

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393459 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.18

(22) Дата подачи заявки  
2022.07.13

(51) Int. Cl. *A61K 35/745* (2015.01)  
*A61K 31/702* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)

---

(54) ПРОБИОТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВЫШЕННОЙ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

---

(31) 21382631.6

(32) 2021.07.13

(33) EP

(86) PCT/EP2022/069692

(87) WO 2023/285573 2023.01.19

(71) Заявитель:

АБ-БИОТИКС, С.А. (ES)

(72) Изобретатель:

Перес Гарсия Марта, Эспадалер Масо  
Жорди (ES)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

---

(57) Предложена пробиотическая композиция, содержащая *Bifidobacterium longum subsp. longum* СЕСТ 7894. Указанная пробиотическая композиция пригодна для лечения, предотвращения или облегчения дисфункции кишечного барьера (например, повышенной кишечной проницаемости) или ассоциированного с ней состояния, или их симптомов, осложнений и/или последствий у нуждающегося в этом субъекта за счет продукции полифосфата. Также предложена комбинация указанной пробиотической композиции с по меньшей мере одним олигосахаридом человеческого молока.

A1

202393459

202393459

A1

## ПРОБИОТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОВЫШЕННОЙ КИШЕЧНОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее изобретение относится к областям медицины и микробиологии и, в частности, к пробиотической композиции для улучшения здоровья человека и животных, в частности, применимой в лечении дисфункции кишечного барьера или ассоциированного с ней состояния.

### 10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Бифидобактерии являются элементами микробиоты кишечника человека, которая играет важную роль в здоровье человека. У младенцев в микробиоте кишечника преобладают бифидобактерии, тогда как во взрослом возрасте уровни их содержания ниже. Присутствие различных видов бифидобактерий меняется с возрастом, с детства до старости. Бифидобактерии играют ключевые роли, оказывая благотворное влияние на нормальное развитие микробиоты кишечника и ее барьерное действие, всасывание поступающих с пищей соединений и созревание иммунной системы в критический период первых этапов жизни.

20 Снижение количества бифидобактерий ассоциировано с более высоким риском долгосрочных нарушений, таких как аллергия, ожирение или воспалительное заболевание кишечника, и может быть вызвано такими факторами, как кесарево сечение, преждевременные роды, искусственное вскармливание или пре- и постнатальное лечение антибиотиками. В связи с этим проводится изучение штаммов бифидобактерий для их применения в качестве пробиотиков в профилактике и лечении заболеваний.

25 В WO2015018883A2 описана пробиотическая композиция, содержащая *Pediococcus pentosaceus* СЕСТ 8330 и необязательно содержащая *Bifidobacterium longum* СЕСТ 7894, пригодная для применения для облегчения чрезмерного плача у младенцев. В клиническом исследовании по изучению композиции из обеих пробиотических бактерий было показано, что потребление пробиотиков вызывало более выраженное сокращение среднего ежедневного времени плача и продолжительности каждого эпизода. Также описано, что «на основании соответствующих свойств бактериальной композиции, описанной выше, можно сделать вывод, что введение бактериальной композиции также полезно для лечения других состояний, характеризующихся желудочно-кишечными расстройствами, связанными с воспалением, возникающим вследствие незрелости иммунной системы; для лечения кишечной гиперчувствительности и для уравнивания избытка нежелательных бактерий в кишечнике». Что касается свойств каждого пробиотического штамма, включенного в композицию, в WO2015018883A2 описано, что *P. pentosaceus* СЕСТ 8330 продемонстрировал более высокую способность индуцировать IL-10 и, следовательно, потенциально может облегчать воспаление в кишечном

тракте, тогда как *B. longum* СЕСТ 7894 продемонстрировал более высокую способность ингибировать рост нежелательных бактерий, обычно присутствующих в больших количествах у младенцев с чрезмерным плачем.

5 В JP2006176450A описана пробиотическая композиция, содержащая молочнокислые бактерии, такие как *Bifidobacterium adolescentis* JCM 1251 или *Bifidobacterium breve* JCM 1273, способные накапливать полифосфорную кислоту за счет поглощения фосфора. Эта композиция потенциально может подавлять чрезмерное всасывание фосфора в тонком кишечнике и, следовательно, иметь положительный эффект в предотвращении различных заболеваний, включая мочекаменную болезнь.

Некоторые штаммы молочнокислых бактерий и бифидобактерий продемонстрировали способность продуцировать полифосфат (polyP), который, как было обнаружено, обладает постбиотическим эффектом из-за его роли в усилении функции кишечного барьера и поддержании  
15 кишечного гомеостаза организма-хозяина. Взаимодействие организма-хозяина и пробиотика обеспечивается посредством эпителиального эндоцитоза polyP, происходящего из пробиотиков. В клетке кишечника polyP индуцирует цитопротекторные факторы, такие как белок теплового шока HSP27, через путь интегрина  $\beta 1$ -p38 MAPK.

20 Предположение о способности бифидобактерий образовывать polyP было высказано Qian *et al.* (2011). Авторы указывают, что бифидобактериальные штаммы *B. adolescentis* ATCC 15703 (JCM 1275), *B. longum* ATCC 15707, *B. longum* ATCC 55816, *Bifidobacterium* sp. BAA-718 и *B. scardovii* BAA-773 продуцируют поддающиеся наблюдению гранулы, которые могут соответствовать гранулам polyP, однако это не было подтверждено. Дальнейшие количественная  
25 оценка или определение характеристик гранул не проводились. Эти гранулы также могут соответствовать гранулам, содержащим, например, металлы, или белковым гранулам. Кроме того, проводится изучение экспрессии гена *ppk*, который кодирует фермент биосинтеза polyP — PPK, в непублическом штамме *B. scardovii* BAA-773 в ответ на окислительный стресс.

30 Также в другом исследовании способность *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Lactococcus* и *Streptococcus* образовывать polyP оценивается с помощью непрямого анализа, при котором измеряют количество фосфата, оставшегося в среде после периода культивирования (Anand *et al.* 2019). *B. adolescentis* JCM 1275 демонстрирует самую высокую способность накапливать  
35 фосфор, однако в этом эксперименте количественное определение polyP не выполняется.

Кроме того, Saiki *et al.*, 2016, проводят не прямое количественное определение продукции polyP молочнокислыми бактериями и бифидобактериями путем прямого количественного определения АТФ после добавления полифосфаткиназы (PPK). PPK представляет собой  
40 фермент, который катализирует обратимую реакцию, в которой образуются polyP и АДФ из

АТФ и фосфата. Результаты демонстрируют широкий спектр способностей к продукции polyP между видами и штаммами. *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1163 демонстрирует самую высокую концентрацию polyP.

5 Эти исследования представляют собой первые шаги к применению пробиотических бактерий, которые способны продуцировать polyP. Тем не менее, пробиотические свойства зависят от штамма, даже среди бактерий одного и того же вида. Поэтому важно найти те штаммы, которые способны продуцировать значительное количество polyP, чтобы оказывать благоприятное воздействие на организм-хозяин. Кроме того, они должны обладать хорошими характеристиками в соответствии со всеми требованиями к пробиотикам, такими как устойчивость к 10 условиям в желудочно-кишечном тракте, адекватная пролиферация, а также должны быть пригодны для крупномасштабного производства.

В реферате Xiao *et al.*, принятом 30 мая 2022 г., сделан вывод о том, что *B. longum* СЕСТ 7894 15 улучшает эффективность инфликсимаба при колите, индуцированном декстрансульфатом натрия (DSS), у мышей путем регулирования микробиоты кишечника и метаболизма желчных кислот.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Задача, решаемая настоящим изобретением, заключается в обеспечении новых композиций, способных оказывать положительное влияние на дисфункции кишечного барьера нуждающегося в этом у субъекта.

25 Авторы изобретения обнаружили новую пробиотическую композицию, которая обладает способностью продуцировать большие количества полифосфата (polyP), который оказывает положительное влияние на кишечный барьер. Пробиотическая композиция содержит штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, который происходит из кишечника человека и адаптирован к условиям, существующим в кишечнике человека. В частности, штамм *Bifidobacterium* согласно настоящему изобретению представляет собой штамм *Bifidobacterium longum* subsp. 30 *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ) под номером доступа СЕСТ 7894 (также упоминаемый в настоящем описании как КАВР-042). Примечательно, что помимо способности продуцировать большие количества polyP, штамм согласно настоящему изобретению также способен расти при продуцировании polyP. Кроме того, поскольку он принадлежит к *B. longum* subsp. *longum*, который 35 присутствует в микробиоте человека на всех этапах жизни, он может оказывать положительное влияние на людей любого возраста — от новорожденных младенцев до пожилых. Кроме того, авторы настоящего изобретения доказали, что указанный штамм хорошо адаптирован к условиям, существующим в желудочно-кишечном тракте младенцев и взрослых, например,

обладает устойчивостью к стрессовым воздействиям условий в желудке и солей желчных кислот, хорошей адгезией к кишечному эпителию, способен использовать сложные сахара из человеческого молока, а также имеет хорошую стабильность, демонстрируя всего 3-кратное снижение численности в течение 12 месяцев, чем неожиданно отличается от других бифидобактерий, известных в данной области .

В рабочих примерах в настоящей заявке представлены подробные экспериментальные данные, демонстрирующие способность пробиотической композиции согласно настоящему изобретению продуцировать значительные количества polyP без ущерба для ее скорости пролиферации. Постоянная пролиферация этого штамма позволяет продуцировать повышенные уровни polyP, который является постбиотической молекулой с защитным влиянием на кишечный барьер. Кроме того, как понятно специалисту в данной области в настоящем контексте, естественной средой обитания этого штамма *Bifidobacterium* является кишечник человека. Таким образом, этот штамм демонстрирует явный потенциал для продукции polyP при пролиферации в этих оптимальных условиях окружающей среды.

В ПРИМЕРЕ 1 показано, что *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 обладает самой высокой способностью продуцировать polyP по сравнению с несколькими протестированными штаммами (например, *B. animalis* BB-12, *B. adolescentis* JCM 1275, *L. plantarum* WCFS1 и *B. scardovii* BAA-773). Кроме того, *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 демонстрирует высокий потенциал пролиферации при продуцировании polyP, что имеет решающее значение для колонизации им кишечника и может обеспечить пролиферацию штаммов на ранних этапах жизни. Таким образом, раннее введение этого полезного для здоровья штамма младенцам может быть полезным для кишечника и позволит сохранять его положительный эффект на последующих этапах жизни.

С точки зрения долгосрочной перспективы, тот факт, что скорость пролиферации штамма согласно настоящему изобретению не снижается из-за высокой продукции polyP, является преимуществом для последующего получения больших количеств polyP в кишечнике человека. На ФИГ. 2 и в ТАБЛИЦЕ 2 показана выдающаяся способность *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 биосинтезировать большие количества polyP при пролиферации во всех временных точках, рассматриваемых в этом исследовании. Аналогично, *B. longum* subsp. *longum* 36524™, *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707 и *B. animalis* BB-12 также продуцируют большие количества polyP и обладают высокими скоростями пролиферации. Однако указанные два штамма *B. longum* не способны поддерживать высокую продукцию polyP через 16 часов, а *B. animalis* BB-12 способен продуцировать обнаруживаемые количества polyP только через 16 ч.

Кроме того, в то время как *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 является штаммом бифидобактерий, обитающих в организме человека (HRB), *B. animalis* BB-12 классифицируется как

штамм, не относящийся к HRB. HRB-штаммы характеризуются тем, что их часто выделяют из фекалий и полости рта здоровых людей, они оказывают лучшее оздоровительное действие и, следовательно, служат лучшим кандидатом в пробиотики для применения у человека, поскольку их метаболизм адаптирован к желудочно-кишечному тракту человека. Напротив, *B. animalis* BB-12 не может в достаточной степени адаптироваться к кишечнику человека и колонизировать его, противостоять условиям в кишечнике человека и поддерживать свою способность к пролиферации при продуцировании больших количеств polyP.

*B. breve* JCM 1273 демонстрирует близкую скорость пролиферации через 6 ч и более высокую скорость пролиферации через 16 ч по сравнению с *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894. Тем не менее, его способность продуцировать polyP значительно ниже в обеих временных точках.

*B. adolescentis* JCM 1275 также способен продуцировать некоторые количества polyP, однако он не обладает способностью одновременно пролиферировать. Следовательно, общая продукция может быть недостаточной, поскольку целью является достижение устойчивого присутствия штамма, т. е. устойчивой продукции polyP. Хотя этот штамм считается типом HRB взрослых, поскольку он встречается в больших количествах у взрослых и пожилых людей, отмечается, что он изредка присутствует у младенцев.

Примечательно, что геномный анализ и эксперименты *in vitro* в ПРИМЕРЕ 3 показали, что *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 может в достаточной степени адаптироваться к желудочно-кишечному тракту младенцев и взрослых. Кроме того, подвид *B. longum* subsp. *longum* является долгосрочным колонизатором, распространенность и численность которого у младенцев выше, чем у других штаммов и видов, таким образом, штамм согласно настоящему изобретению обладает высоким потенциалом колонизации кишечника детей. Кроме того, *B. longum* subsp. *longum* также распространен в кишечнике взрослых и пожилых людей, что оказывает благоприятное воздействие на организм-хозяин.

Кроме того, хотя известно, что *B. scardovii* содержит активный ген *ppk* и обладает исключительной способностью к росту (как показано в ПРИМЕРЕ 1 со штаммом *B. scardovii* BAA-773), его способность продуцировать polyP была минимальной. Далее, известно, что *B. scardovii* является патогенным штаммом, и, таким образом, он не подходит для пробиотической композиции.

Наконец, известно, что *L. plantarum* WCFS1 защищает кишечный барьер посредством продукции polyP, однако *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 продуцирует гораздо большие количества polyP. Кроме того, *L. plantarum* не является доминантной группой в кишечнике младенцев.

В целом, штамм согласно настоящему изобретению будет способен продуцировать наибольшее количество polyP при введении субъекту той же начальной дозы пробиотической композиции. Например, при сравнении таблеток, содержащих одно и тот же количество КОЕ различных исследуемых штаммов, штамм согласно настоящему изобретению обладает наибольшим потенциалом для продукции самого большого количества polyP.

Кроме того, для *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 в фармацевтической композиции продемонстрировано, что количество жизнеспособных бактерий стабильно с течением времени, как показано в ПРИМЕРЕ 2 и на ФИГ. 4. Эти результаты указывают на то, что трехкратного превышения дозы при изготовлении было бы достаточно для обеспечения  $10^9$  КОЕ жизнеспособных бактерий через двенадцать месяцев, что делает возможным крупномасштабное получение и долговременное хранение пробиотической композиции.

Такая долговременная стабильность пробиотического штамма *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 является неожиданной, поскольку из предшествующего уровня техники хорошо известно, что многие пробиотические штаммы бифидобактерий имеют низкую толерантность к кислороду и, соответственно, не демонстрируют достаточной стабильности. Хотя некоторые штаммы бифидобактерий, такие как *B. psychroaerophilum*, *B. indicum* и *B. asteroides*, имеют более высокую стабильность, они не являются HRB-штаммами, подходящими для пробиотических композиций. Напротив, *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 не только является HRB, но также демонстрирует высокую стабильность и, следовательно, устойчивость к кислороду. Таким образом, указанный штамм будет пригоден для получения пробиотической композиции, которая может потребовать долговременного хранения.

Кроме того, было доказано, что действие polyP, продуцируемого *B. longum* СЕСТ 7894, оказывает положительное влияние на целостность барьера, кишечную проницаемость и гомеостаз кишечного барьера, как показано в ПРИМЕРЕ 4. Дополнительно также было подтверждено, что такое влияние связано с продукцией белка теплового шока (HSP27) и индукцией других маркеров целостности барьера, включая белки плотных контактов; все они индуцировались в присутствии polyP, полученного из *B. longum* СЕСТ 7894.

Кроме того, в ПРИМЕРЕ 5 авторами изобретения подтверждена способность *B. longum* СЕСТ 7894 продуцировать polyP в присутствии грудного молока, что указывает на благоприятное действие *B. longum* СЕСТ 7894 у младенцев на грудном вскармливании. Грудное молоко содержит углеводы ОЧМ (олигосахариды грудного молока). Как подтверждено в ПРИМЕРЕ 3, *B. longum* СЕСТ 7894 использует ОЧМ лакто-N-тетрозу (LNT). Кроме того, было подтверждено, что LNT положительно влияет на биосинтез polyP в штамме *B. longum* СЕСТ 7894. Примечательно, что в ПРИМЕРЕ 6 показано, что *B. longum* СЕСТ 7894 способен расти в присутствии супернатанта других бифидобактерий, способных использовать ОЧМ 2'-фукозиллактозу (2'-FL). В целом, эти результаты демонстрируют, что *B. longum* СЕСТ 7894 способен

расти в присутствии двух наиболее распространенных в грудном молоке ОЧМ (LNT и 2'-FL), увеличивая продукцию polyP, и тем самым подчеркивают благоприятную роль добавок с *B. longum* CECT 7894, например, у младенцев.

- 5 В целом, достоверно продемонстрировано, что *B. longum* CECT 7894 продуцирует polyP в больших количествах во время роста, что оказывает положительное влияние на кишечную проницаемость. Кроме того, было также показано, что добавление ОЧМ положительно влияет на биосинтез polyP в *B. longum* CECT 7894.
- 10 В абстракте Xiao *et al.*, принятом 30 мая 2022 года, сделан вывод о том, что *B. longum* CECT 7894 улучшает эффективность инфликсимаба при колите, индуцированном декстран-сульфатом натрия (DSS), путем регулирования микробиоты кишечника и метаболизма желчных кислот. Используемая экспериментальная модель представляет собой индуцированный DSS острый колит у мышей. Язвенный колит считается воспалительным заболеванием
- 15 кишечника, характеризующимся выраженным воспалением кишечника и изменениями в нормальной бактериальной флоре кишечника. Способы лечения, описанные в указанном абстракте, представляют собой инфликсимаб (моноклональное антитело с иммуносупрессорным действием, применяемое для лечения воспалительных состояний, таких как колит) и инфликсимаб + *B. longum* CECT 7894. Группа животных, получавших только *B. longum*
- 20 CECT 7894, отсутствовала. Инфликсимаб очень эффективен при лечении колита как у людей, так и в животных моделях, но его применение было связано с повышенным риском инфекции в нескольких клинических исследованиях (Shah *et al.* 2017).

Авторы описывают, что добавление *B. longum* CECT 7894 к инфликсимабу изменяет микро-

25 биоту и метаболизм желчных кислот. Авторы признают, что этот эффект может объясняться изменениями, связанными с желчными кислотами. *B. longum* CECT 7894 увеличивал относительное содержание бактерий родов *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Butyricoccus*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Gemmiger* и *Parabacterioides* и снижал относительное содержание бактерий родов *Enterococcus* и *Pseudomonas*. Учитывая, что *Enterococci* и особенно *Pseudomonas* могут

30 быть патогенными, и что применение инфликсимаба, как известно, уменьшает воспаление, но увеличивает риск инфекции, сам факт добавления *B. longum* CECT 7894 мог компенсировать недостатки терапии инфликсимабом и, таким образом, способствовать более быстрому лечению кишечника за счет снижения уровней патогенных бактерий, уже находящихся в кишечнике. Следует отметить, что наблюдаемый эффект зависит от ранее существовавшей

35 кишечной микробиоты и от комбинации с инфликсимабом.

Кроме того, авторы сообщают, что улучшение в модели колита, индуцированного DSS, связано с изменениями, связанными с несколькими желчными кислотами. Однако состав желчных кислот у мышей и людей существенно различается, причем первые содержат значимые

40 количества альфа- и бета-форм мукохолевой кислоты, которые практически отсутствуют у



вторых, что ограничивает возможность экстраполяции этих результатов на людей.

С другой стороны, авторы описывают, что некоторые параметры, например, параметры белков плотных контактов (ZO-1, окклюдин), улучшаются в группе инфликсимаба + *B. longum* СЕСТ 7894, но данные, в достаточной мере подтверждающие этот эффект, отсутствуют. Таким образом, в этом реферате показаны некоторые результаты влияния *B. longum* СЕСТ 7894 на эффективность инфликсимаба в специфической экспериментальной модели индуцированного (DSS) колита у мышей путем регуляции микробиоты кишечника и метаболизма желчных кислот.

10

Невозможно сделать вывод о влиянии только *B. longum* СЕСТ 7894 без лечения инфликсимабом, особенно в эксперименте с плотными контактами, где результаты даже для комбинации с инфликсимабом не являются неопровержимыми. Кроме того, невозможно сделать вывод о влиянии *B. longum* СЕСТ 7894 при заболеваниях, отличных от экспериментальной модели колита, применяемой в этом исследовании, поскольку, как уже обсуждалось, наблюдаемый эффект в комбинации с инфликсимабом зависит от ранее существовавшей кишечной микробиоты.

15

Примечательно, что влияние *B. longum* СЕСТ 7894 на облегчение заболевания (как было сказано ранее, за счет улучшения эффективности инфликсимаба путем регуляции микробиоты и метаболизма желчных кислот) можно считать опосредованным влиянием. Напротив, настоящее изобретение демонстрирует прямое влияние *B. longum* СЕСТ 7894, т. е. защита кишечной проницаемости посредством прямой доставки полифосфатов в эпителий кишечника. Кроме того, влияние не зависит от модели заболевания и окружающей микробиоты.

25

В целом, авторы изобретения обнаружили, что штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 обладает набором всех основных характеристик, желательных для того, чтобы пробиотическая композиция оказывала благоприятное влияние на кишечник человека, особенно человека, страдающего от дисфункции кишечного барьера. К ним относятся устойчивость к условиям желудочно-кишечного тракта (такая как устойчивость к стрессовым воздействиям условий в желудке и солям желчных кислот), долговременная стабильность, принадлежность к виду, присутствующему на всех этапах жизни, и выдающаяся способность продуцировать polyP во время пролиферации. Следовательно, пробиотические составы, содержащие *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 согласно изобретению, подходят для улучшения любого клинического состояния, при котором нарушена кишечная проницаемость.

35

Соответственно, изобретение относится к пробиотической композиции, содержащей штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ) под номером доступа СЕСТ 7894, или

полученный из него бактериальный штамм, для применения в способе лечения, предотвращения или облегчения дисфункции кишечного барьера или ассоциированного с ней состояния, или их симптомов, осложнений и/или последствий у нуждающегося в этом субъекта путем продукции полифосфата, причем полученный бактериальный штамм:

- 5 (a) имеет геном, по меньшей мере на 99% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и  
(b) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат.

- 10 Выражение «штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ) под номером доступа СЕСТ 7894, или полученный из него бактериальный штамм, причем полученный бактериальный штамм: (a) имеет геном, по меньшей мере на 99% идентичный геному соответствующего депонированного штамма; и (b) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат» в дальнейшем сокращенно приводится в виде:  
15 *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм.

- В другом аспекте настоящего изобретения предложена пробиотическая композиция, содержащая *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, для применения  
20 в лечении повышенной кишечной проницаемости и ассоциированных с ней состояний у субъекта, причем лечение повышенной кишечной проницаемости является результатом продуцирования полифосфата, и при этом связанные с ней состояния представляют собой внекишечные состояния.

- 25 Из настоящей заявки понятно, что указанная пробиотическая композиция является пригодна для применения в лечении дисфункции кишечного барьера, в частности, повышенной кишечной проницаемости, и что она также является пригодна для применения в лечении самого ассоциированного состояния, т. е. состояния, ассоциированного с дисфункцией кишечного барьера, в частности, с повышенной кишечной проницаемостью. В альтернативном варианте  
30 это может быть выражено следующим образом: пробиотическая композиция для применения в лечении состояний, описанных в настоящей заявке, путем лечения повышенной кишечной проницаемости за счет продуцирования полифосфатов.

Другой аспект настоящего изобретения относится к комбинации, содержащей:

- 35 (i) *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, и  
(ii) по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока,  
причем указанная комбинация выполнена с возможностью одновременного, отдельного или последовательного введения.

Этот аспект, в качестве альтернативы, может быть сформулирован следующим образом: пробиотическая композиция, содержащая *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, описанные в настоящей заявке, для применения в комбинации с по меньшей мере одним олигосахаридом грудного молока, причем указанная комбинация выполнена с  
5 возможностью одновременного, раздельного или последовательного введения.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к комбинации, предложенной в настоящей заявке, для применения в лечении повышенной кишечной проницаемости и ассоциированных с ней состояний у субъекта, причем лечение повышенной кишечной проницаемости  
10 является результатом продуцирования полифосфата, и при этом ассоциированное состояние выбрано из группы, состоящей из иммунного нарушения или заболевания, нарушения или заболевания обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, неврологического или психиатрического нарушения или заболевания и желудочно-кишечного нарушения или заболевания.

15

В другом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая:

- (i) *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм; и
- (ii) по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока.

20 Пробиотическую композицию, комбинацию и композиции согласно аспектам настоящего изобретения можно применять для различных медицинских приложений/применений, которые подробно описаны в настоящей заявке. Все применения, описанные в настоящей заявке, могут быть альтернативно сформулированы следующим образом: применение любой из композиций, описанных в настоящей заявке, для получения фармацевтической композиции, нутрицевтической композиции, ветеринарной композиции или пищевого продукта/пищевой композиции  
25 для лечения, предотвращения или облегчения дисфункции кишечного барьера или ассоциированного с ней состояния или их симптомов, осложнений и/или последствий, описанных в настоящей заявке. Это также может быть альтернативно сформулировано следующим образом: способы лечения, предотвращения или облегчения дисфункции кишечного барьера или ассоциированного с ней состояния, или симптомов, осложнений и/или последствий, описанных в настоящей заявке, у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение указанному субъекту описанных в настоящей заявке композиций в соответствии с аспектами настоящего изобретения.

35 Термины, используемые в формуле изобретения и аспектах изобретения, следует понимать в данном описании в их широком и общем смысле. Тем не менее, их определения приведены далее в настоящей заявке в подробном описании изобретения. Во всем описании и формуле изобретения не предполагается, что термин «содержать» и его варианты исключают другие технические особенности, добавки, компоненты или этапы. Дополнительные объекты, преимущества и особенности изобретения станут понятны для специалистов в данной области  
40

техники после изучения настоящего описания или могут быть выяснены при осуществлении настоящего изобретения. Более того, в объем настоящего изобретения входят все возможные комбинации конкретных и предпочтительных вариантов реализации, описанных в настоящей заявке. Следующие примеры и графические материалы приведены в настоящей заявке с иллюстративными целями и не подразумевают ограничения настоящего изобретения.

## ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **ФИГ. 1** показаны кривые роста исследованных штаммов. PolyP экстрагировали и количественно определяли через 6 и 16 ч. ОП (OD) означает оптическую плотность (измеренную при 595 нм), а t (ч) означает время в часах.

На **ФИГ. 2** показан биосинтез polyP (нмоль) исследуемыми штаммами через 6 и 16 ч роста.

На **ФИГ. 3** показано филогенетическое древо, построенное по методу ближайших соседей, демонстрирующее связь между белками PPK в исследованных бифидобактериальных штаммах.

На **ФИГ. 4** показана стабильность *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) в готовом продукте с течением времени. Жизнеспособные бактерии (в lg(KOE)) представлены в зависимости от времени, выраженного в месяцах (t (мес)).

На **ФИГ. 5** показан рост *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) в присутствии ОЧМ лакто-N-тетрозы (LNT), глюкозы (Gluc) и в отсутствие источника углерода (C-). ОП (OD) означает оптическую плотность (измеренную при 595 нм), а t (ч) означает время в часах.

На **ФИГ. 6** показаны кажущийся коэффициент проницаемости (Papp) (слева) и трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER) (справа) барьера из клеток Caco-2, подвергнутых воздействию супернатантов *B. longum* CECT 7894 с высоким (sb\_MEI) и низким (sb\_LP) количествами polyP. Клетки подвергали воздействию среды MEM, неферментированной среды MEI и среды LP в качестве контролей.

На **ФИГ. 7** показана относительная экспрессия белка HSP27 в клетках Caco-2, подвергнутых воздействию супернатантов *B. longum* CECT 7894 с высоким (MEI) и низким (LP) количествами polyP. Количество HSP27 нормировали к количеству β-актина (слева). Корреляция (коэффициент Пирсона  $r = 0,87$ ,  $p = 0,01$ ) относительной экспрессии HSP27 и количества polyP, выраженного в нмолях P в супернатантах (справа).

На **ФИГ. 8** показана относительная экспрессия (RE) белков плотных контактов Zonula occludens-1 (ZO1), белка адгезии плотных контактов-1 (JAM1) и окклюдина в клетках Caco-2,

подвергнутых воздействию супернатантов *B. longum* СЕСТ 7894 с высоким (mei) и низким (lp) количествами polyP. Экспрессию нормировали к экспрессии генов 18S рРНК и GADPH.

5 На **ФИГ. 9** показан биосинтез polyP (нмоль) культурами *B. longum* СЕСТ 7894, инкубируемыми в различных условиях в течение 6 и 16 ч: контроль (С), грудное молоко (ВМ), LNT, полиамины (Polya).

10 На **ФИГ. 10** показан рост *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) в присутствии супернатанта *B. bifidum* Bb01, культивируемого с ОЧМ 2'-фукозиллактозой (SN *B. bifidum* 2'-FL), глюкозой (Gluc) и в отсутствие источника углерода (С-). ОП (OD) означает оптическую плотность (измеренную при 595 нм), а t (ч) означает время в часах.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### 15 Определения

Пробиотик: в настоящей заявке этот термин относится к живым, непатогенным микроорганизмам, например, бактериям, которые могут приносить пользу для здоровья организма-хозяина, который содержит соответствующее количество указанного микроорганизма. Согласно некоторым вариантам реализации организм-хозяин представляет собой млекопитающее. Согласно некоторым вариантам реализации организм-хозяин представляет собой человека. Некоторые виды, штаммы и/или подтипы непатогенных бактерий в настоящее время признаны пробиотиками. Пробиотик может представлять собой вариант или мутантный штамм бактерии. Пробиотические бактерии могут быть естественным образом мутированными или модифицированными генно-инженерными методами для сохранения, усиления или улучшения желаемых биологических свойств, например выживаемости, для обеспечения пробиотических свойств или для сохранения, усиления или улучшения пробиотических свойств.

30 Полученный из: термины «полученный из», «производный», «вариант», «мутантный» (например, «мутантный штамм») или любой их грамматический вариант, используемые в настоящей заявке, относятся к компоненту, который выделен из или получен с применением указанной молекулы/субстанции (например, штамма согласно настоящему изобретению). Например, бактериальный штамм, полученный из первого бактериального штамма (например, депонированного штамма), может представлять собой штамм, который идентичен первому штамму или

35 в существенной степени схож с первым штаммом. В случае бактериальных штаммов полученный штамм может быть получен, например, в результате естественного мутагенеза, искусственного направленного мутагенеза, искусственного случайного мутагенеза или других методов генетической инженерии, и он сохраняет, усиливает или улучшает по меньшей мере одну способность депонированного штамма.

40

Вспомогательное вещество/носитель: эти термины используются как взаимозаменяемые и относятся к инертной субстанции, добавленной, например, к фармацевтической композиции, для дополнительного облегчения введения соединения, например, бактериального штамма согласно настоящему изобретению. Примеры включают следующее, но не ограничены ими:

5 бикарбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла, полиэтиленгликоли и поверхностно-активные вещества, включая, например, полисорбат. Термины «физиологически приемлемое вспомогательное вещество/носитель» и «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество/носитель», которые могут использоваться как взаимозаменяемые, относятся к субстанции или раз-

10 бавителю, которые не вызывают значительного раздражения организма и не подавляют биологическую активность и свойства вводимого бактериального соединения. Адъювант включен в эти термины.

Композиция: в настоящей заявке этот термин относится к различным композициям и комбинациям в соответствии с аспектами изобретения. Кроме того, он относится к формам продукта, таким как смесь по меньшей мере одного соединения, полезного в соответствии с настоящим изобретением, со вспомогательным веществом/носителем. Например, термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату бактерий согласно настоящему изобретению с другими компонентами, такими как фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения пациенту или субъекту.

15

20

Идентичность: в настоящей заявке этот термин относится к общей консервативности последовательности мономеров между полимерными молекулами, например, между молекулами ДНК и/или молекулами РНК. Термин «идентичный» без каких-либо дополнительных определяющих слов подразумевает, что последовательности на 100% идентичны (100% идентичность последовательностей). Описание двух последовательностей как, например, «на 70% идентичных» эквивалентно описанию их как имеющих, например, «70% идентичность последовательностей».

25

30

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

35

40

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом числа пропусков и длины каждого пропуска, которая может быть определена с помощью математического алгоритма. Для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей доступно подходящее программное обеспечение. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательностей является *bl2seq*, которая выполняет сравнение двух последовательностей с применением алгоритма BLASTN (применяемого для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот) или BLASTP (применяемого для сравнения аминокислотных последовательностей). Другими подходящими программами являются, например, *Needle*, *Stretcher*, *Water* или *Matcher*, часть набора биоинформационных программ EMBOSS. Выравнивание последовательностей можно проводить с применением способов, известных специалистам в данной области техники, таких как MAFFT, Clustal (ClustalW, Clustal X или Clustal Omega), MUSCLE, MAUVE, MUMMER, RAST и т. д.

В определенных аспектах процент идентичности (%ID) первой последовательности со второй последовательностью рассчитывают как  $\%ID = 100 \times (Y/Z)$ , где Y представляет собой количество аминокислотных остатков или азотистых оснований, оцененных как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (например, выровненных путем визуального осмотра или с помощью конкретной программы выравнивания последовательностей), и Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. При сравнении полных или почти полных геномных последовательностей азотистых оснований %ID иногда называют ANI (средняя нуклеотидная идентичность). Расчет ANI обычно включает фрагментацию геномных последовательностей с последующим поиском, выравниванием нуклеотидных последовательностей и вычислением их идентичности.

Предотвращать: термины «предотвращать», «предотвращение», «профилактика» и их варианты в настоящей заявке относятся, например, к:

- (i) частичной или полной задержке начала заболевания, нарушения и/или состояния, описанных в настоящей заявке;
- (ii) частичной или полной задержке начала одного или более симптомов, признаков или клинических проявлений, осложнений или последствий конкретного заболевания, нарушения и/или состояния, описанных в настоящей заявке;
- (iii) частичной или полной задержке начала одного или более симптомов, признаков или проявлений, осложнений или последствий конкретного заболевания, нарушения и/или состояния, описанных в настоящей заявке;
- (iv) частичной или полной задержке прогрессирования конкретного заболевания, нарушения и/или состояния, описанных в настоящей заявке; и/или
- (v) снижению риска развития патологии, связанной с заболеванием, нарушением и/или состоянием, описанными в настоящей заявке.

Субъект: термины «субъект», «пациент», «индивидуум» и «организм-хозяин» и их варианты используются в настоящей заявке как взаимозаменяемые и относятся к любому субъекту-млекопитающему, в частности, человеку, а также включают, без ограничения, людей, домашних животных (например, собак, кошек и т. п.), сельскохозяйственных животных (например, коров, овец, свиней, лошадей и т. п.) и лабораторных животных (например, обезьян, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т. п.), для которых требуются постановка диагноза, лечение или терапия. Композиции, описанные в настоящей заявке, применимы как для лечения человека, так и для ветеринарных применений.

Младенец: термин «младенец» в настоящем описании следует понимать как очень молодое потомство человека или животного, например, ребенка в возрасте до 1 года. Применительно к людям этот термин считается синонимом термина «ребенок первого года жизни». Термин «ребенок» относится к человеку между стадиями рождения и полового созревания. Термин «маленький ребенок» относится к ребенку в возрасте от одного года до семи лет и термин «ребенок раннего возраста» относится к ребенку в возрасте от одного года до трех лет. Однако в настоящем описании термины «младенец», «ребенок первого года жизни», «маленький ребенок» и «ребенок раннего возраста» считаются синонимами и используются как взаимозаменяемые.

Человек, не являющийся младенцем, или не младенец: эти термины в настоящем документе относятся к человеку старше семи лет. Человек, не являющийся младенцем, может быть подростком, взрослым или пожилым человеком (старше 65 лет). В эту категорию также включены спортсмены и не являющиеся младенцами ослабленные люди.

Субъект, нуждающийся в этом: в настоящей заявке термин «субъект, нуждающийся в этом», включает субъектов, таких как субъекты-млекопитающие, которые получили бы пользу от введения композиций согласно изобретению.

Терапевтически эффективное количество: термины «терапевтически эффективная доза» и «терапевтически эффективное количество» используются для обозначения количества композиции согласно настоящему изобретению, достаточного для получения желаемого терапевтического действия, фармакологического и/или физиологического действия на субъекта, нуждающегося в этом. В частности, термины относятся к количеству соединения, которое приводит к предотвращению, задержке начала симптомов или облегчению симптомов состояния, например, диареи. Терапевтически эффективное количество может, например, быть достаточным для лечения, предотвращения, уменьшения тяжести, задержки начала и/или снижения риска возникновения одного или более симптомов заболевания или состояния, связанного с нарушенной функцией кишечного барьера. Терапевтически эффективное количество, а также терапевтически эффективная частота введения могут быть определены способами,



известными специалистами в данной области техники и обсуждаемыми ниже.

Лечение: термины «лечить», «лечение», «терапия» в настоящем документе относятся, например, к снижению тяжести заболевания или состояния, описанных в настоящей заявке; смягчению/облегчению или устранению одного или более симптомов, осложнений или последствий, ассоциированных с заболеванием, описанным в настоящей заявке (например, дисфункцией кишечного барьера или связанным с ней состоянием); обеспечению благоприятного действия на субъекта с состоянием/заболеванием, описанными в настоящей заявке, без обязательного излечения заболевания или состояния. Термин также включает профилактику или предотвращение заболевания или состояния или их симптомов, осложнений или последствий. Следовательно, выражение «лечение» в настоящем документе включает лечение, предотвращение или облегчение заболевания или его симптомов, осложнений и/или последствий.

Термин относится к клиническому или нутриционному вмешательству для предотвращения заболевания или состояния; излечения заболевания или состояния; задержки начала заболевания или состояния; задержки начала симптома, осложнения или последствия; уменьшения серьезности заболевания или состояния; уменьшения серьезности симптома, осложнения или последствия; улучшения одного или более симптомов; улучшения одного или более осложнений; улучшения одного или более последствий; предотвращения одного или более симптомов; предотвращения одного или более осложнений; предотвращения одного или более последствий; задержки одного или более симптомов; задержки одного или более осложнений; задержки одного или более последствий; смягчения/улучшения одного или более симптомов; смягчения/улучшения одного или более осложнений; смягчения/улучшения одного или более последствий; сокращения продолжительности одного или более симптомов; сокращения продолжительности одного или более осложнений; сокращения продолжительности одного или более последствий; снижения частоты одного или более симптомов; снижения частоты одного или более осложнений; снижения частоты одного или более последствий; снижения тяжести одного или более симптомов; снижения тяжести одного или более осложнений; снижения тяжести одного или более последствий; улучшения качества жизни; увеличения выживаемости; предотвращения рецидива заболевания или состояния; задержки рецидива заболевания или состояния; или любой их комбинации, например, по отношению к тому, что ожидается в отсутствие лечения композицией согласно настоящему изобретению.

Диетотерапия и/или диетическая вторичная профилактика: эти термины относятся к полному или частичному кормлению пациентов, которые из-за заболевания, нарушения или медицинского состояния, от которого они страдают: либо имеют ограниченную, ослабленную или нарушенную способность принимать, переваривать, всасывать, метаболизировать или выводить обычную пищу или определенные питательные вещества, содержащиеся в ней, или метабо-

литы, либо имеют другие определенные с медицинской точки зрения потребности в питательных веществах. В настоящем описании термины «осуществление лечения» или «лечение» включают диетотерапию и/или диетическую вторичную профилактику.

5 Симптом: в настоящей заявке этот термин относится к субъективному или физическому признаку, показанию или свидетельству заболевания или физического нарушения, наблюдаемого у субъекта. В целом, указанный термин относится к любому болезненному явлению или отклонению от нормы в структуре, функции или ощущении, испытываемому пациентом и указывающему на заболевание. Симптомы ощущаются или замечаются индивидуумом, испытывающим симптом, но могут быть малозаметны для других. В некоторых вариантах реализации симптом может представлять собой легкий симптом, умеренный симптом или тяжелый симптом. В настоящем документе термин «легкий симптом» относится к симптому, который не представляет угрозы для жизни и не требует, например, проведения интенсивной терапии. В настоящем документе термин «умеренный симптом» относится к симптому, который требует мониторинга, поскольку он может стать опасным для жизни и может потребовать, например, госпитализации. В настоящем документе термин «тяжелый симптом» относится к симптому, который представляет угрозу для жизни и требует, например, проведения интенсивной терапии.

20 Осложнение: в настоящем документе этот термин относится к патологическому процессу или явлению, имеющему место во время заболевания или состояния, которое не является существенной частью заболевания или состояния; причем оно может быть результатом заболевания/состояния или возникнуть по независимым причинам. Например, лечение медицинских состояний антибиотиками или нестероидными противовоспалительными препаратами может привести к повреждению эпителия в кишечнике в качестве побочного эффекта, что приводит к повышенной проницаемости. Эта повышенная проницаемость может привести к повышенному риску аллергических, воспалительных заболеваний или заболеваний обмена веществ в качестве долгосрочных осложнений. В некоторых аспектах осложнение может быть временным. В некоторых аспектах осложнение может быть хроническим или постоянным. В настоящем документе термин «последствие» относится к долгосрочному, хроническому или постоянному осложнению.

35 Кишечный барьер: в настоящей заявке этот термин относится к функциональному объекту, отделяющему просвет кишечника от внутренней среды организма-хозяина и состоящему из механических элементов (слизи, эпителиального слоя), гуморальных элементов (дефенсинов, IgA), иммунологических элементов (лимфоцитов, клеток врожденного иммунитета), мышечных, неврологических элементов и микробиоты.

40 Кишечная проницаемость: в настоящей заявке этот термин относится к функциональной особенности кишечного барьера в данных участках, измеряемой, среди прочего, путем анализа

скоростей потока через стенку кишечника в целом или через компоненты стенки. Кишечная проницаемость относится к контролю материала, проходящего из желудочно-кишечного тракта через клетки, выстилающие стенку кишечника, в остальную часть организма. Здоровый кишечник проявляет избирательную проницаемость, которая позволяет питательным веществам проходить через кишечник, сохраняя при этом барьерную функцию, чтобы потенциально вредные субстанции (такие как антигены) не покидали кишечник и не распространялись в организме более широко.

Нормальная кишечная проницаемость: В настоящей заявке этот термин относится к стабильной проницаемости, обнаруживаемой у здоровых индивидуумов без признаков интоксикации, воспаления или нарушения функций кишечника.

Дисфункция кишечного барьера: Термины «дисфункция кишечного барьера», «нарушенная кишечная проницаемость», «несбалансированная кишечная проницаемость» и «аномальная кишечная проницаемость» используются как взаимозаменяемые и относятся к нарушенной проницаемости, которая не кратковременно изменяется по сравнению с нормальной проницаемостью, что приводит к утрате кишечного гомеостаза, функциональным нарушениям и заболеванию.

Повышенная кишечная проницаемость: В настоящей заявке термин «повышенная кишечная проницаемость» относится к состоянию, при котором контакты в эпителии стенки кишечника теряют свою целостность, что позволяет материалу из просвета перемещаться в кровоток, другие органы или жировую ткань. Когда плотные контакты стенок кишечника ослабляются, кишечник становится более проницаемым, что позволяет бактериям и токсинам проникать из кишечника в кровоток. Это явление обычно называют, например, «дырявым кишечником».

Повышенная кишечная проницаемость является фактором нескольких заболеваний, таких как болезнь Крона, целиакия, сахарный диабет 1-го типа, сахарный диабет 2-го типа, ревматоидный артрит, спондилоартропатии, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, шизофрения, некоторые виды рака, ожирение, жировая дистрофия печени, атопия и аллергические заболевания, среди прочего. В большинстве случаев повышенная проницаемость развивается до заболевания, но причинно-следственная связь между повышенной кишечной проницаемостью при большинстве этих заболеваний неясна. По этой причине в настоящей заявке используется термин «дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость и связанные с ней состояния)».

Термины «кишечный барьер», «кишечная проницаемость», «нормальная кишечная проницаемость», «дисфункция кишечного барьера», «нарушенная/повышенная кишечная проницаемость» также определены в публикации Bischoff et al., 2014.

Олигосахарид человеческого молока: этот термин сокращенно обозначается ОЧМ и также известен как «гликан человеческого молока», эти термины в совокупности относятся к тем олигосахаридам, которые присутствуют в человеческом молоке, и которые представляют собой третьи по количеству твердые компоненты в человеческом молоке после лактозы и жира. ОЧМ представляют собой короткие полимеры простых сахаров, которые обычно состоят из лактозы на восстанавливающем конце с углеводным ядром, которое часто содержит фукозу или сиаловую кислоту, на невозстанавливающем конце. ОЧМ присутствуют в грудном молоке в концентрации 11,3–17,7 г/л, в зависимости от стадий лактации. Известно примерно 200 структурно различных ОЧМ, и они могут быть разделены на категории в соответствии с различными классификациями, например, на ОЧМ с фукозильированным, сиалированным и нейтральным ядром. Композиция олигосахаридов грудного молока в грудном молоке индивидуальна для каждой матери и изменяется в течение периода лактации. Доминирующим олигосахаридом у 80% всех женщин является 2'-фукозиллактоза, которая присутствует в грудном молоке человека в концентрации приблизительно 2,5 г/л; другие распространенные олигосахариды включают лакто-N-тетрозу, лакто-N-неотетрозу и лакто-N-фукопентозу.

Синтетическая смесь: Это означает смесь, полученную химическими и/или биологическими средствами, которая может быть химически идентична смеси, встречающейся в природе, например, в молоке млекопитающих. Все композиции, описанные в настоящей заявке, представляют собой синтетические смеси.

Питательная композиция: Этот термин относится к композиции, которая питает субъекта. Эту питательную композицию обычно применяют перорально или внутривенно, и она обычно содержит источник липидов или жиров и источник белка. В частности, питательная композиция представляет собой полную питательную смесь, которая удовлетворяет все или большинство потребностей субъекта в питании (например, детскую смесь). Питательные композиции содержат пищевые продукты.

Детская смесь: Этот термин в настоящем документе относится к пищевым продуктам, специально предназначенным для применения и в питании у младенцев в течение первых месяцев жизни и удовлетворяющим сами по себе потребности в питании этой категории лиц (статья 2(с) Директивы Европейской комиссии 91/321/ЕЕС 2006/141/ЕС от 22 декабря 2006 года о смесях для детского питания первой и второй ступеней). Он также относится к питательной композиции, предназначенной для младенцев и определенной в «Кодекс Алиментариус» (Codex STAN 72-1981) и Infant Specialities (включая «Пищевые продукты для специального медицинского назначения»). Термин «детская смесь» охватывает следующие формы, без ограничения:

Смесь для детского питания первой ступени: Это означает пищевой продукт, специально предназначенный для применения для питания у младенцев в течение первых шести месяцев жизни.

- 5 Смесь для детского питания второй ступени: Ее можно давать с 6-го месяца и далее. Она представляет собой основной жидкий элемент в рационе этой категории лиц, разнообразие которого постепенно увеличивается.

10 Детская смесь, смесь для детского питания второй ступени и смесь для детского питания первой ступени могут быть в форме жидкости, готовой к употреблению или концентрированной, или в форме сухого порошка, который может быть восстановлен с получением смеси после добавления воды. Такие смеси хорошо известны специалистам в данной области техники.

15 Детское питание: Это означает пищевой продукт, специально предназначенный применения в питании у младенцев или маленьких детей в течение первых лет жизни.

20 Содержащая злаки композиция для младенцев: Это означает пищевой продукт, специально предназначенный применения в питании у младенцев или маленьких детей в течение первых лет жизни.

Обогатитель: Он относится к жидким или твердым пищевым композициям, подходящим для смешивания с грудным молоком или детской смесью.

25 Молочная смесь третьей ступени: Это означает напиток на основе молока, адаптированный к конкретным потребностям питания маленьких детей.

Период отнятия от груди: Означает период, в течение которого материнское молоко замещается другой пищей в рационе младенца.

30 Энтеральное введение: Это означает любую общепринятую форму для доставки композиции не младенцу, которая обеспечивает попадание композиции в желудочно-кишечный тракт (включая желудок).

35 Пероральное введение: Это означает любую общепринятую форму для доставки композиции не младенцу через рот. Соответственно, пероральное введение представляет собой форму энтерального введения.

### **Пробиотическая композиция**

40 В одном из вариантов реализации пробиотическая композиция содержит *Bifidobacterium*

*longum* subsp. *longum*, депонированный под номером доступа СЕСТ 7894.

Штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 описан в публикации WO2015018883A2, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Указанный штамм депонирован в Испанской коллекции типовых культур (СЕСТ, 5 Parc Científic de la Universitat de València, Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 9, 46980 Paterna, Валенсия, Испания) 30 марта 2011 г. (30.03.2011) под номером доступа СЕСТ 7894. Депонирование было осуществлено по условиям Будапештского договора, депонированный штамм жизнеспособен и сохраняет все свои свойства, связанные с депонированием. Он был депонирован тем же заявителем. 10

*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 (также называемый в настоящем описании КАВР-042) был выделен из кала здорового младенца, находящегося на грудном вскармливании. Был проведен анализ СЕСТ 7894 *in silico* и *in vitro* для изучения пробиотических свойств этого штамма, подтверждающий, что штамм способен переносить сложные условия в желудочно-кишечном тракте человека (воздействие условий в желудке и солей желчных кислот) и 15 прикрепляется к эпителию кишечника. Генотипический анализ подтвердил эти свойства.

Олигосахариды человеческого молока (ОЧМ) представляют собой сложные сахара, обнаруживаемые в молоке человека, использование которых бифидобактериями является штамм-специфичным. Согласно настоящей заявке, было обнаружено, что *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 может использовать *in vitro* ОЧМ лакто-N-тетрозу (один из наиболее распространенных ОЧМ, присутствующих в грудном молоке). Соответственно, его геном содержит большинство типичных генов, необходимых для деградации ОЧМ, включая лакто-N-биозидазу, 20 бета-галактозидазу, альфа-галактозидазу, гексозаминидазу и бета-глюкуронидазу. Этот анализ подтверждает, что штамм адаптирован к использованию ОЧМ и, следовательно, к кишечнику младенцев.

Кроме того, *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 обладает универсальным углеводным метаболизмом, поскольку другие гены его генома кодируют действующие на углеводы ферменты (CAZy), что указывает на его способность осуществлять разрушение широкого спектра сложных субстратов. Кроме того, в геноме *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 также присутствуют гены, кодирующие лантипептид В, серпин и адгезины. Лантипептид В (лантибиотик) представляет собой бактериоцин I класса, который проявляет сильную антимикробную активность в 30 отношении ряда грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий. Серпины избирательно инактивируют человеческие эластазы (протеазы) нейтрофилов и поджелудочной железы, что приводит к противовоспалительному эффекту и способствует поддержанию кишечного гомеостаза.

В целом, фенотипический и генотипический анализ *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 в 40

настоящей заявке подтверждает, что указанный штамм хорошо адаптирован к желудочно-кишечному тракту человека, включая кишечник младенцев, поскольку он обладает способностью разлагать ОЧМ.

- 5 Для специалиста в данной области техники понятно, что в настоящем контексте бактериальный штамм был выделен из его природной среды, т. е. он не присутствует в своей природной среде, следовательно, он свободен от других организмов и субстанций, присутствующих в природной среде.
- 10 Появление и распространение устойчивости к противомикробным препаратам у бактерий представляет угрозу для здоровья человека и животных и сопряжено с серьезными финансовыми и социальными издержками. Анализ последовательности всего генома показал, что новый штамм *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 не обладает способностями к передаче генами устойчивости к стандартно применяемым антибиотикам. В целом, эти результаты исключают
- 15 риск потенциальной передачи устойчивости к антибиотикам патогенным видам.

Понятно, что применяя указанный депонированный штамм в качестве исходного материала, специалист в данной области техники сможет обычным способом, с помощью стандартных методик мутагенеза или повторного выделения, получить дополнительные его варианты или

20 мутанты, у которых сохраняются, усилятся или улучшатся описанные в настоящей заявке соответствующие особенности и преимущества указанного штамма, составляющего композицию согласно настоящему изобретению. Таким образом, настоящее изобретение также относится к вариантам/мутантам штамма, описанного в настоящей заявке. В одном из вариантов реализации пробиотическая композиция содержит бактериальный штамм, полученный из штамма

25 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894, причем полученный бактериальный штамм: (а) имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) по меньшей мере 99% с геномом соответствующего депонированного штамма СЕСТ 7894; и (b) сохраняет, усиливает или улучшает способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат.

30 В конкретном варианте реализации бактериальный штамм, полученный из депонированного штамма, имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) по меньшей мере 99% с геномом соответствующего депонированного штамма; более конкретно, % идентичности составляет 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9%. В частности, % ANI составляет по меньшей мере 99,5%. В частности, % ANI составляет 99,50%, 99,51%,

35 99,52%, 99,53%, 99,54%, 99,55%, 99,56%, 99,57%, 99,58%, 99,59%, 99,60%, 99,61%, 99,62%, 99,63%, 99,64%, 99,65%, 99,66%, 99,67%, 99,68%, 99,69%, 99,70%, 99,71%, 99,72%, 99,73%, 99,74%, 99,75%, 99,76%, 99,77%, 99,78%, 99,79%, 99,80%, 99,81%, 99,82%, 99,83%, 99,84%, 99,85%, 99,86%, 99,87%, 99,88%, 99,89%, 99,90%, 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%,

40 99,96%, 99,97%, 99,98% или 99,99%. В другом варианте реализации % ANI составляет по

меньшей мере 99,9%; в частности, % ANI составляет 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98% или 99,99%.

5 В некоторых вариантах реализации мутант получают в результате естественного мутагенеза, искусственного направленного мутагенеза или искусственного случайного мутагенеза. В одном конкретном варианте реализации бактериальный штамм, полученный из депонированного штамма, получали, применяя технологию рекомбинантных ДНК. Таким образом, в другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения штамма, полученного из указанного депонированного штамма, причем указанный способ включает применение указанного депонированного штамма в качестве исходного материала и проведение мутагенеза, и при этом у полученного варианта или мутанта дополнительно сохраняется, усиливается или улучшается по меньшей мере одна способность указанного депонированного штамма, описанного в настоящей заявке.

15 Штамм, образующий часть композиции согласно настоящему изобретению, может быть в форме жизнеспособных клеток. В альтернативном варианте указанный штамм может быть в форме нежизнеспособных клеток. Это может включать термически убитые микроорганизмы или микроорганизмы, убитые в результате воздействия измененного pH, обработки ультразвуком, ионизирующего излучения или высокого давления. Получение продукта проще с нежизнеспособными клетками, поскольку клетки могут быть легко включены в диетические, фармацевтические или пищевые продукты, а требования к хранению гораздо менее ограничены, чем в случае жизнеспособных клеток. Композиция, содержащая штамм согласно настоящему изобретению в виде нежизнеспособных клеток, может содержать продукты, полученные из указанного штамма, которые находятся в среде.

25 Штамм, описанный в настоящей заявке, получают путем культивирования (или ферментирования) бактерий в подходящей искусственной среде и при подходящих условиях. Под выражением «искусственная среда» понимается среда, содержащая природные вещества и необязательно синтетические химические соединения, такие как полимерный поливиниловый спирт, которые могут воспроизводить некоторые функции сывороток. Обычные подходящие искусственные среды представляют собой питательные бульоны, которые содержат элементы, включающие источник углерода (например, глюкозу), источник азота (например, аминокислоты и белки), воду и соли, необходимые для роста бактерий. Рост среды могут находиться в жидкой форме или часто могут быть смешаны с агаром или другим гелеобразующим агентом с получением твердой среды. Указанный штамм можно культивировать отдельно с получением чистой культуры, или в виде смешанной культуры вместе с другими микроорганизмами, или путем культивирования бактерий различных типов отдельно с последующим их объединением в необходимых соотношениях. После культивирования и в зависимости от конечного состава указанный штамм можно применять в виде очищенных бактерий или, в качестве альтернативы, можно применять бактериальную культуру или суспензию клеток



либо как есть, либо после соответствующей последующей обработки. В настоящем описании под термином «биомасса» понимают культуру бактериального штамма, полученную после культивирования (или ферментации, так как данный термин синонимичен термину культивирование).

5

В конкретном варианте реализации указанный штамм ферментируют в искусственной среде и подвергают последующей обработке после ферментации с получением бактериальных клеток, и полученные в результате этого бактериальные клетки находятся в жидкой среде или в твердой форме. В частности, последующую обработку выбирают из группы, состоящей из сушки, замораживания, лиофилизации, сушки в псевдооживленном слое, сушки распылением и охлаждения в жидкой среде, и, более конкретно, она представляет собой лиофилизацию.

10

Под термином «последующая обработка» в настоящем контексте следует понимать любую обработку, которой подвергают биомассу с целью получения пригодных для хранения бактериальных клеток. Целью последующей обработки является снижение метаболической активности клеток в биомассе и, таким образом, замедление скорости вредных для клеток реакций. В результате последующей обработки бактериальные клетки могут находиться в твердой или жидкой форме. В твердой форме подлежащие хранению бактериальные клетки могут находиться в виде порошка или гранул. В любом случае как твердая, так и жидкая формы, содержащие бактериальные клетки, не присутствуют в природе, следовательно, не имеют природного происхождения, поскольку их получают в результате искусственного (-ых) процесса (-ов) последующей обработки. В процессах последующей обработки в конкретных вариантах реализации может потребоваться применение одного или более из так называемых агентов для последующей обработки. В контексте настоящего изобретения выражение «агент для последующей обработки» относится к соединению, применяемому для осуществления описанных в настоящей заявке процессов последующей обработки. В число агентов для последующей обработки следует включить, без ограничения, дегидратирующие агенты, бактериостатические агенты, криопротекторные агенты (криопротекторы), инертные наполнители (также известные как лиопротекторы), материал-носитель (также известный как заполняющий материал) и т. д., применяемые либо отдельно, либо в комбинации.

15

20

25

30

Существует два основных подхода к снижению метаболической активности бактериальных клеток и, следовательно, два подхода к проведению последующей обработки. Первый подход состоит в снижении скорости всех химических реакций, что можно осуществить при снижении температуры путем охлаждения или замораживания с применением холодильных камер, механических морозильных камер и морозильных камер с жидким азотом. В качестве альтернативы, снижения скорости всех химических реакций можно достичь путем добавления субстанций, которые ингибируют рост бактериальных клеток, а именно бактериостатического агента, сокращенно называемого Bstatic.

35

40

Второй подход к проведению последующей обработки состоит в удалении воды из биомассы; данный процесс может включать сублимацию воды с применением лиофилизатора. Подходящие методики удаления воды из биомассы представляют собой сушку, лиофилизацию, сушку распылением или сушку в псевдооживленном слое. Последующие обработки, которые позволяют получить твердую форму, могут представлять собой сушку, замораживание, лиофилизацию, сушку в псевдооживленном слое или сушку распылением.

Последующая обработка представляет собой, в частности, лиофилизацию, которая включает удаление воды из замороженных бактериальных суспензий путем сублимации при пониженном давлении. Этот процесс состоит из трех этапов: предварительного замораживания продукта с получением замороженной структуры, первичной сушки для удаления большей части воды и вторичной сушки для удаления связанной воды. Учитывая цель и ожидаемую вариативность промышленных процессов получения и выделения лиофилизированных бактериальных культур, последние обычно содержат определенное количество инертного наполнителя, также известного как лиопротектор. Его роль состоит в стандартизации содержания живых пробиотических бактерий в продукте. В доступных для приобретения лиофилизированных культурах применяют следующие инертные наполнители: сахаробиозу, сахарозу, лактозу, трегалозу, глюкозу, мальтозу, мальтодекстрин, кукурузный крахмал, инулин и другие фармацевтически приемлемые негигроскопичные наполнители. Необязательно другие стабилизирующие или криозащитные агенты, такие как аскорбиновая кислота, также применяют для получения вязкой пасты, которую подвергают лиофилизации. В любом случае, полученный таким образом материал можно перемолоть до подходящего размера, в том числе в порошок.

В качестве альтернативы сохранению биомассы в твердой форме, биомасса также может быть сохранена в жидкой форме. Это можно сделать путем добавления в культуральную среду бактериостатического агента, описанного выше, для остановки роста бактерий или с помощью промежуточного этапа сбора клеток, ресуспендирования осадка в солевом растворе с бактериостатическим агентом и, необязательно, его охлаждения.

Иногда, как описано, например, выше, в процессе сушки в псевдооживленном слое пробиотическую композицию подвергают иммобилизации и/или нанесению оболочки или процессу инкапсуляции для улучшения срока годности и/или функциональных возможностей. В данной области техники известны несколько методик иммобилизации, нанесения оболочки или инкапсуляции бактерий.

В других вариантах реализации пробиотическая композиция составлена для введения с замедленным высвобождением, например, посредством инкапсуляции в липосомы, микропузырьки, микрочастицы или микрокапсулы и т. п. Подходящие формы с замедленным высвобождением, а также материалы и способы их получения хорошо известны в данной области

техники. Таким образом, подходящая для перорального введения форма любой из пробиотических композиций согласно настоящему изобретению представлена в форме с замедленным высвобождением, дополнительно содержащей по меньшей мере одну оболочку или один матрикс. Оболочка или матрикс для замедленного высвобождения включают, без ограничения, природные, полусинтетические или синтетические полимеры, нерастворимые в воде или модифицированные, воски, жиры, жирные спирты, жирные кислоты, природные, полусинтетические или синтетические пластификаторы или комбинацию двух или более из них. Кишечно-растворимые оболочки могут быть нанесены с применением обычных способов, известных специалистам в данной области техники.

10

Эффективное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) для штамма в композиции будет определено специалистом в данной области техники, и оно будет зависеть от конечного состава. Термин «колониеобразующая единица» («КОЕ») означает количество бактериальных клеток, обнаруженных при микробиологических подсчетах на чашках с агаром.

15

Как известно специалистам в данной области техники, эффективное количество единиц колоний также может быть измерено с помощью эффективного количества активных флуоресцентных единиц. Термин «активные флуоресцентные единицы» («AFU») означает количество бактериальных клеток, обнаруженных при подсчете с помощью проточной цитометрии в гейте, специфичном для характеристик флуоресценции предполагаемых живых клеток. Таким образом, специалист рассматривал бы приведенные выше конкретные количества КОЕ равны примерно такому же количеству AFU.

20

В одном из вариантов реализации пробиотическая композиция представляет собой твердую композицию. Согласно другому варианту реализации пробиотическая композиция представляет собой жидкую композицию.

25

В другом варианте реализации пробиотическая композиция содержит: лиофилизированную бактериальную биомассу, содержащую от примерно  $10^5$  КОЕ до примерно  $10^{12}$  КОЕ штамма; более конкретно, от примерно  $10^8$  КОЕ до примерно  $10^{11}$  КОЕ штамма.

30

В одном из вариантов реализации пробиотическая композиция содержит криопротектор. В частности, указанная пробиотическая композиция содержит по меньшей мере один криопротектор, который представляет собой криопротектор, не содержащий аллергены. В некоторых вариантах реализации указанная пробиотическая композиция содержит по меньшей мере один криопротектор, такой как мальтоза, трегалоза, маннит (в частности, D-маннит), сахароза, лактоза, декстроза, аскорбат натрия, цитрат натрия, L-цистеин, мальтодекстрин, безводная декстроза, крахмал, целлюлоза и инулин. В конкретном варианте реализации криопротектор и/или фармацевтически приемлемый носитель выбран из группы, состоящей из трегалозы, D-маннита, декстрозы, аскорбата натрия, цитрата натрия, L-цистеина, мальтодекстрина, крахмала и целлюлозы.

35

40

В частности, крахмал представляет собой кукурузный, маисовый крахмал и/или картофельный крахмал.

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

10 Согласно некоторым вариантам реализации указанная пробиотическая композиция содержит один или более носителей, выбранных из группы, состоящей из: мальтодекстрина, целлюлозы, крахмалов различных типов, инулина, лактозы или носителя с пониженной активностью воды.

В конкретном варианте реализации пробиотическая композиция представляет собой композицию, содержащую:

- 15 - лиофилизированную бактериальную биомассу, содержащую от примерно  $10^5$  КОЕ до примерно  $10^{12}$  КОЕ штамма;  
 - криопротектор и/или фармацевтически приемлемый носитель, выбранный из эмульсии, суспензии, геля, пасты, гранул, порошка и камеди.

## 20 Продукция полифосфатов

В одном из вариантов реализации продукция полифосфата штаммом *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 или полученного из него бактериального штамма выше, чем продукция полифосфата у контрольного штамма, когда продукцию полифосфата определяют через  
 25 6 ч и/или 16 ч культивирования, выполняя следующие этапы:

- (а) культивирование штаммов, инокулированных при ОП 0,1, в среде для индукции малатдегидрогеназы (MEI), содержащей (на литр, масс./об.): 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона, 0,4%  $K_2HPO_4$ , 0,5%  $KH_2PO_4$ , 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,005%  $MnSO_4$ , 1 мл Tween 80, 0,05% цистеина и 0,5% глюкозы, при 37 °С и в анаэробных условиях;  
 30 (b) сбор клеток путем центрифугирования и лизиса в 1 мл 5% гипохлорита натрия с осторожным перемешиванием в течение 45 мин при комнатной температуре;  
 (с) центрифугирование нерастворимого материала при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °С с получением осадка и двукратная промывка 1 мл 1,5 М NaCl с 1 мМ ЭДТА при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °С;  
 35 (d) экстрагирование polyP из осадков с помощью двух последовательных промывок 1 мл воды и центрифугирования при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °С между ними;  
 (е) осаждение polyP в объединенных водных экстрактах путем добавления 0,1 М NaCl и 1 объема этанола с последующей инкубацией на льду в течение 1 ч;  
 (f) центрифугирование при 16 000 g в течение 10 мин и ресуспендирование осадка polyP  
 40 в 50 мкл воды;

(g) построение стандартной кривой, связывающей количество фосфата, полученного из polyP, с интенсивностью флуоресценции, в соответствии со следующими этапами:

- 5 i. гидролиз серийных разведений образца polyP, выделенного из контрольного штамма-продуцента polyP, такого как *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (Alcántara *et al.* 2014), с помощью одного объема 2 М HCl и инкубации при 95 °C в течение 15 мин;
- ii. нейтрализация разведений путем добавления половины объема 2 М NaOH;
- iii. измерение высвобожденного фосфата с помощью набора BIOMOL Green Kit для определения количества фосфата в каждом разведении;
- 10 iv. измерение высвобожденного фосфата по флуоресценции с применением 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре для определения значения флуоресценции в каждом разведении; и
- 15 v. построение стандартной кривой со значениями уровней фосфата, полученными на этапе (iii), и соответствующими значениями флуоресценции, полученными на этапе (iv); и

(h) количественное определение polyP из ресуспендированных фракций, полученных на этапе (f):

- 20 1) измерение polyP флуоресцентным методом с применением DAPI в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре;
- 2) вычисление количества polyP с помощью стандартной кривой; и
- 25 3) выражение значения уровня polyP в нмоль фосфата.

В рабочем ПРИМЕРЕ 1 (раздел 1.1.2 «Материалы и методы») в настоящей заявке представлено подробное описание анализа, подходящего для количественного определения polyP и, следовательно, оценки способности бактериального штамма продуцировать polyP, как указано на этапах (a)-(h) варианта реализации настоящего изобретения.

30 Уместно отметить, что описания и условия количественного определения polyP, раскрытые на этапах (a)-(h) варианта реализации настоящего изобретения, не ограничивают объем настоящего изобретения. Этот анализ представляет собой один из подходящих способов проверки способности бактериальных штаммов (например, *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894) продуцировать polyP. Подробные условия этого ПРИМЕРА 1 образуют в настоящей заявке конкретный анализ для определения того, соответствуют ли представляющие интерес (производные) бактериальные штаммы критериям варианта реализации настоящего изобретения.

Соответственно, на основании подробного описания анализа в настоящей заявке специалист сможет стандартно повторить этот анализ, чтобы объективно определить, обладают ли конкретные представляющие интерес бактериальные штаммы способностью продуцировать polyP согласно варианту реализации настоящего изобретения.

5

Как указано, продукция polyP может быть количественно определена с помощью описанного выше способа. Такой способ состоит из трех основных этапов, начиная с экстракции polyP из клеток гипохлоритом натрия, окрашивания экстрагированного polyP с помощью DAPI и количественного определения флуоресценции образцов. Количество polyP определяют по стандартной кривой, которая показывает корреляцию количества фосфата, полученного из polyP, с единицами флуоресценции. Этот способ представляет собой непрямой способ количественного определения polyP посредством измерения фосфата по флуоресценции.

10

В некоторых вариантах реализации количественное определение polyP может быть выполнено с помощью альтернативных непрямых способов количественного определения polyP. В конкретном варианте реализации высвобождаемый в результате гидролиза polyP фосфат измеряют с помощью набора BIOMOL Green Kit с получением количества фосфата во всех образцах, т. е. как в контрольном штамме, так и в штамме согласно настоящему изобретению. В другом конкретном варианте реализации количественное определение polyP проводят с помощью добавления фермента PPK для получения фосфата в результате катаболизма polyP.

15

20

Согласно некоторым вариантам реализации продукция polyP штаммом согласно настоящему изобретению или полученного из него бактериального штамма является более высокой, чем у контрольного штамма при определении через 6 ч и/или 16 ч культивирования, с учетом того, что исходный инокулят одинаков для всех штаммов. В частности, продукция polyP выше при определении через 6 ч и 16 ч. В других вариантах реализации продукция polyP выше при определении в одной или более временных точках, например, через 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 13 ч, 14 ч, 15 ч, 16 ч, 17 ч, 18 ч, 19 ч и/или 20 ч культивирования.

25

Контрольный штамм, как он понимается в настоящей заявке и согласно настоящему изобретению, представляет собой, например, по меньшей мере один из следующих контрольных штаммов: *L. plantarum* WCFS1 и *L. paracasei* JCM 1163, которые, как известно, продуцируют polyP; *B. breve* JCM 1273, *B. adolescentis* JCM 1275 и *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707, которые, как известно, способны удалять фосфат; и *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773), который, как известно, содержит ген *ppk*.

30

35

В конкретном варианте реализации контрольный штамм представляет собой, например, *L. plantarum* WCFS1, *L. paracasei* JCM 1163, *B. breve* JCM 1273, *B. adolescentis* JCM 1275, *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707 или *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773).

При применении описанного анализа в некоторых вариантах реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч и 16 ч выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1 в той же временной точке.

В некоторых вариантах реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере, например, в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз или 100 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 10 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1. В частности, уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 15 раз или 18 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 3 раза выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. breve* JCM 1273.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 4 раза выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. adolescentis* JCM 1275. В частности, уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 4,5 раза выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. adolescentis* JCM 1275.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 100 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773). В частности, уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 120 раз, 130 раз или 140 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773).

В некоторых вариантах реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 16 ч по меньшей мере, например, в 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз или 100 раз, 200 раз, 300 раз, 400 раз, 500 раз или 600 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 16 ч выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом, и уровни polyP, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют. В частности, уровни polyP, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют, если контрольным штаммом является *L. plantarum* WCFS1.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 16 ч по меньшей мере в 2 раза выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. breve* JCM 1273.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 16 ч по меньшей мере в 2,5 раза выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. adolescentis* JCM 1275.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 16 ч по меньшей мере в 500 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773).

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 10 раз выше и через 16 ч выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1, причем продукция polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1 и уровни polyP, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют. В частности, уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 15 раз или 18 раз выше и через 16 ч выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1, причем продукция polyP контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1 и уровни polyP, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют.

В конкретном варианте реализации уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в



100 раз выше и через 16 ч по меньшей мере в 500 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773). В частности, уровни polyP, продуцируемого *B. longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученным из него бактериальным штаммом, через 6 ч по меньшей мере в 120 раз, 130 раз или 140 раз выше и через 16 ч по меньшей мере в 500 раз выше, чем при продукции polyP контрольным штаммом *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773).

#### **Комбинация пробиотической композиции с ОЧМ**

10 Термин «пробиотическая композиция» в настоящем документе относится к композиции, содержащей штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CECT 7894 или полученный из него бактериальный штамм, в соответствии с терминами, описанными выше.

15 Как указано, согласно одному из аспектов настоящего изобретения пробиотическая композиция, описанная в настоящей заявке, может дополнительно содержать по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока в комбинации.

20 Поскольку пробиотическая композиция и ОЧМ могут быть составлены вместе в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, варианты реализации изобретения, описанные в настоящей заявке, относятся к «композициям согласно настоящему изобретению» или просто «композициям» для обозначения пробиотической композиции, композиции, содержащей ОЧМ, и композиций, содержащих оба компонента.

25 В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат дополнительный пробиотик, отличный от *B. longum* CECT 7894 или полученного из него бактериального штамма, который способен разлагать ОЧМ, т. е. лакто-N-тетрозу (LNT). В конкретном варианте реализации дополнительный пробиотический штамм представляет собой *Bifidobacterium*, более конкретно *Bifidobacterium bifidum* или *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

30

В конкретном варианте реализации *Bifidobacterium bifidum* представляет собой *B. bifidum*, депонированный как CECT 30646. Штамм депонирован в Испанской коллекции типовых культур (CECT, Parc Científic de la Universitat de València, Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 9, 46980 Paterna, Валенсия, Испания) 17 мая 2022 г. (17.05.2022) с номером доступа CECT 30646. Депонирование было осуществлено по условиям Будапештского договора, депонированный штамм жизнеспособен и сохраняет все свои свойства, связанные с депонированием. Он был депонирован тем же заявителем. *B. bifidum* CECT 30646 (также называемый в этом описании Bb01) был выделен из человеческого молока.

35

В одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат ОЧМ, выбранный из группы, состоящей из фукозилированного олигосахарида, сиалированного олигосахарида, N-ацетиллактозамина и их комбинации.

- 5 В конкретном варианте реализации композиции содержат фукозилированный олигосахарид (в частности, 2'-фукозиллактозу (2'-FL) и/или дифукозиллактозу (DFL)) и N-ацетиллактозамин (в частности, лакто-N-тетрозу (LNT)).

10 ОЧМ могут быть получены путем выделения или обогащения хорошо известными способами из молока, секретируемого млекопитающими, включая, без ограничений, человека, виды крупного рогатого скота, овец, свиней или коз и, в частности, человека. ОЧМ также могут быть получены хорошо известными способами с применением микробной ферментации, ферментативных процессов, химического синтеза или комбинаций этих технологий.

- 15 В композициях согласно настоящему изобретению ОЧМ могут быть растворены, эмульгированы или суспендированы, например, в воде.

В одном из вариантов реализации ОЧМ присутствуют в композициях в общем количестве от 0,1 до 50 г/л, или от 0,3 до 5 г/л, или от 0,5 до 1 г/л, или 0,25 или 0,5 или 1 или 1,5 или 2 г/л.

20

#### *Фукозилированный олигосахарид*

25 Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать один или более фукозилированных олигосахаридов. В частности, фукозилированные олигосахариды включают 2'-фукозиллактозу (2'-FL) и/или дифукозиллактозу (DFL).

30 В некоторых вариантах реализации фукозилированный олигосахарид выбран из группы, включающей 2'-фукозиллактозу (2'-FL), 3-фукозиллактозу (3-FL), дифукозиллактозу (DFL), лакто-N-фукопентозу (т. е. LNFP I, II, III и V), лакто-N-дифукогексозу (LNDFH I и II), лакто-N-дифукогексозу III (LNDFH-III), фукозиллакто-N-гексозу (FLNH I и II), фукозиллакто-N-неогексозу (FLNnH), дифукозиллакто-N-гексозу I, дифукозиллакто-N-неогексозу (I и II) и фукозил-пара-лакто-N-гексозу (FpLNH I и II). Конкретные фукозилированные олигосахариды представляют собой 2'-FL или DFL или их смесь.

35 Фукозилированный олигосахарид может быть выделен с помощью технологии хроматографии или фильтрации из природного источника, такого как молоко животных. В качестве альтернативы, он может быть получен биотехнологическими средствами с применением специфических фукозилтрансфераз и/или фукозидазы либо с применением технологии ферментации на основе ферментов (рекомбинантных или природных ферментов) или технологии микробной  
40 ферментации. В последнем случае микробы могут либо экспрессировать свои природные

ферменты и субстраты, либо могут быть созданы генно-инженерными методами для получения соответствующих субстратов и ферментов. Могут применяться одиночные микробные культуры и/или смешанные культуры. В качестве альтернативы, фукозилированные олигосахариды получают путем химического синтеза из лактозы и свободной фукозы. Фукозилированные олигосахариды также доступны для приобретения, например, в компании Kyowa Flakko Kogyo (Япония).

В частности, композиции согласно настоящему изобретению содержат от 0,02 до 10 г фукозилированного (-ых) олигосахаридов (-ов) на 100 г композиции в пересчете на сухую массу, наиболее конкретно представляющих собой 2'-FL, например, от 0,2 до 0,5 г или от 0,3 до 5 г 2'-FL на 100 г композиции в пересчете на сухую массу и, в частности, от 0,1 до 3 г 2'-FL на 100 г композиции в пересчете на сухую массу.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит количество 2'-FL в следующих диапазонах или количестве: от 0,05 до 20 г/л, или от 0,1 до 5 г/л, или от 0,2 до 3 г/л, или от 0,1 до 2 г/л, или от 0,25 г/л до 1 г/л, или 0,25 г/л, или 1 г/л композиции, когда композиция находится в готовой к употреблению жидкой форме, или от 0,05 до 20 г/л, или от 0,1 до 5 г/л, или от 0,2 до 3 г/л, или 0,1 до 2 г/л, или от 0,25 г/л до 1 г/л, или 0,25 г/л, или 1 г/л (жидкой разбавленной формы), когда композиция представлена в форме порошка и предназначена для повторного приготовления в разбавленной жидкой форме, или то же самое, что и выше, умноженное на 2, 5, 10, 20, 50 или 100, когда композиция представлена в форме концентрированной композиции, предназначенной для разбавления (соответственно в 2, 5, 10, 20, 50 или 100 раз) в воде или грудном молоке человека, либо предназначенной для применения непосредственно в виде концентрированной формы, или от 0,04 г до 1,5 г/100 г порошка пищевой композиции, или от 0,08 до 1,2 г/100 г, или от 0,1 до 1 г/100 г, или от 0,2 до 0,8 г/100 г, или 0,2 г/100 г, или 0,4 г/100 г, или 0,8 г/100 г, или 1 г/100 г, или 1 г/100 г порошка пищевой композиции, когда пищевая композиция представлена в форме сухого порошка.

#### *N*-ацетиллактозамин

В некоторых вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере один *N*-ацетиллактозамин, т. е. указанные композиции содержат *N*-ацетиллактозамин и/или олигосахарид, содержащий *N*-ацетиллактозамин. Подходящие олигосахариды, содержащие *N*-ацетиллактозамин, включают лакто-*N*-тетрозу (LNT), лакто-*N*-неотетрозу (LNnT), лакто-*N*-неогексозу (LNnH), пара-лакто-*N*-неогексозу (pLNnH), пара-лакто-*N*-гексозу (pLNH) и лакто-*N*-гексозу (LNH).

В одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению содержат *N*-ацетиллактозамин, в частности, выбранный из группы, включающей лакто-*N*-тетрозу (LNT) и лакто-*N*-неотетрозу (LNnT).

LNT и LNnT могут быть синтезированы химически путем ферментативного переноса сахаридных звеньев от донорных фрагментов на акцепторные фрагменты с применением гликозилтрансфераз. В альтернативном варианте LNT и LNnT могут быть получены путем химического превращения кетогексоз (например, фруктозы), либо свободных, либо связанных с олигосахаридом (например, лактулозой), в N-ацетилгексозамин или N-ацетилгексозамин-содержащий олигосахарид. Полученный таким образом N-ацетиллактозамин можно затем перенести на лактозу, выступающую в качестве акцепторного фрагмента. LNT также может быть получена путем микробной ферментации, например, с помощью генетически модифицированного штамма *E. coli* K-12, так как он недавно был одобрен Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA).

В частности, композиции согласно настоящему изобретению содержат от 0,01 до 3 г N-ацетиллактозамина на 100 г композиции в пересчете на сухую массу. В частности, они содержат от 0,1 до 3 г LNnT на 100 г композиции в пересчете на сухую массу, например, от 0,1 до 0,25 г или от 0,15 до 0,5 г LNnT на 100 г композиции в пересчете на сухую массу.

В некоторых вариантах реализации композиции содержат количество LNnT в следующих диапазонах или количестве: от 0,02 до 10 г/л, или от 0,05 до 2,5 г/л, или от 0,1 до 1,5 г/л, или от 0,05 до 1 г/л, или от 0,12 г/л до 0,5 г/л, или 0,12 г/л, или 0,5 г/л, или 1 г/л композиции, когда композиция находится в готовой к употреблению жидкой форме, или от 0,02 до 10 г/л, или от 0,05 до 2,5 г/л, или от 0,1 до 1,5 г/л, или от 0,05 до 1 г/л, или от 0,12 г/л до 0,5 г/л, или 0,12 г/л, или 0,5 г/л, или 1 г/л (жидкой разбавленной формы), когда композиция представлена в форме порошка и предназначена для повторного приготовления в разбавленной жидкой форме, или то же самое, что и выше, умноженное на 2, 5, 10, 20, 50 или 100, когда композиция представлена в форме концентрированной композиции, предназначенной для разбавления (соответственно в 2, 5, 10, 20, 50 или 100 раз) в воде или грудном молоке человека, либо предназначенной для применения непосредственно в виде концентрированной формы, или от 0,02 г до 0,75 г/100 г порошка пищевой композиции, или от 0,04 до 0,6 г/100 г, или от 0,05 до 0,5 г/100 г, или от 0,1 до 0,4 г/100 г, или 0,1 г/100 г, или 0,2 г/100 г, или 0,25 г/100 г, или 0,5 г/100 г, или 1 г/100 г, или 3 г/100 г порошка пищевой композиции, когда пищевая композиция представлена в форме сухого порошка.

#### *Сиалированные олигосахариды*

35

Композиции согласно настоящему изобретению в некоторых вариантах реализации могут содержать один или более сиалированных олигосахаридов.

Примеры кислых ОЧМ включают 3'-сиалиллактозу (3'-SL), 6'-сиалиллактозу (6'-SL), 3-фукозил-3'-сиалиллактозу (FSL), LST a, фукозил-LST a (FLST a), LST b, фукозил-LST b (FLST b), LST c,

40

фукозил-LST с (FLST с), сиалил-LNH (SLNH), сиалиллакто-N-гексозу (SLNH), сиалиллакто-N-неогексозу I (SLNH-I), сиалиллакто-N-неогексозу II (SLNH-II) и дисиалиллакто-N-тетрозу (DS-LNT).

5 В одном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению содержит сиалированный олигосахарид, в частности, выбранный из группы, включающей 3'-сиалиллактозу и 6'-сиалиллактозу. Более конкретно, композиции содержат как 3'-сиалиллактозу, так и 6'-сиалиллактозу, причем соотношение между 3'-сиалиллактозой и 6'-сиалиллактозой находится, в частности, в диапазоне от 100 : 1 до 1 : 100, более конкретно от 10 : 1 до 1 : 10, еще более  
10 конкретно от 5 : 1 до 1 : 2.

3'- и 6'-формы сиалиллактозы могут быть выделены с помощью технологии хроматографии или фильтрации из природного источника, такого как молоко животных. В качестве альтернативы, они могут быть получены биотехнологическими средствами с применением специфических сиалилтрансфераз или сиалидаз, нейраминидаз, либо с помощью технологии ферментации на основе ферментов (рекомбинантных или природных ферментов), путем химического синтеза или с помощью технологии микробной ферментации. В последнем случае микробы могут либо экспрессировать свои природные ферменты и субстраты, либо могут быть созданы генно-инженерными методами для получения соответствующих субстратов и ферментов. Мо-  
15 гут применяться одиночные микробные культуры или смешанные культуры. В качестве альтернативы, сиалиллактозы могут быть получены путем химического синтеза из лактозы и свободной N'-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты). Сиалиллактозы также коммерчески доступны для приобретения, например, в компании Kyowa Hakko Kogyo (Япония).

25 В частности, композиция согласно изобретению содержит от 0,05 до 10 г, более конкретно от 0,1 до 5 г, еще более конкретно от 0,1 до 2 г сиалированного (-ых) олигосахарида (-ов) на 100 г композиции в пересчете на сухую массу.

#### *Конкретные формы продукта*

30 Для специалиста в данной области техники понятно, что в данном контексте в отношении предложенной в настоящей заявке комбинации не является существенным, чтобы два «компонента», указанные в настоящей заявке (т. е. *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм и ОЧМ), вводили, например, одновременно в виде однократного приема или в виде одной композиции, или, например, последовательно в виде двух отдельных  
35 композиций. Важно, чтобы эти два компонента могли оказывать свое действие совместно в организме пациента. В частности, указанные два компонента вводят в течение определенного периода времени, например, периода переваривания, который может составлять до восемнадцати часов у взрослого человека.

40

Соответственно, термин «комбинация» относится в настоящей заявке к различным комбинациям указанных двух компонентов, например, в одной композиции, в комбинированной смеси, составленной из отдельных композиций одиночных компонентов, такой как «смесь в резервуаре», и в комбинированном применении одиночных компонентов последовательным образом, т. е. одно за другим с достаточно коротким интервалом, таким как несколько часов, или при одновременном введении. Порядок введения *B. longum* СЕСТ 7894 или полученного из него бактериального штамма и ОЧМ не является существенным.

Таким образом, комбинация пробиотической композиции и ОЧМ может быть составлена для ее одновременного, раздельного или последовательного введения. В частности, если введение не является одновременным, соединения вводят относительно близко по времени друг к другу. Кроме того, соединения вводят в одной и той же или различных лекарственных формах или одним и тем же или различными путями введения и, в частности, перорально. Согласно некоторым вариантам реализации указанную комбинацию двух соединений вводят, например:

- в виде комбинации, которая является частью одной и той же композиции, при этом два соединения вводят всегда одновременно;
- в виде комбинации двух единиц/композиций, каждая из которых содержит одну из субстанций, что обеспечивает возможность одновременного, последовательного или раздельного введения.

Например, *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм вводят независимо от ОЧМ (т. е. в двух единицах), но в одно и то же время.

*B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм и ОЧМ могут быть составлены в любой форме, описанной в настоящей заявке. В настоящей заявке представлены примеры различных комбинаций:

В одном из вариантов реализации указанная комбинация содержит пробиотическую композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, которую вводят младенцам, находящимся на грудном вскармливании, причем ОЧМ присутствуют в грудном молоке.

Согласно другому варианту реализации указанная комбинация содержит пробиотическую композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, и детскую смесь, содержащую ОЧМ. Таким образом, композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, вводят младенцам на искусственном вскармливании. В частности, композиция, содержащая *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, представлена в форме масляных капель.

В одном из вариантов реализации комбинация содержит одну композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм и ОЧМ, в любой из форм продукта, описанных в настоящей заявке.

- 5 В одном из вариантов реализации комбинация предназначена для не младенца и содержит одну композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм и ОЧМ. В другом варианте реализации изобретения комбинация содержит композицию, содержащую ОЧМ, и композицию, содержащую *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, например, в форме шипучей таблетки или энергетического батончика.
- 10

Как указано, комбинация также может включать дополнительный штамм *Bifidobacterium*, который может быть составлен для одновременного, отдельного или последовательного введения с двумя другими соединениями, описанными в настоящей заявке.

15

### **Применение композиций**

Варианты реализации из этого раздела относятся к любой «композиции» согласно настоящему изобретению, а именно к пробиотической композиции, содержащей *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, а также к комбинациям и композициям, включающим пробиотическую композицию и ОЧМ.

20

Как обсуждается в настоящей заявке, пробиотическая композиция обладает высокой эффективностью в продукции полифосфата во время роста. Известно, что механизмы действия *polyP* связаны с защитным действием на эпителиальные клетки посредством предотвращения кишечной проницаемости. Таким образом, *polyP*, полученный из пробиотиков, усиливает функцию кишечного барьера и поддерживает кишечный гомеостаз. Связь между продукцией *polyP* и защитным действием при предотвращении/лечении кишечной проницаемости была продемонстрирована в Примерах, представленных в настоящей заявке (например, ПРИМЕР 4). Кроме того, для специалиста в данной области техники выглядит правдоподобно, что *B. longum* СЕСТ 7894 посредством продукции *polyP* может оказывать положительное действие на барьерную функцию кишечника и связанные с ней состояния, описанные в настоящей заявке.

25

30

Например, в публикации Saiki *et al.*, 2016, показано, что *polyP*, экстрагированный из *L. paracasei* JCM 1163, подавляет индуцированную окислителем кишечную проницаемость в тонком кишечнике мыши. Segawa *et al.*, 2011 демонстрируют, что *polyP* ингибирует проницаемость слизистой оболочки в эксперименте *in vitro* с тканью тонкого кишечника. Сначала они подвергают ткань воздействию окислителя, который увеличивает проницаемость, а затем до-

35

бавляют polyP, чтобы увидеть защитное действие. Проницаемость измеряют путем количественного определения потока маннита. PolyP уменьшает поток маннита и, следовательно, проницаемость. Аналогичным образом, Такака *et al.*, 2015, демонстрируют *in vitro*, что polyP снижает поток маннита через эпителиальные клетки кишечника Caco-2, следовательно, снижая проницаемость. Наконец, Fujiya *et al.*, 2020, исследуют проницаемость путем измерения сопротивления барьера с помощью TEER (как оценивается в настоящей заявке, ПРИМЕР 4, ФИГ. 6). Они обрабатывают клетки эпителия кишечника Caco-2 с помощью ФНО-альфа для повышения проницаемости, а затем демонстрируют, что polyP улучшает сопротивление (улучшает TEER).

Соответственно, экспериментальные данные в настоящей заявке предоставили доказательства правдоподобности того, что пробиотическая композиция будет обладать значительным положительным действием в лечении дисфункции кишечного барьера и ассоциированных с ней состояний у нуждающегося в этом субъекта путем продукции polyP.

В конкретном варианте реализации пробиотическая композиция предназначена для применения в способе лечения дисфункции кишечного барьера. В одном из вариантов реализации изобретения дисфункция кишечного барьера связана с повышенной кишечной проницаемостью. В другом варианте реализации пробиотическая композиция предназначена для применения в способе лечения повышенной кишечной проницаемости. В другом варианте реализации пробиотическая композиция предназначена для применения в способе лечения повышенной кишечной проницаемости и ассоциированных с ней состояний.

В конкретном варианте реализации субъект представляет собой млекопитающее. В более конкретном варианте реализации млекопитающее представляет собой человека. В частности, человек является младенцем. Согласно другому варианту реализации человек представляет собой не младенца. В другом варианте реализации изобретения человек выбран из группы, состоящей из пожилых людей, недоношенных младенцев, младенцев, спортсменов и ослабленных людей.

Согласно некоторым вариантам реализации дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанные с ней состояния связаны с преждевременными родами, старением, высокой интенсивностью физической активности, несбалансированностью питания, инфекцией, лекарственной терапией или стрессом. В конкретном варианте реализации (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны со старением.

*Ассоциированные состояния*



Считается, что здоровый кишечный барьер защищает от бактериальной транслокации, бактериемии, аутоиммунных реакций, нарушений головного мозга, заболеваний сердца и печени и ожирения, помимо прочих состояний. Дисфункция кишечного барьера тесно связана с иммунными заболеваниями, такими как аутоиммунные заболевания (болезнь Крона, целиакия, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, язвенный колит), другие иммунные заболевания (5 бронхиальная астма, аллергический риноконъюнктивит, атопический дерматит, аллергия/гиперчувствительность, такая как пищевая аллергия/гиперчувствительность), болезни обмена веществ, такие как неалкогольная жировая дистрофия печени, цирроз печени, сахарный диабет II типа и ожирение, желудочно-кишечные заболевания, такие как синдром раздраженного кишечника (СРК) или целиакия, и ряд других заболеваний и состояний, включая панкреатит, синдром поликистоза яичников и аутизм. В частности, известно, что барьерная дисфункция из-за повреждения слизистой оболочки также возникает при лекарственной терапии некоторыми средствами, такими как пероральные антибиотики или нестероидные противовоспалительные препараты.

В некоторых вариантах реализации ассоциированное состояние представляет собой иммунное нарушение или заболевание, нарушение или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, неврологическое или психиатрическое нарушение или заболевание либо нарушение или заболевание желудочно-кишечного тракта. В частности, иммунное нарушение или заболевание представляет собой внекишечное иммунное нарушение или заболевание. В другом варианте реализации связанное патологическое состояние представляет собой внекишечное иммунное нарушение или заболевание, нарушение или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы либо неврологическое или психиатрическое нарушение или заболевание.

Согласно некоторым вариантам реализации дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) связана с состояниями, возникающими главным образом в органах, отличных от кишечника, называемыми в настоящей заявке «внекишечными состояниями» или «состояниями, опосредованно связанными с кишечным трактом». Следует отметить, что из-за повышенной проницаемости в некоторых областях кишечника при таких состояниях иногда может происходить минимальная сверхактивация или инфильтрация иммунных клеток. Однако такие местные явления, если таковые имеются, протекают бессимптомно и, по мнению специалистов в данной области техники, не являются основной причиной проблем со здоровьем у пациентов с такими состояниями. Явными примерами таких внекишечных состояний для специалистов в данной области техники являются неврологические или психиатрические состояния (такие как болезнь Альцгеймера, расстройства аутистического спектра, шизофрения или депрессия), состояния, связанные с обменом веществ или сердечно-сосудистой системой (такие как преддиабет, сахарный диабет, ожирение, жировая дистрофия печени, цирроз печени, атеросклероз, гипертензия, инсульт или хроническая сердечная недостаточность), или иммунные нарушения, возникающие на системном уровне или

в местах организма, удаленных от кишечника (такие как красная волчанка, рассеянный склероз, иммуносенесценция, ревматоидный артрит, бронхиальная астма, аллергический риноконъюнктивит, атопический дерматит или другая непищевая аллергия/гиперчувствительность). При таких состояниях бактериальные токсины (такие как, без ограничений, липополисахарид (ЛПС) или триметиламин-N-оксид (ТМАО)) могут проникать в системное кровообращение благодаря повышенной проницаемости в кишечнике и вызывать воспаление и оказывать другие вредные для здоровья воздействия на органы, расположенные далеко от кишечника, такие как сердце, головной мозг, легкие или кожа, а также стенки кровеносных сосудов или иммунные клетки в различных местах организма.

10

Специалистам в данной области понятно, что повышенная кишечная проницаемость ассоциирована с внекишечными заболеваниями, описанными в настоящей заявке, такими как: аллергия, артрит и болезни обмена веществ (Bischoff *et al.*, 2014), психиатрические нарушения (Kelly *et al.*, 2015), артериальная гипертензия и атеросклероз (Verharr *et al.*, 2020), сердечно-сосудистые нарушения (Rogler *et al.*, 2014), болезнь Альцгеймера (Jiang *et al.*, 2017), ожирение (Cox *et al.*, 2015), атопический дерматит (Pike *et al.*, 1986), артрит (Tajik *et al.*, 2020) или болезни обмена веществ (Massier *et al.*, 2021).

15

20

В конкретном варианте реализации ассоциированное состояние представляет собой иммунное нарушение или заболевание, в частности, выбранное из группы, состоящей из аутоиммунных заболеваний, таких как, но не ограничиваясь перечисленными: болезнь Крона, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, язвенный колит и аллергическая реакция/гиперчувствительность (такая как пищевая аллергия/гиперчувствительность, бронхиальная астма, атопический дерматит или аллергический риноконъюнктивит). В частности, иммунное нарушение или заболевание представляет собой внекишечное иммунное нарушение или заболевание, такое как внекишечное аутоиммунное заболевание (в частности, рассеянный склероз, красная волчанка или ревматоидный артрит); иммуносенесценция, непищевая аллергия/гиперчувствительность, бронхиальная астма, атопический дерматит или аллергический риноконъюнктивит.

25

30

В конкретном варианте реализации ассоциированное состояние представляет собой нарушение или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, которое, в частности, выбрано из группы, включающей, помимо прочего, инсульт, хроническую сердечную недостаточность, атеросклероз, артериальную гипертензию, инсулинорезистентность (преддиабет), сахарный диабет, ожирение, неалкогольную жировую дистрофию печени и цирроз печени.

35

40

В конкретном варианте реализации ассоциированное состояние представляет собой неврологическое или психиатрическое нарушение или заболевание, которое, в частности, выбрано из группы, включающей, помимо прочего, болезнь Альцгеймера, расстройства аутистического

спектра, шизофрению и депрессию.

5 В некоторых вариантах реализации внекишечное состояние выбрано из группы, состоящей из ожирения, сахарного диабета, инсулинорезистентности, неалкогольной жировой болезни печени, цирроза печени, непищевой аллергии/гиперчувствительности, иммуносенесценции, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, красной волчанки, саркопении, бронхиальной астмы, аллергического риноконъюнктивита, атопического дерматита, болезни Альцгеймера, атеросклероза, артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности, инсульта, расстройств аутистического спектра, шизофрении и депрессии.

10

В конкретном варианте реализации ассоциированное состояние представляет собой желудочно-кишечное нарушение или заболевание, которое, в частности, выбрано из группы, включающей, помимо прочего, воспалительное заболевание кишечника с ранним началом (такое как болезнь Крона, язвенный колит, резервуарит или лимфоцитарный колит), синдром раздраженного кишечника (СРК), синдром «дырявого» кишечника, атрофию ворсинок, некротизирующий энтероколит, ишемическое повреждение кишечника, повреждение эпителия, вызванное нестероидными противовоспалительными препаратами, и целиакию.

15

СРК, который является одним из наиболее распространенных желудочно-кишечных нарушений в странах с высоким уровнем дохода, обычно связан с наличием измененного кишечного барьера. Сообщалось, что у пациентов с СРК изменения в кишечном барьере связаны с симптомами со стороны желудочно-кишечного (ЖК) тракта, такими как диарея и боль в животе. По-видимому, дисфункция барьера является ранним событием при СРК и может способствовать воспалению кишечника низкой степени тяжести и усилению висцерального восприятия. Кроме того, кишечная проницаемость при подтипах СРК, таких как СРК с преобладанием диареи (СРК-Д) и постинфекционный СРК, часто связана с измененной функцией кишечного барьера.

20

25

Кроме того, язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), которые классифицируются как хронические воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), имеют сходные симптомы и приводят к нарушениям пищеварения, включая диарею, боль в животе, ректальное кровотечение и потерю массы тела. Целостность эпителия нарушается у пациентов с ВЗК, которые также демонстрируют повышенную кишечную проницаемость. Потеря кишечного барьера является одним компонентом, который потенциально способствует механизму множественного поражения при патогенезе ВЗК. Кроме того, у многих пациентов с СРК после заживления слизистой оболочки все еще сохраняются симптомы со стороны кишечника, которые связаны с нарушением кишечной проницаемости.

30

35

В другом варианте реализации ассоциированное состояние характеризуется микровоспалением, повреждением сосудов и/или дисбактериозом желудочно-кишечного тракта.

40

В частности, ассоциированное состояние непосредственно ассоциировано с кишечным трактом. В более конкретном варианте реализации изобретения дисфункция кишечного барьера или ассоциированное состояние выбраны из группы, состоящей из синдрома раздраженного кишечника (СРК), воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), кишечной инфекции, язвы желудка, диареи (например, желудочной или инфекционной, такой как рецидивирующая диарея, вызванная *Clostridium difficile*), целиакии, рака, связанного с пищеварительным трактом, колита, язвенного колита, болезни Крона, митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии (МНГИЭ), синдрома «дырявого» кишечника, атрофии ворсинок, некротизирующего энтероколита (НЭК), ишемического повреждения кишечника, хронической энтеропатии, хронического запора и повреждения слизистой оболочки кишечника. В частности, известно, что дисфункция кишечного барьера из-за повреждения слизистой оболочки также возникает при лекарственной терапии некоторыми средствами, такими как пероральные антибиотики или нестероидные противовоспалительные препараты. В частности, ассоциированное состояние представляет собой синдром раздраженного кишечника (СРК). В частности, ассоциированное состояние представляет собой воспалительное заболевание кишечника (ВЗК). В частности, ассоциированное состояние представляет собой рак. Более конкретно, рак пищеварительного тракта выбран из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудка и колоректального рака.

В некоторых вариантах реализации пробиотическая композиция предназначена для применения в лечении по меньшей мере одного симптома, осложнения и/или последствия, выбранного из группы, состоящей из боли в животе, запора, потери массы тела, ректального кровотечения, саркопении, слабости, кахексии, желудочно-кишечного расстройства, спазмов, вздутия живота, метеоризма, рвоты, тошноты, желудочной боли, утомляемости, лихорадки, измененного всасывания конкретных питательных веществ, снижения аппетита, системного воспаления и теплового удара. В частности, симптом, осложнение и/или последствие выбраны из группы, состоящей из потери массы тела, саркопении, слабости, кахексии, утомляемости, лихорадки, системного воспаления и теплового удара.

В одном варианте реализации введение пробиотической композиции приводит к по меньшей мере одному исходу, выбранному из группы, состоящей из:

- снижения кишечной проницаемости, улучшения барьерной функции желудочно-кишечного тракта, улучшения целостности эпителия кишечника или защиты слизистой оболочки кишечника;
- снижения чувствительности кишечника или улучшения кишечной толерантности;
- улучшения моторики кишечника; и
- поддержания баланса микрофлоры кишечника.

Термины «снижение кишечной проницаемости», «улучшение барьерной функции желудочно-

кишечного тракта», «улучшение целостности эпителия кишечника» и «защита слизистой оболочки кишечника» понимаются как адекватная изоляция нежелательного содержимого просвета в кишечнике.

- 5 Термины «снижение чувствительности кишечника» и «улучшение кишечной толерантности» понимаются как нормальный висцеральный ответ на болевые стимулы.

Под термином «улучшение моторики кишечника» понимают регулярные движения желудочно-кишечного тракта и транзит содержимого внутри него.

10

Термин «поддержание баланса микрофлоры кишечника» понимается как сбалансированная кишечная экосистема.

- 15 В другом варианте реализации введение композиции приводит к по меньшей мере одному исходу, выбранному из группы, состоящей из:

- снижения уровня биомаркеров, связанных с кишечной проницаемостью;
- облегчения или смягчения увеличения уровней биомаркеров, связанных с кишечной проницаемостью, вызванного повреждением слизистой оболочки кишечника; и
- снижения прироста уровней белка плотных контактов в сыворотке, вызванного повреждением слизистой оболочки кишечника.

20

Биомаркеры могут включать циркулирующие индикаторы, такие как кишечная фракция белка, связывающего жирные кислоты (I-FABP, также известный как FABP-2), зонулин, клаудин 3 (или другие белки плотных контактов), цитруллин, липополисахарид (ЛПС) или бактериальная ДНК; индикаторы мочи, такие как олигосахариды (например, лактулоза, маннит, сукралоза, целлобиоза, а также их соотношения, такие как соотношение лактулоза/маннит), полиэтиленгликоли (ПЭГ), хром-этилендиаминтетрауксусная кислота (Сг-ЭДТА); или фекальные маркеры, включая калпротектин, зонулин, альфа ( $\alpha$ )-1-антитрипсин (ААТ), диаминооксидазу (DAO) или липокалин-2 (LCN-2).

25

30

#### *Применение у младенцев*

Все больше доказательств позволяют связать факторы, нарушающие микробиоту в раннем возрасте, с множественными нарушениями, включая воспалительные заболевания, такие как аллергия. Дети с ранним воздействием (первые два года жизни) антибиотиков имеют повышенный риск аллергического ринита, атопического дерматита, бронхиальной астмы в детском возрасте, целиакии и ожирения, помимо других состояний. Кроме того, дети, рожденные с помощью кесарева сечения, более склонны к аллергическому риноконъюнктивиту и бронхиальной астме, чем младенцы, рожденные вагинально, и снижение количества бифидобактерий

35

напрямую связано с атопическим дерматитом и аллергической бронхиальной астмой. Наконец, младенцы на искусственном вскармливании имеют более высокую частоту атопического дерматита по сравнению с младенцами, находящимися на грудном вскармливании. Эти результаты согласуются с тем фактом, что кишечная микробиота играет ключевую роль в формировании структуры кишечного барьера, а проницаемость и изменения кишечной микробиоты связаны с повышенной кишечной проницаемостью при нескольких нарушениях.

Действительно, аномальная кишечная проницаемость связана с аллергией. Например, кишечная проницаемость аномально повышена у 80% детей с пищевой аллергией и пищеварительными проявлениями. Дополнительно, в патогенез атопического дерматита вовлечено нарушение кишечного барьера. Аналогичным образом, младенцы с ранними аллергическими симптомами имеют повышенную кишечную проницаемость для белков по сравнению с неаллергическими младенцами.

Таким образом, пробиотическая композиция, описанная в настоящей заявке, продуцирует молекулы (polyP), обладающие способностью восстанавливать кишечный барьер, что является терапевтическим вариантом для лечения аллергии. Младенцы, рожденные с помощью кесарева сечения, младенцы на искусственном вскармливании или которым вводят антибиотики и недоношенные дети также могут получить пользу от этого лечения пробиотиками в качестве профилактического средства, которое может уменьшить риск возникновения аллергии.

Соответственно, в одном из вариантов реализации субъект представляет собой младенца. В частности, младенец является недоношенным младенцем, ослабленным младенцем, младенцем, рожденным с низкой массой тела при рождении, младенцем с задержкой внутриутробного развития, младенцем, рожденным с помощью кесарева сечения, младенцем, которому вводят антибиотики, младенцем на искусственном вскармливании или младенцем на грудном вскармливании. Более конкретно, младенец является недоношенным младенцем.

Более конкретно, дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с преждевременными родами, родами с помощью кесарева сечения, искусственным вскармливанием, низкой массой тела при рождении и/или введением антибиотиков. В конкретном варианте реализации изобретения дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с преждевременными родами. В конкретном варианте реализации изобретения дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с рождением с помощью кесарева сечения. В конкретном варианте реализации дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с искусственным вскармливанием. В конкретном варианте реализации дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с введением антибиотиков.

Дополнительно, пробиотическая композиция согласно настоящему изобретению не только пригодна для лечения этих состояний и восстановления аномальной микробиоты младенца, но также пригодна для предотвращения этих состояний в будущем посредством усиления здоровой микробиоты младенца. Следовательно, в конкретном варианте реализации пробиотическая композиция предназначена для применения в предотвращении состояний, связанных с младенцами.

В некоторых вариантах реализации ассоциированное состояние, связанное с младенцами, выбрано из группы, состоящей из: болезни Крона, рассеянного склероза, красной волчанки, ревматоидного артрита, язвенного колита, ожирения, инсулинорезистентности (преддиабета), сахарного диабета, синдрома раздраженного кишечника, целиакии, воспалительного заболевания кишечника с ранним возникновением, аллергической реакции/гиперчувствительности, такой как, без ограничений, пищевая аллергия/гиперчувствительность, бронхиальной астмы, атопического дерматита или аллергического риноконъюнктивита, неалкогольной жировой болезни печени, расстройств аутистического спектра, шизофрении и депрессии.

В некоторых вариантах реализации ассоциированное состояние, связанное с младенцами, выбрано из группы, состоящей из: красной волчанки, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, не пищевой аллергии/гиперчувствительности, бронхиальной астмы, атопического дерматита, аллергического риноконъюнктивита, инсулинорезистентности (преддиабета), сахарного диабета, ожирения, неалкогольной жировой болезни печени, расстройств аутистического спектра, шизофрении и депрессии.

В частности, ассоциированное состояние, связанное с младенцами, выбрано из группы, состоящей из расстройств аутистического спектра, не пищевой аллергии/гиперчувствительности, бронхиальной астмы, атопического дерматита, аллергического риноконъюнктивита, инсулинорезистентности (преддиабета), сахарного диабета, жировой дистрофии печени и ожирения.

В более конкретном варианте реализации ассоциированное состояние связано с преждевременными родами и представляет собой аллергию. В другом варианте реализации ассоциированное состояние связано с младенцами, которым вводят антибиотики, и выбрано из группы, включающей, без ограничения, аллергический риноконъюнктивит, атопический дерматит, бронхиальную астму в детском возрасте и ожирение. В другом варианте реализации ассоциированное состояние связано с младенцами, рожденными с помощью кесарева сечения, и выбрано из группы, состоящей из аллергического риноконъюнктивита, атопического дерматита и бронхиальной астмы. В другом варианте реализации ассоциированное состояние связано с младенцами на искусственном вскармливании и представляет собой атопический дерматит.

### *Применение у спортсменов*

Симптомы желудочно-кишечного расстройства, такие как диарея, спазмы, рвота, тошнота и  
5 боль в желудке, распространены среди спортсменов во время высокоинтенсивных тренировок  
и соревнований. Стрессовое воздействие тепла и окислительное повреждение во время фи-  
зических нагрузок вызывают нарушение белков плотных контактов клеток эпителия кишеч-  
ника, что приводит к повышенной проницаемости для эндотоксинов из просвета кишечника.  
Длительная и напряженная физическая нагрузка связана с повышением внутренней темпера-  
10 туры тела и кишечной проницаемости. Таким образом, амплитуда гипертермии, вызванной  
физической нагрузкой, напрямую связана с увеличением кишечной проницаемости, что может  
запускать системное воспаление, которое может влиять на физическую работоспособность и,  
в тяжелых случаях, индуцировать тепловой удар.

15 Введение пробиотической композиции, описанной в настоящей заявке, может противодей-  
ствовать возникновению «дырявого» кишечника под действием физической нагрузки, улучшая  
целостность функции кишечного барьера и уменьшая желудочно-кишечные нарушения у  
спортсменов, что может улучшать их работоспособность во время физической нагрузки при  
высоких температурах.

20 Соответственно, в конкретном варианте реализации субъект является спортсменом. В кон-  
кретном варианте реализации изобретения дисфункция кишечного барьера (например, повы-  
шенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны с физической актив-  
ностью высокой интенсивности.

25 В некоторых вариантах реализации пробиотическая композиция согласно настоящему изоб-  
ретению предназначена для применения в способе лечения дисфункции кишечного барьера  
(например, повышенной кишечной проницаемости) и ассоциированного с ней состояния или  
симптомов, осложнений и/или последствий, выбранных из группы, состоящей из: диареи,  
30 спазмов, рвоты, тошноты, боли в желудке, измененного всасывания конкретных питательных  
веществ, системного воспаления (которое может влиять на физическую работоспособность)  
и, в тяжелых случаях, теплового удара.

### *Применение у пожилых людей*

35 Процесс старения связан с естественным изменением состава микробиоты кишечника, хро-  
ническим воспалением низкой степени тяжести и увеличением проницаемости кишечника —  
явлениями, которые все связаны между собой. Изменения микробиоты кишечника включают



повышенную проницаемость эпителия кишечника, следующее далее проникновение кишечных бактерий и их метаболитов и последующее воспаление. Кроме того, местное воспаление также может непосредственно модулироваться посредством изменений в микробиоте.

- 5 Соответственно, в конкретном варианте реализации субъект представляет собой пожилого или ослабленного человека. В конкретном варианте реализации дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние связаны со старением.
- 10 В частности, дисфункция кишечного барьера (например, повышенная кишечная проницаемость) и связанное с ней состояние, связанные со старением, выбраны из группы, состоящей из запора, диареи, саркопении, слабости, рецидивирующей диареи, вызванной *Clostridium difficile*, болезни Альцгеймера, атеросклероза, инсульта, рака и кахексии, и, более конкретно, саркопении, слабости, болезни Альцгеймера, атеросклероза, хронической сердечной недостаточности, иммуносенесценции и инсульта.
- 15

#### **Формы продукта, содержащие композиции**

- Варианты реализации в настоящем разделе также относятся ко всем композициям согласно настоящему изобретению, т. е. к пробиотической композиции, содержащей *B. longum* СЕСТ 7894 или полученный из него бактериальный штамм, композиции, содержащей ОЧМ, и композициям, содержащим и то, и другое.
- 20

#### *Лекарственные формы*

- 25 В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящей заявке, находятся в лекарственной (фармацевтической) форме, такой как капсула, порошок, суспензия, таблетка, крем или мазь для местного применения.
- 30 Термин «лекарственная форма» понимают в самом широком значении, включающем любую композицию, которая содержит активный ингредиент, в данном случае штамм или композиции, описанные в настоящей заявке, вместе с по меньшей мере фармацевтически приемлемым (также называемым нутрицевтически или ветеринарно приемлемым) вспомогательным веществом. Термин «лекарственная форма» не ограничен лекарственными средствами, но
- 35 включает, например, фармацевтические композиции, нутрицевтические композиции или ветеринарные композиции. Лекарственная форма может иметь различные наименования в зависимости от пути одобрения продукта регулирующими органами, а также в зависимости от страны.

Нутрицевтическая композиция также может быть названа, например, пищевой добавкой или биологически активной добавкой. Под нутрицевтической композицией понимают препарат или продукт, предназначенный для дополнения диеты, полученный из компонентов, обычно применяемых в пищевых продуктах, которые обеспечивают питательными веществами или полезными ингредиентами, которые обычно не потребляются с компонентами нормальной диеты или не могут потребляться в достаточных количествах. Нутрицевтические композиции обычно продают «безрецептурно», т. е. без назначения врачом.

В некоторых вариантах реализации композиции составлены в виде лекарственной формы, в которой штамм является единственным активным агентом или смешан с одним или более другими активными агентами и/или смешан с фармацевтически/нутрицевтически/ветеринарно приемлемыми вспомогательными веществами. В частности, дополнительный активный агент или агенты представляют собой другие пробиотические бактерии, которые не являются антагонистическими по отношению к штамму, образующему композицию согласно настоящему изобретению. В зависимости от состава штамм может быть добавлен в виде очищенных бактерий, в виде бактериальной культуры, как часть бактериальной культуры, в виде бактериальной культуры, которая была подвергнута последующей обработке, и отдельно либо вместе с подходящими носителями или ингредиентами. Примерами других активных ингредиентов, добавляемых к композициям, являются пребиотики, такие как фруктоолигосахариды (например, инулин), галактоолигосахариды, ксилоолигосахариды, арабиноксиланолигосахариды, пектины, бета-глюканы, олигосахариды грудного молока (например, лакто-N-тетроза) или частично гидролизованная гуаровая камедь.

Термин «фармацевтически/нутрицевтически/ветеринарно приемлемый» известен в данной области техники и включает вспомогательные вещества, соединения, материалы, композиции, носители, среды и/или лекарственные формы, которые по результатам тщательной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями субъекта (например, человека или животного), не вызывая избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, и соответствуют приемлемому соотношению польза/риск. Каждый носитель, вспомогательное вещество и т. д. также должны быть «приемлемыми» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава. Подходящие носители, вспомогательные вещества и т. д. можно найти в стандартной фармацевтической/нутрицевтической/ветеринарной литературе.

Таким образом, некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к фармацевтической композиции, нутрицевтической композиции и ветеринарной композиции, содержащим композицию, описанную в настоящей заявке, вместе с по меньшей мере фармацевтически/нутрицевтически/ветеринарно приемлемым вспомогательным веществом, описанным выше.

Неограничивающие примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически/нутрицевтически/ветеринарно приемлемых вспомогательных веществ или носителей, включают: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметил-  
 5 целлюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао-бобов и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буфер-  
 10 ные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; или фосфатные буферные растворы.

Вспомогательные вещества выбирают, без ограничения, из группы, включающей: наполнители/разбавители/объемообразующие агенты, связующие вещества, антиадгезивы, разрыхлители, покрытия, антислеживающие агенты, антиоксиданты, смазывающие вещества, под-  
 15 сластители, вкусоароматические добавки, красители или тензиды.

Наполнители выбраны, без ограничения, из группы, включающей: инулин, олигофруктозу, пектин, модифицированные пектины, микрокристаллическую целлюлозу, лактозу, крахмал, мальтодекстрин, сахарозу, глюкозу, фруктозу, маннит, ксилит, некристаллизующийся сорбит, карбонат кальция, дикальцийфосфат, другие инертные неорганические и органические фармакологически приемлемые наполнители и смеси данных субстанций. В случае лекарственной формы суспензии для перорального применения наполнители или разбавители выбраны из  
 20 группы, включающей: растительное масло, олеиновую кислоту, олеиловый спирт, жидкий полиэтиленгликоль, другие фармакологически приемлемые инертные жидкости или смеси данных субстанций.

Связующие вещества применяют в твердых лекарственных формах, например, чтобы удерживать вместе ингредиенты в таблетке, чтобы быть уверенным в том, что таблетки и гранулы можно получать с применением необходимой механической силы, и чтобы придать объем  
 30 таблеткам с низкой дозой активного агента. Связующие вещества в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, представляют собой: лактозу, сахарозу, кукурузный (маисовый) крахмал, модифицированные крахмалы, микрокристаллическую целлюлозу, модифицированную целлюлозу (например, гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) и гидроксипропилцеллюлозу), другие водорастворимые эфиры целлюлозы, поливинилпирролидон (ПВП), также известный как повидон, полиэтиленгликоль, сорбит, мальтит, ксилит и гидрофосфат кальция; другие подходящие фармакологически приемлемые связующие вещества или смеси данных  
 35 субстанций.

Антиадгезивы применяют для уменьшения адгезии между порошком (гранулами) и поверхностями пуансонов и, таким образом, предотвращения прилипания к пуансонам таблеточного пресса. Их также применяют, чтобы помочь защитить таблетки от слипания. Наиболее часто применяется стеарат магния.

5

В качестве разрыхлителей и суперразрыхлителей в твердых лекарственных формах, таких как таблетки и капсулы, применяют, без ограничения, следующие вещества: перекрестно сшитый поливинилпирролидон, крахмалгликолят натрия, карбоксиметилцеллюлозу натрия, карбоксиметилцеллюлозу кальция и формальдегид-казеин, другой подходящий фармакологически приемлемый разрыхлитель и суперразрыхлитель или их смеси.

10

Покрытия в случае твердых лекарственных форм, таких как таблетки и гранулы для наполнения капсул, защищают ингредиенты от порчи под воздействием влаги в воздухе, позволяют легче проглотить большие таблетки с неприятным вкусом и/или, в случае кишечнорастворимых покрытий, обеспечивают интактное прохождение через среду желудочного сока с повышенной кислотностью (рН приблизительно 1) и позволяют осуществить высвобождение в двенадцатиперстной кишке или подвздошной кишке (тонком кишечнике). Для большинства покрытых оболочкой таблеток применяют пленочное покрытие эфиром целлюлозы — гидроксипропилметилцеллюлозой (ГПМЦ). Иногда применяют другие материалы покрытий, например, синтетические полимеры и сополимеры, такие как поливинилацетатфталат (ПВАФ); сополимеры метилакрилата/метакриловой кислоты; сополимеры метилметакрилата/метакриловой кислоты; шеллак, кукурузный белок зеин или другие полисахариды; воски или воскоподобные субстанции, такие как пчелиный воск, стеариновая кислота; высшие жирные спирты, такие как цетиловый или стеариловый спирт; твердый парафин; глицерилмоностеарат; глицерилдистеарат или их комбинации. Капсулы покрывают желатином или гидроксипропилметилцеллюлозой.

15

20

25

Кишечнорастворимые покрытия контролируют скорость высвобождения лекарственного средства и определяют, в каком отделе пищеварительного тракта будет высвобождено лекарственное средство. Материалы, применяемые для получения кишечнорастворимых покрытий, включают жирные кислоты, воски, шеллак, пластики, растительные волокна и их смеси, также в комбинации с другими упомянутыми выше покрытиями.

30

Антислеживающий агент представляет собой вспомогательное вещество, которое добавляют в порошок или гранулированные материалы для предотвращения образования комков (слеживаемости) и для упрощения упаковки, транспортировки и потребления. В качестве антислеживающих агентов в твердых лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы или порошки, применяют следующие агенты: стеарат магния, коллоидный диоксид кремния, тальк, другие фармакологически приемлемые антислеживающие агенты или их смеси.

35

40

Смазывающие вещества применяют в твердых лекарственных формах, в частности, в таблетках и капсулах, для предотвращения слипания ингредиентов друг с другом и предотвращения прилипания к пуансонам таблеточного пресса или заполняющим капсулы устройствам, а также в твердых капсулах. В качестве смазывающих веществ в таблетках или твердых желатиновых капсулах наиболее часто применяют такие смазывающие вещества, как тальк или диоксид кремния и жиры, например, растительный стеарин, стеарат магния или стеариновую кислоту, и их смеси.

Подсластители добавляют, чтобы улучшить вкус ингредиентов, особенно в твердых лекарственных формах, например, жевательных таблетках, а также в жидких лекарственных формах, таких как сироп от кашля. Подсластители могут быть выбраны из искусственных, природных или синтетических либо полусинтетических подсластителей; неограничивающие примеры подсластителей представляют собой аспартам, ацесульфам калия, цикламат, сукралозу, сахарин, сахара или любую их смесь.

Вкусоароматические добавки можно применять для маскировки активных ингредиентов с неприятным вкусом в любой лекарственной форме. Вкусоароматические добавки могут быть природными (например, фруктовый экстракт) или искусственными. Например, для улучшения вкуса (1) горького продукта: можно применять мяту, вишню или анис; (2) соленого продукта: можно применять персик или абрикос или корень солодки; (3) кислого продукта: малину; и (4) очень сладкого продукта: ваниль.

Кроме вспомогательных веществ из класса вспомогательных веществ, состав согласно настоящему изобретению может содержать другие фармакологически активные или пищевые субстанции, включая, но не ограничиваясь перечисленными: витамины, такие как витамин D (кальциферол) в фармацевтически приемлемой химической форме, в форме соли или производных; минеральные вещества в виде фармацевтически и нутрицевтически приемлемой химической формы; и L-аминокислоты.

В каждом случае форма выпуска композиции будет адаптирована к типу введения, применяемому способами, известными специалисту в данной области техники. Таким образом, композиция может быть представлена в форме растворов или любой другой форме для клинически допустимого введения и в терапевтически эффективном количестве. Таким образом, композиция может быть составлена в виде твердых, полутвердых или жидких препаратов, таких как таблетки, капсулы, порошки (например, полученные в результате лиофилизации (сублимационной сушки) или воздушной сушки), гранулы, растворы, суппозитории, гели или микросферы. В конкретном варианте реализации композиция составлена для введения в жидкой форме или в твердой форме.

В конкретном варианте реализации композиция представлена в твердой форме, такой как таблетки, таблетки для рассасывания, леденцы, жевательные таблетки, жевательные резинки, капсулы, пакеты-саше, порошки, гранулы, частицы с покрытием или таблетки с покрытием, таблетки, пилюли, троше, кишечнорастворимые таблетки и капсулы, диспергируемые полоски и пленки. Более конкретно, композиция представлена в форме капсулы, порошка, таблетки, пилюли, таблеток для рассасывания, пакетов-саше или гранул. В одном из вариантов реализации композиция представлена в форме порошка, который приводят в контакт с водной фазой с образованием раствора. Водная фаза может содержать волокна, такие как инулин. Два компонента (порошок и водная фаза) могут находиться в отдельных отсеках/контейнерах, и указанные два компонента смешивают для восстановления *in situ*.

В одном из вариантов реализации композиция представлена в форме желатиновых капсул. В конкретном варианте реализации указанная композиция имеет форму капсулы из растительного сырья и содержит гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ).

В другом варианте реализации композиция находится в жидкой форме, такой как растворы для перорального введения, капли, суспензии (например, масляные), эмульсии и сиропы. В частности, композиция представлена в форме капель. Более конкретно, композиция представлена в форме масляных капель.

Согласно некоторым вариантам реализации композиция представлена в форме масляной суспензии, которую можно вводить отдельно или в смеси с жидкостью. Масляная суспензия содержит по меньшей мере одно пищевое масло, такое как оливковое масло, кукурузное масло, соевое масло, льняное масло, подсолнечное масло или рисовое масло. Масло присутствует в количестве по меньшей мере 70% масс./масс. В конкретном варианте реализации масляная суспензия также содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество, которое представляет собой эмульгатор, стабилизатор или антислеживающий агент, в количестве 0,1–15% масс./масс. Подходящие агенты представляют собой диоксид кремния, силикагель, коллоидный диоксид кремния, осажденный диоксид кремния, тальк, силикат магния, лецитин, пектин, крахмал, модифицированные крахмалы, конжаковую камедь, ксантановую камедь, геллановую камедь, каррагинан, альгинат натрия, моно- или диглицериды жирных кислот, таких как глицерилмоностеарат или глицерилмоноолеат, и сложные эфиры лимонной кислоты и моно- или диглицеридов.

В частности, композиция представлена в форме пищевой добавки для младенцев в форме масляной суспензии, в частности, в форме масляных капель. В конкретном варианте реализации масляная суспензия содержит подсолнечное масло и коллоидный диоксид кремния, в частности, в количестве 1% по массе, и бактериальные клетки. Согласно другому варианту

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

5 В частности, например, капсула, пакет-саше или стик-пакет, таблетка или пилюля имеют массу от около 150 мг до около 8000 мг. Более конкретно, капсула имеет массу от около 200 мг до около 600 мг. Более конкретно, пакет-саше или стик-пакет имеют массу от около 1,5 г до около 6 г. Более конкретно, таблетка или пилюля имеют массу от около 400 мг до около 1200 мг.

10

В частности, например, распыляемые масляные капли (например, капли с подсолнечным маслом) имеют объем от примерно 3 мл до примерно 50 мл. Более конкретно, спрей имеет объем от около 5 мл до около 50 мл. Более конкретно, масляные капли имеют объем от примерно 3 мл до примерно 30 мл.

15

Что касается получения составов согласно настоящему изобретению, оно находится в рамках компетенции обычного специалиста в данной области техники и будет зависеть от готовой лекарственной формы. Например, и без ограничения, когда готовая лекарственная форма представляет собой твердую форму для перорального применения, такую как таблетки, капсулы, порошок, гранулы, суспензия для перорального применения и т. д., процесс получения твердых лекарственных форм состава включает гомогенизацию: (1) активного (-ых) ингредиента (-ов), включая пробиотические бактерии, подвергнутые последующей обработке, согласно настоящему изобретению в эффективном количестве; (2) с одним или более вспомогательными веществами с образованием гомогенной смеси, в которую, например, в соответствии с требованиями, добавляют смазывающее вещество, такое как стеарат магния или другие смазывающие вещества, с получением готовой лекарственной формы порошка. Таким гомогенным порошком наполняют обычные желатиновые капсулы или, в качестве альтернативы, устойчивые к действию желудочного сока капсулы. В случае таблеток, их получают путем прямого прессования или гранулирования. В первом случае получают гомогенную смесь 25 активных ингредиентов и подходящих вспомогательных веществ, таких как безводная лактоза, некристаллизующийся сорбит и др. Во втором случае таблетки получают путем обработки смеси в гранулированной форме. Гранулы получают с помощью процесса гранулирования активных ингредиентов состава с подходящими наполнителями, связующими веществами, разрыхлителями и небольшим количеством очищенной воды. Полученные таким образом гранулы просеивают и сушат до достижения содержания воды < 1% масс./масс.

35

Что касается процесса получения жидких лекарственных форм (например, суспензии для перорального применения), он включает гомогенизацию активного (-ых) ингредиента (-ов) состава, включая пробиотические бактерии, подвергнутые последующей обработке, согласно 40 настоящему изобретению в эффективном количестве, в инертном жидком разбавителе

(наполнителе), таком как различные растительные масла, такие как подсолнечное, соевое или оливковое масло; олеиновая кислота; олеиловый спирт; жидкие полиэтиленгликоли, такие как ПЭГ 200, ПЭГ 400 или ПЭГ 600; или другие инертные фармакологически приемлемые жидкости. Данный процесс дополнительно включает обработку гомогенной смеси с помощью одного или более процессов, выбранных из группы, включающей: (1) стабилизацию состава путем добавления стабилизаторов суспензии, таких как пчелиный воск, коллоидный диоксид кремния и т. д., и гомогенизации; (2) подслащивание состава путем добавления подсластителя и гомогенизации; (3) ароматизирование состава путем добавления вкусоароматической добавки и гомогенизации.

10

#### *Пищевые продукты/пищевые композиции*

В некоторых вариантах реализации указанная композиция представлена в форме пищевого продукта или съедобной композиции, такой как детские смеси или продукты питания, ферментированные продукты на основе молока (например, йогурт, сыр, творог), ферментированные продукты на основе овощей, хлеб, батончики (например, энергетические батончики), спреды, печенье, сиропы, напитки, заправки, соусы, начинки, супы, мороженое, масла, заправки или кондитерские изделия.

15

20 Термин «пищевой продукт или съедобная композиция» в данной заявке используют в наиболее широком значении, включая любой тип продукта, в любой форме выпуска, который может принять внутрь животное, в частности, человек, но исключая фармацевтические, нутрицевтические и ветеринарные продукты.

25

В частности, композиция включена в детскую смесь или пищу. В частности, композиция включена в напиток.

Примерами других пищевых продуктов являются мясные продукты, шоколадные пасты, наполнители и глазури, шоколад, кондитерское изделие, выпечка, соусы и супы, фруктовые соки и забеливатели для кофе. Пищевой продукт, в частности, содержит материал-носитель, такой как овсяная каша, молочнокислые ферментированные пищевые продукты, резистентный крахмал, пищевые волокна, углеводы, белки и гликозилированные белки. В конкретном варианте реализации штамм согласно настоящему изобретению инкапсулируют или покрывают оболочкой. В частности, молоко может быть животного или растительного происхождения.

30

35

В одном из вариантов реализации пищевой продукт или съедобная композиция представляет собой пищевую композицию, обычно применяемую в области детского питания, но также применяемую в группах пожилых и ослабленных людей.

40



В конкретном варианте реализации композиция согласно настоящему изобретению представляет собой детскую смесь. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композиции представляют собой, например, смесь для детского питания первой ступени, детское питание, содержащую злаки композицию для младенцев, смесь для детского питания второй ступени или молочную смесь третьей ступени, или обогатитель. Композиция также может применяться до и/или во время периода отнятия от груди.

В одном из вариантов реализации пищевая композиция может представлять собой полную пищевую композицию или добавку для стареющих, пожилых или ослабленных людей. В некоторых вариантах реализации композиция согласно настоящему изобретению представляет собой, например, регидратационный раствор или диетическое поддерживающее средство или добавку для пожилых индивидуумов, спортсменов или индивидуумов с ослабленным иммунитетом.

Композиция согласно настоящему изобретению может представлять собой полную композицию, обеспечивающую 100% или большинство потребностей в питании целевых популяций (например, с точки зрения потребностей в калориях; или с точки зрения потребностей в витаминах или минеральных веществах, с точки зрения потребностей в белках, липидах или углеводах). В качестве альтернативы, композиция согласно настоящему изобретению может представлять собой добавку, которую следует употреблять в дополнение к обычному рациону. В этом случае, однако, дозировка и общее потребление композиции адаптированы для обеспечения заявленной пользы от эмоциональной обработке (например, пропорционально калорийной нагрузке и потребностям субъекта в калориях).

Применение композиции согласно настоящему изобретению может охватывать случаи, когда композиция представляет собой добавку, предпочтительно представленную в форме унифицированных доз (например, таблетка, капсула, пакет-саше с порошком и т. д.). Согласно одному из вариантов реализации указанная композиция представляет собой добавку к кормлению грудью у человека. Дозированная лекарственная форма может содержать приемлемые носители, например, фосфатно-солевой буферный раствор, смеси этанола в воде, воду и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, а также различные смачивающие агенты или вспомогательные вещества. Примеры носителей и вспомогательных веществ описаны в настоящей заявке выше.

Композиция может быть в форме порошковой композиции, например, предназначенной для разбавления водой или смешивания с молоком (например, грудным молоком человека) или для проглатывания в виде порошка. В одном из вариантов реализации композиция согласно настоящему изобретению находится в жидкой форме; либо готова к употреблению, либо подлежит разбавлению в воде или смешиванию с молоком (например, грудным молоком человека).

Композиция может быть в форме готовой к употреблению жидкости или может быть жидким концентратом или порошкообразной смесью, которая может быть восстановлена до готовой к употреблению жидкости путем добавления определенного количества воды.

5

#### *Введение*

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения композицию вводят в виде однократной дозы или многократной дозы с определенными временными интервалами, например, можно вводить ежедневно в течение определенного количества дней или в соответствии с определенной схемой введения. В частности, композицию вводят в течение периода от 10 дней до 90 дней. Более конкретно, ее вводят в течение периода от 10 дней до 60 дней или от 15 до 45 дней, более конкретно, в течение 30 дней.

15 Согласно некоторым вариантам реализации композицию вводят от одного раза каждые три дня до трех раз в сутки, в частности, один раз в сутки.

В некоторых вариантах реализации композицию можно вводить перорально, ректально, парентерально, местно, в глаз, в ухо, в нос, интравагинально или в буккальную полость для обеспечения местного и/или системного действия. В частности, композицию вводят перорально. В одном из вариантов реализации единичную дозу композиций согласно настоящему изобретению вводят перорально в любой форме, описанной выше, такой как таблетка, капсула или пилюля, или в виде порошка или гранул, или в виде геля, пасты, раствора, суспензии, эмульсии, сиропа, болюса, электуария или кашицы, в водной или неводной жидкости.

25

В одном из вариантов реализации указанные композиции вводят энтерально. Способы энтерального введения включают кормление через назогастральный зонд или еюнальный зонд, введение перорально, сублингвально и ректально. Таким образом, дозированную лекарственную форму композиций также можно вводить с помощью ректального суппозитория, аэрозольной трубки, назогастрального зонда или прямой инфузии в желудочно-кишечный тракт или желудок у пожилых или ослабленных людей.

В других вариантах реализации композицию можно вводить путем назальной ингаляции, перорального распыления или назогастральным путем. Согласно другим вариантам реализации композицию можно вводить в форме капель для перорального приема.

35

#### **ПРИМЕРЫ**

**ПРИМЕР 1. Способность к биосинтезу полифосфата у *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894)**

40

## 1.1 Материалы и методы

### 1.1.1 Штаммы и условия культивирования

5 Способность к биосинтезу polyP оценивали у 19 штаммов (ТАБЛИЦА 1). Штаммы включали *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894), другие штаммы Bifidobacteria и другие штаммы, принадлежащие к группе *Lactobacillus* и роду *Saccharomyces*. Штаммы включали об-  
наруженные у младенцев и взрослых штаммы бактерий, обитающих в организме человека (HRB), и штаммы, не относящиеся к HRB, из коллекции AB-Biotics S.L. или являющиеся ком-  
10 мерчески доступными продуктами.

Анализ включал следующие контрольные штаммы. *L. plantarum* WCFS1 (Alcántara *et al.* 2014) и *L. paracasei* JCM 1163 (Saiki *et al.* 2016), которые, как известно, продуцируют polyP; *B. breve* JCM 1273, *B. adolescentis* JCM 1275 и *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707, которые, как из-  
15 вестно, способны удалять фосфат (Anand *et al.* 2019); и *B. scardovii* DSMZ 13734 (BAA-773), который, как известно, содержит ген *ppk* (Qian *et al.* 2011).

Штаммы выделяли из коммерческих продуктов, если указано, путем инокуляции на соответ-  
ствующие чашки с агаром. После культивирования отдельные колонии выращивали для хра-  
20 нения в виде аликвот в глицерине, и идентичность вида (ID) подтверждали с помощью ПЦР-  
амплификации и секвенирования по Сэнгеру гена 16S рРНК. Контрольные штаммы были при-  
обретены из коллекций культур, и была подтверждена идентичность видов.

Бифидобактериальные штаммы предварительно культивировали в агаре Man, Rogosa и  
25 Sharpe (MRS) с 0,05% цистеина (MRScys) при 37 °C и в анаэробных условиях. Штаммы лакто-  
бактерий предварительно культивировали в MRS при 30 °C и в аэробных условиях. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-754 предварительно культивировали в среде YPD при 37 °C  
в аэробных условиях при встряхивании.

30 Для количественного анализа продукции polyP применяли среду для индукции малатдегидро-  
геназы (MEI), содержащую (на литр, масс./об.) 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона,  
0,4% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,005% MnSO<sub>4</sub>, 1 мл Tween 80, 0,05% цисте-  
ина и 0,5% глюкозы (Alcántara *et al.* 2014). Штаммы, неспособные расти в MEI, были выращены  
в MRScys. Культуры инокулировали при ОП (595 нм) 0,1, и каждый штамм культивировали в  
35 условиях, указанных выше. Рост отслеживали путем измерения ОП в течение 16 ч.

ТАБЛИЦА 1. Характеристики штаммов. HRB — обитающие в организме человека бифидобак-  
терии; nHRB — nHRB; CECT— Испанская коллекция типовых культур; DSMZ — Немецкая кол-  
лекция микроорганизмов и клеточных культур; ATCC — Американская коллекция типовых

культур. Для штаммов, классифицированных как контрольные, имеются опубликованные доказательства метаболизма polyP.

Штамм	Происхождение	HRB/nHRB	Классификация	Источник
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> KABP-042 (CECT 7894)	Кишечник младенца, находящегося на грудном вскармливании	HRB у младенцев и взрослых	Пробиотик	Коллекция AB-Biotics
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> 36524™	Кишечник взрослого человека	HRB у младенцев и взрослых	Пробиотик	Коммерческий продукт
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707	Кишечник взрослого человека	HRB у младенцев и взрослых	Контроль	CECT
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> BB536	Кишечник младенца, находящегося на грудном вскармливании	HRB у младенцев и взрослых	Пробиотик	Коммерческий продукт
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ABP123	Кишечник младенца, находящегося на грудном вскармливании	HRB у младенцев и взрослых	Пробиотик	Коллекция AB-Biotics
<i>B. bifidum</i> ABP671	Кишечник младенца, находящегося на грудном вскармливании	HRB у младенцев	Пробиотик	Коллекция AB-Biotics
<i>B. breve</i> ABP734	Грудное молоко	HRB у младенцев	Пробиотик	Коллекция AB-Biotics
<i>B. breve</i> M16-V	Кишечник младенца	HRB у младенцев	Пробиотик	Коммерческий продукт

<i>B. breve</i> JCM 1273	Кишечник младенца	HRB у младенцев	Контроль	DSMZ
<i>B. adolescentis</i> JCM 1275	Кишечник взрослого человека	HRB у взрослых	Контроль	DSMZ
<i>B. animalis</i> BB-12	Молочная культура	nHRB	Пробиотик	Коммерческий продукт
<i>B. scardovii</i> BAA-773	Кровь человека	nHRB	Патоген (контроль)	DSMZ
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> JCM 1163	Пиво	Н/П	Контроль	DSMZ
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> WCFS1	Слюна человека	Н/П	Контроль	ATCC
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299v	Кислое тесто	Н/П	Пробиотик	Коммерческий продукт
<i>Levilactobacillus brevis</i> KABP-052 (CECT 7480)	Слюна человека	Н/П	Пробиотик	Коллекция AB-Biotics
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG	Кишечник взрослого человека	Н/П	Пробиотик	ATCC
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Получено из ATCC 55730	Н/П	Пробиотик	Коммерческий продукт
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-754	Тропические фрукты	Н/П	Пробиотик	Коммерческий продукт

### 1.1.2 Количественное определение полифосфата (polyP)

PolyP выделяли из клеток благодаря его устойчивости к гидролизу гипохлоритом натрия, как описано ранее (Alcántara *et al.* 2014). Клетки собирали центрифугированием и лизировали в 1 мл 5% гипохлорита натрия при осторожном перемешивании в течение 45 мин при комнатной температуре. Нерастворимый материал осаждали путем центрифугирования при 16 000 г в течение 5 мин при 4 °С и дважды промывали 1 мл 1,5 М NaCl плюс 1 мМ ЭДТА при 16 000 г в течение 5 мин при 4 °С. PolyP экстрагировали из осадка с помощью двух последовательных промывок 1 мл воды и стадии центрифугирования при 16 000 г в течение 5 мин при 4 °С между ними. PolyP в объединенных водных экстрактах осаждали добавлением 0,1 М NaCl и 1 объема этанола с последующей инкубацией на льду в течение 1 ч. После центрифугирования при 16 000 г в течение 10 мин осадок polyP ресуспендировали в 50 мкл воды.

Для количественного определения экстрагированного из штаммов polyP строили стандартную кривую зависимости между количеством фосфата и интенсивностью флуоресценции. В качестве первого этапа были получены серийные разведения образца polyP, выделенного из продуцирующего полифосфат контрольного штамма *Lactiplantibacillus plantarum*, штамм WCFS1 (Alcántara *et al.* 2014). На втором этапе разбавления гидролизовали одним объемом 2 М HCl, инкубировали при 95 °С в течение 15 мин для высвобождения фосфата, а затем нейтрализовали добавлением половины объема 2 М NaOH. На третьем этапе высвобожденный фосфат из каждого разведения количественно определяли с помощью набора BIOMOL Green Kit (Enzo Life Sciences) в соответствии с рекомендациями производителя. Параллельно высвобожденный фосфат из каждого разведения окрашивали с применением 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl и измеряли флуоресценцию при длине волны возбуждения 415 нм и испускания 550 нм во флуориметре. На последнем этапе строили стандартную кривую по полученным значениями уровней фосфата и соответствующим значениям уровней флуоресценции.

После получения стандартной кривой количества polyP из образцов могут быть количественно определены в соответствии со значениями флуоресценции без необходимости применения набора BIOMOL Green kit. Таким образом, количественное определение polyP из образцов штаммов опосредованно измеряли по флуоресценции DAPI с применением стандартной кривой. Сперва экстрагированный polyP измеряли по флуоресценции с применением DAPI в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре. Затем количество polyP рассчитывали в нмолях фосфата с помощью стандартной кривой. Было выполнено по меньшей мере три биологических повтора.

### 1.1.3 Обнаружение гена *ppk* с помощью анализа *in silico*

Нуклеотидные последовательности для генов *ppk* у видов *Bifidobacteria* и *Lactobacilli* извлекли из NCBI с номерами доступа AE014295.3 (версия 3, дата обновления 31.01.2014, геном *B. longum* NCC2705) и AL935263.2 (версия 2, дата обновления 28.02.2015, геном *L. plantarum* WCFS1) соответственно и подвергли анализу BLAST относительно исследуемых геномов. Аминокислотные последовательности детектированных белков PPK у видов *Bifidobacterium* выравнивали и конструировали древо с применением ClustalW.

## 1.2. Результаты

Способность *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) продуцировать polyP и его соответствующий рост сравнивали с 12 бифидобактериальными штаммами, принадлежащими к 6 различным видам, 6 штаммами лактобацилл, принадлежащими к 5 видам, и 1 штаммом дрожжей (ТАБЛИЦА 1).

Штаммы инокулировали при той же ОП (0,1) в MEI или MRScys и выращивали в течение 16 ч. ОП контролировали, и образование polyP изучали через 6 ч и 16 ч, когда у большинства штаммов наблюдался значительный рост (ФИГ. 1). Значения синтеза polyP и ОП сильно варьировали между штаммами (ФИГ. 1, ФИГ. 2 и ТАБЛИЦА 2).

5

В целом, бифидобактерии показали большую способность к образованию polyP, чем штаммы лактобактерий. Уровни polyP, продуцируемые клетками *L. plantarum* 299v, *L. brevis* KABP-052 (CECT 7840), *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* DSM 17938 и *S. boulardii* CNCM I-754, были очень низкими (< 2 нмоль через 16 ч).

10

Среди бифидобактерий все штаммы были способны продуцировать некоторое количество polyP. Однако *B. bifidum* ABP671, *B. breve* ABP734, *B. breve* M16-V и *B. scardovii* BAA-773 продуцировали самые низкие количества (< 25 нмоль через 16 ч, ФИГ. 2 и ТАБЛИЦА 2). Этот результат показал, что синтез polyP у бифидобактерий был высоко вариабельным среди различных штаммов, как наблюдалось ранее у лактобактерий.

15

По результатам сравнения продукции polyP через 6 и 16 ч *B. scardovii* и все штаммы *B. longum*, кроме *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894), показали более высокие значения polyP через 6 ч, чем через 16 ч (ФИГ. 2 и ТАБЛИЦА 2). Остальные штаммы продуцировали больше polyP через 16 ч, в то время как *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) продуцировал схожие количества в обеих временных точках. Таким образом, можно заключить, что продукция polyP у бифидобактерий изменяется по ходу кривой роста, и это связанное с ростом изменение также зависит от штамма, что подчеркивает важность анализа более чем одной временной точки вдоль кривой роста.

20

Следует отметить, что *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) продемонстрировал бóльшую способность продуцировать polyP через 6 ч (ТАБЛИЦА 2). Примечательно, что через 16 ч *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) также продемонстрировал наилучшую способность образовывать polyP. Интересно, что *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 был единственным штаммом *B. longum*, демонстрирующим такое поведение, т. е. высокая продукция polyP наблюдалась независимо от возраста культуры. И наоборот, другие штаммы, продуцирующие polyP, демонстрировали эту способность только тогда, когда культура была молодой (например, *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707) или когда культура была старой (например, *B. animalis* BB12). Таким образом, способность постоянно продуцировать polyP представляет собой дополнительное преимущество штамма *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894).

25

30

35

Следует отметить, что, в отличие от *B. adolescentis* JCM 1275, *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) был способен к пролиферации при продукции polyP. Кроме того, *B. longum*

subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) продуцировал больше polyP, чем другие штаммы, которые в еще большей степени были способны расти. Это свидетельствует о том, что *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) обладает самым высоким потенциалом для пролиферации и колонизации кишечника при одновременном проявлении положительного действия за счет эффективной продукции постбиотической молекулы polyP.

Дополнительно, *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) был способен продуцировать в 140 раз больше polyP через 6 ч, чем *B. scardovii* BAA-773 (1,6 против 230,9 нмоль, ТАБЛИЦА 2), который, как известно, экспрессирует *ppk* (Qian *et al.*, 2011). *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) был способен продуцировать в 18 раз больше polyP, чем *L. plantarum* WCFS1 (12,7 против 230,9 нмоль, ТАБЛИЦА 2), который, как известно, продуцирует polyP (Alcántara *et al.*, 2018).

ТАБЛИЦА 2. Количественное определение polyP (нмоль) и роста (ОП<sub>550</sub>) штаммов, проанализированных в исследовании через 6 ч и 16 ч. *ppk* — ген полифосфаткиназы; Н/П — неприменимо.

Штамм	6 ч		16 ч		Доступность генома	<i>ppk</i>
	PolyP	ОП	PolyP	ОП		
<i>B. Longum</i> subsp. <i>longum</i> KABP-042 (CECT 7894)	230,9	1,2	258,3	1,8	Да	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> 36524™	199,0	2,1	49,0	2,0	Да	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707	169,7	1,5	3,9	2,5	Да	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> BB536	61,3	1,4	3,3	2,5	Нет	Н/П
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ABP123	27,0	2,6	0,4	5,5	Нет	Н/П
<i>B. bifidum</i> ABP671	0,3	1,4	2,6	4,0	Нет	Н/П
<i>B. breve</i> ABP734	11,9	1,8	22,0	3,6	Да	+
<i>B. breve</i> M16-V	0,1	2,2	20,4	4,5	Нет	Н/П
<i>B. breve</i> JCM 1273	70,0	1,1	105,6	2,8	Нет	Н/П
<i>B. adolescentis</i> JCM 1275	50,4	0,2	87,7	0,2	Да	+
<i>B. animalis</i> BB-12	2,5	0,4	195,4	2,5	Да	+
<i>B. scardovii</i> BAA-773	1,6	3,2	0,5	8,2	Да	+
<i>L. paracasei</i> JCM 1163	6,3	4,6	1,5	5,3	Нет	Н/П
<i>L. plantarum</i> WCFS1	12,7	2,4	0,0	3,2	Да	+
<i>L. plantarum</i> 299v	0,2	2,1	0,0	3,7	Нет	Н/П
<i>L. brevis</i> KABP-052 (CECT 7480)	0,0	0,3	0,1	0,3	Да	-
<i>L. rhamnosus</i> GG	1,3	1,5	0,4	3,7	Да	-
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	0,7	4,6	1,5	5,3	Нет	Н/П
<i>S. boulardii</i> CNCM I-754	0,4	1,2	0,6	3,9	Нет	Н/П



Кроме того, провели оценку наличия гена *ppk* среди доступных геномов исследуемых штаммов методом BLAST (ТАБЛИЦЫ 2 и 3). В согласии с фенотипическими результатами, последовательность *ppk* была обнаружена во всех протестированных бифидобактериях и в некоторых геномах лактобактерий. Однако, с учетом различия в продукции polyP между штаммами, данные подтверждают, что механизмы регуляции у разных штаммов различаются. Фактически, биосинтез polyP у бактерий, по-видимому, регулируется на посттранскрипционном и/или посттрансляционном уровне.

ТАБЛИЦА 3. Идентификация гена *ppk* в доступных геномах методом BLAST. Н/О — не обнаружено.

Штаммы	Референсный геном	<i>ppk</i>	
		Идентичность (%)	Покрытие (%)
<i>B. Longum</i> subsp. <i>longum</i> KABP-042 (CECT 7894)	AE014295.3	99	100
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> 36524™	AE014295.3	99	100
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707	AE014295.3	98	100
<i>B. breve</i> ABP734	AE014295.3	93	100
<i>B. animalis</i> BB-12	AE014295.3	82	100
<i>B. adolescentis</i> JCM 1275	AE014295.3	85	98
<i>B. scardovii</i> BAA-773	AE014295.3	85	100
<i>L. plantarum</i> WCFS1	AL935263.2	100	100
<i>L. brevis</i> KABP-052 (CECT 7480)	AL935263.2	Н/О	Н/О
<i>L. rhamnosus</i> GG	AL935263.2	Н/О	Н/О

Принимая во внимание различия, наблюдаемые между последовательностями *ppk* в бифидобактериальных штаммах, их аминокислотные последовательности выравнивали и построили филогенетическое древо. Результаты показали, что бифидобактериальный РРК может быть сгруппирован в две клады (ФИГ. 3), одна из которых содержит штаммы *B. animalis* и *B. adolescentis*, а другая — штаммы *B. scardovii*, *B. longum* и *B. breve*.

#### ПРИМЕР 2. Стабильность *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) в готовом продукте

Стабильность пробиотических продуктов зависит от нескольких факторов, включая промышленные процессы производства и хранения и собственные характеристики пробиотических штаммов.

Производственные процессы были оптимизированы для снижения потери жизнеспособности штаммов во время производства и хранения. Кроме того, производители, как правило, начинают с более высоких доз пробиотических бактерий для противодействия потерям в течение

срока годности продукта. Однако естественная сниженная аэротолерантность бифидобактерий затрудняет поддержание стабильности при продлении срока годности продукта по сравнению с другими пробиотическими видами.

- 5 В данном исследовании изучали стабильность *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) в готовом продукте.

### 2.1 Материалы и методы

10 Готовый продукт *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) получали в матриксе, содержащем активный ингредиент (минимум  $10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ)), подсолнечное масло (до 10 мл) и DL-альфа-токоферол (4 мг). Продукт упаковывали в стеклянные бутылки из янтарного стекла и хранили в условиях Зоны II (25 °С, 60% относительной влажности (ОВ)).

15 Количество активного ингредиента (пробиотического штамма) было выбрано таким образом, чтобы оно удовлетворяло рекомендуемому показателю КОЕ/доза из имеющихся руководств.

Стабильность штамма изучали, измеряя КОЕ путем подсчета на чашках в соответствии с ISO 29981 через 0, 1, 3 и 6 месяцев после производства. Результаты выражали в виде  $\lg(\text{КОЕ})$ . Была получена линия тренда и оценен прогнозируемый показатель КОЕ через 12 месяцев. 20 Рассчитывали кратность и логарифмическое уменьшение, сравнивая между собой КОЕ через 0 и 12 месяцев.

### 2.2 Результаты

25 На ФИГ. 4 показан живой *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894), обнаруженный в готовом продукте в динамике (0–6 месяцев), и прогнозируемая линия тренда. Через 12 месяцев  $\lg(\text{КОЕ})$  оценивался равным 9,01. Этот результат выявил 3-кратное снижение за 12 месяцев (т. е. логарифмическое уменьшение  $\sim 0,5$ ), что указывает на хорошую стабильность продукта. Таким образом, 3-кратного превышения дозы при производстве будет достаточно для обеспечения  $10^9$  КОЕ живых бактерий через 12 месяцев.

30

### **ПРИМЕР 3. Дополнительные пробиотические характеристики *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894)**

#### 3.1 Материалы и методы

35 Исследовали способность *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) противостоять условиям в желудочно-кишечном тракте, прикрепляться к эпителию кишечника и использовать олигосахариды человеческого молока (ОЧМ). *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) и *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707 применяли в качестве контролей, как указано. Штаммы лактобак-

терий стандартно выращивали в MRS при 37 °С в условиях анаэробноз. Штаммы бифидобактерий выращивали в тех же условиях, за исключением того, что в MRS добавляли 0,1% (масс./об.) цистеина-HCl (MRScys).

- 5 Устойчивость к стрессовым условиям в желудке и выживаемость под действием солей желчных кислот изучали путем воздействия на штаммы растворов, моделирующих условия в желудке (на литр: NaCl 7,3 г, KCl 0,52 г, NaHCO<sub>3</sub> 3,78 г и пепсин 3 г), — при pH 2,3 в течение 30 мин и при pH 3 в течение 90 мин, и культуральной среды, содержащей 0,3% (масс./об.) солей желчных кислот, — в течение 180 мин. Пролиферирующие бактерии подсчитывали методом серийного разведения и подсчета до и после времени инкубации. Коммерческий пробиотический штамм *L. rhamnosus* GG применяли в качестве референса.

Адгезию к эпителию кишечника исследовали *in vitro* с применением эпителиальных клеток кишечника Caco-2. Бактериальные суспензии добавляли к монослоям Caco-2 (множественность заражения (MOI) составляла 1 : 5 (клетки : пробиотик)) и в лунки без клеток Caco-2 в качестве контроля. Через 1 ч инкубации при 37 °С среду удаляли, клетки отделяли и извлекали суспензии. Бактерии подсчитывали в полученной суспензии путем серийных разведений и подсчета на чашках. Бактерии в среде из контрольных лунок также количественно определяли. *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707 применяли как контроль качества с известным процентом адгезии 47–55%.

Способность к деградации ОЧМ тестировали путем выращивания штамма в MRS с ОЧМ лакто-N-тетрозой (1%) в качестве единственного источника углерода. В качестве положительного контроля применяли MRS с 1% глюкозой. MRS без источника углерода применяли в качестве отрицательного контроля. Рост контролировали в течение 24 ч.

Последовательность генома *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) была получена на Illumina HiSeq, риды были собраны и аннотированы. Представляющие интерес гены, такие как гены адгезинов, бактериоцинов, ферментов, разлагающих ОЧМ, и гидролаз солей желчных кислот, искали в геноме с помощью BLAST.

### 3.2 Результаты

Устойчивость к условиям в желудке оценивали путем моделирования быстрого пассажа через желудок без буферизации pH (при pH 2,3 в течение 30 мин) и медленного послеобеденного переваривания с буферизацией pH (при pH 3 в течение 90 мин). *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894), а также хорошо изученный пробиотический штамм *L. rhamnosus* GG продемонстрировали уменьшение < 1 lg(KOE)/мл при воздействии условий в желудке при pH 2,3 и pH 3 (ТАБЛИЦА 4). Кроме того, *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) продемонстрировал высокую толерантность к солям желчных кислот, с уменьшением < 0,5 lg(KOE)/мл, что схоже с показателем у *L. rhamnosus* GG. Кроме того, в геноме *B. longum*

subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) была обнаружена одна копия гена *bsh*, кодирующего фермент гидролазу солей желчных кислот, что подтверждает, что указанный штамм хорошо адаптирован к условиям желудочно-кишечного тракта.

- 5 ТАБЛИЦА 4. Устойчивость к стрессовым условиям в желудке и солям желчных кислот и адгезия к эпителию кишечника. Приведенные значения представляют собой средние значения и стандартные отклонения для Ig(КОЕ)/мл или % от Ig(КОЕ)/мл. В качестве контролей применяли *L. rhamnosus* GG и *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707. Н/П — неприменимо.

Штамм	Раствор, имитирующий условия в желудке, при pH 2,3			Раствор, имитирующий условия в желудке, при pH 3			MRS + соли желчных кислот 0,3%			Адгезия к эпителию кишечника (%)
	Количество		Уменьшение	Количество		Уменьшение	Количество		Уменьшение	
	t = 0 мин	t = 30 мин	t = 0 мин – t = 30 мин	t = 0 мин	t = 90 мин	t = 0 мин – t = 90 мин	t = 0 мин	t = 90 мин	t = 0 мин – t = 90 мин	
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> КАВР042 (СЕСТ 7894)	6,25 ± 0,14	5,67 ± 0,07	0,58 ± 0,07	6,81 ± 0,69	6,53 ± 0,62	0,28 ± 0,06	6,79 ± 0,22	6,57 ± 0,27	0,22 ± 0,09	70,8 ± 1,20
<i>L. rhamnosus</i> GG	6,98 ± 0,23	6,19 ± 0,21	0,68 ± 0,08	6,92 ± 0,24	7,09 ± 0,19	-0,17 ± 0,16	7,01 ± 0,42	6,85 ± 0,26	0,15 ± 0,24	Н/П
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> ATCC 15707	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	51,2 ± 1,00

- 10 Было подтверждено, что *B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) прикрепляется к эпителию кишечника с адгезионной способностью 70,8% (ТАБЛИЦА 4). Штамм прикреплялся в большей степени, чем умеренно прикрепляющийся контрольный штамм *B. longum* subsp. *longum* ATCC 15707 (51,2%). Анализ генома подтвердил, что штамм достаточно оснащен несколькими белками и доменами адгезии. Адгезия бактерий к тканям человека является необходимым условием для эффективной бактериальной колонизации, что, в свою очередь, является желательным признаком для достижения стойкого положительного влияния на здоровье.
- 15

*B. longum* subsp. *longum* КАВР-042 (СЕСТ 7894) был способен расти в присутствии ОЧМ лакто-N-тетрозы (LNT) в качестве единственного источника углерода (ФИГ. 5). Было подтверждено,

что геном содержит гены белков, разлагающих ОЧМ, включая лакто-N-биозидазу, бета-галактозидазу, альфа-галактозидазу, гексозаминидазу, бета-глюкуронидазу. Таким образом, использование ОЧМ штаммом *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) было подтверждено фенотипически и генотипически, что доказывает его хорошую адаптацию к кишечнику младенцев.

Кроме того, геном *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) содержит другие гены, кодирующие действующие на углеводы ферменты (CAZy), что свидетельствует о его способности разрушать широкий спектр сложных субстратов, таких как субстраты, поступающие из разнообразного рациона человека. *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894), по-видимому, обладает вариативным углеводным метаболизмом.

Дальнейший анализ показал наличие генов, кодирующих лантипептид В, серпин и адгезины. Лантипептид В (лантибиотик) представляет собой бактериоцин класса I, продуцируемый штаммами *B. longum*, который проявляет сильную антимикробную активность против ряда грамотрицательных и грамположительных патогенных бактерий. Серпины (от англ. Serine Protease Inhibitors — «ингибиторы сериновых протеаз») избирательно инактивируют человеческие эластазы (протеазы) нейтрофилов и поджелудочной железы, что приводит к противовоспалительному эффекту и способствует поддержанию гомеостаза кишечника.

В целом, анализ *in vitro* и *in silico* штамма *B. longum* subsp. *longum* KABP-042 (CECT 7894) подтверждает пробиотические характеристики указанного штамма, указывая на то, что он хорошо адаптирован к желудочно-кишечному тракту человека, включая кишечник младенцев, поскольку он обладает способностью разлагать ОЧМ.

#### **ПРИМЕР 4. Роль polyP, полученного из *B. longum* CECT7894, в защите кишечного барьера**

Постбиотическое действие polyP связано с его ролью в поддержании кишечного гомеостаза и защите функции кишечного барьера. Одним из механизмов действия является индукция цитопротекторного фактора — белка теплового шока HSP27 — в клетке кишечника (Alcántara *et al.*, 2018).

Было изучено, влияет ли polyP, продуцируемый *B. longum* CECT 7894, на целостность барьера и кишечную проницаемость. Кроме того, было исследовано, связано ли влияние с продукцией HSP27 или с индукцией других маркеров целостности барьера, включая белки плотных контактов.

#### **4.1. Материалы и методы**

#### 4.1.1 Приготовление образцов *B. longum* СЕСТ 7894 и количественное определение продукции polyP

*B. longum* СЕСТ 7894 выращивали в среде MEI и среде с низким содержанием фосфата (LP). Последняя среда имеет тот же состав, что и MEI, но без добавления предшественников polyP (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), поэтому штамм не может продуцировать большие количества polyP. Через 16 ч ростовые культуры центрифугировали и супернатанты собирали, фильтровали и доводили до нейтрального значения pH. Количество polyP измеряли, как описано в ПРИМЕРЕ 1.

#### 4.1.2. Оценка целостности и проницаемости барьера

Оценивали целостность монослоя клеток Caco-2 путем измерения трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) и проницаемость по кажущимся коэффициентам проницаемости (Papp) маркера парацеллюлярного транспорта Lucifer Yellow.

Клетки Caco-2 высевали во вставки с пористой мембраной с апикальным (верхним) и базолатеральным (нижним) отсеками. В оба отсека добавляли минимально обогащенную среду Игла (MEM). Клетки обрабатывали супернатантами *B. longum* СЕСТ 7894, выращенного в средах MEI и LP. Дополнительные клетки обрабатывали MEM, неферментированными средами MEI и LP и применяли в качестве контроля.

Через 72 ч обработки определяли TEER и проницаемость. TEER измеряли с помощью вольт-амперметра Millicell® -ERS. Для анализа проницаемости в апикальный отсек добавляли Lucifer Yellow. Через 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин отбирали аликвоты из базолатерального отсека и измеряли флуоресценцию перенесенного Lucifer Yellow с помощью считывающего флуоресценцию устройства для микропланшетов при длинах волн возбуждения/испускания 485/520 нм.

#### 4.1.3. Количественное определение продукции HSP27

Продукцию HSP27 изучали в эпителиальных клетках кишечника Caco-2 в конфлюэнтном монослое методом вестерн-блоттинга, как описано Alcántara *et al.*, 2018, с некоторыми модификациями. В клеточные культуры добавляли бактериальные супернатанты и инкубировали в течение 16 ч. В качестве контроля применяли среды MEI и LP. Для извлечения HSP27 клетки лизировали буфером для ДСН-ПААГ-электрофореза и кипятили в течение 5 мин. Белки разделяли в ДСН-ПАА-геле, а затем переносили на нейлоновую мембрану (блот). Блоты инкубировали с кроличьей поликлональной сывороткой к HSP27 или с мышинным моноклональным антителом к β-актину (белок, применяемый для нормализации). После промывки применяли конъюгированные с пероксидазой вторичные антитела к IgG кролика и IgG мыши соответственно. Регистрировали изображения блотов и проводили количественное определение белков в системе Imagin 680.

#### 4.1.4. Экспрессия генов, кодирующих белки плотных контактов

Клетки Caco-2 в течение 16 ч подвергали воздействию супернатантов *B. longum* СЕСТ 7894, выращенного в средах MEI и LP. Затем выделяли клетки и экстрагировали РНК с помощью реактива TRIZOL. Из РНК получали кДНК с применением набора для синтеза кДНК SuperScript VILO cDNA synthesis kit. Реакции количественной ПЦР (кПЦР) проводили с SYBR Green в условиях, указанных производителем. Количественно определяли экспрессию белков плотных контактов: Zonula occludens-1 (ZO1), белка адгезии плотных контактов (JAM1) и окклюдина. Для нормализации применяли экспрессию генов 18S рРНК и GADPH.

#### 4.2 Результаты

Во-первых, количества polyP в супернатантах штамма, выращенного в среде MEI, были выше, чем количества в супернатантах штамма, выращенного в среде LP (ТАБЛИЦА 5). Следует отметить, что количества в MEI были ниже, чем результаты количественно определения в ПРИМЕРЕ 1 в той же среде. Однако в ПРИМЕРЕ 1 polyP измеряют внутриклеточно, тогда как в ПРИМЕРЕ 4 polyP измеряют внеклеточно. Здесь изучали внеклеточную продукцию, чтобы имитировать условия в кишечнике, т. е. внеклеточный polyP в контакте с кишечным барьером.

ТАБЛИЦА 5. Количество polyP (нмоль) в супернатантах *B. longum* СЕСТ 7894, выращенного в условиях с высоким (среда MEI) или низким (среда LP) содержанием фосфата в течение 16 ч. Показан рост (ОП<sub>550</sub>) в каждом состоянии.

Среда	PolyP	ОП
MEI	2,24	3,2
LP	0,22	1,1

Эксперименты с монослоями Caco-2 в двухкомпонентной системе показали, что апикальное воздействие супернатантов от *B. longum* СЕСТ 7894 с высокой концентрацией polyP (т. е. из культур в среде MEI) демонстрировало более высокое TEER (что указывает на большую устойчивость клеточного барьера) по сравнению с воздействием супернатантов с низкими количествами polyP и контролей. Экспериментальное измерение потока Lucifer Yellow из апикального в базолатеральный отсек также показало, что высокая концентрация polyP, полученного из *B. longum* СЕСТ 7894, значительно снижает проницаемость соединения по сравнению с супернатантом с низким содержанием polyP и контролями (показано на ФИГ. 6). Эти результаты указывают на то, что polyP, продуцируемый *B. longum* СЕСТ 7894, способствует усилению функционального барьера, противодействующего кишечной проницаемости. Важно отметить, что эффекты были значительными, даже несмотря на то, что количества polyP в супернатантах были ниже, чем внутриклеточные, и это позволяет предположить, что небольших количеств polyP, продуцируемого *B. longum* СЕСТ 7894, достаточно, чтобы оказывать благоприятное воздействие на целостность барьера.

Анализ продукции HSP27 в эпителиальных клетках кишечника вестерн-блоттингом показал, что супернатанты с высокой концентрацией polyP, продуцируемого *B. longum* СЕСТ 7894 (т. е.

из культур в среде MEI), индуцировали значительно более высокую продукцию HSP27 по сравнению с супернатантами из культур с низкой концентрацией polyP (т. е. из культур в среде LP). Кроме того, также наблюдалась корреляция между экспрессией HSP27 и концентрациями polyP в супернатантах *B. longum* СЕСТ 7894 при применении различных образцов с разными количествами polyP (показано на ФИГ. 7). Эти результаты указывают на то, что *B. longum* СЕСТ 7894 может влиять на продукцию HSP27 посредством синтеза polyP, и, следовательно, указанный штамм оказывает защитное действие на эпителий кишечника.

Кроме того, экспрессия белков плотных контактов ZO1, JAM1 и окклюдина, которые имеют решающее значение для поддержания целостности барьера, индуцировалась присутствием высоких количеств polyP в супернатанте *B. longum* СЕСТ 7894 по сравнению с супернатантами с низким содержанием polyP (показано на ФИГ. 8).

В целом, эти результаты подтверждают, что штамм *B. longum* СЕСТ 7894 посредством продукции polyP способен усиливать барьерную целостность, снижая кишечную проницаемость путем индукции продукции цитопротекторного белка HSP27 и белков плотных контактов. Следовательно, *B. longum* СЕСТ 7894 оказывает положительное действие на гомеостаз кишечного барьера.

#### 20 ПРИМЕР 5. Влияние грудного молока, ОЧМ лакто-N-тетрозы и полиаминов на способность *B. longum* СЕСТ7894 продуцировать polyP

*B. longum* естественным образом содержится в грудном молоке человека и в кишечнике младенцев. Молоко человека содержит определенное количество фосфата (субстрата для polyP). Было изучено, способен ли *B. longum* СЕСТ 7894 продуцировать polyP в присутствии грудного молока. Кроме того, некоторые данные о других бактериях свидетельствуют о том, что полиамины и источник углерода могут влиять на метаболизм polyP (Anand *et al.*, 2019). Поскольку грудное молоко содержит полиамины и углеводы ОЧМ, было протестировано, могут ли полиамины и ОЧМ лакто-N-тетроза (LNT), которые использует *B. longum* СЕСТ 7894 (как подтверждено в ПРИМЕРЕ 3), влиять на биосинтез polyP в исследуемом штамме.

##### 5.1. Материалы и методы

*B. longum* СЕСТ 7894 выращивали в среде MEI без глюкозы с добавлением i) грудного молока (1% об./об.); ii) LNT (1% масс./об.); iii) полиаминов в количествах, обнаруживаемых в грудном молоке: 70,0, 424,2 и 610,0 10 нмоль/дл путресцина, спермидина и спермина соответственно, и глюкозы (0,5% масс./об.); и iv) глюкозы (0,5% масс./об.) в качестве положительного контроля. Рост (ОП<sub>550</sub>) и продукцию polyP определяли через 6 и 16 ч инкубирования.

##### 5.2 Результаты



Анализ роста *B. longum* СЕСТ 7894 в присутствии грудного молока (с сахарами, присутствующими в грудном молоке, в качестве единственного источника углерода) показал, что, несмотря на то, что указанный штамм достигает только низкого значения ОП, он все еще способен продуцировать некоторые количества polyP через 6 ч. Рост с LNT в качестве единственного источника углерода через 6 ч был ниже, чем рост в контрольных условиях (ОП 1,8 по сравнению с 2,9). Однако указанный штамм продуцировал большее количество polyP (117,0 против 110,2). Кроме того, polyP сохранялся в течение более длительного периода в случае LNT по сравнению с контролем (145,0 против 70,2 через 16 ч). Присутствие полиаминов в среде MEI с глюкозой не влияло ни на рост, ни на продукцию polyP (см. ТАБЛИЦУ 6 и ФИГ. 9).

ТАБЛИЦА 6. Количественное определение polyP (нмоль) и рост (ОП<sub>550</sub>) культур *B. longum* СЕСТ 7894, инкубированных в различных условиях, через 6 и 16 ч.

Условие	6 ч		16 ч	
	PolyP	ОП	PolyP	ОП
Контроль (глюкоза)	110,2	2,9	70,2	2,7
Грудное молоко	18,5	0,5	2,0	0,5
LNT	117,0	1,8	145,0	2,9
Полиамины	111,0	3,0	48,6	2,7

Таким образом, эти результаты указывают на то, что *B. longum* СЕСТ 7894 может продуцировать polyP в присутствии грудного молока, а ОЧМ LNT усиливает биосинтез polyP, что указывает на LNT-зависимую регуляцию метаболизма polyP в исследуемом штамме. Важно отметить, что это первый случай демонстрации взаимодействия ОЧМ и polyP, и это подчеркивает полезную роль, которую может играть добавка *B. longum* СЕСТ 7894, например, у младенцев.

#### **ПРИМЕР 6. Кроссфидинг *B. longum* СЕСТ 7894 с бифидобактериями, которые используют 2'-FL**

Способность *B. longum* СЕСТ 7894 расти с ОЧМ 2'-FL была исследована путем кроссфидинга с другими бифидобактериями, присутствующими, например, в грудном молоке или кишечнике человека.

##### 6.1 Материалы и методы

*B. bifidum* Vb01 (СЕСТ 30646) выращивали в среде MRS с 2'-фукозиллактозой (2'-FL) (4% масс./об.) в качестве единственного источника углерода в течение 48 ч. Супернатант извлекали и фильтровали для удаления клеток. Супернатант смешивали со свежей средой MRS без источника углерода (1 : 1). *B. longum* СЕСТ 7894 выращивали в этой смеси в течение 24 ч и контролировали ОП.

## 6.2 Результаты

5 *B. longum* СЕСТ 7894 был способен расти в присутствии супернатанта от *B. bifidum* Bb01 (СЕСТ 30646), культивированного с 2'-FL, достигая ОП 0,5 (ФИГ. 10). Этот результат демонстрирует, что *B. longum* СЕСТ 7894 может получать питательные вещества от других бифидобактерий, которые используют 2'-FL. Таким образом, с учетом результатов из ПРИМЕРА 3 (ФИГ. 5), *B. longum* СЕСТ 7894 способен расти в присутствии двух наиболее распространенных ОЧМ в грудном молоке (LNT и 2'-FL).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Непатентная литература

- 5 Qian, Y., Borowski, W. J., & Calhoon, W. D. (2011). Intracellular granule formation in response to oxidative stress in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 320-325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.026>
- Anand, A., Sato, M., & Aoyagi, H. (2019). Screening of phosphate-accumulating probiotics for potential use in chronic kidney disorder. *Food Science and Technology Research*, 25(1), 89-96. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.89>
- 10 Saiki, A., Ishida, Y., Segawa, S., Hirota, R., Nakamura, T., & Kuroda, A. (2016) A lactobacillus mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(5), 955-961. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1135041>
- 15 Saiki, A., Ishida, Y., Segawa, S., Hirota, R., Nakamura, T., & Kuroda, A. (2016) A lactobacillus mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(5), 955-961. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1135041>
- Alcántara, C., Blasco, A., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2014) Accumulation of Polyphosphate in lactobacillus spp. and its involvement in stress resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1650-1659. <https://doi.org/10.1128/aem.03997-13>
- 20 Alcántara, C., Coll-Marqués, J. M., Jadán-Piedra, C., Vélez, D., Devesa, V., Zúñiga, M., & Monedero, V. (2018) Polyphosphate in lactobacillus and its link to stress tolerance and probiotic properties. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01944>
- 25 Pérez, M., Astó, E., Huedo, P., Alcántara, C., Buj, D., & Espadaler, J. (2020) Derived Postbiotics of a multi-strain probiotic formula clinically validated for the treatment of irritable bowel syndrome. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1-1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.05062>
- 30 Abstract Xiao, F., Dong, F., Li, X., Li, Y., Yu, G., Liu, Z., Wang, Y., Zhang, T. (accepted 30 May 2022). *Bifidobacterium longum* CECT 7894 improves the efficacy of infliximab for DSS-induced colitis via regulating the gut microbiota and bile acid metabolism. *Front. Pharmacol. Sec. Gastrointestinal and Hepatic Pharmacology* doi: 10.3389/fphar.2022.902337
- 35 Shah, ED., Farida, JP., Siegel, CA., Chong, K., Melmed, GY. (2017) Risk for overall infection with anti-TNF and anti-integrin agents used in IBD: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2017 Apr;23(4):570-577. doi: 10.1097/MIB.0000000000001049
- 40 Bischoff, SC., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen T., Schulzke, JD., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, JM. (2014) Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC*

Gastroenterol. 2014; 14: 189. doi: 10.1186/s12876-014-0189-7

5 Segawa S., Fujiya M., Konishi H., Ueno N., Kobayashi N., Shigyo T., Kohgo Y. (2011) Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. PLoS One 2011;6(8):e23278 doi: 10.1371 / journal.pone.0023278

10 Tanaka, K., Fujiya, M., Konishi, H., Ueno, N., Kashima, S., Sasajima, J., Moriichi, K., Ikuta, K., Tanabe, H., Kohgo, Y. (2015) Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 467, Issue 3, 20 Nov 2015 pages 541-548. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.159>

15 Fujiya, M., Ueno, N., Hashima, S., Tanaka, K., Sakatani, A., *et al.*, (2020) Long-Chain Polyphosphate Is a Potential Agent for Inducing Mucosal Healing of the Colon in Ulcerative Colitis. Clinical Pharmacology & Therapeutics vol. 197, Issue 1, February 2020, pages 452-461 doi: 10.1002 / cpt.1628

20 Kelly, JR., Kennedy, PJ., Cryan, JF., Dinan, TG., Clarke, G., Hyland NP. (2015) Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. Front Cell Neurosci. 2015; 9: 392. doi: 10.3389/fncel.2015.00392

Verhaar, BJH., Prodan, A., Nieuwdorp, M., Muller, M. (2020) Gut microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: a review. Nutrients 2020 Sep 29;12(10):2982. doi: 10.3390/nu12102982

25 Rogler, G., Rosano, G. (2014) The heart and the gut. European Heart Journal 35, 426-430 doi:10.1093/eurheartj/eh271

30 Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., Zhao, B. (2017) The gut microbiota and Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis 2017;58(1):1-15. doi: 10.3233/JAD-161141.

Cox, AJ., West, NP, Cripps, AW. (2015) Obesity, inflammation, and the gut microbiota. Lancet Diabetes Endocrinol. 2015 Mar;3(3):207-15. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2

35 Pike, MG., Heddle, RJ., Boulton, P., Turner, MW., Atherton, DJ. (1986) Increased intestinal permeability in atopic eczema. J Invest Dermatol 1986 Feb;86(2):101-4. doi: 10.1111/1523-1747.ep12284035

40 Tajik, N., Frech, M., Schulz, O. *et al.* (2020) Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nat Commun* 11, 1995 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>

Massier L, Blüher M, Kovacs P and Chakaroun RM (2021) Impaired Intestinal Barrier and Tissue Bacteria: Pathomechanisms for Metabolic Diseases. *Front. Endocrinol.* 12:616506. doi: 10.3389/fendo.2021.616506

5

Патентная литература

WO2015018883A2

JP2006176450A

10

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Пробиотическая композиция, содержащая:

штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Испанской коллекции типовых культур, СЕСТ, под номером доступа СЕСТ 7894, или полученный из него бактериальный штамм для применения в лечении повышенной кишечной проницаемости и ассоциированных с ней состояний у субъекта, причем лечение повышенной кишечной проницаемости осуществляется за счет продуцирования полифосфата,

при этом полученный бактериальный штамм:

(а) имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) с геномом соответствующего депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99%; и

(b) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат; и

при этом ассоциированные состояния представляют собой внекишечные состояния.

2. Пробиотическая композиция для применения по п. 1, причем внекишечное ассоциированное состояние представляет собой иммунное нарушение или заболевание, нарушение или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы или неврологическое или психиатрическое нарушение или заболевание.

3. Пробиотическая композиция для применения по п. 2, причем ассоциированное состояние выбрано из группы, состоящей из ожирения, сахарного диабета, инсулинорезистентности, неалкогольной жировой болезни печени, цирроза печени, непищевой аллергии/гиперчувствительности, иммуносенесценции, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, красной волчанки, саркопении, бронхиальной астмы, аллергического риноконъюнктивита, атопического дерматита, болезни Альцгеймера, атеросклероза, артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности, инсульта, расстройств аутистического спектра, шизофрении и депрессии.

4. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–3, дополнительно содержащая по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока.

5. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–4, причем повышенная кишечная проницаемость и связанные с ней состояния связаны с преждевременными родами, старением, высокой интенсивностью физической активности, несбалансированностью питания, инфекцией, лекарственной терапией и/или стрессом.

6. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–5, причем субъект пред-

ставляет собой человека, и указанный человек выбран из группы, состоящей из пожилых людей, недоношенных младенцев, младенцев, спортсменов и ослабленных людей.

7. Пробиотическая композиция для применения по п. 6, причем младенец выбран из группы, состоящей из недоношенного младенца, ослабленного младенца, младенца, рожденного с низкой массой тела при рождении, младенца с задержкой внутриутробного развития, младенца, рожденного с помощью кесарева сечения, младенца, которому вводят антибиотики, младенца на искусственном вскармливании и младенца на грудном вскармливании.

8. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–7, причем указанный полученный бактериальный штамм имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью с геномом соответствующего депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99,5%.

9. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–8, причем продукция полифосфата штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 или полученного из него бактериального штамма выше, чем продукция полифосфата у контрольного штамма, когда продукцию полифосфата определяют через 6 ч и/или 16 ч культивирования, выполняя следующие этапы:

(а) культивирование штаммов, инокулированных при OD 0,1, в среде для индукции малатдегидрогеназы, содержащей на литр, масс./об.: 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона, 0,4%  $K_2HPO_4$ , 0,5%  $KH_2PO_4$ , 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,005%  $MnSO_4$ , 1 мл Tween 80, 0,05% цистеина и 0,5% глюкозы, при 37 °C и в анаэробных условиях;

(b) сбор клеток путем центрифугирования и лизиса в 1 мл 5% гипохлорита натрия с осторожным перемешиванием в течение 45 мин при комнатной температуре;

(c) центрифугирование нерастворимого материала при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C с получением осадка и двукратная промывка с использованием 1 мл 1,5 М NaCl с 1 мМ ЭДТА при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C;

(d) экстрагирование полифосфата из осадков с помощью двух последовательных промывок с использованием 1 мл воды и центрифугирования при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C между ними;

(e) осаждение полифосфата в объединенных водных экстрактах путем добавления 0,1 М NaCl и 1 объема этанола с последующей инкубацией на льду в течение 1 ч;

(f) центрифугирование при 16 000 g в течение 10 мин и ресуспендирование осадка полифосфата в 50 мкл воды;

(g) построение стандартной кривой, связывающей количество фосфата, полученного из полифосфата, с интенсивностью флуоресценции, в соответствии со следующими этапами:

i. гидролиз серийных разведений образца полифосфата, выделенного из контрольного штамма *Lactobacillus plantarum* WCFS1, с помощью одного объема 2 М HCl и инкубации при 95 °C в течение 15 мин;

- ii. нейтрализация разведений путем добавления половины объема 2 М NaOH;
  - iii. измерение высвобожденного фосфата с помощью набора BIOMOL Green Kit для определения количества фосфата в каждом разведении;
  - iv. измерение высвобожденного фосфата по флуоресценции с применением 4',6-диамидино-2-фенилиндола, DAPI, в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре для определения значения флуоресценции в каждом разведении; и
  - v. построение стандартной кривой со значениями уровней фосфата, полученными на этапе (iii), и соответствующими значениями флуоресценции, полученными на этапе (iv); и
- (h) количественное определение полифосфата из ресуспендированных фракций, полученных на этапе (f):
- 1) измерение полифосфата методом оценки флуоресценции с применением DAPI в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре;
  - 2) вычисление количества полифосфата с помощью стандартной кривой; и
  - 3) выражение значения уровня полифосфата в нмоль фосфата.
10. Пробиотическая композиция для применения по п. 9, причем продукция полифосфата штаммом *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 или полученным из него бактериальным штаммом через 6 ч по меньшей мере в 10 раз выше и через 16 ч выше, чем продукция полифосфата контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1, при этом продукция полифосфата контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1 и уровни полифосфата, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют.
11. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–10, содержащая штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный под номером доступа СЕСТ 7894.
12. Комбинация, содержащая:
- (i) пробиотическую композицию, содержащую:
    - штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским договором в Испанской коллекции типовых культур, СЕСТ, под номером доступа СЕСТ 7894, или полученный из него бактериальный штамм, причем указанный полученный бактериальный штамм:
      - (a) имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) с геномом соответствующего депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99%; и
      - (b) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат; и
    - (ii) по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока,



причем указанная комбинация выполнена с возможностью одновременного, отдельного или последовательного введения.

5 13. Комбинация по п. 12, причем указанный олигосахарид человеческого молока выбран из группы, состоящей из фукозилированного олигосахарида, сиалированного олигосахарида, N-ацетиллактозамина и их комбинации.

14. Комбинация по п. 13, содержащая 2'-фукозиллактозу и/или лакто-N-тетрозу.

10 15. Комбинация по любому из пп. 12–14, дополнительно содержащая штамм *Bifidobacterium bifidum*, в частности *B. bifidum* СЕСТ 30646.

15 16. Комбинация по любому из пп. 12–15 для применения в лечении повышенной кишечной проницаемости и ассоциированных с ней состояний у субъекта, причем лечение повышенной кишечной проницаемости осуществляется за счет продуцирования полифосфата, и при этом ассоциированное состояние выбрано из группы, состоящей из иммунного нарушения или заболевания, нарушения или заболевания обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, неврологического или психиатрического нарушения или заболевания и желудочно-кишечного нарушения или заболевания.

20

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**(по ст. 34 РСТ, дополнительно откорректированная от 28 июля 2023 г.,  
не для рассмотрения)**

- 5 1. Пробиотическая композиция, содержащая:  
штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским  
договором в Испанской коллекции типовых культур, СЕСТ, под номером доступа СЕСТ 7894,  
или полученный из него бактериальный штамм для применения в лечении внекишечного со-  
стояния, ассоциированного с повышенной проницаемостью кишечника, у субъекта,  
10 причем лечение осуществляется за счет продуцирования полифосфата,  
при этом полученный бактериальный штамм:  
(а) имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) с геномом соответствующего  
депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99%; и  
(б) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать поли-  
15 фосфат.
2. Пробиотическая композиция для применения по п. 1, причем указанное внекишечное состо-  
яние представляет собой иммунное нарушение или заболевание, нарушение или заболева-  
ние обмена веществ или сердечно-сосудистой системы или неврологическое или психиатри-  
20 ческое нарушение или заболевание.
3. Пробиотическая композиция для применения по п. 2, причем нарушение или заболевание  
обмена веществ или сердечно-сосудистой системы выбрано из группы, состоящей из ожире-  
ния, сахарного диабета, инсулинорезистентности, неалкогольной жировой болезни печени,  
25 цирроза печени, атеросклероза, артериальной гипертензии, хронической сердечной недоста-  
точности и инсульта; иммунное нарушение или заболевание выбрано из группы, состоящей  
из пищевой аллергии/гиперчувствительности, иммуносенесценции, рассеянного склероза,  
ревматоидного артрита, красной волчанки, саркопении, бронхиальной астмы, аллергического  
риноконъюнктивита и атопического дерматита; и неврологическое или психиатрическое нару-  
30 шение или заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, расстройств аутистического спек-  
тра, шизофрении и депрессии.
4. Пробиотическая композиция для применения по п. 2, причем внекишечное ассоциирован-  
ное состояние представляет собой иммунное нарушение или заболевание, или нарушение  
35 или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, причем иммунное нару-  
шение или заболевание выбрано из группы, состоящей из пищевой аллергии/гиперчувстви-  
тельности, иммуносенесценции, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, красной вол-  
чанки, саркопении, бронхиальной астмы, аллергического риноконъюнктивита и атопического  
дерматита, и нарушение или заболевание обмена веществ или сердечно-сосудистой системы

выбрано из группы, состоящей из ожирения, диабета, инсулинорезистентности, неалкогольной жировой болезни печени, цирроза печени, атеросклероза, артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности и инсульта.

5 5. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–4, дополнительно содержащая по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока.

6. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–5, причем субъект представляет собой человека, и указанный человек выбран из группы, состоящей из пожилых людей, недоношенных младенцев, младенцев, спортсменов и ослабленных людей.

7. Пробиотическая композиция для применения по п. 6, причем младенец выбран из группы, состоящей из недоношенного младенца, ослабленного младенца, младенца, рожденного с низкой массой тела при рождении, младенца с задержкой внутриутробного развития, младенца, рожденного с помощью кесарева сечения, младенца, которому вводят антибиотики, младенца на искусственном вскармливании и младенца на грудном вскармливании.

8. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–7, причем указанный полученный бактериальный штамм имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью с геномом соответствующего депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99,5%.

9. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–8, причем продукция полифосфата штамма *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 или полученного из него бактериального штамма выше, чем продукция полифосфата у контрольного штамма, когда продукцию полифосфата определяют через 6 ч и/или 16 ч культивирования, выполняя следующие этапы:

(a) культивирование штаммов, инокулированных при OD 0,1, в среде для индукции малатдегидрогеназы, содержащей на литр, масс./об.: 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% триптона, 0,4%  $K_2HPO_4$ , 0,5%  $KH_2PO_4$ , 0,02%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,005%  $MnSO_4$ , 1 мл Tween 80, 0,05% цистеина и 0,5% глюкозы, при 37 °C и в анаэробных условиях;

(b) сбор клеток путем центрифугирования и лизиса в 1 мл 5% гипохлорита натрия с осторожным перемешиванием в течение 45 мин при комнатной температуре;

(c) центрифугирование нерастворимого материала при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C с получением осадка и двукратная промывка с использованием 1 мл 1,5 M NaCl с 1 mM ЭДТА при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C;

(d) экстрагирование полифосфата из осадков с помощью двух последовательных промывок с использованием 1 мл воды и центрифугирования при 16 000 g в течение 5 мин при 4 °C между ними;

(e) осаждение полифосфата в объединенных водных экстрактах путем добавления 0,1 M NaCl и 1 объема этанола с последующей инкубацией на льду в течение 1 ч;

(f) центрифугирование при 16 000 g в течение 10 мин и ресуспендирование осадка полифосфата в 50 мкл воды;

(g) построение стандартной кривой, связывающей количество фосфата, полученного из полифосфата, с интенсивностью флуоресценции, в соответствии со следующими этапами:

i. гидролиз серийных разведений образца полифосфата, выделенного из контрольного штамма *Lactobacillus plantarum* WCFS1, с помощью одного объема 2 М HCl и инкубации при 95 °С в течение 15 мин;

ii. нейтрализация разведений путем добавления половины объема 2 М NaOH;

iii. измерение высвобожденного фосфата с помощью набора BIOMOL Green Kit для определения количества фосфата в каждом разведении;

iv. измерение высвобожденного фосфата по флуоресценции с применением 4',6-диамидино-2-фенилиндола, DAPI, в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре для определения значения флуоресценции в каждом разведении; и

v. построение стандартной кривой со значениями уровней фосфата, полученными на этапе (iii), и соответствующими значениями флуоресценции, полученными на этапе (iv); и

(h) количественное определение полифосфата из ресуспендированных фракций, полученных на этапе (f):

1) измерение полифосфата методом флуоресценции с применением DAPI в конечной концентрации 10 мкМ в 50 мМ буфере трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ NaCl при длине волны возбуждения 415 нм и испускании при 550 нм во флуориметре;

2) вычисление количества полифосфата с помощью стандартной кривой; и

3) выражение значения уровня полифосфата в нмоль фосфата.

10. Пробиотическая композиция для применения по п. 9, причем продукция полифосфата штаммом *B. longum* subsp. *longum* СЕСТ 7894 или полученным из него бактериальным штаммом через 6 ч по меньшей мере в 10 раз выше и через 16 ч выше, чем продукция полифосфата контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1, при этом продукция полифосфата контрольным штаммом *L. plantarum* WCFS1 и уровни полифосфата, продуцируемого контрольным штаммом, через 16 ч отсутствуют.

11. Пробиотическая композиция для применения по любому из пп. 1–10, содержащая штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный под номером доступа СЕСТ 7894.

12. Комбинация, содержащая:

(i) пробиотическую композицию, содержащую:

штамм *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, депонированный в соответствии с Будапештским

договором в Испанской коллекции типовых культур, СЕСТ, под номером доступа СЕСТ 7894, или полученный из него бактериальный штамм, причем указанный полученный бактериальный штамм:

- 5 (a) имеет геном со средней нуклеотидной идентичностью (ANI) с геномом соответствующего депонированного штамма, составляющей по меньшей мере 99%; и
- (b) сохраняет способность соответствующего депонированного штамма продуцировать полифосфат; и
- (ii) по меньшей мере один олигосахарид человеческого молока, причем указанная комбинация выполнена с возможностью одновременного, отдельного или
- 10 последовательного введения.

13. Комбинация по п. 12, причем указанный олигосахарид человеческого молока выбран из группы, состоящей из фукозилированного олигосахарида, сиалированного олигосахарида, N-ацетиллактозамина и их комбинации.

15

14. Комбинация по п. 13, содержащая 2'-фукозиллактозу и/или лакто-N-тетрозу.

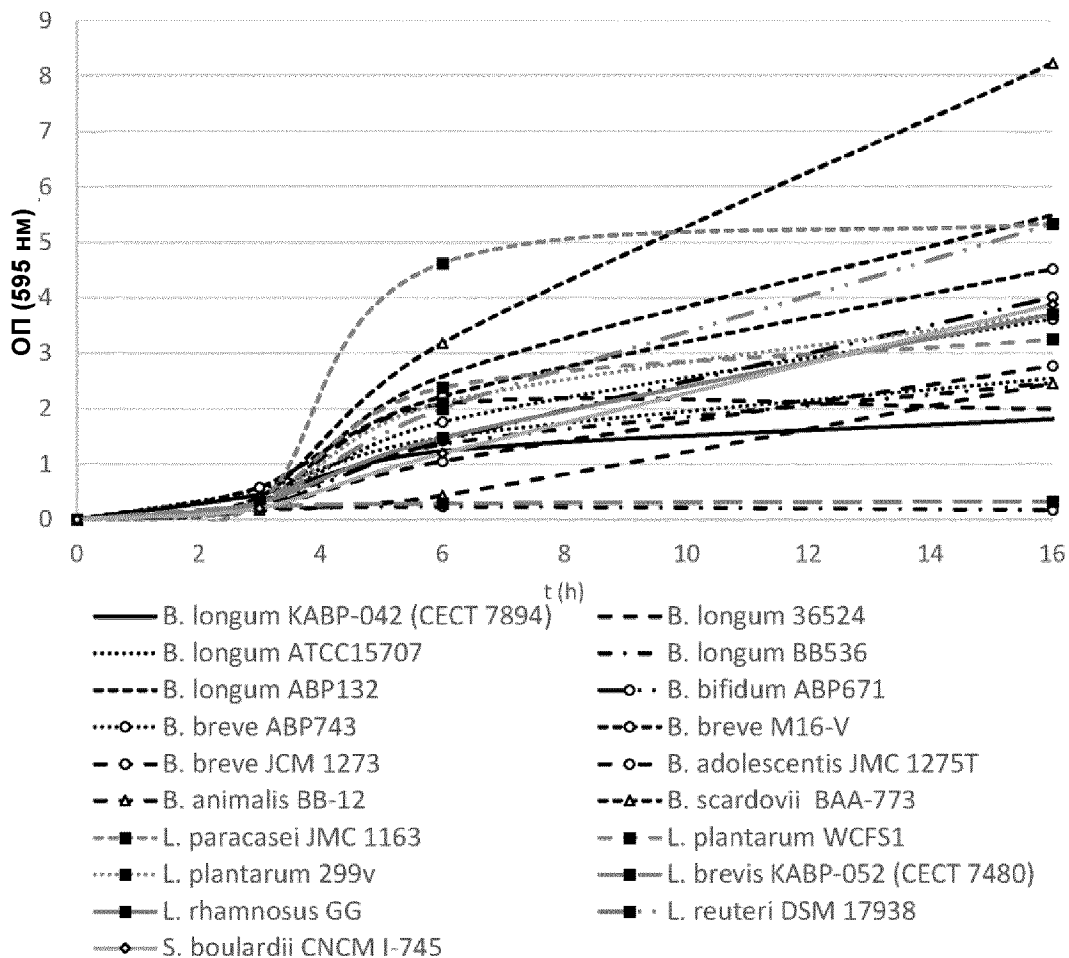
15. Комбинация по любому из пп. 12–14, дополнительно содержащая штамм *Bifidobacterium bifidum*, в частности *B. bifidum* СЕСТ 30646.

20

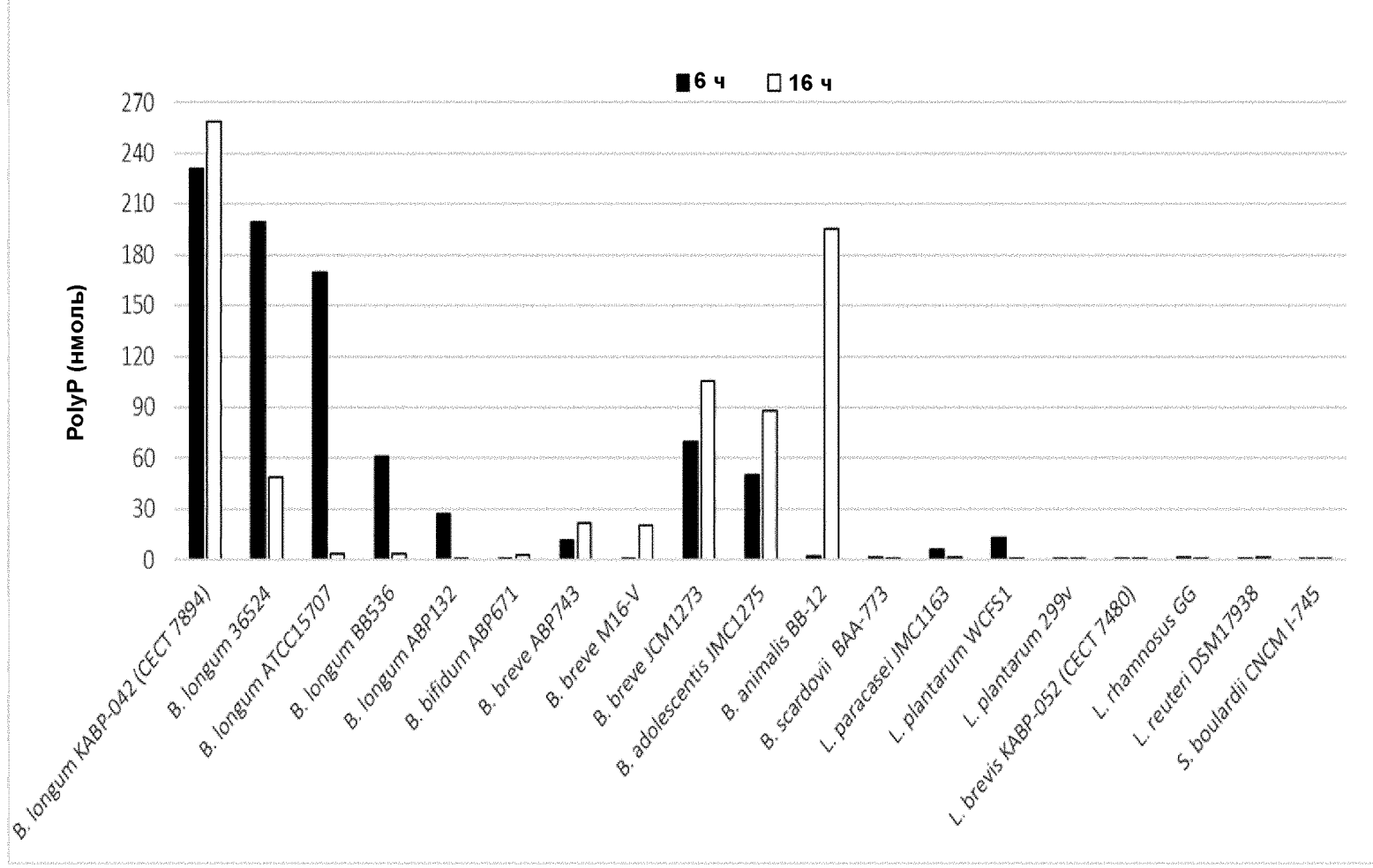
16. Комбинация по любому из пп. 12–15 для применения в лечении состояний, ассоциированных с повышенной кишечной проницаемостью, у субъекта, причем лечение осуществляется за счет продуцирования полифосфата, и при этом ассоциированное состояние выбрано из группы, состоящей из иммунного нарушения или заболевания, нарушения или заболевания обмена веществ или сердечно-сосудистой системы, неврологического или психиатрического нарушения или заболевания и желудочно-кишечного нарушения или заболевания.

25

ФИГ. 1

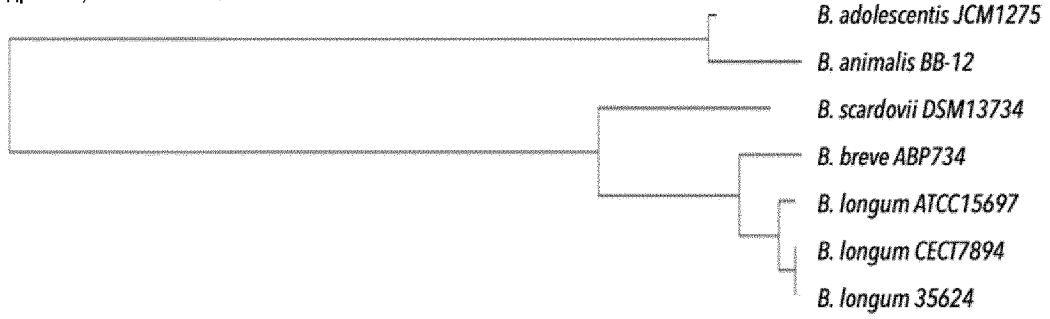


ФИГ. 2



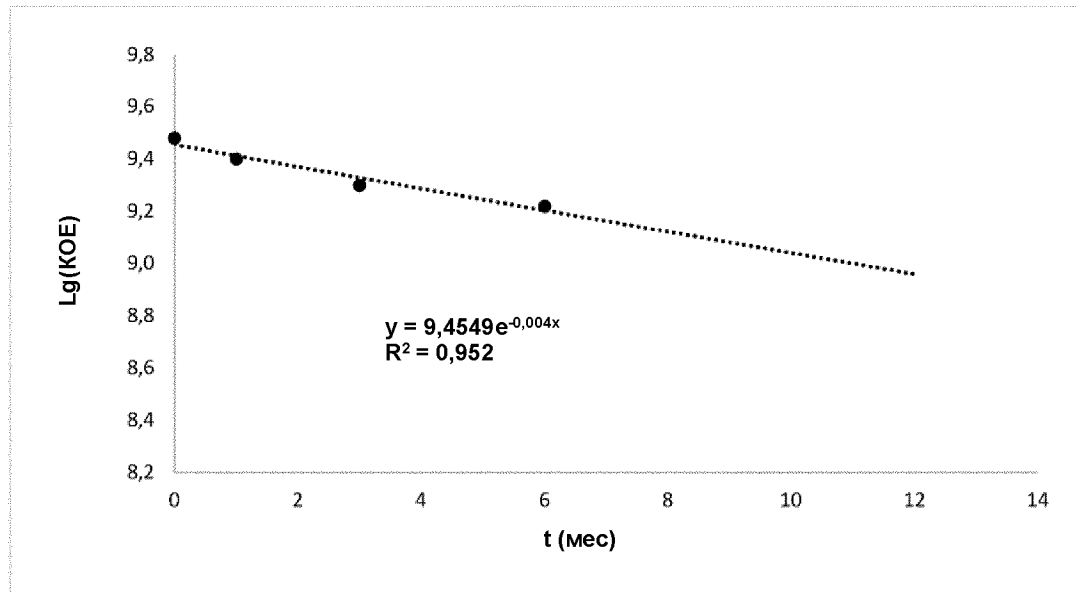
**ФИГ. 3**

Масштаб древа: 0,1

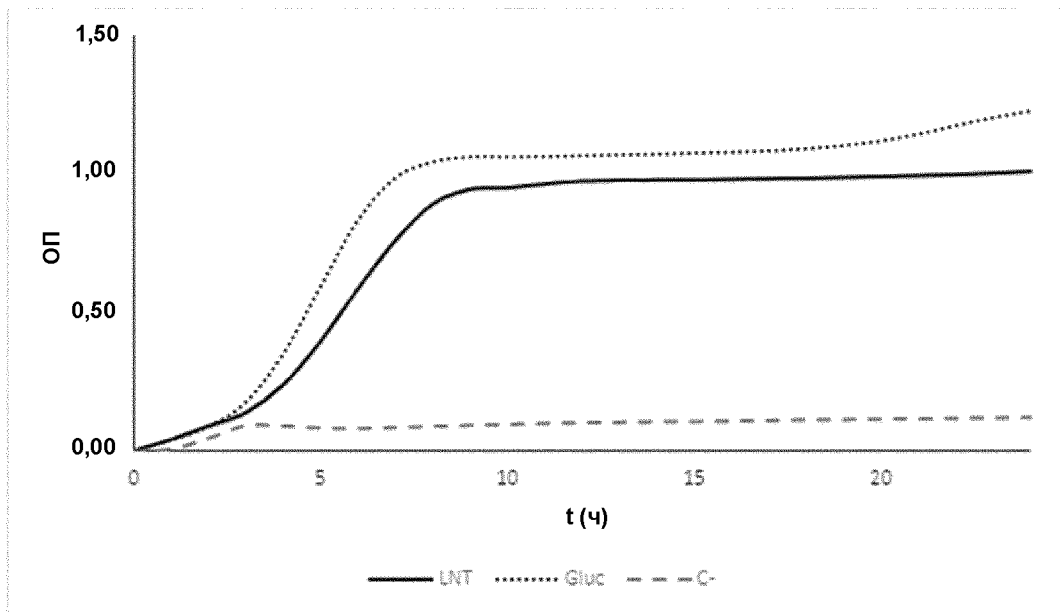




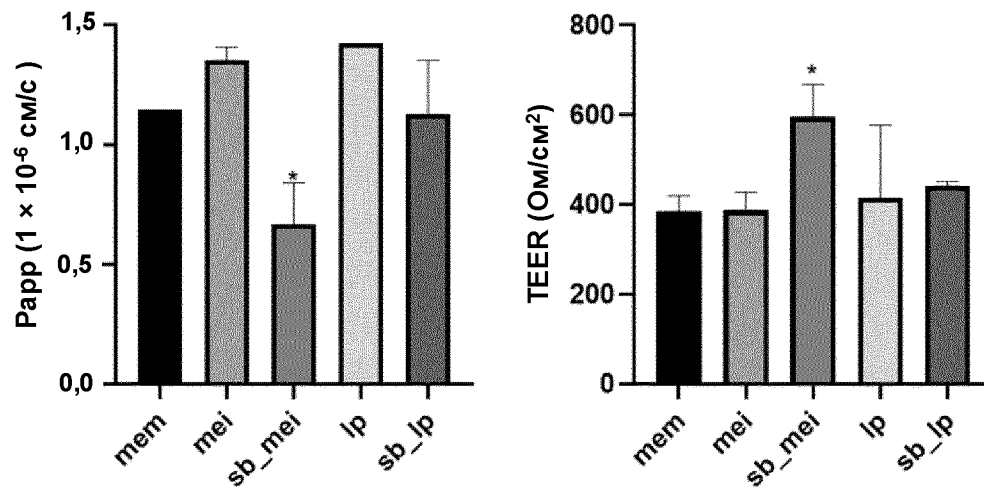
ФИГ. 4



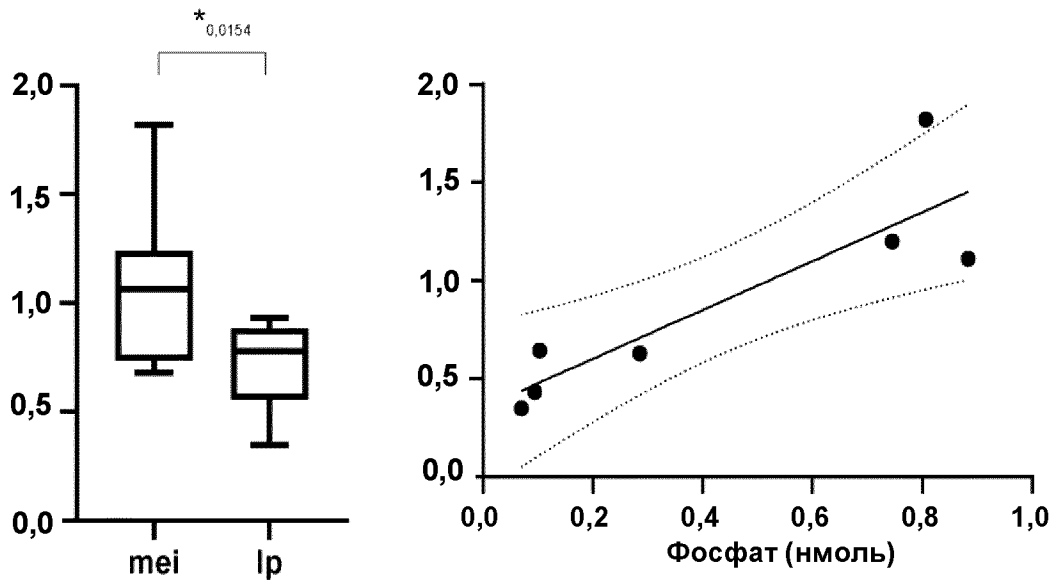
ФИГ. 5



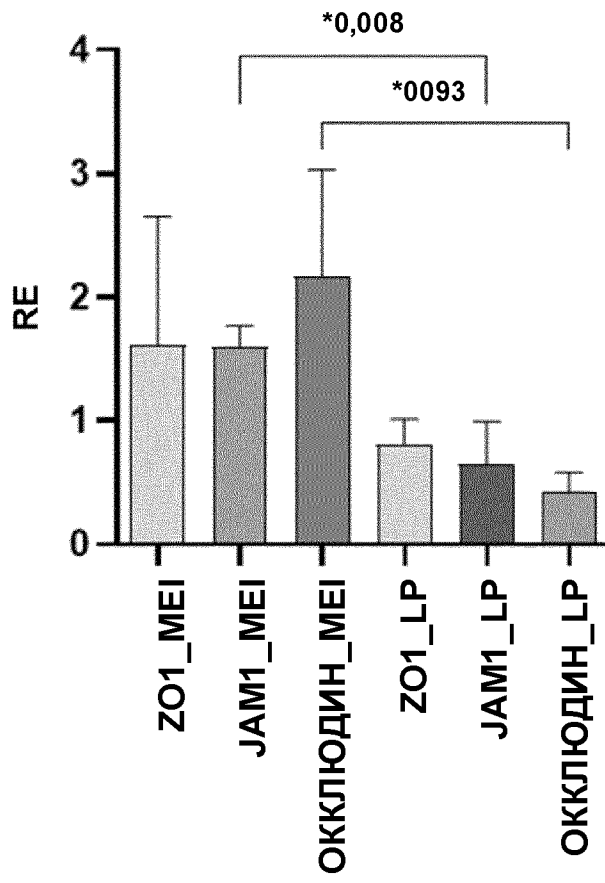
ФИГ. 6



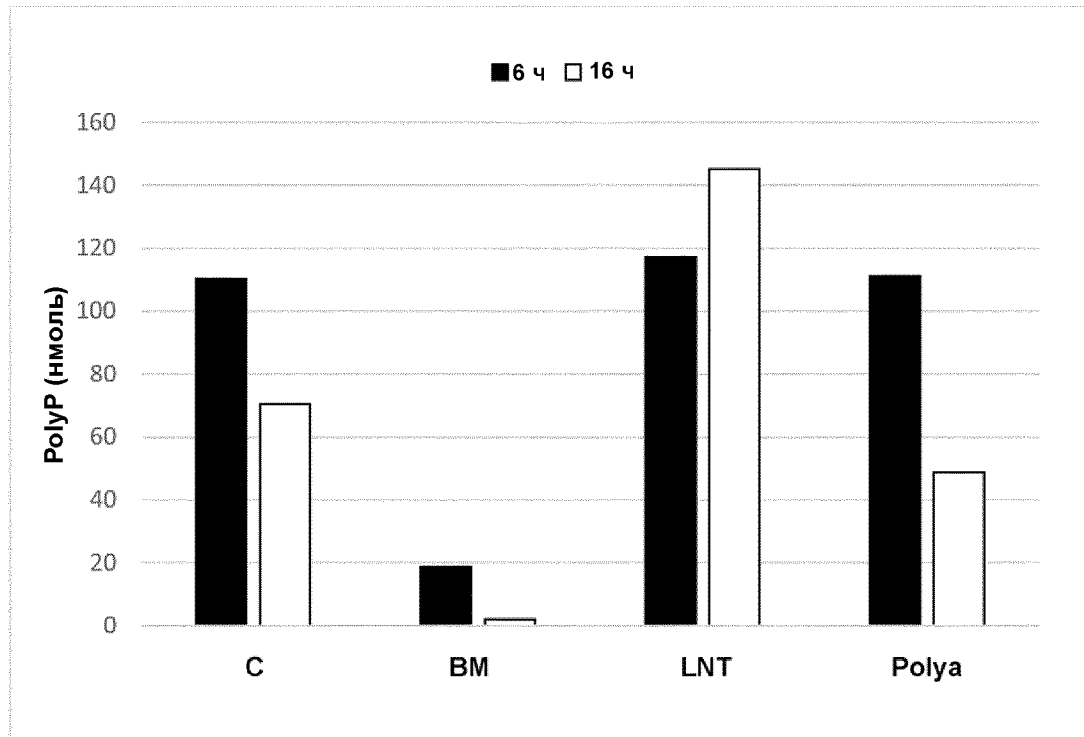
ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

