

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037687

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.04

(51) Int. Cl. A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/14 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201990566

(22) Дата подачи заявки
2017.12.12

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ БАКТЕРИИ РОДА Blautia

(31) 1621123.7

(56) WO-A1-2017148596

(32) 2016.12.12

WO-A1-2018011594

(33) GB

4d Pharma Plc: "Clinical Update - RNS - London Stock Exchange", 19 July 2016 (2016-07-19), XP055446737, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.londonstockexchange.com/exchange/news/market-news/market-news-detail/DDDDA2896979.html> [retrieved on 2018-02-01], the whole document

(43) 2019.06.28

US-A1-2010316617

(86) PCT/GB2017/053722

Anonymous: "4D pharma's Blautix for Irritable Bowel Syndrome shows positive impact - pharmaceutical daily news", 13 December 2016 (2016-12-13), XP055446748, Retrieved from the Internet: URL:<http://www.pharmaceuticaldaily.com/4d-pharmas-blautix-for-irritable-bowel-syndrome-shows-positive-impact>, [retrieved on 2018-02-01], the whole document

(87) WO 2018/109461 2018.06.21

WO-A1-2016203218

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

WO-A1-2016086161

4Д ФАРМА ПиЭлСи (GB)

WO-A2-2012024638

(72) Изобретатель:

Джеффри Иан, Шенахен Фергус,
О'Тул Пол (IE), Стивенсон Алекс,
Малдер Имке, Савиняк Хелен (GB)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, имеющий последовательность 16s rPHK, представленную SEQ ID NO: 5, и/или бактериальный штамм рода *Blautia*, имеющий последовательность 16s rPHK, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности 16s rPHK DSM 14294 (SEQ ID NO: 5), для лечения или предотвращения заболевания, ассоцииированного с уровнем разнообразия микробиоты, который понижен относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, и/или имеется пониженная стабильность своей микробиоты по сравнению со здоровым субъектом, причем заболевание представляет собой синдром раздраженного кишечника (СРК), одно или несколько аутоиммунных заболеваний или одно или несколько аллергических заболеваний. Кроме того, предложен способ лечения или предотвращения СРК, аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, ассоцииированного со снижением уровня разнообразия и стабильности микробиоты кишечника, включающий введение субъекту указанной композиции. Также предложено применение указанной композиции для лечения или предотвращения СРК, аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, ассоцииированного со снижением уровня разнообразия и стабильности микробиоты кишечника. Изобретение расширяет арсенал средств для лечения или предотвращения СРК, аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, ассоцииированного со снижением уровня разнообразия и стабильности микробиоты кишечника.

B1

037687

037687 B1

Область техники

Данное изобретение относится к области композиций, содержащих бактериальные штаммы, выделенные из пищеварительного тракта млекопитающих, и к использованию таких композиций для лечения болезни.

Известный уровень техники

Считается, что кишечник человека *in utero* является стерильным, но сразу после рождения он подвергается воздействию большого количества микроорганизмов от матери и из окружающей среды. После этого происходит динамический период микробной колонизации и сукцессии, зависящий от таких факторов, как способ родов, окружающая среда, питание и генотип хозяина, которые колективно влияют на состав микробиоты кишечника, особенно в ранний период жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится схожей с микробиотой взрослых людей [1]. Микробиота кишечника человека содержит более 1500 разных филотипов, среди которых количественно доминируют два основных бактериальных типа (филума) - Bacteroidetes и Firmicutes [2]. Успешные симбиотические отношения, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к развитию широкого спектра метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает разложение иначе трудноперевариваемых компонентов пищи с образованием побочных продуктов, являющихся важным источником питательных веществ для хозяина и обеспечивающих дополнительную пользу для здоровья. Схожим образом, иммунологическая важность микробиоты кишечника является общепризнанной и основана на примере безмикробных животных, имеющих расстройства иммунной системы, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [3-5].

Значительные изменения состава микробиоты были задокументированы при желудочно-кишечных расстройствах, таких как воспалительная болезнь кишечника (ВБК). Например, уровень бактерий кластера *Clostridium XIVa* снижается у субъектов с ВБК, в то время как численность *E. coli* возрастает, что позволяет предположить сдвиг баланса между симбионтами и патобионтами в кишечнике [6-9, 18].

В знак признания потенциального положительного эффекта, который определенные бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, различные штаммы были предложены для использования при лечении разных болезней (см., например, [10-13]). Ряд штаммов, включая преимущественно штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для использования при лечении различных кишечных расстройств (см. обзор [14] и [15]). В работе [16] предлагается использование штаммов рода *Blautia* для модулирования баланса микрофлоры пищеварительной экосистемы. В контексте работы [16] модулирование относится к промотированию активности ацетогенной бактериальной флоры в ущерб метаногенным и сероредуцирующим бактериям. Этот документ, таким образом, описывает только увеличение количества ацетогенных бактерий. Не обсуждается разнообразие видов, принадлежащих к ряду таксонов. В работе [17] обсуждается использование *Blautia* для улучшения выживания пациентов с реакцией "трансплантат против хозяина" (РТПХ). В ней указывается, что повышенное бактериальное разнообразие ассоциировано со сниженной смертностью, связанной с РТПХ, и что повышенное количество бактерий рода *Blautia* было ассоциировано со сниженной РТПХ. Однако не высказано предположение, что введение *Blautia* пациенту вызывает повышение разнообразия микробиоты и/или индуцирует стабильность микробиоты у субъекта.

Взаимосвязи между различными бактериальными штаммами и разными болезнями и точные эффекты конкретных бактериальных штаммов на кишечник и на системном уровне и на какие-либо конкретные типы болезней изучены плохо, а имеющиеся на сегодня результаты являются неоднозначными и ставят вопросов больше, чем дают ответов [18].

Отличительным признаком многих заболеваний человека, связанных с изменениями микробиоты, является потеря разнообразия микробиоты. В отличие от так называемого дисбиоза, который представляет собой просто измененный состав микробиоты по сравнению с типичной совокупностью микробиоты у здоровых субъектов, потеря разнообразия микробиоты может быть измерена количественно по измеримому снижению числа объектов бактериальных классификаций на основе последовательностей или операционных таксономических единиц (ОТЕ) в образце, типично определяемых методами секвенирования ампликонов 16s рРНК. Потерю разнообразия также измеряют по снижению индекса разнообразия Шеннона (Shannon) или индекса Чao (Chao). Пониженное разнообразие микробиоты описано в недавних исследованиях ожирения, воспалительной болезни кишечника (ВБК), синдрома раздраженного кишечника (СРК), диабета 2-го типа у пожилых людей с хрупкими костями и более старых людей (frailer older people) [20]. Восстановление здоровой микробиоты может быть затруднено, поскольку бактерии в кишечнике препятствуют колонизации. Это создает проблемы при попытках лечения микробиоты болезненных субъектов путем повышения разнообразия микробиоты [19]. Сопутствующая потеря функции микробного метаболизма, как предполагается, является фактором, способствующим симптомам этих патофизиологий. В отличие от здоровых взрослых, у которых микробиота стабильна, микробиота болезненных субъектов, таких как страдающих ВБК, СРК, и пожилых субъектов с хрупкими костями, является нестабильной [18, 20].

Существует потребность в изучении потенциальных эффектов кишечных бактерий с целью разра-

ботки новых методов лечения, использующих кишечные бактерии.

Сущность изобретения

Авторы изобретения разработали новые виды терапии для лечения и предотвращения болезней и расстройств путем увеличения или поддержания разнообразия кишечной микробиоты у субъекта. В частности, авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы из рода *Blautia* могут быть эффективными для увеличения или поддержания численности и/или уравновешенности (evenness) разных типов бактерий в дистальном отделе кишечника субъекта. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, увеличивает разнообразие микробиоты в стуле. Такое увеличение разнообразия наблюдается у здоровых субъектов и у субъектов с СРК. Однако субъекты с СРК, получавшие плацебо, демонстрировали статистически значимое снижение разнообразия микробиома на протяжении исследований. Дополнительно, примеры показывают, что лечение композициями, содержащими *Blautia hydrogenotrophica*, но не плацебо, повышало стабильность микробиоты у субъектов с СРК на протяжении исследований. Стабильность микробиоты у субъектов, получающих композицию, содержащую *Blautia hydrogenotrophica*, была сопоставима с показателями здоровых контрольных субъектов.

Таким образом, в первом варианте реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе увеличения или поддержания разнообразия микробиоты. Аналогично, предусматривается также способ увеличения или поддержания разнообразия микробиоты у субъекта, включающий использование бактериального штамма рода *Blautia*.

Термин "увеличение или поддержание разнообразия микробиоты" используется в данном документе для обозначения увеличения или поддержания численности разных типов бактерий и/или уравновешенности разных типов бактерий в микробиоте субъекта. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты повышается. В некоторых вариантах реализации число разных родов бактерий в микробиоте увеличивается. В некоторых вариантах реализации число разных видов бактерий в микробиоте увеличивается. В некоторых вариантах реализации число разных штаммов бактерий в микробиоте увеличивается. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты поддерживается. В некоторых вариантах реализации число разных родов бактерий в микробиоте поддерживается. В некоторых вариантах реализации число разных видов бактерий в микробиоте поддерживается. В некоторых вариантах реализации число разных штаммов бактерий в микробиоте поддерживается. В некоторых вариантах реализации число родов, видов и штаммов в микробиоте увеличивается или поддерживается.

Увеличение разнообразия микробиоты (*microbiota*) может наблюдаться для (may be for) неацетогенных бактерий. Оно может также наблюдаться как для ацетогенных, так и для неацетогенных бактерий. Такие бактерии хорошо известны специалистам. Вкратце, ацетогенные бактерии продуцируют ацетат в качестве конечного продукта анаэробного дыхания или ферментации.

В некоторых вариантах реализации потеря, увеличение или поддержание разнообразия микробиоты могут быть определены количественно по измеримому уменьшению, увеличению или поддержанию соответственно численности бактериальных классификаций на основе последовательностей или операционных таксономических единиц (OTE) в образце, типично определяемых методами секвенирования ампликонов 16S рРНК. В некоторых вариантах реализации потеря разнообразия может быть измерена по снижению индекса разнообразия Шеннона или индекса ЧАО. Наоборот, в некоторых вариантах реализации увеличение разнообразия может быть измерено по увеличению индекса разнообразия Шеннона или индекса ЧАО. Аналогично, в некоторых вариантах реализации поддержание разнообразия может быть измерено по неизменному результату определения индекса разнообразия Шеннона или индекса ЧАО.

В некоторых вариантах реализации уравновешенность разных типов бактерий увеличивается. В некоторых вариантах реализации относительная численность разных типов бактерий в микробиоте становится более уравновешенной после лечения или профилактики с использованием композиции по изобретению.

Авторы изобретения также разработали новые терапии для лечения и предотвращения болезней и расстройств путем индуцирования стабильности кишечной микробиоты. В частности, авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы из рода *Blautia* индуцируют стабильность кишечной микробиоты. Под "индуцированием стабильности" подразумевается, что разнообразие микробиоты остается стабильным, а также относительная численность разных родов (Genus) в микробиоте остается стабильной. Это важно, потому что ряд болезней и расстройств, включая СРК и ВБК, характеризуются пониженной стабильностью микробиоты. Как описано в примерах, пероральное введение композиций, содержащих *Blautia hydrogenotrophica*, индуцирует стабильность микробиоты в стуле. Таким образом, в дополнительном варианте реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе индуцирования стабильности микробиоты у субъекта. Аналогично, также предусматривается способ индуцирования стабильности микробиоты у субъекта, включающий использование бактериального штамма рода *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации относительная численность разных бактериальных видов в микробиоте субъекта становится более стабильной после лечения или профилактики с использованием композиции по изобретению, например у субъекта с диагнозом болезни или расстройства, характери-

зующихся снижением разнообразия микробиоты. В некоторых вариантах реализации относительная численность разных бактериальных родов в микробиоте субъекта становится более стабильной после лечения или профилактики с использованием композиции по изобретению, например у субъекта с диагнозом болезни или расстройства, характеризующихся снижением разнообразия микробиоты.

Стабильность микробиоты субъекта можно оценить путем сравнения микробиома субъекта в два разных момента времени. В случае различий в микробиоме это может указывать на наличие болезни или расстройства. В некоторых вариантах реализации два разных момента времени разделены периодом времени по меньшей мере в три дня (например, разделены периодом по меньшей мере в 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 3 месяца, 6 месяца, 1 год, 2 года). В некоторых вариантах реализации два разных момента времени разделены периодами в 3-7 дней, 1-2 недели, 2-4 недели, 4-8 недель, 8-24 недели, 24-40 недель, 40-52 недели или более 52 недель. В некоторых вариантах реализации используется более двух разных моментов времени, например три, четыре, пять или более пяти моментов времени. Пригодные интервалы между различными моментами времени выбирают, например, как описано выше.

В предпочтительных вариантах реализации всех аспектов изобретения бактериальный штамм принадлежит к *Blautia hydrogenotrophica* и предпочтительно является бактерией, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294.

В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в стуле субъекта. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в образце стула субъекта. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в дистальном отделе кишечника субъекта. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в желудочно-кишечном тракте субъекта. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в слепой кишке. В некоторых вариантах реализации разнообразие микробиоты и/или стабильность микробиоты относится к разнообразию и/или стабильности микробиоты в ободочной кишке.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение с использованием композиции по изобретению приводит к увеличению разнообразия микробиоты до уровней, наблюдаемых у здорового индивидуума. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение с использованием композиции по изобретению приводит к увеличению разнообразия микробиоты до уровней, превышающих наблюдаемые у некоторых здоровых индивидуумов. В некоторых вариантах реализации здоровый индивидуум имеет схожий/совпадающий с субъектом возраст и/или принадлежит к схожей/совпадающей с субъектом расе. Аналогично, изобретение также предусматривает способ лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*. Примеры болезней или расстройств, ассоциированных с пониженным уровнем разнообразия микробиоты, включают, без ограничений: СРК, ВБК [21], ожирение [22], диабет 2-го типа, инфекционные болезни, аллергические болезни, аутоиммунные болезни и метаболические болезни/расстройства. Лечение или предотвращение этих болезней и расстройств входит в объем изобретения. В некоторых вариантах реализации болезнь или расстройство представляет собой СРК.

В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой младенца или ребенка с пониженным разнообразием микробиоты по сравнению со здоровым младенцем или ребенком соответственно. Было обнаружено, что некоторые дети, у которых позднее развивается аллергическая болезнь, имеют пониженное разнообразие фекальной микробиоты в возрасте 1 недели [23]. Таким образом, в некоторых вариантах реализации младенец имеет возраст менее 1 недели, менее 2 недель, менее 1 месяца, менее 2 месяцев или менее 4 месяцев. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой младенца, родившегося не через естественные родовые пути. Например, в некоторых вариантах реализации субъект представляет собой младенца, рожденного посредством кесарева сечения. Пониженное разнообразие микробиоты также было описано для пожилых субъектов с хрупкими костями. В некоторых вариантах реализации, таким образом, субъект представляет собой пожилого субъекта, например пожилого субъекта с хрупкими костями. В некоторых вариантах реализации субъект имеет возраст 65 лет или больше (например, возраст 70 лет или больше, 75 или больше, 80 или больше, 85 или больше, или 90 или больше) [20].

По оценкам, отдельный человек содержит в своей микробиоте приблизительно 101 разных бактериальных видов и 195 разных штаммов [24]. Соответственно, в некоторых вариантах реализации композиция предназначена для использования при лечении субъекта, содержащего менее 101 разных бактериальных видов (например, менее 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70 бактериальных

видов) и/или менее 195 разных штаммов (например, менее 194, 193, 192, 191, 190, 189, 188, 187, 186, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 бактериальных штаммов) в своей микробиоте. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 80 бактериальных видов (например, более чем 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 бактериальных видов) или до 101 бактериального вида. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 90 бактериальных видов. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 95 бактериальных видов. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 99 бактериальных видов. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 160 бактериальных штаммов (например, более чем 165, 170, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193 или 194 бактериальных штаммов) или до 195 бактериальных штаммов. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 175 бактериальных штаммов. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 185 бактериальных штаммов. Например, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты до более чем 190 бактериальных штаммов.

В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты по меньшей мере на один бактериальный род (например, по меньшей мере на два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять бактериальных родов). В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты по меньшей мере на один бактериальный вид (например, по меньшей мере на два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 17 или 20 бактериальных видов). В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение приводит к увеличению разнообразия микробиоты по меньшей мере на один бактериальный штамм (например, по меньшей мере на два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, 12, 15, 17, 20 или 25 бактериальных штаммов).

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с пониженной стабильностью микробиоты по сравнению с стабильностью микробиоты у здорового субъекта (или по сравнению с популяцией здоровых субъектов). Под "пониженной стабильностью микробиоты" подразумевается, что разнообразие микробиоты не остается настолько же стабильным, а также относительная численность разных родов в микробиоте не остается настолько же стабильной, как стабильность, наблюдаемая у здорового субъекта или в популяции здоровых субъектов. В некоторых вариантах реализации индуцирование стабильности микробиоты приводит к тому, что стабильность индуцируется до уровня, схожего с наблюдаемым у здорового субъекта или в популяции здоровых субъектов. В некоторых вариантах реализации индуцирование стабильности микробиоты приводит к индуцированию стабильности до такого же уровня, как наблюдаемый у здорового субъекта или в популяции здоровых субъектов. Аналогично, изобретение предусматривает способ лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с пониженной стабильностью микробиоты, включающий введение композиции, содержащей штамм бактерий рода *Blautia*. Например, патогенез некоторых болезней или расстройств характеризуется пониженной стабильностью микробиоты. Примерами таких болезней и расстройств являются СРК, ВБК, диабет (например, диабет 2-го типа), аллергические болезни, аутоиммунные болезни и метаболические болезни/расстройства. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с пониженной стабильностью микробиоты, причем лечение или предотвращение включает индуцирование стабильности микробиоты. В некоторых вариантах реализации болезнь или расстройство выбирают из СРК, ВБК, диабета (например, диабета 2-го типа), аллергических болезней, аутоиммунных болезней и метаболических болезней/расстройств. В некоторых вариантах реализации болезнь или расстройство представляет собой СРК или ВБК. В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в способе лечения или предотвращения СРК или ВБК, причем лечение или предотвращение включает индуцирование стабильности микробиоты.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает способ лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, включающий диагностирование субъекта как имеющего пониженный уровень разнообразия микробиоты и затем, если будет определен пониженный уровень разнообразия, введение субъекту композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает способ лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с пониженной стабильностью микробиоты относительно стабильности микробиоты у здорового субъекта, причем способ включает диагностирование субъекта как имеющего пониженную стабильность микробиоты и затем, если будет определена пониженная стабильность, введение субъекту композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

В предпочтительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia hydrogenotrophica*. Могут быть использованы также близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*.

Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 5. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s pPHK в соответствии с SEQ ID NO: 5. Наиболее предпочтительно бактериальный штамм в композиции представляет собой штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонирований с номером доступа DSM 10507/14294.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia stercoris*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 1 или 3. Предпочтительно последовательность является идентичной SEQ ID NO: 3. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, представленную SEQ ID NO: 3.

В дополнительных вариантах реализации изобретения бактериальный штамм в композиции принадлежит к *Blautia wexlerae*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, такие как бактериальные штаммы, имеющие последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 2 или 4. Предпочтительно последовательность является идентичной SEQ ID NO: 4.

Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, представленную SEQ ID NO: 4.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов по изобретению может эффективно увеличивать разнообразие микробиоты и/или индуцировать стабильность микробиоты. Также пероральное введение является удобным для субъектов и практикующих врачей и позволяет обеспечить доставку в и/или частичную или полную колонизацию кишечника.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению содержит один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов или носителей.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению содержит бактериальный штамм, подвергнутый лиофилизации. Лиофилизация представляет собой эффективную и удобную методику получения стабильных композиций, позволяющих обеспечить доставку бактерий и, как было продемонстрировано, обеспечивает получение эффективных композиций в примерах.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает пищевой продукт, содержащий композицию, описанную выше.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию вакцины, содержащей композицию, описанную выше.

Дополнительно, изобретение предусматривает способ увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты и, тем самым, лечения или предотвращения болезни или расстройства, ассоциированных с пониженным разнообразием микробиоты и/или с пониженной стабильностью микробиоты, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: Сравнение микробиоты у здорового человека и пациента с СРК.

Фиг. 2: Сравнение разнообразия микробиоты между днем 16 и днем 1 для здорового человека и пациента с СРК после лечения с использованием *BlautiX* или плацебо.

Фиг. 3: А) Взаимосвязанность (interconnectivity) микробиома у здоровых людей в день 1, день 16 и в конце исследований после лечения *BlautiX*. В) Взаимосвязанность микробиома у пациентов с СРК в день 1, день 16 и в конце исследований после лечения *BlautiX*. Результаты определения взаимосвязанности, наблюдающейся в день 1, день 16 и в конце исследований для здоровых индивидуумов, представленные на фиг. 3А, изображены также на фиг. 3А1, 3А2 и 3А3 соответственно. Результаты определения взаимосвязанности, наблюдающейся в день 1, день 16 и в конце исследований для пациентов с СРК, представленные на фиг. 3В, изображены также на фиг. 3В1, 3В2 и 3В3 соответственно.

Фиг. 4: Сравнение нестабильности профилей микробиоты у здорового человека и пациента с СРК после лечения с использованием BlautiX или плацебо в А) день 16 и день 1, В) конце исследований и день 1 и С) конце исследований и день 16.

Фиг. 5: Сравнение разнообразия микробиоты в разные моменты времени для здорового человека и пациента с СРК после лечения BlautiX.

Фиг. 6: А) Сеть взаимного исключения (mutual exclusion network) у здоровых людей в день 1, день 16 и в конце исследований после лечения BlautiX. В) Сеть взаимного исключения у пациентов с СРК в день 1, день 16 и в конце исследований после лечения BlautiX. Результаты по взаимному исключению, наблюдающиеся в день 1, день 16 и в конце исследований для здоровых индивидуумов, представленные на фиг. 6А, изображены также на фиг. 6А1, 6А2 и 6А3 соответственно. Результаты по взаимному исключению, наблюдающиеся в день 1, день 16 и в конце исследований для пациентов с СРК, представленные на фиг. 6В, изображены также на фиг. 6В1, 6В2 и 6В3 соответственно.

Фиг. 7: Иерархическая кластеризация микробиоты.

Фиг. 8: Сравнение профилей микробиоты до (D14) и после (D32) лечения с использованием BlautiX на основе несходств Брея-Кертиса.

Фиг. 9: А) Визуализация профилей микробиоты для разных группы в D-14 с использованием РСоА (анализ главных координат) на основе несходств Брея-Кертиса. (В) Визуализация профилей микробиоты групп в D14 с использованием РСоА на основе несходств Брея-Кертиса. (С) Значимое различие (значение $p=0,002$) профилей микробиоты для группы BlautiX наблюдалось для всех моментов времени.

Фиг. 10: Сравнение профилей микробиоты для лечения с использованием BlautiX в моменты проведения определений (at study timepoints) (D-14, D-1, D34) на основе несходств Брея-Кертиса.

Раскрытие изобретения

Бактериальные штаммы.

Композиции по изобретению содержат бактериальный штамм рода *Blautia*. Примеры демонстрируют, что бактерии этого рода являются пригодными для увеличения разнообразия микробиоты и/или индукции стабильности микробиоты. Предпочтительные бактериальные штаммы принадлежат к видам *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* и *Blautia wexlerae*. Наиболее предпочтительным является *Blautia hydrogenotrophica*, особенно бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294.

Примеры штаммов *Blautia* для использования по изобретению включают *Blautia hydrogenotrophica*, *B. stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoïdes*, *B. glucerasea*, *B. hansenii*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* и *B. wexlerae*. Виды *Blautia* представляют собой грампозитивные неподвижные бактерии, которые могут быть коккоподобными или овальными и являются все облигатными анаэробами, продуцирующими уксусную кислоту в качестве основного конечного продукта ферментации глюкозы [25]. *Blautia* могут быть выделены из кишечника человека, хотя *B. producta* был выделен из септического образца.

Blautia hydrogenotrophica (прежнее название *Ruminococcus hydrogenotrophicus*) был выделен из кишечников млекопитающих, является строго анаэробным и метаболизирует H_2/CO_2 до ацетата, что может быть важно для питания и здоровья человека. Типовым штаммом *Blautia hydrogenotrophica* является S5a33=DSM 10507=JCM 14656. Генная последовательность 16s rPHK штамма *Blautia hydrogenotrophica* S5a36 имеет номер доступа GenBank X95624.1 (приведена в данном документе как SEQ ID NO: 5). Этот типичный штамм *Blautia hydrogenotrophica* описан в [25] и [26]. Штамм S5a33 и штамм S5a36 соответствуют двум субклонам ацетогенного штамма, выделенного из образца фекалий здорового субъекта. Они демонстрируют одинаковую морфологию, физиологию и метаболизм и имеют идентичные последовательности 16s rPHK. Таким образом, в некоторых вариантах реализации *Blautia hydrogenotrophica* для использования по изобретению имеет последовательность 16s rPHK в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294, была протестирована в примерах и также называется в данном документе штаммом ВН. Штамм ВН был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) 10-го мая 2001 г. как "Ruminococcus hydrogenotrophicus" с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294. Депозитором была INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champelie, France. Права владения на бактерию, депонированную как DSM 10507 и DSM 14294, перешли к фирме 4D Pharma Plc путем переуступки.

Генная последовательность 16s rPHK штамма GAM6-1 T *Blautia stercoris* имеет номер доступа GenBank HM62 6177 (раскрыта в данном документе как SEQ ID NO: 1). Типичный пример штамма *Blautia stercoris* описан в [27]. Типовым штаммом *Blautia wexlerae* является WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850 [25]. Генная последовательность 16s rPHK штамма WAL 14507 T *Blautia wexlerae* имеет номер доступа EF036467 (раскрыта в данном документе как SEQ ID NO: 2). Этот типичный штамм *Blautia wexlerae* описан в [25].

Предпочтительным штаммом *Blautia stercoris* является штамм, депонированный с номером доступа NCIMB 42381, который также называется в данном документе штаммом 830. Последовательность 16s rPHK штамма 830 представлена как SEQ ID NO: 3. Штамм 830 был депонирован в международном депозитарии NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) фирмой GT Biologics Ltd. (Life

Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 12 марта 2015 г. как "Blautia stercoris 830", и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. впоследствии изменила название на 4D Pharma Research Limited.

Предпочтительным штаммом *Blautia wexlerae* является штамм, депонированный с номером доступа NCIMB 42486, который также называется в данном документе штаммом MRX008. Последовательность 16s pPHK штамма MRX008 представлена как SEQ ID NO: 4. Штамм MRX008 был депонирован в международном депозитарии NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) фирмой 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) 16 ноября 2015 г. как "Blautia/Ruminococcus", и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42486.

Ожидается, что бактериальные штаммы, близкородственные со штаммом, протестированным в примерах, также будут эффективно увеличивать разнообразие микробиоты и/или индуцировать стабильность микробиоты. В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia hydrogenotrophica*.

Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 5. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, представляющую собой последовательность SEQ ID NO: 5.

В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia stercoris*. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Предпочтительно последовательность является идентичной SEQ ID NO: 3. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, представленную SEQ ID NO: 3. В определенных вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную последовательности 16s pPHK бактериального штамма *Blautia wexlerae*. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, по меньшей мере на 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичную SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Предпочтительно последовательность идентична SEQ ID NO: 4. Предпочтительно бактериальный штамм для использования по изобретению имеет последовательность 16s pPHK, представленную SEQ ID NO: 4.

Бактериальные штаммы, являющиеся биотипами бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, или биотипами бактерий, депонированных с номерами доступа NCIMB 42381 и NCIMB 42486, как ожидается, также будут эффективно увеличивать разнообразие микробиоты и/или индуцировать стабильность микробиоты. Биотип представляет собой близкородственный штамм, имеющий такие же или очень схожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и являющиеся пригодными для использования по изобретению, могут быть идентифицированы путем секвенирования других нуклеотидных последовательностей бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. Например, может быть секвенирован по существу полный геном, и штамм биотипа для использования по изобретению может иметь по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей по меньшей мере в 80% его полного генома (например, по меньшей мере в 85, 90, 95 или 99% или в его полном геноме). Например, в некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет по меньшей мере 98% идентичности последовательностей по меньшей мере в 98% его генома или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей в 99% его генома. Другие пригодные последовательности для использования при идентификации штаммов биотипа могут включать hsp60 или повторные последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP [28]. Штаммы биотипа могут иметь последовательности по меньшей мере с 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294 и содержит последовательность 16s pPHK, которая по меньшей мере на 99% идентична (например, по меньшей мере на 99,5% или по меньшей мере на 99,9% идентична) с SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации штамм биотипа имеет последовательность с по меньшей мере 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичности последовательностей с соответствующей последовательностью штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294 и имеет последовательность 16s pPHK в соответствии с SEQ ID NO: 5.

Альтернативно, штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и являющиеся пригодными для использо-

вания по изобретению, могут быть идентифицированы путем использования депозита с номером доступа DSM 10507/14294, депозита с номером доступа NCIMB 42381 или депозита с номером доступа NCIMB 42486 и проведения анализа рестрикционных фрагментов и/или анализа ПЦР, например методом флуоресцентного анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (FALFP) и фингерпринтинга с использованием ПЦР амплификации повторяющихся последовательностей межгенных палиндромов (repetitive DNA element (rep)-PCR fingerprinting), или белкового профилирования, или частичного секвенирования рДНК 16s или 23s. В предпочтительных вариантах реализации такие методики могут быть использованы для идентификации других штаммов *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* или *Blautia wexlerae*.

В определенных вариантах реализации штаммы, представляющие собой биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, и пригодные для использования по изобретению, являются штаммами, обеспечивающими такие же характеристики (pattern), как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, при проведении анализа методом рестрикционного анализа амплифицированных рибосомальных ДНК (ARDRA), например, с использованием рестрикционного фермента Sau3AI (примеры методов и руководство приведены, например, в [29]). Альтернативно, штаммы биотипа идентифицируются как штаммы, имеющие такой же характер ферментации углеводов, как и бактерия, депонированная с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486.

Другие штаммы *Blautia*, пригодные для использования в композициях и способах по изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть идентифицированы с использованием любого пригодного способа или стратегии, включая анализы, описанные в примерах. Например, штаммы для использования по изобретению могут быть идентифицированы путем культивации бактерий и введения крысам для тестирования методом анализа растяжения (distension assay). В частности, бактериальные штаммы, имеющие схожие характеристики роста, тип метаболизма и/или поверхностные антигены с бактерией, депонированной с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть пригодными для использования по изобретению. Полезный штамм будет иметь сопоставимую модулирующую активность микробиоты со штаммом DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В частности, штамм биотипа будет вызывать эффекты на микробиоту, сопоставимые с приведенными в примерах эффектами, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивирования и введения, описанных в примерах.

Особенно предпочтительным штаммом по изобретению является штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294. Он является типичным штаммом ВН, который был использован для тестирования в примерах и продемонстрировал эффективность для увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты. Таким образом, Таким образом, изобретение предусматривает клетку, такую как выделенная клетка, штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, или ее производную для использования в терапии, в частности при болезнях и расстройствах, описанных в данном документе.

Производными штамма, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486, могут быть дочерний штамм (потомство) или штамм, выращенный (субклонированный) из исходного. Производный штамм по изобретению может быть модифицирован, например, на генетическом уровне, без потери биологической активности. В частности, производный штамм по изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сопоставимую модулирующую активность микробиоты с исходным штаммом DSM 10507/14294, NCIMB 42381 или NCIMB 42486. В частности, производный штамм будет вызывать эффекты на микробиоту, сопоставимые с эффектами, продемонстрированными в примерах, которые могут быть идентифицированы с использованием протоколов культивации и введения, описанных в примерах. Производное штамма DSM 10507/14294 будет обычно биотипом штамма DSM 10507/14294. Производное штамма NCIMB 42381 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42381. Производное штамма NCIMB 42486 будет обычно биотипом штамма NCIMB 42486.

Ссылки на клетки штамма *Blautia hydrogenotrophica*, депонированного с номером доступа DSM 10507/14294, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа DSM 10507/14294, и такие клетки входят в объем изобретения. Ссылки на клетки штамма *Blautia stercoris*, депонированного с номером доступа NCIMB 42381, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа NCIMB 42381, и такие клетки входят в объем изобретения. Ссылки на клетки штамма *Blautia wexlerae*, депонированного с номером доступа NCIMB 42486, охватывают любые клетки, имеющие такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штаммы, депонированные с номером доступа NCIMB 42486, и такие клетки входят в объем изобретения.

В предпочтительных вариантах реализации бактериальные штаммы в композициях по изобретению являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник.

Терапевтическое применение.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования с целью увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты. Пониженное разнообразие микробиоты и/или пониженная стабильность микробиоты ассоциированы с многочисленными патологическими болезнями и расстройствами, и примеры демонстрируют, что композиции по изобретению могут эффективно увеличивать разнообразие микробиоты и/или индуцировать стабильность микробиоты. Соответственно, болезнь или расстройство, лечение или профилактика которых будут проводиться с использованием композиции по изобретению, предпочтительно представляют собой болезнь или расстройство, ассоциированные с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, и/или болезнь или расстройство, ассоциированные с пониженной стабильностью микробиоты. Таким образом, в некоторых вариантах реализации болезнь или расстройство могут быть ассоциированы с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, а также быть ассоциированы с пониженной стабильностью микробиоты.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении болезни или расстройства, выбранных из СРК, ВБК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней и одной или нескольких метаболических болезней/расстройств. Также предусматривается лечение или предотвращение других болезней и расстройств. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении СРК или ВБК. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении СРК. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении ВБК. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении одной или нескольких аллергических болезней. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении ожирения. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении одной или нескольких инфекционных болезней. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении одной или нескольких аутоиммунных болезней. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении одной или нескольких метаболических болезней/расстройств. Предпочтительно лечение или предотвращение включает увеличение разнообразия микробиоты и/или индуцирование стабильности микробиоты у субъекта.

В определенных вариантах реализации одну или несколько инфекционных болезней выбирают из вирусной, бактериальной или грибковой болезни. В определенных вариантах реализации одна или несколько аллергических болезней представляют собой астму. В определенных вариантах реализации одну или несколько метаболических болезней/расстройств выбирают из диабета, например диабета 2-го типа, и ожирения. В определенных вариантах реализации одну или несколько аутоиммунных болезней выбирают из рассеянного склероза и ревматоидного артрита.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении СРК, ВБК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней, или одной или нескольких метаболических болезней/расстройств путем повышения разнообразия микробиоты в микробиоте. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении СРК или ВБК путем индуцирования стабильности микробиоты. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для использования в лечении или предотвращении СРК путем индуцирования стабильности микробиоты

В предпочтительных вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia*, для использования в лечении или предотвращении ВБК, СРК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней или одной или нескольких метаболических болезней/расстройств, причем лечение или предотвращение включают увеличение разнообразия микробиоты и/или индуцирование стабильности микробиоты у субъекта.

В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает композицию, содержащую бактериальный штамм рода *Blautia* для использования в лечении или предотвращении болезни или расстройства, выбранных из СРК, ВБК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней и одной или нескольких метаболических болезней/расстройств. В некоторых вариантах реализации изобретение предусматривает способ лечения или предотвращения болезни или расстройства, выбранных из СРК, ВБК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или не-

скольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней и одной или нескольких метаболических болезней/расстройств, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Blautia*.

В предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению содержат бактерию, депонированную с номером доступа DSM 10507/14294, и предназначены для использования с целью увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты у субъекта при лечении ВБК, СРК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней и одной или нескольких метаболических болезней/расстройств. В дополнительных предпочтительных вариантах реализации композиции по изобретению содержат бактерию, депонированную с номером доступа DSM 10507/14294, и предназначены для использования в лечении или предотвращении ВБК, СРК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней или одной или нескольких метаболических болезней/расстройства путем повышения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты.

В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или расстройства поражает кишечник. В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или расстройства не поражает кишечник. В некоторых вариантах реализации патогенез болезни или расстройства не локализован в кишечнике. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение производится в месте, отличном от кишечника. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение производится в кишечнике, а также в месте, отличном от кишечника. В определенных вариантах реализации болезнь или состояние являются системными.

В определенных вариантах реализации композиции предназначены для использования у субъектов, которые демонстрируют или, как ожидается, будут демонстрировать пониженные уровни разнообразия микробиоты, например, по сравнению со здоровым субъектом или популяцией здоровых субъектов. Например, в некоторых вариантах реализации композиция предназначена для использования при лечении субъекта, содержащего менее 101 разных бактериальных видов (например, менее 100, 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90, 85, 80, 75 или 70 бактериальных видов) и/или менее 195 разных штаммов (например, менее 193, 190, 187, 185, 183, 180, 175, 170, 165, 160, 150, 140 бактериальных штаммов) в своей микробиоте. Например, в некоторых вариантах реализации композиция предназначена для использования при лечении субъекта, который содержит в своей кишечной микробиоте по меньшей мере на один бактериальный род (например, по меньшей мере на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 бактериальных родов) меньше по сравнению со здоровым субъектом или по сравнению с популяцией здоровых субъектов. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение включает стадию диагностирования субъекта как имеющего пониженный уровень разнообразия микробиоты, и затем, если будет определен пониженный уровень разнообразия, проводится лечение субъекта композицией по изобретению.

В определенных вариантах реализации композиции предназначены для использования у субъектов, которые демонстрируют или, как ожидается, будут демонстрировать пониженную стабильность микробиоты. В некоторых вариантах реализации композиции предназначены для использования у субъектов, которые демонстрируют или, как ожидается, будут демонстрировать пониженную стабильность своей микробиоты, например, по сравнению со здоровым субъектом или популяцией здоровых субъектов. В некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение включает стадию диагностирования субъекта как имеющего пониженную стабильность своей микробиоты, и затем, если будет определена пониженная стабильность, проводится лечение субъекта композицией по изобретению.

В определенных вариантах реализации субъект представляет собой младенца. В определенных вариантах реализации субъект представляет собой ребенка. В определенных вариантах реализации субъект представляет собой взрослого человека.

В определенных вариантах реализации субъект представляет собой здорового субъекта. Например, в некоторых вариантах реализации, в которых композиция используется для предотвращения болезни или расстройства, субъект представляет собой здорового субъекта, необязательно, идентифицированного как имеющего риск развития болезни или расстройства, характеризующихся снижением разнообразия микробиоты.

В определенных вариантах реализации субъект ранее получал, получает или будет получать лечение антибиотиками.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации лечение или предотвращение включает введение композиции по изобретению после, вместе с или перед лечением антибиотиками. Композиция по изобретению и один или несколько антибиотиков могут быть предназначены для раздельного, одновременного или последовательного введения.

В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для использования в способе увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты у субъекта, имеющего повышенный уровень водорода в своем дыхании по сравнению со здоровым субъектом. В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предназначена для использования в

снижении уровня водорода в дыхании субъекта, который демонстрирует или, как ожидается, будет демонстрировать пониженный уровень разнообразия своей микробиоты и/или пониженную стабильность микробиоты. Субъект предпочтительно представляет собой субъекта с диагнозом СРК, ВБК, ожирения, диабета 2-го типа, одной или нескольких инфекционных болезней, одной или нескольких аллергических болезней, одной или нескольких аутоиммунных болезней и/или одной или нескольких метаболических болезней/расстройств. Лечение композицией по изобретению снижает уровень водорода, детектируемый в дыхательных водородных тестах. Соответственно, уровни водорода предпочтительно оценивают с использованием дыхательного водородного теста. Дыхательный водородный тест хорошо известен специалистам, и, таким образом, квалифицированный специалист будет знать, как проводить такой тест. В некоторых вариантах реализации субъекту вводят лактулозу в качестве субстрата для проведения теста.

Дыхательный водородный тест также является полезным инструментом для контроля эффективности или вероятной эффективности увеличения разнообразия микробиоты и/или индуцирования стабильности микробиоты и лечения или профилактики с использованием композиции по изобретению. Например, снижение уровня водорода, детектируемого в дыхании субъекта после лечения композицией по изобретению, может указывать на то, что лечение оказывает усиливающий (increasing), стабилизирующий, терапевтический или профилактический эффект. Соответственно, в некоторых вариантах реализации способы и применение изобретения дополнительно включают контроль уровня водорода в дыхании субъекта в ходе и/или после лечения композицией по изобретению и, тем самым, оценку эффективности или вероятной эффективности усиления, стабилизации, лечения или профилактики. Например, уровни водорода могут контролироваться в один или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или более 4) моментов времени, например включая до начала лечения, в начале лечения, в ходе лечения, в конце лечения и/или после лечения, по желанию. В некоторых вариантах реализации уровень водорода в дыхании субъекта в конце и/или после периода дозирования (во время которого композицию вводят субъекту) сравнивают с уровнем в начале и/или до периода дозирования, и снижение уровня указывает на эффективность или вероятную эффективность усиления, стабилизации, лечения или профилактики. Например, в вариантах реализации, в которых период дозирования составляет 16 дней, может быть желательным проведение измерений в день 1 и день 16 или, например, в день 1, день 2, день 15 и день 16. В некоторых вариантах реализации проводится множество измерений и среднее полученных таким образом результатов измерений (например, среднее для дня 1 и дня 2 и среднее для дня 15 и дня 16). В некоторых вариантах реализации снижение уровня водорода C_{max} по меньшей мере на 40 ppm (млн⁻¹) указывает на то, что усиление, стабилизация, лечение или профилактика являются эффективными или вероятно эффективными. В некоторых вариантах реализации уровня водорода в дыхании субъекта измеряют только один раз, например, в конце или после лечения, и определение того, что уровень имеет значение, равное или близкое к предварительно заданному уровню, указывает на то, что усиление, стабилизация, лечение или профилактика, вероятно, были эффективными. Дыхательный водородный тест является стандартным анализом, и, таким образом, предварительно заданные уровни известны специалистам.

Лечение или предотвращение могут относиться, например, к уменьшению тяжести симптомов или снижению частоты обострений или уменьшению набора факторов (triggers), являющихся проблемными для субъекта.

Бактерии микробиоты могут быть детектированы в фекалиях субъекта с использованием стандартных методик, таких как методики количественной ПЦР (qPCR), использованные в примерах.

Способы введения.

Предпочтительно композиции по изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт для обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по изобретению. Обычно композиции по изобретению вводят перорально, но они могут быть введены ректально, интраназально или буккальным или сублингвальным путями.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению могут быть введены в виде губки (foam), спрея или геля.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению могут быть введены в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например, в форме какао-масла, синтетического твердого жира (например, суппоцир (suprocire), витепсол (witepsol)), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или композиции глицеринового мыла (soap glycerin).

В определенных вариантах реализации композицию по изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт через трубку, такую как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, еюностомический зонд (J tube), чрескожная эндоскопическая гастростомия (ЧЭГ), или отверстие, такое как отверстие в стенке грудной клетки, обеспечивающее доступ к желудку, тощей кишке, и другие пригодные отверстия доступа.

Композиции по изобретению могут быть введены одноразово или они могут вводиться последовательно по схеме лечения. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению предназначены для ежедневного введения. Примеры демонстрируют, что ежедневное введение обеспечивает успешную доставку и клинические преимущества.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению вводят регулярно, например

ежедневно, через день или еженедельно, на протяжении длительного периода времени, такого как на протяжении по меньшей мере одной недели, двух недель, одного месяца, двух месяцев, шести месяцев или одного года. Примеры демонстрируют, что введение *B. hydrogenotrophica* может не приводить к постоянной колонизации кишечника, поэтому регулярное введение на протяжении длительных периодов времени может обеспечивать большие терапевтические и/или профилактические преимущества.

В определенных вариантах реализации изобретения лечение в соответствии с изобретением сопровождается оценкой микробиоты кишечника субъекта. Лечение может быть повторено, если доставка и/или частичная или полная колонизация штаммом по изобретению не достигнута и, таким образом, эффект не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация будут успешными и эффект наблюдается.

В определенных вариантах реализации композиция по изобретению может быть введена беременному животному, например млекопитающему, такому как человеку, с целью предотвращения пониженных уровней разнообразия в микробиоте и/или развития пониженной стабильности микробиоты у ребенка *in utero* и/или после его рождения.

Композиции по изобретению могут быть введены субъекту с диагнозом пониженного разнообразия микробиоты по сравнению со здоровым субъектом и/или пониженной стабильности микробиоты или болезни или расстройства, ассоциированных с пониженным разнообразием микробиоты по сравнению со здоровым субъектом и/или пониженной стабильностью микробиоты, или который был идентифицирован как имеющий риск пониженного разнообразия микробиоты по сравнению со здоровым субъектом и/или пониженной стабильности микробиоты. Композиции могут также быть введены в качестве профилактической меры для предотвращения развития у здорового субъекта пониженного разнообразия микробиоты по сравнению со здоровым субъектом и/или пониженной стабильности микробиоты.

Композиции по изобретению могут быть введены субъекту, идентифицированному как имеющий аномальную микробиоту кишечника. Например, субъект может иметь пониженную колонизацию *Blautia* или их отсутствие и, в частности, *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris* или *Blautia wexlerae*.

Композиции по изобретению могут быть введены в виде пищевого продукта, такого как питательная добавка.

В общем, композиции по изобретению предназначены для лечения людей, хотя они могут быть использованы для лечения животных, включая моногастрических млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по изобретению могут быть пригодными для улучшения роста и продуктивности (репродуктивности) животных. При введении животным может быть использовано введение через желудочный зонд.

Композиции.

В общем, композиция по изобретению содержит бактерии. В предпочтительных вариантах реализации изобретения, композиция приготовлена в лиофилизированной форме. Например, композиция по изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм по изобретению.

Предпочтительно композиция по изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лиофилизация бактерий является хорошо отработанной процедурой и соответствующие рекомендации приведены, например, в работах [30-32]. Примеры демонстрируют, что композиции лиофилизата являются особенно эффективными.

Альтернативно, композиция по изобретению может содержать живую активную бактериальную культуру.

В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был инактивирован, например не был инактивирован нагреванием. В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, например не был убит нагреванием. В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был ослаблен, например не был ослаблен нагреванием. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению не был убит, инактивирован и/или ослаблен. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является живым. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению способен частично или полностью колонизировать кишечник. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм в композиции по изобретению является жизнеспособным и способным частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах реализации композиция содержит смесь живых бактериальных штаммов и убитых бактериальных штаммов.

В предпочтительных вариантах реализации композиция по изобретению инкапсулирована для обеспечения возможности доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсулирование защищает композицию от деградации до доставки в целевую область путем, например, разрыва в результате химических или физических воздействий, таких как давление, ферментативная активность, или физическое разрушение, которое может инициироваться изменениями рН. Может быть использован любой пригод-

ный способ инкапсулирования. Типичные примеры методик инкапсулирования включают захват в пористой матрице, присоединение или адсорбция на поверхностях твердого носителя, самоагрегация путем флоккуляции или с помощью сшивающих агентов и механическое удерживание за микропористой мембраной или в микрокапсule. Рекомендации по инкапсулированию, которые могут быть полезными для приготовления композиций по изобретению, приведены, например, в источниках [33] и [34].

Композиция может быть введена перорально и может иметь форму таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, потому что *Blautia* представляют собой анаэробы. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин С) могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов для улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. Альтернативно, пребиотическая композиция по изобретению может быть введена перорально в виде пищевого или питательного продукта, такого как ферментированный молочный продукт на основе молока или сыворотки, или в виде фармацевтического продукта.

Композиция может быть составлена как пребиотик.

Композиция по изобретению включает терапевтически эффективное количество бактериального штамма по изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для оказания положительного воздействия на субъекта. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника субъекта.

Пригодная ежедневная доза бактерий, например, для взрослого человека может составлять от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{11} колониесформирующих единиц (КОЕ); например, от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{11} КОЕ; в другом примере от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{10} КОЕ.

В определенных вариантах реализации доза бактерий составляет по меньшей мере 10^9 клеток в день, например, по меньшей мере 10^{10} , по меньшей мере 10^{11} или по меньшей мере 10^{12} клеток в день.

В определенных вариантах реализации композиция содержит бактериальный штамм в количестве от примерно 1×10^6 до примерно 1×10^{11} КОЕ/г по отношению к весу композиции; например, от примерно 1×10^8 до примерно 1×10^{10} КОЕ/г. Доза может составлять, например, 1, 3, 5 и 10 г.

Типично, пребиотик, такой как композиция по изобретению, необязательно объединяют по меньшей мере с одним пригодным соединением-пребиотиком. Соединение-пребиотик обычно представляет собой неперевариваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахароспирт, который не разлагается или не всасывается в верхнем отделе пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В определенных вариантах реализации пребиотическая композиция по данному изобретению включает соединение-пребиотик в количестве от примерно 1 до примерно 30 мас.% по отношению к общему весу композиции (например, от 5 до 20 мас.%). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахаридов (или COS), бета-глюканов, модифицированных аравийской камедью (arable gum) и резистентных крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, акациевых волокон (acacia fibers), волокон рожкового дерева (carob), овса и цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды (для простоты обозначаются ниже кц-FOS (FOSs-с.с.)); указанные кц-FOS являются неперевариваемыми углеводами, обычно получаемыми путем конверсии свекловичного сахара и содержащими молекулу сахарозы, с которой связаны три молекулы глюкозы.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты или носители. Примеры таких пригодных эксципиентов приведены в источнике [35]. Приемлемые для терапевтического применения носители или разбавители хорошо известны в фармацевтике и описаны, например, в источнике [36]. Примеры пригодных носителей включают лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры пригодных разбавителей включают этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, эксципиента или разбавителя может проводиться с учетом предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в дополнение к носителю, эксципиенту или разбавителю любое пригодное связующее (связующие), смазывающее вещество (вещества), супспендирующий агент (агенты), покровное вещество (вещества), солюбилизатор(ы). Примеры пригодных связующих включают крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, сыпучая лактоза, бета-лактоза, сахаристые вещества кукурузы, природные и синтетические камеди, такие как гуммиабрик, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленгликоль. Примеры пригодных смазывающих веществ включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Консерванты, стабилизаторы, красители и даже вкусовые агенты могут быть предусмотрены в фармацевтической композиции. Примеры консервантов включают бензоат натрия, сорбиновую кислоту, цистеин и сложные эфиры п-оксибензойной кислоты. Также могут быть использованы

антиоксиданты и суспендирующие агенты. Дополнительным примером пригодного носителя является сахароза. Дополнительным примером консерванта является цистеин.

Композиции по изобретению могут быть составлены в виде пищевого продукта. Например, пищевой продукт может обеспечивать питательные преимущества в дополнение к терапевтическому эффекту по изобретению, такие как у питательной добавки. Аналогично, композиция пищевого продукта может быть составлена таким образом, чтобы она усиливала вкус композиции по изобретению или делала композицию более привлекательной для употребления за счет большего сходства с обычным компонентом пищи, чем с фармацевтической композицией. В определенных вариантах реализации композицию по изобретению составляют в виде продукта на основе молока. Термин "продукт на основе молока" означает любой жидкий или полутвердый продукт на основе молока или сыворотки, имеющий различное содержание жиров. Продукт на основе молока может быть, например, коровьим молоком, козьим молоком, овечьим молоком, снятым молоком, цельным молоком, молоком, восстановленным из сухого молока и сыворотки без какой-либо переработки или переработанным продуктом, таким как йогурт, простокваша, свернувшееся молоко, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кислые молочные продукты. Другая важная группа включает молочные напитки, такие как напитки их сыворотки, кисломолочные продукты, сгущенное молоко, заменители грудного молока (*infant*) или молоко для детского питания (*baby milks*); молочные напитки со вкусовыми добавками (*flavoured milks*), мороженое; содержащие молоко пищевые продукты, такие как сласти.

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один бактериальный штамм или вид и не содержат каких-либо других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут содержать только минимальное (*de minimis*) или биологически незначительное количество других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут быть культурой или лиофилизатом, по существу не содержащими другие виды организмов (*species of organism*).

В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов рода *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат какого-либо другого бактериального рода или содержат только минимальное или биологически незначительное количество бактерий другого рода. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один вид *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат каких-либо других бактериальных видов или содержат только минимальное или биологически незначительное количество бактерий другого вида. В определенных вариантах реализации композиции по изобретению содержат один штамм *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, и не содержат каких-либо других бактериальных штаммов или видов или содержат только минимальное или биологически незначительное количество бактерий другого штамма или вида.

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат более одного бактериального штамма или вида. Например, в некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат более одного штамма из одного и того же вида (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 штаммов) и, необязательно, не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат менее 50 штаммов из одного и того же вида (например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штаммов) и, необязательно, не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 штаммов из одного и того же вида и, необязательно, не содержат бактерий каких-либо других видов. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат более одного вида из одного и того же рода (например, более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 23, 25, 30, 35 или 40 видов) и, необязательно, не содержат бактерий любого другого рода. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат менее 50 видов из одного и того же рода (например, менее 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 и, необязательно, не содержат бактерий любого другого рода. В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению содержат 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, или 31-50 видов из одного и того же рода и, необязательно, не содержат бактерий любого другого рода. Изобретение включает любые комбинации вышеуказанных вариантов.

В некоторых вариантах реализации композиции содержит микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах реализации композиции содержит бактериальный штамм *Blautia*, например *Blautia hydrogenotrophica*, в составе микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах реализации бактериальный штамм *Blautia* присутствует в комбинации с одним или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими бактериальными штаммами из других родов, с которыми он может существовать симбиотически *in vivo* в кишечнике. Например, в некоторых вариантах реализации композиция содержит бактериальный штамм *Blautia hydrogenotrophica* в комбинации с бактериальным штаммом из другого рода. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит два или больше бактериальных штамма, полученных из образца фекалий одного организма, например человека. В некоторых вариантах реализации микробный консорциум не встречается вместе в природе. На-

пример, в некоторых вариантах реализации микробный консорциум содержит бактериальные штаммы, полученные из образцов фекалий по меньшей мере двух разных организмов. В некоторых вариантах реализации два разных организма принадлежат к одному и тому же виду, например два разных человека. В некоторых вариантах реализации два разных организма представляют собой младенца человека и взрослого человека. В некоторых вариантах реализации два разных организма представляют собой человека и млекопитающее, не являющееся человеком.

В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, имеющий такие же характеристики безопасности и терапевтической эффективности, как и штамм *Blautia hydrogenotrophica*, депонированный с номером доступа DSM 10507/14294, но не являющийся штаммом *Blautia hydrogenotrophica*, депонированным с номером доступа DSM 10507/14294, или не относящийся к *Blautia hydrogenotrophica* или не относящийся к *Blautia*.

В некоторых вариантах реализации, в которых композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, вида или рода, индивидуальные бактериальные штаммы, виды или роды могут быть предназначены для раздельного, одновременного или последовательного введения. Например, композиция может содержать все из более чем одного бактериального штамма, вида или рода или бактериальные штаммы, виды или роды могут храниться раздельно и вводиться раздельно, одновременно или определенно. В некоторых вариантах реализации более чем один бактериальные штаммы, виды или роды хранятся раздельно, но смешиваются перед использованием.

В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм для использования по изобретению получают из фекалий взрослого человека. В некоторых вариантах реализации, в которых композиция по изобретению содержит более одного бактериального штамма, все бактериальные штаммы получают из фекалий взрослого человека или, если присутствуют другие бактериальные штаммы, они присутствуют только в минимальных количествах. В некоторых вариантах реализации бактерии могут выращиваться в культуре после получения из фекалий взрослого человека и использоваться в композиции по изобретению.

В некоторых вариантах реализации один или несколько бактериальных штаммов *Blautia* является/являются единственным терапевтически активным агентом (агентами) в композиции по изобретению. В некоторых вариантах реализации бактериальный штамм (штаммы) в композиции является/является единственным терапевтически активным агентом (агентами) в композиции по изобретению.

Композиции для использования в соответствии с изобретением могут нуждаться в разрешении на продажу или не требовать такого разрешения.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизованным. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм подвергнут распылительной сушке. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке и в которой он является живым. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке и в которой он способен частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке и в которой он является жизнеспособным. В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой бактериальный штамм лиофилизирован или подвергнут распылительной сушке и в которой он способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых случаях лиофилизованный или подвергнутый распылительной сушке бактериальный штамм восстанавливают перед введением. В некоторых случаях восстановление осуществляют с помощью разбавителя, описанного в данном документе.

Композиции по изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, разбавители или носители.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает фармацевтическую композицию, содержащую бактериальный штамм, такой как используемый в изобретении; и фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель или разбавитель, причем количество бактериального штамма является достаточным для увеличения разнообразия микробиоты у субъекта и/или индуцирования стабильности микробиоты и/или лечения расстройства, ассоцииированного с пониженным разнообразием микробиоты и/или пониженной стабильностью микробиоты, при введении нуждающемуся в этом субъекту, разнообразие микробиоты, например, болезни или расстройства, таких как СРК, ВБК, ожирение, диабет 2-го типа, одна или несколько инфекционных болезней, одна или несколько аллергических болезней, одна или несколько аутоиммунных болезней или одна или несколько метаболических болезней/расстройств.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевти-

ческую композицию, в которой количество бактериального штамма составляет от примерно 1×10^3 до примерно 1×10^{11} колониес образующих единиц на 1 г веса композиции.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г или 10 г.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой композицию вводят способом, выбранным из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкозы, метилцеллулозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую экscipient, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, сыпучей лактозы, бета-лактозы, сахаристого вещества кукурузы, гуммирабика, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллулозы, полизиленгликоля, олеата натрия, стеарата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, дополнительно содержащую по меньшей мере что-то одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, содержащую консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-оксибензойной кислоты.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, в которой указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

В определенных вариантах реализации изобретение предусматривает вышеуказанную фармацевтическую композицию, где композиция, при хранении в запечатанном контейнере при температуре примерно 4 или примерно 25°C и помещении контейнера в атмосферу с 50% относительной влажности, по меньшей мере 80% бактериального штамма, при измерении в колониес образующих единицах, сохраняется после периода времени, составляющего по меньшей мере примерно 1 месяц, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года.

В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предусматривается в герметически запечатанном контейнере, содержащем композицию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах реализации герметически запечатанный контейнер представляет собой саше или флакон. В некоторых вариантах реализации композиция по изобретению предусматривается в шприце, содержащем композицию, описанную в данном документе.

Композиция настоящего изобретения может в некоторых вариантах реализации предусматриваться в виде фармацевтической композиции. Например, композиция может иметь вид таблетки или капсулы. В некоторых вариантах реализации капсула представляет собой желатиновую капсулу ("gel-cap").

В некоторых вариантах реализации композиции по изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать проглатывание, в результате чего состав поступает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, при котором состав поступает в кровоток прямо из рта.

Фармацевтические композиции, пригодные для перорального введения, включают твердые прессованные массы (solid plugs), твердые микродисперсные материалы, полутвердые и жидкие материалы (включая многофазные или дисперсные системы), такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие материалы, состоящие из множества отдельных частиц или нанодисперсные материалы, жидкости (например, водные растворы), эмульсии или порошки; сосательные таблетки (включая наполненные жидкостью); жвачки; гели; быстродиспергирующиеся лекарственные формы; пленки; каплеты (ovules); спреи и буккальные/мукоадгезивные пластиры.

В некоторых вариантах реализации фармацевтическая композиция представляет собой энтеросолюбильную композицию (enteric formulation), т.е. желудочно-резистентную композицию (например, устойчивую к желудочному pH), пригодную для доставки композиции по изобретению в кишечник путем перорального введения. Энтеросолюбильные композиции могут быть особенно полезны в тех случаях, когда бактерии или другой компонент композиции являются чувствительными к кислоте, например склонны к деградации в условиях желудка.

В некоторых вариантах реализации энтеросолюбильная композиция включает энтеросолюбильное покрытие. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой лекарственную форму с энтеросолюбильным покрытием. Например, композиция может быть таблеткой с энтеросолюбильным покрытием или капсулой с энтеросолюбильным покрытием и т.п. Энтеросолюбильное покрытие может

быть обычным энтеросолюбильным покрытием, например обычным покрытием для таблетки, капсулы и т.п. для пероральной доставки. Композиция может включать пленочное покрытие, например тонкопленочный слой энтеросолюбильного полимера, например нерастворимого в кислоте полимера.

В некоторых вариантах реализации энтеросолюбильная композиция является энтеросолюбильной по своей природе, например желудочно-резистентной без необходимости использования энтеросолюбильного покрытия. Таким образом, в некоторых вариантах реализации композиция представляет собой энтеросолюбильную композицию, не содержащую энтеросолюбильного покрытия. В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой капсулу, изготовленную из терможелирующегося (*thermogelling*) материала. В некоторых вариантах реализации терможелирующейся материала представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза или гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). В некоторых вариантах реализации, капсула включает оболочку, не содержащую какого-либо пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах реализации капсула включает оболочку и оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит какого-либо пленкообразующего полимера (см., например, [37]). В некоторых вариантах реализации композиция по своей природе является энтеросолюбильной капсулой (например, Vcaps® фирмы Capsugel).

В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут благодаря добавкам размягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствующих в оболочке капсул, обладать определенной эластичностью и деформируемостью. Мягкие капсулы могут быть получены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина являются коммерчески доступными от различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, пероральный или ректальный, мягкие капсулы могут иметь различные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедообразными. Мягкие капсулы могут быть получены обычными способами, такими как, например, с использованием процесса Шерера (Scherer) (метод прессования), процесса Accogel (метод прессования) или капельного процесса или процесса выдувания (blowing).

Способы культивирования.

Бактериальные штаммы для использования в данном изобретении могут культивироваться с использованием стандартных микробиологических методик, как описано, например, в источниках [38-40].

Твердая или жидккая среда, используемая для культуры, может быть, например, агаром YCFA (дрожжевой экстракт-гидролизат казеина-жирные кислоты) или средой YCFA. Среда YCFA может содержать (на 100 мл, приблизительные значения) казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO_3 (0,4 г), цистеин (0,1 г), K_2HPO_4 (0,045 г), KH_2PO_4 (0,045 г), NaCl (0,09 г), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 г), CaCl_2 (0,009 г), резазурин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), п-аминобензойную кислоту (3 мкг), фолиевую кислоту (5 мкг) и пиридоксамин (15 мкг).

Бактериальные штаммы для использования в композициях вакцин.

Авторы изобретения определили, что бактериальные штаммы по изобретению пригодны для лечения или предотвращения болезней или расстройств, ассоциированных с уровнем разнообразия микробиоты, пониженным относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта (или относительно разнообразия микробиоты популяции здоровых субъектов) и/или болезней или расстройств, ассоциированных с пониженной стабильностью микробиоты по сравнению со здоровым субъектом (или по сравнению с популяцией здоровых субъектов). Это, вероятно, является результатом эффекта, который бактериальные штаммы по изобретению оказывают на иммунную систему хозяина. Таким образом, композиции по изобретению могут также быть пригодными для предотвращения таких болезней или расстройств при введении в виде композиций вакцин. В определенных таких вариантах реализации бактериальные штаммы по изобретению являются жизнеспособными. В определенных таких вариантах реализации бактериальные штаммы по изобретению способны частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных таких вариантах реализации бактериальные штаммы по изобретению являются жизнеспособными и способны частично или полностью колонизировать кишечник. В других таких определенных вариантах реализации бактериальные штаммы по изобретению могут быть убиты, инактивированы или ослаблены. В определенных таких вариантах реализации композиции могут содержать адьювант вакцины. В определенных вариантах реализации композиции предназначены для введения путем инъекции, такой как подкожная инъекция.

Общие положения.

В практике данного изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы химии, биохимии, молекуллярной биологии, иммунологии и фармакологии, доступные квалифицированным специалистам. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, источники [41] и [42-48] и т.д.

Термин "содержащий" охватывает "включающий", а также "составляющий из", например, композиция, "содержащая" X, может состоять исключительно из X или может что-то включать дополнительно, например X+Y.

Термин "примерно" по отношению к численному значению X является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Выражение "по существу" не исключает "полностью", например, композиция, которая "по существу не содержит" Y, может совершенно не содержать Y. При необходимости, выражение "по существу" может быть опущено в формуле изобретения (*definition of the invention*).

Ссылки на процент идентичности последовательностей между двумя нуклеотидными последовательностями означают, что при выравнивании процентное содержание (percentage) нуклеотидов при сравнении двух последовательностей будет одинаковым. Такое выравнивание и процент гомологии или идентичность последовательностей могут быть определены с использованием компьютерных программ, известных специалистам в данной области техники, например, описанных в разделе 7.7.18 источника [49]. Предпочтительное выравнивание определяют по алгоритму поиска гомологии Смита-Уотермана (Smith-Waterman) с использованием нечеткого (affine) поиска разрывов со штрафом за открытие гэпа 12 и штрафом за продолжение гэпа 2, матрицы BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана раскрыт в источнике [50].

Если не указано конкретно, процесс или способ, включающий множество стадий, может включать дополнительные стадии в начале или в конце способа или может включать дополнительные промежуточные стадии. Также стадии могут быть объединены, пропущены или проведены в альтернативном порядке, при необходимости.

В данном документе описаны различные варианты реализации изобретения. Следует понимать, что признаки, указанные в каждом варианте реализации, могут быть объединены с другими указанными признаками для получения дополнительных вариантов реализации. В частности, варианты реализации, выделенные в данном документе как пригодные, типичные или предпочтительные, могут быть объединены друг с другом (за исключением случаев, когда они являются взаимоисключающими).

Способы осуществления изобретения

Пример 1. Изменения микробиоты пациента после лечения *Blautia hydrogenotrophica*.

Резюме.

Проводили тестирование эффекта *Blautia hydrogenotrophica* на разнообразие и стабильность микробиоты у здоровых людей и пациентов с СРК.

Методология.

Схема исследований.

Были проведены клинические испытания фазы I, в которых *Blautia hydrogenotrophica* ("Blautix", штамм, депонированный с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294) вводили пациентам с СРК или здоровым людям (healthy human patients). Пациентам вводили Blautix на протяжении периода дозирования (дни 1-16), с периодом вымывания в дни 19-23. Собирали образцы фекалий субъектов с СРК и здоровых субъектов, получавших плацебо или Blautix, в следующие моменты времени: базовая линия, день 1 (D1) перед лечением; день окончания лечения 16 (D-16) и в конце исследований (EOS), который соответствовал 2-4 неделям (вымывание) после лечения.

Секвенирование ампликонов 16s.

Набор Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit использовали, в соответствии с инструкциями производителя, для экстракции микробной ДНК из 0,2 г замороженных образцов фекалий субъектов с СРК и здоровых субъектов, получавших плацебо или Blautix, в следующие моменты времени: базовая линия, день 1 (D1) перед лечением; день окончания лечения 16 (D-16) и в конце исследований (EOS), который соответствовал 2-4 неделям (вымывание) после лечения.

Приготовление и секвенирование ампликонов гена 16s рРНК проводили с использованием протокола приготовления библиотеки секвенирования 16s Sequencing Library Preparation Nextera, разработанного фирмой Illumina (San Diego, California, USA). Амплифицируют по 50 нг каждого из экстрактов ДНК фекалий с использованием ПЦР и праймеров, нацеленных на вариабельную область V3/V4 гена 16s рРНК. Продукты очищают и прямую и обратную "штрих-кодовые" метки (barcodes) присоединяют с помощью второго раунда адаптерной ПЦР (adapter PCR). Полученные продукты ПЦР очищают, проводят количественные измерения и эквимолярные количества каждого ампликона затем объединяют перед отправкой для проведения секвенирования коммерческому поставщику GATC GmbH., на платформе MiSeq (длина читаемых фрагментов (chemistry) 2×250 п.о.) или HiSeq (длина читаемых фрагментов 2×300 п.о.).

Анализ данных (после секвенирования).

Проводили слияние исходных данных (data was merge trimmed) для последовательностей с использованием flash-методологии. Это позволяло отфильтровать результаты измерений, имеющие низкое качество (low quality reads). Использовали методологию конвейера (pipeline) USEARCH (версия 8.1.1861_i86_linux64) для идентификации одноэлементных множеств (singletons) и их исключения (to... hide them) на стадии генерирования ОТЕ (операционных таксономических единиц). Алгоритм UPARSE использовали для кластеризации последовательностей в ОТЕ. Химерные последовательности, сгенерированные на стадии амплификации, удаляли с использованием алгоритма удаления химер UCHIME с референсной базой данных Chimeraslayer (дата скачивания: 9 сентября 2016 г.). Затем использовали алгоритм глобального выравнивания USEARCH для картирования всех результатов считывания, включая одноэлементные множества, на оставшиеся ОТЕ-последовательности. Собственные (in-house) скрипты использовались затем для группирования последовательностей в ОТЕ, систематизированные алгоритмом

глобального выравнивания USEARCH. Индивидуальные последовательности были сгруппированы в ОТЕ для получения информации о составе микробиома (численность и разнообразие).

Анализ данных высокого уровня.

Матрица несходства Брея-Кертиса была сгенерирована для каждой пары образцов с использованием библиотеки Vegan в R 3.3.1. Набор данных визуализировали с использованием анализа главных координат с матрицей несходства Брея-Кертиса.

Собственная (in-house) функция heatplot в R была использована для генерирования визуализации тепловой карты с иерархической кластеризацией на основе несходства Брея-Кертиса и связей Уорда (ward linkage).

Индексы разнообразия Шеннона и Симпсона были получены с использованием библиотеки phyloseq в R.

Методология DESeq2 была использована для идентификации таксономических переменных, значимых для выбранных сравнений.

Проводили пермутационный многофакторный дисперсионный анализ (MANOVA) на матрице несходства с использованием функции Adonis в R.

Результаты.

Образцы для всех моментов времени объединяли для обеих групп (71 пациентов с СРК и 67 здоровых контролей, включая как группы, получавшие лечение Blautix, так и группы плацебо). Анализ проводили с использованием меры расстояния, сгенерированной по полному набору данных микробиома. Фиг. 1 показывает, что микробиота субъектов с СРК значимо отличается от здоровых субъектов.

Анализ разнообразия проводили с использованием наблюдаемого числа предсказанных таксонов (ОТЕ), индекса разнообразия Шеннона и индекса разнообразия Симпсона. Обе экспериментальные группы продемонстрировали увеличение разнообразия в момент времени день 16, которое было значимым для наблюдаемых ОТЕ и продемонстрировало тенденцию для (индекса) Симпсона (некорректированное р-значение: $<0,1$) (фиг. 2). Такое увеличение разнообразия не наблюдалось для пациентов, получавших плацебо. Значимое уменьшение разнообразия микробиоты наблюдалось в не получавшей лечения от СРК группе плацебо между концом исследований и днем 1.

Фиг. 3 показывает, что лечение с использованием Blautix повышало связность сети микробиоты определенных таксонов, связанных с состоянием здоровья. У здоровых людей наблюдалось значительное увеличение межмикробных связей с дня 1 до дня 16 (после лечения с использованием Blautix), что позволяет предположить усиление кооперации и структуры микробиоты (фиг. 3А). Связность коррелирует с разнообразием и стабильностью. После периода вымывания структура сети возвращалась к сети, схожей с наблюдаемой в день 1. Лечение с использованием Blautix было, таким образом, способно увеличивать взаимосвязанность у здоровых людей, но эффект терялся после вымывания. У пациентов с СРК сеть оставалась схожей по показателям связности между днем 1 и днем 16, но увеличение связности наблюдалось к концу исследований, что позволяет предположить усиление структуры микробиоты после периода вымывания у получавших Blautix пациентов с СРК (фиг. 3В). Эффект Blautix на связность микробиома, таким образом, проявлялся с задержкой у пациентов с СРК по сравнению со здоровыми пациентами.

Нестабильность/изменение профилей микробиоты отображалось расстояниями Брея-Кертиса между разными моментами времени для одного и того же субъекта. Расстояния Брея-Кертиса показывают несходство между профилями относительного изобилия видов (species abundance), заключенного между 0-1 (0 = одинаковые; 1 = не имеют никаких общих видов). Лечение пациентов с СРК с использованием Blautix уменьшало величину изменений микробиоты в ходе лечения (фиг. 4А) и после лечения (фиг. 4В, 4С). Это показывает, что Blautix повышает стабильность микробиоты у пациентов с СРК и что изменение сохраняется после вмешательства. Такая повышенная стабильность не наблюдалась, когда пациентам с СРК вводили плацебо (Фиг. 4А-4С).

Фиг. 5 показывает, что наблюдалось значительное увеличение разнообразия микробиоты на уровне родов для пациентов с СРК, получавших лечение Blautix, в день 16 по сравнению с днем 1. Анализ разнообразия проводили по индексу разнообразия Шеннона, используемому на уровне родов (некорректированное р-значение: 0,04, сравнение дня 1 с днем 16).

Фиг. 6А и 6В показывают изменения в сетях взаимного исключения у здорового человека и пациента с СРК после лечения с использованием Blautix. У здоровых индивидуумов сеть взаимного исключения становится более плотной и взаимосвязанной в день 16, что позволяет предположить повышенную конкуренцию и ингибицию. Этот эффект терялся, однако, к концу исследований, когда структура сети возвращалась к состоянию на исходный момент времени в период вымывания (фиг. 6А). У пациентов с СРК эффект Blautix на связность взаимного исключения заключался в увеличении диаметра сети за период лечения и период вымывания. Этот эффект был противоположным наблюдавшемуся у здоровых индивидуумов, у которых сеть становилась более плотной. В фазе вымывания для пациентов с СРК наблюдались множественные независимые взаимодействия, отсутствовавшие ранее. Множественные независимые взаимодействия касаются пар таксонов, которые взаимодействуют независимо от остальной сети, т.е. они не имеют каких-либо взаимодействий с остальной сетью.

Визуализация микробиоты показывает, что после лечения с использованием Blautix наблюдалась повышенная связность сети для определенных таксонов, связанных с состоянием здоровья (фиг. 7). Связанные с состоянием здоровья таксоны включают *Clostridium* кластер IV, *Bifidobacterium* и *Prevotella*. *Oscillibacter* также являются родами, потенциально связанными с состоянием здоровья. Такие связанные с состоянием здоровья таксоны задействованы в ответе на лечение.

Пример 2. Защитный эффект в моделях связанных с неврологическим развитием расстройств.

Мышиная модель BTBR.

Мышиная модель BTBR (черно-коричневые, с брахиурией) использует инбредных, генетически модифицированных мышей, которые демонстрируют устойчивый аутистично-подобный фенотип. Для этой породы (strain) были описаны дефициты социального поведения, повышенные патологически циклические действия и повышенное тревожное поведение (anxiety-related behaviours) [51]. Вследствие такого стойкого поведенческого фенотипа мыши BTBR являются идеальной животной моделью для оценки эффективности новых терапевтических агентов при лечении аутистического поведения. Ослабление таких симптомов живым биотерапевтическим средством может также служить индикатором эффективности биотерапевтического лекарственного средства при лечении других психических или неврологических болезней.

Мышь.

Самцов мышей BTBR выращивали самостоятельно. Животных содержали в помещении с контролируемой температурой и влажностью с 12-часовым темновым циклом (освещение включено в периоды с 7:00 до 19:00 часов). Все эксперименты проводились в соответствии с Европейской директивой 2010/63/EEC, требованиями законодательного акта (S.I.) № 543 от 2012 г. и были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных (Animal Experimentation Ethics Committee) Ирландского национального университета в Корке (University College Cork).

Штамм.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294.

Биотерапевтическое средство было предоставлено в виде маточного раствора в глицерине. Живые биотерапевтические средства выращивали на объекте (in the facility) в анаэробных условиях.

Введение живого биотерапевтического средства.

Введение доз *Blautia hydrogenotrophica* начинали, когда мыши достигали возраста 8 недель. Эти мыши получали лечение один раз в день на протяжении 3 недель через желудочный зонд.

Схема введения.

Носителем при пероральном введении был фосфатно-солевой буфер (PBS). Ежедневное пероральное введение осуществляют через желудочный зонд.

Сбор фекалий.

Свежие образцы фекалий собирали у индивидуальных мышей до и после введения *Blautia hydrogenotrophica*. По меньшей мере 20 мг свежих фекалий помещали в микроцентрифужную пробирку, немедленно помещали на лед и затем хранили при -80°C.

Результаты.

Эффект лечения с использованием Blautix на микробиоту между моментами времени (D14, D32) показан на фиг. 8. Наблюдались значимые изменения во времени профилей микробиоты (значение $p=0,001$) между моментами времени исследований до начала лечения (D14) и после лечения (D32).

Дифференциальный анализ с использованием DESeq2 выявил 25 таксонов с разной численностью, значимых (корректированное значение $p<0,05$) при лечении с использованием Blautix между моментами времени исследований аутизма D14 и D32. Таксоны перечислены в табл. 1.

Таблица 1
 Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами
 времени D14 и D32 в исследованиях аутизма. Положительная кратность
 изменений интерпретируется как увеличение показателя в момент
 времени D32 по сравнению с D14

OTE №	Низший уровень	Классификация	Кратность изменения \log_2	Стандарт ная ошибка	Скорректи- рованное значение p
2440650	Род	<i>Clostridium</i> XIVa	19,706	3,008	6.9E-10
307526	Вид	<i>Bacteroides</i> <i>acidifaciens</i>	11,275	0,912	5.0E-33
39008	Вид	<i>Bacteroides</i> <i>acidifaciens</i>	10,501	1,345	1.0E-13
277773	Вид	<i>Alistipes</i> <i>finegoldii</i>	9,954	0,906	2.8E-26
1105465	Род	<i>Barnesiella</i>	9,255	0,923	2.8E-22
943687	Семейство	<i>Porphyromonadaceae</i>	9,200	0,850	1.1E-25
47662	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	8,844	0,988	7.0E-18
181003	Род	<i>Alistipes</i>	8,370	2,069	4.2E-04
1282905	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	7,373	1,004	2.8E-12
1370810	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	6,633	1,986	0,006
1203483	Вид	<i>Bacteroides</i> <i>acidifaciens</i>	6,599	1,584	2.7E-04
74179	Вид	<i>Alistipes</i> <i>massiliensis</i>	6,318	1,899	0,006
1640334	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	6,258	2,066	0,013
76239	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	6,202	1,229	4.6E-06
308030	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	6,196	1,451	1.8E-04
1156020	Семейство	<i>Erysipelotrichaceae</i>	5,827	1,607	0,002
712755	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	5,614	1,749	0,008
11297	Семейство	<i>Porphyromonadaceae</i>	5,450	1,021	1.0E-06
2218722	Род	<i>Clostridium</i> IV	3,983	1,017	0,001
594012	Вид	<i>Clostridium</i> <i>lactatifermentans</i>	2,900	0,952	0,013
453043	Вид	<i>Eubacterium</i> <i>ventriosum</i>	-3,675	1,260	0,018
451019	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	-4,055	1,540	0,041
466087	Вид	<i>Akkermansia</i> <i>muciniphila</i>	-6,727	0,876	2.5E-13
2153421	Род	<i>Blautia</i> XIVa	-8,051	2,577	0,010
866478	Вид	<i>Barnesiella</i> <i>intestinihominis</i>	-8,961	0,846	9.3E-25

Резюме.

В мышной модели аутизма, в которой животные получали Blautix, наблюдалась значимые изменения их микробиома, включая значительное общее увеличение бактериального разнообразия.

Пример 3. Эффект в моделях ишемии головного мозга.

Резюме.

Были проведены испытания защитного эффекта *Blautia hydrogenotrophica* в мышных моделях ишемии головного мозга. С этой целью, были проведены испытания на трех группах по 5-17 мышей. В исследования были включены только животные с нормальным поведением. Первая доза была введена в день 14. Одна группа получала лиофилизированные бактерии ежедневно с первого дня дозирования до

завершения. Контрольные группы получали носитель или лиобуфер.

В день 1 всех мышей анестезировали. Делали срединный разрез на вентральной поверхности шеи для доступа к правой и левой общим сонным артериям. Затем индуцировали модель ишемии головного мозга-реперфузии (I/R) путем двусторонней окклюзии общей сонной артерии (BCCAO) с помощью сосудистых зажимов в течение 15 мин. В конце каждой окклюзии зажимы удаляли.

Штамм.

Бактерия *Blautia hydrogenotrophica*, депонированная с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294.

Схема введения

Число животных	Лечение	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг или мл/животное)
12	Фосфатно-солевой буфер (PBS) (отрицательный контроль)	н.д.	10
17	Лиофилизированный порошок	7,8 мг в 100 мкл	100 мкл на животное
13	Лиофилизированные бактерии	15,6 мг в 100 мкл (доза бактерий=2×10 ⁸)	100 мкл на животное

Схема исследований.

Дни с -14 по 14: Ежедневно доза контроля PBS (лиобуфер), контроля лиофилизированного порошка (носитель) или лиофилизированных бактерий (Blautix).

День 1: Модель ишемии головного мозга-реперфузии (I/R), индуцированная хирургическим путем.

День 14: Половину мышей в каждой группе умерщвляют.

Дни с 14 по 28: Ежедневно доза контроля PBS (лиобуфер), контроля лиофилизированного порошка (носитель) или лиофилизированных бактерий (Blautix) оставшимся мышам в каждой группе.

День 28: Умерщвление остальных мышей.

Фекальные комочки (pellets) собирают в три момента времени: день 14, день 14 и день 28. Взятие каждой пробы проводят в стерильных условиях (полностью асептические условия = с чисткой после каждого животного), причем каждую мышь достают из клетки и помещают отдельно в новый стерильный бокс для индивидуального сбора фекальных комочек. Собирают как можно большее количество фекальных комочек для получения минимум 80 мг, предпочтительно 100 мг материала на мышь.

Результаты.

В D-14 до введения Blautix не детектировали значимых различий профилей микробиоты между группами лечения с использованием Blautix, носителя и лиобуфера (значение $p=0,177$) (см. фиг. 9A). Однако значимые различия в профилях микробиоты наблюдались между разными экспериментальными группами в день 14 (см. фиг. 9B) со значением p , равным 0,011. Авторы изобретения дополнительно оценили изменения во времени в микробиоте группы, получавшей Blautix, и обнаружили значимые различия (см. фиг. 9C) со значением p , равным 0,002.

Дифференциальный анализ с использованием DESeq2 выявил значимые (скорректированное значение $p < 0,05$) таксоны с разной относительной численностью для носителя, лиобуфера и лечения с использованием Blautix между моментами времени в исследованиях инсульта, как указано в табл. 2, что демонстрирует долговременное воздействие на бактериальное разнообразие, оказываемое Blautix. Таксоны, значимые для лечения с использованием Blautix, перечислены в табл. 3-5.

Таблица 2

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени в исследованиях инсульта

	D-14->D14	D14->D28	D-14->D28
Носитель	4	0	2
Лиобуфер	17	2	0
Blautix	7	14	12

Таблица 3

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени D-14 и D14 для лечения с использованием Blautix в исследованиях инсульта. Положительная кратность изменений интерпретируется как увеличенная в D14 по сравнению с D-14

OTE №	Низший уровень	Классификация	Кратность изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
321825	Семейство	Ruminococcaceae	1,647	0,470	0,027
74771	Вид	Alistipes massiliensis	1,530	0,442	0,027
567799	Род	Alistipes	-1,215	0,308	0,008
77091	Род	Clostridium	-1,634	0,489	0,036
472737	Семейство	Lachnospiraceae	-2,585	0,667	0,008
615246	Семейство	Lachnospiraceae	-3,003	0,711	0,007
166882	Семейство	Lachnospiraceae	-5,547	1,406	0,008

Таблица 4

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени D14 и D28 для лечения с использованием Blautix в исследованиях инсульта. Положительная кратность изменений интерпретируется как увеличенная в D28 по сравнению с D14

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
1101936	Порядок (Order)	Clostridiales	3,275	0,709	0,001
218505	Вид	Roseburia faecis	2,568	0,630	0,002
948888	Род	Barnesiella	2,499	0,575	0,001
612631	Род	Clostridium XIVa	2,473	0,723	0,011
201398	Тип (Phylum)	Bacteroidetes	2,045	0,605	0,011
1370810	Вид	Barnesiella intestinihominis	1,878	0,579	0,016
770554	Вид	Alistipes putredinis	1,868	0,626	0,033
558330	Род	Prevotella	1,795	0,453	0,002
943687	Семейство	Porphyromonadaceae	1,586	0,546	0,039
308030	Вид	Barnesiella intestinihominis	1,324	0,361	0,005
176124	Тип	Bacteroidetes	1,163	0,294	0,002
565518	Вид	Oscillospira guilliermondii	-1,571	0,488	0,016
544582	Вид	Flavonifractor plautii	-1,599	0,569	0,050
25678	Вид	Mucispirillum schaedleri	-2,751	0,640	0,001

Таблица 5

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени D-14 и D28 для лечения с использованием Blautix в исследованиях инсульта. Положительная кратность изменений интерпретируется как увеличенная в D28 по сравнению с D-14

OTE №	Низший Уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
688867	Род	Clostridium XIVa	8,296	1,136	3.8E-11
612631	Род	Clostridium XIVa	7,814	1,348	3.1E-07
560658	Семейство	Lachnospiraceae	5,241	1,243	0,001
929749	Вид	Eubacterium	3,190	0,829	0,003

			ruminantium		
518034	Вид	Desulfovibrio fairfieldensis	3,098	0,982	0,024
74771	Вид	Alistipes massiliensis	2,548	0,714	0,007
23310	Вид	Odoribacter laneus	1,621	0,475	0,011
117624	Порядок	Clostridiales	-1,748	0,612	0,049
411272	Род	Clostridium XIVa	-2,923	1,019	0,049
39008	Вид	Bacteroides acidifaciens	-2,953	0,816	0,007
331352	Род	Clostridium XIVa	-3,969	0,626	1.6E-08
77091	Род	Clostridium	-4,247	1,426	0,039

Дифференциальный анализ с использованием DESeq2 выявил значимые (скорректированное значение $p < 0,05$) таксоны с разной относительной численностью для лечения с использованием Blautix по сравнению с носителем, а также для лечения с использованием Blautix по сравнению с лиобуфером для моментов времени исследований инсультта, указанных в табл. 6. Таксоны перечислены в табл. 7-9.

Таблица 6

Значимые таксоны с разной относительной численностью для лечения с использованием Blautix в исследованиях инсультта

	D-14	D14	D28
Blautix по сравнению с носителем	0	10	0
Blautix по сравнению с лиобуфером	2	13	0

Таблица 7

Значимые таксоны с разной относительной численностью для лечения с использованием Blautix по сравнению с носителем в D14 в исследованиях инсультта

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректиро- ванное значение p
25678	Вид	Mucispirillum schaedleri	2,604	0,688	0,014
3119687	Семейство	Lachnospiraceae	2,445	0,642	0,014
321825	Семейство	Ruminococcaceae	2,174	0,564	0,014
627	Род	Clostridium XIVa	1,915	0,601	0,043
308030	Вид	Barnesiella intestinihominis	-1,324	0,419	0,043
1370810	Вид	Barnesiella intestinihominis	-1,540	0,425	0,019
187271	Вид	Ruminococcus flavefaciens	-3,475	1,065	0,042
277773	Вид	Alistipes finegoldii	-3,751	1,178	0,043
940566	Вид	Staphylococcus lentus	-5,228	1,519	0,026
930972	Род	Staphylococcus	-5,418	1,536	0,023

Таблица 8

Значимые таксоны с разной относительной численностью для лечения с использованием Blautix по сравнению с лиобуфером в D-14 в исследованиях инсультта

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректиро- ванное значение p
1161472	Семейство	Lachnospiraceae	6,511	1,403	0,001
392940	Kingdom	Bacteria	-5,169	1,346	0,022

Таблица 9
Значимые таксоны с разной относительной численностью для лечения
с использованием Blautix по сравнению с лиобуфером в D14
в исследованиях инсульты

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
25678	Вид	<i>Mucispirillum schaedleri</i>	2,704	0,753	0,012
1379349	Род	<i>Clostridium</i> XIVa	2,517	0,771	0,027
742656	Вид	<i>Oscillibacter valericigenes</i>	1,738	0,459	0,009
558330	Род	<i>Prevotella</i>	-1,634	0,406	0,006
1370810	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	-1,780	0,390	0,001
712755	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	-1,827	0,464	0,006
47662	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	-2,109	0,606	0,014
1640334	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	-2,260	0,693	0,027
1105465	Род	<i>Barnesiella</i>	-2,306	0,627	0,010
161658	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-2,565	0,816	0,037
277773	Вид	<i>Alistipes finegoldii</i>	-3,619	1,034	0,014
187271	Вид	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	-3,924	1,057	0,010
459041	Вид	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	-4,029	0,981	0,006

Резюме.

Blautix вызывает значимое увеличение разнообразия микробиоты на протяжении периода исследований в мышевой модели инсульта, по сравнению с лиобуфером или контрольным носителем.

Пример 4. Защитный эффект в моделях нейровоспалительных состояний.

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) представляет собой мышевую модель воспаления ЦНС, отображающую многие аспекты заболевания рассеянным склерозом (РС) у человека, и ЭАЭ является наиболее часто используемой экспериментальной моделью рассеянного склероза человека. ЭАЭ также используется в более общем смысле в качестве модели ЦНС-специфических аутоиммунных расстройств [52] и других специфических состояний, включая острый рассеянный энцефаломиелит. ЭАЭ индуцируют путем иммунизации миелиновыми пептидами и адьювантами с целью вызывания иммунного и воспалительного ответа, близко соответствующего механизмам, лежащим в основе многих аутоиммунных и воспалительных расстройств ЦНС, и в частности РС. Многие терапии, демонстрирующие эффективность при ЭАЭ, также проявляют эффективность при лечении РС у людей [52]. Наиболее важно, что ЭАЭ воспроизводит ключевые признаки РС, включая воспаление, демиелинизацию, потерю аксонов и глиоз. Эффекты демиелинизации при ЭАЭ ограничены преимущественно спинным мозгом, с незначительными изменениями ствола головного мозга и мозжечка. При ЭАЭ CD4⁺ Т-клетки являются доминирующей популяцией клеток, присутствующей в ЦНС.

Методология.

Blautia hydrogenotrophica ("Blautix", штамм, депонированный с номером доступа DSM 10507, а также с номером доступа DSM 14294) использовались в виде лиофилизированного порошка и восстанавливались при необходимости.

Использовали 12 взрослых самок мышей C57BL/6J.

В день 0 и день 7 животные получали эмульсию, содержащую MOG35-55 (миelin-олигодендроглиоцитарный гликопротеин) и полный адьювант Фрейнда (ПАФ) с добавкой *Mycobacterium Tuberculosis* H37Ra подкожными инъекциями под газовой (изофлуран) анестезией. В день 0 делали две подкожные инъекции в бока; по одной в каждый нижний квадрант спины. В день 7 делали две подкожные инъекции в бока, по одной в каждый верхний квадрант спины.

В день 0 и день 2 животным вводили коклюшный токсин (РТх) в фосфатно-солевом буфере (PBS) путем интраперitoneальных инъекций. В день 0 введение РТх осуществляли после инъекций MOG.

Введение Blautix или контролей осуществляли с дня -14 по следующей схеме:

день 0: MOG/ПАФ, один раз, подкожно (SC),

день 0: РТх, один раз, интраперитонеально (IP),
 день 2, РТх, один раз, интраперитонеально (IP),
 день 7: MOG/ПАФ, один раз, подкожно (SC).

Введение препаратов осуществляют в течение 15 мин после их приготовления. Blautix вводят в дозе 2×10^8 ; 100 мкл/мышь.

С дня 0 до конца эксперимента у животных оценивают ежедневно по балльной системе клинические признаки ЭАЭ, включая парез и парализ хвоста и/или конечностей.

В день -14, день -1 и день 34 собирают фекальные комочки каждого животного, немедленно подвергают мгновенной заморозке и хранят при -80°C .

Результаты.

Эффект лечения с использованием Blautix на микробиоту между моментами времени (D-14, D-1, D34) для модели РС показан на фиг. 10. Значимые изменения во времени профилей микробиоты наблюдались (значение $p=0,001$) в моменты проведения измерений при исследованиях.

Дифференциальный анализ с использованием DESeq2 выявил значимые (скорректированное значение $p<0,05$) таксоны с разной относительной численностью для лечения с использованием Blautix между моментами времени исследований, как указано в табл. 10. Таксоны перечислены в табл. 11-13.

Таблица 10

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени в исследованиях РС

	D-14->D-1	D-1->D34	D-14->D34
РС (Blautix)	42	30	58

Таблица 11

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени D-14 и D-1 в исследованиях РС.

Положительная кратность изменений интерпретируется как увеличенная в D-1 по сравнению с D-14

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
1105465	Род	Barnesiella	8,076	0,702	2.2E-28
48633	Род	Clostridium XIVa	7,304	0,825	7.0E-17
490405	Вид	Turicibacter sanguinis	6,824	0,778	1.0E-16
491106	Вид	Flavonifractor plautii	5,116	0,923	4.3E-07
43241	Род	Clostridium XIVa	5,041	0,739	2.2E-10
948888	Род	Barnesiella	4,649	0,605	4.3E-13
47662	Вид	Barnesiella intestinihominis	4,276	0,501	5.1E-16
1288839	Семейство	Lachnospiraceae	4,117	1,170	0,003
11297	Семейство	Porphyromonadaceae	4,081	0,600	2.2E-10
198591	Семейство	Lachnospiraceae	3,757	0,788	2.3E-05
49543	Семейство	Lachnospiraceae	3,275	0,897	0,002
1009304	Вид	Oscillospira guilliermondii	3,140	1,043	0,015
930464	Вид	Insolitispirlillum peregrinum	2,804	1,033	0,029
1793164	Род	Parasutterella	2,720	0,576	2.6E-05
1260915	Царство (Kingdom)	Bacteria	2,678	0,804	0,006
36112	Вид	Clostridium leptum	2,584	0,887	0,018
181003	Род	Alistipes	2,581	0,555	3.3E-05
149837	Семейство	Lachnospiraceae	2,434	0,678	0,002
1056232	Род	Clostridium XIVa	2,308	0,856	0,030
770554	Вид	Alistipes	2,223	0,556	0,001

			putredinis		
1176501	Семейство	Lachnospiraceae	2,079	0,758	0,028
33530	Вид	Acetatifactor muris	1,965	0,569	0,004
43033	Род	Alistipes	1,788	0,379	2.6E-05
576748	Семейство	Ruminococcaceae	1,740	0,603	0,019
50759	Вид	Oscillospira guilliermondii	1,570	0,409	0,001
592877	Вид	Pseudoflavorifactor capillosus	1,512	0,418	0,002
712755	Вид	Barnesiella intestinihominis	1,509	0,502	0,015
375558	Вид	Barnesiella intestinihominis	1,505	0,554	0,029
307526	Вид	Bacteroides acidifaciens	1,499	0,492	0,014
74641	Вид	Bacteroides acidifaciens	1,418	0,532	0,032
943687	Семейство	Porphyromonadaceae	1,162	0,397	0,018
791734	Род	Clostridium XlVa	-1,064	0,377	0,023
19031	Вид	Anaerotruncus colihominis	-1,391	0,516	0,030
74179	Вид	Alistipes massiliensis	-1,810	0,305	4.7E-08
211238	Вид	Anaeroplasma abactoclasticum	-2,662	0,859	0,012
76239	Семейство	Lachnospiraceae	-2,721	0,668	4.2E-04
743544	Род	Clostridium XIVa	-3,014	0,672	7.0E-05
993522	Род	Clostridium XIVa	-3,394	0,708	2.2E-05
76325	Род	Lactobacillus	-3,621	0,575	5.2E-09
209309	Семейство	Lachnospiraceae	-3,857	1,295	0,016
567799	Род	Alistipes	-5,435	0,634	4.3E-16
77091	Род	Clostridium	-6,877	1,048	1.0E-09

Таблица 12

Значимые таксоны с разной относительной численностью между моментами времени D-1 и D34 в исследованиях РС.

Положительная кратность изменений интерпретируется как увеличенная в D34 по сравнению с D-1

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректированное значение p
1370810	Вид	Barnesiella intestinihominis	4,794	1,196	0,001
1684470	Вид	Parasutterella excrementihominis	4,434	1,167	0,002
1070245	Вид	Eubacterium plexicaudatum	3,870	0,961	0,001
518034	Вид	Desulfovibrio fairfieldensis	3,867	0,962	0,001
1482481	Вид	Clostridium sporicum	3,228	1,112	0,029
567799	Род	Alistipes	3,218	0,864	0,002
1404432	Вид	Bacteroides acidifaciens	2,978	0,835	0,004
1067514	Род	Barnesiella	2,967	0,921	0,011
76325	Род	Lactobacillus	2,893	0,683	0,001
307526	Вид	Bacteroides acidifaciens	2,218	0,351	1.8E-08
1288839	Семейство	Lachnospiraceae	2,084	0,746	0,035

866478	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	1,936	0,647	0,022
23133	Семейство	<i>Ruminococcaceae</i>	1,840	0,544	0,007
472737	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	1,697	0,524	0,011
842401	Порядок	<i>Clostridiales</i>	1,601	0,535	0,022
39008	Вид	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	1,494	0,390	0,002
74179	Вид	<i>Alistipes massiliensis</i>	1,426	0,328	3.9E-04
277773	Вид	<i>Alistipes finegoldii</i>	1,323	0,461	0,029
76234	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-1,183	0,333	0,004
948888	Род	<i>Barnesiella</i>	-1,453	0,520	0,035
150155	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-1,609	0,421	0,002
783115	Семейство	<i>Desulfovibrionaceae</i>	-2,262	0,608	0,002
773427	Вид	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	-2,443	0,661	0,003
201157	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-2,587	0,754	0,006
596894	Род	<i>Clostridium XIVa</i>	-2,616	0,909	0,029
43033	Род	<i>Alistipes</i>	-3,236	0,718	2.2E-04
1793164	Род	<i>Parasutterella</i>	-3,758	0,632	1.4E-07
49543	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-4,849	0,920	5.5E-06
490405	Вид	<i>Turicibacter sanguinis</i>	-5,152	0,704	2.5E-11
48282	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	-5,460	0,666	4.7E-14

Таблица 13

Значимые таксоны с разной относительной численностью

между моментами времени D-14 и D34 в исследованиях РС.

Положительная кратность изменений интерпретируется

как увеличенная в D3 4 по сравнению с D-14

OTE №	Низший уровень	Классификация	Значимые изменения log2	Стандартная ошибка	Скорректиро- ванное значение р
1105465	Род	<i>Barnesiella</i>	7,221	0,754	2.1E-19
48633	Род	<i>Clostridium XIVa</i>	6,734	0,959	8.7E-11
1288839	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	5,820	0,811	3.5E-11
518034	Вид	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>	5,459	0,999	8.3E-07
1684470	Вид	<i>Parasutterella excrementihominis</i>	5,289	1,408	0,001
1482481	Вид	<i>Clostridium disporicum</i>	4,947	1,295	0,001
1370810	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	4,734	1,263	0,001
1070245	Вид	<i>Eubacterium plexicaudatum</i>	4,620	0,794	1.3E-07
1067514	Род	<i>Barnesiella</i>	4,544	1,103	2.8E-04
1575843	Вид	<i>Clostridium ruminantium</i>	4,393	1,743	0,040
43241	Род	<i>Clostridium XIVa</i>	4,284	0,817	2.4E-06
47662	Вид	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	4,273	0,478	3.8E-17
1728285	Род	<i>Lachnospiracea incertae sedis</i>	4,204	1,221	0,003
11297	Семейство	<i>Porphyromonadacea e</i>	3,921	0,577	3.4E-10
307526	Вид	<i>Bacteroides acidifaciens</i>	3,539	0,534	9.9E-10
198591	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	3,273	0,762	1.4E-04
236126	Вид	<i>Oscillospira guilliermondii</i>	3,175	1,086	0,015
930464	Вид	<i>Insolitospirillum peregrinum</i>	3,152	0,848	0,001
948888	Род	<i>Barnesiella</i>	3,040	0,629	1.6E-05
491106	Вид	<i>Flavonifractor plautii</i>	3,039	1,170	0,034
563211	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	2,564	0,965	0,030
149837	Семейство	<i>Lachnospiraceae</i>	2,562	0,890	0,016
770554	Вид	<i>Alistipes</i>	2,520	0,455	6.2E-07

putredinis						
1260915	Царство (Kingdom)	Bacteria	2,505	0,677	0,001	
36112	Вид	Clostridium leptum	2,483	0,916	0,026	
1056232	Род	Clostridium XIVa	2,319	0,664	0,002	
39008	Вид	Bacteroides acidifaciens	2,107	0,274	9.9E-13	
23133	Семейство	Ruminococcaceae	2,049	0,614	0,004	
74641	Вид	Bacteroides acidifaciens	2,002	0,457	1.0E-04	
712755	Вид	Barnesiella intestinihominis	1,977	0,470	2.0E-04	
277773	Вид	Alistipes finegoldii	1,881	0,388	1.6E-05	
1404432	Вид	Bacteroides acidifaciens	1,805	0,563	0,006	
1176501	Семейство	Lachnospiraceae	1,654	0,630	0,032	
544582	Вид	Flavonifractor plautii	1,418	0,540	0,032	
76234	Семейство	Lachnospiraceae	-0,991	0,389	0,038	
80190	Семейство	Lachnospiraceae	-1,113	0,348	0,006	
182471	Порядок	Clostridiales	-1,315	0,472	0,021	
494032	Вид	Clostridium oroticum	-1,502	0,580	0,034	
2367602	Порядок	Clostridiales	-1,518	0,472	0,006	
74771	Вид	Alistipes massiliensis	-1,617	0,408	0,001	
172154	Род	Clostridium XIVa	-1,628	0,442	0,001	
993522	Род	Clostridium XIVa	-1,799	0,594	0,011	
791734	Род	Clostridium XlVa	-1,842	0,387	2.2E-05	
150155	Семейство	Lachnospiraceae	-1,859	0,532	0,002	
743544	Род	Clostridium XIVa	-2,196	0,558	0,001	
567799	Род	Alistipes	-2,378	0,513	3.9E-05	
96345	Род	Clostridium XIVa	-2,528	0,667	0,001	
19031	Вид	Anaerotruncus colihominis	-2,575	0,610	1.9E-04	
201157	Семейство	Lachnospiraceae	-2,615	0,866	0,011	
578360	Семейство	Lachnospiraceae	-2,870	0,586	1.4E-05	
76239	Семейство	Lachnospiraceae	-3,325	0,631	2.3E-06	
1165458	Семейство	Lachnospiraceae	-3,346	0,754	8.1E-05	
773427	Вид	Anaerotruncus colihominis	-3,475	0,776	7.0E-05	
209309	Семейство	Lachnospiraceae	-3,639	1,042	0,002	
320120	Род	Clostridium XIVa	-3,670	0,811	5.9E-05	
1628488	Вид	Vallitalea guaymasensis	-4,144	1,538	0,027	
48282	Семейство	Lachnospiraceae	-4,653	1,012	4.5E-05	
77091	Род	Clostridium	-7,493	1,192	7.9E-09	

Резюме.

Blautix вызывает значимое увеличение разнообразия микробиоты и приводит к значимым изменениям во времени в ходе лечения в животной модели рассеянного склероза.

Изобретение было описано выше только в качестве примера, и следует понимать, что могут быть сделаны дополнительные модификации, не выходящие за пределы объема формулы изобретения.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 (ген 16s рибосомальной РНК штамма GAM6-1 Blautia stercoris, частичная последовательность - HM626177)

1	tgcaagtgcga	gcgaagcgct	tacgacagaa	ctttcggggg	aagatgtaag
	ggactgagcg				
61	gcggacgggt	gagtaacgcg	tggtaacct	gcctcataca	gggggataac
	agttggaaac				
121	ggctgctaatt	accgcataag	cgcacggtat	cgcatac	agtgtgaaaa
	actccggtgg				
181	tatgagatgg	acccgcgtct	gattagctag	ttggaggggt	aacggcccac
	caaggcgacg				
241	atcagtagcc	ggcctgagag	ggtgaacggc	cacattggga	ctgagacacg
	gcccagactc				
301	ctacgggagg	cagcagtggg	gaatattgca	caatggggga	aaccctgatg
	cagcgacgcc				
361	gcgtgaagga	agaagtatct	cgttatgtaa	acttctatca	gcagggaaaga
	aaatgacggt				
421	acctgactaa	gaagccccgg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggtaatac
	gttaggggca				
481	agcgttatcc	ggatttactg	ggtgtaaagg	gagcgtagac	ggaagagcaa
	gtctgatgtg				
541	aaaggctggg	gcttaacccc	aggactgcat	tggaaactgt	ttttctttag
	tgccggagag				
601	gtaagcgaa	ttcctagtgt	agcggtgaaa	tgcgtagata	ttaggagaa
	caccagtggc				
661	gaaggcggct	tactggacgg	taactgacgt	tgaggctcga	aagcgtgggg
	agcaaacagg				
721	attagatacc	ctggtagtcc	acgcccgtaaa	cgtatatac	tagtgttgg
	ggagcaaaggc				
781	tcttcggtgc	cgcagcaaac	gcaataagta	ttccacctgg	ggagtacgtt
	cgcaagaatg				
841	aaactcaaag	gaattgacgg	ggacccgcac	aagcggtgga	gcatgtggtt
	taattcgaag				
901	caacgcgaag	aaccttacca	agtcttgaca	tgcatctgac	cggttcgtaa
	tggAACCTTT				
961	ccttcgggac	agagaagaca	ggtggtgcat	ggttgtcg	agctcggtc
	gtgagatgtt				
1021	gggttaagtc	ccgcaacgag	cgcaacccct	atcctcagta	gccagcagg
	gaagctggcc				
1081	actctgtgga	gactgccagg	gataacctgg	aggaaggcgg	ggacgacgtc
	aaatcatcat				
1141	gccccttatg	atttgggcta	cacacgtgt	acaatggcgt	aaacaaagg
	aagcgaggcc				
1201	gcgaggggga	gcaaattcca	aaaataacgt	cccagttcg	actgcagtct
	gcaactcgac				
1261	tgcacgaagc	tgaaatcgct	agtaatcg	aatcagaatg	tcgcggtaa
	tacgttccg				
1321	ggtcttgta	acaccgcccc	tcacaccatg	ggagttagta	acgcccgaag
	tc				

SEQ ID NO: 2 (ген 16S рибосомальной РНК штамма WAL 14507 Blautia wexlerae, частичная последовательность - EF036467)

1	caagtcgaac	ggaaattant	ttattgaaac	ttcggtcgat	ttaatttaat
	tctagtggcg				
61	gacgggtgag	taacgcgtgg	gtaacctgcc	ttatacaggg	ggataacagt
	cagaaatggc				
121	tgctaatacc	gcataagcgc	acagagctgc	atggctcagt	gtaaaaaact
	ccgggtgtat				
181	aaagatggacc	cgcgttggat	tagttgttg	gtgggtaac	ggcccaccaa
	ggcgacgatc				
241	catagccggc	ctgagagggt	gaacggccac	attgggactg	agacacggcc
	cagactccta				
301	cgggaggcag	cagtgggaa	tattgcacaa	tggggaaac	cctgatgcag
	cgacgcccgc				
361	tgaaggaaga	agtatctcg	tatgtaaact	tctatcagca	ggaaagatag
	tgacggtacc				
421	tgactaagaa	gccccggcta	actacgtgcc	agcagccgcg	gtaatacgt
	gggggcaagc				
481	gttatccgga	tttactgggt	gtaaagggag	cgtagacggt	gtggcaagtc
	tgatgtgaaa				
541	ggcatggct	caacctgtgg	actgcattgg	aaactgtcat	acttgagtgc
	cggaggggta				
601	agcggaaattc	ctagtgtac	ggtgaaatgc	gtagatatta	ggaggaacac
	cagtggcgaa				
661	ggcggcttac	tggacggtaa	ctgacgttga	ggctcgaaag	cgtggggagc
	aaacaggatt				
721	agataaccctg	gtagtcacg	ccgtaaacga	tgaataacta	ggtgtcgggt
	ggcaaaggcca				
781	ttcgggtccg	tcgcaaacgc	agtaagtatt	ccacctgggg	agtacgttcg
	caagaatgaa				
841	actcaaagga	attgacgggg	acccgcacaa	gcgggtggagc	atgtggttt
	attcgaagca				
901	acgcgaagaa	ccttaccaag	tcttgacatc	cgcctgaccg	atccttaacc
	ggatcttcc				
961	ttcgggacag	gcgagacagg	tggtgcatgg	ttgtcgtag	ctcgtgtcg
	gagatgttgg				
1021	gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccctat	cctcagtagc	cagcattaa
	ggtgggcact				
1081	ctggggagac	tgccaggat	aacctggagg	aaggcgggga	tgacgtcaaa
	tcatcatgcc				
1141	ccttatgatt	tgggctacac	acgtgctaca	atggcgtaaa	caaaggaaag
	cgagattgt				
1201	agatggagca	aatccaaaa	ataacgtccc	agttcgact	gtagtctgca

```

acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgccgat cagaatgccg cggtaatac
gttcccggt
1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca
gtgaccta
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggccggacc gatgactggg gtgaagtcgt
aacaagg

```

SEQ ID NO: 3 (ген 16s рибосомальной РНК штамма 830 Blautia atercoris)

```

TTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTT
ACGACAGAACCTTCGGGGAAAGATGTAAGGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGT
AACCTGCCTCATACAGGGGATAACAGTTGAAACGGCTGCTAATACCGATAAGCGCACAGTA
TCGCATGATACTGGTGTGAAAAACTCCGGTGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTG
GAGGGTAAACGGCCACCAAGGGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGAA
ACCTGATGCAAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGATCTGGTATGAACTTCTATCAGCAGG
GAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATA
CGTAGGGGCAAGCGTTATCCGATTACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTC
TGATGTGAAAGGCTGGGCTTAACCCCAGGACTGCATTGAAACTGTTTCTGAGTGCCGGA
GAGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCG
AAGGCGGTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGAGCAAAGCTTCGGT
CCGCAGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGACCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAAGTCTGACATCGATCTGACCGGTTGTAATGAAACCTTCTGGGACAGAGAAGACAGG
TGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGAAC
CCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGG
AGGAAGGGGGGACGACGTAAACATCATGCCCTTATGATTGGGCTACACACGTGCTACAA
TGGCGTAAACAAAGGGAAAGCGAGCCCGGAGGGGAGCAAATCCAAAATAACGTCCCAGTTC
GGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTC
GCGGTGAATACGTTCCGGTCTGTACACACCGCCGTACACCGGAGTCAGTAACGCC
GAAGTCAGTGACCCAACCTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCAGGATTGATAACTGGGTGAAGT
CTAGGGGGT

```

SEQ ID NO: 4 (консенсусная последовательность 16s РНК штамма 830 MRX008 Blautia wexlerae)

TAACCTGCCTTATAACAGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGA
 GCTGCATGGCTCAGTGTAAAAACTCCGGTGGTATAAGATGGACCCCGCTGGATTAGCTTGTT
 GGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCACATT
 GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGGA
 AACCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTGGTATGTAAACTCTATCAGCAG
 GGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAT
 ACGTAGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGT
 CTGATGTGAAAGGCATGGCTAACCTGTGGACTGCATTGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGG
 AGGGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGC
 GAAGGCGGTTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGAGCATGGCTCTCGG
 TGCCGTCGAAACGCAAGTAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGG
 AATTGACGGGACCCGACAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAGCAACGCGAAGAACCT
 TACCAAGTCTTGACATCCGCTGACCGATCCTAACCGGATTTCCCTCGGGACAGGCGAGAC
 AGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAGCAGC
 AACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTAAAGGTGGCACTCTGGGAGACTGCCAGGGATAACCT
 GGAGGAAGGCGGGGATGACGTAAACATCATGCCCCATTATGATTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGCGTAAACAAAGGGAAAGCGAGATCGTGGAGATGGAGCAAATCCAAAAATAACGTCCCAGT
 TCGGACTGTAGTCTGCAACCGACTACAGAAGCTGGATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATG
 CCGCGGTGAATACGTTCCGGGTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACGC
 CCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO: 5 (ген 16s рибосомальной РНК штамма S5a36 MRX008 Blautia hidrogenotrophica, частичная последовательность - X95624.1)

1	gatgaacgct	ggcggcgtgc	ttaacacatg	caagtcgaac	gaagcgata
	agaacggaga				
61	tttcgggtga	agttttctat	tgactgagtg	gcggacgggt	gagtaacgcg
	tggtaacct				
121	gccctataca	gggggataac	agttagaaat	gactgcta	accgcataa
	cgcacagtt				
181	cgcattgaagc	ggtgtaaaaa	actgaggtgg	tataggatgg	acccgcgtt
	gattagctag				
241	tttgtgaggt	aacggccac	caaggcgacg	atccatagcc	ggcctgagag
	ggtgaacggc				
301	cacattggga	ctgagacacg	gcccaaactc	ctacggagg	cagcagtgg
	gaatatttca				
361	caatggggga	aaccctgatg	cagcgacgcc	gcgtgaagga	agaagtatct

cggtatgtaa
 421 acttctatca gcagggaga aagtgacggt acctgactaa gaagccccgg
 ctaattacgt
 481 gccagcagcc gcggtaatac gtaaggggca agcgttatcc ggatttactg
 ggtgtaaagg
 541 gagcgttagac ggtttggcaa gtctgatgtg aaaggcatgg gctcaacctg
 tggactgcat
 601 tggaaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcggaa ttccctagtgt
 agcggtgaaa
 661 tgcgttagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg
 taactgacgt
 721 tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc
 acgctgtaaa
 781 ccatgtataac taggtgtcgg gtggcaaagc cattcggtgc cgcagcaaac
 gcaataagta
 841 ttcccacctg gggagtagt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgacg
 gggacccgca
 901 caagcggtgg agcatgttgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc
 aaatcttgac
 961 atccctctga ccggaaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac
 aggtggtgca
 1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga
 gcgcaaccct
 1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgccag
 ggataaacctg
 1141 gaggaagggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gatttggct
 acacacgtgc
 1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaagg ggtgacctgg agcaaatctc
 aaaaataaacy
 1261 tctcagttcg gattgtagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggaatcgc
 tagtaatcgc
 1321 gaatcagaat gtcgcggta atacgttccc ggtcttgta cacaccgccc
 gtcacaccat
 1381 gggagtcagt aacgcccga a gtcagtgacc caaccnaaag gagggagctg
 ccgaagggtgg
 1441 gactgataac tgggtga

Список литературы

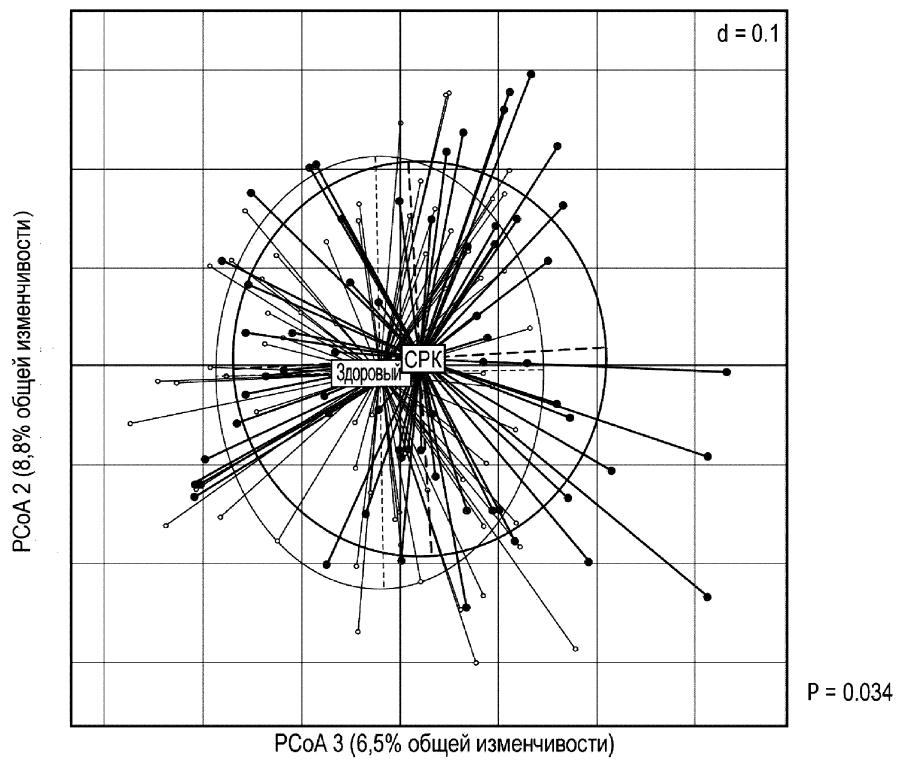
- [1] Сборник статей. (2011) *Индустр. микробиология*. №(4):219-30.
- [2] Tap *et al.* (2009), *Environ Microbiol*, 11(10):2574-84
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Lee and Lee (2014) *World J Gastroenterol.* 20(27): 8886-8897.
- [15] Xie *et al.* (2016) *Journal Dairy Sci.* 99:6913-6921
- [16] WO 01/85187
- [17] WO2016/086161
- [18] YQ *et al.* (2016), *J. Dig. Dis.*, "Therapeutic Modulation of the Gut Microbiota in IBD - More Questions to Be Answered", Oct 15, 1751-2980, 12422, Epub ahead of print.
- [19] Lozupone (2012). *Nature.* 2012 September 13; 489 (7415): 220-230
- [20] Claesson, *et al.* (2012) *Nature*, 488, 178-184.
- [21] Hansen, *et al.*, (2010), *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 26(6): 564-571.
- [22] Turnbaugh *et al.* *Nature*, 457(7228): 480-484.
- [23] Wang *et al.* (2009) *ISME J.* 3(8): 944-954.
- [24] Faith *et al.* (2013), *Science*, 341(6141): 1237439
- [25] Liu *et al.* (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [26] Bernalier *et al.* (1996) *Arch. Microbiol.* 166 (3), 176-183.

- [27] Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [28] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [29] Srùtková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [30] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [31] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [32] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [33] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [34] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [35] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [36] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [37] US 2016/0067188
- [38] Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [39] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [40] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [41] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [42] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [43] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [44] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [45] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [46] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [47] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- [48] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [49] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [50] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [51] Meyza and Blanchard (2017) *Neurosci Biobehav Rev.*;76(Pt A):99-110
- [52] Constantinescu et al. (2011) *Br J Pharmacol.* 164(4):1079-1106

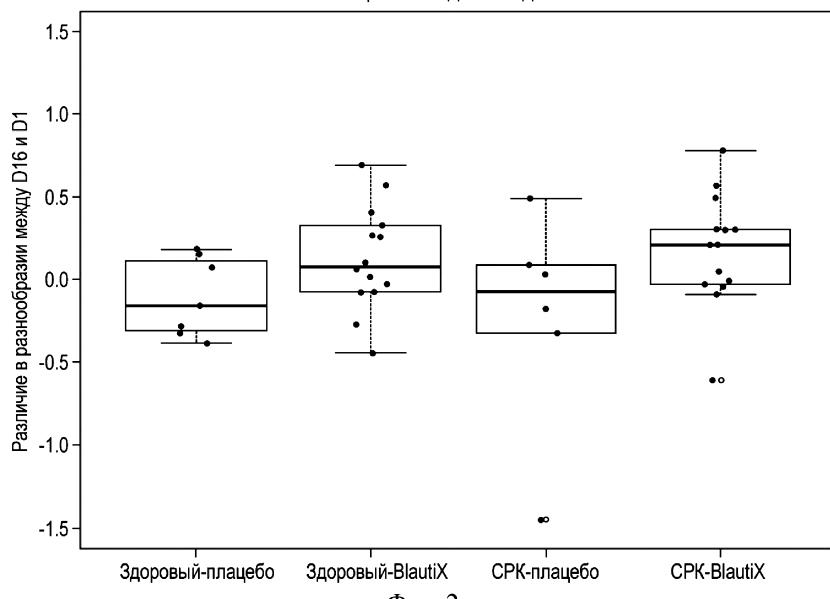
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Blautia hydrogenotrophica*, имеющий последовательность 16s рPHK, представленную SEQ ID NO: 5, и/или бактериальный штамм рода *Blautia*, имеющий последовательность 16s рPHK, по меньшей мере на 95% идентичную последовательности 16s рPHK DSM 14294 (SEQ ID NO: 5), для лечения или предотвращения заболевания, ассоциированного с уровнем разнообразия микробиоты, который понижен относительно разнообразия микробиоты здорового субъекта, и/или имеется пониженная стабильность своей микробиоты по сравнению со здоровым субъектом, причем заболевание представляет собой синдром раздраженного кишечника (СРК), одно или несколько аутоиммунных заболеваний или одно или несколько аллергических заболеваний.
2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что предназначена для перорального введения.
3. Композиция по любому из пп.1 или 2, отличающаяся тем, что содержит один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов.
4. Композиция по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей.
5. Композиция по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что бактериальный штамм лиофилизирован.
6. Композиция по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что бактериальный штамм способен частично или полностью колонизировать кишечник.
7. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что содержит один штамм *Blautia hydrogenotrophica*.
8. Композиция по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что содержит *Blautia hydrogenotrophica* и не содержит бактерий из какого-либо другого рода или содержит такие другие бактерии только в незначительном количестве.
9. Композиция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что содержит *B. hydrogenotrophica* и не содержит бактерий какого-либо другого вида или содержит такие другие бактерии только в минимальном количестве.
10. Композиция по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что содержит *Blautia hydrogenotrophica* в составе микробного консорциума.
11. Способ лечения или предотвращения СРК, аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, ассоциированного со снижением уровня разнообразия и стабильности микробиоты кишечника, включающий введение субъекту композиции по любому из пп.1-10.
12. Применение композиции по любому из пп.1-10 для лечения или предотвращения СРК, аутоиммунного заболевания или аллергического заболевания, ассоциированного со снижением уровня разнообразия и стабильности микробиоты кишечника.

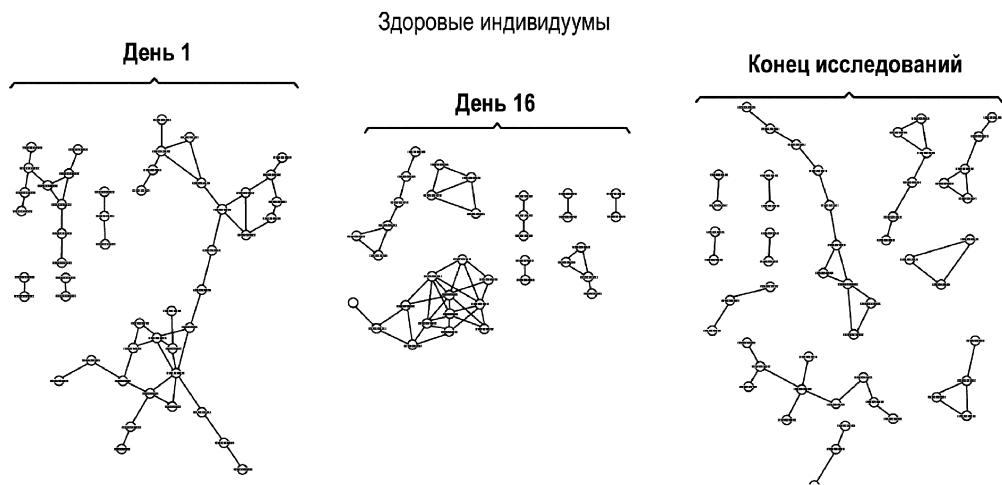
Сравнение микробиоты у здорового пациента и пациента с СРК



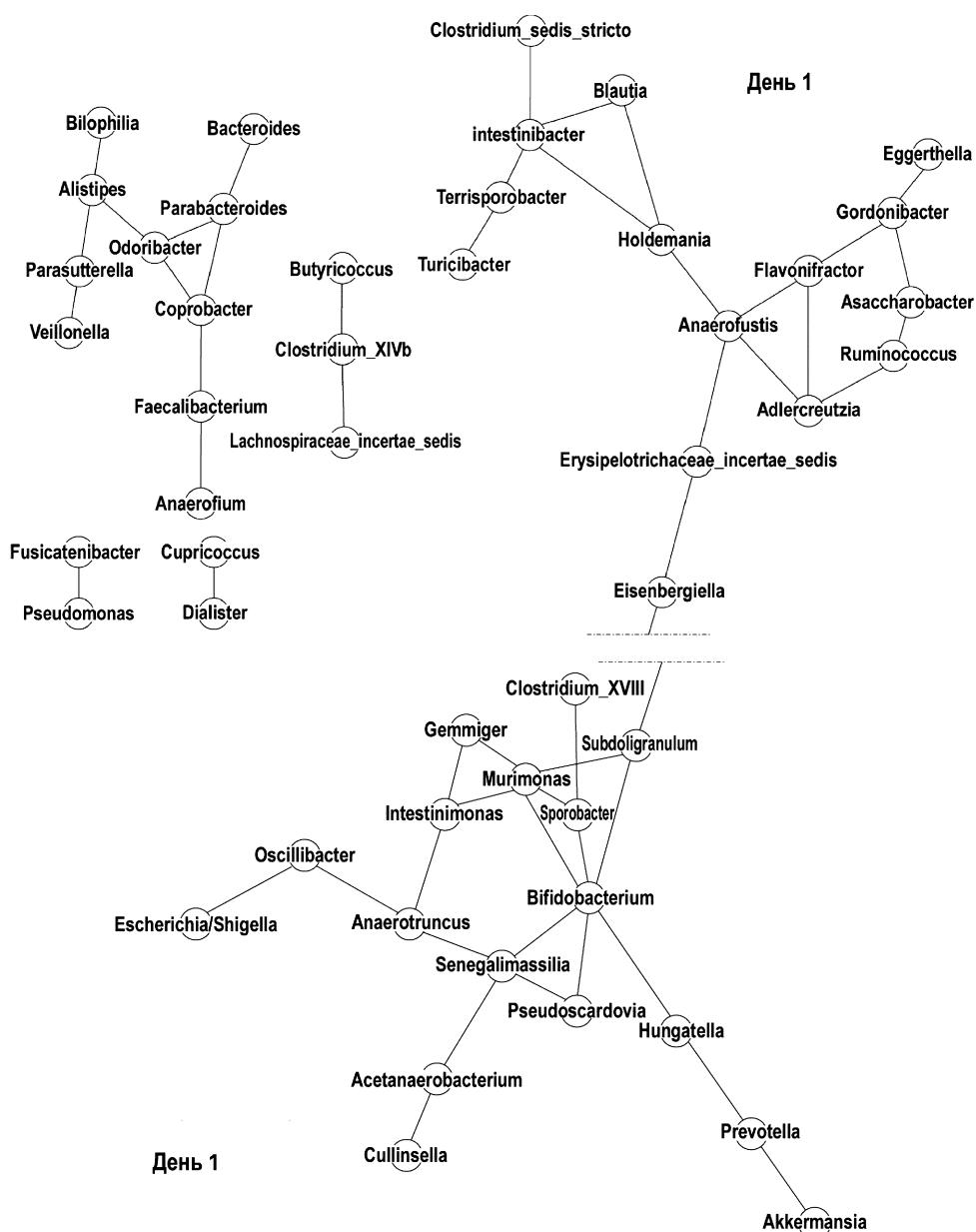
Фиг. 1

Разнообразие по Шенону
Сравнение Дня 16 и Дня 1

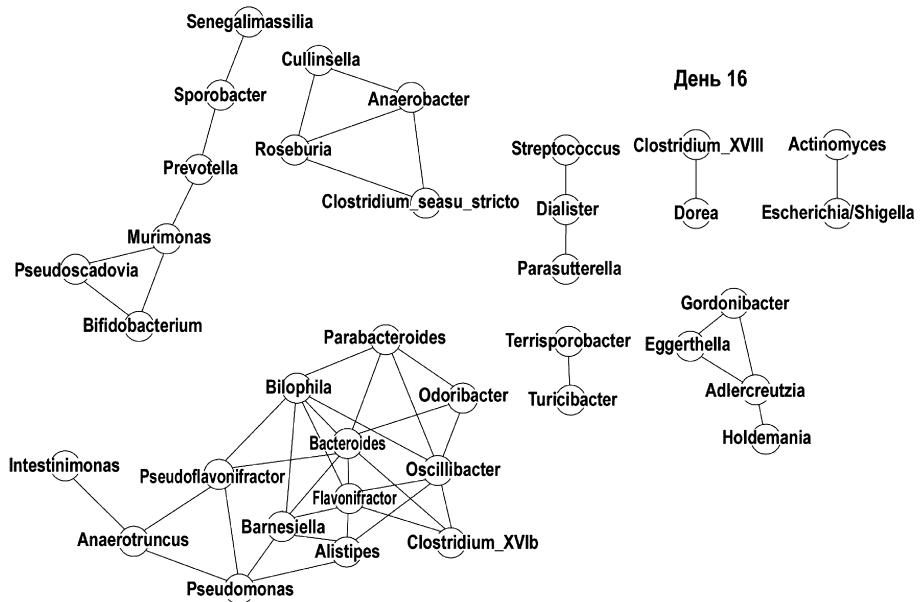
Фиг. 2



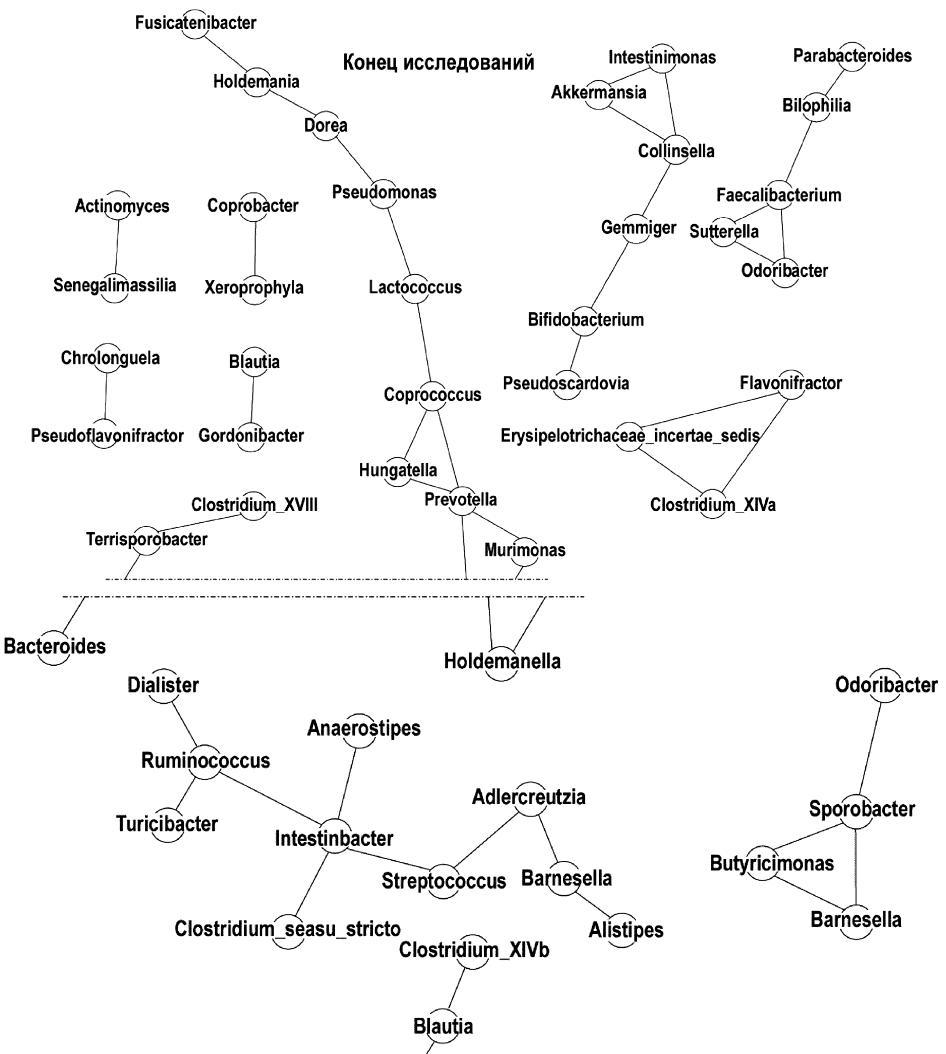
Фиг. 3А



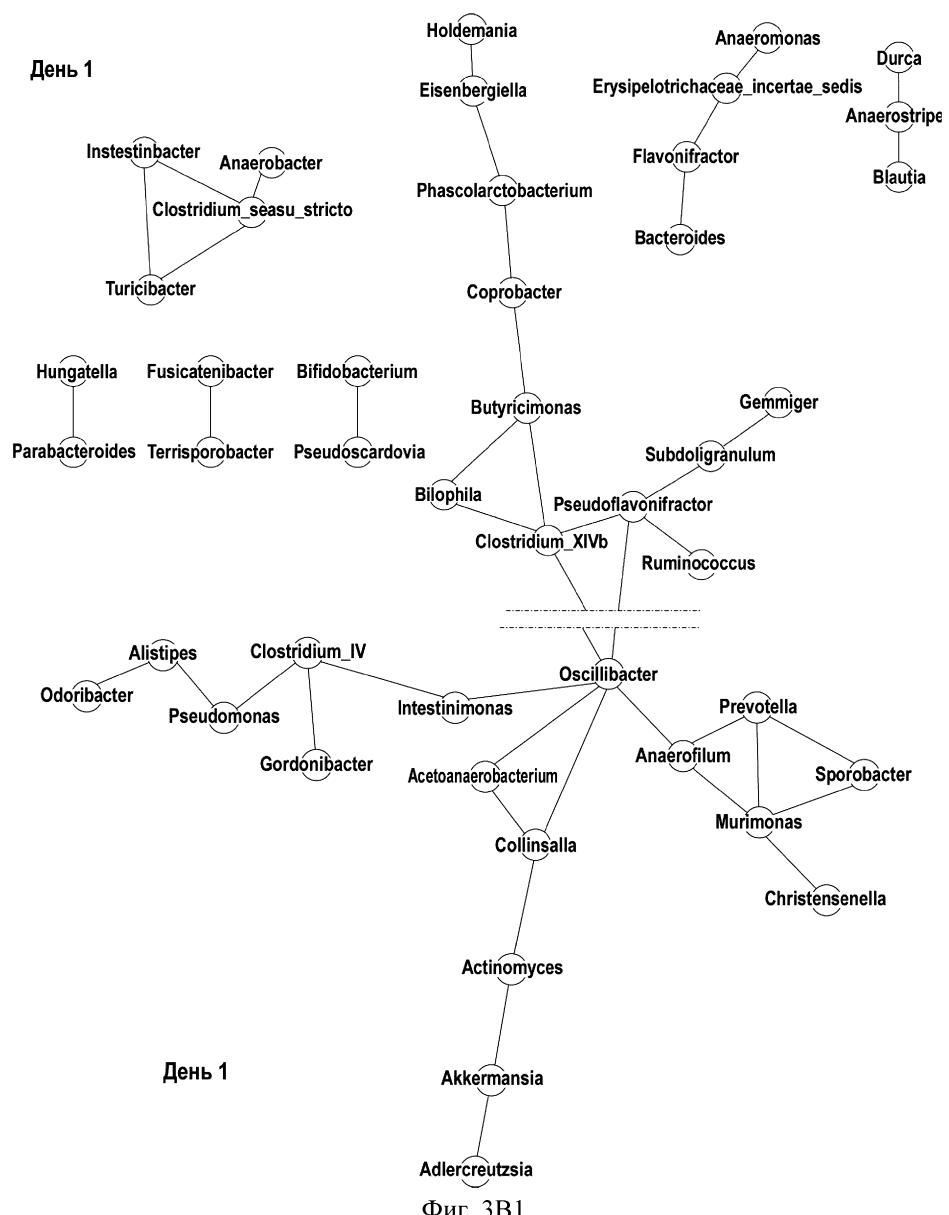
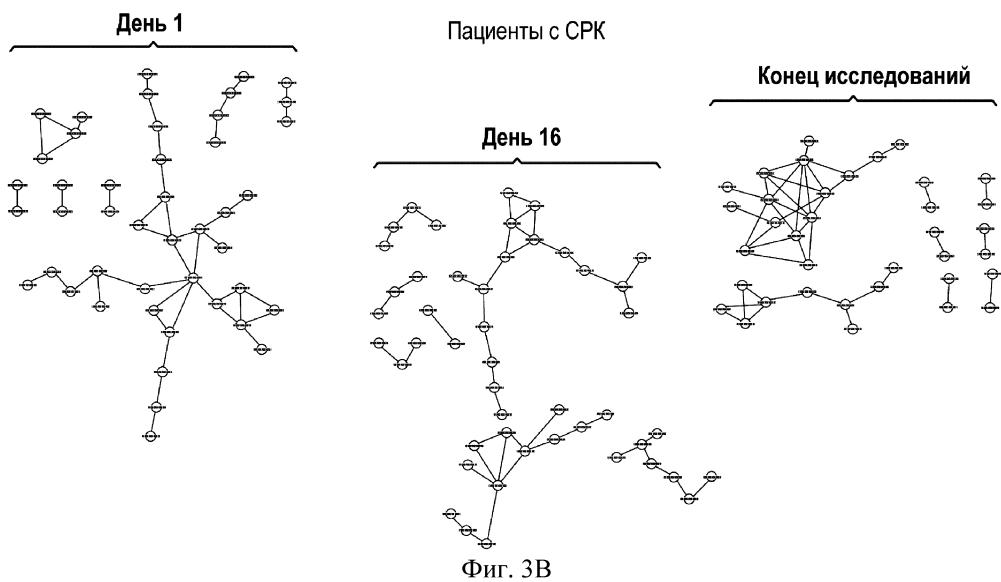
Фиг. 3А1

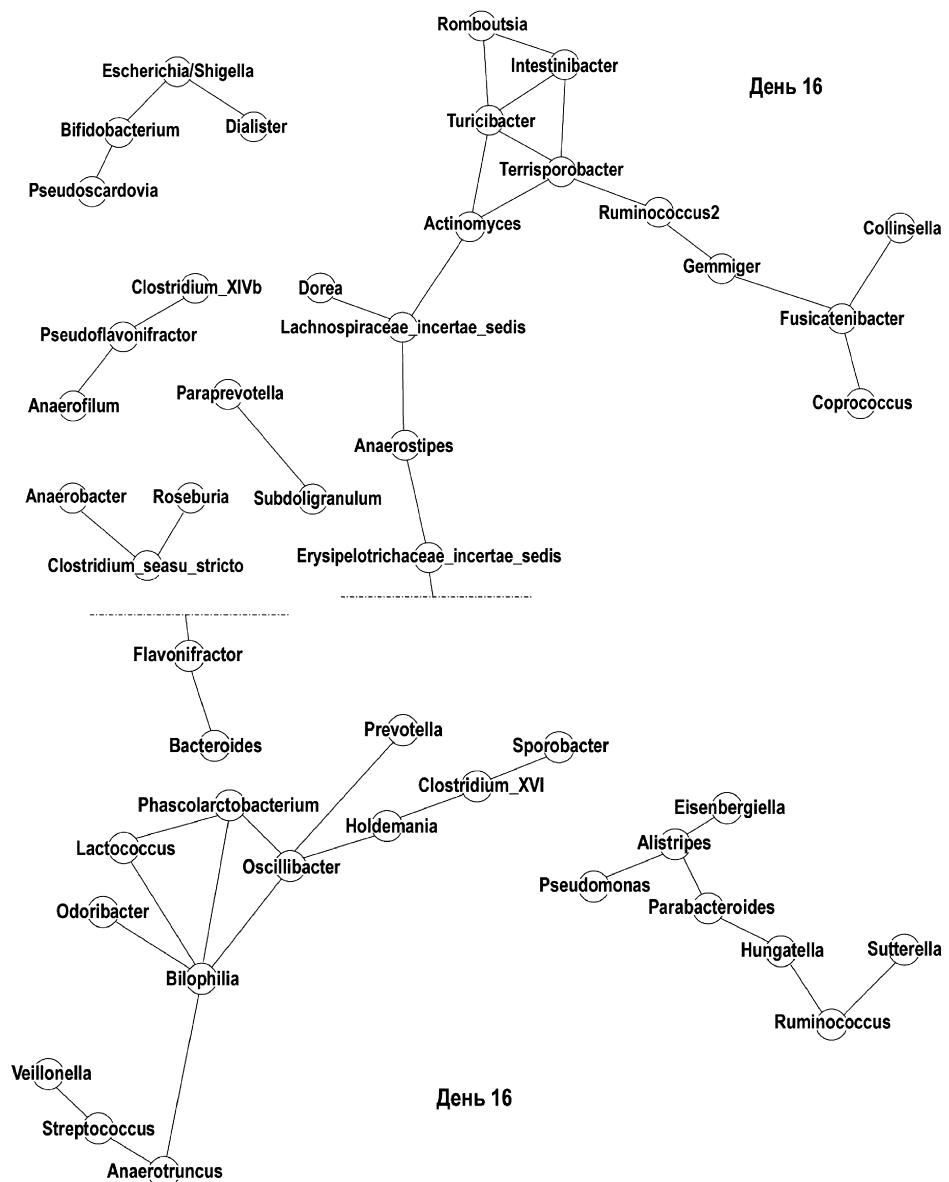


Фиг. 3А2

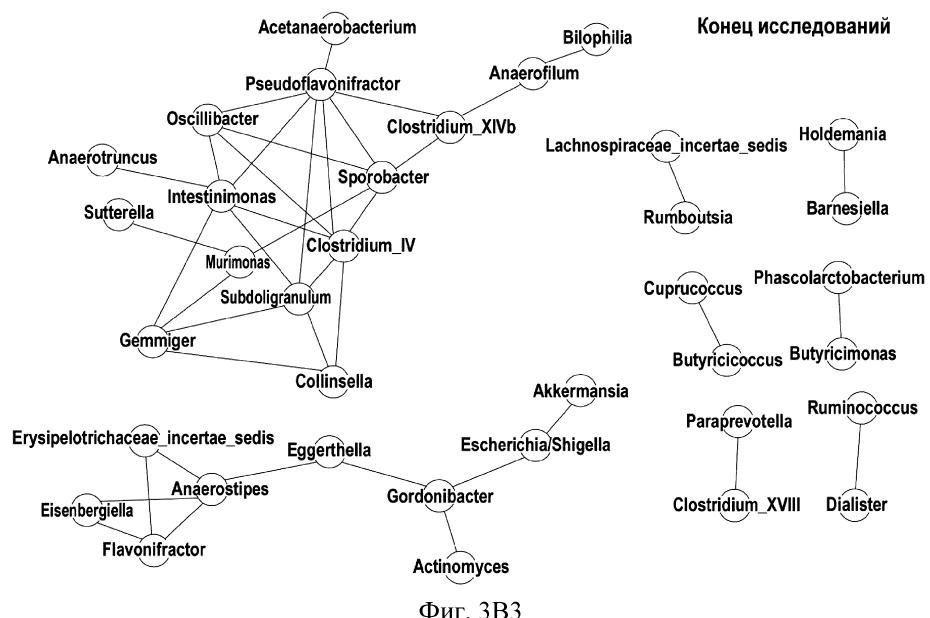


Фиг. 3А3

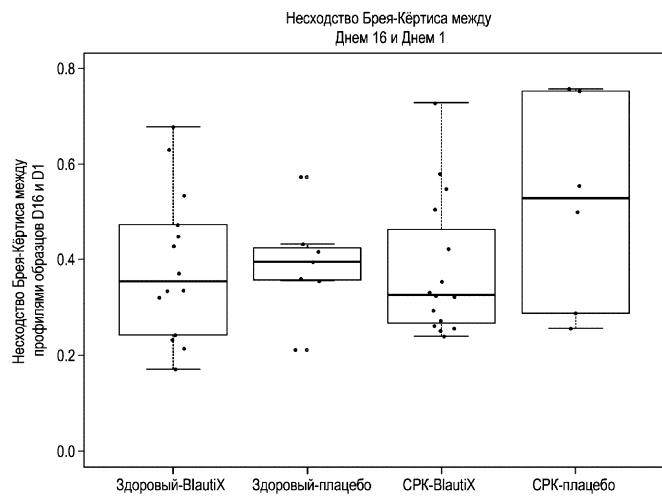




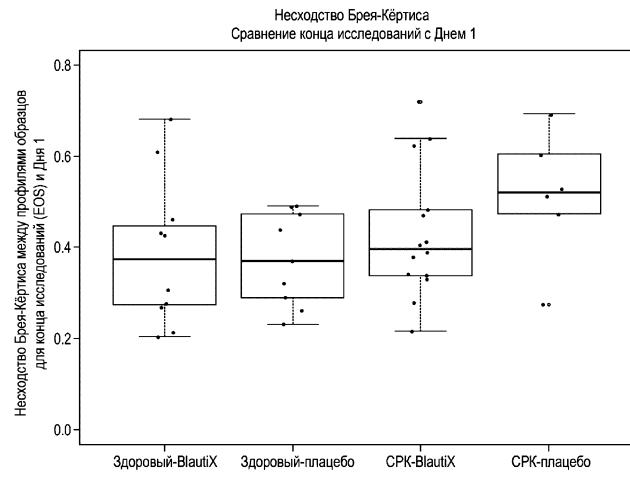
Фиг. 3В2



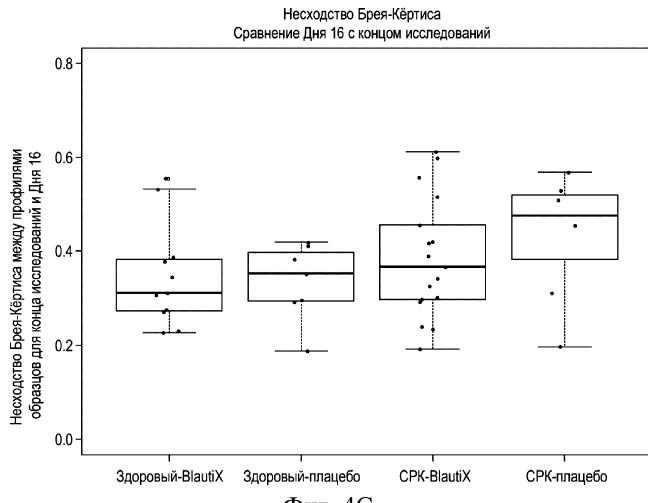
Фиг. 3В3



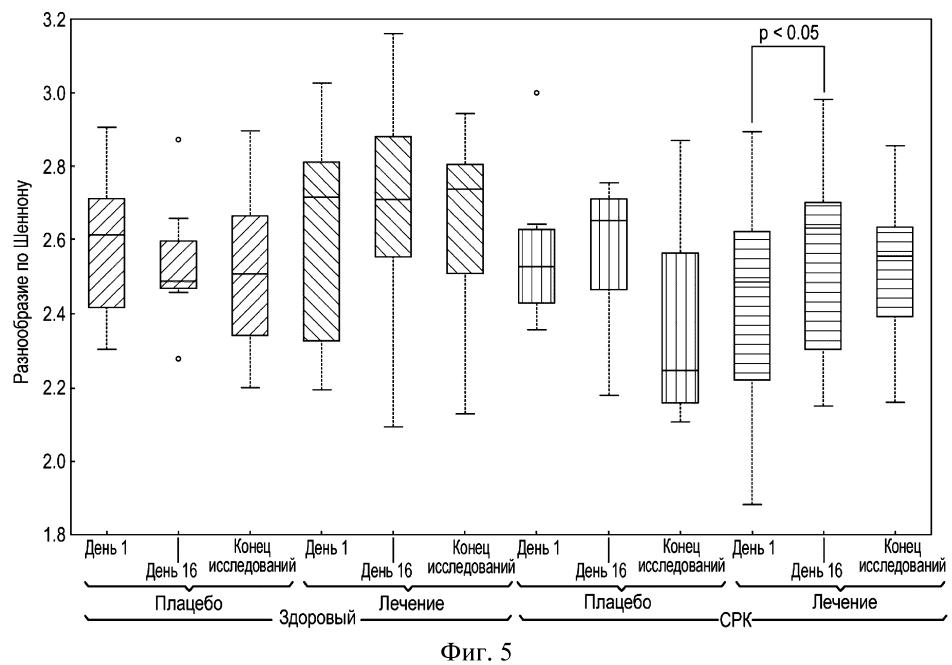
Фиг. 4А



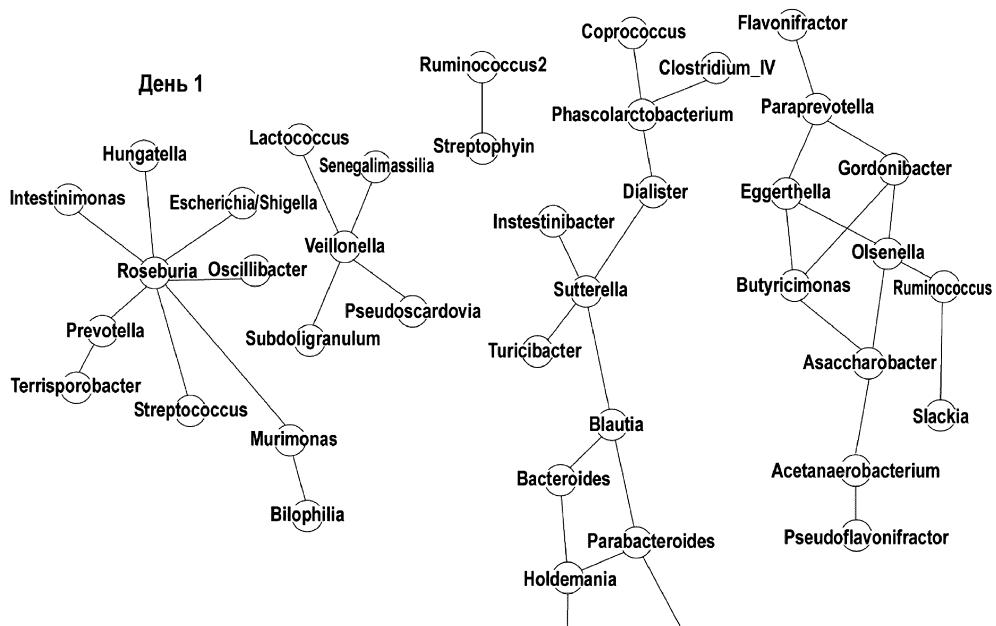
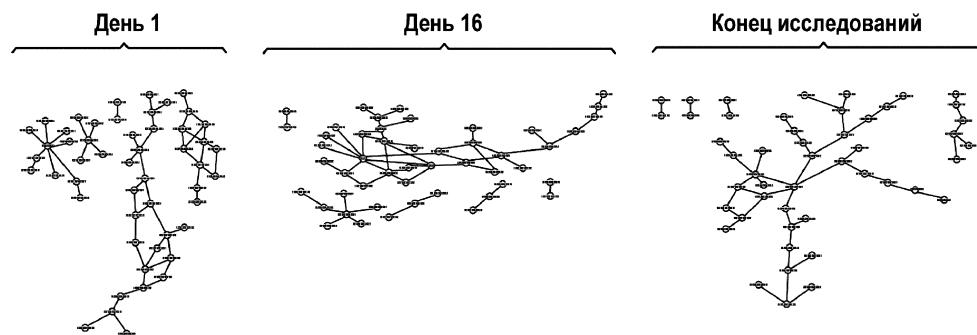
Фиг. 4В

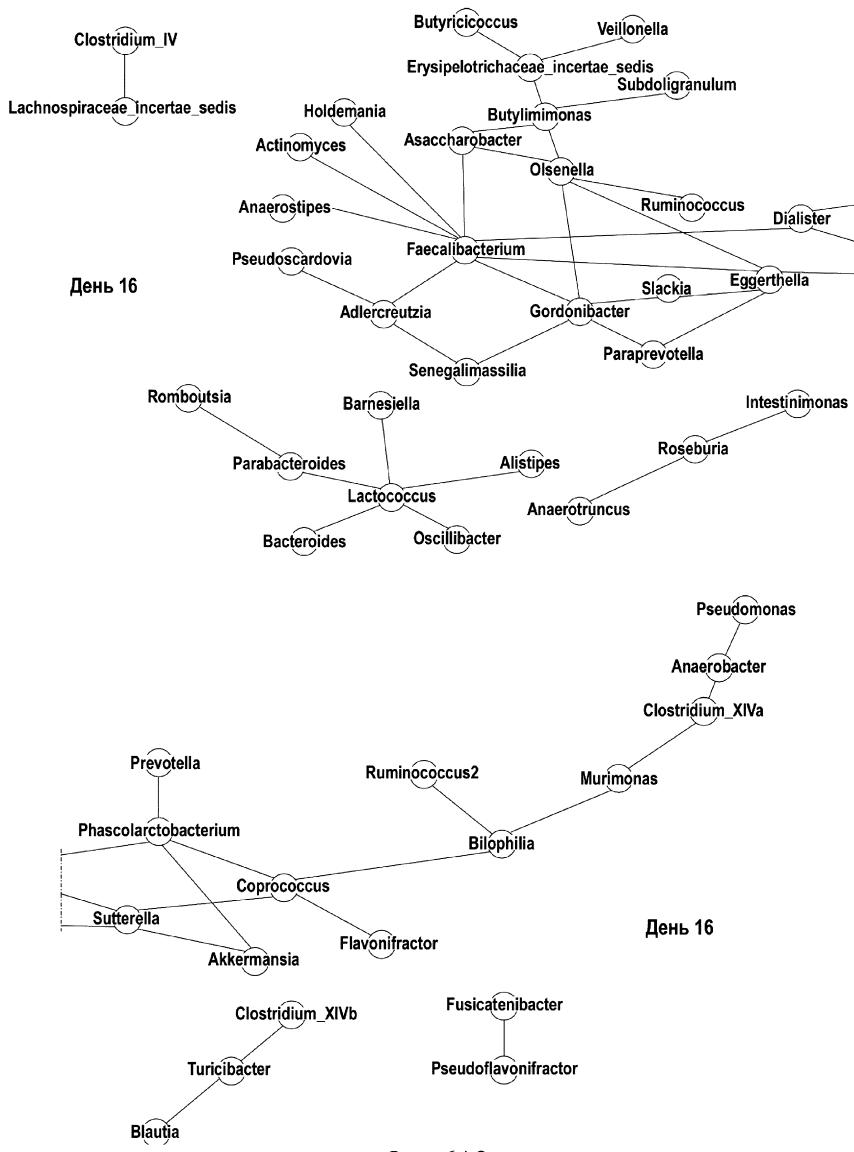
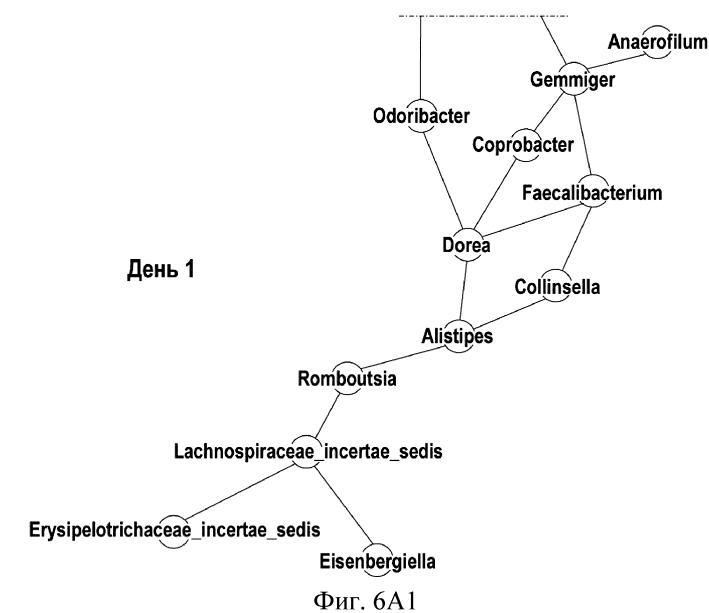


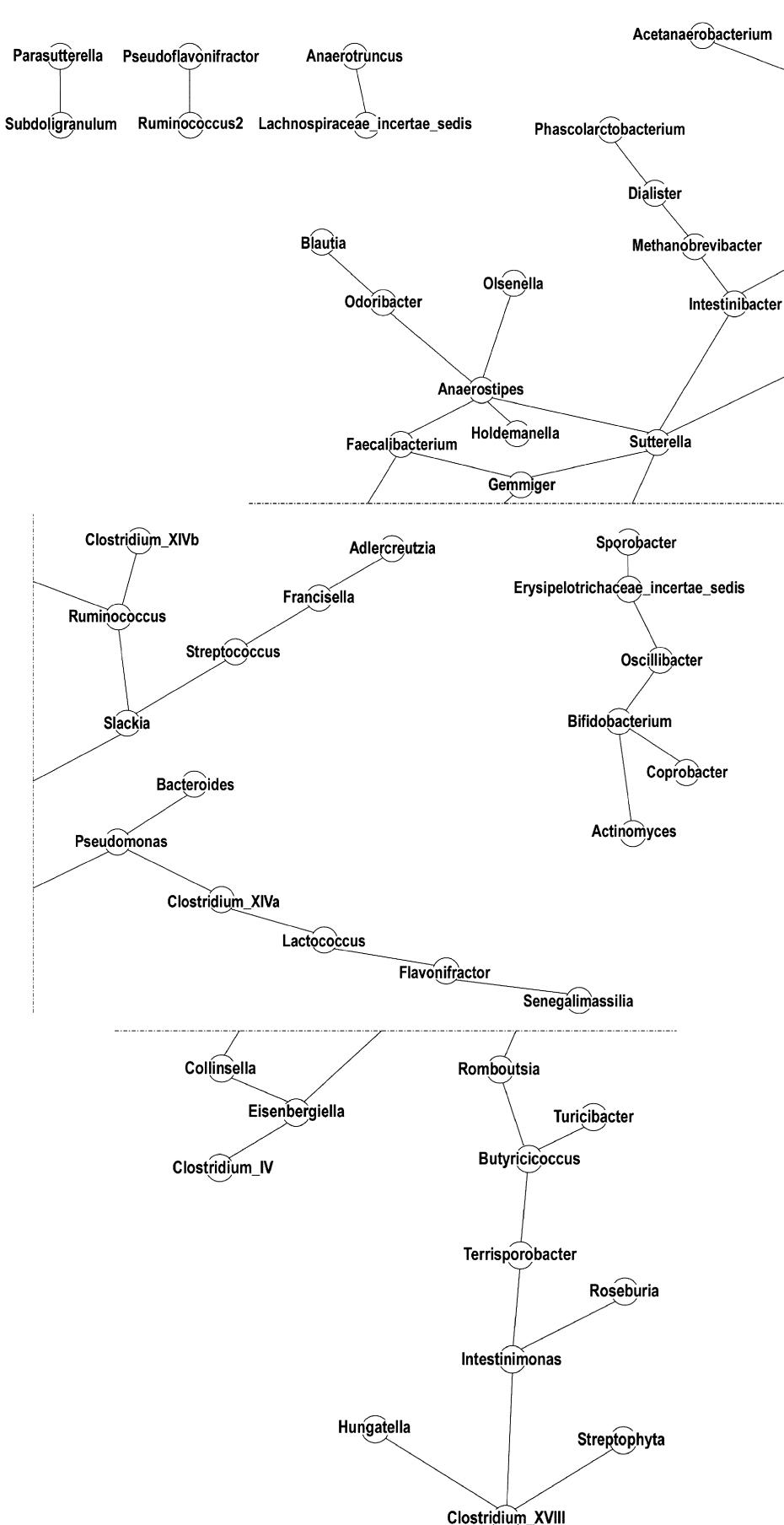
Фиг. 4С



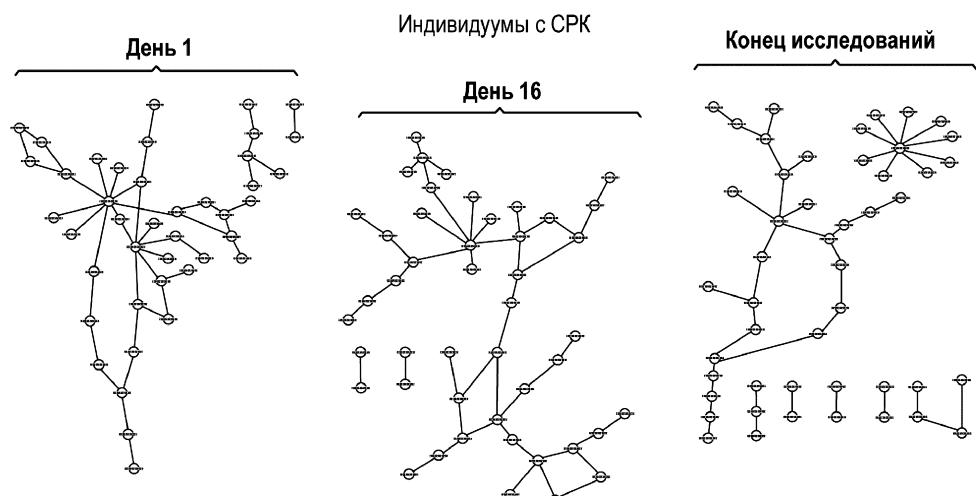
Здоровые индивидуумы



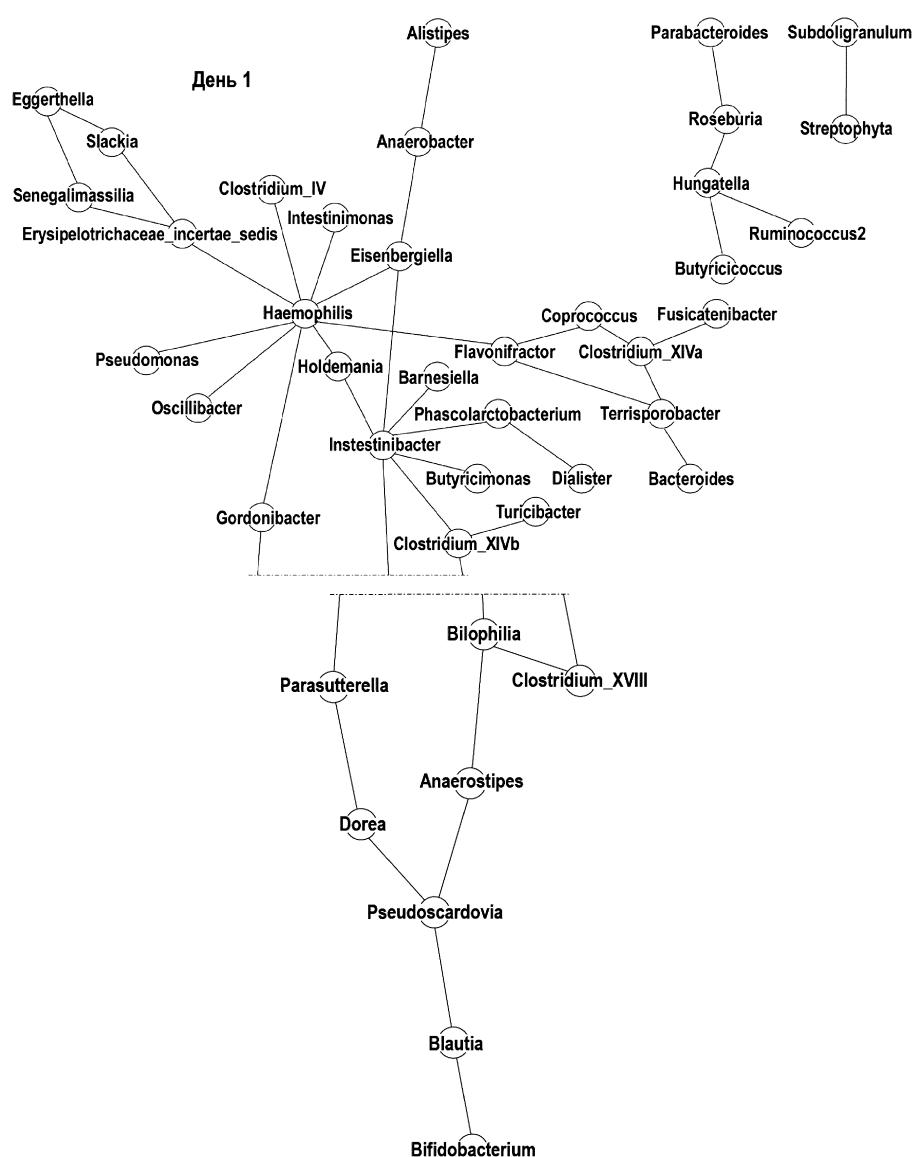


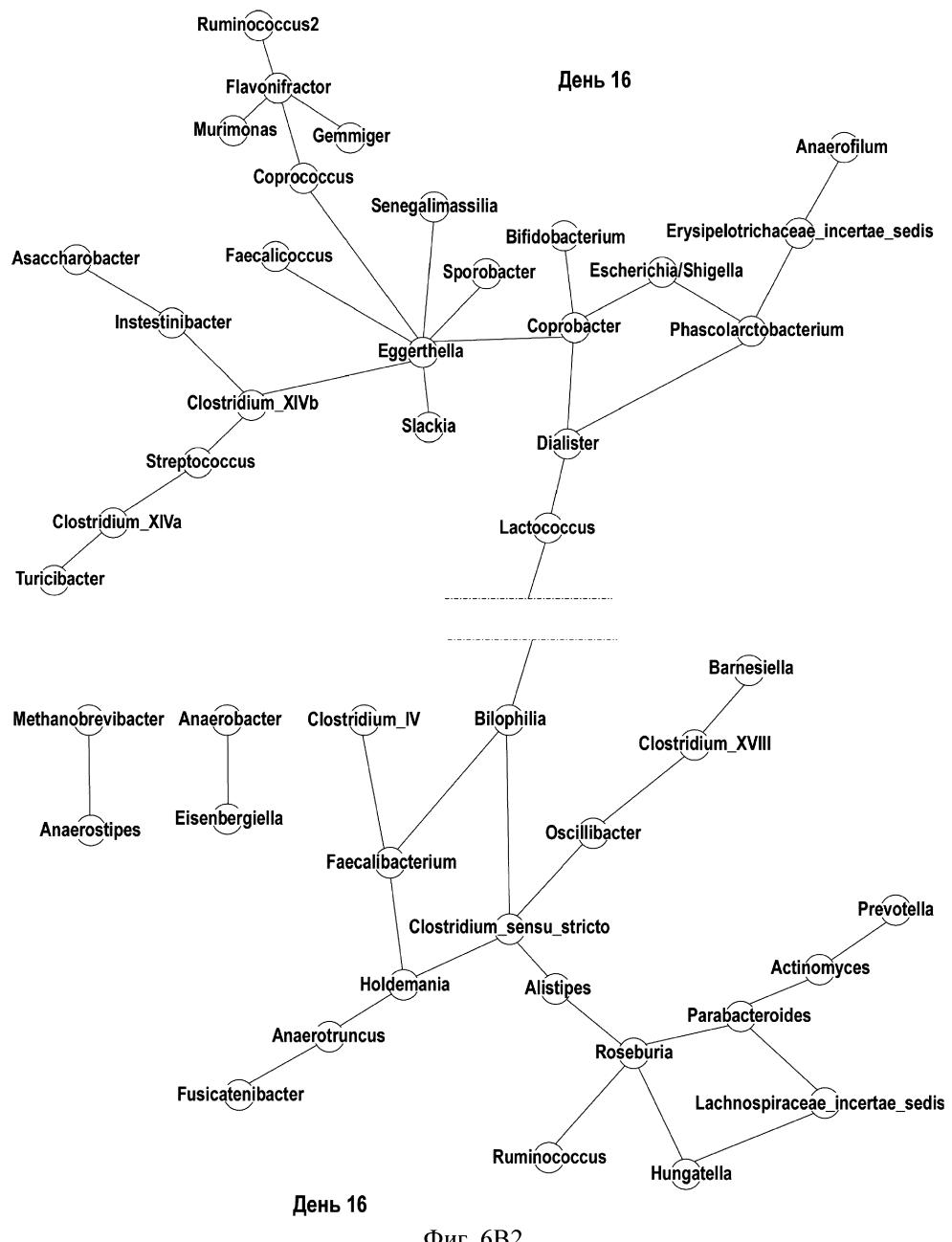


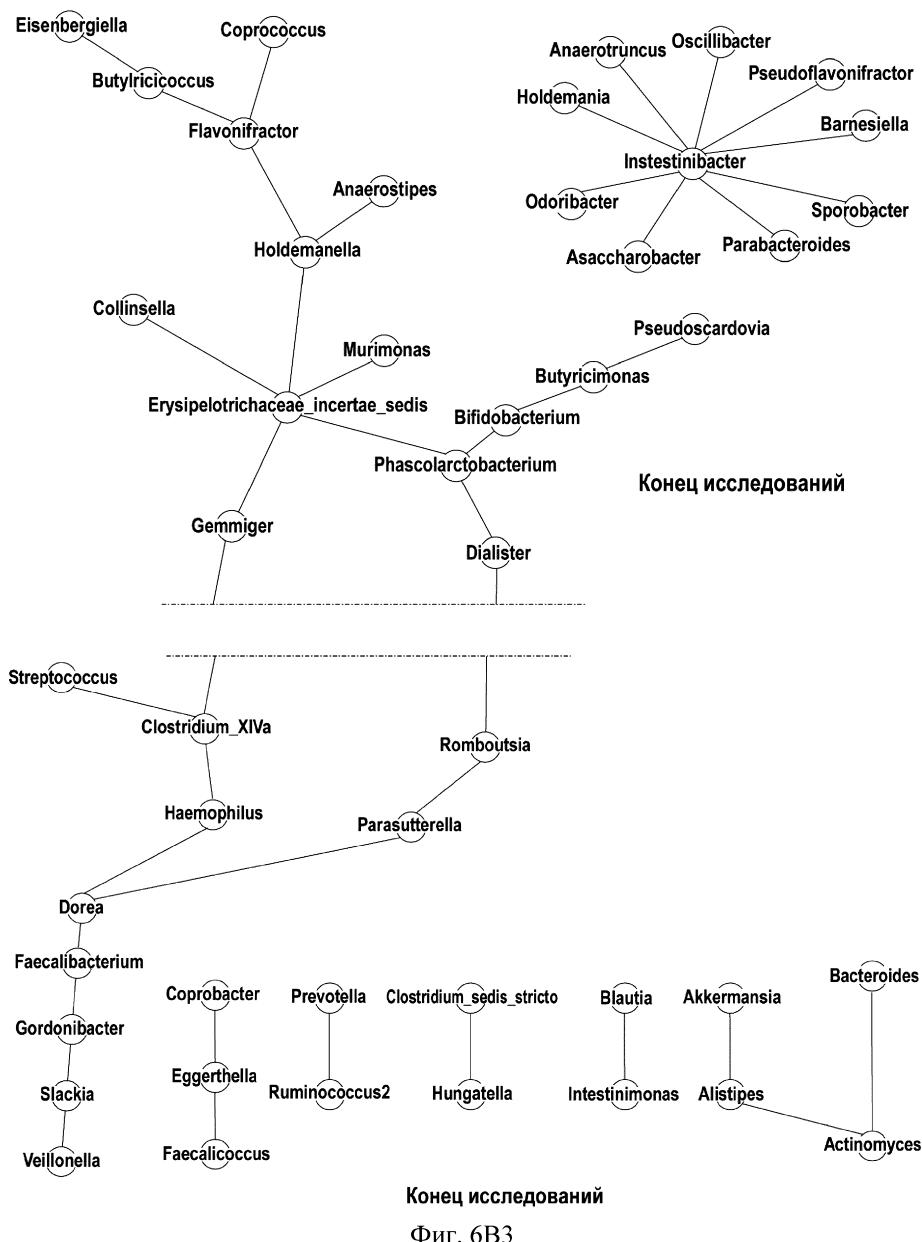
Фиг. 6А3

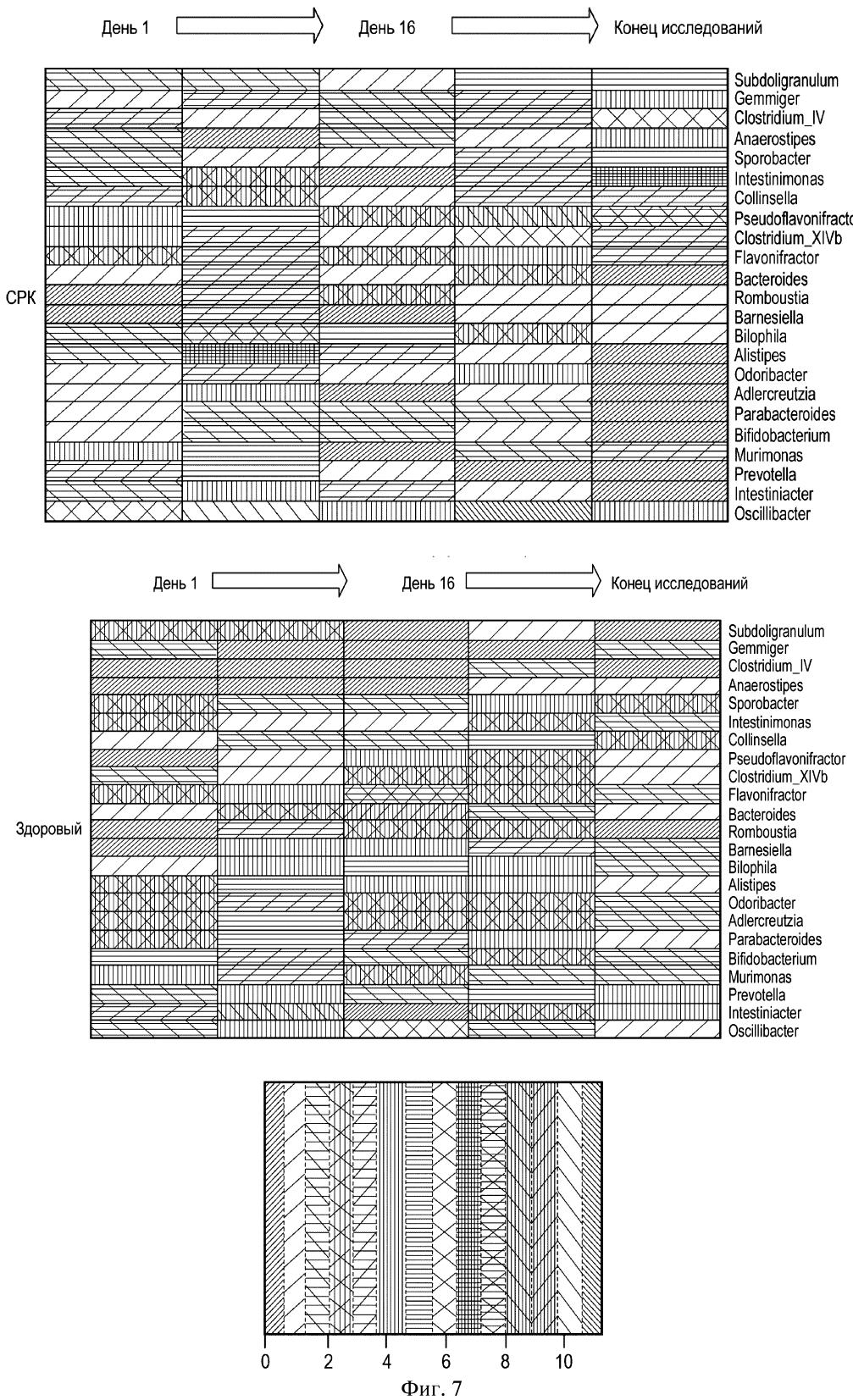


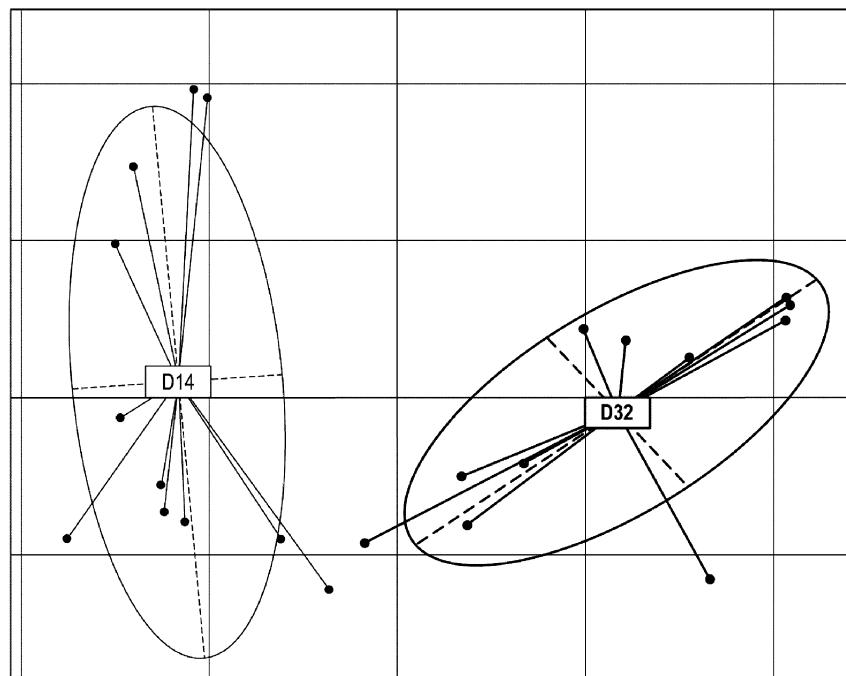
Фиг. 6В

День 1
Фиг. 6В1

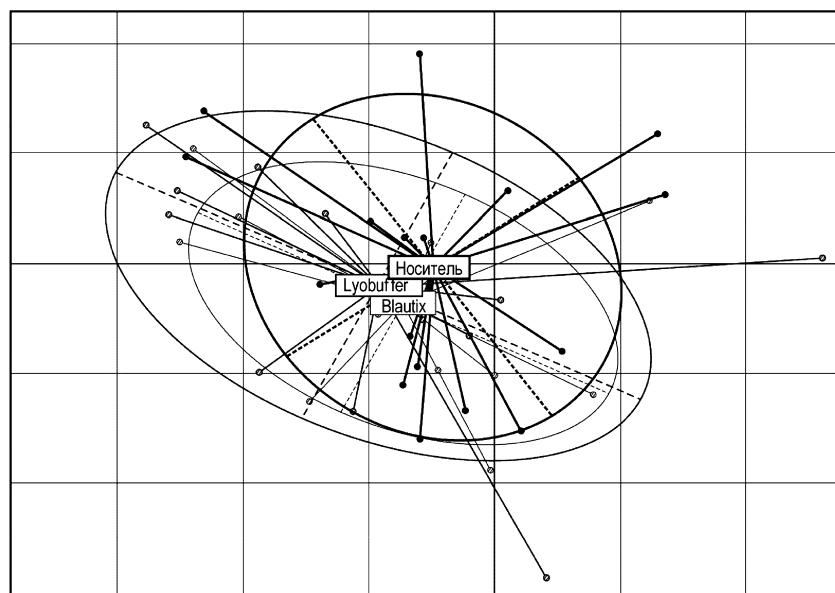




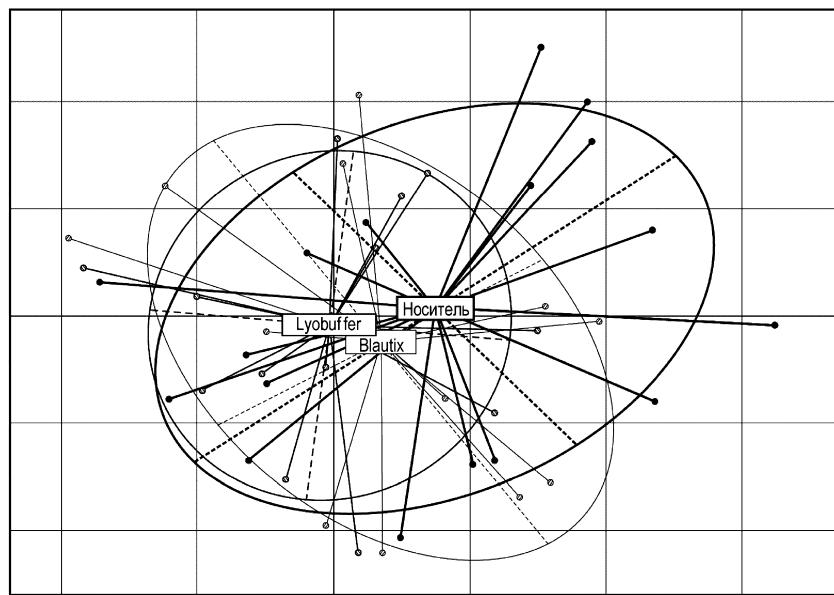




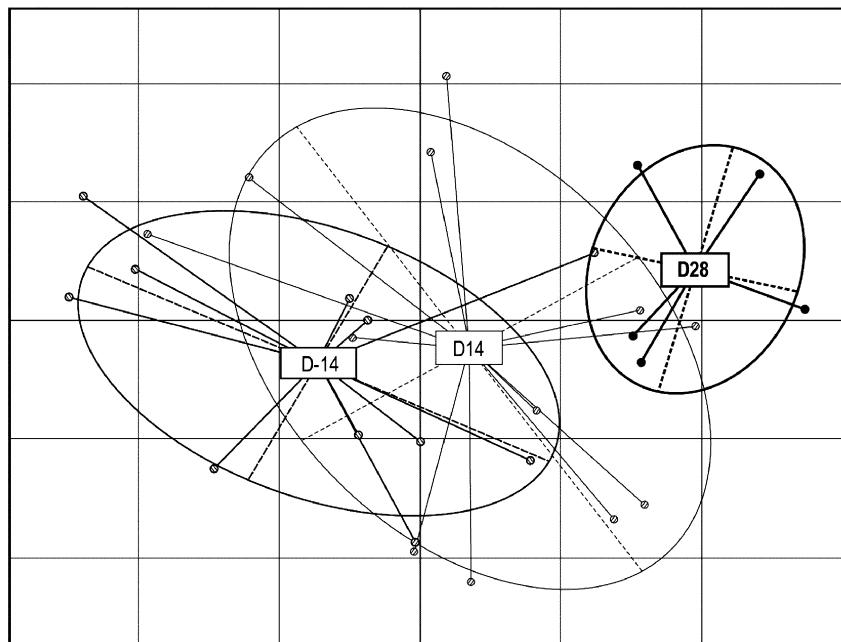
Фиг. 8



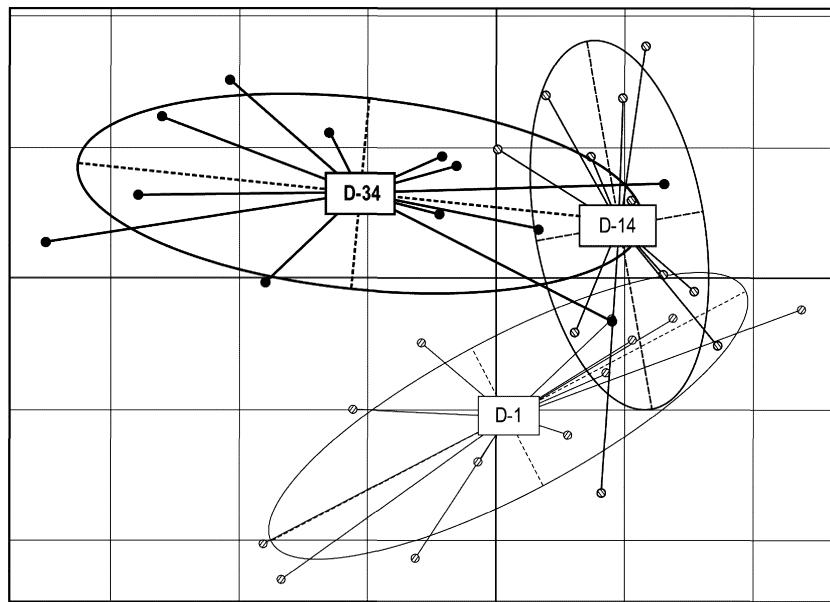
Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 10

