РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 521 364** (13) **C2**

(51) МПК
*A61K 35/74* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009136328/15, 29.02.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
**29.02.2008**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
**01.03.2007 SE 0700551-5**

(43) Дата публикации заявки: **10.04.2011** Бюл. № **10**

(45) Опубликовано: **27.06.2014** Бюл. № **18**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 1993001823 A1, 04.02. 1993. ОЛЕСКИН А.В. Экологически важные свойства популяций микроорганизмов // Соросовский образовательный журнал. 2001.N8. Т.7, стр.11-12. ПИКИНА А.П. Первичный скрининг штаммов бифидобактерий с целью разработки на их основе эффективных препаратов-пробиотиков // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 1999.** (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **01.10.2009**

(86) Заявка PCT:
**SE 2008/000170 (29.02.2008)**

(87) Публикация заявки PCT:
**WO 2008/105715 (04.09.2008)**

Адрес для переписки:
**129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"**

(72) Автор(ы):
**МОЛИН Геран (SE),**
**АХРНЕ Сив (SE),**
**КАРЛССОН Каролин (SE),**
**ЙЕППССОН Бенгт (SE)**

(73) Патентообладатель(и):
**ПРОБИ АБ (SE)**

## (54) ПРИМЕНЕНИЕ LACTOBACILLUS PLANTARUM ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области промышленной микробиологии, а именно к применению одного штамма *Lactobacillus plantarum*, выбранного из группы, состоящей из *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL-9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL-19, DSM 15313, и *Lactobacillus plantarum* HEAL-99, DSM 15316, для повышения разнообразия бактерий в желудочно-кишечном тракте.



RU 2521364 C2

RU 2521364 C2

Указанные выше штаммы применяются для профилактики у здорового индивидуума развития невысокого бактериального разнообразия (LBD), для профилактики у индивидуума с LBD развития транслокации, чрезмерного роста бактерий в толстом кишечнике (LIBO) или в тонком кишечнике (SIBO), для профилактики у индивидуума с LIBO или SIBO развития транслокации. Применение указанных штаммов позволяет повысить эффективность профилактики или лечения инфекций желудочно-кишечного тракта и способность увеличить бактериальное разнообразие. 4 н. и 12 з.п. ф-лы, 1 табл., 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):
**N6.C34-38. NOBAEK S. M.D. et al Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome // Am J Gastroenterol. 2000, v.95 (5), p.1231-8 . RU 2247148 C2, 27.02.2005. WO 2004087893 A1, 14.10.2004**

RU 2521364 C2

RU 2521364 C2

RUSSIAN FEDERATION

(19) **RU** (11) **2 521 364** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
*A61K 35/74* (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009136328/15, 29.02.2008**

(24) Effective date for property rights:
**29.02.2008**

Priority:
(30) Convention priority:
**01.03.2007 SE 0700551-5**

(43) Application published: **10.04.2011** Bull. № **10**

(45) Date of publication: **27.06.2014** Bull. № **18**

(85) Commencement of national phase: **01.10.2009**

(86) PCT application:
**SE 2008/000170 (29.02.2008)**

(87) PCT publication:
**WO 2008/105715 (04.09.2008)**

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):
**MOLIN Geran (SE),**
**AKhRNE Siv (SE),**
**KARLSSON Karolin (SE),**
**JEPPSSON Bengt (SE)**

(73) Proprietor(s):
**PROBI AB (SE)**

RU 2521364 C2

# (54) USING LACTOBACILLUS PLANTARUM FOR PROVIDING BACTERIAL DIVERSITY

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to industrial microbiology, namely to creating of strain Lactobacillus plantarum specified in a group consisting of Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, and Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316, for increasing the gastrointestinal bacterial diversity. The above strains are applicable to prevent developing low bacterial diversity (LBD) in a healthy individual, to prevent developing translocation, large intestinal bacterial overgrowth (LIBO) or small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) in the individual with LBD, to prevent developing translocation in the individual with LIBO or SIBO.

EFFECT: using the above strains enables providing more effective prevention or treatment of gastrointestinal infections and a possibility to enlarge the bacterial diversity.

16 cl, 1 tbl, 1 dwg, 1 ex

RU 2521364 C2

Область, к которой относится изобретение

Изобретение относится к применению одного штамма Lactobacillus plantarum в целях получения композиции, повышающей разнообразие бактерий в желудочно-кишечном тракте, и к применению одного штамма Lactobacillus plantarum в целях получения композиции для профилактического лечения.

Предшествующий уровень техники

Общее мнение специалистов в области биологии состоит в том, что большое разнообразие бактерий (разнообразие микроорганизмов различных типов) играет благоприятную роль для мировой экосистемы и для экосистемы каких-либо конкретных областей, а также для экосистемы конкретного индивидуума. Большое разнообразие микроорганизмов указывает на то, что в такой экосистеме поддерживается благоприятный бактериальный баланс. В противоположность этому, дисбаланс экосистемы или ее нарушение или полное разрушение приводят к «избыточному развитию» нескольких микроорганизмов, к их слиянию с данной системой, к возникновению других нарушений и к развитию новых патологических состояний. Это также относится к экосистеме человеческого кишечника.

Бактериальная флора человеческого желудочно-кишечного (ЖК) тракта представляет собой сложную экосистему. Состав и активность бактериальной флоры играет важную роль в сохранении здоровья человека, что обусловлено влиянием такой флоры на усвояемость пищи, развитие и постоянную регуляцию иммунной системы, а также на резистентность к колонизации бактерий. Желудочно-кишечный тракт может рассматриваться как специальный трубчатый орган, простирающийся от ротовой полости до анального отверстия. Он подразделяется на несколько четко определенных анатомических областей, включая ротовую полость, пищевод, желудок, тонкий кишечник (двенадцатиперстную кишку, тощую кишку и подвздошную кишку) и толстый кишечник (слепую кишку, толстую кишку и прямую кишку). Концентрации бактерий в желудке и в верхних двух третях тонкого кишечника (в двенадцатиперстной кишке и в тощей кишке) относительно низки, что обусловлено высококислотной средой желудка, коротким периодом переноса его содержимого, секрецией желчи и сока поджелудочной железы. Эти концентрации обычно составляют в пределах от $10^2$ до $10^4$ колониеобразующих единиц бактерий (к.о.е.) на миллилитр содержимого желудка или кишечника, и примерами типичных бактерий, живущих в этих областях, являются Streptococcus и Lactobacillus. Дистальная часть тонкого кишечника (подвздошная кишка) обычно имеет концентрацию $10^7$-$10^8$ к.о.е. на мл, и в этой части обычно преобладают такие же типы бактерий, которые присутствуют в толстой кишке, то есть различные бактерии классов Firmicutes, Bacteriodetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Proteobacteria и Bifidobacterium (WANG M., AHRNÉ S., JEPPSSON B. & MOLIN G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. FEMS Microbial Ecology 54:219-231). Наиболее высокая концентрация бактерий обнаружена в толстом кишечнике, что обусловлено более длительным периодом переноса его содержимого (до 60 часов). Было установлено, что в твердых фекалиях бактериальная биомасса составляет 40-55%, а концентрация живых бактерий обычно составляет примерно $10^{10}$-$10^{11}$ к.о.е. на грамм содержимого кишечника. В непораженной, нормальной и здоровой толстой кишке бактериальное разнообразие достигает своего пика. Однако из-за крайне высоких концентраций бактерий толстая кишка также является той частью желудочно-кишечного тракта, которая наиболее подвержена бактериальной транслокации, где живые бактерии или токсичные компоненты бактерий

проходят через слизистую оболочку в мезентриальные лимфоузлы и в другие участки, находящиеся за пределами кишечника, такие как селезенка, печень, почки, брюшная полость и кровоток. Невысокое разнообразие бактерий (LBD) повышает риск чрезмерного размножения бактерий в толстом кишечнике (LIBO) и в тонком кишечнике (SIBO), что может приводить к их транслокации.

Специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение, было продемонстрировано, что в желудочно-кишечном тракте у пациентов с болезнью Крона наблюдается низкое разнообразие бактерий [Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., Roca J., and Doré J. (2006) Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. Gut 55:205-211], [Ott S.J. Musfeldt M., Wenderoth D.F., Hampe J., Brant O., Fölsch U.R., Timmis K.N., and Schreiber S. (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory disease. Gut 53:685-693].

Было также продемонстрировано, что у новорожденных с небольшим разнообразием бактерий в желудочно-кишечном тракте повышается риск развития аллергий [Wang M., Karlsson C., Olsson C., Adlerberth I., Wold A., Strachan D.P., Martricardi P.M., Aberg N., Perkin M.R., Tripodi S., Hesselmar B., Saalman R., Molin G. & Ahrné S. (2008). Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants developing atopic eczema: Low diversity in early microbiota of infants developing atopy. Journal of Allergy and Clinical Immunology 121:129-134].

Кроме того, было продемонстрировано, что у самок крыс, страдающих «избыточным размножением» (при низком разнообразии) микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте, рождаются детеныши с повышенным уровнем гаптоглобина и с недоразвитым кишечником [FAK F., Ahrné S., Molin G., Jeppsson B. & Weström B. (2008). Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 294:148-154].

Таким образом, очевидно, что существует взаимосвязь между низким разнообразием бактерий в желудочно-кишечном тракте и развитием нескольких физиологических нарушений в организме человека и других млекопитающих.

Известно, что применение антибиотиков снижает разнообразие бактерий в желудочно-кишечном тракте. Так как антибиотики применяются почти во всем мире, то специалисты в данной области сталкиваются с необходимостью поиска новых путей решения проблем, связанных с низким разнообразием бактерий в желудочно-кишечном тракте, поскольку такое низкое разнообразие бактерий негативно влияет на общее состояние здоровья людей.

Кроме того, в основном известно, что образ жизни людей в развитых странах способствует развитию множества патологических нарушений и состояний, таких как сердечно-сосудистые заболевания, вызываемые, например, стрессом и избыточным весом. Известно, что у людей с такими нарушениями и состояниями часто наблюдается невысокое разнообразие бактерий в желудочно-кишечном тракте.

Таким образом, специалистам в данной области необходимо решить проблему, связанную с физиологическими нарушениями, ассоциированными с низким разнообразием бактерий в желудочно-кишечном тракте индивидуумов или вызываемыми таким низким разнообразием.

В WO 01/11077 A2 описаны методы диагностики или лечения синдрома раздраженного кишечника и других расстройств, вызываемых избыточным продуцированием бактерий в тонком кишечнике (SIBO) путем введения противомикробных или пробиотических средств, например бифидобактерий (Bifidobacterium) или молочнокислых бактерий (Lactobacillus), или путем нормализации перистальтики кишечника с использованием

прокинетического средства.

Описание сущности изобретения

Вышеуказанные проблемы могут быть решены в соответствии с настоящим изобретением.

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к использованию одного штамма Lactobacillus plantarum в целях получения композиции для повышения бактериального разнообразия в желудочно-кишечном тракте путем введения указанного штамма индивидууму в целях достижения у него более высокой разности индексов разнообразия бактерий по сравнению с индивидуумом, которому было введено плацебо.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к использованию одного штамма Lactobacillus plantarum в целях получения композиции для проведения профилактических мер у здорового индивидуума по предотвращению у него развития низкого бактериального разнообразия (LBD); у индивидуума с LBD для предотвращения развития у него физиологических нарушений, чрезмерно интенсивного роста бактерий в толстом кишечнике (LIBO) или чрезмерно интенсивного роста бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и у индивидуума с LIBO или SIBO для предотвращения у него развития физиологических нарушений.

Настоящее изобретение также относится к способу повышения бактериального разнообразия в желудочно-кишечном тракте индивидуума путем введения ему одного штамма Lactobacillus plantarum в целях достижения у этого индивидуума более высокой разности индексов разнообразия бактерий по сравнению с индивидуумом, которому было введено плацебо.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения одного или множества физиологических нарушений, обусловленных невысоким бактериальным разнообразием (LBD) в желудочно-кишечном (ЖК) тракте индивидуума, индуцированным, но необязательно, избыточным ростом бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и/или в толстом кишечнике (LIBO), где указанный способ включает повышение и/или увеличение разнообразия бактерий и предотвращение избыточного роста бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и в толстом кишечнике (LIBO) этого индивидуума.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к применению штамма Lactobacillus plantarum в целях увеличения разности индексов разнообразия и/или к применению указанного штамма для профилактического лечения.

Краткое описание графического материала

На чертеже представлен профиль T-RFLP (полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов) Haelll-гидролизованных генов рРНК 16S, амплифицированных из слизистой оболочки человека.

Подробное описание изобретения

Авторами настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что введение одного единственного штамма Lactobacillus plantarum приводит к увеличению разнообразия бактерий в желудочно-кишечном тракте, то есть общее число бактерий различных типов в желудочно-кишечном тракте возрастает после введения только одного единственного штамма. Таким образом, в данном случае наблюдается не только увеличение количества вводимого штамма, но также и увеличение количества бактерий других типов. Кроме того, введение и колонизация указанного одного штамма Lactobacillus plantarum приводит к росту новых групп бактерий, которые ранее были неспособны расти в желудочно-кишечном тракте индивидуума. Это противоречит имеющимся ранее предположениям о том, что только смесь различных бактериальных штаммов может вызывать образование смеси бактериальных штаммов в желудочно-

кишечном тракте, то есть способствовать увеличению разнообразия бактерий. Таким образом, специалисты часто сомневаются в этом, считая в своих предположениях, что введение только одного единственного штамма будет приводить к снижению биологического разнообразия. Иными словами, главным аргументом в пользу получения смеси бактерий различных типов является то, что такие смеси будут удовлетворять требованиям разнообразия.

Поэтому для авторов настоящего изобретения было полной неожиданностью то, что введение только одного единственного штамма Lactobacillus plantarum приводит к повышению разнообразия бактерий.

Как указывалось выше, у индивидуумов, страдающих одним или несколькими различными физиологическими нарушениями, определенными ниже, часто одновременно наблюдается LBD (невысокое бактериальное разнообразие), которое является причиной последующего возникновения физиологических нарушений или которое вызывается указанными физиологическими нарушениями. Само LBD не рассматривается как обычное патологическое состояние, но со временем оно может приводить к физиологическим нарушениям, включая различные заболевания или LIBO (избыточный рост бактерий в толстом кишечнике), или SIBO (избыточный рост бактерий в тонком кишечнике). Хотя LIBO и SIBO необязательно являются результатом LBD, однако в большинстве случаев такие эффекты все же наблюдаются. В желудочно-кишечном тракте индивидуума с LIBO или SIBO автоматически возникает LBD. Сами LIBO и SIBO также не рассматриваются как обычные патологические состояния, но все они представляют значительный риск развития нескольких физиологических нарушений, включая различные заболевания, определенные ниже, например нарушение транслокации. Альтернативно, LIBO и SIBO могут быть следствием различных физиологических нарушений. Композиция согласно изобретению может быть введена здоровому индивидууму в целях профилактики развития LBD. Кроме того, указанная композиция может быть также введена индивидууму с LBD, независимо от происхождения LBD, в целях профилактики развития одного или нескольких физиологических нарушений, SIBO или LIBO. Более того, указанная композиция может быть также введена индивидууму с LIBO или с SIBO, независимо от их происхождения, в целях профилактики развития одного или нескольких физиологических нарушений, например, нарушений транслокации содержимого кишечника. В другом варианте изобретения индивидуумам, имеющим LDB и/или SIBO и/или LIBO и в то же время страдающим одним или несколькими вышеупомянутыми физиологическими нарушениями, может быть введена указанная композиция в целях повышения разнообразия бактерий в желудочно-кишечном тракте и тем самым улучшения общего состояния здоровья индивидуума, а также, но необязательно, ослабления тяжести указанных одного или нескольких физиологических нарушений.

Повышенное разнообразие бактерий, наблюдаемое в соответствии с настоящим изобретением, может быть измерено как индекс разнообразия, определенный хорошо известным T-RFLP-методом, в котором используется рестриктирующий фермент Haelll, при этом могут быть вычислены индексы Шеннона-Винера и Симпсона, описанные ниже. Указанное увеличение разности индексов разнообразия в том случае, если используется индекс Шеннона-Винера, составляет, по меньшей мере 0,15, предпочтительно, 0,30, более предпочтительно, 0,45, а еще более предпочтительно, 0,60.

Указанная повышенная разность индексов разнообразия в том случае, если используется индекс Симпсона, составляет по меньшей мере 0,02, предпочтительно,

0,04, более предпочтительно, 0,06, а еще более предпочтительно, 0,08.

Вычисление разности индексов разнообразия ($Di_{diff_total}$) осуществляют, в первой стадии, путем определения разности индексов разнообразия ($Di_{diff}$) у индивидуумов, которым был введен продукт, содержащий один штамм Lactobacillus plantarum, то есть определения величины индекса разнообразия после введения ($Di_{after_product}$) штамма и вычитания из нее величины индекса разнообразия до введения продукта ($Di_{before_product}$), с последующим делением результата на величину ($n_{product}$), представляющую собой число индивидуумов, которым был введен данный продукт. Затем из величины, полученной в первой стадии, вычитают величину разности индексов разнообразия для плацебо ($Di_{placebo_total}=Di_{after_placebo}-Di_{before_placebo}$), деленную на величину ($n_{placebo}$), представляющую собой число индивидуумов, которым было введено плацебо. Уравнение для вычисления разности индексов разнообразия приводится ниже:

$$Di_{diff_total}=\Sigma(Di_{after_product}-Di_{before_product})/(n_{product})-\Sigma(Di_{after_placebo}-Di_{before_placebo})/(n_{placebo}).$$

Разумеется, что индекс разнообразия может быть измерен другими методами, известными специалистам. Кроме того, рестриктирующий фермент Haelll может быть заменен любым другим известным ферментом.

В соответствии с настоящим изобретением общее состояние здоровья людей может быть улучшено в результате увеличения индексов разнообразия бактерий в их желудочно-кишечном тракте. Как уже обсуждалось выше, многие физиологические нарушения ассоциируются с низким индексом разнообразия. Поскольку один штамм Lactobacillus plantarum легко усваивается в форме твердого или жидкого препарата, то пищевой продукт, например продукт, обсуждаемый ниже, может способствовать улучшению здоровья индивидуумов.

Кроме того, описанный здесь повышенный индекс разнообразия может быть использован в целях устранения негативных эффектов, которые наблюдаются в современном обществе и в благополучных странах. Так, например, как обсуждалось выше, огромное количество антибиотиков, которые принимают люди во всем мире, нарушает баланс веществ в желудочно-кишечном тракте этих людей. В соответствии с настоящим изобретением такой нарушенный баланс может нормализоваться, и состояние здоровья человека будет улучшаться в результате введения одного штамма Lactobacillus plantarum.

Кроме того, очевидно, что многие физиологические нарушения, которыми страдают люди в современном обществе, могут быть предотвращены в результате постоянного введения одного штамма Lactobacillus plantarum в соответствии с настоящим изобретением.

В одном из вариантов изобретения указанной композицией является жидкая композиция или твердая композиция, где указанную твердую композицию выбирают из группы, состоящей из таблеток, таблеток для сосания, сладостей, жевательных таблеток, жевательных резинок, капсул, саше, порошков, гранул, частиц с покрытиями и таблеток с покрытиями, таблеток и капсул с энтеросолюбильным покрытием и плавящихся полосок и пленок, а указанную жидкую композицию выбирают из группы, состоящей из перорально вводимых растворов, суспензий, эмульсий и сиропов. Композиция согласно изобретению может быть введена любыми подходящими методами. Однако указанный штамм предпочтительно вводить перорально.

В одном из вариантов изобретения указанная композиция содержит материал-

носитель, где указанный материал-носитель независимо выбран из группы, состоящей из жидкой каши, приготовленной из овсяной муки, пищевых продуктов, полученных путем сбраживания молочной кислоты, резистентного крахмала, пищевых волокон, углеводов, белков и гликозилированных белков.

В одном из вариантов изобретения указанная композиция представляет собой диетический пищевой продукт, функциональный пищевой продукт, пищевую добавку, питательный продукт или пищевой препарат. Так, например, штамм Lactobacillus plantarum может быть введен индивидууму во многих различных формах. Указанный пищевой препарат может быть выбран из группы, состоящей из напитков, йогуртов, соков, мороженого, хлеба, бисквитов, продуктов из зерновых, экологически чистых продуктов и пастообразных продуктов. Таким образом, очевидно, что указанная композиция может быть легко введена в форме пищевого продукта при ежедневном потреблении. Так, например, общее состояние здоровья людей может улучшаться с использованием композиции согласно изобретению.

Штамм Lactobacillus plantarum присутствует в композиции в количестве, составляющем примерно от $1\times10^{6}$ до $1\times10^{14}$ к.о.е. (колониеобразующих единиц), предпочтительно, примерно от $1\times10^{8}$ до $1\times10^{12}$ к.о.е., а более предпочтительно, примерно от $1\times10^{9}$ до $1\times10^{11}$ к.о.е.

Выражение «повышенная разность индексов разнообразия у индивидуумов по сравнению с индивидуумами, которым было введено плацебо», используемое в описании настоящей заявки, означает, что изменение бактериального разнообразия у индивидуумов, которым были введены штаммы Lactobacillus plantarum, было сравнимо с изменениями у других индивидуумов, которым в процессе исследования вводили аналогичный продукт, не содержащий штамма Lactobacillus plantarum. Испытания такого типа называются испытаниями «слепым» методом, то есть во время исследования ни добровольцы, ни персонал, проводящий испытание и анализирующий результаты, не знают о том, какой индивидуум получал плацебо, а какой получал лечебный продукт. Это позволяет исключить многие источники ошибок и ложных результатов.

Выражение «избыточный рост бактерий в толстом кишечнике (LIBO)», используемое в описании настоящей заявки, означает, что бактерии одного или нескольких типов в значительной степени преобладают над бактериальной флорой толстого кишечника, то есть они присутствуют в значительно большем количестве, чем большинство бактерий других типов.

Выражение «избыточный рост бактерий в тонком кишечнике (SIBO)», используемое в описании настоящей заявки, означает, что бактерии одного или нескольких типов в значительной степени преобладают над бактериальной флорой тонкого кишечника, то есть они присутствуют в значительно большем количестве, чем большинство бактерий других типов.

Выражение «невысокое бактериальное разнообразие (LBD)», используемое в описании настоящей заявки, означает бактериальный дисбаланс в желудочно-кишечном тракте индивидуума, который может быть определен по разности индексов разнообразия, составляющей по меньшей мере 0,15, в соответствии с индексом разнообразия Шеннона-Винера, или по меньшей мере 0,02, в соответствии с индексом разнообразия Симпсона. Следует отметить, что используемый в описании настоящей заявки термин «разнообразие» иногда означает «бактериальное разнообразие».

Выражение «физиологические нарушения», используемое в описании настоящей заявки, означает любое плохое состояние здоровья или состояния, ассоциирующиеся

с присутствием LBD и/или LIBO или SIBO или вызываемые их присутствием, такие как желудочно-кишечные расстройства, например нарушение транслокации, болезнь Крона, язвенный колит, синдром раздраженного кишечника и патологические состояния, вызываемые употреблением антибиотиков. Кроме того, LBD, SIBO и LIBO могут быть негативными факторами, способствующими развитию ишемической болезни сердца, заболевания «жирная печень», не вызываемого алкоголем, диабета типа 2, аллергии, атопической экземы и аутоиммунного заболевания.

Выражение «для повышения разнообразия бактерий в желудочно-кишечном тракте», используемое в описании настоящей заявки, означает, что увеличение флоры микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте достигается в присутствии бактерий различных типов. Это означает, что риск «избыточного роста» некоторых вредных бактерий снижается, что приводит к улучшению общего состояния здоровья индивидуумов. Так, например, в соответствии с настоящим изобретением избыточный рост некоторых бактерий в желудочно-кишечном тракте снижается, а поэтому достигается желаемый баланс.

Индекс разнообразия измеряют T-RFLP-методом с использованием рестриктирующего фермента Haelll, где вычисляют индексы разнообразия Шеннона-Винера и Симпсона.

Как указывалось выше, настоящее изобретение также относится к лечению одного или множества физиологических нарушений, ассоциированных с низким бактериальным разнообразием (LBD) в желудочно-кишечном (ЖК) тракте индивидуума, индуцированным, но необязательно, чрезмерным ростом бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и/или в толстом кишечнике (LIBO), где указанное лечение включает повышение и/или увеличение разнообразия бактерий и устранение избыточного роста бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и в толстом кишечнике (LIBO). Лечение LBD осуществляют путем введения одного штамма Lactobacillus plantarum, выбранного из группы, состоящей из Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, и Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316.

Бактерия L. plantarum принадлежит к огромному и относительно разнообразному роду Lactobacillus, который включает примерно 90 официально названных видов или подвидов. Бактерии Lactobacillus spp. традиционно подразделяются на три функциональные группы в зависимости от их способности к сбраживанию, а именно облигатные бактерии, сбраживающие одно вещество (группа I), факультативные бактерии, сбраживающие различные вещества (группа II), и облигатные бактерии, сбраживающие различные вещества (группа III). Бактерии группы I сбраживают исключительно гексозы до молочной кислоты и не могут сбраживать глюконат или пентозы, а бактерии группы II сбраживают не только гексозы до молочной кислоты, но также обладают дополнительной способностью сбраживать пентозы и/или глюконат. Бактерии группы III сбраживают гексозы до молочной кислоты, уксусной кислоты и/или этанола и диоксида углерода. Бактерия L. plantarum представляет собой факультативный микроорганизм, сбраживающий различные вещества. Штамм L. plantarum такого типа был обозначен ATCC 14917.

L. plantarum отличается от многих других штаммов Lactobacillus spp. нижеследующими признаками:

1) L. plantarum имеет относительно крупный геном, что указывает на ее способность принимать множество различных состояний.

2) L. plantarum обладает удивительной способностью сбраживать множество различных углеводов.

3) Бактерии L. plantarum, для ее быстрого роста, требуется марганец, и такая бактерия может аккумулировать марганец на высоких межклеточных уровнях. Марганец защищает бактерию L. plantarum от токсического воздействия кислорода благодаря восстановлению кислородных радикалов до $H_2O_2$. Затем продуцированный $H_2O_2$ может превращаться в $O_2$ и воду под действием фермента-кофактора марганец-псевдокаталазы.

4) L. plantarum обладает высокой устойчивостью к низким значениям pH. Тот факт, что бактерия L. plantarum часто спонтанно преобладает в пищевых продуктах, приготавливаемых путем сбраживания молочной кислоты, где pH обычно составляет ниже 4,0, а также сохраняется при прохождении через кислотную среду желудка человека, указывает на высокий уровень резистентности этой бактерии к кислотным условиям.

5) Бактерия L. plantarum может обладать танназной активностью, а также способностью к метаболизму феноловых кислот.

L. plantarum часто спонтанно присутствует в больших количествах в большинстве пищевых продуктов, приготавливаемых путем сбраживания молочной кислоты, в частности пищевых продуктов, приготавливаемых из материалов растительного происхождения, например в соленых маслинах, в каперсах (в ягодах каперсов), в квашеной капусте, в соленых вестиндских корнишонах, в закваске, в нигерийских лепешках (приготовленных из маиса или сорго), в эфиопском кохо (приготовленном из крахмала Ensete ventricosum), в эфиопской закваске, приготовленной из тефа (Eragrostis tef), и в кассаве. Таким образом, очевидно, что индивидуумы, употребляющие продукты растительного происхождения, приготовленные путем сбраживания молочной кислоты, также потребляют большое количество L. plantarum. Кроме того, L. plantarum присутствует в виноградном соке и в вине. L. plantarum часто присутствует в слизистой желудочно-кишечного тракта человека, простирающегося от ротовой полости до прямой кишки [Molin G., Jeppsson B., Ahrné S., Johansson M.-L., Nobaek S., Stahl M., and Bengmark S. (1993). Numerical taxonomy of Lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines, J. Appl. Bacteriol. 74:314-323; Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A., and Molin G. (1998). The normal Lactobacillus flora of healthy human rectal and oral mucosa, J. Appl. Microbiol. 85:88-94)]. Отсюда следует, что виды L. plantarum, присутствующие в продуктах питания человека и в его кишечнике, занимают уникальное место, причем при употреблении человеком пищевых продуктов, приготовленных путем сбраживания молочной кислоты, процесс такого сбраживания с самого начала является спонтанным при условии, что эти растительные продукты хранятся под прессом в закрытом помещении, например в погребе, а это означает, что, в перспективе, люди будут потреблять микроорганизмы, которые обычно преобладают в такой среде и играют ключевую роль в работе кишечника человека.

Примеры

Определение разнообразия бактерий

Анализ, проводимый методом полиморфизма длин концевых рестрикционных фрагментов (T-RFLP), представляет собой общий метод «фингерпринтинга», основанный на гидролизе флуоресцентно меченных по концам ПЦР-продуктов под действием рестриктирующей эндонуклеазы, и этот метод позволяет получить данные о присутствии известных и неизвестных популяций бактерий. T-RFLP-паттерны генерируют в серии стадий. Вкратце, ДНК данного сообщества бактерий экстрагируют непосредственно из образца. Представляющие интерес гены подвергают ПЦР-амплификации с использованием праймеров, один из которых является флуоресцентно меченным. После очистки ПЦР-продукты гидролизуют рестриктирующей эндонуклеазой, обычно

ферментом, включающим 4 основания. Гидролизованный продукт смешивают с флуоресцентно меченной ДНК стандартного размера, а затем фрагменты разделяют с помощью электрофореза с использованием геля или капиллярной системы, снабженной лазерным детектором, так, чтобы были визуализированы только флуоресцентно меченные концевые фрагменты. Результат такого анализа представляют в двух формах: 1) электрофорограммы, иллюстрирующей профиль бактериального сообщества как серию пиков различной высоты, 2) таблицы, создаваемой с помощью автоматизированной программы исходя из анализа фрагментов, включая наиболее важные параметры, такие как размер, спаривание оснований и высота (или площадь) каждого пика. T-RFLP-профили для сравниваемых образцов могут быть пронумерованы с применением статистических методов. Для сравнения микробных сообществ применяется несколько статистических методов.

В последние годы T-RFLP-анализ микробных сообществ в экологических исследованиях применяется все чаще. Он является воспроизводимым и дает высокое разрешение.

Результаты

*Индивидуумы и взятие образцов*

Индивидуумами, участвующими в исследованиях, были мужчины с хорошим физическим состоянием, но с определенным хорошо контролируемым сердечно-сосудистым заболеванием. Этих индивидуумов подвергали обследованию с использованием гибкого сигмоидоскопа до и после употребления тест-растворов в течение четырех недель. Биоптаты брали стандартным методом из слизистой нижней сигмовидной толстой кишки для проведения последующих анализов.

В исследования на разнообразие бактерий были включены 16 добровольцев, набранных из большой группы индивидуумов, включенных в рандомизированные плацебо-контролируемые испытания, проводимые двойным слепым методом. Девять индивидуумов употребляли 100 мл лечебного продукта в день в течение четырех недель, что соответствовало ежедневному потреблению $10^{11}$ колониеобразующих единиц L. plantarum в день. Семь индивидуумов потребляли 100 мл аналогичного продукта в день, не содержащего бактерий, в течение четырех недель.

*Экстракция ДНК*

Биоптат слизистой обрабатывали в ультразвуковой бане в течение 5 минут, а затем интенсивно перемешивали в течение 2 минут. Затем образцы переносили в УФ-обработанные 1,5-миллилитровые пробирки и центрифугировали при 9000 об/мин в течение 7 минут. К осадку добавляли 380 мкл буфера G2 и 30 мкл протеиназы K (Qiagen, Hilden, Germany). Эти образцы обрабатывали в водяной бане при 56°C до тех пор, пока они полностью не растворялись. Затем суспензии подвергали дезинтеграции путем их встряхивания вместе с 12-15 стеклянными шариками (диаметром 2 мм) в течение 45 минут при 4°C в миксере Эппендорфа (model 5432, Eppendorf, Hamburg, Germany). После центрифугирования при 5000 об/мин в течение одной минуты супернатант переносили в две различные 2-миллилитровые пробирки для образцов (по 200 мкл в каждой пробирке). Дополнительную очистку проводили на устройстве BioRobot® EZ1 с использованием образца ДНК ткани EZ1 DNA и набора ДНК ткани EZ1 (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкциями производителей. ДНК элюировали в 200 мкл.

*ПЦР-амплификация, очистка и измерение концентрации*

Ген рРНК 16S амплифицировали с использованием универсального прямого праймера Cy5-ENV1 (5'-AGA GTT TGA TII TGG CTC AG-3'), флуоресцентно меченного Cy5 по 5'-концу, и обратного праймера ENV2 (5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3'), которые

гибридизовали с 8-27 п.о. и 1511-1492 п.о., соответственно. ПЦР-реакционная смесь содержала 0,2 мкМ каждого праймера, 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотидтриофосфата (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 5 мкл 10 × ПЦР-реакционного буфера (100 мМ трис-HCl, 500 мМ KCl, pH 8,3), 2,5 ед./мкл полимеразы Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) и 0,2-10 мкл матрицы, в конечном объеме 50 мкл. Амплификацию осуществляли в термоячейке Эппендорфа Mastercycler (Hamburg, Germany) с использованием следующей программы: один цикл проводили при 94°C в течение 3 минут, затем 32 цикла проводили при 94°C в течение 1 минуты, при 50°C в течение 45 секунд и при 72°C в течение 2 минут и дополнительный цикл удлинения проводили при 72°C в течение 7 минут.

ПЦР-продукты (5 мкл) идентифицировали на 1,5% (мас./об.) агарозном геле в 1 × TBE-буфере (89 мМ трис, 89 мМ борной кислоты, 2,5 мМ EDTA) после окрашивания этидийбромидом.

ПЦР-продукты трех реакций объединяли в целях уменьшения стандартной ошибки при проведении ПЦР и в целях получения достаточного количества ДНК для T-RFLP-анализа. Ампликоны очищали и концентрировали с использованием набора для ПЦР-очистки MinElute (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с протоколом производителей. Элюирование проводили 30 мкл стерильной дистиллированной воды.

Концентрацию очищенной ДНК измеряли на спектрофотометре FlouroMax-2 с применением программы DataMax для Windows™ (ISA Jobin Yvon - Spex Instruments S.A., Inc., New Jersey) с использованием реагента Quant-iT™PicoGreen® (Invitrogen, Eugen, Oregon, USA), который встраивается двухцепочечной ДНК. Реагент Quant-iT™PicoGreen® использовали в соответствии с инструкциями производителей. Возбуждение осуществляли на длине волны 480 нм.

*T-RFLP-анализ*

Аликвоты 200 нг очищенных ПЦР-продуктов отдельно гидролизовали в течение 16 часов при 37°C с использованием 15 ед. рестриктирующей эндонуклеазы Haelll (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) в общем объеме 10 мкл. После гидролиза ферменты инактивировали путем нагревания при 65°C в течение 15 минут. Гидролизаты смешивали с 1 мкл внутреннего стандарта размера и 4 мкл формамидного загрузочного красителя (3,3 мкл деионизованного формамида, 0,7 мкл 25 мМ EDTA с 5% мас./об. декстранового синего) и смесь денатурировали при 94°C в течение 3 минут, а затем перед загрузкой на полиакриламидный гель сразу помещали на лед.

Внутренние стандарты размера содержали праймер Cy5-ENV1 (20 п.н., как описано выше) и 697 п.н. ПЦР-продукт, амплифицированный из ATCC 11775 E.coli с использованием праймера 685r (5'-TCT ACG CAT TTC ACC GCT AC-3'; E.coli, в положениях 705-685) и Cy5-ENV1. Внешние стандарты размера, состоящие из классификатора размеров ALFexpress 50-500 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) и Cy5-меченного 697 п.н. ПЦР-продукта, также загружали на полиакриламидные гели, содержащие образец, для оценки длин T-RF (концевых рестрикционных фрагментов). Флуоресцентно меченные фрагменты разделяли и детектировали с использованием секвенатора ДНК ALFexpress II на 7% геле ReproGel Long Read (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) в течение 700 минут в следующих условиях: 1500 В, 60 мА и 55°C.

*Статистический анализ*

Площади пиков флуоресцентно меченных T-RF оценивали с помощью программы для анализа фрагментов ALFwin™ Fragment Analyser 1.03 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Относительное количество каждого из T-RF в данном T-RFLP-паттерне вычисляли как площадь пика соответствующего T-RF, деленную на общую площадь

пика всех T-RF, детектируемых по длине фрагмента между 20 и 697 п.н. Индексы Симпсона (D) и Шеннона-Винера (H') вычисляли по формулам: $D=\Sigma p_i^{\ 2}$ и $H'=-\Sigma\ p_i, \ln p_i$, где $p_i$ представляет собой относительное количество i-го пика в данном бактериальном сообществе (Magurran A., 1996, Ecological diversity and its measurement, Chapman and Hall, London). Использование индекса разнообразия Симпсона (1-D) вместо исходной формулы индекса Симпсона гарантирует, что величина данного индекса будет увеличиваться с увеличением разнообразия бактерий. Для каждого индивидуума индексы вычисляли для образцов до и после обработки. Разность индексов разнообразия вычисляли путем вычитания значения индекса до обработки из значения индекса после обработки. Разность индексов бактериального разнообразия у индивидуумов пробиотической группы и плацебо-группы вычисляли с применением критерия суммы рангов Манна-Уитни (SigmaStat, Systat Software, Point Richmond, USA). Величина $p<0,05$ рассматривалась как статистически значимая.

При анализе данных для T-RFLP-профилей было обнаружено, что статистически значимая разность индексов разнообразия микробиоты в кишечнике индивидуумов, обработанных штаммом L. plantarum 299v в течение четырех недель, была сравнимой с разностью индексов у индивидуумов, которые получали плацебо. Рестриктирующую эндонуклеазу Haelll использовали в качестве рестриктирующего фермента, а средняя разность индексов разнообразия, измеренная для индекса Шеннона, составляла 0,2305803 для пробиотической группы и -0,3929243 для плацебо-группы (p=0,026).

Вычисление индекса разнообразия Симпсона подтвердило более высокое разнообразие бактерий после введения L. plantarum 299v. Фермент Haelll использовали в качестве рестриктирующего фермента, и полученный результат был статистически значимым, то есть средняя разность для индексов разнообразия Симпсона составляла 0,0367907 для пробиотической группы и -0,04792 для плацебо-группы (p=0,026).

Средняя разность индексов разнообразия

| | Индекс Шеннона | Индекс Симпсона |
|---|---|---|
| $Di_{before\ 299v}$-$Di_{after\ 299v}$ | 0,2305803 | 0,0367907 |
| $Di_{before\ placebo}$-$Di_{after\ placebo}$ | -0,3929243 | -0,04792 |
| $Di_{total}$ | 0,6235046 | 0,0847107 |
| Значимость $Di_{total}$ | P=0,026 | P=0,026 |

Вышеуказанные результаты показали, что бактериальное разнообразие в кишечнике человека повышается при введении одного штамма Lactobacillus plantarum, то есть у индивидуумов, которым был введен штамм Lactobacillus plantarum, бактериальное разнообразие повышается по сравнению с индивидуумами, которым было введено плацебо.

## Формула изобретения

1. Применение одного штамма Lactobacillus plantarum, выбранного из группы, состоящей из Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, и Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316, для повышения разнообразия бактерий в желудочно-кишечном тракте путем введения указанного штамма индивидууму для достижения у него более высокой разности индексов разнообразия бактерий по сравнению с индивидуумом, которому было введено плацебо, где указанную повышенную разность индексов разнообразия измеряют T-RFLP-методом с использованием Haelll в качестве фермента и индекса разнообразия Шеннона-Винера

и индекса Симпсона.

2. Применение по п.1, где указанная повышенная разность индексов разнообразия в том случае, если используется индекс Шеннона-Винера, составляет по меньшей мере 0,15, предпочтительно, 0,30, более предпочтительно, 0,45, а наиболее предпочтительно, 0,60.

3. Применение по п.1, где указанная повышенная разность индексов разнообразия в том случае, если используется индекс Симпсона, составляет по меньшей мере 0,02, предпочтительно, 0,04, более предпочтительно, 0,06, а наиболее предпочтительно, 0,08.

4. Применение по любому одному из пп.1-3, где указанный штамм вводят в форме жидкой композиции или твердой композиции.

5. Применение по п.4, где указанная твердая композиция выбрана из группы, состоящей из таблеток, таблеток для сосания, сладостей, жевательных таблеток, жевательных резинок, капсул, саше, порошков, гранул, частиц и таблеток с покрытиями, таблеток и капсул с энтеросолюбильным покрытием и расплавляющихся полосок и пленок.

6. Применение по п.4, где указанная жидкая композиция выбрана из группы, состоящей из перорально вводимых растворов, суспензий, эмульсий и сиропов.

7. Применение по любому из пп.1-3, где указанный штамм вводят в форме лекарственного пищевого продукта, функционального пищевого продукта, диетической добавки, питательного продукта или пищевого препарата.

8. Применение одного штамма Lactobacillus plantarum, выбранного из группы, состоящей из Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, и Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316, для профилактики у здорового индивидуума развития невысокого бактериального разнообразия (LBD).

9. Применение одного штамма Lactobacillus plantarum, выбранного из группы, состоящей из Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, и Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316, для профилактики у индивидуума с LBD развития транслокации, чрезмерного роста бактерий в толстом кишечнике (LIBO) или в тонком кишечнике (SIBO).

10. Применение одного штамма Lactobacillus plantarum, выбранного из группы, состоящей из Lactobacillus plantarum 299, DSM 6595, Lactobacillus plantarum 299v, DSM 9843, Lactobacillus plantarum HEAL-9, DSM 15312, Lactobacillus plantarum HEAL-19, DSM 15313, и Lactobacillus plantarum HEAL-99, DSM 15316, для профилактики у индивидуума с LIBO или SIBO развития транслокации.

11. Применение по пп.8-10 для устранения невысокого бактериального разнообразия (LBD) в желудочно-кишечном (ЖК) тракте индивидуума, необязательно индуцированного чрезмерным ростом бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и/или в толстом кишечнике (LIBO), где указанное применение включает повышение и/или увеличение бактериального разнообразия и устранение чрезмерного роста бактерий в тонком кишечнике (SIBO) и в толстом кишечнике (LIBO).

12. Применение по пп.8-10, где указанный штамм вводят в форме жидкой композиции или твердой композиции.

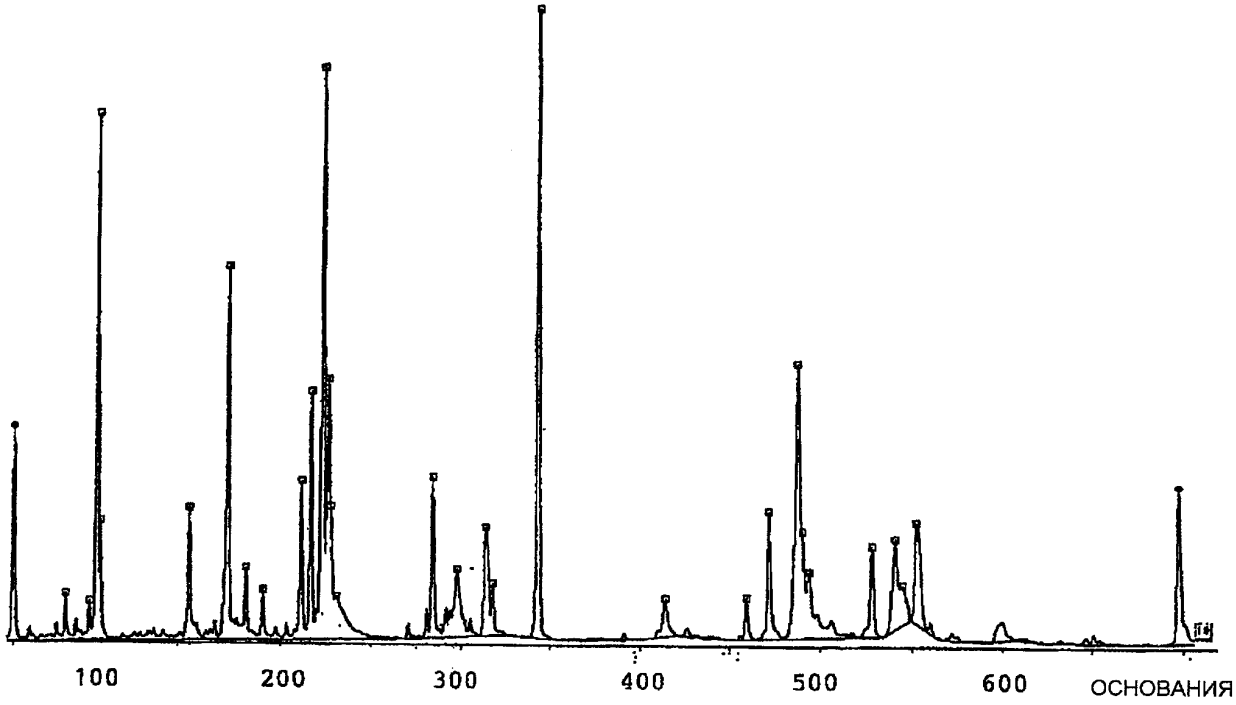
13. Применение по п.12, где указанная твердая композиция выбрана из группы, состоящей из таблеток, таблеток для сосания, сладостей, жевательных таблеток, жевательных резинок, капсул, саше, порошков, гранул, частиц и таблеток с покрытиями, таблеток и капсул с энтеросолюбильным покрытием и расплавляющихся полосок и

пленок.

14. Применение по п.12, где указанная жидкая композиция выбрана из группы, состоящей из перорально вводимых растворов, суспензий, эмульсий и сиропов.

15. Применение по любому из пп.8-10, 13, 14, где указанный штамм вводят в форме лекарственного пищевого продукта, функционального пищевого продукта, диетической добавки, питательного продукта или пищевого препарата.

16. Применение по п.15, где указанный пищевой препарат выбран из группы, состоящей из напитков, йогуртов, соков, мороженого, хлеба, бисквитов, изделий из зерновых, экологически чистых продуктов и пастообразных продуктов.


100
200
300
400
500
600
ОСНОВАНИЯ