

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392228 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.10.04

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.11

(51) Int. Cl. *A61K 35/747* (2015.01)  
*A61K 35/744* (2015.01)  
*A61P 31/14* (2006.01)  
*A61P 11/00* (2006.01)  
*A61P 11/14* (2006.01)  
*A61P 1/12* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)  
*A23L 33/135* (2016.01)

(54) ПРОБИОТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19

(31) PCT/EP2021/053539  
(32) 2021.02.12  
(33) EP  
(86) PCT/EP2022/053332  
(87) WO 2022/171779 2022.08.18  
(71) Заявитель:  
АБ-БИОТИКС, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:  
Эспадалер Масо Хорди, Салаверт  
Ларроса Ариана, Аудиверт Бруге  
Серхи, Боначера Сьерра Микель  
Анхель (ES)

(74) Представитель:  
Кузнецова С.А. (RU)

(57) Предложена пробиотическая композиция, содержащая *Lactobacillus plantarum* CECT 30292, *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *Pediococcus acidilactici* CECT 7483. Пробиотическая композиция используется для лечения, профилактики или облегчения COVID-19 и других инфекционных заболеваний. Она также используется для усиления иммунного ответа.

A1

202392228

202392228

A1

**НАЗВАНИЕ. ПРОБИОТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19****ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к областям медицины и микробиологии и, в частности, к пробиотической композиции для улучшения здоровья человека и животных, в частности применяемой для лечения заболевания COVID-19 и других инфекционных заболеваний и для повышения уровня антител, направленных на вирус SARSCoV-2.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

На дату подачи настоящей заявки на веб-странице [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04517422>) описывается дизайн клинического исследования с идентификатором NCT04517422 и названием «Эффективность *L. plantarum* и *P. acidilactici* у взрослых с SARS-CoV-2 и COVID-19». Данное описание было опубликовано 18 августа 2020 г. Спонсором и ответственной стороной (поставщиком информации) является AB-Biotics, S.A. Заявителем настоящей заявки также является AB-Biotics, S.A. Следовательно, обсуждаемая публикация на веб-странице может рассматриваться как так называемое «представленное изобретателем описание» (т. е. объект изобретения в публичном описании должен соотноситься с изобретателем, одним или более соизобретателями или другим лицом, которое получило сведения об объекте изобретения прямо или косвенно от изобретателя или соизобретателя).

В упомянутой выше публикации на веб-странице указано следующее (выделено нами):

«Рандомизированное контролируемое исследование (RCT) для оценки безопасности и эффективности *Lactobacillus plantarum* CECT 7481, *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *P. acidilactici* CECT 7483 при введении в одной дозе в день для снижения риска развития умеренного или тяжелого заболевания у субъектов с легким COVID-19».

Описание модели вмешательства: рандомизированные контролируемые

исследования. 300 субъектов (в возрасте 18–60 лет) будут распределены для получения комбинации *Lactobacillus plantarum* CECT 7481, *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *P. acidilactici* CECT 7483 (первая группа) или плацебо (вторая группа)».

«Экспериментальная часть: пробиотики

Активный исследуемый продукт содержит четыре штамма молочнокислых бактерий со статусом квалифицированной презумпции безопасности (QPS) Европейского агентства по безопасности продуктов питания (EFSA): *Lactobacillus plantarum* CECT 7481, *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *Pediococcus acidilactici* CECT 7483...».

Настоящая заявка относится к комбинации *Lactobacillus plantarum* CECT 30929 (в настоящем описании также упоминаемого как DSM 33765), *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *Pediococcus acidilactici* CECT 7483. Данная комбинация не описывается в вышеупомянутой публикации на дату подачи настоящей заявки на патент.

Что касается использования пробиотической композиции для лечения COVID-19, вышеупомянутая публикация не описывает каких-либо значимых экспериментальных данных, т. е. утверждения, касающиеся комбинации, могут рассматриваться просто как утверждения, которые не подкреплены какими-либо значимыми проверяемыми экспериментальными данными.

В WO2011092261A1 описывается пробиотическая композиция, образованная из *L. plantarum* CECT 7484, *L. plantarum* CECT 7485 и *P. acidilactici* CECT 7483, для лечения заболеваний или состояний желудочно-кишечного тракта, таких как воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника или вздутие живота и метеоризм.

Коронавирусное заболевание 19 (COVID-19) вызывается новым коронавирусом 2 (SARS-CoV-2, ранее известным как 2019-nCoV). Инфекция SARS-CoV-2 может быть бессимптомной или вызывать широкий спектр симптомов, варьирующихся от

слабых симптомов (например, легкой или умеренной одышки, высокой температуры и/или головной боли при отсутствии пневмонии или с легкой пневмонией) до тяжелых симптомов (например, тяжелой одышки, отношения парциального давления в артериальной крови к доле вдыхаемого кислорода  $< 300$  и/или тяжелой пневмонии), иногда до критических симптомов (например, респираторной недостаточности, септического шока и/или множественной дисфункции или недостаточности органов с летальным исходом). В частности, было неоднократно показано, что низкое насыщение кислородом в артериальной крови является фактором риска прогрессирования заболевания и последующего летального исхода независимо от других симптомов.

Следовательно, чтобы избежать прогрессирования до более тяжелого заболевания, крайне важно обеспечить быструю ремиссию у лиц с легкими формами, которые составляют большинство случаев. Тем не менее единое представление об эффективных способах лечения людей с легким или умеренным заболеванием отсутствует. Например, было обнаружено, что противовоспалительное действие кортикостероидов полезно при тяжелом COVID-19, но предполагается, что их действие может на самом деле ухудшать клинические исходы у пациентов с легким или умеренным заболеванием.

Ранее было показано, что штаммы *L. plantarum* оказывают полезное действие при респираторных инфекциях. [Chong et al. 2019]. Тем не менее было ясно показано, что интенсивность действия различных штаммов *L. plantarum* на иммунные клетки имеет широкий диапазон вариаций [Meijerink et al. 2010].

В недавно проведенном исследовании сообщалось, что лекарственная терапия (гидроксихлорохин, антибиотики и тоцилизумаб отдельно или в комбинации) в сочетании с пробиотической смесью сокращает общую продолжительность симптомов у пациентов, положительных по COVID-19, которые уже продемонстрировали умеренные или тяжелые симптомы и нуждались в госпитализации. Вместе с тем исследование не было рандомизировано и в данном исследовании не сообщалось о каком-либо влиянии на ремиссию заболевания,

снижение вирусной нагрузки или усиление ответа антител [D'Ettorre et al. 2020].

Штамм *P. acidilactici* K15 также недавно исследовался на предмет профилактики обычной простуды и гриппа у детей дошкольного возраста в сезон обычной простуды и гриппа. Тем не менее в исследовании сообщалось об ограниченных эффектах, поскольку пробиотик был не в состоянии сократить продолжительность повышенной температуры или частоты случаев гриппа во всей исследуемой популяции и позволял сократить только продолжительность повышенной температуры у тех субъектов, которые потребляли очень ограниченные количества ферментированных пищевых продуктов. Более того, данный пробиотик был не в состоянии повысить уровни антител, специфичных к гриппу [Hishiki et al. 2020].

Свойства пробиотика зависят от штамма даже среди бактерий одного и того же вида. Следовательно, важно найти такие штаммы, которые имеют более высокую эффективность с точки зрения всех требований в отношении пробиотиков. В частности, считается, что пробиотики редко демонстрируют иммунологические эффекты, а потому имеют высокую штаммоспецифичность [Hill et al. 2014].

В свете вышесказанного крайне важно найти новые методы лечения для субъектов, страдающих от легких или умеренных симптомов COVID-19, чтобы избежать прогрессирования до более тяжелого заболевания.

## **ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Приведенные в настоящем документе рабочие примеры содержат подробные экспериментальные данные, демонстрирующие значимое положительное воздействие при использовании описанных в настоящем документе пробиотических композиций для лечения COVID-19 у пациента-человека.

В примере 2 показано, что описанные в настоящем документе пробиотические композиции существенно увеличивают частоту полной ремиссии заболевания (в день 30 вмешательства). Кроме того, симптоматическая ремиссия достигается раньше у пациентов, получающих пробиотическую композицию. В частности,

пробиотическая композиция существенно снижает вирусную нагрузку в мазках из носоглотки во время вмешательства, уменьшавшуюся в среднем в 9 раз (т. е. почти 1 порядок) в день 30 вмешательства. Более того, пробиотическая композиция увеличивает продукцию антител, что приводит к существенно более высокой концентрации IgG и IgM. Наконец, продолжительность различных специфических симптомов COVID-19 (например, высокой температуры, кашля, головной боли, затрудненного дыхания, боли в теле, гипоксемии и диареи) существенно снижена у пациентов, получающих пробиотическую композицию.

В примере 3 показано, что, с одной стороны, концентрация интерферона-бета в сыворотке была существенно повышенной в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с плацебо как через 15 дней, так и через 30 дней вмешательства. Интерфероны типа I (интерферон-альфа и интерферон-бета) представляют собой белки со способностью ограничивать репликацию вируса в клетках позвоночных. Кроме данного прямого противовирусного эффекта интерфероны типа I также оказывают косвенный противовирусный эффект за счет стимулирования В-лимфоцитов (В-клеток) и натуральных киллерных лимфоцитов (NK-клеток). В-клетки продуцируют вирус-специфические антитела, которые предотвращают распространение вирусов посредством связывания с вирусными частицами.

Следовательно, интерфероны типа I обладают противовирусной активностью широкого спектра. Соответственно, нарушение ответа интерферонов типа I у людей ассоциировано с более тяжелым заболеванием при инфекции легких различными вирусами, в частности коронавирусами, такими как SARS-CoV2, SARS-CoV1 (SARS) и MERS-CoV (MERS), но также вирусом гриппа, риновирусом человека или респираторно-синцитиальным вирусом и даже нелегочными вирусными инфекциями, такими как вирус гепатита С или инфекция головного мозга (энцефалит), вызванная вирусом простого герпеса [Channarannavar et al. 2019; Naagmans et al. 2004].

Следовательно, специалисту в данной области будет очевидна полезность пробиотической композиции, предложенной в настоящем документе, способной

повышать интерферон-бета у пациентов, для лечения заболеваний, при которых могут быть полезны более высокие уровни интерферонов типа I, в частности вирусных инфекций, в частности респираторных вирусных инфекций, более конкретно легочных вирусных инфекций.

С другой стороны, в примере 3 также показано, что концентрация CXCL13 в сыворотке существенно снижалась с течением времени в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с плацебо. CXCL13 представляет собой белок, который индуцируется интерферонами типа I при вирусных инфекциях и способствует началу рекрутинга В-клеток к очагам инфекции. Тем не менее CXCL13 обладает выраженным провоспалительным эффектом и ассоциируется с поражением легких в широком спектре состояний, от COVID-19 до фиброза легких и хронического обструктивного заболевания легких. Следует отметить, что было показано, что блокада CXCL13 ограничивает такое поражение легких.

Вирусные респираторные патогены, в отношении которых известно, что они индуцируют CXCL13, включают в себя SARS-CoV2, грипп и респираторно-синцитиальный вирус. Следовательно, индукция интерферонов типа I при одновременном снижении уровней CXCL13 с течением времени может быть полезной при таких вирусных инфекциях, чтобы стимулировать противовирусный ответ и одновременно предотвратить поражение легочной ткани из-за чрезмерного воспаления, в частности при инфекции SARS-CoV2, вирусом гриппа или респираторно-синцитиальным вирусом. Данное повышение интерферона типа I при одновременном снижении CXCL13 представляет собой неожиданный эффект пробиотических композиций, предложенных в настоящем документе, поскольку известно, что CXCL13 индуцируется интерферонами типа I. Примечательно, что такое снижение CXCL13 не снижает активность В-клеток, о чем свидетельствуют повышенные уровни иммуноглобулинов IgG и IgM, показанные в примере 2. Кроме того, как показано в примере 3, данные результаты коррелируют с короткой продолжительностью клинических симптомов и клиренсом вируса.

В примере 4 показано, что *L. plantarum* СЕСТ 30292 приводит к существенной

сверхэкспрессии гена *Plantaricin G (plnG)* по сравнению с типом штамма WCFS1, а также по сравнению со всеми другими протестированными штаммами. *Plantaricin G* представляет собой бактериальный поверхностный белок, присутствующий в некоторых штаммах вида *Lactobacillus plantarum*. Этот белок специфически участвует в механизмах ингибирования роста конкурирующих патогенов. Важно отметить, что среди белков, по существу продуцируемых *L. plantarum*, *plnG*, в частности, распознается антигенпрезентирующими клетками (АРС), т. е. иммунными клетками, ответственными за поиск потенциальных патогенов. При активации АРС высвобождают интерфероны и другие иммунорегуляторные сигналы, тем самым способствуя активации других иммунных клеток, таких как антитело-продуцирующие В-клетки и натуральные киллерные (NK) клетки.

Как обсуждалось выше в отношении описания на веб-странице [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), утверждения в данном описании на веб-странице можно рассматривать просто как утверждения, которые не подкреплены какими-либо значимыми проверяемыми экспериментальными данными, — очевидно, что на основании данного описания на веб-странице невозможно/нет оснований полагать, что у пациентов-людей может быть достигнуто приведенное в настоящем документе релевантное положительное воздействие.

Опираясь на знания предшествующего уровня, специалист в данной области не мог бы с обоснованным ожиданием успеха предвидеть представленное в настоящем документе экспериментально описанное существенное положительное воздействие. Следует отметить, что клинические результаты намного превысили ожидаемые в рамках гипотезы исходного дизайна исследования. Таким образом, описанное в настоящем документе экспериментальное значимое положительное воздействие является неожиданным для специалиста в данной области и может рассматриваться как значительный вклад в данную область.

Соответственно, один аспект изобретения относится к пробиотической композиции, содержащей:

штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским



договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292, или его производный бактериальный штамм,

штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в CECT под номером доступа CECT 7484, или его производный бактериальный штамм,

штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в CECT под номером доступа CECT 7485, или его производный бактериальный штамм, и

штамм *Pediococcus acidilactici*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в CECT под номером доступа CECT 7483, или его производный бактериальный штамм,

причем каждый производный бактериальный штамм:

(a) имеет геном, на по меньшей мере 99,90% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и

(b) сохраняет по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойства выбирают из группы, состоящей из:

- повышения ремиссии COVID-19;
- сокращения продолжительности симптомов COVID-19;
- уменьшения вирусной нагрузки SARSCoV-2;
- стимуляции продукции антител к вирусу SARSCoV-2 (т. е. повышения уровней антител);
- повышения насыщения крови кислородом; и
- сокращения продолжительности низкого насыщения крови кислородом (т. е. гипоксемии).

Другой аспект относится к штамму *Lactobacillus plantarum*, депонированному в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292, или его производному бактериальному штамму, причем производный бактериальный штамм:

(a) имеет геном, на по меньшей мере 99,90% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и

(b) сохраняет по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного

штамма, причем свойства выбирают из группы, состоящей из:

- повышения ремиссии COVID-19;
- сокращения продолжительности симптомов COVID-19;
- уменьшения вирусной нагрузки SARSCoV-2;
- стимуляции продукции антител к вирусу SARSCoV-2 (т. е. повышения уровней антител);
- повышения насыщения крови кислородом; и
- сокращения продолжительности низкого насыщения крови кислородом (т. е. гипоксемии).

Изобретение также относится к пробиотической композиции, содержащей штамм *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 30292 или его производный бактериальный штамм с вышеупомянутыми характеристиками.

Другой аспект относится к пробиотической композиции, содержащей штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (СЕСТ) под номером доступа СЕСТ 30292, или его производный бактериальный штамм, причем производный бактериальный штамм:

- (a) имеет геном, на по меньшей мере 99,90% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и
- (b) сохраняет по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма по сравнению с контролем, причем свойства выбирают из группы, состоящей из:
  - стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; в частности, уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются;
  - повышения уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета повышаются на по меньшей мере 20%;
  - снижения уровней CXCL13;
  - содержания по меньшей мере такого же количества копий гена *plnG*, как и депонированный штамм; и
  - сверхэкспрессии plantaricin G, в частности сверхэкспрессии plantaricin G в по

меньшей мере четыре раза.

Другой аспект относится к штамму *Lactobacillus plantarum*, депонированному в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292.

Другой аспект относится к способу получения мутантного штамма для штамма *Lactobacillus plantarum*, депонированного под номером CECT 30292, включающему следующие этапы:

- (i): получение мутантов *L. plantarum* CECT 30292;
- (ii): анализ мутантов, полученных на этапе (i), и идентификация мутантного штамма, который сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма; и
- (iii) выделение штамма, идентифицированного на этапе (ii), для получения таким образом мутантного штамма *L. plantarum* CECT 30292, причем такой мутантный штамм сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма.

В настоящем документе «пробиотическая композиция» и «пробиотические композиции» относятся к различным композициям в соответствии с различными аспектами и вариантами осуществления настоящего изобретения.

Описанные в данном документе пробиотические композиции можно использовать для различных медицинских применений/назначений, которые подробно описаны в настоящем документе. Все назначения, описанные в настоящем документе, могут быть альтернативно сформулированы как назначение любой из композиций, описанных в настоящем документе, для производства фармацевтического продукта, ветеринарного продукта, лекарственного средства, пищевого продукта, пищевой добавки или диетического продукта для профилактики и/или лечения заболеваний, описанных в настоящем документе. Это можно также альтернативно сформулировать как способы лечения или профилактики заболеваний, описанных в настоящем документе, или их симптомов и/или осложнений у нуждающегося в

этом субъекта, включающие введение субъекту пробиотических композиций, описанных в настоящем документе.

Один из аспектов изобретения относится к пробиотической композиции для применения в качестве лекарственного средства (т. е. для применения при лечении или профилактике заболевания). Данный аспект можно альтернативно сформулировать как способ лечения с помощью пробиотиков, включающий введение нуждающемуся в этом лицу эффективного количества пробиотической композиции по настоящему изобретению. Используемый в настоящем документе термин «пробиотик» относится к живым микроорганизмам, которые при введении в соответствующих количествах оказывают полезный для здоровья эффект на организм-хозяина.

Один аспект изобретения относится к пробиотической композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения, профилактики или облегчения COVID-19 или его симптомов, осложнений и/или последствий. Данный аспект можно альтернативно сформулировать как способ лечения, профилактики или облегчения COVID-19 или его симптомов и/или осложнений у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту пробиотической композиции, описанной в настоящем документе.

Другой аспект относится к пробиотической композиции в соответствии с изобретением для применения в способе лечения, профилактики или облегчения инфекционного заболевания или его симптомов, осложнений и/или последствий. Данный аспект можно альтернативно сформулировать как способ лечения, профилактики или облегчения инфекционного заболевания или его симптомов и/или осложнений у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту пробиотической композиции, описанной в настоящем документе.

Другой аспект относится к пробиотической композиции в соответствии с изобретением для применения в усилении иммунного ответа (т. е. для применения в активации, стимуляции или усилении иммунного ответа или иммунитета).

Данный аспект можно альтернативно сформулировать как способ усиления иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту пробиотической композиции, описанной в настоящем документе.

Другой аспект относится к пищевой добавке, содержащей пробиотическую композицию, описанную в настоящем документе, и по меньшей мере один приемлемый эксципиент.

Другой аспект относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество пробиотической композиции, описанной в настоящем документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Другой аспект относится к пищевому продукту, содержащему пробиотическую композицию, описанную в настоящем документе, и по меньшей мере один пищевой ингредиент.

Термины, используемые в формуле изобретения и аспектах изобретения, в данном описании трактуются в их широком и общем значении. Тем не менее некоторые из них определены ниже в подробном описании изобретения.

Во всем описании и формуле изобретения слово «содержит» и его вариации не призваны исключать другие технические признаки, добавки, компоненты или этапы. Дополнительные цели, преимущества и признаки изобретения станут очевидны специалистам в данной области после анализа описания или могут быть изучены в рамках практического применения изобретения. Кроме того, настоящее изобретение охватывает все возможные комбинации конкретных и предпочтительных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Следующие примеры и графические материалы представлены в настоящем документе для иллюстративных целей и не призваны носить ограничительный характер в отношении настоящего изобретения.

## ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показан анализ дерева на основании ANI (средней идентичности нуклеотидов), в котором штамм *L. plantarum* DSM 33765 принадлежит к той же кладе, что и СЕСТ 7484 (ANI 99,71%), но более удаленно связан с референсным штаммом WCFS1, а также ATCC 202195 и СЕСТ 7485 (значения ANI 98,7–98,8%). Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 2** показаны результаты электрофореза в пульсирующем поле (PFGE), показывающие, что штамм *L. plantarum* DSM 33765 (два реплицированных гер1 и гер2) имеет воспроизводимый профиль PFGE, который отличается от профиля близкородственного штамма *L. plantarum* СЕСТ 7484. В частности, по сравнению с СЕСТ 7484 у штамма DSM 33765 отсутствуют полосы 97 кДа, но имеются дополнительные полосы от 48,5 до 32,1 кДа. Таким образом, несмотря на близкую связь, оба штамма продемонстрировали отличие друг от друга. Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 3** показана концентрация вирусной нагрузки SARS-CoV-2 в мазках из носоглотки в дни 0, 15 и 30 вмешательства для группы пробиотика и плацебо. В день 30 разница в среднем составляла 0,9 порядка, т. е. концентрация снизилась в среднем в 9 раз. Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 4** показана концентрация антител IgG и IgM к SARS-CoV-2 в дни 0, 15 и 30 вмешательства для группы пробиотика и плацебо. В день 30 у субъектов, получавших пробиотик, уровни IgG были в два раза выше, чем у субъекта в группе плацебо. Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 5** показана концентрация интерферона-бета 1а (INFb) в сыворотке в дни 0, 15 и 30 вмешательства для группы пробиотика и плацебо. В день 30 у субъектов, получавших пробиотик, уровни INFb были существенно повышенными по сравнению с группой плацебо. Более подробную информацию см. в рабочем

примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 6** показана концентрация CXCL13 в сыворотке в дни 0, 15 и 30 вмешательства для группы пробиотика и плацебо. Концентрация в группе, получавшей пробиотик, была существенно ниже как в день 15, так и в день 30 по сравнению с плацебо. Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

На **ФИГ. 7** показана кратность увеличения количества белка Plantaricin G (PlnG) штаммов *L. plantarum* СЕСТ 30292, СЕСТ 7483, СЕСТ 7484, СЕСТ 7485, СЕСТ 7481, 299v и WCFS1. *L. plantarum* СЕСТ 30292 приводит к существенной сверхэкспрессии гена *plnG* по сравнению с типом штамма WCFS1, а также по сравнению со всеми другими протестированными штаммами. Более подробную информацию см. в рабочем примере в настоящем документе.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### Определения

Производный от. Термины «производный от», «производный», «вариант», «мутант» (например, «мутантный штамм») или любой их грамматический вариант, используемые в настоящем документе, относятся к компоненту, который выделен из или получен с использованием установленной молекулы/вещества (например, штамма по настоящему описанию). Например, бактериальный штамм, который получен из первого бактериального штамма (например, депонированного штамма), может представлять собой штамм, который идентичен или по существу аналогичен первому штамму. В случае бактериальных штаммов производный штамм может быть получен посредством, например, природного мутагенеза, искусственного направленного мутагенеза или искусственного случайного мутагенеза.

Экципиент. Термины «эксципиент» и «носитель» используются взаимозаменяемо и относятся к инертному веществу, добавленному, например, к фармацевтической композиции, чтобы дополнительно облегчить введение компонента, например

бактериального штамма настоящего описания.

Идентичность. Используемый в настоящем документе термин «идентичность» относится к сохранению в целом мономерной последовательности между полимерными молекулами, например между молекулами ДНК и/или молекулами РНК. Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных классификаторов подразумевает, что последовательности на 100% идентичны (идентичность последовательности 100%). Описание двух последовательностей как, например, «на 70% идентичных» эквивалентно описанию их как имеющих, например, «идентичность последовательности 70%».

Расчет процента идентичности двух полимерных молекул, например полинуклеотидных последовательностей, может проводиться, например, посредством выравнивания двух последовательностей для целей оптимального сравнения (например, в одну или обе из первой и второй полинуклеотидных последовательностей для оптимального выравнивания могут вводиться пропуски). В определенных аспектах длина последовательности, выровненной для целей сравнения, составляет по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 90% или примерно 100% длины эталонной последовательности. Впоследствии в случае полинуклеотидов сопоставляются основания в соответствующих положениях оснований.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, которые можно определить с помощью математического алгоритма. Существуют приемлемые программы системы программного обеспечения для выравнивания обеих из белковых и нуклеотидных последовательностей. Одной из приемлемых программ для определения процента идентичности последовательности является b12seq, которая осуществляет сравнение между двумя последовательностями с использованием либо алгоритма BLASTN (применяемого для сравнения нуклеотидных



последовательностей), либо алгоритма BLASTP (применяемого для сравнения аминокислотных последовательностей). К другим приемлемым программам относятся, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, часть пакета программ биоинформатики EMBOSS. Выравнивание последовательностей можно проводить с использованием методов, известных в данной области, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE, MAUVE, MUMMER, RAST и т. п.

В определенных аспектах процент идентичности (% ID) первой последовательности относительно второй последовательности рассчитывается как  $\% \text{ ID} = 100 \times (Y/Z)$ , где Y представляет собой количество аминокислотных остатков или нуклеотидных оснований, считаемых идентичными совпадениями при выравнивании первой и второй последовательностей (например, при выравнивании посредством визуального осмотра или конкретной программы выравнивания последовательностей), а Z — общее количество остатков во второй последовательности. При сравнении полных или почти полных геномных последовательностей нуклеотидных оснований % ID иногда называют ANI (средней идентичностью нуклеотидов).

Предотвращать. Термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика» и их варианты, используемые в настоящем документе, относятся, например, к

- (i) частичной или полной задержке наступления заболевания, расстройства и/или состояния, описанных в настоящем документе;
- (ii) частичной или полной задержке наступления одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений, осложнений или последствий конкретного заболевания, расстройства и/или состояния, описанных в настоящем документе;
- (iii) частичной или полной задержке наступления одного или более симптомов, признаков или проявлений, осложнений или последствий конкретного заболевания, расстройства и/или состояния, описанных в настоящем документе;
- (iv) частичной или полной задержке прогрессирования конкретного заболевания, расстройства и/или состояния, описанных в настоящем документе; и/или

(v) снижению риска развития патологии, ассоциированной с заболеванием, расстройством и/или состоянием, описанными в настоящем документе.

Субъект. Термины «субъект», «пациент», «лицо» и «организм-хозяин» и их варианты используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту-млекопитающему, в частности к человеку, но также включая, без ограничений, людей, домашних животных (например, собак, кошек и т. п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т. п.) и лабораторных животных (например, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т. п.), для которых требуется диагностика, лечение или терапия. Способы, описанные в настоящем документе, применимы как к терапии человека, так и к ветеринарии.

Нуждающийся в этом субъект. Используемый в настоящем документе термин «нуждающийся в этом субъект» включает в себя субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которым будет полезно введение композиций по настоящему описанию.

Терапевтически эффективное количество. Используемый в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество композиции по настоящему описанию, которого достаточно для достижения желаемого терапевтического эффекта, фармакологического и/или физиологического эффекта у нуждающегося в этом субъекта.

Лечение. Термины «лечить», «лечение», «терапия», используемые в настоящем документе, относятся, например, к снижению тяжести заболевания или состояния, описанного в настоящем документе; облегчению или устранению одного или более симптомов, осложнений или последствий, ассоциированных с заболеванием, описанным в настоящем документе (например, коронавирусным заболеванием, таким как COVID-19); обеспечению полезных эффектов для субъекта с состоянием/заболеванием, описанным в настоящем документе, без необходимости излечения заболевания или состояния. Термин также включает в себя

профилактику или предотвращение заболевания или состояния или их симптомов, осложнений или последствий.

Термин относится к клиническому или нутритивному вмешательству для предотвращения заболевания или состояния; излечения заболевания или состояния; задержки наступления заболевания или состояния; задержки наступления симптома, осложнения или последствий; снижения серьезности заболевания или состояния; снижения серьезности симптома, осложнения или последствий; улучшения одного или более симптомов; улучшения одного или более осложнений; улучшения одного или более последствий; предотвращения одного или более симптомов; предотвращения одного или более осложнений; предотвращения одного или более последствий; задержки одного или более симптомов; задержки одного или более симптомов; задержки одного или более осложнений; задержки одного или более последствий; облегчения одного или более симптомов; облегчения одного или более осложнений; облегчения одного или более последствий; сокращения продолжительности одного или более симптомов; сокращения продолжительности одного или более осложнений; сокращения продолжительности одного или более последствий; сокращения частоты одного или более симптомов; сокращения частоты одного или более осложнений; сокращения частоты одного или более последствий; снижения тяжести одного или более симптомов; снижения тяжести одного или более осложнений; снижения тяжести одного или более последствий; улучшения качества жизни; повышения выживаемости; предотвращения рецидива заболевания или состояния; задержки рецидива заболевания или состояния; или любой их комбинации, например, относительно того, чего можно было бы ожидать при отсутствии лечения композицией по настоящему описанию.

Симптом. Используемый в настоящем документе термин «симптом» относится к субъективному или физическому признаку, показателю или свидетельству заболевания или физического нарушения, наблюдаемому субъектом. В целом термин относится к любому патологическому явлению или отклонению от нормы в структуре, функции или ощущении, испытываемому пациентом и указывающему

на заболевание. Симптомы ощущаются или отмечаются лицом, испытывающим симптом, но могут быть незаметны для других. В некоторых аспектах симптом может представлять собой слабый симптом, умеренный симптом или тяжелый симптом. Используемый в настоящем документе термин «слабый симптом» относится к симптому, который не является опасным для жизни и не требует, например, лечения в блоке интенсивной терапии (например, в ICU больницы). Используемый в настоящем документе термин «умеренный симптом» относится к симптому, который требует мониторинга, поскольку он может стать опасным для жизни и может потребовать, например, госпитализации. Используемый в настоящем документе термин «тяжелый симптом» относится к симптому, который является опасным для жизни и требует, например, лечения в блоке интенсивной терапии (например, в ICU больницы).

Осложнение. Используемый в настоящем документе термин «осложнение» относится к патологическому процессу или явлению, возникающему во время заболевания или состояния, которое не является существенной частью заболевания или состояния, при этом оно может быть результатом заболевания/состояния или независимых причин. Соответственно, термин «осложнение» относится к медицинским/клиническим проблемам, наблюдаемым у субъектов с диагностированным заболеванием или состоянием, описанным в настоящем документе, например COVID-19. В некоторых аспектах осложнение может быть временным. В некоторых аспектах осложнение может быть хроническим или постоянным. Используемый в настоящем документе термин «последствия» относится к продолжительному, хроническому или постоянному осложнению.

#### Пробиотическая композиция

Как обсуждалось ранее, один аспект изобретения относится к пробиотической композиции, содержащей штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный под номером доступа СЕСТ 30292, или полученный из него бактериальный штамм.

В одном варианте осуществления штамм *Lactobacillus plantarum* представляет

собой штамм, депонированный под номером доступа СЕСТ 30292.

В одном варианте осуществления пробиотическая композиция дополнительно содержит *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 7484, *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 7485 и *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 7483.

*Lactobacillus plantarum* СЕСТ 30292 (также упоминаемый в данном описании как DSM 33765) был выделен из человека (образец кала) и цикория (*cichorium intybus*). Штамм депонировали в Коллекцию микроорганизмов и клеточных культур Германии (DSMZ, GmbH) с адресом Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstr, 7B D-38124 Braunschweig, Germany). Депонированному штамму присвоены номер доступа DSM 33765 и дата депонирования 27 января 2021 г. (27.01.2021). Штамм также был депонирован в Коллекцию типовых культур Испании (СЕСТ, Parc Cientific de la Universitat de València, Carrer del Catedratic Agustin Escardino Benlloch, 9, 46980 Paterna, Valencia, Spain) 26 января 2021 г. (26.01.2021) с номером доступа СЕСТ 30292. Обе процедуры депонирования выполнялись на условиях Будапештского договора, депонированные штаммы являются жизнеспособными и сохраняют все свои признаки, связанные с их депонированием. Депонирование осуществлялось одним и тем же заявителем.

Конкретный вариант осуществления относится к штамму *Lactobacillus plantarum*, депонированному в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (СЕСТ) под номером доступа СЕСТ 30292. Изобретение также относится к пробиотической композиции, содержащей штамм *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 30292.

Штаммы *Lactobacillus plantarum* СЕСТ 7485 и СЕСТ 7484 и штамм *Pediococcus acidilactici* СЕСТ 7483 описаны и защищены в WO2011092261A1, содержание которой в полном объеме включено в настоящий документ путем ссылки. Эти три штамма были депонированы в Коллекцию типовых культур Испании (Parc Cientific de la Universitat de València, Carrer del Catedratic Agustin Escardino Benlloch, 9, 46980

Paterna, Valencia, Spain) 4 февраля 2009 г. (04.02.2009) тем же заявителем настоящей заявки.

Как будет очевидно специалисту в данной области, бактериальный штамм был выделен из его естественной среды, т. е. он не находится в своей естественной среде, поэтому не содержит других организмов и веществ, присутствующих в естественной среде.

*Lactopantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) был ранее известен как *Lactobacillus plantarum*, поэтому *Lactopantibacillus plantarum* и *Lactobacillus plantarum* используются в настоящем описании в равной степени.

Широкий спектр видов молочнокислых бактерий имеет продолжительную историю очевидно безопасного применения. Европейское агентство по безопасности продуктов питания разработало систему, присваивающую таксономическим единицам с подтвержденной продолжительной историей очевидно безопасного применения статус «Квалифицированная презумпция безопасности» (QPS). Штаммы *P. acidilactici* CECT 7483, *L. plantarum* CECT 7484 и *L. plantarum* CECT 7485 и *L. plantarum* DSM 33765 относятся к бактериальным видам, обладающим статусом QPS.

Появление и распространение резистентности к противомикробным средствам у бактерий создают угрозу для здоровья человека и животных и приводят к большим финансовым и социальным затратам. В результате анализа полной геномной последовательности было обнаружено, что новый штамм *L. plantarum* DSM 33765 не содержит генов резистентности к антибиотикам. Штаммы CECT 7483, CECT 7484 и CECT 7485 также не обладают резистентностью к антибиотикам. В целом эти результаты исключают риск потенциального переноса резистентности к антибиотикам на патогенные виды.

Очевидно, что при использовании депонированных штаммов в качестве исходного материала специалист в данной области может в рутинном порядке с помощью стандартных методик мутагенеза или повторного выделения (т. е.

рекультивирования) получать их дополнительные варианты или мутанты, которые сохраняют или усиливают описанные в настоящем документе соответствующие признаки и преимущества штаммов, образующих композицию изобретения. Таким образом, изобретение также относится к вариантам штаммов, описанных в настоящем документе. Используемый в настоящем документе термин «вариант» или «мутант» штамма относится к любому встречающемуся в природе или специфически разработанному штамму, полученному из депонированного референсного штамма, главным образом посредством мутации, который сохраняет по меньшей мере одно указанное выше свойство депонированного штамма.

В примере 5 показана вариабельность между геномами двух различных партий одного и того же штамма (DSM 33765). Было доказано, что два изолята одного и того же штамма могут отличаться на 0,01% по средней идентичности нуклеотидов (ANI). Поэтому штамм, демонстрирующий 99,99% ANI к геному соответствующего депонированного штамма, считается одним и тем же депонированным штаммом CECT 30292.

В конкретном варианте осуществления бактериальный штамм, полученный из депонированного штамма, имеет геном, на по меньшей мере 99,90% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; более конкретно % идентичности составляет 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98% или 99,99%. В частности, % идентичности составляет по меньшей мере 99,95%.

В конкретном варианте осуществления мутанты получают посредством использования технологии рекомбинантной ДНК. В другом варианте осуществления мутанты получают посредством случайного мутагенеза. В другом варианте осуществления мутант представляет собой встречающийся в природе вариант. В другом варианте осуществления мутант получают посредством рекультивирования депонированного штамма. Таким образом, другой аспект изобретения относится к способу получения штамма, полученного из депонированного штамма (в частности, *L. plantarum* CECT 30292), причем способ

включает в себя этапы, на которых используют депонированный штамм в качестве исходного материала и применяют мутагенез или рекультивирование, и при этом полученный вариант или мутант дополнительно сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма.

Это можно альтернативно сформулировать как способ получения мутантного штамма депонированного штамма (в частности, *L. plantarum* СЕСТ 30292), включающий следующие этапы:

- (i): получение мутантов *L. plantarum* СЕСТ 30292;
- (ii): анализ мутантов, полученных на этапе (i), и идентификация мутантного штамма, который сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма; и
- (iii) выделение штамма, идентифицированного на этапе (ii), для получения таким образом мутантного штамма *L. plantarum* СЕСТ 30292, причем такой мутантный штамм сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма.

В некоторых вариантах осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма по сравнению с контролем, причем свойства выбирают из группы, состоящей из:

- повышения ремиссии COVID-19;
- сокращения продолжительности симптомов COVID-19;
- уменьшения вирусной нагрузки SARSCoV-2;
- стимуляции продукции антител к вирусу SARSCoV-2; в частности, стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; более конкретно уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются;
- улучшения гипоксемии;
- сокращения продолжительности гипоксемии;
- повышения уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета повышаются на по меньшей мере 20%;
- снижения уровней CXCL13;



- содержания по меньшей мере такого же количества копий гена *plnG* или большего количества копий гена депонированного штамма; и
- сверхэкспрессии *plantaricin G*, в частности сверхэкспрессии *plantaricin G* в по меньшей мере четыре раза.

Под контролем понимается плацебо или контрольный штамм, который не обладает таким конкретным свойством.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство выбирают из группы, состоящей из: повышения ремиссии COVID-19; сокращения продолжительности симптомов COVID-19; уменьшения вирусной нагрузки SARSCoV-2; стимуляции продукции антител к вирусу SARSCoV-2; в частности, стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; более конкретно уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются; улучшения гипоксемии; и сокращения продолжительности гипоксемии. В конкретном варианте осуществления контролем для таких свойств является плацебо.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство заключается в стимуляции продукции антител к вирусу SARSCoV-2; в частности, стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; более конкретно уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются. В конкретном варианте осуществления контроль для такого свойства представляет собой плацебо.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство заключается в повышении уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета увеличиваются на по меньшей мере 20%. В конкретном варианте осуществления контроль для такого свойства представляет собой плацебо.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство заключается в снижении уровней CXCL13. В конкретном варианте осуществления контроль для такого свойства представляет собой плацебо.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство заключается в содержании по меньшей мере такого же количества копий гена *plnG* или большего количества копий гена депонированного штамма. В конкретном варианте осуществления контроль для такого свойства представляет собой штамм, который содержит только одну копию гена *plnG*, например штамм WCSF1.

В конкретном варианте осуществления полученный мутант сохраняет (или улучшает) по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма, причем свойство заключается в сверхэкспрессии plantaricin G, в частности сверхэкспрессии plantaricin G в по меньшей мере четыре раза. В конкретном варианте осуществления контроль для такого свойства представляет собой, например, штамм WCSF1.

Специалист в данной области будет в состоянии выбрать подходящий способ, который следует использовать для определения свойств полученного мутанта по сравнению с соответствующим депонированным штаммом. Примеры возможных способов оценки таких свойств приводятся в разделе примеров.

Пример 6 показывает, что штамм СЕСТ 30292 имеет дополнительные копии гена *plnG* в плазидах. Таким образом, специалист в данной области может попытаться увеличить количество копий плазмид, содержащих ген *plnG*, или вставить дополнительные копии гена *plnG* в бактериальную ДНК депонированных штаммов. Таким образом, в одном варианте осуществления его производный бактериальный штамм был получен из депонированного штамма посредством

вставки дополнительных копий гена *plnG* либо в бактериальную хромосому, либо в плазмиды.

Очевидно, что для специалиста в данной области получение мутантного штамма СЕСТ 30292 даже без знания геномной последовательности является рутинной процедурой.

Штаммы, формирующие часть композиции изобретения, могут быть в форме жизнеспособных клеток. Альтернативно штамм может быть в форме нежизнеспособных клеток. Это может включать в себя термически инактивированные микроорганизмы или микроорганизмы, инактивированные посредством изменения рН, ультразвуковой обработки, лучевого воздействия или высокого давления. Приготовление продукта упрощается при использовании нежизнеспособных клеток, поскольку клетки можно с легкостью включать в состав диетических, фармацевтических или пищевых продуктов и требования к хранению носят значительно менее ограничительный характер, чем в случае жизнеспособных клеток.

Штаммы, описанные в настоящем документе, получают посредством культивирования (или ферментации) бактерий в приемлемой искусственной среде и в приемлемых условиях. Под выражением «искусственная среда» для микроорганизмов понимается среда, содержащая природные вещества и необязательно синтетические химические вещества, такие как полимерный поливиниловый спирт, который может воспроизводить некоторые из функций сывороток. Часто используемыми приемлемыми искусственными средами являются бульоны питательных веществ, которые содержат элементы, включающие источник углерода (например, глюкозу), источник азота (например, аминокислоты и белки), воду и соли, необходимые для роста бактерий. Среда для выращивания может быть в жидкой форме или часто смешивается с агаром или другим гелеобразующим агентом для получения твердой среды. Штаммы могут культивироваться отдельно с образованием чистой культуры, или в виде смешанной культуры вместе с другими микроорганизмами, или посредством

культивирования бактерий различных типов отдельно с их последующим комбинированием в требуемых пропорциях. После культивирования и в зависимости от конечного состава штаммы могут использоваться в виде очищенных бактерий или, альтернативно, может использоваться бактериальная культура или суспензия клеток, либо в исходной форме, либо после соответствующей последующей обработки. В данном описании под термином «биомасса» понимается культура бактериальных штаммов, полученная после культивирования (или ферментации как термина, синонимичного культивированию).

В конкретном варианте осуществления штаммы ферментируют в искусственной среде и подвергают последующей обработке после ферментации, чтобы получить бактериальные клетки, и полученные бактериальные клетки находятся в жидкой среде или в твердой форме. В частности, последующую обработку выбирают из группы, состоящей из: сушки, заморозки, сушки сублимацией, сушки в псевдооживленном слое, распылительной сушки и охлаждения в жидкой среде, и более конкретно такой обработкой является сублимационная сушка.

Под термином «последующая обработка» в настоящем контексте следует понимать любую обработку биомассы для получения пригодных для хранения бактериальных клеток. Целью последующей обработки является снижение метаболической активности клеток в биомассе и, таким образом, замедление скорости разрушительных для клетки реакций. В результате последующей обработки бактериальные клетки могут быть в твердой или жидкой форме. В твердой форме сохраняемые бактериальные клетки могут представлять собой порошок или гранулы. В любом случае обе из твердых и жидких форм, содержащих бактериальные клетки, не присутствуют в природе, следовательно, имеют неприродное происхождение, поскольку они являются результатом искусственного (-ых) процесса (-ов) последующей обработки. В конкретных вариантах осуществления для процессов последующей обработки может потребоваться применение одного или более так называемых агентов последующей обработки. В контексте настоящего изобретения выражение «агент последующей

обработки» относится к соединению, применяемому для проведения описанных в настоящем документе процессов последующей обработки. Агенты последующей обработки включают в себя, без ограничений, дегидратирующие агенты, бактериостатические агенты, криопротекторные агенты (криопротекторы), инертные наполнители (также известные как лиопротекторы), материал-носитель (также известный как материал основы) и т. д., применяемые либо отдельно, либо в комбинации.

Существует два базовых подхода к снижению метаболической активности бактериальных клеток и, следовательно, два подхода к проведению последующей обработки. Первый представляет собой снижение скорости всех химических реакций, которое можно осуществить посредством снижения температуры посредством охлаждения или заморозки с использованием холодильников, механических морозильных камер и морозильных камер с жидким азотом. Альтернативно снижения скорости всех химических реакций можно достичь посредством добавления веществ, которые ингибируют рост бактериальных клеток, а именно — бактериостатического агента, сокращенно обозначаемого Bstatic.

Второй подход к проведению последующей обработки представляет собой удаление воды из биомассы — процесс, который может включать в себя сублимацию воды с использованием лиофилизатора. Приемлемые методики удаления воды из биомассы представляют собой сушку, сушку сублимацией, распылительную сушку или сушку в псевдооживленном слое. Методиками последующей обработки, приводящими к твердой форме, могут быть сушка, заморозка, сушка сублимацией, сушка в псевдооживленном слое или распылительная сушка.

Последующая обработка представляет собой, в частности, сублимационную сушку, которая включает в себя удаление воды из замороженных суспензий бактерий посредством сублимации при пониженном давлении. Данный процесс состоит из трех этапов: предварительная заморозка продукта с образованием

замороженной структуры, первичная сушка для удаления большей части воды и вторичная сушка для удаления связанной воды. Из-за объективной и ожидаемой вариативности промышленных процессов получения и выделения лиофилизированных бактериальных культур последние обычно содержат определенное количество инертного наполнителя, также известного как лиопротектор. Его роль заключается в стандартизации содержания живых пробиотических бактерий в продукте. В коммерчески доступных лиофилизированных культурах используются следующие инертные наполнители: сахароза, лактоза, трегалоза, глюкоза, мальтоза, мальтодекстрин, кукурузный крахмал, инулин и другие фармацевтически приемлемые негигроскопичные наполнители. Необязательно также используются другие стабилизирующие или защищающие от заморозки агенты, такие как аскорбиновая кислота, для образования вязкой пасты, которую подвергают сублимационной сушке. В любом случае полученный таким образом материал может быть измельчен до надлежащего размера, в том числе до порошка.

Альтернативно вместо сохранения биомассы в твердой форме можно также сохранять биомассу в жидкой форме. Это можно выполнить посредством добавления бактериостатического агента, как описано выше, для остановки роста бактерий в культуральной среде или с промежуточным этапом сбора клеток, ресуспендирования осадка в солевом растворе с бактериостатическим агентом и необязательно его охлаждением.

Иногда, как описано, например, выше, в процессе сушки в псевдооживленном слое, пробиотический препарат подвергают процессу иммобилизации и/или покрытия или инкапсуляции, чтобы улучшить срок хранения и/или функциональные возможности. В данной области известно несколько методик иммобилизации, покрытия или инкапсуляции бактерий.

Эффективное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) для каждого штамма в композиции будет определяться специалистом в данной области и будет зависеть от конечного состава. Термин «колониеобразующая единица» (КОЕ) определяется

как количество бактериальных клеток, получаемое по результатам микробиологических подсчетов в агаровых планшетах.

В некоторых вариантах осуществления, например в пищевых продуктах (например, йогуртах, конфетах), штамм (-ы) присутствует (-ют) в количестве от  $10^5$  КОЕ/г до  $10^{12}$  КОЕ/г, более конкретно от  $10^7$  КОЕ/г до  $10^{11}$  КОЕ/г. В некоторых вариантах осуществления, например в диетических добавках (например, таблетке), штамм (-ы) присутствует (-ют) в количестве в диапазоне от  $10^6$  до  $10^{12}$  КОЕ на дозу (например, таблетку), и в частности от  $10^8$  до  $10^{11}$  КОЕ на дозу.

В конкретном варианте осуществления пробиотическая композиция состоит из 50% штамма *L. plantarum* СЕСТ 30292 (например, 1 миллиард КОЕ) и 50% смеси *L. plantarum* СЕСТ 7485, СЕСТ 7484 и *P. acidilactici* СЕСТ 7483 (например, смесь, имеющая эквивалентное соотношение трех штаммов и в общей сложности 1 миллиард КОЕ).

Как известно специалисту в данной области, эффективное количество колониеобразующих единиц может также измеряться по эффективному количеству активных флуоресцентных единиц (АФЕ). Термин «активная флуоресцентная единица» (АФЕ) определяется как количество бактериальных клеток по результатам подсчета методом проточной цитометрии с окном возбуждения, специфическим для параметров флуоресценции предположительно живых клеток. Таким образом, специалист в данной области будет рассматривать упомянутые выше специфические количества колониеобразующих единиц (КОЕ) как примерно такое же количество активных флуоресцентных единиц (АФЕ).

В одном варианте осуществления пробиотическая композиция представляет собой твердую композицию.

В другом варианте осуществления пробиотическая композиция представляет собой твердую композицию, содержащую: лиофилизированную бактериальную биомассу, содержащую от примерно  $10^5$  КОЕ до примерно  $10^{12}$  КОЕ каждого штамма; и криопротектор.

В частности, пробиотическая композиция содержит по меньшей мере один криопротектор, который представляет собой не содержащий аллергенов криопротектор.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция содержит по меньшей мере один криопротектор, выбранный из группы, состоящей из: мальтозы, трегалозы, маннита (в частности, d-маннита), сахарозы, лактозы, декстрозы, аскорбата натрия или цитрата натрия.

Более конкретно композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из эмульсии, суспензии, геля, пасты, гранул, порошка и камеди. В частности, носитель представляет собой не содержащий аллергенов носитель.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция содержит один или более носителей, выбранных из группы, состоящей из: мальтодекстрина, целлюлозы, крахмалов различных типов, инулина, лактозы или носителя с пониженной активностью воды.

Медицинское применение пробиотической композиции — способ лечения, профилактики или облегчения COVID-19 или его симптомов, осложнений и/или последствий

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции приводит к лечению, профилактике или облегчению по меньшей мере одного симптома COVID-19, выбранного из группы, состоящей из:

- повышенной температуры;
- кашля, в частности сухого кашля;
- головной боли;
- затрудненного дыхания;
- боли в теле, в частности мышечной боли;
- низкого насыщения крови кислородом (гипоксемии), в частности насыщения кислородом SaO<sub>2</sub> или SpO<sub>2</sub> < 92%; и



- диареи.

Как известно специалисту в данной области, SaO<sub>2</sub> является альтернативным показателем насыщения крови кислородом, который относится к насыщению кислородом, измеренному в артериях, а последнее — к насыщению кислородом, измеренному посредством пульсоксиметрии. Показатели SaO<sub>2</sub>, эквивалентные показателям SpO<sub>2</sub>, могут использоваться в настоящем описании в равной мере.

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции приводит к по меньшей мере одному исходу (т. е. эффекту), выбранному из группы, состоящей из:

- ремиссии COVID-19;
- сокращения продолжительности симптомов COVID-19;
- снижения вирусной нагрузки SARS-CoV-2;
- стимуляции продукции антител к вирусу SARS-CoV-2 (т. е. повышения уровней антител); в частности, стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; более конкретно уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются;
- улучшения насыщения крови кислородом (гипоксемии); и
- сокращения продолжительности низкого насыщения крови кислородом (т. е. гипоксемии).

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции приводит к по меньшей мере одному исходу (т. е. эффекту), выбранному из группы, состоящей из:

- повышения уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета повышаются на 20%; и
- снижения уровней CXCL13.

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции субъекту может позволить избежать госпитализации или снизить время госпитализации, избежать попадания в ICU (т. е. исключить потребность в лечении в ICU), отсрочить необходимость лечения в ICU, снизить (сократить) время

лечения в ICU, снизить уровень смертности пациентов, повысить уровень выживаемости пациентов, снизить вероятность смерти пациентов, повысить вероятность выживания пациентов, снизить риск смерти пациентов, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного симптома, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного осложнения, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного последствия, сократить продолжительность по меньшей мере одного симптома, сократить продолжительность по меньшей мере одного осложнения, сократить продолжительность по меньшей мере одного последствия или любую их комбинацию. Соответственно, в настоящем описании предложены способы избежать или сократить госпитализацию, снизить (сократить) время лечения в ICU, отсрочить необходимость лечения в ICU, избежать попадания в ICU (т. е. исключить потребность в лечении в ICU), снизить уровень смертности пациентов, повысить уровень выживаемости пациентов, снизить вероятность смерти пациентов, повысить вероятность выживания пациентов, снизить риск смерти пациентов, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного симптома, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного осложнения, уменьшить степень тяжести по меньшей мере одного последствия, сократить продолжительность по меньшей мере одного симптома, сократить продолжительность по меньшей мере одного осложнения, сократить продолжительность по меньшей мере одного последствия или любую их комбинацию у субъекта и включено введение субъекту пробиотической композиции.

Медицинское применение пробиотической композиции — способ лечения, профилактики или облегчения инфекционного заболевания или его симптомов, осложнений и/или последствий

Как описано в настоящем документе, пробиотическая композиция обладает высокой эффективностью в индуцировании ремиссии пациентов с COVID-19, а также сокращении продолжительности симптомов (например, затрудненного дыхания, гипоксемии, диареи) и увеличении вирус-специфических антител. Более того, композиция продемонстрировала существенный благоприятный эффект в

отношении сокращения продолжительности низкого насыщения крови кислородом (гипоксемии).

Соответственно, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция, вероятно, будет оказывать существенное положительное воздействие при других инфекционных заболеваниях. В частности, пробиотическая композиция будет оказывать существенное положительное воздействие при других инфекционных заболеваниях, характеризующихся присутствием одного или более из вышеупомянутых респираторных и/или желудочно-кишечных симптомов.

В частности, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция будет оказывать существенное положительное воздействие при лечении других вирусных респираторных инфекций с затрудненным дыханием и гипоксемией (в частности, SpO<sub>2</sub> ниже 92%), например SARS, MERS, аденовируса 55 человека, гриппа типа А, в частности H1N1, или новых появляющихся вирусов.

В частности, гипоксемия возникает при респираторном инфекционном заболевании, связанном с вирусными бронхиолитическими инфекциями легких у младенцев и детей. Вирусный бронхиолит чаще всего вызван респираторно-синцитиальным вирусом, но также может вызываться риновирусом, аденовирусом, пневмовирусом, бокавирусом человека, вирусом гриппа или вирусом парагриппа. Часто сообщается об одновременном бронхиолите, вызванном более чем одним вирусом, у одного и того же субъекта. Гипоксемия также была отнесена к факторам риска смерти от вирусного гриппа. Описанная в настоящем документе пробиотическая композиция обладает высокой эффективностью в сокращении симптомов, связанных с инфекциями дыхательных путей. В частности, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция, вероятно, будет оказывать существенное положительное воздействие при лечении других респираторных инфекций (например, вирусных), приводящих к затруднению дыхания или

гипоксемии (в частности,  $SaO_2$  или  $SpO_2 < 92\%$ ), например тяжелого гриппа или вирусного бронхолита. В частности, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция, вероятно, будет оказывать существенное положительное воздействие при лечении низкого насыщения крови кислородом (в частности,  $SpO_2$  ниже 92%).

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание вызвано бактериальной, вирусной, паразитарной и/или грибковой инфекцией.

В конкретном варианте осуществления инфекционное заболевание вызвано вирусной инфекцией. Более конкретно вирусная инфекция выбрана из группы, состоящей из аденовируса, вирусного гепатита (в частности, вируса гепатита С), вирусного энцефалита (в частности, энцефалита, вызванного вирусом простого герпеса), бокавируса человека, риновируса человека, вируса гриппа, в частности вируса гриппа типа А (в частности, H1N1 и его вариантов), вируса парагриппа, пневмовируса, коронавируса, в частности бета-коронавирусов (более конкретно SARS-CoV1, SARS-CoV2 или MERS-CoV), респираторно-синцитиального вируса, риновируса и новых или появляющихся вирусов. Более конкретно вирусная инфекция представляет собой коронавирус, грипп или респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию.

В конкретном варианте осуществления вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию. Коронавирусы представляют собой большие вирусы в оболочке с одноцепочечной РНК, обнаруживаемые у людей и других млекопитающих. Коронавирусы (CoV) индуцируют острые и хронические заболевания. Коронавирусы вызывают респираторное, желудочно-кишечное и неврологическое заболевание. Существует 7 известных коронавирусов, вызывающих заболевание у человека: с одной стороны, 229E, OC43, NL63 и HKU1, как правило, вызывают симптомы обычной простуды, которые не так просто отличить от симптомов, вызванных другими респираторными вирусами, и без затрудненного дыхания, и без осложнений у субъектов с нарушениями

иммунитета. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления коронавируса представляет собой, например, 229E, OC43, NL63 и HKU1 или их мутанты.

С другой стороны, SARS-CoV-1, MERS-CoV и SARS-CoV-2 (все три относятся к подгруппе бета-коронавирусов) могут вызывать более тяжелое заболевание, варьирующееся от одышки (затрудненного дыхания) и низкого насыщения крови кислородом (гипоксемии) до летального исхода. В частности, SARS-CoV-2 является третьим коронавирусом, который вызывал тяжелое заболевание у людей, распространившееся по всему миру, за последние 2 десятилетия. Данными тремя типами CoV являются CoV-ассоциированный тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2) и ближневосточный респираторный синдром, ассоциированный с CoV (MERS-CoV).

В конкретном варианте осуществления коронавируса представляет собой бета-коронавирус.

В конкретном варианте осуществления коронавируса представляет собой вирус SARS-CoV-2, вирус SARS-CoV-1 или вирус MERS-CoV.

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана вирусом SARS (тяжелого острого респираторного синдрома) или SARS-CoV-1, вирусом, идентифицированным в 2003 г. SARS был впервые зарегистрирован в Азии в феврале 2003 г. Прежде чем удалось ограничить глобальную вспышку SARS в 2003 г., болезнь распространилась на более чем два десятка стран в Северной Америке, Южной Америке, Европе и Азии. С 2004 г. не сообщалось о каких-либо известных случаях SARS где-либо в мире. В некоторых аспектах коронавирусная инфекция вызвана вирусом MERS (ближневосточного респираторного синдрома) или MERS-CoV. MERS представляет собой вирусное респираторное заболевание, которое является новым для человека. Заболевание было впервые зарегистрировано в 2012 г. в Саудовской Аравии и с тех пор распространилось на несколько других стран, включая США. У большинства людей, инфицированных MERS-CoV, развилось тяжелое респираторное заболевание, включая повышенную

температуру, кашель и затрудненное дыхание.

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция вызвана SARS-CoV-2. Используемые в настоящем документе термины «SARS-CoV-2», «вирус SARS-CoV-2» и «вирус COVID-19» применяются взаимозаменяемо для обозначения коронавируса, вызывающего COVID-19 (коронавирусное заболевание 2019 г.). Используемый в настоящем документе термин «COVID-19» относится к вирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. COVID-19 представляет собой новое инфекционное заболевание, вызванное коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2). Заболевание COVID-19 впервые было описано 1 декабря 2019 г. и за несколько недель превратилось в пандемию. Исследования показывают, что SARS-CoV-2 индуцирует цитокиновый шторм, который ассоциируется с тяжестью заболевания COVID-19 и его прогнозом. У пациентов с COVID-19 могут развиваться слабые симптомы (местные симптомы в верхних дыхательных путях с повышенной температурой, мышечной болью и т. д.), умеренные (легкая пневмония) или тяжелые, включая тяжелую пневмонию, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), сепсис и септический шок. Тем не менее несмотря на то, что у большинства субъектов, инфицированных SARS-CoV-2, может отсутствовать какое-либо заболевание или может развиваться легкое заболевание, инфекция SARS-CoV-2 не является лишь обычной простудой.

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция может быть вызвана другими вирусами, такими как, например, аденовирус 55 человека, вирус гриппа (например, гриппа типа А, в частности H1N1) или респираторно-синцитиальный вирус.

В одном варианте осуществления инфекционное заболевание приводит к респираторному заболеванию (или индуцирует его).

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание характеризуется затрудненным дыханием.

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание

характеризуется гипоксемией (в частности,  $SaO_2$  или  $SpO_2$  ниже 92%).

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание поражает верхние дыхательные пути.

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание поражает нижние дыхательные пути (т. е. легкие, альвеолы).

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание представляет собой пневмонию, в частности легкую или тяжелую пневмонию.

В конкретном варианте осуществления респираторное заболевание представляет собой ARDS.

Используемые в настоящем документе термины «острый респираторный дистресс-синдром» и «ARDS» относятся к заболеванию или состоянию легких, при котором инфекция (например, вирусная инфекция) или травма легких приводит к воспалению легких, накоплению жидкости в альвеолярных воздушных мешочках, низкому содержанию кислорода в крови и респираторному расстройству. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен способ лечения ARDS, включающий введение пробиотической композиции по настоящему изобретению.

ARDS представляет собой угрожающее жизни состояние, и тяжелое поражение наблюдается на большей части или всей площади обоих легких. ARDS представляет собой быстрое развитие прогрессирующего нарушения функции легких, особенно в отношении способности поглощать кислород, как правило, ассоциированное с нарушением функции других органов. ARDS характеризуется диффузным легочным микрососудистым поражением, приводящим к повышенной проницаемости и, таким образом, некардиогенному отеку легких. Основным отклонением при ARDS является разрушение нормальной альвеолярно-капиллярной мембраны. Альтернативные термины, которые часто используются для обозначения ARDS, включают в себя, помимо прочих, болезнь гиалиновых

мембран, синдром острой дыхательной недостаточности у взрослых, застойный ателектаз, геморрагический легочный синдром, дананговское легкое, синдром жесткого легкого, инфаркт легкого, синдром белого легкого и отек легких.

В некоторых вариантах осуществления считается, что пациент страдает от ARDS, если присутствуют следующие симптомы:

- 1) Клиническое свидетельство респираторного расстройства.
- 2) Радиография грудной клетки, выявляющая диффузное двустороннее снижение прозрачности легочной ткани (отек легких).
- 3) Гипоксемия, которую не удается скорректировать подачей кислорода.
- 4) Гемодинамическое свидетельство окклюзии легочной артерии (заклинивающее давление < 18 мм рт. ст.).
- 5) Торакальная статическая эластичность менее 40 мл/см воды.

В некоторых вариантах осуществления причиной ARDS является, например, тяжелая распространенная инфекция (сепсис); тяжелое снижение артериального давления (шок); пневмония; аспирация (ингаляция) пищи в легкие; травмирование легких из-за вдыхания высоких концентраций кислорода; легочная эмболия; травма грудной клетки; ожоги; передозировка лекарственного средства; или рассеянная внутрисосудистая коагуляция.

В некоторых вариантах осуществления последствия отека легких у пациентов с ARDS включают в себя уменьшение объема легких, эластичности и крупные внутрилегочные шунты (кровь, проходящую через невентилируемые сегменты легкого). Уменьшение объема легких (остаточный объем) способствует ненадлежащей вентиляции/перфузии. Снижение эластичности легких вызывается повышенным возвратным давлением легкого в отечном легком, что клинически увеличивает нагрузку при дыхании и приводит к усталости дыхательных мышц. ARDS влияет на сосудистую систему легких. Легочная гипертензия, не связанная с гипоксемией, очень часто встречается у пациентов с ARDS. Легочная гипертензия вызвана увеличением резистентности легочных сосудов (PVR) в от трех до пяти раз и ассоциируется с увеличением нагрузки правого желудочка.



Распространенные симптомы ARDS включают в себя одышку, гипервентиляцию, сухой кашель, дискомфорт в грудном пространстве и возбуждение. В некоторых аспектах у пациента наблюдается умеренная или тяжелая дыхательная недостаточность и может присутствовать цианоз. В некоторых аспектах при обследовании легких обнаруживаются крупнопузырчатые хрипы и звуки бронхиального дыхания. В некоторых аспектах пациенту требуется вспомогательная искусственная вентиляция легких.

SARS-CoV-2 может также иметь желудочно-кишечные проявления из-за микровоспаления, поражения сосудов и дисбиоза желудочно-кишечного тракта. В результате от 9% до 34% пациентов с COVID-19 страдают диареей. Как обсуждалось в настоящем документе, пробиотическая композиция изобретения существенно сокращает продолжительность диареи у пациентов с COVID-19. Средняя продолжительность диареи у пациентов, получающих пробиотическую композицию, составляла менее половины средней продолжительности в группе плацебо. Соответственно, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция будет иметь существенное положительное воздействие с точки зрения продолжительности желудочно-кишечных симптомов, таких как диарея, вызванных заболеваниями и инфекциями, отличными от COVID-19.

Соответственно, в одном варианте осуществления инфекционное заболевание приводит к желудочно-кишечному заболеванию (или индуцирует его).

В одном варианте осуществления желудочно-кишечное заболевание характеризуется микровоспалением, поражением сосудов и/или дисбиозом желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах осуществления в отношении инфекционных заболеваний и развивающихся в результате респираторных и/или желудочно-кишечных заболеваний введение пробиотической композиции приводит к лечению, профилактике или облегчению по меньшей мере одного симптома, выбранного из

группы, состоящей из:

- повышенной температуры;
- кашля, в частности сухого кашля;
- головной боли;
- затрудненного дыхания;
- боли в теле, в частности мышечной боли;
- низкого насыщения крови кислородом (гипоксемии), в частности насыщения кислородом  $SaO_2$  или  $SpO_2 < 92\%$ ; и
- диареи.

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции приводит к по меньшей мере одному исходу (т. е. эффекту), выбранному из группы, состоящей из:

- ремиссии инфекционного заболевания;
- сокращения продолжительности симптомов;
- снижения вирусной нагрузки;
- стимуляции продукции антител (т. е. повышения уровней антител); в частности, стимуляции продукции антител IgG и IgM; более конкретно уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются;
- улучшения насыщения крови кислородом (гипоксемии); и
- сокращения продолжительности низкого насыщения крови кислородом (т. е. гипоксемии).

В некоторых вариантах осуществления введение пробиотической композиции приводит к по меньшей мере одному исходу (т. е. эффекту), выбранному из группы, состоящей из:

- повышения уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета повышаются на 20%; и
- снижения уровней CXCL13.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании предложен способ выбора субъекта с заболеванием или состоянием, описанным в настоящем

документе (например, COVID-19), для лечения с применением пробиотической композиции в соответствии с изобретением, причем способ включает определение наличия биомаркера, выбранного из группы, состоящей из лимфопении, нейтрофилии, активации коагуляции (на что указывает, например, увеличение показателей D-димера), острого поражения почек (на что указывают, например, повышенные уровни мочевины в крови и креатинина), повышенных уровней IL-6, повышения сердечного тропонина I в плазме, повышения лактатдегидрогеназы в плазме, повышения ферритина в плазме, повышенных уровней IL-10, повышенных уровней TNF $\alpha$ , пониженных уровней CD4<sup>+</sup> Т-клеток, пониженных уровней CD8<sup>+</sup> Т-клеток, лейкоцитоза, повышения уровней прокальцитонина, снижения экспрессии IFN $\gamma$  в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, повышения уровней цитокина, продуцируемого макрофагами с высокой воспалительной активностью, или любой их комбинации, при этом наличие биомаркера указывало, что субъект может получать лечение пробиотической композицией, описанной в настоящем документе.

Медицинское применение пробиотической композиции — усиление иммунного ответа

Защита от COVID-19 опосредована в значительной степени иммунным ответом, направленным против спайкового (S)-белка SARS-CoV-2. S-белок отвечает за связывание вируса с клеткой и является мишенью вирус-нейтрализующих антител. Функциональные нейтрализующие антитела, специфичные к SARS-CoV-2, которые продуцируются после инфицирования, вакцинации или обоих (антиспайковый гликопротеин и анти-RBD), считаются важными для нейтрализации вируса и клиренса вируса и количественно определяются с помощью анализов нейтрализации *in vitro*. Таким образом, стимуляция продукции антител, специфичных к SARS-CoV-2, представляет большой интерес для достижения долгосрочного иммунитета, сформированного обеими из первичной инфекции и/или вакцины. В частности, было показано, что антитела типа IgA преобладают в иммунном ответе на SARS-CoV-2 в течение первых дней инфекции, но быстро исчезают после 3-й недели инфекции, в то время как частота

положительной реакции на антитела типа IgG заметно возрастает.

Как обсуждается в настоящем документе, пробиотическая композиция изобретения усиливает иммунный ответ пациентов, приводящий к существенному увеличению концентрации антител типа IgG и IgM ( $p < 0,001$ ). Примечательно, что в день 30 вмешательства у субъектов, получавших пробиотическую композицию, уровни IgG были в два раза выше, чем у субъектов в группе плацебо. Соответственно, приведенные в настоящем документе экспериментальные данные обеспечивают свидетельство того, что пробиотическая композиция, вероятно, будет оказывать существенное положительное воздействие на стимуляцию иммунного ответа пациентов и, в частности, на продукцию антител, образующихся в результате первичной инфекции и/или вакцины.

Кроме того, упомянутое выше свидетельство показывает, что пробиотическая композиция также, вероятно, будет оказывать существенное положительное воздействие на стимуляцию иммунного ответа (например, повышение продукции антител), сформированного в результате других инфекций (например, бактериальных или вирусных инфекций) или вакцин, в частности в случае вирусных инфекций и/или вирусных вакцин.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция используется для усиления, ускорения и увеличения продолжительности ответа иммунной системы.

В конкретном варианте осуществления введение пробиотической композиции стимулирует продукцию антител (в частности, IgG и/или IgM).

В одном варианте осуществления ответ иммунной системы включает в себя продукцию антител (в частности, IgG и/или IgM), в частности, уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются.

В других вариантах осуществления пробиотическая композиция используется в качестве адъюванта, иммуностимулятора, усилителя иммунного ответа или

иммуномодулятора.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция, описанная в настоящем документе, может вводиться в комбинации с другими терапевтическими и/или профилактическими лекарственными средствами (например, антикоагулянтами, противовоспалительными средствами или регуляторами артериального давления). Пробиотическая композиция и другое лекарственное средство могут быть подобраны по составу для отдельного, последовательного, одновременного введения или в дополнение.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция используется одновременно с другими лекарственными средствами, применяемыми для респираторных инфекций, в частности респираторных инфекций вирусного происхождения, вызывающих гипоксемию, в частности COVID-19, такими как, без ограничений, кортикостероиды (например, дексаметазон, преднизон, метилпреднизолон или гидрокортизон), жаропонижающие средства (например, ацетаминофен или нестероидные противовоспалительные средства, такие как ибупрофен и аналогичные соединения), вирус-специфические нейтрализующие антитела (например, REGN-COV2), вакцины (например, РНК-вакцины, вакцины с использованием рекомбинантных химерных вирусов или пептидные вакцины), молекулы с противовирусной активностью (например, интерферон, плитидепсин, ремдесивир, осельтамивир и аналогичные соединения) или блокирование передачи сигналов цитокинов (например, тоцилизумаб).

В определенных вариантах осуществления пробиотическую композицию вводят в комбинации с вакциной. В одном варианте осуществления пробиотическая композиция предназначена для одновременного применения в комбинации с вакциной.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическую композицию вводят в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством, например противовоспалительным кортикостероидом. К примерам кортикостероидов

относятся метилпреднизолон, флудрокортизон, гидрокортизон, преднизон, преднизолон, флунизолит, флутиказон, беклометазон, будесонид, циклесонид, мометазон и любая их комбинация. В одном варианте осуществления пробиотическая композиция предназначена для одновременного применения в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством.

В одном варианте осуществления пробиотическую композицию вводят в комбинации с жаропонижающим лекарственным средством.

### Продукты, содержащие пробиотические композиции

В некоторых вариантах осуществления бактериальные штаммы, описанные в настоящем документе, могут быть подобраны по составу для отдельного, последовательного, одновременного введения или в дополнение. Схемы и формы введения будут определяться специалистом в данной области. Введение бактериальных штаммов может осуществляться отдельно (с временным интервалом между введением первого бактериального штамма и второго бактериального штамма), последовательно (один за другим), совместно (одновременно) или в дополнение (вместе). Таким образом, их можно вводить в виде отдельных форм или как часть одной композиции. Если продукты вводят в виде отдельных дозированных форм, дозированные формы могут находиться в одних и тех же или разных контейнерах или, например, капсулах или таблетках. В конкретном варианте осуществления штаммы, описанные в настоящем документе, вводят в одной композиции, например таблетке.

Описанные в настоящем документе пробиотические композиции могут быть приготовлены в форме пищевых, фармацевтических или ветеринарных продуктов, в которых штаммы представляют собой единственные активные агенты или смешаны с одним или более другими активными агентами и/или смешаны с фармацевтическими или ветеринарными приемлемыми эксципиентами (в случае фармацевтического или ветеринарного продукта) или соответствующими добавками (в случае пищевого продукта). Предпочтительно дополнительным

активным агентом или агентами являются другие бактерии-пробиотики, которые не антагонистичны к штаммам, образующим композицию изобретения. В зависимости от состава штаммы могут быть добавлены в виде очищенных бактерий, в виде бактериальной культуры, в виде части бактериальной культуры, в виде бактериальной культуры, которая подверглась последующей обработке, и отдельно или вместе с приемлемыми носителями или ингредиентами. Также могут добавляться пребиотики, такие как фруктоолигосахариды (в частности, инулины), галактоолигосахариды, ксилоолигосахариды, арабиноксиланолигосахариды, пектины, бета-глюканы или частично гидролизованная гуаровая камедь.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция представлена в форме фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество пробиотической композиции и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

В конкретных вариантах осуществления состав композиций изобретения готовится в форме фармацевтических продуктов, в частности в форме пищевых добавок. Термин «фармацевтический продукт» в настоящем описании понимается в своем самом широком смысле, включая любую композицию, которая содержит активный ингредиент, в данном случае штаммы, описанные в настоящем документе, в частности в форме композиции вместе с фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Данный термин не ограничивается лекарственными средствами.

Термин «фармацевтически приемлемый» общепризнан в данной области и включает в себя соединения, материалы, композиции, носители, несущие среды и/или дозированные формы, которые в рамках обоснованной медицинской оценки являются приемлемыми для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения сообразно с разумным соотношением пользы/риска. Каждый носитель, эксципиент и т. д. должен также быть «приемлемым» в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами состава. Приемлемые носители, вспомогательные вещества и т. п.

можно найти в стандартных фармацевтических текстах. К некоторым не имеющим ограничительного характера примерам материалов, которые могут выступать в качестве фармацевтически приемлемых носителей, относятся сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетатцеллюлоза; порошковая трагакантовая камедь; солод; желатин; тальк; масло какао и свечные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

Экципиенты без ограничений выбирают из группы, состоящей из: наполнителей/разбавителей/объемообразующих агентов, связующих веществ, антиадгезивных веществ, разрыхлителей, покрытий, препятствующих слеживанию агентов, антиоксидантов, смазочных средств, подсластителей, ароматизаторов, красителей, поверхностно-активных веществ и других классов фармацевтических и ветеринарных приемлемых эксципиентов.

Наполнители без ограничений выбирают из группы, состоящей из: инулина, олигофруктозы, пектина, модифицированных пектинов, микрокристаллической целлюлозы, лактозы, крахмала, мальтодекстрина, сахарозы, глюкозы, фруктозы, маннита, ксилита, некристаллизующегося сорбита, карбоната кальция, дикальцийфосфата, других инертных неорганических и органических фармакологически приемлемых наполнителей и смесей этих веществ. В лекарственной форме пероральной суспензии наполнители или разбавители выбирают из группы, состоящей из: растительного масла, олеиновой кислоты, олеилового спирта, жидкого полиэтиленгликоля, других фармакологически



приемлемых инертных жидкостей или смесей этих веществ.

Связующие вещества используют в твердых дозированных формах, например, для связывания ингредиентов вместе в таблетке, чтобы обеспечить возможность формования таблеток и гранул с требуемой механической прочностью и придать объем таблеткам с низкой активной дозой. К связующим веществам в твердых дозированных формах, например таблетках, относятся: лактоза, сахароза, кукурузный (маисовый) крахмал, модифицированные крахмалы, микрокристаллическая целлюлоза, модифицированная целлюлоза (например, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и гидроксиэтилцеллюлоза), другие водорастворимые простые эфиры целлюлозы, поливинилпирролидон (ПВП), также известный как повидон, полиэтиленгликоль, сорбит, мальтит, ксилит и двухосновной фосфат кальция; другие приемлемые фармакологически приемлемые связующие вещества или смеси этих веществ.

Антиадгезивные вещества используют для снижения адгезии между порошком (гранулами) и поверхностью пресса и тем самым предотвращения прилипания к прессам таблеток. Они также используются, чтобы предотвратить слипание таблеток. Чаще всего используется стеарат магния.

В качестве разрыхлителей и суперразрыхлителей в твердых дозированных формах, таких как таблетки и капсулы, без ограничений используются следующие вещества: поперечно сшитый поливинилпирролидон, натриевая соль гликолята крахмала, натрийкарбоксиметилцеллюлоза, кальцийкарбоксиметилцеллюлоза и формальдегид-казеин, другой приемлемый фармакологически приемлемый разрыхлитель и суперразрыхлитель или их смеси.

Покрытия в случае твердых дозированных форм, таких как таблетки и гранулы для наполнения капсул, защищают ингредиенты от разрушения под действием влаги в воздухе, облегчают глотание больших таблеток с неприятным вкусом и/или в случае кишечнорастворимых покрытий делают возможным прохождение без разрушения через высококислотную среду желудочного сока (рН около 1) и

обеспечивают высвобождение в двенадцатиперстной кишке или подвздошной кишке (тонком кишечнике). Для большинства таблеток с покрытием используют пленочное покрытие из целлюлозного простого эфира гидроксипропилметилцеллюлозы (ГПМЦ). Иногда используют другие материалы для покрытия, например синтетические полимеры и сополимеры, такие как поливинилацетатфталат (PVAF); сополимеры метилакрилата и метакриловой кислоты; сополимеры метилметилакрилата и метакриловой кислоты; шеллак, зеин кукурузного белка или другие полисахариды; воски или воскоподобные вещества, такие как пчелиный воск, стеариновая кислота; высшие жирные спирты, такие как цетиловый или стеариловый спирт; твердый парафин; моностеарат глицерина; дистеарат глицерина или их комбинации. Капсулы покрывают желатином или гидроксипропилметилцеллюлозой.

Кишечнорастворимые покрытия контролируют скорость высвобождения лекарственного средства и определяют, в каком месте пищеварительного тракта будет высвободиться лекарственное средство. Материалы, используемые для кишечнорастворимых покрытий, включают в себя жирные кислоты, воски, шеллак, полимеры и растительные волокна и их смеси, также в комбинации с другими вышеупомянутыми покрытиями.

Антислеживающий агент представляет собой добавку, вводимую в порошкообразные или гранулированные материалы, чтобы предотвратить образование комков (слеживание) и облегчить упаковку, транспортировку и потребление. В качестве антислеживающих агентов в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы или порошки, используется следующее: стеарат магния, коллоидный диоксид кремния, тальк, другие фармакологически приемлемые антислеживающие агенты или их смеси.

Смазочные средства используются в твердых дозированных формах, в частности в таблетках и капсулах, для предотвращения слипания ингредиентов друг с другом и их прилипания к прессам для таблетирования или машине для наполнения капсул, а также в твердых капсулах. Наиболее часто используемыми смазочными

средствами в таблетках или твердых желатиновых капсулах являются используемые в качестве смазочных средств тальк или кремнезем и жиры, например овощной стеарин, стеарат магния или стеариновая кислота и их смеси.

Подсластители добавляют, чтобы сделать ингредиенты более приемлемыми на вкус, в особенности в твердых лекарственных формах, например жевательных таблетках, а также в жидких лекарственных формах, таких как сироп от кашля. Подсластители могут быть выбраны из искусственных, природных или синтетических или полусинтетических подсластителей; к не имеющим ограничительного характера примерам подсластителей относятся аспартам, ацесульфам калия, цикламат, сукралоза, сахарин, сахара или любая их смесь,

Ароматизаторы можно использовать для маскирования неприятных на вкус активных ингредиентов в любой дозированной форме. Вкусоароматические добавки могут быть природными (например, фруктовые экстракты) или искусственными. Например, для улучшения: (1) горького продукта может использоваться мята, вишня или анис; (2) соленого продукта может использоваться персик или абрикос или солодка; (3) кислого продукта — малина; и (4) чрезмерно сладкого продукта — ваниль.

За исключением вспомогательных веществ из класса эксципиентов состав из настоящего изобретения может содержать другие фармакологически активные или питательные вещества, включая, без ограничений, витамины, такие как витамин D (кальциферол), в фармацевтически приемлемой химической форме, соль или производные; минералы в форме фармацевтически и питательно приемлемой химической формы; и L-аминокислоты. Что касается приготовления составов настоящего изобретения, это находится в пределах объема знаний обычного специалиста в данной области и будет зависеть от конечной формы дозирования. Например, и без ограничений, если конечная дозированная форма представляет собой твердый состав для перорального применения, например таблетки, капсулы, порошок, гранулы, пероральную суспензию и т. д., способ приготовления твердых лекарственных форм состава включает в себя гомогенизацию: (1) активного (-ых)

ингредиента (-ов), содержащего (-их) по меньшей мере одну или более пробиотических бактерий изобретения после обработки в эффективном количестве; (2) с одним или более эксципиентами для образования гомогенной смеси, в которую, например, в соответствии с требованиями добавляется смазочное средство стеарат магния или другие смазочные средства с образованием конечной дозированной формы в виде порошка. Таким гомогенным порошком заполняют обычные желатиновые капсулы или, альтернативно, кишечнорастворимые капсулы. В случае таблеток их производят путем прямого прессования или гранулирования. В первом случае готовят гомогенную смесь активных ингредиентов и приемлемых эксципиентов, таких как безводная лактоза, некристаллизующийся сорбит и другие. Во втором случае таблетки обрабатывают для получения смеси в гранулированной форме. Гранулы получают посредством процесса гранулирования активных ингредиентов состава с приемлемыми наполнителями, связующими веществами, разрыхлителями и небольшим количеством очищенной воды. Такие приготовленные гранулы просеивают и высушивают до содержания воды < 1% масс./масс.

Что касается процесса приготовления жидких лекарственных форм (например, суспензии для перорального применения), он включает в себя гомогенизацию активного (-ых) ингредиента (-ов) состава, содержащего по меньшей мере одну или более пробиотических бактерий изобретения после обработки в эффективном количестве в инертном жидком разбавителе (наполнителе), таком как различные растительные масла, например подсолнечное, соевое или оливковое масло; олеиновая кислота; олеиловый спирт; жидкие полиэтиленгликоли, например PEG 200, PEG 400 или PEG 600; или другие инертные фармакологически приемлемые жидкости. Процесс дополнительно включает в себя обработку гомогенной смеси в рамках одного или более процессов, выбранных из группы, состоящей из: (1) стабилизации состава посредством добавления и гомогенизации стабилизаторов суспензии, таких как пчелиный воск, коллоидный диоксид кремния и т. д.; (2) подслащивания состава посредством добавления и гомогенизации подсластителя; (3) ароматизации состава посредством добавления и гомогенизации вкусоароматической добавки. Такие формы состава могут также содержать другие

эксципиенты или ингредиенты, обычно используемые в данной области.

Возможны различные формы или названия фармацевтического продукта в зависимости от порядка утверждения продукта, а также в зависимости от страны. Например, лекарственное средство представляет собой определенный фармацевтический продукт. Лечебное питание представляет собой другой определенный фармацевтический продукт. Термины «лечебное питание» или «продукт питания для специальных медицинских целей» используются в некоторых странах для обозначения пищевого продукта, специально разработанного и предназначенного для диетического лечения заболевания, предусматривающего особые потребности в питании, которые не могут быть соблюдены посредством только обычного рациона. Они определены в нормативных положениях, таких как поправки к Закону об орфанных лекарственных средствах 1988 г. Управления по надзору за качеством продуктов питания и медикаментов в Соединенных Штатах и Директива Европейской комиссии 1999/21/ЕС в Европе. Продукты лечебного питания отличаются от более широкой категории пищевых добавок и от традиционных пищевых продуктов, которые сопровождаются заявлениями о пользе для здоровья. Поэтому в конкретном варианте осуществления составы штаммов изобретения готовят в форме лечебного питания.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция представлена в форме диетической добавки, содержащей пробиотическую композицию и по меньшей мере один приемлемый эксципиент.

В частности, пробиотическая композиция представлена в форме капсул, таблеток, пилюль, саше или суспензии (например, в масле). В частности, масса капсулы, таблетки или пилюли составляет от примерно 350 мг до примерно 450 мг, более конкретно 400 мг. В частности, масса саше составляет от примерно 2 г до примерно 6 г.

В конкретном варианте осуществления пробиотическая композиция представлена

в форме растительной капсулы и содержит ГПМЦ.

Пищевая добавка, также известная как диетическая добавка или питательная добавка, рассматривается как другой конкретный фармацевтический продукт. Это препарат или продукт, предназначенный для дополнения рациона, приготовленный из соединений, обычно используемых в продуктах питания, обеспечивающих питательные или полезные ингредиенты, которые обычно не употребляются в нормальном рационе или могут не употребляться в достаточных количествах. В большинстве случаев пищевые добавки считаются пищевыми продуктами, но их относят к лекарственным средствам, лекарственным средствам природного происхождения или нутрицевтическим продуктам. В контексте настоящего изобретения пищевые добавки также включают в себя нутрицевтики. Пищевые добавки обычно продаются «безрецептурно», т. е. без назначения врача. Если пищевая добавка готовится в форме пилюли, капсулы, таблетки или порошка, она содержит эксципиенты, которые идентичны используемым в лекарственных средствах. Вместе с тем пищевая добавка также может быть в форме пищевого продукта, обогащенного некоторыми питательными веществами (например, батончика или йогурта).

Поэтому в конкретном варианте осуществления пробиотические композиции составляют в виде пищевой добавки или диетической добавки. Диетическую добавку можно вводить в чистом виде, можно смешивать с приемлемой питьевой жидкостью, такой как вода, йогурт, молоко или фруктовый сок, или можно смешивать с твердой или жидкой пищей. В данном контексте пищевая добавка может быть в форме таблеток или леденцов, пилюль, капсул, гранул, порошков, суспензий, саше, конфет, батончиков, сиропов и соответствующих форм введения, обычно в однократной форме.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция представлена в форме масляной суспензии, которую можно вводить отдельно или смешивать с жидкостью. Масляная суспензия содержит по меньшей мере одно пищевое масло, такое как оливковое масло, кукурузное масло, соевое масло, льняное масло,

подсолнечное масло или рисовое масло. Масло присутствует в количестве по меньшей мере 70% масс./масс. В конкретном варианте осуществления масляная суспензия также содержит по меньшей мере один эксципиент, который представляет собой эмульгатор, стабилизатор или антислеживающий агент, в количестве 0,1–15% масс./масс. К приемлемым агентам относятся диоксид кремния, силикагель, коллоидный кремнезем, осажденный кремнезем, тальк, силикат магния, лецитин, пектин, крахмал, модифицированные крахмалы, конжаковая камедь, ксантановая камедь, геллановая камедь, каррагинан, альгинат натрия, моно- или диглицериды жирных кислот, такие как моностеарат глицерина или моноолеат глицерина и сложные эфиры лимонной кислоты моно- или диглицеридов.

В частности, пробиотическая композиция представлена в форме пищевой добавки для младенцев в форме масляной суспензии. В конкретном варианте осуществления масляная суспензия содержит подсолнечное масло и коллоидный кремнезем, в частности 1% по массе, и бактериальные клетки.

В другом варианте осуществления масляная суспензия содержит подсолнечное масло и агент, выбранный из лецитина, моно- или диглицеридов жирных кислот, каррагинана и альгината натрия, и бактериальные клетки.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическая композиция представлена в форме пищевого продукта, содержащего пробиотическую композицию и по меньшей мере один пищевой ингредиент. В частности, пищевой продукт может представлять собой молочный продукт, молоко, йогурт, творог.

Композиции изобретения могут также включаться в различные пищевые продукты или пищевые композиции, такие как молочный продукт (йогурт, сыр, ферментированное молоко, сухое молоко, ферментированный продукт на основе молока, мороженое, ферментированный продукт на основе зерновых, порошок на основе молока), хлеб, батончики, спреды, бисквиты и зерновые, напиток, различные типы масла или соусы. Термин «пищевой продукт» используется в

настоящем документе в самом широком смысле, включая любой тип продукта, в любой форме представления, который может употребляться животным, за исключением фармацевтических и ветеринарных продуктов. Примерами других пищевых продуктов являются мясные продукты, шоколадные спреды, наполнители и глазировка, шоколад, кондитерское изделие, хлебобулочные изделия, соусы и супы, фруктовые соки и забеливатели кофе. Представляющими особый интерес пищевыми продуктами являются пищевые добавки и детские смеси. Пищевой продукт, в частности, содержит материал-носитель, такой как каша из овсяной муки, ферментированные пищевые продукты из молочной кислоты, резистентный крахмал, пищевые волокна, углеводы, белки и гликозилированные белки. В конкретном варианте осуществления штаммы изобретения инкапсулированы или имеют покрытие. В частности, молочные продукты могут быть либо животного, либо растительного происхождения.

В одном варианте осуществления пробиотическая композиция готовится в форме растительных капсул (например, с гидроксиметилпропилцеллюлозой, ГМПЦ), наполненных порошком, содержащим *L. plantarum* DSM 33765 (например, 1 миллиард лиофилизированных колониеобразующих единиц (КОЕ)) наряду с *L. plantarum* СЕСТ 7484, *L. plantarum* СЕСТ 7485 и *P. acidilactici* СЕСТ 7483 (например, 1 миллиард лиофилизированных КОЕ), наряду с носителем (например, мальтодекстрином, картофельным крахмалом, декстрозой).

В другом варианте осуществления пробиотическая композиция готовится в форме саше с солями алюминия, содержащего бактериальные штаммы (например, в тех же количествах, как и описанные выше), носитель (например, мальтодекстрин, декстроза, рисовое волокно, картофельный крахмал), подсластитель (например, сукралоза, сахарин натрия) и ароматизатор.

В другом варианте осуществления пробиотическая композиция представлена во флаконе, содержащем бактериальные штаммы (например, в тех же количествах, как и описанные выше) в суспензии в подсолнечном масле, для введения в виде капель.



В некоторых вариантах осуществления пробиотическую композицию по настоящему изобретению вводят сразу после наступления заболевания, описанного в настоящем документе, или после выявления инфекции. В некоторых вариантах осуществления дополнительные дозы композиции по настоящему изобретению затем вводят после введения начальной дозы.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическую композицию вводят в однократной или многократной дозе с определенными интервалами во времени, например могут вводить ежедневно в течение определенного количества дней или в соответствии с конкретной схемой дозирования. В частности, пробиотическую композицию вводят в течение от 10 дней до 90 дней. Более конкретно ее вводят в течение от 10 дней до 60 дней или от 15 до 45 дней, более конкретно в течение 30 дней.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическую композицию вводят от одного раза каждые три дня до трех раз в день, в частности один раз в день.

В некоторых вариантах осуществления пробиотическую композицию по настоящему описанию могут вводить, например, перорально, внутривенно, внутримышечно или подкожно. В частности, пробиотическая композиция вводится перорально. В других вариантах осуществления пробиотическая композиция может вводиться посредством назальной ингаляции, перорального распыления посредством или назогастральным путем.

## **ПРИМЕРЫ**

### **ПРИМЕР 1. Выделение и характеристика штамма *L. plantarum* CECT 30292 (DSM 33765)**

Номера депонирования CECT 30292 и DSM 33765 используются как эквивалентные.

#### **1.1. Выделение штамма**

Новый штамм *L. plantarum*, депонированный как DSM 33765, выделяли у обоих из человека (образец кала) и цикория (*cichorium intybus*) посредством разбавления растительного экстракта в фосфатно-солевом буфере (PBS) с последующим посевом на агаровые планшеты Man-Rogosa-Sharpe (MRS) и инкубированием в микроаэрофильных условиях (5% CO<sub>2</sub>) при 37 °C.

### 1.2. Секвенирование полного генома

Штамм *L. plantarum* DSM 33765 культивировали в течение 8 ч в жидком бульоне MRS при 37 °C и собирали клетки посредством центрифугирования на ранней фазе логарифмического роста. Полную геномную и плазмидную ДНК экстрагировали с помощью мини-набора QIAamp DNA (Quiagen) в соответствии с инструкциями производителя с дополнительным этапом лизиса, при этом клетки инкубировали при 37 °C в течение 10 мин в лизирующем буфере с добавлением 20 мг/мл лизоцима (Sigma Aldrich, г. Штайнхайм-ам-Альбух, Германия) и 40 ед/мл мутализина (Sigma Aldrich). Матричную ДНК готовили с помощью набора Sequel II Binding Kit 2.0 (Pacific Bioscience), секвенировали с помощью PacBioRSII TAKARA BIO INC (Kaneka, Япония) и формировали с помощью программного обеспечения SMRT Link v8.0.0 (Pacific Bioscience).

Хромосомные выравнивания между DSM 33765 и геномом референсного штамма *L. plantarum* WCSF1 [Kleerebezem et al. 2003], а также геномами *L. plantarum* CECT 7484, CECT 7485 и ATCC 202195 проводились с использованием последовательного алгоритма MAUVE [Darling et al. 2004].

Результаты сопоставления полного генома (таблица 1) однозначно показывают, что штамм DSM 33765 относится к тому же виду *L. plantarum*, что и другие штаммы, о чем свидетельствует средняя идентичность нуклеотидов полного генома (ANI) > 98,5%, что явно выше предельного видового показателя 95% [Jain et al. 2018].

Таблица 1. Сопоставление полного генома на основании ANI

	Lp_ATCC 202195	Lp_CECT 7484	Lp_CECT 7485	Lp_WCSF1	Lp_DSM 33765

Lp_ATCC 202195	*	98,61%	98,64%	98,61%	98,64%
Lp_CECT 7484	98,77%	*	98,77%	98,80%	99,55%
Lp_CECT 7485	98,83%	98,83%	*	98,93%	98,70%
Lp_WCFS1	98,68%	98,80%	98,76%	*	98,79%
Lp_DSM 33765	98,69%	99,71%	98,70%	98,78%	*

Кроме того, анализ дерева на основании ANI (ФИГ. 1) показывает, что штамм принадлежит к той же кладе, что и CECT 7484 (ANI 99,71%), но более удаленно связан с референсным штаммом WCFS1, а также ATCC 202195 и CECT 7485 (значения ANI 98,7–98,8%).

### 1.3. Молекулярный идентификационный отпечаток

Штамм DSM 33765 анализировали в соответствии с описанным ранее протоколом [Rodas et al. 2005] с небольшими модификациями. Штамм выращивали на агаровых планшетах MRS и инкубировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 18 ч. Клетки собирали и промывали 3 раза в 8 мл PET (10 mM Tris, pH 7,6, 1 M NaCl), затем центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин. Гранулы ресуспендировали в 700 мл лизирующего буфера (6 mM Tris, 1 M NaCl, 0,1 M ЭДТА, 0,5% SLS, 0,2% дезоксиголевой кислоты; 1 мг/мл лизоцима; 40 ед/мл мутанолизина; 20 мг/мл РНКазы). К ресуспендированным клеткам добавляли равный объем 1,6% легкоплавкой агарозы (FMC BioProducts, г. Рокленд, штат Мэн, США) и проводили отверждение при 4 °C в течение 1 ч. Вставки переносили в 2 мл лизирующего буфера II (0,5 M ЭДТА, pH 9,2, 1% N-лаурилсаркозина и 1 мг/мл проназы) и инкубировали при 50 °C в течение 48 ч. Затем вставки промывали при комнатной температуре буфером TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Полное расщепление ДНК проводили ферментом рестрикции *Sma*-I (Roche Diagnostics).

Гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE) проводили дважды с использованием прибора CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Вставки загружали в 1% агарозный гель (агароза SeaKem ME, FMC BioProducts, штат Мэн, США). В качестве маркеров ММ (молекулярной массы) ДНК использовали Lambda ladder PFG Marker и Low Range PFG Marker (New England Biolabs). После электрофореза гели окрашивали этидийбромидом и анализировали УФ с помощью системы

GelDoc (BioRad).

Результаты показывают, что штамм *L. plantarum* DSM 33765 имеет воспроизводимый профиль PFGE, который отличается от профиля близкородственного штамма *L. plantarum* CECT 7484. В частности, по сравнению с CECT 7484 у штамма DSM 33765 отсутствуют полосы 97 кДа, но имеются дополнительные полосы от 48,5 до 32,1 кДа. Таким образом, несмотря на близкую связь, оба штамма продемонстрировали отличие друг от друга.

#### 1.4. Аннотация геномов

Общую аннотацию геномов проводили с помощью программы DFAST [Tanizawa et al. 2018] с функциями tRNAscan и Prodigal и плазмиды с консервативным доменом из базы данных [Shennan et al. 2020] идентифицировали с помощью программы PlasmidDB [Galata et al. 2019].

Для идентификации наличия возможных генов резистентности к антибиотикам (AR) геном *L. plantarum* DSM 33765 сравнивали с последней версией полной базы данных резистентности к антибиотикам (CARD), биоинформатической базой данных генов резистентности, их продуктов и ассоциированных с ними фенотипов [Alcock et al. 2020] с использованием параметров по умолчанию для идентификатора гена резистентности (RGI), который поддерживает анализ полных геномов. В качестве двойного контроля геномную последовательность также сравнивали с последней версией базы данных ResFinder [Borltolaia et al. 2020].

Результаты показаны в таблице 2. Секвенирование PacBio *L. plantarum* DSM 33765 привело к четырем контигам, содержащим 3 322 082 п. о. (пары оснований). При том что больший по размерам контиг (3 237 983 п. о.) был идентифицирован в качестве хромосомной последовательности, были обнаружены три дополнительных контига (41 908 п. о., 35 007 п. о. и 7184 п. о.), соответствующих различным плазмидам *L. plantarum*. Ни в бактериальной хромосоме, ни в трех плазмидах не было обнаружено никаких генов резистентности к антибиотикам. Были идентифицированы два гена, связывающие пилин, и десять генов,

связывающих муцин, что указывает на адаптацию штамма к связыванию с мукозом и эпителием и, таким образом, подтверждает его способность колонизировать кишечник.

Таблица 2. Характеризация генома *L. plantarum* DSM 33765

Контиг	Длина (п. о.)	Гены тРНК	Гены рРНК	Спрогно- зирован- ные гены (CDS)	Гены AR	Гены связывания муцина и пилина	Молекула (номер доступа)
1 SEQ ID NO: 5	3 237 983	76	46	3390	Нет	10 + 2	Хромосома
2 SEQ ID NO: 6	41 908	0	0	52	Нет	Нет	Плаزمид (CP017381.1)
3 SEQ ID NO: 7	35 007	0	0	63	Нет	Нет	Плазмид (CP050806.1)
4 SEQ ID NO: 8	7 184	0	0	6	Нет	Нет	Плазмид (CP028984.1)
<b>Всего</b>	<b>3 322 082</b>	<b>76</b>	<b>46</b>	<b>3511</b>	<b>Нет</b>	<b>10 + 2</b>	

### 1.5. Устойчивость штамма СЕСТ 30292 к гастрическим условиям

Готовили имитацию желудочной среды, содержащую 7,3 г/л хлорида натрия, 0,5 г/л хлорида калия, 3,8 г/л гидрокарбоната натрия и 3 г/л пепсина в дистиллированной воде. Образцы указанной имитации среды доводили до рН 2,3 и до рН 3 с использованием 1 Н соляной кислоты. 0,1 мл образцов культивированного в течение ночи штамма СЕСТ 30292 инокулировали в 10 мл имитации желудочной среды при рН 2,3 или рН 3, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 30 мин или 90 мин при 37 °С. Затем готовили 10-кратные последовательные разбавления в буферной физиологической среде. Оба из 0,1 мл полученной за ночь культуры и 0,1 мл различных последовательных разбавлений высевали в разные агаровые планшеты MRS каждый. Колонии подсчитывали после инкубирования при 37 °С в течение 48 ч в анаэробных условиях. Эксперимент повторяли четыре раза.

Результаты в таблице 3 ниже показывают, что штамм обладает высокой устойчивостью к воздействию желудочного сока:

Условие	Лог-показатель инокулированных клеток (КОЕ/мл)	Лог-показатель выживших клеток (КОЕ/мл)	Процент выживаемости (по абсолютному подсчету)
рН 2,3 в течение 30 минут	7,50 ± 0,02	7,45 ± 0,02	88,1%

рН 3,0 в течение 90 минут	7,48 ± 0,06	7,43 ± 0,10	87,6%
---------------------------	-------------	-------------	-------

## **ПРИМЕР 2. Клиническое исследование**

### **2.1. Исследуемый продукт**

Растительные капсулы (гидроксиметилпропилцеллюлоза, ГМПЦ) наполняли порошком, содержащим 1 миллиард КОЕ лиофилизированного нового штамма *L. plantarum* DSM 33765 наряду с 1 миллиардом КОЕ лиофилизированных штаммов *L. plantarum* СЕСТ 7484, *L. plantarum* СЕСТ 7485 и *P. acidilactici* СЕСТ 7483 в мальтодекстриновом носителе. КОЕ-нагрузку капсул проверяли последовательным разбавлением в буфере PBS с последующим высеиванием на агаровые MRS и подсчетом колоний через 48 ч инкубирования при 37 °С в микроаэрофильных условиях.

### **2.2. Схема исследования**

Проводилось четырехступенчатое слепое (для пациента, поставщика медицинского обслуживания, эксперта, проводящего анализ результатов, и главного исследователя) рандомизированное клиническое исследование со сравнением с плацебо для оценки безопасности и эффективности комбинации штамма *L. plantarum* DSM 33765 и штаммов *L. plantarum* СЕСТ 7484, *L. plantarum* СЕСТ 7485 и *P. acidilactici* СЕСТ 7483 при суммарной дозе 2 миллиарда КОЕ один раз в день у субъектов с легким COVID-19. Исследование проводилось в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации.

Первичной целью было снижение тяжести COVID-19 по шкале Всемирной организации здравоохранения [WHO Working Group, 2020]. Вторичные цели включали оценку влияния вышеуказанной комбинации на снижение частоты и тяжести отдельных симптомов COVID-19, снижение вирусной нагрузки и увеличение уровней антител иммуноглобулина IgG и IgM.

Рандомизировали 300 взрослых в возрасте от 18 до 60 лет, с положительным тестом на SARSCoV-2 в мазках из носоглотки, зарегистрированным с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР), со слабыми симптомами

COVID-19 (в соответствии со шкалой ВОЗ для тяжести COVID-19) и с предоставленным информированным согласием. Из участия в исследовании исключали субъектов с насыщением крови кислородом ( $SpO_2$ ) < 90%, получающих иммунодепрессанты, страдающих острым панкреатитом или регулярно использующих другие пробиотики в течение двух недель начала исследования. Рандомизацию проводили по сгенерированному компьютером списку, и никому из участников исследования (пациентам, поставщикам медицинского обслуживания, эксперту, проводящему анализ результатов, и главному исследователю) не сообщали о рандомизации в группу плацебо или в группу пробиотических капсул. Капсулы пробиотика и плацебо были неотличимыми друг от друга. Сгенерированный компьютером список хранился в недоступном месте и в запечатанном конверте у фармацевта, не участвующего в исследовании.

Субъектам, рандомизированным в группы пробиотика или плацебо, вводили одну капсулу назначенного препарата раз в день в течение 30 дней подряд. Симптомы COVID-19 оценивали каждые 5 дней. Количественное определение вирусной нагрузки SARSCoV-2 в мазках из носоглотки проводили в дни 0, 15 и 30 вмешательства. Количественное определение специфических антител IgG и IgM к SARSCoV-2 в образцах крови проводили в дни 0, 15 и 30 вмешательства.

### 2.3. Характеристики субъектов, отобранных на исходном уровне

Группы пробиотика и плацебо в исследовании были сбалансированы с точки зрения клинических и демографических характеристик на исходном уровне (таблица 4).

Таблица 4. Характеристики субъектов на исходном уровне. СО — стандартное отклонение

Характеристики субъектов на исходном уровне	Пробиотик (n = 150)	Плацебо (n = 150)
Слабые симптомы COVID-19 (n, %)	150 (100)	150 (100)
Женщины (n, %)	82 (54,7)	79 (52,7)
Возраст (медиана, мин. — макс.)	34 (19–60)	39 (18–59)
Дни с момента наступления симптомов	4,6 ± 2,9	5,3 ± 3,9

Группа крови		
O+ (n, %)	66 (44,0)	55 (38,7)
A+ (n, %)	48 (32,0)	52 (34,7)
B+ (n, %)	16 (10,7)	14 (9,3)
Другие (n, %)	20 (13,3)	29 (17,3)
Курильщики (n, %)	22 (14,7)	20 (13,3)
Диабет (n, %)	15 (10,0)	16 (10,7)
Гипертензия (n, %)	28 (18,7)	31 (20,7)
Индекс массы тела в кг/м <sup>2</sup> (среднее ± CO)	27,7 ± 4,9	29,6 ± 3,9
Дни с момента наступления симптомов (среднее ± CO)	3,9 ± 1,3	4,0 ± 1,3
Вирусная нагрузка в логарифмическом масштабе копий/мкл (среднее ± CO)	3,7 ± 0,22	3,8 ± 0,21
IgG к SARSCoV-2 в ед/мл (среднее ± CO)	9,2 ± 7,1	8,3 ± 6,4
IgM к SARSCoV-2 в ед/мл (среднее ± CO)	18,0 ± 3,7	18,0 ± 2,7
Повышенная температура (n, %)	73 (48,7)	67 (44,7)
Слабые	23 (15,3)	23 (15,3)
От умеренной до тяжелой формы	50 (33,4)	44 (29,4)
Кашель (n, %)	115 (76,7)	111 (74,0)
Слабые	28 (18,7)	22 (14,7)
От умеренной до тяжелой формы	87 (58,0)	89 (59,3)
Головная боль (n, %)	109 (72,7)	110 (73,3)
Слабые	6 (4,0)	7 (4,7)
От умеренной до тяжелой формы	103 (68,7)	104 (69,3)
Затрудненное дыхание (n, %)	46 (30,7)	30 (20,0)
Слабые	39 (26,0)	27 (18,0)
От умеренной до тяжелой формы	7 (4,7)	3 (2,0)
Боль в теле (n, %)	69 (46,0)	78 (52,0)
Слабые	22 (14,7)	28 (18,7)
От умеренной до тяжелой формы	47 (31,3)	50 (33,3)
Насыщение кислородом (n, %)		
SpO <sub>2</sub> > 92%	21 (14,0)	35 (23,3)
SpO <sub>2</sub> от 90 до 92%	129 (86,0)	115 (76,7)

#### 2.4. Результаты

Во время 30-дневного вмешательства в группе, получавшей пробиотик, только 3 субъекта были исключены из исследования, а в группе плацебо — 4 субъекта. В течение 30-дневного вмешательства ни один пациент не умер или не нуждался в переводе в блок интенсивной терапии.



Полная ремиссия COVID-19. Полная ремиссия COVID-19 определяется как полное исчезновение симптомов наряду с отрицательным результатом ПЦР (т. е. нулевая оценка по шкале ВОЗ для тяжести COVID-19). В день 15 вмешательства ни у одного пациента не наблюдалось полной ремиссии. Вместе с тем полная ремиссия отмечалась у гораздо большего количества пациентов в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с группой плацебо в день 30 вмешательства при весьма высокой статистически значимой разнице (р-значение < 0,001 в соответствии с критерием хи-квадрат). См. таблицу 5.

Симптоматическая ремиссия. Симптоматическая ремиссия определялась как полное исчезновение симптомов независимо от результата ПЦР (т. е. нулевая оценка по шкале ВОЗ для тяжести COVID-19). У пациентов, получавших пробиотик, ремиссия отмечалась на более ранних стадиях введения (т. е. в дни 10, 15 и 20) по сравнению с пациентами, получавшими плацебо. См. таблицу 5.

Таблица 5. Полная ремиссия COVID-19 и симптоматическая ремиссия.

# Обновленное суммарное количество субъектов с учетом субъектов, исключенных из исследования в различные дни оценки \* Статистически значимое при р-значении < 0,001

	Пробиотик	Плацебо
Полная ремиссия		
День 15 (n, %)	0 (0,0)	0 (0,0)
День 30 (n, %)	82 (55,8)*	41 (28,1)*
Симптоматическая ремиссия		
День 5 (n, %)	0 (0,0)	0 (0,0)
День 10 (n, %)	42 (28,0)*	13 (8,7)*
День 15 (n, %)	126 (84,0)*	82 (54,7)*
День 20 (n, %)	150 (100,0)*	127 (85,2)*
День 25 (n, %)	148 <sup>#</sup> (100,0)	145 (98%)
День 30 (n, %)	147 <sup>#</sup> (100,0)	146 <sup>#</sup> (100%)
Потребность в лечении в блоке интенсивной терапии или смерть (n, %)	0 (0,0)	0 (0,0)

Вирусная нагрузка. Во время 30-дневного вмешательства концентрация вирусной нагрузки в мазках из носоглотки была дополнительно сниженной в группе,

получавшей пробиотик, по сравнению с группой плацебо при весьма высокой статистически значимой разнице ( $p < 0,001$ , как показано при повторных оценках ANOVA), как показано на ФИГ. 3. В конце 30-дневного вмешательства разница в среднем составляла 0,9 порядка, т. е. концентрация снизилась в среднем в 9 раз.

Концентрация антител IgG и IgM. Во время 30-дневного вмешательства концентрация антител IgG и IgM к SARS-CoV-2 была дополнительно повышенной в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с группой плацебо при весьма высокой статистически значимой разнице ( $p < 0,001$ , как показано при повторных оценках ANOVA), как показано на ФИГ. 4. В конце 30-дневного вмешательства у субъектов, получавших пробиотик, уровни IgG были в два раза выше, чем у субъектов в группе плацебо.

Проводились статистические корректировки, чтобы оценить, модулировали ли возраст, группа крови, индекс массы тела, сопутствующий диабет или сопутствующая гипертензия эффект воздействия пробиотика на частоту ремиссии, вирусную нагрузку и уровни антител. Примечательно, что, как обнаружилось, ни одна из этих переменных не модулирует эффект пробиотического вмешательства. Следовательно, пробиотик обеспечивал благоприятный эффект независимо от возраста, группы крови, индекса массы тела, сопутствующего диабета или сопутствующей гипертензии.

Сокращение специфических симптомов COVID-19. Во время 30-дневного вмешательства также было обнаружено, что введение пробиотика существенно сокращает продолжительность различных специфических симптомов COVID-19 по сравнению с плацебо, а также количество дней с насыщением крови кислородом ниже 92% (гипоксемией), последнее — несмотря на более высокую долю субъектов с насыщением ниже 92% на исходном уровне в группе, получавшей пробиотик (все с  $p < 0,05$  в соответствии с критерием Манна — Уитни). См. таблицу 6.

Таблица 6. Сокращение специфических симптомов COVID-19

Симптомы	Пробиотик	Плацебо	P-значение
Повышенная температура (среднее, CO)	9,2 ± 3,9	10,8 ± 4,6	0,005
Кашель (среднее, CO)	10,1 ± 4,7	13,5 ± 6,5	0,001
Головная боль (среднее, CO)	6,9 ± 4,0	10,6 ± 6,5	0,001
Затрудненное дыхание (среднее, CO)	1,1 ± 1,6	2,2 ± 3,1	0,021
Боль в теле (среднее, CO)	2,9 ± 2,8	5,0 ± 4,4	0,001
Насыщение кислородом (SpO <sub>2</sub> ) < 92% (среднее, CO)	7,4 ± 3,6	8,4 ± 4,0	0,036
Диарея (среднее, CO)	1,8 ± 2,8	4,4 ± 6,4	0,010

### **ПРИМЕР 3. Измерение концентрации интерферона-бета (IFN $\beta$ ) и хемокина CXCL13 в сыворотке**

#### **3.1. Способы**

Случайным образом выбирали 70 субъектов из 300 субъектов, описанных в ПРИМЕРЕ 2. Рандомизацию в основном стратифицировали по группе вмешательства, чтобы гарантировать отнесение 35 субъектов к группе плацебо и 35 к группе, получавшей пробиотик, а также по статусу инфильтрации легких в начале вмешательства и статусу ответа в конце вмешательства, чтобы гарантировать, что выбранная субпопуляция из 70 субъектов имеет одинаковое распределение относительно полной популяции из 300 субъектов.

Хранящиеся замороженные образцы сыворотки, взятые в дни 0, 15 и 30 вмешательства (см. ПРИМЕР 2), использовали для измерения интерферона-бета (IFN $\beta$ ) и хемокина CXCL13 с использованием стандартных лабораторных наборов для фермент-связанного иммуносорбентного исследования (ELISA). Цифровые рентгеновские снимки легких, полученные в дни 0, 15 и 30, также извлекали из записей пациентов и проводили подсчет воспалительных легочных инфильтратов, если они присутствовали, с использованием валидированной оценки по шкале Брешиа (чем выше оценка, тем более тяжелая воспалительная инфильтрация) [Borghesi et al., 2020].

#### **3.2. Результаты**

Клинические характеристики субъектов. Группы пробиотика и плацебо в субпопуляции из 70 субъектов были сбалансированы с точки зрения клинических

и демографических характеристик на исходном уровне (таблица 7).

Таблица 7. Характеристики 70 субъектов на исходном уровне. CO — стандартное отклонение

	Пробиотик (n = 35)	Плацебо (n = 35)
Женщины (n, %)	22 (62,9%)	22 (62,9%)
Возраст (среднее ± CO)	36,1 ± 12,0	38,3 ± 14,4
Количество метаболических сопутствующих заболеваний [медиана, диапазон]*	0 [0–2]	0 [0–3]
Дни с момента наступления симптома (среднее ± CO)	4,1 ± 1,2	3,9 ± 1,3
Вирусная нагрузка в логарифмическом масштабе копий/мл (среднее ± CO)	6,7 ± 0,3	6,8 ± 0,2
IgG к SARSCoV-2 в ед/мл (среднее ± CO)	9,9 ± 7,5	7,7 ± 6,6
IgM к SARSCoV-2 в ед/мл (среднее ± CO)	17,6 ± 3,8	18,3 ± 2,6
Наличие инфильтратов легких (n, %)	15 (42,9%)	11 (31,4%)
* В том числе диабет, артериальная гипертензия и ожирение (т. е. индекс массы тела ≥ 30 кг/м <sup>2</sup> )		

Концентрация интерферона-бета в сыворотке. На исходном уровне уровни IFN $\beta$  в группе, получавшей пробиотик, и в группе плацебо были неразличимыми. Как показано на ФИГ. 5, во время 30-дневного вмешательства уровни IFN $\beta$  существенно увеличивались в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с плацебо ( $p < 0,001$ , ANOVA для повторных измерений). Более точно концентрация в группе, получавшей пробиотик, была существенно выше как в день 15, так и в день 30 по сравнению с плацебо ( $p < 0,05$ ).

Концентрация CXCL13 в сыворотке. На исходном уровне уровни CXCL13 в группе, получавшей пробиотик, и в группе плацебо были неразличимыми. Как показано на ФИГ. 6, во время 30-дневного вмешательства уровни CXCL13 существенно снижались со временем в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с плацебо ( $p < 0,001$ , ANOVA для повторных измерений). Более точно концентрация в группе, получавшей пробиотик, была существенно ниже как в день 15, так и в день 30 по сравнению с плацебо ( $p < 0,05$ ).

Облегчение симптомов. 70 субъектов ежедневно регистрировали свои симптомы в электронном дневнике пациента. Продолжительность нескольких симптомов была

существенно короче в группе, получавшей пробиотик, по сравнению с группой плацебо, как указано в таблице 8.

Таблица 8. Продолжительность различных симптомов вирусной инфекции (среднее и стандартное отклонение)

	Пробиотик (n = 35)	Плацебо (n = 35)	р-значение (t-критерий Стьюдента)
Дни с повышенной температурой (> 37,5 °C)	3,6 ± 3,5	6,1 ± 3,4	p = 0,003
Дни с кашлем	9,4 ± 4,9	12,7 ± 6,3	p = 0,016
Дни с головной болью	6,0 ± 4,0	9,1 ± 6,6	p = 0,023
Дни с болями в теле	1,7 ± 2,5	4,4 ± 4,1	p = 0,001

В качестве дополнительного подтверждения положительной роли интерферонов типа I против вирусной инфекции более высокие уровни интерферона-бета в общей популяции из 70 субъектов коррелировали с меньшим количеством дней с повышенной температурой (корреляция Спирмена = -0,24, р-значение = 0,042) и меньшим количеством дней с кашлем (корреляция Спирмена = -0,26, р-значение = 0,033). Аналогичная тенденция (т. е. р-значение выше 0,05, но ниже 0,10) также наблюдалась для болей в теле (корреляция Спирмена = -0,21, р-значение = 0,075). Кроме того, более низкие уровни CXCL13 также коррелировали с меньшим количеством дней с повышенной температурой (корреляция Спирмена = 0,27, р-значение = 0,024).

В подгруппе пациентов с воспалительными инфильтратами легких на исходном уровне (n = 15 в группе, получавшей пробиотик, и n = 11 в группе плацебо) снижение инфильтрации коррелировало с более высоким уровнем интерферона-бета (корреляция Спирмена = 0,46, р-значение = 0,018) и в особенности с более низкими уровнями CXCL13 (корреляция Спирмена = 0,69, p < 0,001) в соответствии с защитным эффектом снижения уровней CXCL13 для уменьшения воспаления легких.

Клиренс вируса. Все 70 субъектов были положительными по SARS-CoV2 в начале вмешательства по результатам ПЦР-теста (см. ПРИМЕР 2). В конце 30-дневного

вмешательства у 17 из 35 субъектов (48,6%) в группе, получавшей пробиотик, и у 8 из 35 (22,9%) в группе плацебо отмечалась полная вирусная ремиссия по результатам ПЦР-теста. Таким образом, эффект пробиотика был более чем в два раза выше по сравнению с плацебо, причем такая разница является статистически значимой ( $p$ -значение = 0,026 по критерию хи-квадрат).

#### ПРИМЕР 4. Измерение концентрации Plantaricin G в сыворотке

##### 4.1. Способы

Штаммы *L. plantarum* (CECT 30292, CECT 7483, CECT 7484, CECT 7485, CECT 7481, 299v и WCFS1) выращивали в бульоне MRS при 37 °C. Бактериальные клетки собирали посредством центрифугирования в экспоненциальной фазе роста ( $OD_{620} \sim 0,6$ ) и в стационарном состоянии ( $OD_{620} > 1,5$ ).

Полную РНК выделяли из гранул с использованием набора RNeasy Mini Kit в соответствии с протоколом производителей. Затем РНК конвертировали в кДНК с использованием набора обратной транскриптазы NxGen. Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени (РВ-кПЦР) проводили с использованием SYBRGreen на приборе ABI7900 и регистрировали значения порога цикла (Ct). Данные нормализовали по гену жизненно важных функций *RecA* и экспрессию штамма WCFS1 использовали в качестве эталона для экспрессии гена по методу delta-delta Ct. Праймеры РВ-кПЦР, использованные в экспериментах, приведены в таблице 9.

Таблица 9. Праймеры РВ-кПЦР, использованные в экспериментах

Ген	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
<i>plnG</i> (мишень)	AAGTTGACGAGATGGACT (SEQ ID NO: 1)	GTAGTCCCTTCTAAACTCGT (SEQ ID NO: 2)
<i>RecA</i> (жизненно важные функции)	GGCAGAACAGATCAAGGAAGG (SEQ ID NO: 3)	TATCCAATTCCGGCACGCTTA (SEQ ID NO: 4)

##### 4.2. Результаты

Эксперименты по РВ-кПЦР показали, что *L. plantarum* CECT 30292 приводит к существенной сверхэкспрессии гена *plnG* по сравнению с типом штамма WCFS1

(четырёхкратное увеличение,  $p < 0,001$ ) и по сравнению со всеми другими протестированными штаммами ( $p < 0,05$ ). Эффект сохраняется как в фазе экспоненциального роста штамма, так и в стационарном состоянии (ФИГ. 7). Таким образом, штамм *L. plantarum* СЕСТ 30292 характеризуется более высокой вероятностью обнаружения иммунными клетками по сравнению с другими штаммами *L. plantarum*.

## **ПРИМЕР 5. Оценка вариабельности внутри штамма**

### **5.1. Способы**

Для оценки вариабельности внутри штамма проводили секвенирование полного генома для двух различных партий штамма DSM 33765 с использованием тех же способов, уже описанных в ПРИМЕРЕ 1.

### **5.2. Результаты**

Попарная средняя идентичность нуклеотидов (ANI) между геномами двух различных партий одного и того же штамма (DSM 33765) составляла 99,99%. Учитывая тот факт, что размер генома этого штамма составляет 3 322 082 пар оснований, такая разница в 0,01% достигает около 330 нуклеотидных полиморфизмов.

## **ПРИМЕР 6. Копии гена *plnG***

### **6.1. Способы**

Последовательность гена plantaricin G (*plnG*) загружали из базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q1WFD0>, UniProtKB - Q1WFD0 (Q1WFD0\_LACPN), Entry version 73, 29 сентября 2021 г.) и проводили поиск по геномам штаммов *L. plantarum* СЕСТ 7484, СЕСТ 7485, DSM 33765, а также референсного штамма WCSF1 (см. ПРИМЕР 1). Поиск проводили с использованием приложения «tblastn» программы BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastDocs&DOC\\_TYPE=Download](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=Download)).

### **6.2. Результаты**

Бактериальные хромосомы четырех проанализированных штаммов *L. plantarum* содержат одну копию гена *Plantaricin G (plnG)*. Примечательно, что штамм DSM 33765 был единственным штаммом, который также содержал плазмиды, несущие ген *plnG*, как показано в таблице 10 ниже. Этим, возможно, объясняется заметно более высокая экспрессия Plantaricin G, достигнутая упомянутым штаммом (ПРИМЕР 4).

Таблица 10. Копии гена *plnG* и плазмиды анализируемых штаммов с дополнительными копиями гена *plnG*

Штамм	Копии гена <i>plnG</i> в хромосоме	Плазмиды с дополнительными копиями гена <i>plnG</i>
CECT 7484	1	Нет
CECT 7485	1	Нет
DSM 33765	1	Да
WCSF1	1	Нет



**ССЫЛКИ**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04517422>

WO2011092261A1

Chong et al. *Lactobacillus plantarum* DR7 improved upper respiratory tract infections via enhancing immune and inflammatory parameters: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Dairy Sci.* 2019. 102:4783-4797

Meijerink et al. Identification of Genetic Loci in *Lactobacillus plantarum* That Modulate the Immune Response of Dendritic Cells Using Comparative Genome Hybridization. *PLoS One* 2010. 5:e10632

D'Ettoire et al. Challenges in the Management of SARS-CoV2 Infection: The Role of Oral Bacteriotherapy as Complementary Therapeutic Strategy to Avoid the Progression of COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 2020.:389

Hishiki et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Heat-Killed *Pediococcus acidilactici* K15 for Prevention of Respiratory Tract Infections among Preschool Children. *Nutrients* 2020. 12(7):1989

Hill et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014. 11:506-14

Channapannavar et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J Clin Invest* 2019; 129:3625-3639

Haagmans et al. Pegylated interferon-alpha protects type 1 pneumocytes against SARS coronavirus infection in macaques. *Nat Med.* 2004; 10:290-3

Kleerebezem et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003. 100(4):1990-5

Darling et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004. 14(7):1394-403

Jain et al. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries *Nat Commun.* 2018 Nov 30;9(1):5114

Rodas et al. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005. 55(Pt 1):197-207

Tanizawa et al. DFAST: a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication. *Bioinformatics* 2018. 34(6):1037-1039

Shenman et al. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res* 2020. 48:D265-D8

Galata et al. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res.* 2019. 74:D195-D202

Alcock et al. CARD 2020: Antibiotic Resistome Surveillance with the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research* 2020. 48:D517-D525

Bortolaia et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020. 75:3491-3500

WHO Working Group. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis* 2020. 20:e192-e197

Borghesi et al. Chest X-ray severity index as a predictor of in-hospital mortality in coronavirus disease 2019: A study of 302 patients from Italy. *Int. J. Infect Dis* 2020; 96:291-293

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Пробиотическая композиция, содержащая штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292, или его производный бактериальный штамм, причем производный бактериальный штамм:

(a) имеет геном, на по меньшей мере 99,90% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и

(b) сохраняет по меньшей мере одно свойство соответствующего депонированного штамма по сравнению с контролем, причем свойства выбирают из группы, состоящей из:

- стимуляции продукции антител IgG и IgM к вирусу SARSCoV-2; в частности, уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются;

- повышения уровней интерферона-бета, в частности, уровни интерферона-бета повышаются на по меньшей мере 20%;

- снижения уровней CXCL13;

- содержания по меньшей мере такого же количества копий гена *plnG*, как и депонированный штамм; и

- сверхэкспрессии plantaricin G, в частности сверхэкспрессии plantaricin G в по меньшей мере четыре раза.

2. Пробиотическая композиция по п. 1, в которой штамм *Lactobacillus plantarum* представляет собой штамм, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292.

3. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–2, дополнительно содержащая *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 и *Pediococcus acidilactici* CECT 7483.

4. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–3, которая представляет собой твердую композицию, содержащую:

лиофилизированную бактериальную биомассу, содержащую от примерно  $10^5$  КОЕ

до примерно  $10^{12}$  КОЕ каждого штамма;

криопротектор; и

фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из эмульсии, суспензии, геля, пасты, гранул, порошка и камеди.

5. Пробиотическая композиция по п. 4, которая содержит 50% штамма *L. plantarum* СЕСТ 30292 и 50% смеси *L. plantarum* СЕСТ 7485, СЕСТ 7484 и *P. acidilactici* СЕСТ 7483.

6. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–5 для применения в качестве лекарственного средства.

7. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–5 для применения в способе лечения, профилактики или облегчения COVID-19.

8. Пробиотическая композиция для применения по п. 7, причем введение пробиотической композиции приводит к лечению, профилактике или облегчению по меньшей мере одного симптома, выбранного из группы, состоящей из:

- повышенной температуры;
- кашля;
- головной боли;
- затрудненного дыхания;
- боли в теле;
- гипоксемии, в частности  $< 92\% \text{ SaO}_2$  или  $\text{SpO}_2$ ; и
- диареи.

9. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–5 для применения в способе лечения, профилактики или облегчения инфекционного заболевания, причем инфекционное заболевание вызвано вирусной инфекцией.

10. Пробиотическая композиция по п. 9, причем вирусная инфекция выбрана из группы, состоящей из аденовируса, вирусного гепатита, вирусного энцефалита, бокавируса человека, риновируса человека, вируса гриппа, вируса парагриппа,

пневмовируса, коронавируса, респираторно-синцитиального вируса и риновируса.

11. Пробиотическая композиция по п. 10, причем вирусная инфекция представляет собой коронавирус, грипп или респираторно-синцитиальную вирусную инфекцию.

12. Пробиотическая композиция для применения по п. 11, причем вирусная инфекция представляет собой коронавирусную инфекцию.

13. Пробиотическая композиция для применения по п. 12, причем коронавирус представляет собой вирус SARS-CoV-2, вирус SARS-CoV-1 или вирус MERS-CoV.

14. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 9–13, причем инфекционное заболевание приводит к респираторному заболеванию.

15. Пробиотическая композиция для применения по п. 14, причем респираторное заболевание характеризуется затрудненным дыханием и/или гипоксемией, в частности  $SpO_2$  ниже 92%.

16. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 14–15, причем респираторное заболевание затрагивает верхние дыхательные пути.

17. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 14–15, причем респираторное заболевание затрагивает нижние дыхательные пути.

18. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 14–15, причем респираторное заболевание представляет собой пневмонию.

19. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 14–15, причем респираторное заболевание представляет собой острый респираторный дистресс-синдром (ARDS).

20. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 14–19, причем введение пробиотической композиции приводит к лечению, профилактике или облегчению по меньшей мере одного симптома, выбранного из группы, состоящей

из:

- повышенной температуры;
- кашля;
- головной боли;
- затрудненного дыхания;
- боли в теле;
- гипоксемии, в частности  $< 92\% \text{ SaO}_2$  или  $\text{SpO}_2$ ; и
- диареи.

21. Пробиотическая композиция по любому из пп. 1–5 для применения в усилении иммунного ответа.

22. Пробиотическая композиция для применения по п. 21, причем введение пробиотической композиции стимулирует продукцию антител, в частности IgG и IgM, в частности уровни антител IgG по меньшей мере удваиваются.

23. Пробиотическая композиция по любому из пп. 21–22 для одновременного применения в комбинации с вакциной.

24. Пробиотическая композиция по любому из пп. 13–20 для одновременного применения в комбинации с противовоспалительным лекарственным средством.

25. Пищевой продукт, содержащий пробиотическую композицию, определенную как указано в любом из пп. 1–5, и по меньшей мере один пищевой ингредиент.

26. Пищевой продукт по п. 25, который представляет собой молочный продукт, молоко, йогурт или творог.

27. Диетическая добавка, содержащая пробиотическую композицию, определенную как указано в любом из пп. 1–5, и по меньшей мере один приемлемый эксципиент.

28. Диетическая добавка по п. 27, которая представлена в форме капсулы, таблетки, пилюли, саше или суспензии.

29. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество пробиотической композиции, определенной как указано в любом из пп. 1–5, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

30. Штамм *Lactobacillus plantarum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Коллекцию типовых культур Испании (CECT) под номером доступа CECT 30292.

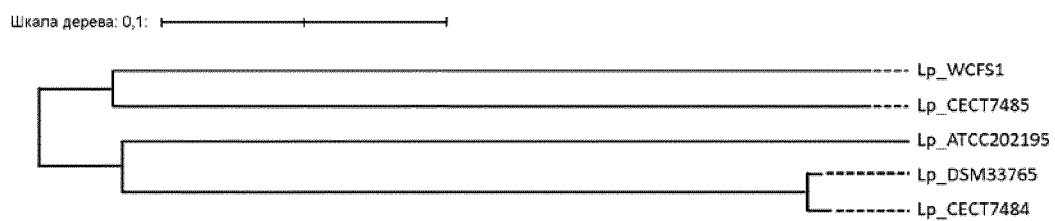
31. Способ получения мутантного штамма для штамма *Lactobacillus plantarum*, депонированного под номером CECT 30292, включающий следующие этапы:

(i): получение мутантов *L. plantarum* CECT 30292;

(ii): анализ мутантов, полученных на этапе (i), и идентификация мутантного штамма, который сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма; и

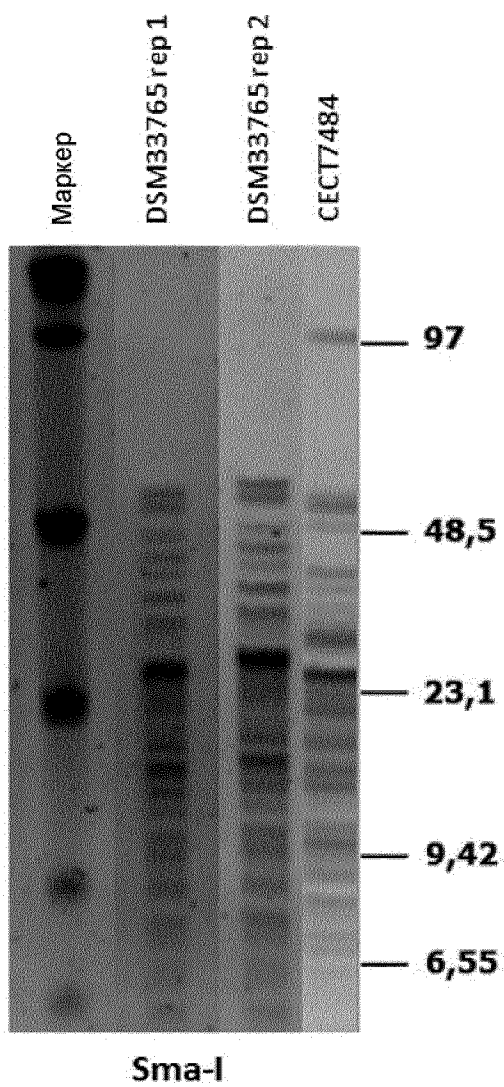
(iii) выделение штамма, идентифицированного на этапе (ii), для получения таким образом мутантного штамма *L. plantarum* CECT 30292, причем мутантный штамм сохраняет или улучшает по меньшей мере одно свойство депонированного штамма.

Фиг. 1

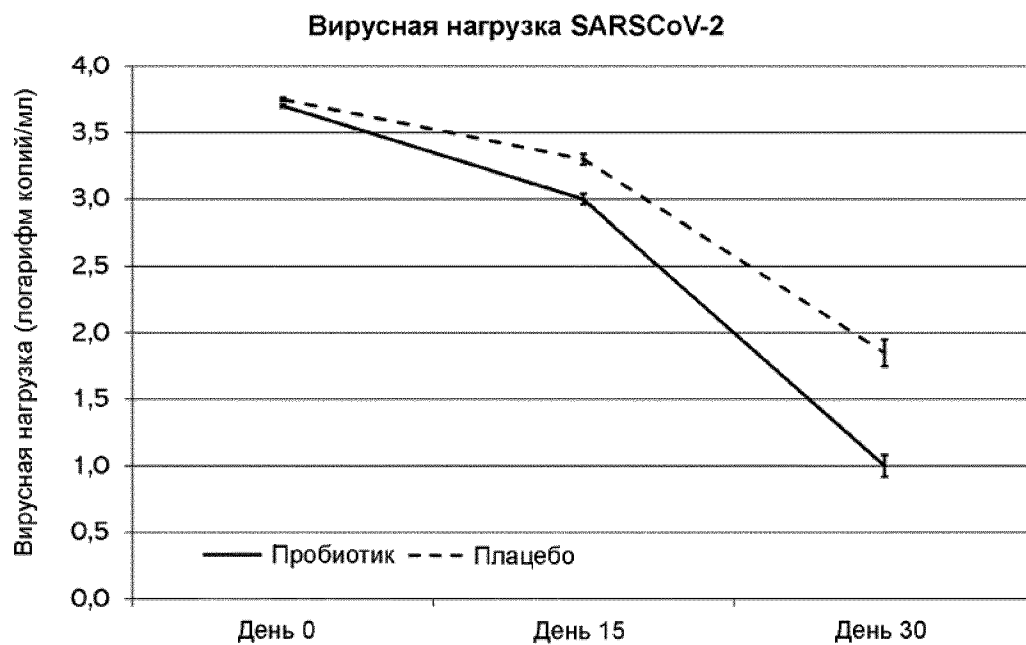




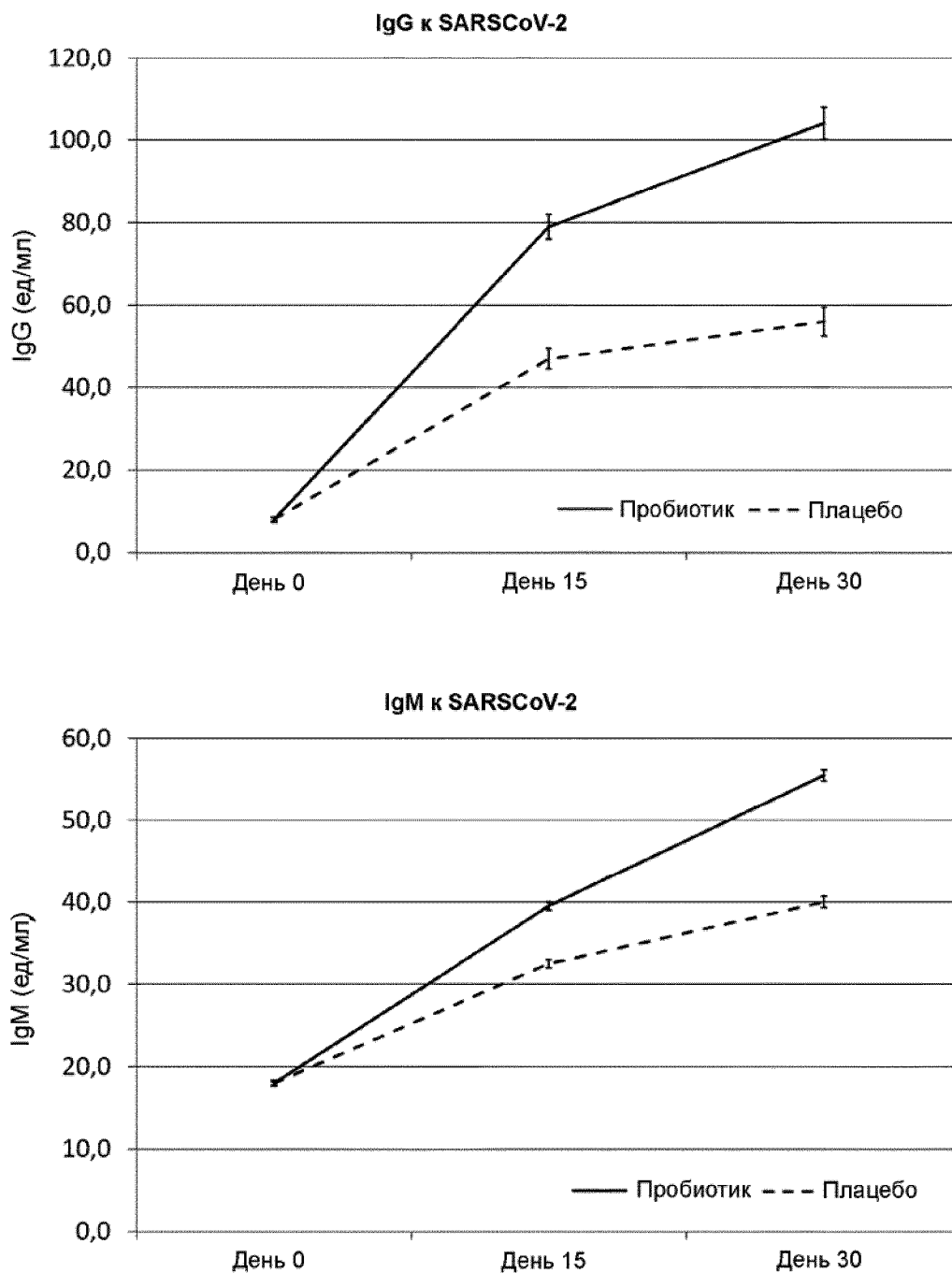
ФИГ. 2



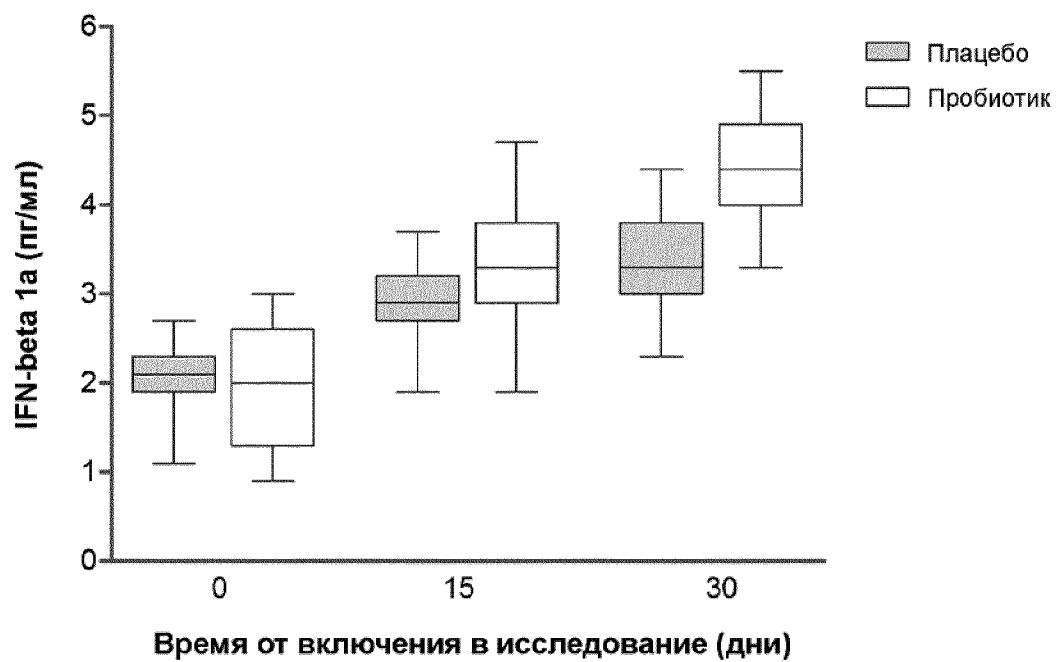
ФИГ. 3



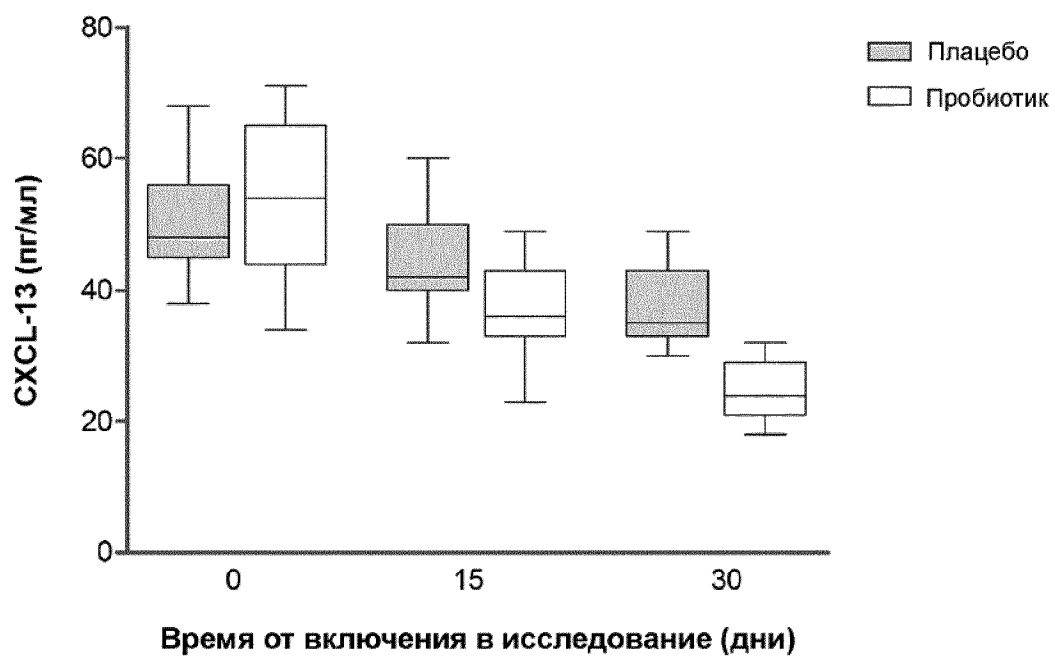
ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7

