



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(52) СПК  
А61К 39/04 (2006.01); А61К 35/74 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015114256, 17.09.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
17.09.2013

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
20.09.2012 GB 1216800.1

(43) Дата публикации заявки: 10.11.2016 Бюл. №  
31

(45) Опубликовано: 25.10.2018

(15) Информация о коррекции:  
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:  
13.12.2018 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 20.04.2015

(86) Заявка РСТ:  
GB 2013/052430 (17.09.2013)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2014/045023 (27.03.2014)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО  
"Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭКЛ Чарльз (GB),  
ГРЭНДЖ Джон (GB)

(73) Патентообладатель(и):

ИММОДЬЮЛОН ТЕРАПЬЮТИКС  
ЛИМИТЕД (GB)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: LOWRY C A et al., Identification  
of an immune-responsive mesolimbocortical  
serotonergic system: potential role in regulation  
of emotional behavior //NEUROSCIENCE,  
11.05.2007, vol. 146, no. 2, pages 756 - 772. WO  
2007071978 A1, 28.06.2007. UA 59766 U,  
25.05.2011.

(54) **ЛЕЧЕНИЕ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОВОГО РАССТРОЙСТВА С ПОМОЩЬЮ  
ВЫДЕЛЕННОЙ MYCOBACTERIUM**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к применению *M. vaccae* для предупреждения посттравматического стрессового расстройства (PTSD). Применение *M. vaccae* для предупреждения PTSD и симптомов, ассоциированных с таким расстройством.

Применение *M. vaccae* для введения субъекту для предупреждения у субъекта повышения уровней IL-6 после воздействия травмирующего события. Вышеописанное изобретение позволяет предупреждать или значительно снижать действие PTSD. 2 н. и 14 з.п. ф-лы, 5 ил., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/04* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2015.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(52) CPC

*A61K 39/04* (2006.01); *A61K 35/74* (2006.01)

(21)(22) Application: **2015114256, 17.09.2013**

(24) Effective date for property rights:  
**17.09.2013**

Priority:

(30) Convention priority:  
**20.09.2012 GB 1216800.1**

(43) Application published: **10.11.2016 Bull. № 31**

(45) Date of publication: **25.10.2018**

(15) Correction information:  
**Corrected version no1 (W1 C2)**

(48) Corrigendum issued on:  
**13.12.2018 Bull. № 35**

(85) Commencement of national phase: **20.04.2015**

(86) PCT application:  
**GB 2013/052430 (17.09.2013)**

(87) PCT publication:  
**WO 2014/045023 (27.03.2014)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO  
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**EKL Charlz (GB),  
GRENDZH Dzhon (GB)**

(73) Proprietor(s):

**IMMODYULON TERAPYUTIKS LIMITED  
(GB)**

(54) **TREATMENT OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER WITH ISOLATED MYCOBACTERIUM**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the pharmaceutical industry, specifically to the use *M. vaccae* for the prevention of post-traumatic stress disorder (PTSD). Use of *M. vaccae* for the prevention of PTSD and symptoms associated with such a disorder.

Use of *M. vaccae* for administration to a subject to prevent the rising of IL-6 levels in a subject after exposure to a traumatic event.

EFFECT: above-described invention can prevent or significantly reduce the effect of PTSD.

16 cl, 5 dwg, 1 ex

## ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к предупреждению посттравматического стрессового расстройства (PTSD). В частности, настоящее изобретение относится к выделенной *Mycobacterium* для применения в предупреждении PTSD и симптомов, ассоциированных с таким расстройством. Представлены также способы улучшения устойчивости у субъекта посредством введения терапевтически эффективного количества выделенной *Mycobacterium*.

## ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Тревожные расстройства являются наиболее распространенными расстройствами из психиатрических заболеваний и составляют огромную экономическую нагрузку. В дополнение к генерализованному тревожному расстройству, они охватывают посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD), паническое расстройство, обсессивно-компульсивное расстройство и социальные, так же как другие фобии.

PTSD может являться тяжелым и хроническим, где в некоторых исследованиях предполагают риск заболеть в течение жизни для 1,3-7,8% в общей популяции. PTSD поражает приблизительно 7,7 миллионов взрослых американцев, но оно может возникать в любом возрасте, включая детство. У женщин PTSD развивается более часто, чем у мужчин, и существуют некоторые доказательства того, что чувствительность к расстройству может передаваться в семьях. PTSD часто сопровождается депрессией, злоупотреблением различными веществами, или одним или несколькими из других тревожных расстройств. PTSD как правило, следует за вызывающим психологический стресс травмирующим событием. Эти события могут включать, например, военные действия, теракты, физическое насилие, сексуальное насилие, дорожно-транспортные происшествия и стихийные бедствия. Ответ на событие может включать сильный страх, беспомощность или ужас. Большинство людей восстанавливаются после травмирующего события с течением времени и возвращаются к нормальной жизни. В отличие от этого, у жертв с PTSD симптомы персистируют и могут ухудшаться с течением времени, предотвращая возвращение к нормальной жизни. В исследованиях PTSD опубликовано доказательство увеличенной воспалительной активности в иммунной системе, включая более высокие уровни воспалительных цитокинов, как в исходной точке, так и после антигенной стимуляции. Эти более высокие уровни воспалительной активности связывали с аномалиями системы НРА и с изменением серотонинергического и норадренергического метаболизма. Показано, что хронически активированный воспалительный ответ вызывает неблагоприятные реакции во многих системах организма. Конкретно, повышения уровня интерлейкина-6 (IL-6) ассоциированы с сообщениями о хронической боли, артрите, диабете, сердечно-сосудистом заболевании и других медицинских состояниях, ассоциированных с PTSD. Действительно, показано, что пациенты с хроническим PTSD имеют значительно более высокие уровни IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF-альфа и MCP-1, однако, в некоторых случаях, более низкие уровни C-реактивного белка и более низкие уровни растворимого CD-40.

Психотерапия в настоящее время составляет основу лечения PTSD. Способы включают когнитивно-поведенческую терапию, экспозиционную терапию и десенсибилизацию и переработку движением глаз. Лекарственное средство может усиливать эффективность психотерапии. Избирательные ингибиторы повторного поглощения серотонина (SSRI), такие как сертралин (Zoloft®) и пароксетин (Paxil®), являются единственными лекарственными средствами, одобренными для лечения PTSD. Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств. Множество нежелательных побочных эффектов ассоциировано с использованием SSRI.

Они включают опасения относительно взаимодействий лекарственных средств, побочных воздействий на желудочно-кишечный тракт, побочных эффектов в сексуальной сфере, суицидальной направленности мышления, острых анксиогенных эффектов и замедленного начала действия. Некоторые трициклические антидепрессанты (ТСА) и ингибиторы моноаминоксидазы (МАОИ), по-видимому, обладают некоторой эффективностью, но их переносимость пациентом является низкой из-за высокой частоты возникновения побочных эффектов. МАОИ имеют требования ограничения диеты и связаны с гипертензивными событиями. ТСА оказывают антихолинергические и сердечно-сосудистые побочные эффекты. Ламотригин, блокатор натриевых каналов, обладал некоторой эффективностью для лечения PTSD в мелкомасштабном исследовании с контролем плацебо.

Существует необходимость разработки способов терапевтического или профилактического лечения PTSD, которые являются безопасными и эффективными.

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте изобретение относится к выделенной *Mycobacterium* для применения для предупреждения PTSD и симптомов, ассоциированных с таким расстройством.

Во втором аспекте изобретение относится к выделенной *Mycobacterium* для введения субъекту для предупреждения повышения у субъекта уровней маркеров воспаления, включая, например, IL-6, после воздействия травмирующего события или для предупреждения изменения серотонинергического и норадренергического метаболизма.

Настоящее изобретение преодолевает недостатки предшествующей области техники посредством предоставления безопасного, лучше переносимого и эффективного способа для предупреждения PTSD. Неожиданно, настоящее изобретение привело к уравнивающему улучшающему иммунорегуляторному эффекту с уменьшением неприемлемых воспалительных ответов. Этот разносторонний профиль действия не может быть достигнут вмешательством в единственный путь и таким образом приводит к более контролируемому и эффективному ответу по сравнению с предшествующей областью техники.

#### ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Изобретение описано со ссылкой на следующие рисунки, в которых:

На фиг.1 показан эффект лечения с помощью *M. vaccae* на проактивное поведение и суммарный индекс доминирования в ходе содержания колоний.

На фиг.2 показано, что лечение с помощью *M. vaccae* предотвращает индуцированное CSC отсутствие социального предпочтения в тесте SPAT.

На фиг.3 показано, что лечение с помощью *M. vaccae* обладает антианксиолитическими свойствами в тесте EPM.

На фиг.4 показаны эффекты предварительной иммунизации *M. vaccae* на индуцированное CSC усиление индуцированного DSS колита.

На фиг.5 показан эффект предварительной иммунизации на гистологическое повреждение, вызванное содержанием в CSC, так же как эффект на соотношение воспалительных и регуляторных цитокинов.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

По настоящему изобретению используют микобактерии для лечения или предупреждения PTSD.

Как применяют в настоящем документе, термины «пациент» и/или «субъект» можно использовать взаимозаменяемо. Во избежание сомнений, настоящее изобретение предназначено предпочтительно для использования для человека, однако, не относящиеся к человеку позвоночные животные (ветеринарное применение) также

могут являться субъектом для терапевтического или профилактического лечения. Например, лошадей и собак часто используют в военных операциях или операциях полиции, так же как в других случаях, таких как бега, где они могут подвергаться воздействию травмирующих условий. Терапию по изобретению можно таким образом использовать для восстановления работоспособности таких животных.

Как применяют в настоящем документе, термин «предупреждение» относится к любому способу, в котором по меньшей мере один признак, симптом, или симптомокомплекс заболевания или расстройства преимущественным образом изменяют, так чтобы предотвращать или задерживать начало, замедлять прогрессирование, предотвращать рецидив или облегчать симптомы или сопутствующие симптомы заболевания или расстройства. Например, для PTSD, предупреждение расстройства может, в конкретных вариантах осуществления, предотвращать возникновение по меньшей мере одного из признаков, симптомов и симптомокомплексов PTSD.

Настоящее изобретение также относится к лечению PTSD, или одного или нескольких симптомов PTSD, у субъекта. Лечение может замедлять прогрессирование, предотвращать рецидив или облегчать PTSD, или один или несколько симптомов расстройства.

Как применяют в настоящем документе, фраза «диагностировано посттравматическое стрессовое расстройство (PTSD)» относится к наличию признака, симптома или симптомокомплекса, показательного для PTSD, психиатрического расстройства, запускаемого травмирующим событием. Такие травмирующие события включают в себя в качестве неограничивающих примеров военные действия, теракты, физическое насилие, сексуальное насилие, дорожно-транспортные происшествия и стихийные бедствия.

В Диагностическом и статистическом руководстве по умственным расстройствам-IV-текст, переработанном (DSM-IV-TR), руководстве для специалистов в области психического здоровья, в котором перечислены категории и критерии психических расстройств, классифицируют PTSD как тревожное расстройство. Согласно DSM-IV-TR, диагноз PTSD может быть поставлен, если:

(1) пациент пережил событие или события, стал свидетелем события или событий, или столкнулся с событием или событиями, включающими фактически или угрожающие смерть или серьезную травму, или угрозу физической неприкосновенности себе или другим, и реакция включала сильный страх, беспомощность или ужас; (2) как последствие травмирующего события, пациент испытывает по меньшей мере 1 симптом повторяющегося события/вторжения, 3 симптома избегания/оцепенения и 2 симптома гиперактивности, и продолжительность симптомов составляет более 1 месяца; и (3) симптомы вызывают клинически значимое расстройство или нарушение в социальной, профессиональной или другой важной области деятельности.

В конкретных вариантах осуществления, если расстройство пациента удовлетворяет критериям DSM-IV-TR, у пациента диагностируют PTSD. В конкретных вариантах осуществления, если пациент имеет по меньшей мере один признак, симптом или симптомокомплекс PTSD, у пациента диагностируют расстройство. В конкретных вариантах осуществления, используют шкалу для измерения признака, симптома или симптомокомплекса PTSD, и расстройство диагностируют на основании измерения с использованием этой шкалы. В конкретных вариантах осуществления, «балл» на шкале используют для диагностики или оценка признака, симптома или симптомокомплекса PTSD. В конкретных вариантах осуществления «балл» может измерять по меньшей

мере одно из частоты, интенсивности или тяжести признака, симптома или симптомокомплекса PTSD.

Как применяют в настоящем документе, термин «симптом» и «симптомы» относятся к субъективным признакам, характеризующим расстройство. Симптомы PTSD могут относиться, в качестве неограничивающих примеров, к повторяющимся и навязчивым воспоминаниям о травме, повторяющимся и беспокоящим снам о травмирующем событии, событию, действиям или ощущениям, как будто травмирующее событие повторяется, ощущению беспокойства при воспоминаниях о травмирующем событии, физиологической реактивности при воспоминаниях о травмирующем событии, попыткам избежать мыслей или ощущений, связанных с травмой, попыткам избежать определенных действий или ситуаций, неспособности вспомнить о травме или аспектах травмы, заметному снижению интереса к серьезной деятельности, ощущениям отчужденности или отстраненности от окружающих, ограниченному диапазону эмоций, чувству ограниченности перспектив на будущее, социальной тревожности, тревожности в незнакомой обстановке, трудностям с засыпанием или поддержанием сна, раздражительности или вспышкам гнева, затрудненной концентрации, сверхнастороженности, проблемам с восприятием боли, болевой устойчивостью и чрезмерной реакции вздрагивания. В конкретных вариантах осуществления, потенциально угрожающие стимулы могут вызывать гиперактивность или тревожность. В конкретных вариантах осуществления физиологическая реактивность проявляется по меньшей мере в одном из аномального дыхания, аномальной частоты ритма сердечных сокращений, аномального кровяного давления, аномального функционирования специального вида чувствительности и аномального функционирования органа чувств. В конкретных вариантах осуществления ограниченный диапазон эмоций характеризуется уменьшенным или ограниченным диапазоном или интенсивностью ощущений, или может происходить демонстрация эмоций, и чувство ограниченности перспектив в будущем может проявляться в форме мыслей, что у пациента не будет карьеры, брака, детей или нормальной продолжительности жизни. В конкретных вариантах осуществления, дети и подростки могут иметь симптомы PTSD, такие как, в качестве неограничивающих примеров, дезорганизованное или возбужденное поведение, повторяющаяся игра, отражающая аспекты травмы, пугающие сны с отсутствием узнаваемого содержания и реконструкция травмы. В конкретных вариантах осуществления симптом может представлять собой стресс, ассоциированный с мнемоническим воспроизведением.

Как применяют в настоящем документе, термин «симптомокомплекс» относится к набору признаков, симптомов или к набору признаков и симптомов, сгруппированных из-за их взаимосвязи друг с другом или их совместного проявления. Например, в конкретных вариантах осуществления PTSD характеризуется тремя симптомокомплексами: повторяющегося события/вторжения, избегания/оцепенения и гиперактивности.

Как применяют в настоящем документе, термин «повторяющееся событие/вторжение» относится по меньшей мере к одному из повторяющихся и навязчивых воспоминаний о травме, повторяющихся и беспокоящих снов, посвященных травмирующему событию, действий или ощущений, соответствующим тому, как будто травматическое событие повторяется, ощущения беспокойства при воспоминаниях о травме и физиологической реактивности при воспоминаниях о травме. В конкретных вариантах осуществления физиологическая реактивность проявляется по меньшей мере в одном из аномального дыхания, аномальной частоты ритма сердечных сокращений, аномального кровяного

давления, аномального функционирования специального вида чувствительности и аномального функционирования органа чувств.

5 Как применяют в настоящем документе, термин «избегание/оцепенение» относится по меньшей мере к одному из попыток избежать мыслей или ощущений, связанных с травмой, попыток избежать определенных действий или ситуаций, неспособности  
10 вспоминать о травме или аспектах травмы, заметного снижения интереса к серьезной деятельности, ощущения отчужденности или отстраненности от окружающих, ограниченного диапазона эмоций и чувства ограниченности перспектив на будущее. Ограниченный диапазон эмоций характеризуется уменьшенным или ограниченным  
15 диапазоном или интенсивностью ощущений, или может происходить демонстрация эмоций. Чувство ограниченности перспектив в будущем может проявляться в форме мыслей, что у пациента не будет карьеры, брака, детей или нормальной продолжительности жизни. Избегание/оцепенение также может проявляться в  
20 социальной тревожности и тревожности в незнакомой обстановке.

15 Как применяют в настоящем документе, термин «гиперактивность» относится по меньшей мере к одному из трудности с засыпанием или поддержанием сна, раздражительности или вспышек гнева, затрудненной концентрации, сверхнастороженности и чрезмерной реакции вздрагивания. Потенциально угрожающие  
20 стимулы могут вызывать гиперактивность или тревожность.

20 Как применяют в настоящем документе, термин «значимо» относится к совокупности наблюдений или событий, которые слишком тесно коррелируют, чтобы это можно  
25 было приписать случайности. Например, в конкретных вариантах осуществления, «значимо изменяется», «значимо уменьшается» и «значимо увеличивается» относится к изменениям или эффектам, которые маловероятно можно признать случайными. В  
30 конкретных вариантах осуществления статистические способы можно использовать для определения того, можно ли обозначить наблюдение «значимым» изменением, уменьшением, увеличением или модификацией.

30 Пациенты с диагнозом PTSD могут ощущать себя «настороженными», взволнованными и сильно обеспокоенными. Депрессия, тревожность, приступы паники  
35 и биполярное расстройство часто ассоциированы с PTSD. Злоупотребление алкоголем и наркотиками также являются распространенными. В конкретных вариантах осуществления расстройства, сопутствующие PTSD, могут включать в качестве  
40 неограничивающих примеров, депрессию, злоупотребление алкоголем и наркотиками.

35 Как применяют в настоящем документе, фраза «улучшение устойчивости» относится к увеличению способности пациента переживать травмирующее событие без заболевания  
40 PTSD или с менее выраженной симптоматикой, или с меньшим нарушением обычной активности в повседневной жизни после события. В конкретных вариантах осуществления улучшение устойчивости может, в конкретных вариантах осуществления, уменьшать по меньшей мере один из признаков, симптомов или симптомокомплексов  
45 PTSD.

40 В конкретных вариантах осуществления «повторяющееся событие/вторжение» включает в себя по меньшей мере одно из повторяющихся и навязчивых воспоминаний  
45 о травме, повторяющихся и беспокоящих снов, посвященных травмирующему событию, действий или ощущений, как будто травмирующее событие повторяется, ощущения беспокойства при воспоминаниях о травме и физиологической реактивности при воспоминаниях о травме.

В конкретных вариантах осуществления физиологическая реактивность включает в себя по меньшей мере одно из аномального дыхания, аномальной частоты ритма

сердечных сокращений, аномального кровяного давления, аномального функционирования по меньшей мере одного из специальных видов чувствительности и аномального функционирования по меньшей мере одного органа чувств.

5 В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один из специальных видов чувствительности выбран из зрения, слуха, осязания, обоняния, вкуса и ощущения. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один орган чувств выбран из

10 глаз, ушей, кожи, носа, языка и глотки.  
В конкретных вариантах осуществления избегание/ощепенение включает по меньшей мере одно из попыток избежать мыслей или ощущений, ассоциированных с травмой, попыток избежать определенных действий или ситуаций, неспособности вспоминать о травме или аспектах травмы, заметного снижения интереса к серьезной деятельности, ощущения отчужденности или отстраненности от окружающих, ограниченного

15 диапазона эмоций, чувства ограниченности перспектив на будущее, социальной тревожности и тревожности, связанной с незнакомой обстановкой.  
В конкретных вариантах осуществления гиперактивность включает в себя по меньшей мере одно из трудности с засыпанием или поддержанием сна, раздражительности или вспышек гнева, затрудненной концентрации, сверхнастороженности, чрезмерной реакции

20 вздрагивания и тревожности от потенциально угрожающих стимулов.  
В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* не снижает физической способности пациента реагировать соответствующим образом и быстро на потенциально угрожающие стимулы.

В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* уменьшает трудность с засыпанием или поддержанием сна посредством уменьшения стресса, ассоциированного с воспоминаниями и сновидениями.

25 В конкретных вариантах осуществления пациент представляет собой ребенка или подростка.

В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* предотвращает по меньшей мере один признак или симптом PTSD у пациента, где признак или симптом выбран из дезорганизованного или возбужденного поведения, проблем с восприятием

30 боли и болевой устойчивостью, головной боли, трудности с засыпанием или поддержанием сна, повторяющейся игры, отражающей аспекты травмы, пугающих снов с отсутствием узнаваемого содержания и реконструкции травмы.  
В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* снижает частоту встречаемости у пациента по меньшей мере одного расстройства, сопутствующего

35 PTSD, выбранного из злоупотребления наркотиками, злоупотребления алкоголем и депрессии.  
В конкретных вариантах осуществления выделенную *Mycobacterium* вводят пациенту до или сразу после травмирующего события.

В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* снижает частоту

40 встречаемости по меньшей мере одного признака, симптома или симптомокомплекса PTSD, как диагностировано или оценено с помощью по меньшей мере одной из Шкалы для клинической диагностики PTSD (CAPS), Шкалы для клинической диагностики PTSD часть 2 (CAPS-2), Шкалы для клинической диагностики PTSD у детей и подростков (CAPS-CA), Шкалы оценки влияния травмирующего события (IES), Шкалы оценки влияния травмирующего события - пересмотренной (IES-R), Шкалы общего

45 клинического впечатления (CGI), Шкалы общего клинического впечатления о тяжести заболевания (CGI-S), Шкалы общего клинического впечатления об улучшении (CGI-I), Шкалы общей оценки PTSD Дьюка (DGRP), Шкалы общей оценки улучшения при PTSD



Дьюка (DGRP-I), Шкалы тревожности Гамильтона (HAM-A), Структурированного опросника для оценки PTSD (SI-PTSD), Опросника для оценки PTSD (PTSD-I), Шкалы симптомов PTSD (PSS-I), Малого международного нейропсихиатрического опросника (MINI), Шкалы оценки депрессии Монтгомери-Асберга (MADRS), Шкалы депрессии Бека (BDI), Шкалы депрессии Гамильтона (HAM-D), Пересмотренной шкалы Гамильтона для оценки депрессии (RHRSD), Большого опросника для оценки депрессии (MDI), Шкалы оценки депрессии пожилого и старческого возраста (GDS-30) и Индекса депрессии у детей (CDI).

В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* значительно изменяет или уменьшает баллы по меньшей мере по одному из CAPS, CAPS-2, CAPS-CA, IES, IES-R, CGI, CGI-S, CGI-I, DGRP, DGRP-I, HAM-A, SI-PTSD, PTSD-I, PSS-I, MADRS, BDI, HAM-D, RHRSD, MDI, GDS-30 и CDI.

В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* значительно уменьшает баллы в конечной точке по сравнению с исходными баллами по меньшей мере по одному из CAPS, CAPS-2, IES, IES-R и НАМА. В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* значительно увеличивает долю отвечающих по CGI-I, обладающих баллом по CGI-I по меньшей мере одним из 1 (очень сильное улучшение) и 2 (сильное улучшение). В конкретных вариантах осуществления выделенная *Mycobacterium* увеличивает долю отвечающих по DGRP-I, обладающих баллом по DGRP-I по меньшей мере одним из 1 (очень сильное улучшение) и 2 (сильное улучшение).

В конкретных вариантах осуществления общая оценка не более 65 по меньшей мере по одной из CAPS и CAP-2 является показателем предупреждения PTSD.

В конкретных вариантах осуществления общая оценка не более 18 по HAM-A является показателем предупреждения тревожного расстройства.

В конкретных вариантах осуществления оценка не более 3 по меньшей мере по одной из CGI-I и DGRP-I является показателем предупреждения PTSD.

В следующем варианте осуществления выделенная *Mycobacterium* предотвращает и/или уменьшает неспецифическое воспаление, сопутствующее PTSD. На такое неспецифическое воспаление могут указывать повышенные уровни в сыворотке С-реактивного белка, такие как более 3 мг/литр.

В следующем варианте осуществления выделенная *Mycobacterium* предотвращает и/или уменьшает частоту встречаемости гистологического повреждения, ассоциированного с PTSD и/или сопутствующим воспалением, например, в ободочной кишке или других частях желудочно-кишечного тракта.

В одном варианте осуществления введение, как определено в настоящем документе, включает введение выделенной *Mycobacterium* в множественных аликвотах и/или дозах, и/или в отдельных случаях. Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* вводят заранее и продолжают вводить пациенту после того, как травмирующее событие произошло. Более предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* продолжают вводить пациенту после того, как травмирующее событие произошло.

В одном аспекте настоящего изобретения выделенная *Mycobacterium* содержит убитую нагреванием *Mycobacterium*. Предпочтительные виды микобактерий для использования по настоящему изобретению включают в себя *M. vaccae*, *M. thermoresistibile*, *M. flavescens*, *M. duvalii*, *M. phlei*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. sphagni*, *M. aichiense*, *M. rhodesiae*, *M. neoaurum*, *M. chubuense*, *M. tokaiense*, *M. komossense*, *M. aurum*, *M. indicus pranii*, *M. tuberculosis*, *M. microti*; *M. africanum*; *M. kansasii*, *M. marinum*; *M. simiae*; *M. gastris*; *M. nonchromogenicum*; *M. terrae*; *M. triviale*; *M. gordonae*; *M. scrofulaceum*; *M. paraffinicum*; *M. intracellulare*; *M. avium*; *M. xenopi*; *M. ulcerans*; *M. diernhoferi*, *M. smegmatis*; *M. thamnophaeos*;

*M. flavescens*; *M. fortuitum*; *M. peregrinum*; *M. chelonae*; *M. paratuberculosis*; *M. leprae*; *M. lepraemurium* и их комбинации.

Предпочтительно, убитая нагреванием *Mycobacterium* является непатогенной.

Непатогенную убитую нагреванием *Mycobacterium* предпочтительно выбирают из *M. vaccae*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. indicus pranii*, *M. phlei* и их комбинаций. Более предпочтительно, непатогенная убитая нагреванием *Mycobacterium* представляет собой шероховатый вариант. Количество выделенной *Mycobacterium*, введенной пациенту, является достаточным для вызова у пациента защитного иммунного ответа, такого что он предотвращает по меньшей мере один признак или симптом PTSD у пациента, где признак или симптом выбран из дезорганизованного или возбужденного поведения, проблем с восприятием боли и болевой устойчивостью, головной боли, трудности с засыпанием или поддержанием сна, повторяющейся игры, отражающей аспекты травмы, пугающих снов с отсутствием узнаваемого содержания и реконструкции травмы. Предпочтительно, введение эффективного количества выделенной *Mycobacterium* представляет собой введение, предотвращающее по меньшей мере один симптомокомплекс PTSD у пациента, где симптомокомплекс выбран из повторяющегося события/вторжения, избегания/оцепенения и гиперактивности.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, является предпочтительным вводить субъекту конкретную дозу выделенной *Mycobacterium*. Таким образом, конкретные варианты осуществления изобретения относятся к средствам защиты, содержащим эффективное количество убитой нагреванием *Mycobacterium* для использования по настоящему изобретению, которое, как правило, может составлять от  $10^3$  до  $10^{11}$  организмов, предпочтительно, от  $10^4$  до  $10^{10}$  организмов, более предпочтительно, от  $10^6$  до  $10^{10}$  организмов, и даже более предпочтительно, от  $10^6$  до  $10^9$  организмов на однократную дозу. Эффективное количество убитой нагреванием *Mycobacterium* для использования по настоящему изобретению может составлять от  $10^3$  до  $10^{11}$  организмов, предпочтительно, от  $10^4$  до  $10^{10}$  организмов, более предпочтительно, от  $10^6$  до  $10^{10}$  организмов, и даже более предпочтительно, от  $10^6$  до  $10^9$  организмов. Наиболее предпочтительно количество убитой нагреванием *Mycobacterium* для использования по настоящему изобретению составляет от  $10^7$  до  $10^9$  клеток или организмов. Как правило, композицию по настоящему изобретению можно вводить в дозе от  $10^8$  до  $10^9$  клеток для использования для людей и животных. Альтернативно, доза составляет от 0,01 мг до 1 мг или от 0,1 мг до 1 мг организмов, представленных в виде либо суспензии, либо сухого препарата.

Один из вариантов осуществления относится к выделенной *Mycobacterium* для введения пациенту для уменьшения у пациента повышения уровней воспалительных цитокинов, таких как IL-6, после воздействия травмирующего события.

Другой вариант осуществления относится к выделенной *Mycobacterium* для введения пациенту для предупреждения у пациента повышения уровней воспалительных цитокинов, таких как IL-6 или IL-1 $\beta$ , или IL-8, или TNF-альфа, или MCP-1, после воздействия травмирующего события. *Mycobacterium* уменьшает у пациента повышение уровней IL-6 или IL-1 $\beta$ , или IL-8, TNF-альфа или MCP-1, после воздействия травмирующего события.

Другой вариант осуществления относится к выделенной *Mycobacterium* для введения пациенту для предупреждения у пациента снижения уровней С-реактивного белка или растворимого CD-40 после воздействия травмирующего события.

В следующем варианте осуществления выделенная *Mycobacterium* оказывает иммуномодулирующий эффект, когда соотношение воспалительных и регуляторных цитокинов, присутствующих в плазме субъекта, поддерживают ниже приблизительно 1, соответственно. Такие воспалительные цитокины включают в себя подобные ИЛ-6, TNF и интерферону-гамма, где регуляторные цитокины включают в себя подобные ИЛ-10 и TGF-бета.

Термин «комбинация», как используют на протяжении описания, предназначен, чтобы включать в себя введение лекарственных средств в одном и том же или в отдельных фармацевтических составах, и в одно и то же время или в различные периоды времени. Таким образом, выделенную *Mycobacterium* и лекарственное средство можно предоставлять в форме отдельных лекарственных средств для введения в одно и то же время или в различные периоды времени. Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* и лекарственное средство предоставляют в форме отдельных лекарственных средств для введения в различные периоды времени. При введении отдельно и в различные периоды времени, либо выделенную *Mycobacterium*, либо лекарственное средство можно вводить первым; однако, является предпочтительным вводить выделенную *Mycobacterium* с последующим лекарственным средством. Кроме того, оба лекарственных средства можно вводить на одни и те же сутки или на различные сутки, и их можно вводить с использованием одного и того же расписания или различных расписаний на протяжении курса лечения.

Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* вводят пациенту перед каким-либо предполагаемым травмирующим событием.

Приостановки дозирования и/или снижения дозы и коррекции расписания проводят по необходимости в зависимости от индивидуальной устойчивости пациента к лечению.

Перед каким-либо предполагаемым травмирующим событием, эффективные количества *Mycobacterium* можно вводить в множественных (повторяющихся) дозах, например, в двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, или двадцати или более повторяющихся дозах, с интервалами приблизительно 2 недели или приблизительно 4 недели, или приблизительно 8 недель.

Выделенную *Mycobacterium* можно вводить пациенту посредством парентерального, перорального, подъязычного, назального способа или способа введения в легкие. В предпочтительном варианте осуществления выделенную *Mycobacterium* вводят посредством парентерального способа, выбранного из подкожной, внутрикожной, субдермальной, внутривенной, внутривенной и внутривенной инъекции. Более предпочтительно, введение парентеральным способом не включает в себя инъекцию экстракта клеточной стенки микобактерий.

В другом предпочтительном варианте осуществления выделенную *Mycobacterium* вводят перорально, включая суспензию, таблетки и т.п. Жидкие составы можно вводить посредством ингаляции лиофилизированных или переведенных в аэрозоль микрокапсул. Дополнительные фармацевтические носители можно использовать для контроля продолжительности действия препарата. Их можно заключать в микрокапсулы, полученные способами коацервации или посредством межповерхностной полимеризации (гидроксиметилцеллюлозных или желатиновых микрокапсул) в коллоидных системах доставки лекарственного средства (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсиях. Наполнители, например, соли, различные придающие объем средства, дополнительные забуферивающие средства, хелатирующие агенты, антиоксиданты, соразтворители и т.п. можно включать в конечный состав.

Пригодный режим дозирования в соответствии с этим вариантом осуществления включает введение выделенной *Mycobacterium* с последующими дополнительными дозами указанной выделенной *Mycobacterium* через 2 недели и продолжением каждые 2 недели для следующих 3 доз с последующими 4 неделями без лечения. Впоследствии, пациентам можно вводить выделенную *Mycobacterium* каждые 4 недели в течение вплоть до 12 месяцев или дольше после первой введенной дозы. Альтернативно, дозирование может включать в себя еженедельное введение после примиряющей или начальной дозы.

Пациент, подвергающийся предполагаемому травмирующему событию, в соответствии с настоящим изобретением, может делать это одновременно, отдельно или последовательно с введением выделенной *Mycobacterium*. Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* вводят пациенту перед предполагаемым травмирующим событием. Более конкретно, выделенную *Mycobacterium* можно вводить пациенту между приблизительно 4 неделями и 1 неделей перед каким-либо предполагаемым травмирующим событием. Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* можно вводить в форме одной или нескольких аликвот, где каждая содержит эффективное количество выделенной *Mycobacterium*, которое можно вводить в один или несколько интервалов времени между 4 неделями и 1 неделей перед каким-либо предполагаемым травмирующим событием. Даже более предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* можно вводить в форме одной или нескольких аликвот, где каждая содержит эффективное количество выделенной *Mycobacterium*, которое можно вводить в один или несколько интервалов времени между 4 неделями и 1 неделей перед каким-либо предполагаемым травмирующим событием, и/или выделенную *Mycobacterium* можно вводить и повторять по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 или более приемов до и/или после какого-либо предполагаемого травмирующего события.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенная *Mycobacterium* может находиться в форме лекарственного средства, вводимого пациенту в лекарственной форме и/или по расписанию, как описано в примерах.

В одном из аспектов изобретения, эффективное количество выделенной *Mycobacterium* можно вводить в форме однократной дозы. Альтернативно, эффективное количество выделенной *Mycobacterium* можно вводить в множественных (повторяющихся) дозах, например, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, десяти или более, или двадцати или более повторяющихся дозах. Предпочтительно, выделенную *Mycobacterium* вводят между приблизительно 4 неделями и 1 сутками перед предполагаемым травмирующим событием, более предпочтительно, между приблизительно 4 неделями и 1 неделей, или между приблизительно 3 неделями и 1 неделей, или приблизительно между 3 неделями и 2 неделями. Введение может быть представлено в однократной или множественных дозах.

Контейнер по изобретению в конкретных случаях может представлять собой флакон, ампулу, шприц, капсулу, таблетку или пробирку. В некоторых случаях выделенную *Mycobacterium* можно лиофилизировать и включать в состав для ресуспендирования перед введением. Однако, в других случаях микобактерии суспендируют в объеме фармацевтически приемлемой жидкости. В некоторых из наиболее предпочтительных вариантов осуществления представлен контейнер, содержащий однократную единичную дозу микобактерий, суспендированную в фармацевтически приемлемом носителе, где единичная доза содержит от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $1 \times 10^{10}$  микобактерий. В некоторых конкретных вариантах осуществления жидкость, содержащую суспендированные микобактерии, предоставляют в объеме между

приблизительно 0,1 мл и 10 мл, или приблизительно 0,5 мл и 2 мл. Понятно, что в конкретных случаях композицию, содержащую микобактерии, в средствах защиты замораживают (т.е. поддерживают при менее, чем приблизительно ноль градусов Цельсия). В вышеописанных композициях представлено идеальное количество единиц для применений, описанных в настоящем документе.

Варианты осуществления, обсуждаемые в контексте способов и/или композиции по изобретению, можно использовать по отношению к любому другому способу или композиции, описанным в настоящем документе. Таким образом, вариант осуществления, относящийся к одному способу или композиции, можно также использовать для других способов и композиций по изобретению.

В некоторых случаях ослабленные микобактерии вводят в конкретные места на субъекте или внутри организма субъекта. Например, композиции микобактерий по изобретению можно вводить поблизости от лимфатических узлов. Таким образом, в конкретных случаях, участки введения композиции микобактерий могут находиться вблизи задних шейных, тонзиллярных, подмышечных, паховых, передних шейных, поднижнечелюстных, подподбородочных или надключичных лимфатических узлов. Такие участки введения могут находиться на правой стороне, на левой стороне или на обеих сторонах тела. В определенных конкретных вариантах осуществления композиции микобактерий вводят вблизи подмышечных, шейных и/или паховых лимфатических узлов. Например, дозу микобактерий можно распределять в тканях, соседних с правым и левым подмышечными лимфатическими узлами и правым и левым паховыми лимфатическими узлами.

В конкретном варианте осуществления дозу микобактерии вводят субъекту посредством внутрикожной инъекции, где дозу распределяют в подмышечной и паховой области по обеим сторонам тела и где присутствуют две инъекции (т.е. две вакцинации) в каждом участке.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления изобретения, способы по изобретению включают в себя введение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз микобактерий, разделенных периодом одни сутки или более. В конкретных предпочтительных вариантах осуществления такие отдельные дозы разделены несколькими сутками, одной неделей, двумя неделями, одним месяцем или более. Например, способы по изобретению могут включать в себя введение 1-5 доз микобактерий в течение периода из трех недель или более. В следующих вариантах осуществления способы по изобретению включает в себя введение 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 2 доз микобактерий в течение периода приблизительно трех недель. Каждая введенная доза может представлять собой такую же или отличную дозу относительно введения предшествующей или последующей дозы. Например, в конкретных случаях является предпочтительным, чтобы доза микобактерий была ниже любой дозы, введенной ранее. Таким образом, в некоторых специфических случаях, вводят дозу микобактерий в приблизительно половине дозы, введенной при любом предшествующем лечении. Такие способы могут являться предпочтительными в конкретных случаях, когда иммунный ответ субъекта на микобактерии больше в ходе последующего лечения. Таким образом, в конкретных случаях, выделенную *Mycobacterium* можно вводить минимальное количество раз, например, за менее чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или менее введений отдельных доз. В некоторых случаях композицию микобактерий вводят дважды.

Композиции микобактерий по изобретению содержат эффективное количество микобактерий, как правило, диспергированных в фармацевтически приемлемом носителе. Фразы «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относятся к

химическим соединениям и композициям, которые не вызывают неблагоприятной, аллергической или другой нежелательной реакции при введении животному, например, такому как человек, при необходимости. Получение фармацевтической композиции, содержащей микобактерии, будет известно специалистам в данной области в свете настоящего описания, как проиллюстрировано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, Более того, понятно, что для введения животному (например, человеку), препараты для парентерального введения должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты. Конкретным примером фармакологически приемлемого носителя, как описано в настоящем документе, является боратный буфер или стерильный солевой раствор (0,9% NaCl).

Как применяют в настоящем документе, «фармацевтически приемлемый носитель» включает в себя все без исключения растворители, диспергирующие среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, замедляющие абсорбцию средства, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, гели, связующие вещества, наполнители, дезинтегрирующие средства, смазывающие средства, подсластители, вкусовые добавки, красители, подобные материалы и их комбинации, как известно специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329).

В предпочтительном варианте осуществления выделенную *Mycobacterium* вводят посредством парентерального способа, выбранного из подкожной, внутрикожной, субдермальной, внутрибрюшинной, внутривенной, внутривезикулярной инъекции, или перорально. Внутрикожная инъекция позволяет доставку всей композиции микобактерий в слой дермы, доступный для иммунного надзора, и таким образом, способный вызывать соответствующий иммунный ответ в местных лимфатических узлах.

Изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

#### ПРИМЕР

#### КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ

В экспериментальной модели, где мышей подвергают стрессовой ситуации, что приводит к некоторым из поведенческих симптомов, наблюдаемых при PTSD, предварительное лечение с помощью *M. vaccae* уменьшает реактивное эмоциональное совладающее поведение. Мыши, помещенные в колонию с доминантным агрессивным самцом, проявляют поведение, отражающее испытанный стресс. Эти мыши демонстрируют, например, увеличенную частоту вертикальной стойки подчинения и увеличенную частоту избегающего поведения. Лечение с помощью *M. vaccae* уменьшало частоту этих типов поведения и фактически увеличивало процент случаев проактивного поведения по отношению к доминантной мыши в любой зарегистрированной временной точке. Эти улучшенные совладающие стратегии перед лицом вызывающего стресс фактора, как можно наблюдать при PTSD, наблюдали также в других тестах связанного с тревожностью поведения и социальной тревожности. Действительно, для мышей после лечения с подошью *M. vaccae* показана пониженная частота связанного с тревожностью поведения, на что указывало увеличенное время, проведенное в открытых рукавах лабиринта по сравнению с мышами после лечения носителем. Лечение *M. vaccae* также предотвращало отсутствие социального предпочтения в тесте социального предпочтения/избегания. Интересно, что экспрессия мРНК триптофангидроксилазы 2 головного мозга являлась значимо увеличенной в ростральном дорсальном ядре шва мышей, предварительно иммунизированных *M. vaccae*. Это имеет отношение к совладающим

стратегиям перед лицом вызывающих стресс факторов, поскольку дофаминергические нейроны в этой области головного мозга вовлечены в пути поощрения. Таким образом, является возможным, что животные после лечения *M. vaccae* ожидают положительного эффекта, и таким образом, этот сдвиг уменьшает стресс неблагоприятного исхода.

5 Сходным образом, в модели на мышах с дополнительным ухудшением воспалительного ответа, ассоциированным с PTSD, для мышей после лечения с помощью *M. vaccae* показано улучшенное равновесие между воспалительным и противовоспалительным ответом, как показано по сниженным уровням IL-6 и повышенным уровням IL-10, соответственно, по сравнению с мышами после лечения

10 носителем в ходе индуцированного DSS колита.

#### Материалы и методы

##### Животные

Самцов мышей C57BL/6 (19-22 г), содержащихся в группах из 4-5 мышей в поликарбонатных клетках (W × L × D: 27 см × 15 см × 42 см) лечили с помощью *M. vaccae* или контрольного носителя (VEH). Кратко, мышам инъецировали s.c. *M. vaccae* [n = 48; 0,1 мг суспензии цельноклеточной убитой нагреванием *M. vaccae* (NCTC11659) в растворе 10 мг/мл, разведенном до 1 мг/мл в 100 мкл стерильного забуференного боратом солевого раствора (BBS)] или VEH (n = 48; 100 мкл BBS) на сутки -21, -14 и -7. После последней инъекции мышей содержали индивидуально в поликарбонатных

20 клетках (W × L × D: 21 см × 14 см × 27 см) в течение одной недели перед началом оценки. Все протоколы экспериментов одобрены Комитетом по ветеринарии и уходу за животными местных органов исполнительной власти, и проведены в соответствии с международными руководствами по этичному использованию животных.

##### Парадигма содержания в хронически субординированных колониях (CSC)

25 Четырех экспериментальных мышей в CSC содержали вместе с более крупным доминантным самцом (30-35 г; получен от скрещивания самки с высокой частотой связанного с тревожностью поведения с самцом C57BL/6) в течение 19 последовательных суток, чтобы индуцировать хронический психологический стресс, как описано ранее<sup>1,2</sup>. Чтобы избежать привыкания в ходе хронического воздействия вызывающего стресс

30 фактора, каждого более крупного самца заменяли новым более крупным самцом на сутки 8 и 15 в 10-00 час. Кратко, мышей содержали в стандартных лабораторных условиях (12-час цикл свет/темнота, включение света в 06-00 час, 22°C, 60% влажность) с водопроводной водой и стандартным кормом для мышей по желанию. Поведение всех мышей (CSC после лечения *M. vaccae* и VEH, и доминантных самцов) регистрировали

35 в течение 1 час на сутки 1, 8 и 15 утром (10-00 час – 11-00 час; немедленно после формирования колоний CSC). Агонистическое поведение анализировали в отношении случаев проактивного эмоционального совладающего поведения (атаки, преследования и залезания на другую мышшь) и случаев реактивного эмоционального поведения (бегства, избегания, поведения принятия вертикальной защитной стойки, подвергания атакам и

40 подвергания залезанию на них).

##### Тест социального предпочтения/избегания (SPAT)

Эффекты лечения *M. vaccae* на поведение социального избегания/тревожности определяли в тесте SPAT. Всех экспериментальных мышей (VEH-SHC; VEH-CSC; *M. vaccae*-SHC; *M. vaccae*-CSC) тестировали в тесте SPAT, как описано ранее<sup>3,4</sup>, на сутки

45 21 между 07-00 час -12-00 час. Кратко, индивидуальную мышшь помещали в бокс для SPAT (W × L × D: 27 см × 45 см × 27 см; интенсивность освещения: 10-40 люкс) на 30 секунд, чтобы позволить ознакомление перед тем, как небольшую пустую клетку из проволочной сетки (W × L × D: 6,5 см × 10 см × 5 см) вводили на 150 секунд. Затем

пустую клетку удаляли, и идентичную клетку, содержащую незнакомого самца мыши, вводили на следующие 150 с. Регистрировали общее пройденное расстояние и время, проведенное в контактной зоне шириной 8 см вокруг клетки из проволочной сетки. Поведение в ходе воздействия нового объекта предоставляет показатель общей тревожности. Поведение в ходе воздействия незнакомой мыши предоставляет показатель социального избегания.

#### Тест в приподнятом крестообразном лабиринте (EPM)

После завершения теста SPAT, эффекты лечения *M. vassae* на связанное с тревожностью поведение оценивали в тесте EPM. Всех экспериментальных мышей (VEN-SHC; VEN-CSC; *M. vassae*-SHC; *M. vassae*-CSC) подвергали тесту EPM в течение 5 минут на сутки 22 между 07-00 час – 12-00 час с 130 люкс в открытых и 30 люкс в закрытых рукавах лабиринта, как описано ранее. Лабиринт, поднятый на 130 см над полом, состоит из двух открытых и двух закрытых рукавов (6 см × 30 см, каждый) лучеобразно расходящихся от центральной платформы (6 см × 6 см) для формирования крестообразной фигуры. Каждую индивидуальную мышь помещали на центральную платформу лицом к закрытому рукаву. Регистрировали время, проведенное в открытых и закрытых рукавах. Количество входов в закрытые рукава лабиринта принимали в качестве показателя двигательной активности.

#### Индукция колита DSS и оценка тяжести

После окончания тестирования EPM, всем экспериментальным мышам (VEN-SHC; VEN-CSC; *M. vassae*-SHC; *M. vassae*-CSC) вводили 1% декстрансульфат натрия (DSS) в питьевой воде в течение одной недели, начиная на сутки 22, и их умерщвляли между 08-00 час и 11-00 час на сутки 29 для оценки тяжести, как описано ранее<sup>4,5</sup>. Кратко, ободочную кишку всех экспериментальных мышей удаляли, очищали и определяли гистологический показатель повреждения. Клетки брыжеечных лимфатических узлов собирали и стимулировали в культуре для измерения секреции цитокинов.

Лечение с помощью *M. vassae* улучшает совладающее поведение перед лицом вызывающего стресс фактора

Определяли эффекты лечения *M. vassae* на общую и социальную тревожность у мышей CSC и SHC, после лечения *M. vassae* и VEN. Лечение с помощью *M. vassae* уменьшает частоту подчиненного и избегающего поведения. В частности, попарные сравнения выявили, что мыши после лечения *M. vassae* демонстрировали значительно меньше вертикальных стоек подчинения, подвергались значительно меньшему количеству атак и демонстрировали меньше панического поведения по сравнению с мышами после лечения VEN на сутки 1 ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$ ;  $p = 0,005$ ). Более того, попарные сравнения показали, что мыши после лечения *M. vassae* демонстрировали значительно меньше избегающего поведения по сравнению с мышами после лечения VEN на сутки 1 ( $p = 0,023$ ) и на сутки 15 ( $p = 0,011$ ). Попарные сравнения выявили, что для что мышей после лечения *M. vassae* показано значительно менее частое подвергание залезанию на них по сравнению с мышами после лечения VEN на сутки 15 ( $p = 0,019$ ), но не на сутки 1 или сутки 8. Процент мышей после лечения *M. vassae*, демонстрирующих проактивное поведение, был значительно выше по сравнению с процентом мышей после лечения VEN (83% по сравнению с 35%;  $p = 0,001$ ; Фиг.1А). Более того, когда рассчитывали суммарный индекс доминирования (вычитая проактивное из реактивного поведения), для мышей после лечения *M. vassae* показали значительно увеличенный суммарный индекс доминирования ( $p = 0,005$ ; Фиг.1В).

#### Тест социального предпочтения/избегания (SPAT)

Время, проведенное в контактной зоне, значительно зависело от присутствия стимула



(мышь в небольшой клетке из проволочной сетки) ( $p < 0,001$ ; Фиг.2). Апостериорный анализ выявил, что время, проведенное в социальной (с мышью внутри клетки) по сравнению с несоциальной (без мыши в клетке) контактной зоне, являлось значимо увеличенным в группе VEH-SHC ( $p = 0,004$ ) и *M. vaccae*-CSC ( $p = 0,002$ ), и приближалось к значимости в группе *M. vaccae*-SHC ( $p = 0,064$ ). Этот эффект отсутствовал в группе VEH-CSC. Это указывает на то, что лечение с помощью *M. vaccae* предотвращает индуцированное CSC отсутствие социального предпочтения. Важно, что общее пройденное расстояние являлось сравнимым среди всех групп лечения.

Тест в приподнятом крестообразном лабиринте (EPM)

Статистический анализ выявил, что процент времени, проведенного мышью в открытых рукавах, являлся значимо увеличенным у мышей CSC после лечения *M. vaccae* по сравнению с соответствующими мышью SHC ( $p = 0,002$ ; Фиг.3). Это указывает на то, что *M. vaccae* обладает антианксиолитическими свойствами.

Предварительная иммунизация с помощью *M. vaccae* облегчала индуцированное CSC усиление индуцированного DSS колита

Определяли эффект предварительной иммунизации *M. vaccae* на индуцированное CSC усиление индуцированного DSS колита (Фиг.4). Воздействие CSC по сравнению с SHC усиливало гистологический показатель повреждения у мышей после лечения VEH ( $p = 0,041$ ). Лечение *M. vaccae* предотвращало увеличение показателя повреждения (Фиг.4B). Более того, лечение *M. vaccae* предотвращало индуцированное CSC увеличение секреции провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$  ( $p = 0,014$ ; Фиг.4D) и IL-6 ( $p = 0,001$ ; Фиг.4E). Более того, у мышей CSC после лечения *M. vaccae* происходила секреция повышенных концентраций IL-10 по сравнению с соответствующими мышью SHC ( $p = 0,036$ ; Фиг.4F), эффект, который отсутствовал у мышей после лечения VEH.

Ссылки

1. Reber SO, Birkeneder L, Veenema AH, Obermeier F, Falk W, Straub RH, Neumann ID. Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: implications and mechanisms. *Endocrinology* 2007;148:670-82.

2. Schmidt D, Reber SO, Botteron C, Barth T, Peterlik D, Uschold N, Mannel DN, Lechner A. Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain, Behavior and Immunity* 2010;24:1097-1104.

3. Haller J, Bakos N. Stress-induced social avoidance: A new model of stress-induced anxiety? *Physiology & Behavior* 2002;77:327-332.

4. Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID. Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 2006;147:4968-4976.

5. Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Veenema AH, Neumann ID. Aggravation of DSS-induced colitis after chronic subordinate colony (CSC) housing is partially mediated by adrenal mechanisms. *Stress* 2008; 11:225-234.

#### (57) Формула изобретения

1. Применение *M. vaccae* для предупреждения посттравматического стрессового расстройства (PTSD) и симптомов, ассоциированных с таким расстройством.

2. Применение по п.1, где *M. vaccae* содержит цельноклеточную *Mycobacterium*.

3. Применение по п.1, где *M. vaccae* содержит непатогенную убитую нагреванием *M. vaccae*.

4. Применение по п.1, где *M. vaccae* представляет собой шероховатый вариант.

5. Применение *M. vaccae* по п.1, в форме вакцинной композиции, необязательно,

содержащей адьювант.

6. Применение по п.1, где *M. vaccae* предназначена для введения военнослужащим.

7. Применение по п.1, где *M. vaccae* предназначена для введения в повторяющихся дозах.

5 8. Применение по п.1, где *M. vaccae* присутствует в единичной дозе, содержащей эффективное количество непатогенной убитой нагреванием *M. vaccae* от  $10^7$  до  $10^9$  клеток.

9. Применение по п.1, где *M. vaccae* предназначена для введения посредством парентерального, перорального, подязычного, назального способа или способа введения в легкие.

10. Применение по п.9, где *M. vaccae* предназначена для введения посредством перорального способа.

11. Применение по п.9, где парентеральный способ выбран из подкожной, внутрикожной, субдермальной, внутрибрюшинной, внутривенной или внутривенной инъекции.

12. Применение по п.1, где *M. vaccae* предотвращает по меньшей мере один признак или симптом посттравматического стрессового расстройства, где признак или симптом выбран из дезорганизованного или возбужденного поведения, проблем с восприятием боли и болевой устойчивостью, головной боли, трудности с засыпанием или поддержанием сна, повторяющейся игры, отражающей аспекты травмы, пугающих снов с отсутствием узнаваемого содержания и реконструкции травмы.

13. Применение по любому из предшествующих пунктов, где *M. vaccae* предотвращает по меньшей мере один симптомокомплекс посттравматического стрессового расстройства, где симптомокомплекс выбран из повторяющегося события/вторжения, избегания/ощепенения и гиперактивности.

14. Применение *M. vaccae* для введения субъекту для предупреждения у субъекта повышения уровней IL-6 после воздействия травмирующего события.

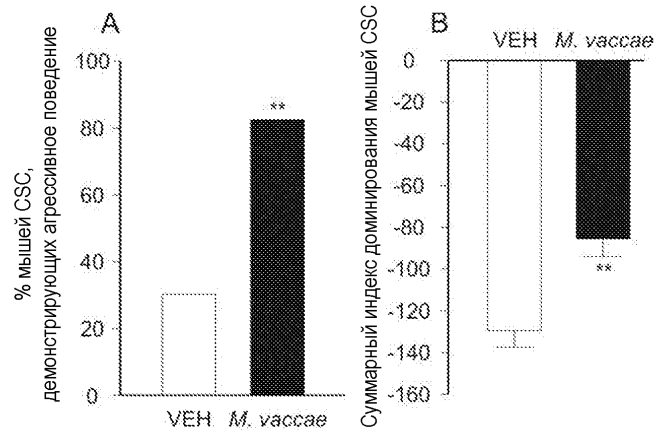
15. Применение по п.14, где указанное травмирующее событие выбрано из военных действий, терактов, физического насилия, сексуального насилия, дорожно-транспортных происшествий и стихийных бедствий.

16. Применение по п.13 или 14, где субъект является военнослужащим.

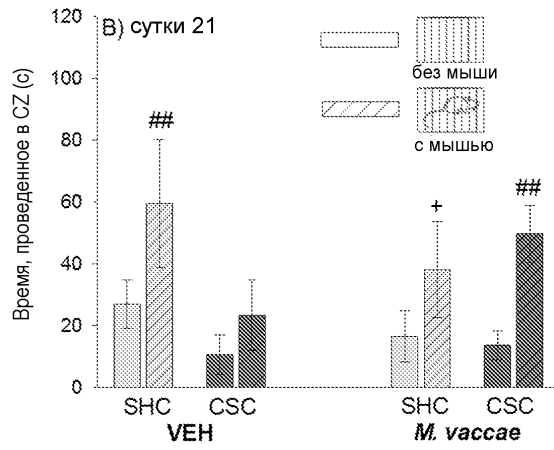
35

40

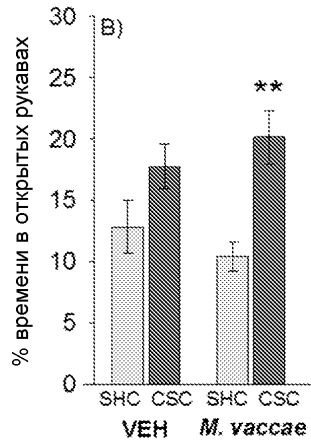
45



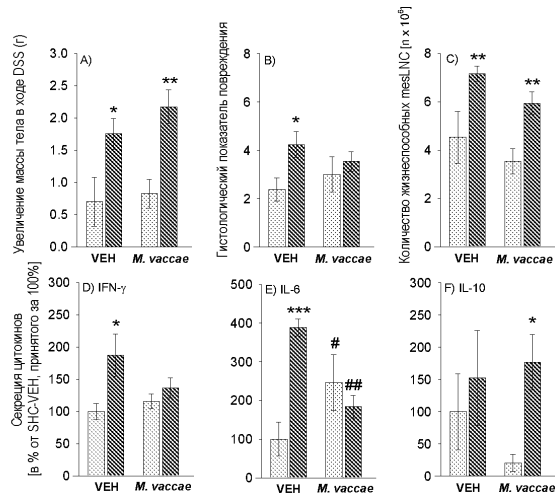
Фиг. 1



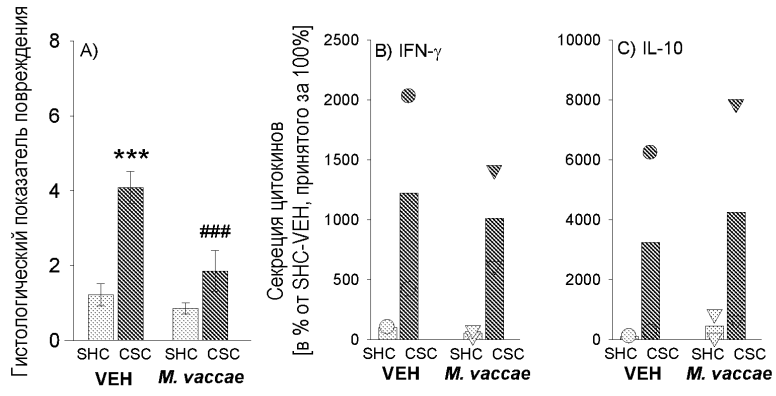
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5