

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393432 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.18

(51) Int. Cl. *A61K 35/745* (2015.01)
A61P 1/04 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.15

(54) ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PARACASEI* ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ

(31) 102021000018740

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.15

Биффи Андреа, Фьоре Уолтер (IT)

(33) IT

(74) Представитель:

(86) PCT/IB2022/056538

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2023/286027 2023.01.19

(71) Заявитель:

АЛЬФАСИГМА С.П.А. (IT)

(57) Настоящее изобретение относится по меньшей мере к одному штамму бактерий, принадлежащему к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM 1-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-01 DSM 26760, и их композициям для применения у новорожденных и/или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, нарушений желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, желудочно-кишечных инфекций патогенными микроорганизмами, желудочно-кишечных инфекций паразитами, аллергии, иммуноопосредуемых или аутоиммунных нарушений, и для поддержания роста индивидуума.

202393432

A1

A1

202393432

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 580160EA/23

ПРИМЕНЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PARACASEI* ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ

Настоящее изобретение относится по меньшей мере к одному штамму бактерий, принадлежащих к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и его композициям для применения у новорожденных индивидуумов в течение первых 4 недель жизни для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, нарушений желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, предпочтительно колик новорожденных или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных (например, некротизирующий энтероколит), для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, желудочно-кишечных инфекций патогенными микроорганизмами (например, вирусы или бактерии), желудочно-кишечных инфекций паразитами, аллергии, иммуноопосредуемых или аутоиммунных нарушений, и для поддерживающего лечения для роста индивидуума.

Микробная колонизация кишечника новорожденных начинается сразу после рождения и является необходимой для формирования барьерной функции слизистой оболочки, гомеостаза кишечника и созревания иммунной системы.

В контексте настоящего изобретения, термины "новорожденный" или "новорожденный индивидуум" относятся к млекопитающему (человек или животное) в период от момента рождения до первых 4 недель (28 суток) жизни.

В первые дни жизни ребенка многочисленные факторы влияют на состав микробиоты кишечника: вагинальная и/или кожная микробиота матери, естественные роды или кесарево сечение, вскармливание грудным молоком (грудное вскармливание) или кормление молочной смесью, и введение антибиотиков и/или других лекарственных средств. В частности, кесарево сечение, молочная смесь, преждевременные роды и применение антибиотиков снижают содержание и разнообразие полезных бактериальных видов в микробиоте, способствуя состоянию дисбиоза. Это в свою очередь может увеличить риск возникновения кишечных колик, некротического энтероколита у недоношенных новорожденных и развития иммуноопосредуемых заболеваний позднее в жизни, таких как аллергия, или воспалительного или функционального заболевания кишечника, и/или родственных симптомов.

В настоящее время приблизительно 12% недоношенных новорожденных с массой тела менее 1500 г страдают от некротического энтероколита и приблизительно одна треть погибает от сепсиса или других осложнений.

Новорожденные не являются физиологически сравнимыми с "хрупкими" взрослыми, и даже с очень маленькими детьми, поскольку в первые недели жизни созревание внутренних органов является неполным и их функциональность вследствие этого не является сравнимой с функциональностью у ребенка или взрослого, однако

ослабленными или больными они быть могут.

"Микробиота кишечника" относится ко всем микроорганизмам (все бактерии, археи, эукариоты и вирусы), присутствующим в желудочно-кишечной (или гастроинтестинальной) среде.

Микробиота выполняет многие полезные виды активности в организме. Действительно, микробы, которые составляют ее, деградируют полисахариды, способствуя пищеварительным функциям, синтезируют витамины, препятствуют колонизации патогенных видов, предоставляют сигналы, необходимые для развития кишечника, и участвуют в модулировании воспалительного и иммунного ответа. Полагают, что этиология многих желудочно-кишечных нарушений, а также нарушений, поражающих другие системы, состоит в аберрантном иммунологическом ответе на микроорганизмы кишечника. Более того, микробиота кишечника образует, вместе с метаболитами, которые она продуцирует, и клетками кишечника, барьер, нарушение функционирования которого вовлечено в патофизиологию многих иммуноопосредуемых нарушений, а также инфекции патогенными микроорганизмами.

Для поддержания хорошего состояния здоровья является необходимым, чтобы существовало равновесие между иммунной системой и микробами, находящимися в кишечнике. Таким образом, было показано, что состояние равновесия зависит от состава микробиоты кишечника: дисбаланс микробиоты, известный под термином "дисбиоз", может приводить к нарушениям иммунной системы, которые могут вызывать вредоносные эффекты как в кишечнике, так и в других системах.

Таким образом, благоприятные эффекты пробиотических бактериальных штаммов (т.е. живых микроорганизмов, которые при введении в достаточных количествах обеспечивают пользу для здоровья), в основном, приписываются нормализации проницаемости кишечного барьера, нормализации микробиоты кишечника и восстановлению равновесия между микробиотой и иммунологическим ответом.

Технической проблемой, на которую направлено или которая решается настоящим изобретением, является предоставление эффективного решения для лечения желудочно-кишечных заболеваний или симптомов воспалительной или функциональной природы (например: кишечные колики, хронический энтероколит) и желудочно-кишечных инфекций патогенными микроорганизмами или желудочно-кишечных инфекций паразитами у новорожденных индивидуумов и/или млекопитающих в первые месяцы жизни (от 1 месяца до ≤ 12 месяцев; месяц может иметь 28, или 29, или 30 или 31 день). Более того, настоящее изобретение направлено на и решает техническую проблему превентивного лечения возникновения аллергии и/или иммуноопосредуемых или аутоиммунных нарушений, связанных с желудочно-кишечной системой (например, глютенная энтеропатия) в более поздние годы жизни подвергаемого лечению индивидуума. Наконец, задачей настоящего изобретения является предоставление эффективного решения для поддержания роста организма новорожденных и/или млекопитающих в первые месяцы жизни.

Заявитель, после научной активности и разработки, направил усилия и решил вышеупомянутую техническую проблему путем предоставления по меньшей мере одного штамма бактерий, принадлежащих к виду *Lactobacillus paracasei*, такого как *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и его композиций (сокращенно, композиции по изобретению), которые эффективно и продуктивно участвуют в развитии подходящей и обогащенной лактобациллами, в частности, *Lactobacillus paracasei*, микробиоты кишечника у новорожденного и/или индивидуума в первые месяцы жизни.

Среди штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, вид *Lactobacillus paracasei* (такой как штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760) относится к виду, часто используемому в качестве штаммов пробиотических бактерий. В частности, штамм *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 тщательно исследован вследствие его благоприятных свойств. Однако до сегодняшнего дня эффекты *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 на новорожденных индивидуумов и/или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев, никогда не исследовались.

Следует отметить, что штамм бактерий *L. casei* DG[®] (CNCM I-1572) или *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) был редепонирован 2 февраля 2022 года в качестве *Lacticaseibacillus paracasei* DG I-1572 DSM 34154 после переклассификации рода *Lactobacillus*, опубликованной Zheng et al. в научном журнале Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020. Два вышеупомянутых названия являются взаимозаменяемыми друг с другом, поскольку они всегда относятся к одному штамму бактерий.

Штамм *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и штамм *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760, их смеси и композиции в соответствии с настоящим изобретением, вводимые индивидуумов неонатального возраста (первые 4 недели жизни), по-видимому, способны эффективно и продуктивно колонизировать кишечный тракт в ходе периода введения и/или первых месяцев жизни, обеспечивая равновесие между кишечной микробиотой и иммунной системой, благоприятное для организма, и стабилизируя проницаемость кишечного барьера.

Наконец, штаммы бактерий, смеси и их композиции по настоящему изобретению хорошо переносятся, не имеют связанных с ними побочных эффектов, их легко получать, и они являются экономичными.

Эти цели и другие, которые станут очевидными из подробного описания, приведенного ниже, достигаются посредством композиций и смесей по настоящему изобретению вследствие технических признаков, заявленных в прилагаемой формуле изобретения.

ЧЕРТЕЖИ

Фиг. 1: схема клинического испытания;

Фиг. 2А-2Е: количественное определение *L. casei* DG[®] в группе 1 (анализируемая композиция; Тх) и группе 2 (плацебо) в образцах кала, взятых в ходе контрольных визитов V1-V5;

Фиг.3А-3D: гистограммы относительного содержания *Lactobacillus* spp. в ходе контрольных визитов V1-V5;

Фиг.4: Метаболомический профиль согласно анализу частично наименьших квадратов-дискриминационному анализу (PLS-DA), демонстрирующий идентифицированные метаболиты, включая бутановую кислоту и пропионовую кислоту.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачей настоящего изобретения является по меньшей мере один штамм бактерий, принадлежащий к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, его смеси или композиции, как определено в настоящем описании далее, по настоящему изобретению (сокращенно, смеси или композиции по изобретению) для применения у новорожденных индивидуумов (первые 4 недели жизни) и/или индивидуумов с 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, нарушений желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, таких как колики новорожденных или кишечные колики, хронический энтероколит или хронических энтероколит у недоношенных новорожденных, некротизирующий энтероколит, сепсис, синдром раздраженного кишечника (сокращенно, IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицируемый IBS или хроническое воспалительное заболевание кишечника (IBD), такое как болезнь Крона, язвенный ректоколит, астма, ожирение, диабет 1 типа, атопический дерматит, рассеянный склероз, злокачественная опухоль и аутизм.

Предпочтительно, штаммы, смеси или их композиции по настоящему изобретению предназначены для применения у новорожденных индивидуумов и/или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, колик новорожденных, или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, или некротизирующего энтероколита.

Задачей настоящего изобретения является по меньшей мере один штамм бактерий, принадлежащий к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, его смеси или композиции, как определено ниже, по настоящему изобретению (сокращенно, смеси или композиции по изобретению) для применения у новорожденных индивидуумов (первые 4 недели жизни) и/или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, желудочно-кишечных инфекций патогенными микроорганизмами (например, вирусами (такими как ротавирус, кишечный аденовирус, кальцивирус, астровирус, вирус гриппа), или бактериями, такими как *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*), желудочно-кишечных инфекций паразитами (предпочтительно, вызываемых гельминтами или кишечными червями (например, *Ossiuri*, *Giardia* и т.д.)), аллергии, иммуноопосредуемых или аутоиммунных нарушений (например, глютеновая энтеропатия, болезнь Грэйвса,

ревматоидный артрит, тиреозит Хашимото, сахарный диабет 1 типа, системная красная волчанка (волчанка), васкулит, болезнь Аддисона, полимиозит, синдром Шегрена, прогрессирующая системная склеродермия, гломерулонефрит (воспаление почек), бесплодие, астма, ожирение, диабет 1 типа, атопический дерматит, рассеянный склероз, злокачественная опухоль и аутизм).

Задачей настоящего изобретения является по меньшей мере один штамм бактерий, принадлежащий к виду *Lactobacillus paracasei*, предпочтительно штамм *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или штамм *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, его смеси или композиции, как определено в настоящем описании далее, по настоящему изобретению (сокращенно, смеси или композиции по изобретению) для применения у новорожденных индивидуумов (первые 4 недели жизни) и/или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤12 месяцев для поддерживающего (адьювантного) лечения для роста индивидуума, под которым подразумевается увеличение массы тела индивидуума, которому проводится введение, оцениваемое в г/неделя.

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* DG[®] (зарегистрированный торговый знак SOFAR S.p.A., Италия) был депонирован SOFAR S.p.A. в Национальной Коллекции культур микроорганизмов Пастеровского института в Париже под номером доступа CNCM I-1572 05 мая 1995 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, DG[®] или *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572); первоначально штамм имел наименование *Lactobacillus casei* DG[®] *sub.casei*; позднее он был переклассифицирован как *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572. Следует уточнить, что это всегда и только один и тот же штамм бактерий, независимо от обозначения *Lactobacillus casei* DG[®] или *Lactobacillus paracasei* DG[®].

Штамм бактерий, идентифицированный как *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, альтернативно называемый *Lactobacillus paracasei* S01, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером доступа DSM 26760 20 ноября 2012 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, *LPC-S01* или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760). Следует уточнить, что это всегда и только один и тот же штамм бактерий, независимо от обозначения *Lactobacillus paracasei* S01 DSM 26760 или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, используемого заявителем.

Указанные композиции по изобретению для применения в способах или лечении по изобретению включают: (i) указанную смесь М по изобретению, содержащую или альтернативно состоящую из *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и необязательно (ii) по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевой или фармацевтической категории.

Согласно одному аспекту изобретения, указанная смесь М, включенная в композицию по изобретению, может содержать или альтернативно состоять из:

- *Lactobacillus paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и

- по меньшей мере одного дополнительного штамма бактерий, выбранного из

группы (I), состоящей из:

- (a) *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,
- (b) *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,
- (c) *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BIIBS01 DSM 33233,
- (d) *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,
- (e) *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708; и их смеси.

Штамм бактерий, принадлежащий к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS01, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33231 31 июля 2019 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, BbIBS01 или *B. breve* BbIBS01 DSM 33231).

Штамм бактерий, принадлежащий к виду *Bifidobacterium breve*, идентифицированный как *Bifidobacterium breve* BbIBS02, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33232 31 июля 2019 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, BbIBS02 или *B. breve* BbIBS01 DSM 33232).

Штамм бактерий, принадлежащий к виду *Bifidobacterium animalis*, идентифицированный как *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BIIBS01, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33233 31 июля 2019 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, BIIBS01 или *B. animalis subsp. lactis* BIIBS01 DSM 33233).

Штамм бактерий, принадлежащий к виду *Lactobacillus plantarum*, идентифицированный как *Lactobacillus plantarum* LpIBS01, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 33234 31 июля 2019 года SOFAR S.p.A. (сокращенно, LpIBS01 или *L. plantarum* LpIBS01).

Штамм бактерий, принадлежащий к виду *Bifidobacterium bifidum*, идентифицированный как *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg=BbfIBS01, или его производное, был депонирован в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) под номером депозита DSM 32708 04 декабря 2017 года Sofar S.p.A. (сокращенно, BbfIBS01 или *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708). Следует уточнить, что это всегда и только один и тот же штамм бактерий, независимо от обозначения *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708 или *Bifidobacterium bifidum* MIMBb23sg DSM 32708, использованного заявителем.

Все из бактериальных штаммов, упоминаемых в настоящем описании (т.е. DG[®], LPC-S01, BbIBS01, BbIBS02, BIIBS01, LpIBS01 и BbfIBS01) были депонированы в соответствии с условиями Будапештского договора. Депозитор штаммов бактерий, описанных и/или заявленных в формуле изобретения настоящей патентной заявки, и правообладатель патентной заявки выражают данным документом их согласие

предоставить доступ ко всем таким штаммам в течение всей длительности патента.

Преимущественно, указанные штаммы бактерий, включенные в композицию по изобретению (т.е. DG[®], LPC-S01, BbIBS01, BbIBS02, BbIBS01, LpIBS01 и BbfIBS01) являются жизнеспособными бактериальными штаммами (пробиотиками). Альтернативно указанные бактериальные штаммы по изобретению могут быть производными жизнеспособного штамма, как определено в настоящем описании.

В контексте настоящего изобретения подразумевается, что термин "производное" бактериального штамма (или "производное" жизнеспособного бактериального штамма) означает постбиотик или парабиотик, например, такой как тиндализованные, обработанные ультразвуком, инактивированные радиационным излучением (предпочтительно гамма-излучением) бактериальные штаммы, лизаты или гомогенаты бактериального штамма, экстракты или фракция стенки бактериального штамма, метаболиты или метаболические биопродукты или экзополисахариды (EPS), продуцируемые бактериальным штаммом, и/или любой другой производный продукт бактериального штамма, известный специалисту в данной области. Указанные производные получают в соответствии с методологиями, известными специалисту в данной области. Предпочтительно под термином "производное" бактериального штамма подразумевают тиндализованный, обработанный ультразвуком, инактивированный радиационным излучением (предпочтительно гамма-излучением) штамм, лизаты или гомогенаты бактериального штамма, экстракты или перипетальная фракция бактериального штамма; более предпочтительно, тиндализованный штамм.

Примеры смесей бактериальных штаммов (En), включенных в смесь M, необязательно вместе по меньшей мере с одним пробиотиком, выбранным из группы (II), и/или дополнительным активным компонентом, выбранным из группы (III), где указанная смесь M включена в композицию по изобретению, приведены ниже:

E1: DG[®] и LPC-S01;

E2: DG[®] и по меньшей мере один штамм, выбранный из группы (I);

E3: LPC-S01 и по меньшей мере один штамм, выбранный из группы (I);

E4: DG[®] и/или LPC-S01, и BbfIBS01 и по меньшей мере один штамм, выбранный из группы (I);

E5: DG[®] и/или LPC-S01, и смесь BbIBS01, BbIBS02, BbIBS01 и LpIBS01;

E6: DG[®] и/или LPC-S01, BbfIBS01 и смесь BbIBS01, BbIBS02, BbIBS01 и LpIBS01.

Смесь M, включенная в композицию по изобретению, в дополнение к штамму *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и необязательно по меньшей мере одному или нескольким штаммам бактерий, выбранных из группы (I), и/или по меньшей мере одному дополнительному активному компоненту, выбранному из группы (III), описанному ниже, может дополнительно содержать по меньшей мере один пребиотик, предпочтительно выбранный из группы (II), состоящей из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), ксилит-олигосахарида (XOS), гуаровой камеди, лактоферрина и их смеси; предпочтительно инулина.

Преимущественно, смесь М, включенная в композицию по изобретению, содержит, или альтернативно состоит из *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и инулина; предпочтительно *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и инулина.

Смесь М, включенная в композицию по изобретению, в дополнение к штамму *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и необязательно по меньшей мере одному или нескольким бактериальным штаммам, выбранным из группы (I), и/или по меньшей мере одному пребиотику, выбранному из группы (II), может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный активный компонент, выбранный из группы (III), состоящей из:

- витаминов группы А, В, С, D, Е и/или К, предпочтительно витамина группы В и/или витамина D;
 - антиоксидантов, таких как глутатион, полифенолы, такие как ресвератрол и транс-ресвератрол, кофермент Q10, астаксантин, ликопен;
 - растительных веществ (ботанические вещества) или их экстрактов с действием расслабления кишечника, таких как валериана, страстоцвет, Melissa лимонная, боярышник, ромашка;
 - минералов или их солей, например цинка, селена, магния, калия;
 - мононенасыщенных жирных кислот, таких как омега-9 и/или полиненасыщенных жирных кислот, таких как омега 3 и омега 6;
 - иммуностимулирующих веществ, средств против диареи и/или питательных веществ; и
- и их смеси.

Преимущественно, смесь М, включенная в композицию по изобретению, содержит или альтернативно состоит из *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и/или *L. paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и витаминов группы В и витамина D; предпочтительно *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и витаминов группы В и витамина D.

В контексте настоящего изобретения, приемлемые "добавки и/или эксципиенты" пищевой категории или фармацевтической категории, необязательно включенные в композицию по изобретению вместе с указанными штаммами бактерий, включают все вспомогательные вещества, известные специалисту в данной области, для получения композиций в твердой форме, полутвердой или жидкой форме, например, такие как носители, разбавители, растворители, солюбилизаторы, подкислители, загустители, подсластители, вкусовые добавки, красители, подсластители, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, консерванты, стабилизаторы, рН-стабилизирующие буферы и их смеси. Например, в случае композиций в форме капель для перорального введения новорожденным или индивидуумам в возрасте от 1 до 12 месяцев, в качестве разбавителя можно использовать масло семян.

Указанные смеси М или композиции по изобретению, согласно любому из описанных вариантов осуществления, могут представлять собой фармацевтическую композицию (или живые биотерапевтические продукты), композицию для медицинского

устройства, композицию пищевой добавки, продукт питания (или новый продукт питания или продукт питания для специальных медицинских целей (FSMP)), композицию пищевой добавки или продукт питания.

Бактериальные штаммы, смеси и их композиции по настоящему изобретению, согласно любому из описанных вариантов осуществления могут быть составлены для перорального или назального введения, предпочтительно для перорального применения, в твердой форме или, альтернативно, в жидкой форме, например, в форме капель на водной или масляной основе (например, различные масла семян или подсолнечное масло).

Преимущественно, указанный по меньшей мере один бактериальный штамм или каждый бактериальный штамм присутствует в смеси М или в композиции по изобретению, в расчете на суточную дозу смеси М или композиции по изобретению, в концентрации в диапазоне от 10×10^6 к.о.е. до 10×10^{12} к.о.е., предпочтительно от 10×10^8 к.о.е. до 10×10^{10} к.о.е., более предпочтительно в концентрации приблизительно 10×10^8 к.о.е. или 10×10^9 к.о.е. (к.о.е.: колониеобразующая единица).

Например, суточная доза смеси или композиции по изобретению (например, капель для перорального введения) содержит: $\geq 1 \times 10^9$ живых бактерий *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572 и масло семян.

Описанные выше суточные дозировки можно вводить индивидууму, нуждающемуся в этом, в индивидуальной дозе (однократная доза) или повторяющимися дозами, например, двумя, тремя или четырьмя суточными дозами. Например, вводят 15-5 капель (на масляной основе), предпочтительно от 12 до 8 капель, например, приблизительно 9-10 капель, композиции по изобретению два раза в сутки, соответствующие приблизительно 2 миллиардам бактерий штамма, предпочтительно *L. paracasei* DG[®] CNCM I-1572.

Для оценки количества живых бактериальных штаммов в композициях или смесях М по настоящему изобретению, эти композиции или смеси М можно анализировать способом подсчета на чашке для определения величины к.о.е.

Для ясности, для достижения цели настоящего изобретения, штамм(ы) бактерий, пребиотика и/или дополнительные (необязательные) активные компоненты, включенные в смесь (М) по изобретению, также можно вводить отдельно (предпочтительно, с временным интервалом от 30 минут до 60 минут) и в любом порядке, однако предпочтительно их вводят индивидууму одновременно, еще более предпочтительно в одной композиции для достижения более быстрого эффекта и простоты введения. Когда указанные штаммы и (необязательные) активные компоненты вводят в одной композиции, указанная единая композиция соответствует композиции по настоящему изобретению.

Если нет иных указаний, выражение о композиции или смеси, или ином, содержащих компонент в количестве "в диапазоне от х до у" означает, что указанный компонент может присутствовать в композиции или ином во всех количествах, находящихся в указанном диапазоне, даже если это явно не указано, причем крайние значения диапазона включены.

Если нет иных указаний, утверждение, что композиция "содержит" один или несколько компонентов или веществ, означает, что могут присутствовать другие компоненты или вещества в дополнение к тому, или тем, которые конкретно указаны.

"Способ лечения" в контексте настоящего изобретения означает вмешательство у индивидуума, нуждающегося в этом, включающее введение штамма бактерий или композиции по изобретению индивидууму в терапевтически эффективном количестве для цели устранения, сокращения/снижения или предупреждения патологии или заболевания и сходных симптомов или нарушений.

Термин "индивидуум(ы)" в контексте настоящего изобретения относится к млекопитающим (животные и человек), предпочтительно к людям периода новорожденности (возраст от 0 до 4 недель) и/или в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев жизни (от начала 2-го месяца до момента перед окончанием 12-го месяца).

Преимущественно, индивидуумы, которых лечат или которым вводят штаммы или смеси или композиции по изобретению, могут представлять собой новорожденных индивидуумов или индивидуумов в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев жизни, рожденных посредством кесарева сечения и/или рожденных преждевременно.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного соединения и/или штамма бактерий, которое индуцирует биологический или медицинский ответ в ткани, системе, млекопитающем или человеке, которого хотят достигнуть, и оно определяется индивидуумом, исследователем, ветеринаром, врачом или другими клиницистом или работником здравоохранения.

Термин "медицинское устройство" в контексте настоящего изобретения используется в значении согласно Законодательному декрету № 46 от 24 февраля 1997 года или согласно новому Регламенту о медицинских изделиях (EU) 2017/745 (MDR).

Термин "новый продукт питания" в контексте настоящего изобретения используется в значении согласно Регламенту ЕС 258 от 1997 года.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Предпочтительные варианты осуществления FRn настоящего изобретения являются следующими.

FR1. Штамм бактерий или композиция для применения у новорожденного индивидуума в течение первых 4 недель жизни и/или у индивидуума в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или направленного на излечение, индивидуума, имеющего нарушения желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, причем такие нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита, сепсиса, синдрома раздраженного кишечника (IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицируемого IBS, хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD),

болезни Крона, язвенного ректоколита, астмы, ожирения, диабета 1 типа, атопического дерматита, рассеянного склероза, злокачественной опухоли, аутизма, аллергии, иммуноопосредуемых, аутоиммунных нарушений, выбранных из глютенной энтеропатии, болезни Грэйвса, ревматоидного артрита, тиреоидита Хашимото, сахарного диабета 1 типа, системной красной волчанки (волчанка), васкулита, болезни Аддисона, полимиозита, синдрома Шегрена, прогрессирующей системной склеродермии, гломерулонефрита (воспаление почек), бесплодия, и поддержания увеличения массы тела у указанного индивидуума;

где указанный штамм бактерий принадлежит к виду *Lactobacillus paracasei*;

где указанная композиция содержит:

(i) смесь М, содержащую или, альтернативно, состоящую из по меньшей мере одного штамма, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*; и

(ii) по меньшей мере одной добавки и/или эксципиента пищевой или фармакологической категории.

FR2. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1,

где указанный штамм бактерий выбран из *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и их смеси;

где указанная композиция содержит:

(i) смесь М, содержащую или, альтернативно, состоящую из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и

(ii) по меньшей мере одну добавку и/или эксципиент пищевой или фармакологической категории.

FR3. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1 или FR2, где указанный штамм или композиция предназначены для применения у новорожденного индивидуума и/или индивидуума в возрасте от 1 месяца до <12 месяцев, для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, колик новорожденных или кишечных колик, или хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных.

FR4. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1 или FR2, где указанный штамм или композиция предназначены для применения у новорожденного индивидуума и/или индивидуума в возрасте от 1 месяца до ≤12 месяцев для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, желудочно-кишечных инфекций патогенными микроорганизмами или желудочно-кишечных инфекций паразитами.

FR5. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1 или FR2, где указанный штамм или композиция предназначены для применения у новорожденного индивидуума и/или индивидуума в возрасте от 1 месяца до ≤12 месяцев для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, аллергии.

FR6. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1 или FR2, где указанный штамм или композиция предназначены для применения у

новорожденного индивидуума и/или индивидуума в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, иммуноопосредуемых, аутоиммунных нарушений, таких как глютенная энтеропатия, болезнь Грэйвса, ревматоидный артрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет 1 типа, системная красная волчанка (волчанка), васкулит, болезнь Аддисона, полимиозит, синдром Шегрена, прогрессирующая системная склеродермия, гломерулонефрит (воспаление почек) и бесплодие.

FR7. Штамм для применения или композиция для применения согласно FR1 или FR2, где указанный штамм или композиция предназначены для применения у новорожденного индивидуума и/или индивидуума в возрасте от 1 месяца до ≤ 12 месяцев для лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, для поддержания увеличения массы тела индивидуума.

FR8. Композиция для применения согласно любому из FR1-7, где указанная (i) смесь M содержит или, альтернативно, состоит из:

- *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572 и/или *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760; и

- по меньшей мере одного дополнительного штамма бактерий, выбранного из группы, состоящей из:

- *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,

- *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,

- *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BIIBS01 DSM 33233,

- *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,

- *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708; и

их смеси.

FR9. Композиция для применения согласно любому из FR1-8, где указанная (i) смесь M дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный активный компонент, выбранный из:

- по меньшей мере одного витамина группы A, B, C, D, E и/или K, предпочтительно витамина группы B и/или витамина D;

- антиоксидантов, таких как глутатион, полифенолы, такие как ресвератрол и транс-ресвератрол, кофермент Q10, астаксантин, ликопен;

- растительных веществ, ботанических веществ или их экстрактов с действием расслабления кишечника, предпочтительно выбранных из валерианы, страстоцвета, мяты лимонной, боярышника и ромашки;

- минералов или их солей, например, цинка, селена, магния, калия;

- мононенасыщенных жирных кислот, таких как омега 9, и/или полиненасыщенных жирных кислот, таких как омега 3 и омега 6;

- иммуностимулирующих веществ, средств против диареи и/или пищевых добавок;

- по меньшей мере одного пребиотика, предпочтительно выбранного из группы (II), состоящей из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS),

ксилит-олигосахарида (XOS), гуаровой камеди, лактоферрина и их смеси, более предпочтительно, инулина; и

и их смеси.

FR10. Штамм для применения или композиция для применения согласно любому из FR1-9, где указанные штаммы представляют собой жизнеспособные бактериальные штаммы или производные бактериальных штаммов, где указанные производные бактериальных штаммов выбраны из: тиндализованного, обработанного ультразвуком, инактивированного радиацией (предпочтительно, гамма-излучением) бактериального штамма, лизата или гомогенизированного бактериального штамма, экстракта или фракции стенки бактериального штамма; предпочтительно тиндализованного бактериального штамма.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Заявитель провел клиническое испытание у новорожденных для оценки эффектов на микробиоту кишечника организма в течение первых 3 месяцев жизни после введения пробиотика *Lactobacillus paracasei* DG[®] штамма CNCM I-1572 (жизнеспособные клетки).

1. ЗАДАЧИ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПЫТАНИЯ

Первичная цель исследования:

Оценить, изменяет ли дополнение композицией по изобретению в форме капель (на масляной основе) для перорального введения, содержащей штамм *L. paracasei* CNCM I-1572 (сокращенно, анализируемая композиция) в течение 28 суток состав фекальной микробиоты кишечника с точки зрения концентрации *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 в исследуемой выборке.

Анализируемая композиция:

Подсолнечное масло (*Helianthus annuus* L., DL-альфа-токоферол, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572 (не менее 14 миллиардов живых клеток на 8 мл).

Вторичные цели исследования:

Оценить прием анализируемой композиции в течение 28 суток с точки зрения:

- изменения состава (ПЦР в реальном времени) фекальной микробиоты кишечника с прогнозированием экологии системы микробиоты на 56 и 84 сутки после приема;
- изменения функциональной активности фекальной микробиоты кишечника (метаболизма) с прогнозированием экологии системы микробиоты на 28, 56 и 84 сутки после приема;
- изменения количества и качества стула (частота и консистенция);
- возникновения колик новорожденных, определяемых согласно критериям "Рим IV";
- безопасности и переносимости продукта;
- роста пациента.

2. ОРГАНИЗАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ

Время исследования (Фиг.1)

- Период включения: 24 недели;

- Длительность лечения: 4 недели;
- Длительность наблюдения: 8 недель;
- Длительность испытания для пациента: 12 недель (84 суток);
- Общая длительность испытания: 36 недель.

3. СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЯ

Рандомизированное, плацебо-контролируемое, двойное слепое, одноцентровое клиническое испытание. Новорожденных стратифицировали по весу при рождении на три группы:

- Нормальная масса тела при рождении (>2500 г, NBW),
- Низкая масса тела при рождении (1500-2500 г LBW),
- Очень низкая масса тела при рождении (1000-1500 г, VLBW).

Испытание проводили в U.O. of Neonatology of the Policlinico Casilino in Rome в качестве единственного участвующего и координирующего центра.

3.1. Исследуемая выборка

Испытание вовлекает набор 60 недоношенных и доношенных новорожденных, распределенных следующим образом: 20 NBW, 20 LBW, 20 VLBW.

3.2 Типы вмешательства

60 включенных индивидуумов рандомизировали в соотношении 1:1 в каждую из трех групп в двух звеньях:

Звено 1:

Тестируемая композиция, в форме капель, 9 капель два раза в сутки, что равно 2 миллиардам к.о.е. (колониеобразующих единиц) *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) в течение 4 недель (28 суток).

Группа 2:

Контроль: плацебо, 9 капель два раза в сутки в течение 4 недель (28 суток).

3.3 Длительность испытания

12-недельный период позволяет оценить изменения микробиоты кишечника, исходя из персистенции штамма *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572), обеспечиваемого приемом анализируемой композиции. 12-недельный период разделен на 4 недели лечения и 8 недель наблюдения. Включая период включения в испытание из приблизительно 24 недель, общая длительность испытания составляет 36 недель.

4. ВЫБОР ИССЛЕДУЕМЫХ ИНДИВИДУУМОВ

4.1 Критерии включения

- 0-48 часов от рождения;
- новорожденные обоих полов с массой тела при рождении ≥ 1000 г;
- новорожденные после кесарева сечения.

4.2 Критерии исключения (включающие только основные)

- естественные роды;
- чрезвычайно низкая масса тела при рождении (ELBW) (<1000 г);
- установленные или предполагаемые системные инфекции;

- любая тяжелая патология, которая по мнению исследователя может препятствовать лечению;

- прием пробиотиков, отличных от исследуемого продукта, новорожденным или кормящей матерью после начала испытания.

- системная терапия или профилактика антибиотиками после рождения и на протяжении всей длительности испытания (только NBW);

- терапия или профилактика системными антибиотиками у кормящей матери (новорожденного с NBW) за 30 суток до родов и на протяжении всего испытания.

Новорожденный будет считаться пригодным для выборки согласно протоколу, если он/она принял по меньшей мере 80% и не более 120% от назначенного лечения.

5. МЕТОДИКИ И СПОСОБЫ

Контрольные визиты с ситуативным взятием образца стула по возможности:

V1 - сутки 1 (0-48 часов после рождения); V2 - сутки 10 (+/- 2 суток); V3 - сутки 28 (+/- 3 суток); V4 - сутки 56 (+/- 3 суток); V5 - сутки 84 (+/- 3 суток) (Фиг. 1).

Более того, в ходе испытания образцы кала, собранные родителями, доставлялись по следующей схеме (1 образец, собранный в пределах 24 часов перед каждым визитом):

До лечения:

- кал в течение первых 48 часов после рождения и, когда это доступно, меконий.

В ходе первой фазы лечения:

- кал через 10 суток после начала приема;

- кал через 28 суток после начала приема;

В фазе наблюдения:

- кал через 56 суток после начала приема;

- кал через 84 суток после начала приема.

Химико-физический анализ образцов кала:

- Анализ посредством ПЦР в реальном времени для оценки количества бактерий штамма *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572);

- Анализ метагеномики и метаболомики для охарактеризации микробиоты кишечника до и после введения пробиотика.

В частности, микробиоту анализировали посредством анализа нуклеотидной последовательности частей гена, кодирующего бактериальную рибосомальную субъединицу 16S рРНК. В частности, использовалась метагеномная стратегия, состоявшая из следующих стадий:

- экстракция, количественное определение и нормализация метагеномной ДНК из образцов кала;

- амплификация способом ПЦР гипервариабельных областей V3-V4 бактериального гена, кодирующего 16S рРНК;

- количественное определение продуктов ПЦР;

- секвенирование с использованием способа Illumina MiSeq;

- биоинформатический анализ последовательности (охарактеризация микробных

сообществ, иерархическая кластеризация, таксономический анализ, конструирование филогенетических дендрограмм с использованием тепловых карт).

Для метаболомного анализа идентифицировали и количественно определяли метаболиты микробного происхождения, продуцированные в качестве летучих органических соединений (VOC). Эти соединения экстрагировали с использованием системы GC-MS/SPME (газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией посредством твердофазной микроэкстракции). Для экстракции VOC использовали покрытое карбоксиполидиметилсилоксаном (CAR-PDMS) волокно (85 мкм) в процессе SPME. Из каждого образца, анализируемого в трех экземплярах, среднее количество 100-500 мг помещали в 10-мл стеклянные флаконы с добавлением 4-метил-2-пентанола в качестве внутреннего стандарта (IS). Затем образцы кала уравнивали в течение 10 минут при 45°C. Волокно подвергали воздействию каждого образца в течение 45 минут перед инъектированием в GC-MS (Hewlett Packard 6890 GC), сопряженным с селективным детектором масс 5973C и оборудованным капиллярной колонкой Supelcowax 10. Метаболиты идентифицировали с использованием их времени удержания (Rt) относительно чистого соединения. Хроматограммы интегрировали и идентифицировали путем сравнения паттерна фрагментов с паттернами из библиотеки NIST с последующим визуальным изучением вручную. Количественные данные о метаболитах получали путем интерполяции относительных площадей относительно площади IS.

6. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ

6.1. Оценка эффективности

Первичный результат

- Подсчет бактериальных геномов *L. casei* DG[®] на 28 сутки посредством ПЦР в реальном времени.

Вторичные результаты

- индикаторы дисбиоза микробиоты кишечника (α -разнообразие и β -разнообразие) на 28, 56 и 84 сутки;

- подсчет бактериальных геномов *L. casei* DG[®] на 56 и 84 сутки;

- число, консистенция, количество и цвет фекальных испражнений в день перед визитом (сутки 1, 10, 28, 56, 84) с использованием Амстердамской шкалы оценки стула для новорожденных;

- химико-физический анализ кала (сутки 1, 10, 28, 56, 84);

- количественная оценка волатилома, т.е. летучих фекальных метаболитов (химические категории: жирные кислоты короткой цепи (SCFA), спирты, кетоны, альдегиды, тиолы, кислоты, сложные эфиры, пиразины, пиридины, фенолы, фураны, терпены, алканы, алкены и т.д.), посредством оценки изменения общего метаболического профиля микробиоты на сутки 28, 56, 84;

- оценка наличия коликов согласно "Римским диагностическим критериям IV";

- оценка неблагоприятных явлений.

7. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистические способы

Категориальные данные представлены в значениях количеств и процентов, в то время как непрерывные данные представлены в качестве средних значений и стандартных отклонений, или медиан и диапазонов.

Сравнения категориальных данных проводят посредством критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера, в зависимости от ситуации. Непрерывные данные сравнивают посредством Т-критерия Стьюдента (для независимых или зависимых данных), Anova и Anova для повторяющихся измерений, где соответствующие статистические тесты определяют нормальность данных; в случае ненормального распределения данных, используют непараметрические критерии, такие как критерий суммы рангов (критерий суммы рангов Манна-Уитни) или суммарный критерий знаковых рангов (знаковый ранговый критерий Уилкоксона), критерий Краскела-Уоллиса или критерий Фридмана. Способы многомерной регрессии используют в указанных случаях для оценки одновременного эффекта нескольких независимых переменных на переменную ответа или для идентификации возможных искажающих факторов и/или анализа временных данных. Результаты считаются статистически значимыми при значении $P < 0,05$.

Все анализы проводят с использованием программного обеспечения Stata 15 (StatCorp).

8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1 Первичный результат: подсчет бактериальных геномов *L. casei* DG[®] на 28 сутки посредством ПЦР в реальном времени

Результаты для образцов кала, взятых в ходе контрольных визитов V1-V5, схематично представлены на диаграммах на Фиг.2А-2Е.

Такие диаграммы (ящичковая диаграмма) демонстрируют концентрации *L. casei* DG[®] в группе плацебо и в группе "Тх", в которой вводили анализируемую композицию, для каждого момента времени наблюдения. Для каждой группы представлена медиана, 25-й процентиль, 75-й процентиль, минимальная и максимальная величина концентрации *L. casei* DG[®] (к.о.е./мл).

Пробиотический *L. casei* DG[®], который обнаруживался в кишечнике индивидуумов в группе лечения, начиная через 10 суток после первого введения, сохранялся вплоть до 84 суток после приема с небольшим снижением, начинающимся в момент V3 наблюдения (56-е сутки лечения).

8.2 Метагеномный анализ

На Фиг.3А-3D представлены гистограммы относительного содержания *Lactobacillus* spp. в моменты времени контрольных визитов V2-V5.

Из анализа экологии микробиоты можно установить, что введение анализируемой композиции (группа Тх) вызывает статистически значимое повышение относительного содержания организмов рода *Lactobacillus* spp. вплоть до десяти суток (момент времени V2) после начала введения ($pFDR \leq 0,05$) и что тенденция этого повышения сохраняется с $p < 0,05$ в моменты времени V4 и V5.

8.3 Метаболомный анализ

На Фиг.4 представлена диаграмма результатов метаболомного анализа PLS-DA: по вертикальной оси указаны идентифицированные метаболиты и по горизонтальной оси показана важность независимой переменной в проекции (VIP).

Анализ PLS-DA идентифицировал метаболиты бутановую кислоту и пропионовую кислоту (SCFA) в качестве основных участников кластеризации между группой плацебо и группой Tx с повышением концентрации указанных метаболитов в образцах Tx.

Рассматривая моменты времени по отдельности посредством PLS-DA, можно видеть, что наибольшее расхождение образцов происходит между V2 и V4 с повышением концентрации SCFA в образцах TX.

Такая тенденция согласуется с более высоким относительным содержанием лактобацилл (раздел 8.2) у индивидуумов в группе Tx, которым вводили анализируемую композицию.

8.4 Корреляция между всеми полученными микробиологическими данными

Результаты, полученные в ходе трех различных подходов, обсуждаемых в предшествующих абзацах (ПЦР в реальном времени, метагеномный анализ, метаболомный анализ) сопоставляли друг с другом посредством корреляции Спирмана.

Для корреляционного анализа моменты времени V2 и V3, соответствующие введению анализируемой композиции (V2: 10 суток; V3: 28 суток), которые были выбраны для метагеномного, метаболомного анализа и анализа посредством ПЦР в реальном времени, продемонстрировали наиболее статистически значимые отличия между группой плацебо и группой Tx, в которой вводили анализируемую композицию.

Путем интегрирования данных, полученных посредством трех подходов, можно было продемонстрировать, что введение пробиотического *L. casei* DG[®] имеет эффект как на экологию, так и на функцию микробиоты, модифицируя экологические ниши бактерий, присутствующих в кишечнике и соответствующий функциональный профиль.

В частности, определенные жирные кислоты короткой цепи (SCFA), такие как бутановая кислота и пропионовая кислота, продемонстрировали положительную корреляцию с определенными полезными бактериями рода *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Eggerthella*, *Bacteroides* и *Bifidobacterium*.

9. КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЯ: Число испражнений, консистенция, количество и цвет

Число испражнений, изучаемое в ходе каждого визита в испытании, было существенно более высоким у индивидуумов, которых лечили анализируемой композицией, чем у индивидуумов, которых лечили плацебо.

Что касается количества кала, отсутствовали статистически значимые отличия между двумя исследуемыми группами через 10, 56 и 84 суток после начала лечения (P=0,12; 0,61 и 0,25; соответственно).

Только в конце периода лечения (сутки 28, V3) наблюдалось статистически значимое отличие количества кала в пользу индивидуумов, которых лечили

анализируемой композицией ($P=0,03$).

Что касается цвета и консистенции стула (параметры, оцененные согласно "Амстердамской шкале для оценки стула у младенцев"), наблюдалось статистически значимое отличие в пользу индивидуумов, которых лечили анализируемой композицией, через 10 суток ($P<0,0001$) и 56 суток ($P=0,007$) после начала лечения в отношении цвета стула, и через 10 суток ($P=0,0016$), 56 суток ($P<0,0001$) и 84 суток ($P=0,05$) в отношении консистенции стула.

10. РЕЗУЛЬТАТЫ БЕЗОПАСНОСТИ В ИСПЫТАНИИ

Результаты анализа безопасности обобщенно представлены в таблице 1 ниже.

		Группа лечения	
		Плацебо (N=29)	Tx (N=30)
Количество пациентов по меньшей мере с одним АЕ*	N (%)	15 (51,7)	12 (40,0)
Количество пациентов по меньшей мере с одним связанным с продуктом АЕ*.	N (%)	0 (0,0)	0 (0,0)
Количество пациентов по меньшей мере с одним серьезным АЕ*	N (%)	8 (27,6)	4 (13,3)
Количество пациентов по меньшей мере с одним тяжелым АЕ*	N (%)	2 (6,9)	2 (6,7)
Количество пациентов, которые завершили испытание преждевременно вследствие АЕ*	N (%)	1 (3,4)	0 (0,0)
Количество АЕ*	N	21	16
Количество серьезных АЕ*.	N	10	6
Количество связанных АЕ*	N	0	0
Количество тяжелых АЕ*	N	2	4
Количество смертей	N	0	1

Таблица 1

*АЕ=неблагоприятное явление

Было зарегистрировано всего 37 неблагоприятных явлений (АЕ), 21 из которых был в группе введения плацебо и 16 было в группе индивидуумов, в которых вводили анализируемую композицию (Tx).

У 27 из 59 включенных в испытание и рандомизированных индивидуумов имелось одно или несколько неблагоприятных явлений (15 индивидуумов в группе плацебо; 12 индивидуумов в группе Tx).

Только два серьезных неблагоприятных явления (некротизирующий колит и предполагаемый сепсис) сообщалось для одного индивидуума, которого лечили

анализируемой композиции. Однако, ни одно из серьезных неблагоприятных явлений, по-видимому, не было связано с введением анализируемой композиции.

То же самое заключение может быть сделано в отношении серьезного неблагоприятного явления (мягкий желудочно-пищеводный рефлюкс, который потребовал госпитализации), наблюдаемого в группе плацебо.

Смерть, зарегистрированная у пациента, которого лечили анализируемой композицией, вызванная диссеминированным внутрисосудистым свертыванием и септическим шоком, была классифицирована исследователем как "маловероятно связанная" с исследуемым лечением.

Все остальные тяжелые и нетяжелые неблагоприятные явления сочтены либо несвязанными (N=29) или маловероятно связанными (N=3) с проводимым исследуемым лечением (плацебо или анализируемая композиция).

В ходе исследуемого периода не было зарегистрировано экземы или кожных заболеваний в двух группах.

11. ЗАКЛЮЧЕНИЯ

Ввиду вышеуказанного, было сделано заключение, что:

- в отношении первичного результата, в группе Tx, в которой вводили анализируемую композицию, пробиотический *L. casei* DG[®] обнаруживался в кишечнике, начиная с 10 суток после начала лечения (V2; Фиг.2B), и сохранялся до конца периода наблюдения V5 (Фиг.2E);

- что касается относительного содержания *Lactobacillus* spp, было показано, что анализируемая композиция вызывает статистически значимое повышение содержания лактобацилл до конца периода наблюдения V5 (Фиг.3D);

- что касается метаболомного анализа PLS-DA, были идентифицированы метаболиты бутановая кислота и пропионовая кислота, которые продемонстрировали более высокую концентрацию в образцах Tx (Фиг.4);

- в результате сопоставления описанных выше микробиологических анализов может быть установлено, что присутствие бутановой кислоты и пропионовой кислоты продемонстрировало положительную корреляцию с определенными видами бактерий, полезными для микробиоты подвергаемых лечению индивидуумов;

- индивидуумы, которых лечили анализируемой композицией, имели статистически значимо более высокое число испражнений, и лучший цвет стула и консистенцию, оцененные согласно Амстердамской шкале для оценки стула у новорожденных, чем группа, в которой вводили плацебо;

- наконец, на основе профиля безопасности и переносимости, проанализированного выше, а также оценки тяжелых неблагоприятных явлений, зарегистрированных в обеих исследуемых группах, анализируемая композиция оказалась безопасной и хорошо переносимой с профилем безопасности, сравнимым с профилем безопасности плацебо.

Результаты, полученные выше, совсем не являются очевидными, поскольку, как упоминалось выше, в течение первых недель жизни млекопитающие и, в частности, люди,

не могут быть сопоставлены даже с детьми, поскольку у них еще не завершилось созревание их внутренних органов. Таким образом, было необходимо провести клинические испытания, описанные выше, чтобы установить эффективность и безопасность штаммов, описанных в настоящем описании, поскольку никак нельзя было предвидеть, что эти штаммы способны обеспечить достигнутый фармакологический ответ, а также что они могут хорошо переноситься новорожденными.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

До настоящего времени не проводилось испытаний для оценки эффектов LCDG на уязвимую популяцию, такую как здоровые новорожденные (у недоношенных и доношенных новорожденных).

Целью данного двойного слепого плацебо-контролируемого испытания было подтверждение способности педиатрического состава LCDG проходить живым через желудочно-кишечный тракт новорожденных (стратифицированных на три группы в соответствии с массой тела при рождении: нормальная масса тела, низкая масса тела, очень низкая масса тела) в ходе и после периода введения посредством оценки его способности положительно влиять на состав микробиоты. Также оценивали безопасность продукта (также мониторинг параметров массы тела, роста и окружности головы), частоту дефекаций, консистенцию стула и возникновение колик.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Экспериментальный продукт

Lactobacillus paracasei (*L. casei* DG® - CNCM I-1572; LCDG) были предоставлены SOFAR S.p.A.

9 капель *Lactobacillus paracasei*, соответствующие 1 миллиарду колониеобразующих единиц (к.о.е.) LCDG, вводили два раза в сутки в течение 28 суток. Капли вводили непосредственно на язык или смешивали с холодной или тепловатой жидкостью.

Исследуемые индивидуумы

Это исследование проводили с сентября 2018 года по март 2021 года. Пациенты, участвовавшие в испытании, были выбраны из группы недоношенных и доношенных новорожденных в Hospital Neonatology Unit, Policlinico Casilino, Рим, Италия. Критерии включения в испытание были определены следующим образом: возраст от 0 до 48 часов, новорожденные обоих полов с массой тела ≥ 1000 г, новорожденные, рожденные посредством кесарева сечения, и письменное информированное согласие родителей/опекунов новорожденных. Критериям исключения были: естественные роды, чрезвычайно низкая масса тела при рождении (ELBW) (< 1000 г), установленная или предполагаемая системная инфекция, известное тяжелое неврологическое заболевание, известное тяжелое метаболическое заболевание, известное генетическое заболевание и хромосомные нарушения, тяжелые пороки развития (например, синдром короткого кишечника; кишечная непроходимость; пациенты с раскрытым артериальным протоком могут быть включены, если он бессимптомный и не требует лечения), известный

тяжелый первичный или вторичный материнских иммунодефицит, известная материнская пищевая аллергия, материнский диабет (в том числе гестационный диабет), недавний или предполагаемый анамнез пристрастия к алкоголю или наркотикам у матери, любое тяжелое состояние, которое по мнению исследователя может препятствовать лечению, недостаточная надежность или наличие состояний, которые могут привести к не соблюдению или не выполнению протокола пациентом. Кроме того, новорожденным запрещалось принимать пробиотики, отличные от исследуемого продукта, на протяжении всего испытания, и кормящим матерям запрещалось принимать любые пробиотики на протяжении всего испытания. Только для новорожденных с нормальной массой тела (NBW), лечение или профилактика системными антибиотиками не допускались от рождения и на протяжении всего испытания, и лечение или профилактика системными антибиотиками не допускались для кормящей матери (младенца NBW) в течение 30 суток до испытания и на протяжении всего испытания.

Каждый родитель/опекун новорожденного подписывал информированное согласие на участие в испытание и получал поясняющий лист с условиями применения исследуемого продукта. На основе критериев включения/исключения, было выбрано 60 недоношенных и доношенных новорожденных.

План испытания

Целью этого 12-недельного рандомизированного двойного-слепого одноцентрового плацебо-контролируемого испытания была оценка того, изменяет ли введение LCDG новорожденным в течение первых 48 часов после рождения состав фекальной кишечной микробиоты после дополнения продуктом в течение 28 суток. 12-недельный период был разделен на 4 недели лечения и 8 недель наблюдения.

Дети были вовлечены в 5 визитов центра: визит 1 (V1; 0-48 часов после рождения), визит 2 (V2; 10 суток +/- 2 суток), визит 3 (V3; 28 суток +/- 3 суток; окончание приема продукта), визит 4 (V4; 56 суток +/- 3 суток) и визит 5 (V5; 84 суток +/- 3; окончание испытания).

В ходе V1 новорожденных стратифицировали на три группы согласно массе тела при рождении: нормальная масса тела при рождении (>2500 г, NBW), низкая масса тела при рождении (1500-2500 г LBW), очень низкая масса тела при рождении (1000-1500 г, VLBW).

Пригодных для включения пациентов, стратифицированных таким образом, рандомизировали в соотношении 1:1 в одну из следующих групп: группа 1: группа лечения: 9 капель два раза в сутки LCDG, соответствующие 2 миллиардам к.о.е. (колониеобразующие единицы) в течение 4 недель (28 суток), начиная с 48 часов после рождения; группа 2: группа плацебо: 9 капель плацебо два раза в сутки (продукт, неотличимый от тестируемого продукта) в течение 4 недель (28 суток), начиная с 48 часов после рождения.

В ходе того же визита собирали демографические данные ребенка и матери и проводили взятие образца стула ребенка. Первичным результатом был состав фекальной

микробиоты кишечника с точки зрения количества бактериальных геномов LCDG на 28-е сутки (V3) после начала лечения посредством ПЦР в реальном времени. Вторичным результатом, оцениваемым в ходе исследования, были: модификация функциональной активности фекальной микробиоты кишечника (метаболомный анализ - α - и β -разнообразие) с прогнозированием экологии микробиоты на 28, 56 и 84 сутки (V3, V4 и V5, соответственно) после начала введения; изменение состава (ПЦР в реальном времени) фекальной микробиоты кишечника с прогнозированием экологии микробиоты на 56 и 84 сутки (V4 и V5, соответственно) после начала введения; изменение качества и количества стула (частота и консистенция); возникновение коликов новорожденных, определяемых согласно критериям "Рим IV" [Castelluzzo]; безопасность и переносимость продукта; благополучие пациента.

Вопросы этики

Настоящее испытание проводили в соответствии с этическими принципами, берущими свое начало или происходящими из Декларации Хельсинки, и в соответствии с Правилами проведения качественных клинических исследований. Исследователь предоставил все документы по испытанию в соответствующий этический комитет и направил спонсору копию одобрения/положительного мнения, полученного от этического комитета (ASL Roma 2: Prot.n 01220672/2018). Все родители/опекуны новорожденных предоставили подписанное информированное согласие.

Оценка результатов

Взятие образцов стула проводили в течение 24 часов перед каждым посещением.

Для каждого новорожденного регистрировали количество испражнений и цвет и консистенцию стула с использованием Амстердамской шкалы для оценки стула (описанной ниже).

Кроме того, физико-химический анализ образцов кала, включая стеркобилиноген, нейтральные жиры, жирные кислоты, мыла, амиды, животные и растительные волокна, слизь и pH, проводили в день каждого визита в Лаборатории клинической патологии больницы Casilino Hospital. Для обеспечения оптимальных условий хранения образцы стула хранились в морозилке больницы при -20°C и отправлялись ежемесячно, с сухим льдом, курьером, оплачиваемым спонсором, в Лабораторию паразитологии/микробиома человека Bambino Gesù Paediatric Hospital (центр San Paolo) для молекулярного анализа.

Анализ посредством ПЦР в реальном времени проводили для оценки бактериальной нагрузки штамма *L. casei* DG[®] (в соответствии с уже валидированным и опубликованным способом; Ferrario) и проводили метагеномный и метаболомный анализ, характеризующий микробиоту кишечника до и после введения пробиотика. В частности, микробиоту оценивали посредством анализа нуклеотидной последовательности участков гена, кодирующего бактериальную рибосомальную субъединицу 16S рРНК. Метагеномную ДНК экстрагировали из образцов стула, количественно определяли и нормализовывали. Гипервариабельные области V3-V4 бактериального гена, кодирующего 16S рРНК, амплифицировали посредством ПЦР и продукты ПЦР количественно

определяли и секвенировали с использованием способа Illumina MiSeq. Биоинформатический анализ последовательности проводили для характеристики микробного сообщества, иерархической кластеризации, таксономического анализа и конструирования филогенетических дендрограмм с тепловыми картами.

Для метаболомного анализа метаболиты микробного происхождения, продуцированные в качестве летучих органических соединений (VOC - химические категории: жирные кислоты короткой цепи, спирты, кетоны, альдегиды, тиолы, кислоты, сложные эфиры, пирозин, пиридин, фенолы, фураны, терпены, алканы, алкены и т.д.) идентифицировали и количественно определяли. Эти соединения экстрагировали посредством системы GC-MS/SPME (газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией посредством твердофазной микроэкстракции). Для экстракции VOC в процессе SPME использовали покрытое карбокси-полидиметилсилоксаном (CAR-PDMS) волокно (85 мкм). Каждый образец анализировали в трех экземплярах и в среднем 100-500 мг помещали в 10-мл стеклянные бутылки с добавлением 4-метил-2-пентанола в качестве внутреннего стандарта (IS). Затем образцы кала уравнивали в течение 10 минут при 45°C. Волокно подвергали воздействию каждого образца в течение 45 минут перед инъектированием в GC-MS (Hewlett Packard 6890 GC), сопряженным с селективным детектором масс 5973C и оборудованным капиллярной колонкой Supelcowax 10. Детекцию метаболитов проводили в соответствии с их характеристиками. Метаболиты идентифицировали с использованием их времени удержания (Rt) относительно чистого соединения. Хроматограммы интегрировали и идентифицировали путем сравнения паттерна фрагментов с паттернами из библиотеки NIST с последующим визуальным изучением вручную. Количественные данные о метаболитах получали путем интерполяции относительных площадей относительно площади IS.

Безопасность оценивали посредством мониторинга неблагоприятных явлений в ходе испытания и измерения массы тела, роста и окружности головы новорожденных на сутки 1 (V1), 10 (V2), 28 (V3), 56 (V4) и 84 (V5).

Наконец, оценку возникновения колики проводили в соответствии с диагностическими критериями "Рим IV" (описанными ниже) и проводили мониторинг суточной частоты и консистенции с помощью специального дневника, который давался матери в ходе V1.

Амстердамская шкала стула

Шкала классифицирует количество кала на четыре класса: 1: размазанный, 2: вплоть 25%, 3: 25-50% и 4: >50%.

Консистенцию стула классифицируют как: А: водянистый, В: мягкий, С: сформированный и D: твердый.

Наконец, цвет стула классифицируют на шесть классов (I-VI).

Диагностические критерии "Рим IV" для колик новорожденных

Для клинических целей диагноз младенческих колик должен быть основан на присутствии всех из следующих критериев: возраст ребенка составляет менее 5 месяцев

при возникновении и разрешении симптомов; повторяющиеся периоды длительного плача, возбужденного состояния и раздражительности, которые возникают без очевидной причины и которые родитель неспособен предотвратить или устранить; отсутствие сниженного роста, лихорадки или недомогания. Термин "возбужденное состояние" относится к прерывающейся вокализации и определяется как "[поведение], которое не является непосредственно плачем, но также не является состоянием кого-либо, кто является активным и счастливым". У детей часто чередуется плач и возбужденное состояние, что затрудняет различение этих двух симптомов.

Для целей исследования диагноз младенческих колик должен включать предшествующие критерии вместе с обоими из следующих: в ходе телефонного звонка или персонального опроса исследователем или врачом родители сообщают о периоде плача или возбужденного состояния, длящемся по меньшей мере 3 часа в сутки в течение по меньшей мере 3 дней в неделю; длительность плача и возбужденного состояния, сообщаемые как непрерывные в течение 24 часов в выбранной группе детей, подтвержденные как длившиеся по меньшей мере 3 часа, проспективно подсчитывают посредством заполнения ежедневного дневника.

Статистический анализ

Рабочая гипотеза предполагает, что *L. casei* DG[®] (*Lactobacillus paracasei* CNCMI-1572; LCDG) имеют поведение, сходное с *L. salivaris*, который в идентичном исследовании продемонстрировал отличие после 28 суток [Putignani et al, на рассмотрении] 2,36 Log₁₀ копий /200 мг стула (от 0,04 с SD 0,4 до 2,5 с SD 2,5). В каждой группе (NBW, LBW, VLBW), учитывая прием группой лечения 2 миллиардов к.о.е./сутки, выборка из 9 пациентов в каждой группе лечения обеспечила бы мощность исследования 80% с двухсторонним t-критерием и уровнем значимости 95% в каждой группе.

Следует отметить, что штамм бактерий *L. casei* DG[®] (CNCM I-1572) или *L. paracasei* DG[®] (CNCM I-1572) был редепонирован 2 февраля 2022 года в качестве *Lacticaseibacillus paracasei* DG I-1572 DSM 34154 после переклассификации рода *Lactobacillus*, опубликованной Zheng et al. в научном журнале Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 70(4):2782-2858, 2020. Эти два вышеупомянутых названия являются взаимозаменяемыми, поскольку они всегда относятся к одному и тому же штамму бактерий.

Ожидая потенциальные потери в ходе наблюдения (выпадение 10%), в испытание включали 20 новорожденных для каждой весовой группы (из которых 10 получали активное лечение и 10 плацебо), с всего 60 новорожденными.

Категориальные данные представляли в качестве количеств и процентов, в то время как непрерывные данные выражали в значениях средних значений и стандартных отклонений или медиан и диапазонов.

Сравнения категориальных данных проводили с использованием критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера, в зависимости от ситуации. Непрерывные данные сравнивали посредством Т-критерия Стьюдента (для независимых или зависимых данных), теста Anova и Anova для повторяющихся измерений, где соответствующие

статистические тесты определяли нормальность данных; в случае ненормального распределения данных, использовали непараметрические критерии, такие как критерий суммы рангов Манна-Уитни или знаковый ранговый критерий Уилкоксона, критерий Краскела-Уоллиса или критерий Фридмана. Способы многомерной регрессии использовали в указанных случаях для оценки одновременного эффекта нескольких независимых переменных на переменную ответа или для идентификации возможных искажающих факторов и/или анализа временных данных. Результаты считались статистически значимыми при значении $P < 0,05$. Во всех случаях анализ проводили с использованием программного обеспечения Stata 15 (StatCorp).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Согласие пациента и основные характеристики

Шестьдесят индивидуумов, выбранных из недоношенных и доношенных новорожденных в отделении новорожденных Policlinico Casilino Hospital, рандомизировали в соотношении 1:1 на две группы лечения: 30 вводили LCDG и 30 вводили плацебо (Фиг.5).

В группе плацебо 20 индивидуумов (66,7%) завершили исследование и 10 (33,3%) не завершили: 2 (6,7%) индивидуума отказались, 1 (3,3%) пациент прекратил испытание рано вследствие неблагоприятного явления (AE), 6 (20,0%) индивидуумов были утрачены в ходе наблюдения (FUP) и 1 (3,3%) индивидуум отказался вследствие необходимости хирургической операции по поводу гамартомы гортанной части глотки.

В группе LCDG 26 индивидуумов (86,7%) завершили испытание и 4 (13,3%) не завершили; из них 3 (10,0%) были утрачены в ходе FUP и 1 (3,3%) умер вследствие диссеминированного внутрисосудистого свертывания и септического шока.

Что касается демографических и основных характеристик, средний возраст матери составлял 35 лет \pm 6 лет для группы плацебо и 35 лет \pm 5 лет для группы LCDG (лечение) ($P=0,94$) и отсутствовали статистически значимые различия между двумя группами лечения в отношении этнической группы матерей, типа грудного вскармливания, веса и роста матери, типа диеты, статуса курения, физической активности, наличия домашних животных и уровня образования.

Что касается характеристик новорожденных, их классифицировали в испытании в соответствии с их массой тела при рождении на 3 группы: нормальная масса при рождении (NBW), низкая масса при рождении (LBW) и очень низкая масса при рождении (VLBW). В ходе испытания было рождено 12 пар близнецов (всего 24 новорожденных), в частности 14 (46,7%) индивидуумов было включено в группу LCDG и 10 (34,5%) в группу плацебо ($P=0,34$). 18 (62,1%) и 17 (56,7%) новорожденных были девочками в группах плацебо и LCDG, соответственно ($P=0,67$), и средняя масса при рождении новорожденных составляла 2050 г \pm 784 г и 2005 г \pm 768 г в группах плацебо и LCDG, соответственно ($P=0,82$). С точки зрения показателя APGAR, гестационного возраста и соотношения PN/EG (AGA и SGA), также отсутствовали статистически значимые различия между двумя группами лечения.

***L. casei* DG (LCDG) выявлялись в кишечнике, начиная с 10 суток после первого введения, и сохранялись до последнего визита (84 сутки).**

Авторы изобретения проанализировали 251 образец стула, полученный от 59 индивидуумов при рождении, стратифицированный по VLW (n=20), LW (n=20) и NW (n=19). Штамм LCDG обнаруживался в образцах кала начиная с 10 суток после первого введения (V2) и сохранялся постоянно до последнего визита (84 суток; визит окончания испытания), с небольшим снижением относительно первого момента времени наблюдения (56-е сутки испытания; 28 суток после последнего введения продукта) (Фиг.6А). Присутствие LCDG было значительно более высоким в группе лечения, чем в контрольной группе, в образцах, полученных в ходе визитов, как в период лечения (на 10 и 28 сутки), так и в период наблюдения (на 56 и 84 сутки). Эти данные также подтверждались при стратификации образцов из каждой группы в соответствии с массой тела при рождении (NW, LW и VLW). В частности, сравнение между 3 классами массы тела (анализ внутри групп) в группе плацебо продемонстрировало статистическое отличие (значение $p=0,01$) концентраций LCDG при V2 (10 суток после первого введения), в то время как в группе лечения статистическое отличие (значение $p=0,01$) концентраций LCDG между 3 классами массы тела возникало при V3 (28 суток после последнего введения продукта). В другие оцениваемые моменты времени не наблюдалось статистически значимого отличия между классами массы тела (Фиг.6В). Более того, на 56 сутки отличие концентраций LCDG между группами лечения и плацебо было статистически значимым для детей NW и VLW (Фиг.6В).

Критерий ранговых знаков Уилкоксона использовали для сравнения концентраций LCDG в разные моменты времени для каждой группы. В группе плацебо отличия между V1 и V2 (значения $p=0,012$), между V1 и V3 (значение $p=0,016$) и между V1 и V4 (значение $p=0,012$) были статистически значимыми. Отличия между V1 и V2 (значение $p=1,5 \times 10^{-12}$), V1 и V3 (значение $p=5,8 \times 10^{-9}$), V1 и V4 (значение $p=1,8 \times 10^{-8}$), V1 и V5 (значение $p=2,0 \times 10^{-6}$), V2 и V4 (значение $p=1,6 \times 10^{-3}$) и между V2 и V5 (значение $p=9,7 \times 10^{-3}$) были статистически значимыми для группы лечения (Фиг.7).

Лечение посредством LCDG было способно сохранить гетерогенность микробиома кишечника

Для подтверждения того, что лечение LCDG способно было сохранять гетерогенность микробиома кишечника, проводили анализ α - и β -разнообразия в образцах стула с использованием метагеномного способа, нацеленного на 16S-РНК.

Анализ α -разнообразия у индивидуумов, разделенных на группу плацебо и группу лечения, в каждый момент времени показал, что в моменты времени V2 (10 суток) и V3 (28 суток), микробиота в группе плацебо, по-видимому, имела более высокое разнообразие микробных видов ($p \geq 0,05$), чем в группе лечения. В момент времени V4, индексы α -разнообразия оказались эквивалентными ($p \geq 0,05$), в то время как в момент времени V5 группа лечения имела более высокое разнообразие микробных видов, чем группа плацебо ($p \geq 0,05$) (Фиг.8А). Однако отсутствует статистически значимое отличие

между группой плацебо и группой лечения в различные моменты времени ($p \geq 0,05$).

Что касается анализа β -разнообразия, матрица разнообразия, полученная с использованием невзвешенного алгоритма UniFrac, предоставляемого в качестве PCoA в различные моменты времени между группой плацебо и группой лечения, продемонстрировала, что отсутствовало статистически значимое отличие ($p \geq 0,05$) между двумя группами в различные моменты времени. Этот результат был подтвержден посредством статистического анализа PERMANOVA, примененного к матрице расстояний, вычисленной с использованием невзвешенного алгоритма Unifrac (**Фиг.8B**).

Поводили анализ распределения операционных таксономических единиц (OTU) на уровне типа и критерий Краскела-Уоллиса использовали для сравнения в различные моменты времени, которые продемонстрировали отсутствие статистически значимых отличий ($p \geq 0,05$) любого из сравнений плацебо/лечение (**Фиг.8C**).

На уровне рода, единственное статистически значимое отличие между плацебо и лечением наблюдалось для момента времени V2 ($p < 0,05$); в частности, род *Lactobacillus* преобладал в группе лечения (**Фиг.8D**).

Введение LCDG повышает концентрацию жирных кислот короткой цепи (SCFA)

Метаболомный анализ проводили для образцов кала ($n=85$), полученных от индивидуумов, для которых сбор проводился в моменты времени наблюдения (V1-V5). Образцы кала анализировали посредством газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией с использованием системы твердофазной микроэкстракции (GC-MS-SPME).

492 метаболита было идентифицировано, количественно определено и классифицировано на 15 химических классов: кислоты, спирты, альдегиды, алканы, алкены, амины, ароматические углеводороды, сложные эфиры, фураны, фураноны, индолы, кетоны, фенолы, пиразины и терпены. Как и ожидалось, метаболические профили каждого образца продемонстрировали значительную вариабельность между индивидуумами. Матрицу исходных данных уплотняли в матрицу из 98 метаболитов, присутствие которых сохранялось по меньшей мере в 10% от всей выборки, для проведения настолько надежного анализа, насколько возможно. Для этой уплотненной матрицы был разработан полный анализ данных. Многомерный анализ проводили с использованием подхода с наблюдением, т.е. анализа частично наименьших квадратов-дискриминантного анализа (PLS-DA), для каждого момента времени. Наибольшая кластеризация образцов согласно лечению (плацебо/лечение) происходила между моментами времени V2 (10 суток) и V4 (56 суток) с повышением концентрации SCFA в образцах группы лечения (**Фиг.9**).

Кроме того, в ходе каждого визита испытания проводили физико-химическую оценку стула для оценки присутствия нейтральных жиров, кислых жиров, мыл, крахмалов, животных и растительных волокон, слизи и значения pH. Критерий хи-квадрат использовали для сравнения любых различий между двумя группами лечения, и для

любого параметра не было выявлено значимых отличий ($P > 0,05$).

Введение LCDG влияло как на экологию, так и на функцию микробиоты, модифицируя экологические ниши бактерий, присутствующих в кишечнике, и соответствующий функциональный профиль.

Результаты, полученные с использованием 3 разных подходов: ПЦР в реальном времени, метагеномного и метаболомного, сопоставляли друг с другом посредством корреляции Спирмана. Для анализа корреляции были выбраны моменты времени V2 и V3, которые совпадают с 10 и 28 сутками введения пробиотика, соответственно, поскольку метагеномный, метаболомный анализ и анализ в реальном времени продемонстрировали наиболее высокие статистически значимые отличия между группами плацебо и лечения в эти моменты времени.

В частности, в момент времени V2 *Lactobacillus paracasei* (к.о.е./мл) положительно коррелировали ($p \leq 0,05$) с метаболитами циклогексаноном, н-декановой кислотой и 3,4-диметилпентаном и с OTU *Lactobacillus*, *Granulicatella*. Более того, можно отметить несколько статистически значимых положительных корреляций между OTU и метаболитами. Наибольший интерес после употребления пробиотика представляли SCFA, включая бутановую кислоту, которая демонстрирует значимые корреляции ($p \leq 0,05$) с *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Collinsella*, *Faecalibacterium* и *Oscillospira*. Пентановая кислота демонстрирует значимые корреляции ($p \leq 0,05$) с *Streptococcus*, *Granulicatella* и *Enterococcus*, в то время как пропионовая кислота имеет значимые корреляции ($p \leq 0,05$) с *Eggerthella*, *Bacteroides* и *Bifidobacterium*.

В момент времени V3 *Lactobacillus paracasei* (к.о.е./мл) положительно коррелировали ($p \leq 0,05$) с 2,3-диметилпентаналем, 1-гексаноном, деканалем и додекановой кислотой (Фиг.10А), в то время как не было выявлено значимых корреляций между *Lactobacillus paracasei* (к.о.е./мл) и различными OTU (Фиг.10В). Наконец, можно отметить несколько статистически значимых положительных корреляций ($p \leq 0,05$) между OTU и метаболитами, в частности, бутановая и пропионовая кислота демонстрируют значимые корреляции ($p \leq 0,05$) с *Collinsella*, в то время как пентановая кислота имеет положительную корреляцию с *Propionibacterium*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* и *Coprococcus* (Фиг.10С).

Введение LCDG не уменьшало количество колики.

В соответствии с диагностическими критериями "Рим IV", исследователь регистрировал эпизод колики, если плач продолжался более 3 часов в течение по меньшей мере 3 дней в неделю вместе с возбужденным состоянием в течение по меньшей мере 3 часов в сутки. В ходе исследования матери должны были заполнять дневник, в котором они должны были отслеживать плач ребенка, если плач продолжался более 3 часов. При всех вовлеченных визитах испытания (10, 28, 56 и 84 суток после рандомизации), не было выявлено статистически значимых отличий между двумя исследуемыми группами (дети с плацебо и Enterolactis). В действительности, количество пациентов, которые плакали более 3 часов в сутки и средняя длительность плача в каждой группе были практически

сходными при каждом визите испытания, с общим количеством 8 колик, произошедших в ходе испытания (4 в группе плацебо и 4 в группе LCDG).

Консистенция стула, количество и цвет

В ходе клинического испытания консистенцию кала, количество и цвет оценивали с использованием Амстердамской шкалы стула. Цвет и консистенция различались на значимом уровне между группой плацебо и группой лечения на 10-е сутки (V2) и 56-е сутки (V4).

При V2 значения p составляли $P < 0,0001$ для цвета кала и $P = 0,0016$ для консистенции кала. В частности, из 143 и 221 всех испражнений, зарегистрированных для РТ, принадлежащих к группе плацебо и лечения, соответственно, в 37 (25,9%) образцов кала группы плацебо и 18 (8,1%) образцов кала группы лечения были классифицированы как цвет II, и 7 (4,9%) образцов кала группы плацебо и ни одного образца кала группы лечения были классифицированы как цвет IV. Что касается консистенции, 80 (55,9%) образцов кала группы плацебо и 152 (68,8%) образца кала группы лечения были классифицированы как консистенция В, и отсутствовали образцы кала группы плацебо и было 6 (2,7%) и 2 (0,9%) образцов кала группы лечения, классифицированных как консистенция С/D и D.

В ходе визита 4, 119 дефекаций и 183 дефекаций произошли у пациентов в группе плацебо и лечения, соответственно, со статистически значимым отличием цвета и консистенции между группами лечения ($P = 0,007$ для цвета кала и $P < 0,0001$ для консистенции кала с использованием амстердамской шкалы).

Что касается количества, отличие было значимым только в образцах, полученных на 28-е сутки (V3), с общим количеством 122 и 219 дефекаций, зарегистрированных для группы плацебо и лечения, соответственно.

Оценка безопасности

Для мониторинга роста включенных новорожденных оценивали параметры массы тела, роста и окружности головы при каждом визите испытания. При сравнении групп лечения и плацебо не было выявлено статистически значимых отличий в ходе испытания. Наконец, не было выявлено отличий основных показателей жизнедеятельности (за исключением RR, который был выше в группе плацебо, чем в группе лечения).

Что касается неблагоприятных явлений (AE), всего 21 AE было зарегистрировано для группы плацебо и 16 AE для группы LCDG в ходе испытания. Среди этих неблагоприятных явлений, было зарегистрировано 10 SAE для группы плацебо и 6 SAE для группы лечения, и 2 тяжелых AE для группы плацебо и 4 тяжелых AE для группы лечения.

В группе плацебо 10 (47,6%) AE считалось мягкими, 9 (42,9%) AE умеренной тяжести и 2 (9,5%) AE тяжелой тяжести, в то время как в группе LCDG 8 (50,0%) AE считались мягкими, 4 (25,0%) AE умеренной тяжести и 4 (25,0%) AE тяжелой тяжести.

Среди AE, которые возникли у РТ из группы плацебо, 3 (14,3%) AE были сочтены маловероятно связанными с лечением (1 "респираторный дистресс-синдром

новорожденных" и 2 "боль в животе") и 1 (4,8%) АЕ было сочтено вероятно связанным с лечением ("желудочно-кишечное рефлюксное заболевание"). У РТ из группы LCDG 2 (12,5%) АЕ были сочтены маловероятно связанными с лечением ("диссеминированное внутрисосудистое свертывание" и "септический шок", которые вызывали смерть пациента через 9 суток после визита 2) и 2 (12,5%) АЕ были сочтены вероятно связанными с лечением ("некротизирующий колит" и "сепсис").

ОБСУЖДЕНИЕ

В определенных клинических испытаниях на новорожденных исследовалось действие пробиотиков при лечении кишечной колики, продемонстрировав их эффективность в отношении снижения длительности эпизодов плача и симптомов колик по сравнению с плацебо [Lundelin].

Длительное испытание для наблюдения пробиотического лечения в ходе периода новорожденности выявило, что более низкий процент индивидуумов в группе лечения пробиотиком имел возникновение аллергии, чем у пациентов, распределенных в группу плацебо [Denkel].

Более того, введение пробиотика коррелировало с более низкой частотой возникновения некротизирующего энтероколита и сниженной смертностью у недоношенных новорожденных [Lundelin, Strunk, Shane, Costeloe].

Согласно этим данным, пробиотики характеризуются превосходным профилем безопасности. Были зарегистрированы случаи бактериемии, вызванные бактериальными штаммами, содержащимися в пробиотиках, хотя они являются чрезвычайно редкими и определяются наличием тяжелого иммунодефицита [Lundelin, Salminen, Thomas].

Однако требуется больше данных в отношении безопасности и потенциального эффекта дополнения пробиотиком у новорожденных.

Учитывая возрастающее применение лактобацилл в пробиотических смесях, правильная идентификация и подсчет клеток LCDG в кале может улучшить исследование фактической стабильности и персистенции этих пробиотиков в микробиоте кишечника человека [Arioli].

В настоящем испытании впервые тестировали безопасность LCDG и их способность положительно влиять на состав микробиоты в определенной выборке, включающей не только младенцев с NMW, но также индивидуумов с LW и VLW.

LCDG выявлялись в кишечнике, начиная с 10 суток после первого введения, и сохранялись до последнего визита (84 суток; окончание испытания), с небольшим снижением, начинающимся с первого момента времени наблюдения (56-е сутки испытания; 28 суток после последнего введения продукта). Присутствие LCDG было значительно более высоким в группе лечения, чем в контрольной группе, при V3 (28-е сутки; последние сутки лечения) для детей с NW и VLW.

Анализируя пробиотические штаммы в образцах стула, хотя и с учетом альфа- и бета-разнообразия, изменение всего профиля микробиоты может оказаться зависимым от времени и не зависимым от лечения (что демонстрирует, что лечение способно сохранять

гетерогенность кишечного микробиома), на уровне рода, согласно первичному анализу, введение пробиотика вызывает статистически значимое повышение уровня организмов рода *Lactobacillus spp* через 10 суток после начала введения. Это повышение также обнаруживалось в более поздние моменты времени, однако было не статистически значимым.

Что касается метаболомного анализа, как и ожидалось, метаболические профили каждого образца продемонстрировали значительную вариабельность между индивидуумами. Анализ PLS-DA идентифицировал метаболиты масляную кислоту и пропионовую кислоту (SCFA) в качестве основных участников кластеризации между группой плацебо и группой лечения с повышением их концентрации в образцах, взятых в группе лечения.

Все эти результаты показали и подтвердили способность LCDG выживать в желудочно-кишечном тракте при сохранении гетерогенности кишечной микробиоты. Эти результаты согласуются с заключениями испытаний, проведенных в здоровой педиатрической (3-12 лет) [Radicioni] или взрослой выборках [Drago].

Более того, результаты, полученные с использованием 3 разных подходов (ПЦР в реальном времени, метагеномика и метаболомика) коррелировали друг с другом при использовании корреляции Спирмана.

Интеграция данных, полученных с помощью этих подходов, демонстрирует, что введение пробиотика LCDG имеет влияние как на экологию, так и на функцию микробиоты, модифицируя экологические ниши бактерий, присутствующих в кишечнике, и соответствующий функциональный профиль. В частности, некоторые SCFA, такие как бутановая и пропионовая кислота, продемонстрировали положительную корреляцию с определенными полезными бактериями, такими как *Faecalibacterium*, *Oscillospira*, *Eggerthella*, *Bacteroides* и *Bifidobacterium*. Эти молекулы продемонстрировали способность влиять на всасывание питательных веществ [Heimann]. Кроме того, положительная корреляция ($p \leq 0,05$) между *Lactobacillus paracasei* (к.о.е./мл) и циклогексаноном, н-декановой кислотой и 3,4-диметилгептаном была выявлена на сутки 28 испытания.

Консистенция, количество и цвет кала также регистрировали в ходе клинического испытания. Количество было значимым только в образцах, взятых на 28-е сутки, в то время как цвет и консистенция различались на значимом уровне на 10-сутки и 56-сутки (4 недели после окончания введения).

С другой стороны, не было выявлено отличий в возникновении колик согласно диагностическим критериям "Рим IV", однако эти результаты, возможно, следует проанализировать с учетом того, что длительность как лечения, так и общего испытания, может быть недостаточной, чтобы увидеть улучшение этого параметра. Например, согласно Pärtty et al [Pärtty], продление дополнения пробиотиком в течение вплоть до 2 месяцев (двукратная длительность этого испытания) с периодом наблюдения вплоть до 1 года, продемонстрировало, что он может облегчать симптомы, ассоциированные с плачем и возбужденным состоянием, у недоношенных новорожденных.

Что касается безопасности, как упоминалось выше, не было выявлено отличий основных показателей жизнедеятельности (за исключением RR, который был выше в группе плацебо, чем в группе лечения).

В ходе испытания также оценивали параметры массы тела, роста и окружности головы при каждом визите испытания для мониторинга роста включенных новорожденных. При сравнении групп лечения и плацебо не было выявлено статистически значимых отличий в ходе испытания. Хотя в предшествующей статье было показано, что коммерчески полученный симбиотический раствор, содержащий комбинацию пробиотиков и пребиотиков, способен увеличить массу тела и окружность головы у недоношенных новорожденных [Guneу], другие испытания показали данные, согласующиеся с результатами, полученными авторами изобретения (т.е. отсутствие отличий между группами лечения и плацебо) [Vlieger], в частности в отношении параметра массы тела [Indrio, Underwood]. На увеличение массы тела у новорожденных влияет множество сосуществующих патологий и доступность родительской нутритивной поддержки и/или обогащение грудного молока [Moni], которые могли влиять на тенденцию массы тела в обеих группах в этом испытании.

Недавно Matin et al [Matin] опубликовали результаты испытания, вовлекающего пероральное введение пробиотиков ($1,5 \times 10^9$ к.о.е./г *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*) кормящим матерям и их новорожденным с очень низкой массой тела при рождении (VLBW) для тестирования изменений уровня общего сывороточного билирубина (TSB) и увеличения массы тела у новорожденных. Введение выбранных пробиотиков снижало уровень TSB у новорожденных, однако не имело значимого эффекта на увеличение массы тела после первой недели вмешательства.

Более того, на основе проанализированного профиля безопасности и переносимости, а также оценки тяжелых АЕ, зарегистрированных в обеих исследуемых группах, было продемонстрировано, что тестируемый продукт является безопасным и хорошо переносился как плацебо в этом испытании.

Ограничения и дальнейшие планы

В целом, результаты настоящего испытания подтвердили высокий профиль безопасности продукта даже для уязвимой популяции, такой как новорожденные с NBW, LBW и VLBW. Хотя LDCG подтвердили способность выживать в желудочно-кишечном тракте, влияя на микробиоту кишечника и композицию и SCFA, учитывая ключевую роль кишечной микробиоты во всасывании питательных веществ и, следовательно, росте новорожденных, было бы полезным в будущем проанализировать долгосрочный эффект продукта с наблюдением, составляющим по меньшей мере один год.

Другим интересным аспектом, который не был полностью освещен в клиническом испытании, является потенциальное влияние продукта на микробиом и сывороточный метаболит в различных условиях питательных веществ. Действительно, питание в раннем детстве определяет развитие кишечной микробиоты. В отличие от грудного вскармливания, было показано, что кормление молочной смесью влияет на микробиом

кишечника и сывороточный метаболом в сторону более неблагоприятного состояния. Недавно было показано, что другой штамм *Lactobacillus paracasei*, хотя и не отменяя влияния кормления молочной смесью, влияет на микробиом и сывороточный метаболом, что может смягчать некоторое неблагоприятное метаболическое влияние кормления молочной смесью [Lee].

ЧЕРТЕЖИ:

Фигура 5. Блок-схема плана испытания. 60 участников было включено в клинической испытание и рандомизировано в одну из групп введения в соотношении 1:1. 20 и 26 завершили испытание в группе плацебо и лечения, соответственно. 20 и 26 индивидуумов завершили испытание в группах плацебо и лечения, соответственно.

Фиг.6. *L. casei* DG (LCDG) выявлялись в кишечнике, начиная с 10 суток после первого введения и сохранялись до последнего посещения (84 суток).

А) Ящичковые диаграммы демонстрируют концентрации *LCDG* для каждого момента времени наблюдения, дифференцированного между плацебо и лечением; В) данные стратифицировали в соответствии с массой тела индивидуума при рождении: VLW (очень низкая масса), LW (низкая масса), NW (нормальная масса). Для каждой группы показана медиана, двадцать пятый перцентиль, семьдесят пятый перцентиль, минимальная и максимальная величины концентрации *L. casei* DG (к.о.е./мл). Верхние столбики соответствуют статистически значимым сравнениям (значение $p < 0,05$).

Фиг.8. Лечение LCDG было способно сохранить гетерогенность микробиома кишечника. (А) анализ α -разнообразия между группой плацебо и группой лечения на 10, 28, 56 и 84 сутки (V2, V3, V4 и V5 соответственно). В) анализ β -разнообразия. Матрицу разнообразия получали с использованием невзвешенного алгоритма UniFrac, предоставляемого в качестве PCoA в различные моменты времени между группой плацебо и группой лечения. С) Гистограммы распределения OTU на уровне типа и критерий Краскала-Уоллиса, применений для сравнений в различные моменты времени. D) Гистограммы, демонстрирующие относительное содержание *Lactobacillus spp.* во все моменты времени.

Фиг.9. Введение LCDG увеличивало концентрацию жирных кислот короткой цепи (SCFA). Анализ метаболитов представлен в качестве анализа частичных наименьших квадратов-дискриминантного анализа (PLS-DA; слева: график оценки; справа: показатели VIP), сравнивающего плацебо с лечением в каждый момент времени: А) V1; В) V2; С) V3; D) V4; E) V5.

Фиг.10. Введение LCDG имело влияние как на экологию и функцию микробиоты, модифицируя экологические нише бактерий, находящихся в кишечнике, и соответствующий функциональный профиль. Корреляционный анализ между *Lactobacillus paracasei*, метаболитами и OTU на 28 сутки (V3; окончание лечения). А) тепловая карта корреляции между метаболитами и *Lactobacillus paracasei* (к.о.е./мл); В) тепловая карта корреляции между OTU и *L. paracasei* (к.о.е./мл); С) тепловая карта корреляции между OTU и метаболитами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Штамм бактерий для применения в способе лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, индивидуума, имеющего нарушения желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, причем такие нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита, сепсиса, синдрома раздраженного кишечника (IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицируемого IBS, хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного ректоколита, астмы, ожирения, диабета 1 типа, атопического дерматита, рассеянного склероза, злокачественной опухоли, аутизма, аллергии, иммуноопосредуемых, аутоиммунных нарушений, выбранных из глютеновой энтеропатии, болезни Грэйвса, ревматоидного артрита, тиреоидита Хашимото, сахарного диабета 1 типа, системной красной волчанки (волчанка), васкулита, болезни Аддисона, полимиозита, синдрома Шегрена, прогрессирующей системной склеродермии, гломерулонефрита (воспаление почек), бесплодия, и поддержания увеличения массы тела у указанного индивидуума;

- где указанный штамм бактерий принадлежит к виду *Lactobacillus paracasei* и выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и их смеси;

- где указанный индивидуум представляет собой новорожденного индивидуума в первые четыре недели жизни.

2. Штамм бактерий для применения по п.1, где возраст указанного индивидуума составляет от 1 месяца до менее или ровно 12 месяцев.

3. Штамм бактерий для применения по п.1 или 2, где указанный штамм представляет собой жизнеспособный штамм бактерий или производное указанного штамма бактерий, причем последнее выбрано из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: тиндализованного бактериального штамма, обработанного ультразвуковым излучением бактериального штамма, бактериального штамма, инактивированного радиацией, предпочтительно, гамма-излучением, лизированного бактериального штамма или бактериального гомогената, экстракта или фракции стенки бактериального штамма; предпочтительно тиндализованного бактериального штамма.

4. Штамм бактерий для применения по любому из пп.1-3, где указанные нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита, сепсиса, синдрома раздраженного кишечника (IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицированного IBS, хронического

воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного ректоколита.

5. Смесь М для применения по любому из пп. 1-4, где указанная смесь содержит или, альтернативно, состоит из штамма бактерий, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, который выбран из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и их смеси; и по меньшей мере одной добавки и/или эксципиента пищевой или фармацевтической категории.

6. Смесь М для применения по п.5, где указанная смесь М содержит или, альтернативно, состоит из: штамма бактерий, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, выбранного из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и их смеси; и

- по меньшей мере одного дополнительного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из:

- *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,
- *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,
- *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BIIBS01 DSM 33233,
- *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,
- *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708; и их смеси.

7. Смесь М для применения по любому из пп. 5 или 6, где указанная смесь М дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный активный компонент, выбранный из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из:

- по меньшей мере одного витамина из группы А, В, С, D, Е и/или К, предпочтительно витамина группы В и/или витамина D;

- одного или нескольких антиоксидантов, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: глутатиона, полифенолов, таких как ресвератрол и транс-ресвератрол, кофермента Q10, астаксантина, ликопена;

- одного или нескольких растительных веществ, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: ботанических веществ или их экстрактов с действием расслабления кишечника, предпочтительно выбранных из валерианы, страстоцвета, мяты лимонной, боярышника и ромашки;

- минералов или их солей, например, цинка, селена, магния, калия;

- одной или нескольких мононенасыщенных жирных кислот, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из омега-9 и/или полиненасыщенных жирных кислот, омега 3 и омега 6;

- одного или нескольких иммуностимулирующих веществ, средств против диареи и/или питательных веществ;

- по меньшей мере одного пребиотика, предпочтительно выбранного из группы (II), состоящей из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS),

ксилит-олигосахарида (XOS), гуаровой камеди, лактоферрина и их смеси; более предпочтительно, инулина; и
и их смеси.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,

По ст.19 (для сведений)

1. Штамм бактерий для применения в способе лечения, превентивного и/или нацеленного на излечение, индивидуума, имеющего нарушения желудочно-кишечного тракта воспалительной и/или функциональной природы, причем такие нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита, сепсиса, синдрома раздраженного кишечника (IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицируемого IBS, хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона и язвенного ректоколита;

- где указанный штамм бактерий принадлежит к виду *Lactobacillus paracasei* и выбран из группы, содержащей или альтернативно состоящей из *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и их смеси;

- где указанный индивидуум представляет собой новорожденного индивидуума в первые четыре недели жизни.

2. Штамм бактерий для применения по п.1, где возраст указанного индивидуума составляет от 1 месяца до менее или ровно 12 месяцев.

3. Штамм бактерий для применения по п.1 или 2, где указанный штамм представляет собой жизнеспособный штамм бактерий или производное указанного штамма бактерий, причем последнее выбрано из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: тиндализованного бактериального штамма, обработанного ультразвуковым излучением бактериального штамма, бактериального штамма, инактивированного радиацией, предпочтительно, гамма-излучением, лизированного бактериального штамма или бактериального гомогената, экстракта или фракции стенки бактериального штамма; предпочтительно тиндализованного бактериального штамма.

4. Штамм бактерий для применения по любому из пп.1-3, где указанные нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита, сепсиса, синдрома раздраженного кишечника (IBS), IBS с преобладающим запором или запорным кишечником, IBS с преобладающей диареей или диарейным кишечником, IBS с чередующимся нарушением кишечника, неклассифицированного IBS, хронического воспалительного заболевания кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного ректоколита.

5. Смесь М для применения по любому из пп. 1-4, где указанная смесь содержит или, альтернативно, состоит из штамма бактерий, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, который выбран из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760, и их смеси; и по меньшей мере одной добавки и/или эксципиента пищевой или

фармацевтической категории.

6. Смесь М для применения по п.5, где указанная смесь М содержит или, альтернативно, состоит из: штамма бактерий, принадлежащего к виду *Lactobacillus paracasei*, выбранного из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: *Lactobacillus paracasei* DG® CNCM I-1572, *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 DSM 26760 и их смеси; и

- по меньшей мере одного дополнительного штамма бактерий, выбранного из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из:

- *Bifidobacterium breve* BbIBS01 DSM 33231,
- *Bifidobacterium breve* BbIBS02 DSM 33232,
- *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BlIBS01 DSM 33233,
- *Lactobacillus plantarum* LpIBS01 DSM 33234,
- *Bifidobacterium bifidum* BbfIBS01 DSM 32708; и

их смеси.

7. Смесь М для применения по любому из пп. 5 или 6, где указанная смесь М дополнительно содержит по меньшей мере один дополнительный активный компонент, выбранный из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из:

- по меньшей мере одного витамина из группы А, В, С, D, Е и/или К, предпочтительно витамина группы В и/или витамина D;

- одного или нескольких антиоксидантов, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: глутатиона, полифенолов, таких как ресвератрол и транс-ресвератрол, кофермента Q10, астаксантина, ликопена;

- одного или нескольких растительных веществ, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: ботанических веществ или их экстрактов с действием расслабления кишечника, предпочтительно выбранных из валерианы, страстоцвета, мелиссы лимонной, боярышника и ромашки;

- минералов или их солей, например, цинка, селена, магния, калия;

- одной или нескольких мононенасыщенных жирных кислот, выбранных из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из омега-9 и/или полиненасыщенных жирных кислот, омега 3 и омега 6;

- одного или нескольких иммуностимулирующих веществ, средств против диареи и/или питательных веществ;

- по меньшей мере одного пребиотика, предпочтительно выбранного из группы (II), состоящей из: инулина, фруктоолигосахарида (FOS), галактоолигосахарида (GOS), ксилит-олигосахарида (XOS), гуаровой камеди, лактоферрина и их смеси; более предпочтительно, инулина; и

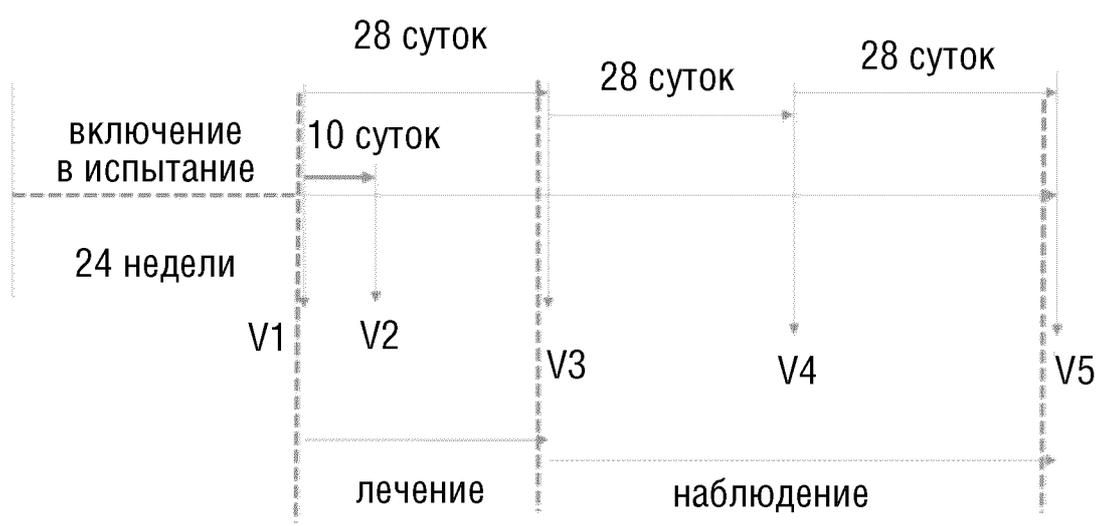
и их смеси.

8. Штамм бактерий для применения по любому из пп.1-4, где указанные нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у

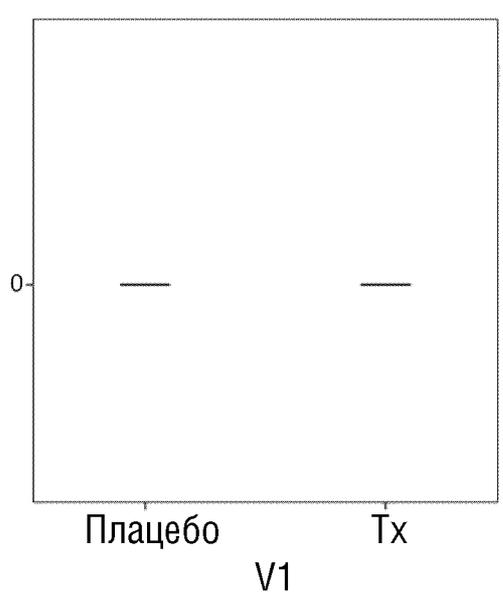
недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита.

9. Смесь М для применения по любому пп.5-7, где указанные нарушения выбраны из группы, содержащей или, альтернативно, состоящей из: колик новорожденных, кишечных колик, хронического энтероколита или хронического энтероколита у недоношенных новорожденных, некротизирующего энтероколита.

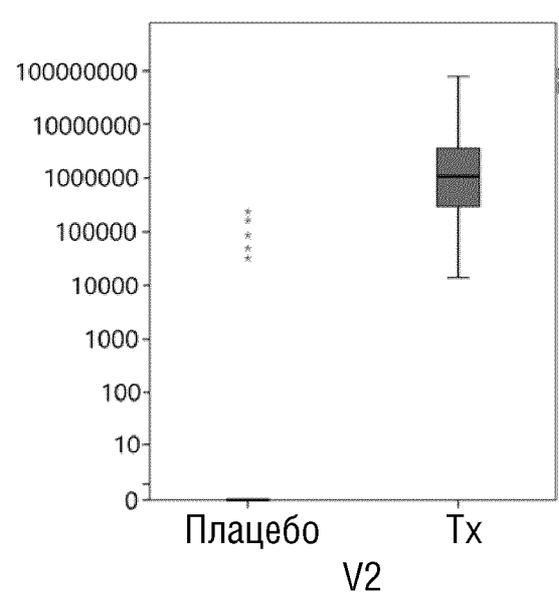
ФИГ.1



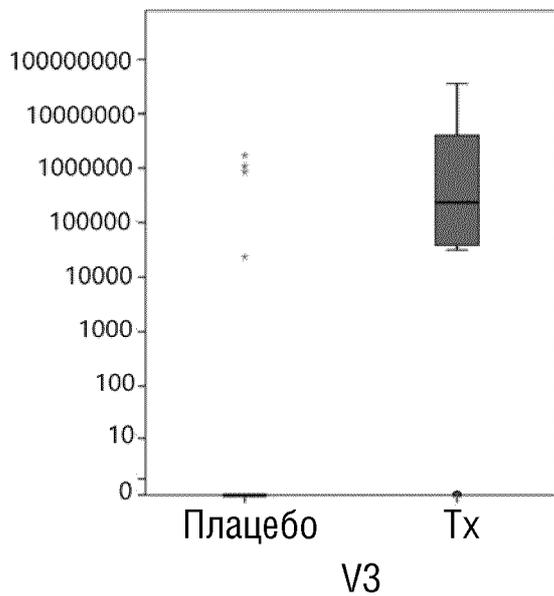
ФИГ.2А



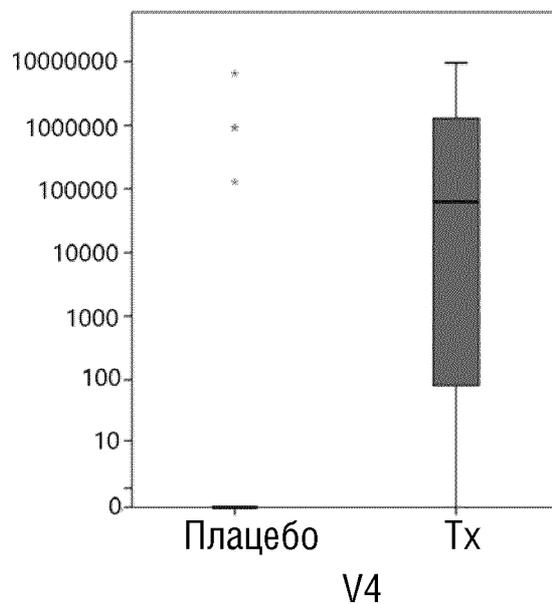
ФИГ.2В



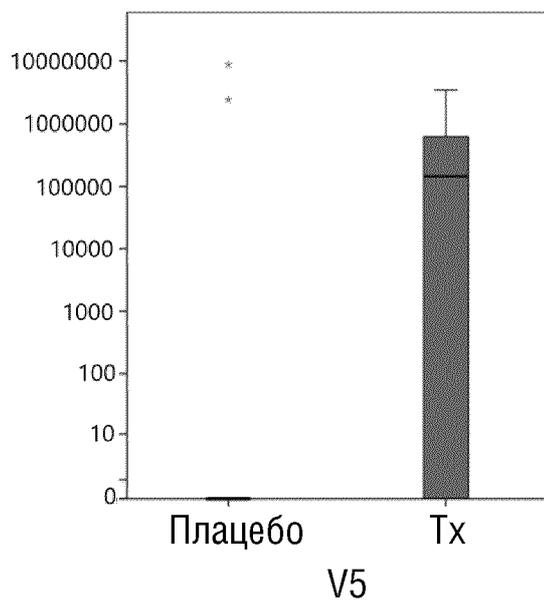
ФИГ.2С



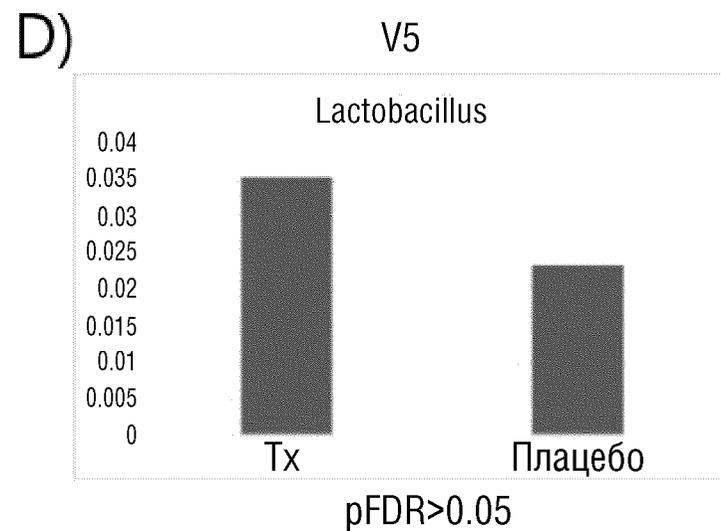
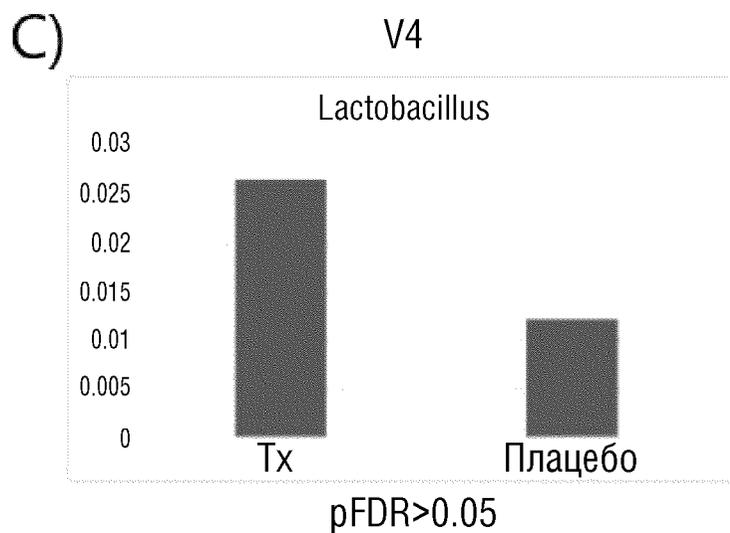
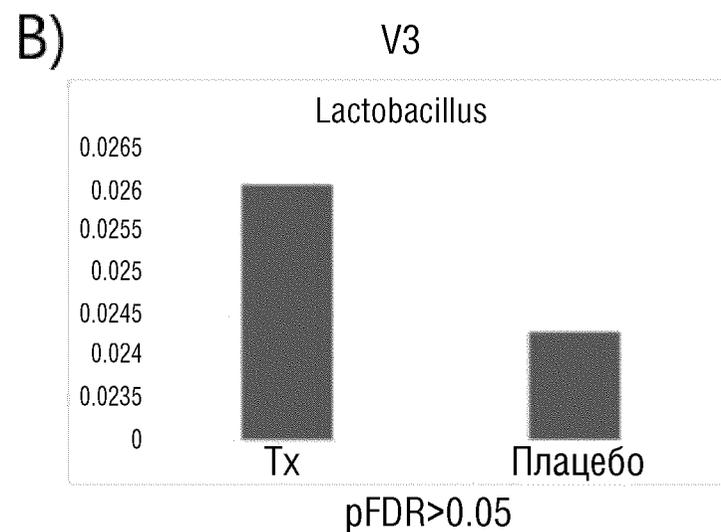
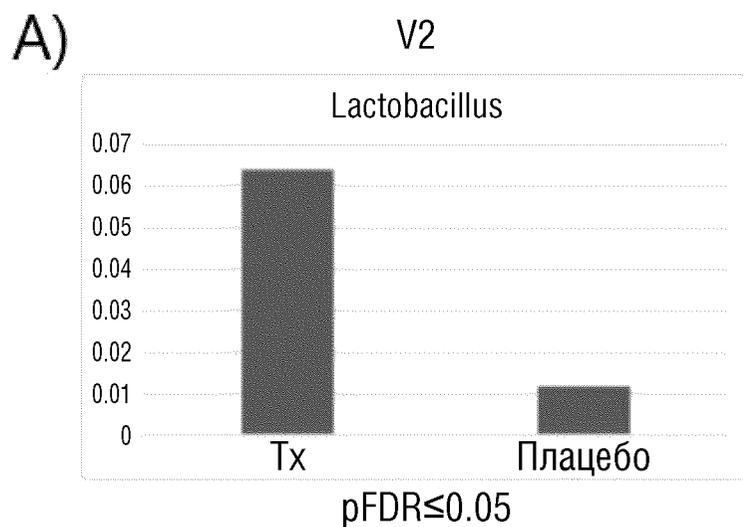
ФИГ.2D



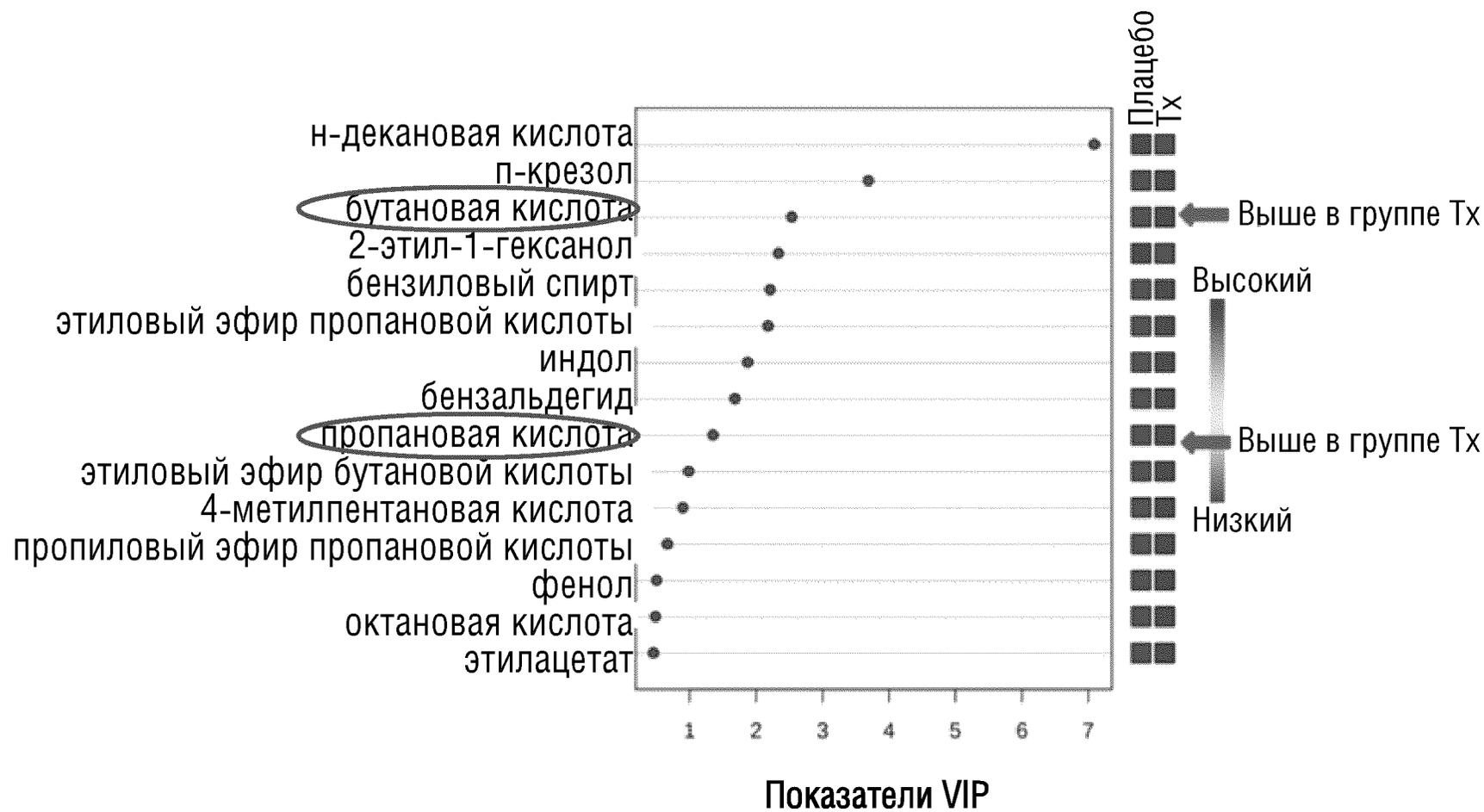
ФИГ.2Е



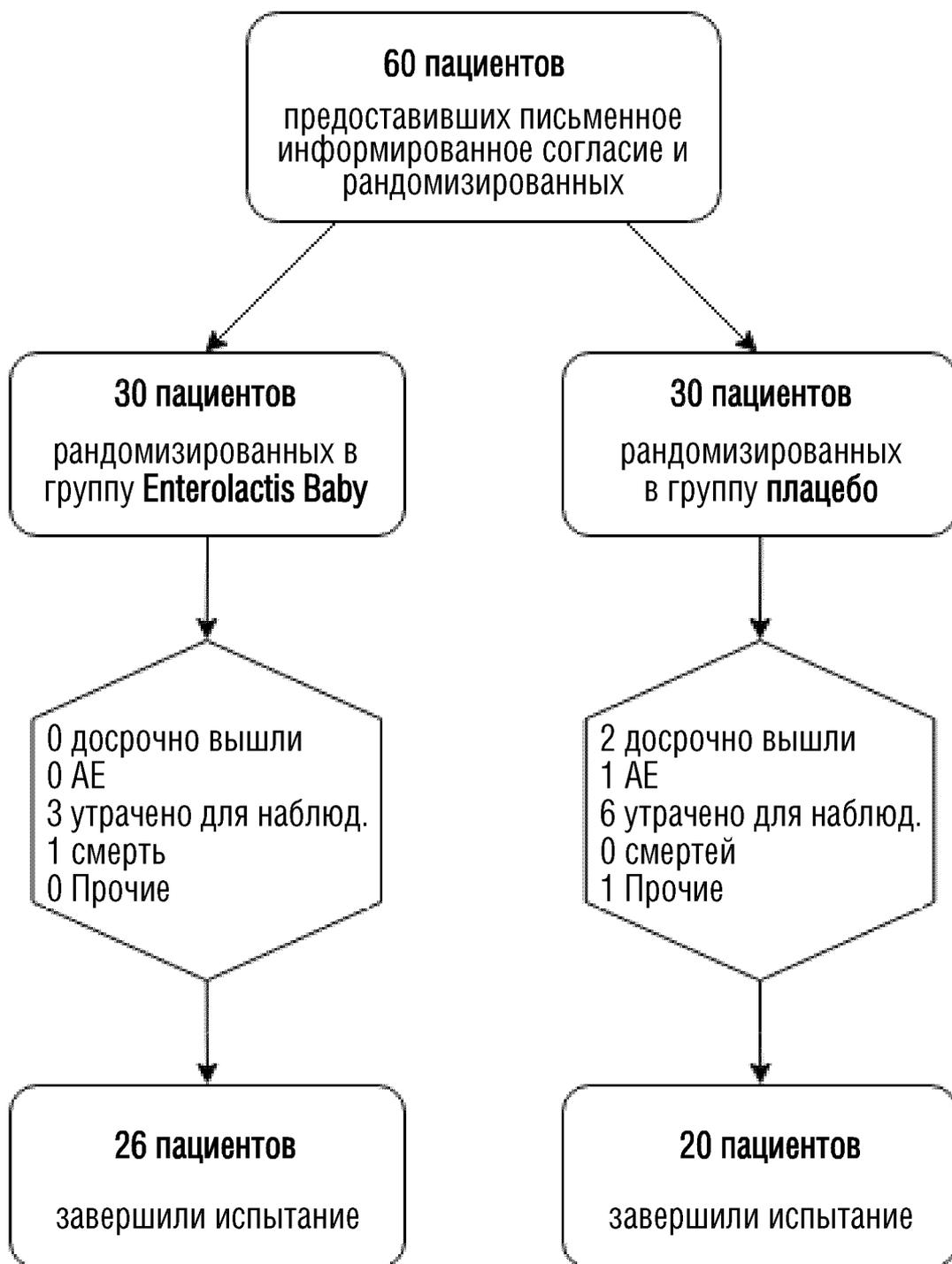
ФИГ.3



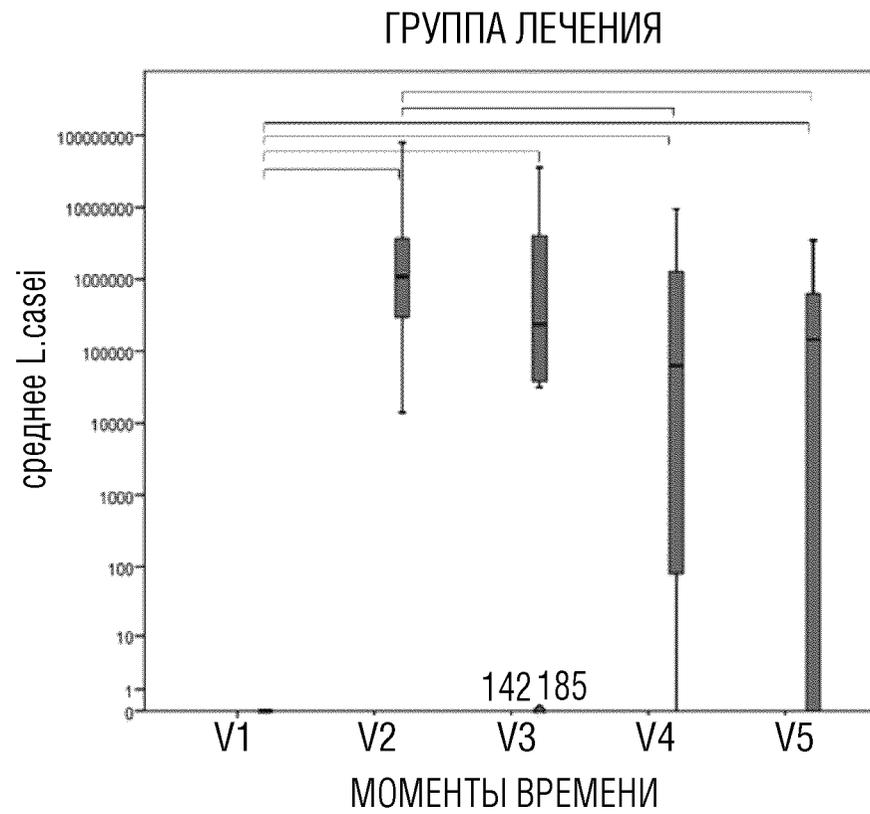
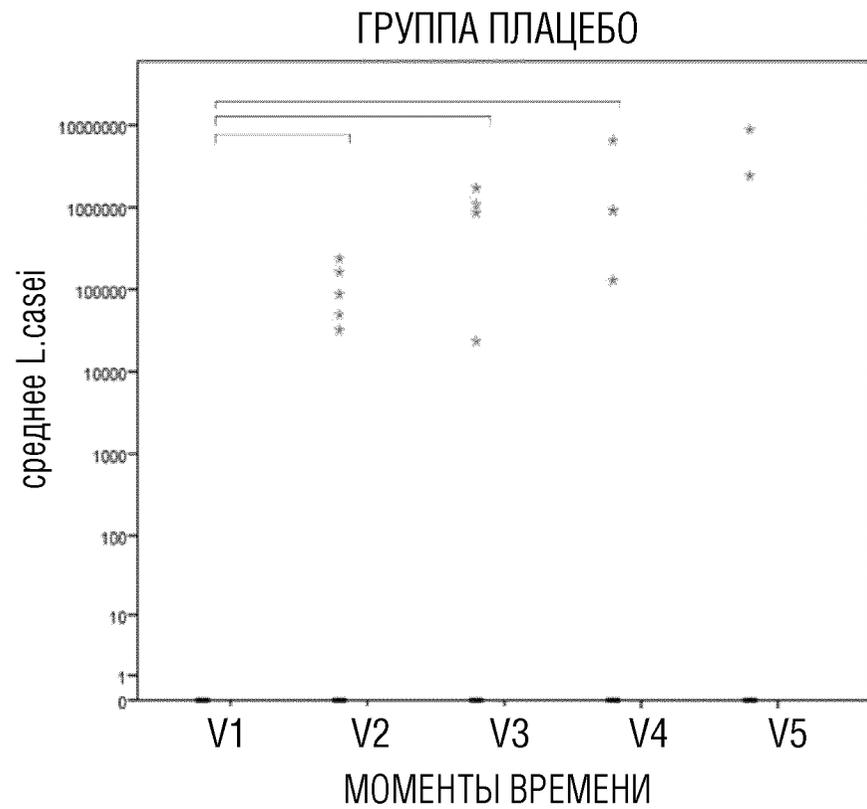
ФИГ.4



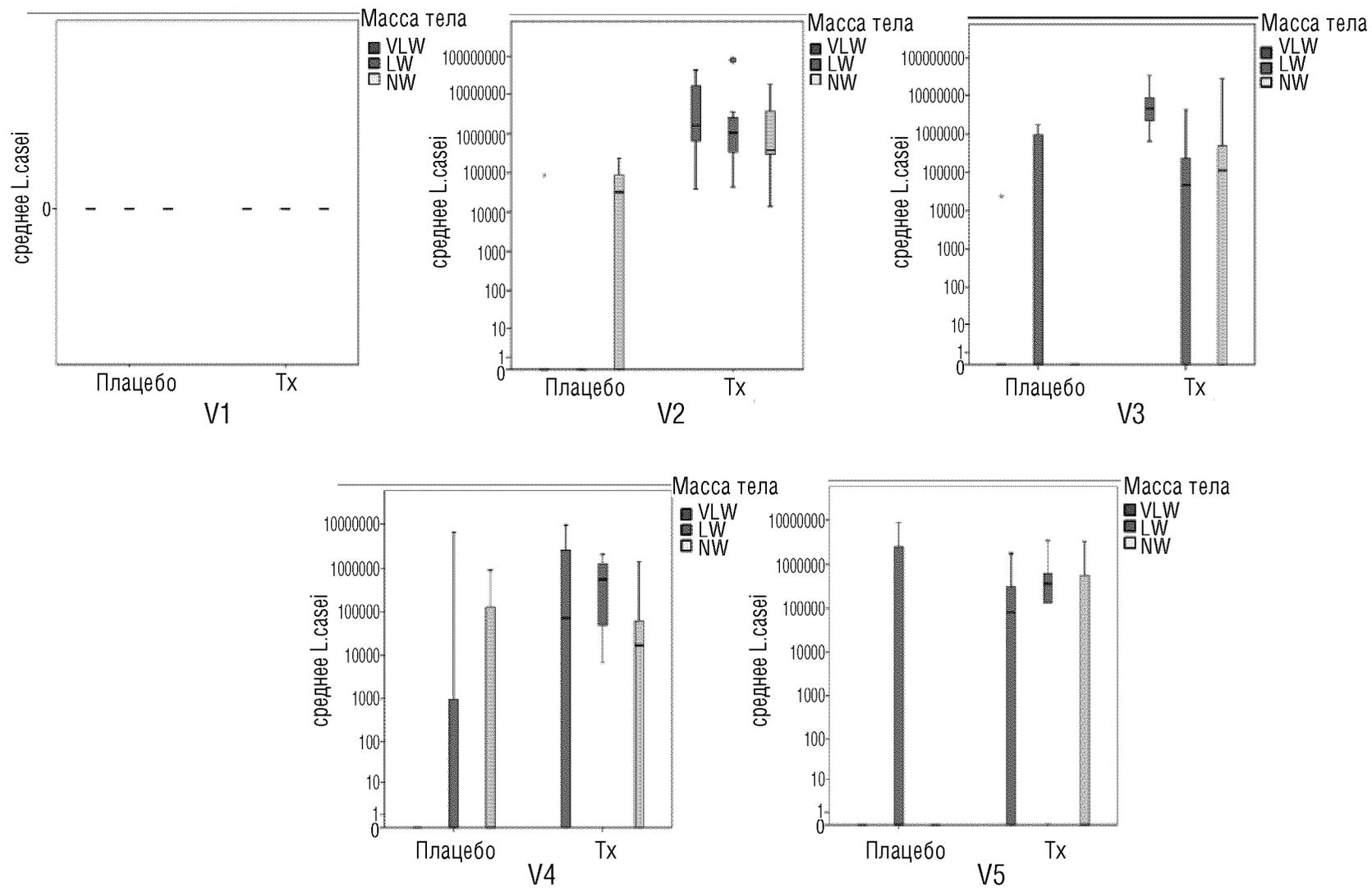
ФИГ.5



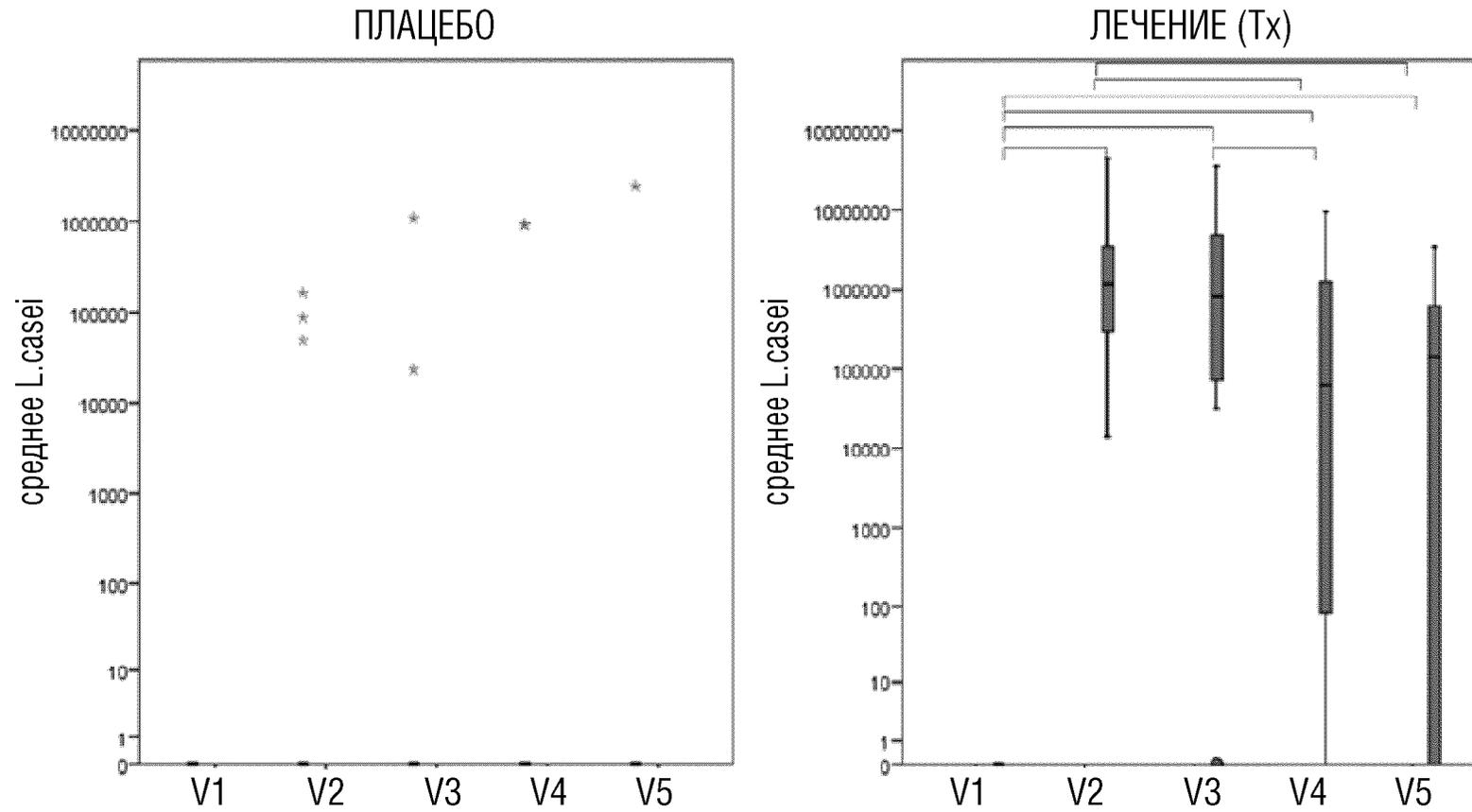
ФИГ.6А



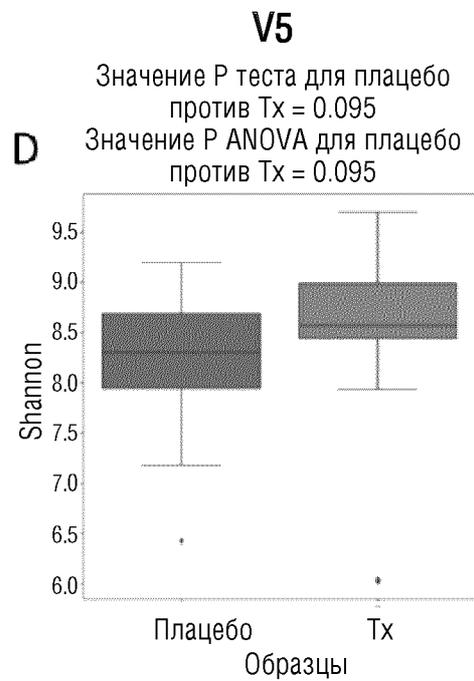
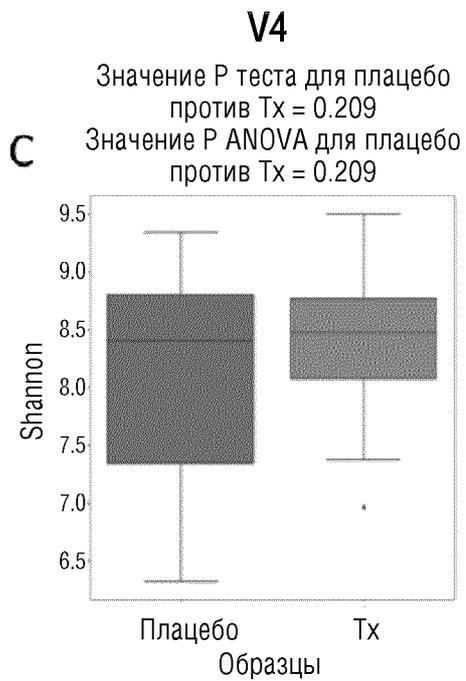
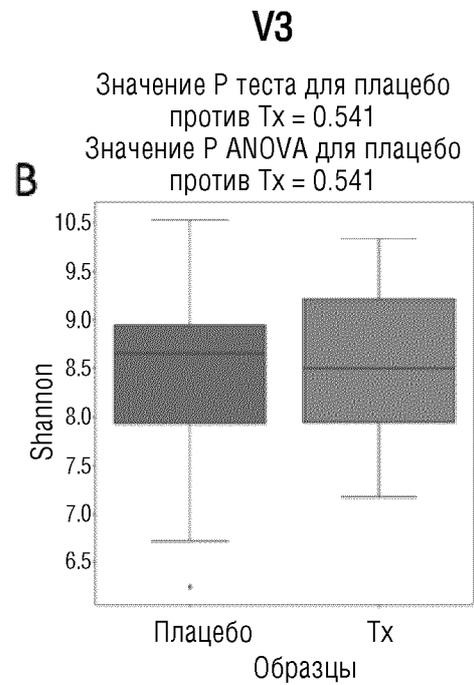
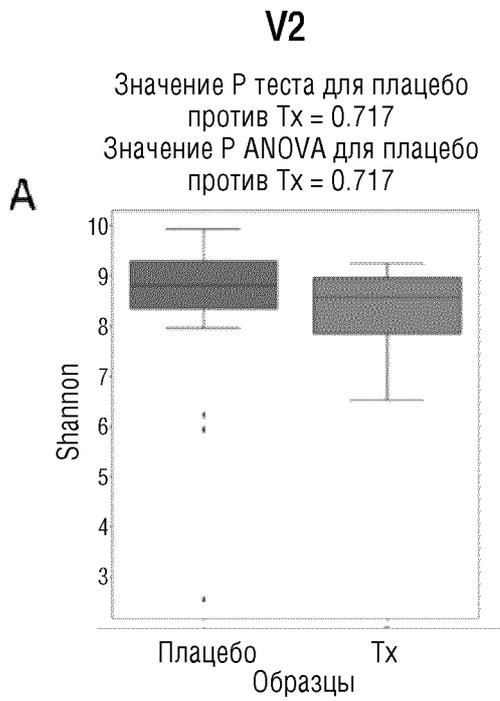
ФИГ.6В



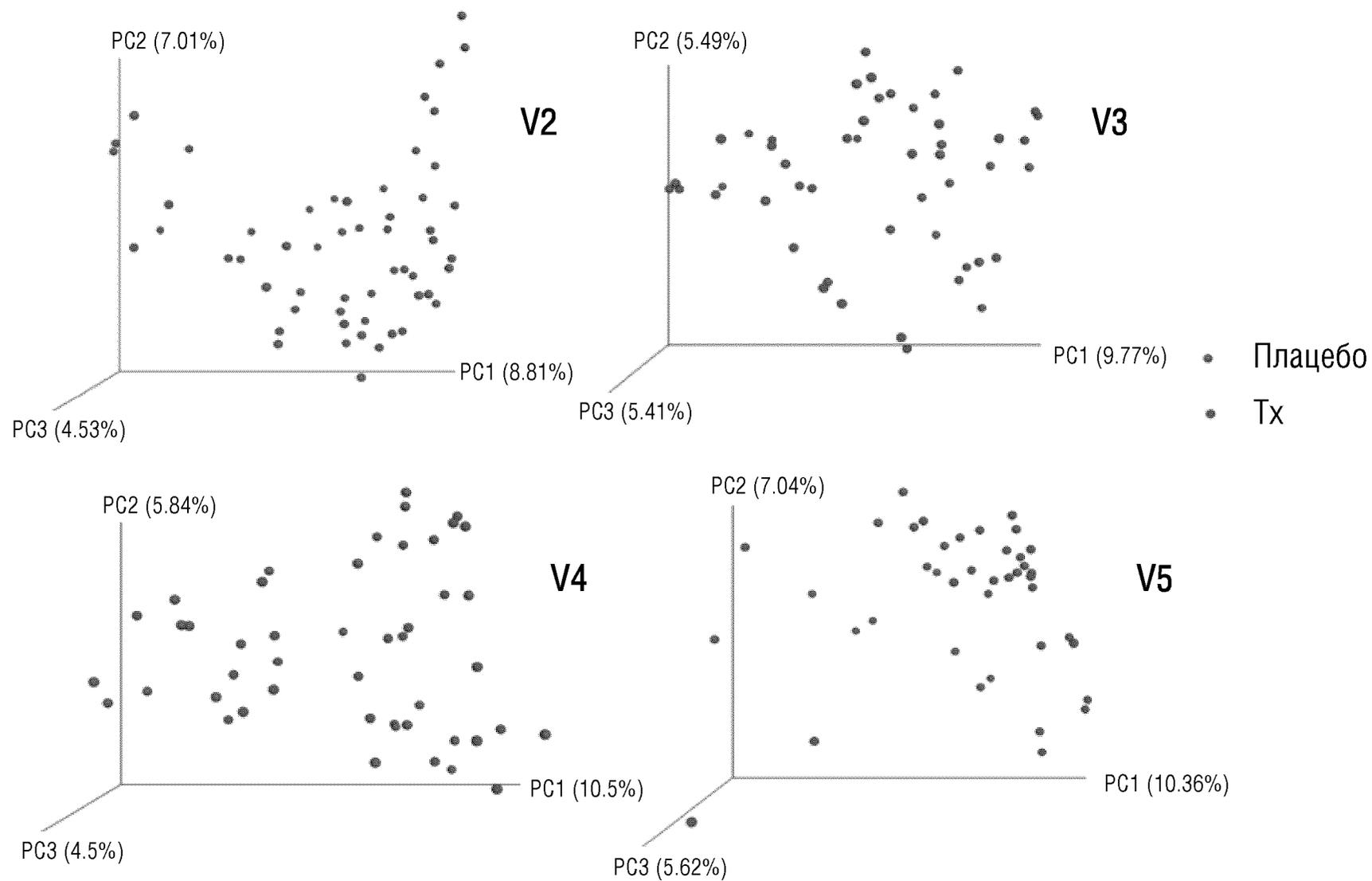
ФИГ.7



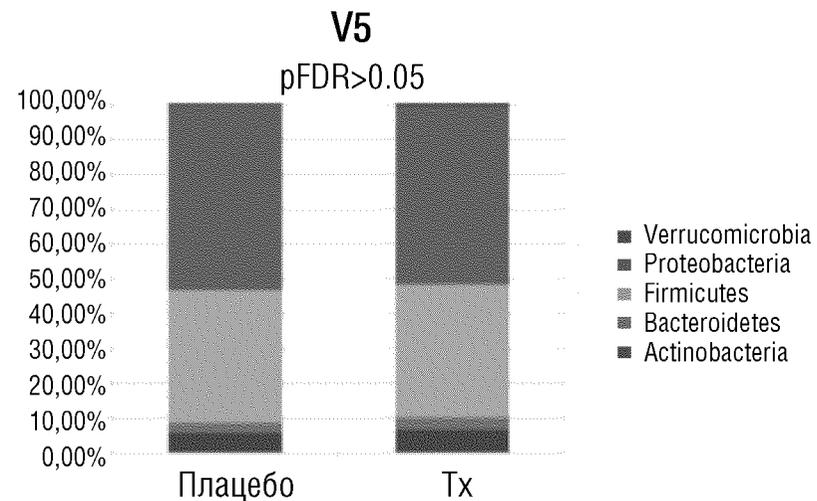
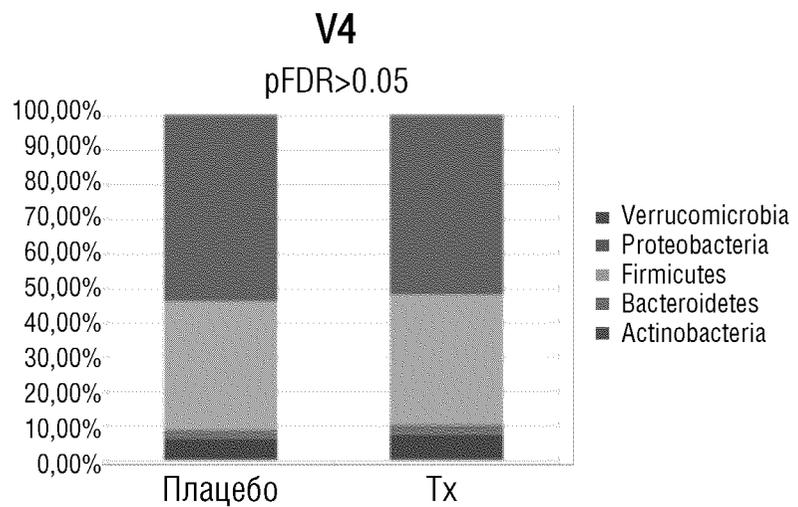
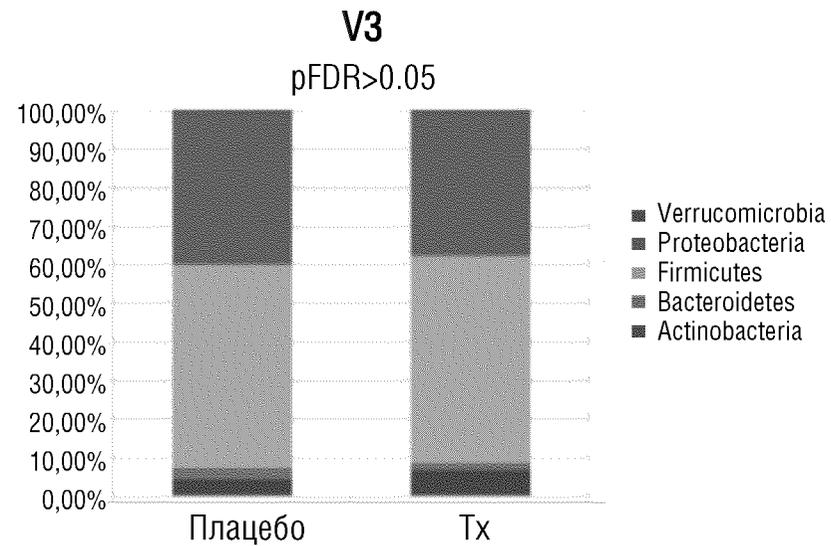
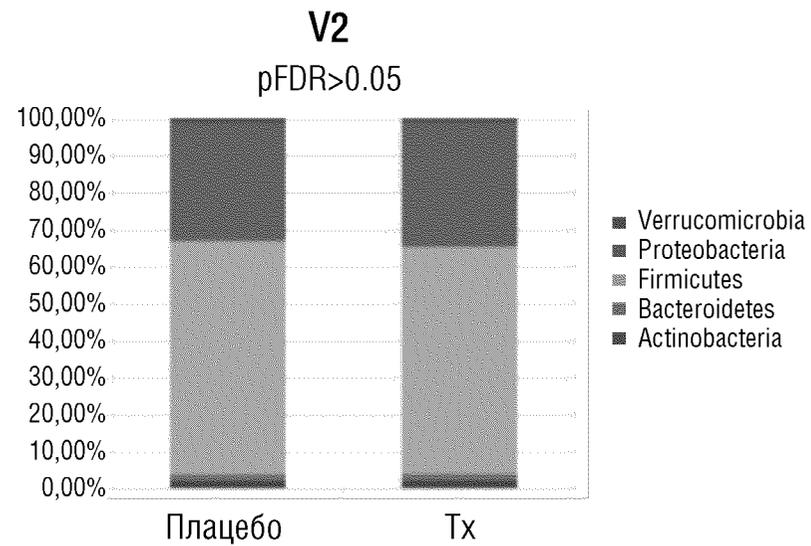
ФИГ.8А



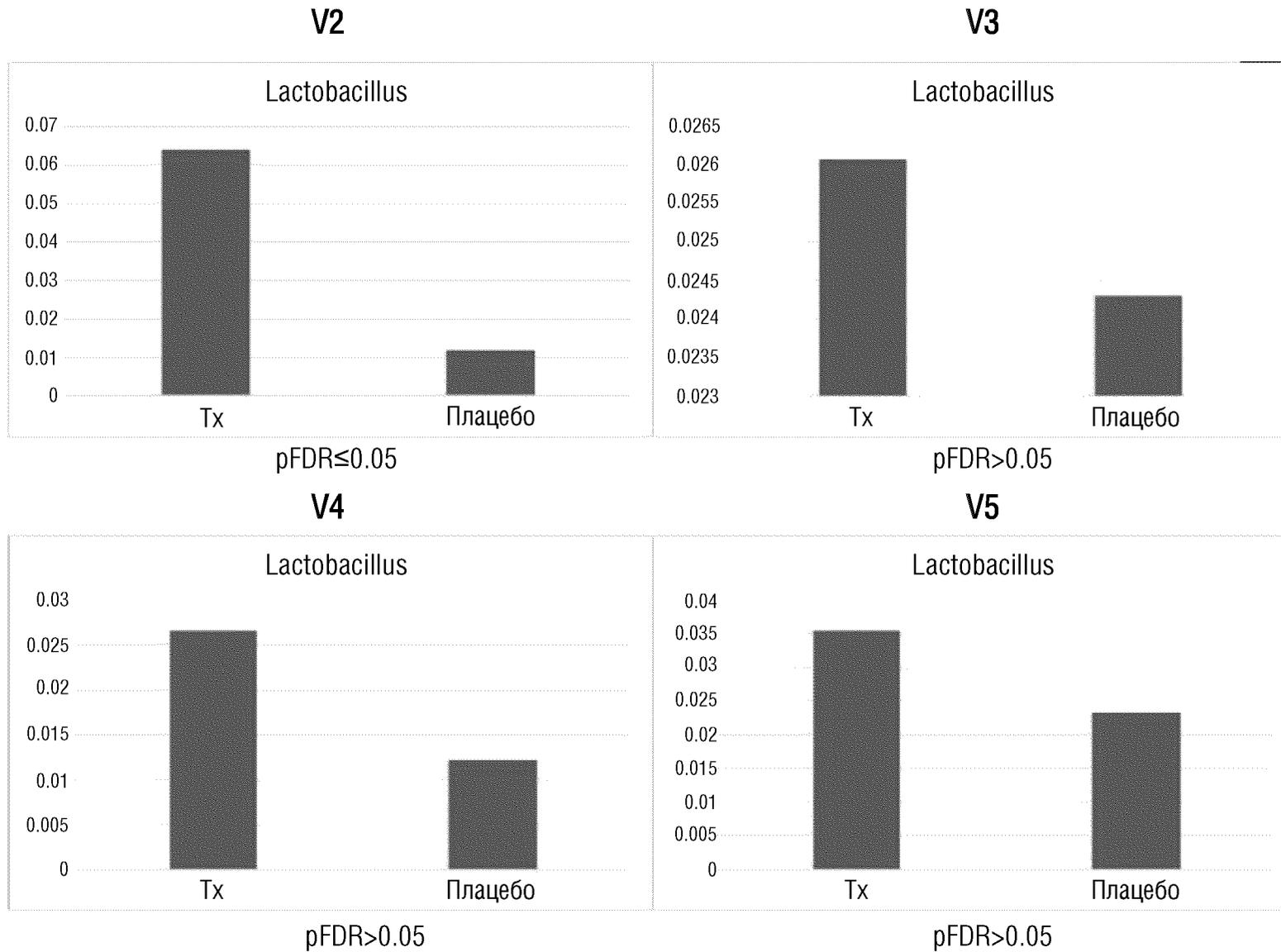
ФИГ.8В



ФИГ.8С

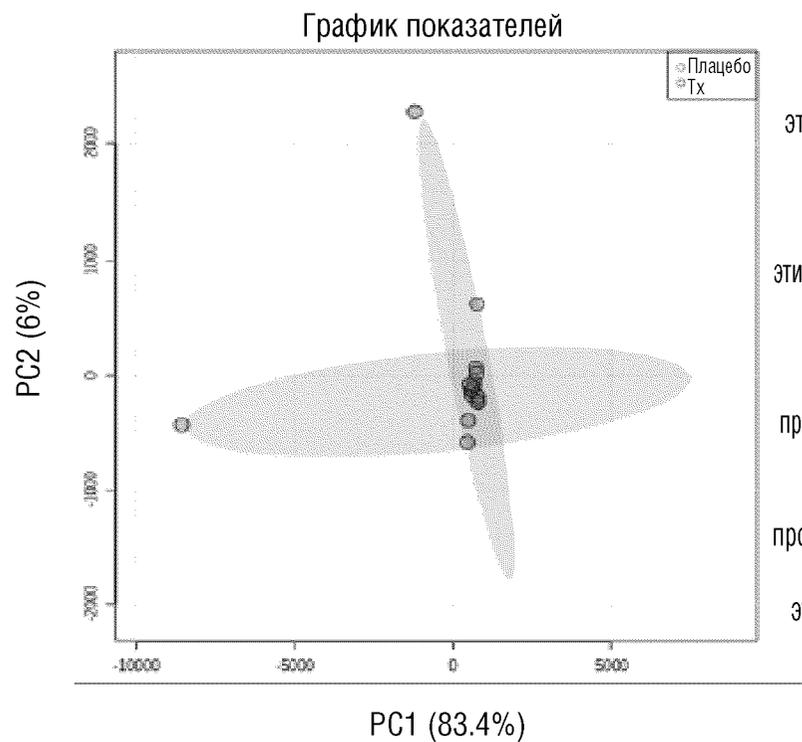


ФИГ.8D



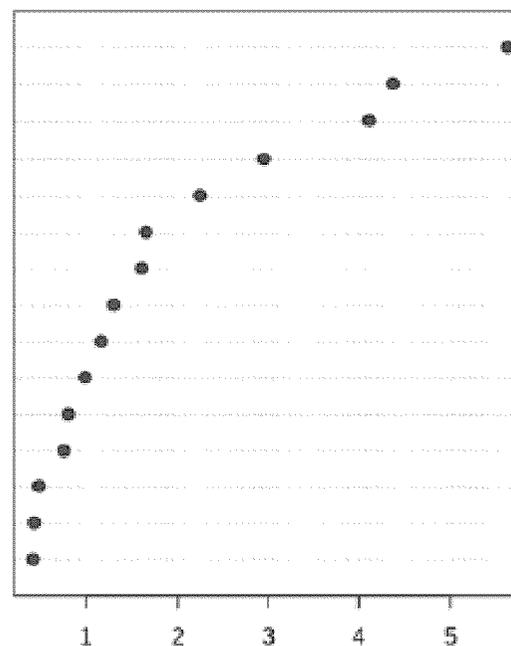
ФИГ.9А

V1-A



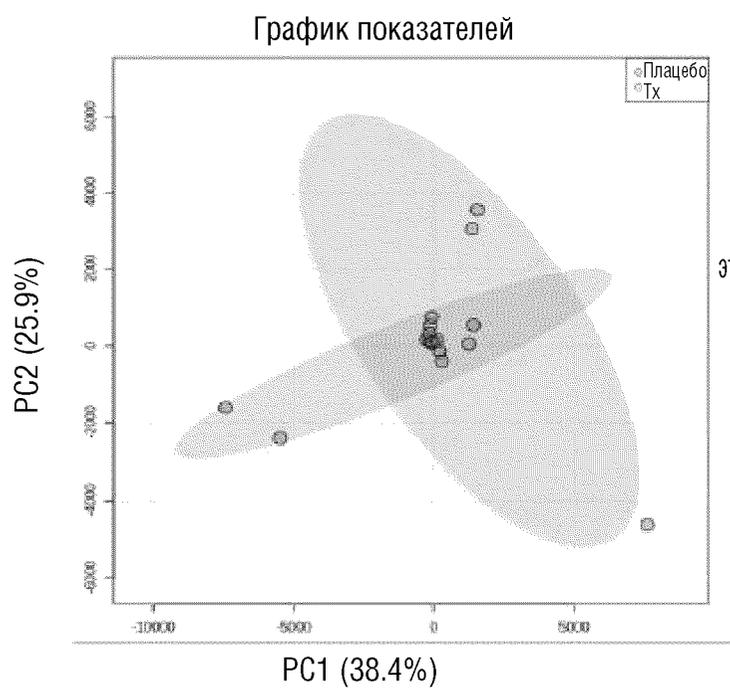
V1-B

- бензиловый спирт
- этиловый эфир пропановой к-ты
- п-крезол
- бутановая кислота
- индол
- этиловый эфир 3-метилбутановой к-ты
- 2-этил-1-гексанол
- пентановая кислота
- 4-метилпентановая кислота
- пропиловый эфир пропановой к-ты
- метилизобутилкетон
- пропановая кислота
- пропиловый эфир бутановой к-ты
- н-пропилацетат
- этиловый эфир гексановой к-ты

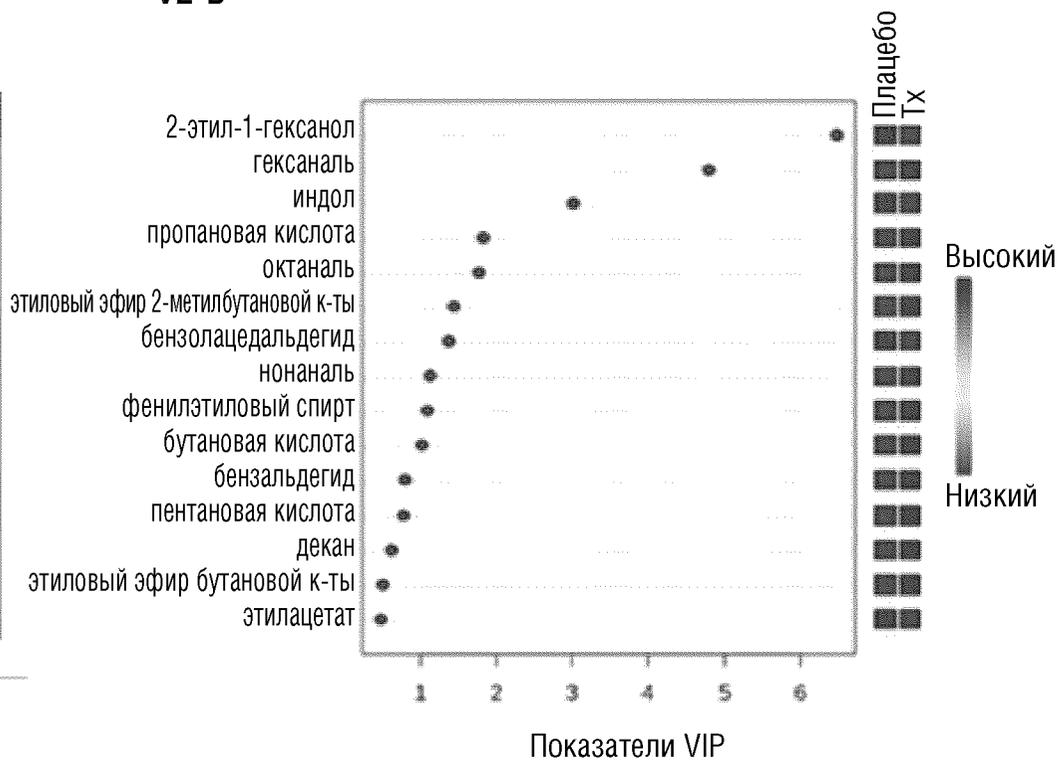


ФИГ.9В

V2-A



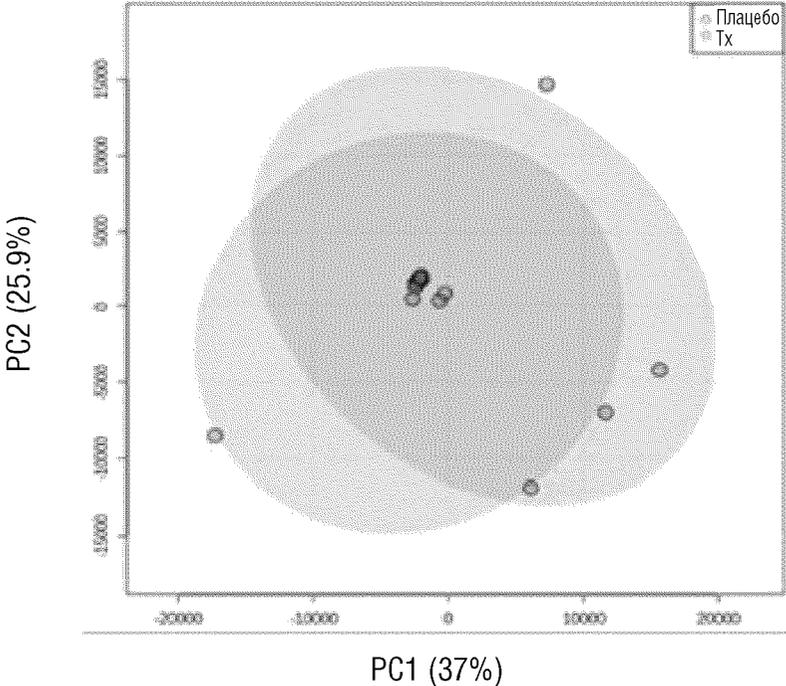
V2-B



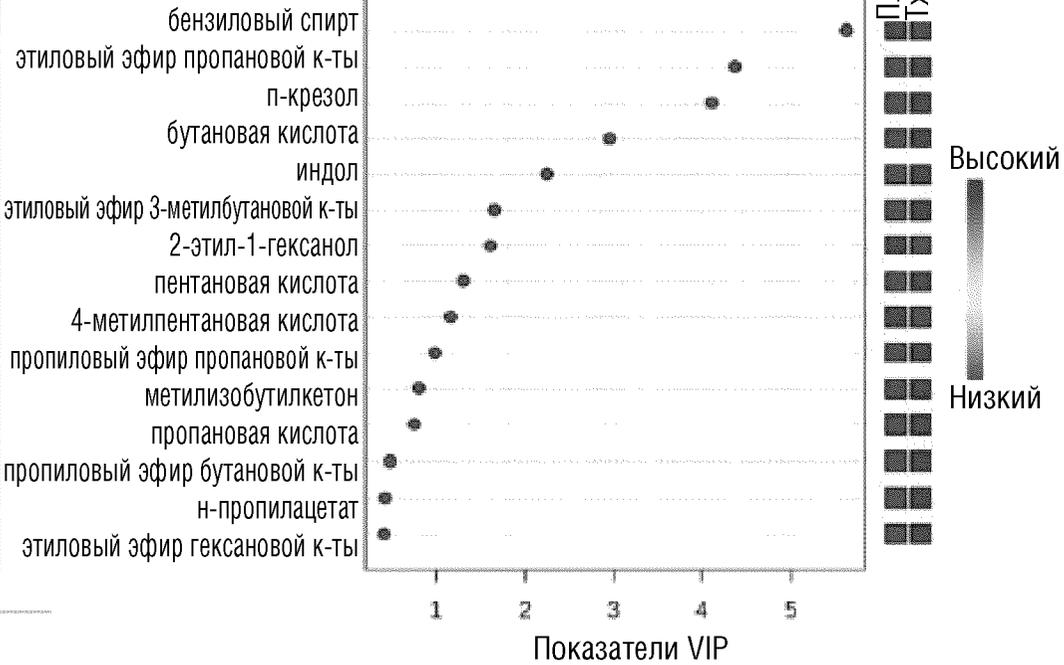
ФИГ.9С

V3-A

График показателей

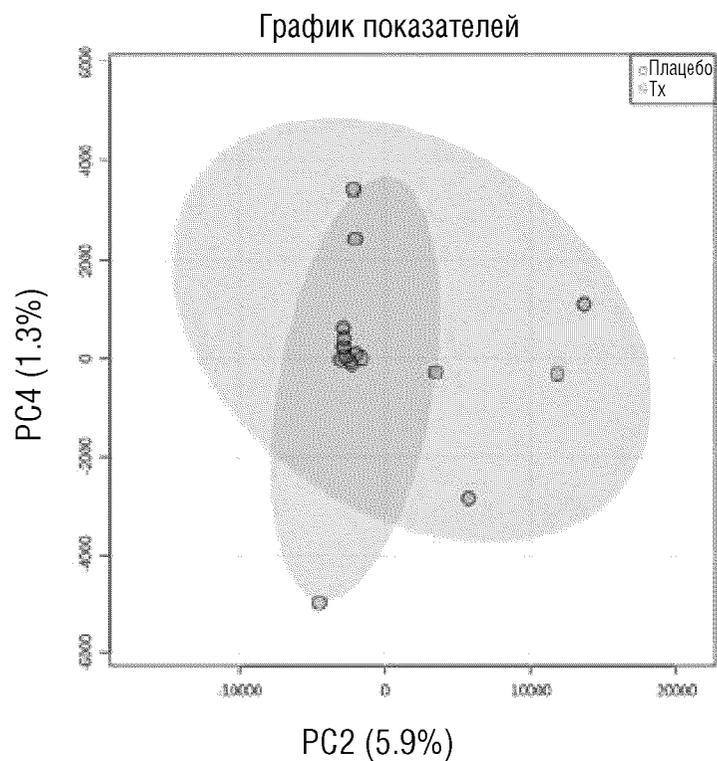


V3-B

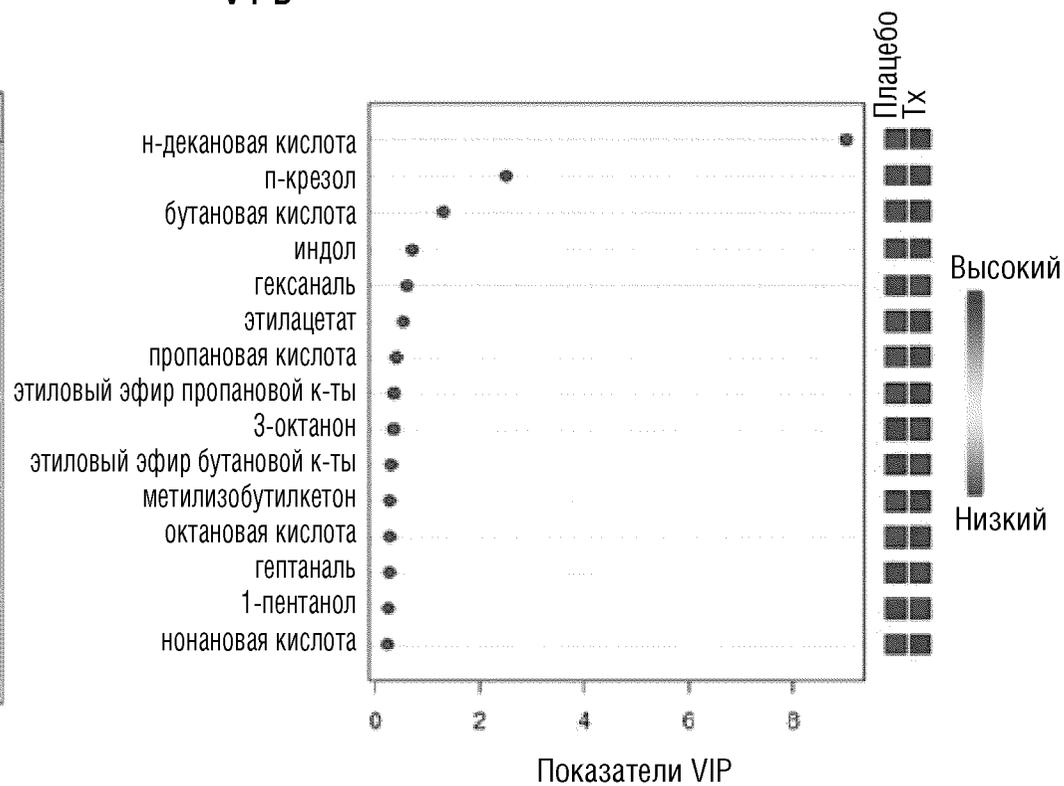


ФИГ.9D

V4-A



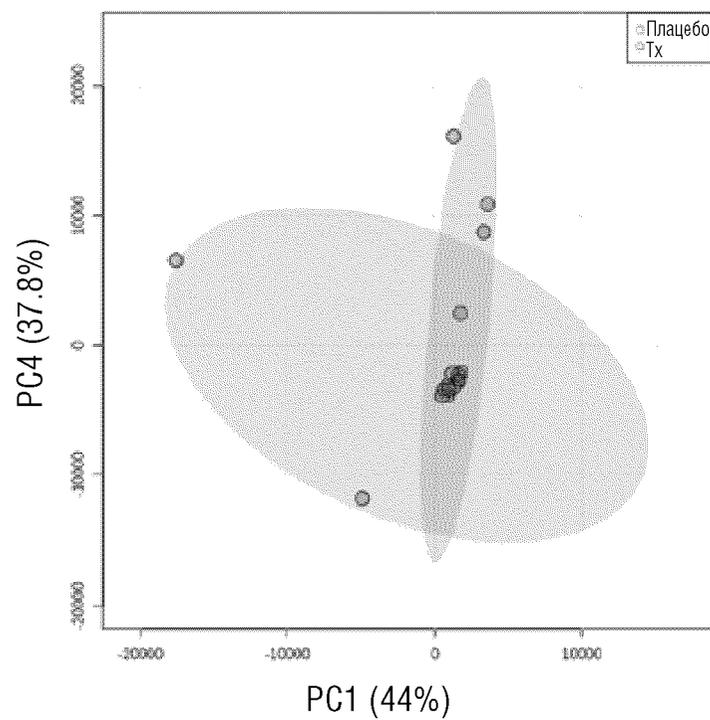
V4-B



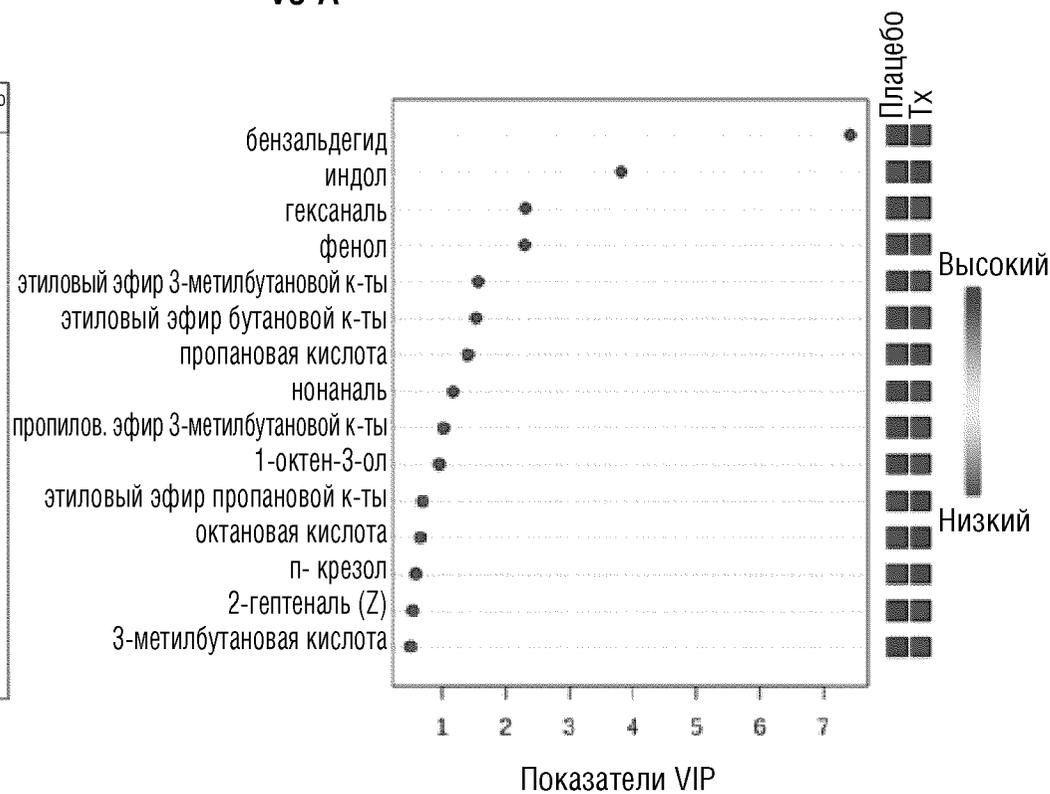
ФИГ.9Е

V5-A

График показателей

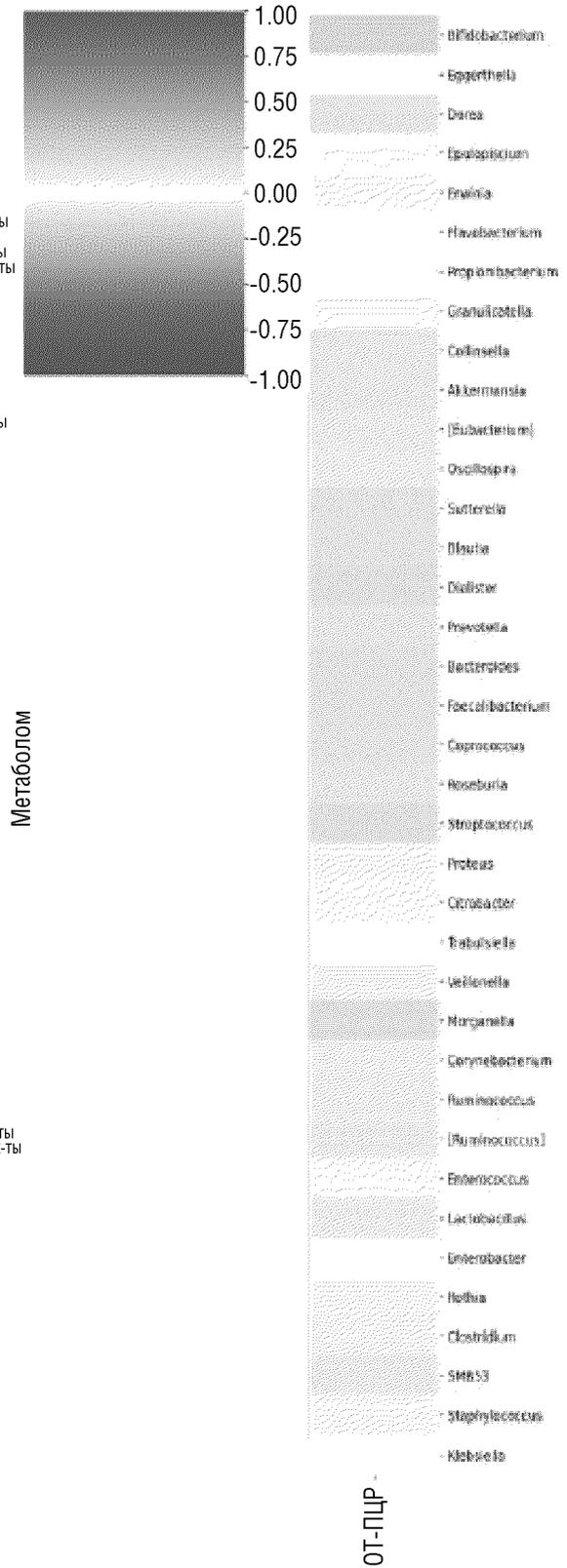
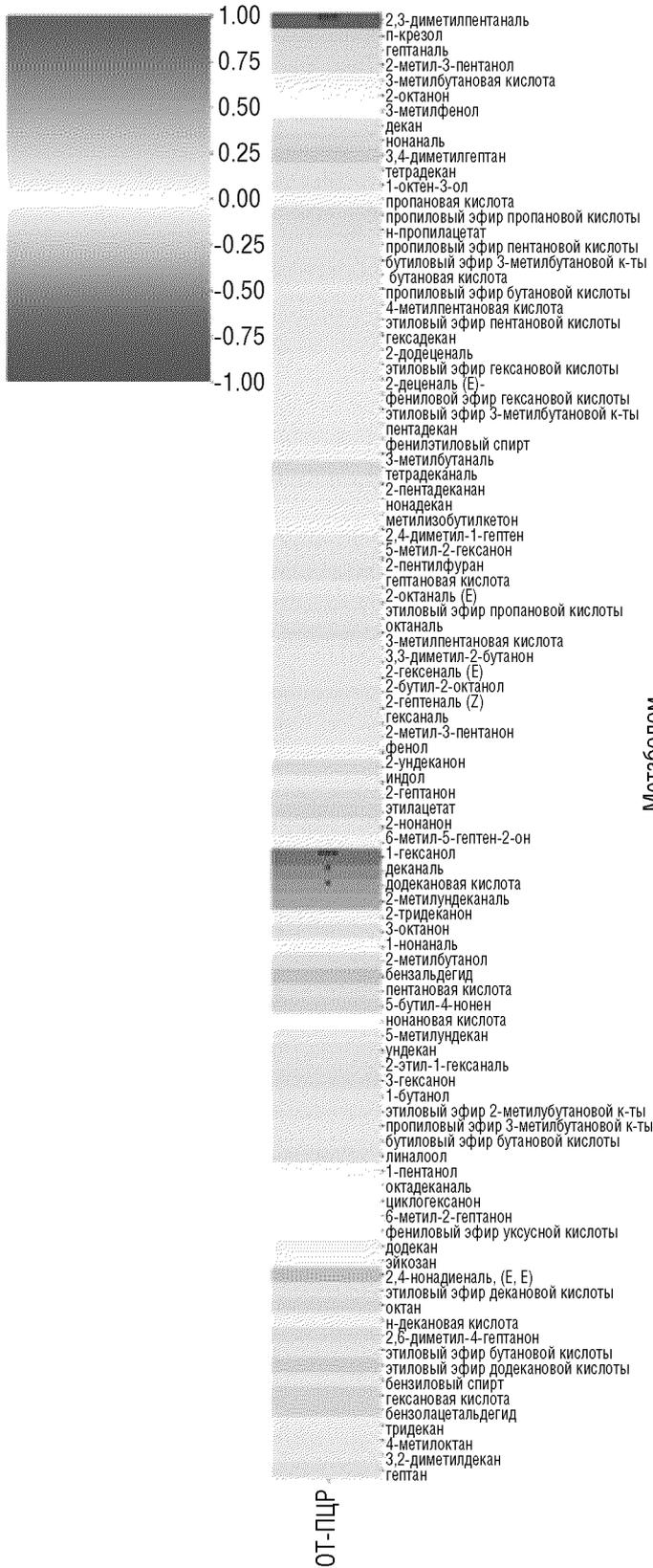


V5-A



ФИГ.10А

ФИГ.10В



ФИГ.10С

