

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193075 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.17

(51) Int. Cl. A61K 35/74 (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.11

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

(31) 19173945.7

(32) 2019.05.10

(33) EP

(86) PCT/EP2020/063084

(87) WO 2020/229428 2020.11.19

(71) Заявитель:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Стивенсон Алекс, Чител Саша (GB)

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

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

A1

202193075

202193075

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 1.500 разных филотипов, среди которых количественно доминируют два основных бактериальных типа (филума) - Bacteroidetes и Firmicutes [2-3]. Успешные симбиотические отношения, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к развитию широкого спектра метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает разложение иначе трудноперевариваемых компонентов пищи с образованием побочных продуктов, являющихся важным источником питательных веществ для хозяина и обеспечивающих 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

[17]. 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 бактерии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения разработали новые терапии для лечения и предотвращения сенсорной гиперчувствительности, аллодинии и/или гипералгезии. В частности, изобретение обеспечивает композицию, содержащую штамм бактерий рода *Blautia*, для использования в способе лечения или профилактики сенсорной гиперчувствительности. Кроме того, изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии, включающий введение композиции, содержащей штамм бактерий рода *Blautia*.

Кроме того, изобретение обеспечивает применение композиции, содержащей штамм бактерий рода *Blautia*, для производства лекарственного средства для лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии.

Сенсорная гиперчувствительность часто связана с аллодинией и/или гипералгезией, и авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы рода *Blautia* могут эффективно снижать аллодинию и/или гипералгезию. Следовательно, в одном варианте реализации изобретение обеспечивает композицию, содержащую штамм бактерий рода *Blautia*, для применения в способе лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, может снижать аллодинию на животной модели фибромиалгии.

Использование организмов из рода *Blautia* для лечения висцеральной гиперчувствительности описано в международной патентной публикации WO2017/148596. Однако, как более подробно объясняется ниже, висцеральная гиперчувствительность и аллодиния/гипералгезия имеют разные патофизиологии и причины. Соответственно, эта публикация не предполагает, что такие организмы могут быть успешно использованы для лечения аллодинии и/или гипералгезии.

В предпочтительных вариантах реализации, изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в лечении или предотвращении сенсорной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом невропатия, комплексный региональный болевой синдром, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия или мигрень. В особенно предпочтительных вариантах реализации представлены композиции, содержащие бактериальный штамм рода *Blautia*, для лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезии. В предпочтительном варианте реализации композиция предназначена для лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии у субъекта с диагнозом фибромиалгия. Авторы изобретения показали, что композиции по изобретению особенно хорошо работают на модели фибромиалгии.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения, бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia hydrogenotrophica*. Бактериальные штаммы могут иметь последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*. Предпочтительно, бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:5. Наиболее предпочтительно, бактериальный штамм в композиции представляет собой штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 14294. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 5. В других вариантах реализации бактериальный штамм в композиции имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 5. В дополнительных вариантах реализации изобретения, бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia stercoris*. Бактериальные штаммы могут иметь последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно, бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:1 или 3. Предпочтительно, последовательность идентична SEQ ID NO:3. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO:3. В других вариантах реализации бактериальный штамм в композиции имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1 или 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 рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно, бактериальный штамм имеет последовательность 16s рНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную SEQ ID NO:2 или 4. Предпочтительно, последовательность идентична SEQ ID NO:4. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO:4. В других вариантах реализации бактериальный штамм в композиции имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 4.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia producta*. 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 producta*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 6. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 6. В других вариантах реализации бактериальный штамм в композиции имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 6.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia coccoides*. 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 coccoides*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 7 или 8. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 7 или 8. В других вариантах реализации бактериальный штамм в композиции имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 7 или 8.

В определенных вариантах реализации, композиция по изобретению предназначена для перорального введения. 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 подвергнута лиофилизации. Композиция по изобретению также может включать лиофилизированный штамм бактерий рода *Blautia*. 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, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, описанную выше.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает композицию вакцины, содержащую композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, описанную выше.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Набор веса с течением времени. Планки погрешностей обозначают

SEM.

Фигура 2: Соматосенсорные реакции (размещения задней лапы). Звездочки указывают на статистически значимые отличия от соответствующего контралатерального ответа. Планки погрешностей обозначают SEM. Нормальный контроль N=12, контроль заболеваний N=24, *Blautia hydrogenotrophica* N=12, Lyobuffer N=12.

Фигура 3: Механический ответ аллодинии (порог отдергивания лапы 50%) на модели фибромиалгии на крысах. Планки погрешностей обозначают SEM. N=12 на группу.

Фигура 4: Тестирование порога сжатия мышц при отдергивании. Планки погрешностей обозначают SEM. N=12 на группу.

ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные штаммы

Композиции по изобретению содержат бактериальный штамм рода *Blautia*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода являются пригодными для лечения или предотвращения сенсорной гиперчувствительности и особенно применимы для лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезии. Предпочтительные бактериальные штаммы принадлежат к видам *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* и *Blautia wexlerae*. Другими бактериальными штаммами для использования по изобретению являются *Blautia producta*, *Blautia coccoides* и *Blautia hansenii* хотя в некоторых вариантах осуществления композиция может не содержать *Blautia producta*.

Примеры штаммов *Blautia* для использования по изобретению включают *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* и *B. wexlerae*. Виды *Blautia* являются грам-позитивными, неподвижными бактериями, не образующими спор, которые могут быть коккоподобными или овальными и все являются облигатными анаэробами, продуцирующими уксусную кислоту в качестве основного конечного продукта ферментации глюкозы [18]. *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 рПНК 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 [18] и [19]. 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 рПНК. Таким образом, в некоторых вариантах реализации, *Blautia hydrogenotrophica* для использования по изобретению имеет последовательность 16s рПНК SEQ ID NO:5.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная 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 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 рПНК штамма GAM6-1^T *Blautia stercoris* имеет номер доступа GenBank HM626177 (раскрыта в данном документе как SEQ ID NO:1). Типичный пример штамма *Blautia stercoris* описан в [20]. Типовым штаммом *Blautia wexlerae* является WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850 [18]. Генная последовательность 16S рПНК 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 [18].

Предпочтительным штаммом *Blautia stercoris* является штамм, депонированный с номером доступа NCIMB 42381, который также называется в данном документе штаммом 830. Последовательность 16s рПНК штамма 830 представлена как SEQ ID NO:3. Штамм 830 был депонирован в международном депозитории NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, 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. Последовательность 16s рПНК этого штамма представлена как SEQ ID NO:4. Этот штамм был депонирован в международном депозитории NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) фирмой 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 16-го ноября 2015 г. как “*Blautia/Ruminococcus*” и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42486.

Предпочтительным штаммом *Blautia producta* для использования по изобретению является штамм, депонированный под номером доступа NCIMB 43170 в международном депозитории NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) компанией 4D Pharma Research Limited (Life Science Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 20 августа 2018 г. как «*Blautia producta*».

Ожидается, что бактериальные штаммы, близкородственные со штаммом, протестированным в примерах, также будут эффективными для лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезии. В определенных вариантах реализации, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рПНК, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичную

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

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

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

В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia producta*. Предпочтительно, бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 6. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 6.

В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рНК бактериального штамма *Blautia coccoides*. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 7 или 8. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s рНК, представленную SEQ ID NO: 7 или 8.

Бактериальные штаммы, являющиеся биотипами бактерии, депонированной с номером доступа DSM 14294, или биотипами бактерий, депонированных с номерами

доступа NCIMB 42381, NCIMB 42486, и NCIMB 43170, как ожидается, также будут эффективными для лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезии. 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 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, или NCIMB 43170, и являющиеся пригодными для использования по изобретению, могут быть идентифицированы путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей бактерии, депонированной с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170. 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 [21]. 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 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, или NCIMB 43170. В некоторых вариантах реализации, штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичности последовательностей с 16s rPHK SEQ ID NO:5.

Альтернативно, штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170 и являющиеся пригодными для использования по изобретению, могут быть идентифицированы путем использования депозита с номером доступа DSM 14294, депозита с номером доступа NCIMB 42381, депозита с номером доступа NCIMB 42486 или депозита с номером доступа NCIMB 43170, 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 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, или NCIMB 43170, и пригодные для использования по изобретению, являются штаммами,

обеспечивающими такие же характеристики (pattern), как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 or NCIMB 43170, при проведении анализа методом рестрикционного анализа амплифицированных рибосомальных ДНК (ARDRA), например, с использованием рестрикционного фермента *Sau3AI* (примеры методов и руководство приведены, например в [22]). Альтернативно, штаммы биотипа идентифицируются как штаммы, имеющие такой же характер ферментации углеводов, как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170.

Другие штаммы *Blautia*, пригодные для использования по изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, или NCIMB 43170, 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 их крысам перед тестированием методом анализа с микроволокнами фон Фрея. В частности, бактериальные штаммы, имеющие схожие характеристики роста, тип метаболизма и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170, могут быть пригодными для использования по изобретению. Полезный штамм будет иметь сопоставимую активность со штаммом DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170 штаммами, как проанализировано, например, с помощью анализа с микроволокнами фон Фрея. В частности, штамм биотипа будет вызывать сопоставимые эффекты в модели фибромивралгии 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 14294. Он является типичным штаммом, 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 14294, или ее производную, для использования в терапии, в частности, при болезнях, описанных в данном документе.

Производными штамма, депонированного с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, или NCIMB 43170, 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 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486, NCIMB 43170. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в модели аллодинии и/или гипералгезии с эффектами,

продемонстрированными в примерах, которые могут быть идентифицированы путем использования протоколов культивации и введения, описанных в примерах. Производное штамма DSM 14294 будет обычно биотипом штамма DSM 14294. Производное штамма NCIMB 42381 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42381. Производное штамма NCIMB 42486 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42486. Производное штамма NCIMB 43170 будет обычно биотипом штамма NCIMB 43170.

Бактериальный штамм также может быть штаммом, имеющим такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа DSM 14294, NCIMB 42381, NCIMB 42486 или NCIMB 43170, 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 сенсорной гиперчувствительности. Их можно использовать для лечения аллодинии и/или гипералгезии. Предпочтительно композиции по данному изобретению предназначены для лечения аллодинии, в частности аллодинии, связанной с фибромиалгией, поскольку авторы изобретения увидели хорошие эффекты для этого, как показано в примерах.

Существует три основных типа патофизиологии боли: ноцицептивная, нейропатическая и сенсорная гиперчувствительность. Сенсорная гиперчувствительность описывает тип боли, который существует без идентифицируемого повреждения нерва или ткани. Считается, что этот тип боли является результатом стойкой дисфункции нейронов по всей ЦНС, что приводит к снижению болевого порога и усилению сенсорных сигналов. У него есть множество названий, включая централизованную, дисфункциональную или идиопатическую боль, центральную сенсibilизацию и синдромы центральной чувствительности. Отличительной чертой этого типа боли является общая гиперчувствительность к различным раздражителям, включая механические, термические, обонятельные, слуховые и визуальные сигналы. Состояния сенсорной гиперчувствительности включают: фибромиалгию, синдром раздраженного кишечника, головные боли напряжения, интерстициальный цистит/синдром тазовой боли, расстройство височно-нижнечелюстного сустава, синдром хронической усталости, синдром беспокойных ног и боль в шее и спине без структурной патологии [23].

Пациенты, страдающие нейропатической болью и сенсорной гиперчувствительностью, могут быть распределены с использованием the Chronic Pain Questions в соответствии с [24], а степень сенсорной гиперчувствительности может быть оценена с использованием шкалы сенсорной гиперчувствительности, описанной в [25].

Аллодиния (боль, возникающая из-за неболезненного раздражителя) и гипералгезия (повышенная чувствительность к боли) обычно связаны с сенсорной

гиперчувствительностью - термином, используемым для описания боли при отсутствии идентифицируемого повреждения нервов или других тканей. Предполагается, что аллодиния и гипералгезия являются результатом стойкой дисрегуляции или дисфункции нейронов. Они часто связаны с множеством состояний, включая невропатию, комплексный региональный болевой синдром, постгерпетическую невралгию, фибромиалгию или мигрень. Композиции по изобретению можно использовать для лечения субъекта с диагнозом из одного или нескольких из этих состояний.

В предпочтительном варианте реализации композиции по данному изобретению предназначены для лечения субъекта с диагнозом фибромиалгия, в частности, для лечения субъекта с диагнозом аллодиния, связанная с фибромиалгией. Эти варианты реализации являются предпочтительными, поскольку авторы изобретения наблюдали хорошие эффекты при использовании композиций по данному изобретению на модели фибромиалгии на крысах. Примеры демонстрируют способность композиций по изобретению оказывать благоприятное воздействие на несколько факторов, которые способствуют более положительному исходу на модели фибромиалгии на крысах. К ним относятся увеличение веса, улучшение результатов при соматосенсорном тестировании и уменьшение механической аллодинии.

Обычно считается, что фибромиалгия является результатом сенсорной гиперчувствительности, термин, используемый для описания боли при отсутствии идентифицируемого повреждения нервов или других тканей. Предполагается, что этот тип боли является результатом стойкой дисрегуляции или дисфункции нейронов. В результате сенсорной гиперчувствительности пациенты испытывают аллодинию и гипералгезию. Фибромиалгия обычно характеризуется хронической болью и усталостью, а также чувствительностью/болезненностью суставов и мышечной ткани, и многие люди с фибромиалгией также сообщают о чувствительности к свету, головных болях и приступах мигрени как о симптомах или сопутствующих заболеваниях.

В отличие от сенсорной гиперчувствительности, висцеральная гиперчувствительность - это термин, используемый для описания ощущения боли во внутренних органах на более интенсивном уровне, чем обычно. Этот тип боли связан с повреждением соматической или висцеральной ткани в результате травмы или воспаления и известен как ноцицептивная боль. Ноцицептивная боль возникает вне нервной системы, и считается, что нервные клетки, передающие болевые импульсы, функционируют нормально. Интересно, что висцеральная гиперчувствительность является отличительной чертой синдрома раздраженного кишечника (СРК). Хотя СРК иногда обнаруживается у больных фибромиалгией, было показано, например, в ссылке [26], что пациенты с фибромиалгией обычно не страдают висцеральной гиперчувствительностью. Другими словами, фибромиалгия и висцеральная гиперчувствительность - это отдельные компоненты разных состояний с разными причинами и патофизиологией.

Как показано в примерах, бактериальные композиции по изобретению могут эффективно снижать аллодинию и/или гипералгезию, в частности, у пациента с диагнозом

фибромиалгия. В вариантах реализации изобретения пациент не страдает висцеральной гиперчувствительностью. В этом отношении «страдать» означает, что либо пациенту был официально поставлен диагноз во время лечения, либо пациент, который еще не получил официального диагноза, но у которого наблюдаются симптомы заболевания.

В предпочтительных вариантах реализации композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии у субъекта, которому был поставлен диагноз нейропатия, комплексный региональный болевой синдром, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия или мигрень. В предпочтительных вариантах реализации композиции по данному изобретению предназначены для лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии у субъекта с диагнозом фибромиалгия.

Лечение или предотвращение аллодинии и/или гипералгезии 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 композиции по изобретению предназначена для использования в лечении или предотвращении тяжелой аллодинии и/или гипералгезии. В некоторых вариантах реализации субъект, страдающий тяжелой аллодинией и/или гипералгезией, представляет собой субъект с диагнозом нейропатия, комплексный региональный болевой синдром, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия или мигрень. В некоторых вариантах реализации субъект, имеющий тяжелую висцеральную гиперчувствительность, представляет собой субъект с диагнозом фибромиалгия.

В некоторых вариантах реализации сенсорная гиперчувствительность (например, аллодиния и/или гипералгезия) не вызвана аутоиммунным заболеванием. Кроме того, в некоторых вариантах реализации субъект, имеющий сенсорную гиперчувствительность (например, тяжелую аллодинию и/или гипералгезию), является субъектом, которому поставлен диагноз невропатия, при этом невропатия не вызвана аутоиммунным заболеванием.

Способы введения

Предпочтительно, композиции по изобретению составлены 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 некоторых вариантах реализации термин «полная колонизация кишечника» означает, что бактерии колонизировали все части кишечника (то есть тонкий кишечник, толстый кишечник и прямую кишку). В дополнительных вариантах реализации изобретения термин «полная колонизация» или «частичная колонизация» означает, что бактерии удерживаются в кишечнике постоянно или временно, соответственно.

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 (suppocire), витепсол (witepsol)), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или композиции глицеринового мыла (soap glycerin).

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

Композиции по изобретению могут быть введены однократно, или они могут вводиться последовательно в составе схемы лечения. В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению предназначены для ежедневного введения (один или несколько раз).

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 уеаг.

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 аллодинии и/или гипералгезии у ребенка in utero и/или после его рождения.

Композиции по данному изобретению могут быть введены пациенту с диагнозом сенсорная гиперчувствительность. Они также могут быть введены пациенту с диагнозом аллодинии и/или гипералгезия, или заболевание или состояние, связанное с аллодинией и/или гипералгезией (в частности, фибромиалгия), или который был идентифицирован как подверженный риску аллодинии и/или гипералгезия. Композиции также можно вводить в качестве профилактической меры для предотвращения развития аллодинии и/или гипералгезии 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*, *Blautia wexlerae*, *Blautia producta* или *Blautia coccoides*.

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

В общем, композиции по изобретению предназначены для профилактики или 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

Композиции по изобретению содержат бактерии. Авторы изобретения выявили удивительную способность бактерий из рода *Blautia* лечить или предотвращать сенсорную гиперчувствительность. Однако для того, чтобы бактерии из рода *Blautia* могли оказать свое положительное действие, они должны быть эффективно доставлены живыми и/или жизнеспособными в тонкий кишечник. Таким образом, в общем, композиция по данному изобретению не содержит инактивированных бактерий вида *Blautia*, в частности, бактерий вида *Blautia* инактивированных путем нагревания.

Композиция по изобретению содержит лиофилизированные бактерии. В предпочтительных вариантах реализации изобретения композиция составлена в лиофилизированной форме. Композиция по изобретению может включать гранулы или желатиновые капсулы, например твердые желатиновые капсулы, содержащие штамм бактерий по изобретению.

Предпочтительно композиция по изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лيوфилизация бактерий является хорошо отработанной процедурой и соответствующие рекомендации приведены, например, в работах [27-29]. Лيوфилизированные композиции являются особенно эффективными.

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

В некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был инактивирован, например, не был инактивирован нагреванием. В некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, например, не был убит нагреванием. В некоторых вариантах реализации, бактериальный штамм в композиции по изобретению не был ослаблен, например, не был

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

Бактериальный штамм в композиции по изобретению предпочтительно является жизнеспособным. Предпочтительно он способен частично или полностью колонизировать кишечник. Бактериальный штамм в композиции по изобретению может быть живым и жизнеспособным. Бактериальный штамм в композиции по изобретению может быть живым, жизнеспособным и способным частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах реализации, композиция содержит смесь живых бактериальных штаммов и убитых бактериальных штаммов. Изобретение относится к композициям, которые составлены для предотвращения разложения или абсорбции бактерий в верхних отделах пищеварительного тракта и невозможности их действия. Например, композиции могут содержать поглотители кислорода и/или пребиотические субстраты, такие как витамин С и неперевариваемые углеводы.

Кроме того, может быть составлена энтеросолюбивая композиция. Это гарантирует, что бактерии не разложатся на пути к тонкому кишечнику.

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 [30-31].

Композиция может быть введена перорально и может иметь форму таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, потому что *Blautia* представляют собой анаэробы.

Композиция по изобретению включает терапевтически эффективное количество

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

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

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

Доза композиции может содержать бактериальный штамм от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ)/г, по отношению к весу композиции. Доза может быть пригодной для взрослого человека. Например, композиция может содержать бактериальный штамм от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г; например, от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г; в другом примере от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г; в другом примере от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1 г, 3 г, 5 г и 10 г. Композиция может быть составлена в виде пробиотика. Пробиотик определяется ФАО/ВОЗ как живой микроорганизм, который при введении в адекватных количествах приносит пользу здоровью хозяина.

Типично, пробиотик, такой как композиция по изобретению, необязательно в комбинации с по меньшей мере одним пригодным соединением-пребиотиком. 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.). Известные пробиотики включают коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

Пребиотическое соединение обычно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахарный спирт, который не разлагается и не всасывается в верхних отделах пищеварительного тракта. Углевод может быть выбран из группы, состоящей из: фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных флуктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахаридов (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.

Другие пребиотические соединения (например, витамин C) могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. Альтернативно, пробиотическая композиция по изобретению может вводиться перорально в виде пищевого или питательного продукта, такого как ферментированный молочный продукт на основе молока или сыворотки, или в виде фармацевтического продукта.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Примеры таких пригодных эксципиентов приведены в источнике [32]. Приемлемые для терапевтического применения носители или разбавители хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в источнике [33]. 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 некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению содержат один вид бактерий и не содержат никаких других видов бактерий. В некоторых вариантах реализации композиции по настоящему изобретению содержат один бактериальный штамм и не содержат никаких других бактериальных штаммов. Например, композиции по настоящему изобретению могут содержать бактерии только вида *Blautia hydrogenotrophica*. Такие композиции могут содержать только минимальные или биологически незначительные количества других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут представлять собой культуру, по существу не содержащую другие виды организмов. В некоторых вариантах реализации, такие композиции могут быть лиофилизатом, по существу не содержащим другие виды организмов.

В некоторых вариантах реализации композиция не содержит бактерий вида *Clostridium* и/или не содержит бактерий вида *Blautia producta*.

В определенных вариантах реализации, композиции по изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов или бактериальных видов 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 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 рода *Blautia* и/или 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 другом примере композиция содержит бактериальный штамм *Blautia hydrogenotrophica* в сочетании с бактериальным штаммом из рода *Blautia*, или композиция содержит бактериальный штамм *Blautia hydrogicotrophica* в сочетании с бактериальным штаммом из рода *Blautia* и 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 содержит бактериальный штамм *Blautia* как часть микробного консорциума, который содержит менее 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или 200 видов бактерий. Виды бактерий могут принадлежать к роду *Blautia* и/или к другим родам, с которыми они могут симбиотически существовать *in vivo* в кишечнике. Специалистам в данной области будет понятно, что бактериальная популяция, состоящая из 200 или менее различных видов, является значительно менее сложной и более контролируемой, чем материал, полученный из образца фекалий, который будет содержать много тысяч различных видов бактерий. В предпочтительных вариантах реализации композиция не является образцом фекалий, например образцом фекалий человека.

В предпочтительных вариантах реализации композиция может быть составлена как часть микробного консорциума, который содержит менее 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 28, 19, 20, 30, 40 или 50 бактериальных штаммов. Штаммы бактерий могут принадлежать роду *Blautia* и/или другим родам, с которыми он может симбиотически жить *in vivo* в кишечнике. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит менее 30 бактериальных штаммов. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит менее 20 бактериальных штаммов. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит менее 10 бактериальных штаммов. 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 14294, но не являющийся штаммом *Blautia hydrogenotrophica*, депонированным с номером доступа DSM 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, как обсуждалось ранее; 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 сенсорную гиперчувствительность, такую как сенсорная гиперчувствительность, ассоциированная с невропатией, комплексным регионарным болевым синдромом,

постгерпетической невралгией, фибромиалгией или мигренью. Предпочтительное заболевание представляет собой фибромиалгию. Нарушение может представлять собой аллодинию и/или гипералгезию, такую как аллодиния и/или гипералгезия, связанные с невропатией, комплексным региональным болевым синдромом, постгерпетической невралгией, фибромиалгией или мигренью. Предпочтительное заболевание представляет собой фибромиалгию.

В определенных вариантах реализации, изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой количество бактериального штамма составляет от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{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”). Капсула может быть твердой или мягкой. В некоторых вариантах реализации, композиция представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут, благодаря добавкам размягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствующих в оболочке капсулы, обладать определенной эластичностью и деформируемостью. Мягкие капсулы могут быть получены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина являются коммерчески доступными от различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, пероральный или ректальный, мягкие капсулы могут иметь различные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедообразными. Мягкие капсулы могут быть получены обычными способами, такими как, например, с использованием процесса Шерера (Scherer) (метод прессования), процесса Accogel (метод прессования) или капельного процесса или процесса выдувания (blowing).

В некоторых вариантах реализации, композиции по изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать проглатывание, в результате чего состав поступает в желудочно-кишечный тракт.

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;

каплеты (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, причем оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит какого-либо пленкообразующего полимера (см., например, [34]). В некоторых вариантах реализации, композиция по своей природе является энтеросолюбильной капсулой (например, Vcaps® фирмы Capsugel).

Способы культивирования

Бактериальные штаммы для использования в данном изобретении могут культивироваться с использованием стандартных микробиологических методик, как описано, например, в источниках [35-37].

Твердая или жидкая среда, используемая для культуры, может быть, например, агаром YCFA (дрожжевой экстракт-гидролизат казеина-жирные кислоты) или средой YCFA. Среда YCFA может содержать (на 100 мл, приблизительные значения): казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO_3 (0,4 г), цистеин (0,1 г), K_2HPO_4 (0,045 г),

K_2HPO_4 (0,045 г), 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), CaCl_2 (0,009 г), резазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), п-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 [38-45] 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 [46]. Предпочтительное выравнивание определяют по алгоритму поиска гомологии Смита-Уотермана (Smith-Waterman) с использованием нечеткого (affine) поиска разрывов со штрафом за открытие гэпа 5 или 12 (более предпочтительно 12) и штрафом за продолжение гэпа 2, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в источнике [47].

Если не указано конкретно, процесс или способ, включающий множество стадий, может включать дополнительные стадии в начале или в конце способа, или может включать дополнительные промежуточные стадии. Также, стадии могут быть объединены, пропущены или проведены в альтернативном порядке, при необходимости.

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

Все патентные и литературные ссылки, цитируемые в данном описании, полностью включены сюда посредством ссылки.

Любая ссылка на метод лечения, включающий введение агента пациенту, также охватывает этот агент для использования в указанном способе лечения, а также использование агента в указанном способе лечения и использование агента в производстве лекарства.

Описанные ниже примеры предлагаются только для иллюстративных целей и никоим образом не предназначены для ограничения объема данного изобретения.

СПОСОБЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1 - Оценка двух тестируемых соединений на модели фибромиалгии на крысах с использованием кислого раствора соли

Резюме

Используя модель фибромиалгии на крысах с использованием кислого физиологического раствора, животные получали либо композицию, содержащую Blautia, либо один из нескольких контролей. Было обнаружено, что композиции по изобретению, среди прочего, уменьшают механическую аллодинию в этой модели на крысах, что указывает на уменьшение фибромиалгии.

Животная модель

В экспериментах использовали модель фибромиалгии на крысах, получавших кислый физиологический раствор, с использованием самцов крыс Sprague-Dawley SD (n=12/группа). В этой модели невоспалительная боль вызывается повторяющимися инъекциями физиологического раствора (pH 4,0) с интервалом в 5 дней. С этой целью крыс анестезировали изофлураном (2-4%) перед инъекцией 100 мкл физиологического раствора с pH 4,0 в левую икроножную мышцу. Через пять дней процесс повторяли; гипералгезия развивается в течение нескольких часов после 2-го введения. Индукция модели была проведена для всех групп лечения, за исключением крыс из нормального контроля, которые подверглись процедуре фиктивной инъекции (физиологический раствор с pH 7,2) и получали эквивалентный объем носителя (например, фосфатно-солевого буферного раствора; PBS), введенного таким же образом, как и в случае тестируемого препарата (например, ежедневным пероральным желудочным зондом).

Схема исследования

Животных акклиматизировали к помещению и взаимодействию с экспериментатором в течение как минимум 7 дней, в течение которых крысы получали начальное воздействие воды с сахарозой, чтобы предотвратить последующие неохотные эффекты и дать возможность оценить исходное потребление воды. В это время крыс случайным образом распределяли по группам лечения на основе массы тела следующим образом:

Группа	Модель индукции	Лечение	Цель	Количество животных
A	100 мкл физиологического	Blautia hydrogenotrophica	Эксперимент	12

	раствора pH 4,0	(p.o) + физиологический раствор (s.c)		
В	100 мкл физиологического раствора pH 4,0	Lyobuffer (p.o) + физиологический раствор (s.c)	Эксперимент	12
С	100 мкл физиологического раствора pH 7,2	PBS (p.o) + физиологический раствор (s.c)	Нормальный контроль	12
Д	100 мкл физиологического раствора pH 4,0	PBS (p.o) + физиологический раствор (s.c)	Контроль заболевания	12
Е	100 мкл физиологического раствора pH 4,0	PBS (p.o) + Бупренофин в физиологическом растворе (s.c)	Положительный контроль	12

В последний день акклиматизации были взяты пробы крови и фекалий.

После фазы акклиматизации начинали ежедневное пероральное введение соответствующего тестируемого вещества или носителя через желудочный зонд в соответствии с назначенными группами (см. таблицу выше). Ежедневное введение продолжалось до конца исследования.

В течение второй недели лечения была проведена оценка механической гипералгезии (то есть оценка моноволокнами фон Фрея) для получения исходных показателей. В течение этой недели также измерялось потребление сахарозы до индукции при подготовке к более позднему тестированию на ангедоние. Образцы крови и фекалий были взяты по завершении двух полных недель лечения.

Индукция модели началась на третьей неделе лечения. Оценка боли, проводившаяся с боковой стороны клетки, выполнялась 2 раза в день в течение первой недели после индукции модели, а затем 1 раз в день в течение оставшейся части исследования. Механическую гипералгезию оценивали через 24 и 72 часа после индукции, а затем снова через 1 и 2 недели, в то время как соматосенсорная установка задней лапы, оценка функциональных движений и тестирование на ангедонию выполнялись еженедельно. По завершении поведенческого тестирования последний набор образцов крови и фекалий был получен за день до эвтаназии.

В день эвтаназии ткани отбирали и готовили для последующего анализа.

Штамм

Blautia hydrogenotrophica (BH) штамм DSM 14294.

Вес

Крыс взвешивали через 24 часа после прибытия в учреждение, а затем как минимум 1 раз в неделю. На Фиг. 1 показано отсутствие разницы в весе между группами в начале исследования (нормальный контроль: $206,80 \pm 9,10$ г; контроль заболеваний: $206,70 \pm 6,54$ г; *Blautia hydrogicotropic*: $204,50 \pm 10,33$ г; Lyobuffer: $206,80 \pm 9,31$ г). Хотя большинство крыс немного похудели через 24 часа после индукции, эта потеря не отличалась между группами, и все крысы продолжали набирать вес в течение следующих недель. К концу эксперимента наблюдалась тенденция к тому, что животные, получавшие *Blautia hydrogenotrophica*, и нормальные контрольные животные набирали больше веса по сравнению с контрольными животными и животными, пролеченными Lyobuffer.

Боль

Оценки боли присваивались 2 раза в день в течение первой недели после индукции, а затем 1 раз в день на протяжении всего исследования. Подсчет очков производится с боковой стороны клетки с использованием 4-балльной шкалы гримасы крысы [48]. Оценка включает наличие/отсутствие сужения глазницы и прижатия носа/щек, а также расположение ушей и усов.

Сенсомоторная функция

Размещение тактильных задних лап позволяет оценить сенсомоторное взаимодействие в ответ на тактильные и проприоцептивные раздражители. Оценка проводилась один раз в неделю после индукции модели, всего 2 подхода. Для проведения теста крыс держат в руке экспериментатора, конечности свободно свисают, а тело удерживают под углом 45° к краю стола. Животное подводят вверх к поверхности стола, пока спинная часть задней лапы не коснется стола. Нормальной реакцией является немедленное размещение лапы на столе. Оценка дня записывается как среднее значение 5 попыток.

На Фиг. 2 показано, что крысы, пролеченные *Blautia hydrogenotrophica*, неожиданно показали улучшение показателей на 2-й неделе, событие, которое не наблюдалось ни в одной другой группе. В правой (ипсилатеральной относительно инъекции) лапе это улучшение достигло статистической значимости по сравнению с обеими группами нормального контроля и Lyobuffer ($p=0,048$ и $p=0,017$, соответственно; Т-тест) и имело тенденцию к отличию от контроля заболевания ($p=0,119$; Т-тест).

Также, что интересно, была обнаружена разница между ипсилатеральным и контралатеральным размещением лап в группах. Эта оценка показала, что крысы нормального контроля менее эффективно размещали на ипсилатеральную сторону от инъекции, разница, которая имела тенденцию к статистической значимости к 2-й неделе ($p=0,054$; парный Т-тест). Уменьшение размещения ипсилатеральной лапы по сравнению с контралатеральной также было отмечено в группе Lyobuffer, с разницей, которая была статистически значимой как на 1-й неделе, так и на 2-й неделе ($p=0,020$ для каждой; парный Т-тест). Однако никаких различий в размещении внутри группы не наблюдалось ни для контрольных, ни для крыс, получавших *Blautia hydrogenotrophica*, хотя важно

отметить, что крысы контрольной группы, по-видимому, испытывали одинаковые трудности с ипсилатеральным и контрлатеральным размещением в обеих временных точках, в то время как крысы, получавшие *Blautia hydrogenotrophica*, показали улучшенные (статистически не значимые) показатели для обеих лап на 2-й неделе.

Функциональное движение

Функция задних конечностей оценивается на открытой площадке с использованием модифицированной версии 21-балльной шкалы оценки опорно-двигательного аппарата Basso, Beatties, Bresnahan (BBB) [49], с оценкой, выполняемой один раз в неделю после индукции модели, всего 2 подхода. Оценка включает размещение лапы, устойчивость, положение пальцев ног, хромоту и поддержку веса (активную и неподвижную).

Ангедония (предпочтение сахарозы)

Перед индукцией модели и введением тестируемого вещества крыс приучали к воде, подслащенной сахарозой, и устанавливали базовый уровень потребления воды в течение 24-часового периода. После этого первоначального воздействия выполняли тестирование предпочтения сахарозы за неделю до индукции модели, а затем один раз в неделю после индукции модели. Для тестирования обычные бутылки с водой были заменены двумя предварительно взвешенными бутылками, одна из которых содержала обычную воду, а другая -- 1%-ный раствор сахарозы. Через 24 часа бутылки снова взвешивали и регистрировали потребление каждой. Уменьшение потребления полезного угощения (сахарозной воды) в течение 24-часового периода приема считается показателем депрессивного поведения (ангедонии). Не было отмечено различий между группами по потреблению сахарозы.

Механическая аллодиния - тестирование с помощью моноволокон по фон Фрею

Тестирование на механическую аллодинию проводили с использованием моноволокон фон Фрея и оценивали с помощью метода Диксона вверх-вниз, чтобы обеспечить порог отдергивания лапы 50%. До индукции модели не было отмечено статистически значимых различий между назначенными группами.

Тестирование проводилось на исходном уровне (т.е. до индукции модели), через 24 часа после индукции и снова через 72 часа, 1 неделю и 2 недели, всего 5 подходов. Аппарат для тестирования состоит из небольшой камеры с полом из проволочной сетки (квадратные отверстия 5 мм). Аппарат приподнят, чтобы обеспечить легкое нанесение моноволокон на подошвенную поверхность каждой лапы крысы. Животным дают возможность акклиматизироваться к тестовой аппаратуре в течение 30 минут перед ежедневным пробным запуском. Диапазон тестирований моноволокон для крыс составляет 3,61-5,18 (сила сгиба 0,41-15,1 г). Тестирование начинается с 2-секундного нанесения моноволокон 4,56 (средний диапазон) перпендикулярно подошвенной области ипсилатеральной задней лапы и с давлением, достаточным для обеспечения сгиба волокна моноволокон. За крысами наблюдают во время нанесения моноволокон и в течение 2 секунд после этого. Положительным ответом является быстрое отдергивание задней лапы и возможный тремор или облизывание лапы. Если ответ неоднозначен, то же

моноволокно применяется повторно после 30-секундной задержки. Если ответ положительный, оценивается следующее самое легкое моноволокно, в то время как отрицательный ответ сопровождается применением следующего более тяжелого моноволокна. Время между нанесением составляет 10 секунд (за исключением неоднозначного ответа, как указано выше). Для анализа получают шесть показаний. Анализ данных осуществляется методом «вверх-вниз» [50]. Статистически значимые отличия от нормального контроля отмечены звездочкой.

На Фиг. 3 показаны результаты оценки с использованием моноволокна фон Фрея. Введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, привело к заметному снижению механической аллодинии по сравнению с контрольными группами.

Мышечная гипералгезия

Механический ноцицептивный порог в икроножной мышце количественно определяли через две недели после индукции с помощью цифрового датчика компрессии, прикладываемого к ипсилатеральной икроножной мышце до тех пор, пока конечность не отдернулась. Были выполнены и усреднены три последовательных тестирования. Сила сжатия, прикладываемая во время отдергивания, записывалась как пороговое значение сжатия во время отдергивания.

Как показано на Фиг. 4, в этот момент времени у этого теста не было никакого основного эффекта. В целом крысы были менее чувствительны во время тестирования, чем ожидалось, при этом показатели компрессии при отмене в среднем на 200-400 г были выше, чем во время пилотного исследования. Следует отметить, что, хотя в этом тесте не было различий между группами, крысы, пролеченные *Blautia hydrogenotrophica*, выполняли те же функции, что и животные положительного контроля.

Забор крови при забое

В дополнение к заборам крови при жизни, описанным выше, окончательный забор крови из сердца выполняли при эвтаназии, когда крысы находились под анестезией. Подготовка образцов плазмы была идентична описанной выше (т.е. к плазме был добавлен как ЭДТА, так и литий-гепарин), образцы хранились при -80 °C.

Забор ганглия спинного корня при забое

По завершении части исследования *in vivo* крыс подвергали глубокой анестезии изофлураном, собирали образцы кишечника и вырезали ганглии дорсального корешка (DRG). После сбора тканей животных умерщвляли декапитацией.

DRG вырезали, погружали в 10% нейтральный забуференный формалин (NBF), подвергали криозащите в 30%-ном растворе сахарозы, замораживали и заключали в среду OCT и хранили при -80 °C. Три среза толщиной 10 мкм на DRG/животное нарезали с использованием криостата (-21 °C), и иммуногистохимический анализ ИHC выполняли на срезах DRG от 8 крыс в каждой группе лечения с использованием проверенных маркеров для TNF α и GFAP.

Забор кишечной ткани при забое

Приблизительно через 24 часа после последнего введения исследуемого препарата

крыс подвергали глубокой анестезии изофлураном и как можно быстрее извлекали следующие органы:

Подвздошную кишку иссекали на 0,5 см выше слепой кишки, разрезали в продольном направлении, промывали (промывка физиологическим раствором) и осторожно удаляли жир и содержимое. Было собрано три равных куса по 1,0 см каждый:

- Проксимальный образец помещали в RNALater™.
- Средний образец был мгновенно заморожен в жидком азоте.
- Дистальный образец фиксировали погружением в 4% параформальдегид (PFA), подвергали криозащите в растворе сахарозы (15-30%), заливали в OCT и замораживали.

Слепая кишка была полностью вырезана вместе с ее содержимым и быстро заморожена в жидком азоте.

Ободочную кишку иссекали на 0,5 см ниже слепой кишки, разрезали в продольном направлении, промывали (промывали физиологическим раствором) и осторожно удаляли жир и содержимое. Были собраны три равных отрезка восходящей кишки по 1,0 см каждый:

- Проксимальный образец помещали в RNALater™.
- Средний образец был мгновенно заморожен в жидком азоте.
- Дистальный образец фиксировали погружением в 4% параформальдегид (PFA), подвергали криозащите в растворе сахарозы (15-30%), заливали в OCT и замораживали.

Поперечную ободочную кишку отбирали целиком, разрезали в продольном направлении, промывали (промывка физиологическим раствором) для удаления содержимого и быстро замораживали в жидком азоте.

Нисходящую толстую кишку отбирали целиком, разрезали в продольном направлении, промывали (промывка физиологическим раствором) для удаления содержимого и быстро замораживали в жидком азоте.

Дополнительные измерения

В ходе этого исследования были оценены два дополнительных показателя, связанные с благосостоянием животных. Боль оценивалась со стороны клетки с использованием 4-балльной шкалы гримасы 2 раза в день в течение первой недели после индукции, а затем 1 раз в день в течение всего исследования, в то время как функциональное движение оценивалось с помощью модифицированной шкалы оценки опорно-двигательного аппарата, один раз в неделю после ознакомления с моделью, всего 2 подхода. Ни по одному из этих показателей не было замечено никаких нарушений, при этом все животные не проявляли явных признаков нежелательной боли или дистресса в любой момент времени. Эти данные представлены в таблице 2.

Таблица 2: Показатели благосостояния животных/параметры модели

Тест	Нормальный	Контроль	Blautia	Lyobuffer
	контроль	заболевания	hydrogenotro	
			phica	

Оценка боли	0	0	0	0
Функциональное движение	7	7	7	7

Выводы

Результаты этого исследования подтверждают вывод о том, что пероральное введение *Blautia hydrogenotrophica* оказывает благотворное влияние на несколько факторов, способствующих достижению более положительного результата в кислотно-солевой модели фибромиалгии. Лечение Lyobuffer никоим образом не защищало, и имело результат эффективности не лучше, чем уровни в контроле заболеваний. Важно отметить, что, хотя различия, наблюдаемые у животных, получавших *Blautia hydrogenotrophica*, не достигли статистической значимости по сравнению с контрольными заболеваниями, это не исключает их биологической значимости, тем более что эта модель по своей природе является изменчивой.

Некоторые результаты подтверждают вывод этого исследования. Во-первых, крысы пролеченные нормальным контролем и *Blautia hydrogenotrophica*, показали тенденцию к увеличению прибавки в весе после индукции модели по сравнению с контрольными группами и группами Lyobuffer.

В поведенческих тестах крысы, пролеченные *Blautia hydrogenotrophica*, показали результаты на уровне нормального контроля или выше, при этом ни одна из этих групп не показала статистически значимых отличий от положительного контроля. Кроме того, соматосенсорное тестирование показало, что лечение *Blautia hydrogenotrophica*, по-видимому, улучшило эффективность на 2-й неделе после индукции, достижение, не отмеченное ни в одной другой группе.

Отсутствие статистических различий между группами нормального контроля и контроля заболеваний, хотя это и не ожидается на основании более ранней пилотной работы, может быть следствием более интенсивного взаимодействия, требуемого на протяжении всего проекта. Ежедневное введение экспериментальных соединений через пероральный желудочный зонд перед индукцией модели и продолжение в течение оставшихся недель исследования, а также повторные заборы крови требовали, чтобы животных регулярно пролечивали и удерживали, часто по несколько раз в день. Кроме того, график поведенческого тестирования требовал повторного лечения сверх того, что имело место во время более короткого и упрощенного пилотного исследования. Сообщения в литературе по человеку показывают, что упражнения могут быть полезны для модулирования симптомов фибромиалгии [51]. У крыс также было показано, что упражнения уменьшают болевую реакцию [52]. В текущем проекте поддающиеся измерению изменения часто наблюдались при сравнении контрольных животных с животными положительного контроля. Учитывая эти результаты, возможно, что модели просто не хватало устойчивости, необходимой на 2-й неделе после индукции для обнаружения более тонких изменений.

Последовательности

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

1 tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61 gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacgggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccgggtg
181 tatgagatgg acccgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaatttgca caatggggga aacctgatg cagcgacgc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtagggggga
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt tttcttgag tggcgagag
601 gtaagcgga ttctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc
781 tcttcgggtc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtagctt cgcaagaatg
841 aaactcaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggt taattcgaag
901 caacggaag aaccttacc agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaacttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggtgtcgtc agtcgtgtc gtgagatgtt
1021 gggtaagtc ccgcaacgag cgcaaccct atctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgt acaatggcgt aaacaaagg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttccc
1321 ggtctgtac acaccgccc tcacaccatg ggagtcagta acggcgaag tc

SEQ ID NO:2 (Ген 16S рибосомальной РНК штамма WAL 14507 *Blautia wexlerae*,
частичная последовательность - EF036467)

1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
181 aagatggacc cgcgttgat tagctgttg gtgggtaac ggcccacaa ggcgacgatc
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc
481 gttatccgga ttactgggt gtaaaggag cgtagacgggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
601 agcggaaatc ctagttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgtga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt

721 agataacctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
 901 acgcgaagaa cettaccaag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc ggaatttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtcatgg ttgtctcag ctctgtctgt gagatgttg
 1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcaact
 1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggtat cagaatgccg cggatgaatac gttcccggtg
 1321 cttgtacaca ccgccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
 1381 tgcaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

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

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG
 AGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTTCGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGG
 ACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCTCATACAGGGGGGATAACAGTTGGAAAC
 GGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCG
 GTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGGTAACGGCCCACCA
 AGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACA
 CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACC
 CTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCA
 GCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA
 GCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGC
 ATTGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGG
 TGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGT
 AACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGC
 AGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAA
 GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTATTCTGAAGCAACGC
 GAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTTCGTAATGGAACCTTTCCT
 TCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
 TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGC
 TGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTC
 AAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAA
 GGGAAGCGAGCCCGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACT
 GCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT
 GTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTC
 AGTAACGCCCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGAT

TGATAACTGGGGTGAAGTCTAGGGGGT

SEQ ID NO:4 (Консенсусная последовательность 16s рРНК штамма NCIMB 42486 *Blautia wexlerae*)

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTCTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAG
TAACGCGTGGGTAACCTGCCTTATACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAA
TACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATAA
GATGGACCCGCGTTGGATTAGCTTGTGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGA
TCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAG
CGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAG
ATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACG
GTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCTGTGGACTGCATTGGAAC
TGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACG
TTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAAC
GCAGTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAAGTCTTGACATCCGCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGAC
AGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCT
GGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCAT
GCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGA
GATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTCGGACTGTAGTCTGC
AACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCC
CGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

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

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatag agaacggaga
61 ttccggtga agttttctat tgactgagtg gcggacgggt gagtaacgcg tgggtaacct
121 gccctataca gggggataac agttagaaat gactgctaata accgcataag cgcacagctt
181 cgcatagaagc ggtgtgaaaa actgaggtgg tataggatgg acccgcttg gattagctag
241 ttggtgaggt aacggccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
301 cacattggga ctgagacacg gcccaaacct ctacgggagg cagcagtgga gaatattgca
361 caatggggga aacctgatg cagcgacgcc gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa
421 acttctatca gcagggaaga aagtacgggt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
481 gccagcagcc gcgtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
541 gagcgtagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat

601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttccatgtgt agcggtgaaa
 661 tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
 781 cgtgaatac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta
 841 ttcccactg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg gggaccgcga
 901 caagcggtag agcatgtgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgac
 961 atccctctga cggggaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtggtgca
 1021 tgggtgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag ggataacctg
 1141 gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca tgccccctat gatttgggct acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcggtga atacgttccc gggcttctga cacaccgccc gtcacacat
 1381 gggagtcagt aacgccccgaa gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg ccgaagggtg
 1441 gactgataac tggggtga

SEQ ID NO:6 (Консенсусная последовательность гена 16S рибосомальной РНК штамма *Blautia producta* NCIMB 43170)

GACTTCGGGCGTTACTGACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACC
 CGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCGT
 GCAGTCGAGTTGCAGACTGCAGTCCGAACTGGGACGTTATTTTTGGGATTCGCTCAA
 CATCGCTGTCTCGCTTCCCTTTGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCA
 TAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCCGGGTTATCCCCGGCAGT
 CTCCCTAGAGTGCCCACCATCATGTGCTGGCTACTAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTT
 GCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTG
 TCTCCTCTGCCCCGAAGGGAAGTCCCCGTTACGGGACGGTCAGAGGGATGTCAAGA
 CTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCG
 GGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATAC
 TTATTGCGTTTGCTGCGGCACCGAATGGCTTTGCCACCCGACACCTAGTATTCATCGT
 TTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTC
 AACGTCAGTTACCGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTA
 CGCATTTACCGCTACACTAGGAATTCCGCTTACCTCTCCGGCACTCTAGAACAACA
 GTTTCCAATGCAGTCCTGGGGTTAAGCCCCAGCCTTTCACATCAGACTTGCTCTTCCG
 TCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACC
 GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGGGCTTCTTAGTCAGGTACCGTCATTTTCTTC
 CCTGCTGATAGAAGTTTACATACCGAGATACTTCTTCCTTCACGCGGCGTCGCTGCA
 TCAGGGTTTCCCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG
 CCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTACCCCTCTCAGGCCGGCTACTGATCGTCGC
 CTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAACCTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCTCATACCA
 CCGGAGTTTTTTCACACCAGACCATGCGGTCCTGTGCGCTTATGCGGTATTAGCAGTC
 ATTTCTAACTGTTATCCCCCTGTATGAGGCAGGTTACCCACGCGTTACTCACCCGTCC

GCCGCTCAGTCACAAAGACTTCAATCCGAAGAAATCCTGTCTTAGTGCTTCGCT

SEQ ID NO:7 - Последовательность гена pPHK 16S штамма *Blautia coccoides* - показатели консенсусной последовательности 2 Contig 15, собранные с использованием Geneious

TCGGCAGCTCCTTCCTTTCGGTTAGGTCAGTTCGGGCGTTACTGACTCC
CATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCT
GATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGTCGAGTTGCAGACTGCAGTCCG
AACTGGGACGTTATTTTTGGGATTCGCTCAACATCGCTGTCTCGCTTCCCTTTGTTTA
CGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGT
CCCCGCCTTCCTCCGGGTTATCCCCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCAACATCATGTG
CTGGCTACTAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGA
CACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTCTGCCCCGAAGGGAAGTCCCC
GTTACGGGACGGTCAGAGGGATGTCAAGACTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGA
ATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATT
CTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATACTTATTGCGTTTGCTGCGGCACCGAATGG
CTTTGCCACCCGACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA
ATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACCGTCCAGTAAGCCG
CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCTAATATCTACGCATTTACCGCTACACTAGGAATTC
CGCTTACCTCTCCGGCACTCTAGAACAACAGTTTCCAATGCAGTCCTGGGGTTAAGC
CCCAGCCTTTCACATCAGACTTGCTCTTCCGTCTACGCTCCCTTTACACCCAGTAAAT
CCGGATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGG
GCTTCTTAGTCAGGTACCGTCATTTTCTTCCCTGCTGATAGAAGTTTACATAACCGAGA
TACTTCTTCCTTCACGCGGGCGTCGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTGTGCAATATTCC
CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTCA
CCCTCTCAGGCCGGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGGGCGGTACCCCTCCAACCTAGC
TAATCAGACGCGGGTCCATCTCATACCACCGGAGTTTTTTCACACCAGACCATGCGGT
CCTGTGCGCTTATGCGGTATTAGCAGTCATTTCTAACTGTTATCCCCCTGTATGAGGC
AGGTTACCCACGCGTTACTCACCCGTCCGCCGCTCAGTCACAAAGACTTCAATCCGA
AGAAATCCGTCTTAGTGCTTCGCTCGACTGCA

SEQ ID NO:8 - Последовательность гена pPHK 16S штамма *Blautia coccoides* - показатели консенсусной последовательности 2, собранные с использованием Geneious

GGTCGCTTCGGCAGCTCTTCCTTTCGGTTAGGTCAGTTCGGGCGTTACT
GACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGG
CATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCGTGCAGTCGAGTTGCAGACTGC
AGTCCGAAGTGGGACGTTATTTTTGGGATTCGCTCAACATCGCTGTCTCGCTTCCCTT
TGTTTACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAAATCATAAGGGGCATGATGATTTGA
CGTCGTCCCCGCCTTCCTCCGGGTTATCCCCGGCAGTCTCCCTAGAGTGCCCAACATC
ATGTGCTGGCTACTAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTCTGCCCCGAAGGGAA
GTCCCCGTTACGGGACGGTCAGAGGGATGTCAAGACTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG

CTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCCTTTGAGT
TTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGAATACTTATTGCGTTTGCTGCGGCACC
GAATGGCTTTGCCACCCGACACCTAGTATTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACCGTCCAGTA
AGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCTAATATCTACGCATTTACACCGCTACACTAGG
AATTCGCTTACCTCTCCGGCACTCTAGAACAACAGTTTCCAATGCAGTCCTGGGGT
TAAGCCCCAGCCTTTACATCAGACTTGCTCTTCCGTCTACGCTCCCTTTACACCCAG
TAAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGGGGCTTCTTAGTCAGGTACCGTCATTTTCTTCCCTGCTGATAGAAGTTTACATAC
CGAGATACTTCTTCCTTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGGTTTCCCCCATTTGTGCAAT
ATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCC
GTTACCCCTCTCAGGCCGGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGGGCCGTTACCCCTCCAA
CTAGCTAATCAGACGCGGGTCCATCTCATACCACCGGAGTTTTTCACACCAGACCAT
GCGGTCCTGTGCGCTTATGCGGTATTAGCAGTCATTTCTAACTGTTATCCCCCTGTAT
GAGGCAGGTTACCCACGCGTTATCACCCGTCCGCCGCTCAGTCACAAAGACTTCAAT
CCGAAGAAATCCGTCTTAGCGCTCCGCTCGACTGCATGGTAGC

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] WO 01/85187
- [18] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [19] Bernalier et al. (1996) *Arch. Microbiol.* 166 (3), 176-183.
- [20] Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [21] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [22] Srůtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [23] Stanos et al. (2016) *Postgraduate Medicine*, 128, 5, 502-515

- [24] Coyne et al (2017) *Postgraduate Medicine*, 129, 1, 22-31
- [25] Dixon et al. (2016) *J Behav Med*, 39:537-550
- [26] Pace et al. (2001) *Visceral Hypersensitivity Is Not a Feature of Fibromyalgia Syndrome*, *Journal of Musculoskeletal Pain*, 9:1, 47-55.
- [27] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [28] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ред. by Day and McLellan, Humana Press.
- [29] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [30] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [31] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [32] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2-е изд., (1994), ред. A Wade and PJ Weller
- [33] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [34] US 2016/0067188
- [35] *Handbook of Microbiological Media*, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [36] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [37] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [38] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20-е изд., ISBN: 0683306472.
- [39] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [40] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [41] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [42] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3-е изд. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [43] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [44] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5-е изд. (Current Protocols).
- [45] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2-е изд. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [46] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [47] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [48] Sotocinal et al. (2011). *Mol Pain*, 7: 55. doi: 10.1186/1744-8069-7-55.
- [49] Basso et al. (1995). *J Neurotrauma*, 12:1-21.
- [50] Chaplan et al. (1994). *J Neurosci Methods*, 53; 55-63.

- [51] O'Dwyer et al.(2019) Rheumatology International, <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04270-3>
- [52] Allen et al (20017) Arthritis & Rheumatology, 69(7): 1407-1417

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Blautia*, для применения в способе лечения или предотвращения сенсорной гиперчувствительности.
2. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Blautia*, для применения в способе лечения или профилактики аллодинии и/или гипералгезии.
3. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что композиция предназначена для лечения или предотвращения (а) сенсорной гиперчувствительности и/или (b) аллодинии и/или гипералгезии у субъекта с диагнозом нейропатия, комплексный региональный болевой синдром, постгерпетическая невралгия, фибромиалгия или мигрень.
4. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что субъекту была диагностирована фибромиалгия.
5. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция предназначена для применения у пациента, у которого не была диагностирована висцеральная гиперчувствительность.
6. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм принадлежит к видам *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae* или *Blautia producta*.
7. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм является *Blautia hydrogenotrophica*.
8. Композиция по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что бактериальный штамм 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*.
9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что (а) бактериальный штамм имеет последовательность рРНК 16s, которая по меньшей мере на 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 5 или которая имеет последовательность 16s. последовательность рРНК SEQ ID NO: 5; или (b) бактериальный штамм имеет последовательность рРНК 16s, которая по меньшей мере на 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична любой из SEQ ID NO: 6-8 или которая имеет последовательность рРНК 16s любую из SEQ ID NO: 6-8.
10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция предназначена для перорального введения.
11. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.
12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм является лиофилизированным или жизнеспособным.
13. Композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что композиция содержит (а) бактериальный штамм *Blautia hydrogenotrophica* как часть

микробного консорциума или (b) только бактерии вида *Blautia hydrogenotrophica*.

14. Композиция по любому из предшествующих пунктов, которая не содержит бактерий рода *Clostridium*.

15. Способ лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезия, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, нуждающемуся в этом пациенту.

По доверенности

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ (по ст. 34 РСТ)

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, для применения в способе лечения или предотвращения сенсорной гиперчувствительности у субъекта с диагнозом фибромиалгия.

2. Композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, для применения в способе лечения или предотвращения аллодинии и/или гипералгезии, обе из которых связаны с сенсорной гиперчувствительностью у субъекта с диагнозом фибромиалгия.

3. Композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, для применения в способе лечения или предотвращения фибромиалгии.

4. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для применения у пациента, у которого не была диагностирована висцеральная гиперчувствительность.

5. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, предназначенная для перорального введения.

6. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, содержащая один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

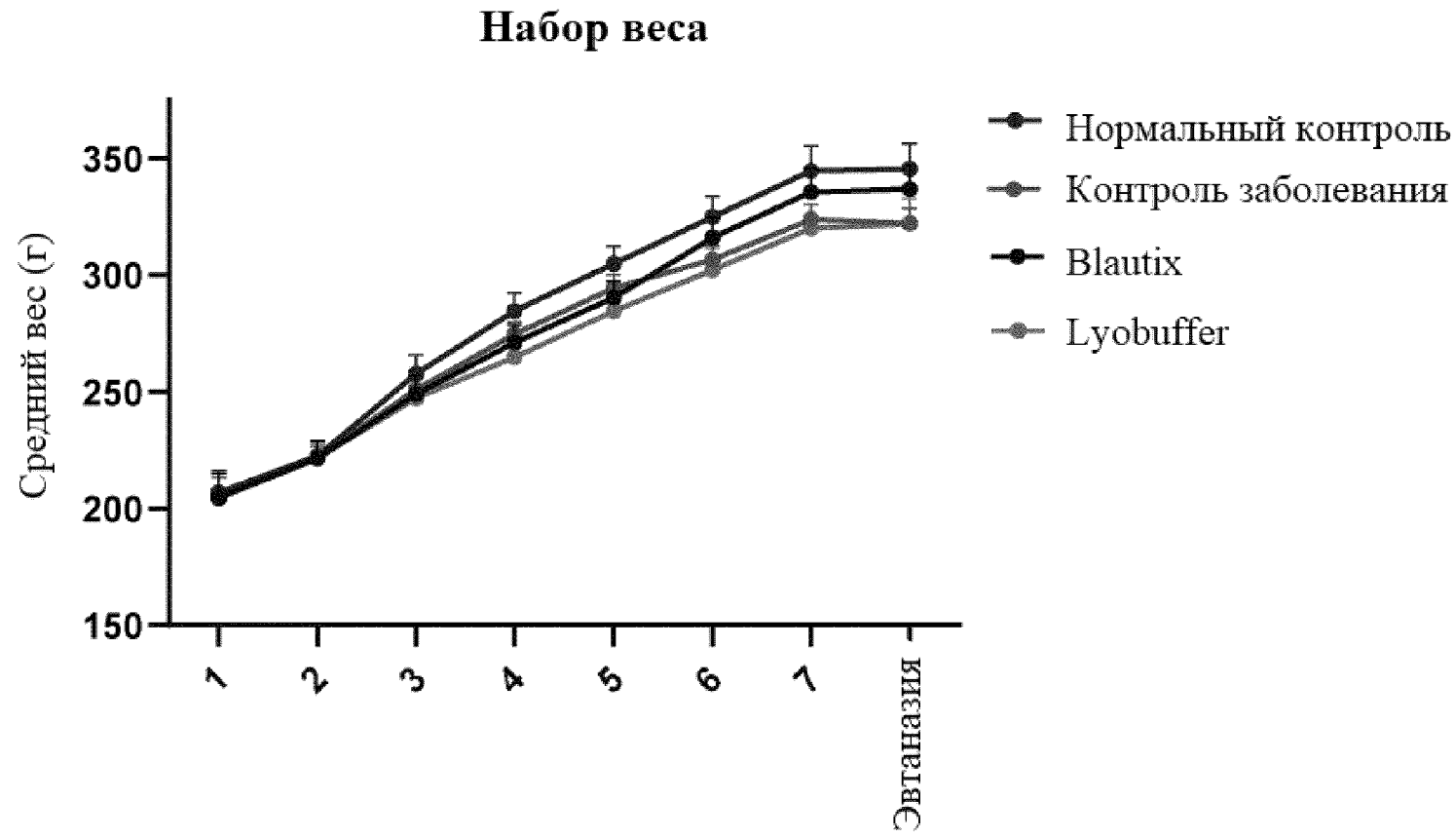
7. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, отличающаяся тем, что бактериальный штамм является лиофилизированным или жизнеспособным.

8. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, содержащая (a) бактериальный штамм *Blautia hydrogenotrophica* как часть микробного консорциума или (b) только бактерии вида *Blautia hydrogenotrophica*.

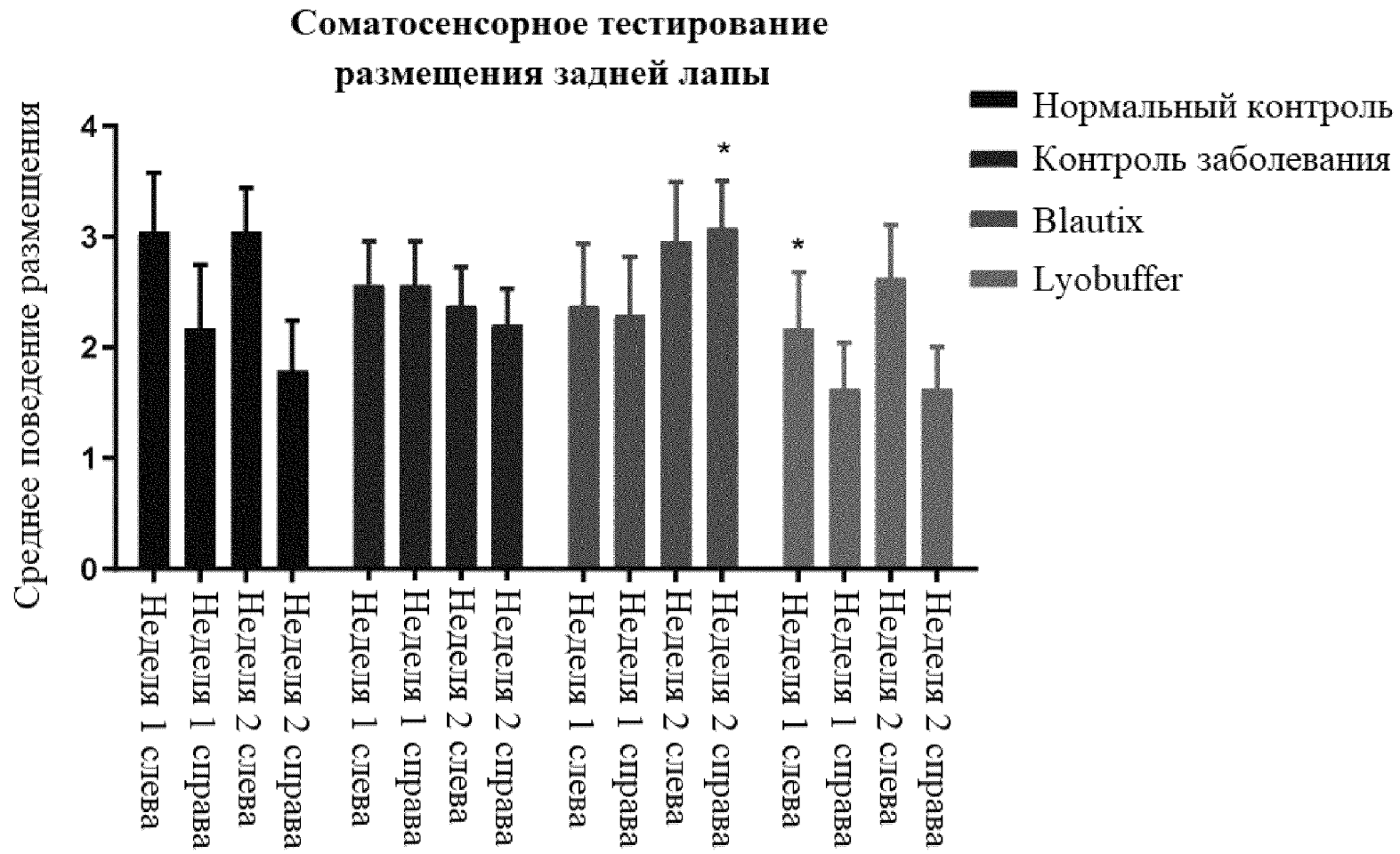
9. Композиция для применения по любому из предшествующих пунктов, не содержащая бактерии рода *Clostridium*.

По доверенности

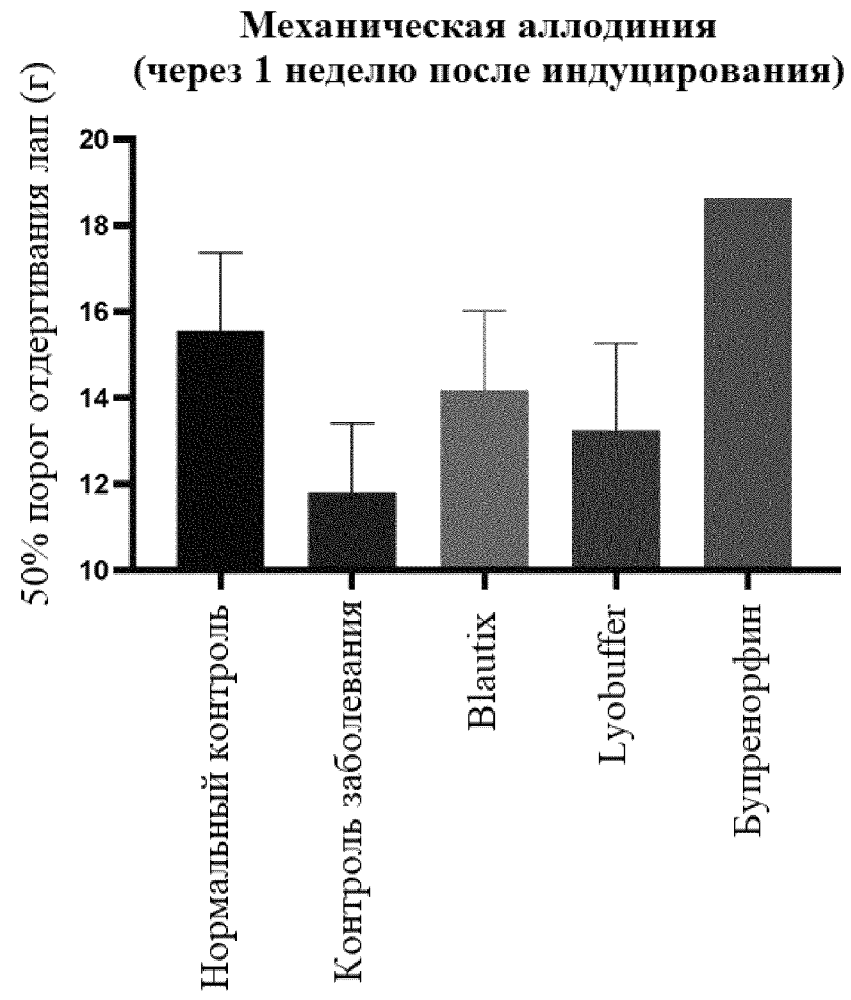
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Среднее сжатие мышц

