

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047396**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.15

(21) Номер заявки
201992175

(22) Дата подачи заявки
2018.03.16

(51) Int. Cl. **C07K 7/06** (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A23L 33/195 (2016.01)
A61K 35/741 (2015.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 14/335 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ**

(31) **62/472,047**

(32) **2017.03.16**

(33) **US**

(43) **2020.03.05**

(86) **PCT/CA2018/050319**

(87) **WO 2018/165764 2018.09.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МИКРОСИНТЕСИС ИНК. (СА)

(72) Изобретатель:
**Целла Моника Анжела, Куртис
Сарах М., Розке Джонатхон Патрик
(СА)**

(74) Представитель:
Пронин В.О. (RU)

(56) **WO-A1-2015021530
WO-A1-2009155711
US-A1-20040031072
US-A1-20130330335
WO-A1-2016172722**

(57) В изобретении предложены пептиды, которые получены из пробиотических бактерий, которые могут быть полезны для профилактики и/или лечения энтеральных инфекций или не энтеральных инфекций у субъекта. Пептиды также могут найти применение для снижения вирулентности энтеральных инфекций или не энтеральных инфекций у субъекта. Также предложены композиции пептидов и композиции, содержащие фракции культуральной среды пробиотических бактерий.

047396 B1

047396 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к пробиотическим молекулам. В частности, настоящее изобретение согласно своим аспектам относится к пробиотическим молекулам, композициям, содержащим пробиотические молекулы и различным способам и применениям пробиотических молекул.

Уровень техники

Показано, что малый биопептид, вырабатываемый видами *Lactobacillus*, эффективен против инфекции энтерогеоморрагических *Escherichia coli* [Medellin-Pena et al., 2009]. Было показано, что он влияет, оказывая отрицательную регуляцию, на транскрипцию генов *E. coli*, вовлеченных в колонизацию и чувство кворума, и способен предотвращать адгезию *E. coli* к эпителиальным клеткам хозяина [Medellin-Pena et al., 2009]. Было продемонстрировано, что биопептид влияет на секреторную систему *E. coli* типа III (T3SS) и способен препятствовать сигнальной системе чувства кворума (QS), что приводит к отрицательной регуляции вирулентных генов [Medellin-Pena et al., 2007, Medellin-Pena and Griffiths, 2009].

В публикации Международной заявки на патент № WO 2009/155711 описаны выделенные и охарактеризованные молекулы, полученные из пробиотических бактерий из родов *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* или *Bifidobacterium* для применения в композициях и способах для лечения и/или профилактики инфекции вредными патогенными бактериями, такими как *Salmonella* или *E. coli*. Выделенные молекулы также можно применять в пищевых продуктах или продуктах лечебного питания, которые обеспечивают пробиотики в желудочно-кишечном тракте млекопитающих.

В публикации Международной заявки на патент № WO 2015/021530 описаны молекулы, полученные из пробиотических бактерий, которые предложены для применения в композициях и способах для лечения и/или профилактики инфекции патогенными вирусами. Выделенные молекулы также можно применять в пищевых продуктах или продуктах лечебного питания, которые обеспечивают пробиотики в желудочно-кишечном тракте млекопитающих.

Существует потребность в альтернативных терапиях, чтобы преодолеть или ослабить по меньшей мере некоторые недостатки предшествующего уровня техники и/или предложить полезную альтернативу.

Описание чертежей

Настоящее изобретение будет более понятным из следующего описания в сочетании со ссылками на чертежи, на которых:

на фиг. 1 показан анализ клеточной токсичности лактатдегидрогеназы. Дозозависимая кривая ингибирования клеточной токсичности бесклеточным супернатантом. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение;

на фиг. 2 показан анализ клеточной токсичности лактатдегидрогеназы. Дозозависимая кривая ингибирования клеточной токсичности бесклеточным супернатантом. Планки погрешностей представляют стандартное отклонение.

Сущность изобретения

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, содержащий аминокислотную последовательность MALPPK, при этом пептид имеет менее чем 19 аминокислотных остатков.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, состоящий из аминокислотной последовательности MALPPK.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, содержащий аминокислотную последовательность CVLPPK, при этом пептид имеет менее чем 68 аминокислотных остатков.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, состоящий из аминокислотной последовательности CVLPPK.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, содержащий аминокислотную последовательность HLLPLP, при этом пептид имеет менее чем 9 аминокислотных остатков.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, состоящий из аминокислотной последовательности HLLPLP.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, содержащий последовательность XX[L или I]PPK, при этом каждый X независимо обозначает гидрофобную аминокислоту, при этом пептид имеет менее чем 19 аминокислотных остатков.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, состоящий из последовательности XX[L или I]PPK, при этом каждый X независимо обозначает гидрофобную аминокислоту.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, состоящий из последовательности X_1X_2 [L или I]PPK, при этом X_1 выбран из N, C, Q, M, S и T, и при этом X_2 выбран из A, I, L и V.

В соответствии с одним аспектом изобретения предложен пептид, содержащий последовательность или состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из LPVPK, ALPK, EVLNCLALPK, LPLP, HLLPLPL, YVPEPF, KYVPEPF и EMPFKPYVPEPF, при этом пептид содержит 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков

В одном аспекте пептид получают из пробиотических бактерий, выбранных из *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* и их комбинаций.

В одном аспекте *Lactobacillus* выбирают из *Lactobacillus acidophilus* (La-5), *Lactobacillus fermentum*,

Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum*.

В одном аспекте *Lactococcus* представляет собой *Lactococcus lactis*.

В одном аспекте *Bifidobacterium* выбирают из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium crudilactis* и их смесей.

В одном аспекте *Streptococcus* представляет собой *Streptococcus thermophilus*.

В одном аспекте пептид скомбинирован с одним или более из противовирусного препарата, источника сахара, съедобного пищевого продукта, пищевой добавки и принимаемой внутрь жидкости.

В одном аспекте пептид сконцентрирован из бесклеточного супернатанта или его фракции.

В одном аспекте пептид предложен в виде сухой фракции культуральной среды, например, в лиофилизированном виде или в высушенном распылением виде.

В одном аспекте сухая фракция культуральной среды представляет собой бесклеточный супернатант.

В соответствии с одним аспектом предложена композиция, содержащая описанный в настоящем документе пептид.

В одном аспекте композиция представляет собой пищевой продукт, питьевой продукт, продукт здорового питания, медикамент или пищевую добавку.

В одном аспекте композиция содержит живые пробиотические бактерии, из которых получают пептиды.

В одном аспекте композиция содержит живые пробиотические бактерии, отличные от тех бактерий, из которых получают пептиды.

В одном аспекте пептиды в композиции являются очищенными.

В соответствии с одним аспектом предложен способ лечения и/или профилактики инфекции у субъекта и/или снижения вирулентности инфекции у субъекта, причем способ содержит введение пептида или композиции, описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном аспекте инфекция является энтеральной инфекцией.

В одном аспекте инфекция является не энтеральной инфекцией.

В одном аспекте инфекция выбрана из группы, состоящей из инфекции мочевыводящих путей, вагинальной инфекции, инфекции дыхательных путей, инфекции желудка, вырабатывающей биопленку инфекции, мастита, кожной инфекции и инфекции полости рта.

В соответствии с одним аспектом предложен способ снижения антибиотической резистентности, содержащий введение описанных в настоящем документе пептидов субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном аспекте способ предназначен для снижения антибиотической резистентности MRS.

В соответствии с одним аспектом предложен способ лечения MRS, содержащий введение описанных в настоящем документе пептидов субъекту, нуждающемуся в этом.

В соответствии с одним аспектом предложен способ предотвращения или разрушения и/или пенетрации биопленок, содержащий введение описанных в настоящем документе пептидов.

В соответствии с одним аспектом предложен способ лечения раны, содержащий введение описанных в настоящем документе пептидов.

В соответствии с одним аспектом предложен способ уменьшения прилипания не энтерального патогена к ткани субъекта, содержащий введение описанных в настоящем документе пептидов.

В соответствии с одним аспектом предложен инертный объект, содержащий описанные в настоящем документе пептиды.

В одном аспекте инертный объект представляет собой стент, катетер или раневую повязку, содержащий(ую) пробиотические молекулы, которые высвобождаются из объекта за некоторый период времени.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными после прочтения следующего подробного описания. Однако, следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и показывают варианты осуществления изобретения, предназначены исключительно для иллюстрации, поскольку многочисленные изменения и модификации, не выходящие за пределы сути и объема настоящего изобретения, будут понятны специалистам в данной области техники после прочтения подробного описания.

Подробное описание

Описано применение пробиотических молекул в лечении инфекций желудочно-кишечного тракта. Без ограничения какой-либо теорией, предполагают, что молекулы, описанные в международных заявках на патент №№ WO 2009/155711 и WO 2015/021530, препятствуют у патогенов работе системы чувства кворума (QS) в системе секреции типа III (T3SS), и в предыдущей работе было показано, что пробиотические молекулы могут приводить к отрицательной регуляции генов вирулентности множества энтеральных патогенов. Бесклеточный экстракт штамма *L. acidophilus* обладал способностью препятствовать чувству кворума у *Clostridium difficile* и мог отрицательно регулировать гены вирулентности *C. difficile* [Yun et al., 2014]. Бесклеточные экстракты штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* ингибировали рост *Campylobacter jejuni* и отрицательно регулировали промотор *flaA sigma 28*, а также обладали способностью отрицательно регулировать экспрессию генов *ciaB* и *flaA* у *Campylobacter jejuni* [Ding et al., 2005,

Mundi et al., 2013]. Обнаружили также, что пробиотические молекулы, вырабатываемые *Lactobacillus*, влияют на вирулентность *Salmonella*, и показали, что основной их мишенью являются вирулентные гены, участвующие в T3SS [Sharma 2014]. В полевом исследовании, проведенном в 2015 г., тестировали пробиотические молекулы *in vivo* на отлученных от груди молочных поросят и обнаружили, что эти молекулы оказывают значимое влияние на снижение тяжести и встречаемости диареи [University of Guelph/MicroSintesis, 2015].

В настоящее время обнаружили, что такой способ действия эффективен также при отрицательной регуляции эффектов генов вирулентности, которые регулируются чувством кворума, не только у кишечных патогенов, но и у других типов патогенов и инфекционных агентов. Кроме того, идентифицированы новые пептиды, которые также эффективны при лечении и/или профилактике энтеральных или не энтеральных инфекций и/или снижении вирулентности таких инфекций. Кроме того, эти пептиды согласно аспектам изобретения способны по меньшей мере частично преодолевать лекарственную резистентность, согласно другим аспектам изобретения способны снижать лекарственную резистентность, согласно другим аспектам изобретения способны излечивать и/или предотвращать и/или снижать вирулентность инфекций, вызванных резистентными к лекарственным средствам бактериями, и согласно другим аспектам изобретения способны потенцировать эффекты, оказываемые антибиотиками на бактерии и/или резистентные к лекарственным средствам бактерии.

Определения.

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. См., например, Singleton et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994); Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Для целей настоящего изобретения ниже приводится определение следующих терминов.

"Полученный" означает, что пробиотические молекулы вырабатываются непосредственно или опосредованно пробиотическими бактериями. Например, пробиотические бактерии могут секретировать пробиотические молекулы непосредственно в культуральную среду. В других аспектах молекулы могут образовываться опосредованно в культуральной среде, например, путем отщепления от более длинных пептидов.

"Варианты" последовательностей, описанные в настоящем документе, представляют собой биологически активные последовательности, которые имеют пептидную последовательность, которая отличается от нативной последовательности или последовательности дикого типа, за счет вставки, делеции, модификации и/или замены одной или более аминокислот в пределах нативной последовательности. Такие варианты обычно имеют менее чем 100% идентичность последовательности с нативной последовательностью. Первоначально, однако, биологически активный вариант будет иметь аминокислотную последовательность с более чем 70% идентичностью последовательности с последовательностью соответствующей встречающейся в природе последовательности, обычно по меньшей мере около 75%, более обычно по меньшей мере около 80%, еще более обычно по меньшей мере около 85%, еще более обычно по меньшей мере около 90%, и еще более обычно по меньшей мере около 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности. Варианты нуклеотидных фрагментов любой длины, которые сохраняют биологическую активность соответствующей нативной последовательности. Варианты также включают последовательности, где одна или более аминокислоты добавлены к любому концу или внутри нативной последовательности. Варианты также включают последовательности, где ряд аминокислот удален и необязательно заменен на одну или более различных аминокислот.

"Процент идентичности последовательности" в настоящем документе определен как процент аминокислотных остатков в перспективной последовательности, которые идентичны остаткам в интересующей последовательности после выравнивания последовательностей и введения разрывов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета любых консервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Никакие из 5', 3' или удлиняющих сегментов, делеций или вставок в перспективную последовательность не следует толковать как влияющие на идентичность или гомологичность последовательности. Методы и компьютерные программы для сравнения хорошо известны в области техники, например, "BLAST".

"Активный" или "активность" для целей настоящего документа относится к биологической активности нативной или встречающейся в природе пробиотической молекулы, где "биологическая" активность означает биологическую функцию (ингибиторную или стимулирующую), вызываемую нативной или встречающейся в природе пробиотической молекулой.

Таким образом, "биологически активный" или "биологическая активность" при использовании в сочетании с описанными в настоящем документе пробиотическими молекулами относится к пробиотической молекуле или аминокислотной последовательности, которая проявляет или разделяет эффекторную функцию нативной пробиотической молекулы или последовательности. Например, описанные в настоящем документе пробиотические молекулы обладают биологической активностью по предотвращению,

ингибированию или лечению инфекции у животного.

"Биологически активный" или "биологическая активность" при использовании в сочетании с вариантными последовательностями означает, что вариантные последовательности проявляют или разделяют эффекторную функцию родительской последовательности. Биологическая активность вариантной последовательности может быть повышенной, пониженной, или на таком же уровне по сравнению с родительской последовательностью.

"Изолированный" относится к молекуле, которая была очищена от своего источника или была получена рекомбинантными или синтетическими способами и очищена. Очищенные пробиотические молекулы существенно свободны от других аминокислот.

"Существенно свободный" в настоящем документе означает менее чем примерно 5%, обычно менее чем примерно 2%, более обычно менее чем примерно 1%, еще более обычно менее чем примерно 0,5%, наиболее обычно менее чем примерно 0,1% контаминацию аминокислотами других источников. "Существенно чистая" композиция пробиотической молекулы означает композицию, содержащую по меньшей мере примерно 90 % по массе пробиотической молекулы в расчете на общую массу композиции, обычно по меньшей мере примерно 95 % по массе, более обычно по меньшей мере примерно 90 % по массе, еще более обычно по меньшей мере примерно 95 % по массе и еще более обычно по меньшей мере примерно 99 % по массе нуклеотида в расчете на общую массу композиции.

Используемый в данном документе термин "лечение" или "терапия" представляет собой подход для получения полезных или желательных клинических результатов. Для целей настоящего изобретения полезные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, снижение симптомов, снижение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, откладывание или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или не обнаруживаемую. "Лечение" и "терапия" могут также означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения или терапии. Таким образом, термин "лечение" или "терапия" представляет собой вмешательство, проводимое с целью изменения патологии расстройства. В частности, лечение или терапия могут непосредственно предотвращать, замедлять или иным образом уменьшать патологию заболевания или расстройства, такого как инфекция, или могут сделать инфекцию более восприимчивой к лечению или терапии другими терапевтическими агентами.

Термины "терапевтически эффективное количество", "эффективное количество" или "достаточное количество" означают количество, достаточное при введении субъекту, включая млекопитающего, например человека, для достижения желаемого результата, например, количество, эффективное для лечения инфекции. Эффективные количества пробиотических молекул, описанных в настоящем документе, могут изменяться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и вес субъекта. Режимы дозирования или лечения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа, как понятно специалисту.

Кроме того, режим лечения субъекта терапевтически эффективным количеством может состоять из однократного введения или, альтернативно, включать серию применений. Продолжительность периода лечения зависит от множества факторов, таких как степень тяжести и/или место заболевания, возраст субъекта, концентрация агента, ответная реакция пациента на агент или их комбинации. Также следует понимать, что эффективная дозировка агента, используемого для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в ходе конкретного режима лечения. Изменения дозировки могут возникать и проявляться в стандартных диагностических анализах, известных в данной области техники. Пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут в некоторых аспектах вводиться до, во время или после лечения традиционными способами лечения рассматриваемого заболевания или расстройства, такого как инфекция.

Термин "субъект", применяемый в данной заявке, относится к любому представителю "царства" животных, включая птиц, рыб, беспозвоночных, земноводных, млекопитающих и рептилий. Как правило, субъект является относящимся к человеку или не относящимся к человеку позвоночному. Не относящиеся к человеку позвоночные включают сельскохозяйственных животных, домашних животных и лабораторных животных. Не относящиеся к человеку субъекты также в частности включают не относящиеся к человеку приматов и грызунов. Не относящиеся к человеку субъекты также в частности включают, без ограничения, домашнюю птицу, кур, лошадей, коров, свиней, коз, собак, кошек, морских свинок, хомяков, норок, кроликов, ракообразных и моллюсков. Обычно субъект представляет собой птицу или млекопитающее. Термин "млекопитающее" относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая человека, других высших приматов, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных в зоопарке, спортивных или комнатных животных, таких как собаки, кошки, крупный рогатый скот, лошади, овцы, свиньи, козы, кролики и т.д. Обычно млекопитающее представляет собой человека.

Введение "в сочетании с" одним или более дополнительными терапевтическими агентами включает в себя одновременное (совместное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает, что соединение или комбинация соединений совместимы с остальными ингредиентами состава для фармацевтического применения, и что его в основ-

ном безопасно вводить людям в соответствии с установленными государственными стандартами, в том числе теми, которые опубликованы Управлением по контролю за продуктами питания и лекарствами США.

"Носители", как применяют в настоящем документе, включают фармацевтически приемлемые носители, эксципенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или субъекта, подвергаемых их воздействию при используемых дозах и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный рН буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфорную, лимонную и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, например, сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и PLURONICS™.

"Липосома" представляет собой маленькую везикулу, которая состоит из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активных веществ, которые могут использоваться для доставки агента, такого как пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, субъекту, такому как млекопитающее. Компоненты липосомы обычно собраны в двухслойную структуру, похожую на липидную структуру биологических мембран.

В понимании объема настоящей заявки слова "один" и "указанный" служат для обозначения, что есть один элемент или более. Кроме того, термин "содержит" и его производные при использовании в настоящем документе следует понимать как неограничивающие термины, которые определяют наличие упомянутых свойств, элементов, компонентов, групп, систем и/или этапов, но не исключают наличия других неупомянутых свойств, элементов, компонентов, групп, систем и/или этапов. Вышеизложенное также применяют к словам, имеющим одинаковые значения, таким как термины, "включая", "имея" и их производным.

Следует понимать, что любые аспекты, описанные как "содержащие" определенные компоненты, могут также "состоять из" или "состоять существенно из", где "состоять из" имеет ограниченное или ограничительное значение, а "состоять преимущественно из" означает включение спецификационных компонентов, но невключение других компонентов, за исключением материалов, присутствующих как примеси, неизбежных материалов, присутствующих как результат процессов, применяемых для обеспечения компонентов, и компонентов, добавленных с целью, отличной от достижения технического эффекта изобретения. Например, композиция, определенная с использованием фразы "состоящая существенно из" охватывает все известные фармацевтически приемлемые добавки, эксципенты, растворители, носители и тому подобное. Обычно композиция, состоящая существенно из набора компонентов, будет содержать менее чем 5% по массе, обычно менее чем 3% по массе, более обычно менее чем 1% по массе не спецификационных компонентов.

Следует понимать, что любой компонент, определенный в настоящем документе как включенный, может быть явным образом не включен в формулу изобретения при помощи оговорки или негативного признака. Например, в аспектах изобретения энтеральные инфекции, такие как энтеральные бактериальные и/или энтеральные вирусные инфекции, явным образом не включены в композиции и способы, описанные в настоящем документе. В других аспектах изобретения молекулы, описанные в настоящем документе, не являются бактериоцинами.

Кроме того, все приведенные в настоящем документе диапазоны включают конец диапазонов, а также все промежуточные точки диапазона, указано ли это явно или нет.

Наконец, термины степени, такие как "по существу", "примерно" и "приблизительно", при использовании в данном документе означают приемлемую величину отклонения модифицированного термина, из условия чтобы конечный результат не был значительно изменен. Эти термины степени должны толковаться как включающие отклонение по меньшей мере $\pm 5\%$ от модифицированного термина, если такое отклонение не отрицает значение слова, которое оно модифицирует.

Пробиотические молекулы и композиции, содержащие пробиотические молекулы.

В настоящем изобретении предложены пробиотические молекулы, выделенные из пробиотических бактерий и других культуральных фракций, таких как бесклеточный супернатант, бактерий, которые могут минимизировать, ингибировать, лечить и/или предотвращать инфекцию у субъекта, обычно не энтеральные инфекции. В частности, молекула (молекулы) могут быть получены из одного или более видов бактерий, выбранных из группы, состоящей из родов *Aerococcus*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Weissella*. Конкретные пробиотически активные виды молочнокислых бактерий включают *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus*

casei subsp. paracasei, *Lactobacillus casei* subsp. casei, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei* subsp. paracasei, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. cremoris, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus thermophilus*. Дополнительные примеры содержат пробиотически активные виды *Bifidobacterium* включая *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis* и *Bifidobacterium breve*.

Дополнительные виды бактерий могут быть выбраны из группы, состоящей из пробиотически активных *Paenibacillus lautus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosus*, а также микроорганизма *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, штамм LC-705, DSM 7061, описанный в публикации EP № 0576780, и описанный как *Lactobacillus rhamnosus* LC-705, DSM 7061 в US5908646, отдельно или в комбинации с бактерией рода *Propionibacterium* или другим штаммом *Lactobacillus casei*.

Конкретные штаммы пробиотических бактерий, которые могут продуцировать описанные в настоящем документе молекулы, в некоторых аспектах, выбирают из группы штаммов, состоящей из: *Bifidobacterium animalis* штамм DSM 15954, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* штамм DSM 15953, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* штамм DSM 15955, *Enterococcus faecium* штамм DSM 15958, *Lactobacillus acidophilus* штамм DSM 13241 (La-5), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* штамм DSM 15956, *Lactobacillus helveticus* штамм DSM 14998, *Lactobacillus helveticus* штамм DSM14997, *Lactococcus lactis* штамм DSM14797, *Streptococcus thermophilus* штамм DSM15957, *Lactobacillus fermentum* штамм ATCC55845 и *Lactobacillus rhamnosus* штамм ATCC55826.

В преимущественных аспектах молекулы получают из *Lactobacillus acidophilus* (La-5), а также из штаммов *Pediococcus*, штаммов *Bifidobacterium*, таких как, но не ограничиваясь ими, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium crudilactis*, а также из штаммов *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* и *Streptococcus thermophilus*.

В настоящее время было показано, что пробиотические молекулы эффективны против не энтеральных патогенов, также были идентифицированы новые молекулы, которые эффективны против энтеральных и не энтеральных патогенов. Пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, включают молекулы, описанные в международных патентных заявках №№ WO 2009/155711 и WO 2015/021530, каждая из которых включена во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых аспектах пробиотические молекулы представляют собой малые молекулы, обычно белковые, которые являются термостойкими (могут нагреваться, замораживаться и размораживаться и все еще проявлять активность), стабильны в течение длительных периодов времени в замороженном состоянии (более двух лет), могут быть легко продуцированы в больших объемах (например, около 2 мг/л) и могут быть высушены такими способами, как лиофилизация и/или высушивание распылением. Обычно молекулы представляют собой пептиды.

Молекулы могут быть включены в различные вещества для введения субъекту, такому как любой тип животного и человек. Например, молекулы могут быть включены в любой тип пищевого продукта, пищевой добавки или напитка для потребления животным или человеком.

Как терапевтическое средство, пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть введены известным образом животному или человеку для эффективного лечения инфекции. Как терапевтическое или профилактическое средство, лечение можно проводить в сочетании с другими терапиями, если это желательно. В другом варианте осуществления пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть применены в композициях и способах в добавление к применению целых пробиотических бактерий. Альтернативно, целые пробиотические бактерии могут быть использованы отдельно, при условии, что бактерии культивируют и/или используют так, что молекулы продуцируются в культуральной среде в терапевтически эффективном количестве.

В некоторых аспектах пробиотические молекулы получают из пробиотических бактерий, таких как *Lactobacillus acidophilus* (La-5), где молекула содержит одну или более из следующих аминокислотных последовательностей: MALPPK, CVLPPK, HLLPLP и LKPTPEGD. Обычно молекула содержит одну или более из следующих аминокислотных последовательностей: MALPPK, CVLPPK, HLLPLP и LKPTPEGD. Специалисту в данной области понятно, что эти последовательности могут быть изменены путем делеции, замены или вставки при условии, что активность молекул существенно не снижена. Например, последовательность может содержать XX[L или I]PPK, при этом X обозначает гидрофобную аминокислоту. Альтернативно, последовательность может содержать X₁X₂[L или I]PPK, при этом X₁ выбран из N, C, Q, M, S и T, и при этом X₂ выбран из A, I, L и V.

Последовательности могут дополнительно содержать вставки, замены или делеции одного или более аминокислотных остатков. Кроме того, молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть

дополнительно изменены с помощью гликозилирования, дегликозилирования, органических и неорганических солей и ковалентно модифицированы. Также охватываются молекулы, модифицированные для увеличения периода полувыведения *in vivo*, например, пегилированные. Возможные, но не ограничивающие модификации молекул, описанных в настоящем документе, включают модификации, содержащие комбинации аминокислотных замен вместе с делецией одной или более аминокислот или добавлением одной или более аминокислот.

В общем аспекте молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть предоставлены в терапевтически эффективном количестве отдельно или в составе композиции и в количествах, которые могут изменяться в зависимости от таких факторов, как статус инфекции/состояние здоровья, возраст, пол и вес реципиента. Режимы дозирования или лечения могут быть скорректированы для обеспечения оптимального терапевтического ответа и могут зависеть от решения лечащего врача или ветеринара. Например, несколько разделенных доз могут быть введены ежедневно или с периодическими интервалами, и/или дозу можно пропорционально уменьшить, в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Количество молекулы для введения будет зависеть от пути введения, времени введения и может изменяться в соответствии с индивидуальными ответами субъекта. Подходящими путями введения являются, например, местный, оральный, ректальный или парентеральный (например, внутривенный, подкожный или внутримышечный) путь. Кроме того, молекулы могут быть включены в полимеры, обеспечивающие замедленное высвобождение, причем полимеры имплантируются вблизи места, где требуется доставка, например, в место инфекции, или полимеры могут быть имплантированы, например, подкожно или внутримышечно или доставлены внутривенно или внутрибрюшинно так, чтобы привести к системной доставке молекул, описанных в настоящем документе.

Описанные в настоящем документе молекулы могут быть введены в форме, например, таблетки, капсулы, таблетки для рассасывания, облатки, раствора, суспензии, эмульсии, порошка, аэрозоля, суппозитория, спрея, пастилки, мази, крема, пасты, пены, геля, тампона, пессария, гранулы, болюса, жидкости для полоскания рта или трансдермального пластыря. Молекулы могут быть введены в виде бесклеточного супернатанта, который, в некоторых аспектах, представляет собой концентрат бесклеточного супернатанта. Концентрат может быть в виде жидкости или порошка.

Лекарственные формы включают лекарственные формы, подходящие для перорального, ректального, назального, ингаляционного, местного (в том числе дермального, трансдермального, буккального и сублингвального), вагинального, парентерального (включая подкожного, внутримышечного, внутривенного, интрадермального, интраокулярного, интратрахеального и эпидурального), интрацестерального или ингаляционного введения. Для удобства лекарственные формы могут быть представлены в виде стандартной дозовой формы и могут быть получены традиционными способами, используемыми в фармацевтике. Такие способы включают этап объединения активного ингредиента с фармацевтическим носителем (носителями) или эксципиентом (эксципиентами). В общем, композиции готовят путем равномерного и тщательного объединения активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями, либо и теми и другими, с последующим, в случае необходимости, формированием продукта.

Лекарственные формы для перорального введения могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, облатки или таблетки, каждая из которых содержит предварительно заданное количество активного ингредиента; или в виде порошка или гранул; или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле и т.д.

Таблетка может быть изготовлена путем прессования или отливки в форме необязательно с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть изготовлены путем прессования в подходящих машинах молекул, описанных в настоящем документе, в свободно текущей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанных со связующим веществом, смазывающим веществом, инертным разбавителем, консервантом, поверхностно-активным и/или диспергирующим агентом. Литые таблетки могут быть приготовлены путем разлива по формам в подходящей машине смеси порошкообразных соединений, смоченной инертным жидким разбавителем. Таблетки могут быть необязательно покрыты оболочкой или помечены риской и могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить замедленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента, содержащегося в них.

Составы для местного применения через рот включают таблетки для рассасывания, содержащие ингредиенты в ароматизированной основе, обычно сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик; и ополаскиватели для полости рта, содержащие ингредиент в подходящем жидком носителе.

Составы, подходящие для местного введения в кожу, могут быть представлены в виде мазей, кремов, гелей или паст, содержащих ингредиент, который нужно вводить, в фармацевтически приемлемом носителе. В одном варианте осуществления система местной доставки представляет собой трансдермальный пластырь, содержащий ингредиент, который нужно вводить.

Лекарственные формы для ректального введения могут быть представлены в виде суппозитория с подходящей основой, содержащей, например, масло какао или салицилат.

Лекарственные формы, подходящие для назального введения, в которых носитель представляет собой твердую фазу, включают неизмельченный порошок, имеющий размер частиц, например, в диапазоне от 20 до 500 микрон, который вводят путем быстрой ингаляции через носовые ходы порошка из контейнера, подносимого близко к носу. Подходящие лекарственные формы, в которых носитель представляет собой жидкость, для введения, например, назальный спрей или назальные капли, включают водные или масляные растворы активного ингредиента.

Лекарственные формы, подходящие для вагинального введения, могут быть представлены в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие ингредиенты, как носители, которые, как известно из уровня техники, являются подходящими.

Лекарственные формы, подходящие для ингаляции, могут быть представлены в виде аэрозолей, распылительных растворов, порошков или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту такие ингредиенты, как носители, которые, как известно из уровня техники, являются подходящими.

Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворы, которые делают лекарственную форму изотонической по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты и загустители. Лекарственные формы, подходящие для парентерального введения, включают аэрозольные препараты антиангиогенных агентов в том числе, но не ограничиваясь ими, частицы низкомикронных или нанометрических (например, менее 2000 нм, обычно менее 1000 нм, наиболее обычно менее 500 нм в поперечном сечении в среднем) размеров, каковые частицы состоят из молекул, описанных в настоящем документе, отдельно или в комбинации с дополнительными ингредиентами или в полимере для пролонгированного высвобождения. Лекарственные формы могут быть представлены в однократных или многократных контейнерах, например, запечатанные ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном сублимацией (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Приготовленные для немедленного приема растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток ранее описанного типа.

Композиции, содержащие описанные в настоящем документе молекулы, могут содержать от примерно 0,00001% по массе до примерно 99% по массе активного ингредиента и в любом диапазоне в указанном интервале значений. Например, типичные дозы могут содержать от примерно 0,1 мкг до примерно 100 мкг молекул, описанных в настоящем документе, на дозу 300 мг, например, примерно 0,5 мкг, примерно 1 мкг, примерно 2 мкг, примерно 3 мкг, примерно 4 мкг, примерно 5 мкг, примерно 6 мкг, примерно 7 мкг, примерно 8 мкг, примерно 9 мкг, примерно 10 мкг, примерно 25 мкг, примерно 50 мкг или примерно 75 мкг на дозу 300 мг, например, от примерно 0,1 мкг до около 10 мкг, или от примерно 1 мкг до примерно 5 мкг, или от примерно 1 мкг до примерно 2 мкг на дозу 300 мг (включая любые соответствующие приращения и проценты по массе).

Пробиотические молекулы могут вводиться на протяжении нескольких часов, дней, недель или месяцев, в зависимости от нескольких факторов, включающих тяжесть подлежащей лечению инфекции, считается ли рецидив инфекции вероятным или для профилактики инфекции и т.д. Введение может быть непрерывным, например, непрерывная инфузия в течение нескольких часов, дней, недель, месяцев и т.д. Альтернативно, введение может быть прерывистым, например, молекулы могут вводиться один раз в день на протяжении нескольких дней, один раз в час на протяжении нескольких часов или по любому другому такому графику, как это считается подходящим.

Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть получены с помощью хорошо известных способов получения фармацевтически приемлемых композиций, которые можно вводить субъектам, таким образом, что эффективное количество активного вещества объединено в смеси с фармацевтически приемлемым наполнителем. Подходящие наполнители описаны, например, в "Handbook of Pharmaceutical Additives" (составлено Майклом и Ирен Эш, Gower Publishing Limited, Олдершот, Англия (1995)). Исходя из этого, композиции включают, хотя и не исключительно, растворы веществ в сочетании с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями или разбавителями и могут содержаться в буферных растворах с подходящим рН и/или быть изотоническими с физиологическими жидкостями. В этой связи может быть сделана ссылка на патент США № 5843456 (который включен во всей своей полноте в настоящий документ посредством ссылки).

Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, например, стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстрин, агар, пектин, арахисовое масло, оливковое масло, кунжутное масло и воду. Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать один или более стабилизаторов, такие как, например, углеводы, включая сорбитол, маннитол, крахмал, сахарозу, декстрин и глюкозу, белки, такие как альбумин или казеин, и буферы, подобные щелочным фосфатам.

В другом неограничивающем аспекте введение пробиотических молекул может осуществляться любым способом, подходящим для введения молекулы в пищеварительный тракт, например, перорально

или ректально, после чего пробиотические молекулы попадают в кровоток. Бактерии, продуцирующие пробиотические молекулы и/или выделенные пробиотические молекулы, могут быть смешаны с носителем и нанесены на жидкий или твердый корм или на питьевую воду. Материал носителя должен быть нетоксичным для животного. Бактерии, продуцирующие пробиотические молекулы и/или выделенные пробиотические молекулы, также могут быть в составе композиции, представленной в виде пасты с бактериальным раствором для непосредственного введения в рот животного. Лекарственная форма может включать добавленные ингредиенты для улучшения вкусовых качеств, увеличения срока годности, придания питательной ценности и тому подобное. Если желательна воспроизводимая и измеренная доза, молекулы могут вводиться канюлей рубца, как описано в настоящем документе. Количество молекул, выделенных из пробиотических бактерий, подлежащих введению, зависит от факторов, влияющих на эффективность. Путем мониторинга инфекции до, во время и после введения пробиотических молекул из пробиотических бактерий, специалисты в данной области техники могут легко определить уровень дозировки, необходимый для уменьшения количества инфекции, переносимой животными. Молекулы из одного или более штаммов пробиотических бактерий могут быть введены совместно. Комбинация штаммов может быть полезной, поскольку отдельные животные могут различаться в отношении штамма, который является наиболее стойким у данного животного.

Способы введения пробиотических молекул по существу одинаковы как для профилактики, так и для лечения. Следовательно, исключена необходимость первоначально определить, переносится ли патогенная инфекция животными. Путем регулярного введения эффективной дозы всем животным в стаде риск заражения патогенной инфекцией может быть существенно уменьшен или устранен путем комбинации профилактики и лечения.

Специалисту в данной области техники понятно, что выделенные молекулы и содержащие их фракции культуры могут использоваться в сочетании с известными терапиями для профилактики и/или лечения инфекций у субъекта. Также понятно, что композиции пробиотических молекул, описанных в настоящем документе, будь то выделенные или во фракции культуры или в сочетании с пробиотическими бактериями, также могут использоваться в сочетании (в составе с) с источником сахара, таким как, например, глюкоза, в количестве до от примерно 0,01% до примерно 0,1% или более от массы композиции.

Также понятно, что хотя композиции, описанные в настоящем документе, могут быть непосредственно приняты внутрь или использованы в качестве добавки в сочетании с пищевыми продуктами, следует понимать, что они могут быть включены в различные пищевые продукты и напитки, включая, но не ограничиваясь этим, йогурты, мороженое, сыры, хлебобулочные изделия, такие как хлеб, печенье и пирожные, молочные продукты и заменители молока, кондитерские изделия, композиции пищевых масел, спреда, хлопья для завтрака, соки, мясо, плодоовощную продукцию и тому подобное. В объем термина "пищевые продукты" должны входить, в частности, пищевые продукты, которые возможно классифицировать как функциональные пищевые продукты, то есть "пищевые продукты, схожие по внешнему виду с обычными пищевыми продуктами и предназначенные для употребления в составе нормальной диеты, но которые были модифицированы для физиологических ролей, помимо предоставления простых питательных веществ. Подобным образом, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в дозированных формах, таких как капсула или высушенная и спрессованная таблетка или ректальный или вагинальный суппозиторий, или в виде аэрозоля или ингалятора. Опять же, количество активных пробиотических молекул будет изменяться в зависимости от конкретного пищевого продукта или напитка и может содержать любое количество до примерно 100% продукта, особенно когда они сформулированы в виде глотаемой капсулы/таблетки.

Специалисту в данной области также понятно, что молекулы, описанные в настоящем документе, независимо от того, выделены ли они или представлены как внутри фракции культуры, могут быть объединены с использованием пробиотических бактерий в способах лечения или для пищевых добавок. В конкретных аспектах молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть объединены с живыми пробиотическими бактериями вида, из которого получены молекулы. В других аспектах эти виды бактерий могут быть исключены из композиций. В других аспектах молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть объединены с живыми пробиотическими бактериями вида, который не продуцирует данные молекулы.

Способы применения.

Неожиданным образом обнаружили, что пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, при введении в выделенной форме или в форме бактерий, из которых получают пробиотические молекулы, нашли применение при лечении инфекций, согласно аспектам изобретения при лечении энтеральных или не энтеральных инфекций, ряд которых в частности описан ниже.

Согласно отдельным аспектам настоящего изобретения молекулы, описанные в настоящей заявке, синергетически взаимодействуют друг с другом и/или с антибиотиками или другими противомикробными агентами при лечении и/или профилактики энтеральной или не энтеральной инфекции и/или снижении вирулентности энтеральной или не энтеральной инфекции, понижая резистентность к антибиотикам и/или повышая чувствительность определенного патогенного микроорганизма к общепринятому лечению, такому как лечение антибиотиками.

Энтеральные инфекции.

В число бактерий, обычно вовлеченных в энтеральные инфекции, входят *Escherichia coli*, такая как ЕНЕС, *Vibrio cholerae*, и несколько видов *Salmonella*, *Shigella* и анаэробных стрептококков. Энтеральные инфекции характеризуются диареей, абдоминальным дискомфортом, тошнотой и рвотой, а также анорексией. Тяжелая рвота и диарея могут приводить к значительной потере жидкости и электролитов.

Применение определенных пробиотических молекул для лечения энтеральных инфекций, таких как описанные выше, как бактериальных так и вирусных, описано в Международной заявке на патент №№ WO 2009/155711 и WO 2015/021530, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки. К настоящему времени идентифицированы дополнительные пептиды, такие как MALPPK, CVLPPK и HLLPLP, которые также находят применение в лечении и/или профилактике таких инфекций.

Инфекции мочевыводящих путей.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) являются одними из наиболее часто встречающихся бактериальных инфекций у людей, причем *E. coli* ответственна за 90 % всех ИМП и по оценке каждый год поражает 11,3 миллионов женщин [Marrs et al., 2005]. Штаммы *Lactobacillus*, которые являются доминирующей микрофлорой, обнаруживаемой во влагалище здоровых женщин, проникают туда из прямой кишки и промежности и формируют во влагалище барьер, блокирующий проникновение уропатогенов. Концепцию искусственного увеличения количества лактобацилл с помощью пробиотиков давно обсуждают теоретически, но лишь недавно была показана ее эффективность [Reid and Bruce, 2005]. В ряде исследований было показано положительное влияние пробиотических штаммов *Lactobacillus*, применяемых в лечении ИМП, в частности при профилактике рецидивов ИМП [Bruce et al., 1992; Chrisholm, 2015; Delley et al., 2015; Stapleton et al., 2011]. Существует сильная потребность в нахождении безопасного, эффективного и не являющегося антибактериальным способа лечения рецидивов инфекций мочевыводящих путей [Stapleton et al., 2011].

Наиболее распространенным патогеном ИМП является *E. coli*, которая обладает вирулентностью, регулируемой посредством QS, и ранее было показано, что энтеральная *E. coli* становится менее вирулентной при лечении пробиотическими молекулами, описанными в настоящей заявке [Medellin-Pena et al., 2007, Medellin-Pena and Griffiths, 2009, включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки]. Уропатогенная *E. coli* (UPEC) имеет многие вирулентные гены, совпадающие с вирулентными генами энтеральной *E. coli* и активируемые таким же образом, и обладает T3SS. Таким образом, пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, должны быть эффективны в отношении снижения вирулентности штамма UPEC [Snyder et al., 2004]. Reid [2000] показал, что штамм *Lactobacillus acidophilus* вырабатывал соединение, которое значимо ингибировало адгезию уропатогенных энтерококков на уроэпителиальных клетках. Основным геном, чья роль в ИМП показана *in vivo*, являются гены *fim*, представляющие собой гены фимбриального белка, который необходим для прикрепления к поверхности уроэпителиальных клеток, что нужно для возникновения инфекции [Snyder et al., 2004]. Мы протестируем регуляцию этих генов в штамме UPEC на отрицательную регуляцию при воздействии пробиотических молекул, описанных в настоящей заявке, чтобы убедиться, что этот биопептид эффективно снижает вирулентность уропатогенного штамма *E. coli*.

Согласно другим аспектам, пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут найти применение в лечении острого цистита, например, вызванного *E. coli* или *S. saprophyticus*; в лечении пиелонефрита, например, вызванного *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* или *Proteus mirabilis*; при лечении осложненной ИМП, например, вызванной *E. coli*, *Enterococci*, *Klebsiella*, *Proteus* или *P. aeruginosa*; или простатита, например, вызванного *E. coli*, грамм-отрицательными бактериями, *Staphylococcus* или *Enterococcus*.

Бактериальный вагиноз.

Другой распространенной инфекцией является бактериальный вагиноз (БВ), для которого характерен переход в вагинальной микрофлоре от доминирования защитных лактобактерий к патогенным бактериям, и который является причиной до 25 % визитов в гинекологические клиники [Barrons and Tassone, 2008]. БВ повышает риск инфекции ВИЧ и повышает риск рождения детей с низкой массой тела и преждевременных родов [Reid and Burton, 2002]. Частота излечения БВ с помощью традиционных антибиотиков низкая, и до 50% женщин испытывают рецидив инфекции за 6 месяцев [Barrons and Tassone, 2008]. Ежедневный прием штаммов *Lactobacillus* приводил к восстановлению нормальной вагинальной микрофлоры у пациентов с асимптоматическим БВ [Reid and Burton, 2002]. В исследовании обнаружили, что применение штаммов *Lactobacillus* в виде монопрепарата было связано с частотой излечения БВ, сравнимой с частотой излечения при стандартной терапии антибиотиками [Barrons and Tassone, 2008].

Исследования показали, что применение лиофилизированных суппозиторий с пробиотическими бактериями дает возможность быстрой колонизации мочевого тракта пробиотическими клетками [Barrons and Tassone, 2008; Reid and Bruce, 2006]. Поскольку пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, устойчивы к способам высушивания, таким как лиофилизация, лиофилизированные суппозитории являются эффективным путем доставки. Это улучшило бы доступность пробиотических молекул к месту локализации инфекции.

Инфекции дыхательных путей.

Инфекции дыхательных путей охватывают большое число инфекций (отиты, пневмония, фарингиты) и патогенов, включая такие распространенные штаммы, как *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Staphylococcus aureus* [Nagalingam et al., 2013]. Инфекции дыхательных путей являются очень тяжелыми, особенно у младенцев и пожилых людей, и вносят значимый вклад в заболеваемость и смертность в мировом масштабе. Альтернативные методы лечения и профилактики принесли бы пользу [Veras de Araujo et al., 2015].

В настоящей заявке в частности рассмотрены инфекции нижних и верхних дыхательных путей с точки зрения пользы лечения описанными в настоящей заявке молекулами. Например, *Streptococcus pyogenes*, стрептококк группы А при стрептококковых фарингитах ("стрептококковое горло") и/или другие инфекции горла можно лечить молекулами, описанными в настоящей заявке.

Nagalingam и соавторы предполагают, что состав микробиома носовых пазух коррелирует с заболеванием. Микробиом носовых пазух пациентов с хроническим риносинуситом показал значимое снижение популяции молочнокислых бактерий (LAB) по сравнению со здоровыми лицами [Nagalingam et al., 2013]. Кроме того, они предполагают, что добавку LAB можно применять для защиты слизистых оболочек дыхательного пути от инфекций, так же как и в случае ЖК и мочеполового пути [Nagalingam et al., 2013]. Есть целый ряд исследований того, как пробиотики влияют на инфекции верхних дыхательных путей. Два примера показали, что в двух очень восприимчивых популяциях (младенцы и пожилые) у лиц, получавших пероральные добавки пробиотических бактерий, инфекции верхних дыхательных путей (ИВДП) встречались реже по сравнению с контрольными группами [Maldonado et al., 2012; Guilmard et al., 2010].

В большинстве исследований использовали пероральный прием пробиотических бактерий, однако назальные спреи также были эффективными [Skovberg et al., 2009]. Таким образом, еще одним способом доставки могут быть назальные спреи. Это улучшило бы доставку пробиотических бактерий к месту инфицирования.

Инфекция *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori вызывает хронический гастрит и отвечает за развитие язвенной болезни, и его считают фактором риска развития злокачественных заболеваний желудка, таких как лимфомы лимфоидной ткани, ассоциированные со слизистой оболочкой желудка, и аденокарцинома желудка [Wang et al., 2004]. Хотя существующие антибактериальные терапии являются эффективными, есть опасения, связанные с резистентностью к антибиотикам. Кроме того, такие лекарственные средства могут иметь негативные побочные эффекты, которые часто приводят к прекращению лечения. По этим причинам желательно изучать альтернативные терапии [Wang et al., 2004]. В своем исследовании Wang et al., [2004] обнаружили, что при приеме внутрь пробиотический йогурт, содержащий штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, был способен подавлять инфекцию *H. pylori* у людей [Wang et al., 2004]. В более старом исследовании обнаружили, что супернатант *Lactobacillus acidophilus* La1 подавлял рост *H. pylori* *in vitro*, и было показано, что он оказывал подавляющее действие на *H. pylori* у людей [Michetti et al., 1999]. В другом исследовании, проведенном Canducci с соавторами, было также показано, что истощенный культуральный супернатант *L. acidophilus* обладает способностью резко снижать жизнеспособность *H. pylori* как *in vitro*, так и *in vivo* [2000]. Это дает убедительное подтверждение того, что пробиотическая биоактивность, продуцируемая штаммами *Lactobacillus* в бесклеточной истощенной среде, может оказывать полезный эффект при лечении инфекции *H. pylori*.

Инфекция метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) отвечает за многие угрожающие жизни инфекции, включая пневмонию, сепсис, остеомиелит и эндокардит. Колонизация пациентов обычно длится в течение долгого периода времени, при этом 50 % пациентов остаются колонизированными по истечении одного года [Karska-Wysocki, et al., 2010]. MRSA представляет собой биопленку, вырабатываемую патогеном, которая способна к адгезии со многими поверхностями. Это исследование продемонстрировало, что *Lactobacillus acidophilus* обладали способностью элиминировать 99 % клеток MRSA через 24 ч инкубации. В исследовании этот эффект связывают с молочнокислыми бактериями, вырабатывающими биоактивные пептиды, которые ингибируют формирование биопленки [Karska-Wysocki, et al., 2010]. Показано, что пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, препятствуют системам QS, которые регулируют формирование биопленки. Это могло бы ингибировать биопленки и, следовательно, пробиотические молекулы могли бы быть эффективны в лечении не только MRSA, но и других резистентных к антибиотикам патогенов.

Здоровье полости рта.

Научные исследования подтверждают, что пробиотики эффективны для поддержания здоровья полости рта и профилактики болезней полости рта. Например, показано, что пробиотики могут усиливать симбиотическую микрофлору и предотвращать колонизацию патогенами, тем самым предотвращая воспаление десен [Niesta et al., 2012]. Есть несколько исследований, в которых оценивается применение *Lactobacilli* probiotics для поддержания здоровья полости рта. Результаты указывают на то, что применение таблеток, содержащих *L. reuteri*, было связано со значительным снижением *Prevotella intermedia* в слюне,

а также с количеством периодонтальных патогенов, таких как *P. gingivalis* [Iniesta et al., 2012]. Результаты указывают на то, что пероральное введение таблеток для рассасывания с *L. reuteri* может быть полезным в сочетании со снятием зубных отложений и выравниванием поверхности корней зубов при хроническом периодонтите [Teughels et al., 2013].

Porphyromonas gingivalis - распространенный патоген, ответственный за периодонтит. Пробиотический штамм *Lactobacillus* значительно снижал количество *P. gingivalis* [Matsuoka and Koga, 2014]. Примеры показывают, что применение пробиотических бактерий *Lactobacillus* может препятствовать адгезии патогенов, и колонизация этих бактерий может давать значимую пользу для здоровья.

Из вышесказанного очевидно, что пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут найти применение в лечении широкого множества патогенов, включая бактерии, вирусы, дрожжи, грибы и паразитов. Согласно аспектам изобретения патоген является энтеральным или не энтеральным и/или инфекция локализована или не локализована в кишечнике.

Например, пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут быть полезными при лечении бактериальной инфекции, вызванной родом, выбранным из группы, состоящей из

Abiotrophia, Achromobacter, Acidaminococcus,

Acidovorax, Acinetobacter, Actinobacillus, Actinobaculum, Actinomadura, Actinomyces,

Aerococcus, Aeromonas, Afipia, Agrobacterium, Alcaligenes, Alloiococcus, Alteromonas, Amycolata, Amycolatopsis, Anaerobospirillum, Anaerorhabdus, "Anguillina", Arachnia, Arcanobacterium, Arcobacter, Arthrobacter, Atopobium, Aureobacterium, Bacillus, Bacteroides, Balneatrix, Bartonella, Bergeyella, Bifidobacterium, Bilophila, Branhamella, Borrelia, Bordetella, Brachyspira, Brevibacillus, Brevibacterium, Brevundimonas, Brucella, Burkholderia, Buttiauxella, Butyrivibrio, Calymmatobacterium, Campylobacter, Capnocytophaga, Cardiobacterium, Catonella, Cedecea, Cellulomonas, Centipeda, Chlamydia, Chlamydophila, Chromobacterium, Chyseeobacterium, Chryseomonas, Citrobacter, Clostridium, Collinsella, Comamonas, Corynebacterium, Coxiella, Cryptobacterium, Delfia, Dermabacter, Dermatophilus, Desulfomonas, Desulfovibrio, Dialister, Dichelobacter, Dolosicoccus, Dolosigranulum, Edwardsiella, Eggerthella, Ehrlichia, Eikenella, Empedobacter, Enterobacter, Enterococcus, Erwinia, Erysipelothrix, Escherichia, Eubacterium, Ewingella, Exiguobacterium, Facklamia, Filif actor, Flavimonas, Flavobacterium, Flexispira, Francisella, Fusobacterium, Gardnerella, Gemella Globicatella, Gordona, Haemophilus, Hafnia, Helicobacter, Helococcus, Holdemania, Ignavigranum, Johnsonella, Kingella, Klebsiella, Kocuria, Koserella, Kurthia, Kytococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Lautropia, Leclercia, Legionella, Leminorella, Leptospira, Leptotrichia, Leuconostoc, Listeria, Listonella, Megasphaera, Methylobacterium, Microbacterium, Micrococcus, Mitsukella, Mobiluncus, Moellerella, Moraxella, Morganella, Mycobacterium, Mycoplasma, Myroides, Neisseria, Nocardia, Nocardiosis, Ochrobactrum, Oeskovia, Oligella, Orientia, Paenibacillus, Pantoea, Parachlamydia, Pasteurella, Pediococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus, Photobacterium, Photorhabdus, Plesiomonas, Porphyromonas, Prevotella, Propionibacterium, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Pseudonocardia, Pseudoramibacter, Psychrobacter, Rahnella, Ralstonia, Rhodococcus, Rickettsia, Rochalimaea, Roseomonas, Rothia, Ruminococcus, Salmonella, Selenomonas, Serpulina, Serratia, Shewenella, Shigella, Simkania, Slackia, Sphingobacterium, Sphingomonas, Spirillum, Staphylococcus, Stenotrophomonas, Stomatococcus, Streptobacillus, Streptococcus, Streptomyces, Succinivibrio, Sutterella, Suttonella, Tatumella, Tissierella, Trabulsiella, Treponema, Tropheryma, Tsákamurella, Turicella, Ureaplasma, Vagococcus, Veillonella, Vibrio, Weeksella, Wolinella, Xanthomonas, Xenorhabdus, Yersinia u Yokenella.

Например, бактериальная инфекция может быть вызвана бактерией, выбранной из группы, состоящей из

Actinomyces europeus, Actinomyces georgiae,

Actinomyces gerencseriae, Actinomyces graevenitzii, Actinomyces israelii, Actinomyces meyeri, Actinomyces naeslundii, Actinomyces neuii neuii, Actinomyces neuii anitratus, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces radingae, Actinomyces turicensis, Actinomyces viscosus, Arthrobacter creatinolyticus, Arthrobacter cumminsii, Arthrobacter woluwensis, Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus myroides, Bacillus pumilus, Bacillus sphaericus, Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Borrelia afzelii, Borrelia andersonii, Borrelia bissettii, Borrelia burgdorferi, Borrelia garinii, Borrelia japonica, Borrelia lusitaniae, Borrelia tanukii, Borrelia turdi, Borrelia valaisiana Borrelia caucasica, Borrelia crocidurae, Borrelia recurrentis, Borrelia duttoni, Borrelia graingeri, Borrelia hermsii, Borrelia hispanica, Borrelia latyschewii, Borrelia mazzottii, Borrelia parkeri, Borrelia persica, Borrelia recurrentis, Borrelia turicatae, Borrelia venezuelensi, Bordetella bronchiseptica, Bordetella hinzii, Bordetella holmseii, Bordetella parapertussis, Bordetella pertussis, Bordetella trematum, Clostridium absonum, Clostridium argentinense, Clostridium baratii, Clostridium bifermentans, Clostridium beijerinckii, Clostridium butyricum, Clostridium cadaveris, Clostridium carnis, Clostridium celatum, Clostridium clostridioforme, Clostridium cochlearium, Clostridium cocleatum, Clostridium fallax, Clostridium ghonii, Clostridium glycolicum, Clostridium haemolyticum, Clostridium hastiforme, Clostridium histolyticum, Clostridium indolis, Clostridium innocuum, Clostridium irregulare, Clostridium leptum, Clostridium limosum, Clostridium malenominatum, Clostridium novyi, Clostridium oroticum, Clostridium paraputrißcum, Clostridium piliforme, Clostridium putrefasciens, Clostridium ramosum, Clostridium septicum, Clostridium sordelii, Clostridium sphenoides, Clostridium sporogenes, Clostridium subterminale, Clostridium symbiosum, Clostridium tertium, Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia vulneris, Enterococcus avium, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus cecorum, Enterococcus dispar, Enterococcus durans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus flavescens, Enterococcus gallinarum, Enterococcus hirae, Enterococcus malodoratus, Enterococcus mundtii, Enterococcus pseudoavium, Enterococcus raffinosus, Enterococcus solitarius, Haemophilus aegyptius, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus par aphrophilus, Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus segnis, Haemophilus ducreyi, Haemophilus influenzae, Klebsiella ornitholytica, Klebsiella oxytoca, Klebsiella planticola, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae, Klebsiella terrigena, Lysteria ivanovii, Lysteria monocytogenes, Mycobacterium abscessus, Mycobacterium africanum, Mycobacterium alvei, Mycobacterium asiaticum, Mycobacterium aurum, Mycobacterium avium, Mycobacterium bohemicum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium branderi, Mycobacterium brumae, Mycobacterium celatum, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium chubense, Mycobacterium confluentis, Mycobacterium conspicuum, Mycobacterium cookii, Mycobacterium flavescens, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium gadium, Mycobacterium gastris, Mycobacterium genavense, Mycobacterium gordonae, Mycobacterium goodii, Mycobacterium haemophilum, Mycobacterium hassicum, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium interjectum, Mycobacterium heidelbergense, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium lentiflavum, Mycobacterium leprae, Mycobacterium malmoense, Mycobacterium marinum, Mycobacterium microgenicum, Mycobacterium

microti, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium shimoidei*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium thermoresistabile*, *Mycobacterium triplex*, *Mycobacterium triviale*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tusciae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium wolinskyi*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycoplasma buccale*, *Mycoplasma faucium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma lipophilum*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma primatum*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma spermatophilum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas monteillii*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Pseudomonas pertucinogena*, *Pseudomonas pseudocaligenes*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia prowazeldi*, *Rickettsia rickettsiae*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia typhi*, *Salmonella choleraesuis choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis arizonae*, *Salmonella choleraesuis bongori*, *Salmonella choleraesuis diarizonae*, *Salmonella choleraesuis houtenae*, *Salmonella choleraesuis indica*, *Salmonella choleraesuis salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis capitis*, *Staphylococcus c. ureolyticus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus cohnii cohnii*, *Staphylococcus c. ureolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis hominis*, *Staphylococcus h. novobioceticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi schleiferi*, *Staphylococcus s. coagulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosum*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis*, *Streptococcus equi equi*, *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus porcinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus constellatus*, *Streptococcus constellatus pharyngidis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus acidominimus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Vibrio alginolyticus*, *V. carchariae*, *Vibrio cholerae*, *C. cincinnatiensis*, *Vibrio damsela*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia pestis*, *Yersinia aldovae*, *Yersinia bercovieri*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia frederiksenii*, *Yersinia intermedia*, *Yersinia kristensenii*, *Yersinia mollaretii*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia rohdei*.

Альтернативно, пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут найти применение при лечении вируса из семейства, выбранного из группы, состоящей из Astroviridae, Caliciviridae, Picornaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Reoviridae, Bornaviridae, Retroviridae, Poxviridae, Herpesviridae,

Adenoviridae, Papovaviridae, Parvoviridae, Hepadnaviridae, (например, вируса, выбранного из группы, состоящей из вируса Коксаки А-24, вируса Адено 11, вируса Адено 21, вируса Коксаки В, вируса болезни Борна, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа, вируса калифорнийского энцефалита, вируса папилломы человека, вируса ветряной оспы, вируса колорадской клещевой лихорадки, вируса простого герпеса, вируса коровьей оспы, вируса парагриппа 1, вируса парагриппа 2, вируса парагриппа 3, вируса лихорадки Денге, вируса эболы, парвовируса В19, вируса Коксаки А- 16, ВПГ-1, вируса гепатита А, вируса гепатита В, вируса гепатита С, вируса гепатита D, вируса гепатита Е, вируса иммунодефицита человека, Коксаки В1-В5, вирусов гриппа А, В или С, вируса Ла-Кросс, вируса Ласса, вируса краснухи Коксаки А или В, эховируса, вируса лимфатического хориоменингита, ВПГ-2, вируса свинки, респираторно-синцитиального вируса, вируса Эпштейна-Барра, полиовируса, энтеровируса, вируса бешенства, рубивируса, вируса оспы человека, вируса WEE, вируса желтой лихорадки и вируса варицелла-зостер).

Альтернативно, пробиотические молекулы, описанные в настоящем документе, могут найти применение при лечении дрожжей или грибов. Например, грибок или дрожжевой грибок, который инфицировал хозяина, выбран из группы, состоящей из *Aspergillus* sp., *Dermatophytes*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* sp., *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum* и *Dematiaceous Fungi*.

При использовании в настоящем документе термин "паразит" или "паразитическая инфекция" следует рассматривать в значении организма, одноклеточного либо многоклеточного, отличного от вируса, бактерии, грибка или дрожжевого грибка, который способен инфицировать другой организм, например, человека. Примеры таких паразитов включают, например, паразита, выбранного из группы, состоящей из

Ancylostoma ceylanicum, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Balantidium coli*, *Blastocystis hominis*, *Clonorchis sinensis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Dientamoeba fragilis*, *Diphyllobothrium latum*, *Dipylidium caninum*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepatica*, *Enterobius vermicularis*, *Fasciola hepatica*, *Fasciolopsis buski*, *Giardia intestinalis* (син. *Giardia lamblia*), *Heterophyes heterophyes*, *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis nana*, *Isospora belli*, *Metagonimus yokogawai*, *Necator americanus*, *Opisthorchis felinus*, *Paragonimus westermani*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Taenia saginata*, *Trichuris trichiura*, *Babesia divergens*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Leishmania braziliensis* и *Leishmania donovani*.

Согласно аспектам изобретения, пробиотические молекулы можно применять в целом для снижения формирования биопленки или для разрушения уже сформированных биопленок. Пробиотические молекулы также могут найти применение в отрицательной регуляции вирулентных генов, преимущественно тех, которые связаны с ТЗСС, и в снижении присоединения патогенов к ткани и/или поверхностям. Предусмотрено также лечение ран и лечение и/или профилактика инфекций в ранах с применением пробиотических молекул, описанных в настоящей заявке.

В определенных аспектах изобретения предусмотрено лечение специфичных энтеральных инфекций. Например, туберкулоидный подвид *Mycobacterium avium* отвечает за хронический гранулематозный энтерит крупного рогатого скота. Молочная индустрия США сообщила о ежегодных потерях в 1,5 миллиарда долларов из-за заболевания и о том, что 22 % молочных стад в США инфицированы. У них ТЗСС, и поэтому ожидается лечение или профилактика путем применения пробиотических молекул, описанных в настоящем документе.

Согласно более общим аспектам изобретения пробиотические молекулы можно применять в качестве альтернативы или дополнения к стандартным терапиям антибиотиками, для того чтобы снизить применение антибиотиков и ослабить развитие резистентности к антибиотикам.

Пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут, согласно аспектам изобретения, быть введены, например, путем парентерального, внутривенного, подкожного, интрадермального, внутримышечного, внутричерепного, интраорбитального, офтальмического, интравентрикулярного, интракапсулярного, интраспинального, интрацестерияльного, внутрибрюшинного, интраназального, интравентрикулярного, интравагинального, аэрозольного или перорального введения. Обычно композиции согласно изобретению вводят перорально или непосредственно в место локализации инфекции.

Пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут, согласно аспектам изобретения, быть введены в комбинации, одновременно или последовательно, со стандартными терапевтическими средствами при инфекции, включая, например, антибиотики. Пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут находиться в лекарственной форме совместно с такими стандартными терапевтическими средствами, если это применимо.

Пробиотические молекулы, описанные в настоящей заявке, могут быть применены в любом подходящем количестве, но как правило они предложены в дозах, содержащих от примерно 1 до примерно 10000 нг/кг, таких как от примерно 1 до примерно 1000, примерно 1 до примерно 500, примерно 10 до

примерно 250, или от примерно 50 до примерно 100 нг/кг, таких как примерно 1, примерно 10, примерно 25, примерно 50, примерно 75, примерно 100, примерно 150, примерно 200, примерно 250, примерно 300 или примерно 500 нг/кг.

В вышеприведенном описании настоящее изобретение раскрыто в общих чертах. Более полное понимание можно получить посредством ссылки на следующие конкретные Примеры. Эти Примеры описаны исключительно в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема изобретения. Изменения в форме и замена эквивалентов предусматриваются в зависимости от обстоятельств или целесообразности. Хотя в настоящем документе использованы специфические термины, такие термины предназначены для описания, а не для ограничительных целей.

Примеры

Пример 1. Сводная информация по уropатогенной *E. coli* и идентификации биопептидов.

Цель.

Целью экспериментов было определить, может ли бесклеточный супернатант из La-5 отрицательно регулировать экспрессию вирулентных генов в уropатогенной *E. coli* (UPEC).

Материалы и методы.

Применяемый в этих экспериментах бесклеточный супернатант La-5 представлял собой серию D4. Два штамма UPEC были выделены при инфекции мочевыводящего пути собаки. Они были предоставлены патобиологической лабораторией Университета Гуэлфа. Штамм 1 получил обозначение UPEC99, а штамм 2 - UPEC804. Штаммы культивировали в агаре LB. Были протестированы две различные среды: LB и среда из синтетической мочи.

Наборы протестированных праймеров.

Обозначение гена	Название гена	FWD или REV	Последовательность 5'-3'
FimA	Фимбриальный белок типа 1	FWD	CATCGTTTCCAACGCATCCT
FimA	Фимбриальный белок типа 1	REV	GGTTGCGGCACCAATGGCATAATA
FliC	Флагеллин	FWD	ACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAA
FliC	Флагеллин	REV	GCGCTGTTAATACGCAAGCCAGAA
GapA	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	FWD	CATCGTTTCCAACGCATCCT
GapA	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	REV	ACCTTCGATGATGCCGAAGTT
PapA_2	Основной фимбриальный Pilus P	FWD	GTGCCTGCAGAAAATGCAGAT
PapA_2	Основной фимбриальный Pilus P	REV	CCCGTTTTCCAATCGAATCA
HylA	Гемолизин A	FWD	ACCTTGTCAGGACGGCAGAT
HylA	Гемолизин A	REV	CCGTGCCATTCTTTTCATCA
TufA	Фактор элонгации Tu	FWD	ACTTCCCGGGCGACGACACTC
TufA	Фактор элонгации Tu	REV	CGCCCGGCATTACCATCTCTAC

Анализы были проведены аналогично анализам *Salmonella*, как описано в Sharma 2014. UPEC выращивали 4 ч в присутствии бесклеточного супернатанта. Клетки собирали и выделяли РНК. Чтобы удалить геномную ДНК, РНК обрабатывали ДНКазой. РНК использовали в качестве матрицы для создания кДНК. кДНК проанализировали с помощью количественной ПЦР, и экспрессию генов нормализовали по отношению к референсному гену и сравнили с контролем без бесклеточной среды.

Результаты.

Таблица 1.1

Сравнение экспрессии генов в среде LB и в среде из синтетической мочи

Целевой ген	Штамм	Среда	Референсный ген	Отрицательная регуляция
FliC	Штамм 1 (E99)	LB	GapA	0,024
FliC	Штамм 1 (E99)	Среда из синтетической мочи	GapA	0,014
FliC	Штамм 2 (E804)	LB	GapA	0,56
FliC	Штамм 2 (E804)	Среда из синтетической мочи	GapA	0,045
HylA	Штамм 1 (E99)	LB	GapA	16,47
HylA	Штамм 1 (E99)	Среда из синтетической мочи	GapA	1,35
HylA	Штамм 2 (E804)	LB	GapA	Не экспрессировался
HylA	Штамм 2 (E804)	Среда из синтетической мочи	GapA	Не экспрессировался
FimA	Штамм 1 (E99)	LB	GapA	Не экспрессировался
FimA	Штамм 1 (E99)	Среда из синтетической мочи	GapA	Не экспрессировался
FimA	Штамм 2 (E804)	LB	GapA	Не экспрессировался
FimA	Штамм 2 (E804)	Среда из синтетической мочи	GapA	Не экспрессировался

Данные табл. 1.1 подтвердили, что бесклеточный супернатант эффективен при отрицательной регуляции HylA, но не FliC. Также в среде LB отрицательная регуляция HylA более выражена, чем в среде из синтетической мочи. Экспрессию этих генов в дальнейшем исследовали только в среде LB, поскольку в ней отрицательная регуляция генов была выше. Этот эксперимент поставили еще раз, чтобы подтвердить, что ответ был штаммоспецифичным.

Таблица 1.2

Сравнение штаммоспецифичной регуляции генов

Целевой ген	Штамм	Среда	Референсный ген	Отрицательная регуляция
FliC	Штамм 1 (E99)	LB	GapA	1,90
FliC	Штамм 2 (E804)	LB	GapA	0,705
HylA	Штамм 1 (E99)	LB	GapA	12,72
HylA	Штамм 2 (E804)	LB	GapA	Не экспрессировался

Данные табл. 1.2 подтверждают, что бесклеточный супернатант может отрицательно регулировать HylA, но только в штамме 1, поскольку HylA, по-видимому, в штамме 2 не экспрессируется. Бесклеточный супернатант, по-видимому, не оказывает влияния на отрицательную регуляцию FliC.

Таблица 1.3

Дозозависимая кривая серии D4 UPES штамма 1 (E99)

Целевой ген	Доза	Референсный ген	Отрицательная регуляция
HylA	4x	GapA	40,46
HylA	2x	GapA	19,86
HylA	1 x	GapA	24,69
HylA	0,5 x	GapA	4,90
HylA	0,25 x	GapA	2,79

1x доза является эквивалентом 10 мл бесклеточного супернатанта (1x). Отрицательная регуляция HylA коррелирует с количеством анализируемого материала. Это подтверждает, что бесклеточный супернатант специфично взаимодействует с регуляцией HylA и потенциальными последующими механизмами.

Таблица 1.4

Сводная таблица экспрессии гена *HylA* в штамме 1 (E99) в серии для испытаний стабильности (S1)

Целевой ген	Обработка	Референсный ген	Кратная отрицательная регуляция <i>HylA</i>
<i>HylA</i>	E99 0,25x	<i>GapA</i>	0,98
<i>HylA</i>	E99 0,5x	<i>GapA</i>	3,16
<i>HylA</i>	E99 1x	<i>GapA</i>	6,96
<i>HylA</i>	E99 2x	<i>GapA</i>	10,85

1x доза является эквивалентом 10 мл бесклеточного супернатанта (1x). Вторую серию материала протестировали для того, чтобы определить в сухом бесклеточном супернатанте, может ли дополнительная независимая производственная серия также отрицательно регулировать экспрессию *HylA*. Наблюдали дозозависимый ответ отрицательной регуляции *HylA* на количество сухого бесклеточного супернатанта.

Пример 2. Идентификация биоактивных молекул из бесклеточного супернатанта.

Цель.

Целью этих экспериментов было идентифицировать биоактивные пептиды из бесклеточного супернатанта.

Материалы и методы.

Бесклеточный супернатант разделяли с использованием смолы Сефадекс G75. Образцы разделяли и собирали по фракциям: фракция 1 (>163000 Да), фракция 2 (163000-14500 Да), фракция 3 (14500-1300 Да), фракция 4 (1300-110 Да), фракция 5 (110-10 Да). Образцы собирали и анализировали с помощью количественной ПЦР с использованием штамма *Salmonella enteric* тифимуриум DT104. Отрицательную регуляцию *HilA* сравнивали с референсным геном 16S.

Праймеры:

HilA FWD 5'-3'-TGTCGGAAGATAAAGAGCAT

HilA REV 5'-3'-AAGGAAGTATCGCCAATGTA

16S FWD 5'-3'-CAAGTCATCATGGCCCTTAC

16S REV 5'-3'-CGGACTACGACGCACTTTAT

Активную фракцию после эксклюзионной хроматографии G75 в дальнейшем разделяли с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Фракции после обратной фазы: фракция 1 (0-2 мин), фракция 2 (2-4 мин), фракция 3 (4-16 мин), фракция 4 (16-32 мин), фракция 5 (32-40 мин), фракция 6 (40-58 мин). Фракции высушивали и нейтрализовывали с целью удаления из раствора ацетонитрила и трифторуксусной кислоты. Высушенные фракции анализировали с использованием тех же условий анализа по количественной ПЦР, как описано выше. Фракции анализировали с помощью независимого секвенирования в высокотехнологичном аналитическом центре Университета Гуэлфа. Провели сравнение пептидов из активных фракций 6 серий, и установили часто встречающиеся в сериях пептиды.

Таблица 2.1

Определение отрицательной регуляции в фракциях, полученных на эксклюзионной хроматографии, по методу количественной ПЦР

Обработка	Целевой ген	Референсный ген	Кратная отрицательная регуляция
Ввод	<i>HilA</i>	16S	14,36
Фракция 1	<i>HilA</i>	16S	1,38
Фракция 2	<i>HilA</i>	16S	2,98
Фракция 3	<i>HilA</i>	16S	10,97
Фракция 4	<i>HilA</i>	16S	1,84
Фракция 5	<i>HilA</i>	16S	3,30

Фракцию 3, полученную на эксклюзионной хроматографии, охарактеризовали дополнительно, поскольку ее активность была аналогична активности при вводе, а это подтверждает, что активность этой фракции является основным компонентом биоактивных молекул.

Таблица 2.2

Количественная ПЦР отрицательной регуляции в полученной после обращенно-фазовой хроматографии (ОФ) фракции, которую очистили из фракции 3, полученной после эксклюзионной хроматографии

Обработка	Целевой ген	Референсный ген	Кратная отрицательная регуляция
ОФ фракция 1	<i>HilA</i>	16S	1,15
ОФ фракция 2	<i>HilA</i>	16S	0,68
ОФ фракция 3	<i>HilA</i>	16S	3,78
ОФ фракция 4	<i>HilA</i>	16S	0,56
ОФ фракция 5	<i>HilA</i>	16S	169
ОФ фракция 6	<i>HilA</i>	16S	0,0096

ОФ фракции 3 и 5 были выбраны для независимого секвенирования, результаты получены для

фракции 5, поскольку она обладала наибольшей активностью. Следует отметить, что MALPPK также обнаружили в ОФ фракции 3, но другие пептиды были обнаружены только в фракции 5.

Таблица 2.3

Независимое секвенирование биопептидов ОФ фракции 5,
проанализированных из 6 производственных серий

Последовательность пептида	Номер серии					
	D4	D8	D10	D14	D15	P64
MALPPK	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует
CVLPPK	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует
HLLPLP	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Не обнаружен	Не обнаружен
LKPTREGD	Не обнаружен	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Присутствует	Не обнаружен

Независимое секвенирование использовали для идентификации аминокислотных последовательностей, ответственных за отрицательную регуляцию вирулентных генов, таких как HlyA, в *Salmonella enterica* тифимуриум DT104. Анализировали шесть независимых производственных серий. Бесклеточный супернатант разделяли с использованием эксклюзионной хроматографии (Сефадекс G75). Образцы выделяли в 5 фракций на основании их молекулярной массы. Третью фракцию с прогнозируемой молекулярной массой в диапазоне 14,5-1,3 кДа дополнительно проанализировали с помощью обращенно-фазовой хроматографии, а фракцию ОФ 5 проанализировали с помощью независимого секвенирования. При сравнении всех проанализированных биопептидов были идентифицированы два пептида, часто встречающиеся во всех шести сериях, и два дополнительных пептида, часто встречающиеся по меньшей мере в 4 сериях. Поскольку независимое секвенирование дает только количественный анализ, все эти четыре пептида были синтезированы, чтобы идентифицировать, какие пептиды ответственны за отрицательную регуляцию HlyA у *Salmonella enteric* тифимуриум DT104.

Таблица 2.4

Полуколичественное определение биопептидов из
полученной на эксклюзионной хроматографии фракции 3
из серии для испытаний стабильности I (S1)

Последовательность пептида	Концентрация пептида (нг/мл)
MALPPK	2500
CVLPPK	Ниже предела обнаружения
HLLPLP	2,5-5
LKPTREGD	25-50
YPVEPF	10-25
YPPGGP	100

Выбранные по независимому секвенированию биопептиды и два дополнительных пептида, которые были идентифицированы в Международной заявке на патент № WO 2009/155711, проанализировали с помощью масс-спектрометрии с использованием метода мониторинга множественных реакций (MRM) с целью полуколичественного определения количества биопептида, находившегося в серии для испытаний стабильности S1. Пиковое значение каждого пептида сравнивали с пиковым значением серий разведения известного количества каждого биопептида. С помощью такого полуколичественного метода идентифицировали, что MALPPK был наиболее часто встречающимся пептидом из 6 проанализированных пептидов.

Таблица 2.5

Анализ с помощью количественной ПЦР изменений в экспрессии
HylA и HlyA в присутствии отдельных синтетических биопептидов

Последовательность пептида	Целевой ген	Референсный ген	Кратная отрицательная регуляция
MALPPK	HylA	GapA	9,06
CVLPPK	HylA	GapA	3,20
HLLPLP	HylA	GapA	2,64
LKPTREGD	HylA	GapA	4,69
YPVEPF	HylA	GapA	1,03
YPPGGP	HylA	GapA	3,56
MALPPK	HlyA	16S	19,56
CVLPPK	HlyA	16S	3,75
HLLPLP	HlyA	16S	2,93
LKPTREGD	HlyA	16S	11,08
YPVEPF	HlyA	16S	0,68
YPPGGP	HlyA	16S	2,93

Синтетические биопептиды проанализировали в количестве 50 мкг на анализ. Анализ с помощью количественной ПЦР подтвердил, что все пептиды влияют на отрицательную регуляцию HylA за исключением YPVEPF. По-видимому, пептид MALPPK оказывает самое сильное влияние на отрицательную

регуляцию HylA, а затем следуют LKPTPEGD, YPPGGP, CVLPPK и HLLPLP.

Сводная информация.

Данные, представленные в табл.х 2.1-2.5 демонстрируют, что пептиды, обнаруженные в бесклеточном супернатанте из ферментизированной La-5 среды могут отрицательно регулировать экспрессию HylA в *Salmonella enterica* тифимуриум DT104 и гемолизина A (HylA). HylA - порообразующий токсин, вырабатываемый UPEC и являющийся одним из вирулентных факторов, задействованных в инфекционном процессе. По-видимому, взаимодействие является специфическим, поскольку присутствие бесклеточного супернатанта не оказывает отрицательной регуляции экспрессии флагеллина (FNC). Две независимых производственных серии продемонстрировали дозозависимую специфичную отрицательную регуляцию HylA. При независимом секвенировании полученной на эксклюзионной хроматографии фракции 3 идентифицировали четыре пептида. Были синтезированы эти четыре пептида и два дополнительных пептида из предыдущего патента, и их влияние на экспрессию гена HylA было количественным образом оценено с помощью количественной ПЦР. Проанализировали все биопептиды за исключением YPVEPF, и MALPPK оказался наиболее активным пептидом из 6 проанализированных пептидов.

Пример 3. Анализ клеточной токсичности уропатогенной *E. coli*.

Цель.

Целью этого эксперимента было определить с помощью анализа физиологической клеточной токсичности, снижалась ли выработка токсина у уропатогенной *E. coli* в присутствии бесклеточной среды *Lactobacillus acidophilus*.

Материалы и методы.

Высушенный бесклеточный супернатант растворили в жидкой питательной среде LB (14 мг/мл) и довели до pH 7,2 с использованием 0,1 N NaOH. Раствор развели жидкой питательной средой LB до конечной концентрации. Жидкую питательную среду (5 мл) инокулировали 50 мл культуры штамма UPEC099 18 ч. Образец выращивали в течение 4 ч при 37°C с перемешиванием 200 об/мин. Аликвоту культуры 1 мл центрифугировали при 10000 × g, чтобы удалить клетки *E. coli*. Супернатант (100 мл) добавили к 1 мл клеток млекопитающих HT29 (1Е6 клеток/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C с добавлением 5% CO₂. После инкубации смесь перенесли в 1,5 мл тубу и центрифугировали при 250 × g, чтобы удалить клетки млекопитающих. Супернатант (50 мкл) использовали для тестирования клеточной токсичности с помощью набора для анализа цитотоксичности "Pierce Lactate Dehydrogenase LDH" (Thermo Fisher Scientific). Растворы для анализа приготавливали в соответствии с инструкциями производителя. 50 мкл супернатанта инкубировали с 50 мкл аналитической реакционной смеси в 96-луночном планшете. Планшет накрывали фольгой для защиты от света и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Добавляли смесь для остановки реакции (50 мкл), и данные с 96-луночного планшета считывали при 490 нм и 680 нм. Значения абсорбции были использованы для расчета цитотоксичности, данные выражены как процент ингибирования.

Результаты/обсуждение.

Данные, представленные на фиг. 1 и 2, показывают ингибирование образования токсина UPEC бесклеточным супернатантом. Эти данные дают физиологическое подтверждение тому, что бесклеточный супернатант способен дозозависимым образом снижать влияние токсина на клетки млекопитающих HT29. Лактатдегидрогеназа является физиологическим маркером лизиса клеток, и ингибирование лактатдегидрогеназы в конечной точке анализа подтверждает, что лизису подверглось меньшее количество клеток млекопитающих, из чего можно сделать вывод, что бесклеточный супернатант может снижать количество токсина, вырабатываемого UPEC099.

Пример 4. Тестирование бесклеточного супернатанта из дополнительных пробиотических бактерий.

Цель.

Целью данного эксперимента было определить, вырабатывают ли другие пробиотические бактерии аналогичные биоактивные пептиды, в бесклеточном супернатанте.

Материалы и методы.

Все пробиотические бактерии культивировали в течение 48 ч с использованием одинаковой ферментационной среды. Клетки были выделены из ферментационной среды с помощью центрифугирования, и бесклеточный супернатант был нейтрализован до pH 7 с помощью 0,1 N NaOH. Супернатант разделили по алиquotам на образцы 10 мл и лиофилизировали. Аликвоту использовали либо для биологического анализа, либо для эксклюзионной хроматографии. Для эксклюзионной хроматографии образец разделяли с помощью смолы Сефандекс G75. Образцы разделяли и собирали по фракциям: фракция 1 (>163000 Да), фракция 2 (163000-14500 Да), фракция 3 (14500-1300 Да), фракция 4 (1300-110 Да), фракция 5 (110-10 Да). Фракцию 3 из каждой пробиотической культуры собрали и высушили, высушенные образцы были проанализированы с помощью независимого секвенирования в высокотехнологичном аналитическом центре Университета Гуэлфа (табл. 3).

Кроме того, 1× образец из каждой пробиотической культуры был протестирован с помощью анализа количественной ПЦР с использованием *Salmonella*, описанном в примере 1, или с помощью анализа на

лактатдегидрогеназу (LDH) с использованием либо UPEC 099, либо *Staphylococcus aureus* 81M. Для анализа LDH высушенный бесклеточный супернатант ресуспендировали в 5 мл лизогенного бульона и инокулировали либо UPEC 099, либо *Staphylococcus aureus* 81M и инкубировали в течение 4 ч. После инкубации образцы были центрифугированы, и супернатант проанализировали. 100 мкл аликвоту супернатанта добавили к 1 мл HT29 клеток млекопитающих при 1×10^6 клеток на мл в 12-луночном планшете. Образцы инкубировали в течение 45 мин при 37°C и 5% CO₂. Супернатант затем анализировали с помощью протокола производителя (набор для анализа цитотоксичности "Pierce LDH" Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). Процент ингибирования рассчитывали с использованием контроля без обработки и контроля с лизированным детергентом по формуле, приведенной в протоколе (табл. 3).

Таблица 3

Сводка активности из пробиотических бесклеточных супернатантов и идентифицированных пептидов из SEC фракции 3

Виды бактерий	Название штаммов	Культ. Кол. Код	LDH (%) ингиб. UPEC 099	LDH (%) ингиб. MRS A 81M	Кратная отриц. рег. HIIA.	Пептидная последовательность MALPPK	Пептидная последовательность HLLPLP	Пептидная последовательность YPVEPF
<i>L. acidophilus</i>	La-5	DSM - 13241	83	80	-77	MALPPK	HLLPLP	YPVEPF
<i>L. rhamnosus</i>	GG [Gorbach-Goldin]	ATC C 53103	48	43	-36	LPVPK	TTLPLPTT	Не определено
<i>L. reuteri</i>		DSM - 17938	90	0	-43	EVLNCLALPK	HLLPLP	EMPFKPYPEPF
<i>L. lactis</i>	Berridge X 13 [BUCS AV 453, NCDO 496, NCIB 8586]	ATC C 11454	95	17	-202	MALPPK	HLLPLPL	KYVPEPF

Пример 5. Преодоление лекарственной резистентности.

Цель.

Определить, может ли бесклеточный супернатант из пробиотических бактерий, таких как *Lactobacillus acidophilus* La-5, повышать у обладающих лекарственной резистентностью бактерий чувствительность к антибиотикам, в частности у резистентных к метициллину стафилококков устойчивость к цефокситину.

Материалы и методы.

Бесклеточный супернатант La-5, применяемый в этих экспериментах, был получен из серий N9-N10 и N13. В этих экспериментах применяли три устойчивых к метициллину штамма стафилококка (MRS): 1) *Staphylococcus pseudintermedius* (обозначение штамма C260 22-2011 dtqa), клинический изолят из кожной инфекции собаки; 2) *Staphylococcus aureus* (обозначение штамма LA - 414M SPA t034), связанный с сельскохозяйственными животными штамм, выделенный из говядины, поставленной продовольственным магазином в Шарлоттауне, PEI, Канада; и 3) *Staphylococcus aureus* (обозначение штамма 81M SPA t008), выделенный из куриного мяса, поставленного продовольственным магазином в Шарлоттауне, PEI, Канада. Все три штамма MRS были предоставлены Атлантическим ветеринарным колледжем (AVC) Университета острова принца Эдуарда. Резистентность этих штаммов к метициллину была подтверждена пресоналом AVC с помощью диско-диффузионного метода с использованием оксисициллинового диска. Штаммы исходно культивировали на скошенном агаре с овечьей кровью, а затем переносили на чашки с агаром и лизогенным бульоном. Цефокситин, ресуспендированный в метаноле, применяли для тестирования резистентности к антибиотикам, а рост тестировали в двух различных типах сред, стандартном лизогенном бульоне и стандартной BBL™ среды Мюллера-Хинтона со стандартизированным содержанием катионов (Becton, Dickinson and Company). Для каждого штамма в каждой соответствующей среде определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИС) цефокситина в присутствии и отсутствии бесклеточного супернатанта. Анализы проводили в соответствии с руководствами Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) для тестирования МИС видов стафилококков [CLSI, 2015], а также Европейского комитета по тестированию антимикробной чувствительности (EUCAST) Европейского общества клинической микробиологии и инфекционных болезней [EUCAST, 2003].

Протокол тестирования МИС был следующим. Бесклеточные супернатанты ресуспендировали в соответствующей среде и стерилизовали с помощью фильтра с размером пор 0,22 мкм. Сухой бесклеточ-

ный супернатант взвешивали для получения требуемой концентрации и добавляли в концентрациях в диапазоне 0-60 мг/мл.

Цефокситин добавляли для получения конечных концентраций в диапазоне 0-250 мг/мл. Культуры каждого соответствующего штамма выращивали в течение ночи либо в лизогенном бульоне, либо в среде Мюллера-Хинтона в течение 16-20 ч при 37°C и с перемешиванием на 200 об/мин в аэробных условиях до достижения оптической плотности 1,2-1,6 на 600 нм (OD600). Культуры, выросшие в течение ночи, разводили в 1000 раз и инокулировали ими соответствующие образцы; такое разведение выросшей в течение ночи культуры обеспечивало инокулят, содержащий около 5×10^6 КОЕ/мл. Культуры (150 мкл) выращивали в 96-луночном чистом титрационном микропланшете с плоским дном. Титрационный микропланшет затем покрывали парафильмом и инкубировали при $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. После инкубирования данные с микропланшета считывали при 600 нм с помощью микропланшетного ридера. Значение MIC представляло собой концентрацию антибиотика, которая приводила к $\text{OD} < 0,1$ при 600 нм. Данные представляют собой среднее по двум техническим повторам из двух биологических повторов.

β -лактамы, такие как метициллин и цефокситин, ингибируют биосинтез бактериальной клеточной стенки. У бактерий развились механизмы, позволяющие не реагировать на такие ингибиторы, что приводит к резистентности к антибиотикам. МесА - ген, который может связывать β -лактамы, тем самым снижая их активность. Стафилококки, получившие ген МесА, являются устойчивыми к метициллину. Поскольку экспрессию МесА регулирует чувство кворума, мы изучили, может ли бесклеточный супернатант повышать чувствительность резистентных к метициллину стафилококков путем ингибирования чувства кворума.

Данные показывают, что бесклеточный супернатант может повышать чувствительность резистентных к метициллину видов стафилококков к антибиотику цефокситину; это в свою очередь снижает концентрацию цефокситина, необходимую для приостановки или профилактики пролиферации резистентных к метициллину видов стафилококков. Для тестируемых концентраций бесклеточного супернатанта (5 мг/мл, 30 мг/мл и 60 мг/мл) данные указывают на дозозависимый ответ: при возрастании концентрации бесклеточного супернатанта наблюдается более высокое снижение MIC цитотоксина по сравнению с контролем 0 мг/мл. Комбинация цефокситина и бесклеточного супернатанта может повышать чувствительность резистентных к метициллину стафилококков в 2,5-6,25 раза по сравнению с одним цефокситином (табл. 4).

Таблица 4

Диапазон значений MIC цефокситина для резистентных к метициллину стафилококков

	Диапазон концентраций цефокситина ($\mu\text{г}/\text{мл}$), ингибирующих рост до O.D. < 0.1				
Концентрация сухого бесклеточного супернатанта на анализ ($\text{мг}/\text{мл}$)	MSRP C260 Лизогенный бульон	MRSA LA 414M Лизогенный бульон	MRSA LA 414M Бульон Мюллера-Хинтона	MRSA 81M Лизогенный бульон	MRSA 81M Бульон Мюллера-Хинтона
0	125-175	30-40	50-60	75-125	75-100
5	50-75	15-20	40-50	40-50	40-50
30	20-30	15-20	20-30	30-40	30-40
60	20-30	10-15	20-30	30-40	20-30

Для эксклюзионной хроматографии образец разделяли с помощью смолы Сефандекс G75. Образцы разделяли и собирали по фракциям: фракция 1 (>163000 Да), фракция 2 (163000-14500 Да), фракция 3 (14500-1300 Да), фракция 4 (1300-110 Да), фракция 5 (110-10 Да). Резистентный к метициллину *Staphylococcus aureus* 81M был наиболее устойчив к цефокситину при совместной инкубации с полученной на эксклюзионной хроматографии фракцией 3. Этот факт указывает на то, что активным компонентом является полученная на эксклюзионной хроматографии фракция 3 (табл. 5), и убедительно подтверждает, что биоактивные молекулы, ответственные за этот эффект, аналогичны охарактеризованным в настоящей заявке молекулам.

Таблица 5

Диапазон значений МИС цефокситина для резистентного к метициллину *Staphylococcus aureus* 81M с полученными на эксклюзионной хроматографии фракциями бесклеточного супернатанта

Контроли	Диапазон концентраций цефокситина (µг/мл), ингибирующих рост до O.D. < 0.1
Необработанный (0 мг/мл)	60-75
Бесклеточный супернатант (30 мг/мл)	20-30
Номер фракции эксклюзионной хроматографии	
Фракция 1	60-75
Фракция 2	75-100
Фракция 3	30-40
Фракция 4	60-75
Фракция 5	40-50

В вышеприведенном описании настоящее изобретение раскрыто в общих чертах. Хотя в настоящем документе использованы специфические термины, такие термины предназначены для описания, а не для ограничительных целей.

Все публикации, патенты и заявки на патенты, процитированные выше, включены в настоящую заявку во всей своей полноте посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая(ый) отдельная(ый) публикация, патент или заявка на патент был(а) в частности и отдельно указана как включенная во всей своей полноте посредством ссылки.

Хотя предпочтительные варианты осуществления изобретения детально описаны в настоящей заявке, специалисты в данной области техники поймут, что в них можно внести вариации без отхода от сущности изобретения или объема прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пробиотический пептид, содержащий последовательность XXLPPK, при этом каждый X независимо обозначает гидрофобную аминокислоту, при этом пептид имеет менее чем 19 аминокислотных остатков и отрицательно регулирует HylA и HiiA.

2. Пробиотический пептид по п.1, содержащий аминокислотную последовательность MALPPK.

3. Пробиотический пептид по п.1, состоящий из аминокислотной последовательности MALPPK.

4. Пробиотический пептид по любому из пп.1-3, полученный из пробиотической бактерии, выбранной из *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* *Enterococcus* и их комбинаций.

5. Пробиотический пептид по п.4, при этом *Lactobacillus* выбрана из *Lactobacillus acidophilus* (La-5), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus plantarum*.

6. Пробиотический пептид по п.4, при этом *Lactococcus* представляет собой *Lactococcus lactis*.

7. Пробиотический пептид по п.4, при этом *Bifidobacterium* выбрана из *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* и *Bifidobacterium crudilactis* и их смесей.

8. Пробиотический пептид по п.4, при этом *Streptococcus* представляет собой *Streptococcus thermophilus*.

9. Пробиотический пептид по п.4, при этом *Enterococcus* представляет собой *Enterococcus faecium*.

10. Пробиотический пептид по любому из пп.1-8, при этом пептид скомбинирован с одним или более из антивирусного средства, источника сахара, съедобного пищевого продукта, пищевой добавки и принимаемой внутрь жидкости.

11. Пробиотический пептид по любому из пп.1-10, при этом пептид сконцентрирован из бесклеточного супернатанта или его фракции.

12. Пробиотический пептид по любому из пп.1-10, при этом пептид предложен в виде сухой фракции культуральной среды, например в лиофилизированном виде или в высушенном распылением виде.

13. Пробиотический пептид по п.12, при этом сухая культуральная фракция представляет собой бесклеточный супернатант.

14. Пробиотическая композиция, содержащая эффективное количество пробиотического пептида по любому из пп.1-13.

15. Композиция по п.14, при этом композиция представляет собой пищевой продукт, питьевой продукт, продукт здорового питания, медикамент или пищевую добавку.

16. Композиция по п.14 или 15, при этом композиция дополнительно содержит живые пробиотические бактерии, из которых получены указанные пробиотические пептиды.

17. Композиция по любому из пп.14-16, при этом композиция дополнительно содержит живые пробиотические бактерии, не являющиеся бактериями, из которых получены пептиды.

18. Композиция по любому из пп.14-17, при этом пробиотические пептиды в композиции являются очищенными.

19. Способ лечения и/или профилактики инфекции у субъекта и/или снижения вирулентности инфекции у субъекта, причем способ включает введение пробиотического пептида по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

20. Способ по п.19, при этом инфекция является энтеральной инфекцией.

21. Способ по п.19, при этом инфекция является не энтеральной инфекцией.

22. Способ по п.21, при этом инфекция выбрана из группы, состоящей из инфекции мочевыводящих путей, вагинальной инфекции, инфекции дыхательных путей, инфекции желудка, вырабатывающей биопленку инфекции, мастига, кожной инфекции и инфекции полости рта.

23. Способ снижения резистентности к антибиотикам, включающий введение пробиотических пептидов по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

24. Способ по п.23, при этом способ предназначен для снижения резистентности MRS к антибиотикам.

25. Способ лечения инфекций, вызванных MRS, включающий введение пробиотических пептидов по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

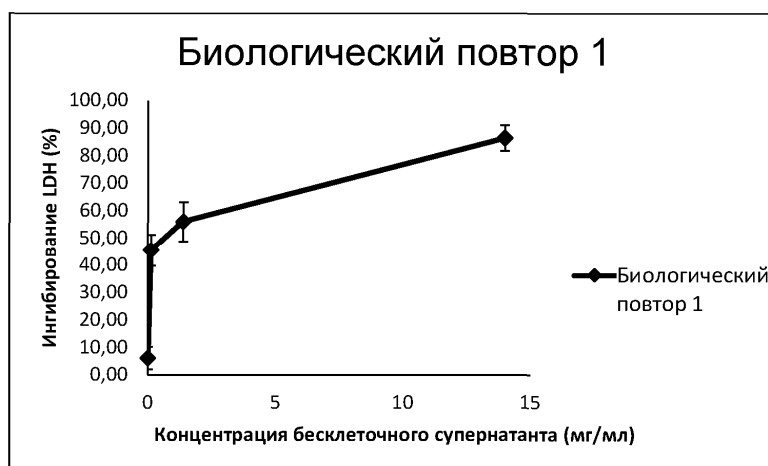
26. Способ профилактики или разрушения и/или пенетрации биопленок, включающий введение пептидов по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

27. Способ лечения раны, включающий введение пробиотических пептидов по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

28. Способ снижения прикрепления не энтерального патогена к ткани субъекта, включающий введение пробиотических пептидов по любому из пп.1-13 или композиции по любому из пп.14-18 нуждающемуся в этом субъекту.

29. Инертный объект для высвобождения пробиотического пептида, содержащий пробиотические пептиды по любому из пп.1-13 или композицию по любому из пп.14-18.

30. Инертный объект по п.29, представляющий собой стент, катетер или раневую повязку.



Фиг. 1



Фиг. 2

