

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040533**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.06.17**

(21) Номер заявки  
**201791702**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.01.13**

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 31/702* (2006.01)  
*A61K 31/716* (2006.01)  
*A61K 31/733* (2006.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)

---

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ГЛИКАНОВ И СВЯЗАННЫЕ С НИМИ СПОСОБЫ**

---

(31) 62/108,039; 62/152,005; 62/152,011;  
62/152,007; 62/152,017; 62/152,016;  
62/216,997; 62/216,993; 62/216,995;  
62/217,002; 62/238,110; 62/238,112

(32) 2015.01.26; 2015.04.23; 2015.04.23;  
2015.04.23; 2015.04.23; 2015.04.23;  
2015.09.10; 2015.09.10; 2015.09.10;  
2015.09.10; 2015.10.06; 2015.10.06

(33) US

(43) 2018.04.30

(86) PCT/US2016/013305

(87) WO 2016/122889 2016.08.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КАЛЕЙДО БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.**  
(US)

(72) Изобретатель:  
**Фон Мальтцан Джеффри А.,  
Силверман Джаред, Яманака Ивонн  
Дж., Милвид Джек, Джеремия  
Джон М. (US)**

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

(56) US-A1-2004235789  
US-A1-2005004070  
WO-A1-2004052121  
WO-A1-2009082214

---

(57) Предложены гликановые терапевтические препараты, фармацевтические композиции и продукты лечебного питания с ними, которые могут содержать микронутриенты, полифенолы, пребиотики, пробиотики или другие агенты, а также способы их получения. Также предложены способы применения указанных гликановых терапевтических препаратов, например с целью регулирования состава микробиоты желудочно-кишечного тракта человека и лечения дисбиозов.

---

**B1**

**040533**

**040533**

**B1**

### Уровень техники

Микробиота человека является комплексной и отличается у каждого индивидуума в зависимости от влияния генетических факторов, возраста, пола, стрессовых ситуаций, питания и диеты. Микробиота выполняет множество функций и может влиять на физиологические процессы в организме хозяина. Изменение количества и видов микробиоты кишечника может изменить функцию среды и взаимодействие с организмом хозяина. В данной области техники известно ограниченное количество пробиотических бактерий, при этом сообщается о некоторых преимуществах для здоровья при приеме таких бактерий человеком. Некоторые пищевые продукты считаются "пребиотическими" продуктами, содержащими вещества, которые могут способствовать росту определенных бактерий, которые расцениваются как полезные для организма человека. Результаты клинических исследований этих веществ противоречивы относительно их эффективности, при этом влияние таких веществ на здоровье человека обычно описывается как скромное. Таким образом, существует потребность в разработке новых терапевтических способов, которые могут стимулировать благоприятные изменения микробиоты и улучшать здоровье человека.

#### Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам регулирования содержания бактериальных таксонов в желудочно-кишечной микробиоте субъекта-человека, при этом способ включает введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат, в количестве, эффективном для регулирования содержания бактериальных таксонов, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB, точки разветвления на остаток) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны включают, по меньшей мере, первый и второй бактериальные таксоны.

В некоторых вариантах реализации изобретения препарат содержит разветвленные олигосахариды. В некоторых вариантах реализации изобретения средняя степень разветвления в препарате (DB) составляет по меньшей мере 0,05 (например, по меньшей мере 0,1).

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более гликозидных связей независимо включают 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более, две или более или три или более гликозидных связей присутствуют как в альфа-, так и в бета-конфигурации.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахарида, выбранного из группы, состоящей из тетрозы, пентозы, гексозы и гептозы. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахарида, выбранного из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения, по меньшей мере, множество гликанов, например по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% (по весу или количеству), или по существу все гликаны в препарате не содержат повторяющейся единицы гликановых единиц больше предварительно выбранного эталонного уровня, например повторяющейся единицы 2, 3, 4 или больше гликановых единиц. В одном из вариантов реализации изобретения предварительно выбранный эталонный уровень составляет 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от общего количества гликановых единиц в гликане. В качестве примера, в одном варианте реализации изобретения, в гликанах, состоящих из 20 сахаридных мономеров, менее 50% этих 20 мономеров являются повторяющимися единицами 2 или 3 гликановых повторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат является синтетическим и не выделен из природного олигосахаридного или полисахаридного источника.

В некоторых вариантах реализации изобретения содержание бактериальных таксонов (например, каждого из первого и второго бактериальных таксонов) в микробиоте желудочно-кишечного тракта человека регулируется по меньшей мере на около 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750% или по меньшей мере на 1000%. В некоторых вариантах реализации изобретения регулирование включает повышение или снижение содержания бактериальных таксонов (например, каждого из первого и второго бактериальных таксонов) в микробиоте желудочно-кишечного тракта человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают комменсальные бактериальные таксоны. В других вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают патогенные бактериальные таксоны.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из Akkermansia, Alistipes, Anaerofilum, Bacteroides, Bilophila, Blautia, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Campylobacter, Candidatus, Citro-

bacter, Clostridium, Collinsella, Coprococcus, Desulfovibrio, Dialister, Dorea, Enterobacter, Enterococcus, Escherichia, Eubacterium, Faecalibacterium, Fusobacterium, Haemophilus, Klebsiella, Lachnospira, Lactobacillus, Odoribacter, Oscillospira, Parabacteroides, Peptococcus, Peptostreptococcus, Phascolarctobacterium, Porphyromonas, Portiera, Prevotella, Providencia, Pseudomonas, Roseburia, Ruminococcus, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Subdoligranulum, Vibrio и Yersinia. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из Prevotella, Akkermansia, Bacteroides, Clostridium (Erysipelotrichaceae), Clostridium (Clostridiaceae), Bifidobacterium, Aggregatibacter, Clostridium (Peptostreptococcaceae), Parabacteroides, Lactobacillus и Enterococcus. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из Akkermansia, Bacteroides, Bifidobacterium, Lactobacillus и Parabacteroides. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из Akkermansia и Blautia.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают таксоны, преобладающие в тонком кишечнике или толстом кишечнике. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны), преобладающие в тонком кишечнике, включают род, выбранный из группы, состоящей из Achromobacter, Agrobacterium, Blautia, Burkholderia, Coprococcus, Cryococcus, Enterococcus, Eubacterium, Eoldemania, Lactococcus, Mycobacterium, Pseudoramibacter, Ralstonia, Sphingomonas, Streptococcus и Turicibacter. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны), преобладающие в толстом кишечнике, включают род, выбранный из группы, состоящей из Anaerotruncus, Akkermansia, Bacteroides, Bilophila, Butyrivibrio, Odoribacter, Parabacteroides, Phascolarctobacterium, Prevotella и Ruminococcus.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит полифенольный препарат. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенольный препарат содержит растительный полифенол, выделенный из растительного сырья. В некоторых вариантах реализации изобретения растительное сырье включает чернику, клюкву, виноград, персик, сливу, гранат, сою, красное вино, черный чай или зеленый чай.

В некоторых вариантах реализации изобретения посредством регулирования содержания бактериальных таксонов (например, первого и второго бактериальных таксонов) лечат дисбиоз, например дисбиоз, описанный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения интенсивности симптома, обусловленного лекарственным средством или лечением, у субъекта-человека, при этом способ включает введение субъекту-человеку гликанового терапевтического препарата в количестве, эффективном для снижения интенсивности симптома, обусловленного лекарственным средством или лечением, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, выбирают из группы, состоящей из вздутия живота, диареи, рвоты, тошноты и запора. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, представляет собой диарею. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, представляет собой запор.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция снижает интенсивность симптомов, обусловленных лекарственным средством, при этом композицию вводят до, параллельно или после введения лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство представляет собой противодиабетическое лекарственное средство, иммунодепрессивное лекарственное средство, противомикробное лекарственное средство, химиотерапевтическое лекарственное средство, антипсихотическое лекарственное средство, лекарственное средство-ингибитор протонного насоса или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (НПВС). В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из ципрофлоксацина, клиндамицина, амоксициллина-клавуланата, цефиксима, эфалоспоринов, фторхинолонов, азитромицина, кларитромицина, эритромицина, тетрациклина, азитромицина, иринотекана (камптосара), 5-фторурацила, лейковорина, оксалиплатина, бортезомиба, иматиниба, леналидомида, имбрувики, ипилимумаба, пертузумаба, капецитабина, доцетаксела, лапатиниба, эрлотиниба, кармустина, этопозиды, арацитина, мелфалана, цитарабина, даунорубицина, амсакрина, митоксантрона, оланзапина, ранитидина, фамотидина, циметидина, омепразола, сукаралфата, эзомепразола, напроксена, диклофенака, индометацина, ибупрофена, кетопрофена, пироксикама, целекоксиба, нимесулида, аспирина, метформина, пароксетина, вальпроевой кислоты и клозапина.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция снижает интенсивность симптомов, обусловленных лечением, при этом лечение включает лучевую терапию или хирургическое вмешательство.

В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, проявляется у субъекта во время приема лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов повышает приверженность субъекта к предписанному режиму лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов повышает переносимость субъектом более высокой дозы лекарственного средства, необходимой для введения согласно предписанному режиму лечения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу регулирования микробного разнообразия в желудочно-кишечном тракте субъекта-человека, при этом способ включает введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат, в количестве, эффективном для регулирования микробного разнообразия, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB, точки разветвления на остаток) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1. В некоторых вариантах реализации изобретения микробное разнообразие включает бактериальное разнообразие. В некоторых вариантах реализации изобретения регулирование включает увеличение или уменьшение микробного разнообразия.

В некоторых вариантах реализации изобретения микробное разнообразие определяется (например, измеряется) посредством или выражается через индекс разнообразия Шеннона. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 5%. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 15%. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 0,3 log. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 0,6 log. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 1 log.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. В некоторых вариантах реализации изобретения повышают содержание по меньшей мере на 5% по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. В некоторых вариантах реализации изобретения повышают содержание по меньшей мере на 5% по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Parabacteroides*. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Parabacteroides*. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода *Akkermansia* и *Blautia*. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание обоих бактериальных родов *Akkermansia* и *Blautia*. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством регулирования микробного разнообразия лечат дисбиоз.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, имеющего для этого показания, при этом способ включает: а) идентификацию субъекта-человека, имеющего показания для лечения дисбиоза, и б) введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для лечения дисбиоза, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение аль-

фа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет инфекционное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения инфекционное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из инфекции *Clostridium difficile* (CDI); ванкомицин-резистентной энтерококковой инфекции (ВРЭ), инфекционного колита или колита, вызванного *C. difficile*. В некоторых вариантах реализации изобретения инфекционное заболевание, нарушение или состояние представляет собой диарею, выбранную из группы, состоящей из диареи, ассоциированной с *Clostridium difficile* (CDAD), антибиотико-ассоциированной диареи (АДЦ), антибиотико-индуцированной диареи, диареи путешественников (ДП), диареи у детей и (острой) инфекционной диареи.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние выбирают из группы, состоящей из ожирения, предиабета (резистентного к инсулину), диабета типа II, высокого уровня сахара в крови натощак (гипергликемия) и метаболического синдрома. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой фактор риска сердечно-сосудистой патологии, выбранный из группы, состоящей из высокого уровня холестерина в крови, высокого уровня ЛПНП, высокого кровяного давления (гипертензии), высокого уровня триглицеридов, низкого уровня ЛПВП.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет воспалительное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), язвенного колита (ЯК), болезни Крона (БК), воспаления кишечника и микроскопического колита. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из синдрома раздраженного кишечника (СРК), запора, диареи, нарушения пищеварения и неязвенной диспепсии.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из аутоиммунного артрита, диабета типа I, рассеянного склероза и псориаза. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет аллергию. В некоторых вариантах реализации изобретения аллергия включает астму или атопический дерматит.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет неврологическое заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения неврологическое заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из аутизма, гипераммониемии и печеночной энцефалопатии.

В некоторых вариантах реализации лечение дополнительно включает введение второго лекарственного средства или фармацевтического агента. В некоторых вариантах реализации изобретения второе лекарственное средство или фармацевтический агент является лекарственным средством или агентом для стандартного лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекты лечения фармацевтической композицией, содержащей гликановый терапевтический препарат и второе лекарственное средство или фармацевтический агент, являются аддитивными. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекты лечения фармацевтической композицией, содержащей гликановый терапевтический препарат и второе лекарственное средство или фармацевтический агент, являются синергическими.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят ежедневно. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят каждый день в течение предварительно установленного количества дней (период лечения). В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет от около 1 дня до около 30 дней. В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет от около 1 месяца до около 6 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводят композицию в течение одного периода лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводят композицию в течение более чем одного периода лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения посредством лечения дисбиоза лечат субъекта-человека.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу регулирования функционального пути микробиоты желудочно-кишечного тракта субъекта, включающий гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для регулирования функционального пути, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь регулирует образование

микробиотой противомикробного агента, вторичной желчной кислоты, короткоцепочечной жирной кислоты, сидерофора или метаболита, указанного в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения противомикробный агент включает бактериоцин или перекись водорода. В некоторых вариантах реализации изобретения короткоцепочечная жирная кислота включает формиат, бутират, ацетат, пропионат или валерат. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболит включает 2-гидроксиизобутират, 3-гидроксиизовалерат, 3-метилкротонилглицин, 3-метилкротонилглицин, аллантоин, бетаин, формиат, маннит, п-крезол глюкуронид, фенилацетилглицин, саркозин, таурин, уксусную кислоту, ацетилальдегид, аскорбиновую кислоту, бутанидин, масляную кислоту, дезоксихоловую кислоту, этилфенилсульфат, муравьиную кислоту, индол, изомасляную кислоту, изовалериановую кислоту, пропионовую кислоту, серотонин, янтарную кислоту, сукцинат, ТМАО, триптофан, валериановую кислоту, урсодезоксихоловую кислоту, лактат, молочную кислоту или перекись водорода.

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь регулирует уровень воспалительного или иммуномодулирующего цитокина у субъекта-человека. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительный и иммуномодулирующий цитокин включает интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, фактор некроза опухоли (TNF), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 5 (CCL5, также известный как RANTES), трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) или интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ).

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь повышает уровень короткоцепочечной жирной кислоты у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты индуцирует генерацию регуляторных Т (Treg) клеток у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты снижает уровень проницаемости эндотоксина в кишечник или плазму субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты уменьшает воспалительную реакцию у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения короткоцепочечную жирную кислоту получают по меньшей мере из одного бактериального вида семейства Ruminococcaceae и/или Lachnospiraceae.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает ожирением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики рецидива инфекции, вызванной *Clostridium difficile*, у субъекта-человека, ранее получавшего лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*, при этом способ включает введение гликанового терапевтического препарата в количестве, эффективном для профилактики рецидива, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения рецидив включает повторение одного или более симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной *C. difficile*. В некоторых вариантах реализации изобретения рецидив возникает во время или после применения терапии первой линии или стандартного режима лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*, представляет собой антибиотик. В некоторых вариантах реализации изобретения антибиотик выбирают из группы, состоящей из ванкомицина, метронидазола и фидаксомицина. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят параллельно или после введения лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят в комбинации со вторым лекарственным средством или лечением. В некоторых вариантах реализации изобретения второе лекарственное средство или лечение включает антибиотик. В некоторых вариантах реализации изобретения антибиотик выбирают из группы, состоящей из ванкомицина, метронидазола и фидаксомицина.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение композиции приводит к снижению тяжести симптома, ассоциированного с инфекцией *C. difficile* у субъекта, но не элиминирует популяцию *C. difficile* в организме субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения введение композиции приводит к снижению тяжести симптома, ассоциированного с инфекцией *C. difficile* у субъекта, но не изменяет уровень популяции *C. difficile* в организме субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, при этом способ включает а) получение препарата, содержащего комбинацию синтетических гликанов; б) достижение значения одной или более следующих характеристик препарата; в) степень полимеризации (DP), г) среднюю степень разветвления (DB), д) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям и е) приготовление препарата в виде фармацевтической композиции, если выполняется один или более из следующих критериев: i) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют DP по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц, ii) средняя степень разветвления (DB) гликанов в

препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает а) достижение значения одной или более следующих характеристик препарата: i) идентичность гликановых единиц, ii) соотношение гликановых единиц и б) приготовление препарата в виде фармацевтической композиции, если iii) соотношение гликановых единиц в препарате примерно такое же, как соотношение исходных гликановых единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает б) достижение значения любой одной или обеих дополнительных характеристик препарата: iv) уровень роста бактерий в среде, дополненной препаратом, комменсальных штаммов, выбранных из группы, состоящей из *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Prevotella copri* DSM 18205, *Bacteroides thetaiotamicron* ATCC 29741, *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838, *Clostridium scindens* ATCC 35704, *Ruminococcus obeum* ATCC 29714, *Clostridium nexile* ATCC 27757 и *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503; v) уровень бактериального роста в среде, дополненной препаратом, патогенных штаммов, выбранных из группы, состоящей из *Clostridium difficile* ATCC ВАА-1382, *Clostridium difficile* ATCC 43255, *Enterococcus faecium* ATCC 700221 и *Salmonella enterica* ATCC 27869; и с) приготовление препарата в форме фармацевтической композиции, если соблюден один или оба из следующих критериев: vi) стимуляция роста по меньшей мере 5 комменсальных штаммов средой, дополненной препаратом, vii) стимуляция роста не более чем 2 патогенных штаммов средой, дополненной препаратом. В некоторых вариантах реализации изобретения этап (б) может выполняться до или параллельно с другим этапом процесса.

В некоторых вариантах реализации изобретения этап приготовления препарата в форме фармацевтической композиции включает один или более процессов: i) удаление нежелательных компонентов из препарата, ii) уменьшение объема препарата, iii) стерилизация препарата, iv) смешивание препарата с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, v) смешивание препарата со вторым лекарственным средством или фармацевтическим агентом, vi) приготовление препарата в форме водного раствора или сиропа, vii) приготовление препарата в форме таблетки или пилюли и viii) приготовление препарата в форме капсулы.

В некоторых вариантах реализации изобретения этап приготовления препарата в форме фармацевтической композиции включает один или более процессов: ix) упаковка препарата, x) маркировка упакованного препарата и xi) продажа или предложение для продажи упакованного и маркированного препарата.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, включающему (i) получение терапевтического гликанового препарата, содержащего по меньшей мере одну гликановую единицу, выбранную из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы, (ii) определение того, является ли предварительно выбранный пик ЯМР или группа пиков ЯМР ассоциированным(ой) с гликановым препаратом, и (iii) если присутствует предварительно выбранный пик или группа пиков, приготовление препарата в форме фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения пик представляет собой пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC ЯМР. В некоторых вариантах реализации изобретения определение включает достижение значения идентичности пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC или группы пиков, ассоциированных с препаратом, и при наличии предварительно выбранного пика, приготовление препарата в форме фармацевтической композиции.

В некоторых вариантах реализации изобретения i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$ -сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1, 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 9 6,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,18, 93,0; 5,10, 94,3; 5,34, 98,2; 5,31, 99,6; 5,11, 100,8; 4,91, 99,4; 4,56, 97,3; 4,64, 104,2; 4,54, 103,4; 4,44, 102,6; 4,44, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и

$^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

В некоторых вариантах реализации изобретения i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1; 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 93,0; 5,10, 94,3; 5,34, 98,2; 5,31, 99,6; 5,11, 100,8; 4,91, 99,4; 4,56, 97,3; 4,64, 104,2; 4,54, 103,4; 4,44, 102,6; 4,44, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат, содержащий комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) составляет по меньшей мере 0,01, при этом i) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее 30 единиц гликанов, ii) гликановый препарат содержит как альфа-, так и бета-гликозидные связи, iii) по меньшей мере одна из гликозидных связей, присутствующих в гликанах препарата, содержит 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь, и iv) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более гликозидных связей независимо включают 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более, две или более или три или более гликозидных связей присутствуют как в альфа-, так и в бета-конфигурации.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахарида, выбранного из группы, состоящей из тетрозы, пентозы, гексозы и гептозы. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахарида, выбранного из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере множество гликанов, например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% (по весу или количеству) или по существу все гликаны в препарате не содержат повторяющейся единицы гликановых единиц больше предварительно выбранного эталонного уровня, например повторяющейся единицы 2, 3, 4 или больше гликановых единиц. В одном из вариантов реализации изобретения предварительно выбранный эталонный уровень составляет 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от общего количества гликановых единиц в гликане. В качестве примера в одном варианте реализации изобретения в гликанах, состоящих из 20 сахаридных мономеров, менее 50% этих 20 мономеров являются повторяющимися единицами 2 или 3 гликановых повторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат является синтетическим и не выделен из природного олигосахаридного или полисахаридного источника.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит полифенольный препарат. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит препарат пробиотических бактерий. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит лекарственное средство или терапевтический агент. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.



В некоторых вариантах реализации изобретения композицию готовят в виде единичной лекарственной формы. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма предназначена для перорального введения. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма предназначена для растворения в водном растворе и перорального введения в виде напитка, сиропа, раствора или суспензии.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичную лекарственную форму готовят как систему с замедленным высвобождением или систему, контролируруемую по времени. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма предназначена для высвобождения гликанового терапевтического препарата в определенной области ЖКТ. В некоторых вариантах реализации изобретения определенная область ЖКТ включает желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник или ободочную кишку.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция регулирует содержание рода бактерий, присутствующего в ЖКТ. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция регулирует содержание рода бактерий, присутствующего в тонком или в толстом кишечнике, либо и в тонком и в толстом кишечнике. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция регулирует содержание рода бактерий, преобладающего в тонком кишечнике и выбранного из группы, состоящей из рода *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Blautia*, *Burkholderia*, *Coprococcus*, *Cryocola*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Holdemania*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudoramibacter*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Streptococcus* и *Turicibacter*. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция регулирует содержание рода бактерий, преобладающего в толстом кишечнике и выбранного из группы, состоящей из рода *Anaerotruncus*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bilophila*, *Butyricimonas*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Prevotella* и *Ruminococcus*.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,1 до около 5 мл терапевтического гликанового препарата и предназначена для перорального введения и высвобождения терапевтического гликанового препарата в определенной области ЖКТ. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,1 до около 100 мг терапевтического гликанового препарата и предназначена для перорального введения и высвобождения терапевтического гликанового препарата в определенной области ЖКТ.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,1 до около 5 мл терапевтического гликанового препарата и предназначена для перорального введения, при этом композиция регулирует содержание рода бактерий, выбранного из группы, состоящей из *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Anaerotruncus*, *Phascolarctobacterium*, *Ruminococcus*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Cryocola*, *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Eoldemania*, *Pseudoramibacter*, *Eubacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia* и *Ralstonia*.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,1 до около 100 мг терапевтического гликанового препарата и предназначена для перорального введения, при этом композиция регулирует содержание рода бактерий, выбранного из группы, состоящей из *Bacteroides*, *Butyricimonas*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Anaerotruncus*, *Phascolarctobacterium*, *Ruminococcus*, *Bilophila*, *Akkermansia*, *Cryocola*, *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Blautia*, *Coprococcus*, *Holdemania*, *Pseudoramibacter*, *Eubacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia* и *Ralstonia*.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предлагается фармацевтический набор, содержащий а) гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для регулирования содержания бактериальных таксонов, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01; ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее 30 гликановых единиц; и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет от около 1:1 до около 5:1, б) по меньшей мере, второй компонент, выбранный из группы, состоящей из препарата полифенолов, препарата пробиотических бактерий, лекарственного средства или терапевтического агента и диетического компонента, с) инструктивный материал и d) упаковку.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтический гликановый препарат, содержащий по меньшей мере одну гликановую единицу, выбранную из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы, при этом препарат содержит гликановую единицу, ассоциированную с одним или более из следующих пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1; 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соот-

ветствующий пик; iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 93,0; 5,10, 94,3; 5,34, 98,2; 5,31, 99,6; 5,11, 100,8; 4,91, 99,4; 4,56, 97,3; 4,64, 104,2; 4,54, 103,4; 4,44, 102,6; 4,44, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере один из пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит терапевтический гликановый препарат, содержащий по меньшей мере одну гликановую единицу, выбранную из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы, при этом препарат содержит гликановую единицу, ассоциированную с одним или более из следующих пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC: i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1; 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик; vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения с целью регулирования содержания бактериальных таксонов в желудочно-кишечной микробиоте субъекта-человека, при этом указанная фармацевтическая композиция содержит гликановый терапевтический препарат, в количестве, эффективном для регулирования содержания бактериальных таксонов, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB, точки разветвления на остаток) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны включают, по меньшей мере, первый и второй бактериальные таксоны.

В некоторых вариантах реализации изобретения препарат содержит разветвленные олигосахариды. В некоторых вариантах реализации изобретения средняя степень разветвления в препарате (DB) составляет по меньшей мере 0,05 (например, по меньшей мере 0,1).

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или более гликозидных связей независимо включают 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более, две или более или три или более гликозидных связей присутствуют как в альфа-, так и в бета-конфигурации.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахаридов, выбранных из группы, состоящей из тетрозы, пентозы, гексозы и гептозы. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или более моносахаридов, выбранных из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере множество гликанов, например по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% (по весу или количеству), или по существу все гликаны в препарате не содержат повторяющейся единицы гликановых единиц больше предварительно выбранного эталонного уровня, например повторяющейся единицы 2, 3, 4 или больше гликановых единиц. В одном из вариантов реализации изобретения предварительно выбранный эталонный уровень составляет 10, 20, 30, 40, 50 или 60% от общего количества гликановых единиц в гликане. В качестве примера, в одном варианте реализации изобретения в гликанах, состоящих из 20 сахаридных мономеров, менее 50% этих мономеров являются повторяющимися единицами 2 или 3 гликановых повторов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат является синтетическим и не выделен из природного олигосахаридного или полисахаридного источника.

В некоторых вариантах реализации изобретения содержание бактериальных таксонов (например, каждого из первого и второго бактериальных таксонов) в микробиоте желудочно-кишечного тракта человека регулируется по меньшей мере на около 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750% или по меньшей мере на 1000%. В некоторых вариантах реализации изобретения регулирование включает повышение или снижение содержания бактериальных таксонов (например, каждого из первого и второго бактериальных таксонов) в микробиоте желудочно-кишечного тракта человека.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают комменсальные бактериальные таксоны. В других вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают патогенные бактериальные таксоны.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из *Akkermansia*, *Alistipes*, *Anaerofilum*, *Bacteroides*, *Bilophila*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Campylobacter*, *Candidatus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Desulfovibrio*, *Dialister*, *Dorea*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, *Odoribacter*, *Oscillospira*, *Parabacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Phascolarctobacterium*, *Porphyromonas*, *Portiera*, *Prevotella*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Subdoligranulum*, *Vibrio* и *Yersinia*. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Parabacteroides*. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают род, выбранный из группы, состоящей из *Akkermansia* и *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны) включают таксоны, преобладающие в тонком кишечнике или толстом кишечнике. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны), преобладающие в тонком кишечнике, включают род, выбранный из группы, состоящей из *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Blautia*, *Burkholderia*, *Coprococcus*, *Cryococcus*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Eoldemania*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudoramibacter*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Streptococcus* и *Turicibacter*. В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны (например, первый и второй бактериальные таксоны), преобладающие в толстом кишечнике, включают род, выбранный из группы, состоящей из *Anaerotruncus*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bilophila*, *Butyrivibrio*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Prevotella* и *Ruminococcus*.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция дополнительно содержит полифенольный препарат. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенольный препарат содержит растительный полифенол, выделенный из растительного сырья. В некоторых вариантах реализации изобретения растительное сырье включает чернику, клюкву, виноград, персик, сливу, гранат, сою, красное вино, черный чай или зеленый чай.

В некоторых вариантах реализации изобретения посредством регулирования содержания бактериальных таксонов (например, первого и второго бактериальных таксонов) лечат дисбиоз, например дисбиоз, описанный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения с целью снижения интенсивности симптома, обусловленного лекарственным средством или лечени-

ем, у субъекта-человека, при этом способ включает введение субъекту-человеку гликанового терапевтического препарата в количестве, эффективном для снижения интенсивности симптома, обусловленного лекарственным средством или лечением, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, выбирают из группы, состоящей из вздутия живота, диареи, рвоты, тошноты и запора. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, представляет собой диарею. В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, представляет собой запор.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция снижает интенсивность симптомов, обусловленных лекарственным средством, при этом композицию вводят до, параллельно или после введения лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство представляет собой противодиабетическое лекарственное средство, иммунодепрессивное лекарственное средство, противомикробное лекарственное средство, химиотерапевтическое лекарственное средство, антипсихотическое лекарственное средство, лекарственное средство-ингибитор протонного насоса или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (НПВС). В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство выбирают из группы, состоящей из ципрофлоксацина, клиндамицина, амоксициллина-клавуланата, цефиксима, эфалоспоринов, фторхинолонов, азитромицина, кларитромицина, эритромицина, тетрациклина, азитромицина, иринотекана (камптосара), 5-фторурацила, лейковорина, оксалиплатина, бортезомиба, иматиниба, леналидомида, имбрувики, ипилимумаба, пертузумаба, капецитабина, доцетаксела, лапатиниба, эрлотиниба, кармустина, этопозида, арацитина, мелфалана, цитарабина, даунорубицина, амсакрина, митоксантрона, оланзапина, ранитидина, фамотидина, циметидина, омепразола, сукральфата, эзомепразола, напроксена, диклофенака, индометацина, ибупрофена, кетопрофена, пироксикама, целекоксиба, нимесулида, аспирина, метформина, пароксетина, вальпроевой кислоты и клозапина.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция снижает интенсивность симптомов, обусловленных лечением, при этом лечение включает лучевую терапию или хирургическое вмешательство.

В некоторых вариантах реализации изобретения симптом, обусловленный лекарственным средством или лечением, проявляется у субъекта во время приема лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов повышает приверженность субъекта к предписанному режиму лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов повышает переносимость субъектом более высокой дозы лекарственного средства, необходимой для введения согласно предписанному режиму лечения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения с целью регулирования микробного разнообразия в желудочно-кишечном тракте субъекта-человека, при этом способ включает введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат, в количестве, эффективном для регулирования микробного разнообразия, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB, точки разветвления на остаток) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1. В некоторых вариантах реализации изобретения микробное разнообразие включает бактериальное разнообразие. В некоторых вариантах реализации изобретения регулирование включает увеличение или уменьшение микробного разнообразия.

В некоторых вариантах реализации изобретения микробное разнообразие определяется (например, измеряется) посредством или выражается через индекс разнообразия Шеннона. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 5%. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 15%. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 0,3 log. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 0,6 log. В некоторых вариантах реализации изобретения индекс разнообразия Шеннона повышается или снижается по меньшей мере на около 1 log.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium*

(Peptostreptococcaceae), Parabacteroides, Lactobacillus и Enterococcus. В некоторых вариантах реализации изобретения повышают содержание по меньшей мере на 5% по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода Prevotella, Akkermansia, Bacteroides, Clostridium (Erysipelotrichaceae), Clostridium (Clostridiaceae), Bifidobacterium, Aggregatibacter, Clostridium (Peptostreptococcaceae), Parabacteroides, Lactobacillus и Enterococcus.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода Prevotella, Akkermansia, Bacteroides, Clostridium (Erysipelotrichaceae), Clostridium (Clostridiaceae), Bifidobacterium, Aggregatibacter, Clostridium (Peptostreptococcaceae), Parabacteroides, Lactobacillus и Enterococcus. В некоторых вариантах реализации изобретения повышают содержание по меньшей мере на 5% по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода Prevotella, Akkermansia, Bacteroides, Clostridium (Erysipelotrichaceae), Clostridium (Clostridiaceae), Bifidobacterium, Aggregatibacter, Clostridium (Peptostreptococcaceae), Parabacteroides, Lactobacillus и Enterococcus.

В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода Akkermansia, Bacteroides, Bifidobacterium, Lactobacillus и Parabacteroides. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере двух бактериальных таксонов, выбранных из группы, состоящей из рода Akkermansia, Bacteroides, Bifidobacterium, Lactobacillus и Parabacteroides. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание по меньшей мере одного бактериального таксона, выбранного из группы, состоящей из рода Akkermansia и Blautia. В некоторых вариантах реализации изобретения регулируют содержание обоих бактериальных родов Akkermansia и Blautia. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством регулирования микробного разнообразия лечат дисбиоз.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта-человека, имеющего для этого показания, при этом способ включает: а) идентификацию субъекта-человека, имеющего показания для лечения дисбиоза, и б) введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для лечения дисбиоза, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет инфекционное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения инфекционное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из инфекции Clostridium difficile (CDI); ванкомицин-резистентной энтерококковой инфекции (ВРЭ), инфекционного колита или колита, вызванного C. difficile. В некоторых вариантах реализации изобретения инфекционное заболевание, нарушение или состояние представляет собой диарею, выбранную из группы, состоящей из диареи, ассоциированной с Clostridium difficile (CDAD), антибиотико-ассоциированной диареи (AAD), антибиотико-индуцированной диареи, диареи путешественников (ДП), диареи у детей и (острой) инфекционной диареи.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние выбирают из группы, состоящей из ожирения, предиабета (резистентного к инсулину), диабета типа II, высокого уровня сахара в крови натощак (гипергликемия) и метаболического синдрома. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболическое заболевание, нарушение или патологическое состояние представляет собой фактор риска сердечно-сосудистой патологии, выбранный из группы, состоящей из высокого уровня холестерина в крови, высокого уровня ЛПНП, высокого кровяного давления (гипертензии), высокого уровня триглицеридов, низкого уровня ЛПВП.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет воспалительное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), язвенного колита (ЯК), болезни Крона (БК), воспаления кишечника и микроскопического колита. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из синдрома раздраженного кишечника (СРК), запора, диареи, нарушения пищеварения и неязвенной диспепсии.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из аутоиммунного артрита, диабета типа I, рассеянного склероза и псориаза. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет аллергию. В некоторых вариантах реализации изобретения аллергия включает астму или атопический дерматит.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект-человек имеет неврологическое заболевание, нарушение или состояние. В некоторых вариантах реализации изобретения неврологическое заболевание, нарушение или состояние выбирают из группы, состоящей из аутизма, гипераммониемии и печеночной энцефалопатии.

В некоторых вариантах реализации лечение дополнительно включает введение второго лекарственного средства или фармацевтического агента. В некоторых вариантах реализации изобретения второе лекарственное средство или фармацевтический агент является лекарственным средством или агентом для стандартного лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекты лечения фармацевтической композицией, содержащей гликановый терапевтический препарат и второе лекарственное средство или фармацевтический агент, являются аддитивными. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекты лечения фармацевтической композицией, содержащей гликановый терапевтический препарат и второе лекарственное средство или фармацевтический агент, являются синергическими.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят ежедневно. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят каждый день в течение предварительно установленного количества дней (период лечения). В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет от около 1 дня до около 30 дней. В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет от около 1 месяца до около 6 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводят композицию в течение одного периода лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту вводят композицию в течение более чем одного периода лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения посредством лечения дисбиоза лечат субъекта-человека.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в регулировании функционального пути микробиоты желудочно-кишечного тракта субъекта, включающий гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для регулирования функционального пути, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь регулирует образование микробиотой противомикробного агента, вторичной желчной кислоты, короткоцепочечной жирной кислоты, сидерофора или метаболита, указанного в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения противомикробный агент включает бактериоцин или перекись водорода. В некоторых вариантах реализации изобретения короткоцепочечная жирная кислота включает формиат, бутират, ацетат, пропионат или валерат. В некоторых вариантах реализации изобретения метаболит включает 2-гидроксиизобутират, 3-гидроксиизовалерат, 3-метилкротонилглицин, 3-метилкротонилглицин, аллантоин, бетаин, формиат, маннит, п-крезол глюкуроноид, фенилацетилглицин, саркозин, таурин, уксусную кислоту, ацетиальдегид, аскорбиновую кислоту, бутанидин, масляную кислоту, дезоксихоловую кислоту, этилфенилсульфат, муравьиную кислоту, индол, изомасляную кислоту, изовалериановую кислоту, пропионовую кислоту, серотонин, янтарную кислоту, сукцинат, ТМАО, триптофан, валериановую кислоту, урсодезоксихоловую кислоту, лактат, молочную кислоту или перекись водорода.

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь регулирует уровень воспалительного или иммуномодулирующего цитокина у субъекта-человека. В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительный и иммуномодулирующий цитокин включает интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, фактор некроза опухоли (TNF), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 5 (CCL5, также известный как RANTES), трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) или интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ).

В некоторых вариантах реализации изобретения функциональный путь повышает уровень короткоцепочечной жирной кислоты у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты индуцирует генерацию регуляторных Т (Treg) клеток у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты снижает уровень проницаемости эндотоксина в кишечник или плазму субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенный уровень короткоцепочечной жирной кислоты уменьшает воспалительную реакцию у субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения короткоцепочечную жирную кислоту получают по меньшей мере из одного бактериального вида семейства Ruminococcaceae и/или Lachnospiraceae.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает ожирением.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения с целью профилактики рецидива инфекции, вызванной *Clostridium difficile*, у субъекта-человека, ранее получавшего лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*, при этом указан-

ная композиция содержит гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для профилактики рецидива, при этом i) гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию разветвленных гликанов, причем средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01 (например, по меньшей мере 0,05 или по меньшей мере 0,1), ii) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц и iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет в целом от около 1:1 до около 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения рецидив включает повторение одного или более симптомов, ассоциированных с инфекцией, вызванной *C. difficile*. В некоторых вариантах реализации изобретения рецидив возникает во время или после применения терапии первой линии или стандартного режима лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственное средство для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*, представляет собой антибиотик. В некоторых вариантах реализации изобретения антибиотик выбирают из группы, состоящей из ванкомицина, метронидазола и фидаксомицина. В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят параллельно или после введения лекарственного средства для лечения инфекции, вызванной *C. difficile*.

В некоторых вариантах реализации изобретения композицию вводят в комбинации со вторым лекарственным средством или лечением. В некоторых вариантах реализации изобретения второе лекарственное средство или лечение включает антибиотик. В некоторых вариантах реализации изобретения антибиотик выбирают из группы, состоящей из ванкомицина, метронидазола и фидаксомицина.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение композиции приводит к снижению тяжести симптома, ассоциированного с инфекцией *C. difficile* у субъекта, но не элиминирует популяцию *C. difficile* в организме субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения введение композиции приводит к снижению тяжести симптома, ассоциированного с инфекцией *C. difficile* у субъекта, но не изменяет уровень популяции *C. difficile* в организме субъекта.

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Репрезентативная кривая эксклюзионной хроматографии (ЭХ) образца glu100 между 16 и 20,5 мин, демонстрирующая средний молекулярный вес (МВ) и МВ при 10% максимальной абсорбции как в начале, так и в конце кривой.

Фиг. 2. Репрезентативная аномерная область  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектра образца glu100, демонстрирующая распределение сигнала альфа- и бета-гликозидных связей.

Фиг. 3. Репрезентативная аномерная область  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектров образцов а) glu100, б) glu50gal50 и в) gal100, демонстрирующих аддитивный эффект характерных пиков.

Фиг. 4. Репрезентативные ГХ хроматограммы трех типичных перметилированных и гидролизованных гликанов, демонстрирующие распределение региохимии по заданному сравнению с известными стандартами.

Фиг. 5. Репрезентативное частичное распределение пиков в аномерной области  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектра образца glu100, демонстрирующее разделение между альфа- и бета-изомерами по оси  $^1\text{H}$ , с альфа-изомерами в нижней части ( $^1\text{H} > 4,8$  ч./млн в этом случае) и бета-изомерами в верхней части ( $^1\text{H} < 4,8$  ч./млн в этом случае). Кроме того, концевые и внутренние сахара можно различать по оси  $^{13}\text{C}$  с концевыми сахарами в верхней части ( $^{13}\text{C} < 94$  ч./млн для альфа-изомеров и  $^{13}\text{C} < 100$  ч./млн для бета-изомеров в этом случае) и внутренними сахарами в нижней части ( $^{13}\text{C} > 94$  ч./млн для альфа-изомеров и  $^{13}\text{C} > 100$  ч./млн для бета-изомеров в этом случае).

Фиг. 6. Часть типового катализатора с полимерным остовом и боковыми цепями проиллюстрирована на фиг. 6а. Часть типового катализатора, в котором боковая цепь с кислой группой соединена с полимерным остовом с помощью линкера и в котором боковая цепь с катионной группой соединена непосредственно с полимерным остовом, проиллюстрирована на фиг. 6б.

Фиг. 7. Расстояния рассчитывали для каждой мыши между образцами микробиот, отобранными за 1 день до и через 5 дней после введения гликанов или воды, как описано в примере 10. Чем больше расстояние, тем большее изменение в микробной композиции.

Фиг. 8. Индекс разнообразия Шеннона. Для определения значимости наблюдаемых различий, как описано в примере 10, использовали парный тест Уилкоксона.

Фиг. 9. Относительное содержание последовательностей, относящихся к роду *Akkermansia*, типу *Verrucomicrobia*, проиллюстрировано на фиг. 9а. Относительное содержание последовательностей, относящихся к роду *Blautia*, типу *Firmicutes*, проиллюстрировано на фиг. 9б.

Фиг. 10. Кривая выживания Каплана-Мейера после инфицирования *C. difficile* в зависимости от группы лечения для всех групп, получающих короткое лечение, как описано в примере 12.

Фиг. 11. Изменение веса в течение 10 дней после инфицирования *C. difficile* для всех групп, получающих короткое лечение (среднее  $\pm$  СО), как описано в примере 12.

Фиг. 12. Изменение относительного содержания бактерий в зависимости от рода, регистрируемое непосредственно от начала лечения гликанами и инфицирования *C. difficile* (день -1) до непосредственно 6 дня лечения гликанами и 4 дня лечения ванкомицином (день 6), как описано в примере 12. Приведены

только те роды, относительное содержание которых изменялось в среднем на 5%. Только 1 клетка в группе лечения водой выжила на день 6.

Фиг. 13. Расчетное относительное содержание биосинтезированных вторичных желчных кислот на день 6, непосредственно после лечения гликанами или ванкомицином, как описано в примере 12. Незакрашенные кружки представляют собой клетки, а черные кружки представляют собой среднее значение с  $\pm$ СО инфекции *C. difficile*, возникшей в день 0, при этом показаны только клетки с животными, выжившими при инфицировании (n=4 клетки в день 0). (\*P<0,05, критерий суммы рангов Уилкоксона).

Фиг. 14. Логарифмическое изменения альфа-разнообразия (по измерению с помощью индекса Шеннона) от дня -1 непосредственно перед лечением гликанами при инфицировании *C. difficile* до дня 6 после лечения гликанами или ванкомицином, как описано в примере 12. Точки представляют собой альфа-разнообразие одной клетки, а линии представляют медианное альфа-разнообразие.

Фиг. 15. Процентное изменение веса мышей по сравнению с днем 0 исследования (среднее  $\pm$ СО). 2,5% DSS вводили от дня 0 до дня 5 во всех группах, как описано в примере 13. Акациевое волокно, glu100 и man52glu29gal19 вводили от дня 7 до дня 14 в группах лечения.

Фиг. 16. Оценка воспаления ободочной кишки на день 14 исследования посредством эндоскопического балла, как описано в примере 13. Горизонтальные полосы представляют собой медианный эндоскопический балл. \*\*P<0,01, \*P<0,05; критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони для нескольких гипотез.

Фиг. 17. Наклоны графика изменения % веса от дня 0 до дня 41 у мышей, получавших glu100 (0,3%, фиг. 17a), man52glu29gal19 (1%, фиг. 17b) и воду (оба графика), как описано в примере 14. Наклоны графиков у группах, получавших glu100- и man52glu29gal19, значительно отличались от наклона графика в группе мышей, получавших воду (P<0,001; линейная модель смешанных эффектов со значительной связью между днем исследования и изменением веса; линии регрессии показаны с затенением, представляющим  $\pm$  стандартная ошибка наклона). Представлены индивидуальные % изменения веса животных (треугольники или круги).

Фиг. 18. Уровень сахара в крови на день 39 у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, диету с низким содержанием жиров или диету с высоким содержанием жиров и лечение glu100 (0,3%) или man52glu29gal19 (1%), как описано в примере 14. Верхняя и нижняя оси на ячейке соответствуют первому и третьему квартилям, а линии, отходящие вверх и вниз, простираются до самого высокого и самого низкого значения, которое находится в пределах 1,5 интервала междуквартильного диапазона или в пределах расстояния между первым и третьим квартилями. Мышам с помощью желудочного зонда вводили 2 г/кг (при мощности дозы 5 мл/кг) глюкозы в воде и оценивали уровень глюкозы в крови через 2 ч после введения дозы. Единицы по оси Y представляют собой мг/дл глюкозы.

Фиг. 19. Вес эпидидимального жира на день 41 в процентах от общего веса тела у мышей, получающих диету с высоким содержанием жиров, мышей, получающих диету с низким содержанием жиров, и мышей, получающих диету с высоким содержанием жиров и лечение man52glu29gal19 (1%), fos (0,3%, 1%) и glu100 (0,3%), как описано в примере 14.

#### Подробное описание сущности изобретения

У людей микробиота желудочно-кишечного тракта в значительной степени стабильна, если состояние здоровья организма хозяина удовлетворительное; однако экосистема микробиоты желудочно-кишечного тракта может изменяться в зависимости от возраста, заболеваний хозяина, включая инфицирование патогенами, стресса, диеты и приема медикаментозного лечения, и тем самым переходить в состояние дисбиоза. Настоящее изобретение относится к гликановым терапевтическим препаратам и их фармацевтическим композициям (а также продуктам лечебного питания или диетическим добавкам), а также к связанным с ними способам, которые, как было установлено, являются эффективными в лечении дисбиоза. Неожиданно было обнаружено, что гликановые препараты и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, оказывают терапевтическое воздействие на ряд заболеваний, нарушений или патологических состояний, которые могут быть ассоциированы с дисбиозом. Не желая быть связанными теорией, считается, что препараты гликановой терапии и фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут действовать путем регулирования содержания микробных организмов в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) организма человека-хозяина, тем самым вызывая желаемый физиологический эффект, например улучшение состояния здоровья организма хозяина. Гликановые терапевтические средства могут селективно перевариваться определенными микробными компонентами, тем самым индуцируя специфические изменения как состава, так и/или активности (например, функции) микробиоты в ЖКТ, что улучшает состояние здоровья и самочувствие хозяина. Гликановые терапевтические средства могут действовать как адаптированные, точно налаженные регуляторы роста резидентной или приобретенной микробиоты, например усиливая или восстанавливая рост полезных бактерий и/или подавляя рост патогенных микроорганизмов или микроорганизмов, которые ассоциированы с заболеванием или патологическим состоянием.

Описанные в настоящем документе гликановые терапевтические средства могут опосредовать сдвиги в содержании важных таксонов микробиоты желудочно-кишечного тракта (и ассоциированных с



ними функциональных или геномных сдвигов), также предлагаются способы, посредством которых гликановые терапевтические средства могут изменять состав или функцию микробиоты желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах реализации изобретения сдвиги микробного состава позволяют вводить, регулировать, повышать, снижать или стимулировать множественные важные свойства микробиоты. В некоторых вариантах реализации изобретения регулирование включает изменения i) устойчивости экосистем к нарушениям (или дисбиозам), ii) разнообразия микробиот, iii) продукции метаболитов, iv) колонизацию патобионтами и патогенами и v) воздействия на метаболизм хозяина, иммунную и другие функции или любые их комбинации.

В настоящем документе описаны способы, композиции и наборы, пригодные для лечения и/или профилактики дисбиоза и заболеваний, возможно ассоциированных с дисбиозом микробиоты желудочно-кишечного тракта, и/или способы, пригодные для снижения интенсивности симптомов указанных патологических состояний у субъекта, имеющего для этого показания, и для улучшения общего состояния здоровья хозяина. Далее в настоящем документе описаны лекарственные формы для гликановых терапевтических средств. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственные формы предназначены для конкретной доставки в конкретные области ЖКТ, такие как, например, тонкий или толстый кишечник. Посредством введения фармацевтических композиций, продуктов лечебного питания или диетических добавок, содержащих гликановые препараты, можно лечить или предотвращать дисбиоз, например патологические состояния, при которых нарушается благоприятная бактериальная микробиота, и при которых проявляется дисбиоз микробиоты. В некоторых вариантах реализации изобретения степень нарушения может быть снижена с помощью описанных в настоящем документе гликановых терапевтических средств, тем самым можно достичь улучшенного физиологического роста и функции полезной микробиоты в организме хозяина. Такое лечение или профилактика могут реализовываться непосредственно, например гликановое терапевтическое средство, описанное в настоящем документе, может обуславливать замещение патогенного микроорганизма непатогенным микроорганизмом или увеличивать рост полезных или комменсальных микроорганизмов, или лечение или профилактика могут реализовываться косвенно, например гликановое терапевтическое средство, описанное в настоящем документе, может влиять на метаболизм или другие функции микробиоты, таким образом модулируя физиологические процессы в организме хозяина, например посредством воздействия одного или более продуктов метаболизма в нисходящем направлении. Введение гликановых терапевтических средств, описанных в настоящем документе, может улучшить общее состояние здоровья хозяина и восстановить нормальное равновесие в выбранной нише, такой как ЖКТ, путем воздействия на одного или более представителей микробной популяции.

#### Получение гликановых терапевтических препаратов

Препараты, содержащие множество гликанов, такие как олиго- и полисахаридные смеси, могут быть получены с помощью неферментативного катализатора, например полимерного катализатора, описанного в патенте США № 8466242, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте, или могут быть получены с помощью других пригодных способов. Способы получения полимерных и твердосплавных катализаторов, описанных в настоящем документе, можно найти в WO 2014/031956, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Гликаны, полученные, например, с использованием катализатора, могут быть структурно более разнообразными гликанами, чем те, которые получены с помощью ферментативных реакций.

Предлагаются также способы получения препаратов гликанов (например, олиго- или полисахаридных соединений), описанных в настоящем документе, путем а) предоставления одной или более моно- или дисахаридных гликановых единиц или их комбинации; б) приведения в контакт моно- или дисахаридов с любым из описанных в настоящем документе полимерных катализаторов и пригодным растворителем (таким как, например, вода или неводный растворитель) в течение периода времени, достаточного для продуцирования популяции полимеризованных видов (с желаемой средней степенью полимеризации); и с) выделения и/или восстановления по меньшей мере части полимеризованного гликанового препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения препараты гликанов (например, олиго- или полисахариды) являются полимолекулярными. В некоторых вариантах реализации изобретения препараты гликанов (например, олиго- или полисахариды) являются полимолекулярными и полидисперсными. Например, гликановые терапевтические препараты содержат комбинацию отличающихся олигосахаридных видов (например, с неодинаковой степенью полимеризации и степенью разветвления и с неодинаковыми соотношениями альфа-гликозидной связи к бета-гликозидной связи). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат множество отличающихся видов (например, олигосахаридов) и могут состоять из  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$  или более видов в разных пропорциях друг к другу. В настоящем документе описаны средние показатели характеристик гликановых терапевтических препаратов, такие как степень полимеризации, степень разветвления, соотношения альфа- и бета-гликозидных связей и т.д.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходный материал (содержащий гликановые еди-

ницы) приводят в контакт с полимерным катализатором в условиях, которые способствуют образованию одной или более гликозидных связей между гликановыми единицами, тем самым получая препарат гликанов. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица представляет собой моносахарид. Пригодные полимерные катализаторы включают кислотные мономеры и ионные мономеры, которые связаны с образованием полимерного остова, причем каждый кислотный мономер имеет по меньшей мере одну кислоту Бренстеда-Лоури, а каждый ионный мономер независимо имеет по меньшей мере одну азотсодержащую катионную группу или фосфорсодержащую катионную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый кислотный мономер полимерного катализатора может иметь одну кислоту Бренстеда-Лоури, и в некоторых случаях кислоты Бренстеда-Лоури неодинаковы. В некоторых вариантах реализации изобретения каждый ионный мономер полимерного катализатора содержит одну азотсодержащую катионную группу или фосфорсодержащую катионную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения по меньшей мере один ионный мономер полимерного катализатора содержит две азотсодержащие катионные группы или фосфорсодержащие катионные группы. Схематическое изображение общих функциональных групп приведено на фиг. 6a и b.

В некоторых вариантах реализации изобретения синтез гликанов (например, олиго- или полисахаридов) с помощью полимерного катализатора осуществляют в водной среде. Одним из пригодных водных растворителей является вода, которая может быть получена из различных источников. Как правило, предпочтительными являются источники воды с более низкими концентрациями ионных частиц, поскольку такие ионные частицы могут снижать эффективность полимерного катализатора. В некоторых вариантах реализации изобретения, в которых водный растворитель представляет собой воду, вода имеет менее 10% ионных веществ (например, соли натрия, фосфора, аммония, магния).

Как правило, полимерный катализатор и гликановые единицы вводят во внутреннюю камеру реактора либо одновременно, либо последовательно. Синтез гликанов (например, олиго- или полисахаридов) может осуществляться в периодическом или непрерывном процессе. Например, в одном варианте реализации изобретения синтез гликана осуществляют в периодическом процессе, при этом содержимое реактора непрерывно смешивают или соединяют, и все или значительное количество продуктов реакции удаляют (например, выделяют и/или извлекают). В одном варианте синтез гликана осуществляют в периодическом процессе, при этом содержимое реактора первоначально перемешивают или соединяют, но дальнейшее физическое смешивание не выполняют. В другом варианте синтез гликана осуществляют в периодическом процессе, при этом один раз выполняют дополнительное смешивание содержимого или периодическое смешивание содержимого реактора (например, один или более раз в час), все или значительное количество продуктов реакции удаляют (например, выделяют и/или извлекают) через определенный промежуток времени.

В других вариантах реализации изобретения синтез гликана (например, олиго- или полисахарида) осуществляют в непрерывном процессе, при котором содержимое протекает через реактор со средней непрерывной скоростью потока, но без явного смешивания. После введения полимерного катализатора и гликановых единиц в реактор, содержимое реактора непрерывно или периодически смешивают или соединяют и через некоторое время удаляют все или значительное количество продуктов реакции (например, выделяют и/или извлекают). В одном варианте синтез гликана осуществляют в непрерывном процессе, при котором смесь, содержащую катализатор и гликановые единицы, активно не перемешивают. Кроме того, смешивание катализатора и гликановых единиц может происходить в результате перераспределения полимерных катализаторов, осаждающихся под действием силы тяжести, или неактивного смешения, которое происходит по мере протекания материала через непрерывный реактор.

В некоторых вариантах реализации указанного способа исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из одного или более моносахаридов, одного или более дисахаридов или их комбинации. В некоторых вариантах реализации указанного способа исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из фуранозного сахара и пиранозного сахара. В некоторых вариантах реализации указанного способа исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из тетроза, пентозы, гексозы или гептозы. В некоторых вариантах реализации указанного способа исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы, все из которых в некоторых случаях находятся либо в L- или D-форме, в альфа- или бета-конфигурации (для димеров), и/либо дезокси-форме, где это применимо, и любых их комбинациях. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые единицы замещены или дериватизированы одним или более из элементов, выбранных из группы, состоящей из сложного эфира ацетата, неполного эфира сульфата, сложного эфира фосфата или пирувильной циклической ацетальной группы, или в противном случае были дериватизированы, например в одной или более гидроксильных группах.

Гликановые единицы, применяемые в описанных в настоящем документе способах, могут включать один или более сахаров. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более сахаров выбирают из моносахаридов, дисахаридов и трисахаридов или любых их смесей. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более сахаров являются моносахаридами, такими как один или более мо-

носахаридов С5 или С6. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более сахаров являются моносахаридами С5. В других вариантах реализации изобретения один или более сахаров являются моносахаридами С6.

В некоторых вариантах реализации указанного способа исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из группы, состоящей из аминсахаров, дезоксисахаров, иминосахаров, сахарных кислот, короткоцепочечных жирных кислот и сахарных спиртов, с целью получения гибридных гликанов.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из группы, состоящей из моносахаридов и других углеводов, включая, но не ограничиваясь ими, гликольдегид, глицеральдегид, дигидроксиацетон, эритроз, треоз, эритулозу, арабинозу, ликсозу, рибозу, ксилозу, рибулозу, ксилулозу, аллозу, альтрозу, галактозу, глюкозу, гулозу, идоз, маннозу, талозу, фруктозу, псикозу, сорбозу, тагатозу, фукозу, фукулозу, рамнозу, манногептулозу, седогептулозу, нейраминовою кислоту, N-ацетилмурамининовую кислоту, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, фруктозамин, галактозамин, глюкозамин, сорбитол, глицерол, эритритол, тритол, арабитол, ксилит, маннитол, сорбитол, галактитол, фуцитол и молочную кислоту.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из группы, состоящей из дисахаридов и других углеводов, включая, но не ограничиваясь ими, акарвиозин, N-ацетилактозамин, аллолактозу, целлобиозу, хитобиозу, галактозу-альфа-1,3-галактозу, гентиобиозу, изомальт, изомальтозу, изомальтулозу, кожибиозу, лактитол, лактобионовую кислоту, лактозу, лактулозу, ламинарибиозу, мальтитол, мальтозу, маннобиозу, мелибозу, мелибулозу, неохеспериозу, нигерозу, робинозу, рутинозу, самбубиозу, софорозу, сукралозу, сахарозу, изобутират ацетата сахарозы, октаацетат сахарозы, трегалозу, туранозу, вицианозу и ксилобиозу.

В некоторых вариантах реализации изобретения исходным материалом для реакции полимеризации является одна или более гликановых единиц, выбранных из группы, состоящей из аминсахара, дезоксисахара, иминосахара, сахарной кислоты, короткоцепочечной жирной кислоты и сахарного спирта.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица может существовать в виде соли (например, фармацевтически приемлемой соли), такой как, например, гидрохлорат, гидроидат, гидробромат, фосфат, сульфат, метансульфат, ацетат, формиат, тартрат, малат, цитрат, сукцинат, лактат, глюконат, пируват, фумарат, пропионат, аспарат, глутамат, бензоат и аскорбат.

Пригодные гликановые единицы включают аминсахара, такие как, например, акарбоза, N-ацетилманнозамин, N-ацетилмураминовая кислота, N-ацетилнейраминовая кислота, N-ацетилэпигалактозамин, арабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевина, D-фруктоза-L-гистидин, N-гликолинорамидная кислота, кетозамин, кидамицин, маннозамин, 1В-метилселен-N-ацетил-D-галактозамин, мураминовая кислота, мурамилдипептид, фосфорибозиламин, PUGNAc, сиалил-Льюис А, сиалил-Льюис Х, валламицин, воглибоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, аспартилглюкозамин, бациллитиол, даунозамин, дезозамин, фруктозамин, галактозамин, глюкозамин, меглумин и перосамин.

Пригодные гликановые единицы включают дезоксисахара, такие как, например, 1-5-ангидроглюцитол, кладиноза, колитола, 2-дезоксид-Д-глюкоза, 3-дезоксиглюкозон, дезоксирибоза, дидезоксинуклеотид, дигиталоза, фтордезоксиглюкоза, саргеноза и сульфохиновоза.

Пригодные гликановые единицы включают иминосахара, такие как, например, кастаноспермин, 1-дезоксигирицидин, иминосахар, миглитол, миглостат и свайнсонин.

Пригодные гликановые единицы включают сахаросодержащие кислоты, такие как, например, N-ацетилнейраминовая кислота, N-ацетилталосамнуриновая кислота, альдаровая кислота, альдоновая кислота, 3-дезоксид-Д-манно-окт-2-улозоновая кислота, глюкуроновая кислота, глюкозаминуриновая кислота, глицериновая кислота, N-гликолилнейраминовая кислота, идуроновая кислота, изосахариновая кислота, пангамовая кислота, сиаловая кислота, треоновая кислота, улозоновая кислота, уроновая кислота, ксилоновая кислота, глюконовая кислота, аскорбиновая кислота, кетодезоксигулозоновая кислота, галактуриновая кислота, галактозаминуриновая кислота, маннуриновая кислота, маннозаминуриновая кислота, винная кислота, муциновая кислота, сахаровая кислота, молочная кислота, щавелевая кислота, янтарная кислота, гексановая кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, масляная кислота, лимонная кислота, глюкозамининовая кислота, яблочная кислота, сукциаминовая кислота, себациновая кислота и каприновая кислота.

Пригодные гликановые единицы включают короткоцепочечные жирные кислоты, такие как, например, муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, каучуковая кислота, изомасляная кислота, валериановая кислота и изовалериановая кислота.

Пригодные гликановые единицы включают сахарные спирты, такие как, например, метанол, этиленгликоль, глицерол, эритритол, тритол, арабитол, рибитол, ксилит, маннитол, сорбитол, галактитол, идитол, волемитол, фуцитол, инозитол, мальтозитол, мальтотетраитол и полиглицитол.

Гликановые единицы (например, сахара), применяемые в способах, описанных в настоящем документе, могут быть получены из любых известных в коммерческом отношении источников или получены

согласно любым способам, известным в данной области техники.

#### Условия реакции

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановую единицу и катализатор (например, полимерный катализатор или катализатор на твердой подложке) оставляют для осуществления реакции в течение по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 16 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 36 ч или по меньшей мере 48 ч; или от 1 до 24 ч, от 2 до 12 ч, от 3 до 6 ч, от 1 до 96 ч, от 12 до 72 ч или от 12 до 48 ч.

В некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов, полученных согласно способам, описанным в настоящем документе, можно регулировать временем реакции. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов повышают посредством увеличения времени реакции, тогда как в других вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов снижают посредством уменьшения времени реакции.

#### Температура реакции

В некоторых вариантах реализации изобретения температуру реакции поддерживают в диапазоне от около 25 до около 150°C. В некоторых вариантах реализации изобретения температура составляет от около 30 до около 125°C, от около 60 до около 120°C, от около 80 до около 115°C, от около 90 до около 110°C, от около 95 до около 105°C или от около 100 до 110°C.

#### Количество гликановых единиц

Количество гликановых единиц, применяемых в способах, описанных в настоящем документе, относительно количества применяемого растворителя может влиять на скорость реакции и количество готового продукта. Количество применяемых гликановых единиц может быть охарактеризовано содержанием твердых веществ. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание твердых веществ относится к общим твердым веществам жидкой массы в процентах от сухой массы. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание твердых веществ в гликановой единице составляет от около 5 до около 95 мас.%, от около 10 до около 80 мас.%, от около 15 до около 75 мас.% или от около 15 до около 50 мас.%.

#### Количество катализатора

Количество катализатора, применяемого в способах, описанных в настоящем документе, может зависеть от нескольких факторов, включая, например, выбор типа гликановой единицы, концентрацию гликановой единицы и условия реакции (например, температура, время и pH). В некоторых вариантах реализации изобретения весовое соотношение катализатора к гликановой единице составляет от около 0,01 до около 50 г/г, от около 0,01 до около 5 г/г, от около 0,05 до около 1,0 г/г, от около 0,05 до около 0,5 г/г, от около 0,05 до около 0,2 г/г или от около 0,1 до около 0,2 г/г.

#### Растворитель

В некоторых вариантах реализации изобретения способы использования катализатора осуществляют в водной среде. Одним из пригодных водных растворителей является вода, которая может быть получена из различных источников. Как правило, источники воды с более низкими концентрациями ионных форм (например, соли натрия, фосфора, аммония или магния) являются предпочтительными, так как такие ионные формы могут снижать эффективность катализатора. В некоторых вариантах реализации изобретения, когда водный растворитель представляет собой воду, вода имеет удельное сопротивление, составляющее по меньшей мере 0,1 мегаом сантиметра, по меньшей мере 1 мегаом сантиметр, по меньшей мере 2 мегаом сантиметра, по меньшей мере 5 мегаом сантиметров или по меньшей мере 10 мегаом сантиметров.

#### Содержание воды

Кроме того, по мере протекания реакции дегидратации согласно указанным способам, вода образуется с каждым сопряжением одной или более гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать мониторинг количества воды, присутствующей в реакционной смеси, и/или соотношение воды к мономеру или катализатору в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает удаление по меньшей мере части воды, полученной в реакционной смеси (например, удаление по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 99 или 100%, например, путем вакуумной фильтрации). Следует, однако, понимать, что количество воды для мономера можно регулировать посредством условий реакции и применяемого конкретного катализатора.

Для удаления воды из реакционной смеси можно применять любой способ, известный в данной области техники, включая, например, вакуумную фильтрацию, вакуумную дистилляцию, нагревание и/или испарение. В некоторых вариантах реализации изобретения способ предусматривает включение воды в реакционную смесь.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагаются способы получения олигосахаридной композиции путем объединения гликановой единицы и катализатора, имеющего кислотные и ионные фрагменты, для образования реакционной смеси, при этом в реакционной смеси образуется вода; и удаления по меньшей мере части воды, полученной в реакционной смеси. В некоторых вариантах по мень-

шей мере часть воды удаляют для поддержания содержания воды в реакционной смеси менее 99%, менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% по весу.

В некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов, полученных согласно способам, описанным в настоящем документе, можно регулировать путем коррекции или контроля концентрации воды, присутствующей в реакционной смеси. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов повышают посредством снижения концентрации воды, тогда как в других вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов снижают посредством повышения концентрации воды. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание воды в реакции корректируют в ходе реакции с целью регулирования степени полимеризации одного или более олигосахаридов.

В одном примере в круглодонную колбу, снабженную верхней мешалкой и конденсатором короткого пути с рубашкой, может быть добавлен один или более моно-, димер-, тример- или других олигосахаридов с 1-50% (1-10%, 1-20%, 1-30%, 1-40%, 1-60%, 1-70%) по сухому весу одного или более катализаторов, описанных в настоящем документе. В сухую смесь можно добавлять воду или другой совместимый растворитель (0,1-5 экв., 1-5 экв., 1-4 экв., 0,1-4 экв.), при этом жидкую массу можно комбинировать при низкой скорости (например, 10-100 об/мин, 50-200 об/мин, 100-200 об/мин) с использованием лопасти, соответствующей как можно точнее по размеру контуру выбранной круглодонной колбы. Смесь нагревают до 70-180°C (70-160°C, 75-165°C, 80-160°C) при давлении вакуума 10-1000 мбар. Реакционную смесь можно перемешивать от 30 мин до 6 ч, постоянно удаляя воду из смеси. Ход реакции можно контролировать с помощью ВЭЖХ. Твердую массу, полученную таким способом, можно растворить в объеме воды, достаточном для создания раствора около 50 Брикс (грамм сахара на 100 г раствора). После завершения растворения твердый катализатор можно удалить фильтрованием, а раствор олигомера можно сконцентрировать до около 50-75 Брикс, например путем роторного испарения. В некоторых случаях можно применять органический растворитель, причем несмешивающиеся с водой растворители могут быть удалены путем двухфазной экстракции, а смешивающиеся с водой растворители могут быть удалены, например, путем роторного испарения параллельно с этапом концентрирования.

#### Дополнительные этапы обработки

В некоторых случаях препарат может пройти дополнительные этапы обработки. Дополнительные этапы обработки могут включать, например, этапы очистки. Этапы очистки могут включать, например, разделение, разбавление, концентрирование, фильтрацию, обессоливание или ионообмен, хроматографическое разделение или обесцвечивание или любую их комбинацию.

#### Обесцвечивание

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают этап обесцвечивания. Один или более из полученных олигосахаридов могут подвергаться этапу обесцвечивания посредством любого способа, известного в данной области техники, включая, например, обработку абсорбентом, активированным углем, хроматографию (например, с применением ионообменной смолы), гидрогенизацию и/или фильтрацию (например, микрофильтрацию).

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более из полученных олигосахаридов приводят в контакт с поглощающим цвет материалом при определенной температуре, определенной концентрации и/или в течение определенного времени. В некоторых вариантах реализации изобретения масса поглощающих цвет видов, контактирующих с одним или более олигосахаридами, составляет менее 50% массы одного или более олигосахаридов, менее 35% от массы одного или более олигосахаридов, менее 20% от массы одного или более олигосахаридов, менее 10% от массы одного или более олигосахаридов, менее 5% от массы одного или более олигосахаридов, менее 2% от массы одного или более олигосахаридов или менее 1% от массы одного или более олигосахаридов.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом, поглощающим цвет. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом, поглощающим цвет, в течение менее 10 ч, менее 5 ч, менее 1 ч или менее 30 мин. В конкретном варианте реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом, поглощающим цвет, в течение 1 ч.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом, поглощающим цвет, при температуре от 20 до 100°C, от 30 до 80°C, от 40 до 80°C или от 40 до 65°C. В конкретном варианте реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом, поглощающим цвет, при температуре 50°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой активированный уголь. В одном варианте реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой порошкообразный активированный уголь. В других вариантах реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой ионообменную смолу. В одном варианте реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой сильноосновную катионообменную смолу в хлоридной форме. В другом варианте реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой сшитый полистирол. В еще одном варианте реализации изобретения материал, погло-

шающий цвет, представляет собой сшитый полиакрилат. В некоторых вариантах реализации изобретения материал, поглощающий цвет, представляет собой Amberlite FPA91, Amberlite FPA98, Dowex 22, Dowex Marathon MSA или Dowex Optipore SD-2.

#### Ионный обмен/обессоливание (деминерализация)

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более олигосахаридов приводят в контакт с материалом для удаления солей, минералов и/или других ионных веществ. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более олигосахаридов пропускают через пару анионных/катионных обменных колонок. В одном варианте реализации изобретения анионообменная колонка содержит слабоосновную обменную смолу в гидроксидной форме, а катионообменная колонка содержит сильнокислотную обменную смолу в протонированной форме.

#### Отделение и концентрирование

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают выделение одного или более олигосахаридов. В определенных вариантах выделение одного или более олигосахаридов включает отделение по меньшей мере части одного или более олигосахаридов от по меньшей мере части катализатора, с помощью любого способа, известного в данной области техники, включая, например, центрифугирование, фильтрацию (например, вакуумную фильтрацию, мембранную фильтрацию) и гравитационное осаждение. В некоторых вариантах реализации изобретения выделение одного или более олигосахаридов включает отделение по меньшей мере части одного или более олигосахаридов от по меньшей мере части любого непрореагировавшего сахара с помощью любого способа, известного в данной области техники, включая, например, фильтрацию (например, мембранную фильтрацию), хроматографию (например, хроматографическое фракционирование), дифференциальную растворимость и центрифугирование (например, дифференциальное центрифугирование).

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают этап концентрирования. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения выделенные олигосахариды подвергаются испарению (например, вакуумному испарению) с получением концентрированной олигосахаридной композиции. В других вариантах реализации изобретения выделенные олигосахариды подвергаются этапу распылительной сушки для получения олигосахаридного порошка. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенные олигосахариды подвергаются как этапу испарения, так и этапу распылительной сушки.

#### Содержание воды

Кроме того, по мере протекания реакции дегидратации согласно указанным способам, вода образуется с каждым сопряжением одного или более сахаров. В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, могут дополнительно включать мониторинг количества воды, присутствующей в реакционной смеси, и/или соотношение воды к сахару или катализатору в течение определенного периода времени. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает удаление по меньшей мере части воды, полученной в реакционной смеси (например, удаление по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 99 или 100%, например, путем вакуумной фильтрации). Следует, однако, понимать, что количество воды для сахара можно регулировать посредством условий реакции и применяемого конкретного катализатора.

Для удаления воды из реакционной смеси можно применять любой способ, известный в данной области техники, включая, например, вакуумную фильтрацию, вакуумную дистилляцию, нагревание и/или испарение. В некоторых вариантах реализации изобретения способ предусматривает включение воды в реакционную смесь.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предлагаются способы получения олигосахаридной композиции путем: объединения гликановой единицы и катализатора, имеющего кислотные и ионные фрагменты, для образования реакционной смеси, при этом в реакционной смеси образуется вода; и удаления по меньшей мере части воды, полученной в реакционной смеси. В некоторых вариантах по меньшей мере часть воды удаляют для поддержания содержания воды в реакционной смеси менее 99%, менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% по весу.

В некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов, полученных согласно способам, описанным в настоящем документе, можно регулировать путем коррекции или контроля концентрации воды, присутствующей в реакционной смеси. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов повышают посредством снижения концентрации воды, тогда как в других вариантах реализации изобретения степень полимеризации одного или более олигосахаридов снижают посредством повышения концентрации воды. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание воды в реакции корректируют в ходе реакции с целью регулирования степени полимеризации одного или более олигосахаридов.

#### Фракционирование

В некоторых вариантах реализации изобретения способы, описанные в настоящем документе, дополнительно включают этап фракционирования. Полученные и очищенные олиго- или полисахариды могут быть затем разделены по молекулярной массе с помощью любого способа, известного в данной

области техники, включая, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию, адсорбцию/десорбцию (например, хроматографию с активированным углем при высоком давлении) или фильтрацию (например, ультрафильтрацию или диафильтрацию). В некоторых вариантах реализации изобретения полученные и очищенные гликаны разделяют на пулы, представляющие 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или более чем 98% коротких (около DP1-2), средних (около DP3-10), длинных (около DP11-18) или очень длинных (около DP>18) видов.

В некоторых вариантах реализации изобретения полученные гликаны фракционируют путем адсорбции на углеродистом материале с последующей десорбцией фракций путем промывки материала смесями органического растворителя в воде при концентрации 1, 5, 10, 20, 50 или 100%. В одном варианте реализации изобретения адсорбционный материал представляет собой активированный уголь. В другом варианте реализации изобретения адсорбционный материал представляет собой смесь активированного угля и объемобразующего агента, такого как диатомовая земля или целит 545, в 5, 10, 20, 30, 40 или 50% части по объему или весу.

В других вариантах реализации изобретения полученные гликаны разделяют путем прохождения через высокоэффективную жидкостную хроматографическую систему. В определенных вариантах полученные гликаны разделяют с помощью ион-аффинной хроматографии, хроматографии гидрофильного взаимодействия или эксклюзионной хроматографии, включающей гель-проникающую хроматографию и гель-фильтрационную хроматографию.

В других вариантах реализации изобретения низкомолекулярные материалы удаляют с помощью способов фильтрации. В некоторых вариантах низкомолекулярные материалы могут быть удалены с помощью диализа, ультрафильтрации, диафильтрации или тангенциальной потоковой фильтрации. В некоторых вариантах реализации изобретения фильтрацию проводят в статическом аппарате диализной пробирки. В других вариантах реализации изобретения фильтрацию проводят в фильтрационной системе динамического потока. В других вариантах реализации изобретения фильтрацию проводят фильтрационными картриджами с центробежным ускорением.

#### Характеристики гликановых терапевтических препаратов

Гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, могут содержать олигосахариды и/или полисахариды. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат гомоолиго- или полисахариды (или гомогликаны), в которых все моносахариды в полисахариде являются одного и того же типа. Гликановые терапевтические препараты, содержащие гомополисахариды, могут включать моносахариды, связанные вместе посредством одного или более типов гликозидных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические средства включают гетероолиго- или полисахариды (или гетерогликаны), в которых присутствует более одного типа моносахарида. Гликановые терапевтические препараты, содержащие гетерополисахариды, могут включать отличающиеся типы моносахаридов, связанных вместе посредством одного или множества типов гликозидных связей.

Моносахариды представляют собой структурные элементы дисахаридов (таких как сахароза и лактоза) и полисахаридов (такие как целлюлоза и крахмал). Гликановые терапевтические препараты могут содержать моносахарид одного типа (в таком случае они именуется гомополимерами или гомогликанами) или комбинацию (в таком случае они именуется гетерополимерами или гетерогликанами). Олигосахарид представляет собой сахаридный полимер, содержащий небольшое количество (обычно от двух до девяти) гликановых единиц (в данном случае моносахаридов).

Например, фруктоолигосахариды (FOS), которые содержатся во многих овощах, состоят из коротких цепей молекул фруктозы, некоторые из которых заканчиваются молекулой глюкозы. Галактоолигосахариды (GOS), которые также встречаются в природе, состоят из коротких цепей молекул галактозы. Эти соединения могут только частично усваиваться организмом человека. Олигосахариды в основном продуцируются в результате разрушения природных полимеров, таких как крахмал или инулин, из прямых экстрактов натуральных веществ, таких как соя, или путем химического или ферментативного синтеза.

Полисахариды представляют собой полимерные углеводные молекулы, состоящие из длинных цепей гликановых единиц, соединенных друг с другом посредством связей, таких как, например, гликозидные связи. Полисахариды содержат более десяти гликановых единиц (в данном случае моносахаридов). Встречающиеся в природе полисахариды могут иметь общую формулу  $C_x(H_2O)_y$ , где  $x$  обычно является большим числом, например, между 10 и 2500. В некоторых вариантах реализации изобретения гидролиз может быть использован для получения составляющих моносахаридов или олигосахаридов, которые являются пригодными для продуцирования гликанов, описанных в настоящем документе. Гликановые единицы, такие как, например, моносахариды, могут существовать во многих различных формах, например конформеры, циклические формы, ациклические формы, стереоизомеры, таутомеры, аномеры и изомеры.

В некоторых вариантах реализации изобретения создают гликановые терапевтические препараты (например, олиго- или полисахариды), которые являются полидисперсными, проявляя диапазон степеней полимеризации. В некоторых случаях препараты могут быть разделены на фракции, например, представляющие 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или более чем 98% коротких (около DP1-2), средних (около

DP3-10), длинных (около DP11-18) или очень длинных (около DP>18) видов.

В одном варианте реализации изобретения предлагается полидисперсный фракционированный гликановый терапевтический препарат, содержащий по меньшей мере 85, 90 или по меньшей мере 95% видов средней длины с DP около 3-10. В одном варианте реализации изобретения предлагается полидисперсный фракционированный гликановый терапевтический препарат, содержащий по меньшей мере 85, 90 или по меньшей мере 95% видов большой длины с DP около 11-18. В одном варианте реализации изобретения предлагается полидисперсный фракционированный гликановый терапевтический препарат, содержащий по меньшей мере 85, 90 или по меньшей мере 95% видов очень большой длины с DP около 18-30. В некоторых вариантах реализации изобретения средние, длинные и очень длинные фракционированные препараты характеризуются соотношением альфа-гликозидной связи к бета-гликозидной связи от 0,8:1 до 5:1 или от 1:1 до 4:1. В некоторых вариантах реализации изобретения фракционированные препараты имеют среднюю степень разветвления от около 0,01 до около 0,2 или от около 0,05 до 0,1.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются способы с применением описанного полимерного катализатора для контроля молекулярно-массового распределения гликанов. Например, большая часть, например около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 97% гликанового препарата имеет DP от 2 до 25, от 3 до 25, от 4 до 25, от 5 до 25, от 6 до 25, от 7 до 25, от 8 до 25, от 9 до 25, от 10 до 25, от 2 до 30, от 3 до 30, от 4 до 30, от 5 до 30, от 6 до 30, от 7 до 30, от 8 до 30, от 9 до 30, или от 10 до 30.

В одном варианте реализации изобретения гликановый терапевтический препарат имеет степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического препарата имеет DP по меньшей мере 5 и менее чем 30 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического препарата имеет DP по меньшей мере 8 и менее чем 30 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического препарата имеет DP по меньшей мере 10 и менее чем 30 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического средства имеет DP от 3, 4, 5, 6, 7, 8 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического средства имеет DP от 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 до 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического средства имеет DP от 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 до 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 гликановых единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановое терапевтическое средство имеет степень полимеризации (DP) распределения после объединения одной или более гликановых единиц (например, сахаров) с полимерным катализатором (например, через 2, 3, 4, 8, 12, 24 или 48 ч после объединения одной или более гликановых единиц, например, сахаров, с катализатором), составляющую: DP2=0-40%, например, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 2%; или 10-30% или 15-25%; DP3=0-20%, например менее 15%, менее 10%, менее 5%; или 5-15%; и DP4=более 15%, более 20%, более 30%, более 40%, более 50%; или 15-75%, 20-40% или 25-35%.

Полученная степень превращения для одной или более гликановых единиц (например, сахаров) в способах, описанных в настоящем документе, может быть определена с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники, включая, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации изобретения полученная степень превращения в терапевтический гликановый препарат с DP>1 после объединения одной или более гликановых единиц с катализатором (например, через 2, 3, 4, 8, 12, 24 или 48 ч после объединения одной или более гликановых единиц с катализатором) превышает около 50% (составляет, например, более чем 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98%). В некоторых вариантах реализации изобретения полученная степень превращения в терапевтический гликановый препарат с DP>2 после объединения одной или более гликановых единиц с катализатором (например, через 2, 3, 4, 8, 12, 24 или 48 ч после объединения одной или более гликановых единиц с катализатором) превышает 30% (составляет, например, более чем 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98%).

В одном варианте реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 97% гликанового терапевтического препарата имеет DP по меньшей мере 2. В одном варианте реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 97% гликанового терапевтического препарата имеет DP по меньшей мере 3.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,8%, или по меньшей мере 99,9%, или даже 100% гликанового терапевтического препарата имеет степень полимеризации (DP) по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или по меньшей мере 12 гликановых единиц и менее чем 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16 или менее чем 15 гликановых единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препа-



раты, в которых по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99,8%, или по меньшей мере 99,9%, или даже 100% гликанового терапевтического препарата имеет степень полимеризации (DP) по меньшей мере 5 и менее чем 30 гликановых единиц, по меньшей мере 8 и менее чем 30 гликановых единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90%, 95 или около 97% гликанового терапевтического препарата имеет среднюю степень полимеризации (DP) около DP5, DP6, DP7, DP8, DP9, DP10, DP11 или DP12.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере 50, 60, 70 или 80% гликанового терапевтического препарата имеет степень полимеризации по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц или по меньшей мере 5 и менее чем 25 гликановых единиц. В некоторых вариантах реализации изобретения средняя DP гликанового терапевтического препарата определяется между около DP7 и DP9 или между около DP6 и DP10. В некоторых вариантах реализации изобретения эти гликановые терапевтические препараты характеризуются соотношением альфа-гликозидной связи к бета-гликозидной связи от 0,8:1 до 5:1 или от 1:1 до 4:1. В некоторых вариантах реализации изобретения фракционированные препараты имеют среднюю степень разветвления от около 0,01 до около 0,2 или от около 0,05 до 0,1.

В некоторых вариантах реализации изобретения около 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или около 97% гликанового терапевтического средства имеет средний молекулярный вес около 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800 г/моль и менее чем 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900 и 5000 г/моль.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые препараты (например, олиго- или полисахариды) варьируются от линейных до сильно разветвленных. Неразветвленные гликаны могут содержать только альфа-связи или только бета-связи. Неразветвленные гликаны могут содержать по меньшей мере одну альфа-связь и по меньшей мере одну бета-связь. Разветвленные гликаны могут содержать по меньшей мере одну гликановую единицу, связанную посредством альфа- или бета-гликозидной связи, с тем чтобы образовать ветвь. Уровень разветвления или степень разветвления (DB) могут варьироваться, так что примерно каждая 2-я, 3-я, 4-я, 5-я, 6-я, 7-я, 8-я, 9-я, 10-я, 15-я, 20-я, 25-я, 30-я, 35-я, 40-я, 45-я, 50-я, 60-я или 70-я единица содержит по меньшей мере одну точку разветвления. Например, гликоген животных содержит точку разветвления примерно через каждые 10 единиц.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, содержащие комбинацию разветвленных гликанов, при этом средняя степень разветвления (DB, точки разветвления на один остаток) составляет 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 0,95; 0,99; 1 или 2. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, средняя степень разветвления которых составляет по меньшей мере 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 или по меньшей мере 0,4. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, степень разветвления которых составляет от 0,01 до 0,1, от 0,01 до 0,2, от 0,01 до 0,3, от 0,01 до 0,4 или от 0,01 до 0,5. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, средняя степень разветвления которых не равна 0. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, средняя степень разветвления которых не находится в диапазоне между по меньшей мере 0,1 и менее 0,4 или по меньшей мере 0,2 и менее 0,4. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты включают линейные гликаны. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты включают гликаны, которые имеют разветвленную структуру или структуру "ветвь на ветви". В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, степень разветвления (DB) которых не равна 0, но составляет по меньшей мере 0,01; 0,05; 0,1 или по меньшей мере 0,2 или составляет от 0,01 до 0,2 или от около 0,05 до 0,1.

Некоторые гликаны содержат олигосахариды, которые имеют восстанавливающий конец и невосстанавливающий конец, независимо от того, является ли сахарид на восстанавливающем конце фактически восстанавливающим сахаром. В соответствии с принятой номенклатурой большинство олигосахаридов изображены в настоящем документе с невосстанавливающим концом слева и восстанавливающим концом справа. Большинство олигосахаридов, описанных в настоящем документе, описываются с использованием названия или аббревиатуры для невосстанавливающего сахара (например, Gal или D-Gal), которому предшествует или за которым следует конфигурация гликозидной связи (альфа или бета), кольцевая связь, положение кольца восстанавливающего сахара, участвующего в связи, с последующим названием или аббревиатурой восстанавливающего сахара (например, Glc или D-Glc). Связь (например, гликозидная связь, галактозидная связь, глюкозидная связь и т.д.) между двумя сахарными единицами может быть выражена, например, как 1,4, 1->4 или (1-4), что в настоящем документе взаимозаменяемо. Каждый сахарид может находиться в циклической форме (например, в форме пиранозы или фуранозы). Например, лактоза представляет собой дисахарид, состоящий из циклических форм галакто-

зы и глюкозы, соединенных бета-связью (1-4), при этом ацетальный кислородный мост находится в бета-ориентации.

Связи между отдельными гликановыми единицами, обнаруживаемые в ликановых терапевтических препаратах, могут включать альфа 1->2, альфа 1->3, альфа 1->4, альфа 1->6, альфа 2->1, альфа 2->3, альфа 2->4, альфа 2->6, бета 1->2, бета 1->3, бета 1->4, бета 1->6, бета 2->1, бета 2->3, бета 2->4 и бета 2->6.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат только альфа-связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат только бета-связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат комбинации альфа- и бета-связей. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение "альфа-гликозидная связь: бета-гликозидная связь" в препарате составляет около 0,1:1; 0,2:1; 0,3:1; 0,4:1; 0,5:1; 0,6:1; 0,7:1; 0,8:1; 0,9:1; 1:1; 1,2:1; 1,5:1; 1,7:1; 2:1; 2,2:1; 2,5:1; 2,7:1; 3:1; 4:1; 5:1; 6:1; 7:1; 8:1; 9:1 или около 10:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит как альфа-, так и бета-гликозидные связи, выбранные из группы, состоящей из 1->2 гликозидной связи, 1->3 гликозидной связи, 1->4 гликозидной связи, 1->5 гликозидной связи и 1->6 гликозидной связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере две или по меньшей мере три альфа- и бета 1->2 гликозидные связи, альфа- и бета 1->3 гликозидные связи, альфа- и бета 1->4 гликозидные связи, альфа и бета 1->5 гликозидные связи и/или альфа- и бета 1->6 гликозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты характеризуются соотношением "альфа-гликозидная связь: бета-гликозидная связь" в препарате около 0,8:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 или 5:1 или соотношение варьируется от около 0,8:1 до около 5:1 или от около 1:1 до около 4:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию гликановых единиц с альфа- или бета-конфигурацией, например, гликановый терапевтический препарат характеризуется желаемым соотношением, таким как: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:100, 1:150 альфа-конфигурации к бета-конфигурации или бета-конфигурации к альфа-конфигурации.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все гликановые единицы с альфа- или бета-конфигурацией, в некоторых случаях содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% гликановых единиц соответствующей другой конфигурации.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90%, 95, 97, 98, 99%, по меньшей мере 99,9% или даже 100% гликанов с альфа-гликозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99%, по меньшей мере 99,9% или даже 100% гликанов с бета-гликозидными связями. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или по меньшей мере 85% гликанов имеют гликозидные связи, которые являются альфа-гликозидными связями, и по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или по меньшей мере 85% имеют гликозидные связи, которые являются бета-гликозидными связями и при этом процент альфа- и бета-гликозидных связей не превышает 100%.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99%, по меньшей мере 99,9% или даже 100% гликозидных связей в гликанах являются одной или более из следующих гликозидных связей: 1->2 гликозидные связи, 1->3 гликозидные связи, 1->4 гликозидные связи и 1->6 гликозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, по меньшей мере 20 или 25% гликановых гликозидных связей представляют собой 1->2, 1->3, 1->4 и 1->6 гликозидные связи. В некоторых случаях гликановые терапевтические препараты дополнительно содержат по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или по меньшей мере 85% гликановых гликозидных связей, выбранных из группы, состоящей из альфа 2->1, альфа 2->3, альфа 2->4, альфа 2->6, бета 2->1, бета 2->3, бета 2->4 и бета 2->6 гликозидных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат гликаны с по меньшей мере двумя гликозидными связями, выбранными из группы, состоящей из альфа 1->2 и альфа 1->3, альфа 1->2 и альфа 1->4, альфа 1->2 и альфа 1->6, альфа 1->2 и бета 1->2, альфа 1->2 и бета 1->3, альфа 1->2 и бета 1->4, альфа 1->2 и бета 1->6, альфа 1->3 и альфа 1->4, альфа 1->3 и бета 1->6, альфа 1->3 и бета 1->2, альфа 1->3 и бета 1->3, альфа 1->3 и бета 1->4, альфа 1->3 и бета 1->6, альфа 1->4 и альфа 1->6, альфа 1->4 и бета 1->2, альфа 1->4 и бета 1->3, альфа 1->4 и бета 1->4, альфа 1->4 и бета 1->6, альфа 1->6 и бета 1->2, альфа 1->6 и бета 1->3, альфа 1->6 и бета 1->4, альфа 1->6 и бета 1->6,

бета 1->2 и бета 1->3, бета 1->2 и бета 1->4, бета 1->2 и бета 1->6, бета 1->3 и бета 1->4, бета 1->3 и бета 1->6, и бета 1->4 и бета 1->6.

Препараты, содержащие разветвленное гликановое терапевтическое соединение (например, с DB 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 0,95; 0,99; 1 или 2), содержат боковую цепь, которая может быть одинаковой или отличающейся боковой цепью, при этом боковая цепь может быть присоединена к основной цепи посредством одной или более бета- и альфа-связей, таких как (1-2), (1-3), (1-4), (1-6), (2-3), (2-6) или других пригодных связей.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере одна гликановая единица представляет собой сахар в L-форме. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются препараты гликанов, в которых по меньшей мере одна гликановая единица представляет собой сахар в D-форме. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются препараты гликанов, в которых гликановые единицы представляют собой сахара в L- или D-форме, поскольку они являются природными или более распространенными (например, D-глюкоза, D-ксилоза, L-арабиноза).

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию L- и D-форм гликановых единиц, например, с желаемым соотношением L-форм к D-формам или D-форм к L-формам, таким как: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:100, 1:150.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат гликаны, состоящие из гликановых единиц, все из которых по существу находятся в L- или D-формах; в некоторых случаях содержат около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% гликановых единиц соответствующей другой формы.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере одна гликановая единица представляет собой тетрозу, пентозу, гексозу или гептозу. В некоторых случаях гликановые единицы, участвующие в образовании гликанов (например, комбинация разветвленных олигосахаридов или полисахаридов) гликанового терапевтического препарата, являются разными. Примеры моносахаридных гликановых единиц включают гексозы, такие как глюкоза, галактоза и фруктоза, и пентозы, такие как ксилоза. Как правило, моносахариды имеют химическую формулу:  $C_x(H_2O)_y$ , где обычно  $x \geq 3$ . Моносахариды можно классифицировать по количеству  $x$  атомов углерода, которые они содержат, например диоза (2), триоза (3), тетроза (4), пентоза (5), гексоза (6) и гептоза (7). Моносахаридные гликановые единицы могут существовать в ациклической (с открытой цепью) форме. Моносахариды с открытой цепью с одним и тем же молекулярным графом могут существовать в виде двух или более стереоизомеров. Моносахариды могут также существовать в циклической форме в результате реакции нуклеофильного присоединения между карбонильной группой и одним из гидроксильных той же молекулы. Реакция создает кольцо атомов углерода, замкнутое одним мостиковым атомом кислорода. В этих циклических формах кольцо обычно имеет 5 (фуранозы) или 6 атомов (пиранозы).

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию различных моносахаридных гликановых единиц, таких как комбинация диозы (2), триозы (3), тетрозы (4), пентозы (5), гексозы (6) или гептозы (7), в любом желаемом соотношении, например, для любых двух гликановых единиц: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:100, 1:150 и т.д., для любых трех гликановых единиц: 1:1:1, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:5:1, 1:6:1, 1:7:1, 1:8:1, 1:9:1, 1:10:1, 1:12:1, 1:14:1, 1:16:1, 1:18:1, 1:20:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:3:2, 1:4:2, 1:5:2, 1:6:2, 1:7:2, 1:8:2, 1:9:2, 1:10:2, 1:1:3, 1:2:3, 1:3:3, 1:4:3, 1:5:3, 1:6:3, 1:7:3, 1:8:3, 1:9:3, 1:10:3, 1:1:4, 1:2:4, 1:3:4, 1:4:4, 1:5:4, 1:6:4, 1:7:4, 1:8:4, 1:9:4, 1:10:4, 1:1:5, 1:2:5, 1:3:5, 1:4:5, 1:5:5, 1:6:5, 1:7:5, 1:8:5, 1:9:5, 1:10:5 и т.д., для любых четырех гликановых единиц: 1:1:1:1, 1:2:2:1, 1:3:2:1, 1:4:2:1, 1:5:2:1, 1:6:2:1, 1:7:2:1, 1:8:2:1, 1:9:2:1, 1:10:2:1, 1:1:1:2, 1:2:2:2, 1:3:2:2, 1:4:2:2, 1:5:2:2, 1:6:2:2, 1:7:2:2, 1:8:2:2, 1:9:2:2, 1:10:2:2 и т.д., для любых пяти гликановых единиц: 1:1:1:1:1, 1:2:2:1:1 и т.д., для любых шести гликановых единиц: 1:1:1:1:1:1, 1:1:1:1:1:2 и т.д., для любых семи гликановых единиц: 1:1:1:1:1:1:1, 1:1:1:1:1:1:2 и т.д. и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат включает желаемую комбинацию из двух, трех, четырех или пяти различных гликановых единиц, такую как комбинация, например, i) одной или более гликановых единиц, выбранных из моносахаридов, выбранных из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы; ii) одной или более гликановых единиц, выбранных из дисахаридов, выбранных из акариовина, п-ацетилактозамина, аллолактозы, целлобиозы, хитобиозы, галактозы-альфа-1,3-галактозы, гентиобиозы, изомальта, изомальтозы, изомальтулозы, кожибиозы, лактиттола, лактобионовой кислоты, лактозы, лактулозы, ламинарибиозы, мальтиттола, мальтозы, маннобиозы, мелибиозы, мелибулозы, неохесперидозы, нигерозы, роинозы, рутинозы, самбубиозы, софорозы, сукралозы, сахарозы, изобутират ацетата сахарозы, октаацетата сахарозы, трегалозы, туранозы, виктозы и ксилобиозы; iii) одной или более гликановых единиц, выбранных из

аминосхаров, выбранных из акарбозы, N-ацетилэманозамина, N-ацетилмураминовой кислоты, N-ацетилнураминовой кислоты, N-ацетилэталозаминоновой кислоты, арабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевины, D-фруктоз-L-гистидина, N-гликолинораминовой кислоты, кетозамина, кидамицина, маннозамина, 1В-метилселен-N-ацетил-D-галактозамина, мураминовой кислоты, мурамилдипептида, фосфорибозиламина, PUGNAc, сиалил-Льюис А, сиалил-Льюис Х, валламицина, воглибозы, N-ацетилгалактозамина, N-ацетилглюкозамина, аспартилглюкозамина, бациллитиола, даунозамина, дезо-замина, фруктозамина, галактозамина, глюкозамина, меглумина и перосамина; iv) одной или более гликановых единиц, выбранных из дезоксисахара, выбранного из 1-5-ангидроглюцитолола, кладинозы, коли-тозы, 2-дезоксид-глюкозы, 3-дезоксиглюкозона, дезоксирибозы, дидезоксинуклеотида, дигиталозы, фтордезоксиглюкозы, саргенозы и сульфохинозиды; v) одной или более гликановых единиц, выбранных из иминосахаров, выбранных из кастаноспермина, 1-дезоксигиримицина, иминосахара, миглитола, миглостата и свайнсонина; одной или более гликановых единиц, выбранных из сахарных кислот, выбранных из N-ацетилнейраминовой кислоты, N-ацетилталосамнуриновой кислоты, альдаровой кислоты, альдоновой кислоты, 3-дезоксид-манно-окт-2-улонозой кислоты, глюкуроновой кислоты, глюкозаминуриновой кислоты, глицериновой кислоты, N-гликозилнейраминовой кислоты, идуроновой кислоты, изосахариновой кислоты, пангамовой кислоты, сиаловой кислоты, треоновой кислоты, улонозой кислоты, уроновой кислоты, ксилоновой кислоты, глюконовой кислоты, аскорбиновой кислоты, кетодезоксиулонозой кислоты, галактуриновой кислоты, галактозаминуриновой кислоты, маннуриновой кислоты, маннозаминуриновой кислоты, винной кислоты, муциновой кислоты, сахаровой кислоты, молочной кислоты, щавелевой кислоты, янтарной кислоты, гексановой кислоты, fumarовой кислоты, малеиновой кислоты, масляной кислоты, лимонной кислоты, глюкозамининовой кислоты, яблочной кислоты, сукциаминовой кислоты, себациновой кислоты и каприновой кислоты; vi) одной или более гликановых единиц, выбранных из короткоцепочечных жирных кислот, выбранных из муравьиной кислоты, уксусной кислоты, пропионовой кислоты, каучуковой кислоты, изомаляной кислоты, валериановой кислоты и изовалериановой кислоты; vii) одной или более гликановых единиц, выбранных из сахарных спиртов, выбранных из метанола, этиленгликоля, глицерола, эритритолола, треитолола, арабитолола, рибитолола, ксилита, маннитола, сорбитолола, галактитолола, идитолола, волемитолола, фуцитолола, инозитолола, мальтотритолола, мальтотетраитолола и полиглицитолола.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит гликановую единицу или множество гликановых единиц, присутствующих в форме соли (например, фармацевтически приемлемой форме соли), такой как, например, гидрохлорат, гидроидат, гидробромат, фосфат, сульфат, метансульфат, ацетат, формиат, тартрат, малат, цитрат, сукцинат, лактат, глюконат, пируват, fumarат, пропионат, аспартат, глутамат, бензоат и аскорбат.

Типовые гликаны описываются трехбуквенным кодом, представляющим мономерный сахарный компонент, за которым следует число выше 100, отражающее процентное содержание материала, составляющего мономер. Таким образом, термином "glu100" описывают гликан, получаемый в результате введения 100% D-глюкозы (гликановая единица), а "glu50gal50" относится к гликану, получаемому в результате введения 50% D-глюкозы и 50% D-галактозы (гликановые единицы) или, в альтернативном варианте, в результате введения димера лактозы (гликановая единица). В данном контексте xyl=D-ксилоза; ara=L-арабиноза; gal=D-галактоза; glu=D-глюкоза; rha=L-рамноза; fuc=L-фукоза; man=D-манноза; sor=D-сорбитол; gly=D-глицерол; neu=NAc-нейраминовая кислота.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат одну гликановую единицу А, выбранную из пунктов i)-vii) выше, при этом гликановая единица А характеризуется 100% вводимым количеством гликановой единицы. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат выбирают из гомогликанов xyl100, rha100, ara100, gal100, glu100 и man100. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат выбирают из гомогликанов fuc100 и fru100.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию из двух гликановых единиц А и В, независимо выбранных из пунктов i)-vii) выше, при этом А и В могут быть выбраны из той же самой или другой группы i)-vii), и при этом А и В могут быть выбраны в любом желаемом соотношении (например, от 1 до 99% А и 99-1% В, не превышающем 100%).

Например, в некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат выбирают из гетерогликанов ara50gal50, xyl75gal25, ara80xyl20, ara60xyl40, ara50xyl50, glu80man20, glu60man40, man60glu40, man80glu20, gal75xyl25, glu50gal50, man62glu38 и гибридных гликанов glu90sor10 и glu90gly10.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию из трех гликановых единиц А, В и С, независимо выбранных из пунктов i)-vii) выше, при этом А, В и С могут быть выбраны из той же или другой группы i)-vii), и при этом А, В и С могут быть выбраны в любом желаемом соотношении (например, от 1-99% А, 1-99% В, 1-99% С, не превышающем 100%).

Например, в некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат выбирают из гетерогликанов xyl75glu12gal12, xyl33glu33gal33, glu33gal33fuc33, man52glu29gal19 и гибридного гликана glu33gal33neu33.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию из четырех гликановых единиц А, В, С и D, независимо выбранных из пунктов i)-vii) выше, при этом А, В, С и D могут быть выбраны из той же или другой группы i)-vii) и при этом А, В, С и D могут быть выбраны в любом желаемом соотношении (например, от 1 до 99% А, 1-99% В, 1-99% С, 1-99% D), не превышающем 100%.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит комбинацию из пяти гликановых единиц А, В, С, D и E, независимо выбранных из пунктов i)-vii) выше, при этом А, В, С и D могут быть выбраны из той же или другой группы i)-vii), и при этом А, В, С, D и E могут быть выбраны в любом желаемом соотношении (например, от 1 до 99% А, 1-99% В, 1-99% С, 1-99% D, 1-99% E), не превышающем 100%.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, в которых по меньшей мере одна гликановая единица выбрана из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию двух различных моносахаридных гликановых единиц, такую как комбинация, например, глюкозы и галактозы, глюкозы и арабинозы, глюкозы и маннозы, глюкозы и фруктозы, глюкозы и ксилозы, глюкозы и фукозы, глюкозы и рамнозы, галактозы и арабинозы, галактозы и маннозы, галактозы и фруктозы, галактозы и ксилозы, галактозы и фукозы, галактозы и рамнозы, арабинозы и маннозы, арабинозы и фруктозы, арабинозы и ксилозы, арабинозы и фукозы, арабинозы и рамнозы, маннозы и фруктозы, маннозы и ксилозы, маннозы и фукозы, маннозы и рамнозы, фруктозы и ксилозы, фруктозы и фукозы, фруктозы и рамнозы, ксилозы и фукозы, ксилозы и рамнозы, фукозы и рамнозы, например, в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90 или 1:100 или в обратном соотношении.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию трех различных моносахаридных гликановых единиц, такую как комбинация, например, для глюкозосодержащих гликановых терапевтических препаратов, глюкозы, галактозы и арабинозы; глюкозы, галактозы и маннозы; глюкозы, галактозы и фруктозы; глюкозы, галактозы и ксилозы; глюкозы, галактозы и фукозы; глюкозы, галактозы и рамнозы; глюкозы, арабинозы и маннозы; глюкозы, арабинозы и фруктозы; глюкозы, арабинозы и ксилозы; глюкозы, арабинозы и фукозы; глюкозы, арабинозы и рамнозы; глюкозы, маннозы и фруктозы; глюкозы, маннозы и ксилозы; глюкозы, маннозы и фукозы; глюкозы, маннозы и рамнозы; глюкозы, фруктозы и ксилозы; глюкозы, фруктозы и фукозы; глюкозы, фруктозы и рамнозы; глюкозы, фукозы и рамнозы, например, в соотношении 1:1:1, 1:2:1, 1:3:1, 1:4:1, 1:5:1, 1:6:1, 1:7:1, 1:8:1, 1:9:1, 1:10:1, 1:12:1, 1:14:1, 1:16:1, 1:18:1, 1:20:1, 1:1:2, 1:2:2, 1:3:2, 1:4:2, 1:5:2, 1:6:2, 1:7:2, 1:8:2, 1:9:2, 1:10:2, 1:1:3, 1:2:3, 1:3:3, 1:4:3, 1:5:3, 1:6:3, 1:7:3, 1:8:3, 1:9:3, 1:10:3, 1:1:4, 1:2:4, 1:3:4, 1:4:4, 1:5:4, 1:6:4, 1:7:4, 1:8:4, 1:9:4, 1:10:4, 1:1:5, 1:2:5, 1:3:5, 1:4:5, 1:5:5, 1:6:5, 1:7:5, 1:8:5, 1:9:5, 1:10:5 и т.д.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все диозные (2) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% триозы (3), тетрозы (4), пентозы (5), гексозы (6) или гептозы (7) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все триозные (3) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержащие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% диозы (2), тетрозы (4), пентозы (5), гексозы (6) или гептозы (7) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все тетрозные (4) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержащие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% диозы (2), триозы (3), пентозы (5), гексозы (6) или гептозы (7) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все пентозные (5) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% диозы (2), триозы (3), тетрозы (4), гексозы (6) или гептозы (7) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все гексозные (6) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% диозы (2), триозы (3), тетрозы (4), пентозы (5) или гептозы (7) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу все гептозные (7) моносахаридные единицы, в некоторых случаях содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% диозы (2), триозы (3), тетрозы (4), пентозы (5) или гексозы (6) или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препа-

раты, в которых по меньшей мере одна гликановая единица представляет собой фуранозный сахар. В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются препараты гликанов, в которых по меньшей мере одна гликановая единица представляет собой пиранозный сахар. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат комбинации фуранозных и пиранозных сахаров. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение "фуранозный сахар:пиранозный сахар" в препарате составляет около 0,1:1; 0,2:1; 0,3:1; 0,4:1; 0,5:1; 0,6:1; 0,7:1; 0,8:1; 0,9:1; 1:1; 1,2:1; 1,5:1; 1,7:1; 2:1; 2,2:1; 2,5:1; 2,7:1; 3:1; 4:1; 5:1; 6:1; 7:1; 8:1; 9:1 или около 10:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат желаемую комбинацию фуранозных и пиранозных сахаров, например, в желаемом соотношении, таком как 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:100, 1:150 фуранозы к пиранозе или пиранозы к фуранозе.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды и полисахариды) содержат по существу только фуранозный или пиранозный сахар, в некоторых случаях содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% соответствующего другого сахара.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат по существу только пиранозный сахар и не более чем около 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4% или не более, чем около 5% мономерных гликановых единиц в препарате в форме фуранозы. В некоторых вариантах реализации изобретения не более 3, 2 или не более 1% мономерных гликановых единиц в препарате находятся в форме фуранозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит сиаловую кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит липид и жирную кислоту. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит аминокислоту.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит детектируемую повторяющуюся единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не содержит статистически значимого количества повторяющейся единицы. В одном варианте реализации изобретения повторяющаяся единица характеризуется DP по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или по меньшей мере 6 гликановых единиц. Например, гиалуронан представляет собой гликозаминогликан с повторяющейся дисахаридной единицей, состоящей из двух производных глюкозы, глюкуроната (глюкуроновой кислоты) и N-ацетилглюкозамина. Гликозидные связи представляют собой бета (1->3) и бета (1->4). Целлюлоза представляет собой полимер, изготовленный с повторяющимися единицами глюкозы, соединенными вместе посредством бета-связей. Наличие и количество повторяющихся единиц можно определить, например, путем общего гидролиза (например, для определения доли гликановых единиц), анализа метилирования (например, для определения распределения типов связей) и HSQC (гетероядерная спектроскопия с одноквантовым переносом когеренции) (например, для определения распределения альфа - и бета-гликозидов). Специалистам в данной области техники известны статистические методы определения значимости.

При необходимости, моносахаридные или олигосахаридные гликановые единицы гликанов дополнительно замещают или дериватизируют, например, гидроксильные группы могут быть этерифицированы или эстерифицированы. Например, гликаны (например, олиго- или полисахарид) могут содержать модифицированные сахаридные единицы, такие как 2'-дезоксирибоза, в которой удалена гидроксильная группа, 2'-фторорибоза, в которой гидроксильная группа замещена фтором, или N-ацетилглюкозамин, азотсодержащая форма глюкозы (например, 2'-фторорибоза, дезоксирибоза и гексоза). Степень замещения (DS, среднее количество гидроксильных групп на гликозильную единицу) может быть 1, 2 или 3 или другой пригодной степенью DS. В некоторых вариантах реализации изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% гликановых единиц замещены или дериватизированы. В некоторых вариантах реализации изобретения степень замещения варьируется между субъединицами, например, определенный процент не являющийся дериватизированным, характеризуется DS=1, DS=2 или DS=3. Можно создать любую желаемую комбинацию, например, 0-99% субъединиц не дериватизированы, 0-99% субъединиц характеризуется DS=1, 0-99% субъединиц характеризуется DS=2, и 0-99% субъединиц характеризуется DS=3, с общим показателем 100%. Степень замещения можно контролировать посредством регуляции среднего количества молей заместителя, добавляемого в гликозильный фрагмент (молярное замещение (MS)). Распределение заместителей по длине гликановой олиго- или полисахаридной цепи можно контролировать посредством регуляции условий реакции, типа реагента и степени замещения. В некоторых вариантах реализации изобретения мономерные субъединицы замещены одним или более элементами, выбранными из группы, состоящей из ацетатного эфира, сульфатного полуэфира, фосфатного эфира или пирувильной циклической ацетальной группы.

Молярный процент видов со степенью полимеризации (DP)<sub>n</sub> (обозначенный в настоящем докумен-

те как DP(n)) в популяции определяется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), например на приборе Agilent 1260 BioInert, оснащенный детектором показателя преломления (RI) и множеством колонок, знакомых специалистам в данной области техники, использующих воду в качестве подвижной фазы. Колонки выбирают из химических анализов, включая, но не ограничиваясь ими, HPLC, координацию металлов и водную эксклюзионную хроматографию, которые наилучшим образом выделяют виды, представляющие интерес. Молярный % DP(n) определяется по формуле

$$\% DP(n) = 100 * AUC [DP(n)] / AUC [DP(общая)],$$

где AUC определяется как площадь под кривой для представляющих интерес видов, определяемая путем калибровки по известным стандартам. Молярный процент изомеров гликозидной связи (% альфа и % бета) определяют с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с использованием различных 2D-методов, известных специалистам в данной области техники. Альфа- и бета-изомеры можно различать, например, по их особому сдвигу на спектре ЯМР, а молярное процентное соотношение определяют по формуле

$$\% (\text{гликозидный изомер } n) \text{ гликозидных связей} = 100 * AUC [\text{сдвиг (изомер } n)] / AUC [\text{сдвиг (изомер альфа+изомер бета)}],$$

где AUC определяют как площадь под кривой при определенном значении сдвига, известным своим происхождением от желаемого изомера n. Молярный процент региохимических изомеров определяют аналогичным образом с использованием формулы

$$\% (\text{региоизомер } n) \text{ региоизомеров} = 100 * AUC [\text{сдвиг (региоизомер } n)] / AUC [\text{сдвиг (все региоизомеры)}].$$

Относительный процент мономерных сахаров, составляющих олигомерную популяцию, определяют, например, путем общего кислотного переваривания олигомерного образца с последующей конверсией в аллидолный ацетат, после чего проводят газохроматографический (ГХ) анализ полученных мономерных растворов по сравнению с ГХ известных стандартов. Молярный процент мономера (n), где n может быть любым сахаром, определяют по формуле

$$\% (\text{сахар } n) = 100 * AUC [\text{сахар } n] / AUC [\text{общее количество всех мономерных сахаров}].$$

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат можно контролировать, например, путем выбора заряда, структуры (например, DP, степени разветвления) и/или дериватизации гликановых единиц.

Гликановый терапевтический препарат, состоящий из одного типа сахарных единиц, равномерно связанных в линейных цепях, обычно является нерастворимыми в воде при 23°C, даже когда гликаны имеют низкую молекулярную массу со степенью полимеризации (DP) от 20 до 30. Степень растворимости гликановых терапевтических препаратов может быть скорректирована, например путем введения в гликаны (1->6)-связей и чередующихся гликозидных связей. Дополнительные степени свободы, обеспечиваемые вращением вокруг связей C-5-C-6, дают более высокие значения энтропии раствора. Гомогликаны с двумя типами сахарных связей или гетерогликаны, состоящие из двух типов Сахаров, обычно более растворимы, чем гомогенные полимеры. Ионизация линейных гомогликанов может добавить растворимость, например, гелям. Вязкость растворов часто зависит от третичных структур гликанов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты сильно разветвлены, например имеют среднее значение DB по меньшей мере 0,01; 0,05 или 0,1. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты имеют среднее значение DB от 0,1 до 0,2. Гликановые терапевтические препараты, содержащие разветвленный олигосахарид, являются высокорстворимыми. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты могут быть концентрированы по меньшей мере до 55, 65, 60, 65, 70, 75, 80 Брикс или по меньшей мере 85 Брикс без явного затвердевания или кристаллизации при 23°C (конечный предел растворимости). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты концентрируют по меньшей мере до около 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 г/мл или по меньшей мере 4 г/мл без явного затвердевания или кристаллизации при 23°C (конечный предел растворимости).

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты (например, олигосахариды) являются разветвленными, например имеют среднее значение DB по меньшей мере 0,01; 0,05 или 0,1 и характеризуются конечным пределом растворимости в воде по меньшей мере около 70, 75, 80 Брикс или по меньшей мере около 85 Брикс при 23°C или по меньшей мере около 1, 2 г/мл или по меньшей мере около 3 г/мл.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты характеризуются конечным пределом растворимости по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 г/л в деионизированной воде или в пригодном буфере, таком как, например, забуференный фосфатом физиологический раствор с pH 7,4 или аналогичным физиологическим pH и при 20°C. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты растворяются без осадка на более 50%, более 60%,

более 70%, более 80%, более 90%, более 95%, более 96%, более 97%, более 98%, более 99% или более 99,5%, что наблюдается при концентрации более 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 г/л в деионизированной воде или в пригодном буфере, таком как, например, забуференный фосфатом физиологический раствор с pH 7,4 или аналогичным физиологическим pH и при 20°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты характеризуются желаемой степенью сладости. Например, сахароза (столовый сахар) является прототипом сладкого вещества. Сахароза в растворе имеет степень восприятия сладости 1, при этом другие вещества оцениваются относительно сахарозы (например, сладость фруктозы, оценивается в 1,7 раза выше по сравнению с сахарозой). В некоторых вариантах реализации изобретения сладость гликановых терапевтических препаратов составляет от 0,1 до 500000 по отношению к сахарозе. В некоторых вариантах реализации изобретения относительная сладость составляет 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 80; 90; 100; 350; 400; 450; 500; 500; 500; 500; 1000; 2000; 2000; 3000; 4000; 5000; 75000; 100000; 150000; 200000; 250000; 300000; 350000; 40000; 450000; 500000 или более 500000 по отношению к сахарозе (если показатель сладости сахарозы взят за единицу). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат умеренно сладкий или сладкий и горький.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат, например препарат, который по существу характеризуется DP2+ или DP3+ (например, по меньшей мере 80, 90% или по меньшей мере 95% или фракционированный препарат DP2 + или DP3+), по существу воспринимается как сладкий, а относительная сладость составляет около 0, 0,0001; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 или около 0,8 относительно сахарозы (если показатель сладости сахарозы взят за единицу).

#### Идентификация и характеристика гликановых терапевтических препаратов

При необходимости можно охарактеризовать гликановые терапевтические препараты. Например, гликановые терапевтические препараты, которые были идентифицированы в одном или более анализах *in vitro* или *in vivo* как стимулирующие рост полезных для здоровья бактерий, или подавляющие рост микробных патогенов, могут быть дополнительно охарактеризованы с помощью любого способа, известного в данной области техники, и способов, описанных в настоящем документе. Пригодные способы описаны далее в примерах.

Мономерные структурные элементы (например, моносахаридная или гликановая единичная композиция), аномерная конфигурация боковых цепей, наличие и расположение групп заместителей, степень полимеризации/молекулярный вес и структура связи у гликановых терапевтических препаратах могут быть идентифицированы с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, таких как, например, анализ метилирования, восстановительное расщепление, гидролиз, ГХ-МС (газовая хроматография-масс-спектрометрия), MALDI-MS (матричная лазерная десорбция/ионизационная масс-спектрометрия), ESI-MS (электрораспылительная ионизационная масс-спектрометрия), ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием показателя ультрафиолета или преломления), НРАЕС-РАD (высокоэффективная анион-обменная хроматография с импульсным амперометрическим детектированием), СЕ (капиллярный электрофорез), ИР (инфракрасная/рамановская спектроскопия и методы спектроскопии ЯМР (ядерного магнитного резонанса). У полимерах кристаллической консистенции кристаллическая структура может быть проанализирована с помощью, например, ЯМР твердого тела, FT-IR (инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье) и WAXS (широкоугольное рассеяние рентгеновских лучей). DP, распределение DP и полидисперсность можно определить, например, с помощью вискозиметрии и ЭХ (ЭХ-ВЭЖХ, высокоэффективная эксклюзионная хроматография). Сторонние группы, концевые группы и заместители могут быть идентифицированы, например, с помощью ЭХ с маркировкой, водной аналитики, MALDI-MS, FT-IR и ЯМР. Для идентификации мономерных компонентов гликанов можно применять такие способы как, например, кислотно-каталитический гидролиз, ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) или ГЖХ (газожидкостная хроматография) (после превращения в аллитаты альдитола). Для определения связей, присутствующих в гликанах, в одном примере полисахарид метилируют метилиодидом и сильным основанием в ДМСО, осуществляют гидролиз, получают восстановление до частично метилированных альдитов, проводят ацетилирование в метилированные альдитолацетаты и анализируют с помощью ГЖХ/МС (газожидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией). В некоторых вариантах реализации изобретения для определения последовательности полисахаридов проводят частичную деполимеризацию с применением кислоты или ферментов для определения структур. Возможные структуры полисахарида сравнивают с возможными структурами гидролитических олигомеров и определяют, какая из возможных структур могла бы продуцировать олигомеры. С целью идентификации аномерной конфигурации, в одном примере интактный полисахарид или препарат олигосахаридов подвергают ферментативному анализу, например, приводят в контакт с ферментом, который является специфичным для конкретного типа связывания, например, β-галактозидазой или α-глюкозидазой и т.д., после этого для анализа продуктов можно применить ЯМР.



Например, распределение (или средний показатель) степени полимеризации (DP) гликанового терапевтического препарата может быть измерено путем введения образца с концентрацией, например, 10-100 мг/мл, в устройство Agilent 1260 BioPure для ВЭЖХ (или аналогичное), снабженное колонкой Bio-Rad Aminex HPX-42A 7,8×300 мм (или аналогичной) и RI-детектором, как описано, например, в Gomez et al. (Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes, *J Agric Food Chem*, 2014, 62:9769). В альтернативном варианте образец с концентрацией можно вводить в устройство Dionex ICS5000 для ВЭЖХ (или аналогичное), оборудованное колонкой Dionex CarboPac PA1 4×250 мм (или аналогичной) и PAD-детектором, как описано, например, в Hoick et al., (Feruloylated and nonferuloylated arabino-oligosaccharides from sugar beet pectin selectively stimulate the growth of bifidobacterium spp. in human fecal in vitro fermentations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(12), 6511-6519). Интеграция полученного спектра по сравнению со стандартным раствором олигомеров позволяет определить среднее значение DP.

Распределение показателей молекулярного веса можно измерить, например, с помощью масс-спектрометрии MALDI. Концентрацию олигосахаридов можно измерить с помощью рефрактометра сахара в Меттлер-Толедо (Mettler-Toledo) (или аналогичного) с конечной величиной, скорректированной на стандартизованную кривую для учета различий преломления между мономерами и олигомерами.

Распределение гликозидной региохимии можно охарактеризовать, например, с помощью различных методов 2D-ЯМР, включая анализ COZY, HMBC, HSQC, DEPT и TOCSY с применением стандартных импульсных последовательностей и спектрометра Bruker 500 МГц. Пики могут быть определены путем корреляции со спектрами встречающихся в природе полисахаридов с известной региохимией.

В некоторых вариантах реализации изобретения относительное пиковое распределение образца зависит от ряда факторов, включая, но не ограничиваясь ими, концентрацию и чистоту образца, идентичность и качество растворителя (например, изотопно-меченый растворитель) и применяемую последовательность импульсов. По этой причине в вариантах реализации изобретения относительное пиковое распределение, например, гликана, содержащего глюкозу, может изменяться (например, на около 0,01 ч./млн, около 0,02 ч./млн или около 0,05 ч./млн), когда спектр ЯМР получают в аналогичных условиях из-за указанных факторов. В этих примерах, применяемых в настоящем документе, термины "соответствующий пик" или "соответствующие пики" относятся к пикам ЯМР, ассоциированным с одним и тем же образцом, но которые изменяются (например, на около 0,01 ч./млн, около 0,02 ч./млн или около 0,05 ч./млн) из-за факторов, включающих, например, концентрацию и чистоту образца, идентичность и качество изотопно-меченого растворителя и применяемую последовательность импульсов.

Мономерные композиции олигомеров могут быть измерены, например, с помощью метода полного гидролиза, при котором известное количество олигомера растворяют в сильной кислоте при повышенной температуре и оставляют на достаточное время для осуществления полного гидролиза. Концентрация отдельных мономеров затем может быть измерена с помощью способов ВЭЖХ или ГХ, описанных в настоящем документе и известных в данной области техники, для получения относительных измерений численности, как описано в Hoick et al. Абсолютные количества можно измерить, добавляя в образец ВЭЖХ известное количество активного стандарта детектора, выбранного для предотвращения перекрытия с любым из критических сигналов.

Степень разветвления в любой данной популяции может быть измерена с помощью анализа метилирования, описанного, например, Nakomori (J. Biochem. (Tokyo), 1964, 55, 205). С помощью этих данных может быть установлена идентификация потенциальных повторяющихся единиц путем объединения данных общего гидролиза, среднего показателя DP и анализа метилирования и сравнения их со спектром DEPT ЯМР. Корреляция количества аномерных сигналов углерода с этими данными указывает, требуется ли регулярная единица повтора для соответствия собранным данным, как продемонстрировано, например, в Harding, et al. (*Carbohydr. Res.* 2005, 340, 1107).

Гликановые терапевтические препараты, например те, которые содержат моносахаридные или дисахаридные гликановые единицы, такие как глюкоза, галактоза, фукоза, ксилоза, арабиноза, рамноза и манноза, могут быть идентифицированы с использованием одного, двух, трех или четырех следующих параметров: а) наличие 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более (например, по меньшей мере 4 или 5) диагностических аномерных ЯМР-пигов, каждый из которых представляет собой отличающийся тип гликозидной связи, б) соотношение альфа-связи к бета-связи от около 0,8 до 1 и от около 5 до 1 (например, от около 1:1 до 4:1, обычно в пользу альфа-связи), с) по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 разные гликозидные региохимии из перечня 1,2-, 1,3-, 1,4- и 1,6-замещенных и по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 разные гликозидные региохимии из перечня 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,6-, 1,3,4-, 1,3,6- и 1,4,6-замещенных, и d) распределение DP, в котором по меньшей мере 50, 60, 70% или по меньшей мере 80% отдельных видов имеют DP по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, от 3 до 30 или от 5 до 25. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые препараты представляет собой уникальный структурный класс, отличающийся от встречающихся в природе олигосахаридов. В некоторых вариантах реализации изобретения охарактеризованы средние показатели ранее неизвестных свойств гликановых терапевтических препаратов (например, DP, DB, соотношение "альфа-гликозидная связь:бета-гликозидная связь"), которые отли-

чаются от свойств олигосахаридов, встречающихся в природе. Указанные структурные характеристики могут быть количественно определены с помощью способов, описанных в настоящем документе. Гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, имеют по меньшей мере одну, две, три, четыре или по меньшей мере пять из следующих характеристик.

(i) Распределение показателей молекулярного веса, например от около DP3 до около DP30 или от около DP5 до около DP25, которое может быть идентифицировано с помощью количественных масс-спектрометрических измерений, ЭХ-ВЭЖХ, IAC-ВЭЖХ или ионно-обменная (ИО) ВЭЖХ.

(ii) Значительная доля как альфа-, так и бета-связей из соотношениями связей, например, от 0,8:1, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 до 5:1 (в основном в пользу альфа-стереохимии), которую можно идентифицировать с помощью множества методов ЯМР, включая последовательность импульсов HSQC, которая позволяет четко различать и количественно определять сигналы от альфа- и бета-гликозидов. наличие как альфа-, так и бета-гликозидных связей в наблюдаемых соотношениях (см. табл. 6, демонстрирующую наличие значительной доли как альфа-, так и бета-связей в одном и множестве сахарных гликанов) в гликановом терапевтическом препарате некоторых вариантов реализации изобретения отличается от препаратов встречающихся в природе олиго- или полисахаридов, в основном в пользу одной первичной гликозидной стереохимии, и в некоторых случаях препарат содержит только относительно небольшую часть противоположной стереохимии.

(iii) Наличие по меньшей мере одной, двух, трех или четырех региохимий гликозидов, которые могут быть идентифицированы либо методом характерного процесса ЯМР, либо посредством идентификации разветвления перметилирования, разработанной Nakomori, et al. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты имеют по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10% одного, двух, трех или четырех из 1,2-, 1,3-, 1,4- и 1,6-гликозидных типов связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты имеют по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10% двух из 1,2-, 1,3-, 1,4- и 1,6-гликозидных типов связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты имеют по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10% трех из 1,2-, 1,3-, 1,4- и 1,6-гликозидных типов связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты имеют по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или по меньшей мере 10% всех четырех из 1,2-, 1,3-, 1,4- и 1,6-гликозидных типов связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат дополнительно содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4 или по меньшей мере 5% разветвленных типов связей. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4 или по меньшей мере 5% по меньшей мере одного, двух или по меньшей мере трех разветвленных типов связей, включая, но не ограничиваясь ими, 1,3,6-, 1,4,6- или 1,2,4-гликозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере два типа связей из 1,3,6-, 1,4,6- или 1,2,4-гликозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4 или по меньшей мере 5% трех разветвленных типов связей из 1,3,6-, 1,4,6- или 1,2,4-гликозидов. Сахара, которые не имеют гидроксильной группы в данной позиции X, не будут иметь тип 1,X-связи, например, фукоза (6-дегидроксигалактоза) не будет иметь 1,6-гликозидных связей, но будут иметь 1,2-, 1,3- и 1,4-гликозидные связи. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 или по меньшей мере 3% мономерных гликановых единиц в форме фуранозы. Наличие большого количества гликозидных региохимий и разветвлений (см. фиг. 4 для 3 типовых гликанов) в гликановом терапевтическом препарате согласно некоторым вариантам реализации изобретения отличается от препаратов встречающихся в природе олиго- или полисахаридов, в основном в пользу специфических связей. Хотя известно, что все эти региохимические свойства встречаются в олигосахаридах из природных источников, препараты олигосахаридов из природных источников не включают количественные признаки и структурную комплексность региохимии, характерную для гликановых терапевтических препаратов согласно некоторым вариантам реализации изобретения.

(iv) Распределение гликозидных связей, которое представляет собой по меньшей мере 50, 60, 70, 80% или по меньшей мере 90% всех возможных комбинаций регио- и стереохимий. В каждом конкретном случае региохимическое распределение может быть определено с помощью анализа разветвления, а стереохимическое распределение может быть определено с помощью ЯМР. HSQC-ЯМР. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты демонстрируют разнообразие пиков в аномерной области, которые ассоциированы с мультипликативной комбинацией как региохимии, так и стереохимии. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит по меньшей мере два или по меньшей мере три альфа-1,2-, альфа-1,3-, альфа-1,4-, и альфа-1,6-гликозидов и по меньшей мере два или по меньшей мере три бета-1,2-, бета-1,3-, бета-1,4-, и бета-1,6-гликозидов. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат содержит все четыре из альфа-1,2-, альфа-1,3-, альфа-1,4-, и альфа-1,6-гликозидов и все четыре из бета-1,2-, бета-1,3-, бета-1,4-, и бета-1,6-гликозидов. В качестве примера, HSQC препарата glu100 показывает, что препарат содержит все альфа-1,2-, альфа-1,3-, альфа-1,4-, и альфа-1,6-гликозиды, а также все бета-1,2-,

бета-1,3-; бета-1,4- и бета-1,6-гликозиды. Сахара, которые не имеют гидроксильной группы в данной позиции X, не будут иметь тип 1,X-связи, например фукоза (6-дегидрокси-галактоза) не будет иметь 1,6-гликозидных связей, но будут иметь 1,2-; 1,3- и 1,4-гликозидные связи.

(v) Уникальная "картина" HSQC, которая является результатом аддитивного характера последовательности импульсов HSQC. Для любого данного гликана спектры HSQC позволяют идентифицировать пики, которые являются уникальными для специфического регио- и стереохимической связи. Например, фиг. 5 иллюстрирует частичное распределение спектров препарата glu100, демонстрируя то, как эти пики могут применяться для идентификации специфических гликозидных регио- и стереохимии. Компонентные гликановые единицы (например, сахара) в гликане демонстрируют спин-выделение в последовательности импульсов HSQC, а спектр HSQC любого гликана, состоящего из множества Сахаров, представляет собой сумму пиков его отдельных сахаров. Компоненты гликановых единиц (например, мономеры) могут быть идентифицированы с помощью спектра HSQC, который показывает 4, 5, 6 или более пиков, перечисленных в табл. 7 для каждого из компонентов гликановых единиц (например, сахаров). Спектры на фиг. 3а-с иллюстрируют это путем сравнения спектров препаратов glu100, gal100 и glu50gal50.

#### Фармацевтические композиции, продукты лечебного питания и единичные лекарственные формы

В настоящем изобретении также предлагаются способы получения фармацевтических композиций, содержащих гликановый терапевтический препарат, которому свойственны одна или более, две или более, три или более или четыре или более характеристики препаратов, описанные в настоящем документе (включая критерии (i)-(v) выше). В частности, способы включают получение гликанового терапевтического препарата и достижения показателя (показателей) для одной или более, двух или более или трех или более характеристик препарата, включая, например, i) степень полимеризации (DP), ii) среднюю степень разветвления (DB, точки разветвления на остаток), iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, iv) идентичность гликановых единиц и v) соотношение гликановых единиц и получение фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат, если желаемые или предварительно установленные критерии препарата удовлетворяются в пределах требуемого диапазона отклонений.

Способы приготовления гликанового терапевтического препарата в форме фармацевтической композиции, продукта лечебного питания или диетической добавки известны в данной области техники и могут включать один или более, два или более, три или более или четыре или более из следующих этапов: (i) приготовление препарата в форме лекарственного продукта, (ii) упаковку препарата, (iii) маркировку упакованного препарата и (iv) продажу или предложение для продажи упакованного и маркированного препарата. Приготовление гликанового терапевтического препарата в форме лекарственного продукта известно в данной области техники и может включать один или более, два или более, три или более или четыре или более из следующих этапов: (i) удаление нежелательных компонентов из препарата, (ii) уменьшение объема препарата, (iii) стерилизация препарата, (iv) смешивание препарата с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем, (v) смешивание препарата со вторым лекарственным средством или фармацевтическим агентом, (vi) приготовление препарата с пригодной консистенцией, такой как, например, водный разбавленный раствор, сироп или твердое вещество, (vii) приготовление препарата в пригодной лекарственной форме, например в форме таблетки, пилюли или капсулы.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат подвергается дальнейшей обработке для получения либо гликанового терапевтического сиропа или порошка. Например, в одном варианте гликановый терапевтический препарат концентрируют с целью получения сиропа. Для концентрирования раствора могут применяться любые пригодные способы, известные в данной области техники, такие как применение вакуумного испарителя. В другом варианте гликановый терапевтический препарат высушивают распылением с целью получения порошка. Для высушивания распылением с целью получения порошка могут применяться любые пригодные способы, известные в данной области техники.

В настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты. В некоторых случаях фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, дополнительно включают второй агент, например пребиотическое вещество и/или пробиотическую бактерию. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, дополнительно содержат микронутриент. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, не содержат пребиотического вещества. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, не содержат пробиотической бактерии. Кроме того, в некоторых случаях фармацевтические композиции, продук-

ты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, содержат одно или более вспомогательных веществ или носителей, включая разбавители, связующие вещества, разрыхлители, диспергирующие вещества, смазывающие вещества, скользящие вещества, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, вкусо-ароматические вещества и красители.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции или продукты для лечебного питания, а также диетические добавки включают гликановый терапевтический препарат glu100, ara100, xyl100, gal100, glu50gal50, gal75xyl25, ara50gal50, man62glu38, ara50xyl50, man52glu29gal19 или glu33gal33fuc33.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции или продукты для лечебного питания, а также диетические добавки включают гликановый терапевтический препарат glu100, ara100, xyl100, glu50gal50, man52glu29gal19 или glu33gal33fuc33.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции или продукты для лечебного питания, а также диетические добавки включают гликановый терапевтический препарат glu100 и man52glu29gal19.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты (и наборы, содержащие их), содержат один или более микронутриентов. В некоторых вариантах реализации изобретения микронутриент выбирают из группы, состоящей из микроэлемента, холина, витамина и полифенола.

В некоторых вариантах осуществления микронутриент представляет собой микроэлемент металла. Микроэлементы, пригодные для применения в качестве микронутриентов, включают, но не ограничиваются ими, бор, кобальт, хром, кальций, медь, фторид, йод, железо, магний, марганец, молибден, селен и цинк.

В некоторых вариантах осуществления микронутриент представляет собой витамин. Витамины, пригодные для применения в качестве микронутриентов, включают, но не ограничиваются ими, витамин В, витамин В1 (тиамин), витамин В2 (рибофлавин), витамин В3 (ниацин), витамин В5 (пантотеновая кислота), витамин В6 (пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин), витамин В7 (биотин), витамин В8 (эрганиловая кислота), витамин В9 (фолиевая кислота), витамин В12 (цианокобаламин), холин, витамин А (ретинол), витамин С (аскорбиновая кислота), витамин D, витамин Е (токоферол), витамин К, каротиноиды (альфа-каротин, бета-каротин, криптоксантин, лютеин, ликопен) и зеаксантин.

В некоторых вариантах осуществления микронутриент представляет собой полифенол. Полифенолы представляют собой химические соединения или молекулы, которые характеризуются наличием по меньшей мере одного ароматического кольца с одной или более гидроксильными группами. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой синтетический полифенол или природный полифенол. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой природный полифенол, который получают из растительного сырья.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой флавоноид или катехин. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноид или катехин выбирают из антоцианов, хальконов, дигидрохальконов, дигидрофлавонолов, флаванолов, флаванонов, флавонолов и изофлавоноидов. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой лигнан.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол выбирают из алкилметоксифенолов, алкилфенолов, куркуминоидов, фуранокумаринов, гидроксibenзальдегидов, гидроксibenзокетонов, гидроксинамидальдегидов, гидроксикумаринов, гидроксифенилпропенов, метоксифенолов, нафтохинонов, фенольных терпенов, а также тирозолов. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой танин или дубильную кислоту.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол выбирают из гидроксibenзойных кислот, гидроксикоричных кислот, гидроксифенилуксусных кислот, гидроксифенилпропановых кислот и гидроксифенилпентановых кислот. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой астильбен.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенол представляет собой любой из полифенолов, перечисленных в табл. 5.

Кроме того, при необходимости, фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, включающие гликановые терапевтические препараты, могут включать терапевтически активные агенты, пребиотические вещества и/или пробиотические бактерии. В альтернативных или дополнительных вариантах реализации изобретения терапевтически активные агенты, пребиотические вещества и/или пробиотические бактерии могут вводиться отдельно (например, до, одновременно или после введения гликановой терапии), а не в составе фармацевтической композиции, продукта для лечебного питания и диетической добавки (например, в качестве комбинированного средства), содержащих гликановые препараты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции или продукты для лечебного питания или диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, вводят в комбинации с рекомендуемой или предписанной диетой, например диетой, которая богата пробиотическими и/или пребиотическими пищевыми продуктами, что может быть определено врачом или другим специалистом в области здравоохранения. Терапевтически активные агенты,

пребиотические вещества и/или пробиотические бактерии можно вводить для регулирования микробиоты кишечника субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинированный эффект (например, на количество или интенсивность микробных, геномных или функциональных сдвигов) является аддитивным. В других вариантах реализации изобретения комбинированный эффект (например, на количество или интенсивность микробных, геномных или функциональных сдвигов) является синергетическим.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат пребиотическое вещество или его препарат.

В некоторых вариантах реализации изобретения пребиотики могут вводиться субъекту, принимающему фармацевтические композиции или продукты для лечебного питания, или диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе. Пребиотики являются неперевариваемыми веществами, которые при потреблении могут оказывать полезное физиологическое воздействие на организм хозяина путем избирательного стимулирования благоприятного роста или активности ограниченного числа облигатных бактерий в кишечнике (Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 1995 June; 125(6): 1401-12.). Пребиотик, такой как пищевое волокно или пребиотический олигосахарид (например, кристаллическая целлюлоза, пшеничные отруби, овсяные отруби, кукурузное волокно, соевое волокно, волокно свеклы и тому подобное), может дополнительно стимулировать рост пробиотических и/или комменсальных бактерий в кишечнике путем обеспечения ферментируемой дозы углеводов для бактерий и увеличения уровней этих микробных популяций (например, лактобактерий и бифидобактерий) в желудочно-кишечном тракте.

Пребиотики включают, но не ограничиваются ими, различные галактаны и смолы на основе углеводов, такие как псиллиум, гуар, карраген, геллан, лактулоза и аморфофаллус коньяк. В некоторых вариантах реализации изобретения пребиотик представляет собой одно или более веществ, выбранных из группы, состоящей из галактоолигосахаридов (GOS), лактулозы, раффинозы, стахиозы, лактозакрызы, фруктоолигосахаридов (FOS, например олигофруктозы или олигофруктана), инулина, изомальтоолигосахаридов, ксиллолигосахаридов (XOS), паратинозных олигосахаридов, изомальтозных олигосахаридов (IMOS), трансгалактозилированных олигосахаридов (например трансгалакто-олигосахаридов), трансгалактозилированных дисахаридов, соевых олигосахаридов (например, соя-олигосахаридов), хитозановых олигосахаридов (хиозов), гентиоолигосахаридов, соевых и пектиновых олигосахаридов, глюкоолигосахаридов, пектикоолигосахаридов, продуктов поликонденсации палатинозы, ангидрида III дифруктозы, сорбита, мальтита, лактита, полиолов, полидекстрозы, линейных и разветвленных декстранов, пулалана, гемицеллюлозы, восстановленной паратинозы, целлюлозы, бета-глюкозы, бета-галактозы, бета-фруктозы, вербаскозы, галактинола, ксилана, инулина, хитозана, бета-глюкана, гуаровой камеди, гуммиарабика, пектина, альгината натрия и лямбда-каррагинана или их смесей.

Пребиотики можно встретить в определенных продуктах питания, например, в корне цикория, в артишоке иерусалимском, зелени одуванчика, чесноке, луке-порее, репчатом луке, спарже, пшеничных отрубях, пшеничной муке, банане, молоке, йогурте, сорго, лопухе, брокколи, брюссельской капусте, кочанной капусте, цветной капусте, листовой капусте, кормовой капусте, редьке и брюкве, а также в мисо. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в сочетании с диетой, которая включает продукты, богатые пребиотиками. Пригодные источники растворимых и нерастворимых волокон являются коммерчески доступными.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, включающие гликановые терапевтические препараты, дополнительно содержат пробиотическую бактерию или ее препарат, например, полученный из бактериальных культур, которые обычно считаются безопасными (GRAS) или известными комменсальными или пробиотическими микроорганизмами. В некоторых вариантах реализации изобретения, чтобы максимизировать полезный эффект эндогенных комменсальных микроорганизмов или экзогенно вводимых пробиотических микроорганизмов, фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, включающие гликановый терапевтический препарат, вводят для стимуляции роста и/или активности полезных бактерий в желудочно-кишечном тракте.

Примеры пригодных пробиотиков включают, но не ограничиваются ими, организмы, классифицированные как роды *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* и семейство *Christensenellaceae*. Неисключающие примеры пробиотических бактерий, которые могут применяться в способах и композициях, описанных в настоящем документе, включают *L. acidophilus*, виды *Lactobacillus*, такие как *L. crispatus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. Plantarum*, *L. sporogenes* и *L. bulgaricus*, а также виды *Bifidobacterium*, такие как *B. lactis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. anolescentis* и *B. infantis*. Дрожжи, такие как *Saccharomyces boulardii*, также пригодны в качестве пробиотиков для введения в

кишечник, например, посредством пероральных лекарственных формы или продуктов питания. Например, йогурт представляет собой продукт, который уже содержит виды бактерий, такие как *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*.

Пригодными бактериями для регулирования микробиоты желудочно-кишечного тракта могут быть бактерии, которые продуцируют органические кислоты (молочный и уксусные кислоты) или которые продуцируют цитотоксические или цитостатические агенты (для ингибирования патогенного роста), такие как, например, перекись водорода ( $H_2O_2$ ) и бактериоцины. Бактериоцины представляют собой небольшие противомикробные пептиды, которые могут убивать как близкородственные бактерии, так и проявлять более широкий спектр активности (например, низин).

Пригодные бактерии могут включать один или более родов *Akkermansia*, *Anaerofilum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Dorea*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* и *Streptococcus*, и/или один или более видов *Akkermansia muciphilia*, *minuta*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Clostridium scindens*, *Dialister invisus*, *Eubacterium rectal*, *Eubacterium eligens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах реализации изобретения пробиотические или комменсальные бактерии включают одну или более бактерий, перечисленных в табл. 1.

Пребиотические вещества и пробиотические штаммы, которые могут быть объединены с гликановыми терапевтическими препаратами, описанными в настоящем документе, для получения композиции или набора, могут быть выделены на любом уровне чистоты с помощью стандартных способов, при этом очистку можно осуществить с помощью обычных способов, известных специалистам в данной области техники, таких как дистилляция, перекристаллизация и хроматография. Выращенные бактерии, которые будут применяться в композиции, отделяют от культурального бульона с помощью любого способа, включая, без ограничений, центрифугирование, фильтрацию или декантацию. Клетки, отделенные от ферментационного бульона, в некоторых случаях промывают водой, солевым раствором (0,9% NaCl) или любым пригодным буфером. Полученную влажную клеточную массу можно высушить любым пригодным способом, например, с помощью лиофилизации.

В некоторых вариантах реализации изобретения пробиотические бактерии представляют собой лиофилизированные вегетативные клетки. В некоторых вариантах реализации изобретения применяются препараты спор из спорообразующих пробиотических бактерий.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция дополнительно содержит пребиотик и пробиотик. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит пробиотики, жизнеспособность которых частично ослаблена (например, смесь содержит 10, 20, 30, 40, 50% или более нежизнеспособных бактерий), или пробиотики, состоящие исключительно из нежизнеспособных микробов. Композиции могут дополнительно содержать микробные мембраны и/или клеточные стенки, которые были выделены от убитых микробов и очищены. При необходимости, пробиотический организм может быть включен в фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию в виде культуры в воде или другой жидкой или полутвердой среде, в которой пробиотик остается жизнеспособным. В другом способе лиофилизированный порошок, содержащий пробиотический организм, может быть введен в материал в виде частиц или жидкий или полутвердый материал путем смешивания или соединения.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, продукты для лечебного питания и диетические добавки, содержащие гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, дополнительно содержат второй терапевтический агент или его препарат. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтический агент представляет собой антибиотик, противогрибковый агент, противовирусный агент или противовоспалительный агент (например, цитокин, гормон и т.д.). Антибиотики включают аминогликозиды, такие как амикацин, гентамицин, канамицин, неомицин, стрептомицин и тобрамицин; цефалоспорины, такие как цефамандол, цефазолин, цефалексин, цефалоглицин, цефалоридин, цефалотин, цефапирин и цефрадин; макролиды, такие как эритромицин и тролеандомицин; пенициллины, такие как пенициллин G, амоксициллин, ампициллин, карбенициллин, клоксациллин, диклоксациллин, метициллин, нафциллин, оксациллин, фенетициллин и тикарциллин; полипептидные антибиотики, такие как бацитрацин, колистиметат, колистин, полимиксин В; тетрациклины, такие как хлортетрациклин, демеклоциклин, доксициклин, метациклин, миноциклин, тетрациклин и окситетрациклин; и различные антибиотики, такие как хлорамфеникол, клиндамицин, цикloserин, линкомицин, рифампин, спектиномицин, ванкомицин, биомицин и метронидазол.

Гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, другие терапевтически активные агенты, пребиотические вещества, микронутриенты и пробиотики могут быть соединены или смешаны в одной фармацевтической композиции или в продукте для лечебного питания, или в диетической добавке. В других вариантах реализации изобретения они могут содержаться в отдельных контейнерах (и/или в различных пригодных единичных лекарственных формах), но упаковываются вместе в один или более наборов. В некоторых вариантах реализации изобретения препараты или композиции не упаковываются или не помещаются вместе. Врач может затем вводить препараты или композиции вме-

сте, например, до, одновременно или после друг друга. В некоторых вариантах реализации изобретения препараты или композиции действуют синергетически при регулировании микробиоты у субъекта, например, в желудочно-кишечном тракте.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит от 0,1 до 100% гликанового терапевтического препарата по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %. В другом варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 100% гликанового терапевтического препарата по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит около 1-90%, около 10-90%, около 20-90%, около 30-90%, около 40-90%, около 40-80%, около 40-70%, около 40-60%, около 40-50%, около 50-90%, около 50-80%, около 50-70%, около 50-60%, около 60-90%, около 60-80%, около 60-70%, около 70-90%, около 70-80%, около 70-90%, около 70-80%, около 80-90%, около 90-96%, около 93-96%, около 93-95%, около 94-98%, около 93-99% или около 90-100% гликанового терапевтического препарата по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %.

Фармацевтическая композиция, содержащая гликановый терапевтический препарат, в некоторых случаях может содержать одно или более вспомогательных веществ или носителей. Фармацевтическая композиция может содержать от около 1% до около 90% одного или более вспомогательных веществ или носителей по показателю вес/вес, вес/об., об./об. или молярного %. Например, фармацевтическая композиция может содержать около 1-90%, 1-75%, 1-60%, 1-55%, 1-50%, 1-45%, 1-40%, 1-25%, 1-15%, 1-10%, 10-90%, 10-75%, 10-60%, 10-55%, 10-50%, 10-45%, 10-40%, 10-25%, 10-15%, 15-90%, 15-75%, 15-60%, 15-55%, 15-50%, 15-45%, 15-40%, 15-25%, 25-90%, 25-75%, 25-60%, 25-55%, 25-50%, 25-45%, 25-40%, 40-90%, 40-75%, 40-60%, 40-55%, 40-50%, 40-45%, 45-90%, 45-75%, 45-60%, 45-55%, 45-50%, 50-90%, 50-75%, 50-60%, 50-55%, 55-90%, 55-75%, 55-60%, 60-90%, 60-75%, 75-90% одного или более вспомогательных веществ или носителей по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %.

#### Продукты лечебного питания

В настоящем изобретении также предлагаются гликановые терапевтические препараты, приготовленные в виде продукта лечебного питания. Любой гликановый терапевтический препарат, описанный в настоящем документе, может быть приготовлен в виде продукта лечебного питания, а также фармацевтических композиций, которые содержат гликановые терапевтические препараты.

Продукты лечебного питания определены в разделе 5(b)(3) Закона об лекарственных препаратах для лечения орфанных заболеваний (21 U.S.C. 360ee(b)(3)). Продукты лечебного питания разрабатывают для употребления в пищу (приема внутрь) или энтерального введения (например, кормление/применение назогастрального зонда) под наблюдением медицинского работника, например, врача. Продукты лечебного питания предназначены для специфического диетического лечения заболевания или патологического состояния, такого как, например, дисбактериоз микробиоты желудочно-кишечного тракта или заболевания желудочно-кишечного тракта, описанного в настоящем документе. В данном контексте термин "продукты лечебного питания" не включает продукты питания, которые просто рекомендуются врачом в качестве части общего рациона для контроля за симптомами или с целью снижения риска заболевания или патологического состояния. Продукты лечебного питания, содержащие гликановые терапевтические препараты, представляют собой продукты, которые являются синтетическими (например, составленные и/или обработанные продукты, например, предусмотренные для частичного или полного питания пациента путем перорального приема или зондового энтерального кормления) и не встречающимися в природе продуктами питания, применяемыми в естественном состоянии. Продукты лечебного питания, содержащие гликановые терапевтические препараты, могут представлять собой основной компонент контроля за заболеванием или патологическим состоянием желудочно-кишечного тракта, например, продукты лечебного питания может представлять собой частичный или единственный источник пищи для субъекта, имеющего показания для приема продуктов лечебного питания. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект имеет ограниченную или ослабленную способность глотать, переваривать, поглощать или метаболизировать обычные пищевые продукты или определенные нутриенты. В других вариантах реализации изобретения у субъекта есть другие особые медицинские показания для приема нутриентов, регулирование содержания которых в пище не может быть достигнуто только путем модификации обычной диеты. Продукты лечебного питания, содержащие гликановые терапевтические препараты, вводят субъекту, имеющего для этого показания, под медицинским наблюдением (которое может быть активным и постоянным), при этом, как правило, субъекта инструктируют относительно употребления продуктов лечебного питания. Продукты лечебного питания могут содержать одну или более пищевых добавок, окрашивающих добавок, вспомогательных веществ GRAS и других агентов или веществ, пригодных для продуктов лечебного питания. Относительно питательной полноценности препараты продуктов лечебного питания могут иметь полные или неполные формулы.

#### Диетические добавки

Любой описанный в настоящем документе гликановый терапевтический препарат может быть при-

готовлен в виде диетической добавки, например, для применения в способе, описанном в настоящем документе.

Диетические добавки регулируются в соответствии с Законом о диетических добавках (DSHEA) 1994 года. Диетическая добавка представляет собой продукт, принимаемый перорально, который содержит "диетический ингредиент", предназначенный для дополнения диеты. "Диетические ингредиенты" в этих продуктах могут включать, помимо описанного в настоящем документе гликанового терапевтического препарата, один или более витаминов, минералов, трав или других растительных веществ, аминокислот и таких веществ, как ферменты, ткани органов, железистые ткани и метаболиты. Диетические добавки также могут быть экстрактами или концентратами и находиться во многих формах, таких как таблетки, капсулы, мягкие гели, гелевые капсулы, жидкости или порошки. Диетические добавки также могут быть в других формах, например, в баре, в этом случае информация на их этикетке не должна представлять продукт как обычную пищу или единственный источник питания или диеты. DSHEA требует, чтобы каждая добавка была помечена как диетическая добавка, а не как общий продукт питания.

#### Лекарственные формы

Предлагаемые в настоящем изобретении гликановые терапевтические препараты могут разрабатываться в любой пригодной лекарственной форме, например для перорального или энтерального введения. Лекарственные формы, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью способов, которые известны специалистам в данной области техники.

Лекарственная форма может представлять собой пакет, такой как любой отдельный контейнер, который содержит фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию в виде, например, жидкости (для промывания/полоскания), геля, крема, мази, порошка, таблетки, пилюли, капсулы, депо, одноразового аппликатора или медицинского устройства (например, шприца). Например, в настоящем изобретении предлагается также изделие, такое как контейнер, содержащий единичную лекарственную форму фармацевтической гликановой терапевтической композиции и этикетку с инструкциями для применения такого гликанового терапевтического средства.

Формы композиций, которые могут применяться перорально, включают таблетки, плотные капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие герметичные капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. Таблетки можно изготовить прессованием или формованием, в некоторых случаях с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть получены путем прессования активного ингредиента в соответствующей машине в свободнотекущей форме, такой как порошок или гранулы, в некоторых случаях смешанных со связующими агентами (например, повидон, желатин, гидроксипропилметилцеллюлоза), инертными разбавителями, консервантом, антиоксидантом, разрыхлителем (например, гликолят крахмала натрия, сшитый повидон, сшитая натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы) или смазывающими, поверхностно-активными или диспергирующими агентами. Формованные таблетки можно получить формованием смеси порошкового соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем, в соответствующей машине. В некоторых случаях таблетки могут быть покрыты или иметь риск для разлома и могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента. В некоторых случаях таблетки могут иметь энтеросолюбильное покрытие, чтобы обеспечить высвобождение в определенных отделах кишечника (например, ободочная кишка, нижние отделы тонкого кишечника), за исключением желудка. Все составы для перорального введения могут быть в дозах, пригодных для такого введения. Плотные капсулы могут содержать активные ингредиенты в смеси с наполнителем, таким как лактоза, связующими агентами, такими как крахмалы, и/или смазывающими агентами, такие как тальк или стеарат магния и, в некоторых случаях, стабилизаторами. В мягких капсулах активные соединения и/или другие агенты (например, пребиотики или пробиотики) могут быть растворены или суспендированы в пригодных жидкостях, таких как жирные масла, жидкий парафин или жидкие полиэтиленгликоли. Кроме того, можно добавлять стабилизаторы. Ядра драже покрываются пригодными покрытиями. Для этой цели могут применяться концентрированные растворы сахара, которые в некоторых случаях могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбополиэфир, полиэтиленгликоль или диоксид титана, растворы лака и пригодные органические растворители или смеси растворителей. В таблетки или покрытия драже могут быть добавлены красители или пигменты для идентификации или характеристики различных комбинаций доз активного соединения.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с инертным твердым разбавителем, например карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с водорастворимым носителем, таким как полиэтиленгликоль, или масляной средой, например арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

В одном варианте реализации изобретения предлагаемая гликановая терапевтическая композиция включает состав из мягкого геля. Мягкий гель может содержать оболочку на основе желатина, которая окружает жидкую начинку. Оболочку можно изготовить из желатина, пластификатора (например, глицерина и/или сорбита), модификатора, воды, красителя, антиоксиданта или ароматизатора. Оболочку можно изготовить из крахмала или каррагинана. Наружный слой можно покрыть энтеросолюбильным по-



крытием. В одном варианте реализации изобретения состав с мягким гелем может включать водорастворимый или масляный раствор для заполнения или суспензию композиции, покрытой слоем желатина.

Твердые препараты для перорального применения могут содержать энтеросолюбильное покрытие, с помощью которого можно контролировать участок пищеварительного тракта, в котором абсорбируется гликановая терапевтическая композиция. Например, энтеросолюбильное покрытие может быть разработано таким образом, что гликановая терапевтическая композиция не растворяется в желудке, а вместо того перемещается в тонкий кишечник, где подлежит растворению. Энтеросолюбильное покрытие может быть стабильным при низком pH (например, в желудке) и может растворяться при более высоком pH (например, в тонком кишечнике). Материал, который может быть использован в энтеросолюбильных покрытиях, включает, например, альгиновую кислоту, фталат ацетата целлюлозы, пластмассы, воски, шеллак и жирные кислоты (например, стеариновая кислота, пальмитиновая кислота).

Препараты для перорального применения также могут быть представлены в жидкой лекарственной форме. Жидкие препараты могут быть в виде, например, водных или масляных суспензий, растворов, сиропов эмульсий или эликсиров или могут быть представлены в виде сухого продукта для разбавления водой или другим пригодным разбавителем перед применением. Такие жидкие препараты могут содержать обычные добавки, такие как суспендирующие агенты, например сорбит, метилцеллюлоза, сироп глюкозы, желатин, гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия или гидрированные пищевые жиры, эмульгирующие агенты, например лецитин, сорбитанмоноолеат, аравийская камедь; неводные несущие среды (которые могут включать пищевые масла), например миндальное масло, масляные сложные эфиры, такие как глицерин, пропиленгликоль или этиловый спирт; консерванты, например, метил- или пропил-р-гидроксibenzoат или сорбиновая кислота, и, при необходимости, обычные ароматизаторы или красители. В некоторых вариантах реализации изобретения жидкие композиции могут содержать, например, агент в форме "вода в растворе" и/или суспензии; и несущую среду, содержащую полиэтиоксилированное касторовое масло, спирт и/или полиоксиэтилированный сорбитанмоноолеат с ароматизаторами или без них. Каждая лекарственная форма может содержать эффективное количество гликанового терапевтического препарата и может в некоторых случаях содержать фармацевтически инертные агенты, такие как обычные вспомогательные вещества, несущие среды, наполнители, связующие вещества, разрыхлители, вещества, регулирующие pH, буфер, растворители, солубилизирующие агенты, подсластители, красители и любые другие неактивные агенты, которые могут быть включены в фармацевтические лекарственные формы для введения. Примеры таких несущих сред и добавок можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17-е издание (1985).

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут быть в виде единичных дозированных форм или многодозовых форм. В данном контексте термин "единичная дозированная форма" относится к физически дискретной единице, пригодной для введения человеку, имеющему для этого показание. В одном варианте реализации изобретения единичная дозированная форма предоставляется в упаковке. Каждая единичная доза может содержать predetermined количество активного ингредиента (ингредиентов), достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с другими фармацевтическими носителями или вспомогательными веществами. Примеры единичных лекарственных форм включают, но не ограничиваются ими, ампулы, шприцы и индивидуально упакованные таблетки и капсулы. Единичные лекарственные формы можно вводить в виде фракций или кратно. Многодозовая лекарственная форма представляет собой множество идентичных единичных дозированных форм, упакованных в один контейнер, которые можно вводить в изолированной единичной дозированной форме. Примеры многодозовых лекарственных форм включают, но не ограничиваются ими, флаконы, банки с таблетками или капсулами, или флаконы с пинтами или галлонами. В другом варианте реализации изобретения многодозовые лекарственные формы включают различные фармацевтически активные агенты. Например, может быть представлена многодозовая лекарственная форма, которая содержит первый элемент дозы, содержащий композицию с гликановым терапевтическим препаратом, и второй элемент дозы, содержащий пребиотик, терапевтический агент и/или пробиотик, который может находиться в форме модифицированного высвобождения. В этом примере пара элементов дозы может составлять лекарственную форму с единичной дозой. В одном варианте реализации изобретения предлагается набор, содержащий множество единичных доз, при этом каждая единица дозы содержит первый элемент дозы, содержащий композицию с гликановым терапевтическим препаратом, и второй элемент дозы, содержащий пробиотик, фармацевтический агент, пребиотик или их комбинацию, который может находиться в форме модифицированного высвобождения. В другом варианте реализации изобретения набор дополнительно содержит комплект инструкций.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,001 мг до около 10 гликанового терапевтического препарата (например, гликанового терапевтического препарата, описанного в настоящем документе). Например, единичная лекарственная форма может содержать от около 0,001 мг до около 9,5 г, от около 0,005 мг до около 9 г, от около 0,01 мг до около 8,5 г, от около 0,05 до около 8 г, от около 0,075 мг до около 7,5 г, от около 0,1 мг до около 7 г, от около 0,25 мг до около 6,5 г, от около 0,5 мг до около 6 г, от около 0,75 мг до около 5,5 г, от около 1 мг до около 5 г, от около 2,5 до около 4,5 г, около 5 мг до около 4 г, от около 7,5 до около 3,5 г, от около 10 до около 3 г, от

около 12,5 до около 2,5 г, от около 15 мг до около 2 г, от около 17,5 до около 1,5 г, около 1 г, от около 25 мг до около 750 мг, от около 50 мг до около 500 г или от около 75 мг до около 250 мг гликанового терапевтического препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,001 мг до около 100 мг, от около 0,005 мг до около 75 мг, от около 0,01 мг до около 50 мг, от около 0,05 до около 25 мг, от около 0,1 мг до около 10 мг, от около 0,5 мг до около 7,5 мг или от около 1 мг до около 5 мг гликанового терапевтического препарата. В других вариантах осуществления единичная лекарственная форма содержит от около 1 мг до около 100 мг, от около 2,5 мг до около 75 мг, от около 5 мг до около 50 мг или от около 10 мг до около 25 мг гликанового терапевтического препарата. В других вариантах осуществления единичная лекарственная форма содержит от около 100 мг до около 10 г, от около 250 мг до около 7,5 г, от около 500 мг до около 5 г, от около 750 мг до около 2,5 г или от около 1 г до около 2 г гликанового терапевтического препарата.

В других вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,001 мл до около 1000 мл гликанового терапевтического препарата (например, гликанового терапевтического препарата, описанного в настоящем документе). Например, единичная лекарственная форма может содержать от около 0,001 мл до около 950 мл, от около 0,005 мл до около 900 мл, от около 0,01 мл до около 850 мл, от около 0,05 мл до около 800 мл, от около 0,075 мл до около 750 мл, от около 0,1 мл до около 700 мл, от около 0,25 мл до около 650 мл, от около 0,5 мл до около 600 мл, от около 0,75 мл до около 550 мл, от около 1 мл до около 500 мл, от около 2,5 мл до около 450 мл, от около 5 мл до около 400 мл, от около 7,5 мл до около 350 мл, от около 10 мл до около 300 мл, от около 12,5 до около 250 мл, от около 15 мл до около 200 мл, от около 17,5 до около 150 мл, от около 20 мл до около 100 мл или около 25 мл до около 75 мл гликанового терапевтического препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,001 мл до около 10 мл, от около 0,005 мл до около 7,5 мл, от около 0,01 мл до около 5 мл, от около 0,05 до около 2,5 мл, от около 0,1 мл до около 1 мл, от около 0,25 мл до примерно 1 мл или от около 0,5 мл до около 1 мл гликанового терапевтического препарата. В других вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,01 мл до около 10 мл, от около 0,025 мл до около 7,5 мл, от около 0,05 до около 5 мл или от около 0,1 мл до около 2,5 мл гликанового терапевтического препарата. В других вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма содержит от около 0,1 до около 10 мл, от около 0,25 мл до около 7,5 мл, от около 0,5 до около 5 мл, от около 0,5 до около 2,5 мл или от около 0,5 мл до около 1 мл гликанового терапевтического препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма, например таблетка, капсула (например, твердая капсула, плотная капсула или мягкая капсула) или мягкий гель, имеет длину корпуса от около 0,1 дюйма до около 1,5 дюйма (например, около 0,5 дюйма и около 1 дюйма) или от около 5 мм до около 50 мм (например, от около 10 мм до около 25 мм). В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма, например таблетка, капсула (например, твердая капсула, плотная капсула или мягкая капсула) или мягкий гель, имеет внешний диаметр от около 0,05 дюйма до около 1 дюйма (например, от около 0,1 дюйма до около 0,5 дюйма) или от около 1 мм до около 25 мм (например, от около 5 мм до около 10 мм).

Каждая единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата может иметь калорийность от около 0,01 ккал до около 1000 ккал. Например, единичная лекарственная форма может иметь калорийность от около 0,01 ккал до около 900 ккал, от около 0,05 до около 800 ккал, от около 0,1 ккал до около 700 ккал, от около 0,25 ккал до около 600 ккал, около 0,5 ккал до около 500 ккал, от около 0,75 ккал до около 400 ккал, от около 1 ккал до 300 ккал, от около 5 ккал до около 200 ккал или от около 10 ккал до около 100 ккал. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата имеет калорийность от 10 ккал до около 500 ккал. В других вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата имеет калорийность от 50 ккал до около 500 ккал.

В других вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма может иметь калорийность от около 0,001 ккал до около 100 ккал, от около 0,005 ккал до около 90 ккал, от около 0,01 ккал до около 80 ккал, от около 0,025 ккал до около 70 ккал, от около 0,05 ккал до до около 60 ккал, от около 0,075 ккал до около 50 ккал, от около 0,1 ккал до 40 ккал, от около 0,25 ккал до около 30 ккал, от около 0,5 ккал до около 25 ккал, от около 0,25 до около 20 ккал или от около 0,1 ккал до около 10 ккал.

Единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата может быть приготовлена для растворения в водном растворе (например, в воде, молоке, соке и т.п.) и вводится перорально в виде напитка, сиропа, раствора или суспензии. Например, единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата может быть в форме кубика, пакета, пастилки, пилюли, таблетки, капсулы, конфеты, порошка, эликсира или концентрированного сиропа, приготовленных для растворения в водном растворе перед пероральным введением. В некоторых вариантах реализации изобретения единичная лекарственная форма гликанового терапевтического препарата может быть в форме кубика, пакета, пастилки, пилюли, таблетки, капсулы, конфеты, порошка, эликсира или концентрированного сиропа, приготовленных для растворения *in vivo*, например, во рту, желудке, тонком кишечнике или ободочной кишке

субъекта при пероральном введении.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановую терапевтическую композицию вводят энтерально. Этот путь введения предпочтительно включает пероральное введение, или через оральный или назальный зонд (включая назогастральный, назо-еюнальный, орально-гастральный или орально-еюнальный зонд). В других вариантах реализации изобретения введение включает ректальное введение (включая клизму, суппозиторий или введение при колоноскопии).

Лекарственные формы, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью способов, которые известны специалистам в данной области техники. Например, для изготовления таблеток эффективное количество пребиотика может быть равномерно диспергировано в одном или более вспомогательных веществах или добавках, например, с применением градиента с высоким сдвигом, гранулирования с низким сдвигом, гранулирования с псевдооживленным слоем или путем смешивания для прямого прессования. Вспомогательные вещества и добавки включают разбавители, связующие вещества, разрыхлители, диспергирующие вещества, смазывающие вещества, скользящие вещества, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, антиадгезивы, сорбенты, подсластители, а также красители или их комбинацию. Разбавители, также называемые наполнителями, могут применяться для увеличения объема таблетки с целью достижения необходимого размера для прессования. Неограничивающие примеры разбавителей включают лактозу, целлюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, маннит, сухой крахмал, гидролизованные крахмалы, сахарную пудру, тальк, хлорид натрия, диоксид кремния, оксид титана, дигидрат дикальцийфосфата, сульфат кальция, карбонат кальция, оксид алюминия и каолин. Связующие вещества могут придавать сцепляющие свойства составу таблеток и могут применяться для содействия состоянию интактности таблетки после прессования.

Неограничивающие примеры пригодных связующих веществ включают крахмал (включая кукурузный крахмал и предварительно желатинизированный крахмал), желатин, сахара (например, глюкозу, декстрозу, сахарозу, лактозу и сорбит), целлюлозы, полиэтиленгликоль, альгиновую кислоту, декстрин, казеин, метилцеллюлозу, воски, натуральные и синтетические смолы, например, аравийская камедь, трагакант, альгинат натрия, гуммиарабик, ксантановая камедь и синтетические полимеры, такие как полиметакрилаты, поливиниловые спирты, гидроксипропилцеллюлоза и поливинилпирролидон. Смазывающие вещества также могут облегчать производство таблеток; их неограничивающие примеры включают стеарат магния, стеарат кальция, стеариновую кислоту, бегенат глицерина и полиэтиленгликоль. Разрыхлители могут облегчать разрыхление таблетки после введения, и их неограничивающие примеры включают крахмалы, альгиновую кислоту, сшитые полимеры, такие как, например, сшитый поливинилпирролидон, натрия кроскармеллозу, калия или натрия крахмала гликолят, глины, целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза (СМС), СМС-Na, СМС-Ca)), крахмалы, камеди и тому подобное. Неограничивающие примеры пригодных скользящих веществ включают диоксид кремния, тальк и тому подобное. Стабилизаторы могут ингибировать или замедлять реакции разложения лекарственного средства, включая окислительные реакции. Поверхностно-активные вещества могут включать и могут быть анионными, катионными, амфотерными или неионными. Типовые подсластители могут включать экстракт стевии, аспартам, сахарозу, алитам, сахарин и тому подобное. При необходимости, таблетки могут также содержать нетоксичные вспомогательные вещества, такие как буферные агенты pH, консерванты, например антиоксиданты, смачивающие или эмульгирующие агенты, солибилизирующие агенты, агенты для покрытия, ароматизаторы (например, мята, вишня, анис, персик, абрикос, лакричник, малина, ваниль) и тому подобное. Дополнительные вспомогательные вещества и добавки могут включать ацетат алюминия, бензиловый спирт, бутилпарабен, бутилгидрокситолуол, динатриевую ЭДТК кальция, дигидрат гидрофосфата кальция, двузамещенный фосфат кальция, трехзамещенный фосфат кальция, воск канделилы, карнубский воск, гидрированное касторовое масло, цетилпиридиновый хлорид, лимонную кислоту, коллоидный диоксид кремния, сополивидон, кукурузный крахмал, цистеин HCl, диметикон, динатрийгидрофосфат, эритрозиновый натрий, этилцеллюлозу, желатин, глицерин, глицерилмоноолеат, глицерилмоностеарат, глицин, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гипромеллозу, железа оксид красный или окись железа, железа оксид желтый, оксид железа или окись железа, карбонат магния, оксид магния, стеарат магния, метионин, сополимер метакриловой кислоты, метилпарабен, силикатированную микрокристаллическую целлюлозу, минеральное масло, фосфорную кислоту, простой фосфат кальция, безводный фосфат кальция, полаксамер 407, полаксамер 188, простой поллаксер, полиэтилен оксид, полиокси-140 стеарат, полисорбат 80, бикарбонат калия, сорбат калия, картофельный крахмал, повидон, пропиленгликоль, пропиленпарабен, пропилпарабен, ретинилпальмитат, натрия сахарин, селен, двуокись кремния, силикагель, коллоидальную двуокись кремния, бензоат натрия, карбонат натрия, дигидрат цитрата натрия, натрий-кроссмеллозу, лаурилсульфат натрия, метабисульфит натрия, пропионат натрия, натрий-крахмал, натрий-крахмальный гликолят, стеарилфумарат натрия, сорбиновую кислоту, сорбитол, сорбитанмоноолеат, предварительно желатинизированный крахмал, янтарную кислоту, триацетин, триэтилцитрат, растительный стеарин, витамин А, витамин Е, витамин С или их комбинацию. Количество указанных вспомогательных веществ и добавок может быть правильно выбрано на основе их соотношения с другими компонентами и свойствами препарата и способа получения.

Состав немедленного высвобождения эффективного количества гликановой терапевтической композиции могут содержать одну или более комбинаций вспомогательных веществ, которые обеспечивают быстрое высвобождение фармацевтически активного агента (например, от 1 мин до 1 ч после введения). Термин "составы с контролируемым высвобождением" (также называемые составами с пролонгированным высвобождением (SR), удлиненным высвобождением (ER, XR или XL), медленным или замедленным высвобождением, контролируемым высвобождением (CR) или постоянным высвобождением) относится к высвобождению гликановой терапевтической композиции из лекарственной формы в определенный желаемый момент времени после введения лекарственной формы субъекту.

В одном варианте реализации изобретения лекарственная форма с контролируемым высвобождением начинает свое высвобождение и продолжает высвобождение в течение длительного периода времени. Высвобождение может начаться почти сразу или может быть долговременным. Высвобождение может быть постоянным, может увеличиваться или уменьшаться со временем, может быть импульсным, может быть непрерывным или прерывистым и тому подобное. В одном варианте реализации изобретения термин "доза с контролируемым высвобождением" относится к высвобождению агента из композиции или лекарственной формы, в которой агент высвобождается согласно желаемому профилю в течение длительного периода времени. В одном аспекте контролируемое высвобождение относится к замедленному высвобождению агента из композиции или лекарственной формы, в которой агент высвобождается согласно желаемому профилю, в котором высвобождение происходит через некоторое время.

Фармацевтические носители или несущие среды, пригодные для введения предлагаемых в настоящем изобретении соединений, включают все такие носители, известные специалистам в данной области техники, пригодные для конкретного способа введения. Кроме того, композиции могут содержать один или более компонентов, которые не ухудшают желаемое действие, или компонентов, которые дополняют желаемое действие, или осуществляют другое действие.

В дополнительном аспекте лекарственная форма может представлять собой шипучую лекарственную форму. Термин "шипучий" означает, что лекарственная форма, смешанная с жидкостью, включая воду и слюну, выделяет газ. Некоторые шипучие агенты (или шипучие пары) выделяют газ в результате химической реакции, которая происходит при воздействии шипучего дезинтегрирующего агента на воду или на слюну во рту. Эта реакция может быть результатом реакции растворимого источника кислоты и щелочного монокарбоната или источника карбоната. Реакция этих двух общих соединений приводит к образованию газообразного диоксида углерода при контакте с водой или слюной. Шипучую пару (или индивидуальную кислоту и основание отдельно) можно покрыть защищающим от растворения или энтеросолюбильным покрытием для предотвращения преждевременной реакции. Такую пару можно также смешивать с ранее лиофилизированными частицами (такими как гликановый терапевтический препарат). Источники кислоты могут быть любыми, которые являются безопасными для потребления человеком и могут включать пищевые кислоты, кислотные и гидритовые антациды, такие как, например, лимонный, винный, амалиновый, фумиевый, адипиновый и янтарный. Источники карбоната включают сухой твердый карбонат и бикарбонатную соль, такую как бикарбонат натрия, карбонат натрия, бикарбонат калия и карбонат калия, карбонат магния и тому подобное. Также включены реагенты, которые выделяют кислород или другие газы и которые безопасны для потребления человеком. В одном варианте реализации изобретения применяются лимонная кислота и бикарбонат натрия.

В другом аспекте лекарственная форма может быть в форме конфет (например, в матрице), такой как леденец или пастилка. В одном варианте реализации изобретения эффективное количество гликанового терапевтического препарата диспергируется в матрице конфеты. В одном варианте реализации изобретения матрица конфеты содержит один или более сахаров (таких как декстроза или сахароза). В другом варианте реализации изобретения матрица конфеты представляет собой матрицу, не содержащую сахара. Выбор конкретной матрицы конфет характеризуется широким спектром. Можно применять обычные подсластители (например, сахарозу), сахарные спирты, пригодные для применения пациентам с диабетом (например, сорбитол или маннитол), или другие подсластители (например, подсластители, описанные в настоящем документе). Основа конфеты может быть очень мягкой и быстро растворяться, или может быть жесткой и медленно растворяться. Различные формы будут иметь преимущества в разных ситуациях.

Композиция массы конфеты, содержащая эффективное количество гликанового терапевтического препарата, может вводиться перорально субъекту, имеющему для этого показание, так что эффективное количество гликанового терапевтического препарата будет высвобождаться во рту пациента, когда масса конфеты растворяется и проглатывается. Субъект, имеющий для этого показание, включает взрослого человека или ребенка.

Лекарственные формы, описанные в настоящем документе, могут также принимать форму фармацевтических частиц, изготовленных различными способами, включая, но не ограничиваясь этим, гомогенизацию под высоким давлением, увлажненный или сухой помол в шаровой мельнице или осаждение малых частиц (например, nGimat's NanoSpray). Другими способами, пригодными для получения подходящей порошкообразной композиции, являются получение раствора активных ингредиентов и вспомогательных веществ с последующим осаждением, фильтрацией и распылением или последующим удалением.

ем растворителя путем сушки вымораживанием с последующим распылением порошка до желаемого размера частиц. В одном варианте реализации изобретения фармацевтические частицы имеют конечный размер 3-1000 мкм, например, чаще всего 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 мкм. В другом варианте реализации изобретения фармацевтические частицы имеют конечный размер 10-500 мкм. В другом варианте реализации изобретения фармацевтические частицы имеют конечный размер 50-600 мкм. В другом варианте реализации изобретения фармацевтические частицы имеют конечный размер 100-800 мкм.

В другом аспекте настоящего изобретения предлагается способ изготовления единичной лекарственной формы, описанной в настоящем документе, включая получение гликанового терапевтического препарата (например, гликанового терапевтического препарата, описанного в настоящем документе); приготовление гликанового терапевтического препарата в виде единичной лекарственной формы (например, единичной лекарственной формы, описанной в настоящем документе), упаковывание единичной лекарственной формы, маркирование упакованной единичной лекарственной формы и/или продажу или предложение для продажи упакованной и маркированной единичной лекарственной формы.

Единичные лекарственные формы, описанные в настоящем документе, также могут подвергаться обработке. В одном варианте реализации изобретения обработка включает один или более из процессов: обработку лекарственной формы с получением фармацевтической композиции, например составление, соединение со вторым компонентом, например вспомогательным веществом или буфером; порционирование на меньшие или большие аликвоты; размещение в контейнере, например, в газообразном или жидком контейнере; упаковывание; маркировку; доставку или перемещение в другое место. В одном варианте реализации изобретения обработка включает один или более из процессов: классификацию, выбор, принятие или отбраковывание, выпуск или удержание, обработку с получением фармацевтической композиции, доставку, перемещение в другое место, составление, маркировку, упаковывание, выпуск на рынок или продажу или предложение для продажи, в зависимости от того, выполняется ли заданное пороговое значение. В некоторых вариантах реализации изобретения обработанные лекарственные формы содержат гликановый терапевтический препарат, описанный в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения обработка включает один или более из процессов: обработку лекарственной формы с получением фармацевтической композиции, например составление, соединение со вторым компонентом, например вспомогательным веществом или буфером; порционирование на меньшие или большие аликвоты; размещение в контейнере, например в газообразном или жидком контейнере; упаковывание; маркировку; доставку или перемещение в другое место. В одном варианте реализации изобретения обработка включает один или более из процессов: классификацию, выбор, принятие или отбраковывание, выпуск или удержание, обработку с получением фармацевтической композиции, доставку, перемещение в другое место, составление, маркировку, упаковывание, выпуск на рынок или продажу или предложение для продажи, в зависимости от определения. В другом варианте реализации изобретения предлагается оральная лекарственная форма, содержащая гликановую терапевтическую композицию, при этом пероральная лекарственная форма представляет собой сироп. Сироп может содержать около 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 85% твердого вещества. Сироп может содержать около 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% жидкости, например воды. Твердое вещество может содержать гликановую терапевтическую композицию. Твердое вещество может составлять, например, около 1-96%, 10-96%, 20-96%, 30-96%, 40-96%, 50-96%, 60-96%, 70-96%, 80-96% или 90-96% гликановой терапевтической композиции. В другом варианте реализации изобретения гликановую терапевтическую композицию готовят в виде вязкой жидкости.

В одном варианте реализации изобретения указанная композиция содержит пенообразующий компонент, нейтрализующий компонент или нерастворимое в воде пищевое волокно. Пенообразующим компонентом может быть по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из гидрокарбоната натрия, карбоната натрия и карбоната кальция. В одном варианте реализации изобретения нейтрализующий компонент может быть по меньшей мере одним элементом, выбранным из группы, состоящей из лимонной кислоты, L-винной кислоты, фумаровой кислоты, L-аскорбиновой кислоты, DL-яблочной кислоты, уксусной кислоты, молочной кислоты и безводной лимонной кислоты. В одном варианте реализации изобретения нерастворимое в воде пищевое волокно может быть по меньшей мере одним элементом, выбранным из группы, состоящей из кристаллической целлюлозы, пшеничных отрубей, овсяных отрубей, волокна шишки, соевого волокна и свекольного волокна. Препарат может содержать сахарозу, сложный эфир жирной кислоты, сахарную пудру, порошок фруктового сока и/или ароматизирующий материал.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственные формы предназначены для высвобождения фармацевтических композиций, содержащих гликановые терапевтические препараты, в определенном отделе (отделах) желудочно-кишечного тракта, таком как тонкий или толстый кишечник. В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственные формы предназначены для высвобождения фармацевтических композиций, содержащих гликановые терапевтические препараты, в определенном отделе (отделах) желудочно-кишечного тракта, таком как слепая кишка, восходящая ободочная кишка, поперечная ободочная кишка, нисходящая ободочная кишка, сигмовидная кишка и/или прямая кишка.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему доставки, чувствительную к ферментам. Например, полимеры, чувствительные к трипсину, могут быть получены с применением гидрогелей, которые сшиты пептидами, расщепляемыми трипсином. Трипсин проявляет активность в тонком кишечнике. Трипсин-чувствительные системы доставки могут применяться для целевой доставки фармацевтических гликановых терапевтических композиций в тонкую кишку. В другом примере, перевариваемые ферментами гидрогели, состоящие из поливинилпирролидона, сшитого альбумином, расщепляются в присутствии пепсина.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой устройство доставки, которое обеспечивает длительную задержку препарата в определенном месте желудочно-кишечного тракта. Например, гастроретентивная система доставки обеспечивает длительное высвобождение фармацевтических гликановых терапевтических композиций в желудке. Гастроретентивную доставку можно применять для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, которые регулируют содержание бактерий в желудке или в верхнем отделе тонкого кишечника.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему мукоадгезивной доставки, посредством которой осуществляется прилипание к поверхностям слизистой оболочки желудка. Такие системы доставки обычно состоят из полимеров с многочисленными водородсодержащими группами, например, сшитые полиакриловые кислоты, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, альгинат натрия, каррагенан, карбопол 934Р или тиолированный поликарбофил.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой увеличивающуюся систему доставки, которая быстро увеличивается в размерах в желудке, что замедляет ее прохождение через привратник. К таким системам относятся системы, которые разворачиваются в желудке. Например, геометрические формы, такие как тетраэдры, кольца, диски и т.д., могут быть помещены в желатиновую капсулу. Когда капсула растворяется, указанная форма разворачивается. Системы могут состоять из одного или более поддающихся эрозии полимеров (например, гидроксипропилцеллюлозы), одного или более не поддающихся эрозии полимеров (например, полиолефинов, полиамидов, полиуретанов). Затем гликановую терапевтическую композицию можно диспергировать в полимерной матрице. Время удерживания может быть точно отрегулировано посредством полимерной смеси. В альтернативном варианте могут применяться устройства, изготовленные из эластичных полимеров, которые являются стабильными в кислотном рН желудка, но растворяются в нейтральных/щелочных условиях в более нижних отделах желудочно-кишечного тракта. Такие полимерные составы могут препятствовать кишечной непроходимости, когда устройство выходит из желудка. Могут также применяться надмолекулярные полимерные гели, сшитые водородными связями между карбоксильными группами, например, состоящие из поли(акрилоил-6-аминокапроновой кислоты) (РА6АСА) и поли(метаакриловой кислоты-со-этилакрилата) (EUDRAGIT L 100-55). Другие системы включают набухающие вспомогательные, такие как коллагеновые губки. Например, гидрогелевая матрица (например, набухающая сердцевина: поливинилпирролидон XL, карбопол 934Р, карбонат кальция) набухает в желудке, увеличиваясь в размерах в 2-5 раз. Суперпористые композиты гидрогелей за несколько минут увеличиваются в сотни раз по сравнению с их первоначальным объемом. Некоторые системы используют образования газа для достижения расширения, например генерирующие диоксид углерода расширяющиеся системы, которые окружены гидрофильной мембраной.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему доставки, контролируемую плотностью. Эти системы предназначены для удерживания на поверхности или погружения в желудочные жидкости, что задерживает их опорожнение из желудка. Например, системы с высокой плотностью позволяют устройству оседать на дно желудка, ниже привратника и, таким образом, избегать опорожнения желудка. Другие системы представляют собой системы с низкой плотностью/плавающие системы. Такие устройства могут, например, содержать захваченный воздух в полых камерах или могут вмещать в себя материалы с низкой плотностью, такие как жиры, масла или шипучий порошок. Низкая плотность может быть достигнута путем набухания, например, капсулы с гидроколлоидом растворяются при контакте с желудочной жидкостью, а гидроколлоиды набухают с образованием слизистой формации.

Альтернативные полимеры включают хитозаны, альгинат натрия и матрицу глицерол моноолеата. Низкая плотность может быть достигнута за счет образования газа. Например, таблетки, содержащие карбонат и в некоторых случаях лимонную кислоту, выделяют углекислый газ после контакта с кислыми водными средами. Выделенный диоксид углерода захватывается в гелеобразующий гидроколлоид, что заставляет систему держаться на поверхности жидкости. Гидроколлоиды включают гидроксипропилметилцеллюлозу и карбопол 934Р.

В некоторых вариантах реализации изобретения в лекарственной форме для фармацевтических

гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, используется конструкцию для удержания устройства в тонком или толстом кишечнике. Характеристики специфичного местоположения устройства определяются специфическим механизмом, приводящим в действие систему, например, рН, ферментом и т.д. К ним относятся системы, предназначенные для мукоадгезии, а также микроигольные пилюли. Микроигольные пилюли содержат резервуар с лекарственным средством, покрытый микроиглами и инкапсулированный в покрытие, чувствительное к рН. Когда пилюля достигает желаемого места в желудочно-кишечном тракте и покрытие растворяется, благодаря микроиглам пилюля задерживается на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. В других вариантах реализации изобретения микроигольные пилюли содержат капсулу, которая состоит из двух химических отсеков, заполненных лимонной кислотой и бикарбонатом натрия, соответственно. Когда пилюля растворяется в пищеварительной системе, барьеры между этими двумя веществами разрушаются, что позволяет им смешиваться и вступать в химическую реакцию, которая толкает микроиглы сахаридов через внешний слой капсулы и в слизистую оболочку тонкого кишечника. Сахаридные иглы могут быть заполнены лекарственными средствами, которые доставляются в близлежащие кровеносные сосуды, при абсорбции сахара.

В некоторых вариантах реализации изобретения в лекарственной форме для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, используется рН-чувствительное полимерное покрытие. Например, рН-зависимые полимеры (би- или трифазные) могут быть нерастворимы при низких уровнях рН (например, кислотоустойчивые в желудке, рН 1-2) и становятся более растворимыми при повышении рН, например до около рН 5,5-6,2 в двенадцатиперстной кишке, до около рН 5,7 в восходящей ободочной кишке, до около рН 6,4 в слепой кишке, до около рН 6,6 в поперечной ободочной кишке, до около рН 7,0 в нисходящей ободочной кишке, до около рН 7,2-7,5 в подвздошной кишке или до около рН 7,5 в дистальных отделах тонкого кишечника. В одном примере технология TARGIT™ может применяться для специфической доставки фармацевтических гликановых терапевтических композиций в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). В системе применяются рН-чувствительные покрытия на капсулы с крахмалом, изготовленные литьем под давлением, для целевого воздействия в терминальном отделе подвздошной кишки и ободочной кишке.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему с отсроченным высвобождением или систему с высвобождением, контролируемым временем. В таких системах обычно используются энтеросолюбильные покрытия, которые могут комбинироваться с рН-чувствительными функциями и функциями модифицированного по времени высвобождения. Например, могут применяться таблетки ЕТР (с энтеросолюбильным покрытием, нанесенным прессованием, с замедленным высвобождением), которые состоят из трех компонентов: сердцевина таблетки, содержащая гликановый терапевтический препарат (функция быстрого высвобождения), нанесенный прессованием набухающий слой гидрофобного полимера (например, гидроксипропилцеллюлоза (НРС), и функция замедленного высвобождения. Длительность фазы замедления может контролироваться либо посредством веса, либо посредством состава полимерного слоя, а также посредством слоя энтеросолюбильного покрытия (функция кислотной резистентности).

В некоторых вариантах реализации изобретения в лекарственной форме для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, используется энтеросолюбильные покрытия для таблеток и капсул Eudragit®. Другие пригодные синтетические полимеры включают шеллак, этилцеллюлозу, ацетатфталат целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилацетатфталат и полиглутаминовые кислоты, такие как поли-γ-глутаминовая кислота (γ-PGA). Эти покрытия сочетают как мукоадгезивные, так и рН-зависимые механизмы высвобождения. Для улучшения целенаправленной доставки в ободочную кишку покрытия Eudragits® в своем составе имеют метакриловые сополимеры с различными композициями боковых групп, которые изменяют значения рН, при которых они являются растворимыми. Например, при применении систем с покрытием Eudragit®, в желудке (например, при рН 1,4) и в тонком кишечнике (например, при рН 6,3) не происходит значительного высвобождения лекарственного средства, тогда как значительное высвобождение лекарственного средства можно наблюдать при рН 7,8 в илеоцекальной области.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему доставки, инициируемую микроорганизмами, такую как система доставки на основе полисахаридов. Системы доставки на основе полисахаридов содержат биоразлагаемые и мукоадгезивные полимерные покрытия, включая хитозановые и пектиновые покрытия. Другие пригодные природные полимеры включают, например, гуаровую камедь, инулин, циклодекстрин, декстран, амилазу, хондротинсульфат и камедь бобов рожкового дерева. Эти системы доставки могут применяться для целенаправленной доставки гликановых терапевтических препаратов в тонкий кишечник. Покрытия с природными полисахаридами, такими как гуаровая камедь, ксантановая камедь, хитозан, альгинаты и т.д., расщепляются микробиотой толстого кишечника, например ферментами, такими как ксилозидаза, арабинозидаза, галактозидаза и т.д.

Например, для доставки фармацевтических гликановых терапевтических композиций может применяться технология CODES™. Эта система сочетает полисахаридное покрытие с pH-чувствительным покрытием. В некоторых вариантах реализации изобретения система состоит из сердцевинки таблетки, покрытой тремя слоями полимерных покрытий. Внешнее покрытие состоит из Eudragit L. Это покрытие растворяется в двенадцатиперстной кишке и обнажает следующее покрытие. Следующее покрытие состоит из Eudragit E. Этот слой позволяет высвободить лактулозу, присутствующую во внутренней сердцевинке. Лактулоза метаболизируется в короткоцепочечные жирные кислоты, которые снижают значение pH окружающей среды, в которой растворяется слой Eudragit E. Растворение Eudragit E обуславливает начало действия гликанового терапевтического препарата. Бактерии, присутствующие в ободочной кишке, ответственны за расщепление полисахаридов, которые высвобождаются из сердцевинки таблетки. Расщепление полисахаридов может привести к образованию органических кислот, что снижает pH содержимого среды, окружающей таблетку.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой систему доставки, контролируруемую давлением. Разработка указанной системы основана на том явлении, что более высокие показатели давления регистрируются в ободочной кишке по сравнению с тонким кишечником. Например, в системах этилцеллюлозы, которые нерастворимы в воде, высвобождение гликановых терапевтических препаратов происходит после расщепления водонерастворимой полимерной капсулы под воздействием давления в просвете ободочной кишки. Профиль высвобождения можно регулировать путем изменения толщины этилцеллюлозы, размера капсулы и/или плотности капсулы.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой пульсирующую систему целенаправленной доставки в ободочную кишку. Например, система может быть системой пульсации.

Используемая капсула содержит пробку, которая помещается в капсулу, контролирующую высвобождение гликанового терапевтического препарата. Набухающий гидрогель (например, гидроксилпропилметилцеллюлоза (HPMC), полиметилметакрилат или поливинилацетат) уплотняет лекарственное средство. Когда капсула контактирует с жидкостью, пробка выталкивается из капсулы, и гликановый терапевтический препарат высвобождается. Профиль высвобождения можно контролировать, изменяя длину и/или точку пересечения пробки с корпусом капсулы. Другая система представляет собой порт-систему. Корпус капсулы заключают в полупроницаемую мембрану. Нерастворимая пробка состоит из осмотически активного агента и гликанового терапевтического препарата. Когда капсула контактирует с жидкостью, полупроницаемая мембрана способствует приток жидкости, что повышает давление в корпусе капсулы. Это приводит к вытеснению пробки и высвобождению гликанового терапевтического препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой осмотически контролируемую систему целенаправленной доставки в ободочную кишку. Типовая система OROS-CT состоит из осмотических блоков (до 5 или 6 напорно-вытяжных блоков), инкапсулированных в твердую желатиновую капсулу. Напорно-вытяжные блоки имеют двухслойную структуру с наружной кишечечно-непроницаемой мембраной и внутренней полупроницаемой мембраной. Внутренняя центральная часть напорно-вытяжного блока состоит из слоя лекарственного средства и напорного слоя. Гликановый терапевтический препарат высвобождается через полупроницаемую мембрану. Корпус капсулы, охватывающий напорно-вытяжные блоки, растворяется сразу же после введения. В желудочно-кишечном тракте кишечная непроницаемая мембрана предотвращает абсорбцию воды. Энтеросолюбильное покрытие растворяется в тонком кишечнике (более высокий pH, >7), вода поступает в блок через полупроницаемую мембрану, вызывая разбухание напорного слоя и вытеснение гликанового терапевтического препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой "умную пилюлю", которая может применяться для высвобождения гликанового терапевтического препарата непосредственно перед достижением илеоцекального клапана.

В некоторых вариантах реализации изобретения лекарственная форма для фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, представляет собой ректально вводимый состав. Например, фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию вводят в жидком составе в прямую кишку с помощью клизмы. Как правило, вводимый объем составляет менее 10 мл. Также фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию вводят в прямую кишку в суппозиториях. Суппозитории представляют собой твердые лекарственные формы, которые расплавляются или растворяются при введении в прямую кишку, высвобождая гликановый терапевтический препарат. Типовые вспомогательные вещества для составов суппозиториев включают масло какао, полиэтиленгликоли и агар.



### Получение полифенолов, синтез и приготовление экстрактов

В настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции, содержащие гликановые терапевтические препараты и полифенольные препараты. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие гликановые терапевтические препараты, содержат по меньшей мере один полифенол. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие гликановые терапевтические препараты, содержат множество полифенолов.

Гликановые терапевтические препараты и препараты полифенолов могут быть получены отдельно. Например, гликановые терапевтические препараты могут быть синтезированы, и препараты полифенолов могут быть экстрагированы, как описано в настоящем документе. В другом примере гликановые терапевтические препараты могут быть синтезированы, и препараты полифенолов могут быть синтезированы, как описано в настоящем документе. В еще одном примере гликановые терапевтические препараты могут быть синтезированы, а препараты полифенолов могут включать множество полифенолов, которые были экстрагированы из источника и множества, которое было синтезировано.

В некоторых вариантах реализации изобретения препараты полифенолов получают из экстрактов, содержащих полифенолы. В других вариантах реализации изобретения препараты полифенолов содержат синтетические полифенолы.

Фармацевтические композиции и продукты для лечебного питания могут быть получены путем смешивания гликановых терапевтических препаратов с препаратами полифенолов любым пригодным способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения препараты смешивают в соотношении 0,00000001:1, 0,0000001:1, 0,000001:1, 0,000005:1, 0,0001:1, 0,001:1, 0,01:1, 0,1:1, 0,5:1, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 (об./об.), (вес./вес.), (вес./об.) или молярном соотношении (гликан:полифенол, полифенол:гликан).

В некоторых вариантах реализации изобретения препараты полифенолов экстрагируют из растений, частей растений, клеток растений или растительных продуктов. Примеры частей растений включают, но не ограничиваются ими, кору, цветок, лепесток, стебель, цветоножку, клубень, корень, плод, ягоду, семя, орех, листья. Примеры растительных продуктов включают, но не ограничиваются ими, сок, мякоть, кожу, пюре, пасту и суспензию. Примеры растений могут включать, но не ограничиваются ими, черника, клюква, виноград, персик, слива, гранат, соя, красное вино, черный чай, зеленый чай. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы экстрагируют из множества растений, частей растений, клеток растений или растительных продуктов. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенольный экстракт получают из комбинации множества растений, частей растений, клеток растений или растительных продуктов.

Полифенолы могут быть экстрагированы из любого пригодного источника, такого как, например, продукты питания, богатые полифенолами, включая, но не ограничиваясь ими, гвоздику, мяту перечную, анис звездчатый, какао-порошок, орегано, семена сельдерея, рябину черноплодную, темный шоколад, муку из льняного семени, черную бузину, каштан, полынь трехзубчатую, розмарин, мяту колосистую, тимьян обыкновенный, голубику узколистную, черную смородину, каперсы, черную оливку, чернику щитковую, фундук, орех pekan, соевую муку, сливу, зеленую оливку, сладкий базилик, порошок карри, черешню, артишок, ежевику, жареные соевые бобы, молочный шоколад, клубнику, красный цикорий, красную малину, фильтрованный кофе, имбирь, цельнозерновую муку из твердых сортов пшеницы, чернослив, миндаль, темный сорт винограда, красный лук, зеленый цикорий, тимьян обыкновенный, свежая рафинированная мука из кукурузы, сою, темпе, цельнозерновую ржаную муку, яблоко, шпинат, лук-шалот, лимонную вербену, черный чай, красное вино, зеленый чай, соевый йогурт, желтый лук, соевое мясо, цельнозерновую пшеничную муку, чистосортный яблочный сок, чистосортный гранатовый сок, оливковое масло экстра-класса, черную фасоль, персик, чистосортный апельсиновый сок, тмин, чистосортный грейпфрутовый сок, белую фасоль, китайскую корицу, чистосортный апельсиновый сок, брокколи, красную смородину, соевый тофу, чистосортный лимонный сок, цельнозерновую овсяную муку, абрикос, тмин, рафинированную ржаную муку, спаржу, грецкий орех, картофель, корицу цейлонскую, петрушку, нектарин, майоран, красный салат, шоколадный напиток с молоком, айву, салат эндивий (эскарриоль), соевое молоко, чистосортный сок помело, рапсовое масло, грушу, ростки сои, зеленый виноград, морковь, уксус, соевый сыр, белое вино и розовое вино.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы могут быть экстрагированы из сока растений. В некоторых вариантах реализации изобретения сок растений представляет собой сок ягод черники, ягод ежевики, ягод малины, hockenberry, ягод крыжовника, бойзеновых ягод, ягод асаи, ягод воронца, ягод барбариса, ягод толокнянки, ягод калин, ягод черноплодной рябины, ягод дерна канадского, буйволовых ягод, ягод черемухи, ягод брусники, ягод бузины, ягод клюквы, ягод ежевики, ягод смородины, ягод черники, ягод годжи, ягод крыжовника, винограда, ягод фотинии, ягод черники облиствленной, ягод плюща, ягод ирги колосистой, ягод можжевельника, ягод брусники, логановых ягод, ягод омель белой, ягод гордовика сливолистного, оregonского винограда, хурмы, ягод лаконоса американского, ягод бирючины, ягод малины мелкоцветной, клубники, ягод ирги канадской, ягод гибрида ежевики и малины, ягод ежевики острозубчатой, ягод белой шелковицы, ягод красной шелковицы, ягод черной шелковицы, ягод малины японской, ягод грушанки, ягод тиса или ягод гибрида черной смородины и

ежевики.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы могут быть экстрагированы из растений или ткани растений, которые были модифицированы, выращены, разработаны или иным образом преобразованы, например, с целью изменения состава или количества содержания полифенолов. В некоторых вариантах реализации изобретения растения или ткани растений обрабатываются, подвергаются действию или контактируют с полифенол-индуцирующим агентом (например, химическим агентом или излучением, таким как УФ), до или после сбора или выделения растения или ткани растения, с целью индуцирования или стимулирования продукции полифенолов растением или тканью растения, или с целью повышения относительного количества полифенолов в растении или ткани растения, по сравнению, например, с необработанным растением или тканью, или растением или тканью, которые не подвергались воздействию или не контактировали с полифенол-индуцирующим агентом.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции гликановых терапевтических препаратов содержат препараты полифенолов, которые могут быть экстрагированы любым способом, известным в данной области техники. Например, способ экстракции может включать один или более из следующих этапов: i) сушка источника; ii) измельчение, растирание, дробление, смешивание или иной способ гомогенизации источника; iii) экстракция полифенолов из источника, например с применением растворителя.

В некоторых случаях исходный материал может быть предварительно обработан ферментами или обработан ферментами во время экстракции. Примеры ферментов включают, но не ограничиваются ими, пектолитические ферменты и ферменты, разрушающие клеточную стенку полисахаридов.

Растворителем может быть любой пригодный растворитель, известный в данной области техники. Например, растворителем может быть органический растворитель, такой как, но не ограничиваясь ими, метанол, этанол, ацетон и этилацетат, и в некоторых случаях водный растворитель (содержащий воду). При необходимости, растворитель может включать органические кислоты, такие как, но не ограничиваясь ими, трифторуксусная кислота, муравьиная кислота, уксусная кислота, лимонная кислота, соляная кислота, винная кислота, серная кислота или фосфорная кислота. Растворитель может представлять собой смесь органического растворителя и кислоты в любом необходимом соотношении. Растворитель может включать сверхкритический CO<sub>2</sub>.

Экстракция может проводиться при температуре от 0 до 100°C. Способы экстракции включают мацерацию и экстракцию в аппарате Сокслета, роторное испарение, экстракцию с помощью микроволн, ультразвуковую экстракцию, субкритическую водную экстракцию, сверхкритическую флюидную экстракцию, флюидную экстракцию под давлением, жидкостную экстракцию под давлением и ускоренную экстракцию растворителем.

В некоторых вариантах реализации изобретения экстракция может выполняться несколько раз с одним и тем же исходным материалом. При необходимости можно объединить несколько экстракций из исходного материала. В других вариантах реализации изобретения несколько экстракций из разных исходных материалов могут быть объединены.

Очистка и фракционирование экстракта полифенола может быть осуществлена любым пригодным способом, известным в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими: i) последовательную экстракцию или разделение жидких фаз, ii) твердофазную экстракцию, iii) противоточную хроматографию и iv) центрифугирование. Для последовательной экстракции неочищенный экстракт можно промыть неполярными растворителями для удаления липидов. Примеры неполярных растворителей включают, но не ограничиваются ими, гексан, дихлорметан и хлороформ. Для твердофазной экстракции неочищенный экстракт можно промыть субстратом, связывающим твердую фазу, для отделения заместителей полифенолов и/или удаления сахаров. В некоторых вариантах реализации изобретения водорастворимые компоненты, такие как сахар и органические кислоты, удаляют подкисленной водой. Примеры субстратов, связывающих твердую фазу, включают, но не ограничиваются ими: C18, Амберлит (Amberlite) XAD-2, XAD-7, XAD-16, Оазис (Oasis) HLB, C8 на основе кремнезема, HLB на основе сополимера, PH, ENV+, RP-C18, Тойоперл (Toyopearl), LH-20, полиамидная смола и MCX. При необходимости полифенолы могут быть дополнительно фракционированы путем подбора растворителя для элюирования и pH растворителя. Примеры элюентов включают, но не ограничиваются ими, этанол, метанол, ацетон и воду, а также любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения фенольные кислоты элюируются водой. В некоторых вариантах реализации изобретения неполимерные фенолы элюируются подкисленным этилацетатом. В некоторых вариантах реализации изобретения полимерные фенолы элюируются с помощью комбинации воды, ацетона, этанола и/или метанола. В некоторых вариантах реализации изобретения процианидины элюируются ацетоном и водой.

В качестве одного из примеров проантоцианидины могут быть выделены из кожицы ягод винограда. Кожицу ягод винограда можно собирать после выжимания и удаления сока из ягод винограда. Для экстракции полифенолов из кожицы ягод винограда можно применять пригодный растворитель, например смесь ацетона и воды. Затем растворитель удаляют. Воднофазовая экстракция может быть проведена, например, с помощью хлороформа, при этом экстракты в некоторых случаях могут быть лиофилизированы. Полученный порошок может быть очищен с помощью адсорбционной хроматографии. Проан-

тоцианидины можно промыть и элюировать растворителем (например, метанолом, ацетоном) и трифторуксусной кислотой. Растворитель удаляют, а водную фазу в некоторых случаях сушат вымораживанием для получения проантоцианидиновых порошков.

Для характеристики полученных смесей проантоцианидинов можно применять различные способы. Кислотный катализ в присутствии избытка фторглюцинола может применяться для определения состава субъединиц, результата конверсии и средней степени полимеризации. Массовое распределение полифенолов определяется с помощью масс-спектрометрии. Метод масс-спектрометрии состоит из растворения полифенолов в пригодном растворителе (например, метанол/ацетонитрил) и инфузии в электрораспылитель. Гель-проникающая хроматография может обеспечивать спектры элюирующих пиков и запускаться с двумя последовательными колонками (например, TSKgel G3000 Hxl с размером частиц 6 мкм с последующей G2500 Hxl с размером частиц 5 мкм H2500 Hxl, обе с внутренним диаметром 300×7,8 мм), при этом хроматография выполняется в изократических условиях с подвижной фазой в виде диметилформамида. Пигментированные проантоцианидины могут быть охарактеризованы с помощью оптической спектрофотометрии. Наконец, анализ элементов С, Н и N можно провести, загрузив образец порошка в оловянную чашу и запустить процесс анализа на анализаторе элементов, таком как, например, Carlo Erba EZ 1108.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиции, описанные в настоящем документе, содержат синтетические полифенолы. Полифенолы могут быть получены не только из пригодных растительных источников (например, растительных экстрактов), но и могут быть синтезированы. Полифенолы могут быть синтезированы с помощью пригодной комбинации химических, биохимических или биотехнологических способов, известных в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы экстрагируют из природных сорбентов, а затем модифицируют с помощью химических, биохимических или биотехнологических способов. В некоторых вариантах реализации изобретения синтезированные или модифицированные полифенольные химические структуры являются такими, которые не встречаются в природе. Примеры химических модификаций включают, но не ограничиваются ими, метилирование, гидроксильное, пренилирование, гликозилирование, димеризацию, полимеризацию.

Примеры гликозилирования включают, но не ограничиваются ими, глюкозиды, галактозиды, арабинозиды, рамнозиды.

Способы химического синтеза полифенолов известны в данной области техники и описаны, например, в Quideau S et al. "Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis", *Angewandte Chemie* 2011, 50, 586-621. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы синтезируют или модифицируют с помощью биотехнологических способов, например с применением ферментов для катализа соответствующих реакций. Реакции могут происходить в клетках (например, в бактериях, дрожжах, клетках растений), или в экстрактах, или лизатах, например, бактерий, дрожжей или клеток растений. В некоторых вариантах реализации изобретения конкретные ферменты выделяют и применяют в пригодных буферных системах и при соответствующих условиях реакции. Способы биотехнологического синтеза полифенолов известны в данной области техники и описаны, например, в Cress B et al. "Isoflavonoid Production By Genetically Engineered Microorganisms", *Natural Products*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. 1647-1681; Trantas EA et al. "When Plants Produce Not Enough Or At All: Metabolic Engineering Of Flavonoids In Microbial Hosts", *Frontiers in Plant Science* 2015, 6.

Полифенолы можно количественно определить или измерить с помощью любого пригодного метода. В некоторых вариантах реализации изобретения для сравнения измерений применяются известные концентрации эталонного стандарта (например, полифенола или множества полифенолов). В некоторых вариантах реализации изобретения общее количество полифенолов количественно определяют по методу Фолина-Дени, по методу Фолина-Циокальто, с помощью титрования перманганатом, колориметрии солями железа, ВЭЖХ, осаждения субстратов или электромагнитной абсорбции.

В некоторых вариантах реализации изобретения количественно определяют полифенольные классы. Например, антоцианины могут быть количественно определены с помощью электромагнитной абсорбции между длиной волны 490 и 550 нМ при одном или более значениях рН. Проантоцианидины могут быть количественно определены с помощью колориметрических методов, осаждения субстрата или анализов связывания с белками или их комбинации. В другом примере дубильные вещества могут быть количественно определены с применением иодида калия, роданина или нитрита натрия или анализов связывания с белками или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения для разделения и количественной оценки полифенолов или множества полифенолов применяют газовую хроматографию. При необходимости, полифенолы могут быть модифицированы перед газовой хроматографией, например, чтобы сделать полифенолы более летучими. В альтернативном или дополнительном варианте полифенолы количественно определяют с помощью ВЭЖХ, в некоторых случаях с применением различных твердых носителей и подвижных фаз. Полифенолы также могут быть количественно оценены с помощью масс-спектрометрии (МС). В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы количественно определяют с помощью ВЭЖХ-МС, в некоторых случаях с применением различных твердых носителей и подвижных фаз. В некоторых вариантах реализации изобретения определяют антиокси-

дантную способность полифенолов. Например, антиоксидантную способность полифенолов можно измерить с помощью Тролокс-эквивалентного анализа антиоксидантной способности, анализа способности к поглощению кислородного радикала, анализа параметров общего улавливания свободных радикалов антиоксидантом, анализа антиоксидантной способности относительно восстановления ионов железа, анализа антиоксидантной способности относительно восстановления ионов меди или их комбинации.

Другие способы экстракции, очистки, анализа и количественной оценки фенолов известны в данной области техники и описаны, например, в Dai J. and Mumper RJ, "Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties", *Molecules* 2010, 15(10), 7313-7352.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы могут быть экстрагированы и/или концентрированы с применением белков из разных источников и, в некоторых случаях, с изменением рН, например, как описано Raskin et al. в патентной публикации США № 20140328997.

В некоторых вариантах реализации изобретения количество полученных экстрагированных полифенолов выражается в мкг/кг исходного материала. В некоторых вариантах реализации изобретения количество полученных экстрагированных полифенолов выражается в мг/кг исходного материала. В некоторых вариантах реализации изобретения количество полученных экстрагированных полифенолов выражается в г/кг исходного материала.

В некоторых вариантах реализации изобретения препарат полифенолов включает флавоноиды. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноиды представляют собой антоцианины, антоцианидины, хальконы, дигидрохальконы, дигидрофлавонолы, флаванолы, флаван-3-олы, флаваноны, флавоны, флавонолы, изофлавоноиды, проантоцианидины, конденсированные танины, негидролизующие танины. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноиды представляют собой мономеры. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноиды представляют собой димеры. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноиды представляют собой полимеры. В некоторых вариантах реализации изобретения флавоноиды являются химически модифицированными. Примеры химических модификаций включают, но не ограничиваются ими, метилирование, гидроксильное, пренилирование, гликозилирование. Примеры гликозилирования включают, но не ограничиваются ими, глюкозиды, галактозиды, арабинозиды, рамнозиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения препарат полифенолов включает гидролизующие танины, флоротанины, лигнаны, алкиметоксифенолы, алкифенолы, куркумиды, фуранокумарины, гидроксibenзальдегиды, гидроксibenзокетоны, гидроксibenциналдегид, гидроксикумарины, гидроксифенилпропены, метоксифенолы, нафтохиноны, фенольные терпены, тирозолы, арбутин, катехол, пирокатехол, резорцин, куместрол, фенол, флорин, пирогаллол, фторглюцинол, сальвианоловую кислоту, гидроксibenзойную кислоту, гидроксикоричную кислоту, гидроксифенилуксусную кислоту, гидроксифенилпропановую кислоту, гидроксифенилпентановую кислоту, стильбены. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы представляют собой мономеры. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы представляют собой димеры. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы представляют собой полимеры. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы являются химически модифицированными. Примеры химических модификаций включают, но не ограничиваются ими, метилирование, гидроксильное, пренилирование, гликозилирование. Примеры гликозилирования включают, но не ограничиваются ими, глюкозиды, галактозиды, арабинозиды, рамнозиды.

В некоторых вариантах реализации изобретения экстракты содержат несколько из одного или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более) полифенолов, перечисленных в табл. 5. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, содержащие гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, содержат несколько из одного или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более) полифенолов, перечисленных в табл. 5.

#### Наборы

В настоящем изобретении также предлагаются наборы. Например, набор может содержать единичные лекарственные формы фармацевтической гликановой терапевтической композиции и листок-вкладыш в упаковку, содержащий инструкции для применения гликанового терапевтического препарата при лечении желудочно-кишечного нарушения или патологического состояния. Наборы включают фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию в пригодной упаковке для применения субъектом, имеющего для этого показание. Любая из описанных в настоящем документе композиций может быть упакована в виде набора. Набор может содержать количество фармацевтической гликановой терапевтической композиции (в некоторых случаях дополнительно содержащей пребиотическое вещество, пробиотическую бактерию и/или второй терапевтический агент), достаточное для всего курса лечения или для части курса лечения. Дозы фармацевтической гликановой терапевтической композиции могут быть отдельно упакованы или фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция может быть предоставлена в виде нерасфасованной массы или их комбинаций. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения, в наборе, в пригодной упаковке, представлены индивидуальные дозы гликановой терапевтической композиции, которые соответствуют моментам введения дозы согласно схеме лечения, при этом дозы упаковывают в один или более пакетов.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция может быть представлена в виде нерасфасованной массы в одном контейнере или в двух, трех, четырех, пяти или более пяти контейнерах. Например, каждый контейнер может содержать достаточное количество фармацевтической гликановой терапевтической композиции для определенной недели в программе лечения, выполняемой в течение месяца. Если предусмотрено более одного контейнера для нерасфасованной массы, контейнеры для нерасфасованной массы могут быть соответствующим образом упакованы вместе с целью обеспечения достаточного количества фармацевтической гликановой терапевтической композиции для всего или части периода лечения. Контейнер или контейнеры могут иметь этикетку, содержащую информацию, полезную для субъекта, имеющего показания для лечения, или для врача, назначающего протокол лечения, например схемы введения доз.

Фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция может быть упакована с другими пригодными веществами, такими как пробиотические бактерии, пребиотические вещества или другие вещества, как описано в настоящем документе. Другое вещество или вещества могут быть упакованы отдельно от фармацевтической гликановой терапевтической композиции или смешаны с фармацевтической гликановой терапевтической композицией или их комбинациями. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения наборы включают лекарственную форму, содержащую все ингредиенты, предназначенные для применения в ходе курса лечения, или части курса лечения, например фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию и в некоторых случаях буферы, вспомогательные вещества и т.д., пробиотик, пребиотик или терапевтический агент. В одном варианте реализации изобретения фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию упаковывают в одну упаковку или набор упаковок, а дополнительные компоненты, такие как пробиотические бактерии, пребиотики и терапевтические агенты, упаковывают отдельно от фармацевтической гликановой терапевтической композиции.

Наборы могут дополнительно включать печатные материалы, такие как инструкции, ожидаемые результаты, отзывы, объяснения, предупреждения, клинические данные, информацию для медицинских работников и тому подобное. В одном варианте реализации изобретения указанные наборы содержат этикетку или другую информацию, указывающую, что набор предназначен только для применения под руководством медицинского работника. Контейнер может дополнительно включать ложки, шприцы, бутылки, чашки, аппликаторы или другие измерительные или обслуживающие устройства.

#### Способы регулирования микробных таксонов, геномных и функциональных состояний микробиома

В настоящем изобретении предлагается способ регулирования содержания бактериальных таксонов (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более таксонов) в микробиоте желудочно-кишечного тракта субъекта-человека. Эти способы включают введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для регулирования содержания таксонов. При введении гликанового терапевтического препарата содержание бактериальных таксонов может увеличиваться относительно других таксонов (или относительно одного момента времени к другому), при этом увеличение может составлять по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750% или по меньшей мере 1000%. При введении гликанового терапевтического препарата содержание бактериальных таксонов может также уменьшаться относительно других таксонов (или относительно одного момента времени к другому), при этом уменьшение может составлять по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 75, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или по меньшей мере 99,9%. В некоторых вариантах реализации изобретения дисбиоз нарушает микробиоту и увеличивает содержание одного или более нежелательных таксонов и/или увеличивает содержание одного или более желательных таксонов. Посредством введения гликанового терапевтического препарата можно регулировать содержание желательных и/или нежелательных бактериальных таксонов микробиоты желудочно-кишечного тракта субъекта-человека, таким образом, осуществляя лечение дисбиоза.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен регулировать (например, увеличивать или уменьшать) рост одной или более бактерий, таких как, например, те, которые принадлежат к родам *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira* и *Subdoligranulum*, которые обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен регулировать (например, увеличивать или уменьшать) рост одной или более бактерий, таких как, например, те, которые, как считается, ассоциированы со здоровым состоянием желудочно-кишечного тракта, например представителей одного или более из родов *Akkermansia*, *Anaerofilum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Dorea*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* и *Streptococcus*, и/или представителей одного или более из видов *Akkermansia muciphilia*, *Christensenella minuta*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum*, *Clostridium scindens*, *Dialister invisus*, *Eubacterium rectal*, *Eubacterium eligens*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus thermophilus*.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен регулировать (например, увеличивать или уменьшать) рост по меньшей мере двух бактериальных таксо-

нов, выбранных из *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Примеры гликановых терапевтических препаратов включают *glu100*, *ara100*, *glu50gal50* и *glu33gal33fuc33*. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен регулировать рост двух бактериальных таксонов: *Akkermansia* и *Blautia*. Типовой гликановый терапевтический препарат представляет собой *xy1100*.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат вызывает селективные изменения как в составе, так и в активности (или функции) микробиоты желудочно-кишечного тракта, тем самым принося пользу для состояния здоровья организма хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат является селективным субстратом для одного или ограниченного количества потенциально полезных бактерий, которые находятся в желудочно-кишечном тракте, стимулируя их рост и/или метаболическую активность. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен изменять состав микробиоты желудочно-кишечного тракта до достижения или пониженного количества определенных бактерий в составе. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат селективно стимулирует рост и/или селективную активность желудочно-кишечных бактерий, ассоциированных с удовлетворительным состоянием здоровья и самочувствия. В одном примере гликановые терапевтические композиции, описанные в настоящем документе, уменьшают содержание или относительное количество или плотность заселения патогенных бактерий.

Отношения между микробиотой и организмом хозяина являются не просто комменсальными (невредное сосуществование), но во многих случаях это симбиотические отношения. Несмотря на то, что субъекты могут жить без микробиоты, микроорганизмы выполняют множество полезных функций, таких как ферментация неиспользуемых энергетических субстратов, тренировка иммунной системы, предотвращение роста патогенных бактерий, регулирование функционального развития кишечника, продукция витаминов для организма хозяина (таких как биотин и другие витамины) (см., например, Dominguez-Bello M G and Blaser M J, 2008 *Microbes Infect*, 10(9): 1072-1076). Широко распространенные в желудочно-кишечном тракте бактериальные таксоны включают роды *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Parabacteroides*, *Alistipes*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Faecalibacterium*, *Oscillospira* и *Subdoligranulum*. Считается, что некоторые бактериальные роды и виды ассоциированы с удовлетворительным состоянием желудочно-кишечного тракта, такие как, например, род *Akkermansia*, *Anaerofilum*, *Bacteroides*, *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Dialister*, *Dorea*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lachnospira*, *Lactobacillus*, *Phascolarctobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Roseburia*, *Ruminococcus* и *Streptococcus* и/или виды *Akkermansia* *municipiphila*, *Christensenella* *minuta*, *Clostridium* *coccoides*, *Clostridium* *leptum*, *Clostridium* *scindens*, *Dialister* *invisus*, *Eubacterium* *rectal*, *Eubacterium* *eligens*, *Faecalibacterium* *prausnitzii*, *Streptococcus* *salivarius* и *Streptococcus* *thermophilus*.

Однако в определенных условиях в экологической нише ЖКТ присутствуют патогенные виды и патобионты, которые способны вызывать заболевание, например путем индуцирования инфекции и/или воспаления и/или бактерий, ассоциируемых с патологическим состоянием, которые не обязательно являются возбудителем заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены, содержание которых можно регулировать посредством описанных в настоящем документе гликановых терапевтических препаратов, выбирают из группы, состоящей из родов *Bilophila*, *Campylobacter*, *Candidatus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Portiera*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* и *Yersinia*.

В некоторых вариантах реализации изобретения ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены, содержание которых можно регулировать посредством описанных в настоящем документе гликановых терапевтических препаратов, выбирают из группы, состоящей из видов *Bilophila* *wadsworthia*, *Campylobacter* *jejuni*, *Citrobacter* *farmer*, *Clostridium* *difficile*, *Clostridium* *perfringens*, *Clostridium* *tetani*, *Collinsella* *aerofaciens*, *Enterobacter* *hormaechei*, *Enterococcus* *faecalis*, *Enterococcus* *faecium*, *Escherichia* *coli*, *Fusobacterium* *varium*, *Fusobacterium* *nucleatum*, *Haemophilus* *parainfluenzae*, *Klebsiella* *pneumonia*, *Peptostreptococcus* *stomatis*, *Porphyromonas* *asaccharolytica*, *Pseudomonas* *aeruginosa*, *Salmonella* *bongori*, *Salmonella* *enteric*, *Shigella* *boydii*, *Shigella* *dysenteriae*, *Shigella* *flexneri*, *Shigella* *sonnei*, *Staphylococcus* *aureus*, *Streptococcus* *infantarius*, *Vibrio* *cholera* и *Yersinia* *enterocolitica*.

В некоторых вариантах реализации изобретения ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены, содержание которых можно регулировать посредством описанных в настоящем документе гликановых терапевтических препаратов, могут находиться преимущественно в одной или более определенных областях желудочно-кишечного тракта.

Например, следующие ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены обитают преимущественно в толстом кишечнике (ободочной кишке): *Listeria*, *Entamoeba* *histolytica*, *Balantidium* *coli*, *Basidiobolus* *ranarum*, *Trypanosoma* *cruzi*, *Clostridium* *botulinum*, *Fasciola* *hepatica*, *Histoplasma*

capsulatum, Rotavirus, Schistosoma mansoni, Schistosoma japonicum и Schistosoma mekongi, Shigella, Brachyspira aalborgi, Serpulina pilosicoli, Trichuris trichiura и Yersinia enterocolitica.

Следующие бактерии, патобионты и патогены, ассоциированные с заболеванием, обитают преимущественно в тонком кишечнике: Vibrio, Yersinia enterocolitica, Yersinia pseudotuberculosis, Clostridium perfringens, Capillaria philippinensis, Cryptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis и CMV-вирус.

Следующие бактерии, патобионты и патогены, ассоциированные с заболеванием, обитают преимущественно в толстом и тонком кишечнике: Campylobacter и Salmonella.

В другом примере следующие бактерии, патобионты и патогены, ассоциированные с заболеванием, преимущественно обитают в желудке: CMV-вирус, Bacillus anthracis, Candida, Cryptosporidium, EBV (вирус Эпштейна-Барр), Giardia lamblia, Helicobacter pylori, Helicobacter felis, Helicobacter fennelliae, Helicobacter cinaedi, Mycobacterium avium, Herpes varicella zoster, Histoplasma и Toxoplasma.

Здоровая микробная популяция защищает организм хозяина, например посредством усиления кишечного барьера, конкурентного исключения потенциальных патогенов или бактерий, ассоциированных с заболеваниями, а также путем ингибирования роста бактериальных патогенов и бактерий, ассоциированных с заболеваниями. Здоровая популяция бактерий может оказывать прямое антибактериальное действие на патогены и ассоциированные с заболеваниями бактерии путем продуцирования антибактериальных веществ, в том числе бактериоцинов и кислоты (Cotter PD, et al. 2005 Nat Rev, 3:777-788; Servin A L, 2004 FEMS Microbiol Rev, 28: 405-440). Антибактериальные вещества оказывают влияние самостоятельно или синергически, ингибируя рост патогенов или бактерий, ассоциированных с заболеваниями. Здоровая популяция бактерий может уменьшать адгезию как патогенов, так и их токсинов к слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов в желудочно-кишечном тракте, таких как, например, те, которые принадлежат к родам Bacteroides, Odoribacter, Parabacteroides, Alistipes, Blautia, Clostridium, Coprococcus, Dorea, Eubacterium, Lachnospira, Roseburia, Ruminococcus, Faecalibacterium, Oscillospira и Subdoligranulum, и которые обнаруживаются в желудочно-кишечном тракте. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, например тех, которые, как считается, ассоциированы со здоровым состоянием желудочно-кишечного тракта, например представителей одного или более из родов Akkermansia, Anaerofilum, Bacteroides, Blautia, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Clostridium, Coprococcus, Dialister, Dorea, Fusobacterium, Eubacterium, Faecalibacterium, Lachnospira, Lactobacillus, Phascolarctobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Prevotella, Roseburia, Ruminococcus и Streptococcus, и/или представителей одного или более из видов Akkermansia municipiphila, Christensenella minuta, Clostridium coccoides, Clostridium leptum, Clostridium scindens, Dialister invisus, Eubacterium rectal, Eubacterium eligens, Faecalibacterium prausnitzii, Streptococcus salivarius и Streptococcus thermophilus. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, таких как таксоны типа Verrucomicrobia, например рода Akkermansia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, преимущественно обитающих в тонком кишечнике. Например, гликановый терапевтический препарат регулирует рост одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в тонком кишечнике, таких как, например, Actinobacteria, Firmicutes (Bacilli, Clostridia) и Proteobacteria (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует рост одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в тонком кишечнике и выбраны из родов: Cryocolla, Mycobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus, Turicibacter, Blautia, Coprococcus, Eoldemania, Pseudoramibacter Eubacterium, Agrobacterium, Sphingomonas, Achromobacter, Burkholderia и Ralstonia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, преимущественно обитающих в толстом кишечнике. Например, гликановый терапевтический препарат регулирует рост одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в толстом кишечнике, таких как, например Bacteroidetes, Firmicutes (Clostridia), Verrucomicrobia, и Proteobacteria (Deltaproteobacteria). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует рост одного или более (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в толстом кишечнике и выбраны из родов: Bacteroides, Butyrivibrio, Odoribacter, Parabacteroides, Prevotella, Anaerotruncus, Phascolarctobacterium, Ruminococcus, Bilophila и Akkermansia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в слепой кишке, таких как, например, Actinobacteria, Bacteroides, Bacilli, Clos-

tridia, Mollicutes, Alpha Proteobacteria и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в восходящей ободочной кишке, таких как, например, Actinobacteria, Bacteroides, Bacilli, Clostridia, Fusobacteria, Beta Proteobacteria, Delta/Epsilon Proteobacteria, Gamma Proteobacteria и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в поперечной ободочной кишке, таких как, например, Actinobacteria, Bacteroides, Clostridia, Mollicutes, Fusobacteria и Gamma Proteobacteria.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в нисходящей ободочной кишке, таких как, например, Bacteroides, Clostridia, Mollicutes, Fusobacteria, Delta/Epsilon Proteobacteria и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в сигмовидной кишке, таких как, например, Actinobacteria, Bacteroides, Bacilli, Clostridia, Mollicutes, Alpha Proteobacteria, Beta Proteobacteria и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, которые преимущественно обитают в прямой кишке, таких как, например, Bacteroides, Clostridia, Mollicutes, Alpha Proteobacteria, Gamma Proteobacteria и Verrucomicrobia.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты регулируют (например, стимулируют/увеличивают или подавляют/уменьшают) рост одного или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или более 200) эндогенных комменсальных микробных таксонов или экзогенно вводимых пробиотических бактериальных таксонов различных родов, включая, например, Alistipes, Akkermansia, Anaerofilum, Bacteroides, Blautia, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Clostridium, Coprococcus, Dialister, Dorea, Fusobacterium, Eubacterium, Faecalibacterium, Lachnospira, Lactobacillus, Odoribacter, Oscillospira, Parabacteroides, Phascolarctobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Prevotella, Roseburia, Ruminococcus, Streptococcus и Subdoligranulum.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты регулируют (например, стимулируют/увеличивают или подавляют/уменьшают) рост одного или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 150, 200 или более 200) эндогенных комменсальных или симбиотических микробных таксонов или экзогенно вводимых пробиотических бактериальных таксонов различных родов, включая, но не ограничиваясь ими, бактериальные таксоны, выбранные из группы, состоящей из родов Akkermansia, Anaerofilum, Bacteroides, Blautia, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Clostridium, Coprococcus, Dialister, Dorea, Fusobacterium, Eubacterium, Faecalibacterium, Lachnospira, Lactobacillus, Phascolarctobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Prevotella, Roseburia, Ruminococcus и Streptococcus, а также видов Akkermansia muciphilia, Christensenella minuta, Clostridium coccoides, Clostridium leptum, Clostridium scindens, Dialister invisus, Eubacterium rectal, Eubacterium eligens, Faecalibacterium prausnitzii, Streptococcus salivarius и Streptococcus thermophilus, которые, как считается, ассоциированы со здоровым состоянием желудочно-кишечного тракта, и поддаются регуляции с помощью гликановых препаратов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты регулируют (например, существенно увеличивают или существенно уменьшают) рост (и общее количество) (или существенно увеличивают или существенно уменьшают относительное содержание в общей популяции желудочно-кишечного тракта) одного или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50) родов, видов или филогенетических групп, перечисленных в табл. 1. В табл. 1 приведен перечень родовых уровней микробных составляющих желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты существенно увеличивают рост, например общее число или относительное содержание в общей популяции желудочно-кишечного тракта, популяции толстого кишечника или популяции тонкого кишечника одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50) ОТЕ (операционная таксономическая единица), родов, видов или филогенетических групп, перечисленных в табл. 1, 3 и 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты существенно уменьшают рост, например общее число или относительное содержание в общей популяции желудочно-кишечного тракта, популяции толстого кишечника или популяции тонкого кишечника одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50) ОТЕ (операционная таксономическая единица), родов, видов или филогенетических групп, пе-



речисленных в табл. 1, 3 и 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты существенно увеличивают и уменьшают рост, например общее число или относительное содержание в общей популяции желудочно-кишечного тракта, популяции толстого кишечника или популяции тонкого кишечника одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50) ОТЕ (операционная таксономическая единица), родов, видов или филогенетических групп, перечисленных в табл. 1, 3 и 4.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, которые являются субстратами только для отобранных групп бактерий, которые способны употреблять гликановый препарат в качестве источника пищи. Расщепление гликанового терапевтического препарата оказывает благоприятное воздействие на здоровье организма хозяина. Благоприятное воздействие на здоровье обусловлено селективной стимуляцией роста и/или биологической активности выбранного количества микробных родов, видов или штаммов в микробиоте желудочно-кишечного тракта, которые способны употреблять гликановый препарат в качестве источника пищи и принести пользу для здоровья организму хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения эффекты гликанового терапевтического препарата обусловлены селективной стимуляцией роста полезных бактерий в желудочно-кишечном тракте. Такое увеличение и уменьшение численности некоторых таксонов может быть достаточным для "нормализации" резидентной микробиоты, например с целью восстановления здорового состояния или микробного равновесия. Увеличение или уменьшение численности оценивают по сравнению с численностью, присутствующей в организме субъекта-человека до приема фармацевтической гликановой терапевтической композиции, или численностью в контрольной группе, не принимающей фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию. Пребиотический индекс (PI) можно использовать в качестве опосредованного значения для эффектов гликановых терапевтических препаратов, описанных в настоящем документе. PI относится к сумме: (Bifidobacteria/всего бактерий)(Lactobacilli/всего бактерий)-(Bacteroides/всего бактерий)-(Clostridia/всего бактерий) (см. Palframan et al, 2003, Lett Appl Microbiol 37: 281-284). В некоторых вариантах реализации изобретения также может учитываться соотношение "Eubacterium gestale/всего бактерий". Eubacterium gestale производит бутират, который благоприятно влияет на кишечный барьер у взрослых.

Например, стимуляция роста определенных бактериальных таксонов может снизить pH ободочной кишки, увеличить выработку короткоцепочечных жирных кислот, предотвратить пролиферацию и адгезию патогенных микроорганизмов (барьерный эффект), усилить метаболизм потенциально канцерогенных аминных соединений и/или увеличить продукцию витаминов.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, которые могут перевариваться микробиотой (например, путем ферментации углеводов) без определенных побочных эффектов или с существенным снижением интенсивности симптомов ферментации, таких как повышенное газообразование, которое может вызвать метеоризм, дискомфорт и/или вздутие живота.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение некоторых бактериальных таксонов или их относительное количество может быть изменено. Такие изменения могут быть проанализированы по сравнению с количеством или соотношением таксонов, присутствующих в организме субъекта до введения фармацевтической гликановой терапевтической композиции, или количеством или соотношением таксонов в контрольной группе, не принимающей фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат является селективным субстратом для одного или ограниченного количества потенциально полезных бактериальных таксонов, которые находятся в желудочно-кишечном тракте, стимулируя их рост и/или метаболическую активность. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способен изменять состав микробиоты желудочно-кишечного тракта до достижения повышенного или пониженного количества определенных бактериальных таксонов в составе. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат селективно стимулирует рост и/или селективную активность желудочно-кишечных бактериальных таксонов, ассоциированных с удовлетворительным состоянием здоровья и самочувствия.

В настоящем изобретении предлагаются способы, которые включают введение субъекту, имеющего для этого показание, фармацевтической гликановой терапевтической композиции в количестве, эффективном для регулирования микробного разнообразия. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством введения гликанового терапевтического препарата регулируют (например, увеличивают или уменьшают) микробное разнообразие в желудочно-кишечном тракте (или конкретно в толстом или тонком кишечнике) субъекта-человека. Разнообразие может увеличиваться или уменьшаться при введении эффективного количества гликанового препарата.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат увеличивает разнообразие. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат уменьшает разнообразие. Типовые гликановые терапевтические препараты, которые регулируют мик-

робное разнообразие, включают glu100, ara100, xyl100, glu50gal50 и glu33gal33fuc33.

В некоторых вариантах реализации изобретения дисбиоз нарушает микробиоту и увеличивает или уменьшает микробное разнообразие, таким образом обуславливая нарушенное состояние. Посредством введения гликанового терапевтического препарата можно регулировать микробное разнообразие, тем самым осуществляя лечение дисбиоза. В некоторых вариантах реализации изобретения микробное разнообразие уменьшается, а содержание одного или более, двух или более, трех или более или четырех или более бактериальных таксонов, включая Akkermansia, Blautia, Bacteroides, Bifidobacterium Lactobacillus и Parabacteroides, увеличивается.

Микробное разнообразие может быть измерено с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники, включая анализ последовательностей 16S рДНК, описанный в настоящем документе. Разнообразие может быть выражено, например, посредством индекса разнообразия Шеннона (энтропия Шеннона), количества наблюдаемых ОТЕ, индекса Chao1 и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты регулируют (например, увеличивают или уменьшают) разнообразие в микробной популяции, например в желудочно-кишечном тракте, которое может быть выражено посредством энтропии Шеннона в качестве меры.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты увеличивают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона на 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000%. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты увеличивают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона (log) в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, в 100 раз или более. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты уменьшают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона на 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 99% или более. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты уменьшают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона в (log) 1 раз, 2 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раз, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, в 100 раз или более.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты увеличивают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45% или по меньшей мере на 50%.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты увеличивают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона по меньшей мере (log) в 0,2 раза, 0,3 раза, 0,4 раза, 0,5 раза, 0,8 раза, 1 раз, 1,2 раза, 1,5 раза, 1,8 раза или по меньшей мере в 2 раза.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты уменьшают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70% или по меньшей мере на 75%.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты уменьшают микробное разнообразие и ассоциированную энтропию Шеннона по меньшей мере (log) в 0,2 раза, 0,3 раза, 0,4 раза, 0,5 раза, 0,8 раза, 1 раз, 1,2 раза, 1,5 раза, 1,8 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза или по меньшей мере в 5 раз.

Некоторые способы, описанные в настоящем документе, включают введение гликановых терапевтических препаратов для модуляции иммунных функций и функций эпителиальных клеток кишечника в организме хозяина. Посредством гликановых терапевтических препаратов можно активировать иммунную функцию, например для повышения возможностей организма хозяина бороться с инфекциями, тогда как подавление иммунной функции может препятствовать возникновению аллергии или воспаления кишечника. Регулирование содержания полезных бактерии может стимулировать ответные реакции эпителиальных клеток кишечника, включая восстановление поврежденного эпителиального барьера, продуцирование антибактериальных веществ и клеточных защитных белков и блокирование апоптоза кишечных эпителиальных клеток, индуцированного цитокинами.

Бактерии могут вызывать как про-, так и противовоспалительные реакции в клетках организма хозяина (млекопитающих), при этом различные виды бактерий могут вызывать различные реакции хозяина. В одном варианте реализации изобретения гликановые терапевтические препараты применяют для изменения популяции бактерий, чтобы вызвать необходимую реакцию организма хозяина. Реакцию организма хозяина можно модулировать посредством прямых взаимодействий с бактериальной популяцией или косвенных взаимодействий посредством секретлируемых или выделенных бактериальных продуктов (например, короткоцепочечных жирных кислот). Гликановые терапевтические препараты могут изменять бактериальную популяцию таким образом, что бактериальная популяция при прямом или косвенном взаимодействии с клетками организма хозяина стимулирует продуцирование антимикробных пептидов (AMP) или модулирует (т.е. увеличивает или уменьшает продукцию) воспалительных и иммуномодулирующих цитокинов, включая интерлейкин-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-23, фактор некроза опухоли (TNF), хемокиновый (C-C мотив) лиганд 5 (CCL5,

также известный как RANTES), трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ) или интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ), или модулирует другие врожденные или адаптивные иммунные ответы.

В некоторых вариантах реализации изобретения воспалительное состояние желудочно-кишечного тракта модулируют посредством перорального введением гликанового терапевтического препарата. В некоторых вариантах реализации изобретения в результате бактериальной ферментации гликановых терапевтических препаратов в кишечнике продуцируются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК). КЦЖК, продуцируемые микробиотой кишечника, служат источниками энергии для эпителиальных клеток толстого кишечника и, как предполагается, способствуют поддержанию барьерной функции кишечника, что в свою очередь ограничивает уровни эндотоксина в плазме и предотвращает системное воспаление (Cani et al., Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability, *Gut*, 2009, 58:1091). Кроме того, КЦЖК способствуют формированию регуляторных Т-клеток (Treg) и, как предполагается, играют роль в ограничении воспалительных реакций (Arpaia et al., Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation, *Nature*, 2013, 504:451). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты вводят для индуцирования системных эффектов, например продукции КЦЖК и других продуцируемых микроорганизмами иммуномодулирующих молекул или метаболитов, для регулирования воспалительного состояния дистальных участков кишечника.

Гликановые терапевтические препараты при введении субъекту в эффективном количестве могут регулировать продуцирование одного или более микробных метаболитов, таких как перечисленные в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты при введении субъекту в эффективном количестве могут регулировать содержание (например, увеличивать или уменьшать) одного или более из следующих микробных метаболитов: муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, масляная кислота, изомаляновая кислота, валериановая кислота, изовалериановая кислота, аскорбиновая кислота, молочная кислота, триптофан, серотонин и/или индол. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты при введении субъекту в эффективном количестве могут регулировать содержание (например, увеличивать или уменьшать) одного или более из следующих микробных метаболитов: янтарная кислота, триметиламин (ТМА), ТМАО (N-оксид триметиламина), дезоксихоловая кислота, этифенилсульфат, ацетилальдегид, перекись водорода и/или бутандион. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть обнаружено значительное увеличение или уменьшение содержания метаболита. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат расщепляется микробиотой кишечника (например, клостридий), что приводит, например, к высвобождению короткоцепочечных жирных кислот, таких как бутират, ацетат и пропионат, которые могут действовать как иммуномодулирующие (например, противовоспалительные) агенты, и других метаболитов (например, желчных кислот и лактата), которые характеризуются благоприятными эффектами на состояние здоровья организма хозяина.

Гликановые терапевтические препараты при введении субъекту в эффективном количестве могут модулировать один или более путей в организме хозяина. Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) являются бактериальными метаболитами, продуцируемыми в кишечнике комменсальными бактериями, включая представителей семейства Ruminococcaceae и Lachnospiraceae (Vital M, Howe AC, Tiedje JM. 2014. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio* 5(2):e00889-14. doi:10.1128/mBio.00889-14). КЦЖК модулируют ряд иммунологических факторов человека; например, лечение пропионатом, КЦЖК, у мышей или *in vitro* повышало экспрессию Foxp3, регуляторного фактора Т-клеток, и IL-10, противовоспалительного цитокина, в регуляторных Т-клетках ободочной кишки. Кроме того, было показано, что воздействие КЦЖК увеличивает распространенность и количество регуляторных Т-клеток в ободочной кишке (cTreg) и CD4+ Т-клеток у безмикробных мышей (Smith PM et al. 2013. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*; 341(6145). КЦЖК стимулируют барьерную функцию кишечника, влияя на продукцию муцина и желудочно-кишечного пептида LL-37, а также КЦЖК дополнительно модулируют воспаление, подавляя NF- $\kappa$ B и продуцируя воспалительные цитокины, такие как IL-6 и TNF- $\alpha$  (Kim CH et al. 2014. Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids, T Cells, and Inflammation. *Immune Network* 14(6):277-288). В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты при введении в эффективном количестве регулируют содержание видов бактерий, которые продуцируют КЦЖК, таких как, например, бактерий семейства Ruminococcaceae и/или семейства Lachnospiraceae. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты модулируют иммунитет и воспаление в организме хозяина. Например, в анализе *in vitro* из примера 8, рост ROB.74, представителя семейства Ruminococcaceae, поддерживался 13 из 15 гликанов, а рост CSC.32 и CNE.31, представителя семейства Lachnospiraceae, поддерживался 6 и 7 из 15 гликанов соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагается способ модуляции функционального пути микробиоты желудочно-кишечного тракта. Эти способы включают введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для модуляции функционального пути. В некоторых вариантах реализации изобретения

функциональный путь регулирует образование микробиотой противомикробного агента, вторичной желчной кислоты, короткоцепочечной жирной кислоты, сидерофора или метаболита, указанного в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения короткоцепочечную жирную кислоту получают по меньшей мере из одного или более представителей семейства бактерий Ruminosaccasaceae и/или семейства бактерий Lachnospiraceae. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает ожирением.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические гликановые композиции содержат один или более полифенолов. Гликановый терапевтический препарат и один или более полифенолов в фармацевтической композиции могут иметь аддитивные или синергические эффекты.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы способны регулировать содержание одного или более бактериальных компонентов в желудочно-кишечном тракте (например, относительно полифенолов из экстракта клюквы: Anhê FF et al. et al. "A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice." Gut. 2014; относительно полифенолов из экстракта черники: Guglielmetti S et al. "Differential modulation of human intestinal bifidobacterium populations after consumption of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink. J Agric Food Chem. 2013; 61(34):8134-40; Lacombe A et al. "Phytochemicals in lowbush wild blueberry inactivate *Escherichia coli* 0157:H7 by damaging its cell membrane." Foodborne Pathog Dis. 2013; 10(11):944-50; относительно полифенолов из экстрактов винограда: Choy YY et al. "Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins." Food Funct. 2014; 5(9): 2298-308; Roopchand DE et al. "Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high fat diet-induced metabolic syndrome." Diabetes. 2015; относительно полифенолов из экстракта персика и сливы: Noratto GD et al. "Carbohydrate-free peach (*Prunus persica*) and plum (*Prunus domestica*) juice affects fecal microbial ecology in an obese animal model." PLoS One. 2014; 9(7):e101723; относительно полифенолов из красного вина и черного чая: Kemperman RA, Gross G, Mondot S, et al. Impact of polyphenols from black tea and red wine/grape juice on a gut model microbiome. Food Res Int. 2013, 53(2): 659-69; относительно полифенолов из сои (бобовых): Rafii F "The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol." Metabolites. 2015 Jan 14:56-73).

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, содержащая гликановый терапевтический препарат и полифеноловый препарат, регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост одного или более бактериальных таксонов, таких как бактерии типа *Verrucomicrobia*, например, рода *Akkermansia*. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция, содержащая гликановый терапевтический препарат и полифеноловый препарат, повышает содержание бактерий типа *Verrucomicrobia*, включая род *Akkermansia*.

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы в указанных композициях обладают антиоксидантными свойствами. В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы в указанных композициях обладают антибактериальными свойствами. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством антиоксидантных и/или антибактериальных свойств полифенолов в указанных композициях регулируется содержание одной или более бактерий, обитающих в желудочно-кишечном тракте.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция включает полифенолы, которые действуют как противомикробные средства, например путем ингибирования роста подмножеств видов, таких как, например, патогены или патобионты. (Puupponen-Pimiä R et al. "Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries." 2001. Journal of Applied Microbiology 90: 494-507; Puupponen-Pimiä R et al. "Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens." 2005. Journal of Applied Microbiology 98: 991-1000).

В некоторых вариантах реализации изобретения полифенолы в указанной композиции представляют собой селективный субстрат для одного или более бактериальных таксонов, обитающих в желудочно-кишечном тракте (например, Selma MV et al. "Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health." 2009. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 6485-6501; Déprez S et al. "Polymeric Proanthocyanidins Are Catabolized by Human Colonic Microflora into Low-Molecular-Weight Phenolic Acids." 2000. The Journal of Nutrition 131: 2733-2738; Tzounis X et al. "Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora." 2007. The British Journal of Nutrition 99: 782-792; Kutschera M et al. "Isolation of catechin-converting human intestinal bacteria." 2011. Journal of Applied Microbiology 111: 165-175; Schneider H et al. "Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract." 1999. Archives of Microbiology 171: 81-91; Hein EM et al. "Deconjugation and Degradation of Flavonol Glycosides by Pig Cecal Microbiota Characterized by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH)." 2008. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56: 2281-2290).

Способы скрининга множества гликановых терапевтических препаратов

С целью получения характеристики эффектов гликановых терапевтических препаратов, предлагается скрининг-система на основе микропланшета *in vitro*, которая демонстрирует эффективность гликановых терапевтических препаратов, включая способность ингибировать (или антагонизировать/подавлять) рост определенных микробных компонентов и способность стимулировать (или усиливать) рост других

микробных компонентов. В этих способах предлагаются новые гликановые терапевтические препараты, которые способны улучшить состояние микробиома желудочно-кишечного тракта и/или способствовать здоровью субъекта. В некоторых вариантах реализации изобретения способы скрининга включают: i) предоставление множества гликановых терапевтических препаратов, ii) воздействие препарата на один или более скринируемых объектов, iii) выбор гликановых терапевтических препаратов на основе полученных результатов скрининга и в некоторых случаях iv) выделение выбранных гликановых терапевтических препаратов. В приведенных примерах описан пригодный способ одноштаммового скрининга. Другие пригодные способы скрининга известны обычному специалисту, и любые необходимые экспериментальные параметры могут корректироваться только с помощью обычных экспериментов.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты способствуют росту бактериальных штаммов, которые способны значительно снижать скорость роста патогенов и/или способны частично или полностью восстанавливать бактериальную популяцию, которая ассоциируется со здоровым состоянием желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, которые способствуют росту полезных бактерий. Типовые гликаны перечислены в табл. 8. В некоторых вариантах реализации изобретения способствующий росту комменсальный гликановый терапевтический препарат включает gal100, glu100, xyl100, ara100, ara50gal50, ara50xyl50, gal75xyl25, glu50gal50, man62glu38, glu33gal33fuc33 и man52glu29gal19.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются гликановые терапевтические препараты, которые не способствуют росту патогенных бактерий, но способствуют росту полезных бактерий. Типовые гликаны перечислены в табл. 9. В некоторых вариантах реализации изобретения комменсально-селективный гликановый терапевтический препарат (например, гликановый терапевтический препарат, который предпочтительно способствует росту комменсальных бактерий по сравнению с ростом патогенных бактерий) включает gal100, glu100, xyl100, ara50gal50 и ara50xyl50.

В некоторых вариантах реализации изобретения предлагаются способы, которые включают выбор гликанового терапевтического препарата для последующей обработки (например, его приготовление в виде фармацевтической композиции) или последующего анализа (например, анализа дополнительных характеристик) с применением одноштаммового скрининга. Например, гликановый терапевтический препарат можно проанализировать на предмет стимулирования роста в средах, дополненных препаратом комменсальных штаммов, выбранных из группы, состоящей из *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Prevotella copri* DSM 18205, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838, *Clostridium scindens* ATCC 35704, *Ruminococcus obeum* ATCC 29714, *Clostridium nexile* ATCC 27757 и *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503. В альтернативных или дополнительных вариантах гликановый терапевтический препарат можно проанализировать на предмет стимулирования роста в средах, дополненных препаратом патогенных штаммов, выбранных из группы, состоящей из *Clostridium difficile* ATCC BAA-1382, *Clostridium difficile* ATCC 43255, *Enterococcus faecium* ATCC 700221 и *Salmonella enterica* ATCC 27869. Гликановый терапевтический препарат может быть выбран для последующей обработки или анализа, если соблюден один или оба из следующих критериев: i) гликановый терапевтический препарат способствует росту по меньшей мере 4, 5 или по меньшей мере 6 комменсальных штаммов, и ii) гликановый терапевтический препарат способствует росту не более 3, 2, 1 или не более 0 патогенных штаммов.

Эффект гликановых терапевтических препаратов на бактериальный рост также можно проанализировать в других анализах *in vitro*, а также с применением моделей лабораторных животных. Бактерии могут быть получены из образцов, отобранных из ниши, представляющей интерес (например, образец кала, содержащий фекалии), и размножены с помощью способов, известных в данной области техники. После этого могут быть проведены конкурентные анализы роста *in vitro* в условиях, подходящих для роста бактерий из ниши, представляющей интерес, например в условиях, которые могут имитировать естественную среду ниши, например желудочно-кишечного тракта или его отделов, таких как толстый и тонкий кишечник. Такие условия включают, но не ограничиваются ими, аэробные условия, анаэробные условия, низкое/высокое/нейтральное значение pH, физиологическую температуру (например, температуру тела человека) и т.д.

В некоторых вариантах реализации изобретения анализы *in vivo* проводят для определения эффекта гликанового терапевтического препарата на рост бактерий в желудочно-кишечном тракте. Чтобы определить, может ли гликановый терапевтический препарат регулировать содержание микробной популяции в желудочно-кишечном тракте субъекта, может применяться модель лабораторных животных, такая как мышьяная модель заболевания человека. Микробиоту мышей можно проанализировать и охарактеризовать. Качественные оценки могут быть выполнены с применением профилирования 16S rPHK микробной популяции в желудочно-кишечном тракте здоровых мышей. Это также может быть достигнуто путем полного секвенирования генома, полного секвенирования генома методом дробовика (WGS) или традиционных микробиологических методов. Количественные оценки могут проводиться с применением количественной ПЦР (кПЦР) или с применением традиционных микробиологических методов и подсчета образованных колоний. В некоторых случаях мышам можно назначать антибиотикотерапию, чтобы имитировать состояние нарушенной микробиоты желудочно-кишечного тракта, при котором микробиота

желудочно-кишечного тракта характеризуется дисбиозом. Известно, что лечение антибиотиками может уменьшить таксономическое изобилие, разнообразие и равномерность популяций кишечных бактерий, включая сокращение содержания значительного количества бактериальных таксонов. (DeThlefsen et al., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing, PLoS Biology 6(11):3280 (2008)).

Различные эффекты гликановых терапевтических препаратов (например, для оценки регулирования содержания бактериальных таксонов, регулирования микробного разнообразия, контроля симптомов, вызванных лекарственными средствами, и для оценки терапевтических эффектов (например, для оценки изменения связанных с заболеванием клинических проявлений)), можно оценить на пригодных моделях животных для определенного заболевания, таких как, например, мышьяная модель DSS-колита (например, для оценки заболеваний, нарушений или патологических состояний, ассоциированных с воспалением или поражением, вызванным лекарственными средствами), мышьяная модель ожирения, индуцированной диетой (например, для оценки метаболических заболеваний, нарушений или патологических состояний) и мышьяная модель инфекции *S. difficile* (например, для оценки заболеваний, нарушений или патологических состояний, ассоциированных с инфекцией или вызванных лекарственными средствами) и моделей мышей дикого типа, подвергнутых, например, лечению лекарственными средствами (например, лечению антибиотиками, лечению препаратами против рака и т.д.), или изменения диеты, такие как, например, диета без содержания клетчатки, диета с низким содержанием клетчатки, нормальный полноценный пищевой рацион, диета с высоким содержанием жиров и т.д., для оценки различных состояний микробиоты желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения скрининговые методы проводят с использованием пригодной модели лабораторного животного. Например, гликановый терапевтический препарат вводят лабораторному животному и через некоторое время берут образец из желудочно-кишечного тракта лабораторного животного и анализируют на предмет роста бактериальных таксонов. При необходимости лабораторное животное можно приводить контакт с патогенами или другими бактериями, чтобы облегчить колонизацию организма животного до или одновременно с введением гликанового терапевтического препарата. В некоторых вариантах реализации изобретения выбирают такой гликановый терапевтический препарат, который способен регулировать (например, увеличивать или уменьшать) рост по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или по меньшей мере 20 бактериальных таксонов в организме лабораторного животного.

В одном варианте реализации изобретения животная модель представляет собой мышьяную модель инфекции *S. difficile*, при этом гликановый терапевтический препарат способен регулировать содержание одного или более микроорганизмов, выбранных из группы, состоящей из *Prevotella*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Clostridium* (*Erysipelotrichaceae*), *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Bifidobacterium*, *Aggregatibacter*, *Clostridium* (*Peptostreptococcaceae*), *Parabacteroides*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. В одном варианте реализации изобретения животная модель представляет собой модель мышей дикого типа с диетой без содержания клетчатки и нормальным полноценным пищевым рационом, при этом гликановый терапевтический препарат способен регулировать содержание *Akkermansia* и *Blautia*. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат представляет собой *xyl100*, *glu100*, *glu33gal33fuc33*, *glu50gal50* или *ara100*.

В некоторых вариантах реализации изобретения скрининговый анализ представляет собой анализ *in vitro*, в котором один или более бактериальных таксонов выращивают в питательной среде, при этом рост контролируют в присутствии гликановых терапевтических препаратов и сравнивают с ростом в отсутствие гликановых терапевтических препаратов. В питательной среде можно выращивать любое практическое количество бактериальных таксонов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40 или 50 таксонов. В некоторых вариантах реализации изобретения выбирают такой гликановый терапевтический препарат, который регулирует (например, увеличивает или уменьшает) рост по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или по меньшей мере 20 бактериальных таксонов. В одном варианте реализации изобретения скрининговый анализ представляет собой одноштаммовый анализ, при этом гликановый терапевтический препарат выбирают из тех, которые перечислены в табл. 8, изменяя по меньшей мере 5, 6, 7 или 8 штаммов из табл. 8.

В некоторых вариантах реализации изобретения рост одной или более бактерий увеличивается по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900% или по меньшей мере на 1000% через 1, 6, 12, 18, 24, 48 или 72 ч после приведения в контакт.

В других вариантах реализации изобретения рост одной или более бактерий уменьшается по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или по меньшей мере на 99,9% через 1, 6, 12, 18, 24, 48 или 72 ч после приведения в контакт.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат также регулирует концентрацию одного или более микробных метаболитов, выбранных из группы, состоящей из метаболитов, перечисленных в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения концентрация метаболита увеличивается по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,

65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900% или по меньшей мере на 1000% через 1, 6, 12, 18, 24, 48 или 72 ч после контактирования. В других вариантах реализации изобретения концентрация метаболита уменьшается по меньшей мере на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или по меньшей мере на 99,9% через 1, 6, 12, 18, 24, 48 или 72 ч после приведения в контакт.

Перевариваемость представляет собой параметр, который может быть установлен для гликановых терапевтических препаратов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, подвергаются скринингу для оценки их перевариваемости. Перевариваемость гликановых терапевтических препаратов можно оценить с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники. В некоторых вариантах реализации изобретения перевариваемость оценивают с помощью физиологически релевантной реакции переваривания *in vitro*. Образцы на разных этапах переваривания могут быть проанализированы с помощью стандартных гликановых методов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Посредством мониторинга количества интактных гликановых терапевтических препаратов, проводимого в динамике, можно рассчитать полупериод переваривания. Для оценки сравнительной перевариваемости (например, по сравнению с эталонным гликаном) или для оценки абсолютной перевариваемости могут применяться пригодные анализы.

Перевариваемость гликанового терапевтического препарата зависит от количества или наличия гидролизуемых гликозидных связей в видах гликана, содержащегося в препарате. Ферменты, способные гидролизовать гликозидные связи, как правило, являются специфичными для конкретной связи, стереохимии и композиции субъединицы. Определенные типы гидролизуемых связей, например альфа 1,4; альфа 1,6; альфа 1,2; и альфа 1,6 гликозидные связи распознаются специфическими микробными ферментами (например, альфа-глюкозидаза, цикломальтодекстриназа, неопуллуназа, глюканотрансфераза, трегалогидролаза и тому подобное) и не являются субстратами для ферментов млекопитающих. Перевариваемость гликанов зависит от многих факторов, включая, например, степень полимеризации, степень разветвления, тип гликозидных связей, положение связей, аномерную конфигурацию (например, L- или D-конфигурацию, альфа/бета-конфигурацию) гликановой единицы (единиц) (например, моносахарид) и состав гликановой единицы. Например, фуранозиды, как правило, более подвержены гидролизу, чем пиранозиды. Дезоксисахара, как правило, более кислотолабильные, чем недезоксисахара.

Уронические кислоты, как правило, менее восприимчивы к гидролизу, чем неуронические моносахариды. Разветвление защищает от переваривания ферментами человека, при этом, как правило, характерно то, что чем больше молекула, тем меньше скорость ферментации (перевариваемость) в ободочной кишке. Эти характеристики в целом способствуют непереваживанию гликозидазами человека и могут способствовать селективной ферментации или перевариванию микробиотой.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические гликановые терапевтические композиции, которые вводятся перорально и которые достигают кишечника, включают смесь из множества видов гликанов с желаемой степенью переваривания в кишечнике (или в определенных областях кишечника) хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не переваривается ферментам млекопитающих и может быть гидролизован только микробными ферментами. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не может метаболизироваться организмом человека и только метаболизируется (или ферментируется) микробиотой человека.

Различные микробные таксоны имеют разные гидролизующие ферменты. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат может ферментироваться в одноштабном анализе переваривания *in vitro* одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более комменсальными бактериальными видами, например, *Bacteroides caccae* ATCC 43185, *Prevotella copri* DSM 18205, *Bacteroides thetaiotamicron* ATCC 29741, *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838, *Clostridium scindens* ATCC 35704, *Ruminococcus obeum* ATCC 29714, *Clostridium nexile* ATCC 27757 и *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не ферментируется в одноштабном анализе переваривания *in vitro* одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более комменсальными бактериальными видами, например, *Clostridium difficile* ATCC BAA-1382, *Clostridium difficile* ATCC 43255, *Enterococcus faecium* ATCC 700221 и *Salmonella enterica* ATCC 27869. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат не ферментируется в одноштабном анализе переваривания *in vitro* специфическими бактериальными таксонами (например, по меньшей мере 70, 80, 90, 95 или 98% гликанового препарата не подвергается ферментации), но ферментируется таксонами *in vivo* в соответствующей бактериальной нише хозяина (например, желудочно-кишечном тракте или его определенной области, такой как ободочная кишка или тонкий кишечник). В некоторых вариантах реализации изобретения бактериальные таксоны включают *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Parabacteroides*. Ферментативность может быть измерена, например, с помощью мониторинга роста бактериальных таксонов *in vitro* или *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации изобретения гидролиз гликозидных связей катализируется ферментом, при этом скорость катализа может быть измерена с помощью любых подходящих способов, из-

вестных в данной области техники, и скорость можно сравнить со скоростью другого фермента. Высокая скорость гидролиза, перенос гликановых единиц и/или модификация гликановых единиц может указывать на то, что указанная связь является пригодным субстратом фермента. Легкость гидролиза может найти выражение в высокой скорости каталитической реакции. Другие связи являются несовместимыми с ферментом или набором ферментов и трудно поддаются гидролизу. В некоторых вариантах реализации изобретения перевариваемость (выраженная как полупериод) составляет 30 мин или меньше, 20 мин или меньше, 15 мин или меньше, 10 мин или меньше, 5 мин или меньше, 4 мин или меньше, 3 мин или меньше, 2 мин или меньше или 1 мин или меньше. В некоторых вариантах реализации изобретения перевариваемость (выраженная как полупериод) составляет 30 мин или больше, 45 мин или больше, 1 ч или больше, 2 ч или больше, 3 ч или больше, 4 ч или больше, 5 ч или больше или 10 ч или больше. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты содержат менее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40% или менее 50% связей, которые гидролизуются ферментом млекопитающих - амилазой. Перевариваемость также может быть оценена по полупериоду переваривания в желудке.

#### Идентификация бактериальных компонентов

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтические гликановые терапевтические композиции, описанные в настоящем документе, вводят субъекту для увеличения роста полезных бактерий и/или для уменьшения роста патогенов в желудочно-кишечном тракте. В некоторых вариантах реализации изобретения с помощью гликанового препарата микробная популяция изменяется в сторону здорового состояния. Изменения содержания микроорганизмов, происходящие в желудочно-кишечном тракте, могут быть проанализированы с применением любого количества способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе.

В качестве одного количественного метода для определения того, приводит ли гликановый терапевтический препарат к изменению популяции бактерий в желудочно-кишечном тракте, может быть выполнена количественная ПЦР (кПЦР). Геномную ДНК можно экстрагировать из образцов с применением коммерчески доступных наборов, таких как Mo Bio Powersoil®-htp 96 Well Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, штат Калифорния), Mo Bio Powersoil® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Карлсбад, штат Калифорния) или QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Валенсия, штат Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя или другими стандартными способами, известными специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации изобретения кПЦР можно проводить с применением HotMasterMix (SPRIME, Гейтерсберг, штат Мэриленд) и праймеров, специфичных для определенных (например, полезных или желаемых) бактерий; можно проводить на 96-луночном реакционном планшете MicroAmp® Fast Optical со штрихкодом (0,1 мл) (Life Technologies, Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк), а также можно выполнять на термоциклере BioRad C1000™, оснащенном CFX96™ Real-Time System (BioRad, Геркулес, штат Калифорния), с флуоресцентными показаниями каналов FAM и ROX. Значение Cq для каждой лунки на канале FAM определяют с помощью программного обеспечения CFX Manager™ в версии 2.1. Log<sub>10</sub> (КОЕ/мл) каждого экспериментального образца рассчитывают, вводя значение Cq данного образца в модель линейной регрессии, генерируемую на стандартной кривой, сравнивая значения Cq стандартных лунок кривой с известным log<sub>10</sub> (КОЕ/мл) этих образцов. Специалист в данной области может применять альтернативные режимы кПЦР.

В некоторых вариантах реализации изобретения микробные компоненты идентифицируют, характеризуют ДНК-последовательность микробной малой субъединицы 16S гена рРНК (ген 16S рРНК). Ген 16S рРНК имеет длину около 1500 нуклеотидов и в целом является высококонсервативным для всех организмов, но при этом содержит определенные вариабельные и гипервариабельные области (V1-V9), которые включают достаточное разнообразие нуклеотидов для дифференциации таксонов видового и штаммового уровня для большинства организмов. Указанные области в бактериях определяются нуклеотидами 69-99, 137-242, 433-497, 576-682, 822-879, 986-1043, 1117-1173, 1243-1294 и 1435-1465 соответственно с применением нумерации на основе системы номенклатуры *E. coli*. (см., например, Brosius et al., Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*, PNAS 75 (10):4801-4805 (1978)).

Состав микробной популяции можно вывести путем секвенирования полного гена 16S рРНК или по меньшей мере одной из областей V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 и V9 этого гена или путем секвенирования любой комбинации вариабельных областей от этого гена (например, V1-3 или V3-5). В одном варианте реализации изобретения области V1, V2 и V3 применяют для характеристики микробиоты. В другом варианте реализации изобретения области V3, V4 и V5 применяют для характеристики микробиоты. В другом варианте реализации изобретения область V4 применяют для характеристики микробиоты.

Последовательности, которые по меньшей мере на 97% идентичны друг другу, группируют в операционные таксономические единицы (ОТЕ). ОТЕ, которые содержат последовательности с сходством 97%, соответствуют приблизительно таксонам видового уровня. По меньшей мере одну репрезентативную последовательность из каждой ОТЕ выбирают и применяют для получения таксономического опре-



деления по ОТЕ путем сравнения с базой данных с специально подобранными последовательностями генов 16S рРНК (такими как базы данных Greengenes или SILVA). Взаимосвязь между ОТЕ в микробной популяции может быть выведена путем построения филогенетического дерева из репрезентативных последовательностей из каждой ОТЕ.

Используя известные методы, с целью определения полной последовательности 16S или последовательности любой варибельной области последовательности 16S, геномную ДНК экстрагируют из бактериального образца, 16S рРНК (полную область или специфические варибельные области) амплифицируют с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР), продукты ПЦР очищают, а нуклеотидные последовательности выделяют для определения генетического состава гена 16S рРНК или варибельной области гена. Если выполняется полное секвенирование 16S, применяемый метод секвенирования может быть, но не ограничен, секвенированием по Сэнгеру. Если применяется одна или более варибельных областей, например область V4, секвенирование может выполняться, но не ограничиваясь этим, с помощью метода Сэнгера или с помощью метода секвенирования нового поколения, такого как метод Illumina. Праймеры, предназначенные для "отжига" до консервативных областей генов 16S рРНК (например, праймеры 515F и 805R для амплификации области V4), могут содержать уникальные штрихкодовые последовательности, позволяющие одновременно характеризовать множество микробных популяций.

Другим способом идентификации микробной композиции является характеристика нуклеотидных маркеров или генов, в частности высококонсервативных генов (например, генов "домашнего хозяйства"), или их комбинации, или полное секвенирование генома методом дробовика (WGS). Используя определенные методы, ДНК, экстрагированная из бактериального образца, будет иметь специфические геномные области, амплифицированные с применением ПЦР и секвенированные для определения нуклеотидной последовательности амплифицированных продуктов. Согласно методу WGS экстрагированная ДНК фрагментируется на куски разной длины (от 300 до 40000 нуклеотидов) и непосредственно секвенируется без амплификации. Данные последовательности могут быть сгенерированы с применением любого метода секвенирования, включая, но не ограничиваясь ими, метод Сэнгера, Illumina, 454 Life Sciences, Ion Torrent, ABI, Pacific Biosciences и/или Oxford Nanopore.

В дополнение к гену 16S рРНК анализируют выбранный набор генов, которые известны как маркерные гены для данного вида или таксономической группы, для оценки состава микробной популяции. В альтернативных вариантах эти гены анализируют с применением стратегии скрининга на основе ПЦР. Например, различные штаммы патогенной *Escherichia coli* выделяют с применением генов, которые кодируют термолabile (LT<sub>I</sub>, LT<sub>IIa</sub> и LT<sub>IIb</sub>) и термостойкие (ST<sub>I</sub> и ST<sub>II</sub>) токсины, типы веротоксинов 1, 2 и 2e (VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub> и VT<sub>2e</sub> соответственно), цитотоксические некротизирующие факторы (CNF1 и CNF2), механизмы прикрепления и вытеснения (eaeA), энтероагрегативные механизмы (Eagg) и энтероинвазивные механизмы (Einv). Оптимальные гены, применяемые для определения таксономического состава микробной популяции с помощью маркерных генов, знакомы с обычным специалистам в области таксономической идентификации, основанной на последовательности.

Библиотеки последовательностей для микробного полного секвенирования генома методом дробовика (WGS) могут быть получены из геномной ДНК бактерии. Относительно геномной ДНК, которая была выделена из образца человека или лабораторного животного, то в некоторых случаях ДНК может быть обогащена для бактериальной ДНК с помощью коммерчески доступных наборов, например, набора для обогащения ДНК NEBNext Microbiome (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс) или другого набора для обогащения. Библиотеки последовательностей могут быть получены из геномной ДНК также с помощью коммерчески доступных наборов, таких как набор для подготовки образцов Nextera Mate-Pair, TruSeq DNA PCR-Free или TruSeq Nano DNA или набор для подготовки образцов Nextera XT (Illumina, Сан-Диего, штат Калифорния) в соответствии с инструкциями производителя. В альтернативном варианте библиотеки могут быть получены с помощью других наборов, совместимых с платформой секвенирования Illumina, таких как NEBNext DNA Library Construction Kit (New England Biolabs, Ипсвич, штат Массачусетс). Затем библиотеки можно секвенировать с помощью стандартной технологии секвенирования, включая, но не ограничиваясь этим, секвенирование с помощью секвенсера MiSeq, HiSeq или NextSeq (Illumina, Сан-Диего, штат Калифорния).

В альтернативном варианте библиотеку фрагментов для полного секвенирования генома методом дробовика получают с помощью стандартных способов в данной области техники. Например, библиотеку фрагментов для полного секвенирования генома методом дробовика можно сконструировать с применением набора для получения библиотек GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (454 Life Sciences, Брэнфорд, штат Коннектикут), амплифицировать с применением набора GS FLX Titanium emPCR Kit (454 Life Sciences, Брэнфорд, штат Коннектикут) и секвенировать согласно стандартным протоколам 454 пиросеквенирования на секвенсоре 454 (454 Life Sciences, Брэнфорд, штат Коннектикут).

Бактериальную РНК можно выделить из микробных культур или образцов, которые содержат бактерии, с помощью коммерчески доступных наборов, таких как набор для очистки бактериальной РНК RiboPure Bacterial RNA Purification Kit (Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния). Другой способ выделения бактериальной РНК может включать обогащение мРНК в очищенных образцах бактериальной РНК путем удаления тРНК. В альтернативном варианте РНК можно преобразовать в кДНК, которая

применяется для генерации библиотек секвенирования с использованием стандартных наборов, таких как набор для подготовки образцов Nextera XT Sample Preparation Kit (Illumina, Сан-Диего, штат Калифорния).

Последовательности нуклеиновых кислот анализируют с целью определения таксономических характеристик с помощью способов, определяющих сходство последовательностей и филогенетическое размещение, или с помощью комбинации этих двух подходов. Аналогичный подход используется для аннотирования названий белков, функции белка, названий транскрипционных факторов и любой другой схемы классификации для последовательностей нуклеиновых кислот. Способы на основе сходства последовательности включают BLAST, BLASTx, tBLASTn, tBLASTx, RDP-классификатор, DNAClust, RapSearch2, DIAMOND, USEARCH и различные реализации этих алгоритмов, таких как QIIME или Mothur. Посредством указанных способов картируют последовательность, считанную в эталонную базу данных, и выбирают наилучшее соответствие. Общие базы данных включают KEGG, MetaCyc, избыточную базу данных NCBI, Greengenes, RDP и Silva для таксономических определений. Для получения функциональных характеристик, считанные последовательности картируют в различные функциональные базы данных, такие как COG, KEGG, BioCyc, MetaCyc и базу данных с карбогидрат-активными ферментами (CAZy). Группы микроорганизмов определяют с помощью программного обеспечения, включая MetaPhlAn.

#### Протеомический анализ микробных популяций

Гликановые терапевтические препараты могут быть выбраны на основе их способности увеличивать экспрессию микробных белков, ассоциированных со здоровыми состояниями, или уменьшать экспрессию микробных белков, ассоциированных с патологическими состояниями. Протеомический анализ микробных популяций может быть выполнен согласно протоколам, известным специалисту в данной области техники (например, Cordwell, Exploring and exploiting bacterial proteomes, *Methods in Molecular Biology*, 2004, 266:115). Для идентификации дифференцированных экспрессированных белков (например, для идентификации изменений экспрессии белка при воздействии на микробные популяции гликановыми терапевтическими препаратами), протеомический анализ может быть проведен, как описано, например, в Juste et al. (Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease, *Gut*, 2014, 63:1566). Например, белок выделяют из микробных лизатов из двух образцов (например, из образца микробной популяции, на которую не воздействовали гликановыми терапевтическими препаратами, и образца микробной популяции, на которую воздействовали гликановыми терапевтическими препаратами). Каждый образец белка помечают (например, флуоресцентным красителем, например, минимальным красителем Cy3 или Cy5 CyDye DIGE Fluor, GE Healthcare) и анализируют с помощью двумерного дифференциального гель-электрофореза (2D-DIGE). Гели окрашиваются, а белковые пятна, идентифицированные как существенно отличающиеся между двумя образцами, вырезают, расщепляют и анализируют с помощью жидкостной хроматографии-тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). X!TandemPipeline (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) можно применять для идентификации дифференциально экспрессируемых белков.

Гликановые терапевтические препараты также могут быть выбраны для введения субъекту-человеку в зависимости от их влияния на наличие продуктов микробной ферментации. Например, гликановые терапевтические препараты могут быть выбраны в зависимости от их способности индуцировать или стимулировать рост бактерий, которые продуцируют короткоцепочечные жирные кислоты, такие как пропионат (пропионовая кислота), ацетат и/или бутират (масляная кислота). Аналогичным образом, гликановые терапевтические препараты могут быть выбраны в зависимости от их способности индуцировать или стимулировать рост бактерий, которые продуцируют молочную кислоту, которая может модулировать рост других бактерий путем образования кислой среды. Такой анализ может также применяться для попарного соединения пробиотических бактерий с помощью гликановых терапевтических препаратов, вследствие чего гликановый терапевтический препарат является субстратом для получения желаемых продуктов ферментации.

Метаболиты, которые присутствуют в свежеприготовленной или отработанной культуральной среде или в биологических образцах, собранных у людей, можно определять с применением способов, описанных в настоящем документе. Объективные способы, которые можно применять для определения относительной концентрации метаболитов в образце и известны специалистам в данной области техники, представляют собой такие способы, как газовая или жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией или ИН-ЯМР. Эти измерения могут быть подтверждены путем выполнения анализа стандартных метаболитов с помощью тех же аналитических систем.

В случае анализа с помощью метода газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС) или жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) полярные метаболиты и жирные кислоты можно экстрагировать с применением монофазных или двухфазных систем органических растворителей и водного образца и дериватизировать (Fendt et al., Reductive glutamine metabolism is a function of the  $\alpha$ -ketoglutarate to citrate ratio in cells, *Nat Commun*, 2013, 4:2236; Fendt et al., Metformin decreases glucose oxidation and increases the dependency of prostate cancer cells on reductive glutamine metabolism, *Cancer Res*, 2013, 73:4429; Metallo et al., Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia,

Nature, 2011, 481:380). Типовый протокол дериватизации полярных метаболитов включает образование производных метоксим-tBDMS посредством инкубации метаболитов с 2% метоксиламина гидрохлоридом в пиридине с последующим добавлением N-трет-бутилдиметилсилил-N-метилтрифторацетамида (MTBSTFA) с 1% трет-бутилдиметилхлорсиланом (t-BDMCS).

Неполярные фракции, включая триацилглицериды и фосфолипиды, могут быть омылены для высвобождения жирных кислот и этерифицированы с образованием метиловых эфиров жирных кислот, например, путем инкубации с 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метаноле или с применением реагента Метил-8 (Thermo Scientific). Затем дериватизированные образцы можно проанализировать с помощью ГХ-МС с применением стандартных методов ЖХ-МС, например с колонкой DB-35MS (30×0,25 мм внутр. диаметр×0,25 мкм, Agilent J&W Scientific), установленной на газовом хроматографе (ГХ), соединенном с масс-спектрометром (МС). Массовые изотопмерные распределения можно определить путем интеграции фрагментов метаболит-ионов и скорректировать относительно естественного содержания с применением стандартных алгоритмов, таких как адаптированные алгоритмы, описанные Fernandez et al. (Fernandez et al., Correction of 13C mass isotopomer distributions for natural stable isotope abundance, J Mass Spectrom, 1996, 31:255). В случае жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) полярные метаболиты можно проанализировать с использованием стандартного настольного устройства для ЖХ-МС/МС, оборудованного колонкой, такой как полимерная колонка SeQuant ZIC-pHILIC (2,1×150 мм, EMD Millipore). Примеры мобильных фаз, применяемых для разделения, могут включать буферы и органические растворители, скорректированные до определенного значения pH.

В комбинации или в альтернативном варианте экстрагированные образцы можно проанализировать с помощью <sup>1</sup>H-ядерного магнитного резонанса (<sup>1</sup>H-NMR). Образцы можно объединить с изотопно обогащенными растворителями, такими как D<sub>2</sub>O, в некоторых случаях в присутствии буферного раствора (например, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в D<sub>2</sub>O, pH 7,4). Образцы также можно дополнить эталонным стандартом для калибровки и определения химического сдвига (например, 5 мМ натриевая соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат (DSS-d<sub>6</sub>, Isotec, США)). Перед анализом раствор можно профильтровать или отцентрифугировать, чтобы удалить отложения или осадок, а затем переносить в пригодную ампулу или сосуд для анализа ЯМР (например, 5 мм ампулу для ЯМР). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР можно получить на стандартном ЯМР-спектрометре, таком как спектрометр Avance II+500 Bruker (500 МГц) (Bruker, DE), оснащенный зондом с головкой 5 мм QXI-Z C/N/P, и проанализировать с помощью программного обеспечения для анализа интеграции спектров (например, Chenomx NMR Suite 7.1, Chenomx Inc., Эдмонтон, провинция Альберта). (Duarte et al., <sup>1</sup>H-NMR protocol for exometabolome analysis of cultured mammalian cells, Methods Mol Biol, 2014:237-47). В альтернативном варианте <sup>1</sup>H-ЯМР можно провести в соответствии с другими опубликованными протоколами, известными в данной области техники (Chassaing et al., Lack of soluble fiber drives diet-induced adiposity in mice, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015; Bai et al., Comparison of Storage Conditions for Human Vaginal Microbiome Studies, PLoS ONE, 2012:e36934).

#### Способы лечения

В настоящем изобретении приведены способы лечения субъекта-человека. Эти способы в некоторых вариантах реализации изобретения включают один или оба из процессов: i) идентификация субъекта-человека, у которого диагностировано или подозревается наличие дисбиоза микробиоты желудочно-кишечного тракта, и ii) введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликаный терапевтический препарат в количестве, эффективном для лечения указанного дисбиоза.

Фармацевтические гликановые терапевтические композиции, описанные в настоящем документе, пригодны для введения людям, имеющим для этого показание. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой человека, у которого отмечается один или более симптомов дисбиоза микробиоты желудочно-кишечного тракта, включая, но не ограничиваясь этим, избыточный рост нежелательного патогена или одного или более нежелательных бактериальных таксонов, снижение содержания ключевых бактериальных таксонов, ассоциированных со здоровым состоянием, уменьшение или увеличение разнообразия микробных видов по сравнению со здоровым индивидуумом или снижение общего количества полезных бактерий.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты эффективны при лечении различных заболеваний, нарушений или патологических состояний. Такие заболевания, нарушения или патологические состояния могут быть ассоциированы с дисбиозом микробиоты. Нарушения в благоприятной микробиоте могут возникать из-за множества факторов (например, генетических или экологических), включая, но не ограничиваясь ими, применение антибиотиков, химиотерапевтических средств и других лекарственных средств, вызывающих дисбиоз, или лечение (например, лучевая терапия), инфекцию, вызванную патогенами, активность патобионтов, нарушенную калорийность потребляемой пищи (например, рацион с высоким содержанием жиров, рацион с высоким содержанием сахара), нарушенное потребление (неперевариваемость) клетчатки (например, рацион с низким содержанием или без клетчатки), факторы хозяина (например, генетические изменения организма хозяина) и тому подобное.

В некоторых вариантах реализации изобретения заболевание, нарушение или патологическое со-

стояние является ассоциированным с дисбиозом микробиоты желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством лечения дисбиоза лечат заболевание, нарушение или патологическое состояние.

Симптомы, которые могут быть ассоциированы с дисбиозом микробиоты желудочно-кишечного тракта и/или с желудочно-кишечным заболеванием, нарушением или патологическим состоянием, включают, но не ограничиваются ими, повышенное газообразование, изжогу, диспепсию, вздутие живота, метеоризм, диарею, боль в животе, судороги и рвоту. Незначительные проблемы с пищеварением, связанные с желудочно-кишечным трактом, также включают периодическое вздутие живота, диарею, запор, повышенное газообразование или диспепсию.

#### Инфекционные заболевания

В некоторых вариантах реализации изобретения введение гликанового терапевтического препарата уменьшает проявления инфекции. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие заболевания, нарушения или патологического состояния, включая желудочно-кишечные инфекционные заболевания, включая инфекцию *Clostridium difficile* (CDI); ванкомицин-резистентные энтерококковые инфекции (ВРЭ), инфекционный колит и колит, вызванный *C. difficile*; микозы, такие как, например, инфекция *Candida albicans*, инфекция *Campylobacter jejuni*, инфекция *Helicobacter pylori*; диарею, например, ассоциированную с *Clostridium difficile* (CDAD), диарею, ассоциированную с антибиотиками (АДЦ), диарею, индуцированную антибиотиками, диарею путешественников (ДП), диарею у детей, (острую) инфекционную диарею, рак ободочной кишки и печени, амебому; некротизирующий энтероколит (НЭК) и чрезмерный рост бактерий в тонком кишечнике (ЧРБТК); нарушение пищеварения или неязвенную диспепсию; анальные трещины, перианальный абсцесс и анальную фистулу; дивертикулез или дивертикулит; пептические язвы; а также гастроэнтерит.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие инфекции *Clostridium difficile* (CDI); ванкомицин-резистентной энтерококковой инфекции (ВРЭ), инфекционного колита или колита, вызванного *C. difficile*.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие микозов, таких как, например, инфекция *Candida albicans*, инфекция *Campylobacter jejuni* или инфекция *Helicobacter pylori*.

В некоторых вариантах реализации изобретения инфекция желудочно-кишечного тракта представляет собой бактериальную или вирусную инфекцию, такую как инфекция, вызванная, например, ВРЭ, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholera*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Helicobacter pylori*, ротавирусом или норовирусом.

В некоторых вариантах реализации изобретения инфекция желудочно-кишечного тракта представляет собой грибковую инфекцию, такую как инфекция, вызванная, например, *Candida*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* или *Coccidioides*.

В некоторых вариантах реализации изобретения инфекция желудочно-кишечного тракта представляет собой протозойную инфекцию, такую как инфекция, вызванная, например, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие диареи, такой как, например, диареи, ассоциированной с *Clostridium difficile* (CDAD), диареи, ассоциированной с антибиотиками (ААД), диареи, индуцированной антибиотиками, диареи путешественников (ДП), диареи у детей или (острой) инфекционной диареи.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие некротизирующего энтероколита (НЭК); гастроэнтерита; чрезмерного роста бактерий в тонком кишечнике (ЧРБТК) или сходного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с инфекцией желудочно-кишечного тракта.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие рака ободочной кишки, рака печени, амебомы; нарушения пищеварения или неязвенной диспепсии; анальных трещин, перианального абсцесса и анальной фистулы; дивертикулеза или дивертикулита; пептической язвы или сходного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного со структурными изменениями желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с колитом, индуцированным инфекцией *Clostridium difficile* (CDI), могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. У субъектов с CDI-индуцированным колитом могут отмечаться следующие симптомы: водянистая диарея, судороги, боль в животе, анорексия, недомогание, лихорадка, обезвоживание, болезненность при пальпации нижних отделов живота и/или симптом Щеткина-Блумберга. Наличие *C. difficile* в кале

пациентов можно подтвердить бактериологическим исследованием кала, иммуноферментным анализом с глутаматдегидрогеназой, методом ПЦР для определения генов токсинов *C. difficile*, анализом цитотоксинов в кале или иммуноферментным анализом на выявление токсинов А и В *C. difficile*. Группы пациентов включают субъектов с первичной CDI, субъектов с рецидивирующей CDI, субъектов с различной степенью тяжести CDI-ассоциированной диареи (легкой, умеренной, тяжелой) и субъектов, подверженных риску CDI, из-за наличия факторов риска, таких как лечение антибиотиками, лечение антибиотиками широкого спектра, нахождение в больнице или лечение в течение длительного срока, хирургическая операция на органах желудочно-кишечного тракта, заболевания толстого кишечника, ослабленная иммунная система, химиотерапия, пожилой возраст, заболевание почек или применение ингибиторов протонного насоса. Стандартные способы лечения CDI включают применение антибиотиков, такие как метронидазол, фидаксомицин или ванкомицин. Лечение может также включать пробиотики, трансплантацию фекалий и введение жидкости для предотвращения обезвоживания. Выздоровление оценивают по снижению интенсивности диареи (например, отсутствие 24-часового периода с более чем тремя испражнениями неоформленным калом) и обратному развитию других симптомов, описанных выше. Устранение инфекции можно подтвердить отсутствием положительного результата теста кала на *C. difficile*.

В одном варианте реализации изобретения предлагаются способы профилактики, лечения, ослабления симптомов и/или предотвращения первоначальной колонизации или рецидива колонизации патогенами. В некоторых вариантах реализации изобретения рецидив возникает во время или после применения терапии первой линии или стандартного режима лечения. В некоторых случаях патогенная нагрузка может первоначально уменьшаться при приеме стандартного лечения, но затем нагрузка начинает снова увеличиваться, что может вызвать рецидив заболевания. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты можно вводить (например, в начале, во время или после первичного лечения) для предотвращения рецидива или лечения одного или более симптомов рецидива. В некоторых вариантах реализации изобретения ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены, выбирают из группы, состоящей из видов *Bilophila wadsworthia*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter farmer*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Collinsella aerofaciens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium varium*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella bongori*, *Salmonella enteric*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus infantarius*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia enterocolitica*.

В некоторых вариантах реализации изобретения ассоциированные с заболеванием бактерии, патобионты или патогены включают роды *Bilophila*, *Campylobacter*, *Candidatus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Desulfovibrio*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Klebsiella*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Portiera*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* и *Yersinia*.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ предотвращения рецидива симптомов *C. difficile* у субъекта, который лечился препаратом первой линии (например, ванкомицин, метронидазол, фидаксомицин). Способ включает этапы идентификации субъекта, инфицированного *C. difficile* и получающего антибиотик, и введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для предотвращения рецидива одного или более симптомов, ассоциированных с инфекцией *C. difficile*. В некоторых вариантах реализации изобретения жизнеспособный патоген *C. difficile* сохраняется в желудочно-кишечном тракте субъекта (например, количество КОЕ обнаруживается в образце, полученном от субъекта, например в образце кала) даже после лечения антибиотиком, но выраженность симптомов, ассоциированных с *C. difficile*, значительно снижается.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъектов с подтвержденной колонизацией и инфекцией, вызванными ванкомицин-резистентными энтерококками (ВРЭ), можно пролечить согласно способам, описанным в настоящем документе. Бактерии рода *Enterococcus* являются распространенными представителями кишечной микробиоты. Ванкомицин-резистентные представители этого рода, обычно *E. faecalis* и *E. faecium*, могут обуславливать колонизацию и инфекцию ванкомицин-резистентными энтерококками (ВРЭ). У субъектов, колонизированных ВРЭ, могут определяться ВРЭ-положительный образец кала, ректальный мазок, периректальный мазок или образец с другого участка тела. Резистентность к ванкомицину можно оценить с помощью бактериологического культурального исследования или с помощью анализов на основе ПЦР, которые обнаруживают опероны гена резистентности к ванкомицину (*Van*). Несмотря на то, что колонизированные субъекты не обязательно имеют симптомы заболевания, эта группа субъектов подвергается повышенному риску ВРЭ-инфекции. У субъектов с ВРЭ-инфекцией могут отмечаться следующие симптомы: диарея, лихорадка, озноб, инфекция мочевых путей (ИМП), бактериемия, эндокардит, инфекция внутрибрюшных и тазовых органов, респираторная инфекция или инфекция другого участка тела. Пациенты включают субъектов, которые колонизированы ВРЭ, субъектов с диагностированной ВРЭ-инфекцией, и субъектов, которые подвержены риску колонизации или инфекции ВРЭ из-за наличия факторов риска, таких как госпитализация, длительное нахождение в больнице из-за необходимости получения лечения, длительное применение антибиотиков, иммуносупрессия,

хирургическое вмешательство, открытые раны, стационарные устройства (например, внутривенные линии или мочевые катетеры) или работа в качестве медицинского работника. Стандартные меры предотвращения колонизации или инфекции ВРЭ включают строгое соблюдение надлежащих правил гигиены (например, мытье рук) и предотвращение возможных факторов риска (например, удаление стационарных устройств). Субъекты, колонизированные ВРЭ, но без диагностированной ВРЭ-инфекции, как правило, лечения не получают. Стандартные варианты лечения ВРЭ-инфекций ограничены из-за резистентности возбудителя к стандартным антибиотикам, но могут включать комбинации антибиотиков и/или антибиотиков, такие как хинупристин-даллопристин, линезолид, даптомицин и тигециклин, которые, как было продемонстрировано, сохраняют активность против многих штаммов ВРЭ. Лечение может также включать пробиотики или поддерживающую терапию. Выздоровление оценивают по устранению инфекции и обратному развитию других симптомов, описанных выше. Устранение инфекции или колонизации можно подтвердить отсутствием положительного результата теста на ВРЭ в соответствующем биологическом образце. Предотвращение инфекции или колонизации можно количественно определить аналогичным образом.

#### Воспалительные заболевания

В некоторых вариантах реализации изобретения введение гликанового терапевтического препарата уменьшает воспаление. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие заболевания, нарушения или патологического состояния, включая желудочно-кишечные воспалительные заболевания, включая воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), язвенный колит (ЯК), болезнь Крона (БК), идиопатическое воспаление тонкого кишечника, индетерминальный колит, поухит; синдром раздраженного толстого кишечника (СРТК), рак ободочной кишки и печени, некротический энтероколит (НЭК), воспаление кишечника, запор, микроскопический колит, диарея; болезнь "трансплантат против хозяина" (БТПХ); (пищевые) аллергии; псевдомембранозный колит; нарушение пищеварения или неязвенная диспепсия; дивертикулез или дивертикулит, ишемический колит; радиационный колит или энтерит; коллагеновый колит; гастроэнтерит; а также полипы.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), язвенного колита (ЯК), болезни Крона (БК), воспаления кишечника, микроскопического колита или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с воспалением кишечника.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие идиопатического воспаления тонкого кишечника, индетерминального колита, поухита, псевдомембранозного колита, ишемического колита, радиационного колита (энтерита), коллагенового колита или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с воспалением кишечника.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие гастроэнтерита; болезни "трансплантат против хозяина" (БТПХ) или (пищевой) аллергии.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие синдрома раздраженного толстого кишечника (СРТК), запора, диареи, нарушения пищеварения, неязвенной диспепсии или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с измененным кишечным транзитом.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие рака ободочной кишки, рака печени, некротизирующего энтероколита (НЕК); дивертикулеза или дивертикулита; полипов или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного со структурными изменениями кишечника.

У субъектов с воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК) могут отмечаться колики и боль в животе, диарея, которая может быть кровянистой, императивные позывы к опорожнению кишечника, запоры, тошнота, рвота, лихорадка, потеря веса, потеря аппетита и/или железодефицитная анемия из-за потеря крови. Симптомы ВЗК могут возникать при обострениях заболевания с чередующимися периодами симптомного и бессимптомного течения заболевания. ВЗК можно диагностировать с помощью комбинации тестов, включая анализ кала (для исключения инфекционных причин диареи, оценки количества следов крови в кале и количественного определения биомаркеров, ассоциированных с ВЗК, таких как фекальный калпротектин), развернутый анализ крови для оценки уровней воспаления, анализы крови для оценки биомаркеров, включая С-реактивный белок (СРБ) и перинуклеарное цитоплазматическое антитело против нейтрофилов (pANCA), рентгенологическое исследование с барием, сигмоидоскопию, колоноскопию и эндоскопию. Популяции пациентов включают субъектов с язвенным колитом (ЯК, ограниченным ободочной кишкой или толстым кишечником), субъектов с болезнью Крона (БК, поражающей лю-

бой сегмент желудочно-кишечного тракта) и субъектов с заболеваниями различной степени тяжести (легкой, средней, тяжелой). Стандартные способы лечения ВЗК включают применение аminosалицилатов (например, сульфасалазин, месаламин, бальсалазид, олсалазин), кортикостероидов (например, гидрокортизон, преднизон, метилпреднизолон, преднизолон, будесонид, дексаметазон), иммунодепрессантов (например, азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин), антибиотиков (например, метро니다зол, ципрофлоксацин, рифаксимин), ингибиторов фактора некроза опухоли (например, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол), ингибиторов интегрина (например, натализумаб, ведолизумаб) и хирургическое вмешательство. Обратное развитие заболевания или надлежащий контроль за заболеванием можно количественно оценить с помощью эндоскопического или сигмоидоскопического исследования тяжести заболевания в соответствии со стандартными параметрами оценки, а также по ослаблению интенсивности симптомов, описанных выше, снижению тяжести заболевания, определяемому с помощью комплексных индексов, таких как индекс активности болезни Крона (CAI), или по улучшению качества жизни, связанного со здоровьем и оцениваемого по опроснику ВЗК (IBD-Q).

#### Метаболические заболевания

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие заболевания, нарушения или патологического состояния, включая: ожирение, преддиабет, диабет типа II, высокий уровень холестерина в крови, высокий уровень ЛПНП, высокое кровяное давление, высокий уровень сахара в крови натощак, высокий уровень триглицеридов, низкий уровень ЛПВП, неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП), неалкогольный стеатогепатит (НАСГ); метаболический синдром; гипергаммонемия, дефицит незаменимых питательных веществ, гемохроматоз, непереносимость лактозы, непереносимость глютена; а также энтеропатический акродерматит.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие ожирения, (инсулинорезистентного) преддиабета, диабета типа II, высокого уровня сахара в крови натощак (гипергликемия), метаболического синдрома или подобное заболевание, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с симптомами метаболических заболеваний.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие высокого уровня холестерина в крови, высокого уровня ЛПНП, высокого кровяного давления (гипертензия), высокого уровня триглицеридов, низкого уровня ЛПВП или подобного фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие неалкогольной жирной болезни печени (НЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), гипергаммонемии или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния печени.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие непереносимости лактозы, непереносимости глютена или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с непереносимостью пищи.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие дефицита незаменимых питательных веществ, гемохроматоза, энтеропатического акродерматита или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с нарушением питания.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ лечения метаболического нарушения у человека, имеющего для этого показания, путем: введения человеку фармацевтической гликановой терапевтической композиции для лечения метаболического нарушения. В одном варианте реализации изобретения метаболическое нарушение выбирают из ожирения, отложений жира, резистентности к инсулину, диабета и синдрома жировой дегенерации печени.

Метаболические нарушения могут включать нарушения, заболевания и патологические состояния, которые обусловлены или характеризуются аномальным увеличением веса; использованием или потреблением энергии; измененными реакциями на питательные вещества, источники энергии, гормоны или другие сигнальные молекулы; или измененным метаболизмом углеводов, липидов, белков или нуклеиновых кислот или их комбинацией. Примеры метаболических нарушений включают резистентность к инсулину, чувствительность к инсулину, синдром жировой дегенерации печени, ожирение, увеличенное отложение жира и диабет (например, диабет типа 1, диабет типа 2). В одном варианте предлагаемые в настоящем документе способы предназначены для лечения ожирения. В настоящем документе предлагаются способы лечения ожирения у субъекта, имеющего для этого показания, с применением фармацевтической гликановой терапевтической композиции, которая может изменять микробиоту кишечника субъекта, что в определенной степени приводит к потере веса и/или уменьшению количества жира в организме субъекта.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ уменьшения отложений жира у субъекта, имеющего для этого показания, путем введения человеку фармацевтической гликановой терапевтической композиции в количестве, эффективной для уменьшения отложений жира. Увеличенное отложение жира можно определить с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники, включая, например, измерение окружности талии, отношение окружности талии к окружности бедер, измерение толщины складки кожи, биоэлектрический импеданс, подводное взвешивание, плевтизографию с перемещением воздуха или гидрометрию.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ улучшения метаболизма глюкозы у субъекта, имеющего для этого показания, путем введения субъекту фармацевтической гликановой терапевтической композиции в количестве, эффективном для улучшения метаболизма глюкозы. Метаболизм глюкозы можно определить с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники, включая, например, измерение уровня сахара в крови натощак, уровня инсулина натощак, анализ крови на инсулин после приема пищи, анализ крови на сахар после приема пищи, пероральный тест толерантности к глюкозе, внутривенный тест толерантности к глюкозе, уровень гликированного гемоглобина, или случайный анализ крови на сахар.

В одном варианте реализации изобретения предлагается способ повышения чувствительности к инсулину у человека путем введения субъекту фармацевтической гликановой терапевтической композиции в количестве, эффективном для повышения чувствительности к инсулину, при этом у человека отмечалась чувствительность к инсулину до введения гликанового терапевтического препарата и отмечается чувствительность к инсулину после введения гликанового терапевтического препарата, причем чувствительность к инсулину у человека после введения гликанового терапевтического препарата выше, чем чувствительность к инсулину у человека до введения гликанового терапевтического препарата. Чувствительность к инсулину можно определить с помощью любого пригодного способа, известного в данной области техники, включая, например, определение уровня сахара в крови натощак, уровня инсулина в крови натощак, анализ крови на инсулин после приема пищи, анализ крови на сахар после приема пищи, пероральный тест толерантности к глюкозе, внутривенный тест толерантности к глюкозе, уровень гликированного гемоглобина или случайный анализ крови на сахар.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с диабетом типа 2 могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. У субъектов с диабетом типа 2 может отмечаться снижение остроты зрения, периферическая невропатия, полиурия, усиленная жажда, усталость, усиление чувства голода, потеря веса или грибковые инфекции, инфекции мочевого пузыря, почек, кожи или другие инфекции. Диабет типа 2 диагностируют по критериям, описанным Американской диабетической ассоциацией (ADA), включая следующие: глюкоза в плазме натощак (FPG) 126 мг/дл (7 мМ) или выше, или 2-часовой уровень глюкозы в плазме 200 мг/дл (11,1 мМ) или выше во время перорального теста толерантности к глюкозе 75 г (OGTT), или случайный уровень глюкозы в плазме 200 мг/дл (11,1 мМ) или выше у пациента с классическими симптомами гипергликемии или гипергликемического кризиса, или содержание гемоглобина A1c (HbA1c) 6,5% или выше. Популяция пациентов включает взрослых и детей с диабетом типа 2, субъектов, подверженных риску развития диабета типа 2 (например, субъекты с преддиабетом или субъекты с избыточным весом), а также пациентов с диабетом типа 2 в сочетании с заболеваниями метаболического синдрома, включая ожирение, повышенное кровяное давление, повышенные уровни триглицеридов в сыворотке крови и низкий уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Стандартные способы лечения диабета типа 2 включают изменение стиля жизни (диета, физические упражнения и модификация поведения), ингибиторы альфа-глюкозидазы, бигуаниды (например, метформин), препараты сульфонилмочевины, ингибиторы дипептидилпептидазы IV (DPP-4), глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), меглитиниды, селективные ингибиторы транспортера-2 (SGLT2) натрия-глюкозы, тиазолидиндионы, инсулин и амиллиномиметики. Эффективность лечения можно оценить по обратному развитию симптомов или по диагностическим критериям, перечисленным выше (например, снижение FPG до нормальных уровней), или, у субъектов, находящихся в группе риска развития диабета типа 2, по снижению скорости перехода патологического состояния в диабет типа 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с подтвержденной неалкогольной жировой болезнью печени (НЖБП) и/или неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ) можно пролечить согласно способам, описанным в настоящем документе.

Неалкогольная жирная болезнь печени (НЖБП) характеризуется аномальным накоплением жира в печени. НЖБП может прогрессировать до неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), который характеризуется воспалением печени, фиброзом и циррозом. Субъекты с НЖБП не обязательно имеют симптомы заболевания. У субъектов с НЖБП или НАСГ могут отмечаться увеличенные размеры печени (обнаруживаемые при физикальном обследовании), усталость, потеря веса, общая слабость и/или боль в верхнем правом квадранте живота. Диагноз НЖБП/НАСГ подтверждают определением повышенных уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ) или аспаргатаминотрансферазы (АСТ), увеличенных уровней печеночных и специфических гистопатологических маркеров (например, обнаруживаемых при биопсии печени, абдоминальном ультразвуковом исследовании, КТ или МРТ). Популяции пациентов включают субъектов с НЖБП, субъектов с НАСГ, субъектов с риском развития НЖБП/НАСГ (например, субъектов с избы-



точным весом или повышенным уровнем холестерина), а также субъектов с НЖБП/НАСГ в сочетании с патологическим состоянием метаболического синдрома, включая ожирение, повышенный уровень глюкозы в плазме натощак, повышенное кровяное давление, повышенные уровни триглицеридов в сыворотке крови и низкие уровни липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Стандартные способы лечения НЖБП/НАСГ включают изменение стиля жизни (диета, физические упражнения, модификация поведения и исключение употребления алкоголя). Способы лечения в клинических исследованиях или на этапе разработки включают применение агонистов фарнезоидного X-рецептора (FXR) (например, обеситихоловой кислоты), агонистов рецептора 5, сопряженного с белком Takeda G (TGR5), конъюгатов жирной кислоты и желчной кислоты (например, арамохола), антиоксидантов (например, витамина E), антифибротических агентов, агонистов гамма-рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR), агонистов PPAR альфа/дельта, ингибиторов каспазы (например, эмрикасана) и/или ингибиторов галектина-3. Эффективность лечения можно оценить по обратному развитию симптомов или по диагностическим критериям, перечисленным выше (например, снижение АЛТ до нормальных уровней), или, у субъектов, находящихся в группе риска развития НЖБП/НАСГ, по снижению скорости перехода патологического состояния в НЖБП/НАСГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с ожирением могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. Ожирение является серьезной проблемой здравоохранения, поскольку может характеризоваться отрицательным влиянием на здоровье. Например, ожирение может привести к снижению продолжительности жизни и/или повышению частоты развития патологических состояний, таких как диабет, высокое кровяное давление, заболевания сердца, инсульт, высокий уровень холестерина, апноэ во сне и артрит. Субъекты с ожирением имеют индекс массы тела (ИМТ) выше 30 кг/м<sup>2</sup>. В альтернативном варианте, субъекты с ожирением могут быть ранжированы на основе процента жировых отложений (более 25% для мужчин или более 33% для женщин). Диагностика может также включать оценку уровней липидов натощак (холестерина, триглицеридов), функции печени, уровней глюкозы, уровней инсулина, гликированного гемоглобина (HbA1c) и/или толерантности к глюкозе. Популяции пациентов включают субъектов с ожирением детского возраста, умеренным ожирением, морбидным/тяжелым ожирением, генетическими причинами ожирения (включая синдром Прадера-Вилли, синдром Барде-Бидля, синдром Коэна и синдром МОМО) и ожирением в сочетании с патологическим состоянием метаболического синдрома (повышенное кровяное давление, повышенный уровень глюкозы в плазме натощак, повышенные уровни триглицеридов в сыворотке крови и низкие уровни липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)). Стандартные способы лечения ожирения включают изменение стиля жизни (диета, физические упражнения, модификация поведения), бариатрическую хирургию, применение препаратов, которые нарушают пищевую абсорбцию (например, тетрагидролипостатин), препаратов, которые нарушают пищевое поступление, препаратов, которые увеличивают расход энергии, и препаратов для лечения общих сопутствующих заболеваний (например, препараты для лечения диабета типа 2 или гипертензии). Критерии эффективности лечения включают изменение массы тела, уровней липидов натощак, функции печени, уровней глюкозы, уровней инсулина, HbA1c и/или толерантности к глюкозе.

#### Другие заболевания

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие заболевания, нарушения или патологического состояния, включая: аутоиммунный артрит, диабет типа I, атопический дерматит, аутизм, астму, сердечно-сосудистые заболевания, хроническое заболевание почек, рассеянный склероз, заболевания сердца, псориаз, гипераммониемию, печеночную энцефалопатию, кахексию, подагру, непереносимость лекарственных средств (например, метформина), низкую пероральную биодоступность лекарственных средств, недержание кала, болезнь Хиршпрунга, анизмус, колики, кишечную непроходимость, геморрой и кишечные инвагинации.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие аутоиммунного артрита, диабета типа I, рассеянного склероза, псориаза или подобного аутоиммунного заболевания, нарушения или патологического состояния.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие астмы, атопического дерматита или подобной аллергии на факторы окружающей среды.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие хронического заболевания почек, заболевания сердца, сердечно-сосудистого заболевания или подобного заболевания, нарушения или патологического состояния, ассоциированного с недостаточностью органа.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие аутизма, гипераммонемии, печеночной энцефалопатии или подобного заболевания, нарушения

или патологического состояния, ассоциированного с неврологическими симптомами.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие кахексии, подагры или подобного нарушения обмена веществ.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие болезни Хиршпрунга, кишечной непроходимости, анизмуса, инвагинации, недержания кала, геморроя или подобного нарушения желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с атопическим дерматитом (АД) могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. У субъектов с атопическим дерматитом (АД) может быть сухая, зудящая и/или воспаленная кожа. Диагноз и тяжесть АД можно определять с применением индекса SCORAD (Oranje, A. P., et al. "Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score." *British Journal of Dermatology* 157.4 (2007): 645-648) or the Eczema Area and Severity Index (EASI) score (Hanifin et al., *The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis, Experimental Dermatology*, 2001, 10:11). Симптомы АД могут возникать при обострениях заболевания с чередующимися периодами симптомного и бессимптомного течения заболевания. На участках кожи с АД обычно присутствует *Staphylococcus aureus*, при этом в участках пораженной кожи или системно может быть повышен уровень биомаркеров, включая IgE и воспалительные или Th2 цитокины и хемокины. Популяции пациентов включают младенцев с ранним дебютом АД, детей с АД детского возраста, взрослых с поздним дебютом АД, беременных женщин, подвергающихся риску обострений АД ("атопические высыпания беременности"), субъектов с обострением АД легкой, средней или тяжелой степени тяжести, или субъектов, которые подвержены риску развития АД. Стандартные способы лечения АД включают местное применение увлажняющих средств, местное применение стероидных мазей, таких как гидрокортизоновая, отбеливающие ванны, антибиотики, иммуномодулирующие агенты, такие как такролимус, антигистамины, терапию на основе антител (включая антитела, блокирующие IgE, рецептор IL-4, IL-4 и IL-13) и другие противовоспалительные агенты. Лечение может также включать применение пробиотиков. Обратное развитие заболевания или надлежащий контроль за заболеванием можно количественно оценить с помощью стандартных критериев SCORAD или EASI, описанных выше.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с астмой могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. У субъектов с астмой могут отмечаться хрипы, кашель, одышка и/или стеснение или боль в грудной клетке. Эти симптомы обычно эпизодичны и могут быть обусловлены такими факторами, как физическая нагрузка упражнения или воздействие аллергенов. Кроме того, дети с астмой могут иметь в анамнезе рецидивирующий бронхит, бронхиолит или пневмонию или длительный кашель после простудного заболевания. Диагноз астмы устанавливают путем тестирования функции легких с помощью спирометрии на фоне лечения бронходилататорами или без такового. Популяция пациентов включает младенцев с астмой; субъектов с астмой детского возраста; субъектов с дебютом астмы во взрослом возрасте; субъектов с интермиттирующей, легкой персистирующей, среднетяжелой стойкой или тяжелой персистирующей астмой; субъектов с астмой, индуцированной физической нагрузкой; субъектов с аллергической астмой; субъектов с кашлевым вариантом астмы; субъектов с профессиональной астмой; субъектов с ночной астмой; а также субъектов, которые подвержены риску развития астмы, например, имеющих семейный анамнез атопии. Стандартные способы лечения астмы включают применение ингаляционных кортикостероидов (например, будесонид, флутиказон, беклометазон, мометазон и циклезонид), бронходилататоров короткого действия (например, албутерол), бронходилататоров длительного действия (например, салметерол), модификаторов лейкотриена (например, монтелукаст) или других противовоспалительных агентов, антихолинергических агентов (например, ипратропий, тиотропий), анти-IgE (например, омализумаб), применяемых при аллергической астме, и/или системных стероидов (например, преднизон, преднизолон, метилпреднизолон, дексаметазон). Лечение может также включать пробиотики. Эффективность лечения можно оценить по уменьшению частоты или тяжести описанных выше симптомов, улучшению функции легких (оценивается по таким параметрам, как максимальная объемная скорость выдоха (МОСВ) или объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ1)), снижению потребности в продолжении или начале лечения астмы, или по изменению уровней биомаркеров воспаления дыхательных путей (например, сывороточного IgE, выдыхаемого оксида азота, количества эозинофилов в крови или мокроте, воспалительных цитокинов, Th2-цитокинов и т.д.).

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с хроническим заболеванием почек (ХЗП) могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. У субъектов с ХЗП могут проявляться усталость, нарушение концентрации внимания, плохой аппетит, нарушения сна, судороги мышц в ночное время, отеки ступней и голеней, кожная сыпь/зуд, тошнота, рвота, металлический привкус во рту, одышка и/или полиурия. Диагноз заболевания почек, в том числе ХЗП, устанавливают путем определения скорости клубочковой фильтрации (СКФ), уровня мочевины и креатинина в крови, уровня альбумина в моче, биопсии почек, ультразвукового исследования и/или компьютерной томографии. Популяции пациентов включают субъектов с ХЗП, обусловленным диабетической нефропа-

тией; субъектов с ХЗП, обусловленным высоким кровяным давлением; субъектов с поликистозным заболеванием почек, пиелонефритом или гломерулонефритом; субъектов с поражением почек из-за длительного применения нефротоксичных лекарственных средств; а также субъектов, подверженных риску развития ХЗП, из-за наличия факторов риска, таких как диабет, высокое кровяное давление или семейный анамнез заболевания почек. Стандартные способы лечения ХЗП включают применения лекарственных средств для снижения кровяного давления, контроля уровня глюкозы в крови и снижения уровня холестерина в крови. Лечение может также включать модификации диеты и применение пробиотиков. Эффективность лечения можно оценить по обратному развитию симптомов или по диагностическим критериям, перечисленным выше (например, снижение содержания альбумина в моче и креатинина в сыворотке), снижению потребности в начале диализа или продлению времени до начала диализа, снижению уровня уремических веществ в крови (например, р-крезолсульфат и индоксилсульфат) или других потенциально опасных циркулирующих факторов (например, N-оксид триметиламина (ТМАО) или, у субъектов, подверженных риску развития ХЗП, по снижению скорости перехода патологического состояния в ХЗП.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекты с печеночной энцефалопатией (ПЭ) могут быть пролечены согласно способам, предложенным в настоящем документе. Печеночная энцефалопатия включает несколько неблагоприятных неврологических симптомов, которые возникают при неспособности печени удалять из крови токсичные вещества, такие как аммиак. У субъектов с ПЭ могут проявляться замешательство, забывчивость, беспокойство или возбуждение, внезапные изменения в личности или поведении, изменения профиля сна, дезориентация, сладковатый или затхлый запах выдыхаемого воздуха, невнятная речь и/или затруднение контроля двигательных функций. Диагноз ПЭ утанавливают на основании тестов функции печени, уровня аммиака в сыворотке крови, ЭЭГ и других анализов крови и неврологических исследований. Популяции пациентов включают субъектов с легкой ПЭ, тяжелой ПЭ, явной ПЭ, субъектов с одним или более эпизодами ПЭ в анамнезе, а также субъектов, подверженных риску развития ПЭ из-за наличия факторов риска, таких как поражение печени. Стандартные способы лечения ПЭ включают применение лактулозы, лактитола и антибиотиков (например, рифаксимин или неомицин). Лечение может также включать модификации диеты и применение пробиотиков. Эффективность лечения можно оценить по обратному развитию симптомов или по диагностическим критериям, перечисленным выше (например, снижение уровня аммиака в сыворотке крови), снижение частоты эпизодов ПЭ в динамике или, у субъектов, подверженных риску развития ПЭ, по уменьшения количества первичных эпизодов ПЭ.

Нарушения пищеварения, обусловленные лекарственными средствами или лечением

В настоящем изобретении предлагаются способы снижения интенсивности симптомов, обусловленных лекарственными средствами или лечением, у субъекта-человека. Такие симптомы, обусловленные лекарственными средствами или лечением, включают любые нарушения пищеварения. Примеры нарушений пищеварения включают, но не ограничиваются ими, увеличение веса, запор, изжогу, диспепсию, повышенное газообразование, вздутие живота, метеоризм, диарею, боль в животе, спазмы, тошноту и рвоту. В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения представляет собой диарею. Способ включает введение субъекту-человеку фармацевтической композиции, содержащей гликановый терапевтический препарат в количестве, эффективном для снижения интенсивности одного или более симптомов, обусловленных лекарственным средством или лечением. В одном варианте реализации изобретения лечение представляет собой лучевую терапию.

В одном варианте реализации изобретения субъекта определяют как подходящего кандидата для лечения гликановым терапевтическим препаратом, если у субъекта диагностировали или подозревают наличие диареи, обусловленной лекарственным средством; запора, обусловленного лекарственным средством; токсичности, обусловленной лекарственным средством; непереносимости, обусловленной лекарственным средством (например, метформином, химиотерапией); нарушения микробиома, обусловленного лекарственным средством; заболевания микробиома, обусловленного лекарственным средством; заболевания желудочно-кишечного тракта, обусловленного лекарственным средством; энтерита или колита, обусловленного лекарственным средством; или подобного нарушения или патологического состояния, обусловленного лекарственным средством.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию, содержащую гликановый терапевтический препарат, вводят до, параллельно или после введения лекарственного средства (или лучевой терапии), введение которого обуславливает развитие симптомов. Примеры лекарственных средств, которые часто ассоциируются с симптомами, обусловленными лекарственными средствами или лечением, включают, но не ограничиваются ими, противораковое лекарственное средство, противодиабетическое лекарственное средство, иммунодепрессивное лекарственное средство, противомикробное лекарственное средство, химиотерапевтическое лекарственное средство, антипсихотическое лекарственное средство, лекарственное средство-ингибитор протонного насоса или нестероидное противовоспалительное лекарственное средство (НПВС). Введение этих лекарственных средств обычно ассоциируется с дисбиозами, которые могут, например, развиваться во время лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения дисбиоз вызывает или усиливает симптомы, обусловленные лекарственным средством или

лечением, такие как нарушения пищеварения. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством введения гликанового терапевтического препарата микробиом регулируется таким образом, что интенсивность симптомов, обусловленных лекарственным средством или лечением, снижается. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат способствует росту комменсальных бактерий и/или поддерживает рост полезных микробных популяций, на качественное и количественное содержание которых отрицательно влияет лечение лекарственными средствами, или которые могут дополнять комменсальные бактерии, на качественное и количественное содержание которых отрицательно влияет лечение лекарственными средствами.

Специфические примеры лекарственных средств, ассоциированных с нарушениями пищеварения, выраженность которых можно снизить при введении гликанового терапевтического препарата, включают, но не ограничиваются ими, цiproфлоксацин, клиндамицин, амоксициллин-клавуланат, цефиксим, эфалоспорины, фторхинолоны, азитромицин, кларитромицин, эритромицин, тетрациклин, азитромицин, иринотекан (камптосар), 5-фторурацил, лейковорин, оксалиплатин, бортезомиб, иматиниб, леналидомид, имбрувица, ипилимумаб, пертузумаб, капецитабин, доцетаксел, лапатиниб, эрлотиниб, кармустин, этопозид, арацитин, мелфалан, цитарабин, даунорубицин, амсакрин, митоксантрон, оланзапин, ранитидин, фамотидин, циметидин, омепразол, сукральфат, эзомепразол, напроксен, диклофенак, индометацин, ибупрофен, кетопрофен, пироксикам, целекоксиб, нимесулид, аспирин, метформин, пароксетин, вальпроевую кислоту или клозапин.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта химиотерапевтическим агентом. В одном варианте реализации изобретения нарушение пищеварения представляет собой диарею. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой иринотекан, 5-фторурацил, лейковорин или их комбинации. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой оксалиплатин, лейковорин, 5-фторурацил или их комбинации. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой бортезомиб, иматиниб, леналидомид, имбрувика, ипилимумаб, пертузумаб, капецитабин, доцетаксел, лапатиниб, эрлотиниб или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой кармустин, этопозид, арацитин, мелфалан или их комбинации. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой цитарабин, даунорубицин, этопозид или их комбинации. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой амсакрин, цитарабин, этопозид или их комбинации. В конкретных вариантах реализации изобретения химиотерапевтический агент представляет собой митоксантрон, цитарабин или их комбинации.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта антибиотиком. В одном варианте реализации изобретения нарушение пищеварения представляет собой диарею. В конкретных вариантах реализации изобретения антибиотик представляет собой цiproфлоксацин, клиндамицин, амоксициллин-клавуланат, цефиксим, эфалоспорины, фторхинолоны, азитромицин, кларитромицин, эритромицин, тетрациклин или азитромицин.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта антипсихотическим лекарственным средством. В одном варианте реализации изобретения нарушение пищеварения представляет собой увеличение веса. В одном варианте реализации изобретения лекарственное средство представляет собой оланзапин.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта лекарственным средством - ингибитором протонного насоса. В одном варианте реализации изобретения нарушение пищеварения представляет собой диарею. В конкретных вариантах реализации изобретения лекарственное средство представляет собой ранитидин, фамотидин, циметидин, омепразол, сукральфат или эзомепразол.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (НПВС). В одном варианте реализации изобретения нарушение пищеварения представляет собой диарею. В конкретных вариантах реализации изобретения лекарственное средство представляет собой напроксен, диклофенак, индометацин, ибупрофен, кетопрофен, пироксикам, целекоксиб, нимесулид или аспирин.

В некоторых вариантах реализации изобретения нарушения пищеварения ассоциированы с лечением субъекта метформином, пароксетином, вальпроевой кислотой или клозапином.

В одном варианте реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов повышает приверженность субъекта к предписанному режиму лечения. В одном варианте реализации изобретения снижение интенсивности одного или более симптомов позволяет врачу назначать более высокую дозу лекарственного средства, подлежащего введению. В таких вариантах реализации изобретения лечение основного заболевания является более эффективным (например, более более эффективное снижение интенсивности симптомов, более короткий период до достижения безсимптомного состояния или выздоровления или более длительное поддержание безсимптомного состояния или состояния без заболевания и т.д.).

### Другие варианты реализации изобретения

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект отмечает снижение интенсивности по меньшей мере одного симптома заболевания, нарушения или патологического состояния желудочно-кишечного тракта после лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения можно определить степень снижения тяжести симптома после лечения (например, с помощью измерения известного биомаркера), которая составляет порядка 3, 5, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или около 100%. В некоторых вариантах реализации изобретения интенсивность симптомов, измеренная согласно настоящему описанию, снижается в среднем на около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или около 100% по сравнению с интенсивностью симптомов до введения фармацевтической гликановой терапевтической композиции. В некоторых вариантах реализации изобретения сниженная тяжесть симптома сохраняется по меньшей мере около одного дня, двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, одной недели, двух недель, трех недель, одного месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, одного года, двух лет, пяти лет, десять лет после лечения или сниженная тяжесть симптома определяется постоянно.

В одном варианте реализации изобретения симптом желудочно-кишечного заболевания, нарушения или патологического состояния сохраняется частично, существенно, или полностью устраняется или снижается в тяжести у субъекта в течение по меньшей мере около 1 дня, 1 недели, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 9 месяцев, одного года, 18 месяцев, двух лет, трех лет, четырех лет, пяти лет, десяти лет или более десяти лет после прекращения лечения. В другом варианте реализации изобретения симптом желудочно-кишечного заболевания, нарушения или патологического состояния постоянно устраняется или снижается в тяжести у субъекта после прекращения лечения.

В некоторых вариантах реализации изобретения введение фармацевтических гликановых терапевтических композиций улучшает общее состояние здоровья хозяина и/или состояние здоровья конкретной ниши, например, желудочно-кишечного тракта, например, путем регулирования (например, увеличения или уменьшения) роста или содержания одного или более представителей микробной популяции в нише (например, резидентные комменсальные бактерии и/или приобретенные патогены или патобионты).

В исследованиях кишечника были идентифицированы биомаркеры, что дало возможность продемонстрировать влияние пребиотиков на состояние здоровья, при этом биомаркеры также могут применяться для характеристики влияния пребиотиков на состояние здоровья и воздействия лечения фармацевтическими гликановыми терапевтическими композициями, описанными в настоящем документе, на микробиоту и среду желудочно-кишечного тракта. Эти маркеры включают: i) изменения в микробиоте желудочно-кишечного тракта и общем метаболизме желудочной среды, например, образование органических кислот, ii) модуляцию иммунной системы, оценку воспалительных и иммунных глобулинов; iii) увеличение абсорбции минералов в ободочной кишке, таких как кальций, цинк или магний; iv) регуляцию липидного обмена, снижение уровня холестерина; v) индукцию других важных процессов гомеостаза в организме хозяина (см. обзоры Pool-Zobel B L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. 2005. British Journal of Nutrition 93 Suppl 1:S73-90; and Liong M T. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention: Postulated Mechanisms and In-vivo Evidence. 2008. International Journal of Molecular Sciences 9(5):854-63).

Фармацевтические гликановые терапевтические композиции при введении субъекту в эффективном количестве могут модулировать один или более путей в организме хозяина. Лечение гликановым терапевтическим препаратом может приводить к повышению или снижению уровня одного или более биомаркеров, что можно определить с помощью способов, известных в данной области техники. Исследователь может легко определить, в каком моменте времени или моментах времени в ходе лечения следует измерять уровень биомаркера(ов), например до лечения, с различными интервалами во время лечения и/или после лечения. Любой пригодный образец, например, образец, специфичный для желудочно-кишечного тракта, такой как образец ткани или биоптат, смыв, выделяемое желудочно-кишечного тракта (например, фекалии/образец кала) и т.д., можно получить от субъекта и в последующем этот образец проанализировать. В некоторых вариантах реализации изобретения может быть обнаружено значительное повышение или снижение уровня биомаркера.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат расщепляется микробиотой кишечника (например, клостридией), что приводит, например, к высвобождению короткоцепочечных жирных кислот, таких как бутират, ацетат и пропионат, которые могут действовать как иммуномодулирующие (например, противовоспалительные) агенты, и других метаболитов (например, желчных кислот и лактата), которые характеризуются благоприятными эффектами на состояние здоровья организма хозяина.

С целью оценки влияния фармацевтических гликановых терапевтических композиций на продукцию КЦЖК в кишечнике, могут быть собраны образцы кала. Уровни КЦЖК, особенно ацетат, пропионат и бутират, можно определить количественно. Уровни КЦЖК, креатинов и гидрокси-КЦЖК можно количественно определить путем подщелачивания образцов кала, получения характерного метаболического состава образца с применением, например, 1D <sup>1</sup>H-ЯМР-спектрометра и анализа с помощью контролируемых многомерных статистических методов. Инулин можно использовать в качестве положительного контроля.

В некоторых вариантах реализации изобретения микробные метаболитные профили образцов пациентов или микробные культуры из образцов субъектов используют для идентификации факторов риска развития желудочно-кишечного инфекционного и/или воспалительного заболевания, нарушения или патологического состояния. Типовые метаболиты для диагностических целей, прогностической оценки риска или оценки лечения включают метаболиты, перечисленные в табл. 2. В некоторых вариантах реализации изобретения микробные метаболитные профили анализируют в разные моменты времени во время болезни и лечения субъекта, с целью более объективной оценки патологического состояния субъекта, включая выздоровление или рецидив. Такой мониторинг также имеет важное значение для снижения риска развития у субъекта нового заболевания, нарушения или патологического состояния желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах реализации изобретения посредством метаболитных профилей получают информацию о последующем лечении.

Кроме того, фармацевтические гликановые терапевтические композиции, описанные в настоящем документе, можно применять в комбинации с различными другими видами стандартного лечения, если лечащим врачом или другим медицинским работником эта комбинация расценивается как приносящая пользу пациенту. В некоторых вариантах реализации изобретения комбинация гликанового терапевтического препарата и терапевтического агента стандартного лечения характеризуется аддитивными или синергическими эффектами. Фармацевтические гликановые терапевтические композиции можно вводить до, одновременно или после стандартного лечения. В некоторых случаях стандартное лечение нарушает состав и здоровое состояние нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта (например, применение антибактериальных, противовирусных или противогрибковых агентов), что может привести к нежелательному размножению вредных бактерий или патогенов, которые могут обуславливать один или более симптомов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения введение фармацевтических гликановых терапевтических композиций, описанных в настоящем документе, является эффективным для облегчения этих симптомов и улучшения состава популяции микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

#### Введение гликановых терапевтических препаратов

Для любой фармацевтической гликановой терапевтической композиции, применяемой в способе, описанном в настоящем документе, первичную терапевтически эффективную дозу можно оценить из данных моделей лабораторных животных, известных специалистам в данной области техники. Такая информация может использоваться для более точного определения пригодных доз у людей. Начальные дозы можно также оценить из данных *in vitro* или *in vivo*. Начальные дозы также можно определить путем сравнения эффективности соединений, применяемых в способах, описанных в настоящем документе, в анализах моделей с эффективностью известных соединений. Например, начальные дозы можно определить путем сравнения эффективности гликановых терапевтических препаратов в анализах моделей с эффективностью других соединений, которые продемонстрировали эффективность при лечении описанных патологических состояний. В этом способе начальную дозу можно рассчитать, умножив соотношение эффективных концентраций, полученных в анализе моделей для гликановых терапевтических препаратов, применяемых в описанных в настоящем документе способах, и контрольного соединения, на эффективную дозу контрольного соединения. Например, если препарат, применяемый в настоящем способе, является в два раза эффективнее в анализе моделей по сравнению с известным соединением (например, эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) гликанового терапевтического препарата равна половине  $EC_{50}$  известного соединения в том же анализе), начальная эффективная доза гликанового терапевтического препарата будет составлять половину известной дозы для известного соединения. Обычный специалист в данной области техники, применяя эти рекомендации, может определить первичную эффективную дозу у субъектов, например у людей. Количество и интервал введения доз можно регулировать индивидуально, чтобы обеспечить уровни гликанового терапевтического препарата, которые являются достаточными для поддержания терапевтического эффекта. Специалист в данной области техники, не применяя излишних экспериментов, сможет оптимизировать терапевтически эффективные дозы для местного введения.

В зависимости от нарушения и субъекта, подлежащих лечению, а также способа введения, указанные композиции могут вводиться в различных дозах. В одном варианте реализации изобретения применяют наименьшее эффективное количество или дозу гликанового терапевтического препарата. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат вводят в дозе от около 0,01 до около 10000 мг/кг, от около 0,1 до около 1000 мг/кг, от около 1 до около 100 мг/кг, 0,05 до около 5000 мг/кг, от около 0,5 до около 5000 мг/кг, от около 5 до около 500 мг/кг. Эту дозу можно назначать в мг/кг/сутки и можно вводить в качестве начальной дозы или можно увеличить или уменьшить с течением времени (например, в течение нескольких дней или недели) до достижения конечной дозы.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат вводят в общей суточной дозе на одного субъекта от около 1 мг в сутки до около 100 г в сутки; от около 10 мг в сутки до около 10 г в сутки; от около 100 мг в сутки до около 10 г в сутки; от около 1 грамма в сутки до около 10 г в сутки, от около 2 г в сутки до около 20 г в сутки; от около 5 г в сутки до около 50 г в сутки.

В некоторых вариантах реализации изобретения симптом желудочно-кишечного заболевания, нарушения или патологического состояния у субъекта, имеющего симптомы, снижается по интенсивности

или устраняется в результате введения субъекту увеличенного, уменьшенного или постоянного количества (или доз) фармацевтической гликановой терапевтической композиции в течение определенного периода времени (например, в течение периода лечения).

В одном варианте реализации изобретения указанная композиция содержит полезные, комменсальные и/или пробиотические бактериальные штаммы в количестве, составляющем от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^{13}$  КОЕ/дозу и бактериальный штамм или от  $1 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{11}$  КОЕ/дозу и бактериальный штамм.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят один, два или три раза в сутки. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят два раза в сутки. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят каждый день в течение предварительно установленного количества дней (период лечения). В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 100, 200, 300 или 365 дней. В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. В некоторых вариантах реализации изобретения период лечения составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 лет или продолжается пожизненно.

В одном варианте реализации изобретения общая продолжительность периодов лечения желудочно-кишечного заболевания, нарушения или патологического состояния может составлять от одного дня до 10 лет, от одного дня до 1 года, от 1 дня до 6 месяцев, от 1 дня до 3 месяцев, от 1 дня до 1 месяца, от одного дня до одной недели, от одного дня до пяти дней, от одного дня до 10 дней, от одной недели до 12 недель или от четырех недель до десяти недель или от четырех недель до восьми недель или около шести недель. Субъект может получить необходимое количество курсов лечения, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более 10 курсов лечения. В течение периода лечения субъект принимает фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию, описанную в настоящем документе, в некоторых случаях вместе с приемом пищевых продуктов, содержащих пребиотики и/или пробиотики. В одном варианте реализации изобретения гликановую фармацевтическую терапевтическую композицию также можно вводить в комбинации с другим веществом (таким как пробиотические или комменсальные полезные бактерии, пребиотическое вещество или терапевтический агент), как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция также может быть скомбинирована с антибиотиком, который нарушает нормальный рост микробиоты желудочно-кишечного тракта. Как правило, продолжительность лечения антибиотиками составляет 1-14 дней или 2-10 дней, или 5-7 дней. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат вводят субъекту, имеющего для этого показания, сразу после окончания одного или более курс(ов) лечения антибиотиками (например, через 1 ч, через 6 ч, через 12 ч, через 24 ч, через 36 ч, через 48 ч, через 3 дня, через 4 дня, через 5 дней, через 6 дней, через 7 дней, через 2 недели, через 3 недели или через 4 недели после окончания лечения антибиотиками). Во время курса лечения антибиотиками фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию можно назначать в начале лечения антибиотиками; вскоре после лечения антибиотиками, например через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней после лечения; или можно вводить при диагностированном нежелательном росте патогенов.

В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию также можно скомбинировать с лекарственным средством, вызывающим дисбиоз, например лекарственным средством, которое нарушает нормальный рост микробиоты желудочно-кишечного тракта, например, химиотерапевтическим лекарственным средством, антипсихотическим лекарственным средством, лекарственным средством-ингибитором протонного насоса или нестероидным противовоспалительным лекарственным средством (НПВС). В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая гликановая терапевтическая композиция снижает интенсивность симптомов у субъекта-человека, обусловленных лекарственными средствами или лечением. Указанные симптомы включают нарушения пищеварения, такие как, например, увеличение веса, запор, изжогу, диспепсию, повышенное газообразование, вздутие живота, метеоризм, диарею, боль в животе, спазмы, тошноту и рвоту. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановый терапевтический препарат вводят субъекту, имеющего для этого показания, сразу после окончания одного или более курс(ов) лечения лекарственными средствами (например, через 1 ч, через 6 ч, через 12 ч, через 24 ч, через 36 ч, через 48 ч, через 3 дня, через 4 дня, через 5 дней, через 6 дней, через 7 дней, через 2 недели, через 3 недели или через 4 недели после окончания лечения антибиотиками). Во время курса лечения лекарственными препаратами фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию можно назначать до начала лечения лекарственными средствами (например, за 1, за 2, за 3, за 4, за 5, за 6, за 7 дней); в день начала лечения лекарственными средствами; или вскоре после лечения антибиотиками, например, через 1, через 2, через 3, через 4, через 5, через 6, через 7 или более дней после лечения, и в некоторых случаях можно назначать только изначально (например, на короткий период) или на протяжении всего периода лечения лекарственными средствами, и можно даже продолжать в течение необходимого периода после окончания периода лечения лекарственными средствами (например, в течение 1-7 дней, 1-14 дней или 1-21 дней после окончания лечения). В некоторых вариантах реализации изобретения введение фармацевтической гликановой тера-

певтической композиции начинают или продолжают в том случае, если на фоне лечения лекарственными средствами возникают и/или диагностируются один или более нежелательных эффектов (например, нарушения пищеварения или рост патогенов). В некоторых вариантах реализации изобретения лечебным агентом, вызывающим дисбиоз, не является лекарственное средство, но это может быть лучевая терапия или хирургическое вмешательство; в этих случаях фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию также можно вводить, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения общее количество и продолжительность периодов лечения основаны на ответе субъекта на лечение. Например, у индивидуума может наблюдаться снижение интенсивности симптомов после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней лечения фармацевтической гликановой терапевтической композицией. В другом примере у индивидуума может наблюдаться снижение интенсивности симптомов после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 месяцев лечения фармацевтической гликановой терапевтической композицией. Таким образом, продолжительность лечения определяется индивидуальным ответом субъекта на фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию и началом снижения интенсивности одного или более симптомов. Таким образом, при приеме данной дозы фармацевтической гликановой терапевтической композиции у субъекта могут отмечаться симптомы, что может обуславливать необходимость продолжения приема субъектом той же дозы или более низкой дозы до купирования симптомов. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения продолжительность лечения не определяется с момента его начала; при этом лечение продолжается до достижения максимальной суточной дозы фармацевтической гликановой терапевтической композиции или до достижения желаемого уровня снижения интенсивности симптомов. В одном варианте реализации изобретения лечение является непрерывным.

В одном варианте реализации изобретения, согласно схеме лечения, субъекту можно вводить одну дозу в течение первого периода лечения и вторую дозу в течение второго периода лечения. Например, субъекту можно вводить одну дозу фармацевтической гликановой терапевтической композиции в течение недельного периода и вторую дозу в течение следующего недельного периода.

Субъект может самостоятельно вводить фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию, при этом гликановую терапевтическую композицию выдает или рекомендует (или приписывает) специалист в области здравоохранения, например врач или другой квалифицированный специалист в области здравоохранения; а также, в некоторых случаях, специалист в области здравоохранения контролирует результаты исследований (например, полученные результаты уровней биомаркеров в образцах, взятых от субъекта) и/или изменения состояния здоровья и критерии эффективности лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическую гликановую терапевтическую композицию вводит специалист в области здравоохранения.

В одном варианте реализации изобретения субъект, имеющий для этого показание, может пройти повторные курсы лечения с применением фармацевтической гликановой терапевтической композиции. Курс лечения можно повторить, если симптомы снова появятся или усилятся по интенсивности до нежелательного уровня. В альтернативном варианте курс лечения можно повторять с регулярными или предварительно заданными интервалами. Таким образом, лечение можно повторять примерно через месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, шесть месяцев, восемь месяцев, десять месяцев, один год, 18 месяцев, два года, три года, четыре года, пять лет или более пяти лет или в любой их комбинации (например, лечение можно повторить через один год, затем каждые два-пять лет после этого). Лечение можно повторять по той же схеме (например, по продолжительности, дозе, времени введения дозы, дополнительным веществам и т.д.), что применялась в первом лечении, или схему можно модифицировать. Например, можно уменьшить или увеличить продолжительность лечения, а также повысить или снизить дозу. В некоторых случаях лечение гликановым терапевтическим препаратом можно проводить в комбинации с разным количеством или композициями агентов, например, содержащих больше или меньше других веществ или меньше или больше веществ (таких как, например, пробиотическое вещество, пробиотическая бактерия или терапевтический агент) в дополнение к гликановому терапевтическому препарату.

Дополнительные вещества можно назначать в сочетании с фармацевтической гликановой терапевтической композицией.

Указанные вещества могут усиливать действие доз гликанового терапевтического препарата путем, например, стимуляции роста бактерий в желудочно-кишечном тракте, которые облегчают симптомы желудочно-кишечного заболевания, нарушения или патологического состояния, увеличивают адгезию пробиотических или полезных комменсальных бактерий в нише или в кишечнике. Указанные вещества можно назначать перед лечением гликановым терапевтическим препаратом, во время лечения гликановым терапевтическим препаратом, после лечения гликановым терапевтическим препаратом или в любой их комбинации. В случае введения указанных веществ во время лечения гликановым терапевтическим препаратом, их можно вводить параллельно с введением дозы гликанового терапевтического препарата или до или после введения дозы гликанового терапевтического препарата или в любой их комбинации. В одном варианте реализации изобретения вещества, применяемые в сочетании с фармацевтической гликановой терапевтической композицией, включают пробиотический микроорганизм(ы), пробиотики, терапевтические агенты или буферы/носители/вспомогательные вещества. Одно или более из этих веществ



можно применять в комбинации с фармацевтической гликановой терапевтической композицией в любое подходящее время до, во время, после лечения или в какой-либо их комбинации.

#### Определения

В данном контексте термин "содержание" микробных таксонов является относительным термином и означает относительное наличие микробных таксонов по отношению к другим таксонам в популяции в определенной микробной нише, такой как желудочно-кишечный тракт, или во всем организме хозяина (например, в модели заболевания человека или лабораторного животного).

В данном контексте термины "достигать" или "достижение" означают получение значения, например числового значения, или изображения, или физической сущности (например, образца), путем "непосредственного достижения" или "косвенного достижения" значения или физической сущности. Термин "непосредственное достижение" означает выполнение процесса (например, выполнение синтетического или аналитического метода или протокола) для получения значения или физической сущности. Термин "косвенное достижение" относится к получению значения или физической сущности от другой стороны или источника (например, от лаборатории третьей стороны, которая непосредственно получила физическую сущность или значение). Непосредственное достижение значения или физической сущности включает выполнение процесса, который включает физическое изменение физического вещества или использование аппарата или устройства. Примеры непосредственного достижения значения включают получение образца от субъекта-человека. Непосредственное достижение значения включает выполнение процесса, в котором используют аппарат или устройство, например ЯМР-спектрометр для получения спектра ЯМР.

Термин "колонизация" включает нетранзиторное обитание бактерии или другого микробного организма в организме хозяина. В данном контексте термин "сокращение колонизации" микробиоты в организме субъекта-хозяина, например, в желудочно-кишечном тракте, патогенными бактериальными таксонами, включает уменьшение времени обитания патогенных бактериальных таксонов в нише, а также уменьшение количества, концентрации или содержания патогенного бактериального таксона, обитающего непосредственно в нише или прилипшего к поверхности ниши. Измеряемое уменьшение количества прилипших патогенных бактериальных таксонов может быть продемонстрировано, например, с помощью анализа биопсийного образца; кроме того, уменьшения количества можно оценить косвенно, например, путем измерения патогенной нагрузки, например, в желудочно-кишечном тракте организма хозяина.

В данном контексте термин "отличающийся", например относительно вида гликана в терапевтическом препарате, предназначен для обозначения того, что указанный вид химически и/или структурно отличается от другого. Например, два сахара являются "отличающимися", если они отличаются химически, например фукоза и ксилоза, или отличаются структурно, например циклические или ациклические, L- или D-формы. Два димера являются "отличающимися", если они состоят из одних и тех же двух мономеров, но одна пара содержит альфа-1,4-связь, а другая пара содержит бета-1,6-связь. Отличающиеся вещества могут иметь любую другую пригодную отличительную характеристику или свойство, которые можно обнаружить с помощью способов, известных в данной области техники и/или описанных в настоящем документе.

В данном контексте термин "разнообразие микробной популяции" или "микробное разнообразие" относится к разнообразию, обнаруженному в микробиоте данной ниши или в организме субъекта-хозяина. Указанный термин может относиться к числу и/или изобилию отличающихся микробных таксонов в организме хозяина или в отдельной нише. Разнообразие может быть выражено, например, с помощью индекса разнообразия Шеннона (энтропия Шеннона), разнообразия альфа-бета, общего количества наблюдаемых ОТЕ или индекса Chao1, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты, описанные в настоящем документе, регулируют (например, увеличивают или уменьшают) разнообразие в микробной популяции, которое может быть выражено посредством энтропии Шеннона в качестве меры. Например, чем больше неравномерность содержания бактериальных таксонов, тем больше взвешенное геометрическое среднее значения  $p_i$  в формуле Шеннона и тем меньше соответствующая энтропия Шеннона. Если практически все содержание сосредоточено на одном таксоне, а другие таксоны очень редки (даже если их много), энтропия Шеннона приближается к нулю. Когда есть только один таксон, энтропия Шеннона точно равна нулю.

В данном контексте термин "схема введения дозы", "схема введения доз" или "схема лечения" означает способ введения лекарственного средства, посредством которого достигают терапевтической цели. Схема лечения включает определение одного, двух, трех или четырех параметров: путь введения, однократная доза, частота введения доз и продолжительности лечения.

Термин "дисбиоз желудочно-кишечной микробиоты" относится к несбалансированному состоянию микробиоты, например, в желудочно-кишечном тракте, при котором нарушается или изменяется нормальное разнообразие, отношение первых бактериальных таксонов ко вторым бактериальным таксонам и/или функция экологической сети. Это нежелательное, например нездоровое, состояние может быть обусловлено рядом факторов, включая (но не ограничиваясь этим) уменьшение или увеличение разнообразия микробиоты (например, бактериальных таксонов), избыточный рост одного или более патогенов

или патобионтов или сдвиг экологической микробной популяции, которая больше не может обеспечить свою основную функцию в организме субъекта-хозяина и поэтому в одном варианте реализации изобретения больше не способствует здоровому состоянию или ассоциируется с нежелательными симптомами у субъекта.

Термин "экологическая ниша" или просто "ниша" относится к экологическому пространству, в котором находится организм или группа организмов (например, желудочно-кишечный тракт или один или более отделов желудочно-кишечного тракта, таких как, например, желудок, толстый или тонкий кишечник, прямая кишка и т.д.). В некоторых вариантах реализации изобретения ниша конкретно относится к пространству, которое занимают микроорганизмы. Ниша может описывать, как организм или популяция организмов реагирует на распределение ресурсов, физических параметров (например, пространства ткани хозяина) и конкурентов (например, при росте, когда ресурсы в изобилии, а также когда хищники, паразиты и патогены отсутствуют), и как это в свою очередь изменяет те же самые факторы (например, ограничение доступа к ресурсам другими организмами, выступая в качестве источника пищи для хищников и потребителя пищевого объекта).

Термины "эффективное количество" и "терапевтически эффективное количество" фармацевтической композиции или лекарственного средства означают достаточное количество композиции или агента для обеспечения желаемого эффекта. В некоторых вариантах реализации изобретения врач или другой специалист в области здравоохранения определяет соответствующее количество и схему введения доз. Эффективное количество также относится к количеству фармацевтической композиции или лекарственному средству, которое предотвращает развитие или рецидив заболевания.

В данном контексте термин "гликановый терапевтический препарат" (также называемый "препаратом гликановой терапии", "гликановым препаратом" или "гликановым терапевтическим средством") относится к препарату, содержащему гликаны (иногда называемые видами гликанов) и проявляющему терапевтический эффект. Гликановый терапевтический препарат включает синтетическую смесь из множества моно-, ди-, олигомерных и/или полимерных видов гликанов (например, олиго- и/или полисахаридов, иногда называемых "олигосахаридами"), при этом олигомерные и/или полимерные виды гликанов включают гликановые единицы, которые связаны с помощью гликозидных связей. Гликановый терапевтический препарат может быть приготовлен в виде фармацевтической композиции или продукта лечебного питания для применения человеком. Гликановый терапевтический препарат может быть приготовлен в любой пригодной лекарственной форме, включая набор. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановые терапевтические препараты не содержат одного или более встречающихся в природе олиго- или полисахаридов, включая глюкоолигосахарид, маннанолигосахарид, инулин, линозу, мальтотретраозу, нигеротетразозу, нистозу, сеземозу, стахиозу, изомальтотриозу, нигеротриозу, мальтотриозу, мелецитозу, мальтотриулозу, рафинозу, кестозу, фруктоолигосахарид, 2'-фукозилалактозу, галактоолигосахарид, гликозил, идропаринукс, изомальтоолигосахарид, мальтодекстрин, ксилололигосахарид, агар, агарозу, альгиновую кислоту, альгурионовую кислоту, альфа-глюкан, амилопектин, амилозу, арабкосилат, бета-глюкан, капсулан, каррагинан, целлодекстрин, целлюлин, целлюлозу, хитин, нанофибрилы хитина, хитозан, хризоламинрин, курдлан, циклодекстрин, альфа-циклодекстрин, декстран, декстрин, диальдегидный крахмал, фикоилл, фруктан, фукоидан, галактоглюкоманнан, галактоманнан, галактозаминогалактан, желлановую смолу, глюкан, глюкоманнан, глюкороноксилад, гликокаликс, гликоген, гемицеллюлозу, гипромеллозу, кефиран, ламинарин, лентинан, леван полисахарид, лишенин, маннан, слизь, натуральную смолу, парамилон, пектиновую кислоту, пектин, пентакрахмал, фитогликоген, плеуран, полигинан, полидекстрозу, порфиран, пуллулан, шизофиллан, сефарозу, силистин, сизофиран, сагамадекс, желлановую камедь, ксантановую камедь, ксилан, ксилоглюкан, зимозан и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения гликаны существуют в виде соли, например фармацевтически приемлемой соли.

В данном контексте термин "гликановая единица" (иногда называемая "пищевым сахаром") относится к отдельной единице видов гликанов, описанных в настоящем документе, например к структурным элементам, из которых получают гликаны. В одном варианте реализации изобретения гликановая единица представляет собой мономер. В одном варианте реализации изобретения гликановая единица представляет собой димер. В одном варианте реализации изобретения гликановая единица представляет собой моноссахарид. В одном варианте реализации изобретения гликановая единица представляет собой дисахарид. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица представляет собой углевод и может быть выбрана из сахарного спирта, короткоцепочечной жирной кислоты, сахарной кислоты, иминосахара, дезоксисахара и аminosахара. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица представляет собой эритрозу, триозу, эритулозу, арабинозу, лизозу, рибозу, ксилозу, рибулозу, ксилулозу, аллозу, альтрозу, галактозу, глюкозу, гулозу, идозу, маннозу, талозу, фруктозу, пикозу, сорбозу, тагатозу, фукозу, фукулозу, рамнозу, манногептулозу, седогептулозу и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения гликановая единица представляет собой глюкозу, галактозу, арабинозу, маннозу, фруктозу, ксилозу, фукозу или рамнозу. В некоторых вариантах реализации изобретения гликан содержит отличающиеся гликановые единицы, например первый и второй моноссахарид, или первый и второй дисахарид, или моноссахарид и дисахарид. В некоторых вариантах реализации изобретения гликан содержит отличающиеся гликановые единицы, например первую, вторую, третью, чет-

вертую и/или пятую отличающуюся гликановую единицу.

В данном контексте термин "выделенный" или "очищенный" гликановый терапевтический препарат (также иногда называемый "обработанным") относится к препарату, являющемуся по существу чистым и не содержащим загрязнений, например, патогенов или иного нежелательного биологического материала, или токсичных или других нежелательных органических или неорганических соединений. В некоторых вариантах реализации изобретения чистые или выделенные соединения, композиции или препараты могут содержать следы растворителей и/или солей (например, менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1%, менее 0,5% или 0,1% по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %. Очищенные соединения или препараты содержат по меньшей мере около 60% (по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного %), по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере, около 99% по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного % соединения (соединений), представляющего интерес. Например, очищенный (по существу чистый) или выделенный гликановый терапевтический препарат представляет собой по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 99,5, 99,8, 99,9 или 100% гликанового терапевтического препарата по показателю вес./вес., вес./об., об./об. или молярного % (т.е. не включая какого-либо растворителя, такого как, например, вода, в которой гликановый терапевтический препарат может быть растворен) и является отделенным от компонентов, которые его сопровождают, например на этапе производства, экстракции/очистки и/или обработки (например, так, что гликановый терапевтический препарат по существу не содержит нежелательных соединений). Чистоту можно оценить с помощью любого подходящего стандартного метода, например с помощью колоночной хроматографии (например, с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ)), тонкослойной хроматографии (ТСХ), газовой хроматографии (ГХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Очищенность или чистота также могут определять степень стерильности, при которой введение препарата субъекту-человеку является безопасным, например отсутствие жизнеспособных инфекционных или токсичных агентов.

В данном контексте термин "микробном" относится к генетическому содержанию популяций микроорганизмов, которые обитают в организме субъекта и на субъекте (например, в организме субъекта-человека и на субъекте-человеке) как постоянно, так и временно, включая эукариоты, археи, бактерии и вирусы (включая бактериальные вирусы (например, фаги)), при этом "генетическое содержание" включает геномную ДНК, РНК, такую как рибосомальная РНК и матричная РНК, эпигеном, плазмиды и все другие типы генетической информации. В некоторых вариантах реализации изобретения микробном конкретно относится к генетическому содержанию популяций микроорганизмов в нише.

В данном контексте термин "микробиота" относится к популяции микроорганизмов, которые определяются (постоянно или временно) в организме субъекта и на субъекте (например, в организме субъекта-человека и на субъекте-человеке), включая эукариоты, археи, бактерии и вирусы (включая бактериальные вирусы, например, фаги). В некоторых вариантах реализации изобретения микробиота конкретно относится к микробной популяции в нише.

В данном контексте термины "патобионты" или "(оппортунистические патогены)" относятся к симбиотическим организмам, способным вызывать заболевание только тогда, когда в организме субъекта для этого существуют определенные генетические и/или окружающие условия.

В данном контексте термин "патогенный" (например, "патогенные бактерии") относится к веществу, микроорганизму или условию, которое может вызвать заболевание. В определенных контекстах патогены также включают микроорганизмы (например, бактерии), которые ассоциированы с заболеванием или патологическим состоянием, но для которых (прямая) причинная связь не установлена или еще не установлена. В данном контексте термин "патогены" относится к вирусам, паразитам и бактериям или другим патогенам, которые могут обуславливать инфекционный процесс у субъекта, например, у человека.

В данном контексте термин "фармацевтическая композиция" или "фармацевтический препарат" представляет собой композицию или препарат, обладающий фармакологической активностью или другим прямым эффектом в подавлении, лечении или профилактике заболевания, и/или готовую лекарственную форму или ее состав, предназначенные для применения у человека. Как правило, фармацевтическую композицию или фармацевтический препарат производят согласно правил организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Фармацевтические композиции или препараты могут быть стерильными или нестерильными. В случае нестерильных продуктов такие фармацевтические композиции или препараты, как правило, соответствуют микробиологическим спецификациям и критериям для нестерильных фармацевтических продуктов, как описано в Фармакопее США (USP) или Европейской фармакопее (EP). Фармацевтические композиции могут дополнительно содержать или могут вводиться совместно с дополнительными активными агентами, такими как, например, дополнительные терапевтические агенты. Фармацевтические композиции могут также включать, например, дополнительные терапевтические агенты, полифенолы, пребиотические вещества, пробиотические бактерии, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, растворители, носители или любую их комбинацию.

"Фармацевтические гликановые терапевтические композиции" (или просто "гликановые терапевти-

ческие композиции") представляют собой фармацевтические композиции, как описано в настоящем документе, содержащие гликановые терапевтические препараты и в некоторых случаях дополнительные агенты, ингредиенты, вспомогательные вещества или носители. Любой гликановый терапевтический препарат, описанный в настоящем документе, может быть приготовлен в виде фармацевтической композиции.

В данном контексте термин "фенотип" относится к набору наблюдаемых характеристик отдельного организма. В качестве примера у субъекта может быть фенотип "здорового" или "больного". Фенотипы описывают состояние организма, а все организмы в пределах фенотипа имеют тот же набор характеристик, которые описывают фенотип. Фенотип индивидуума частично или полностью приводит к взаимодействию генома и/или микробиома организмов с окружающей средой.

В данном контексте термин "субъект" (в некоторых случаях "пациент") относится к любому субъекту-человеку. Этот термин не обозначает конкретный возраст или пол. Субъектами могут быть беременные женщины. Субъекты могут включать новорожденных детей (преждевременно рожденных, рожденных в срок), детей в возрасте до одного года, детей младшего возраста (например, от 1 года до 12 лет), подростков (например, 13-19 лет), взрослых (например, 20-64 года) и пожилых людей (65 лет и старше). Субъекты не включают сельскохозяйственных животных, например сельскохозяйственных животных или скот, например крупный рогатый скот, лошадей, овец, свиней, цыплят и т.д.

В данном контексте термин "существенное снижение" (например, в отношении биомаркера или метаболита) означает снижение на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98, 99, 99,9% или 100%.

В данном контексте термин "существенное повышение" (например, в отношении биомаркера или метаболита) означает повышение на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 или более 1000%.

В данном контексте термин "синтетический" относится к искусственному соединению или препарату, такому как гликановый терапевтический препарат, который не встречается в природе. В одном варианте реализации изобретения полимерный катализатор, описанный в настоящем документе, применяют для синтеза гликанов для препарата в подходящих условиях реакции, например, реакции полимеризации, в результате которой образуются олигомеры и полимеры из отдельных гликановых единиц, которые добавляют к реакции. В некоторых вариантах реализации изобретения полимерный катализатор действует как агент гидролиза и может разрушать гликозидные связи. В других вариантах реализации изобретения полимерный катализатор может образовывать гликозидные связи. Синтетические гликановые терапевтические препараты могут также включать гликановые препараты, которые не являются выделенными из природного олиго- или полисахаридного источника. Следует понимать, что, хотя гликановый терапевтический препарат не является выделенным из природного олиго- или полисахаридного источника, гликановые единицы, составляющие гликановый препарат, могут быть и часто являются выделенными из природных олиго- или полисахаридных источников, включая перечисленные в настоящем документе, или являются синтезированными *de novo*.

В данном контексте термины "лечение" и "воздействие" относятся к введению агента или композиции субъекту (например, субъекту, имеющему симптомы, нежелательное патологическое состояние, нарушение или заболевание) с целью влияния на снижение тяжести и/или частоты возникновения симптома, устранения симптома и/или его основной причины, и/или содействия ослаблению или устранению поражения, и/или предотвращения нежелательного патологического состояния, нарушения или заболевания у субъекта, не имеющего симптомов, который восприимчив к определенному нежелательному патологическому состоянию, нарушению или заболеванию, или у субъекта с подозрением на развитие или риск развития патологического состояния, нарушения или заболевания.

### Примеры

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами. Примеры приведены только для иллюстративных целей и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем или содержание изобретения. Если не указано иное, то в практике настоящего изобретения будут использоваться обычные способы химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, в соответствии с уровнем техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); Green & Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012); Colowick & Kaplan, *Methods In Enzymology* (Academic Press); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Edition (Pharmaceutical Press, 2012); Sundberg & Carey, *Advanced Organic Chemistry: Parts A and B*, 5th Edition (Springer, 2007).

Пример 1. Приготовление гликановых терапевтических препаратов.

В круглодонную колбу, снабженную верхней мешалкой и конденсатором короткого пути с рубашкой, добавляли один или более моно- или дисахаридов вместе с 3-20% по сухому весу одного или более катализаторов, описанных в патенте США № 84 66242 и WO 2014/031956, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. В сухую смесь добавляли воду или другой совместимый растворитель (1,54 экв.), жидкую массу комбинировали со скоростью около 100 об/мин с использованием лопасти, соответствующей как можно точнее по размеру контуру выбранной круглодонной колбы. Затем смесь нагревали до 80-155°C. После того, как твердые вещества расплавились, ем-

кость помещали под вакуумное давление 10-1000 мбар. Реакционную смесь перемешивали от 30 мин до 8 ч, постоянно удаляя воду из смеси. Ход реакции контролировали с помощью ВЭЖХ. При достижении достаточной олигомеризации мешалку отключали, реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и доводили давление до атмосферного, а твердую массу растворяли в объеме воды, достаточном для получения раствора около 50 Брикс (грамм сахара на 100 Г раствора). После завершения растворения твердый катализатор удаляли фильтрованием, а раствор олигомера концентрировали до около 50-75 Брикс путем роторного испарения. В случаях применения органического растворителя, несмешивающиеся с водой растворители удаляли путем двухфазной экстракции, а смешивающиеся с водой растворители удаляли путем роторного испарения параллельно с этапом концентрирования.

Среди прочего следующие 25 гликанов были получены в нескольких партиях и испытаны в различных анализах, описанных в настоящем документе.

Единичная гликановая единица (гомогликаны): xyl100, rha100, ara100, gal100, glu100 и man100.

Две гликановые единицы (гетерогликаны): ara50gal50, xyl75gal25, ara80xyl20, ara60xyl40, ara50xyl50, glu80man20, glu60man40, man60glu40, man80glu20, gal75xyl25, glu50gal50, man62glu38 и гибридные гликаны glu90sor10 и glu90gly10.

Три гликановые единицы (гетерогликаны): xyl75glu2gal12, xyl33glu33gal33, glu33gal33fuc33, man52glu29gal19 и glu33gal33neu33.

Пример 2. Очистка гликановых терапевтических препаратов.

Олиго- и полисахариды синтезировали, как описано в примере 1, растворяли в деионизированной воде до конечной концентрации 25-50 Брикс. Затем материал подвергали воздействию по меньшей мере 2 массовых эквивалентов ионообменной смолы Dowex Monosphere 88. Воздействие может происходить путем вихревого взбалтывания в колбе при 120-170 об/мин или путем фильтрации через колонку, наполненную увлажненной жидкой массой, до тех пор, пока время удержания станет достаточным для достижения конечного значения pH раствора от 3 до 5. Олигомерный раствор выделяли путем фильтрования (как в случае реакций с вихревым взбалтыванием) или элюирования (как в случае фильтрации с использованием колонки); процесс повторяли с ионообменной смолой Dowex Monosphere 77 аналогичным образом до тех пор, пока pH раствора не увеличивался выше 5,5. Наконец, раствор подвергали воздействию обесцвечивающей смолы Dowex Optipore SD-2 Adsorbent до получения достаточного осветления раствора и фильтровали через фильтр 0,2 мкм для удаления остаточных смол и смолистых фракций. Конечный раствор затем концентрировали до 50-85 Брикс путем роторного испарения или до состояния твердого продукта путем лиофилизации.

Пример 3. Высокопроизводительное приготовление гликанового терапевтического препарата в больших масштабах.

Олигомеры и полимеры, описанные в примере 1, синтезировали параллельно на 24-, 48- или 96-луночных планшетах или на матрицах аналогичных размеров с флаконами объемом 1 драхма, размещенных в алюминиевых нагревательных блоках. В этом примере все переносы жидкости осуществлялись программируемым роботом или вручную с использованием калиброванных пипеток. В каждый флакон или лунку добавляли 20-100% по сухому весу одного или более катализаторов, описанных в патенте США № 8466242 и WO 2014/031956. Планшет или нагревательный блок помещали в вакуумную печь, нагретую до 50-150°C под вакуумом 10-800 мбар. Вакуумный насос печи защищали двухступенчатым конденсатором, состоящим из рециркуляционного охлаждающего улавливателя, за которым следовал улавливатель из сухим льдом/ацетоном. Планшеты или блоки нагревали в течение 30 мин до 6 ч при повышенной температуре и пониженном давлении без перемешивания. По истечении предварительно установленного периода времени давление в печи доводили до атмосферного, планшеты или блоки охлаждали до комнатной температуры, и каждую лунку или флакон разбавляли деионизированной водой до около 50 Брикс. Этапы твердофазной экстракции, описанные в примере 2, проводили путем элюирования через последовательные колонки, наполненные увлажненной жидкой массой, при этом элюент из каждой колонки протекал непосредственно в верхнюю часть следующей колонки со скоростью от 2 до 6 объемов слоя/час с помощью перистальтического насоса или другого пригодного небольшого насоса. Затем капилляр колонки промывали деионизированной водой, а комбинированные эфлюенты концентрировали путем лиофилизации для выделения твердых порошков с остаточным содержанием воды 1-10% по массе.

Пример 4. Модификация гликановых терапевтических препаратов путем удаления низкомолекулярных соединений.

Олигомеры или полимеры, полученные и очищенные, как описано в примерах 1 и 2, модифицировали таким образом, чтобы удалить низкомолекулярные соединения. Разделение осуществляли с помощью осмотического разделения. Около 45 см диализной трубки MWCO Biotech CE 1,0 кД (ширина плоскости 31 мм) от компании Spectrum Labs помещали в деионизированную воду и пропитывали в течение 10 мин, затем один конец герметизировали зажимом для диализной трубки. Раствор 25 Брикс из 8 г сухо-го олигосахариды стерильно фильтровали и герметизировали в трубке с помощью второго зажима вместе с несколькими мл воздуха, чтобы трубка могла плавать. Заполненную трубку затем помещали в 3-галлонный резервуар с деионизированной водой, который перемешивали с усилием, достаточным для того, чтобы вызвать медленное вращение герметичных трубок. Через 8 ч воду в резервуаре заменяли, а

трубку оставляли для перемешивания еще на 16 ч. Как только диализ был завершен и материал характеризовался значением DP2+, превышающим 95%, и значением DP3+, превышающим 90%, разбавленный раствор стерильно фильтровали и концентрировали под вакуумом до конечной концентрации около 65 Брикс или лиофилизировали до твердого вещества с остаточной влажностью от 1 до 10%. В альтернативном варианте разделение осуществляли с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF). В этом случае 100 мл гликанового образца 25 Брикс, растворенных в деионизированной воде и стерильно профильтрованных, помещали в загрузочный флакон системы Spectrum Labs KrosFlo Research Pi TFF, которая была подготовлена в соответствии с рекомендациями производителя. Затем образец подвергали диафильтрации через полый волоконный фильтр 1 кД mPES MidiKros при трансмембранном давлении 25 фунт/кв.дюйм изб.давления. Образцы ВЭЖХ загрузочной смеси, взятые на каждые 0,5 объема диафильтрации, использовали для определения, если материал характеризовался значением DP2+, превышающим 95%, и значением DP3+, превышающим 90%, в этот момент раствор стерильно фильтровали и концентрировали в вакууме до получения сиропа 65 Брикс или лиофилизировали до твердого вещества с остаточным содержанием воды 1-10% по массе.

Пример 5. Способы анализа гликановых терапевтических препаратов.

Измерение содержания гликанов с помощью жидкой рефрактометрии

Этот эксперимент был разработан для количественного определения количества гликанов в любом данном водном растворе. Портативный сахарный рефрактометр Mettler-Toledo Refracto 30GS калибровали с использованием деионизированной воды высокой степени очистки, полученной путем обратного осмоса. Несколько капель раствора гликана фильтровали через 0,2-микронный шприцевой фильтр непосредственно на линзу рефрактометра. Измерение проводили при комнатной температуре и регистрировали в единицах Брикс. Как правило, гликаны концентрировали до 75 Брикс при 23°C без явного затвердевания или кристаллизации. Затем единицы Брикс можно было преобразовать в растворимость, принимая удельную плотность воды за 1,0 г/мл. Таким образом, 75 Брикс (100 грамм раствора, состоящего из 75 г гликана и 25 г воды) эквивалентны водной растворимости 3,0 г/мл. Для сравнения, водная растворимость D-глюкозы при 25°C составляет 0,909 г/мл (48 Брикс) (Sigma-Aldrich).

Анализ мономерной композиции с помощью гидролиза и ГХ-МС

Этот эксперимент был разработан для количественного определения соотношения содержания мономеров в предоставленном олигосахариде. Анализ гликозильной композиции проводили с помощью комбинированной газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ/МС) пер-О-триметилсилильных (ТМС) производных моносахаридных метилгликозидов, полученных из образца путем кислотного метанолиза, как описано ранее Santander et al. (2013) *Microbiology* 159:1471. 100-200 мкг образца лиофилизировали в пригодную пробирку для анализа. Инозитол (20 мкг) добавляли к образцу в качестве внутреннего стандарта, затем образец нагревали до 80°C в 1 М HCl/метаноле в течение 18 ч. Полученные моносахариды затем повторно ацетилювали с применением пиридина и уксусного ангидрида в MeOH и пер-О-триметилсилилировали с помощью Tri-Sil (Pierce) при 80°C в течение 30 мин. Анализ ГХ/МС ТМС метилгликозидов проводили на Agilent 7890A GC, соединенном с MSD 5975C, используя капиллярную колонку с плавленым кварцевым слоем Supelco Equity-1 (30 м×0,25 мм внутр.диаметр). Каждый пик был отнесен к компоненту сахара, на основании сравнения с известными стандартами, при этом интеграция соответствующих пиков позволила провести чистое вычисление относительного процента мономеров в гликане из предоставленного образца. Во всех анализируемых случаях мономерная композиция данного олигосахариды соответствовала исходному соотношению в пределах экспериментальной ошибки, а композиция на выходе соответствовала исходной композиции в пределах точности измерения.

Анализ молекулярно-вещного распределения с помощью  
экслюзионной хроматографии (ЭХ)

Этот эксперимент был разработан для количественного определения распределения молекулярного веса в предоставленном олигосахариде. Измерение проводили с помощью ВЭЖХ с использованием метода, описанного в статье Фармакопеи США, 38 (6) In-Process Revision: Heparin Sodium (USP37-NF32). Разделения получали в системе Agilent 1200 HPLC с колонкой superpose 12 с применением 50 mM ацетата аммония в качестве элюента со скоростью потока 1,0 мл/мин и детектором ELSD. Температуру колонки устанавливали на 30°C, а для построения стандартной кривой применяли декстран (вес 1 кД, 5 кД, 10 кД). Раствор 2 мг/мл образцов готовили и пропускали через спиновый фильтр 0,45 мкм с последующим введением 40 мкл в систему ВЭЖХ. Полиномиальную кривую третьего порядка строили на основе логарифмических показателей молекулярного веса и объемов элюирования перечисленных стандартов. Средневесовой молекулярный вес (Mw), среднечисленный молекулярный вес (Mn) и индекс полидисперсности (PDI) для образца рассчитывали по сравнению со стандартной кривой. На фиг. 1 проиллюстрирована кривая, полученная во время ЭХ-оценки образца glu100, в котором средний молекулярный вес был определен на уровне 1212 г/моль или около DP7. Верхнее значение молекулярного веса материала, определяемое точкой кривой при 10% максимальной абсорбции в начале кривой, было определено на уровне 4559 г/моль или около DP28. Нижнее значение молекулярного веса материала, определяемое точкой кривой при 10% максимальной абсорбции в конце кривой, было определено на уровне 200 г/моль

или около DP1. Аналогичный анализ образца glu50gal50 продемонстрировал показатели МВ, высокой массы и низкой массы 1195 г/моль (~DP7), 4331 г/моль (~DP27) и 221 г/моль (~DP1) соответственно.

Анализ молекулярно-вещного распределения с помощью ион-аффинной хроматографии (ИАХ)

Доля гликана со значением DP, превышающим или равным 2 (DP2+) и 3 (DP3+), может быть измерена с помощью ионно-аффинной хроматографии. Образец гликана разбавляли до 50-100 мг/мл и 10 мкл полученного раствора вводили в систему ВЭЖХ Agilent 1260 BioPure, оснащенной колонкой BioRad Aminex HPLX-42A 7,8×300 мм и RI-детектором. Применяя чистую воду класса ВЭЖХ в качестве элюента, образец элюировали со скоростью 0,6 мл/мин через колонку с температурой 80°C и RI-детектором, поддерживающим температуру на уровне 50°C. Пики, представляющие DP1-6, определяли путем сравнения с эталонными стандартами и интегрировали с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Как правило, пики интегрировали как DP1, DP2, DP3, DP4-7 и DP8+. Значение DP, которое достигается реакцией, описанной в примере 1, отличается от мономера к мономеру, хотя и является сопоставимым между партиями, если процедура выполняется правильно, например, глюкоза надежно достигает более высоких значений DP, чем арабиноза. Например, в 17 партиях glu100 значения DP2+ варьировались от 85-93%, а значения DP3+ варьировались от 80-90%. И наоборот, в 6 партиях gal100 значения DP2+ варьировались от 63-78%, а значения DP3+ варьировались от 48-71%. Смеси мономеров характеризовались средними значениями отдельных компонентов.

Анализ альфа-/бета-распределения с помощью 2D-ЯМР Этот эксперимент был разработан для количественного определения соотношения альфа- и бета-гликозидных связей в предоставленном образце с помощью двумерного ЯМР. Около 150 мг раствора олигосахарида 65 Брикс сушили до получения стабильной массы в вакуумной печи при 45-95°C при давлении 400 мбар. Образец подвергали двум циклам растворения в D<sub>2</sub>O и сушки для удаления остаточной H<sub>2</sub>O. После высушивания образец растворяли в 750 мкл D<sub>2</sub>O с 0,1% ацетоном, помещали в ампулу для ЯМР 3 мм и анализировали в аппарате Bruker Avance-III, работающем при 500,13 МГц <sup>1</sup>H (125,77 МГц <sup>13</sup>C) и оснащенным зондом Bruker BBFO, функционирующим при 21,1°C. Образец анализировали с применением гетероатомной единичной квантовой когерентной импульсной последовательности (HSQC) с использованием стандартной импульсной последовательности от Bruker. Аномерные протоны от 4-6 ч./млн (1H) до 80-120 ч./млн (13C) определяли по аналогии с глюкозой, как описано в Roslund, et al. (2008) Carbohydrate Res. 343:101-112. Спектры относились к внутреннему ацетоновому сигналу: <sup>1</sup>H - 2,22 ч./млн; <sup>13</sup>C - 30,8 ч./млн. Изомеры определяли количественно путем интеграции их соответствующих пиков с помощью программного пакета MNova от Mestrelab Research (Сантьяго-де-Компостела, Испания). На фиг. 2 проиллюстрирована аномерная область репрезентативного спектра. В табл. 6 приведено распределение по 13 отличающимся комбинациям мономеров, демонстрирующее, что соотношение альфа-/бета-определяется выше чем 4:1, как в случае с gal100, и ниже чем 1:1, как в случае с glu50gal50.

Таблица 6. Распределение альфа- и бета-связей по партиям и типам гликанов

Гликаны	Альфа-связи (%)	Бета-связи (%)
Glu100	58	42
	61	39
	60	40
Gal100	60	40
Glu50gal50	50	50
	56	44
Glu33gal33fuc33	55	45
Man100	57	43
Man52glu29gal19	76	24
Ara100	67	33
Rha100	80	20
Xyl100	57	43
	59	41
Xyl75gal25	56	44

#### Идентификация состава с помощью ЯМР

Этот эксперимент был разработан для идентификации состава гликана с помощью 2D-ЯМР-идентификации составляющих мономеров. Около 150 мг раствора олигосахарида 65 Брикс сушили до получения стабильной массы в вакуумной печи при 45-95°C при давлении 400 мбар. Образец подвергали двум циклам растворения в D<sub>2</sub>O и сушки для удаления остаточной H<sub>2</sub>O. После высушивания образец растворяли в 750 мкл D<sub>2</sub>O с 0,1% ацетоном, помещали в ампулу для ЯМР 3 мм и анализировали в аппарате Bruker Avance-III, работающем при 500,13 МГц <sup>1</sup>H (125,77 МГц <sup>13</sup>C) и оснащенном зондом Bruker BBFO, функционирующим при 70°C. Образец анализировали с применением гетероатомной единичной квантовой когерентной импульсной последовательности (HSQC) с использованием стандартной импульсной последовательности от Bruker. Затем аномерную область каждого гликанового спектра, полученного из одного мономера сахара, исследовали на пики, представляющие специфические гликозидные связи, характерные для этого мономера.

Предполагается, что из-за спин-изолированной природы одиночных углеводных колец в полисахаридах HSQC-спектры гликана более чем с одним мономером представлены суммой пиков HSQC каждого из его составляющих сахаров. Поэтому каждый составляющий мономер имеет уникальные пики HSQC, которые появятся в любом гликане, содержащем этот мономер, независимо от других составляющих мономеров, и, кроме того, мономеры, применяемые для синтеза гликанов, могут быть определены путем идентификации характерных пиков, уникальных для каждого составляющего мономера. Например, фиг. 3 демонстрирует, что HSQC-спектры glu50gal50 являются гибридом спектров glu100 и gal100. В табл. 7 приведены характерные пики для выбранных гликановых единиц.

Таблица 7. Диагностические пики HSQC для каждого компонента сахара.

Мономер	Сдвиг <sup>1</sup> H	Сдвиг <sup>13</sup> C	Мономер	Сдвиг <sup>1</sup> H	Сдвиг <sup>13</sup> C	
Глюкоза	5,42	92,5	Ксилоза	5,18	93,0	
	5,21	92,8		5,10	94,3	
	5,18	93,9		5,34	98,2	
	5,08	97,0		5,31	99,6	
	5,36	98,4		5,11	100,8	
	5,34	99,8		4,91	99,4	
	5,38	100,3		4,56	97,3	
	4,95	98,6		4,64	104,2	
	4,62	96,6		4,54	103,4	
	4,70	103,6		4,44	102,6	
	4,49	103,4		4,44	104,1	
	Галактоза	5,37		92,9	Арабиноза	5,22
5,24		93,1	5,13	93,2		
5,14		96,0	5,29	96,0		
4,96		99,3	5,26	97,2		
5,31		98,7	5,12	96,6		
5,39		101,4	5,18	99,6		
5,00		101,8	5,06	99,2		
4,80		101,3	4,99	100,0		
4,63		97,0	5,26	101,9		
4,56		97,2	5,06	102,1		
4,53		103,1	4,55	97,4		
4,43		104,1	4,54	105,2		
Фукоза	5,18	92,9		4,50	105,5	
	5,33	92,4		4,38	103,9	
	5,04	96,3	Рамноза	5,21	93,2	
	4,90	99,7		5,10	94,5	
	4,52	97,0		4,85	94,1	
	4,39	103,6		5,01	95,8	
Манноза	5,37	93,0			5,35	100,5
	5,16	94,6			5,15	102,2
	4,88	94,2		5,04	102,9	
	5,39	101,7		4,78	97,9	
	5,24	101,9		4,71	99,0	
	5,13	102,8		4,72	101,0	
	5,03	102,7				
	5,24	105,6				
	5,09	108,0				
	4,88	94,2				
4,89	100,0					
4,70	101,1					

Проявлялось по меньшей мере 5 пиков для каждой гликановой единицы, применяемой в качестве исходного материала в синтезе гликанового терапевтического препарата, содержащего 3 или менее отличающихся гликановых единиц. HSQC-спектры гликановых терапевтических препаратов, содержащих 4 или более отличающихся гликановых единиц, имеют по меньшей мере 4 пика для каждой составляющей гликановой единицы.

#### Анализ разветвления

Этот эксперимент был разработан для количественного определения распределения гликозидных региоизомеров (разветвлений) в предоставленном олигосахариде. Для анализа гликозильных связей образцы перметилировали, деполимеризовали, восстанавливали и ацетиловали; полученные частично метилированные альдитоловые ацетаты (PMAA) анализировали с помощью газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС), как описано в Heiss et al (2009) Carbohydr. Res. 344:915. Образцы суспенди-



рвали в 200 мкл диметилсульфоксида и оставляли перемешиваться в течение 1 дня. Перметилирование осуществляли с помощью двух циклов обработки гидроксидом натрия (15 мин) и метилиодидом (45 мин). Водный раствор гидролизovali добавлением 2 М трифторуксусной кислоты и нагреванием до 121°C в течение 2 ч. Твердые вещества выделяли в вакууме и ацетилировали в уксусной кислоте/трифторуксусной кислоте. Полученные РМАОА анализировали на устройстве Agilent 7890А GC, соединенном с MSD 5975С (масс-селективный детектор, режим ионизации электронным ударом); разделение проводили с применением капиллярной колонки 30 мм Supelco SP-2331 связанной фазы, с плавленным кварцевым слоем SP-2331. На фиг. 4 проиллюстрированы три репрезентативные ГХ-спектра из этого анализа. Эти анализы демонстрируют, что гликаны имели по меньшей мере 0,1-10% каждой из 1,2-; 1,3-; 1,4- и 1,6-гликозидных связей. Материалы также содержали по меньшей мере 5% разветвленных типов связей (включая, но не ограничиваясь ими, 1,3,6-, 1,4,6- или 1,2,4-гликозиды) и по меньшей мере 3% мономерных единиц, существовавших в фуранозной форме. Гликан, происходящий из одного мономера, состоял из по меньшей мере 12 отличающихся неконцевых замещающих профилей. Гликан, происходящий из двух мономеров, состоял из по меньшей мере 18 отличающихся неконцевых замещающих профилей. Гликан, происходящий из трех или более мономеров, состоял из по меньшей мере 24 отличающихся неконцевых замещающих профилей.

Пример 6. Сбор образцов кала.

Образцы кала собирали, предоставляя субъектам систему сбора образцов Fisherbrand Commode (Fisher Scientific) и соответствующие инструкции по ее применению. Собранные образцы хранили с пакетами льда или при -80°C до обработки (McInnes & Cutting, Manual of Procedures for Human Microbiome Project: Core Microbiome Sampling Protocol A, v12.0, 2010, hmpdacc.org/doc/HMP\_MOP\_Version12\_0\_072910.pdf). Также для сбора кала могли применять альтернативные устройства. Например, образцы можно собирать в контейнер Globe Scientific с завинчивающейся крышкой и оснащенный ложкой (Fisher Scientific) или применять систему для сбора OMNIgene-GUT (DNA Genotek, Inc.), которая стабилизирует микробную ДНК для последующей экстракции и анализа нуклеиновой кислоты. Субъекты, сдающие образцы кала, получали инструкции, предоставленные изготовителем, относительно применения каждого устройства для сбора. Аликвоты образцов фекалий хранили при -80°C в соответствии со стандартными протоколами, известными специалисту в данной области техники.

Пример 7. Определение титра культуральных образцов и микробных образцов, собранных из кала.

Для определения титра общераспространенных бактерий желудочно-кишечного тракта образцы кала собирали, как описано в прим. 6, и готовили в виде суспензий 10% вес./об. в стерильном забуференном фосфатом солевом растворе (PBS). Десятикратные серийные разведения готовили в стерильном PBS и осуществляли посев на чашки Петри (100 мкл на разбавление) с кровяным агаром Brucella (Anaerobe Systems; инкубировали в анаэробных условиях для определения неселективного титра общераспространенной кишечной микробиоты, включая Bacteroides, или инкубировали в аэробных условиях для определения неселективного титра факультативных анаэробов, таких как Proteobacteria). Также можно было применить агар с желчью и эскулином для Bacteroides (Anaerobe Systems; культивирование в анаэробных условиях для титрования микроорганизмов группы Bacteroides fragilis group), фруктозный агар из цикло-серином-цефокситином (Anaerobe Systems; культивирование в анаэробных условиях для титрования Clostridium difficile), агар Lactobacillus-MRS (Anaerobe Systems; культивирование в анаэробных условиях для титрования Lactobacillus), агар с эозином и метиленовым синим (Teknova; культивирование в аэробных условиях для титрования Escherichia coli и других грамотрицательных кишечных бактерий), агар с желчью и эскулином (BD; культивирование в аэробных условиях для титрования видов Enterococcus), селективный агар для Bifidobacterium (Anaerobe Systems; для титрования видов Bifidobacterium) или агар MacConkey (Fisher Scientific; для титрования E. coli и других грамотрицательных кишечных бактерий). Чашки Петри инкубировали при 37°C в аэробных или анаэробных условиях, в зависимости от видов микроорганизмов, представляющих интерес. Через 24-48 ч колонии подсчитывали и применяли для обратного пересчета концентрации жизнеспособных клеток в исходном образце.

Для неселективных культуральных образцов, содержащих бактерии, полученные от человека или в модели лабораторного животного, применяли обогащенную среду или агар, такой как кровяной агар Brucella (Anaerobe Systems), бульон с сердечно-мозговым экстрактом (Teknova) или глюкозный бульон с мясного фарша (Anaerobe Systems). Минимальный состав среды, такой как M9 (Life Technologies), дополненный аминокислотами, источниками углерода или другими питательными веществами по необходимости, применяли для неселективных культуральных бактерий в анализах in vitro для оценки эффектов гликанов или других соединений на популяции бактерий. В альтернативных вариантах другие минимальные составы среды, известные специалистам в данной области техники, применяют, например, как описано в Martens et al. (Mucosal Glycan Foraging Enhances Fitness and Transmission of a Saccharolytic Human Gut Bacterial Symbiont, 2008, Cell Host & Microbe, 4:447-457). В альтернативных вариантах суспензии кала с концентрацией 0,1-10% мас./об. в PBS применяли в присутствии или в отсутствие дополнительных элементов среды в анализах in vitro для оценки эффектов гликанов или других соединений на популяции бактерий.

Пример 8. Анализы роста единичных штаммов.

Проведен анализ *in vitro* для оценки способности различных бактериальных штаммов, включая комменсальные и патогенные штаммы бактерий желудочно-кишечного тракта, использовать разные гликаны в качестве субстратов для роста. Этот анализ разработан для оценки способности выбранных гликанов способствовать росту микробиоты, ассоциированной со здоровым состоянием желудочно-кишечного тракта. Кроме того, сравнивали способность выбранных гликанов стимулировать рост комменсальных штаммов со способностью гликанов стимулировать рост микроорганизмов, ассоциированных с патологическим состоянием. При тестировании гликановых препаратов относительно их воздействия на группы бактерий (по отдельности), характерных для здорового или патологического состояния, могут быть выбраны гликановые препараты, которые избирательно усиливают рост бактерий, ассоциированных со здоровым состоянием, в отличие от бактерий, ассоциированных с патологическим состоянием. Бактериальные штаммы обрабатывали на всех этапах в анаэробной камере (AS-580, Anaerobe Systems) с палладиевым катализатором. В камере изначально создавали анаэробные условия путем продувки анаэробной газовой смесью, состоящей из 5% водорода, 5% диоксида углерода и 90% азота, а затем поддерживали в анаэробном состоянии с использованием этой же анаэробной газовой смеси. Анаэробные условия в камере подтверждали ежедневно с помощью анаэробных индикаторных полосок Oxoid, которые меняют цвет в присутствии кислорода. Все культуральные среды, чашки Петри для анализа, другие реагенты и пластмассовые материалы предварительно помещали в анаэробную камеру за 24-48 ч до контакта с бактериями. Гликаны ara50gal50, glu33gal33fuc33, glu50gal50, gal100, glu100, ara50xyl50, xyl100, ara100, ara60xyl40, rha100, gal75xyl25, glu90gly10, man62glu38, man52glu29gal19 и два доступных в продаже вещества в качестве контроля: акациевое волокно (органический порошок акациевого волокна, NOW Foods, Блумингдейл, штат Иллинойс) и FOS (Nutraflora FOS, NOW Foods, Блумингдейл, штат Иллинойс) готовили в концентрации 5% мас./об. в воде, стерилизовали посредством фильтрации и добавляли на планшеты для анализа Costar 3370 для конечной концентрации 0,5% мас./об. в анализе, с каждым анализируемым гликаном в двух соседних лунках, а также декстрозой и водой - в качестве положительных и отрицательных контролей.

Бактериальные изоляты получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и Института Лейбница DSMZ - Немецкого института микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ). 8 комменсальных видов (*Bacteroides caccae* ATCC 43185 "BCA.26", *Prevotella copri* DSM 18205 "PCO.72", *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 "BTH.8", *Bacteroides cellulosilyticus* DSM 14838 "BCE.71", *Clostridium scindens* ATCC 35704 "CSC.32", *Ruminococcus obeum* ATCC 29714 "ROB.74", *Clostridium nexile* ATCC 27757 "CNE.31" и *Parabacteroides distasonis* ATCC 8503 "PDI.6") и три патогенных вида (*Clostridium difficile* ATCC BAA-1382 "CDI.23" и ATCC 43255 "CDI.24", *Enterococcus faecium* ATCC 700221 "EFM.66" и *Salmonella enterica* ATCC 27869 "SEN.52") выращивали в анаэробных условиях в течение 18-48 ч при 37°C на кровяном агаре Brucella (Anaerobe Systems), предварительно восстановленной обогащенной среде, содержащей ферментативные продукты переваривания казеина и тканей животных, экстракт дрожжей, хлорид натрия, декстрозу, бисульфит натрия, кровь овец, гемин и витамин K1. Комменсальные виды *Akkermansia muciniphila* ATCC BAA-835 "AMU.73" выращивали в анаэробных условиях на чашках с агаром MTGE (Anaerobe Systems), обогащенной среде, включающей белковый состав, экстракт дрожжей, витамин K1 и летучие жирные кислоты. Инокулят получали путем соскабливания колоний с чашек Петри с агаром, суспендирования их в фосфатном буфере, определения оптической плотности суспензий клеток при 600 нм (OD<sub>600</sub>) в полистироловом 96-луночном плоскодонном планшете для анализа Costar 3370 с применением планшет-ридера Biotek Synergy 2 с программным обеспечением для считывания микропланшетов Gen5 2.0 All-In-One в соответствии с протоколом производителя и разбавления клеток до OD<sub>600</sub> 0,01-0,02 в определенных и полуопределенных средах, которые были приготовлены без сахаров. Изоляты *D. formicigenerans*, *P. distasonis*, *C. difficile*, а также *E. faecium* анализировали в 900 мг/л хлорида натрия, 26 мг/л дигидрата хлорида кальция, 20 мг/л гексагидрата хлорида магния, 10 мг/л тетрагидрата хлорида марганца, 40 мг/л сульфата аммония, 4 мг/л гептагидрата сульфата железа, 1 мг/л гексагидрата хлорида кобальта, 300 мг/л двухосновного фосфата калия, 1,5 г/л двухосновного фосфата натрия, 5 г/л бикарбоната натрия, 0,125 мг/л биотина, 1 мг/л пиридоксина, 1 мг/л пантотената, 75 мг/л гистидина, 75 мг/л глицина, 75 мг/л триптофана, 150 мг/л аргинина, 150 мг/л метионина, 150 мг/л треонина, 225 мг/л валина, 225 мг/л изолейцина, 300 мг/л лейцина, 400 мг/л цистеина и 450 мг/л пролина (Theriot CM et al. Nat Commun. 2014; 5: 3114), дополненными 3,5% (об./об.) глюкозным бульоном с мясного фарша (CMG, Anaerobe Systems), обогащенной средой, включающей экстракт дрожжей, пептон, говяжий фарш и фосфатный буфер. *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. cellulosilyticus*, а также *S. enterica* анализировали в 100 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,2), 15 мМ хлорида натрия, 8,5 мМ сульфата аммония, 4 мМ L-цистеина, 1,9 мкМ гематина, 200 мкМ L-гистидина, 100 мкМ хлорида магния, 1,4 мкМ сульфата железа гептагидрата, 50 мкМ хлорида кальция, 1 мкг/мл витамина K3 и 5 нг/мл витамина B12 (Martens EC et al. Cell Host & Microbe 2008; 4, 447-457). *C. scindens*, *P. copri*, а также *R. obeum* анализировали в 10 г/л триптонового пептона, 5 г/л экстракта дрожжей, 0,5 г/л гидрохлорида L-цистеина, 0,1 М фосфатного буфера калия с pH 7,2, 1 мкг/мл витамина K3, 0,08% вес./об. хлорида кальция, 0,4 мкг/мл гептагидрата сульфата железа, 1 мкг/мл резазурина, 1,2 мкг/мл гематина, 0,2 мМ гистидина, 0,05% Твин 80, 0,5% мясного экстракта

(Sigma), 1% минеральной добавки (ATCC), 1% витаминной добавки (ATCC), 0,017% об./об. уксусной кислоты, 0,001% об./об. изовалериановой кислоты, 0,2% об./об. пропионовой кислоты и 0,2% об./об. N-масляной кислоты (Romano KA et al. mBio 2015; 6(2): e02481-14); для *S. nexile*, а также для *A. muciniphila* эту среду дополняли бульоном CMG с конечной концентрацией 3,5% об./об.. Бактерии подвергали воздействию гликанов ara50gal50, glu33gal33fuc33, glu50gal50, gal100, glu100, ara50xyl50, xyl100, ara100, ara60xyl40, rha100, gal75xyl25, man62glu38, man52glu29gal19, коммерчески доступного акациевого волокна, коммерчески доступного FOS и декстрозы при конечной концентрации 0,5% вес/об. на 96-луночных микропланшетах, конечный объем 200 мкл на лунку, при 37°C в течение 18-48 ч, в анаэробных условиях, до появления мутности в контрольных лунках с положительным ростом, содержащих 0,5% вес./об. декстрозы. Измерения OD<sub>600</sub> для каждого изолята в конце периода инкубации получали с использованием планшет-ридера Biotek Synergy2 с программным обеспечением Gen5 2.0 в соответствии со спецификациями производителя. Нормализацию измерений проводили путем деления показаний OD<sub>600</sub> изолята на анализируемых гликанах на показания OD<sub>600</sub> изолята в среде, дополненной 0,5% вес./об. декстрозы, чтобы облегчить сравнение потребления гликанов штаммами, которые растут в существенно отличающихся диапазонах OD<sub>600</sub>. В табл. 8 и 9 обобщены полученные результаты.

Обозначения гликанов		
№ гликана	Идентификация гликана	% DP3+
1	gal75xyl25	50
2	glu50gal50	68-80
3	gal100	78-83
4	glu33gal33fuc33	54-82
5	man62glu38	63
6	ara50gal50	73
7	glu100	79-80
8	man52glu29gal19	47-77
9	xyl100	37-73
10	ara50xyl50	63
11	ara100	48-85
12	ara60xyl40	70
13	rha100	45-49
14	FOS	
15	акациевое волокно	

Большинство гликанов поддерживали рост комменсальных штаммов, оцененных в этом анализе. Gal75xyl25, glu33gal33fuc33, glu50gal50, gal100, man62glu38, ara50gal50, glu100, man52glu29gal19, ara50xyl50 xyl100 и ara100 поддерживали рост по меньшей мере 5 из 9 комменсальных штаммов (см. табл. 8).

Таблица 8. Рост комменсальных бактерий, поддерживаемый гликанами

№ гликана	Изоляты w/NG >0,2	Комменсальные бактерии, средний нормализованный рост (NG)								
		PDI. 6	BTH. 8	BCA. 26	CNE. 31	CSC. 32	BCE. 71	PCO. 72	AMU. 73	ROB. 74
1	9/9	+++	++	++	+	+	++	+++	++	+
2	9/9	+++	+	++	+	+	++	+++	+	+
3	9/9	+++	+	+	++	+	+	++	+	+
4	9/9	+++	+	+	+	+	+	++	+	+
5	8/9	+++	++	++	+	+	++	-	+	+
6	8/9	+++	+	+	-	+	+	++	+	+
7	8/9	+++	+	+	+	-	+	++	+	+
8	7/9	+++	+	+	-	+	+	-	+	+
9	6/9	+++	+	+	-	-	+	++	-	+
10	6/9	++	+	+	-	-	+	++	-	+
11	5/9	-	+	+	-	-	+	++	-	+
12	4/9	++	-	+	-	-	+	+	-	-
13	2/9	-	-	-	-	-	-	+	-	+
14	5/9	+++	++	++	-	-	-	++	-	++
15	1/9	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Обозначения символов	
Символ	NG
-	< 0,2
+	0,2-6
++	0,6-1,2
+++	>1,2

Некоторые гликаны поддерживали рост анализируемых комменсальных бактерий лучше, чем анализируемых патогенов: ara50gal50, glu33gal33fuc33, gal100, glu100 ara50xyl50, xyl100, при этом коммерческий доступный FOS, применяемый в качестве контроля, поддерживал рост 5 или более из 9 комменсальных изолятов и 2 или менее из 4 патогенных изолятов с нормализованными значениями роста по меньшей мере 0,2. В проведенном анализе оба гликана glu50gal50 и gal75xyl25 поддерживали большинство комменсальных и патогенных штаммов с нормализованными значениями роста по меньшей мере 0,2; однако указанные гликаны поддерживали более высокий уровень роста с большей долей комменсальных, чем патогенных штаммов: gal75xyl25 обуславливал нормализованные значения роста >0,6 для 6 из 9 комменсальных штаммов и 1 из 4 патогенных штаммов, а glu50gal50 обуславливал нормализованные значения роста > 0,6 для 4 из 9 комменсальных штаммов и 0 из 4 патогенных штаммов. В анализе один гликан поддерживал рост патогенных, а также комменсальных штаммов: man62glu38 поддерживал рост 4 из 4 патогенных и по меньшей мере 8 из 9 комменсальных штаммов с нормализованными значениями роста по меньшей мере 0,2, и 3 из 4 патогенных и 6 или менее из 9 комменсальных штаммов с нормализованными значениями роста >0,6. В анализе один гликан не поддерживал рост большинства комменсальных или патогенных штаммов: gha100 и коммерчески доступное акациевое волокно, применяемое в качестве контроля, поддерживало 2 или менее из 9 комменсальных и 2 или менее из 4 патогенных штаммов с нормализованными значениями роста >0,2 (см. табл. 9).

Таблица 9. Дифференциальный рост комменсальных и патогенных бактерий под воздействием выбранных гликанов

№ гликана	Комменсальные бактерии w/NG> 0,2	Патогенные бактерии w/NG> 0,2	Комменсальные бактерии										Патогенные бактерии			
			FDI. 6	BTN. 8	BCA. 26	CNE. 31	CSC. 32	VCE. 71	PCO. 72	AMU. 73	ROB. 74	CDI. 23	CDI. 24	SEN. 52	EFM. 66	
3	9/9	0/4	+++	+	+	++	+	+	++	+	+	-	-	-	-	
7	8/9	2/4	+++	+	+	+	-	+	++	+	+	+	-	-	+	
6	8/9	0/4	+++	+	+	-	+	+	++	+	+	-	-	-	-	
10	6/9	0/4	++	+	+	-	-	+	++	-	+	-	-	-	-	
9	6/9	0/4	+++	+	+	-	-	+	++	-	+	-	-	-	-	
14	5/9	1/4	+++	++	++	-	-	-	++	-	++	-	-	-	+	
1	9/9	3/4	+++	++	++	+	+	++	+++	++	+	+	-	+	+	
2	9/9	4/4	+++	+	++	+	+	++	+++	+	+	+	+	+	++	
5	8/9	4/4	+++	++	++	+	+	++	-	+	+	++	++	+	++	
13	2/9	0/4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	
15	1/9	2/4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	

Обозначения символов	
Символ	NG
-	< 0,2
+	0,2-6
++	0,6-1,2
+++	>1,2

Эти данные свидетельствуют о том, что гликановые терапевтические препараты поддерживает рост комменсальных бактерий, при этом некоторые подгруппы гликанов дифференциально поддерживают рост комменсальных штаммов по сравнению с патогенными.

Пример 9. Влияние гликанов на микробные популяции *in vitro*.

С целью определения желаемого состава гликанов, бактериальные культуры выращивают в присутствии кандидатов-гликанов и анализируют их рост, состав популяции (например, путем секвенирования гена 16S рНК), продукцию метаболитов и фенотипические или транскриптомические свойства. Желаемые гликаны выбирают исходя из их способности вызывать желаемые свойства в бактериальной культуре. Бактериальные культуры включают монокультуры, смешанные культуры, культуры, выделенные из организма человека или моделей лабораторных животных, культуры, выделенные из организма человека или модели лабораторного животного и содержащие изолят или набор изолятов, или культуры, выделенные из организма человека или модели лабораторного животного и обедненные (например, путем применения антибиотика). Титр бактериальных культур определяют, как описано в примере 7, а состав и свойства бактериальных культур количественно определяют так, как описано в настоящем документе, или основываясь на стандартных протоколах. Этот анализ можно проводить в присутствии антибиотиков или других анализируемых соединений. Результаты, полученные в анализах *in vitro*, сравнивают с результатами, полученными после лечения людей гликанами или введения гликанов лабораторному животному в модели животного, как описано, например, в примере 10 и в примере 12, тем самым устанавливая корреляцию результатов *in vitro* - *in vivo*.

Пример 10. Влияние гликанов на кишечную микробиоту мышей, ранее не получавших лечение.

Этот эксперимент проводили для оценки влияния гликановых терапевтических препаратов на микробиоту кишечника и кратковременные поазатели веса мышей, ранее не получавших лечение. В этой модели здоровым мышам вводили гликаны вместе с питьевой водой в течение 6 дней и у каждой мыши отбирали образцы кала для анализа 16S рНК.

Мышей C57B1/6 (B6N Tac), организм которых не содержал патогенов (MPF; Taconic Biosciences, Джермантаун, штат Нью-Йорк), в возрасте 8-10 недель, размещали отдельно в клетках по 6 животных на

дозовую группу. Животных без ограничений кормили кормом PicoLab Rodent Diet 20 ("5053"; LabDiet, Сент-Луис, штат Миссури) или кормом, не содержащим волокон ("ZFD"; модифицированная диета для грызунов AIN-93G: D15091701, Research Diets, Нью-Брансвик, штат Нью-Джерси), в течение всего исследования, при этом мыши имели свободный доступ к воде. Мышей поддерживали в цикле "12 ч света/темноты". Мышей адаптировали в течение 7 дней (от дня -7 до дня -1) до введения гликанов.

Гликаны вводили мышам, включая их в питьевую воду, в концентрации 1% вес./об. со дня 0 по день 5. Контрольные мыши получали воду, не содержащую гликан. Свежие образцы кала собирали у каждой мыши со дня -2 по день 5. Показатели веса мышей контролировали в дни -1, 1, 3 и 4. Вес тела мышей существенно не изменился на протяжении всего исследования.

Геномную ДНК экстрагировали из образцов кала, а варибельную область 4 гена 16S рРНК амплифицировали и секвенировали (Earth Microbiome Project protocol [www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/](http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/16s/) and Caporaso JG et al. 2012. Анализ сверхвысокой продукции микробиологической популяции на платформах Illumina HiSeq и MiSeq. ISME J.). Операционные таксономические единицы (ОТЕ) генерировали путем выравнивания последовательностей 16S рРНК с идентичностью 97%. Микробные популяции сравнивали одну с другой с помощью дистанционной метрики UniFrac (Lozupone C. et al., Appl. Environ. Microbiol. December 2005 vol. 71 no. 12 8228-8235).

Значительные изменения наблюдали при введении мышам препарата xyl100. Дистанции UniFrac между микробиотами, отобранными за один день до и через 5 дней после введения гликана, были значительно больше у мышей, получавших ксилозу, по сравнению с мышами, которые не получали никакого гликана ( $p=0,0043$ , тест Манна-Уитни, фиг. 7). Разнообразие альфа измеряли с помощью расчетного индекса Шеннона в микробиоте до и после введения гликана или воды. Индекс Шеннона значительно уменьшился после 5 дней введения ксилозы ( $p=0,0313$ , парный тест Уилкоксона, фиг. 8).

Изменения наблюдаемых сдвигов с введением ксилозы объяснялись увеличением относительной численности последовательностей, относящихся к роду *Akkermansia* (тип Verrucomicrobia,  $p=0,0313$ , парный тест Уилкоксона, фиг. 9a), и роду *Blautia* (тип Firmicutes, семейство Lachnospiraceae,  $p=0,0313$ , парный тест Уилкоксона, фиг. 9b).

Наиболее распространенным видом *Akkermansia* в кишечнике млекопитающих является *Akkermansia muciniphila*. Предпочтительным источником энергии для этого микроорганизма является муцин кишечника хозяина. Применение диеты с низким содержанием клетчатки и высоким содержанием простых сахаров и жиров приводит к уменьшению продукции слизи (British Journal of Nutrition/Volume 102/Issue 01/July 2009, pp 117-125, Quantitative Imaging of Gut Microbiota Spatial Organization, Earle KA et al, Cell Host Microbe. 2015 Oct 14; 18(4): 478-88). Истончение слизистой оболочки кишечника может привести к увеличению проницаемости стенки кишечника и транслокации микроорганизмов или их компонентов, таких как липополисахариды (ЛПС), которые вызывают воспаление. Уровни ЛПС повышаются при потреблении диеты с высоким содержанием жиров у грызунов, у которых впоследствии развивается метаболический синдром (Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance, Cani PD et al, Diabetes. 2007 Jul; 56(7):1761-72).

Несмотря на то, что способность *Akkermansia muciniphila* разрушать ксилозу *in vitro* не доказана (пример 8, табл. 8, AMU.73), другие виды могут обуславливать первичную ферментацию xyl100, такие как, например, *Bacteroidetes*, которые, в свою очередь, могут стимулировать рост *Akkermansia*. Например, колонизация мышей, организм которых не содержит патогенов, микроорганизмом *Bacteroides thetaiotaomicron* индуцирует продукцию слизи бокаловидными клетками кишечника (Wrzosek et al. BMC Biology 2013 11:). Это может создать благоприятную среду для роста *Akkermansia*. Потребление слизи микроорганизмом *Akkermansia* может стимулировать увеличение продукции слизи и играть роль в восстановлении кишечного барьера, который предотвращает просачивание микробного эндотоксина ЛПС. Снижение эндотоксемии уменьшает воспаление и может облегчить симптомы, ассоциированные с метаболическим синдромом. Например, введение FOS или *Akkermansia muciniphila* грызунам в модели ожирения, индуцированного диетой, приводит к снижению уровня ЛПС в сыворотке крови, уменьшению жировой массы и веса тела (Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity, Everard A, PNAS. 2013 May 28; 110 (22):9066-71).

Продемонстрировано, что метаболиты *Akkermansia muciniphila*, в том числе пропионат КЦЖК, уменьшают экспрессию регуляторов жировой массы *Gpr43* и гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, и увеличивают экспрессию регуляторов гена гистондеацетилаз *Hdac3* и *Hdac5* (Lukovac et al. 2014. Differential Modulation by *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* of Host Peripheral Lipid Metabolism and Histone Acetylation in Mouse Gut Organoids mBio 5(4):e01438-14). Гликановые терапевтические препараты при введении в эффективном количестве могут регулировать содержание бактериальных видов, которые продуцируют КЦЖК, и тем самым регулировать отложения жира и ожирение. В анализе *in vitro* рост AMU.73, изолята *A. muciniphila*, поддерживали 8 из 15 гликанов, как показано в табл. 8.

Пример 11. Модели совместного культивирования *in vitro* для анализа влияния гликанов на реакции хозяина на популяции бактерий в отделах кишечника.

Бактерии могут вызывать как про-, так и противовоспалительные реакции в клетках организма хо-

зьяна (млекопитающих), при этом различные виды бактерий могут вызывать различные реакции хозяина. Препараты гликанов применяются для изменения популяции бактерий с целью получения желаемого ответа хозяина. Модель совместного культивирования *in vitro* применяется для оценки ответов хозяина, обусловленных бактериальными популяциями, выращенными в присутствии гликанов. С помощью этого анализа выбирают гликаны, которые способствуют росту популяций бактерий, обуславливающих полезные реакции хозяина, или минимизируют вредные реакции хозяина.

Эпителиальные клеточные линии или ткани кишечника применяются в модели совместной культуры (Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S, 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*. 47:79-97) (Borrueal et al., 2003. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *Am J Gastroenterology*. 98:865-870). Энтероцитоподобные клетки CaCO-2 человека высевают с плотностью  $2,5 \times 10^5$  клеток/мл на клеточных культуральных вставках 25 мм (размер нуклеопоры 0,4 мкм, Becton Dickinson). Вставки помещают в 6-луночные планшеты для культивирования тканей (Nunc) и выращивают 18-22 дня при 37°C/10% CO<sub>2</sub> в среде DMEM (глутамин, высокое содержание глюкозы; Amimed), дополненной 20% сывороткой плода теленка, инактивированной теплом (56°C, 30 мин, Amimed), 1% незаменимыми аминокислотами MEM (Gibco BRL), 10 мкг/мл гентамицина (Gibco BRL) и 0,1% пенициллином/стрептомицином 10000 МЕ/мл/10000 мкг/мл, Gibco BRL). Среду клеточной культуры меняют каждый второй день до полной дифференцировки клеток. В альтернативном варианте применяется трехмерная реконструированная модель ткани, полученная из нормальных клеток эпителия и эндотелиальных клеток тонкого кишечника человека и фибробластов (модель Epilntestinal, MatTek Corporation, Ашленд, штат Массачусетс).

Трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) определяют с помощью вольтметра/омметра MultiCell-ERS. Вставки с тканевой культурой дважды промывают предварительно нагретой не содержащей антибиотика средой перед внесением бактериальных культур. Отдельно бактериальные культуры выращивают в присутствии гликановых препаратов, как описано в примере 9. После 16-24 ч роста в присутствии гликанов бактериальные суспензии готовят в среде, не содержащей антибиотиков, и добавляют  $10^6$ - $10^8$  КОЕ к конфлюэнтным культурам клеток или тканей. Совместные культуры инкубируют при 37°C в течение 4-24 ч.

По завершении периода совместной инкубации супернатант собирают и анализируют на воспалительные и иммуномодулирующие цитокины, включая IL-1, IL-1, TNF, IL-8, RANTES, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-12, IL-17 и IL-23. Это исследование проводят с помощью ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) или другого сравнимого метода количественной оценки (например, Lumiplex Assay, Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния), в соответствии со стандартными протоколами. Для анализа более широкого диапазона реакций проводят оценку генной экспрессии (например, с помощью микрочипов) или транскриптомический анализ (например, с помощью РНК-Seq) путем лизирования клеток и очистки РНК, в соответствии со стандартными протоколами. Эта процедура применяется для анализа экспрессии генов, кодирующих воспалительные цитокины, иммуномодулирующие цитокины, антимикробные пептиды и другие соответствующие реакции организма хозяина.

Пример 12. Влияние гликанов на мышиную модель инфекции *Clostridium difficile*.

Этот эксперимент проводили для анализа влияния гликановых терапевтических препаратов на мышиную модель инфекции *Clostridium difficile* (Chen et al, 2008, A Mouse Model of *Clostridium difficile*-Associated Disease. *Gastroenterology* 135(6), 1984-1992). В этой модели здоровые мыши подвергались воздействию антибиотиков, что обуславливало их восприимчивость к инфекции *C. difficile* и возникновение симптомов заболевания, сходных по развитию и проявлению с клинической картиной заболевания у человека. У людей заболевание чаще всего является результатом воздействия антибиотиков широкого спектра действия, которые, как считается, приводят к дисбиозу в кишечнике и последующей колонизации ободочной кишки *C. difficile*. Увеличение бионагрузки *C. difficile* приводит к продукции токсинов бактерией и воспалением ободочной кишки. Клинические проявления у людей включают диарею, потерю веса, воспаление кишечника, лихорадку и обезвоживание. В США клиническая распространенность инфекции и заболевания, вызванных *C. difficile*, составляет около 750000 случаев в год.

Мышей (самки C57BL/6, 8-10 недель, по 16-18 г каждая, Harlan Laboratories, Индианаполис, штат Индиана) размещали группами по 3 на клетку, по 4 клетки на группу лечения. Мышам вводили смесь антибиотиков вместе с питьевой водой в течение 9 дней, начиная со дня -14, за четырнадцать дней до инфицирования *Clostridium difficile* в день 0. Смесь антибиотиков состояла из 1% глюкозы, канамицина (0,5 мг/мл), гентамицина (0,044 мг/мл), колистина (1062,5 ед/мл), метронидазола (0,269 мг/мл), ципрофлоксацина (0,156 мг/мл), ампициллина (0,1 мг/мл) и ванкомицина (0,056 мг/мл). За три дня до инфицирования *Clostridium difficile* (в день -3) мышам вводили единичную дозу клиндамицина (10 мг/кг) в объеме 0,5 мл дистиллированной воды с помощью перорального желудочного зонда (ПО) (см. табл. 10). Все химические вещества были приобретены у Sigma-Aldrich Corp. (Сент-Луис, штат Миссури). В день 0 мышам инфицировали *Clostridium difficile* (споры штамма VPI 10463 (ATCC-43255)), около  $4,5 \log_{10}$  спор на мышь, ПО, в объеме дозы, составляющем 0,5 мл дистиллированной воды.

Таблица 10. Лечение

Лечение	Способ введения	Продолжительность лечения
Обычная вода (контроль)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6 (L)
Ванкомицин (контроль)	ПО-зонд	1 раз в сутки, от дня 0 до дня 4
glu100 (L)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6
glu100 (S)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -1 до дня 6 (S)
glu33gal33fuc33 (L)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6
glu33gal33fuc33 (S)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -1 до дня 6
ara100 (L)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6
ara100 (S)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -1 до дня 6
glu50gal50 (L)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6
glu50gal50 (S)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -1 до дня 6
FOS**FOS (Nutraflora FOS; NOW Foods, Елумингдейл, штат Иллинойс) (L)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -15 до дня 6
FOS (S)	Питьевая вода	1 раз в сутки, от дня -1 до дня 6

#### А. Ассоциированные с заболеванием клинические проявления.

Ассоциированные с заболеванием клинические проявления регистрировали в течение десяти дней, начиная со дня инфицирования *Clostridium difficile* (в день 0) и до дня 10 включительно. Клинические проявления, включая вялость, сгорбленную позу и взъерошенную шерсть, влажный хвост/живот и гипотермию, оценивали по шкале от 0 до 4 баллов: норма=0; вялость=1; вялость+сгорбленная поза=2; вялость+сгорбленная поза+влажный хвост/живот (диарея)=3; вялость+сгорбленная поза+влажный хвост/живот+гипотермия=4. Также проводили мониторинг и регистрировали гибель (от дня 0 до дня 10 или дня 11) и вес (от дня 1 дня 7 и дня 10) животных. Мыши, у которых регистрировали потерю веса тела более чем на 25% по сравнению со днем 0, были гуманно подвергнуты эвтаназии.

В этих исследованиях во всех животных с влажным хвостом/животом (диарея; клинический балл "3") состояние прогрессировало до смерти. Диарея является показателем воспаления и кровоизлияний в ободочной кишке, при этом являясь фактором, обуславливающим снижение веса, наблюдаемого на моделях грызунов, с колонизацией/инфицированием *C. difficile*.

Возможность предотвращать смерть животных на день 6 в этих экспериментах, применяя указанное лечение, указывает на его потенциальный профилактический эффект относительно заболевания, например, у человека. Возможность предотвращать смерть животных от дня 7 до дня 11 в этих экспериментах, применяя указанное лечение, указывает на то, что животные были защищены от рецидива заболевания в этих моделях.

Кроме того, ежедневно от дня 0 до дня 6, оценивали носительство спор *Clostridium difficile*, свидетельствующее о колонизации кишечника *Clostridium difficile* как у мышей, так и людей. Для подсчета КОЕ спор, гранулы кала мышей суспендировали в 50% этаноле в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) и перемешивали вихревым способом. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, тщательно перемешивали вихревым способом и последовательно разбавляли в PBS. Полученные суспензии наносили на агар ТССФА, селективный для *Clostridium difficile* (Teknova, Холлистер, штат Калифорния), и выращивали в анаэробной атмосфере при 37°C в течение ночи для подсчета КОЕ.

Эффекты лечения оценивали путем сравнения ассоциированных с заболеванием фенотипов в пролеченных гликаном, нелеченных (простая вода) и пролеченных ванкомицином группах. FOS представляет собой коммерчески доступный неперевариваемый фруктоолигосахарид. В клинических исследованиях с применением коммерчески доступного FOS в качестве препарата при антибиотико-ассоциированной диарее, диарее, ассоциированной с *Clostridium difficile* (Lewis et al., Failure of dietary oligofructose to prevent antibiotic-associated diarrhea. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 469-477), а также при рецидиве инфекции *Clostridium difficile* (Lewis et al, Effect of the Prebiotic Oligofructose on Relapse of *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea: A Randomized, Controlled Study. *Clin Gastroent Hepatol* 2005 (3):442-448.) получили разные результаты, причем в первом исследовании эффективность лечения с применением FOS не была



доказана, а во втором исследовании продемонстрировали снижение частоты возникновения рецидива заболевания.

#### Выживание

Достоверное различие относительно показателя выживания животных регистрировали между животными, которым вводили воду (несущую среду), и животными, получавшими либо гликаны, либо ванкомицин (фиг. 10). Лечение животных прекращали на день 4 (для ванкомицина) и день 6 (для гликанов), а смертность животных/клиническую картину оценивали до дня 10 или дня 11 включительно. Среди животных, получавших воду, 75% особей умерли ко дню 4 (фиг. 10). Все (100%) животных, получавших ванкомицин, выжили ко дню 7. Однако 17% животных в группе, получавшей ванкомицин, умерли ко дню 10. Остальные, выжившие в группе, получавшей ванкомицин, характеризовались клиническим баллом выше 0. Для групп, получавших гликаны (L=дни лечения от -15 до 6, S=дни от -1 до 6), показатели смертности ко дню 6 были следующими: для glu100 (L), glu33gal33fuc33 (L) и glu50gal50 (L и S) смертность составила 0%. В группе, получавшей ara100 (S) glu33gal33fuc33 (S), glu100 (L) и FOS (L), умерло 8% животных. В группе, получавшей ara100 (L) и FOS (S), умерло 25% животных. У всех выживших особей, пролеченных гликанами, регистрировали клинический балл 0 и не отмечали случаев смерти от дня 7 до дня 11. Ни одна из особей в группах glu100 (L и S), glu33gal33fuc33 ((L и S), ara100 (S) и glu50gal50 (L и S) не характеризовалась клиническим баллом "3", что указывает на потенциальное предотвращение развития диареи посредством этого лечения. У двух животных в контрольной группе, не получавшей лечение, наблюдалась диарея.

#### Потеря веса

Потеря веса у животных, пролеченных любым из анализируемых гликанов, была достоверно меньше, чем у животных, получавших воду (фиг. 11, \*\*\*  $P < 0,001$ ; повторные измерения ANOVA, множественные сравнения с поправкой Бонферонни). Профиль потери веса у животных, получавших гликаны, достоверно не отличался от такового у группы, получавшей ванкомицин.

В. Эффект лечения на носительство спор *C. difficile*.

Наличие спор *C. difficile* в фекалиях мышей оценивали в дни 0-6. У животных, получавших ванкомицин, в течение всех исследуемых дней спор в фекалиях не обнаруживали. Мыши, которые получали гликаны или воду, имели от 2 до 6  $\log_{10}$  КОЕ/грамм фекалий. Несмотря на носительство спор *C. difficile* в день 6, животные, получавшие гликаны, оставались здоровыми на день 10 с клиническим баллом "0" в день 7 и день 10. У всех животных, получавших ванкомицин, были обнаружены клинические симптомы в день 10, с показателем смертности 17%.

С. Сдвиги микробиологических компонентов кишечника, ассоциированные с гликанами.

Чтобы определить, как состав микробиоты кишечника реагирует на лечение гликановыми терапевтическими препаратами, было проведено секвенирование 16S рРНК фекальных гранул в вариабельной области V4 с применением стандартных протоколов из проекта микробиома Земли (Earth Microbiome Project: [www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/](http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/)).

В день 6 после прекращения лечения гликанами наблюдали достоверное различие между филогенетическим составом микробиоты кишечника мышей, получавших гликаны (L или S), и мышей, получавших либо FOS, либо несущую среду и ванкомицин в качестве контроля (табл. 11).

Таблица 11. Сравнение конечного состава микробиоты кишечника между группами, получавшими гликаны, или несущую среду, ванкомицин или FOS в качестве контролей

	Несущая среда	Ванкомицин	FOS
Glu100	–	–	*
Glu33gal33fuc33	**	**	*
Glu50gal50	***	***	***
Ara100	**	**	*

\* прим.  $P < 0,05$ ,

\*\* прим.  $P < 0,01$ ,

\*\*\* прим.  $P < 0,001$ ; парные измерения adonis (ANOVA), множественные сравнения с поправкой Бонферонни

Относительное содержание различных бактериальных родов увеличивалось при лечении различными видами гликанов, лечении ванкомицином или применении воды в качестве контроля. Фиг. 12 иллюстрирует изменения относительного содержания отдельных бактериальных родов за период от непосредственно до (день -1) до непосредственно после (день 6) лечения гликанами или ванкомицином. Содержание бактерий рода *Bacteroides* увеличивалось при лечении с применением ara100, FOS и glu50gal50. Содержание бактерий рода *Parabacteroides* увеличивалось при лечении с применением glu33gal33fuc33. Содержание бактерий рода *Bifidobacterium* увеличивалось при лечении с применением FOS, glu100 и glu50gal50. Продemonстрировано, что содержание бактерий рода *Bacteroides*, *Parabacteroides*, а также *Bifidobacterium* положительно коррелируют с составом микробиома, устойчивого к *C. difficile* (Seekatz and Young, 2014, *The Journal of Clinical Investigation*). Примечательно, что содержание бактерий рода *Enterococcus* уменьшалось при всех видах лечения, а содержание бактерий рода *Lactobacillus* уменьшалось при

лечении с применением FOS, glu100 и glu50gal50. Ранее продемонстрирована положительная корреляция содержания бактерий рода *Enterococcus*, а также *Lactobacillus* с составом микробиома, восприимчивого к *C. difficile* (Seekatz and Young, 2014, The Journal of Clinical Investigation).

Показано, что некоторые вторичные желчные кислоты ухудшают рост *C. difficile* in vitro. Предполагается, что способность микробиома кишечника превращать первичные желчные кислоты во вторичные желчные кислоты напрямую противодействует инфекции *C. difficile*. Все три гликана (glu33gal33fuc33, ara100 и glu50gal50) увеличивали предполагаемый функциональный потенциал микробиома кишечника относительно превращения первичных желчных кислот во вторичные желчные кислоты (фиг. 13). При применении ванкомицина в качестве контроля этой закономерности не наблюдали. Кроме того, один гликан (glu100) и коммерчески доступный FOS уменьшали предполагаемый функциональный потенциал микробиома кишечника в среднем. Функциональные предположительные оценки получали в результате секвенирования 16S рПНК с применением PICRUST ([picrust.github.io/picrust/](http://picrust.github.io/picrust/)).

Продукция вторичных желчных кислот связана с уменьшением прорастания и роста *C. difficile*, а представители семейства *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae* ассоциированы с продукцией вторичных желчных кислот и устойчивостью к прорастанию и росту *C. difficile* (Theriot CM, Bowman AA и Young VB. 2016. Antibiotic-induced alterations of the gut microbiota alter secondary bile acid production and allow for *Clostridium difficile* spore germination and outgrowth in the large intestine. *mSphere* 1(1):e00045-15.) Гликановые терапевтические препараты при введении в эффективном количестве могут регулировать содержание бактериальных видов, которые продуцируют вторичные желчные кислоты и тем самым способствуют устойчивости к прорастанию, избыточному росту и колонизации *C. difficile*.

В анализе in vitro из примера 8 рост ROB.74, представителя семейства *Ruminococcaceae*, поддерживался 13 из 15 гликанов, а рост CSC.32 и CNE.31, представителя семейства *Lachnospiraceae*, поддерживался 6 и 7 из 15 гликанов соответственно, как показано в табл. 8. Два препарата гликанов, glu50gal50 и ara100, достоверно увеличивали относительную количественную роль пути биосинтеза вторичных желчных кислот в мышинной модели инфекции *C. difficile* (фиг. 13).

Альфа-разнообразию микробиоты кишечника (оцениваемое по индексу Шеннона) увеличивалось за период от непосредственно до (день -1) до непосредственно после (день 6) лечения гликаном (фиг. 14).

Эти результаты, полученные в широко используемой модели животных для инфекции *Clostridium difficile*, свидетельствуют о том, что гликановые терапевтические препараты уменьшали потерю веса, вызванную инфекцией *C. difficile*-, и улучшали показатели выживания. По-видимому, выбранные гликаны индуцируют рост бактериальных родов, которые способствуют устойчивости к *C. difficile* (*Bacteroides*, *Parabacteroides*, а также *Bifidobacterium*) и создают условия, которые менее благоприятны для роста *C. difficile* (например, повышают уровень вторичных желчных кислот).

Пример 13. Влияние гликанов на мышиную модель колита.

Этот эксперимент проводили для анализа влияния гликановых терапевтических препаратов на мышиную модель (Okayasu et al, 1990, A Novel Method in the Induction of Reliable Experimental Acute and Chronic Ulcerative Colitis in Mice. *Gastroenterology* 98:694-702). В этой модели здоровые мыши подвергались воздействию декстрансульфата натрия (DSS), вводимого в питьевой воде, который обуславливал возникновение симптомов заболевания, сходных по развитию и проявлению с клинической картиной заболевания у человека. Язвенный колит у человека представляет собой прогрессирующее воспалительным заболеванием кишечного тракта с распространенностью около 150-300 на 100000 населения. Язвенный колит является результатом aberrантного иммунного ответа организма хозяина на комменсальную флору, ограничивается ободочной кишкой и проявляется диффузным воспалением слизистой оболочки. Симптомы у людей включают воспаление/изъязвление ободочной кишки, потерю веса и диарею с испражнениями, которые могут содержать кровь.

Мышей (самцы C57BL/6, 6-8 недель, по 22-24 г каждый, Charles River Laboratories, Вилмингтон, штат Массачусетс) размещали группами по 8 на клетку, по 1 клетке на группу лечения. Контрольная группа мышей, получавших несущую среду без 2,5% DSS, состояла из 6 особей. Мышам вводили гликановые терапевтические препараты с концентрацией 1% в питьевой воде от дня -7 (7 дней до введения DSS) до дня 14. От дня 0 до дня 5 мышам вводили DSS (MP Bio, Санат Ана, Калифорния, 36000-50000 Да) в концентрации 2,5% в питьевой воде для индуцирования клинических проявлений колита.

Ассоциированные с заболеванием клинические проявления регистрировали в течение двенадцати дней, начиная от дня 0 до дня 11 включительно. Оцениваемыми клиническими проявлениями были следующие: вес, частота диареи и кровь в кале. Кроме того, на день 14 проводили эндоскопическое исследование ободочной кишки. Применяли следующую систему подсчета баллов: норма, отсутствие отеков или отторжения слизистой оболочки, четкая васкуляризации= 0; отек, отторжение слизистой оболочки, снижение васкуляризации=1; отек, отторжение слизистой оболочки, снижение васкуляризации, хрупкость=2; активное кровоточивость, эрозия=3; активное изъязвление, эрозия=4. Гистопатологическое исследование проводили на образцах терминальных участков ободочной кишки всех мышей. Срезы ободочной кишки фиксировали в формалине и окрашивали гематоксилином и эозином (ГЭ). Для оценки поражений ободочной кишки, включая эрозию слизистой оболочки, уменьшение количества желез ободочной кишки и воспаление, распространяющееся от слизистой оболочки до трансмурального слоя, с

регенерирующим (гиперпластическим) слизистым и железистым эпителием, применяли полуколичественный анализ. Все признаки имитировали колит у человека. В этой модели пиковая потеря веса обычно возникала в день 10.

Все животные получали 2,5% DSS в питьевой воде в течение дней 0-5. Следующие терапевтические гликановые препараты смешивали с питьевой водой и вводили животным от дня -7 до дня 14 в концентрации 1%: FOS (коммерчески доступный; в качестве контроля); glu100; man52glu29gal19; акациевое волокно (коммерчески доступное, в качестве контроля). Контрольная группа получала чистую питьевую воду вместо воды, содержащей гликану.

Эффекты анализируемых видов лечения оценивали путем сравнения ассоциированных с заболеванием клинических признаков в пролеченных и не леченных (получавших простую воду) гликанами группами. FOS (Nutraflora FOS, NOW Foods, Блумингдейл, штат Иллинойс) является коммерчески доступным неперевариваемым фруктоолигосахаридом. Акациевое волокно (органический порошок, NOW Foods, Блумингдейл, штат Иллинойс) является коммерчески доступной волоконной добавкой.

У мышей лечение с применением glu100 и man52glu29gal19 уменьшало частоту диареи и снижение веса от дня 0 до дня 11 (фиг. 15), а также достоверно уменьшало проявления воспаления в ободочной кишке (день 14, фиг. 16) согласно данным эндоскопии, по сравнению с животными, получавшими либо простую воду (контрольная группа, получавшая несущую среду), либо акациевые волокна. Гистопатологические результаты образцов ободочной кишки у мышей отражали результаты эндоскопического анализа в отношении эффективности терапии гликанами. Совокупное количество дней с проявлением диареи в группах контроля и лечения было следующее: группа контроля, получавшая воду: 10 дней; акациевое волокно: 14 дней; FOS: 4 дня; glu100: 2 дня; man52glu29gal19: 3 дня. В совокупности эти данные показывают, что лечение гликанами оказывает значительное защитное действие на модель колита у мышей.

Эти результаты, полученные на широко используемой модели колита у животных, показывают, что гликановая терапия уменьшает потерю веса, вызванную DSS, диарею, а также воспаление и поражение ободочной кишки, по данным эндоскопического и гистопатологического исследования.

Пример 14. Влияние гликанов на мышиную модель ожирения, индуцированного диетой.

Этот эксперимент проводили для анализа влияния гликановых терапевтических препаратов на мышиную модель ожирения, индуцированного диетой с высоким содержанием жиров (Wang and Liao, *A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. Methods Mol Biol.* 2012; 821: 421-433). В этой модели здоровым мышам вводили диету, содержащую 60% жира в течение 6 недель. У этих мышей отмечали достоверное увеличение веса по сравнению с мышами, получавшими диету с низким (10%) содержанием жиров. У людей ожирение представляет собой накопление избыточного жира в организме и может оказывать негативное влияние на здоровье, включая развитие диабета 2-го типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Основными причинами ожирения являются чрезмерное потребление пищи, отсутствие физической активности и генетическая предрасположенность. В США около 38% взрослых (78 миллионов) и 17% детей и подростков (13 миллионов) страдают ожирением. Мышиная модель ожирения, индуцированного диетой, воспроизводит критерии оценки заболевания у человека, включая увеличение веса, снижение безжировой массы тела, изменения в физиологии органов и изменения маркеров диабета.

Мышей (самцы C57BL/6, 8-10 недель, по 16-18 грамм каждый, Taconic Labs, Джермантаун, штат Нью-Йорк) размещали группами по 1-2 на клетку, по 8 животных на группу лечения. Мыши получали диету с высоким (60%) содержанием жиров (60% от общего количества ккал составляли жиры) (D12492, Research Diets, Нью-Брансвик, штат Нью-Йорк) или сопоставимую диету, содержащую 10% жира (10% от общего количества ккал составляли жиры) (D12450; Research Diets). Через неделю после приема указанной диеты мышам, получавшим диету с высоким содержанием жиров, вводили гликаны (вводили в питьевую воду, от дня 0 до дня 44): glu100 в концентрации 0,3% вес./об. или man52glu29gal19 в концентрации 1% вес./об. в питьевой воде, коммерчески доступный FOS (Nutraflora FOS, NOW Foods, Блумингдейл, штат Иллинойс) в концентрации 6%, 1% или 0,3% вес./об. в питьевой воде или в простой воде (в качестве контроля). Группе мышей, потребляющих диету с низким содержанием жиров, давали простую воду (в качестве контроля). Диеты были одинаковыми для каждой группы в ходе всего исследования.

#### Увеличение веса

Вес контролировали через день от дня 0 до дня 44. Мыши, получавшие диету с высоким содержанием жиров, прибавляли в весе достоверно быстрее по сравнению с мышами, получавшими диету с низким содержанием жиров. Лечение с применением glu100 (0,3% в питьевой воде) и man52glu29gal19 (1% в питьевой воде) достоверно уменьшало наклон кривой увеличения веса от дня 0 до дня 41 у мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, по сравнению с мышами, получавшими воду (несущую среду) (фиг. 17А и фиг. 17В). FOS в любой дозе не оказывал существенного влияния на процент снижения веса (%) по сравнению с животными, получающими воду в качестве контроля.

#### Толерантность к глюкозе

В день 42 мышам проводили пероральный тест на толерантность к глюкозе после голодания в течение 12 ч, а затем введения дозы глюкозы с помощью перорального зонда (2 грамма/кг, Ayala et al. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice *Disease*

Models & Mechanisms 3, 525-534 (2010)). Уровни глюкозы в крови контролировали с помощью портативного глюкометра (One Touch Ultra®, LifeScan Inc, Вейн, штат Пенсильвания) через 120 мин после приема дозы глюкозы. У мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, отмечалась более низкая способность к клиренсу глюкозы из системного кровотока по сравнению с мышами, получавшими диету с низким содержанием жиров (фиг. 18). У мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров и пролеченных glu100 (0,3%) и man52glu29gal19 (1%), регистрировались более низкие уровни глюкозы в крови по сравнению с мышами, получавшими диету с высоким содержанием жиров и воду в качестве контроля. Эти уровни глюкозы были более сходными с уровнями глюкозы у мышей, получавших диету с низким содержанием жиров и воду в качестве контроля.

#### Развитие жировых телец

В день 44 эпидидимальные жировые тельца мышей удаляли и взвешивали. Вес жировых телец в процентах от общего веса тела использовали как суррогатный конечный критерий оценки безжировой массы тела, с увеличенным весом жирового тельца, соответствующему нижнему показателю безжировой массы тела. У мышей, получавших man52glu29gal19 (1%) и диету с высоким содержанием жиров, регистрировали более низкий % жирового тельца/веса тела, чем у мышей, получавших воду в качестве контроля (фиг. 19), или пролеченных с применением FOS и принимавших диету с высоким содержанием жиров.

Оценки этих трех критериев в модели ожирения предполагают, что более долгосрочная модель может привести к существенным изменениям в других параметрах, которые оцениваются в указанной модели (Wang and Liao, A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. Methods Mol Biol. 2012; 821: 421-433). Например, мыши, получавшие диету с высоким содержанием жиров, будут иметь более многочисленные изменения в органах по сравнению с мышами, получавшими диету с низким содержанием жиров. На неделе 12 эксперимента и позже мышей умерщвляли, а некоторые ткани собирали/обрабатывали для анализа. Ободочную и слепую кишку резецировали, взвешивали и оценивали; мыши с ожирением имели более короткую ободочную и слепую кишку, причем ободочная кишка характеризовалась меньшим весом. Содержимое слепой кишки замораживали для хранения и последующего анализа 16S РНК и метаболитов. Печень резецировали, взвешивали и хранили в формалине для гистопатологического исследования. У мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, как правило, печень имела более высокую плотность по сравнению с мышами, которые питались диетой с низким содержанием жиров. Образцы крови собирали и обрабатывали для получения плазмы и анализа воспалительных маркеров (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6 и KC/GRO), клинической химии (холестерин, триглицериды) и уровня липополисахарида (ЛПС). У мышей, получавших диету с высоким содержанием жиров, повышались уровни маркеров воспаления и отмечались более высокие уровни холестерина, триглицеридов и циркулирующих ЛПС. Все эти критерии оценки проявлений ожирения в исследуемой модели животных являются аналогичными для людей. Выбранные гликаны снижают частоту встречаемости или степень укорочения ободочной и слепой кишки и уменьшают вес ободочной кишки. Выбранные гликаны снижают частоту или степень увеличения веса печени. Выбранные гликаны снижают частоту выявления или уровни воспалительных маркеров, снижают уровни холестерина и/или системных ЛПС.

Эти результаты, полученные в широко используемой животной модели ожирения, индуцированной диетой, свидетельствуют о том, что гликановые терапевтические препараты могут предотвращать увеличение веса, индуцированное диетой с высоким содержанием жиров, улучшать выведение глюкозы из системного кровотока и повышать соотношение безжировой к жировой массе тела.

#### Пример 15. Влияние гликанов на экспрессию генов в мышинной модели.

Исследование проводили с двумя группами мышей. Контрольную группу составляли мыши, получавшие стандартный рацион, а группы лечения составляли мыши, получавшие стандартный рацион, дополненный гликанами. Через 1-30 дней у мышей отбирали образцы крови, мышей умерщвляли, а ткани из кишечника, печени, кожи и других участков тела, представляющих интерес, собирали и хранили при -80°C. РНК выделяли из тканей и превращали в кДНК. Матрицу GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) применяли для анализа дифференциальной экспрессии между около 14000 мышинных генов нелеченных и пролеченных гликанами животных. Протокол эксперимента и анализ первичных данных выполняли согласно инструкций производителя и стандартных протоколов. Информацию о биологической функции дифференциально экспрессированных генов и их участии в различных процессах получали из следующих баз данных: RefGene (Ссылка на гены, белки и антитела: [refgene.com/](http://refgene.com/)), CTD (Сравнительная база данных токсигеномики: [ctd.mdibl.org/](http://ctd.mdibl.org/)), MGI (Информация о геномах мышей: [www.informatics.jax.org/](http://www.informatics.jax.org/)), KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов: [www.genome.jp/kegg/genes.html](http://www.genome.jp/kegg/genes.html)). Указанный алгоритм применяется для идентификации дифференциальной экспрессии генов, кодирующих воспалительные цитокины, иммуномодулирующие цитокины, антимикробные пептиды и другие соответствующие эффекторные молекулы.

Таблица 1. Родовые уровни микробных составляющих желудочно-кишечного тракта.

Тип	Класс	Род
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomyces, Adlercreutzia, Atopobium, Bifidobacterium, Collinsella, Corynebacterium, Eggerthella, Mobiluncus, Propionibacterium, Rothia, Slackia
Bacteroidetes	Bacteroidia	Alistipes, Bacteroides, Dysgonomonas, Odoribacter, Parabacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Tannerella
	Flavobacteria	Capnocytophaga
Firmicutes	Bacilli	Bacillus, Enterococcus, Gemella, Granulicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Turicibacter, Weissella
	Clostridia	Acidaminococcus, Anaerococcus, Anaerofilum, Anaerofustis, Anaerostipes, Anaerotruncus, Anaerovorax, Bacteroides, Blautia, Clostridium, Coprococcus, Dehalobacterium, Dialister, Dorea, Eubacterium, Faecalibacterium, Finegoldia, Lachnobacterium, Lachnospira, Megamonas, Megasphaera, Mitsukella, Moryella, Oribacterium, Oscillospira, Peptococcus, Peptoniphilus, Peptostreptococcus, Phascolarctobacterium, Pseudobutyrvibrio, Roseburia, Ruminococcus, Ruminococcus, Selenomonas, Subdoligranulum, Veillonella
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacterium, Leptotrichia
	Betaproteobacteria	Comamonas, Herbaspirillum, Lautropia, Neisseria, Oxalobacter, Sutterella
	Deltaproteobacteria	Bilophila, Desulfovibrio, LE30
	Epsilonproteobacteria	Campylobacter, Helicobacter
	Gammaproteobacteria	Actinobacillus, Aggregatibacter, Citrobacter, Escherichia, Haemophilus, Klebsiella, Moraxella, Pseudomonas, Raoultella
Spirochaetes	Spirochaetes	Treponema
Synergistetes	Synergistetia	Cloacibacillus, Synergistes
Tenericutes	Erysipelotrichi	Bulleidia, Catenibacterium, Clostridium, Coprobacillus, Holdemania, RFN20
	Mollicutes	Asteroleplasma, Mycoplasma
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Akkermansia
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobrevibacter

Таблица 2. Микробные метаболиты

2-гидроксиизобутират, 3-гидроксиизовалерат, 3-метилкротонилглицин, аллантаин, бетаин, формиат, маннитол, глюкоронид *p*-крезола, фенилацетилглицин, саркозин, таурин, уксусная кислота, ацетилальдегид, аскорбиновая кислота, бутандион, масляная кислота, дезоксихолевая кислота, этилфенилсульфат, муравьиная кислота/формиат, индол, изомасляная кислота, изовалериановая кислота, пропионовая кислота, серотонин, янтарная кислота/сукцинат, ТМАО, триптофан, валериановая кислота, урсодезоксихолевая кислота, лактат, пероксид водорода

Таблица 3. Родовые уровни микробных составляющих, преобладающих в толстом кишечнике (по сравнению с тонким кишечником) у здоровых людей

Тип	Класс	Род
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroides</i> , <i>Butyricimonas</i> , <i>Odoribacter</i> , <i>Parabacteroides</i> , <i>Prevotella</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Anaerotruncus</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> , <i>Ruminococcus</i> ,
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Bilophila</i>
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	<i>Akkermansia</i>

Таблица 4. Родовые уровни микробных составляющих, преобладающих в тонком кишечнике (по сравнению с толстым кишечником) у здоровых людей

Тип	Класс	Род
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Cryocola</i> , <i>Mycobacterium</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Turicibacter</i>
	<i>Clostridia</i>	<i>Blautia</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Holdemania</i> , <i>Pseudoramibacter Eubacterium</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium</i> , <i>Sphingomonas</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Ralstonia</i>

Таблица 5. Полифенолы

Подкласс полифенола	Название соединения
Антоцианы	<p>Малвидина 3-О-(6''-кумароил-галактозид), цианидин общий, делфинидина 3-О-(6''-ацетилгалактозид), цианидина 3-О-(6''-ацетилгалактозид), малвидин, цианидина 3-О-галактозид, цианидина 3-О-глюкозид, цианидина 3-О-рутинозид, цианидина 3-О-софорозид, пеларгонидина 3-О-глюкозид, цианидина 3-О-(6''-малонил-глюкозид), пеонидин, пеонидина 3-О-глюкозид, пеонидина 3-О-рутинозид, пеларгонидина 3-О-рутинозид, пеларгонидин, цианидин, малвидина 3,5-О-диглюкозид, цианидина 3-О-глюкозил-рутинозид, пеларгонидина 3-О-софорозид, пеларгонидина 3-О-глюкозил-рутинозид, цианидина 3-О-(6''-сукцинилглюкозид), пеларгонидина 3-О-(6''-сукцинилглюкозид), делфинидин, делфинидина 3-О-галактозид, делфинидина 3-О-глюкозид, делфинидина 3-О-арабинозид, петунидин, петунидина 3-О-галактозид, цианидина 3-О-арабинозид, петунидина 3-О-глюкозид, петунидина 3-О-галактозид, петунидина 0-арабинозид, малвидина 3-О-глюкозид, малвидина 3-О-арабинозид, цианидина 3-О-(6''-ацетиларабинозид), делфинидина 3-О-(6''-ацетилглюкозид), петунидина 3-О-(6''-ацетилгалактозид), пеонидина 3-О-(6''-ацетилгалактозид), цианидина 3-О-(6''-ацетилглюкозид), малвидина 3-О-(6''-ацетилгалактозид), петунидина 3-О-(6''-ацетилглюкозид), общие полимерные антоцианы, малвидина 3-О-(6''-ацетилглюкозид), пеонидина 3-О-(6''-ацетилглюкозид), пеларгонидина 3-О-арабинозид, делфинидина 3-О-рутинозид, цианидина 3-О-самбубизид, пеларгонидина 3-О-(6''-малонил-глюкозид), пеонидина 3-О-(6''-р-кумароил-глюкозид), цианидина 3-О-ксилозид, малвидина 3-О-галактозид, пеонидина 3-О-арабинозид, петунидина 3-О-рутинозид, делфинидина 3-О-ксилозид, петунидина 3-О-(6''-р-кумароил-глюкозид), пеларгонидина 3-О-галактозид, пеларгонидина 3-О-самбубизид, делфинидина 3-О-самбубозид, цианидина 3-О-ксилозил-рутинозид, витизин А, делфинидина 3-О-(6''-р-кумароил-глюкозид), пигмент А, р-кумароил витизина А, ацетил-витизин А, цианидина 3-О-(6''-р-кумароил-глюкозид), цианидина 3-О-самбубизид 5-О-глюкозид, цианидина 3-О-(6''-кофеоил-глюкозид), цианидина 3,5-О-диглюкозид, пинотин А, делфинидина 3,5-О-диглюкозид, пеларгонидина 3,5-О-диглюкозид, малвидина 3-О-(6''-кофеоил-глюкозид), цианидина 3-О-(6''-диоксалил-глюкозид), цианидина 3-О-ламинарибиозид, цианидина 3-О-(3''-малонил-глюкозид), цианидина 3-О-(6''-малонил-глюкозид), цианидина 3-О-(6''-малонил-ламинарибиозид), цианидина 3-О-дималонил-ламинарибиозид, цианидина 3-О-(6''-малонил-арабинозид), делфинидина 3-О-глюкозил-глюкозид, цианидина 3-О-(6''-малонил-3''-глюкозил-глюкозид), цианидина 3-О-(2''-ксилозил-6''-</p>

	<p>глюкозил-галактозид), цианидина 3-О-(2"-ксилозил-6"- (6' '-кафеоил-глюкозил)-галактозид), цианидина 3-О-(2' '-ксилозил-галактозид), цианидина 3-О-(2"-ксилозил-6"- (6" '-р-гидроксibenзоил-глюкозил)-галактозид), цианидина 3-О-(2"-ксилозил-6"- (6" '-синапоил-глюкозил)-галактозид), цианидина 3-О-(2"-ксилозил-6"- (6"-ферулоил-глюкозил)-галактозид), 3-О-(2"-ксилозил-6"- (6" '-р-кумароил-глюкозил)-галактозид), делфинидина 3-О-(6' '-малонил-глюкозил), малвидина 3-О-рутинозид, лутеолинидина 3-О-глюкозид, делфинидина 3-О-ферулоил-глюкозид, петунидина 3,5-О-диглюкозид, петунидина 3-О-рамнозид, лутеолинидин, агликон витизина А, агликон пигмента А, агликон пинотина А, 4-О-метилцианидина 3-О-галактозид, малвидина 3-О-(6"-О-ацетил)-глюкозид, цианидина 3-О-диглюкозид-5-О-глюкозид, пеонидина 3-О-диглюкозид-5-О-глюкозид, пеонидина 3,5-О-диглюкозид, пеонидина 3-О-(2-О-(6-О-(Е)-кафеоил-D-глюкозил)-D-глюкозид)-5-OD-глюкозид, пеонидина 3-О-софорозид, пеонидина 3-О-самбубиозид, пеонидина 3-О-самбубиозид-5-О-глюкозид, пеонидина 3-О-ксилозид, 4'-О-метилцианидина 3-OD-глюкозид, цианидина 3-О-глюкуронид, цианидина 3-О-(3' ', 6' '-О-дималонил-глюкозид), цианидина 3-сульфат, 4-О-метилделфинидил 3-О-L-арабинозид, 4-О-метилделфинидил 3-OD-глюкозид, изопеонидина 3-О-арабинозид, изопеонидина 3-О-галактозид, изопеонидина 3-О-глюкозид, изопеонидина 3-О-рутинозид, изопеонидина 3-О-самбубиозид, изопеонидина 3-О-ксилозид, 4-О-метилпетунидина 3-О-D-галактозид, 4-О-метилпетунидина 3-О-D-глюкозид, цианидина 3-О-(2-О-(6-О-(Е)-кафеоил-D-глюкозил)-D-глюкозид)-5-О-D-глюкозид, 4'-О-метилделфинидина 3-О-рутинозид, пеларгонидина 3-О-(6' '-ацетил-глюкозид)</p>
Хальконы	<p>Хальконарингенин общий, бутеин, ксантогумол, хальконарингенин, хальконарингенина 2'-О-глюкуронид, хальконарингенина 4'-О-глюкуронид, хальконарингенина 7-О-глюкуронид</p>
Дигидрохальконы	<p>Флоретин, флоридзин, флоретина ксилозил-галактозид, флоретина 2-О-ксилозилглюкозид, 3-гидроксифлоретина 2'-О-ксилозилглюкозид, 3-гидроксифлоретина 2'-О-глюкозид, флоридзин общий, 3-гидроксифлоретин, флоретина 2'-О-глюкуронид, 3-метоксифлоретина 3'-О-глюкозид, 3-гидрокси-4-О-метилфлоретина 3'-О-глюкозид, 3-гидроксифлоретина 3'-О-глюкозид</p>
Дигидрофлавонолы	<p>Дигидрокверцетина 3-О-рамнозид, дигидрокверцетин, энгелетин, дигидромирицетина 3-О-рамнозид, дигидрокверцетина 3-О-глюкозид, дигидромирицетин, дигидрокаемпферол</p>
Флаванолы	<p>(+)-катехин, (-)-эпикатехин, (+)-галлокатехин, (-)-эпигаллокатехин, (-)-эпикатехина 3-О-галлат, (-)-эпигаллокатехина 3-О-галлат, катехины общие, теафлавины общие, теарубигины общие, теафлавин, теафлавина 3-О-галлат, теафлавина 3'-О-галлат, теафлавина 3,3'-О-дигаллат, (+)-галлокатехина 3-О-</p>



	<p>галлат, (-)-катехин, (+)-катехина 3-О-галлат, теафлавовая кислота, эпитеафлавовая кислота, 3'-О-галлат эпитеафлавовой кислоты, изонеотеафлавина 3-О-галлат, (-)-галокатехина 3-О-галлат, (-)-галокатехин, (-)-катехина 3-О-галлат, (+)-эпикатехин, (-)-эпикатехина 8-С-галактозид, изонеотеафлавин, процианидиновый димер В1, процианидиновый димер В2, процианидиновый димер В3, процианидиновый димер В4, процианидиновый димер В5, процианидиновый димер В7, проделфинидиновый димер В3, процианидиновый тример С1, процианидиновый тетрамер Т4, 02 меры, процианидины общие, процианидиновый тример ЕЕС, 01 меры, полимеры (&gt; 10 мер), 03 меры, 04-06 меры, 07-10 меры, процианидиновый димер В6, процианидиновый тример Т2, процианидиновый тример С2, 3-О-галлат процианидинового димера В2, 3'-О-галлат процианидинового димера В1, проделфинидиновый тример GC-GC-C, процианидиновый тример Т3, 04 меры, процианидиновый димер А2, 05 меры, 06 меры, 07 меры, 08 меры, 09 меры, 10 меры, 02-03 меры, (+)-эпикатехин-(2а-7) (4а-8)-катехина 3-О-арабинозид, циннамтаннина В1 3-О-галактозид, (+)-эпикатехин-(2а-7) (4а-8)-эпикатехина 3-О-арабинозид, циннамтаннина В1 3-О-арабинозид, процианидиновый димерА1, циннамтаннин В1, проантоцианидины общие, проделфинидиновый тример GC-CC, проделфинидиновый тример C-GC-C, (+)-эпикатехин-(2а-7) (4а-8)-катехин, (+)-эпикатехин-(2а-7) (4а-8)-эпикатехин, (-)-эпикатехин-(2а-7) (4а-8)-эпикатехина 3-О-галактозид, циннамтаннин А2, бис-8,8'-катехинилметан, циннамтаннин А3, (+)-катехин 3-О-глюкоза, 3'-О-метилэпикатехин, 4'-О-метил-(-)-эпикатехина 3'-О-глюкуронид, эпикатехина 3'-О-глюкуронид, эпигаллокатехина 3-О-галлат-4''-О-глюкуронид, 3'-О-метилкатехин, 3'-О-метил-(-)-эпикатехина 3-О-галлат, 4'-О-метилэпигаллокатехин, 4''-О-метилэпигаллокатехина 3-О-галлат, 4'-О-метилэпикатехин, эпигаллокатехина 3-О-галлат--7-О-глюкозид-4''-О-глюкуронид, теазинензин А, 3-О-метилэпигаллокатехин, 3',4''-диметил-(-)-эпикатехина 3-О-галлат, (-)-эпигаллокатехина 3-О-глюкуронид, 3'-О-метил-(-)-эпигаллокатехина 3-О-галлат, 3',3''-О-метил-(-)-эпигаллокатехина 3-О-галлат, 3'-О-метил-(-)-эпикатехина 7-О-глюкуронид, эпикатехина 7-О-глюкуронид, (-)-эпигаллокатехина 3'-О-глюкуронид, (-)-эпигаллокатехина 7-О-глюкуронид, 4'-О-метил-(-)-эпигаллокатехина 3'-О-глюкуронид, 4'-О-метил-(-)-эпигаллокатехина 7-О-глюкуронид, 4'-О-метил-(-)-эпигаллокатехина 3'-сульфат</p>
--	---

Флаваноны	Нарингенин, эриодиктиол, гесперетин, гесперетин общий, нарингенин общий, эриоцитрин, гесперидин, нарингин, нарирутин, неозериоцитрин, неогесперидин, изозакуранетина 7-О-рутинозид, понцирин, дидимин, нарирутина 4'-О-глюкозид, нарингина 4'-О-глюкозид, нарингина 6'-малонат, изозакуранетин, нарингинина 7-О-глюкозид, пинокебрин, 8-пренилнarinгенин, 6-пренилнarinгенин, 6-геранилнarinгенин, изоксантогумол, эриодиктиола 7-О-глюкозид, сакуранетин, гесперетина 3'-О-глюкуронид, гесперетина 7-О-глюкуронид, гесперетина 3'-сульфат, гесперетина 7-сульфат, гомозериодиктол, нарингинина 4'-О-глюкуронид, нарингинина 5-О-глюкуронид, нарингинина 7-О-глюкуронид, гесперетина 3',7-О-диглюкуронид, гесперетина 5,7-О-диглюкуронид, пинобанкзин, 5-О-метилпинобанкзин
Флавоны	Апигенин, лютеолин, апигенин общий, лютеолин общий, диосмин, изорфоифолин, неодиосмин, ройфолин, синензетин, нобилетин, тангеретин, лютеолина 7-О-диглюкуронид, хризин, диосметин, акацетин, лютеолина 7-О-рутинозид, тетраметилскутинареин, лютеолина 7-О-глюкозид, апигенина 7-О-глюкозид, апигенина 6,8-ди-С-глюкози, синензетин общий, апигенина 6,8-С-арабинозид-С-глюкозид, апигенина 6,8-С-галактозид-С-арабинозид, лютеолина 7-О-глюкуронид, апигенина 7-О-глюкуронид, лютеолина 7-О-малонилглюкозид, лютеолина 6-С-глюкозид, лютеолина 8-С-глюкозид, лютеолина 6-С-глюкозид 8-С- арабинозид, лютеолина 7-О-(2-апиозилглюкозид), лютеолина 7-О-(2-апиозил-4-глюкозил-6-малонил)-глюкозид, апигенина 6-С-глюкозид 8-С-арабинозид, лютеолина 7-О-(2-апиозил-6-малонил)-глюкозид, апигенина 7-О-апиозилглюкозид, апигенина 8-С-глюкозид, 7,3', 4'-тригидроксифлавоны, 7,4'-дигидроксифлавоны, геральдон, байкалейн, апигенина 6-С-глюкозид, гиспидклин, цирзимаритин, лютеолина 4'-О-глюкозид, 5,6-дигидрокси-7,8,3',4'-тетраметоксифлавоны, пибреллин, гарденин В, непетин, джакеозидин, цирзилинеол, зупаторин, 6-гидроксилютеолин, 6-гидроксилютеолина 7-О-рамнозид, skutellarein, апигенина 7-О-(6'' - малонил-апиозилглюкозид), хризозериол, хризозериола 7-О-апиозилглюкозид, хризозериола 7-О-(6''-малонил-апиозилглюкозид), хризозериола 7-О-глюкозид, хризозериола 7-О-(6''-малонилглюкозид), апигенина 7-О-диглюкуронид, роифолина 4'-О-глюкозид, 3'-О-деметилнобилетин, 4'-О-деметилнобилетин, 6-О-деметилзупатилин, 6-О-метилскуталларин, апигенина 4'-О-глюкуронид, апигенина 5-О-глюкуронид, зупатилин, изоскутеллареин, skutellarein 4-О-глюкуронид, skutellarein 5-О-глюкуронид, skutellarein 6,7-О-диглюкуронид, skutellarein 6-О-глюкуронид, skutellarein 7-сульфат, skutellarein 7-О-глюкуронид, трицин, 6-О-метилскутеллареин

Флавонолы	<p>Кемпферол, кверцетин, кверцетина 3-О-галактозид, кверцетина 3-О-глюкозид, кверцетина 3-О-ксилозид, кверцетина 3-О-рамнозид, кверцетина 3-О-рутинозид, кверцетина 3-О-софорозид, кверцетина 3-О-арабинозид, кверцетина 3-О-ксилозилглюкуронид, кверцетин общий, кемпферол общий, мирицетин общий, изорамнетина 3-О-глюкозид 7-О-рамнозид, изорамнетина 3-О-рутинозид, кемпферола 3-О-глюкуронид, изорамнетина 7-О-рамнозид, кверцетина 3,4'-О-диглюкозид, мирицетина 3-О-рутинозид, мирицетин, морин, кемпферид, мирицетина 3-О-галактозид, мирицетина 3-О-глюкозид, кверцетина 3-О-глюкозид-ксилозид, кверцетина 3-О-ацетилрамнозид, кемпферола 3-О-галактозид, галангин, Изофамнетин, кемпферола 3-О-глюкозид, кемпферола 3-О-рутинозид, кемпферола 3-О-глюкозил-рамнозил-галактозид, кемпферола 3-О-глюкозил-рамнозил-глюкозид, кверцетина 3-О-глюкозил-рамнозил-галактозид, кверцетина 3-О-глюкозил-рамнозил-глюкозид, рамнетин, изорамнетина 3-О-глюкозид, мирицетина 3-О-рамнозид, кверцетина 3-О-рамнозил-галактозид, кемпферола 3-О-арабинозид, кверцетина 3-О-глюкуронид, изорамнетина 3-О-глюкуронид, мирицетина 3-О-арабинозид, кверцетина 3,7,4'-О-триглюкозид, кверцетина 7,4'-О-диглюкозид, кверцетина 4'-О-глюкозид, изорамнетина 4'-О-глюкозид, 3,7-диметилкверцетин, кемпферола 3-О-софорозид, кемпферола 3,7-О-диглюкозид, кверцетина 3-О-диглюкозид, кемпферола 3-О-софорозид 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-софоротриозид 7-О-софорозид, кемпферола 3-О-синапоил-каффеоил-софорозид 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-ферулоил-каффеоил-софорозид 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-ферулоил-софоротриозид, кемпферола 3-О-синапоил-софорозид 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-каффеоил-софорозид 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-ферулоил-софорозид 7-О-глюкозид, кверцетина 3-О-(6"-малонилглюкозид), кемпферола 3-О-(6"-малонилглюкозид), кемпферола 3-О-рамнозид, кверцетина 3-О-(6"-малонилглюкозид) 7-О-глюкозид, патулетин, кверцетагетин, спинацетин, патулетина 3-О-глюкозил-(1-&gt;6)-[апиозил (1-&gt;2)]-глюкозид, спинацетина 3-О-глюкозил-(1-&gt;6)-[апиозил (1-&gt;2)]-глюкозид, патулетина 3-О-(2''-ферулоилглюкозил) (1-&gt;6)-[апиозил (1-&gt;2)]-глюкозид, спинацетина 3-О-(2"-р-кумароилглюкозил) (1-&gt;6)-[апиозил (1-&gt;2)]-глюкозид, спинацетина 3-О-(2" ферулоилглюкозил) (1-&gt;6)-[апиозил (1-&gt;2)]-глюкозид, спинацетина 3-О-глюкозил-(1-&gt;6)-глюкозид, джакейдина 4'-О-глюкуронид, 5,3',4'-тригидрокси-3-метокси-6:7-метиленедиоксифлавона 4'-О-глюкуронид, 5,4'-дигидрокси-3,3'-диметокси-6:7-метиленедиоксифлавона 4'-О-глюкуронид, спинатозид, спинатозида 4'-О-глюкуронид, кемпферола 3-О-ксилозилглюкозид, кемпферола 3-О-ацетилглюкозид, кверцетина 3-О-ксилозил-рутинозид, кемпферола 3-О-ксилозил-рутинозид, кверцетина 3-О-глюкозил-глюкозид, кверцетина 7-О-глюкозид,</p>
-----------	---

	<p>кверцетина 3-О-(6'-ацетилглюкозид), кемпферола 3-О-робинозид 7-О-рамнозид, кемпферола 7-О-глюкозид, кемпферола 3-О-галактозид 7-О-рамнозид, кемпферола 3-О-(6'-ацетил-галактозид) 7-О-рамнозид, кверцетина 3-О-(6'-ацетил-галактозид) 7-О-рамнозид, кемпферола 3-О-(2'-рамнозил-галактозид) 7-О-рамнозид, кемпферола 3-О-(2'-рамнозил-6'-ацетил-галактозид) 7-О-рамнозид, 6,8-дигидроксикемпферол, изорамнетина 3-О-галактозид, кверцетина 3-О-рамнозил-рамнозилглюкозид, кемпферола 3-О-рамнозил-рамнозилглюкозид, метилгалангин, кемпферола 3,7,4'-О-триглюкозид, 5,3',4'-тригидрокси-3-метокси-6:7-метиленedioксифлавонон, 5,4'-дигидрокси-3,3'-диметокси-6:7-метиленedioксифлавонон, джакейдин, натсудадаин, 3-метоксинобилетин, 3-метоксисиненсетин, кверцетина 3'-О-глюкуронид, кверцетина 3'-сульфат, кверцетина 4'-О-глюкуронид, изорамнетина 4'-О-глюкуронид, тамариксетин, кверцетина 3-О-глюкозил-рутинозид</p>
Изофлавоноиды	<p>Даидзеин, формонетин, генистеин, биочанин А, глицитеин, глицитин, 6'' - О-ацетилдаизин, 6'' - О-малонилгенистин, дайдзин, генистин, 6'' - О-ацетилгенистин, 6'' - О-ацетилглицитин, 6'' - О-малонилдайдзин, 6'' - О-малонилглицитин, 2', 7-дигидрокси-4', 5'-диметоксиизофлавонон, 2-дегидро-О-десметиланголензин, 2'-гидроксиформонетин, 3', 4', 7-тригидроксиизофлавонон, 3', 4', 7-тригидроксиизофлаванон, 3', 7-дигидроксиизофлаванон, 3'-гидроксидаидзеин, 3'-гидрокси-О-десметиланголензин, 4', 6, 7-тригидроксиизофлаванон, 4', 7, 8-тригидроксиизофлаванон, 4', 7-дигидрокси-3'-метоксиизофлаванон, 4', 7-дигидрокси-6-метоксиизофлаванон, 4-гидроксиэквол, 4'-О-метилэквол, 5, 6, 7, 3', 4'-пентагидроксиизофлавонон, 5, 6, 7, 4'-тетрагидроксиизофлавонон, 5, 7, 8, 4'-пентагидроксиизофлавонон, 5, 7, 8, 4'-тетрагидроксиизофлавонон, 5'-гидрокси-О-десметиланголензин, 5'-метокси-О-десметиланголензин, 6, 7, 3', 4'-тетрагидроксиизофлавонон, 6, 7, 4'-тригидроксиизофлавонон, 6'-гидроксианголензин, 6'-гидрокси-О-десметиланголензин, 7, 3', 4'-тригидрокси-6-метоксиизофлавонон, 7, 3', 4'-тригидроксиизофлавонон, 7, 8, 3', 4'-тетрагидроксиизофлавонон, 7, 8, 4'-тригидроксиизофлавонон, анголензин, каликозин, даидзеина 4', 7-О-диглюкуронид, даидзеина 4', 7-дисульфат, даидзеина 4'-О-глюкуронид, даидзеина 4'-сульфат, даидзеина 7-О-глюкуронид, дигидробиханин А, дигидродаидзеин, дигидродаидзеина 7-О-глюкуронид, дигидроформонетин, дигидрогенистеин, дигидроглицитеин, эквол, формонетина 7-О-глюкуронид, формонетина 7-сульфат, генистеина 4, 7-О-диглюкуронид, генистеина 4', 7-дисульфат, генистеина 4'-О-глюкуронид, генистеина 4'-сульфат, генистеина 5-О-глюкуронид, генистеина 7-О-</p>

	<p>         глюкоуронид, генистеина 7-сульфат, глицитеина 4'-О-глюкоуронид, глицитеина 7-О-глюкоуронид, копарин, О-дезметиланголензин, оробол, прунетин, псевдобаптигенин, пуэрарин, даидзина 4'-О-глюкоуронид, иризолидона 7-О-глюкоуронид, текторигенина 7-сульфат, текторигенина 4'-сульфат, иризолидон, текторигенин, текторидин, 5,7-дигидрокси-8,4'-диметоксиизофлаван, изотекторигенин, эквола 7-О-глюкоуронид, эквола 3,4-О-глюкоуронид, 8-гидроксидаидзеин, даидзеина 7-сульфат, даидзеина 4'-О-сульфо-7-О-глюкоуронид, даидзеина 7-О-сульфо-4'-О-глюкоуронид, эквола 4'-сульфат, 3',4',5,7-тетрагидроксиизофлаванон, 3'-О-метилэквол, 6-О-метилэквол, 3'-гидроксигенистеин, 3'-гидроксидигидродаидзеин, 6-гидроксигидродаидзеин, 3'-гидроксиэквол, цис-4-гидроксиэквол, 4'-метокси-2',3,7-тригидроксиизофлаванон, ирилон, веститон, сативанон, бутин, 3'-гидроксимеланеттин, ликуиритигенин, меланеттин, стевенин, виолонон, изоликуиритигенин, дальбергин, 3'-О-метилвиоланон, 8-гидроксидигидродаидзеин       </p>
Лигнаны	<p>         Секоизоларицирезинол, матаирезинол, ларицирезинол, пинорезинол, сиригарезинол, изоларицирезинол, арктигенин, трахелогенин, медиорезинол, 1-ацетоксипинирезинол, секоизоларицирезинола ди-О-глюкозид, сезамин, сезамоллин, сезамоллинол, сезаминол, сезаминола 2'-О-β-D-глюкозил (1-&gt;2) - О-[β-D-глюкозил (1-&gt;6)]-β-D-глюкозид, сезаминола 2'-О-β-D-глюкозил (1-&gt;6)-О-β-D-глюкозид, сезаминола 2'-О-β-D-глюкозид, сезамол, сезамоллинола 4'-О-β-D-глюкозил (1-&gt;6)-О-β-D-глюкозид, 7-гидроксиматаирезинол, изогидроксиматаирезинол, секоизоларицирезинол-сесквилигнан, циклоларицирезинол, 7-оксоматаирезинол, тодолактол А, конидендрин, 7-гидроксисекоизоларицирезинол, нортрахелогенин, ларицирезинол-сесквилигнан, ангидро-секоизоларицирезинол, диметилматаирезинол, эписезамин, эписезаминол, сезаминола 2'-О-β-D-глюкозил (1-&gt;2)-О-β-D-глюкозид, энтеродиол, энтеролактон, сезаминола 2-О-триглюкозид, шизандрин, гомисин D, шизандрол В, тиглоитгломицин Н, шизанхенол, шизантерин А, гомисин М2, деоксишизандрин, шизандрин В, шизандрин С, 2-гидроксиэнтеродиол, 4-гидроксиэнтеродиол, 6-гидроксиэнтеродиол, 2-гидроксиэнтеролактон, 4-гидроксиэнтеролактон, 6-гидроксиэнтеролактон, 2'-гидроксиэнтеролактон, 4'-гидроксиэнтеролактон, 6'-гидроксиэнтеролактон, 5-гидроксиэнтеролактон, 7-гидроксиэнтеролактон       </p>
Нефенольные метаболиты	<p>         4-этилбензойная кислота, глицин, 1,3,5-триметоксибензол, ванилоилглицин       </p>
Алкилметокси-фенолы	<p>         4-винилгваякол, 4-этилгваякол, 4-винилсирингол       </p>

Алкилфенолы	5-генеикозенилрезорцинол, 5-генеикозилрезорцинол, 5-гептадецилрезорцинол, 5-нонадеценилрезорцинол, 5-нонадецилрезорцинол, 5-пентакозенилрезорцинол, 5-пентакозилрезорцинол, 5-пентадецилрезорцинол, 5-трикоценилсенилрезорцинол, 5-трикосилрезорцинол, алк(ен)илрезорцинолы, алкенилрезорцинолы общие, алкилрезорцинолы общие, 3-метилкатехол, 4-метилкатехол, 4-этилкатехола, 4-винилфенол, 4-этилфенол
Бетацианины	Бетанин, изобетанин, бетанидин, изобетанидин
Капсаиноиды	Капсаицин
Куркуминоиды	Куркумин, деметоксикуркумин, бисдеметоксикуркумин
Дигидро-капсаицины	Дигидрокапсаицин, нордигидрокапсаицин
Фурано-кумарины	Бергаптен, псорален, ксантотоксин, изопимпинеллин, ангелицин
Гидрокси-бензальдегиды	Сирингальдегид, протокатеховый альдегид, ванилин, 4-гидроксибензальдегид, галлиевый альдегид, р-анисальдегид, этилванилин, ванилина 4-сульфат
Гидроксибензо-кетоны	3-метоксиацетофенон, 2,3-дигидрокси-1-гваяцилпропанон, пеонол, 2,4-дигидроксиацетофенон 5-сульфат, 2-гидрокси-4-метоксиацетофенон 5-сульфат, резацетофенон, норатириол
Гидроксициннам-альдегиды	Феруальдегид, синапальдегид
Гидрокикумарины	Кумарин, изокумарин, меллеин, скополетин, эскулетин, эскулин, умбеллиферон, 4-гидроксикумарин, уролитин D, уролитина B 3 -сульфат, уролитина A 3,8-О-диглюкорогнид, уролитина A 3,8-дисульфат, уролитин A, уролитин B, уролитина B 3 -О-глюкуронид, уролитин C
Гидроксифенил-спирты	Гомованиллилловый спирт
Гидроксифенол-пропены	2-метокси-5-проп-1-енилфенол, анетол, эвгенол, ацетилэвгенол, [6]-гингерол, эстрагол
Метоксифенолы	Гваякол, р-анизидин
Нафтохиноны	Juglone, 1,4-нафтохинон
Фенольные терпены	Карнозиновая кислота, розманол, карнозол, эпирозманол, розмадиал, тимол, карвакрол
Тирозолы	Гидрокситирозол, 3,4-DHPEA-AC, р-НPEA-AC, олеуропеин, деметилолеуропеин, 3,4-DHPEA-EA, лигстрозид, 3,4-DHPEA-EDA, гидрокситирозола 4-О-глюкозид, диметилловый эфир олеозида, олеозида 11 1-О-глюкозид, гидрокситирозола 1-О-глюкозид, р-НPEA-EDA, р-НPEA-EA, олеуропеин-агликон, лигстрозид-агликон, элеонолевая кислота, тирозола 4-О-глюкуронид, тирозола 4-сульфат, гидрокситирозол общий

Другие полифенолы	Куместрол, катехол, пирогаллол, флорин, фенол, фторглюцинол, арбутин, гидрохинон, 3,4-дигидроксибензилгликоль, 5,5', 6,6'-Тетрагидрокси-3,3'-бииндолил, резорцинол, 1-фенил-6,7-дигидрокси-изохроман, 1-(3-метокси-4-гидрокси)-фенил-6,7-дигидроксиизохроман, литоспермиевая кислота, литосперминовая кислота В, сальвианолевая кислота В, сальвианолевая кислота С, сальвианолевая кислота D, сальвианолевая кислота G, изопропил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-гидроксипропаноат
Гидроксibenзойные кислоты	Гликозид эллагиновой кислоты, протокатехиновая кислота, галлиевая кислота, ванилиновая кислота, эллаговая кислота общая, гентизиновая кислота, эллаговая кислота, 4-гидроксibenзойная кислота, 3,4-диметоксibenзойная кислота, сиреневая кислота, 5-О-галлоилхининовая кислота, арабинозид эллаговой кислоты, ацетил-ксилозид эллаговой кислоты, ацетил-арабинозид эллаговой кислоты, 4-метоксibenзойная кислота, галлиевая кислота общая, бензойная кислота, 2-гидроксibenзойная кислота, 3-гидроксibenзойная кислота, 2,3-дигидроксibenзойная кислота, 2,4-дигидроксibenзойная кислота, 1-О-галлоил-глюкоза, 4-О-глюкозид 4-гидроксibenзойной кислоты, 4-О-глюкозид протокатеховой кислоты, 4-О-глюкозид галлиевой кислоты, 3,5-дигидроксibenзойная кислота, 2,6-дигидроксibenзойная кислота, 3-О-галлат галлиевой кислоты, этиловый эфир галлиевой кислоты, дилактон валонеивой кислоты, 2,6-диметоксibenзойная кислота, 2-гидрокси-4-метоксibenзойная кислота, дилактон сангисорбиновой кислоты, галлоил-глюкоза, ламбертианин С, сангвиин Н-6, сангвиин Н-10, эллагитанины общие, пуникалагин, галлаговая кислота, дубильная кислота, гидролизуемые танины общие, 3-О-метилгаллиевая кислота, 4-О-метилгаллиева кислота, 3,4-О-диметилгаллиевая кислота, пуникалин, 4-гидроксигиппуровая кислота, 3-гидроксигиппуровая кислота, 2-гидроксигиппуровая кислота, гиппуровая кислота, пеонифлорин, 4-сульфат ванилиновой кислоты, 2,3,4-тригидроксibenзойная кислота
Гидроксикоричные кислоты	р-кумаровая кислота, 5-р-кумароилхинная кислота, 4-р-кумароилхинная кислота, кофеиновая кислота, ферулоил-глюкоза, феруловая кислота, кофеилвинная кислота, розмариновая кислота, о-кумаровая кислота, м-кумаровая кислота, синаповая кислота, р-Кумароил-глюкоза, р-кумароилхинная кислота, 3-кофеилхинная кислота, вербаскозид, 4-кофеилхинная кислота, р-кумароил винная кислота, 2,5-ди-S-глутатионилкафтановая кислота, ферулоилвинная кислота, этиловый эфир кофеиновой кислоты, циннамоил-глюкоза, 5-кофеилхинная кислота, 3-р-кумароилхинная кислота, 2-S-глутатионилкафтановая кислота, 5-ферулоилхинная кислота, 4-ферулоилхинная кислота, 3-ферулоилхинная кислота, 5-синапоилхинная кислота, 4-синапоилхинная кислота, 3-синапоилхиновая

	<p>кислота, 3,5-дикаффеоилхинная кислота, изоферуловая кислота, кафеоил-глюкоза, 4-О-глюкозид р-кумариновой кислоты, 4-О-глюкозид кофеиновой кислоты, 4-О-глюкозид феруловой кислоты, глюкозидный эфир р-кумароилвинной кислоты, р-этиловый эфир кумаровой кислоты, транс-кофеоил винная кислота, цис-кофеоил винная кислота, транс-р-кумароилвинная кислота, цис-р-кумароилвинная кислота, транс-кофеиновая кислота, цис-кофеиновая кислота, транс-р-кумариновая кислота, транс-феруловая кислота, цис-р-кумариновая кислота, цис-феруловая кислота, 3,4-диметоксикоричная кислота, гидроксикофеиновая кислота, кофеиновая кислота общая, синапиевая кислота общая, акриловая кислота, 5-5'-дегидродиферуловая кислота, 5-8'-дегидродиферуловая кислота, 1,2-дизинапоилгенциобиоза, 1-синапоил-2-ферулоилгенциобиоза, 1,2-дифероилгенциобиоза, 1,2,2'-тризинапоилгенциобиоза, 1,2'-дизинапоил-2-ферулоилгенциобиоза, 1-синапоил-2,2'-диферулоилгенциобиоза, 1,2,2'-триферулоилгенциобиоза, 8-О-4'-дегидродиферуловая кислота, 8-8'-дегидродиферуловая кислота, 5-8'-бензофуран дегидродиферуловая кислота, цис-3-кофеилхинная кислота, 3,4-дикофеилхинная кислота, цис-5-кофеилхинная кислота, 3,4-дифелулоилхинная кислота, 3,5-дифелулоилхинная кислота, 1-кофеилхинная кислота, 1,3-дикофеилхинная кислота, 1,5-дикофеилхинная кислота, 4,5-дикофеилхинная кислота, дикофеилхинная кислота, bD-фруктозил-aD-(6-О-(E))-ферулоилглюкозид, авенантрамид 1p, авенантрамид 1f, авенантрамид 2p, авенантрамид 2c, авенантрамид 2f, авенантрамид 1c, авенантрамид 1s, авенантрамид 2s, синапоил-глюкоза, р-кумароил яблочная кислота, р-кумароил гликолевая кислота, 3-кофеил-1,5-хинолактон, 4-кофеил-1,5-хинолактон, сложные эфиры хинной кислоты, 3-ферулоил-1,5-хинолактон, 4-ферулоил-1,5-хинолактон, 3,4-дикофеил-1,5-хинолактон, 3-р-кумарил-1,5-хинолактон, 4-р-кумарил-1,5-хинолактон, коричная кислота, кумарил 3-гидрокситирозин, кумарил аспарагиновая кислота, р-кумарил аспарагиновая кислота, р-кумарил тирозин, кофеил тирозин, р-кумарил 3-гидрокситирозин, изовербаскозид, синапин, авенантрамид A2, авенантрамид K, кампестерина ферулат, ситостанина ферулат, 4-О-8', 5'-5''-дегидротрифелевая кислота, 24-метилхолестанола ферулат, 24-метилхолестерола ферулат, 24-метиллатостерола ферулат, стигмастанола ферулат, ситостерола ферулат, шотенола ферулат, 24-метиленхолестанола ферулат, транс-5-кофеилхинная кислота, транс-3-кофеилхинная кислота, 3-О-метилрозмариновая кислота, 4-О-глюкуронид синапиновой кислоты, 4-сульфат синапиновой кислоты, 4-сульфат ферулоилглицина, ферулоилглицин, 3-О-глюкуронид изоферуловой кислоты, 3-сульфат изоферуловой кислоты, 4-сульфат</p>
--	--



	<p>феруловой кислоты, 4-О-глюкуронид феруловой кислоты, 4-сульфат кофеиновой кислоты, кофеиновая кислота 3-сульфат, 4-сульфат р-кумаровой кислоты, ферулоил-С1-глюкуронид, изоферулоил-С1-глюкуронид, 3-О-глюкуронид кофеиновой кислоты, 4-О-глюкуронид кофеиновой кислоты, кофеил С1-глюкуронид, хлорогеновая кислота общий, 1,5-диферулоилхинная кислота, 1-кофеил-5-ферулоилхинная кислота, 1-ферулоил-5-кофеилхинная кислота</p>
Гидроксифенил-уксусные кислоты	<p>3,4-дигидроксифенилуксусная кислота, 4-гидроксифенилуксусная кислота, гомованилиновая кислота, гомовератровая кислота, метоксифенилуксусная кислота, 3-гидроксифенилуксусная кислота, 2-гидроксифенилуксусная кислота, 4-метоксифенилуксусная кислота, фенацетилглицин, фенилуксусная кислота, 4-гидроксиманделевая кислота, 2-гидрокси-2-фенилуксусная кислота, 4-сульфат гомованилиновой кислоты, 4-гидроксифенилмолочная кислота</p>
Гидроксифенил-пропановые кислоты	<p>Дигидро-р-кумаровая кислота, дигидрокофеиновая кислота, 3,4-дигидроксифенил-2-оксипропановая кислота, 3-гидрокси-3-(3-гидроксифенил)пропионовая кислота, 3-(3,4-дигидроксифенил)-2-метоксипропионовая кислота, 3-гидроксифенилпропионовая кислота, 4-сульфат дигидроферуловой кислоты, 3-О-глюкуронид дигидроизоферуловой кислоты, 3-О-глюкуронид дигидрокофеиновой кислоты, 3-сульфат дигидрокофеиновой кислоты, дигидроферуловая кислота, 4-О-глюкуронид дигидроферуловой кислоты, дигидросинаповая кислота, дигидроферулоилглицина 4-сульфат, дигидроферулоилглицин, даншенсу, 3-метокси-4-гидроксифенилмолочная кислота, метиловый эфир 3,4-дигидроксифенилмолочной кислоты, гидроксиданшенсу, 3-фенилпропионовая кислота, 3-гидрокси-4-метоксифенилмолочная кислота, 3-сульфат дигидроферуловой кислоты, 4-гидроксифенил-2-пропионовая кислота</p>
Гидроксифенил-пентановые кислоты	<p>5-(3'-метокси-4'-гидроксифенил)-γ-валеролактон, 4'-О-глюкуронид 5-(3'-метокси-4'-гидроксифенил)-γ-валеролактона, 4-гидрокси-(3',4'-дигидроксифенил)валериановая кислота, 5-(3',4'-дигидроксифенил)валериановая кислота, 5-(3',4'-дигидроксифенил)-γ-валеролактон, 5-(3',4',5'-тригидроксифенил)-γ-валеролактон, 5-(3',5'-дигидроксифенил)-γ-валеролактон, 5-гидроксифенил-γ-валеролактон, 3-гидроксифенилвалериановая кислота, 5-(3',5'-дигидроксифенил)-γ-валеролактона 3-О-глюкуронид</p>

Стильбены	Транс-ресвератрол, транс-ресвератрола 3-О-глюкозид, пицатаннол, цис-ресвератрол, э-виниферин, птеростильбен, d-виниферин, цис-ресвератрола 3-О-глюкозид, паллидол, пицатаннола 3-О-глюкозид, пинозилвин, ресвератрола 5-О-глюкозид, ресвератрол, ресвератрола 3-О-глюкозид, 3,4,5,4'-тетраметоксистильтбен, 3'-гидрокси-3,4,5,4'-тетраметоксистильтбен, 3-гидрокси-4,5,4'-триметоксистильтбен, 4,4'-дигидрокси-3,5-диметоксистильтбен, 4'-гидрокси-3,4,5-триметоксистильтбен, 4-гидрокси-3,5,4'-триметоксистильтбен, цис-ресвератрола 3-О-глюкуронид, цис-ресвератрола 3-сульфат, цис-ресвератрола 4'-О-глюкуронид, цис-ресвератрола 4'-сульфат, ресвератрола 3-О-глюкуронид, ресвератрола 3-сульфат, ресвератрола 4'-О-глюкуронид, транс-ресвератрола 3,5-дисульфат, транс-ресвератрола 3,4'-дисульфат, транс-ресвератрола 3-О-глюкуронид, транс-ресвератрола 3-сульфат, транс-ресвератрола 4'-О-глюкуронид, транс-ресвератрола 4'-сульфат, дигидроресвератрол
-----------	---

#### Эквиваленты и сфера применения

Настоящий документ ссылается на различные выданные патенты, опубликованные патентные заявки, журнальные статьи и другие публикации, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Если существует конфликт между любыми включенными ссылками и настоящей спецификацией, спецификация должна контролироваться. Кроме того, любой конкретный вариант реализации настоящего изобретения, который относится к уровню техники, может быть однозначно исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты реализации изобретения считаются известными специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение явно не указано в настоящем документе. Любой конкретный вариант реализации изобретения может быть исключен из любого пункта формулы изобретения по любой причине независимо от того, связано ли это с существованием предшествующего уровня техники.

Специалистам в данной области техники будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе. Объем настоящих вариантов реализации изобретения, описанных в данном документе, не ограничивается приведенным выше описанием, графическими материалами или примерами, а скорее соответствует изложенным в прилагаемой формуле изобретения. Специалисты в данной области техники поймут, что различные изменения и модификации этого описания могут быть осуществлены без отклонения от сущности или объема настоящего изобретения, как определено в следующей формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с дисбактериозом микробиоты желудочно-кишечного тракта, содержащая гликановый терапевтический препарат, содержащий комбинацию разветвленных гликанов, при этом средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01, причем

i) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют степень полимеризации (DP) по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц,

ii) гликановый препарат содержит как альфа-, так и бета-гликозидные связи,

iii) по меньшей мере одна из гликозидных связей, присутствующих в гликановом препарате, содержит 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь,

iv) отношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет от около 1:1 до около 5:1.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что по меньшей мере две или 3 гликозидные связи независимо включают 1->2 гликозидную связь, 1->3 гликозидную связь, 1->4 гликозидную связь или 1->6 гликозидную связь.

3. Композиция по п.1 или 2, отличающаяся тем, что гликановая единица содержит по меньшей мере один из моносахаридов, выбранный из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, фруктозы, ксилозы, фукозы и рамнозы.

4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что гликановый терапевтический препарат является синтетическим и не выделен из природного олигосахаридного или полисахаридного источника.

5. Композиция по любому из пп.1-4, дополнительно содержащая (i) полифенольный препарат, (ii)

препарат пробиотических бактерий, (iii) лекарственное средство или терапевтическое средство и (iv) фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что указанную композицию готовят в виде единичной лекарственной формы, и тем, что необязательно (i) единичная лекарственная форма предназначена для перорального введения или (ii) единичная лекарственная форма предназначена для растворения в водном растворе и перорального введения в виде напитка, сиропа, раствора или суспензии.

7. Фармацевтическая композиция по любому одному из пп.1-6, содержащая по меньшей мере одну гликановую единицу, выбранную из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы, при этом указанный препарат содержит гликановую единицу, ассоциированную с одним, двумя или более из следующих пиков  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC:

(i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$ -сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1; 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 93,0; 5,10, 94,3; 5,34, 98,2; 5,31, 99,6; 5,11, 100,8; 4,91, 99,4; 4,56, 97,3; 4,64, 104,2; 4,54, 103,4; 4,44, 102,6; 4,44, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

8. Фармацевтический набор, содержащий:

i) фармацевтическую композицию по любому из пп.1-7,

ii) по меньшей мере, второй компонент, выбранный из группы, состоящей из препарата полифенолов, препарата пробиотических бактерий, лекарственного средства или терапевтического агента для лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с дисбактериозом микробиоты желудочно-кишечного тракта, и диетического компонента;

i) инструктивный материал, а также

ii) упаковку.

9. Способ изготовления фармацевтической композиции по любому из пп.1-7, включающий:

(a) получение препарата, содержащего комбинацию синтетических гликанов,

(b) достижение значения одной или более следующих характеристик препарата:

(i) степень полимеризации (DP),

(ii) средняя степень разветвления (DB),

(iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, а также

(c) приготовление препарата в виде фармацевтической композиции, если выполняется один или более из следующих критериев:

(i) по меньшей мере 50% гликанов в препарате имеют DP по меньшей мере 3 и менее чем 30 гликановых единиц,

(ii) средняя степень разветвления (DB) гликанов в препарате составляет по меньшей мере 0,01,

(iii) соотношение альфа-гликозидных к бета-гликозидным связям, присутствующим в гликанах препарата, составляет от около 1:1 до около 5:1.

10. Способ по п.9, дополнительно включающий:

b) достижение значения любой одной или обеих дополнительных характеристик препарата:

(iv) идентификация гликановых единиц,

(v) соотношение гликановых единиц, а также

c) приготовление препарата в виде фармацевтической композиции, если

(vi) соотношение гликановых единиц в препарате примерно такое же, как соотношение исходных

гликановых единиц.

11. Способ по п.9 или 10, где стадия приготовления препарата в виде фармацевтической композиции включает один или более из следующих процессов:

- i) удаление нежелательных компонентов из препарата,
- ii) уменьшение объема препарата,
- iii) стерилизация препарата,
- iv) смешивание препарата с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом или носителем,
- v) смешивание препарата со вторым лекарственным средством или фармацевтическим агентом,
- vi) приготовление препарата в форме водного раствора или сиропа,
- vii) приготовление препарата в форме таблетки или пилюли,
- viii) приготовление препарата в форме капсулы.

12. Способ по п.9, включающий:

(i) получение терапевтического гликанового препарата, содержащего по меньшей мере одну гликановую единицу, выбранную из группы, состоящей из глюкозы, галактозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, рамнозы и маннозы,

(ii) определение того, является ли предварительно выбранный пик ЯМР или группа пиков ЯМР ассоциированным(ой) с гликановым препаратом, и

(iii) если присутствуют предварительно выбранный пик или группа пиков, приготовление препарата в форме фармацевтической композиции.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что пик представляет собой пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC ЯМР и определение включает достижение значения идентичности пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC или группы пиков, ассоциированных с препаратом, и, при наличии предварительно выбранного пика, приготовление препарата в виде фармацевтической композиции.

14. Способ по п.12 или 13, отличающийся тем, что

(i) для гликанов, содержащих глюкозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,42, 92,5; 5,21, 92,8; 5,18, 93,9; 5,08, 97,0; 5,36, 98,4; 5,34, 99,8; 5,38, 100,3; 4,95, 98,6; 4,62, 96,6; 4,70, 103,6; 4,49, 103,4  $^1\text{H}$ -сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(ii) для гликанов, содержащих галактозу, пики включают по меньшей мере один пик  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранный из 5,37, 92,9; 5,24, 93,1; 5,14, 96,0; 4,96, 99,3; 5,31, 98,7; 5,39, 101,4; 5,00, 101,8; 4,80, 101,3; 4,63, 97,0; 4,56, 97,2; 4,53, 103,1; 4,43, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(iii) для гликанов, содержащих фукозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 92,9; 5,33, 92,4; 5,04, 96,3; 4,90, 99,7; 4,52, 97,0; 4,39, 103,6  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

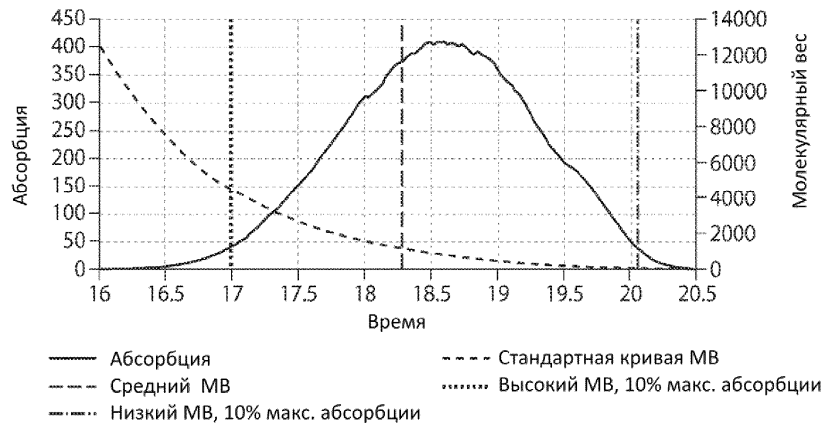
(iv) для гликанов, содержащих ксилозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,18, 93,0; 5,10, 94,3; 5,34, 98,2; 5,31, 99,6; 5,11, 100,8; 4,91, 99,4; 4,56, 97,3; 4,64, 104,2; 4,54, 103,4; 4,44, 102,6; 4,44, 104,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(v) для гликанов, содержащих арабинозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,22, 93,2; 5,13, 93,2; 5,29, 96,0; 5,26, 97,2; 5,12, 96,6; 5,18, 99,6; 5,06, 99,2; 4,99, 100,0; 5,26, 101,9; 5,06, 102,1; 4,55, 97,4; 4,54, 105,2; 4,50, 105,5; 4,38, 103,9  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

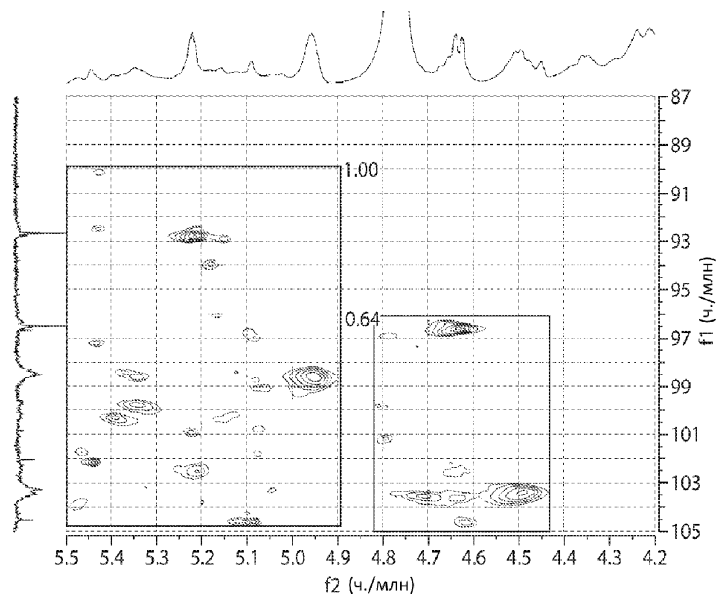
(vi) для гликанов, содержащих рамнозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,21, 93,2; 5,10, 94,5; 4,85, 94,1; 5,01, 95,8; 5,35, 100,5; 5,15, 102,2; 5,04, 102,9; 4,78, 97,9; 4,71, 99,0; 4,72, 101,0  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик;

(vii) для гликанов, содержащих маннозу, пики включают по меньшей мере один пик или два пика  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, выбранных из 5,37, 93,0; 5,16, 94,6; 4,88, 94,2; 5,39, 101,7; 5,24, 101,9; 5,13, 102,8; 5,03, 102,7; 5,24, 105,6; 5,09, 108,0; 4,88, 94,2; 4,89, 100,0; 4,70, 101,1  $^1\text{H}$  сдвиг (ч./млн) и  $^{13}\text{C}$  сдвиг (ч./млн) или соответствующий пик.

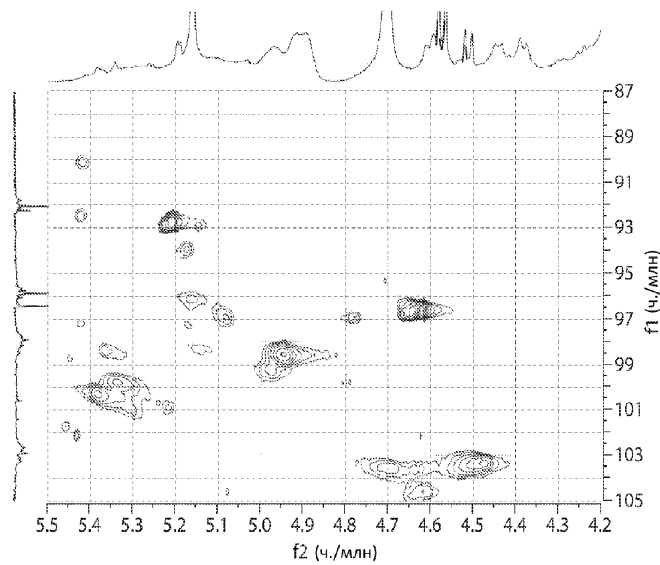
Кривая ЭХ распределения GLU100 по сравнению со стандартным МВ



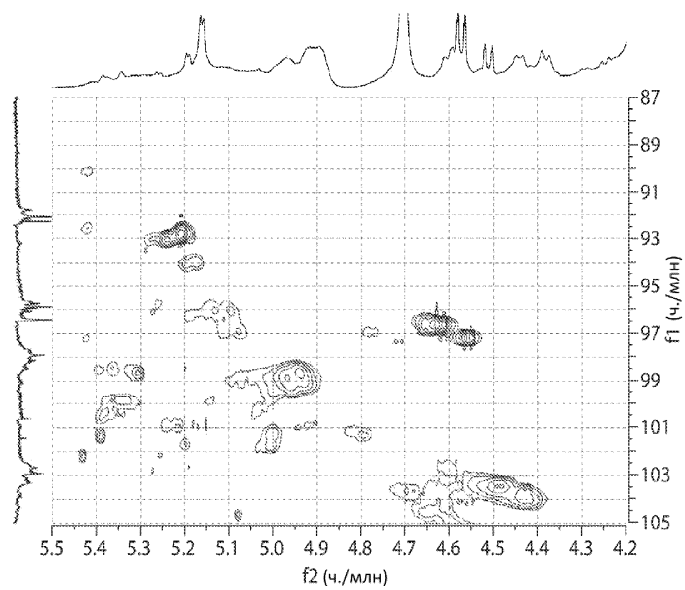
Фиг. 1



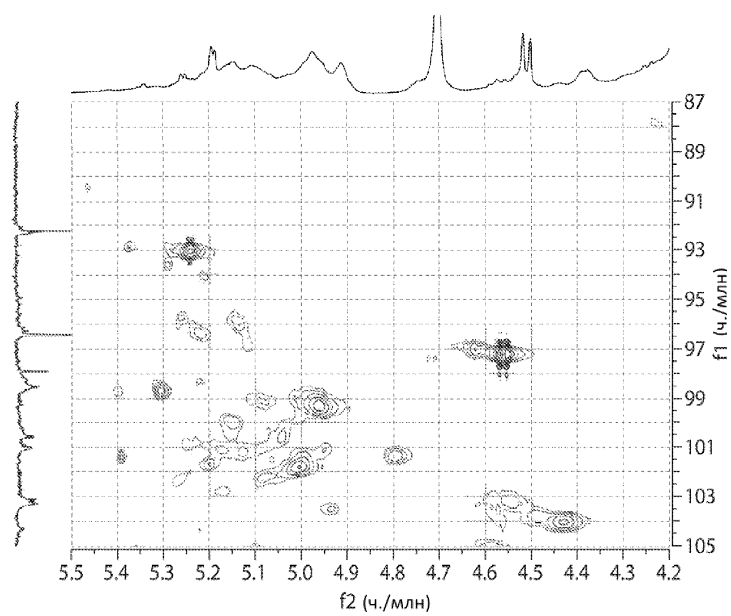
Фиг. 2



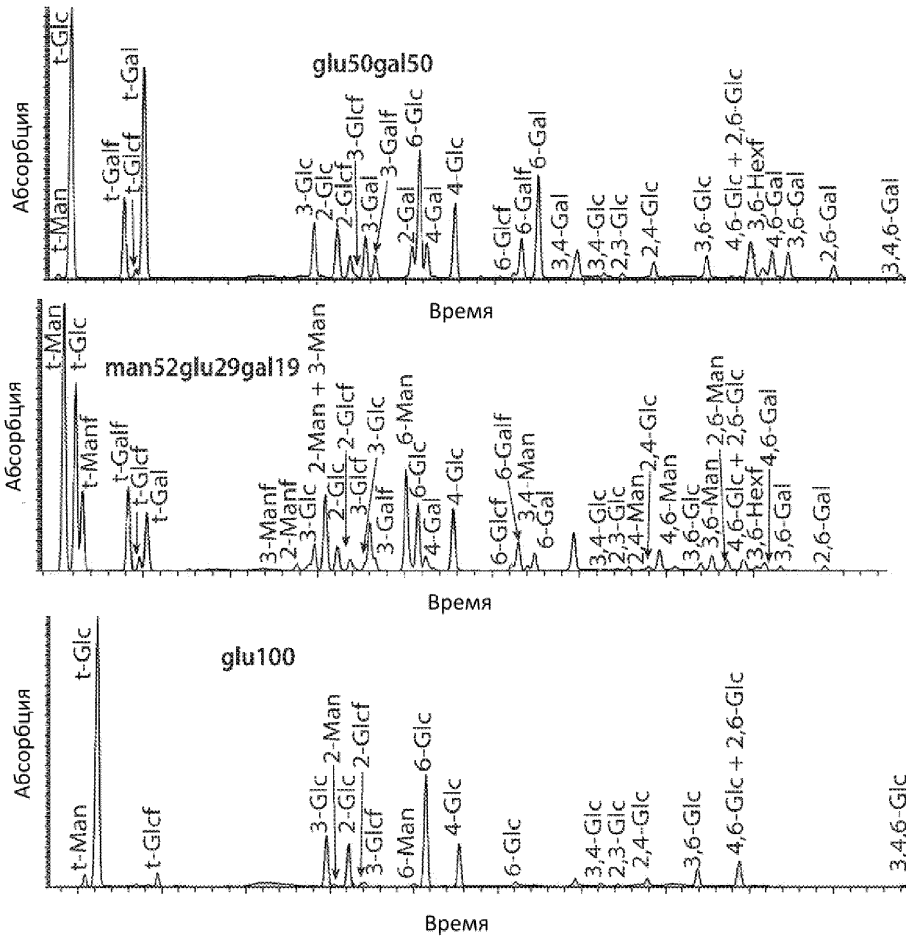
Фиг. 3а



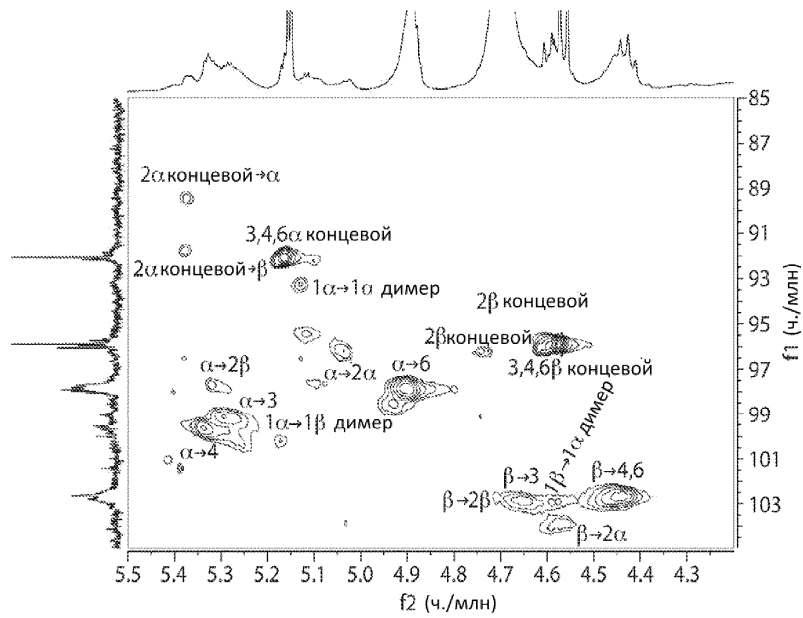
Фиг. 3б



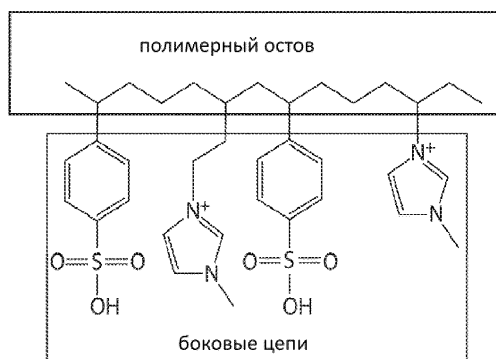
Фиг. 3с



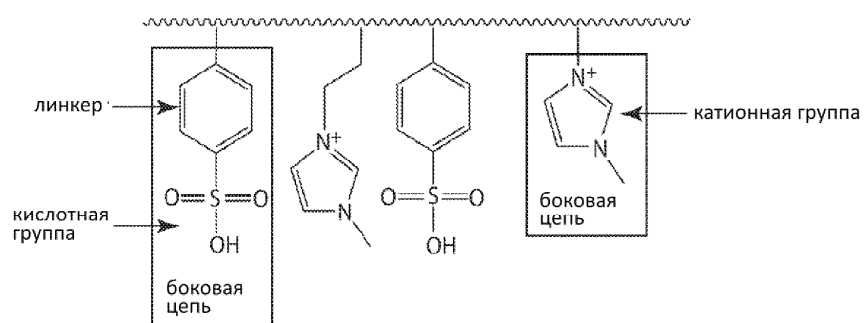
Фиг. 4



Фиг. 5

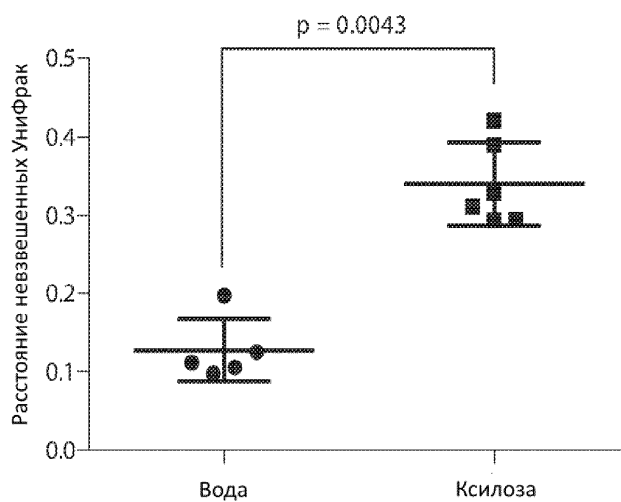


Фиг. 6а



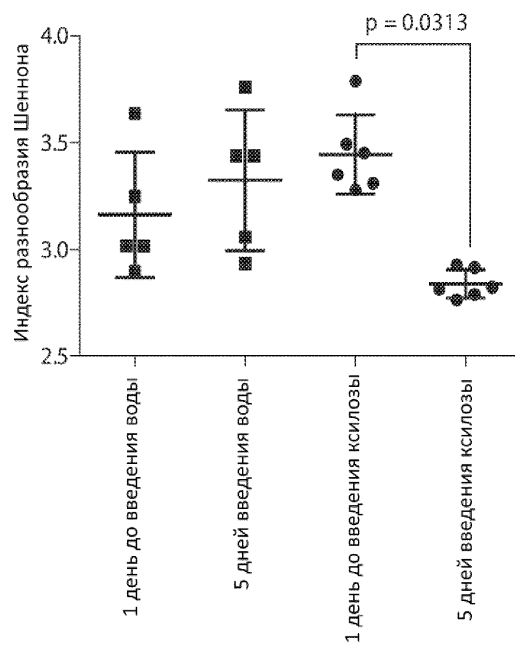
кислотная группа

Фиг. 6б

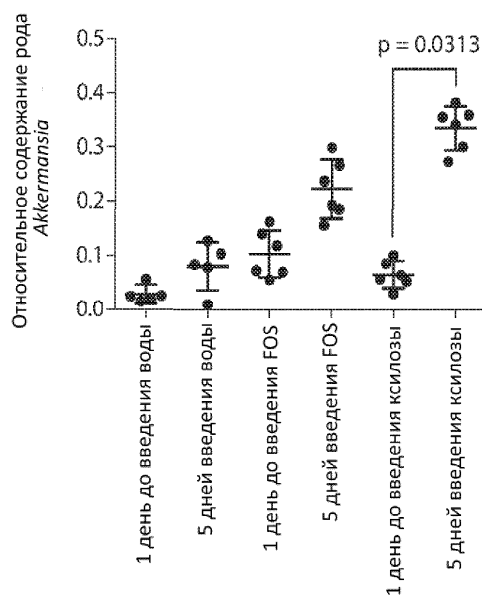


Фиг. 7

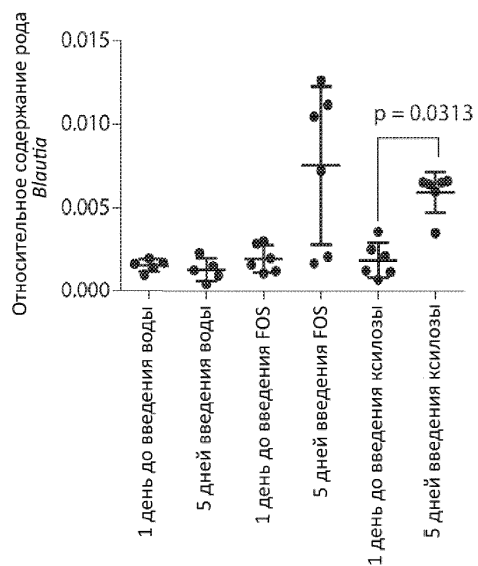




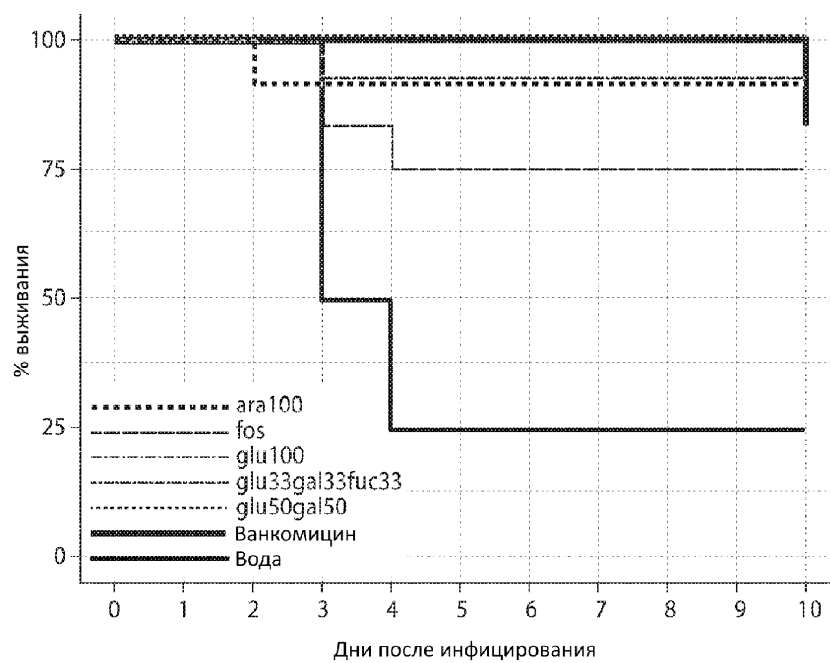
Фиг. 8



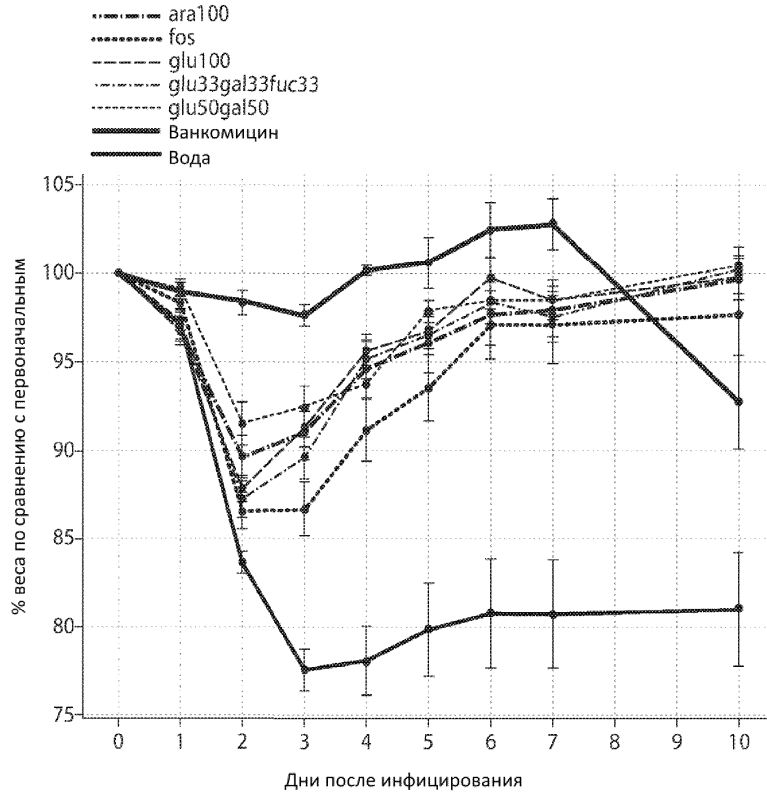
Фиг. 9а



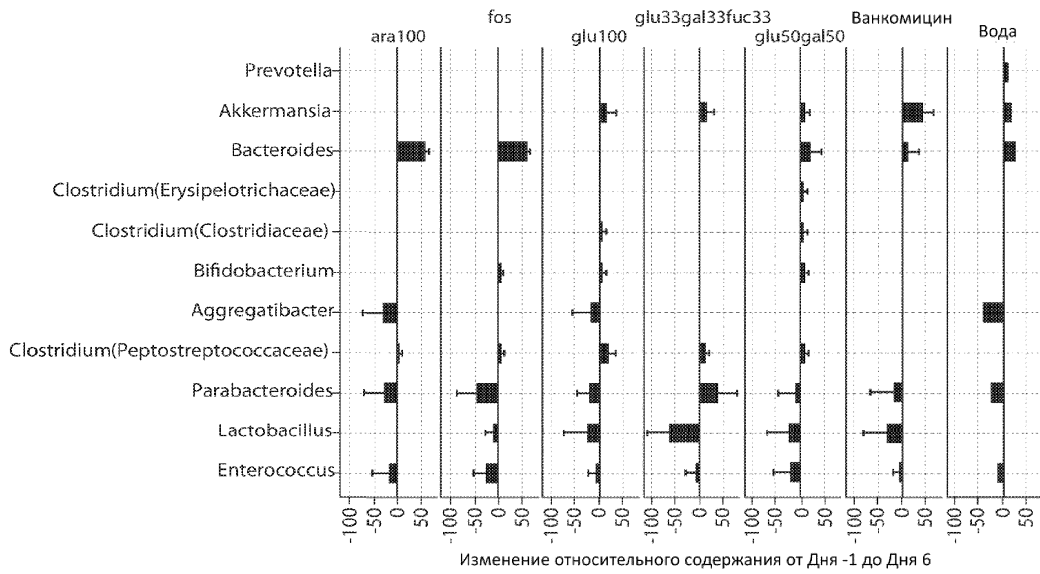
Фиг. 9b



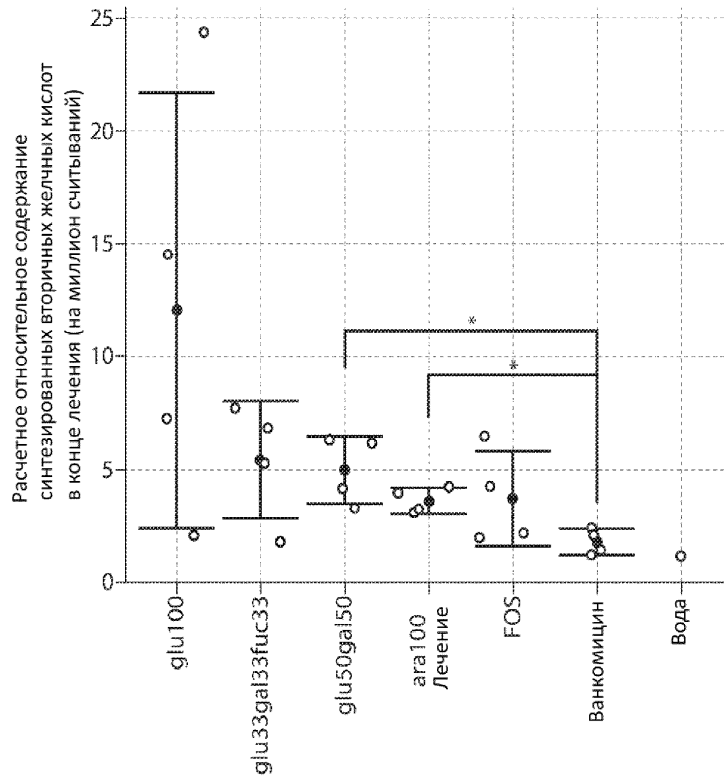
Фиг. 10



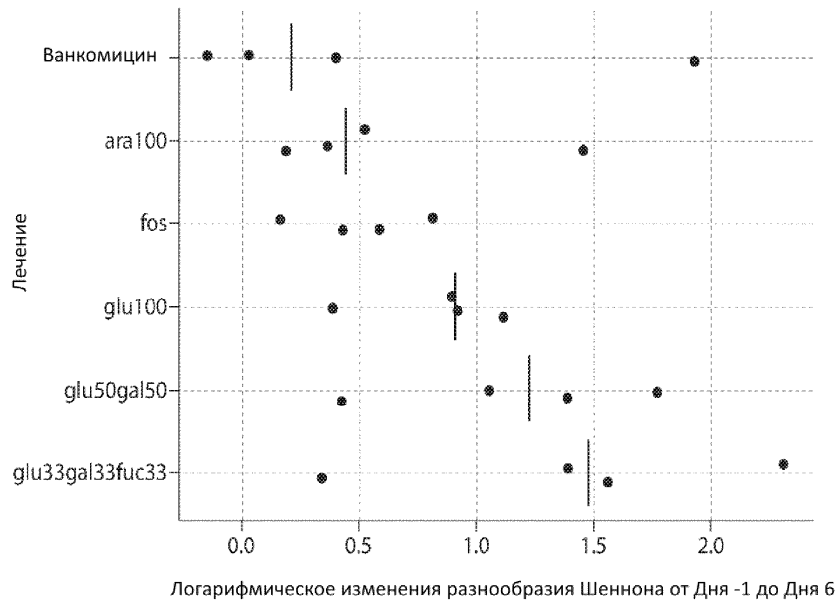
Фиг. 11



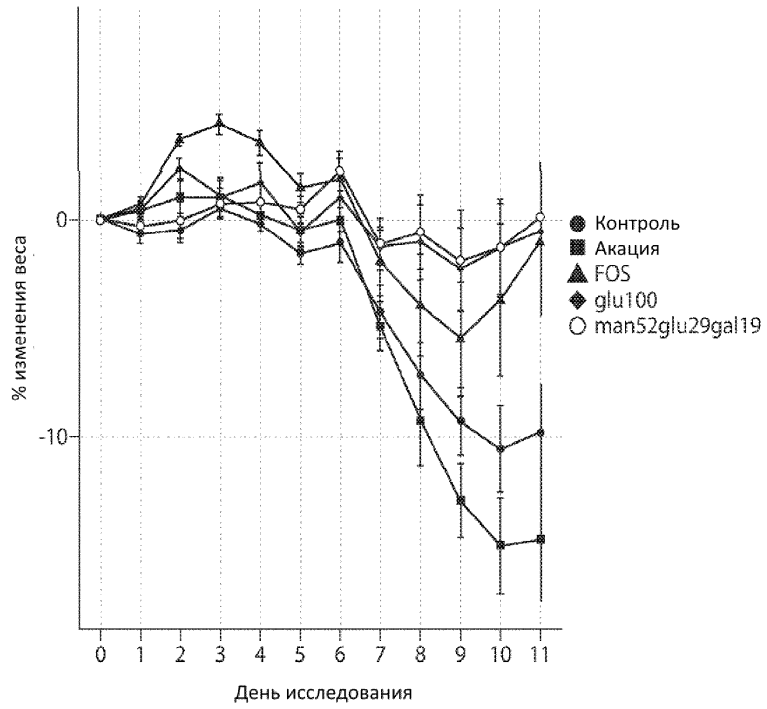
Фиг. 12



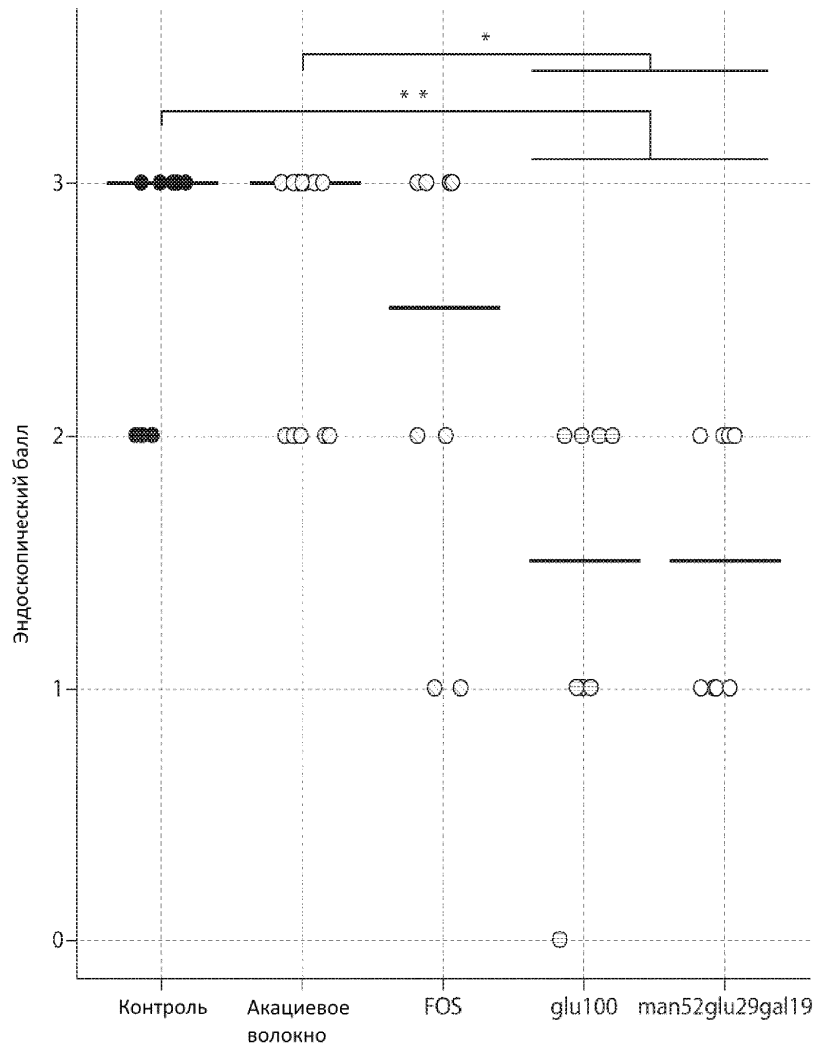
Фиг. 13



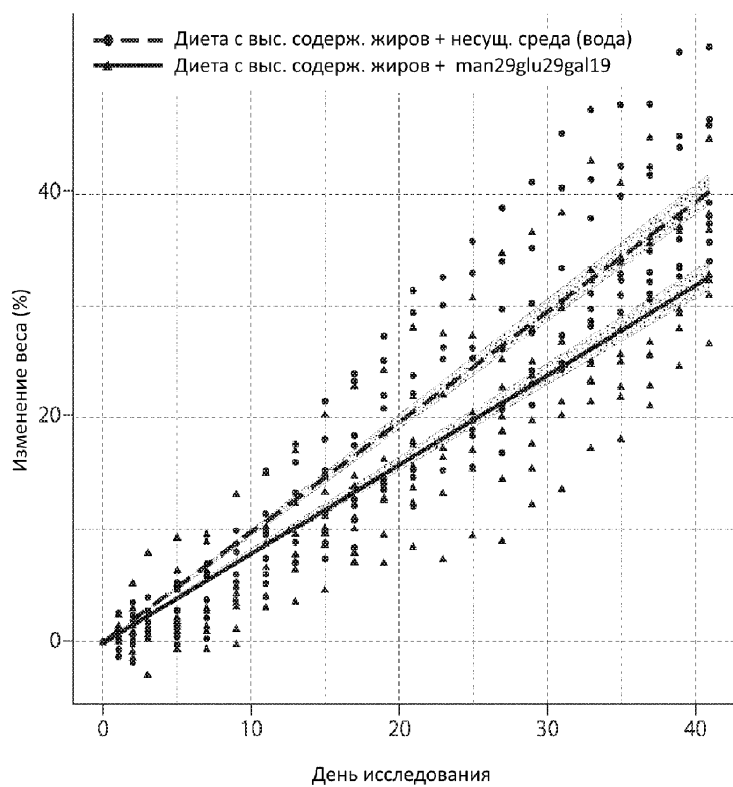
Фиг. 14



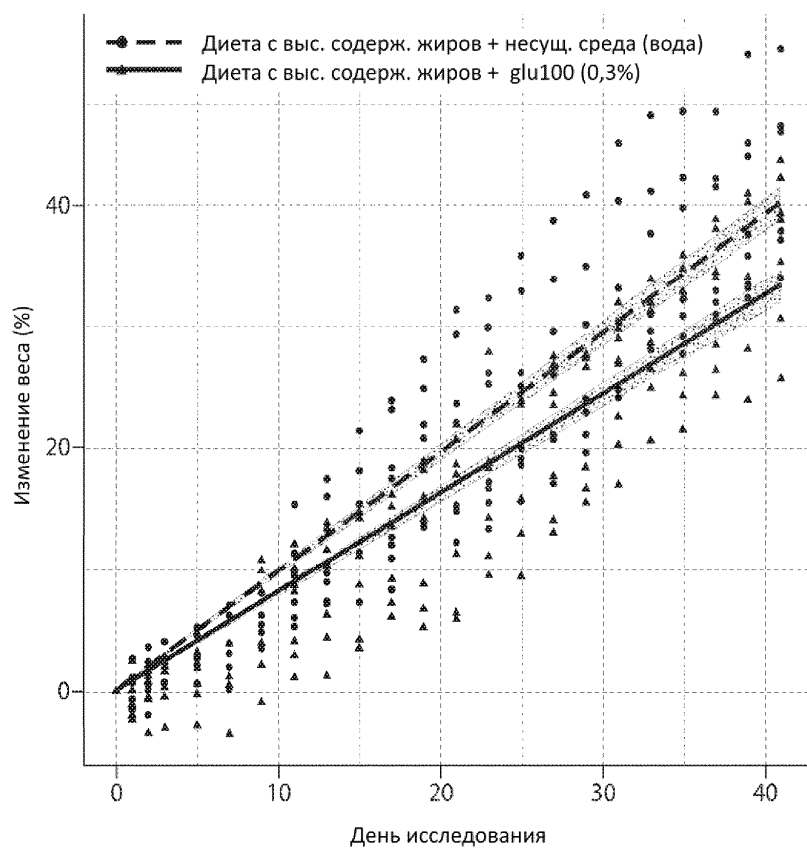
Фиг. 15



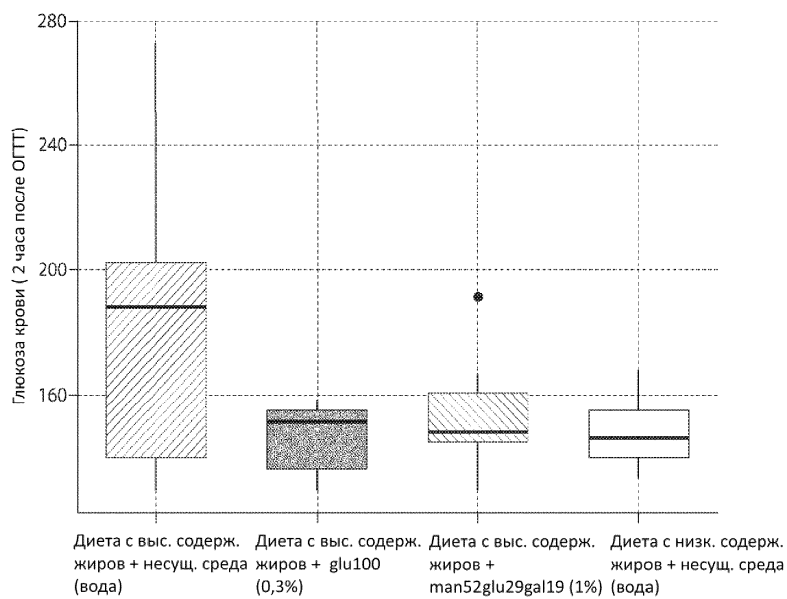
Фиг. 16



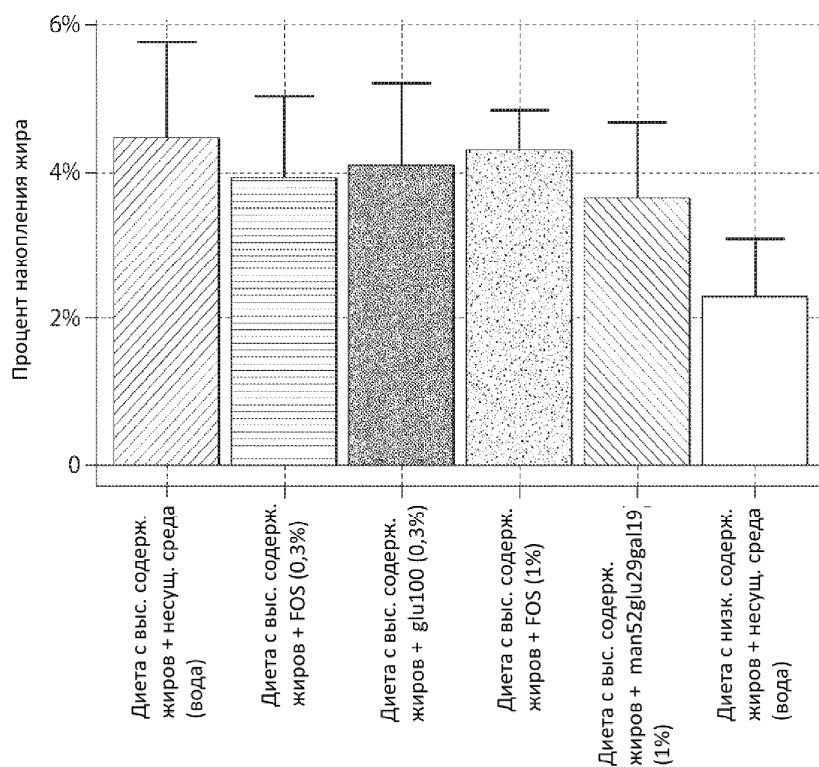
Фиг. 17а



Фиг. 17б



Фиг. 18



Фиг. 19

