



(51) МПК  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: **2009136394/10, 28.03.2008**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
**28.03.2008**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
**28.03.2007 US 60/907,312**

(43) Дата публикации заявки: **10.05.2011** Бюл. № 13

(45) Опубликовано: **10.11.2012** Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 03/010297 A, 06.02.2003. EP 1688481 A, 09.08.2006. WO 2004/076615 A, 10.09.2004. RU 2001119046 A, 20.06.2003. ABE, FUMIAKI. Bifidobacterium longum BB536 as a probiotic. Food Style, 2002, 21, 6(9), 63-76. SHIBA T. et al. The suppressive effect of bifidobacteria on Bacteroides vulgatus, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowwei disease. Microbiol. Immunol. 2003, v.47, №6, p.371-378.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: **28.10.2009**

(86) Заявка РСТ:  
**IE 2008/000034 (28.03.2008)**

(87) Публикация заявки РСТ:  
**WO 2008/117267 (02.10.2008)**

Адрес для переписки:

**191036, Санкт-Петербург, а/я 24,  
 "НЕВИНПАТ", А.В. Поликарпову, рег.№ 9**

(72) Автор(ы):

**МакШЕРРИ Джон (IE),  
 О'МАХОУНИ Лайам (IE),  
 О'САЛЛИВАН Дэвид (IE),  
 КЪЕЛИ Барри (IE)**

(73) Патентообладатель(и):

**Элиментари Хелт Лимитед (IE)**

**(54) ПРОБИОТИЧЕСКИЙ ШТАММ Bifidobacterium longum, ПРОБИОТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ШТАММА Bifidobacterium longum**

(57) Реферат:

Пробиотический штамм Bifidobacterium longum NCIMB 41387 оказывает иммуномодулирующие эффекты путем модуляции уровней цитокинов или путем антагонизации и удаления провоспалительных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта. Штамм предназначен для применения

в профилактике и/или лечении воспалительной активности, такой как нежелательная воспалительная активность желудочно-кишечного тракта, например воспалительное заболевание кишечника. Пробиотическая композиция, содержащая штамм Bifidobacterium longum NCIMB 41387 и добавку, и штамм Bifidobacterium longum NCIMB 41387

используются в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности, для применения в профилактике и/или лечении ракового заболевания желудочно-кишечного тракта, для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для профилактики и/или лечения

нежелательной воспалительной активности и в качестве противои инфекционного пробиотического штамма. Изобретение в значительной степени вызывает иммуномодулирующие эффекты *in vitro*. 4 н. и 41 з.п. ф-лы, 12 ил., 6 пр., 1 табл.

R U 2 4 6 6 1 8 5 C 2

R U 2 4 6 6 1 8 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2006.01)  
*A61P 37/02* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009136394/10, 28.03.2008**

(24) Effective date for property rights:  
**28.03.2008**

Priority:

(30) Convention priority:  
**28.03.2007 US 60/907,312**

(43) Application published: **10.05.2011 Bull. 13**

(45) Date of publication: **10.11.2012 Bull. 31**

(85) Commencement of national phase: **28.10.2009**

(86) PCT application:  
**IE 2008/000034 (28.03.2008)**

(87) PCT publication:  
**WO 2008/117267 (02.10.2008)**

Mail address:

**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",  
A.V. Polikarpovu, reg.№ 9**

(72) Inventor(s):

**MakShERRI Dzhon (IE),  
O'MAKhOUNI Lajam (IE),  
O'SALLIVAN Dehvid (IE),  
K'ELI Barri (IE)**

(73) Proprietor(s):

**Ehlimentari Khelt Limited (IE)**

(54) **PROBIOTIC STRAIN *Bifidobacterium longum*, PROBIOTIC COMPOSITION AND USE OF STRAIN *Bifidobacterium longum***

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: probiotic strain *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 has immunomodulatory effects by modulation of cytokine levels or by antagonisation and removal of anti-inflammatory microorganisms from the gastrointestinal tract. The strain is to be used for prevention and/or treatment of inflammatory activity, such as undesired inflammatory activity of the gastrointestinal tract, e.g. inflammatory intestinal disease. The probiotic composition containing the strain *Bifidobacterium*

*longum* NCIMB 41387 and an additive, and the strain *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 are used for prevention and/or treatment of undesired inflammatory activity, for prevention and/or treatment of a malignant disease of the gastrointestinal tract, for preparation of anti-inflammatory biotherapeutic agents for prevention and/or treatment of undesired inflammatory activity, and as the anti-infectious probiotic strain.

EFFECT: invention causes considerable immunomodulatory effects in vitro.

45 cl, 12 dwg, 6 ex

Данное изобретение относится к штамму *Bifidobacterium* и его применению в качестве пробиотических бактерий, в частности в качестве иммуномодулирующего биотерапевтического агента.

5 Защитные механизмы для защиты желудочно-кишечного тракта человека от колонизации кишечными бактериями являются чрезвычайно сложными и включают как иммунологические, так и неиммунологические аспекты [1]. Врожденные защитные механизмы включают низкий рН желудка, соли желчных кислот, перистальтику, слизистые слои и противомикробные соединения, такие как лизоцим [2].

10 Иммунологические механизмы включают специализированные лимфоидные скопления, подстилающие М-клетки, именуемые пейеровыми бляшками, которые распространены по всей тонкой и толстой кишке [3]. Антигены просвета (кишечника), представленные в этих участках, приводят к стимуляции подходящих субпопуляций Т- и В-клеток с установлением цитокиновых сетей и секрецией антител в желудочно-кишечный тракт [4]. Кроме того, презентация антигенов внутриэпителиальным лимфоцитам и иммунным клеткам подлежащей собственной пластинки может происходить через эпителиальные клетки [5]. Следовательно, организм "хозяина" осуществляет значительный вклад в иммунологическую защиту желудочно-кишечного

15 тракта. Однако, поскольку слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта представляет собой наибольшую поверхность, на которой организм "хозяина" взаимодействует с внешней средой, должны существовать специфические контрольные механизмы для регуляции иммунологической реактивности на 100 тонн пищи, которые перерабатывает желудочно-кишечный тракт за среднюю продолжительность жизни.

20 Кроме того, кишечник колонизирован более чем 500 видами бактерий, численность которых в толстой кишке составляет  $10^{11}$ - $10^{12}$ /г. Следовательно, эти контрольные механизмы должны быть способны отличать непатогенные прикрепленные бактерии от инвазивных патогенов, которые вызвали бы значительное поражение организма

25 "хозяина". На самом деле, кишечная флора вносит вклад в защиту организма "хозяина" путем конкуренции с только что проглоченными потенциально патогенными микроорганизмами.

Бактерии, присутствующие в желудочно-кишечном тракте человека, могут стимулировать воспаление. Нарушенные иммунные ответы на собственную

35 микрофлору связывали с определенными болезненными состояниями, такими как воспалительное заболевание кишечника. Антигены, ассоциированные с нормальной флорой, обычно приводят к иммунологической толерантности, и неспособность достичь этой толерантности является главным механизмом воспаления слизистой [6].

40 Доказательство этого нарушения толерантности включает увеличение уровней антител, направленных против кишечной флоры, у пациентов с воспалительным заболеванием кишечника (IBD).

Настоящее изобретение направлено на штамм *Bifidobacterium*, который, как было показано, оказывает иммуномодулирующие эффекты путем модуляции уровней

45 цитокинов или путем антагонизации и удаления провоспалительных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно данному изобретению предложен штамм *Bifidobacterium* AN1205 (NCIMB41387) или его мутанты или варианты.

50

Мутант может представлять собой генетически модифицированный мутант. Вариант может представлять собой встречающийся в природе вариант *Bifidobacterium*. Указанный штамм может быть пробиотическим. Он может находиться в форме

биологически чистой культуры.

Согласно данному изобретению также предложен выделенный штамм *Bifidobacterium* NCIMB 41387. В одном воплощении данного изобретения штаммы *Bifidobacterium* находятся в форме жизнеспособных клеток. В качестве альтернативы, штаммы *Bifidobacterium* находятся в форме нежизнеспособных клеток. В одном воплощении изобретения штаммы *Bifidobacterium* выделены из кала младенцев, причем указанные штаммы *Bifidobacterium* являются в значительной степени иммуномодулирующими у людей после перорального потребления.

Согласно данному изобретению также предложен препарат, который содержит штамм *Bifidobacterium* по изобретению.

В одном воплощении изобретения препарат включает другое пробиотическое вещество.

В одном воплощении изобретения препарат включает пребиотическое вещество.

Предпочтительно препарат включает проглатываемый носитель. Проглатываемый носитель может представлять собой фармацевтически приемлемый носитель, такой как капсула, таблетка или порошок. Предпочтительно проглатываемый носитель представляет собой пищевой продукт, такой как сквашенное молоко, йогурт, замороженный йогурт, сухое молоко, концентрат молока, плавленые сыры, приправы или напитки.

В одном воплощении данного изобретения препарат по изобретению дополнительно содержит белок и/или пептид, в частности белки и/или пептиды, которые обогащены глутамином/глутаматом, липид, углевод, витамин, минеральный элемент и/или микроэлемент.

В одном воплощении данного изобретения штамм *Bifidobacterium* присутствует в препарате в концентрации более чем  $10^6$  КОЕ (колониобразующая единица) на грамм системы доставки. Предпочтительно препарат включает любой один или более чем один из адьюванта, бактериального компонента, лекарственного средства или биологического соединения.

В одном воплощении данного изобретения препарат предназначен для протоколов иммунизации и вакцинации.

Кроме того, согласно данному изобретению предложен штамм *Bifidobacterium* или препарат по изобретению для применения в качестве пищевого продукта, в качестве лекарственного средства, для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности, для применения в профилактике и/или лечении нежелательной респираторной воспалительной активности, такой как астма, для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности желудочно-кишечного тракта, такой как воспалительное заболевание кишечника, например болезнь Крона или язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, паучит или постинфекционный колит, для применения в профилактике и/или лечении ракового(ых) заболевания(ий) желудочно-кишечного тракта, для применения в профилактике и/или лечении системного заболевания, такого как ревматоидный артрит, для применения в профилактике и/или лечении аутоиммунных расстройств, обусловленных нежелательной воспалительной активностью, для применения в профилактике и/или лечении рака, обусловленного нежелательной воспалительной активностью, для применения в профилактике рака, для применения в профилактике и/или лечении диареи, вызванной нежелательной воспалительной активностью, такой как диарея, ассоциированная с *Clostridium difficile*, диарея, ассоциированная с ротавирусом, или постинфекционная диарея, для применения в

профилактике и/или лечении диареи, вызванной инфекционным агентом, таким как *E.coli*.

Согласно данному изобретению также предложен штамм *Bifidobacterium* или препарат по изобретению для применения в получении противовоспалительного биотерапевтического агента для профилактики и/или лечения нежелательной воспалительной активности или для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для профилактики и/или лечения нежелательной воспалительной активности.

В одном воплощении данного изобретения штамм по изобретению действует путем антагонизации и удаления провоспалительных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта.

Согласно данному изобретению также предложен штамм *Bifidobacterium* или препарат по изобретению для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для уменьшения уровней провоспалительных цитокинов.

Кроме того, согласно данному изобретению предложен штамм *Bifidobacterium* для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для модификации уровней IL-10 (интерлейкин-10).

Согласно данному изобретению также предложено применение штамма *Bifidobacterium* в качестве противоинфекционного пробиотика благодаря его способности противодействовать росту патогенных видов.

Авторы данного изобретения обнаружили, что конкретные штаммы *Bifidobacterium* вызывают иммуномодулирующие эффекты *in vitro*.

Поэтому данное изобретение имеет большое потенциальное терапевтическое значение при профилактике или лечении нарушенных иммунных ответов, таких как нежелательные воспалительные реакции, например астма.

*Bifidobacterium* представляют собой комменсальные микроорганизмы. Их выделяют из микробной флоры желудочно-кишечного тракта человека. Иммунная система в желудочно-кишечном тракте не может давать выраженную реакцию на представителей этой флоры, так как формирующаяся воспалительная активность также разрушила бы клетки хозяина и функцию ткани. Следовательно, существует(ют) некий(е) механизм(ы), посредством которого(ых) иммунная система может распознавать комменсальных непатогенных представителей желудочно-кишечной флоры как отличающихся от патогенных организмов. Это обеспечивает то, что повреждение тканей хозяина является ограниченным и защитный барьер все еще поддерживается.

Депонирование штамма *Bifidobacterium longum* АН1205 было произведено в NCIMB 11 мая 2006 года, и ему был присвоен регистрационный номер NCIMB 41387.

*Bifidobacterium longum* может представлять собой генетически модифицированный мутант, или он может представлять собой его встречающийся в природе вариант.

Предпочтительно *Bifidobacterium longum* находится в форме жизнеспособных клеток.

В качестве альтернативы, *Bifidobacterium longum* может находиться в форме нежизнеспособных клеток.

Понятно, что конкретный штамм *Bifidobacterium* по изобретению можно вводить животным (включая людей) в перорально проглатываемой форме в традиционном препарате, таком как капсулы, микрокапсулы, таблетки, гранулы, порошок, лепешки, пилюли, суппозитории, суспензии и сиропы. Подходящие препараты могут быть получены стандартными способами с использованием традиционных органических и неорганических добавок. Количество активного ингредиента в медицинской

композиции может находиться на уровне, который будет оказывать желательный терапевтический эффект.

Препарат также может включать бактериальный компонент, лекарственное средство или биологическое соединение.

Кроме того, вакцину, содержащую штаммы по изобретению, можно получать с использованием любого подходящего известного способа, и она может включать фармацевтически приемлемый носитель или адъювант.

Во всем описании изобретения термины "мутант", "вариант" и "генетически модифицированный мутант" включают штамм бифидобактерий, генетические и/или фенотипические свойства которых изменены по сравнению с родительским штаммом. Встречающийся в природе вариант *Bifidobacterium longum* включает спонтанные изменения селективно выделенных целевых свойств. Преднамеренное изменение свойств родительского штамма осуществляется традиционными (*in vitro*) методами генетических манипуляций, такими как разрушение гена, конъюгативный перенос и т.д. Генетическая модификация включает введение экзогенных и/или эндогенных последовательностей ДНК в геном штамма бифидобактерий, например, путем вставки в геном бактериального штамма посредством векторов, включая плазмидную ДНК или бактериофаги.

Природные или индуцированные мутации включают по меньшей мере изменения одного основания, такие как делецию, вставку, трансверсию, или другие модификации ДНК, которые могут приводить к изменению аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью ДНК.

Термины "мутант", "вариант" и "генетически модифицированный мутант" также включают штамм бифидобактерий, который подвергся генетическим изменениям, которые накапливаются в геноме со скоростью, сопоставимой в природе для всех микроорганизмов и/или генетических изменений, которые происходят в результате спонтанной мутации и/или приобретения генов, и/или потери генов, которая не достигается преднамеренной (*in vitro*) манипуляцией с геномом, но достигается посредством естественного отбора вариантов и/или мутантов, которые обеспечивают селективное преимущество для поддержания выживания данной бактерии при воздействии давления окружающей среды, такого как антибиотики. Мутант можно создать с помощью преднамеренной (*in vitro*) вставки в геном конкретных генов, которые фундаментально не изменяют биохимическую функциональность организма, но продукты которых можно использовать для идентификации или отбора бактерии, например, по устойчивости к антибиотикам.

Специалисту в данной области будет понятно, что мутантные или вариантыные штаммы бифидобактерий можно идентифицировать посредством анализа гомологии последовательности ДНК с родительским штаммом. Штаммы бифидобактерий, имеющие близкую идентичность последовательности с родительским штаммом, считаются мутантными или вариантными штаммами. Штамм бифидобактерий с идентичностью (гомологией) последовательности 96% или более, такой как 97% или более, или 98% или более, или 99% или более, с родительской последовательностью ДНК можно считать мутантным или вариантным. Гомологию последовательностей можно определять с использованием онлайн-алгоритма по поиску гомологии программы "BLAST", общедоступного на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Мутанты родительского штамма также включают штаммы, происходящие из бифидобактерий, имеющие по меньшей мере 85%-ную гомологию последовательности, такую как по меньшей мере 90%-ная гомология

последовательности, или по меньшей мере 95%-ную гомологию последовательности с межгенной спейсерной полинуклеотидной последовательностью 16s-23s родительского штамма. Эти мутации могут дополнительно содержать мутации ДНК в других последовательностях ДНК в бактериальном геноме.

#### 5 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг.1 представлен профиль штрихкода ВОХ ПЦР (полимеразная цепная реакция) (биоанализатор) для *V. longum* АН1205. Размеры пар оснований определяли с использованием программы Agilent 2100.

10 На Фиг.2 представлен график, иллюстрирующий выход *V. longum* АН1205 из кала на протяжении 8-суточного периода кормления, который демонстрирует способность АН1205 проходить через желудочно-кишечный тракт мыши.

На Фиг.3 представлена гистограмма, показывающая эффект *V. longum* АН1205 на продукцию цитокина IL-10 человеческими РВМС (моноклеарные клетки периферической крови). Результаты выражены как среднее  $\pm$  SE (стандартная ошибка) (n=6).

На Фиг.4А и Б представлены графики, показывающие эффект пробиотического бактериального штамма АН1205 (А) и плацебо (Б) на общее число клеток в бронхоальвеолярном лаваже после стимуляции овалбумином (OVA) у сенсibilизированных животных (n=10/группу, \*p<0,05 по сравнению со стимуляцией только OVA).

На Фиг.5А и Б представлены графики, показывающие эффект обработки пробиотическим штаммом АН1205 (А) и плацебо (Б) на реактивность дыхательных путей к метахолину, как оценивали по изменениям форсированной паузы (Penh) у сенсibilизированных овалбумином (OVA) мышей через 24 часа после интраназального стимула OVA или физиологическим раствором. Каждая точка данных представляет собой среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего) (n=10/группу, \*p<0,05 по сравнению с одним OVA).

На Фиг.6 А-Д представлены графики, показывающие уровни цитокинов IL-10 (А), IFN $\gamma$  (интерферон-гамма) (Б), TNF (фактор некроза опухолей) (В), IL-6 (Г) и CCL2 (Д) в бронхоальвеолярном лаваже (BAL) у сенсibilизированных овалбумином (OVA) мышей. Каждая колонка представляет собой среднее  $\pm$ SEM (n=10, \*p<0,05 по сравнению с OVA-стимулированным, обработанным физиологическим раствором контролем).

На Фиг.7 представлен график, иллюстрирующий, что CD4<sup>4+</sup> CD25<sup>+</sup> клетки от мышей, которых кормили АН1205, значительно снижали пролиферацию CD4 Т-клеток-респондеров (n=7).

На Фиг.8 представлен график, показывающий процент клеток пейеровых бляшек в CD4+ популяции, которые также представляют собой CD25+, как оценивали проточной цитометрией.

На Фиг.9А и Б представлены графики, показывающие, что процент CD4/CD25+ клеток, экспрессирующих фактор транскрипции Foxp3, подвергается значительной повышающей регуляции у стерильных мышей, потребляющих АН1205. (А)=клетки селезенки, (Б)=клетки MLNC (n=4/группу для анализа селезенки, n=2/3 для анализа MLNC).

50 На Фиг.10 представлен график, показывающий, что уровень цитокинов IL-6, MCP-1 и IFN- $\gamma$ , секретлируемых CD3/CD28-стимулированными культурами MLNC, снижался, когда стерильные мыши потребляли *Vifidobacterium longum* АН1205. Результаты выражены как среднее значение на группу  $\pm$  стандартная ошибка (n=4/группу).

На Фиг.11 представлен график, показывающий, что уровень цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$ , секретируемых CD3/CD28-стимулированными культурами спленоцитов, снижался, когда стерильные мыши потребляли *Bifidobacterium longum* AN1205. Результаты выражены как среднее значение на группу  $\pm$  стандартная ошибка (n=4/группу).

На Фиг.12 представлен график, иллюстрирующий стабильность пробиотического штамма AN1205 на протяжении 3 месяцев по сравнению с *Lactobacillus GG*.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения обнаружили, что штамм AN1205 *Bifidobacterium longum* является не только устойчивым к кислоте и желчи и проходит через желудочно-кишечный тракт, но также неожиданно оказывает иммуномодулирующие эффекты путем модуляции уровней цитокинов или путем антагонизации и удаления провоспалительных или иммуномодулирующих микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта.

Обычным применением пробиотических бактерий является применение в форме жизнеспособных клеток. Однако оно также может быть распространено на нежизнеспособные клетки, такие как убитые культуры или композиции, содержащие полезные факторы, экспрессируемые пробиотическими бактериями. Они могли бы включать микроорганизмы, убитые нагреванием, или микроорганизмы, убитые воздействием измененного pH, или подвергнутые действию давления. Получение продукта с нежизнеспособными клетками проще, клетки можно легко включать в фармацевтические препараты, и требования к хранению являются значительно менее ограниченными, чем в случае с жизнеспособными клетками. *Lactobacillus casei* YIT 9018 является примером эффективного применения клеток, убитых нагреванием, в качестве способа лечения и/или предупреждения роста опухолей, как описано в патенте США № US4347240.

Не известно, требуются ли интактные бактерии для оказания иммуномодулирующего эффекта или можно использовать только индивидуальные активные компоненты по изобретению. Были идентифицированы провоспалительные компоненты некоторых бактериальных штаммов. Провоспалительные эффекты грамотрицательных бактерий опосредованы липополисахаридом (LPS). Один LPS индуцирует провоспалительную сеть, отчасти благодаря связыванию LPS с рецептором CD14 на моноцитах. Предполагается, что компоненты пробиотических бактерий обладают иммуномодулирующей активностью благодаря эффектам целой клетки. При выделении этих компонентов предполагается манипуляция фармацевтического уровня.

IL-10 продуцируется Т-клетками, В-клетками, моноцитами и макрофагами. Этот цитокин усиливает пролиферацию и дифференцировку В-клеток в клетки, секретирующие антитела. IL-10 демонстрирует, главным образом, противовоспалительные активности. Он осуществляет повышающую регуляцию экспрессии IL-1RA моноцитами и подавляет большую часть воспалительных активностей моноцитов. IL-10 ингибирует продукцию моноцитами цитокинов, реакционноспособных промежуточных соединений кислорода и азота, экспрессию МНС (главный комплекс гистосовместимости) II класса, киллинг паразитов и продукцию IL-10 через механизм обратной связи [7]. Также было показано, что этот цитокин блокирует продукцию моноцитами интестинальной коллагеназы и коллагеназы типа IV, препятствуя PGE<sub>2</sub>-сАМР-зависимому пути, и, следовательно, может быть важным регулятором разрушения соединительной ткани, наблюдающегося при хронических воспалительных заболеваниях.

Ответ организма "хозяина" на инфекцию характеризуется врожденными и приобретенными клеточными и гуморальными иммунными реакциями, предназначенными для ограничения распространения нежелательного организма и для восстановления гомеостаза органа. Однако для ограничения агрессивности побочных эффектов на ткани хозяина может быть активирован целый ряд регуляторных ограничений. Регуляторные Т-клетки (Treg) служат одним таким механизмом. Они происходят из тимуса, но также могут индуцироваться в периферических органах, включая слизистую кишечника. Преднамеренное введение Treg клеток подавляет воспалительное заболевание в различных мышечных моделях, включая экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, воспалительное заболевание кишечника, индуцированный бактериями колит, артрит, индуцированный коллагеном, диабет I типа, эозинофильное воспаление дыхательных путей, заболевание "трансплантат против хозяина" и трансплантацию органов. Транскрипционный фактор forkhead (с функциональным доменом в форме "вилки") Foxp3 (forkhead box P3), селективно экспрессирующийся в клетках Treg, требуется для развития и функции Treg и является достаточным для индукции фенотипа Treg в традиционных CD4 клетках [19]. Мутации в Foxp3 вызывают тяжелый аутоиммунитет во многих органах как у человека, так и у мыши. Авторы данного изобретения описали штамм *Bifidobacterium*, который продуцирует CD25- положительные/Foxp3- положительные Т-регуляторные клетки *in vivo*.

Данное изобретение станет более понятным из следующих примеров.

Пример 1: Характеристика бактерий, выделенных из кала младенцев. Демонстрация пробиотических свойств

Выделение пробиотических бактерий

Свежий кал получали от 3-суточных грудных младенцев мужского пола и последовательные разведения переносили на чашки со средами TRY (триптиказа, пептон и дрожжевой экстракт) и MRS (deMann, Rogosa and Shape) с 0,05% цистеина и мупироцина. Чашки инкубировали в анаэробных сосудах (BBL, Oxoid) с использованием наборов, генерирующих CO<sub>2</sub> (Anaerocult A, Merck), в течение 2-5 суток при 37°C. Изоляты грамположительных, отрицательных по каталазе стержневидных или раздвоенных/плеоморфных бактерий высевали штрихами для определения чистоты на сложные неселективные среды (MRS и TRY). Изоляты обычно культивировали на среде MRS или TRY, если не указано иное, при 37°C в анаэробных условиях. Предполагаемые *Bifidobacterium* концентрировали в 40%-ном глицерине и хранили при -20°C и -80°C.

После выделения чистого штамма бифидобактерий, которому присвоили обозначение AN1205, оценили микробиологические характеристики и обобщили их в Таблице 1, приведенной ниже. AN1205 представляет собой грамположительную, отрицательную по каталазе бактерию плеоморфной формы, которая является положительной по фруктозо-6-фосфатфосфокеталазе, подтверждая ее идентичность в качестве бифидобактерий. При использовании минимальных сред, в которые был включен один источник углерода, AN1205 была способна расти на всех протестированных источниках углерода (глюкоза, лактоза, рибоза, арабиноза, галактоза, раффиноза, фруктоза, экстракт солода, манноза, мальтоза, сахароза).

Таблица 1	
Физико-химические характеристики <i>B. longum</i> AN1205	
Характеристики штамма	<i>B. longum</i> AN1205
Окрашивание по Грамму	+

	Каталаза	-
	Подвижность	-
	F6РРК*	+
	Коагуляция молока	+
5	Анаэробная культура при 45°C	-
	Аэробная культура при 45°C	-
	Ферментация углеводов:	
	Глюкоза	+
	Лактоза	+
10	Рибоза	+
	Арабиноза	+
	Галактоза	+
	Раффиноза	+
	Фруктоза	+
	Экстракт солода	+
15	Манноза	+
	Мальтоза	+
	Сахароза	+
* означает анализ фруктозо-6-фосфатфосфокетолазы		

## 20 Идентификация вида

Для идентификации видов выделенных бифидобактерий проводили секвенирование межгенного спейсера (IGS) 16s. Кратко, ДНК выделяли из АН1205 с использованием 100 мкл экстрагирующего раствора и 25 мкл раствора для приготовления ткани (Sigma, набор XNAT2). Пробы инкубировали в течение 5 минут при 95°C и затем добавляли 100 мкл нейтрализующего раствора (набор XNAT2). Раствор геномной ДНК количественно оценивали с использованием спектрофотометра Nanodrop и хранили при 4°C. ПЦР проводили с использованием IGS праймеров, IGS L (левый): 5'-GCTGGATCACCTCCTTTC-3' (SEQ ID NO. 3), который основан на SEQ ID NO. 1, и IGS R (правый): 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (SEQ ID NO. 4), который основан на SEQ ID NO. 2. Условия циклов представляли собой: 94°C за 3 мин (1 цикл), 94°C за 30 с, 53°C за 30 с, 72°C за 30 с (28 циклов). ПЦР реакция содержала 4 мкл (50 нг) ДНК, смесь для ПЦР (набор XNAT2), 0,4 мкМ праймеров IGS L и R (MWG Biotech, Германия). ПЦР реакции проводили в термоциклере Eppendorf.

35 ПЦР-продукты (10 мкл) разделяли рядом с маркером молекулярной массы (лестница 100 п.н., Roche) на 2%-ном агарозном геле, окрашенном EtBr (бромистый этидий), в ТАЕ для определения профиля IGS. ПЦР-продукты Bifidobacterium (одна полоса) очищали с использованием набора для очистки Promega Wizard PCR.

40 Очищенные ПЦР-продукты секвенировали с использованием последовательностей праймеров (приведенных выше) для межгенной спейсерной области. Данные по последовательностям затем искали в базе данных нуклеотидных последовательностей NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) для определения идентичности штамма по гомологии нуклеотидов. Полученные

45 данные по ДНК последовательностям использовали в стандартной системе поиска нуклеотид-нуклеотидной гомологии BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Идентифицировали ближайшее соответствие с данной последовательностью и затем выравнивали последовательности для сравнения с использованием

50 программы DNASTAR MegAlign. Полученные последовательности (SEQ ID NO. 1 (прямая последовательность IGS) и SEQ ID NO. 2 (обратная последовательность IGS)) можно посмотреть в перечне последовательностей. Поиск в базе данных NCIMB выявил, что АН1205 имеет уникальную последовательность IGS (SEQ ID NO. 1

(прямая последовательность) и SEQ ID NO. 2 (обратная последовательность)) с ближайшей гомологией последовательностей с *Bifidobacterium longum*.

Для того чтобы выявить штрихкодový профиль ПЦР для АН1205, ПЦР проводили с использованием праймеров BOX [8]. Условия циклов представляли собой: 94°C за 7 мин (1 цикл), 94°C за 1 минуту, 65°C за 8 минут (30 циклов) и 65°C за 16 минут. ПЦР реакция содержала 50 нг ДНК, смесь для ПЦР (набор XNAT2), 0,3 мкМ праймер BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (SEQ ID NO. 5) (MWG Biotech, Германия). ПЦР реакции проводили на термоциклере Eppendorf. ПЦР-продукты (1 мкл) разделяли рядом с маркером молекулярной массы (лестница ДНК 7500, Agilent, Германия) с использованием DNA 7500 LabChip® на Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Германия). Штрихкод (профиль ПЦР-продуктов) определяли с использованием программы Agilent Bioanalyzer, где идентифицировали число и величину пиков (ПЦР-продуктов) (Фиг.1).

#### Профили чувствительности к антибиотикам

Профили чувствительности к антибиотикам штамма *B. longum* определяли с использованием анализа "чувствительности к дискам". Культуры выращивали в подходящей бульонной среде в течение 24-48 ч, не густо высевали на чашки (100 мкл) с агаровой средой и помещали на агар диски, содержащие известные концентрации антибиотиков. Штаммы исследовали на чувствительность к антибиотикам после 1-2-суточной инкубации при 37°C в анаэробных условиях. Штаммы считали чувствительными, если были видны зоны ингибирования 1 мм или более. Независимо оценивали минимальную ингибирующую концентрацию (МИС) для каждого антибиотика. МИС для клиндамицина, ванкомицина и метронидазола составляли 0,032, 0,75 и более 256 соответственно.

#### Прохождение через кишечник

Для определения того, могла ли *Bifidobacterium longum* выживать при низких значениях pH, эквивалентных значениям, обнаруженным в желудке, бактериальные клетки отбирали из свежих, выращенных в течение ночи культур, дважды промывали в фосфатном буфере (pH 6,5) и ресуспендировали в бульоне TRY, pH которого был доведен до 2,5 (1 М HCl). Клетки инкубировали при 37°C и выживание измеряли с интервалами 5, 30, 60 и 120 минут с использованием чашечного способа подсчета. АН1205 хорошо выживали в течение 5 минут при pH 2,5, тогда как через 30 минут жизнеспособных клеток не выделяли.

На выходе из желудка предположительные пробиотики подвергаются воздействию желчных солей в тонком кишечнике. Для того чтобы определить способность *B. longum* выживать при воздействии желчи, культуры высевали штрихами на чашки с TRY и агаром, дополненные 0,3% (масс./об.), 0,5%, 1%, 2%, 5%, 7,5% или 10% свиной желчи. Рост *B. longum* АН1205 наблюдали на чашках, содержащих вплоть до 0,5% желчи.

В мышинной модели оценивали способность *B. longum* АН1205 проходить через желудочно-кишечный тракт. Мыши ежедневно потребляли  $1 \times 10^9$  АН1205, и фекальные комочки исследовали на присутствие скормленного микроорганизма. Определение АН1205 было облегчено выделением спонтанного рифампицин-устойчивого варианта бифидобактерий - включение рифампицина в чашки с TRY, используемые для оценки прохождения, гарантировало, что культивировали только скормленные бифидобактерии, устойчивые к рифампицину. Фекальные образцы собирали ежедневно и подтверждали прохождение *S. longum* через желудочно-кишечный тракт (Фиг.2).

### Антимикробная активность

Индикаторные патогенные микроорганизмы, используемые в этом исследовании, размножали в следующей среде при следующих условиях роста: *Salmonella typhimurium* (37°C, аэробные) - в триптон-соевом бульоне/агаре с добавлением 0,6%-ного дрожжевого экстракта (TSAYE, Oxoid), *Campylobacter jejuni* (37°C, анаэробные) и *E.coli* O157:H7 (37°C, анаэробные) - на среде с кровяным агаром, *Clostridium difficile* (37°C, анаэробные) - в улучшенной клостридиальной среде (RCM, Oxoid). Все штаммы инокулировали в свежую ростовую среду и выращивали в течение ночи перед использованием в экспериментах.

Антимикробную активность определяли с использованием замедленного способа [9]. Кратко, *B. longum* АН1205 инкубировали в течение 36-48 ч. Десятикратные последовательные разведения не густо высевали на чашки (100 мкл) на среду ТРУ-агар. После инкубации в течение ночи чашки с отчетливыми колониями покрывали слоем с индикаторной бактерией. Индикаторный "газон" получали путем инокуляции расплавленного верхнего слоя 2% (об./об.) ночной индикаторной культуры, который выливали на поверхность инокулированных чашек с ТРУ. Чашки снова инкубировали в течение ночи в условиях, подходящих для роста индикаторной бактерии. Индикаторные культуры с зонами ингибирования с радиусом более 1 мм считали чувствительными к тестируемой бактерии. *B. longum* АН1205 ингибировала рост всех протестированных патогенных организмов с измеренными зонами осветления 8,67, более 80, 4,33 и 11,67 мм для *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *E.coli* O157:H7 и *Clostridium difficile* соответственно.

Пример 2: Продукция цитокинов РВМС в ответ на *B. longum*

Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) получали от здоровых доноров посредством центрифугирования в градиенте плотности. РВМС стимулировали пробиотическим бактериальным штаммом в течение 72-часового периода при 37°C. В это время культуральные супернатанты собирали, центрифугировали, распределяли по аликвотам и хранили при -70°C до оценки на уровне IL-10 с использованием цитометрического анализа с шариками (BD BioSciences). АН1205 индуцировал значительную секрецию IL-10 человеческими РВМС, что свидетельствует о том, что этот пробиотический штамм будет индуцировать противовоспалительный ответ *in vivo* (Фиг.3).

Пример 3: *B. longum* АН1205 ослабляет респираторное заболевание в мышинной модели астмы

В этом исследовании изучали, подавляют ли пробиотические бактерии *Bifidobacterium longum* АН1205 аллергические ответы в мышинной модели аллергического воспаления дыхательных путей, сенсibilизированной овальбумином (OVA). Кратко, взрослых самцов мышей BALB/c сенсibilизировали внутрибрюшинной инъекцией OVA в 0-е сутки и на 6-е сутки. На 12-е и 14-е сутки мышей интраназально стимулировали OVA. Через двадцать четыре часа после последней стимуляции (15-е сутки) мышей подвергали измерениям реактивности дыхательных путей с последующей BAL процедурой. В качестве контролей служили мыши, сенсibilизированные OVA/алюминиевыми квасцами, стимулированные физиологическим раствором. На протяжении всего испытания животные получали пробиотик или плацебо. Воспаление дыхательных путей (цитокины и количество клеток) оценивали путем определения количества воспалительных клеток в бронхоальвеолярном лаваже. Реактивность дыхательных путей также измеряли с использованием плетизмографа для целого организма Вухсо. Также выделяли

спленоциты из OVA-сенсibilизированных мышей и инкубировали в присутствии антител против CD3 и против CD28, после чего измеряли уровни цитокинов в супернатантах посредством проточной цитометрии.

5 В. longum AN1205 не вызывал значимого уменьшения числа клеток, выделенных из BAL жидкости после стимуляции OVA по сравнению с животными, которых кормили бульоном (Фиг.4). Измеряли реактивность дыхательных путей, и стимуляция мышей, сенсibilизированных OVA, приводила к увеличению АНР (гиперчувствительность дыхательных путей) на метахолин по сравнению с мышами, стимулированными физиологическим раствором. AN1205 не модулировал эту  
10 повышенную реактивность дыхательных путей на метахолин, как оценивали по изменениям в форсированной паузе (Фиг.5).

Уровни цитокинов BAL измеряли цитометрическим анализом с шариками и продемонстрировали, что животные, которых кормили AN1205, имели существенно  
15 сниженные уровни TNF- $\alpha$  по сравнению с OVA контролем (Фиг. 6B). Не было замечено значимых различий для уровней IL-10, IFN- $\gamma$ , IL-6 и CCL2 (Фиг.6).

#### Пример 4: Treg-эффекторная модель

В этом исследовании изучали эффект потребления пробиотика на число и  
20 активность регуляторных Т-клеток у здоровых мышей. Мышей BALB/c (10/группу) кормили *Bifidobacterium longum* AN1205 или плацебо в течение трех недель. После потребления пробиотика/плацебо выделяли CD4+CD25+ Т-регуляторные клетки и их подавляющую активность *in vitro* определяли путем измерения пролиферации анти-CD3/CD28-стимулированных CFSE-меченных CD4+ Т-клеток-респондеров,  
25 используя проточную цитометрию. В качестве контроля CD4+ Т-клетки-респондеры инкубировали вместе с CD4+CD25- Т-клетками. Процент CD4+CD25+ клеток (регуляторные Т-клетки) в мышинных спленоцитах, которые также являются FoxP3-положительными, определяли в селезенках мышей, которых кормили пробиотиком или плацебо.  
30

% CD4+ клеток, которые пролиферировали при инкубации вместе с CD4+CD25+ клетками от мышей, которых кормили пробиотиком/плацебо, сравнивали с % CD4+ клеток, которые пролиферировали при инкубации вместе с CD4+CD25- клетками от тех же испытуемых мышей. В каждом случае пролиферация Т-клеток была меньше в  
35 культурах, содержащих CD4+CD25+ клетки, по сравнению с культурами, содержащими только CD4 клетки и истощенными по CD25+ клеткам (Фиг.7).

Определяли % клеток в CD4+ популяции, которые также были CD25+ (Фиг.8). Группа, которую кормили *Bifidobacterium longum* AN1205, имела значительно  
40 больше CD4+ Т-клеток, которые были CD25+ (т.е. Т-регуляторные клетки), чем группа, которую кормили плацебо. Это говорит о том, что % Т-регуляторных клеток в CD4+ популяции значительно повышался при кормлении AN1205.

Также определяли число CD4+CD25+FoxP3+ клеток в полных популяциях спленоцитов мышей, которых кормили пробиотиком или плацебо. Число CD4+CD25+  
45 Т-регуляторных клеток, экспрессирующих FoxP3, не изменялось в селезенках мышей, которых кормили пробиотиком, по сравнению с мышами, которых кормили плацебо или которых не кормили.

#### Пример 5: Стерильная модель

50 Стерильных мышей приобретали в возрасте 6 недель и содержали в стерильном блоке в блоке биологических служб в УСС. Животные потребляли пробиотический штамм *Bifidobacterium longum* AN1205 в течение 9 суток или оставались стерильными. Индукцию Т-регуляторных клеток оценивали по проточной цитометрии и уровни

цитокинов количественно определяли с помощью СВА.

Прохождение АН1205 оценивали путем измерения числа бифидобактерий на селективном агаре в ходе исследования. АН1205 не проходил через кишечник стерильных мышей в измеримых количествах, даже если ежедневно вводили  
5 приблизительно  $1 \times 10^9$  организмов. Данные результаты говорят о том, что для выживания бифидобактерий в кишечнике требуются дополнительные микробные факторы или факторы организма "хозяина".

Хотя АН1205 не проходил через кишечник в определенных количествах, данные  
10 бактерии действительно взаимодействовали с иммунной системой организма "хозяина". Количество CD4+CD25+Foxp3+ клеток в брыжеечном лимфатическом узле и селезенке стерильных животных, которых кормили АН1205, значительно увеличивалось после 9 суток кормления (Фиг.9). Общее количество CD3/CD4 или CD3/CD8 оставалось неизменным.

Выделенные из брыжеечных лимфатических узлов клетки (MLNC) и спленоциты стимулировали *in vitro* антителами против CD3/CD28 или LPS или оставляли нестимулированными в качестве отрицательных контролей. Секреция MLNC IL-6 и IFN- $\gamma$  после CD3/CD28 стимуляции была значительно снижена в культуральных  
20 супернатантах, тогда как уровни MCP-1 были значительно подавлены, когда мышей предварительно кормили АН1205 (Фиг.10). Уровни IL-10 оставались похожими между группами. Высвобождение спленоцитами IL-6 и TNF- $\alpha$  было значительно, но не значимо снижено при предварительном кормлении АН1205 (Фиг.11). Для нестимулированных или LPS-стимулированных культур не было замечено значимых  
25 различий, но в целом авторы данного изобретения наблюдали меньшую продукцию провоспалительных цитокинов у животных, которых кормили бифидобактериями АН1205.

#### Пример 6: Результаты по стабильности

30 Стабильность пробиотического штамма АН1205 варьировала на протяжении 3 месяцев при 30°C (Фиг.12).

Lactobacillus GG был плохим исполнителем на протяжении периода тестирования с 2 log падением на протяжении 3 месяцев, тогда как штамм АН1205 продемонстрировал падение жизнеспособности вплоть до примерно 1 log на  
35 протяжении того же периода тестирования.

#### Иммуномодуляция

Человеческая иммунная система играет важную роль в этиологии и патологии огромного числа человеческих заболеваний. Гипер- и гипоиммунореактивность  
40 приводит к большинству болезненных состояний или является их компонентом. Одно семейство биологических соединений, названных цитокинами, является особенно важным для контроля иммунных процессов. Нарушения этих тонких цитокиновых сетей все в большей степени связывают со многими заболеваниями. Эти заболевания включают, но не ограничиваются этим, воспалительные расстройства,  
45 иммунодефицит, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, рак (особенно раковые заболевания желудочно-кишечной и иммунной систем), диарею, диарею, ассоциированную с антибиотиками, педиатрическую диарею, аппендицит, аутоиммунные расстройства, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера,  
50 ревматоидный артрит, целиакию, сахарный диабет, трансплантацию органов, бактериальные инфекции, вирусные инфекции, грибковые инфекции, пародонтоз, заболевание мочеполовой системы, заболевание, передающееся половым путем, ВИЧ-инфекцию, репликацию ВИЧ, диарею, ассоциированную с ВИЧ, травму,

ассоциированную с хирургическим вмешательством, метастатическое заболевание, индуцированное хирургическим вмешательством, сепсис, потерю массы тела, анорексию, контроль лихорадки, кахексию, заживление ран, язвы, барьерную функцию кишечника, аллергию, астму, респираторные расстройства, расстройства кровообращения, коронарную болезнь сердца, анемию, расстройства системы свертывания крови, почечное заболевание, расстройства центральной нервной системы, заболевание печени, ишемию, расстройства питания, остеопороз, эндокринные расстройства, эпидермальные расстройства, псориаз и обыкновенные угри. Эффекты на продукцию цитокинов являются специфичными для каждого из исследованных пробиотических штаммов. Таким образом, можно выбрать конкретные пробиотические штаммы для нормализации особого цитокинового дисбаланса, индивидуального для конкретного типа заболевания. Адаптацию терапий, специфичных для заболевания, можно осуществлять с использованием либо одного штамма AN1205 или его мутантов или вариантов, либо набора этих штаммов.

#### Обучение иммунной системы

Кишечная флора важна для развития и правильного функционирования кишечной иммунной системы. В отсутствие кишечной флоры кишечная иммунная система является недоразвитой, как продемонстрировано в стерильных животных моделях, и определенные функциональные параметры, такие как фагоцитирующая способность макрофагов и продукция иммуноглобулинов, снижаются [10]. Важность кишечной флоры в стимуляции неповреждающих иммунных ответов становится более очевидной. Увеличение частоты возникновения и тяжести аллергий в западном мире связывали с улучшением гигиены и санитарии, сопровождающимся уменьшением числа и диапазона инфекционных стимулов, с которыми сталкивается организм "хозяина". Это отсутствие иммунной стимуляции может позволить организму "хозяина" реагировать на непатогенные, но антигенные агенты, приводя к аллергии или аутоиммунитету. Преднамеренное потребление ряда непатогенных иммуномодулирующих бактерий обеспечило бы организм "хозяина" необходимыми и подходящими обучающими стимулами для правильного развития и контроля иммунной функции.

#### Воспаление

Воспаление представляет собой термин, используемый для описания местного накопления жидкости, белков плазмы и лейкоцитов в участке, который имеет сохраняющееся физическое повреждение, инфекцию или где имеет место продолжительный иммунный ответ. Контроль воспалительного ответа осуществляется на нескольких уровнях [11]. Контролирующие факторы включают цитокины, гормоны (например, гидрокортизон), простагландины, реакционноспособные промежуточные соединения и лейкотриены. Цитокины представляют собой низкомолекулярные биологически активные белки, которые участвуют в генерации и контроле иммунологических и воспалительных ответов, в то же время регулируя также развитие, репарацию тканей и гематопоз. Они обеспечивают средства коммуникации между самими лейкоцитами и также с другими типами клеток. Большинство цитокинов являются плеiotропными и экспрессируют множество биологически перекрывающихся активностей. Цитокиновые каскады и сети контролируют воспалительный ответ, а не действие конкретного цитокина на конкретный тип клеток [12]. Ослабление воспалительного ответа приводит к меньшим концентрациям подходящих активирующих сигналов и других воспалительных медиаторов, что приводит к прекращению воспалительного ответа. TNF $\alpha$

представляет собой основной провоспалительный цитокин, так как он инициирует каскад цитокинов и биологических эффектов, приводящих к воспалительному состоянию. Поэтому для лечения воспалительных заболеваний в настоящее время используют агенты, которые ингибируют TNF $\alpha$ , например инфликсимаб.

5 Полагают, что провоспалительные цитокины играют главную роль в патогенезе многих воспалительных заболеваний, включая воспалительное заболевание кишечника (IBD). Современные способы лечения IBD направлены на снижение уровней этих провоспалительных цитокинов, включая IL-8 и TNF $\alpha$ . Такие способы  
10 лечения также могут играть важную роль при лечении системных воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит.

Штаммы по настоящему изобретению могут иметь потенциальное применение в лечении целого ряда воспалительных заболеваний, особенно при использовании в комбинации с другими противовоспалительными способами лечения, такими как  
15 нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) или инфликсимаб.

#### Цитокины и рак

Продукция многофункциональных цитокинов при широком спектре типов  
20 опухолей говорит о том, что значительные воспалительные ответы являются продолжительными у пациентов с раковым заболеванием. В настоящее время не ясно, какой защитный эффект против роста и развития опухолевых клеток *in vivo* имеет этот ответ. Однако эти воспалительные ответы могли бы оказывать вредное воздействие на организм "хозяина", имеющего опухоль. Сложные взаимодействия цитокинов  
25 вовлечены в регуляцию продукции цитокинов и пролиферации клеток в опухолевой и нормальной тканях [13, 14]. Уже давно известно, что потеря массы (кахексия) является одной из самых обычных причин смерти пациентов с раковым заболеванием и исходное нарушение питания указывает на плохой прогноз. Для того чтобы опухоль  
30 росла и распространялась, она должна индуцировать образование новых кровеносных сосудов и разрушать внеклеточный матрикс. Воспалительный ответ, возможно, играет важную роль в механизмах, описанных выше, способствуя, таким образом, ухудшению здоровья хозяина и развитию опухоли. Благодаря  
35 противовоспалительным свойствам *Bifidobacterium longum infantis*, эти бактериальные штаммы могут снижать скорость злокачественной трансформации (малигнизации) клеток. Кроме того, кишечные бактерии могут продуцировать из пищевых соединений вещества с генотоксической, канцерогенной и опухолестимулирующей активностью, и кишечные бактерии могут активировать проканцерогены до ДНК-  
40 реакционноспособных агентов [15]. В общем, виды *Bifidobacterium* имеют низкие активности ксенобиотик-метаболизирующих ферментов по сравнению с другими популяциями в кишечнике, такими как бактероиды, эубактерии и клостридии. Следовательно, увеличение числа бактерий *Bifidobacterium* в кишечнике могло бы полезным образом модифицировать уровни этих ферментов.

#### 45 Доставка вакцины/лекарственного средства

Большинство патогенных организмов поступают через поверхности слизистых оболочек. Эффективная вакцинация этих участков защищает против инвазии  
50 конкретного инфекционного агента. К настоящему времени стратегии пероральной вакцинации концентрировались на применении живых ослабленных патогенных организмов или очищенных инкапсулированных антигенов [16]. Пробиотические бактерии, модифицированные способами генной инженерии для продукции антигенов из инфекционного агента *in vivo*, могут обеспечивать привлекательную альтернативу,

так как считается, что эти бактерии являются безопасными для потребления человеком (статус GRAS (вещества, признанные полностью безвредными)).

Исследования на мышах продемонстрировали, что потребление пробиотических бактерий, экспрессирующих чужеродные антигены, может активировать защитные иммунные ответы. Ген, кодирующий фрагмент С столбнячного токсина (TTFC), экспрессировали в *Lactococcus lactis*, и мышей иммунизировали пероральным путем. Эта система была способна индуцировать титры антител, достаточно высокие для защиты мышей от летального стимула токсином. Кроме презентации антигена, живые бактериальные векторы могут продуцировать биоактивные соединения, такие как иммуностимулирующие цитокины, *in vivo*. *L. lactis*, секретирующий биоактивные человеческие IL-2 или IL-6 и TTFC, индуцировал в 10-15 раз более высокие сывороточные титры IgG у мышей, иммунизированных интраназально [17]. Однако при использовании этого конкретного бактериального штамма общий уровень IgA не увеличивался посредством коэкспрессии с этими цитокинами. Другие бактериальные штаммы, такие как *Streptococcus gordonii*, также проверяли на их пригодность в качестве вакцин слизистых. Рекомбинантный *S. gordonii*, колонизирующий полости рта и влажные места мышей, индуцировал и антительные ответы слизистых, и системные антительные ответы на антигены, экспрессируемые этой бактерией [18]. Таким образом, пероральная иммунизация с использованием пробиотических бактерий в качестве векторов не только защитила бы организм "хозяина" от инфекции, но и могла бы заменить иммунологические стимулы, которые обычно вызывал бы патоген, способствуя, таким образом, иммунологическому обучению организма "хозяина".

#### Пребиотики

Введение пробиотических организмов осуществляется путем проглатывания микроорганизма в подходящем носителе. Было бы полезным предложить среду, которая стимулировала бы рост этих пробиотических штаммов в толстой кишке. Добавление одного или более олигосахаридов, полисахаридов или других пребиотиков стимулирует рост молочнокислых бактерий в желудочно-кишечном тракте. Пребиотиками называют любой нежизнеспособный компонент пищи, который специфически сбраживается в толстой кишке собственными бактериями, которые, как полагают, имеют положительное значение, например бифидобактериями, лактобациллами. Типы пребиотиков могут включать пребиотики, которые содержат фруктозу, ксилитозу, сою, галактозу, глюкозу и маннозу. Комбинированное введение пробиотического штамма с одним или более пребиотическими соединениями может усиливать рост введенного пребиотика *in vivo*, приводя к более явной пользе для здоровья, и называется синбиотическим.

#### Другие активные ингредиенты

Понятно, что пробиотические штаммы можно вводить профилактически или в качестве способа лечения либо сами по себе, либо с другими пробиотическими и/или пребиотическими веществами, как описано выше. Кроме того, данные бактерии можно использовать как часть схемы профилактики или лечения с использованием других активных веществ, таких как вещества, используемые для лечения воспаления или других расстройств, особенно расстройств с участием иммунной системы. Такие комбинации можно вводить в одном препарате или в отдельных препаратах, которые вводят в то же самое или в разное время, и используя те же самые или разные пути введения.

Данное изобретение не ограничивается воплощениями, описанными здесь выше, которые могут отличаться в деталях.

## Пример композиции

## а) пробиотическая композиция

В данной пробиотической композиции пробиотические бактерии представляют собой штамм *Bifidobacterium longum* АН 1205 и перевариваемый носитель представляет собой йогурт.

Содержание *Bifidobacterium longum* АН 1205 в йогурте составляет  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Состав йогурта:

Компонент	Количество (%)
Коровье молоко	75.0
Обезжиренное сухое молоко	3.0
Фруктовый сок	10.0
Жидкий фруктовый сахар	3.0
Гидратированный кристаллический виноградный сахар	4.0
Твердый фруктовый сахар	2.0
Дистиллированная вода	3.0

рН йогурта составляет около 4.

## б) способ получения пробиотической композиции

$5 \times 10^8$  КОЕ/мл бактерий добавляют к свежеприготовленному йогурту.

## Ссылки

1. McCracken V.J. and Gaskins H.R. Probiotics and the immune system. In: Probiotics a critical review, Tannock, GW (ed), Horizon Scientific Press, UK. 1999, p.85-113.

2. Savage D.C. Interaction between the host and its microbes. In: Microbial Ecology of the Gut, dark and Bauchop (eds), Academic Press, London. 1977, p.277-310.

3. Kagnoff M.F. Immunology of the intestinal tract. Gastroenterol. 1993; 105 (5):1275-80.

4. Lamm M.E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol. 1997; 51:311-40.

5. Raychaudhuri S., Rock KL. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. Nat biotechnol., 1998; 16:1025-31.

6. Stallmach A., Strober W, MacDonald TT, Lochs H, Zeitz M. Induction and modulation of gastrointestinal inflammation. Immunol. Today, 1998; 19 (10):438-41.

7. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med 1991 Oct 1; 174(4):915-24.

8. Masco L, Huys G, Gevers D, Verbruggen L, Swings J. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. Syst Appl Microbiol. 2003 Nov; 26(4):557-63. PMID: 14666984.

9. Tagg, JR, Dajani, AS, Wannamaker, LW. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Bacteriol Rev. 1976; 40:722-756.

10. Crabbe PA, H. Bazin, H. Eyssen, and J.F. Heremans. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ free intestinal tract. Into. Arch. Allergy Appl Immunol, 1968; 34:362-75.

11. Henderson B., Poole, S and Wilson M. 1998. In "Bacteria-Cytokine interactions in health and disease. Portland Press, 79-130.

12. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. Annu Rev Biochem 1990; 59:783-836.

13. McGee DW, Bamberg T, Vitkus SJ, McGhee JR. A synergistic relationship between TNF-

alpha, IL-1 beta, and TGF-beta 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. Immunology 1995 Sep; 86(1):6-11.

14. Wu S, Meeker WA, Wiener JR, Berchuck A, Bast RC Jr, Boyer CM. Transfection of ovarian cancer cells with tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) antisense mRNA abolishes the proliferative response to interleukin-1 (IL-1) but not TNF-alpha. Gynecol Oncol 1994 Apr; 53(1):59-63.

15. Rowland I.R. Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson G.R. (ed). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, 1995, pp 155-174.

Boca Raton CRC Press.

16. Walker, R.I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. Vaccine, 1994; 12:387-400.

17. Steidler L, K. Robinson, L. Chamberlain, K.M. Scholfield, E. Remaut, R.W.F. Le Page and J.M. Wells. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of Lactococcus lactis coexpressing antigen and cytokine. Infect, fmmun., 1998; 66:3183-9.

18. Medaglini D., G. Pozzi, T.P. King and V.A. Fischetti. Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium Streptococcus gordonii after oral colonization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995;92:6868-72

McCracken V.J. and Gaskins H.R., 'Probiotics a critical review', Horizon Scientific Press, UK 1999, p.278.

19. Marson, A., Kretschmer, K., Frampton, G.M., Jacobsen, E.S., Polansky, J.K., Maclsaac, K.D., Levine, S.S., Fraenkel, E., von Boehmer, H and Young, R.A. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. Letters to Nature, 2007.

#### Формула изобретения

1. Штамм Bifidobacterium longum NCIMB 41387, который является пробиотическим.

2. Штамм по п.1 в форме жизнеспособных клеток.

3. Штамм по п.1 в форме нежизнеспособных клеток.

4. Штамм по п.1, где штамм действует путем антагонизации и удаления провоспалительных микроорганизмов из желудочно-кишечного тракта.

5. Штамм по п.1 для применения в продуктах питания.

6. Штамм по п.1 для применения в качестве лекарственного средства.

7. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности.

8. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности желудочно-кишечного тракта, такой как воспалительное заболевание кишечника, например болезнь Крона или язвенный колит, синдром раздраженного кишечника; паучит; или постинфекционный колит.

9. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении ракового заболевания желудочно-кишечного тракта.

10. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении системного заболевания, такого как ревматоидный артрит.

11. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении аутоиммунных расстройств, обусловленных нежелательной воспалительной активностью.

12. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении рака, обусловленного нежелательной воспалительной активностью.

13. Штамм по п.1 для применения в профилактике рака.

14. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении диареи, вызванной

нежелательной воспалительной активностью, такой как диарея, ассоциированная с *Clostridium difficile*, диарея, ассоциированная с ротавирусом, или постинфекционная диарея, или диарея, вызванная инфекционным агентом, таким как *E.coli*.

5 15. Штамм по п.1 для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для профилактики и/или лечения нежелательной воспалительной активности.

16. Штамм по п.15 для применения в получении группы биотерапевтических агентов для модификации уровней IL-10 (интерлейкин-10).

10 17. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении аллергии, астмы или респираторных расстройств.

18. Штамм по п.1 для применения в профилактике и/или лечении аллергического воспаления дыхательных путей.

15 19. Штамм по п.1 для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для снижения уровней провоспалительных цитокинов.

20. Пробиотическая композиция, которая содержит штамм *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 по п.1 и добавку.

21. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит пребиотическое вещество.

20 22. Композиция по п.20, дополнительно содержащая проглатываемый носитель.

23. Композиция по п.22, где проглатываемый носитель представляет собой фармацевтически приемлемый носитель, такой как капсула, таблетка или порошок.

25 24. Композиция по п.22, где проглатываемый носитель представляет собой пищевой продукт, такой как сквашенное молоко, йогурт, замороженный йогурт, сухое молоко, молочный концентрат, плавленые сыры, приправы или напитки.

30 25. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит белок и/или пептид, в частности белки и/или пептиды, которые обогащены глутамином/глутаматом, липид, углевод, витамин, минеральный элемент и/или микроэлемент.

26. Композиция по п.20, которая содержит штамм *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 в количестве более чем  $10^6$  КОЕ/г композиции.

27. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит адъювант.

35 28. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит бактериальный компонент.

29. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит лекарственное средство.

30 30. Композиция по п.20, которая дополнительно содержит биологическое соединение.

40 31. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в продуктах питания.

32. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в качестве лекарственного средства.

33. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности.

45 34. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении нежелательной воспалительной активности желудочно-кишечного тракта, такой как воспалительное заболевание кишечника, например болезнь Крона или язвенный колит, синдром раздраженного кишечника; паучит; или постинфекционный колит.

50 35. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении ракового заболевания желудочно-кишечного тракта.

36. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или

лечении системного заболевания, такого как ревматоидный артрит.

37. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении аутоиммунных расстройств, обусловленных нежелательной воспалительной активностью.

5 38. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении рака, обусловленного нежелательной воспалительной активностью.

39. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике рака.

10 40. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в профилактике и/или лечении диареи, вызванной нежелательной воспалительной активностью, такой как диарея, ассоциированная с *Clostridium difficile*, диарея, ассоциированная с ротавирусом, или постинфекционная диарея, или диарея, вызванная инфекционным агентом, таким как *E.coli*.

15 41. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для профилактики и/или лечения нежелательной воспалительной активности.

42. Композиция по п.41 для применения в получении группы биотерапевтических агентов для модификации уровней IL-10.

20 43. Композиция по любому из пп.20-30 для применения в получении противовоспалительных биотерапевтических агентов для снижения уровней провоспалительных цитокинов.

25 44. Применение штамма *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 по п.1 в предупреждении и/или лечении воспалительных расстройств, иммунодефицита, воспалительного заболевания кишечника, синдрома раздраженного кишечника, ракового заболевания (в частности желудочно-кишечной и иммунной систем), диареи, диареи, ассоциированной с антибиотиками, педиатрической диареи, аппендицита, аутоиммунных расстройств, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, 30 ревматоидного артрита, целиакии, сахарного диабета, трансплантации органов, бактериальных инфекций, вирусных инфекций, грибковых инфекций, пародонтоза, заболевания мочеполовой системы, заболевания, передающегося половым путем, ВИЧ-инфекции, репликации ВИЧ, диареи, ассоциированной с ВИЧ, травмы, ассоциированной с хирургическим вмешательством, метастатического заболевания, 35 индуцированного хирургическим вмешательством, сепсиса, потери массы тела, анорексии, контроля лихорадки, кахексии, заживления ран, язв, барьерной функции кишечника, аллергии, астмы, респираторных расстройств, расстройств кровообращения, коронарной болезни сердца, анемии, расстройств системы 40 свертывания крови, почечного заболевания, расстройств центральной нервной системы, заболевания печени, ишемии, расстройств питания, остеопороза, эндокринных расстройств, эпидермальных расстройств, псориаза и/или обыкновенных угрей.

45 45. Применение штамма *Bifidobacterium longum* NCIMB 41387 по п.1 в качестве противоинфекционного пробиотического штамма благодаря его способности противодействовать росту *Salmonella typhimurium*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* и *Clostridium difficile*.

50

**БУДАПЕШТСКИЙ ДОГОВОР О МЕЖДУНАРОДНОМ  
ПРИЗНАНИИ ДЕПОНИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ  
ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ПАТЕНТНОЙ ПРОЦЕДУРЫ**

Alimentary Health Ltd  
5<sup>th</sup> Floor, Biosciences Building  
University College Cork  
College Road  
Cork  
Ireland

МЕЖДУНАРОДНЫЙ БЛАНК

РАСПИСКА В ПОЛУЧЕНИИ В СЛУЧАЕ  
ПЕРВОНАЧАЛЬНОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ,  
выданная согласно Правилу 7.1  
МЕЖДУНАРОДНЫМ ОРГАНОМ  
ПО ДЕПОНИРОВАНИЮ,  
идентифицированным внизу этой страницы

**ИМЯ И АДРЕС  
ДЕПОЗИТОРА**

<b>I. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМА</b>	
Опознавательная ссылка, присвоенная ДЕПОЗИТОРОМ: ОРГАНОМ: <i>Bifidobacterium longum</i> АН 1205	Регистрационный номер, присвоенный МЕЖДУНАРОДНЫМ ОРГАНОМ ПО ДЕПОНИРОВАНИЮ:  NCIMB 41387
<b>II. НАУЧНОЕ ОПИСАНИЕ И/ИЛИ ПРЕДЛАГАЕМОЕ ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ</b>	
Микроорганизм, идентифицированный в I выше, сопровождался: <input type="checkbox"/> научным описанием <input checked="" type="checkbox"/> предлагаемым таксономическим определением (Отметить крестиком, когда это применимо).	
<b>III. РАСПИСКА В ПОЛУЧЕНИИ И ПРИНЯТИЕ</b>	
Данный Международный орган по депонированию принимает микроорганизм, идентифицированный в I выше, который был получен им <b>11 мая 2006</b> (Дата первоначального депонирования) <sup>1</sup> .	
<b>IV. РАСПИСКА В ПОЛУЧЕНИИ ЗАЯВЛЕНИЯ О ПРЕОБРАЗОВАНИИ</b>	
Микроорганизм, идентифицированный в I выше, был получен данным Международным органом по депонированию (дата первоначального депонирования), и заявление о преобразовании первоначального депонирования в депонирование согласно Будапештскому Договору было получено им (дата расписки в получении заявления о преобразовании).	
<b>V. МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГАН ПО ДЕПОНИРОВАНИЮ</b>	
Название: NCIMB Ltd.,  Адрес: Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland., UK	Подпись(и) лиц(а), имеющих полномочия представлять Международный орган по депонированию, или уполномоченного(ых) лиц(а):  Дата: 27 мая 2006

<sup>1</sup> Когда применяется Правило 6.4(d), такой датой является дата, на которую был приобретен статус Международного органа по депонированию.

Бланк ВР/4 (единственная страница)

**БУДАПЕШТСКИЙ ДОГОВОР О МЕЖДУНАРОДНОМ  
ПРИЗНАНИИ ДЕПОНИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ  
ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ПАТЕНТНОЙ ПРОЦЕДУРЫ**

Alimentary Health Ltd  
5<sup>th</sup> Floor, Biosciences Building  
University College Cork  
College Road  
Cork  
Ireland

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ БЛАНК**

**СВИДЕТЕЛЬСТВО О ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ,**  
выданное согласно Правилу 10.2  
**МЕЖДУНАРОДНЫМ ОРГАНОМ ПО  
ДЕПОНИРОВАНИЮ,**  
идентифицированным на следующей странице

**ИМЯ И АДРЕС СТОРОНЫ,  
КОТОРОЙ ВЫДАНО СВИДЕТЕЛЬСТВО  
О ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ**

<b>I. ДЕПОЗИТОР</b>	<b>II. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМА</b>
Имя:  <b>КАК УКАЗАНО ВЫШЕ</b>	Регистрационный номер, присвоенный <b>МЕЖДУНАРОДНЫМ ОРГАНОМ ПО ДЕПОНИРОВАНИЮ:</b>
Адрес:	NCIMB 41387 Дата депонирования или передачи <sup>1</sup> :  11 мая 2006
<b>III. СВИДЕТЕЛЬСТВО О ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ</b>	
Жизнеспособность микроорганизма, идентифицированного в II выше, была проверена 11 мая 2006 <sup>2</sup> . На данную дату указанный микроорганизм был:	
<input checked="" type="checkbox"/> жизнеспособным <sup>3</sup> <input type="checkbox"/> больше не жизнеспособным	

- <sup>1</sup> Указать дату первоначального депонирования или, в случае повторного депонирования или передачи, последнюю из соответствующих дат (дату повторного депонирования или дату передачи).  
<sup>2</sup> В случаях применения Правил 10.2(a)(ii) и (iii) сослаться на последнюю проверку жизнеспособности.  
<sup>3</sup> Отметить крестиком подходящий бокс.

Бланк ВР/9 (первая страница)

<b>IV. УСЛОВИЯ, В КОТОРЫХ ОСУЩЕСТВЛЯЛАСЬ ПРОВЕРКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ<sup>4</sup></b>	
<b>V. МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОРГАН ПО ДЕПОНИРОВАНИЮ</b>	
Название: NCIMB Ltd.,  Адрес: Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA Scotland., UK	Подпись(и) лиц(а), имеющих полномочия представлять Международный орган по депонированию, или уполномоченного(ых) лиц(а):   Дата: 27 мая 2006

<sup>4</sup> Заполнить, если эта информация была запрошена, и если результаты проверки оказались отрицательными.

## УТОЧНЕННЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Элиментари Хелт Лимитед  
<120> Пробиотические штаммы Bifidobacterium  
<130> P-RU62063P  
<140> 2009136394  
<141> 2008-03-28  
<150> US 60/907,312  
<151> 2007-03-28  
<160> 5  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 494  
<212> ДНК  
<213> Bifidobacterium longum  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7)..(7)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(11)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (13)..(13)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (48)..(48)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (50)..(50)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (139)..(139)  
<223> n представляет собой a, c, g или t  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (144)..(144)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (170)..(170)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (176)..(176)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (185)..(185)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (189)..(189)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (193)..(193)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (203)..(203)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (211)..(211)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (237)..(237)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (259)..(259)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (263)..(263)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (275)..(275)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (289)..(289)  
<223> n представляет собой а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (294)..(294)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (309)..(309)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (329)..(329)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (339)..(339)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (351)..(351)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (369)..(369)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (373)..(373)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (386)..(386)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (394)..(394)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (405)..(405)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (417)..(417)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (427)..(427)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (442)..(442)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (452)..(452)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (456)..(456)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (460)..(460)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (463)..(463)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (465)..(465)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (470)..(470)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (485)..(485)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (487)..(487)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (489)..(491)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (493)..(493)  
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 1  
 gcctagnctt ncnngncasac gtcaccasac ggtgtcgcac ggcscgntn ggcacccctc 60  
 ctagsaaatt cscaggacga caaatcatca cactaaaatg atcacaanaac gatcgaacaa 120  
 aacactaaaa atagagttn gattngaaatt aacagcaaga acgaggaatn aaaggnaacc 180  
 ccgtnttgnt tngtccact atncagtttt naagccacca cgcaccacca cgcggtncgg 240  
 acgggaccag cscgcatna ggnacgatgg gcatngaate cgcscaggnc aaancctggg 300  
 gtggcgatnc gggagcccaa aagcgcacnc acaccactnc cgcggaacat nccacgacgg 360

acgcaccgna agnccatgat tttttncaca ccancagccc caagncgccc cgactgncgc 420  
gacgccnggg ctgcaccgc cngacgaaca tncggncgtn ttntncgtan aaaggagggtt 480  
cccancnann ncng 494

<210> 2  
<211> 479  
<212> ДНК  
<213> Bifidobacterium longum

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (3)..(3)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (5)..(5)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(15)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (43)..(43)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (108)..(108)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (134)..(134)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (147)..(147)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (164)..(164)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (232)..(232)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (281)..(281)  
<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (337)..(337)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (344)..(344)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (361)..(361)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (375)..(375)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (378)..(378)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (400)..(400)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (404)..(404)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (407)..(407)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (413)..(414)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (419)..(419)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (422)..(422)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (427)..(427)  
<223> n представляет собой a, c, g или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (430)..(431)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (433)..(434)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (449)..(449)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (454)..(454)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (456)..(456)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (459)..(459)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<220>

<221> misc\_feature

<222> (473)..(473)

<223> n представляет собой а, с, г или т

<400> 2

aananaaacg ccgcngttct ccgcgggtgcg tgccccgtcg tcncggcagt cgcggcggcc 60

tggggctgct ggtgtggaag agatcatggg ctttcgggtgc gtccgtontg ggatgttccg 120

cgggagtggt gtgnatgcgc ttttggnote ccggatcgcc accncaggct ttggcctggc 180

gcgattcgat gcccatcggt cctgatggcg ggctgggtccc gtccggacgg cntggtggtg 240

cgtggtggct tgagaactgg atagtggacg cgagcaagac ngggtttctt ttgattcctc 300

ttcttgctgt tgatttcgaa tcgaacteta tttttantgt ttgnttccat cgttttgtga 360

ncattttaat gtgangantt gtcctctggg aatttgctan gaangancct tgnngccang 420

cncacntgn ngnnctgtt gcctgcaang gcgnangng gaagcccttg canccagaa 479

<210> 3

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> праймер

<400> 3

gctggatcac ctcccttc

18

<210> 4

<211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер

<400> 4  
 ctgggtgcca ggcattcca

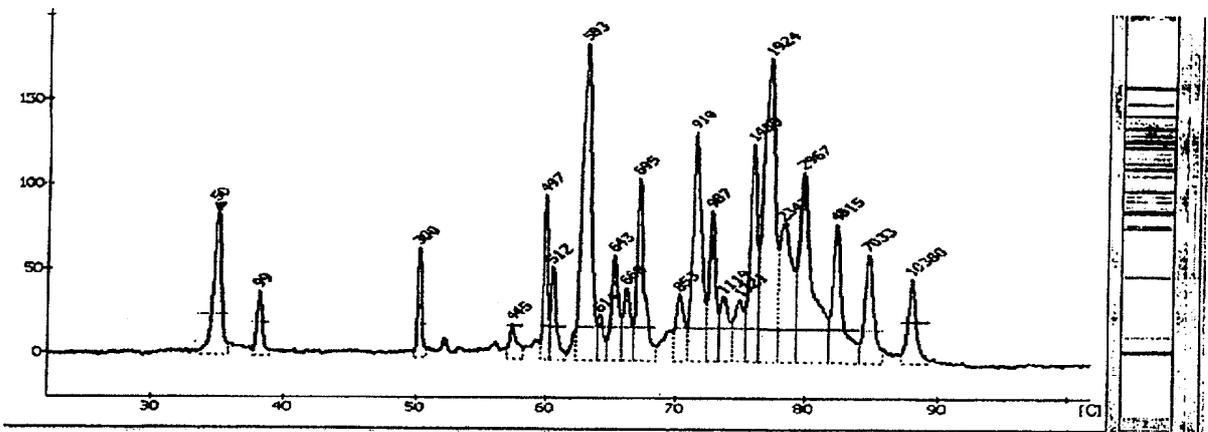
18

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

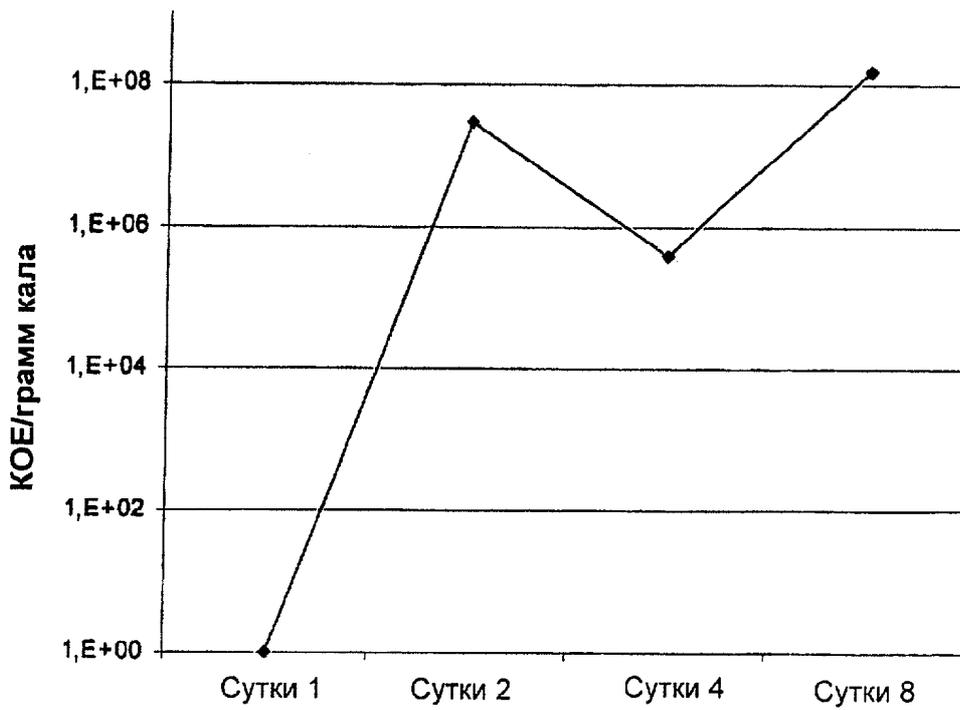
<220>  
 <223> праймер

<400> 5  
 ctaccggsaac gscagcgtga cg

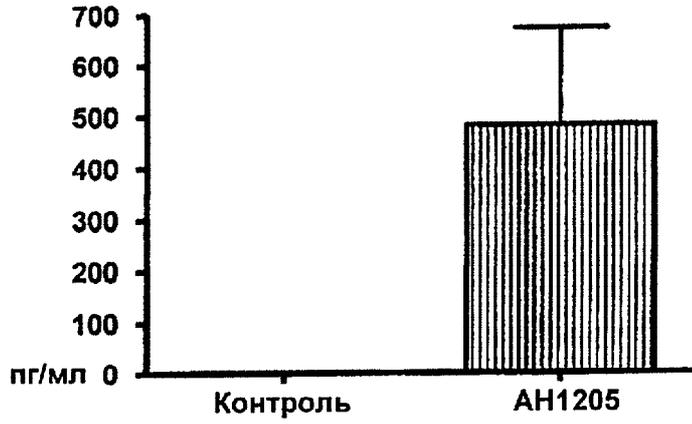
22



Фиг. 1



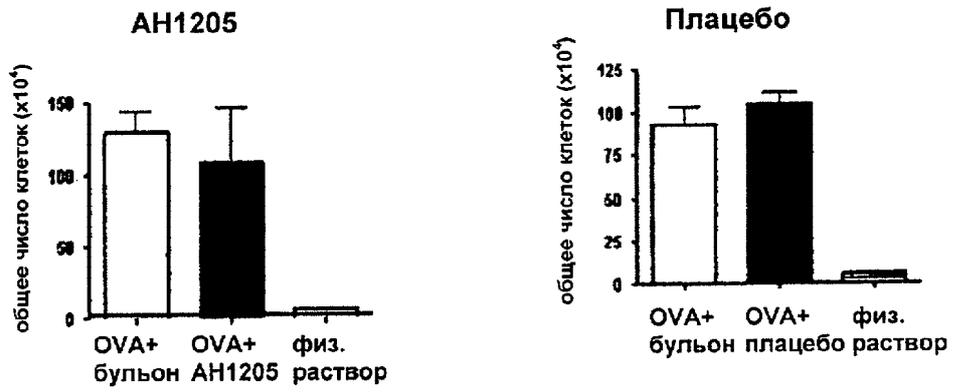
Фиг. 2



Фиг. 3

А

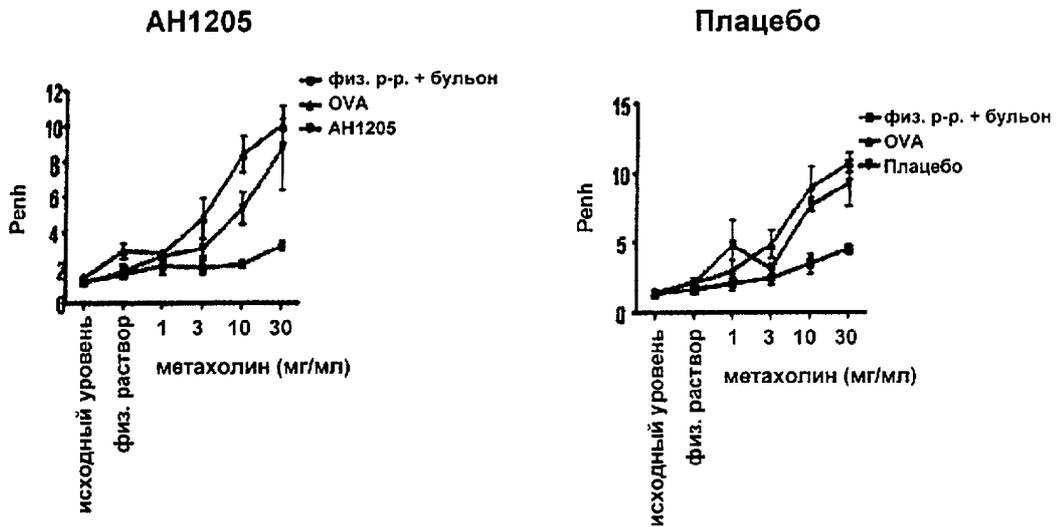
Б



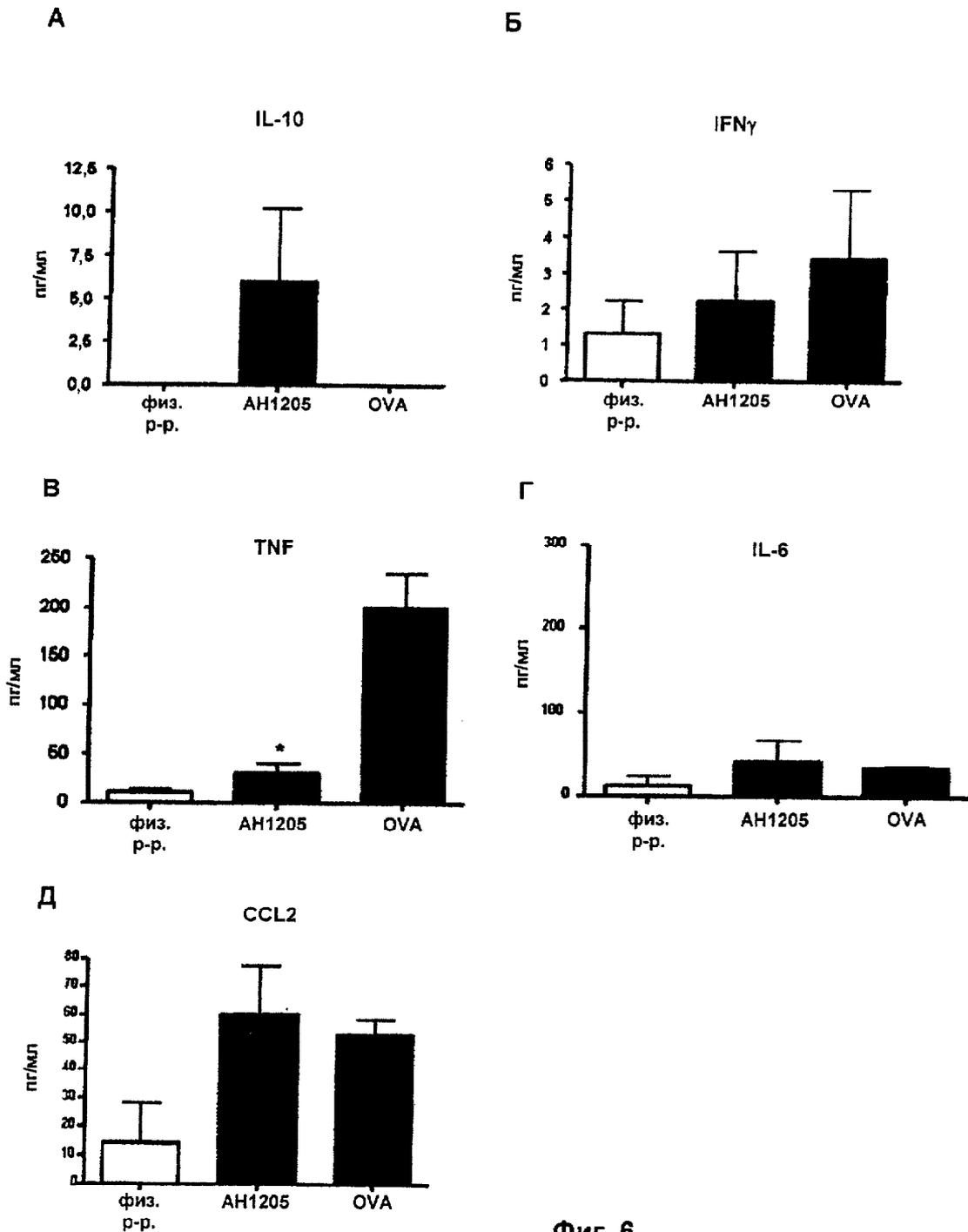
Фиг. 4

А

Б

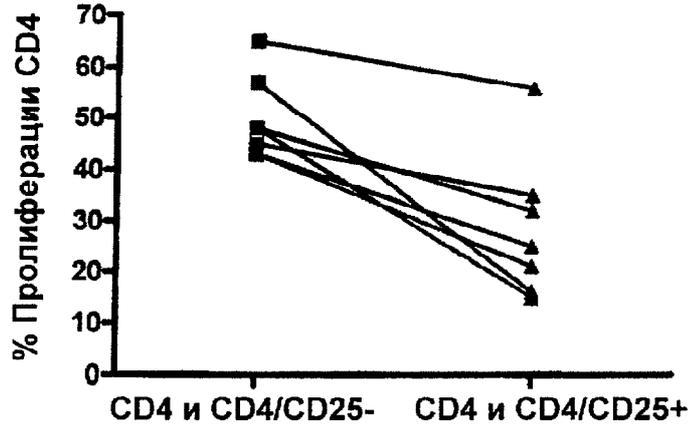


Фиг. 5

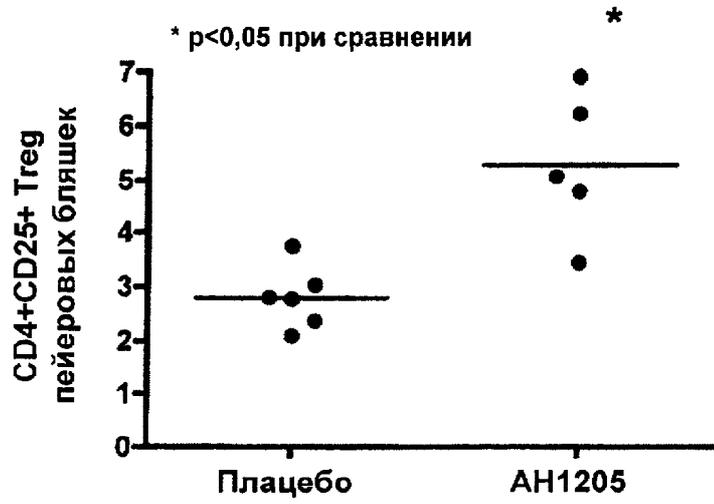


Фиг. 6

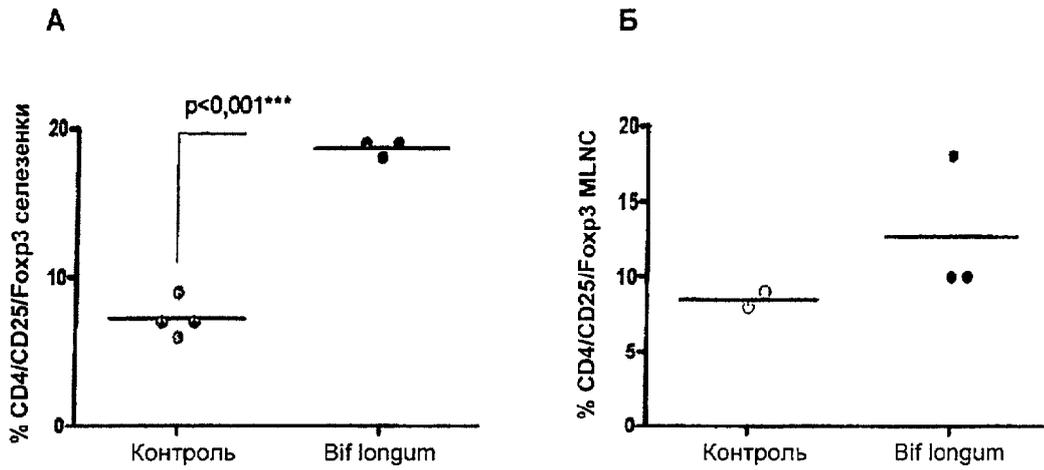
Bif AH1205



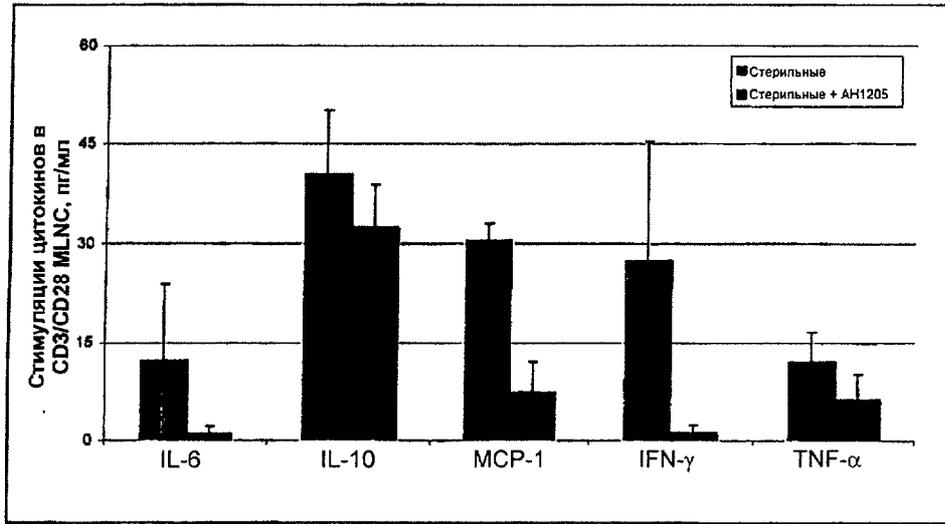
Фиг. 7



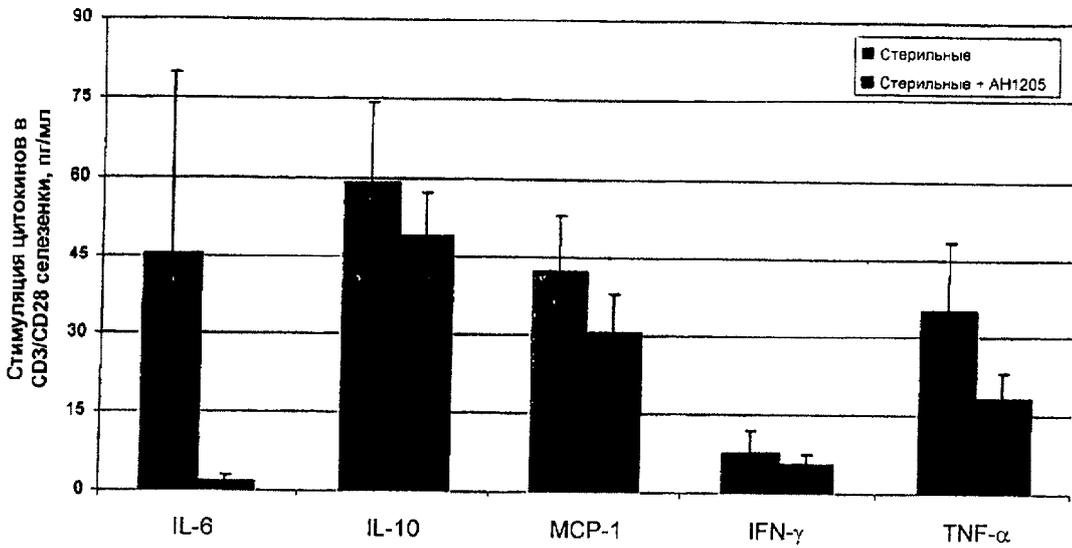
Фиг. 8



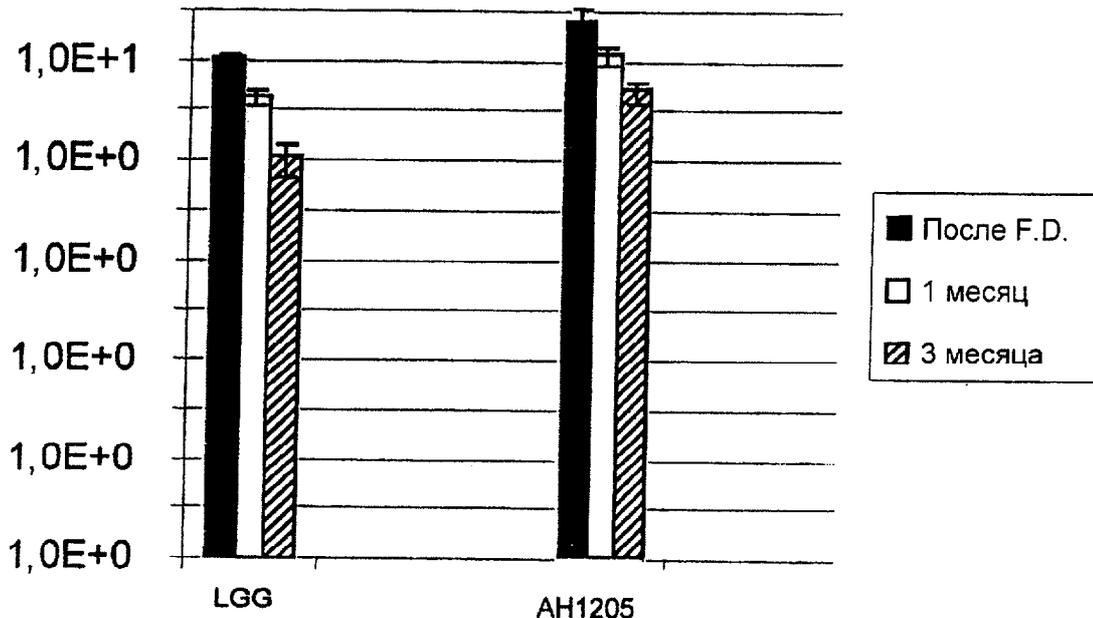
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12