



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110913878 A

(43)申请公布日 2020.03.24

(21)申请号 201880046299.0

(71)申请人 4D制药研究有限公司

(22)申请日 2018.05.22

地址 英国阿伯丁郡

(30)优先权数据

1708176.1 2017.05.22 GB

(72)发明人 海琳·萨维尼亚克

1714309.0 2017.09.06 GB

伊姆克·伊丽莎白·马尔德

1714298.5 2017.09.06 GB

亚历山大·詹姆斯·史蒂文森

1714305.8 2017.09.06 GB

特德·迪南·约翰·克赖恩

1716493.0 2017.10.09 GB

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

1718551.3 2017.11.09 GB

有限责任公司 11204

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

代理人 王达佐 洪欣

2020.01.10

(51)Int.Cl.

A61K 35/74(2015.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 25/00(2006.01)

PCT/GB2018/051389 2018.05.22

A61P 25/18(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

A61P 25/22(2006.01)

W02018/215758 EN 2018.11.29

A61P 25/28(2006.01)

(83)生物保藏信息

A61P 25/16(2006.01)

DSM 14294 2001.05.10

A61P 25/14(2006.01)

NCIMB 42381 2015.03.12

A61P 29/00(2006.01)

NCIMB 42486 2015.11.16

A61P 25/24(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

权利要求书5页 说明书91页 附图91页

(54)发明名称

包含细菌菌株的组合物

(57)摘要

本发明提供用于治疗和预防中枢神经系统
病症和疾患的包含细菌菌株的组合物。

1. 一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述中枢神经系统病症或疾患由微生物丛-肠-脑轴介导。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中。
4. 如权利要求1或2所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防选自由以下组成的组的病症或疾患的方法中:自闭症谱系病症(ASD);儿童发育障碍;强迫症(OCD);重度抑郁障碍;抑郁;季节性情感障碍;焦虑障碍;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎);压力障碍;创伤后压力障碍;精神分裂症谱系病症;精神分裂症;双相障碍;精神病;情绪障碍;痴呆;阿尔茨海默氏病;帕金森氏病;慢性疼痛;运动神经元病;亨廷顿氏病;格林-巴利综合征以及脑膜炎。
5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。
6. 如权利要求5所述的组合物,其中所述组合物用于减轻或预防自闭症的方法中。
7. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物预防、减轻或缓解刻板、重复、强迫和/或焦虑行为。
8. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防强迫症的方法中。
9. 如权利要求8所述的组合物,其中所述组合物预防、减轻或缓解重复、强迫和/或焦虑行为。
10. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防重度抑郁障碍的方法中。
11. 如权利要求10所述的组合物,其中所述组合物治疗或预防急性重度抑郁事件和/或预防新的事件(复发预防)。
12. 如权利要求10或11所述的组合物,其中所述组合物预防、减少或缓和轻度、中度或重度MDD事件的发生。
13. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。
14. 如权利要求13所述的组合物,其中所述焦虑障碍为广泛性焦虑障碍(GAD);特定恐惧症;社交焦虑障碍;分离焦虑障碍;广场恐惧症;恐慌障碍和/或选择性缄默症。
15. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。
16. 如权利要求15所述的组合物,其中所述神经认知障碍为血管性痴呆;阿尔茨海默氏病和血管性痴呆混合形式;路易体病;额颞痴呆;帕金森氏痴呆;克罗伊茨费尔特-雅各布病;亨廷顿氏病;以及韦尼克-柯沙可夫综合征。
17. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物用于调节所述微生物丛-肠-脑轴的方法中。
18. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述细菌菌株属于粪便布劳特氏菌。
19. 如权利要求1-17中任一项所述的组合物,其中所述细菌菌株属于韦克斯勒布劳特氏菌。

20. 如权利要求1-17中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株属于嗜氢布劳特氏菌。

21. 如权利要求1-18中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

22. 如权利要求1-18中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:1或2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

23. 如权利要求22所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列，或其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:2表示的16s rRNA序列。

24. 如权利要求1-17或19中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与韦克斯勒布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

25. 如权利要求1-17或19中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:3或4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

26. 如权利要求25所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列，或其中所述细菌菌株具有由SEQ ID NO:4表示的16s rRNA序列。

27. 如权利要求1-17或20中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与嗜氢布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

28. 如权利要求1-17或20中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株具有与SEQ ID NO:7至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。

29. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。

30. 如权利要求29所述的组合物，其中所述组合物用于减轻或预防自闭症的方法中。

31. 如权利要求29或30所述的组合物，其中所述组合物包含预防、减轻或缓解刻板、重复、强迫和/或焦虑行为的粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株。

32. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防强迫症的方法中。

33. 如权利要求32所述的组合物，其中所述组合物包含预防、减轻或缓解重复、强迫和/或焦虑行为的粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株。

34. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防重度抑郁障碍的方法中。

35. 如权利要求34所述的组合物，其中所述组合物包含治疗或预防急性重度抑郁事件和/或预防新的事件(复发预防)的粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株。

36. 如权利要求34或35所述的组合物，其中所述组合物预防、减少或缓和轻度、中度或重度MDD事件的发生。

37. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。

38. 如权利要求37所述的组合物,其中所述焦虑障碍为广泛性焦虑障碍(GAD);特定恐惧症;社交焦虑障碍;分离焦虑障碍;广场恐惧症;恐慌障碍和/或选择性缄默症。

39. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。

40. 如权利要求39所述的组合物,其中所述神经认知障碍为血管性痴呆;阿尔茨海默氏病和血管性痴呆混合形式;路易体病;额颞痴呆;帕金森氏痴呆;克罗伊茨费尔特-雅各布病;亨廷顿氏病;以及韦尼克-柯沙可夫综合征。

41. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。

42. 如权利要求41所述的组合物,其中所述组合物用于减轻或预防自闭症的方法中。

43. 如权利要求41或42所述的组合物,其中所述组合物包含预防、减轻或缓解刻板、重复、强迫和/或焦虑行为的韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株。

44. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防强迫症的方法中。

45. 如权利要求44所述的组合物,其中所述组合物包含预防、减轻或缓解重复、强迫和/或焦虑行为的韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株。

46. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防重度抑郁障碍的方法中。

47. 如权利要求46所述的组合物,其中所述组合物包含治疗或预防急性重度抑郁事件和/或预防新的事件(复发预防)的韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株。

48. 如权利要求46或47所述的组合物,其中所述组合物预防、减少或缓和轻度、中度或重度MDD事件的发生。

49. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。

50. 如权利要求49所述的组合物,其中所述焦虑障碍为广泛性焦虑障碍(GAD);特定恐惧症;社交焦虑障碍;分离焦虑障碍;广场恐惧症;恐慌障碍和/或选择性缄默症。

51. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。

52. 如权利要求51所述的组合物,其中所述神经认知障碍为血管性痴呆;阿尔茨海默氏病和血管性痴呆混合形式;路易体病;额颞痴呆;帕金森氏痴呆;克罗伊茨费尔特-雅各布病;亨廷顿氏病;以及韦尼克-柯沙可夫综合征。

53. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。

54. 如权利要求53所述的组合物,其中所述组合物用于减轻或预防自闭症的方法中。

55. 如权利要求53或54所述的组合物,其中所述组合物包含预防、减轻或缓解刻板、重复、强迫和/或焦虑行为的嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株。

56. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株,其用于治疗或预防强迫症的方法中。

57. 如权利要求56所述的组合物,其中所述组合物包含预防、减轻或缓解重复、强迫和/

或焦虑行为的嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株。

58. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防重度抑郁障碍的方法中。

59. 如权利要求58所述的组合物，其中所述组合物包含治疗或预防急性重度抑郁事件和/或预防新的事件(复发预防)的嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株。

60. 如权利要求58或59所述的组合物，其中所述组合物预防、减少或缓和轻度、中度或重度MDD事件的发生。

61. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。

62. 如权利要求61所述的组合物，其中所述焦虑障碍为广泛性焦虑障碍(GAD)；特定恐惧症；社交焦虑障碍；分离焦虑障碍；广场恐惧症；恐慌障碍和/或选择性缄默症。

63. 如权利要求1所述的组合物，其中所述组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株，其用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。

64. 如权利要求63所述的组合物，其中所述神经认知障碍为血管性痴呆；阿尔茨海默氏病和血管性痴呆混合形式；路易体病；额颞痴呆；帕金森氏痴呆；克罗伊茨费尔特-雅各布病；亨廷顿氏病；以及韦尼克-柯沙可夫综合征。

65. 如权利要求20、27以及28中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株使丁酸盐的水平增加。

66. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述组合物用于经口施用。

67. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

68. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株为冻干的。

69. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述细菌菌株为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。

70. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其中所述组合物包含布劳特氏菌属的单一菌株。

71. 如前述权利要求中任一项所述的组合物，其包含作为微生物菌剂的一部分的所述布劳特氏菌属细菌菌株。

72. 一种包含如前述权利要求中任一项所述的组合物的食物产品，所述食物产品用于如前述权利要求中任一项所述的用途。

73. 一种包含如前述权利要求中任一项所述的组合物的疫苗组合物，所述疫苗组合物用于如前述权利要求中任一项所述的用途。

74. 一种治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法，所述方法包括向有需要的患者施用包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物。

75. 一种治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法，所述方法包括向有需要的患者施用包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物。

76. 一种治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法，所述方法包括向有需要的患者施用包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物。

77. 一种以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞，所述细

胞用于如权利要求1-18、20-22、26-37以及50-55中任一项所述的用途。

78.一种以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于如权利要求1-17、19、23-25以及38-55中任一项所述的用途。

79.一种包含如权利要求77中任一项所述的细胞的组合物,所述组合物用于如权利要求1-18、20-22、26-37以及50-55中任一项所述的用途。

80.一种包含如权利要求78中任一项所述的细胞的组合物,所述组合物用于如权利要求1-17、19、23-25以及38-55中任一项所述的用途。

81.如权利要求79或80所述的组合物,其包含药学上可接受的载体或赋形剂。

包含细菌菌株的组合物

技术领域

[0001] 本发明在包含从哺乳动物消化道分离的细菌菌株的组合物以及此类组合物在疾病治疗中的用途的领域内。

[0002] 发明背景

[0003] 人肠道在子宫内被认为是无菌的,但它在出生之后立即暴露于各种各样的母体和环境微生物。此后,发生微生物定植和演替的动态期受诸如递送模式、环境、膳食以及宿主基因型等因素的影响,所有这些因素均影响肠道微生物丛的组成,特别是在早期生活期间。随后,微生物丛稳定并且变得像成年一样[1]。人肠道微生物丛含有超过500-1000种不同种系型,基本上属于两种主要细菌类群:拟杆菌门和厚壁菌门[2]。由人肠道的细菌定植产生的成功共生关系已产生多种代谢功能、结构功能、保护功能以及其他有益功能。定植的肠道的代谢活性增强确保以其他方式难消化的膳食组分得以降解,并且副产物的释放为宿主提供重要营养来源。类似地,肠道微生物丛的免疫重要性为完全认可的并且例示于具有受损免疫系统的无菌动物中,所述受损免疫系统在引入共生细菌之后在功能上得以重建[3-5]。

[0004] 人微生物群系的大小和复杂性的发现已引起许多健康和疾病概念的持续评估。当然,已在诸如炎性肠道疾病(IBD)等胃肠道病症中记录了微生物丛组成的显著变化[6-9]。最近,对关于在人脑部疾病中可发挥病理生理学作用的肠道微生物群系的改变的技术的兴趣有所增加[10]。临床前和临床证据强烈表明脑部发育与微生物丛之间的联系[11]。

[0005] 越来越多的临床前文献证实脑部与肠道微生物群系之间涉及多个神经分泌和内分泌信号传导系统的双向信号传导。实际上,已将微生物群系中增加的梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)种类水平与脑部病症相联系[12],并且在脑部发育病症中还涉及拟杆菌门与厚壁菌门不平衡[13]。在免疫介导的中枢神经系统(CNS)病症中涉及改变水平的肠道共生物,包括双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、萨特氏菌属(*Sutterella*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)以及瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)的肠道共生物以及产碱菌科(*Alcaligenaceae*)的肠道共生物的暗示因表明在患者与健康受试者之间缺乏微生物丛改变的研究而受到怀疑[14]。这表明,目前,微生物群系与人脑部疾病之间的联系的实际作用未得到充分表征。因此,需要更多直接分析研究来鉴定改变微生物群系对CNS病症的治疗性影响。

[0006] 承认某些细菌菌株可能对动物肠道具有潜在积极影响,已建议将多种菌株用于治疗各种疾病(参见例如[14-17])。另外,已建议将包括大部分乳杆菌属和双歧杆菌属菌株的某些菌株用于治疗不与肠道直接相关的各种炎性和自体免疫性疾病(关于综述,参见[18]和[19])。此外,已在动物模型中研究了一系列益生菌,以确定肠道微生物群系在调节情绪行为中的作用,并且双歧杆菌属和乳杆菌属为显示有益作用、减轻焦虑以及重复行为并且增加社交互动的主要属[20-22]。然而,不同疾病与不同细菌菌株之间的关系以及特定细菌菌株对肠道以及在全身性水平下以及对任何特定类型的疾病的精确作用未得到充分表征,特别是对于中枢神经系统疾病来说。

[0007] 存在越来越多的证据表明在自闭症谱系病症(ASD)以及其他神经发育和神经精神

病症中微生物丛-肠-脑轴受到影响。动物模型已提供对微生物丛如何可参与ASD的深入了解。此外,临床前研究已证实在包括母体免疫活化(MIA)小鼠模型和黑褐色短尾(BTBR)小鼠的动物模型中通过施用有益活生物治疗剂来靶向肠道微生物丛在改善孤独症相关行为中展示功效。BTBR小鼠为基因修饰的近交小鼠品系,展示许多与ASD相关的行为,诸如受损的社交性、重复行为以及增加的焦虑。此外,这些小鼠还展现胃肠功能失调以及肠道微生物丛组成的改变。因此,它代表用于研究微生物丛-肠-脑轴在ASD中的作用的适当动物模型。

[0008] 因此,在本领域中对治疗中枢神经系统病症的新方法存在需要。还需要表征肠道细菌的潜在效应以使得可开发使用肠道细菌的新疗法。

发明内容

[0009] 本发明人已开发用于治疗和预防中枢神经系统病症的新疗法。特别地,本发明人已开发用于治疗和预防由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患的新疗法。特别地,本发明人已确定布劳特氏菌属(Blautia)的细菌菌株可有效治疗和预防由微生物丛-肠-脑轴介导的疾病和疾患。如实施例中所描述,在自闭症谱系病症的小鼠模型中经口施用包含布劳特氏菌属菌株的组合物可减轻与微生物丛-肠-脑轴的功能失调相关的症状。此外,如实施例中所描述,经口施用包含布劳特氏菌属菌株的组合物可调节与微生物丛-肠-脑轴的功能相关的信号传导分子的水平以及神经发育和神经精神病症。

[0010] 因此,在第一实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中的包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。在优选实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中的包含粪便布劳特氏菌(Blautia stercoris)种类的细菌菌株的组合物。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗中枢神经系统病症或疾患特别有效。在某些实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中的包含韦克斯勒布劳特氏菌(Blautia wexlerae)种类的细菌菌株的组合物。在特定实施方案中,中枢神经系统病症或疾患为由微生物丛-肠-脑轴介导的。在其他实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中的包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。在优选实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中的包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗神经发育障碍或神经精神疾患特别有效。在某些实施方案中,本发明提供一种用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中的包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物。本发明人已确定用来自此属的细菌菌株治疗可在中枢神经系统病症,特别是那些由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症的小鼠模型中提供临床益处。本发明人已确定用来自此属的细菌菌株治疗可调节枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导;可调节下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴路径的活性;可调节神经内分泌和/或神经免疫路径;和/或可调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对调节枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导;调节下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴路径的活性;调节神经内分泌和/或神经免疫路径;和/或调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性特别有效。在某些实施方案中,使用韦克斯勒布劳特氏菌的组合物也可为有效的。

[0011] 在特定实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防选自由以下组成的组的疾病或疾患的方法中:自闭症谱系病症(ASD);儿童发育障碍;强迫症(OCD);重度抑郁障碍;抑郁;季节性情感障碍;焦虑障碍;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎);压力障碍;创伤后压力障碍;精神分裂症谱系病症;精神分裂症;双相障碍;精神病;情绪障碍;痴呆;阿尔茨海默氏病(Alzheimer's);帕金森氏病(Parkinson's disease);和/或慢性疼痛。在其他实施方案中,本发明的组合物可适用于治疗或预防多发性硬化;运动神经元病;亨廷顿氏病(Huntington's disease);格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)和/或脑膜炎。来自布劳特氏菌属的细菌菌株对微生物丛-肠-脑轴和对由微生物丛-肠-脑轴介导的疾病的影响可为由微生物丛-肠-脑轴介导的其他疾病和疾患,诸如上文所列的那些疾病和疾患提供治疗益处。在其他实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗与由微生物丛-肠-脑轴介导的疾病和疾患,诸如上文所列的那些疾病和疾患相关的共病的方法中。在特别优选的实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗与由微生物丛-肠-脑轴介导的疾病和疾患,诸如上文所列的那些疾病和疾患相关的胃肠道共病的方法中。本申请中所用的用于评估自闭症谱系病症的症状的小鼠模型实验在本领域中已知可适用于评估其他中枢神经系统病症,包括上文所列的那些中枢神经系统病症的症状[23-25]。

[0012] 在特别优选的实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防诸如自闭症等自闭症谱系病症的方法中。本发明人已确定在自闭症谱系病症的小鼠模型中用布劳特氏菌属菌株治疗可减轻症状严重程度并且可预防或减轻刻板、重复、强迫以及焦虑行为。在优选实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗自闭症谱系病症。使用布劳特氏菌属的组合物可对治疗自闭症谱系病症特别有效。在优选实施方案中,本发明提供一种用于减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为,特别地用于治疗自闭症谱系病症的组合物。在优选实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗自闭症谱系病症的行为症状。在优选实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗自闭症谱系病症的胃肠道症状。在优选实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗自闭症谱系病症的行为和胃肠道症状。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导;可调节HPA轴路径的活性;可调节神经内分泌和/或神经免疫路径;和/或可调节共代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性,自闭症谱系病症的神经病理学中涉及所有这些因素。在某些实施方案中,用布劳特氏菌属菌株治疗可调节催产素和/或升压素激素的水平。在优选实施方案中,本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物,所述组合物用于一种治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗自闭症谱系病症特别有效。在某些实施方案中,本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。

[0013] 在其他优选实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防强迫症(OCD)的方法中。在优选实施方案中,本发明提供一

种用于在OCD的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的组合物。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；和/或可调节共生代谢产物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，OCD的神经病理学中涉及所有这些因素。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防OCD的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗OCD特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防OCD的方法中。

[0014] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防重度抑郁障碍（MDD）的方法中。用布劳特氏菌属菌株治疗可在抑郁小鼠模型中提供临床益处。在优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗抑郁。使用布劳特氏菌属菌株的组合物可对治疗抑郁特别有效。在优选实施方案中，本发明提供一种用于在抑郁的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的组合物。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，MDD的神经病理学中涉及所有这些因素。在某些实施方案中，用布劳特氏菌属菌株治疗可调节催产素和/或升压素激素的水平。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防MDD的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗MDD特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防MDD的方法中。

[0015] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。在本申请的实例中在焦虑症的小鼠模型中用布劳特氏菌属菌株治疗可降低发病率和疾病严重程度。在优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗焦虑障碍。使用布劳特氏菌属菌株的组合物可对治疗焦虑障碍特别有效。在优选实施方案中，本发明提供一种用于在焦虑症的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的组合物。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗焦虑障碍特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。

[0016] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防诸如创伤后压力障碍等压力障碍的方法中。在压力障碍的小鼠模型中包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物可减小压力。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，压力障碍的神经病理学中涉及所有这些因素。在某些实施方案中，用布劳特氏菌属菌株治疗可调节催产素和/或升压素激素的水平。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗

或预防压力障碍的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗压力障碍特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防压力障碍的方法中。

[0017] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防诸如精神分裂症等精神分裂症谱系和精神病性障碍的方法中。包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物可改善精神分裂症谱系和精神病性障碍的小鼠模型中的阳性和阴性症状。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，精神分裂症谱系和精神病性障碍的神经病理学中涉及所有这些因素。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防精神分裂症谱系和精神病性障碍的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗精神分裂症谱系和精神病性障碍特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防精神分裂症谱系和精神病性障碍的方法中。

[0018] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防双相障碍的方法中。包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物在双相障碍的小鼠模型中可减少躁狂症和/或抑郁症的发生。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，双相障碍的神经病理学中涉及所有这些因素。在某些实施方案中，用布劳特氏菌属菌株治疗可调节催产素和/或升压素激素的水平。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防双相障碍的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗双相障碍特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防双相障碍的方法中。

[0019] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防诸如阿尔茨海默氏病等神经认知障碍的方法中。包含布劳特氏菌属种类的细菌菌株的组合物在神经认知障碍的小鼠模型中可改善认知和行为功能。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，神经认知障碍的神经病理学中涉及所有这些因素。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗神经认知障碍特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。

[0020] 在其他优选实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防帕金森氏病的方法中。包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物在帕金森氏病的小鼠模型中可改善运动和认知功能。用布劳特氏菌属菌株治疗可调节

中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；可调节HPA轴路径的活性；可调节神经内分泌和/或神经免疫路径；并且可调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性，帕金森氏病的神经病理学中涉及所有这些因素。在某些实施方案中，用布劳特氏菌属菌株治疗可调节催产素和/或升压素激素的水平。在优选实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防帕金森氏病的方法中。使用粪便布劳特氏菌的组合物可对治疗帕金森氏病特别有效。在某些实施方案中，本发明提供一种包含韦克斯勒布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防帕金森氏病的方法中。

[0021] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌 (*Blautia hydrogenotrophica*) 种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗中枢神经系统病症或疾患特别有效。

[0022] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗神经发育障碍或神经精神疾患特别有效。

[0023] 使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对调节中枢神经系统、自主神经系统以及肠道神经系统中的信号传导；调节下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴路径的活性；调节神经内分泌和/或神经免疫路径；和/或调节共生代谢产物、炎性标记物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性特别有效。在一个特别优选的实施方案中，嗜氢布劳特氏菌调节丁酸盐的水平。在某些实施方案中，丁酸盐水平的调节可治疗或预防中枢神经系统病症或疾患。

[0024] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗自闭症谱系病症特别有效。

[0025] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防OCD的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗OCD特别有效。

[0026] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防MDD的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗MDD特别有效。

[0027] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防焦虑障碍的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗焦虑障碍特别有效。

[0028] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防压力障碍的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗压力障碍特别有效。

[0029] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防精神分裂症谱系和精神病性障碍的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗精神分裂症谱系和精神病性障碍特别有效。

[0030] 在某些实施方案中，本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合

物,所述组合物用于治疗或预防双相障碍的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗双相障碍特别有效。

[0031] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防神经认知障碍的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗神经认知障碍特别有效。

[0032] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的细菌菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防帕金森氏病的方法中。使用嗜氢布劳特氏菌的组合物可对治疗帕金森氏病特别有效。

[0033] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于在由微生物丛-肠-脑轴介导的疾病或疾患的治疗或预防中调节微生物丛-肠-脑轴的方法中。特别地,可使用本发明的组合物在自闭症谱系病症;强迫症;重度抑郁障碍;焦虑障碍;压力障碍;精神分裂症谱系病症;双相障碍;神经认知障碍以及帕金森氏病的治疗或预防中调节微生物丛-肠-脑轴。

[0034] 在本发明的优选实施方案中,组合物中的细菌菌株属于粪便布劳特氏菌。还可使用密切相关的菌株,诸如具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列的细菌菌株。优选地,细菌菌株具有与SEQ ID N0:1或2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是对于SEQ ID N0:2。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有由SEQ ID N0:2表示的16s rRNA序列。

[0035] 在本发明的优选实施方案中,组合物中的细菌菌株属于韦克斯勒布劳特氏菌。还可使用密切相关的菌株,诸如具有与韦克斯勒布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列的细菌菌株。优选地,细菌菌株具有与SEQ ID N0:3或4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是对于SEQ ID N0:4。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有由SEQ ID N0:4表示的16s rRNA序列。

[0036] 在本发明的优选实施方案中,组合物中的细菌菌株属于嗜氢布劳特氏菌。还可使用密切相关的菌株,诸如具有与嗜氢布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列的细菌菌株。优选地,细菌菌株具有与SEQ ID N0:7至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。最优先地,组合物中的细菌菌株为以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株。

[0037] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于经口施用。经口施用本发明菌株可有效治疗中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的那些中枢神经系统病症和疾患。另外,经口施用对于患者和从业者来说为方便的并且允许递送至肠道和/或部分或全部定植于肠道。

[0038] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体。

[0039] 在某些实施方案中,本发明的组合物包含已冻干的细菌菌株。冻干为用于制备允许递送细菌的稳定组合物的有效并且方便的技术。

[0040] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含如上文所描述的组合物的食物产品。

[0041] 在某些实施方案中,本发明提供一种包含如上文所描述的组合物的疫苗组合物。

[0042] 另外,本发明提供一种治疗或预防由微生物丛-肠-脑轴功能失调介导的疾病或疾患的方法,所述方法包括施用包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物。

[0043] 在开展以上发明时,本发明人已鉴定和表征特别适合用于治疗的细菌菌株。本发明的粪便布劳特氏菌菌株显示有效治疗本文所描述的疾病,诸如自闭症谱系病症。因此,在另一方面中,本发明提供一种以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供包含此类细胞的组合物,或此类细胞的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0044] 在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42381保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42381保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42381保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症或优选为自闭症的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42381保藏的菌株的组合物,所述组合物用于尤其在自闭症的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的方法中。

[0045] 在开展以上发明时,本发明人已鉴定并且表征对于疗法特别适用的另一细菌菌株。本发明的韦克斯勒布劳特氏菌菌株显示有效治疗本文所描述的疾病,诸如自闭症谱系病症。因此,在另一方面中,本发明提供一种以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供包含此类细胞的组合物,或此类细胞的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0046] 在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42486保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42486保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42486保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症或优选为自闭症的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号NCIMB 42486保藏的菌株的组合物,所述组合物用于尤其在自闭症的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的方法中。

[0047] 在开展以上发明时,本发明人已鉴定并且表征特别适合用于治疗的细菌菌株。本发明的嗜氢布劳特氏菌菌株显示有效治疗本文所描述的疾病,诸如自闭症谱系病症。因此,在另一方面中,本发明提供一种以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞。本发明还提供包含此类细胞的组合物,或此类细胞的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0048] 在尤其优选的实施方案中,本发明提供一种包含以登录号DSM14294保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中,本发明提供包含以登录号DSM 14294保藏的菌株的组合物,所述组合物用于治疗

或预防神经发育障碍或神经精神疾患的方法中。在尤其优选的实施方案中，本发明提供一种包含以登录号DSM 14294保藏的菌株的组合物，所述组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症或优选为自闭症的方法中。在尤其优选的实施方案中，本发明提供一种包含以登录号DSM14294保藏的菌株的组合物，所述组合物用于尤其在自闭症的治疗中减轻刻板、重复、强迫或焦虑行为的方法中。

附图说明

- [0049] 图1:在3-室测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。*p<0.05,新颖相较于熟悉(A),并且**p<0.01,物体相较于动物(B)。
- [0050] 图2:在强迫游泳测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。Mrx006显著不同于媒介物组,**p<0.01;媒介物组显著不同于原初组,##p<0.01。
- [0051] 图3:在悬尾测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。
- [0052] 图4:在恐惧条件化测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。*MRX006显著不同于媒介物组;#媒介物显著不同于原初组;*p<0.05,#p<0.05,##p<0.01,###p<0.001。
- [0053] 图5:在新颖物体识别测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。#,相较于组内的熟悉物体显著不同;#p<0.05。
- [0054] 图6:在埋珠测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。
- [0055] 图7:在高架十字迷宫测试中用MRX006处理对C57B1/6小鼠的影响。
- [0056] 图8:用MRX006处理对C57B1/6小鼠中压力诱导的体温过高的影响。#媒介物组显著不同于原初组,#p<0.05。
- [0057] 图9:用MRX006处理对C57B1/6小鼠中的循环催产素水平的影响。*Mrx006显著不同于媒介物组,*p<0.05。
- [0058] 图10:用MRX006处理对C57B1/6小鼠中的皮质甾酮血浆水平的影响。*显著不同于原初(A)或媒介物(B)组,*p<0.05。
- [0059] 图11:用MRX006处理对C57B1/6小鼠的肠道渗透性的影响。
- [0060] 图12:用MRX006处理对C57B1/6小鼠的器官重量和结肠长度的影响。
- [0061] 图13:在三室社交互动测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。##p<0.01,相对于组内的相应小鼠。###p<0.001,相对于组内的相应小鼠.*p<0.05,相对于媒介物组。
- [0062] 图14:在强迫入侵者测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。
- [0063] 图15:在埋珠测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。*p<0.05,如通过事前比较相对于媒介物组所测定。
- [0064] 图16:在梳理测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。*p<0.05,相对于媒介物组。**p<0.01,如通过事前比较相对于媒介物组所揭示。
- [0065] 图17:在高架十字迷宫测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。
- [0066] 图18:在旷场场地中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。*p<0.05,相对于媒介物组。
- [0067] 图19:在强迫游泳测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。
- [0068] 图20:在雌性尿液嗅闻测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。#p<0.05,相对于水媒介物组。**p<0.01,相对于媒介物组。
- [0069] 图21:在新颖物体识别测试中用MRX006处理对BTBR小鼠的影响。

- [0070] 图22:用MRX006处理对BTBR小鼠的离体胃肠道渗透性的影响。
- [0071] 图23:用MRX006处理对BTBR小鼠的体内胃肠道渗透性的影响。
- [0072] 图24:用MRX006处理对BTBR小鼠的体内胃肠道活力的影响。*p<0.05,如通过事前比较相对于媒介物组所揭示。
- [0073] 图25:用MRX006处理对BTBR小鼠中的压力诱导的皮质甾酮血浆水平的影响。
- [0074] 图26:用MRX006处理对BTBR小鼠的器官重量和结肠长度的影响。
- [0075] 图27用MRX006处理对BTBR小鼠随时间推移的重量的影响。
- [0076] 图28:在MIA小鼠模型中用Mrx006长期处理使埋藏弹珠的数目减少。#p<0.05,相对于对照组;**p<0.01,相对于媒介物MIA组。
- [0077] 图29:在食物偏好社交传递测试中用MRX006长期处理对MIA小鼠的社交性的影响。
- [0078] 图30:用MRX006长期处理使MIA小鼠中由暴露于旷场场地引起的压力诱导的自主活动性减弱。##p<0.01,相对于对照组,*p<0.05,相对于媒介物MIA组。
- [0079] 图31:在雌性尿液嗅闻测试中用MRX006长期处理对MIA小鼠的抑郁样行为的影响。&p<0.05相对于相应水组。
- [0080] 图32:用MRX006处理对MIA小鼠的体内胃肠道活力的影响。
- [0081] 图33:用MRX006处理对MIA小鼠的器官重量和结肠长度的影响。
- [0082] 图34:用MRX006处理对BTBR小鼠中的循环细胞因子浓度的影响。
- [0083] 图35:在埋珠测试中用MRX008处理对MIA小鼠的影响。##p<0.01,相对于对照组。
- [0084] 图36:在食物偏好社交传递测试中用MRX008长期处理对MIA小鼠的影响。
- [0085] 图37:在强迫游泳测试中用MRX008长期处理对MIA小鼠的影响。
- [0086] 图38:用MRX008长期处理对肠道渗透性的影响。
- [0087] 图39:用MRX008长期处理对肠道活力的影响。##p<0.01,相对于对照组。
- [0088] 图40:在食物偏好社交传递测试中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。
- [0089] 图41:在强迫入侵者测试中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。
- [0090] 图42:在埋珠测试中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。
- [0091] 图43:在高架十字迷宫中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。
- [0092] 图44:在旷场场地中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。*p<0.05,如通过事前成对比较相对于媒介物组所揭示。
- [0093] 图45:在强迫游泳测试中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的影响。
- [0094] 图46:在雌性尿液嗅闻测试中用MRX008长期处理对BTBR小鼠的抑郁样行为的影响。##p<0.01,相对于水媒介物组。
- [0095] 图47:用MRX008长期处理对BTBR小鼠的体内肠道活力的影响。
- [0096] 图48:用MRX008长期处理对BTBR小鼠中的选择性解剖学标记物的影响。
- [0097] 图49:用MRX006长期处理对BTBR小鼠的下丘脑中的催产素、升压素以及其相应受体的表达的影响。*p<0.05,相对于媒介物组。
- [0098] 图50:用MRX006长期处理对BTBR小鼠的杏仁核中的催产素、升压素以及其相应受体的表达的影响。*p<0.05,相对于媒介物组。
- [0099] 图51:在旷场场地中用嗜氢布劳特氏菌和丁酸盐长期处理对BTBR小鼠的影响。图51B、图51D、图51F以及图51H中的数据分别与图51A、图51C、图51E以及图51G中的数据相同，

除了已将PBS和LYO对照数值汇集在一起。 $p \leq 0.05$:*,相较于C57BL/6(相同处理,在适用的情况下);#,相较于PBS相同基因型;§BTBR:But相较于PBS或Bact相较于Lyo。PBS为丁酸盐施用的阴性对照;LYO为细菌(嗜氢布劳特氏菌)施用的阴性对照;BUT为丁酸盐的实验施用;BACT为嗜氢布劳特氏菌的实验施用。

[0100] 图52:在埋珠测试中用嗜氢布劳特氏菌和丁酸盐长期处理对BTBR小鼠的影响。图52B中的数据与图52A中的数据相同,除了已将PBS和LYO对照数值汇集在一起。 $p \leq 0.05$:*,相较于C57BL/6(相同处理,在适用的情况下);#,相较于PBS相同基因型;§BTBR:But相较于PBS或Bact相较于Lyo。PBS为丁酸盐施用的阴性对照;LYO为细菌(嗜氢布劳特氏菌)施用的阴性对照;BUT为丁酸盐的实验施用;BACT为嗜氢布劳特氏菌的实验施用。

[0101] 图53:在挖掘测试中用嗜氢布劳特氏菌和丁酸盐长期处理对BTBR小鼠的影响。图53A示出了挖掘所用时间,而图53B示出了挖掘次数。 $p \leq 0.05$:*,相较于C57BL/6(相同处理,在适用的情况下);#,相较于PBS相同基因型;§BTBR:But相较于PBS或Bact相较于Lyo。PBS为丁酸盐施用的阴性对照;LYO为细菌(嗜氢布劳特氏菌)施用的阴性对照;BUT为丁酸盐的实验施用;BACT为嗜氢布劳特氏菌的实验施用。

[0102] 图54:在自我梳理测试中用嗜氢布劳特氏菌和丁酸盐长期处理对BTBR小鼠的影响。图54A示出了梳理所用时间;图54C示出了梳理次数,并且图54E示出了每一次的梳理所用时间。图54B、图54D以及图54F中的数据分别与图54A、图54C以及图54E相同,除了已将PBS和LYO对照数值汇集在一起。 $p \leq 0.05$:*,相较于C57BL/6(相同处理,在适用的情况下);#,相较于PBS相同基因型;§BTBR:But相较于PBS或Bact相较于Lyo。PBS为丁酸盐施用的阴性对照;LYO为细菌(嗜氢布劳特氏菌)施用的阴性对照;BUT为丁酸盐的实验施用;BACT为嗜氢布劳特氏菌的实验施用。

[0103] 图55:嗜氢布劳特氏菌(每天 10^{10} 个持续14天)对健康HIM大鼠的盲肠内容物中的短链脂肪酸产量(RMN ^1H)的影响。

[0104] 图56:用包含嗜氢布劳特氏菌(Blautix)的组合物处理28天或未用其处理的IBS-HMA大鼠的粪便样品中的嗜氢布劳特氏菌群体的qPCR评估。

[0105] 图57:用嗜氢布劳特氏菌(Blautix)处理28天或未用其处理的IBS-HMA大鼠的盲肠样品中的短链脂肪酸(SCFA)浓度。图57A示出了总SCFA的浓度。图57B示出了乙酸、丙酸以及丁酸的浓度。

[0106] 图58:在三室测试中用嗜氢布劳特氏菌和丁酸盐长期处理对BTBR小鼠的影响。图58A示出了施用对社交性(嗅闻物体或另一小鼠的偏好)的影响,而图58B示出了社交新颖性的偏好(即相较于熟悉小鼠嗅闻新的小鼠)。 $p \leq 0.05$:S,相较于50%:*,相较于C57BL/6(相同处理,在适用的情况下);#,相较于PBS相同基因型;§BTBR:But相较于PBS或Bact相较于Lyo。PBS为丁酸盐施用的阴性对照;LYO为细菌(嗜氢布劳特氏菌)施用的阴性对照;BUT为丁酸盐的实验施用;BACT为嗜氢布劳特氏菌的实验施用。图59:用MRX006长期处理对下丘脑细胞系中催产素和催产素受体的表达的影响。

[0107] 图60:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对结肠中的离体胃肠道渗透性和紧密连接物表达的影响。

[0108] 图61:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对回肠中的离体胃肠道渗透性和紧密连接物表达的影响。

- [0109] 图62:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对盲肠短链脂肪酸产量的影响。
- [0110] 图63:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对脾细胞的细胞因子表达的影响。
- [0111] 图64:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对氨基酸的血浆水平的影响。
- [0112] 图65:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对脑干中的神经递质水平的影响。
- [0113] 图66:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对海马神经递质受体的基因表达的影响。
- [0114] 图67:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对杏仁核神经递质受体的基因表达的影响。
- [0115] 图68:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对前额叶皮质神经递质受体的基因表达的影响。
- [0116] 图69:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对海马中炎性标记物的基因表达的影响。
- [0117] 图70:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对杏仁核中炎性标记物的基因表达的影响。
- [0118] 图71:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对前额叶皮质中炎性标记物的基因表达的影响。
- [0119] 图72:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对海马内分泌标记物的基因表达的影响。
- [0120] 图73:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对杏仁核内分泌标记物的基因表达的影响。
- [0121] 图74:在BALBc小鼠模型中用MRX006长期处理对前额叶皮质内分泌标记物的基因表达的影响。
- [0122] 图75:在MIA小鼠模型中用MRX006长期处理对结肠和回肠的体内胃肠道渗透性的影响。
- [0123] 图76:在MIA小鼠中在三室社交互动测试中用MRX006处理对社交新颖性的影响。
- [0124] 图77:在MIA小鼠中在三室社交互动测试中用MRX006处理对社交偏好的影响。
- [0125] 图78:在梳理测试中用MRX006处理对MIA小鼠的影响。
- [0126] 图79:在高架十字迷宫测试中用MRX006处理对MIA小鼠的影响。
- [0127] 图80:在强迫游泳测试中用MRX006处理对MIA小鼠的影响。
- [0128] 图81:用MRX006处理对MIA小鼠中的压力诱导的皮质甾酮血浆水平的影响。
- [0129] 本发明的公开内容
- [0130] 细菌菌株
- [0131] 本发明的组合物包含布劳特氏菌属的细菌菌株。实例证实此种类的细菌适用于治疗或预防由微生物丛-肠-脑轴介导的自闭症谱系病症和中枢神经系统病症。本申请中用于评估自闭症谱系病症的症状的小鼠模型实验在本领域中已知可适用于评估包括上文所列的那些的其他中枢神经系统病症的症状。
- [0132] 本发明提供一种包含布劳特氏菌属的细菌菌株的组合物，所述组合物用于疗法中，例如用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患，特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患。在某些实施方案中，本发明的组合物包含布劳特氏菌属的菌株并

且不含任何其他细菌属。在某些实施方案中，本发明的组合物包含布劳特氏菌属的单一菌株并且不含任何其他细菌菌株、属或种类。

[0133] 用于本发明中的布劳特氏菌属菌株的实例包括粪便布劳特氏菌、粪布劳特氏菌(*B. faecis*)、球形布劳特氏菌(*B. coccoides*)、哥鲁色布劳特氏菌(*B. glucerasea*)、汉逊布劳特氏菌(*B. hansenii*)、嗜氢布劳特氏菌、鲁提布劳特氏菌(*B. lutii*)、延长布劳特氏菌(*B. producta*)、施氏布劳特氏菌(*B. schinkii*)以及韦克斯勒布劳特氏菌。优选种类为粪便布劳特氏菌、韦克斯勒布劳特氏菌以及嗜氢布劳特氏菌。布劳特氏菌属种类为革兰氏反应阳性、非能动细菌，所述革兰氏反应阳性、非能动细菌可为球形或椭圆形的并且全部为产生乙酸作为葡萄糖发酵的主要终产物的专性厌氧微生物[26]。布劳特氏菌属可为从人肠道分离的，不过延长布劳特氏菌为从败血病样品分离的。粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1^T的16S rRNA基因序列的GenBank登录号为HM626177(本文中以SEQ ID NO:1形式公开)。[27]中描述了示例性粪便布劳特氏菌菌株。韦克斯勒布劳特氏菌的典型菌株为WAL 14507=ATCC BAA-1564=DSM 19850[28]。韦克斯勒布劳特氏菌菌株WAL 14507T的16S rRNA基因序列的GenBank登录号为EF036467(本文中以SEQ ID NO:3形式公开)。[28]中描述了此示例性韦克斯勒布劳特氏菌菌株。

[0134] 实施例中测试了以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌并且本文中也称为MRX006(菌株830)。术语“MRX006”、“MRx0006”、“Mrx006”、“Mrx0006”以及菌株830在本文中可互换使用。SEQ ID NO:2中提供了所测试的MRX006(830菌株)的16S rRNA序列。MRX006(菌株830)由GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)于2015年3月12日以“粪便布劳特氏菌830”形式保藏于国际保藏机构NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)并且被分配登录号NCIMB 42381。GT Biologics Ltd. 后来更名为4D Pharma Research Limited。

[0135] MRX006(菌株830)的基因组包含染色体和质粒。SEQ ID NO:5中提供了MRX006(菌株830)的染色体序列。SEQ ID NO:6中提供了MRX006(菌株830)的质粒序列。这些序列是使用PacBio RS II平台产生的。

[0136] 实施例中测试了以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌细菌并且在本文中也称为菌株MRX008。术语“MRX008”、“MRx0008”、“Mrx008”以及“Mrx0008”在本文中可互换使用。SEQ ID NO:4中提供了所测试的MRX008菌株的16S rRNA序列。菌株MRX008由4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)于2015年11月16日以“布劳特氏菌属/瘤胃球菌属”形式保藏于国际保藏机构NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)并且被分配登录号NCIMB 42486。

[0137] 本发明的另一优选菌株为以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌细菌。此菌株以登录号DSM 14294以“S5a33”形式于2001年5月10日保藏于Deutsche Sammlung von Mikroorganismen[德国微生物保藏中心](Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany)。保藏人为INRA Laboratoire de Microbiologie CR de Clermont-Ferrand/Theix63122 Saint Genès Champanelle, France。已通过分配将保藏物的所有权转给4D Pharma Plc。4D Pharma Plc已通过协议批准4D Pharma Research Limited在申请中提到所保藏的生物材料并且已无保留并且不可撤回地同意使得保藏材料为公众可获得的。登录

号DSM 14294下的保藏物于2000年5月11日公布并且。

[0138] 实施例中测试了以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌细菌并且为本发明的优选菌株。

[0139] 与实施例中所测试的菌株密切相关的细菌菌株也预期有效治疗或预防自闭症谱系病症以及中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与粪便布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID N0:1或2至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是对于SEQ ID N0:2。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有由SEQ ID N0:2表示的16s rRNA序列。在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与韦克斯勒布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID N0:3或4至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,序列同一性是对于SEQ ID N0:4。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有由SEQ ID N0:4表示的16s rRNA序列。

[0140] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体。在优选实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有在SEQ ID N0:5的至少60%(例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的范围内与SEQ ID N0:5具有至少90%序列同一性(例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的染色体。举例来说,用于本发明中的细菌菌株所具有的染色体可在SEQ ID N0:5的70%中与SEQ ID N0:5具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的80%中与SEQ ID N0:5具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的90%中与SEQ ID N0:5具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的100%中与SEQ ID N0:5具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的70%中与SEQ ID N0:5具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的80%中与SEQ ID N0:5具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的90%中与SEQ ID N0:5具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的100%中与SEQ ID N0:5具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的70%中与SEQ ID N0:5具有至少98%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的80%中与SEQ ID N0:5具有至少98%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的90%中与SEQ ID N0:5具有至少98%序列同一性,或在SEQ ID N0:5的100%中与SEQ ID N0:5具有至少98%序列同一性。

[0141] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒。在优选实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有在SEQ ID N0:6的至少60%(例如至少65%、70%、75%、80%、85%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的范围内与SEQ ID N0:6具有至少90%序列同一性(例如至少92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性)的质粒。举例来说,用于本发明中的细菌菌株所具有的质粒可在SEQ ID N0:6的70%中与SEQ ID N0:6具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的80%中与SEQ ID N0:6具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的90%中与SEQ ID N0:6具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的100%中与SEQ ID N0:6具有至少90%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的70%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的80%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的90%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID N0:6的100%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性。

80%中与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID NO:6的90%中与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID NO:6的100%中与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性,或在SEQ ID NO:6的70%中与SEQ ID NO:6具有至少98%序列同一性,或在SEQ ID NO:6的80%中与SEQ ID NO:6具有至少98%序列同一性,或在SEQ ID NO:6的100%中与SEQ ID NO:6具有至少98%序列同一性。

[0142] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID NO:5具有序列同一性的染色体以及与SEQ ID NO:6具有序列同一性的质粒。

[0143] 作为以登录号42381保藏的细菌的生物型的细菌菌株也预期有效治疗或预防自闭症谱系病症以及中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。作为以登录号42486保藏的细菌的生物型的细菌菌株也预期有效治疗或预防自闭症谱系病症以及中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。生物型为具有相同或非常类似生理和生物化学特征的密切相关的菌株。

[0144] 作为以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株可通过对以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的其他核苷酸序列进行测序来鉴定。举例来说,大体上可对整个基因组进行测序,并且用于本发明中的生物型菌株可在其整个基因组的至少80%中(例如在至少85%、90%、95%或99%中,或在其整个基因组中)具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。举例来说,在一些实施方案中,生物型菌株在其基因组的至少98%中具有至少98%序列同一性或在其基因组的99%中具有至少99%序列同一性。其他适合用于鉴定生物型菌株的序列可包括hsp60或重复序列,诸如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP或[29]。生物型菌株可具有与以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列。

[0145] 在一些实施方案中,生物型菌株具有与以NCIMB 42381保藏的菌株MRX006的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且包含与SEQ ID NO:2至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有与以NCIMB 42381保藏的菌株MRX006的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且具有SEQ ID NO:2的16S rRNA序列。

[0146] 在一些实施方案中,生物型菌株具有与以NCIMB 42486保藏的菌株MRX008的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且包含与SEQ ID NO:4至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有与以NCIMB 42486保藏的菌株MRX008的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且具有SEQ ID NO:4的16S rRNA序列。

[0147] 或者,作为以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株可通过使用登录号NCIMB 42381保藏物或登录号NCIMB 42486保藏物以及限制片段分析和/或PCR分析来鉴定,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性(FAFLP)和重复DNA

元件(rep)-PCR指纹分析或蛋白质表达谱分析或部分16S或23s rDNA测序来进行。在优选实施方案中,可使用此类技术来鉴定其他粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌菌株。

[0148] 在某些实施方案中,作为以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株为如下菌株,所述菌株当通过扩增核糖体DNA限制分析(ARDRA)进行分析时,例如当使用Sau3AI限制酶时提供与以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌相同的模式(关于示例性方法和指导参见例如[30])。或者,生物型菌株经鉴定为如下菌株,所述菌株具有与以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌相同的碳水化合物发酵模式。

[0149] 适合用于本发明的组合物和方法中的其他粪便布劳特氏菌菌株,诸如以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型可使用包括实施例中所描述的分析的任何适当的方法或策略来鉴定。举例来说,可通过在厌氧YCFA中培养和/或将向自闭症谱系病症小鼠模型施用细菌并且然后评估细胞因子水平来鉴定用于本发明中的菌株。特别地,与以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌具有类似生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可适用于本发明中。适用菌株将具有与NCIMB 42381或42486菌株类似的免疫调节活性。特别地,生物型菌株将对自闭症谱系病症模型引发与实施例中所示的效应类似的效应,这可通过使用实施例中所描述的培养和施用方案来鉴定。

[0150] 本发明的特别优选的菌株为以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株。这种菌株是实施例中所测试的示例性MRX006菌株并且显示有效治疗疾病。因此,本发明提供一种以登录号NCIMB42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,诸如分离的细胞。本发明还提供一种包含以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞的组合物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0151] 本发明的特别优选的菌株为以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株。这是实施例中所测试的示例性MRX008菌株并且显示有效治疗疾病。因此,本发明提供一种以登录号NCIMB42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,诸如分离的细胞。本发明还提供一种包含以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞的组合物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0152] 以登录号NCIMB 42381或42486保藏的菌株的衍生物可为子代菌株(子代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。以登录号NCIMB42381或42486保藏的菌株的衍生物可为子代菌株(子代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。本发明的菌株的衍生物可例如在不消除生物活性的情况下在基因层面上加以修饰。特别地,本发明的衍生菌株具治疗活性。衍生菌株将具有与原始NCIMB 42381或42486菌株类似的免疫调节活性。特别地,衍生菌株将对中枢神经系统病症或疾患模型引发与实施例中所示的效应类似的效应并且对细胞因子水平引发类似效应,这可通过使用实施例中所描述的培养和施用方案来鉴定。NCIMB 42381菌株的衍生物通常将为NCIMB 42381菌株的生物型。NCIMB 42486菌株的衍生物通常将为NCIMB 42486菌株的生物型。

[0153] 提到以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的细胞涵盖与以登录号

NCIMB 42381保藏的菌株具有相同安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且此类细胞由本发明涵盖。因此,在一些实施方案中,提到以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的细胞仅指以NCIMB 42381保藏的MRX006菌株,而不指不以NCIMB42381保藏的细菌菌株。在一些实施方案中,提到以登录号NCIMB42381保藏的粪便布劳特氏菌菌株的细胞指与以登录号NCIMB42381保藏的菌株具有相同安全性和治疗功效特征但不以NCIMB42381保藏的菌株的细胞。

[0154] 提到以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株的细胞涵盖与以登录号NCIMB 42486保藏的菌株具有相同安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且此类细胞由本发明涵盖。因此,在一些实施方案中,提到以登录号NCIMB 42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株的细胞仅指以NCIMB 42486保藏的菌株,而不指不以NCIMB42486保藏的细菌菌株。在一些实施方案中,提到以登录号NCIMB42486保藏的韦克斯勒布劳特氏菌菌株的细胞是指与以登录号NCIMB 42486保藏的菌株具有相同安全性和治疗功效特征但不以NCIMB 42486保藏的菌株的细胞。

[0155] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体;以及例如如上文所描述与SEQ ID NO:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,优选具有与SEQ ID NO:2或4至少99%同一的16s rRNA序列,更优选所述细菌菌株包含SEQ ID NO:2或4的16S rRNA序列。

[0156] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0157] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体;以及例如如上文所描述与SEQ ID NO:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0158] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与由SEQ ID NO:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID NO:2或4的16S rRNA序列);以及在SEQ ID NO:5的至少90%中与SEQ ID NO:5具有至少95%序列同一性的染色体,并且所述细菌菌株有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0159] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株为粪便布劳特氏菌并且具有与由SEQ ID NO:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID NO:2或4的16S rRNA序列);以及在SEQ ID NO:5的至少98%中(例如在至少99%或至少99.5%中)与SEQ ID NO:5具有至少98%序列同一性(例如至少99%或至少99.5%序列同一性)的染色体,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0160] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒;以及例如如上文所描述与SEQ ID NO:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,优选具有与SEQ ID NO:2或4至少99%同一的16s rRNA序列,更优选所述细菌菌株包含SEQ ID NO:2或4的16S rRNA序列。

[0161] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0162] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒;以及例如如上文所描述与SEQ ID N0:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0163] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与由SEQ ID N0:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID N0:2或4的16S rRNA序列);以及在SEQ ID N0:6的至少90%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性的质粒,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0164] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株为粪便布劳特氏菌并且具有与由SEQ ID N0:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID N0:2或4的16S rRNA序列);以及在SEQ ID N0:6的至少98%中(例如在至少99%或至少99.5%中)与SEQ ID N0:6具有至少98%序列同一性的质粒(例如至少99%或至少99.5%序列同一性),并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0165] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体;例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒;以及例如如上文所描述与SEQ ID N0:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,优选具有与SEQ ID N0:2或4至少99%同一的16s rRNA序列,更优选所述细菌菌株包含SEQ ID N0:2或4的16S rRNA序列。

[0166] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体;以及例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0167] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有例如如上文所描述与SEQ ID N0:5具有序列同一性的染色体;例如如上文所描述与SEQ ID N0:6具有序列同一性的质粒;以及例如如上文所描述与SEQ ID N0:1、2、3或4具有序列同一性的16S rRNA序列,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0168] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与由SEQ ID N0:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID N0:2或4的16S rRNA序列);在SEQ ID N0:5的至少90%中与SEQ ID N0:5具有至少95%序列同一性的染色体;以及在SEQ ID N0:6的至少90%中与SEQ ID N0:6具有至少95%序列同一性的质粒,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0169] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株为粪便布劳特氏菌并且具有与由

SEQ ID NO:2或4表示的16s rRNA序列至少99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列(例如所述细菌菌株包含SEQ ID NO:2或4的16S rRNA序列);在SEQ ID NO:5的至少98%中(例如在至少99%或至少99.5%中)与SEQ ID NO:5具有至少98%序列同一性(例如至少99%或至少99.5%序列同一性)的染色体;以及在SEQ ID NO:6的至少98%中(例如在至少99%或至少99.5%中)与SEQ ID NO:6具有至少98%序列同一性(例如至少99%或至少99.5%序列同一性)的质粒,并且有效治疗或预防中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0170] 在优选实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。

[0171] 已从哺乳动物的肠道分离的嗜氢布劳特氏菌(先前称为嗜氢瘤胃球菌(*Ruminococcus hydrogenotrophicus*))为严格厌氧的,并且将H₂/CO₂代谢为乙酸盐,乙酸盐对于人体营养和健康而言可为重要的。嗜氢布劳特氏菌的典型菌株为S5a33=JCM 14656。嗜氢布劳特氏菌菌株S5a36的16S rRNA基因序列的GenBank登录号为X95624.1(在本文中以SEQ ID NO:7形式公开)。[28]和[31]中描述了此示例性嗜氢布劳特氏菌菌株。S5a33菌株和S5a36菌株对应于从健康受试者的粪便样品分离的菌株的两个亚克隆。它们显示相同形态、生理学以及代谢并且具有相同16S rRNA序列。因此,在一些实施方案中,用于本发明中的嗜氢布劳特氏菌具有SEQ ID NO:7的16S rRNA序列。

[0172] 在某些实施方案中,用于本发明中的细菌菌株具有与嗜氢布劳特氏菌的细菌菌株的16s rRNA序列至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有与SEQ ID NO:7至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%同一的16s rRNA序列。优选地,用于本发明中的细菌菌株具有由SEQ ID NO:7表示的16s rRNA序列。

[0173] 作为以登录号DSM 14294保藏的细菌的生物型的细菌菌株也预期有效治疗或预防自闭症谱系病症以及中枢神经系统病症和疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症和疾患。

[0174] 作为以登录号DSM 14294保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株可通过对以登录号DSM 14294保藏的细菌的其他核苷酸序列进行测序来鉴定。举例来说,大体上可对整个基因组进行测序,并且用于本发明中的生物型菌株可在其整个基因组的至少80%中(例如在至少85%、90%、95%或99%中,或在其整个基因组中)具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性。举例来说,在一些实施方案中,生物型菌株在其基因组的至少98%中具有至少98%序列同一性或在其基因组的99%中具有至少99%序列同一性。其他适合用于鉴定生物型菌株的序列可包括hsp60或重复序列,诸如BOX、ERIC、(GTG)₅或REP或[29]。生物型菌株可具有与以登录号DSM 14294保藏的细菌的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列。

[0175] 在一些实施方案中,生物型菌株具有与以登录号DSM 14294保藏的菌株的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且包含与SEQ ID NO:7至少99%同一(例如至少99.5%或至少99.9%同一)的16S rRNA序列。在一些实施方案中,生物型菌株具有与以登录号DSM 14294保藏的菌株的对应序列具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%序列同一性的序列并且具有SEQ ID NO:7的16S

rRNA序列。

[0176] 或者,作为以登录号DSM 14294保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株可通过使用登录号DSM 14294保藏物以及限制片段分析和/或PCR分析来鉴定,例如通过使用荧光扩增片段长度多态性(FAFLP)和重复DNA元件(rep)-PCR指纹分析或蛋白质表达谱分析或部分16S或23S rDNA测序来进行。在优选实施方案中,可使用此类技术来鉴定其他嗜氢布劳特氏菌菌株。

[0177] 在某些实施方案中,作为以登录号NCIMB 42381或42486保藏的细菌的生物型并且适合用于本发明中的菌株为如下菌株,所述菌株当通过扩增核糖体DNA限制分析(ARDRA)进行分析时,例如当使用Sau3AI限制酶时提供与以登录号DSM 14294保藏的细菌相同的模式(关于示例性方法和指导参见例如[30])。或者,生物型菌株经鉴定为如下菌株,所述菌株与以登录号DSM 14294保藏的细菌具有相同的碳水化合物发酵模式。

[0178] 适合用于本发明的组合物和方法中的其他嗜氢布劳特氏菌菌株,诸如以登录号DSM 14294保藏的细菌的生物型可使用包括实例中所描述的分析的任何适当的方法或策略来鉴定。举例来说,用于本发明中的菌株可通过在厌氧YCFA中培养和/或将向自闭症谱系病症小鼠模型施用细菌并且然后评估细胞因子水平来鉴定。特别地,与以登录号DSM 14294保藏的细菌具有类似生长模式、代谢类型和/或表面抗原的细菌菌株可适用于本发明中。适用菌株将具有与登录号DSM14294菌株类似的免疫调节活性。特别地,生物型菌株将对自闭症谱系病症模型引发与实施例中所示的效应类似的效果,这可通过使用实例中所描述的培养和施用方案来鉴定。

[0179] 本发明的特别优选的菌株为以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株。这是实施例中所测试的示例性菌株并且显示有效治疗疾病。因此,本发明提供一种以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,诸如分离的细胞。本发明还提供一种包含以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞的组合物。本发明还提供一种以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株的生物纯培养物。本发明还提供一种以登录号DSM14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株或其衍生物的细胞,所述细胞用于特别针对本文所描述的疾病的疗法中。

[0180] 以登录号DSM 14294保藏的菌株的衍生物可为子代菌株(子代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。以登录号DSM 14294保藏的菌株的衍生物可为子代菌株(子代)或从原始菌株培养(亚克隆)的菌株。本发明的菌株的衍生物可例如在不消除生物活性的情况下在基因层面上加以修饰。特别地,本发明的衍生菌株具治疗活性。衍生菌株将具有与以登录号DSM 14294保藏的原始菌株类似的免疫调节活性。特别地,衍生菌株将对中枢神经系统病症或疾患模型引发与实施例中所示的效应类似的效果并且对细胞因子水平引发类似效应,这可通过使用实例中所描述的培养和施用方案来鉴定。DSM 14294菌株的衍生物通常将为DSM 14294菌株的生物型。

[0181] 提到以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株的细胞涵盖与以登录号DSM 14294保藏的菌株具有相同安全性和治疗功效特征的任何细胞,并且此类细胞由本发明涵盖。因此,在一些实施方案中,提到以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株的细胞仅指以DSM 14294保藏的菌株,而不指不以DSM 14294保藏的细菌菌株。在一些实施方案中,提到以登录号DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株的细胞指与以登录号DSM 14294保藏

的菌株具有相同安全性和治疗功效特征但不以DSM 14294保藏的菌株的细胞。

[0182] 在优选实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。

[0183] 治疗用途

[0184] 微生物丛-肠-脑轴的调节

[0185] 肠与脑之间的通讯(微生物丛-肠-脑轴)是经由双向神经介质通讯系统来进行。当前证据表明存在于肠道中的微生物丛可经由微生物丛-肠-脑轴调节脑部发育并且产生行为表型。实际上,许多综述提出微生物丛-肠-脑轴在维持中枢神经系统功能中起作用并且中枢神经系统病症和疾患发展中涉及微生物丛-肠-脑轴功能失调[10]、[13]、[14]、[32]。

[0186] 脑与肠道之间的双向通讯(即肠-脑轴)包括中枢神经系统、神经内分泌以及神经免疫系统,包括下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、自主神经系统(ANS)的交感神经和副交感神经臂,包括肠道神经系统(ENS)和迷走神经,以及肠道微生物丛。

[0187] 如实施例中所证实,本发明的组合物可调节微生物丛-肠-脑轴并且减轻与CNS病症相关的行为症状。因此,本发明的组合物可适用于治疗或预防中枢神经系统(CNS)的病症,特别是与微生物丛-肠-脑轴功能失调相关的那些病症和疾患。

[0188] 本发明的组合物还可适用于治疗或预防神经发育障碍和/或神经精神疾患。神经发育疾病和神经精神疾患常常与微生物丛-肠-脑轴相关。本发明的组合物可适用于治疗或预防由微生物丛-肠-脑轴功能失调介导的神经发育疾病和/或神经精神疾患。在其他优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防神经发育障碍或神经精神疾患。

[0189] 在特定实施方案中,本发明的组合物可适用于治疗或预防选自由以下组成的组的疾病或疾患:自闭症谱系病症(ASD);儿童发育障碍;强迫症(OCD);重度抑郁障碍;抑郁;季节性情感障碍;焦虑障碍;精神分裂症谱系病症;精神分裂症;双相障碍;精神病;情绪障碍;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎);压力障碍;创伤后压力障碍;痴呆;阿尔茨海默氏病;帕金森氏病;和/或慢性疼痛。在其他实施方案中,本发明的组合物可适用于治疗或预防运动神经元病;亨廷顿氏病;格林-巴利综合征和/或脑膜炎。

[0190] 本发明的组合物可特别适合用于治疗或预防慢性病,治疗或预防对其他疗法(诸如用抗精神病剂和/或抗抑郁剂处理)尚未起反应的患者的疾病,并且/或者治疗或预防组织损伤和与微生物丛-肠-脑轴功能失调相关的症状。

[0191] 在某些实施方案中,本发明的组合物调节CNS。在一些实施方案中,本发明的组合物调节自主神经系统(ANS)。在一些实施方案中,本发明的组合物调节肠道神经系统(ENS)。在一些实施方案中,本发明的组合物调节下丘脑、垂体、肾上腺(HPA)轴。在一些实施方案中,本发明的组合物调节神经内分泌路径。在一些实施方案中,本发明的组合物调节神经免疫路径。在一些实施方案中,本发明的组合物调节CNS、ANS、ENS、HPA轴和/或神经内分泌以及神经免疫路径。在某些实施方案中,本发明的组合物调节共生代谢产物的水平和/或受试者的胃肠道渗透性。

[0192] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由神经系统调节。因此,在一些实施方案中,本发明的组合物调节神经系统中的信号传导。在某些实施方案中,本发明的组合物调节中枢神经系统的信号传导。在一些实施方案中,本发明的组合物调节感觉神经元中的信号传导。在其他实施方案中,本发明的组合物调节运动神经元中的信号传导。在一些实施方案中,本发明

的组合物调节ANS中的信号传导。在一些实施方案中,ANS为副交感神经系统。在优选实施方案中,本发明的组合物调节迷走神经的信号传导。在其他实施方案中,ANS为交感神经系统。在其他实施方案中,本发明的组合物调节肠道神经系统中的信号传导。在某些实施方案中,ANS和ENS神经元的信号传导是直接响应于胃肠道的管腔内容物。在其他实施方案中,ANS和ENS神经元的信号传导是间接响应于由管腔细菌产生的神经化学品。在其他实施方案中,ANS和ENS神经元的信号传导是响应于由管腔细菌或肠内分泌细胞产生的神经化学品。在某些优选实施方案中,ENS的神经元活化迷走传入,从而影响CNS的功能。在一些实施方案中,本发明的组合物调控肠嗜铬细胞的活性。

[0193] 在某些实施方案中,本发明的组合物调节动物模型中的恐惧条件化。在某些实施方案中,可使用本发明的组合物来调节恐惧和/或焦虑的发展和/或调节受试者中恐惧和/或焦虑消除的程度。在某些实施方案中,可使用本发明的组合物来调节动物模型中压力诱导的体温过高的程度。在某些实施方案中,本发明的组合物调节受试者中压力和/或焦虑的水平。

[0194] 自闭症谱系病症 (ASD)

[0195] 自闭症谱系病症为一组异质性神经发育疾患,其特征为早发性社交互动困难、沟通困难以及异常限制的重复行为和兴趣。症状可在很小的年龄就被识别到,但ASD常常是在开始主流教育的更有能力的儿童中被诊断出来。自闭症代表主要类型的ASD。

[0196] 有史以来,基于三个核心范围来诊断自闭症:社交互动减少、沟通异常以及限制和重复的行为和兴趣。在国际疾病分类 (ICD-10R, WHO 1993) 和诊断以及统计手册 (DSM-IV, American Psychiatric Association, 2000) 中,将自闭症归入广泛性发育障碍 (PDD) 的涵盖性术语,有四种可能的诊断亚型:亚斯伯格综合征 (Asperger Syndrome)、儿童自闭症/孤独症、非典型自闭症以及未另外规定的PDD。在DMS-5中,将这些诊断亚型组合成单一类别的自闭症谱系病症 (ASD) 并且已将先前使用的三个受损核心范围减少至两个主要范围,即社交沟通和互动以及重复行为,包括感觉统合失调。

[0197] ASD为‘谱系病症’,因为它以多种不同方式影响每个人并且可在非常轻度至重度范围内。受影响的个体的功能大体上根据语言能力、智力水平、共病、症状组成以及服务的可获得性而变化。认知功能、学习、注意力以及感觉处理通常受损。

[0198] DSM-IV说明自闭症的诊断需要存在至少六种症状,包括社交互动定性损伤的最少两种度量、一种沟通定性损伤症状以及一种限制和重复行为症状。DMS-5重新定义了在两种症状范围中对ASD的诊断:(i) 社交互动和社交沟通缺陷;以及(ii) 限制、重复模式的行为、兴趣或活动。

[0199] 在ASD中共病医学疾患为高度普遍的。共病包括焦虑和抑郁、癫痫发作、注意力缺陷、攻击行为、睡眠问题、胃肠道病症、癫痫症、智力迟钝、智障以及进食困难。

[0200] 实施例证实本发明的组合物在自闭症谱系病症的动物模型中实现发病率降低并且降低疾病严重程度,并且因此它们可适用于治疗或预防自闭症谱系病症。

[0201] ASD为部分由环境因素触发的中枢神经系统病症。因此,微生物丛-肠-脑轴功能失调可引起ASD的发展和持续。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症。在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防自闭症。在一些实施方案中,自闭症为广泛性发育障碍 (PDD)。在另一实施方案中,PDD为亚斯伯格综合征、儿童自

闭症/孤独症、非典型自闭症和/或未另外规定的PDD。因此,在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防自闭症谱系病症、自闭症、广泛性发育障碍;亚斯伯格综合征;儿童自闭症/孤独症、非典型性自闭症和/或未另外规定的PDD。

[0202] 本发明的组合物可适用于调节受试者的微生物丛-肠-脑轴。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于预防已被鉴定为处于ASD风险中或在出生前或早期发育阶段;在儿童期和/或成年期已被诊断为患有ASD的患者的ASD。本发明的组合物可适用于预防ASD的发展。

[0203] 本发明的组合物可适用于管理或缓解ASD。ASD的治疗或预防可指例如缓解症状的严重程度或降低恶化频率或减小对于患者来说为问题的触发因素的范围。

[0204] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解ASD的至少一种核心症状。

[0205] 在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解DMS-5中分类的ASD的两种症状范围中的至少一者。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解社交互动和/或社交沟通缺陷。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解限制、重复模式的行为、兴趣或活动。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解社交互动、社交沟通缺陷和/或预防、减轻或缓解限制、重复模式的行为、兴趣或活动。

[0206] 在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解重复行为、刻板行为、强迫行为、惯例行为、相同行为以及限制行为。在一些实施方案中,本发明的组合物改善患有ASD的受试者的社交认识、社交信息处理、社交沟通能力、社交焦虑/回避以及孤独症性沉迷和特质。

[0207] 在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解与ASD的核心症状相关的额外症状。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解患有ASD的受试者的易怒(包括攻击性、故意自我伤害以及发脾气)、激动、哭喊、昏睡、社交退缩、刻板行为、活动过度、不遵从、言语不当、焦虑、抑郁和/或过度控制或受控的行为。在一些实施方案中,本发明的组合物改善患有ASD的受试者的认知功能、学习、注意力和/或感觉处理。

[0208] 在其他实施方案中,本发明的组合物改善患有ASD的受试者中的二级结果测量。在一些实施方案中,二级结果测量包括额外症状和/或功能评定量表、行为量表以及所关注的杂项测量。

[0209] 在一些实施方案中,本发明的组合物在用于评估引起患有ASD的受试者的核心症状的诊断和/或症状量表中的阳性变化。在一些实施方案中,诊断和/或症状量表为自闭症诊断访谈修订版(ASI-R)。在一些实施方案中,诊断或症状量表为通用型自闭症诊断观察时间表(ADOS-G),现为ADOS-2。在其他实施方案中,诊断或症状量表为自闭症诊断访谈修订版(ADI-R)。在其他实施方案中,诊断或症状量表为社交和沟通障碍诊断访谈(DISCO)。在其他实施方案中,诊断或症状量表为儿童自闭症评定量表(CARS和CARS2)。

[0210] 在一些实施方案中,本发明的组合物在ASD的功效终点的通用测量中引起阳性变化。在某些实施方案中,通用测量包括但不限于异常行为清单(ABC)、儿童行为清单(CBCL)、文兰-II适应行为量表(Vineland-II Adaptive Behaviour Scales,VABS)、社交反应量表(SRS)和/或重复行为量表修订版(RBS-R)。

[0211] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有ASD的受试者的总体

功能展示积极影响。

[0212] 其他量表将为本领域技术人员已知的。在一些实施方案中,本发明的组合物将改善本领域技术人员已知的诊断和/或症状量表的结果。

[0213] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和ASD的共病的发病。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和焦虑和抑郁、癫痫发作、注意力缺陷、攻击行为、睡眠问题、胃肠道病症(包括肠易激综合征(IBS))、癫痫症、智力迟钝、智障和/或进食困难的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解胃肠道共病,诸如腹痛、腹泻以及胀气。

[0214] 在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解可在临幊上与自闭症相似地存在的某些精神和行为病症的症状。因此,在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解注意缺陷病症(ADHD);情感/焦虑障碍;依恋障碍;对立违抗性障碍(ODD);强迫症(OCD)和/或精神病,包括精神分裂症(认知损伤)。

[0215] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗ASD的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解ASD特别有效。此类疗法包括抗精神剂、抗焦虑以及抗抑郁剂药物。此类药物包括利培酮(risperidone)(Risperdal®);奥氮平(olanzapine)(Zyprexa®);氟西汀(fluoxetine)(Prozac®);舍曲林.sertraline)(Zoloft®);氟伏沙明(fluvoxamine)(Luvox®);氯米帕明(clomipramine)(Anafranil®);卤吡醇(haloperidol)(Haldol®);硫利达嗪(thioridazine);氟非那嗪(fluphenazine);氯丙嗪;齐拉西酮(ziprasidone)(Geodon®);卡马西平(carbamazepine)(Tegretol®);拉莫三嗪(lamotrigine)(Lamictal®);托吡酯(topiramate)(Topamax®);丙戊酸(Depakote®);哌醋甲酯(methylphenidate)(Ritalin®);地西洋(diazepam)(Valium®)以及劳拉西泮(lorazepam)(Ativan®)。

[0216] 关于用于治疗自闭症谱系病症的医学产品的临幊开发的EMA准则说明,归因于疾病的异质性,使用单一化合物可能不会对全部核心症状实现显著影响,并且因此必定展现对至少一种核心症状的短期功效。实施例中已显示所用的活生物治疗菌株有效治疗自闭症谱系病症的至少一种核心症状,因此这些菌株和相关布劳特氏菌属菌株预期针对人类疾病为有效的。

[0217] 强迫症(OCD)

[0218] OCD为属于焦虑障碍的异质性、慢性并且致残的病症。根据DSM-IV定义,OCD的基本特征为严重并且耗时(一天超过一小时)的复发性强迫和/或强制(准则A)或引起明显痛苦或显著妨碍受试者的正常惯例、职业功能、平常社交活动或关系(准则C)。因为在病症过程期间的一些点,所述人已认识到强迫或强制为过度的或不合理的(准则B)。

[0219] 强迫定义为所经历的侵入性和不适当的复发性和持久性想法、冲动或想象并且引起明显焦虑或痛苦。所述想法、冲动或想象并非简单地为过度担心现实问题,它们是作为患者自己想法的产物而被患者识别(例如担心污染、对称强迫)。所述人试图忽略、抑制或以另外一些想法或动作来中和所述强迫。

[0220] 强制定义为重复行为(例如洗手、顺序、贮藏、检验)或精神动作(例如默默祈祷、计

数、重复措辞),这些行为和动作为人感觉响应于强迫或根据必须严格应用的规则而被迫进行的。

[0221] OCD常常与包括以下的其他精神疾病的共病发病率相关:重度抑郁障碍、其他焦虑障碍(广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、恐慌障碍)、物质滥用以及饮食障碍(厌食症和暴食症)。

[0222] OCD为可归因于微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的OCD。

[0223] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解OCD的基本症状特征。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的复发性强迫和/或强制。在某些实施方案中,强迫为所经历的侵入性和不适当的复发性和持久性想法、冲动或想象并且引起明显焦虑或痛苦。在某些实施方案中,强制为受试者感觉响应于强迫或根据必须严格应用的规则而被迫进行的重复行为。

[0224] 在某些实施方案中,根据Y-BOCS和/或NIMH-OC诊断和/或症状量表,本发明的组合物改善受试者的OCD症状。在一些实施方案中,Y-BOCS量表用于监测主要终点的改善。在一些实施方案中,NIMH-OC量表用于监测二级参数的改善。

[0225] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有ASD的受试者的总体社交功能(关系、工作等)展示积极影响。在一些实施方案中,总体量表为席汉残疾量表(Sheehan disability scale)。

[0226] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解OCD的至少一种共病。OCD的共病包括重度抑郁障碍、其他焦虑障碍(广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、恐慌障碍)、物质滥用以及饮食障碍(厌食症和暴食症)基列得拉吐瑞氏综合征(Gilles de la Tourette syndrome)、ADHD(注意力缺陷/活动过度障碍)以及发育障碍。

[0227] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗OCD的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解OCD特别有效。此类疗法包括血清素和多巴胺再摄取抑制剂;氯米帕明和抗精神病剂。

[0228] 重度抑郁障碍(MDD)

[0229] MDD与实质性社交心理功能失调和高度个体精神紧张有关并且具有过高发病率和死亡率(自杀风险相当大)。术语重度抑郁障碍涵盖临床抑郁症、重度抑郁症、单相抑郁症、单相病症、复发性抑郁症以及简单地抑郁症。术语重度抑郁障碍覆盖情绪障碍;精神抑郁;慢性抑郁;季节性情感障碍以及边缘型人格障碍。

[0230] 根据DMS-5准则,MDD症状包括情绪抑郁或日常活动的兴趣或快乐丧失超过两周;以及社交、职业以及教育功能受损。几乎每天存在特定症状(以下九种中的至少五种):一天中大多数时间情绪抑郁或易怒;每天大多数时间对大多数活动的兴趣或快乐减少;显著体重变化或食欲变化;睡眠变化(失眠症或嗜睡症);积极性变化(精神运动性激动或迟缓);疲劳或能量损失;负罪感或无用感(感到无价值或过度或不适当的内疚);专注力下降(思考或专注能力削弱,或更犹豫不决;以及自杀倾向(死亡或自杀想法,或受试者具有自杀计划)。此外,MDD与包括以下各项的焦虑症状有关:不合理的担忧;全神贯注于令人不愉快的担忧;难以放松和/或感到紧张。MDD事件可为轻度、中度或重度的。

[0231] MDD事件常常与同如帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、脑血管病症、癌症以及慢性疼痛综合征的其他精神病症或躯体病症的共病相关。MDD经常与作为共病的广谱的其他精神障碍相关,包括广泛性焦虑障碍;焦虑障碍;物质使用障碍;创伤后压力障碍(PTSD);人格障碍;疼痛;压力;肠易激综合征;失眠症;头痛以及人际问题。

[0232] 重度抑郁障碍为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的MDD。

[0233] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防急性重度抑郁事件和/或预防新事件(复发预防)。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和轻度、中度或重度MDD事件的发生。

[0234] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解如根据本文所列的DMS-5准则所归类的MDD症状中的一者或多者。在一优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的情绪抑郁。在一优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者在大多数活动中的兴趣或快乐减少。在一些实施方案中,本发明的组合物在2-周时间内减少MDD症状的发生。

[0235] 在一些实施方案中,根据症状或诊断量表本发明的组合物改善MDD症状。用于评估症状改善的此类量表包括汉密尔顿抑郁评定量表(Hamilton Rating Scale of Depression,HAMD)和蒙哥马利阿斯伯格抑郁评定量表(Montgomery Asberg Depression Rating Scale)。此外,祖恩抑郁自我评定量表(SDS)和祖恩焦虑症自我评定量表(SAS)也是适合的症状改善量表。

[0236] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有MDD的受试者的总体社交和职业功能展示积极影响。

[0237] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防抗治疗性MDD。

[0238] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解MDD的至少一种共病。MDD的共病包括广泛性焦虑障碍;焦虑障碍;物质使用障碍;创伤后压力障碍(PTSD);人格障碍;疼痛;压力;IBS;失眠症;头痛以及人际问题。

[0239] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗MDD的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解MDD特别有效。此类疗法包括抗抑郁剂、加强策略(例如组合疗法、锂和其他情绪稳定剂、甲状腺激素以及非典型性抗精神病药)或甚至第二代抗精神病药。

[0240] 焦虑障碍

[0241] 焦虑障碍为一组以感到焦虑和恐惧为特征的精神障碍。存在许多焦虑障碍,包括广泛性焦虑障碍(GAD);特定恐惧症;社交焦虑障碍;分离焦虑障碍;广场恐惧症;恐慌障碍以及选择性缄默症。

[0242] 根据DMS-5以六个准则来诊断GAD。第一准则为过于焦虑或担忧历时超过六个月,其中所述焦虑或担忧为关于许多活动在大多数时间存在的。第二准则为受试者不能管理第一准则的症状。第三准则为发生以下中的至少三者(在儿童中为一者):不安;容易疲劳;专注问题;易怒;肌肉紧张以及睡眠问题。最后三个准则为症状产生显著社交、职业以及功能损伤;症状并非归因于药剂、药物或其他身体健康问题;以及症状不更好地符合另一精神问题,诸如恐慌障碍。全部其他焦虑障碍均可视为GAD的鉴别诊断。

[0243] GAD经常与作为共病的广谱的其他精神障碍相关,包括抑郁;物质使用障碍;压力;IBS;失眠症;头痛;疼痛;心脏事件;人际问题以及ADHD。

[0244] 焦虑障碍为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的焦虑障碍。在某些实施方案中,焦虑障碍为广泛性焦虑障碍(GAD);特定恐惧症;社交焦虑障碍;分离焦虑障碍;广场恐惧症;恐慌障碍以及选择性缄默症。

[0245] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的如根据本文所列的DMS-5准则所归类的GAD症状中的一者或多者。根据DMS-5,相同症状与其他焦虑障碍有关。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的焦虑障碍症状中的一者或多者。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的焦虑或担忧。在某些实施方案中,本发明的组合物在六个月内减少症状的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解不安;疲劳;专注力丧失;易怒;肌肉紧张;和/或睡眠问题。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解与焦虑障碍相关的社交、职业以及功能损伤。

[0246] 在一些实施方案中,根据症状或诊断量表本发明的组合物改善焦虑障碍的症状。在某些实施方案中,用于评估症状改善的量表包括汉密尔顿焦虑评定量表(HAM-A)。在一些实施方案中,使用HAM-A总量表来评估主要终点。在其他实施方案中,HAM-A精神焦虑因素可适合作为次要终点。

[0247] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有焦虑障碍的受试者的总体社交、职业以及功能损伤展示积极影响。在一些实施方案中,总体量表为席汉残疾量表。

[0248] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解GAD和焦虑障碍的至少一种共病。GAD的共病包括抑郁;物质使用障碍;压力;IBS;失眠症;头痛;疼痛;心脏事件;人际问题以及ADHD。

[0249] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗焦虑障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解焦虑障碍特别有效。此类疗法包括选择性血清素再摄取抑制剂(文拉法辛(venlafaxine)、度洛西汀(duloxetine)、艾司西酞普兰(escitalopram)以及帕罗西汀(paroxetine));苯并二氮卓(阿普唑仑(alprazolam)、劳拉西泮(lorazepam)和氯硝西泮(clonazepam));普瑞巴林(pregabalin)(**Lyrica®**)和加巴喷丁(gabapentin)(**Neurontin®**);血清素受体部分激动剂(丁螺环酮和坦度螺酮(tandospirone));非典型性血清素能抗抑郁剂(诸如伊米帕明(imipramine)和氯米帕明)、单胺氧化酶抑制剂(MAOI)(诸如吗氯贝胺(moclobemide)和苯乙肼);羟嗪;普萘洛尔(propranolol);可尼丁(clonidine);胍法辛(guanfacine)以及哌唑嗪。

[0250] 创伤后压力障碍(PTSD)

[0251] PTSD为严重并且致残的病症,其基本特征为包括创伤事件作为此病症的诱发因素。

[0252] 根据DMS-V准则将PTSD的症状分组至四个主要群集中:(i)侵扰:实例包括恶梦、不

希望有的创伤事件想法、闪回以及以情绪痛苦或生理反应性对创伤提示起反应；(ii)回避：实例包括避免引起创伤记忆，包括地点、场合或其他提示；(iii)认知和情绪的阴性改变：实例包括因创伤事件而扭曲责备自己或他人、关于自己或世界的消极看法、持久的消极情绪（例如恐惧、内疚、羞愧）、感到疏远以及情感受限（例如不能经历积极情绪）；(iv)警觉性和反应性的改变：实例包括生气、鲁莽或自毁行为、睡眠问题、专注力问题、吃惊反应增加以及过度警觉。

[0253] 创伤事件4周内消除的症状符合急性压力障碍的准则。DSM将急性（症状持续不到三个月）与慢性PTSD（症状持续长于3个月）区别开。如果症状在压力源之后超过6个月时开始，那么将病症定义为延迟发作的PTSD。

[0254] PTSD带有与重度抑郁障碍和物质使用障碍的高共病率。

[0255] PTSD为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此，在优选实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防受试者的PTSD。根据类似发病机理，在某些实施方案中，本发明的组合物用于治疗或预防压力障碍。在某些实施方案中，本发明的组合物治疗急性压力障碍。在一些实施方案中，本发明的组合物治疗急性和/或慢性PTSD。在一些实施方案中，本发明的组合物治疗延迟发作的PTSD。

[0256] 在某些实施方案中，本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的如根据本文所列的DMS-5准则所归类的PTSD（或压力障碍）症状中的一者或多者。在优选实施方案中，本发明的组合物预防、减轻或缓解患有PTSD的受试者的侵入性想法。在优选实施方案中，本发明的组合物预防、减轻或缓解患有PTSD的受试者的回避行为。在优选实施方案中，本发明的组合物预防、减轻或缓解患有PTSD的受试者的认知和情绪的阴性改变。在优选实施方案中，本发明的组合物预防患有PTSD的受试者的警觉性和反应性的改变。

[0257] 在一些实施方案中，根据症状或诊断量表本发明的组合物改善PTSD和压力障碍的症状。在某些实施方案中，用于评估症状改善的量表为PTSD临床管理（CAPS）量表。

[0258] 在一些实施方案中，本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善（CGI-I）量表。在一些实施方案中，本发明的组合物对患有PTSD和压力障碍的受试者的总体社交、职业以及功能损伤展示积极影响。在一些实施方案中，总体量表为席汉残疾量表。

[0259] 在优选实施方案中，本发明的组合物预防、减轻或缓解PTSD和压力障碍的至少一种共病。PTSD和压力障碍的共病包括MDD、物质使用障碍；压力以及焦虑。

[0260] 在一些实施方案中，本发明的组合物当与用于治疗PTSD和压力障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解PTSD和压力障碍特别有效。此类疗法包括血清素能剂、三环抗抑郁剂、情绪稳定剂、肾上腺素能抑制剂、抗精神病剂、苯并二氮卓、舍曲林（Zoloft®）、氟西汀（Prozac®）和/或帕罗西汀（Paxil®）。

[0261] 精神分裂症谱系和精神病性病症

[0262] 这些疾病影响受试者清楚思考、作出正确判断、在情绪上作出反应、有效沟通、理解现实以及适当表达的能力。精神疾病包括精神分裂症（症状列举如下）；情感分裂性障碍（受试者具有精神分裂症与情绪障碍的症状，诸如抑郁或双相障碍）；精神分裂症样障碍（展示精神分裂症的症状，但症状持续较短时间：在1至6个月之间）；短时精神病性病症（受试者

展示突然、短期精神病行为,常常是响应于非常紧张的事件,诸如家人死亡-恢复通常不到一个月);妄想障碍(妄想持续至少1个月);共有型精神病性病症;物质诱导的精神病性病症;归因于另一医学疾患的精神病性病症;妄想痴呆(展示类似于精神分裂症的症状并且在晚年当人年老时开始)。最熟知的精神病性病症为精神分裂症并且大部分精神病性病症展示与精神分裂症类似的症状。

[0263] 精神分裂症为具有异质性过程和症状型态的重度精神疾病。精神分裂症临幊上与所谓的阳性和阴性症状一起存在。阳性症状包括妄想、幻觉、无组织的言语以及无组织或紧张性行为。阴性症状包括情感冷淡、想法和言语的流利性和多产性方面以及幊始有目的行为方面的限制。阳性症状似乎反映正常功能的过量或扭曲,而阴性症状似乎反映正常功能的减少或丧失。此外,认知缺陷(工作记忆、信息处理、注意力/警惕性、学习、推理以及社交认知的缺陷)为常见的。在当前抗精神病治疗的情况下,认知缺陷通常显示不良改善。精神分裂症患者还具有情绪症状。除这些主导症状之外,精神分裂症还与同诸如以下的其他精神症状共病有关:躁狂和抑郁症状、焦虑或强迫症状、物质滥用和依赖以及人格障碍。

[0264] 根据DMS-5,对于精神分裂症的诊断,受试者必须具有以下症状中的至少两者:妄想;幻觉;无组织的言语;无组织或紧张性行为以及阴性症状。所述症状中的至少一者必须为存在妄想、幻觉或无组织的言语。连续紊乱迹象必须持续至少6个月,在此期间受试者必须经历至少1个月的活动性症状,并且在大量时间内发生社交或职业退化问题。

[0265] 精神分裂症谱系和精神病性病症为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的精神分裂症谱系和/或精神病性病症。在某些实施方案中,精神分裂症谱系和精神病性病症是选自精神分裂症;情感分裂性病症;精神分裂症样病症;短时精神病性病症;妄想障碍;共有型精神病性病症;物质诱导的精神病性病症;归因于另一医学疾患的精神病性病症以及妄想痴呆。在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防精神分裂症。在某些实施方案中,精神分裂症是选自偏执狂样、无组织、紧张性、未分类精神分裂症以及其余精神分裂症。

[0266] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的如根据本文所列的DMS-5准则所归类的精神分裂症症状中的一者或多者。这些实施方案适用于预防、减轻或缓解其他精神分裂症谱系和精神病性病症的症状。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解精神分裂症的阴性症状。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解精神分裂症的阴性和阳性症状。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解患有精神分裂症的受试者的妄想、幻觉、无组织的言语以及无组织或紧张性行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解患有精神分裂症的受试者的情感冷淡、想法和言语的流利性和多产性方面以及幊始有目的行为方面的限制。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解患有精神分裂症的受试者的认知缺陷和/或情绪障碍。

[0267] 在某些实施方案中,本发明的组合物在6个月内减少受试者中精神分裂症的阳性和/或阴性症状的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物改善患有精神分裂症谱系或精神病性病症的受试者的社交和/或职业功能。

[0268] 在一些实施方案中,根据症状或诊断量表本发明的组合物改善精神分裂症谱系或精神病性病症的症状。在某些实施方案中,用于评估症状改善的量表为阳性和阴性症状量

表(PANSS)和简明精神病学评定量表(BPRS)。在某些实施方案中,使用用于评估阴性症状(SANS)的量表。

[0269] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有精神分裂症谱系或精神病性病症的受试者的总体社交和职业损伤展示积极影响。

[0270] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解精神分裂症谱系或精神病性病症的至少一种共病。在某些实施方案中,共病呈躁狂和抑郁症状、焦虑或强迫症状、物质滥用和依赖以及人格障碍形式。

[0271] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防抗治疗性难治性精神分裂症。

[0272] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗PTSD和压力障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或精神精神分裂症谱系或精神病性病症特别有效。在某些实施方案中,此类疗法包括第一代抗精神病剂,包括氯丙嗪、氟非那嗪、卤吡醇和/或过非那嗪(perphenazine)。在某些实施方案中,此类疗法包括第二代疗法,包括阿立哌唑(aripiprazole)(Abilify®);阿塞那平(asenapine)(Saphris®);依匹哌唑(brexpiprazole)(Rexulti®);卡利拉嗪(cariprazine)(Vraylar®);氯氮平(clozapine)(Clozарil®);伊潘立酮(iloperidone)(Fanapt®);鲁拉西酮(lurasidone)(Latuda®);奥氮平(Zyprexa®);帕利哌酮(paliperidone)(Invega);喹硫平(quetiapine)(Seroquel®);利培酮(Risperdal®);齐拉西酮(Geodon®)。

[0273] 双相障碍

[0274] 双相障碍一般为慢性病。躁狂症为双相障碍的主要症状。根据特定躁狂和抑郁事件的持续时间和模式,存在若干类型的双相障碍。在DMS-5中,在I型双相病症、II型双相病症、循环性精神病症、快速循环双相障碍以及双相障碍NOS之间进行区分。

[0275] 根据DSM,躁狂症为明显的异常和持续升高、扩张或易怒情绪时期。事件必须持续一周,并且情绪必须具有以下症状中的至少三者:高自尊;睡眠需要减少;言语速率增加;想法快速跳跃;容易分心;对物体或活动的兴趣增加;精神运动性激动;对高危风险活动的追求增加。

[0276] I型双相病症涉及一个或多个躁狂或混合(躁狂症和抑郁症)事件以及至少一个重度抑郁事件(MDD事件的症状参见上文)。II型双相病症具有一个或多个重度抑郁事件,伴随至少一个轻度躁狂事件。不存在躁狂或混合事件。轻度躁狂症为躁狂症的较轻形式。所述症状引起显著社交、职业以及功能损伤。循环性精神病的特征为改变的低水平抑郁症以及轻度躁狂症时期。在可进行诊断之前所述症状在成人中必须存在至少两年或在儿童中存在一年。成人和儿童中的无症状时期分别持续不长于两个月或一个月。快速循环双相障碍为严重形式的双相障碍。它在人在一年内具有重度抑郁症、躁狂症、轻度躁狂症或混合状态的至少四个事件时发生。未另外说明(NOS)的双相障碍归类不明显符合其他类型的双相症状。当存在多个双相症状但不足以符合其他亚型中的任一者的标志时诊断为NOS。

[0277] 双相障碍与以下共病有关:ADHD;焦虑障碍;物质障碍;肥胖症以及代谢综合征。

[0278] 双相障碍为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的双相障碍。在某些实施方案中,双相障碍为I型双相病症。在某些实施方案中,双相障碍为II型双相病症。在某些实施方案中,双相障碍为循环性精神病病症。在某些实施方案中,双相障碍为快速循环双相障碍。在某些实施方案中,双相障碍为双相障碍NOS。

[0279] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的双相障碍症状中的一者或多者。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和受试者中躁狂事件的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和异常和持续升高、扩张或易怒情绪的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解以下症状中的一者或多者:高自尊;睡眠需要减少;言语速率增加;想法快速跳跃;容易分心;对物体或活动的兴趣增加;精神运动性激动;对高危风险活动的追求增加。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和受试者中一个或多个躁狂或混合事件的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物减少受试者中至少一个重度抑郁事件的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和至少一个重度抑郁事件伴随至少一个轻度躁狂事件的发生。

[0280] 在优选实施方案中,本发明的组合物治疗急性期的双相障碍和/或预防其他事件的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物治疗患有双相障碍的受试者的急性期躁狂/抑郁事件并且预防其他躁狂/抑郁事件的发生。

[0281] 在一些实施方案中,根据症状或诊断量表本发明的组合物改善双相障碍的症状。在某些实施方案中,用于评估躁狂事件的症状改善的量表为躁狂状态评定量表和杨氏躁狂症评定量表(Young Mania Rating Scale)。在某些实施方案中,量表为倍克-拉范森躁狂症量表(Bech-Rafaelsen Mania Scale, BRMAS)。在某些实施方案中,用于评估自躁狂事件转换至抑郁事件的症状改善的量表包括汉密尔顿抑郁评定量表、蒙哥马利郡-阿斯伯格评定量表以及倍克-拉范森抑郁量表。

[0282] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有双相障碍的受试者的总体社交、职业以及功能损伤展示积极影响。

[0283] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解双相障碍的至少一种共病。在某些实施方案中,共病是选自ADHD、焦虑障碍、物质障碍、肥胖症以及代谢综合征。

[0284] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防对锂和双丙戊酸盐无反应的躁狂抑郁病和双相障碍。

[0285] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗双相障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解双相障碍特别有效。在某些实施方案中,此类疗法包括碳酸锂、抗惊厥药物(包括丙戊酸盐、双丙戊酸盐、卡马西平以及拉莫三嗪)以及抗精神病药物(包括阿立哌唑、奥氮平、喹硫平以及利培酮)。

[0286] 神经认知障碍和阿尔茨海默氏病

[0287] 在DSM-5中,将术语痴呆用术语重度神经认知障碍和轻度神经认知障碍替换。神经认知障碍为异质性类别的精神疾病。最常见的神经认知障碍为阿尔茨海默氏病,随后为血管性痴呆或两者的混合形式。其他形式的神经退行性病症(例如路易体病(Lewy body disease)、额颞痴呆、帕金森氏痴呆(Parkinson's dementia)、克罗伊茨费尔特-雅各布病

(Creutzfeldt-Jakob disease)、亨廷顿氏病以及韦尼克-柯沙可夫综合征(Wernicke-Korsakoff syndrome))伴随有痴呆。

[0288] 根据DSM-5的痴呆症状准则为在一种或多种选自以下的认知范围中认知从先前表现水平显著衰退的证据:学习和记忆;语言;执行功能;复杂注意力;知觉运动以及社交认知。认知缺陷必定妨碍日常活动中的独立性。此外,在精神错乱的情形中不排除地发生认知缺陷并且通过另一精神障碍(例如MDD或精神分裂症)不能更好地解释。

[0289] 除主要症状之外,患有神经认知障碍的受试者展示行为和精神症状,包括激动、攻击性、抑郁、焦虑、冷漠、精神病以及睡眠觉醒循环紊乱。

[0290] 神经认知障碍为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的神经认知障碍。在优选实施方案中,神经认知障碍为阿尔茨海默氏病。在其他实施方案中,神经认知障碍是选自血管性痴呆;阿尔茨海默氏病和血管性痴呆混合形式;路易体病;额颞痴呆;帕金森氏痴呆;克罗伊茨费尔特-雅各布病;亨廷顿氏病;以及韦尼克-柯沙可夫综合征。

[0291] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的神经认知障碍症状中的一者或多者。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和受试者的认知衰退的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物改善患有神经认知障碍的受试者在一种或多种选自以下的认知范围中的表现水平:学习和记忆;语言;执行功能;复杂注意力;知觉运动以及社交认知。在一些实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和与神经认知障碍相关的一种或多种选自以下的行为和精神症状的发生:激动、攻击性、抑郁、焦虑、冷漠、精神病以及睡眠觉醒循环紊乱。

[0292] 在某些实施方案中,本发明的组合物通过在临床前阶段干预疑似发病机理来预防、减轻或缓解症状性疾病。在某些实施方案中,本发明的组合物以减慢或抑制症状进展来改善疾病修饰(disease modification)。在一些实施方案中,减慢或抑制症状进展与延迟潜在神经病理学过程方面的证据有关。在优选实施方案中,本发明的组合物改善神经认知障碍的症状,包含增强的认知和功能改善。在优选实施方案中,本发明的组合物改善痴呆(BPSD)的行为和精神症状。在优选实施方案中,本发明的组合物改善患有神经认知障碍的受试者进行日常活动的能力。

[0293] 在优选实施方案中,本发明的组合物改善患有阿尔茨海默氏病的受试者的认知与功能两者。在一些实施方案中,本发明的组合物改善患有阿尔茨海默氏病的受试者的认知终点。在一些实施方案中,本发明的组合物改善患有阿尔茨海默氏病的受试者的功能终点。在优选实施方案中,本发明的组合物改善患有阿尔茨海默氏病的受试者的认知和功能终点。在其他优选实施方案中,本发明的组合物改善患有阿尔茨海默氏病的受试者的总临床反应(总体终点)。

[0294] 在一些实施方案中,根据症状或诊断测试本发明的组合物改善神经认知障碍的症状。在某些实施方案中,用于评估阿尔茨海默氏病(和其他神经认知障碍)的症状改善的测试是选自物体认知、日常生活的活动、变化总体评估、健康相关生活质量测试以及评估神经认知障碍的行为和精神症状的测试。

[0295] 在某些实施方案中,用于评估症状改善的物体认知测试使用阿尔茨海默氏病评估量表认知子量表(ADAS-cog)和经典ADAS量表。在某些实施方案中,使用用于阿尔茨海默氏

病的神经生理学测试系列 (NTB) 来评估认知的症状改善。

[0296] 在一些实施方案中,变化总体评估测试使用用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善 (CGI-I) 量表。在一些实施方案中,总体量表为基于临床医师访视的改变印象量表 (Clinician's Interview Based Impression of Change plus,CIBIC-plus)。在一些实施方案中,总体量表为阿尔茨海默氏病合作研究单位临床医师总体变化印象 (ADCS-CGIC)。

[0297] 在某些实施方案中,健康相关生活质量测量为阿尔茨海默氏病相关QOL (ADRQL) 和 QOL-阿尔茨海默氏病 (QOL-AD)。

[0298] 在某些实施方案中,评估神经认知障碍的行为和精神症状的测试是选自阿尔茨海默氏病行为病理学评定量表 (BEHAVE-AD) ;痴呆行为评定量表 (BRSD) ;神经精神调查表 (NPI) ;以及柯恩-曼斯菲尔德激动行为调查表 (Cohen-Mansfield Agitation Inventory, CMAI) 。

[0299] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗神经认知障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解神经认知障碍特别有效。在某些实施方案中,此类疗法包括乙酰胆碱酯酶抑制剂,包括多奈哌齐 (donepezil) (**Aricept®**)、加兰他敏 (galantamine) (**Razadyne®**) 及利斯的明 (rivastigmine) (**Exelon®**);以及美金刚。

[0300] 帕金森氏病

[0301] 帕金森氏病为常见神经退行性疾病,其神经病理学特征为神经细胞(产生多巴胺的细胞)的异质性群体的退化。帕金森氏病的临床诊断需要动作迟缓和以下核心症状中的至少一者:静止性震颤;肌肉僵硬以及姿势反射损伤。疾病进展期间可能存在或发展的其他迹象和症状为自主性紊乱(流涎、皮脂溢出、便秘、排尿紊乱、性功能问题、立位低血压、多汗症)、睡眠紊乱以及嗅觉感觉或温度感觉紊乱。抑郁症状和认知功能障碍共病在许多帕金森氏病患者以及与路易体有关的神经认知障碍中得以发展。

[0302] 帕金森氏病为可因微生物丛-肠-脑轴功能失调而发展或持续的精神病症。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防受试者的帕金森氏病。

[0303] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的帕金森氏病症状中的一者或多者。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的帕金森氏病的一种或多种核心症状。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的动作迟缓。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的静止性震颤;肌肉僵硬和/或姿势反射损伤。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解与帕金森氏病进展相关的一种或多种选自以下的症状:自主性紊乱(流涎、皮脂溢出、便秘、排尿紊乱、性功能问题、立位低血压、多汗症)、睡眠紊乱以及嗅觉感觉或温度感觉紊乱。

[0304] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解作为帕金森氏病的共病的抑郁症状。在某些实施方案中,本发明的组合物改善词语记忆和/或执行功能。在某些实施方案中,本发明的组合物改善注意力、工作记忆、词语流利性和/或焦虑。

[0305] 在其他优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解作为帕金森氏病的共病的认知功能障碍。

[0306] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解帕金森氏病的进展。在某些

实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解后期运动并发症。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解后期运动波动。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解神经元丢失。在某些实施方案中,本发明的组合物改善帕金森氏病痴呆(PDD)的症状。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解执行功能、注意力和/或工作记忆的损伤。在某些实施方案中,本发明的组合物改善多巴胺能神经传递。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受损的多巴胺能神经传递。

[0307] 在一些实施方案中,根据症状或诊断量表本发明的组合物改善帕金森氏病的症状。在某些实施方案中,用于评估帕金森氏病中的运动功能症状改善的测试为统一帕金森氏病评定量表。特别地,UPDRS II考虑日常生活的活动而UPDRS III考虑运动检验。

[0308] 在一些实施方案中,根据症状或诊断测试和/或量表本发明的组合物改善与PDD相关的症状。在某些实施方案中,测试或量表是选自霍普金斯词语学习测验修订版(Hopkins Verbal Learning Test-Revised,HVLT-R);戴利斯-卡普兰执行功能系统(Delis-Kaplan Executive Function System,D-KEFS)颜色-词语干扰测试;汉密尔顿抑郁评定量表(HAM-D 17;抑郁);汉密尔顿焦虑评定量表(HAM-A;焦虑)以及统一帕金森氏病评定量表(UPDRS;PD 症状严重程度)。

[0309] 在一些实施方案中,本发明的组合物改善用于评估精神和神经病症的临床总体印象-总体改善(CGI-I)量表。在一些实施方案中,本发明的组合物对患有帕金森氏病的受试者的总体社交和职业损伤展示积极影响。

[0310] 在一些实施方案中,本发明的组合物当与用于治疗神经认知障碍的另一疗法组合使用时对预防、减轻或缓解神经认知障碍特别有效。在某些实施方案中,此类疗法包括多巴胺激动剂(包括L-Dopa+);单胺氧化酶抑制剂、儿茶酚胺-0-甲基转移酶抑制剂;抗胆碱能剂以及谷氨酸盐调节剂。

[0311] 其他中枢神经系统病症

[0312] 在优选实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防与微生物丛-肠-脑轴功能失调相关的中枢神经系统病症。除以上实施方案之外,本发明的组合物用于治疗或预防精神病;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎)和/或慢性疼痛。在其他实施方案中,本发明的组合物可适用于治疗或预防运动神经元病;亨廷顿氏病;格林-巴利综合征和/或脑膜炎。

[0313] 亨廷顿氏病

[0314] 亨廷顿氏病为由遗传性缺陷基因引起的遗传性脑部疾患,该疾病损害脑中的某些神经细胞。此脑损伤随时间推移逐渐变得更糟并且可影响运动、认知(感知、意识、思考、判断)以及行为。所述疾病的早期特征可包括个性改变、情绪波动、不安运动、易怒以及行为改变。

[0315] 在某些实施方案中,本发明的组合物用于治疗或预防亨廷顿氏病。在某些实施方案中,本发明的组合物管理亨廷顿氏病的症状,诸如易怒或过分的运动。在某些实施方案中,本发明的组合物治疗与亨廷顿氏病相关的抑郁和/或改善症状,诸如社交退缩、缺乏兴趣以及睡眠紊乱。在某些实施方案中,本发明的组合物改善记忆和专注于任务的能力。在某些实施方案中,本发明的组合物治疗致残异常运动。在某些实施方案中,本发明的组合物治疗行为问题、反社交行为、易怒以及与亨廷顿氏病相关的精神病。在某些实施方案中,本发明的组合物诱导神经保护并且预防神经损伤。在某些实施方案中,本发明的组合物增加多

巴胺的水平和/或含多巴胺的细胞的水平。

[0316] 神经化学因子、神经肽和神经递质以及微生物丛-肠-脑轴

[0317] 如上文所概述,微生物丛-肠-脑轴由许多不同生理系统调节。微生物丛-肠-脑轴由许多信号传导分子调节。这些信号传导分子水平改变引起中枢神经系统发育和/或功能方面的缺陷。实际上,微生物丛-肠-脑轴的功能和中枢神经系统病症或疾患的发病机理中涉及本部分中所公开的许多分子([14]、[32]、[10]、[33])。由本发明人进行的实验表明可通过施用布劳特氏菌属菌株触发行为变化。此影响可为由对信号传导分子,特别地本部分中所列的那些信号传导分子的水平的影响所介导的。这些改变可引起与布劳特氏菌属菌株相关的治疗益处。因此,归因于本文所公开的中枢神经系统病症和疾患展示类似基础生物化学和生理发病机理(即经由微生物丛-肠-脑轴)的事实,对于这些病症和疾患也可实现布劳特氏菌属菌株的类似治疗益处。施用粪便布劳特氏菌可对触发与中枢神经系统病症或疾患相关的行为变化特别有效。在某些实施方案中,施用韦克斯勒布劳特氏菌可对触发与中枢神经系统病症或疾患相关的行为变化特别有效。

[0318] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由神经化学因子、神经肽以及神经递质的水平调节。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物调节神经化学因素、神经肽以及神经递质的水平。因此,在某些优选实施方案中,本发明的组合物直接改变CNS生物化学。在优选实施方案中,本发明的组合物调节脑源性神经营养因子(BDNF)的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节单胺的水平。在某些实施方案中,单胺为血清素(5-羟基色胺(5-HT))、多巴胺、降肾上腺素和/或肾上腺素。在某些实施方案中,单胺为儿茶酚胺。在某些实施方案中,儿茶酚胺为多巴胺、降肾上腺素以及肾上腺素。在某些实施方案中,单胺为色胺。在某些实施方案中,色胺为血清素和褪黑素。在某些实施方案中,本发明的组合物调节乙酰胆碱的水平。

[0319] 在某些优选实施方案中,本发明的组合物调节催产素的水平。催产素与情绪、社交、认知和神经内分泌生理学以及自调节有关。特别地,催产素释放参与抗焦虑;积极情绪;母性行为、配对结合;性行为;社交记忆;嗅觉记忆;食欲减退作用;HPA轴对压力的反应的减弱;在出生和哺乳期间的自激励以及其他生理和心理过程。在某些实施方案中,本发明的组合物增加催产素的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物降低催产素的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物增加或减少催产素信号传导。在某些实施方案中,本发明的组合物调节催产素受体的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节进入神经元、肌肉以及胃肠道细胞或从其中出来的钙离子的通量。在优选实施方案中,本发明的组合物通过调节催产素的水平治疗和预防与微生物丛-肠-脑轴相关的神经发育和神经精神病症和疾病。

[0320] 在某些实施方案中,本发明的组合物调节脑单胺和其代谢产物的水平。在优选实施方案中,单胺为血清素。在某些实施方案中,本发明的组合物调节色氨酸代谢的血清素能和/或犬尿氨酸途径。在某些实施方案中,本发明的组合物调节诸如5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)等血清素代谢产物的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节诸如高香草酸(HVA)等多巴胺代谢产物的水平。这些神经递质和神经化学因子的调节适用于治疗压力、抑郁症以及焦虑相关病症。

[0321] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由 γ -氨基丁酸(GABA)的水平调节。因此,在优选实施方案中,本发明的组合物调节GABA的水平。GABA为降低神经元兴奋性的抑制性神经递质。

在某些实施方案中，本发明的组合物增加GABA的水平。在某些实施方案中，本发明的组合物降低GABA的水平。在某些实施方案中，本发明的组合物改变GABA能神经传递。在某些实施方案中，本发明的组合物调节中枢神经系统不同区中的GABA转录的水平。在某些实施方案中，共生体衍生的GABA穿过血脑屏障并且直接影响神经传递。在某些实施方案中，本发明的组合物导致海马、杏仁核和/或蓝斑中的GABA减少。在某些实施方案中，本发明的组合物使得皮质区中的GABA增加。

[0322] 诸如血清素、褪黑素、GABA、组胺以及乙酰胆碱等神经活性分子的水平与诸如痴呆、阿尔茨海默氏病以及亨廷顿氏病等中枢神经系统疾病的病理生理学有关。

[0323] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由组胺的水平调节。因此，在某些实施方案中，本发明的组合物调节组胺的水平。在某些实施方案中，组胺具有免疫调节作用。在某些实施方案中，组胺水平使细菌能够从管腔易位至系统循环中。因此，在一些实施方案中，本发明的组合物改变胃肠道渗透性和/或屏障功能。在某些其他实施方案中，组胺充当与中枢过程有关的神经递质。

[0324] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由HPA轴调节。因此，在某些实施方案中，本发明的组合物调节HPA活性。在某些实施方案中，本发明的组合物使HPA压力反应减弱。在某些优选实施方案中，本发明的组合物调节与HPA活性相关的炎性反应。在某些实施方案中，本发明的组合物调节糖皮质素的水平。在某些优选实施方案中，本发明的组合物调节皮质甾酮和肾上腺素的水平。在某些实施方案中，本发明的组合物调节促肾上腺皮质素释放因子和/或升压素的水平。在某些实施方案中，本发明的组合物调节升压素和/或其他神经垂体或抗利尿激素的水平。HPA轴活性改变与焦虑和压力障碍有关。

[0325] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由免疫反应和炎性因子和标记物的改变调节。因此，在某些实施方案中，本发明的组合物可调节免疫反应。在某些实施方案中，本发明的组合物调节循环神经免疫信号传导分子的全身水平。在某些优选实施方案中，本发明的组合物调节促炎性细胞因子产生和炎症。在某些实施方案中，本发明的组合物调节炎性状态。在某些实施方案中，本发明的组合物调节脾细胞增殖反应。在某些实施方案中，本发明的组合物调节C-反应蛋白；IL-1家族细胞因子；IL-1 β ；IL-2；IL-4；IL-6；IL-8；IL-10；IL-12p40；IL-17；IL-17A；IL-21；IL-23；TNF- α 以及IFN- γ 的全身和/或血浆水平。在一些实施方案中，本发明的组合物调节抗炎性细胞因子（例如IL-10）的水平。在优选实施方案中，本发明的组合物增加IL-10的水平。在一些实施方案中，本发明的组合物调节TNF- α 的水平。在优选实施方案中，本发明的组合物调节IFN- γ 的水平。在一些实施方案中，本发明的组合物调节IFN- γ : IL-10比率。在某些优选实施方案中，本发明的组合物降低IFN- γ : IL-10比率。在优选实施方案中，本发明的组合物降低促炎性细胞因子TNF- α 和IFN- γ 的水平。增加的细胞因子循环水平与包括抑郁、焦虑、精神分裂症以及ASD的各种神经精神病症密切相关。在诸如精神分裂症、重度抑郁障碍以及双相障碍等病症中突出了炎性状态改变的证据。

[0326] 在某些实施方案中，本发明的组合物调节介导耐受性的树突细胞的水平并且相互地调控促炎和抗炎性细胞因子反应。在某些实施方案中，本发明的组合物降低髓过氧化物酶（炎症和氧化的标记物）的全身水平。免疫系统和炎性反应的治疗调节剂适用于治疗自闭症谱系病症和情绪障碍。

[0327] 在某些实施方案中，本发明的组合物调节对感染或接种的免疫反应。在某些实施

方案中,本发明的组合物调节响应于感染或接种的炎症的水平。在某些优选实施方案中,本发明的组合物调节在妊娠期间响应于感染或接种的母体免疫活化。因此,可在妊娠期间施用本发明的组合物以治疗或预防后代的中枢神经系统病症。

[0328] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由共生代谢产物的水平调节。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物调节微生物丛代谢产物的全身水平。在某些优选实施方案中,本发明的组合物调节短链脂肪酸(SCFA)的水平。在某些实施方案中,SCFA的水平增加或降低。在一些实施方案中,SCFA为丁酸(BA)(或丁酸盐)。在一些实施方案中,SCFA为丙酸(PPA)。在一些实施方案中,SCFA为乙酸。在某些实施方案中,本发明的组合物调节SCFA穿过血脑屏障的能力。在某些实施方案中,本发明的组合物调节多糖A(PSA)的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节有效促炎性内毒素脂多糖(LPS)的水平。LPS引起炎性细胞因子的产生,从而改变生理大脑活动并且调节神经肽合成。LPS对CNS的调节具有重要影响,增加致力于控制情绪的区域(例如杏仁核)的活性。在某些实施方案中,本发明的组合物调节色氨酸和/或其代谢产物的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节4-乙基苯基硫酸盐(4EPS;与ASD相关行为异常相关的尿毒症毒素)的水平。在优选实施方案中,本发明的组合物降低受试者中4-乙基苯基硫酸盐的水平。通过刺激由管腔内肠道刺激引起的神经元信号传导路径所产生的信号有力调节大脑活动,包括疼痛感知、免疫反应调节、情绪控制以及其他稳态功能。因此,能够调节这些因子的水平的组合物对于治疗或预防CNS病症而言将具有广泛治疗应用。

[0329] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由胃肠道渗透性的水平调节。因此,在一些实施方案中,本发明的组合物改变胃肠道上皮的完整性。在某些实施方案中,本发明的组合物调节胃肠道的渗透性。在某些实施方案中,本发明的组合物调节胃肠道的屏障功能和完整性。在某些实施方案中,本发明的组合物调节胃肠道活力。在某些实施方案中,本发明的组合物调节共生代谢产物和炎性信号传导分子从胃肠道管腔易位至血流中。

[0330] 微生物丛-肠-脑轴的信号传导由胃肠道中的微生物群系组成调节。因此,在某些实施方案中,本发明的组合物调节胃肠道的微生物群系组成。在某些实施方案中,本发明的组合物预防微生物群系生态失调和毒性代谢产物(例如LPS)的相关增加。在某些实施方案中,本发明的组合物调节胃肠道中梭状芽孢杆菌属的水平。在优选实施方案中,本发明的组合物降低胃肠道中梭状芽孢杆菌属的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物降低空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)的水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节有害厌氧菌的增殖以及由这些细菌产生的神经毒素的产量。在某些实施方案中,本发明的组合物调节乳杆菌属和/或双歧杆菌属的微生物群系水平。在某些实施方案中,本发明的组合物调节微生物群系水平的萨特氏菌属、普雷沃菌属、瘤胃球菌属和/或产碱菌科。在某些实施方案中,本发明的组合物增加植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)和/或布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)的水平。

[0331] 在某些实施方案中,本发明的组合物通过大量使用抗生素预防微生物群系组成的失调。在某些优选实施方案中,本发明的组合物在妊娠期间施用抗生素后维持功能性母体微生物群系组成。因此,可在妊娠期间施用本发明的组合物以治疗或预防后代的中枢神经系统病症。

[0332] 已显示调节微生物群系对改善精神病症相关行为,包括焦虑、抑郁、自闭症谱系病

症、强迫症以及记忆能力(包括空间和非空间记忆)以及包括帕金森氏病的其他CNS相关病症为有效的。某些研究已表明益生菌可降低心理压力、躯体化、抑郁以及愤怒-敌意。乳杆菌属的水平与抑郁有关并且在与胃肠道不适相关的疼痛信号传导中有所涉及。

[0333] 在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解与本文所描述的中枢神经系统病症相关的行为症状中的至少一者。在优选实施方案中,本发明的组合物改善受试者的总临床反应。

[0334] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的刻板、重复行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和异常限制行为和/或兴趣的发生。在某些实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的复发性强迫和/或强制。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者社交行为的缺陷。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的回避行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者沟通行为的缺陷。

[0335] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的认知和情绪的阴性改变。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的焦虑相关行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的压力相关行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的抑郁相关行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的攻击行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减少或缓和异常和持续升高、扩张性或易怒情绪的发生。

[0336] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的侵入性想法。在优选实施方案中,本发明的组合物预防受试者的警觉性和反应性的改变。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的妄想、幻觉、无组织的言语以及无组织或紧张性行为。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的情感冷淡、想法和言语的流利性和多产性方面以及开始有目的行为方面的限制。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解以下症状中的一者或者两者:高自尊;睡眠需要减少;言语速率增加;想法快速跳跃;容易分心;对物体或活动的兴趣增加;精神运动性激动;对高危风险活动的追求增加。

[0337] 在优选实施方案中,本发明的组合物改善受试者的空间和/或非空间记忆缺陷。在优选实施方案中,本发明的组合物改善受试者的认知与功能两者。在优选实施方案中,本发明的组合物改善受试者的自主活动性。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的动作迟缓。在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解受试者的静止性震颤;肌肉僵硬和/或姿势反射损伤。

[0338] 在优选实施方案中,本发明的组合物预防、减轻或缓解与本文所公开的CNS病症相关的至少一种共病。

[0339] 在优选实施方案中,本发明的组合物改善受试者关于用于本文所描述的CNS病症的症状和/或诊断量表中的至少一者的得分。在某些其他实施方案中,症状和/或诊断量表是选自一般健康问卷(GHQ);抑郁焦虑和压力量表(DASS);莱顿抑郁敏感性指数修订版(Leiden Index of Depression Sensitivity-Revised,LEIDS-r);阳性和阴性症状量表(PANSS);状态特质焦虑调查表(STAI);发育行为检查表(DBC);贝克抑郁调查表(Beck Depression Inventory,BDI);贝克焦虑调查表(Beck Anxiety Inventory,BAI);霍普金斯

症状检查表(Hopkins Symptom Checklist, HSCL-90)；医院焦虑和抑郁量表(HADS)；知觉压力力量表(PSS)；应对检查表(CCL)(也用于对付日常生活的压力)；以及基于问卷的情绪状态分析(POMS)。

[0340] 在某些实施方案中，当在本领域技术人员已知的CNS病症的其他动物模型中评估治疗功效时本发明的组合物可改善症状和/或诊断量表。除实施例中所公开的行为分析之外，本发明的组合物还可改善互惠社交互动；嗅觉沟通；超声波发声；运动刻板(诸如转圈和垂直跳跃)、重复行为，诸如自我梳理和挖掘；以及在空间任务中的毅力。

[0341] 此外，本发明的组合物将适合用于治疗和/或预防CNS病症的其他动物模型中的CNS病症。其他小鼠模型包括近交小鼠品系(包括BALB/cJ和C58/J)并且还包括基因修饰的小鼠品系(包括NEUREXIN1、NEUROLIGIN3、NEUROLIGIN4、SHANK2、SHANK3、CNTNAP2、Tsc1/2以及Fmr1基因突变体小鼠品系)。

[0342] 丁酸盐为充当组蛋白去乙酰酶抑制剂的短链脂肪酸，能够通过G蛋白偶联受体进行信号传导并且在代谢路径的调控中有所涉及。

[0343] 实施例证实嗜氢布劳特氏菌当以口服组合物形式施用时使丁酸盐的肠道水平增加。实施例还证实嗜氢布劳特氏菌适用于治疗中枢神经系统病症和疾患。嗜氢布劳特氏菌的此作用可由丁酸盐介导。

[0344] 已将丁酸盐与大脑的海马和额叶皮质中的组蛋白去乙酰化相联系[34]并且在亨廷顿氏病、帕金森氏病、阿尔茨海默氏病以及自闭症中有所涉及[35]。

[0345] 在某些实施方案中，用于本发明中的嗜氢布劳特氏菌菌株为丁酸盐产生者。在某些实施方案中，用于本发明中的嗜氢布劳特氏菌菌株通过乙酰辅酶A、戊二酸盐、4-氨基丁酸盐和/或赖氨酸路径合成丁酸盐。在某些实施方案中，用于本发明中的嗜氢布劳特氏菌菌株代谢复合多糖(例如淀粉和木聚糖)以产生乙酰辅酶A，乙酰辅酶A可随后用于合成丁酸盐。在某些实施方案中，用于本发明中的嗜氢布劳特氏菌菌株通过结肠中的细菌发酵产生丁酸盐。

[0346] 在某些优选实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物调节丁酸盐的水平。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使丁酸盐的水平增加。

[0347] 在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物为组蛋白去乙酰酶(HDAC)抑制剂。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物抑制大脑的海马和额叶皮质中的组蛋白去乙酰化。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使组蛋白乙酰化增加并且促进促存活、促再生以及促可塑性基因的表达。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物拯救组蛋白乙酰化，预防神经元细胞死亡并且延长寿命(例如在亨廷顿氏病中)。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物防止神经元发生细胞死亡(例如在帕金森氏病中)。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使组蛋白乙酰化恢复并且增加学习相关基因的表达(例如用于治疗或预防阿尔茨海默氏病)。在某些实施方案中，这些表观遗传修饰可为潜在精神病治疗。

[0348] 在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物的HDAC抑制剂活性影响参与神经元存活、可塑性以及再生的许多基因的转录。在某些实施方案中，本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使神经营养因子的启动子周围的乙酰化增加。在某些实施方案

中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使BDNF、GDNF以及NGF的启动子周围的乙酰化增加。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使BDNF、GDNF以及NGF的表达增加。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使参与可塑性的包括c-Fos和Homer1a的立即早期基因的表达增加。在某些实施方案中,脑中这些因子的表达发生改变。

[0349] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物的去乙酰酶抑制活性维持非组蛋白蛋白质的乙酰化。在某些实施方案中,乙酰化影响许多蛋白质的酶活性和代谢活性。举例来说,已显示HDAC抑制剂在氧化应力期间维持转录因子Sp1的乙酰化和活化,从而增强保护性适应反应以促进细胞存活。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物预防体内的氧化应力。

[0350] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物恢复血脑屏障(BBB)完整性和/或额叶皮质、海马以及纹状体中的紧密连接蛋白的表达(例如水闸蛋白5和/或闭合蛋白)。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物恢复和/或维持BBB完整性。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物促进和/或维持紧密连接物表达。因此,在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物可建立和/或维持针对与中枢神经系统病症,特别是神经发育障碍和/或神经精神疾患相关的炎性介体、神经化学因子、神经肽以及神经递质的屏障。

[0351] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物抑制神经炎症。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使IL-1RA(促炎性IL-1 β 的抑制剂)的水平增加。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使促炎性IL-1 β 和/或TNF α 的水平降低。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物使IL-4表达增加,这使IL-1RA的水平增加。

[0352] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物为消炎剂。在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物抑制因子 κ B(NF- κ B)活化。因此,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物可调节包括以下的早期免疫发炎反应基因的表达:IL-1B、TNF α 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、可诱导硝酸合酶、环氧合酶-2、细胞间粘附分子-1、T细胞受体- α 以及MHC II类分子。

[0353] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物影响线粒体活性。因此,在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物治疗和/或预防阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、线粒体脑病变和/或肾上腺脑白质营养不良。

[0354] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物影响通过GPCR进行的信号传导。因此,在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物治疗和/或预防帕金森氏病。

[0355] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物影响组蛋白乙酰化。因此,在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物治疗和/或预防阿尔茨海默氏病、帕金森氏病和/或亨廷顿氏病。

[0356] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物影响微生物群系稳态。因此,在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物治疗和/或预防中枢神经系统病症和疾患。

[0357] 在某些实施方案中,本发明的包含嗜氢布劳特氏菌的组合物可触发与中枢神经系统病症或疾患相关的行为变化的改善。

[0358] 在某些实施方案中,嗜氢布劳特氏菌的作用可能与丁酸盐无关。举例来说,实施例证实施用嗜氢布劳特氏菌,但不单独施用丁酸盐,使小鼠的水平和垂直活动性以及在旷场模型中央所用的时间显著增加,表明在减轻焦虑方面的作用。具体地说,嗜氢布劳特氏菌在减轻焦虑样和刻板行为方面展示功效,而丁酸盐的功效限于减轻刻板行为。

[0359] 施用模式

[0360] 优选地,本发明的组合物是要向胃肠道施用以使本发明的细菌菌株能够递送至和/或部分或完全定植于肠道。通常,本发明的组合物是经口施用,但它们可经直肠、经鼻内或经由经颊或经舌下途径施用。

[0361] 在某些实施方案中,可以泡沫形式、以喷雾或凝胶形式施用本发明的组合物。

[0362] 在某些实施方案中,可以栓剂(诸如直肠栓剂)形式,例如以可可豆油(可可脂)、合成硬脂(例如suphocire、witepsol)、甘油基-明胶、聚乙二醇或肥皂甘油组合物形式施用本发明的组合物。

[0363] 在某些实施方案中,经由管子,诸如鼻胃管、口胃管、胃管、空肠造口管(J管)、经皮内镜胃造口术(PEG);或孔口,诸如提供到达胃、空肠的入口的胸壁孔口以及其他适合的入口孔将本发明的组合物施用至胃肠道。

[0364] 本发明的组合物可一次施用,或它们可作为治疗方案的一部分依序施用。在某些实施方案中,本发明的组合物是要每天施用。

[0365] 在本发明的某些实施方案中,伴随根据本发明的治疗进行患者肠道微生物丛的评估。如果未实现本发明的菌株的递送和/或部分或完全定植,以致未观测到功效,那么可将治疗重复,或者如果递送和/或部分或总定植为成功的并且观测到功效,那么可停止治疗。

[0366] 在某些实施方案中,可向妊娠动物,例如哺乳动物,诸如人施用本发明的组合物,以防止所述动物的孩子在子宫内和/或在其出生之后发展炎性或自体免疫疾病。

[0367] 可向已被诊断为具有中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患,或已被鉴定为处于中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患的风险中的患者施用本发明的组合物。还可作为预防措施施用组合物以防止健康患者中发展中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患。

[0368] 可向已被鉴定为具有异常肠道微生物丛的患者施用本发明的组合物。举例来说,患者可具有减少或不存在的布劳特氏菌属,特别是粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌的定植。举例来说,患者可具有减少或不存在的布劳特氏菌属,特别是粪便布劳特氏菌、韦克斯勒布劳特氏菌或嗜氢布劳特氏菌的定植。

[0369] 可以诸如营养补充物等食物产品形式施用本发明的组合物。

[0370] 通常,本发明的组合物用于治疗人,不过它们可用于治疗动物,包括单胃哺乳动物,诸如禽类、猪、猫、狗、马或兔。本发明的组合物可适用于增强动物的生长和表现。如果施用动物,那么可使用口服灌胃。

[0371] 组合物

[0372] 通常,本发明的组合物包含细菌。在本发明的优选实施方案中,将组合物配制成为冷

冻干燥形式。举例来说,本发明的组合物可包含含有本发明的细菌菌株的颗粒或明胶胶囊,例如硬明胶胶囊。

[0373] 优选地,本发明的组合物包含冻干的细菌。细菌的冻干为确立已久的程序并且相关指导可在例如参考文献[36]、[]以及[38]中获得。

[0374] 或者,本发明的组合物可包含活的活性细菌培养物。

[0375] 在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株尚未被去活化,例如尚未被加热去活化。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株尚未被杀死,例如尚未被加热杀死。在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株尚未被减毒,例如尚未被加热减毒。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株尚未被杀死、去活化和/或减毒。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株为活的。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株为有活力的。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株能够部分或完全定植于肠道。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物中的细菌菌株为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。

[0376] 在一些实施方案中,组合物包含活细菌菌株与已被杀死的细菌菌株的混合物。

[0377] 在优选实施方案中,将本发明的组合物封装以使细菌菌株能够递送至肠道。封装防止组合物降解直到通过例如在诸如压力、酶活性等化学或物理刺激下破裂或可由pH值变化触发的物理崩解而递送至目标位置。可使用任何适当的封装方法。示例性封装技术包括包埋于多孔基质内、附着或吸附于固体载体表面、通过絮凝或在交联剂存在下自我聚集以及机械容纳于微孔膜或微胶囊后。关于可适用于制备本发明的组合物的封装的指导为在例如参考文献[39]和[40]中可获得的。

[0378] 组合物可经口施用并且可呈片剂、胶囊或粉末形式。封装产品为优选的,因为布劳特氏菌属为厌氧菌。可包括其他成分(诸如维生素C)作为除氧剂和益菌生底物以改善递送和/或部分或完全定植以及体内存活。或者,可以食物或营养产品(诸如基于奶或乳清等发酵乳制品)形式或以药物产品形式经口施用本发明的益生菌组合物。

[0379] 可将组合物调配成益生菌形式。

[0380] 本发明的组合物包括治疗有效量的本发明的细菌菌株。治疗有效量的细菌菌株足以对患者发挥有益作用。治疗有效量的细菌菌株可足以使得递送至和/或部分或总定植于患者肠道。

[0381] 举例来说,对于成年人,细菌的适合的日剂量可为约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位(CFU);例如约 1×10^7 至约 1×10^{10} CFU;在另一实例中,为约 1×10^6 至约 1×10^{10} CFU。

[0382] 在某些实施方案中,组合物含有相对于组合物的重量约 1×10^6 至约 1×10^{11} CFU/g的量的细菌菌株;例如约 1×10^8 至约 1×10^{10} CFU/g。剂量可为例如1g、3g、5g以及10g。典型地,益生菌(诸如本发明的组合物)任选与至少一种适合的益菌生化合物组合。益菌生化合物通常为不易消化的碳水化合物,诸如寡糖或多糖,或糖醇,所述碳水化合物在上部消化道中不降解或吸收。已知益菌生包括诸如菊粉和转半乳-寡糖等商业产品。

[0383] 在某些实施方案中,本发明的益生菌组合物包括相对于组合物总重量以重量计约1%至约30%的量的益菌生化合物(例如以重量计5%至20%)。碳水化合物可选自由以下组成的组:果糖-寡糖(或FOS)、短链果糖-寡糖、菊粉、异麦芽糖醇-寡糖、果胶、木糖-寡糖(或XOS)、壳聚糖-寡糖(或COS)、 β -葡聚糖、阿拉伯胶修饰并且具耐性的淀粉、聚糊精、D-塔格

糖、阿拉伯胶纤维、角豆、燕麦以及柑桔纤维。在一个方面中，益菌生为短链果糖-寡糖(为简单起见在下文中显示为FOSs-c.c.)；所述FOSs-c.c.不为可消化的碳水化合物，通常通过甜菜糖转化而获得并且包括与三种葡萄糖分子结合的蔗糖分子。

[0384] 在某些实施方案中，将本发明的组合物与用于治疗或预防所述中枢神经系统病症的另一治疗剂化合物组合使用。在一些实施方案中，将本发明的组合物与调节中枢神经递质和神经肽的营养补充物一起施用。在优选实施方案中，营养补充物包含营养维生素或由其组成。在某些实施方案中，维生素为维生素B6、镁、二甲基甘氨酸(维生素B16)以及维生素C。在某些实施方案中，将本发明的组合物与另一益生菌组合施用。在某些优选实施方案中，益生菌包含猪鞭虫(*Trichuris suis*)卵或由其组成。

[0385] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂或载体。在参考文献[41]中可找到此类适合的赋形剂的实例。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂为药物技术中熟知的并且在例如参考文献[42]中有描述。适合的载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇、山梨糖醇等。适合的稀释剂的实例包括乙醇、甘油以及水。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可考虑预期投药途径和标准药物实践来进行选择。药物组合物可包含作为载体、赋形剂或稀释剂或除载体、赋形剂或稀释剂之外的任何一种或多种适合的粘合剂、一种或多种润滑剂、一种或多种悬浮剂、一种或多种包衣剂、一种或多种增溶剂。适合的粘合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖(诸如葡萄糖)、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、天然和合成树胶(诸如阿拉伯胶、黄蓍胶或海藻酸钠)、羧甲基纤维素以及聚乙二醇。适合的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。可在药物组合物中提供防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸以及对羟基苯甲酸的酯。还可使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0386] 可将本发明的组合物调配成食物产品形式。举例来说，除本发明的治疗作用之外食物产品还可提供营养益处，诸如在营养补充物中。类似地，可对食物产品进行配制以增强本发明的组合物的味道或使得组合物因更类似于常见食物项目，而非药物组合物而更具消费吸引力。在某些实施方案中，将本发明的组合物调配成基于奶的产品形式。术语“基于奶的产品”意指具有不同脂肪水平的任何液体或半固体的基于奶或乳清的产品。基于奶的产品可为例如奶牛奶、山羊奶、绵羊奶、脱脂乳、全脂奶、奶粉再制奶以及未经任何加工的乳清或经加工的产品，诸如酸乳、凝结奶、凝乳、酸奶、酸全脂奶、白脱乳以及其他酸奶产品。另一重要组包括奶饮料，诸如乳清饮料、发酵奶、浓缩奶、婴儿或宝宝奶；调味奶、冰淇淋；含奶食物，诸如甜品。

[0387] 在一些实施方案中，本发明的组合物包含布劳特氏菌属的一个或多个细菌菌株并且不含来自任何其他属的细菌，或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一属的细菌。因此，在一些实施方案中，本发明提供一种包含布劳特氏菌属的一个或多个细菌菌株的组合物，所述组合物不含来自任何其他属的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一属的细菌，以供用于疗法中。

[0388] 在一些实施方案中，本发明的组合物包含粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株并且不含来自任何其他种类的细菌，或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一种类的细菌。因此，在一些实施方案中，本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株的组合物，所述组合物

不含来自任何其他种类的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一种类的细菌,以供用于疗法中。

[0389] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株并且不含来自任何其他种类的细菌,或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一种类的细菌。因此,在一些实施方案中,本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他种类的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一种类的细菌,以供用于疗法中。

[0390] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株并且不含来自任何其他布劳特氏菌属种类的细菌,或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一布劳特氏菌属种类的细菌。因此,在一些实施方案中,本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他布劳特氏菌属种类的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一布劳特氏菌属种类的细菌,以供用于疗法中。

[0391] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含嗜氢布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株并且不含来自任何其他布劳特氏菌属种类的细菌,或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一布劳特氏菌属种类的细菌。因此,在一些实施方案中,本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的一个或多个细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他布劳特氏菌属种类的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的来自另一布劳特氏菌属种类的细菌,以供用于疗法中。

[0392] 在某些实施方案中,本发明的组合物含有单一细菌菌株或种类并且不含任何其他细菌菌株或种类。此类组合物可仅包含微量或生物学不相关量的其他细菌菌株或种类。此类组合物可为大体上不含其他种类的有机体的培养物。

[0393] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含布劳特氏菌属的单一细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他菌株的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的另一细菌菌株,以供用于疗法中。

[0394] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含粪便布劳特氏菌或韦克斯勒布劳特氏菌种类的单一细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他菌株的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的另一细菌菌株,以供用于疗法中。

[0395] 在一些实施方案中,本发明提供一种包含嗜氢布劳特氏菌种类的单一细菌菌株的组合物,所述组合物不含来自任何其他菌株的细菌或所述组合物仅包含微量或生物学不相关量的另一细菌菌株,以供用于疗法中。

[0396] 在一些实施方案中,本发明的组合物包含超过一个细菌菌株。举例来说,在一些实施方案中,本发明的组合物包含来自相同种类的超过一个菌株(例如超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40或45个菌株),并且任选地,不含来自任何其他种类的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含来自相同种类的不到50个菌株(例如不到45、40、35、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4或3个菌株),并且任选地,不含来自任何其他种类的细菌。在一些实施方案中,本发明的组合物包含来自相同种类的1-40、1-30、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、2-10、2-5、6-30、6-15、16-25或31-50个菌株,并且任选地,不含来自任何其他种类的细菌。本发明包含

前述各项的任何组合。

[0397] 在一些实施方案中,组合物包含微生物菌剂。举例来说,在一些实施方案中,组合物包含布劳特氏菌属细菌菌株作为微生物菌剂的一部分。举例来说,在一些实施方案中,布劳特氏菌属细菌菌株与来自与其可在体内在肠道中共生生活的其他属的一个或多个(例如至少2、3、4、5、10、15或20个)其他细菌菌株组合存在。举例来说,在一些实施方案中,组合物包含布劳特氏菌属的细菌菌株与来自不同属的细菌菌株的组合。在一些实施方案中,微生物菌剂包含获自单一有机体(例如人)的粪便样品的两个或更多个细菌菌株。在一些实施方案中,微生物菌剂不一起存在于自然界中。举例来说,在一些实施方案中,微生物菌剂包含获自至少两个不同有机体的粪便样品的细菌菌株。在一些实施方案中,两个不同有机体来自相同物种,例如两个不同的人。在一些实施方案中,两个不同有机体为婴儿人类和成年人类。在一些实施方案中,两个不同有机体为人和非人哺乳动物。

[0398] 在一些实施方案中,本发明的组合物另外包含与菌株MRX006具有相同安全性和治疗功效特征的细菌菌株,但所述细菌菌株不为以NCIMB 42381保藏的MRX006,或所述细菌菌株不为粪便布劳特氏菌。在一些实施方案中,本发明的组合物另外包含与菌株MRX008具有相同安全性和治疗功效特征的细菌菌株,但所述细菌菌株不为以NCIMB 42486保藏的MRX008,或所述细菌菌株不为韦克斯勒布劳特氏菌。

[0399] 在一些实施方案中,本发明的组合物另外包含与以DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株具有相同安全性和治疗功效特征的细菌菌株,但所述细菌菌株不为以DSM 14294保藏的嗜氢布劳特氏菌菌株,或所述细菌菌株不为嗜氢布劳特氏菌。

[0400] 在一些实施方案中,本发明的组合物不包含芽孢杆菌属(*Bacillus*)的细菌菌株。在一些实施方案中,本发明的组合物不包含枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和/或不包含凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)。在一些实施方案中,要通过本发明的组合物治疗的CNS病症不为双相障碍。在一些实施方案中,要通过本发明的组合物治疗的患者不具有真菌感染。在一些实施方案中,要通过本发明的组合物治疗的患者未罹患念珠菌病。在一些实施方案中,要通过本发明的组合物治疗的患者尚未被诊断为具有真菌感染和/或尚未被诊断为罹患念珠菌病。在优选的此类实施方案中,要通过本发明的组合物治疗的患者从未被诊断为具有真菌感染和/或从未被诊断为罹患念珠菌病。

[0401] 在本发明的组合物包含超过一个细菌菌株、种类或属的一些实施方案中,可使用个别细菌菌株、种类或属分开、同时或依序施用。举例来说,组合物可包含所述超过一个细菌菌株、种类或属中的全部,或可将所述细菌菌株、种类或属分开储存并且分开、同时或依序施用。在一些实施方案中,将所述超过一个细菌菌株、种类或属分开储存,但在使用之前混合在一起。

[0402] 在一些实施方案中,从成年人粪便获得用于本发明中的细菌菌株。在本发明的组合物包含超过一个细菌菌株的一些实施方案中,所有细菌菌株均获自成年人粪便,或如果存在其他细菌菌株那么它们仅以微量存在。可在从成年人粪便获得之后对细菌进行培养并且用于本发明的组合物中。

[0403] 如上文所提到,在一些实施方案中,一个或多个布劳特氏菌属细菌菌株为本发明的组合物中仅有的一种或多种治疗活性剂。在一些实施方案中,组合物中的一个或多个细菌菌株为本发明的组合物中仅有的一种或多种治疗活性剂。

[0404] 根据本发明使用的组合物可能需要或可能不需要市场批准。

[0405] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中所述细菌菌株为冻干的。在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中所述细菌菌株为喷雾干燥的。在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株为冻干的或喷雾干燥的并且其中它为活的。在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株为冻干的或喷雾干燥的并且其中它为有活力的。在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株为冻干的或喷雾干燥的并且其中它能够部分或完全定植于肠道。在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株为冻干的或喷雾干燥的并且其中它为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。

[0406] 在一些情况下,在施用之前使冻干或喷雾干燥的细菌菌株复原。在一些情况下,通过使用本文所描述的稀释剂来进行复原。

[0407] 本发明的组合物可包含药学上可接受的赋形剂、稀释剂或载体。

[0408] 在某些实施方案中,本发明提供一种药物组合物,所述药物组合物包含:如本发明中所用的细菌菌株;以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中细菌菌株呈当向有需要的受试者施用时足以治疗病症的量;并且其中病症是选自由以下组成的组:自闭症谱系病症(ASD);儿童发育障碍;强迫症(OCD);重度抑郁障碍;抑郁;季节性情感障碍;焦虑障碍;精神分裂症谱系病症;精神分裂症;双相障碍;精神病;情绪障碍;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎);压力障碍;创伤后压力障碍;痴呆;阿尔茨海默氏病;帕金森氏病;和/或慢性疼痛;运动神经元病;亨廷顿氏病;格林-巴利综合征和/或脑膜炎。

[0409] 在某些实施方案中,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含:如本发明中所用的细菌菌株;以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂;其中细菌菌株呈足以治疗或预防中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患的量。在优选实施方案中,所述疾病或疾患是选自由以下组成的组:自闭症谱系病症(ASD);儿童发育障碍;强迫症(OCD);重度抑郁障碍;抑郁;季节性情感障碍;焦虑障碍;精神分裂症谱系病症;精神分裂症;双相障碍;精神病;情绪障碍;慢性疲劳综合征(肌痛性脑脊髓炎);压力障碍;创伤后压力障碍;痴呆;阿尔茨海默氏病;帕金森氏病;和/或慢性疼痛。在其他实施方案中,本发明的组合物可适用于治疗或预防运动神经元病;亨廷顿氏病;格林-巴利综合征和/或脑膜炎。

[0410] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中细菌菌株的量为相对于组合物的重量每克约 1×10^3 至约 1×10^{11} 个菌落形成单位。

[0411] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中组合物以1g、3g、5g或10g的剂量施用。

[0412] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,其中组合物通过选自由以下组成的组的方法来施用:经口、经直肠、经皮下、经鼻、经颊以及经舌下。

[0413] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,所述药物组合物包含选自由以下组成的组的载体:乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露糖醇以及山梨糖醇。

[0414] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,所述药物组合物包含选自由以下组成的组的稀释剂:乙醇、甘油以及水。

[0415] 在某些实施方案中,本发明提供以上药物组合物,所述药物组合物包含选自由以

下组成的组的赋形剂：淀粉、明胶、葡萄糖、无水乳糖、自由流动乳糖、 β -乳糖、玉米甜味剂、阿拉伯胶、黄蓍胶、海藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠以及氯化钠。

[0416] 在某些实施方案中，本发明提供以上药物组合物，所述药物组合物进一步包含以下各项中的至少一者：防腐剂、抗氧化剂以及稳定剂。

[0417] 在某些实施方案中，本发明提供以上药物组合物，所述药物组合物包含选自由以下组成的组的防腐剂：苯甲酸钠、山梨酸以及对羟基苯甲酸的酯。

[0418] 在某些实施方案中，本发明提供以上药物组合物，其中当组合物在约4°C或约25°C下储存于密封容器中并且容器放置于具有50%相对湿度的氛围中时，在至少约1个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年的时间之后如以菌落形成单位所测量剩余至少80%的细菌菌株。

[0419] 在一些实施方案中，本发明的组合物提供于包含如本文所描述的组合物的密封容器中。在一些实施方案中，密封容器为香囊或瓶子。在一些实施方案中，本发明的组合物提供于包含如本文所描述的组合物的注射器中。

[0420] 在一些实施方案中，可以药物制剂形式提供本发明的组合物。举例来说，可以片剂或胶囊形式提供组合物。在一些实施方案中，胶囊为明胶胶囊（“gel-cap”）。

[0421] 在一些实施方案中，经口施用本发明的组合物。经口施用可涉及吞咽，使得化合物进入胃肠道；和/或经颊、经舌或经舌下施用，借此化合物直接从口腔进入血流。

[0422] 适合用于经口施用的药物制剂包括固体塞剂、固体微粒、半固体以及液体（包括多个相或分散系统），诸如片剂；含有多微粒或纳米微粒、液体（例如水溶液）、乳液或粉末的软胶囊或硬胶囊；糖锭（包括液体填充的）；咀嚼物；凝胶；快速分散剂型；膜剂；珠剂；喷雾；以及颊/粘膜粘附贴片。

[0423] 在一些实施方案中，药物制剂为肠溶制剂，即胃部抗性制剂（例如对胃部pH值具抗性），所述肠溶制剂适合用于通过经口施用将本发明的组合物递送至肠道。当细菌或组合物的另一组分具酸敏性，例如在胃部条件下倾向于降解时，肠溶制剂可特别适用。

[0424] 在一些实施方案中，肠溶制剂包含肠溶衣。在一些实施方案中，制剂为肠溶包衣剂型。举例来说，制剂可为肠溶包衣片剂或肠溶包衣胶囊等。肠溶衣可为常规肠溶衣，例如用于经口递送的片剂、胶囊等的常规包衣。制剂可包含薄膜包衣，例如肠溶聚合物（例如酸不溶性聚合物）的薄膜层。

[0425] 在一些实施方案中，肠溶制剂固有地为肠溶的，例如具胃部抗性，而不需要肠溶衣。因此，在一些实施方案中，制剂为不包含肠溶衣的肠溶制剂。在一些实施方案中，制剂为由热凝胶材料制成的胶囊。在一些实施方案中，热凝胶材料为纤维素材料，诸如甲基纤维素、羟甲基纤维素或羟丙基甲基纤维素（HPMC）。在一些实施方案中，胶囊包含不含任何成膜聚合物的外壳。在一些实施方案中，胶囊包含外壳并且外壳包含羟丙基甲基纤维素并且不包含任何成膜聚合物（例如参见[43]）。在一些实施方案中，制剂为固有肠溶胶囊（例如来自Capsugel的Vcaps®）。

[0426] 在一些实施方案中，制剂为软胶囊。软胶囊为可由于添加存在于胶囊壳中的软化剂（诸如甘油、山梨糖醇、麦芽糖醇以及聚乙二醇）而具有一定弹性和软度的胶囊。可例如基于明胶或淀粉来制备软胶囊。可从各种供应商商购获得基于明胶的软胶囊。根据投药方法

(诸如经口或经直肠),软胶囊可具有各种形状,这些形状可为例如圆形、椭圆形、长方形或鱼雷状。可通过常规方法来制备软胶囊,诸如通过谢勒法(Scherer process)、艾可杰尔法(Accogel process)或液滴或吹制法。

[0427] 培养方法

[0428] 可使用如例如参考文献[44]、[]以及[46]中详述的标准微生物学技术来培养用于本发明中的细菌菌株。

[0429] 用于培养的固体或液体培养基可为YCFA琼脂或YCFA培养基。YCFA培养基可包括(每100ml,近似值):酪胨(1.0g)、酵母提取物(0.25g)、NaHCO₃(0.4g)、半胱氨酸(0.1g)、K₂HPO₄(0.045g)、KH₂PO₄(0.045g)、NaCl(0.09g)、(NH₄)₂SO₄(0.09g)、MgSO₄·7H₂O(0.009g)、CaCl₂(0.009g)、刃天青(0.1mg)、氯化血红素(1mg)、生物素(1μg)、钴胺(1μg)、对氨基苯甲酸(3μg)、叶酸(5μg)以及毗哆胺(15μg)。

[0430] 用于疫苗组合物中的细菌菌株

[0431] 本发明人已确定本发明的细菌菌株适用于治疗或预防中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患。这可能为本发明的细菌菌株对宿主中枢神经系统、自主性神经系统和/或肠道神经系统;HPA路径的活性;神经免疫和神经内分泌路径;以及宿主胃肠道中共生代谢产物的水平和/或宿主的胃肠道渗透性的影响的结果。因此,当作为疫苗组合物施用本发明的组合物时还可适用于预防中枢神经系统病症或疾患,特别是由微生物丛-肠-脑轴介导的中枢神经系统病症或疾患。在某些此类实施方案中,本发明的细菌菌株为有活力的。在某些此类实施方案中,本发明的细菌菌株能够部分或完全定植于肠道。在某些此类实施方案中,本发明的细菌菌株为有活力的并且能够部分或完全定植于肠道。在其他某些此类实施方案中,本发明的细菌菌株可为杀死的、去活化的或减毒的。在某些此类实施方案中,组合物可包含疫苗佐剂。在某些实施方案中,组合物用于经由注射,诸如经由皮下注射来施用。

[0432] 一般说明

[0433] 除非另外指出,否则本发明的实践将采用本领域技术范围内的常规化学、生物化学、分子生物学、免疫学以及药理学方法。此类技术在文献中有充分解释。参见例如参考文献[47]和[48]-[54]等。

[0434] 术语“包含”涵盖“包括”以及“由……组成”,例如“包含”X的组合物可排他地由X组成或可包括额外的东西,例如X+Y。

[0435] 关于数值x的术语“约”为任选的并且意指例如x±10%。

[0436] 在某些实施方案中,术语“调节”意指增加或活化。在替代实施方案中,术语“调节”意指降低或抑制。

[0437] 词语“大体上”不排除“完全”,例如“大体上不含”Y的组合物可为完全不含Y的。必要时,可将词语“大体上”从本发明的定义中省去。

[0438] 提到两个核苷酸序列之间的序列同一性百分比意指当比对时,所述百分比的核苷酸在比较所述两个序列时为相同的。可使用本领域中已知的软件程序(例如描述于参考文献[55]的部分7.7.18中的那些软件程序)来测定此比对和同源性或序列同一性百分比。通过史密斯-沃特曼同源性检索算法(Smith-Waterman homology search algorithm)使用仿射空隙检索来测定优选比对,空隙开口罚分为12并且空隙延伸罚分为2,BLOSUM矩阵为62。

参考文献[56]中公开了史密斯-沃特曼同源性检索算法。

[0439] 除非特别陈述,否则包括许多步骤的工艺或方法可在方法开始或结束时包括额外步骤,或可包括额外中间步骤。另外,如果适当,那么可将步骤组合、省去或以替代顺序进行。

[0440] 本文描述了本发明的各种实施方案。应了解,可将各实施方案中所规定的特征与其他所规定的特征组合,以提供其他实施方案。特别地,可将本文中强调为适合、典型或优选的实施方案彼此组合(除了当它们互相排斥时)。

[0441] 用于执行本发明的模式

[0442] 本研究的目标为评估在展示与神经发育和精神病症相关的动态特征的两种不同小鼠模型中活生物治疗剂对精神和神经病症的治疗的影响。特别地,研究集中于(i) C57BL/6wt小鼠模型、(ii) BTBR近交、基因修饰小鼠模型以及(iii)母体免疫活化(MIA)小鼠模型中的孤独症相关行为。研究了长期MRX006与媒介物处理在三种小鼠模型中在焦虑、抑郁以及认知和社交范围的行为中的影响。此外,进行生理和解剖学分析以及循环细胞因子和催产素水平的检测。

[0443] 关于用于治疗自闭症谱系病症的医学产品的临床开发的EMA准则说明,归因于疾病的异质性,使用单一化合物可能不会对全部核心症状实现显著影响,并且因此必定展现对至少一种核心症状的短期功效。实施例中所测试的活生物治疗剂已显示有效治疗自闭症谱系病症的至少一种核心症状,因此这些菌株和相关布劳特氏菌属菌株预期针对人类疾病为有效的。类似地,其他中枢神经系统病症或疾患展示具有多种不同症状的复杂病变,并且批准的治疗较少。因此,应了解,有效治疗不需要治疗中枢神经系统病症或疾患的全部症状。如果一种治疗将治疗与中枢神经系统病症或疾患相关的症状中的一者,那么它将被视为在治疗上适用。

[0444] 实施例1-评估C57BL/6小鼠的焦虑、抑郁、认知以及社交领域的行为

[0445] 实施例1a-用于C57BL/6小鼠实验的材料和方法

[0446] 小鼠

[0447] 从Harlan UK购得雄性C57BL/6小鼠。使动物居住在按12h暗循环(7:00-19:00h开灯)的温度和湿度受控的房间中。全部实验根据欧洲指令2010/63/EEC 2012年的S.I.编号543的要求来进行,并且由科克大学(University College Cork)的动物实验伦理委员会(Animal Experimentation Ethics Committee)批准。

[0448] 菌株

[0449] MRX006:以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌。

[0450] 在甘油储备液中提供生物治疗剂。使活生物治疗剂在设备中在厌氧条件下生长。

[0451] 活生物治疗剂施用

[0452] 当小鼠7周龄时开始使用MRX006或媒介物(对照)进行给药。在开始行为系列之前每天用MRX006或磷酸盐缓冲溶液(PBS)将这些小鼠处理一次,持续4周。在行为系列期间每天将小鼠再处理一次。在施用之前将MRX006(1×10^9 CFU,经口施用)溶解于PBS中。

[0453] 施用时间表

[0454] 以下示出用于研究的处理组。用于经口施用的媒介物为PBS。经由口服灌胃进行每天经口施用。

[0455]	组	处理	次数
	1	原初(未灌胃)	12
	2	对照(PBS, 口服灌胃)	12
	3	MRX006(于PBS中口服灌胃)	12

[0456] 不处置原初组直到开始行为系列。

[0457] 粪便收集

[0458] 每周从个别小鼠收集新鲜粪便样品直到研究结束。将至少20mg的新鲜粪便放置于微量离心管中,立即放置于冰上并且然后储存在-80°C下。

[0459] 实验设计和方法

[0460] 如上文所概述,当小鼠7周龄时开始使用MRX006进行给药。在行为实验之前,进行4周初始给药。按以下顺序进行行为系列:第5周时埋珠和3室测试;第6周时高架十字迷宫和悬尾测试;第8周时旷场和新颖物体识别测试;第9周时压力诱导的体温过高测试;第10周时恐惧条件化测试;以及第11周时强迫游泳测试。第9周时进行荧光素肠道渗透性分析。最后,在12周时,扑杀小鼠并且解剖得到脑、近端和远端结肠、肾上腺和脾脏区,以及血浆样品。

[0461] 图解设计和统计分析

[0462] 全部图均在graphpad prism软件(第5版)上产生。使用IBM SPSS Statistic 22.0 (EEUU) 分析数据。使用柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫正态性检验(Kolmogorov-Smirnov normality test) 分析数据分布。使用双因素ANOVA和费雪最小显著差异(Fisher's least significant difference, LSD) 事后检验对比较媒介物组与MRX006组的数据进行分析。通过未配对史都登氏t检验(unpaired Student t test) 对比较媒介物组与原初小鼠的数据进行分析。通过克鲁斯卡尔-沃利斯(Kruskal-Wallis) 和非参数曼-惠特尼U检验(non-parametric Mann-Whitney U test) 分析非正态分布的数据。P<0.05为统计显著性的准则。

[0463] 实施例1b-社交互动行为的评估-三室测试

[0464] 基本原理

[0465] 3-室社交互动测试(3-CSIT) 为经充分验证的行为学相关模型,所述行为学相关模型评估性匹配同种个体之间的社交互动并且允许读出小鼠的社交新颖性和社交偏好。使用所述测试来表征和展示此行为读出的变化。所述测试允许小鼠在无生命物体或性匹配同种小鼠之间自由探索。

[0466] 此外,3-室测试(3-CHT) 为用以评估在啮齿动物模型中呈一般社交性形式的认知和对社交新颖事物的兴趣的测试。啮齿动物一般偏好用比物体更多的时间与另一啮齿动物在一起(社交性)。此外,相较于熟悉的小鼠,啮齿动物偏好研究新颖小鼠(社交新颖性)。基于这些倾向,3-CHT可帮助鉴定在社交性和/或社交新颖性方面具有缺陷的啮齿动物。

[0467] 方法

[0468] 将动物放置于矩形设备中,所述矩形设备由具有小圆孔从而允许方便进出所有区室的隔板划分成三个室(左室和右室以及较小的中间室)。所述测试由三个依序进行的10min试验组成:(1)习惯(允许测试动物探索三个空室);(2)社交性(将不熟悉的动物放置于左室或右室中的内部网线笼中);(3)社交新颖性偏好(将新颖动物放入室中先前为空的相反地现在有熟悉的动物的内部笼中)。原初动物应不具有对习惯阶段的任一室的偏好、对社交性阶段的小鼠的偏好以及对社交新颖性阶段的新颖小鼠的偏好。辨别比率增加将表明

社交行为增加。全部动物为年龄和性别匹配的，在每次30分钟试验之后清洁各个室并且垫上新鲜垫草。对于三个阶段中的每一者，通过安装在设备上的摄像机记录行为。

[0469] 结果

[0470] 组内的史都登氏t检验表明，所有组均用相较于物体更多的时间研究小鼠 ($**p < 0.01$)，表明社交性无缺陷(图1)。每天灌胃未影响社交性。有趣的是，MRX006使研究新颖小鼠所用的时间相较于熟悉的小鼠有所增加，表明社交新颖性增加 ($p < 0.05$ ；图1)。

[0471] 结论

[0472] 在三室测试中用MRX006长期处理使C57BL/6小鼠对社交新颖事物的偏好增强。

[0473] 实施例1c-评估抑郁样行为-强迫游泳测试 (FST)

[0474] 基本原理

[0475] 强迫游泳测试 (FST) 为最广泛用于评估抗抑郁活性的实验范式。在适应不动的浮起姿势之前，原初动物将以游泳、攀爬以及潜水的形式展示逃避行为。不动的持续时间指示行为绝望程度。抗抑郁药物使在此测试中不动所用的时间减少。

[0476] 方法

[0477] 迫使小鼠在用23–25°C自来水填充至17cm深的玻璃筒 (24×21cm) 中游泳6min。由装在顶板上的照相机录像记录FST。评分的行为参数为在6-min测试的最后4min期间的不动性。

[0478] 结果

[0479] 每天灌胃使不动时间增加，表明与原初小鼠相比的抑郁样行为 (t 史都登氏检验， $t (190 = 4.565; p < 0.01$ ；图2)。用MRX006长期处理使不动显著减少，表明与媒介物组相比的抗抑郁样作用 ($F (2.29) = 14.992; **p < 0.01$)。

[0480] 结论

[0481] 在强迫游泳测试中用MRX006长期处理诱导抗抑郁样行为。

[0482] 实施例1d-评估抑郁样行为-悬尾测试

[0483] 基本原理

[0484] 悬尾测试为经充分表征的用以评估抗抑郁样行为的测试。不动所用的时间为抑郁样行为的指示。用抗抑郁药物处理使不动所用的时间减少。

[0485] 方法

[0486] 将小鼠通过粘附在尾部尖端之前1cm的一片胶带悬挂至抬高的棒 (60cm) 上持续6min的时间。以此类方式悬挂小鼠，使其无法逃脱或抓住附近表面。在此测试期间，持续六分钟，对所得逃避取向行为进行定量。评分的行为参数为不动所用的时间。通过三脚架照相机对测试进行录像记录并且由不知晓实验条件的研究者对不动的时间进行人工评分。

[0487] 结果

[0488] 在悬尾测试中每天灌胃处置 (史都登氏t检验， $t (20) = 0.9405; p = 0.3582$) 和用MRX006长期处理 (单因素ANOVA, $F (2.30) = 2.014; p = 0.152$) 未诱导任何显著作用 (图3)。

[0489] 结论

[0490] 在悬尾测试中用MRX006长期处理在C57BL/6小鼠中未诱导任何可观测的抗抑郁样行为。

[0491] 实施例1e—评估认知—恐惧条件化测试

[0492] 基本原理

[0493] 使用情景恐惧条件化作为海马依赖性记忆的测量。恐惧条件化为一种联想学习形式,所述联想学习形式测量由动物对非条件刺激(US)(诸如电击)加上条件刺激(CS)、特定音调或光或气味展示的僵直反应。利用测量僵直水平来评估动物对US和CS刺激的反应。此测试测量小鼠如何高效地忘记其在获得日所获得的内容。所述测试评估小鼠对与非条件刺激相关的条件刺激的焦虑程度以及小鼠在存在条件刺激的情况下在重复的不存在配对非条件刺激的情况下显示降低的焦虑和/或压力(僵直水平)的速度。

[0494] 方法

[0495] 用于此测试的设备由上面有灯的室组成。各个室定位于较大的室内部,所述较大的室防止其受外部光和噪音影响。在第一天(训练或获得阶段),将小鼠放入室中并且纪录其僵直行为3min(基线),随后以长达2min的间隔进行多达6次光/音调[条件刺激(CS-30s)]和足部电击[非条件刺激(US-2s)]配对。配对由提示[例如组合光(约260lx)和音调暴露(80分贝)]20s以及在提示的最后2s内足部电击组成。足部电击使僵直行为增加。电流强度为0.6mA。使用诱发僵直反应的最小电流。在最后配对之后两分钟,使小鼠回到其正常居住条件。在条件化之后24和48h(分别为2天(提取阶段)和3天(消退阶段))时,在不存在足部电击的情况下重复相同实验程序,以测试记忆保持和条件化的恐惧记忆的消退(消退阶段)。情景记忆保持的特征为当在不存在足部电击的情况下将动物放置于所述情景(即足部电击室)中时的僵直行为。

[0496] 结果

[0497] 测量获得阶段(暴露于结合在一起的CS与US两者)、提取和消退阶段(CS不与US结合)中的僵直水平(参见图4)。在此研究中,在获得阶段中每天灌胃诱导僵直水平与原初动物相比的显著增加(阶段1#p<0.05;阶段2###p<0.001;阶段3-4##p<0.01)。当与媒介物组相比时,在获得阶段期间MRX006长期处理未改变僵直水平。获得阶段后面为提取阶段,提取阶段在训练期之后耗费24小时(CS后面没有US)。数据显示在媒介物组中阶段1(暴露于第一音调)中的僵直水平与原初组相比显著增加(p<0.05)。有趣的是,当与媒介物组相比时,在MRX006处理的小鼠中在阶段1观测到僵直水平显著降低(*p<0.05)。总地来说,在提取阶段中,MRX006处理者当与媒介物组相比时展示僵直水平降低的倾向,表明用MRX006长期处理可增强学习力。提取阶段后面为消退阶段(24小时后,CS并且无US)。此测试测量小鼠如何高效地忘记其在获得日所获得的内容。在阶段3的消退阶段中媒介物组当与原初组相比时显示僵直水平增加(p<0.05)。用MRX006长期处理在消退阶段中未诱导任何显著变化。

[0498] 结论

[0499] 用MRX006长期处理在提取阶段中降低僵直水平,表明MRX006可增强学习力。总地来说,用MRX006长期处理未可观测地显著改变恐惧条件化行为。

[0500] 实施例1f—评估认知—新颖物体识别(NOR)测试**[0501] 基本原理**

[0502] 所用方案是从Bevins和Besheer(2006)改编的,并且用以测试认知,尤其识别记忆。此测试是基于与熟悉物体相比啮齿动物用更多时间探索新颖物体的自发倾向。选择探索新颖物体反映使用学习和识别记忆。此外,改善的记忆反映减轻的抑郁样行为。

[0503] 方法

[0504] 所用方案是从Bevins和Besheer (2006) 改编的。该方案历时3天来进行。在第1天，允许动物适应测试环境10分钟，所述测试环境为配备有顶部照相机的大容器。未使用垫草并且在各动物之间将容器用70%乙醇进行擦拭。在第2天，允许动物适应测试设备10分钟。在此时间之后，将动物从容器中移出并且将两个相同物体引入环境中。使动物回到所述容器并且允许它再探索10分钟。在各试验之前用70%乙醇溶液清洁物体。在训练期之后，将啮齿动物从环境移出进入24小时的延迟期。在第3天，使啮齿动物回到所述容器，所述容器此时仅含有前一天的1个熟悉物体和1个新颖物体。记录动物对2个物体的活性持续5分钟。通过人工观察记录啮齿动物探索各物体所用时间的量并且产生对应于相较于总互动时间与新颖物体互动所用的时间的辨别指数(DI)值。与对照大鼠相比DI降低指示此类型记忆的缺陷。

[0505] 结果

[0506] 每天灌胃处置未影响C57B1/6小鼠的识别记忆(图5)。实际上，两组均显示相较于熟悉物体偏好探索新颖物体更多的模式(不过未达到统计学显著性)。长期用MRX006处理的小鼠展示相较于熟悉物体探索新颖物体的偏好显著增加($p<0.05$) (图5)。

[0507] 结论

[0508] 用MRX006长期处理产生用相较于熟悉物体显著更多的时间研究新颖物体的C57B1/6小鼠，表明增强识别记忆。

[0509] 实施例1g-评估焦虑样行为-埋珠测试

[0510] 基本原理

[0511] 埋珠测试为新事物恐惧症、焦虑以及强迫强制性行为的适用模型。该测试还用以测试新颖抗抑郁剂、抗焦虑剂以及抗精神病剂。用诸如抗焦虑剂等药理学药剂预处理的小鼠与对照小鼠相比显示减轻的埋珠行为。

[0512] 方法

[0513] 将小鼠个别地放入新颖聚丙烯笼($35 \times 28 \times 18.5\text{cm}$, L×W×H)中，所述新颖聚丙烯笼含有标准啮齿动物(硬木)垫草(5cm)以及其顶部的20个弹珠(五行弹珠有规律地间隔2cm，远离笼壁并且相隔2cm)。在1000勒克司(lux)的光强度下进行实验。30分钟后，将小鼠从这些笼中移出并且对埋藏超过表面2/3的弹珠数目进行评分。

[0514] 结果

[0515] 史都登氏t检验(媒介物相较于原初; $t(20)=0.1308$; $p=0.8973$)和单因素ANOVA分析($F(2.38)=0.992$; $p=0.384$)表明用MRX006长期处理与每天灌胃均未改变埋藏弹珠的数目，表明焦虑样基线没有改变(图6)。

[0516] 结论

[0517] 在埋珠测试中用MRX006长期处理未可观测地改变C57B1/6小鼠的焦虑样行为。

[0518] 实施例1h-评估焦虑样行为-高架十字迷宫测试

[0519] 基本原理

[0520] 高架十字迷宫(EPM)为广泛用于评估啮齿动物的焦虑样行为的测试。EPM评估一般焦虑行为，其中较不焦虑的小鼠在迷宫的开放臂中耗费更多时间。开放臂活性(持续时间)增加反映抗焦虑行为。

[0521] 方法

[0522] 设置由从地板升高1米的灰色塑料十字形迷宫组成,所述灰色塑料十字形迷宫包括两个开放(嫌恶)臂和两个封闭(安全)臂($50 \times 5 \times 15\text{cm}$ 壁)。实验在红光(7勒克司)下进行。将小鼠面向开放臂(以避免直接进入封闭臂)放入迷宫中央并且允许它们探索场地六分钟的持续时间。使用装在顶板上的照相机录像记录实验以允许测量若干行为参数。在各受试者之后用70% (体积/体积)乙醇清洁设备以防止来自先前小鼠的嗅觉提示。对在开放/封闭臂中所用的时间、在中央所用的时间以及转向次数进行人工分析。分别针对焦虑样行为和自主活动性测量在各臂中所用时间的百分比和进入各臂的次数。进入臂定义为四只爪全部在臂内部。开放臂活性(持续时间)增加反映抗焦虑行为。

[0523] 结果

[0524] 史都登氏t检验分析表明每天灌胃未影响在开放臂中所用的时间(图7)。单因素ANOVA分析表明当与对照组相比时用MRX006长期处理未改变高架十字迷宫中的行为(图7)。具体地说,用Mrx006长期处理未改变在开放臂中和在封闭臂中所用的时间。

[0525] 结论

[0526] 用MRX006长期处理未可观测地改变C57B1/6小鼠在高架十字迷宫中的行为。

[0527] 实施例1i—在压力诱导的体温过高(SIH)测试中评估焦虑水平

[0528] 基本原理

[0529] SIH范式为经充分表征的焦虑指示。在此测试中,简单地通过测量直肠温度来触发压力。

[0530] 方法

[0531] 简单来说,在测试之前使动物单独居住1天。使用经润滑的温度敏感探针以15min间隔测量直肠温度两次。归因于在第一次温度测量期间所经历的压力,第二次测量的温度(T_2)高于第一次(T_1)。此温度差($\Delta T = T_2 - T_1$)定义为SIH反应。SIH反应因不同类别的抗焦虑剂而降低。

[0532] 结果

[0533] 每天灌胃处置增加 ΔT ,表明焦虑样行为(史都登氏t检验, $t(19) = 2.121, p = 0.047$)。当与媒介物组相比时,用MRX006长期处理未诱导 ΔT 变化(单因素ANOVA, $F(2.29) = 1.215; p=0.312$) (图8)。

[0534] 结论

[0535] 在压力诱导的体温过高测试中,在C57B1/6小鼠中用MRX006长期处理未可观测地改变压力诱导的温度变化。

[0536] 实施例1j-生理分析-血浆催产素水平

[0537] 方法和结果

[0538] 测量原初、媒介物以及MRX006处理的小鼠中的催产素水平(图9)。在雄性和雌性的中枢神经系统中起作用的催产素肽对于包括联络、性行为、社交识别、攻击性以及信赖的多种复杂社交行为来说为重要的。放射免疫分析(RIA)为用于测量血液中非常小量的肽和代谢产物的灵敏方法。制备用于RIA的样品并且快递以便通过RIA技术(RIAgnosis, Sinzing, Germany)进行催产素测量。在C57B1/6小鼠中用MRX006长期处理显示催产素水平降低($p < 0.05$)。

[0539] 实施例1k-生理分析-压力诱导的皮质甾酮血浆水平

[0540] 方法和结果

[0541] 皮质甾酮为响应于压力释放的主要啮齿动物激素。在此研究中,在原初、媒介物以及MRX006处理的小鼠中在基线处和强迫游泳测试(急性压力暴露)之后测量皮质甾酮水平变化(图10)。在不同时间点进行皮质甾酮测量,即在T0(强迫游泳测试之前)以及暴露于强迫游泳测试后30min(T30)、90min(T90)以及120min(T120)时进行测量。数据显示在T30时与原初组相比在媒介物组中压力诱导的皮质甾酮水平显著增加($p<0.05$)。有趣的是,在T30时当与对照组相比时在MRX006处理的小鼠中观测到压力诱导的皮质甾酮水平显著增加。在其他时间点未观测到显著变化。这些结果可表明在媒介物组与MRX006处理组中对压力的敏感性增加。

[0542] 实施例11-生理分析-体内胃肠道渗透性分析

[0543] 基本原理

[0544] 使用此程序来评估体内肠道活力。在不同长期处理之间通过经口施用荧光素衍生物后定量血液中的异硫氰酸荧光素(FITC)来定量肠道渗透性。这是经确立用于基于经口施用的荧光素衍生物通过肠道渗漏至周围系统中的原理来定量肠道渗透性的方法。

[0545] 方法

[0546] 使测试小鼠单独居住并且空腹过夜。第二天早上(约9am),通过口服灌胃施用小鼠FITC右旋糖酐((600mg/kg)。两小时后,在肝素涂布的毛细管中收集100 μ l的血液样品并且转移至深色艾本德管(darkened eppendorf)中并且放置于冰上。将样品3500 \times g离心15分钟,吸出血浆并且将样品储存在-80 $^{\circ}$ D下长久储存。

[0547] 使用未稀释的血浆来定量FITC浓度。将25 μ l的FITC一式两份移液至384孔板(Greiner bio one)中。用Victor光谱仪在490nm-520nm的范围之间测量FITC。对于标准曲线,在PBS(pH7.4)中制备FITC的连续稀释液。吸收率增加指示屏障完整性降低。

[0548] 结果

[0549] 数据显示在每天灌胃情况下肠道渗透性增加的倾向($p=0.051$),但它未能达到显著性(图11)。MRX006组之间的总肠道渗透性保持不变。

[0550] 结论

[0551] 用MRX006长期处理对肠道渗透性未展示可观测的影响。

[0552] 实施例1m-生理分析-器官重量和结肠长度

[0553] 每天灌胃处置和用MRX006长期处理未诱导盲肠重量、脾脏重量以及肾上腺重量的变化(图12)。

[0554] C57B1/6小鼠模型的结论

[0555] 在广泛用于筛选抗抑郁样活性的测试强迫游泳测试中用MRX006长期处理诱导抗抑郁样作用。此外,用MRX006长期处理增强C57B1/6小鼠的社交行为,在3-室测试中所述小鼠用相较于熟悉小鼠更多的时间与新颖小鼠互动,表明MRX006逆转社交损伤,社交损伤为自闭症谱系病症的核心症状。此外,在恐惧条件化测试中用MRX006长期处理倾向于降低僵直水平,表明施用此菌株改善记忆的认知功能并且降低C57B1/6小鼠的焦虑。

[0556] 需要其他研究来表征当短期或亚长期施用时MRX006对催产素水平和皮质甾酮水平的影响。证据表明MRX006调节下丘脑垂体轴(HPA)的信号传导。

[0557] 因此,MRX006的施用引起抗抑郁作用,增强社交新颖性并且引起促认知作用。

[0558] 实施例2-BTBR小鼠模型

[0559] BTBR小鼠模型使用展示稳健孤独症样表型的近交、基因修饰小鼠。在此品系中已报道社交行为缺陷、增加的重复行为以及增加的焦虑相关行为 (Meyza和Blanchard, 2017)。归因于此稳健行为表型,BTBR小鼠为用于评估新颖治疗剂用于治疗孤独症相关行为的功效的理想动物模型。通过活生物治疗剂来缓解此类症状还可指示生物治疗剂在治疗其他精神病学或神经疾病方面的功效。

[0560] 实施例2a-用于BTBR小鼠模型的材料和方法

[0561] 小鼠

[0562] 在室内培育雄性BTBR小鼠。使动物居住在按12h暗循环(7:00-19:00h开灯)的温度和湿度受控的房间中。全部实验根据欧洲指令2010/63/EEC 2012年的S.I. 编号543的要求来进行,并且由科克大学的动物实验伦理委员会批准。

[0563] 菌株

[0564] MRX006:以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌。

[0565] 在甘油储备液中提供生物治疗剂。使活生物治疗剂在设备中在厌氧条件下生长。

[0566] 活生物治疗剂施用

[0567] 当小鼠8周龄时开始使用MRX006或媒介物进行给药。在开始行为系列之前每天用MRX006或磷酸盐缓冲溶液(PBS)将这些小鼠处理一次,持续3周。在行为系列期间每天将小鼠再处理一次。在施用之前将MRX006(1X10⁷至1X10⁹ CFU,经口施用)溶解于PBS中。

[0568] 施用时间表

[0569] 以下示出用于研究的处理组。用于经口施用的媒介物为PBS。经由口服灌胃进行每天经口施用。

组	处理	次数
1	对照(PBS, 口服灌胃)	10
2	MRX006 (于 PBS 中口服灌胃)	10

[0570] 粪便收集

[0571] 每周从个别小鼠收集新鲜粪便样品直到研究结束。将至少20mg的新鲜粪便放置于微量离心管中,立即放置于冰上并且然后储存在-80°C下。

[0572] 实验设计和方法

[0573] 如上文所概述,当小鼠8周龄时开始使用MRX006进行给药。在行为实验之前,进行3周初始给药。按以下顺序进行行为系列:第4周时埋珠测试;第5周时高架十字迷宫;第6周时旷场和新颖物体识别测试以及食物偏好社交传递测试;第7周时雌性尿液嗅闻和社交互动测试以及第9周时强迫游泳测试。胭脂红胃肠道活力分析和胃肠道渗透性分析尾部放血分别在第8周和第9周期间进行。最后,在第10周至第11周,将小鼠杀死用于脾细胞刺激以及回肠和结肠中的FITC的离体测量。

[0574] 以下实施例中概述了在BTBR模型中活生物治疗剂处理对刻板、社交以及抑郁样行为以及胃肠道参数(渗透性和活力)的影响。

[0575] 上表中所列的组1代表对照BTBR小鼠,对照BTBR小鼠将预期显示与自闭症谱系病症相关的表型。处理对自闭症谱系病症的行为症状的任何影响将通过组1与组2之间的差异

来鉴定。

[0578] 图解设计和统计分析

[0579] 全部图均在graphpad prism软件(第5版)上产生。使用IBM SPSS Statistic 22.0 (EEUU) 分析数据。使用柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫正态性检验分析数据分布。使用单因素ANOVA和费雪最小显著差异(LSD)事后检验对比较媒介物组与MRX006组的数据进行分析。如果ANOVA未揭示处理的显著影响,那么针对对照组进行事前成对比较测试。通过克鲁斯卡尔-沃利斯和非参数曼-惠特尼U检验分析非正态分布的数据。P<0.05为统计显著性的准则。

[0580] 实施例2b-社交行为的评估-三室社交互动测试

[0581] 基本原理

[0582] 3-室社交互动测试(3-CSIT)为充分验证的行为学相关模型,所述行为学相关模型评估性匹配同种个体之间的社交互动并且允许读出小鼠的社交新颖性和社交偏好。所述测试允许小鼠在无生命物体或性匹配同种小鼠之间自由探索。

[0583] 方法

[0584] 将动物放置于矩形设备中,所述矩形设备由具有小圆孔从而允许方便进出所有区室的隔板划分成三个室(左室和右室以及较小的中间室)。所述测试由三个依序进行的10min试验组成:(1)习惯(允许测试动物探索三个空室);(2)社交性(将不熟悉的动物放置于左室或右室中的内部网线笼中);(3)社交新颖性偏好(将新颖动物放入室中先前为空的相反地现在有熟悉的动物的内部笼中)。原初动物应不具有对习惯阶段中的任一室的偏好、对社交性阶段的小鼠的偏好以及对社交新颖性阶段的新颖小鼠的偏好。辨别比率增加将表明社交行为增加。全部动物为年龄和性别匹配的,在每次30分钟试验之后清洁各个室并且垫上新鲜垫草。对于三个阶段中的每一者,通过安装在设备上的摄像机记录行为。

[0585] 结果

[0586] 关于评估社交性,组内的史都登氏t检验揭示对于MRX006组来说相对于物体对新颖同种个体(CS)的偏好增加[$t(22) = 5.281; P < 0.0001$] (图13A)。关于评估社交新颖性,组内的史都登氏t检验揭示仅在媒介物组中对新颖同种个体的偏好增加[$t(22) = 3.452; P < 0.001$]。与新颖同种个体的互动时间的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3, 47) = 2.492; P = 0.43$; 图13B]。然而,事前成对比较测试表明用MRX006 ($t(22) = 0.7497; P = 0.4614$) 处理当与媒介物组相比时使与新颖同种个体的互动时间减少。研究新颖同种个体所用时间百分比的ANOVA揭示处理的影响 [$F(3, 47) = 2.942; P = 0.0433$; 图13C]。事后比较揭示用MRX006处理使研究新颖同种个体的时间的百分比降低($p < 0.05$)。

[0587] 双因素ANOVA分析[物体/同种个体(CS): [$F(1, 47) = 21.164; P < 0.0001$; 处理: $F(1, 47) = 0.56; P = 0.815$; 物体/CS x 处理: $F(1, 47) = 5.414; P = 0.025$] 继之以事后分析表明MRX006处理的小鼠用相较于物体更多的时间研究同种个体($p < 0.01$; 图13D)。双因素ANOVA分析[熟悉相较于新颖: $F(1, 47) = 3.454; P = 0.070$; 处理: $F(1, 47) = 0.360; P = 0.552$; F/N x 处理: $F(1, 47) = 8.627; P = 0.005$] 继之以事后比较表明用MRX006处理的小鼠用相较于熟悉的小鼠显著更少的时间研究新颖小鼠($p < 0.05$; 图13E)。相比之下,媒介物小鼠用相较于熟悉的同种个体更多的时间研究新颖小鼠($p < 0.05$; 图13E)。百分比分析表明当与媒介物组相比较时,MRX006处理的小鼠用更少的时间与新颖同种个体互动($t = 2.480$ df = 22; $P =$

0.0213;图13F)。

[0588] 结论

[0589] 在三室测试中用MRX006长期处理降低BTBR小鼠的社交新颖性并且降低社交认知。

[0590] 实施例2c-社交行为的评估-强迫入侵者测试

[0591] 基本原理

[0592] 此程序评估啮齿动物之间的社交互动行为。通过将入侵者小鼠放入居留小鼠的居住笼中,可评估社交互动和攻击行为。

[0593] 方法

[0594] 各时期由将入侵者小鼠放入居留小鼠的居住笼中10分钟的时间组成。使用装在顶板上的照相机录像记录实验以允许测量若干行为参数。记录动物用于互动的时间量。

[0595] 结果

[0596] 互动时间的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3,45) = 2.327; P=0.088$;图14]。类似地,事前成对比较测试表明用MRX006处理 ($t=1.425 df=22; P=0.1682$) 当与媒介物组相比时未影响社交互动行为。

[0597] 结论

[0598] 在社交互动测试中用MRX006长期处理不影响BTBR小鼠的社交行为。

[0599] 实施例2d-刻板行为的评估-埋珠测试

[0600] 基本原理

[0601] 此测试评估重复、强迫以及焦虑行为。埋藏弹珠的数目较高指示更加焦虑或刻板的行为。实际上,用诸如抗焦虑剂等药理学药剂处理的小鼠与对照小鼠相比显示减弱的埋珠行为。

[0602] 方法

[0603] 将小鼠个别地放入新颖聚丙烯笼 ($35 \times 28 \times 18.5\text{cm}, L \times W \times H$) 中,所述新颖聚丙烯笼含有标准啮齿动物(硬木)垫草 (5cm) 以及其顶部的20个弹珠(五行弹珠有规律地间隔2cm,远离笼壁并且相隔2cm)。在1000勒克司的光强度下进行实验。30分钟后,将小鼠从这些笼中移出并且对埋藏超过表面2/3的弹珠数目进行评分。

[0604] 结果

[0605] 如通过ANOVA所测定,处理对埋藏弹珠的数目无影响 [$F(3,45) = 1.64; P=0.193$]。然而,事前成对比较测试表明MRX006 ($t=2.276 df=21, p<0.05$) 使埋藏弹珠的数目减少(图15)。

[0606] 结论

[0607] 在埋珠测试中用MRX006处理使BTBR小鼠的重复行为减轻。

[0608] 实施例2e-刻板行为的评估-梳理测试

[0609] 基本原理

[0610] 使用此测试作为刻板和重复行为的指示。梳理所用时间增加指示刻板或重复行为增加。

[0611] 方法

[0612] 将小鼠个别地放入新颖玻璃烧杯 (500mL) 中,所述新颖玻璃烧杯用树脂玻璃(Plexiglas)顶部覆盖。在60勒克司的光强度下进行实验。使用附接至三脚架的手持摄像机

录像记录实验。记录梳理行为20分钟。

[0613] 结果

[0614] 如通过ANOVA [$F(3,47) = 4.174; P=0.011$] 所测定活生物治疗剂对梳理活性存在显著影响。事后比较表明相对于媒介物组用MRX006处理使梳理所用时间的量显著减少 ($p < 0.05$) (图16)。类似地,事前成对比较测试表明与媒介物组相比MRX006 ($t = 2.895 df = 22, p < 0.01$) 使梳理所用时间减少。

[0615] 结论

[0616] 在梳理测试中用MRX006长期处理使BTBR小鼠的重复行为减轻。

[0617] 实施例2f-焦虑样行为的评估-高架十字迷宫

[0618] 基本原理

[0619] 高架十字迷宫 (EPM) 为广泛用于评估啮齿动物的焦虑样行为的测试。EPM评估一般焦虑行为,其中较不焦虑的小鼠在迷宫的开放臂中耗费更多时间。开放臂活性(持续时间)增加反映抗焦虑行为。

[0620] 方法

[0621] 设置由从地板升高1米的灰色塑料十字形迷宫组成,所述灰色塑料十字形迷宫包括两个开放(嫌恶)臂和两个封闭(安全)臂 (50x 5x 15cm壁)。实验在红光(7勒克司)下进行。将小鼠面向开放臂(以避免直接进入封闭臂)放入迷宫中央并且允许它们探索场地五分钟的持续时间。使用装在顶板上的照相机录像记录实验以允许测量若干行为参数。分别针对焦虑样行为和自主活动性测量在各臂中所用时间的百分比以及进入各臂的次数。进入臂定义为四只爪全部在臂内部。

[0622] 结果

[0623] ANOVA分析揭示活生物治疗剂处理对在封闭臂中所用时间的百分比无影响 [$F(3,47) = 0.885; P=0.457$; 图17A]。开放臂中所用时间百分比的克鲁斯卡尔沃利斯非参数分析揭示处理无影响[卡方 (chi-squared) = 1.220; $df = 3; P = 0.748$; 图17B]。进入封闭臂的次数的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3,44) = 1.82; P = 0.159$; 图17C]。进入开放臂的次数的克鲁斯卡尔沃利斯非参数分析揭示处理无影响 [卡方 = 2.045; $df = 3; P = 0.563$; 图17D]。

[0624] 结论

[0625] 在高架十字迷宫中用MRX006长期处理对BTBR小鼠的焦虑样行为无影响。

[0626] 实施例2g—焦虑样行为的评估-旷场场地

[0627] 基本原理

[0628] 使用旷场场地来评估暴露于新颖压力环境的反应和自主活动性。原初小鼠天然地将大多数时间耗费在场地壁旁边,因为它与场地中央相比暴露较少。在中央所用时间的持续时间增加表示焦虑样行为减轻。

[0629] 方法

[0630] 将小鼠个别地放入旷场场地 ($43 \times 35 \times 25, L \times w \times h$) 中并且允许它们探索10分钟。实验在60勒克司的光强度下进行。使用装在顶板上的照相机录像记录实验以允许使用Ethovision软件测量若干行为参数。针对自主活动性对行进距离进行评分。

[0631] 结果

[0632] 移动距离的ANOVA未揭示处理对在旷场场地中的自主活动性的影响 [$F(3,47) =$

0.317; P=0.813; 图18A和图18D]。在外部区域所用时间的ANOVA未揭示处理的影响 [F (3, 46) = 2.217; P=0.100; 图18B]。然而,事前成对比较测试表明MRX006处理 ($t=2.791df=21;p<0.05$; 图18E) 使在旷场场地外部区域所用的时间减少。在内部区域所用时间的ANOVA未揭示处理的影响 [F (3, 46) = 2.217; P=0.100; 图18C]。然而,事前成对比较测试表明MRX006处理 ($t=2.791df=21;p<0.05$; 图18F) 使在旷场场地内部区域所用的时间增加。

[0633] 结论

[0634] 在旷场场地测试中用MRX006长期处理使BTBR小鼠的焦虑样行为减轻。

[0635] 实施例2h-抑郁样行为的评估-强迫游泳测试

[0636] 基本原理

[0637] 强迫游泳测试 (FST) 为最广泛用于评估抗抑郁活性的实验范式。在适应不动的浮起姿势之前,原初动物将以游泳、攀爬以及潜水的形式展示逃避行为。不动的持续时间指示行为绝望程度。抗抑郁药物使在此测试中不动所用的时间减少。

[0638] 方法

[0639] 迫使小鼠在用23–25°C自来水填充至17cm深的玻璃筒中 (24×21cm) 游泳6min。由装在顶板上的照相机录像记录FST。评分的行为参数为在6-min测试的最后4min期间的不动性。

[0640] 结果

[0641] 不动时间的ANOVA未揭示处理的影响 [F (3, 46) = 1.309; P=0.284; 图19]。

[0642] 结论

[0643] 在强迫游泳测试中用MXR006长期处理不影响BTBR小鼠的不动时间。

[0644] 实施例2i-抑郁样行为的评估-雌性尿液嗅闻测试

[0645] 基本原理

[0646] 使用雌性尿液嗅闻测试 (FUST) 来评估啮齿动物的快感缺乏样行为。嗅闻时间减少表明社交回避/快感缺乏,而增加表示社交行为/快感行为增加。

[0647] 方法

[0648] 在测试之前使实验小鼠单独居住一周。在测试期间,将于无菌水中浸泡过的棉球棍放入居住笼中并且允许小鼠嗅闻/研究三分钟。在此三分钟测试之后,将棉球棍移出。45分钟后,将新的棉球棍浸入雌性尿液(从处于周期的发情期的相同品系的雌性小鼠收集)中,并且放入笼中。允许小鼠对此再嗅闻/研究三分钟。记录嗅闻水和尿液所用的时间量。

[0649] 结果

[0650] 对于媒介物组,史都登氏t检验揭示相对于嗅闻水所用的时间嗅闻尿液所用的时间显著增加 [$t (16) = 2.611; P=0.0189$; 图20A]。对于暴露于水,在水组中嗅闻所用时间的ANOVA未揭示处理的影响 [F (3, 35) = 0.875; P=0.464]。对于暴露于尿液,嗅闻所用时间的ANOVA未揭示处理的影响 [F (3, 34) = 2.153; P=0.114]。然而,事前比较表明当与媒介物组相比时用MRX006长期处理 ($t=3.602df=16;P=0.0024$) 使嗅闻尿液所用的时间增加。

[0651] 双因素ANOVA分析 [尿液: [F (1, 36) = 44.118; P<0.0001]; 处理: [F (1, 36) = 12.335; P=0.001]; 尿液x处理: [F (1, 36) = 9.236; P=0.005] 继之以事后检验表明与媒介物组相比用MRX006处理的小鼠用更多时间嗅闻尿液 (* $p<0.01$; 图20B)。重要地,正如所料媒介物小鼠用比水更多的时间嗅闻尿液 (# $p<0.05$)。

[0652] 结论

[0653] 在雌性嗅闻尿液测试中用MRX006长期处理使BTBR小鼠嗅闻雌性尿液所用的时间显著增加。

[0654] 实施例2j-抑郁样行为的评估-新颖物体识别测试

[0655] 基本原理

[0656] 所用的方案为从Bevins和Besheer (2006) 改编的,并且用以测试识别记忆。改善的记忆反映减轻的抑郁样行为。

[0657] 方法

[0658] 所用方案为从Bevins和Besheer (2006) 改编的。该方案历时3天来进行。在第1天,允许动物适应测试环境10分钟,所述测试环境为配备有顶部照相机的大容器。未使用垫草并且在各动物之间将容器用70%乙醇进行擦拭。在第2天,允许动物适应测试设备10分钟。在此时间之后,将动物自容器中移出并且将两个相同物体引入环境中。使动物回到所述容器并且允许它再探索10分钟。在各试验之前用70%乙醇溶液清洁物体。在训练期之后,将啮齿动物从环境移出进入24小时的延迟期。在第3天,使啮齿动物回到所述容器,所述容器此时仅含有前一天的1个熟悉物体和1个新颖物体。记录动物对2个物体的活性持续5分钟。通过人工观察记录啮齿动物探索各物体所用时间的量并且产生对应于相较于总互动时间与新颖物体互动所用的时间的辨别指数(DI)值。与对照大鼠相比DI降低指示此类型记忆的缺陷。

[0659] 结果

[0660] 组内的史都登氏t检验在新颖物体识别测试的第一天未揭示对物体A或B的偏好(图21A)。组内的史都登氏t检验未揭示相对于熟悉物体对新颖物体的偏好。对于新颖物体,互动时间的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3, 46) = 0.122; P = 0.946$; 图21B]。此外,通过ANOVA分析揭示处理对辨别指数无影响 [$F(3, 47) = 0.535; P = 0.661$; 图21C]。

[0661] 结论

[0662] 在新颖物体识别测试中用MRX006长期处理对BTBR小鼠的认知行为无影响。

[0663] 实施例2k-体内胃肠道渗透性分析

[0664] 基本原理

[0665] 使用此程序来评估体内肠道活力。

[0666] 方法

[0667] 使测试小鼠单独居住并且空腹过夜。第二天早上(约9am),通过口服灌胃向小鼠施用FITC右旋糖酐((600mg/kg)。两小时后,在肝素涂布的毛细管中收集100 μ l的血液样品并且转移至深色艾本德管中并且放置于冰上。将样品3500 \times g离心15分钟,吸出血浆并且将样品储存在-80 $^{\circ}$ D下长久储存。

[0668] 使用未稀释的血浆来定量FITC浓度。将25 μ l的FITC一式两份移液至384孔板(Greiner bio one)中。用Victor光谱仪在490nm-520nm的范围之间测量FITC。对于标准曲线,在PBS (pH7.4) 中制备FITC的连续稀释液。吸收率增加指示屏障完整性降低。

[0669] 结果

[0670] 通过经口施用荧光化合物异硫氰酸荧光素(FITC),随后后续尾部放血以评估血浆中的FITC水平来评估肠道屏障功能。FITC浓度的ANOVA未揭示处理的显著影响 [$F(3, 47) =$

1.366;P=0.266;图23]。

[0671] 结论

[0672] 用MRX006长期处理未影响BTBR小鼠的肠道渗透性。

[0673] 实施例21-离体胃肠道渗透性分析

[0674] 基本原理和方法

[0675] 使用尤斯灌流室(Ussing chamber)离体评估回肠和结肠的渗透性。从小鼠切除结肠和回肠并且收集至含有克雷布氏缓冲液(Kreb's buffer)的5mL管子中。沿肠系膜线切割结肠与回肠两者并且安装至尤斯灌流室设备上。对于结肠,将4mL的含有右旋葡萄糖的克雷布氏溶液添加至尤斯灌流室设备的两侧。对于回肠,将4mL的含有D-甘露糖醇的克雷布氏溶液添加至粘膜侧,同时将相等体积的含右旋葡萄糖的克雷布氏溶液添加至浆膜侧。将灌流室用卡波金气体(carbogen gas)(95%O₂和5%CO₂)充氧并且保持在37°C下以维持组织完整性。将2.5mg/mL FITC-右旋糖酐添加至粘膜室中。在时间点0min(基线)、60min、90min以及120min从浆膜室取得样品。将25μl的FITC一式两份移液至384孔板(Greiner bio one)中。用Victor光谱仪在490nm-520nm的范围之间测量FITC。对于标准曲线,在PBS(pH7.4)中制备FITC的连续稀释液。

[0676] 结果

[0677] 在离体肠道渗透性分析中,重复测量ANOVA揭示时间对结肠[F(3,87)=64.197;P<0.0001]与回肠[F(3,87)=34.572;P<0.0001]两者的影响。重复测量ANOVA未揭示处理相对于时间对结肠[F(9,87)=1.184;P=0.316;图23A]或回肠[F(9,87)=0.810;P=0.609;图22B]的影响。

[0678] 结论

[0679] 用MRX006长期处理不影响结肠或回肠的渗透性。

[0680] 实施例2m-体内胃肠道活力分析

[0681] 基本原理

[0682] 使用此程序来评估体内肠道活力。

[0683] 方法

[0684] 在开始测试之前使小鼠单独居住。为小鼠经口灌胃给予不可吸收的有色染料(胭脂红)。记录排泄第一团有色粪便的时间并且用作整个肠道的蠕动活力的指示。

[0685] 结果

[0686] 通过口服灌胃向小鼠施用不可吸收的有色染料(胭脂红)。记录排泄第一团有色粪便的时间并且用作整个肠道的蠕动活力的指示。活力时间的ANOVA揭示处理无影响[F(3,47)=2.097;P=0.114]。然而,事前成对比较测试表明当与媒介物组相比时用MRX006处理的小鼠(t=2.270df=22,p<0.05;图24)展示改变的肠道活力。

[0687] 结论

[0688] 在BTBR小鼠中用MRX006长期处理显示降低的肠道活力。

[0689] 实施例2n-压力诱导的循环皮质甾酮测定

[0690] 基本原理

[0691] 暴露于FST产生HPA轴的稳健活化,并且应激激素皮质甾酮的水平增加。将在暴露于FST之前和之后得到的血浆皮质甾酮浓度用作压力诱导的下丘脑垂体肾上腺(HPA)轴活

化的指示。

[0692] 方法

[0693] 在FST当天,将小鼠从其居住笼移出并且移至手术室,在其中取得基础血液样品。使用解剖刀片去除尾部的最尖端(1mm)。使用肝素化的毛细管收集血液并且然后转移至微量离心管中。还在暴露于FST之后30、60、90以及120分钟时取得血液样品以评估峰值和回收皮质甾酮水平。将血液保持在冰上并且然后在4°C下在2,500×g下离心15分钟。遵循供应商说明书(ENZO皮质甾酮ELISA,ADI-900-097,Enzo Life Sciences),通过ELISA评估血浆皮质甾酮。

[0694] 结果

[0695] 重复测量ANOVA揭示时间的显著影响 [$F(4, 164) = 127.127; P < 0.0001$; 图25]。事后比较揭示所有组在30分钟时间点的循环皮质甾酮显著增加。重复测量ANOVA未揭示处理相对于时间的显著影响 [$F(12, 164) = 0.561; P = 0.871$]。

[0696] 结论

[0697] 用MRX006长期处理不影响暴露于强迫游泳测试的BTBR小鼠中的压力诱导的皮质甾酮水平。

[0698] 实施例2o-器官重量和结肠长度

[0699] 按体重%计的器官重量的ANOVA未揭示处理对肾上腺 [$F(3, 44) = 1.480; P = 0.234$; 图26A]、脾脏 [$F(3, 43) = 0.779; P = 0.513$; 图26B]或盲肠 [$F(3, 44) = 0.441; P = 0.725$; 图26C]的影响。结肠长度的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3, 46) = 0.826; P = 0.487$; 图26D]。

[0700] 结论

[0701] 用MRX006处理不影响选择性解剖学标记物。

[0702] 实施例2p-体重监测

[0703] 在实验的持续时间内每周一次评估动物体重以确定细菌菌株中的任一者是否影响此特定参数。重复测量ANOVA揭示时间的显著影响 [$F(11, 484) = 111.217; P < 0.0001$; 图27]。重复测量ANOVA未揭示处理相对于时间的影响 [$F(33, 484) = 0.581; P = 0.971$]。

[0704] 结论

[0705] 用MRX006长期处理不影响BTBR小鼠的体重。

[0706] BTBR小鼠模型的结论

[0707] 此研究的主要发现为用MRX006处理使刻板和焦虑相关行为减弱。具体地说, MRX006使埋珠测试中埋葬弹珠的数目减少并且使动物用于梳理的时间的量减少。此外, 用此活生物治疗剂处理使在旷场中央所用时间的量增加, 这与在周边所用时间的量减少一致, 这指示抗焦虑样作用。然而, 在高架十字迷宫测试中观测到对焦虑样行为无影响。MRX006改善BTBR小鼠的刻板和焦虑相关行为的能力为有前景的并且表明它可为有效治疗剂。

[0708] MRX006还使嗅闻来自雌性小鼠的尿液所用的时间增加。最初将雌性尿液嗅闻测试设计为评估啮齿动物的快感样行为的测试, 其中将嗅闻尿液所用时间增加解释为寻求奖赏行为增加(Malkesman等, 2010)。鉴于未报道BTBR小鼠展示抑郁样表型, 在当前实验中在用MRX006处理之后观测到嗅闻尿液所用时间增加可能不反映快感行为的改善。相反地, 可能

MRX006增加这些小鼠识别和加工社交信息(即雌性费洛蒙)的能力。然而,在3室测试和社交互动测试中未观测到组间社交行为的差异。用MRX006处理使小鼠研究新颖同种小鼠所用的时间量相对于熟悉的同种个体有所减少。

[0709] 除了肠道活力,当前研究中所评估的活生物治疗剂未影响所测量的若干生理参数。举例来说,在压力诱导的皮质甾酮分泌、解剖重量、肠道渗透性或总体重中观测到活生物治疗剂无影响。在肠道活力分析中,用MRX006处理使以胭脂红染料口服灌胃之后第一团红色球粒出现所用的时间延长。此类结果表明MRX006延长肠道活力。

[0710] 实施例3-母体免疫活化(MIA)小鼠模型

[0711] MIA小鼠模型使用妊娠小鼠的环境免疫激发以在后代中触发自闭症谱系病症的核心症状。MIA小鼠典型地展示刻板行为(如由梳理和埋珠测试所显示)和社交沟通缺陷(如由社交玩耍、3-室社交互动以及食物偏好社交传递测试所显示)。后代展示自闭症的三种核心症状(沟通减少;社交性降低;以及重复或刻板行为增加)并且因此提供适合用于确定施用治疗剂是否可缓解与自闭症谱系病症相关并且确实存在于许多其他神经病症中的行为表型的模型。充分确定的是,不管了解潜在生物机制抑或生理机制,动物模型中行为表型的改变指示潜在临床相关干预(Crawley 2012)。

[0712] 实施例3a-用于MIA小鼠模型的材料和方法

[0713] 小鼠

[0714] 如先前所描述进行母体免疫活化(环境ASD小鼠模型)方案(Hsiao, McBride等2013)。简单来说,根据(Hsiao, McBride等2013)中所描述的方法在E12.5为妊娠C57BL/6N小鼠(ENVIGO, UK)腹膜内注射盐水或20mg/kg聚(I:C)。这些小鼠在以下实验中列为MIA小鼠。雄性小鼠在8周龄时开始行为。使动物居住在按12h暗循环(7:00-19:00h开灯)的温度和湿度受控的房间中。全部实验根据欧洲指令2010/63/EEC 2012年的S.I.编号543的要求来进行,并且由科克大学的动物实验伦理委员会批准。

[0715] 菌株

[0716] MRX006:以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌。

[0717] 使活生物治疗剂在设备中在厌氧条件下生长。

[0718] 活生物治疗剂施用

[0719] 当小鼠8周龄时开始使用MRX006或媒介物进行给药。在开始行为系列之前每天用MRX006或磷酸盐缓冲溶液(PBS)将这些小鼠处理一次,持续3周。在行为系列期间将小鼠每天再处理一次,持续5周。在施用之前将MRX006(1X10⁷至1X10⁹ CFU,经口施用)溶解于PBS中。

[0720] 施用时间表

[0721] 以下示出用于研究的处理组。用于经口施用的媒介物为PBS。经由口服灌胃进行每天经口施用。

	组	处理	次数
[0722]	1	对照(PBS, 口服灌胃)	9
[0723]	2	媒介物 MIA (PBS, 口服灌胃)	15
	3	MRX006 MIA (于 PBS 中口服灌胃)	13

[0724] 粪便收集

[0725] 每周从个别小鼠收集新鲜粪便样品直到研究结束。将至少20mg的新鲜粪便放置于微量离心管中,立即放置于冰上并且然后储存在-80°C下。

[0726] 实验设计和方法

[0727] 如上文所概述,当小鼠8周龄时开始使用MRX006或媒介物进行给药。按以下顺序进行行为系列:第4周时旷场场地测试,第5周时埋珠测试;第6周时食物偏好社交传递测试以及第7周时雌性尿液嗅闻测试。胭脂红胃肠道活力分析和胃肠道渗透性分析尾部放血分别在第7周和第8周期间进行。最后,在第9周,将小鼠杀死用于脾细胞刺激以及回肠和结肠中的FITC的离体测量。

[0728] 以下实施例中概述了在MIA模型中活生物治疗剂处理对刻板、社交以及抑郁样行为以及胃肠道参数(渗透性和活力)的影响。

[0729] 上表中所列的组2代表母体免疫活化小鼠,在妊娠期间将其母体用聚(I:C)处理。这些小鼠将预期与对照小鼠(组1)相比显示与自闭症谱系病症相关的表型,此对照确保聚(I:C)施用在母体小鼠后代中引起预期行为症状。处理对自闭症谱系病症的行为症状的任何影响将通过组2与组3之间的差异来鉴定。

[0730] 图解设计和统计分析

[0731] 全部图均在graphpad prism软件(第5版)上产生。使用IBM SPSS Statistic 22.0 (EEUU) 分析数据。使用柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫正态性检验分析数据分布。使用单因素ANOVA和费雪最小显著差异(LSD)事后检验对比较媒介物组与MRX006组的数据进行分析。如果ANOVA未揭示处理的显著影响,那么针对对照组进行事前成对比较测试。通过克鲁斯卡尔-沃利斯和非参数曼-惠特尼U检验分析非正态分布的数据。P<0.05为统计显著性的准则。

[0732] 实施例3b-刻板行为的评估-埋珠测试

[0733] 基本原理

[0734] 此测试评估重复、强迫以及焦虑行为。埋藏弹珠的数目较高指示更加焦虑或刻板的行为。实际上,与对照小鼠相比,用诸如抗焦虑剂等药理学药剂处理的小鼠显示减少的埋珠行为。

[0735] 方法

[0736] 将小鼠个别地放入新颖聚丙烯笼($35 \times 28 \times 18.5\text{cm}$, $L \times W \times H$)中,所述新颖聚丙烯笼含有标准啮齿动物(硬木)垫草(5cm)以及其顶部的20个弹珠(五行弹珠有规律地间隔2cm,远离笼壁并且相隔2cm)。在1000勒克司的光强度下进行实验。30分钟后,将小鼠从这些笼中移出并且对埋藏超过表面2/3的弹珠数目进行评分。

[0737] 结果

[0738] 对照组与媒介物MIA组之间的史都登氏t检验分析表明与对照组相比媒介物MIA小鼠埋藏更多弹珠($t(21) = 2.751, P = 0.011$;图28)。埋藏弹珠的数目的ANOVA揭示处理的显著影响 [$F(3, 48) = 18.39, P < 0.001$]。事后比较表明用MRX006长期处理使埋藏弹珠的数目减少($p < 0.01$;图28)。

[0739] 结论

[0740] 媒介物MIA组显示埋藏了比对照组显著更多的弹珠,表明MIA模型在小鼠中成功触

发自闭症谱系病症样症状。用MRX006长期处理使MIA小鼠的重复、强迫以及焦虑行为减轻。

[0741] 实施例3c-社交行为的评估-食物偏好社交传递

[0742] 基本原理

[0743] 食物偏好社交传递为嗅觉记忆的相关测试,所述测试在小鼠中用于评估社交行为。在此测试中,观察者小鼠与最近吃过新颖食物的展示者小鼠互动。当观察者小鼠面对展示者吃过的食物与另外一些新颖食物之间的选择时,观察者小鼠会偏爱展示者吃过的食物。降低的食物偏好将指示降低的社交性。

[0744] 方法

[0745] 如先前所描述进行此测试(Desbonnet, Clarke等2015)。简单来说,在测试之前18小时,剥夺小鼠的食物,而水任意获取。食物选择由与研磨过的小鼠食物一起制备的1%研磨过的肉桂或2%粉末可可组成。从每个笼中随机选择展示者小鼠并且用蓝色标记物标记尾部以能够在后续社交互动期间加以鉴定。在1小时取样期之前和之后将展示者食物容器称重。包括在测试中需要消耗最少0.2g的食物。将展示者小鼠放回其相应居住笼进入与笼同伴的30分钟互动期。随后,个别测试笼同伴对提示的食物或新颖食物的偏好。在即将进入每个选择期之前和之后将容器称重。然后将所观测的小鼠放回其相应居住笼并且在24小时后重复选择期。测试小鼠将在不存在展示者小鼠作为社交提示的情况下嗅闻肉桂或可可,并且当给出两者之间的选择时优先选择相同食物。

[0746] 结果

[0747] 食物偏好百分比的史都登氏t检验揭示在0小时($t(22)=0.3325, P=0.7427$)或24小时($t(21)=0.2878, P=0.7763$)评估时对照与媒介物MIA组之间无差异。展示者提示的食物偏好的ANOVA揭示当观察者暴露于食物选择时在0小时 [$F(3,48)=1.49, P=0.228$;图29A]或24小时评估 [$F(3,47)=2.66, P=0.059$;图29B]时无显著差异。在食物偏好社交传递测试中用MRX006处理未改变对提示的食物的偏好。

[0748] 结论

[0749] 媒介物MIA组未展示降低的食物偏好社交传递(MIA媒介物展示与对照相比食物偏好无改变),表明MIA模型尚未触发降低的社交性表型。用MRX006长期处理对食物偏好无影响。然而,由于MIA模型在此测试中似乎未引起降低的社交性表型,故不可能在食物偏好社交传递测试中测定用MRX006长期处理对社交性的影响。

[0750] 实施例3d-焦虑样行为的评估-旷场场地

[0751] 基本原理

[0752] 使用旷场场地来评估暴露于新颖压力环境的反应和自主活动性。原初小鼠天然地将大多数时间耗费在场地壁旁边,因为它与场地中央相比暴露较少。在中央所用的持续时间增加表示焦虑样行为减轻。

[0753] 方法

[0754] 将小鼠个别地放入旷场场地($43 \times 35 \times 25, L \times w \times h$)中并且允许它们探索10分钟。实验在60勒克司的光强度下进行。使用装在顶板上的照相机录像记录实验以允许使用Ethovision软件测量若干行为参数。针对自主活动性对行进距离进行评分。

[0755] 结果

[0756] 史都登氏t检验揭示对照与媒介物MIA组之间的移动总距离无显著差异($t(22)=$

0.9357, P=0.3596)。移动总距离的ANOVA揭示处理的显著影响 [$F(3, 47) = 4.36, P=0.003$, 图30A]。事后比较表明相对于媒介物处理的动物用MRX006处理使行进的总距离减小 ($p < 0.05$)。史都登氏t检验揭示相对于对照组由媒介物MIA组在旷场外部区域所用的时间显著增加 ($t(21) = 3.337, P=0.003$)。在旷场外部区域所用的时间的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 47) = 0.093$, 图30B]。史都登氏t检验揭示相对于对照小鼠由媒介物MIA组在内部区域所用的时间显著减少 ($t(21) = 3.337, P=0.003$)。在内部区域所用的时间的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 47) = 0.93, P=0.96$, 图30C]。

[0757] 结论

[0758] 用MRX006处理使MIA小鼠在旷场场地中行进的距离减小。因此, MRX006可使由暴露于旷场场地引起的压力诱导的自主活动性减弱。

[0759] 实施例3e-抑郁样行为的评估-雌性尿液嗅闻测试

[0760] 基本原理

[0761] 使用雌性尿液嗅闻测试 (FUST) 来评估啮齿动物的快感缺乏样行为。嗅闻时间减少表明社交回避/快感缺乏, 而增加表示社交行为/快感行为增加。

[0762] 方法

[0763] 在测试之前使实验小鼠单独居住一周。在测试期间, 将于无菌水中浸泡过的棉球棍放入居住笼中并且允许小鼠嗅闻/研究三分钟。在此三分钟测试之后, 将棉球棍移出。45分钟后, 将新的棉球棍浸入雌性尿液 (从处于周期的发情期的相同品系的雌性小鼠收集) 中, 并且放入笼中。允许小鼠对此再嗅闻/研究三分钟。记录嗅闻水和尿液所用的时间量。

[0764] 结果

[0765] 曼-惠特尼U检验表明对照 [曼-惠特尼U值 = 7, P=0.0123] 与媒介物MIA [曼惠特尼U值 = 57; P=0.0201] 组均用比水更多的时间嗅闻尿液 (图31)。对于嗅闻尿液所用的时间, 克鲁斯卡尔-沃利斯非参数分析未揭示处理的影响 [$df=4, P=0.3293$]。

[0766] 结论

[0767] 在雌性嗅闻尿液测试中用MRX006长期处理不影响MIA小鼠的抑郁样行为。

[0768] 实施例3f-体内肠道活力分析

[0769] 基本原理

[0770] 已报道MIA模型引起肠道屏障功能的变化。因此, 确定用生物治疗剂长期处理是否改变肠道活力为重要的。

[0771] 方法

[0772] 在开始测试之前使小鼠单独居住。为小鼠经口灌胃给予不可吸收的有色染料 (胭脂红)。记录排泄第一团有色粪便的时间并且用作整个肠道的蠕动活力的指示。

[0773] 结果

[0774] 史都登氏t检验分析表明当与对照组相比时媒介物MIA组未展现改变的肠道活力 (在较少时间内检测到红色球粒) ($t(22) = 0.006, P=0.9950$)。活力时间的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 50) = 0.99, P=0.404$, 图32]。

[0775] 结论

[0776] 在此实验中, 媒介物MIA组与对照相比未展现改变的肠道活力。与对照或媒介物MIA组相比, 用MRX006长期处理未影响肠道活力。

[0777] 实施例3g-器官重量和结肠长度

[0778] 对于结肠长度,史都登氏t检验未揭示媒介物MIA与对照组之间的任何显著差异($t(21)=1.26, P=0.26$)。结肠长度的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3,49)=0.69, P=0.57$;图33A]。对于按体重%计的盲肠重量,史都登氏t检验未揭示媒介物MIA与对照组之间的显著差异 ($t(22)=0.56, P=0.58$)。ANOVA揭示处理对盲肠重量无显著影响 [$F(3,48)=0.84, P=0.48$,图33B]。对于按体重%计的脾脏重量,史都登氏t检验未揭示媒介物MIA与对照组之间的显著差异 ($t(22)=0.64, P=0.53$)。ANOVA揭示处理对脾脏重量无显著影响 [$F(3,48)=2.25, P=0.09$,图33C]。

[0779] 结论

[0780] 在自闭症的MIA小鼠模型中用MRX006处理不影响结肠长度或器官重量。

[0781] MIA小鼠模型的结果的讨论

[0782] 用MRX006长期处理能够逆转在埋珠测试中在MIA小鼠中所观测到的表型。用MRX006长期处理能够使埋藏弹珠的数目减少,表明刻板样行为减轻。此外,用MRX006长期处理使行进距离减小,而对在旷场场地中在内部和外部区域中所用的时间没有任何影响。因此,用MRX006处理可使由暴露于旷场场地引起的压力诱导的自主活动性减弱。在食物社交传递和雌性尿液嗅闻测试中观测到处理无显著影响,表明在MIA小鼠模型中在社交和抑郁样行为中无直接可观测的影响。所测试的活生物治疗剂未影响肠道活力或渗透性。因此,已证实MIA模型适合用于评估刻板样、重复以及焦虑行为,但它不再形成与自闭症谱系病症相关的许多其他症状。然而,结果显示用MRX006长期处理可对自闭症谱系病症的症状具有积极作用。

[0783] 关于自闭症谱系病症的治疗中的MRX006的总结论

[0784] MRX006显示在BTBR与MIA小鼠模型中在治疗刻板和焦虑样行为方面为有效的。在自闭症的小鼠模型中逆转行为和生物表型的疗法预期对人类疾病有效。

[0785] 关于用于治疗自闭症谱系病症的医学产品的临床开发的EMA准则说明,归因于疾病的异质性,使用单一化合物可能不会对全部核心症状实现显著影响,并且因此必定展现对至少一种核心症状的短期功效。MRX006活生物治疗剂已显示有效治疗自闭症谱系病症的至少一种核心症状,因此它和相关布劳特氏菌属和粪便布劳特氏菌菌株预期对人类疾病有效。类似地,其他中枢神经系统病症或疾患展示具有多种不同症状的复杂病变,并且批准的治疗较少。因此,应了解,有效治疗不需要治疗中枢神经系统病症或疾患的全部症状。如果一种治疗将治疗与中枢神经系统病症或疾患相关的症状中的一者,那么它将被视为在治疗上适用。

[0786] 实施例4-BTBR小鼠中的循环细胞因子的测量

[0787] 方法和结果

[0788] 在实验结束时在每个动物扑杀当天从躯干血(trunk blood)收集血浆。使用商购获得的电致化学发光多重系统(MSD, Gaithersberg, MSD, USA)评估来自媒介物和MRX006组的血浆样品中的循环细胞因子。分析以下细胞因子:IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A、IL-21、IL-23、TNF- α 以及IFN- γ 。多重分析表明在媒介物与MRX006处理的动物中IL-1 β 、IL-4、IL-17A、IL-21以及IL-23的水平低于检测限。对于循环TNF- α ,史都登氏t检验未揭示用MRX006处理的显著影响 ($t(21)=0.4264, P=0.6742$,图34A)。对于循环IFN-,史都登氏t检验未揭示用MRX006处理的显著影响 ($t(21)=0.4264, P=0.6742$,图34B)。

未揭示用MRX006处理的显著影响 ($t(17) = 0.4103, P=0.6867$, 图34B)。对于循环IL-6, 史都登氏t检验未揭示用MRX006处理的显著影响 ($t(11) = 0.020, P=0.98$, 图34C)。对于循环IL-10, 用MRX006长期处理引起IL-10水平的非显著增加 ($t(13) = 1.396, P=0.1861$, 图34D)。

[0789] 结论

[0790] 虽然就调控循环细胞因子浓度而言MRX006不存在显著影响,但在用活生物治疗剂处理之后存在明显的非显著循环IL-10增加倾向。此类结果表明MRX006具有免疫调控特性并且可增加抗炎性细胞因子的产量。虽然多重分析是对含有基础、未经刺激细胞因子浓度的血浆样品进行,但评估MRX006在经刺激条件下是否能够调节IL-10和其他细胞因子将为有趣的。

[0791] 实施例5-评估用MRX006亚短期处理对C57BL/6小鼠中的中枢和外周催产素水平的影响

[0792] 制备细菌菌株并且如以上实施例中所概述进行施用。在每个具有10-12只小鼠的7个实验处理组中,将C57BL/6小鼠用活生物治疗剂处理六天。随后,从小鼠解剖下丘脑并且通过放射免疫分析(RIA)检测下丘脑中的催产素水平,此外,通过RIA检测血浆中的催产素水平。此外,通过RIA和其他分析方法检测催产素受体、白介素和其他炎性标记物以及升压素激素的水平。

[0793] 实施例6-稳定性测试

[0794] 在25°C或4°C下将含有本文所描述的至少一种细菌菌株的本文所描述的组合物储存于密封容器中并且将容器放置于具有30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%或95%相对湿度的氛围中。在1个月、2个月、3个月、6个月、1年、1.5年、2年、2.5年或3年之后,如通过标准方案所测定以菌落形成单位所测量至少50%、60%、70%、80%或90%的细菌菌株将被保留。

[0795] 实施例7-MIA小鼠模型中另一活生物治疗剂的施用

[0796] 实施例7a-用于MIA小鼠模型的材料和方法

[0797] 此实施例中所用的小鼠、活生物治疗剂施用以及粪便收集与以上实施例3中所用的那些相同。

[0798] 菌株

[0799] MRX008:韦克斯勒布劳特氏菌,以登录号NCIMB 42486保藏的细菌。

[0800] 施用时间表

[0801] 以下示出用于研究的处理组。用于经口施用的媒介物为PBS。经由口服灌胃进行每天经口施用。

[0802]

组	处理	次数
1	对照(PBS, 口服灌胃)	11
2	媒介物MIA (PBS, 口服灌胃)	10
3	MRX008 MIA (于PBS中口服灌胃)	11

[0803] 实验设计和方法

[0804] 当小鼠8周龄时开始使用MRX008或媒介物进行给药。按以下顺序进行行为系列:第5周时埋珠测试;第6周时食物偏好社交传递以及第8周时强迫游泳测试。胭脂红胃肠道活力分析和胃肠道渗透性分析尾部放血分别在第7周和第8周期间进行。最后,在第9周,将小鼠

杀死用于脾细胞刺激以及回肠和结肠中的FITC的离体测量。

[0805] 以下实施例中概述了在MIA模型中活生物治疗剂处理对刻板、社交以及抑郁样行为以及胃肠道参数(渗透性和活力)的影响。

[0806] 上表中所列的组2代表母体免疫活化小鼠,在妊娠期间将其母体用聚(I:C)处理。这些小鼠将预期与对照小鼠(组1)相比显示与自闭症谱系病症相关的表型,此对照确保聚(I:C)施用在母体小鼠后代中引起预期行为症状。处理对自闭症谱系病症的行为症状的任何影响将通过组2与组3之间的差异来鉴定。

[0807] 图解设计和统计分析

[0808] 全部图均在graphpad prism软件(第5版)上产生。使用IBM SPSS Statistic 22.0(EEUU)分析数据。使用柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫正态性检验分析数据分布。使用单因素ANOVA和费雪最小显著差异(LSD)事后检验对比较媒介物组与MRX008组的数据进行分析。如果ANOVA未揭示处理的显著影响,那么针对对照组进行事前成对比较测试。通过克鲁斯卡尔-沃利斯和非参数曼-惠特尼U检验分析非正态分布的数据。P<0.05为统计显著性的准则。

[0809] 实施例7b-刻板行为的评估-埋珠测试

[0810] 基本原理和方法

[0811] 参见以上实施例3b。

[0812] 结果

[0813] 对照组与媒介物MIA组之间的史都登氏t检验分析表明与对照组相比,媒介物MIA小鼠埋藏更多的弹珠($t(19)=3.00, P=0.007$;图35)。埋藏弹珠的数目的ANOVA揭示处理的影响 [$F(3,42)=6.37, P=0.001$]。相对于媒介物MIA组,用MRX008长期处理显示埋藏弹珠的数目减少。

[0814] 结论

[0815] 媒介物MIA组显示埋藏了比对照组显著更多的弹珠,表明MIA模型在小鼠中成功触发自闭症谱系病症样症状。在用MRX008长期处理后在MIA小鼠中存在重复、强迫以及焦虑行为减轻的倾向。

[0816] 实施例7c-社交行为的评估-食物偏好社交传递

[0817] 基本原理和方法

[0818] 参见以上实施例3c。

[0819] 结果

[0820] 展示者提示的食物偏好的ANOVA揭示不管是施用媒介物抑或是MRX008,当观察者在展示者互动之后立即(T0) ($F(3,34)=0.38, P=0.77$;图36A) 或24h后 ($F(3,34)=0.85, P=0.48$;36B) 暴露于食物选择时无显著差异。

[0821] 结论

[0822] 媒介物MIA组未展示降低的食物偏好社交传递(MIA媒介物展示与对照相比食物偏好无改变),表明MIA模型尚未触发降低的社交性表型。因此,不可能使用MIA小鼠模型来测定用MRX008长期处理对社交性的影响。

[0823] 实施例7d-抑郁样行为的评估-强迫游泳测试

[0824] 基本原理

[0825] 强迫游泳测试(FST)为最广泛用于评估抗抑郁活性的实验范式([57])。在此测试中,迫使小鼠游泳6min并且评分的行为参数为在6-min测试的最后4min期间的不动性。在适应不动的浮起姿势之前,原初动物将以游泳、攀爬以及潜水的形式展示逃避行为。不动的持续时间指示行为绝望程度。抗抑郁药物使在此测试中不动所用的时间减少。

[0826] 方法

[0827] 迫使小鼠在用23–25°C自来水填充至17cm深的玻璃筒中(24×21cm)游泳6min。由装在顶板上的照相机录像记录FST。评分的行为参数为在6-min测试的最后4min期间的不动性。

[0828] 结果

[0829] 史都登氏t检验分析揭示在对照组与媒介物MIA组之间关于不动时间无显著差异($t=0.8968, df=20; 0.3805$)。不动时间的ANOVA未揭示用MRX008处理的影响,不过在施用MRX008之后不动所用的时间似乎略微倾向于减少 [$F(3, 42) = 1.803; P=0.1625$; 图37]。

[0830] 结论

[0831] 在强迫游泳测试中媒介物MIA组未展示不动时间增加(MIA媒介物展示与对照相比不动时间无改变),表明MIA模型未增加抑郁样症状。因此,不可能使用MIA小鼠模型来测定用MRX008长期处理对抑郁样行为的影响。

[0832] 实施例7e-体内肠道渗透性分析

[0833] 基本原理

[0834] 已报道MIA模型引起肠道屏障功能的变化。因此,确定用生物治疗剂长期处理是否影响肠道渗透性为重要的。

[0835] 方法

[0836] 将测试小鼠单个关笼并且移去食物过夜。第二天(在约9am时)通过口服灌胃施用小鼠FITC右旋糖酐(异硫氰酸荧光素;MW:4kDa,Sigma;浓度:每一动物600mg/kg的80mg/ml FITC PBS (pH7.4) 溶液)。在FITC施用之后两小时时,在肝素涂布的毛细管中由尾部放血收集100μl的血液样品并且转移至琥珀艾本德管并且放置于冰上。将样品3500×g离心15分钟,吸出血浆并且将样品储存在-80°C下长久储存。

[0837] 使用未稀释的血浆来定量FITC浓度。将25μl的FITC一式两份移液至384孔板(Greiner bio one)中。用Victor光谱仪在490nm–520nm的范围之间测量FITC。对于标准曲线,在PBS (pH7.4) 中制备FITC的连续稀释液。

[0838] 此外,在第9周扑杀小鼠之后,进行回肠和结肠中的FITC的离体测量。

[0839] 结果

[0840] 史都登氏t检验分析揭示对照组与MIA媒介物组之间无差异($t(20) = 0.56, P=0.58$; 图38)。FITC浓度的ANOVA未揭示处理的显著影响 [$F(3, 39) = 2.23, P=0.08$]。

[0841] 结论

[0842] 在此实验中,媒介物MIA组未展示改变的肠道渗透性(MIA媒介物展示与对照相比渗透性无改变)。此外,用MRX008长期处理未影响MIA小鼠的肠道渗透性。

[0843] 实施例7f-体内肠道活力分析

[0844] 基本原理和方法

[0845] 参见以上实施例3f。

[0846] 结果

[0847] 史都登氏t检验分析表明当与对照组相比时媒介物MIA组展现增加的肠道活力(在较少时间内检测到红色球粒) ($t(19) = 3.00, P=0.007$)。活力时间的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 38) = 0.74, P=0.54$; 图39]。

[0848] 结论

[0849] 在此实验中,媒介物MIA组与对照相比展示增加的肠道活力。用MRX008长期处理与对照相比未影响肠道活力。

[0850] 实施例8-在BTBR小鼠模型中另一活生物治疗剂的施用

[0851] 实施例8a-用于BTBR小鼠模型的材料和方法

[0852] 此实施例中所用的小鼠、活生物治疗剂施用以及粪便收集与以上实施例2中所用的那些相同。

[0853] 菌株

[0854] MRX008:韦克斯勒布劳特氏菌,以登录号NCIMB 42486保藏的细菌。

[0855] 施用时间表

[0856] 以下示出用于研究的处理组。用于经口施用的媒介物为PBS。经由口服灌胃进行每天经口施用。

[0857]	组	处理	次数
	1	对照(PBS, 口服灌胃)	10
	2	MRX008(于PBS中口服灌胃)	10

[0858] 实验设计和方法

[0859] 如上文所概述,当小鼠8周龄时开始使用MRX008进行给药。在涵盖社交性、焦虑、刻板(stereopathy)以及认知测试的行为实验之前进行3周初始给药。按以下顺序进行行为系列:第4周时埋珠测试;第5周时高架十字迷宫;第6周时旷场和新颖物体识别测试以及食物偏好社交传递测试;第7周时雌性尿液嗅闻和社交互动测试以及第9周时强迫游泳测试。胭脂红胃肠道活力分析和胃肠道渗透性分析尾部放血分别在第8周和第9周期间进行。最后,在第10周至第11周,将小鼠杀死用于脾细胞刺激以及回肠和结肠中的FITC的离体测量。

[0860] 以下实施例中概述了在BTBR模型中活生物治疗剂处理对刻板、社交以及抑郁样行为以及胃肠道参数(渗透性和活力)的影响。

[0861] 上表中所列的组1代表对照BTBR小鼠,对照BTBR小鼠将预期显示与自闭症谱系病症相关的表型。处理对自闭症谱系病症的行为症状的任何影响将通过组1与组2之间的差异来鉴定。

[0862] 图解设计和统计分析

[0863] 全部图均在graphpad prism软件(第5版)上产生。使用IBM SPSS Statistic 22.0(EEUU)分析数据。使用柯尔莫哥洛夫-斯米尔诺夫正态性检验分析数据分布。使用单因素ANOVA和费雪最小显著差异(LSD)事后检验对比较媒介物组与MRX008组的数据进行分析。如果ANOVA未揭示处理的显著影响,那么针对对照组进行事前成对比较测试。通过克鲁斯卡尔-沃利斯和非参数曼-惠特尼U检验分析非正态分布的数据。 $P < 0.05$ 为统计显著性的准则。

[0864] 实施例8b-社交行为的评估-食物偏好社交传递

[0865] 基本原理

[0866] 食物偏好社交传递为嗅觉记忆的相关测试,所述测试在小鼠中用于评估社交行为。在此测试中,观察者小鼠与最近吃过新颖食物的展示者小鼠互动。当观察者小鼠面对展示者吃过的食物与另外一些新颖食物之间的选择时,观察者小鼠会偏爱展示者吃过的食物。降低的食物偏好将指示降低的社交性。

[0867] 方法

[0868] 如先前所描述进行此测试(Desbonnet, Clarke等2015)。简单来说,在测试之前18小时,剥夺小鼠的食物,而水任意获取。食物选择由与研磨过的小鼠食物一起制备的1%研磨过的肉桂或2%粉末可可组成。从每个笼中随机选择展示者小鼠并且用蓝色标记物标记尾部以能够在后续社交互动期间加以鉴定。在1小时取样期之前和之后将展示者食物容器称重。包括在测试中需要消耗最少0.2g的食物。将展示者小鼠放回其相应居住笼进入与笼同伴的30分钟互动期。随后,个别测试笼同伴对提示的食物或新颖食物的偏好。在即将进入各选择期之前和之后将容器称重。然后将所观测的小鼠放回其相应居住笼并且在24小时后重复选择期。测试小鼠将在不存在展示者小鼠作为社交提示的情况下嗅闻肉桂或可可,并且当给出两者之间的选择时优先选择相同食物。

[0869] 结果

[0870] 展示者提示的食物偏好的ANOVA揭示当观察者在展示者互动之后立即(T0) ($F(3, 36) = 1.123; P = 0.354$; 图40A) 或24h后 ($F(3, 38) = 0.138; P = 0.936$; 图40B) 暴露于食物选择时无显著差异。

[0871] 结论

[0872] 在社交传递食物偏好测试中用MRX008处理未影响BTBR小鼠的社交性。

[0873] 实施例8c-社交行为的评估-强迫入侵者测试

[0874] 基本原理和方法

[0875] 参见以上实施例2c。

[0876] 结果

[0877] 互动时间的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3, 36) = 1.905; P = 0.1462$; 图41]。

[0878] 结论

[0879] 在社交互动测试中用MRX008处理未影响BTBR小鼠的社交行为。

[0880] 实施例8d-刻板行为的评估-埋珠测试

[0881] 基本原理和方法

[0882] 参见以上实施例2d。

[0883] 结果

[0884] 埋藏弹珠的数目的ANOVA未揭示处理的显著影响 [$F(3, 39) = 0.835; P = 0.483$; 图42], 不过用MRX008长期处理展示由BTBR小鼠埋藏的弹珠数目减少的倾向。

[0885] 结论

[0886] 用MRX008长期处理未显著影响BTBR小鼠的重复、强迫以及焦虑行为,不过它展示此行为水平降低的倾向。

[0887] 实施例8e-焦虑样行为的评估-高架十字迷宫

[0888] 基本原理和方法

[0889] 参见以上实施例2f。

[0890] 结果

[0891] 在封闭臂中所用时间的百分比的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 39) = 0.556; P = 0.647$; 图43A]。用MRX008处理的小鼠与媒介物组相比似乎在开放臂中耗费更多时间(图43B)。与此一致,与媒介物组相比,用MRX008长期处理似乎使进入开放臂的次数增加(图43D)。进入封闭臂的次数的ANOVA揭示处理无影响 [$F(3, 39) = 0.556; P = 0.647$; 图43C]。

[0892] 结论

[0893] 用MRX008长期处理在高架十字迷宫中在BTBR小鼠中显示非显著抗焦虑行为倾向。

[0894] 实施例8f-焦虑样行为的评估-旷场场地

[0895] 基本原理和方法

[0896] 参见以上实施例2g。

[0897] 结果

[0898] 移动距离的ANOVA未揭示处理对在旷场场地中的自主活动性的显著影响 [$F(3, 37) = 1.325; P = 0.282$, 图44A], 不过MRX008似乎使移动距离减小, 表明压力诱导的自主活动性降低。在外部区域所用的时间的ANOVA未揭示处理的影响 [$F(3, 37) = 1.598; P = 0.208$; 图44B]。事前成对比较表明用Mrx008处理使在内部区域所用的时间减少 [$t = 2.388 df = 17; P = 0.0288$; 图44C]。

[0899] 结论

[0900] 用MRX008长期处理显示压力诱导的自主活动性降低的倾向,但显示在内部区域中的时间减少,暗示焦虑样行为。

[0901] 实施例8g-抑郁样行为的评估-强迫游泳测试

[0902] 基本原理和方法

[0903] 参见以上实施例2h。

[0904] 结果

[0905] 不动时间的ANOVA未揭示处理对在FST中BTBR小鼠的不动时间的影响 [$F(3, 38) = 1.879; P = 0.151$; 图45], 不过用MRX008长期处理引起不动所用的时间减少的倾向,表明抗抑郁剂行为。

[0906] 结论

[0907] 在强迫游泳测试中用MRX008处理非显著地减少BTBR小鼠的不动时间,暗示处理的抗抑郁作用。

[0908] 实施例8h-抑郁样行为的评估-雌性尿液嗅闻测试

[0909] 基本原理和方法

[0910] 参见以上实施例2i。

[0911] 结果

[0912] 对于媒介物组,曼-惠特尼U检验揭示相对于嗅闻水所用的时间嗅闻尿液所用的时间显著增加 [$t = 2.976 df = 18; P = 0.0081$]。对于暴露于水,嗅闻所用时间的克鲁斯卡尔沃利斯非参数分析未揭示处理在水组中的影响 [卡方: 6.352; df = 3; P = 0.096]。对于暴露于尿液,嗅闻所用时间的克鲁斯卡尔沃利斯非参数分析未揭示处理的影响 [卡方: 3.639; df = 3; P = 0.303, 图46]。

[0913] 结论

[0914] 用MRX008处理对BTBR小鼠嗅闻尿液所用的时间无影响。

[0915] 实施例8i-体内胃肠道活力分析

[0916] 基本原理和方法

[0917] 参见以上实施例2m。

[0918] 结果

[0919] 活力时间的ANOVA揭示处理无影响 $F(3,39) = 2.072; P=0.121$; 图47]。

[0920] 结论

[0921] 用MRX008处理未影响肠道活力。

[0922] 实施例8j-器官重量和结肠长度

[0923] 按体重%计的器官重量的ANOVA未揭示处理对肾上腺 $F(3,37) = 0.208; P=0.890$; 图48A]、脾脏 $F(3,35) = 0.629; P=0.601$; 图48B]或盲肠 $F(3,37) = 0.883; P=0.460$; 图48C]的影响。结肠长度的ANOVA未揭示处理的影响 $F(3,37) = 5.635; P=0.003$; 图48D]。

[0924] 关于自闭症谱系病症的治疗中的MRX008的总结论

[0925] 本文所公开的实验展示如下证据,在小鼠模型中施用另一布劳特氏菌属种类(即韦克斯勒布劳特氏菌MRX008)可适用于治疗神经发育和神经精神病症。特别地,在BTBR小鼠模型中,用MRX008处理分别在高架十字迷宫和强迫游泳测试中展示潜在抗抗焦虑作用以及抗抑郁作用的倾向,不过旷场场地分析表明MRX008未影响焦虑样行为。此外,在MIA与BTBR小鼠模型中如通过埋珠测试所示MRX008可减轻刻板、重复以及焦虑行为。用MRX008生物治疗剂处理未改变这些研究中所测量的若干生理参数。

[0926] 关于用于治疗自闭症谱系病症的医学产品的临床开发的EMA准则说明,归因于疾病的异质性,使用单一化合物可能不会对全部核心症状实现显著影响,并且因此必定展现对至少一种核心症状的短期功效。MRX008活生物治疗剂已显示有效治疗自闭症谱系病症的至少一种核心症状,因此它和相关布劳特氏菌属及韦克斯勒布劳特氏菌菌株预期对人类疾病有效。类似地,其他中枢神经系统病症或疾患展示具有多种不同症状的复杂病变,并且批准的治疗较少。因此,应了解,有效治疗不需要治疗中枢神经系统病症或疾患的全部症状。如果一种治疗将治疗与中枢神经系统病症或疾患相关的症状中的一者,那么它将被视为在治疗上适用。

[0927] 实施例9-评估用MRX008亚短期处理对C57BL/6小鼠中的中枢和外周催产素水平的影响

[0928] 制备细菌菌株并且如以上实施例中所概述进行施用。在每个具有10-12只小鼠的7个实验处理组中,将C57BL/6小鼠用活生物治疗剂处理六天。随后,从小鼠解剖下丘脑并且通过放射免疫分析(RIA)检测下丘脑中的催产素水平,此外,通过RIA检测血浆中的催产素水平。此外,通过RIA和其他分析方法检测催产素受体、白介素和其他炎性标记物以及升压素激素的水平。

[0929] 实施例10-评估用MRX006长期处理对BTBR小鼠的下丘脑和杏仁核中的催产素、升压素以及其相应受体的基因表达水平的影响

[0930] 用MRX006长期处理使BTBR小鼠的下丘脑中的催产素和升压素的基因表达水平增

加(参见图49C和图49D)。图49A和图49B中示出了对此组织中催产素和升压素受体的水平的影响。

[0931] 图50中示出了用MRX006长期处理对BTBR小鼠的杏仁核中的催产素、升压素或其相应受体的基因表达水平的影响。

[0932] 因此,用MRX006长期处理使BTBR小鼠的下丘脑中升压素和催产素的表达增加。此突出结果提供在施用活生物治疗剂后脑中的化学变化与行为变化之间的相关性。这是首次有任何研究报导活生物治疗剂能够改变中枢催产素/升压素系统,并且在改善胃肠道功能的情况下同时改变社交、焦虑样以及刻板行为。

[0933] 实施例11-C57BL/6和BTBR小鼠模型中嗜氢布劳特氏菌的施用

[0934] 在使用BTBR小鼠作为自闭症谱系病症和其他神经病症的模型的行为实验中,将施用PBS与LYO两者的C57BL/6小鼠用作对照来证实BTBR小鼠模型有效展现增加的焦虑、降低的社交嫌恶以及增加的刻板行为。这允许评估细菌处理对这些ASD相关行为缺陷的影响。

[0935] 实施例11a-焦虑样行为的评估-旷场场地

[0936] 基本原理和方法

[0937] 参见以上实施例2g。水平活动性为小鼠在旷场场地中行进的距离。垂直活动性为小鼠用后腿站起的发生次数。高频率的这些行为指示增加的移动和探索和/或较低的焦虑水平。在场地中央区域这些行为的频率增加指示高探究行为和低焦虑水平。

[0938] PBS为丁酸盐施用的阴性对照,因为丁酸盐是在PBS中施用。LYO为嗜氢布劳特氏菌施用的阴性对照。在第一次分析(图51A、图51C以及图51E)之后,将C57BL/6与BTBR模型中的PBS和LYO的阴性对照的值组合并且取平均值,以在第二次分析(图51B、图51D以及图51F)中提供简化比较。

[0939] 结果

[0940] 水平活动性

[0941] 如由焦虑和/或自闭症相关模型将预期,BTBR小鼠与C57BL/6小鼠相比展示显著降低的水平活动性。与PBS对照相比,LYO阴性对照显示对C57BL/6小鼠的水平活动性无影响。与PBS对照相比,在头30分钟内,用LYO对照或单独丁酸盐处理的BTBR小鼠显示行进距离无显著差异,而在第二个30分钟内,LYO对照使BTBR小鼠行进的距离减少。然而,用细菌菌株处理的小鼠与BTBR对照小鼠相比显示行进距离显著增加(图51A)。

[0942] 为提供对照与实验值之间的进一步比较,如上文所概述,在第二次分析中将PBS和LYO对照的值组合。类似于第一次分析,施用丁酸盐未影响水平活动性。然而,与BTBR模型对照相比,施用细菌菌株显著增加水平活动性(图51B)。

[0943] 垂直活动性

[0944] 与C57BL/6小鼠相比,BTBR小鼠展示显著降低的垂直活动性(站起)。与PBS对照相比,LYO阴性对照显示对C57BL/6小鼠的垂直活动性无影响。与BTBR PBS对照小鼠相比,用单独丁酸盐处理的BTBR小鼠显示站起无差异,而LYO对照使BTBR小鼠的垂直活动性降低。然而,与BTBR LYO对照小鼠相比,用细菌菌株处理的小鼠显示垂直活动性显著增加(图51C)。

[0945] 为提供对照与实验值之间的进一步比较,如上文所概述,在第二次分析中将PBS和LYO对照的值组合。类似于第一次分析,施用丁酸盐未影响BTBR小鼠的垂直活动性。然而,与BTBR对照相比,施用细菌菌株显著增加垂直活动性(图51D)。

[0946] 在头5分钟内在旷场中央的行进距离%

[0947] 如将预期,在分析的头五分钟内,与C57BL/6小鼠相比,BTBR小鼠显示其在旷场场地中央的行进距离百分比增加。这反映展示增加的焦虑行为的BTBR小鼠行进的总距离减少,并且反映以下事实,在分析的头5分钟内,更焦虑的BTBR小鼠更可能使自己熟悉其初始环境,而不是进入探索阶段(图51E)。

[0948] 为提供对照与实验值之间的进一步比较,如上文所概述,在第二次分析中将PBS和LYO对照的值组合(图51F)。

[0949] 在旷场场地中央所用的时间%

[0950] 当考虑全部分析时间时,与C57BL/6小鼠相比,BTBR小鼠显示在场地中央所用时间的百分比降低。这反映BTBR小鼠增加的焦虑和降低的水平活动性。LYO对照与单独丁酸盐均未影响在场地中央所用的时间。然而,在BTBR小鼠中,与LYO对照相比,施用细菌菌株使在场地中央所用的时间量显著增加(图51G)。

[0951] 为提供对照与实验值之间的进一步比较,如上文所概述,在第二次分析中将PBS和LYO对照的值组合。类似于第一次,与BTBR对照相比,施用丁酸盐未影响在场地中央所用的时间。施用细菌菌株使在旷场中央所用的时间量增加。

[0952] 结论

[0953] 在BTBR小鼠模型中在旷场场地测试中用嗜氢布劳特氏菌的组合物长期处理使探索性活性增加并且使焦虑样行为减轻。重要地,与BTBR对照相比,向BTBR小鼠模型施用细菌菌株使水平和垂直活动性增加并且使在场地中央所用的时间总量增加。因此,在代表中枢神经系统病症(例如自闭症谱系病症)的小鼠模型中,此细菌菌株具有抗焦虑作用并且改善探究行为。

[0954] 实施例11b—刻板行为的评估-埋珠测试

[0955] 基本原理和方法

[0956] 参见以上实施例2d。PBS为丁酸盐施用的阴性对照。LYO为嗜氢布劳特氏菌菌株施用的阴性对照。在第一次分析(图52A)之后,将C57BL/6与BTBR模型中的PBS和LYO的阴性对照的值组合并且取平均值,以在第二次分析(图52B)中提供简化比较。

[0957] 结果

[0958] 如将预期,与C57BL/6模型对照相比,BTBR模型小鼠展示重复行为增加,显示埋藏了显著更多的弹珠(图52B)。施用丁酸盐和细菌菌株使埋藏弹珠的数目减少(图52A和图52B)。

[0959] 结论

[0960] 施用丁酸盐和/或细菌菌株使埋藏弹珠的数目减少,指示焦虑或刻板行为减轻。

[0961] 实施例11c—刻板行为的评估-挖掘测试

[0962] 基本原理和方法

[0963] 类似于埋珠测试的基本原理,增加的挖掘行为对应于重复和刻板行为增加。

[0964] 结果

[0965] 如将预期,与C57BL/6对照菌株相比,在BTBR模型中,挖掘所用的时间存在显著增加(图53A)。然而,在C57BL/6和BTBR菌株之间挖掘次数不显著地不同(图53B)。因此,不可能评估细菌菌株或丁酸盐在此分析中预防重复行为的作用。

[0966] 实施例11d-刻板行为的评估-自我梳理测试

[0967] 基本原理和方法

[0968] 参见以上实施例2e。PBS为丁酸盐施用的阴性对照。LY0为嗜氢布劳特氏菌施用的阴性对照。在第一次分析(图54A、图54C以及图54E)之后,将C57BL/6与BTBR模型中的PBS和LY0的阴性对照的值组合并且取平均值,以在第二次分析(图54B、图54D以及图54F)中提供简化比较。

[0969] 结果

[0970] 与用于刻板行为的BTBR模型一致,与C57BL/6小鼠模型相比,在PBS与LY0对照两者中,BTBR小鼠显示增加的梳理所用时间以及增加的梳理次数。与PBS对照相比,单独施用丁酸盐显示梳理所用时间、梳理次数以及每次梳理所用的时间减少。施用细菌菌株使每次梳理的梳理所用时间减少(图54A、图54C以及图54E)。

[0971] 为提供对照与实验值之间的进一步比较,如上文所概述,在第二次分析中将PBS和LY0对照的值组合。此第二次分析提供类似于第一次分析的结果(图54B、图54D以及图54F)。

[0972] 结论

[0973] 施用丁酸盐或嗜氢布劳特氏菌使每次梳理的梳理所用时间量减少。

[0974] 实施例11e-嗜氢布劳特氏菌实验的总结论

[0975] 在旷场场地测试中,嗜氢布劳特氏菌显著改善BTBR小鼠的探究行为。此外,此细菌菌株减轻这些小鼠的焦虑样行为。因此,很明显施用此细菌调节BTBR小鼠的展示自闭症样特征的行为。因此,将预期这些细菌适合用于治疗和/或预防中枢神经系统病症或疾患,包括神经发育和/或神经精神病症或疾患。

[0976] 在自我梳理测试中施用此细菌菌株还似乎使每次梳理进行刻板行为的时间量减少。

[0977] 实施例11f-丁酸盐实验的总结论

[0978] 刻板行为分析的数据预示丁酸盐在中枢神经系统病症中的治疗作用。

[0979] 与BTBR对照相比,施用丁酸盐使埋藏弹珠的数目减少,并且使平均数目恢复至类似于在C57BL/6野生型对照小鼠中所观测到的水平。此外,与BTBR对照相比,单独施用丁酸盐使总梳理所用时间和梳理次数减少。

[0980] 这些结果提供关于丁酸盐在动物模型中减轻重复和刻板行为的作用的指示。

[0981] 实施例12-细菌冻干物对健康大鼠的SCFA产量的影响

[0982] 研究了慢性施用嗜氢布劳特氏菌菌株DSM 14294的冻干物对健康HIM大鼠中的SCFA产量的影响并且将结果报道于图55中。上文的附图描述中提供了关于实验的其他细节。图55表明施用BH诱导乙酸盐以及丁酸盐产量的显著增加。

[0983] 实施例13-所研究的嗜氢布劳特氏菌在人微生物丛相关大鼠(HMA大鼠)模型中的功效

[0984] 概述

[0985] 为由每组16个无菌大鼠(包含对照组中的8个大鼠和处理组中的8个大鼠)组成的组接种来自人IBS受试者(IBS-HMA大鼠)的粪便微生物丛。使用来自3个不同IBS患者的粪便样品进行三次连续实验。用健康受试者($n=2$ 受试者;2组健康HMA大鼠)的粪便样品接种另外两组的大鼠($n=10$)作为内脏敏感性对照。因此,存在24个IBS微生物丛相关大鼠(对照),

24个用Blautix处理的IBS微生物丛相关大鼠和20个健康微生物丛相关大鼠。然后为一半的IBS-HMA大鼠施用根据本发明的包含嗜氢布劳特氏菌细菌菌株的组合物持续28天，而另一半动物接受对照溶液。

[0986] 菌株

[0987] 嗜氢布劳特氏菌 (BH) 菌株DSM 14294。

[0988] 组合物和施用

[0989] 将BH冻干物悬浮于无菌矿物质溶液中达到每毫升 10^{10} 个细菌的浓度。为每一IBS-HMA大鼠通过口服灌胃每天施用两毫升此悬浮液，持续28天的时间。

[0990] 对照溶液为无菌矿物质溶液，通过口服灌胃每天(每一大鼠2ml)向对照组的IBS-HMA大鼠施用所述无菌矿物质溶液。

[0991] 大鼠

[0992] 为无菌雄性费舍尔大鼠 (Fisher rat) (10周龄) 接种来自IBS受试者 (IBS-HMA大鼠) 的人粪便微生物丛。为十六只大鼠接种相同人粪便接种体。使用来自三个不同IBS受试者的粪便样品进行三次连续实验。为每组十只大鼠的另外两组接种来自2个健康受试者的粪便样品 (标准敏感性对照组)。

[0993] 研究设计

[0994] 第14天-为无菌大鼠接种人粪便微生物丛。

[0995] 第0天至第28天-通过口服灌胃给予日剂量的BH冻干物 (分析组)，或对照溶液 (对照组)

[0996] 第14天与第22天之间-进行操作以将电极植入腹部 (用于扩张分析)

[0997] 第22天至第28天-使大鼠适应以避免与扩张测试相关的压力。

[0998] 第28天-扩张分析并且使动物安乐死以收集用于硫化物和短链脂肪酸 (SCFA) 分析的盲肠样品。

[0999] 第0天、第14天以及第28天-收集粪便样品用于微生物分析：用于评估BH群体和其他微生物共生群的qPCR以及使用选择培养基和严格厌氧法列出微生物的官能团。

[1000] 结果

[1001] 图56呈现来自接受对照溶液或BH冻干物的IBS-HMA大鼠的粪便样品中的嗜氢布劳特氏菌群体的qPCR分析的结果。在投药期结束时 (第28天) 在接受BH冻干物的大鼠中观测到BH群体显著增加，这证实结肠中BH的成功递送。

[1002] 图57报道施用BH对IBS-HMA大鼠的盲肠样品中的主要发酵代谢产物短链脂肪酸的影响。施用BH使得乙酸盐浓度显著增加并且丁酸盐浓度显著增加 (图57B)。

[1003] 实施例14-在三室测试中对社交互动行为的评估

[1004] 基本原理和方法

[1005] 参见以上实施例1b。在此实验中，记录的数据为探索时间，探索时间由在头5-min时间内和在10-min时期内对圆筒 (含有物体、同种物) 的嗅闻时间来定义。

[1006] 读出：

[1007] ● 测试1, 社交性 (同种物相较于物体) :

[1008] ○ 社交性指数：同种物嗅闻时间% (如果>50% : 具社交性，即相较于物体偏爱同种物)

- [1009] ○其他读出,探究行为指数:同种物探索时间、物体探索时间的总探索时间
- [1010] ●测试2,社交新颖性偏好(新的同种物相较于熟悉的同种物):
- [1011] ○社交新颖性偏好(或嫌恶)指数:新同种物嗅闻时间%
- [1012] ○其他读出,探究行为指数:新同种物探索时间和熟悉同种物探索时间、总探索时间
- [1013] 结果
- [1014] 测试1:社交性(图58A):
- [1015] 在C57BL/6小鼠中,在PBS和LY0处理的小鼠中社交性并不不同。如将预期,在PBS对照中BTBR小鼠显示降低的社交性。出人意料地,当用LY0处理时BTBR小鼠展示改善的社交性。然而,BTBR-PBS与C57-PBS、BTBR-LY0与C57-LY0以及BTBR-PBS与BTBR-LY0之间的差异不显著。有趣的是,施用丁酸盐改善BTBR小鼠的社交性(BTBR-PBS与BTBR-BUT之间显著不同。与细菌PBS对照相比,施用嗜氢布劳特氏菌使社交性增加。
- [1016] 测试2:社交新颖性(图58B):
- [1017] 在用PBS处理的C57BL/6小鼠中存在社交新颖性偏好,但在施用LY0的C57BL/6小鼠中此偏好降低(这些差异不显著)。在10min时期内,当用PBS或LY0处理时,BTBR小鼠与C57BL/6小鼠相比显示降低的社交新颖性偏好。BTBR-PBS与C57-PBS、BTBR-LY0与C57 LY0以及BTBR-PBS与BTBR-LY0之间的差异不显著。因此,图58B中所示的结果难以解释。
- [1018] 关于自闭症谱系病症的治疗中的嗜氢布劳特氏菌的总结论
- [1019] 本文所公开的实验展示如下证据,在小鼠模型中施用另一布劳特氏菌属种类(即嗜氢布劳特氏菌)可适用于治疗神经发育和神经精神病症。特别地,用嗜氢布劳特氏菌处理减轻焦虑样、刻板以及重复行为,并且增加小鼠的社交性。
- [1020] 关于用于治疗自闭症谱系病症的医学产品的临床开发的EMA准则说明,归因于疾病的异质性,使用单一化合物可能不会对全部核心症状实现显著影响,并且因此必定展现对至少一种核心症状的短期功效。嗜氢布劳特氏菌活生物治疗剂已显示有效治疗自闭症谱系病症的至少一种核心症状,因此它和相关布劳特氏菌属和嗜氢布劳特氏菌菌株预期对人类疾病有效。类似地,其他中枢神经系统病症或疾患展示具有多种不同症状的复杂病变,并且批准的治疗较少。因此,应了解,有效治疗不需要治疗中枢神经系统病症或疾患的全部症状。如果一种治疗将治疗与中枢神经系统病症或疾患相关的症状中的一者,那么它将被视为在治疗上适用。实施例15-评估用MRX006长期处理对下丘脑细胞系中催产素和其相应受体的基因表达水平的影响
- [1021] 用MRX006长期处理使下丘脑细胞系中催产素和其受体的mRNA表达水平显著增加(图59A和图59B)。
- [1022] 此突出结果提供在施用MRX006后脑中的化学变化与行为变化之间的相关性。这是首次有任何研究报导活生物治疗剂能够改变中枢催产素系统,并且在改善胃肠道功能的情况下同时改变社交、焦虑样以及刻板行为。
- [1023] 实施例16-BALBc小鼠模型
- [1024] 实施例16a-用于BALBc小鼠模型的材料和方法
- [1025] 小鼠
- [1026] 使BALBc (Envigo, UK) 成年雄性小鼠成组居住在12h明-暗循环(7:00-19:00h开灯)

下;标准啮齿动物食物和水任意获取。全部实验均根据欧洲指令2010/63/EEC 2012年的S.I.编号543的要求来进行,并且由科克大学的动物实验伦理委员会批准。在开始实验时动物为8周龄。

[1027] 菌株

[1028] MRX006:以登录号NCIMB 42381保藏的粪便布劳特氏菌细菌。

[1029] 在甘油储备液中提供细菌并且使其在设备中在厌氧条件下生长。

[1030] MRX006施用

[1031] 在到达动物单位后允许动物习惯其等候室一周。当小鼠8周龄时开始使用MRX006或媒介物进行给药。在施用之前将MRX006 (1×10^7 至 1×10^9 CFU) 溶解于PBS中。小鼠在15:00与17:00之间以 1×10^9 CFU的剂量接受MRX006口服灌胃 (200μL剂量) 连续6天。在第7天,将动物去头并且收获组织用于实验。

[1032] 组织收集

[1033] 考虑处理和测试条件以随机方式将动物处死;在9.00a.m.与2:30p.m.之间进行取样。在EDTA(乙二胺四醋酸)钾管中收集躯干血并且在4000g下旋转15min。分离血浆并且储存在-80°C下用于进一步分析。将脑快速切除,解剖并且将各脑区在干冰上快速冷冻并且储存在-80°C下用于进一步分析。去除脾脏,收集于5mL RPMI培养基(含有L-谷酰胺和碳酸氢钠,R8758 Sigma+10%FBS(F7524,Sigma)+1%Pen/Strep(P4333,Sigma))中并且在扑杀之后立即加工用于离体免疫刺激。将肠道组织(将回肠和结肠中最靠近盲肠的2cm区段切除,并且使用离盲肠最近的1cm的组织)安装至尤斯灌流室中用于肠道渗透性分析。再取1cm的回肠和结肠组织用于紧密连接基因表达分析。去除盲肠,称重并且储存在-80°C下用于SCFA分析。

[1034] 统计分析

[1035] 将正态分布的数据以平均值±SEM的呈现;非参数数据集以具有四分位间距的中值形式呈现。应用未配对双尾t检验来分析参数数据并且对于非参数使用曼-惠特尼检验。在所汇集的数据集中采用斯皮尔曼秩相关系数(Spearman's rank correlation coefficient)进行相关性分析。在所有情况下,p值<0.05被视为显著。

[1036] 实施例16b-评估用MRX006长期处理对离体胃肠道渗透性和紧密连接物表达的影响

[1037] 方法

[1038] 通过颈椎脱位使小鼠安乐死,并且去除回肠末端和结肠,放置于冰冻的克雷布氏溶液中,沿肠系膜线打开并且谨慎冲洗。然后如先前所描述(Hyland和Cox,2005[58])将制剂与维持在37°C下的充氧(95%O₂,5%CO₂)克雷布氏缓冲液一起放置于尤斯灌流室(Harvard Apparatus,Kent,UK,暴露面积为0.12cm²)中。以2.5mg/mL的最终浓度将4kDa FITC-右旋糖酐添加至粘膜室中;在随后3h内每30min从浆膜室收集200μL样品。

[1039] 结果

[1040] 使用FITC从管腔传送至尤斯灌流室的浆膜侧作为肠道渗透性的指示(如实施例21中所描述),确定MRX006对回肠或结肠组织渗透性无影响。图60A和图61A证实用MRX006长期处理不影响结肠或回肠的渗透性。

[1041] MRX006对回肠或结肠组织中紧密连接蛋白(参与维持肠道屏障的完整性)闭合蛋

白、酶IDO-1(吲哚胺-吡咯2,3-加双氧酶-1,色氨酸/犬尿氨酸路径中的第一和限速酶)以及TPH1(色氨酸羟化酶1,色氨酸羟化酶的同功异构物,其负责血清素的合成)的mRNA表达均无影响(图60以及图61B、图61C和图61E)。然而,MRX006使回肠中TJP-1(紧密连接蛋白1,一种紧密连接蛋白)的mRNA表达增加,但不使结肠中的mRNA表达增加(图60D和图61D)。

[1042] 讨论

[1043] MRX006对回肠或结肠渗透性无影响,但使TJP1表达增加。TJP1为与维持肠道完整性相关的许多紧密连接蛋白中的一者,并且虽然我们确定看到了此mRNA表达增加,但这可能不一定反映此紧密连接物的蛋白质表达,也不反映它合并至内皮中。用MRX006处理6天不改变渗透性的发现表明它不负面影响肠道渗透性和完整性。MRX006同样未改变IDO-1也未改变TPH1,表明它不改变血清素产量也不改变肠道中的色氨酸/犬尿氨酸路径。

[1044] 这些数据证实,用MRX006长期处理不改变肠道渗透性并且不影响肠道屏障的完整性。这表明MRX006使刻板和焦虑相关行为减弱的能力不引起肠道屏障完整性的缺陷。

[1045] 实施例16c-评估用MRX006长期处理对盲肠短链脂肪酸产量的影响

[1046] 方法

[1047] 将盲肠内容物混合并且与MilliQ水一起涡旋并且在室温下孵育10min。通过离心(10000g,5min,4°C)以使细菌和其他固体集结成粒并且0.2μm过滤来获得上清液。将它转移至透明GC小瓶中并且使用2-乙基丁酸(Sigma)作为内标。使用装配有ZB-FFAP柱(30m×0.32mm×0.25mm;Phenomenex)的Varian 3500GC火焰-电离系统分析SCFA的浓度。使用不同浓度的含有乙酸盐、丙酸盐、异丁酸盐、正丁酸盐、异戊酸盐以及戊酸盐的标准混合物(Sigma)构建标准曲线。通过使用Varian Star色谱工作站版本6.0软件将峰整合。全部SCFA数据均以μmol/g表示。

[1048] 结果

[1049] 当来自膳食的不易消化的纤维由肠道中的细菌发酵时产生短链脂肪酸(SCFA)。当与媒介物PBS施用相比时,6天的MRX006施用对乙酸盐($t_{12}=0.959, p=0.357$)、丙酸盐($t_{12}=1.033, p=0.322$)、异丁酸盐($t_{12}=1.859, p=0.090$)、丁酸盐($t_{12}=0.857, p=0.408$)、异戊酸盐($t_{12}=1.757, p=0.107$)或戊酸盐($t_{12}=0.434, p=0.672$)无影响(图62)。

[1050] 讨论

[1051] 施用MRX006对盲肠SCFA产量无影响。这表明6天MRX006方案未改变发酵,或所述细菌负责来自膳食的不易消化的纤维的发酵。

[1052] 实施例16d-评估用MRX006长期处理对脾细胞的细胞因子表达的影响

[1053] 基本原理/方法

[1054] 离体脾细胞分析涉及使用细菌或病毒模拟物激发来激发脾细胞(从参与免疫防护的主要器官脾脏分离的细胞)。

[1055] 在处死之后立即将脾脏收集于5mL RPMI培养基中并且立即培养。首先将脾脏细胞在RPMI培养基中均质化。匀浆步骤随后为RBC溶解步骤,其中将细胞在1ml的RBC溶解缓冲液(11814389001ROCHE,Sigma)中孵育5min。添加10ml的培养基以停止溶解并且随后200g离心5min。此后为最后一步,在最后一步中使细胞穿过40um过滤器。然后在40um过滤器上过滤匀浆,在200g下离心5min并且再悬浮于培养基中。对细胞进行计数并且接种(每毫升培养基4,000,000个)。在适应2.5h之后,用脂多糖(LPS-2μg/ml)或伴刀豆球蛋白A(ConA-2.5μg/ml)

刺激细胞24h。在刺激之后,收获上清液以使用促炎性组1(小鼠) V-PLEX试剂盒(Meso Scale Discovery, Maryland, USA)针对TNF α 、IL-10、IL-1 β 、干扰素 γ 、CXCL2以及IL6评估细胞因子释放。使用MESO QuickPlex SQ 120、SECTOR成像器2400、SECTOR成像器6000、SECTOR S 600进行分析。

[1056] 结果

[1057] MRX006对响应于LPS(模拟细菌感染)或伴刀豆球蛋白A(模拟病毒感染)刺激的促炎性(IFN γ 、TNF α 、IL-1 β)与抗炎性(IL-10、IL-6)或CXCL1(免疫反应活化的标记物)无影响(图63)。

[1058] 讨论

[1059] MRX006还对在用LPS或伴刀豆球蛋白A激发之后脾细胞的细胞因子表达无影响。这证实6-天MRX006施用不负面影响先天外周免疫反应。这表明MRX006处理不活化全身性免疫活化。

[1060] 实施例16e-评估用MRX006长期处理对氨基酸的血浆水平的影响

[1061] 基本原理和方法

[1062] 在实验结束时,收集躯干血用于血浆中的氨基酸分析。这将给出因微生物丛的变化而生物合成和分解代谢必需氨基酸的指示。

[1063] 考虑处理和测试条件以随机方式将动物处死;在9.00a.m.与2:30p.m.之间进行取样。在EDTA(乙二胺四醋酸)钾管中收集躯干血并且在4000g下旋转15min。分离血浆并且储存在-80°C下用于进一步分析。将血浆用0.2mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH 2.2)稀释,得到250nmol的各氨基酸残基。将样品用内标正亮氨酸稀释,得到125nm/mL的最终浓度。使用装配有Jeol Na⁺高性能阳离子交换柱的Jeol JLC-500/V氨基酸分析器(Jeol Ltd, Garden City, Herts, UK)对氨基酸进行定量。

[1064] 结果

[1065] MRX006使血浆中的脯氨酸和苯丙氨酸水平降低。

[1066] 讨论

[1067] 在6天MRX006施用之后氨基酸的血浆水平大体不变。存在九种不能从头合成并且必须直接在膳食中或通过膳食分解供应的必需氨基酸。这些氨基酸包括缬氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸以及组氨酸。另外六种氨基酸被视为在人膳食中为有条件地必需的,意味着在特殊病理生理学条件下其合成可能受限,诸如婴儿早熟或处于严重分解代谢痛苦中的个体。这六种氨基酸包括精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、谷酰胺、脯氨酸以及酪氨酸。五种氨基酸在人中为非必需的,意味着其可在体内足量合成。这五种为丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸以及丝氨酸。

[1068] 在此研究中,必需氨基酸苯丙氨酸和另一重要氨基酸脯氨酸在MRX006施用之后减少,表明此益生菌可在来自膳食的主要氨基酸的代谢中起作用。

[1069] 实施例16f-评估用MRX006长期处理对脑干中的神经递质水平的影响

[1070] 方法

[1071] 通过HPLC对来自脑干的样品分析神经递质浓度。简单来说,在掺加有4ng/40 μ l的N-甲基5-HT(Sigma Chemical Co., UK)作为内标的500 μ l冰冻流动相中将脑干组织超声处理。流动相含有0.1M柠檬酸、5.6mM辛烷-1-磺酸(Sigma)、0.1M磷酸二氢钠、0.01mM EDTA

(Alkem/Reagecon,Cork) 以及9% (v/v) 甲醇(Alkem/Reagecon),并且使用4N氢氧化钠(Alkem/Reagecon) 调节至pH 2.8。然后将匀浆在4℃下在22,000×g下离心15min并且将40μl上清液注射至HPLC系统上,所述HPLC系统由SCL 10-Avp系统控制器、LECD 6A电化学检测器(Shimadzu)、LC-10AS泵、CTO-10A烘箱、SIL-10A自动注射器(具有维持在40C下的样品冷却器)以及在线Gastorr脱气器(ISS,UK)组成。在分离(流速0.9ml/min)时采用维持在30℃下的反相柱(Kinetex2.6u C18 100×4.6mm,Phenomenex)。在+0.8V下操作与Ag/AgCl参比电极(Shimadzu)组合的玻璃碳工作电极并且使用Class-VP 5软件(Shimadzu)分析所产生的色谱图。通过如通过标准注射所测定的特征滞留时间来鉴定神经递质,所述标准注射在样品分析期间以常规间隔进行操作。测量分析物相较于内标的峰高比率并且与标准注射相比较。结果以每克组织鲜重的神经递质奈克数表示。

[1072] 结果

[1073] 如通过未配对双尾t检验所测定,6天MRX006施用对去甲基肾上腺素、多巴胺、血清素、5-HIAA (5-羟基吲哚-乙酸;5-HT (5-羟基-色胺(血清素)的代谢产物) 的水平或血清素周转(5-HIAA:5-HT的比率) 无影响(图65)。去甲基肾上腺素(t₁₂=0.307,p=0.764)、多巴胺(t₁₂=0.957,p=0.357)、血清素(t₁₂=0.745,p=0.074)、5-HIAA(t₁₂=0.379,p=0.711)水平或脑干中的血清素周转(t₁₂=0.683,p=0.507)。

[1074] 讨论

[1075] 在6-天MRX006施用之后脑干中的神经递质水平不变。这些数据表明,MRX006不负面地影响由在脑干层面的单胺水平控制的行为。

[1076] 实施例16g-评估用MRX006长期处理对中枢和胃肠道基因表达的影响

[1077] 基本原理

[1078] 在来自杏仁核、前额叶皮质以及海马的脑组织中分析神经递质受体[血清素受体1a (5-HT1a)、多巴胺D1受体、GABAB受体亚单位B1、GABA受体、NMDA2A以及NMDA2B受体]、炎性标记物[IL-1β、IL6、CD11b、TNFα以及TLR4]以及内分泌标记物[皮质甾酮释放因子(CRF)、皮质甾酮释放因子受体1和2(CRFR1、CRFR2)、脑源性神经营养因子(BDNF)、升压素受体、催产素受体、糖皮质素受体以及矿物皮质素受体]的基因表达。

[1079] 方法

[1080] 根据制造商建议使用mirVana™ miRNA分离试剂盒(Ambion/Llife technologies, Paisley,UK) 提取总RNA并且处理DNA酶(Turbo DNA-free,Ambion/life technologies)。使用NanoDrop™分光光度计(Thermo Fisher Scientific Inc.,Wilmington,Delaware,USA)根据制造商的说明书对RNA进行定量。使用Agilent生物分析仪(Agilent,Stockport,UK) 根据制造商的程序评估RNA质量并且计算RNA完整指数(RIN)。将RIN值>7的RNA用于后续实验。使用应用生物系统高容量cDNA试剂盒(Applied Biosystems,Warrington,UK) 根据制造商的说明书将RNA逆转录至cDNA。简单来说,添加Multiscribe逆转录酶(50U/μL) (1) (2) (1) (10) 作为RT预混液的一部分,25℃孵育10min,37℃孵育2h,85℃孵育5min并且在4℃下储存。使用由Applied Biosystems针对小鼠特定靶基因设计的探针(6羧基荧光素-FAM),同时使用β-肌动蛋白作为内源性对照进行定量PCR。扩增反应物含有1μl cDNA、5μl的2X PCR预混液(Roche)、900nM的各引物并且通过添加无RNA酶水达到总共10μl。将全部反应使用96孔板在LightCycler®480系统上一式三份地进行。热循环条件如制造商(Roche) 关于55次

循环所建议。为了检查扩增子污染,将不含模板对照的每次运行针对所用的各探针一式三份地进行。记录循环阈值(C_t)的值。使用 β -肌动蛋白对数据进行校正并且使用 $2^{-\Delta \Delta CT}$ 法转化并且呈现为相较于对照组的变化倍数。

[1081] 结果

[1082] 图66表明,MRX006对神经递质受体血清素1a(5-HT1a) ($t_{11}=0.742, p=0.474$)、多巴胺D1受体 ($t_{10}=1.426, p=0.184$)、GABA_B受体B1亚单位 ($t_{12}=1.871, p=0.086$)、GABA_A受体 ($t_{12}=0.017, p=0.987$)、NMDA受体亚单位2A ($t_{11}=1.275, p=0.229$)、NMDA受体亚单位2B ($t_{11}=1.39, p=0.192$) 的海马基因表达无影响。

[1083] 图67表明MRX006对神经递质受体多巴胺D1受体 ($t_{11}=0.429, p=0.677$)、GABA_B受体B1亚单位 ($t_{11}=0.998, p=0.344$)、GABA_A受体 ($t_{11}=1.145, p=0.277$)、NMDA受体亚单位2A ($t_{12}=0.852, p=0.411$)、NMDA受体亚单位2B ($t_{12}=0.395, p=0.707$) 的杏仁核基因表达无影响。

[1084] 图68表明MRX006对神经递质受体多巴胺D1受体 ($t_{11}=0.583, p=0.571$)、GABA_B受体B1亚单位 ($t_{12}=1.304, p=0.217$)、GABA_A受体 ($t_{10}=2.043, p=0.068$)、NMDA受体亚单位2A ($t_{11}=0.177, p=0.104$)、NMDA受体亚单位2B ($t_{11}=1.235, p=0.243$) 的前额叶皮质基因表达无影响。

[1085] MRX006对神经递质受体在所研究的脑区中的任一者中的mRNA表达无影响(图66至图68)。

[1086] 在海马和杏仁核中(图69和图70_[A1])，对各种炎性标记物的mRNA表达无影响。MRX006对炎性标记物IL-1 β ($t_{10}=1.346, p=0.208$)、IL-6 ($t_{12}=1.041, p=0.308$)、CD11b ($t_{12}=1.195, p=0.255$)、TNF α ($t_{11}=0.816, p=0.342$)、TLR4 ($t_{12}=0.521, p=0.612$) 的海马基因表达无影响。MRX006对炎性标记物IL-1 β ($t_{11}=1.53, p=0.988$)、IL-6 ($t_{11}=1.145, p=0.217$)、CD11b ($t_{11}=1.143, p=0.275$)、TLR4 ($t_{11}=0.971, p=0.532$) 的杏仁核基因表达无影响。

[1087] 在前额叶皮质中,MRX006使TLR4的mRNA表达降低,而其他炎性标记物无任何变化(图71)。MRX006使前额叶皮质中TLR4 ($t_{12}=2.639, p=0.0216$) 的mRNA表达显著降低,但对IL-6 ($t_{11}=1.145, p=0.217$) 或CD11b ($t_{11}=2.175, p=0.523$) 的前额叶皮质基因表达无进一步影响。

[1088] MRX006使海马中升压素受体的mRNA表达显著降低 ($t_{12}=2.389, p=0.0342$) ,但对内分泌标记物CRF ($t_{12}=0.767, p=0.458$)、CRFR1 ($t_{12}=0.174, p=0.865$)、CRFR2 ($t_{11}=0.238, p=0.816$)、BDNF ($t_{12}=1.548, p=0.148$)、催产素受体 ($t_{12}=0.762, p=0.461$)、糖皮质素受体 ($t_{12}=0.607, p=0.556$)、矿物皮质素受体 ($t_{12}=0.67, p=0.516$) 的mRNA表达无进一步影响(图72)。

[1089] MRX006对杏仁核内分泌标记物CRFR1 ($t_{12}=0.226, p=0.825$)、CRFR2 ($t_{11}=0.78, p=0.451$)、BDNF ($t_{12}=0.201, p=0.844$)、升压素受体 ($t_{12}=0.756, p=0.465$)、催产素受体 ($t_{11}=0.167, p=0.87$)、糖皮质素受体 ($t_{11}=1.027, p=0.327$)、矿物皮质素受体 ($t_{11}=1.448, p=0.175$) 的mRNA表达无影响(图73_[A2])。

[1090] MRX006对前额叶皮质内分泌标记物CRFR1 ($t_{12}=1.666, p=0.122$)、CRFR2 ($t_{11}=1.179, p=0.261$)、BDNF ($t_{11}=1.065, p=0.310$)、催产素受体 ($t_{11}=1.037, p=0.322$)、糖皮

质素受体 ($t_{12}=1.185, p=0.259$)、矿物皮质素受体 ($t_{11}=1.910, p=0.083$) 的 mRNA 表达无影响(图74)。

[1091] 在杏仁核和前额叶皮质中(图73和图74),任何内分泌标记物的mRNA表达均无变化,而在海马中(图72)存在升压素受体的mRNA表达的降低,而对所分析的其他内分泌标记物无任何影响。

[1092] 讨论

[1093] 在6-天MRX006施用之后,炎性、内分泌以及神经递质受体的中枢基因表达大体不变。

[1094] 关于MRX006施用针对生理参数的总结论

[1095] 总地说来,这些数据证实MRX006施用不负面影响全身性和中枢生理事件。这些数据表明MRX006可在极小非所需副作用情况下具有高耐受性型态。

[1096] 实施例17-母体免疫活化(MIA)小鼠模型

[1097] 所用的MIA小鼠与实施例3a中所描述相同。

[1098] 实施例17a-在MIA模型中评估用MRX006长期处理对体内胃肠道渗透性的影响

[1099] 如实施例2k中所描述使用尤斯灌流室体内评估回肠和结肠的渗透性。图75证实在MIA模型中用MRX006长期处理不影响结肠或回肠的渗透性。

[1100] 这证实用MRX006长期处理不改变肠道渗透性,这表明MRX006的有益社交行为、减轻焦虑样行为以及刻板行为的作用不引起肠道完整性的缺陷。

[1101] 实施例17b-社交行为的评估-三室社交互动测试

[1102] 如关于实施例1a所描述进行3-室社交互动测试(3-CSIT),然而由不知晓处理的研究者对此数据进行人工评分。通过计算机跟踪软件自动产生实施例1a中的数据,所述计算机跟踪软件不能区分开与小鼠互动与仅仅同小鼠位于同一室中。^[A3]

[1103] 在社交新颖性测试中(图76^[A4]),不存在MIA-诱导的社交辨别缺陷并且MRX006对社交新颖性无进一步影响。

[1104] 图77^[A5]表明在社交性测试中,MRX006能够逆转MIA-诱导的社交行为缺陷。这类似于在MRX006可逆转社交性缺陷的BTBR模型中所见到的数据^[A6]。

[1105] 实施例17c-社交行为的评估-梳理测试

[1106] 如实施例2e中所描述进行梳理测试。在梳理测试中用MRX006长期处理不引起MIA小鼠的重复行为的变化(图78)。

[1107] 实施例17d-社交行为的评估-高架十字迷宫

[1108] 如实施例2f中所描述进行高架十字迷宫测试。用MRX006处理对MIA小鼠在高架十字迷宫中的焦虑样行为无影响(图79)。

[1109] 实施例17e-社交行为的评估-强迫游泳测试

[1110] 如实施例2h中所描述进行强迫游泳测试。在强迫游泳测试中用MRX006长期处理使MIA小鼠的不动时间减少(图80)。

[1111] 实施例17f-压力诱导的循环皮质甾酮测定

[1112] 如实施例2n中所描述测量皮质甾酮的水平。用MRX006长期处理不影响在暴露于强迫游泳测试的MIA小鼠中压力诱导的皮质甾酮水平(图81)。

[1113] 结论

[1114] 用MRX006处理逆转MIA-诱导的社交行为缺陷并且使强迫游泳测试中的不动时间减少。这证实MRX006改善社交性的能力和其抗抑郁活性。

[1115] 除上文在实施例3中所描述的结果之外,已证实MRX006对自闭症谱系病症的症状具有积极影响。

[1116] 序列

[1117] SEQ ID NO:1(粪便布劳特氏菌菌株GAM6-1 16S核糖体RNA基因,部分序列-HM626177)

```

1 tgcaagtcga gcbaaggcgt tacgacagaa cttcgaaaa aagatgttaag ggactgagcg
61 gcggacgggt gagtaacgcg tggtaaacct gcctcataca ggggataaac agttggaaac
121 ggctgctaatt accgcataag cgacggtat cgcatac acgtgtaaaa actccgtgg
181 tatgagatgg acccgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggcctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc
301 ctacggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggaa aaccctgatg cagcgcacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcaggaaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gttaggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgttagac ggaagagcaa gtctgatgt
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttctttag tgccggagag
601 gtaagcggaa ttccatgtgt agcggtaaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
[1118]
661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
721 attagataacc ctggtagtcc acgcgtaaa cgtatac tagtgtttgg ggagcaaagc
781 tcttcggcgc cgcagcaaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
841 aaactcaaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtgggt taattcgaag
901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggAACCTTT
961 ctttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agtcgtgtc gtgagatgtt
1021 gggtaagtc ccgcaacggc cgcaacccct atcctcagta gccagcaggta gaagctggc
1081 actctgttgg gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtct acaatggcgt aaacaaagg aagcggcccc
1201 gcgagggggaa gcaaattccca aaaataacgt cccagttcg actgcagttt gcaactcgac
1261 tgcacaaggc tggaatcgct agtaatcgca aatcagaatg tgcgggtgaa tacgttcccg
1321 ggtcttgc acaccggcccg tcacaccatg ggagtca gacccggaaag tc

```

[1119] SEQ ID NO:2(粪便布劳特氏菌MRX006(菌株830)的共有16S rRNA序列)

```

[1120] TTKCTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCCCCCTCTTAACACATGCAAGTCCACCGAAGCGCTTACGAC
AGAACCTTCGGGGAAAGATGTAAGGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGTAACCTGCCTCATACAGGG
GGATAACAGTTGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACTGTGAAAAACTCCGGTGG
TATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGA
GAGGGTGAAACGCCACATTGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAAT
GGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGGAAGAAGTATCTGGTATGTAAACTCTATCAGCAGGGAAAGAA
AATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGCAAGCGTTAT
CCGGATTACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGCTTAACCCAGGAC
TGCATTGGAAACTGTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATT
AGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCGCTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAG
GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGAGCAAAGCTTCCGGTCCGCAGC
AAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTATCGAAGCAACGCGAAGAACCTACCAAGTCTGACATCGATCTGACCGGTTCGTAAT

```

GGAACCTTCCTCGGGACAGAGAACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG
 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAA
 CCTGGAGGAAGGCAGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTATGATTGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAA
 ACAAAGGGAAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCAAAATAACGTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGA
 CTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTAAATACGTTCCCAGGTCTGTACACACCG
 CCCGTACACCATGGGAGTCAGTAACGCCAGTCAGTGACCCAACCTAGGGAGGGAGCTGCCAAGGCAGGATT
 GATAACTGGGGTGAAGTCTAGGGGGT

[1121] SEQ ID NO:3(韦克斯勒布劳特氏菌菌株WAL 1450716S核糖体RNA基因,部分序列-EF036467)

```

 1 caagtcgaac gggatttttattttaaaac ttccgtcgat ttaatttaat tcttagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacagg ggataacagt cagaatggc
 121 tgctaataacc gcataagcgc acagagctgc atggctcaat gtggaaaaact ccgggttgtat
 181 aagatggacc cgcgttggat tagcttggat gtggggtaac ggccccaccaa ggccgacgatc
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
 301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tggggaaac cctgtatcgag cgaccccgcg
 361 tgaaggaaaga agtatctcggt tatgtaaact tctatcagca gggaaagatag tgacggtaacc
 421 tgactaaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgc gtaatacgtt aaaaaaaaaaaaa
 481 gttatccgaa ttacttgggt gtaaaaggag ctagacggcgt gtggcaagtc tgatgtgaaa
 541 ggcattggctt caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagttgc cggaggggta
 601 agcggaaattc ctatgttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggagggacac cagtggcgaa
 661 ggccgttac tgacggtaa ctgacgttga ggctgaaag cgtggggagc aaacaggatt
 721 agataccctg gtatccacg ccttacacg tgaataacta ggtgtcggtt ggcaaaagcca
 781 ttccgtgccc tcgcaaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttgc caagaatgaa
 841 actcaaaaggaa attgacgggg acccgaccaa gcggtggagc atgtggttt attcgaaagca
 901 acgcggaaatcccttaccaag tcttgcacatc cgccgttgcgatccatcc accatccgggg
 961 ttccggacac gcgagacacgg tgggtcatgg ttgtcgatcg ctgcgtgtcg gagatgttgg
 1021 gttaaatccc gcaacggcgc caacccat cctcgttgc cagcattaa ggtggcact
 1081 ctggggagac tgccaggat aacctggagg aaggcgggg tgacgtcaaa tcattatgcc
 1141 ctttatgtt gggctacac acgtgtaca atggcgatcaa caaaggaaag cgagattgtg
 1201 agatggagca aatccaaatataacgtccc agtccggact gtagtctgca acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgcttagt aatcgccgtt cagaatgccg cggtaatac gttccgggt
 1321 cttgtacaca ccgccccgtca caccatgggat gtcgttgc cccgttgc gtagacttac
 1381 tgcaaaaggaa gagctggcga aggccggacc gatgttggg gtagacttgc aacaaggat

```

[1122] SEQ ID NO:4(韦克斯勒布劳特氏菌菌株MRX008的共有16S rRNA序列)

[1123] TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGTGGTAACC
 TGCCTTAT

[1124] ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTG
 AAAAACTC

[1125] CGGTGGTATAAGATGGACCCCGTGGATTAGCTTGTGCTGGGTAACGGCCACCAAGGCATGAT
 CCATAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAAATATTGCACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGAAACTT
 CTATCAGCAGGGAAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCGCTAACTACGTGCCAGCCGCGTAATAC
 GTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGC
 ATGGGCTAACCTGTGGACTGCATTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAG

CGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTACTGGACGGTAAC TGACGTTGAGGCTC
 GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGGA
 GCATGGCTTCGGTGCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTCGCAAGAACCTACAAAG
 GGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATCGAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCT
 TGACATCCGCCTGACCGATCCTAACCGGATCTTCCTCGGGACAGGCAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
 GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACGAGCGAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTAAGGTGG
 GCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCAGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTATGATT
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCAAAATAACGT
 CCCAGTTGGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGATCGCTAGTAATCGGGATCAGAACGCCGG
 TGAATACGTTCCGGGTCTTGTACACACCGCCGTCACACCAGGGAGTCAGTAACGCCGAA3TCAGTGACCTAA
 CTGCAAA3AAGGAGCTGCC3AA

- [1127] SEQ ID NO:5 (菌株830) 染色体序列)-参见电子序列表。
- [1128] SEQ ID NO:6 (MRX006 (菌株830) 质粒序列)-参见电子序列表。
- [1129] SEQ ID NO:7 (嗜氢布劳特氏菌菌株S5a36 16S核糖体RNA基因,部分序列-X95624.1)

```

1 gatgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac gaagcgatacg agaacggaga
61 ttccgttga agttttctat tgactgagtgc gccgacgggt gagtaacgcg tggtaacct
121 gcccatacata gggggataac agttagaaat gactgctaatt accgcataag cgcacagctt
181 cgcatgaagc ggtgtgaaaa actgagggtgg tataggatgg acccgcggtt gattagctag
241 ttggtaggtt aacggccccac caaggcgacg atccatagcc ggcctgagag ggtgaacggc
301 cacattggga ctgagacacgcg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca
361 caatggggaa aaccctgtatc cagcgacgccc gcgtgaagga agaagtatct cggatgtaa
421 acttctatca gcagggaaaga aagtgcgtt acctgactaa gaagccccgg ctaattacgt
481 gccagcagcc gccgtataac gtaagggca agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg
[1130] 541 gagcgttagac gttttggcaa gtctgtatgg aaaggcatgg gctcaacctg tggactgcat
601 tggaaactgt cagacttgag tgccggagag gcaagcgaa ttcctagttt agcgtgaaa
661 tgcgttagata ttaggaggaa caccagtggc gaaggcggcc tgctggacgg taactgacgt
721 tgaggctcga aacgcgtgggg agcaaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgctgtaaa
781 cgatgaatac taggtgtcggt gtggcaaaacg cattcggtgc cgcagcaaac gcaataagta
841 ttcccacctg gggagtacgt tcgcaagaat gaaactcaaa ggaattgcg gggacccgca
901 caagcggtgg agcatgtgg ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aaatcttgc
961 atccctctga ccggaaagta atgttccctt ttcttcggaa cagaggagac aggtgggtgca
1021 tggttgtcgt cagctcgtgt cgttagatgt tgggttaagt cccgcaacgc ggcacccct
1081 tattcttagt agccagcagg tagagctggg cactctaggg agactgcacgg ggataacctg
1141 gaggaagggtg gggatgcgtt caaatcatca tgcggctt gatttggctt acacacgtgc
1201 tacaatggcg taaacaaagg gaagcgaaagg ggtgacctgg agcaaatctc aaaaataacg
[1131] 1261 tctcgttgc gattgttagtc tgcaactcga ctacatgaag ctggatcg tagtaatcgc
1321 gaatcagaat gtcgcgggtga atacgttccc ggtctttgtt cacaccgccc gtcacaccat
1381 gggagtcaagt aacgcggca gtcagtgcacc caaccnaaag gaggagctg ccgaagggtgg
1441 gactgataac tgggtga

```

- [1132] 参考文献
- [1133] [1]Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol.9(4):279-90.
- [1134] [2]Eckburg et al. (2005) Science.10:308 (5728):1635-8.
- [1135] [3]Macpherson et al. (2001).Microbes Infect.3(12):1021-35

- [1136] [4] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59 (12) :2088–96.
- [1137] [5] Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122 (1) :107–18.
- [1138] [6] Frank et al. (2007) PNAS 104 (34) :13780–5.
- [1139] [7] Scanlan et al. (2006) J Clin Microbiol. 44 (11) :3980–8.
- [1140] [8] Kang et al. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16 (12) :2034–42.
- [1141] [9] Machiels et al. (2013) Gut. 63 (8) :1275–83.
- [1142] [10] Mayer et al. (2014) The Journal of Neuroscience 34 (46) :15490–15496
- [1143] [11] Cryan and Dinan (2015) Neuropsychopharmacology, 40:241–2.
- [1144] [12] Zhou and Foster (2015) Neuropsychiatric Disease and Treatment 11: 715–723.
- [1145] [13] Wang and Kasper (2014) Brain Behav Immun. 38:1–12.
- [1146] [14] WO2013/050792
- [1147] [15] WO03/046580
- [1148] [16] WO2013/008039
- [1149] [17] WO2014/167338
- [1150] [18] Goldin and Gorbach (2008) Clin Infect Dis. 46 Suppl 12: S96–100.
- [1151] [19] Azad et al. (2013) BMJ. 347:f6471.
- [1152] [20] Bravo et al. (2011) Proc Natl Acad Sci USA, 108:16050–5.
- [1153] [21] Kantak et al. (2014) Behav Pharmacol. 25:71–9.
- [1154] [22] Savignac et al. (2014) Neurogastroenterol Motil. 26:1615–27.
- [1155] [23] de Theije et al. (2014) Brain Behav Immun. 37:197–206.
- [1156] [24] Hsiao et al. (2013) Cell. 155:1451–63.
- [1157] [25] Meyza and Blanchard (2017) Neurosci Biobehav Rev.
- [1158] [26] Liu et al. (2008) Int J Syst Evol Microbiol 58, 1896–1902.
- [1159] [27] Park et al. (2012) Int J Syst Evol Microbiol. 62 (Pt 4) :776–9.
- [1160] [28] Liu et al. (2008) Int J Syst Evol Microbiol. 58 (Pt 8) :1896–902.
- [1161] [29] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology. 26:557–563.
- [1162] [30] Srutková et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87 (1) :10–6.
- [1163] [31] Bernalier et al. (1996) Arch. Microbiol. 166 (3) , 176–183.
- [1164] [32] Wang et al. (2016) J Neurogastroenterol Motil 22:589–605.
- [1165] [33] Li and Zhou (2016) Neuroscience 324:131–139.
- [1166] [34] Hyland and Stanton (2016) The Gut–Brain Axis:Dietary, Probiotic and Prebiotic Interventions on the Microbiota (Academic Press) .
- [1167] [35] Bourassa et al. (2016) Neuroscience Letters 625, 56–63
- [1168] [36] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 9–24.
- [1169] [37] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [1170] [38] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592–3597.
- [1171] [39] Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.

- [1172] [40]Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol.3 (2) :39-48.
- [1173] [41]Handbook of Pharmaceutical Excipients,2nd Edition, (1994) ,Edited by A Wadc and PJ Weller
- [1174] [42]Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro edit.1985)
- [1175] [43]US 2016/0067188
- [1176] [44]Handbook of Microbiological Media,Fourth Edition (2010) Ronald Atlas,CRC Press.
- [1177] [45]Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C.Hunter-Cevera,Academic Press
- [1178] [46]Strobel (2009) Methods Mol Biol.581:247-61.
- [1179] [47]Gennaro (2000) Remington:The Science and Practice of Pharmacy.20th edition,ISBN:0683306472.
- [1180] [48]Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course, (Ream et al.,eds.,1998,Academic Press) .
- [1181] [49]Methods In Enzymology (S.Colowick and N,Kaplan,eds.,Academic Press, Inc.)
- [1182] [50]Handbook of Experimental Immunology,Vols,I-IV (D.M,Weir and C.C, Blackwell,eds,1986,Blackwell Scientific Publications)
- [1183] [51]Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) .
- [1184] [52]Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi,K.S.ed.,CRC Press,1997)
- [1185] [53]Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology,5th edition (Current Protocols) ,
- [1186] [54]PCR(Introduction to Biotechniques Series) ,2nd ed. (Ncwtion&Graham cds.,1997,Springer Verlag)
- [1187] [55]Current Protocols in Molecular Biology (F.M,Ausubel et al.,eeds., 1987) Supplement 30
- [1188] [56]Smith&Waterman (1981) Adv.Appl.Math.2:482-489.
- [1189] [57]Cryan and Mombereau (2004) Mol Psychiatry 9:326-57.
- [1190] [58]Hyland and Cox (2006) Br J Pharmacol.146 (5) :712-722

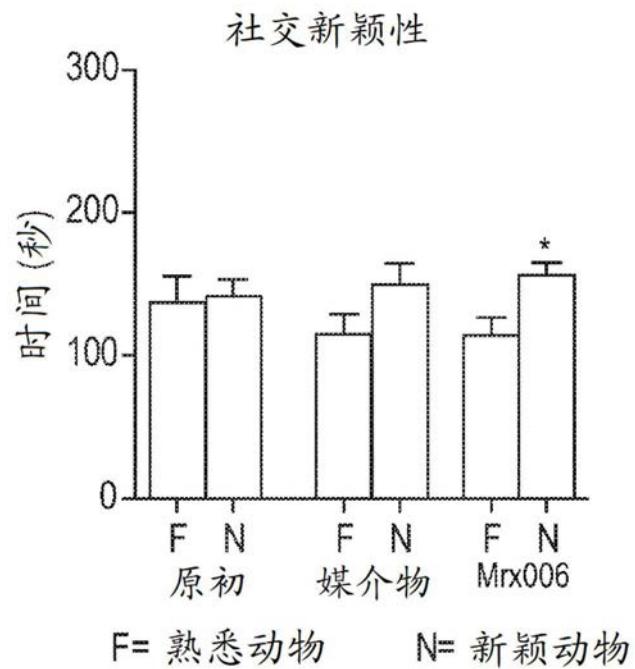


图1A

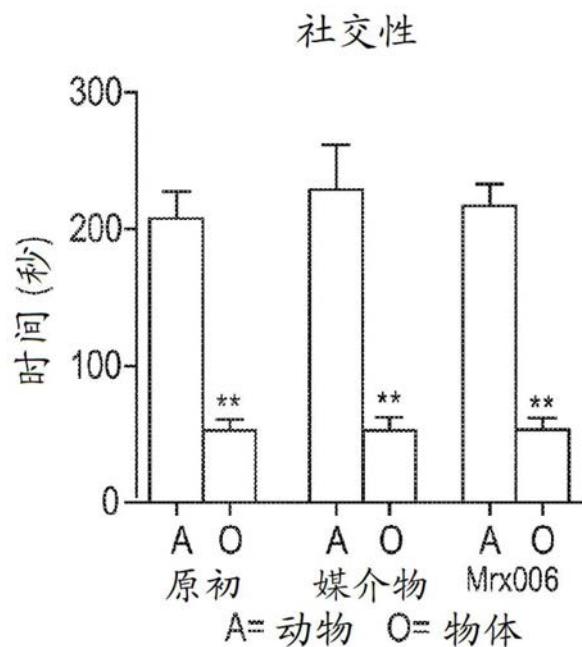


图1B

强迫游泳测试

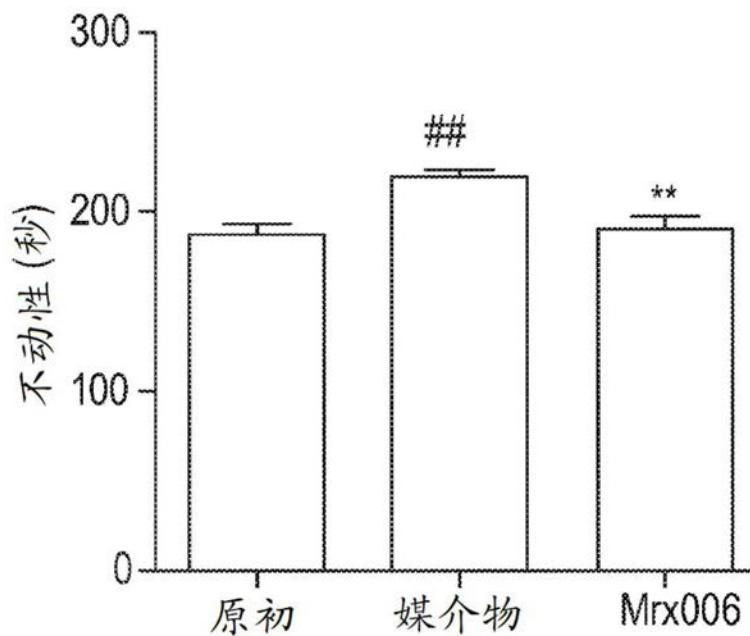


图2

悬尾测试

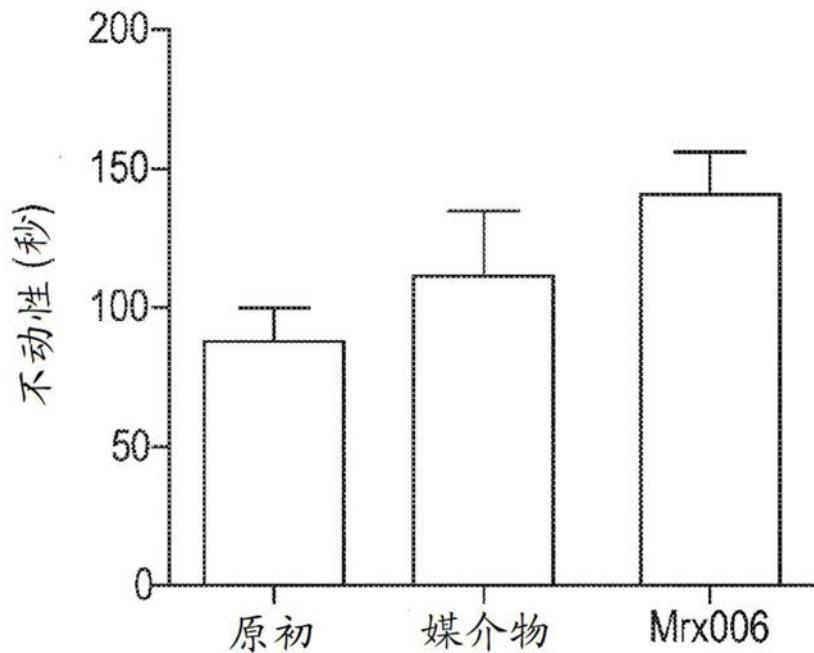


图3

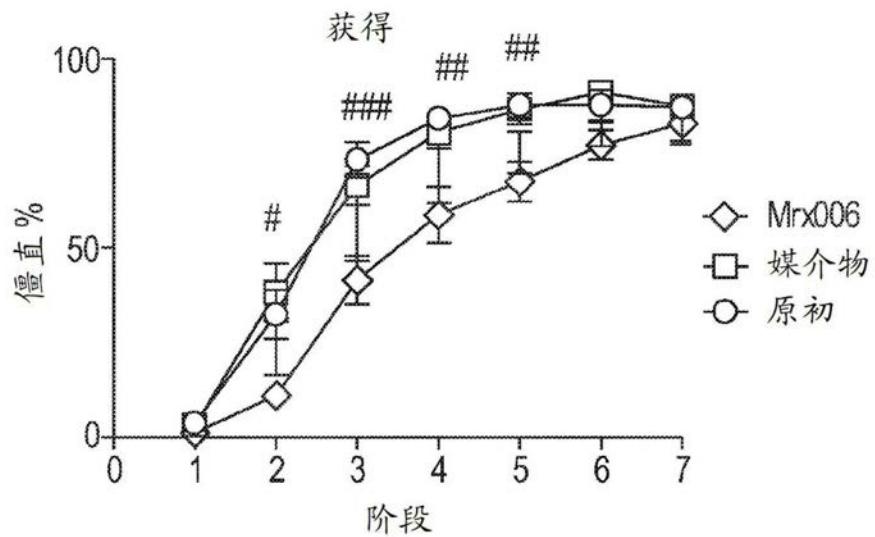
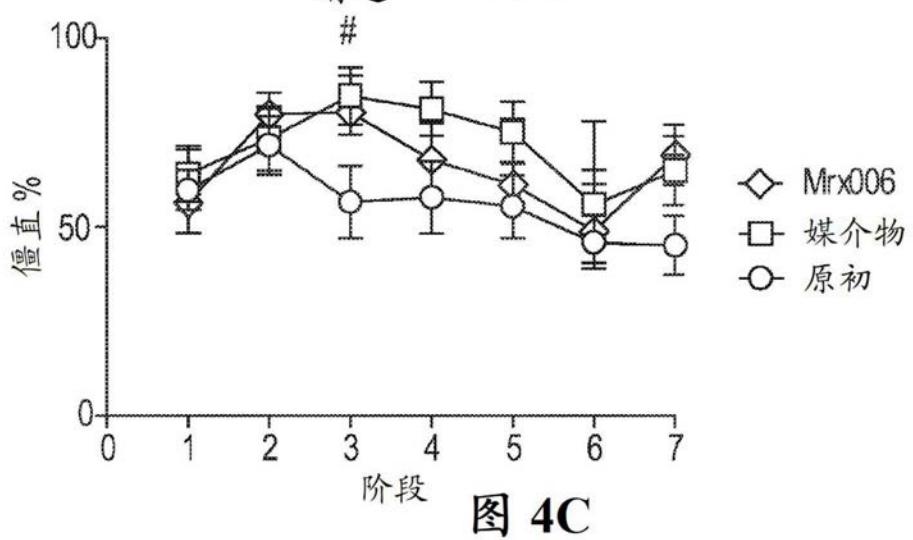
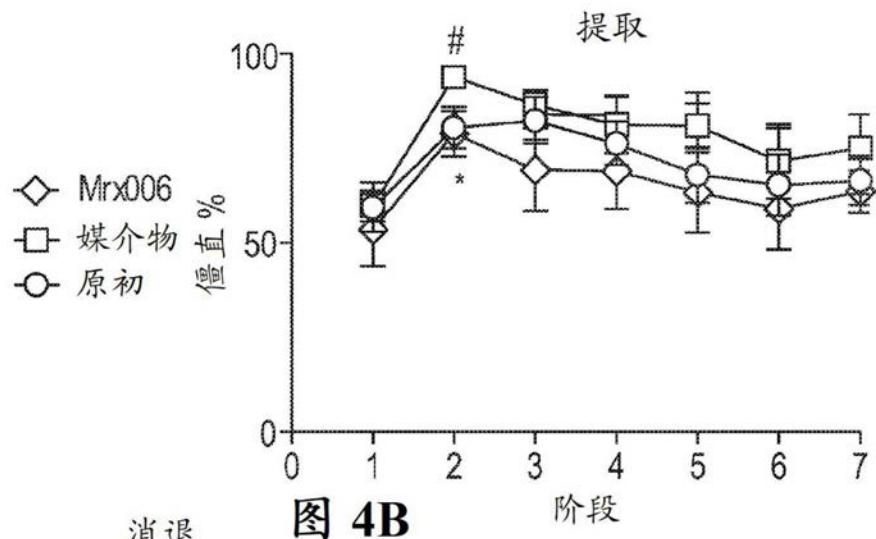


图4A



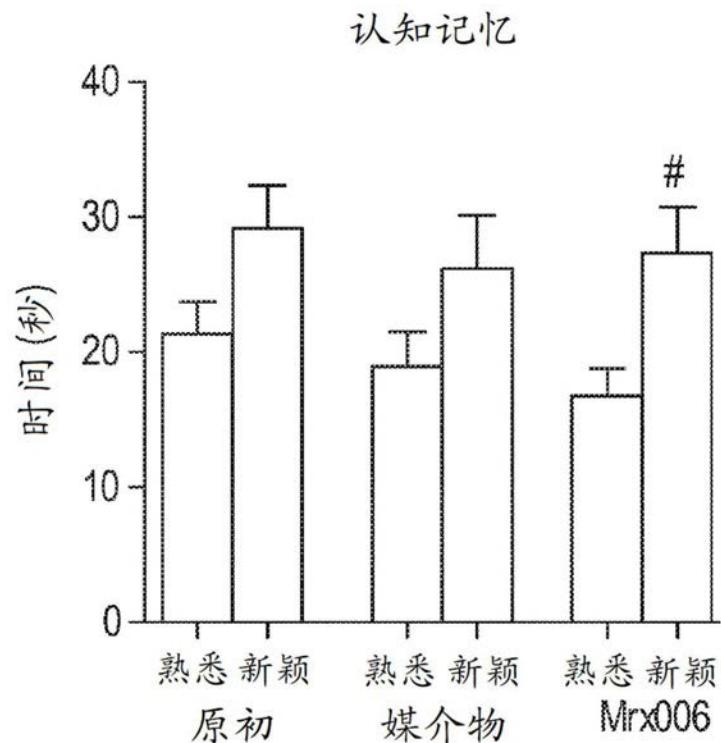


图5

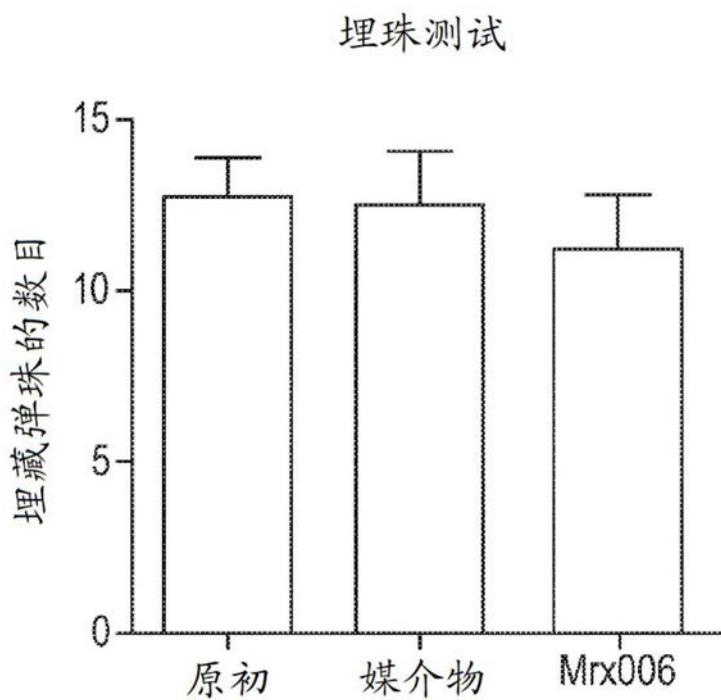


图6

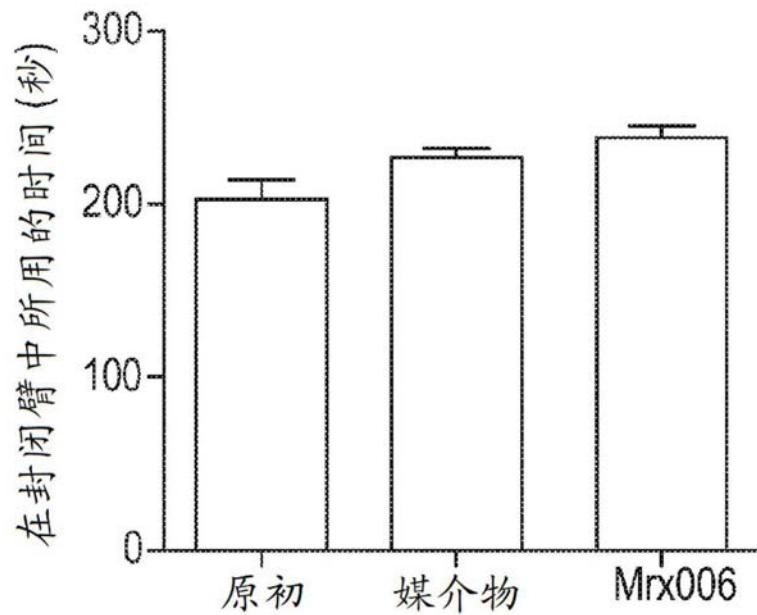


图7A

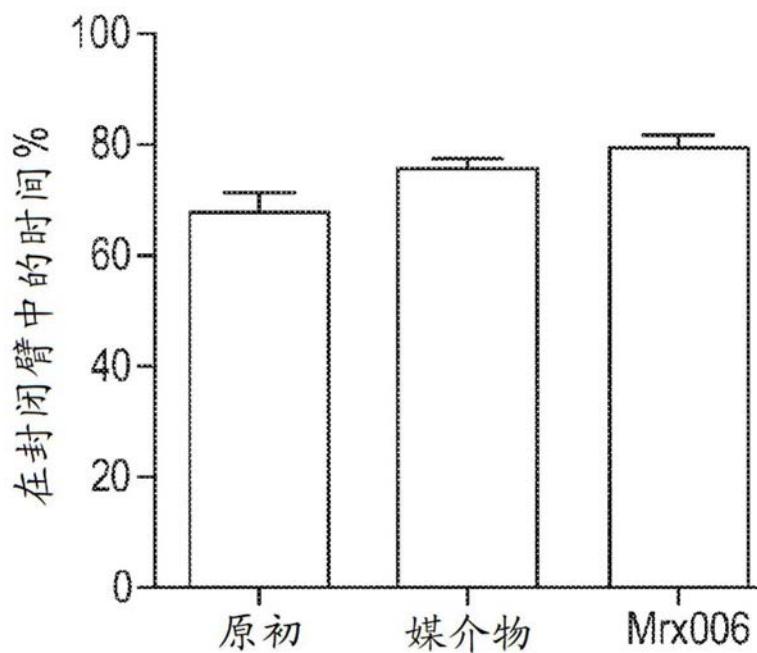


图7B

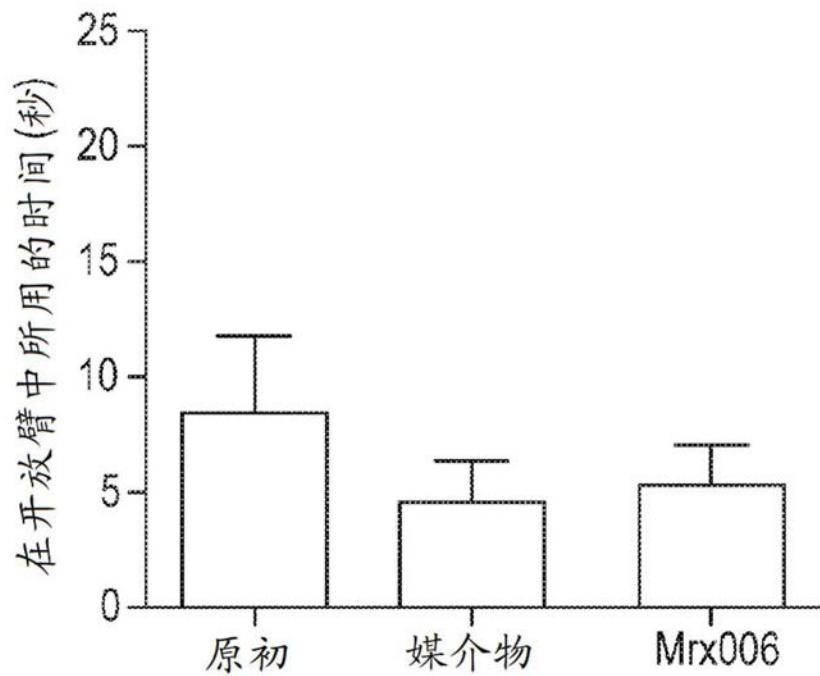


图7C

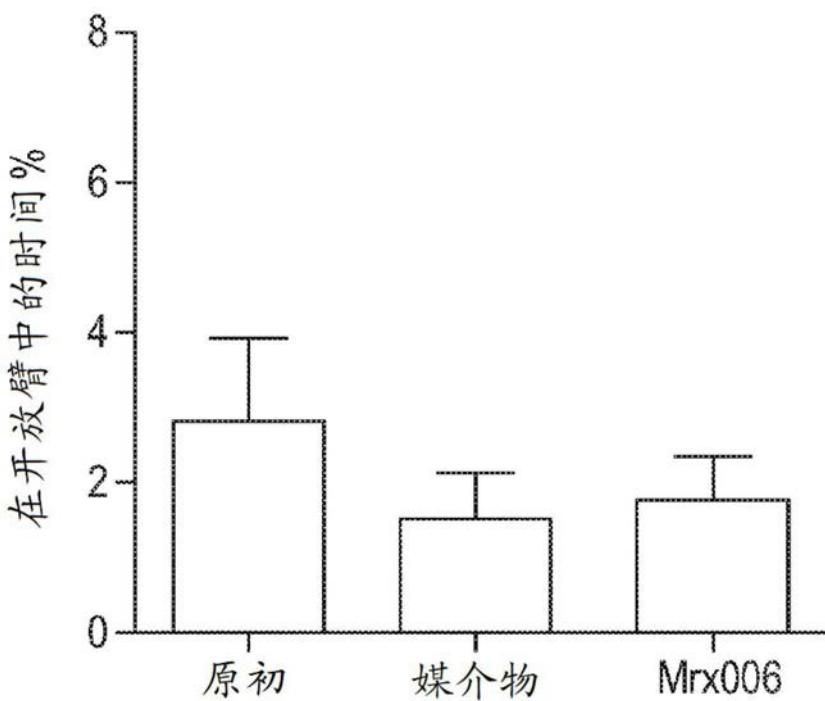


图7D

压力诱导的体温过高

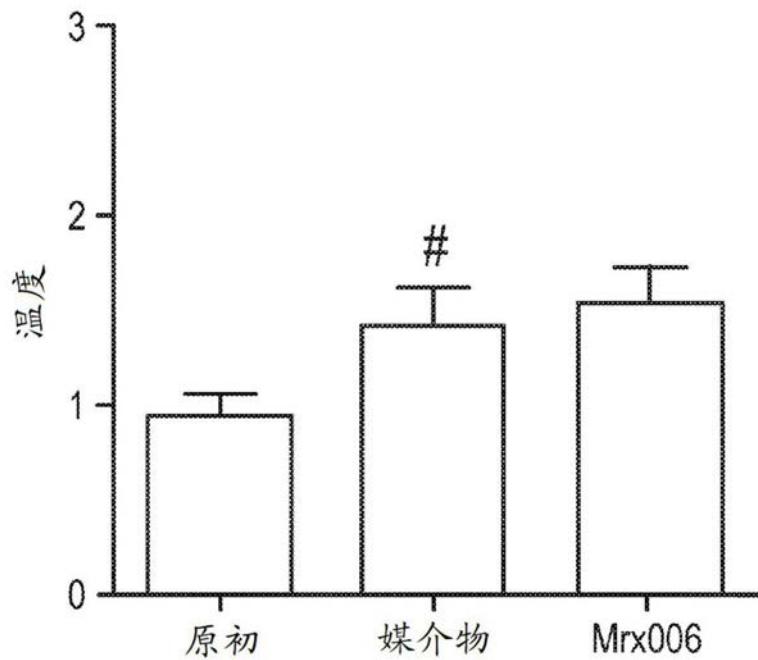


图8

循环催产素

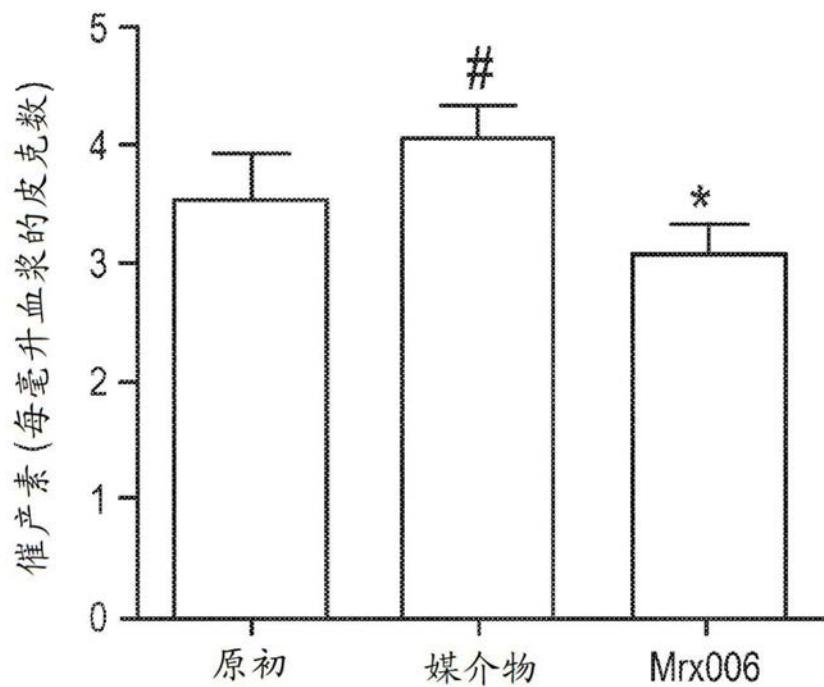


图9

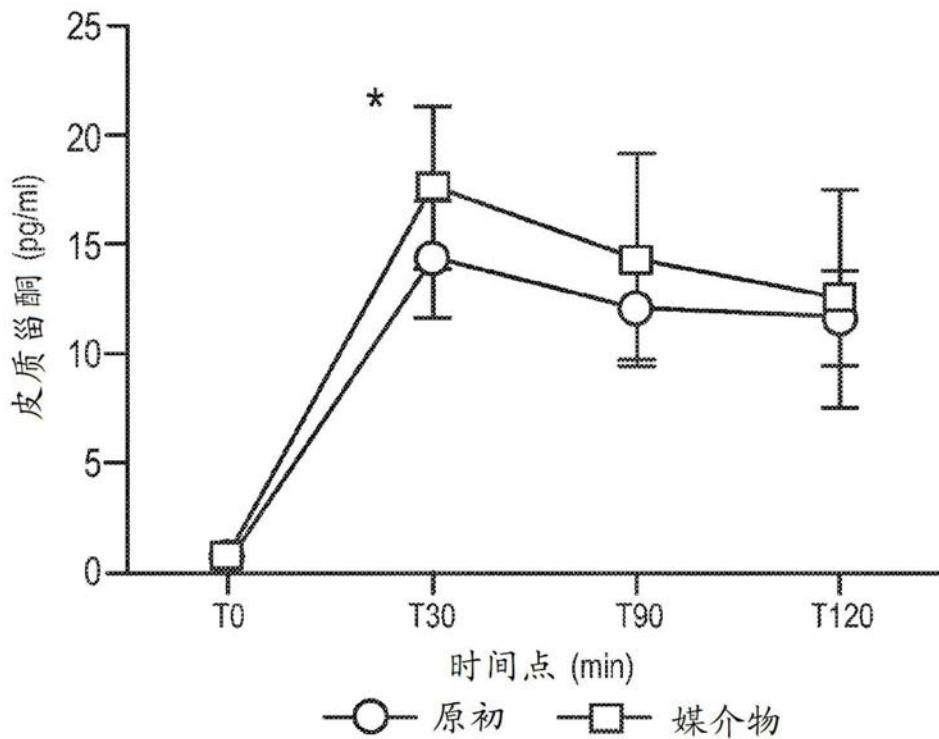


图10A

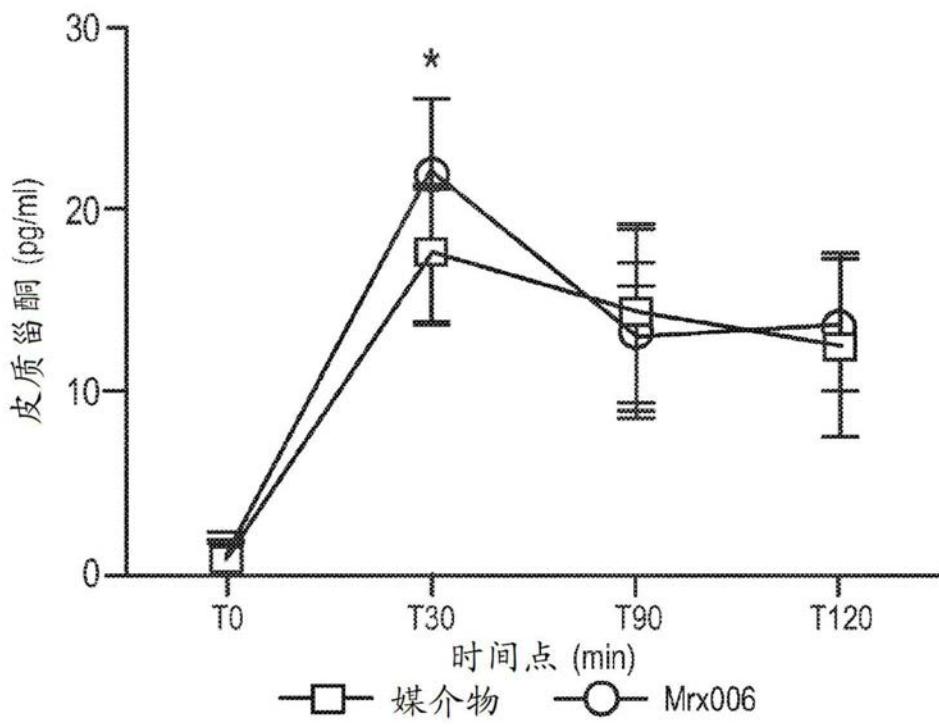


图10B

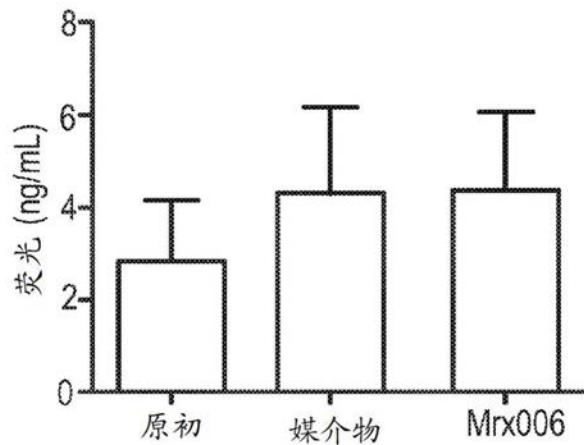


图11

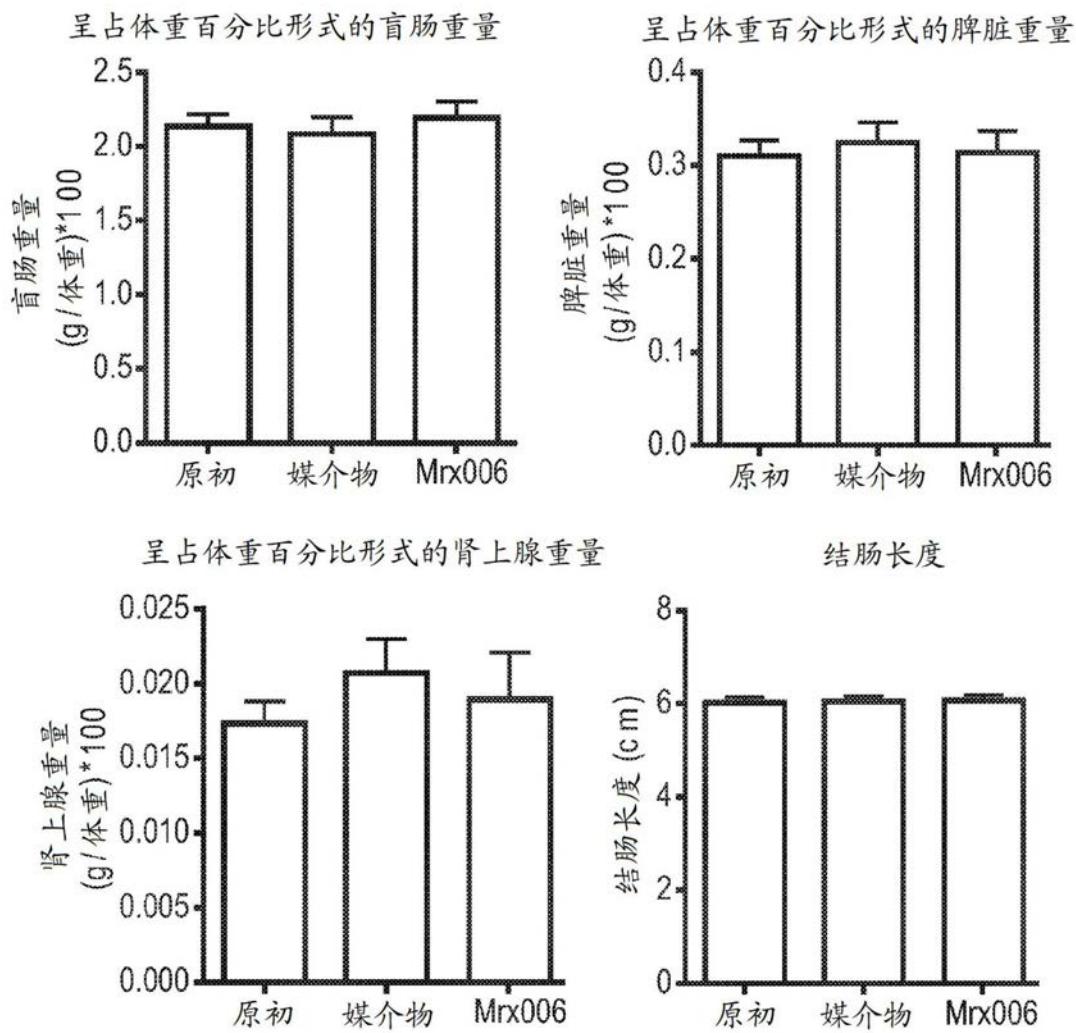


图12

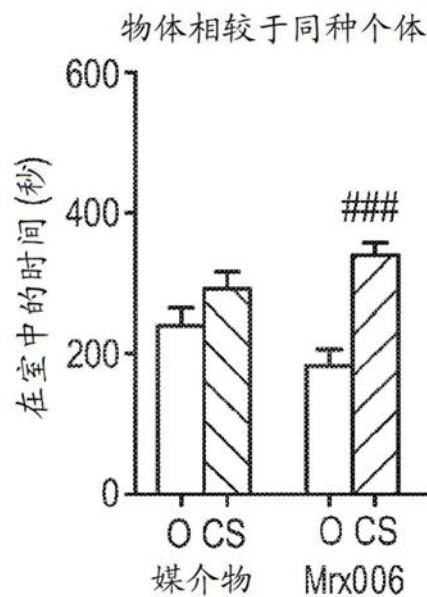


图13A

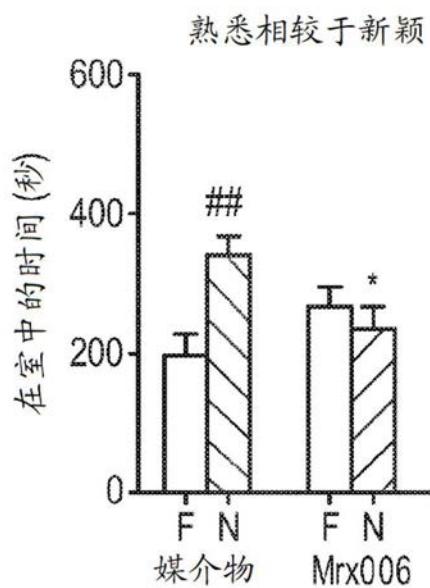


图13B

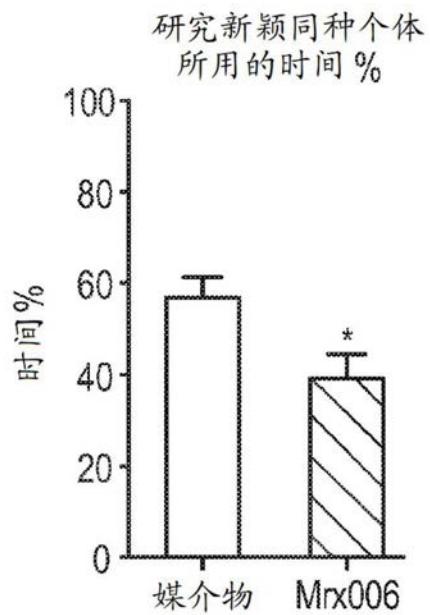


图13C

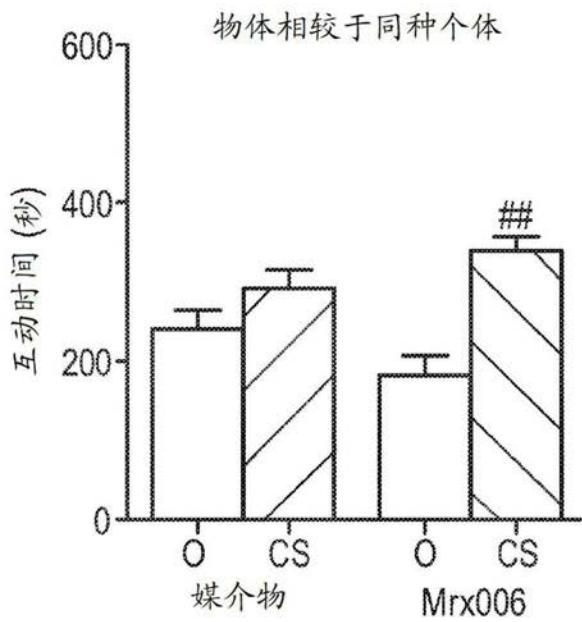


图 13D

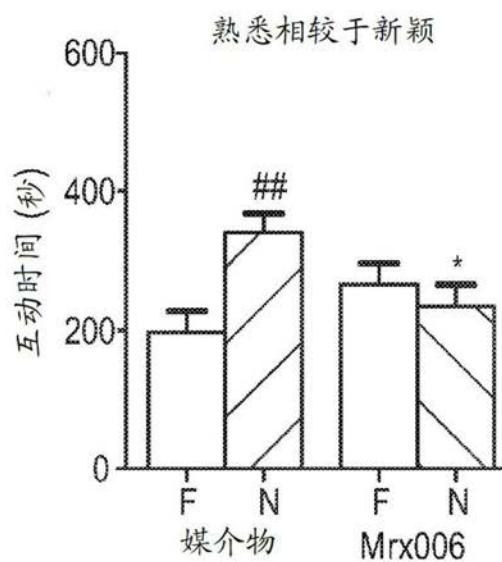


图 13E

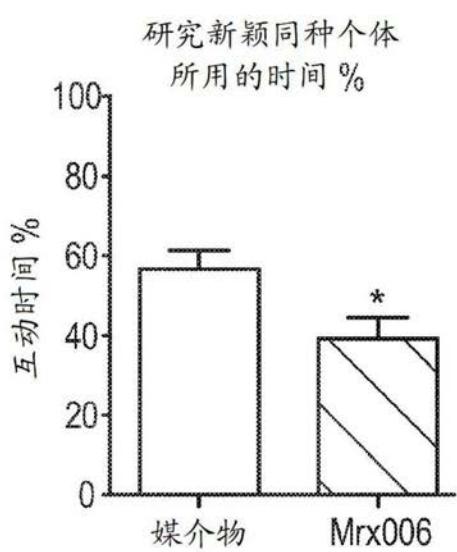


图 13F

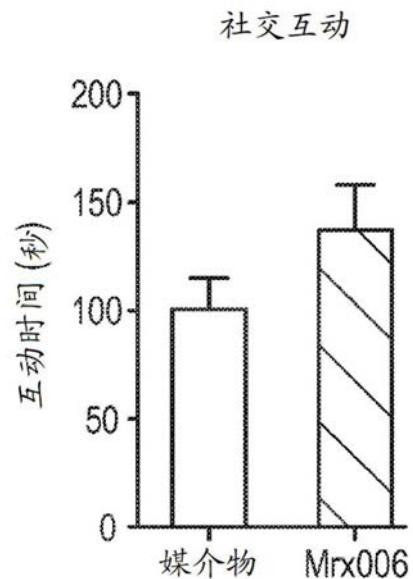


图14

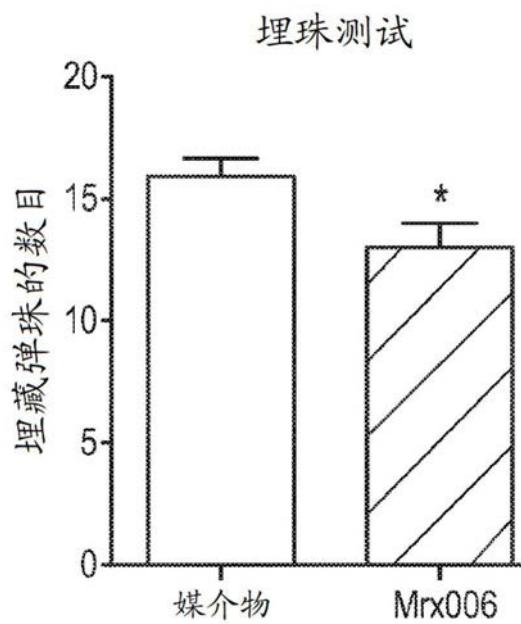


图15

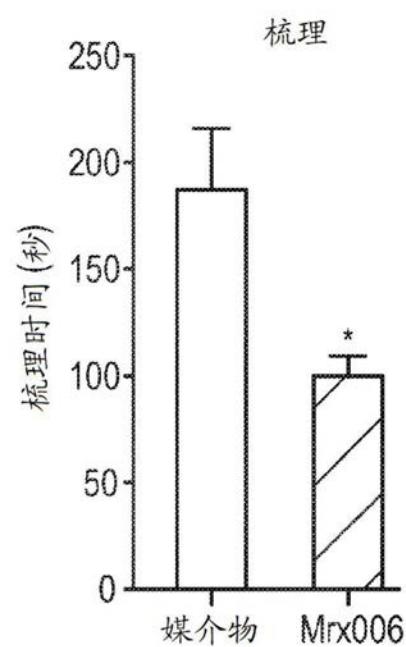


图16A

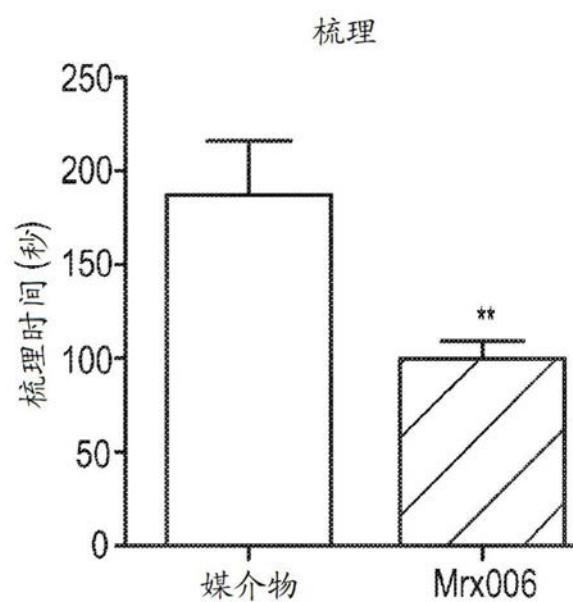


图16B

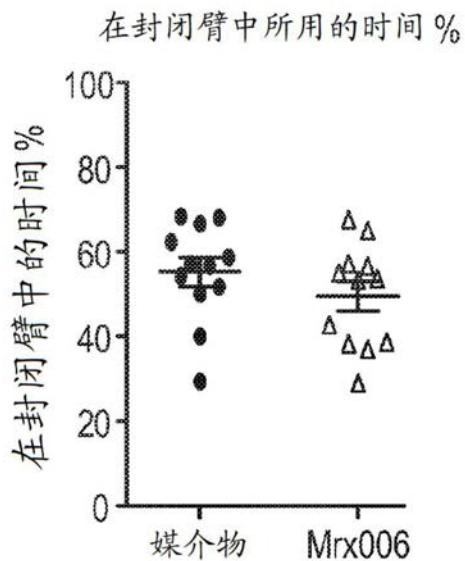


图17A

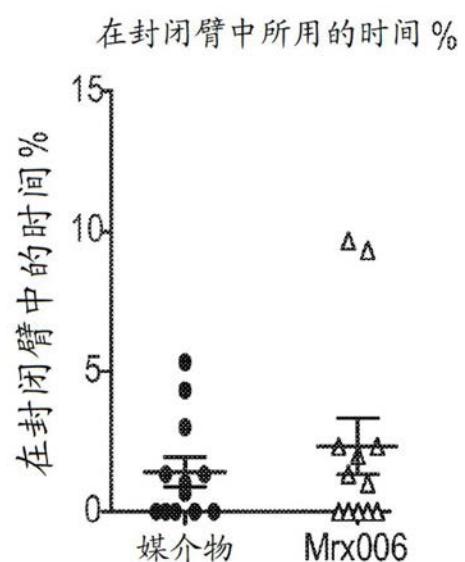


图17B

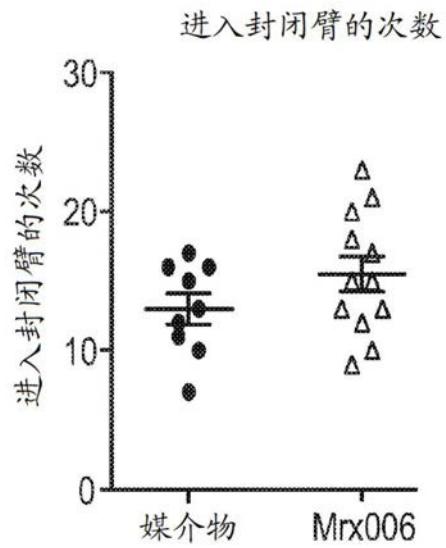


图17C

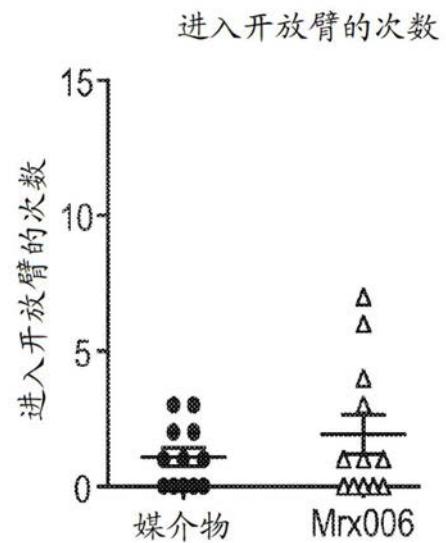


图17D

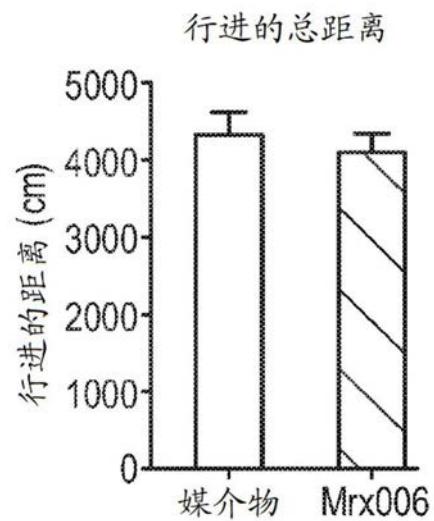


图18A

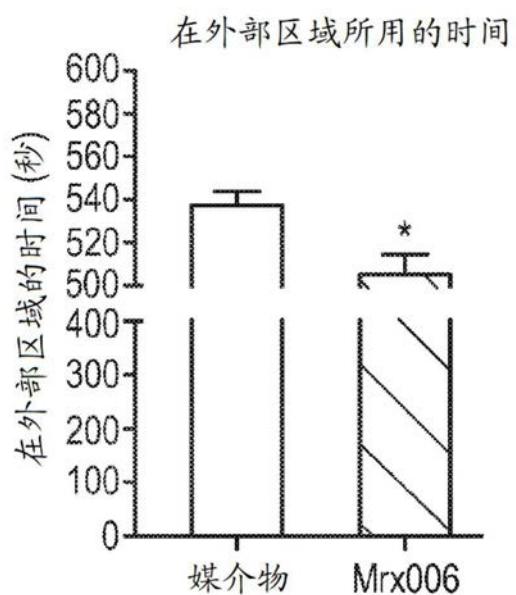


图18B

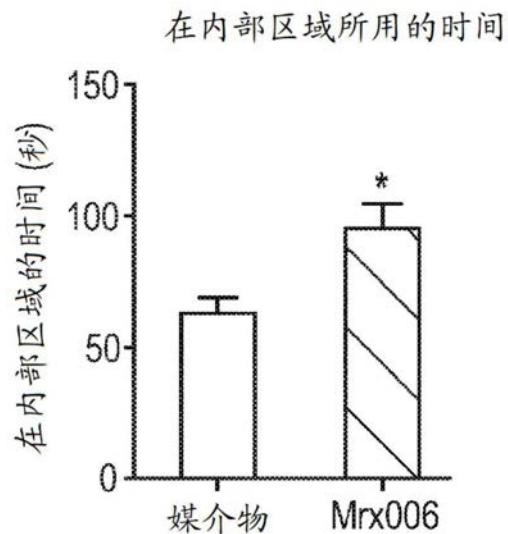


图18C

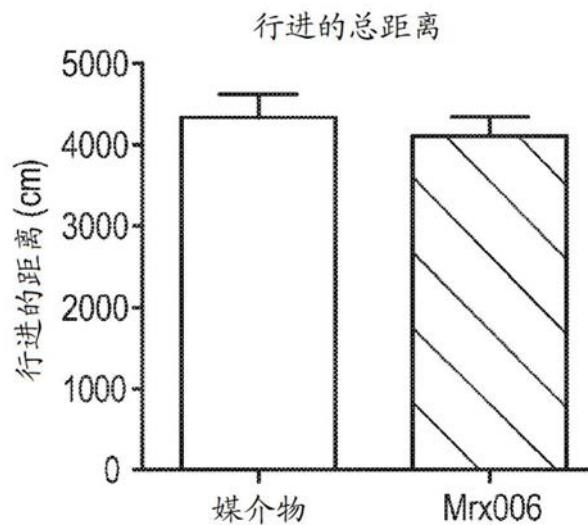


图18D

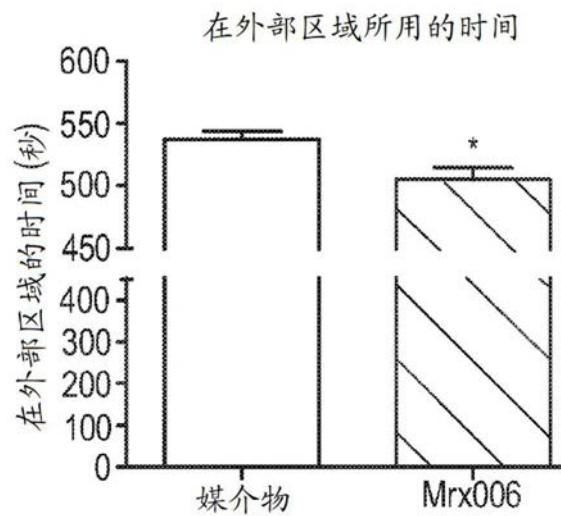


图18E

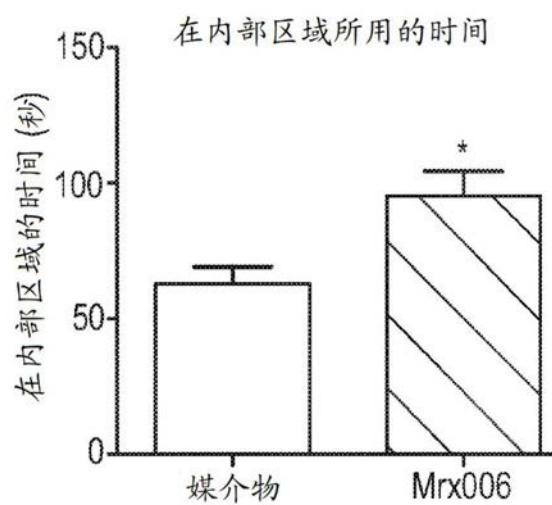


图18F

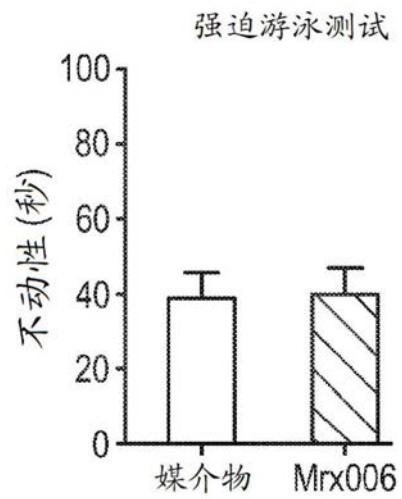


图19

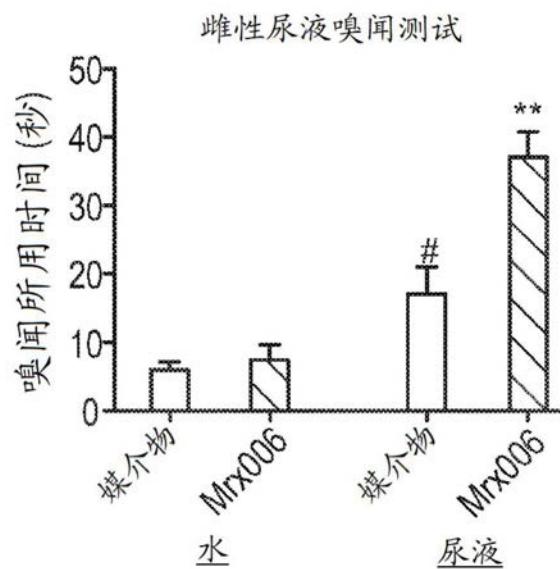


图20A

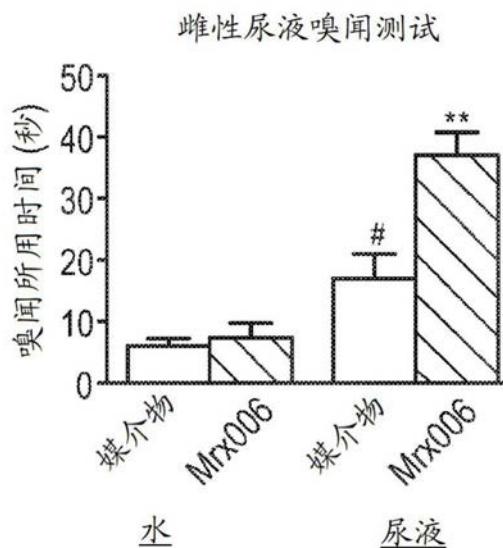


图20B

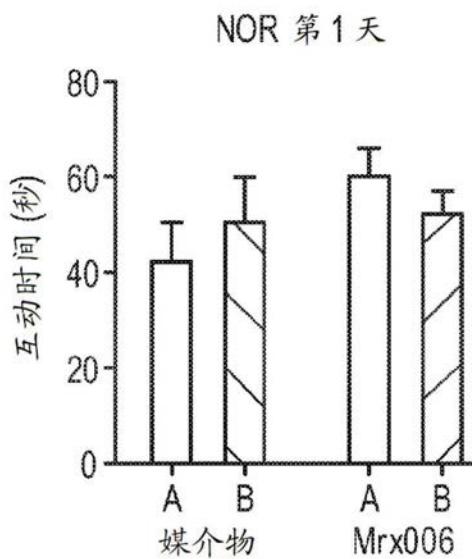


图21A

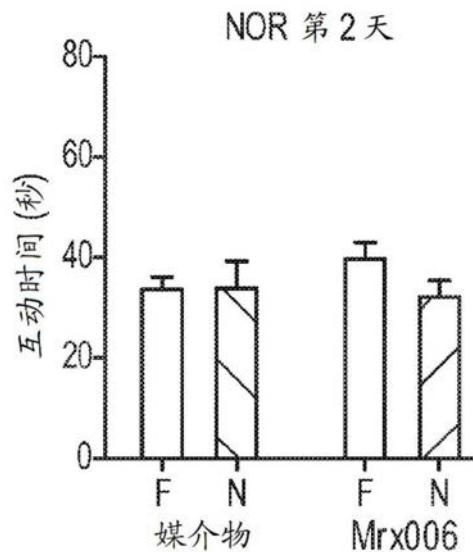


图21B

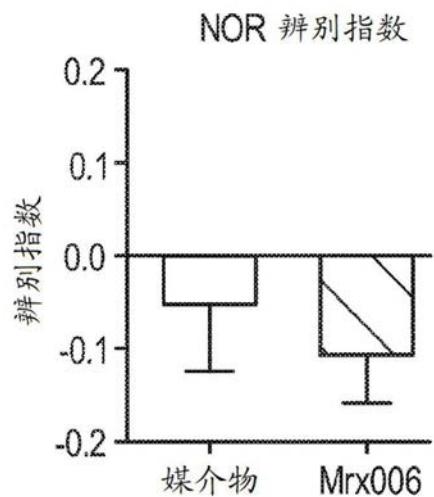


图21C

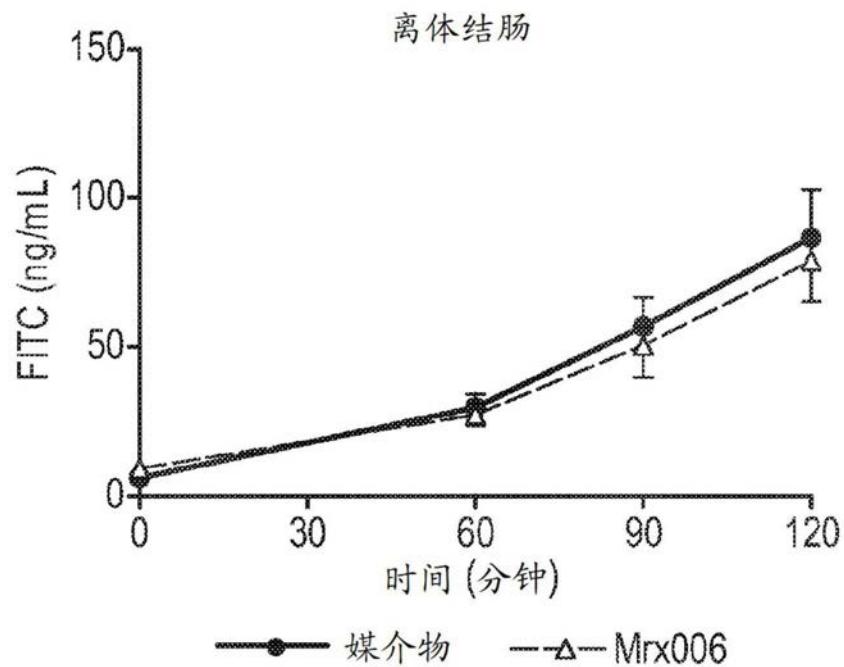


图22A

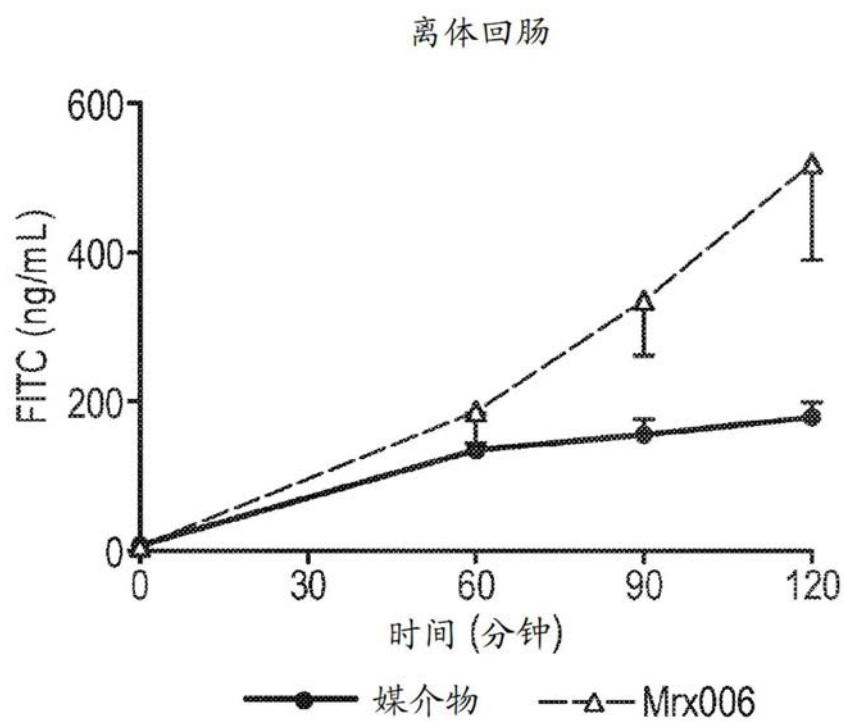


图22B

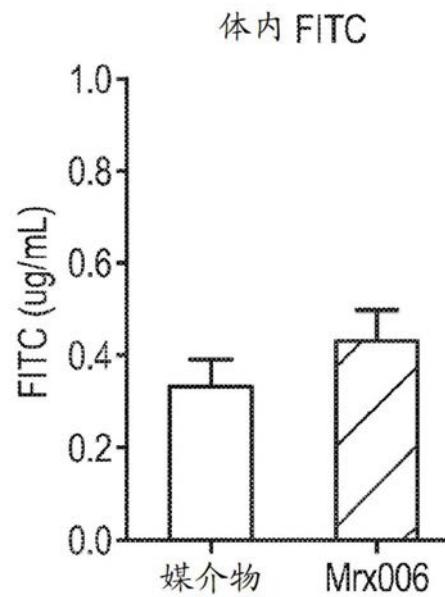


图23

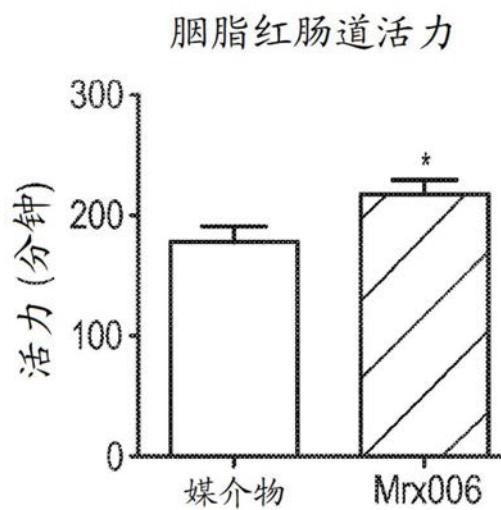


图24

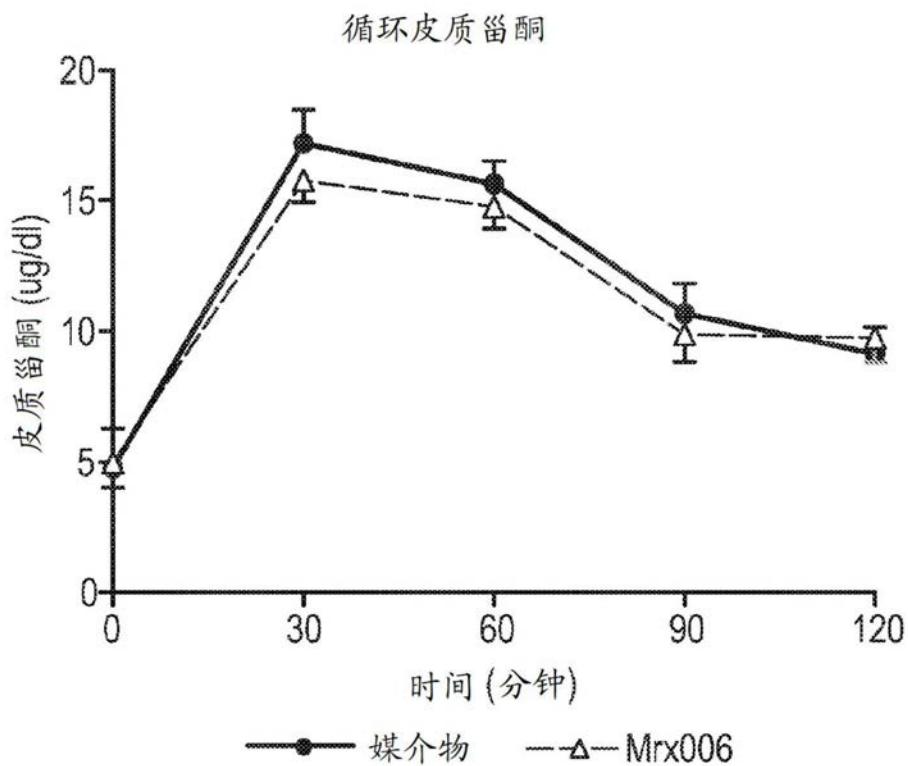


图25

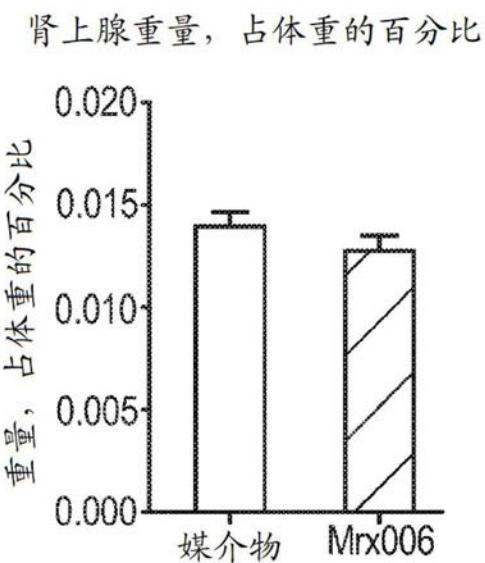


图26A

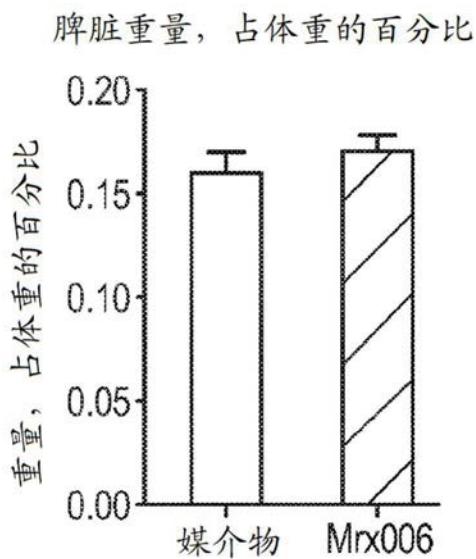


图26B

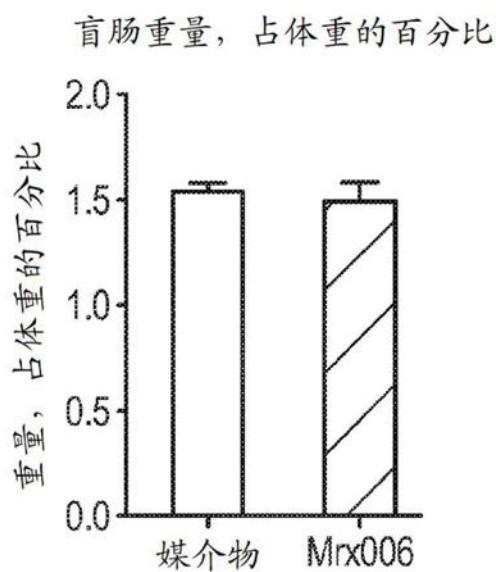


图26C

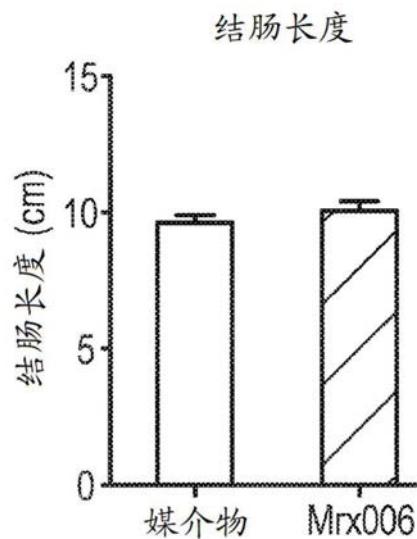


图26D

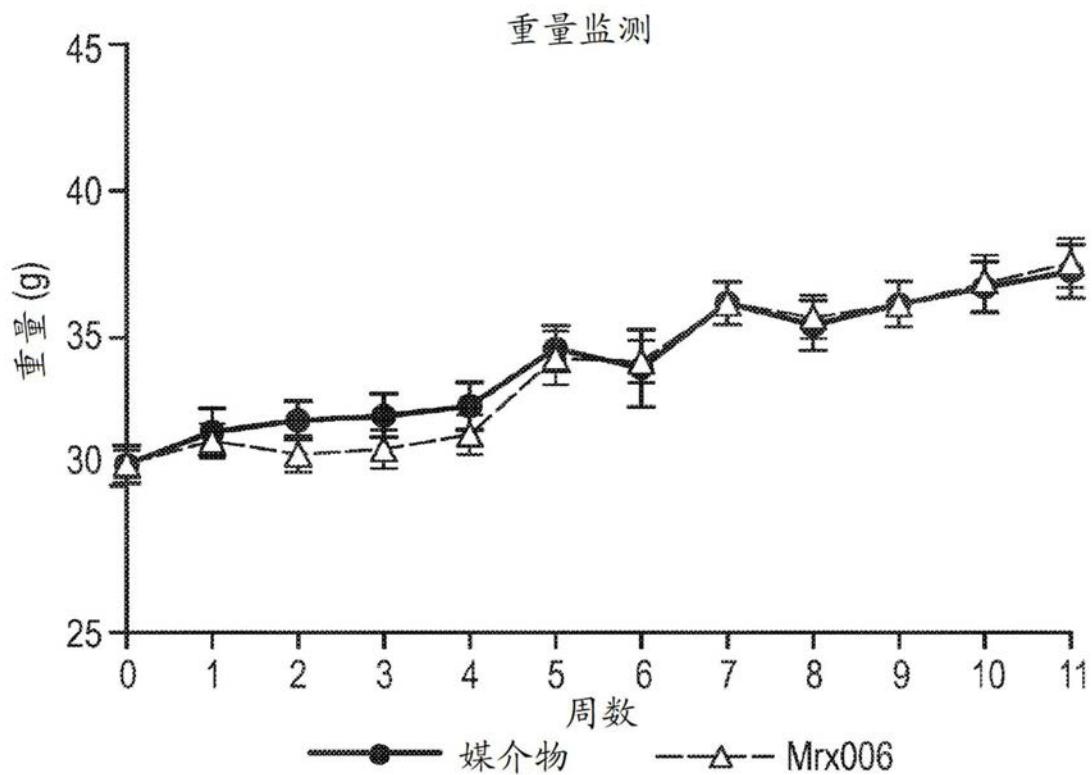


图27

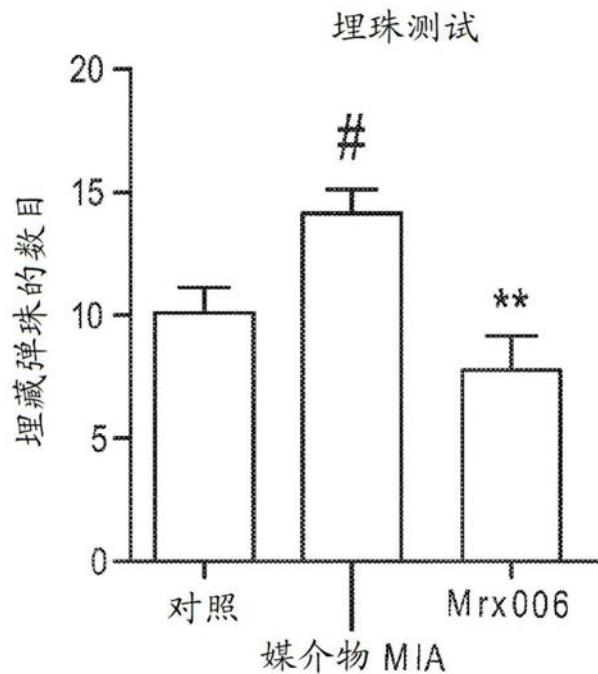


图28

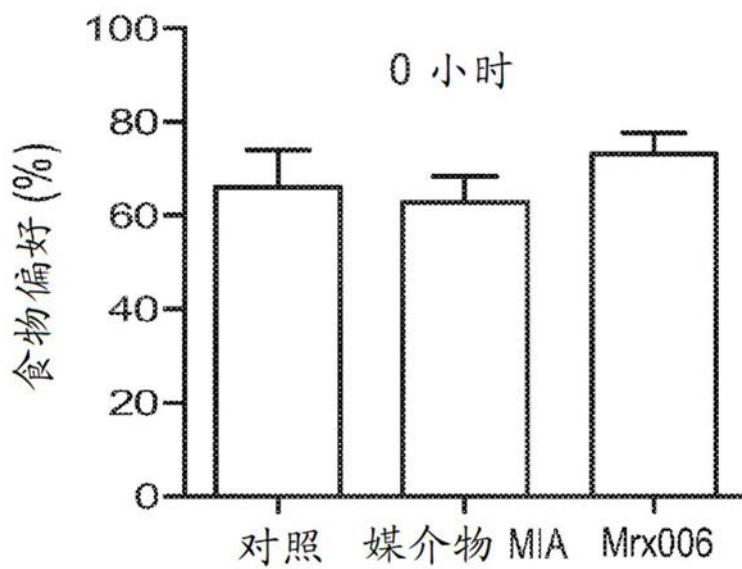


图29A

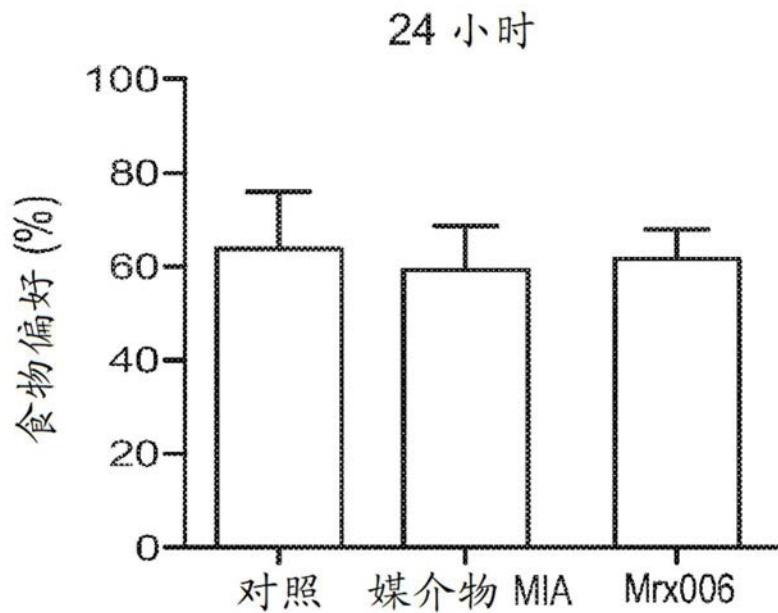


图29B

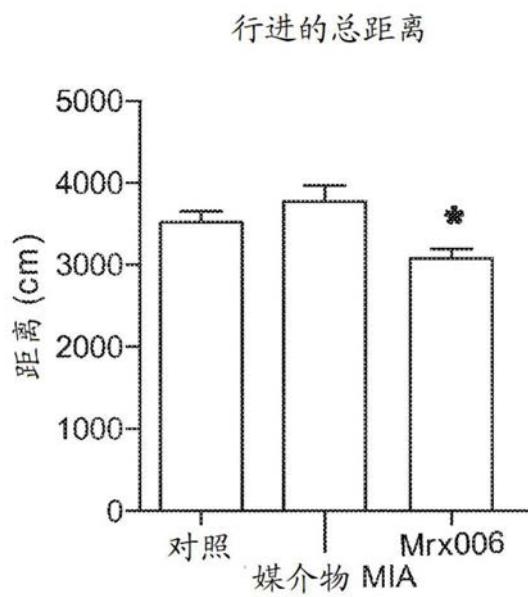


图30A

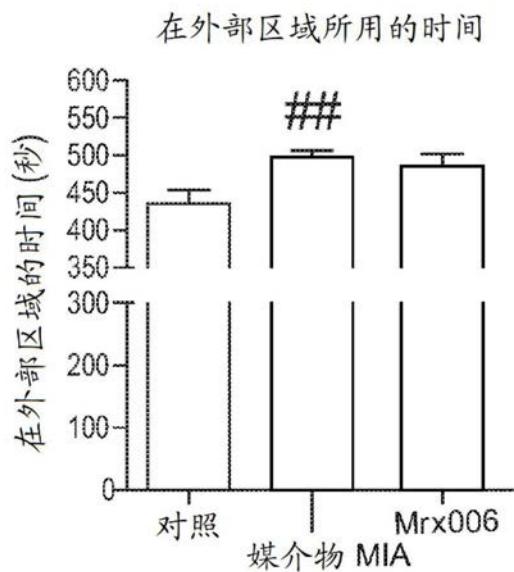


图30B

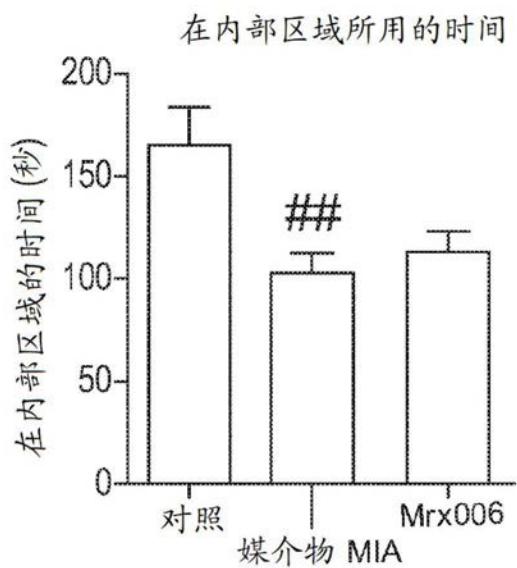


图30C

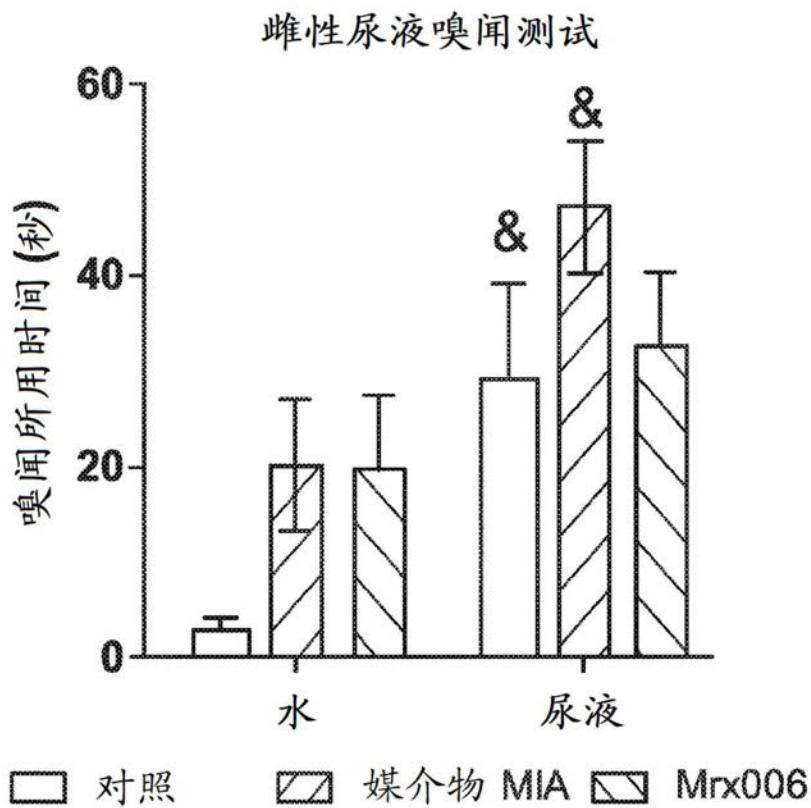


图31

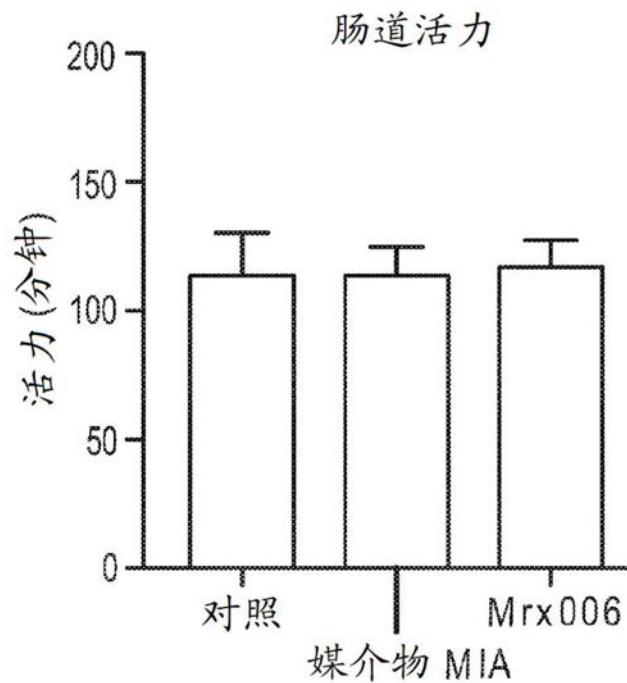


图32

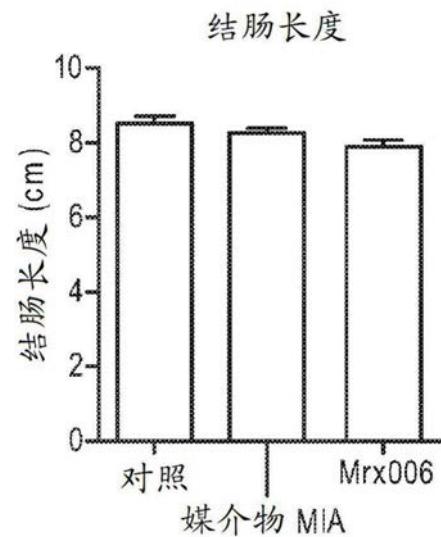


图33A

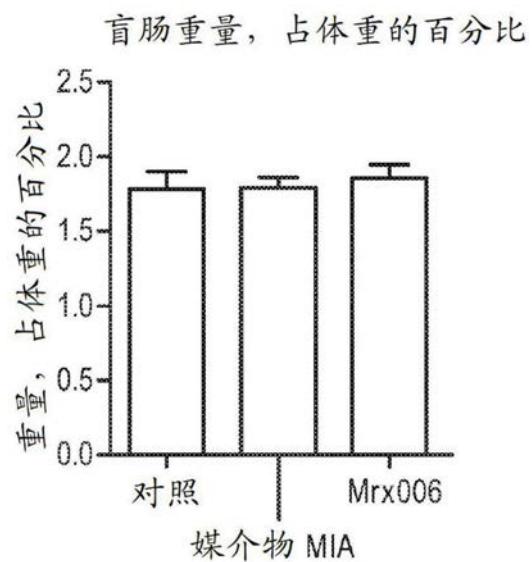


图33B

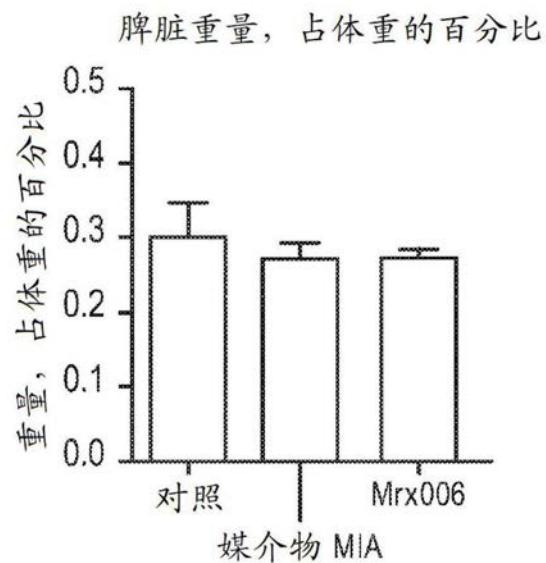


图33C

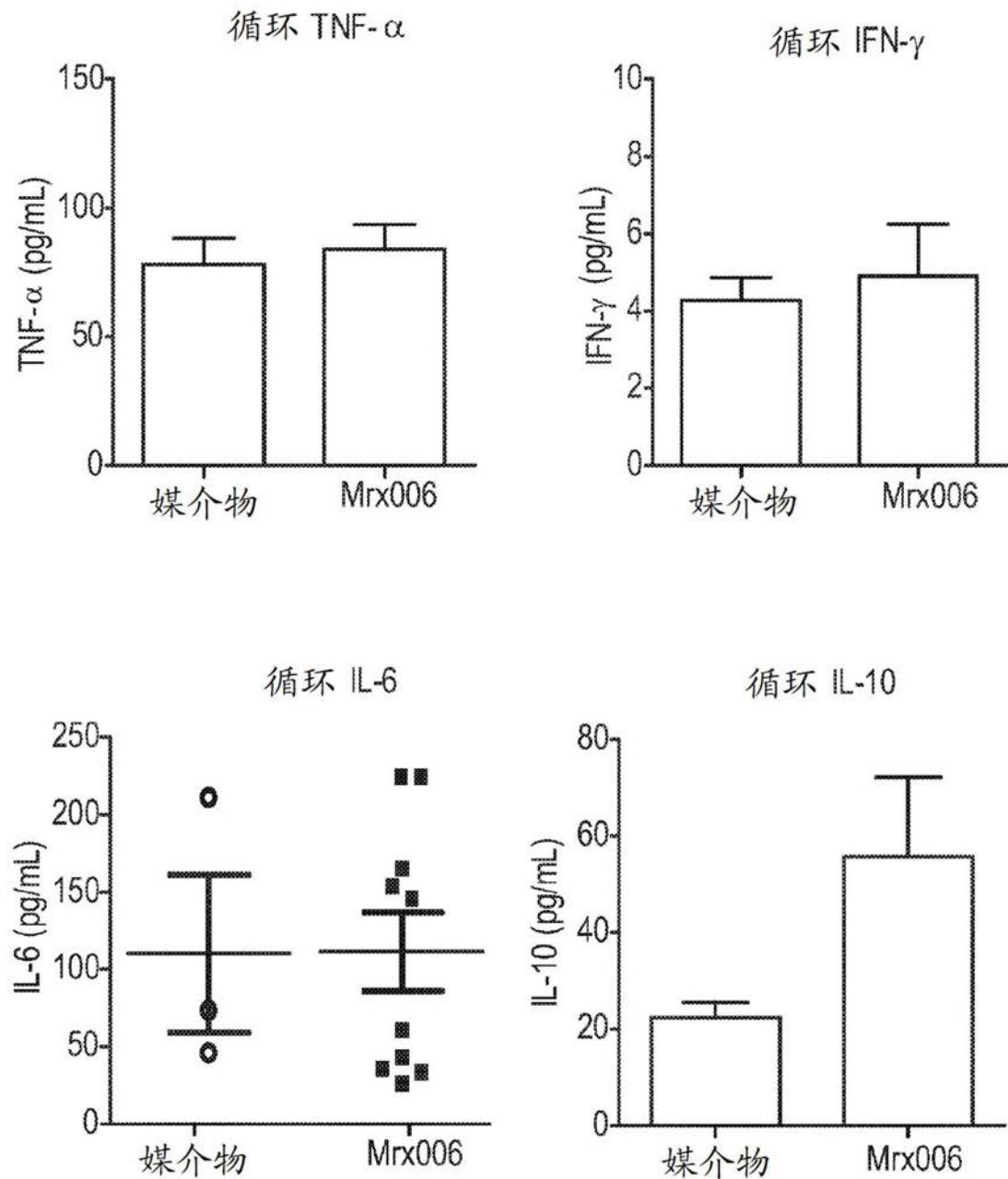
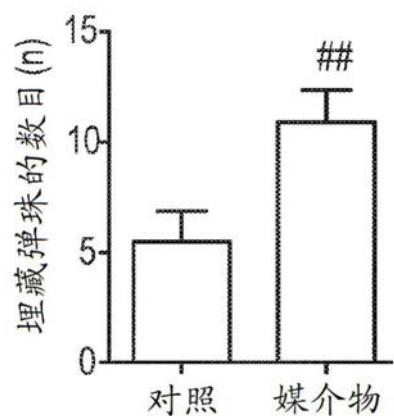
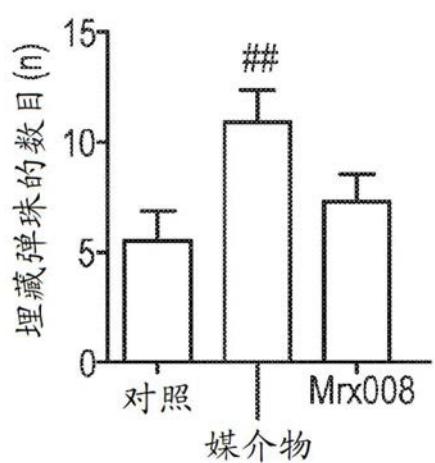


图34



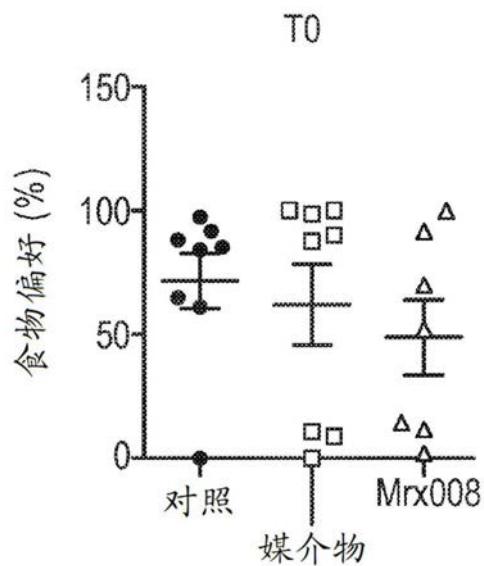


图36A

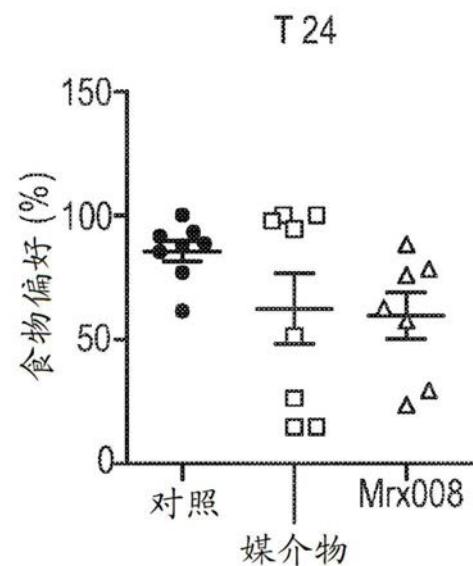


图36b

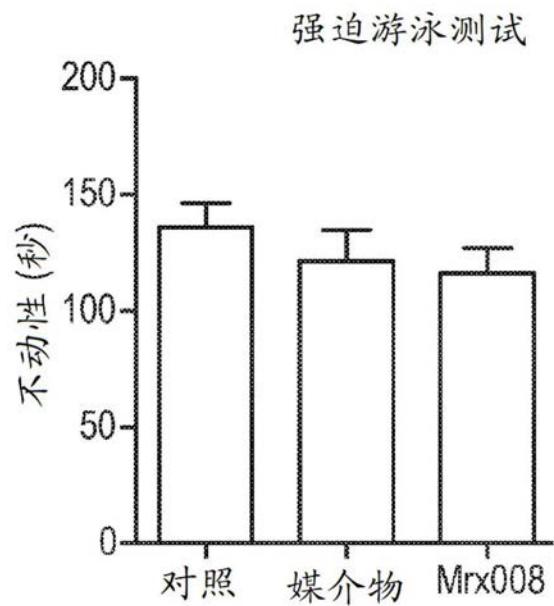


图37

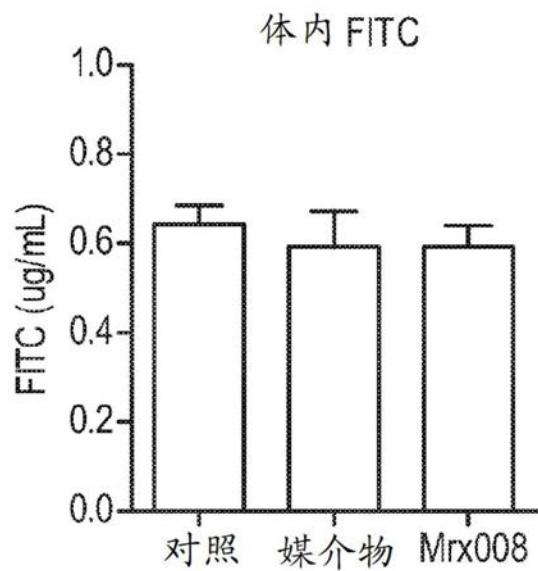


图38

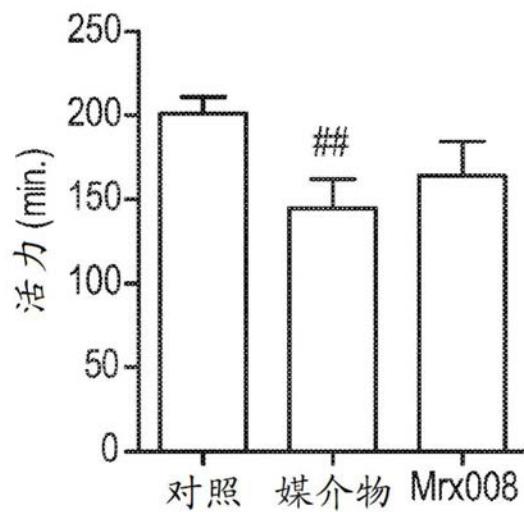


图39

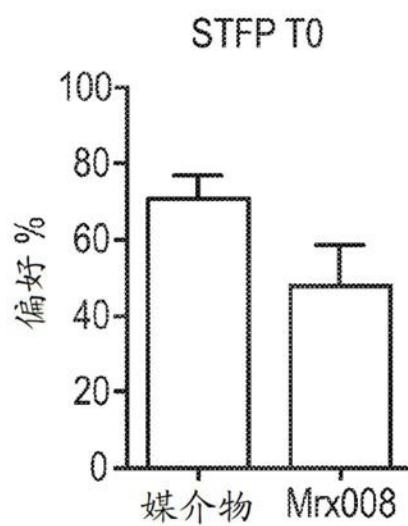


图40A

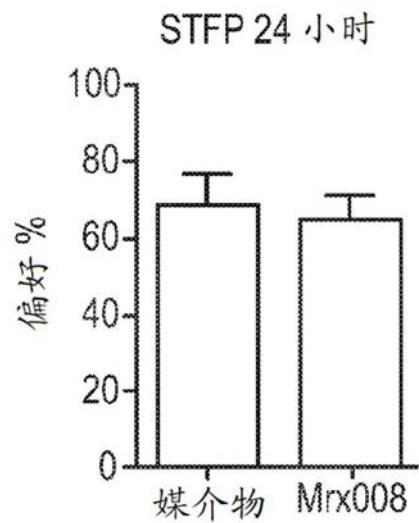


图40B

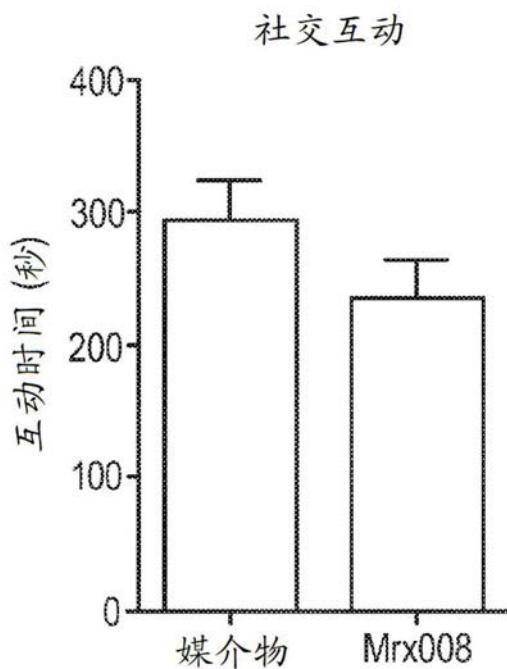


图41

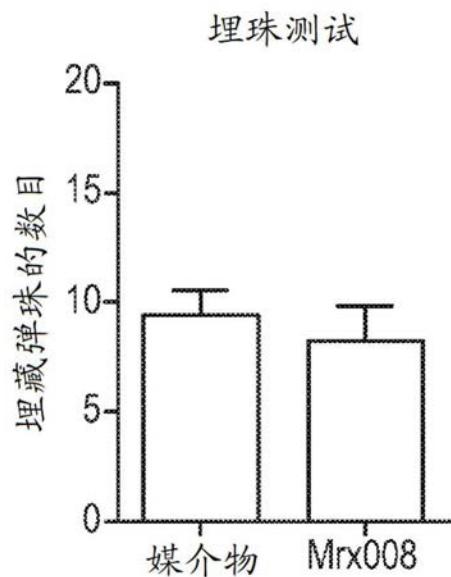


图42

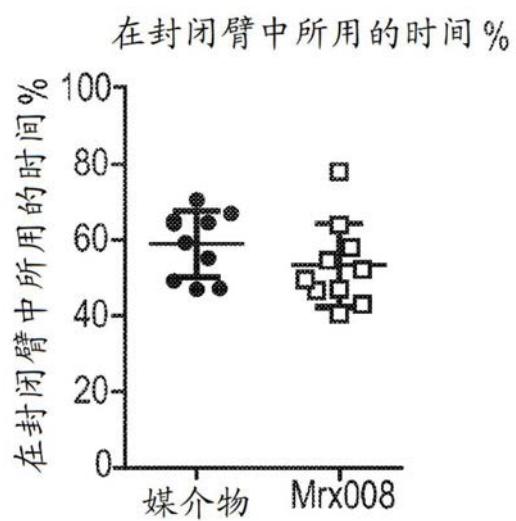


图43A

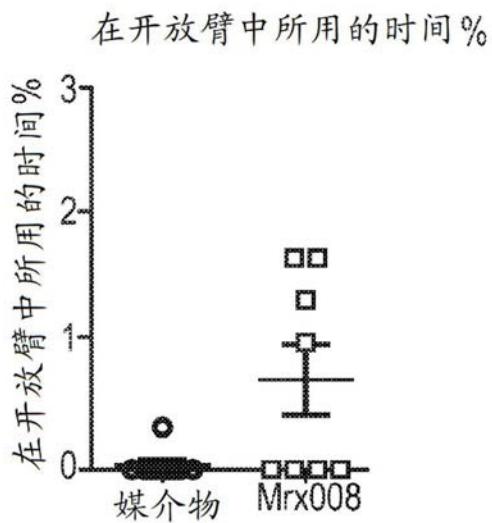


图43B

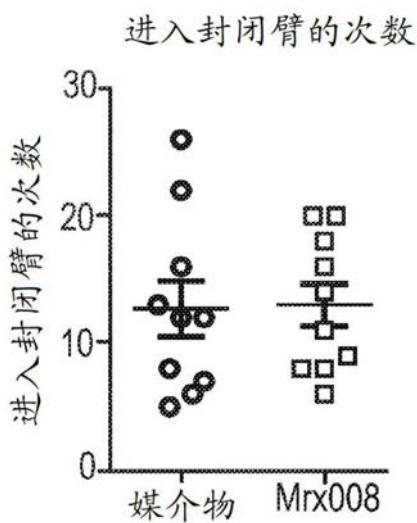


图43C

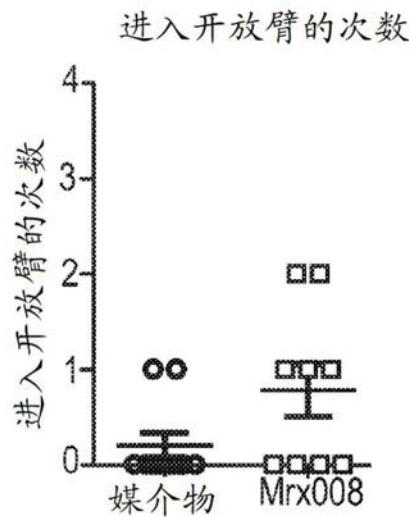


图43D

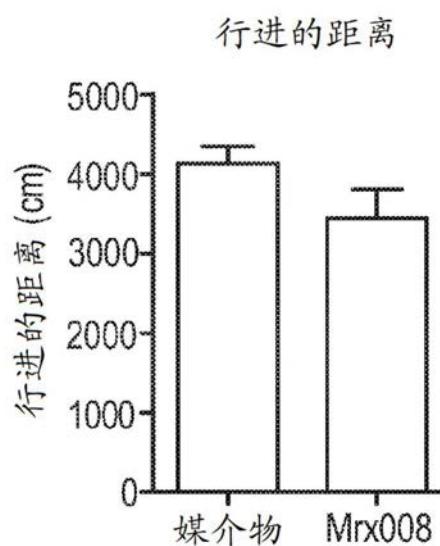


图44A

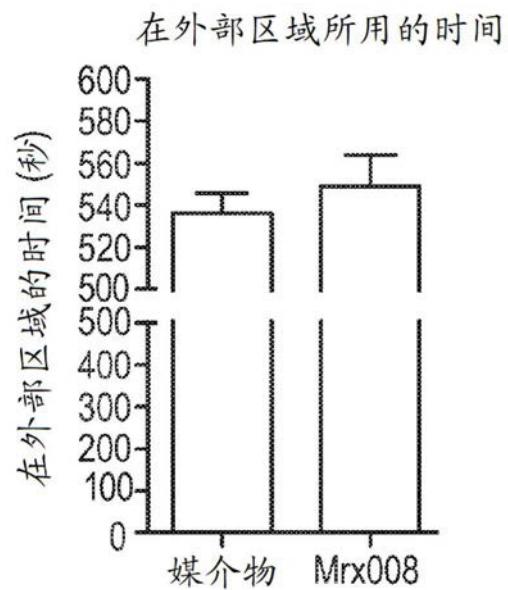


图44B

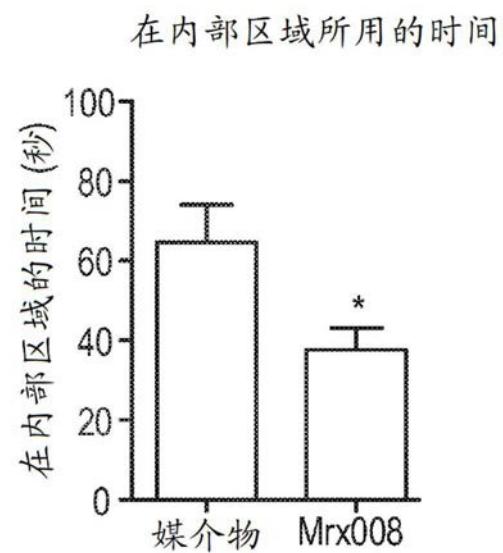


图44C

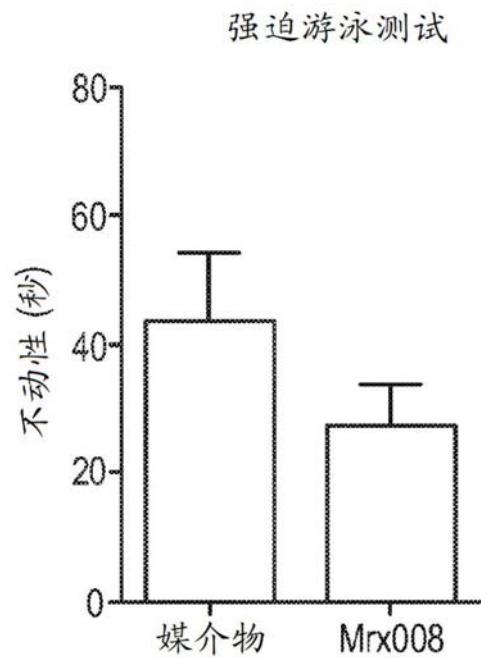


图45

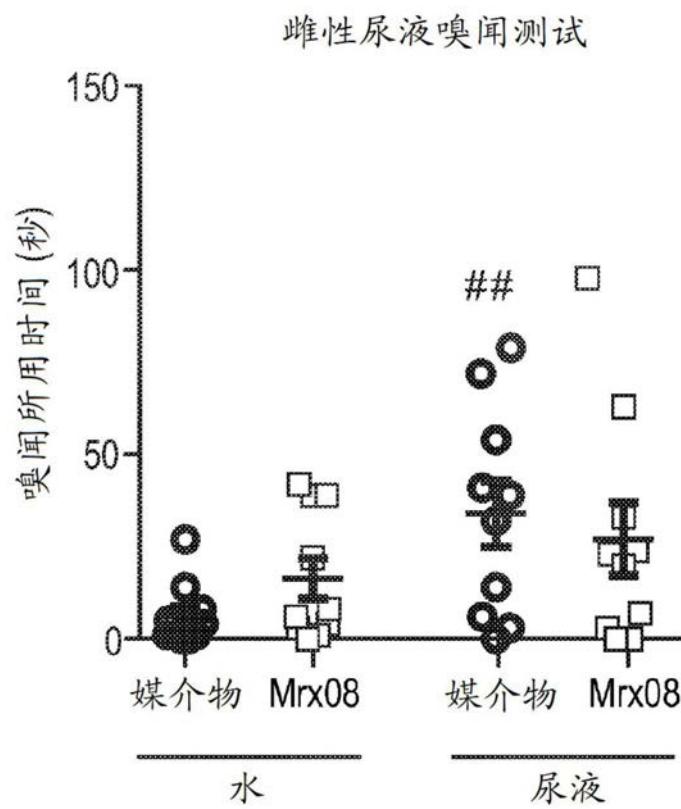


图46

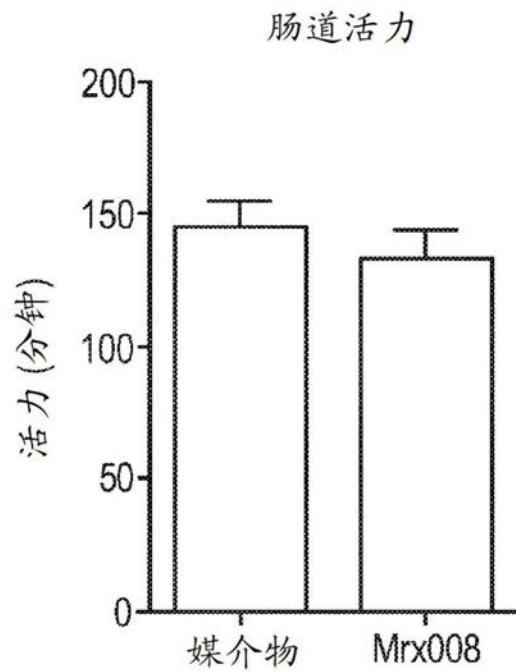


图47

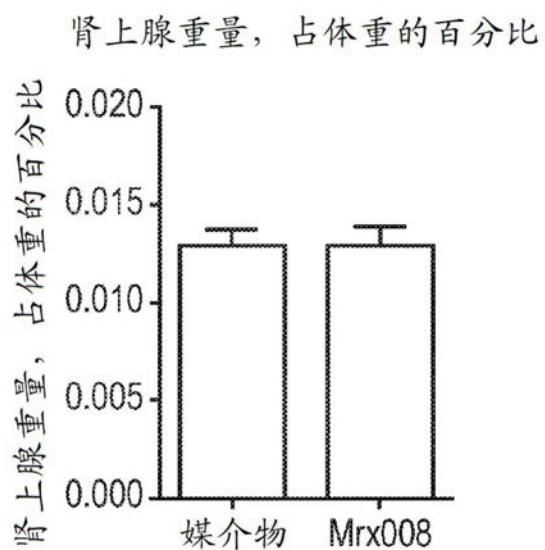


图48A

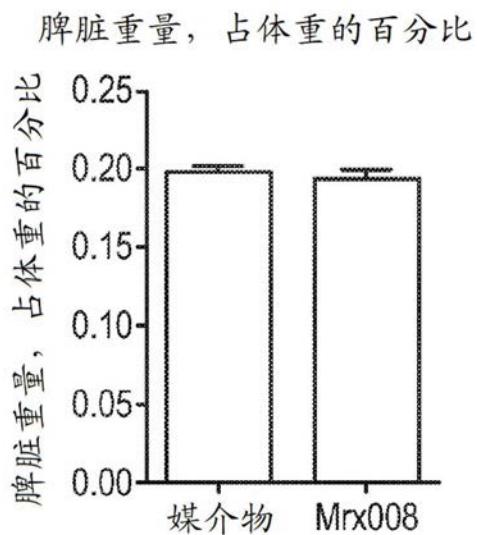


图48B

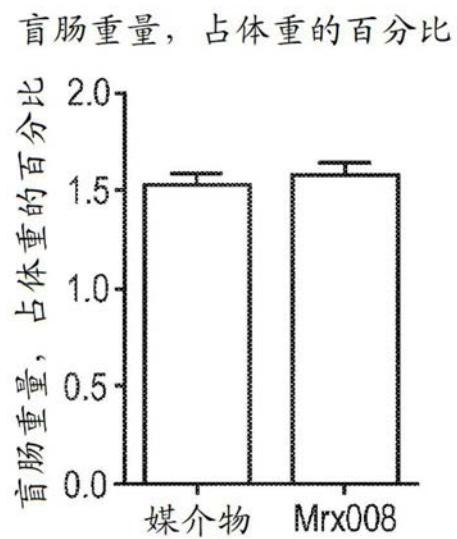


图48C

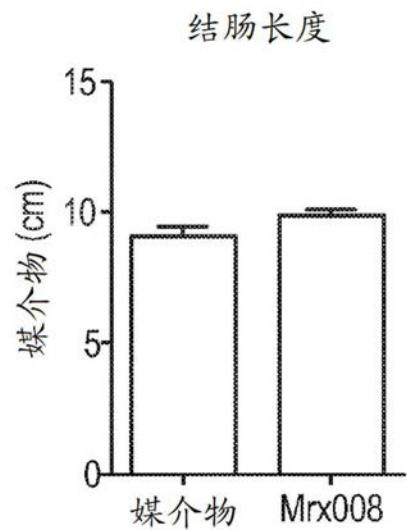


图48D

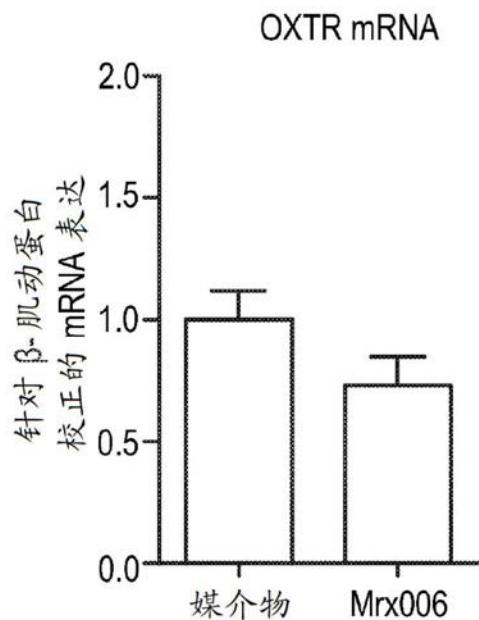


图49A

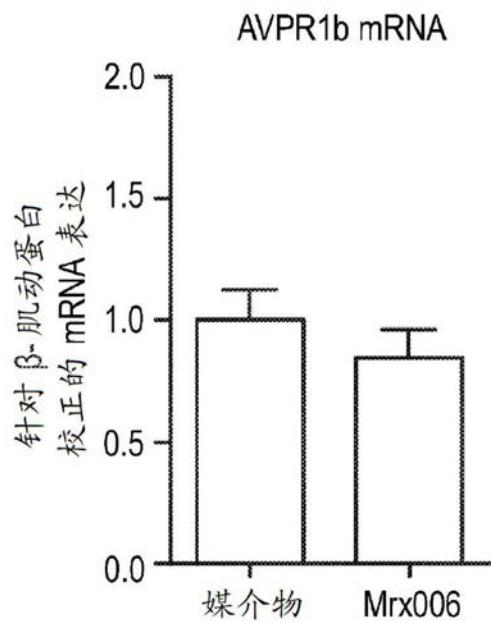


图49B

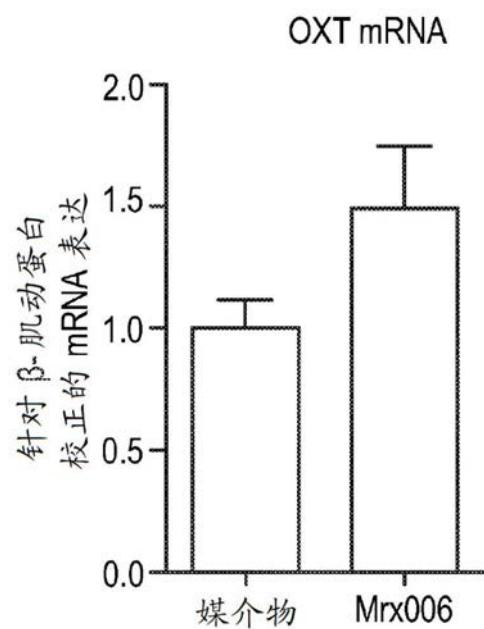


图49C

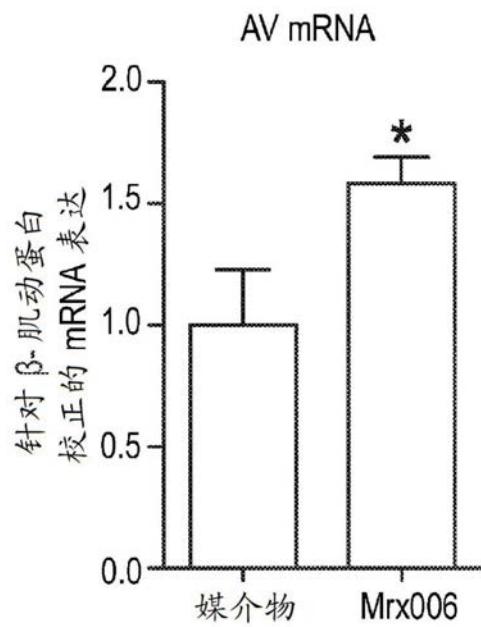


图49D

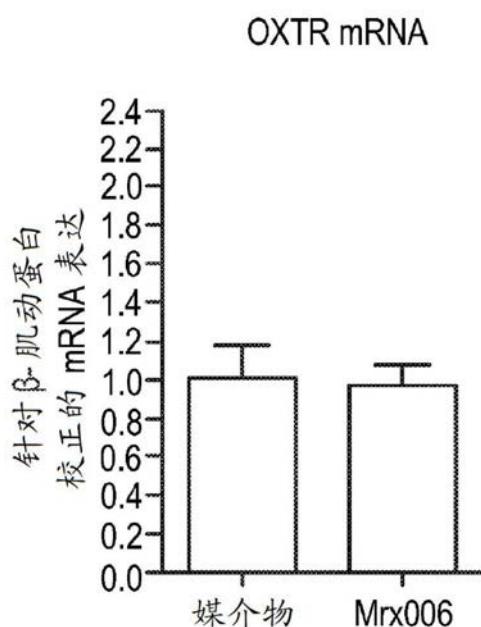


图50A

AVPR1b mRNA

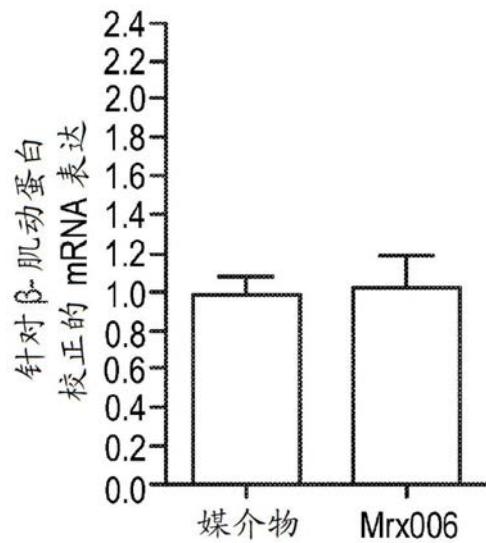


图50B

OXT mRNA

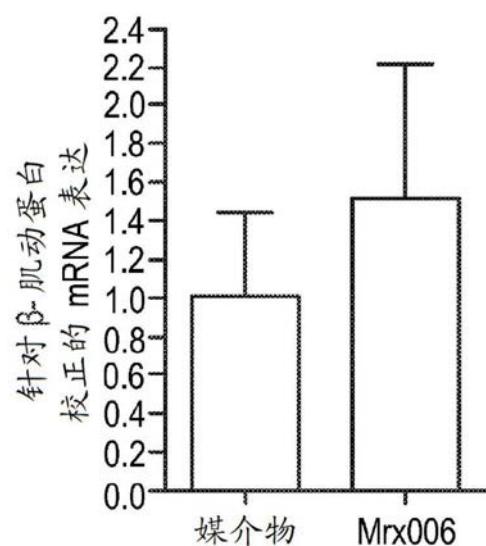


图50C

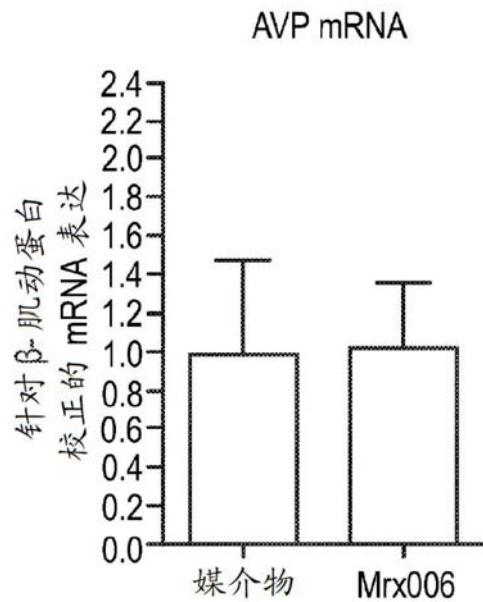


图50D

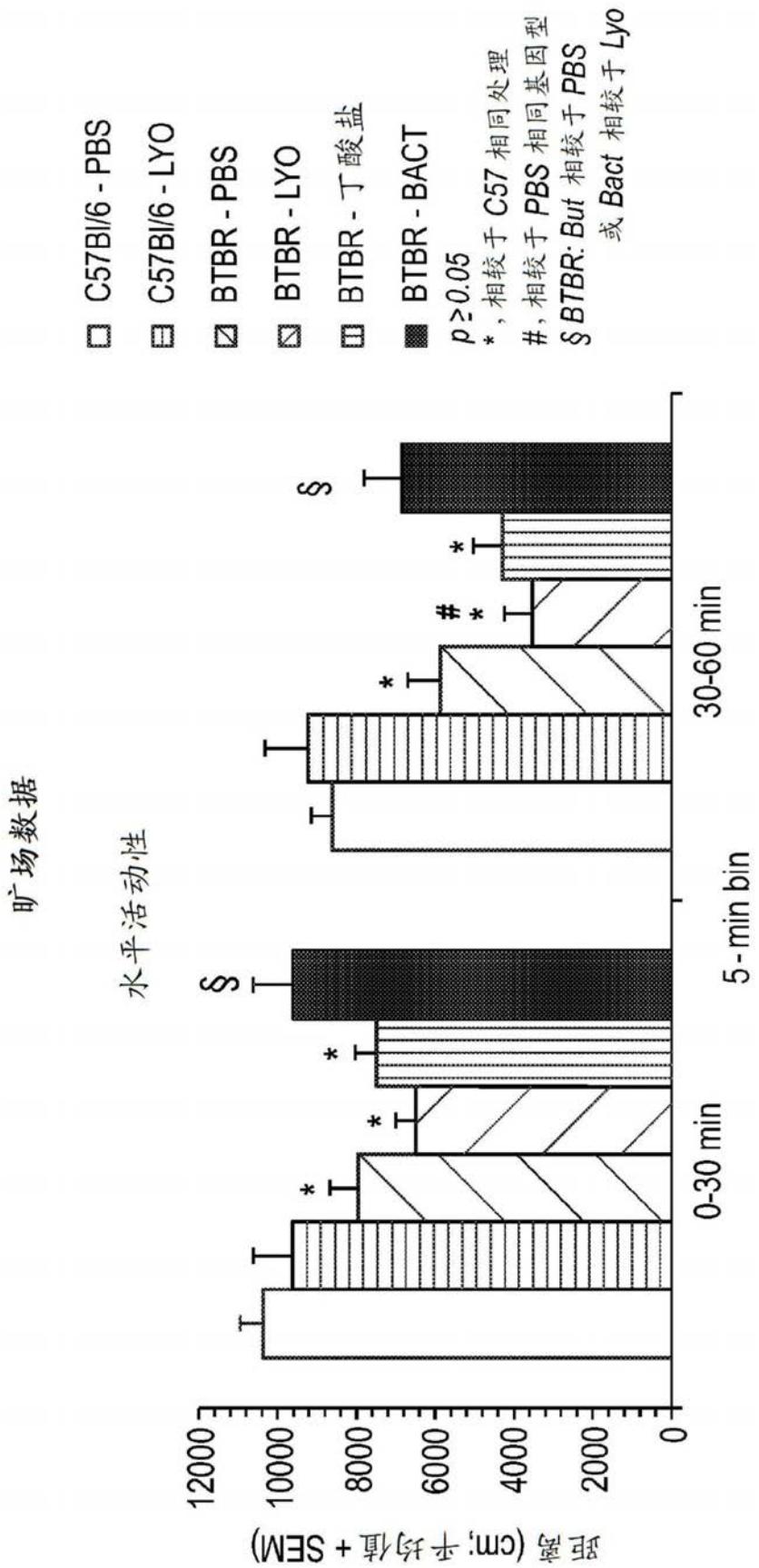


图51A

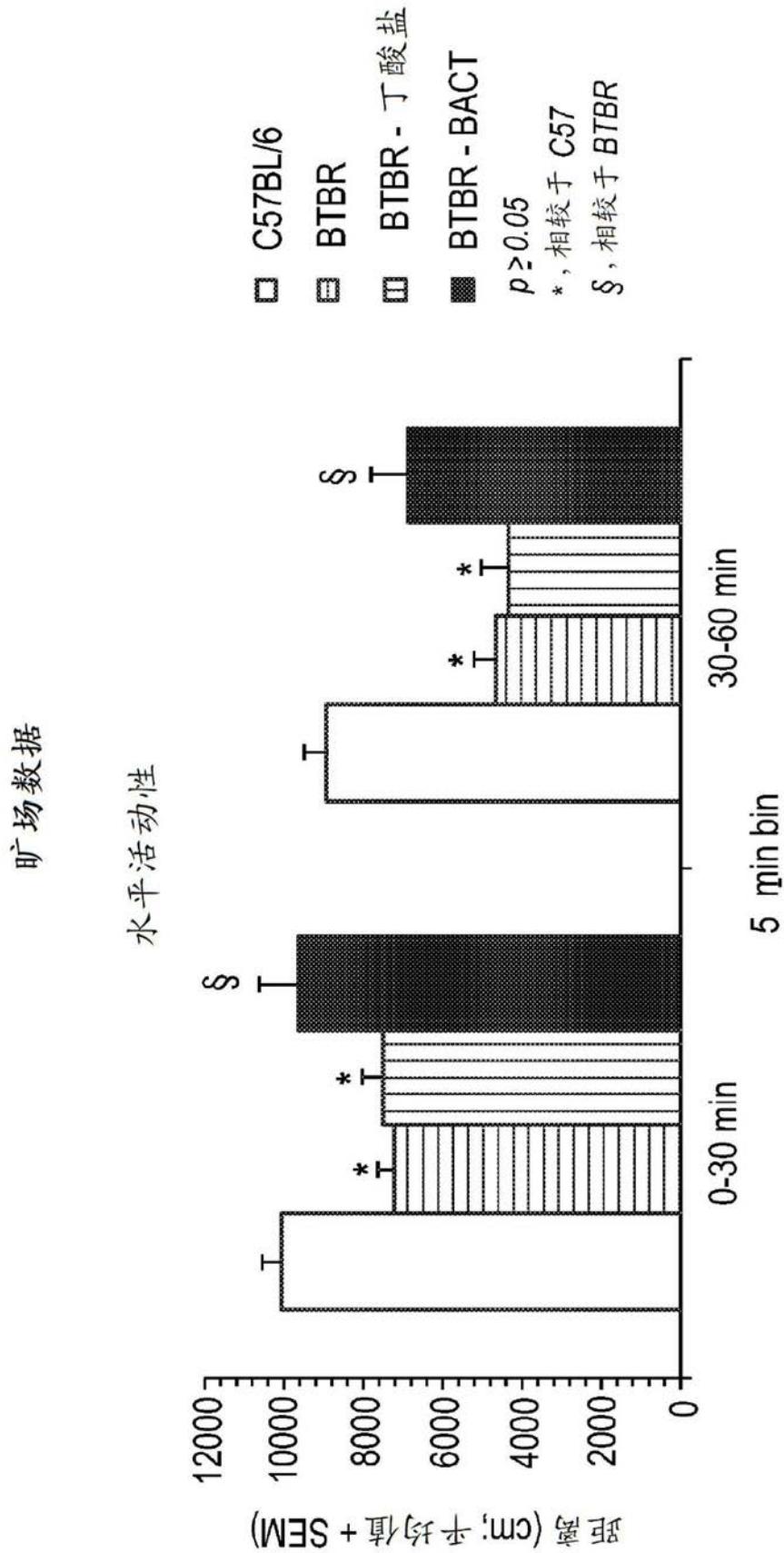


图51B

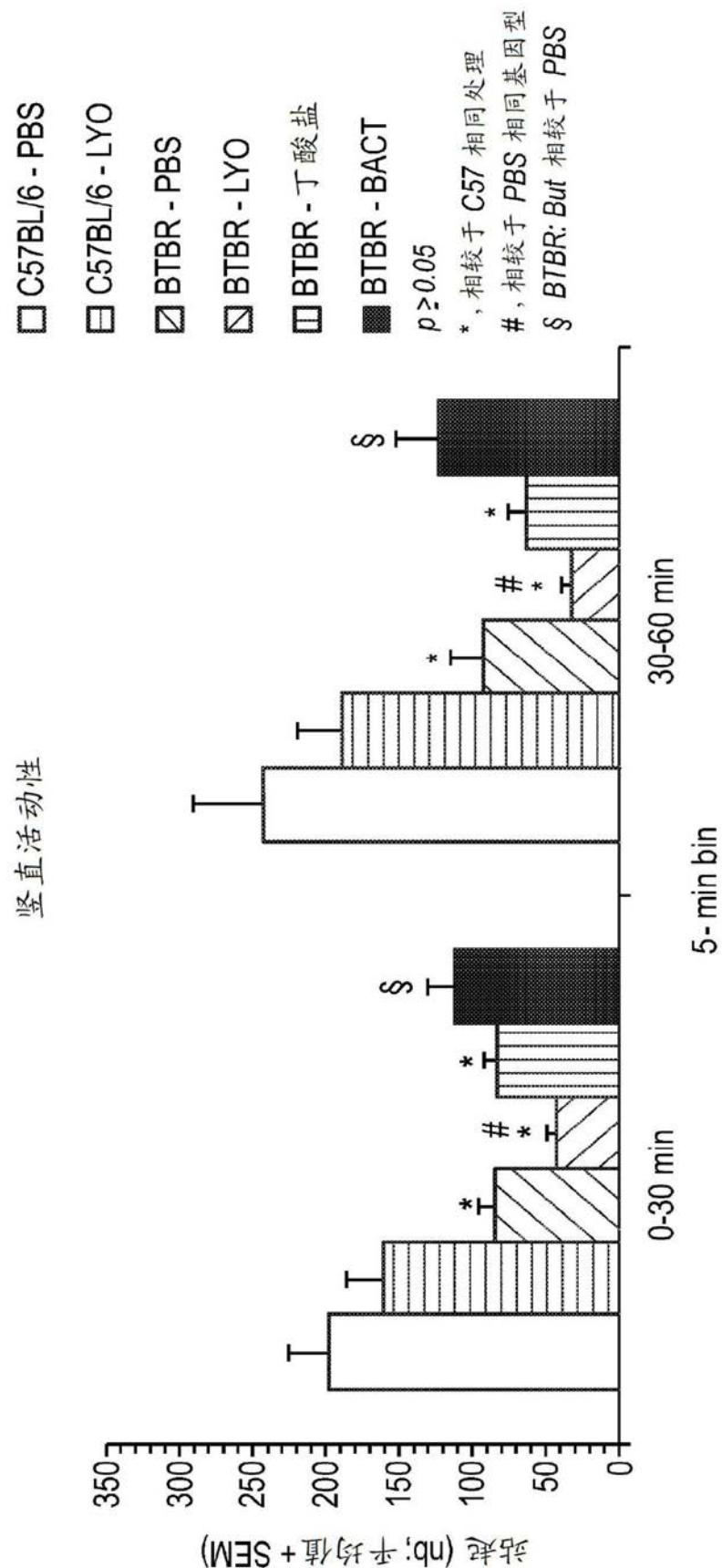


图 51C

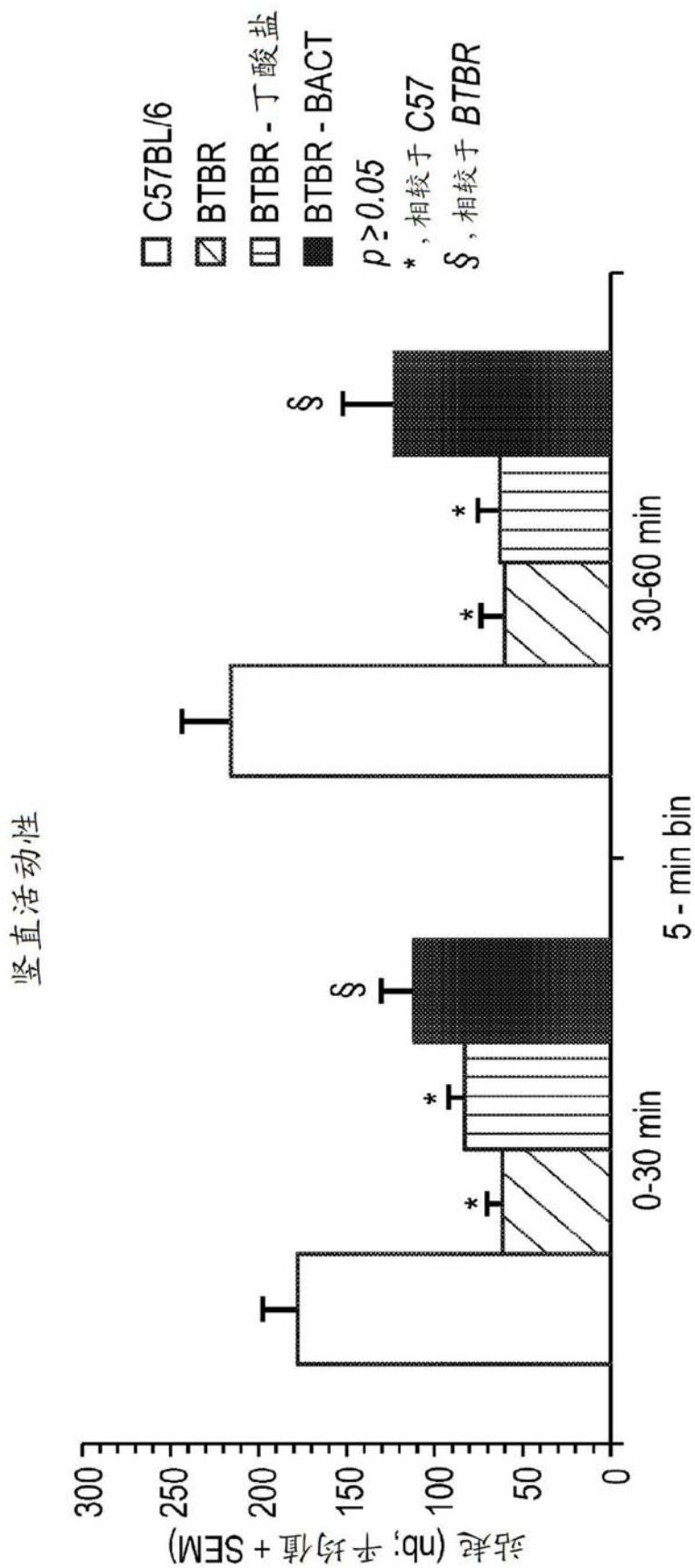


图51D

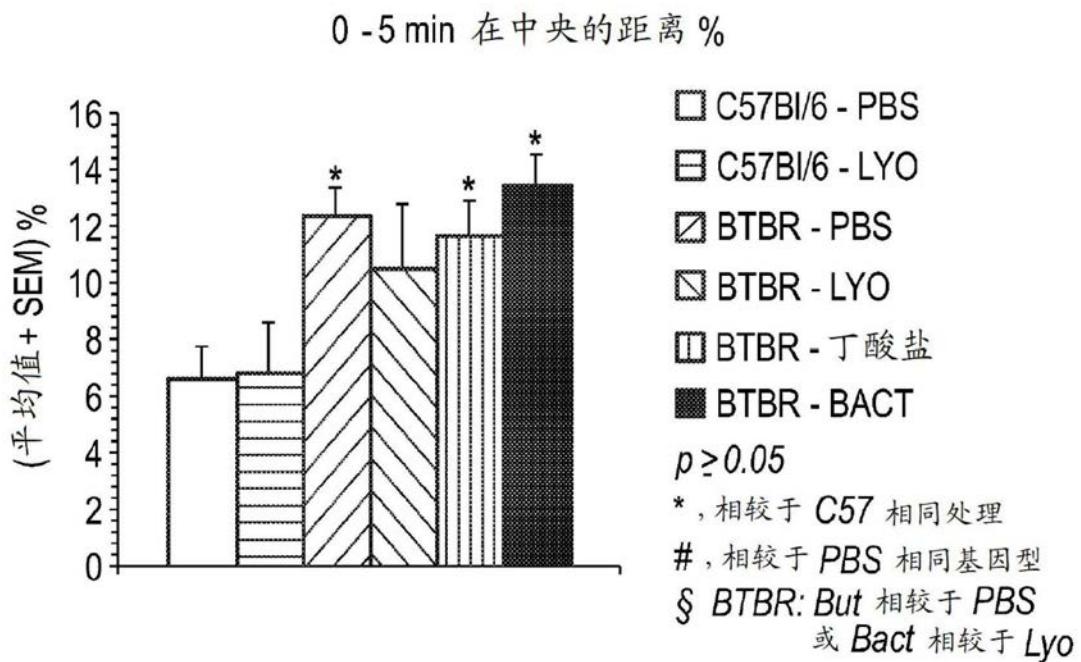


图51E

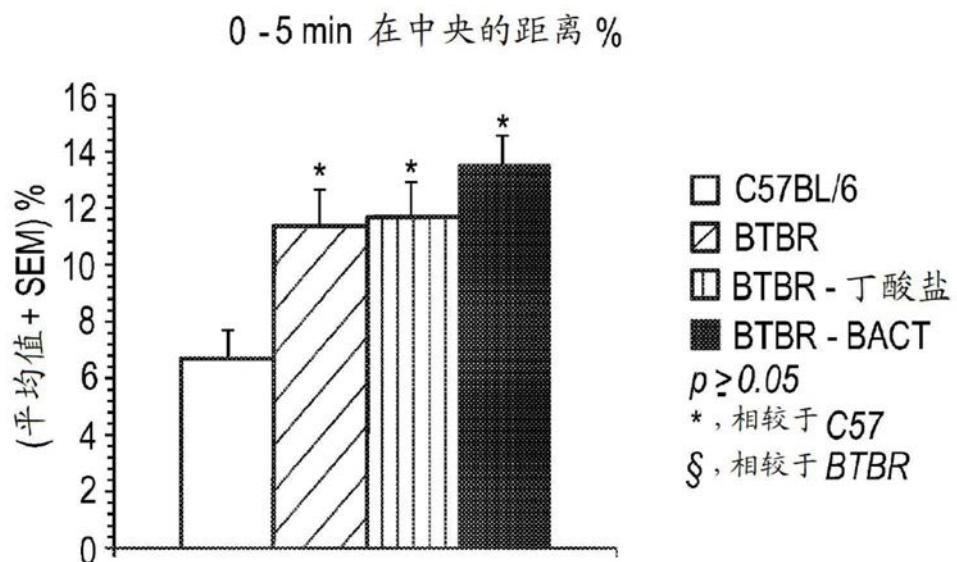


图51F

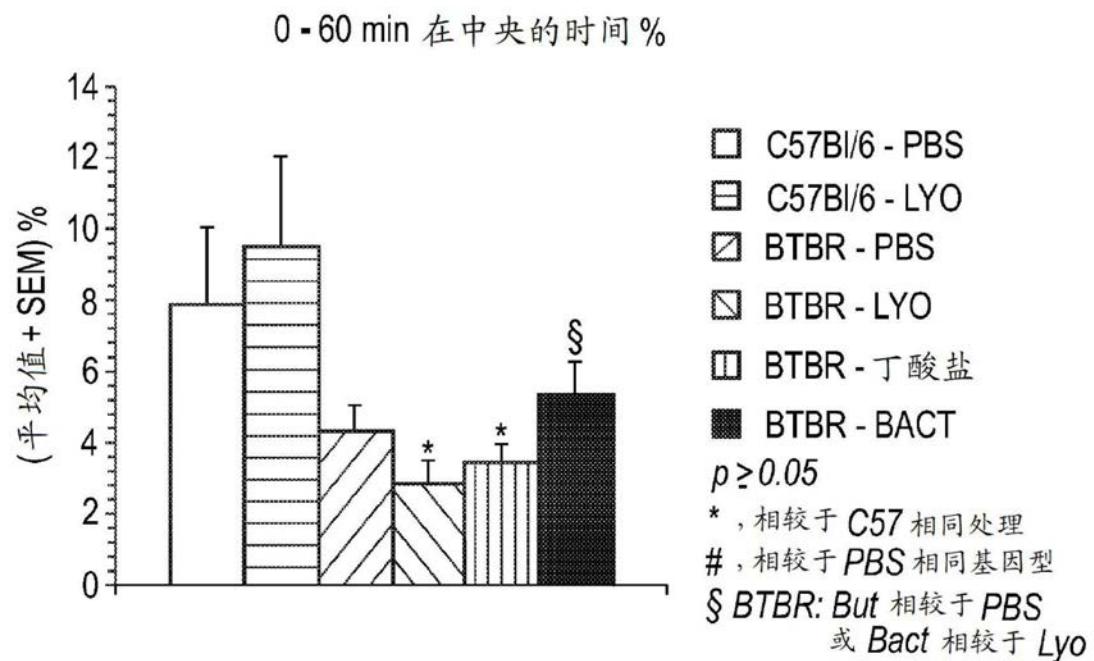


图51G

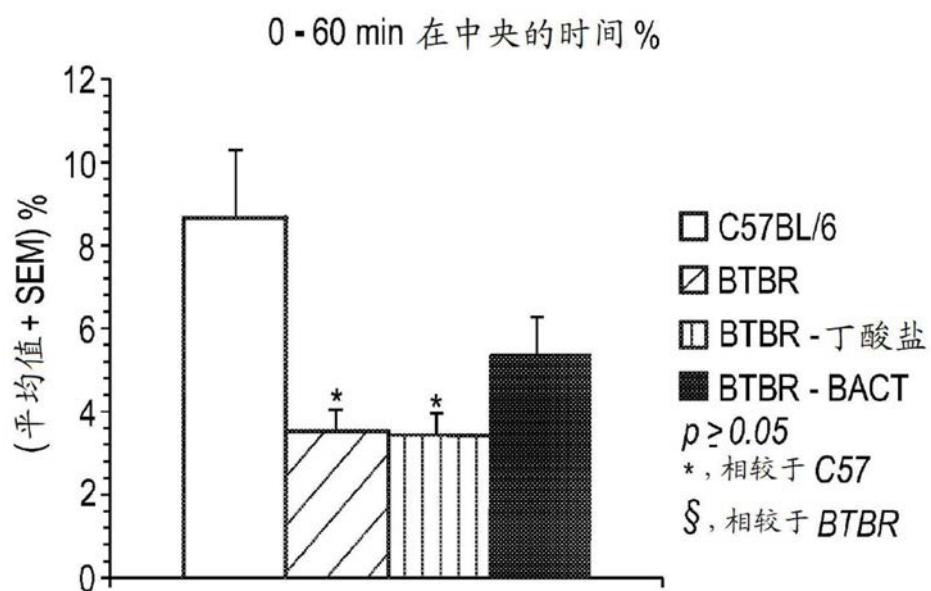


图51H

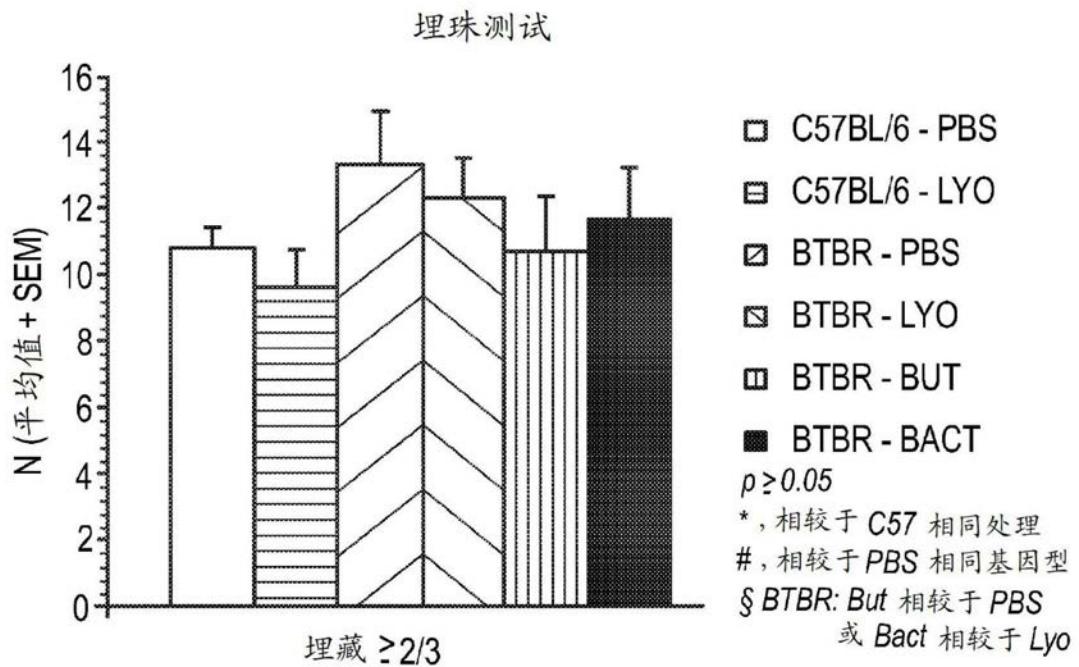


图52A

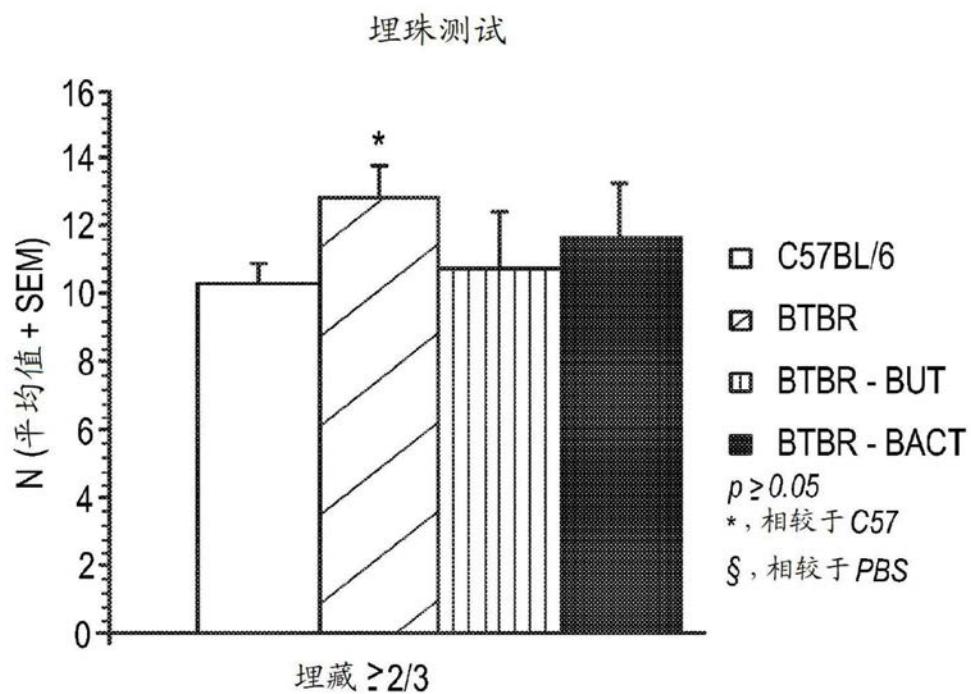


图52B

挖掘测试

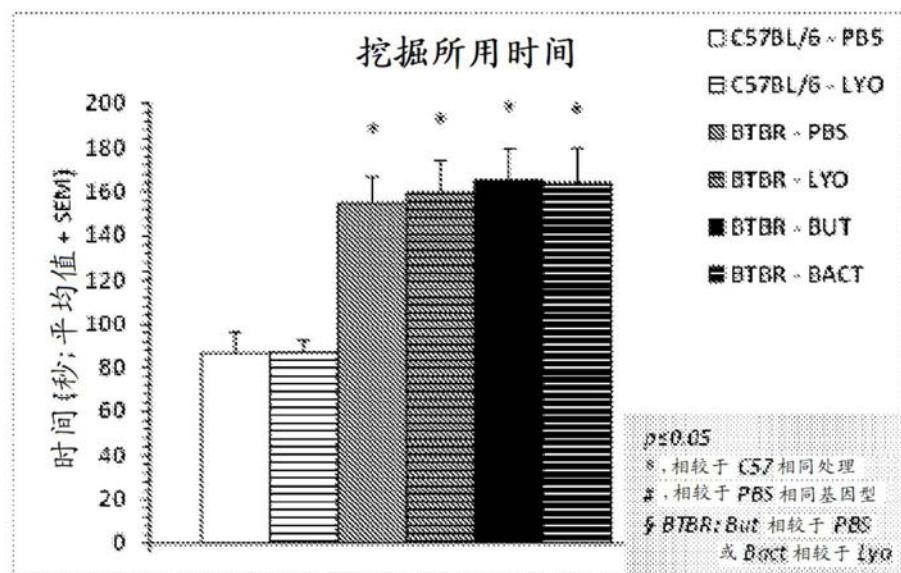


图53A

挖掘测试

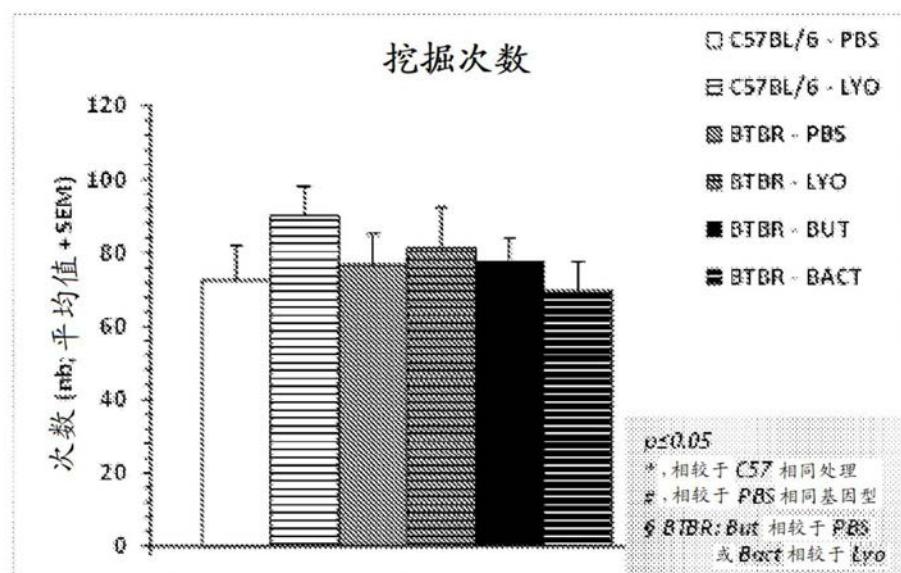


图53B

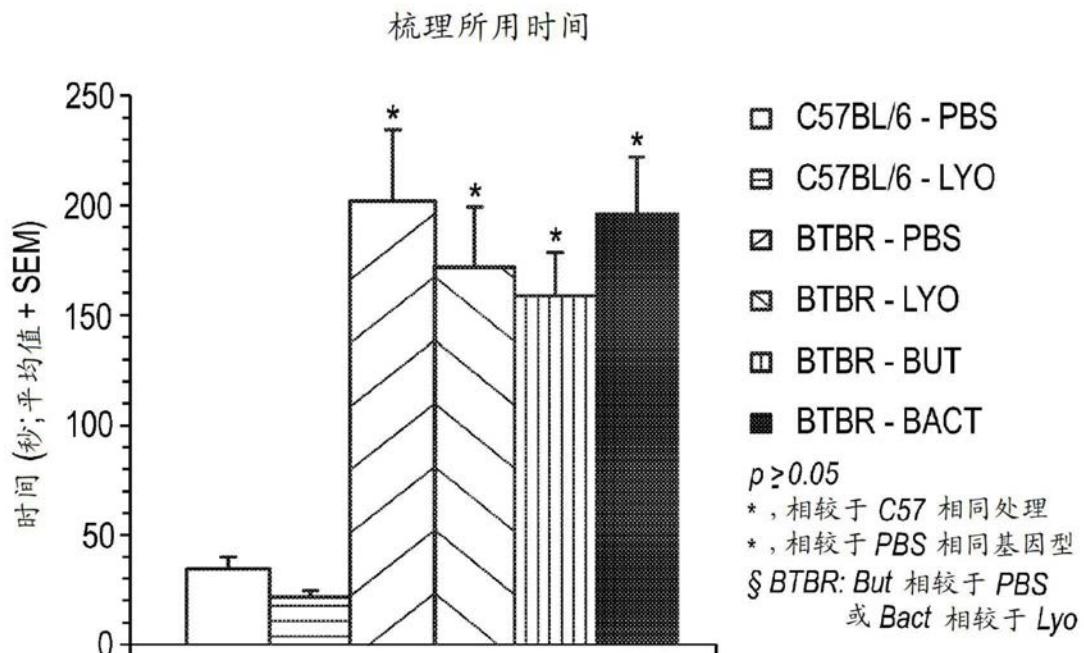


图54A

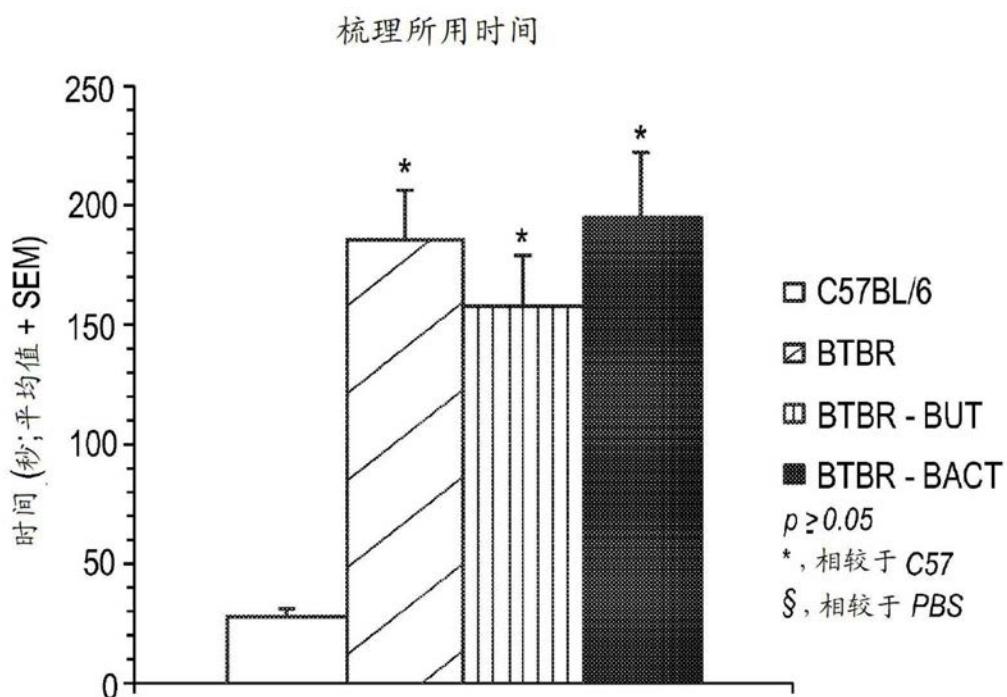


图54B

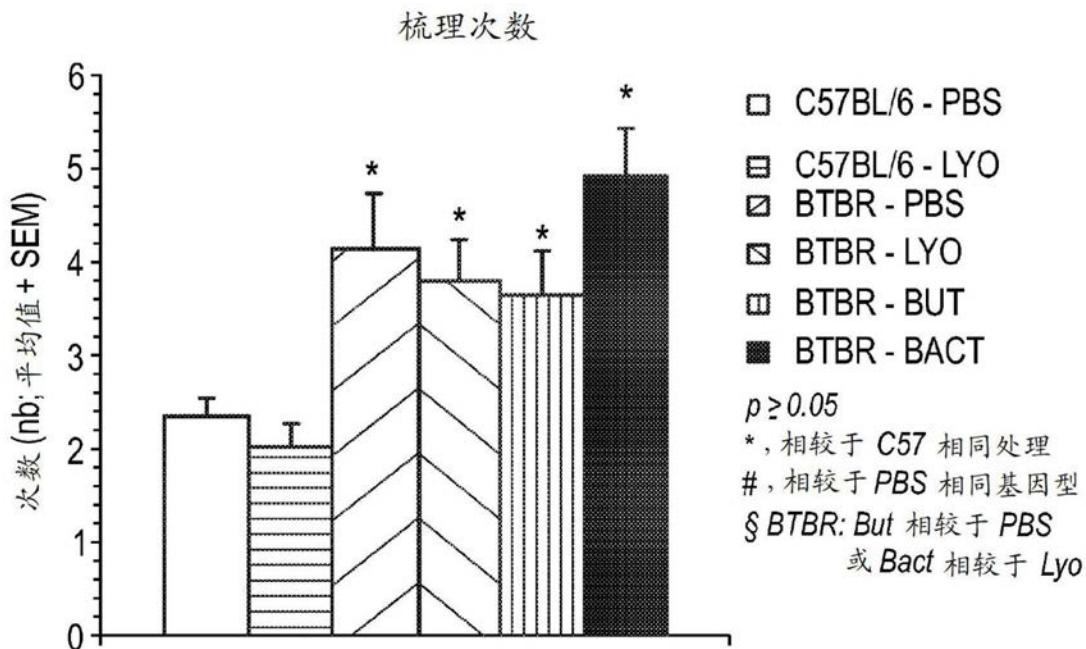


图54C

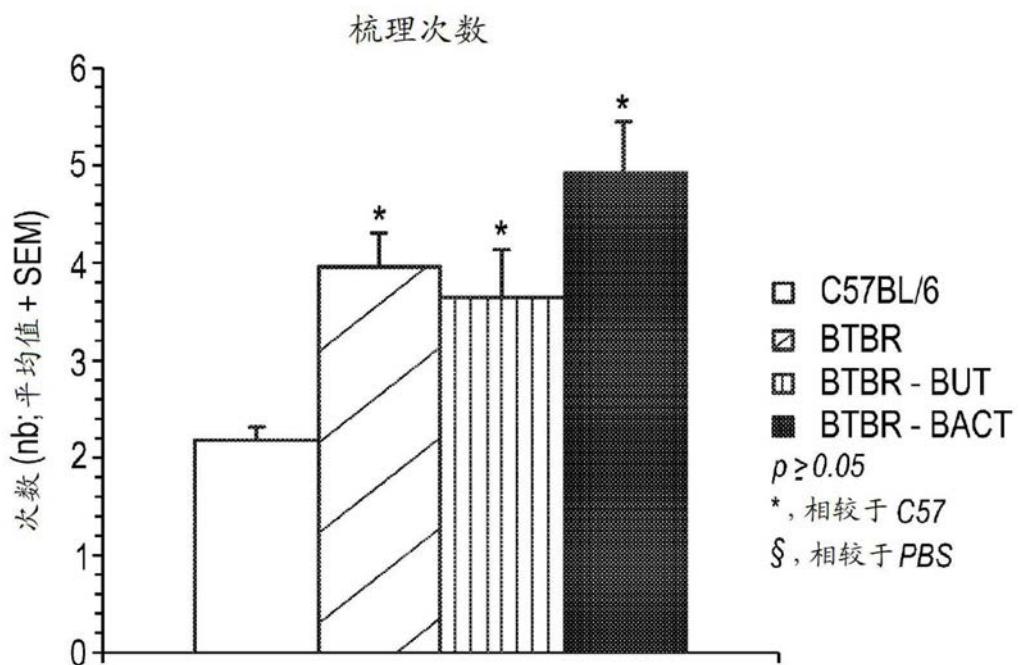


图54D

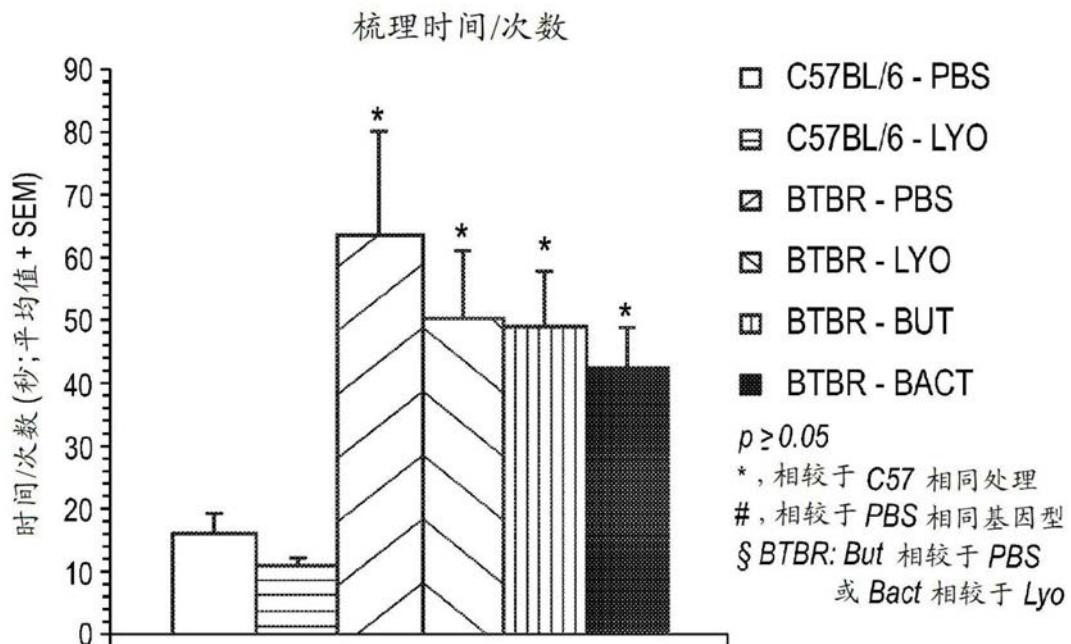


图54E

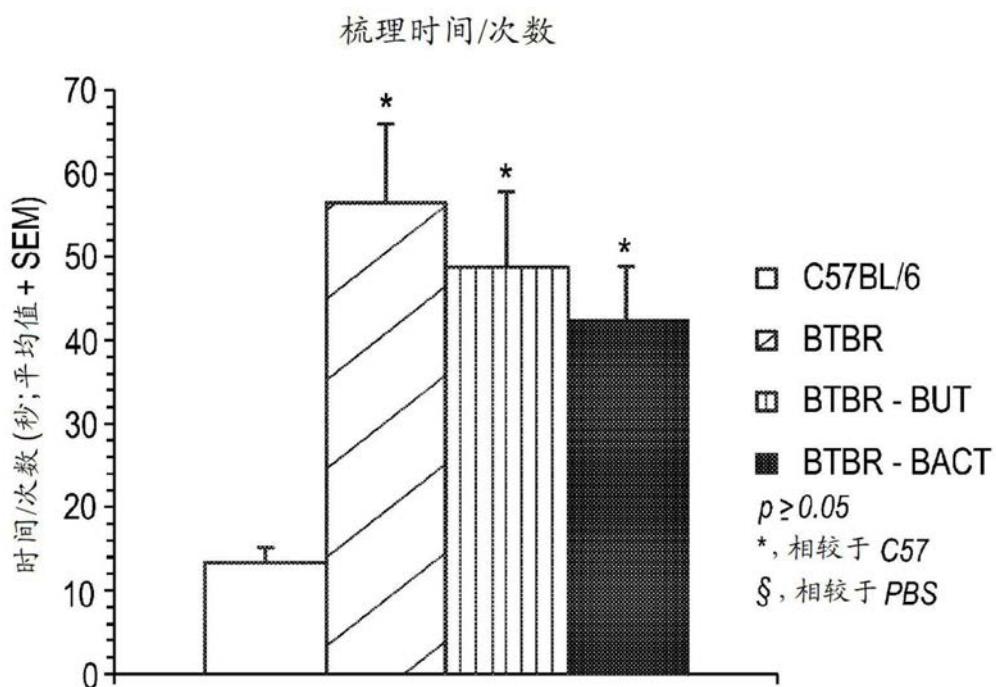
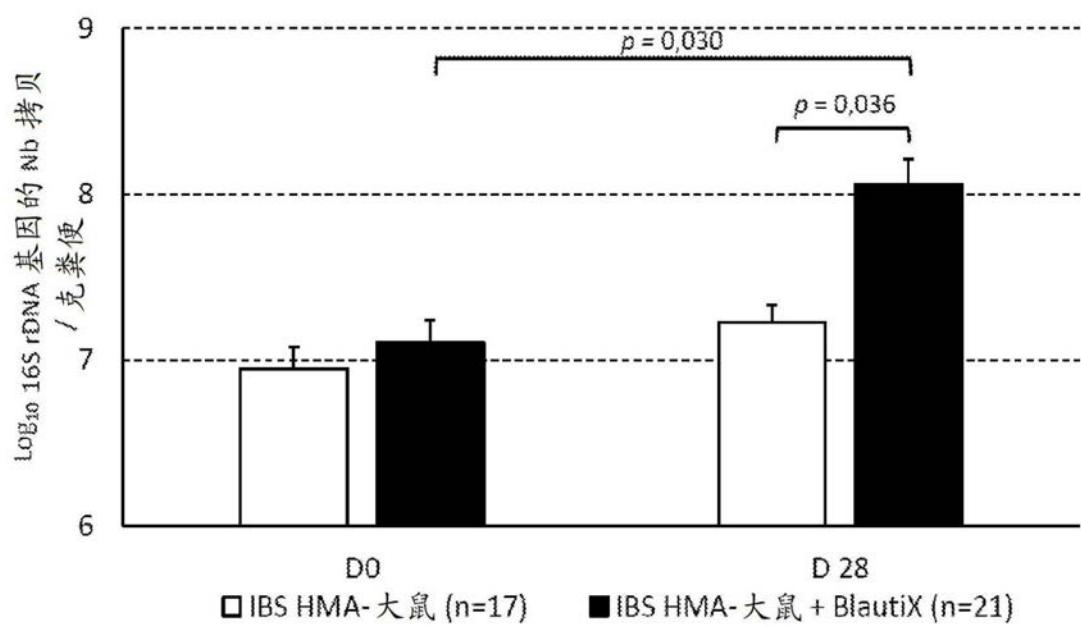
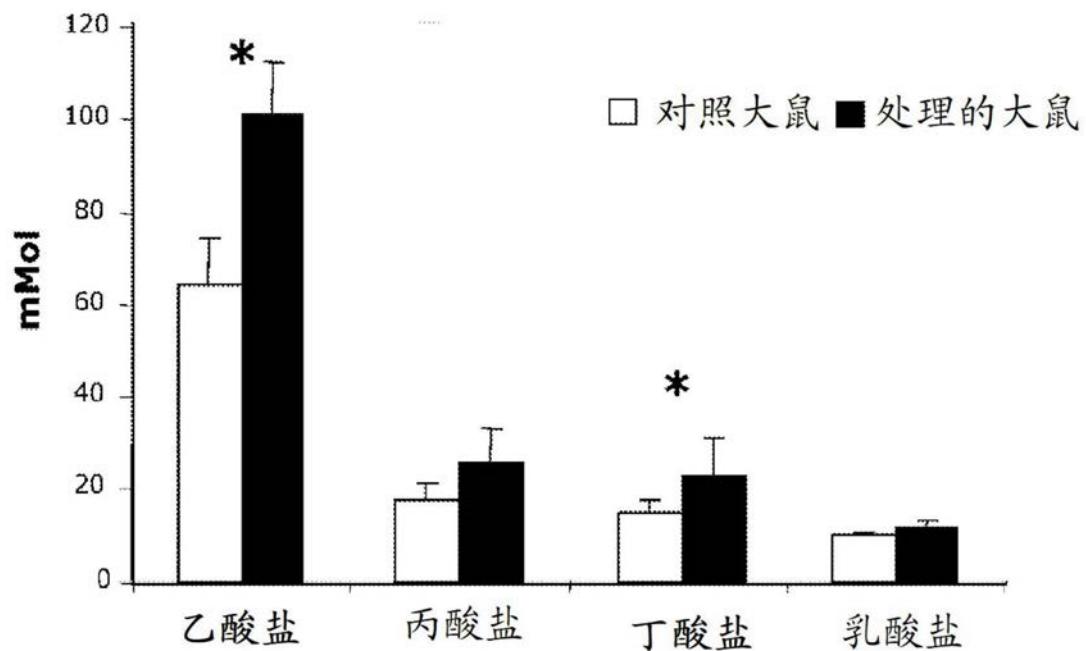


图54F



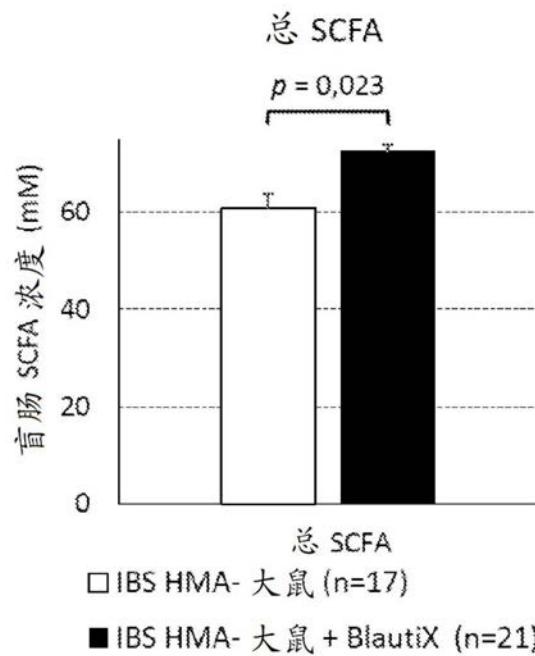


图57A

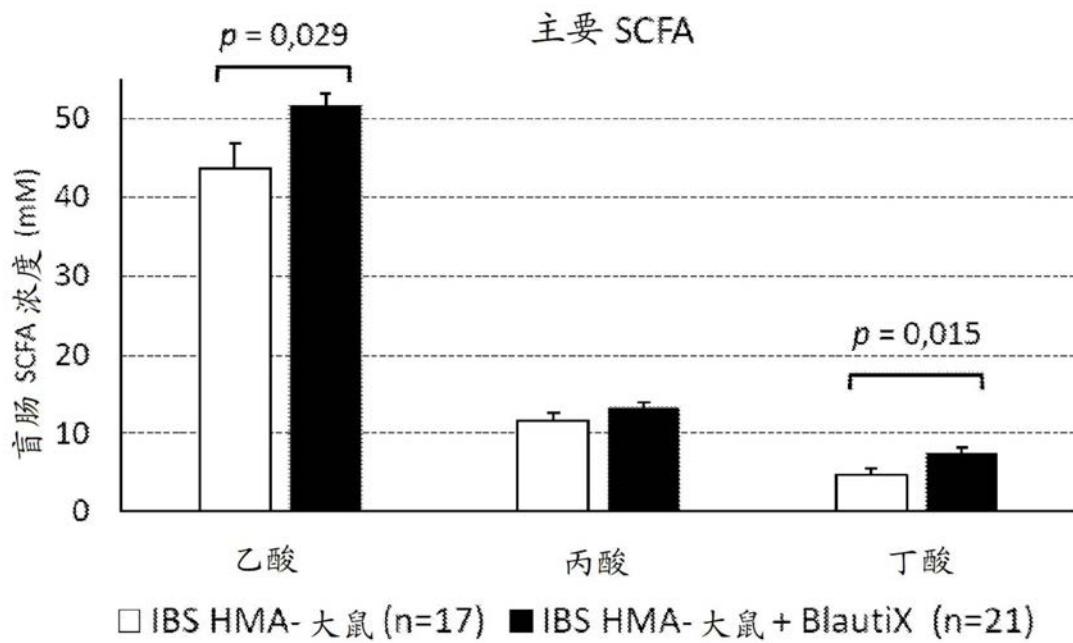


图57B

社交性测试

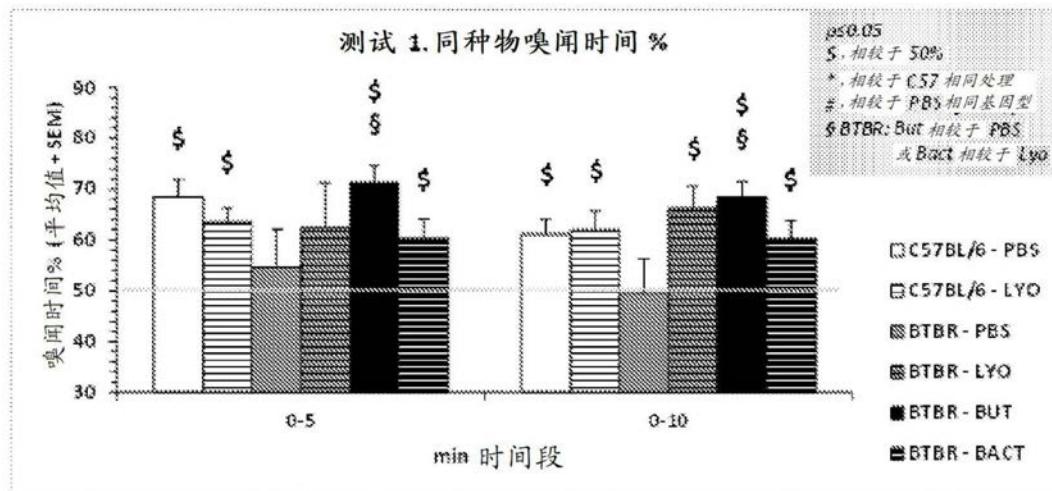


图58A

社交新颖性测试

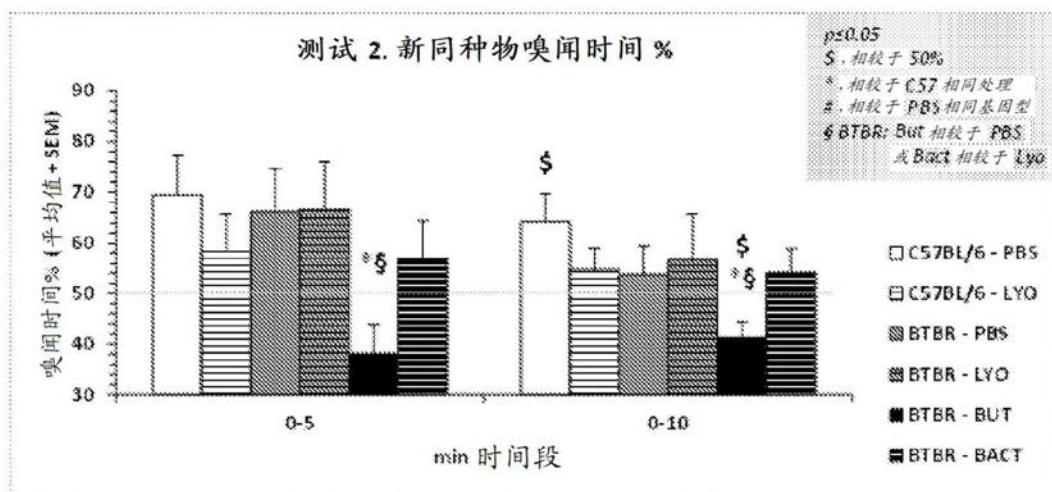


图58B

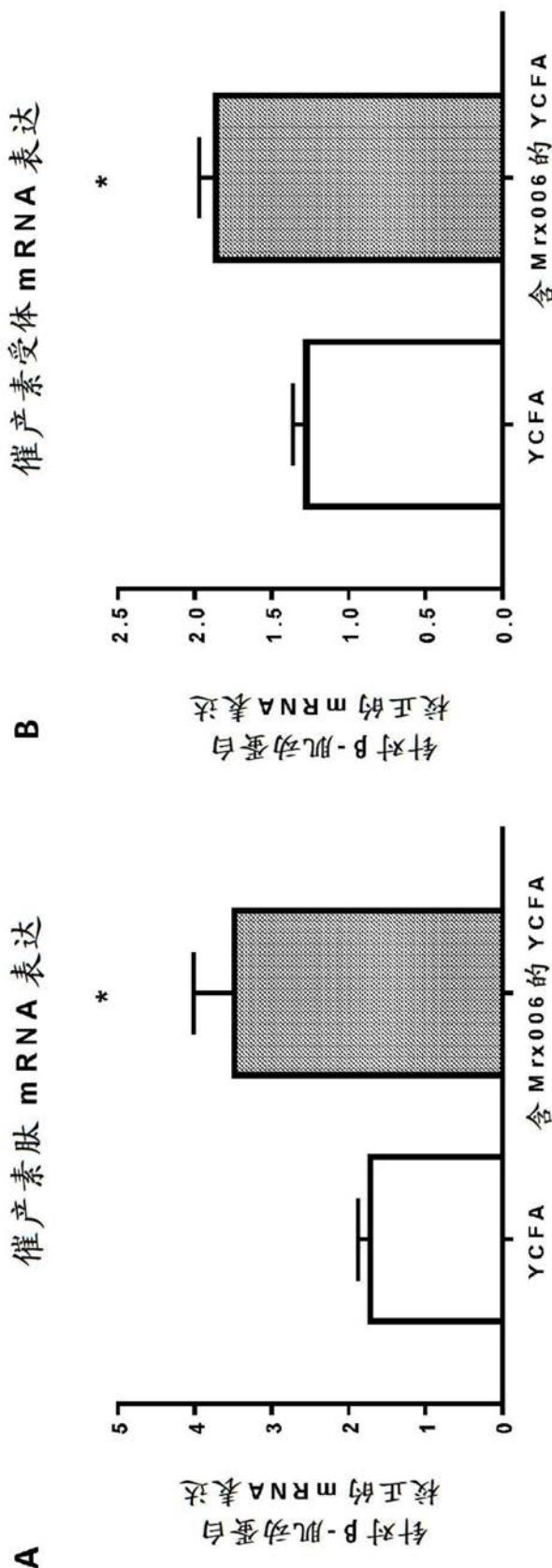


图59

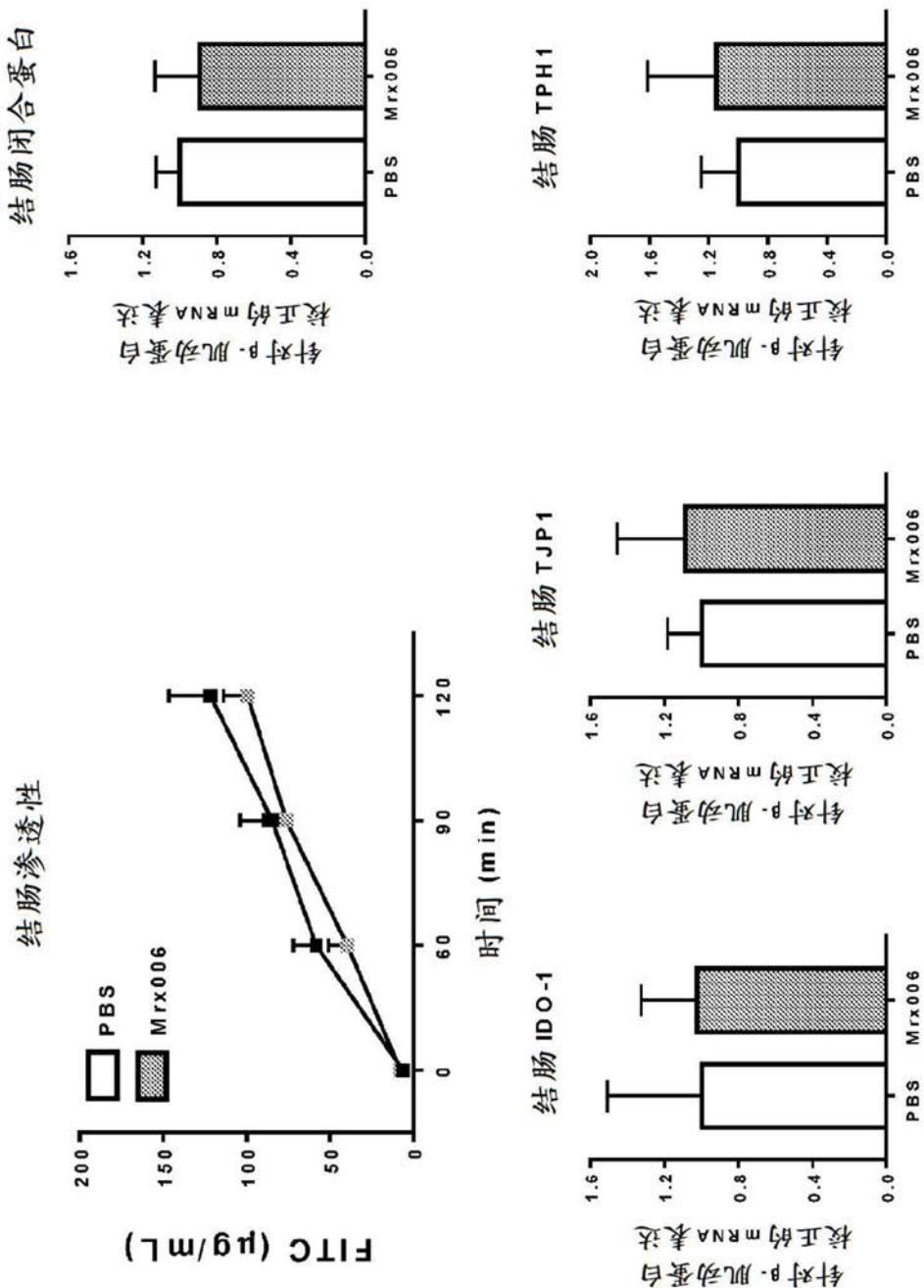


图60

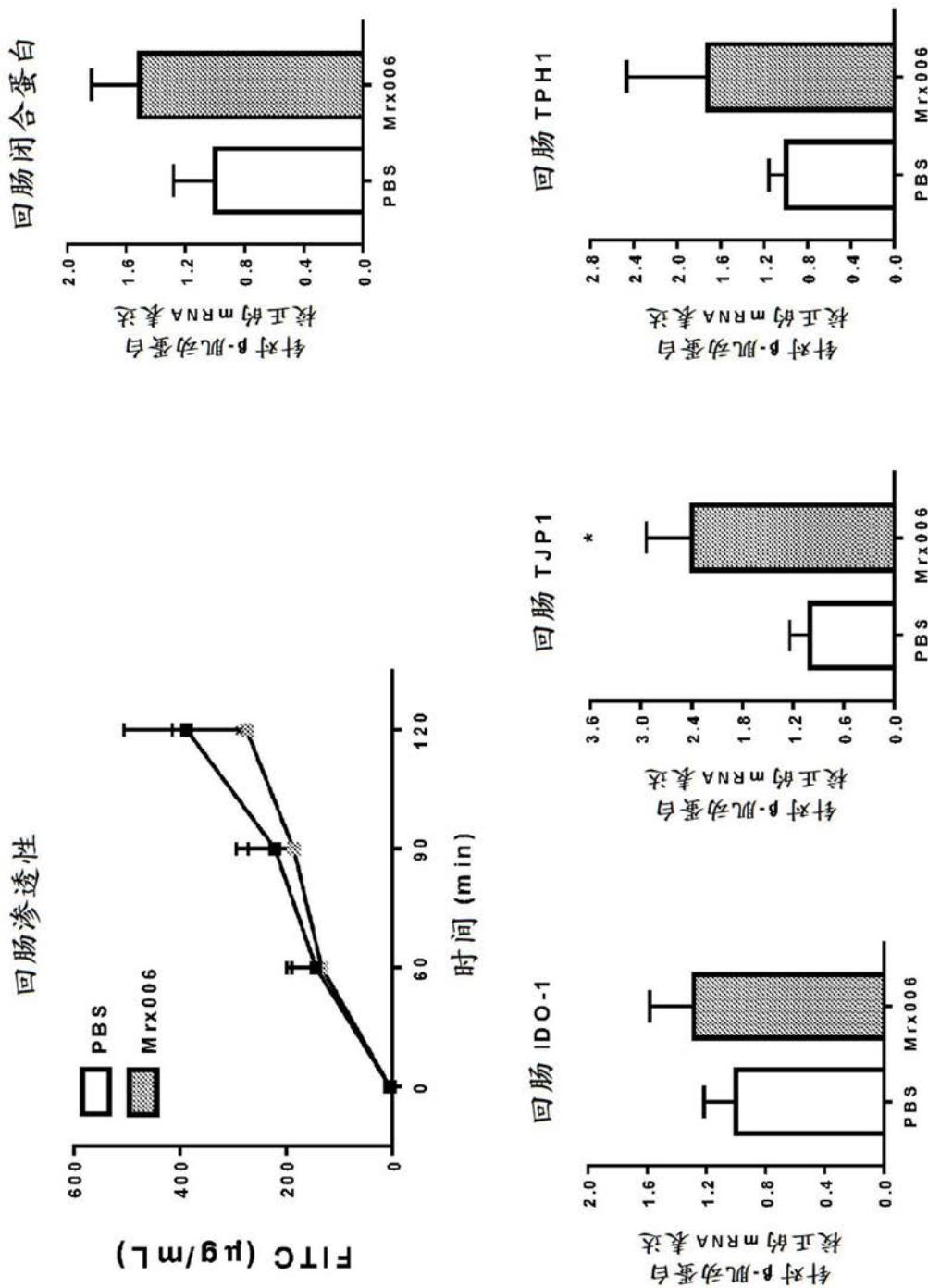


图61

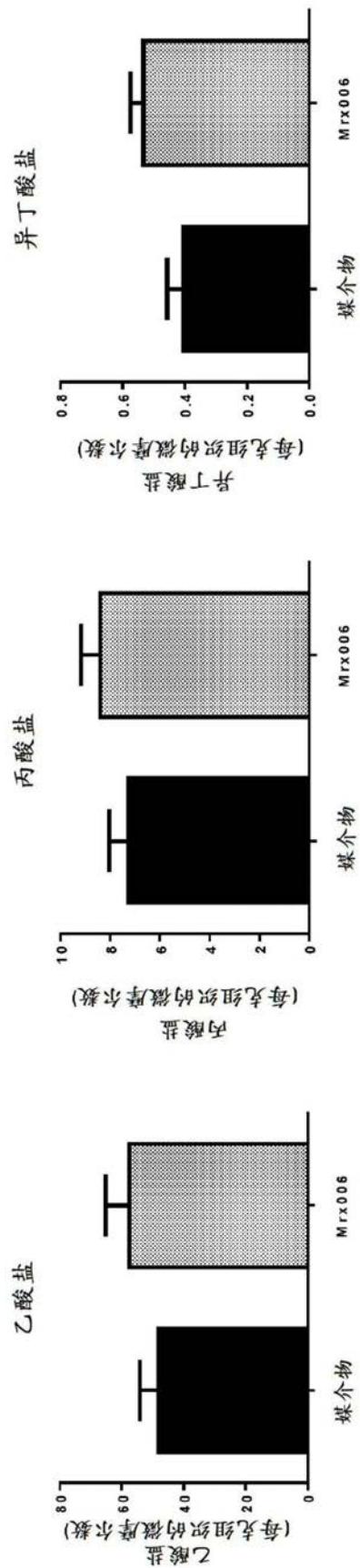


图62

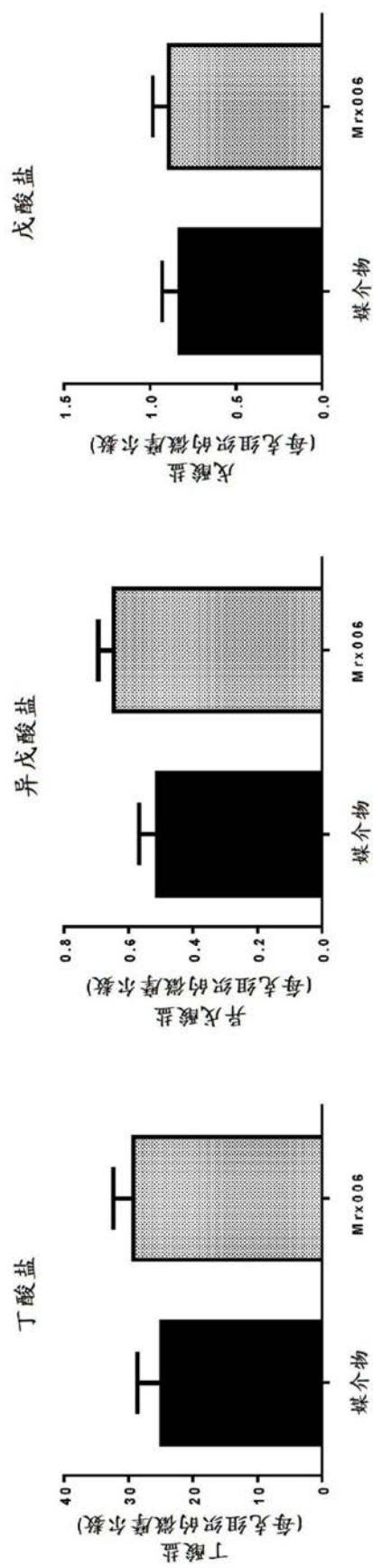


图62续

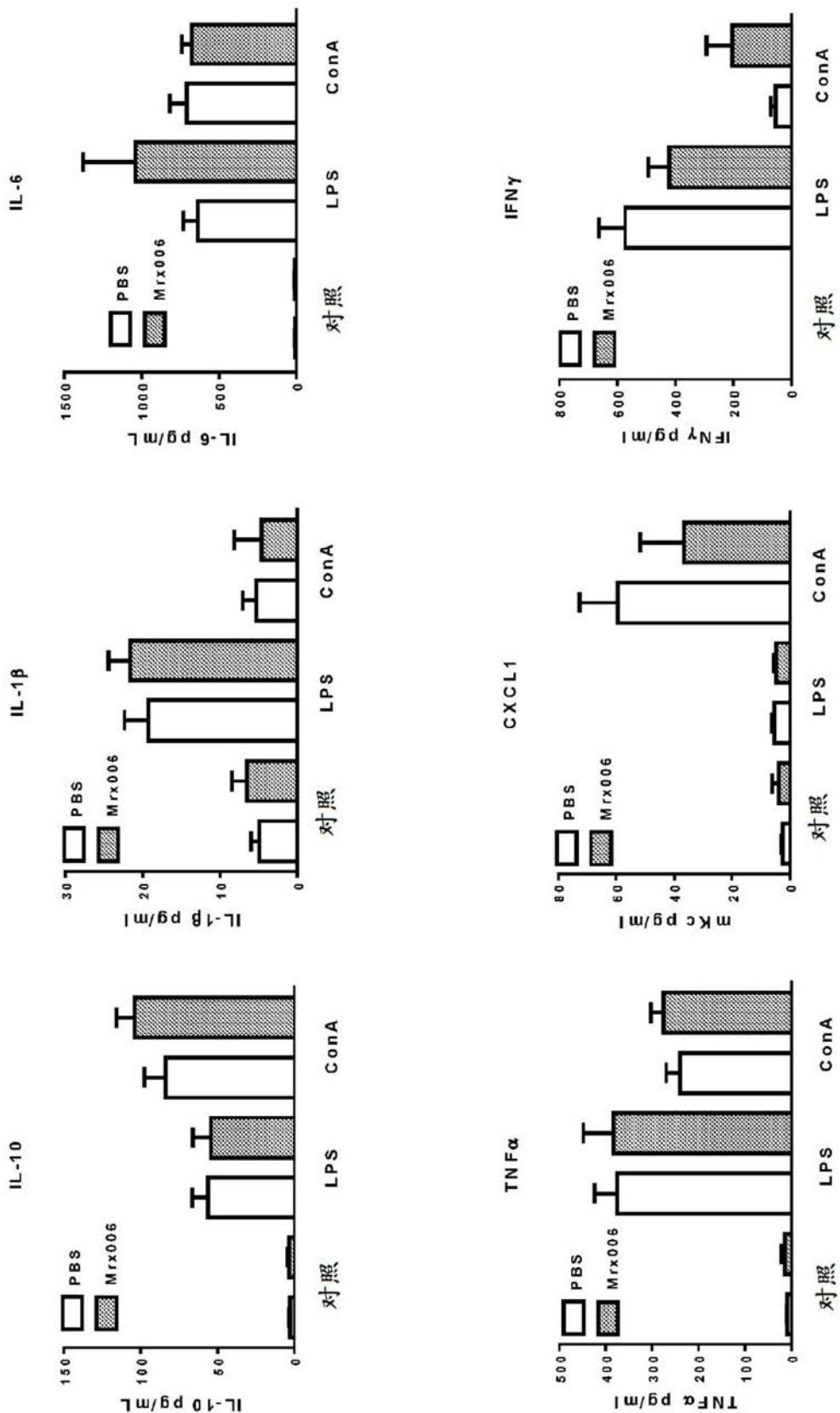


图63

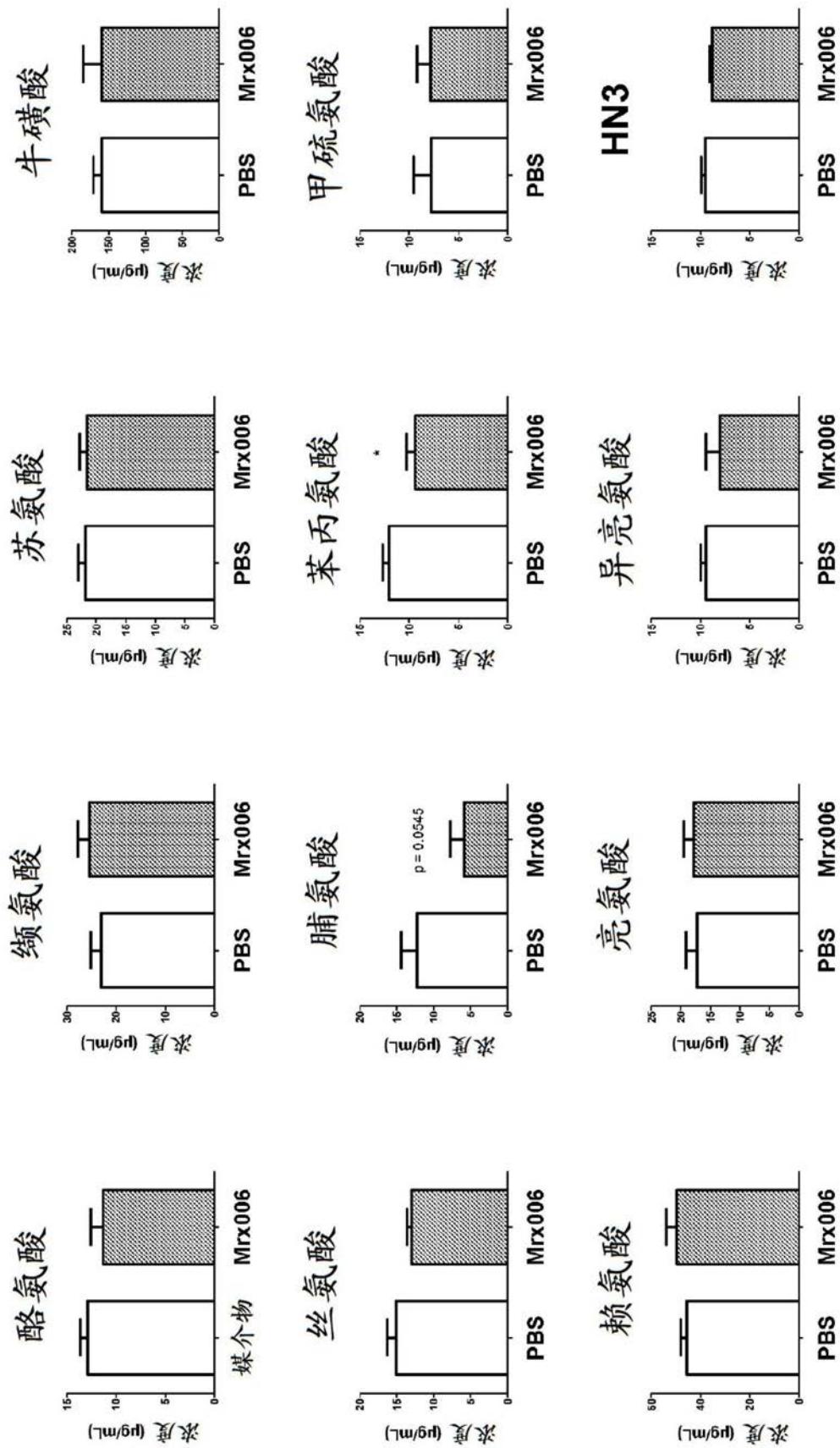


图64

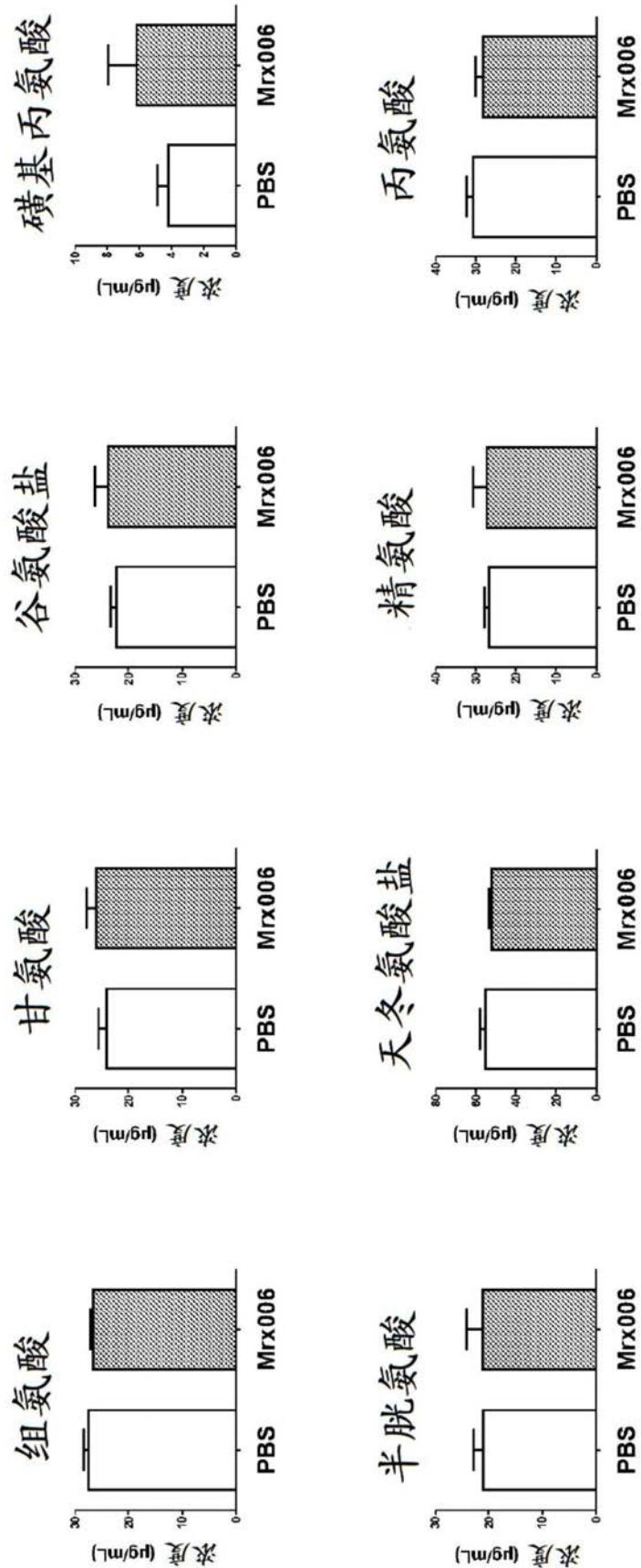


图64续

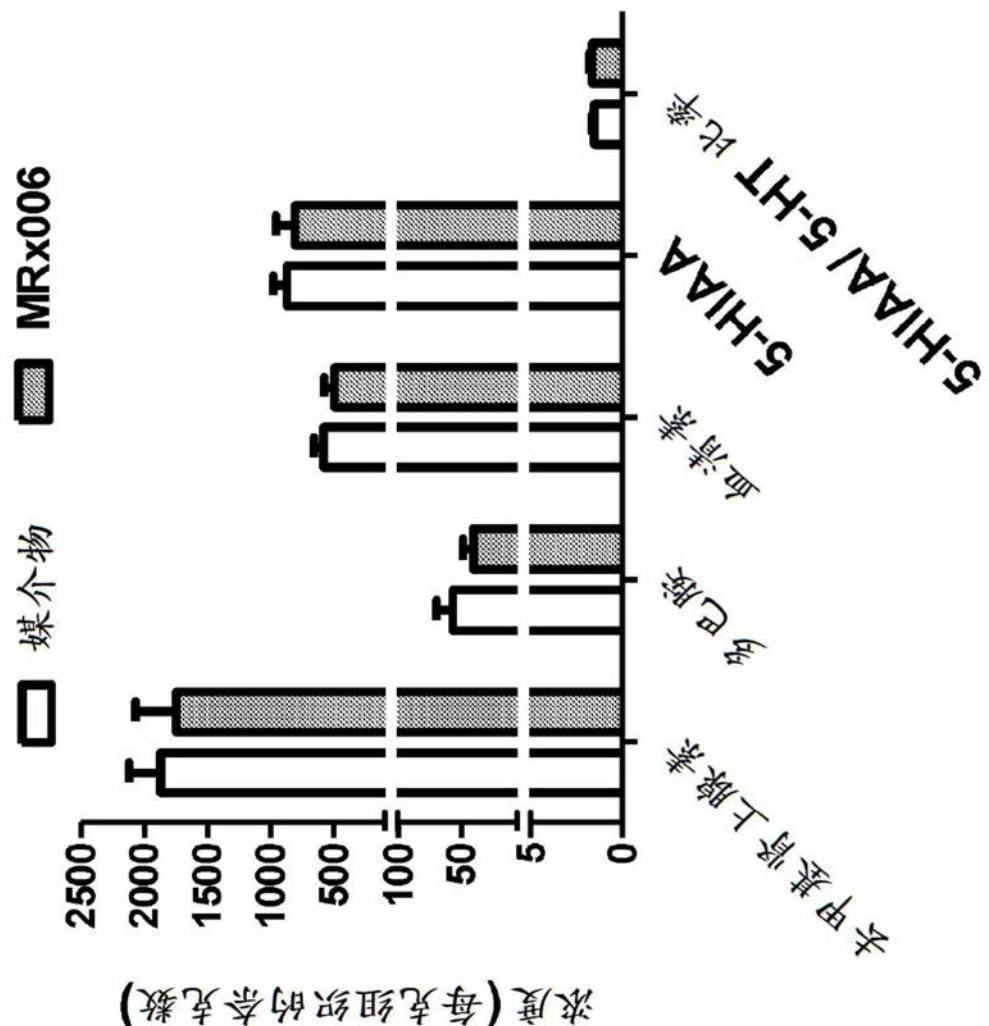


图65

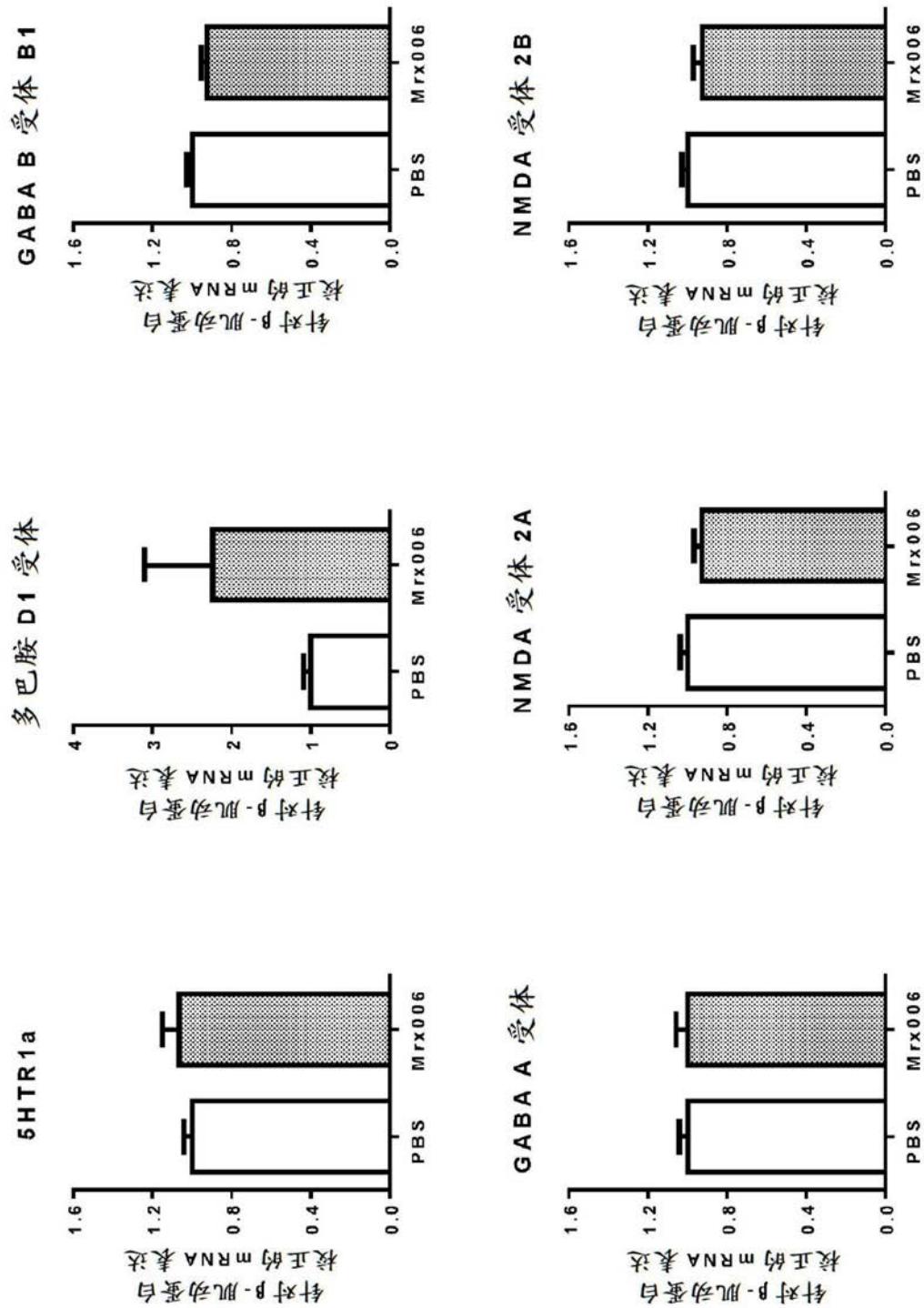


图66

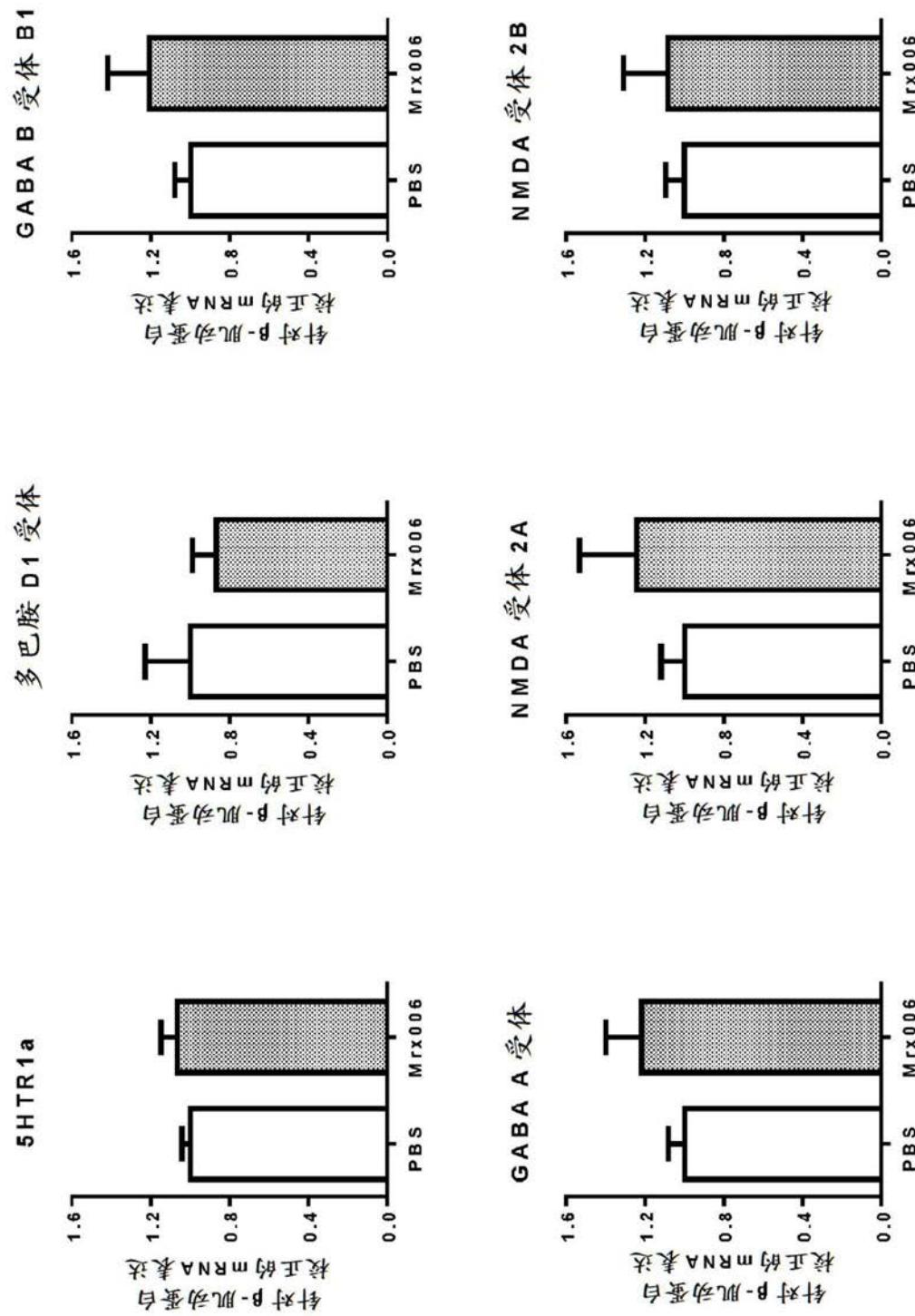


图67

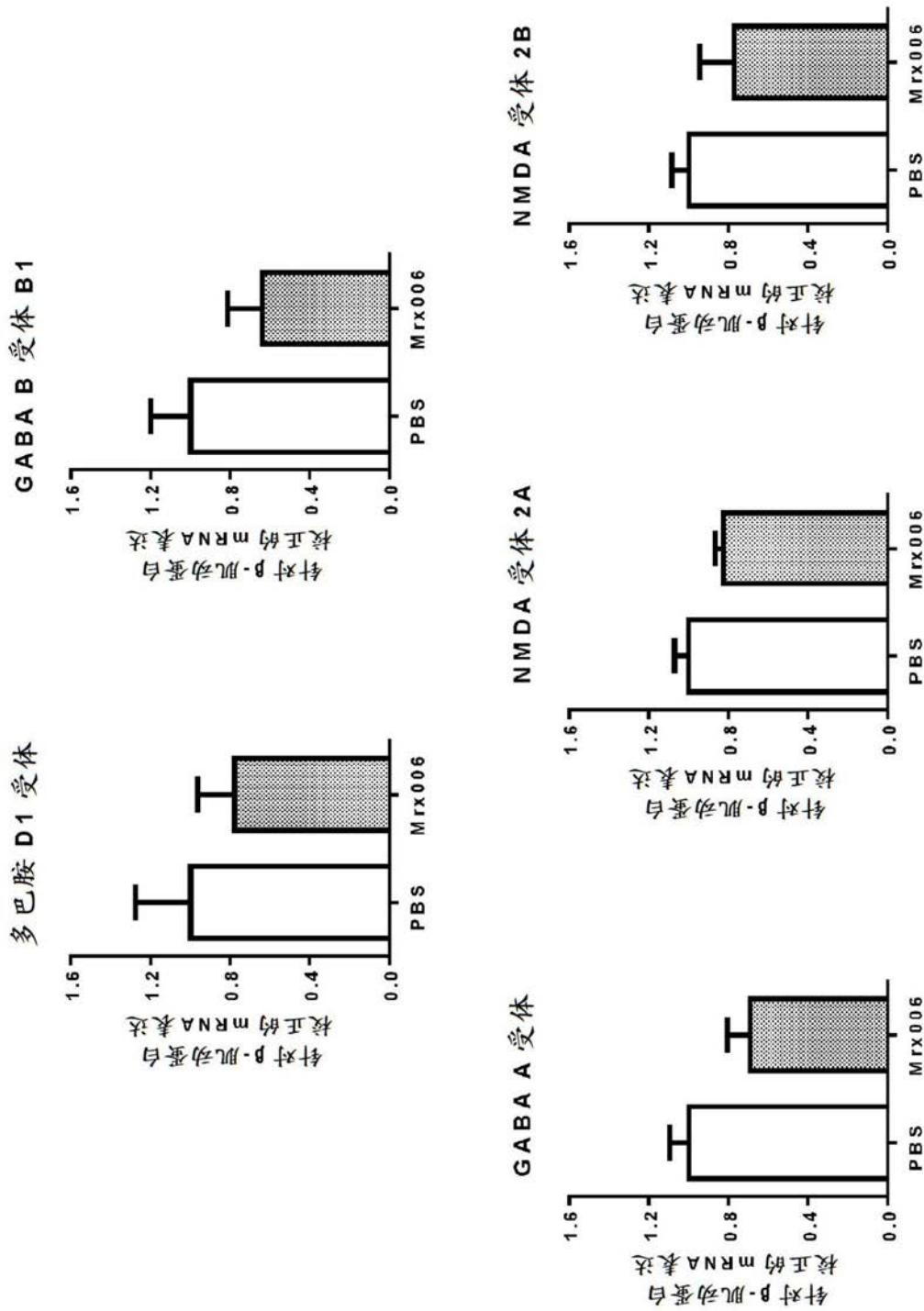


图68

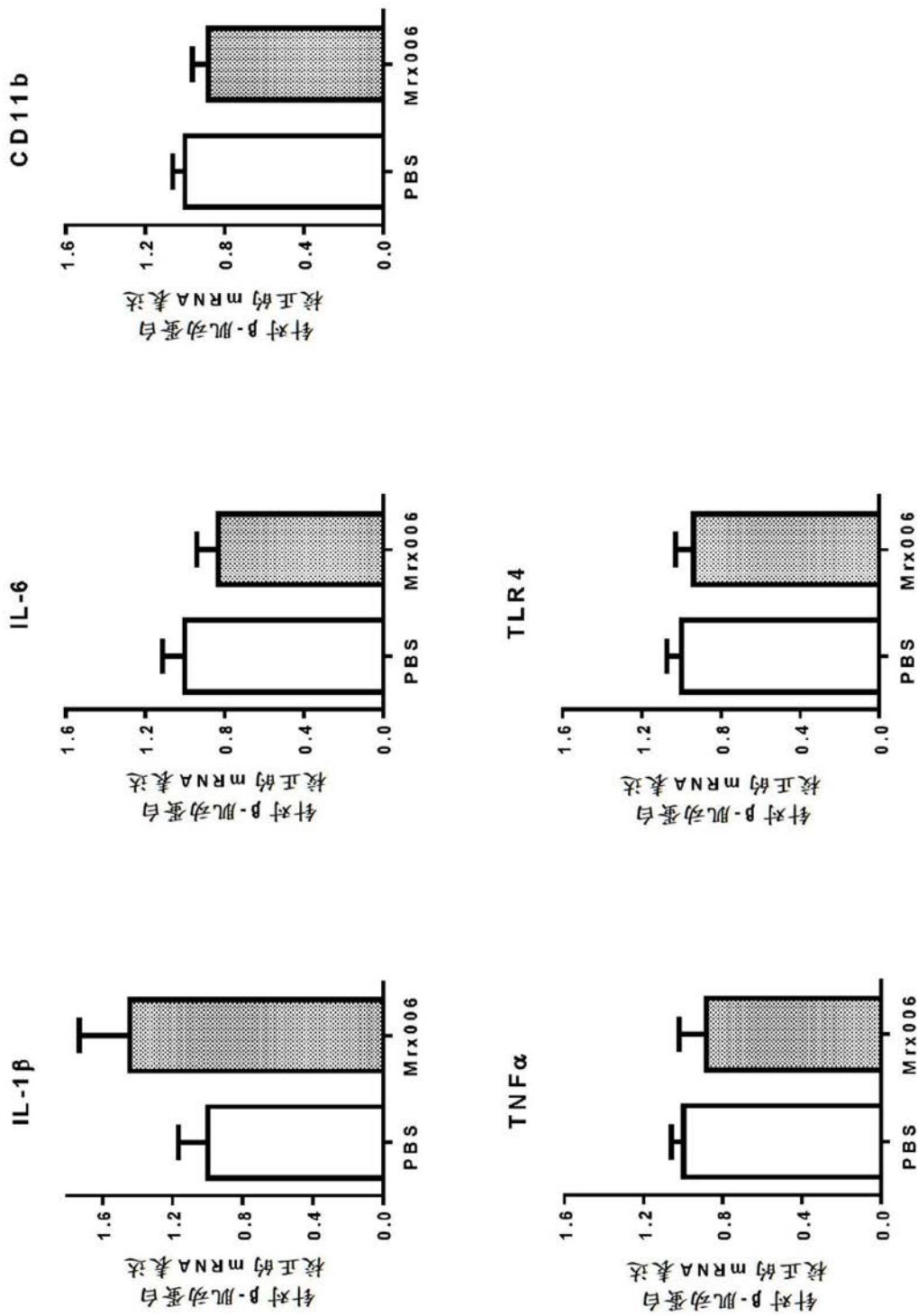


图69

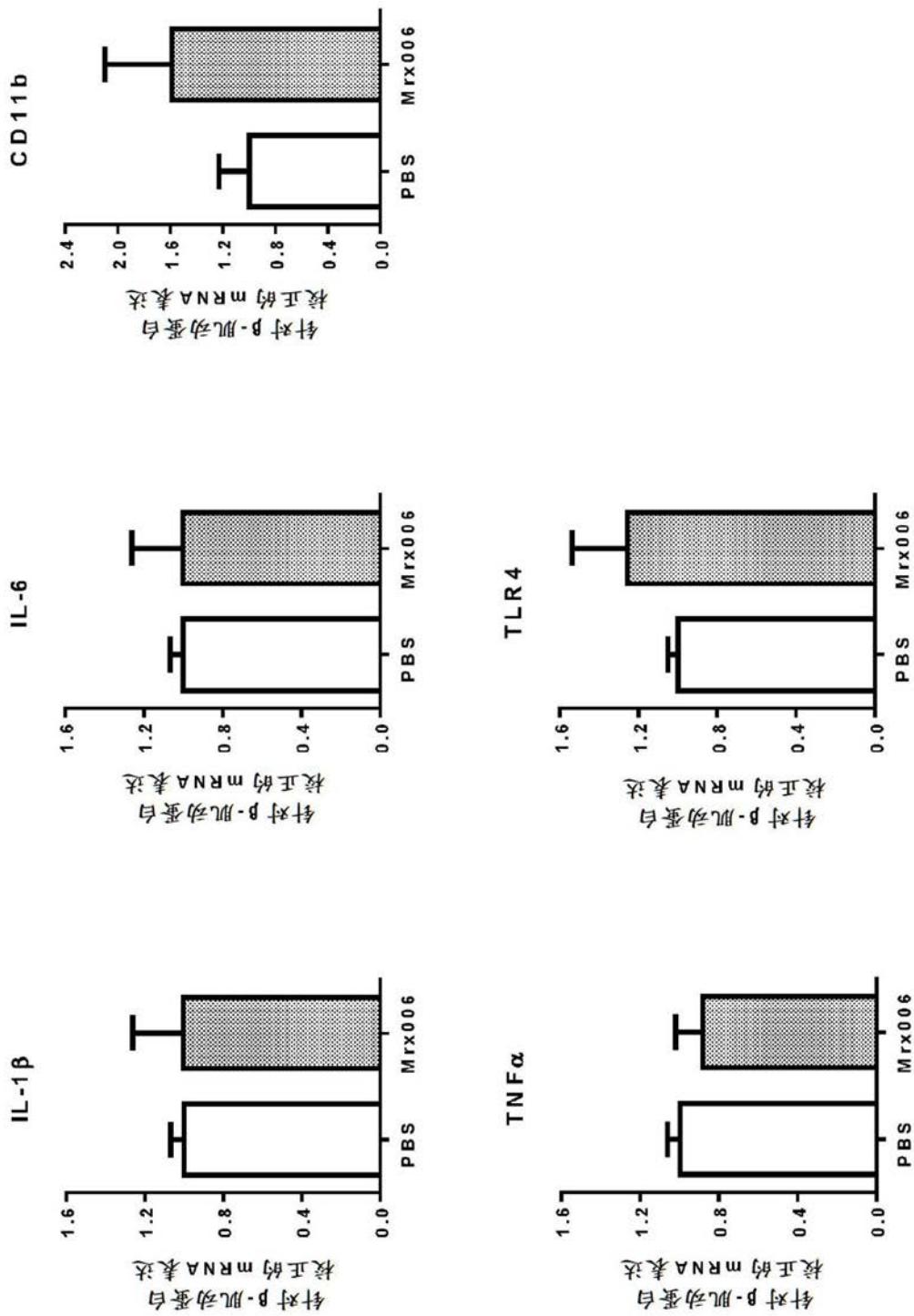


图70

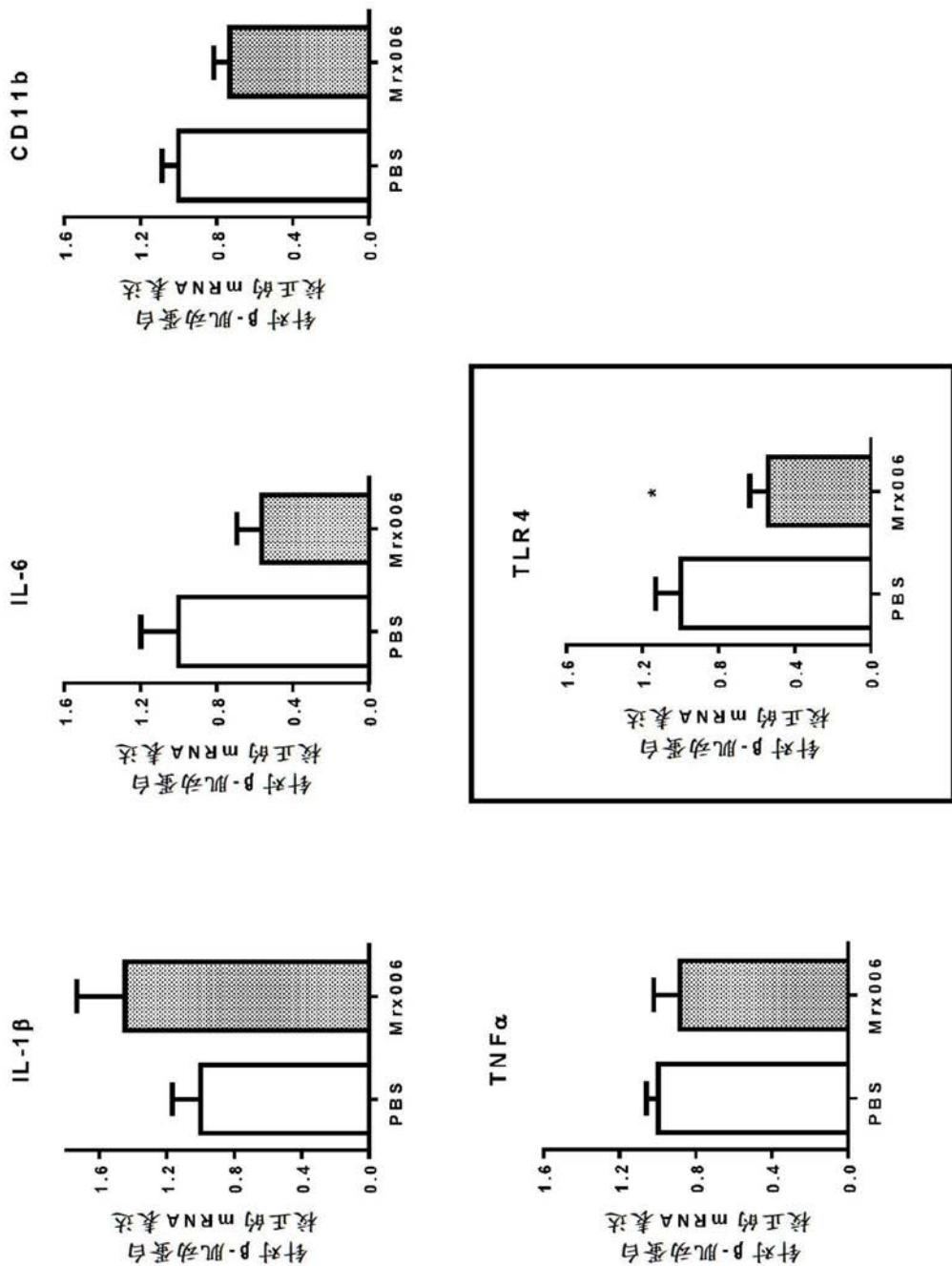


图71

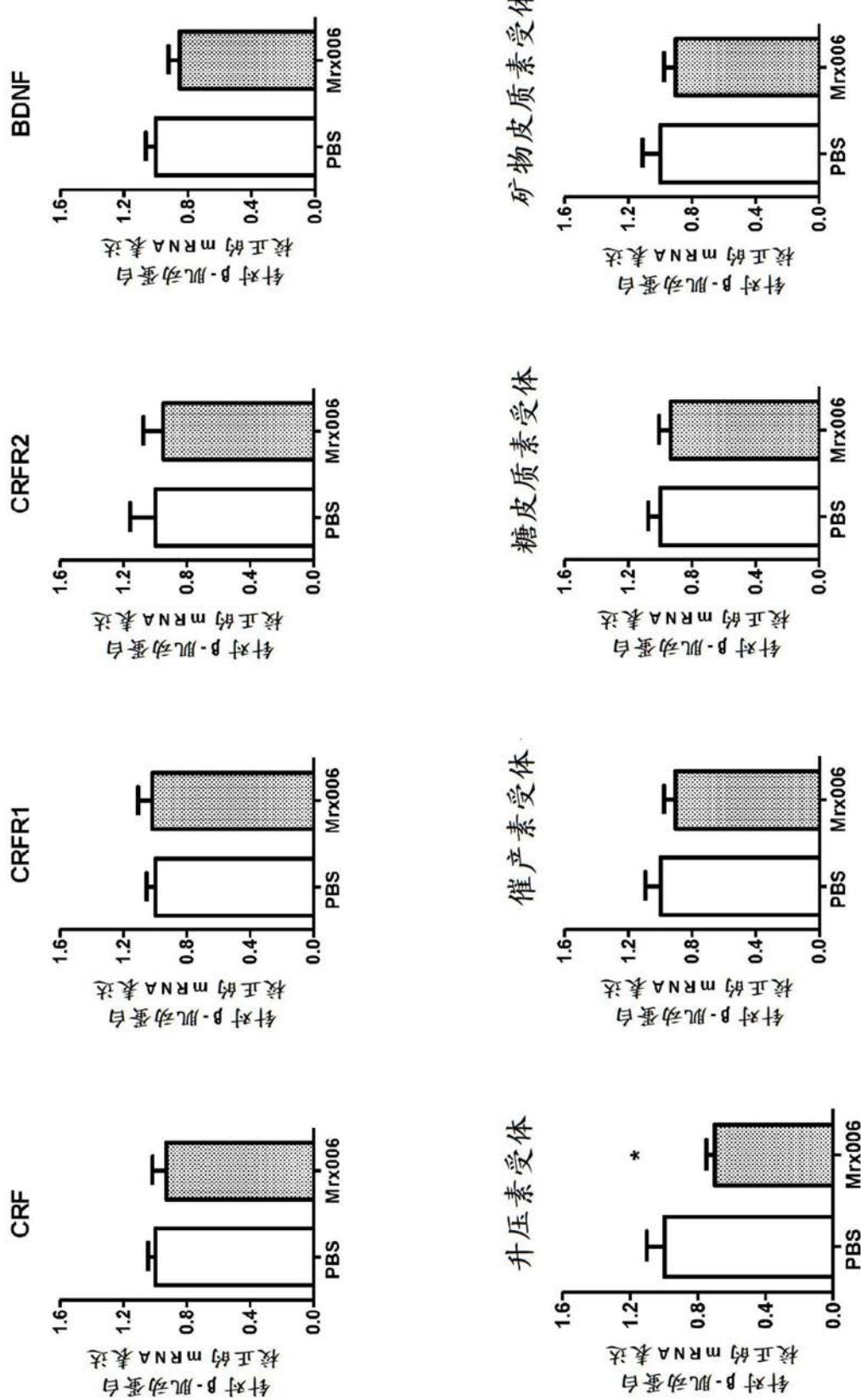


图72

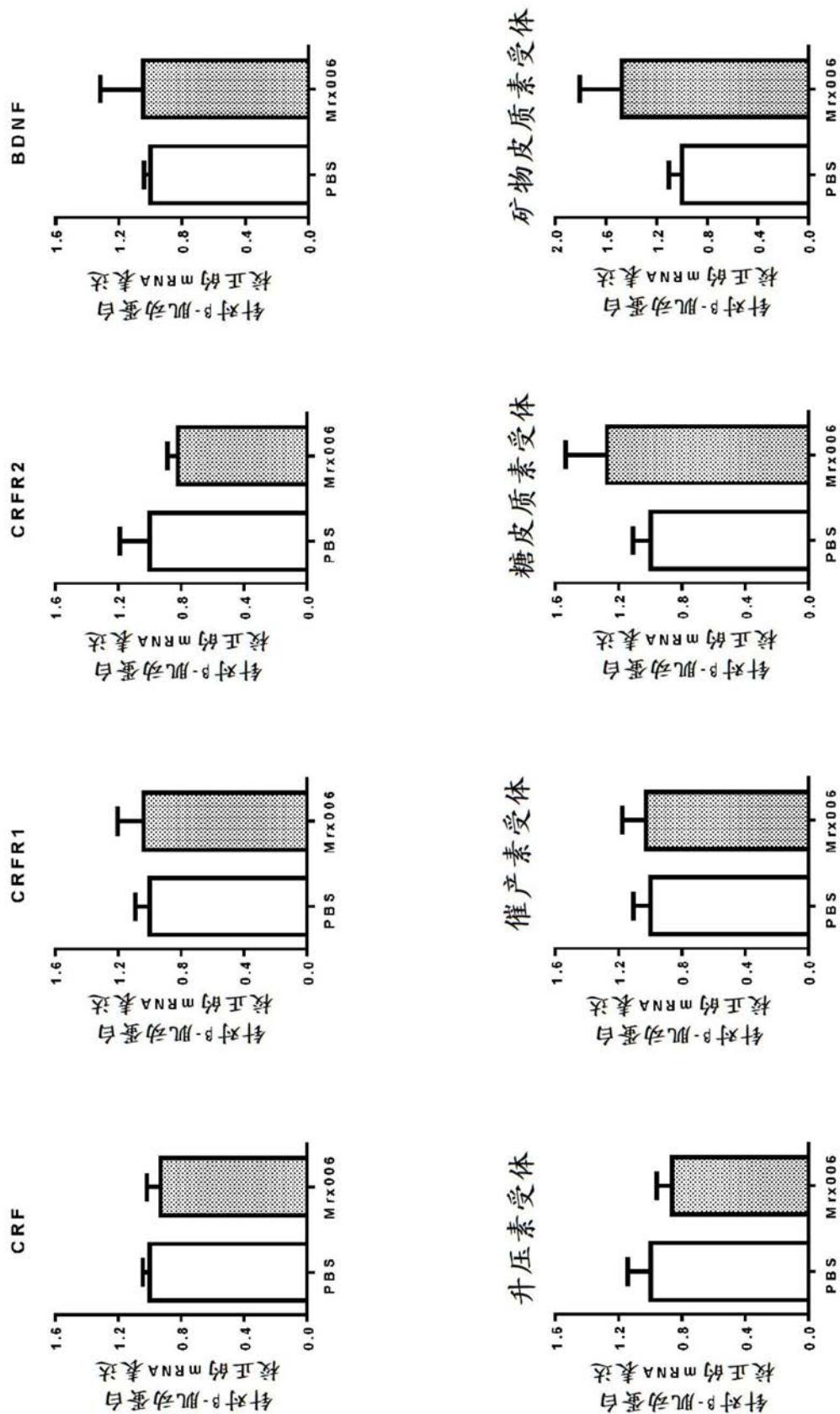


图73

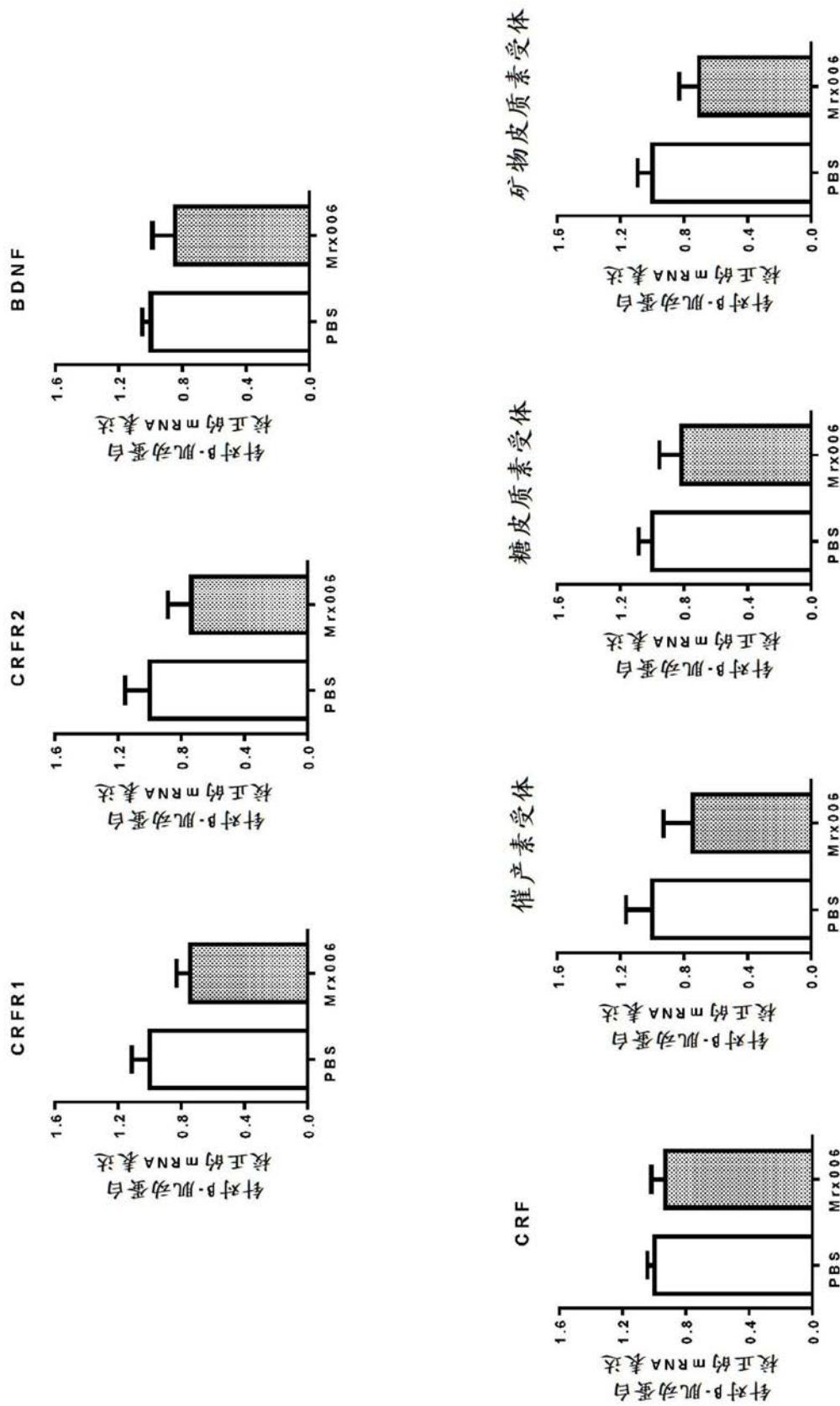


图74

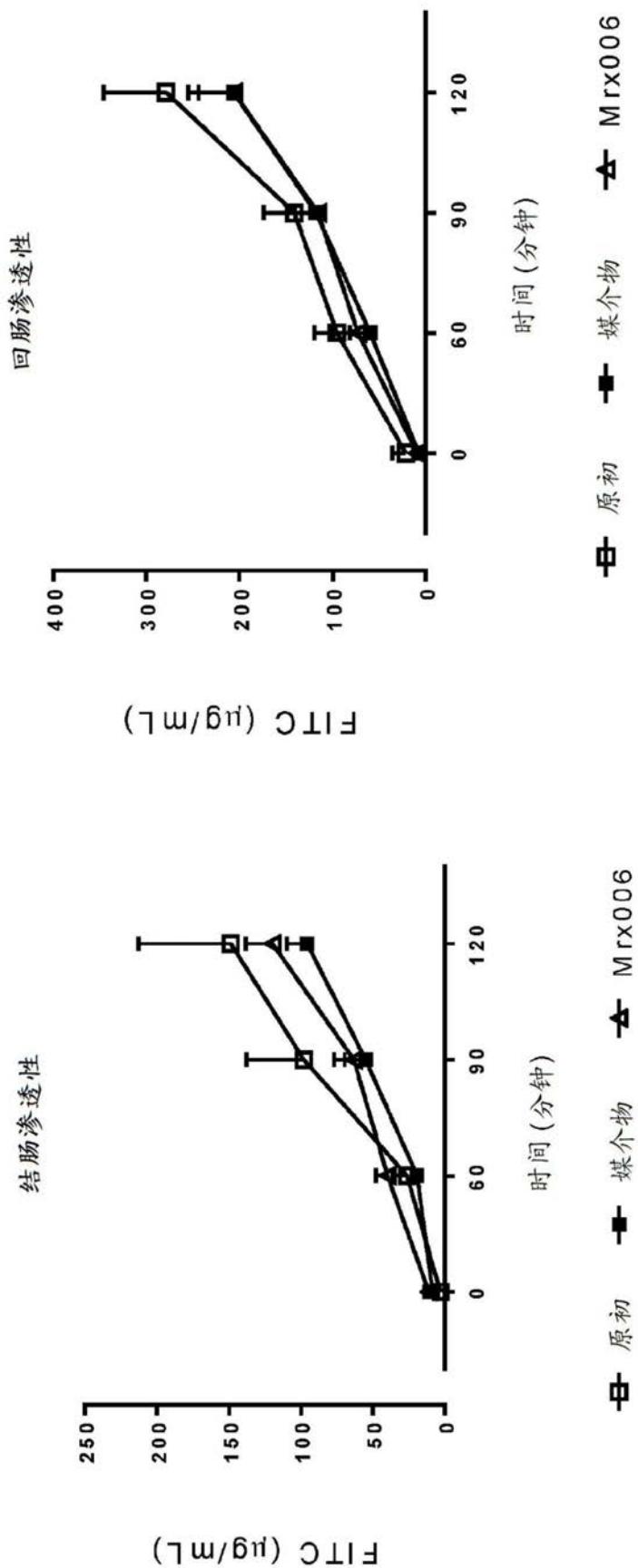


图 75

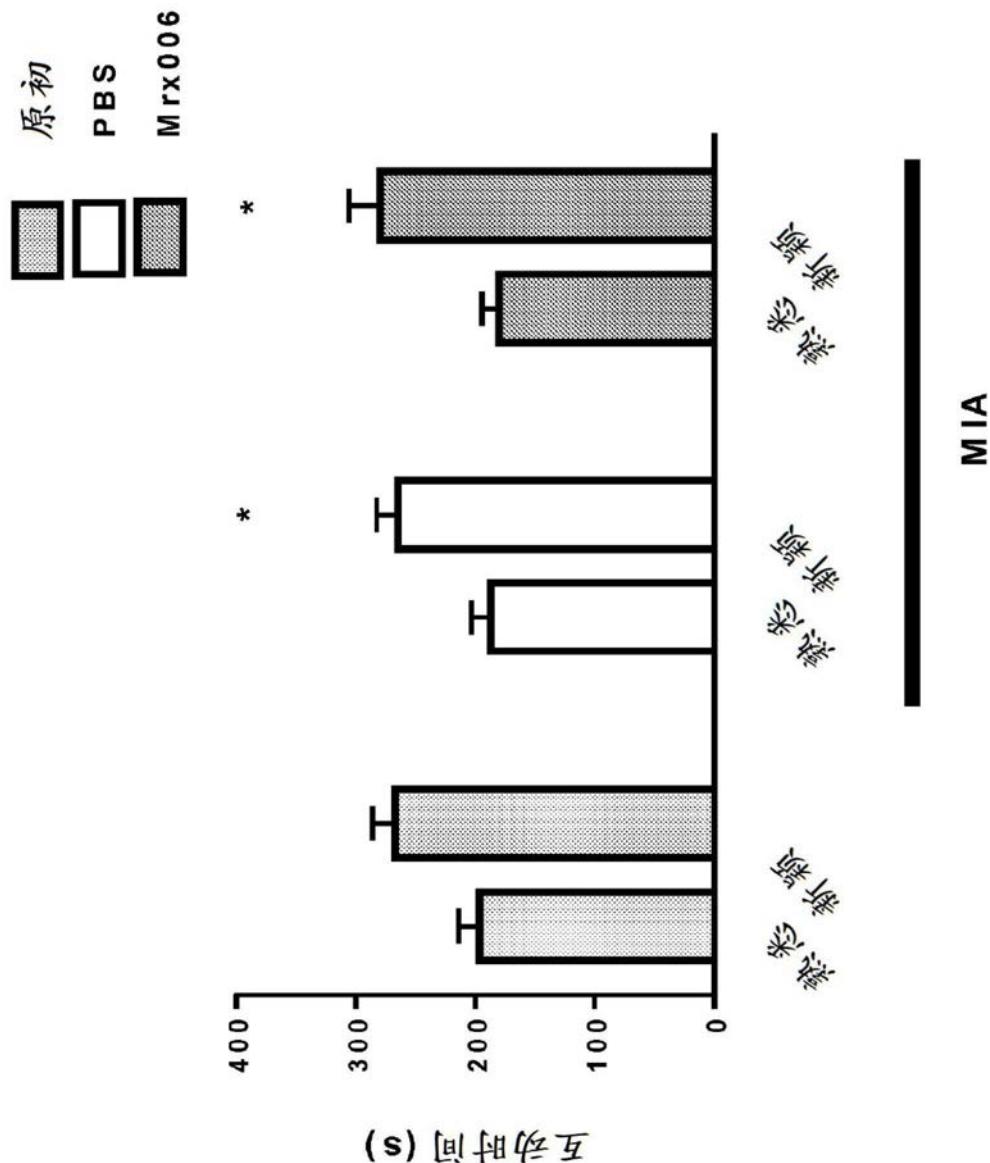


图76

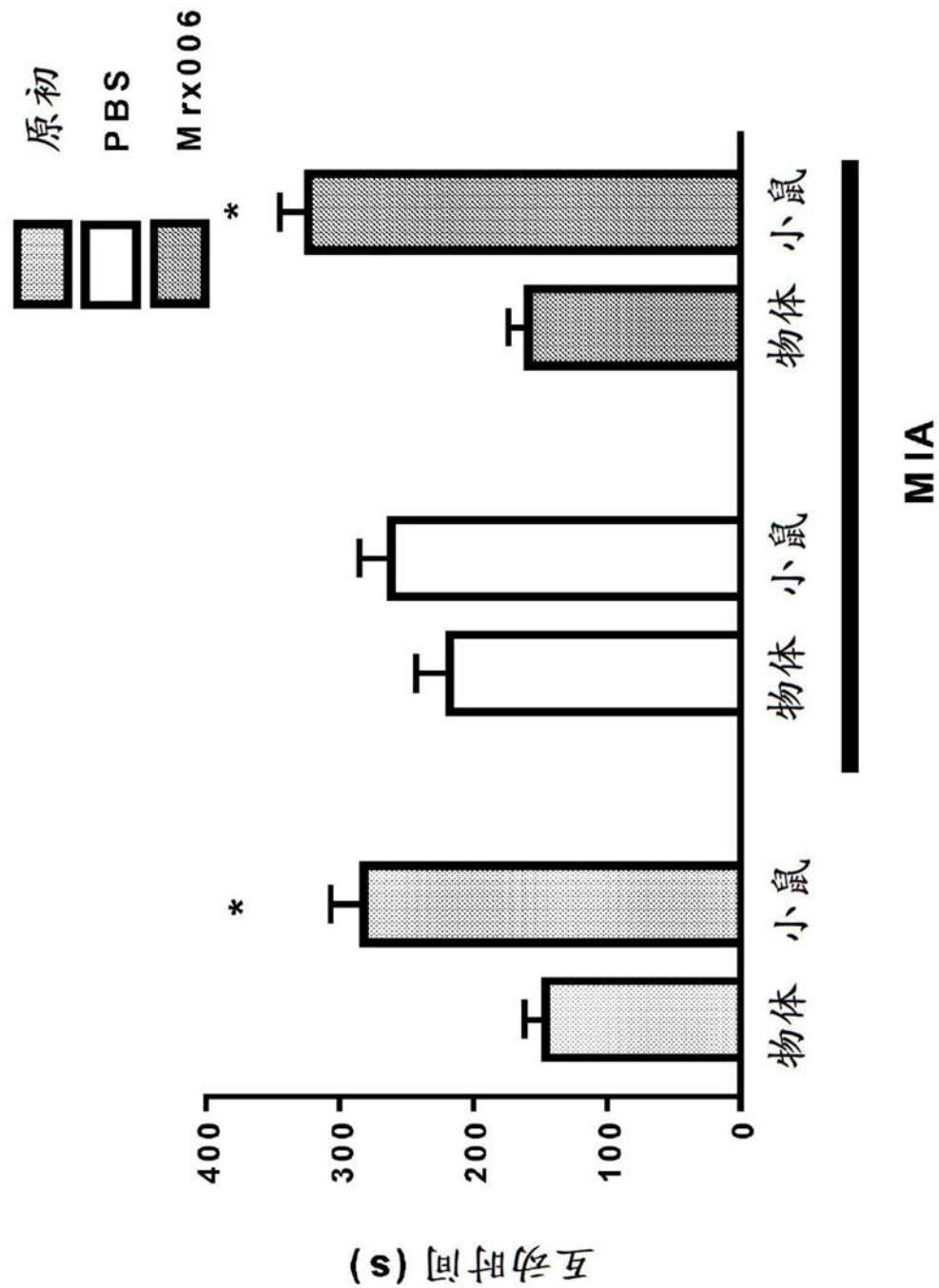


图77

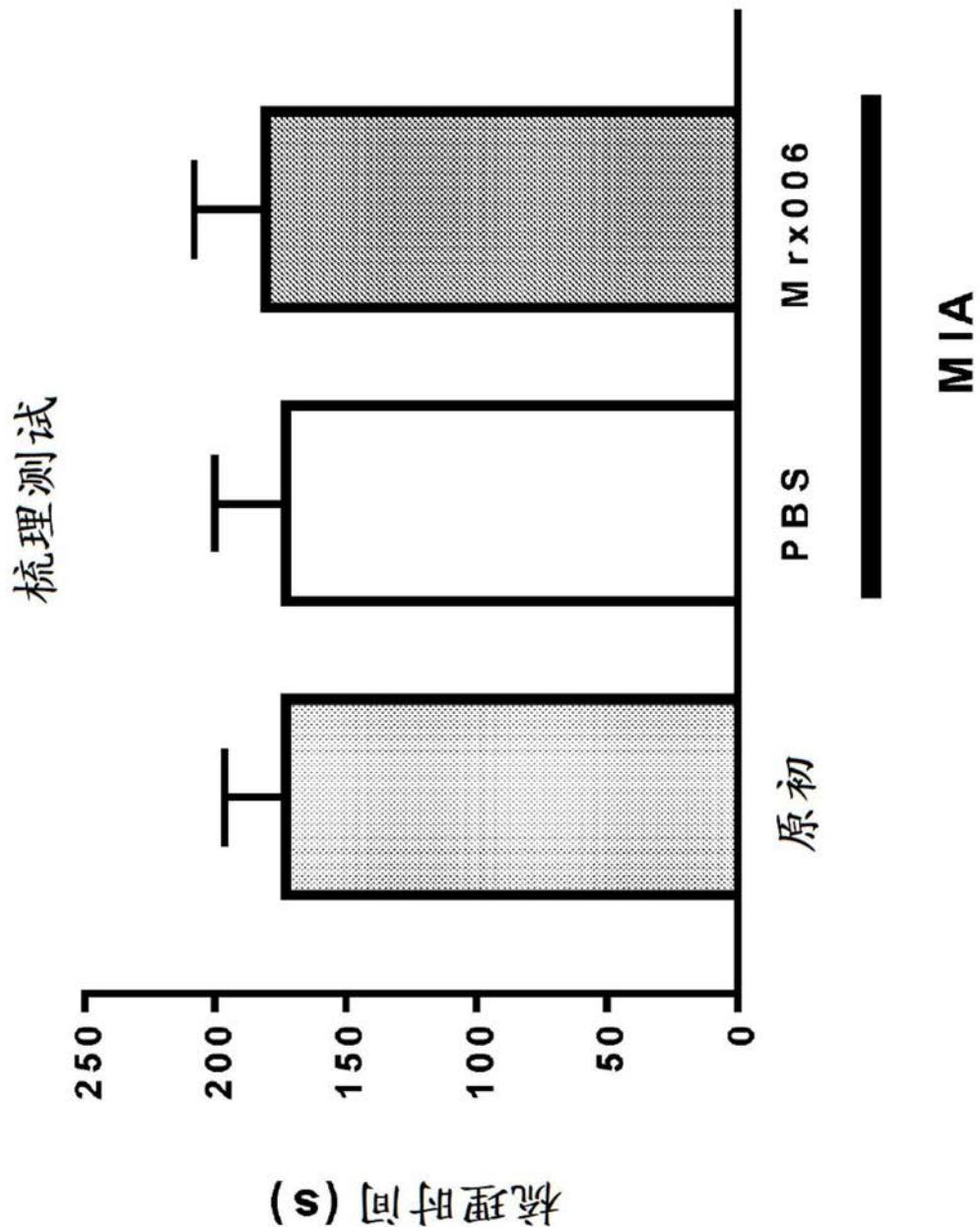


图78

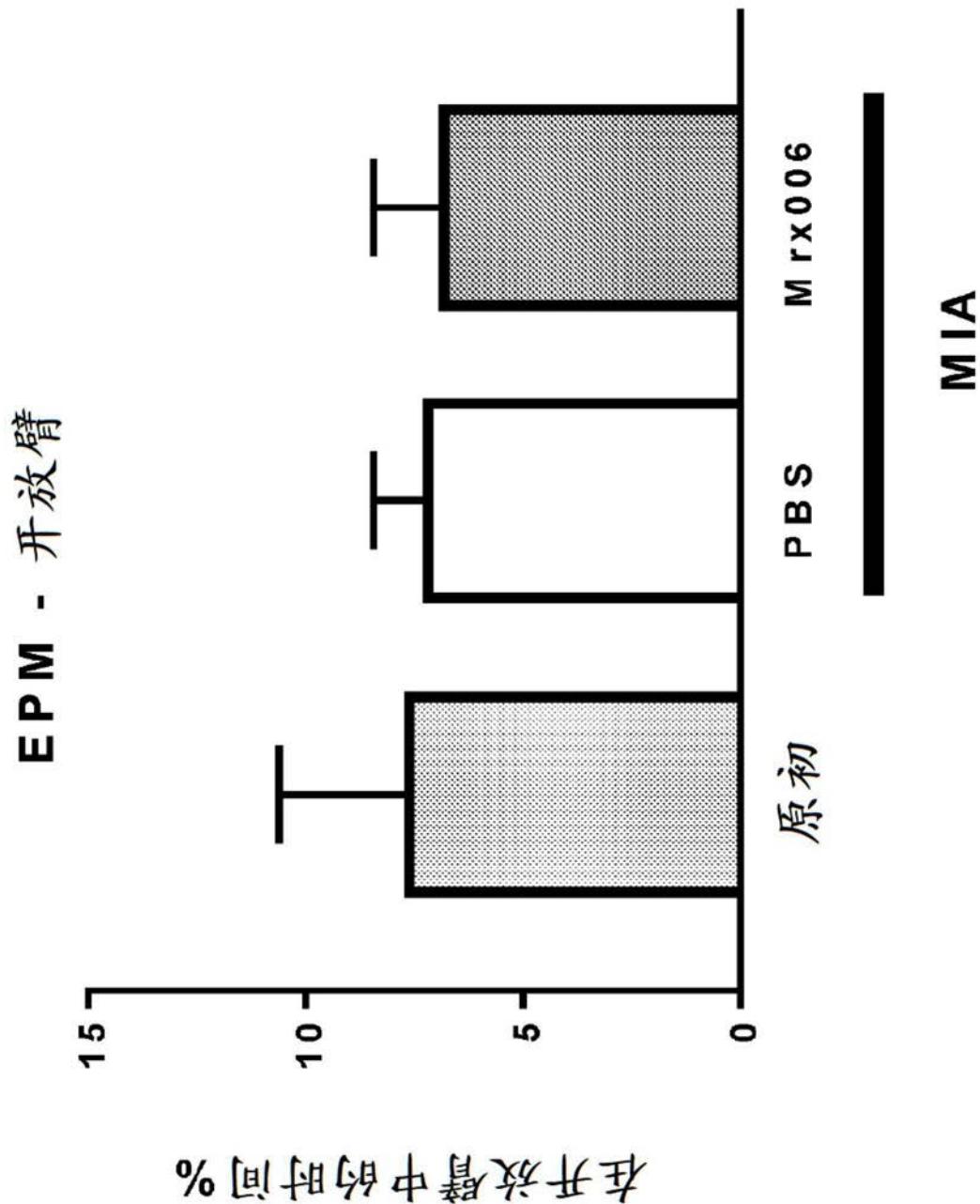


图79

强迫游泳测试

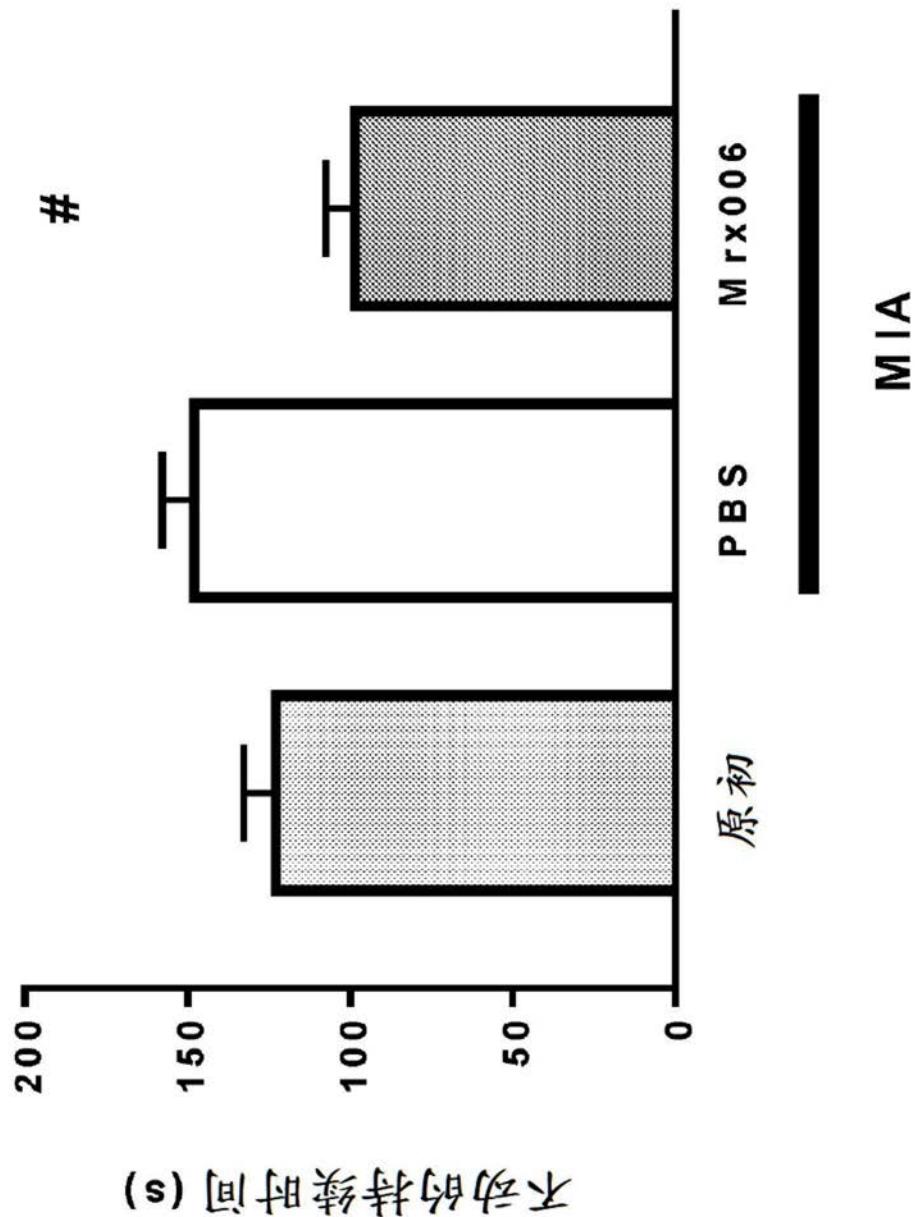


图80

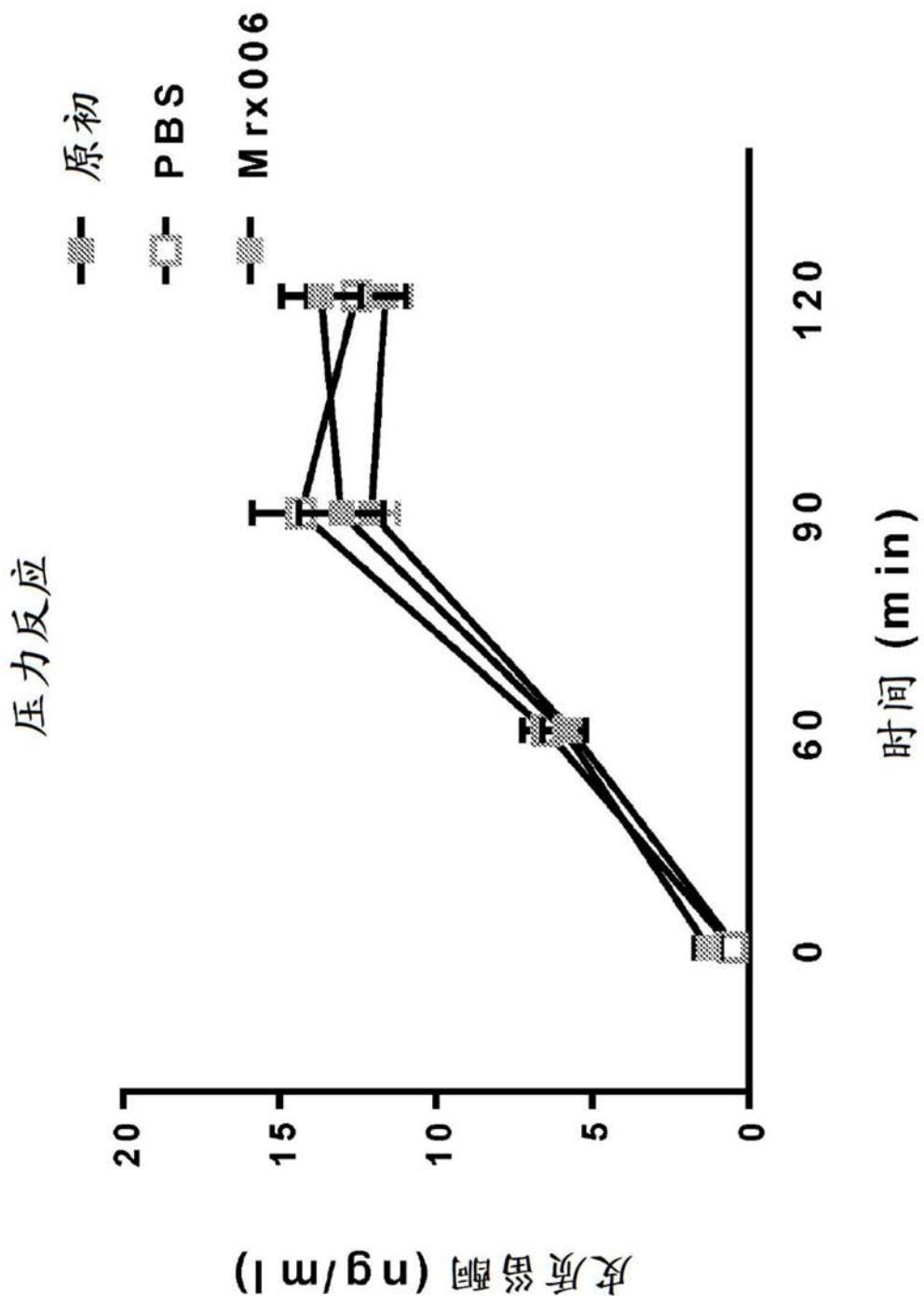


图81