, M. et al., Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 7315 and СЕСТ 7316 isolated from faeces of healthy children. Lett App. Microbiol., 2012, vol. 54, p. 240-6). SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности 16S рПНК *Pedococcus pentosaceus* СЕСТ 8330, и SEQ ID NO: 2 соответствует последовательности 16S рПНК *Bifidobacterium longum* СЕСТ 7894.

Генотипирование штаммов выполняли посредством расщепления генома и гель-электрофореза в пульсирующем поле (PFGE).

Pedococcus pentosaceus СЕСТ 8330 подвергали ранее описанному протоколу (Rodas, A.M., et al., Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. Int J. Syst. Evol. Microbiol., 2005, 55(1), p. 197-207) с незначительными модификациями. Так как имеющиеся в продаже штаммы *Pedococcus pentosaceus* не были доступны для применения в качестве контролей, в анализ включали два имеющихся в продаже штамма *Pedococcus acidilactici* (1 и 2 на фиг. 1). Штаммы выращивали на чашках с агаровой MRS и инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 18 ч. Клетки собирали и промывали 3 раза в 8 мл PET (10 мМ Трис pH 7,6, 1 М NaCl), затем центрифугировали 10 мин со скоростью 6000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 700 мл буфера для лизиса (6 мМ Трис, 1 М NaCl, 0,1 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0,5% SLS, 0,2% дезоксихолиновая кислота; 1 мг/мл лизоцим; 40 Ед/мл мутанолизин; 20 мг/мл РНКазы). Эквивалентный объем 1,6% агарозы с низкой точкой плавления (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) добавляли к ресуспендированным клеткам и оставляли отвердевать при 4°C в течение 1 ч. Вставки переносили в 2 мл буфера для лизиса II (0,5 М EDTA pH 9,2, 1% N-лаурил саркозин и 1 мг/мл проназа) и инкубировали при 50°C в течение 48 ч. Затем вставки промывали при комнатной температуре буфером TE (10 мМ Трис, 1 мМ EDTA pH 8,0). Полное расщепление ДНК выполняли отдельно посредством рестрикционных ферментов Sma-I и Not-I (Roche Diagnostics). Гель-электрофорез в пульсирующем поле выполняли, используя прибор CHEF DRIII (BioRad Laboratories).

Вставки загружали в 1% агарозный гель (агароза SeaKem ME, FMC BioProducts, ME, USA). В табл. 3 описаны условия электрофореза для каждого фермента. Маркеры молекулярной массы ДНК представляли собой маркер Lambda ladder PFG и маркер Low Range PFG (New England Biolabs). После электрофореза гели окрашивали бромидом этидия и УФ с использованием GelDoc System (BioRad).

Таблица 3

Условия для электрофореза

Фермент	Блок	Начальный импульс (сек)	Конечный импульс (сек)	Время (часы)
<i>Not-I</i>	1	2	25	18
<i>Sma-I</i>	1	0,5	5	16

Bifidobacterium longum CECT 7894 характеризовали посредством PFGE (градиентного электрофореза в пульсирующем поле), используя *Xba I* и *Spe I* в качестве рестрикционных ферментов, как описано в Briczinski, E.P. et al. "Technical note: a rapid в pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria" J. Dairy Sci. 2006, vol. 89, p. 2424-2427. Полученные паттерны сравнивали с паттернами для *B. longum* CECT 4551.

Результаты изображены на фиг. 1 и 2. Паттерны рестрикции *Not-I* и *Sma-I* при гель-электрофорезе в пульсирующем поле были разными для штамма *Pediosoccus pentosaceus* CECT 8330 и имеющих в продаже контрольных штаммов, принадлежащих к видам *Pediosoccus acidilactici* (1 и 2). Включение штаммов *Pediosoccus pentosaceus* в качестве контролей не было возможным, так как они не имелись в продаже. PFGE позволяет различать штаммы одного и того же вида и, таким образом, может быть использован для того, чтобы однозначно идентифицировать данный бактериальный штамм в рамках бактериального вида (Rodas, A.M., et al. 2005 supra).

Пример 6. Получение масляной суспензии.

400 мл подсолнечного масла вносили в емкость, снабженную средствами для перемешивания. Медленно добавляли при перемешивании (150 об/мин) 9,5 г коллоидного диоксида кремния, чтобы избежать образования комков и агломератов, до полной гомогенизации. 13,3 г *Pediosoccus pentosaceus* CECT 8330, содержащие 5×10^{12} КОЕ, добавляли в емкость при медленном перемешивании (50 об/мин) до полного диспергирования. Затем в емкость добавляли 42,75 г *Bifidobacterium longum* CECT 7894, содержащего 5×10^{12} КОЕ при медленном перемешивании (50 об/мин) до полного диспергирования. Наконец, в суспензию добавляли подсолнечное масло вплоть до 1000 мл и перемешивали до гомогенизации конечной суспензии. Суспензию хранили при комнатной температуре.

Пример 7. Клиническое исследование.

Дизайн исследования.

Пилотное клиническое испытание проводили для оценивания эффективности и безопасности пробиотической смеси, содержащей *P.pentosaceus* CECT 8330 и *B.longum* CECT 7894. Исследование планировали как проспективное двойное слепое плацебо-контролируемое рандомизированное клиническое испытание с двумя параллельными группами, которое вовлекало суммарное количество 8 участвующих центров из Каталонии (Spain). Протокол исследования был утвержден Комиссией по этике от IDIAP Jordi Gol (Barcelona, Spain) и от Fundacio Unio Catalana d'Hospitals (Barcelona, Spain) в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Привлекали к участию родившихся в срок здоровых младенцев обоих полов, соответствующих всем следующим критериям включения: возраст от 21 до 120 суток; минимальный вес при рождении 2,5 кг; либо естественно вскармливаемый, либо питающийся детской смесью (гидролизованной или иницирующей смесью); чрезмерный плач и беспокойство в соответствии с определением "сильный, постоянный и безутешный плач, проблематичный для нормального функционирования семьи, что означает по меньшей мере 60 мин в сутки за 3 или более эпизодов, наблюдаемый в течение по меньшей мере 1 недели, при предварительном исключении органической этиологии, подобной непроходимости кишечника или другому". Критерии исключения представляли собой следующие: преждевременно родившиеся младенцы (роды раньше 37 недель); хроническое заболевание; расстройство желудочно-кишечного тракта в анамнезе (не связанные с коликами); младенцы с ослабленным иммунитетом; перенесенное или ожидаемое хирургическое вмешательство; прием пробиотиков или антибиотиков за одну неделю до включения в исследование; младенцы, чьи родители или представители были неспособны соответствующим образом следовать требованиям исследования. Субъектов случайным образом распределяли либо в группу лечения пробиотиком, либо в группу плацебо. Лечение состояло из композиции, как описано в примере 6. Плацебо состояло из той же самой масляной суспензии без пробиотика. Композиции вводили за 30 мин до кормления (5 капель/сутки) в течение 14 суток. Во время исследования родителей просили заполнять анкеты, записывая приверженность к лечению, изменения плача и неблагоприятные эффекты.

Анализ данных выполняли с IBM® SPSS Statistic v20 для Windows и результаты выражали в виде средних значений и стандартных ошибок. Среднее ослабление суточной продолжительности плача во

время клинического испытания вычисляли в виде разности между средним суммарным количеством минут плача в сутки во время последних 3 суток исследования (сутки 12, 13 и 14) и средним суммарным количеством минут в сутки во время первых 3 суток исследования (сутки 1, 2 и 3). Среднее ослабление продолжительности каждого эпизода вычисляли в виде разности между средним количеством минут продолжительности каждого эпизода во время последних 3 суток исследования (сутки 12, 13 и 14) и средним количеством минут продолжительности каждого эпизода во время первых 3 суток исследования (сутки 1, 2 и 3).

Результаты.

В начале клинического испытания подтверждали, что *n*, равное 9 младенцев, принадлежащих к группе плацебо, и *n*, равное 11 младенцев, принадлежащих к группе пробиотической смеси, соответствовали предложенному определению продолжительности плача и поэтому оставались для продолжения исследования. Средняя продолжительность плача данной популяции в начале исследования варьировала от 60 до 240 мин. Во время исследования и плацебо, и смесь с пробиотиком переносились хорошо и не наблюдалось неблагоприятных эффектов, связанных с введением. Кроме того, как показано на фиг. 3, во время исследования продолжительность плача снижалась как в группе плацебо, так и в группе пробиотика. Однако потребление пробиотика вызывало более сильное снижение средней продолжительности плача. Аналогичную тенденцию наблюдали для продолжительности каждого эпизода.

Наблюдаемый клинический эффект свидетельствует в пользу пробиотических свойств, наблюдаемых *in vitro*. Такие результаты представляют определенный интерес, так как это исследование имеет несколько преимуществ по сравнению с другими исследованиями, где пробиотики применяли для лечения колик. Например, исследование включало младенцев как естественно вскармливаемых, так и питающихся детской смесью, что представляет определенный интерес, так как современным пробиотическим смесям не удалось показать никакого улучшения в субпопуляциях, питающихся детской смесью. Кроме того, младенцев привлекали к участию на основе более реалистичного клинического определения младенческих колик согласно суточной клинической практике, и период лечения (14 суток) был короче периода лечения многих других клинических испытаний (21-28 суток).

Библиографические ссылки.

Andreoletti, O. et al. "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006", The EFSA Journal 2008, vol. 923, p. 1-48.

Bosch, M. et al., "Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children", Lett. App. Microbiol., 2012, 54, 240-6.

Briczinski, E.P. et al. "Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of *bifidobacteria*", J. Dairy Sci. 2006, vol. 89, p. 2424-2427.

De Weerth, C. et al. "Intestinal Microbiota of Infants with colic: Development and specific signatures" Pediatrics 2013, vol. 131, Issue 2, e550-e558.

Dupont, C. et al. "A-Lactalbumin-Enriched and Probiotic-Supplemented Infant Formula in Infants with Colic: Growth and Gastrointestinal Tolerance", European Journal of Clinical Nutrition. 2010, vol. 64, Issue 7, p. 765-767.

Igarashi T. "Study of the relationship between changes in lactic acid bacterial cell components and stimulation of IL-12 production under salt-stressed conditions", Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 2010, vol. 74, p. 2171-2175.

Jonganurakkun, B. et al. "*Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use", Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, vol. 106, Issue 1, p. 69-73.

Lehtonen, L. et al. "Intestinal Microflora in colicky and noncolicky infants: Bacterial Cultures and Gas-Liquid Chromatography", Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1994, vol. 19, p. 310-314.

Mentula, S. et al. "Microbial composition and fecal fermentation end products from colicky infants - A probiotic supplementation pilot", Microbial Ecology in Health and Disease, 2008, vol. 20, no. 1, p. 37-47.

Roos, S. et al. "454 Pyrosequencing Analysis on Faecal Samples from a Randomized DBPC Trial of Colicky Infants Treated with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938", PLoS ONE, 2013, vol. 8, no. 2, e56710 1-5.

Savino, F. et al. "*Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) Versus Simethicone in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study", Pediatrics, 2007, vol. 119, Issue, e124-e130.

Savino, F. et al. "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", Pediatrics, 2010, vol. 126, Issue 3, e526-e533.

Szajewska, H. et al. "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", Journal of Pediatrics, 2012, vol. 162, Issue 2, p. 257-262.

Vitali, B. et al. "Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables", Food Microbiology 2012, vol. 31, Issue 1, p. 116-125.

Pilone, G.J., et al., "Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine" Am J Enol Vitic 1991, vol. 42, p. 153-157.

WO 2007/142596.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Бактериальная композиция для снижения воспаления в кишечном тракте, содержащая от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г жизнеспособных клеток *Pediosoccus pentosaceus*, обладающих способностью индуцировать образование интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в способе, включающем следующие стадии:

а) обеспечение дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаги путем выращивания ТНР-1 моноцитов клеточной линии РНЕ88081201 в среде RPMI 1640 с 10% FBS и с фторбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА) до конечной концентрации 0,16 мкМ;

б) выращивание ТНР-1 макрофагов в среде RPMI 1640 с 10% FBS в 24-луночных планшетах для ELISA до конечной концентрации 10^6 макрофагов/лунка;

в) инкубирование в течение 2,5 ч ТНР-1 макрофагов с липополисахаридом (LPS) в конечной концентрации 10 нг/мл и промывание ТНР-1 макрофагов средой на основе D-PBS;

г) приготовление культуры клеток *Pediosoccus pentosaceus* посредством выращивания их в течение ночи в среде MRS при 37°C в атмосфере с 5% CO₂;

д) добавление в лунки для ELISA 500 мкл среды RPMI 1640 с 10% FBS и подходящего количества разведения клеток *Pediosoccus pentosaceus* для получения конечного соотношения 25:1 ($2,5 \times 10^7$ КОЕ клеток *Pediosoccus pentosaceus*: 10^6 ТНР-1 макрофагов);

е) инкубирование ТНР-1 макрофагов с клетками *Pediosoccus pentosaceus* в течение 2,5 ч при 37°C, а также без клеток *Pediosoccus pentosaceus* в таких же условиях в качестве отрицательного контроля;

ж) промывание ТНР-1 макрофагов средой D-PBS для удаления клеток *Pediosoccus pentosaceus*, затем добавление к ТНР-1 макрофагам среды RPMI 1640 с 10% FBS, дополненной 50 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл ампициллина и 12 мкг/мл хлорамфеникола, инкубирование при 37°C при 5-7% CO₂ и отбор аликвот через 5 и через 24 ч;

з) центрифугирование аликвот и анализ супернатантов посредством проточной цитометрии для количественного определения интерлейкина-10;

и) вычисление нормированного увеличения концентрации интерлейкина-10 по формуле $(IL-10_{24ч} - IL-10_{5ч})/IL-10_{5ч}$, где $IL-10_{5ч}$ и $IL-10_{24ч}$ представляют собой концентрацию интерлейкина-10 через 5 и через 24 ч соответственно.

2. Бактериальная композиция по п.1, где продукция интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в присутствии клеток *Pediosoccus pentosaceus*, выраженная в виде нормированного увеличения, по меньшей мере в 2 раза больше продукции интерлейкина-10 ТНР-1 макрофагами в отсутствие клеток *Pediosoccus pentosaceus*.

3. Бактериальная композиция по любому из пп.1, 2, где клетки *Pediosoccus pentosaceus* обладают способностью к антагонизму в отношении грамположительных и грамотрицательных кишечных бактерий, причем способность к антагонизму определена посредством следующих стадий:

1) равномерное распределение патогенных штаммов в чашках, содержащих среду Oxoid, и выращивание до конфлюэнтности в CO₂-инкубаторе при подходящих для роста каждого патогена температурах и % CO₂;

2) приведение двух цилиндрических сегментов конфлюэнтной агаровой среды, равномерно засеянной клетками *Pediosoccus pentosaceus*, диаметром 6 мм в контакт с засеянной патогеном средой, при расположении как (а) ростовой стороны одного цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде, так и (б) неростовой стороны другого цилиндрического сегмента вплотную к засеянной патогеном среде; и инкубирование в течение ночи при 37°C;

3) измерение на следующий день зон ингибирования посредством размещения чашки с агаром на плоской линейке;

4) вычисление ингибирующей рост активности (GI) посредством вычитания диаметра цилиндра (CD) из диаметра зоны ингибирования (IZD), измеренных в сантиметрах, и деления этой разности на 2 по формуле

$$GI = (IZD - CD)/2.$$

4. Бактериальная композиция по п.3, где грамположительные бактерии включают бактерии, выбранные из *Clostridium difficile* и *Enterococcus faecalis*.

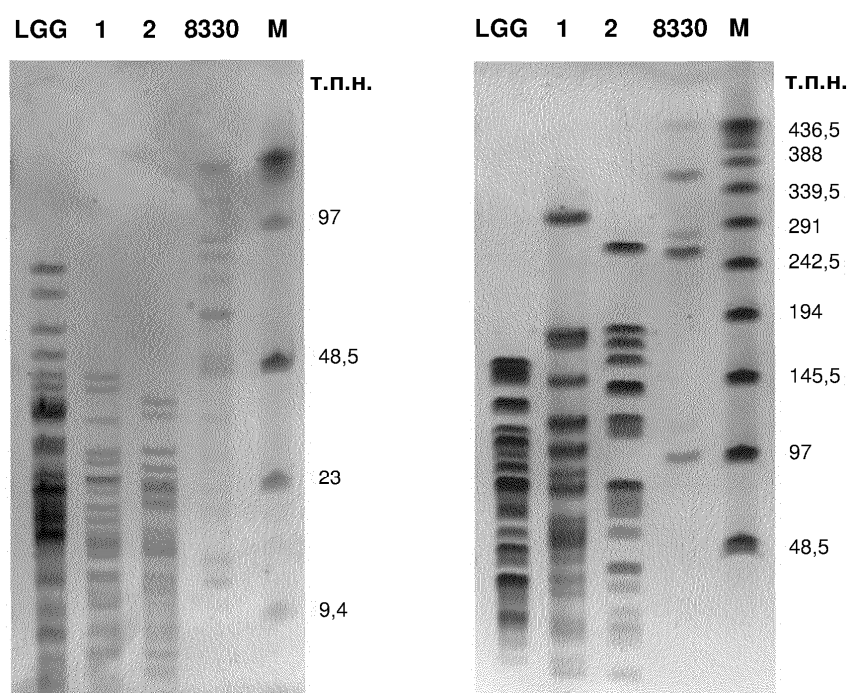
5. Бактериальная композиция по п.3, где грамотрицательные бактерии включают бактерии, выбранные из *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*.

6. Бактериальная композиция по п.3, где клетки *Pediosoccus pentosaceus* обладают способностью к антагонизму в отношении *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* и *Bacteroides vulgatus*.

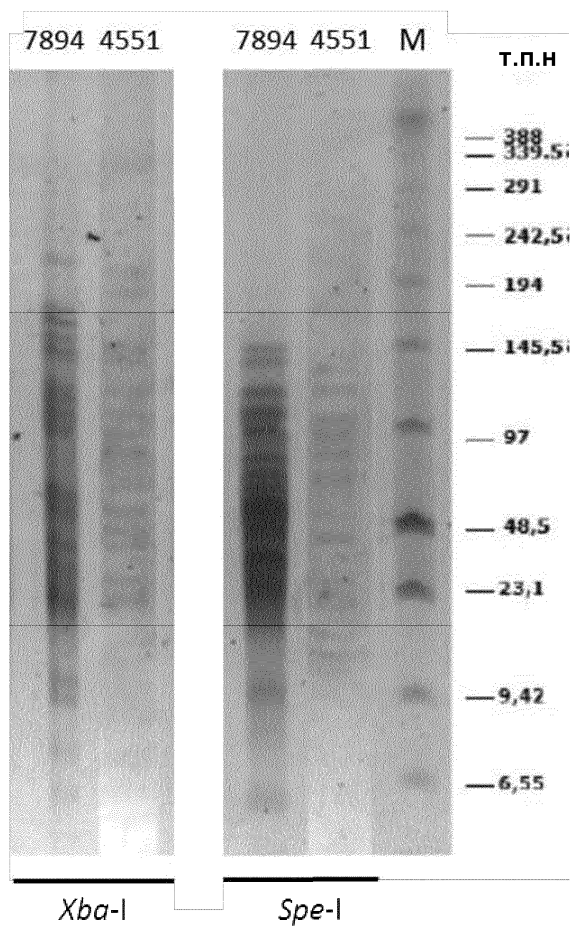
7. Бактериальная композиция по любому из пп.1-6, где *Pediosoccus pentosaceus* представляет собой *Pediosoccus pentosaceus* СЕСТ 8330.

8. Бактериальная композиция по любому из пп.1-7, дополнительно содержащая от 10^4 до 10^{12} КОЕ/г клеток *Bifidobacterium longum* СЕСТ 7894.

9. Применение бактериальной композиции по любому из пп.1-8 в уменьшении интенсивности плача у младенцев.



Фиг. 1



Фиг. 2

