

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036958**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.20

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 9/19 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990275

(22) Дата подачи заявки
2017.07.13

(54) КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ BLAUTIA, ДЛЯ СНИЖЕНИЯ УРОВНЯ ПАТОГЕННЫХ ENTEROBACTERIACEAE В ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОМ ТРАКТЕ

(31) 1612190.7; 1616018.6; 1616016.0;
1703548.6; 1703552.8
(32) 2016.07.13; 2016.09.20; 2016.09.20;
2017.03.06; 2017.03.06

(56) US-A1-2016184370
US-A1-2010247489
WO-A1-2012142605
WO-A1-0207741
WO-A1-0185187
WO-A1-2016057671

(33) GB

(43) 2019.05.31

(86) PCT/GB2017/052076

(87) WO 2018/011593 2018.01.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
4Д ФАРМА ПиЭлСи (GB)

C. LIU ET AL.: "Reclassification of Clostridium coccoides, Ruminococcus hansenii, Ruminococcus hydrogenotrophicus, Ruminococcus luti, Ruminococcus productus and Ruminococcus schinkii as Blautia coccoides gen. nov., comb. nov., Blautia hansenii comb. nov., Blautia hydrogenotrophica comb. nov., Blautia luti comb. nov", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 1896-1902, XP055005236, ISSN: 1466-5026, DOI:10.1099/ijs.0.65208-0, the whole document

(72) Изобретатель:
Крузе Лорен, Абузи Клоэ, Берналье-Донадий Анник (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение предусматривает применение фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм рода Blautia, имеющий последовательность гена 16s рРНК, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, для снижения уровня патогенных Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте пациента.

B1

036958

036958 B1

Область техники

Данное изобретение относится к области композиций, содержащих бактериальные штаммы, выделенные из пищеварительного тракта млекопитающих, и использованию таких композиций для лечения болезни.

Известный уровень техники

Считается, что кишечник человека *in utero* является стерильным, но сразу после рождения он подвергается воздействию большого количества микроорганизмов от матери и из окружающей среды. После этого происходит динамический период микробной колонизации и сукцессии, зависящий от таких факторов как способ родов, окружающая среда, питание и генотип хозяина, которые коллективно влияют на состав микробиоты кишечника, особенно в ранний период жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится схожей с микробиотой взрослых людей [1]. Микробиота кишечника человека содержит более 1500 разных филотипов, среди которых количественно доминируют два основных бактериальных типа (филума) - *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [2-3]. Успешные симбиотические отношения, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к развитию широкого спектра метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает разложение иначе трудноперевариваемых компонентов пищи с образованием побочных продуктов, являющихся важным источником питательных веществ для хозяина и обеспечивающих дополнительные полезные эффекты для здоровья. Схожим образом иммунологическая важность микробиоты кишечника является общепризнанной и была подтверждена на примере безмикробных животных, имеющих расстройства иммунной системы, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [4-6].

Значительные изменения состава микробиоты были задокументированы при желудочно-кишечных расстройствах, таких как воспалительная болезнь кишечника (ВБК). Например, уровни бактерий кластера XIVa *Clostridium* и кластера XI *Clostridium* (*F. prausnitzii*) у пациентов с ВБК понижены, в то время как численность *E. coli* увеличивается, что позволяет предположить сдвиг баланса между симбионтами и патобионтами в кишечнике [7-11].

В знак признания потенциального положительного эффекта, который определенные бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, различные штаммы были предложены для использования при лечении разных болезней (см., например, [12-15]). Ряд штаммов, включая преимущественно штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для использования при лечении различных кишечных расстройств (см. обзор [16]). Штаммы рода *Blautia* были также предложены для использования при модулировании бактериального баланса пищеварительной экосистемы у пациентов с СПК (WO 01/85187). Однако взаимосвязи между различными бактериальными штаммами и разными болезнями и точные эффекты конкретных бактериальных штаммов на кишечник и на системном уровне и на какие-либо конкретные типы болезней изучены плохо.

Существует потребность в изучении потенциальных эффектов кишечных бактерий с целью разработки новых методов лечения, использующих кишечные бактерии.

US 2010/0247489 описывает использование минеральных питательных веществ для лечения расстройств пищеварения. US '789 предлагает также возможное использование многочисленных разных родов бактерий, включая *Enterobacteriaceae*, для предотвращения и уменьшения образования газа в ободочной кишке, таким образом, этот документ предполагает, что увеличение численности *Enterobacteriaceae* spp. в желудочно-кишечном тракте может быть использовано для лечения определенных болезней. US '789 не описывает каких-либо способов снижения численности *Enterobacteriaceae* spp.

WO 2016/086206 предполагает, что бактерии порядка *Clostridiales*, включая *Enterobacteriaceae* spp., могут быть использованы для лечения или предотвращения дисбиоза. WO 2016/086206 не содержит ни предположения о том, что снижение уровня *Enterobacteriaceae* spp. в желудочно-кишечном тракте может быть использовано для лечения болезней, ни каких-либо предположений, каким образом может быть достигнуто снижение уровня *Enterobacteriaceae* spp.

WO 2012/142605 предполагает возможность лечения ряда разных болезней комбинацией микроорганизмов. WO '605 предлагает возможное использование большого числа бактериальных видов, но WO '605 не содержит описания того, каким образом какой-либо из предложенных бактериальных видов может быть использован для лечения какой-либо из указанных болезней.

Сущность изобретения

Авторы изобретения разработали новые терапии для лечения и предотвращения болезней, ассоциированных с *Enterobacteriaceae*, в частности *E. coli*. В частности, авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы из рода *Blautia* могут быть эффективными при снижении уровня *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, может снижать уровень *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте, включая *E. coli*, и может излечивать или предотвращать болезни, ассоциированные с *Enterobacteriaceae* или *E. coli*. Таким образом, в первом варианте реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе снижения уровня *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте.

В предпочтительных вариантах реализации всех аспектов изобретения Enterobacteriaceae представляют собой *E. coli*. В предпочтительных вариантах реализации всех аспектов изобретения бактериальный штамм принадлежит к *Blautia hydrogenotrophica* и предпочтительно представляет собой бактерию, депонированную с номером доступа DSM 10507/14294.

В предпочтительных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения болезни, ассоциированной с инфекцией Enterobacteriaceae, такой как инфекция *E. coli*. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении инфекции Enterobacteriaceae, такой как инфекция *E. coli*.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте, предпочтительно уровня *E. coli*, при лечении или предотвращении СРК, болезни Крона, язвенного колита, функциональной диспепсии, диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных.

Авторы изобретения разработали новые терапии для лечения и предотвращения диареи. В частности, авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы из рода *Blautia* могут эффективно уменьшать диарею. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, может уменьшать диарею у пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК).

В предпочтительных вариантах реализации изобретения, бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia hydrogenotrophica*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 5. Наиболее предпочтительно бактериальный штамм в композиции представляет собой штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia stercoris*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 1 или 3. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 3. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 3.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia wexlerae*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 2 или 4. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 4. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов по изобретению может эффективно снижать уровень Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте. Также пероральное введение удобно для пациентов и практикующих врачей и позволяет обеспечить доставку в и/или частичную или полную колонизацию кишечника.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению содержит бактериальный штамм, подвергнутый лиофилизации. Лيوфилизация представляет собой эффективную и удобную методику приготовления стабильных композиций, позволяющих обеспечить доставку бактерий, и продемонстрировала возможность получения эффективных композиций в примерах.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает пищевой продукт, содержащий композицию, описанную выше.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию вакцины, содержащей композицию, описанную выше.

Дополнительно изобретение предусматривает способ снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте и тем самым лечение или предотвращение болезней, ассоциированных с Enterobacteriaceae, включающий введения композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Измерение популяции ВН методом кПЦР (количественной ПЦР), показывающее увеличение численности ВН в дни 14 и 28 для крыс НМ1-СРК (инокулированных кишечной микробиотой человека, больного СРК), получавших лиофилизат ВН.

Фиг. 2. Исследования дозирования на крысах НМ (инокулированных кишечной микробиотой человека) - количественное определение *V. hydrogenotrophica* методом ОТ-ПЦР в образцах фекалий крыс НМ-здорового человека (инокулированных кишечной микробиотой здорового человека), получавших разные концентрации бактериальных видов.

Фиг. 3. Время пассажа *V. hydrogenotrophica* после перорального введения (10^9 /день) крысам НМ-здорового человека.

Фиг. 4. Сравнение уровней *V. hydrogenotrophica*, присутствующих в фекальных и цекальных образцах крыс НМ-здорового человека (количественное определение методом ОТ-ПЦР) после 14 дней введения - *V. hydrogenotrophica* вводят в количестве 10^{10} /день/крысу.

Фиг. 5. Эффект введения *V. hydrogenotrophica* на состав микробиоты в фекалиях крыс, ассоциированных с микробиотой здорового человека. Введение 10^{10} *V. hydrogenotrophica*/день в течение 14 дней (результаты для фекальной микробиоты от 2 здоровых людей (20 крыс НМ) - анализ методом кПЦР).

Фиг. 6. Влияние введения *V. hydrogenotrophica* на микробные популяции крыс НМ-СРК.

Фиг. 7a. Изменение уровней *Blautia hydrogenotrophica* в микробиоте пациента во время и после лечения с использованием *Blautix*.

Фиг. 7b. Изменение уровней *Enterobacteria* в микробиоте пациента во время и после лечения с использованием *Blautix*.

Фиг. 8. Результаты определения S_{max} методом дыхательного водородного теста для дня 1, дня 2, дня 15 и дня 16 для пациентов с СРК, получавших *Blautix* (фиг. 8a), и пациентов с СРК, получавших плацебо (фиг. 8b); фиг. 8c представляет собой график, сравнивающий процент получавших *Blautix* пациентов со снижением водорода между средним для дней 15 и 16 и средним для дней 1 и 2, с процентом пациентов со снижением водорода между этими моментами времени, получавших плацебо.

Фиг. 9a: парные данные нескорректированных и скорректированных дыхательных водородных тестов в день 1 и день 15 для пациентов с СРК, получавших *Blautix*; фиг. 9b: график, сравнивающий средние нескорректированные результаты дыхательного водородного теста в день 1 и день 15 для группы лечения с использованием *Blautix*; фиг. 9c: график, сравнивающий средние скорректированные результаты дыхательного водородного теста в день 1 и день 15 для группы лечения с использованием *Blautix*.

Фиг. 10a: парные данные нескорректированных и скорректированных дыхательных водородных тестов в день 1 и день 15 для пациентов с СРК, получавших плацебо; фиг. 10b: график, сравнивающий средние нескорректированные результаты дыхательного водородного теста в день 1 и день 15 для группы плацебо; фиг. 10c: график, сравнивающий средние скорректированные результаты дыхательного водородного теста в день 1 и день 15 для группы плацебо.

Фиг. 11. Графики, сравнивающие средние результаты дыхательного водородного теста в день 1 и день 15 для группы лечения с использованием *Blautix* (*Verum* (группа препарата с действующими веществами)) и группы плацебо (фиг. 11a: нескорректированный уровень водорода; фиг. 11b: скорректированный уровень водорода).

Фиг. 12. Оценка популяции *V. hydrogenotrophica* методом кПЦР в образцах фекалий крыс НМА-СРК (ассоциированных с микробиотой человека, больного СРК), получавших или не получавших композицию, содержащую *V. Hydrogenotrophica* (*BlautiX*), в течение 28 дней.

Фиг. 13. Подсчет бактерий в образцах фекалий крыс НМА-СРК после введения *V. hydrogenotrophica* (*BlautiX*) по сравнению с контрольным раствором.

Фиг. 14. Изменение симптомов пациентов на протяжении периода дозирования (дни 1-16) клинических испытаний фазы I.

Фиг. 15. Изменение симптомов пациентов на протяжении периода вымывания клинических испытаний фазы I.

Раскрытие изобретения

Бактериальные штаммы

Композиции по изобретению содержат бактериальный штамм рода *Blautia*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода являются пригодными для снижения уровня *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте, в частности *E. coli*. Предпочтительные бактериальные штаммы принадлежат к видам *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* и *Blautia wexlerae*. Другими предпочтительными бактериальными штаммами для использования по изобретению являются *Blautia producta*, *Blautia coccoides* и *Blautia hansenii*. Наиболее предпочтительными являются *Blautia hydrogenotrophica*, особенно бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294.

Примеры штаммов *Blautia* для использования по изобретению включают *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* и *B. wexlerae*. Виды *Blautia* представляют собой грампозитивные неподвижные бактерии, которые могут быть коккоподобными или овальными, и все являются облигатными анаэробами, продуцирующими уксусную кислоту

в качестве основного конечного продукта ферментации глюкозы [17]. *Blautia* могут быть выделены из кишечника человека, хотя *B. producta* был выделен из септического образца.

Blautia hydrogenotrophica (прежнее название *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) был выделен из кишечника млекопитающих, является строго анаэробным и метаболизирует H_2/CO_2 до ацетата, что может быть важно для питания и здоровья человека. Типовым штаммом *Blautia hydrogenotrophica* является S5a33=DSM 10507=JCM 14656. Генная последовательность 16S рНК штамма S5a36 *Blautia hydrogenotrophica* имеет номер доступа GenBank X95624.1 (приведена в данном документе как SEQ ID NO: 5). Этот типичный штамм *Blautia hydrogenotrophica* описан в [17] и [18]. Штамм S5a33 и штамм S5a36 соответствуют двум субклонам штамма, выделенного из образца фекалий здорового субъекта. Они демонстрируют одинаковую морфологию, физиологию и метаболизм и имеют идентичные последовательности 16s рНК. Таким образом, в некоторых вариантах реализации *Blautia hydrogenotrophica* для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294 была протестирована в примерах и также называется в данном документе штаммом ВН. Штамм ВН был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) 26 января 1996 г. как "*Ruminococcus hydrogenotrophicus*" с номером доступа DSMZ 10507, а также с номером доступа DSMZ 14294 как "S5a33" 14 мая 2001 г. Депозитарием была INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, France. Права владения на депонированные материалы перешли к 4D Pharma Plc путем переуступки.

Генная последовательность 16S рНК штамма GAM6-1^T *Blautia stercoris* имеет номер доступа GenBank HM626177 (приведена в данном документе как SEQ ID NO: 1). Типичный пример штамма *Blautia stercoris* описан в [19]. Типовым штаммом *Blautia wexlerae* является WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850 [17]. Генная последовательность 16S рНК штамма WAL 14507 T *Blautia wexlerae* имеет номер доступа GenBank EF036467 (приведена в данном документе как SEQ ID NO: 2). Этот типичный штамм *Blautia wexlerae* описан в [17].

Предпочтительным штаммом *Blautia stercoris* является штамм, депонированный с номером доступа NCIMB 42381, который также называется в данном документе штаммом 830. Последовательность 16s рНК штамма 830 представлена как SEQ ID NO: 3. Штамм 830 был депонирован в международном депозитории NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) фирмой GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 12 марта 2015 г. как "*Blautia stercoris* 830", и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. впоследствии изменила название на 4D Pharma Research Limited.

Предпочтительным штаммом *Blautia wexlerae* является штамм, депонированный с номером доступа NCIMB 42486, который также называется в данном документе штаммом MRX008. Последовательность 16s рНК штамма MRX008 представлена как SEQ ID NO: 4. Штамм MRX008 был депонирован в международном депозитории NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) фирмой 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 16 ноября 2015 г. как "*Blautia/Ruminococcus MRx0008*", и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42486.

Ожидается, что бактериальные штаммы, близкородственные со штаммом, протестированным в примерах, также будут эффективно снижать уровень Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте, в частности *E. coli*. В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*.

Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 5.

В определенных вариантах реализации, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 3. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 4. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 4.

Бактериальные штаммы, являющиеся биотипами бактерии, депонированной с номером доступа

DSM 10507/14294, или биотипами бактерий, депонированных с номерами доступа NCIMB 42381 и NCIMB 42486, как ожидается, также будут эффективно снижать уровень Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте, в частности *E. coli*. Биотип представляет собой близкородственный штамм, имеющий такие же или очень схожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и являющиеся пригодными для использования по изобретению, могут быть идентифицированы путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. Например, может быть секвенирован по существу полный геном, и штамм биотипа для использования по изобретению может иметь по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей по меньшей мере в 80% его полного генома (например, по меньшей мере в 85, 90, 95 или 99% или в его полном геноме). Например, в некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательностей по меньшей мере в 98% его генома или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей в 99% его генома. Другие пригодные последовательности для использования при идентификации штаммов биотипа могут включать hsp60 или повторные последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)_s, или REP или [20]. Штаммы биотипа могут иметь последовательности по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного как DSM 10507/14294, и содержит последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет последовательность по меньшей мере с 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного как DSM 10507/14294, и имеет последовательность 16s рНК в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Альтернативно штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и являющиеся пригодными для использования по изобретению могут быть идентифицированы путем использования депозита с номером доступа DSM 10507/14294, депозита с номером доступа NCIMB 42381 или депозита с номером доступа NCIMB 42486 и проведения анализа рестрикционных фрагментов и/или анализа ПЦР, например методами флуоресцентного анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (FAFLP) и фингерпринтинга с использованием ПЦР амплификации повторяющихся последовательностей межгенных палиндромов (repetitive DNA element (rep)-PCR fingerprinting), или белкового профилирования, или частичного секвенирования рДНК 16S или 23s. В предпочтительных вариантах реализации такие методики могут быть использованы для идентификации других штаммов *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* или *Blautia wexlerae*.

В определенных вариантах реализации штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и пригодные для использования по изобретению, являются штаммами, обеспечивающими такие же характеристики (pattern), как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, при проведении анализа методом рестрикционного анализа амплифицированных рибосомальных ДНК (ARDRA), например с использованием рестрикционного фермента *Sau3AI* (примеры методов и руководство приведены, например, в [21]). Альтернативно штаммы биотипа идентифицируются как штаммы, имеющие такой же характер ферментации углеводов, как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486.

Другие штаммы *Blautia*, пригодные для использования в композициях и способах по изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть идентифицированы с использованием любого пригодного способа или стратегии, включая анализы, описанные в примерах. Например, штаммы для использования по изобретению могут быть идентифицированы путем культивации бактерий и введения крысам для тестирования методом анализа растяжения (distension assay). В частности, бактериальные штаммы, имеющие схожие характеристики роста, тип метаболизма и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть пригодными для использования по изобретению. Полезный штамм будет иметь сопоставимую модулирующую активность микробиоты со штаммом DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В частности, штамм биотипа будет вызывать эффекты воздействия на Enterobacteriaceae, сопоставимые эффектами, продемонстрированными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивации и введения, описанных в примерах.

Особенно предпочтительным штаммом по изобретению является штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294. Он является типичным штаммом ВН, который

был использован для тестирования в примерах и продемонстрировал эффективное снижение уровня *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте, в частности *E. coli*. Таким образом, изобретение предусматривает клетку, такую как выделенная клетка, штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, или ее производную для использования в терапии, в частности при болезнях, описанных в данном документе.

Производными штамма, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть дочерний штамм (потомство) или штамм, выращенный (субклонированный) из исходного. Производный штамм по изобретению может быть модифицирован, например, на генетическом уровне, без потери биологической активности. В частности, производный штамм по изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь модулирующую активность микробиоты, сопоставимую с исходным штаммом DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В частности, производный штамм будет вызывать эффекты воздействия на *Enterobacteriaceae*, сопоставимые с эффектами, продемонстрированными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивации и введения, описанных в примерах. Производное DSM 10507/14294 будет обычно биотипом штамма DSM 10507/14294. Производное NCIMB 42381 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42381. Производное NCIMB 42486 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42486.

Ссылки на клетки штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа DSM 10507/14294, и такие клетки входят в объем изобретения. Ссылки на клетки штамма *Blautia stercoris*, депонированного с номером доступа NCIMB 42381, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа NCIMB 42381, и такие клетки входят в объем изобретения. Ссылки на клетки штамма *Blautia wexlerae*, депонированного с номером доступа NCIMB 42486, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа NCIMB 42486, и такие клетки входят в объем изобретения.

В предпочтительных вариантах реализации бактериальные штаммы в композициях по изобретению являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник.

Терапевтическое применение

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровня *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте. Повышенные уровни *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте ассоциированы с многочисленными патологическими состояниями и болезнями, и примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут эффективно снижать уровень *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте.

В предпочтительных вариантах реализации всех аспектов изобретения *Enterobacteriaceae* представляет собой *E. coli*.

Таким образом, предпочтительно композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровня *E. coli* в желудочно-кишечном тракте.

В определенных вариантах реализации, *Enterobacteriaceae* представляет собой патогенный штамм, такой как *E. coli* O157:H7, O104:H4, O121, O26, O103, O111, O145, O104:H21 или O104:H4.

В альтернативных вариантах реализации *Enterobacteriaceae* является комменсальным или непатогенным штаммом. Повышенные уровни таких *Enterobacteriaceae* могут способствовать таким состояниям, как СРК и болезнь Крона, и примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут оказывать эффект уменьшения численности *Enterobacteriaceae* в контексте СРК.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении болезни, ассоциированной с инфекцией *Enterobacteriaceae*, такой как инфекция *E. coli*. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных. В таких вариантах реализации *Enterobacteriaceae* может быть патогенным штаммом.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении болезни, ассоциированной с повышенными уровнями *Enterobacteriaceae*, таких как *E. coli*. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных. В таких вариантах реализации *Enterobacteriaceae* может быть комменсальным или непатогенным штаммом.

В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или состояния поражает кишечник. В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или состояния не поражает кишечник. В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или состояния не локализован в кишечнике. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение производится в месте, отличном от кишечника. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение производится в кишечнике, а также в месте, от-

личном от кишечника. В определенных вариантах реализации болезнь или состояние являются системными.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении инфекции Enterobacteriaceae, такой как инфекция *E. coli*. В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении инфекции желудочно-кишечного тракта, и в частности слепой кишки. В таких вариантах реализации Enterobacteriaceae может быть патогенным штаммом.

В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в стуле субъекта. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в образце стула, взятом у субъекта. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в дистальном отделе кишечника субъекта. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в слепой кишке. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в ободочной кишке. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в прямой кишке. В некоторых вариантах реализации уровень Enterobacteriaceae снижается в тонкой кишке.

В предпочтительных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования при лечении инфекций, вызываемых патогенными Enterobacteriaceae.

В предпочтительных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования при лечении инфекции *E. coli*.

В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте, предпочтительно уровня *E. coli*, при лечении или предотвращении болезни, ассоциированной с повышенными уровнями Enterobacteriaceae, такой как СРК, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, функциональная диспепсия, диарея, гастроэнтерит, инфекция мочевыводящих путей или менингит новорожденных. Известно, что Enterobacteriaceae, и в частности *E. coli*, являются потенциальными инициаторами или, как известно, усугубляют болезнь Крона и неспецифический язвенный колит [22-24], поэтому эффект, продемонстрированный в примерах для композиций по изобретению, может быть полезным при лечении этих состояний.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования при лечении или предотвращении СРК, болезни Крона, язвенного колита, функциональной диспепсии, диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных путем снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте.

В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению содержат бактерию, депонированную с номером доступа DSM 10507/14294, и предназначены для использования с целью снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте при лечении болезни Крона, язвенного колита, функциональной диспепсии или наиболее предпочтительно СРК. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению содержат бактерию, депонированную с номером доступа DSM 10507/14294, и предназначены для использования при лечении или предотвращении болезни Крона, язвенного колита, функциональной диспепсии или наиболее предпочтительно СРК, путем снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте.

В определенных вариантах реализации композицию вводят в комбинации с антибиотиком, таким как фторхинолон, азитромицин, ципрофлоксацин или рифаксимин. В определенных вариантах реализации, композицию вводят в комбинации с дегидратирующим средством, таким как регидратирующий раствор для перорального введения. Композиция по изобретению может быть введена одновременно с антибиотиком или дегидратирующим средством или последовательно с антибиотиком или дегидратирующим средством.

В определенных вариантах реализации композиции предназначены для использования у пациентов, которые демонстрируют или, как ожидается, будут демонстрировать повышенные уровни Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте, например по сравнению со здоровым субъектом или популяцией здоровых субъектов.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в способе лечения, предотвращения или снижения колонизации желудочно-кишечного тракта Enterobacteriaceae.

В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для использования в способе снижения уровня Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте у субъекта, имеющего повышенный уровень водорода в своем дыхании по сравнению со здоровым субъектом. В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для использования при снижении уровня водорода в дыхании субъекта, который демонстрирует или, как ожидается, будет демонстрировать повышенный уровень Enterobacteriaceae в желудочно-кишечном тракте. Субъект предпочтительно представляет собой субъекта с диагнозом СРК, болезни Крона, язвенного колита, функциональной диспепсии, диареи, гастроэнтерита, инфекции мочевыводящих путей или менингита новорожденных и/или инфекции, вызываемой патогенными Enterobacteriaceae, например *E. coli*. Примеры показывают, что лече-

ние композицией по изобретению снижает уровень водорода, детектируемый в дыхательных водородных тестах. Соответственно уровни водорода предпочтительно оценивают с использованием дыхательного водородного теста. Дыхательный водородный тест хорошо известен специалистам и, таким образом, квалифицированный специалист будет знать, как проводить такой тест. В некоторых вариантах реализации, пациенту вводят лактулозу в качестве субстрата для проведения теста.

Дыхательный водородный тест также является полезным инструментом для контроля эффективности или вероятной эффективности снижения уровня Enterobacteriaceae и лечения или профилактики с использованием композиции по изобретению. Например, снижение уровня водорода, детектируемого в дыхании субъекта после лечения композицией по изобретению, может указывать на то, что лечение оказывает эффект снижения уровня, терапевтический или профилактический эффект. Соответственно в некоторых вариантах реализации способы и применение изобретения дополнительно включают контроль уровня водорода в дыхании субъекта в ходе и/или после лечения композицией по изобретению и тем самым оценку эффективности или вероятной эффективности снижения уровня, лечения или профилактики. Например, уровни водорода могут контролироваться в один или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или более 4) моментов времени, например, включая моменты времени до начала лечения, в начале лечения, в ходе лечения, в конце лечения и/или после лечения, по желанию. В некоторых вариантах реализации уровень водорода в дыхании субъекта в конце и/или после периода дозирования (во время которого субъекту вводят композицию) сравнивают с уровнем в начале и/или до периода дозирования, и снижение уровня указывает на эффективность или вероятную эффективность снижения уровня, лечения или профилактики. Например, в вариантах реализации, в которых период дозирования составляет 16 дней, может быть желательным проводить измерения в день 1 и день 16, или, например, в день 1, день 2, день 15 и день 16. В некоторых вариантах реализации проводят множество измерений и определяют среднее для полученных таким образом результатов измерений (например, среднее для дня 1 и дня 2 и среднее для дня 15 и дня 16). В некоторых вариантах реализации, снижение уровня водорода C_{max} на по меньшей мере 40 ppm (млн^{-1}) указывает на то, что снижение уровня, лечение или профилактика являются эффективными или вероятно эффективными. В некоторых вариантах реализации уровень водорода в дыхании субъекта измеряют только один раз, например в конце или после лечения, и определение того, что уровень имеет значение, равное или близкое к предварительно заданному уровню, указывает на то, что снижение уровня, лечение или профилактика, вероятно, были эффективными. Дыхательный водородный тест является стандартным анализом и, таким образом, предварительно заданные уровни известны специалистам.

Лечение или профилактика могут относиться, например, к уменьшению тяжести симптомов или снижению частоты обострений, или уменьшению набора факторов (triggers), являющихся проблемными для пациента.

Уровни Enterobacteriaceae можно детектировать в фекалиях пациента, с использованием стандартных методик, таких как методики кПЦР, используемые в примерах.

Способы введения

Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт для обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по изобретению. Обычно композиции по изобретению вводят перорально, но они могут быть введены ректально, интраназально или буккальным или сублингвальным путями.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению могут быть введены в виде губки (foam), спрея или геля.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению могут быть введены в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например в форме какао-масла, синтетического твердого жира (например, суппоцир (suprocire), витепсол (witepsol)), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или композиции глицеринового мыла (soap glycerin).

В определенных вариантах реализации композицию по изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт через трубку, такую как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, еюностомический зонд (J tube), чрескожная эндоскопическая гастростомия (ЧЭГ), или отверстие, такое как отверстие в стенке грудной клетки, обеспечивающее доступ к желудку, тощей кишке, и другие пригодные отверстия доступа.

Композиции по изобретению могут быть введены однократно или они могут вводиться последовательно по схеме лечения. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для ежедневного введения. Примеры демонстрируют, что ежедневное введение обеспечивает успешную колонизацию и клиническую пользу.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению вводят регулярно, например ежедневно, через день или еженедельно, на протяжении длительного периода времени, такого как на протяжении по меньшей мере одной недели, двух недель, одного месяца, двух месяцев, шести месяцев или одного года. Примеры демонстрируют, что введение ВН может не приводить к постоянной колонизации кишечника, поэтому регулярное введение на протяжении длительных периодов времени может обеспечивать большую терапевтическую пользу.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению вводят в течение 7, 14, 16, 21 или 28 дней или не более 7, 14, 16, 21 или 28 дней. Например, в некоторых вариантах реализации композиции по изобретению вводят в течение 16 дней.

В определенных вариантах реализации изобретения лечение в соответствии с изобретением сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение может быть повторено, если доставка и/или частичная или полная колонизация штаммом по изобретению не будут достигнуты и, таким образом, эффект не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация будут успешными, и эффект наблюдается.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению может быть введена беременному животному, например млекопитающему, такому как человеку, с целью предупреждения развития повышенных уровней *Enterobacteriaceae* у ребенка/детеныша *in utero* и/или после его рождения.

Композиции по изобретению могут быть введены пациенту с установленным диагнозом повышенных уровней *Enterobacteriaceae* или болезни или состояния, ассоциированных с повышенными уровнями *Enterobacteriaceae*, или который был идентифицирован как имеющий риск повышенных уровней *Enterobacteriaceae*. Композиции могут также быть введены в качестве профилактической меры для предотвращения развития повышенных уровней *Enterobacteriaceae* у здорового пациента.

Композиции по изобретению могут быть введены пациенту, который был идентифицирован как имеющий аномальную микробиоту кишечника. Например, у пациента может наблюдаться пониженная колонизация *Blautia* или их отсутствие, и в частности *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* или *Blautia wexlerae*.

Композиции по изобретению могут быть введены в виде пищевого продукта, такого как питательная добавка.

В общем композиции по изобретению предназначены для лечения людей, хотя они могут быть использованы для лечения животных, включая моногастрических млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по изобретению могут быть пригодными для улучшения роста и продуктивности (*performance*) животных. При введении животным может быть использовано введение через желудочный зонд.

В некоторых вариантах реализации субъект, которому должна быть введена композиция, представляет собой взрослого человека. В некоторых вариантах реализации субъект, которому должна быть введена композиция, представляет собой младенца человека.

Композиции

В общем композиция по изобретению содержит бактерии. В предпочтительных вариантах реализации изобретения, композиция приготовлена в лиофилизированной форме. Например, композиция по изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например, твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм по изобретению.

Предпочтительно, композиция по изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лيوфилизация бактерий является хорошо отработанной процедурой и соответствующие рекомендации приведены, например, в работах [25-27]. Примеры демонстрируют, что композиции лиофилизата являются особенно эффективными.

Альтернативно, композиция по изобретению может содержать живую активную бактериальную культуру. Примеры демонстрируют, что культуры бактерий по изобретению являются терапевтически эффективными.

В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был инактивирован, например не был инактивирован нагреванием. В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, например не был убит нагреванием. В некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был ослаблен, например не был ослаблен нагреванием. Например, в некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, инактивирован и/или ослаблен. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является живым. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению способен частично или полностью колонизировать кишечник. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит смесь живых бактериальных штаммов и убитых бактериальных штаммов.

В предпочтительных вариантах реализации композиция по изобретению инкапсулирована для обеспечения возможности доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсулирование защищает композицию от деградации до доставки в целевую область путем, например разрыва в результате химических или физических воздействий, таких как давление, ферментативная активность, или физическое разрушение, которое может инициироваться изменениями pH. Может быть использован любой пригодный способ инкапсулирования. Типичные примеры методик инкапсулирования включают захват в по-

ристой матрице, присоединение или адсорбцию на поверхностях твердого носителя, самоагрегацию путем флокуляции или с помощью сшивающих агентов, и механическое удерживание за микропористой мембраной или в микрокапсуле. Рекомендации по инкапсулированию, которые могут быть полезными для приготовления композиций по изобретению, приведены, например, в источниках [28-29].

Композиция может быть введена перорально и может иметь форму таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, потому что *Vlaütia* представляют собой анаэробы. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин С), могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. Альтернативно пробиотическая композиция по изобретению может быть введена перорально в виде пищевого или питательного продукта, такого как ферментированный молочный продукт на основе молока или сыворотки, или в виде фармацевтического продукта.

Композиция может быть составлена как пробиотик.

Композиция по изобретению включает терапевтически эффективное количество бактериального штамма по изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для оказания положительного воздействия на пациента. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника пациента.

Пригодная ежедневная доза бактерий, например для взрослого человека, может составлять от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ); например, от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{11} КОЕ.

В определенных вариантах реализации доза бактерий составляет по меньшей мере 10^9 клеток в день, например по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} или по меньшей мере 10^{12} клеток в день.

В определенных вариантах реализации, композиция содержит бактериальный штамм в количестве от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г по отношению к весу композиции; например, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1, 3, 5 и 10 г.

Типично пробиотик, такой как композиция по изобретению, необязательно объединяют по меньшей мере с одним пригодным соединением-пребиотиком. Соединение-пребиотик обычно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как олиго-или полисахарид, или сахароспирт, который не разлагается или не всасывается в верхнем отделе пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В определенных вариантах реализации пробиотическая композиция по данному изобретению включает соединение-пребиотик в количестве от примерно 1 до примерно 30 мас.% по отношению к общему весу композиции (например, от 5 до 20 мас.%). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахаридов (или COS), бета-глюканов, модифицированных аравийской камедью (*arable gum*) и резистентных крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, акациевых волокон (*acacia fibers*), волокон рожкового дерева (*carob*), овса и цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды (для простоты обозначаются далее кц-FOS (FOSs-с.с.)); указанные кц-FOS являются неперевариваемыми углеводами, обычно получаемыми путем конверсии свекловичного сахара и содержащими молекулу сахарозы, с которой связаны три молекулы глюкозы.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Примеры таких пригодных эксципиентов приведены в источнике [30]. Приемлемые для терапевтического применения носители или разбавители хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в источнике [31]. Примеры пригодных носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры пригодных разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, эксципиента или разбавителя может проводиться с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в дополнение к носителю, эксципиенту или разбавителю, любое пригодное связующее (связующие), смазывающее вещество (вещества), суспендирующий агент (агенты), покровное вещество (вещества), солюбилизатор(ы). Примеры пригодных связующих включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводную лактозу, сыпучую лактозу, бета-лактозу, сахаристые вещества кукурузы, природные и синтетические камеди, такие как гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлозу и полиэтиленгликоль. Примеры пригодных смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Консерванты, стабилизаторы, красители и даже вкусовые агенты могут быть предусмотрены в фармацевтической композиции. Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту, цистеин и сложные эфиры *p*-оксибензойной кислоты, например в некоторых вариантах реализации консервант выбирают из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров *p*-

оксигензойной кислоты. Также могут быть использованы антиоксиданты и суспендирующие агенты. Дополнительным примером пригодного носителя является сахароза. Дополнительным примером консерванта является цистеин.

Композиции по изобретению могут быть составлены в виде пищевого продукта. Например, пищевой продукт может обеспечивать питательную пользу в дополнение к терапевтическому эффекту по изобретению, такую как у питательной добавки. Аналогично композиция пищевого продукта может быть составлена таким образом, чтобы она усиливала вкус композиции по изобретению или делала композицию более привлекательной для употребления за счет большего ее сходства с обычным компонентом пищи, а не с фармацевтической композицией. В определенных вариантах реализации композицию по изобретению составляют в виде продукта на основе молока. Термин "продукт на основе молока" означает любой жидкий или полутвердый продукт на основе молока или сыворотки, имеющий различное содержание жиров. Продукт на основе молока может быть, например, коровьим молоком, козьим молоком, овечьим молоком, снятым молоком, цельным молоком, молоком, восстановленным из сухого молока и сыворотки без какой-либо переработки, или переработанным продуктом, таким как йогурт, простокваша, свернувшееся молоко, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кислые молочные продукты. Другая важная группа включает молочные напитки, такие как напитки из сыворотки, кисломолочные продукты, сгущенное молоко, заменители грудного молока (infant) или молоко для детского питания (baby milks); молочные напитки со вкусовыми добавками (flavoured milks), мороженое; содержащие молоко пищевые продукты, такие как сладости.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов рода *Blautia* и не содержат бактерий какого-либо другого рода или содержат только минимальное (*de minimis*) или биологически незначимое количество бактерий другого рода.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один бактериальный штамм или вид и не содержат каких-либо других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут содержать только минимальное или биологически незначимое количество других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут быть культурой, по существу не содержащей других видов организмов (*species of organism*). В некоторых вариантах реализации такие композиции могут быть лиофилизатом, по существу не содержащим других видов организмов.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов рода *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат какого-либо другого бактериального рода, или содержат только минимальное или биологически незначимое количество бактерий другого рода. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один вид *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат каких-либо других бактериальных видов, или содержат только минимальное или биологически незначимое количество бактерий другого вида. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один штамм *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат каких-либо других бактериальных штаммов или видов, или содержат только минимальное или биологически незначимое количество бактерий другого штамма или вида.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат более одного бактериального штамма или вида. Например, в некоторых вариантах реализации, композиции по изобретению содержат более одного штамма одного и того же вида (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 штаммов) и необязательно не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат менее 50 штаммов одного и того же вида (например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штаммов) и необязательно не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации, композиции по изобретению содержат 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 штаммов одного и того же вида и необязательно не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат более одного вида из одного и того же рода (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 или 40 видов) и необязательно не содержат бактерий любого другого рода. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат менее 50 видов из одного и того же рода (например, менее 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 и необязательно не содержат бактерий любого другого рода. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, или 31-50 видов из одного и того же рода и необязательно не содержат бактерий любого другого рода. Изобретение включает любые комбинации вышеописанных вариантов.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах реализации композиция содержит бактериальный штамм *Blautia* в составе микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм *Blautia* присутствует в комбинации с одним или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими бактериальными штаммами из других родов, с которыми он может существовать симбиотически *in vivo* в кишечнике. Например, в некоторых вариантах реализации композиция содержит бактериальный

штамм *Blautia hydrogenotrophica* в комбинации с бактериальным штаммом из другого рода. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит два или больше бактериальных штаммов, полученных из образца фекалий одного организма, например человека. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум не встречается вместе в природе. Например, в некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит бактериальные штаммы, полученные из образцов фекалий по меньшей мере двух разных организмов. В некоторых вариантах реализации два разных организма принадлежат к одному и тому же виду, например два разных человека. В некоторых вариантах реализации два разных организма представляют собой младенца человека и взрослого человека. В некоторых вариантах реализации два разных организма представляют собой человека и млекопитающее, не являющееся человеком.

В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, имеющий такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294, но не являющийся штаммом *Blautia hydrogenotrophica*, депонированным с номером доступа DSM 10507/14294, или не являющийся *Blautia hydrogenotrophica*, или не являющийся *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации, когда композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, вида или рода, индивидуальные бактериальные штаммы, виды или роды могут быть предназначены для раздельного, одновременного или последовательного введения. Например, композиция может содержать все из более чем одного бактериального штамма, вида или рода, или бактериальные штаммы, виды или роды могут храниться раздельно и вводиться раздельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах реализации более чем один бактериальные штаммы, виды или роды хранятся раздельно, но смешиваются перед использованием.

В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению получают из фекалий взрослого человека. В некоторых вариантах реализации, когда композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, все бактериальные штаммы получают из фекалий взрослого человека или, если присутствуют другие бактериальные штаммы, то они присутствуют только в минимальных количествах. Бактерии могут выращиваться в культуре после получения из фекалий взрослого человека и использоваться в композиции по изобретению.

В некоторых вариантах реализации один или несколько бактериальных штаммов *Blautia* является/являются единственным терапевтически активным агентом (агентами) в композиции по изобретению. В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм (штаммы) в композиции является/являются единственным терапевтически активным агентом (агентами) в композиции по изобретению.

Композиции для использования в соответствии с изобретением могут нуждаться в разрешении на продажу или не требовать такого разрешения.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизированным. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм подвергнут распылительной сушке. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке, и в которой он является живым. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке, и в которой он является жизнеспособным. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке, и в которой он способен частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке и в которой он является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых случаях лиофилизированный или подвергнутый распылительной сушке бактериальный штамм восстанавливают перед введением. В некоторых случаях восстановление осуществляют с помощью разбавителя, описанного в данном документе.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, разбавители или носители.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую бактериальный штамм по изобретению; фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем количество бактериального штамма является достаточным для снижения уровней *Enterobacteriaceae* и/или лечения расстройства, ассоциированного с повышенными уровнями *Enterobacteriaceae*, при введении нуждающемуся в этом субъекту; причем расстройство является ассоциированным с повышенными уровнями *Enterobacteriaceae*, таким как болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, функциональная диспепсия или, более предпочтительно, СРК, или диарея, гастроэнтрит, инфекция мочевыводящих путей, или менингит новорожденных.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевти-

ческую композицию, в которой количество бактериального штамма составляет от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм веса композиции.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой композицию вводят в дозе 1, 3, 5 или 10 г.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой композицию вводят способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую эксципиент, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, сыпучей лактозы, бета-лактозы, сахаристого вещества кукурузы, гуммиарабика, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую по меньшей мере что-то одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-оксибензойной кислоты.

В определенных вариантах реализации предусматривается фармацевтическая композиция по изобретению, причем композиция не содержит каких-либо минеральных веществ или, более конкретно, не содержит каких-либо металлов с атомным числом более 33, например композиция не содержит каких-либо минеральных веществ из группы, состоящей из селена, молибдена, вольфрама, соединений селена, соединений молибдена и соединений вольфрама.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, причем при хранении композиции в запечатанном контейнере при температуре примерно 4 или примерно 25°C, и помещении контейнера в атмосферу с 50% относительной влажности, по меньшей мере 80% бактериального штамма при измерении в колониеобразующих единицах сохраняется после периода времени, составляющего по меньшей мере примерно 1, 3, 6 месяцев; 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 года.

В некоторых вариантах реализации предусматривается композиция по изобретению в запечатанном контейнере, содержащем композицию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах реализации запечатанный контейнер представляет собой саше или флакон. В некоторых вариантах реализации предусматривается композиция по изобретению в шприце, содержащем композицию, описанную в данном документе.

Композиция по данному изобретению может в некоторых вариантах реализации предусматриваться в виде фармацевтической композиции. Например, композиция может иметь вид таблетки или капсулы. В некоторых вариантах реализации капсула представляет собой желатиновую капсулу ("gel-cap").

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать проглатывание, в результате чего состав поступает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, при котором состав поступает в кровоток прямо изо рта.

Фармацевтические композиции, пригодные для перорального введения, включают твердые прессованные массы (solid plugs), твердые микродисперсные материалы, полутвердые и жидкие материалы (включая многофазные или дисперсные системы), такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие материалы, состоящие из множества отдельных частиц или нанодисперсные материалы, жидкости (например, водные растворы), эмульсии или порошки; сосательные таблетки (включая наполненные жидкостью); жвачки; гели; быстродиспергирующиеся лекарственные формы; пленки; капли (ovules); спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой энтеросолюбильную композицию (enteric formulation), т.е. желудочно-резистентную композицию (например, устойчивую к желудочному pH), пригодную для доставки композиции по изобретению в кишечник путем перорального введения. Энтеросолюбильные композиции могут быть особенно полезны в тех случаях, когда бактерии или другой компонент композиции являются чувствительными к кислоте, например склон-

ны к деградации в условиях желудка.

В некоторых вариантах реализации энтеросолюбильная композиция включает энтеросолюбильное покрытие. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой лекарственную форму с энтеросолюбильным покрытием. Например, композиция может быть таблеткой с энтеросолюбильным покрытием или капсулой с энтеросолюбильным покрытием и т.п. Энтеросолюбильное покрытие может быть обычным энтеросолюбильным покрытием, например обычным покрытием для таблетки, капсулы и т.п. для пероральной доставки. Композиция может включать пленочное покрытие, например тонкопленочный слой энтеросолюбильного полимера, например нерастворимого в кислоте полимера.

В некоторых вариантах реализации энтеросолюбильная композиция является энтеросолюбильной по своей природе, например желудочно-резистентной, без необходимости использования энтеросолюбильного покрытия. Таким образом, в некоторых вариантах реализации композиция представляет собой энтеросолюбильную композицию, не содержащую энтеросолюбильного покрытия. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой капсулу, изготовленную из терможелирующегося (thermogelling) материала. В некоторых вариантах реализации терможелирующийся материал представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). В некоторых вариантах реализации капсула включает оболочку, не содержащую какого-либо пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах реализации капсула включает оболочку и оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит какого-либо пленкообразующего полимера (см., например, [32]). В некоторых вариантах реализации, композиция по своей природе является энтеросолюбильной капсулой (например, Vcaps® фирмы Capsugel).

В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут благодаря добавкам размягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствующих в оболочке капсулы, обладать определенной эластичностью и деформируемостью. Мягкие капсулы могут быть получены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина являются коммерчески доступными от различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, пероральный или ректальный, мягкие капсулы могут иметь различные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедообразными. Мягкие капсулы могут быть получены обычными способами, такими как, например, с использованием процесса Шерера (Scherer) (метод прессования), процесса Accogel (метод прессования) или капельного процесса или процесса выдувания (blowing).

Способы культивирования

Бактериальные штаммы для использования в данном изобретении могут культивироваться с использованием стандартных микробиологических методик, как описано, например, в источниках [33-35].

Твердая или жидкая среда, используемая для культуры, может быть, например, агаром YCFA (дрожжевой экстракт-гидролизат казеина-жирные кислоты) или средой YCFA. Среда YCFA может содержать (на 100 мл, приблизительные значения): казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO₃ (0,4 г), цистеин (0,1 г), K₂HPO₄ (0,045 г), KH₂PO₄ (0,045 г), NaCl (0,09 г), (NH₄)₂SO₄ (0,09 г), MgSO₄·7H₂O (0,009 г), CaCl₂ (0,009 г), резазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), п-аминобензойную кислоту (3 мкг), фолиевую кислоту (5 мкг) и пиридоксамин (15 мкг).

Общие положения

В практике данного изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, доступные квалифицированным специалистам. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, источники [36-43] и т.д.

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "состоящий из", например композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X, или может что-то включать дополнительно, например X+Y.

Термин "примерно" по отношению к численному значению x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Выражение "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может совершенно не содержать Y. При необходимости, выражение "по существу" может быть опущено в формуле изобретения (definition of the invention).

Ссылки на процент идентичности последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями означают, что при выравнивании процентное содержание (percentage) нуклеотидов при сравнении двух последовательностей будет одинаковым. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичности последовательностей могут быть определены с использованием компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники, например, описанных в разделе 7.7.18 источника [44]. Предпочтительное выравнивание определяют по алгоритму поиска гомологии Смита-Уотермана (Smith-Waterman) с использованием нечеткого (affine) поиска разрывов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продолжение гэпа 2, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в источнике [45].

Если не указано конкретно, процесс или способ, включающий множество стадий, может включать

дополнительные стадии в начале или в конце способа, или может включать дополнительные промежуточные стадии. Также стадии могут быть объединены, пропущены или проведены в альтернативном порядке, при необходимости.

В данном документе описаны различные варианты реализации изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте реализации, могут быть объединены с другими указанными признаками, для получения дополнительных вариантов реализации. В частности, варианты реализации, выделенные в данном документе как пригодные, типичные или предпочтительные, могут быть объединены друг с другом (за исключением случаев, когда они являются взаимоисключающими).

Способы осуществления изобретения

Пример 1. Введение бактериальных инокулятов крысам, несущим микробиоту кишечника человека, больного СРК

Резюме.

Крысы инокулируют фекальной микробиотой человека, больного СРК. Крысам затем вводят композиции, содержащие бактериальные штаммы по изобретению и анализируют колонизацию *Blautia hydrogenotrophica*.

Штамм.

Blautia hydrogenotrophica (ВН), штамм DSM 10507/14294.

Композиции и введение.

Лиофилизат ВН - вводят с помощью желудочного зонда.

Контрольный раствор вводят с помощью желудочного зонда.

Крысы.

Инокулированные кишечной микробиотой человека, больного СРК.

Схема исследований.

День 14 - крысы инокулируют кишечной микробиотой человека, больного СРК.

Дни 0-28 - ежедневная доза лиофилизата ВН или контрольного раствора.

Дни 0, 14 и 28 - кПЦР популяции ВН в образцах фекалий.

Результаты.

Фиг. 1 изображает результаты анализа методом кПЦР популяции ВН в образцах фекалий крыс, получавших контрольный раствор (СРК) или лиофилизат ВН (СРК+ВН). Наблюдалось увеличение популяции ВН в дни 14 и 28 у крыс, получавших лиофилизат ВН, что подтверждает успешную колонизацию.

Выводы.

Введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, приводило к успешной колонизации.

Пример 2. Введение бактериального лиофилизата здоровым крысам и эффект на *Enterobacteriaceae*.

Были исследованы эффекты введения лиофилизата штамма DSM 10507/14294 *Blautia hydrogenotrophica* (ВН) на крыс НИМ-здорового человека (инокулированных микробиотой кишечника здорового человека), и результаты представлены на фиг. 2-5. Дополнительные подробности, касающиеся экспериментов, приведены выше в описании фигур. Фиг. 2 изображает, что пригодная доза ВН для крыс составляет 10^9 клеток в день или больше. Фиг. 3 изображает, что в этих экспериментах ВН не колонизируют постоянно пищеварительный тракт крыс. Фиг. 4 изображает, что ВН присутствует преимущественно в слепой кишке. Неожиданно фиг. 5 изображает, что введение ВН индуцирует статистически значимое снижение *Enterobacteriaceae* в фекалиях крыс, детектируемое методом кПЦР.

Пример 3. Введение бактериального лиофилизата в крысиной модели СРК.

Были дополнительно исследованы эффекты введения лиофилизата штамма DSM 10507/14294 *Blautia hydrogenotrophica* (ВН) в крысиной модели СРК. Безмикробных крыс инокулировали образцами фекалий от пациентов С-СРК (с запором) или U-СРК (несубтипированные). Результаты приведены на фиг. 6, и дополнительные подробности, касающиеся экспериментов, приведены выше в описании фигур.

Фиг. 6 подтверждает, что введение лиофилизата ВН вызывает статистически значимое снижение *Enterobacteriaceae*, которые представлены преимущественно *E. coli*. Как и ожидалось, также наблюдается увеличение ВН.

Пример 4. Сравнение *Blautia hydrogenotrophica* в микробиоте пациентов.

Были проведены клинические испытания фазы I, в которых *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", штамм, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294) вводили людям с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Пациентам вводили Blautix на протяжении периода дозирования (дни 1-16), с периодом вымывания в дни 19-23. Было найдено, что Blautix является безопасным и хорошо переносимым. *Blautia hydrogenotrophica* (Blautix) в микробиоте пациентов измеряли в день 1, день 16 и в конце исследований (EOS), со следующими результатами.

Таблица 1

Пациент	Препарат	Blautix - День 1		Blautix - День 16		Blautix - EOS	
		Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.
Плацебо	Здорового	4.30E+07	8.40E+07	4.79E+07	7.63E+07	3.59E+07	6.23E+07
Blautix	Здорового	2.92E+07	2.25E+07	6.35E+07	1.02E+08	2.58E+07	3.34E+07
Плацебо	СРК	3.58E+07	3.45E+07	2.44E+07	3.13E+07	2.09E+07	2.47E+07
Blautix	СРК	3.17E+07	6.28E+07	8.53E+07	1.57E+08	3.71E+07	5.56E+07

Анализ выявил тенденции изменения уровней *Blautia hydrogenotrophica* в образцах стула пациентов (см. фиг. 7а). Участники, получавшие Blautix, имели повышенные уровни бактерий в своих образцах стула после периода дозирования (день 16). Это демонстрирует успешную доставку Blautix в кишечник. Уровни возвращались к нормальным после периода вымывания (конец исследований; EOS). Таким образом, Blautix не колонизирует кишечник постоянно после прекращения дозирования. Оба наблюдения согласуются с доклинической моделью.

Пример 5. Сравнение *Enterobacteria* в микробиоте пациентов.

Проводили также измерения *Enterobacteria* в микробиоте пациентов в ходе клинических испытаний фазы I в день 1, день 16 и в конце исследований, со следующими результатами.

Пациент	Препарат	<i>Enterobacteria</i> - День 1		<i>Enterobacteria</i> - День 16		<i>Enterobacteria</i> - EOS	
		Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.	Среднее	Ст.откл.
Плацебо	Здорового	5.89E+08	1.00E+09	3.32E+08	6.26E+08	2.85E+08	4.28E+08
Blautix	Здорового	9.96E+08	1.06E+09	4.87E+08	6.64E+08	2.70E+08	3.76E+08
Плацебо	СРК	7.85E+08	1.28E+09	3.01E+08	4.92E+08	2.45E+09	2.45E+09
Blautix	СРК	8.38E+09	1.96E+10	1.12E+09	1.45E+09	6.17E+08	9.91E+08

Анализ выявил тенденции изменения уровней *Enterobacteria* в образцах стула пациентов (см. фиг. 7b). Пациенты с СРК, получавшие Blautix, продемонстрировали снижение *Enterobacteria*. Это согласуется с наблюдениями доклинической модели.

Пример 6. Результаты дыхательного водородного теста.

Уровни водорода в дыхании являются биомаркером активности Blautix - механизм его действия (MoA) связан с метаболизмом эндогенного H_2 для продуцирования ацетата. Людям вводили лактулозу и определяли уровни водорода (H_2) (C_{max}) в образцах, взятых в четыре момента времени: день 1, день 2, день 15 и день 16. Нескорректированные результаты для водорода конвертировали в скорректированные результаты для водорода.

Некоторые пациенты были исключены из анализа. Было три причины, по которым субъекты не включались в анализ методом дыхательного водородного теста: 1) они имели результат дыхательного водородного теста $СМАХ < 20$ в один из четырех дней взятия образцов и потому считались не отвечающими на тест; 2) они были продуцентами метана (определялись как продуцирующие больше метана, чем водорода в дыхательном тесте), это влияет на водородный ответ; и/или 3) было получено сильно отклоняющееся значение в дыхательном водородном тесте (232 ppm). Субъекты 3.12 (Blautix), 3.24 (Blautix),

4.07 (Blautix) были исключены как не отвечающие. Субъекты 3.03 (Blautix) и 3.08 (плацебо) были исключены как продуценты метана (4.07, указанный как исключенный выше, был также продуцентом метана). Субъект 4.09 (плацебо) был исключен из-за сильно выпадающего значения.

Скорректированные результаты анализа водорода для конца периода дозирования (дни 15/16) сравнивали с базовой линией (дни 1/2). У 10 из 12 пациентов (83%), получавших Blautix, наблюдалось снижение уровней водорода за этот период (фиг. 8a и 8c). В отличие от этого, 3 из 6 (50%) пациентов, получавших плацебо, имели пониженные уровни водорода (фиг. 8b и 8c).

Фиг. 9 изображает нескорректированные и скорректированные результаты определения водорода для экспериментальной группы, получавшей Blautix (Verum (группа препарата с действующими веществами)), вместе со статистическим анализом результатов. Было обнаружено, что средние значения для нескорректированного и скорректированного H_2 различаются между днем 1 и днем 15. После 13,5 дней эксперимента, детектировалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение H_2 в дыхательном тесте с определением C_{max} после стимуляции лактулозой. В отличие от этого, в группе плацебо средние значения для дня 1 и дня 15 были эквивалентными ($p > 0,05$) (фиг. 10). Таким образом, среднее значение в экспериментальной группе (также называемой группой VERUM), снижается между днем 1 и днем 15, в то время как среднее для группы плацебо является эквивалентным в день 1 и день 15 как для нескорректированных результатов определения водорода, так и для скорректированных результатов определения водорода (фиг. 11).

Пример 7. Испытания на стабильность.

Композицию, описанную в данном документе, содержащую по меньшей мере один бактериальный штамм, описанный в данном документе, хранят в запечатанном контейнере при температуре 25 или 4°C, и контейнер помещают в атмосферу с 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 95% относительной влажности. По истечении 1, 2, 3, 6 месяцев; 1, 1,5, 2, 2,5 или 3 лет должно сохраняться по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или 90% бактериального штамма, по результатам измерения колониеобразующих единиц в соответствии со стандартными протоколами.

Пример 8. Способность *V. hydrogenotrophica* изменять микробиоту в модели крыс, ассоциированных с микробиотой человека (крыс НМА).

Резюме.

Группы по 16 безмикробных крыс (включающие 8 крыс в контрольной группе и 8 крыс в экспериментальной группе) инокулировали фекальной микробиотой человека, больного СРК (крысы НМА-СРК). Было проведено три последовательных эксперимента с использованием образцов фекалий от 3 разных пациентов с СРК. Две другие группы крыс ($n=10$) инокулировали образцами фекалий здорового субъекта ($n=2$ субъекта; 2 группы крыс НМА-здорового человека) в качестве контроля. Таким образом, использовали 24 крысы, ассоциированных с СРК-микробиотой (контроль), 24 крысы, ассоциированных с СРК-микробиотой, получавших Blautix, и 20 крыс, ассоциированных с микробиотой здорового человека. Половине крыс НМА-СРК затем вводили в течение 28 дней композицию, содержащую бактериальный штамм *V. hydrogenotrophica* по изобретению, в то время как другая половина животных получала контрольный раствор. В день 28 после введения анализировали уровни тех микроорганизмов из фекальной микробиоты, для которых ранее наблюдались изменения у пациентов с СРК.

Штамм.

Blautia hydrogenotrophica (ВН), штамм DSM 10507V14294.

Композиция и введение.

Лиофилизат ВН суспендировали в стерильном растворе минеральных солей до концентрации 10^{10} бактерий/мл. Вводили ежедневно по 2 мл этой суспензии на крысу НМА-СРК с помощью желудочного зонда на протяжении 28 дней.

Контрольный раствор представлял собой стерильный раствор минеральных солей, который вводили ежедневно (2 мл на крысу) с помощью желудочного зонда контрольной группе крыс НМА-СРК.

Крысы.

Самцов безмикробных крыс (в возрасте 10 недель) инокулировали фекальной микробиотой человека, больного СРК (крысы НМА-СРК). Шестнадцать крыс инокулировали одним и тем же инокулятом фекалий человека. Проводили три последовательных эксперимента с образцами фекалий от трех разных субъектов с СРК. Две другие группы по десять крыс инокулировали образцами фекалий от 2 здоровых субъектов (контрольные группы нормо-чувствительности).

Схема исследований.

День 14 - инокуляция безмикробных крыс фекальной микробиотой человека.

Дни 0-28 - ежедневная доза лиофилизата ВН (экспериментальная группа) или контрольный раствор (контрольная группа) с помощью желудочного зонда

Дни 0, 14 и 28 - взятие образцов фекалий для микробного анализа: кПЦР для оценки популяции ВН и других комменсальных групп микроорганизмов и подсчет функциональных групп микроорганизмов с использованием селективных сред и строго анаэробного метода.

Результаты.

На фиг. 12 представлены результаты анализа методом кПЦР популяции *V. hydrogenotrophica* в об-

разцах фекалий крыс НМА-СРК, получавших контрольный раствор или лиофилизат ВН. Значимое увеличение популяции ВН наблюдалось в конце периода введения (D28) у крыс, получавших лиофилизат ВН, что подтверждает успешную доставку ВН в ободочную кишку.

На фиг. 13 изображен эффект введения *V. hydrogenotrophica* на определенные микроорганизмы фекальной микробиоты, для которые ранее наблюдались изменения у пациентов с СРК. Уровень видов *Enterobacteriaceae* снижался после введения *V. hydrogenotrophica*.

Выводы

Введение *Blautia hydrogenotrophica* приводило к снижению *Enterobacteriaceae*.

Пример 9. Изменение симптомов у пациентов в ходе клинических испытаний фазы I.

Были проведены клинические испытания фазы I, в которых *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", штамм, депонированный с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294) вводили людям с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Пациентам вводили Blautix на протяжении периода дозирования (дни 1-16), с периодом вымывания в дни 19-23. Было найдено, что Blautix является безопасным и хорошо переносимым.

Контролировались четыре симптома, одним из которых была диарея. В ходе исследований регистрировали, испытывают ли пациенты улучшение, отсутствие изменений или ухудшение каждого из этих симптомов. Результаты для пациентов, получавших Blautix, сравнивали с результатами, полученными для пациентов, которым вводили плацебо. Контроль симптомов проводили в три момента времени: день 1, день 15/16 и в конце испытаний. Результаты приведены на фиг. 14 и 15.

При сравнении описываемых пациентами симптомов в день 16 с базовыми показателями 1 дня 82% из 17 пациентов с СРК, получавших Blautix, сообщили об улучшении симптомов (фиг. 14). Улучшение симптомов, одним из которых была диарея, поддерживает использование Blautix для лечения или предотвращения диареи.

50% пациентов, получавших плацебо, сообщили об улучшении симптомов (фиг. 14). Высокие показатели реакции на плацебо являются установленным явлением в клинических исследованиях СРК. Ксифаксан (Xifaxan) недавно получил разрешение на использование для лечения СРК на основании значительно меньших улучшений по сравнению с плацебо (см.: <http://www.accessdata.fda.gov/spl/data/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d/5ab6fceb-4d22-4480-81fc-8bc28c16770d.xml>).

На основании приведенного тут описания ожидалось ухудшение симптомов при завершении исследований (дни 19-23) по сравнению с симптомами в момент завершения введения препарата (день 16). Такое ухудшение симптомов наблюдалось в клинических испытаниях фазы I: 41% пациентов с СРК сообщили об ухудшении симптомов после прекращения приема Blautix (фиг. 15). Ухудшение симптомов, одним из которых была диарея, после прекращения приема Blautix, таким образом, также поддерживает использование Blautix при лечении или предотвращении диареи.

Последовательности.

SEQ ID NO:1 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма GAM6-1
Blautia stercoris, частичная последовательность - HM626177)

```

1  tgcaagtcga  gcgaagcgct  tacgacagaa  ccttcggggg  aagatgtaag
ggactgagcg
61  gcggacgggt  gagtaacgcg  tgggtaacct  gcctcataca  gggggataac
agttgaaaac
121  ggctgctaат  accgcataag  cgcacggtat  cgcатgatac  агtgтgaaaa
actccgggtgg
181  tatgagatgg  acccgcgtct  gattagctag  ttggaggggt  aacggccac
caaggcgacg
241  atcagtagcc  ggcctgagag  ggtgaacggc  cacattggga  ctgagacacg
gccagactc
301  ctacgggagg  cagcagtggg  gaatattgca  caatggggga  aaccctgatg
cagcgacgcc
361  gcgtgaagga  agaagtatct  cggtatgtaa  acttctatca  gcagggaga
aatgacggт
421  acctgactaa  gaagccccgg  ctaactacgt  gccagcagcc  gcgгtaatac
gtagggggca
481  agcgttatcc  ggatttactg  ggtgtaaagg  gagcgtagac  ggaagagcaa
gtctgatgtg
541  aaaggctggg  gcttaacccc  aggactgcat  tgгaaactgt  ttttcttgag
tgccggagag
601  gtaagcggaa  ttcctagtgt  agcggtgaaa  tgcgtagata  ttaggaggaa
caccagtggc
661  gaaggcggct  tactggacgg  taactgacgt  tgaggctcga  aagcgtgggg
agcaaacagg
721  attagatacc  ctggtagtcc  acgccgtaaa  cgatgaatac  taggtgttgg
ggagcaaacg

```

036958

781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt
 cgcaagaatg
 841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt
 taattcgaag
 901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa
 tggaaccttt
 961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgctgct agctcgtgct
 gtgagatggt
 1021 gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt
 gaagctgggc
 1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgct
 aatcatcat
 1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaggg
 aagcagagccc
 1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct
 gcaactcgac
 1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa
 tacgttccccg
 1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc
 SEQ ID NO:2 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма WAL 14507
Blautia wexlerae, частичная последовательность - EF036467)
 1 caagtcgaac ggggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat
 tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt
 cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact
 ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagcttggtg gtggggtaac ggcccaccaa
 ggcgacgatc
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc
 cagactccta
 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag
 cgacgccgcg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca ggaagatag
 tgacggtacc
 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta

gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaagggag cgtagacggt gtggcaagtc
 tgatgtgaaa
 541 ggcattgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc
 cggaggggta
 601 agcgggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac
 cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc
 aaacaggatt
 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt
 ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg
 caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg accgcacaaa gcggtggagc atgtggttta
 attcgaagca
 901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc
 ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgatgg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt
 gagatgttgg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa
 ggtgggcact
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa
 tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaaggggaag
 cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca
 acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggatgaatac
 gttcccgggt
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca
 gtgacctaac
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt
 aacaaggt

SEQ ID NO:3 (Консенсусная последовательность 16s рРНК
 штамма 830 *Blautia stercoris*)

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTT

ACGACAGAACCTTCGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGT
AACCTGCCTCATAACAGGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTA
TCGCATGATACAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTG
GAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAA
ACCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG
GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTC
TGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGA
GAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTG
CCGCAGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTTTCCTTCGGGACAGAGAAGACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGG
AGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGCCCCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTC
GGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC
GCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCCCGCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCC
GAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTGGGGTGAAGT
CTAGGGGGT

SEQ ID NO:4 (Консенсусная последовательность 16s рPHK
штамма MRX008 *Blautia wexlerae*)

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
TAACCTGCCTTATAACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGA
GCTGCATGGCTCAGTGTGAAAAACTCCGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTT
GGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGA
AACCTGATGCAGCGACCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAG
GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGT
CTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCTGTGGACTGCATTGGAACTGTCATACTTGAGTGCCGG
AGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA

GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGG
 TGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAAGTCTTGACATCCGCCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGAC
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCT
 GGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGT
 TCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATG
 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGC
 CCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO:5 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма S5a36 *Blautia hydrogenotrophica*, частичная последовательность - X95624.1)

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag
 agaacggaga
 61 tttcggttga agttttctat tgactgagtg gcggaacgggt gagtaacgcg
 tgggtaacct
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaat accgcataag
 cgcacagctt
 181 cgcacgaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcggtt
 gattagctag
 241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag
 ggtgaacggc
 301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacctc ctacgggagg cagcagtgagg
 gaatattgca
 361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct
 cggtatgtaa
 421 acttctatca gcaggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg
 ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggttaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg
 ggtgtaaagg
 541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg
 tgactgcat
 601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcttagtgt
 agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg

taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc
 acgctgtaaa
 781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac
 gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtagct tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg
 gggacccgca
 901 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc
 aatcttgac
 961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcgaa cagaggagac
 aggtggtgca
 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
 gcgcaaccct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag
 ggataacctg
 1141 gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct
 acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc
 aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc
 tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcgggtga atacgttccc gggctcttgta cacaccgccc
 gtcacaccat
 1381 gggagtcagt aacgcccga gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg
 ccgaaggtgg
 1441 gactgataac tgggggtga

Список литературы.

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Tap et al. (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84.
- [4] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [5] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [6] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [7] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [8] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.

- [9] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [10] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [11] Lopetuso et al. (2013), *Gut Pathogens*, 5: 23
- [12] WO 2013/050792
- [13] WO 03/046580
- [14] WO 2013/008039
- [15] WO 2014/167338
- [16] Lee and Lee (2014) *World J Gastroenterol.* 20(27): 8886-8897.
- [17] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [18] Bernalier et al. (1996) *Arch. Microbiol.* 166 (3), 176-183.
- [19] Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [20] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [21] Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [22] Darfeuille-Michaud et al. (2004) *Gastroenterology* 127(2):412-21.
- [23] Strus et al. (2015) *Cent Eur J Immunol.*40(4):420-30.
- [24] Petersen et al. (2015) *Scand J Gastroenterol.*;50(10):1199-207.
- [25] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [26] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [27] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [28] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [29] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [30] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [31] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing

- Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [32] US 2016/0067188
- [33] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [34] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [35] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
- [36] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [37] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [38] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [39] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [40] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [41] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [42] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [43] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [44] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [45] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

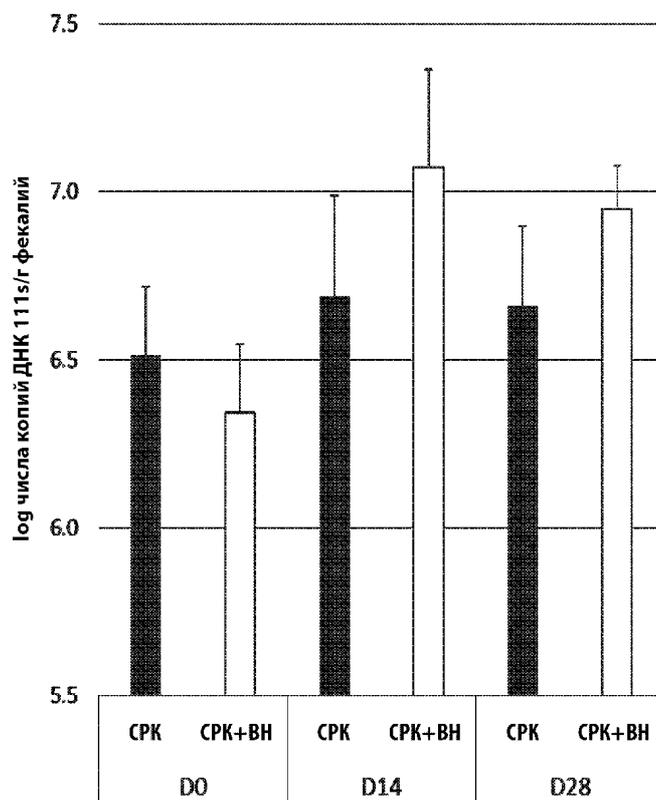
1. Применение фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*, имеющий последовательность гена 16s рРНК, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, для снижения уровня патогенных *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте пациента.
2. Применение по п.1, отличающееся тем, что *Enterobacteriaceae* представляет собой *E. coli*.
3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что пациент имеет синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, функциональную диспепсию, диарею, гастроэнтерит, инфекцию мочевыводящих путей или менингит новорожденного.
4. Применение по п.3, отличающееся тем, что пациент имеет диарею, гастроэнтерит, инфекцию мочевыводящих путей или менингит новорожденного.
5. Применение по п.3, отличающееся тем, что пациент имеет синдром раздраженного кишечника.
6. Применение фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*, имеющий последовательность гена 16s рРНК, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5, для лечения инфекций, вызываемых патогенными *Enterobacteriaceae* в желудочно-кишечном тракте пациента.
7. Применение по пп.1-6, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой штамм *Blautia hydrogenotrophica*, имеющий последовательность гена 16s рРНК, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 5.
8. Применение по пп.1-7, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой штамм *Blautia hydrogenotrophica* DSMZ 14294, имеющий последовательность гена 16s рРНК SEQ ID NO: 5.
9. Применение по пп.1-8, отличающееся тем, что композиция предназначена для перорального введения.

10. Применение по пп.1-9, отличающееся тем, что композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, в частности носителей.

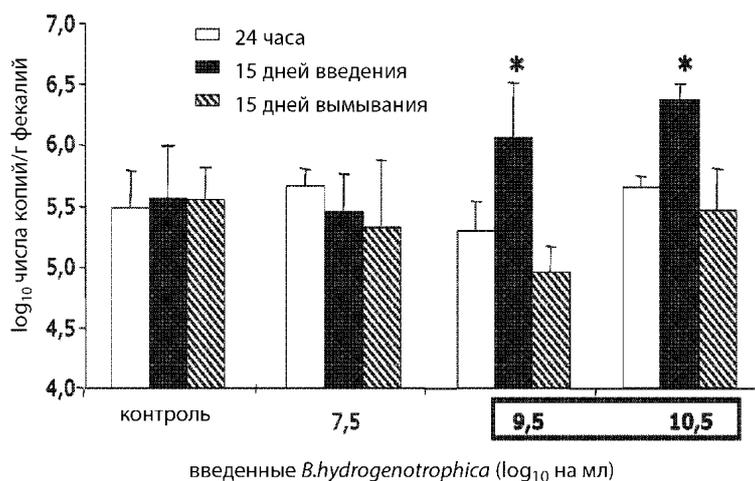
11. Применение по пп.1-10, отличающееся тем, что бактериальный штамм является лиофилизированным.

12. Применение по пп.1-10, отличающееся тем, что бактериальный штамм является нативным.

Измерение популяции ВН методом кПЦР

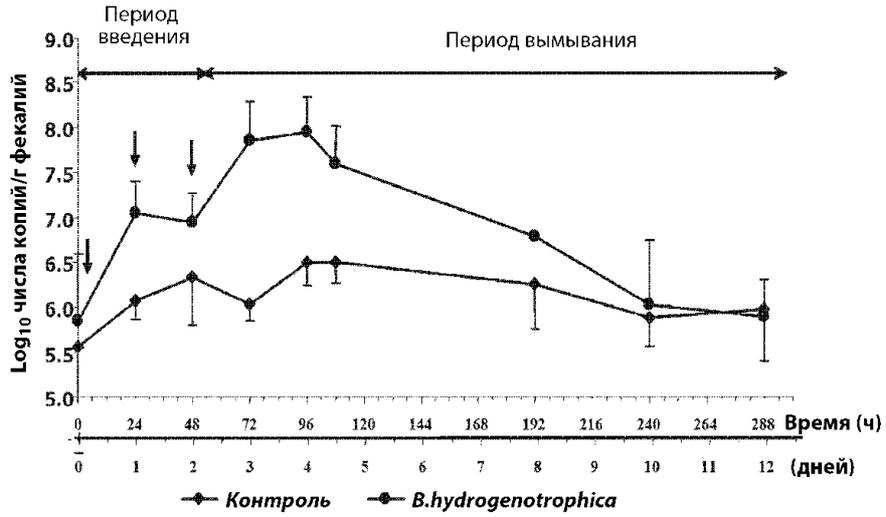


Фиг. 1

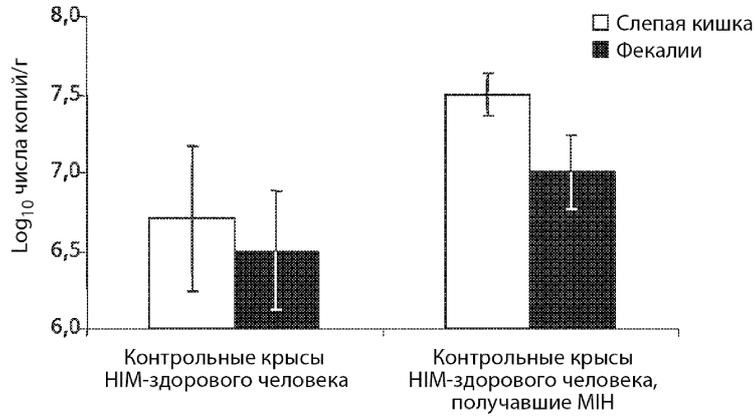


введенные *B. hydrogenotrophica* (log₁₀ на мл)

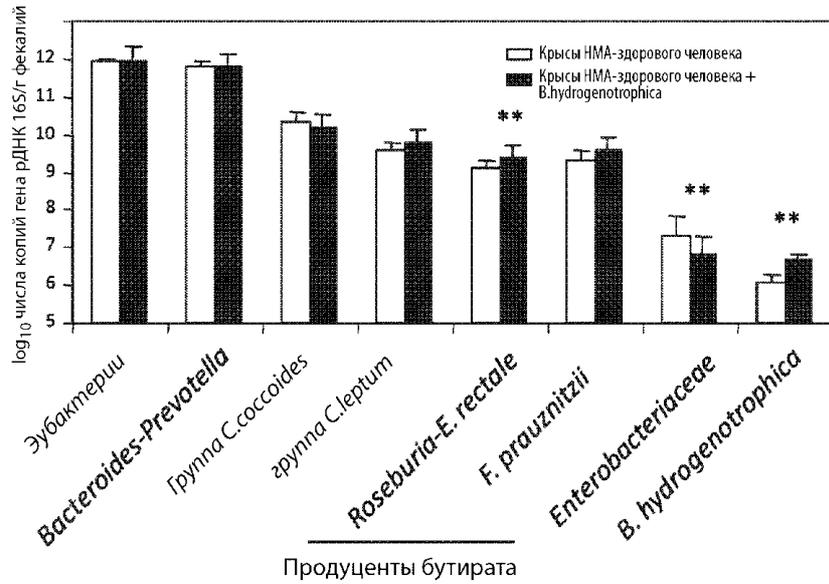
Фиг. 2



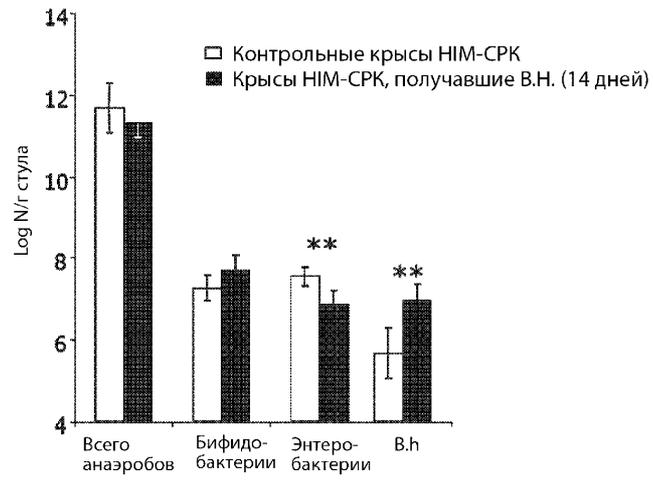
Фиг. 3



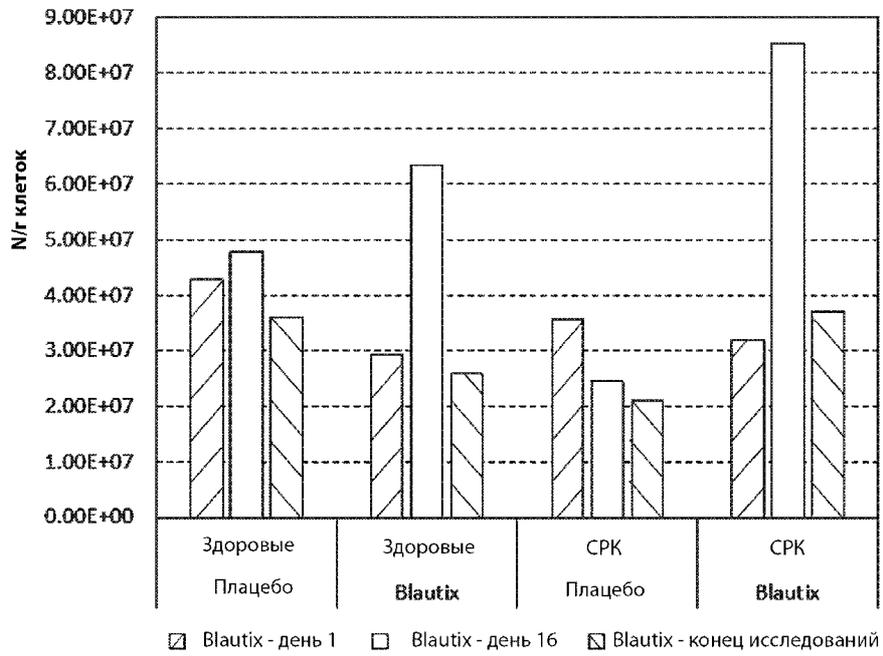
Фиг. 4



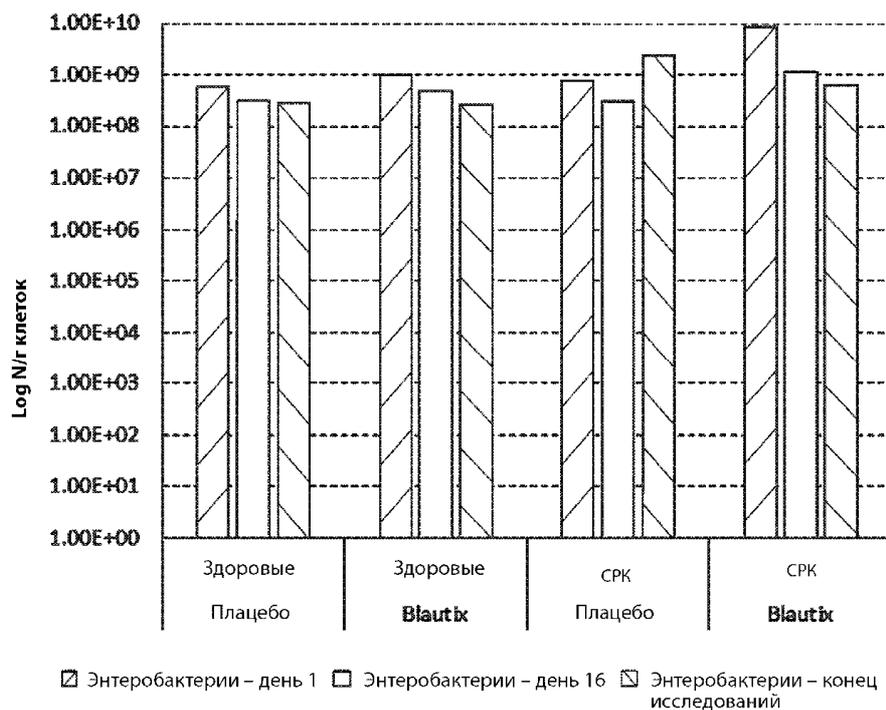
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7а



Фиг. 7b

Blautix - 10/12 продемонстрировали снижение уровня водорода (83%)

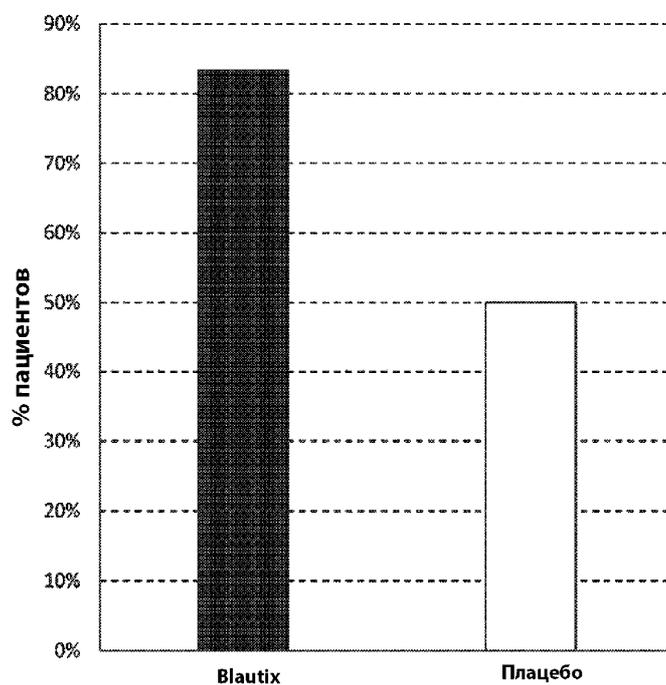
	День 1	День 2	Среднее	День 15	День 16	Среднее		Разность
Пациент №	Стах	Стах		Стах	Стах			Стах
3.02	123.0	94.0	108.5	34.0	74.0	54.0		-54.5
3.04	70.0	32.0	51.0	25.0	46.0	35.5		-15.5
3.05	163.0	116.0	139.5	167.0	111.0	139.0		-0.5
3.07	71.0	69.0	70.0	46.0	80.0	63.0		-7.0
3.09	121.0	76.0	98.5	66.0	65.0	65.5		-33.0
3.11	75.0	98.0	86.5	128.0	76.0	102.0		15.5
3.13	118.0	41.0	79.5	85.0	59.0	72.0		-7.5
3.15	155.0	99.0	127.0	63.0	87.0	75.0		-52.0
3.17	134.0	210.0	172.0	139.0	107.0	123.0		-49.0
3.19	72.0	53.0	62.5	87.0	85.0	86.0		23.5
3.21	144.0	139.0	141.5	75.0	126.0	100.5		-41.0
3.22	59.0	71.0	65.0	55.0	34.0	44.5		-20.5
Среднее	108.8	91.5	100.1	80.8	79.2	80.0		-20.1
СО	37.3	48.4		43.5	26.7			26.2
Медиана	119.5	85.0		70.5	78.0			-18.0
							Пациенты со снижением H ₂	10 (83%)

Фиг. 8a

Плацебо - 3/6 продемонстрировали снижение уровня водорода (50%)

	День 1	День 2	Среднее		День 15	День 16	Среднее		Разность
Пациент №	Стаж	Стаж			Стаж	Стаж			Стаж
3.06	126.0	91.0	108.5		86.0	131.0	108.5		0.0
3.10	124.0	168.0	146.0		107.0	88.0	97.5		-48.5
3.14	55.0	79.0	67.0		53.0	68.0	60.5		-6.5
3.16	98.0	123.0	110.5		123.0	151.0	137.0		26.5
3.23	58.0	113.0	85.5		79.0	99.0	89.0		3.5
4.13	58.0	69.0	63.5		25.0	38.0	31.5		-32.0
Среднее	86.5	107.2	96.8		78.8	95.8	87.3		-9.5
СО	33.8	36.0	31.2		35.7	41.2	37.0		26.8
Медиана	78.0	102.0	97.0		82.5	93.5	93.3		-3.3
								Пациенты со снижением H ₂	3 (50%)

Фиг. 8b



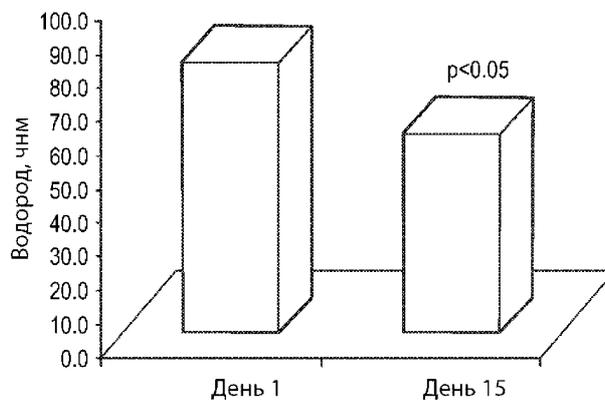
Фиг. 8с

Группа VERUM

случайный номер	день 1 Стах	день 15 Стах		№2, скорректированный	случайный номер	день 1 Стах	день 15 Стах	
3.02	89.8	23.0			3.02	123.0	34.0	
3.04	68.0	21.0			3.04	70.0	25.0	
3.05	130.4	112.8			3.05	163.0	167.0	
3.07	56.8	37.6			3.07	71.0	46.0	
3.09	96.8	52.8			3.09	121.0	66.0	
3.11	63.6	104.9			3.11	75.0	128.0	
3.12	12.3	38.7			3.12	16.0	53.0	
3.13	110.3	82.5			3.13	118.0	85.0	
3.15	115.7	83.8			3.15	155.0	63.0	
3.17	97.8	83.7			3.17	134.0	139.0	
3.19	31.1	66.1			3.19	72.0	87.0	
3.21	144.0	71.4			3.21	144.0	75.0	
3.22	52.7	43.9			3.22	59.0	35.0	
3.24	27.1	26.7			3.24	29.0	27.0	
		Т-критерий, односторонний	0.02032643				Т-критерий, односторонний	0.04798585
	день 1	день 15				день 1	день 15	
среднее	79.7	58.5			среднее	96.4	75.0	
СО	38.7	29.5			СО	46.5	43.0	
п	14	14			п	14	14	
медиана	78.9	53.3			медиана	96.5	64.5	
мин.	12.3	21.0			мин.	16.0	25.0	
макс.	144.0	112.8			макс.	163.0	167.0	

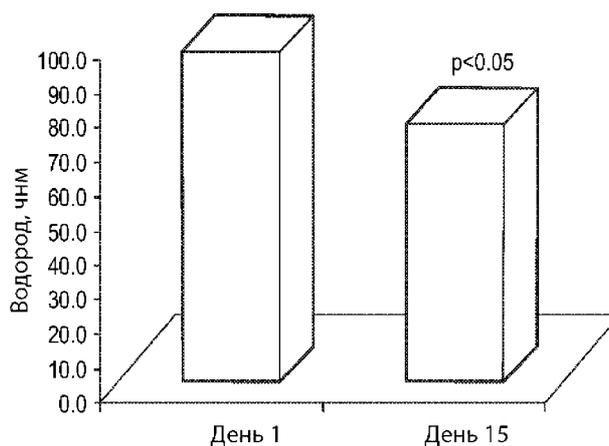
Фиг. 9а

Водород, нескорректированный



Фиг. 9б

Водород, скорректированный



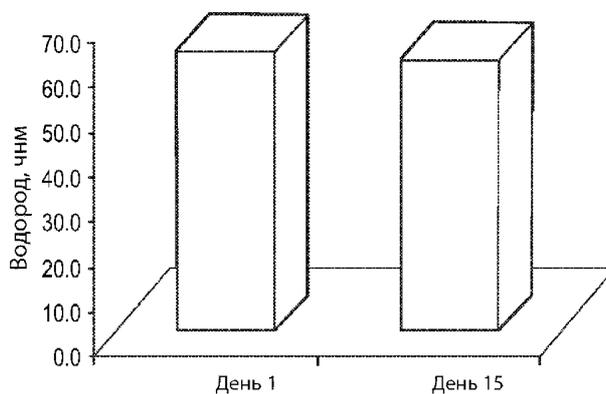
Фиг. 9с

Группа плацебо

случайный номер	день 1 Стах	день 15 Стах		Н2, скорректированный	случайный номер	день 1 Стах	день 15 Стах		
3.06	103.3	81.9			3.06	126.0	86.0		
3.08	42.3	43.3			3.08	55.0	58.0		
3.10	97.6	84.3			3.10	124.0	107.0		
3.14	35.0	42.4			3.14	55.0	53.0		
3.16	59.0	80.9			3.16	98.0	123.0		
3.23	41.1	62.2			3.23	58.0	79.0		
4.13	53.2	25.0			4.13	58.0	25.0		
			T-критерий, односторонний	0.41620609				T-критерий, односторонний	0.27096549
	день 1	день 15				день 1	день 15		
среднее	61.7	60.0			среднее	82.0	75.9		
СО	27.7	23.5			СО	33.1	33.5		
N	7	7			N	7	7		
медиана	53.2	62.2			медиана	58.0	79.0		
мин.	35.0	25.0			мин.	55.0	25.0		
макс.	103.3	84.3			макс.	126.0	123.0		

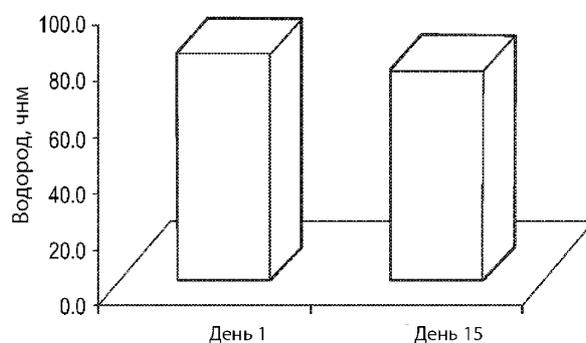
Фиг. 10а

Нескорректированный уровень водорода - плацебо



Фиг. 10b

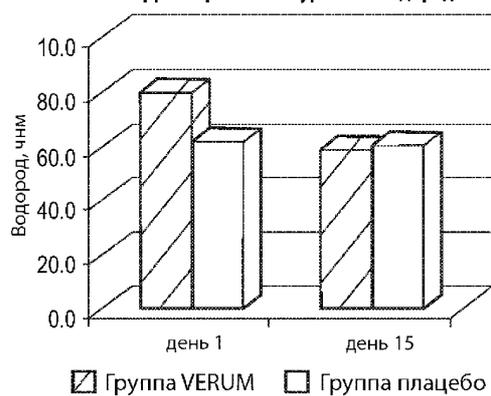
Скорректированный уровень водорода - плацебо



Фиг. 10с

	день 1	день 15	N
Группа VERUM	79.7	58.5	14
Группа плацебо	61.7	60	7

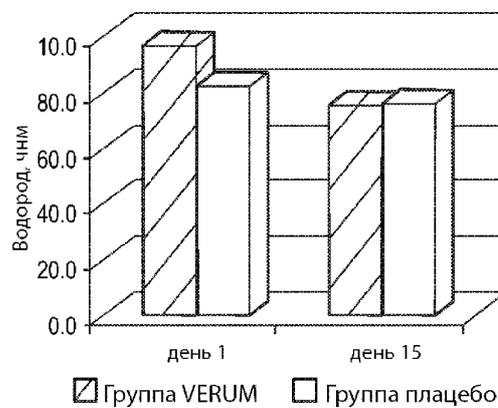
Нескорректированный уровень водорода



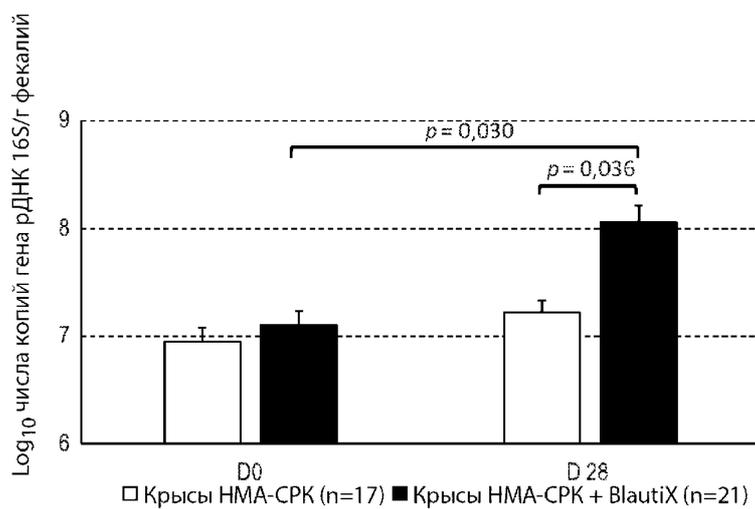
Фиг. 11a

	день 1	день 15	N
Группа VERUM	96.4	75	14
Группа плацебо	82	75.9	7

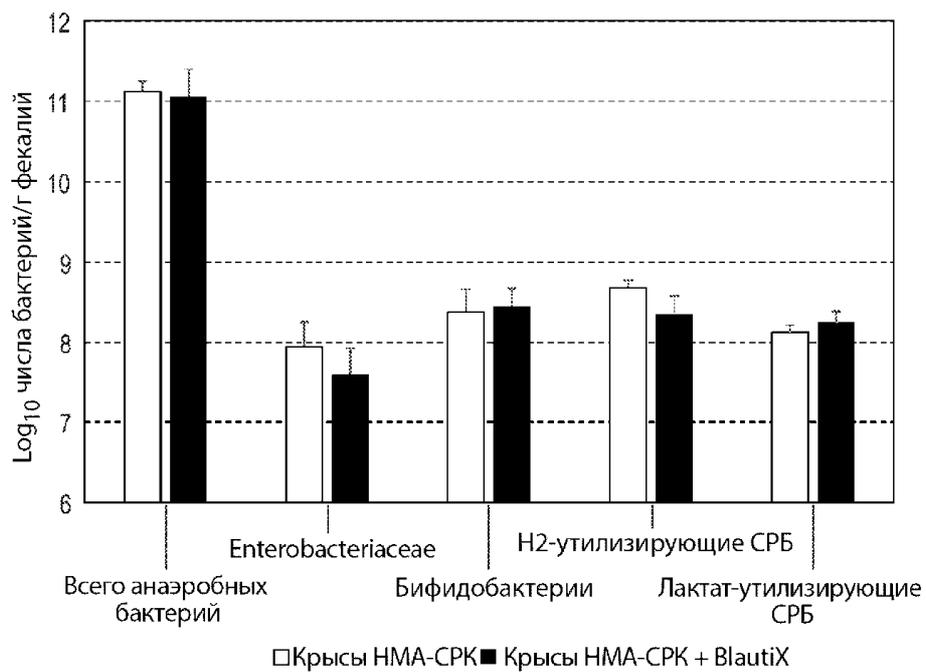
Скорректированный уровень водорода



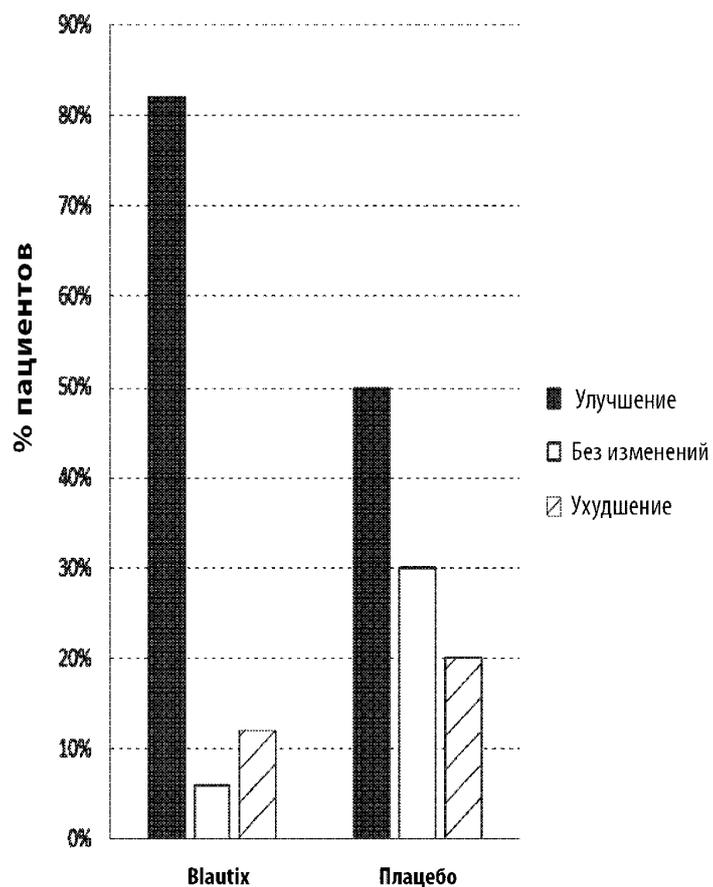
Фиг. 11b



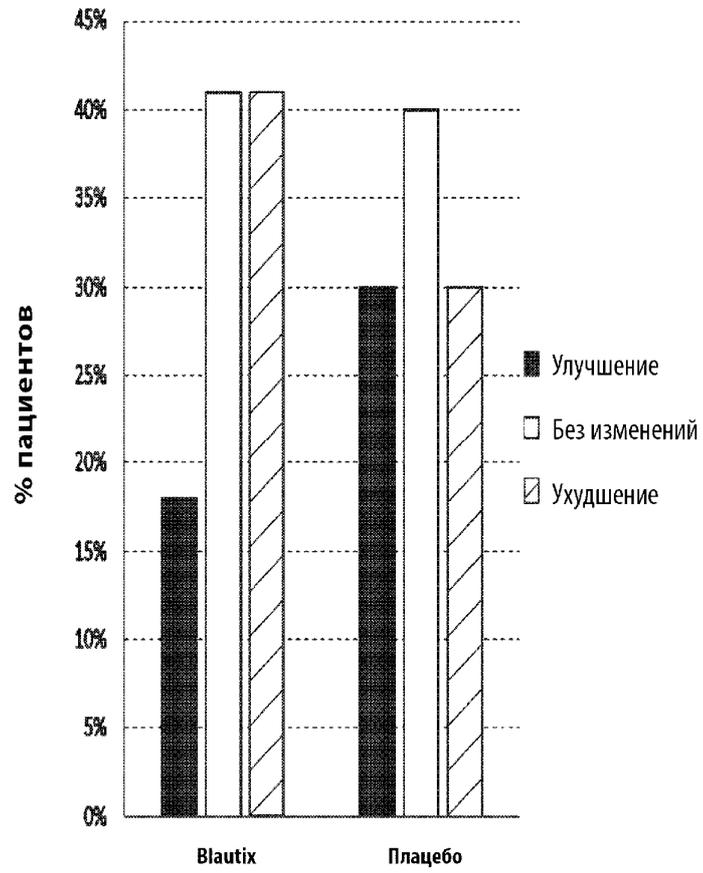
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

