

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090835** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2021.01.29**

(51) Int. Cl. *A61K 35/741* (2006.01)  
*A23L 33/135* (2006.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.03.06**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ**

---

(31) **1603817.6; 1612191.5; 1616022.8**

(72) Изобретатель:

(32) **2016.03.04; 2016.07.13; 2016.09.20**

**Берналье-Донадий Анник, Крузе  
Лорен, Абузи Клоэ (FR)**

(33) **GB**

(62) **201891970; 2017.03.06**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

**4Д ФАРМА ПИЭЛСИ (GB)**

---

(57) В изобретении предложены композиции, содержащие один или несколько бактериальных штаммов, для лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности.

**A1**

**202090835**

**202090835**

**A1**

**КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ****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 (из организма) матери и 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 флотипов, 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 дополнительную пользу для здоровья. Схожим образом, иммунологическая важность микробиоты кишечника является общепризнанной и основана 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 *Clostridium* XIVa и кластера *Clostridium* XI (*F. prausnitzii*) снижаются у пациентов с ВБК, 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 в [16]). Штаммы рода *Blautia* были также предложены для использования при модулировании бактериального баланса пищеварительной экосистемы (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 любые конкретные типы болезней, изучены плохо.

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

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Авторы изобретения разработали новые терапии для лечения и предотвращения висцеральной гиперчувствительности. В частности, авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы рода *Blautia* могут эффективно снижать висцеральная гиперчувствительность. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, может снижать висцеральная гиперчувствительность в крысиных моделях висцеральной гиперчувствительности и синдрома раздраженного кишечника (СРК). Таким образом, в первом варианте реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности.

В предпочтительных вариантах реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода

*Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии или, более предпочтительно, СРК. В других предпочтительных вариантах реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии, детской колики или, более предпочтительно, СРК.

В дополнительных предпочтительных вариантах реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности брюшной полости, предпочтительно, в желудочно-кишечном тракте, и наиболее предпочтительно, в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта. В дополнительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности в слепой кишке, ободочной кишке или прямой кишке.

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

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

В определенных вариантах реализации, композиция по изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов по изобретению может быть эффективным при лечении висцеральной гиперчувствительности. Также, пероральное введение является удобным для пациентов и практикующих врачей и позволяет осуществлять доставку в кишечник и/или его частичную или полную колонизацию.

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 является эффективной и удобной

методикой приготовления стабильных композиций, позволяющих осуществлять доставку бактерий, и продемонстрировала получение эффективных композиций в примерах.

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

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

Дополнительно, изобретение предусматривает способ лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

**Фигура 1:** Измерение популяции ВН методом кПЦР (количественной ПЦР), показывающее увеличение ВН в дни 14 и 28 у животных, получавших лиофилизат ВН.

**Фигура 2:** Влияние культуры и лиофилизата (lyophilisate) ВН на реакцию животных на растяжение, показывающее уменьшение сокращений у животных, получавших композиции ВН.

**Фигура 3:** Влияние культуры ВН на микробиоту, показывающее снижение на 1 десятичный порядок (1 log decrease) СРБ (сульфатредуцирующих бактерий) у крыс, получающих ежедневно дозу культуры ВН.

**Фигура 4:** Влияние лиофилизата ВН на микробиоту.

**Фигура 5:** Влияние лиофилизата ВН на ферментацию микробиоты – короткоцепочечные жирные кислоты, показывающее увеличение продуцирования ацетата у крыс, получающих ВН.

**Фигура 6:** Влияние лиофилизата ВН на ферментацию микробиоты – сульфиды, показывающее снижение продуцирования сульфидов.

**Фигура 7:** Влияние лиофилизата ВН на реакцию животных на растяжение. Крысы МІН (инокулированные микробиотой кишечника человека) с СРК+ВН: тест CRD.

**Фигура 8:** Влияние лиофилизата ВН на реакцию животных на растяжение. Крысы МІН-СРК+ВН: Все данные – тест CRD.

**Фигура 9:** Влияние лиофилизата ВН на сульфиды. Крысы МІН-

СРК+ВН: Концентрации сульфидов (мг/л). Фигура 9а показывает концентрацию сульфидов в слепой кишке для каждой крысы после введения лиофилизата ВН или контрольного раствора. Фигура 9б показывает среднее значение +/- СКО (среднеквадратичное отклонение) концентрации сульфидов в слепой кишке, измеренное у крыс с СРК-микробиотой после введения лиофилизата ВН или контрольного раствора.

**Фигура 10:** Влияние лиофилизата ВН на сульфиды. Крысы МІН-СРК+ВН: Все данные - Концентрации сульфидов (мг/л). Фигура 10а показывает концентрацию сульфидов в слепой кишке для каждой крысы после введения лиофилизата ВН или контрольного раствора. Фигура 10б показывает среднее значение +/- СКО концентрации сульфидов в слепой кишке, измеренной у крыс с СРК-микробиотой после введения лиофилизата ВН или контрольного раствора.

**Фигура 11:** Исследования дозирования у крыс НІМ (инокулированных микробиотой кишечника человека) - количественное определение методом ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) *B. hydrogenotrophica* в образцах фекалий крыс НІМ-здорового человека (инокулированных микробиотой кишечника здорового человека), получавших разные концентрации бактериальных видов.

**Фигура 12:** Время пассажа *B. hydrogenotrophica* после перорального введения ( $10^9$ /день) крысам НІМ-здорового человека.

**Фигура 13:** Сравнение уровней *B. hydrogenotrophica*, определенных в фекальных и цекальных (саесал) образцах крыс НІМ-здорового человека (количественное определение методом ОТ-ПЦР) после 14 дней введения - *B. hydrogenotrophica* вводят в дозе  $10^{10}$ /день/крысу.

**Фигура 14:** Эффект *B. hydrogenotrophica* ( $10^{10}$ /день в течение 14 дней) на продуцирование короткоцепочечных жирных кислот (RMN  $^1$ H) в слепой кишке крыс НІМ-здорового человека.

**Фигура 15:** Влияние введения *B. hydrogenotrophica* на микробные популяции у крыс НІМ-СРК.

**Фигура 16:** Продуцирование сульфидов у крыс НІМ-СРК, получающих *B. hydrogenotrophica* ( $10^{10}$ /день в течение 14 дней). Контрольные крысы препарат не получали.

**Фигура 17:** Изменения симптомов пациента на протяжении периода введения препарата (дни 1-16) фазы I клинических испытаний.

**Фигура 18:** Изменения симптомов пациента на протяжении периода вымывания фазы I клинических испытаний.

**Фигура 19:** Оценка популяции *B. hydrogenotrophica* методом кПЦР в образцах фекалий крыс НМА (ассоциированных с микробиотой человека) с СРК, получавших или не получавших композицию, содержащую *B. hydrogenotrophica* (BlautiX), в течение 28 дней.

**Фигура 20:** Реакция брюшных мышц (abdominal response) на колоректальное растяжение (colorectal distension) у крыс НМА-СРК, получавших или не получавших *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) на протяжении 28 дней, и у не получавших препарата крыс НМА-здорового человека.

**Фигура 21:** Подсчет бактерий в образцах фекалий крыс НМА-СРК после введения *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) по сравнению с контрольным раствором.

**Фигура 22:** Концентрация сульфида в цекальных образцах крыс НМА-СРК, получавших или не получавших *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) на протяжении 28 дней.

**Фигура 23:** Концентрации короткоцепочечных жирных кислот (SCFA) в цекальных образцах крыс НМА-СРК, получавших или не получавших *B. hydrogenotrophica* (BlautiX) в течение 28 дней.

**Фигура 23а** показывает общую концентрацию SCFA. **Фигура 23б** показывает концентрацию уксусной кислоты, пропионовой кислоты и масляной кислоты.

## РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

### Бактериальные штаммы

Композиции по изобретению содержат бактериальный штамм рода *Blautia*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода являются пригодными для лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности. 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*.

Примеры штаммов *Blautia* для использования по изобретению включают *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. gluceracea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* и *B. wexlerae*. Виды *Blautia* являются грам-положительными неподвижными бактериями, 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 SEQ ID NO:5.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная под номером доступа DSM 10507, а также под номером доступа DSM 14294, была протестирована в примерах и также называется в данном документе штаммом ВН. Штамм ВН был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) в январе 1996 г. как "*Ruminococcus hydrogenotrophicus*" под номером доступа DSM 10507, а также под номером доступа DSM 14294 как "S5a33" 10-го мая 2001 г. Депозитором была INRA

Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genès Champanelle, France. Право владения депонированными материалами перешло к фирме 4D Pharma Plc путем переуступки.

Генная последовательность 16S рРНК штамма GAM6-1<sup>T</sup> *Blautia stercoris* имеет номер доступа GenBank HM626177 (раскрыта 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 рРНК штамма WAL 14507 T *Blautia wexlerae* имеет номер доступа GenBank EF036467 (раскрыта 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 рРНК 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-го 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 рРНК 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-го ноября 2015 г. как "*Blaqutia/Ruminococcus MRx0008*" и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42486.

Ожидается, что бактериальные штаммы, близкородственные со штаммом, протестированным в примерах, также будут эффективными для лечения или предотвращения висцеральной

гиперчувствительности. В определенных вариантах реализации, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК 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 рРНК по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК 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, последовательность идентична SEQ ID NO:3. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO:3. В определенных вариантах реализации, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК 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, последовательность идентична SEQ ID NO:4. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК, 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 эффективными для лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности. 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 в по меньшей мере 80% его полного генома (например, в по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 99%, или в его полном геноме). Например, в некоторых вариантах реализации, штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательностей в по меньшей мере 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*,  $(GTG)_5$ , или *REP* или [20]. Штаммы биотипа могут иметь последовательности в по меньшей мере 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 рРНК, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) с SEQ ID NO:5. 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 имеет последовательность 16s рРНК 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, методом флуоресцентного анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (FAFLP) и фингерпринтинга с использованием ПЦР амплификации повторяющихся последовательностей ДНК межгенных полиндромов (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 анализ 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 сопоставимые эффекты в модели висцеральной гиперчувствительности с эффектами, приведенными в примерах, которые могут быть идентифицированы путем использования протоколов культивирования 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 эффективность при лечении болезни. 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 сопоставимую модулирующую активность микробиоты с исходным штаммом DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в модели висцеральной гиперчувствительности с эффектами, продемонстрированными в примерах, которые могут быть идентифицированы путем использования протоколов культивации и

введения, описанных в примерах. Производное штамма DSM 10507/14294 будет обычно биотипом штамма DSM 10507/14294. Производное штамма NCIMB 42381 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42381. Производное штамма 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 предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования при лечении висцеральной гиперчувствительности. Висцеральная гиперчувствительность представляет собой особый тип боли, характеризующийся субъективно болевым ощущением, расположенным в абдоминальной области, вызванным активацией ноцицепторов органов грудной полости, таза или брюшной полости. Висцеральная гиперчувствительность обычно является рассеянной и труднолокализуемой, и тем отличается от соматической боли, обычно более острой и более локализованной. Также, висцеральная гиперчувствительность обычно не ассоциирована с конкретными

органическими поражениями, в отличие от соматической боли. Ноцицепторы внутренних органов по своей природе отличаются от кожных и большинства других ноцицепторов, не принадлежащих внутренним органам [22].

Висцеральная гиперчувствительность обычно ощущается в брюшной полости, но не все боли в животе относятся к висцеральной гиперчувствительности. Наоборот, существует много потенциальных причин боли в животе, и боль в животе может быть соматической, отраженной или висцеральной болью. Соматическая боль в брюшной полости может быть вызвана воспаленным органом, и (в этом случае) обычно является острой и локализованной. Боли в животе могут быть вызваны фибромиалгией, которая представляет собой состояние соматической (кожной и мышечной) гиперчувствительности. Отраженная боль ощущается на участке кожи, удаленном от больного органа.

Висцеральная гиперчувствительность часто ассоциирована с функциональной диспепсией и синдромом раздраженного кишечника (СРК). Однако, не все боли, ассоциированные с функциональной диспепсией и СРК, связаны с висцеральной гиперчувствительностью. В действительности, многие пациенты с СРК также демонстрируют широкий спектр соматических симптомов в абдоминальной области (боль в спине, изжога) и за пределами абдоминальной области (мигрень, диспареуния, мышечная боль в областях тела, соматотопически отличных от кишечника) [23].

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

Висцеральная гиперчувствительность также известна как висцеральная боль, и эти два термина используются в дном

документе взаимозаменяемо.

Как показано в примерах, бактериальные композиции по изобретению могут эффективно снижать висцеральная гиперчувствительность. В частности, бактериальные композиции по изобретению могут снижать ответ на колоректальное растяжение, являющееся проявлением висцеральной гиперчувствительности, которое поражает многих пациентов. В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности брюшной полости, предпочтительно, в желудочно-кишечном тракте, и наиболее предпочтительно, в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта. В дополнительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности в слепой кишке, ободочной кишке или прямой кишке.

В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом, функциональной диспепсией, детской коликой или, более предпочтительно, СРК. В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии, детской колики или, более предпочтительно, СРК. В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности при лечении болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии, детской колики или, более предпочтительно, СРК.

В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным

колитом, функциональной диспепсией или, более предпочтительно, СРК. В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии или, более предпочтительно, СРК. В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении висцеральной гиперчувствительности при лечении болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии или, более предпочтительно, СРК. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования при лечении висцеральной гиперчувствительности у пациента, страдающего от болезненного растяжения желудочно-кишечного тракта, в частности, в ободочной или прямой кишке.

Определенные аспекты дискомфорта и боли, ассоциированных с СРК и другими кишечными состояниями могут быть вызваны избыточным образованием газов в желудочно-кишечном тракте и общим объемом таких накапливающихся газов. Увеличенный объем разных газов может вызывать, например, метеоризм. Как показано в примерах, бактериальные композиции по изобретению могут быть эффективными для лечения конкретного аспекта СРК и других кишечных состояний – висцеральной гиперчувствительности. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, укажем, что наблюдаемый эффект бактериальных композиций по изобретению на висцеральную гиперчувствительность может быть ассоциирован с влиянием бактерий на конкретный газ –  $H_2S$ , и влиянием на сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), которые синтезируют  $H_2S$  в кишечнике.  $H_2S$  может выполнять важную роль как сигнальная молекула боли и эффект композиций по изобретению на висцеральную гиперчувствительность, наблюдаемый в примерах, может быть связан с уменьшением продуцирования  $H_2S$  в кишечнике, которое может усиливать висцеральную гиперчувствительность посредством влияния на болевую сигнализацию, независимо от любых эффектов вздутия, связанных с объемом газа. Примеры демонстрируют, что бактериальные композиции по изобретению могут эффективно снижать

СРБ и снижать  $H_2S$ . В некоторых вариантах реализации, бактериальные композиции по изобретению снижают СРБ и/или снижают  $H_2S$  в слепой кишке. СРБ представляют собой анаэробные бактерии, которые используют восстановление сульфата для получения энергии, и примеры СРБ включают члены рода *Desulfovibrio*, и в частности *Desulfovibrio piger*, которые являются наиболее распространенным видом, а также роды *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* и *Desulfotomaculum*.

В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ при лечении висцеральной гиперчувствительности. В таких вариантах реализации, композиция может предпочтительно иметь форму бактериальной культуры. В таких вариантах реализации, композиция может, предпочтительно, быть лиофилизатом. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования для снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте при лечении висцеральной гиперчувствительности. В таких вариантах реализации, композиция может, предпочтительно, быть лиофилизатом.

В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции желудочно-кишечного тракта СРБ при лечении висцеральной гиперчувствительности. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции СРБ в слепой кишке при лечении висцеральной гиперчувствительности.

В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ, снижения уровней  $H_2S$ , или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК. В дополнительных вариантах реализации, композиции по изобретению

предназначены для использования с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ, снижении уровней  $H_2S$ , или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом, функциональной диспепсией или детской коликой, например, при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом или функциональной диспепсией.

В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции СРБ в желудочно-кишечном тракте, снижении уровней  $H_2S$ , или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК. В дополнительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции СРБ в желудочно-кишечном тракте, снижения уровней  $H_2S$ , или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом, функциональной диспепсией или детской коликой, например, при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом или функциональной диспепсией.

В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ, снижении уровней  $H_2S$ , или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности брюшной полости, предпочтительно, в желудочно-кишечном тракте, более предпочтительно, в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта, в слепой кишке, в ободочной кишке или в прямой кишке. В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции СРБ в желудочно-кишечном тракте, снижении уровней  $H_2S$ , или предотвращении повышенных

уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности брюшной полости, предпочтительно, в желудочно-кишечном тракте, более предпочтительно, в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта, в слепой кишке, в ободочной кишке или в прямой кишке.

В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в способе лечения, предотвращения или снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в способе лечения, предотвращения или снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции желудочно-кишечного тракта СРБ. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в способе снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте.

В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для использования в лечении пациентов, демонстрирующих, или у которых ожидается проявление, повышенных уровней СРБ и/или  $H_2S$  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 предотвращении висцеральной гиперчувствительности у субъекта, получающего или получавшего лечение антибиотиками, или страдающего или страдавшего бактериальным гастроэнтеритом. Лечение антибиотиками и бактериальный гастроэнтерит ассоциированы с изменениями микробиоты кишечника, которые могут предшествовать висцеральной гиперчувствительности, и которые могут быть предотвращены композициями по изобретению. Композиции по изобретению могут вводиться параллельно с лечением антибиотиками.

В предпочтительных вариантах реализации, лечение композициями по изобретению приводит к снижению висцеральной гиперчувствительности, снижению колонизации СРБ, и/или снижению уровней  $H_2S$ .

Лечение или предотвращение висцеральной

гиперчувствительности может относиться к, например, уменьшению тяжести симптомов или снижению частоты обострений или уменьшению набора факторов (triggers), являющихся проблемными для пациента. Например, в некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для использования в лечении или предотвращении тяжелой висцеральной гиперчувствительности. В некоторых вариантах реализации, субъект с тяжелой висцеральной гиперчувствительностью представляет собой субъекта с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии, детской колики или, более предпочтительно, СРК. В некоторых вариантах реализации, субъект с тяжелой висцеральной гиперчувствительностью является субъектом с диагнозом болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии или, более предпочтительно, СРК.

#### 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, ежностомический 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 одноразово, или они могут вводиться последовательно в составе схемы лечения. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для ежедневного введения. Примеры демонстрируют, что ежедневное введение обеспечивает успешную колонизацию и клинические преимущества в крысиной модели висцеральной гиперчувствительности.

Примеры также демонстрируют, что введение ВН может не приводить к стойкой колонизации кишечника, поэтому регулярное введение на протяжении длительных периодов времени может обеспечивать большие терапевтические преимущества. Таким образом, примеры показывают успешную доставку бактериального штамма по изобретению в ободочную кишку после ежедневного введения.

Соответственно, 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 year.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению вводят в течение 7 дней, 14 дней, 16 дней, 21 дня или 28 дней или не более чем 7 дней, 14 дней, 16 дней, 21 дня 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 достигнута и, таким образом, эффективность не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация будет успешной и наблюдается эффективность.

В определенных вариантах реализации, композиция по изобретению может быть введена беременному животному, например, млекопитающему, такому как человеку, с целью предотвращения

развития висцеральной гиперчувствительности у ребенка *in utero* и/или после его рождения.

Композиции по изобретению могут быть введены пациенту, которому был поставлен диагноз висцеральной гиперчувствительности или болезни или состояния, ассоциированных с висцеральной гиперчувствительностью, или который был идентифицирован как имеющий риск висцеральной гиперчувствительности. Композиции могут быть также введены в качестве профилактической меры для предотвращения развития висцеральной гиперчувствительности у здорового пациента.

Композиции по изобретению могут быть введены пациенту с идентифицированной аномальной микробиотой кишечника. Например, пациент может иметь пониженную колонизацию *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, субъектом, которому должна вводиться композиция, является взрослый человек. В некоторых вариантах реализации, субъектом, которому должна вводиться композиция, является младенец.

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. Лиофилизация бактерий является хорошо отработанной процедурой и соответствующие рекомендации приведены, например, в работах [24–26]. Примеры демонстрируют, что композиции лиофилизата являются особенно эффективными. В предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению содержат лиофилизированные бактерии и предназначены для лечения висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК, предпочтительно, для снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  при лечении висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации, композиции по изобретению содержат лиофилизированные бактерии и предназначены для лечения висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК, предпочтительно, для использования с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта СРБ при лечении висцеральной гиперчувствительности. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации, композиция по изобретению содержит лиофилизированные бактерии и предназначена для лечения висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК, предпочтительно, для использования с целью снижения уровней колонизации, сообщества и/или популяции СРБ в желудочно-кишечном тракте при лечении висцеральной гиперчувствительности.

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 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 способным 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 пористой матрице, присоединение или адсорбция на поверхностях твердого носителя, самоагрегация 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 [27-28].

Композиция может быть введена перорально и может иметь форму таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, потому что *Blautia* представляют собой анаэробы. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин C), могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пробиотических 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 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  $1 \times 10^3$  до примерно  $1 \times 10^{11}$  колониеобразующих единиц (КОЕ); например, от примерно  $1 \times 10^7$  до примерно  $1 \times 10^{10}$  КОЕ; в другом примере от примерно  $1 \times 10^6$  до примерно  $1 \times 10^{10}$  КОЕ; в другом примере от примерно  $1 \times 10^7$  до примерно  $1 \times 10^{11}$  КОЕ; в другом примере от примерно  $1 \times 10^8$  до примерно  $1 \times 10^{10}$  КОЕ; в другом примере от примерно  $1 \times 10^8$  до примерно  $1 \times 10^{11}$  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  $1 \times 10^6$  до примерно  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/г, по отношению к весу композиции; например, от примерно  $1 \times 10^8$  до примерно  $1 \times 10^{10}$  КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1 г, 3 г, 5 г и 10 г.

Типично, пробиотик, такой как композиция по изобретению, необязательно в комбинации с по меньшей мере 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 флуктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахариды (или COS), бета-глюканы, 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 флуктоолигосахариды (для простоты обозначаются ниже кц-FOS (FOSs-c.c.)); 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 [29]. Приемлемые для терапевтического применения носители или разбавители хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в источнике [30]. 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, безводная лактоза, сыпучая лактоза, бета-лактоза, сахаристые вещества кукурузы, природные и синтетические

камеди, такие как гуммиарабик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза 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 п-оксибензойной кислоты, например, в некоторых вариантах реализации, консервант выбирают из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-оксибензойной 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 питательные преимущества в дополнение к терапевтическому эффекту по изобретению, такие 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 сходства с обычным компонентом пищи, чем 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 их 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 сласти.

В некоторых вариантах реализации, композиции по изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов рода *Blautia* и не содержат бактерий любого другого рода, или содержат только минимальное (*de minimis*) или биологически незначительное 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 (*de minimis*) или биологически незначительное количество других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут быть культурой, по существу не содержащей другие виды организмов (*species of organism*). В некоторых вариантах реализации, такие композиции могут быть лиофилизатом, по существу не содержащим другие виды 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 незначительное 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 незначительное 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 незначительное 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 из 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 из 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 из 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 видов) 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 разные 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 относящийся к *Blautia hydrogenotrophica* или не относящийся к *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации, в которых композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, вида или рода, индивидуальные бактериальные штаммы, виды или роды могут быть предназначены для отдельного, 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 отдельно и вводиться отдельно, одновременно или последовательно. В некоторых вариантах реализации, более чем один бактериальные штаммы, виды или роды хранятся отдельно, но смешиваются перед использованием.

В некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм для

использования по изобретению получают из фекалий взрослого человека. В некоторых вариантах реализации, в которых 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; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем количество бактериального штамма является достаточным для лечения расстройства при введении нуждающемуся в этом субъекту; и где расстройство представляет собой висцеральная гиперчувствительность, такую как висцеральная гиперчувствительность, ассоциированная с болезнью Крона, неспецифический язвенный колит, функциональная диспепсия, детская колика или, более предпочтительно, СРК.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую: бактериальный штамм по изобретению; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель; причем количество бактериального штамма является достаточным для лечения расстройства при введении нуждающемуся в этом субъекту; и где расстройство представляет собой висцеральная гиперчувствительность, такую как висцеральная гиперчувствительность, ассоциированная с болезнью Крона, неспецифический язвенный колит, функциональная диспепсия или, более предпочтительно, СРК.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой количество бактериального штамма составляет от примерно

$1 \times 10^3$  до примерно  $1 \times 10^{11}$  колониеобразующих единиц на грамм от веса композиции.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г 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, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, где композиция, при хранении в запечатанном контейнере при температуре примерно 4°C или примерно 25 °C, и помещении контейнера в атмосферу с 50% относительной влажности по меньшей мере 80% бактериального штамма, при измерении в колониеобразующих единицах, сохраняет (активность/жизнеспособность) после периода времени, составляющего по меньшей мере примерно: 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года.

В некоторых вариантах реализации, композиция по изобретению предусматривается в герметически запечатанном контейнере, содержащем композицию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах реализации, герметически запечатанный контейнер представляет собой саше или флакон. В некоторых вариантах реализации, композиция по изобретению предусматривается 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, лигвальное 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, склонны 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, [31]). В некоторых вариантах реализации, композиция по своей природе является энтеросолюбивой 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 Assogel (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 [32-34].

Твердая или жидкая среда, используемая для культуры, может быть, например, агаром YSCFA (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),  $\text{NaHCO}_3$  (0,4 г), цистеин (0,1 г),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,045 г),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,045 г),  $\text{NaCl}$  (0,09 г),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,09 г),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,009 г),  $\text{CaCl}_2$  (0,009 г), резазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), *p*-аминобензойная кислота (3 мкг), фолиевая кислота (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 [35-42] 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 будет одинаковым при сравнении двух последовательностей. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичность последовательностей могут быть определены с использованием компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники, например, описанных в разделе 7.7.18 источника [43]. 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 [44].

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 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 - Эффективность бактериальных инокулятов (inocula) в крысиной модели висцеральной гиперчувствительности

##### Резюме

Крыс инокулируют фекальной микробиотой человека с СРК, демонстрирующего висцеральная гиперчувствительность. Крысам затем вводят композиции, содержащие бактериальные штаммы в соответствии с изобретением и затем проводят тестирование с использованием анализа растяжения для измерения висцеральной гиперчувствительности. Было найдено, что композиции по изобретению снижают реакцию крыс на растяжение, что указывает на снижение висцеральной гиперчувствительности.

##### Штамм

*Blautia hydrogenotrophica* (BH), штамм DSM 10507/14294.

##### Композиции и введение

Культура BH (16H) или лиофилизат - вводят с помощью желудочного зонда

Контрольный раствор вводят с помощью желудочного зонда

##### Крысы

Инокулированные микробиотой кишечника человека от субъекта с СРК.

#### Схема исследований

День -14 - крыс инокулируют микробиотой кишечника человека от субъекта с СРК

Дни 0-28 - ежедневная доза культуры ВН или лиофилизата, или контрольного раствора

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

Между днями 14 и 28 - операция с целью имплантации электрода в брюшную полость (для анализа растяжения)

День 28 - анализ растяжения, взятие образцов из слепой кишки для анализа сульфидов и короткоцепочечных жирных кислот (SCFA), подсчет микробиоты в образцах фекалий на селективных средах

#### Результаты

На Фигуре 1 представлены результаты анализа методом кПЦР популяции ВН в образцах фекалий крыс, которым вводили контрольный раствор (СРК) или лиофилизат ВН (СРК+ВН). Наблюдается увеличение популяции ВН в дни 14 и 28 у крыс, получающих лиофилизат ВН, что подтверждает успешную колонизацию.

На Фигуре 2 представлены результаты анализа растяжения. Крыс подвергают колоректальному растяжению и регистрируют число сокращений в минуту в качестве специфической меры висцеральной гиперчувствительности. Крысы, получающие композиции по изобретению, демонстрировали сниженное число сокращений и пониженную висцеральную гиперчувствительность.

Фигуры 3 и 4 иллюстрируют эффекты введения культуры ВН и лиофилизата на микробиоту в образцах фекалий. Введение культуры ВН приводило к заметному снижению (1 десятичный порядок величины (1 log)) сульфатредуцирующих бактерий (СРБ).

Фигура 5 показывает влияние введения лиофилизата ВН на ферментацию микробиоты, измеряемую по концентрации короткоцепочечных жирных кислот в образцах из слепой кишки. Введение лиофилизата ВН приводило к увеличению продуцирования ацетата.

Фигура 6 показывает влияние введения лиофилизата ВН на

ферментацию микробиоты, измеряемую по концентрации сульфида ( $H_2S$ ) в образцах из слепой кишки. Введение ВН приводило к снижению продуцирования сульфида.

#### Выводы

Введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, приводило к успешной колонизации и заметному снижению висцеральной гиперчувствительности, измеряемой с использованием анализа растяжения. Этот эффект наблюдался при введении *Blautia hydrogenotrophica* в виде культуры и в виде лиофилизата. Введение *Blautia hydrogenotrophica* также оказывало заметный эффект на состав и ферментацию микробиоты, с наблюдаемым снижением СРБ и продуцирования сульфидов. Эти данные указывают, что *Blautia hydrogenotrophica* может быть полезным для снижения висцеральной гиперчувствительности, и в частности висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК. Снижение висцеральной гиперчувствительности может быть ассоциировано с наблюдаемым снижением СРБ и продуцирования сульфидов.

Пример 2 - Эффективность бактериального лиофилизата в крысиной модели висцеральной гиперчувствительности

Наблюдения, полученные в Примере 1, были подтверждены в дополнительных экспериментах с использованием лиофилизата штамма DSM 10507/14294 *Blautia hydrogenotrophica* (ВН) и крысиной модели СРК. Как показано на Фигурах 7 и 8, введение лиофилизата ВН обеспечивало статистически значимое снижение числа брюшных сокращений в ответ на растяжение, что указывает на снижение висцеральной гиперчувствительности. На Фигуре 7, фекальный образец от одного субъекта с СРК был использован для инокуляции крыс. На Фигуре 8 образцы фекалий от трех субъектов с СРК были использованы для инокуляции крыс, причем одним из этих субъектов с СРК был субъект с СРК с Фигуры 7. Кроме того, как показано на Фигурах 9 и 10, введение лиофилизата ВН обеспечивало статистически значимое снижение сульфидов. На Фигуре 9 фекальный образец одного субъекта с СРК был использован для инокуляции крыс. На Фигуре 10, образцы фекалий от трех субъектов с СРК были использованы для инокуляции крыс, причем одним из этих субъектов с СРК был субъект с СРК с Фигуры 9.

Пример 3 - Эффекты бактериального лиофилизата у здоровых крыс

Были изучены эффекты введения лиофилизата штамма DSM 10507/14294 *Blautia hydrogenotrophica* (ВН) на здоровых крыс Н1М и результаты представлены на Фигурах 11-14. Дополнительные подробности, касающиеся экспериментов, приведены выше в описаниях фигур. Фигура 11 показывает, что пригодная доза ВН для крыс составляет  $10^9$  клеток в день или больше. Фигура 12 показывает, что в этих экспериментах ВН не приводит к постоянной колонизации пищеварительного тракта крыс. Фигура 13 показывает, что ВН присутствует преимущественно в слепой кишке. Фигура 14 показывает, что введение ВН индуцирует увеличение ацетата, а также продуцирование бутирата.

Пример 4 - Эффективность бактериального лиофилизата в крысиной модели висцеральной гиперчувствительности

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 З-СРК (с запором) или У-СРК (несубтипированный). Большинство экспериментов проводилось с образцами фекалий от пациентов с СРК, демонстрирующих висцеральная гиперчувствительность (ВН (висцеральная гиперчувствительность), измеренная с помощью баростата). Результаты представлены на Фигурах 15 и 16, и дополнительные подробности экспериментов приведены выше в описаниях фигур. Фигура 15 подтверждает, что введение лиофилизата ВН вызывает статистически значимое снижение сульфатредуцирующих бактерий. Как и ожидалось, также наблюдается увеличение ВН. Фигура 16 показывает, что введение ВН индуцировало статистически значимое снижение количества  $H_2S$ , продуцируемого крысами Н1М-СРК. Сверхпродуцирование  $H_2S$  в слепой кишке микробиотой кишечника ассоциировано с висцеральной гиперчувствительностью.

Пример 5 - Изменения симптомов пациента в фазе I клинических испытаний

Была проведена фаза I клинических испытаний, в которых

*Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", штамм, депонированный с номером доступа DSM 10507, а также под номером доступа DSM 14294) вводили пациентам с синдромом раздраженного кишечника (СРК). Пациентам вводили Blautix в период введения препарата (дни 1-16), дни 19-23 составляют период вымывания. Было найдено, что Blautix является безопасным и хорошо переносимым. Контролировали четыре симптома, одним из которых была боль в животе. 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 Фигурах 17 и 18.

При сравнении описываемых пациентами симптомов в день 16 с базовыми показателями дня 1, 82% из 17 пациентов с СРК, получавших Blautix, сообщили об улучшении симптомов (Фигура 17). Улучшение симптомов, одним из которых была боль в животе, поддерживает использование Blautix для лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности. Особо отметим, что пациенты 3.02, 3.17 и 3.24, испытывавшие сильную боль в животе в начале испытаний, имели, соответственно, слабую, слабую, и отсутствие боли в животе, в день 15/16.

50% пациентов, получавших плацебо, сообщили об улучшении симптомов (Фигура 17). 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 [45].

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 фазе I клинических испытаний: 41% пациентов с СРК сообщили об ухудшении симптомов после прекращения приема Blautix (Фигура 18). Ухудшение

симптомов, одним из которых является боль в животе, после прекращения приема *Blautix*, таким образом, также поддерживает использование *Blautix* для лечения или предотвращения висцеральной гиперчувствительности.

**Пример 6 - Эффективность воздействия *B. hydrogenotrophica* на висцеральная гиперчувствительность, исследованную на крысиной модели, ассоциированной с микробиотой человека (крыс НМА)**

#### Резюме

Группы по 16 безмикробных крыс (включающие 8 крыс в контрольной группе и 8 крыс в группе лечения) инокулировали фекальной микробиотой от человека с СРК (крысы НМА-СРК). Проводили 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 чувствительности внутренних органов. Таким образом, использовали 24 крысы, ассоциированные с СРК-микробиотой (контроль), 24 крысы, ассоциированные с СРК-микробиотой, получающие *Blautix*, и 20 крыс, ассоциированных с микробиотой здорового человека. Половине крыс НМА-СРК затем вводили в течение 28 дней композицию, содержащую бактериальный штамм *B. hydrogenotrophica* в соответствии с изобретением, а другая половина животных получала контрольный раствор. После 28 дней введения, всех крыс НМА тестировали методом анализа растяжения ободочной кишки для измерения чувствительности внутренних органов. Было найдено, что композиция по изобретению снижает реакцию на растяжение у крыс НМА-СРК, что указывает на снижение висцеральной гиперчувствительности, которая доходила до нормочувствительности, наблюдавшейся у крыс НМА-здорового человека.

#### Штамм

*Blautia hydrogenotrophica* (ВН), штамм DSM 10507<sup>T</sup>/14294.

#### Композиция и введение

Лиофилизат ВН суспендируют в стерильном минеральном растворе до концентрации  $10^{10}$  бактерий на мл. Два миллилитра этой суспензии вводят ежедневно каждой крысе НМА-СРК с помощью

желудочного зонда, на протяжении 28 дней.

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

#### Крысы

Самцов безмикробных крыс Fisher (в возрасте 10 недель) инокулировали фекальной микробиотой человека от субъекта с СРК (крысы НМА-СРК). Шестнадцать крыс инокулируют одним и тем же фекальным инокулятом человека. Проводят три последовательных эксперимента с образцами фекалий от трех разных субъектов с СРК. Две другие группы из десяти крыс инокулировали образцами фекалий от 2 здоровых субъектов (нормочувствительные контрольные группы).

#### Схема исследований

День -14 - Инокуляция безмикробных крыс фекальной микробиотой человека.

Дни 0-28 - Ежедневная доза лиофилизата ВН (группа анализа), или контрольного раствора (контрольная группа) с помощью желудочного зонда

Между днями 14 и 22 - операция с целью имплантации электрода в брюшную полость (для анализа растяжения)

Дни 22-28 - Адаптация крыс во избежание стресса, ассоциированного с тестом на растяжение.

День 28 - Анализ растяжения и эвтаназия животных для сбора образцов из слепой кишки для анализа сульфидов и короткоцепочечных жирных кислот (SCFA).

Дни 0, 14 и 28 - Сбор образцов фекалий для проведения 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 **фигуре 19** представлены результаты анализа методом кПЦР популяции *B. hydrogenotrophica* в образцах фекалий крыс НМА-СРК, получавших контрольный раствор или лиофилизат ВН. Значительное увеличение популяции ВН наблюдалось в конце периода введения (D

28) у крыс, получавших лиофилизат ВН, что подтверждает успешную доставку ВН в ободочную кишку.

На **фигуре 20** представлены результаты анализа растяжения. Крыс подвергают колоректальному растяжению и регистрируют число сокращений за 5 минут как специфическую меру висцеральной гиперчувствительности. Крысы НМА-СРК, получавшие композицию по изобретению, демонстрируют снижение сокращений, что отражает снижение висцеральной гиперчувствительности. После введения *B. hydrogenotrophica*, крысы НМА-СРК демонстрировали нормочувствительность внутренних органов, по сравнению с результатами, полученными для крыс НМА-здорового человека.

**фигура 21** показывает эффекты введения *B. hydrogenotrophica* на некоторые группы микроорганизмов из фекальной микробиоты, для которых ранее наблюдались изменения у пациентов с СРК. Введение ВН приводило к значительному снижению сульфатредуцирующих бактерий (СРБ).

**фигура 22** показывает влияние введения ВН на концентрацию сульфидов ( $H_2S$ ) в образцах из слепой кишки крыс НМА-СРК. Введение ВН приводило к значительному снижению продуцирования сульфидов. Данные на Фигуре 22 совпадают с приведенными на Фигуре 10, но масштаб отличается.

**фигура 23** показывает влияние введения ВН на основные ферментативные метаболиты – короткоцепочечные жирные кислоты – в образцах из слепой кишки крыс НМА-СРК. Введение ВН приводило к значительному увеличению концентрации ацетата, а также к значительному увеличению концентрации бутирата (Фигура 23b).

#### Выводы

Введение композиции, содержащей *Blautia hydrogenotrophica*, приводит к значительному снижению висцеральной гиперчувствительности, измеряемой с помощью анализа растяжения. Было найдено, что после приема препарата чувствительность внутренних органов у крыс НМА-СРК была схожей с показателями, измеренными для крыс НМА-здорового человека. Введение композиции, содержащей *B. hydrogenotrophica*, может восстанавливать чувствительность внутренних органов животных НМА-СРК до нормальной. Введение *Blautia hydrogenotrophica* также

оказывает значительный эффект на состав микробиоты и ферментацию и, особенно, индуцирует важные снижения СРБ и продуцирования сульфидов. Эти данные указывают, что *Blautia hydrogenotrophica* могут быть полезными для снижения висцеральной гиперчувствительности, и в частности висцеральной гиперчувствительности, ассоциированной с СРК. Снижение висцеральной гиперчувствительности может быть ассоциировано с наблюдаемым снижением СРБ и продуцирования сульфидов.

#### **Пример 7 - Проверка устойчивости**

Композицию, описанную в данном документе, содержащую по меньшей мере один бактериальный штамм, описанный в данном документе. зранят в запечатанном контейнере при температуре 25°C или 4°C и контейнер помещают в атмосферу с 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% относительной влажности. После 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет, 2,5 лет 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.

#### **Последовательности**

SEQ ID NO:1 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма GAM6-1 *Blautia stercoris*, частичная последовательность - NM626177)

1 tgcaagtcga gsgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag  
ggactgagcg

61 gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac  
agttggaaac

121 ggctgctaат accgcataag cgcacgggtat cgcатgatac агtgтgаааа  
actccggtgg

181 tatgagatgg acccgctct gattagctag ttggaggggt aacggccсac  
саaggсgасg

241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg  
gcccagactc

301 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggga aaccctgatg  
cagcgacgcc

361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaaga

aatgacggt  
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac  
gtagggggca  
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa  
gtctgatgtg  
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag  
tgccggagag  
601 gtaagcggaa ttcttagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa  
caccagtggc  
661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg  
agcaaacagg  
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttgg  
ggagcaaagc  
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt  
cgcaagaatg  
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt  
taattcgaag  
901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa  
tggaaccttt  
961 ccttcggggac agagaagaca ggtgggtgcat ggttgctcgtc agctcgtgct  
gtgagatggt  
1021 gggттаagtc ccgcaacgag cgcaaccctc atcctcagta gccagcaggt  
gaagctgggc  
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgctc  
aatcatcat  
1141 gcccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg  
aagcgagccc  
1201 gcgaggggga gcaaатссса аааатаасgt сссagtтсgg actgcagtct  
gcaactcgac  
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgцggtgaa  
tacgttccccg  
1321 ggtcttgtag acaccgcccg tcacaccatg ggagtсagta acgcccgaag tc  
SEQ ID NO:2 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма WAL 14507  
*Blautia wexlerae*, частичная последовательность - EF036467)  
1 caagtcgaac ggggaattant ttattgaaac ttcggctcgat ttaatttaat  
tctagtggcg

61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt  
cagaaatggc

121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact  
ccggtggtat

181 aagatggacc cgcggttgat tagcttgttg gtggggtaac ggcccaccaa  
ggcgacgatc

241 catagccggc ctgagagggg 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 gtaaaggag cgtagacggg gtggcaagtc  
tgatgtgaaa

541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc  
cggaggggta

601 agcgggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac  
cagtggcgaa

661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc  
aacacaggatt

721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt  
ggcaaagcca

781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg  
caagaatgaa

841 actcaaagga attgacgggg acccgcaaaa gcggtggagc atgtggttta  
attcgaagca

901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc  
ggatctttcc

961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgcatg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt  
gagatggttg

1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa  
ggtgggcact

1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa  
tcatcatgcc

1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaaag  
 cgagattgtg  
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca  
 acccgactac  
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cgggtgaatac  
 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  
 AACCTGCCTCATAACAGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTA  
 TCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTG  
 GAGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTG  
 GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAA  
 ACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGG  
 GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
 CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTC  
 TGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGA  
 GAGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCG  
 AAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTG  
 CCGCAGCAAACGCAATAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAA  
 TTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC  
 CAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTTTCCTTCGGGACAGAGAAGACAGG  
 TGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
 CCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGG  
 AGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAA  
 TGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGCCCGGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTC  
 GGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC  
 GCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCC  
 GAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTGGGGTGAAGT  
 CTAGGGGGT

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

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGG  
 TAACCTGCCTTATACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGA  
 GCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTT  
 GGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATT  
 GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGA  
 AACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAG  
 GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
 ACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGT  
 CTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCTGTGGACTGCATTGGAACTGTCATACTTGAGTGCCGG  
 AGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGC  
 GAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
 GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGG  
 TGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGG  
 AATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT  
 TACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGAC  
 AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCC GCAACGAGCGC  
 AACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCT  
 GGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTAC  
 AATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCCAAAATAACGTCCCAGT  
 TCGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATG  
 CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGC  
 CCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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 gcggacgggt gagtaacgcg  
 tgggtaacct  
 121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag  
 cgcacagctt  
 181 cgcatagaag ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcgttg  
 gattagctag  
 241 ttggtgaggt aacggcccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag  
 ggtgaacggc

301 cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg  
gaatattgca

361 caatggggga aaccctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct  
cggtatgtaa

421 acttctatca gcaggaaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg  
ctaattacgt

481 gccagcagcc gcggtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg  
ggtgtaaagg

541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg  
tggactgcat

601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttcctagtgt  
agcggtgaaa

661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg  
taactgacgt

721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc  
acgctgtaaa

781 cgatgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac  
gcaataagta

841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg  
gggaccgca

901 caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc  
aaatcttgac

961 atccctctga ccgggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac  
aggtggtgca

1021 tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga  
gcgcaaccct

1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag  
ggataacctg

1141 gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttgggct  
acacacgtgc

1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaactctc  
aaaaataacg

1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc  
tagtaatcgc

1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggctcttgta cacaccgccc  
gtcacaccat

1381 gggagtcagt aacgccccgaa 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] Robinson and Gebhart (2008) *Mol Interv,* 8(5): 242-253.
- [23] Zhou et al. (2010) *Pain.* 148(3): 454-461.
- [24] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.

- [25] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [26] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
- [27] Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.
- [28] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
- [29] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [30] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [31] US 2016/0067188
- [32] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [33] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [34] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
- [35] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [36] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [37] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [38] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [39] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [40] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [41] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols).
- [42] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [43] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30

[44] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

[45] XIFAXAN - rifaximin tablet, Salix Pharmaceuticals, Inc. - FDA Highlights of Prescribing Information, Revised November 2015.

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм с последовательностью 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:5, для использования в способе лечения или профилактики висцеральной гиперчувствительности, где бактериальный штамм не является штаммом вида *Blautia hydrogenotrophica*.

2. Композиция по п. 1, где висцеральная гиперчувствительность ассоциирована с СРК (синдромом раздраженного кишечника), болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом, функциональной диспепсией или детской коликой.

3. Композиция по п. 2, где висцеральная гиперчувствительность ассоциирована с СРК, болезнью Крона, неспецифическим язвенным колитом или функциональной диспепсией.

4. Композиция по п. 1, где композиция предназначена для применения в лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом СРК, болезни Крона, неспецифического язвенного колита, функциональной диспепсии или детской колики.

5. Композиция по п. 4, где композиция предназначена для применения в лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом СРК, болезни Крона, неспецифического язвенного колита или функциональной диспепсии.

6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция предназначена для применения с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта сульфатредуцирующими бактериями (СРБ) при лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности.

7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция предназначена для применения с целью снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте при лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности.

8. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция предназначена для применения в лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности у пациента,

страдающего от болезненного растяжения желудочно-кишечного тракта, в частности, в толстой или прямой кишке.

9. Композиция по любому из пп. 1-8, где бактериальный штамм является штаммом вида *Blautia stercoris*.

10. Композиция по любому из пунктов 1-8, где бактериальный штамм является штаммом вида *Blautia wexlerae*.

11. Композиция по любому из пп. 1-8, где бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO:5, или который имеет последовательность 16s rRNA SEQ ID NO:5.

12. Композиция по любому из пп. 1-8, где бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Blautia stercoris*.

13. Композиция по любому из пп. 1-8, где бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Blautia wexlerae*.

14. Композиция по п. 1, где композиция содержит бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, для применения в способе лечения или профилактики висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом СРК.

15. Композиция по п. 1, где композиция содержит бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, для применения с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта сульфатредуцирующими бактериями (СРБ), снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте при лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности.

16. Композиция по п. 1, где композиция содержит бактериальный штамм вида *Blautia stercoris*, для применения в способе лечения или профилактики висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом СРК.

17. Композиция по п. 1, где композиция содержит

бактериальный штамм вида *Blautia stercoris*, для применения с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта сульфатредуцирующими бактериями (СРБ), снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте при лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности.

18. Композиция по пункту 1, где композиция содержит бактериальный штамм вида *Blautia wexlerae*, для применения в способе лечения или профилактики висцеральной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом СРК.

19. Композиция по п. 1, где композиция содержит бактериальный штамм вида *Blautia wexlerae*, для применения с целью снижения колонизации желудочно-кишечного тракта сульфатредуцирующими бактериями (СРБ), снижения уровней  $H_2S$  или предотвращения повышенных уровней  $H_2S$  в желудочно-кишечном тракте при лечении или профилактике висцеральной гиперчувствительности.

20. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция предназначена для перорального введения.

21. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

22. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где бактериальный штамм является лиофилизированным.

23. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где бактериальный штамм является жизнеспособным.

24. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция содержит один штамм рода *Blautia*.

25. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая содержит бактериальный штамм *Blautia* как часть микробного консорциума.

26. Пищевой продукт, содержащий композицию по любому из предшествующих пунктов, для применения по любому из предшествующих пунктов.

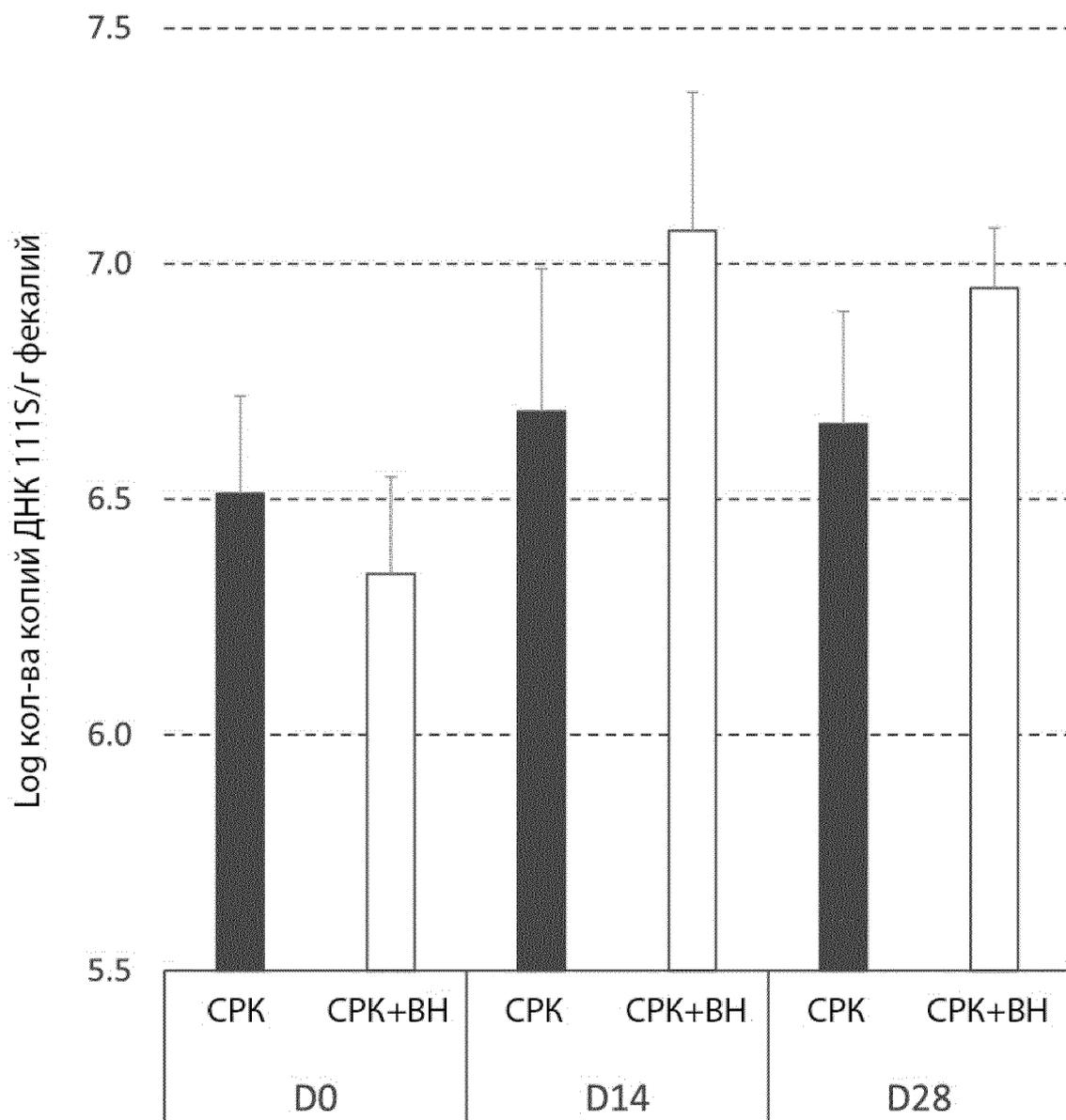
27. Вакцинная композиция, содержащая композицию по любому из предшествующих пунктов, для применения по любому из предшествующих пунктов.

28. Способ лечения или профилактики висцеральной

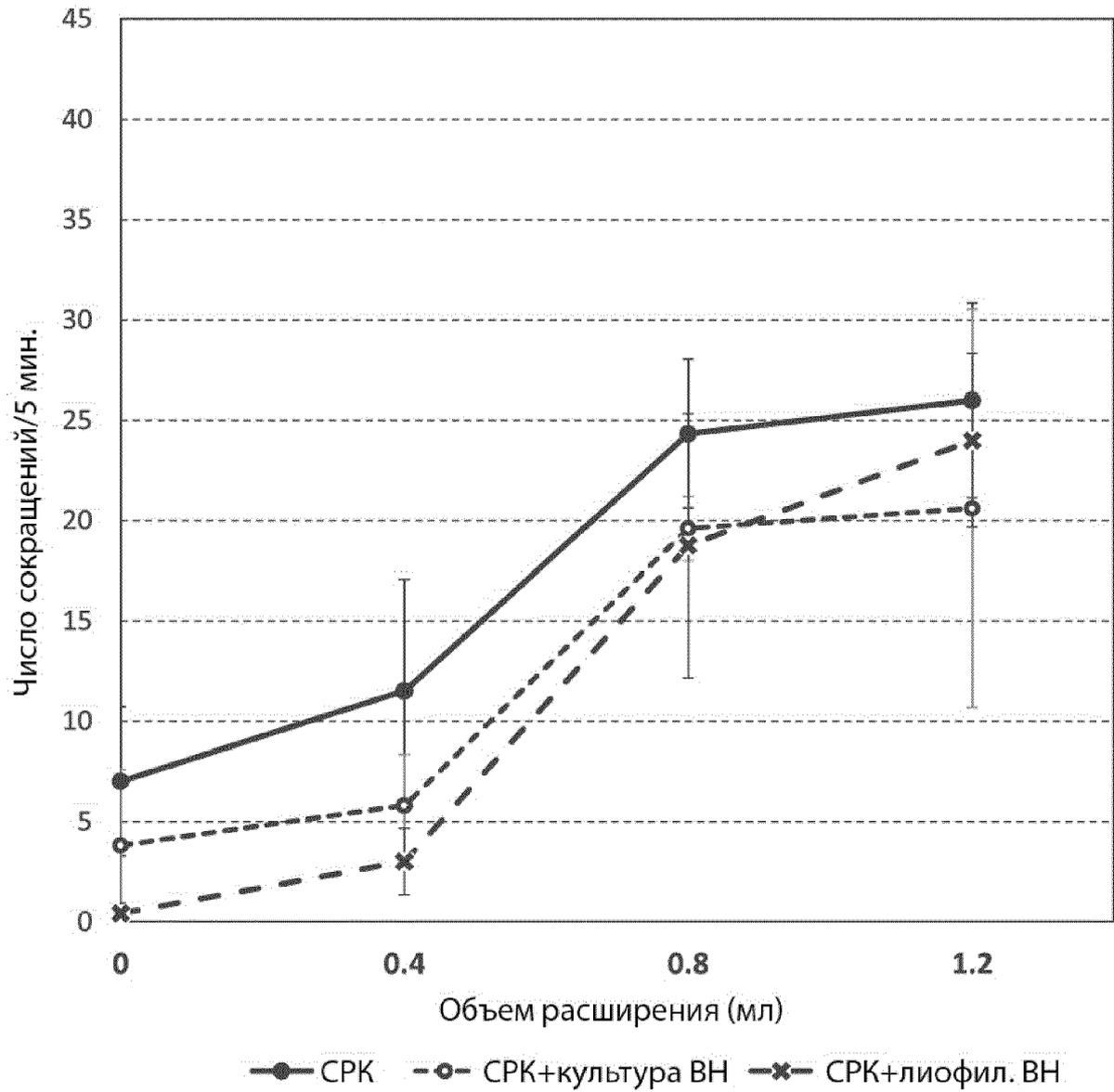
гиперчувствительности, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм с последовательностью 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:5 нуждающемуся в этом пациенту, где бактериальный штамм не является штаммом вида *Blautia hydrogenotrophica*.

29. Применение композиции, содержащей бактериальный штамм с последовательностью 16s, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:5, лечения или профилактики висцеральной гиперчувствительности, где бактериальный штамм не является штаммом вида *Blautia hydrogenotrophica*.

Фиг. 1

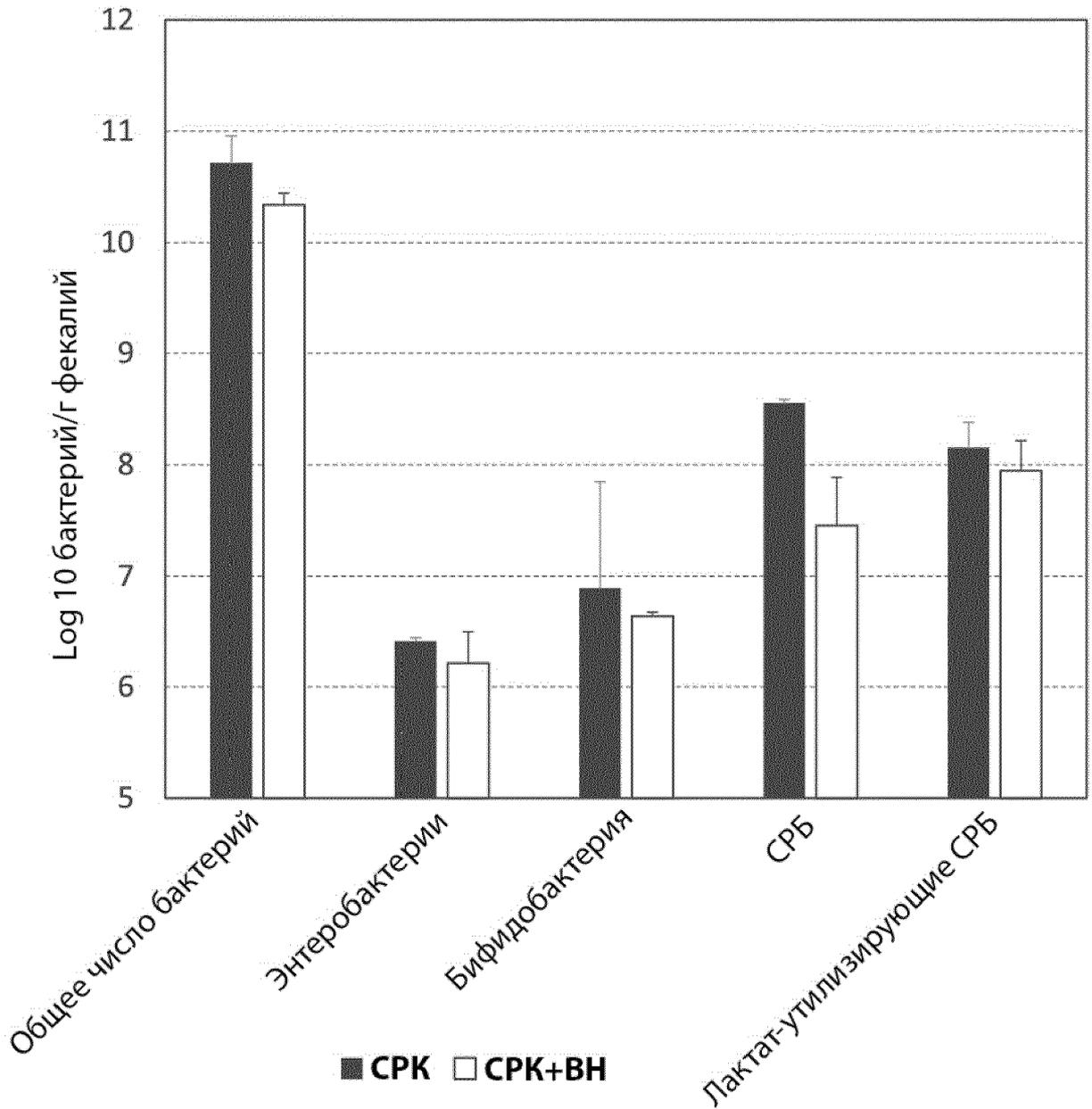


Фиг. 2



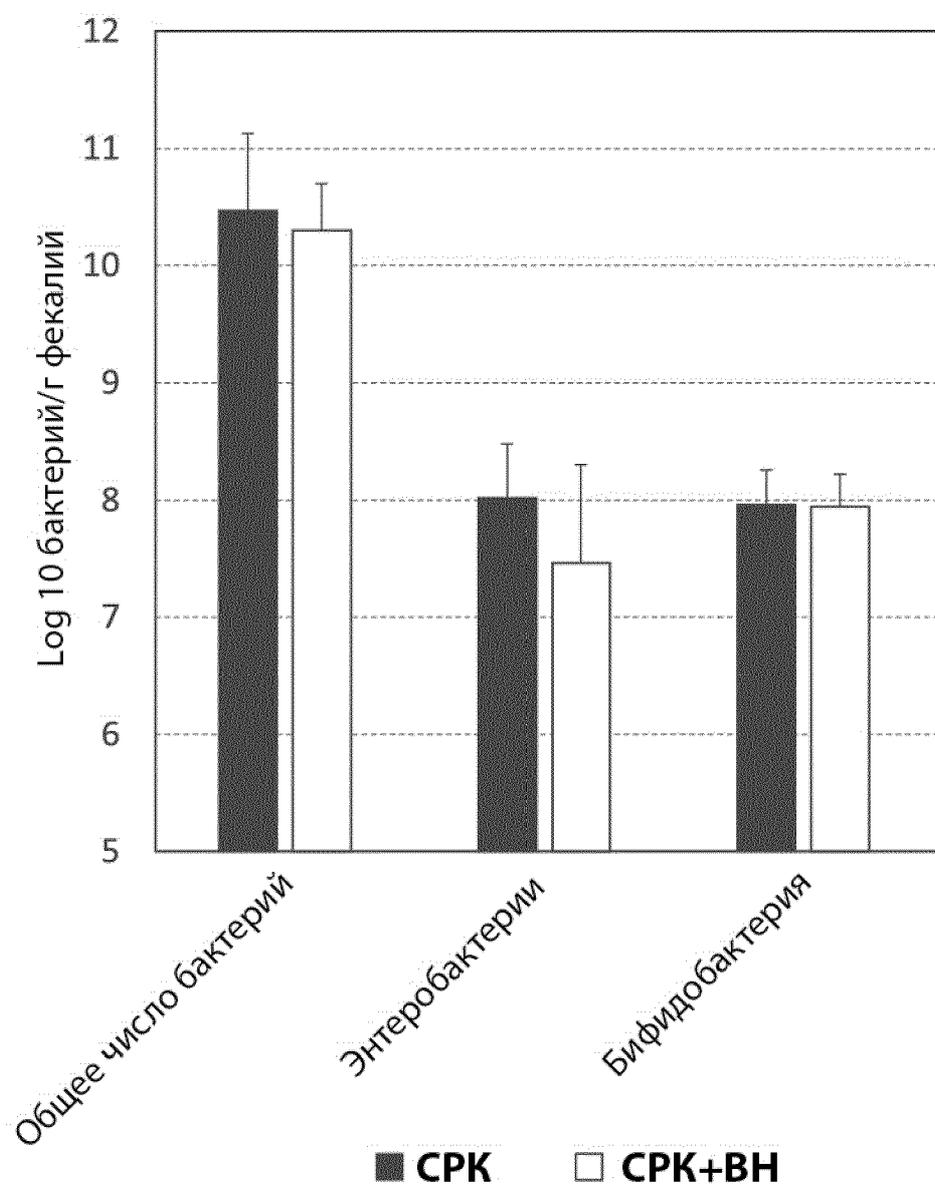
Фиг. 3

## Влияние культуры ВН на микробиоту



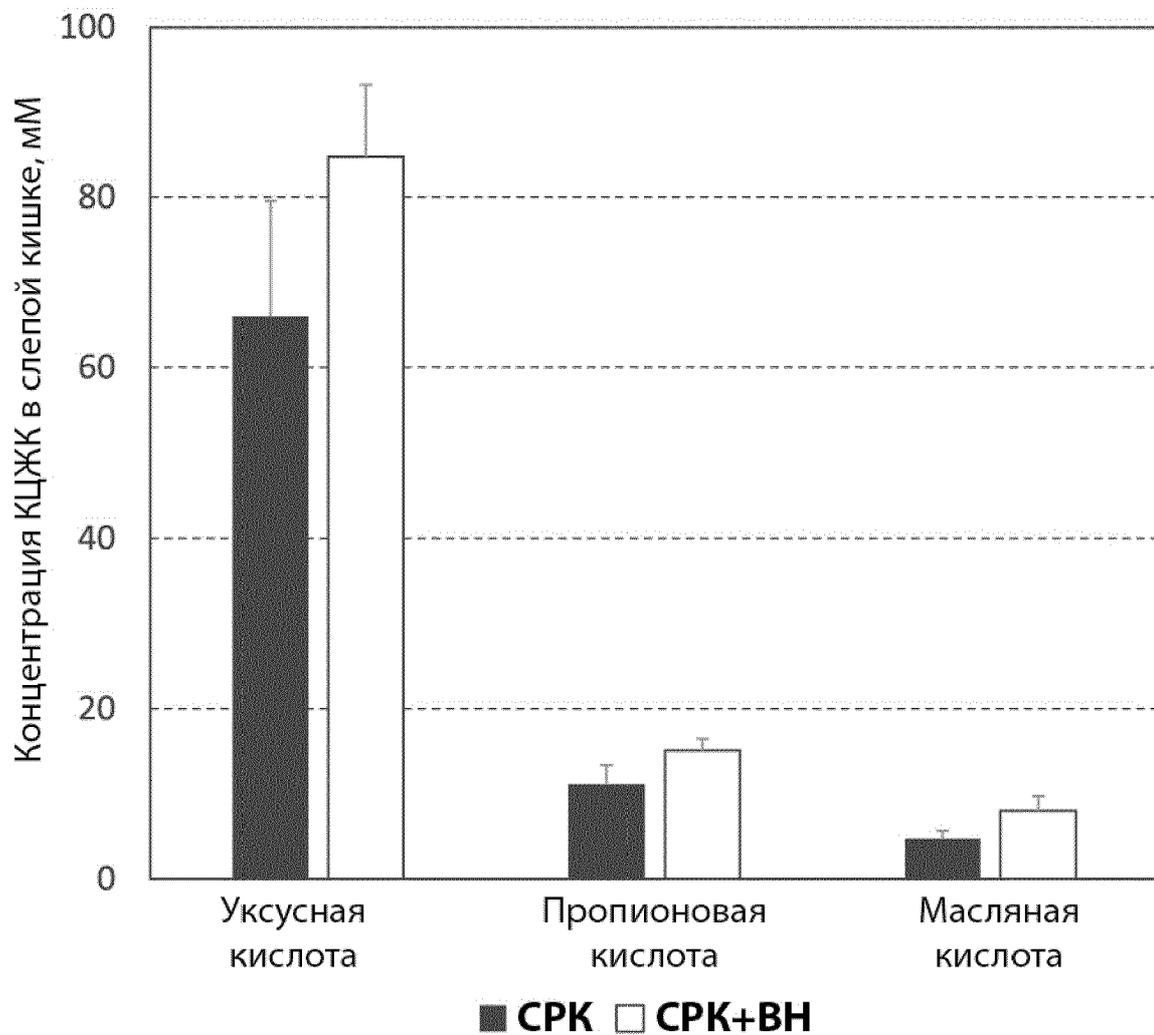
Фиг. 4

## Влияние лиофилизата ВН на микробиоту



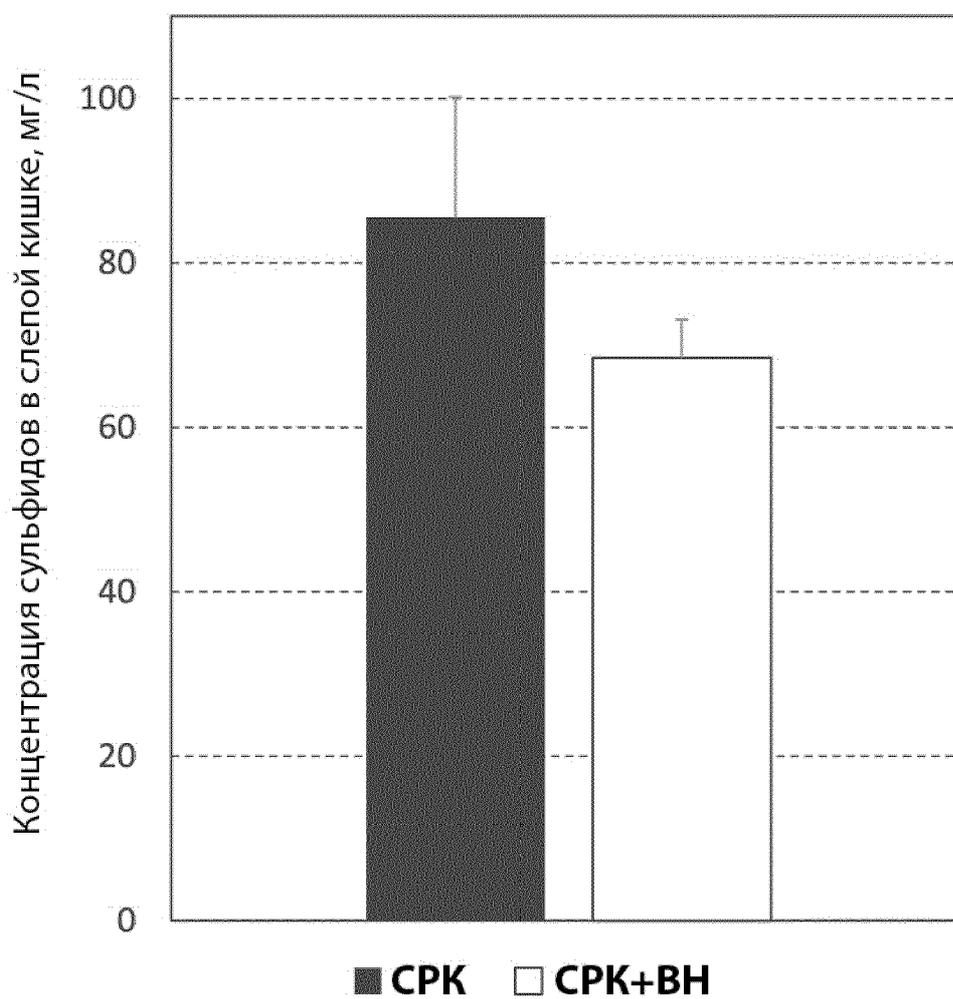
Фиг. 5

**Влияние ВН на концентрацию ферментации микробиоты слепой кишки – короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК)**

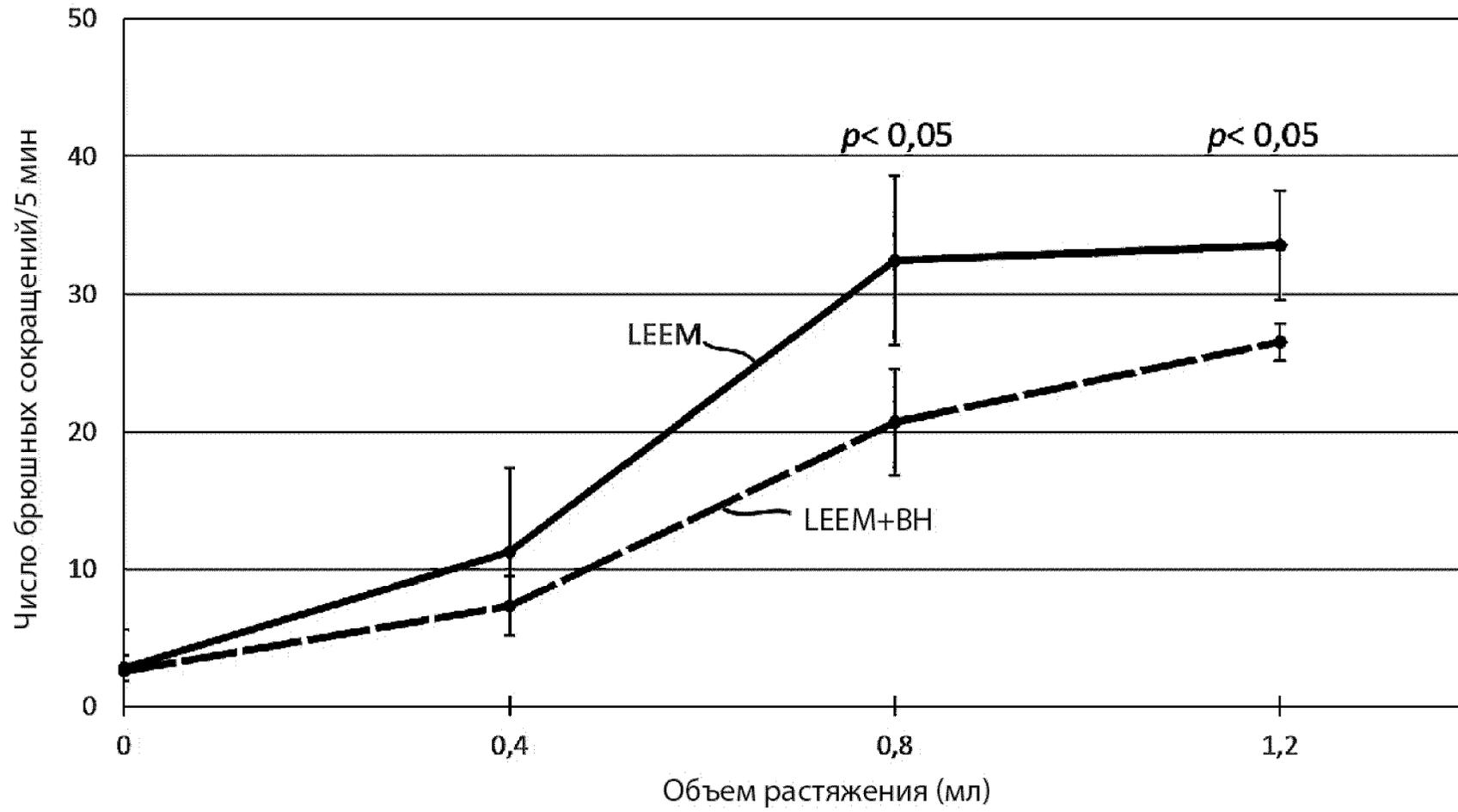


Фиг. 6

**Влияние лиофилизата ВН на ферментацию микробиоты  
– сульфиды в слепой кишке**

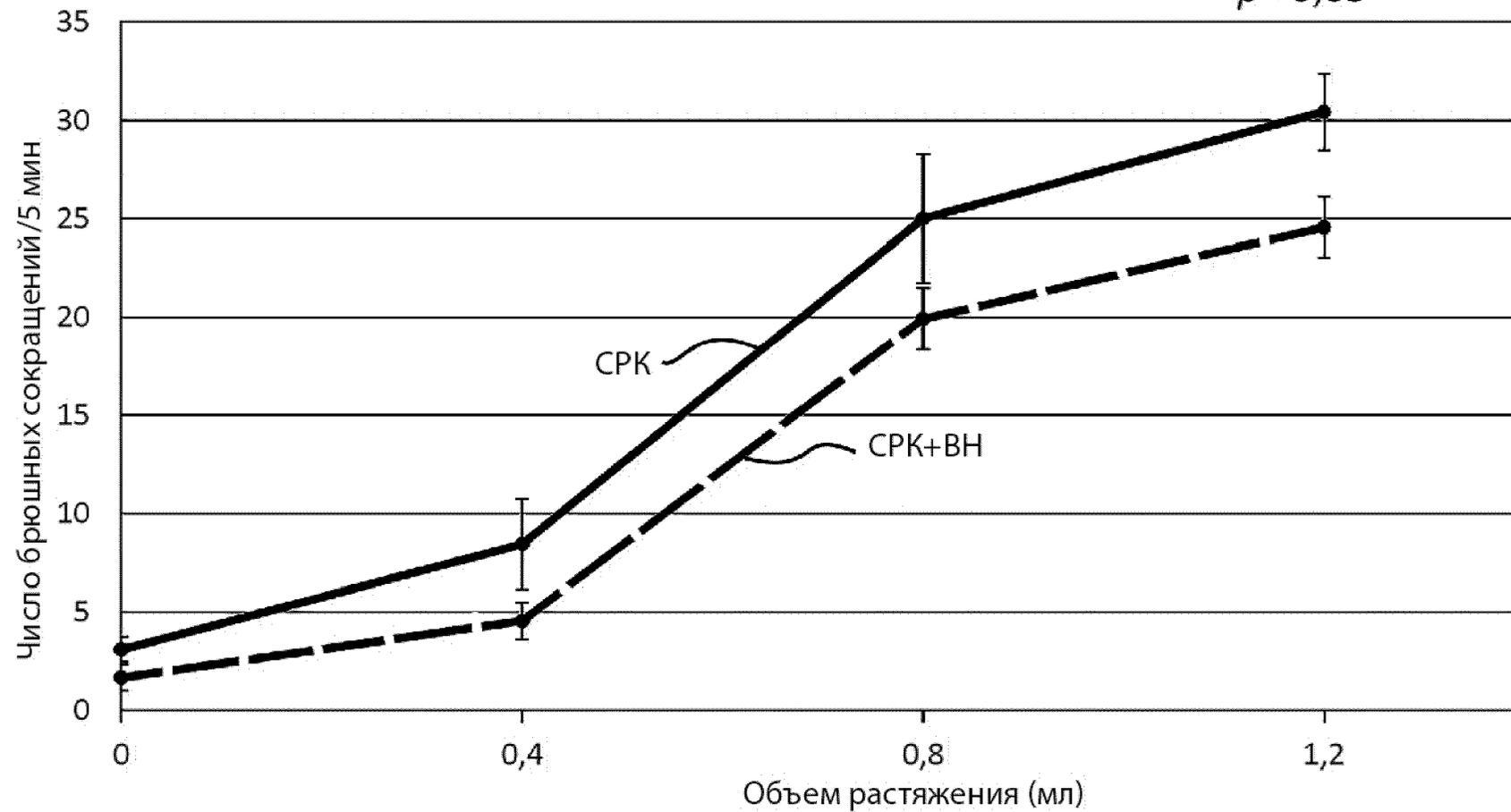


Фиг. 7

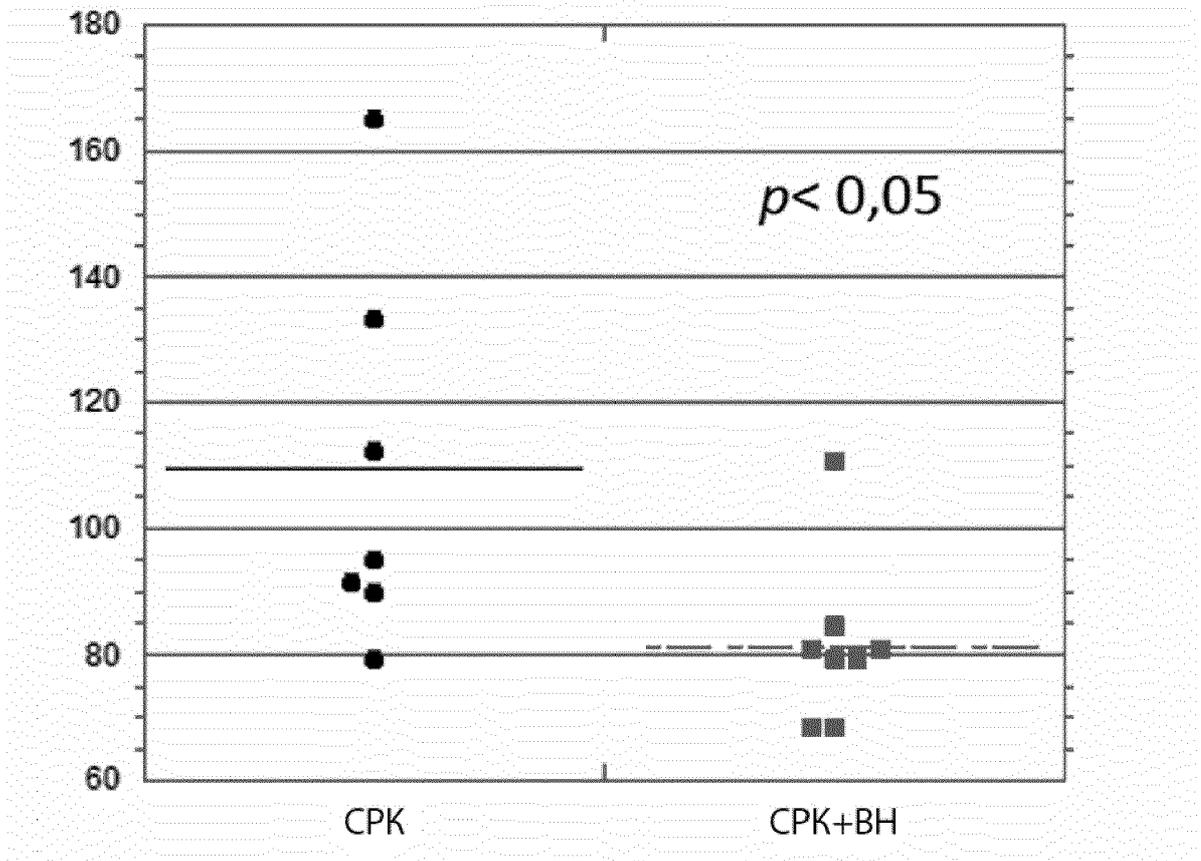


Фиг. 8

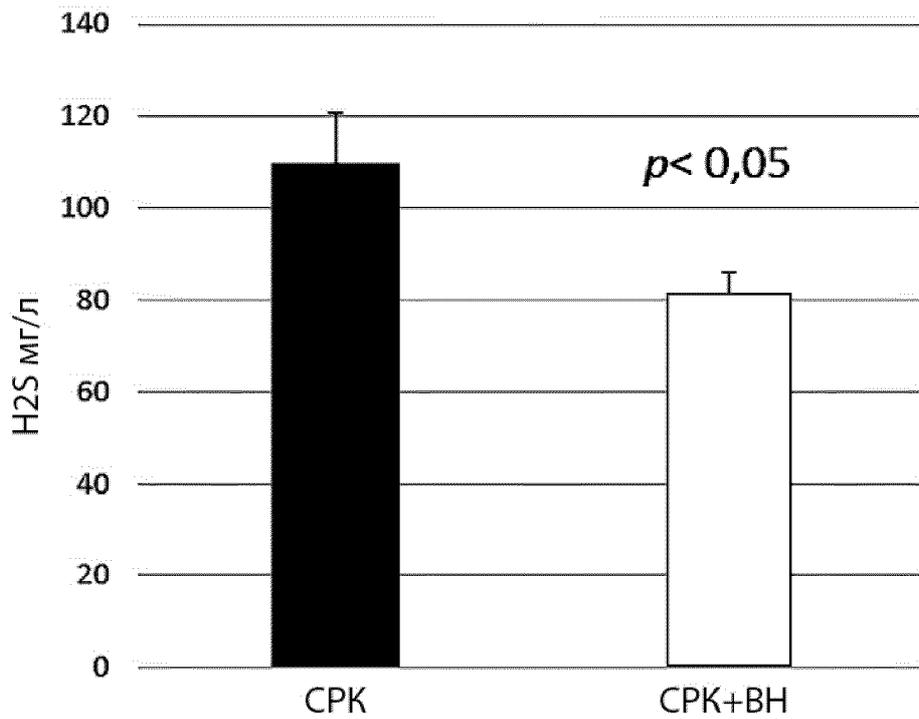
$p < 0,05$



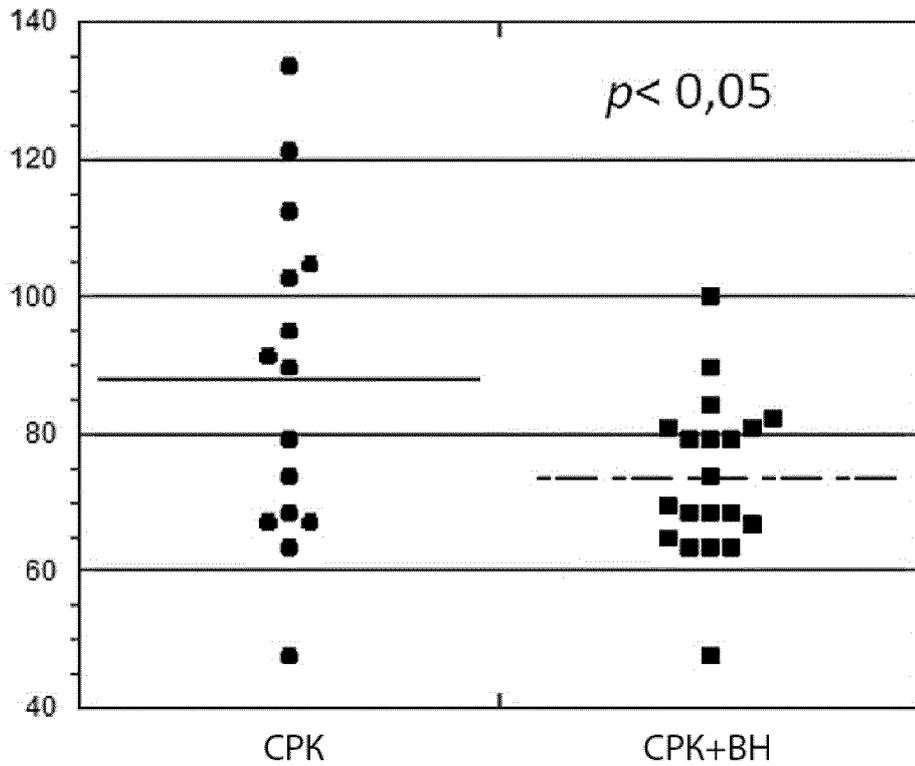
Фиг. 9А



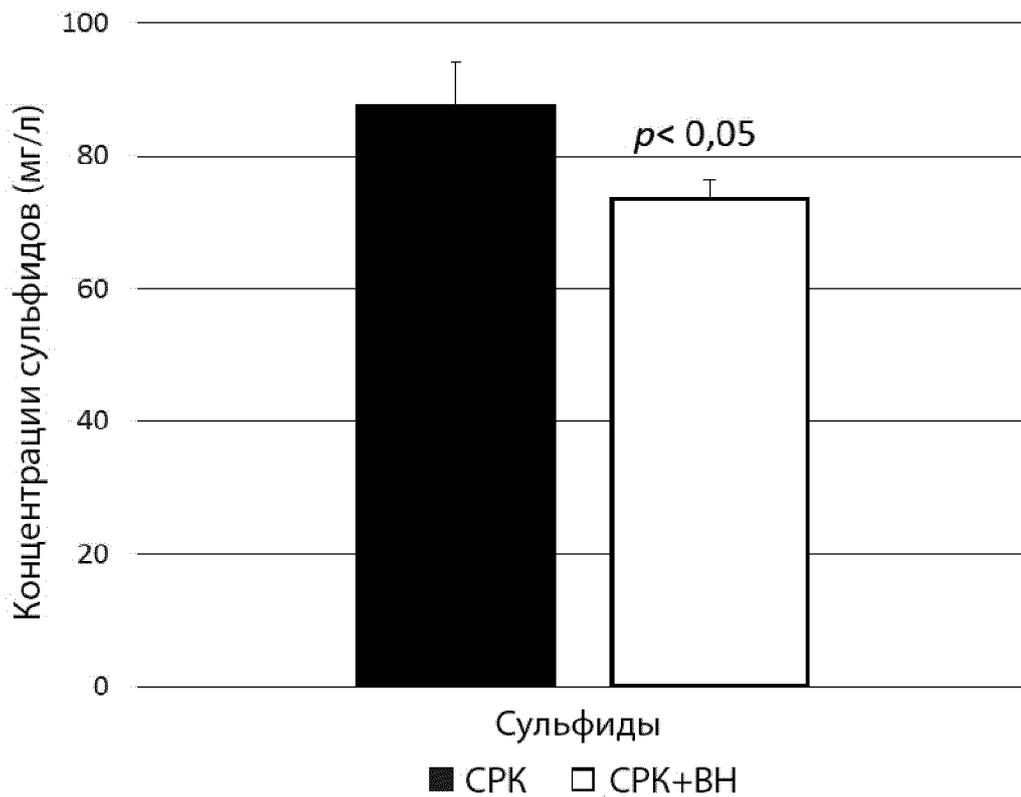
Фиг. 9В



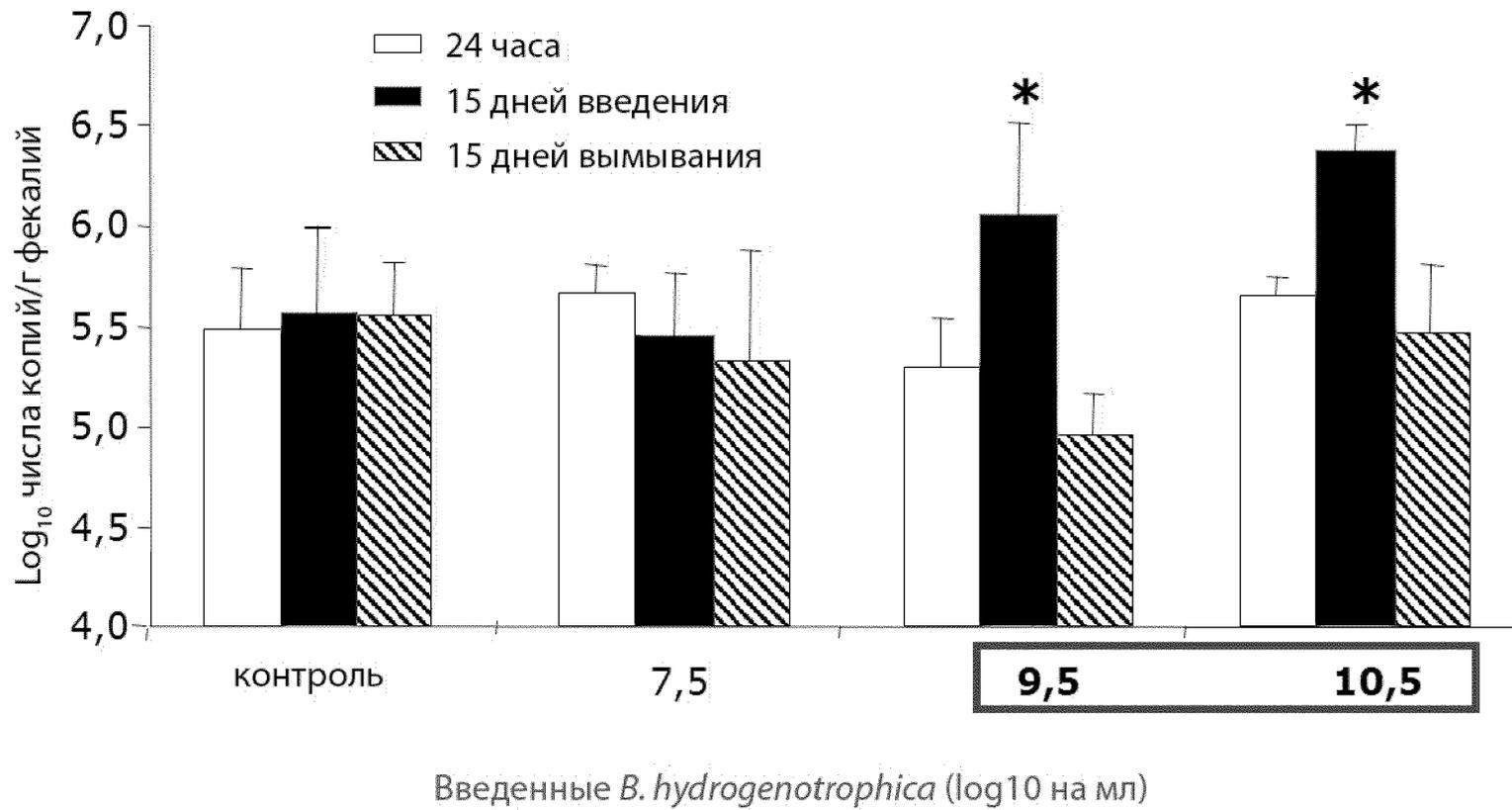
Фиг. 10А



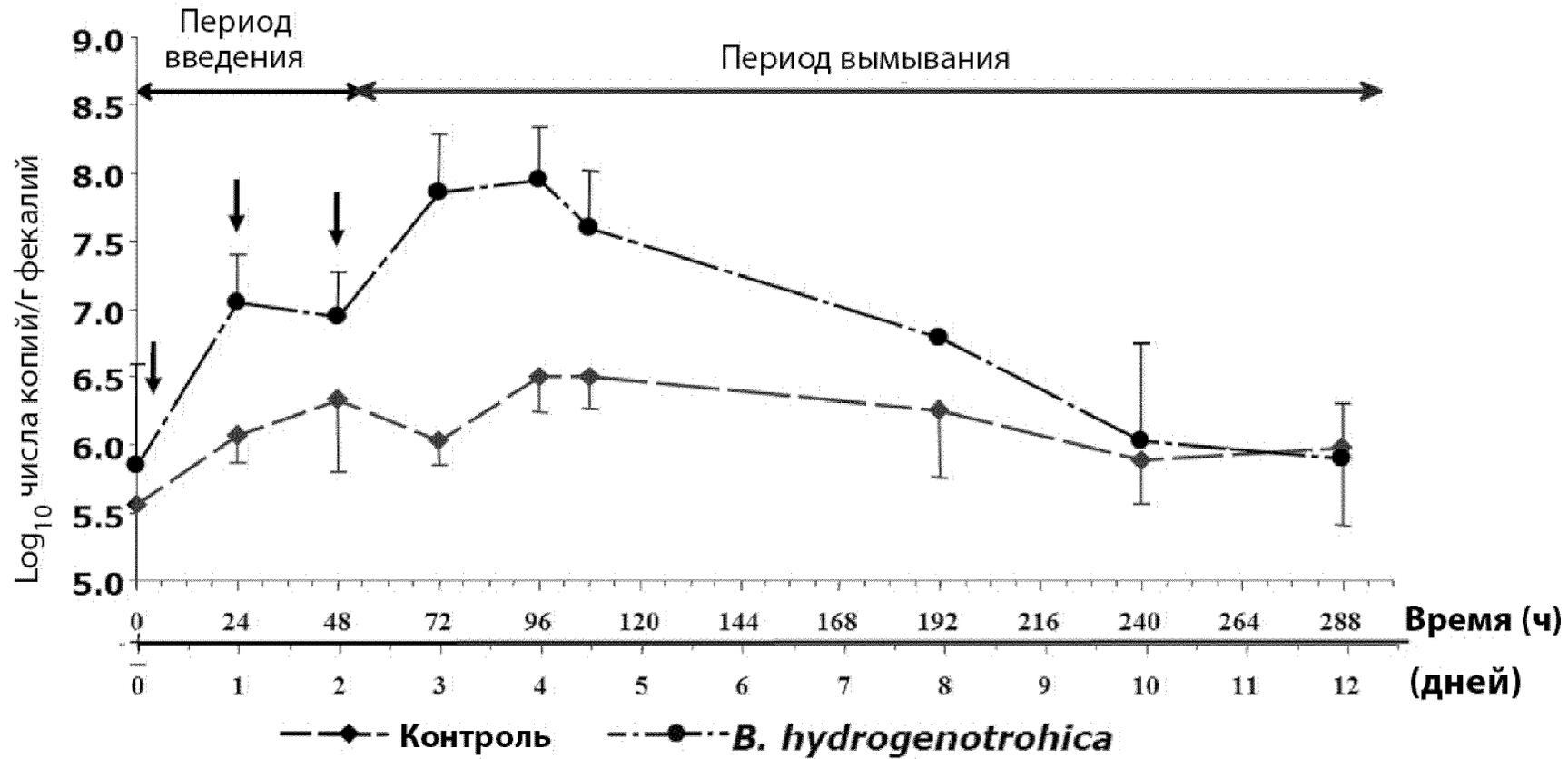
Фиг. 10В



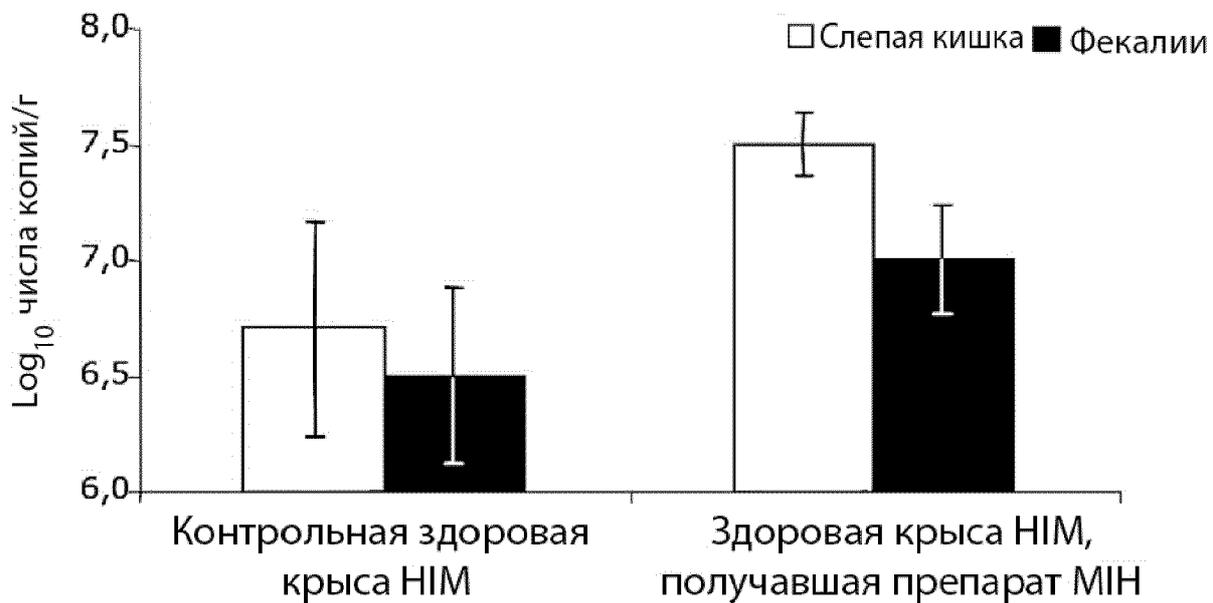
Фиг. 11



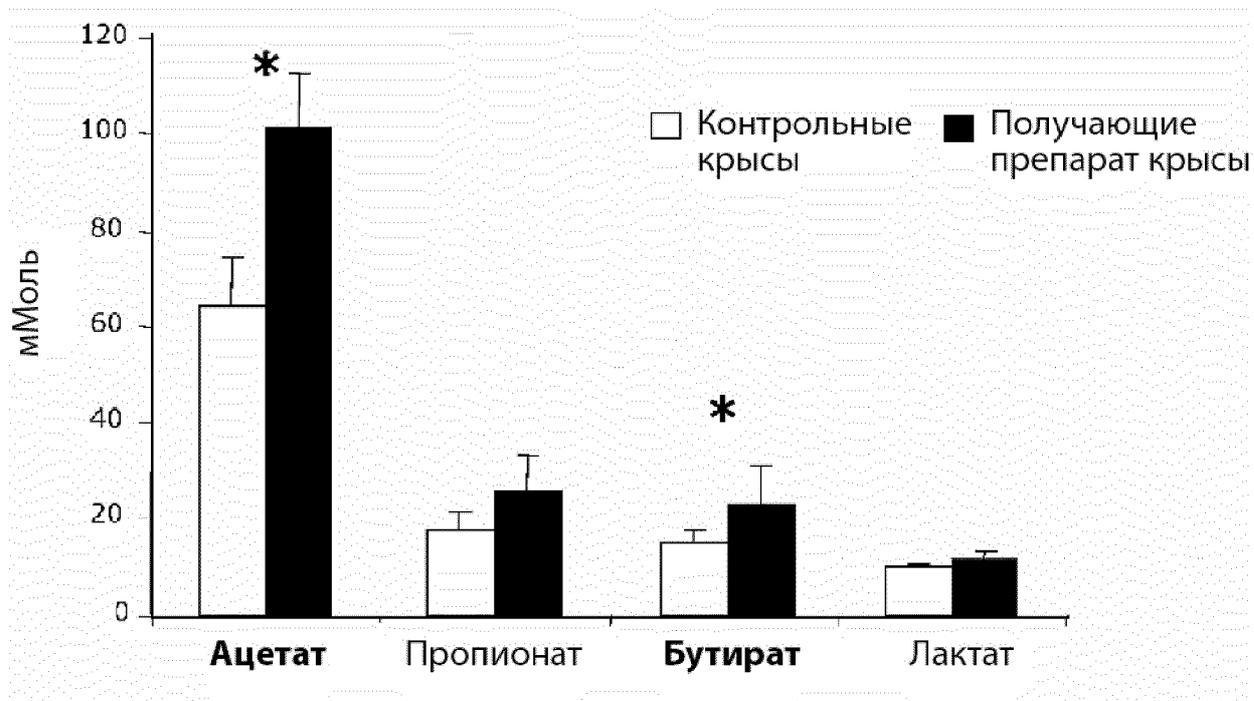
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

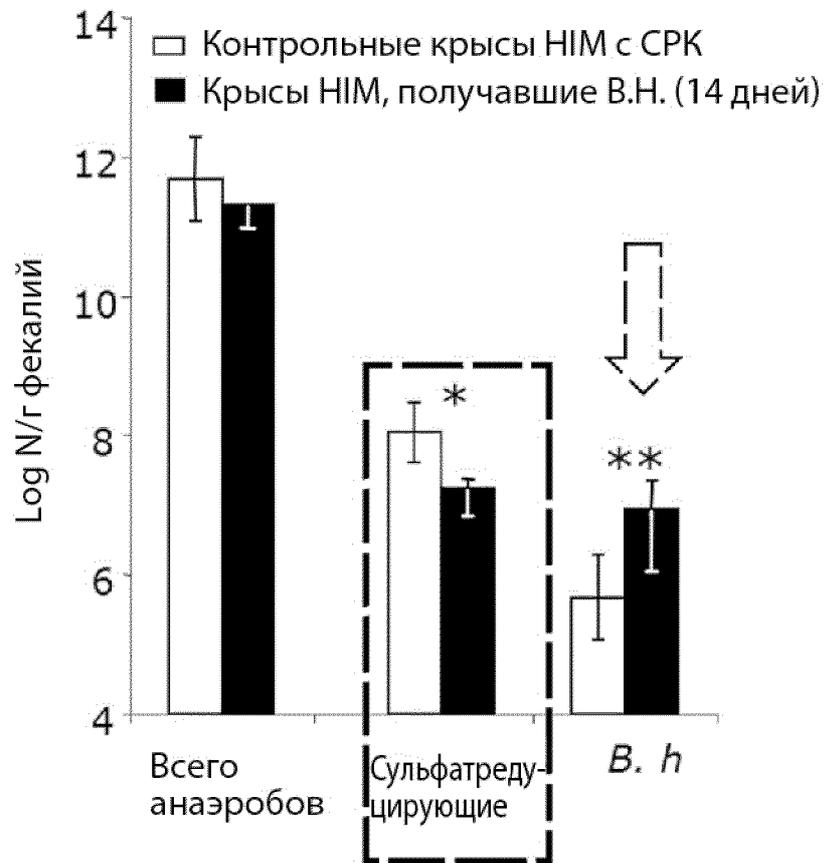
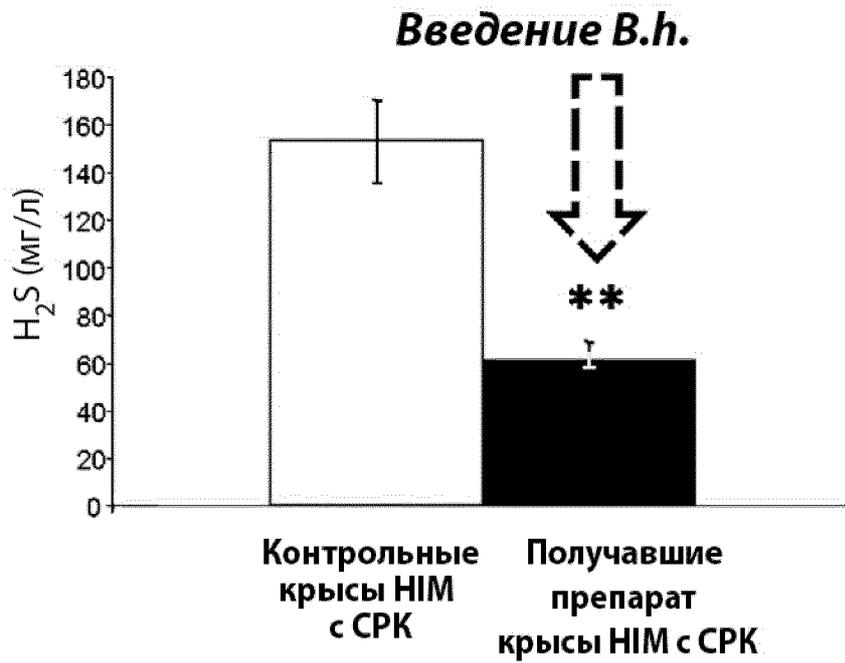
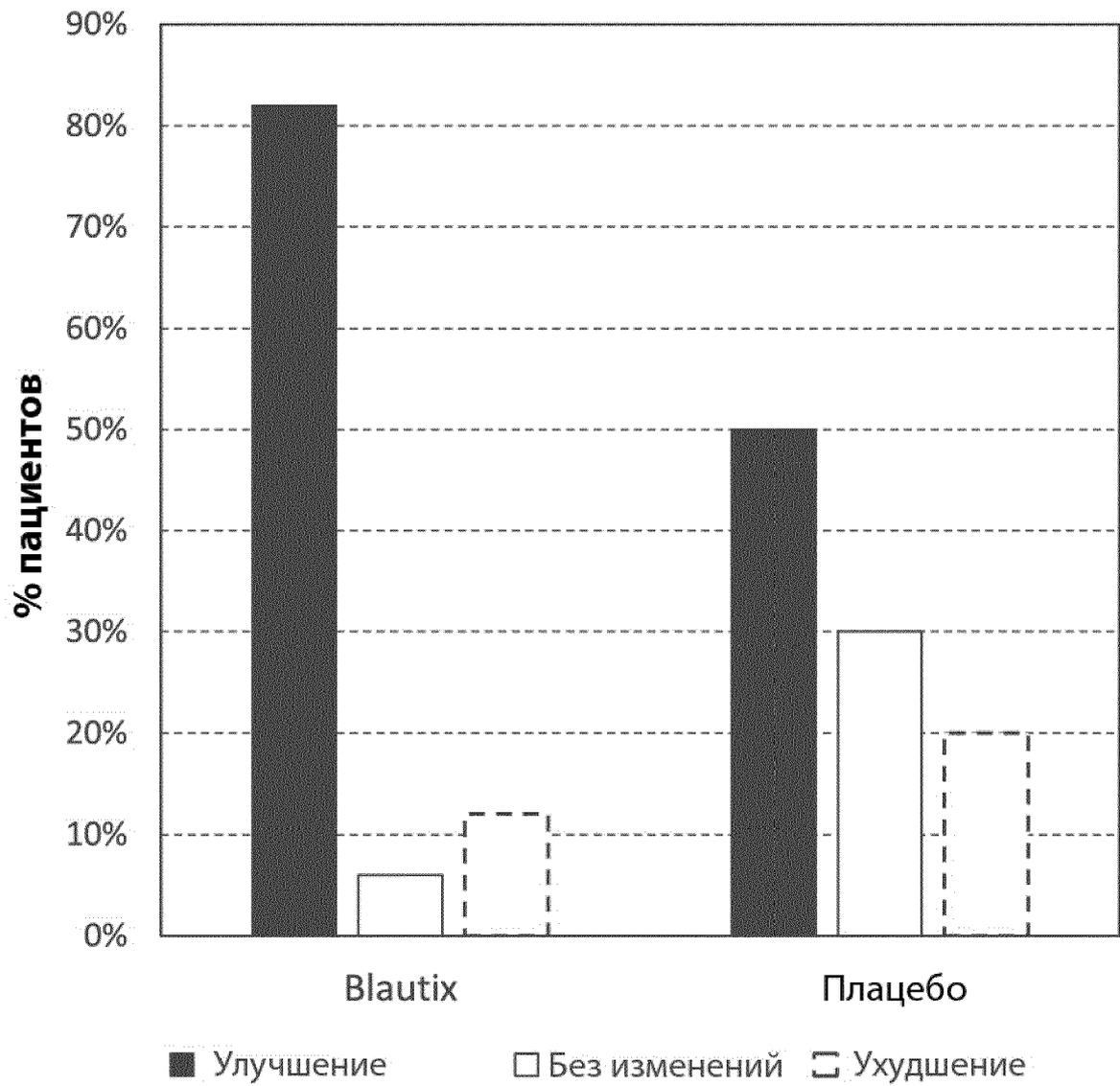


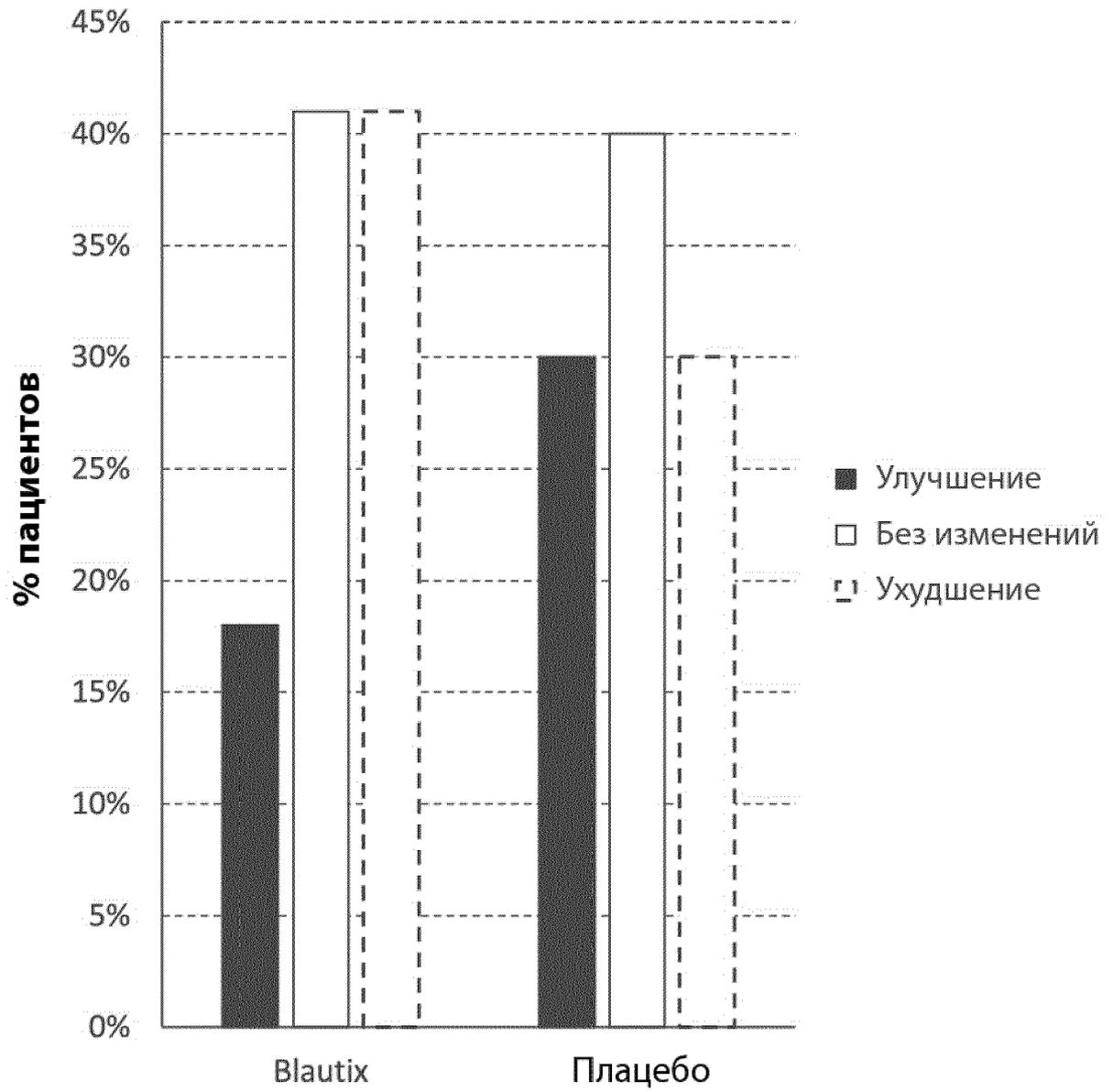
FIG. 16



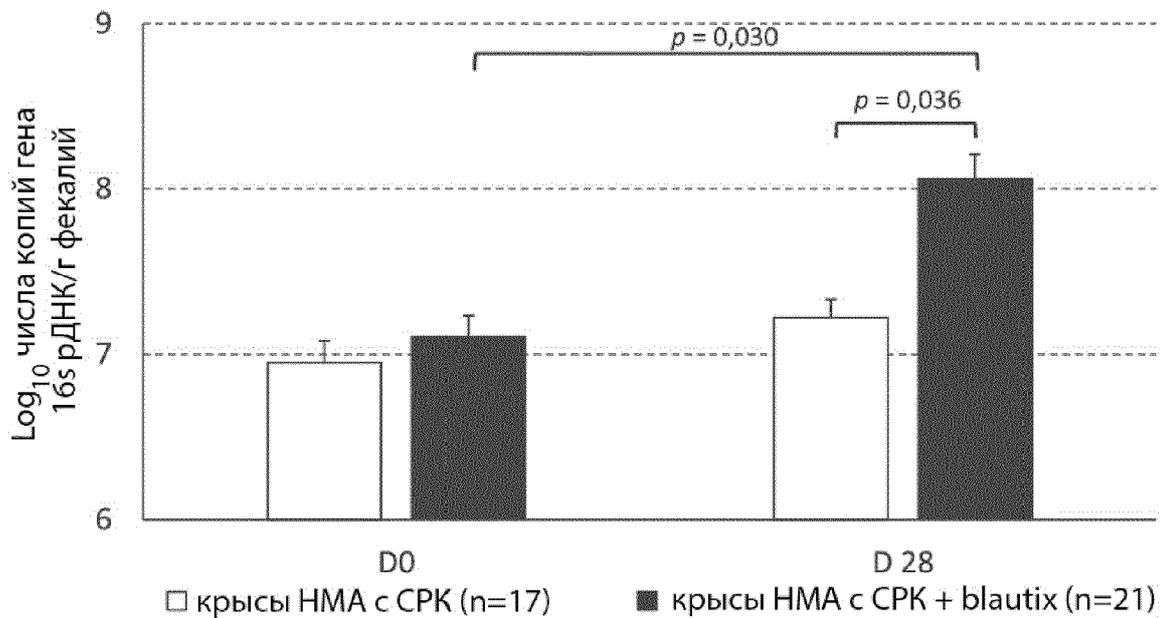
Фиг. 17



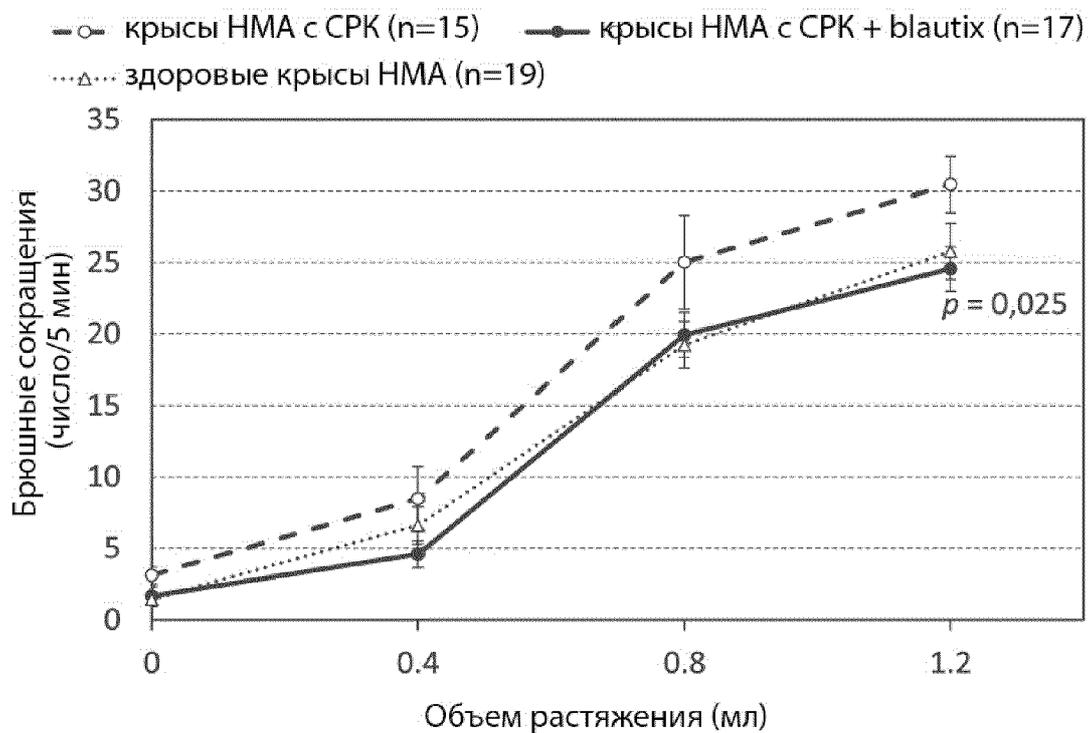
Фиг. 18



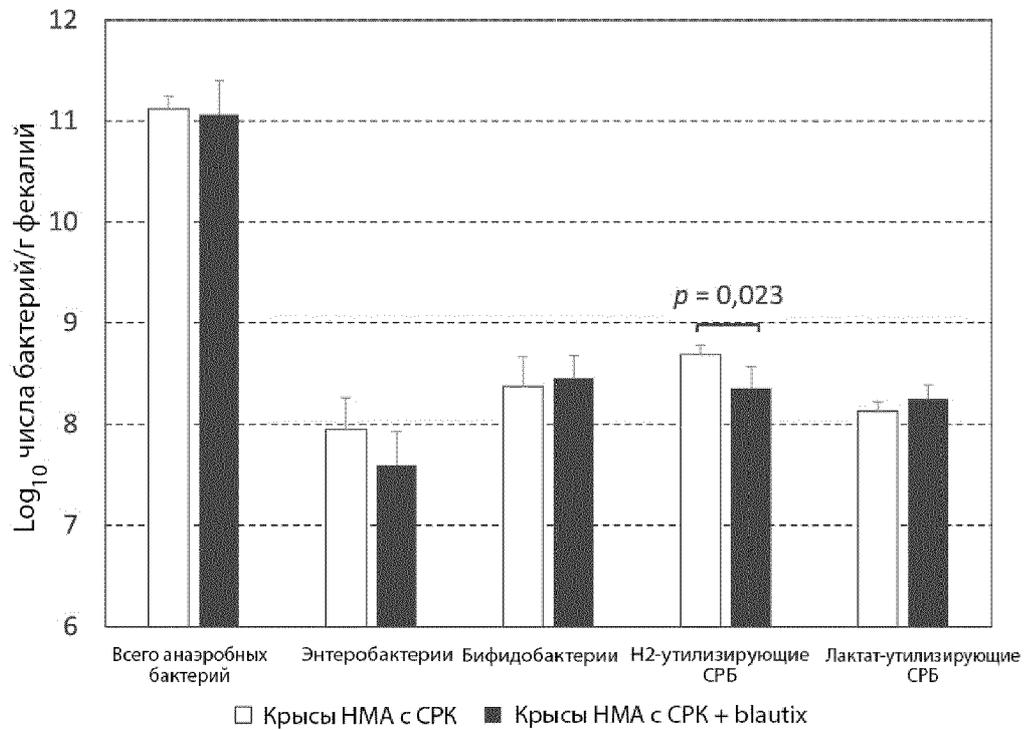
Фиг. 19



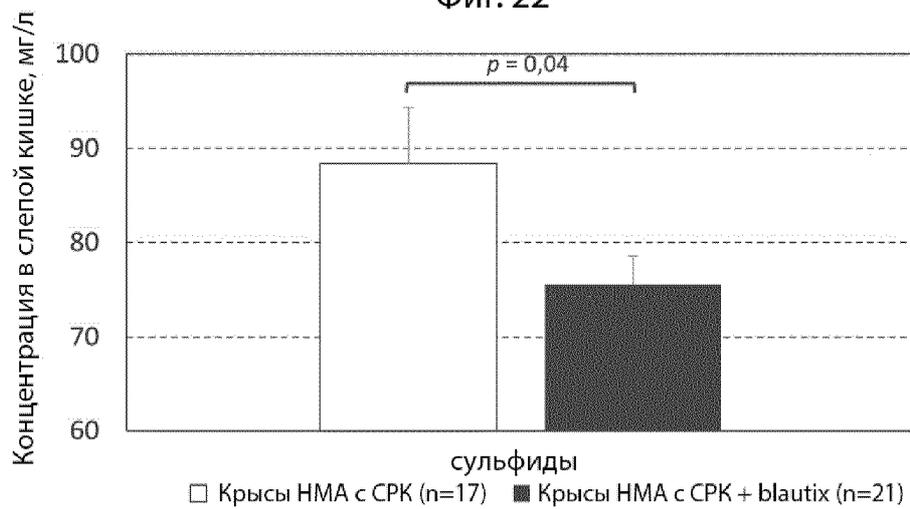
Фиг. 20



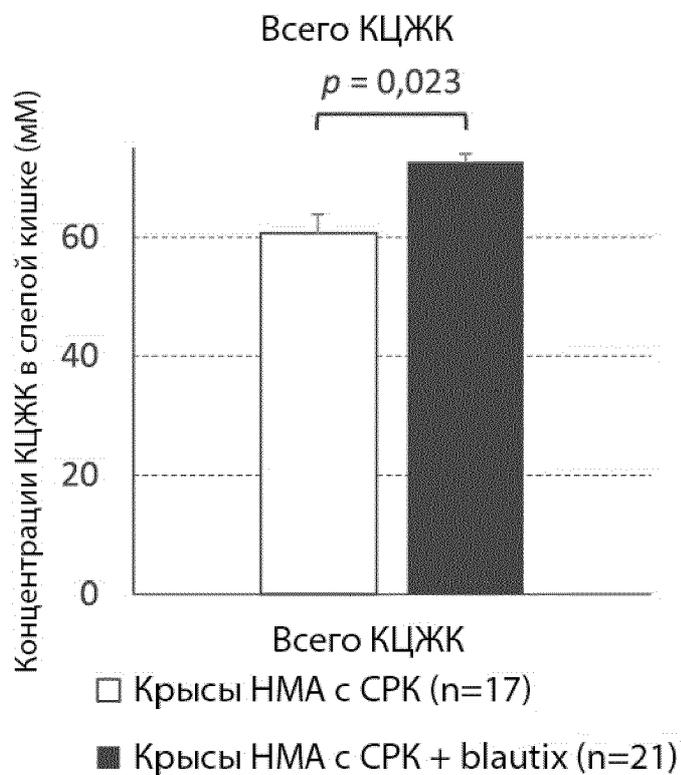
Фиг. 21



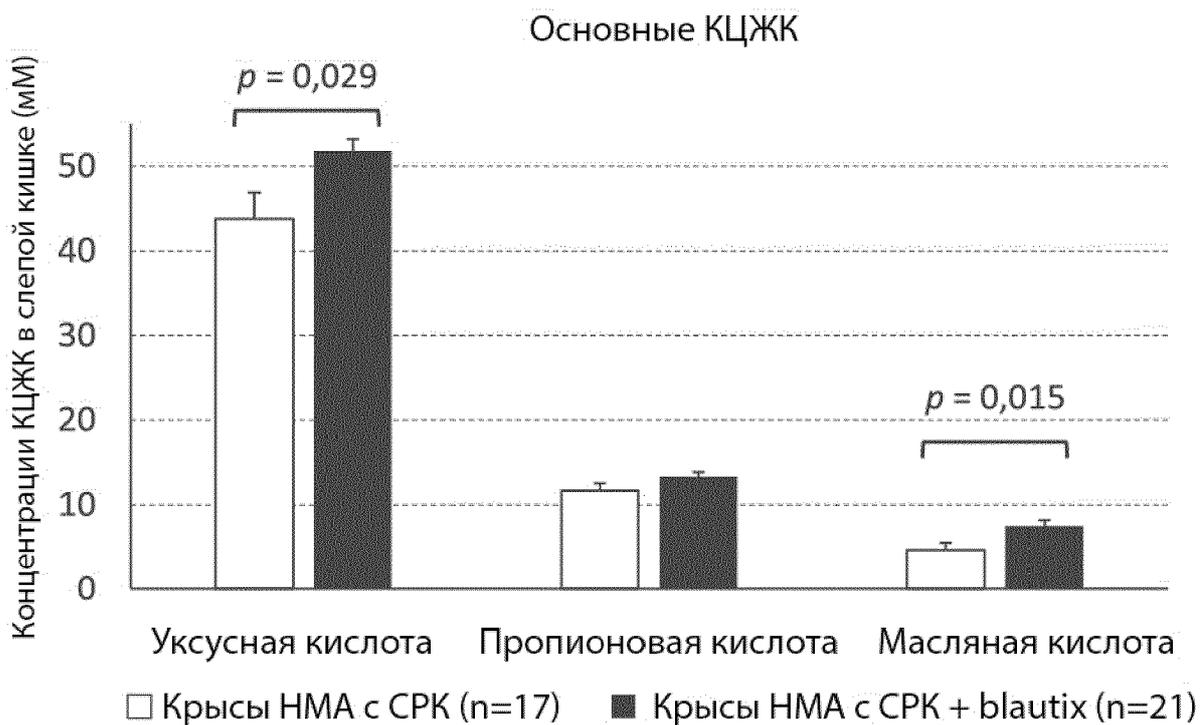
Фиг. 22



Фиг. 23А



Фиг. 23В



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202090835**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*A61K 35/741 (2006.01)*  
*A23L 33/135 (2006.01)*  
*A61P 1/00 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A61K 35/741, A23L 33/135, A61P 1/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	US 7749494 B2 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE) 06.07.2010, формула, кол. 4, строки 1-10, пример 9	1-29
A	NCBI, База данных GenBank: NR_044054.1, <i>Blautia wexlerae</i> DSM 19850 16S ribosomal RNA, partial sequence, 03.02.2015	1-29
A	NCBI, База данных GenBank: NR_117867.1, <i>Blautia stercoris</i> strain GAM6-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, 03.02.2015	1-29
A	WO 2009/154463 A2 (STICHTING TOP INSTITUTE FOOD AND NUTRITION et al.) 23.12.2009, формула	1-29
A	US 2010/0316617 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)) 16.12.2010, формула, абзац [0034]	
A	XU Guang-Yin et al. The endogenous hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine-β synthase contributes to visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. <i>Molecular Pain</i> , 2009, 5: 44 (1-8), doi: 10.1186/1744-8069-5-44, реферат, с. 6 кол. 1, последний абзац – кол. 2, абзац 1, с. 7, кол. 1, абзац 3	1-29

последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

«P» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

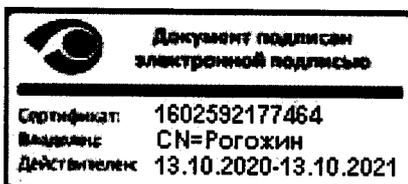
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **03/12/2020**



Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

Д.Ю. Рогожин