



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/20 (2019.05); A61K 35/74 (2019.05); A23C 9/127 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2018147697, 28.12.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
28.12.2018Дата регистрации:  
26.10.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.12.2018

(43) Дата публикации заявки: 29.06.2020 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 26.10.2020 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова,  
12, ФГБНУ "ИЭМ", Патентно-аналитическая  
группа, Сысуеву В.М.

(72) Автор(ы):

Суворов Александр Николаевич (RU),  
Ермоленко Елена Игоревна (RU),  
Котылева Мария Петровна (RU),  
Цапиева Анна Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение "Институт  
экспериментальной медицины" (ФГБНУ  
"ИЭМ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 2139070 C1, 10.10.1999. RU  
2546253 C2, 10.04.2015. RU 2505304 C2,  
27.01.2014. RU 2553372 C1, 10.06.2015. RU  
2460778 C1, 10.09.2012. RU 2580002 C1,  
10.04.2016.

(54) Способ приготовления аутопробиотика на основе анаэробного консорциума бактерий

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения аутопробиотического продукта нового поколения. Способ получения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума индигенных бактерий предусматривает приготовление экстракта фекалий путем их ресуспендирования в фосфатном буфере. Отделяют надосадочную жидкость центрифугированием с последующим смешиванием надосадочной жидкости с физиологическим раствором и фильтрацией. Вносят полученный фильтрат в питательную среду, содержащую дрожжевой экстракт, натрия хлорид, глюкозы моногидрат, тиогликолевую

кислоту, панкреатический гидролизат казеина, L-цистеин, агар гранулированный, желатин и дистиллированную воду в заданных количествах, в которую затем вносят суспензию фекалий в физиологическом растворе, содержащем витамин К и глюкозу, с последующим культивированием в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 3-6 суток, центрифугируют, ресуспендируют осадок в стабилизирующем растворе, содержащем 10% сахарозы и 1% желатина, с получением целевого продукта. Изобретение позволяет расширить ассортимент аутопробиотиков. 18 ил., 1 табл., 7 пр.

RU 2 734 896 C2

RU 2 734 896 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2015.01)  
*A23C 9/127* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 1/20 (2019.05); A61K 35/74 (2019.05); A23C 9/127 (2019.05)*(21)(22) Application: **2018147697, 28.12.2018**(24) Effective date for property rights:  
**28.12.2018**Registration date:  
**26.10.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **28.12.2018**(43) Application published: **29.06.2020 Bull. № 19**(45) Date of publication: **26.10.2020 Bull. № 30**

Mail address:

**197376, Sankt-Peterburg, ul. Akad. Pavlova, 12,  
FGBNU "IEM", Patentno-analiticheskaya gruppa,  
Sysuevu V.M.**

(72) Inventor(s):

**Suvorov Aleksandr Nikolaevich (RU),  
Ermolenko Elena Igorevna (RU),  
Kotyleva Mariya Petrovna (RU),  
Tsapieva Anna Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
nauchnoe uchrezhdenie "Institut  
eksperimentalnoj meditsiny" (FGBNU "IEM")  
(RU)**

(54) **METHOD FOR PREPARING AN AUTOPROBIOTIC BASED ON AN ANAEROBIC CONSORTIUM OF BACTERIA**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to producing an autoprobiotic product of a new generation. Method for producing an autoprobiotic agent based on an anaerobic consortium of indigenous bacteria involves preparation of a faecal extract by resuspending in a phosphate buffer. Supernatant is separated by centrifugation, followed by mixing the supernatant with physiological saline and filtration. One introduces the obtained filtrate into a nutrient medium containing a yeast extract, sodium chloride, glucose monohydrate, thioglycolic acid, casein pancreatic hydrolyzate, L-cysteine, granular

agar, gelatine and distilled water in given amounts, into which a faecal suspension is then added in a physiological solution containing vitamin K and glucose, followed by cultivation under anaerobic conditions at temperature of 37 °C for 3–6 days, centrifuged, resuspended residue in stabilizing solution containing 10 % sucrose and 1 % gelatine, to produce desired product.

EFFECT: invention allows to expand the range of autoprobiotics.

1 cl, 18 dwg, 1 tbl, 7 ex

**C 2**  
**9 6 8 4 2 7 3**  
**R U**

**R U**  
**2 7 3 4 8 9 6**  
**C 2**

Изобретение относится к области микробиологии и биотехнологии, и может быть использовано для лечения больных с нарушением микробного баланса путем персональной коррекции дисбиотических нарушений и восстановления исходного состояния микробиоты, возникших вследствие антибиотико- и химиотерапии, или других негативных воздействий.

Микробиота человека представляет собой систему, состоящую из множества микробиоценозов, характеризующихся определенным составом и занимающих соответствующие биотопы в организме человека. Ведущими микробиоценозами являются кишечник, урогенитальный тракт, ротовая полость и кожа. Микробиота играет важную роль в обеспечении защиты от инфекций и стимуляции иммунных функций макроорганизма. Кишечная микробиота выполняет множество функций, на которые не способен макроорганизм - синтезирует витамины групп В и К, участвует в регуляции липидного и азотистого обменов, в регуляции моторики кишечника.

Микробный дисбаланс может приводить к заболеваниям, связанным с нарушениями работы иммунной системы, а также создает условия, которые способствуют возникновению гастрита и язвенной болезни желудка, нарушению обмена веществ и злокачественных опухолей толстой кишки.

Исследования последних лет доказывают, что нет однозначного понятия нормы микробиоты. Между различными участками тела одного человека и между различными людьми на протяжении месяцев, недель и даже дней наблюдаются стабильные отличия состава микробиоты. Однако, как доказывает в своих работах J.G. Caporaso, некоторая группа микроорганизмов из общего микробного сообщества на каждом участке наблюдения в течение всего времени наблюдения остается неизменной и является индивидуальной [Caporaso J.G., Lauber C.L., Costello E.K. et al. Moving pictures of the human microbiome. // *Genome Biology*. - 2011; 12(R50)]. Отсюда следует, что микробиота не является универсальной и требует индивидуального подхода при лечении состояний, связанных с ее нарушением.

На микробиоту организма влияет множество факторов, среди них - различные заболевания, антибиотики, стрессы, нарушения режима питания, - все это приводит к развитию дисбиоза. Учитывая роль, которую выполняет микробиота в функционировании макроорганизма, очевидно, что поддержание и восстановление микробного баланса, а также профилактика дисбиоза являются важной задачей для современного медицинского и научного сообщества.

Для восстановления и поддержания свойственной для каждого конкретного индивидуума микробиоты является актуальным применение пробиотиков, основу которых составляют определенные виды непатогенных для человека бактерий и их комбинации.

Традиционным подходом к терапии дисбиоза является назначение больным препаратов на основе монокультур пробиотиков, однако в ряде случаев доказана большая эффективность поликомпонентных пробиотиков по сравнению с монокомпонентными пробиотиками [Koning C.J., Jonkers D.M., Stobberingh E.E., et al. The effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxicillin. // *Am J Gastroenterol* 2008; 103 (1): 178-189; Chapman C.M.C., Gibson G.R., Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? // *European journal of nutrition*. - 2011; 50(1): 1-17.].

Консорциумы бактерий, получаемые путем совместного культивирования двух и более штаммов, признаны более эффективными в сравнении со смесью пробиотических бактерий ввиду отсутствия антагонистических взаимоотношений у симбионтов.

- В многочисленных рандомизированных исследованиях показано, что пробиотики эффективны при коррекции дисбиоза [Sazawal S. Hiremath G. et al. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials [Article] // The Lancet infectious diseases. - 2006. - Vol. 6(6). - pp. 374-382; Varughese C.A. Vakil N.H., Phillips K.M. Antibiotic-associated diarrhea: a refresher on causes and possible prevention with probiotics - continuing education article [Article] // Journal of pharmacy practice. - 2013. - Vol. 26(5). - pp. 476-482]. Однако в ряде случаев они не приводят к стабилизации состава микробиоценоза, более того, могут вызывать развитие дисбиоза, нарушение моторики кишечника и даже инфекционной патологии [ *Suárez-García* I., et al.
- <sup>10</sup> *Lactobacillus jensenii* bacteremia and endocarditis after dilatation and curettage: case report and literature review.// Infection. - 2012; 40(2): 219-222; Wu, R.Y., Pasyk, M. et al. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for *Lactobacillus reuteri* and *rhamnosus* strains // Neurogastroenterology & Motility - 2013, 25, №3: 205-214; Wu W. C, Zhao W., Li, S. Small intestinal bacteria overgrowth decreases small intestinal motility in the NASH rats // World journal of gastroenterology. - 2008, 14, №2:313. - 317].

Широко применяемые биотехнологические штаммы пробиотиков являются чужеродными для организма определенного человека и могут быть отторгнуты вследствие биологической несовместимости. Известно, что пробиотические штаммы бактерий, к которым организм не проявляет иммунологической толерантности, должны <sup>20</sup> вводиться длительными курсами, так как быстро элиминируются [Ермоленко Е.И. Молочнокислые бактерии. - Lambert academic Publishing, Deutschland Lambert; 2011. - 283 с; Wu, W. C., Zhao, W., Li, S. Small intestinal bacteria overgrowth decreases small intestinal motility in the NASH rats. // World journal of gastroenterology. - 2008, 14, №2:313. - 317].

При лечении тяжелых псевдомембранозных колитов, болезни Паркинсона, <sup>25</sup> рассеянного склероза результатов удалось добиться, применяя фекальную (микробную) трансплантацию [Chanyi R., Craven L. et al. Faecal microbiota transplantation: Where did it start? What have studies taught us? Where is it going? // SAGE Open Medicine Volume 5: 1-6; Rao K., Safdar N. Fecal microbiota transplantation for the treatment of *Clostridium difficile* infection. // Journal of hospital medicine. - 2016; 11(1):56-61]. В то же время, отсроченные <sup>30</sup> эффекты данного подхода невозможно спрогнозировать, не говоря о малоприятной процедуре введения препарата фекалий в организм и опасности инфицирования.

Применение индигенных бактерий (аутопробиотиков) - один из перспективных путей преодоления перечисленных проблем [Suvorov A, Karaseva A. et al. Autoprobiotics as an Approach for Restoration of Personalised Microbiota. // Front Microbiol. 2018; 9:1869; Соловьева <sup>35</sup> О.И., Симаненков В.И. и др. Аутопробиотический *Enterococcus faecium* в лечении синдрома раздраженной кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Прил. №40. Материалы 18-й гастроэнтерологической недели. - 2012. - Том. 22. - №5. - стр. 166; Чичерин И.Ю., Погорельский И.П. и др. Аутопробиотикотерапия // Журнал инфектологии. - 2013; Т. 5, №4: С. 43-54.].

<sup>40</sup> Доказана клиническая эффективность применения индигенных (аутопробиотических) энтерококков и лактобацилл для коррекции дисбиоза и лечения ряда желудочно-кишечных заболеваний [Симаненков В.И., Суворов А.Н. и др. Способ профилактики постинфекционного синдрома раздраженной кишки. Патент РФ №2553372, 27.01.2014; Симаненков В.И., Суворов А.Н. и др. Способ получения персонифицированного <sup>45</sup> аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого продукта. Патент РФ №2546253, 25.04.2013; Суворов А.Н., Симаненков В.И. и др. Способ получения аутопробиотика на основе *Enterococcus faecium*, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина. Патент РФ

№2460778, 10.09.2012; Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы // Патент РФ 2139070, 10.11.1999; Малкоч А.В., Бельмер С.В., Ардатская М.Д. Функциональные нарушения моторики желудочно-кишечного тракта и кишечная микрофлора // Педиатрическая фармакология. - 2009, Т. 6., №. 5:70-75].

Однако выделение истинных аутопробиотических штаммов является трудоемким процессом, вследствие чего, вероятность выделить более одного индигенного штамма, пригодного для применения в качестве аутопробиотика невысока. Особенно сложно получить смесь аутопробиотических штаммов, выращенных на различных питательных средах, более того, их объединение является в достаточной степени случайным.

Предлагаемый способ приготовления персонафицированного пробиотика нового поколения на основе анаэробного консорциума бактерий (аутопробиотика) принципиально отличается от традиционных пробиотиков тем, что является уникальным для каждого отдельного индивидуума.

Известен способ получения аутопробиотика на основе штаммов *Enterococcus faecium* [Патент РФ №2460778, дата подачи 10.09.2012], согласно которому производят забор пробы индигенной микрофлоры кишечника хозяина, осуществляют посев бактерий из фекалий пациента на селективную питательную среду, на которой выращивают культуру *E. faecium*, затем производят идентификацию и отбор типичных для этого вида микроорганизмов колоний, получают чистую культуру, уточняют видовую принадлежность и содержание факторов патогенности методом полимеразной цепной реакции и после отбора апатогенных клонов *E. faecium*, соответствующих стандартам генетической безопасности и физиологической функциональности, готовят из них молочнокислую закваску.

Однако недостатком данного способа является создание продукта на основе единственного штамма индигенной бактерии.

Известен способ получения консорциума бактерий для молочной промышленности [Патент РФ №2491332, дата подачи 27.08.2013], предусматривающий совместное поэтапное культивирование в питательной среде входящих в него пяти штаммов бифидобактерий, согласно которому проводят посев каждого из штаммов в ферментер по 2% к объему питательной среды с учетом длительности экспоненциальной фазы роста каждого из них. Недостатком данного способа является отсутствие в консорциуме бактерий различных родов. Кроме того, штаммы, составляющие консорциум, не являются индигенными и могут быть причиной осложнений.

Наиболее близким по техническому результату к заявляемому является способ получения аутопробиотика на основе разбавленного кишечного содержимого пациентов, обогащенного лакто- и бифидобактериями [Патент РФ №2139070, дата подачи 10.11.1999]. Однако данный способ имеет следующий недостаток - неконтролируемый конечный состав аутопробиотического комплекса, включающего различный набор бактериальных штаммов, отсутствие бактериологического и генетического контроля качества конечного продукта, отсутствие возможности повторного получения препарата на основании исходного материала.

Способ получения анаэробного консорциума бактерий заключается в том, что в течение 3-6 суток осуществляют культивирование индивидуальной биомассы фекалий в анаэробных условиях в жидкой питательной среде, содержащей тиогликолевую кислоту, дрожжевой экстракт, хлорид натрия, моногидрат глюкозы, панкреатический гидролизат казеина, L-цистеин, агар и желатин, растворенные в воде, добавляют витамин К (менадиона натрия бисульфит, или викасол), глюкозу и предварительно

приготовленный из этих же фекалий стерильный экстракт. Состав питательной среды приведен в таблице 1.

Для приготовления физиологического раствора с селективными добавками для растворения фекалий в асептических условиях к 0,9% раствору хлорида натрия добавляют менадион натрия бисульфит до конечной концентрации 0,05% и глюкозу до конечной концентрации 1%.

**Таблица 1. Состав питательной среды для культивирования пробы фекалий для получения анаэробного консорциума**

Наименование компонента	Количество
Дрожжевой экстракт	4,5 - 5,5 г
Натрия хлорид	2,0 - 3,0 г
Глюкозы моногидрат	2,5 - 7,5 г
Панкреатический гидролизат казеина	10,0 - 18,0 г
Кислота тиогликолевая	0,2 - 0,3 г
L-цистин	0,4 - 0,5 г
Раствор свежеприготовленного резазурина натрия (1:1000)	0,9 - 1,1 мл
Агар гранулированный (влажность не более 15 %)	0,6 - 0,8 г
Желатин	0,3 - 0,7 г
Вода дистиллированная	1 л

Для приготовления персонального аутопробиотика на основе анаэробного консорциума бактерий 20-30 мг фекалий растворяют в 0,2 мл физиологического раствора с селективными добавками, тщательно ресуспендируют и вносят в 15 мл специально подготовленной питательной среды с селективными добавками, затем культивируют в термостате при 37°C в течение 6 суток. Далее, биомассу бактерий анаэробного консорциума центрифугируют при 3500 об/мин, сливают надосажок, а биомассу ресуспендируют в стабилизирующем буфере (раствор стерильного фильтрата, добавляют витамин К и глюкозу до конечной концентрации 0,02-0,07% и 0,5-2%, соответственно).

Для приготовления персонального аутопробиотика на основе анаэробного консорциума бактерий 20-30 мг фекалий растворяют в 0,2-0,5 мл физиологического раствора, тщательно ресуспендируют и вносят в 10-12 мл специально подготовленной питательной среды с добавлением витамина К, глюкозы и полученного заранее стерильного экстракта фекалий, затем культивируют в термостате при 37°C в течение 3-6 суток. Далее, биомассу бактерий анаэробного консорциума центрифугируют при 3500 об/мин, сливают надосажок, а осадок ресуспендируют в стабилизирующем растворе (раствор 10% сахарозы и 1% желатина, рН 5,5) и готовый аутопробиотик хранят при

температуре -40 - -80°C до использования не более 5 дней.

Для контроля качества и безопасности анаэробного консорциума полученную в результате анаэробного культивирования биомассу высевают на селективные и диагностические среды - МРС, Эндо, азидную, хромогенную и маннитол-солевую среды для определения наличия и количества таких бактерий как: *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* Засеянные среды культивируют в термостате при 37°C в течение 24-48 ч.

Одновременно из биомассы бактерий выделяют ДНК и направляют на исследование при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для установления финального состава полученного аутопробиотического комплекса. Если по результатам генетического анализа и бактериологического посева, патогенные бактерии отсутствуют, а количество бифидобактерий и лактобацилл находится в пределах 7 и более Ig КОЕ/мл, готовый аутопробиотик используют для коррекции дисбиоза у пациента.

Разработанный способ приготовления аутопробиотика на основе анаэробного консорциума бактерий был исследован в лабораторных условиях на базе ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины».

Пример 1. Изучение видового состава аутопробиотика на основе анаэробного консорциума бактерий

Видовой состав аутопробиотика анализировали бактериологически, при помощи ПЦР-РВ и метагеномного анализа 16SpPHK. Представленные диаграммы (фиг. 1 - 3) иллюстрируют микробный состав консорциума при культивировании с добавлением фекального экстракта и без такового, определенный при помощи ПЦР-РВ. Добавление стерильного фекального экстракта проводили непосредственно перед посевом индивидуальной биомассы размороженных фекалий. Для этого 1 г фекалий ресуспендировали в 1 мл фосфатного буферного раствора с рН 7,4. Затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин. Далее 0,5 мл надосадочной жидкости смешивали с 2,5 мл физиологического раствора и фильтровали через фильтр с размером пор 45 мкм. Затем, в предварительно прогретую до 60°C и затем охлажденную до 37°C пробирку с питательной средой (V=10 мл) вносили 1,2 мл стерильного фильтрата (10% от общего объема). Затем в питательную среду с фекальным фильтратом вносили суспензию фекалий, культивировали и получали аутопробиотик, как описано выше. Контроль полученной биомассы анаэробного консорциума с фильтратом и без фильтрата производили с помощью ПЦР-РВ.

Как показано на фиг. 1, добавление фекального экстракта не во всех случаях приводит к увеличению общего количества бактерий, например, у крысы №60 общее микробное число уменьшалось. Также по-разному влияло добавление фекального экстракта на популяцию лактобацилл (фиг. 2). При добавлении фекального экстракта выявлена тенденция к уменьшению *Bacteroides fragilis* (фиг. 3).

Следовательно, для получения анаэробного консорциума можно использовать любой из вариантов культивирования фекального образца. Однако состав анаэробного консорциума при использовании экстракта будет изменен в лучшую сторону благодаря уменьшению количества *B. fragilis*, не являющегося полезным и облигатным представителем микробиоценоза кишечника фекалий.

Принципиально важным оказалось увеличение количества полезных бутиратпродуцирующих фекалибактерий на фоне снижения *B. fragilis*, являющегося

условно-патогенным микроорганизмом. Обращало на себя внимание увеличение популяции энтеробактерий (эшерихий и энтеробактера) больше стандартных значений в 10-100 раз. Однако в варианте культивирования в течение 6 суток, особенно фекального без экстракта, жизнеспособные энтеробактерии не выявлялись. Исключение составлял энтеробактер. Таким образом, вариант 6-дневного (и более) культивирования проб на специально разработанной питательной среде с селективными добавками является наиболее эффективным.

Пример 2. Метагеномный анализ состава консорциума, полученного при различных условиях культивирования.

Исследовано представительство отдельных таксонов в составе анаэробного консорциума, полученного путем культивирования в питательной среде без фекального экстракта в течение 3 часов (con), 6 часов (con\_minus) и с его добавлением в питательную среду (con\_plus). На рисунках 5-7 представлены данные, полученные путем 16SpPHK метагеномного анализа состава консорциума, полученного при различных условиях культивирования нескольких фекальных образцов, взятых от здоровых крыс Вистар. Показано представительство таксонов в составе анаэробных консорциумов на уровне филумов (фиг. 5), семейств (фиг. 6) и родов (фиг. 7). Видно, что преобладают бактерии рода *Lactobacillus* spp.

Пример 3. Сравнение образцов микробиоты кишечника крыс с анаэробными консорциумами.

В этом эксперименте приведено сравнение результатов секвенирования микрофлоры кишечника крыс получавших моноштаммы аутопробиотика с результатами секвенирования микробиоты после приема с результатами секвенирования анаэробных консорциумов, полученных в результате культивирования микробов, взятых из образцов кишечной микрофлоры животных.

Результаты представлены на фиг. 8, где показано представительство таксонов в составе анаэробных консорциумов на уровне родов. Образцы микрофлоры кишечника животных соответствовали нескольким экспериментальным группам - после действия антибиотиков (3ab), после коррекции кишечного дисбиоза аутопробиотиком на базе лактобацилл (1b), после коррекции кишечного дисбиоза аутопробиотиком на базе анаэробного консорциума (an), а также двум контрольным группам - получавшим физиологический раствор после приема антибиотиков (k1), и получавшим физиологический раствор в ходе всего эксперимента (k2).

Результаты секвенирования микробиомов после приема анаэробного консорциума объединяет высокая доля Firmicutes (con\_minus - консорциум без добавок, образцы с 488 по 484; con\_plus - с добавками, образцы 495-501, con-анаэробный консорциум, образцы с 445 по 451). Для образцов после воздействия антибиотиков (3ab), как и в предыдущих наших экспериментах, была характерна высокая доля Proteobacteria. В этой партии образцов у контроля k1, получавшего антибиотика, но не получившего аутопробиотиков, низкая доля Proteobacteria, и группа k1 в этом отношении не существенно отличается от образцов после получения аутопробиотиков. Контроль k2, получавший только физраствор, объединяет заметная доля TM7, которых почти нет в образцах других групп. Кроме того, у k2 низкая доля Bacteroidetes, значительно ниже, чем у большинства остальных образцов не из консорциумов.

Пример 4. Изучение влияния введения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума на состав микробиоты.

Изменения состава микробиоты оценивали с помощью количественной ПЦР (ПЦР-РВ) на 9 день после воздействия аутопробиотиков. Результаты, представленные на фиг.



9 и 10, показывают, что после приема анаэробного консорциума снижается представительство условно патогенных грамотрицательных микроорганизмов.

Пример 5. Изучение влияния введения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума на показатели иммунитета крыс.

5 Изменения иммунологических показателей крыс после введения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума оценивали с помощью проточной цитометрии. Результаты, представленные на фиг. 11-16, показывают, что прием анаэробного консорциума существенно изменяет ответы системы врожденного иммунитета организма по типу противовоспалительных реакций.

10 Пример 6. Изучение влияния введения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума на деятельность кишечного эпителия.

Результаты изменения активности щелочной фосфатазы после введения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума представлены на фиг. 17-18. Видно, что в проксимальных отделах тонкой кишки и в толстой кишке достоверно  
15 возрастает активность щелочной фосфатазы, что говорит о позитивных сдвигах в работе кишечного эпителия.

При помощи метагеномного анализа показано, что в состав предлагаемого консорциума входит несколько родов бактерий, более 70% которых относится к филуму Firmicutes, семейству Lactobacillaceae роду Lactobacillus. Представляя собой  
20 аутопробиотик, анаэробный консорциум лишен недостатков, присущих традиционным пробиотикам, таких как развитие инфекционных процессов, нарушение моторики кишечника, чрезмерная иммуностимуляция лимфатического аппарата.

Предложенный способ получения принципиально нового аутопробиотика может быть использован в медицинской, пищевой и микробиологической промышленности  
25 для получения персонифицированных лекарственных продуктов и препаратов.

Пример 7. Применение предложенного способа получения анаэробного консорциума из фекалий людей

Были собраны фекалии 10 здоровых людей в возрасте 22-65 лет и в течение 12 часов  
30 после дефекации доставлены в лабораторию ФГБНУ «ИЭМ», где были помещены по 1-2 г в 10 криовиал объемом 2 мл и промаркированы с указанием времени загрузки проб и номера в коллекции биоматериалов, депонированных в отделе молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», лаборатории «Микробном». Хранение осуществляли при температуре -80°C.

35 Для получения персонального аутопробиотика на основе анаэробного консорциума индигенных бактерий приготавливали экстракт фекалий путем их ресуспендирования в фосфатном буфере с рН 7,4, отделяли надосадочную жидкость центрифугированием при 3500 об/мин, затем смешивали надосадочную жидкость с физиологическим раствором, фильтровали и полученный фильтрат вносили в предварительно прогретую  
40 до 65°C и остуженную до 37°C питательную среду, состав которой приведен в табл.1., затем вносили стерильную суспензию фекалий в физиологическом растворе, содержащем витамин К и глюкозу. Культивирование осуществляли в анаэробных условиях в термостате при 37°C в течение 3 и 6 суток, для чего были взяты отдельные пробирки для каждого срока инкубации. После культивирования биомассу бактерий анаэробного  
45 консорциума центрифугировали при 3500 об/мин, сливали надосадок, а осадок ресуспендировали в стабилизирующем растворе с рН 5,5, содержащем 10% сахарозы и 1% желатина. Готовый аутопробиотик хранили при температуре не выше -40°C до использования не более 5 дней.

Исходную суспензию фекалий, использованную для посева, а также пробы анаэробных консорциумов после трех и шести суток культивирования отбирали в количестве 500 мкл и хранили при температуре -20°C для последующего генетического анализа. Часть материала до замораживания использовали для посева на селективные и диагностические среды - МРС, Эндо, азидную, хромогенную и маннитол-солевую среды для определения наличия и количества таких бактерий как: *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. Засеянные среды культивируют в термостате при 37°C в течение 24-48 ч.

Одновременно из биомассы бактерий выделяют ДНК и направляют на исследование при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для установления финального состава полученного аутопробиотического комплекса. Если по результатам генетического анализа и бактериологического посева, патогенные бактерии отсутствуют, а количество бифидобактерий и лактобацилл находится в пределах 7 и более Ig КОЕ/мл, готовый аутопробиотик используют для коррекции дисбиоза у пациента.

Список цитируемой литературы

1. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M. [et al] The human microbiome project [Article] // Nature. - 2007. - Vol. 449. - pp. 804-81

2. Pfeiffer J.K., Sonnenburg J.L. The intestinal microbiota and viral susceptibility. // *Frontiers in Microbiology*. - 2011; 2(92): 133-139.

3. Greenblum S., Turnbaugh P. J., Borenstein E. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 2012; 109(2): 594-559.

4. Zou S., Fang L., Lee M. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. // *Gastroenterology reports (Oxford)* - 2018; 6(1): 1-12.

5. Gonzalez A., Clemente J.C., Shade A. [et al] Our microbial selves: what ecology can teach us. // *European Molecular Biology Organization Reports*. - 2011; 12(8): 775-784.

6. Caporaso J.G, Lauber C.L., Costello E.K. [et al] Moving pictures of the human microbiome. // *Genome Biology*. - 2011; 12(R50).

7. Koning C.J., Jonkers D.M., Stobberingh E.E., et al. The effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxicillin. // *Am J Gastroenterol* 2008; 103 (1): 178-189.

8. Chapman C.M.C., Gibson G.R., Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? // *European journal of nutrition*. - 2011; 50(1):1-17.

9. Sazawal S. Hiremath G, Dhingra U., Malik P., Deb S., Black R.E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials [Article] // *The Lancet infectious diseases*. - 2006. - Vol. 6(6). - pp. 374-382.

10. Varughese C.A. Vakil N.H., Phillips K.M. Antibiotic-associated diarrhea: a refresher on causes and possible prevention with probiotics-continuing education article [Article] // *Journal of pharmacy practice*. - 2013. - Vol. 26(5). - pp. 476-482.

11. *Suárez-García I., Sánchez-García A., Soler L.* et al *Lactobacillus jensenii* bacteremia and endocarditis after dilatation and curettage: case report and literature review.// *Infection*. - 2012; 40(2): 219-222

12. Wu, R.Y., Pasyk, M., Wang, B., Forsythe, P., Bienenstock, J., Mao, Y.K., Kunze, W.A. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for *Lactobacillus reuteri* and *rhamnosus* strains // *Neurogastroenterology & Motility* - 2013, 25, №3:205-214.

13 Wu W.C., Zhao W., Li, S. Small intestinal bacteria overgrowth decreases small intestinal

motility in the NASH rats // World journal of gastroenterology. - 2008, 14, №2:313. - 317.

14. Ермоленко Е.И. Молочнокислые бактерии. - Lambert academic Publishing, Deutchland Lambert; 2011. - 283 с.

15. Chanyi R., Craven L., Harvey B., Reid G., Silverman M., Burton J. Faecal microbiota transplantation: Where did it start? What have studies taught us? Where is it going? // SAGE Open Medicine Volume 5:1-6

16. Rao K., Safdar N. Fecal microbiota transplantation for the treatment of Clostridium difficile infection. // Journal of hospital medicine. - 2016;11(1):56-61

17. Suvorov A, Karaseva A, Kotyleva M, Kondratenko Y, Lavrenova N, Korobeynikov A, Kozyrev P, Kramskaya T, Leontieva G, Kudryavtsev I, Guo D, Lapidus A, Ermolenko E. Autoprobiotics as an Approach for Restoration of Personalised Microbiota. // Front Microbiol. 2018; 9:1869.

18. Соловьева О.И., Симаненков В.И., Суворов А.Н, Сундукова З.Р., Цапиева А.Н. Аутопробиотический Enterococcus faecium в лечении синдрома раздраженной кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение №40. Материалы восемнадцатой гастроэнтерологической недели. - 2012. - Том. 22. - №5. - стр. 166

19. Чичерин И.Ю., Погорельский И.П., Лундовских И.А., Гаврилов К.Е., Шабалина М.Р., Дармов И.В. Аутопробиотикотерапия // Журнал инфектологии. - 2013; Т. 5, №4: С. 43-54.

20. Симаненков В.И., Суворов А.Н., Соловьева О.И., Цапиева А.Н., Шумилина И.А. Способ профилактики постинфекционного синдрома раздраженной кишки. Патент РФ №2553372, 27.01.2014

21. Симаненков В.И., Суворов А.Н., Соловьева О.И., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Сундукова З.Р. Способ получения персонифицированного аутопробиотического продукта и способ лечения синдрома раздраженной кишки с использованием этого продукта. Патент РФ RU 2546253, 25.04.2013

22. Суворов А.Н., Симаненков В.И., Сундукова З.Р., Ермоленко Е.И., Цапиева А.Н., Донец В.Н., Соловьева О.И. Способ получения аутопробиотика на основе Enterococcus faecium, представителя индигенной микрофлоры кишечника хозяина. Патент РФ RU 2460778, 10.09.2012

23. Шендеров Б.А., Манвелова М.А. Способ получения аутопробиотика, содержащего живые бифидобактерии и лактобациллы // Патент РФ 2139070, 10.11.1999.

24. Малкоч А.В., Бельмер С.В., Ардатская М.Д. Функциональные нарушения моторики желудочно-кишечного тракта и кишечная микрофлора // Педиатрическая фармакология. - 2009, Т. 6, №. 5:70-75.

25. Амерханова А.М., Алешкин А.В., Жиленкова О.Г. Консорциум бифидобактерий для приготовления бактериальных препаратов и биологически активных добавок к пище, предназначенных для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет, и способ его получения, биологически активная добавка к пище для коррекции микрофлоры желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет и бактериальный препарат для лечения дисбиотических состояний желудочно-кишечного тракта людей старше 14 лет. Патент РФ RU 2491332, 27.08.2013.

#### (57) Формула изобретения

Способ получения аутопробиотика на основе анаэробного консорциума индигенных бактерий, предусматривающий приготовление экстракта фекалий путем их ресуспендирования в фосфатном буфере, отделение надосадочной жидкости

центрифугированием с последующим смешиванием надосадочной жидкости с физиологическим раствором и фильтрацией, внесение полученного фильтрата в питательную среду, содержащую дрожжевой экстракт в количестве 4,5-5,5 г, натрия хлорид - 2,0-3,0 г, глюкозы моногидрат - 2,5-7,5 г, тиогликолевую кислоту - 0,2-0,3 г, панкреатический гидролизат казеина - 10,0-18,0 г, L-цистеин - 0,4-0,5 г, агар гранулированный - 0,6-0,8 г, желатин - 0,3-0,7 г, дистиллированную воду - 1 л, в которую затем вносят суспензию фекалий в физиологическом растворе, содержащем витамин К и глюкозу, с последующим культивированием в анаэробных условиях при температуре 37°С в течение 3-6 суток, центрифугированием, ресуспендированием осадка в стабилизирующем растворе, содержащем 10% сахарозы и 1% желатина, с получением целевого продукта.

15

20

25

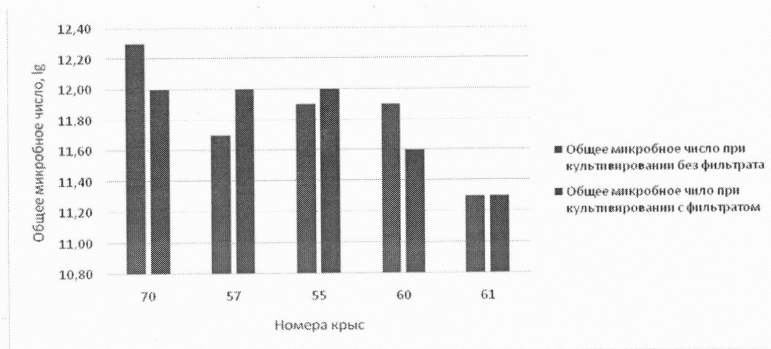
30

35

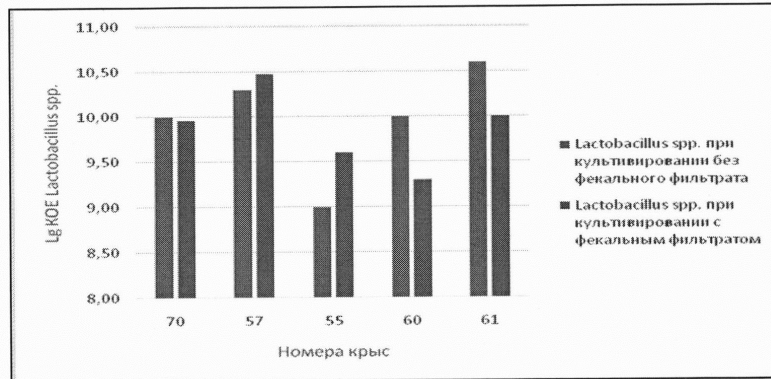
40

45

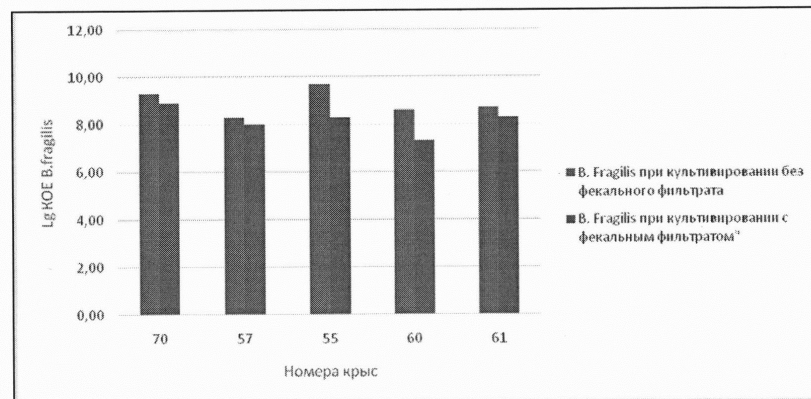
1



Фиг.1

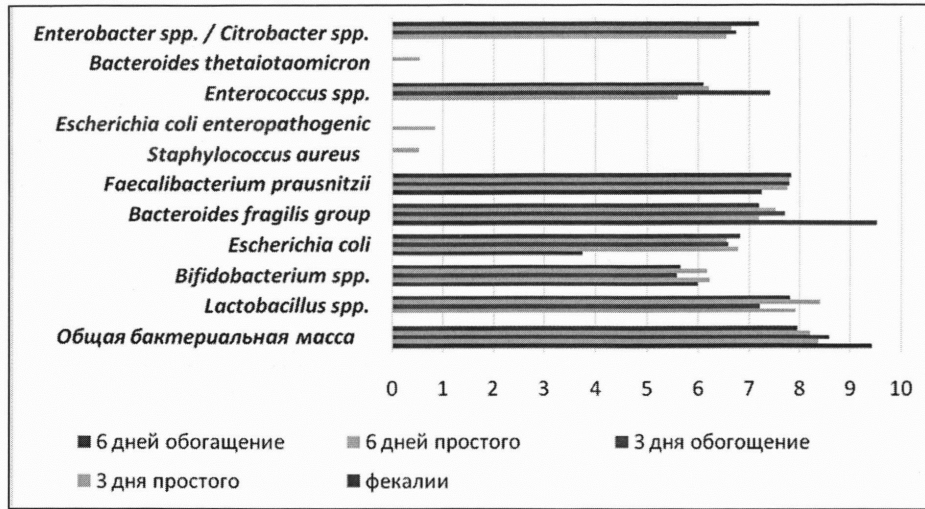


Фиг 2

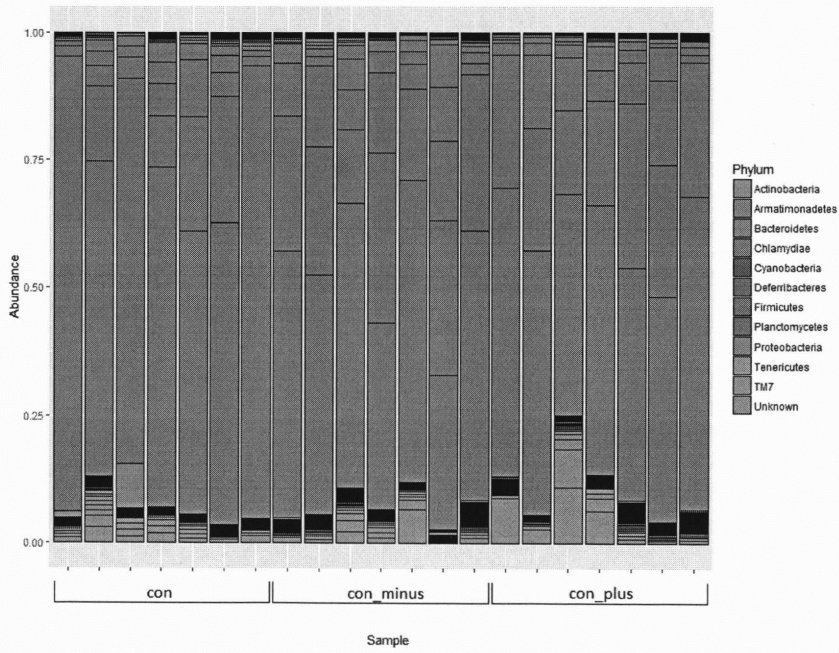


Фиг.3

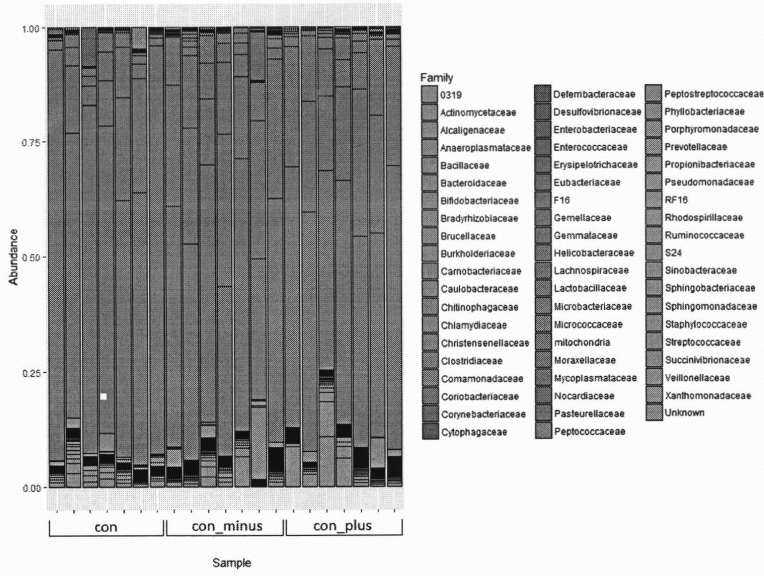
2



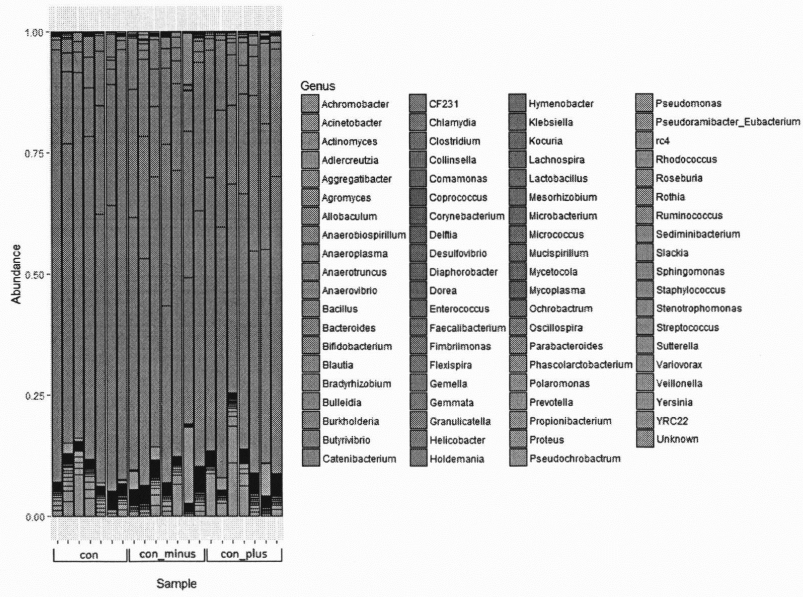
Фиг.4



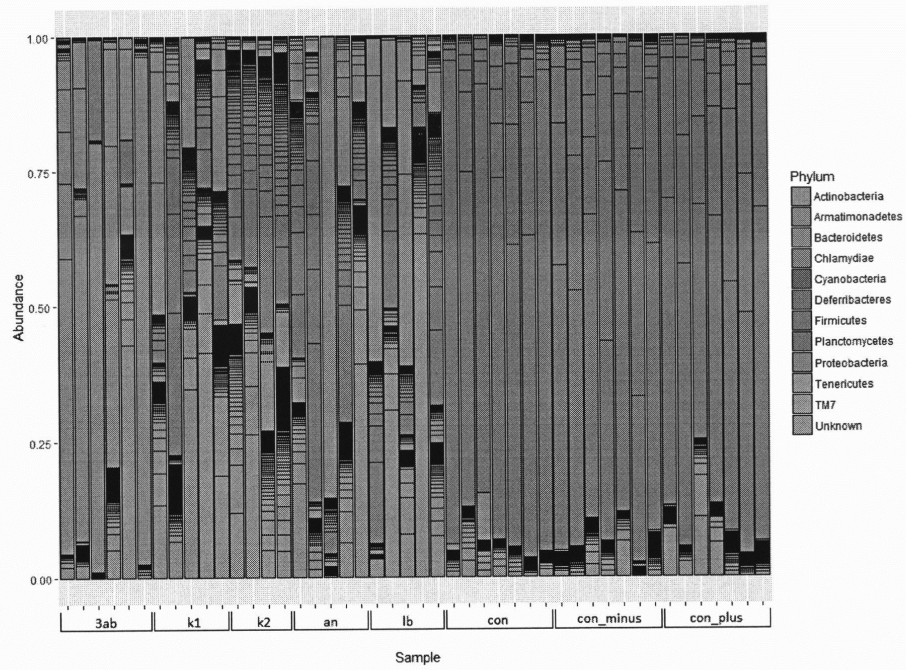
Фиг.5



Фиг. 6



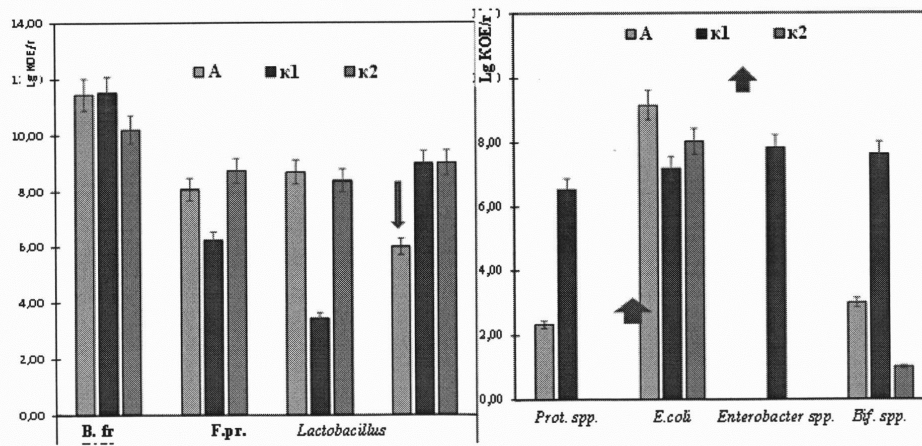
Фиг. 7



Фиг.8

Анаэробные бактерии

Факультативные анаэробы

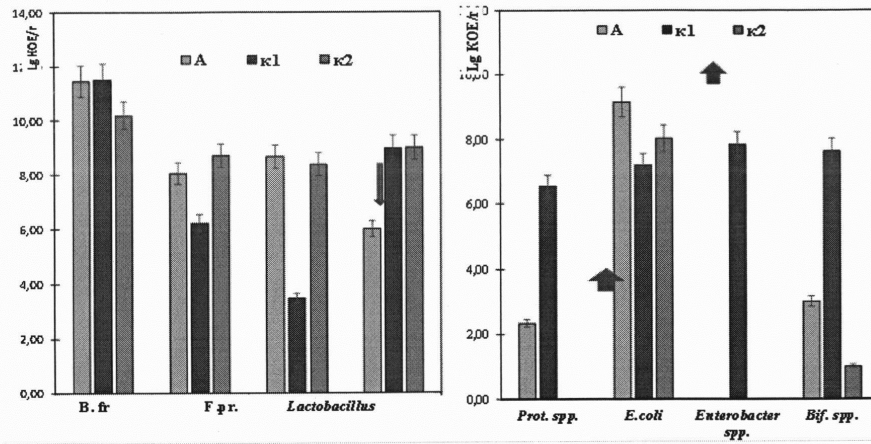


Фиг. 9

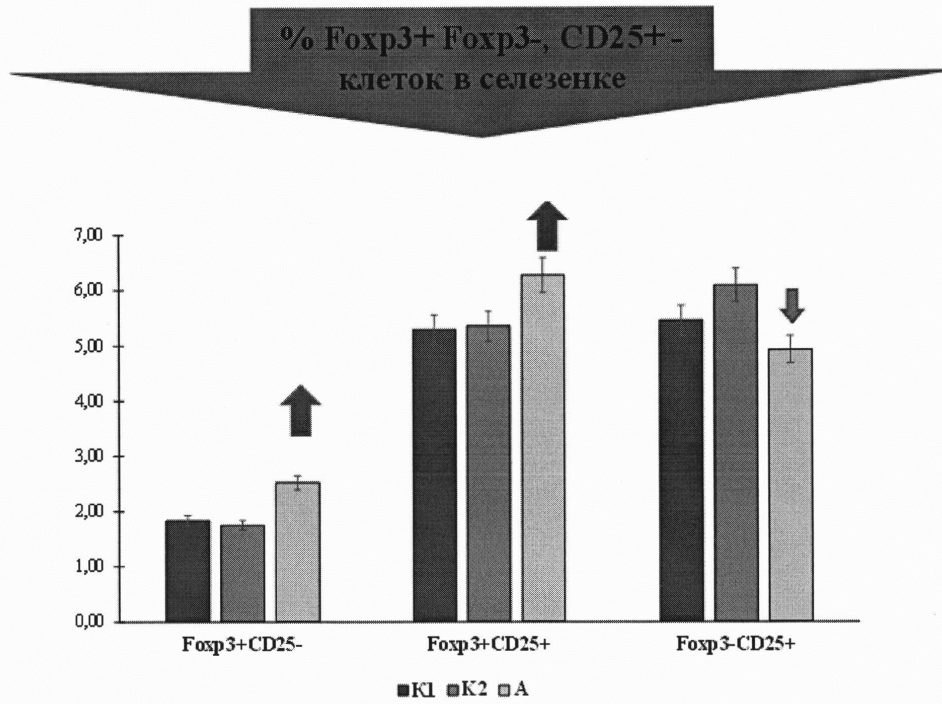


Анаэробные бактерии

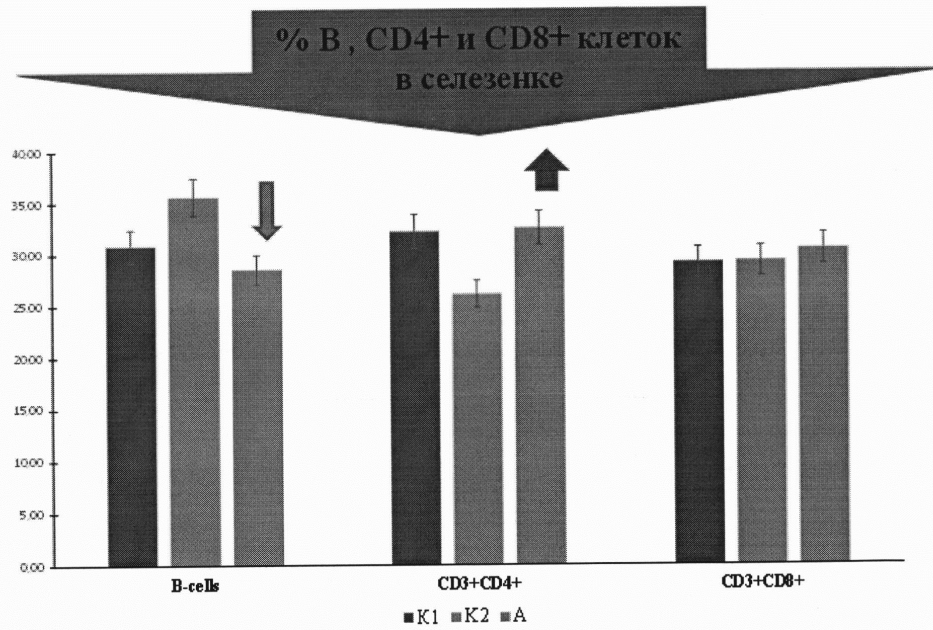
Факультативные анаэробы



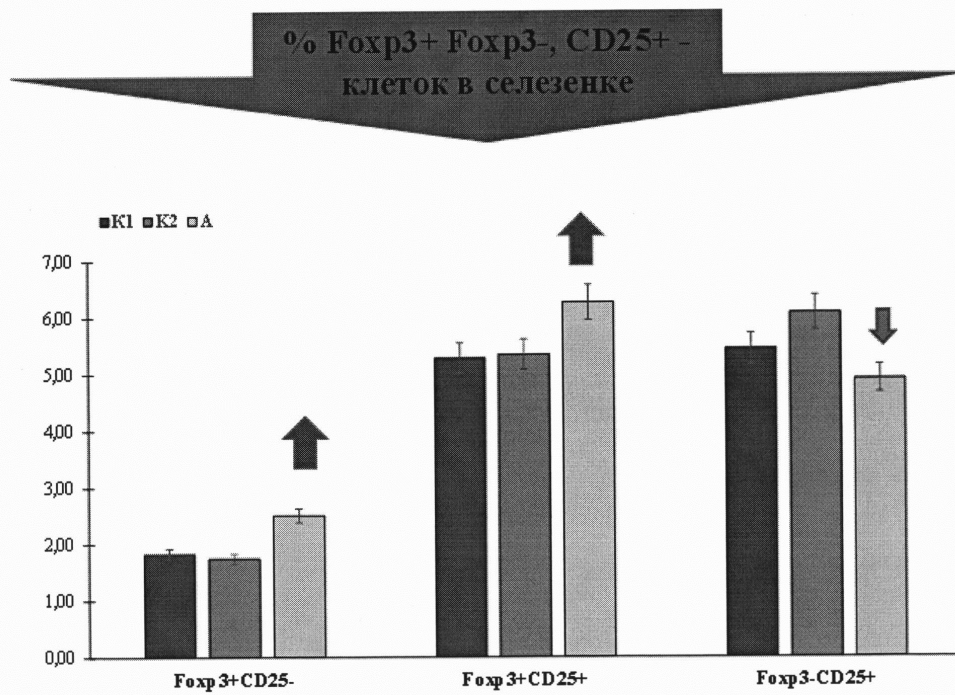
Фиг. 10



Фиг.11

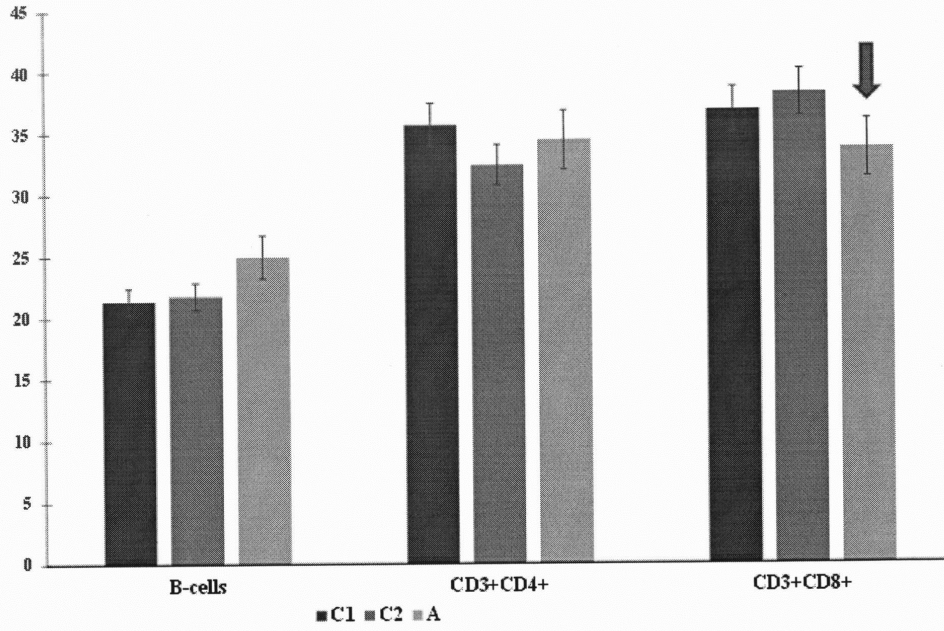


Фиг.12

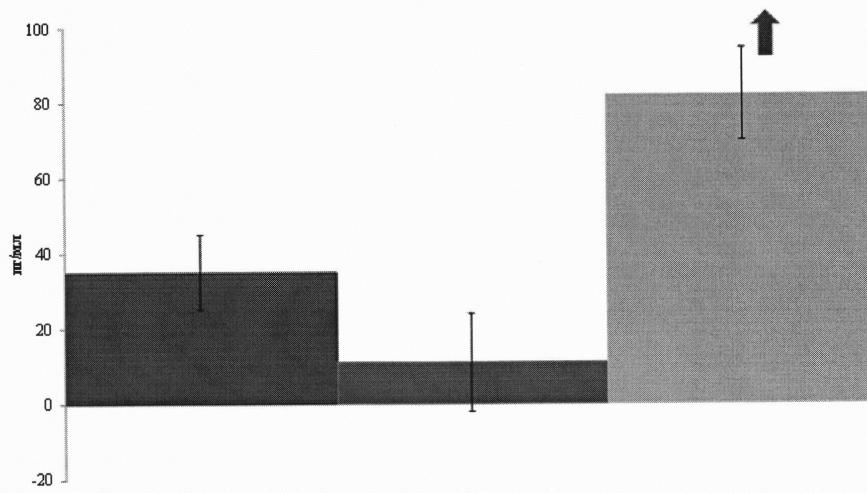


Фиг.13

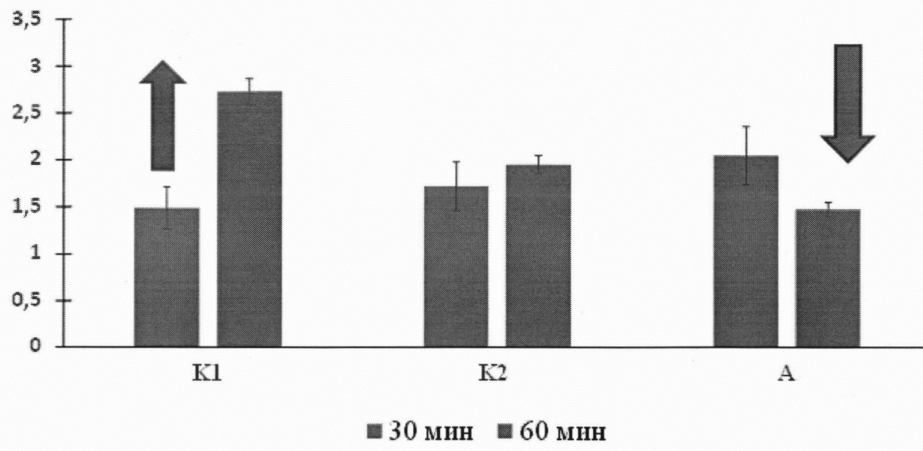
**% В и CD+CD4+ CD3+CD8+ клеток в крови**



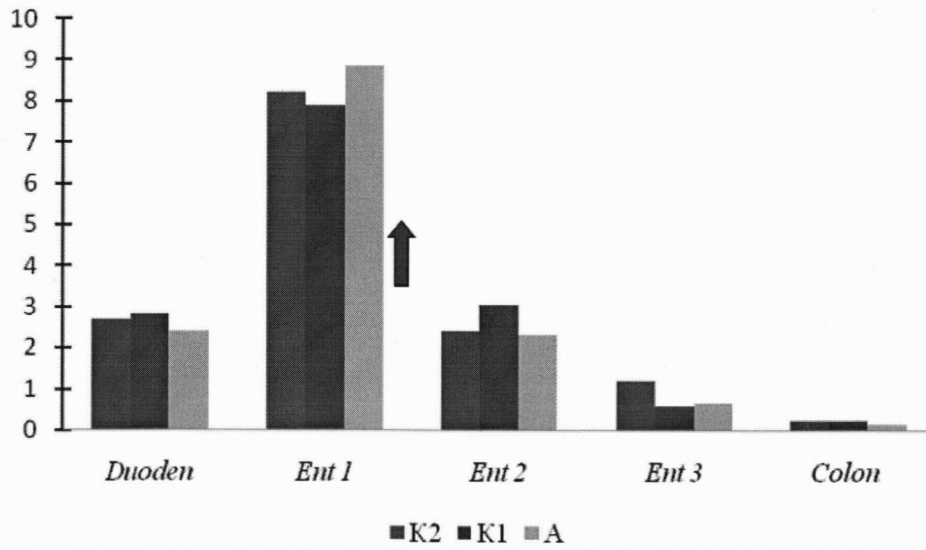
Фиг.14



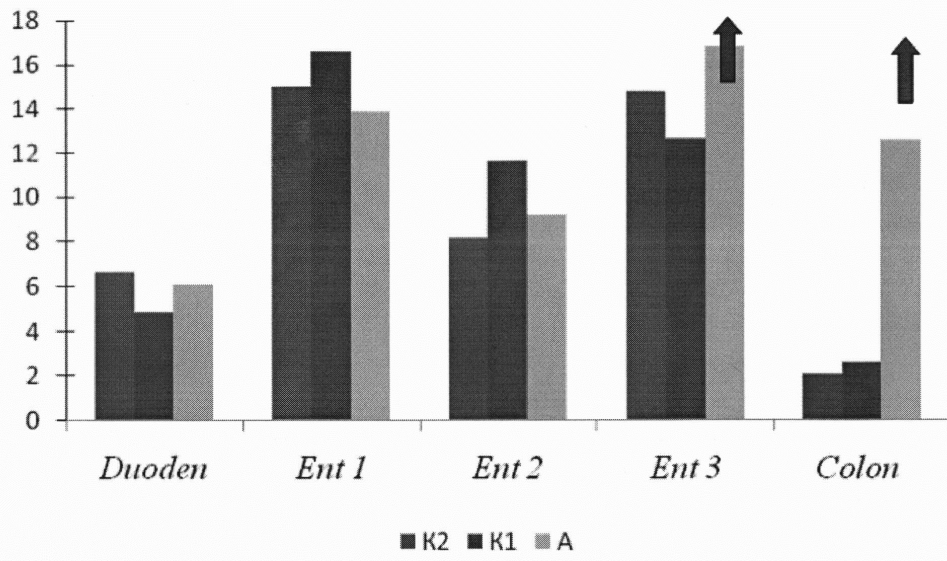
Фиг.15



Фиг.16.



Фиг. 17



Фиг. 18