

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290628** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.13

(22) Дата подачи заявки
2020.08.19

(51) Int. Cl. *A61K 35/747* (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) ПРОБИОТИЧЕСКАЯ ДОСТАВКА НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

(31) 62/888,757

(32) 2019.08.19

(33) US

(86) PCT/US2020/046896

(87) WO 2021/034879 2021.02.25

(71) Заявитель:
БЭЙЛОР ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:
**Кирни Кристофер Мишель, Чоудхури
Анкан, Ортис Патрик (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к стратегии лечения для борьбы с определенными инфекциями в кишечнике, такими как *h. pylori*. В стратегии используется система на основе пробиотиков для экспрессии и доставки направленного противомикробного пептида в кишечник. Направленный противомикробный пептид экспрессируется из гибридного гена, который кодирует противомикробный пептид, слитый с направляющим пептидом, причем последний связывается с белками целевой бактерии. Эта технология может избирательно и специфично устранять целевые бактерии из кишечной микробиоты. Специфичность нацеливания на уровне штамма, вида или рода зависит от последовательности направленного пептида, используемого для обеспечения нацеливания. Лечение можно проводить перорально, например, с помощью съедобного пробиотика.

202290628

A1

A1

202290628

ПРОБИОТИЧЕСКАЯ ДОСТАВКА НАПРАВЛЕННЫХ ПРОТИВОМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к средствам уничтожения определенных видов кишечных бактерий, таких как *helicobacter pylori*, без изменения микробиома.

[0002] Микробиота кишечника влияет на здоровье человека многими способами. Микробиом кишечника содержит более 100 триллионов бактерий и в значительной степени участвует в опосредовании иммунного ответа хозяина, а также выполняет другие важные функции, включая извлечение питательных веществ и энергии из пищи. Бактериальный состав кишечника предрасполагает людей к проблемам со здоровьем от ожирения и злокачественной опухоли до психологических нарушений. Нарушение микробиома (дисбиоз) приводит к дисбалансу типов и количества бактерий, составляющих нормальную защитную микрофлору человека. Существует ряд факторов, которые приводят к дисбиозу, включая прием внутрь патогенных бактерий и опосредованное антибиотиками или иммуносупрессивно опосредованное истощение микробиома. Дисбиоз связан с многочисленными заболеваниями человека, включая как кишечные, так и внекишечные нарушения. В литературе указывается на дисбиоз при патогенезе СРК, воспалительном заболевании кишечника, колоректальном раке, а также аллергиях, сердечно-сосудистом заболевании и психическом заболевании. Кроме того, кишечную микробиоту рассматривают в качестве предшественника аутоиммунных заболеваний, поскольку было показано, что тяжесть и/или встречаемость заболевания снижается у безмикробных моделей животных.

[0003] В других случаях изменения в кишечных бактериях возникают в результате проглатывания опасного патогена, который может вызывать кишечные расстройства. Есть несколько, если таковые имеются, описанных способов для эффективного уничтожения определенных видов бактерий, вызывающих проблемы в кишечнике, либо в качестве активного патогена, либо в качестве игрока в микробиоме, который предрасполагает людей к различным нарушениям.

[0004] *Helicobacter pylori* представляет собой кишечную бактерию, которая является первичным возбудителем пептических язв и рака желудка. Рак желудка занимает третье место в мире по летальности среди злокачественных опухолей и особенно распространен на Дальнем Востоке (Bahkti et al., 2020). Только 1 из 5 пациентов выживает после рака желудка через 5 лет после постановки диагноза. *H. pylori* признана Международным агентством по изучению злокачественной опухоли канцерогеном группы 1. По оценкам, 4,4 миллиарда человек инфицированы *H. pylori*, при этом в развивающихся странах наблюдается самый высокий уровень распространения инфекции (распространенность 70% в Африке) (Nooi et al., 2017). В Соединенных Штатах Америки *H. pylori* встречается в два раза чаще у небелого населения, чем у белого населения (Everhart et al., 2000) и

ассоциирована с более низким социально-экономическим статусом во всем мире.

[0005] Коммерческой вакцины против *H. pylori* не существует. Несмотря на то, что в некоторых странах, использующих лечение антибиотиками, наблюдается некоторый прогресс в снижении распространенности *H. pylori*, в настоящее время у изолятов *H. pylori* наблюдается значительное увеличение показателей резистентности к антибиотикам. Распространенность резистентности *H. pylori* к кларитромицину выросла с 11% до 60% всего за 4 года (2005-2009 гг.) в Корее, при этом аналогичный рост был зарегистрирован в Китае и Японии (Thung et al., 2016). Хотя стандартное лечение на самом деле представляет собой терапию тремя антибиотиками, показатели устойчивости к антибиотикам продолжают расти. Таким образом, трудно увидеть перспективы лечения *H. pylori* с помощью антибиотиков. Аналогичные проблемы возникают и с другими бактериями.

СУЩНОСТЬ

[0006] Настоящее изобретение относится к стратегии лечения для борьбы с некоторыми инфекциями в кишечнике, такими как *h. pylori*. в стратегии используется система на основе пробиотиков для экспрессии и доставки направленного противомикробного пептида в кишечник. направленный противомикробный пептид экспрессируется из гибридного гена в днк пробиотической бактерии и может быть последовательностью, кодирующей противомикробный пептид, слитой с последовательностью, кодирующей направленный пептид, при этом последний пептид отвечает за связывание с белком целевой бактерии. слияние может происходить с участием или без участия линкерной последовательности, то есть независимо от наличия линкерной последовательности. эта технология может избирательно и специфически устранять целевые бактерии из кишечной микробиоты. Специфичность нацеливания на уровне штамма, вида или рода зависит от направленного белка, используемого для обеспечения нацеливания. лечение можно вводить перорально, например, с помощью перорального пробиотика.

[0007] Предлагаемые варианты осуществления, описываемые в настоящем документе, относятся к способу контроля целевых бактерий, таких как *H. pylori*, который не включает антибиотики. Для доставки активного белка в этом способе используют сконструированные пробиотические бактерии. В предлагаемых вариантах осуществления используют молочнокислые бактерии, в том числе виды *Lactococcus* и *Lactobacillus*, такие как *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus acidophilus*, которые являются пищевыми бактериями, безопасными для потребления человеком или получившими статус GRAS (в основном признаны безопасными) у FDA и находят широкое коммерческое применение для переработки молочных пищевых продуктов. Пробиотики представляют собой хорошо зарекомендовавшую себя технологию, недорогую, хорошо масштабируемую и очень успешную в коммерческом отношении. Эти коммерческие черты делают эту технологию особенно подходящей для крупномасштабного применения, особенно в развивающихся странах.

[0008] Пробиотическая бактерия может быть сформулирована как узнаваемый

пищевой продукт, который обычно встречается на рынке пробиотиков, такой как сухой йогурт в гранулах, который можно хранить без охлаждения в течение месяцев. В таком формате продукт могут употреблять путешественники в зарубежные страны или в длительных экспедициях или солдаты с едой, возможно, два раза в неделю, в профилактических («превентивных») целях. Лечение может также служить в качестве терапии, используя в пищу, после того как пациент заболел.

[0009] Настоящая технология важна и выгодна, поскольку она использует направленные противомикробные пептиды, которые уничтожают только целевую бактерию, оставляя нетронутыми всех других членов микробного сообщества. Использование пробиотических бактерий, которые попадают внутрь и остаются активными в пищеварительной системе, для направленной секреции рекомбинантного противомикробного пептида непосредственно в кишечнике пациента также существенно отличается от предыдущих технологий.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0010] На фиг. 1 показан вектор re-sumostar, несущий пмп, для экспрессии в клетках *e. coli* bl21. сайт протеазы sumo находится между sumo и a12c-пмп.

[0011] На фиг. 2 показана экспрессия sumo/пмп в *e. coli* и расщепление пмп без партнера по слиянию sumo.

[0012] На фиг. 3 представлены значения логарифмов минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в мкМ для ненацеленных и нацеленных аналогов евроцина и плектазина в отношении *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*.

[0013] На фиг. 4 показан клеточно-кинетический профиль для *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* и *E. faecalis* (по часовой стрелке), созданный путем нанесения на график логарифма КОЕ/мл бактерий, выращенных в присутствии каждого пептида.

[0014] На фиг. 5 показана активность ингибирования биопленки, оцененная путем построения графика оптической плотности кристаллического фиолетового (540 нм) в зависимости от концентрации четырех ПМП на четырех бактериях - *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* и *E. faecalis*.

[0015] На фиг. 6 представлены результаты ПЦР-анализа экстрактов, полученных с помощью обратного желудочного зонда, демонстрирующие присутствие *Lactococcus lactis*, содержащих пустой вектор, вектор с противомикробным пептидом и вектор с противомикробным пептидом с направленным пептидом из мультимерина, в желудках мышей через три дня после приема внутрь.

[0016] На фиг. 7 показан вектор для трансформации *Lactococcus lactis* в соответствии с вариантами осуществления, описываемыми в настоящем документе.

[0017] На фиг. 8 показана жизнеспособность *E. coli* в присутствии различных разведений антибиотиков и супернатанты бульонных культур *Lactococcus lactis*, секретирующие противомикробный пептид с наличием или с отсутствием направленного пептида.

[0018] На фиг. 9 показан типичный вектор для секреции ПМП и нПМП в *Lactococcus lactis*.

[0019] На фиг. 10 показаны результаты количественной ПЦР на гене VacA, демонстрирующие элиминацию *H. pylori* путем совместного культивирования *in vitro* с *L. lactis*, экспрессирующими нПМП или пМП.

[0020] На фиг. 11 показан рост *Lactobacillus plantarum* через 24 часа совместного культивирования с *L. lactis*, экспрессирующими пустой вектор (pTKR), ПМП (алитезерин, латероспорулин или CRAMP) или нПМП (MM1-алитезерин, MM1-латероспорулин или MM1-CRAMP).

[0021] На фиг. 12 показан рост *Escherichia coli* через 24 часа совместного культивирования с *L. lactis*, экспрессирующими пустой вектор (pTKR), ПМП (алитезерин, латероспорулин или CRAMP) или нПМП (MM1-алитезерин, MM1-латероспорулин или MM1-CRAMP).

[0022] На фиг. 13 показана стандартная кривая для КОЕ/мкл культуры *H. pylori* со значениями C_T количественной ПЦР.

[0023] На фиг. 14 показан терапевтический тест с КОЕ/мкл *H. pylori* в зависимости от суток после инокуляции у мышей, обработанных на Сутки 5 после инокуляции *H. pylori* пробиотиком *Lactococcus lactis*, секретирующим ПМП или нПМП.

[0024] На фиг. 15 показан профилактический тест с КОЕ/мкл *H. pylori* в желудочной жидкости мыши для контрольных мышей (Нулевая) и мышей, инокулированных пустым вектором (pTKR) или пробиотиком *Lactococcus lactis*, секретирующим ПМП или нПМП (где MM1=направленный пептид мультимерина 1), до инокуляции *H. pylori* на Сутки 4.

[0025] На фиг. 16 показаны различия в таксономическом разнообразии для бактериальных популяций желудка мыши с четырьмя различными обработками без присутствия *H. pylori*: лечение антибиотиками, пробиотиком *L. lactis* с пустым вектором, ложной инокуляцией с буфером, пробиотиком, экспрессирующим ПМП, пробиотиком, экспрессирующим нПМП.

[0026] На фиг. 17 показаны различия в относительной численности четырех бактериальных видов-индикаторов при разных обработках; *Staphylococcus* и *Acinetobacter* ассоциированы с дисбиозом, а *Lactobacillus* и *Muribacter* - со здоровьем микробиоты; Сутки 0 - перед любым лечением; Сутки 5 - через 5 суток после инфицирования *H. pylori*; Сутки 8 и 10 представляют собой третьи и пятые сутки, соответственно, после различных видов терапевтического лечения (пробиотики либо с пустым вектором, либо экспрессирующие ПМП или нПМП).

[0027] На фиг. 18 показаны таксономические различия (расстояния) в данных секвенирования для видов бактерий, обнаруженных в желудке мыши, в четырех группах лечения: «Пустая» (пробиотик, несущий только пустой вектор), «Нулевая» (ложная инокуляция с буфером), «Нацеленная» (пробиотик, экспрессирующий нПМП) и «Ненацеленная» (пробиотики, экспрессирующие ПМП), по сравнению с Пустой группой.

[0028] На фиг. 19 показаны таксономические различия (расстояния) в данных

секвенирования для видов бактерий, обнаруженных в желудке мыши, в четырех группах лечения: «Пустая» (пробиотик, несущий только пустой вектор), «Нулевая» (ложная инокуляция с буфером), «Нацеленная» (пробиотик, экспрессирующий НПМП) и «Ненацеленная» (пробиотики, экспрессирующие ПМП), по сравнению с Нулевой группой.

[0029] На фиг. 20 показаны кумулятивные таксономические различия (энтропия Шеннона), накопленные за пять суток в данных секвенирования для видов бактерий, обнаруженных в желудке мыши после четырех различных обработок: «Пустая» (пробиотик, несущий только пустой вектор), «Нулевая» (ложная инокуляция с буфером), «Нацеленная» (пробиотик, экспрессирующий НПМП) и «Ненацеленная» (пробиотики, экспрессирующие ПМП).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0030] Настоящее изобретение относится к способам для нацеливания на целевую бактерию и элиминации целевой бактерии с использованием пробиотика, который экспрессирует и выделяет белок, который убивает разрушающую бактерию, не нанося вреда другим бактериям.

[0031] В предпочтительных вариантах осуществления настоящая технология относится к пробиотической бактерии, которая была трансформирована для включения конструкции днк для направленного противомикробного пептида. в предпочтительных вариантах осуществления пробиотическая бактерия представляет собой бактерию, безопасную для человека, такую как *Lactococcus lactis*. последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид, включает последовательность, кодирующую нацеленный (направленный) пептид, слитую с последовательностью, кодирующей противомикробный пептид, и экспрессируется пробиотической бактерией в виде гибридного белка. направленный пептид специфичен для целевой бактерии и ограничивает действие противомикробного пептида этой конкретной бактерией.

[0032] Таким образом, предпочтительные варианты осуществления, описываемые в настоящем документе, относятся к пробиотику для профилактики или лечения состояния, вызванного целевой бактерией, живущей в желудочно-кишечном тракте субъекта, включающему пробиотическую бактерию. Пробиотическая бактерия представляет собой молочнокислую бактерию, такую как бактерия *Lactococcus*, и предпочтительно *Lactococcus lactis*. Пробиотическая бактерия была трансформирована, чтобы содержать структуру ДНК, экспрессирующую направленный противомикробный пептид, где последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид включает последовательность, кодирующую противомикробный пептид, слитую с последовательностью, кодирующей направленный пептид, который связывается с белком целевой бактерии. Белок целевой бактерии может быть фактором вирулентности. В предпочтительных вариантах осуществления целевой бактерией является *H. pylori*, а фактором вирулентности является VacA. Направленным пептидом может быть мультимерин-1. Направленный противомикробный пептид убивает целевые бактерии в желудочно-кишечном тракте

индивидуума. Направленный противомикробный пептид также в минимальной степени разрушает другие бактерии, находящиеся в желудочно-кишечном тракте индивидуума, по сравнению с ненаправленными противомикробными пептидами, антибиотиками или другими видами лечения широкого спектра действия.

[0033] Как применяют в настоящем документе «минимально разрушает» означает, что направленный противомикробный пептид не вызывает нарушения, которое могло бы оказать влияние на здоровье, в отличие от технического изменения численности бактерий. «Минимально разрушает» также означает, что направленный противомикробный пептид не разрушает значительно другие нецелевые бактерии, если такое разрушение может оказать воздействие на здоровье.

[0034] Предпочтительные варианты осуществления относятся к пробиотической системе, которая доставляет противомикробные пептиды (ПМП) в кишечник. Противомикробные пептиды представляют собой натуральные продукты, вырабатываемые растениями, животными и грибами для защиты от бактериальной инфекции (Ngyuen et al., 2011). Однако сам по себе ПМП обладает широким спектром действия, сходным с антибиотиками. Документально доказано, что широкая активность антибиотиков приводит к дисбиозу микробиоты. Во многих публикациях показана связь между антибиотик-индуцированным дисбактериозом и ревматоидным артритом, воспалительным заболеванием кишечника, диабетом, ожирением и другими нарушениями (для обзора см. Keeney et al., 2014). Это одно из последствий избыточного использования антибиотиков и неселективных ПМП, которое является их общим слабым местом. Типичные ПМП, используемые в предпочтительных вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, включают латероспорулин, алитезерин и противомикробный пептид, подобный кателину (CRAMP).

[0035] Для решения этой проблемы дисбактериоза, возможные варианты осуществления, описываемые в настоящем документе, включают направленный пептид, слитый с ПМП, полученный из соответствующего гибридного гена направленный пептид-ПМП пробиотической бактерии. Это позволяет полученному направленному ПМП (нПМП) специфически связываться с целевой бактерией, такой как *H. pylori*, оставляя комменсальные бактерии кишечника практически нетронутыми. Таким образом, пробиотик, экспрессирующий нПМП, будет размножаться в желудке и избирательно убивать целевой патоген, *H. pylori*, не создавая проблем со здоровьем, связанных с антибиотиками и другими препаратами широкого спектра действия. Аналогичным образом можно воздействовать и на другие целевые бактерии, и *H. pylori* использована в настоящем документе в качестве примера.

[0036] В предпочтительных вариантах осуществления специфичность направленного пептида, описываемого в настоящем документе, основана на природной специфичности бактериального фактора вирулентности и рецепторов хозяина, с которыми он связывается. VacA является белковым фактором вирулентности, продуцируемым всеми изолятами *H. pylori* (Fitchen et al., 2005). Он секретируется, но также прилипает к

поверхности клеток *H. pylori* (Fitchen et al., 2005). VacA естественным образом связывается с человеческими рецепторным белком, мультимерином-1. В предпочтительных вариантах осуществления, описываемых в настоящем документе, используют последовательность, связывающую VacA, (аминокислоты 321-340) белка мультимерина-1 (Satoh et al., 2013), для применения в качестве направленного пептида для нПМП. Таким образом, эти нПМП будут локализованы на поверхности *H. pylori* посредством связывания с частью VacA, и ПМП затем сможет действовать, дестабилизируя бактериальную мембрану и специфически убивая клетку *H. pylori*.

[0037] Пробиотические нПМП, описанные в вариантах осуществления, отличаются от аналогичных технологий. Они обладают селективностью, не встречающейся у антибиотиков и ненаправленных ПМП. Использование пробиотиков позволяет производить пробиотические нПМП намного дешевле, чем белки нПМП, очищенные из системы гетерологической экспрессии или синтезированные химически. Это сочетание селективности и масштабируемости с низкой стоимостью необходимо для того, чтобы любая замена дешевых и широко распространенных антибиотиков была успешной в коммерческом отношении и, таким образом, достигала предполагаемых пациентов.

[0038] Предпочтительные варианты осуществления, описываемые в настоящем документе, относятся к съедобной пробиотической бактерии *Lactococcus lactis*, где пробиотическая бактерия была трансформирована для включения конструкции ДНК, экспрессирующей направленный противомикробный пептид, где последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид, включает последовательность, кодирующую противомикробный пептид, слитый с последовательностью, кодирующей направленный пептид, который связывается с пептидом VacA *H. pylori*, полученный из соответствующего гибридного гена бактерии *L. lactis*, где противомикробным пептидом является латероспорулин, алитезерин или подобный кателину противомикробный пептид, и где направленный противомикробный пептид уничтожает *H. pylori* в желудочно-кишечном тракте пациента, не оказывая значительного разрушающего действия на другие виды бактерий. Другими словами, пробиотическая бактерия, экспрессирующая направленный противомикробный пептид, не нарушит таксономический баланс микробиоты желудка и не вызовет длительных повреждений.

[0039] Дополнительные предпочтительные варианты осуществления относятся к способу лечения заболевания или состояния, связанного с *H. pylori*, путем введения пищевого пробиотика индивидууму, где пищевой пробиотик принимается внутрь и остается активным в кишечнике субъекта достаточно долго для секреции направленного противомикробного пептида, уничтожающего *H. pylori*.

[0040] В другом аспекте настоящего изобретения предлагается пробиотическая композиция, включающая терапевтическое количество трансформированной пробиотической бактерии *L. lactis*, экспрессирующей направленный противомикробный пептид, и приемлемый эксципиент, адъювант, носитель, буфер или стабилизатор. Под «терапевтическим количеством» следует понимать количество типичного пробиотика,

достаточное для проявления ингибирующего действия на *H. pylori*. Фактическое количество, скорость и время введения будут зависеть от характера и тяжести состояния или заболевания, которое лечат. Назначение лечения входит в обязанности врачей общей практики и других врачей. Приемлемый эксципиент, адъювант, носитель, буфер или стабилизатор должны быть нетоксичными и не должны мешать эффективности секретируемого противомикробного белка. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который предпочтительно является пероральным.

[0041] Бактерии *L. lactis*, используемые в описанной пробиотической композиции, могут быть представлены в виде живой культуры, в виде неактивного материала или их сочетания. Специалистам в данной области понятно, что бактерия *L. lactis* может стать неактивной, например, в процессе лиофилизации, который хорошо известен специалистам в данной области.

[0042] Пример соответствующего процесса лиофилизации может начинаться со среды, содержащей соответствующую бактерию *L. lactis*, в которую перед лиофилизацией можно добавить подходящее защитное средство для защиты клеток. Примеры подходящих защитных средств в качестве неограничивающих примеров включают, дистиллированную воду, полиэтиленгликоль, сахарозу, трегалозу, обезжиренное молоко, ксилозу, гемицеллюлозу, пектин, амилозу, амилопектин, ксилан, арабиногалактан, крахмал (например, картофельный крахмал или рисовый крахмал) и поливинилпирролидон. Газы, полезные для процесса лиофилизации, в качестве неограничивающих примеров включают азот и диоксид углерода.

[0043] В одном из аспектов бактерии *L. lactis* в описанной пробиотической композиции могут быть представлены в виде дисперсии в растворе или среде. В другом аспекте, бактерии *L. lactis* в описанном пробиотике могут быть представлены в виде полутвердой формы или лепешки. В другом аспекте, бактерии *L. lactis* в описанном пробиотике могут быть представлены в виде порошка.

[0044] Количества подходящих бактерий *L. lactis* можно получать с использованием процесса ферментации. Например, стерильные анаэробные ферментеры могут быть загружены средами, такими как глюкоза, полисахариды, олигосахариды, моно- и дисахариды, экстракт дрожжей, источники белка/азота, макроэлементы и микроэлементы (витамины и минералы); и культуры желаемых бактерий *L. lactis* можно добавлять в среду. Во время ферментации можно контролировать концентрацию (колониеобразующие единицы на грамм), чистоту, безопасность и отсутствие примесей, чтобы гарантировать качественный конечный результат. После ферментации клетки бактерий *L. lactis* могут быть отделены от среды с помощью различных хорошо известных методов, таких как фильтрация, центрифугирование и т.п. Выделенные клетки можно сушить, например, лиофилизацией, распылением сушкой, тепловой сушкой или их сочетаниями с добавлением защитных растворов/сред по мере необходимости.

[0045] Пробиотические композиции можно получать в различных формах, таких как

капсулы, суппозитории, таблетки, еда/напиток и т.п. Пробиотические композиции могут включать различные фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как микрокристаллическая целлюлоза, маннит, глюкоза, обезжиренное порошковое молоко, поливинилпирролидон, крахмал и их сочетания.

[0046] Пробиотическую композицию можно получать в виде капсул. Капсула (т.е., носитель) может быть полый, в основном цилиндрической капсулой, образованной из различных веществ, таких как желатин, целлюлоза, углевод или т.п. Капсула может содержать внутри пробиотические бактерии. Необязательно, и в дополнение к соответствующим пробиотическим бактериям, капсула может включать в качестве неограничивающих примеров краситель, ароматизатор, рисовый или другой крахмал, глицерин, карамельный краситель и/или диоксид титана.

[0047] Пробиотическую композицию можно получать в виде суппозитория. Суппозиторий может включать в качестве неограничивающих примеров соответствующие пробиотические бактерии и один или несколько носителей, такие как полиэтиленгликоль, гуммиарабик, ацелированные моноглицериды, карнубский воск, ацетатфталат целлюлозы, кукурузный крахмал, дибутилфталат, докзат натрия, желатин, глицерин, оксиды железа, каолин, лактоза, стеарат магния, метилпарабен, фармацевтическая глазурь, повидон, пропилпарабен, бензоат натрия, монолеат сорбитана, сахарозный тальк, диоксид титана, белый воск и красители.

[0048] Пробиотическую композицию можно получать в виде таблетки. Таблетка может включать соответствующие пробиотические бактерии и один или несколько таблетизирующих агентов (т.е., носителей), таких как двухосновный фосфат кальция, стеариновая кислота, кроскармеллоза, диоксид кремния, целлюлоза и целлюлозное покрытие. Таблетки могут быть изготовлены с использованием процесса прямого прессования, хотя специалисты в данной области понимают, что для изготовления таблеток можно использовать различные методы. Капсула также может содержать композицию.

[0049] Пробиотическая композиция может быть приготовлена в виде пищевого продукта или напитка или, альтернативно, в качестве добавки к пищевому продукту или напитку, где соответствующее количество пробиотических бактерий добавляют к пищевому продукту или напитку, чтобы сделать пищевой продукт или напиток носителем.

[0050] Концентрация пробиотических бактерий в пробиотической композиции может варьироваться, в частности, в зависимости от желаемого результата, типа используемых бактерий, формы и способа введения. Например, пробиотическую композицию можно получать с количеством пробиотических бактерий в препарате не менее чем приблизительно 1×10^6 колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм, в зависимости от общей массы препарата.

[0051] Когда молочнокислые бактерии используются в качестве носителей для экспрессии в кишечнике, различные молочные продукты, такие как йогурт, сухой йогурт в гранулах или другие молочные продукты, можно использовать в качестве физического носителя для перорального введения, с наличием или отсутствием вышеупомянутых

адъювантов или носителей.

[0052] В другом аспекте предлагается использование в производстве лекарственного средства терапевтически эффективного количества пробиотика, как определено выше, для введения индивидууму.

[0053] Термин «терапевтически эффективное количество» означает нетоксичное, но достаточное количество пробиотика для обеспечения желаемого терапевтического эффекта. Количество, которое является «эффективным», будет варьироваться от индивидуума к индивидууму, в зависимости от возраста и общего состояния индивидуума, конкретной концентрации и вводимой композиции и т.п. Таким образом, не всегда возможно указать точное эффективное количество. Однако подходящее эффективное количество в каждом отдельном случае может быть определено специалистом в данной области с помощью общепринятого экспериментирования. Кроме того, эффективное количество представляет собой концентрацию, находящуюся в диапазоне, достаточном для того, чтобы обеспечить готовое применение состава для доставки количества лекарственного средства, находящегося в диапазоне терапевтической эффективности.

[0054] Ожидается, что пробиотик в его окончательной форме будет иметь очень низкую стоимость производства и будет легко масштабироваться. Кроме того, он должен иметь длительный срок хранения и не требовать охлаждения. Рецепт врача может не потребоваться. Таким образом, рынок сбыта ожидается необычайно широким. Ожидается, что пробиотик обеспечит узконаправленный контроль по очень низкой цене.

[0055] Пробиотические композиции, описываемые в настоящем документе, можно использовать для профилактики или лечения инфекций, вызванных *H.pylori*, или заболеваний или нарушений, вызванных *H.pylori*, у людей и животных. Пробиотические композиции можно вводить в качестве профилактического средства перед воздействием или заражением *H. pylori*. Пробиотические композиции можно вводить терапевтически после инфицирования *H. pylori*. Пробиотические композиции можно включать в корм для животных или питьевую воду для животных.

Пример 1

[0056] Были разработаны сконструированные белки, которые специфически убивают определенные патогенные бактерии, не повреждая неродственные комменсальные бактерии. специфичность уничтожения обусловлена нацеливающим (направленным) пептидом, присоединенным к противомикробному пептиду, экспрессируемому из гибридного гена. в настоящем примере на кожный патоген, *staphylococcus aureus*, воздействовали с помощью очищенного направленного противомикробного белка, полученного из экспрессирующей системы *e. coli*. однако система нацеливания может быть модифицирована так, чтобы специально убивать любую бактерию.

[0057] В этом примере два широко используемых противомикробных пептида (ПМП), плектазин и евроцин, были генетически слиты с нацеленным пептидом A12C, который селективно связывается с видами *Staphylococcus*. Следует отметить, что пептид A12C был разработан с использованием стандартного способа биопэннинга; теоретически,

на любую бактерию можно нацеливаться при использовании этого способа производства направленного белка. A12C был разработан другой лабораторией в качестве направленного белка для везикул, что также показывает, что пептиды, разработанные для других целей, могут быть перепрофилированы для использования в качестве направленного белка для противомикробных пептидов. Нацеленный пептид не снижал активность в отношении целевых *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, но резко снижал активность в отношении нецелевых видов, *Enterococcus faecalis* и *Bacillus subtilis*. Этот эффект был в равной степени очевиден для двух разных ПМП, двух разных видов стафилококков, двух разных бактерий из отрицательного контроля, а также против биопленочных и планктонных форм бактерий.

[0058] **Способы:**

[0059] **Реагенты.** Вектор pE-SUMOstar (LifeSensors) выращивали в *E. coli* 10-β и BL21 (New England Biolabs) и высвобождали ПМП из экспрессированного слияния/ПМП с использованием протеазы Ulp1 собственного производства. ПМП плектазин (GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY (SEQ ID NO:1); MW 4408) и евроцин (GFGCPGDAYQCSEHCRALGGGRTGGYCAGPWYLGHPPTCCSF (SEQ ID NO:2); MW 4345) экспрессировали из pE58 SUMOstar, как и A12C-плектазин (MW 6137) и A12C-евроцин (MW 6074), оба из которых содержали пептид, нацеленный на A12C (подчеркнут), плюс короткий линкер (GVHMOVAGPGREPTGGGHM) (SEQ ID NO:3), генетически слитый с N-концом соответствующих последовательностей ПМП. В качестве контроля плектазин и евроцин также конъюгировали с последовательностью бактериального феромона AgrD1 (YSTCYFIM) (SEQ ID NO:4) (Mao et al. 2013) на N-конце. Синтетический пептид A12C (Биосинтез) использовали в качестве контроля в виде «только нацеленного пептида». На ФИГ. 1 показан вектор pE-SUMOstar, несущий ПМП, для экспрессии в клетке *E. coli* BL21. Сайт протеазы SUMO находится между SUMO и A12C-ПМП.

[0060] **Экспрессия, очистка и анализ слитых белков.** Последовательности ДНК для ПМП синтезировали (Integrated DNA Technologies) и лигировали в вектор pE66 SUMOstar, и клонировали в клетках *E. coli* 10-β. Плазмиду из них использовали для трансформации клеток *E. coli* BL21 для экспрессии белков. Трансформированные культуры выращивали и индуцировали IPTG в соответствии со стандартными способами. Полученные бактериальные осадки ресуспендировали в PBS/25 mM имидазола/0,1 мг/мл лизоцима и замораживали в течение ночи. Затем клетки размораживали, обрабатывали ультразвуком и ультрацентрифугировали при 80000×g в течение 1 часа при 4°C и слитый белок bhis/SUMO/ПМП в супернатанте очищали с помощью колоночной хроматографии с никелем. ПМП отделяли от SUMO путем протеолиза с использованием Ulp1 (1 ед на 100 мкг слитого белка) при 4°C в течение ночи и оценивали расщепление с помощью SDS-PAGE. Выходы продукта рассчитывали из данных SDS-PAGE с использованием NIH ImageJ для измерения плотности полос и полос маркерных дорожек для эталонной массы. Проводили масс-спектрометрию, чтобы убедиться в правильном отщеплении ПМП от

белка-носителя SUMO. Гидролиз трипсином в геле (Thermo Fisher) проводили на ПМП, вырезанном из геля SDS-PAGE. Дайджестпродукт расщепления исследовали методом LC-ESI-MS (Synapt G2-S, Waters) в Центре масс-спектрометрии Университета Бейлора. Анализ данных МС был выполнен с помощью MassLynx (v4.1). Спектры каждого белка, как нецелевого, так и целевого, были центрированы по пикам и обработаны MaxEnt3, сопоставлены с гипотетическими пиками от пептидов, генерируемых путем имитации трипсинового расщепления соответствующего белка.

[0061] **Анализ гемолитической активности.** Направленные ПМП, ненаправленные ПМП и синтетический пептид A12C оценивали на гемолитическую активность для человека посредством воздействия на отмытые эритроциты человека. Клетки цельной крови собирали у здорового добровольца с использованием стандартных способов (Evans et al. 2013), и клетки разбавляли фосфатно-солевым буфером до 5×10^8 клеток/мл. Для инициации гемолиза 190 мкл клеток добавляли к 20 мкл 2-кратного серийно разведенного пептида/тестового реагента в фосфатно-солевом буфере. Лунки без пептида использовали в качестве отрицательных контролей, а лунки, содержащие 1% 85 Triton X-100, использовали в качестве положительных контролей.

[0062] **Анализ бактерицидной активности *in vitro*.** Белок, расщепленный протеазой ULP-1, тестировали для антимикробного анализа против четырех штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* и *Bacillus subtilis*. Эти четыре вида выбирали, потому что они являются грам-положительными, а ПМП плектазин и евроцин особенно активны против грам-положительных бактерий (Mygind et al. 2005, Oeemig et al. 2012). Контроли для компонентов были свободны от белка SUMO и синтетически полученного пептида A12C. Ванкомицин применяли в качестве положительного контроля. Использовали стандартный протокол для анализа планшета для микротитрования с серийным разведением, в котором производили серийные 2-кратные разведения исследуемого пептида на 96-луночном планшете, содержащем однородный бактериальный инокулят для всех разведений пептида. После роста бактерий в присутствии пептида жизнеспособность клеток анализировали с помощью резазурина. Эксперименты со всеми пептидами против всех видов бактерий проводились более чем в 5 повторях каждый.

[0063] **Исследование кинетики клеток *in vitro*.** Расщепляемые протеазой Ulp-1 пептиды анализировали для определения их динамического действия против бактерий в растущей культуре. Бактерии выращивали при 37°C при встряхивании и разбавляли до $\sim 1 \times 10^8$ КОЕ/мл. В эти культуры добавляли плектазин или евроцин в количестве, в 3 раза превышающем соответствующую минимальную ингибирующую концентрацию, или версии, нацеленные на A12C, в той же концентрации. Контрольная концентрация ванкомицина представляла собой среднее значение используемой молярной концентрации плектазина и евроцина. Затем наблюдали за ростом через 2-10 часов после добавления пептидов, разводя 10 мкл культуры в среде и высевая на чашки с агаром Мюллера-Хинтона. Количество колоний регистрировали в следующие сутки.

[0064] **Анализ ингибирования биопленки *in vitro*.** Помимо планктонных культур,

использовали культуры биопленок для анализа ингибирования пептидами с использованием стандартных способов (O'Toole 2011). В кратком изложении, в течение ночи культуры разбавляли 1:100 и добавляли к серийно разведенным пептидам. Биопленкам давали возможность расти в течение 24-36 часов при культивировании без встряхивания. Жидкость удаляли и биопленки отмывали, сушили и фиксировали метанолом, а затем окрашивали кристаллическим фиолетовым, который позже растворяли в 30% уксусной кислоте, и измеряли оптическую плотность полученного раствора при 540 нм для определения количества образовавшейся биопленки. Все анализы проводились в трех и более повторях.

[0065] **Результаты:**

[0066] **Экспрессия и очистка белков.** Слитые белки ПМП/SUMO, с доменом-мишенью A12C или без него, экспрессировали на высоком уровне в клетках *E. coli* BL21. Они были успешно расщеплены протеазой для SUMO (Ulp-1) на их компонент ПМП и белок-носитель SUMO и были четко визуализированы с помощью SDS-PAGE как свободный ПМП с массой 4-6 кДа и слитые белки SUMO/ПМП с массой ~17 кДа. На ФИГ. 2 показана экспрессия SUMO/ПМП в *E. coli* и расщепление ПМП без партнера по слиянию SUMO, где дорожка 1: контроль в виде свободного SUMO и дорожки 2-9: интактные слитые белки (четные дорожки) и продукты расщепления (нечетные дорожки) в следующем порядке: SUMO/плектазин, SUMO/A12C-плектазин, SUMO/евроцин, SUMO/A12C-евроцин. Стрелки: свободный ПМП. Средние выходы ($n \geq 3$) белков плектазина, A12C-плектазина, евроцина и A12C-евроцина составили 15-26 мг (3-4 мкмоль) на литр культуры. Для подтверждения пептидов их экстрагировали из полос геля SDS-PAGE, расщепляли трипсином и анализировали масс-спектрометрией. Идентичность пептидов подтверждали с помощью приложения MassLynx (v4.1) (Waters).

[0067] **Анализ гемолитической активности.** В соответствии с ранее опубликованными отдельными исследованиями плектазина и евроцина (Mygind et al., 2005, Oeemig et al., 2012, Yacoby et al., 2006), как направленные, так и ненаправленные слитые пептиды, наряду со свободным контрольным пептидом A12C, не проявляли гемолитический эффект на эритроцитах человека по сравнению с положительным контролем с 20% Triton-X (данные не показаны).

[0068] **Анализ бактерицидной активности *in vitro*.** Наблюдали отличающуюся токсичность по отношению к нецелевым колониям с пептидом, нацеленным на A12C, добавленным к ПМП. A12C-ПМП сохранили свою токсичность в отношении обоих целевых видов стафилококков, но показали значительное снижение токсичности в отношении нецелевых видов бактерий по сравнению с немодифицированными ПМП. На ФИГ. 3 представлены значения логарифма минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в мкМ для направленных и ненаправленных аналогов евроцина и плектазина в отношении *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*. Области в рамках представляют 50% значений, а столбцы - 95%. Немодифицированные плектазин и евроцин имели ожидаемые средние значения МИК 3-6

мкМ, которые являются типичными значениями для ПМП с последовательными три-дисульфидными связями, произведенными в экспрессирующей системе *E. coli* (Li et al. 2010, Parachin et al. 2012, Li et al. др. 2017). Напротив, добавление нацеленного пептида A12C делает эти ПМП практически неингибирующими по отношению к нецелевым бактериям со значениями МИК >70 мкМ. Во всех случаях значения МИК для A12C/ПМП по сравнению с ПМП значительно различались для обеих нецелевых бактерий, *E. faecalis* и *B. subtilis* ($p < 0,001$; двусторонний тест тест ANOVA). Отрицательные контроли (только SUMO и только A12C) не проявляли противомикробной активности (данные не показаны), и их использовали для всех экспериментов.

[0069] **Исследование кинетики клеток *in vitro*.** Кинетика роста в течение периода от 8 до 10 часов более убедительно продемонстрировала потерю антимикробной активности A12C/ПМП в отношении нецелевых видов бактерий. Для этих бактерий обработка A12C/ПМП привела к бактериальному росту, который лишь немного отставал от культур, обработанных буферным контролем. На ФИГ. 4 показан клеточно-кинетический профиль для *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* и *E. faecalis* (по часовой стрелке), созданный путем построения $\log$ КОЕ/мл бактерий, выращенных в присутствии каждого пептида в течение 8-10 часов и собранных за 2- 3-х часовые интервалы. Немодифицированные ПМП обладали бактерицидным действием, сходным с контрольным ванкомицином. Напротив, все пептиды - как направленные, так и ненаправленные - продемонстрировали сильный бактерицидный эффект в отношении целевых бактерий *S. epidermidis* и *S. aureus*, аналогичный положительному контролю с ванкомицином. Относительно более пологая кривая роста контрольных культур *B. subtilis* отражает кинетику их роста, которая намного медленнее, чем у других бактерий.

[0070] **Анализ ингибирования биопленки *in vitro*.** Выращивание бактериальных культур с пептидами продемонстрировало преимущественное ингибирование бактериальной биопленки штаммов стафилококка направленными ПМП по сравнению с нестафилококковыми бактериями. На ФИГ. 5 показана активность ингибирования биопленки, оцененная путем построения графика оптической плотности кристаллического фиолетового (540 нм) в зависимости от концентрации 4 ПМП на 4 микроорганизмах - *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* и *E. faecalis* (по часовой стрелке) (*= $p < 0,1$, **= $p < 0,05$, $n \geq 3$). Показатель абсорбции (таким образом, количество образующейся биопленки) снижался с увеличением концентрации пептида для всех четырех бактерий при лечении ненаправленными пептидами, но направленные пептиды не оказывали сходного действия на *B. subtilis* и *E. faecalis* со значительной ($p < 0,10$ или $p < 0,05$) разницей значений оптической плотности между направленными и ненаправленными ПМП при концентрации свыше 6,25 мкМ.

[0071] Этот пример демонстрирует успешное нацеливание ПМП плектазина и евроцина на две стафилококковые бактерии. Важно отметить, что это было достигнуто за счет устранения активности против двух тестируемых нецелевых бактерий. Это ожидаемый результат для противомикробной терапии, которая сохраняет комменсальные члены

микробиома, убивая патогенные бактерии-мишени. Это также результат, который был достигнут против *S. aureus* у Mao et al. (2013) с использованием бактериального феромонового пептида для нацеливания плектазина. Помимо более низкой МИК для самого немодифицированного плектазина, наблюдалась такая же резкая степень снижения активности против нецелевых бактерий, *E. faecalis* и *B. subtilis*, как сообщалось Mao et al. (2013). Таким образом, продемонстрировано, что лиганд, полученный путем биопэннинга, работает так же эффективно, как лиганд, полученный из феромона, который является классом нацеленного пептида, используемого во всех целевых ПМП на сегодняшний день. Следует отметить, что лиганд, полученный из феромона, был более специфичным, чем A12C, с активностью против *S. aureus*, но не *S. epidermis*, в то время как A12C/плектазин был высокоактивен против обоих видов.

[0072] Четыре основных источника лигандов существуют для применения в качестве пептидов для ПМП. Во-первых, бактериальные феромоны являются видоспецифичными пептидными сигналами, которые запускают развитие компетентности, вирулентности или других способностей, и феромоновые пептиды были определены для многих патогенных бактерий (Monnet et al. 2016). Во-вторых, биопэннинг представляет собой средство скрининга случайных библиотек пептидов на способность связываться с целевой последовательностью, такой как рецепторы на бактериальных клетках. В-третьих, рецептор-связывающие белки бактериофагов можно использовать в качестве ресурса для разработки нацеливающих пептидов для ПМП. Уже были охарактеризованы рецептор-связывающие белки фагов против многих патогенных бактерий (Dowah и Clokie 2018, Nobrega et al. 2018). Кроме того, можно проводить скрининг новых фагов против менее изученных бактериальных патогенов (Weber-Dąbrowska et al. 2016). В-четвертых, на факторы вирулентности целевого бактериального патогена можно воздействовать с помощью таргетных (направляющих) пептидов, состоящих из последовательности рецептора хозяина, которая связывается с бактериальным фактором вирулентности. Таким образом, последовательность рецептора хозяина используют в качестве направленного пептида, чтобы направить ПМП обратно к бактериальному патогену. Это продемонстрировано в экспериментах по данной патентной заявке.

ПРИМЕР 2

[0073] Было показано, что взятая для примера пробиотическая бактерия, *Lactococcus lactis*, хорошо выживает в желудке мыши. мышей принудительно кормили рекомбинантным пробиотиком перорально через желудочный зонд и восстанавливали рекомбинантную бактериальную ДНК из желудков мышей полностью через 3 дня после введения. на фиг. 6 показано, что *Lactococcus lactis*, содержащие экспрессирующий вектор PT1BIN1 с открытыми рамками считывания либо противомикробного пептида латероспорулина (ПМП1), либо противомикробного пептида алиссасерина (ПМП2), либо латероспорулина, генетически слитого с открытой рамкой считывания нацеливающего пептида, полученного из мультимерина (направленный ПМП1), все присутствовали через 3 дня после введения этих бактерий мышам через желудочный зонд, о чем свидетельствует

ПЦР (с использованием вектор-специфических праймеров) желудочных экстрактов, полученных с помощью обратного желудочного зонда. это указывает на то, что рекомбинантная *Lactococcus lactis* размножалась в желудках мышей. принудительное кормление (пероральный желудочный зонд) применяют для того, чтобы обеспечить доставку в каждую мышшь одинакового количества бактерий. обратный пероральный желудочный зонд применяли для промывания мышинного желудка буфером и сбора содержимого желудка для анализа ПЦР. На фиг. 6, положительный контроль представлял собой ПЦР ДНК PT1BIN1/латероспорулина, а отрицательный контроль представлял собой ПЦР без ДНК-матрицы, с теми же специфичными для вектора праймерами, которые использовались как в обеих контрольных ПЦР, так и для ПЦР для экстрактов мыши на других дорожках. последняя полоса на фиг. 6 - маркерная дорожка с лестничным ДНК-маркером. все положительные полосы содержали днк ожидаемого размера.

[0074] Также был разработан вектор, который значительно облегчает конструирование *Lactococcus lactis*. Для создания этого вектора (показанного на ФИГ. 7) исходный вектор *Lactococcus lactis*, pT1NX, был модифицирован путем добавления участка начала репликации *E. coli* и кассеты резистентности к канамицину, оба из экспрессирующего вектора *E. coli* на основе SUMO, pE-SUMOstar. На ФИГ. 7, блок устойчивости к канамицину представляет как кассету kanR, так и участок начала репликации *E. coli*. Этот бинарный вектор (pT1bin1) можно выращивать в *E. coli*, чтобы облегчить добавление ПМП или вставок с направляющими последовательностями с помощью способов рекомбинантной ДНК. Большое количество плазмиды можно получить с помощью стандартных способов получения плазмиды, чтобы облегчить трансформацию *Lactococcus lactis*. Эта последняя трансформация труднодостижима с продуктами лигирования, но ее легче проводить с ДНК из плазмидных препаратов.

[0075] Было продемонстрировано *in vitro*, что сконструированная *Lactococcus lactis*, секретирующая противомикробный пептид, убивает другие бактерии *in vitro*. Это показано на ФИГ. 8 как выживаемость *E. coli* в присутствии бульонной культуры *Lactococcus lactis*, секретирующей противомикробный пептид с наличием или в отсутствии направленного пептида. На ФИГ. 8 показана жизнеспособность *E. coli* при различных разведениях антибиотиков и супернатантов. Следует отметить, что условные обозначения должны располагаться в обратном порядке строк сверху вниз, при этом верхняя линия на графике соответствует буферному контролю, а нижняя - ванкомицину. Для получения результатов, показанных на ФИГ. 8, культуры *Lactococcus lactis*, содержащие либо пустой вектор pT1bin1, либо pT1bin1, содержащий антимикробный пептид латероспорулин, либо pT1bin1, содержащий латероспорулин, генетически слитый с направляющим пептидом из мультимерина, центрифугировали для удаления бактериальных клеток, а полученные супернатанты добавляли в отдельные заквасочные культуры *E. coli* для проверки ингибирования роста кишечной палочки. Используемая заквасочная культура для всех повторов состояла из 500 мкл *E. coli*, культивируемых в течение ночи, разведенных в 50 мл бульона LB. Было проведено три повтора каждой обработки, и каждая точка на графике

представляет собой среднее значение с соответствующей величиной ошибки. Для запуска обработок и повторов требуется 96-луночный планшет для микротитрования. В каждую лунку добавляли 100 мкл разбавленного супернатанта *Lactococcus lactis* к 100 мкл заквасочной культуры *E. coli*. Как видно по оси X на ФИГ. 8, используемые разведения варьировались от отсутствия разведения (100 мкл 100% супернатанта добавляли к 100 мкл *E. coli*) до 1/200 разведения супернатанта (добавляли 100 мкл 0,5% супернатанта). Положительные контроли с антибиотиком разбавляли аналогично, с указанным в описании начальным содержанием (неразбавленным). Ось Y на ФИГ. 8 представляет ингибирование жизнеспособности *E. coli* разведениями этих супернатантов и антибиотиков. Жизнеспособность *E. coli* измеряют путем посева на чашки с агаром LB культур в каждую лунку через 4 часа воздействия супернатанта или антибиотика. Полученные колонии, появляющиеся на чашках, регистрировали, при этом контрольная обработка неразбавленным буфером была установлена на 100%, а все другие обработки преобразовывались в доли этого значения, как показано на оси ординат.

[0076] Глядя на ФИГ. 8, можно видеть, что буферный контроль не ингибировал *E. coli*. Однако бульонная культура *Lactococcus lactis* (с удаленными клетками) действительно ингибировала *E. coli* даже при отсутствии рекомбинантного противомикробного пептида (пустой контрольный вектор). Это рассматривали как исходный уровень для изучения эффекта секретируемых рекомбинантных белков. Экспрессия латероспорулина *Lactococcus lactis* приводила к значительному снижению жизнеспособности *E. coli* по сравнению с исходным уровнем. Тем не менее, не было замечено различий между исходным уровнем пустого вектора и мультимерин-направленным лактоспорулином (нацеленным). Это означает, что направленный пептид полностью отменял противомикробную активность латероспорулина в отношении нецелевой бактерии *E. coli*. Это согласуется с результатами, показанными в Примере 1 для *Staphylococcus*. Эти данные подтверждают способность этих экстрактов убивать различные целевые бактерии, такие как *Helicobacter pylori*.

Пример 3

[0077] Контроль *Helicobacter pylori in vitro* посредством *Lactococcus lactis*, экспрессирующих нПМП

[0078] Цель

[0079] Этот пример демонстрирует, что противомикробный пептид (ПМП), экспрессирующийся из гибридного гена, секретирующийся из пробиотика *Lactococcus lactis* и слитый с полученным из мультимерина направленным пептидом, который специфичен для *Helicobacter pylori*, может специфически убивать *H. pylori*, когда пробиотик совместно культивировали с *H. pylori in vitro*. Это было подтверждением принципа действия *in vitro* перед проведением исследований *in vivo* на мышах.

[0080] Дизайн эксперимента

[0081] В совместных культурах применяли разные разведения *L. lactis*, но в каждой лунке было 10 мкл культуры *H. pylori* (~3000 КОЕ). *L. lactis* секретируют ПМП, нПМП или содержали пустой экспрессирующий вектор. В качестве ПМП были протестированы

алитезерин и CRAMP. Они были сконструированы либо генетически слитыми с мультимериновым направляющим пептидом (направленный ПМП или нПМП), либо без него (ПМП). Количество *H. pylori*, присутствующего в совместной культуре в любой данный момент времени, измеряют с помощью количественной ПЦР с использованием праймеров, специфичных для самого гена *VacA*, который кодирует рецепторный белок, с которым связывается нПМП. Весь эксперимент проводили в трех повторах, и рост *H. pylori* через 24 часа в присутствии *L. lactis*, экспрессирующих различные ПМП или нПМП, показан на ФИГ. 10.

[0082] Способы

[0083] Генетические конструкции

[0084] На ФИГ. 9 показан вектор для секреции ПМП и нПМП из *Lactococcus lactis*. Открытые рамки считывания ПМП, кодон-оптимизированные для *Lactococcus lactis*, клонировали в модифицированный вектор pT1NX-kanR (pTKR) для экспрессии/секреции в *L. lactis* между участками рестрикционных ферментов BamHI и SpeI путем замены белка *sraX* исходной плазмиды. Промотор P1 выше сайта разреза BamHI контролирует экспрессию ниже по течению в качестве конститутивного промотора, который активируется при низком pH. Ген *usp45* непосредственно перед сайтом BamHI кодирует эндогенный сигнальный пептид *L. lactis*, что обеспечивает секрецию полученного слитого пептида. После лигирования ПМП/нПМП в вектор pTKR им трансформировали *E. coli* (10β, NEB) и высевали на планшеты, селективные к канамицину. Плазмида pT1NX (LMBP 3498) обладает устойчивостью к эритромицину, но была модифицирована для создания pTKR, как показано на ФИГ. 9, который также обладает устойчивостью к канамицину для клонирования в электрокомпетентные *E. coli* (10β, NEB) для размножения плазмиды. Экстрагированная плазмида из *E. coli* была затем электропорирована в электрокомпетентные *L. lactis* MG1363 (LMBP 3019) и посеяна на эритромицинселективные чашки GM17 (30°C, микроаэробные, в течение ночи). После скрининга на наличие ОРС ПМП/нПМП при помощи ПЦР, отобранные колонии выращивали в жидких культурах бульона M17 с глюкозой (0,5% масс./об.) в присутствии эритромицина (5 мкг/мл).

[0085] ПМП/нПМП, использованные в этом эксперименте

[0086] Следующие ПМП и направленные ПМП (нПМП) клонировали в вектор секреции pTKR. Мультимерин 1 (MM1)-направленный пептид MQKMTDQVNYQAMKLTLLQK (SEQ ID NO: 5) подчеркнут, а последовательность линкера из серина/глицина выделена жирным шрифтом.

ПМП/нПМП

Последовательность пептида

Латероспорулин

ACQCPDAISGWTHTDYQCHGLENKMYRHVYAICMNGTQVY
CRTEWGSSC (SEQ ID NO:6)

MM1-

MQKMTDQVNYQAMKLTLLQKSGGGSACQCPDAISGWTHTD

латероспорулин

YQCHGLENKMYRHVYAICMNGTQVYCRTEWGSSC (SEQ ID

NO:7)

Алитезерин GLKDIFKAGLGSLVKGIAAHVAN (SEQ ID NO:8)**MM1-алитезерин** MQKMTDQVNYQAMKLTLLQKSGGGSGLKDIFKAGLGSLVKGIAAHVAN (SEQ ID NO:9)**CRAMP** ISRLAGLLRKGGEKIGEKLLKKIGQKIKNFFQKLVPQPE (SEQ ID NO:10)**MM1-CRAMP** MQKMTDQVNYQAMKLTLLQKSGGGSISRLAGLLRKGGEKIGEKLKKIGQKIKNFFQKLVPQPE (SEQ ID NO:11)**Подчеркнуто=Мультимерин 1, Жирный шрифт=линкер**[0087] Совместное культивирование *L. lactis*/*H. pylori* и анализ количественной ПЦР

[0088] Клоны *L. lactis* с ПМП/нПМП наращивали из банка клеток в глицерине и выращивали в бульоне GM17 в течение ночи с эритромицином (5 мкг/мл) без встряхивания. Штаммы *H. pylori* выращивали на кровяном агаре с TS в течение ночи в микроаэробных условиях и в среде с >5% CO₂. Затем колонии с чашки переносили на бульон TS с сывороткой новорожденных телят (5%) и выращивали в течение ночи в микроаэробных условиях и среде с >5% CO₂. Культуры *L. lactis* серийно разбавляли в 96-луночном культуральном планшете бульоном TSB до объема 100 мкл. В каждую лунку добавляли по 10 мкл культуры *H. pylori* в течение ночи и объем каждой лунки доводили до 200 мкл дополнительным бульоном TS. Планшет затем оставляли для роста в течение ночи в микроаэробной среде с >5% CO₂. Через 24 часа содержимое лунок из культурального планшета переносили на 96-луночный планшет для ПЦР. Этот планшет для ПЦР герметизировали и нагревали в течение 15 мин при 100°C и охлаждали при 4°C в течение 5 минут. Затем планшет центрифугировали при 2000 g в течение 2 минут и супернатант использовали в качестве матрицы для количественной ПЦР. Количественную ПЦР проводили с использованием праймеров для гена *VacA* для количественного определения *H. pylori* (прямой: 5'-ATGGAAATACAACAACACAC-3' (SEQ ID NO:12), обратный: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' (SEQ ID NO:13) и праймеров для гена *acta* для количественного определения *L. lactis*. Строили стандартные кривые для *H. pylori* и *L. lactis*, определяя значения C_T для различных разведений ночных культур соответствующих бактерий (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) в планшетах для количественной ПЦР, КОЕ для разведений оценивали путем посева на соответствующие чашки с агаром.

[0089] Результаты

[0090] На ФИГ. 10 показаны результаты количественной ПЦР по гену *VacA* *H. pylori*, совместно культивируемой с *L. lactis*, экспрессирующими нПМП или ПМП. *L. lactis*, экспрессирующие ПМП с направляющими пептидами или без них, снижали культуру *H. pylori* до уровня ниже базового уровня обнаружения для этого эксперимента (значение C_T 40). Обычные ПМП представлены открытыми символами, а нПМП представлены сплошными серыми символами. Алитезерин был не очень эффективен, если не был слит с

направляющим пептидом. Контрольный эксперимент (сплошная линия) с *L. lactis*, несущими пустой вектор, показал, что пробиотик *L. lactis* сам по себе практически не влиял на рост *H. pylori* в течение 24 часов. Величины ошибок представляют 95% доверительный интервал.

[0091] Выводы

[0092] *L. lactis*, экспрессирующие два разных ПМП, были способны подавлять до исходного уровня жизнеспособную культуру *H. pylori in vitro*. Было показано, что последовательность мультимеринового направленного пептида не влияет на токсичность ПМП в CRAMP, при этом нацеленный и ненацеленный CRAMP одинаково токсичен для *H. pylori*. Во всех случаях нПМП (префикс «ММ1») был более токсичным (ниже по оси ординат), чем соответствующий ПМП. В случае пары алитезерин ПМП/нПМП, для высокой токсичности в отношении *H. pylori* необходим направленный пептид.

Пример 4

[0093] Влияние пробиотических нпмп на нецелевые бактерии.

[0094] ЦЕЛЬ

[0095] Определить влияние пробиотика *L. lactis*, экспрессирующего ПМП или НПМП, на нецелевые бактерии *in vitro*.

[0096] ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

[0097] Дизайн эксперимента был идентичен дизайну, описанному выше в примере 3, за исключением того, что нецелевая бактерия заменяла целевую *h. pylori*. в качестве нецелевых бактерий использовали *lactobacillus plantarum* (грамположительные) и *escherichia coli* (грамотрицательные).

[0098] Способы

[0099] Все способы описаны выше в Примере 3.

[0100] Результаты

[0101] На ФИГ. 11 показан рост *Lactobacillus plantarum* через 24 часа совместного культивирования с *L. lactis*, экспрессирующими пустой вектор (pTKR), ПМП (алитезерин, латероспорулин или CRAMP) или нПМП (ММ1-алитезерин, ММ1-латероспорулин или ММ1-CRAMP). По сравнению с контролем, содержащим только пробиотик (*Lactococcus lactis* с пустым вектором pTKR), совместное культивирование *Lactobacillus plantarum* с пробиотиком, экспрессирующим либо ПМП, либо нПМП, приводило к снижению титра нецелевых бактерий с увеличением количества применяемого пробиотика. Тем не менее, обработка пробиотиком/ПМП оказывала значительно более негативное влияние на рост нецелевых бактерий, чем обработка пробиотиком/нПМП для всех трех протестированных ПМП. В частности, при уровне КОЕ 100000/мкл, который был максимально эффективным для уничтожения *H. pylori* в Примере 3, все обработки пробиотиками/ПМП приводили к низким уровням *Lactobacillus*, неопределяемым с помощью количественной ПЦР. Напротив, уровни пробиотиков/нПМП были на уровне 10000 КОЕ/мкл для алитезерина и латероспорулина с нПМП и 2500 для нПМП CRAMP. При более низких уровнях пробиотиков между пробиотиками нПМП и ПМП наблюдалась разница в 5-7 раз, при этом

пробиотики/нПМП значительно менее вредны для нецелевых *Lactobacillus*, чем пробиотики/ПМП. Величины ошибок представляют 95% доверительный интервал.

[0102] На ФИГ. 12 показан рост *Escherichia coli* через 24 часа совместного культивирования с *L. lactis*, экспрессирующими пустой вектор (pTKR), ПМП (алитезерин, латероспорулин или CRAMP) или нПМП (MM1-алитезерин, MM1-латероспорулин или MM1-CRAMP). Как видно на ФИГ. 12, результаты для нецелевых эффектов против *E. coli* были такими же, как и для *L. plantarum*, описанные выше.

[0103] Выводы

[0104] На основании этих результатов относительно нецелевых бактерий *in vitro* можно сделать вывод, что нПМП значительно менее вредны для этих двух нецелевых бактериальных форм, чем ПМП в пробиотической системе доставки. Эти результаты *in vitro* показывают, по меньшей мере, часть картины нецелевых эффектов пробиотических ПМП и нПМП. Как более подробно обсуждается ниже, в среднем, по всей микробиоте желудка мыши пробиотические нПМП обладают не более разрушительным эффектом, чем неконструированные пробиотики *Lactococcus lactis*.

Пример 5

[0105] **Терапевтический контроль *H. pylori* у мышей.**

[0106] Цель

[0107] Контроль *H. pylori* с помощью *Lactococcus lactis*, экспрессирующих нПМП, тестировали у мыши *in vivo*. Терапевтический тест является более строгим, чем профилактический тест, поскольку возбудителю дается время для приживания и размножения в мыши до введения пробиотика. Этот наиболее строгий тест был выбран для оценки действия различных ПМП, с исследованием трех различных ПМП в направленной и немодифицированной формах.

[0108] Дизайн эксперимента

[0109] Пробиотические контрольные мыши. Эти мыши получали только пробиотик, приготовленный, как описано в предыдущем примере. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 до инокуляции с помощью обратного желудочного зонда; ресуспендированные *L. lactis* вводили мышам через желудочный зонд; желудочные образцы собирали на Сутки 3, 5 и 7.

[0110] Терапевтическое лечение мышей, инфицированных *H. pylori*. Этим мышам были инокулированы *H. pylori*, и *H. pylori* давали возможность прижиться в желудке мыши в течение трех суток, с ежедневными инокуляциями для обеспечения приживаемости. Затем мышам вводили *L. lactis*, секретирующие ПМП или нПМП, для терапевтического лечения инфекции *H. pylori*. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 до инокуляции *H. pylori*; ресуспендированные *H. pylori* вводили через желудочный зонд один раз в день в течение трех суток подряд; затем на Сутки 5 собирали содержимое желудка для проверки на присутствие *H. pylori*, и на Сутки 5 кормили мышей ресуспендированными *L. lactis*; последующие желудочные образцы собирали на Сутки 8 и 10.

[0111] Контрольные мыши с нелеченной инфекцией *H. pylori*. Эти мыши были

инфицированы *H. pylori*, и никакой профилактики или терапии не проводилось. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 до инокуляции *H. pylori*; ресуспендированные *H. pylori* вводили через желудочный зонд один раз в день в течение трех суток подряд; затем на Сутки 5, 8 и 10 собирали желудочные образцы для проверки на наличие *H. pylori*.

[0112] Способы

[0113] Введение *L. lactis* и *H. pylori* мышам через желудочный зонд. Культуры *L. lactis* выращивали в течение ночи, как описано выше. В течение ночи культуры центрифугировали при 4000 g в течение 15 минут при 4°C. Осадки ресуспендировали в среде PBS. Исходные культуры *H. pylori* выращивали в течение ночи на кровяном агаре с TS, как описано выше, а затем соскребали с помощью стерильной петли и ресуспендировали в стерильном PBS. Обе бактериальные суспензии скормливали мышам с использованием иглы для желудочного зонда калибром 1,5, в объеме, не превышающем половину объема их желудка (~250 мкл). Колониеобразующие единицы (КОЕ) скормливаемой ресуспензии определяли путем разбавления ресуспензии в 1/1000 и 1/10000 раз и посева на соответствующие чашки. Образцы из желудка мыши до и после инокуляции собирали путем промывания желудка избытком PBS (~300 мкл), а желудочную жидкость собирали путем обратной пероральной инъекции через желудочный зонд во время поддержания вакуума.

[0114] Анализ на присутствие *H. pylori* и *L. lactis* с помощью количественной ПЦР. Собранные желудочные образцы нагревали при 100°C в течение 15 минут и охлаждали при 4°C в течение 5 минут. Супернатанты собирали и помещали в 96-луночный планшет и проводили количественную ПЦР с праймерами для гена *VacA* для количественного определения *H. pylori* и праймерами для гена *acta* для количественного определения *L. lactis*. Стандартные кривые для каждой бактерии в сравнении с их значениями C_T строили путем включения различных разведений ночных культур соответствующих бактерий (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) в количественную ПЦР и посева этих разведений на соответствующие чашки для определения соответствующих значений КОЕ. Каждая точка данных представляет, по меньшей мере, данные от трех мышей.

[0115] Стандартизация значений количественной ПЦР. Стандартная кривая для КОЕ/мкл культуры *H. pylori* со значениями C_T представлена на ФИГ. 13. Ее применяли для получения данных КОЕ/мкл из значений C_T количественной ПЦР на ФИГ. 14.

[0116] Результаты

[0117] Перед инокуляцией *H. pylori*, в Сутки 0, мыши имели очень низкие уровни нативной *H. pylori* с геном *VacA* (8-200 КОЕ/мкл) (фигура 14). Через 5 суток после инокуляции *H. pylori* регистрировали 2000-12000 КОЕ/мкл *H. pylori*, что свидетельствует о сильной репликации в желудке мыши. На сутки 5 мыши, кроме нулевого контроля, были инокулированы пробиотиками. *H. pylori* продолжала хорошо размножаться в мышах нулевого контроля, увеличившись в 3 раза после Суток 5 и достигнув 40000 КОЕ/мкл на Сутки 10. После лечения пробиотиками на Сутки 5 пробиотический контроль pTKR (пустой вектор) увеличился в 2 раза к Суткам 10. У мышей, используемых для лечения pTKR,

инокуляция *H. pylori* была не столь эффективной, поэтому титр *H. pylori* был ниже на Сутки 5, чем у других групп мышей, даже до обработки пробиотиками.

[0118] Напротив, у всех мышей, которым вводили пробиотики, экспрессирующие ПМП или нПМП, наблюдалось сильное снижение *H. pylori* в желудке после пробиотической терапии, введенной на Сутки 5 (фигура 14). Это снижение составляло от 15 до 320 раз в зависимости от лечения ПМП или нПМП, что привело к окончательным уровням *H. pylori* в 100-1000 раз меньше, чем в нулевом контроле, который не получал пробиотической терапии и у которого продолжался рост *H. pylori* после Суток 5. Кроме того, в каждой из трех пар ПМП/нПМП лечение ПМП было значительно менее эффективным в борьбе с *H. pylori*, чем лечение нПМП. В частности, на Сутки 10 для алитезерина и CRAMP было в 15 раз больше *H. pylori* с ПМП по сравнению с нПМП, а для латероспорулина - в 2,5 раза больше *H. pylori* для ПМП по сравнению с нПМП. Величины ошибок представляют 95% доверительный интервал.

[0119] На ФИГ. 14 показаны КОЕ/мкл *H. pylori* в желудочной жидкости мыши для контрольных мышей (нулевых) и мышей, инокулированных пустым вектором (pTKR) или пробиотиком *Lactococcus lactis*, секретирующим ПМП или нПМП (где ММ1=направленный пептид из мультимерина 1).

[0120] Выводы

[0121] Экспрессия ПМП или нПМП в пробиотике *L. lactis* приводила к значительному снижению (от 15 до 320 раз) титров *H. pylori* в желудке мыши, предварительно инокулированной *H. pylori*. Таким образом, можно ожидать, что пробиотик *L. lactis*, сконструированный для экспрессии ПМП или нПМП, послужит сильным терапевтическим средством для лечения *H. pylori*. Кроме того, между эффекторными белками ПМП и нПМП можно провести существенное различие, и это различие сохраняется для всех трех исследованных ПМП. нПМП были в 2,5, 15 и 15 раз более эффективны в элиминации *H. pylori*, чем ПМП для латероспорулина, алитезерина и CRAMP, соответственно. Таким образом, технология нПМП функционально превосходит по эффективности уничтожения технологию ПМП при доставке через пробиотики для применения против *H. pylori*.

Пример 6

[0122] **Профилактический контроль *H. pylori* у мышей.**

[0123] Цель

[0124] Мышей инокулировали пробиотиком *L. lactis*, секретирующим нПМП или ПМП, в качестве профилактического лечения для предотвращения приживания *H. pylori* после контрольной инокуляции спустя 3 дня. Хотя ожидается, что любое медицинское применение пробиотической технологии нПМП будет терапевтическим, а не профилактическим, и хотя это менее строгий тест на эффективность, чем терапевтический тест, этот эксперимент был проведен для полноты картины.

[0125] Дизайн эксперимента

[0126] Контрольные мыши с пробиотиком. Эти мыши получали только пробиотик,

приготовленный, как описано в примерах выше. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 до инокуляции помощью обратного желудочного зонда; ресуспендированные *L. lactis* вводили мышам через желудочный зонд; желудочные образцы собирали на Сутки 3, 5 и 7.

[0127] Заражение *H. pylori* мышей с профилактическим лечением пробиотиком. Эти мыши получили пробиотик, экспрессирующий ПМП или нПМП, а затем через 3 дня были заражены *H. pylori*. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 перед инокуляцией *L. lactis*; ресуспендированные *L. lactis* вводили через желудочный зонд в те же сутки; затем на Сутки 3 собирали содержимое желудка для проверки на наличие *L. lactis*, и на Сутки 3 скормливали мышам ресуспендированные *H. pylori* один раз в день в течение трех суток подряд; последующие желудочные образцы собирали на Сутки 8 и 10.

[0128] Контрольные мыши с нелеченной инфекцией *H. pylori*. Эти мыши были инфицированы *H. pylori*, и им не проводили никакой профилактики или терапии. Желудочные образцы собирали на Сутки 0 перед инокуляцией *H. pylori*; ресуспендированные *H. pylori* вводили через желудочный зонд один раз в день в течение трех суток подряд; затем желудочные образцы собирали на Сутки 5, 8 и 10 для проверки на наличие *H. pylori*.

[0129] Результаты

[0130] На ФИГ. 15 показаны КОЕ/мкл *H. pylori* в жидкости желудка мыши для контрольных мышей (Null) и мышей, инокулированных пустым вектором (pTKR) или пробиотиком *Lactococcus lactis*, секретирующим ПМП или нПМП (где ММ1=направленный пептид из мультимерина-1), с последующим дополнительным кормлением *H. pylori*. Все мыши начинали с 170-300 КОЕ/мкл нативной *H. pylori* в сутки 0, до инокуляции *L. lactis*. К Суткам 4 нативная *H. pylori* повышалась до 500-700 КОЕ/мкл непосредственно перед экзогенной стимуляцией *H. pylori*. К Суткам 12 содержание *H. pylori* повысилось только до 1500 (нПМП) и 2000 (ПМП) КОЕ/мкл у мышей с профилактикой пробиотиком, получавших ММ1-алитезерин (нПМП) или алитезерин (ПМП). Напротив, содержание *H. pylori* увеличилось до 13000 и 18000 КОЕ/мкл у мышей при профилактической предварительной обработке пустым вектором (pTKR) или без профилактики пробиотиком, соответственно. Величины ошибок представляют 95% доверительный интервал.

[0131] Выводы

[0132] Оба пробиотика, сконструированные для доставки ПМП или нПМП, обеспечивали сильную профилактическую защиту от заражения *H. pylori*. Уровень *H. pylori* увеличивался только в 2 раза через 7 дней после заражения *H. pylori* при условии предварительной обработки пробиотиком/ПМП или пробиотиком/нПМП. Напротив, с пробиотиком с пустым вектором количество *H. pylori* увеличилось в 26 раз за 7 дней. Это свидетельствует о том, что профилактическое лечение очень эффективно против инфекции *H. pylori*.

Пример 7

[0133] **Анализ последовательностей микробиома демонстрирует только**

незначительное нарушение микробиоты желудка мышей

[0134] Цель

[0135] Микробные сообщества желудка мышей из профилактических и терапевтических экспериментов исследовали с помощью секвенирования следующего поколения. Будет определено влияние этих обработок на микробное разнообразие в желудке. Ожидалось, что из-за избирательной токсичности нПМП микробиота мышей, обработанных пробиотиком/нПМП, будет более разнообразной, чем у мышей, обработанных пробиотиком/ПМП.

[0136] Предпосылки

[0137] Было обнаружено, что *H. pylori* вызывает дисбиоз микробиоты кишечника у людей (Liou et al., 2019). У людей было обнаружено, что микробное разнообразие кишечника снижается с ростом инфекции *H. pylori*, в то время как эрадикация *H. pylori* часто связана с увеличением микробного разнообразия (Li et al., 2017). Однако лечение антибиотиками, в основном, связано со уменьшением и таксонов, и количества бактерий в кишечнике (Lange et al., 2016). В этом исследовании мышам, обработанные *H. pylori*, проводили ряд видов терапевтического лечения в течение 5 суток, а затем сравнивали. Таким образом, стало возможным сравнение влияния инфекции *H. pylori* на таксономию по сравнению с инфекцией, которую лечили одним пробиотиком, пробиотиком/ПМП, пробиотиком/нПМП или антибиотиками.

[0138] Дизайн эксперимента

[0139] В экспериментах для терапевтических и профилактических исследований получали желудочные образцы мышей через обратный желудочный зонд, которые использовали для количественной ПЦР в примерах 5 (терапия) и 6 (профилактика) выше. Эти же образцы проанализировали для популяционных сдвигов в микробиоте желудка с использованием секвенирования нового поколения. Таким образом, схема эксперимента идентична примерам 5 и 6.

[0140] Способы

[0141] Как описано для примеров 5 и 6, желудочные образцы мышей, собранные при помощи обратного желудочного зонда, нагревали при 100°C в течение 15 минут и охлаждали при 4°C в течение 5 минут. Супернатанты собирали и помещали в 96-луночный планшет для предварительной обработки для секвенирования следующего поколения. Образцы амплифицировали с праймерами 16 секунд, а затем с праймерами Illumina index с последующей очисткой и очисткой. Образцы были объединены в библиотеку и секвенированы с использованием набора Illumina MiSeq v3. Данные были демультиплексированы, очищены от шума и проанализированы с помощью QIIME2.

[0142] Результаты

[0143] Влияние терапевтических средств на общее бактериальное разнообразие желудка: оценки разрежения. Кривые разрежения, полученные в результате секвенирования следующего поколения Illumina MiSeq, применяли для оценки общего количества бактерий. Они представляют собой количество видов (оперативных

таксономических единиц, OTU), которые были обнаружены в различных частях набора данных. Различные части набора данных представляют собой случайно выбранные подвыборки. Кривые разрежения применены для определения минимального количества операций, которые можно использовать, при этом представляя весь диапазон OTU, чтобы уменьшить нагрузку на компьютер при расчетах. Для наших целей эта стандартная диаграмма показывает видовое разнообразие при каждой обработке.

[0144] Разительные различия в бактериальном разнообразии наблюдали в данных из Суток 8 и 10 терапевтического исследования, подробно описанного в Примере 5 (фиг. 16). В этом исследовании инфекция *H. pylori* развивалась в течение пяти суток до Суток 5. На Сутки 5 вводили терапию. К Суткам 8 или 10 терапию проводили трое или пятеро суток для воздействия на микробиоту желудка, соответственно. Как показано на ФИГ. 16, использование комбинации антибиотиков тетрациклин/амоксикаллин приводило к наименьшему видовому разнообразию. Важно отметить, что использование ПМП, доставляемых пробиотиком (данные для всех трех представленных здесь ПМП), приводило к меньшему разнообразию по сравнению с использованием пробиотика с пустым вектором или без терапии, но к большему разнообразию по сравнению с использованием антибиотиков. Максимальное разнообразие было получено при обработке пробиотиком, экспрессирующим нПМП (данные для всех трех ПМП представлены на ФИГ. 16).

[0145] Различия, наблюдаемые в экспериментах *in vitro* Примера 2 в отношении нецелевых эффектов, вероятно, наблюдались в широком масштабе в этих данных *in vivo*. При уменьшении нецелевых эффектов экспрессия нПМП пробиотиками приводила к выживанию более широкого круга видов бактерий по сравнению с ПМП. Вполне вероятно, что более низкое разнообразие, наблюдаемое при применении пробиотика/пустого вектора или при отсутствии терапии, было связано с их неэффективностью в уничтожении *H. pylori*, которая, как было показано в предыдущих исследованиях, снижала бактериальное разнообразие (Lange et al., 2016). Несмотря на то, что ПМП и антибиотики способны убивать *H. pylori*, их собственная широкомасштабная токсичность снижает бактериальное разнообразие.

[0146] Воздействие терапевтических средств на виды-индикаторы

[0147] Есть лишь несколько публикаций, в которых бактерии мышинного желудка идентифицируются как полезные для микробиоты кишечника. *Muribacter muris* (син. *Actinobacter muris*) представляет собой обычную комменсальную бактерию мышей, которая использовалась в качестве замены ниши для успешной элиминации патогена *Haemophilus influenzae* у мышей, что приводило к снижению заболеваемости (Granland et al., 2020). Было показано, что *Lactobacillus murinus*, преобладающая кишечная комменсальная бактерия, снижает воспаление кишечника (Pan et al., 2018). Было показано, что *Lactobacillus reuteri* останавливает аутоиммунитет в кишечнике мышей (He et al., 2017) и ее использовали для защиты мышей от энтеротоксигенной инфекции *E. coli* (Wang et al., 2018), а также было показано, что она оказывает противовоспалительное действие у людей во многих исследованиях (Mu et al., 2018). Поскольку в наших результатах секвенирования

следующего поколения было обнаружено, что все эти виды преобладают, мы использовали их в качестве индикаторных видов для здоровой микробиоты кишечника.

[0148] Для подбора индикаторов дисбиоза микробиоты были выбраны два рода бактерий из 10 наиболее распространенных бактерий, которые размножаются при инфицировании *H. pylori*, а именно *Staphylococcus* и *Acinetobacter*.

[0149] Содержание этих бактерий, определенное по данным секвенирования следующего поколения, показано на ФИГ. 17 для различных моментов времени и обработок. Можно видеть, что благоприятные индикаторы, *Lactobacillus* и *Muribacter*, снизились в ответ на инфекцию *H. pylori*, но после лечения пробиотиком/нПМП восстановились до уровней, превышающих уровни до заражения. Этот рикошетный эффект был сильнее, чем у пробиотиков/ПМП. Что касается показателей дисбиоза, то количество как *Staphylococcus*, так и *Acinetobacter* значительно увеличивалось в ответ на инфекцию *H. pylori*, но значительно уменьшалось в ответ на пробиотик, экспрессирующий либо нПМП, либо ПМП.

[0150] Трудно проанализировать тысячи бактерий, обнаруженных с помощью секвенирования следующего поколения в желудке мыши в этих терапевтических экспериментах. Кроме того, трудно изучить такие данные по отдельным видам, учитывая недостаток опубликованной информации о пользе или вреде отдельных бактериальных таксонов для здоровья популяции микробиоты желудка мышей. Однако эти четыре бактерии действительно имеют значение для здоровья микробиоты желудка, и влияние пробиотиков, экспрессирующих нПМП, на эти четыре индикаторных вида подтверждает нашу общую гипотезу о положительном воздействии лечения пробиотиками/нПМП. Лечение пробиотиками/нПМП увеличило численность известных полезных видов-индикаторов и уменьшило количество наиболее распространенных видов-индикаторов дисбактериоза после терапии инфекции *H. pylori*.

[0151] Влияние лечения на неинфицированных мышей с течением времени

[0152] Влияние различных видов терапевтического лечения на неинфицированных мышей с течением времени является важным вопросом. Любая терапия или профилактическое лечение должны оказывать минимальное негативное влияние на нативную микрофлору кишечника. В качестве стандартного базового уровня лечения показано, что антибиотики оказывают разрушительное воздействие на микробное разнообразие кишечника (Lange et al., 2016). Ожидается, что как заражение *H. pylori*, так и терапевтическая элиминация *H. pylori* будут отрицательными и положительными вмешивающимися факторами, соответственно, в отношении оценки разнообразия (Liou et al., 2019; Li et al., 2017). Таким образом, правильный план эксперимента не должен включать *H. pylori*. По этой причине сравнивали эффекты различных видов терапевтического лечения у неинфицированных мышей.

[0153] Микробиота желудка мыши состоит из тысяч видов бактерий. Чтобы изобразить изменение численности каждого из этих видов до и после обработки, необходимо использовать определенные статистические показатели. Следующие

показатели указывают на то, что лечение нПМП вызывает гораздо меньше изменений в микробиоте желудка, чем лечение ПМП.

[0154] На ФИГ. 18, все виды бактерий из желудка мыши сопоставляются между четырьмя группами лечения: Пустая (пробиотик, несущий только пустой вектор), Нулевая (ложная инокуляция буфером), Направленная (пробиотик, экспрессирующий нПМП), и Ненаправленная (пробиотик, экспрессирующий ПМП). На этой фигуре последние три обработки сравнивают с Пустой обработкой. В общих чертах, ось Y представляет собой таксономическое расстояние набора видов бактерий в каждой обработке по сравнению с набором видов бактерий в Пустой обработке. В частности, используемый показатель (ось Y) представляет собой плагин от QIIME, называемый непараметрическим тестом на взаимозависимость микробов (NMiT) (Zhang et al., 2017).

[0155] Важно отметить, что лечение нПМП («Направленное») гораздо более тесно связано с простым лечением пробиотиками («Пустое»), чем лечение ПМП («Ненаправленное») или мышами, получающими только имитационную инокуляцию с буфером («Нулевое»). Это означает, что лечение пробиотиком, экспрессирующим нПМП, больше похоже на обычное лечение пробиотиками.

[0156] На ФИГ. 19 применяют тот же показатель, но в сравнении с «Нулевым» лечением (ложная инокуляция). Опять же, набор видов, обнаруженный при лечении пробиотиком/нПМП («Направленное»), более тесно связан с набором микроорганизмов из желудка с ложной инокуляцией, как и контроль с пустым вектором. Набор при «Ненаправленном» лечении (пробиотик/ПМП) опять имеет более отдаленное родство.

[0157] На ФИГ. 20 измерены различия, наблюдаемые в сообществах видов при одной и той же обработке, но в разные моменты времени. Используемый показатель представляет собой энтропию Шеннона и откладывается по оси Y. Более отрицательное значение (ниже по оси ординат) указывает на большее изменение популяции за 5 суток с момента инокуляции мышей на Сутки 0. Можно видеть, что лечение пробиотиком ПМП («Ненаправленное») привело к наибольшему изменению популяции за 5 суток. Напротив, отрицательные контроли («Пустой» и «Нулевой») и лечение пробиотиками/нПМП («Направленное») привели лишь к скромным изменениям в популяции. Величины ошибок представляют собой 95% доверительный интервал для всех трех фигур.

ССЫЛКИ

Следующие патенты и публикации включены, таким образом, в качестве ссылки.

WO 2017/009373

WO 2019/055781

Патент США № 9925223

Патент Австралии № 2016/204543

Публикация патентной заявки США № US 2013/0259834

Публикация патентной заявки США № US 2008/0044481

Публикация патентной заявки США № US 2014/0066363

Baktash A, Terveer EM, Zwartink RD, et al. Mechanistic insights in the success of fecal

microbiota transplants for the treatment of *clostridium difficile* infections. *Front Microbiol.* 2018;9:1242. doi:10.3389/fmicb.2018.01242

Börner RA, Kandasamy V, Axelsen AM, Nielsen AT, Bosma EF. Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiol Lett.* 2019;366(1):fny291. doi:10.1093/femsle/fny291

Borrero J, Chen Y, Dunny GM, Kaznessis YN. Modified lactic acid bacteria detect and inhibit multiresistant enterococci. *ACS Synth Biol.* 2015;4(3):299-306. doi:10.1021/sb500090b

Choudhury A, Islam SMA, Ghidey MR, Kearney CM. Repurposing a drug targeting peptide for targeting antimicrobial peptides against *Staphylococcus*. *Biotechnol Lett.* 2020;42(2):287-294. doi:10.1007/s10529-019-02779-y

Deng T, Ge H, He H, *et al.* The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. *Protein Expr Purif.* 2017;140:52-59. doi:10.1016/j.pep.2017.08.003

Ilan Y. Why targeting the microbiome is not so successful: can randomness overcome the adaptation that occurs following gut manipulation?. *Clin Exp Gastroenterol.* 2019;12:209-217. Published 2019 May 8. doi:10.2147/CEG.S203823

Dowah ASA, Clokie MRJ (2018) Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophys Rev* 10:535-542. doi: 10.1007/s12551-017-0382-3

Eckert R, He J, Yarbrough DK, *et al* (2006) Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3651-3657. doi: 10.1128/AAC.00622-06

Eckert R, Sullivan R, Shi W (2012) Targeted Antimicrobial Treatment to Re-establish 194 a Healthy Microbial Flora for Long-term Protection. *Adv Dent Res* 24:94-97. doi: 10.1177/0022034512453725

Evans BC, Nelson CE, Yu SS, *et al* (2013) Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J Vis Exp* e50166. doi:198 10.3791/50166

Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS, McQuillan G. Seroprevalence and ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *J Infect Dis.* 2000;181(4):1359-1363. doi:10.1086/315384

Fitchen N, Letley DP, O'Shea P, Atherton JC, Williams P, Hardie KR. All subtypes of the cytotoxin VacA adsorb to the surface of *Helicobacter pylori* post-secretion. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 7):621-630. doi:10.1099/jmm.0.45946-0

Forkus B, Ritter S, Vlysidis M, Geldart K, Kaznessis YN. Antimicrobial Probiotics Reduce *Salmonella enterica* in Turkey Gastrointestinal Tracts. *Sci Rep.* 2017;7:40695. Published 2017 Jan 17. doi:10.1038/srep40695

Geldart K, Forkus B, McChesney E, McCue M, Kaznessis YN. pMPES: A Modular Peptide Expression System for the Delivery of Antimicrobial Peptides to the Site of Gastrointestinal Infections Using Probiotics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016;9(4):60. Published 2016 Oct 5. doi:10.3390/ph9040060

Geldart KG, Kommineni S, Forbes M, *et al.* Engineered *E. coli* Nissle 1917 for the reduction of vancomycin-resistant Enterococcus in the intestinal tract. *Bioeng Transl Med.* 2018;3(3):197-208. Published 2018 Sep 8. doi:10.1002/btm2.10107

Ghidey M, Islam SMA, Pruett G, Kearney CM. Making plants into cost-effective bioreactors for highly active antimicrobial peptides. *N Biotechnol.* 2020;56:63-70. doi:10.1016/j.nbt.2019.12.001

Granland CM, Scott NM, Lauzon-Joset JF, *et al.* Nasal Delivery of a Commensal Pasteurellaceae Species Inhibits Nontypeable *Haemophilus influenzae* Colonization and Delays Onset of Otitis Media in Mice. *Infect Immun.* 2020;88(4):e00685-19. Published 2020 Mar 23. doi:10.1128/IAI.00685-19

He B, Hoang TK, Wang T, *et al.* Resetting microbiota by *Lactobacillus reuteri* inhibits T reg deficiency-induced autoimmunity via adenosine A2A receptors. *J Exp Med.* 2017;214(1):107-123. doi:10.1084/jem.20160961

Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology.* 2017;153(2):420-429. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022

Islam SMA, Kearney CM, Baker EJ (2017) CSPred: A machine-learning-based compound model to identify the functional activities of biologically-stable toxins. In: 2017 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM). pp 2254-2255

Islam SMA, Sajed T, Kearney CM, Baker EJ (2015) PredSTP: a highly accurate SVM based model to predict sequential cystine stabilized peptides. *BMC Bioinformatics* 16:210. doi: 10.1186/s12859-015-0633-x

Keeney KM, Yurist-Doutsch S, Arrieta MC, Finlay BB. Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:217-235. doi:10.1146/annurev-micro-091313-103456

Lange K, Buerger M, Stallmach A, Bruns T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig Dis.* 2016;34(3):260-268. doi:10.1159/000443360

Li C, Blencke H-M, Paulsen V, *et al* (2010) Powerful workhorses for antimicrobial peptide expression and characterization. *Bioeng Bugs* 1:217-220. doi: 10.4161/bbug.1.3.11721

Li, T., Qin, Y., Sham, P. *et al.* Alterations in Gastric Microbiota After *H. pylori* Eradication and in Different Histological Stages of Gastric Carcinogenesis. *Sci Rep* 7, 44935 (2017). doi.org/10.1038/srep44935

Li Z, Wang X, Wang X, *et al* (2017) Research advances on plectasin and its derivatives as new potential antimicrobial candidates. *Process Biochemistry* 56:62-70. doi: 10.1016/j.procbio.2017.02.006

Liou JM, Lee YC, El-Omar EM, Wu MS. Efficacy and Long-Term Safety of *H. pylori* Eradication for Gastric Cancer Prevention. *Cancers (Basel).* 2019;11(5):593. doi:10.3390/cancers11050593

Mao R, Teng D, Wang X, *et al* (2013) Design, expression, and characterization of a novel targeted plectasin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol*

97:3991-4002. doi: 10.1007/s00253-012-210 4508-z

Monnet V, Juillard V, Gardan R (2016) Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit Rev Microbiol* 42:339-351. doi: 10.3109/1040841X.2014.948804

Mu Q, Tavella VJ, Luo XM. Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Front Microbiol*. 2018;9:757. Published 2018 Apr 19. doi:10.3389/fmicb.2018.00757

Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, et al (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437:975-980. doi: 10.1038/nature04051

Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29:464-472. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.05.001

Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, et al (2018) Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* 16:760-773. doi: 10.1038/s41579-018-0070-8

Oeemig JS, Lynggaard C, Knudsen DH, et al (2012) Eurocin, a new fungal defensin: structure, lipid binding, and its mode of action. *J Biol Chem* 287:42361-42372. doi: 10.1074/jbc.M112.382028

O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/2437

Pan F, Zhang L, Li M, et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice. *Microbiome*. 2018;6(1):54. Published 2018 Mar 21. doi:10.1186/s40168-018-0440-5

Parachin NS, Mulder KC, Viana AAB, et al (2012) Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides* 38:446-456. doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.020

Peschel A, Sahl H-G (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* 4:529-536. doi: 10.1038/nrmicro1441

Saeidi N, Wong CK, Lo TM, *et al.* Engineering microbes to sense and eradicate *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen. *Mol Syst Biol*. 2011;7:521. Published 2011 Aug 16. doi:10.1038/msb.2011.55

Satoh K, Hirayama T, Takano K, Suzuki-Inoue K, Sato T, Ohta M, Nakagomi J, Ozaki Y (2013) VacA, the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, binds to multimerin 1 on human platelets. *Thrombosis J* 11:23. doi: 10.1186/1477-9560-11-23

Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, *et al.* Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43(4):514-533. doi:10.1111/apt.13497

Vilander AC, Dean GA. Adjuvant Strategies for Lactic Acid Bacterial Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2019;7(4):150. Published 2019 Oct 16. doi:10.3390/vaccines7040150

Wang T, Teng K, Liu G, et al. *Lactobacillus reuteri* HCM2 protects mice against Enterotoxigenic *Escherichia coli* through modulation of gut microbiota. *Sci Rep*. 2018;8(1):17485. Published 2018 Nov 30. doi:10.1038/s41598-018-35702-y

Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, et al (2016) Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Front Microbiol* 7:1177-1177. doi: 10.3389/fmicb.2016.01177

Worthington RJ, Melander C (2013) Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends Biotechnol* 31:177-184. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.006

Wu C-H, Liu I-J, Lu R-M, Wu H-C (2016) Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. *J Biomed Sci* 23:. doi: 10.1186/s12929-016-0223-x

Yacoby I, Shamis M, Bar H, et al (2006) Targeting Antibacterial Agents by Using Drug-Carrying Filamentous Bacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:2087-2097. doi: 10.1128/AAC.00169-06

Zhang L, Wu WK, Gallo RL, *et al.* Critical Role of Antimicrobial Peptide Cathelicidin for Controlling *Helicobacter pylori* Survival and Infection. *J Immunol.* 2016;196(4):1799-1809. doi:10.4049/jimmunol.1500021

Zhang Y, Han SW, Cox LM, Li H. A multivariate distance-based analytic framework for microbial interdependence association test in longitudinal study. *Genet Epidemiol.* 2017;41(8):769-778. doi:10.1002/gepi.22065

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пробиотик для профилактики или лечения состояния, вызванного целевой бактерией, живущей в желудочно-кишечном тракте индивидуума, содержащий:

пробиотическую бактерию, где пробиотическая бактерия была трансформирована для включения конструкции днк, экспрессирующей направленный противомикробный пептид, где последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид включает последовательность, кодирующую противомикробный пептид, слитую с последовательностью, кодирующую направленный пептид, который связывается с белком целевой бактерии, где направленный противомикробный пептид убивает целевую бактерию в желудочно-кишечном тракте индивидуума, и где направленный противомикробный пептид минимально разрушает другие бактерии, обнаруженные в желудочно-кишечном тракте индивидуума, по сравнению с ненаправленными противомикробными пептидами или антибиотиками.

2. Пробиотик по п. 1, где пробиотическая бактерия включает молочнокислую бактерию.

3. Пробиотик по п. 2, где молочнокислая бактерия включает бактерию *Lactococcus*.

4. Пробиотик по п. 3, где бактерия *Lactococcus* включает *Lactococcus lactis*.

5. Пробиотик по п. 1, где белок целевой бактерии является фактором вирулентности.

6. Пробиотик по п. 5, где фактором вирулентности является пептид VacA.

7. Пробиотик по п. 1, где противомикробный пептид представляет собой латероспорулин, алитезерин или родственный кателину противомикробный пептид.

8. Пробиотик по п. 1, где целевая бактерия представляет собой *H. pylori*.

9. Пробиотик по п. 1, где направленный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:5.

10. Пробиотик по п. 1, где противомикробный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10.

11. Пробиотик по п. 1, где направленный противомикробный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11.

12. Пробиотическая композиция для профилактики или лечения состояния, вызванного целевой бактерией, живущей в желудочно-кишечном тракте индивидуума, содержащая:

пробиотик по п. 1; и

приемлемый эксципиент или носитель.

13. Пробиотическая композиция по п. 1, где пробиотическая бактерия является съедобной, и где приемлемый эксципиент или носитель является съедобным.

14. Способ профилактики или лечения состояния пациента, вызванного целевой бактерией, обнаруженной в желудочно-кишечном тракте индивидуума, включающий:

введение пробиотической композиции индивидууму, где пробиотическая композиция содержит пробиотическую бактерию и приемлемый эксципиент или носитель, где пробиотическая бактерия была трансформирована для включения конструкции ДНК,

экспрессирующей направленный противомикробный пептид, где последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид, включает последовательность, кодирующую противомикробный пептид, слитую с последовательностью, кодирующей направленный пептид, который связывается с белком целевой бактерии; и

предоставление направленному противомикробному пептиду возможности уничтожения целевой бактерии в желудочно-кишечном тракте индивидуума, и где направленный противомикробный пептид минимально разрушает другие бактерии, обнаруженные в желудочно-кишечном тракте индивидуума, по сравнению с ненаправленными противомикробными пептидами или антибиотиками.

15. Способ по п. 14, где пробиотическая бактерия включает молочнокислую бактерию.

16. Способ по п. 15, где молочнокислая бактерия включает бактерию *Lactococcus*.

17. Способ по п. 16, где бактерия *Lactococcus* включает *Lactococcus lactis*.

18. Способ по п. 14, где белок целевой бактерии является фактором вирулентности.

19. Способ по п. 18, где фактором вирулентности является пептид VacA.

20. Способ по п. 14, где противомикробный пептид представляет собой латероспорулин, алитезерин или родственный кателину противомикробный пептид.

21. Способ по п. 14, где целевая бактерия включает *H. pylori*.

22. Способ по п. 14, где направленный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:5.

23. Способ по п. 14, где противомикробный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10.

24. Способ по п. 14, где направленный противомикробный пептид имеет последовательность, включающую SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 или SEQ ID NO:11.

25. Способ по п. 14, где индивидуум представляет собой животное.

26. Способ по п. 14, где индивидуум представляет собой человека.

27. Способ по п. 14, где пробиотическая бактерия является съедобной, и где приемлемый эксципиент или носитель является съедобным.

28. Способ по п. 14, где пробиотическую композицию вводят перорально.

29. Пробиотик для профилактики или лечения состояния, вызванного *Helicobacter pylori*, живущей в желудочно-кишечном тракте индивидуума, содержащий:

пробиотическую бактерию *lactococcus lactis*, где пробиотическая бактерия *lactococcus lactis* была трансформирована для включения конструкции днк, экспрессирующей направленный противомикробный пептид, где последовательность, кодирующая направленный противомикробный пептид включает последовательность, кодирующую противомикробный пептид, слитую с последовательностью, кодирующую направленный пептид, который связывается с пептидом vaca *h. pylori*, где направленный противомикробный пептид убивает *h. pylori* в желудочно-кишечном тракте индивидуума, и где направленный противомикробный пептид минимально разрушает другие бактерии, обнаруженные в желудочно-кишечном тракте индивидуума, по сравнению с

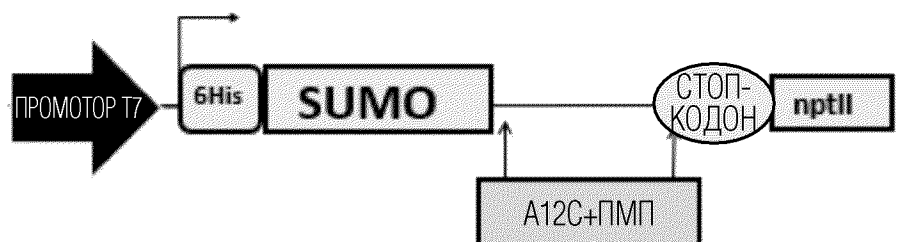
ненаправленными противомикробными пептидами или антибиотиками.

30. Пробиотик по п. 29, где направленный пептид получен из последовательности мультимерина-1.

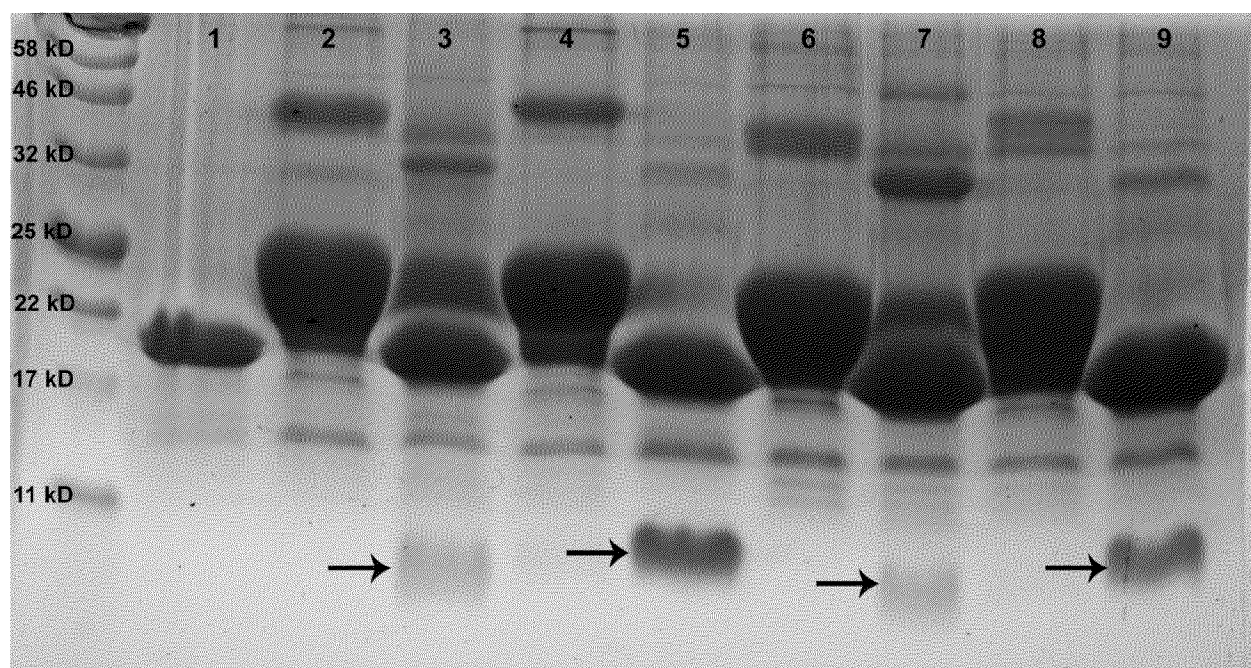
31. Пробиотик по п. 29, где противомикробный пептид представляет собой латероспорулин, алитезерин или родственную кателину противомикробный пептид.

По доверенности

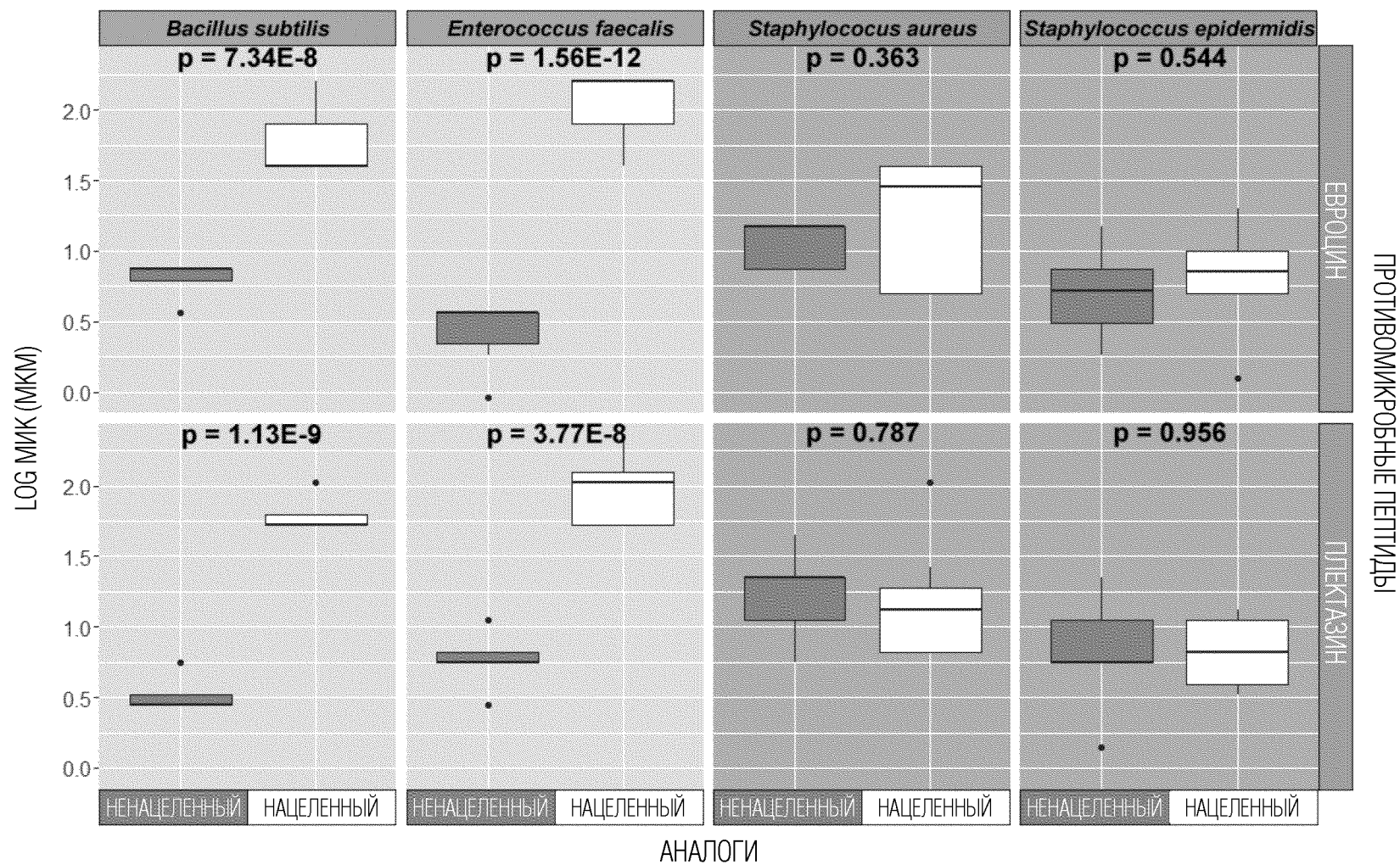
ФИГ. 1



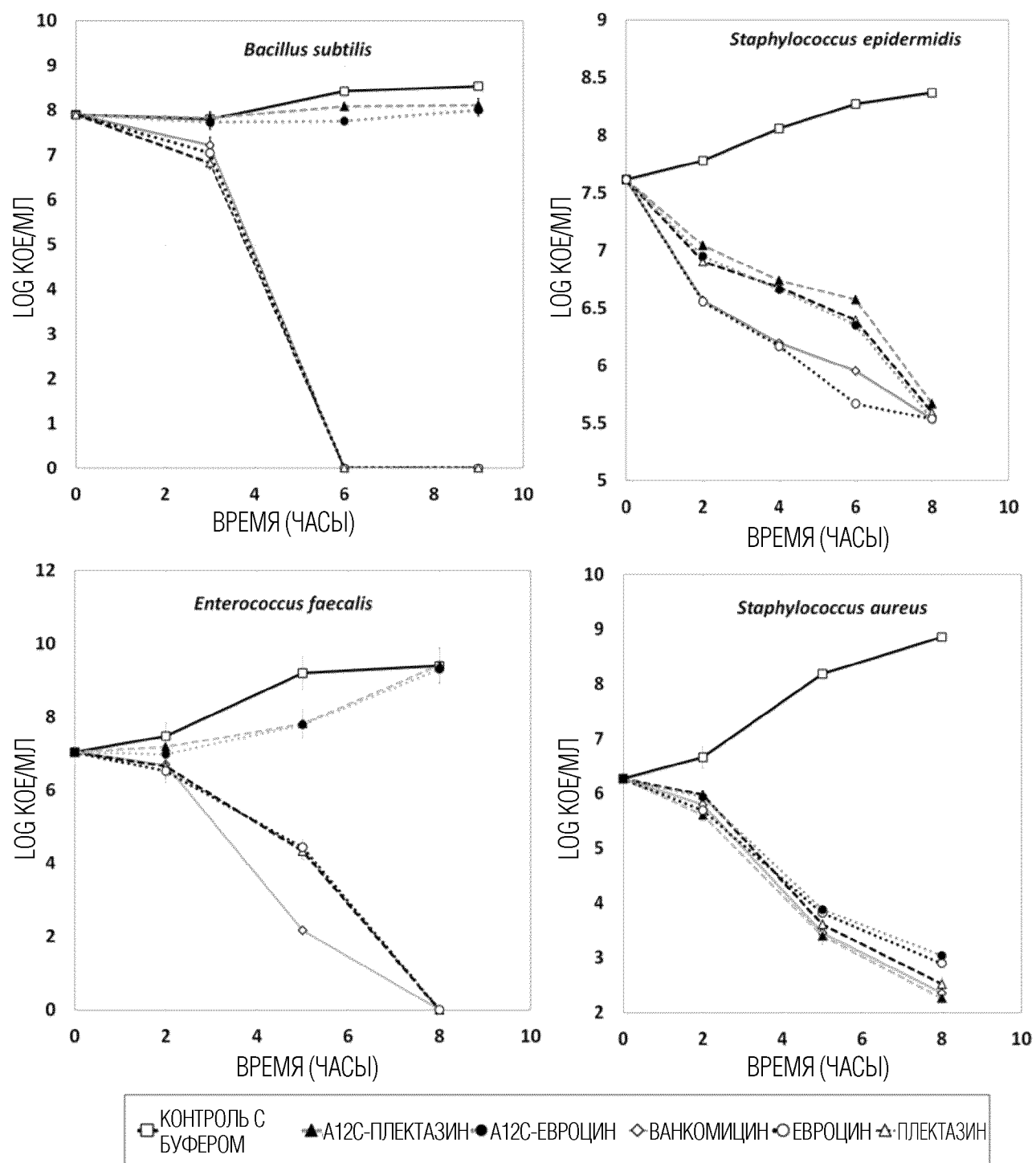
ФИГ. 2



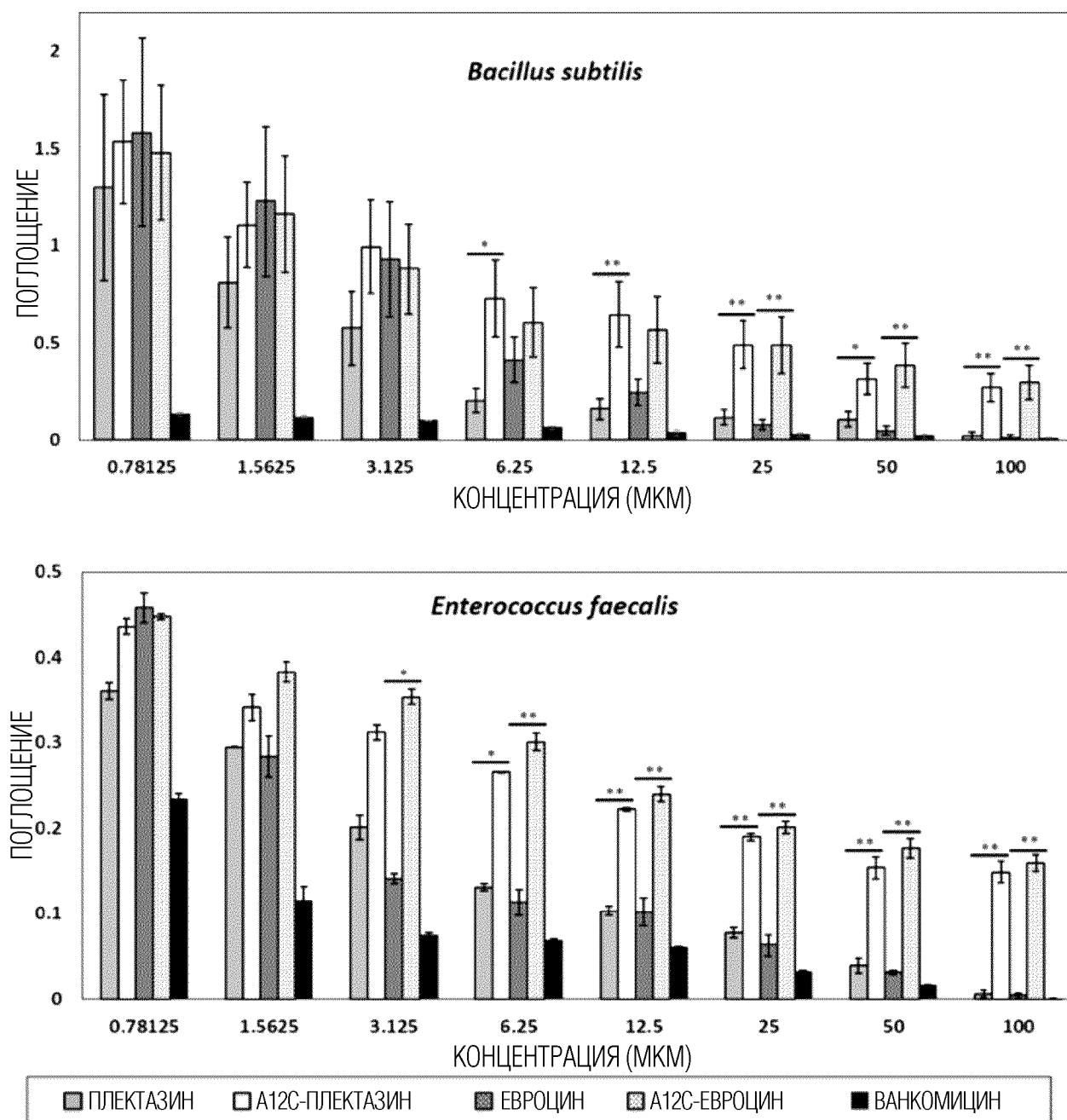
ФИГ. 3



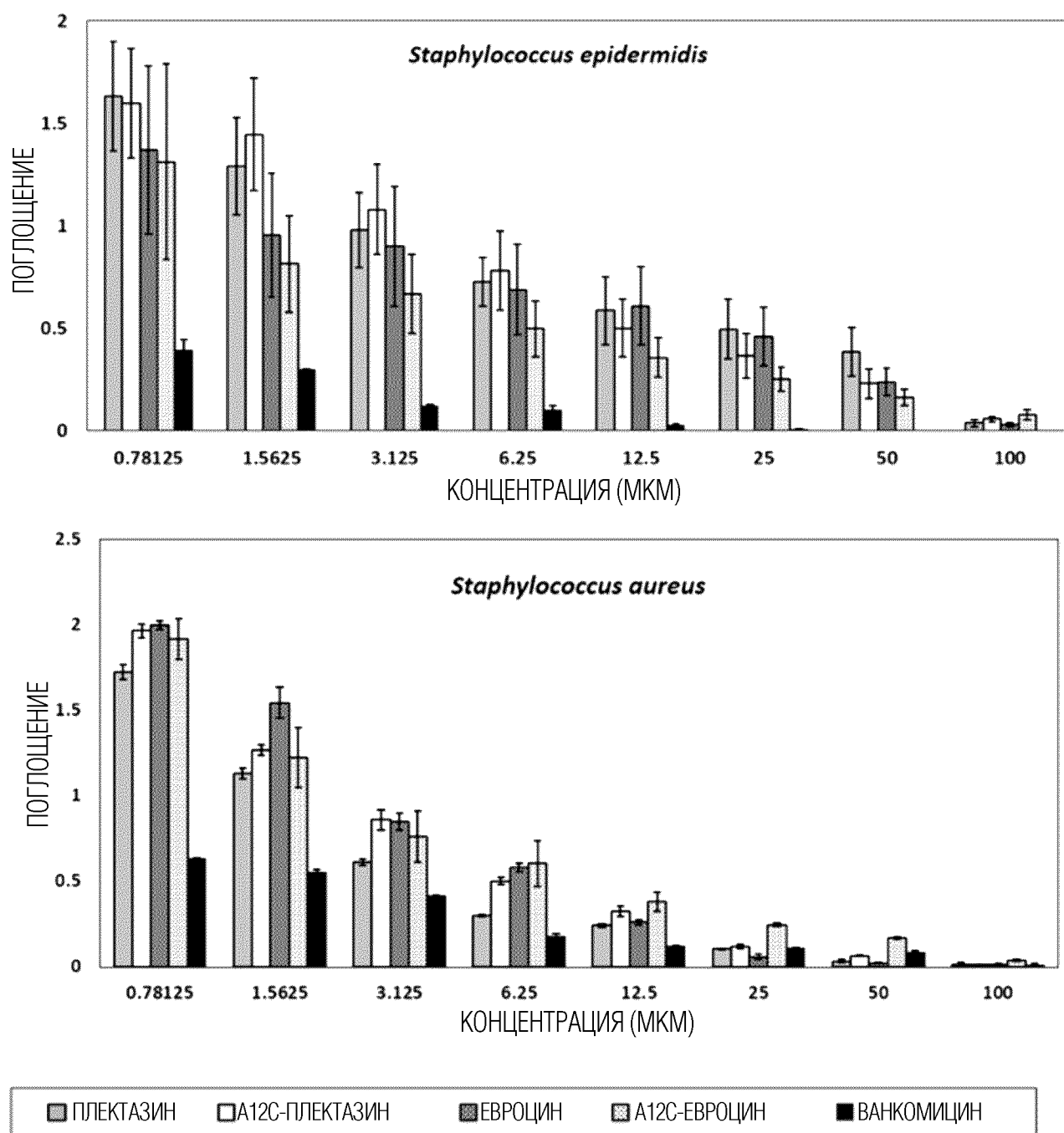
ФИГ. 4



ФИГ. 5

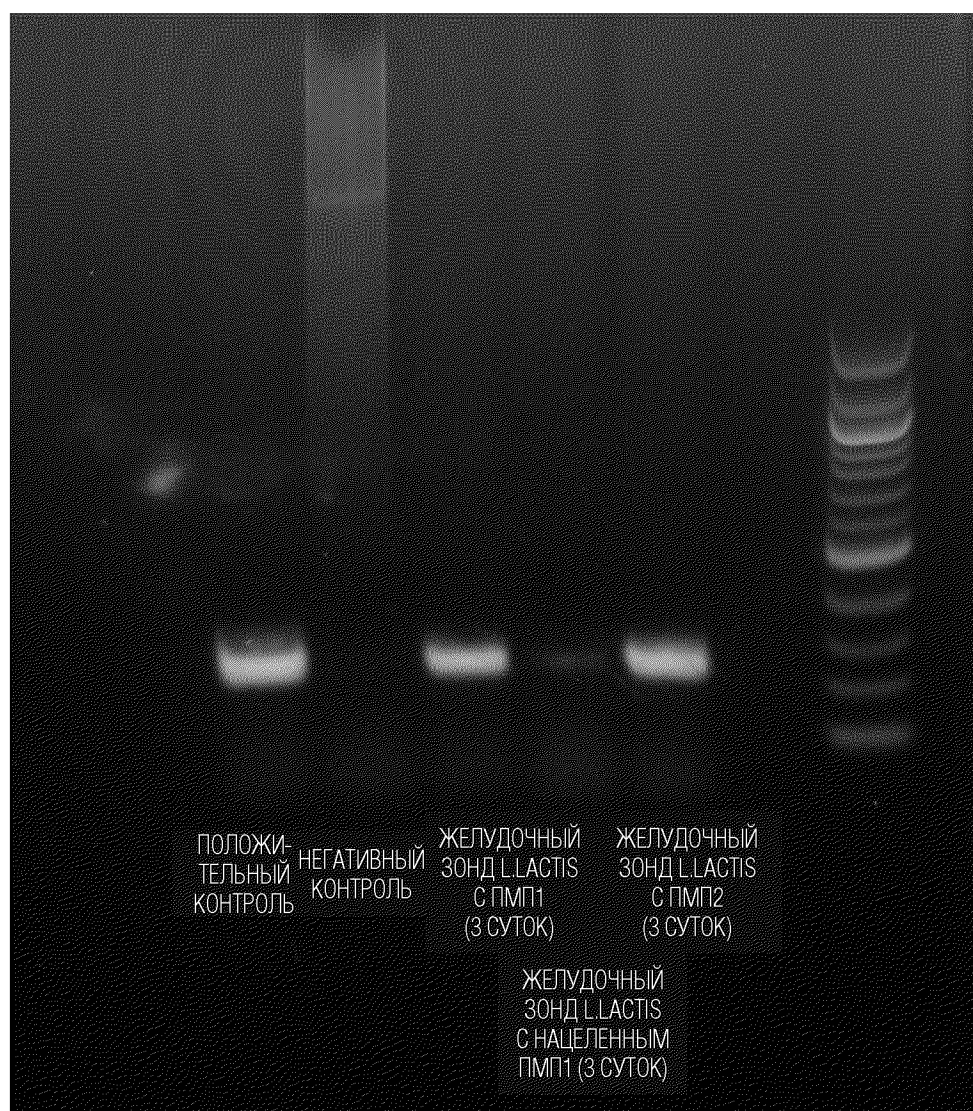


ФИГ. 5 (продолжение)

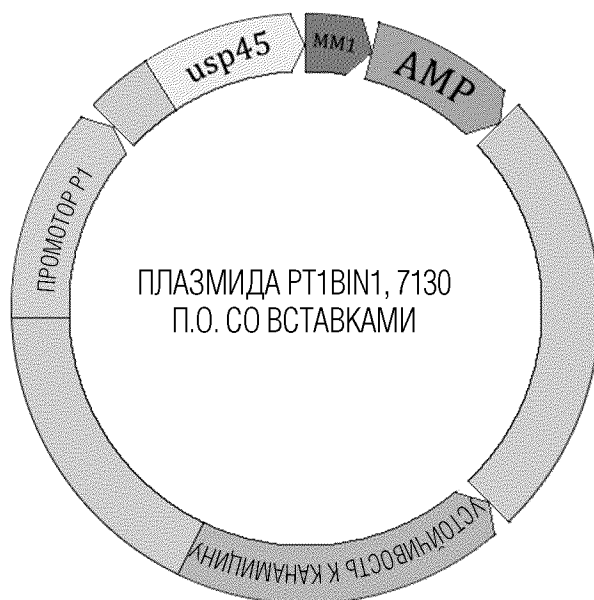


6/20

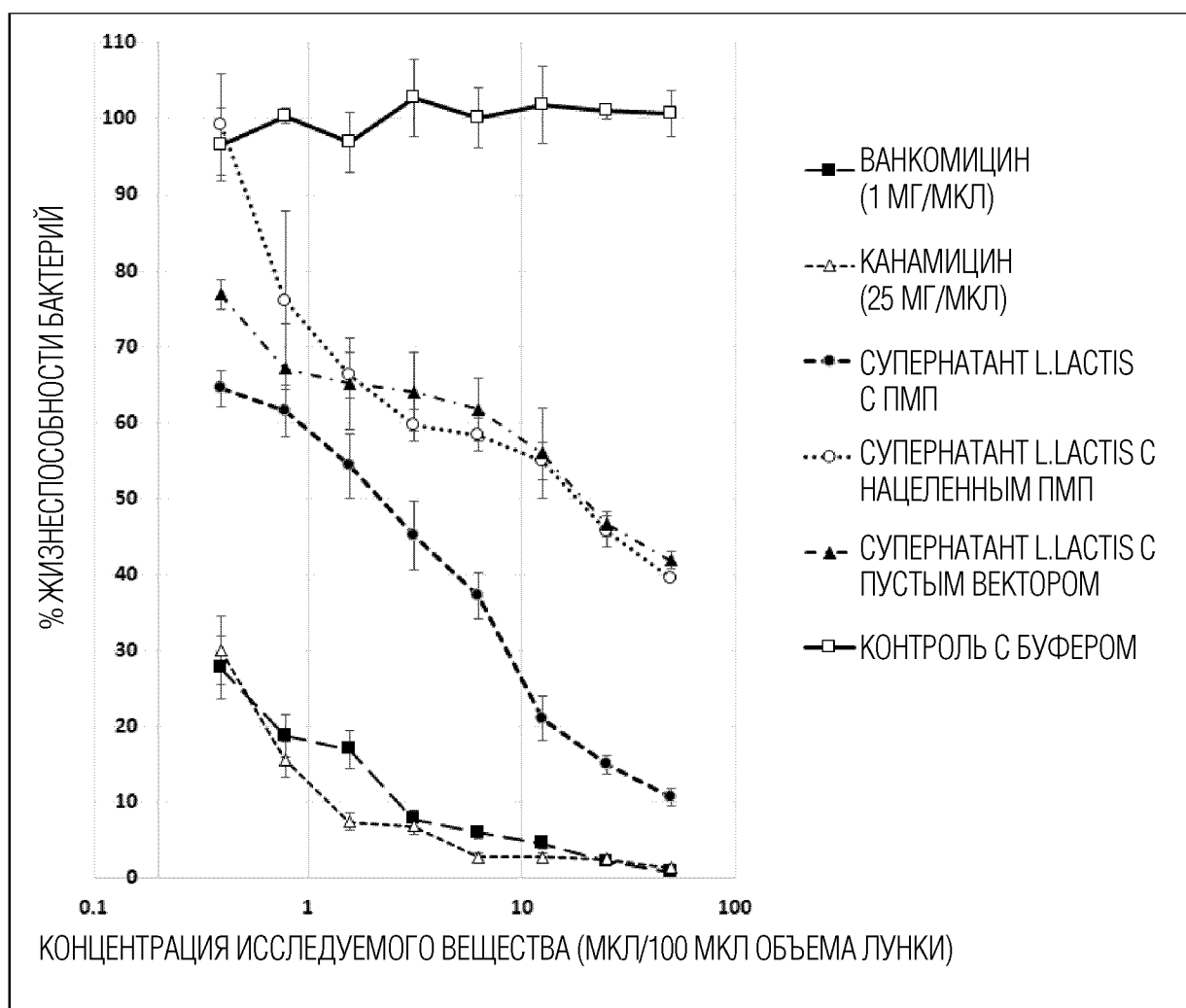
ФИГ. 6



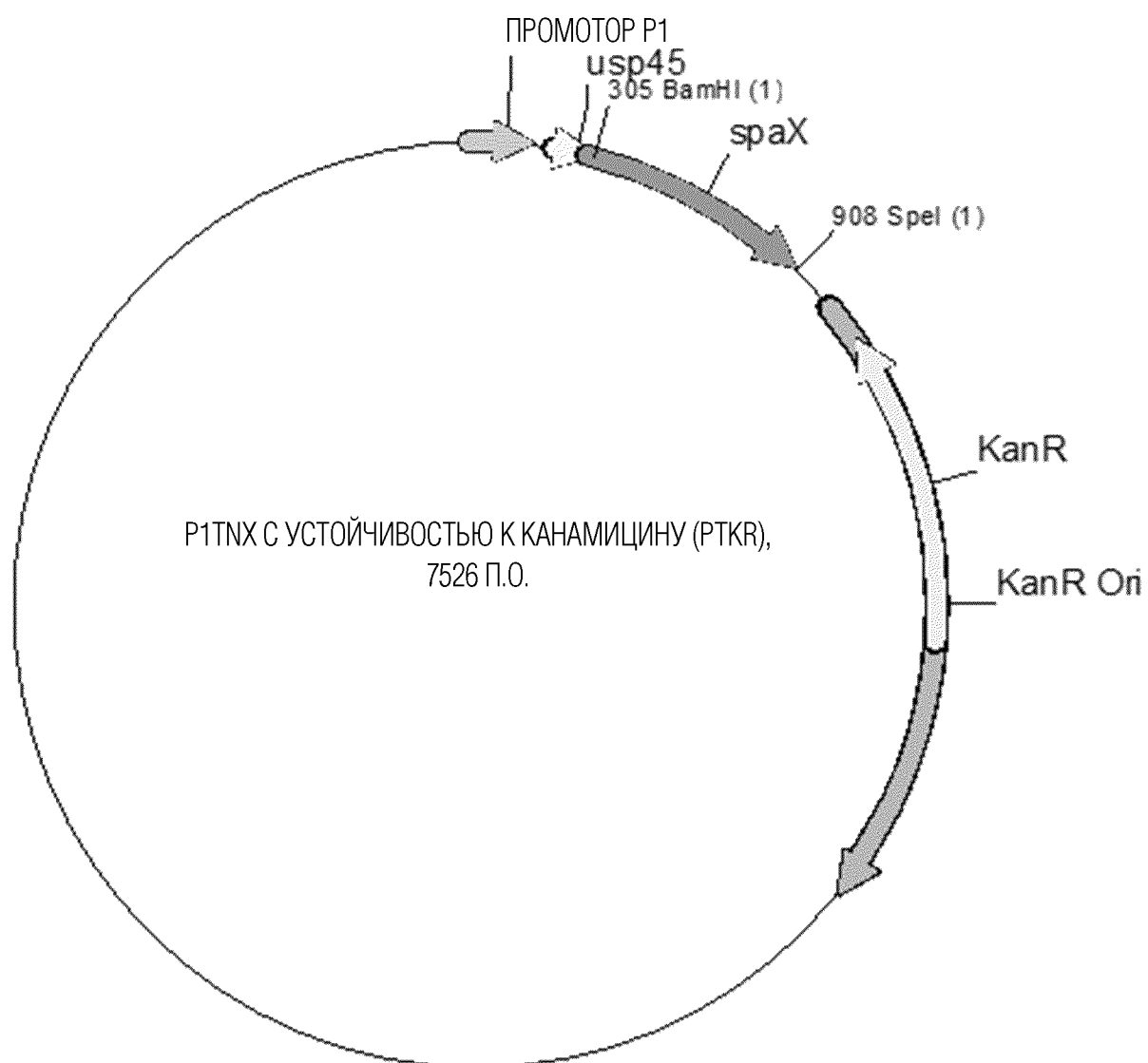
ФИГ. 7



ФИГ. 8

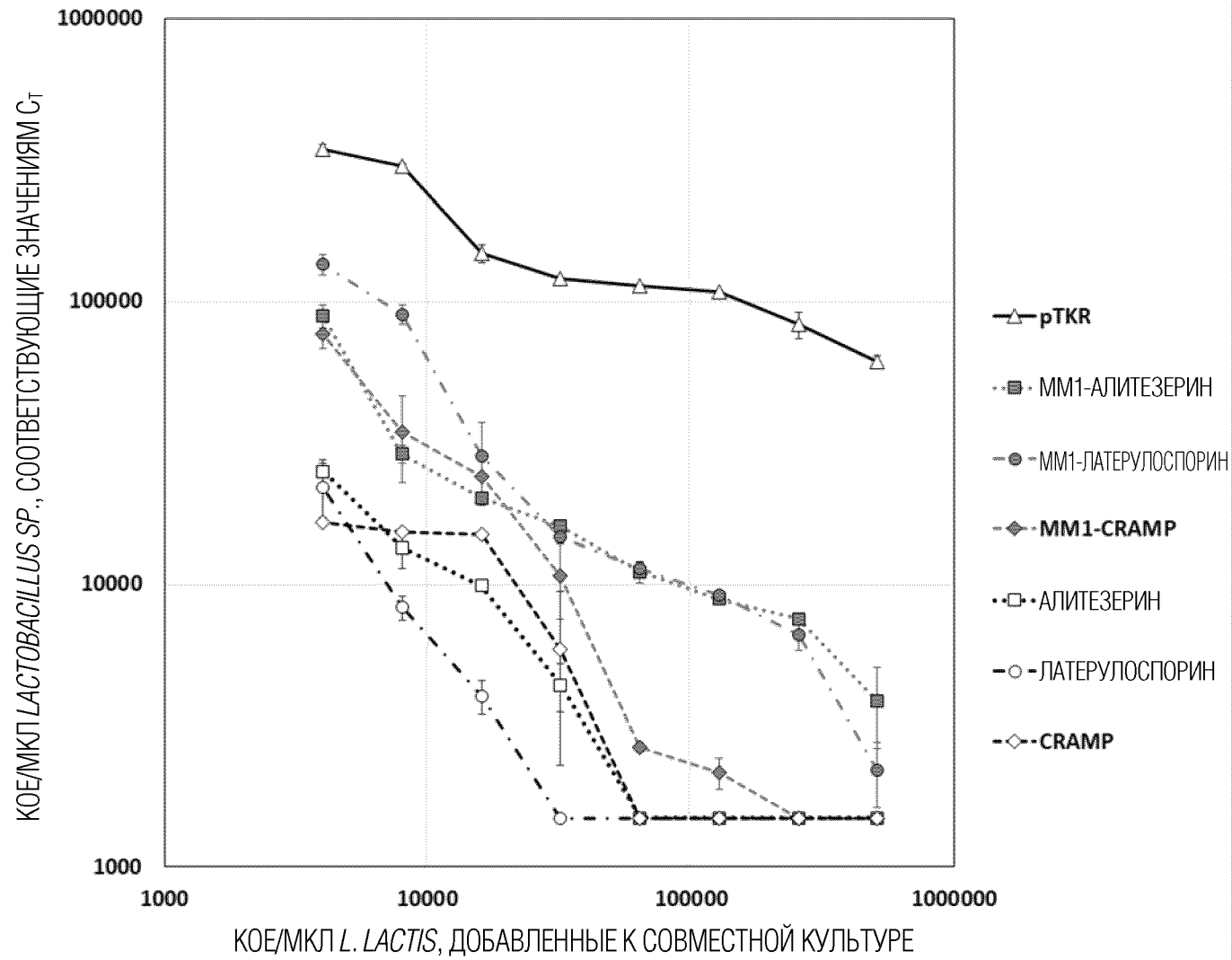


ФИГ. 9



ФИГ. 11

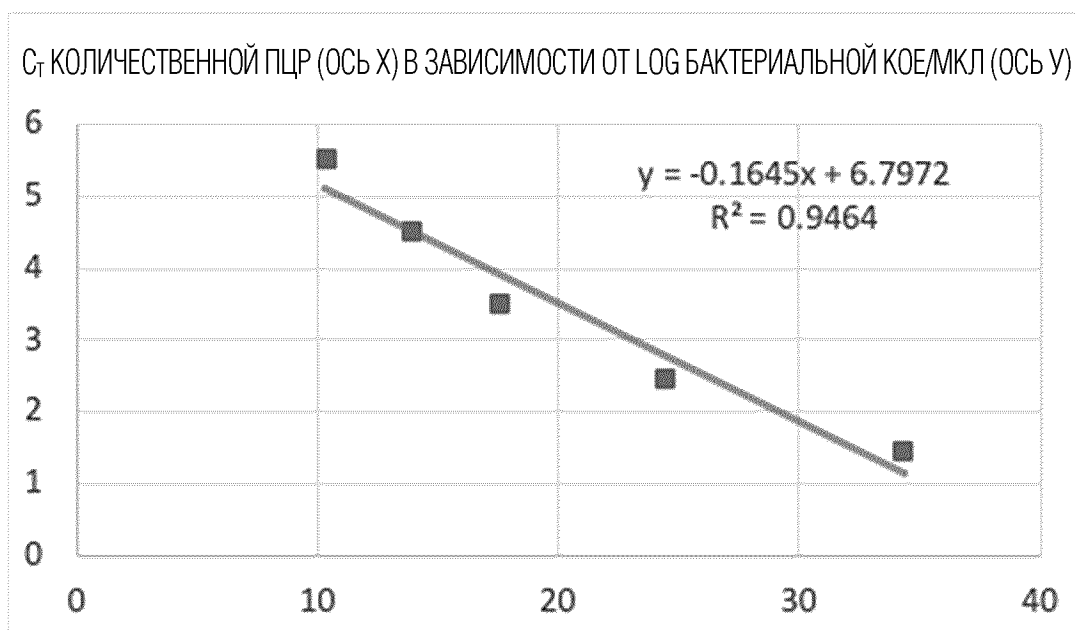
РОСТ *LACTOBACILLUS SP* ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА СОВМЕСТНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ С *L. LACTIS*



ФИГ. 12

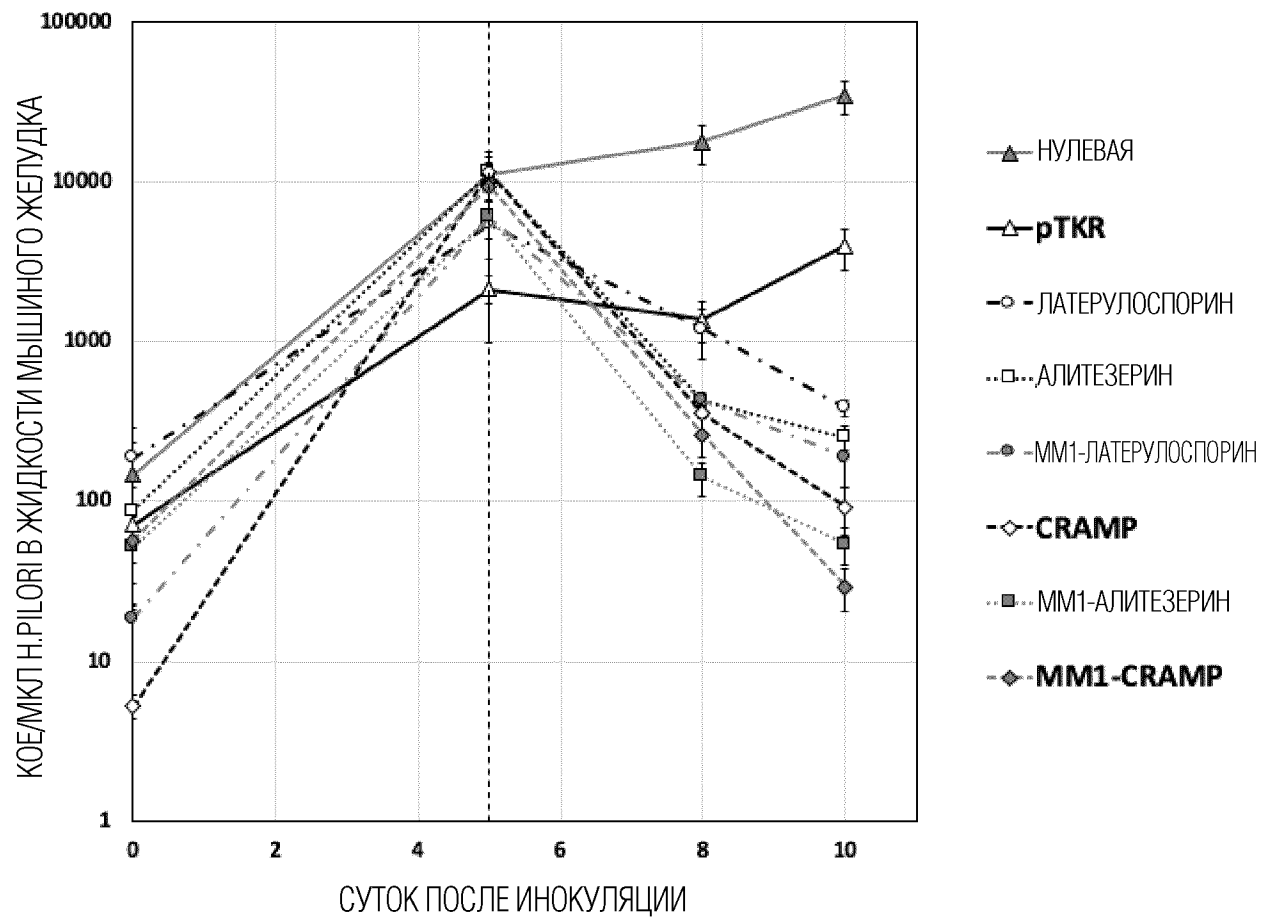
13/20

ФИГ. 13

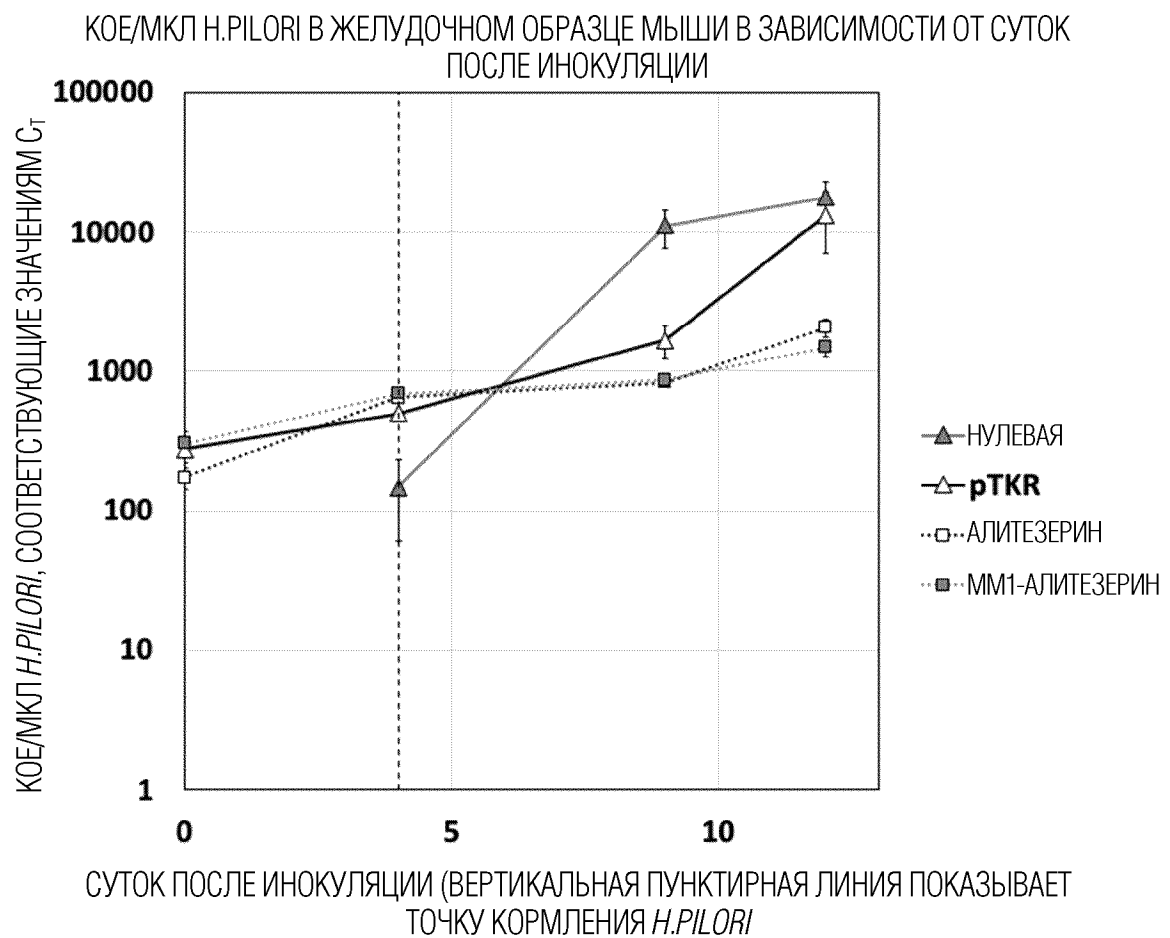


14/20

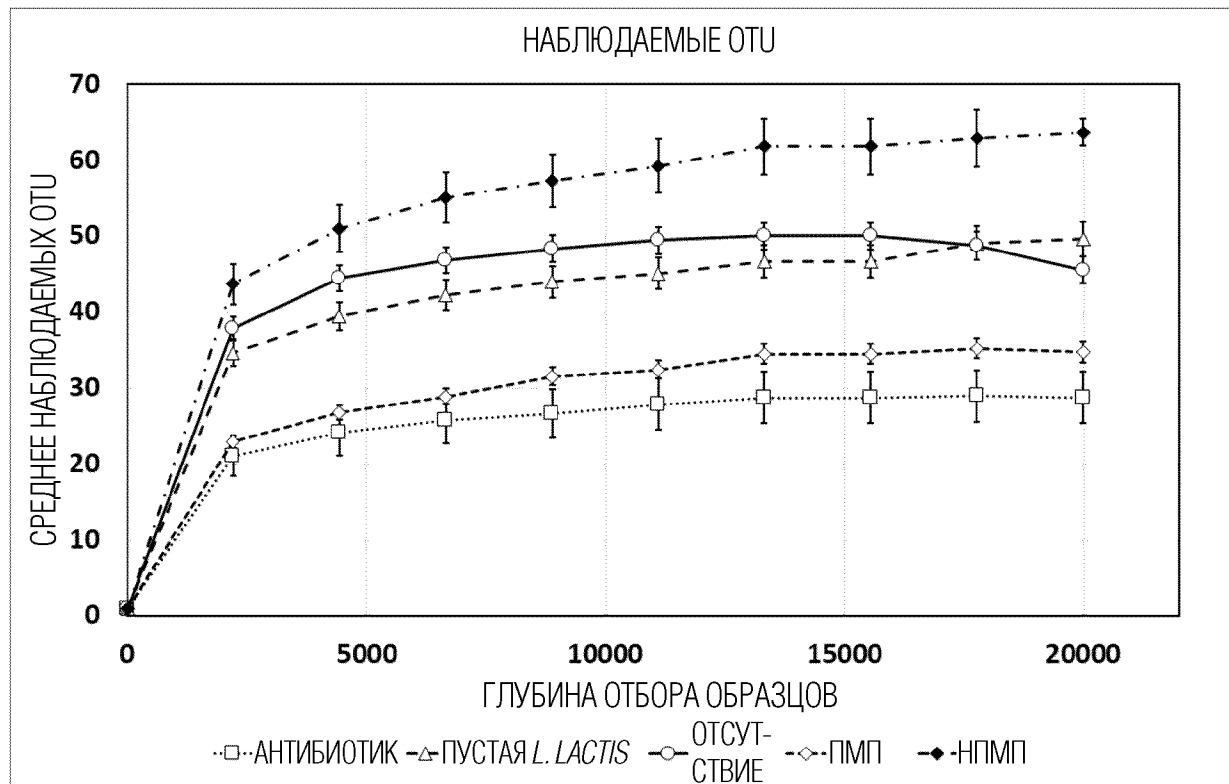
ФИГ. 14



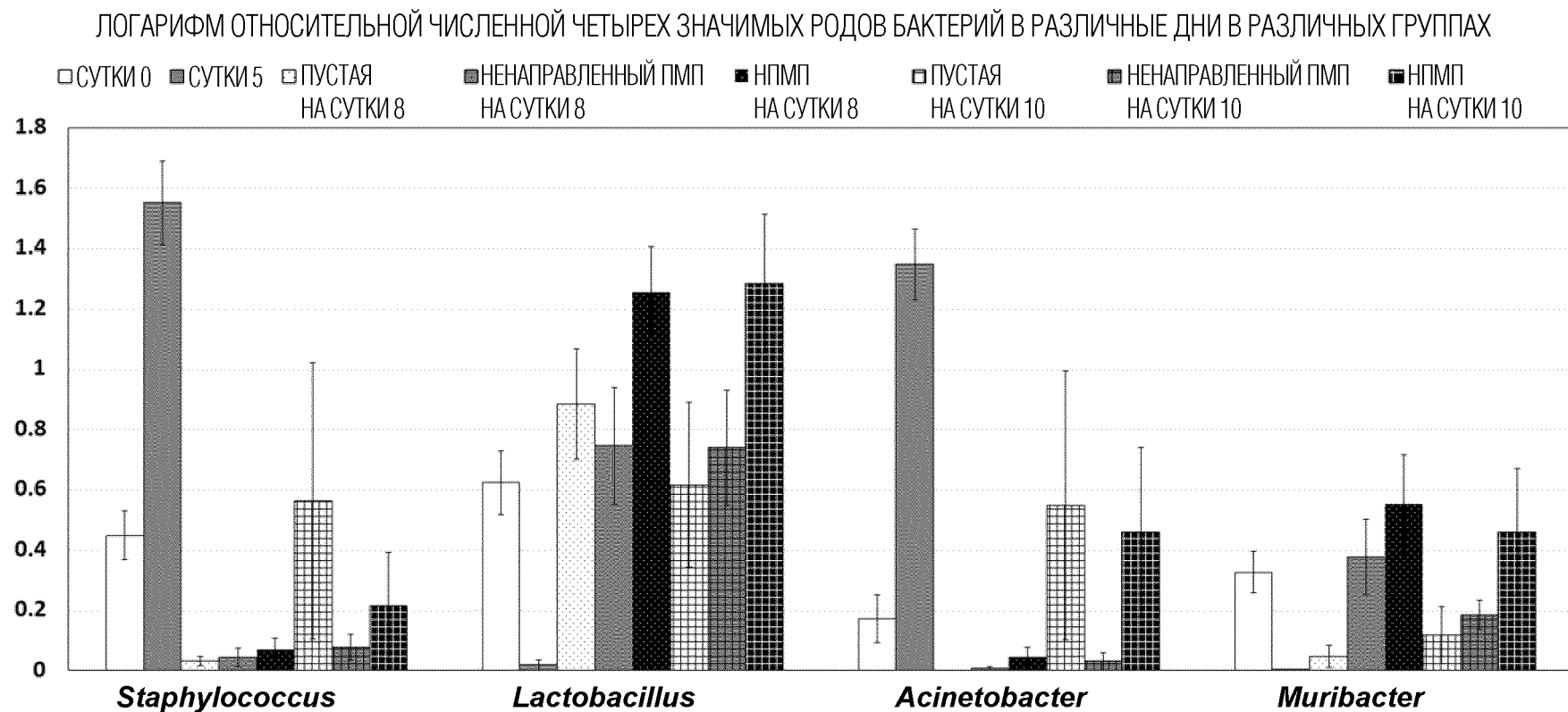
ФИГ. 15



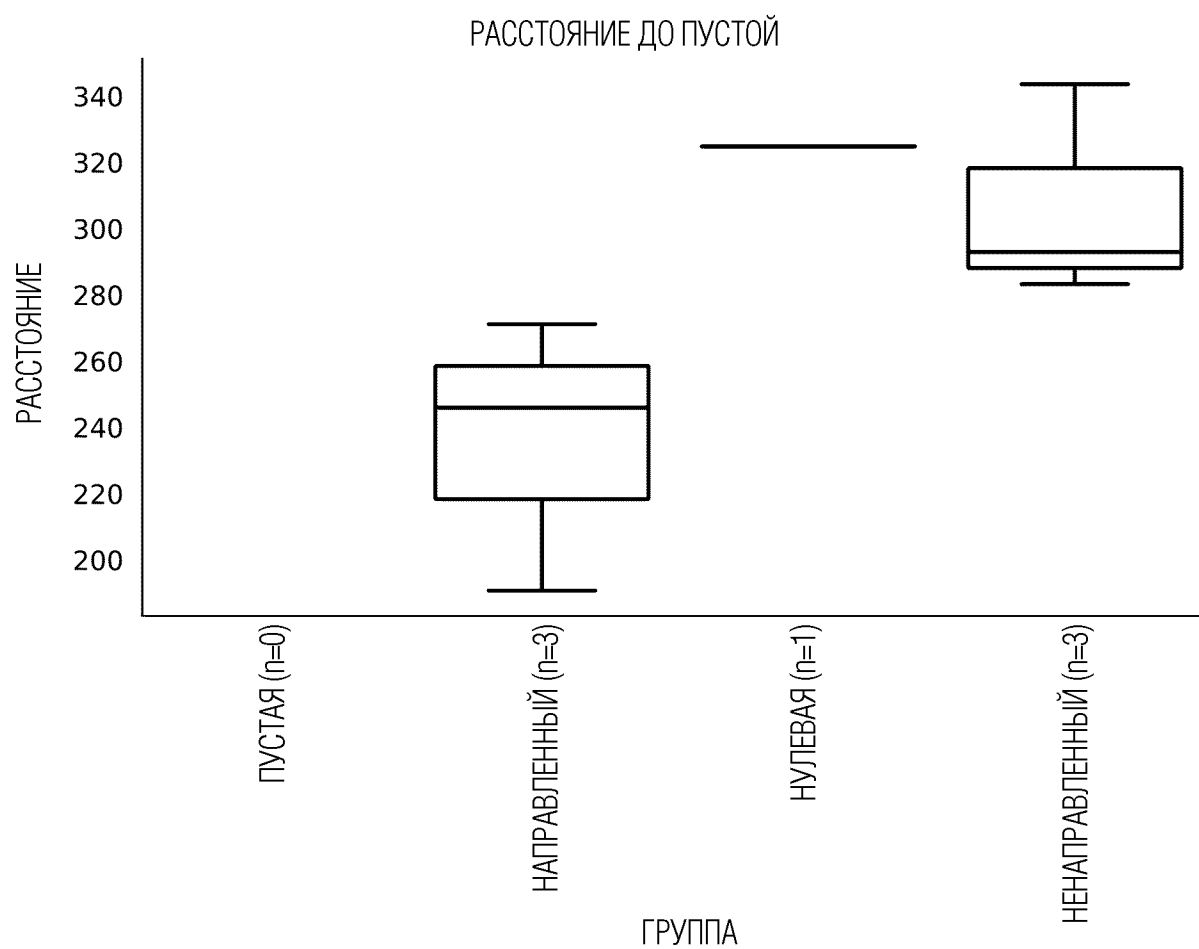
ФИГ. 16



ФИГ. 17

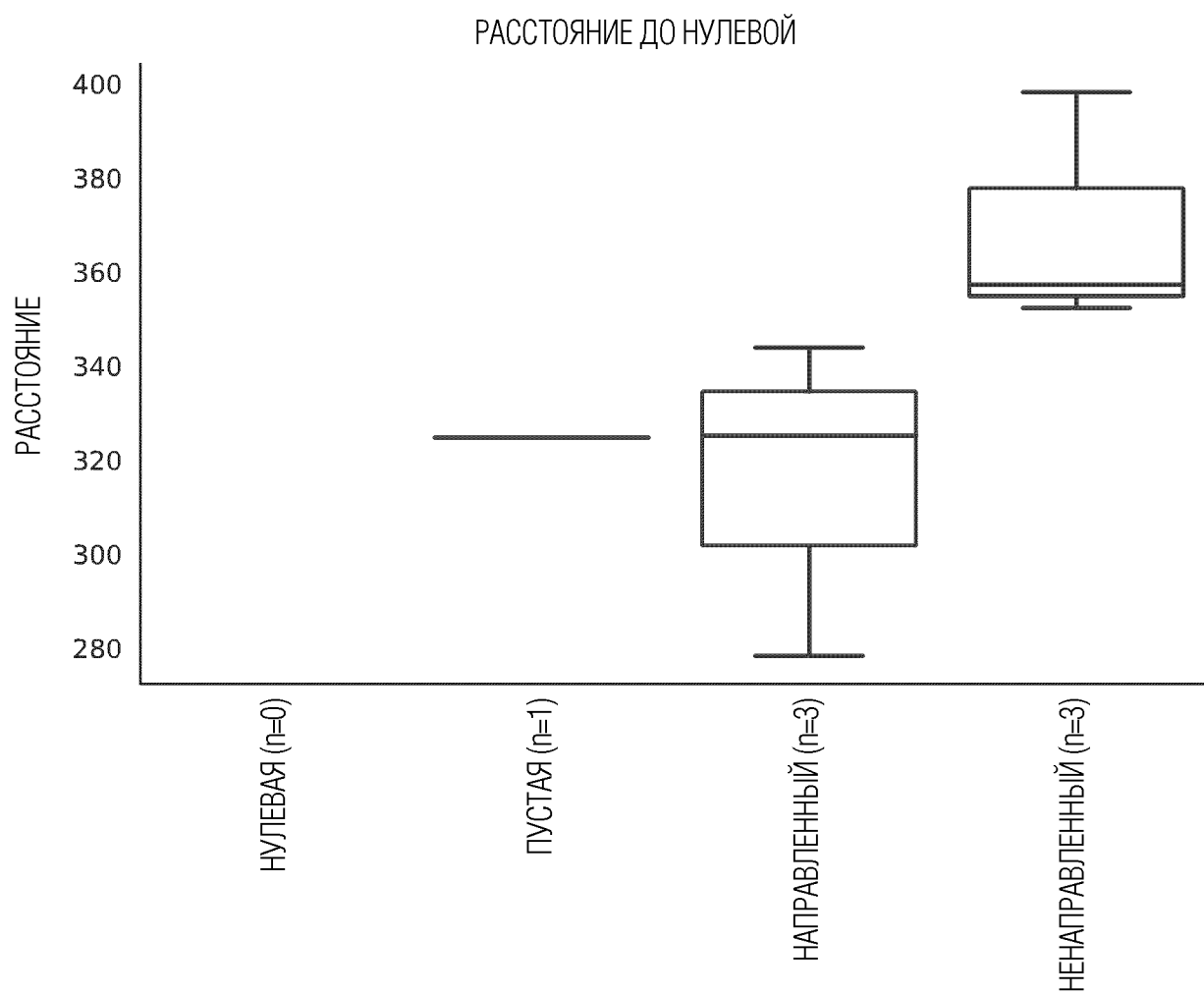


ФИГ. 18



19/20

ФИГ. 19



20/20

ФИГ. 20

