

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005127331/13, 27.01.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.01.2004(30) Конвенционный приоритет:
31.01.2003 SE 0300245-8

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2006

(45) Опубликовано: 20.04.2009 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: YANO T. et al, *Selective Growth and
Mechanism of Related Enzymes of Bifidobacteria,*
Japanese Journal of Dairy and Food Science, v.39,
№ 6, 1990. US 6077504, 20.06.2000. RU 2112034
C1, 27.05.1998.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 31.08.2005(86) Заявка РСТ:
SE 2004/000098 (27.01.2004)(87) Публикация РСТ:
WO 2004/067731 (12.08.2004)Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, А.В.
Поликарпову

(72) Автор(ы):

МОЛИН Геран (SE),
АХРНЕ Сив (SE),
ЙЕППССОН Бенгт (SE)

(73) Патентообладатель(и):

ПРОБИ АБ (SE)

(54) НОВЫЕ ШТАММЫ БИФИДОБАКТЕРИЙ, ОБЛАДАЮЩИЕ СПОСОБНОСТЬЮ
ПРОДУЦИРОВАТЬ ГЛУТАМИН

(57) Реферат:

Изобретение относится к области микробиологии и может быть использовано в фармацевтической промышленности и в медицине. Новые штаммы *Bifidobacterium infantis* обладают способностью выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин. Данные штаммы используют в составе композиции или для получения лекарственного средства, которые назначают либо пациентам,

подвергшимся обширному хирургическому вмешательству или интенсивной терапии при синдроме полиорганной недостаточности и кишечной недостаточности, либо пациентам, получающим химиотерапию или страдающим воспалительными заболеваниями. Применение изобретения позволяет обеспечить высокую продукцию глутамина в среде для роста, имитирующей среду толстого кишечника. 16 н. и 23 з.п. ф-лы, 6 ил., 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2005127331/13, 27.01.2004**(24) Effective date for property rights:
27.01.2004(30) Priority:
31.01.2003 SE 0300245-8(43) Application published: **27.01.2006**(45) Date of publication: **20.04.2009 Bull. 11**(85) Commencement of national phase: **31.08.2005**(86) PCT application:
SE 2004/000098 (27.01.2004)(87) PCT publication:
WO 2004/067731 (12.08.2004)Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, A.V. Polikarpovu

(72) Inventor(s):

**MOLIN Geran (SE),
AKhrNE Siv (SE),
JEPPSSON Bengt (SE)**

(73) Proprietor(s):

PROBI AB (SE)**(54) NOVEL STRAINS OF BIFIDOBACTERIA, POSSESSING ABILITY TO PRUDUCE GLUTAMINE**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology, medicine.

SUBSTANCE: novel strains *Bifidobacterium infantis* possess ability to survive in intestinal tract and produce glutamine. Said strains are used as components of composition or for obtaining medications, which are either prescribed to patients, subjected to vast surgical interference or

intensive therapy in case of syndrome of multiple organ failure and intestine failure, or to patients, undergoing chemical therapy or suffering from inflammatory diseases.

EFFECT: high glutamine production in growth medium, imitating large intestine medium.

39 cl, 6 dwg, 3 tbl

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым штаммам *Bifidobacterium*, обладающим способностью продуцировать глутамин и необязательно аргинин *in vivo*.

Уровень техники изобретения

Глутамин представляет собой аминокислоту, присутствующую в организме в наибольшем количестве. Он является «переносчиком азота» между тканями и питательными веществами для энтероцитов, колоноцитов, лимфоцитов и пролифилирующих клеток. У пациентов с недостатком глутамина ослаблена функция кишечника, в частности, вследствие потери защиты против транслокации бактерий и/или эндотоксина из просвета кишечника в кровообращение в системе воротной вены. Недостаток глутамина встречается у тяжелобольных или тяжелораненых пациентов и может способствовать высокой степени инфицированности и мышечному истощению.

Энтеральное введение глутамина оказывает благоприятное воздействие на пациентов с различными симптомами. В отделении интенсивной терапии для пациентов с множественным нарушением функций органов введение глутамина уменьшало инфекционные осложнения у таких пациентов (Houdijk *et al.*, *Lancet*, 352: 772-776, 1998). Похожие эффекты наблюдали у пациентов, подвергшихся пересадке костного мозга, получающих добавленный к парентеральному питанию глутамин (Ziegler *et al.*, *Annals Internal Medicine*, 116: 821-828, 1992). Другим примером являются пациенты с синдромом укороченной тонкой кишки, у которых наблюдали существенное улучшение их абсорбционной способности после введения глутамина (Byrne *et al.*, *Annals of Surgery*, 222: 243-255, 1995). Также было показано, что пероральное введение глутамина во время и после химиотерапии значительно уменьшало как продолжительность, так и серьезность связанного с химиотерапией стоматита. Был сделан вывод о том, что перорально вводимый глутамин, по-видимому, является простым и эффективным средством для увеличения общего состояния многих пациентов с высоким риском развития ран во рту как последствий интенсивной химиотерапии рака (Anderson *et al.*, *Cancer* 1998; 83: 1433-9). Введение глутамина с пищей после интенсивной нагрузки также уменьшало частоту инфекций, особенно инфекций верхних дыхательных путей (Castell, *Amino acids* 2001; 20 (1): 49-61). Тем не менее, точное действие глутамина при иммунодепрессии пока еще не установлено.

Наибольшая техническая сложность, связанная с глутамином, заключается в том, что во время получения и хранения глутамин легко преобразуется в глутаминовую кислоту (глутамат), то есть глутамин представляет собой относительно нестабильное соединение, которое сложно включить в состав пероральной композиции. Более того, перорально вводимый глутамин будет находиться в кислом окружении желудка и вероятней всего будет преобразован в глутаминовую кислоту, и никогда не достигнет кишечника и не абсорбируется в качестве глутамина.

Аргинин повышает функцию иммунной системы и способствует заживлению ран. Введение аргинина использовали у пациентов после операции и пациентов, подвергающихся интенсивной терапии. В большинстве клинических исследований аргинин вводили совместно с другими веществами, такими как РНК и рыбий жир. Существуют данные, свидетельствующие о том, что введение аргинина модулирует послеоперационный иммунный ответ. В публикации Daly, John E., *et al.*, *Surgery* 112: 55-67, 1992 показано, что энтеральное питание с добавлением аргинина, РНК и омега-3-жирных кислот пациентов после операции улучшает иммунную защиту

посредством различных механизмов. Аргинин уменьшает осложнения у пациентов, подвергающихся химиолучевой терапии и хирургическому вмешательству (Teraske et al., 2001; *Lancet* 358: 696-701) и уменьшает длительность пребывания пациентов в отделении интенсивной терапии (Bauer et al., 1995, *Critical Case Medicine* 23: 436-449).

Увеличение выживаемости можно наблюдать у животных, которые находились на пищевом рационе с дополнением аргинина. Количественный подсчет колоний и вычисление процента оставшихся жизнеспособных бактерий показали, что способность уничтожать транслоцированные организмы значительно повышалась у животных, получавших аргинин (Adawi, D., et al., 1997, *Hepatology* 25: 642-647).

Штаммы *Bifidobacterium* spp., которые представляют собой бифидобактерии, часто присутствуют в большом количестве в толстой кишке человека, особенно у детей, находящихся на грудном вскармливании. Считается, что бактерии из *Bifidobacterium* spp. являются пробиотиками, то есть, это живые бактерии, которые при приеме внутрь оказывают благоприятное воздействие на организм хозяина. Было установлено, что большое количество *Bifidobacterium* spp. в толстом кишечнике оказывает благоприятное воздействие на организм. Тем не менее, механизм такого благоприятного воздействия в значительной степени неизвестен.

Предшествующий уровень техники

Matteuzzi et al. [*Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1978; 129 B, 175-181] исследовали большое количество бифидобактерий, имеющих различные зоны распространения на их способность секретировать свободные аминокислоты в бульонную культуру. Полученные данные указывают на то, что некоторые виды бифидобактерий способны синтезировать все аминокислоты, необходимые для роста, и также выделять указанные соединения в культуральную жидкость. Было обнаружено, что *B.thermophilum*, *B.bifidum* и *B.adolescentis* являются лучшими продуцентами, и аминокислоты, в основном обнаруживаемые в культуральных жидкостях, представляли собой, главным образом, аланин, валин и аспарагиновую кислоту. Было предположено, что *Bifidobacterium* spp. играют ненужную роль в аминокислотном метаболизме желудочно-кишечного тракта.

В заявке WO 01/83700 (University of Maryland) описана композиция и способ лечения и профилактики желудочно-кишечных нарушений, неонатального некротического энтероколита (NEC) и бактериального сепсиса. Композиция включает в себя комбинацию грамположительных бактерий, в частности *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, и глутамин и ее следует вводить перорально или назоперорально. Было указано, что композиция блокирует транслокацию бактериальных агентов, таких как грамотрицательные бактерии.

Вводимый внутривенно глутамин очень эффективен, но дорог и сложен. Лучшим способом введения глутамина, конечно, могло бы стать использование бактериального штамма, обладающего способностью продуцировать значительные количества глутамина в кишечнике. Однако до сих пор никаких таких штаммов описано не было.

Сущность изобретения

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что определенные штаммы *Bifidobacterium* способны продуцировать глутамин в среде для роста, имитирующей среду толстого кишечника человека. Указанные штаммы можно, таким образом, использовать для получения глутамина *in vivo* после перорального или энтерального введения млекопитающим, особенно человеку. Некоторые из штаммов также способны продуцировать аргинин.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематически представлены электрофоретические данные, полученные с помощью типирования по длине рестрикционных фрагментов (RFLP) для штаммов CURE 19, CURE 21, CURE 26, CURE 28 и CURE 29, полученных при расщеплении хромосомной ДНК при помощи EcoRI и Hind III, соответственно, за которым следовала гибридизация с меченным DIG зондом, состоящим из фрагмента величиной 420 н.п. (положения с 506 до 926, нумерация в *E. coli*) гена 16S рРНК *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008, используя гибридизацию блоттингом по Саузерну. Меченный Dig маркер молекулярной массы ДНК II (Roche) и маркер молекулярной массы ДНК VI (Roche) использовали в качестве стандарта.

На фиг. 2 показана фотография разделенных фрагментов ДНК, полученных при расщеплении хромосомной ДНК штаммов CURE 19 (полоса 1), CURE 29 (полоса 2) и CURE 28 (полоса 3) рестрикционным ферментом EcoRI (анализ с рестрикционной эндонуклеазой, REA). Маркер высокомолекулярной массы ДНК (BRL) и маркер молекулярной массы ДНК VI (Roche) использовали в качестве стандарта (полоса 4).

На фиг. 3 показана фотография разделенных фрагментов ДНК, полученных при расщеплении хромосомной ДНК штаммов CURE 19 (полоса 2), CURE 28 (полоса 3) и CURE 29 (полоса 4) рестрикционным ферментом Hind III. Маркер высокомолекулярной массы ДНК (BRL) и маркер молекулярной массы ДНК VI (Roche) использовали в качестве стандартов (полосы 1 и 5).

На фиг. 4 показана фотография разделенных фрагментов ДНК, полученных при расщеплении хромосомной ДНК штаммов CURE 21 (полоса 1) и CURE 26 (полоса 2) рестрикционным ферментом EcoRI. Маркер высокомолекулярной массы ДНК (MD, США) и маркер молекулярной массы ДНК VI (Roche) использовали в качестве стандарта (полоса 3).

На фиг. 5 показана фотография разделенных фрагментов ДНК, полученных при расщеплении хромосомной ДНК штаммов CURE 21 (полоса 2) и CURE 26 (полоса 3) рестрикционным ферментом Hind III. Маркер высокомолекулярной массы ДНК (Мэрилэнд, США) и маркер молекулярной массы ДНК VI (Roche) использовали в качестве стандартов (полосы 1 и 4).

На фиг. 6 показан индекс активности заболевания на 4, 5, 6 и 7 день. Символ «*» обозначает $p < 0,05$ по сравнению с контрольным колитом, Q обозначает $p < 0,05$ по сравнению с *L. gasseri*, символ «#» обозначает $p < 0,05$ по сравнению с *L. paracasei*.

Описание изобретения

Изобретение относится к штамму *Bifidobacterium*, обладающему способностью выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*. Главным образом, глутамин продуцируется в толстой кишке человека. Выживание в данном контексте означает, что бактериальные штаммы изолировали в различных случаях забора образцов в фекалиях индивидуума. Таким образом, бактерии некоторое время, очевидно, растут и выживают в организме их хозяина. Бифидобактериальные штаммы по изобретению могут расти на питательных средах, имеющих pH ниже 7, главным образом 5,5-6,5. Агар Рогоза представляет собой один пример такой среды, другим примером является MRS.

В предпочтительном аспекте новые штаммы также обладают способностью поглощать аммиак.

Изобретение, главным образом, относится к штаммам, принадлежащим к виду *Bifidobacterium infantis*.

В определенном аспекте изобретение также относится к штамму *Bifidobacterium*,

который содержит гены 16S рПНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК молекулярных размеров приблизительно 2840 т.п.н., полученных при расщеплении хромосомной ДНК с использованием Hind III, за которым следовало разделение фрагментов посредством электрофореза в агарозном геле и гибридизация с меченным DIG зондом из фрагмента величиной 420 н.п. (положения с 506 до 926, нумерация в *E. coli*) гена 16S рПНК *L.casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 с использованием гибридизации блоттингом по Саузерну. Такие штаммы представляют собой, например, штаммы, помещенные в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 23 августа 2002 года, *Bifidobacterium infantis* CURE 19 (DSM 15158); *Bifidobacterium infantis* CURE 21 (DSM 15159); *Bifidobacterium infantis* CURE 26 (DSM 15160); *Bifidobacterium infantis* CURE 28 (DSM 15161); *Bifidobacterium infantis* CURE 29 (DSM 15162).

Другой аспект изобретения также относится к штамму *Bifidobacterium*, который содержит гены 16S рПНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК молекулярных размеров приблизительно 895 т.н.п., полученных при расщеплении хромосомной ДНК с использованием EcoRI, за которым следовало разделение фрагментов посредством электрофореза в агарозном геле, и гибридизация с меченным DIG зондом из фрагмента величиной 420 н.п. (положения с 506 до 926, нумерация в *E. coli*) гена 16S рПНК *L.casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 с использованием гибридизации блоттингом по Саузерну. В предпочтительном аспекте указанные штаммы способны продуцировать глутамин без уменьшения количества глутаминовой кислоты.

Изобретение, главным образом, относится к штаммам *Bifidobacterium infantis* CURE 21 и *Bifidobacterium infantis* CURE 26, которые помещены в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 23 августа 2002 года и которым присвоены номера доступа DSM 15159 и DSM 15160, соответственно, или их вариантам. Указанные штаммы способны продуцировать глутамин без уменьшения количества глутаминовой кислоты.

По другому аспекту изобретение также относится к штамму *Bifidobacterium*, который содержит гены 16S рПНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК молекулярных размеров приблизительно 3420 т.н.п., полученных при расщеплении хромосомной ДНК с использованием EcoRI, за которым следовало разделение фрагментов посредством электрофореза в агарозном геле и гибридизация с меченным DIG зондом из фрагмента величиной 420 н.п. (положения с 506 до 926, нумерация в *E. coli*) гена 16S рПНК *L.casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 с использованием гибридизации блоттингом по Саузерну. По предпочтительному аспекту указанный штамм обладает способностью продуцировать аргинин.

Изобретение, главным образом, также относится к следующим штаммам, которые помещены в Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 23 августа 2002 г. и которым присвоен номер доступа, а именно *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161 и *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162 и их вариантам. Указанные штаммы способны также продуцировать аргинин в дополнение к глутамину.

Все новые штаммы были изолированы из фекалий маленьких детей и выбраны для культивирования на агаре при значении pH ниже 7. Штаммы впоследствии охарактеризовали при помощи риботипирования и REA.

Другой целью изобретения является композиция, содержащая один или более штаммов *Bifidobacterium* по изобретению в комбинации с носителем. Примеры

носителей представляют собой овсяную кашу, кисломолочные ферментированные продукты, инулин, лактулозу, фруктоолигосахариды, устойчивый крахмал, β -глюканы и гуаровую смолу. Для того чтобы улучшить пролиферацию бифидобактерий и

увеличить продукцию глутамин и аргинина, соответственно, и увеличить поглощение аммиака в толстом кишечнике, следует добавлять в композицию диетические волокна. Диетические волокна представляют собой, например, инулин, фруктоолигосахариды, мальтодекстрины, β -глюканы и гуаровую смолу. Таким образом, изобретение также относится к композиции, содержащей, как описано, диетические волокна.

Композиции по изобретению, такие как суспензии, таблетки, капсулы, порошки, можно вводить перорально. Также их можно вводить в клизме.

Композиция по изобретению может представлять собой пищевую композицию, в которой носитель является пищевым продуктом. Штаммы *Bifidobacterium*, продуцирующие глутамин, можно назначать маленьким детям, пожилым людям, спортсменам и обычным потребителям, которые желают поддержать форму, улучшить работу мышц и избежать подавления иммунитета после физических нагрузок. Штаммы *Bifidobacterium*, продуцирующие аргинин, можно давать обычным потребителям, которые хотят поддержать форму и избежать отрицательного воздействия на иммунную функцию.

Композиция по изобретению может представлять собой фармацевтическую композицию, в которой носитель является терапевтически приемлемым носителем. Штаммы, продуцирующие глутамин, а также штаммы, продуцирующие аргинин, можно дополнительно использовать в составах для энтерального питания.

Штаммы *Bifidobacterium* по изобретению, поглощающие аммиак, можно назначать пациентам с преходящей почечной недостаточностью, такой как наблюдаемой у пациентов, находящихся на интенсивной терапии после хирургической операции и осложнений или после других заболеваний, таких как серьезные инфекции, интоксикации. В таких случаях, как предполагается, функция почек, восстанавливается, и лечение, направленное на уменьшение азотной нагрузки в кишечнике, может избавить от необходимости в диализе. Штаммы, поглощающие аммиак можно вводить пациентам с печеночной недостаточностью и энцефалопатией, например, при гепатитах или интоксикации или после злоупотребления алкоголем. Сниженная абсорбция азотных веществ в кишечнике будет в таких ситуациях облегчать энцефалопатию и улучшать функцию печени. Штаммы *Bifidobacterium*, поглощающие аммиак, можно назначать маленьким детям, пожилым людям или потребителям с заболеваниями, которые препятствуют преобразованию в печени аммиака в мочевины, или у которых увеличена абсорбция азота в кишечнике, например, у пациентов с хронической почечной или печеночной недостаточностью от небольшой до средней степени, не нуждающихся еще в трансплантации или диализе.

В определенном аспекте, композиция по изобретению также может содержать один или несколько штаммов *Lactobacillus*.

Кроме необязательного благоприятного воздействия, оказываемого молочнокислыми бактериями как таковыми, указанные бактерии могут защищать бифидобактерии от вредного воздействия кислорода.

В еще одном аспекте изобретение относится к одному или нескольким штаммам, принадлежащим к виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в терапии.

Изобретение относится к использованию одного или нескольких штаммов *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28,

DSM 15161; *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162 или их вариантам для получения лекарственных препаратов для лечения пациентов, находящихся на интенсивной терапии с множественным нарушением функций органов и кишечной недостаточностью, для профилактики у пациентов, подвергающихся химиотерапии, и

пациентов с воспалительными заболеваниями и для послеоперационного введения после обширного хирургического вмешательства.

Экспериментальная часть

Выделение штаммов

Все штаммы выделяли из фекалий маленьких детей в возрасте от одной недели до одного года. Образцы фекалий последовательно разбавляли в растворе для разбавления (0,9% [мас./об.] NaCl, 0,1% [мас./об.] пептона, 0,1% [мас./об.] твина 80, 0,02% [мас./об.] цистеина-HCl) и наносили на чашки с агаром Рогоза. Изоляты выбирали по их способности расти на агаре Рогоза, pH 5,4 и повторяли выделение из одного индивидуума. Изоляты собирали с чашек с агаром Рогоза после инкубации при 37°C в течение 72 часов. Их идентифицировали на уровне рода при помощи специфичной для рода PCR (Roy *et al.*, 2000; *FEMS Microbiological Letters* 191: 17-24) и на уровне вида при помощи секвенирования 16S рДНК (Pettersson *et al.*, 2002; *Systematic and Applied Microbiology* 23: 332-336). Штаммы можно было выделять, по крайней мере, дважды из одного и того же индивидуума с перерывом от одной до четырех недель между сбором образцов, которые убедительно указывают на то, что штаммы обладали определенной способностью колонизировать ЖК тракт. Штаммы идентифицировали риботипированием, которое представляет собой анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, RFLP, гена 16S рПНК, и при помощи REA, который представляет собой анализ с рестрикционной эндонуклеазой.

Выделили следующие штаммы:

- 1) *Bifidobacterium infantis* CURE 19; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «кислый» запах после ферментации;
- 2) *Bifidobacterium* CURE 20; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «кислый» запах после ферментации;
- 3) *Bifidobacterium infantis* CURE 21; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «кислый» запах после ферментации;
- 4) *Bifidobacterium* CURE 22; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «приятный» запах после ферментации;
- 5) *Bifidobacterium* CURE 23; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «приятный» запах после ферментации;
- 6) *Bifidobacterium infantis* CURE 24; способен расти на агаре Рогоза и до некоторой степени ферментировать овсяную кашу, «приятный» запах после ферментации;
- 7) *Bifidobacterium* CURE 25; способен расти на агаре Рогоза и ферментировать овсяную кашу;
- 8) *Bifidobacterium infantis* CURE 26; способен расти на агаре Рогоза и ферментировать овсяную кашу;
- 9) *Bifidobacterium dentium* CURE 27; способен расти на агаре Рогоза и ферментировать овсяную кашу;
- 10) *Bifidobacterium infantis* CURE 28; способен расти на агаре Рогоза и ферментировать овсяную кашу;
- 11) *Bifidobacterium infantis* CURE 29; способен расти на агаре Рогоза и ферментировать овсяную кашу;
- 12) *Bifidobacterium infantis* CURE 30; способен расти на агаре Рогоза и

ферментировать овсяную кашу.

Продукция глутамина

Выделенные штаммы 1-12 исследовали относительно продукции глутамина в бульон посредством следующей процедуры.

Исследуемые штаммы культивировали при 37°C в течение 4 дней в питательной среде (бульон), модифицированной на основе среды, описанной Matteuzzi et al. (Ann. Microbil. (Inst. Pasteur, 1978, 129 B: 175-181). Бульон состоял из: ацетата натрия, 10 г/л; аскорбиновой кислоты, 10 г/л; сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄), 5 г/л; вторичного гидрофосфата калия (K₂HPO₄), 3 г/л; дигидрофосфата калия (KH₂PO₄), 3 г/л; MgSO₄ × 7H₂O, 0,32 г/л; FeSO₄ × 7H₂O, 0,01 г/л; MnSO₄ × H₂O, 0,007 г/л; NaCl, 0,01 г/л; дрожжевого экстракта, 0,5 г/л; глюкозы, 20 г/л; твина 80, 1 мл/л. Перед автоклавированием pH доводили до 6,18-6,24 с использованием 1M NaOH.

Концентрацию глутамина в бульоне измеряли до инокуляции бактерий и после роста исследуемого штамма. После выращивания культуру центрифугировали и фильтровали в стерильных условиях и потом несодержащий клетки супернатант замораживали при -80°C. Аминокислоты анализировали в автоматическом анализаторе (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) после добавления сульфосалициловой кислоты и доведения pH с использованием гидроксида лития.

Увеличение концентрации глутамина и глутаминовой кислоты в бульоне после выращивания различных исследуемых штаммов показано ниже в таблице 1.

Таблица 1. Увеличенная концентрация глутамина и уменьшение/продукция глутаминовой кислоты в бульонной культуре после выращивания исследуемых штаммов <i>Bifidobacterium</i> .		
Исследуемый штамм	Глутамин (мкмоль/л)	Глутаминовая кислота (уменьшение (R), продукция (P) в мкмоль/л)
<i>B. infantis</i> CURE 19	53 (29-67) [#]	R
<i>Bifidobacterium</i> CURE 20	4,2 (3,5-4,8) [§]	R
<i>B. infantis</i> CURE 21	37 (36-38) [#]	P 37 (31-41)
<i>Bifidobacterium</i> CURE 22	16 (14-18) [§]	R
<i>Bifidobacterium</i> CURE 23	8,9 (8,1-9,6) [§]	R
<i>B. infantis</i> CURE 24	3,0 (0-5,9) [§]	R
<i>B. infantis</i> CURE 25	35	R
<i>B. infantis</i> CURE 26	36	P 60
<i>B. dentium</i> CURE 27	7,4	R
<i>B. infantis</i> CURE 28	35	R
<i>B. infantis</i> CURE 29	28	R
<i>B. infantis</i> CURE 30	37	R
[#] Среднее значение для трех образцов, полученных из трех отдельных культур		
[§] Среднее значение для двух образцов, полученных из двух отдельных культур		

Все исследуемые штаммы продуцировали некоторое количество глутамина, но только семь из 12 исследуемых штаммов осуществляли относительно высокую продукцию глутамина (> 20 мкмоль/л). Для всех штаммов, кроме двух (CURE 21 и CURE 26), увеличение глутамина имело место наряду с сильным уменьшением количества глутаминовой кислоты в среде. Среда, к которой не добавляли никаких бактерий, имела среднюю начальную концентрацию глутаминовой кислоты 223 мкмоль/л, в то время как содержание глутамина равнялось нулю. Три штамма CURE 20, CURE 23 и CURE 24 потребляли всю доступную концентрацию глутаминовой кислоты в среде, в то время как CURE 28 уменьшал концентрацию глутаминовой кислоты на 247 мкмоль/л, CURE 29 на 220 мкмоль/л, CURE 22 на 187 мкмоль/л, CURE

19 на 128 мкмоль/л, CURE 30 на 160 мкмоль/л, CURE 27 на 151 мкмоль/л и CURE 25 на 47 мкмоль/л. Можно сделать предположение, что данные бактерии преобразуют глутаминовую кислоту в глутамин. Два штамма CURE 21 и CURE 26 продуцировали глутамин без какого-либо уменьшения концентрации глутаминовой кислоты в среде. В отличие от других штаммов, они увеличивали уровень глутаминовой кислоты в бульоне.

Продукция аргинина

Продукцию данной аминокислоты в каждом исследуемом штамме измеряли после выращивания исследуемого штамма при 37°C в течение 4 дней в питательной среде (бульон), модифицированной на основе среды, описанной Matteuzzi et al. (1978).

Бульон состоял из: ацетата натрия, 10 г/л; аскорбиновой кислоты, 10 г/л; сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄), 5 г/л; вторичного гидрофосфата калия (K₂HPO₄), 3 г/л; дигидрофосфата калия (KH₂PO₄), 3 г/л; MgSO₄ × 7H₂O, 0,32 г/л; FeSO₄ × 7H₂O, 0,01 г/л; MnSO₄ × H₂O, 0,007 г/л; NaCl, 0,01 г/л; дрожжевого экстракта, 0,5 г/л; глюкозы, 20 г/л; твина 80, 1 мл/л. Перед автоклавированием pH доводили до 6,18-6,24 с использованием 1M NaOH.

Концентрацию аминокислоты в бульоне измеряли до инокуляции бактерий и после выращивания исследуемого штамма. После выращивания культуру центрифугировали и фильтровали в стерильных условиях и потом несодержащий клетки супернатант замораживали при -80°C. Аминокислоты анализировали в автоматическом анализаторе (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) после добавления сульфосалициловой кислоты и доведения pH с использованием гидроксида лития.

Увеличение концентрации аргинина и цитруллина в бульоне после выращивания различных исследуемых штаммов показано в таблице 2.

Таблица 2.

Увеличенные концентрации аргинина и цитруллина в бульоне после выращивания исследуемых штаммов.

Исследуемый штамм	Аргинин (мкмоль/л)	Цитруллин (мкмоль/л)
<i>B. infantis</i> CURE 19	11 (8,8-14) [#]	52 (9,2-136) [#]
<i>Bifidobacterium</i> CURE 20	0 [§]	4,1 (4,4-3,7) [§]
<i>B. infantis</i> CURE 21	0 [#]	0 [#]
<i>Bifidobacterium</i> CURE 22	0 [§]	6,3 (5,8-6,7) [§]
<i>Bifidobacterium</i> CURE 23	2,0 (0-3,9) [§]	6,1 (5,4-6,8)
<i>B. infantis</i> CURE 24	0 [§]	0 [§]
<i>B. infantis</i> CURE 25	0	4,2
<i>B. infantis</i> CURE 26	2,6	0
<i>B. dentium</i> CURE 27	4,9	0,0
<i>B. infantis</i> CURE 28	37	202
<i>B. infantis</i> CURE 29	26	13
<i>B. infantis</i> CURE 30	2,0	5,7
[#] Среднее значение для трех образцов, полученных из трех отдельных культур		
[§] Среднее значение для двух образцов, полученных из двух отдельных культур		

Три из 12 исследуемых штаммов, а именно CURE 19, CURE 28 и CURE 29, увеличивали концентрацию аргинина более чем на 10 мкмоль/л. Два из указанных штамма, а именно CURE 19 и CURE 28, также осуществляли поразительно значительную продукцию цитруллина (>100 мкмоль/л). Цитруллин продуцировался либо дезаминированием аргинина или посредством NO-синтазы и образования NO. Продукция цитрулина также отражает продукцию аргинина на более ранней стадии.

Другие аминокислоты также выделялись в бульон во время роста исследуемых

штаммов, см. таблицу 3. CURE 21 не продуцировал ни цитруллин, ни аргинин, но продуцировал значительные количества аспарагиновой кислоты и тирозина. CURE 26 не продуцировал никакого цитруллина, но продуцировал небольшие количества аргинина и широкий спектр различных аминокислот. Более того, CURE 26 представлял собой единственный штамм, который увеличивал концентрацию пролина в бульоне. Все исследуемые штаммы продуцировали треонин.

ТАБЛИЦА 3.
Увеличение концентраций аминокислот (мкмоль/л) дополнительно к глутамину, глутаминовой кислоте, аргинину и цитруллину в бульоне после выращивания исследуемых штаммов.

Штамм	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ala	Gly	Ile
CURE 19	39	15	0	23	15	0	0
CURE 21	51	21	0	96	0	0	0
CURE 26	46	46	12	151	61	0	6
CURE 28	44	12	14	0	0	0	0
CURE 29	35	28	0	0	2	0	0

Thr - треонин; Tyr - тирозин; Cys - цистеин; Asp - аспарагиновая кислота; Ala - аланин; Gly - глицин; Ile - изолейцин

Значения представляют собой средние значения для трех или двух образцов из трех или двух отдельных культур.

Генотипическая идентификация

REA

Штаммы исследовали относительно характера расщепления хромосомной ДНК посредством анализа с рестрикционной эндонуклеазой - REA - способом по публикации Stahl M, Molin G, Persson A, Ahrne S & Stahl S, International Journal of Systematic Bacteriology, 40:189-193, 1990 и дополнительно усовершенствованным Johansson, M-L et al. International Journal of Systematic Bacteriology 45:670-675, 1995. Схематически REA можно описать следующим образом: хромосомную ДНК из штаммов, вовлеченных в исследование, получали и расщепляли рекстрикционными эндонуклеазами. 0,75 мкг каждой ДНК отдельно обрабатывали при 37°C в течение 4 ч с использованием 10 единиц EcoRI и Hind III; каждую эндонуклеазу использовали отдельно. Расщепленные фрагменты ДНК разделяли по размеру электрофорезом в геле, используя погруженные горизонтальные агарозные блочные гели. Гели состояли из 150 мл 0,9% агарозы (с ультрачистой степенью чистоты для ДНК; низким электрическим внутренним осмосом; BioRad Laboratories, Ричмонд, США) и их заливали в качестве блочных гелей (150 на 235 мм). 0,2 мкг маркера ДНК высокомолекулярной массы (Bethesda Research Laboratories, Мэриленд, США) совместно с 0,5 мкг маркера молекулярного веса ДНК VI (Roche, Германия) использовали в качестве стандартов. Минимального смещения полосы и максимальной четкости добились, применяя образец ДНК в загрузочном буфере с фиколлом (2 г фиколла, 8 мл воды, 0,25% бромфенола).

Гели электрофорезировали при постоянном напряжении 40V в течение 18 ч приблизительно при 6-8°C. Буфер (89 mM Tris, 23 mM H₃PO₄, 2 mM EDTA натрия, pH 8,3) рециркулировал во время периода электрофореза. Затем гели окрашивали в течение 20 минут бромидом этидия (2 мкг/мл) и обесцвечивали в дистиллированной воде, визуализировали при 302 нм с использованием прибора для УФ-просвечивания (UVP Inc., Сан-Габриель, США) и фотографировали. Данный способ проведения электрофореза в геле дал хорошо распределенную и относительно хорошо разделенную полосу снизу молекулярной массы $1,2 \times 10^6$.

RFLP гена 16S рРНК (риботипирование)

Получение хромосом и анализ с рестрикционной эндонуклеазой хромосомной ДНК проводили как описано ранее (Stahl et al., 1990, Stahl et al., 1994).

Зонд представлял собой фрагмент из 420 н.п. (положения с 506 до 926, нумерация в *E.coli*) гена 16S рРНК *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* DSM 20008, полученный при PCR и меченный DIG-способом мечения ДНК по инструкции, прилагаемой производителем (Boehringer Mannheim, Бромма, Швеция). Используемое в реакции количество зонда составляло 50 нг.

Гибридизация блоттингом по Саузерну. Один мкг хромосомной ДНК расщепляли с использованием 10 ед. EcoRI и Hind III (Boehringer Mannheim) в течение 4 ч при 37°C. Разделение рестрикционных фрагментов электрофорезом в агарозном геле проводили по Stahl et al., 1994. Меченный DIG маркер молекулярной массы ДНК II и маркер молекулярной массы ДНК VI использовали в качестве стандартов (Roche, Германия). ДНК иммобилизовали на положительно заряженной нейлоновой мембране (Roche) высушиванием в течение 30 мин при 120°C. Предварительную гибридизацию, гибридизацию и хемолюминесцентное определение с субстратом CSPD® (Roche) проводили по инструкции, прилагаемой производителем. Температура гибридизации составляла 68°C. Исследования привели к появлению одной единичной полосы с молекулярной массой приблизительно 2840 т.н.п. для всех штаммов (CURE 19, 21, 26, 28 и 29), если хромосомную ДНК расщепляли Hind III. В тех случаях, когда хромосомную ДНК расщепляли EcoRI, гены 16S рРНК заканчивались единичным фрагментом с молекулярной массой приблизительно 895 т.н.п. в штаммах CURE 21 и 26, в то время как другую единичную полосу с молекулярной массой приблизительно 3420 т.н.п. получали для штаммов CURE 19, 28 и 29.

Исследование in vivoИсследование 1. Воздействия штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на вызванные DDS колиты у крыс

Цель данного исследования заключалась в сравнении воздействий штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на вызванный DDS (декстрансульфат натрия) колит у крыс.

Крысы Sprague-Dawley разделяли на шесть групп: одна контрольная группа (колит без введения бактерий) и пять групп, которым вводили различные бактериальные штаммы (*Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus gasseri* LG1, *Bifidobacterium* 3B1 и *Bifidobacterium infantis* CURE 19 соответственно). Бактериальные штаммы вводили перорально в течение 7 дней до развития колита (0 день) и непрерывно вводили в течение 7 дней в комбинации с DDS (5% мас./об., разбавленный в воде). Степень тяжести колита определяли ежедневно с использованием DAI (индекса активности заболевания). Сбор образцов проводили на 14 день и в кишечнике определяли бактериальную транслокацию и бактериальное количество.

В группах, получавших *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* 3B1 и *Bifidobacterium* CURE 19, DAI значительно уменьшался на 4, 5, 6 и 7 день по сравнению с контрольной группой. Дополнительно, DAI значительно снижался в группе, получавшей *B. infantis* CURE 19 по сравнению с группами, получавшими *Lactobacillus paracasei* 8700:2 и *Lactobacillus gasseri* LG1 через 6 и 7 дней. По сравнению с контрольным колитом бактериальная транслокация в кишечные лимфатические узлы значительно уменьшалась во всех группах, так же как и транслокация *Enterobacteriaceae* в печень.

В заключение необходимо отметить, что пероральное введение бактериальных штаммов *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus gasseri* LG1, *Bifidobacterium* 3B1 и *Bifidobacterium infantis* CURE 19 способно осуществлять положительные воздействия, уменьшая транслокацию при экспериментальном колите у крыс. *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* 3B1 и *Bifidobacterium infantis* CURE 19 показали наиболее выраженные воздействия на повышение DAI у крыс с вызванным DDS колитом. *Bifidobacterium infantis* CURE 19 был несколько более эффективным при нейтрализации колита, чем другие штаммы через 6 дн. и 7 дн. обработки. Пожалуйста, смотри фигуру 6.

Исследование 2. Выживание *Lactobacillus* и/или *Bifidobacterium* в ЖК тракте после перорального введения

Пероральное введение *Lactobacillus* или *Bifidobacterium* оказывает различные положительные воздействия, например, предотвращение связанной с приемом антибиотиков диареи (D'Souza et al., 2002, BMJ 324: 1361).

Можно достичь положительных воздействий при условии, что бактерии выживают при пероральном введении и обладают способностью выживать и разрастаться в кишечнике. Для того чтобы обнаружить подходящие штаммы, которые могут использоваться в качестве пробиотика, множество возможных штаммов-кандидатов вводят перорально здоровым индивидуумам. Определение частоты встречаемости введенных штаммов в фекалиях устанавливает штаммы с высокой выживаемостью. Цель данного исследования заключается в обнаружении пригодных для перорального введения бактериальных штаммов с высокой способностью выживать и разрастаться в ЖК тракте человека.

Планирование исследования

В течение четырех недель четырнадцать добровольцев должны выпить смесь приблизительно 20 различных штаммов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Все штаммы являются представителями штаммов, встречающихся у людей или в пище, образующей молочную кислоту. Образцы фекалий будут собраны до введения, после 3 недель введения и через одну неделю после окончания введения. Бактериальную флору определяют по количеству жизнеспособных микроорганизмов и RAPD (случайно амплифицированные полиморфные ДНК; Johansson et al., 1995).

Заключение

Данные результаты показывают, что выбранные штаммы, а именно *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161 и *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162 могут выжить при прохождении через желудочно-кишечный тракт после перорального введения. Исследования на крысах также показывают возможность осуществить положительные воздействия на экспериментальный колит.

Формула изобретения

1. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, способный выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин in vivo.
2. Штамм по п.1, обладающий способностью поглощать аммиак.
3. Штамм по п.1, который имеет гены 16S рРНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 2840 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью Hind III с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и

гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

4. Штамм по п.1, который имеет гены 16S рPHK, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 895 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью *EcoRI* с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

5. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, способный выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*.

6. Штамм по п.5, обладающий способностью поглощать аммиак.

7. Штамм по п.5, который имеет гены 16S рPHK, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 2840 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью *Hind III* с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

8. Штамм по п.5, который имеет гены 16S рPHK, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 895 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью *EcoRI* с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

9. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, способный выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*.

10. Штамм по п.9, обладающий способностью поглощать аммиак.

11. Штамм по п.9, который имеет гены 16S рPHK, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 2840 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью *Hind III* с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

12. Штамм по п.9, который имеет гены 16S рPHK, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 3420 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью *EcoRI* с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рPHK *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

13. Штамм по п.9, который способен продуцировать аргинин.

14. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, способный выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*.

15. Штамм по п.14, обладающий способностью поглощать аммиак.

16. Штамм по п.14, который имеет гены 16S рРНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 2840 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью Hind III с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и
5 гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рРНК *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

17. Штамм по п.14, который имеет гены 16S рРНК, расположенные в единичных
10 фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 3420 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью EcoRI с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рРНК *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008
15 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

18. Штамм по п.14, который способен продуцировать аргинин.

19. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, способный выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*.

20. Штамм по п.19, обладающий способностью поглощать аммиак.

21. Штамм по п.19, который имеет гены 16S рРНК, расположенные в единичных фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 2840 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью Hind III с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и
25 гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рРНК *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

22. Штамм по п.19, который имеет гены 16S рРНК, расположенные в единичных
30 фрагментах ДНК с молекулярными размерами приблизительно 3420 т.н.п., получаемых путем расщепления хромосомной ДНК с помощью EcoRI с последующим разделением фрагментов электрофорезом в агарозном геле и гибридизацией с зондом, меченным DIG, из фрагмента гена 16S рРНК *L. casei* subsp. *pseudoplatantarum* DSM 20008
35 размером 420 н.п. (положение с 506 до 926, нумерация в *E.coli*), используя гибридизацию по Саузерну.

23. Штамм по п.19, который способен продуцировать аргинин.

24. Композиция для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию,
40 для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующаяся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства, содержащая один или несколько штаммов *Bifidobacterium*, обладающих способностью выживать в кишечном тракте и продуцировать глутамин *in vivo*, выбранных из группы, состоящей из *Bifidobacterium*
45 *infantis* CURE 21, DSM 15159, *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161 и *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, в сочетании с носителем.

25. Композиция по п.24, отличающаяся тем, что носитель представляет собой
50 овсяную кашу.

26. Композиция по п.24, отличающаяся тем, что также содержит диетические волокна.

27. Композиция по п.26, отличающаяся тем, что является пищевой композицией.

28. Композиция о п.26, отличающаяся тем, что является фармацевтической композицией, в которой носитель представляет собой терапевтически приемлемый носитель.

29. Композиция по п.27 или 28, отличающаяся также тем, что содержит один или несколько штаммов *Lactobacillus*.

30. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, принадлежащий виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в качестве лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующийся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

31. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, принадлежащий виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в качестве лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующийся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

32. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, принадлежащий виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в качестве лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующийся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

33. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, принадлежащий виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в качестве лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующийся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

34. Штамм *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, принадлежащий виду *Bifidobacterium infantis*, для применения в качестве лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующийся в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

35. Применение штамма *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, для получения лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующегося в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

36. Применение штамма *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, для получения лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной

недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующегося в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

5 37. Применение штамма *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, для получения лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию, для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих
10 воспалительными заболеваниями, или использующегося в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

38. Применение штамма *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, для получения лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию,
15 для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующегося в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

39. Применение штамма *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, для получения лекарственного средства для лечения пациентов с синдромом полиорганной недостаточности и кишечной недостаточностью, получающих интенсивную терапию,
20 для профилактики пациентов, получающих химиотерапию, и пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями, или использующегося в послеоперационной терапии после обширного хирургического вмешательства.

25

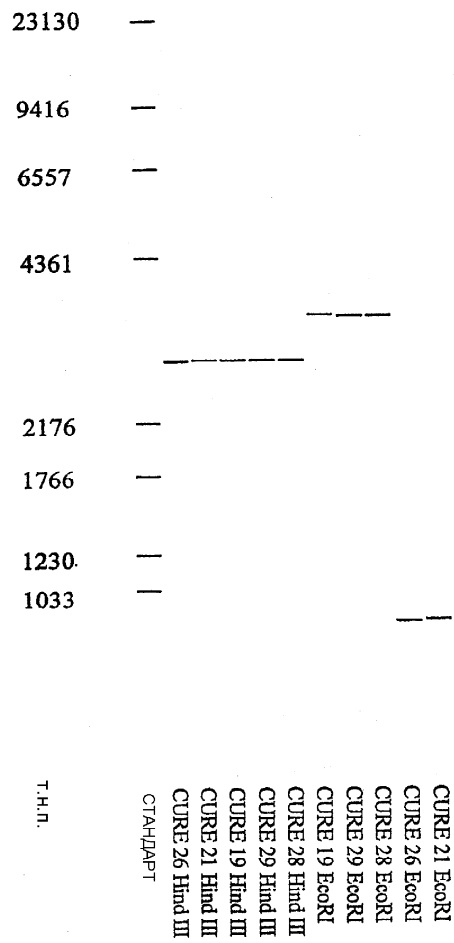
30

35

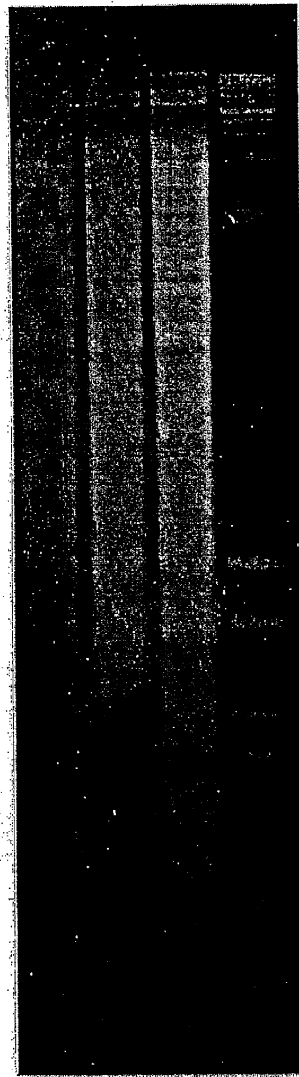
40

45

50

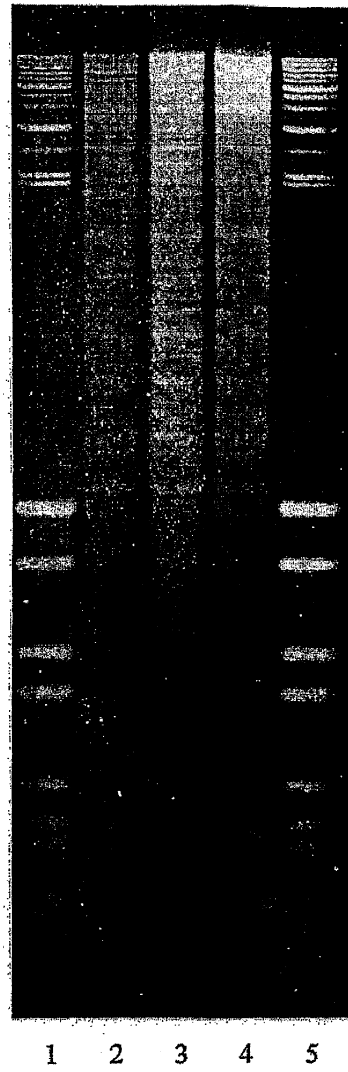


ФИГ. 1

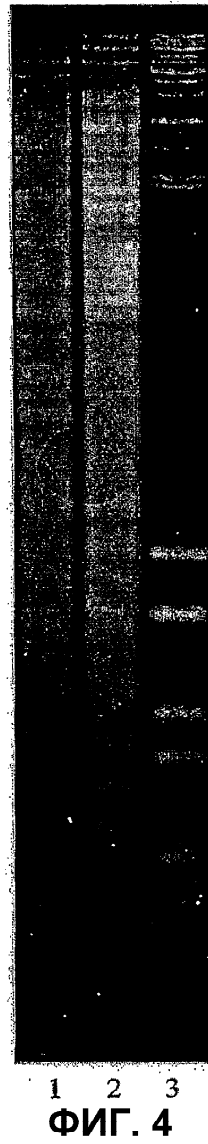


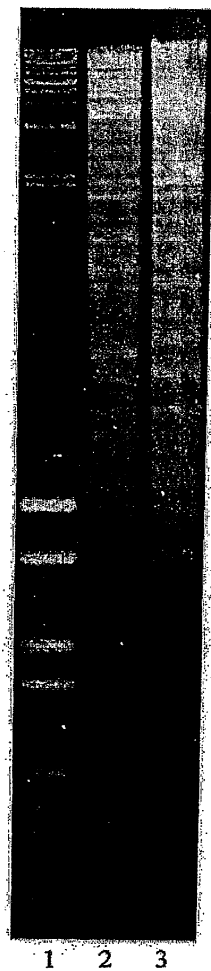
1 2 3 4

ФИГ. 2

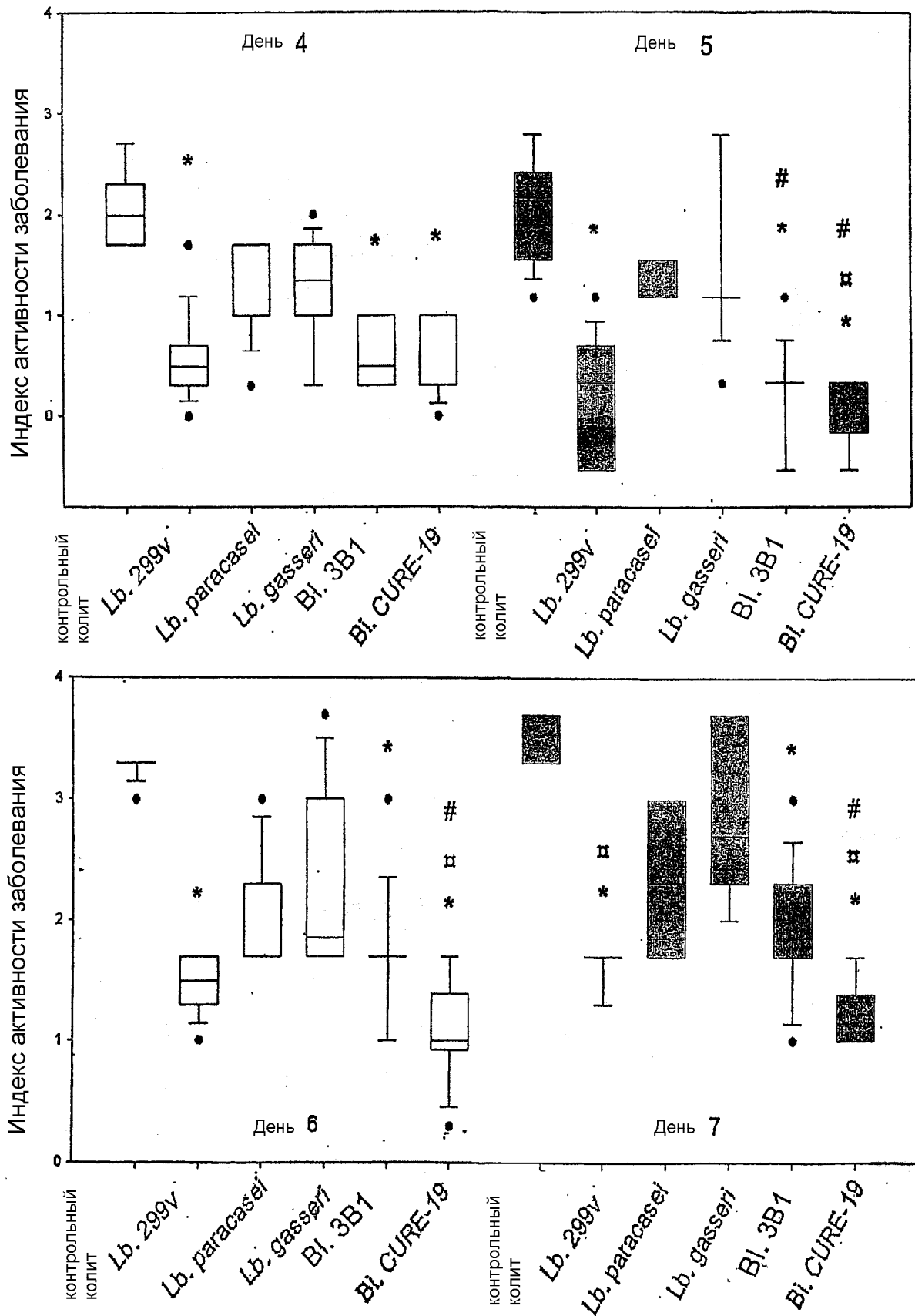


ФИГ. 3





ФИГ. 5



ФИГ. 6