

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992648** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.03.13

(22) Дата подачи заявки
2018.06.14

(51) Int. Cl. *A61K 35/74* (2015.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ РОДА MEGASPHERA,
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 1709468.1; 1709534.0; 1712851.3;
1803826.5; 1805989.9; 1805991.5;
1805990.7; 1806779.3; 1806780.1

(32) 2017.06.14; 2017.06.15; 2017.08.10;
2018.03.09; 2018.04.11; 2018.04.11;
2018.04.11; 2018.04.25; 2018.04.25

(33) GB

(86) PCT/EP2018/065858

(87) WO 2018/229216 2018.12.20

(71) Заявитель:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Малдер Имке Элизабет, Юилл
Саманта, Этторре Анна, Ахмед Суад,
Фотиаду Партена, Урсиа Джозеф Роби
Айринган, Савиньяк Элен (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены композиции, содержащие бактериальные штаммы, для лечения и предупреждения нейродегенеративных заболеваний.

A1

201992648

201992648

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560461EA/092

КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ШТАММ РОДА MEGASPHERA, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение принадлежит к области композиций, содержащих бактериальные штаммы, выделенные из пищеварительного тракта млекопитающих, и применению таких композиций в лечении заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Считается, что кишечник человека является стерильным *in utero*, однако он подвергается воздействию большого разнообразия материнских и средовых микроорганизмов непосредственно после рождения. Таким образом, происходит динамический период микробной колонизации и сукцессии, которые находятся под влиянием факторов, таких как способ доставки, окружение, питание и генотип хозяина, все из которых влияют на состав кишечной микробиоты, особенно во время раннего периода жизни. Впоследствии микробиота стабилизируется и становится похожей на присущую взрослому организму [1]. Микробиота кишечника человека содержит более чем 500-1000 различных фило типов, принадлежащих по сути двум основным бактериальным типам, Bacteroidetes и Firmicutes [2]. Успешные симбиотические связи, возникающие в результате бактериальной колонизации кишечника человека, привели к возникновению широкого разнообразия метаболических, структурных, защитных и других полезных функций. Повышенная метаболическая активность колонизированного кишечника обеспечивает то, что иным образом неперевариваемые компоненты пищи разрушаются с высвобождением побочных продуктов, обеспечивая важный источник питательных веществ для хозяина. Аналогичным образом, иммунологическая важность микробиоты кишечника является общепризнанной и представлена в качестве примера у безмикробных животных, которые имеют нарушенную иммунную систему, которая функционально восстанавливается после введения комменсальных бактерий [3-5].

Значительные изменения состава микробиоты были описаны при желудочно-кишечных нарушениях, таких как воспалительная болезнь кишечника (IBD - inflammatory bowel disease). Например, уровни бактерий XIVa кластера Clostridium снижаются у пациентов с IBD, в то время как число E. coli повышается, предполагая сдвиг баланса симбионтов и патобионов в кишечнике [6-9].

Учитывая потенциальный положительный эффект, который определенные бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, различные штаммы были предложены для применения в лечении различных заболеваний (см., например, [10-13]). Кроме того, определенные штаммы, в том числе главным образом штаммы Lactobacillus и Bifidobacterium, были предложены для применения в лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые непосредственно не связаны с кишечником (см. [14] и [15] в целях ознакомления). В то же время, связь между

различными заболеваниями и различными бактериальными штаммами, а также точные эффекты определенных бактериальных штаммов на кишечник и на системном уровне и на любые определенные типы заболеваний недостаточно охарактеризованы, особенно в случае нейродегенеративных нарушений.

В последнее время отмечался повышенный интерес в данной области техники касательно изменений в микробиоме кишечника, которые могут играть патофизиологическую роль в заболеваниях головного мозга человека [16]. Результаты доклинических и клинических исследований в значительной степени предполагают наличие связи между развитием головного мозга и микробиотой [17]. Все большее число фактов из доклинической литературы продемонстрировали двунаправленную передачу сигналов между головным мозгом и микробиомом, включающую нейрокринные и эндокринные сигнальные системы. Действительно повышенные уровни видов *Clostridium* в микробиоме были связаны с нарушениями головного мозга [18], а нарушение баланса типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* также наблюдалось при нарушениях развития головного мозга [19]. Предположения касательно того, что измененные уровни комменсалов кишечника, в том числе таковых родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* и *Ruminococcus* и семейства *Alcaligenaceae* играют роль в иммуноопосредованных нарушениях центральной нервной системы (ЦНС), оценивали в исследованиях, предполагающих отсутствие изменения в микробиоте у пациентов и здоровых субъектов [19]. Также имели место предположения касательно того, что введение пробиотиков может быть эффективным в лечении неврологических нарушений. В то же время указанные исследования не привели к заключению о том, что сами по себе пробиотические композиции могут приводить к достижению терапевтических эффектов в отношении лечения нейродегенерации, и не показали каких-либо полезных эффектов в отношении каких-либо определенных бактерий [20, 21]. Это указывает на то, что в настоящее время практический эффект связи между микробиомом и заболеваниями головного мозга человека является слабо охарактеризованным. Соответственно более прямые аналитические исследования требуются для идентификации терапевтического влияния изменения микробиомы на нейродегенеративные нарушения.

В данной области техники имеет место требование к новым способам лечения нейродегенеративных нарушений. Также имеет место требование к потенциальным эффектам бактерий кишечника, подлежащих характеристике, в связи с чем могут быть разработаны новые виды терапии с помощью бактерий кишечника.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы данного изобретения разработали новые виды терапии для лечения и предупреждения нейродегенеративных нарушений. Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальные штаммы из рода *Megasphaera* могут быть эффективными для лечения нейродегенеративных заболеваний. Как описано в примерах, введение композиций, содержащих *Megasphaera massiliensis*, может приводить к защите от активных форм кислорода, тем самым выступая в качестве нейропротектора. Авторы

данного изобретения также обнаружили, что лечение *Megasphaera massiliensis* может приводить к снижению активации провоспалительных молекул, таких как NF κ B и IL-6, с помощью LPS и мутантного α -синуклеина. Авторы данного изобретения обнаружили, что лечение *Megasphaera massiliensis* может приводить к снижению активности деацетилирования гистонов и перекисного окисления липидов *in vitro*, которые могут способствовать снижению клеточной смерти и апоптоза. Авторы данного изобретения также обнаружили, что *Megasphaera massiliensis* может продуцировать индол, который может ослаблять воспаление и окислительный стресс. Кроме того, авторы данного изобретения продемонстрировали, что лечение *Megasphaera massiliensis* может приводить к повышению уровней кинуренина.

Авторы данного изобретения также обнаружили, что *Megasphaera massiliensis* продуцирует определенные органические кислоты, в том числе гексановую кислоту, валериановую кислоту и 4-гидроксифенилуксусную кислоту. Авторы данного изобретения также обнаружили, что *Megasphaera massiliensis* может приводить к повышению активации провоспалительного цитокина IL-8, который может облегчать активацию миелинизации нейронов. Авторы данного изобретения также обнаружили, что лечение комбинацией *Megasphaera massiliensis* и ретиноевой кислотой может приводить к повышению секреции нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), который может облегчать активацию нейрогенеза и нейритогенеза и/или предупреждать клеточную смерть. Авторы данного изобретения также обнаружили, что лечение *Megasphaera massiliensis*, которая может продуцировать валериановую кислоту, может приводить к снижению деацетилирования гистонов, которое может способствовать снижению клеточной смерти и апоптоза. Кроме того, авторы данного изобретения также обнаружили, что *Megasphaera massiliensis* может продуцировать гексановую кислоту, которая может быть нейропротекторной или нейропрепаративной, например, в результате активации роста нейритов. Авторы данного изобретения обнаружили, что *Megasphaera massiliensis*, которая может продуцировать гексановую кислоту, приводит к повышению экспрессии MAP2 (белка, ассоциированного с микротрубочками 2), который считается необходимым для образования микротрубочек в нейритогенезе. Таким образом, авторы данного изобретения также обнаружили, что *Megasphaera massiliensis*, которая может продуцировать гексановую кислоту, может быть использована для активации роста нейритов. *Megasphaera massiliensis* и другие бактерии, которые продуцируют органические кислоты, например, гексановую кислоту, валериановую и 4-гидроксифенилуксусную кислоту, таким образом, могут быть пригодными для лечения нейродегенеративных нарушений.

В первом варианте осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в лечении, например, для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена

композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранных из группы, состоящей из: болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцереbellлярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в лечении или предупреждении болезни Паркинсона, такой как болезнь Паркинсона в результате действия факторов окружающей среды, семейная болезнь Паркинсона, или болезнь Паркинсона, ассоциированная с общим воспалительным статусом. Авторы данного изобретения обнаружили, что лечение штаммами *Megasphaera* может приводить к активации провоспалительных молекул, таких как NFκB и IL-6, с помощью LPS и мутантного α-синуклеина в моделях *in vitro* болезни Паркинсона в результате действия факторов окружающей среды и семейной болезни Паркинсона. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, для применения в лечении болезни Паркинсона. Композиции, в которых используется *Megasphaera massiliensis*, могут быть особенно эффективными для лечения болезни Паркинсона.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания с ранним началом. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в способе предупреждения или задержки начала прогрессирования нейродегенеративного заболевания.

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения бактериальный штамм в композиции представляет собой *Megasphaera massiliensis*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, которые имеют последовательность 16S рНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рНК бактериального штамма *Megasphaera massiliensis*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16S рНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO:1 или 2. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO:2. Предпочтительно

бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO:2.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению предназначена для перорального введения. Пероральное введение штаммов по данному изобретению может быть эффективным для нейродегенеративных нарушений. Кроме того, пероральное введение является удобным для пациентов и врачей и способствует доставке в кишечник и/или частичной или полной колонизации кишечника.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению содержит бактериальный штамм, который был лиофилизирован. Лиофилизация представляет собой эффективную и удобную методику получения стабильных композиций, которые обеспечивают доставку бактерий.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложен продукт питания, содержащий композицию, описанную выше.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена вакцинная композиция, содержащая композицию, описанную выше.

Кроме того, в данном изобретении предложен способ лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*.

При разработке указанного выше изобретения авторы данного изобретения обнаружили и охарактеризовали бактериальный штамм, который является особенно пригодным для лечения. Как показано, штамм *Megasphaera massiliensis* по данному изобретению является эффективным для лечения заболеваний, описанных в данном документе, таких как нейродегенеративные заболевания. Таким образом, в другом аспекте в данном изобретении предложена клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированная под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также предложены композиции, содержащие такие клетки или биологически чистые культуры таких клеток. В данном изобретении также предложена клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения композиция предназначена для применения в лечении повреждения головного мозга. Нейропротекторная активность композиций по данному изобретению и их способность снижать уровни активности гистондеацетилазы (HDAC) может делать их пригодными для лечения повреждения головного мозга. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении инсульта, например, лечения повреждения головного мозга, являющегося результатом инсульта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: Жизнеспособность клеток нейробластомы

Фиг. 2: Снижение секреции IL-6

Фиг. 3: Секреция IL-8

Фиг. 4: Ингибирование секреции IL-6 и IL-8 α -синуклеином

Фиг. 5: Ингибирование индуцированной α -синуклеином активации промотора NF κ B

Фиг. 6: Ингибирование индуцированной LPS активации промотора NF κ B

Фиг. 7: Изменение антиоксидантной способности

Фиг. 8: Изменение суммарной антиоксидантной способности (окисление липидов)

Фиг. 9: Изменение активности гистондеацетилазы (HDAC)

Фиг. 10: Уровень продуцирования индола

Фиг. 11: Уровень продуцирования кинуренина

Фиг. 12: Средние уровни дофамина (DA) (Фиг. 12A), уровни DOPAC (Фиг. 12B) и уровни HVA (Фиг. 12C) в полосатом теле. Данные изображены в виде среднего+SEM.

Фиг. 13: Активация роста нейритов: световая микроскопия и экспрессия гена MAP2 (Фиг. 13A), иммунофлуоресцентная микроскопия с использованием фаллоидина (Фиг. 13B)

Фиг. 14: Изменение уровней ROS в (a) клетках U373 и (b) клетках SHSY-5Y

Фиг. 15: Нейропротекция - жизнеспособность клеток. На Фиг. 15 продемонстрированы те же самые данные, что и на Фиг. 1.

Фиг. 16: Индуцированные штаммами изменения активности гистондеацетилазы в цельных клетках и клеточных лизатах (Фиг. 16A), индуцированные кислотами изменения активности гистондеацетилазы (Фиг. 16B), продуцирование метаболитов штаммами (Фиг. 16C)

Фиг. 17: Ингибирование HDAC1 (Фиг. 17A), ингибирование HDAC2 (Фиг. 17B), ингибирование HDAC3 (Фиг. 17C)

Фиг. 18: Ингибирование HDAC I класса (Фиг. 18A); ингибирование HDAC1 (Фиг. 18B); ингибирование HDAC2 (Фиг. 18C); ингибирование HDAC3 (Фиг. 18D)

Фиг. 19: Уровень продуцирования BDNF

Фиг. 20: Уровни продуцирования метаболитов - нейромедиаторы в головном мозге

Фиг. 21: Уровни продуцирования метаболитов - органические кислоты в супернатанте

Фиг. 22: Влияние на функцию кишечного барьера

Фиг. 23: Продуцирование нейромедиаторов в головном мозге

Фиг. 24: Изменения в экспрессии рецепторов в гиппокампе - А) рецептора окситоцина, В) рецептора вазопрессина, С) глюкокортикоидного рецептора и D) минералокортикоидного рецептора

Фиг. 25: Изменения экспрессии в гиппокампе А) кортикотропин-рилизинг гормона (CRH), В) экспрессии BDNF и С) TLR4

Фиг. 26: А) Изменения экспрессии рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1) и В) экспрессии рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2) в гиппокампе

Фиг. 27: Изменения экспрессии в гиппокампе А) фактора некроза опухоли, В) интерлейкина 1b и С) IL-6

Фиг. 28: А) Изменения экспрессии в гиппокампе интегрин альфа М (CD11b) и В) изменения экспрессии в гиппокампе серотонинового рецептора 1А (рецептор 5-HT1A)

Фиг. 29: А) Изменения экспрессии субъединицы 2А глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA в гиппокампе (Grin2A) и В) экспрессии субъединицы 2В глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B) в гиппокампе

Фиг. 30: Изменения экспрессии в гиппокампе А) А-рецептора 2 гамма-аминомасляной кислоты (GABA A2), В) В-рецептора 1 гамма-аминомасляной кислоты (GABA BR1) и С) дофаминового рецептора 1 (DRD1)

Фиг. 31: Изменения в экспрессии рецепторов в миндалине - А) рецептора окситоцина, В) рецептора вазопрессина, С) глюкокортикоидного рецептора и D) минералокортикоидного рецептора

Фиг. 32: Изменения в экспрессии в миндалине А) нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), В) Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4), С) рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1) и D) рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2)

Фиг. 33: Изменения экспрессии в миндалине А) интегрин альфа М (CD11b), В) интерлейкина 6 (IL-6), С) субъединицы 2А глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2A) и D) субъединицы 2В глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B)

Фиг. 34: Изменения экспрессии в миндалине А) субъединицы альфа 2 рецептора ГАМК-А (GABRA2), В) субъединицы рецептора 1 типа В ГАМК-А (GABBR1) и С) дофаминового рецептора 1 (DRD1)

Фиг. 35: Изменения экспрессии в префронтальной коре А) рецептора окситоцина, В) нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), С) минералокортикоидного рецептора и D) глюкокортикоидного рецептора

Фиг. 36: Изменения экспрессии в префронтальной коре А) Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4), В) рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1), С) рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2) и D) интегрин альфа М (CD11b)

Фиг. 37: Изменения экспрессии в префронтальной коре А) интерлейкина 6 (IL-6), В) субъединицы 2А глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2A), С) субъединицы 2В глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B) и D) субъединицы альфа 2 рецептора ГАМК-А (GABRA2)

Фиг. 38: Изменения экспрессии в префронтальной коре А) субъединицы рецептора 1 типа В ГАМК-А (GABBR1) и В) дофаминового рецептора 1 (DRD1)

Фиг. 39: Изменения экспрессии в толстой кишке А) триптофангидролазы 1 (Tph1)

и В) индоламин-2,3-диоксигеназы-1 (IDO1)

Фиг. 40: Изменения экспрессии в подвздошной кишке А) триптофангидролазы 1 (Trp1) и В) индоламин-2,3-диоксигеназы-1 (IDO1)

Фиг. 41: Изменения уровней циркулирующих метаболитов триптофана А) кинуренина, В) триптофана и С) показателя метаболизма кинуренин/триптофан

Фиг. 42: Влияние на продуцирование интерферона γ из спленоцитов мышей, получающих в пищу MRx0029

Фиг. 43: Влияние на продуцирование интерлейкина 1β из спленоцитов

Фиг. 44: Влияние на продуцирование интерлейкина 6 из спленоцитов

Фиг. 45: Влияние на продуцирование фактора некроза опухоли из спленоцитов

Фиг. 46: Влияние на продуцирование интерлейкина 10 из спленоцитов

Фиг. 47: Влияние на продуцирование хемоаттрактанта CXCL1 из спленоцитов

Фиг. 48: Изменения уровней короткоцепочечных жирных кислот в слепой кишке

Фиг. 49: Индуцированные MRx0029 и MRX005 изменения уровней экспрессии генов актина, виллина, окклюдина, TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE.

Фиг. 50: Дифференцировка клеток SHSY5Y, индуцированная MRx0005 и MRx0029. (A-C) Иллюстративные изображения иммуномеченных фаллоидином и MAP2 клеток. (D-F) Изображения A-C при слиянии с изображениями с DAPI. (G-I) Иммуномеченные $\beta 3$ тубулином клетки. (J-L) Изображения при слиянии с изображениями с DAPI. Увеличение $\times 630$. Вестерн-блоттинг эффектов обработки MRx0005 и MRx0029 на клетки SHSY5Y. Мембраны для вестерн-блоттинга зондировали антителами к MAP2 (M) и $\beta 3$ тубулину (N). Актин использовали в качестве контроля нагрузки. Нижние панели: иллюстративные блоты на основе одного из шести отдельных экспериментов; верхние панели: относительная денситометрическая интенсивность.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные штаммы

Композиции по данному изобретению содержат бактериальный штамм рода *Megasphaera*. Указанные примеры демонстрируют, что бактерии данного рода являются пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. Предпочтительные бактериальные штаммы представляют собой вид *Megasphaera massiliensis*.

Примеры видов *Megasphaera* для применения в данном изобретении включают в себя *Megasphaera elsdonii*, *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera massiliensis*, *Megasphaera indica*, *Megasphaera paucivorans*, *Megasphaera sueciensis* и *Megasphaera micronuciformis*. Дополнительным примером вида *Megasphaera* для применения в данном изобретении является *Megasphaera hexanoica*. *Megasphaera* представляют собой облигатно анаэробных сбраживающих лактат желудочно-кишечных микроорганизмов жвачных и нежвачных млекопитающих, в том числе людей.

Типовой штамм *M. massiliensis* представляет собой NP3 (=CSUR P245=DSM 26228)

[22]. Номер доступа в GenBank последовательностей генов 16S рРНК штамма *M. massiliensis* NP3 представляет собой JX424772.1 (раскрытый в данном документе в виде SEQ ID NO:1).

Бактерия *Megasphaera massiliensis*, исследуемая в разделе Примеры, обозначается в данном документе как штамм MRx0029. Последовательность 16S рРНК штамма MRx0029, который был исследован, предложена в SEQ ID NO:2.

Штамм MRx0029 был депонирован с разрешения международного депозитария NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия) 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 13 июля 2017 г. в виде “*Megasphaera massiliensis* MRx0029” и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42787.

Бактериальные штаммы, близкородственные штамму, исследованному в примерах, также, как предполагается, будут эффективными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рРНК бактериального штамма *Megasphaera massiliensis*. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO:1 или 2. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO:2. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO:2.

Бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 или NP3, также, как предполагается, будут эффективными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. Биотип представляет собой близкородственный штамм, который имеет те же самые или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 или NP3 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью секвенирования других нуклеотидных последовательностей штаммов MRx0029 или NP3. Например, по сути весь геном может быть секвенирован, а биотиповой штамм для применения в данном изобретении может иметь, по меньшей мере, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентичность последовательности в пределах, по меньшей мере, 80% своего всего генома (например, в пределах, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% или 99%, или в пределах своего всего генома). Другие подходящие последовательности для применения в идентификации биотиповых штаммов могут включать в себя hsp60 или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP или [23]. Биотиповые штаммы могут иметь последовательности, по меньшей мере, с 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9%

идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью штаммов MRx0029 или NP3.

В качестве альтернативы штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 или NP3 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с использованием штаммов MRx0029 или NP3 и рестрикционного анализа фрагментов и/или ПЦР, например, с помощью полиморфизма длины флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP) и ПЦР-фингерпринтинга повторяющихся ДНК-элементов (гер), или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23S rDNA. В предпочтительных вариантах осуществления такие методики могут быть использованы для идентификации других штаммов *Megasphaera massiliensis*.

В определенных вариантах осуществления штаммы, которые представляют собой биотипы штаммов MRx0029 или NP3 и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, представляют собой штаммы, которые обеспечивают тот же самый паттерн, что и штаммы MRx0029 или NP3 при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), например, при использовании фермента рестрикции Sau3AI (иллюстративные способы и руководство см., например, [24]). В качестве альтернативы биотиповые штаммы идентифицируют в виде штаммов, которые имеют те же самые паттерны сбраживания углеводов, что и штаммы MRx0029 или NP3.

Другие штаммы *Megasphaera*, которые являются пригодными в композициях и способах по данному изобретению, такие как биотипы штаммов MRx0029 или NP3, могут быть идентифицированы с помощью любого подходящего способа или стратегии, в том числе анализов, описанных в примерах. Например, штаммы для применения в данном изобретении могут быть идентифицированы с помощью культивирования с клетками нейробластомы и последующей оценки уровней цитокинов и уровней нейропротекции или нейропролиферации. В частности, бактериальные штаммы, которые имеют аналогичные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены к штаммам MRx0029 или NP3, могут быть пригодными в данном изобретении. Пригодный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность по отношению к штаммам MRx0029 или NP3. В частности, биотиповой штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в отношении моделей нейродегенеративных заболеваний и сопоставимые эффекты в отношении уровней цитокинов, что и эффекты, продемонстрированные в разделе Примеры, которые могут быть идентифицированы с помощью использования протоколов культивирования и введения, описанных в разделе Примеры.

Особенно предпочтительным штаммом по данному изобретению является штамм *Megasphaera massiliensis* MRx0029. Он представляет собой иллюстративный штамм, исследуемый в примерах и, как показано, является эффективным для лечения заболеваний. Таким образом, в данном изобретении предложена клетка, такая как

выделенная клетка, штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного. В данном изобретении также предложена композиция, содержащая клетку штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного. В данном изобретении также предложена биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029. В данном изобретении также предложена клетка штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

Особенно предпочтительным штаммом по данному изобретению является штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 42787. Он представляет собой иллюстративный штамм MRx0029, исследуемый в примерах и, как показано, является эффективным для лечения заболеваний. Таким образом, в данном изобретении предложена клетка, такая как выделенная клетка, штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также предложена композиция, содержащая клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также предложена биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787. В данном изобретении также предложена клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

Производное штамма по данному изобретению может представлять собой дочерний штамм (потомство) или штамм, культивированный (субклонированный) из исходного штамма. Производное штамма по данному изобретению может быть модифицированным, например, на генетическом уровне, без устранения биологической активности. В частности, производный штамм по данному изобретению является терапевтически активным. Производный штамм будет иметь сопоставимую терапевтическую активность по отношению к штамму MRx0029. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в отношении моделей нейродегенеративных заболеваний и сопоставимые эффекты в отношении уровней цитокинов, что и эффекты, продемонстрированные в разделе Примеры, которые могут быть идентифицированы с помощью использования протоколов культивирования и введения, описанных в разделе Примеры. Производное штамма MRx0029 будет, как правило, представлять собой биотип штамма MRx0029.

Ссылки на клетки штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029 охватывают любые клетки, которые имеют те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штамм MRx0029, и такие клетки охвачены данным изобретением.

В предпочтительных вариантах осуществления бактериальные штаммы в композициях по данному изобретению являются жизнеспособными и способными частично или полностью колонизировать кишечник.

Авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis*

приводят к снижению активации воспалительных цитокинов, таких как IL-6, и к повышению активации воспалительного цитокина IL-8. IL-8 был связан с образованием миелиновых оболочек [25]. Хроническое воспаление, индуцированное IL-6, может в конечном итоге приводить к клеточной смерти. Таким образом, бактериальные штаммы по данному изобретению являются особенно пригодными в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений. В некоторых вариантах осуществления бактериальные штаммы являются пригодными в лечении патологических состояний, характеризующихся повышенной активацией IL-6. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся демиелинизацией. Многие нейродегенеративные заболевания характеризуются демиелинизацией. Демиелинизация препятствует передаче потенциалов действия в нейронах, нарушая эффективное взаимодействие в нервной системе. Было показано, что IL-8 положительно влияет на образование и репарацию миелиновых оболочек. Таким образом, композиции по данному изобретению являются особенно эффективными в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений, характеризующихся демиелинизацией, таких как рассеянный склероз.

Авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* по данному изобретению приводят к облегчению симптомов нейродегенеративных заболеваний в моделях болезни. Например, авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Megasphaera massiliensis* способствуют росту нейритов *in vitro*, и, таким образом, могут быть использованы в активации репарации нейронов с целью лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, бактериальные штаммы по данному изобретению предназначены для лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний.

Авторы данного изобретения также обнаружили, что бактериальные штаммы по данному изобретению приводят к повышению активации BDNF. BDNF представляет собой нейротрофический фактор, который, как было показано, приводит к усилению дифференцировки и выживаемости нейронов. Таким образом, композиция по данному изобретению может быть использована в способе повышения выживаемости нервных клеток в лечении или предупреждении нейродегенеративных заболеваний.

Дополнительной бактерией, которая может быть использована в композициях по данному изобретению, является вид *Parabacteroides distasonis*. Указанные примеры демонстрируют, что как *Parabacteroides distasonis*, так и *Megasphaera massiliensis* имеют нейропротекторную активность, однако продуцируют различные метаболиты и могут иметь различные механизмы действия и специфическую нейропротекторную активность. Таким образом, указанные виды могут быть особенно эффективными при использовании в комбинации. В предпочтительных вариантах осуществления композиция содержит штамм вида *Parabacteroides distasonis* и штамм вида *Megasphaera massiliensis*.

Бактерию *Parabacteroides distasonis*, депонированную под номером доступа

NCIMB 42382, исследовали в разделе Примеры и также обозначали в данном документе как штамм MRx0005. MRX0005, MRX005, MRx005 и MRx0005 используют в данном документе взаимозаменяемо. Последовательность 16S рНК штамма MRx0005, который был исследован, предложена в SEQ ID NO:17. Штамм MRx0005 был депонирован с разрешения международного депозитария NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия) GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 12 марта 2015 г. в виде "Parabacteroides sp 755" и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. впоследствии изменила свое название на 4D Pharma Research Limited.

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42787, или его производное или биотип, и штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42382, или его производное или биотип, предпочтительно для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Паркинсона.

Терапевтическое применение

Как продемонстрировано в примерах, бактериальные композиции по данному изобретению являются эффективными для лечения нейродегенеративных нарушений. В частности, лечение композициями по данному изобретению приводит к повышению нейропролиферации или нейритогенезу и выступает в качестве нейропротектора против агентов, которые приводят к разрушению дофаминергических нейронов. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений, которые являются результатом гибели нейронов.

Композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активации промотора NF κ B, который приводит к активации продуцирования цитокинов, например, IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α и IL-6. Обработка клеток мутантным α -синуклеином представляет собой модель семейной болезни Паркинсона. Точечная мутация в положении 53 от аденина до треонина приводит к неправильной укладке α -синуклеина. Некорректно уложенный α -синуклеин впоследствии приводит к агрегации в нерастворимые фибриллы, которые образуют тельца Леви. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений, которые являются результатом нейровоспаления, неправильной укладки белков и/или средового воздействия. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для лечения семейной болезни Паркинсона. Активация промотора NF κ B опосредована лигандом TLR4. Как известно, TLR4 опосредует клеточную смерть в мышинной модели MPTP, которая имитирует болезнь Паркинсона. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для ингибирования способности передачи сигнала с участием TLR4 активировать промотор NF κ B. Следует особенно отметить, что в случае PD как TLR2, так и TLR4, как было

обнаружено, активированы в головном мозге пациентов с PD [26]. Кроме того, α -syn был описан в качестве лиганда TLR2 [27] и с помощью клеток НЕК-TLR4 было продемонстрировано, что α -syn также представляет собой лиганд TLR4 [28].

Композиции по данному изобретению приводят к снижению секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, которые могут быть индуцированы липополисахаридом (LPS). Обработка клеток LPS имитирует болезнь Паркинсона, вызываемую средовыми факторами. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для снижения секреции IL-6. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для лечения болезни Паркинсона в результате действия факторов окружающей среды.

Примеры нейродегенеративных заболеваний, подлежащих лечению с помощью композиций по данному изобретению, включают в себя: болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцеребеллярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации. Дополнительное заболевание, подлежащее лечению композициями по данному изобретению, представляет собой прогрессирующую воспалительную нейропатию.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в ослаблении гибели нейронов, в частности, при лечении нейродегенеративных нарушений. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в защите нейронов, в частности, при лечении нейродегенеративных нарушений.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении или предупреждении потери дофаминергических клеток в черной субстанции. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении или предупреждении дегенерации дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении или предупреждении дегенерации дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции и последующей потери их проекционных нервных волокон в полосатом теле. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении или предупреждении потери нигростриальных дофаминергических нейронов.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней дофамина. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней DOPAC (3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней дофамина и DOPAC. В определенных вариантах осуществления уровни дофамина и/или DOPAC в полосатом теле повышаются. Уровни дофамина и DOPAC могут быть измерены с помощью любого подходящего способа, известного в данной области техники, такого как радиоферментативный способ, например, в плазме крови или CSF (например, описанный [29]), или способ ВЭЖХ с обращенной фазой, возможно, с электрохимической детекцией, например, в плазме крови или CSF (например, описанный в [30]).

Нейропротекторные свойства композиций по данному изобретению, показанные в разделе Примеры, означают, что композиции могут быть особенно эффективными для предупреждения или задержки начала или прогрессирования нейродегенеративных нарушений. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения при задержке начала прогрессирования нейродегенеративных нарушений.

Композиции по данному изобретению могут приводить к повышению секреции IL-8. IL-8, как было показано, играет определенную роль в миелинизации нейронов. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть использованы для повышения секреции IL-8.

Терапевтические композиции по данному изобретению могут приводить к повышению активации BDNF. BDNF действует на определенные нейроны центральной нервной системы с целью поддержания выживаемости существующих нейронов и содействия росту и развитию новых нейронов и синапсов. BDNF является активным в гиппокампе, коре головного мозга и базальных отделах переднего мозга, а также является важным для долговременной памяти. Композиции по данному изобретению, таким образом, могут быть использованы для повышения секреции BDNF. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть использованы в лечении нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с ухудшением долговременной памяти. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для улучшения долговременной памяти, в частности, для улучшения долговременной памяти, которая ухудшается в результате нейродегенеративного заболевания.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению митохондриальной метаболической активности в нейронах.

Модуляция оси микробиота-кишечник-головной мозг

Взаимодействие между кишечником и головным мозгом (ось микробиота-кишечник-головной мозг) происходит с помощью двунаправленной нейрогуморальной системы взаимодействия. Последние данные показывают, что микробиота, которая

находится в кишечнике, может приводить к модуляции развития головного мозга и появлению поведенческих фенотипов посредством оси микробиота-кишечник-головной мозг. Действительно, ряд обзоров предполагает роль оси микробиота-кишечник-головной мозг в поддержании функциональности центральной нервной системы и предполагает нарушение функции оси микробиота-кишечник-головной мозг в развитии нарушений и патологических состояний центральной нервной системы [16],[19],[31].

Двунаправленное взаимодействие между головным мозгом и кишечником (т.е., ось кишечник-головной мозг) включает в себя центральную нервную систему, нейроэндокринную и нейроиммунную системы, в том числе ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники (HPA), симпатический и парасимпатический отделы автономной нервной системы (ANS), в том числе энтерическую нервную систему (ENS) и блуждающий нерв, а также микробиоту кишечника.

Как продемонстрировано в примерах, композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию оси микробиота-кишечник-головной мозг и снижению клеточной смерти, ассоциированной с нейродегенеративными нарушениями. Соответственно, композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений, в частности, таких нарушений и патологических состояний, которые ассоциированы с нарушением функции оси микробиота-кишечник-головной мозг.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранных из группы, состоящей из: болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцереbellлярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

Композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодными для лечения или предупреждения хронического заболевания, лечения или предупреждения заболевания у пациентов, которые не отвечают на другие лекарственные препараты (такие как лечение леводопой, агонистами дофаминовых рецепторов, ингибиторами МАО-В, ингибиторами СОМТ, антагонистами глутамата и/или антихолинергическими препаратами), и/или лечения или предупреждения повреждения тканей и симптомов, ассоциированных с нарушением функции оси микробиота-кишечник-головной мозг.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию ЦНС. В некоторых вариантах осуществления композиции по

данному изобретению приводят к модулированию автономной нервной системы (ANS). В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию энтерической нервной системы (ENS). В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (НРА). В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию нейроэндокринного пути. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию нейроиммунного пути. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию ЦНС, ANS, ENS, оси НРА и/или нейроэндокринного и нейроиммунного путей. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней метаболитов комменсалов и/или проницаемости в желудочно-кишечном тракте субъекта.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется нервными системами. Соответственно в некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в нервных системах. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в центральной нервной системе. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в сенсерных нейронах. В других вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в двигательных нейронах. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в ANS. В некоторых вариантах осуществления ANS представляет собой парасимпатическую нервную систему. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала с участием блуждающего нерва. В других вариантах осуществления ANS представляет собой симпатическую нервную систему. В других вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию передачи сигнала в энтерической нервной системе. В определенных вариантах осуществления передача сигнала с участием нейронов ANS и ENS происходит непосредственно в ответ на содержимое просвета желудочно-кишечного тракта. В других вариантах осуществления передача сигнала с участием нейронов ANS и ENS происходит косвенно в ответ на нейрохимические соединения, продуцируемые внутрипросветными бактериями. В других вариантах осуществления передача сигнала с участием нейронов ANS и ENS происходит в ответ на нейрохимические соединения, продуцируемые внутрипросветными бактериями или энтероэндокринными клетками. В определенных предпочтительных вариантах осуществления нейроны ENS приводят к активации афферентных путей блуждающего нерва, которые оказывают влияние на функции ЦНС. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к регуляции активности

энтерохромаффиноцитов.

Нейродегенеративные заболевания

Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона представляет собой распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся с нейropатологической точки зрения дегенерацией гетерогенных популяций нервных клеток (клеток, продуцирующих дофамин). Клинический диагноз болезни Паркинсона требует наличия брадикинезии и, по меньшей мере, одного из следующих симптомов: тремора в покое; мышечной ригидности и нарушения постурального рефлексa. Другие признаки и симптомы, которые могут присутствовать или развиваться во время прогрессирования заболевания представляют собой расстройства вегетативной нервной системы (сиалорею, себорею, запор, нарушения мочеиспускания, нарушение половой функции, ортостатическую гипотензию, гипергидроз), нарушения сна и нарушения чувства обоняния или восприятия температуры. Болезнь Паркинсона представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое может развиваться или продолжаться в результате нарушения функции оси микробиота-кишечник-головной мозг. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении болезни Паркинсона у субъекта.

В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона. Композиции, содержащие бактериальный штамм рода *Megasphaera*, могут приводить к улучшению двигательных и когнитивных функций в моделях болезни Паркинсона. Лечение штаммами *Megasphaera* может приводить к модулированию передачи сигнала в центральной, автономной и энтерической нервных системах; может приводить к модулированию пути с участием оси НРА; может приводить к модулированию нейроэндокринных и/или нейроиммунных путей; и может приводить к уровням метаболитов комменсалов, воспалительных маркеров и/или проницаемости в желудочно-кишечном тракте субъекта, все из которого связано с neuropатологией болезни Паркинсона. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона. Композиции, в которых используется *Megasphaera massiliensis*, могут быть особенно эффективными для лечения болезни Паркинсона.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов болезни Паркинсона у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких основных симптомов болезни Паркинсона у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по

данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению брадикинезии у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению тремора в покое; мышечной ригидности и/или нарушения постурального рефлекса у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов, ассоциированных с прогрессированием болезни Паркинсона, выбранных из расстройств вегетативной нервной системы (сиалореи, себореи, запора, нарушений мочеиспускания, нарушения половой функции, ортостатической гипотензии, гипергидроза), нарушений сна и нарушений чувства обоняния или восприятия температуры.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению симптомов депрессии, сопутствующих болезни Паркинсона. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к улучшению вербальной памяти и/или управляющих функций. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации внимания, рабочей памяти, беглости речи и/или тревожности.

В других предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению когнитивных дисфункций, сопутствующих болезни Паркинсона.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению прогрессирования болезни Паркинсона. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению более поздних осложнений. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению поздних двигательных флуктуаций. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению потери нейронов. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов деменции, обусловленной болезнью Паркинсона (PDD - Parkinson's disease dementia). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, ослаблению или нормализации нарушения исполнительной функции, внимания и/или рабочей памяти. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к улучшению дофаминергической нейротрансмиссии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению нарушенной дофаминергической нейротрансмиссии.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов болезни Паркинсона в соответствии с

симптоматической или диагностической шкалой. В определенных вариантах осуществления тесты для оценки симптоматического улучшения двигательной функции болезни Паркинсона представляют собой унифицированную шкалу оценки болезни Паркинсона. В частности, UPDRS II учитывает активность в повседневной жизни, а UPDRS III учитывает двигательную активность.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов, ассоциированных с PDD в соответствии с симптоматическим или диагностическим тестом и/или шкалой. В определенных вариантах осуществления тест или шкалу выбирают из теста речевого заучивания Хопкинса - модифицированного (HVLТ-R - Hopkins Verbal Learning Test - Revised); теста системы оценки управляющих функций Делис-Каплана (D-KEFS - Delis-Kaplan Executive Function System); теста словесно-цифровой интерференции; шкалы Гамильтона для оценки депрессии (HAM-D 17 - Hamilton Depression Rating Scale; депрессия); шкалы Гамильтона для оценки тревожности (HAM-A - Hamilton Anxiety Rating Scale; тревожность) и унифицированную шкалу оценки болезни (UPDRS - Unified Parkinson's Disease Rating Scale; тяжесть симптомов PD).

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к улучшению шкалы общего клинического впечатления - общего улучшения (CGI-I - Clinical Global Impression - Global Improvement) для оценки психиатрических и неврологических нарушений. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению отображают положительное влияние на общее социальное и профессиональное ухудшению субъекта с болезнью Паркинсона.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя снижение или предупреждение потери дофаминергических клеток в черной субстанции. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя дегенерацию дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя снижение или предупреждение дегенерации дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции и последующую потерю их проекционных нервных волокон в полосатом теле. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя снижение или предупреждение потери нигростриальных

дофаминергических нейронов.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя повышение уровней дофамина. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя повышение уровней DOPAC. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении неврологических нарушений, таких как болезнь Паркинсона у субъекта, при этом указанное применение включает в себя повышение уровней дофамина и DOPAC. В определенных вариантах осуществления уровни дофамина и/или DOPAC в полосатом теле повышаются.

Болезнь Альцгеймера и деменция

В DSM-5 термин деменция был заменен терминами тяжелое нейрокогнитивное расстройство и легкое нейрокогнитивное расстройство. Нейрокогнитивное расстройство представляет собой гетерогенный класс психиатрических заболеваний. Наиболее распространенным нейрокогнитивным расстройством является болезнь Альцгеймера, сопровождающаяся сосудистыми деменциями или смешанными формами из двух указанных заболеваний. Другие формы нейродегенеративных нарушений (например, деменция с тельцами Леви, лобно-височная деменция, деменция при болезни Паркинсона, болезнь Крейтцфельда-Якоба, болезнь Гентингтона и синдром Вернике-Корсакова) сопровождаются деменцией.

Болезнь Альцгеймера и деменция также характеризуются потерей нейронов, поэтому нейропротекторные и нейропролиферативные эффекты, показанные в примерах в случае композиций по данному изобретению, свидетельствуют о том, что они могут быть пригодными для лечения или предупреждения указанных патологических состояний.

Симптоматические критерии деменции в соответствии с DSM-5 указывают на значительное снижение когнитивных способностей по сравнению с предыдущим уровнем функционирования в одной или нескольких областях, выбранных из: обучения и памяти; языка; исполнительной функции; комплексного внимания; перцептивно-двигательного и социального познания. Когнитивные дефициты должны нарушать самостоятельность в повседневной активности. Кроме того, когнитивные дефициты не возникают исключительно в контексте делирия и более подходящим образом не объясняются с точки зрения другого психического нарушения (например, MDD или шизофрении).

Кроме первичного симптома, субъекты с нейродегенеративными нарушениями проявляют поведенческие и психиатрические симптомы, в том числе возбуждение, агрессию, депрессию, апатию, психоз и нарушения цикла сна-бодрствования.

Нейродегенеративные нарушения могут развиваться или продолжаться в результате нарушения функции оси микробиота-кишечник-головной мозг. Таким образом,

в предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В других вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбирают из сосудистых деменций; смешанной формы болезни Альцгеймера и сосудистой деменции; деменции с тельцами Леви; лобно-височной деменции; деменции при болезни Паркинсона; болезни Крейтцфельда-Якоба; болезни Гентингтона; и синдрома Вернике-Корсакова.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов нейродегенеративных нарушений у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению проявления когнитивных функций у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению уровня функционирования субъекта с нейродегенеративными нарушениями в одной или нескольких областях, выбранных из: обучения и памяти; языка; исполнительной функции; комплексного внимания; перцептивно-двигательного и социального познания. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению проявления одного или нескольких поведенческих и психиатрических симптомов, ассоциированных с нейродегенеративными нарушениями, выбранными из возбуждения, агрессии, депрессии, апатии, психоза и нарушений цикла сна-бодрствования.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению симптоматического заболевания в результате вмешательства в предполагаемые патогенные механизмы на доклинической стадии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации модификации заболевания, при этом замедляется или останавливается прогрессирование симптомов. В некоторых вариантах осуществления замедление или остановка прогрессирования симптомов коррелирует с признаками задержки лежащих в основе нейропатологических процессов. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов нейродегенеративных нарушений, включающих повышение когнитивных и функциональных возможностей. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации поведенческих и психиатрических симптомов деменции (BPSD). В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации способности субъекта с нейродегенеративным нарушением осуществлять повседневную активность.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному

изобретению приводят к нормализации как когнитивных функций, так и функционирования у субъекта с болезнью Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению приводит к нормализации когнитивного конечного результата у субъекта с болезнью Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации функционального конечного результата у субъекта с болезнью Альцгеймера. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации когнитивного и функционального конечного результата у субъекта с болезнью Альцгеймера. В еще одних дополнительных предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к общему клиническому ответу (общему конечному результату) у субъекта с болезнью Альцгеймера.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов нейродегенеративных нарушений в соответствии с симптоматической или диагностической шкалой. В определенных вариантах осуществления тесты для оценки симптоматической нормализации болезни Альцгеймера (и других нейродегенеративных нарушений) выбирают из объективных когнитивных тестов, тестов оценки активности в повседневной жизни, совокупной оценки изменений, тестов состояния здоровья, связанных с качеством жизни, и тестов, оценивающих поведенческие и психиатрические симптомы нейродегенеративных нарушений.

В определенных вариантах осуществления в объективных когнитивных тестах для оценки симптоматической нормализации применяют когнитивную подшкалу шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера (ADAS-cog - Alzheimer's disease Assessment Scale cognitive subscale) и классическую шкалу ADAS. В определенных вариантах осуществления симптоматическую нормализацию когнитивных функций оценивают с помощью нейропсихологической батареи тестов для применения при болезни Альцгеймера (NTB).

В некоторых вариантах осуществления в совокупной оценке теста изменений применяют шкалу общего клинического впечатления - общего улучшения (CGI-I - Clinical Global Impression - Global Improvement) для оценки психиатрических и неврологических нарушений. В некоторых вариантах осуществления совокупная шкала представляет собой расширенную шкалу оценки изменений клиницистом на основании опроса (CIBICplus - Clinician's Interview Based Impression of Change plus). В некоторых вариантах осуществления совокупная шкала представляет собой шкалу оценки изменений на основании общего клинического впечатления опросника совместного исследования болезни Альцгеймера (ADCS-CGIC - Alzheimer's Disease Cooperative Study Unit Clinician's Global Impression of Change).

В определенных вариантах осуществления связанные с показателями здоровья характеристики качества жизни представляют собой связанное с болезнью Альцгеймера QOL (ADRQL - Alzheimer's Disease-Related QOL) и QOL при болезни Альцгеймера (QOL-

AD - QOL-Alzheimer's Disease).

В определенных вариантах осуществления тесты, оценивающие поведенческие и психиатрические симптомы нейродегенеративных нарушений выбирают из шкалы оценки поведенческой патологии при болезни Альцгеймера (BEHAVEAD - Behavioural pathology in Alzheimer's Disease Rating Scale); поведенческой шкалы оценки деменции (BRSD - Behavioural Rating Scale for Dementia); нейропсихиатрического опросника (NPI - Neuropsychiatric Inventory); и опросника Когена-Мансфилда для возбуждения (CMAI - Cohen-Mansfield Agitation Inventory).

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению являются особенно эффективными в предупреждении, снижении или ослаблении нейродегенеративных нарушений, при использовании в комбинации с другим лекарственным препаратом для лечения нейродегенеративных нарушений. В определенных вариантах осуществления такие лекарственные препараты включают в себя ингибиторы ацетилхолинэстеразы, в том числе донепезил (Aricept®), галантамин (Razadyne®) и ривастигмин (Exelon®), а также мемантин.

Рассеянный склероз

Рассеянный склероз (MS - multiple sclerosis) представляет собой демиелинизирующее заболевание, при котором миелиновые оболочки, окружающие нейроны в головном и спинном мозге, разрушаются. Точные причины, лежащие в основе MS, являются неизвестными, однако, считается, что они варьируют между индивидуумами. Определенные формы MS являются наследственными. Считается, что средовые факторы также способствуют развитию MS. У некоторых индивидуумов комбинация как генетических, так и средовых факторов может вызывать наступление MS.

Имеет место широкое разнообразие симптомов, ассоциированных с MS. Субъекты могут проявлять почти любой неврологический симптом, ассоциированный с нарушением автономного, зрительного, двигательного или сенсорного контроля. Точные симптомы будут варьировать в зависимости от очага нервного поражения/демиелинизации.

IL-8 играет роль в образовании миелиновых оболочек. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть предназначены для применения при ремиелинизации нейронов у субъектов с MS. Композиции по данному изобретению также могут быть использованы для защиты нейронов от демиелинизации. Другими словами, композиции по данному изобретению могут быть предназначены для применения в способе лечения или предупреждения рассеянного склероза с помощью восстановления или предупреждения потери миелиновых оболочек нейронов.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов MS у субъекта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению усталости у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению тремора в покое,

мышечной слабости, мышечных спазмов, ригидности мышц, парестезии и/или атаксии у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов, ассоциированных с прогрессированием MS, выбранных из перечня, состоящего из расстройств вегетативной нервной системы: запора, нарушений мочеиспускания, нарушения половой функции, дисфагии, дизартрии, синкопа, вертиго и/или головокружения; нарушений сна; и нарушения чувства обоняния или восприятия температуры. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких глазных симптомов, ассоциированных с MS. В некоторых вариантах осуществления глазной симптом выбирают из перечня, состоящего из потери зрения, боли в глазах, цветовой слепоты, двоения в глазах и/или непроизвольного движения глаз у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению головокружения, вертиго, нейропатической боли, мышечно-скелетной боли, когнитивной дисфункции, недержания кала, дисфагии, дизартрии или любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению симптомов депрессии или тревожности, сопутствующих MS.

В некоторых вариантах осуществления нормализацию симптомов определяют с помощью критериев МакДональда 2017 г. для диагностики MS.

В определенных вариантах осуществления лечение композициями по данному изобретению приводит к снижению частоты MS или тяжести MS. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении частоты рецидивов или тяжести рецидивов. В определенных вариантах осуществления лечение композициями по данному изобретению приводит к предупреждению снижения двигательной функции или приводит к нормализации двигательной функции, ассоциированной с MS. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении снижения двигательной функции или для применения в нормализации двигательной функции при лечении MS. В определенных вариантах осуществления лечение композициями по данному изобретению приводит к предупреждению развития паралича при MS. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении паралича при лечении MS.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении рассеянного склероза у пациента, который был идентифицирован как имеющий риск развития рассеянного склероза, или которому был поставлен диагноз рассеянного склероза ранней стадии или «рецидивирующе-ремиттирующий» рассеянный склероз. Композиции по данному

изобретению могут быть пригодными для предупреждения развития MS. Композиции по данному изобретению могут быть пригодными для предупреждения прогрессирования MS. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения у пациента, идентифицированного как имеющего генетическую предрасположенность к MS, такую как фенотип основного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса, лейкоцитарный антиген человека (HLA)-DR2 или HLA-DR4.

Композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или нормализации рассеянного склероза. Композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодными для снижения симптомов, ассоциированных с рассеянным склерозом. Лечение или предупреждение рассеянного склероза может относиться, например, к ослаблению тяжести симптомов или снижению частоты обострений или диапазона иницирующих факторов, которые представляют проблему для пациента. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к замедлению или остановке прогрессирования заболевания.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении рецидивирующе-ремиттирующего MS. В альтернативных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении прогрессирующего MS, такого как прогрессирующий MS (SPMS), который развивается со временем после постановки диагноза RRMS, первичный прогрессирующий MS (PPMS), который проявляется постепенным непрерывным неврологическим нарушением и прогрессирующим рецидивированием MS (PRMS), который является аналогичным PPMS, однако с перекрывающимися рецидивами.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении одного или нескольких симптомов MS, выбранных из группы, состоящей из: усталости, проблем со зрением, онемения, покалывания, мышечных спазмов, мышечной ригидности, мышечной слабости, нарушений при передвижении, боли, нарушений при размышлении, обучении и планировании, депрессии и тревожности, нарушений половой функции, нарушений мочевого пузыря, нарушений кишечника, сложностей при разговоре и глотании.

Нейрохимические факторы, нейропептиды и нейромедиаторы, а также ось микробиота-кишечник-головной мозг

Как изложено выше, ось микробиота-кишечник-головной мозг модулируется рядом различных физиологических систем. Ось микробиота-кишечник-головной мозг модулируется рядом сигнальных молекул. Изменения уровней указанных сигнальных молекул приводят к нейродегенеративным заболеваниям. Эксперименты, выполняемые авторами данного изобретения, свидетельствуют о том, что введение вида *Megasphaera*, и, в частности, *Megasphaera massiliensis*, может приводить к модулированию уровней индола и кинуренина. Нарушение регуляции указанных метаболитов может приводить к

нейродегенеративным заболеваниям, таким как болезнь Паркинсона.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней моноаминов головного мозга и их метаболитов. В предпочтительных вариантах осуществления указанным метаболитом является кинурерин. В определенных вариантах осуществления композиции по указанному изобретению приводят к модулированию кинуренина, что представляет собой основной путь метаболизма триптофана, который выступает в качестве пути для продуцирования никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). Кинуренин может быть метаболизирован до нейроактивных соединений, таких как кинуреиновая кислота (KYNA) и 3-гидрокси-1-кинуренин (3-OH-1-KYN), и в дополнительных стадиях до хинолиновой кислоты (QUIN). Нарушение регуляции кинуреинового пути может приводить к активации иммунной системы и накоплению потенциально нейротоксических соединений. Изменения кинуреинового метаболизма может быть связано с развитием болезни Паркинсона. Как было продемонстрировано, уровни кинуренина снижены во фронтальной коре, скорлупе и компактной части черной субстанции пациентов с PD [32]. Таким образом, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней кинуренина при лечении болезни Паркинсона.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения композиции по данному изобретению могут приводить к повышению уровней кинуренина. Как было показано, повышенные уровни кинуренина приводят к ослаблению индуцированной MPP⁺ гибели нейронов *in vitro* в клеточной линии дофаминергической нейробластомы человека [33]. В определенных вариантах осуществления кинуренин и кинуреиновая кислота могут приводить к активации арил-углеводородного рецептора GI (Ahr) и рецепторов GPR35. Активация рецептора Ahr приводит к индукции продуцирования IL-22, который может приводить к ингибированию местного воспаления. Активация GPR35 приводит к индукции продуцирования инозитолтрифосфата и мобилизации Ca²⁺.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней индола. В предпочтительных вариантах осуществления указанным метаболитом является кинурерин. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию кинуренина, который представляет собой основной путь метаболизма триптофана.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями нейрохимических факторов, нейропептидов и нейромедиаторов. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней нейрохимических факторов, нейропептидов и нейромедиаторов. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к непосредственному изменению биохимических превращений в ЦНС.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Соответственно в предпочтительных

вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней ГАМК. ГАМК представляет собой ингибирующий нейромедиатор, который приводит к снижению возбудимости нейронов. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению уровней ГАМК. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровней ГАМК. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к изменению ГАМКергической нейротрансмиссии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию транскрипции ГАМК в различных участках центральной нервной системы. В определенных вариантах осуществления происходящая от комменсалов ГАМК проникает через гематоэнцефалический барьер и непосредственно воздействует на нейротрансмиссию. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению ГАМК в гиппокампе, миндалине и/или голубом пятне. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению ГАМК в областях коры головного мозга.

Иммунный ответ

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется изменениями в иммунном ответе и воспалительными факторами и маркерами. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию иммунного ответа. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию системных уровней циркулирующих нейроиммунных сигнальных молекул. В определенных предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию продуцирования провоспалительных цитокинов и воспалению. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию воспалительного процесса. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению продуцирования и секреции IL-6. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровней активации промотора NFκB. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению способны приводить к модулированию активации продуцирования IL-6 с помощью сильнодействующего провоспалительного эндотоксина липополисахарида (LPS). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению способны приводить к модулированию промотора NFκB с помощью LPS и α-синуклеиновых мутантных белков, таких как A53T. Повышенные циркулирующие уровни цитокинов тесно ассоциированы с различными нейродегенеративными нарушениями, в том числе болезнью Паркинсона, деменцией и болезнью Альцгеймера. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении уровней IL-6 и/или уровней NFκB при лечении

нейродегенеративного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению секреции IL-8. Как было показано, IL-8 приводит к индукции образования миелиновых оболочек и восстановлению эффективного взаимодействия между нейронами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в индукции образования миелиновых оболочек при лечении нейродегенеративных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в восстановлении взаимодействия между нейронами. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в сохранении взаимодействия между нейронами.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями метаболитов комменсалов. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию системных уровней метаболитов микробиоты. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровня короткоцепочечных жирных кислот (SCFA). В определенных вариантах осуществления уровень SCFA повышается или снижается. В некоторых вариантах осуществления SCFA представляет собой масляную кислоту (ВА) (или бутират). В некоторых вариантах осуществления SCFA представляет собой пропионовую кислоту (PPA). В некоторых вариантах осуществления SCFA представляет собой уксусную кислоту. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию способности SCFA проникать через гематоэнцефалический барьер.

Ацетилирование и деацетилирование гистонов представляют собой важные эпигенетические регуляторы экспрессии генов. Нарушение баланса ацетилирования и деацетилирования гистонов может приводить к апоптозу. Нарушение регуляции таких гистонацетилтрансфераз играет роль в патогенезе, ассоциированном с возрастными нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз и снижение когнитивных функций [34]. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию активности гистондеацетилазы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активности гистондеацетилазы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активности гистонацетилазы.

Пациенты с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе болезнью Паркинсона, болезнью Гентингтона, болезнью Альцгеймера и амиотрофическим латеральным склерозом, проявляют высокие уровни перекисного окисления липидов. Липиды являются восприимчивыми к окислению активными формами кислорода, а головной мозг имеет высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот.

Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию перекисного окисления липидов. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению перекисного окисления липидов. Снижение окислительного повреждения, вызванного реактивными формами кислорода, может быть использовано для целенаправленного воздействия на нейродегенеративных заболеваний ранней стадии. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенерации ранней стадии. Кроме того, соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении развития нейродегенеративного заболевания. В таких вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть предназначены для применения у пациента, который был идентифицирован как имеющий риск развития нейродегенеративного заболевания.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями проницаемости в желудочно-кишечном тракте. Соответственно в некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к изменению целостности эпителия в желудочно-кишечном тракте. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию проницаемости желудочно-кишечного тракта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию барьерной функции и целостности желудочно-кишечного тракта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию подвижности желудочно-кишечного тракта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию перемещения метаболитов комменсалов и воспалительных сигнальных молекул в кровотоки из просвета желудочно-кишечного тракта.

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями составом микробиома в желудочно-кишечном тракте. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию состава микробиома желудочно-кишечного тракта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению дисбиоза микробиома и сопутствующему повышению токсических метаболитов (например, LPS). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней *Clostridium* в желудочно-кишечном тракте. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровня *Clostridium* в желудочно-кишечном тракте. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровней *Campylobacter jejuni*. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию пролиферации вредных анаэробных бактерий и продуцированию нейротоксинов, продуцируемых указанными

бактериями. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней *Lactobacillus* и/или *Bifidobacterium* в микробиоме. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней родов *Sutterella*, *Prevotella*, *Ruminococcus* и/или семейства *Alcaligenaceae* в микробиоме. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению уровня *Lactobacillus plantarum* и/или *Saccharomyces boulardii*.

Повреждение головного мозга

Указанные примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению являются нейропротекторными и имеют ингибирующую активность в отношении HDAC. HDAC2 представляет собой основную мишень в случае функционального восстановления от инсульта [35], а ингибирование HDAC может предупреждать повреждение белого вещества [36], поэтому композиции по данному изобретению могут быть пригодными в лечении повреждения головного мозга.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга. В некоторых вариантах осуществления повреждение головного мозга представляет собой травматическое повреждение головного мозга. В некоторых вариантах осуществления повреждение головного мозга представляет собой приобретенное повреждение головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом травмы. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом опухоли. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом кровоизлияния в мозг. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом энцефалита. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом церебральной гипоксии. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга, являющегося результатом церебральной аноксии.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении инсульта. Эффекты, показанные в примерах, особенно связаны с лечением инсульта. Инсульт возникает в случае, когда кровоток, по меньшей мере, к части головного мозга нарушается. Без надлежащего снабжения кровью с целью обеспечения кислорода и питательных веществ в ткань

головного мозга и удаления побочных продуктов из ткани головного мозга клетки головного мозга начинают погибать. Симптомы инсульта зависят от участка головного мозга, который нарушается в результате недостаточного кровотока. Симптомы включают в себя паралич, онемение или слабость мышц, потерю равновесия, головокружение, внезапную сильную головную боль, нарушение речи, потерю памяти, потерю способности рассуждать, внезапную спутанность сознания, нарушение зрения, кому или даже смерть. Инсульт также обозначается как приступ головного мозга или нарушение мозгового кровообращения (CVA). Симптомы инсульта могут быть кратковременными в случае, если достаточный кровоток восстанавливается в пределах короткого периода времени. В то же время, если недостаточный кровоток продолжается в течение значительного периода времени, то симптомы могут быть необратимыми.

В некоторых вариантах осуществления инсульт представляет собой ишемию головного мозга. Ишемия головного мозга происходит в случае, когда имеет место недостаточный кровоток в ткани головного мозга с целью соответствия метаболических потребностей. В некоторых вариантах осуществления ишемия головного мозга представляет собой фокальную ишемию головного мозга, т.е., ограниченную определенной областью головного мозга. В некоторых вариантах осуществления ишемия головного мозга представляет собой глобальную ишемию головного мозга, т.е., охватывающую обширную площадь ткани головного мозга. Фокальная ишемия головного мозга обычно происходит в случае, если сосуд головного мозга становится закупоренным, либо частично, либо полностью, приводя к снижению тока крови к определенному участку головного мозга. В некоторых вариантах осуществления фокальная ишемия головного мозга представляет собой ишемический инсульт. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт является тромботическим, т.е., вызванным тромбом или кровяным сгустком, который развивается в сосуде головного мозга и ограничивает или блокирует кровоток. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт представляет собой тромботический инсульт. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт является эмболическим, т.е. вызванным эмболом или неприкрепленной массой, которая проходит через кровоток и ограничивает или блокирует кровоток в участке, удаленном от своего места происхождения. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт представляет собой эмболический инсульт. Глобальная ишемия головного мозга возникает, если кровоток к головному мозгу в целом блокируется или ограничивается. В некоторых вариантах осуществления глобальная ишемия головного мозга вызвана гипоперфузией, например, в результате шока. В некоторых вариантах осуществления глобальная ишемия головного мозга представляет собой результате сердечного приступа.

В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от фокальной ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект,

диагностированный повреждением головного мозга, страдал от ишемического инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от тромботического инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от эмболического инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от глобальной ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от гипоперфузии. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от сердечного приступа.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении фокальной ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении ишемического инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении тромботического инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении эмболического инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении глобальной ишемии головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении гипоперфузии.

В некоторых вариантах осуществления инсульт представляет собой геморрагический инсульт. Геморрагический инсульт вызван кровоизлиянием в головной мозг или вокруг головного мозга, приводя к набуханию, сдавливанию и разрушению клеток и тканей головного мозга. Геморрагический инсульт часто представляет собой результат ослабленного кровеносного сосуда, который разрывается и кровоточит в окружающий головной мозг. В некоторых вариантах осуществления геморрагический инсульт представляет собой кровоизлияние в головной мозг, т.е., вызвано кровоизлиянием в самой ткани головного мозга. В некоторых вариантах осуществления кровоизлияние в головной мозг вызвано интрапаренхиматозным кровоизлиянием. В некоторых вариантах осуществления кровоизлияние в головной мозг вызвано внутрижелудочковым кровоизлиянием. В некоторых вариантах осуществления геморрагический инсульт представляет собой субарахноидальное кровоизлияние, т.е., кровоизлияние, которое возникает за пределами ткани головного мозга, однако все еще в пределах черепа. В некоторых вариантах осуществления геморрагический инсульт представляет собой результат церебральной амилоидной ангиопатии. В некоторых вариантах осуществления геморрагический инсульт представляет собой результат аневризмы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления геморрагический инсульт представляет собой

результат церебральной артериовенозной мальформации (AVM).

В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от геморрагического инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от кровоизлияния в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от интрапаренхиматозного кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от внутрижелудочкового кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от субарахноидального кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от церебральной амилоидной ангиопатии. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от аневризмы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от церебральной AVM.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении геморрагического инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении кровоизлияния в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении интрапаренхиматозного кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении внутрижелудочкового кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении субарахноидального кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении церебральной амилоидной ангиопатии. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении аневризмы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении церебральной AVM.

Восстановление достаточного кровотока в головной мозг после периода приостановки, несмотря и на эффективность в облегчении симптомов, ассоциированных с инсультом, может парадоксальным образом приводить к дальнейшему повреждению ткани головного мозга. Во время периода приостановки пораженная ткань страдает от недостатка кислорода и питательных веществ, а внезапное восстановление кровотока может приводить к воспалению и окислительному повреждению в результате индукции окислительного стресса. Это известно как реперфузионное повреждение, и научно доказано не только после инсульта, но и также после сердечного приступа или другого повреждения тканей, когда кровоснабжение возвращается в ткань после периода ишемии или недостатка кислорода. В некоторых вариантах осуществления субъект,

диагностированный повреждением головного мозга, страдал от реперфузионного повреждения в результате инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении реперфузионного повреждения в результате инсульта.

Транзиторная ишемическая атака (ТИА - transient ischemic attack), часто обозначаемая как миниинсульт, представляет собой общепризнанный предупредительный сигнал более серьезного инсульта. Субъекты, которые испытывали один или несколько ТИА, таким образом, имеют более высокий риск инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект, диагностированный повреждением головного мозга, страдал от ТИА. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении ТИА. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга у субъекта, который страдал ТИА.

Высокое кровяное давление, высокий уровень холестерина в крови, семейный анамнез инсульта, заболевание сердца, сахарный диабет, аневризмы головного мозга, артериовенозные мальформации, серповидно-клеточная анемия, васкулит, нарушения свертываемости крови, применение нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), курение табака, употребление большого количества алкоголя, употребление запрещенных наркотиков, ожирение, отсутствие физической активности и неправильное питание считаются факторами риска инсульта. В частности, как было убедительно показано, снижение кровяного давления приводит к предупреждению как ишемических, так и геморрагических инсультов [³⁷, ³⁸]. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга у субъекта, который имеет, по меньшей мере, один фактор риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет два фактора риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет три фактора риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет четыре фактора риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет более четырех факторов риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет высокое кровяное давление. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет высокий уровень холестерина в крови. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет семейный анамнез инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание сердца. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сахарный диабет. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет аневризму головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет артериовенозные мальформации. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет васкулит. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет серповидно-клеточную анемию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет нарушение свертываемости крови. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет историю применения нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID). В некоторых вариантах осуществления

субъект курит табак. В некоторых вариантах осуществления субъект употребляет большие количества алкоголя. В некоторых вариантах осуществления субъект употребляет запрещенные наркотики. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет избыточную массу тела. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет отсутствие физической активности. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет неправильное питание.

Указанные примеры свидетельствуют о том, что композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения повреждения головного мозга и способствования выздоровлению при введении до наступления явления повреждения. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодными для лечения повреждения головного мозга при введении субъектам, имеющим риск повреждения головного мозга, такого как инсульт.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении повреждения, вызванного потенциальным повреждением головного мозга, предпочтительно инсультом. Указанные композиции могут приводить к снижению вызванного повреждения при введении до наступления потенциального повреждения головного мозга, в частности, при введении пациенту, идентифицированному как имеющему риск повреждения головного мозга.

Указанные примеры свидетельствуют о том, что композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения повреждения головного мозга и способствования выздоровлению при введении после наступления явления повреждения. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть особенно пригодными для лечения повреждения головного мозга при введении субъектам после повреждения головного мозга, такого как инсульт.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате снижения повреждения, связанного с двигательной функцией. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате нормализации двигательной функции. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате повышения мышечной силы. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате улучшения памяти. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате повышения общественного признания. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к лечению повреждения головного мозга в результате нормализации неврологической функции.

Лечение повреждения головного мозга может относиться, например, к облегчению тяжести симптомов. Лечение повреждения головного мозга может также относиться к снижению неврологических нарушений после инсульта. Композиции по данному

изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены субъекту до начала инсульта, например, пациенту, идентифицированному как имеющему риск инсульта. Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены после инсульта, например, во время восстановления. Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время острой фазы восстановления (т.е., до одной недели включительно после инсульта). Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время подострой фазы восстановления (т.е., от одной недели до трех месяцев включительно после инсульта). Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время хронической фазы восстановления (от трех месяцев после инсульта).

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с вспомогательным активным агентом. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в комбинации с аспирином или тканевым активатором плазминогена (tPA). Другие вспомогательные агенты включают в себя другие антитромбоцитарные средства (такие как клопидогрел), антикоагулянты (такие как гепарины, варфарин, апиксабан, дабигатран, эдоксабан или ривароксабан), антигипертензивные средства (такие как диуретики, ингибиторы ACE, блокаторы кальциевых каналов, бета-блокаторы или альфа-блокаторы) или статины. Композиции по данному изобретению могут приводить к улучшению ответа пациента на вспомогательный активный агент.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению влияния ишемии на ткани. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению степени повреждения на ткани, вызванные ишемией. В определенных вариантах осуществления ткани, повреждаемые в результате ишемии, представляют собой ткани головного мозга. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению некроза или числа некротических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению апоптоза или числа апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению числа некротических или апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению клеточной смерти в результате некроза и/или апоптоза. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению клеточной смерти в результате некроза и/или апоптоза, вызываемых в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к восстановлению ткани, поврежденной в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению скорости выведения некротических клеток и/или апоптотических клеток. В

определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению эффективности выведения некротических клеток и/или апоптических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к замещению и/или регенерации клеток в тканях. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к замещению и/или регенерации клеток в тканях, поврежденных в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к улучшению общего гистологического состояния ткани (например, при биопсии).

Пути введения

Предпочтительно композиции по данному изобретению предназначены для введения в желудочно-кишечный тракт с целью обеспечения доставки и/или частичной или полной колонизации кишечника бактериальным штаммом по данному изобретению. Как правило, композиции по данному изобретению вводят перорально, однако они могут быть введены ректально, интраназально или с помощью буккального или сублингвального путей.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть введены в виде пены, крема или геля.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть введены в виде суппозитория, такого как ректальный суппозиторий, например, в форме масла какао (какао-масла), синтетического твердого жира (например, супокир, витепсол), глицерожелатина, полиэтиленгликоля или мыльной глицериновой композиции.

В определенных вариантах осуществления композицию по данному изобретению вводят в желудочно-кишечный тракт с помощью зонда, такого как назогастральный зонд, орогастральный зонд, желудочный зонд, еюностомический зонд (J-зонд), чрескожной эндоскопической гастростомии (PEG) или порта, такого как порт-система, имплантируемая в области грудной клетки, которая обеспечивает доступ к желудку, тощей кишке, а также другие подходящие порты доступа.

Композиции по данному изобретению могут быть введены однократно или они могут быть введены последовательно как часть схемы лечения. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для ежедневного введения.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения лечение в соответствии с данным изобретением сопровождается оценкой микробиоты кишечника пациента. Лечение можно повторять, если доставки и/или частичная или полная колонизация штаммом по данному изобретению не достигаются, в результате чего эффективность не наблюдается, или лечение может быть прекращено, если доставка и/или частичная или полная колонизация являются успешными и эффективность наблюдается.

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению может быть введена беременному животному, например, млекопитающему, такому как

человек, с целью предупреждения воспалительного или аутоиммунного заболевания, развивающегося у его ребенка *in utero* и/или после рождения.

Композиции по данному изобретению могут быть введены пациенту, который был диагностирован нейродегенеративным заболеванием или который был идентифицирован как имеющий риск нейродегенеративного заболевания. Указанные композиции также могут быть введены в виде профилактической меры с целью предупреждения развития нейродегенеративного заболевания у здорового пациента.

Композиции по данному изобретению могут быть введены пациенту, который был идентифицирован как имеющий патологическую микробиоту кишечника. Например, пациент может иметь пониженную или отсутствующую колонизацию *Megasphaera*, и, в частности, *Megasphaera massiliensis*.

Композиции по данному изобретению, могут быть введены в качестве продукта питания, такого как пищевая добавка.

Как правило, композиции по данному изобретению предназначены для лечения людей, хотя они могут быть использованы для лечения животных, в том числе моногастрических млекопитающих, таких как домашняя птица, свиньи, кошки, собаки, лошади или кролики. Композиции по данному изобретению могут быть пригодны для усиления роста и характеристик животных. При введении животным может быть использован желудочный зонд.

Композиции

Как правило, композиция по данному изобретению содержит бактерии. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения композицию составляют в лиофилизированной форме. Например, композиция по данному изобретению может содержать гранулы или желатиновые капсулы, например, твердые желатиновые капсулы, содержащие бактериальный штамм по данному изобретению.

Предпочтительно композиция по данному изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лиофилизация бактерий представляет собой общепризнанную процедуру, а соответствующее руководство доступно, например, в литературных источниках [39], [], [41]].

В качестве альтернативы композиция по данному изобретению может содержать живую, активную бактериальную культуру.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению не был инактивирован, например, не был термоинактивирован. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению не был убит, например, не был убит нагреванием. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению не был аттенуирован, например, не был аттенуирован нагреванием. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению не был убит, инактивирован и/или аттенуирован. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению является

живым. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению является жизнеспособным. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению способен частично или полностью колонизировать кишечник. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм в композиции по данному изобретению является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых вариантах осуществления указанная композиция содержит смесь живых бактериальных штаммов и бактериальных штаммов, которые были убиты.

В предпочтительных вариантах осуществления композиция по данному изобретению является инкапсулированной с целью обеспечения доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсулирование приводит к защите композиции от распада до введения в целевой участок, с помощью, например, разрыва в результате химических или физических стимулов, например, давления, ферментативной активности или физической дезинтеграции, которые могут быть активированы изменениями pH. Может быть использован любой подходящий способ инкапсулирования. Иллюстративные методики инкапсулирования включают в себя захват в пористый матрикс, прикрепление или адсорбцию на твердых поверхностях носителя, самоагрегацию в результате флокуляции или с помощью сшивающих агентов, а также механического сдерживания за микропористой мембраной или микрокапсулой. Руководство по инкапсулированию, которое может быть пригодным для получения композиций по данному изобретению, доступно, например, в литературных источниках [42] и [43].

Указанная композиция может быть введена перорально и может находиться в форме таблетки, капсулы или порошка. Инкапсулированные продукты являются предпочтительными, поскольку *Megasphaera* представляют собой анаэробов. Другие ингредиенты (такие как, например, витамин С) могут быть включены в качестве поглотителей кислорода и пребиотических субстратов с целью улучшения доставки и/или частичной или полной колонизации и выживания *in vivo*. В качестве альтернативы пробиотическая композиция по данному изобретению может быть введена перорально в качестве продукта питания или питательного продукта, такого как сброженный молочный продукт на основе молока или сыворотки или в виде фармацевтического продукта.

Указанная композиция может быть составлена в виде пробиотика.

Композиция по данному изобретению содержит терапевтически эффективное количество бактериального штамма по данному изобретению. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма является достаточным для того, чтобы оказать положительный эффект при введении пациенту. Терапевтически эффективное количество бактериального штамма может быть достаточным для того, чтобы привести к доставке и/или частичной или полной колонизации кишечника пациента.

Подходящая суточная доза бактерии, например, для взрослого человека, может составлять от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ); например, от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{10} КОЕ; в

другом примере от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^{10} КОЕ.

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

В типичном случае пробиотик, такой как композиция по данному изобретению, необязательно комбинируют, по меньшей мере, с одним подходящим пребиотическим соединением. Пребиотическое соединение обычно представляет собой трудноусваиваемый углевод, такой как олиго- или полисахарид, или сахарный спирт, который не расщепляется или всасывается в верхнем отделе пищеварительного тракта. Известные пребиотики включают в себя коммерческие продукты, такие как инулин и трансгалактоолигосахариды.

В определенных вариантах осуществления пребиотическая композиция по данному изобретению содержит пребиотическое соединение в количестве от приблизительно 1 до приблизительно 30% по массе, по отношению к общей массе композиции (например, от 5 до 20% от массы). Углеводы могут быть выбраны из группы, состоящей из: фруктоолигосахаридов (или FOS), короткоцепочечных фруктоолигосахаридов, инулина, изомальтолигосахаридов, пектинов, ксилоолигосахаридов (или XOS), хитозанолигосахаридов (или COS), бета-глюканов, аравийской камеди, модифицированных и устойчивых крахмалов, полидекстрозы, D-тагатозы, волокон из акации, волокон рожкового дерева, овса и цитрусовых. В одном аспекте пребиотики представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды (для простоты продемонстрированные в данном документе ниже в виде FOS-с.с); указанные FOS-с.с. представляют собой трудноусваиваемые углеводы, как правило, получаемые в результате превращения свекловичного сахара и содержащие молекулу сахарозы, с которой связаны три молекулы глюкозы.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению используют в комбинации с другим терапевтическим соединением для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят с пищевыми добавками, которые приводят к модулированию нейропротекции или нейропролиферации. В предпочтительных вариантах осуществления пищевые добавки содержат или состоят из полезных для здоровья витаминов. В определенных вариантах осуществления указанные витамины представляют собой витамин B6, магний, диметилглицин (витамин B16) и витамин C. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят в комбинации с другим пробиотиком.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в усилении эффекта второго агента в отношении нейродегенеративного заболевания. Иммуномодулирующие эффекты композиций по данному изобретению могут приводить к тому, что мозг становится более восприимчивым

к стандартным препаратам, таким как леводопа, агонисты дофаминовых рецепторов, ингибиторы МАО-В, ингибиторы СОМТ, антагонисты глутамата и/или антихолинергические препараты), которые представляют собой иллюстративные вспомогательные средства, подлежащие введению в комбинации (последовательно или одновременно) с композициями по данному изобретению.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые наполнители или носители. Примеры таких подходящих наполнителей могут быть найдены в источнике литературы [44]. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в источнике литературы [45]. Примеры подходящих носителей включают в себя лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры подходящих разбавителей включают в себя этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, наполнителя или разбавителя может быть выполнен на основании предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в качестве дополнения носителя, наполнителя или разбавителя любое (любые) подходящий (подходящие) связывающее (связывающие) вещество (вещества), смазывающее (смазывающие) вещество (вещества), суспендирующий (суспендирующие) агент (агенты), покрывающий (покрывающие) агент (агенты), солюбилизующий (солюбилизующие) агент (агенты). Примеры подходящих связывающих веществ включают в себя крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, свободно сыпучая лактоза, бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические смолы, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза или полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы могут быть предложены в фармацевтической композиции. Примеры консервантов включают в себя бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксибензойной кислоты. Также могут быть использованы антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Композиции по данному изобретению могут быть составлены в виде продукта питания. Например, продукт питания может обеспечивать питательный эффект в дополнение к терапевтическому эффекту по данному изобретению, например, в пищевой добавке. Аналогичным образом, продукт питания может быть составлен с целью усиления вкуса композиции по данному изобретению или с целью создания более привлекательной для потребления композиции в результате большего сходства с распространенным продуктом питания, а не с фармацевтической композицией. В определенных вариантах осуществления композицию по данному изобретению составляют в виде продукта на основе молока. Термин «продукт на основе молока» означает любой жидкий или полужидкий продукт на основе молока или сыворотки, имеющий варьирующее содержание жира. Продукт на основе молока может представлять собой коровье молоко,

козье молоко, овечье молоко, обезжиренное молоко, цельное молоко, молоко, воссоединенное с порошковым молоком и сывороткой без какой-либо обработки, или обработанный продукт, такой как йогурт, простокваша, сырный сгусток, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает в себя молочные напитки, такие как напитки из молочной сыворотки, кисломолочные продукты, сгущенное молоко, молоко для молочные смеси для младенцев или новорожденных; молоко со вкусовыми наполнителями, мороженое; молокосодержащие продукты, такие как конфеты.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов рода *Megasphaera* и не содержат бактерий из любых других родов, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из других родов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая один или несколько бактериальных штаммов рода *Megasphaera*, которая не содержит бактерий из любых других родов, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из других родов для применения в лечении.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов вида *Megasphaera massiliensis* и не содержат бактерий из любого другого вида, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого вида. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая один или несколько бактериальных штаммов вида *Megasphaera massiliensis*, которая не содержит бактерий из любого другого вида, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого вида для применения в лечении.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один или несколько бактериальных штаммов вида *Megasphaera massiliensis* и не содержат бактерий из любого другого вида *Megasphaera*, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого вида *Megasphaera*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая один или несколько бактериальных штаммов вида *Megasphaera massiliensis*, которая не содержит бактерий из любого другого вида *Megasphaera*, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого вида *Megasphaera* для применения в лечении.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один бактериальный штамм или вид и не содержат никакие другие бактериальные штаммы или виды. Такие композиции могут содержать только незначительные или биологически незначимые количества других бактериальных штаммов или видов. Такие композиции могут представлять собой культуру, которая по

сути не содержит других видов организмов.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая один бактериальный штамм рода *Megasphaera*, которая не содержит бактерий из любых других штаммов, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого штамма для применения в лечении.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая один бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis*, которая не содержит бактерий из любых других штаммов, или которые содержат только незначительные или биологически незначимые количества бактерий из другого штамма для применения в лечении.

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат более одного бактериального штамма. Например, в некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат более одного штамма в пределах того же самого вида (например, более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 штаммов), и необязательно не содержат бактерий из любых других видов. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат менее 50 штаммов в пределах того же самого вида (например, менее чем 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 штамма), и необязательно не содержат бактерий из любых других видов. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат 1-40, 130, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 210, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25 или 31-50 штаммов в пределах одного вида и необязательно не содержат бактерий из других видов. Данное изобретение содержит любую комбинацию из изложенного выше.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит микробный консорциум. Например, в некоторых вариантах осуществления указанная композиция содержит бактериальный штамм *Megasphaera* в виде части микробного консорциума. Например, в некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм *Megasphaera* присутствует в комбинации с одним или несколькими (например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20) другими бактериальными штаммами из других родов, с которыми он может жить симбиотически *in vivo* в кишечнике. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит бактериальный штамм *Megasphaera* в комбинации с бактериальным штаммом из другого рода. В некоторых вариантах осуществления указанный микробный консорциум содержит два или более бактериальных штамма, полученных из образца кала одного организма, например, человека. В некоторых вариантах осуществления указанный микробный консорциум не встречается совместно в природе. Например, в некоторых вариантах осуществления микробный консорциум содержит бактериальные штаммы, полученные из образцов кала, по меньшей мере, двух различных организмов. В некоторых вариантах осуществления два различных организма происходят от одного и того же вида, например, двух различных людей. В некоторых

вариантах осуществления указанные два различные организмы представляют собой младенца и взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления указанные два различные организмы представляют собой человека и не относящегося к человеку млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, который имеет те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штамм MRx0029, однако который не представляет собой MRx0029, или который не представляет собой *Megasphaera massiliensis*.

В некоторых вариантах осуществления, в которых композиция по данному изобретению содержит более одного бактериального штамма, вида или рода, отдельные бактериальные штаммы, виды или роды могут быть предназначены для отдельного, одновременного или последовательного введения. Например, указанная композиция может содержать все из более чем одного бактериального штамма, вида или рода, или бактериальные штаммы, виды или роды могут храниться отдельно и могут быть введены отдельно, одновременно или повторно. В некоторых вариантах осуществления более чем один бактериальный штамм, вид или род хранятся отдельно, но смешиваются вместе перед применением.

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении получают из кала взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления, в которых композиция по данному изобретению содержит более чем один бактериальный штамм, все из бактериальных штаммов получают из кала взрослого человека, или если присутствуют другие бактериальные штаммы, то они присутствуют лишь в незначительных количествах. Бактерии могли быть культивированы после получения из кала взрослого человека и могут быть применены в композиции по данному изобретению.

Как упоминалось выше, в некоторых вариантах осуществления один или несколько бактериальных штаммов *Megasphaera* предоставляют собой только терапевтически активный (активные) агент (агенты) в композиции по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления бактериальный (бактериальные) штамм (штаммы) в композиции представляет/предоставляют собой только терапевтически активный (активные) агент (агенты) в композиции по данному изобретению.

Композиции для применения в соответствии с данным изобретением могут требовать или могут не требовать регистрацию.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом бактериальный штамм является лиофилизированным. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом бактериальный штамм является высушенным распылением. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при

этом указанный бактериальный штамм является лиофилизированным или высушенным распылением и при этом он является живым. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом указанный бактериальный штамм является лиофилизированным или высушенным распылением и при этом он является жизнеспособным. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом указанный бактериальный штамм является лиофилизированным или высушенным распылением и при этом он способен частично или полностью колонизировать кишечник. В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом указанный бактериальный штамм является лиофилизированным или высушенным распылением и при этом он является жизнеспособным и способен частично или полностью колонизировать кишечник.

В некоторых случаях лиофилизированный бактериальный штамм введением композицию разбавляют. В некоторых случаях разведение происходит с помощью применения разбавителя, описанного в данном документе.

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

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом указанный бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения нейродегенеративного заболевания при введении субъекту, нуждающемуся в этом.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая: бактериальный штамм по данному изобретению и фармацевтически приемлемый наполнитель, носитель или разбавитель; при этом указанный бактериальный штамм находится в количестве, достаточном для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом содержание бактериального штамма составляет от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц на грамм по отношению к массе композиции.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанную композицию вводят в дозе 1 г, 3 г, 5 г или 10 г.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанную композицию вводят с помощью способа, выбранного из группы, состоящей из перорального, ректального, подкожного, назального, буккального и сублингвального введения.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая носитель, выбранный из группы, состоящей из лактозы, крахмала, глюкоза, метилцеллюлозы, стеарата магния, маннита и сорбита.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая разбавитель, выбранный из группы, состоящей из этанола, глицерина и воды.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, содержащая наполнитель, выбранный из группы, состоящей из крахмала, желатина, глюкозы, безводной лактозы, свободно сыпучей лактозы, бета-лактозы, кукурузного подсластителя, аравийской камеди, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, дополнительно содержащая, по меньшей мере, одно из консерванта, антиоксиданта и стабилизатора.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая консервант, выбранный из группы, состоящей из бензоата натрия, сорбиновой кислоты и сложных эфиров п-гидроксибензойной кислоты.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена указанная выше фармацевтическая композиция, при этом бактериальный штамм является лиофилизированным.

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, при этом указанная композиция хранится в закупоренном контейнере при приблизительно 4°C или приблизительно 25°C и контейнер помещен в атмосферу, имеющую 50% относительную влажность, по меньшей мере, 80% бактериального штамма, измеренного в колониеобразующих единицах, сохраняется после периода, по меньшей мере, приблизительно: 1 месяца, 3 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет, 2,5 лет или 3 лет.

В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению предложена в закупоренном контейнере, содержащем композицию, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления закупоренных контейнер представляет собой саше или флакон. В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению предложена в шприце, содержащем композицию, описанную в данном документе.

Композиция по данному изобретению в некоторых вариантах осуществления может быть предложена в виде фармацевтической композиции. Например, указанная композиция может быть предложена в виде таблетки или капсулы. В некоторых вариантах осуществления указанная капсула представляет собой желатиновую капсулу («gel-cap»).

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению

вводят перорально. Пероральное введение может включать в себя проглатывание, в результате чего соединение проникает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, с помощью которых соединение проникает в кровотоки непосредственно из ротовой полости.

Фармацевтические составы, подходящие для перорального введения, включают в себя твердую прессованную массу, твердые микрочастицы, мягкие и жидкие (в том числе многофазные или дисперсные системы), такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или наночастицы, жидкости (например, водные растворы), эмульсии или порошки; пастилки (в том числе заполненные жидкостью); жевательные конфеты; гели; быстродиспергирующие лекарственные формы; пленки; капсулы; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав представляет собой кишечнорастворимый состав, т.е., устойчивый к действию желудочного сока состав (например, устойчивый к pH желудка), который является подходящим для доставки композиции по данному изобретению в кишечник в результате перорального введения. Кишечнорастворимые составы могут быть особенно пригодными в случае, если бактерия или другой компонент композиции является чувствительным к кислотному воздействию, например, восприимчивым к деградации в условиях желудка.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимый состав содержит кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой кишечнорастворимую лекарственную форму. Например, указанный состав может представлять собой кишечнорастворимую таблетку или кишечнорастворимую капсулу или т.п. Кишечнорастворимое покрытие может представлять собой стандартное кишечнорастворимое покрытие, например, стандартное покрытие для таблетки, капсулы или т.п. для пероральной доставки. Указанный состав может содержать пленочное покрытие, например, тонкослойную пленку из кишечнорастворимого полимера, например, кислотонерастворимого полимера.

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимый состав является по своей природе кишечнорастворимым, например, устойчивым к действию желудочного сока, без необходимости кишечнорастворимого покрытия. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой кишечнорастворимый состав, который не содержит кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой капсулу, изготовленную из термогелевого материала. В некоторых вариантах осуществления указанный термогелевый материал представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления указанная капсула содержит оболочку, которая не содержит никакого пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах осуществления указанная капсула содержит оболочку и указанная оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит никакого пленкообразующего полимера

(например, см. [46]). В некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой по своей природе кишечнорастворимую капсулу (например, Vcaps® от Capsugel).

В некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой мягкую капсулу. Мягкие капсулы представляют собой капсулы, которые могут, благодаря добавлению смягчителей, таких как, например, глицерин, сорбит, мальтит и полиэтиленгликоли, присутствовать в оболочке капсулы, имеют определенную эластичность и мягкость. Мягкие капсулы могут быть получены, например, на основе желатина или крахмала. Мягкие капсулы на основе желатина являются коммерчески доступными от различных поставщиков. В зависимости от способа введения, такого как, например, перорально или ректально, мягкие капсулы могут иметь различные формы, они могут быть, например, круглыми, овальными, продолговатыми или торпедоподобными. Мягкие капсулы могут быть получены с помощью стандартных способов, таких как, например, с помощью способа Scherer, способа Accogel или способа капли или выдувания.

Способы культивирования

Бактериальные штаммы для применения в данном изобретении могут быть культивированы с помощью стандартных микробиологических методик, как подробно описано, например, в литературных источниках [47], [] и [49].

Твердая или жидкая среда, используемые для культивирования, могут представлять собой агар YCFA или среду YCFA. Среда YCFA содержит (на 100 мл, примерные значения): казитон (1,0 г), дрожжевой экстракт (0,25 г), NaHCO_3 (0,4 г), цистеин (0,1 г), K_2HPO_4 (0,045 г), KH_2PO_4 (0,045 г), NaCl (0,09 г), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 г), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 г), CaCl_2 (0,009 г), резарузин (0,1 мг), гемин (1 мг), биотин (1 мкг), кобаламин (1 мкг), *n*-аминобензойную кислоту (3 мкг), фолиевую кислоту (5 мкг) и пиридоксамин (15 мкг).

Бактериальные штаммы для применения в вакцинных композициях

Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальные штаммы по данному изобретению являются пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. По-видимому, это является результатом того влияния, которое бактериальные штаммы по данному изобретению оказывают на иммунную систему хозяина. Таким образом, композиции по данному изобретению могут также быть пригодными для предупреждения нейродегенеративных нарушений при введении в качестве вакцинных композиций. В определенных вариантах осуществления бактериальные штаммы по данному изобретению могут быть убитыми, инактивированными или аттенуированными. В определенных таких вариантах осуществления композиции могут содержать адъювант вакцины. В определенных вариантах осуществления указанные композиции предназначены для введения с помощью инъекции, например, с помощью подкожной инъекции.

Общие указания

Практическое применение указанного изобретения будет осуществляться, если не

указано иное, с помощью стандартных способов химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе. См., например, литературные источники [50] и [51, 57] и др.

Термин «содержащий» охватывает «включающий», а также «состоящий», например, композиция, «содержащая» X, может состоять исключительно из X или может включать в себя что-либо дополнительное, например, X+Y.

Термин «приблизительно» в отношении числового значения x является необязательным и означает, например, $x \pm 10\%$.

Выражение «по сути» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по сути не содержит» Y, может полностью не содержать Y. При необходимости выражение «по сути» может быть опущено из определения по данному изобретению.

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означает, что при выравнивании указанный процент нуклеотидов является тем же самым при сравнении с указанными двумя последовательностями. Указанное выравнивание и указанный процент гомологии или идентичности последовательности могут быть определены с помощью компьютерных программ, известных в данной области техники, например, программ, описанных в разделе 7.7.18 источника литературы [58]. Предпочтительное выравнивание определяют с помощью алгоритма поиска гомологии Smith-Waterman с использованием поиска аффинных гэпов, при этом штраф за открытие гэпа составляет 12 и штраф за продление гэпа составляет 2, матрица BLOSUM составляет 62. Алгоритм поиска Smith-Waterman раскрыт в литературном источнике [59].

Если не указано специально, то процесс или способ, содержащий несколько этапов, могут включать дополнительные этапы в начале или в конце способа, или могут включать дополнительные промежуточные этапы. Кроме того, этапы можно комбинирования, опускать или осуществлять в альтернативном порядке, при необходимости.

Различные варианты осуществления описаны в данном документе. Необходимо понимать, что характеристики, определенные в каждом варианте осуществления, могут быть комбинированы с другими определенными характеристиками, для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. В частности, варианты осуществления, выделенные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные, могут быть комбинированы друг с другом (кроме случаев, когда они являются взаимоисключающими).

ПУТИ/РЕЖИМЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1 - Эффективность бактериального инокулята при действии в качестве нейропротектора

Краткое описание

Клетки нейробластомы обрабатывали композициями, содержащими бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением. Используемые клетки нейробластомы

SH-SY5Y являются дофамин-продуцирующими и прочно утвердились в качестве модели *in vitro* для исследования нейродегенеративных заболеваний. Наблюдали способность указанных бактериальных штаммов к повышению нейропролиферации. Клетки нейробластомы также обрабатывали дофаминергическим нейротоксином 1-метил-4-фенилпиридином (MPP), который индуцирует необратимые симптомы болезни Паркинсона в клетках нейробластомы. Изучали способность бактериальных штаммов к функционированию в качестве нейропротекторных в отношении MPP.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Клеточная линия

Клетки нейробластомы SH-SY5Y приобретали из ECCACC (№ в кат. 94030304) и выращивали в MEM (Sigma Aldrich, № в кат. M2279) с добавлением питательной смеси Хэма F-12 (Sigma Aldrich, № в кат. N4888).

Способ

После выращивания клетки нейробластомы SH-SY5Y высевали на 96-луночный планшет по 11000 клеток/луночка и инкубировали в течение 2 дней. Затем клетки переносили в среду для дифференцировки (которая содержит FBS при 1%) и 10 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma Aldrich, № в кат. R2625-100MG). Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали на 7-й день дифференцировки. Клетки предварительно обрабатывали с добавлением или без добавления MPP (Sigma Aldrich, № в кат. D048-1G) в течение 8 часов. Впоследствии клетки обрабатывали 10% бактериальным супернатантом и инкубировали в течение ночи. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью реагента ССК-8 (Sigma Aldrich, набор для подсчета клеток - 8, № в кат. 96992-3000TESTS-F) и считывали при длине волны 450 нм.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 1. Обработка клеток нейробластомы MRx0029 или MRX0005 приводила к повышению пролиферации нейронов. Клетки нейробластомы, которые обрабатывали MPP совместно с бактериальным штаммом, имели повышенную жизнеспособность клеток по сравнению с клетками, обработанными только MPP (которые имели сниженную жизнеспособность). Указанные данные показывают, что бактериальный штамм может выступать в качестве нейропротектора. Защитный эффект был более высоким в случае клеток, обработанных MRX0029, которые восстанавливали жизнеспособность в большей степени, чем клетки положительного контроля, обработанные кверцетином. Указанные данные демонстрируют, что указанные бактериальные штаммы могут выступать в качестве нейропротектора.

Пример 2 - Эффективность бактериального инокулята в снижении секреции IL-6

Краткое описание

Активация провоспалительных цитокинов была связана с повреждением нейронов

при нейродегенеративных заболеваниях. Липополисахарид (LPS) представляет собой известный стимулятор провоспалительного цитокина IL-6. Клетки астроцитомы типа глиобластомы человека обрабатывали композициями, содержащими бактериальные штаммы по данному изобретению в комбинации с LPS, с целью наблюдения их способности модулировать уровни IL-6.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

MG U373 представляет собой астроцитому типа глиобластомы, происходящую из злокачественной опухоли, а клетки приобретали в Sigma-Aldrich (№ в кат. 08061901-1VL). Клетки астроцитомы типа глиобластомы человека MG U373 выращивали в MEM (Sigma Aldrich, № в кат. M-2279) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-Glut, 1X раствора MEM заменимых аминокислот и 1X пирувата натрия.

Способ

После выращивания клетки MG U373 высевали на 24-луночный планшет по 100000 клеток/луночка. Клетки обрабатывали только LPS (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRx0029 в течение 24 ч. Также выполняли контроль в случае, если клетки инкубировали в необработанных средах. После этого не содержащие клеток супернатанты центрифугировали при 10000 g в течение 3 минут при 4°C. IL-6 измеряли с помощью набора для ИФА IL-6 человека от Peprotech (№ в кат. 900-K16) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 2. Обработка клеток нейробластомы LPS и бактериальным штаммом приводила к снижению уровня секретируемых IL-6.

Пример 2b - Эффективность бактериального инокулята в модулировании секреции IL-8

Краткое описание

Поскольку нейровоспаление играет ключевую роль в нейродегенеративных заболеваниях и, как было показано, IL-8 оказывает нейроразрушительные эффекты, оценивали влияние композиций, содержащих бактериальные штаммы и LPS на активации IL-8. Клетки астроцитомы типа глиобластомы человека обрабатывали композициями, содержащими бактериальные штаммы по данному изобретению в комбинации с LPS, с целью наблюдения их способности модулировать уровни IL-8.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Клеточная линия

MG U373 представляет собой астроцитому типа глиобластомы, происходящую из

злокачественной опухоли, а клетки приобретали в Sigma-Aldrich (№ в кат. 08061901-1VL). Клетки астроцитомы типа глиобластомы человека MG U373 выращивали в MEM (Sigma Aldrich, № в кат. M-2279) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-Glut, 1X раствора MEM заменимых аминокислот и 1X пирувата натрия.

Способ

После выращивания клетки MG U373 высевали на 24-луночный планшет по 100000 клеток/луночка. Клетки обрабатывали только LPS (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRX0029 в течение 24 ч. После этого не содержащие клеток супернатанты центрифугировали при 10000 g в течение 3 минут при 4°C. IL-8 измеряли с помощью набора для ИФА IL-8 человека от Peprotech (№ в кат. 900-K18) в соответствии с инструкцией производителя.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 3. Обработка клеток нейробластомы бактериальными штаммами приводила к повышению секреции IL-8 независимо от наличия LPS.

Пример 2С - Эффективность бактериального инокулята в снижении индуцированного α -синуклеином воспаления.

Краткое описание

Нейровоспаление играет ключевую роль в болезни Паркинсона, и, как было показано, α -синуклеин индуцирует нейровоспаление *in vivo*. Таким образом, оценивали способность бактериальных штаммов по данному изобретению ингибировать индуцированное α -синуклеином воспаление. Сокультуру клеток астроцитомы типа глиобластомы человека и клеток нейробластомы подвергали воздействию α -синуклеина дикого типа и мутантных изоформ E46K и A53T и обрабатывали композициями, содержащими бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением. Затем исследовали способность бактериальных штаммов ингибировать индуцированную α -синуклеином секрецию IL-6.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Клеточная линия

MG U373 представляет собой астроцитому типа глиобластомы, происходящую из злокачественной опухоли, а клетки приобретали в Sigma-Aldrich (№ в кат. 08061901-1VL). Клетки астроцитомы типа глиобластомы человека MG U373 выращивали в MEM (Sigma Aldrich, № в кат. M-2279) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-Glut, 1X раствора MEM заменимых аминокислот и 1X пирувата натрия.

SH-SY5Y представляет собой клеточную линию нейробластомы человека, происходящую из злокачественной нейробластомы, и может быть приобретена в Sigma-Aldrich (№ в кат. 94030304-1VL). Клетки выращивали в 50% MEM и 50% питательной смеси F-12 среды Хэма с добавлением 2 mM L-глутамина, 10% термоинактивированной

FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки на среде для выращивания клеток высевали на 96-луночном планшете по 11000 клеток/лунка и помещали в инкубатор. Через 2 дня среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали через 7 дней дифференцировки.

Способ

Клетки SHSY5Y высевали на 12-луночные планшеты с плотностью 50000 клеток/лунка. Клетки выращивали в 50% MEM и 50% питательной смеси F-12 среды Хэма с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% термоинактивированной FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки на среде для выращивания клеток высевали на 96-луночном планшете по 11000 клеток/лунка и помещали в инкубатор. Через 2 дня среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали через 7 дней дифференцировки. U373 высевали на 12 планшетов Трансвелл (0,4 мкм сложнополиэфирная мембрана, Costar) с плотностью 50000 клеток/лунка в течение 72 часов. Клетки кокультивировали совместно в течение 24 часов до обработки в среде для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS без ретиноевой кислоты).

После этого клетки обрабатывали 25 мкг/мл α -синуклеина (ДТ, А53Т, Е46К) в присутствии или в отсутствии 10% бактериального супернатанта в течение 48 часов. Не содержащие клеток супернатанты собирали, центрифугировали при 10000 g в течение 3 минут при 4°C, разделяли на аликвоты и хранили при -80 0C. IL-6 и IL-8 человека измеряли, как описано выше.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 4. Обработка клеток α -синуклеином дикого типа и мутантными изоформами Е46К и А53Т приводила к индукции умеренной секреции IL-6 (Фиг. 4А). Индуцированную α -syn секрецию IL-6 ингибировали в клетках, обработанных бактериальными штаммами (Фиг. 4А). Снижение секреции IL-6 была наибольшей при введении MRX0029.

Пример 3 - Эффективность бактериального инокулята в снижении активации NF κ B

Краткое описание

Активация промотора NF κ B приводит к продуцированию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α и IL-6. Промотор NF κ B может быть активирован с помощью α -синуклеина, а LPS с помощью стимуляции лиганда TLR4. Мутации α -синуклеина, такие как α -синуклеин А53Т, связаны с семейной болезнью Паркинсона. Обработка нейронов LPS имитирует болезнь Паркинсона, вызванную факторами окружающей среды. Изучали способность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением, приводить к ингибированию активации промотора NF κ B.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Hek blue TLR4 человека приобретали в InvivoGen (№ в кат. hkb-hltr4). Hek blue TLR4 человека выращивали в DMEM с высоким содержанием глюкозы (Sigma Aldrich, № в кат. D-6171) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-глутамин, нормоцина и 1X раствора для селекции HEK Blue.

Способ

После выращивания клетки Hek blue человека высевали на 96-луночные планшеты по 25000 клеток/луночка в 4 повторах. Одну группу клеток обрабатывали только α -синуклеином A53T (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRx0029 в течение 22 ч. Вторую группу клеток обрабатывали LPS (10 нг/мл, из *Salmonella enterica* серотип Typhimurium, Sigma Aldrich, № в кат. L6143) отдельно или с помощью 10% бактериального супернатанта из MR029 в течение 22 часа. После этого клетки центрифугировали и 20 мкл супернатанта смешивали с 200 мкл реагента Quanti Blue (InvivoGen, № в кат. гер-qb2), инкубировали в течение 2 ч и считывали поглощение при 655 нм.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 5 и 6. На Фиг. 5 продемонстрировано, что активация промотора NF κ B α -синуклеином ингибируется MRx0029. На Фиг. 6 продемонстрировано, что активация промотора NF κ B LPS не ингибируется MRx0029.

Пример 4 - Эффективность бактериального инокулята в изменении антиоксидантной способности

Краткое описание

Изучали способность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением, приводить к изменению антиоксидантной способности. Антиоксидантную способность бактериального штамма определяли с помощью хорошо известного анализа ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)).

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способ

Бактериальные клетки (10^6 или более) собирали и центрифугировали. Их суспендировали в аналитическом буфере (с использованием трехкратного объема осадка). Суспензию подвергали воздействию ультразвука на льду в течение 5 минут и затем центрифугировали при 12000 x g в течение 10 минут. Супернатант удаляли и измеряли с помощью набора для анализа ABTS, производимого Sigma Aldrich (код CS0790) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 7. На Фиг. 7 продемонстрировано, что MRx0029 имеет антиоксидантную способность, составляющую примерно 2 мМ, по сравнению с тролоксом.

Пример 5 - Эффективность бактериального инокулята в изменении уровней перекисного окисления липидов

Краткое описание

Изучали способность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением, приводить к изменению уровней перекисного окисления липидов. Анализ веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (TBAR), использовали для измерения побочных продуктов перекисного окисления липидов.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Способ

Бактериальные клетки (10^6 или более) собирали и центрифугировали, этап промывки выполняли с использованием изотонического солевого раствора до ресуспендирования осадка в аналитического буфере хлорида натрия. Суспензию подвергали воздействию ультразвука на льду в течение 10 минут и затем центрифугировали при 10 000 x g в течение 10 минут. Супернатант удаляли и уровень перекисного окисления липидов оценивали с помощью анализа веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 8. На Фиг. 8 продемонстрировано, что MRx029 способен ингибировать перекисное окисление липидов на примерно 20%, что представляет собой более высокую антиоксидантную способность, чем положительный контроль, бутилированный гидрокситолуол (1% масс./об.).

Пример 6 - Эффективность бактериального инокулята в отношении активности гистондеацетилазы

Краткое описание

Изучали способность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением, приводить к изменению активности гистондеацетилазы. Нарушение регуляции гистондеацетилазы играло роль в патогенезе, ассоциированном с возраст-ассоциированными нейродегенеративными заболеваниями.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

Клеточная линия

Использовали клеточную линию НТ-29, поскольку присутствовала гистондеацетилаза.

Способ

Не содержащие клеток супернатанты бактериальных культур в стационарной фазе выделяли с помощью центрифугировали и фильтровали на 0,22 мкм фильтре. Клетки HT-29 использовали через 3 дня после наступления конfluence и использовали в сниженных количествах в 1 мл DTS за 24 часа до наступления эксперимента. Клетки HT-29 подвергали воздействию 10% не содержащего клеток супернатанта, разведенного в DTS, и оставляли для инкубации в течение 48 часов. Затем белки нуклеазы экстрагировали с помощью набора для экстракции нуклеаз Sigma Aldrich и образцы мгновенно замораживали до измерения активности HDAC. Активность для измерения активности HDAC оценивали флуориметрически с помощью набора Sigma Aldrich (Великобритания).

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 9. На Фиг. 9 продемонстрировано, что MRx0029 способен приводить к снижению уровней активности гистондеацетилазы.

Пример 7 - Уровень продуцирования индола в бактериях

Краткое описание

Исследовали способность бактерий по данному изобретению продуцировать индол. Индол принимал участие в ослаблении воспаления и окислительного стресса.

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

ATCC 11775 представляет собой бактериальный референтный штамм, который, как известно, продуцирует индол.

Способ

Интактные бактериальные клетки в стационарной фазе инкубировали с 6 мМ триптофаном в течение 48 часов. Бактериальные виды, которые имеют фермент триптофаназу, будут утилизировать триптофан в качестве субстрата для продуцирования индола. Через 48-часовой период инкубации супернатант удаляли и добавляли к реагенту Ковакак с целью количественной оценки индола. Стандарты, рабочие растворы и реагенты готовили с помощью стандартизированных способов, валидированных во внутрилабораторных условиях.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 10. На Фиг. 10 продемонстрировано, что MRx0029 имеет способность продуцировать индол из триптофана в концентрациях, составляющих примерно 0,2 мМ.

Пример 8 - Уровень продуцирования кинуренина в бактериях

Краткое описание

Исследовали способность бактерий по данному изобретению продуцировать кинуренин. Нарушение регуляции кинуреинового пути может приводить к активации иммунной системы и накоплению потенциально нейротоксических соединений.

Изменения кинуреинового метаболизма может быть связано с развитием болезни Паркинсона.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRx0029

DSM 17136 представляет собой штамм *Bacteroides copricola*, который, как известно, продуцирует кинуренин.

Способ

Не содержащие клеток супернатанты бактериальных культур в стационарной фазе выделяли с помощью центрифугировали и фильтровали на 0,22 мкм фильтре, а до использования замораживали. Стандарты, рабочие растворы кинуренина и реагенты готовили с помощью стандартизированных способов, валидированных во внутрилабораторных условиях. Образцы обрабатывали трихлоруксусной кислотой и центрифугировали при 10000 x g в течение 10 минут при 4°C. Супернатант собирали и распределяли в 96-лучночный планшет. Реактив Эрлиха использовали для детекции кинуренина и добавляли в соотношении 1:1.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 11. На Фиг. 11 продемонстрировано, что MRx0029 имеет способность продуцировать кинуренин в концентрации, составляющей примерно 40 мкМ.

Пример 9 - Уровни дофамина, DOPAC и HVA в полосатом теле у обработанных МРТР бактерий мышей

Болезнь Паркинсона представляет собой распространенное нейродегенеративное заболевание, отличительные клинические характеристики которого включают в себя тремор, замедление движения, ригидность и постуральную неустойчивость. Указанные симптомы главным образом связаны с дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции и последующей потерей их проекционных нервных волокон в полосатом теле [60]. Мыши, обработанные МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином), избирательно теряют значительные количества nigrostriальных дофаминергических нейронов [61]. МРТР приводил к индукции потери дофаминергических клеток в черной субстанции, имитируя клиническое состояние при болезни Паркинсона и, таким образом, пригодную модель для исследования антипаркинсонических лекарственных средств.

Целью указанного исследования была оценка эффектов анаэробных бактерий MRX0029 с использованием мышей с повреждениями, вызванными МРТР.

48 самцов мышей распределяли на 4 различные группы обработки (группы А, В, Е и I по n=12 животных в каждой группе). Группы обработки продемонстрированы в Табл. 1 ниже, а время временная динамика изложена ниже.

Таблица 1: Группы обработки

Гру	n	Обработка	Повреждение
-----	---	-----------	-------------

ппа		Вещество	Уровень безопасности	Доза	Путь	Схема	Вещество	Доза	Путь	Схема
А	12	Носитель (PBS)	-	-	р.о.	18 дней: день (-14) - день	Носитель (0,9% солевой раствор)		i.p.	День 0
В	12	Носитель (PBS)	-	-	р.о.	18 дней: день (-14) - день	МРТР	4x 20 мг/кг	i.p.	День 0
Е	12	MRx0029 Megasphaera sp. (gly)	S1/S2	2×10 ⁸ бактерий	р.о.	18 дней: день (-14) - день	МРТР	4x 20 мг/кг	i.p.	День 0
І	12	Носитель (PBS)	-	-	р.о.	18 дней: день (-14) - день	МРТР	4x 20 мг/кг	i.p.	День 0
		7-нитроиндазол	-	50 мкг/кг	i.p.	день 0 (2x i.p.)				

Группы А, В, Е и І обрабатывали ежедневно в течение 18 дней с помощью желудочного зонда либо бактериями (MRx0029 - группа Е), либо носителем (PBS). Пероральную обработку начинали за 14 дней до повреждения МРТР. Животные группы І получали ежедневно (PBS) р.о. (пероральную) обработку носителем и инъекцию i.p. (интраперитонеальную) референтным лекарственным препаратом за 30 минут до и через 90 минут после первого введения МРТР в день 0. Используемый объем в случае р.о. и обработки носителем составлял 200 мкл на мышь. Бактериальный штамм группы Е происходил из глицериновых рабочих растворов (gly). В случае пероральной обработки зонды для использования хранили во флаконе, содержащем 70% этанол и промывали до и после каждого использования дистиллированной водой. Каждая группа обработки имела свой собственный зонд и флакон с этанолом и флакон с дистиллированной водой.

Пробирки и зонды не меняли между группами. Непосредственно перед обработкой каждый шприц промывали N2.

В день 0 МРТР (20 мг/кг массы тела (b.w.) 4 раза, 2 ч интервал между обработками) инъецировали i.p. животным групп В, Е и I. Одна группу животных (А) подвергалась холостому повреждению в результате введения носителя МРТР (0,9% солевого раствора). Используемый объем составлял 10 мкл на г массы тела. Взвешивание животных выполняли до обработки МРТР с целью введения животным доз в соответствии с их фактической массой тела. После этого животные получали ежедневно обработку р.о.

Составление препаратов для дозирования и приготовления глицериновых рабочих растворов для дозирования

Название бактериального штамма:	MRx0029 <i>Megasphaera</i> sp.
Условия хранения/стабильности:	-80 °C
Носитель:	1x PBS
Дозы обработки:	2×10 ⁸ бактерий
Введение:	200 мкл
Номер партии:	н.о.

В случае обработки группы Е (MRx0029)

1.) 1 глицериновый рабочий раствор извлекали из -80°C холодильника и помещали в анаэробные условия (анаэробная банка с саше) при 37°C с целью размораживания (это составляло 30-40 минут).

2.) Полностью размороженный глицериновый рабочий раствор центрифугировали при 6000 x g в течение 10 минут при комнатной температуре.

3.) Супернатант удаляли без нарушения осадка (например, с помощью пипетки).

4.) 4,22 мл стерильного предварительного подогретого (37 °C) 1 x PBS добавляли и осторожно перемешивали с помощью пипетки.

5.) Мышам вводили дозу 200 мкл бактериального раствора. Животным вводили дозу в течение 15 минут после ресуспендирования осадка с использованием PBS.

Составление группы референтных препаратов

Название референтного препарата:	7-нитроиндазол
Условия хранения/стабильности:	-20°C
Носитель:	Арахисовое масло
Дозы обработки:	50 мкг/кг
Введение:	i.p. (за 30 минут до и через 90 минут после 1-й обработки МРТР)
Номер серии:	МКBS6671V

Подходящее количество 7-нитроиндазола растворяли в арахисовом масле с целью достижения конечной концентрации 50 мг/кг.

Материалы и способы

Животные

Линия мышей:	C57BL/6J (линия мышей JAX™) JAX™, номенклатурный номер мышей 000664
Поставщик:	Charles River Laboratories
Возраст в начале исследования:	~10 недель
Пол:	Мужской
Число животных:	48

Особое содержание животных и рандомизация

Перчатки заменяли в каждой группе обработки и распыляли 70% раствор этанола в каждую клетку одной и той же группы с целью сведения к минимуму риска загрязнения во всех случаях работы с животными (например, обработка, исследование поведения, очистка и забор образцов тканей).

Обработку проводили в случайном порядке и чередовали ежедневно для того, чтобы предупредить обработку тех же самых групп в одно и то же время. Животных рандомизировали на клетку при заборе образцов тканей.

Забор образцов тканей и обработка

На день 4 животных всех групп умерщвляли и извлекали головной мозг. Таким образом, мышей глубоко анестезировали с помощью инъекции пентобарбитала (600 мг/кг).

Кровь (примерно 500 мкл) собирали с помощью прокола сердца. Затем мышей транскардиально перфузировали 0.9% солевым раствором и головной мозг удаляли и продольно рассекали. Левое полушарие подразделяли на ткань полосатого тела (для ВЭЖХ), ткань черной субстанции, а также остаточный головной мозг, взвешивали и мгновенно замораживали и хранили при -80°C. Инструменты и поверхности, которые находились в контакте с животными, подлежали очистке 70% этанолом до вскрытия следующего животного.

Биохимический анализ уровней дофамина, DOPAC и HVA с помощью ВЭЖХ в полосатом теле

Образцы полосатого тела (n=6 из каждой группы обработки; в общей сложности 24 образца) смешивали в соотношении 1:10 (масс./об.) с 0,2 М перхлорной кислотой, содержащей 100 мкМ EDTA-2Na, и гомогенизировали при 0°C в стеклянном гомогенизатора Pestlemicro. После отстаивания в течение 30 минут на льду гомогенаты центрифугировали при 10000 об./мин. в течение 10 минут в охлажденной центрифуге Biofuge Fresco (Heraeus Instruments, Германия). Супернатанты осторожно аспирировали и смешивали с 0,4 М Na-ацетатным буфером, pH 3 в соотношении 1:2 (об./об.) и фильтровали через 0,22 мкм центрифугальный фильтр (Merck Millipore, Германия) в течение 4 минут при 14000 g при 4 °C. Фильтраты хранили при -80°C до анализа ВЭЖХ.

Анализ ВЭЖХ

Концентрации DA, DOPAC и HVA в образцах полосатого тела определяли с помощью жидкостной колончатой хроматографии с электрохимической детекцией [62; 63]. Использовали систему ВЭЖХ (HTEC-500, Eisom Corp., Киото, Япония), содержащую безимпульсный микроструйный насос, дегазатор и амперометрический детектор, оснащенный стеклоглеродным электродом, функционирующим при +0,45 В по сравнению с референтным электродом Ag/AgCl. Образцы инъецировали с помощью CMA/200 замороженного микроэмплера (CMA/Microdialysis, Стокгольм, Швеция). Хроматограммы фиксировали и интегрировали с помощью компьютеризированной системы получения данных (DataApeх, Прага, Чешская республика). DA, DOPAC и HVA разделяли на 150×2,1 i.d. мм колонке (CA5-ODS, Eisom Corp., Киото, Япония). Подвижная фаза состояла из 0,1 М фосфатного буфера при pH 6,0, 0,13 мМ ЭДТА, 2,3 мМ натрий-1-октансульфоната и 20% (об./об.) метанола. Предел детектирования (соотношение сигнал-шум=3) в случае DA оценивали до 0,5 фмоль в 15 мкл (0,03 нМ), введенных в колонку.

Результаты

Введение бактериальных штаммов хорошо переносилось животными. В день выполнения повреждений с использованием МРТР и при необходимости через день после этого использовали красный свет для согревания животных. Если животные содержались в неблагоприятных условиях (ощущали холод, были обезвоженными, имели аномальное поведение), их снабжали влажным кормом и при необходимости проводили подкожную обработку.

Для анализа уровней дофамина, DOPAC и HVA использовали ткань полосатого тела от 6 животных на обработку. Данные анализировали с помощью критерия Крускала-Уоллиса с последующим использованием апостериорного критерия Дьюнна для множественных сравнений или однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием апостериорного критерия Бонферрони (А по сравнению со всем (*), В по сравнению со всем, I по сравнению со всем (#)). */# = $p < 0,5$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Здоровые животные в группе А имели высокие уровни дофамина, DOPAC и HVA, в то время как обработка МРТР в группе В приводила к их снижению, а положительный контроль (группа I) приводил к восстановлению продуцирования до некоторой степени (Фиг. 12). Животные группы I проявляли тенденцию к более высоким уровням дофамина, чем группа, обработанная бактериями, и группа В. Уровни DOPAC (метаболит дофамина), как правило, были значимо ниже у животных группы В по сравнению с уровнями DOPAC животных без повреждений группы А (Фиг. 12В).

Немаловажно, что обработка MRx0029 (группа E), как было обнаружено, приводила к восстановлению продуцирования дофамина и DOPAC (Фиг. 12А и 12В соответственно). Обработка MRx0029, таким образом, может быть пригодной для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений.

Пример 10 - Эффективность бактерий в изменении роста нейритов

Краткое описание

Рост нейритов представляет собой важный процесс развития связей между нейронами. Таким образом, способность бактериальных штаммов и органических кислот индуцировать рост нейритов исследовали с помощью измерения уровней транскрипции белка, ассоциированного с микротрубочками MAP2, специфического маркера дифференцировки нейронов.

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRX0029

Способ

SHSY5Y высевали в 10 см чашки Петри с плотностью 2×10^6 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали средой для дифференцировки (среда для дифференцировки, содержащая 1% FBS без RA) с 10% бактериальными супернатантами или YCFA+, 10 мкМ RA, 200 мкМ гексановой кислоты или 200 мкМ вальпроевой кислоты в течение 17 часов. Затем были получены иллюстративные изображения с помощью фазово-контрастного микроскопа EVOS XL при увеличении 40X/0,65. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью кПЦР. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta ct)}$.

Иммунофлуоресцентная и конфокальная микроскопия

Клетки высевали на 8-луночные предметные стекла (Marienfeld Laboratory Glassware) по 5×10^4 клеток/лунка в течение ночи и обрабатывали 10% бактериальным супернатантом в течение 24 часов. Для дифференцировки клетки обрабатывали 10 нМ ретиноевой кислотой в течение 5 дней до обработки бактериальным супернатантом. Затем клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 20 минут при комнатной температуре (КТ). Фиксированные клетки промывали PBS и пермеабелизовали 1% Тринон X-100 в PBS в течение 10 минут. После промывания PBS препараты инкубировали блокирующим буфером (4% BSA/PBS) в течение 1 ч при КТ до добавления анти-MAP2 антитела (sc-74421, Santa Cruz Biotechnology Inc), разведенного в 1% BSA/PBS в течение 12 ч при 4°C. Затем их промывали дважды PBS, после этого инкубировали конъюгированным с Alexa Fluor 488 анти-мышинное антитело (Molecular Probes Inc) и конъюгированным с Alexa Fluor 594 фаллоидином (ab176757, Abcam) в течение 1 ч при КТ. После промывания 3X PBS препараты заключали с VectorshieldD, содержащим DAPI (Sigma, Aldrich). Препараты исследовали с помощью микроскопа Zeiss Axioscope, оснащенного 63x/1,2 W объективом Corr и наборами фильтров, подходящих для детекции используемых флуорохромов. Выставленное вручную время воздействия в случае цифрового получения изображений, иммуномеченных MAP-2, поддерживали постоянным, обеспечивая сравнение между различными лунками и видами обработки. Время воздействия фаллоидина (F-актина) и DAPI варьировало с целью соответствия полю зрения. Рандомизированные поля зрения получали с помощью фотоаппарата

QImaging, контролируемого программным обеспечением Image Pro Plus. Изображения сохраняли в виде TIF и открывали в Adobe Photoshop CC 2015.1.2 и наложения изображений с использованием MAP-2, DAPI и фаллоидина перекрывали и сливали. Иллюстративные изображения выбирали для иллюстрации различий в количестве и положении исследуемых белков.

Результаты

Результаты представлены на Фиг. 13. На Фиг. 13А продемонстрированы иллюстративные микроскопические изображения недифференцированных клеток SHSY-5Y, инкубированных с каждой из кислот и бактериальных супернатантов. Обработка клеток MRX0029 приводила к индукции нейроноподобного фенотипа, демонстрирующего сходные свойства с клетками, обработанными ретиноевой кислотой (которая используется для конечной дифференцировки клеток нейробластомы), тела клеток которых были более крупные и пирамидоподобными, при этом нейриты и отростки разветвлялись в направлении сети с соседними клетками. На Фиг. 13В продемонстрировано, что MRx0029 значительно приводит к активации MAP2 в недифференцированных клетках нейробластомы. Окрашивание фаллоидином (агентом, связывающим актиновый цитоскелет) дополнительно указывало на другую организацию цитоскелетной структуры в клетках, обработанных MRx0029, дополнительно подтверждая гипотезу дифференцировки нейронов в случае MRx0029 (Фиг. 13В).

Пример 11 - Эффективность бактериального инокулята в снижении окислительных уровней в клетках

Предпосылки

Образование активных форм кислорода способствует патогенезу нейродегенеративных заболеваний. Исследовали способность бактериальных штаммов приводить к защите дифференцированных клеток SHSY-5Y и U373 от реактивных форм кислорода (ROS), образованных в результате обработки трет-бутилгидропероксидом (ТВНР).

Материалы и методы

Бактериальный штамм

Megasphaera massiliensis MRX0029

Способ

Клетки SHSY-5Y высевали в черном плоскодонном 96-луночном планшете с плотностью 5000 клеток/лунка и помещали в инкубатор CO₂. Через 24 часа среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день. На день 10 среду для дифференцировки заменяли и клетки промывали предварительно подогретым PBS и окрашивали 10 мкМ молекулярным зондом DCFDA в течение 20 минут в среде для выращивания клеток, содержащей 1% FBS. Затем клетки повторно промывали предварительно подогретым PBS и обрабатывали 100 мкМ ТВНР в присутствии или в отсутствии 10% бактериального супернатанта в течение 2 часов. Интенсивность

флуоресценции измеряли с помощью планшет-ридера TECAN при Ex/Em 485/530 нм.

Результаты

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на Фиг. 14. На Фиг. 14b продемонстрировано, что MRX0029 способен ингибировать продуцирование ROS в дифференцированных клетках нейробластомы SHSY-5Y. MRX0029 не оказывал влияния на образование ROS в клетках астроглиобластомы U373 (Фиг. 14a). Это демонстрирует, что указанный аспект антиоксидантного эффекта был специфическим в отношении нейронов.

Пример 12 - Нейропротекция

RA-дифференцированные клетки SHSY-5Y обрабатывали MPP⁺, активным метаболитом МРТР, химическим соединением, широко используемым для имитации *in vitro* и *in vivo* некоторых характеристик патологии РД. Жизнеспособность клеток измеряли в виде скорости дыхания в митохондриях (Фиг. 15). Как MRx0005, так и MRx0029 продемонстрировали значимые эффекты и сами по себе способствуют повышению метаболической активности в митохондриях в клетках SHSY-5Y. MRX0029 продемонстрировал полную защиту от MPP⁺, восстанавливая жизнеспособность клеток почти до того же самого уровня необработанных клеток и более, чем положительный контроль кверцетином. Защита MRx0005 составляла приблизительно 20% по сравнению с образцом, обработанным YCFA-MPP⁺, приблизительно то же самое наблюдали в случае положительного контроля кверцетином (Фиг. 15).

Пример 13 - Дополнительный анализ механизма ингибирования гистондеацетилазы

Введение

Микробиота кишечника со своим огромным разнообразием и метаболической емкостью представляет собой огромный метаболический резервуар для продуцирования широкого разнообразия молекул со способностью воздействовать на активность HDAC. В нескольких исследованиях оценивали ингибирующую активность HDAC метаболитов микробного происхождения, отличных от бутирата, которая, как было показано, приводит к ингибированию HDAC и ассоциирована с улучшением двигательной функции при болезни Гентингтона [64]. Таким образом, авторы данного изобретения были заинтересованы определить, какие метаболиты отвечают за ингибирование HDAC и дополнительно выявить механизмы, с помощью которых достигается ингибирование.

Материалы и методы

Сбор бактериальных культур и не содержащих клеток супернатантов

Чистые культуры бактерий выращивали в анаэробных условиях в бульоне YCFA до тех пор, пока они не достигала своей стационарной фазы роста. Культуры центрифугировали при 5000 x g в течение 5 минут и не содержащий клеток супернатант (CFS) фильтровали с помощью 0,2 мкм фильтра (Millipore, Великобритания). 1 мл аликвот CFS до использования хранили при -80 °C. Бутират натрия, гексановую кислоту и валериановую кислоту получали от Sigma Aldrich (UK) и суспензии готовили в бульоне YCFA.

Количественная оценка SCFA и MCFA бактериальных супернатантов

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) и среднецепочечные жирные кислоты (MCFA) из бактериальных супернатантов анализировали и количественно оценивали с помощью MS Omics APS следующим образом. Образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм), инсталлированная в GC (7890B, Agilent), соединенном с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного в [65].

Анализ специфической активности HDAC

Специфическую ингибирующую активность HDAC анализировали в случае HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 с помощью флуорогенных аналитических наборов для каждого типа HDAC (BPS Bioscience, Калифорния). Анализы проводили в соответствии с инструкциями производителя и анализ каждого образца проводили в трех повторах. Не содержащие клеток супернатанты разбавляли 1 к 10 и подвергали воздействию специфических белков HDAC, предоставляемых в наборе для поддержания соответствия между способами.

Результаты

Метаболиты комменсальных микроорганизмов, ингибирующие гистондеацетилазу, представляют собой бутират и валериановую кислоту

MRx0029, супернатант которого продемонстрировал ингибирование HDAC как в цельных клетках HT29, так и клеточных лизатах HT29, продуцировали валериановую кислоту и гексановую кислоту при средних концентрациях 5,08 мМ и 1,60 мМ соответственно (Фиг. 16А и С).

Для исследования того, какие метаболиты отвечали за индуцированном штаммом ингибирование HDAC, различные концентрации гексановой кислоты, валериановой кислоты и бутирата натрия измеряли в случае ингибирования их HDAC в отношении цельных клеток HT-29 и клеточного лизата HT-29. Результаты на Фиг. 16В демонстрирует значимое ($P < 0,05$) ингибирование активности HDAC бутиратом натрия в отношении цельных клеток, а также клеточного лизата, в то время как гексановая кислот не демонстрировала значимой ингибирующей активности. Валериановая кислота приводила к ингибированию общей активности HDAC (* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($P < 0,001$), **** ($p < 0,0001$)).

Высокоэффективные общие ингибиторы исследованных HDAC целенаправленно воздействуют на HDAC класса I.

Исследовали специфический профиль ингибирования HDAC исследуемого бактериального штамма. Анализы специфического ингибирования HDAC (BPS Bioscience,

Калифорния) выполняли в случае HDAC класса I и класса II. Способность бактериального штамма приводить к ингибированию ферментов HDAC сравнивали с бутиратом, гексановой и валериановой кислотой. Результаты демонстрируют, что MRX0029 представляет собой очень высокоэффективный ингибитор ферментов HDAC класса I (HDAC1, 2 и 3). Ингибирование HDAC класса II не было таким значительным (данные не продемонстрированы).

Обсуждение

Штамм с ингибирующей активностью в отношении HDAC продуцировал значительные количества валериановой кислоты и гексановой кислоты, а также значительные количества бутирата натрия (Фиг. 16C). При исследовании в виде чистых соединений валериановая кислота и бутират натрия приводили к значимому ингибированию HDAC ($p < 0,0001$).

Интересным является то, что результаты в случае специфической активности HDAC демонстрируют, что исследуемый штамм представляет собой высокоэффективный ингибитор HDAC класса I и, в частности, HDAC2 (Фиг. 17 и 18). HDAC класса I (HDAC1, 2, 3 и 8) содержатся в ядре и повсеместно экспрессируются в нескольких типах клеток человека. HDAC 1-3 имеют более чем 50% общей гомологии, однако имеют различные структуры и клеточные функции [66]. Они главным образом участвуют в выживаемости, пролиферации и дифференцировке клеток, и, таким образом, их ингибирование может быть пригодным в ряде заболеваний [67]; [68]; [69]; [70]; [71].

Пример 14 - Уровень секреции BDNF в клетках SHSY-5Y

Предпосылки

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) представляет собой универсальную молекулу в головном мозге, ассоциированную с развитием нейронов, нейропротекцией и нейродегенерацией. BDNF не только приводит к защите от нейродегенерации, но также и психических расстройств, таких как депрессия и тревожность, которые довольно распространены среди пациентов, диагностированных PD или AD.

Способы

SH-SY5Y высевали в 24-луночных планшетах с плотностью 60 000 клеток/луночка и помещали в инкубатор. Через 24 часа среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали на день 10 дифференцировки. В случае обработки среду для дифференцировки удаляли и заменяли 450 мкл полной средой для выращивания клеток и 50 мкл бактерий SN добавляли к обработанным лункам или YCFA+ добавляли в качестве отрицательного контроля.

Результаты

Результаты продемонстрированы на Фиг. 19, на котором показано, что введение MRX0029 в комбинации с ретиноевой кислотой приводит к повышению секреции BDNF из дифференцированных клеток нейробластомы. Композиции, содержащие

комменсальные бактерии и органические кислоты, таким образом, могут быть пригодными в терапии.

Пример 15 - Производство метаболитов - метаболиты в головном мозге

Предпосылки

Метаболиты, присутствующие в бактериальных супернатантах, могут непосредственно влиять на ответ хозяина на окислительный стресс, межклеточное взаимодействие и нейропротекцию. Метаболиты, которые играют основную роль в нейробиологических процессах, измеряли во время скрининга *ex vivo* в ткани головного мозга мышей, получавших в пищу MRx0005 и MRx0029.

Способы

Животные

Взрослые самцы мышей BALBc (Envigo, Великобритания) размещали по группам в условиях 12-часового цикла света-темноты; стандартный корм для грызунов и вода были доступны в неограниченном количестве. Все эксперименты осуществляли в соответствии с Европейскими руководствами при одобрении Комитетом по контролю этических норм обращения с животными Ирландского национального университета в Корке. Возраст животных составлял 8 недель в начале эксперимента.

Схема исследования

Животным давали адаптироваться к комнате для содержания в течение одной недели после прибытия в комплекс для содержания животных. Они получали с помощью желудочного зонда (доза 200 мкл) живых биотерапевтических препаратов в дозе 1×10^9 КОЕ в течение 6 последовательных дней между 15:00 и 17:00. На день 7 животных декапитировали и ткани извлекали для эксперимента.

Сбор тканей

Животных умерщвляли в случайном порядке в зависимости от обработки и условий исследования; забор образцов происходил между 9.00 и 13.00. Кровь из туловища собирали в пробирки с калий-ЭДТА (этилендиаминтетрауксовая кислота) и центрифугировали в течение 15 минут при 4000 g. Плазму крови выделяли и хранили при -80°C для последующего анализа. Головной мозг быстро вырезали, рассекали и каждую область головного мозга мгновенно замораживали на сухом льду и хранили при -80°C для последующего анализа. Селезенку удаляли и обрабатывали немедленно после выборок для иммуностимуляции *ex vivo*. Ткань кишечника (2 см сегменты подвздошной кишки и толстой кишки, рядом со слепой кишкой вырезали, и использовали наиболее удаленный 1 см ткани слепой кишки) помещали в камеры Ussing для анализа кишечной проницаемости. Слепую кишку удаляли, взвешивали и хранили при -80°C для анализа SCFA.

Анализ моноаминов

Концентрацию нейромедиаторов анализировали с помощью ВЭЖХ в отношении образцов из ствола головного мозга. Вкратце, ткань ствола головного мозга подвергали ультразвуковой обработке в 500 мкл охлажденной подвижной фазы с добавлением 4 нг/40

мкл N-метил-5-НТ (Sigma Chemical Co., Великобритания) в качестве внутреннего стандарта. Подвижная фаза содержала 0,1 М лимонной кислоты, 5,6 мМ октан-1-сульфоновой кислоты (Sigma), 0,1 М натрия дигидрофосфата, 0,01 мМ ЭДТА (Alkem/Reagecon, Корк) и 9% (об./об.) метанола (Alkem/Reagecon) и доводили до pH 2,8 с помощью 4 N гидроксида натрия (Alkem/Reagecon). Затем гомогенаты центрифугировали в течение 15 минут при $22000 \times g$ при 4°C и 40 мкл супернатанта вводили в систему ВЭЖХ, которая состояла из системного контроллера SCL 10-Avp, электрохимического детектора LECD 6A (Shimadzu), насоса LC-10AS, печи CTO-10A, автоинжектора SIL-10A (с охладителем проб, содержащимся при 40 C) и онлайн дегезатором Gastorr (ISS, Великобритания). Колонку с обращенной фазой (Kinetex 2.6 мкм C18 100 \times 4,6 мм, Phenomenex) поддерживаемую при 30 °C, использовали в разделении (скорость потока 0,9 мл/мин). Стеклоуглеродный рабочий углерод в комбинации с референтным электродом Ag/AgCl (Shimadzu), функционирующем при +0,8 В и полученные хроматограммы анализировали с помощью компьютерной программы Class-VP 5 (Shimadzu). Нейромедиаторы идентифицировали по их характерному времени удерживания, определенному с помощью внутренних инъекций, которые хроматографировали через равные промежутки во время анализа образцов. Отношения высот пиков аналита по сравнению с внутренним стандартом измеряли и сравнивали со стандартной инъекцией. Результаты выражали в виде нг на г массы сырой ткани.

Анализ метаболитов

В случае анализа GC-метаболитов образцы бактериальных супернатантов дериватизировали метилхлорформатом с помощью слегка модифицированной версии протокола, описанного в [72]. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью GC (7890B, Agilent), соединенного с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного в [65].

В случае анализа жирных кислот образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм), инсталлированная в GC (7890B, Agilent), соединенном с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного в [65].

Результаты - продуцирование нейромедиаторов

Результаты продемонстрированы на Фиг. 20, которая показывает, что в головном мозге мышей, которые получали в пищу MRx0029, уровни норадреналина повышались

($p=0,0507$), что сопровождалось незначительным повышением серотонина и 5-Н1АА. Указанные данные подтверждают анализ метаболитов, изложенный ниже, предполагая, что MRx00029 представляет собой основного продуцент 4-гидроксифенилуксусной кислоты, известного антиоксиданта [73]. Гораздо более важнее, что 4-гидроксифенилуксусная кислота представляет собой синтетическое промежуточное соединение дофамина и норэпинефрина и важную биоактивную молекулу [74]. Фактически при PD дегенеративные изменения распространяются за пределы дофаминергической системы, влияя в одинаковой степени на серотонинергические и норадренергические системы, что, в свою очередь, приводит к повышенным уровням серотонина (5-гидрокситриптамина, 5-НТ) и норадреналина (норэпинефрина) как в структурах полосатого тела, так и в экстрастриарных структурах [75]. L-DOPA целенаправленно воздействует главным образом на характеристики PD, в том же время, она не направлена на снижение как 5-НТ, так и норадреналина. Помимо этого, чем более длительной является продолжительность обработки L-DOPA, тем более видимыми являются диапазон двигательных и недвигательных осложнений (например, дискинезия, психиатрические симптомы) [76]. Таким образом, указанные данные демонстрируют, что бактерии, которые продуцируют органические кислоты, такие как 4-гидроксифенилуксусная кислота, могут быть пригодными в лечении, в частности, в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Результаты - продуцирование метаболитов

Метаболиты, присутствующие в бактериальных супернатантах, могут непосредственно влиять на ответ хозяина на окислительный стресс, межклеточное взаимодействие и нейропротекцию особым образом. Анализировали метаболиты в супернатанте культур MRX0029 и MRX0005, а результаты продемонстрированы на Фиг. 21.

Незначительное количество метаболитов демонстрировали выраженную разницу между двумя анализируемыми штаммами. Концентрация янтарной кислоты была особенно повышенной в MRx0005. Интересно, что отношение образец/среда в случае 4-гидроксифенилуксусной кислоты была значительно выше в MRx0029 (Фиг. 21А).

Анализ жирных кислот в супернатантах обнаружил интересную дихотомию в двух штаммах: MRx0005 продуцировали главным образом уксусную и пропановую кислоту, в то время как MRx0029 продуцировал бутановую, пентановую и гексановую кислоту, при этом оба в линейной и разветвленной формах (Фиг. 21В). Эти оба штамма значительно различались и, в частности, продуцирование 4-гидроксифенилуксусной кислоты MRx0005 и MRx0029 соответственно было примечательным (Фиг. 21А). Кроме того, MRx0005, по-видимому, продуцирует больше С2 и С3 короткоцепочечных жирных кислот, в то время как MRx00029 продуцировал больше С4 (бутират) и как линейные, так и разветвленные среднецепочечные жирные кислоты, в том числе гексановую кислоту.

Янтарная кислота представляет собой метаболит цикла Кребса, участвующий в окислительном фосфорилировании. Комплекс окислительного фосфорилирования

представляет собой основной этап синаптической передачи белков и везикул в проксимальные и дистальные участки [77]. Нарушение его функционирования было описано при нейродегенеративных нарушениях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и спиноцеребеллярной атаксии 1 типа [78]. Указанные результаты являются особенно интересными, поскольку янтарная кислота может приводить к усилению митохондриальной активности и поддерживать восприимчивые нейроны при нейродегенеративном заболевании, связанном с неправильной укладкой белков, в том числе PD [79]. Как BDNF, так и янтарная кислота имеют аналогичную защитную активность не только при нейродегенерации, но также и при психических расстройствах, таких как депрессия и тревожность, которые являются довольно распространенными среди пациентов, диагностированных PD или AD.

На Фиг. 21В также продемонстрировано, что MRX0029 представляет собой продуцента бутирата (бутановой кислоты). Это может иметь больше значение, поскольку бутират имеет известную роль в снижении непроницаемости гематоэнцефалического барьера, что оказывает нейропротекторный эффект [80]. Указанное свойство MRx0029 (и других нейропротекторных бактерий) может способствовать его эффективности.

Пример 16 - Модулирование экспрессии мРНК белков плотных контактов с помощью MRx0029

Поскольку последние данные свидетельствуют о том, что нарушение функционирования и воспаление кишечника представляет собой двигательный симптом, ассоциированный с PD, изучали способность бактериальных штаммов по данному изобретению вызывать любое нарушение функции кишечного барьера. Монослой эпителиальных муцин-продуцирующих клеток HT29-mtx [81] использовали в качестве модели *in vitro* для оценки повреждения кишечного барьера и иммуностимуляции после обработки MRx0005 и MRx0029. Дифференцированные клетки HT29-mtx, подверженные воздействию форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA), секретировали значительное количество IL-8; в отличие от этого, обработка в течение 24 часов бактериальными супернатантами MRx0005 и MRx0029, приводила к индукции даже более секреции IL-8 по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными YSCFA (Фиг. 22А).

Изучали способность MRx0005 и MRx0029 регулировать проницаемость эпителия в результате модификации внутриклеточной передачи сигнала включала в себя экспрессию и локализацию белков, участвующих в образовании кишечного барьера.

РНК выделяли и количественный анализ RT-PCR (qRT-PCR) выполняли для характеристики изменений экспрессии генов белков плотных контактов во время инкубации с MRx0005 и MRx0029. Введение MRx0029 приводило к повышению экспрессии мРНК окклюдина, виллина, белка плотных контактов 1 и 2 (соответственно TJP1 и TJP2) через 2 часа после инкубации (Фиг. 22В). В отличие от этого, воздействие MRx0005 не приводило к изменению экспрессии генов белков плотных контактов, указывая на то, что указанные два штамма функционируют различным образом на

кишечный барьер.

Результаты *in vitro* сравнивали с данными из параллельного анализа *ex vivo* в отношении кишечника мышей, получавших в пищу MRx0005 и MRx0029. Экспрессию генов TJP2 и окклюдина количественно оценивали в толстой кишке и подвздошной кишке. Данные *ex vivo* точно отражают данные *in vitro*, поскольку MRx0029 был способен значимо повышать активность TJP1 и окклюдина ($p=0,073$) в участке толстой кишки в кишечнике мыши (Фиг. 22C+22D). MRx0029 также был способен снижать функцию проницаемости в толстой кишке тех же самых мышей (Фиг. 22E+22F).

Материалы и способы - экстракция РНК и анализ кПЦР

Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора RNeasy (Qiagen, Манчестер, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя, и концентрацию РНК определяли с помощью поглощения при 260/280 нм с использованием спектрофотометра (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Вилмингтон, Делавер). В случае анализа экспрессии мРНК кДНК получали из суммарной РНК с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции (Applied Biosystems, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции обратной транскрипции выполняли в термоциклере (Biometra, Германия) при 25°C в течение 10 минут, 37°C в течение 120 минут и 85°C в течение 5 минут, удерживали при 4°C. Полученную в результате кДНК амплифицировали в двух повторах с помощью ПЦР-анализа SYBR-Green, а продукты выявляли на приборе осуществления ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 flex (Applied Biosystems, Великобритания) с помощью стандартизированного профиля (исходная денатурация при 95°C в течение 10 минут, с последующими 40 циклами по 15 секунд денатурации при 95°C и 60 секундами отжига/удлинения при 60/65°C, в зависимости от праймеров. Стадию диссоциации добавляли через 40 циклов с целью получения кривой плавления. Анализ выполняли с помощью программного обеспечения для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems QuantStudio v1.2. Праймерные последовательности актина, виллина, окклюдина, TJP1 и TJP2 предложены в перечне последовательностей.

Пример 16 - Исследование стабильности

Композиция, описанная в данном документе, содержащая, по меньшей мере, один бактериальный штамм, описанный в данном документе, хранится в закупоренном контейнере при 25°C или 4°C и контейнер помещен в атмосферу, имеющую 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% или 95% относительную влажность. Через 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 1,5 года, 2 года, 2,5 года или 3 года, по меньшей мере, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% бактериального штамма будет сохраняться, как измеряют с помощью колониеобразующих единиц, определенных стандартными протоколами.

Пример 17

Способы

Животные

Используемые животные и схема исследования были такими же самыми, что и в

Примере 15.

Бактериальные штаммы

755: Parabacteroides distasonis (MRX005)

Megasphaera massiliensis (MRX0029)

Сбор тканей

Животных умерщвляли в случайном порядке в зависимости от обработки и условий исследования; забор образцов происходил между 9.00 и 14.30. Кровь из туловища собирали в пробирки с калий-ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и центрифугировали в течение 15 минут при 4000 g. Плазму крови выделяли и хранили при -80°C в для последующего анализа. Головной мозг быстро вырезали, рассекали и каждую область головного мозга мгновенно замораживали на сухом льду и хранили при -80°C для последующего анализа. Селезенку удаляли, собирали в 5 мл среду RPMI (с L-глутамином и бикарбонатом натрия, R8758 Sigma+10% FBS (F7524, Sigma) + 1% Pen/Strep (P4333, Sigma)) и обрабатывали сразу после иммуностимуляции ex-vivo. Ткань кишечника (2-3 см сегменты подвздошной кишки и толстой кишки, рядом со слепой кишкой вырезали, и использовали наиболее удаленный 1-2 см ткани слепой кишки) помещали в камеры Ussing для анализа кишечной проницаемости. Слепую кишку удаляли, взвешивали и хранили при -80°C для анализа SCFA.

Анализ моноаминов

Концентрацию нейромедиаторов анализировали, как описано в Примере 10.

Анализ цитокинов в селезенке

Селезенку извлекали незамедлительно в 5 мл среды RPMI после умерщвления и незамедлительно культивировали. Клетки селезенки вначале гомогенизировали в указанной среде RPMI, затем инкубировали в течение 5 минут с 1 мл буфера для лизиса RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). Добавляли еще 10 мл среды RPMI, затем с последующим 200G центрифугированием в течение 5 минут. Затем супернатант фильтровали через 40 мкм сито. Клетки подсчитывали и высевали (4000000/мл среды). Через 2,5 ч после адаптации клетки стимулировали липополисахаридом (LPS-2 мкг/мл) или конкавалином А (ConA-2,5 мкг/мл) в течение 24 ч. После стимуляции супернатанты собирали для оценки высвобождения цитокинов с использованием набора для провоспалительной панели 1 (мышь) V-PLEX Kit (Meso Scale Discovery, Мериленд, США) в случае TNF α , IL-10, IL-1 β , интерферона γ , CXCL2 и IL6. Анализы выполняли с помощью MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S 600.

Анализ экспрессии генов

Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора для выделения miRNA mirVana™ (Ambion/Life technologies, Пейсли, Великобритания) и обрабатывали ДНКазой (Turbo DNA-free, Ambion/life technologies) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК количественно оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Уилмингтон, Делавэр, США) в соответствии с инструкциями

производителя. Качество РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent Bioanalyzer (Agilent, Стокпорт, Великобритания) в соответствии с процедурой производителя и рассчитывали число целостности РНК (RIN). РНК со значением RIN >7 использовали для последующих экспериментов. РНК обратно транскрибировали в кДНК с помощью высокопроизводительного набора кДНК Applied Biosystems (Applied Biosystems, Уоррингтон, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, обратную транскриптазу Multiscribe (50 ЕД/мкл) (1)(2)(1)(10) добавляли в виде части мастер-микса при КТ, инкубировали при 25°C в течение 10 минут, при 37°C в течение 2 часов, при 85°C в течение 5 минут и хранили при 4°C. Количественную ПЦР проводили с помощью зондов (6-карбоксит-флуоресцеин - FAM), сконструированных Applied Biosystems для специфических целевых генов мыши, в то время как β -актин использовали в качестве эндогенного контроля. Реакционные смеси для амплификации содержали 1 мкл кДНК, 5 мкл 2X мастер-микс для ПЦР (Roche), 900 нМ каждого праймера и составляли в общей сложности 10 мкл при добавлении не содержащей РНКазы воды. Все реакции осуществляли в тройном повторе с помощью 96-луночных планшетов в системе LightCycler®480. Условия термоциклирования были такими, как рекомендовано производителем (Roche) для 55 циклов. Для проверки загрязнения при амплификации в каждом цикле содержались не содержащие матриц контроли в тройном повторе для каждого использованного зонда. Фиксировали значения порогового цикла (Ct). Данные нормализовали с помощью β -актина и преобразовывали с помощью способа 2- $\Delta\Delta$ CT и представляли в виде кратного изменения по сравнению с контрольной группой.

Анализ короткоцепочечных жирных кислот в содержимом слепой кишки

Содержимое слепой кишки смешивали и подвергали перемешиванию на вортексе с водой MilliQ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Супернатанты получали с помощью центрифугирования (10000 g, 5 минут, 4 °C) с целью осаждения бактерий и других твердых частиц и фильтрации до 0,2 мкм. Его переносили в прозрачный флакон GC и в качестве внутреннего стандарта использовали 2-этилмасляную кислоту (Sigma). Концентрацию SCFA анализировали с помощью системы ионизации в пламени Varian 3500 GC, подгоняли до колонки ZB-FFAP (30 м x 0,32 мм x 0,25 мм; Phenomenex). Стандартную кривую строили при различных концентрациях стандартной смеси, содержащей ацетат, пропионат, изобутират, н-бутират, изовалерат и валерат (Sigma). Пики интегрировали с помощью программного обеспечения Varian Star Chromatography Workstation версии 6.0. Все данные SCFA выражали в виде мкмоль/г.

Статистический анализ

Нормально распределенные данные представляли в виде среднего \pm SEM; непараметрические совокупности данные представляли в виде медианы с интерквартильной шириной. Непарный двухсторонний t-критерий применяли для анализа параметрических данных, а критерий Манна-Уитни использовали для непараметрических данных. Ранговый коэффициент корреляции Спирмена использовали для корреляционного анализа в объединенных совокупностях данных р-Значение < 0,05 считали

значимым во всех случаях.

Результаты - продуцирование нейромедиаторов

Результаты на Фиг. 23 демонстрируют влияние обработки MRx005 на концентрацию нейромедиаторов в головном мозге мышей. Наиболее примечательно, что обработка MRx005 приводит к снижению дофамина.

Результаты - Экспрессия генов

Экспрессию генов рецепторов нейромедиаторов [серотониновый рецептор 1a(5-HT_{1a}), дофаминовый рецептор D1, субъединица B1 рецептора GABA, рецептор GABA_A, рецептор NMDA2A (Grin2A) и NMDA2B (Grin2b)], маркеров воспаления [IL-1 β , IL6, CD11b, TNF α и TLR4] и эндокринных маркеров [кортикостерон-релизинг фактора (CRF), кортикостерон-релизинг фактора 1 и 2 (CRFR1, CRFR2), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), рецептора вазопрессина, рецептора окситоцина, глюкокортикоидного рецептора и минералокортикоидного рецептора] анализировали в ткани головного мозга из гиппокампа, миндалины и префронтальной коры.

На Фиг. 24-38 продемонстрированы изменения экспрессии генов после обработки MRX005 или MRX0029 в области гиппокампа, миндалины и префронтальной коры. Обработка MRx0029 приводила к повышению экспрессии глюкокортикоидного рецептора в миндалине (Фиг. 31C). На Фиг. 32A продемонстрировано, что MRx005 приводил к значимому повышению экспрессии BDNF в миндалине, в то время как обработка MRx0029 приводила к значимому повышению экспрессии TLR4 в миндалине (Фиг. 32).

Как MRx005, так и MRx0029 могут приводить к повышению экспрессии CD11b в миндалине (Фиг. 33A), в то время как экспрессия IL-6, Grin2a и Grin2b снижается после обработки MRx005 (Фиг. 33B-D). Кроме того, MRx005 и MRx0029 приводили к значимому повышению экспрессии GABRA2 и повышению экспрессию GABBR1 в миндалине.

Обработка MRx005 приводила к значимому повышению экспрессии BDNF в префронтальной коре (Фиг. 35B).

Обсуждение

Введение MRx005 и MRx0029 вызывало изменения экспрессии генов, особенно в миндалине.

Результаты - Влияние на экспрессию Trp1 и IDO-1

На Фиг. 39 продемонстрировано, что MRx0029 может приводить к значимому повышению экспрессии триптофангидроксилазы-1 (Trp1) в толстой кишке, а обработка MRX005 может приводить к повышению экспрессии IDO-1 в толстой кишке. Обработка MRX005 приводила к повышению экспрессии Trp1 и IDO1 в подвздошной кишке (Фиг. 40).

Индоламинпиррол-2,3-диоксигеназа-1 (IDO-1) представляет собой первый и ограничивающий скорость фермент в пути триптофан/кинуренин, в то время как триптофангидроксилаза 1 (Trp1), изоформа фермента триптофангидролазы, отвечает за синтез серотонина. Указанные данные свидетельствуют о том, что MRx0029 и MRx005

могут влиять на уровни серотонина и путь триптофан/кинурина.

Результаты - Влияние на уровни метаболита триптофана

На Фиг. 41 продемонстрировано влияние обработки MRx005 на уровни циркулирующего кинуренина и триптофана.

Результаты - Влияние на экспрессию цитокинов из спленоцитов

Анализ спленоцитов ex-vivo включает в себя воздействие на спленоциты (клетки, выделенные из селезенки, основного органа, участвующего в иммунной защите) бактерио- или вирус-имитирующей атаки.

MRX005 приводил к значимому снижению уровней интерферона γ в спленоцитах после воздействия LPS (Фиг. 42). Кроме того, MRX005 приводил к значимому снижению уровней интерлейкина 6 и фактора некроза опухоли после воздействия LPS (Фиг. 44 и 45 соответственно). Обработка MRx0029 приводила к снижению интерферона γ , интерлейкина 1 β и интерлейкина 6 после воздействия LPS (Фиг. 42, 43 и 44 соответственно).

Обработка MRx005 и MRx0029 приводила к повышению уровней хемоаттрактанта CXCL1 (Фиг. 47).

Результаты - Влияние на уровни короткоцепочечных жирных кислот в слепой кишке

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) продуцировались, если трудноусваиваемые волокна из пищи сбраживались бактериями в кишечнике. Результаты введения MRX005 продемонстрированы на Фиг. 48.

Пример 18 - Дополнительный анализ индуцированных MRX029 и MRX005 изменений уровней экспрессии генов

Способы

Клеточная линия

Клетки SH-SY5Y

Бактериальные штаммы

755: Parabacteroides distasonis (MRX005)

Megasphaera massiliensis (MRX0029)

кПЦР

SHSY5Y высевали в 10 см чашки Петри с плотностью 2×10^6 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали средой для дифференцировки (среда для дифференцировки, содержащая 1% FBS без RA) с 10% бактериальными супернатантами или YSCFA+, 10 мкМ RA, 200 мкМ гексановой кислоты или 200 мкМ вальпроевой кислоты в течение 17 часов. Затем были получены иллюстративные изображения с помощью фазово-контрастного микроскопа EVOS XL при увеличении 40X/0,65. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью кПЦР. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со

способом $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Праймерные последовательности MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE предложены в перечне последовательностей.

Иммуномечение и визуализация клеток

Клетки высевали на 8-луночные предметные стекла (Marienfeld Laboratory Glassware) по 5×10^4 клеток/лунка в течение ночи и обрабатывали 10% бактериальным супернатантом в течение 24 часов. Для дифференцировки клетки обрабатывали 10 нМ RA в течение 5 дней до обработки не содержащим клеток бактериальным супернатантом в течение 24 часов. После этого клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS в течение 20 минут при комнатной температуре (КТ). Фиксированные клетки промывали PBS и пермеабелизовали 1% Тринон X-100 в PBS в течение 10 минут. После промывания PBS препараты инкубировали блокирующим буфером (4% BSA/PBS) в течение 1 ч при КТ до добавления анти-MAP2 антитела или β 3-тубулина (sc-74421 и sc-80005 соответственно, Santa Cruz Biotechnology Inc), разведенного в 1% BSA/PBS в течение 12 ч при 4°C. Затем их промывали дважды PBS, после этого инкубировали конъюгированным с Alexa Flour 488 анти-мышинное антитело (Molecular Probes Inc) и конъюгированным с Alexa Flour 594 фаллоидином (ab176757, Abcam) в течение 1 ч при КТ. После промывания 3X PBS препараты окрашивали DAPI и заключали с Vectashield® (Vector Laboratories). Препараты исследовали с помощью микроскопа Axioskop 50 (Zeiss), оснащенного 63x/1,2 W объективом Corr и наборами фильтров, подходящих для детекции используемых флуорохромов. Выставленное вручную время воздействия в случае цифрового получения изображений, иммуномеченных MAP-2, поддерживали постоянным, обеспечивая сравнение между различными лунками и видами обработки. Время воздействия фаллоидина (F-актина) и DAPI варьировало с целью соответствия полю зрения. Рандомизированные поля зрения получали с помощью фотоаппарата QImaging, контролируемого программным обеспечением Image Pro Plus. Изображения сохраняли в виде файлов TIFF и открывали в Adobe Photoshop CC 2015.1.2. Изображения с использованием MAP-2, DAPI и фаллоидина затем накладывали и сливали. Иллюстративные изображения выбирали для иллюстрации различий в количестве и положении исследуемых белков.

Иммуноблоттинг

Клетки SH-SY5Y культивировали в указанных условиях, описанных выше, обрабатывали MRx0005 и MRx0029 в течение 24 часов и затем лизировали в буфере RIPA, содержащем коктейль из ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Великобритания). Концентрацию белка оценивали с помощью набора для анализа BCA (Pierce Biotechnology, Рокфорд, Иллинойс), разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF. Затем мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком или 5% BSA и инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами (соответственно MAP2 и β 3-тубулином). Затем блоты инкубировали с соответствующим конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным антителом, а белки выявляли с помощью набора для хемилюминесцентной детекции (Pierce Biotechnology, Рокфорд,

Иллинойс). Как в случае MAP2, так и в случае β 3-тубулина, β -актин выступал в качестве контроля с целью наблюдения вариабельности нагружения белка в образцах.

Результаты и обсуждение

Экспрессия генов

На Фиг. 13а (графическая врезка) и 49 продемонстрированы индуцированные MRx0029 и MRX005 изменения уровней экспрессии актина, виллина, окклюдина, TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE.

Микроскопия и иммуноблоттинг

На Фиг. 50 продемонстрировано изменение уровня экспрессии MAP2 в клетках SHSY5Y, определенные с помощью конфокальной микроскопии. Уровни экспрессии MAP2 и β 3-тубулина также количественно оценивали с помощью иммуноблоттинга. Результаты, продемонстрированные на Фиг. 50M и N, свидетельствуют о том, что MRX029 приводит к индукции повышения уровня экспрессии MAP2.

Последовательности

SEQ ID NO:1 (ген *Megasphaera massiliensis* 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: NP3 - JX424772.1)

```

1 agagttagat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac
61 gagaagagat gagaagcttg ctcttatca attcgagtgg caaacgggtg agtaacgcgt
121 aagcaacctg ccttcagat ggggacaaca gctggaaacg gctgctaata ccgaatacgt
181 tctttccgcc gcatgacggg aagaagaaag ggaggccttc gggctttcgc tggaggaggg
241 gcttgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg atcagtagcc
301 ggtctgagag gatgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg
361 cagcagtggt gaattctccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgaacga
421 tgacggcctt cgggttata agttctgta tatgggacga acagggcac ggtaataacc
481 cggtgtcttt gacgtaccg taagagaaag ccacggctaa ctactgcca gcagccgagg
541 taatacgtag gtggcaagcg ttgtccgaa ttattggcg taaagggcg gcagccggca
601 tcgaagtcg gctttaaag tgcggggctt aaccccgta ggggaccgaa actgtgaagc
661 tcgagtgtcg gagaggaaag cggaaacct agttagcgg tgaatgcgt agatattagg
721 aggaacacca gtggcgaag cggtttctg gacgacaact gacgtgagg cgcgaaagcc
781 aggggagcaa acgggattag atacccggg agtctggcc gtaaacgat gatactagg
841 gtaggaggtg tgactcctt ctgtccgga gtaacgcaa taagtatcc gctggggag
901 tacggccgca aggtgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagtat
961 gtggtttaat tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagcc ttgacattga ttgctacgga
1021 aagagatttc cgtttctct tcggaagaca agaaaacagg tggcgcagg ctgtctcag
1081 ctctgtctg gagatgttg gtttaagccc gcaacgagcg caaccctat ctctgttgc
1141 cagcacctcg ggtggggact cagaagagac tgccgcagac aatgcggagg aaggcgggga
1201 tgactcaag tcatcatgcc cttatggct tgggctacac acgtactaca atggcttta
1261 atagagggac gcgaaggagc gatccggagc aaaccccaaa aacagagtc cagttcggat
1321 tgcaggtctc aactcgcctg catgaagcag gaatcgtag taatgcagg tcagcact
1381 gcggtgaata cgttcccggg cttgtacac accgcccgc acaccagaa agtcattcac

```

1441 acccgaagcc ggtgaggcaa ccgcaaggaa ccagccgtcg aaggtggggg cgatgattgg

1501 ggtgaagtcg taacaaggt

SEQ ID NO:2 (консенсусная последовательность 16S рРНК штамма *Megasphaera massiliensis* MRx0029)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTA
 AGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATA
 CGTTCTTTCCGCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTTTCGCTGG
 AGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCCACCAAGGCGAC
 GATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTATATGGGAC
 GAACAGGACATCGGTTAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAGTGCGGG
 GCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTGGAGAGGAAAGCG
 GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 AGCGGCTTTCTGGACGACAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACG
 GGATTAGATAACCCGGTAGTCCTGGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGT
 ATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGG
 AAAGAGATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCT
 TCTGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAATGCGGA
 GGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGT
 АСТААТGGCTCTТААТАGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAA
 AACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCG
 СТАGТААТCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAАТАCGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCACACCACGAAAGTCATTCACACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCCGCAAG

Праймеры, используемые для кПЦР (с SEQ ID NO в скобках)

Название	Прямая последовательность	Обратная последовательность
ACTB	GATCAAGATCATTTGCTCCTC (3)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAC (4)
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (5)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (6)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (7)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (8)
Окклюдин	AAGAGGAATTTTGACACTGG (9)	GCCATGTACTCTTCACTTTC (10)
TJ1	AAGTCACACTGGTGAAATCC (11)	CTCTTGCTGCCAAACSTATCT (12)

TJP2 CCCTCCCCTGGATCAGGAT (13) GCCATCAAACCTCGTCCATCA (14)

Виллин CATTACCTGCTCTACGTTT (15) AGATGGACATAAGATGAGGTG (16)

SEQ ID NO:17 (консенсусная последовательность 16S рPHK штамма *Parabacteroides distasonis* MRX0005)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCTAT
CAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAGTCGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCC
GCATGGGAATATTTGCTAAAGATTCATCGCTGATAGATAGGCATGCGTTCCATTAGG
CAGTTGGCGGGGTAACGGCCCCACCAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAA
GGTCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTGA
GGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAG
GTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCGGGACGTGTCCCGTT
TTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTT
TTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAGAATTGCCGTTGAAACTGGGA
GGCTTGAGTATGTTTGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGA
TATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGAT
GCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAA
CGATGATCACTAGCTGTTTGCGATACACTGTAAGCGGCACAGCGAAAGCGTTAAGT
GATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCG
GGTTTGAACGCATTCGGACMGAKGTGGAAACACATTTTCTAGCAATAGCCATTTGC
GAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATA
ACGAGCGCAACCCTTGCCACTAGTТАCTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGG
ACTGCCAGCGTAAGCTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTT
ACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGGACAAAGGGAAGCCACCTGGCG
ACAGGGAGCGAATCCCCAAACACGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
TCCGTGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTC
CGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAACTGGTGACTGGGGCTAAGTCGTACGG
GG

Праймеры и зонды, используемые для кПЦР *ex vivo* (с SEQ ID NO в скобках)

Ex vivo:

Название	Прямая последовательность	Обратная последовательность	Зонд
ACTB	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG (18)	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG (19)	/56-FAM/CTG GCC TCA /ZEN/CTG TCC ACC TTC C/3IABkFQ/ (20)
GAPDH	AAT GGT GAA GGT CGG TGT G (21)	GTG GAG TCA TAC TGG AAC ATG TAG (22)	/56-FAM/TGC AAA TGG /ZEN/CAG CCC TGG TG/3IABkFQ/ (23)
BDNF	GCT GCC TTG ATG TTT ACT TTG AC (24)	GCA ACC GAA GTA TGA AAT AAC CA (25)	/56-FAM/ACC AGG TGA /ZEN/GAA GAG TGA TGA CCA TCC /3IABkFQ/ (26)
IL6	AGC CAG AGT CCT TCA GAG A (27)	TCC TTA GCC ACT CCT TCT GT (28)	/56-FAM/CCT ACC CCA /ZEN/ATT TCC AAT GCT CTC CT/3IABkFQ/ (29)

Дополнительные праймеры, используемые в кПЦР (с SEQ ID NO в скобках)

ID гена	Прямая последовательность	Обратная последовательность
---------	---------------------------	-----------------------------

NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATTT (34)	CTGTGCGCCCAGATTACCT (35)
SYP	CTCGGCTTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTCA (37)

Список литературы

- [1] Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad *et al.* (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Mayer *et al.* (2014) *The Journal of Neuroscience* 34(46):15490 –15496
- [17] Cryan and Dinan (2015) *Neuropsychopharmacology,* 40: 241-2.
- [18] Zhou and Foster (2015) *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11: 715–723.
- [19] Wang and Kasper (2014) *Brain Behav Immun.* 38: 1–12.
- [20] US2004/005304
- [21] US2004/170617
- [22] Padmanabhan *et al.* (2013) *Standards in Genomic Sciences* 8:525-538
- [23] Masco *et al.* (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
- [24] Srůtková *et al.* (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
- [25] Kadi *et al.* (2006) *J Neuroimmunol* 174: 133-46
- [26] Pal R *et al.* (2016) *Neurol Res.* 38(12):1111-1122
- [27] Daniele *et al.* (2015) *Sci Signal* 8(376):ra45
- [28] Ahmed *et al.*, manuscript in preparation
- [29] Baraczka *et al.* (1983) *J Neural Transm.* 58(3-4):299-304.
- [30] Eldrup *et al.* (1995) *Acta Neurol Scand.* 92(2):116-21.
- [31] Wang *et al.* (2016) *J Neurogastroenterol Motil* 22: 589-605.
- [32] Zadori *et al.* (2012) *Journal of Neural Transmission,* 119, 2, 275–283
- [33] Lee *et al.* (2008) *European J. Cell Biology* 87:389–397
- [34] Pirooznia and Elefant (2013) *Front Cell Neurosci.* 7: 30.
- [35] Tang, *et al.* (2017) *J Am Heart Assoc,* 6(10).
- [36] Wang *et al.* (2015) *PNAS.* 112(9):2583-2858
- [37] Psaty *et al.* (2003) *JAMA,* 289(19):2534–44
- [38] Lancet. (1995) 346(8991–8992):1647–53
- [39] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9–24.
- [40] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [41] Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- [42] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [43] Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [44] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller.
- [45] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в лечении/терапии.

2. Композиция по п. 1 для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцереbellлярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

4. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания наступающего в раннем возрасте.

6. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения с целью снижения гибели нейронов или защиты нейронов.

7. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе предупреждения или задержки начала или прогрессирования нейродегенеративного заболевания.

8. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе уменьшения уровней IL-6 и/или уровней NFκB при лечении или предупреждении нейродегенеративного заболевания.

9. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе повышения уровней дофамина и/или DOPAC при лечении или предупреждении нейродегенеративного заболевания.

10. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения повреждения головного мозга.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанное повреждение головного

мозга представляет собой инсульт, например, ишемию головного мозга, фокальную ишемию головного мозга, ишемический инсульт или геморрагический инсульт.

12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Megasphaera massiliensis*.

13. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Megasphaera massiliensis*.

14. Композиция по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO:1 или 2.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO:2, или отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК представленную SEQ ID NO:2.

16. Композиция по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

17. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения повреждения головного мозга в результате инсульта.

18. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

19. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

20. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

21. Продукт питания, содержащий указанную композицию по любому из предыдущих пунктов, для применения по любому из указанных пунктов.

22. Вакцинная композиция, содержащая указанную композицию по любому из предыдущих пунктов, для применения по любому из указанных пунктов.

23. Способ лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Megasphaera*, пациенту, нуждающемуся в этом.

24. Клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или ее производное.

25. Композиция, содержащая указанную клетку по п. 24.

26. Композиция по п. 25, содержащая фармацевтически приемлемый носитель или

наполнитель.

27. Биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или ее производное.

28. Клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или ее производное, для применения в лечении/терапии.

29. Клетка по п. 28, отличающаяся тем, что указанная клетка предназначена для применения в способе, определенном в любом из пп. 1-11.

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ (СТАТЬЯ 34)
(ДЛЯ СВЕДЕНИЙ)**

1. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания.

2. Композиция для применения по п. 1, где указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 95% идентична SEQ ID NO: 2.

3. Композиция для применения по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что способ предназначен для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцереbellлярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

4. Композиция для применения по п. 3, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

5. Композиция для применения по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания наступающего в раннем возрасте.

6. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для применения в способе предупреждения или задержки начала или прогрессирования нейродегенеративного заболевания.

7. Композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Megasphaera*, для применения в способе лечения повреждения головного мозга.

8. Композиция для применения по п. 7, где указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 95% идентична SEQ ID NO: 2.

9. Композиция для применения по п. 7 или 8, отличающаяся тем, что указанное повреждение головного мозга представляет собой инсульт, например, ишемию головного мозга, фокальную ишемию головного мозга, ишемический инсульт или геморрагический инсульт.

10. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Megasphaera massiliensis*.

11. Композиция для применения по любому из пп. 2-6 или 8-10, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая, по меньшей мере, на 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична SEQ ID NO: 2.

12. Композиция для применения по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

13. Композиция для применения по п. 7 или 8, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит бактериальный штамм вида *Megasphaera massiliensis* для применения в способе лечения повреждения головного мозга в результате инсульта.

14. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

15. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

16. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

17. Продукт питания, содержащий указанную композицию по любому из предыдущих пунктов, для применения по любому из указанных пунктов.

18. Клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787.

19. Композиция, содержащая указанную клетку по п. 18.

20. Композиция по п. 19, содержащая фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

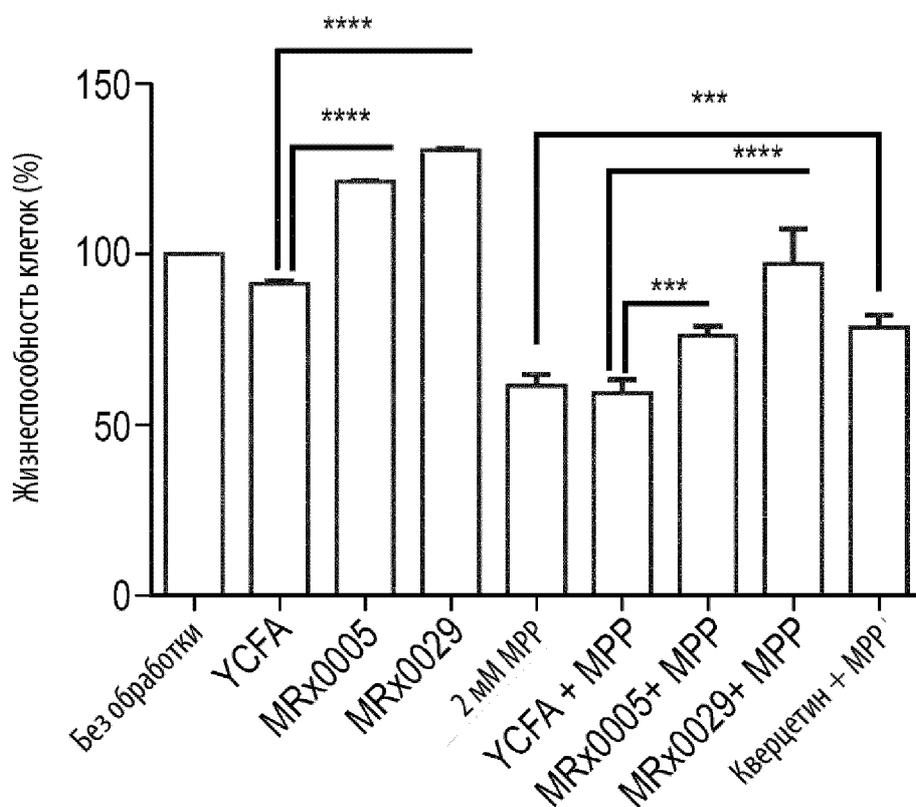
21. Биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787.

22. Клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787 для применения в лечении/терапии.

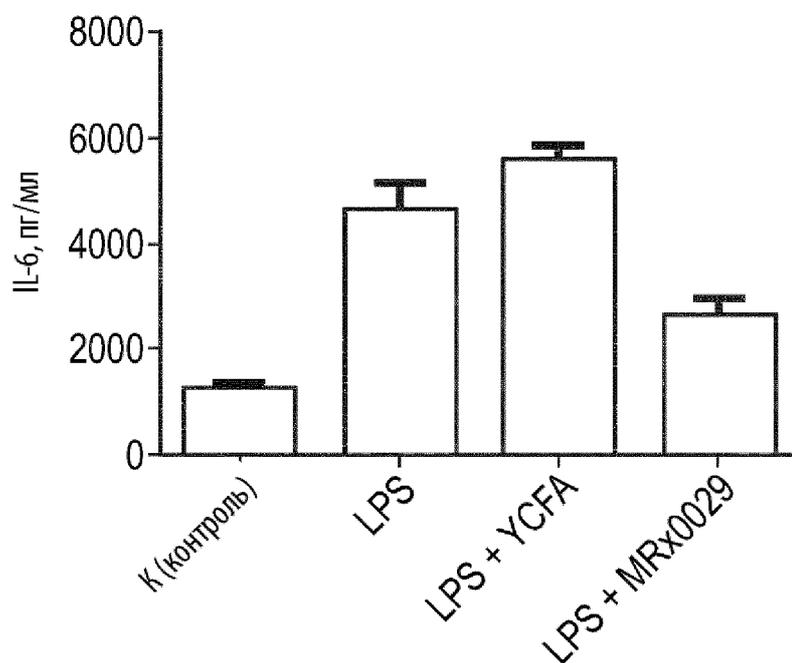
23. Клетка по п. 22, отличающаяся тем, что указанная клетка предназначена для применения в способе, определенном в любом из пп. 1, 3-7 или 9.

По доверенности

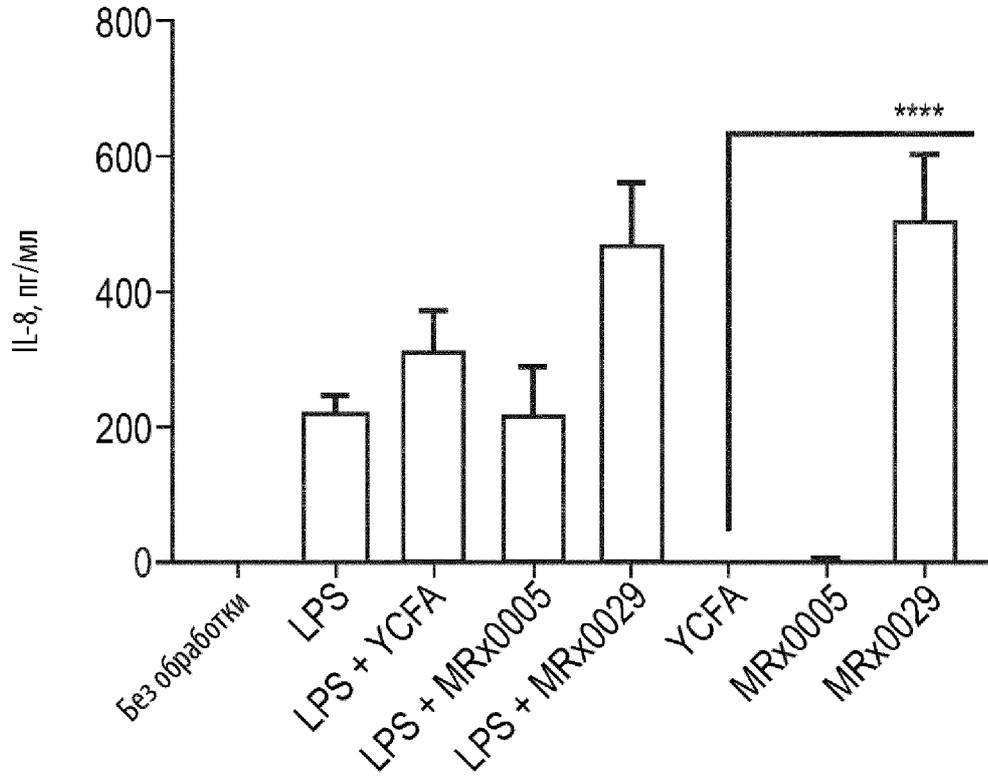
Фиг. 1 Защита от нейротоксичности



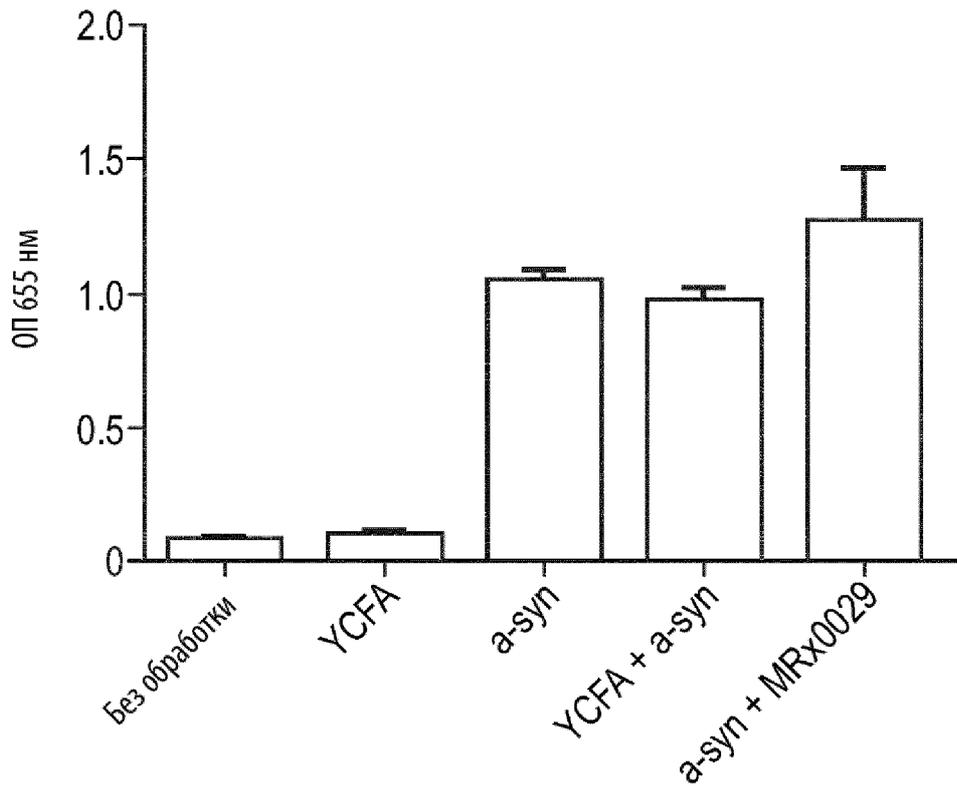
Фиг. 2 Ингибирование индуцированной LPS секрети IL-6 в клетках MG U373



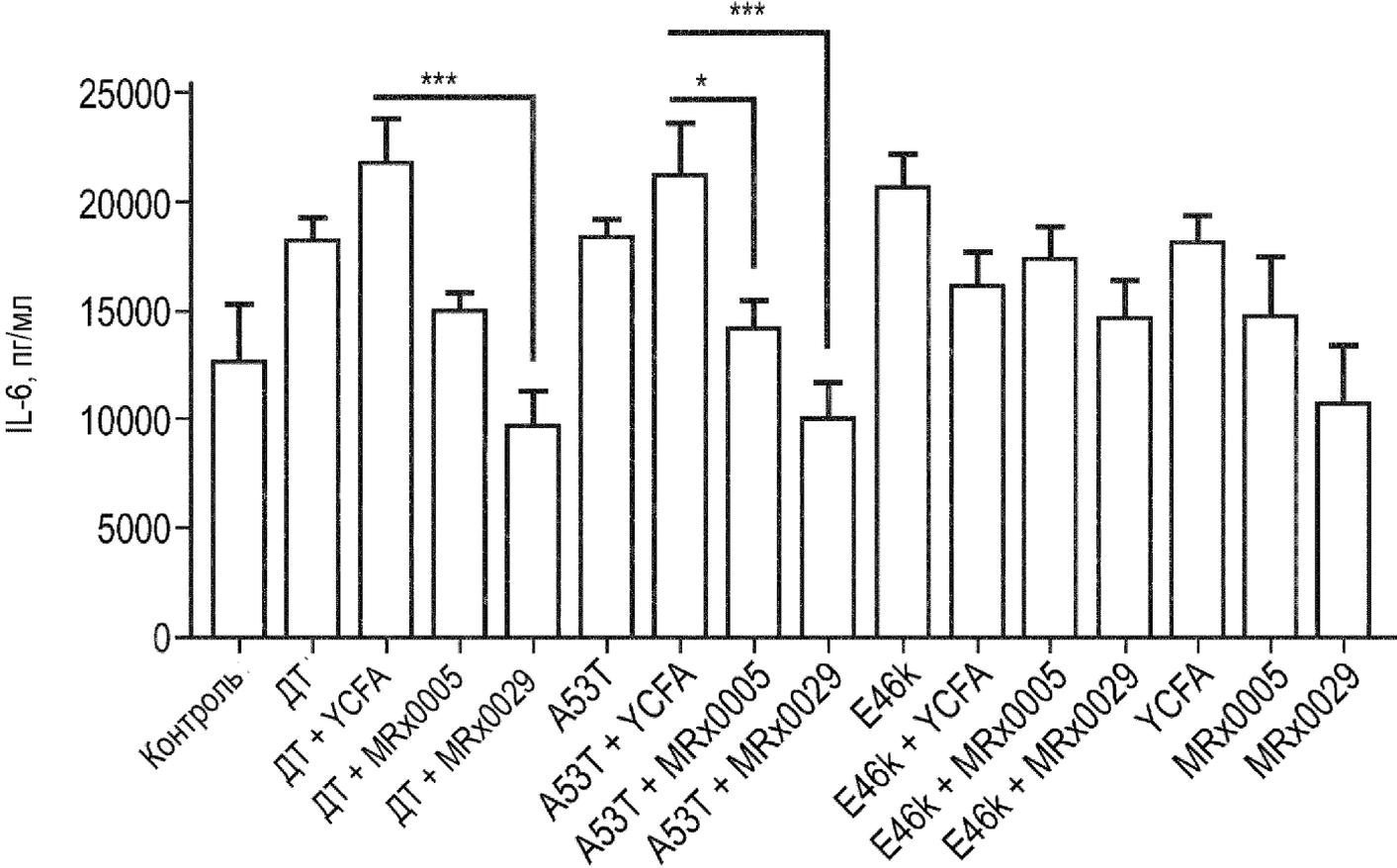
Фиг. 3 Секретия IL-8 из U373



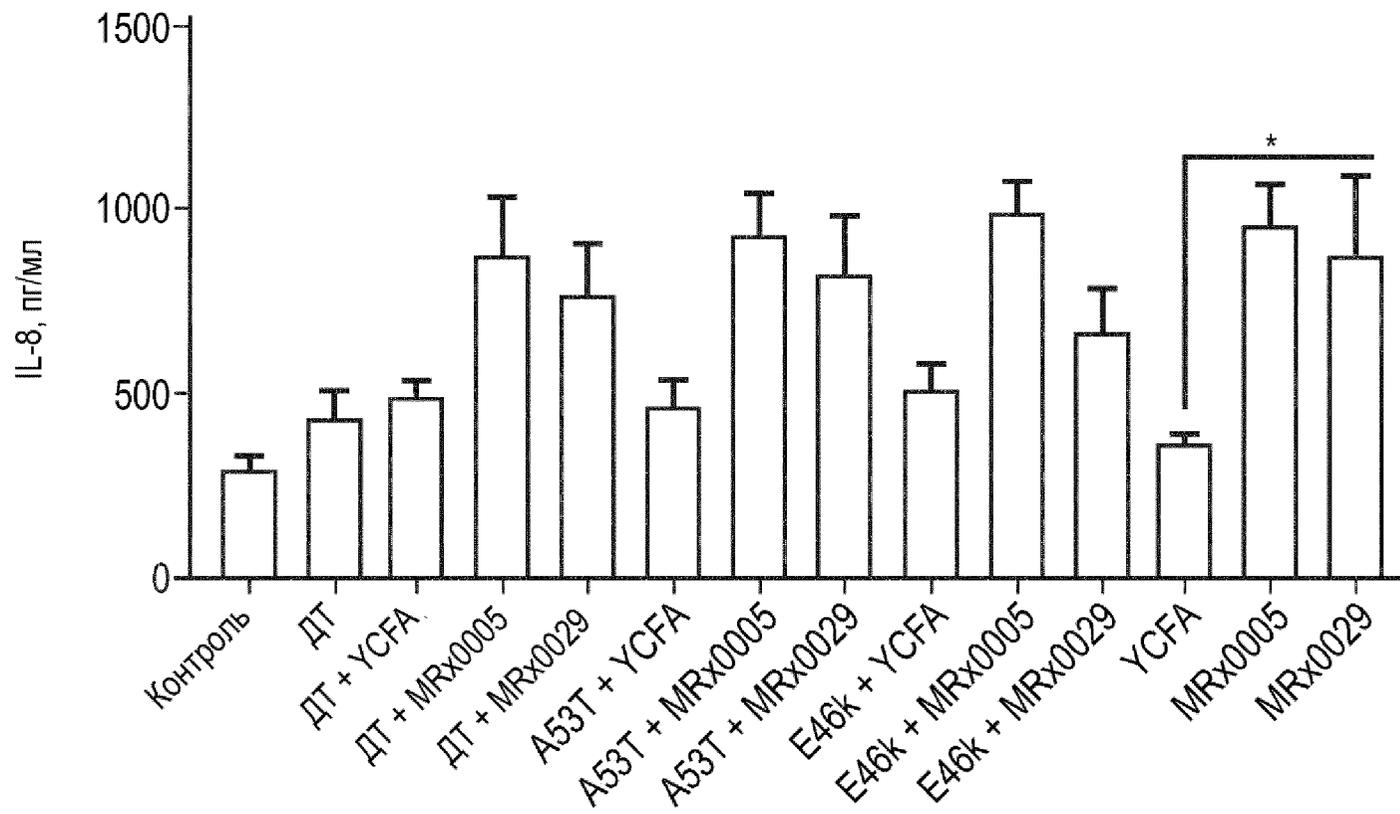
Фиг. 5 Ингибирование индуцированной α -синуклеином активации NF κ B-AP1 в HEK-TLR4



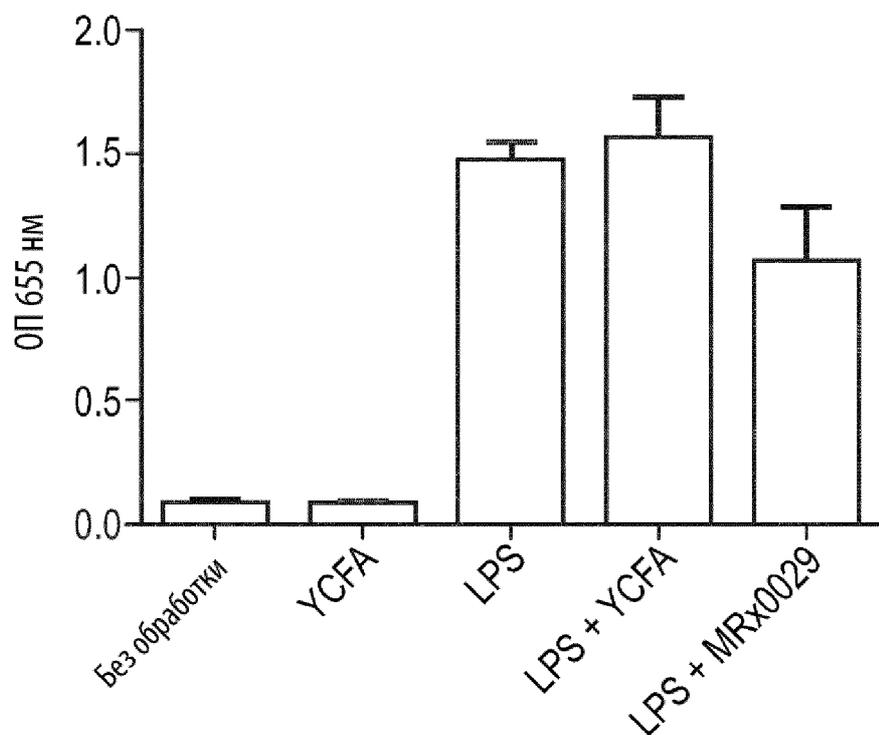
Фиг. 4А Секретия IL-6 из U373



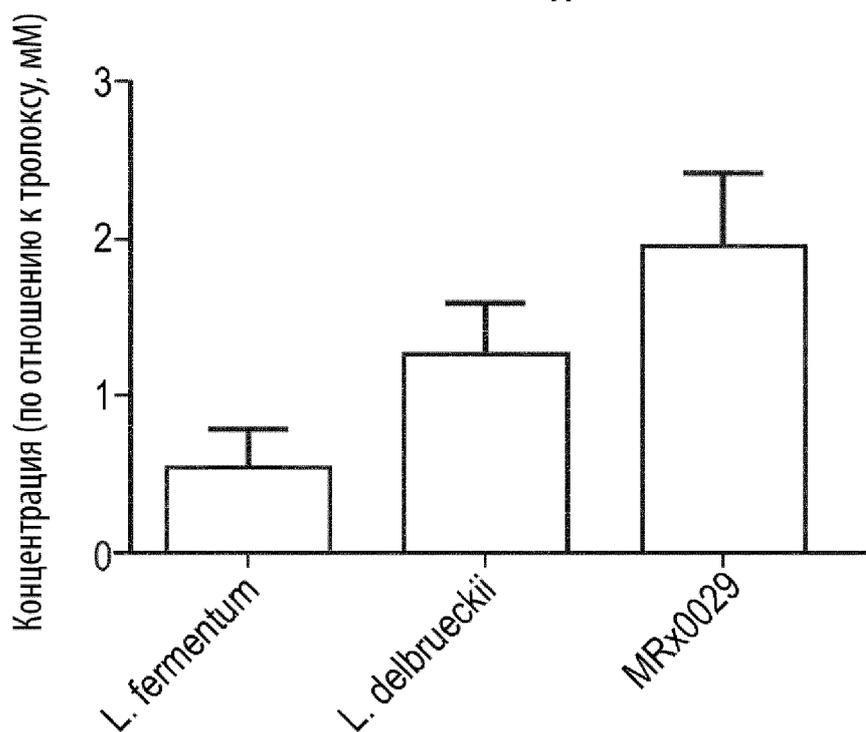
Фиг. 4В Секреция IL-8 из U373



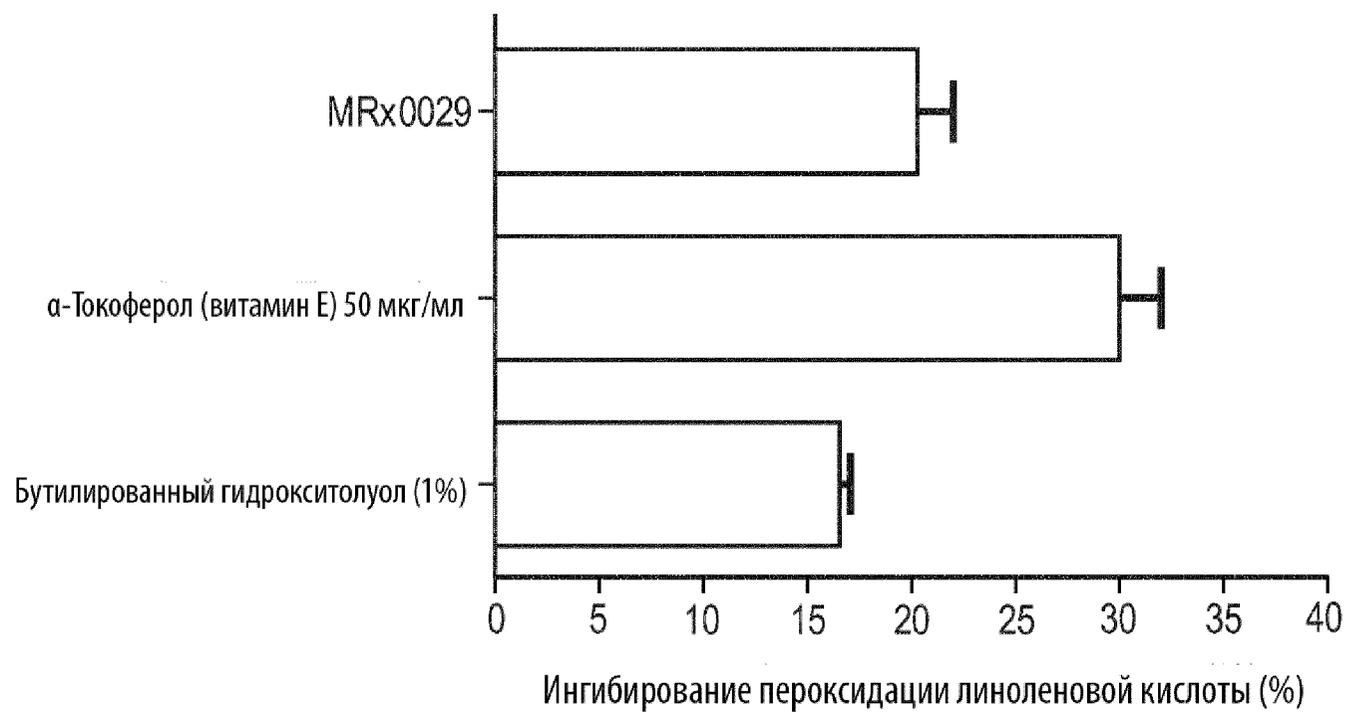
Фиг. 6 Ингибирование индуцированной LPS активации NFkB-AP1 в HEK-TLR4

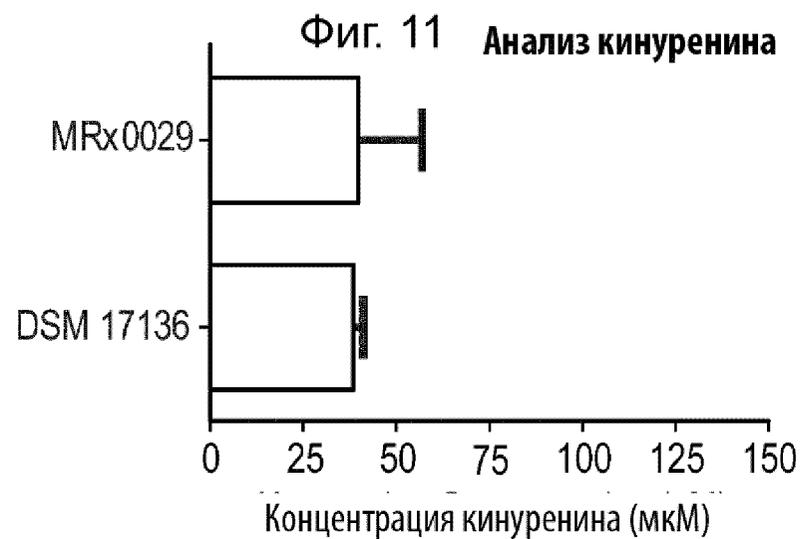
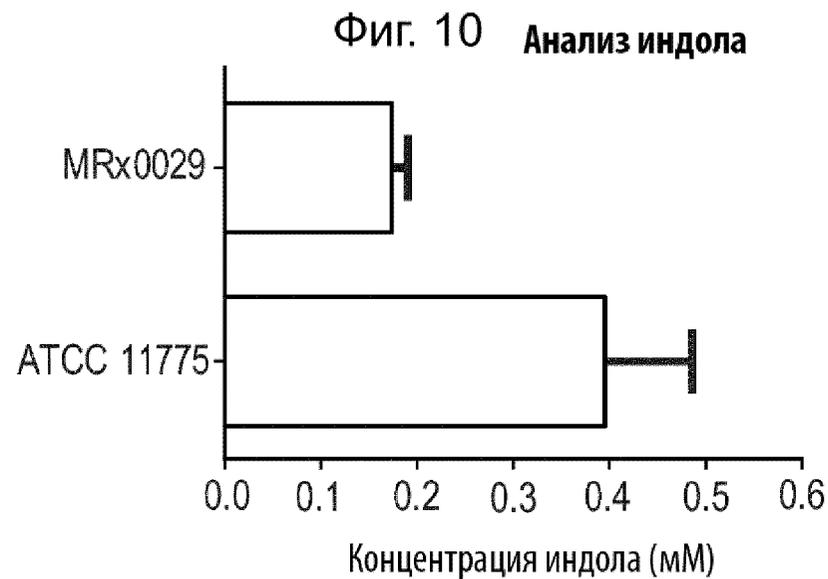
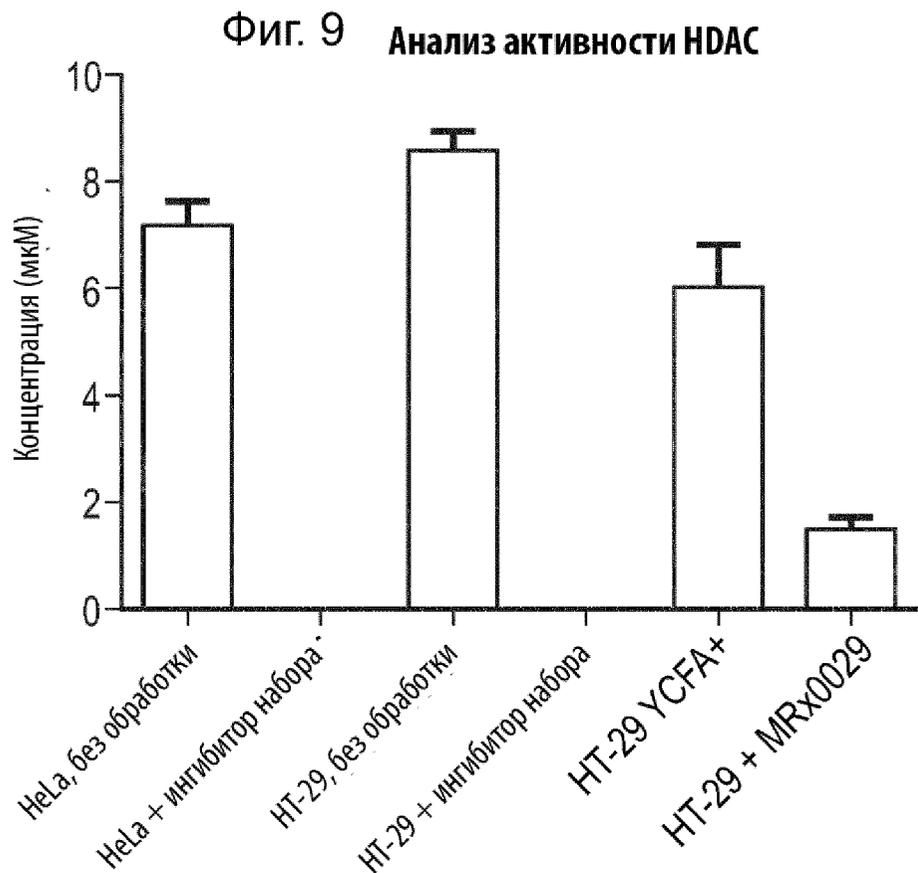


Фиг. 7 Анализ антиоксидантной способности

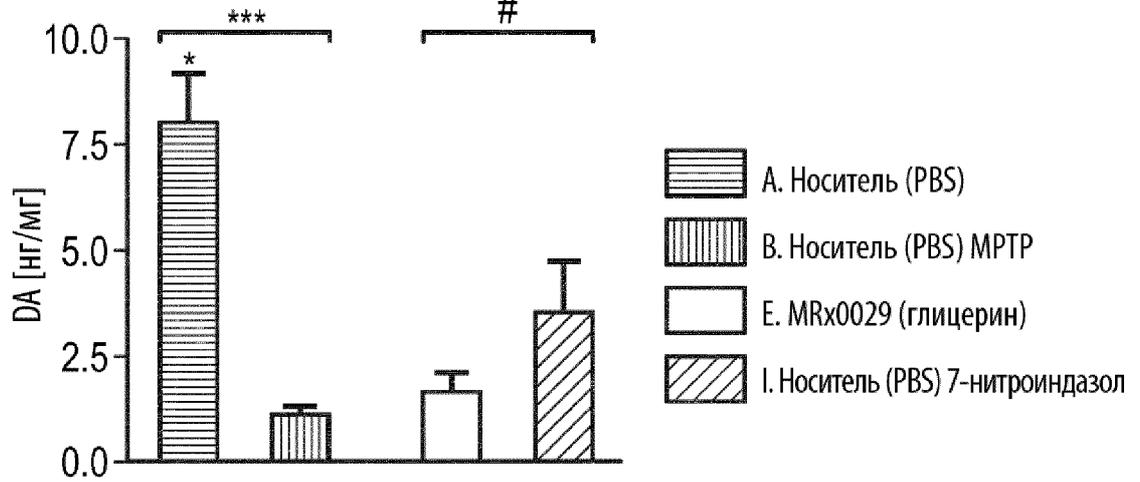


Фиг. 8 Суммарная антиоксидантная способность

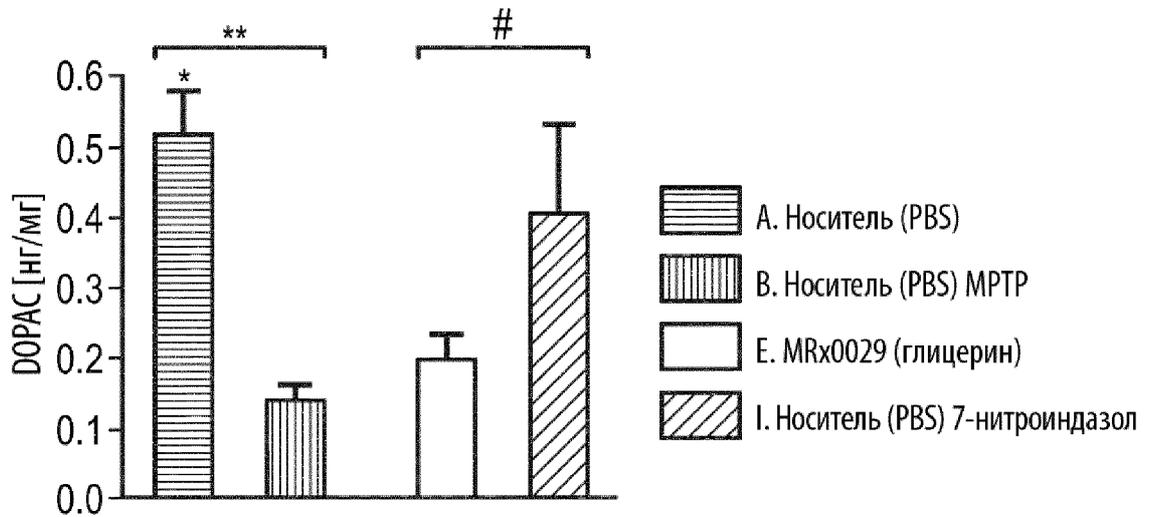




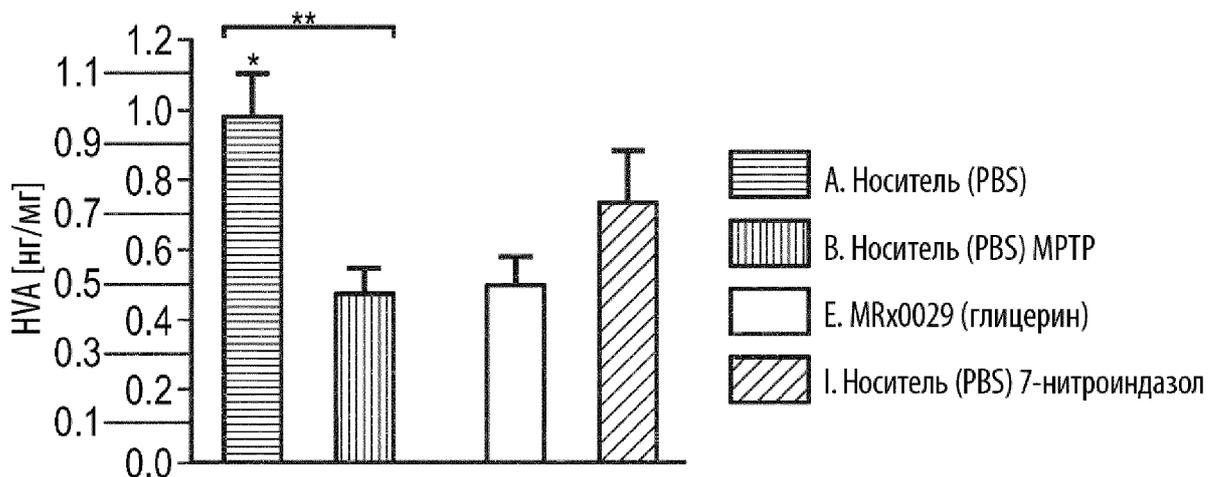
Фиг. 12А DA

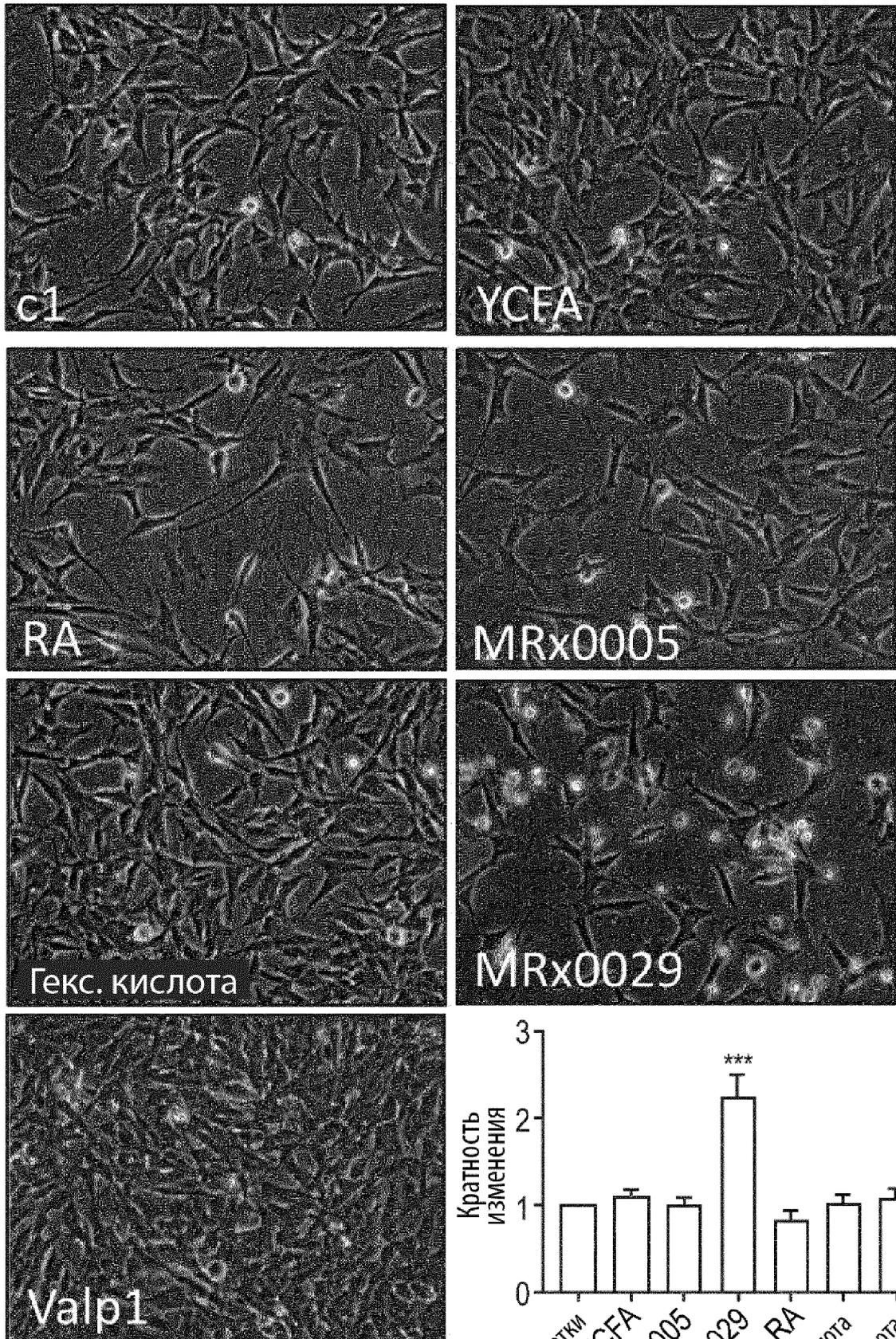


Фиг. 12В ДОРАС



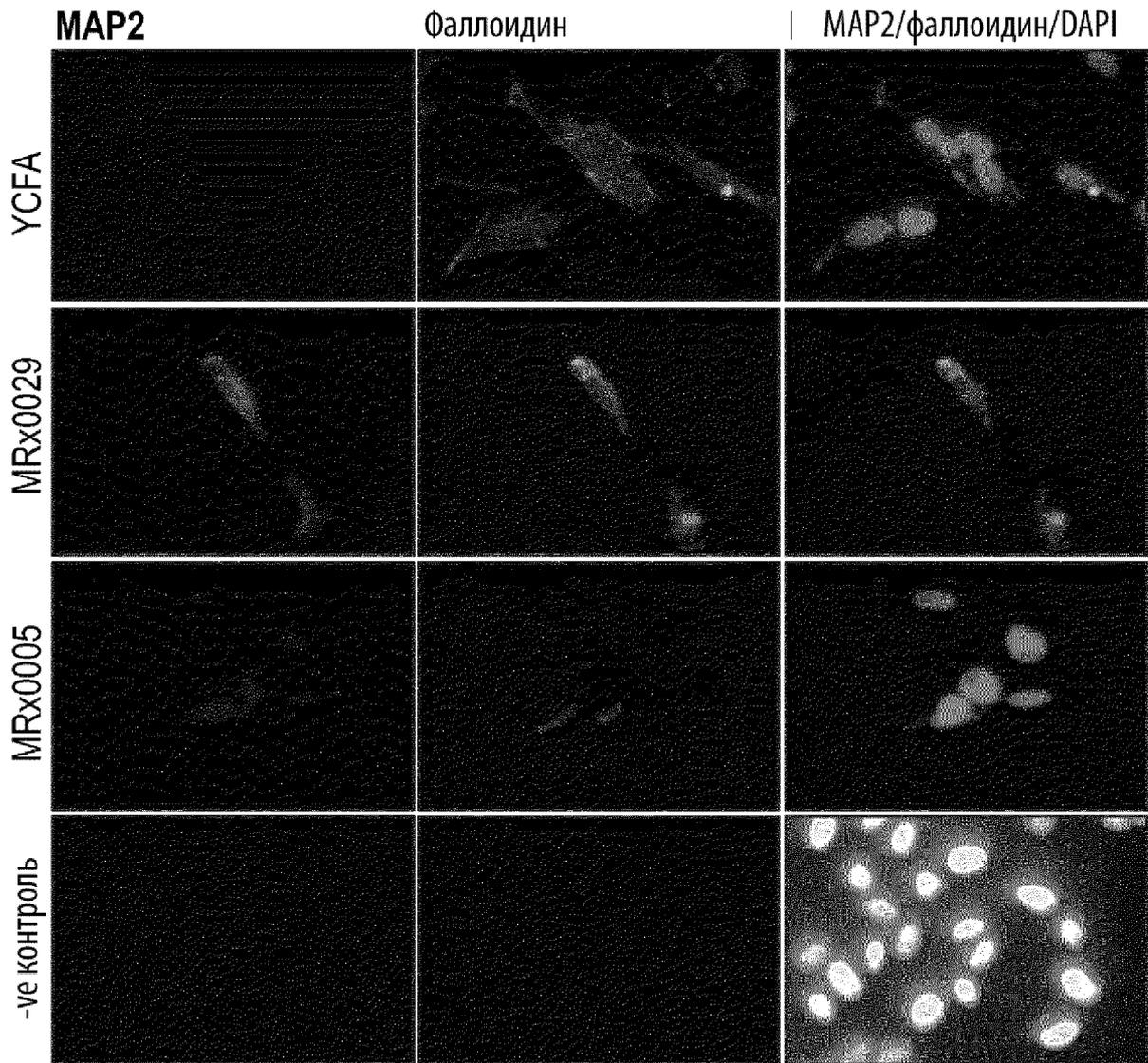
Фиг. 12С HVA



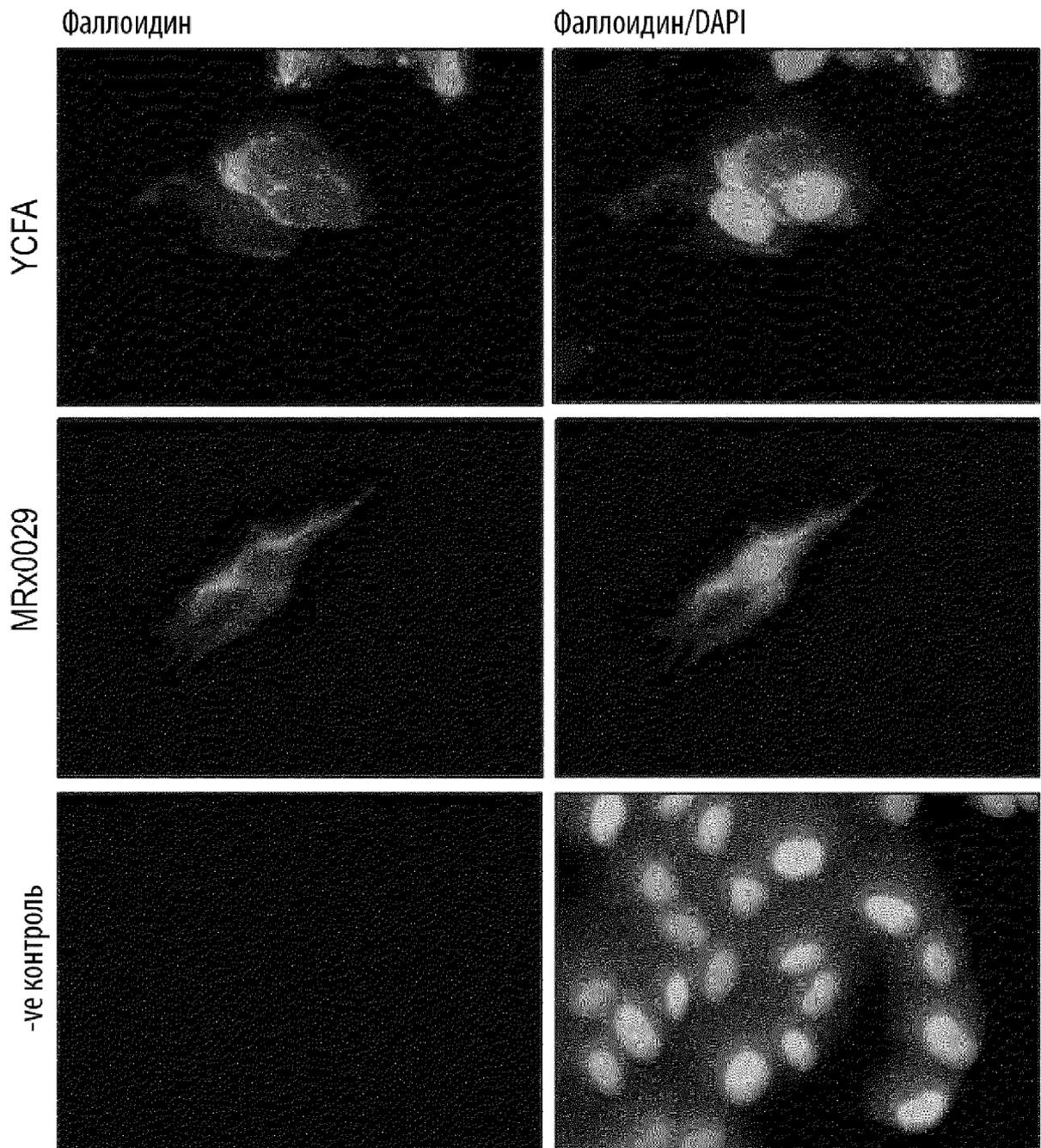


Фиг. 13А Рост нейритов

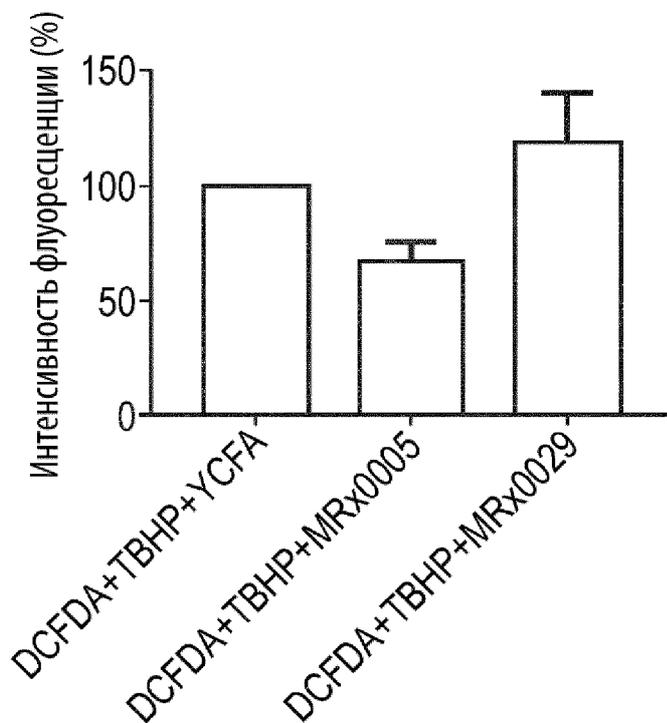
Фиг. 13В



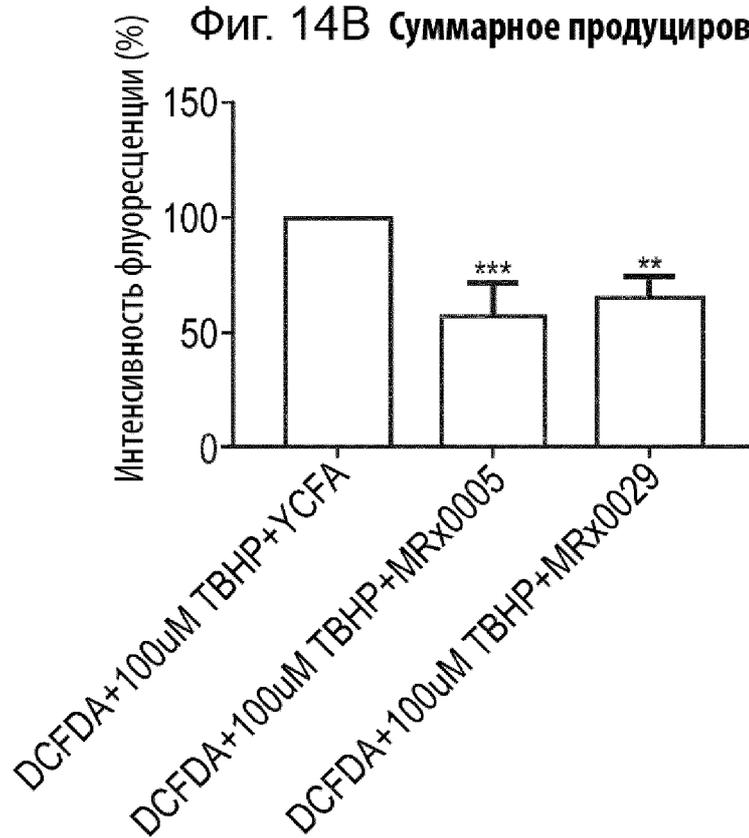
Фиг. 13В (продолж.)



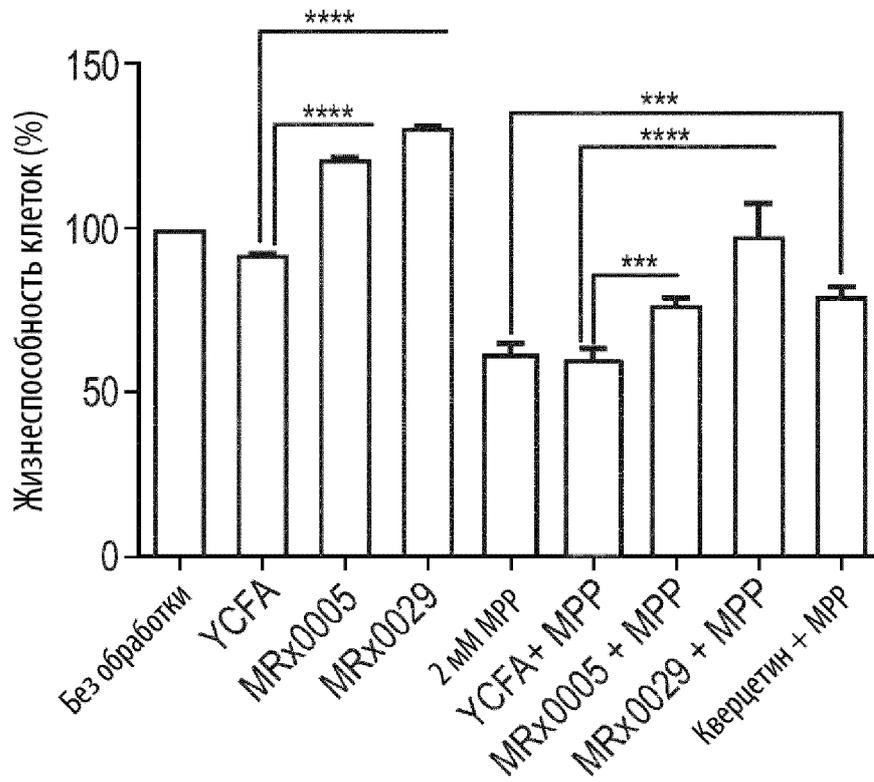
Фиг. 14А Суммарное продуцирование ROS



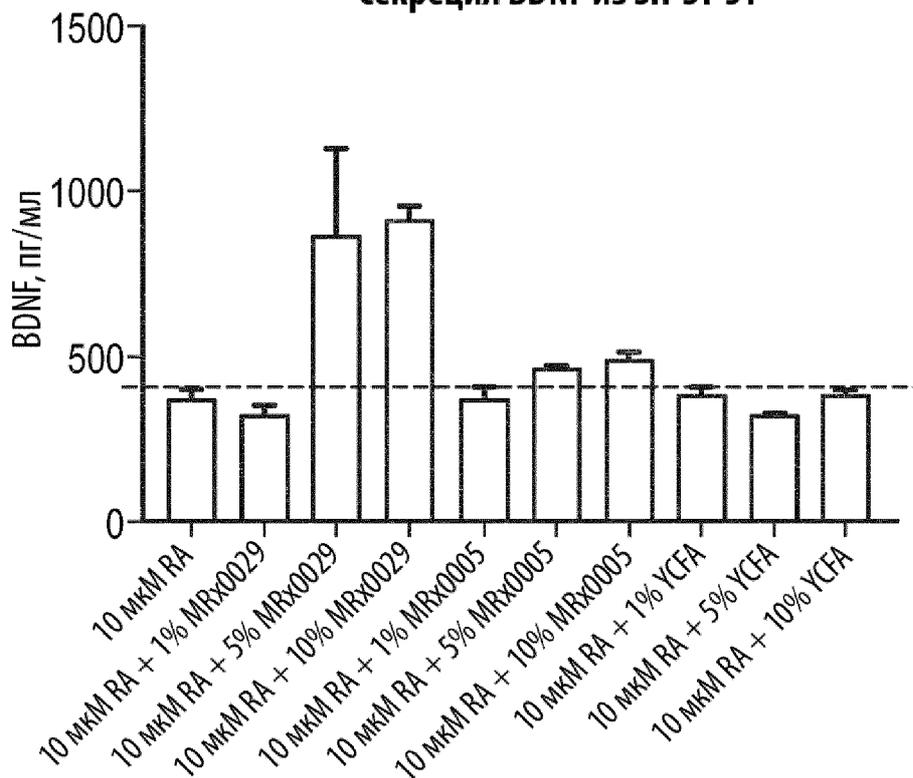
Фиг. 14В Суммарное продуцирование ROS

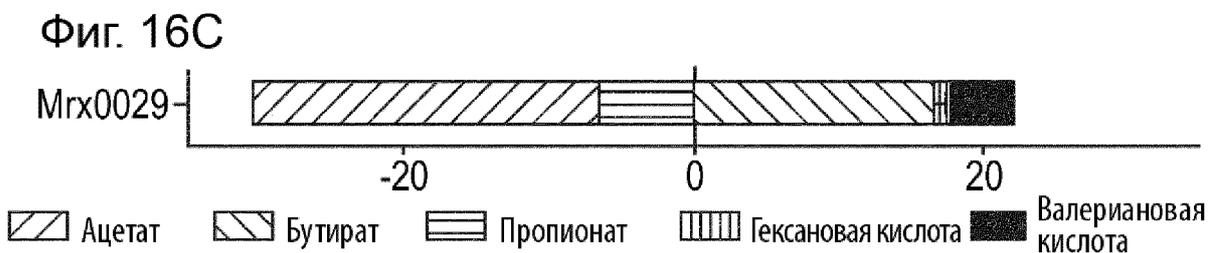
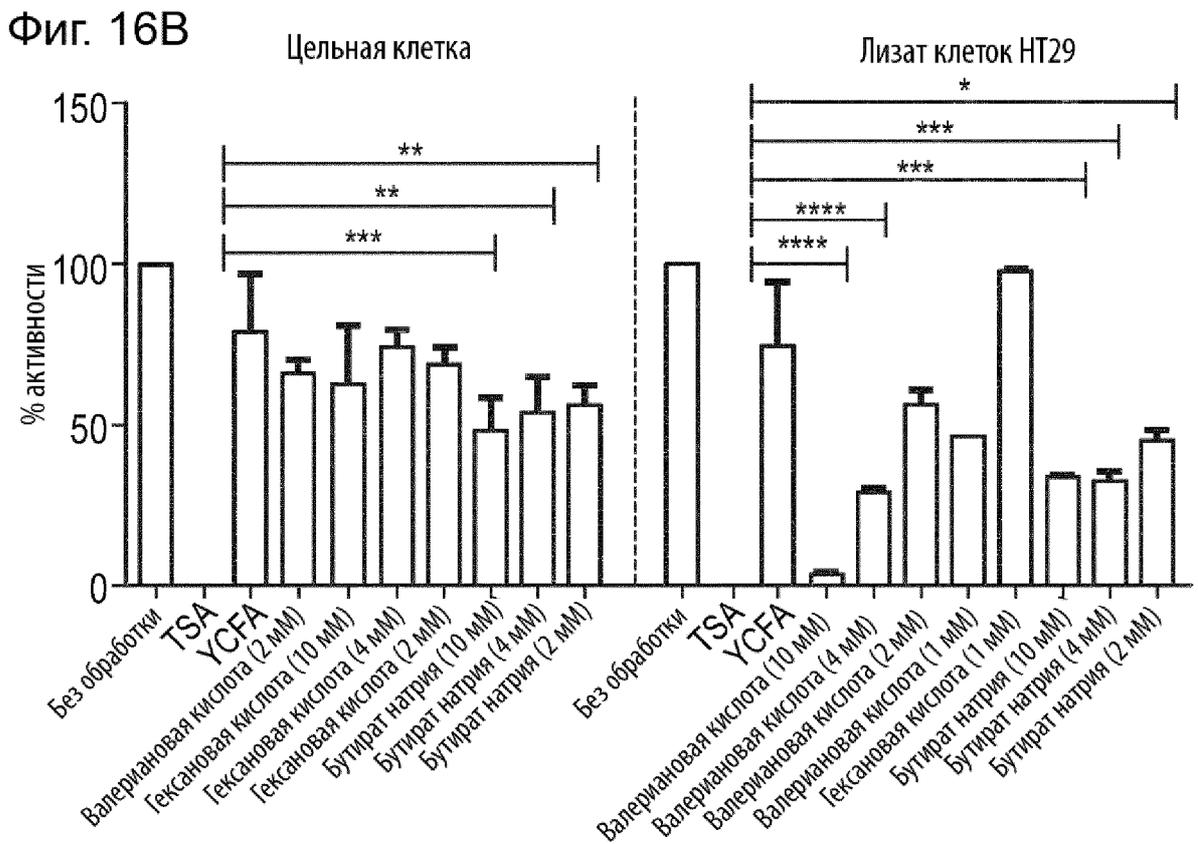
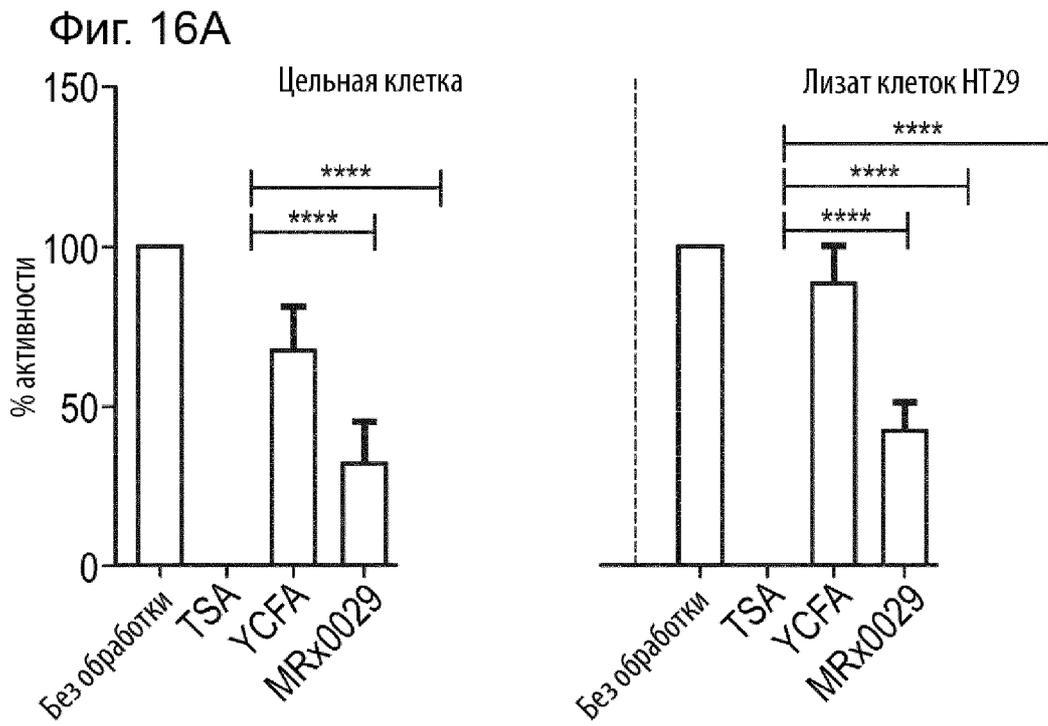


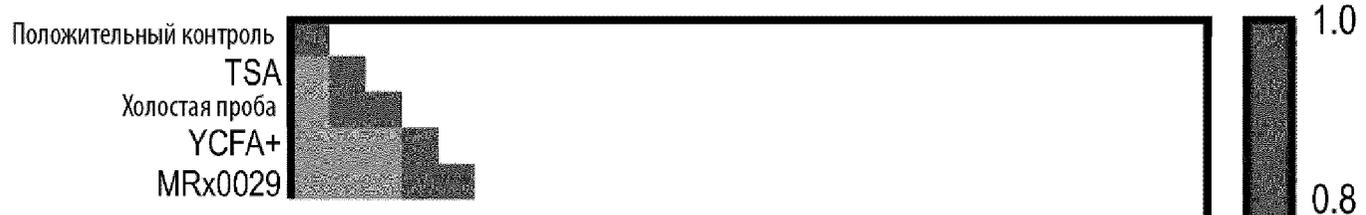
Фиг. 15 Нейропротекция – жизнеспособность клеток



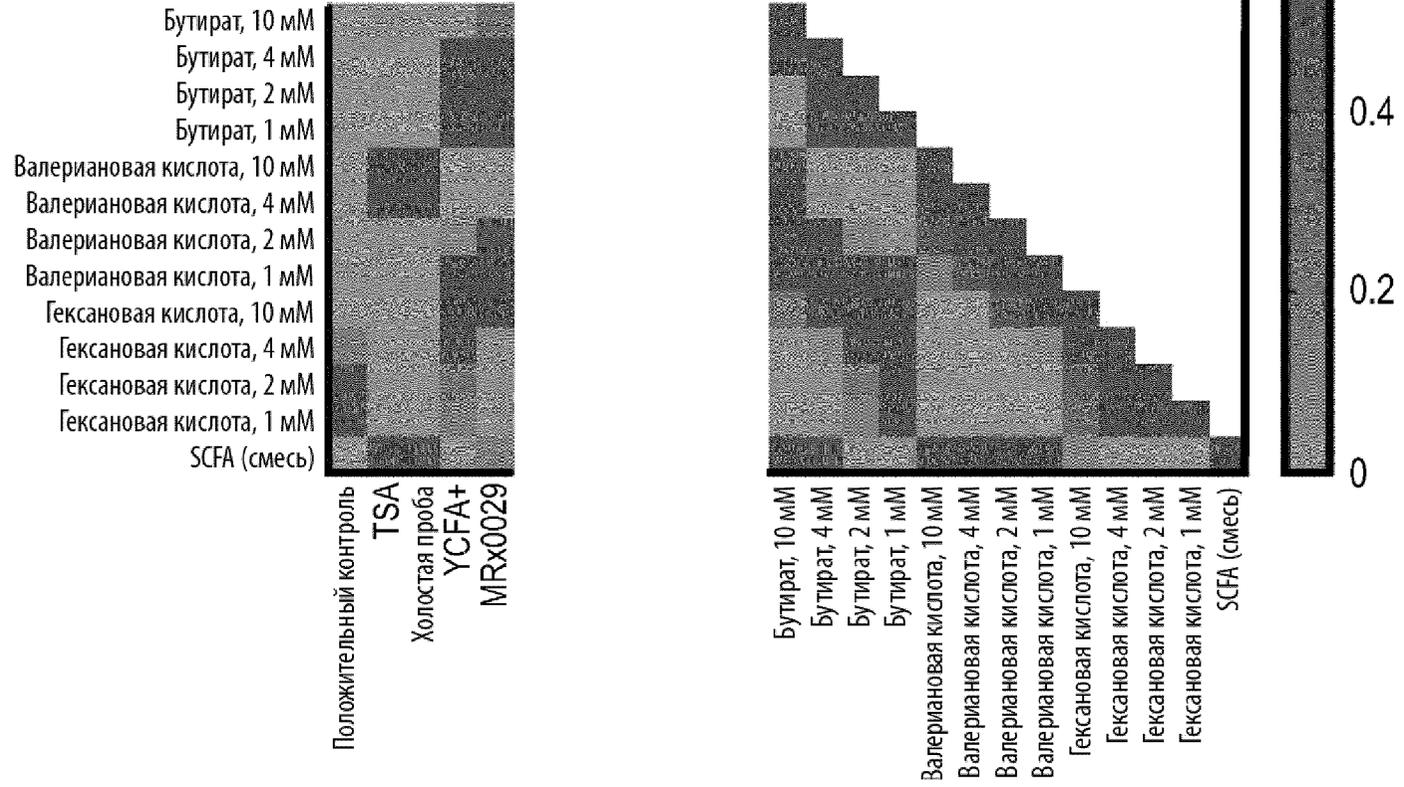
Фиг. 19 Секреция BDNF из SH-SY-5Y

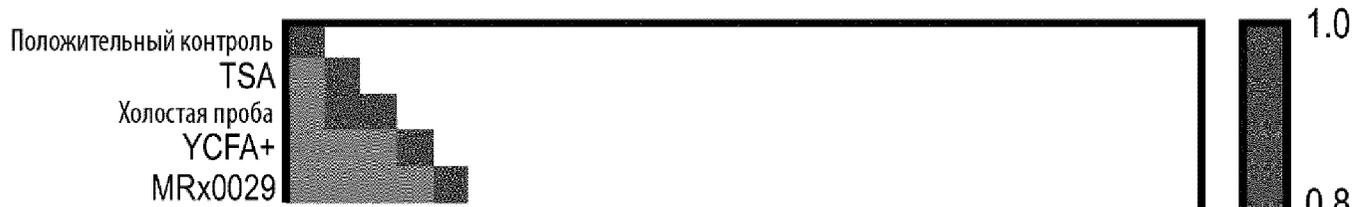




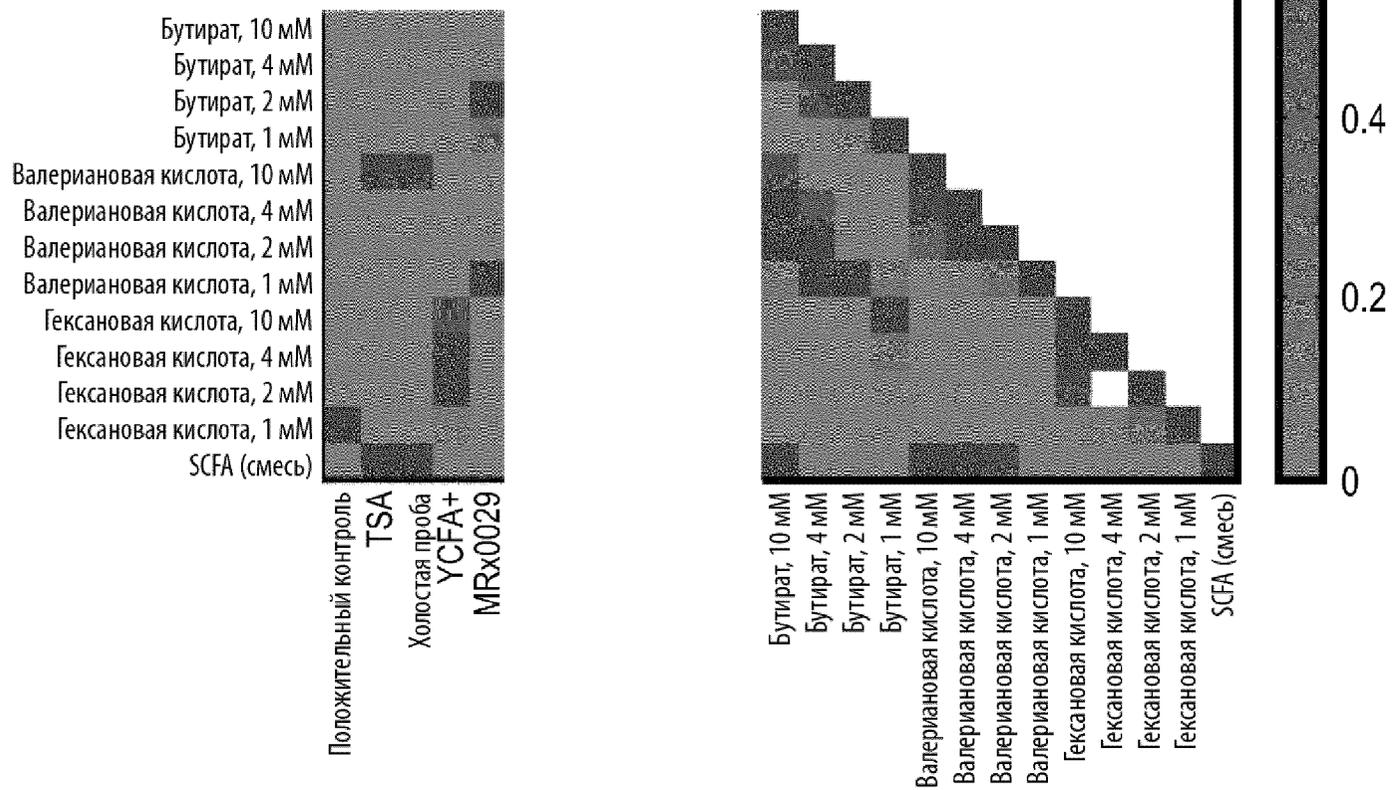


Фиг. 17А HDAC 1



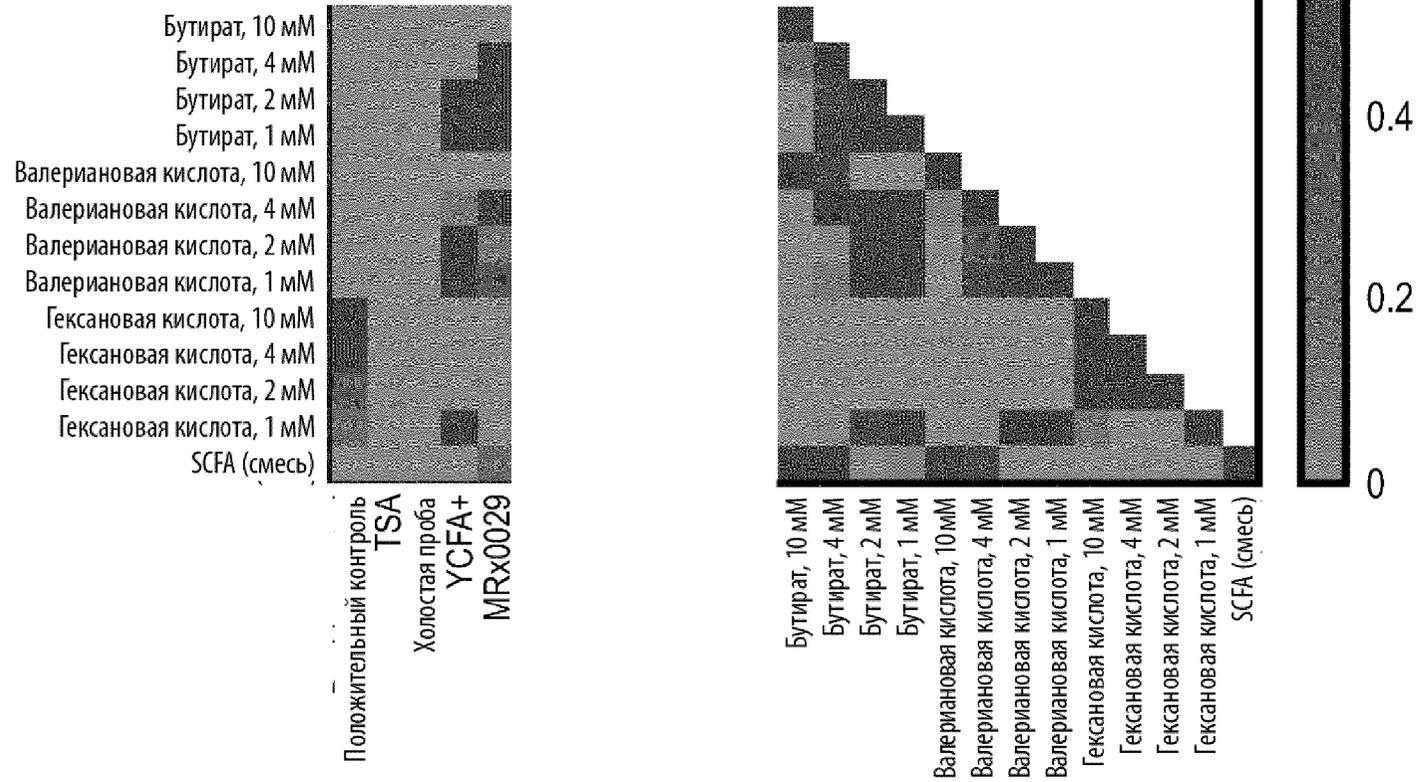


Фиг. 17В HDAC 2

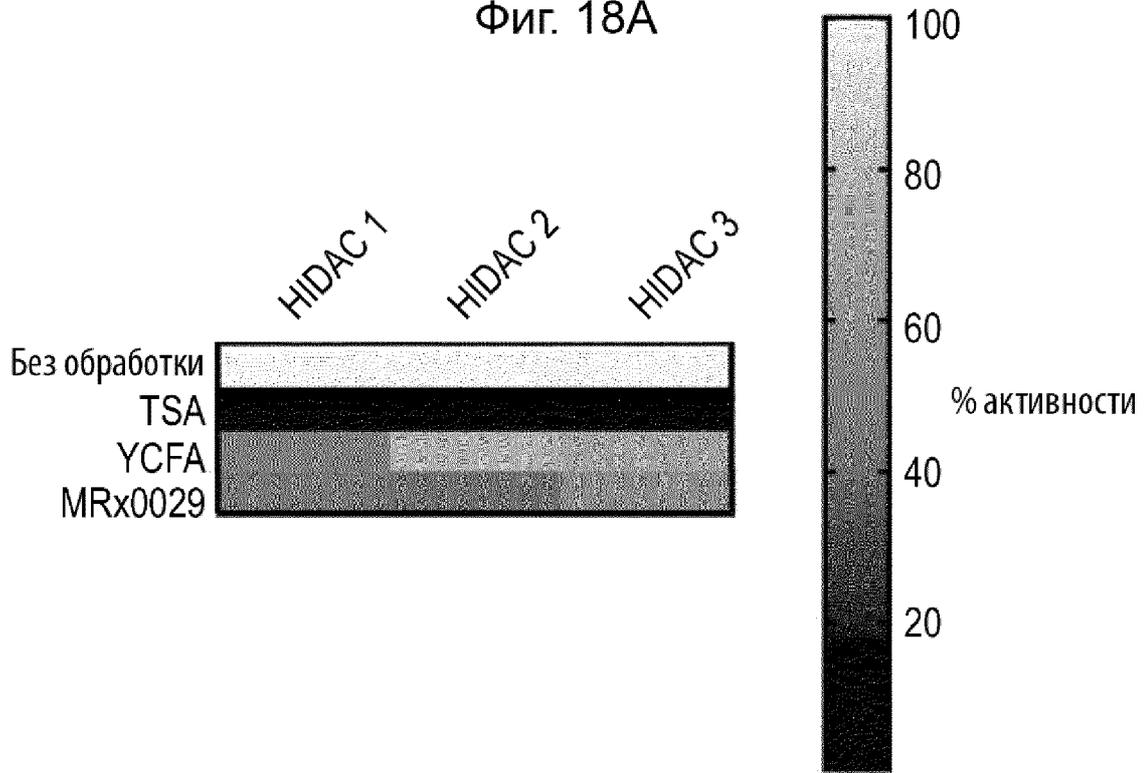




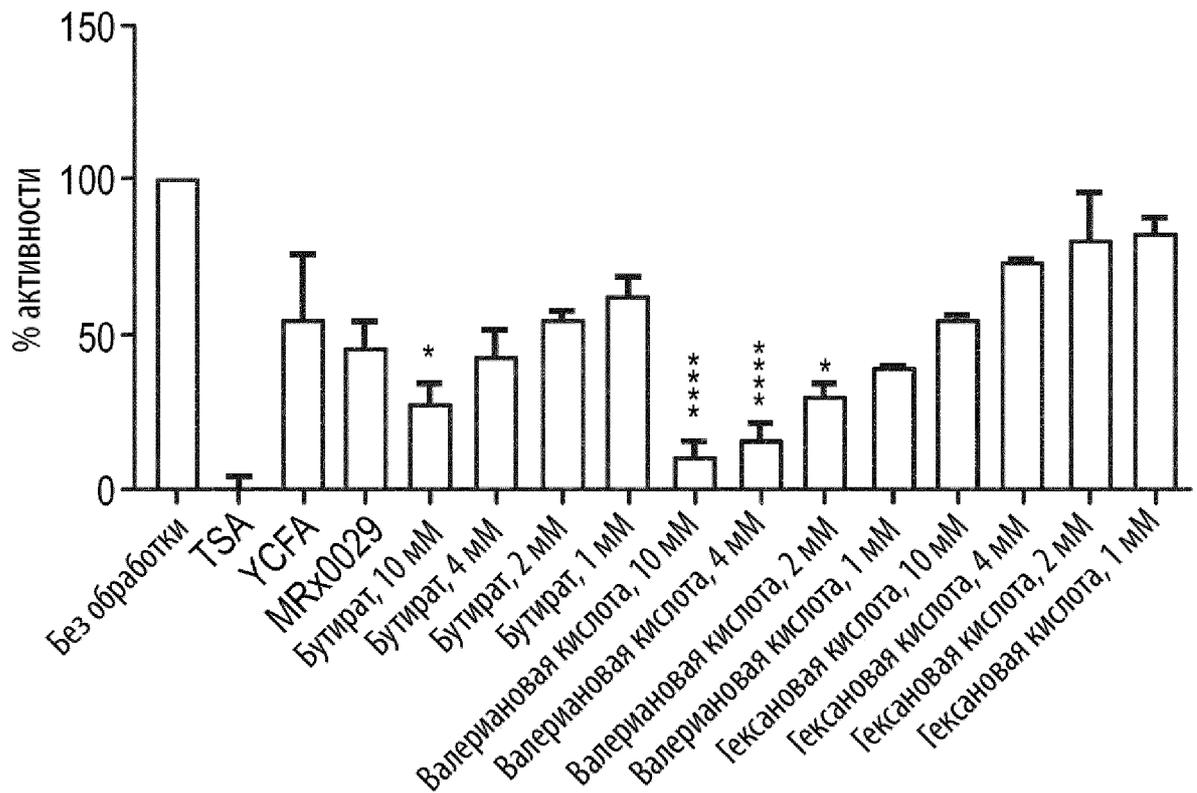
Фиг. 17С HDAC 3



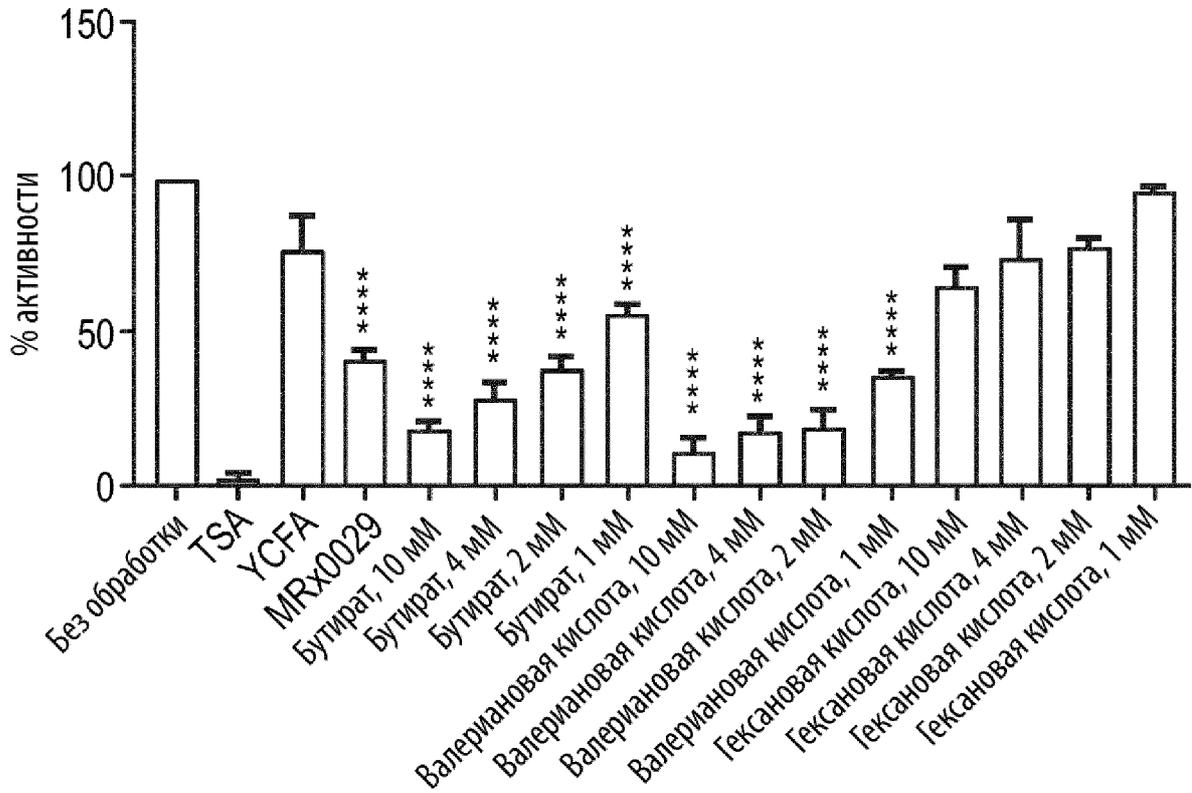
Фиг. 18А



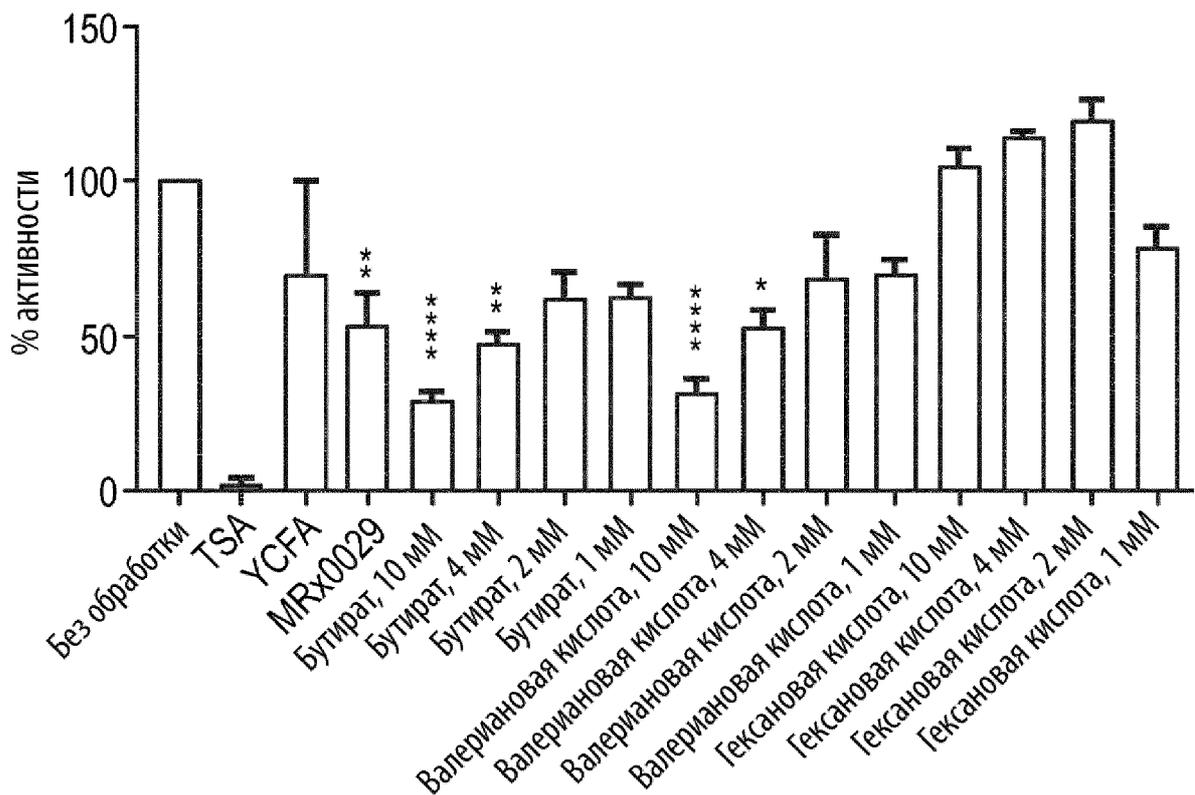
Фиг. 18В



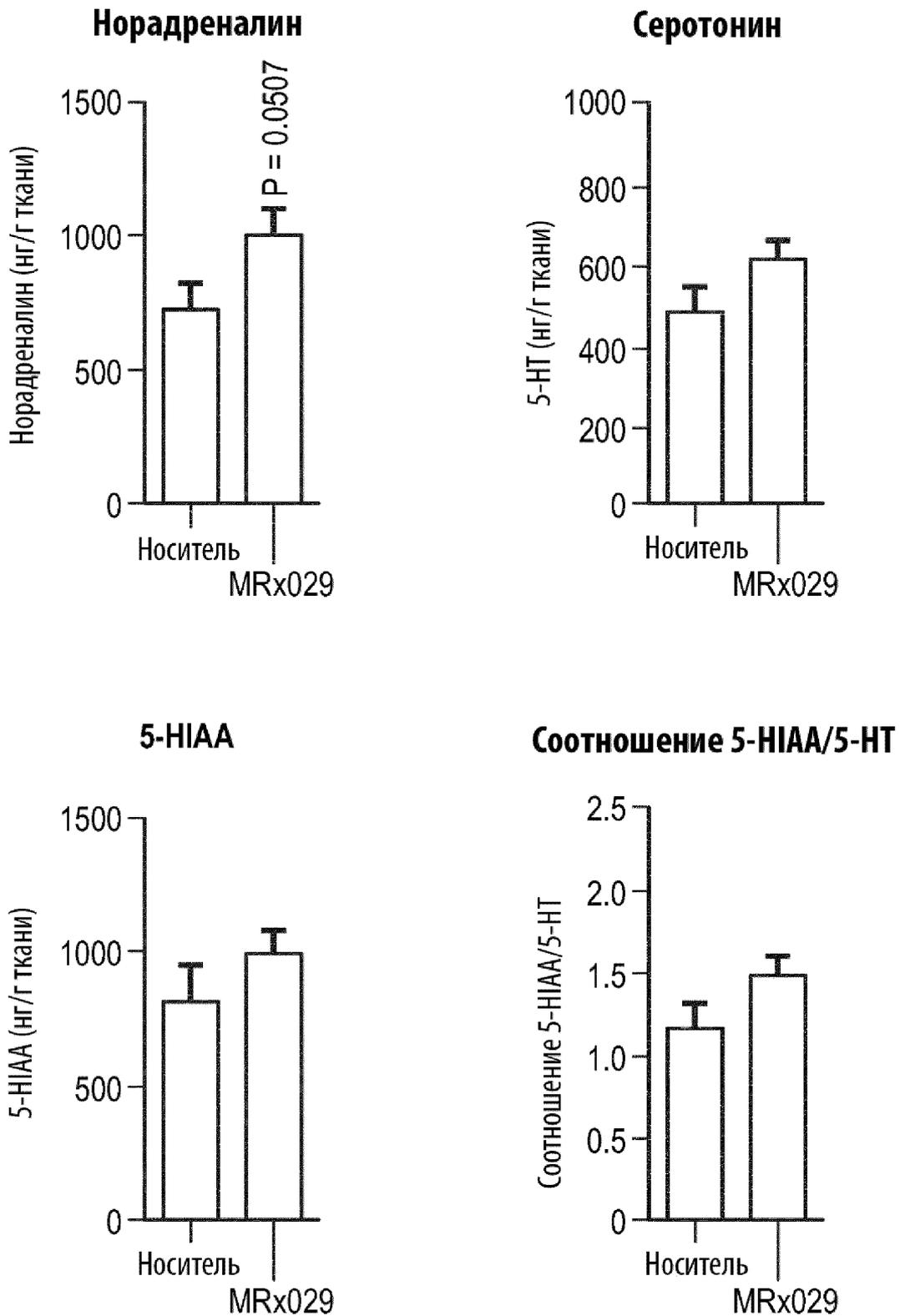
Фиг. 18С



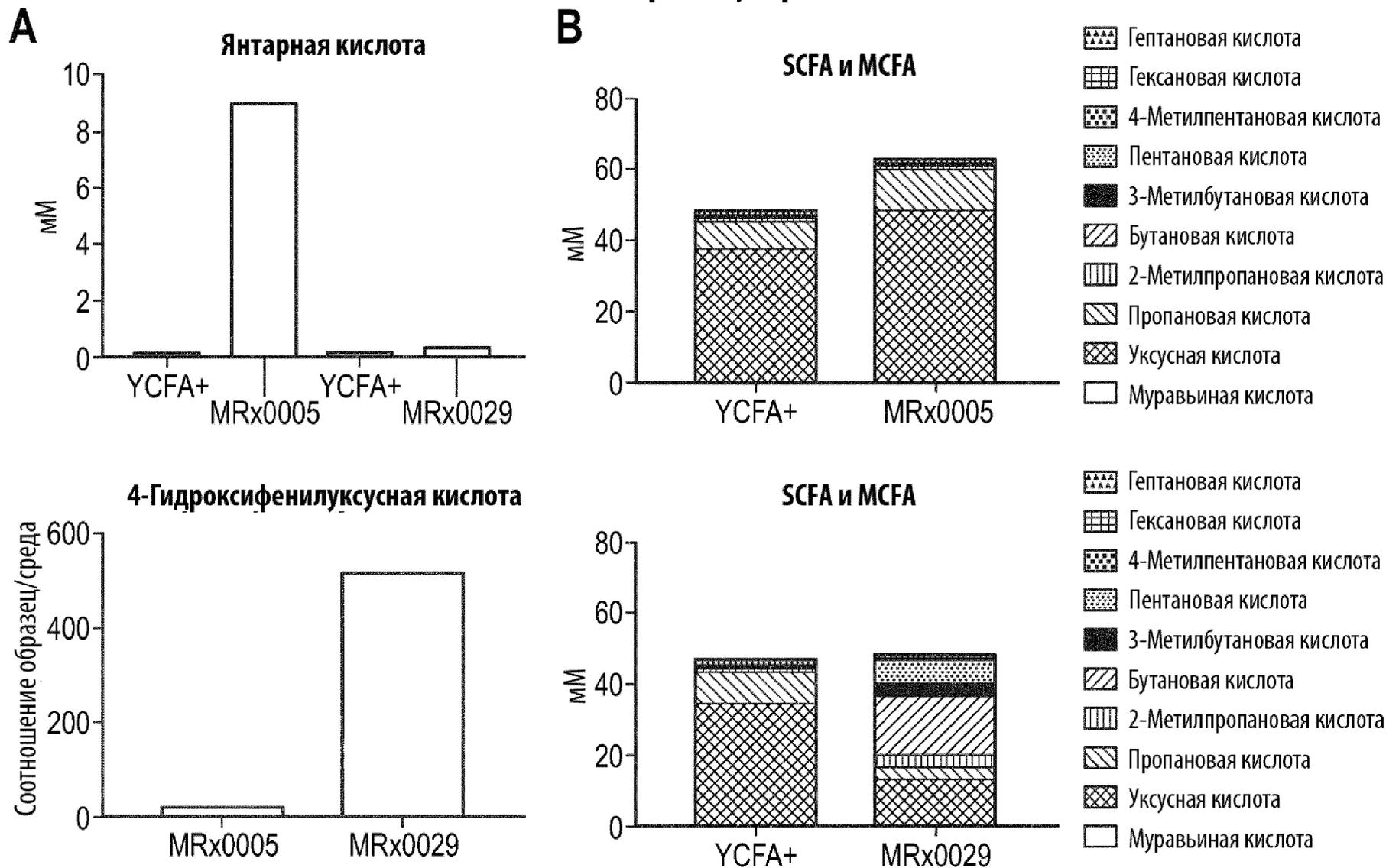
Фиг. 18D



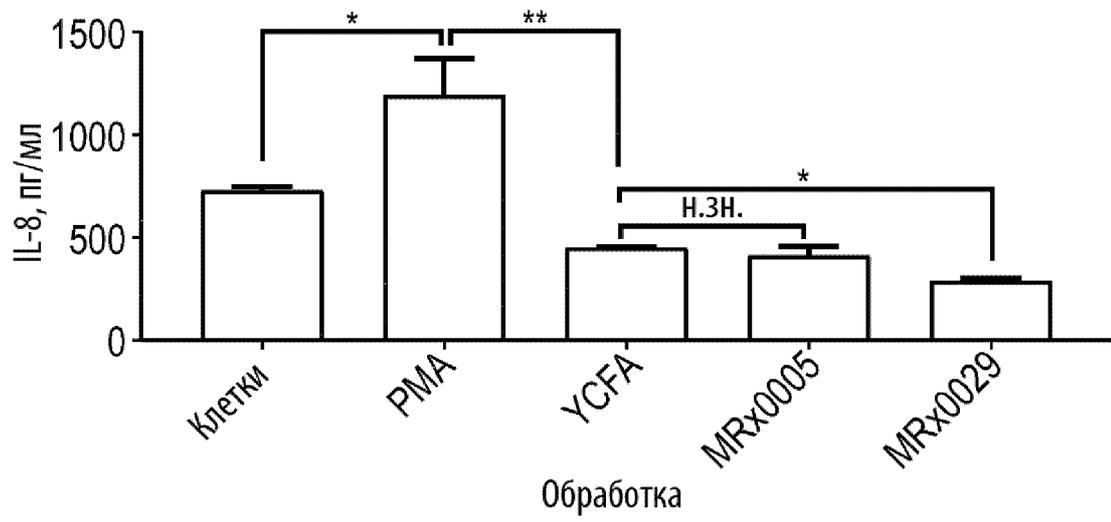
Фиг. 20 Продуцирование нейромедиаторов в головном мозге

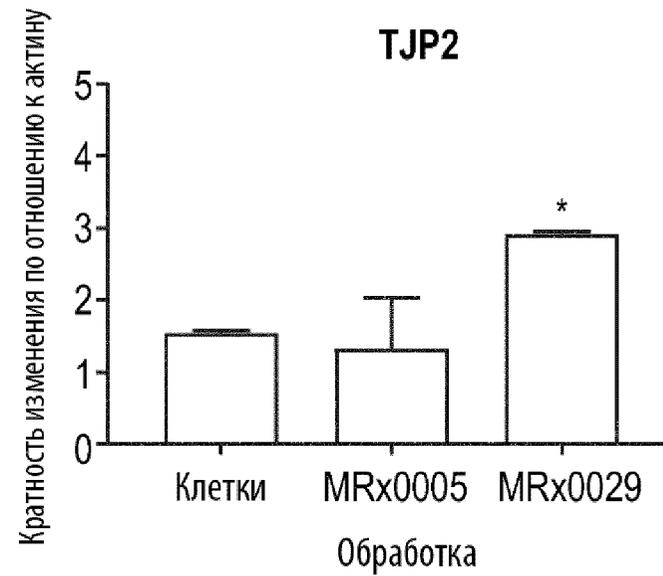
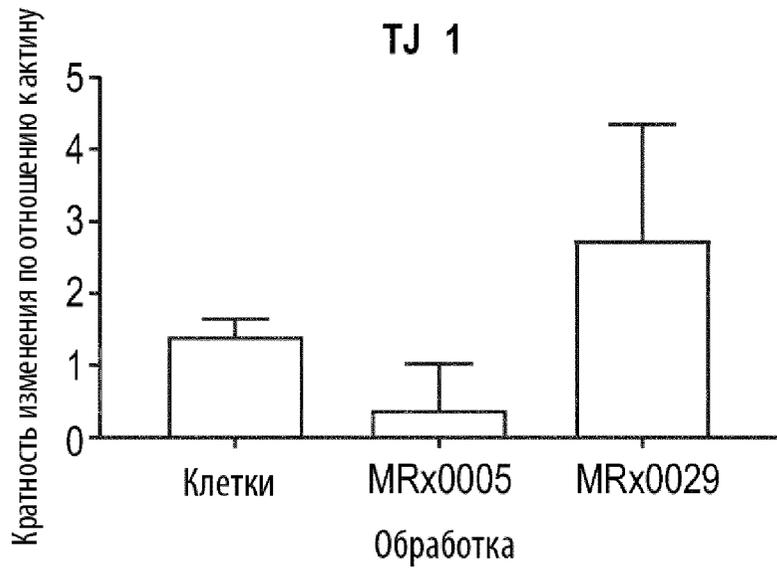


Фиг. 21 **Метаболиты бактерий в супернатанте**

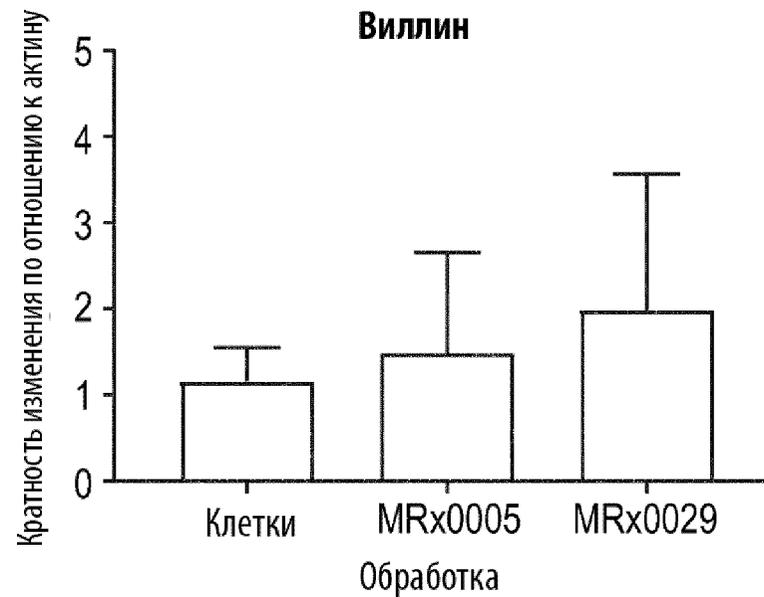
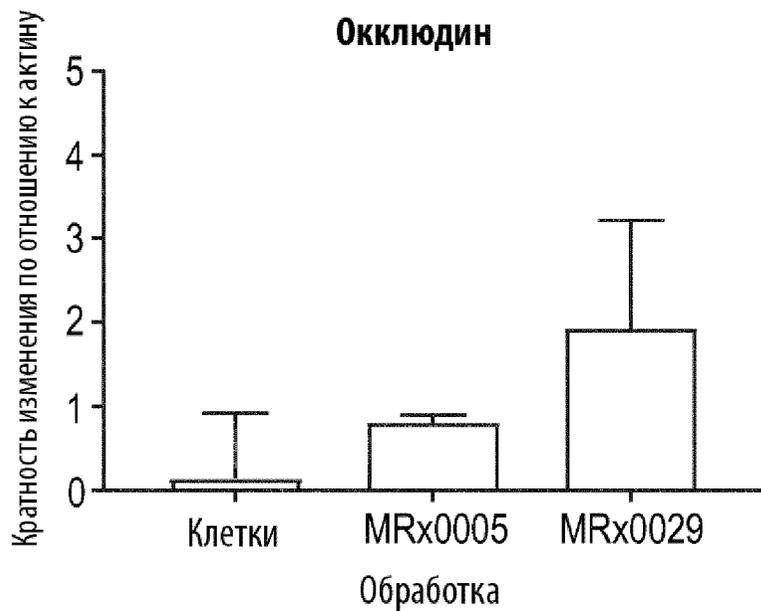


Фиг. 22А

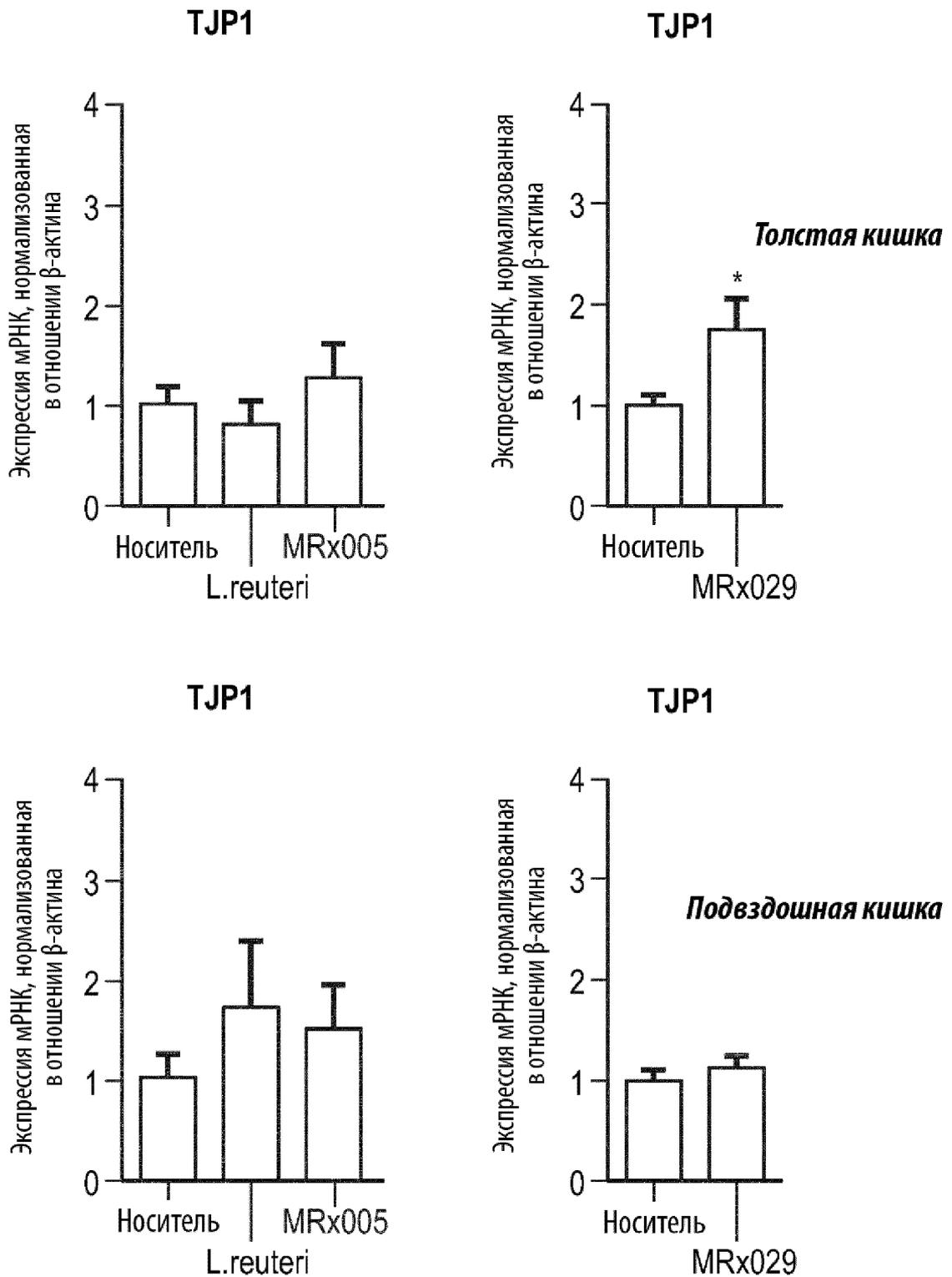




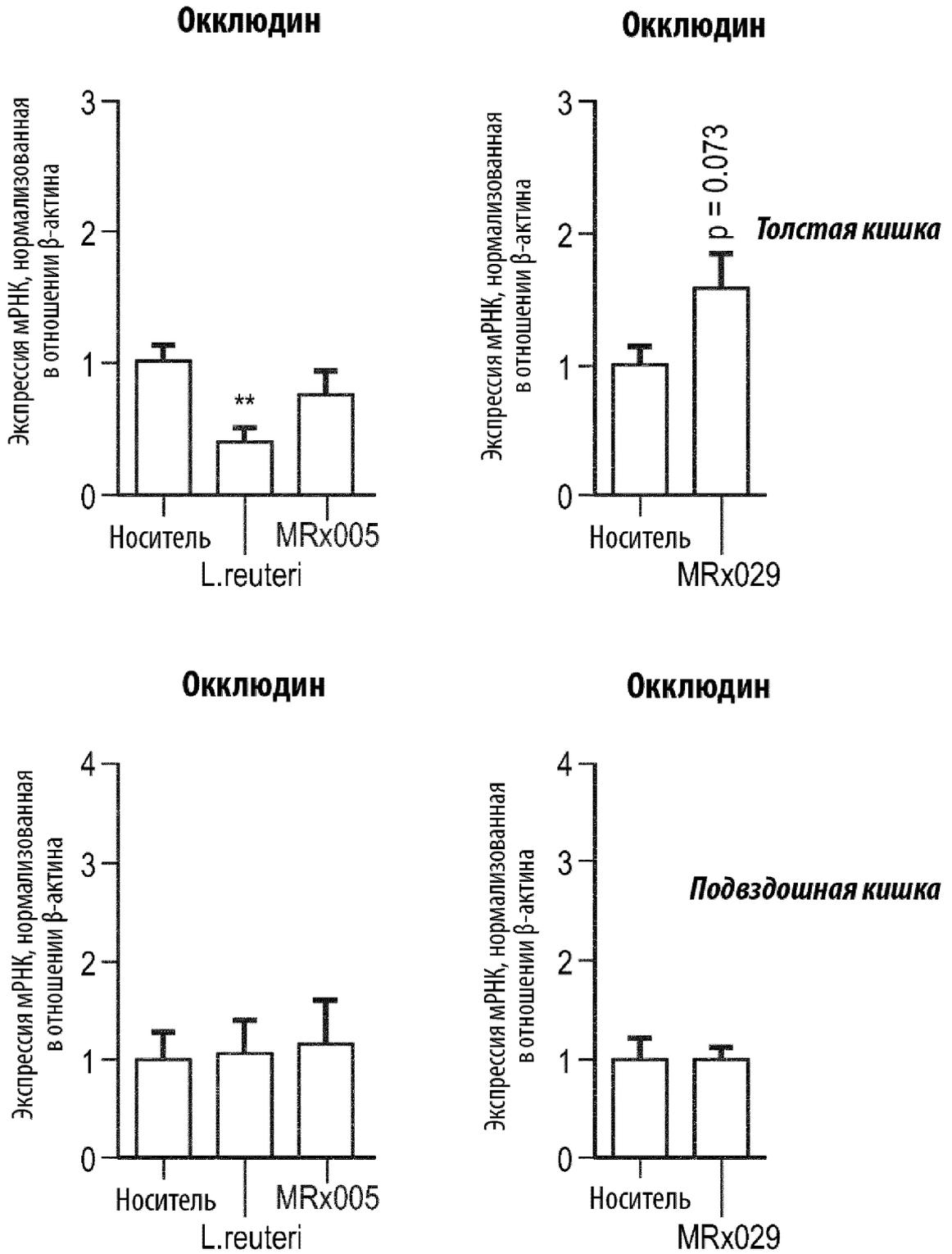
Фиг. 22В



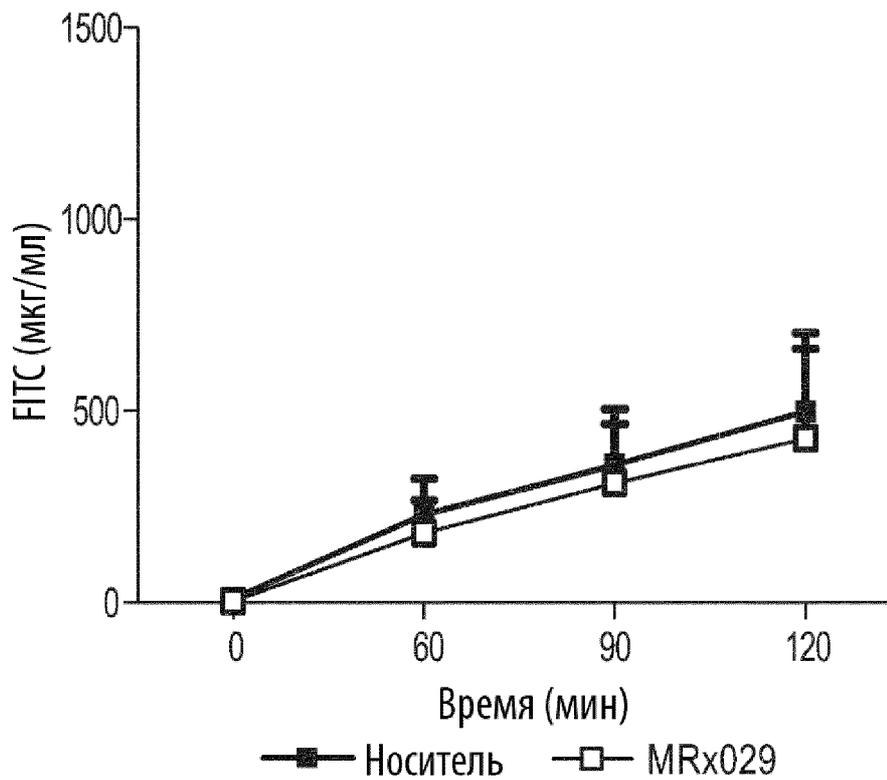
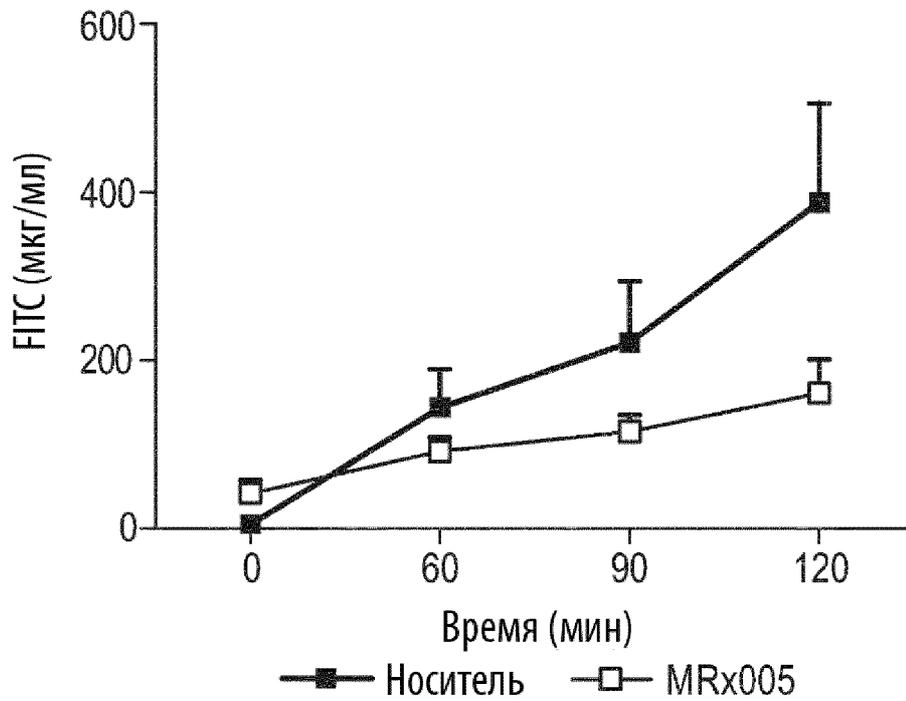
Фиг. 22С



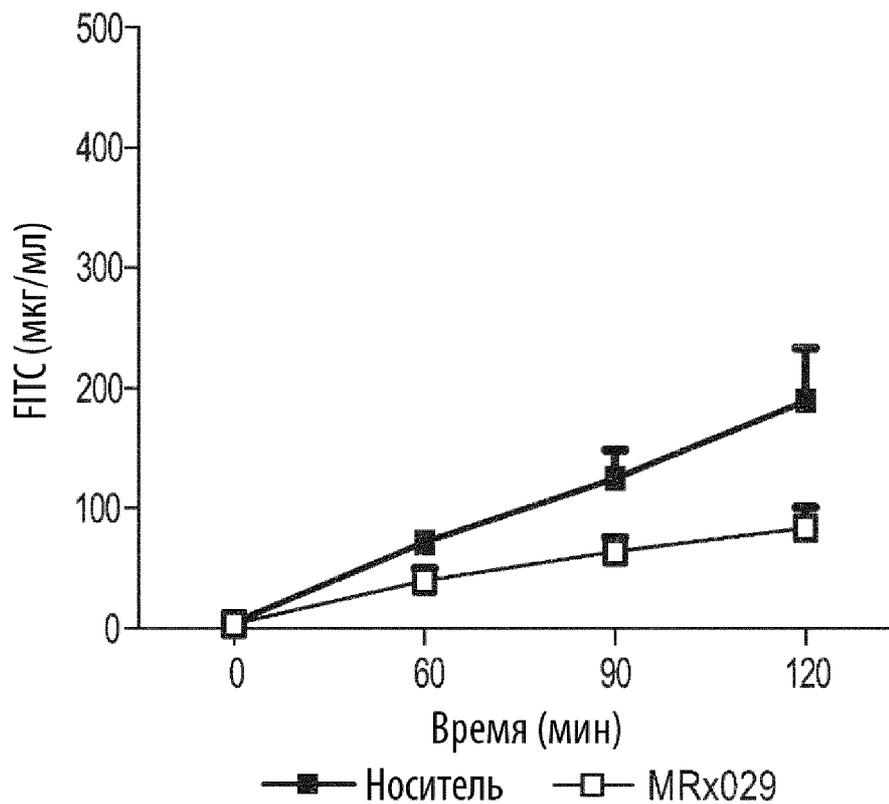
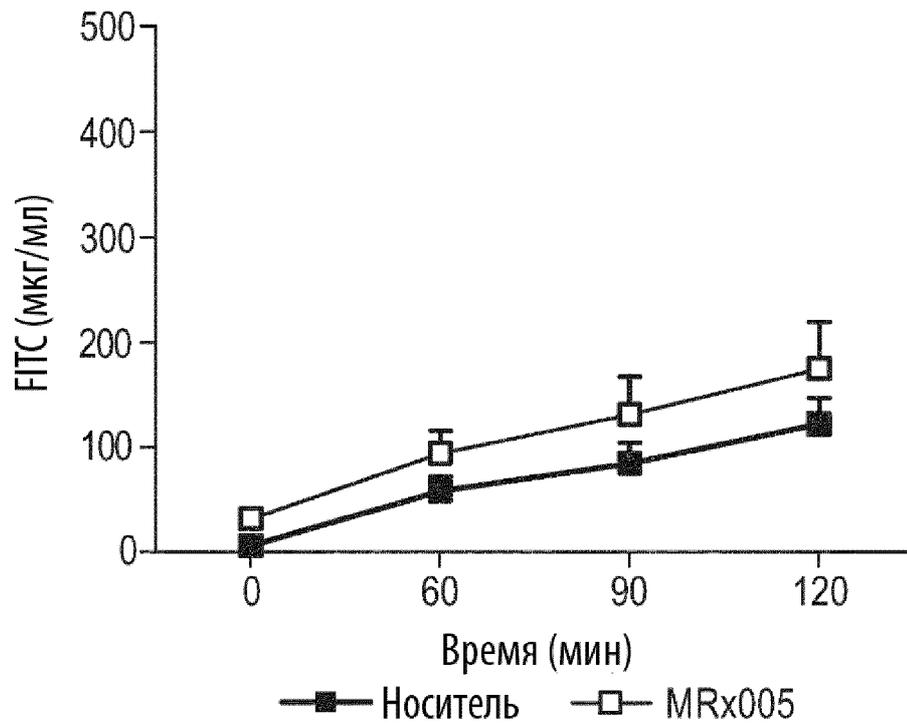
Фиг. 22D

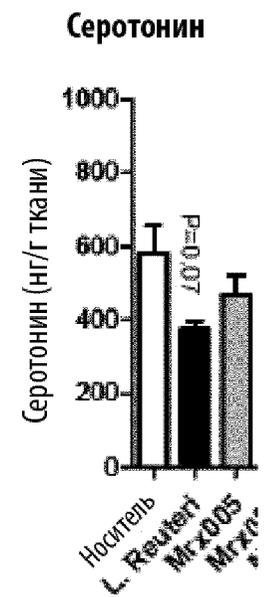
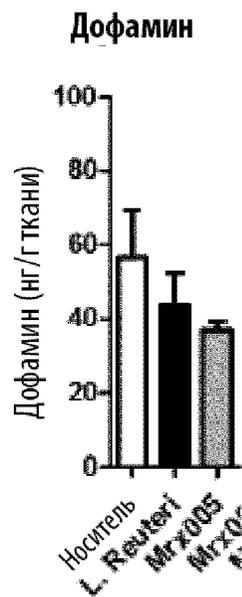
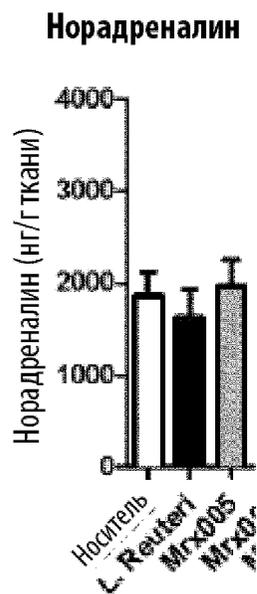


Фиг. 22Е Проницаемость в подвздошной кишке

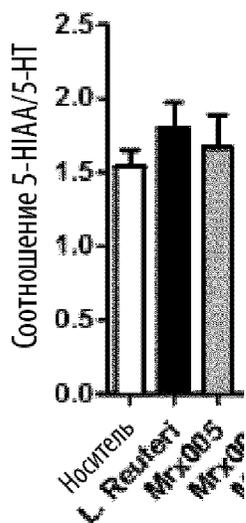


Фиг. 22F Проницаемость в толстой кишке

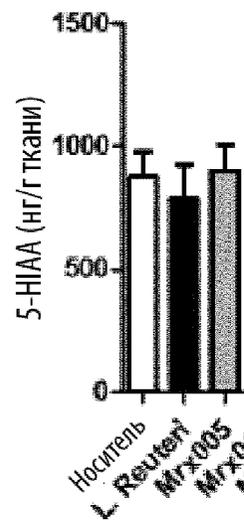




Показатель метаболизма серотонина 5-НИАА/5-НТ

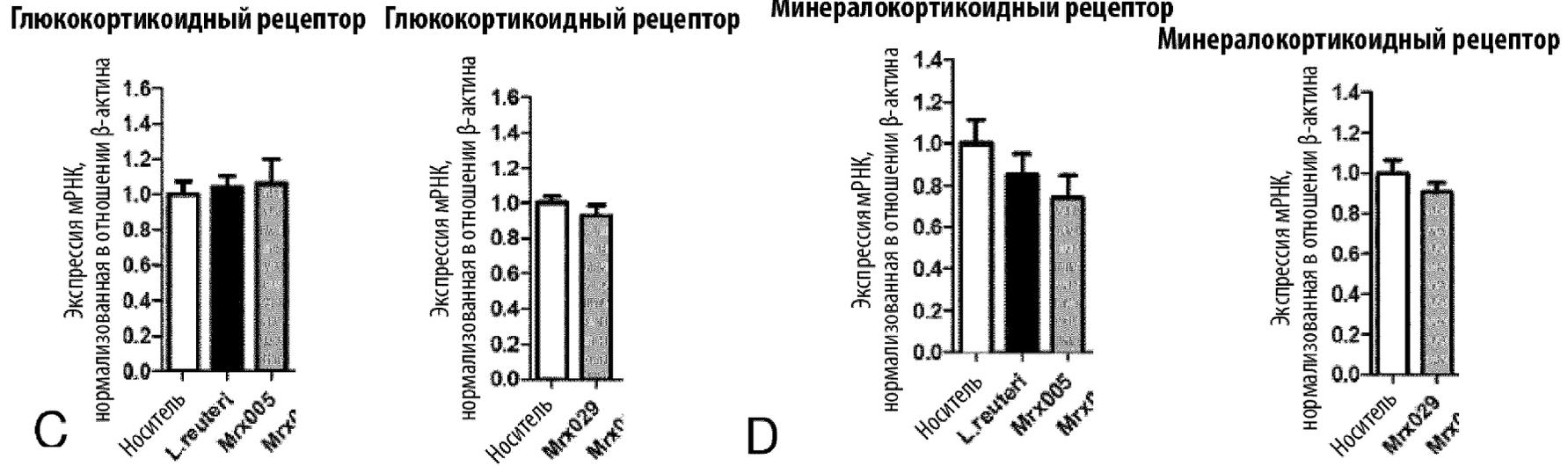
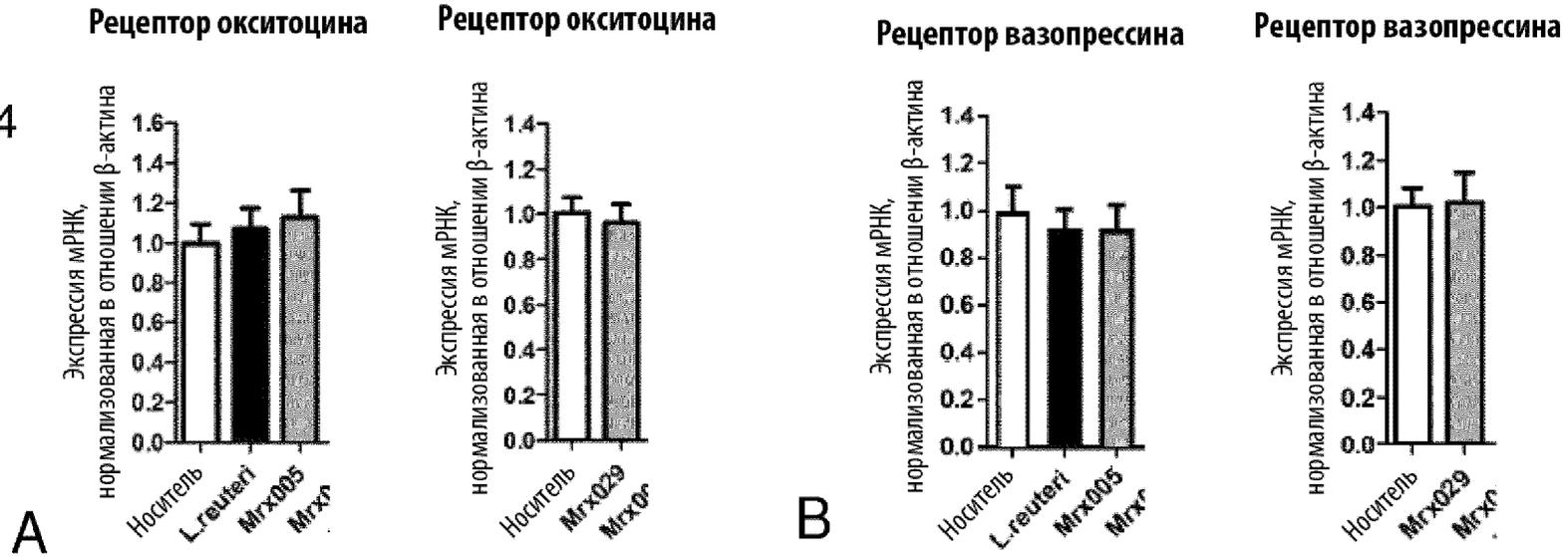


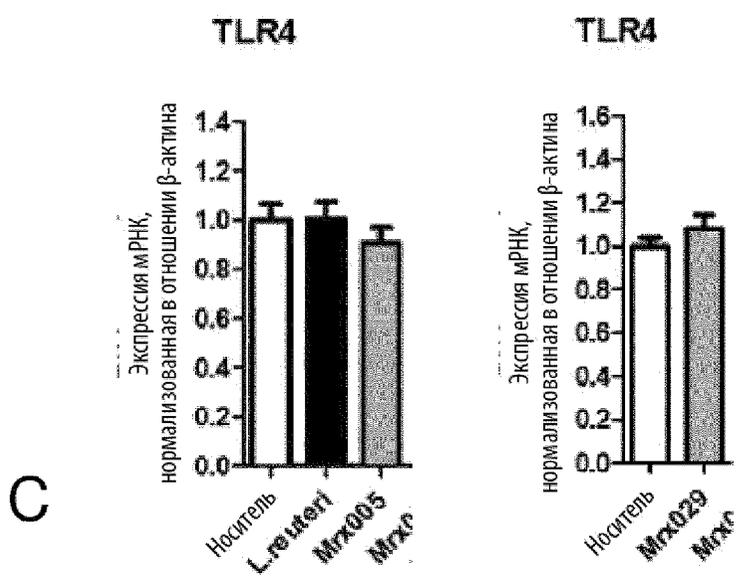
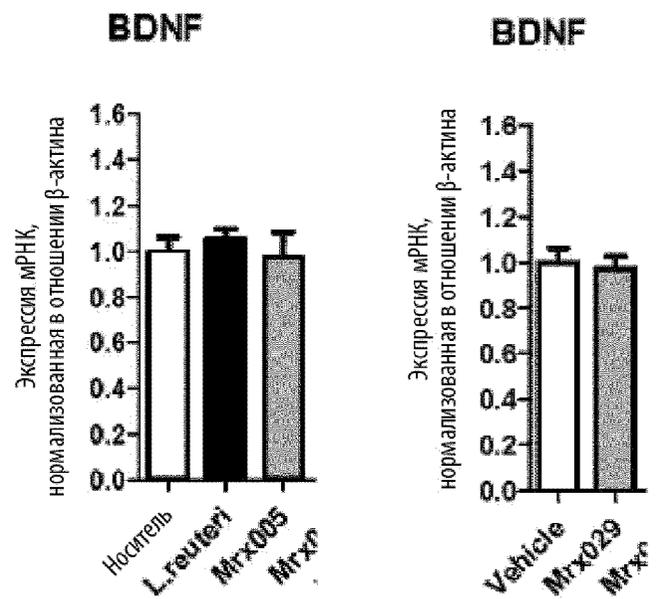
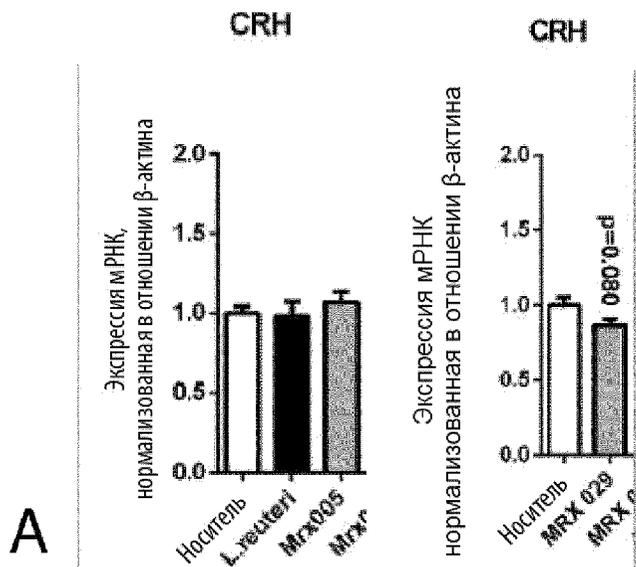
5-Гидроксииндолуксусная кислота (5-НИАА)



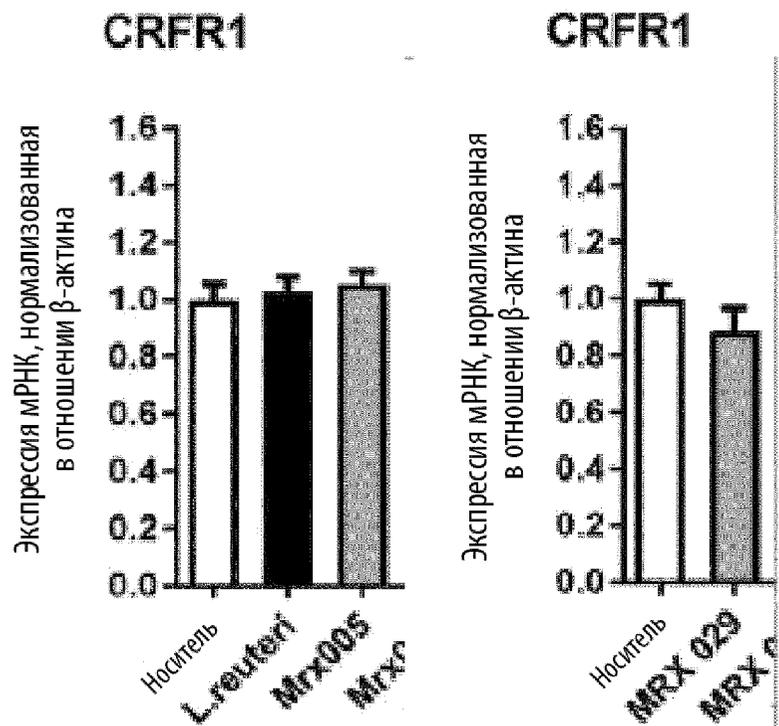
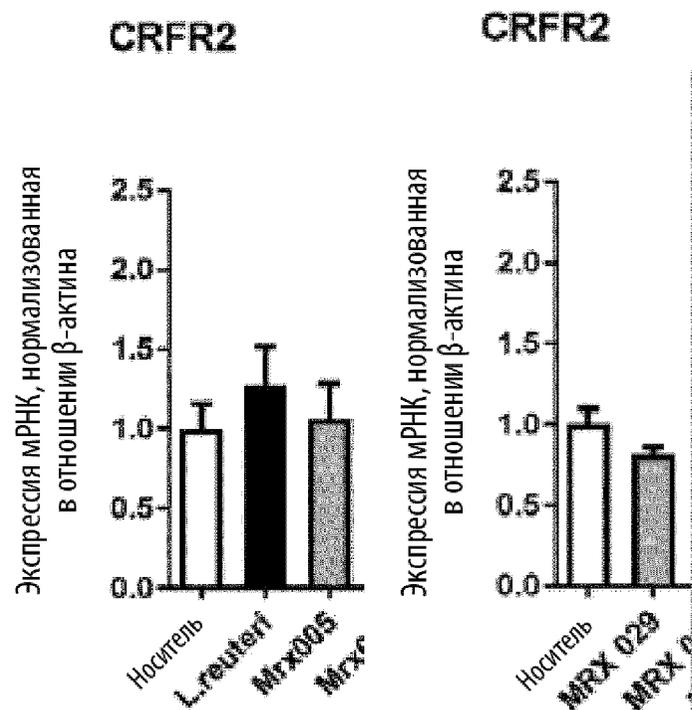
Фиг. 23

Фиг. 24





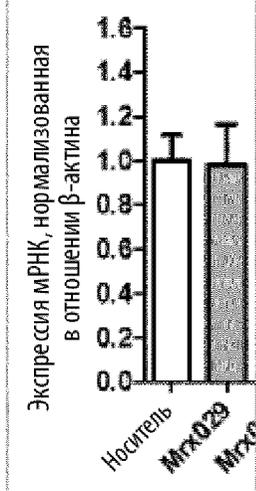
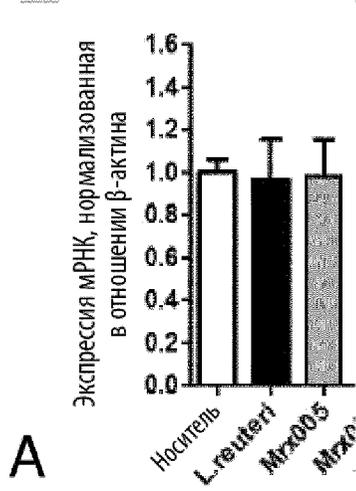
Фиг. 25

A**B**

Фиг. 26

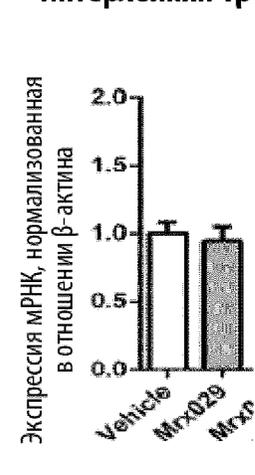
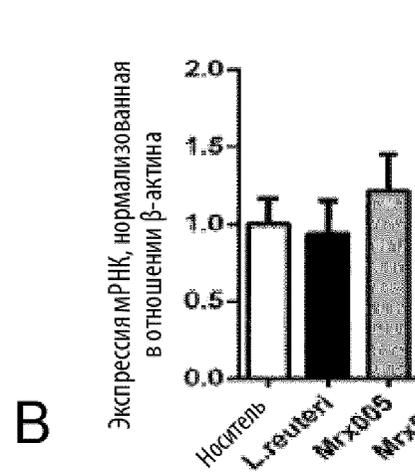
Фактор некроза опухоли α

Фактор некроза опухоли α



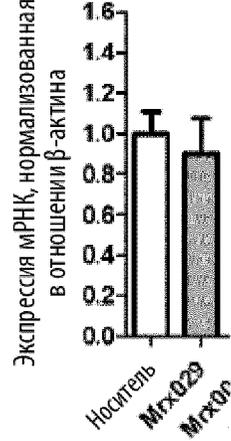
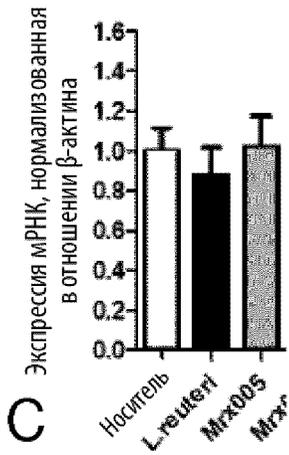
Интерлейкин 1 β

Интерлейкин 1 β

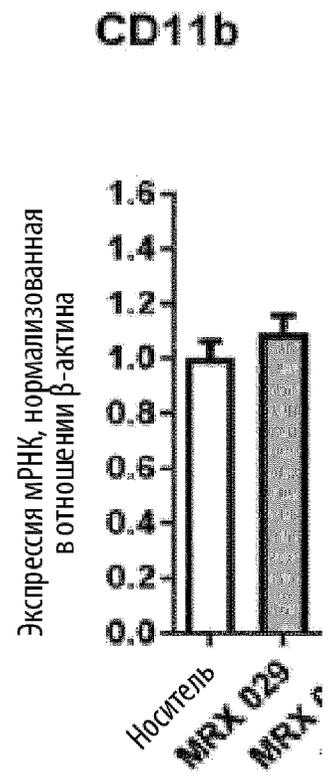
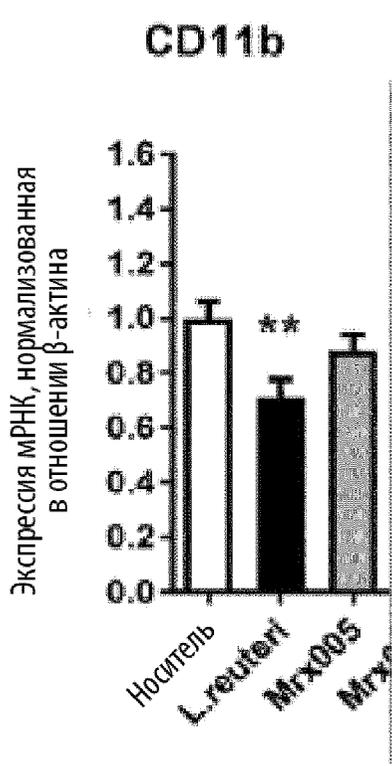


Интерлейкин 6

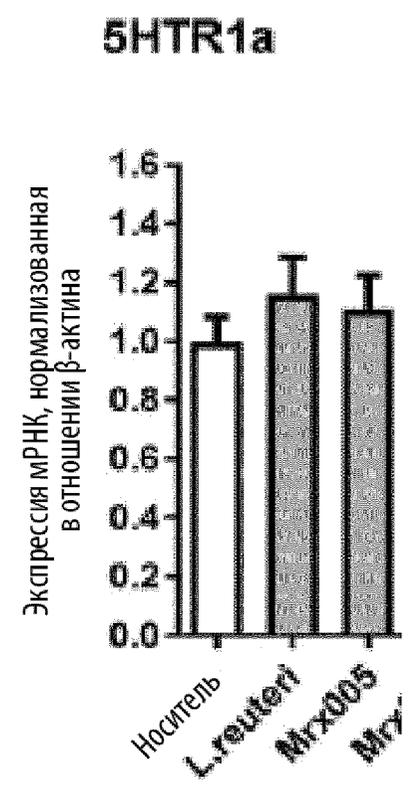
Интерлейкин 6



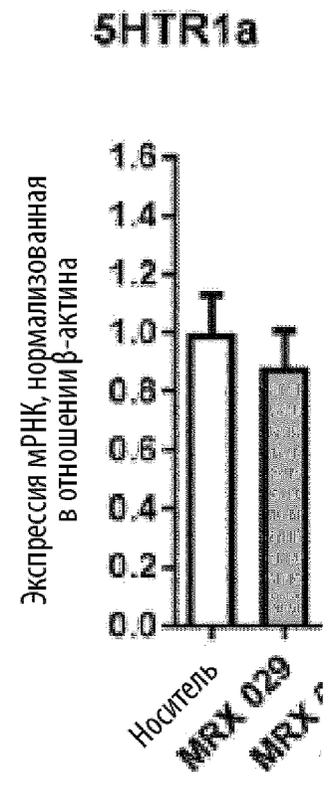
Фиг. 27



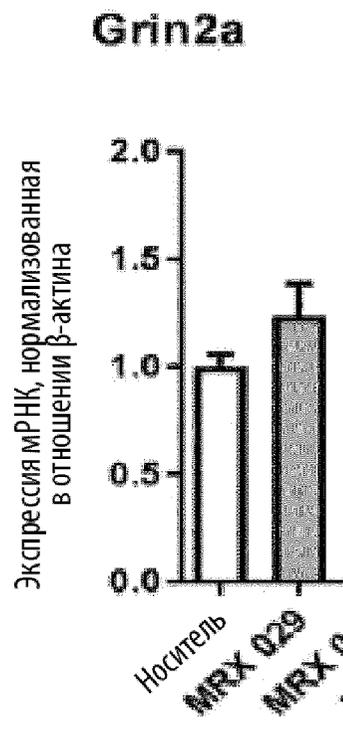
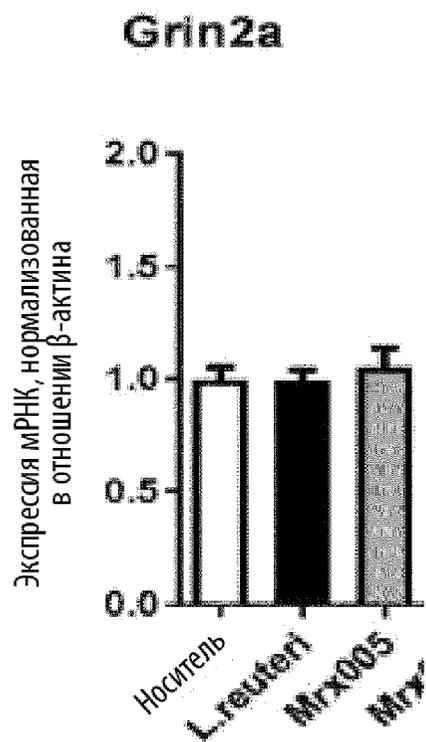
A



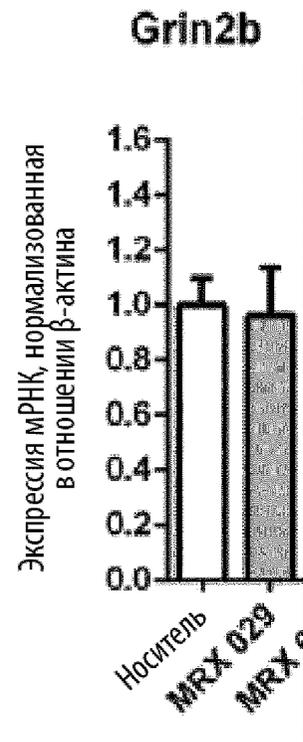
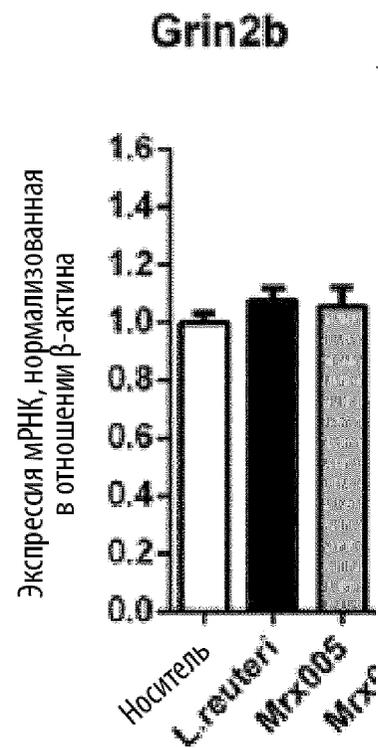
B



Фиг. 28

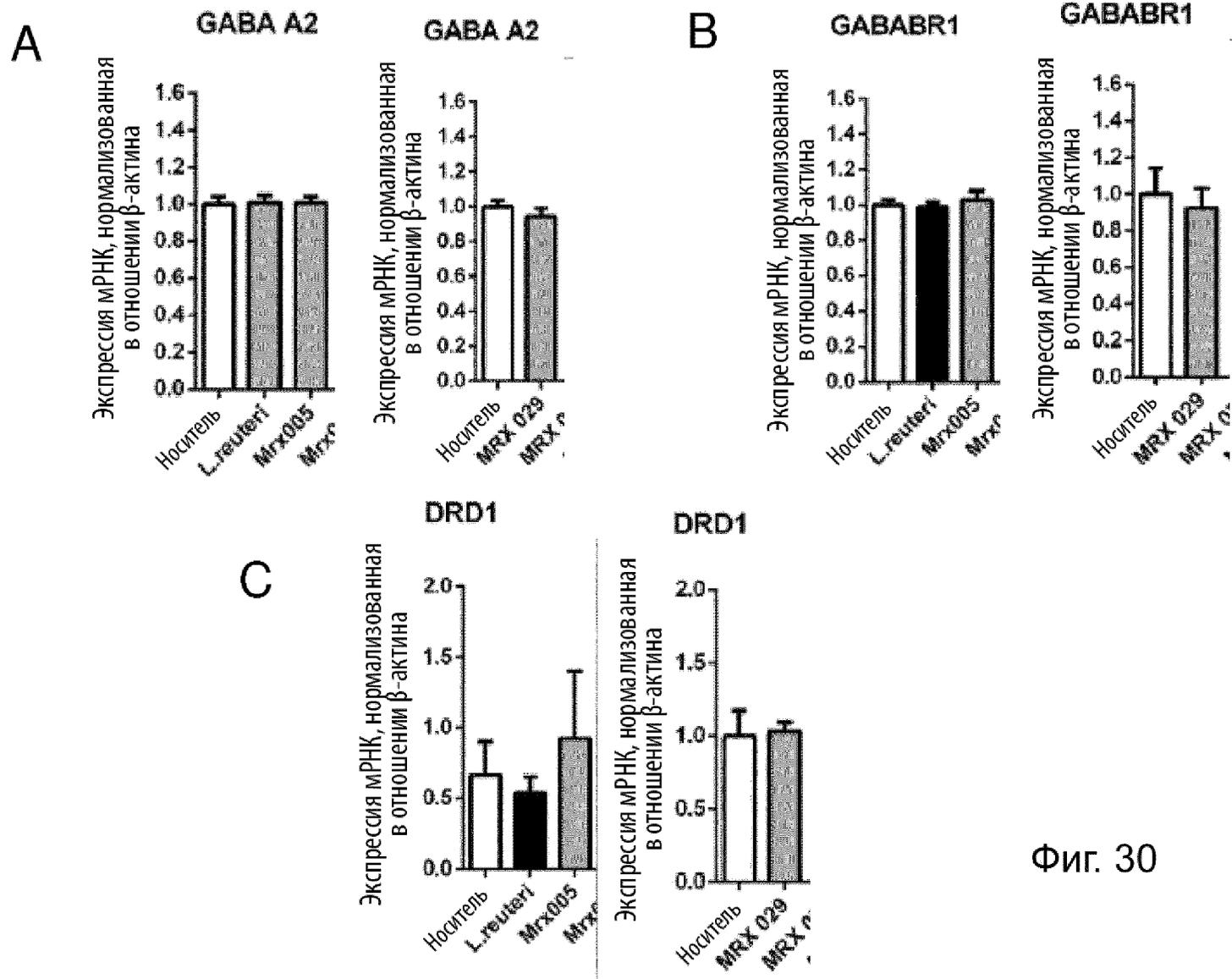


A



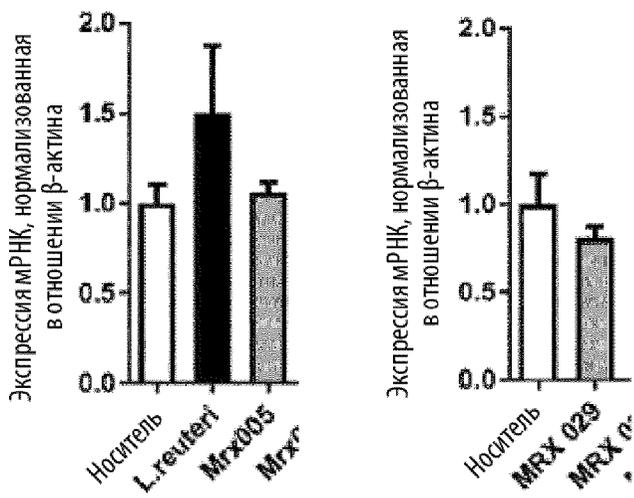
B

Фиг. 29

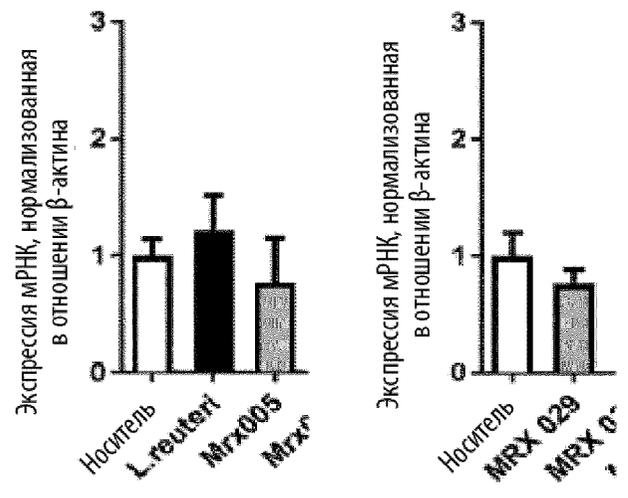


Фиг. 30

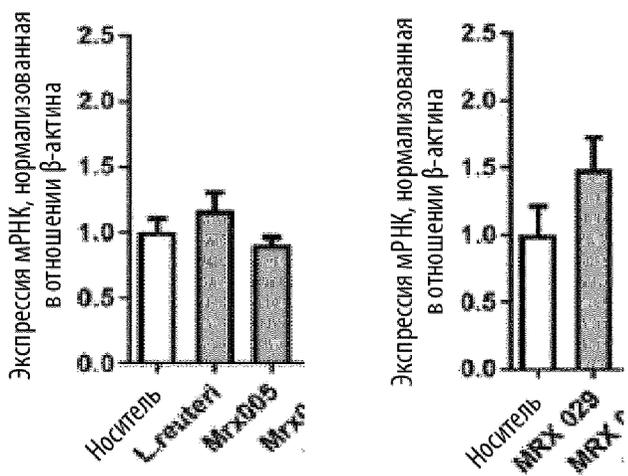
A **Рецептор окситоцина**



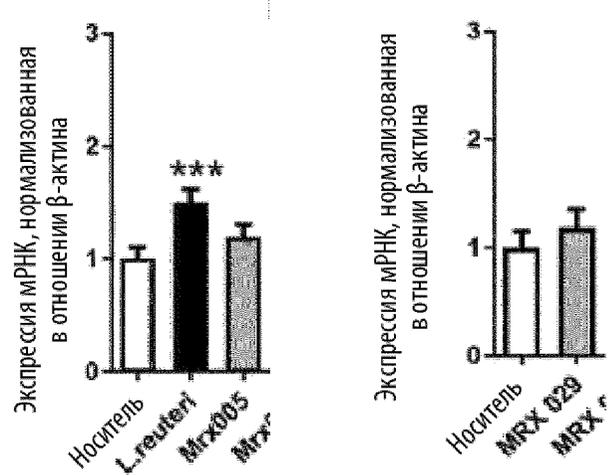
B **Рецептор вазопрессина 1b**



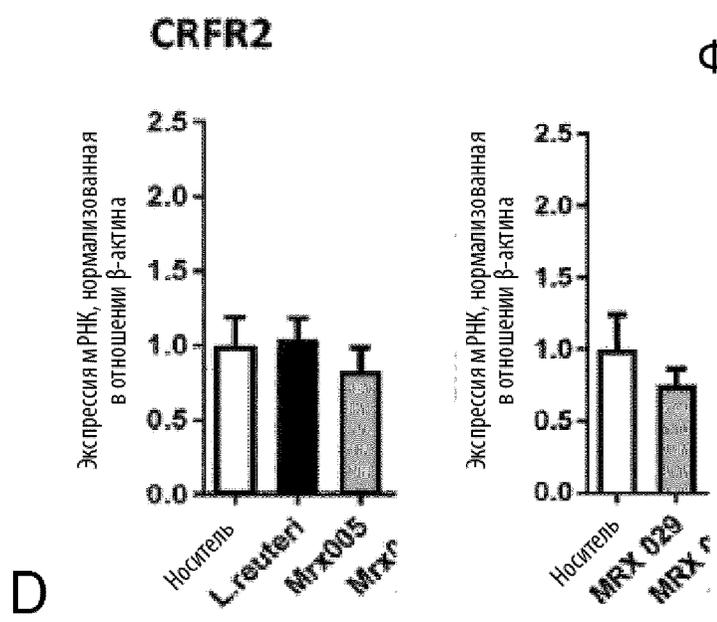
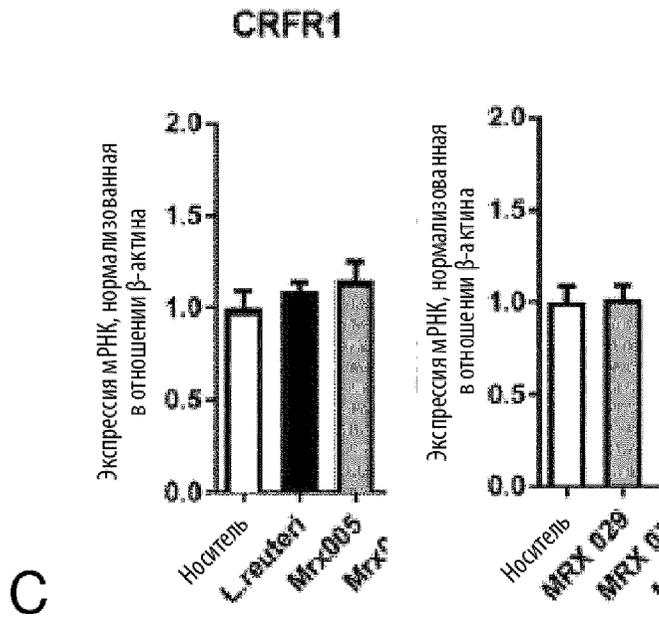
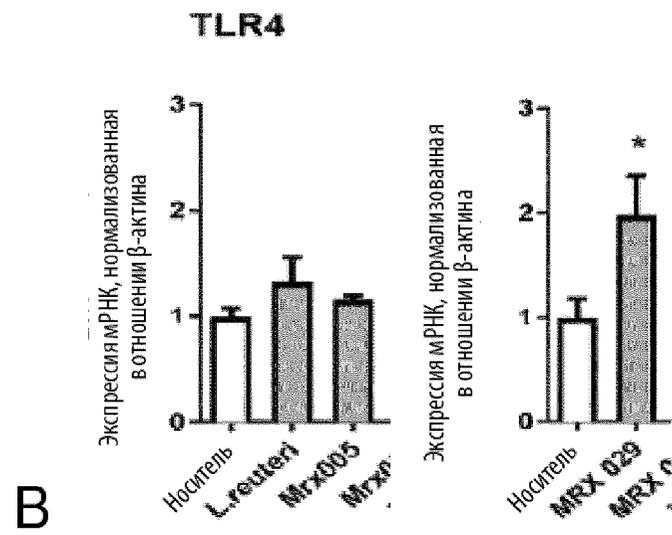
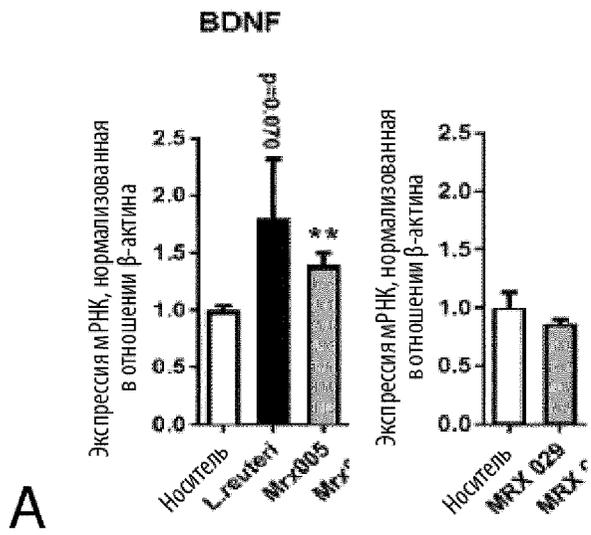
C **Глюкокортикоидный рецептор**



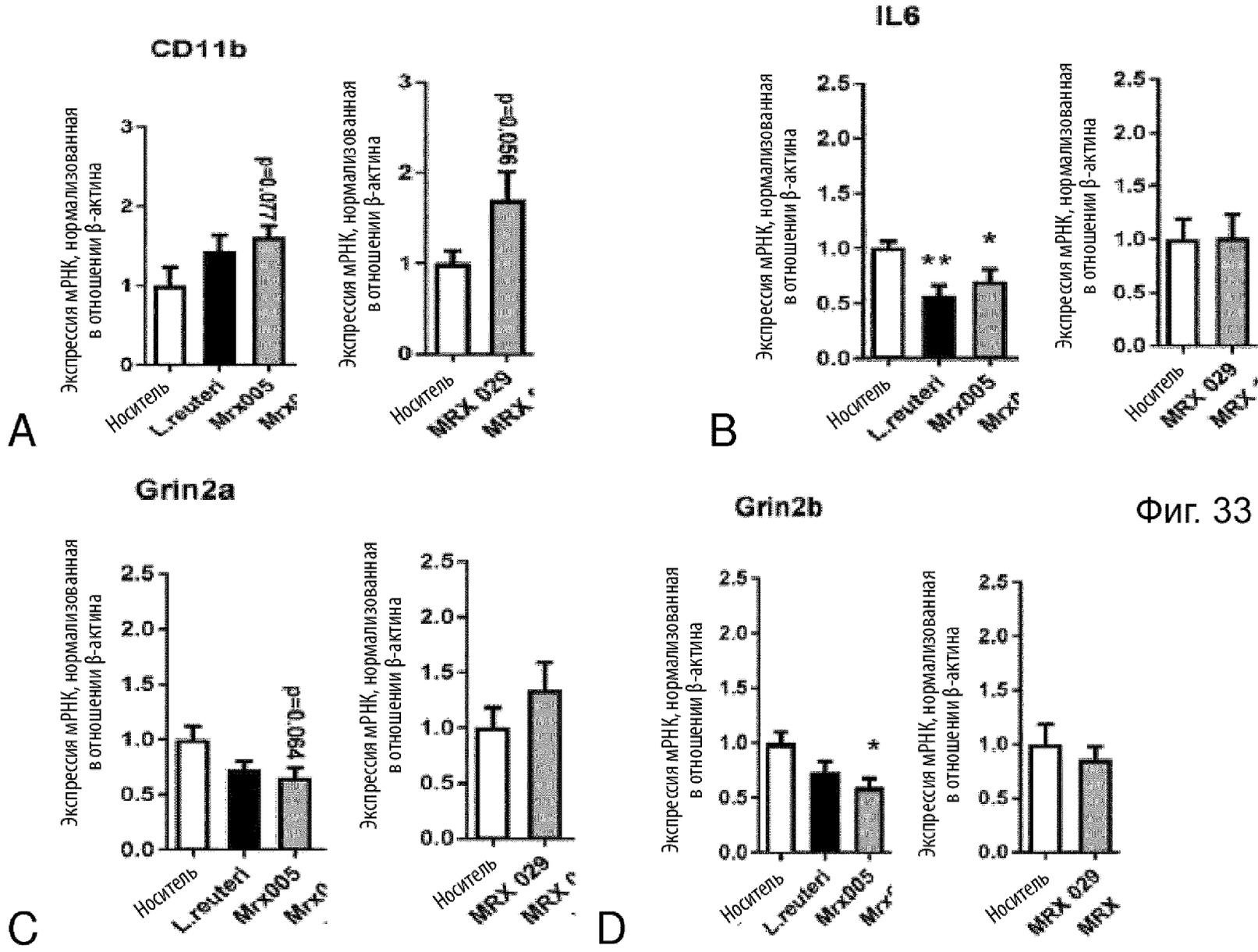
D **Минералокортикоидный рецептор**



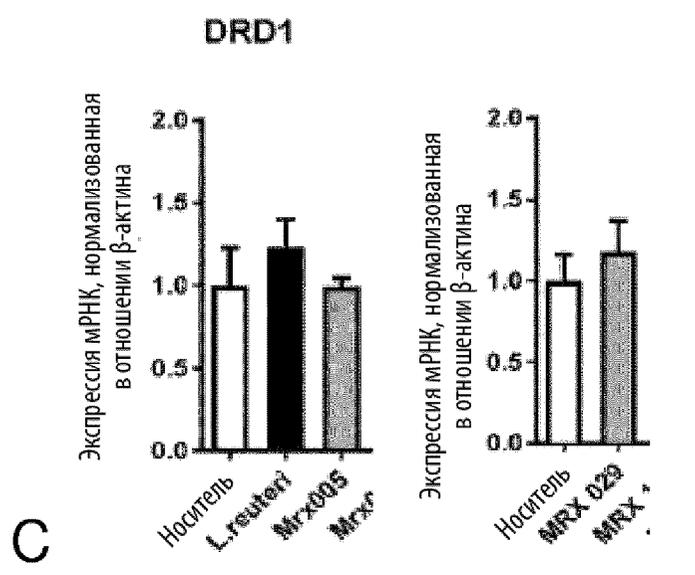
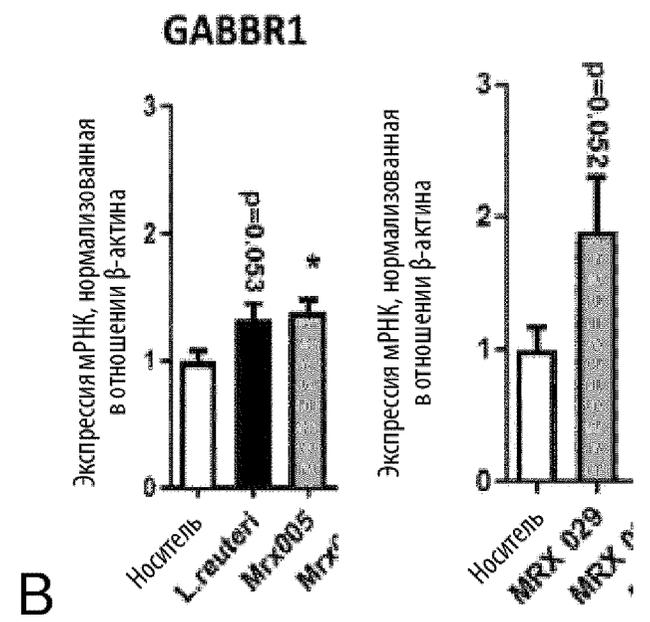
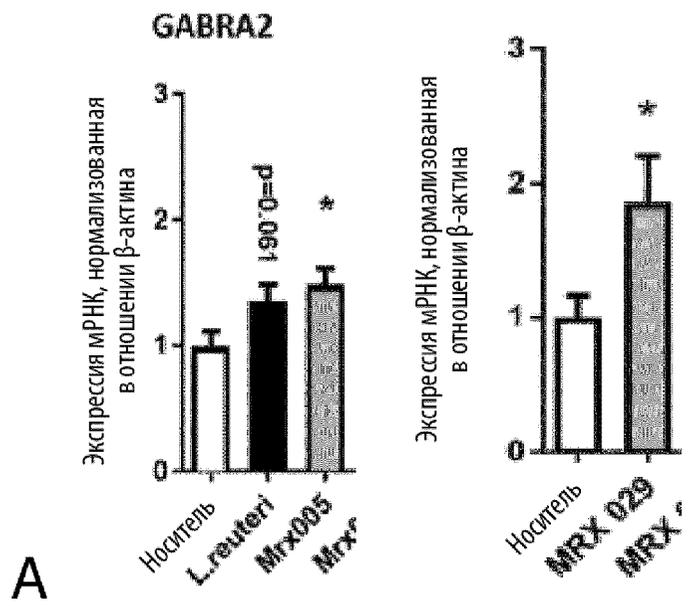
Фиг. 31



Фиг. 32

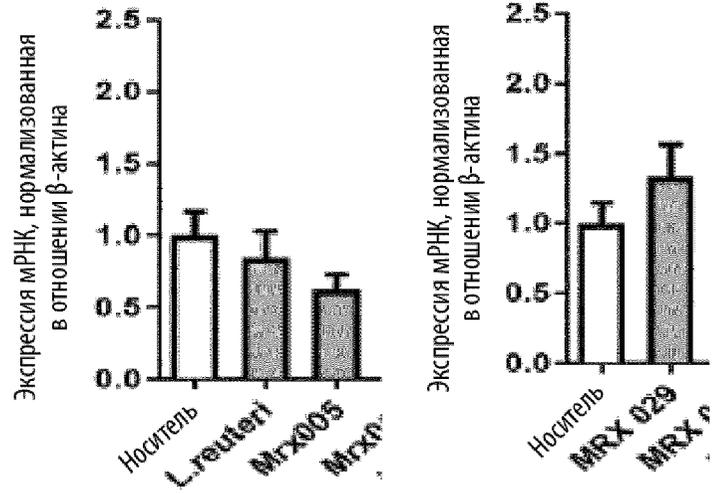


Фиг. 33



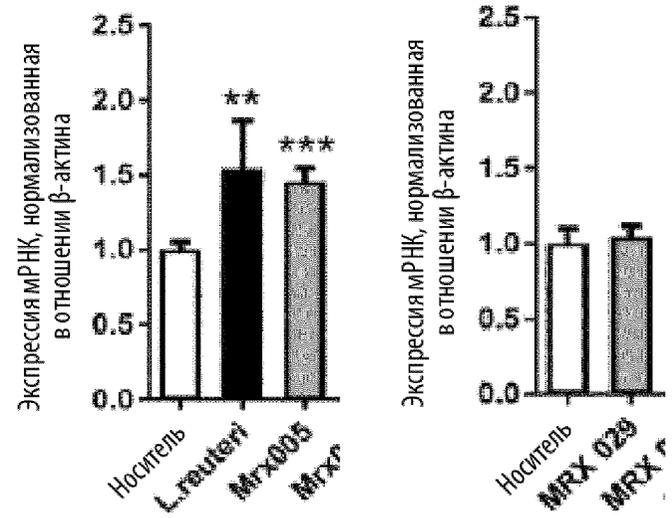
Фиг. 34

Рецептор окситоцина



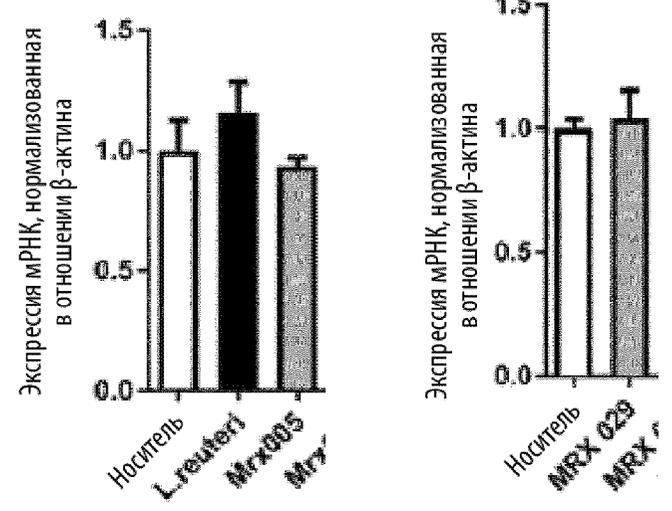
A

BDNF



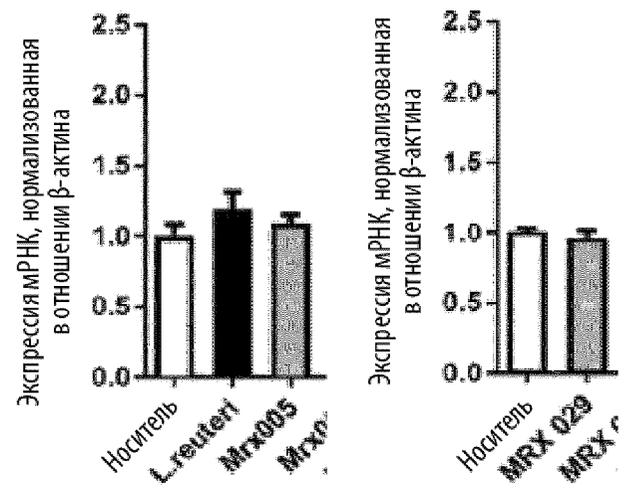
B

Минералокортикоидный рецептор



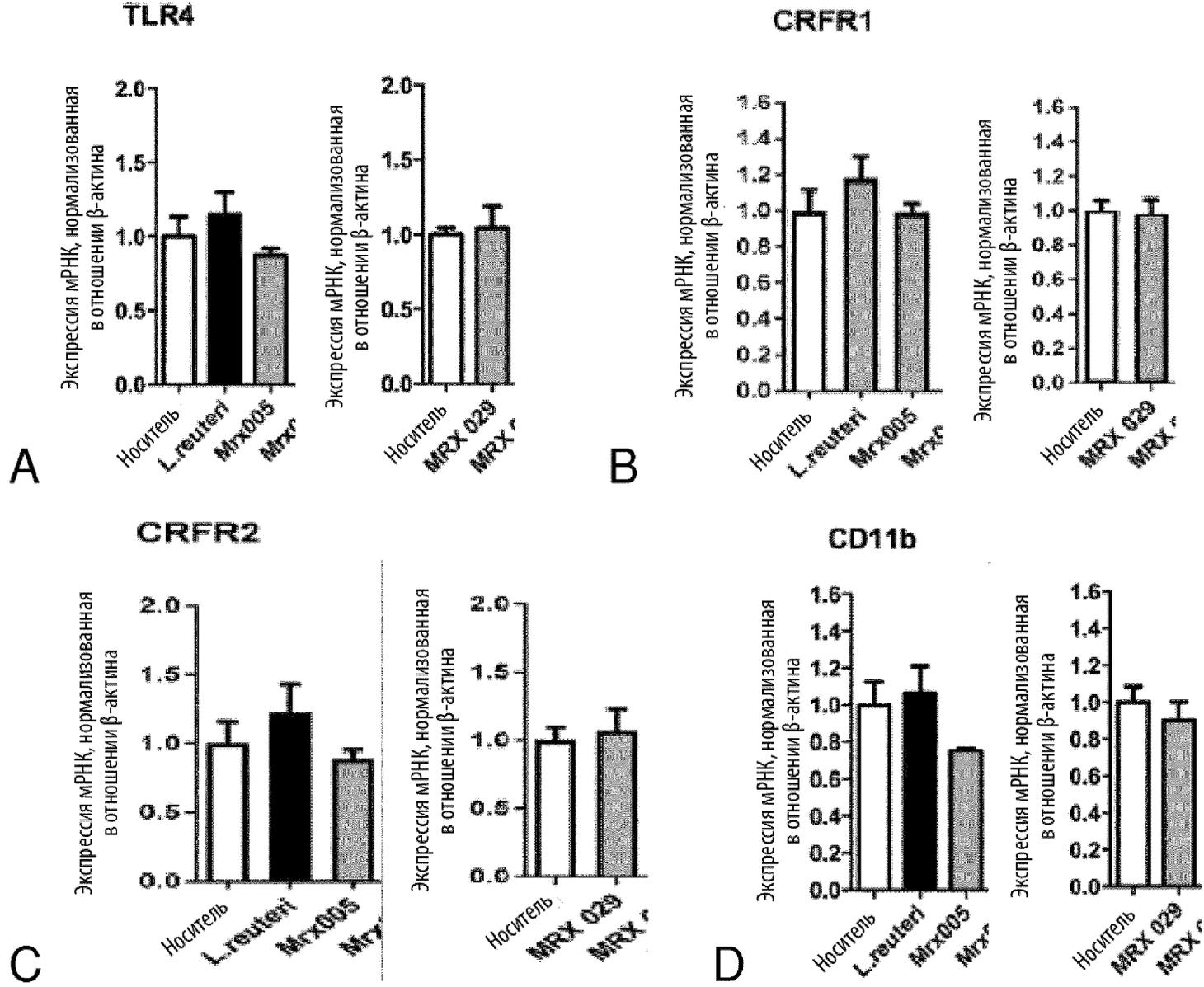
C

Глюкокортикоидный рецептор

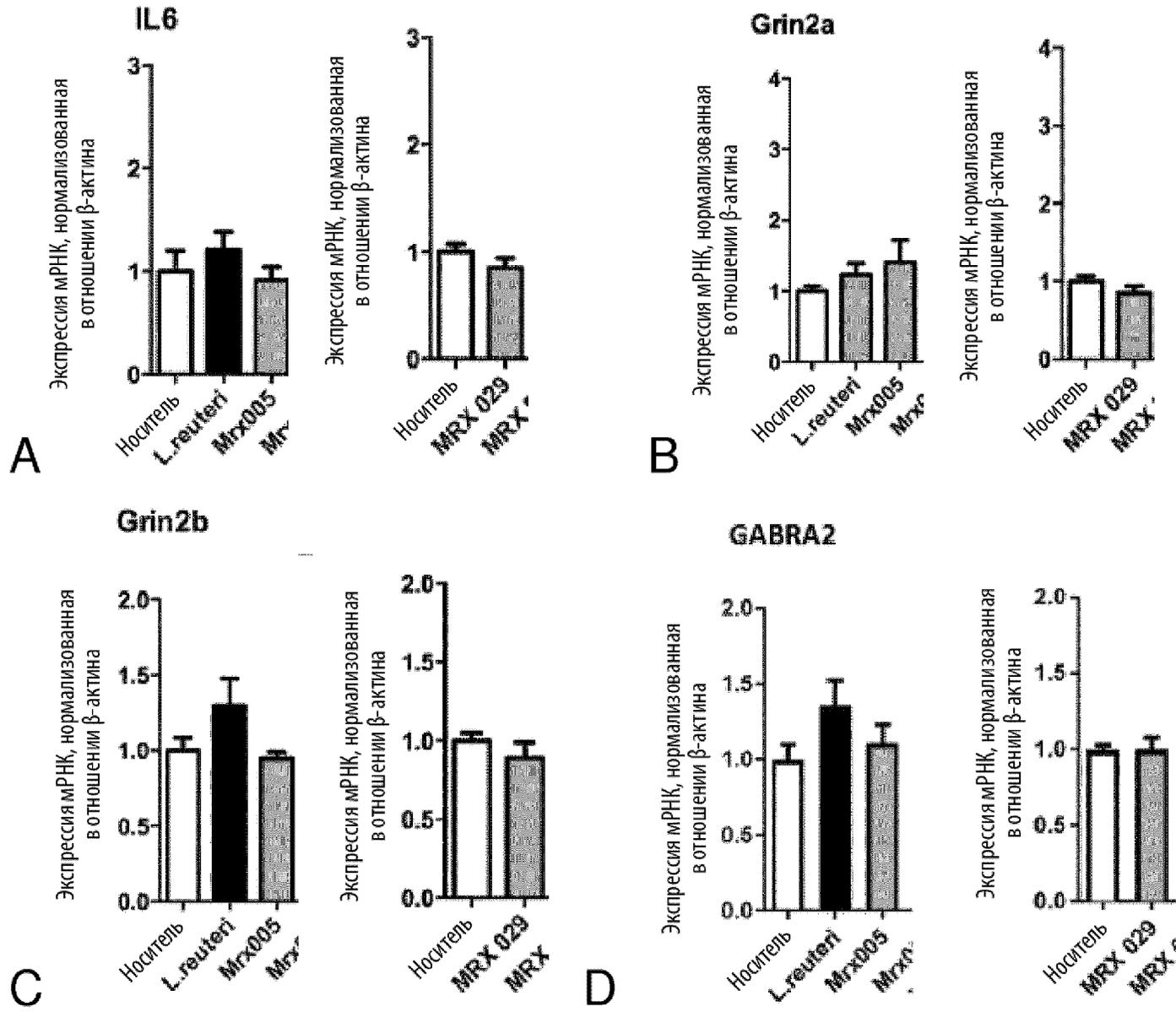


D

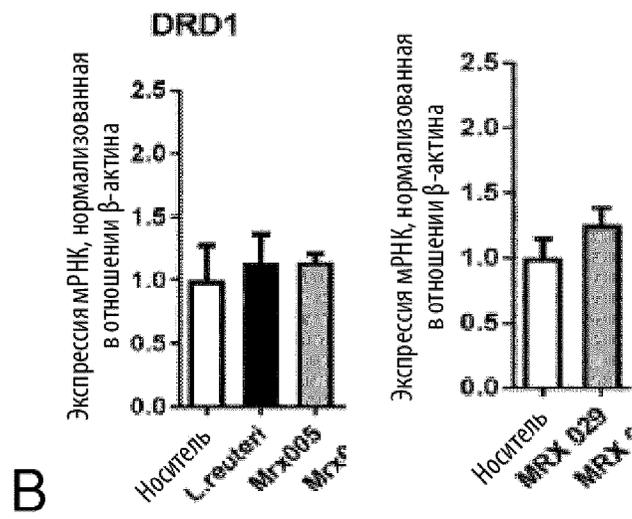
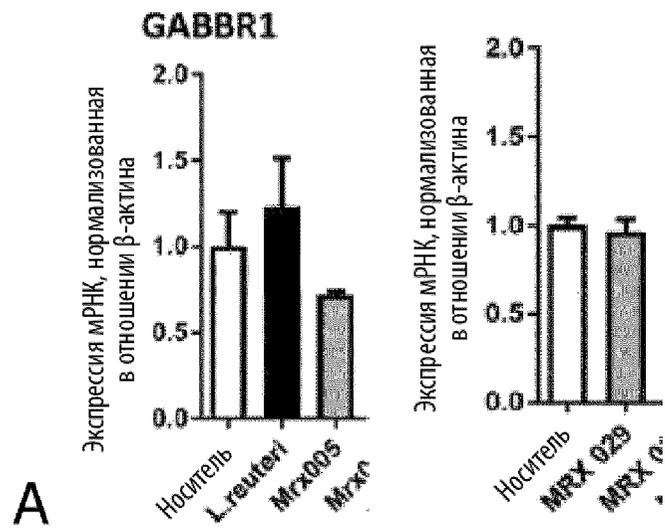
Фиг. 35



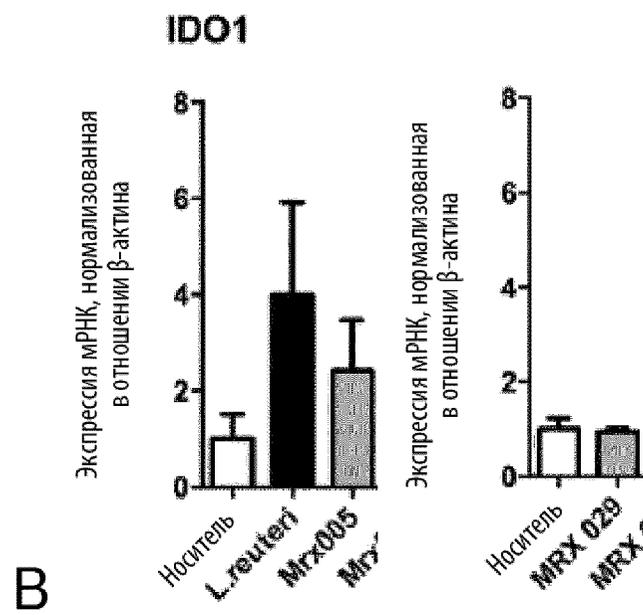
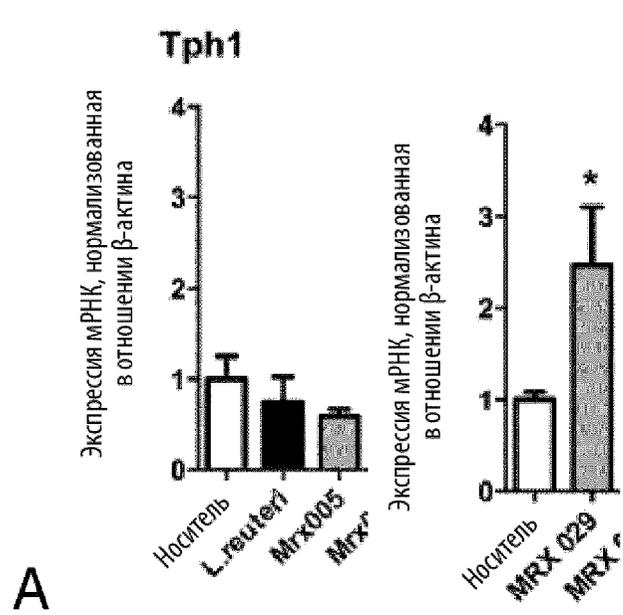
Фиг. 36



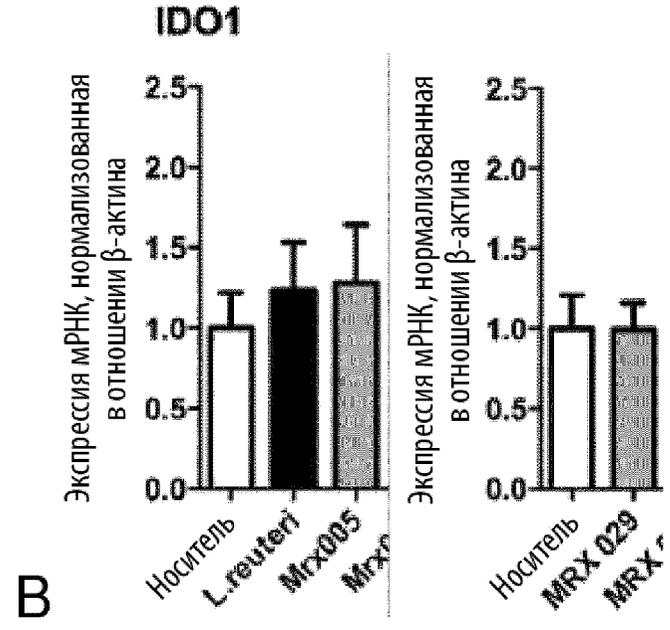
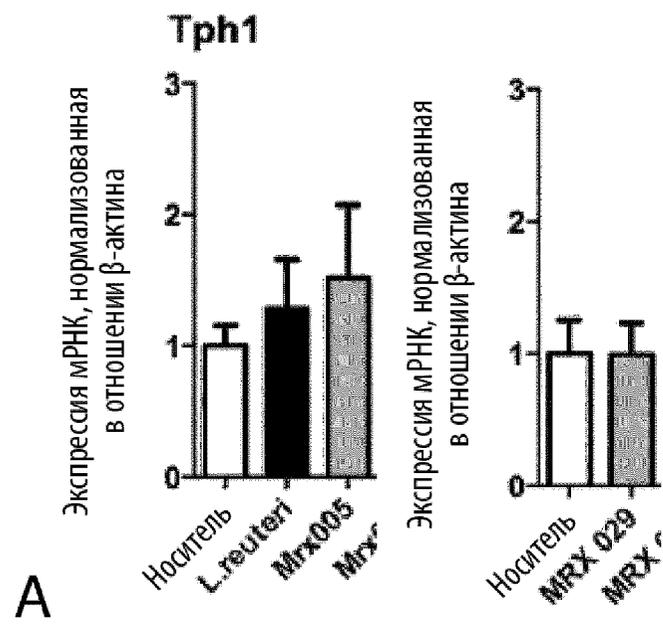
Фиг. 37



Фиг. 38

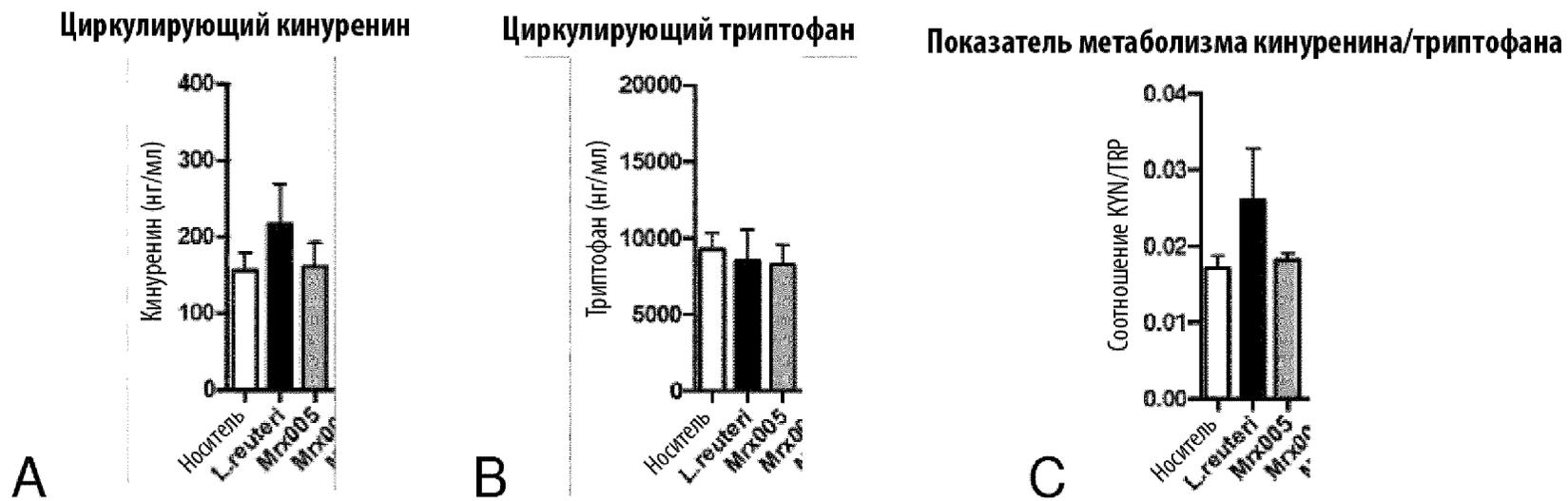


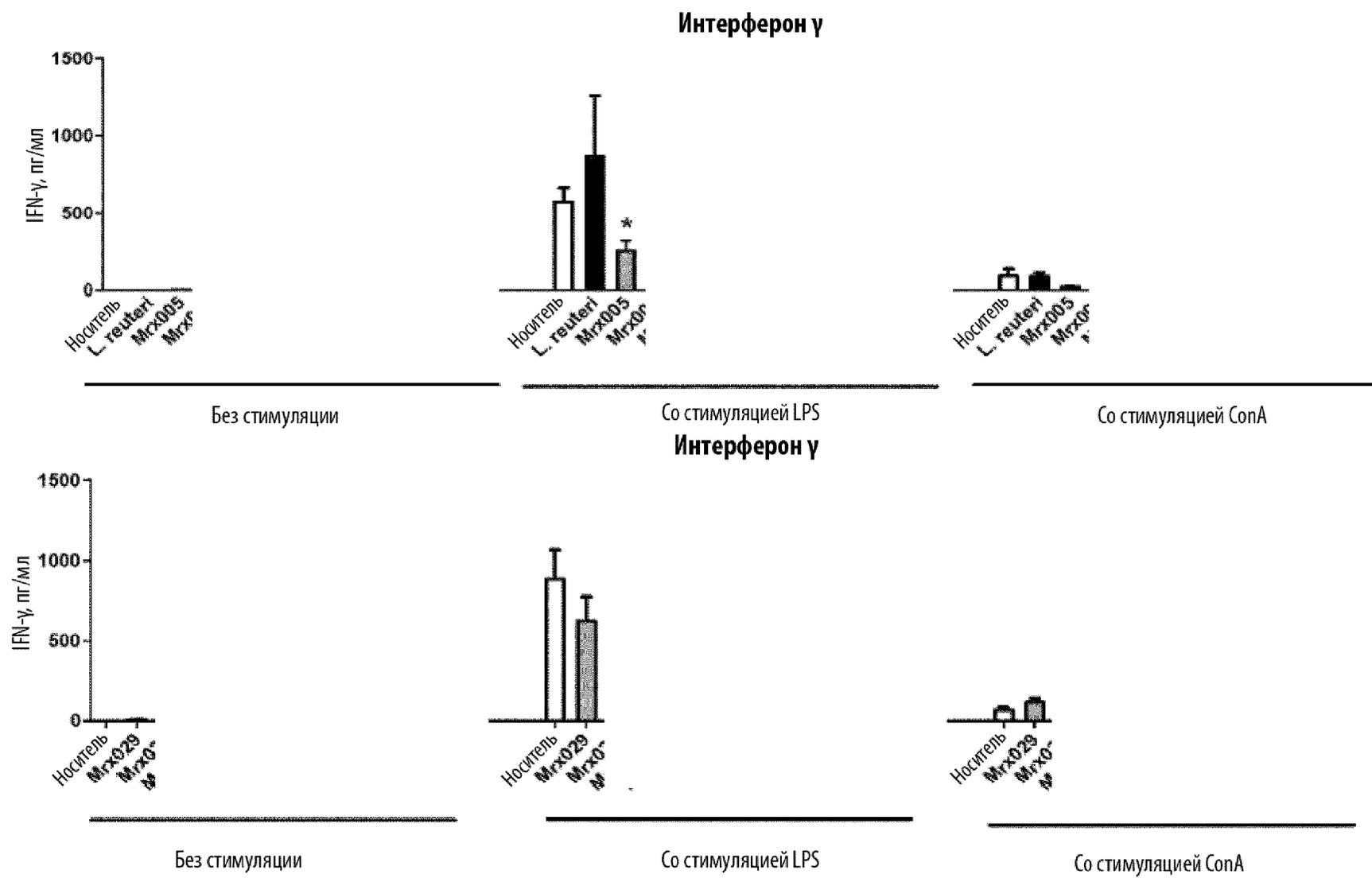
Фиг. 39



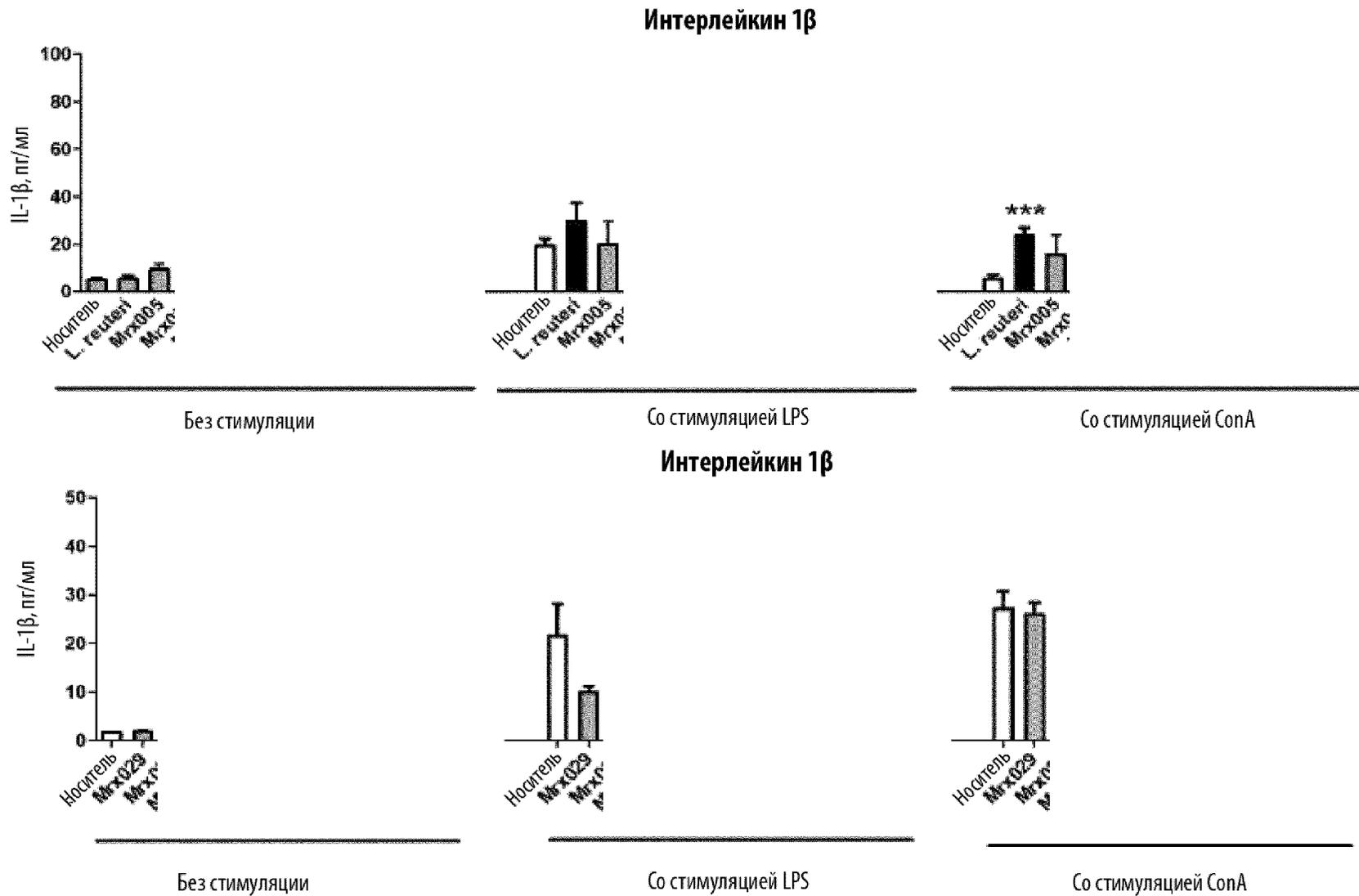
Фиг. 40

Фиг. 41

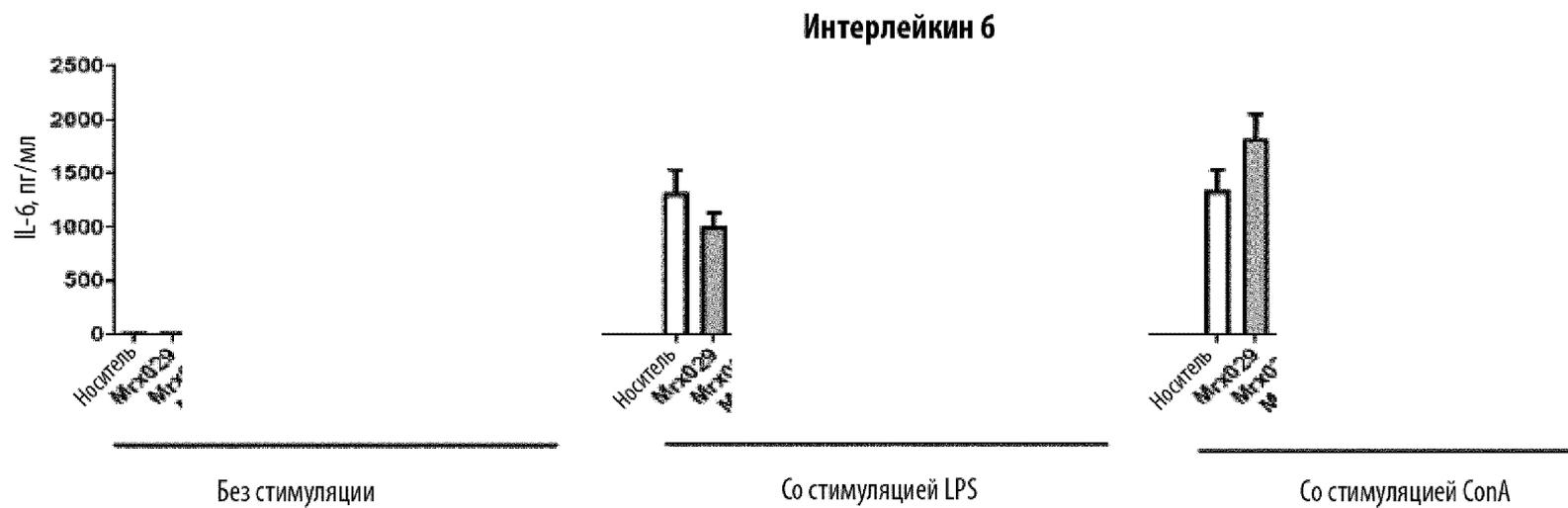
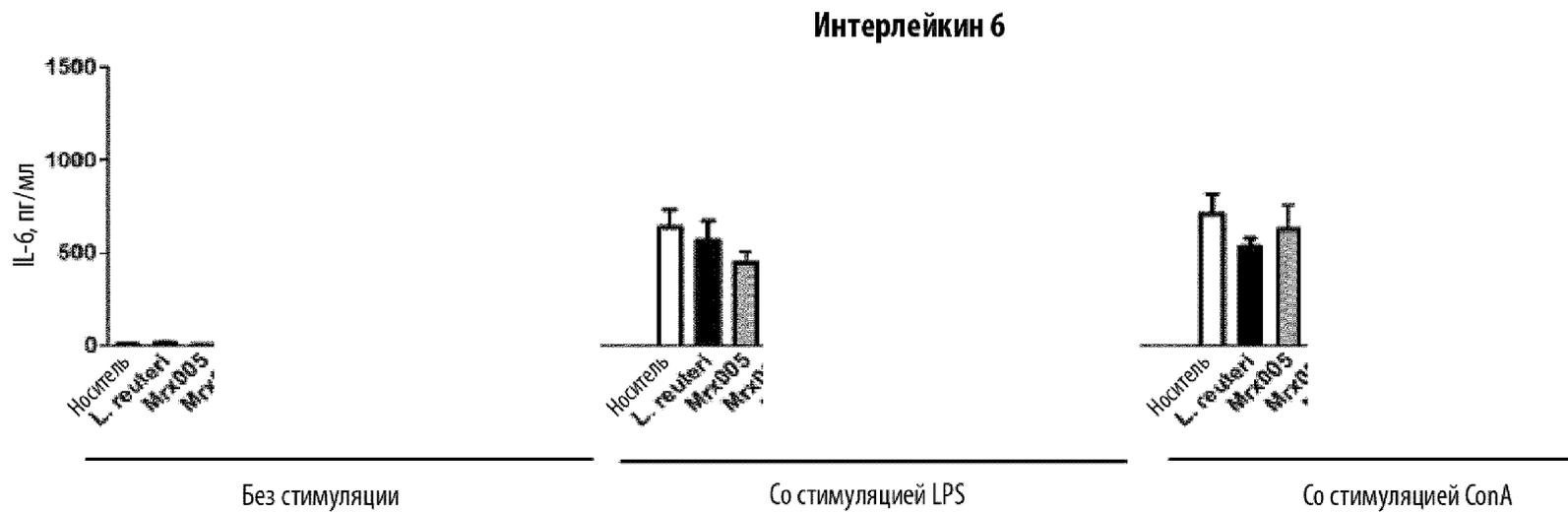




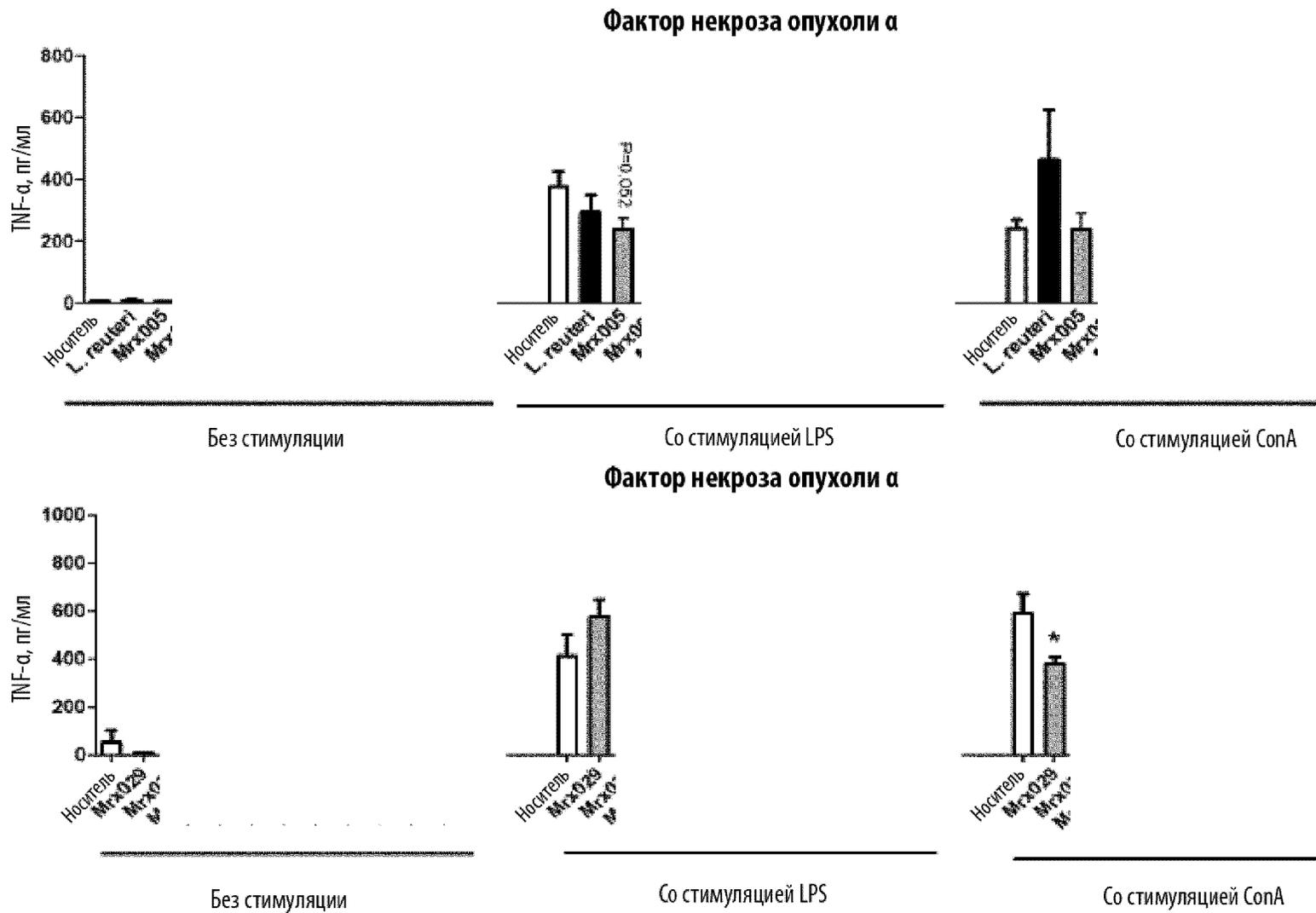
Фиг. 42



Фиг. 43



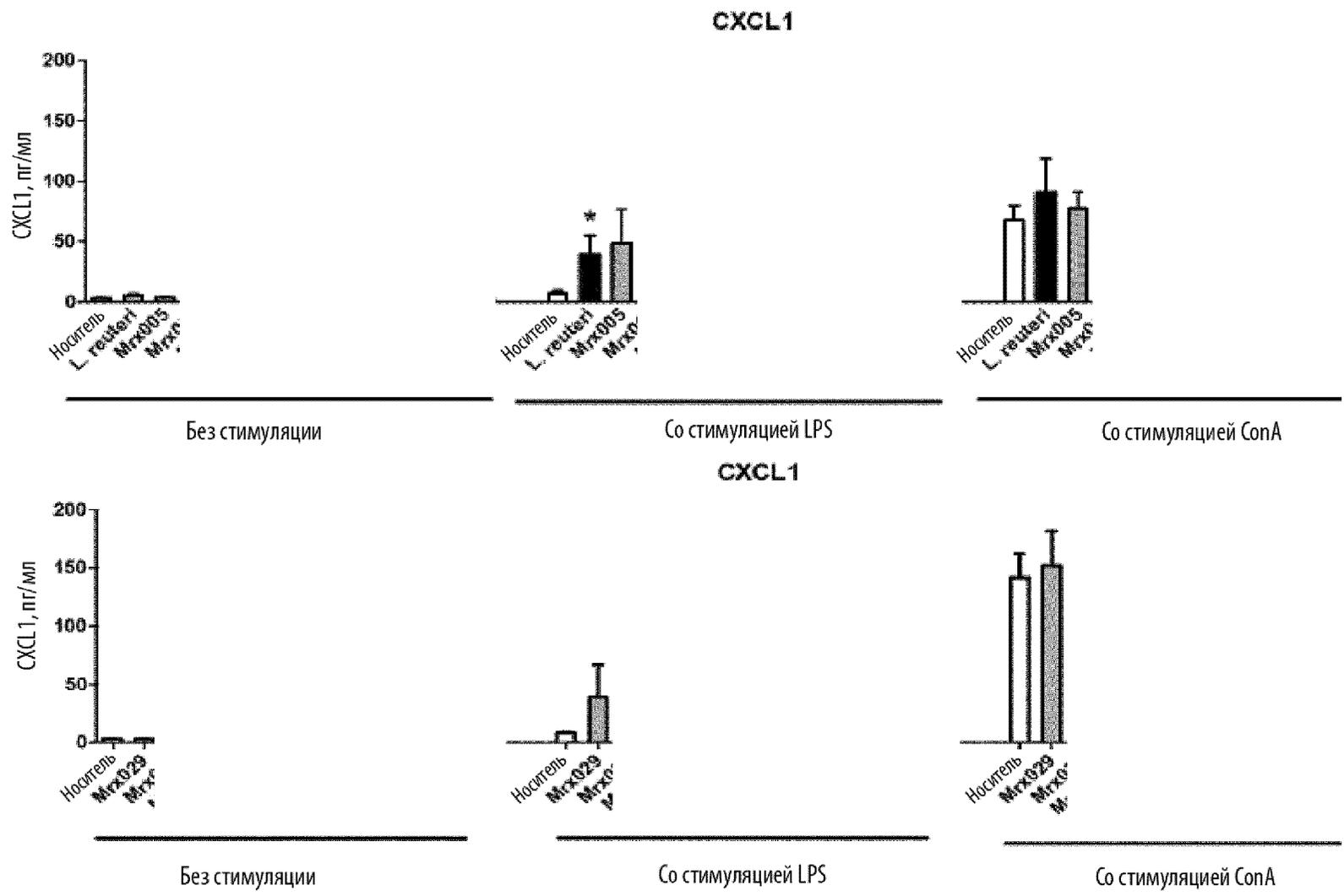
Фиг. 44



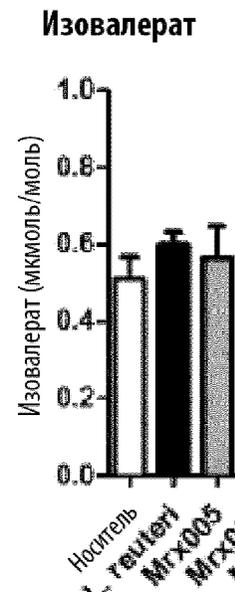
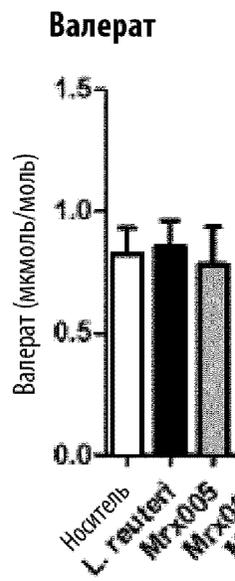
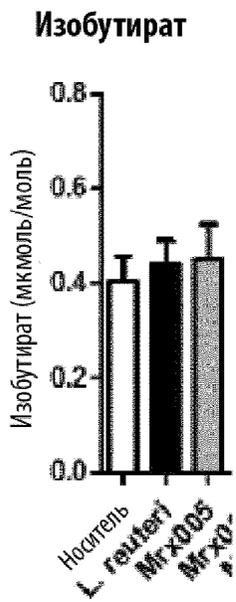
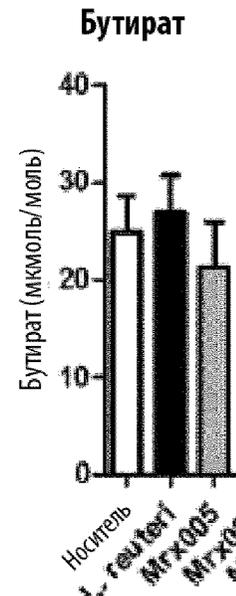
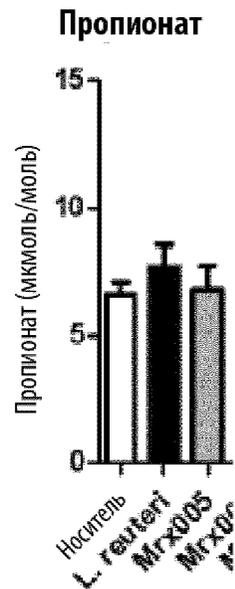
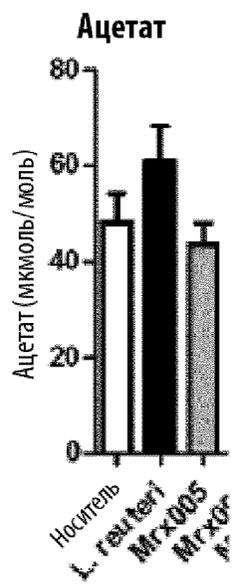
Фиг. 45



Фиг. 46

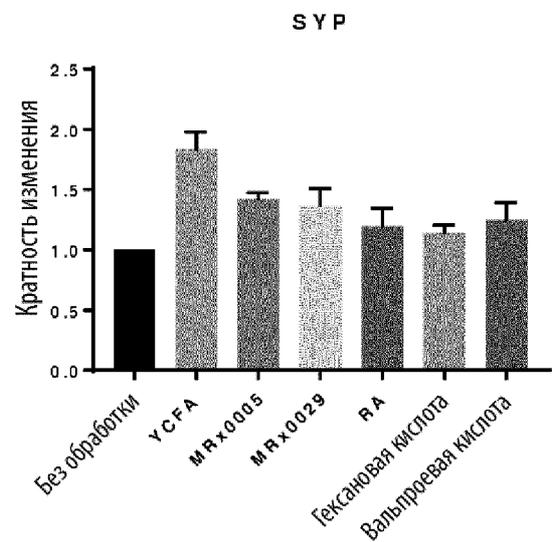
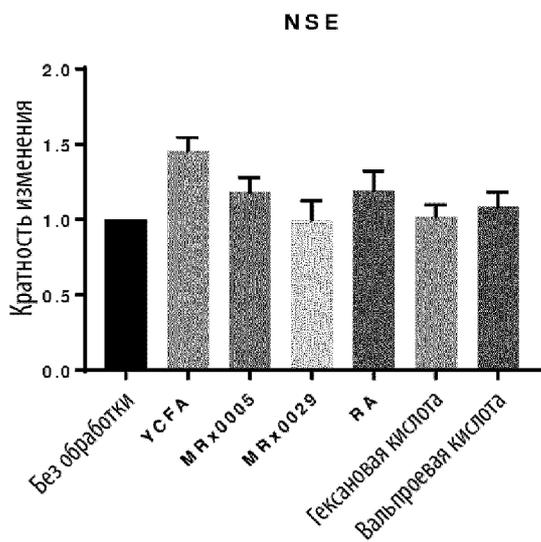
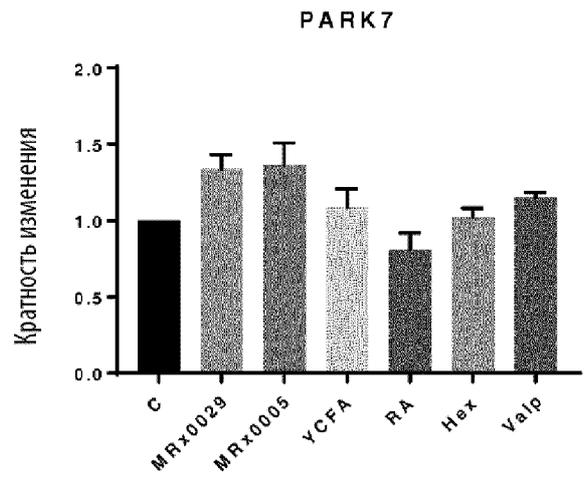
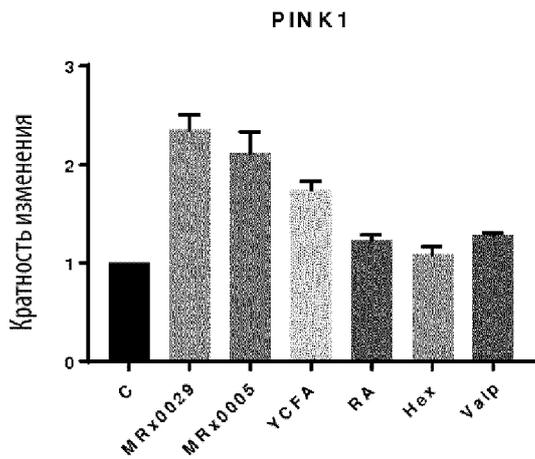
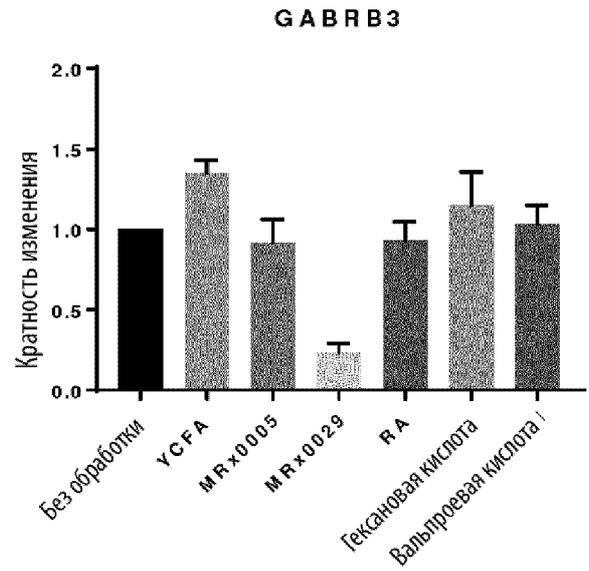
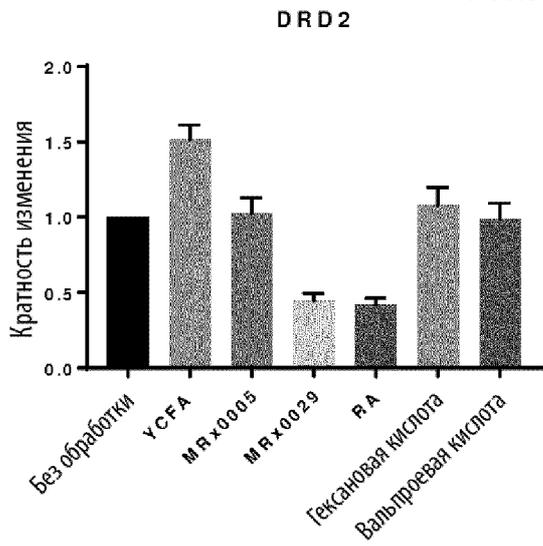


Фиг. 47

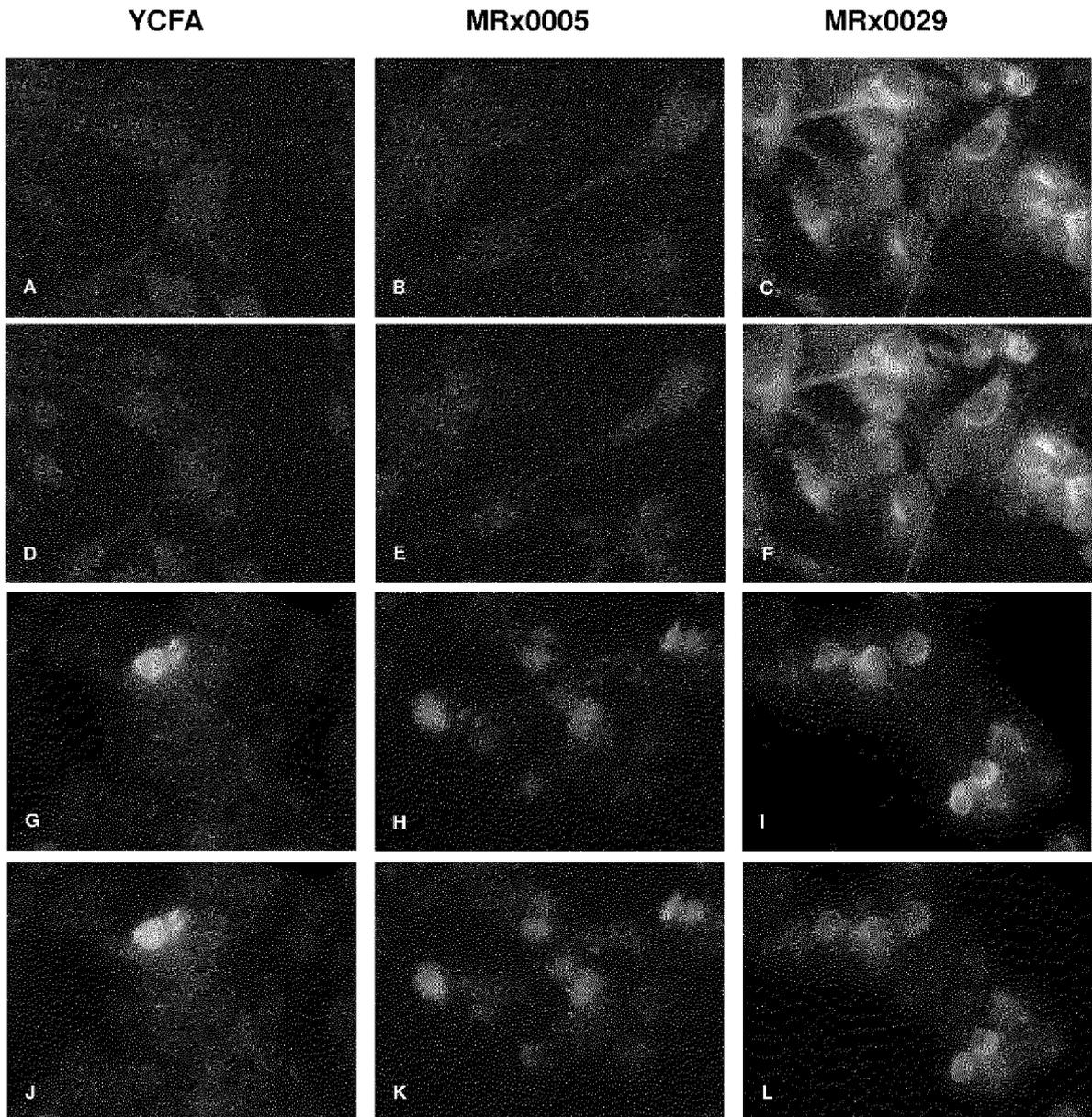


Фиг. 48

Фиг. 49



Фиг. 50



Фиг. 50 (продолжение)

