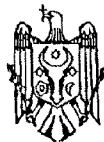




MD/EP 3600363 T2 2021.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3600363 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/74 (2015.01.01)
A23L 33/135 (2016.01.01)
A61K 9/19 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0143 (22) Data de depozit: 2018.06.14 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18731819.1, 2018.06.14 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3600363, 2020.02.05 (31) Numărul cererii prioritare: 201709465; 201709526; 201805990; 201805989; 201805991; 201806780; 201806779 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.06.14; 2017.06.15; 2018.04.11; 2018.04.11; 2018.04.11; 2018.04.25; 2018.04.25 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB; GB; GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 05/2021, 2021.05.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 49/2020, 2020.12.02 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 03/2020, 2020.03.31
(71) Solicitant: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (72) Inventatori: MULDER Imke Elisabeth, GB; ETTORRE Anna, GB; AHMED Suaad, GB; FOTIADOU Parthena, GB; URCIA Joseph Roby Iringan, GB; SAVIGNAC Helene, GB (73) Titular: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții cuprinzând tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

1
Invenția furnizează compoziții cuprinzând tulpini bacteriene pentru tratarea și prevenirea unei tulburări neurodegenerative.

2
Secvențe: 25
Revendicări: 15
Figuri: 44

MD/EP 3600363 T2 2021.05.31

(54) Compositions comprising bacterial strains**(57) Abstract:**

1

The invention provides compositions comprising bacterial strains for treating and preventing a neurodegenerative disorder.

2

Sequences: 25

Claims: 15

Fig.: 44

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL TEHNIC**

5 Această invenție este în domeniul compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene izolate din tractul digestiv de mamifer și utilizarea de astfel de compoziții în tratamentul bolilor.

FUNDAL INVENȚIEI

10 Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o largă varietate de microbi maternali și din mediu imediat după naștere. Apoi, are loc o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori cum ar fi metodele de livrare, mediul, dieta și genotipul gazdei, din care toate impactează asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în primii ani de viață. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare cu cea adultă [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 500-1000 de
15 filotipuri diferite aparținând în mod esențial la două divizii bacteriene majore, Bacteroidetes și Firmicutes [2]. Reacțiile simbiotice de succes care apar din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o largă varietate de funcții metabolice, structurale, protectoare și alte funcții benefice. Activitățile metabolice sporite ale intestinului colonizat asigură că, componente alimentare altfel nedigerabile, sunt degradate cu eliberarea produselor secundare furnizând o sursă nutrientă importantă pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este
20 bine recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni care au un sistem imunitar alterat care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriei comensale [3-5].

Modificări dramatice în compoziția microbiotei au fost documentate în tulburările gastrointestinale cum ar fi boala inflamatorie intestinală (IBD). De exemplu, nivelurile de bacterii CIVa în clusterul *Clostridium* sunt reduse la pacienții cu IBD în timp ce numărul de *E. coli* este crescut, sugerând o deplasare în echilibrul simbiotei și patobiotei în intestin [6-9].
25

În recunoașterea potențialului efect pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animalului, au fost propuse diferite tulpini pentru utilizare în tratamentul diferitelor boli (vezi, de exemplu, [10-13]). De asemenea, anumite tulpini, incluzând mai ales tulpinile *Lactobacillus* și *Bifidobacterie*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor boli inflamatorii și autoimune care nu sunt direct legate de intestin (vezi [14] și [15] pentru revizii).
30 Totuși, relația între diferite boli și diferite tulpini bacteriene, și efectele precise ale tulpinilor bacteriene particulare asupra intestinului și la un nivel sistemic și pe orice tip particular de boli sunt slab caracterizate, în special pentru tulburările neurodegenerative.

Recent, în domeniu, a crescut interesul cu privire la alterările din microbiomul intestinal care poate juca un rol patofiziologic în bolile creierului uman [16]. Dovada preclinică și clinică sugerează puternic o legătură între dezvoltarea creierului și microbiotă [17]. Un corp în creștere din literatura preclinică a demonstrat semnalizare bidirecțională între creier și microbiomul intestinal, implicând multiple sisteme de semnalizare neurocrine și endocrine. Într-adevăr, nivelurile crescute de specii *Clostridium* în microbiom au fost legate de tulburările creierului [18],
40 și un dezechilibru al filei *Bacteroidetes* și *Firmicutes* a fost de asemenea implicat în dezvoltarea tulburărilor creierului [19]. Sugestiile că nivelurile alterate ale comensalelor intestinale, inclusiv cele de *Bifidobacterie*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* și *Ruminococcus* genera și ale familiei *Alcaligenaceae* sunt implicate în tulburările sistemului nervos central (CNS) mediate imun, sunt chestionate prin studii sugerând o lipsă a alterării în microbiotă între pacienți și subiecții sănătoși [10]. *Parabacteroides distasonis* au fost propuse pentru tratarea unei varietăți de tulburări incluzând astmul, artrita reumatoidă și scleroza multiplă [20].
45

Ca și astmul și artrita reumatoidă, scleroza multiplă este în primul rând mediată de sistemul imunitar. Sistemul imunitar atacă axonii mielinăți în sistemul nervos central, distrugând plăcile sau leziunile denumite mielină. Demyelinarea apare în particular în nervii optici, măduva spinării subpială, trunchiul cerebral, cerebel, și regiunile materiei albe juxtacorticale și periventriculare.
50

Ca atare, scleroza multiplă are o patologie diferită de a altor boli neurodegenerative, cum ar fi boala Parkinson, boala Alzheimer sau demența. De exemplu, scleroza multiplă este diagnosticată în mod obișnuit la pacienți de 20 ani și de 30 ani, în timp ce multe alte boli neurodegenerative, cum ar fi boala Parkinson, Alzheimer și demența, sunt diagnosticate predominant la pacienți cu vârste de peste 65 ani.
55

Boala Parkinson, la fel ca multe boli neurodegenerative, este în primul rând mediată de acumularea de proteină pliată greșit. Boala Parkinson este o sinucleinopatologie care implică acumularea de α -sinucleină, care se agregă ca fibrile insolubile în corpi Lewy în citoplasma

corpului neuronal. Acumularea de α -sinucleină este toxică și afectează funcțiile mitocondriilor, lizozomilor, și reticulului endoplasmatic, și interferează cu transportul microtubulelor.

Medicamentele antiinflamatorii nonsteroidiene (NSAID) cum ar fi ibuprofenul, au fost testate pentru eficacitatea lor în tratarea unei varietăți de boli neurologice, dar impactul clinic al NSAID asupra bolilor neurodegenerative cum ar fi boala Parkinson rămâne neclar. În timp ce unele studii au arătat că utilizarea NSAID cronică este protectoare împotriva bolii Parkinson, alte studii nu ar putea confirma existența unei relații semnificative. O meta analiză recentă a indicat că utilizarea de NSAID neaspirinice, în special ibuprofen, reduce riscul de PD cu 15% în timp ce utilizarea aspirinei nu a prezentat nici un efect [21].

În prezent, efectul practic al legăturii între microbiom și bolile creierului uman este slab caracterizat. Corespunzător, sunt necesare studii analitice mai directe pentru a identifica impactul terapeutic al alterării microbiomului asupra tulburărilor neurodegenerative.

Există o cerință în domeniu pentru noi metode de tratare a tulburărilor neurodegenerative. Există de asemenea o cerință pentru efecte potențiale ale bacteriei intestinale de a fi caracterizată astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii utilizând bacteria intestinală.

WO2016/203220 descrie compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides* pentru utilizare într-o metodă de tratament sau prevenire a bolilor inflamatorii și autoimune mediate de IL-17 sau de calea T_H17. Yang Fang și colab. (Int J Clin Exp Med 2016;9(9):17946-17951) descriu niveluri mai ridicate de citokine în sangele periferic al pacienților cu boala Parkinson în comparație cu un grup de control sănătos. Waisman Ari și colab. (Acta Neuropathol 2015; 129:625-637) descriu IL-17 și rolul său în sistemul nervos central.

REZUMATUL INVENȚIEI

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea tulburărilor neurodegenerative. Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Parabacteroides* pot fi eficiente pentru tratarea bolilor neurodegenerative. Cum s-a descris în exemple, administrarea compozițiilor cuprinzând *Parabacteroides distasonis* poate proteja împotriva speciilor reactive de oxigen și preveni inflamația, care acționează astfel ca neuroprotector. Inventatorii au identificat de asemenea că tratamentul cu *Parabacteroides distasonis* poate reduce activarea de molecule proinflamatoare, cum ar fi NF κ B și IL-6, prin LPS și α -sinucleina mutantă A53T. Inventatorii au identificat că tratamentul cu *Parabacteroides distasonis* poate reduce activitatea de deacetilare histonă și peroxidare lipidă *in vitro*, care poate ajuta la reducerea morții celulei și apoptozei. Inventatorii au identificat de asemenea că *Parabacteroides distasonis* poate produce indol care poate atenua inflamația și stresul oxidativ. Mai mult, inventatorii au demonstrat că tratamentul cu *Parabacteroides distasonis* poate crește nivelurile de kinurenine.

Inventatorii au descoperit de asemenea că tratamentul cu *Parabacteroides distasonis* crește activarea de BDNF. BDNF este un factor neurotrofic de creștere care a dovedit că sporește diferențierea și supraviețuirea neuronilor. Astfel, compozițiile invenției pot fi utilizate într-o metodă de amplificare a supraviețuirii celulei nervoase în tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative.

Invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: boală Parkinson, inclusiv paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicament; boală Alzheimer, inclusiv sindrom Benson; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală a neuronului motor; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, inclusiv corpi Lewy, demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV și degenerare corticobazală.

În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson, cum ar fi din mediu, familial sau Parkinson asociat cu stări inflamatorii generale. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini *Parabacteroides* poate reduce activarea moleculelor proinflamatoare, cum ar fi NF κ B și IL-6, prin LPS și α -sinucleina mutantă A53T în modelele *in vitro* de Parkinson din mediu și familial. În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană a speciilor *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson. Compozițiile utilizând *Parabacteroides distasonis* pot fi în special eficiente pentru tratarea Parkinsonului.

În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii neurodegenerative cu debut timpuriu. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare într-o metodă de prevenire sau întârziere a debutului sau progresului unei tulburări neurodegenerative.

În realizările preferate ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Parabacteroides distasonis*. Pot fi de asemenea utilizate tulpinile strans asociate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență ARNr 16S care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența ARNr 16S a unei tulpini bacteriene de *Parabacteroides distasonis*. Preferabil, tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16S care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 sau 9. Preferabil, identitatea de secvență este cu SEQ ID NO:9. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are secvența ARNr 16S reprezentată de SEQ ID NO:9.

În anumite realizări, compoziția invenției este pentru administrare orală. Administrarea orală a tulpinilor invenției poate fi eficientă pentru tulburările neurodegenerative. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite livrarea la și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde unul sau mai mulți excipienți acceptabili farmaceutic sau purtători.

În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea compozițiilor stabile care permit livrarea bacteriei.

În anumite realizări, invenția furnizează un produs alimentar cuprinzând compoziția cum s-a descris mai sus.

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția cum s-a descris mai sus.

În anumite realizări ale invenției, compoziția este pentru utilizare în tratarea leziunii creierului. Activitatea neuroprotectoare a compozițiilor invenției și abilitatea lor de a reduce nivelurile de activitate de deacetilază histonă (HDAC) le poate face utile pentru tratarea leziunii creierului. În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral, cum ar fi tratarea leziunii creierului care rezultă dintr-un accident vascular cerebral.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Viabilitatea celulară a celulelor neuroblastom

Figura 2A: Reglare negativă a secreției IL-6 **Figura 2B:** Reglare negativă a secreției IL-8

Figura 3: Inhibarea secreției IL-6 și IL-8 α -sinucleină

Figura 4: Inhibarea de α -sinucleină indusă de activarea promotorului NF κ B

Figura 5: Inhibarea de LPS indusă de activarea promotorului NF κ B

Figura 6: Modificare în capacitatea antioxidantă

Figura 7: Modificare în capacitatea antioxidantă totală (oxidare lipidă)

Figura 8: Modificare în activitatea de deacetilază histonă (HDAC)

Figura 9: Nivel de producție de indol

Figura 10: Nivel de producție de kirumenine

Figura 11: Neuro protecție - viabilitate celulară. Figura 11 prezintă aceleași date ca Figura 1.

Figura 12: Niveluri de producție de metaboliți - neurotransmițători în creier

Figura 13: Niveluri de producție de metaboliți - acizi organici în supernatantul

Figura 14: Efect asupra funcționării barierei intestinale

Figura 15: Nivel de producție BDNF

Figura 16: Modificare în nivelurile ROS în (A) celule U373, (B) celule SH-SY5Y

Figura 17: Producție de neurotransmițători în creier

Figura 18: Modificări în expresia receptorului hipocampal - A) receptor oxitocin, B) receptor vasopresin, C) receptor glucocorticoid și D) receptor mineralocorticoid

Figura 19: Modificări în expresia hipocampală a A) hormonului de eliberare a corticotropinei (CRH), B) expresiei BDNF și C) TLR4

Figura 20: A) Modificări în expresia receptorului 1 al hormonului de eliberare a corticotropinei hipocampale (CRFR1) și B) expresia receptorului 2 al hormonului de eliberare a corticotropinei (CRFR2)

Figura 21: Modificări în expresia hipocampală a A) factorului de necroză tumorală, B) interleukinei 1b și C) IL-6

Figura 22: A) Modificări în expresia alfa M integrinei hipocampale (CD11b) și B) modificări în expresia receptorului 1A de serotonină hipocampală (receptor 5-HT1A)

Figura 23: A) Modificări în expresia subunității 2A de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat hipocampal (Grin2A) și B) subunității 2B de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2B)

Figura 24: Modificări în expresia hipocampală a A) receptorului 2 al acidului A gama-aminobutiric (GABA A2), B) receptorului 1 al acidului B gama-aminobutiric (GABA BR1) și C) receptorului 1 de dopamină (DRD1)

5 **Figura 25:** Modificări în expresia receptorului de amigdală - A) receptor oxitocin, B) receptor vasopresin, C) receptor glucocorticoid și D) receptor mineralocorticoid

Figura 26: Modificări în expresia amigdală de A) factor neurotrofic derivat din creier (BDNF), B) receptor 4 de tip Toll (TLR-4), C) receptor 1 al hormonului de eliberare a corticotropinei (CRFR1) și D) receptor 2 al hormonului de eliberare a corticotropinei (CRFR2)

10 **Figura 27:** Modificări în expresia amigdală de A) alfa M integrină (CD11b), B) Interleukină-6 (IL-6), C) subunitate 2A de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2A) și D) subunitate 2B de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2B)

Figura 28: Modificări în expresia amigdală de A) subunitate alfa 2 a receptorului GABA-A (GABRA2), B) subunitate a receptorului 1 de tip B al GABA-A (GABBR1) și C) receptor 1 de dopamină (DRD1)

15 **Figura 29:** Modificări în expresia cortexului prefrontal al A) receptorului oxitocin, B) factorului neurotrofic derivat din creier (BDNF), C) receptorului mineralocorticoid și D) receptorului glucocorticoid

Figura 30: Modificări în expresia cortexului prefrontal al A) receptorului 4 de tip Toll (TLR-4), B) receptorului 1 al hormonului de eliberare a corticotropinei (CRFR1), C) receptorului 2 al hormonului de eliberare a corticotropinei (CRFR2) și alfa M integrinei (CD11b)

20 **Figura 31:** Modificări în expresia cortexului prefrontal al A) Interleukinei-6 (IL-6), B) subunității 2A de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2A), C) subunității 2B de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2B) și D) subunității alfa 2 a receptorului GABA-A (GABRA2)

25 **Figura 32:** Modificări în expresia cortexului prefrontal al A) subunității 1 a receptorului de tip B al receptorului GABA-A (GABBR1) și B) receptorului 1 de dopamină (DRD1)

Figura 33: Modificări în expresia colonului de A) Triptofan Hidroxilază-1 (Tph1) și B) Indolamină2,3-Dioxigenază-1 (IDO1)

30 **Figura 34:** Modificări în expresia ileumului de A) Triptofan Hidroxilază-1 (Tph1) și B) Indolamină2,3-Dioxigenază-1 (IDO1)

Figura 35: Modificări în circulația nivelurilor metabolite de triptofan A) kinurenine, B) triptofan și C) indice de metabolism kinurenine/triptofan

Figura 36: Efect asupra producției de interferon- γ de la splenocitele de șoarece de la șoareci alimentați cu MRx0005 și MRx0029

35 **Figura 37:** Efect asupra producției de interleukină-1 β de la splenocite

Figura 38: Efect asupra producției de interleukină-6 de la splenocite

Figura 39: Efect asupra producției de factor de necroză tumorală de la splenocite

Figura 40: Efect asupra producției de interleukină-10 de la splenocite

Figura 41: Efect asupra producției de chemoattractant CXCL1 de la splenocite

40 **Figura 42:** Modificări în nivelurile de acid gras ale catenei scurte cecale

Figura 43: Modificări induse de MRx0029 și MRX005 în nivelurile de expresie ale genei de Actină, Villin, Occludin TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 și NSE.

Figura 44: Diferențiere celulară SHSY5Y indusă de MRx0005 și MRx0029. (A-C) Imagini reprezentative de celule imuno etichetate cu Phalloidin și MAP2. (D-F) Imaginile A-C imbinat cu imagini DAPI. (G-I) Celule imunoetichetate cu tubulină β 3. (J-L) imbinat cu imagini DAPI. Amplificare x630. J-K) Analiză de culoare Western a efectelor tratamentului cu MRx0005 și MRx0029 asupra celulelor SHSY5Y. Membranele colorate Western au fost sondate cu anticorpi la MAP2 (M) și tubulină β 3 (N). Actina a fost utilizată ca control de încărcare. Panourile de jos: culori reprezentative de la unul până la șase experimente separate; panourile de sus: intensitate densitometrică relativă.

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

55 Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*. Exemplele demonstrează că bacteriile din acest gen sunt utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative. Tulpinile bacteriene preferate sunt ale speciilor *Parabacteroides distasonis*.

60 Exemple de specii *Parabacteroides* pentru utilizare în invenție includ *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* și *Parabacteroides johnsonii*. *Parabacteroides* seamănă cu *Bacteroides* și sunt gram-negative, obligatoriu anaerobe, care nu formează spori, nemotile și în formă de tijă, și de dimensiuni 0,8-1,6 μ m, 1,2-12 μ m. *Parabacteroides distasonis* este una dintre cele mai comune specii în excrementele umane.

5

10

15

20

25

30

35

45

50

55

60

din WO2018229189 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO2018229189, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO:10 din WO2018229189 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO2018229189, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO:10 din WO2018229189 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO2018229189, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO:10 din WO2018229189 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO2018229189, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO:10 din WO2018229189 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO2018229189.

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri de bacterii depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin utilizarea analizei fragmentului de depozit și restricție cu numărul de acces NCIMB 42382 și/sau analizei PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului cu lungimea fragmentului amplificată fluorescent (FAFLP) și a amprente (rep)-PCR a elementului ADN repetitiv, sau a profilului proteinei, sau a secvențierii ADN parțială 16S sau 23S. În realizările preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini *Parabacteroides distasonis*.

În anumite realizări, tulpinile care sunt biotipuri de bacterii depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același tipar ca bacteriile depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 când s-au analizat prin analiză de restricție ADN ribozomală amplificată (ARDRA), de exemplu când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru exemple de metode și ghidări vezi, de exemplu [24]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași tipare de fermentare a carbohidraților ca bacteriile depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382.

Alte tulpini *Parabacteroides* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipurile de bacterii depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382, pot fi identificate utilizând orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv testele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin cultivare cu celule neuroblastom și apoi evaluând nivelurile citokinelor și nivelurile de neuroprotecție sau neuroproliferație. În particular, tulpinile bacteriene care au tipare de creștere similare, antigeni de tip metabolic și/sau de suprafață cu bacteriile depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea activitate modulatorie imună comparabilă cu tulpina NCIMB 42382. În particular, o tulpină biotip va declanșa efecte comparabile asupra modelelor neurodegenerative de boală și efecte comparabile asupra nivelurilor citokinelor cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple.

O tulpină în special preferată divulgată aici este tulpina *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382. Acesta este exemplul de tulpină 755 testat în exemple și prezentat a fi eficient pentru tratarea bolii. Prin urmare, divulgarea furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia. Divulgarea furnizează de asemenea o compoziție cuprinzând o celulă de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia. Divulgarea furnizează de asemenea o cultură biologică pură de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382. Invenția furnizează de asemenea o celulă de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382, pentru utilizare în terapie pentru bolile descrise aici.

Un derivat al tulpinei depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat de tulpină al invenției poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără ablația activității biologice. În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea activitate modulatorie imună comparabilă cu tulpina NCIMB 42382 originală. În particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile pe modelele de boli neurodegenerative și efecte comparabile pe nivelurile citokinelor cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple. Un derivat al tulpinei NCIMB 42382 va fi în general un biotip de tulpină NCIMB 42382.

Referirile la celulele de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpinile depozitate sub numărul de acces NCIMB 42382, și astfel de celule sunt cuprinse în invenție.

În realizările preferate, tulpinile bacteriene din compozițiile invenției sunt viabile și capabile de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

Inventatorii au descoperit că tulpinile *Parabacteroides distasonis* reduc secreția de citokine proinflamatorii cum ar fi IL-6 și IL-8. IL-8 au fost implicate în formarea tecii de mielină. Inflamație cronică indusă de IL-6 poate conduce în final la moartea celulei. Prin urmare, tulpinile bacteriene ale invenției sunt în special utile în tratamentul sau prevenirea tulburărilor

neurodegenerative. În unele realizări, tulpinile bacteriene sunt utile în tratamentul afecțiunilor caracterizate prin activarea sporită de IL-6. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative caracterizate prin demielinare. Multe boli neurodegenerative sunt caracterizate de demielinare. Demielinarea împiedică propagarea de acțiune potențială cu neuronii, afectând comunicația eficientă în sistemul nervos. S-a arătat că IL-8 contribuie pozitiv la formarea și repararea tecii de mielină. MRx0029 crește *per se* secreția de IL-8. Prin urmare, compozițiile invenției sunt în special benefice în tratamentul sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative caracterizate prin demielinare.

Inventatorii au descoperit de asemenea că tulpinile bacteriene ale invenției cresc activarea de BDNF. BDNF este un factor neurotrofic de creștere care s-a dovedit că sporește diferențierea și supraviețuirea neuronilor. Astfel, compozițiile invenției pot fi utilizate într-o metodă de amplificare a supraviețuirii celulei nervoase în tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative.

O bacterie suplimentară care poate fi utilizată în compozițiile invenției este specia *Megasphaera massiliensis*. Exemplele demonstrează că *Parabacteroides distasonis* și *Megasphaera massiliensis* au ambele activități neuroprotectoare, dar produc metaboliți diferiți și pot avea mecanisme de acțiune diferite și activități neuroprotectoare specifice. Prin urmare, aceste specii pot fi în special eficiente când sunt utilizate în combinație. În realizările preferate, compoziția cuprinde o tulpină a speciilor *Parabacteroides distasonis* și o tulpină a speciilor *Megasphaera massiliensis*.

Bacteria *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382 a fost testată în exemple și este de asemenea cea la care se face referire în acest document ca tulpină MRx0005. MRx0005, MRx005, MRx005 și MRx0005 sunt utilizate aici interschimbabil. O secvență ARNr 16S pentru tulpina MRx0005 care a fost testat este prevăzută în SEQ ID NO:9. Tulpina MRx0005 a fost depozitată cu autoritatea de depozitare internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) de GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) pe 12 martie 2015 ca „*Parabacteroides sp 755*” și i-a fost asigat numărul de acces NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. și-a modificat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

Tulpina *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787 este exemplul de tulpină MRx0029 testat în exemple și prezentată a fi eficientă pentru tratarea bolii. Tulpina NCIMB 42787 a fost depozitată cu autoritatea de depozitare internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland) de 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland) pe 26 iulie 2017 ca „*Megasphaera massiliensis MRx0029*” și i-a fost asigat numărul de acces NCIMB 42787. Prin urmare, divulgarea furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, de tulpină *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787, sau un derivat al acesteia. Divulgarea furnizează de asemenea o compoziție cuprinzând o celulă de tulpină *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787, sau un derivat al acesteia. Divulgarea furnizează de asemenea o cultură biologic pură de tulpină *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787. Divulgarea furnizează de asemenea o celulă de tulpină *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787, sau un derivat al acesteia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise aici.

În unele realizări, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând tulpina depozitată la NCIMB sub numărul de acces NCIMB 42787, sau un derivat sau biotip al acesteia, și tulpina depozitată la NCIMB sub numărul de acces NCIMB 42382, sau un derivat sau biotip al acesteia, preferabil pentru utilizare în terapie, preferabil pentru utilizare în tratarea unei boli neurodegenerative cum ar fi boala Parkinson.

Utilizări terapeutice

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene ale invenției sunt eficiente pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative. În particular, tratamentul cu compozițiile invenției creștere neuroproliferarea și acționează ca neuroprotector împotriva agenților care distrug neuronii dopaminergici. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative care sunt rezultatul morții neuronilor.

Compozițiile invenției pot scăde activarea promotorului NFκB, care activează producția de citokine, de exemplu IL-1β, IL-1α, IL-18, TNFα și IL-6. Tratarea celulelor cu α-sinucleină mutantă este un model pentru Parkinsonul familial. O mutație punctuală la poziția 53 din adenină la treonină conduce la plierea greșită a α-sinucleinei. α-sinucleina pliată incorect se agregă ulterior în fibrile insolubile care formează corpi Lewy. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative care sunt rezultatul neuroinflamației, plierii inadecvate a proteinei și/sau expunerii la mediu. Compozițiile invenției pot fi utilizate

pentru tratamentul Parkinsonului familial. Activarea promotorului NF κ B este mediată prin ligandul TLR4. TLR4 este cunoscut pentru medierea morții celulei pe modelul MPTP la șoarece, care simulează boala Parkinson. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a inhiba abilitatea de semnalizare TLR4 pentru a activa promotorul NF κ B. De o relevanță particulară pentru PD, ambii

5 TLR2 și TLR4 au fost găsiți ca fiind reglați pozitiv în creierile pacienților cu PD [25]. Mai mult, α -syn a fost descris ca ligand pentru TLR2 [26] și am demonstrat că α -syn este de asemenea un ligand pentru TLR4 utilizând celule HEK-TLR4.

Compozițiile invenției scad secreția de citokine proinflamatorii cum ar fi IL-6, care poate fi indusă de lipopolizaharidă (LPS). Tratamentul celulelor cu LPS simulează Parkinsonul cauzat de

10 factori din mediu. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a scădea secreția de IL-6. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru tratamentul Parkinsonului din mediu.

S-a postulat că chemokinele au funcții importante în sistemul nervos central (CNS), în plus față de rolul lor principal de migrație direcțională a leucocitelor. Într-o linie celulară de tip precursor de oligodendrocite murine chemokinele MCP-1 nu au crescut proliferarea precursorului

15 de oligodendrocite. În culturile de mielinare primară MCP-1 nu a sporit formarea segmentului de mielină în acest sistem. Inventatorii au descoperit că MRx0005 promovează nivelurile MCP-1. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor MCP-1 în tratamentul bolii.

Bolile neurodegenerative pentru a fi tratate cu compozițiile invenției includ: boală

20 Parkinson, inclusiv paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalie cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicament; boală Alzheimer, inclusiv sindrom Benson; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală a neuronului motor; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, incluzând corpi Lewy, demență vasculară și frontotemporală;

25 afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV, și degenerare corticobazală. O boală neurodegenerativă suplimentară pentru a fi tratată cu compozițiile divulgate aici este neuropatia inflamatorie progresivă.

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi eficiente pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative care apar la pacienții în vârstă. Exemplele arată că compozițiile invenției pot

30 tratata boala Parkinson care este predominant diagnosticată la pacienții peste 65 ani. În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru tratarea pacienților de 65 ani sau mai în vârstă. În alte anumite realizări, pacienții sunt între 40 până la 65 ani. În alte realizări, pacienții sunt mai în vârstă de 40 ani. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unei boli asociate cu vârsta înaintată, de exemplu, o boală diagnosticată după vârsta de 50 ani.

În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în

35 tratarea unei tulburări neurodegenerative mediate sau caracterizate de acumularea de proteină, în particular de proteină pliată greșit.

În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în

40 tratarea unei tulburări neurodegenerative asociate cu pierderea neuronală a materiei gri. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru tratarea unei tulburări neurodegenerative care nu este asociată cu leziunile materiei albe.

În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în

45 tratarea unei tulburări neurodegenerative asociate cu simptome permanente.

În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în

50 tratarea unei tulburări neurodegenerative care nu este o tulburare autoimună. În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în tratarea unei tulburări neurodegenerative care nu este scleroză multiplă.

În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în

55 reducerea morții neuronilor, în particular, în tratamentul tulburărilor neurodegenerative. În anumite realizări, compozițiile divulgate în acest document sunt pentru utilizare în protejarea neuronilor, în particular în tratamentul tulburărilor neurodegenerative.

Proprietățile neuroprotectoare ale compozițiilor invenției, așa cum se arată în exemple, înseamnă că, compozițiile pot fi în special eficiente pentru prevenirea sau întârzierea debutului sau

60 progresului tulburărilor neurodegenerative. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în întârzierea debutului sau progresului unei tulburări neurodegenerative.

Compozițiile invenției pot crește secreția de IL-8. S-a arătat că IL-8 joacă un rol în mielinarea neuronală. În unele realizări, compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a crește

65 secreția de IL-8.

Compozițiile terapeutice ale invenției pot crește activarea de BDNF. BDNF acționează

pe anumiți neuroni ai sistemului nervos central pentru a susține supraviețuirea neuronilor existenți și ajuta la creșterea și dezvoltarea de noi neuroni și sinapse. BDNF este activ în

hipocampus, cortex și antecreierul bazal, și este important pentru memoria pe termen lung. Compozițiile invenției pot fi prin urmare utilizate pentru a crește secreția de BDNF. Compozițiile pot fi prin urmare utilizate în tratamentul bolilor neurodegenerative asociate cu deprecierea memoriei pe termen lung. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru îmbunătățirea memoriei pe termen lung, în particular pentru îmbunătățirea memoriei pe termen lung care este alterată de o boală neurodegenerativă.

În anumite realizări, compozițiile invenției cresc activitatea metabolică a mitocondriilor în celulele neuronale.

Modularea axei microbiotă-intestin-creier

Comunicația între intestin și creier (axa microbiotă-intestin-creier) are loc printr-un sistem de comunicație neurohumoral bidirecțional. Dovezi recente arată că microbiota care rezidă în intestin poate modula dezvoltarea creierului și produce fenotipuri comportamentale prin axa microbiotă-intestin-creier. Într-adevăr, un număr de revizii sugerează un rol al axei microbiotă-intestin-creier în menținerea funcționalității sistemului nervos central și au implicat disfuncția axei microbiotă-intestin-creier în dezvoltarea tulburărilor și afecțiunilor sistemului nervos central [16-27].

Comunicația bidirecțională între creier și intestin (*adică* axa -intestin-creier) include sistemul nervos central, sistemele neuroendocrine și neuroimunitare, incluzând axa hipotalamus-pituitar-adrenal (HPA), brațele simpatice și parasimpatice ale sistemului nervos autonom (ANS), inclusiv sistemul nervos enteric (ENS) și nervul vag, și microbiota intestinală.

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile prezentei invenții pot modula axa microbiotă-intestin-creier și reduce moartea celulei asociate cu tulburările neurodegenerative. Corespunzător, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative, în particular a acelor tulburări și afecțiuni asociate cu disfuncția axei microbiotă-intestin-creier.

Compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: boală Parkinson, inclusiv paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, inclusiv sindrom Benson; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală a neuronului motor; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență; incluzând corpi Lewy; demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV și degenerare corticobazală.

Compozițiile invenției pot fi în special utile pentru tratarea sau prevenirea bolii cronice, tratarea sau prevenirea bolii la pacienții care nu au răspuns la alte terapii (cum ar fi tratamentul cu Levodopa, agoniști de dopamină, inhibitori MAO-B, inhibitori COMT, antagoniști Glutamat, și/sau anticolinergice), și/sau tratarea sau prevenirea deteriorării țesutului și simptomele asociate cu disfuncția axei microbiotă-intestin-creier.

În anumite realizări, compozițiile invenției modulează CNS. În unele realizări, compozițiile invenției modulează sistemul nervos autonom (ANS). În unele realizări, compozițiile invenției modulează sistemul nervos enteric (ENS). În unele realizări, compozițiile invenției modulează axa hipotalamică, pituitară, adrenală (HPA). În unele realizări, compozițiile invenției modulează calea neuroendocrină. În unele realizări, compozițiile invenției modulează calea neuroimună. În unele realizări, compozițiile invenției modulează CNS, ANS, ENS, axa HPA și/sau căile neuroendocrine și neuroimune. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de metaboliți comensali și/sau permeabilitatea gastrointestinală a unui subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a modula sistemul dopaminergic.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către sistemele neurale. Corespunzător, în unele realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea în sistemele neurale. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea sistemului nervos central. În unele realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea în neuronii senzoriali. În alte realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea în neuronii motori. În unele realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea în ANS. În unele realizări, ANS este sistemul nervos parasimpatic. În realizările preferate, compozițiile invenției modulează semnalizarea nervului vag. În alte realizări, ANS este sistemul nervos simpatic. În alte realizări, compozițiile invenției modulează semnalizarea în sistemul nervos enteric. În anumite realizări, semnalizarea neuronilor ANS și ENS răspunde direct la conținuturile lumenale ale tractului gastrointestinal. În alte realizări, semnalizarea neuronilor ANS și ENS răspunde indirect la substanțele neurochimice produse de bacteria luminală. În alte realizări, semnalizarea neuronilor ANS și ENS răspunde la substanțele neurochimice produse de bacteria luminală sau de celulele enteroendocrine. În anumite

realizări preferate, neuronii aferenților vagali care activează ENS, influențează funcțiile CNS. În unele realizări, compozițiile invenției reglează activitatea celulelor enterocromafine.

Boli neurodegenerative

5 Tauopatiile sunt boli neurodegenerative asociate cu agregarea patologică a proteinei tau în încălțirile neurofibriliare sau gliofibriliare din creierul uman. Boala Alzheimer este un exemplu al unei tauopatologii. Sinucleinopatiile (denumite de asemenea α -Sinucleinopatii) sunt boli neurodegenerative caracterizate prin acumularea anormală de agregate de α -sinucleină în neuroni, fibre nervoase sau celule gliale. Boala Parkinson este un exemplu al unei sinucleinopatologii.

10 Există suprapunere clinică și patologică între aceste două patologii. Pacienții cu boală Parkinson au frecvent demență și pacienții cu boală Alzheimer manifestă adesea parkinsonism [28]. De exemplu, paralizia supranucleară progresivă (cunoscută de asemenea ca sindrom Steele-Richardson-Olszewski) are o tauopatologie, dar conduce de asemenea la parkinsonism proeminent [29]. Mutațiile în *LRRK2* cunoscute că cauzează parkinsonism sunt asociate cu acumularea de sinucleină, tau, nici una, sau ambele proteine [30].

15 Boala cu corpi Lewy (LBD) este o boală neurodegenerativă care este una dintre cauzele cele mai comune de demență la vârstnici. LBD exemplifică existența unui continuum între patologiiile tau și sinucleină. LBD partajează caracteristicile clinice și patologice cu boala Parkinson, demența bolii Parkinson și boala Alzheimer [28].

20 În realizări particulare, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea tauopatiilor și/sau sinucleinopatiilor. În realizări particulare, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea tauopatiilor. În realizări particulare, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea sinucleinopatiilor. În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: boală Parkinson, inclusiv paralizia supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și
25 parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, inclusiv sindrom Benson; și demență; incluzând corpi Lewy; demență vasculară și frontotemporală.

În realizările preferate, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea bolii Parkinson, inclusiv a paraliziei supranucleare progresive, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și
30 parkinsonism indus de medicamente. În realizările preferate, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea bolii Alzheimer, inclusiv sindrom Benson. În alte realizări preferate, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea demenței; incluzând corpi Lewy; demență vasculară și frontotemporală.

Boala Parkinson

35 Boala Parkinson este o boală neurodegenerativă comună caracterizată neuropatologic prin degenerarea populațiilor eterogene de celule neurale (celule producătoare de dopamină). Diagnosticul clinic al bolii Parkinson necesită bradikinezie și cel puțin unul dintre următoarele simptome cheie: tremur în repaus; rigiditate musculară și deprecierea reflexelor posturale. Alte
40 semne și simptome care pot fi prezente sau dezvoltate în timpul progresului bolii sunt tulburările autonome (sialoree, seboare, constipație, tulburări de micțiune, funcționare sexuală, hipotensiune ortostatică, hiperhidroză), tulburări de somn și tulburări în sens de miros sau în sens de temperatură. Boala Parkinson este o boală neurodegenerativă care se poate dezvolta sau persista din cauza disfuncției axei microbiotă-intestin-creier. Prin urmare, în realizările preferate,
45 compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea bolii Parkinson la un subiect.

În alte realizări preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson. Compozițiile cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides* pot îmbunătăți
50 funcțiile motoare și cognitive în modele bolii Parkinson. Tratamentul cu tulpini *Parabacteroides* poate modula semnalizarea în sistemele nervoase central, autonomice și enterice; poate modula activitatea căii axei HPA; poate modula căile neuroendocrine și/sau neuroimune; și poate modula nivelurile de metaboliți comensali, markeri inflamatori și/sau permeabilitatea gastrointestinală a unui subiect, din care toate sunt implicate în neuropatologia bolii Parkinson. În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină
55 bacteriană a speciilor *Parabacteroides distasonis* pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson. Compozițiile utilizând *Parabacteroides distasonis* pot fi în special eficiente pentru tratarea bolii Parkinson.

În realizările preferate, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome ale bolii Parkinson la un subiect. În realizările preferate, compozițiile invenției
60 previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome cheie ale bolii Parkinson la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează bradikinezia la un subiect.

În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează tremurul în repaus; rigiditatea musculară și/sau deprecierea reflexelor posturale la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome asociate cu progresul bolii Parkinson selectat dintre perturbările autonome (sialoree, seboare, constipație, tulburări de micțiune, funcționare sexuală, hipotensiune ortostatică, hiperhidroză), perturbări de somn și perturbări în sens de miros sau în sens de temperatură.

În realizările preferate, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează simptomele depresive comorbide cu boala Parkinson. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc memoria verbală și/sau funcțiile executive. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc atenția, memoria de lucru, fluenta verbală și/sau anxietatea.

În alte realizările preferate, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează disfuncțiile cognitive comorbide cu boala Parkinson.

În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează progresul bolii Parkinson. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează complicațiile motoare mai târzii. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează fluctuațiile motoare mai târzii. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează pierderea neuronală. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele de demență ale bolii Parkinson (PDD). În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează deprecierea funcției executive, atenției și/sau memoriei de lucru. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc neurotransmiterea dopaminergică. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează neurotransmiterea dopaminergică alterată.

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele bolii Parkinson în conformitate cu o scală simptomatică sau de diagnoză. În anumite realizări, testele pentru evaluarea îmbunătățirii simptomatice a funcționării motoare în boala Parkinson este Scala de Notare Unificată a Bolii Parkinson. În particular, UPDRS II ia în considerare activitatea vieții zilnice și UPDRS III ia în considerare examinarea motoare.

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele asociate PDD în conformitate cu un test și/sau scală simptomatică sau de diagnoză. În anumite realizări, testul sau scala sunt selectate dintre Testul de Învățare Verbală Hopkins - Revizuit (HVLT-R); Sistemul Funcției Executive Delis-Kaplan (D-KEFS) Testul de Interefrență Culoare-Cuvant; Scala de Notare a Depresiei Hamilton (HAM-D 17; depresie); Scala de Notare a Anxietății Hamilton (HAM-A; anxietate) și Scala de Notare Unificată a Bolii Parkinson (UPDRS; severitatea simptomului PD).

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc scala de Impresie Clinică Globală - Îmbunătățire Globală (CGI-I) pentru evaluare psihiatrică și tulburări neurologice. În unele realizări, compozițiile invenției afișează un efect pozitiv asupra deprecierii sociale globale și ocupaționale a subiectului cu boală Parkinson.

Boala Alzheimer și demența

În DSM-5, termenul demență a fost înlocuit cu termenii tulburare neurocognitivă majoră și tulburare neurocognitivă ușoară. Tulburarea neurocognitivă este o clasă eterogenă de boli psihiatrice. Cea mai comună tulburare neurocognitivă este boala Alzheimer, urmată de demența vasculară sau forme amestecate ale celor două. Alte forme de tulburări neurodegenerative (de exemplu boală cu corpi Lewy, demență frontotemporală, demență Parkinson, boală Creutzfeldt-Jakob, boală Huntington, și sindrom Wernicke-Korsakoff) sunt însoțite de demență.

Boala Alzheimer și demența sunt de asemenea caracterizate prin pierdere neuronală, astfel că efectele neuroprotectoare și neuroproliferative prezentate în exemple pentru compozițiile invenției au indicat că ele pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea acestor afecțiuni.

Criteriile simptomatice pentru demența sub DSM-5 sunt dovada scăderii cognitive semnificative de la un nivel de performanță anterior în unul sau mai multe domenii cognitive selectate dintre: învățare și memorie; limbaj; funcție executivă; atenție complexă; cogniție perceptual-motoare și socială. Deficitul cognitiv trebuie să interfere cu independența în activitățile zilnice. În plus, deficitul cognitiv nu apare exclusiv în contextul unui delir și nu este mai bine explicat de o altă tulburare mentală (de exemplu MDD sau schizofrenie).

În plus față de simptomul primar, subiecții cu tulburări neurodegenerative afișează simptome comportamentale și psihiatrice incluzând agitare, agresivitate, depresie, anxietate, apatie, psihoză și tulburări în ciclul somn-veghe.

Tulburările neurodegenerative se pot dezvolta sau persista din cauza disfuncției axei microbiotă-intestin-creier. Prin urmare, în realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative la un subiect. În realizările preferate, tulburarea neurodegenerativă este boala Alzheimer. În alte realizări, tulburarea

neurodegenerativă este selectată dintre demență vasculară; forme amestecate de boală Alzheimer și demență vasculară; boală cu corpi Lewy; demență frontotemporală; demență Parkinson; boală Creutzfeldt-Jakob; boală Huntington; și sindrom Wernicke-Korsakoff.

5 În realizările preferate, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome ale tulburărilor neurodegenerative la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează apariția scăderii cognitive la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc nivelul de performanță al unui subiect cu tulburări neurodegenerative în unul sau mai multe domenii cognitive selectate dintre: învățare și memorie; limbaj; funcție executivă; atenție complexă; cogniție perceptual-motoare și socială. În unele
10 realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează apariția unuia sau mai multor simptome comportamentale și psihiatrice asociate cu tulburările neurodegenerative selectate dintre agitare, agresiune, depresie, anxietate, apatie, psihoză și tulburări ale ciclului somn-veghe.

15 În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează boala simptomatică prin intervenția în mecanismele patologice suspectate la un stadiu preclinic. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc modificarea bolii, cu încetinirea sau oprirea progresului simptomului. În unele realizări, încetinirea sau oprirea progresului simptomului se corelează cu dovada de întârziere a procesului neuropatologic de bază. În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele tulburărilor neurodegenerative cuprinzând sporirea cognitivă și îmbunătățirea funcțională. În realizările preferate, compozițiile invenției
20 îmbunătățesc simptomele comportamentale și psihiatrice de demență (BPSD).

În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc abilitatea unui subiect cu tulburare neurodegenerativă de a întreprinde activități zilnice.

În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc atât cogniția cât și funcționarea la un subiect cu boală Alzheimer. În unele realizări, compoziția invenției
25 îmbunătățește obiectivul cognitiv la un subiect cu boală Alzheimer. În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc obiectivul funcțional la un subiect cu boală Alzheimer. În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc obiectivele cognitive și funcționale la un subiect cu boală Alzheimer. În încă alte realizări preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc răspunsul clinic global (obiectivul global) la un subiect cu boală Alzheimer.

30 În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele tulburărilor neurodegenerative în conformitate cu un test simptomatic sau de diagnostic. În anumite realizări, testele pentru evaluarea simptomatică a îmbunătățirii bolii Alzheimer (și a altor tulburări neurodegenerative) sunt selectate dintre obiectivul cognitiv, activitățile vieții zilnice, evaluarea globală a modificării, teste de calitatea vieții asociate cu sănătatea și teste de evaluare
35 comportamentală și simptome psihiatrice de tulburări neurodegenerative.

În anumite realizări, testele obiectivului cognitiv pentru evaluarea îmbunătățirii simptomatice utilizează subscalele cognitive a Scalei de Evaluare a Bolii Alzheimer (ADAS-cog) și scala ADAS clasică. În anumite realizări, îmbunătățirea simptomatică a cogniției este evaluată utilizând Bateria de Teste Neurofiziologice pentru utilizare în boala Alzheimer (NTB).

40 În unele realizări, evaluarea globală a testelor de modificare utilizează scala de Impresie Clinică Globală - Îmbunătățire Globală (CGI-I) pentru evaluare psihiatrică și tulburări neurologice. În unele realizări, scala globală este Impresia pe Bază de Interviu a Clinicianului a Modificării plus (CIBIC-plus). În unele realizări, scala globală este Impresia Globală a Unității de Studiu Cooperativ al Bolii Alzheimer a Clinicianului a Modificării (ADCS-CGIC).

45 În anumite realizări, măsurătorile de calitate a vieții asociată cu sănătatea sunt QOL asociată cu Boala Alzheimer (ADRQL) și QOL Bolii Alzheimer (QOL-AD).

În anumite realizări, testele de evaluare a simptomelor comportamentale și psihiatrice ale tulburărilor neurodegenerative sunt selectate dintre patologia comportamentală în Scala de Notare a Bolii Alzheimer (BEHAVE-AD); Scala de Notare Comportamentală pentru Demență (BRSD);
50 Inventarul Neuropsihiatric (NPI); și Inventarul de Agitare Cohen-Mansfield (CMAI).

În unele realizări, compozițiile invenției sunt în special eficiente la prevenirea, reducerea sau atenuarea tulburărilor neurodegenerative când sunt utilizate în combinație cu o altă terapie pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative. În anumite realizări, astfel de terapii includ inhibitori acetilcolinesterază incluzând donepezil (Aricept®), galantamină (Razadyne®) și
55 rivastigmină (Exelon®), și memantină.

Factori neurochimici, neuropeptide și neurotransmițători și axa microbiotă-intestin-creier

Cum s-a evidențiat mai sus, axa microbiotă-intestin-creier este modulată de către un număr de diferite sisteme fiziologice. Axa microbiotă-intestin-creier este modulată de către un număr de molecule de semnalizare. Alterările în nivelurile acestor molecule de semnalizare conduc
60 la boli neurodegenerative. Experimentele efectuate de inventatori au indicat că administrarea de specii *Parabacteroides*, și în particular *Parabacteroides distasonis*, poate modula nivelurile de

indol și kinurenine. Dereglarea acestor metaboliți poate conduce la boli neurodegenerative, cum ar fi boala Parkinson.

În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de monoamine ale creierului și metaboliții acestora. În realizările preferate metabolitul este kinurenina. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează kinurenina, care este principala cale de metabolism a triptofanului, care servește ca cale de producție a dinucleotidei adenină nicotinamidă (NAD⁺). Kinureninele pot fi metabolizate la compuși neuroactivi cum ar fi acidul kinurenic (KYNA) și 3-hidroxi-1-kinurenina (3-OH-1-KYN), și în etape suplimentare la acidul chinolinic (QUIN). Dereglarea căii kinurenine poate conduce la activarea sistemului imunitar și la acumularea de compuși potențial neurotoxici. Alterările în metabolismul kinureninelor pot fi implicate în dezvoltarea bolii Parkinson. S-a demonstrat că nivelurile de kinurenine sunt scăzute în cortexul frontal, putamen și substantia nigra pars compacta ale pacienților cu PD [31]. Prin urmare, în anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor de kinurenine în tratamentul bolii Parkinson.

În anumite realizări ale invenției, compozițiile invenției pot crește nivelurile de kinurenină. S-a demonstrat că nivelurile crescute de kinurenină atenuează moartea celulei neuronale indusă de MPP⁺ *in vitro* într-o linie celulară neuroblastom dopaminergică umană [32]. În anumite realizări kinurenina și acidul kinurenic, pot activa receptorul de hidrocarbură aril GI (Ahr) și receptorii GPR35. Activarea receptorului Ahr induce producția de IL-22, care poate inhiba inflamația locală. Activarea GPR35 induce producția de inozitol trifosfat și mobilizarea Ca²⁺.

În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de indol. În realizările preferate metabolitul este kinurenina. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează căile kinurenine, care constituie calea principală a metabolismului de triptofan.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de niveluri de factori neurochimici, neuropeptide și neurotransmițători. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de factori neurochimici, neuropeptide și neurotransmițători. Corespunzător, în anumite realizări preferate, compozițiile invenției alterează direct biochimia CNS.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de niveluri de acid γ -aminobutiric (GABA). Corespunzător, în realizările preferate, compozițiile invenției modulează nivelurile de GABA. GABA este un neurotransmițător inhibitor care reduce excitabilitatea neuronală. În anumite realizări, compozițiile invenției cresc nivelurile de GABA. În anumite realizări, compozițiile invenției scad nivelurile de GABA. În anumite realizări, compozițiile invenției alterează neurotransmiterea GABAergică. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelul de transcripție GABA în diferite regiuni ale sistemului nervos central. În anumite realizări, derivatele comensale GABA traversează bariera hematoencefalică și afectează direct neurotransmiterea. În anumite realizări, compozițiile invenției conduc la o reducere a GABA în hipocampus, amigdală și/sau locus coeruleus. În anumite realizări, compozițiile invenției conduc la o creștere a GABA în regiunile corticale.

40 **Răspuns imun**

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către alterările în răspunsul imun și factori și markeri inflamatori. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției pot modula răspunsul imun. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile sistemice ale moleculelor de semnalizare neuroimune în circulație. În anumite realizări preferate, compozițiile invenției modulează producția și inflamația de citokine proinflamatorii. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează starea inflamatorie. În anumite realizări, compozițiile invenției scad producția și secreția de IL-6. În anumite realizări, compozițiile invenției scad activarea promotorului NF κ B. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt capabile să moduleze activarea producției de IL-6 prin lipopolizaharida endotoxină proinflamatorie potentă (LPS). În anumite realizări, compozițiile invenției sunt capabile să moduleze activarea promotorului NF κ B prin proteine LPS și α -sinucleină mutantă cum ar fi A53T. Nivelurile crescute în circulație de citokine sunt strâns asociate cu diferite tulburări neurodegenerative, incluzând Parkinson, demență și Alzheimer. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelurilor IL-6 și/sau nivelurilor NF κ B în tratamentul unei tulburări neurodegenerative.

În unele realizări, compozițiile invenției cresc secreția de IL-8. S-a arătat că IL-8 induce formarea tecii de mielină și reface sau conservă comunicația neuronală eficientă. Astfel, în unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în inducerea formării tecii de mielină în tratamentul bolilor neurodegenerative. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în refacerea comunicației neuronale. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în conservarea comunicației neuronale.

Semnălizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de niveluri de metaboliți comensali. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile sistemice de metaboliți ai microbiotei. În anumite realizări preferate, compozițiile invenției modulează nivelul de acizi grași cu catenă scurtă (SCFA). În anumite realizări nivelul de SCFA este crescut sau scăzut. În unele realizări, SCFA este acidul butiric (BA) (sau butiratul). În unele realizări, SCFA este acidul propionic (PPA). În unele realizări, SCFA este acidul acetic. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează abilitatea SCFA de a traversa bariera hematoencefalică.

Acetilarea și deacetilarea histonă sunt regulatori epigenetici importanți ai expresiei genei. Un dezechilibru în acetilarea și deacetilarea histonă poate conduce la apoptoză. Dereglarea de astfel de acetiltransferaze histone a fost implicată în patogeniza asociată cu bolile neurodegenerative asociate cu vârsta, cum ar fi boala Parkinson, boala Huntington, boala Alzheimer, scleroza laterală amiotrofică și scăderea cognitivă [33]. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției pot modula activitatea de deacetilază histonă. În anumite realizări, compozițiile invenției pot reduce activitatea de deacetilază histonă. În anumite realizări, compozițiile invenției pot reduce activitatea de acetilază histonă.

Pacienții cu boli neurodegenerative, incluzând boala Parkinson, boala Huntington, boala Alzheimer și scleroza laterală amiotrofică, prezintă niveluri ridicate de peroxidare lipidică. Lipidele sunt vulnerabile la oxidare cu specii reactive de oxigen, și creierul este bogat în acizi grași polinesaturați. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției pot modula peroxidarea lipidică. În anumite realizări, compozițiile invenției poate reduce peroxidarea lipidică. Reducerea deteriorării oxidative cauzate de speciile reactive de oxigen poate fi utilizată pentru a ținti din timp stadiile de boli neurodegenerative. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea stadiului timpuriu de neurodegenerare. De asemenea corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea dezvoltării unei tulburări neurodegenerative. În astfel de realizări, compozițiile invenției pot fi pentru utilizare la un pacient care a fost identificat cu risc de a dezvolta o tulburare neurodegenerativă.

Semnălizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de niveluri de permeabilitate gastrointestinale. Corespunzător, în unele realizări, compozițiile invenției alterează integritatea epiteliului tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează permeabilitatea tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează funcționarea barierei și integritatea tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează motilitatea tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează translocarea metaboliților comensali și moleculelor inflamatorii de semnălizare în fluxul sanguin din lumenul tractului gastrointestinal.

Semnălizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către compoziția microbiomei în tractul gastrointestinal. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției modulează compoziția microbiomei tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției previn disbioza microbiomei și creșterea asociată în metaboliți toxici (de exemplu LPS). În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de Clostridium în tractul gastrointestinal. În realizările preferate, compozițiile invenției reduc nivelul de Clostridium în tractul gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc nivelurile de Campilobacter jejuni. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează proliferarea de bacterii anaerobe nocive și producția de neurotoxine produsă de aceste bacterii. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile microbiome de Lactobacillus și/sau Bifidobacterium. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile microbiome de Sutterella, Prevotella, Ruminococcus genera și/sau ale familiei Alcaligenaceae. În anumite realizări, compozițiile invenției cresc nivelul de Lactobacillus plantarum și/sau Saccharomyces boulardii.

50 **Leziunea creierului**

Exemplele demonstrează că compozițiile invenției sunt neuroprotectoare și au activitate inhibitoare HDAC. HDAC2 este o țintă crucială pentru recuperarea funcțională dintr-un accident vascular cerebral [34] și inhibarea HDAC poate preveni leziunea materiei albe [35], astfel încât compozițiile invenției pot fi utile în tratamentul leziunii creierului.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului. În unele realizări, leziunea creierului este o leziune traumatică a creierului. În unele realizări, leziunea creierului este o leziune a creierului dobândită. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă din traumă. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă dintr-o tumoră. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă dintr-un accident vascular cerebral. În unele realizări, compozițiile invenției

sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă dintr-o hemoragie a creierului. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă din encefalită. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă din hipoxie cerebrală. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru

5 utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă din anoxie cerebrală.

În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral. Efectele prezentate în exemple sunt în special relevante pentru tratamentul unui accident vascular cerebral. Accidentul vascular cerebral are loc când curgerea sângelui la cel puțin o parte din creier este întreruptă. Fără o alimentare adecvată cu sânge pentru a furniza oxigen și

10 nutrienți la țesutul cerebral și pentru a îndepărta deșeurile produse din țesutul cerebral, celulele creierului încep rapid să moară. Simptomele accidentului vascular cerebral sunt dependente de regiunea creierului care este afectată de curgerea inadecvată a sângelui. Simptomele includ paralizie, amorteală sau slăbiciune a mușchilor, pierderea echilibrului, amețală, dureri bruște severe de cap, deprecierea vorbirii, pierderea memoriei, pierderea abilității de motivare, confuzie

15 bruscă, deprecierea vederii, comă sau chiar moarte. Un accident vascular cerebral este de asemenea referit ca atac cerebral sau accident cerebrovascular (CVA). Simptomele accidentului vascular cerebral pot fi scurte dacă curgerea adecvată a sângelui este refăcută într-o perioadă scurtă de timp. Totuși, dacă curgerea inadecvată a sângelui continuă pe o perioadă semnificativă de timp, simptomele pot fi permanente.

În unele realizări, accidentul vascular cerebral este ischemia cerebrală. Ischemia cerebrală rezultă când există o curgere insuficientă a sângelui la țesuturile creierului pentru a îndeplini cererea metabolică. În unele realizări, ischemia cerebrală este ischemia cerebrală focală, adică localizată la o regiune specifică a creierului. În unele realizări ischemia cerebrală este ischemie cerebrală globală, adică cuprinzând o zonă largă a țesutului cerebral. Ischemia cerebrală focală are

25 loc în mod obișnuit când un vas cerebral devine blocat, fie parțial sau complet, reducând fluxul de sânge la o regiune specifică a creierului. În unele realizări ischemia cerebrală focală este accidentul vascular cerebral ischemic. În unele realizări, accidentul vascular cerebral ischemic este trombotic, adică cauzat de o tromboză sau cheag de sânge, care se dezvoltă într-un vas cerebral și restricționează sau blochează curgerea sângelui. În unele realizări accidentul vascular cerebral ischemic este un accident vascular cerebral trombotic. În unele realizări, accidentul vascular cerebral ischemic este embolic, adică cauzat de o embolie, sau o masă neatașată care circulă prin fluxul sanguin și restricționează sau blochează curgerea sângelui la un loc distant față de punctul său de origine. În unele realizări accidentul vascular cerebral ischemic este un accident vascular cerebral embolic. Ischemia cerebrală globală are loc în mod obișnuit când curgerea sângelui la

35 creier ca întreg este blocată sau redusă. În unele realizări ischemia cerebrală globală este cauzată de hipoperfuzie, adică din cauza șocului. În unele realizări ischemia cerebrală globală este un rezultat al unui stop cardiac.

În unele realizări subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit o ischemie cerebrală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit o ischemie cerebrală focală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un accident vascular cerebral ischemic. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un accident vascular cerebral trombotic. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un accident vascular cerebral embolic. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit o ischemie cerebrală globală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit hipoperfuzie. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un stop cardiac.

În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea ischemiei cerebrale. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea ischemiei cerebrale focale. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral ischemic. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral trombotic. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral embolic. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea ischemiei cerebrale globale. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea hipoperfuziei.

În unele realizări, accidentul vascular cerebral este accident vascular cerebral hemoragic. Accidentul vascular cerebral hemoragic este cauzat de sângerarea în, sau în jurul creierului conducând la umflarea, presiunea și deteriorarea celulelor și țesuturilor creierului. Accidentul vascular cerebral hemoragic este în mod obișnuit un rezultat al unui vas de sânge slăbit care se rupe și sângerează împrejurul creierului. În unele realizări, accidentul vascular cerebral hemoragic este o hemoragie intracerebrală, adică cauzată de sângerarea în țesutul cerebral însuși. În unele realizări hemoragia intracerebrală este cauzată de o hemoragie intraparenchimală. În unele

realizări hemoragia intracerebrală este cauzată de o hemoragie intraventriculară. În unele realizări
accidentul vascular cerebral hemoragic este o hemoragie subarahnoidă adică sângerare care apare
în exteriorul țesutului cerebral dar încă în cavitatea craniană. În unele realizări, accidentul vascular
cerebral hemoragic este un rezultat al angiopatiei amiloide cerebrale. În unele realizări, accidentul
5 vascular cerebral hemoragic este un rezultat al unui anevrism cerebral. În unele realizări,
accidentul vascular cerebral hemoragic este un rezultat al malformării arteriovenoase cerebrale
(AVM).

În unele realizări subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un accident
vascular cerebral hemoragic. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a
10 suferit o hemoragie intracerebrală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a
suferit o hemoragie intraparenchimală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea
creierului a suferit o hemoragie intraventriculară. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu
leziunea creierului a suferit o hemoragie subarahnoidă. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu
leziunea creierului a suferit o angiopatie amiloidă cerebrală. În unele realizări, subiectul
15 diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un anevrism cerebral. În unele realizări, subiectul
diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un AVM cerebral.

În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului
vascular cerebral hemoragic. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în
tratarea unei hemoragii intracerebrale. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru
20 utilizare în tratarea unei hemoragii intraparenchimale. În unele realizări, compozițiile invenției
sunt pentru utilizare în tratarea unei hemoragii intraventriculare. În unele realizări, compozițiile
invenției sunt pentru utilizare în tratarea unei hemoragii subarahnoidale. În unele realizări,
compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unei angiopatii amiloide cerebrale. În unele
realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unui anevrism cerebral. În unele
25 realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea AVM cerebral.

Refacerea curgerii adecvate a sângelui la creier după o perioadă de întrerupere, deși
eficientă în atenuarea simptomelor asociate cu accidentul vascular cerebral, poate conduce
paradoxal la deteriorarea în continuare a țesutului cerebral. În timpul perioadei de întrerupere,
țesutul afectat suferă de lipsa oxigenului și nutrienților, și refacerea bruscă a curgerii sângelui
30 poate conduce la inflamație și deteriorare oxidativă prin inducerea de stres oxidativ. Aceasta este
cunoscută ca leziune de reperfuzie, și este bine documentată nu numai după accidentul vascular
cerebral, ci și de asemenea după un atac de cord sau altă deteriorare a țesutului când alimentarea
cu sange se întoarce la țesut după o perioadă de ischemie sau lipsă de oxigen. În unele realizări
subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit de leziune de reperfuzie ca rezultat al
35 accidentului vascular cerebral. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în
tratarea leziunii de reperfuzie ca rezultat al accidentului vascular cerebral.

Un atac ischemic tranzitoriu (TIA), referit adesea ca miniaccident vascular cerebral, este
un semnal de alarmă recunoscut pentru un accident vascular cerebral mai serios. Subiecții care au
suferit unul sau mai multe TIA sunt prin urmare la un risc mai mare de accident vascular cerebral.
40 În unele realizări subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un TIA. În unele realizări,
compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unui TIA. În unele realizări, compozițiile
invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului la un subiect care a suferit un TIA.

Presiunea sanguină ridicată, colesterolul marit în sânge, un istoric familial al accidentului
vascular cerebral, boala de inimă, diabetul, anevrismele cerebrale, malformațiile arteriovenoase,
45 boala celulei seceră, vasculita, tulburările de sângerare, utilizarea unor medicamente
antiinflamatoare nonsteroidiene (NSAID), fumatul, consumul unor cantități mari de alcool,
utilizarea ilegală a medicamentelor, obezitatea, lipsa de activitate fizică și o dietă nesănătoasă sunt
toți considerați a fi factori de risc pentru accidentul vascular cerebral. În particular, scăderea
presiunii sanguine s-a dovedit a fi concludivă pentru a preveni atât accidentul vascular cerebral
50 ischemic cât și hemoragic [36, 37]. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în
tratarea leziunii creierului la un subiect care are cel puțin un factor de risc pentru accidentul
vascular cerebral. În unele realizări subiectul are doi factori de risc pentru accidentul vascular
cerebral. În unele realizări subiectul are trei factori de risc pentru accidentul vascular cerebral. În
unele realizări subiectul are patru factori de risc pentru accidentul vascular cerebral. În unele
55 realizări subiectul are mai mult de patru factori de risc pentru accidentul vascular cerebral. În unele
realizări subiectul are presiune sanguină ridicată. În unele realizări subiectul are colesterol mărit în
sânge. În unele realizări subiectul are un istoric familial al accidentului vascular cerebral. În unele
realizări subiectul are o boală de inimă. În unele realizări subiectul are diabet. În unele realizări
subiectul are un anevrism cerebral. În unele realizări subiectul are malformații arteriovenoase. În
60 unele realizări subiectul are vasculită. În unele realizări subiectul are boala celulei seceră. În unele
realizări subiectul are o tulburare de sângerare. În unele realizări subiectul are un istoric de

utilizarea a unor medicamente antiinflamatoare nonsteroidiene (NSAID). În unele realizări subiectul fumează. În unele realizări subiectul consumă cantități mari de alcool. În unele realizări subiectul utilizează medicamente ilegale. În unele realizări subiectul este obez. În unele realizări subiectul este supraponderal. În unele realizări subiectul are o lipsă de activitate fizică. În unele

5 realizări subiectul are o dietă nesănătoasă.

Exemplele au indicat că compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea leziunii creierului și ajută la recuperare când sunt administrate înainte să apară evenimentul leziunii. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi în special utile pentru tratarea leziunii creierului când sunt administrate subiecților cu risc de leziune a creierului, cum ar fi accidentul vascular cerebral.

10 În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea deteriorării cauzate de o potențială leziune a creierului, preferabil de un accident vascular cerebral. Compozițiile pot reduce deteriorarea cauzată când ele sunt administrate înainte ca potențiala leziune a creierului să aibă loc, în particular când se administrează unui pacient identificat cu risc de leziune a creierului.

15 Exemplele au indicat că compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea leziunii creierului și ajutorarea recuperării când sunt administrate după ce evenimentul de leziune a avut loc. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi în special utile pentru tratarea leziunii creierului când sunt administrate subiecților după o leziune a creierului, cum ar fi accidentul vascular cerebral.

20 În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin reducerea deteriorării motorii. În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea funcției motoare. În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea rezistenței mușchilor. În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea memoriei. În unele realizări, compozițiile invenției

25 tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea recunoașterii sociale. În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea funcționării neurologice.

Tratamentul leziunii creierului se poate referi la, de exemplu, o ameliorare a severității simptomelor. Tratamentul leziunii creierului se poate referi de asemenea la o reducere a deprecierii neurologice după accidentul vascular cerebral. Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea

30 accidentului vascular cerebral pot fi furnizate către subiect înaintea debutului accidentului vascular cerebral, de exemplu la un pacient identificat ca fiind cu risc de accident vascular cerebral. Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate după ce un accident vascular cerebral a avut loc, de exemplu, în timpul recuperării. Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate în timpul fazei

35 acute de recuperare (adică până la o săptămână după accidentul vascular cerebral). Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate în timpul fazei subacute de recuperare (adică de la o săptămână până la trei luni după accidentul vascular cerebral). Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate în timpul fazei cronice de recuperare (de la trei luni după accidentul vascular cerebral).

40 În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în combinație cu un agent activ secundar. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în combinație cu aspirina sau țesutul activator plasminogen (tPA). Alți agenți secundari includ alte antitrombocite (cum ar fi clopidogrel), anticoagulanți (cum ar fi heparine, warfarine, apixaban, dabigatran, edoxaban sau rivaroxaban), antihipertensive (cum ar fi diuretice, inhibitor ai ACE, blocanți ai

45 canalelor de calciu, beta-blocanți sau alfa-blocanți) sau statine. Compozițiile invenției pot îmbunătăți răspunsul pacientului la agentul activ secundar.

În anumite realizări, compozițiile invenției reduc efectul ischemiei pe țesuturi. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc cantitatea deteriorată la țesuturile cauzate de ischemie. În anumite realizări, țesuturile deteriorate de ischemie sunt țesuturi cerebrale. În anumite realizări,

50 compozițiile invenției reduc necroza sau numărul de celule necrotice. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc apoptoza sau numărul de celule apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc numărul de celule necrotice și apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției previn moartea celulei prin necroză și/sau apoptoză. În anumite realizări, compozițiile invenției previn moartea celulei prin necroză și/sau apoptoză cauzate de ischemie. În

55 anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc recuperarea țesutului deteriorat prin ischemie. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc viteza de eliminare a celulelor necrotice și/sau a celulelor apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc eficacitatea de eliminare a celulelor necrotice și/sau a celulelor apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc înlocuirea și/sau regenerarea celulelor în țesuturi. În anumite

60 realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc înlocuirea și/sau regenerarea celulelor în țesuturile

deteriorate de ischemie. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc histologia globală a țesutului (de exemplu după o biopsie).

Moduri de administrare

Preferabil, compozițiile invenției trebuie să fie administrate la tractul gastrointestinal pentru a permite livrarea la și / sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană a invenției. În general, compozițiile invenției sunt administrate oral, dar ele pot fi administrate rectal, intranazal, sau pe cale bucală sau sublinguală.

În anumite realizări, compozițiile invenției poate fi administrate ca spumă, ca pulverizator sau ca gel.

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi administrate ca supozitoare, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unui ulei de teobrom (unt de cacao), grăsime dură sintetică (de exemplu supocire, witepsol), glicero-gelatină, polietilen glicol, sau compoziție de glicerină cu săpun.

În anumite realizări, compoziția invenției este administrată la tractul gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nazogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub de jejunostomie (tub J), gastronomie endoscopică percutanată (PEG), sau un port, cum ar fi un port al peretelui toracic care furnizează acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

Compozițiile invenției pot fi administrate odată, sau ele pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite realizări, compozițiile invenției trebuie să fie administrate zilnic.

În anumite realizări ale invenției, tratamentul conform invenției este însoțit de evaluarea microbiotei intestinului pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă livrarea de și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina invenției nu este obținută astfel încât eficacitatea nu este observată, sau tratamentul poate fi oprit dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală este cu succes și eficacitatea este observată.

În anumite realizări, compoziția invenției poate fi administrată unui animal gestant, de exemplu un mamifer cum ar fi un om pentru a preveni dezvoltarea unei boli inflamatorii sau autoimune la copilul acestuia *in utero* și sau după ce este născut.

Compozițiile invenției pot fi administrate la un pacient care a fost diagnosticat cu o boală neurodegenerativă, sau care a fost identificat ca fiind cu risc de o boală neurodegenerativă. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea de boli neurodegenerative la un pacient sănătos.

Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau absentă cu *Parabacteroides*, și în particular cu *Parabacteroides distasonis*.

Compozițiile invenției pot fi administrate ca produs alimentar, cum ar fi un supliment nutrițional.

În general, compozițiile invenției sunt pentru tratamentul oamenilor, deși ele pot fi utilizate pentru a trata animale incluzând mamifere monogastrice cum ar fi păsări de curte, porci, pisici, câini, cai sau iepuri. Compozițiile invenției pot fi utile pentru sporirea creșterii și performanței animalelor. Dacă se administrează la animale, poate fi utilizat gavajul oral.

Compoziții

În general, compoziția invenției cuprinde bacterii. În realizările preferate ale invenției, compoziția este formulată în formă criodesicată. De exemplu, compoziția invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină tari, cuprinzând o tulpină bacteriană a invenției.

Preferabil, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriei este o procedură bine stabilită și ghidarea relevantă este disponibilă în, de exemplu, referirile [38-40].

Alternativ, compoziția invenției poate cuprinde o cultură bacteriană vie, activă.

În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost inactivată, de exemplu, nu a fost inactivată termic. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost ucisă, de exemplu, nu a fost ucisă termic. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost atenuată, de exemplu, nu a fost atenuată termic. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost ucisă, inactivată și/sau atenuată. De exemplu, în unele realizări, tulpină bacteriană din compoziția invenției este vie. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă și capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

În unele realizări, compoziția cuprinde un amestec de tulpini bacteriene vii și tulpini bacteriene care au fost ucise.

În realizările preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinei bacteriene la intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până când livrarea la locația țintă prin, de exemplu, ruperea cu stimuli chimici sau fizici cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică, sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificări în pH. Poate fi utilizată orice metodă de încapsulare adecvată. Exemple de tehnici de încapsulare includ captarea într-o matrice poroasă, atașarea sau adsorbția pe suprafețe purtătoare solide, autoagregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare, și conținutul mecanic după o membrană microporoasă sau o microcapsulă. Ghidarea despre încapsulare care poate fi utilă pentru prepararea compozițiilor invenției este disponibilă în, de exemplu, referirile [41] și [42].

Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub forma unei tablete, capsule sau pulberi. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Parabacteroides* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse ca eliminatori de oxigen și subtraturi prebiotice pentru a îmbunătăți livrarea și/sau colonizarea și supraviețuirea parțială sau totală *in vivo*. Alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată oral ca aliment sau produs nutrițional, cum ar fi lapte sau zer pe bază de produse lactate fermentate, sau ca produs farmaceutic.

Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană a invenției. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutic dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a conduce la livrarea la și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

O doză zilnică adecvată de bacterie, de exemplu pentru un adult human, poate fi de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități de formare a coloniilor (CFU); de exemplu, de la aproximativ 1×10^7 până la aproximativ 1×10^{10} CFU; într-un alt exemplu de la aproximativ 1×10^6 până la aproximativ 1×10^{10} CFU.

În anumite realizări, compoziția conține tulpină bacteriană într-o cantitate de la aproximativ 1×10^6 până la aproximativ 1×10^{11} CFU/g, în raport cu greutatea compoziției; de exemplu, de la aproximativ 1×10^8 până la aproximativ 1×10^{10} CFU/g. Doza poate fi, de exemplu, de 1 g, 3g, 5g, și 10g.

De obicei, un probiotic, cum ar fi compoziția invenției, este opțional combinat cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este uzual un carbohidrat nedigerabil cum ar fi o oligo sau polizaharidă, sau un alcool din zahăr, care nu este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale cum ar fi inulina și transgalacto-oligozaharidele.

În anumite realizări, compoziția probiotică a prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% din masă, în raport cu greutatea totală a compoziției, (de exemplu de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul constând din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, amidonuri modificate din gumă arabilă și rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre acacia, roșcovă, ovăz, și fibre citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate arătate aici mai jos ca FOSs-c.c); respectivele FOSs-c.c. nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin conversia sfeclei de zahăr și incluzând o moleculă zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt utilizate în combinație cu un alt compus terapeutic pentru tratarea sau prevenirea tulburării neurodegenerative. În unele realizări, compozițiile invenției sunt administrate cu supliment nutrițional care modulează neuroprotecția sau neuroproliferarea. În realizările preferate, suplimentele nutriționale cuprind sau constau din vitamine nutriționale. În anumite realizări, vitaminele sunt vitamina B6, magneziu, dimetilglicină (vitamina B16) și vitamina C. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt administrate în combinație cu un alt probiotic.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în amplificarea efectului unui agent secundar asupra unei boli neurodegenerative. Efectele modulatorie imune ale compozițiilor invenției pot face creierul mai susceptibil la terapiile convenționale cum ar fi Levodopa, agoniști de dopamină, inhibitori MAO-B, inhibitori COMT, antagoniști Glutamat, sau anticolinergice, care sunt exemple de agenți secundari pentru a fi administrați în combinație (secvențial sau simultan) cu compozițiile invenției.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți acceptabili farmaceutic sau purtători. Exemple de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [43]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși,

- de exemplu, în referința [44]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și altele asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, excipientului sau diluantului poate fi selectată cu referire la calea de administrare intenționată și practica farmaceutică standard.
- 5 Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de, purtător, excipient sau diluant orice lianți, lubrifianți, agenți de punere în suspensie, agenți de acoperire, agenți de solubilizare adecvați. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoză, lactoză anhidră, lactoză liber curgătoare, beta-lactoză, îndulcitori din porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilen glicol.
- 10 Exemple de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și altele asemenea. Conservanții, stabilizatorii, coloranții și chiar agenții de aromatizare pot fi furnizați în compoziția farmaceutică. Exemple de conservanți includ benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic. Pot fi de asemenea utilizați antioxidanți și agenți de punere în suspensie.
- 15 Compozițiile invenției pot fi formulate ca produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate asigura beneficiu nutrițional în plus față de efectul terapeutic al invenției, cum ar fi un supliment nutrițional. În mod similar, un produs alimentar poate fi formulat pentru a ameliora gustul compoziției invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru consum, fiind mai similară cu un articol alimentar comun, mai degrabă decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite realizări, compoziția invenției este formulată ca produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” înseamnă orice produs pe bază de lapte sau zer, lichid sau semisolid având un conținut de grăsime variabil. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, lapte integral, lapte recombinat din lapte praf și zer fără nici o procesare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurtul, laptele covăsit, cașul, laptele acrit, laptele integral acrit, caimacul din lapte și alte produse din lapte acrit. Un alt grup important include băuturile din lapte, cum ar fi băuturi din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru nou născuți sau copii, lapte aromat, înghețată; lapte conținând alimente cum ar fi dulciurile.
- 20 În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene din genul *Parabacteroides* și nu conțin bacterii din nici un alt gen, sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-un alt gen. Astfel, în unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând una sau mai multe tulpini bacteriene din genul *Parabacteroides*, care nu conține bacterii din nici un alt gen sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-un alt gen, pentru utilizare în terapie.
- 25 În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Parabacteroides distasonis* și nu conțin bacterii din nici o altă specie, sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă specie. Astfel, în unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Parabacteroides distasonis*, care nu conține bacterii din nici o altă specie sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă specie, pentru utilizare în terapie.
- 30 În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Parabacteroides distasonis* și nu conțin bacterii din nici o altă specie *Parabacteroides*, sau care cuprind numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă specie *Parabacteroides*. Astfel, în unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Parabacteroides distasonis*, care nu conține bacterii din nici o altă specie *Parabacteroides* sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă specie *Parabacteroides*, pentru utilizare în terapie.
- 35 În anumite realizări, compozițiile invenției conțin o singură tulpină bacteriană sau specie și nu conțin nici o altă tulpină bacteriană sau specie. Astfel de compoziții pot cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic din alte tulpini bacteriene sau specii. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial fără alte specii de organisme.
- 40 În unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o singură tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, care nu conține bacterii din nici o altă tulpină sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă tulpină pentru utilizare în terapie.
- 45 În unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o singură tulpină bacteriană a speciilor *Parabacteroides distasonis*, care nu conține bacterii din nici o altă tulpină sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități de bacterii irelevante biologic dintr-o altă tulpină pentru utilizare în terapie.
- 50 În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină bacteriană. De exemplu, în unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai mult de o tulpină din aceleași specii
- 55
- 60

(de exemplu mai mult de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 sau 45 tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 tulpini din aceleași specii (de exemplu mai puțin de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 sau 3 tulpini), și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind 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, sau 31-50 tulpini din aceleași specii și, opțional, nu conțin bacterii din nici o altă specie. Invenția cuprinde orice combinație a celor anterioare.

În unele realizări, compoziția cuprinde un consorțiu microbian. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde tulpina bacteriană *Parabacteroides* ca parte a unui consorțiu microbian. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană *Parabacteroides* este prezentă în combinație cu una sau mai multe (de exemplu cel puțin 2, 3, 4, 5, 10, 15 sau 20) alte tulpini bacteriene din alte genuri cu care ea poate viețui simbiotic *in vivo* în intestin. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde o tulpină bacteriană de *Parabacteroides* în combinație cu o tulpină bacteriană din genuri diferite. În unele realizări, consorțiul microbian cuprinde două sau mai multe tulpini bacteriene obținute dintr-o mostră de excremente a unui singur organism, de exemplu un om. În unele realizări, consorțiul microbian nu este găsit împreună în natură. De exemplu, în unele realizări, consorțiul microbian cuprinde tulpini bacteriene obținute din mostre de excremente de la cel puțin două organisme diferite. În unele realizări, cele două diferite organisme sunt din aceeași specie, de exemplu de la doi oameni diferiți. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un nou născut uman și un adult uman. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un om și un mamifer neuman.

În unele realizări, compoziția invenției cuprinde suplimentar o tulpină bacteriană care are aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpina MRX005, dar care nu este MRx0005, sau care nu este o *Parabacteroides distasonis*.

În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, specii sau genuri, tulpini bacteriene individuale, speciile sau genurile pot fi pentru administrare separată, simultană sau secvențială. De exemplu, compoziția poate cuprinde toate dintre mai mult de o tulpină bacteriană, specii sau genuri, sau tulpinile bacteriene, speciile sau genurile pot fi depozitate separat și administrate separat, simultan sau secvențial. În unele realizări, mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen sunt depozitate separat dar sunt amestecate împreună înainte de utilizare.

În unele realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție este obținută din excremente de adult uman. În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, toate dintre tulpinile bacteriene sunt obținute din excremente de adult uman sau dacă alte tulpini bacteriene sunt prezente, ele sunt prezente numai în cantități *de minimis*. Se poate ca bacteria să fi fost cultivată după ce a fost obținută din excremente de adult uman și să fie utilizată într-o compoziție a invenției.

În unele realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție este obținută din excremente de nou născut uman. În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, toate dintre tulpinile bacteriene sunt obținute din excremente de nou născut uman sau dacă alte tulpini bacteriene sunt prezente, ele sunt prezente numai în cantități *de minimis*. Se poate ca bacteria să fi fost cultivată după ce a fost obținută din excremente de nou născut uman și să fie utilizată într-o compoziție a invenției.

Cum s-a menționat mai sus, în unele realizări, una sau mai multe tulpini bacteriene *Parabacteroides* este/sunt singurul agent activ terapeutic într-o compoziție a invenției. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziție este singurul agent activ terapeutic dintr-o compoziție a invenției.

Compozițiile pentru utilizare conform invenției pot sau pot să nu necesite aprobarea de piață.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este liofilizată. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este pulverizată uscat. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau pulverizată uscat și în care este vie. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau pulverizată uscat și în care este viabilă. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau pulverizată uscat și în care este capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului. În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care tulpina bacteriană este liofilizată sau pulverizată uscat și în care este viabilă și capabilă de colonizarea parțială sau totală a intestinului.

În unele cazuri, tulpina bacteriană liofilizată este reconstituită înainte de administrare. În unele cazuri, reconstituirea este prin utilizarea a unui diluant descris aici.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți acceptabili farmaceutic, diluanți sau purtători.

5 În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare neurodegenerativă când se administrează unui subiect care are nevoie de aceasta.

10 În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata sau preveni o tulburare neurodegenerativă.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de la aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități de formare ale coloniilor pe gram față de o greutate a compoziției.

15 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată la o doză de 1 g, 3 g, 5 g sau 10 g.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată printr-o metodă selectată din grupul constând din orală, rectală, subcutanată, nazală, bucală, și sublinguală.

20 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un purtător selectat din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un diluant selectat din grupul constând din etanol, glicerol și apă.

25 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză liber curgătoare, beta-lactoză, îndulcitor din porumb, acacia, tragacant, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilen glicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

30 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând în plus cel puțin un conservant, un antioxidant și un stabilizator.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un conservant selectat din grupul constând din benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic.

35 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care repectiva tulpină bacteriană este liofilizată.

40 În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care când compoziția este depozitată într-un recipient etanșat la aproximativ 4°C sau la aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă având 50% umiditate relativă, cel puțin 80% din tulpina bacteriană după cum s-a măsurat în unități de formare ale coloniilor, rămâne după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

45 În unele realizări, compoziția invenției este furnizată într-un recipient etanșat cuprinzând o compoziție cum s-a descris aici. În unele realizări, recipientul etanșat este un pliculeț sau sticlă. În unele realizări, compoziția invenției este furnizată într-o seringă cuprinzând o compoziție cum s-a descris aici.

Compoziția din prezenta invenție poate, în unele realizări, să fie furnizată ca formulare farmaceutică. De exemplu, compoziția poate fi urnizată ca tabletă sau capsule. În unele realizări, capsula este o capsulă de gelatină („gel-cap”).

50 În unele realizări, compozițiile invenției sunt administrate oral. Administrarea orală poate implica înghițirea, astfel încât compusul intră în tractul gastrointestinal, și/sau administrarea bucală, linguală, sau sublinguală prin care compusul intră în fluxul sanguin direct din gură.

55 Formulările farmaceutice adecvate pentru administrare orală includ dopuri solide, microparticule solide, semisolidă și lichide (incluzând sisteme cu faze multiple sau dispersate) cum ar fi tabletele; capsule moi sau tari conținând multi sau nanoparticule, lichide (de exemplu soluții apoase), emulsii sau pulberi; pastile (inclusiv umplute cu lichid; gume; geluri; forme de dozare cu dispersare rapidă; filme; ovule; pulverizatoare; și plasturi bucali/mucoadezivi).

60 În unele realizări formularea farmaceutică este o formulare enterică, adică o formulare gastrorezistentă (de exemplu, rezistentă la pH-ul gastric) care este adecvată pentru livrarea compoziției invenției în intestin prin administrare orală. Formulările enterice pot fi în special utile când bacteria sau o altă componentă a compoziției este sensibilă la acid, de exemplu predispusă la degradare sub condiții gastrice.

În unele realizări, formularea enterică cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o formă de dozare acoperită enteric. De exemplu, formularea poate fi o tabletă acoperită enteric sau o capsulă acoperită enteric, sau altele asemenea. Acoperirea enterică poate fi o acoperire enterică convențională, de exemplu, o acoperire convențională pentru o tabletă, capsulă, sau altele asemenea pentru livrare orală. Formularea poate cuprinde un film de acoperire, de exemplu, un strat subțire de film al unui polimer enteric, de exemplu un polimer insolubil în acid.

În unele realizări, formularea enterică este intrinsec enterică, de exemplu, gastrorezistentă fără a necesita o acoperire enterică. Astfel, în unele realizări, formularea este o formulare enterică care nu cuprinde o acoperire enterică. În unele realizări, formularea este o capsulă făcută dintr-un material termogel. În unele realizări, materialul termogel este un material celulozic, cum ar fi metilceluloza, hidroximetilceluloza sau hidroxipropilmetilceluloza (HPMC). În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă care nu conține nici un film de formare a polimerului. În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă și carcasa cuprinde hidroxipropilmetilceluloză și nu cuprinde nici un film de formare a polimerului (vezi de exemplu [45]). În unele realizări, formularea este o capsulă enterică intrinsecă (de exemplu, Vcaps® de la Capsugel).

În unele realizări, formularea este o capsulă moale. Capsulele moi sunt capsule care pot, din cauza adăugării de agenți de înmuiere, cum ar fi, de exemplu, glicerol, sorbitol, maltitol și polietilen glicoli, prezenți în carcasa capsulei, avea o anumită elasticitate și moliciune. Capsulele moi pot fi produse, de exemplu, pe bază de gelatină sau amidon. Capsulele moi pe bază de gelatină sunt disponibile comercial de la diferiți furnizori. Depinzând de metoda de administrare, cum ar fi, de exemplu, orală sau rectală, capsulele moi poate avea diferite forme, ele putând fi, de exemplu, rotunde, ovale, alungite sau în formă de torpilă. Capsulele moi pot fi produse prin procedee convenționale, cum ar fi, de exemplu, prin procedeul Scherer, procedeul Accogel sau procedeul de picurare sau suflare.

Metode de cultivare

Tulpinile bacteriene pentru utilizare din prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici de microbiologie standard cum s-a detaliat în, de exemplu, referirile [46-48].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (pe 100ml, valorile aproximative): Casitonă (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteină (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄ · 7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurin (0,1 mg), hemin (1 mg), biotină (1 μg), cobalamin (1 μg), acid *p*-aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg), și piridoxamină (15 μg).

Tulpini bacteriene pentru utilizare în compozițiile pentru vaccin

Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene ale invenției sunt utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative. Acest lucru este probabil un rezultat al efectului pe care tulpinile bacteriene ale invenției îl au asupra sistemului imunitar al gazdei. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi de asemenea utile pentru prevenirea tulburărilor neurodegenerative, când sunt administrate ca compoziții pentru vaccin. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției pot fi ucise, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de realizări, compozițiile pot cuprinde un adjuvant de vaccin. În anumite realizări, compozițiile sunt pentru administrare prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

General

Practica din prezenta invenție va utiliza, dacă nu se indică altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în competențele domeniului. Astfel de tehnici sunt explicate complet în literatură. Vezi, de exemplu, referirile [49] și [50-56], etc.

Termenul „cuprinzând” cuprinde „incluzând” precum și „constând” de exemplu o compoziție „cuprinzând” X poate consta exclusiv din X sau poate include altceva suplimentar de exemplu X + Y.

Termenul „aproximativ” în raport cu o valoare numerică *x* este opțional și înseamnă, de exemplu, $x \pm 10\%$.

Cuvântul „substanțial” nu exclude „complet” de exemplu o compoziție care este „substanțial fără” Y poate fi complet fără Y. Unde este necesar, cuvântul „substanțial” poate fi omis din definiția invenției.

Referirile la un procentaj de identitate de secvență între două secvențe de nucleotidă înseamnă că, atunci când sunt aliniate, acel procentaj de nucleotide este același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și procente de omologie sau identitate de secvență pot fi determinate utilizând programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [57]. O aliniere preferată este determinată prin algoritmul de căutare a

omologiei Smith-Waterman utilizând o căutare de gol afin cu o penalitate de deschidere a golului de 12 și o penalitate de extensie a golului de 2, matricea BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este divulgat în ref. [58].

- 5 În afară de cazul când se declară specific, un procedeu sau metodă cuprinzând numeroase etape poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau sfârșitul metodei, sau poate cuprinde etape de intervenție suplimentare. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este adecvat.

- 10 Sunt descrise aici diferite realizări ale invenției. Se va aprecia că, caracteristicile specificate în fiecare realizare pot fi combinate cu alte caracteristici specificate, pentru a furniza alte realizări. În particular, realizările evidențiate aici ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate una cu cealaltă (cu excepția faptului când ele se exclud reciproc).

MODURI PENTRU EFECTUAREA INVENȚIEI

Exemplul 1 - Eficacitatea inoculării bacteriene de a acționa ca neuroprotector

Rezumat

- 15 Celulele neuroblastom au fost tratate cu compoziții cuprinzând tulpinile bacteriene conform invenției. Celulele neuroblastom SH-SY5Y utilizate sunt producătoare de dopamină și bine stabilite ca un model *in vitro* pentru studierea bolilor neurodegenerative. S-a observat abilitatea tulpinilor bacteriene de a crește neuroproliferarea. Celulele neuroblastom au fost tratate de asemenea cu 1-metil-4-fenilpiridin neurotoxin dopaminergic tratat (MPP), care induce
20 simptome permanente ale bolii Parkinson în celulele neuroblastom. A fost investigată abilitatea tulpinilor bacteriene de a acționa ca neuroprotector împotriva MPP.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*, *Megasphaera massiliensis* MRx0029

- 25 **Linie celulară**

Celulele neuroblastom SH-SY5Y au fost cumpărate de la ECCACC (Nr. cat.: 94030304) și au fost crescute în MEM (Sigma Aldrich, cat n. M2279) suplimentat cu amestec de nutrient F-12 Ham (Sigma Aldrich, cat n. N4888).

Metodă

- 30 Odată crescute, celulele neuroblastom SH-SY5Y au fost placcate pe placă cu 96 de godeuri la 11.000 celule/godeu și incubate timp de 2 zile. Celulele au fost apoi transferate în mediu de diferențiere (care conține FBS la 1%) și acid retinoic 10 uM (Sigma Aldrich, cat. n. R2625-100MG). Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi și celulele au fost recoltate în ziua 7 de diferențiere. Celulele au fost pretratate cu sau fără MPP (Sigma Aldrich, cat. n. D048-1G)
35 timp de 8 ore. Ulterior, celulele au fost tratate cu supernatant bacterian 10% și incubate peste noapte. Viabilitatea celulară a fost măsurată utilizând reactiv CCK-8 (Sigma Aldrich, Trusă de Numărare a Celulelor - 8, cat. n. 96992-3000TESTS-F) și citită la 450nm lungime de undă.

Rezultate

- 40 Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 1. Tratatamentul celulelor neuroblastom cu MRx0005 sau MRx0029 a condus la o creștere în proliferarea de neuroni. Celulele neuroblastom care au fost tratate cu MPP împreună cu tulpina bacteriană au avut o viabilitate celulară crescută în comparație cu celulele tratate cu MPP singur (care au avut o viabilitate scăzută). Aceste date arată că tulpinile bacteriene pot acționa ca neuroprotector.

Exemplul 2A - Eficacitatea inoculării bacteriene de a reduce secreția de IL-6.

- 45 **Rezumat**

Activarea citokinelor proinflamatoare a fost asociată cu deteriorarea neuronului în boala neurodegenerativă. Lipopolizaharida (LPS) este un stimulator cunoscut al citokinelor proinflamatoare IL-6. Celulele astrocitom glioblastom umane au fost tratate cu compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției în combinație cu LPS pentru a observa abilitatea lor de a modula nivelurile de IL-6.
50

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*

Linie celulară

- 55 MG U373 este un astrocitom glioblastom uman derivat dintr-o tumoră malignă și a fost cumpărat de la Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL). Celulele de astrocitom glioblastom umane MG U373 au fost crescute în MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279) suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen Strep, 4mM L-Glut, soluție aminocidă neesențială IX MEM și piruvat de sodiu IX.

Metodă

- 60 Odată crescute, celulele MG U373 au fost placcate pe placă cu 24 de godeuri la 100.000 celule/godeu. Celulele au fost tratate cu LPS (1ug/mL) singur sau cu 10% supernatant de bacterie

din MRx0005 timp de 24 ore. Un control a fost de asemenea efectuat unde celulele au fost incubate în mediu netratat. După aceea supernatanții fără celule au fost colectați, centrifugați la 10.000g timp de 3min la 4°C. IL-6 a fost măsurat utilizând trusa ELISA umană IL-6 de la Peprotech (cat n.#900-K16) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului.

5 Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 2A. Tratamentul celulelor neuroblastom cu LPS și tulpina bacteriană a condus la o scădere în nivelul de IL-6 secretat.

Exemplul 2B - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru a modula secreția de IL-8.

Rezumat

10 Deoarece neuroinflamația joacă un rol pivotal în bolile neurodegenerative și IL-8 s-a dovedit că are efecte neuropozitive, a fost evaluat efectul compozițiilor cuprinzând tulpinile bacteriene ale invenției și LPS asupra activării IL-8. Celulele astrocitom glioblastom umane au fost tratate cu compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției în combinație cu LPS pentru a observa abilitatea lor de a modula nivelurile de IL-8.

15 Material și Metode

Tulpini bacteriene

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linie celulară

20 MG U373 este un astrocitom glioblastom uman derivat dintr-o tumoare malignă și a fost cumpărat de la Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL). Celulele astrocitom glioblastom umane MG U373 au fost crescute în MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279) suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen Strep, 4mM L-Glut, soluție aminoacidă neesențială IX MEM și piruvat de sodiu IX.

Metodă

25 Odată crescute, celulele MG U373 au fost placcate pe placă cu 24 de godeuri la 100.000 celule/godeu. Celulele au fost tratate cu LPS (1ug/mL) singur sau cu 10% supernatant de bacterie din MRX0029 timp de 24 ore. După aceea supernatanții fără celule au fost colectați, centrifugați la 10.000g timp de 3min la 4°C. IL-8 a fost măsurat utilizând trusa ELISA umană IL-8 de la Peprotech (cat n.#900-K18) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului.

Rezultate

30 Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 2B.

Exemplul 2C - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru a reduce inflamația indusă de α -sinucleină.

Rezumat

35 Neuroinflamația joacă un rol pivotal în boala Parkinson și α -sinucleina s-a dovedit că induce neuroinflamația *in vivo*. Prin urmare, a fost evaluată abilitatea tulpinei bacteriene a invenției de a inhiba neuroinflamația indusă de α -sinucleină. O cocultură de celule astrocitom glioblastom umane și celule neuroblastom a fost expusă la α -sinucleină de tip sălbatic și izoformele mutante E46K și A53T și tratată cu compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției. A fost apoi testată abilitatea tulpinilor bacteriene de a inhiba secreția de IL-6 indusă de α -sinucleină.

40 Material și Metode

Tulpini bacteriene

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linie celulară

45 MG U373 este un astrocitom glioblastom uman derivat dintr-o tumoare malignă și a fost cumpărat de la Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL). Celulele astrocitom glioblastom umane MG U373 au fost crescute în MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279) suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen Strep, 4mM L-Glut, soluție aminoacidă neesențială IX MEM și piruvat de sodiu IX.

50 SH-SY5Y este o linie celulară neuroblastom umană derivată dintr-un neuroblastom malign și poate fi cumpărată de la Sigma-Aldrich (cat n. 94030304-1VL). Celulele au fost crescute în 50 % MEM și 50% mediu cu amestec de nutrient F-12 Ham suplimentat cu 2mM L-Glutamină, FBS inactivat termic 10%, 100 U/ml penicilină, 100 μ g/ml streptomycină. Celulele pe mediul de creștere au fost placcate pe placă cu 96 de godeuri la 11.000 celule/godeu și plasate în incubator. După 2 zile, mediul a fost înlocuit cu mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând FBS 1%) și acid retinoic 10 μ M. Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi și celulele au fost utilizate după 7 zile de diferențiere.

Metodă

60 Celulele SHSY5Y au fost placcate pe plăci cu 12 godeuri la o densitate de 50.000 celule/godeu. Celulele au fost crescute în 50 % MEM și 50% mediu cu amestec de nutrient F-12 Ham suplimentat cu 2mM L-Glutamină, FBS inactivat termic 10%, 100 U/ml penicilină, 100 μ g/ml streptomycină. Celulele pe mediul de creștere au fost placcate pe placă cu 96 de godeuri la

11.000 celule/godeu și plasate în incubator. După 2 zile, mediul a fost înlocuit cu mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS) și 10 μ M acid retinoic. Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi și celulele au fost utilizate după 7 zile de diferențiere. U373 au fost placate pe plăci cu 12 transgodeuri (membrană de poliester de 0,4 μ m, Costar) la o densitate de 50.000 celule/godeu timp de 72 ore. Celulele au fost cocultivate împreună timp de 24 ore înainte de tratament în mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS fără acid retinoic).

Apoi celulele au fost tratate cu 25 μ g/ml α -sinucleină (Wt, A53T, E46K) în prezența sau absența a 10% supernatant de bacterie timp de 48 ore. Supernatanții fără celule au fost colectați, centrifugați la 10000g timp de 3 min la 4°C, alicotați și depozitați la -80°C. IL-6 și IL-8 umane au fost măsurate cum s-a descris mai sus.

Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 3. Tratamentul celulelor cu α -sinucleină de tip sălbatic și izoformele mutante E46K și A53T a indus o secreție moderată de IL-6. Secreția indusă de α -syn de IL-6 a fost inhibată în celulele tratate cu tulpinile bacteriene.

Exemplul 3 - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru a reduce activarea NF κ B

Rezumat

Activarea promotorului NF κ B conduce la producția de citokine proinflamatoare incluzând IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α și IL-6. Promotorul NF κ B poate fi activat de α -sinucleină și LPS prin stimularea ligandului TLR4. Mutațiile în α -sinucleină, cum ar fi α -sinucleină A53T, sunt implicate în Parkinsonul familial. Tratamentul celulelor neuronale cu LPS simulează Parkinsonul cauzat de factorii din mediu. A fost investigată abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției de a inhiba activarea promotorului NF κ B.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: Parabacteroides distasonis

Linie celulară

TLR4 albastre Hek umane au fost cumpărate de la InvivoGen (cat n. hkb-htr4). TLR4 albastre Hek umane au fost crescute în glucoză bogată în DMEM (Sigma Aldrich, cat n. D-6171) suplimentată cu 10% FBS, 1% Pen Strep, 4mM L-Glut, Normocin și soluție de selecție albastră IX HEK.

Metodă

Odată crescute, celulele albastre Hek umane au fost placate în plăci cu 96 de godeuri la 25.000 celule/godeu în 4 replicat. Un set al celulelor a fost tratat cu α -sinucleină A53T (1 μ g/mL) singură sau cu 10% supernatant de bacterie din MRx0005 timp de 22 ore. Al doilea set al celulelor a fost tratat cu LPS (10 ng/mL, din serotip enteric de Salmonella Typhimurium, Sigma Aldrich, cat n. L6143) singur sau cu 10% supernatant de bacterie din MRx0005 timp de 22 ore. Celulele au fost ulterior centrifugate și 20 μ l de supernatant au fost amestecate cu 200 μ l de reactiv albastru Quanti (InvivoGen, cat n. rep-qb2), incubate timp de 2 ore și absorbanta citită la 655nm.

Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figurile 4 și 5. Figura 4 arată că activarea promotorului NF κ B de către α -sinucleină este inhibată de MRx0005. Figura 5 arată că activarea promotorului NF κ B de către LPS este inhibată de MRx0005.

Exemplul 4 - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru alterarea capacității antioxidante

Rezumat

Abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției de a altera capacitatea antioxidantă. Capacitatea antioxidantă a tulpinei bacteriene a fost stabilită utilizând bine cunoscutul test ABTS (acid 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)).

Tulpină bacteriană

755: Parabacteroides distasonis

Metodă

Celulele bacteriene (10^6 sau mai multe) au fost colectate și centrifugate. Ele au fost resuspendate în tampon de testare (utilizând de trei ori volumul peletului). Suspensia a fost sonicată pe gheață timp de 5 minute și apoi centrifugată la 12.000 x g timp de 10 minute. Supernatantul a fost îndepărtat și măsurat utilizând trusa de test ABTS produsă de Sigma Aldrich (cod CS0790), în conformitate cu instrucțiunile fabricantului.

Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 6. Figura 6 arată că MRx0005 are o capacitate antioxidantă de aproximativ 0,5mM în comparație cu Trolox.

Exemplul 5 - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru alterarea nivelurilor de peroxidare lipidă

Rezumat

A fost investigată abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției de a altera nivelurile de peroxidare lipidă. A fost utilizat testul substanțelor reactive tiobarbiturice (TBAR) pentru a măsura produsele secundare de peroxidare lipidă.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*

Metodă

Celulele bacteriene (10^6 sau mai multe) au fost colectate și centrifugate, a fost efectuată o etapă de spălare cu soluție salină izotonică înainte ca peletul să fie resuspendat în tampon de testare de clorură de potasiu. Suspensia a fost sonicată pe gheață timp de 10 minute și apoi centrifugată la $10.000 \times g$ timp de 10 minute. Supernatantul a fost îndepărtat și nivelul de peroxidare lipidă evaluat utilizând testul substanțelor reactive tiobarbiturice.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 7. Figura 7 arată că MRx0005 este capabil să inhibe peroxidarea lipidă cu aproximativ 20 %, care este o capacitate antioxidantă mai ridicată decât controlul pozitiv, hidroxitoluen butilat (1% m/v).

Exemplul 6 - Eficacitatea inoculării bacteriene asupra activității de deacetilază histonă

Rezumat

A fost investigată abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției de a altera activitatea de deacetilază histonă. Dereglarea deacetilazei histone a fost implicată în patogeneza asociată cu bolile neurodegenerative asociate cu vârsta.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*

Linie celulară

A fost utilizată linia celulară HT-29 deoarece este prezentă deacetilaza histonă.

Metodă

Supernatanții fără celule de culturi bacteriene de fază staționară au fost izolați prin centrifugare și filtrare într-un filtru de 0,22 μ M. Celulele HT-29 au fost utilizate la 3 zile post confluență și au fost coborâte în 1 mL DTS cu 24 ore înainte de începerea experimentului. Celulele HT-29 au fost provocate cu 10 % supernatant fără celule diluat în DTS și acestea au fost lăsate să incubeze timp de 48 ore. Proteinele nuclează au fost apoi extrase utilizând trusa de extragere Sigma Aldrich Nuclease și mostrele au fost congelate instantaneu înainte de măsurarea activității HDAC. Activitatea HDAC a fost evaluată fluorometric utilizând trusa Sigma Aldrich (UK).

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 8. Figura 8 arată că MRx0005 este capabil să reducă nivelurile activității de deacetilază histonă.

Exemplul 7 - Nivelul producției de indol în bacterie

Rezumat

A fost investigată abilitatea bacteriei invenției de a produce indol. Indolul a fost implicat în atenuarea inflamației și stresului oxidativ.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*

ATCC 11775 este o tulpină bacteriană de referință care este cunoscută că produce indol.

Metodă

Celulele bacteriene intacte în fază staționară au fost incubate cu 6mM Triptofan timp de 48 ore. Speciile bacteriene care posedă enzima triptofanază vor utiliza triptofanul ca substrat pentru a produce indol. După o perioadă de incubare de 48 ore, supernatantul a fost îndepărtat și s-a adăugat la reactiv Kovac pentru cuantificarea indolului. Standardele, soluțiile stoc și reactivii au fost preparați utilizând metode standardizate validate intern.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 9. Figura 9 arată că MRx0005 are capacitatea de a produce indol din triptofan, la concentrații de aproximativ 0,2mM.

Exemplul 8 - Nivelul producției de kinurenine în bacterie

Rezumat

A fost investigată abilitatea bacteriei invenției de a produce kinurenină. Dereglarea căii kinurenine poate conduce la activarea sistemului imunitar și acumularea de compuși potențial neurotoxici. Alterările în metabolismul kinureninelor pot fi implicate în dezvoltarea bolii Parkinson.

Tulpină bacteriană

755: *Parabacteroides distasonis*

DSM 17136 este o tulpină de *Bacteroides copricola* care este cunoscută că produce kinurenine.

Metodă

- 5 Supernatanții fără celule de culturi bacteriene de fază staționară au fost izolați prin centrifugare și filtrați într-un filtru de 0,22 μM și congelați până la utilizare. Standardele de kinurenine, soluțiile stoc și reactivii au fost preparați utilizând metode standardizate validate intern. Moștra a fost tratată cu acid tricloroacetic și centrifugată la 10.000xg timp de 10 minute la 4°C. Supernatantul a fost colectat și dispensat într-o placă cu 96 godeuri. S-a utilizat reactivul Ehrlich pentru detecția kinureninei și s-a adăugat la un raport de 1:1.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 10. Figura 10 arată că MRx0005 are capacitatea de a produce kinurenine la o concentrație de aproximativ 70 μM .

Exemplul 9 - neuroprotecția

- 15 Celulele SHSY-5Y diferențiate RA au fost tratate cu MPP+, metabolitul activ al MPTP, utilizat chimic pe larg pentru a imita *in vitro* și *in vivo* unele din caracteristicile patologiei PD. Viabilitatea celulară a fost măsurată ca rată de mitocondrii respirate (Figura 11). Ambele MRx0005 și MRx0029 au prezentat efecte semnificative și promovează *per se* o creștere a activității metabolice a mitocondriilor în celulele SHSY-5Y. Protecția MRx0005 a fost de 20% în comparație cu moștra tratată cu YCFA-MPP+, aproximativ aceeași observată pentru controlul pozitiv cu quercetin (Fig. 11).

Exemplul 10 - Producție de metaboliți - metaboliți în creier**Fundal**

- 25 Metaboliți prezenți în supernatanții bacteriei pot influența direct răspunsul gazdei la stresul oxidativ, comunicația celulă-cu-celulă și neuroprotecția. Metaboliții care joacă un rol cheie în procesele neurologice au fost măsurați în timpul *ex vivo* screening-ului în țesutul cerebral al șoarecilor hrăniți cu MRx0005 și MRx0029.

Metode**Animale**

- 30 Șoarecii masculi adulți BALBc (Envigo, UK) au fost găzduiți în grup sub un ciclu lumină-intuneric de 12 ore; mâncarea standard pentru rozătoare și apa au fost disponibile ad libitum. Toate experimentele au fost efectuate în conformitate cu Recomandările Europene după aprobarea de către University College Cork Animal Ethics Experimentation Committee. Animalele au fost în vârstă de 8 săptămâni la începerea experimentului.

35 Conceperea studiului

Animalele au fost lăsate să habiteze în camera lor de deținere timp de o săptămână după sosirea în unitatea pentru animale. Ele primesc gavaj oral (doză de 200 μL) de bioterapeutice vii la o doză de 1×10^9 CFU timp de 6 zile consecutive între 15:00 și 17:00. În ziua 7, animalele sunt decapitate, și țesuturile sunt recoltate pentru experimentare.

40 Colectarea țesutului

Animalele au fost sacrificate într-o manieră aleatoare cu privire la tratament și afecțiunea testată; luarea unei mostre a avut loc între 9,00 a.m. și 1:00 p.m. Sângele recoltat a fost colectat în tuburi EDTA (Acid acetic tetra diamin etilenic) de potasiu și centrifugat timp de 15 min la 4000 g. Plasma a fost izolată și depozitată la -80°C pentru analiză ulterioară. Creierul a fost repede excizat, disecat și fiecare regiune a creierului a fost congelată instantaneu pe gheață uscată și depozitată la -80°C pentru analiză ulterioară. Splina a fost îndepărtată și procesată imediat după eliminare pentru stimulare imună *ex-vivo*. Țesut intestinal (segmentele de ileum și colon de 2 cm cele mai apropiate de cecum au fost excizate, și cel mai îndepărtat 1cm de țesut față de cecum au fost utilizate) a fost montat în camere de utilizare pentru testul de permeabilitate intestinală. Cecumul a fost îndepărtat, cântărit și depozitat la -80°C pentru analiza SCFAs.

Analiza monoamină

- Concentrația neurotransmițătorului a fost analizată prin HPLC pe mostre din trunchiul cerebral. Pe scurt, țesutul trunchiului cerebral a fost sonicat în 500 μL de fază mobilă răcită presărută cu 4 ng/40 μL de N-Metil 5-HT (Sigma Chimic Co., UK) ca standard intern. Faza mobilă a conținut 0,1 M acid citric, 5,6 mM acid octan-1-sulfonic (Sigma), 0,1 M fosfat diacid de sodiu, 0,01 mM EDTA (Alkem/Reagecon, Cork) și 9% (v/v) metanol (Alkem/Reagecon) și a fost ajustată la pH 2,8 utilizând 4 N hidroxid de sodiu (Alkem/Reagecon). Omogenații au fost apoi centrifugați timp de 15 min la 22,000 $\times$ g la 4°C și 40 μL de supernatant injectat pe sistemul HPLC care a constatat dintr-un controler de sistem SCL 10-Avp, un detector electrochimic LECD 6A (Shimadzu), o pompă LC-10AS, un cuptor CTO-10A, un autoinjector SIL-10A (cu moștra mai rece menținută la 40°C) și un degazor online Gastorr (ISS, UK). O coloană cu fază inversă

(Kinetex 2,6 u C18 100 × 4,6 mm, Phenomenex) menținută la 30°C a fost utilizată în separare (debit 0,9 ml/min). Electrocul de lucru din carbon sticlos a fost combinat cu un electrod de referință Ag/AgCl (Shimadzu) operat la +0,8 V și cromatogramele generate au fost analizate utilizand software-ul de Clasă-VP 5 (Shimadzu). Neurotransmițătorii au fost identificați prin timpii lor de retenție caracteristici după cum s-a determinat prin injecții standard, care rulează la intervale regulate în timpul analizei mostrei. Rapoartele înălțimilor maxime ale analitului versus standardul intern au fost măsurate și comparate cu injecția standard. Rezultatele au fost exprimate ca ng de neurotransmițător pe g de greutate proaspătă de țesut.

Analiza metabolitului

Pentru analiza GC-metabolitului, mostrele de supernatanți bacterieni au fost derivate cu cloroformiat de metil utilizând o versiune puțin modificată din protocolul descris de Smart și colab. (DOI: 10,1038/nprot,2010,108). Toate mostrele au fost analizate într-o ordine aleatoare. Analiza a fost efectuată utilizând GC (7890B, Agilent) cuplat cu un detector cvadрупol (59977B, Agilent). Sistemul a fost controlat prin ChemStation (Agilent). Seria de date a fost convertită la formatul netCDF utilizând Chemstation (Agilent), înainte ca datele să fie importate și procesate în Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) utilizand software-ul PARADISE descris de Johnsen și colab. (DOI: 10,1016/j.chroma.2017.04.052).

Pentru analiza acidului gras, mostrele au fost acidulate utilizând acid clorhidric, și s-au adăugat standarde interne marcate cu deuteriu. Toate mostrele au fost analizate într-o ordine aleatoare. Analiza a fost efectuată utilizând o coloană cu polaritate ridicată (coloană Zebron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) instalată într-un GC (7890B, Agilent) cuplat cu un detector cvadрупol (59977B, Agilent). Sistemul a fost controlat prin ChemStation (Agilent). Seria de date a fost convertită la formatul netCDF utilizând Chemstation (Agilent), înainte ca datele să fie importate și procesate în Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) utilizând software-ul PARADISE descris de Johnsen și colab (DOI: 10,1016/j.chroma.2017.04.052).

Rezultate - producția de neurotransmițători

Rezultatele sunt prezentate în Figura 12, care arată că în creierile șoarecilor alimentați cu MRx0029, nivelurile de noradrenalină sunt crescute ($p=0,0507$), însoțite de o ușoară creștere de serotonină și 5-HIAA. Aceste date susțin analiza metabolitului prezentată mai jos, sugerând că MRx00029 este un producător major de acid 4-hidroxifenilacetic, un cunoscut antioxidant (Weon și colab, 2016). Mai important, acidul 4-hidroxifenilacetic este un intermediar sintetic de dopamină și norepinefrină și o importantă moleculă bioactivă (Huot și colab, Parkinson's Disease 2015). De fapt, în PD, modificările degenerative se extind dincolo de sistemul dopaminergic, afectând în mod egal sistemele serotonergic și noradrenergic, care conduc în schimb la niveluri scăzute de serotonină (5-hidroxitriptamină, 5-HT) și noradrenalină (norepinefrină) în ambele structuri striatală și extra-striatală (Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y Creier Res. 1983 Sep 26; 275(2):321-8.). L-DOPA țintește în principal caracteristicile asociate cu dopamina ale PD, totuși nu adresează scăderile în ambele 5-HT și noradrenalină. În plus față de acest lucru este că cu cât mai lungă este durata tratamentului cu L-DOPA, cu atât mai vizibilă este gama complicațiilor motoare și nonmotoare (de exemplu dischinezie, simptome psihiatrice) (Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R, Mov Disord. 2005 Feb; 20(2):190-9.) Prin urmare, aceste date demonstrează că bacteriile care produc acizi organici, cum ar fi acidul 4-hidroxifenilacetic sau acidul succinic, pot fi utile în terapie, în particular în tratamentul bolilor neurodegenerative.

Rezultate - producția de metaboliți

Metaboliți prezenți în supernatanții bacterieni pot influența direct răspunsul gazdei la stresul oxidativ, comunicația celulă-cu-celulă și neuroprotecția în principal. Metaboliții din supernatantul de culturi de MRX0029 și MRX0005 au fost analizați și rezultatele sunt prezentate în Figura 13.

Cațiva metaboliți au prezentat o diferență frapantă între cele două tulpini analizate. Concentrația de acid succinic a fost în special ridicată la MRx0005. Interesant, raportul mostră/mediu pentru acidul 4-hidroxifenilacetic a fost semnificativ mai ridicat la MRx0029 (Fig. 13).

Analiza acidului gras în supernatanți a dezvăluit o dihotomie interesantă la cele două tulpini: MRx0005 a produs în principal acid acetic și propanoic, în timp ce MRx0029 a produs acid butanoic, pentanoic și hexanoic, atât în formele liniare cât și în formele ramificate (Fig. 14B). Cele două tulpini au părut foarte diferite și în particular, producția de acid succinic și acid 4-hidroxifenilacetic de către MRx0005 și MRx0029 respectiv a fost notabilă (Figura 14A). Mai mult, se pare că MRx0005 produce mai mulți acizi grași cu catenă scurtă C2 și C3, în timp ce MRx00029 produse mai mulți acizi grași cu catenă medie atât liniară cât și ramificată, C4 (butirat), incluzand acidul hexanoic.

Acidul succinic este un metabolit ciclic Krebs implicat în fosforilarea oxidativă. Complexul de fosforilare oxidativă este o etapă cheie pentru traficul sinaptic al proteinelor și veziculelor la regiunile proximală și distală (Budd SL și Nichols, 1998). Disfuncția sa a fost raportată în tulburările neurodegenerative incluzând boală Alzheimer, boală Parkinson și ataxie spinocerebrală de tip 1 (Manczak M și colab. 2004; Ebadi și colab., 2001). Aceste descoperiri sunt în special interesante deoarece acidul succinic poate augmenta activitatea mitocondriilor și susține neuronii vulnerabili în boala neurodegenerativă asociați cu proteinele pliate anormal incluzând PD (Ferro și colab, Plos one, 2017). BDNF și acidul succinic au ambii o activitate protectoare similară nu numai în neurodegenerare ci de asemenea și în tulburările mentale ca depresie și anxietate, care sunt destul de comune printre pacienți diagnosticați cu PD sau AD.

Figura 14B demonstrează de asemenea că MRX0029 este un producător de butirat (acid butanoic). Acest lucru poate fi semnificativ deoarece butiratul are un rol cunoscut de reducere a impermeabilității barierei hematoencefalice, care are un efect neuroprotector [59]. Această proprietate a MRx0029 (și a altor bacterii neuroprotectoare) poate contribui la eficacitatea sa.

Exemplul 11 - Modularea expresiei ARNm a proteinelor cu joncțiune strânsă

Deoarece dovezi recente sugerează că disfuncția și inflamația intestinală sunt simptome nonmotoare asociate cu PD, a fost investigată abilitatea tulpinilor bacteriene ale invenției de a cauza orice disfuncție a barierei intestinale. Monostraturile celulare care produc HT29-mtx epitelial, mucin (Gagnon și colab, J Microbiological Methods, 2013) au fost utilizate ca un model *in vitro* pentru a evalua întreruperea barierei intestinale și stimularea imună după tratamentul cu MRx0005 și MRx0029. Celulele HT29-mtx diferențiate expuse la forbol 12-miristat-13-acetat (PMA) au secretat o cantitate semnificativă de IL-8; în contrast, tratamentul timp de 24 ore cu supernatanți bacterieni MRx0005 și MRx0029, a indus o secreție chiar mai scăzută de IL-8 comparativ cu ambele celule netratate și tratate cu YCFA (Fig. 14A).

A fost apoi investigată abilitatea MRx0005 și MRx0029 de a regla permeabilitatea epitelială prin modificarea transducției semnalului intracelular implicată în expresia și localizarea proteinelor implicate în formarea barierei intestinale.

ARN a fost izolat și analiza RT-PCR cantitativă (qRT-PCR) a fost efectuată pentru a caracteriza modificările în expresia genei proteinelor cu joncțiune strânsă în timpul incubării cu MRx0005 și MRx0029. Administrarea de MRx0029 a sporit expresia ARNm de Occludin, Villin, proteină 1 și 2 cu joncțiune strânsă (respectiv TJP1 și TJP2) după 2 ore de incubare (Fig. 14B). În contrast, expunerea la MRx0005 nu a alterat expresia genei proteinelor cu joncțiune strânsă arătând că cele două tulpini acționează diferențial asupra barierei intestinale.

Rezultatele *in vitro* au fost comparate cu date din analiza paralelă *ex vivo* pe intestinul șoarecilor alimentați cu MRx0005 și MRx0029. Expresia genei de TJP2 și occludin a fost cuantificată în colon și ileum. Datele *ex vivo* oglindesc perfect datele *in vitro* deoarece MRx0029 a fost capabilă să regleze pozitiv semnificativ TJP1 și Occludin ($p=0,073$) în regiunea colonului intestinului murin (Fig. 14C+14D). MRx0029 a fost de asemenea capabilă să scadă funcția de permeabilitate în colonul acelorși șoareci (Fig. 14E+14F).

Materiale și metode - extragerea ARN și analiza qPCR

ARN total a fost extras utilizând mini trusa RNeasy (Qiagen, Manchester, JUK) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului, și concentrația ARN determinată prin absorbantă la 260/280 nm utilizând un spectrofotometru (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE). Pentru analiza expresiei ARNm, ADNc a fost preparat din 2000 ng din ARN total utilizând trusa de transcripție inversă ADNc de capacitate ridicată (Thermo Fisher, Loughborough) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Reacțiile de transcripție inversă au fost efectuate într-un termociclator (Biometra, Germania) la 25°C timp de 10 min, 37°C timp de 120 min, și 85°C timp de 5 min. ADNc rezultat a fost amplificat în duplicate prin testul SYBR-Green PCR, și produsele au fost detectate pe o mașină PCR în timp real QuantStudio 7 (Applied Biosystems, UK) utilizând un profil standardizat (denaturare inițială de 95°C timp de 10 minute, urmată de 40 cicluri de 10 secunde de denaturare la 95°C și 30 secunde de recoacere/extensie la 60°C). S-a adăugat o etapă de disociere după 40 cicluri pentru a genera o curbă de topire. Analiza a fost efectuată utilizând software-ul Applied Biosystems QuantStudio Real-Time PCR v1.2. Secvențele inițitoare pentru Actină, Villin, Occludin TJP1 și TJP2 sunt furnizate în lista de secvențe.

Exemplul 12 - Nivelul secreției de BDNF în celulele SHSY-5Y

Fundal

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF) este o moleculă omniprezentă în creier asociată cu dezvoltarea neurală, neuroprotecția și neuroregenerarea. BDNF nu numai că protejează împotriva neurodegenerării ci de asemenea și împotriva tulburărilor mentale ca depresia și anxietatea, care sunt destul de comune printre pacienți diagnosticați cu PD sau AD.

Metode

SH-SY5-SY au fost placcate pe placă cu 24 de godeuri la densitatea de 60.000 celule/godeu și plasate în incubator. După 24 ore, mediul a fost înlocuit cu mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS) și 10 μ M acid retinoic. Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi și celulele au fost utilizate în ziua 10 de diferențiere. Pentru tratament, mediul de diferențiere a fost îndepărtat și înlocuit cu 450ul de mediu de creștere deplin și s-au adăugat 50 μ l de bacterii SN la godeurile tratate sau s-a adăugat YCFA+ ca control negativ.

Rezultate

Rezultatele sunt prezentate în Figura 15, care arată că administrarea de MRX0005 în combinație cu acidul retinoic crește secreția de BDNF din celulele neuroblastom diferențiate.

Exemplul 13 - Eficacitatea inoculării bacteriene pentru reducerea nivelurilor oxidative în celule Fundal

Generarea de specii reactive de oxigen contribuie la patologia bolilor neurodegenerative. A fost investigată abilitatea tulpinilor bacteriene de a proteja celulele diferențiate SHSY-5Y și U373 din specii reactive de oxigen (ROS) generate prin tratamentul cu peroxid de hidrogen terț-butil (TBHP).

Material și Metode

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRX0029

Metodă

Celulele SHSY-5Y au fost placcate pe o placă neagră cu fund plat cu 96 de godeuri la densitatea de 5000 celule/godeu și plasate în incubatorul CO₂. După 24 ore, mediul au fost înlocuit cu mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS) și 10 μ M acid retinoic. Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi. În ziua 10 mediul de diferențiere a fost îndepărtat și celulele au fost spălate cu PBS preîncălzit și colorate cu 10uM sondă moleculară DCFDA timp de 20 minute în mediu de creștere conținând 1% FBS. Apoi celulele au fost spălate din nou cu PBS preîncălzit și tratate cu 100uM TBHP în prezența sau absența a 10% supernatant bacterian timp de 2 ore. Intensitatea fluorescenței a fost măsurată utilizând cititorul de placă TECAN la Ex/Em 485/530 nm.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 16. Figura 16b arată că MRX0005 este capabilă să inhibe producția de ROS în celulele neuroblastom SHSY-5Y diferențiate. MRX0005 reduce de asemenea generarea de ROS în celulele astroglioblastom (Figura 16a). Acest lucru arată că MRX0005 are activitate generală antioxidantă.

Exemplul 14 - Testarea stabilității

O compoziție descrisă aici conținând cel puțin un tulpină bacteriană descrisă aici este depozitată într-un recipient etanșat la 25°C sau 4°C și recipientul este plasat într-o atmosferă având 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% sau 95% umiditate relativă. După 1 lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani, cel puțin 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% din tulpina bacteriană va rămâne după cum s-a măsurat în unități de formare ale coloniilor determinate prin protocoale standard.

Exemplul 15

Metode

Animale

Animalele și conceperea studiului utilizate au fost aceleași ca pentru Exemplul 10.

Tulpini bacteriene

• 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)

• *Megasphaera massiliensis* (MRX0029)

Colectarea țesutului

Animalele au fost sacrificate într-o manieră aleatoare cu privire la tratament și afecțiunea testată; luarea mostrei a avut loc între 9,00 a.m. și 2:30 p.m. Sângele recoltat a fost colectat în tuburi EDTA (Acid acetic tetra diamin etilenic) de potasiu și centrifugat timp de 15 min la 4000 g. Plasma a fost izolată și depozitată la -80°C pentru analiză ulterioară. Creierul a fost repede excizat, disecat și fiecare regiune a creierului a fost congelată instantaneu pe gheață uscată și depozitată la -80°C pentru analiză ulterioară. Splina a fost îndepărtată, colectată în 5 mL mediu RPMI (cu L-glutamină și bicarbonat de sodiu, R8758 Sigma + 10 % FBS (F7524, Sigma) + 1% Pen/Strep (P4333, Sigma)) și procesată imediat după sacrificare pentru stimulare imună ex-vivo. Țesutul intestinal (2-3 cm de segmente de ileum și colon cele mai apropiate de cecum au fost excizate, și cei mai îndepărtați 1cm 2cm de țesut din cecum au fost utilizați) a fost montat în camere de utilizare pentru testul de permeabilitate intestinală. Cecumul a fost îndepărtat, cântărit și depozitat la -80°C pentru analiza SCFAs.

Analiza monoamină

Concentrația neurotransmițătorului a fost analizată cum s-a descris în Exemplul 10***Test de citokine ale splinei***

Splinele au fost colectate imediat în 5mL mediu RPMI după sacrificare și cultivate imediat. Celulele din splină au fost mai întâi omogenizate în acest mediu RPMI, urmate de 5
 5 minute incubare cu 1ml tampon de lizare RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). S-au adăugat 10 ml suplimentari de mediu RPMI, urmați de 200G centrifugare timp de 5 minute. Supernatantul a fost apoi filtrat printr-un filtru de 40um. Celulele au fost numărate și însămânțate (mediu 4.000.000/mL). După 2,5 ore de adaptare, celulele au fost stimulate cu lipopolizaharidă (LPS-2
 10 $\mu\text{g/ml}$) sau concanavalin A (ConA-2,5 $\mu\text{g/ml}$) timp de 24 ore. După stimulare, supernatanții au fost recoltați pentru a evalua eliberarea citokinelor utilizând trusa V-PLEX cu Panou 1 Proinflamator (șoarece) (Meso Scale Discovery, Mariland, SUA) pentru $\text{TNF}\alpha$, IL-10, IL-1 β , Interferon γ , CXCL2 și IL6. Analizele au fost efectuate utilizand MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S 600.

Analiza expresiei genelor

ARN total a fost extras utilizand trusa de izolare ARNmi mirVana™ (Ambion/Llife technologies, Paisley, UK) și tratat cu DNase (Turbo ADN-free, Ambion/Life Technologies) in conformitate cu recomandările fabricantului. ARN a fost cuantificat utilizând spectrofotometrul NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, SUA) in conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Calitatea ARN a fost evaluată utilizând bioanalizorul Agilent (Agilent,
 20 Stockport, UK) în conformitate cu procedura fabricantului și a fost calculat un număr de integritate ARN (RIN). ARN cu valoarea RIN >7 a fost utilizat pentru experimentele ulterioare. ARN a fost transcris invers la ADNc utilizând trusa ADNc de capacitate ridicată Applied Biosystems (Applied Biosystems, Warrington, UK) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Pe scurt, transcriptaza inversă Multiscribe (50 U/ μL) (1)(2)(1)(10) a fost adăugată ca o parte din amestecul de bază RT, incubată la 25°C timp de 10 min, 37°C timp de 2 ore, 85°C timp de 5 min și depozitată la 4°C. A fost efectuată PCR cantitativă utilizând sonde (6 carboxi fluoresceină - FAM) concepute de Applied Biosystems la genele de șoarece țintite specific, în timp ce utilizează β -actina ca un control endogen. Reacțiile de amplificare au conținut 1 μL ADNc, 5 μL de amestec de bază 2X PCR (Roche), 900 nM din fiecare inițiator și au fost aduse la un total de 10 μL prin adăugarea de apă fără RNase. Toate reacțiile au fost efectuate în triplicat utilizând plăci cu 96 de
 30 godeuri pe sistemul LightCycler®480. Condițiile de termociclare au fost după cum s-a recomandat de fabricant (Roche) pentru 55 cicluri. Pentru a verifica contaminarea ampliconului, fiecare rulare nu a conținut nici un control de tipar în triplicat pentru fiecare sondă utilizată. Valorile pragului de ciclu (Ct) au fost înregistrate. Datele au fost normalizate utilizand β -actină și transformate utilizand metoda 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ și prezentate ca modificare de pliere vs. grupul de control.

Analiza acizilor grași cu catenă scurtă în conținutul cecal

Conținutul de cecum a fost amestecat și vortexat cu apă MilliQ și incubat la temperatura camerei timp de 10 min. Supernatanții au fost obținuți prin centrifugare (10000 g, 5 min, 4°C) la bacteriile peletului și a altor solide și filtrare la 0,2 μm . A fost transferat la o fiolă GC limpede și s-a
 40 utilizat acid 2-Etilbutiric (Sigma) ca standard intern. Concentrația de SCFA a fost analizată utilizand un sistem de ionizare cu flammă Varian 3500 GC, ajustat cu o coloană ZB-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm; Phenomenex). A fost construită o curbă standard cu diferite concentrații ale unui amestec standard conținând acetat, propionat, izo-butirat, n-butirat, izovalerat și valerat (Sigma). Maximele au fost integrate utilizând software-ul stației de lucru Varian Star Chromatography versiunea 6.0. Toate datele SCFA sunt exprimate ca $\mu\text{mol/g}$.

Analiza statistică

Datele normal distribuite sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM; seturile de date neparametrice sunt prezentate ca medie cu interval inter-cvartilă. S-a aplicat testul t neîmperecheat bidirecțional pentru a analiza datele parametrice și testul Mann-Whitney a fost utilizat pentru datele neparametrice. Coeficientul de corelare a gradului Spearman a fost utilizat pentru analiza de corelație în seturile de date grupate. O valoare $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă în toate cazurile.

Rezultate - Producția de neurotransmițători

Rezultatele din Figura 17 prezintă efectul tratamentului cu MRx005 asupra concentrației de neurotransmițători în creierul șoarecilor. Cel mai notabil, tratamentul cu MRx005 conduce la o scădere în dopamină.

Rezultate - Expresia genelor

Expresia genelor pentru receptorii neurotransmițători [receptor de serotonină 1a(5-HTR1a), receptor D1 de dopamină, subunitatea B1 a receptorului GABA, receptorul GABAA, receptorii NMDA2A (Grin2A) și NMDA2B (Grin2b)], markerii inflamatori [IL-1 β , IL6, CD11b, $\text{TNF}\alpha$ și TLR4], și markerii endocriini [factor de eliberare al corticosteronului (CRF), receptorii 1
 60

și 2 ai factorului de eliberare al corticosteronului (CRFR1, CRFR2), factor neurotrofin derivat din creier (BDNF), receptor vasopresin, receptor oxitocin, receptor glucocorticoid și receptor mineralocorticoid] au fost analizați în țesutul cerebral din hipocampus, amigdală și cortexul prefrontal.

Figurile 18-32 prezintă modificările în expresia genei după tratamentul cu MRX005 sau MRX0029 în hipocamp, amigdală și cortexul prefrontal. Tratamentul cu MRx0029 a condus la o creștere în expresia receptorului glucocorticoid în amigdală (Figura 25C). Figura 26A arată că MRx005 a crescut semnificativ expresia de BDNF în amigdală, în timp ce tratamentul cu MRx0029 a crescut semnificativ expresia de TLR4 în amigdală (Figura 26B).

Ambele MRx005 și MRx0029 pot crește expresia de CD11b în amigdală (Figura 27A), în timp ce expresia de IL-6, Grin2a și Grin2b este redusă după tratamentul cu MRx005 (Figurile 27B-D). În plus, MRx005 și MRx0029 au crescut semnificativ expresia de GABRA2 și au crescut expresia de GABBR1 în amigdală.

Tratamentul cu MRx005 a condus la o creștere semnificativă în expresia de BDNF în cortexul prefrontal (Figura 29B).

Discuție

Administrarea de MRx005 și MRx0029 a cauzat modificări în expresia genei, în special în amigdală.

Rezultate - Efect asupra expresiei de Tph1 și IDO-1

Figura 33 arată că MRx0029 poate crește semnificativ expresia de triptofan hidroxilază-1 (Tph1) în colon și că tratamentul cu MRX005 poate crește expresia de IDO-1 în colon. Tratamentul cu MRX005 a crescut expresia de Tph1 și IDO1 în ileum, în timp ce MRX029 nu a avut efect asupra expresiei acestor gene în ileum (Figura 34).

Indolamina-pirol 2,3-dioxigenază-1 (IDO-1) este prima enzimă și limitatoare de rată în calea triptofan/kinurenină în timp ce triptofan hidroxilaza 1 (Tph1), o izoformă a enzimei triptofan hidroxilază, este responsabilă pentru sinteza serotoninei. Aceste date sugerează că MRx0029 și MRx005 pot afecta nivelurile de serotonină și calea triptofan/kinurenină.

Rezultate - Efectul asupra nivelurilor de metaboliți triptofan

Figura 35 prezintă efectul tratamentului cu MRx005 asupra nivelurilor de kinurenină și triptofan în circulație.

Rezultate - Efectul asupra expresiei de citokine din splenocite

Testul de splenocite ex-vivo implică provocarea splenocitelor (celule izolate din splină - un organ principal implicat în apărarea imună), cu o provocare bacterio sau viral mimetică.

MRX005 a redus semnificativ nivelurile de interferon- γ în splenocite după o provocare cu LPS (Figura 36). În plus, MRX005 a redus nivelurile de interleukină-6 și factorul de necroză tumorală după o provocare cu LPS (Figurile 38 și 39, respectiv). Tratamentul cu MRx0029 a condus la o reducere de interferon- γ , interleukină-1 β și interleukină-6 după o provocare cu LPS (Figurile 36, 37 și 38, respectiv).

Tratamentul cu MRx005 și MRx0029 a condus la o creștere în nivelurile de chemoattractant CXCL1 (Figura 41).

Rezultate - Efect asupra nivelurilor de acizi grași cu catenă scurtă cecali

Acizii grași cu catenă scurtă (SCFAs) sunt produși când fibrele nedigerabile din dietă sunt fermentate de bacterii în intestin. Efectele administrării de MRX005 sunt prezentate în Figura 42.

Exemplul 16 - Analiza suplimentară a modificărilor MRX029 și MRX005 în expresia nivelurilor genei

Metode

Linie celulară

Celule SH-SY5Y

Tulpini bacteriene

• **755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)**

• ***Megasphaera massiliensis* (MRX0029)**

qPCR

SH-SY5Y au fost placcate în plăci Petri de 10 cm la o densitate de 2×10^6 celule. După 24 ore celulele au fost tratate în mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS fără RA) cu 10% supernatanți bacterieni sau YCFA+, 10uM RA, 200uM acid hexanoic sau 200uM acid valproic, timp de 17 ore. După aceea au fost luate imagini reprezentative utilizând microscopul de bază EVOS XL cu contrast de fază la o amplificare de 40X/0,65. Celulele au fost colectate, și ARN total a fost izolat în conformitate cu protocolul mini trusei RNeasy (Qiagen). ADNc-urile au fost făcute utilizând trusa de transcripție inversă ADNc de capacitate ridicată (Applied Biosystems). Expresia genei a fost măsurată utilizând qPCR. GAPDH a fost utilizat ca control

intern. Modificarea plierii a fost calculată în conformitate cu metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Secvențele inițitoare pentru MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 și NSE sunt furnizate în lista de secvențe.

Imuno-marcarea și imagistica celulară

Celulele au fost însămânțate pe lamele cameră cu 8 godeuri (Marienfeld Laboratory Glassware) la 5×10^4 celule/godeu peste noapte și au fost tratate cu 10% supernatant bacterian timp de 24 ore. Pentru diferențiere, celulele au fost tratate cu 10 nM RA timp de 5 zile înainte de tratarea cu supernatant bacterian fără celule timp de 24 ore. După aceea, celulele au fost fixate cu 4% paraformaldehidă în PBS timp de 20 minute la temperatura camerei (RT). Celulele fixate au fost spălate cu PBS, și permeabilizate cu 1% Triton X-100 în PBS timp de 10 minute. După spălarea cu PBS, lamelele au fost incubate cu tampon de blocare (4% BSA/PBS) timp de 1 oră la RT înainte de adăugarea de anticorp anti-MAP2 sau β 3-tubulină (sc-74421 și sc-80005 respectiv, Santa Cruz Biotechnology Inc) diluat în 1% BSA/PBS timp de 12 ore la 4°C. Ele au fost apoi spălate de două ori cu PBS, urmată de incubare cu Alexa Flour 488 conjugat anti-șoarece (Molecular Probes Inc) și Alexa Flour 594 conjugat Phalloidin (ab176757, Abcam) timp de 1 oră la RT. După spălarea 3X cu PBS, lamelele au fost colorate cu DAPI și montate cu Vectashield® (Vector Laboratories). Lamelele au fost vizualizate utilizând un microscop Axioskop 50 (Zeiss) echipat cu un obiectiv 63x/1,2 W Korr și s-au utilizat seturi de filtre adecvate pentru detecția fluorocromului. Timpii de expunere manuali pentru achiziția digitală de imagini imuno-etichetate cu MAP-2 au fost ținuti constanți permițând comparația între diferite godeuri și tratamente. Timpii de expunere Phalloidin (F-actină) și DAPI au variat pentru a se potrivi câmpului vizual. Domeniile vizuale aleatoare au fost obținute utilizând o cameră QImaging controlată prin software-ul Image Pro Plus. Imaginile au fost salvate ca fișiere TIFF și deschise în Adobe Photoshop CC 2015.1.2. Imaginile MAP-2, DAPI și imaginile Phalloidin au fost apoi suprapuse și îmbinate. Imaginile reprezentative au fost selectate pentru a ilustra diferențele în abundență și locație ale proteinelor examinate.

Imunocolorare

Celulele SH-SY5Y cultivate sub condițiile indicate descrise mai sus, tratate cu MRx0005 și MRx0029 timp de 24 ore și apoi lizate în tampon RIPA conținând amestec de inhibitori de protează (Roche Diagnostics, UK). Concentrația de proteină a fost estimată utilizând trusa de testare a proteinei BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), separată cu SDS-PAGE și transferată la o membrană PVDF. Membranele au fost apoi blocate cu 5% lapte uscat fără grăsime sau 5% BSA și incubate peste noapte la 4°C cu anticorpi primari (respectiv MAP2 și β 3-tubulină). Petele au fost apoi incubate cu anticorp secundar conjugat cu peroxidază din hrean adecvată (HRP), și proteinele au fost detectate cu trusa de detecție a chemiluminiscenței (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Pentru ambele MAP2 și β 3-tubulină, β -actina a servit ca control pentru a monitoriza variabilitatea de încărcare a proteinei printre mostre.

Rezultate și discuție

Expresia genei

Figura 43 prezintă modificările induse de MRx0029 și MRX005 în nivelurile de expresie de Actină, Villin, Occludin TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 și NSE.

Rezultate - Microscopie și imunocolorare

Figura 44 prezintă modificarea în nivelul de expresie al MAP2 în celulele SHSY5Y după cum s-a determinat prin microscopia confocală. Nivelurile de expresie ale MAP2 și β 3-tubulinei au fost de asemenea cuantificate prin analiză de imunocolorare. Rezultatele prezentate în figura 44M și N au indicat că MRX029 induce o creștere în expresia nivelului de MAP2.

Secvențe

Inițiatori suplimentari utilizați în qPCR (cu SEQ ID NO în paranteze)

ID genă	Secvență directă	Secvență inversă
NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATTT (34)	CTGTGCGCCAGATTACCT (35)
SYP	CTCGGCTTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTTCA (37)

50

55

SECVENȚE

SEQ ID NO:1 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 5825 - AB238922)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcgggg tgtagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc
121 aacttgcccta tcagaggggg ataaccggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
181 gatcccgcat gggaatattt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt
241 aggagttgg cggggtaacg gcccacaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
301 gtccccaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat
361 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgcgt gagggatgaa ggttctatgg
421 atcgtaaacc tcttttataa gggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct
481 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcc aagccgcg taatacggag gatccgagcg
541 ttatccgat ttattgggtt taaagggtgc gtaggcgcc ttttaagtca gcggtgaaag
601 tctgtggctc aaccatagaa ttgccgttga aactggggg cttgagtatg ttgaggcag
661 gcggaatgcg tgggtgtagc gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgccaag
721 gcagcctgcc aagccattac tgacgtgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta
781 gataccctgg tagtcacgc agtaaagcat gatcactagc tgtttgcgat acactgtaag
841 cggcacagcg aaagcgtaa gtgatccacc tggggagtag gccggcaacg gtgaaactca
901 aaggaattga cgggggccc cacaagcggg ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg

```

5

```

961 aggaacctta cccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat
1021 agccgtttgc gaggtgctgc atggttctcg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
1081 tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggtgga ggactctggt
1141 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaaggc ggggatgacg tcaaatcagc acggccctta
1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaa gggaggccacc tggcgacagg
1261 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccgca ctccgtgaag
1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt
1381 acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtagctga agtccgtaac cgaaaggatc
1441 ggcctagggg aaaactgggt actggggcta agtcgtaaca aggtaacc

```

SEQ ID NO:2 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13400 - AB238923)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggccacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctcatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcgcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggcggc tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccgccg ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac agtgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccactg gggagtagc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccgca caagcggagg aacatctggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgagctgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcca ggtgctgcat ggttgctgc tcgctcgtgc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagt actaacagg aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacagggg
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcgctgaa tacgttcccg ggccttgtag
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:3 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13401 - AB238924)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg

61 ggcagcacag gtagcaatac ccgccggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agtcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt gatgctgagg actctgggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg gtagtagcgc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggcgga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaagg atgccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagctctg caaccogact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggctttgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagcgtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:4 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13402 - AB238925)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagge ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac ccgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 qcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag

961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcggg ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgttttgcga ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgct aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcggg tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgctc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggctttgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:5 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13401 - AB238926)

1 agagtttggat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccgcgcga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgacca actcctacgg gaggcaçcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagt
 601 tgtggtccta ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggg
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccg ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccgcg caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcggg ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgttttgcga ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgct aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcggg tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgctc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggctttgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

5

SEQ ID NO:6 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13404 - AB238927)

1 agagtttggat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg

61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacg gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt agcgggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatccgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agtcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctgggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggcgga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaagg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggcttgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagcgtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:7 (Gena *Parabacteroides merdae* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 9497 - AB238928)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag
 301 gaagggtccc cacattggta ctgagacag gacczaactc ctacgggagg cagcagtga
 361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagcczagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggttaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtagggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttggt gctcaacat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttta ttcgatgata

961 cgcgaggaac cttaccocggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttataa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
 1381 ttgtacacac cggccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO:8 (Gena *Parabacteroides merdae* pentru ARN ribozomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13405 - AB238929)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggttcc gcatgggaat atttgtaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaacgcagc atggataggg gtictgagag
 301 gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaactc ctacgggagg cagcagtga
 361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatcgc
 541 agcgttatcc ggattttatt ggtttaaagg gtgcgtaggg ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttggt gctcaacat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cactcggga gtacgccggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccocggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttataa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
 1381 ttgtacacac cggccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

5

SEQ ID NO:9 (secvență ARNr 16S consens pentru tulpina *Parabacteroides distasonis* 755)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCTATCAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAGT
 CGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGCTAAAGATTTCATCGCTGATAGATAGGCATGCG
 TTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACA
 TTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTGACCTGAACC

AGCCAAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCGGGACGTGTCC
CGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGGAGGATCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCCTAGGCGGCCTTTTAAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAG
AATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTTGAAGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
ATCAGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCGAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAAA
CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGAGTAAACGATGATCACTAGCTGTTTGGGATACACTGTAAGCGGCACAGC
GAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGCCGCAACCGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCGGGTTTGAACGCATTCCGACMGAKGTGGAA
ACACATTTTCTAGCAATAGCCATTTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAG
TGCCATAACGAGCGCAACCTTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGCGTAAG
CTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGG
ACAAAGGGAAGCCACCTGGCGAGAGGAGCGAATCCCAAACACGCTCTAGTTCCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
TCCGTGAAGCTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG
CCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGTACCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCCTAGGGTAAACTGGTACTGG
GGCTAAGTCGTACGGGG

SEQ ID NO:10 (secvență genom a tulpinei 755) - vezi lista de secvențe electronică din WO2018229189.

SEQ ID NO:11 (secvență ARNr 16S consens pentru tulpina *Megasphaera massiliensis* MRX0029)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGAC
AACAGCTGGAACGGCTGCTAATACGAATACGTTCTTTCCGCCCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCCTTCGGG
CTTTCCGCTGAGAGAGGGCTTGCGCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCC
GGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAACGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGTCTGTATATG
GGACGAACAGGACATCGGTTAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGCGGCATCGCAAGT
CGGTCTTAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTCGGAGAGGAAAGCGGAA
TTCTTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACAGTGGCGAAAGCGGCTTTCTGGACGACAACCTGA
CGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGTAGTCTTGCCGTAACGATGGATACTAGG
TGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGACGCAACGCAAGAACCTTA
CCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGGAAGAGATTCCGGTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGACAGG
CTGTGCTCAGCTCGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACC
TCGGGTGGGACTCAGAAGAGACTGCCGAGACAATGCGGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTT
ATGGCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAAA
ACAGAGTCCAGTTCGATTGCGAGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGACGATA
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCATTACACCCGAAGCCGGTGA
GGCAACCGCAAG

5

Inițiatori utilizat pentru qPCR (cu SEQ ID NO în paranteză)

Nume	Secvență directă	Secvență inversă
ACTB	GATCAAGATCATTGCTCCTC (12)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAAC (13)
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (14)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (15)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (16)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (17)
Occludin	AAGAGGAATTTGACACTGG (18)	GCCATGTACTCTTCACTTTC (19)
TJ1	AAGTCACACTGGTGAAATCC (20)	CTCTTGCTGCCAAACTATCT (21)
TJP2	CCCTCCCCTGGATCAGGAT (22)	GCCATCAAACCTCGTCCATCA (23)
Villin	CATTACCTGCTCTACGTTTG (24)	AGATGGACATAAGATGAGGTG (25)

REFERIRI

10

- [1] Spor și colab. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.
- [2] Eckburg și colab. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson și colab. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35
- [4] Macpherson și colab. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.
- 15 [5] Mazmanian și colab. (2005) Cell 15;122(1):107-18.
- [6] Frank și colab. (2007) PNAS 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan și colab. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.

- [8] Kang și colab. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels și colab. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- 5 [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin și Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad și colab. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Mayer și colab (2014) *The Journal of Neuroscience* 34(46):15490 -15496
- 10 [17] Cryan și Dinan (2015) *Neuropsychopharmacology*, 40: 241-2.
- [18] Zhou și Foster (2015) *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11: 715-723.
- [19] Wang și Kasper (2014) *Brain Behav Immun.* 38: 1-12.
- [20] WO2016/203220
- [21] Capitol 38 - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system
- 15 (2014) *Handbook of Clinical Neurology* 119, 577-584
- [22] Sakamoto și Benno (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 7):1599-605.
- [23] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [24] Srůtkova și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [25] Pal R și colab, *Neurol Res* 2016, 38(12):1111-1122
- 20 [26] Daniele SG și colab, *Sci Signal* 2015, 8(376):ra45
- [27] Wang și colab. (2016) *J Neurogastroenterol Motil* 22: 589-605.
- [28] Foguem & Manckoundia (2018) *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18: 24
- [29] Ludolph și colab. (2009) *Eur J Neurol.* 16(3): 297-309.
- [30] Galpern & Lang (2006) *Neurological Progress* 59 (3) 449-458
- 25 [31] Zadori și colab (2012) *Journal of Neural Transmission*, 119, 2, 275-283
- [32] Lee și colab (2008) *Europaan J. Cell Biology* 87:389-397
- [33] Pirooznia și Elefant (2013) *Front Cell Neurosci.* 7: 30.
- [34] Tang, și colab. (2017) *JAm Heart Assoc*, 6(10).
- [35] Wang și colab. (2015) *PNAS* 112(9):2583-2858
- 30 [36] Psaty și colab. (2003) *JAMA*, 289(19):2534-44
- [37] *Lancet.* (1995) 346(8991-8992):1647-53
- [38] Miyamoto-Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [39] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. de Day și McLellan, Humana Press.
- [40] Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- 35 [41] Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [42] Kailasapathy și colab. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [43] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, ediția a 2-a, (1994), editat de A Wade și PJ Weller
- [44] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [45] US 2016/0067188
- 40 [46] *Handbook of Microbiological Media*, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [47] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [48] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [49] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. A 20-a ediție, ISBN: 0683306472.
- 45 [50] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream și colab., eds., 1998, Academic Press).
- [51] *Methods In Enzymology* (S. Colowick și N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [52] *Handbook of Experimental Immunology*, Volumele I-IV (D.M. Weir și C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 50 [53] Sambrook și colab. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laborator Press).
- [54] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [55] Ausubel și colab. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, ediția a 5-a (Current Protocols).
- 55 [56] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [57] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel și colab., eds., 1987) Supliment 30
- [58] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- 60 [59] Michel și Prat (2016) *Ann Transl Med.* 4(1): 15.

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
 <120> COMPOZIȚII CUPRINZÂND TULPINI BACTERIENE
 <130> P070771EP
 5 <141> 2018-06-14
 <150> GB 1709465,7
 <151> 2017-06-14
 <150> GB 1709526,6
 <151> 2017-06-15
 10 <150> GB 1805990,7
 <151> 2018-04-11
 <150> GB 1805989,9
 <151> 2018-04-11
 <150> GB 1806780,1
 15 <151> 2018-04-25
 <150> GB 1805991,5
 <151> 2018-04-11
 <150> GB 1806779,3
 <151> 2018-04-25
 20 <160> 25
 <170> SeqWin2010, versiunea 1.0
 <210> 1
 <211> 1488
 <212> ADN
 25 <213> Parabacteroides distasonis
 <400> 1
 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
 ggcagcgggg tgtagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc 120
 aacttgcta tcagaggggg ataaccgggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg 180
 gatcccgcat gggaatatgt gctaaagatt catcgctgat agatagcat gcgtccatt 240
 aggcagttgg cggggtaacg gccccacaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag 300
 gtccccaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat 360
 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgcgt gagggatgaa ggttctatgg 420
 atcgtaaac tcttttataa gggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct 480
 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgccg gcagccggcg taatacggag gatccgagcg 540
 ttatccggat ttattgggtt taaagggtgc gtagggcgcc ttttaagtca gcggtgaaag 600
 tctgtggctc aaccatagaa ttgcccgtga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag 660
 gcggaatgcg tgggtgtagcg gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgccaag 720
 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta 780
 gataccctgg tagtccacgc agtaaacgat gatcactagc tgtttgcgat acactgtaag 840
 cggcacagcg aaagcgttaa gtgatccacc tggggagtac gccggcaacg gtgaaactca 900
 aaggaattga cggggggccc cacaagcgga ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg 960
 aggaacctta cccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat 1020
 agccgtttgc gaggtgctgc atggttgcg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag 1080
 tgccataacg agcgcaacc ttgccactag ttaactaacg gttaggctga ggactctggt 1140
 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaagcg ggggatgacg tcaaatcagc acggccctta 1200
 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaaag ggaggccacc tggcgacagg 1260
 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccgga ctccgtgaag 1320
 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt 1380
 acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtacctga agtccgtaac cgaaaggatc 1440
 ggcctagggt aaaactggtg actggggcta agtcgtaaca aggtaacc 1488
 <210> 2
 30 <211> 1486
 <212> ADN
 <213> Parabacteroides distasonis
 <400> 2

agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgacg	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
cttacctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
cgtaaacctc	ttttataaagg	gaataaagtg	cgggacgtgt	cctgttttgt	atgtacctta	480
tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacgaggga	tcggagcggt	540
atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctggggggct	tgagtatggt	tgaggcaggc	660
ggaatgcgtg	gtgtagcgtg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaacccoga	ttgcgaaggc	720
agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	agtgtaaagc	840
gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtagc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
ggaattgacg	ggggcccgca	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
ccgtttgcga	ggtgctgcat	ggttgtcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	aaagctgagg	actctggtgg	1140
gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
tcggggcgca	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaaggg	aagccacctg	gcgacagggg	1260
gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtcgt	caaccggact	ccgtgaagct	1320
ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcgggtgaa	tacgttcccg	ggccttgtac	1380
acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tcgtaaccg	aaaggatcgg	1440
cctagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

<210> 3

<211> 1486

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides distasonis

<400> 3

agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
ggcagcacag	gtagcaatac	ccggcgcgga	ccggcgacg	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
cttgcctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
cgtaaacctc	ttttataaagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cctgttttgt	atgtacctta	480
tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacgaggga	tcggagcggt	540
atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatggt	tgaggcaggc	660
ggaatgcgtg	gtgtagcgtg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaacccoga	ttgcgaaggc	720
agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	actgtaaagc	840
gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtagc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
ggaattgacg	ggggcccgca	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
ccgtttgcga	ggtgctgcat	ggttgtcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	gatgctgagg	actctggtgg	1140
gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
tcggggcgca	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaaggg	atgccacctg	gcgacagggg	1260
gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtcgt	caaccggact	ccgtgaagct	1320
ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcgggtgaa	tacgttcccg	ggccttgtac	1380
acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tcgtaaccg	aaaggatcgg	1440
cctagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

<210> 4

<211> 1486

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 4

10

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacattt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataaag gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac actgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg gcccttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 5

<211> 1486

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides distasonis

<400> 5

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacattt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataaag gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac attgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg gcccttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 6

<211> 1486

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 6

10

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacattt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcggt 540
atccggattht attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccttggtg gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac atgtgaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctgggtg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caacccgact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcg c atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg ggccctgtac 1380
acaccgcccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 7

<211> 1492

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides merdae

<400> 7

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
cagggggtccc gcatgggaat atttgtaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaacggacy atggataggg gttctgagag 300
gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag 360
gaatattggt caatggcga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgag 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg 600
aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcgga tgcgtggtgt agcgtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaagcgagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttta ttcgatgata 960
cgcgaggaa cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttacta acaggtgaag ctgaggactc 1140

```

```

tggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccgatcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag 1440
gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

10 <210> 8

<211> 1492

<212> ADN

<213> Parabacteroides merdae

<400> 8

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
caggggttcc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattagggcag ttggcggggt aacggccccc caaaccgacg atggataggg gttctgagag 300
gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag 360
gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagt cgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggaggatgag 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggg ggtgatttaa gtcagcgggtg 600
aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcggaa tgcgtggtgt agcgtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgtatgattac taggagtgtt cgatacaatg 840
taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacgggtgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata 960
cgcagcggaa cttaaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtctgcagct cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
tggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia ttgcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggtatgcta atctccaaac catgtctcag ttccggtcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag 1440
gatcgcccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

<210> 9

<211> 1403

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides distasonis

<400> 9

```

amccgggtgg cgaccggcgc acgggtgagt aacgcgtatg caacttgctt atcagagggg 60
gataaaccgg cgaaagtcgg actaataccg catgaagcag ggatcccgca tgggaatatt 120
tgctaaagat tcatcgctga tagataggca tgcgttccat taggcagttg gcggggtaac 180
ggccaccacaa accgacgatg gataggggtt ctgagaggaa ggtcccccac attgggtactg 240
agacacggac caaactccta cgggagcgag cagtggaggaa tattggtcaa tgggcgtgag 300
cctgaaccag ccaagtcgcg tgagggatga aggttctatg gatcgtaaac ctcttttata 360
agggataaaa gtgcgggacg tgtcccgttt tgtatgtacc ttatgaataa ggatcggcta 420
actccgtgcc agcagcccg cgtaatcgga ggatccgagc gttatccgga tttattgggt 480
ttaaagggtg cgtaggcggc cttttaagtc agcgggtgaaa gtctgtggct caaccataga 540
attgccgttg aaactgggag gcttgagtat gtttgaggca ggcggaatgc gtggtgtagc 600
ggtgaaatgc atagatatca cgcagaaccc cgattgcgaa ggcagcctgc caagccatta 660
ctgacgctga tgcacgaaag cgtggggatc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 720
cagtaaacga tgatcactag ctgtttgcga tacactgtaa gcggcacagc gaaagcggtta 780
agtgatccac ctggggagta cgccggcaac ggtgaaactc aaaggaattg acggggggccc 840
gcacaagcgg aggaacatgt ggtttaattc gatgatacgc gaggaacdt acccggtttt 900
gaacgcattc ggacmgakgt ggaaacacat tttctagcaa tagccatttg cgaggtgctg 960
catggttgtc gtcagctcgt gccgtgaggt gtccgcttaa gtgccataac gagcgcaacc 1020
cttgccacta gttactaaca ggtaaagctg aggactctgg tgggactgcc agcgtaaagct 1080
gcgaggaagg cggggatgac gtcaaatcag cacggccctt acatccgggg cgacacacgt 1140
gttacaatgg cgtggacaaa gggaagccac ctggcgacag ggagcgaatc cccaaaccac 1200
gtctcagttc ggatcggagt ctgcaacccg actccgtgaa gctggattcg ctagtaatcg 1260
cgcacagccc atggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc 1320
atgggagccg ggggtacctg aagtcogtaa ccgcgaggat cggcctaggg taaaactggt 1380
gactggggct aagtcgtacg ggg 1403

```

<210> 11

10 <211> 1398

<212> ADN

<213> Megaspheara massiliensis

<400> 11

	tgagaagcctt	gcttcttatc	gattctagtg	gcaaacgggt	gagtaacgcg	taagcaacct	60
	gcccttcaga	tggggacaac	agctggaaac	ggctgcta	accgaatacg	ttctttccgc	120
	cgcatacgcg	gaagaagaaa	gggagccctt	cgggctttcg	ctggaggagg	ggcttgctgc	180
	tgattagcta	gttgaggagg	taacggccca	ccaaggcgac	gatcagtagc	cggctctgaga	240
	ggatgaacgg	ccacattggg	actgagacac	ggcccagact	cctacgggag	gcagcagtg	300
	ggaatcttcc	gcaatggacg	aaagtctgac	ggagcaacgc	cgcgtgaacg	atgacggcct	360
	tcgggttgta	aagttctgtt	atatgggacg	aacaggacat	cggttaatac	ccggtgtctt	420
	tgacggtacc	gtaagagaaa	gccacggcta	actacgtgcc	agcagccgcg	gtaatacgta	480
	ggtggcaagc	gttgtccgga	attattgggc	gtaaagggcg	cgcaggcggc	atcgcaagtc	540
	ggtcttaaaa	gtgcggggct	taaccccggt	aggggaccca	aactgtgaag	ctcgagtgtc	600
	ggagaggaaa	gcggaattcc	tagtgtagcg	gtgaaatgcg	tagatattag	gaggaacacc	660
	agtggcgaaa	gcggctttct	ggacgacaac	tgacgctgag	gcgcgaaagc	caggggagca	720
	aacgggatta	gatacccccg	tagtcctggc	cgtaaacgat	ggatactagg	tgtaggaggt	780
	atcgactcct	tctgtgccgg	agttaacgca	ataagtatcc	cgcctgggga	gtacggccgc	840
	aaggctgaaa	ctcaaaggaa	ttgacggggg	cccgcacaag	cgggtggagta	tgtgggttaa	900
	ttcgacgcaa	cgcgaagaac	cttaccaagc	cttgacattg	attgctacgg	aaagagattt	960
	ccggttcttc	ttcggaagac	aagaaaaacg	gtggtgcacg	gctgtcgtca	gctcgtgtcg	1020
	tgagatggtg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	gcaaccctta	tcttctgttg	ccagcacctc	1080
	gggtggggac	tcagaagaga	ctgccgcaga	caatgcggag	gaaggcgggg	atgacgtcaa	1140
	gtcatcatgc	cccttatggc	ttgggctaca	cacgtactac	aatggctctt	aatagaggga	1200
	agcgaaggag	cgatccggag	caaaccctaa	aaacagagtc	ccagttcgga	ttgcaggctg	1260
	caactcgcct	gcatgaagca	ggaatcgcta	gtaatcgtag	gtcagcatac	tgcggtgaat	1320
	acgttcccgg	gccttgtaca	caccgcccgt	cacaccacga	aagtcattca	caccggaagc	1380
	cggtgaggca	accgcaag					1398
	<210>	12					
	<211>	20					
	<212>	ADN					
5	<213>	Secvență artificială					
	<220>						
	<223>	Inițiator					
	<400>	12					
	gatcaagatc	attgctctc	20				
10	<210>	13					
	<211>	20					
	<212>	ADN					
	<213>	Secvență artificială					
	<220>						
15	<223>	Inițiator					
	<400>	13					
	ttgtcaagaa	agggtgtaac	20				
	<210>	14					
	<211>	21					
20	<212>	ADN					
	<213>	Secvență artificială					
	<220>						
	<223>	Inițiator					
	<400>	14					
25	ggtatcgtgg	aaggactcat g	21				
	<210>	15					
	<211>	21					
	<212>	ADN					
	<213>	Secvență artificială					
30	<220>						
	<223>	Inițiator					
	<400>	15					
	atgccagtga	gcttccggt c	21				
	<210>	16					
35	<211>	20					
	<212>	ADN					
	<213>	Secvență artificială					
	<220>						
	<223>	Inițiator					
40	<400>	16					
	ctcagcaccg	ctaacagagg	20				
	<210>	17					

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 5 <223> Inițiator
 <400> 17
 cattggcgcct tctctctc 19
 <210> 18
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Inițiator
 <400> 18
 15 aagaggaatt ttgacctgg 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 20 <220>
 <223> Inițiator
 <400> 19
 gccatgtact cttcacttc 20
 <210> 20
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Inițiator
 30 <400> 20
 aagtcacact ggtgaaatcc 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Inițiator
 <400> 21
 ctcttgctgc caaactatct 20
 40 <210> 22
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 45 <223> Inițiator
 <400> 22
 ccctccctg gatcaggat 19
 <210> 23
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Inițiator
 <400> 23
 55 gccatcaaac tcgtccatca 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 60 <220>
 <223> Inițiator

<400> 24
 cattacctgc tctacgtttg 20
 <210> 25
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223> Inițiator
 <400> 25
 10 agatggacat aagatgaggt g 21

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- YANG FANG ET AL: "The clinical significance of the imbalance of Th17 and Treg cells and their related cytokines in peripheral blood of Parkinson's disease patients", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE 2015, E-CENTURY PUBLISHING CORPORATION, US , vol. 9, no. 9 1 January 2016 (2016-01-01), pages 17946-17951, XP009507459, ISSN: 1940-5901 Retrieved from the Internet: [URL:https://pdfs.semanticscholar.org/d9d5/cb54bbbadceb6d3f0f2e77b0290a0e0759d1.pdf](https://pdfs.semanticscholar.org/d9d5/cb54bbbadceb6d3f0f2e77b0290a0e0759d1.pdf) [retrieved on 2018-08-15]
- WO-A1-2016/203218
- WAISMAN ARI ET AL: "The role of IL-17 in CNS diseases", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 129, no. 5, 26 February 2015 (2015-02-26), pages 625-637, XP035481826, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/S00401-015-1402-7 [retrieved on 2015-02-26]
- WO-A1-2016/203220
- SATORU HASEGAWA ET AL: "Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease", PLOS ONE, vol. 10, no. 11, 5 November 2015 (2015-11-05), page e0142164, XP055468390, DOI: 10.1371/journal.pone.0142164
- WO-A1-2017/079450
- M. SAKAMOTO: "Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov.", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 56, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1599-1605, XP055312207, GB ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ij.s.0.64192-0

(57) Revendicări:

1. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei tulburări neurodegenerative selectată din grupul constând din boală Parkinson, incluzând paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, incluzând sindrom Benson; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală a neuronului motor; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, incluzând corpi Lewy, demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV și degenerare corticobazală.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson.

3. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-2, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a debutului timpuriu al bolii neurodegenerative.

4. Compoziția pentru utilizare conform cu oricare din revendicările precedente, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de prevenire sau întârziere a debutului sau progresului unei tulburări neurodegenerative.

5. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare a leziunii creierului.

6. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 5, în care leziunea creierului este accident vascular cerebral, cum ar fi ischemie cerebrală, ischemie cerebrală focală, accident vascular cerebral ischemic sau accident vascular cerebral hemoragic.

7. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este de *Parabacteroides distasonis*.

8. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Parabacteroides distasonis*.

9. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1-7, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 sau 9.

10. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 9, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:9, sau în care tulpina bacteriană are secvența ARNr 16s reprezentată de SEQ ID NO:9.

11. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția cuprinde o tulpină bacteriană a speciilor *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson.

12. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente, în care compoziția este pentru administrare orală; și/sau în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți acceptabili farmaceutic sau purtător; și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată.

13. Un produs alimentar cuprinzând compoziția oricăreia din revendicările precedente, pentru utilizarea oricăreia din revendicările precedente.

14. O celulă de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382, pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei tulburări neurodegenerative, în care celula este pentru utilizare într-o metodă definită în oricare dintre revendicările 1-4.

15. Celula conform revendicării 14, în care tulburarea neurodegenerativă este boala Parkinson.

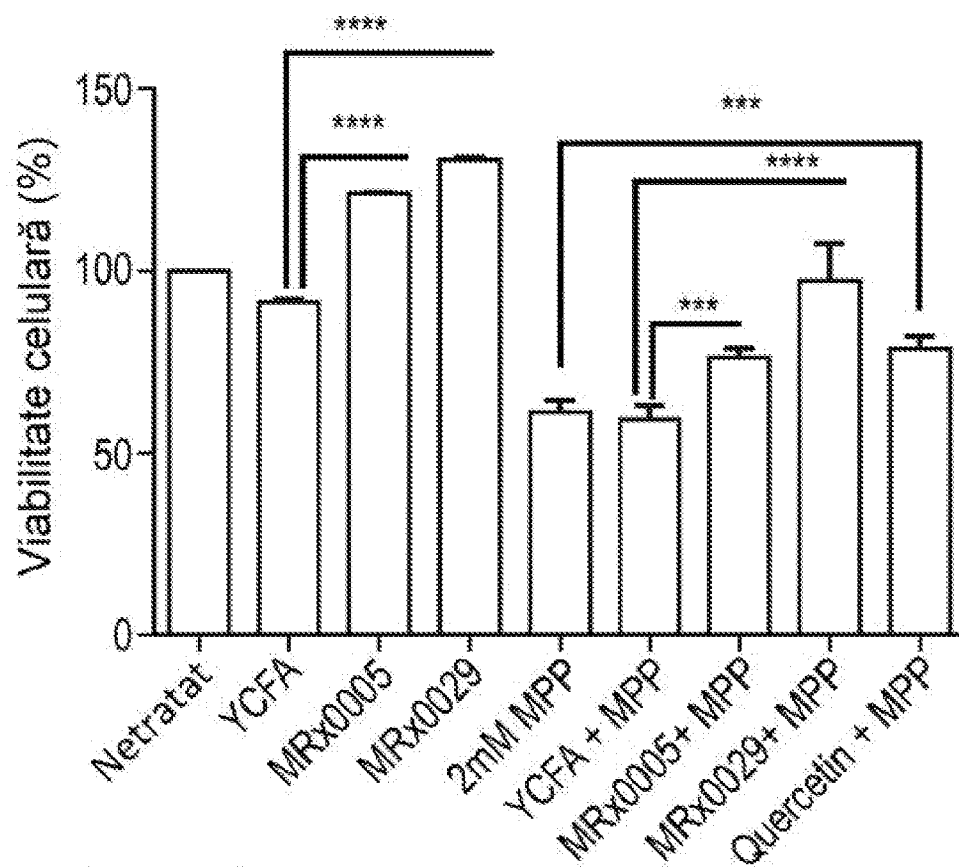
FIG. 1 Protecție împotriva neurotoxicității

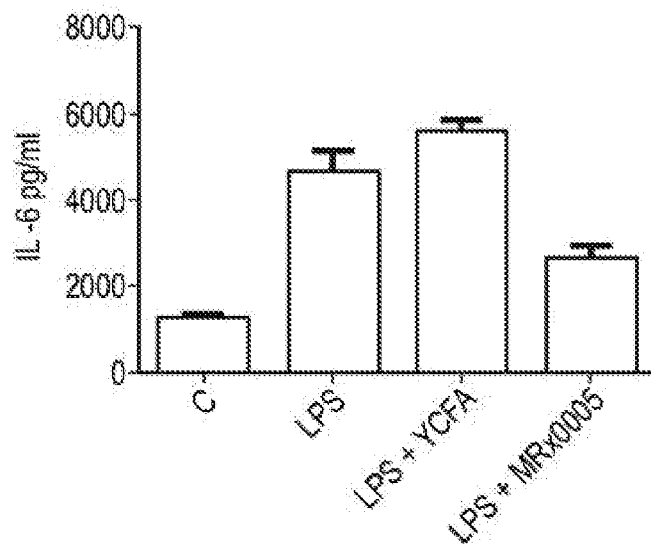
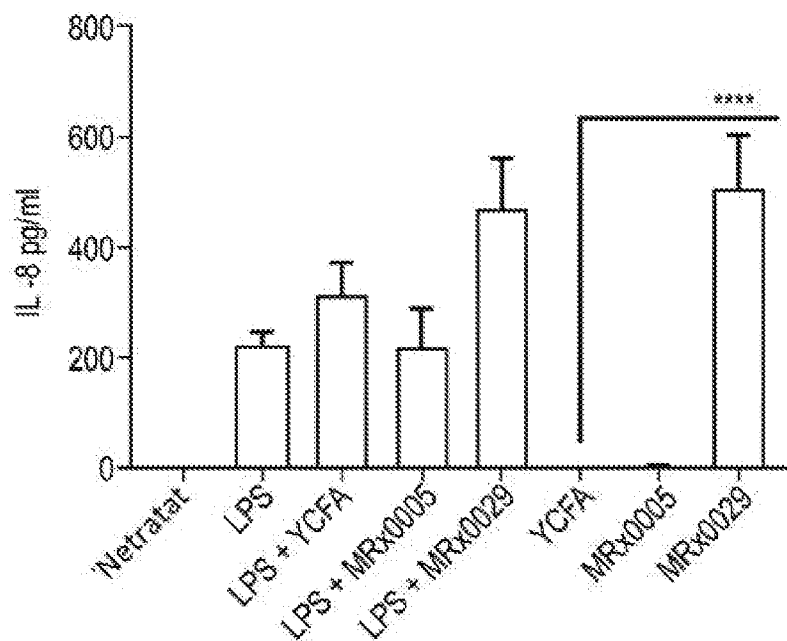
FIG. 2A Inhibarea secreției de IL-6 indusă de LPS în celulele U373**FIG. 2B** Secreția de IL-8 din U373

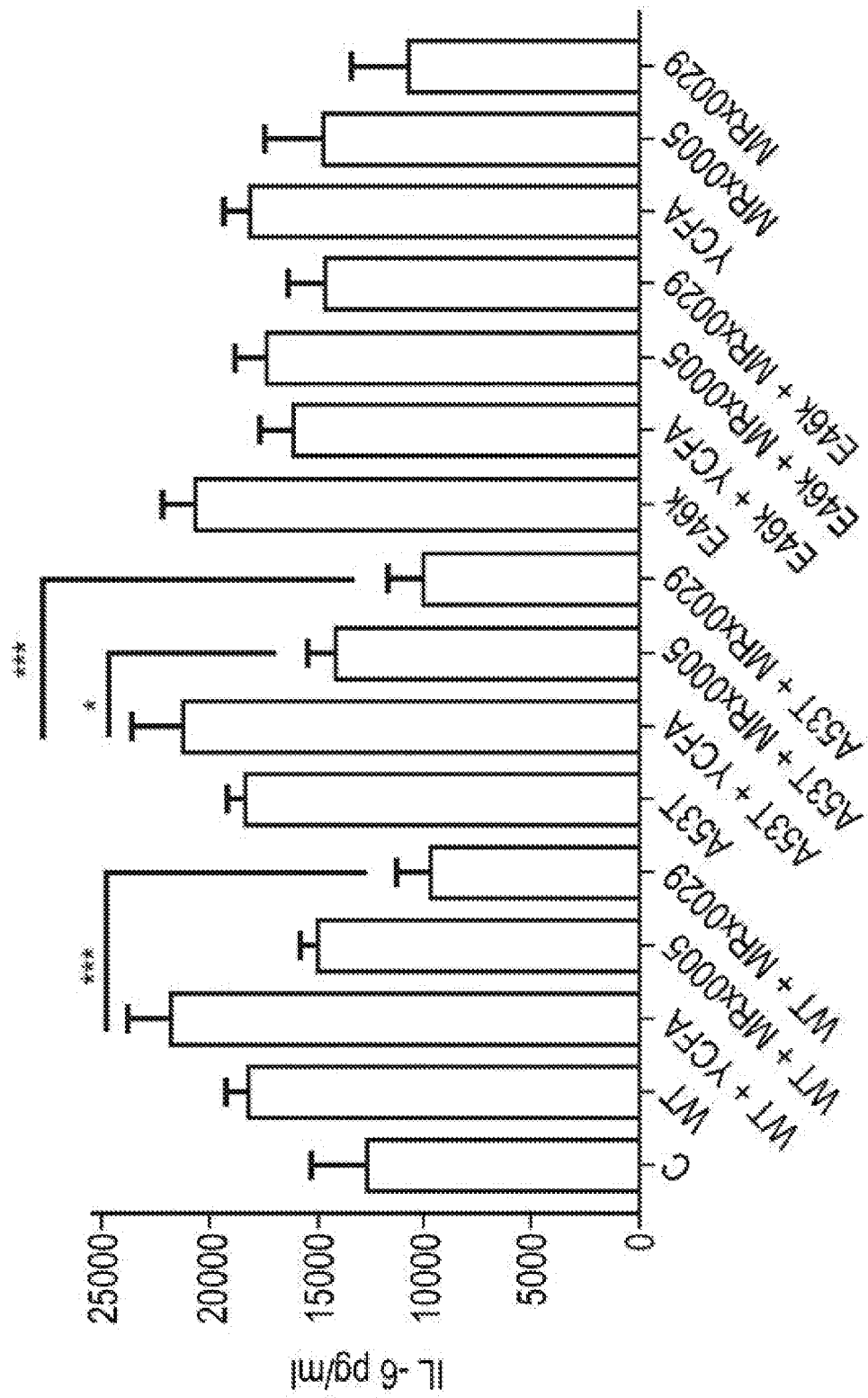
FIG. 3A Secreția de IL-6 din U373

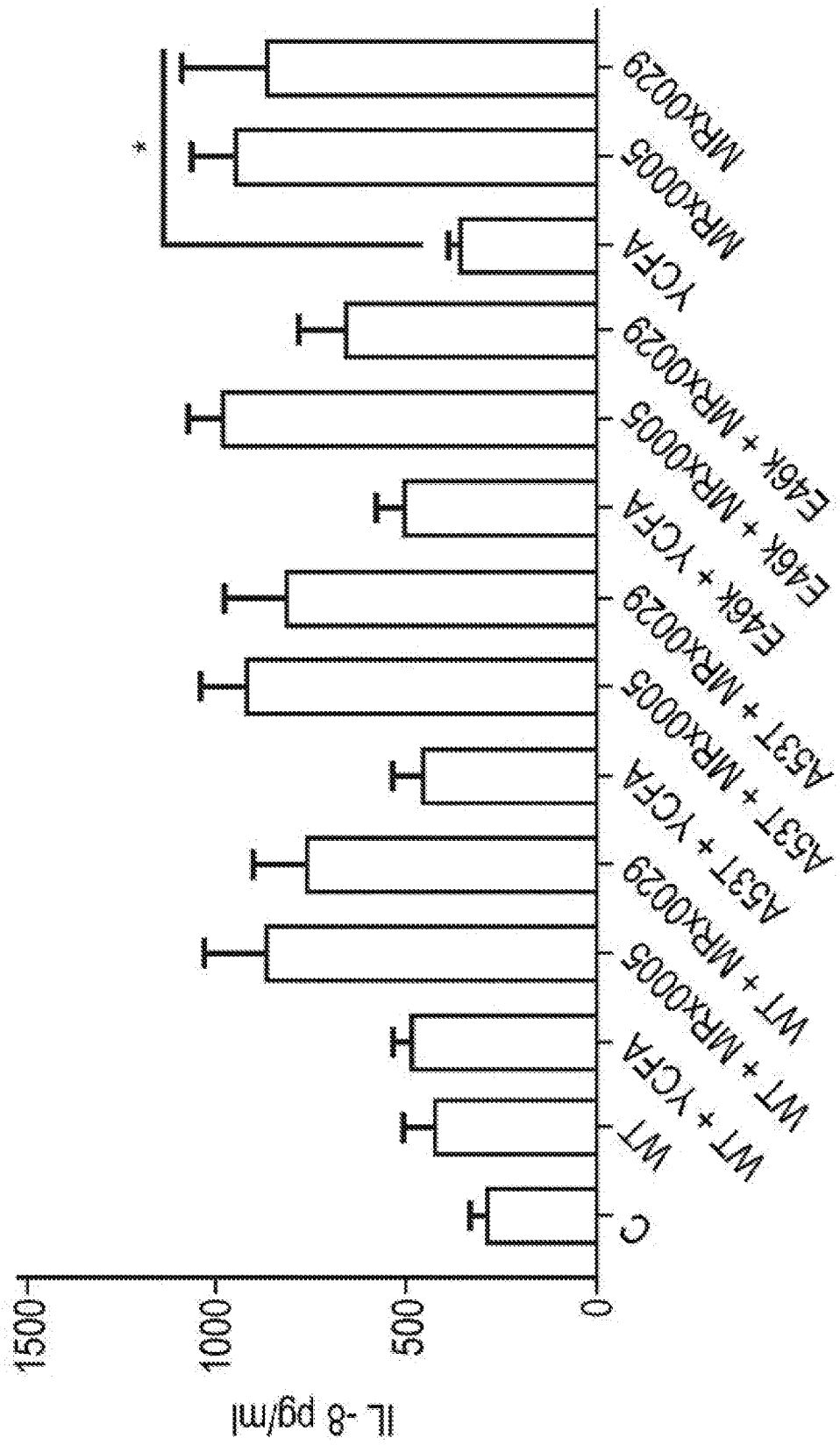
FIG. 3B Secreția de IL-8 din U373

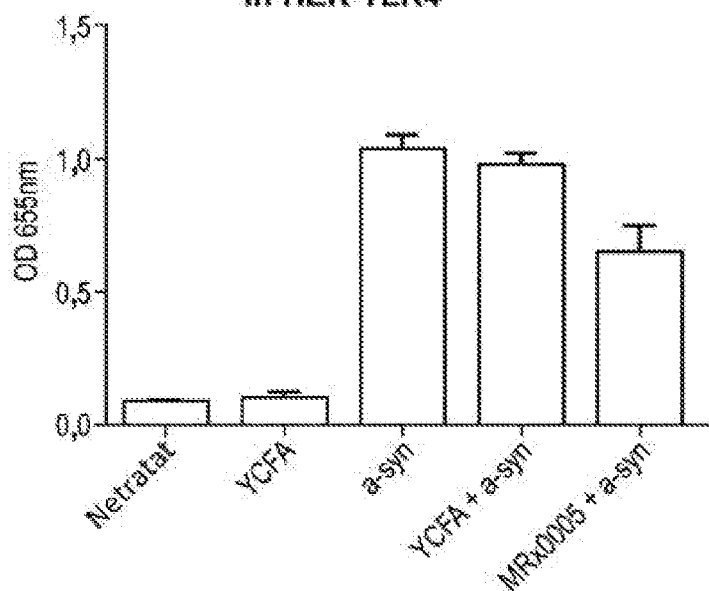
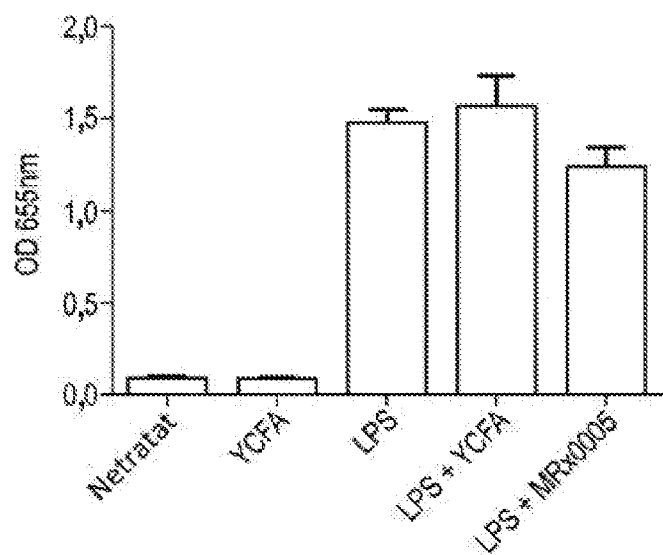
FIG. 4 Inhibarea activării NF κ B-AP1 indusă de α -sinucleină în HEK-TLR4**FIG. 5** Inhibarea activării NF κ B-AP1 indusă de LPS în HEK-TLR4

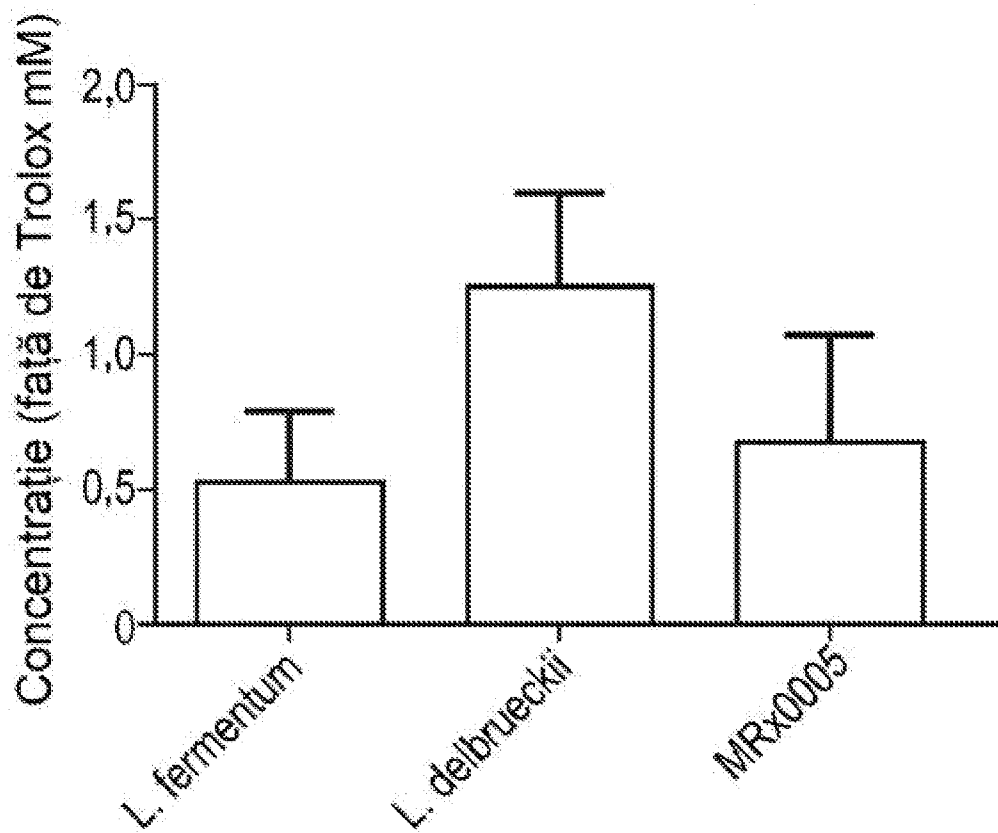
FIG. 6 Testarea capacității antioxidante

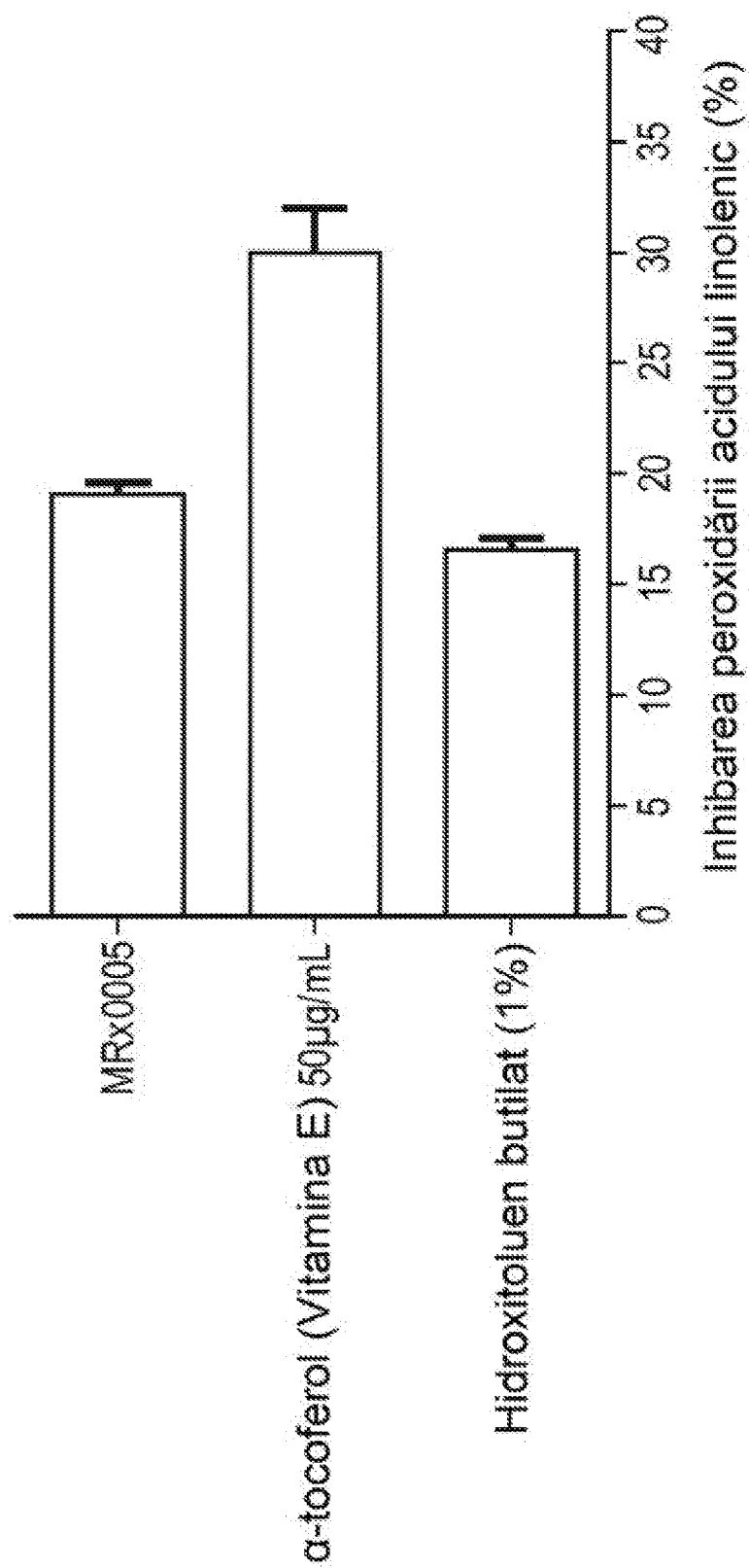
FIG. 7 Capacitate antioxidantă totală

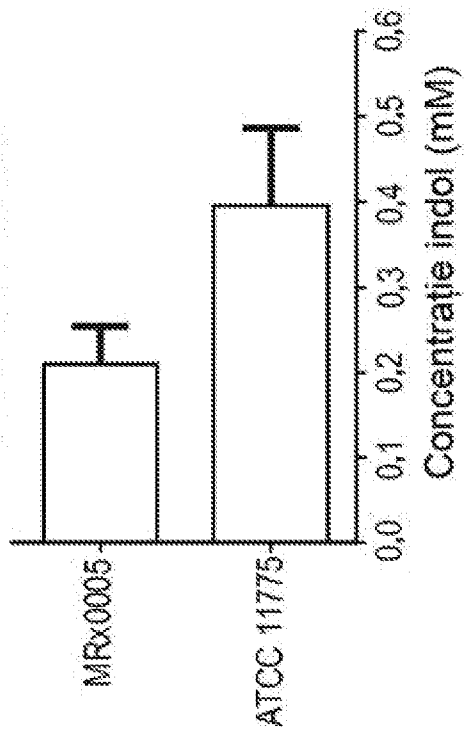
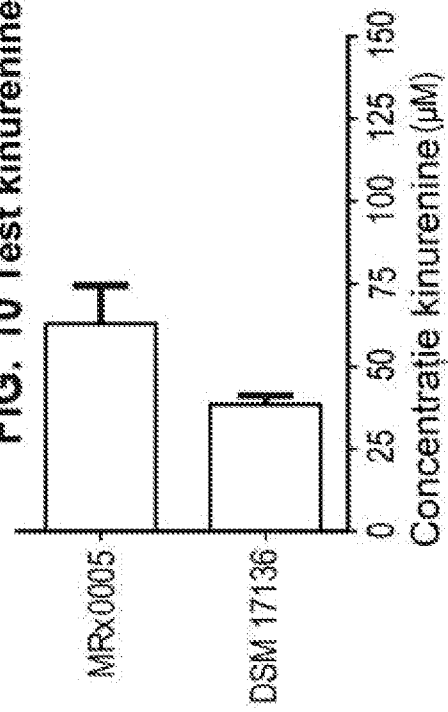
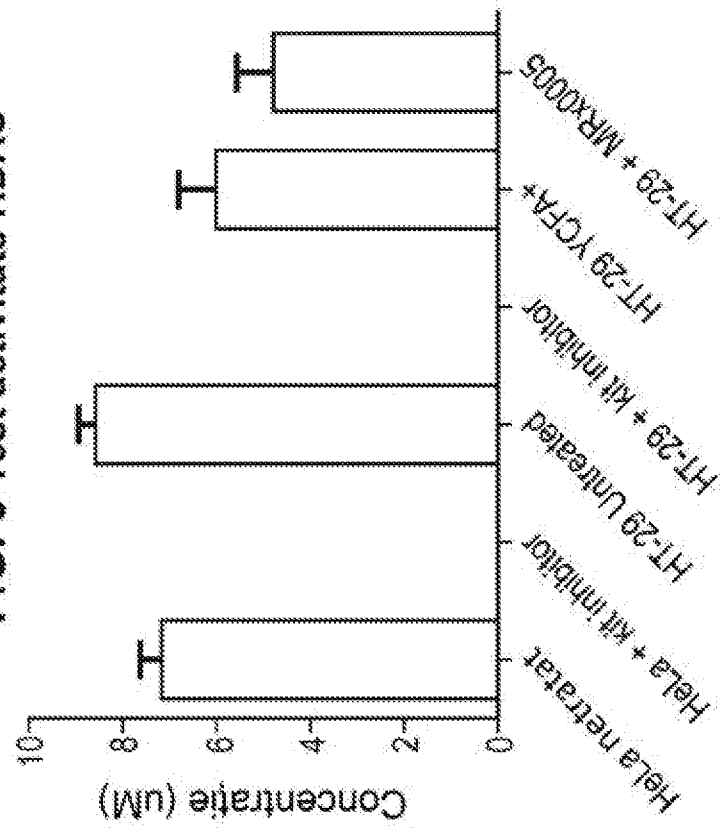
FIG. 9 Test indol**FIG. 10 Test kinurenine****FIG. 8 Test activitate HDAC**

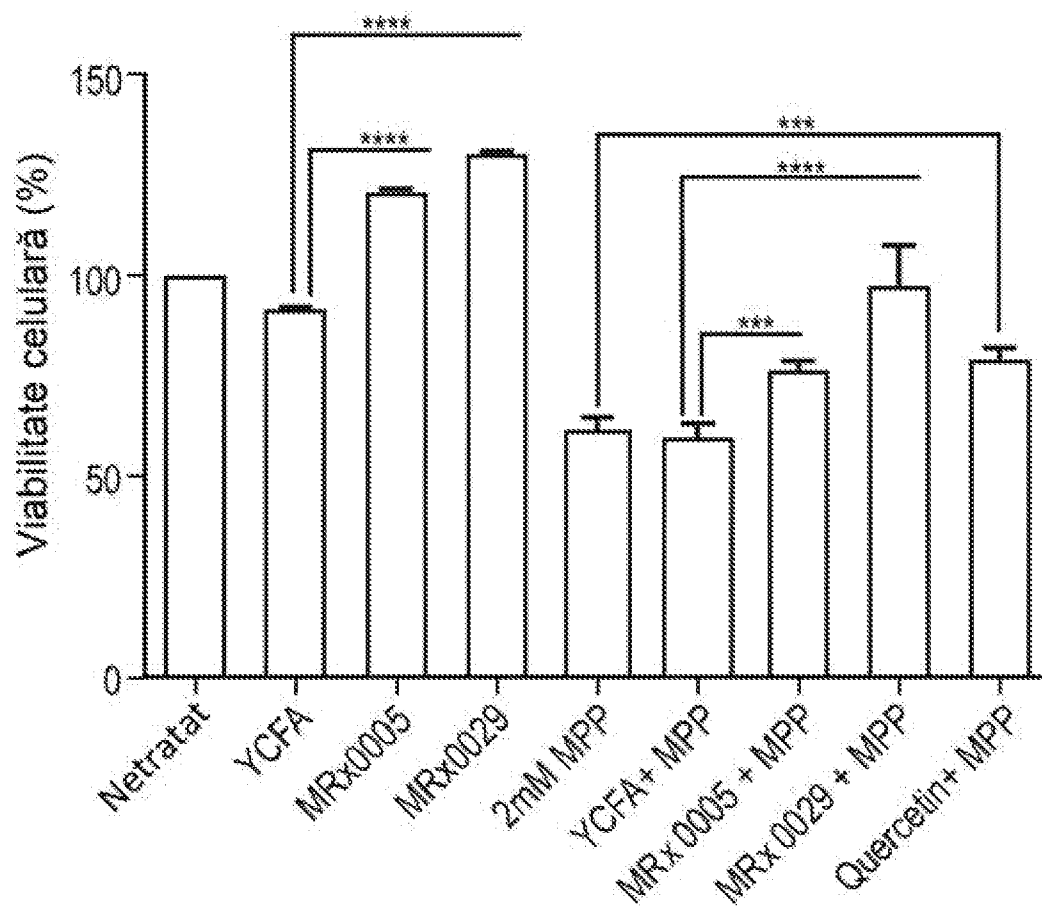
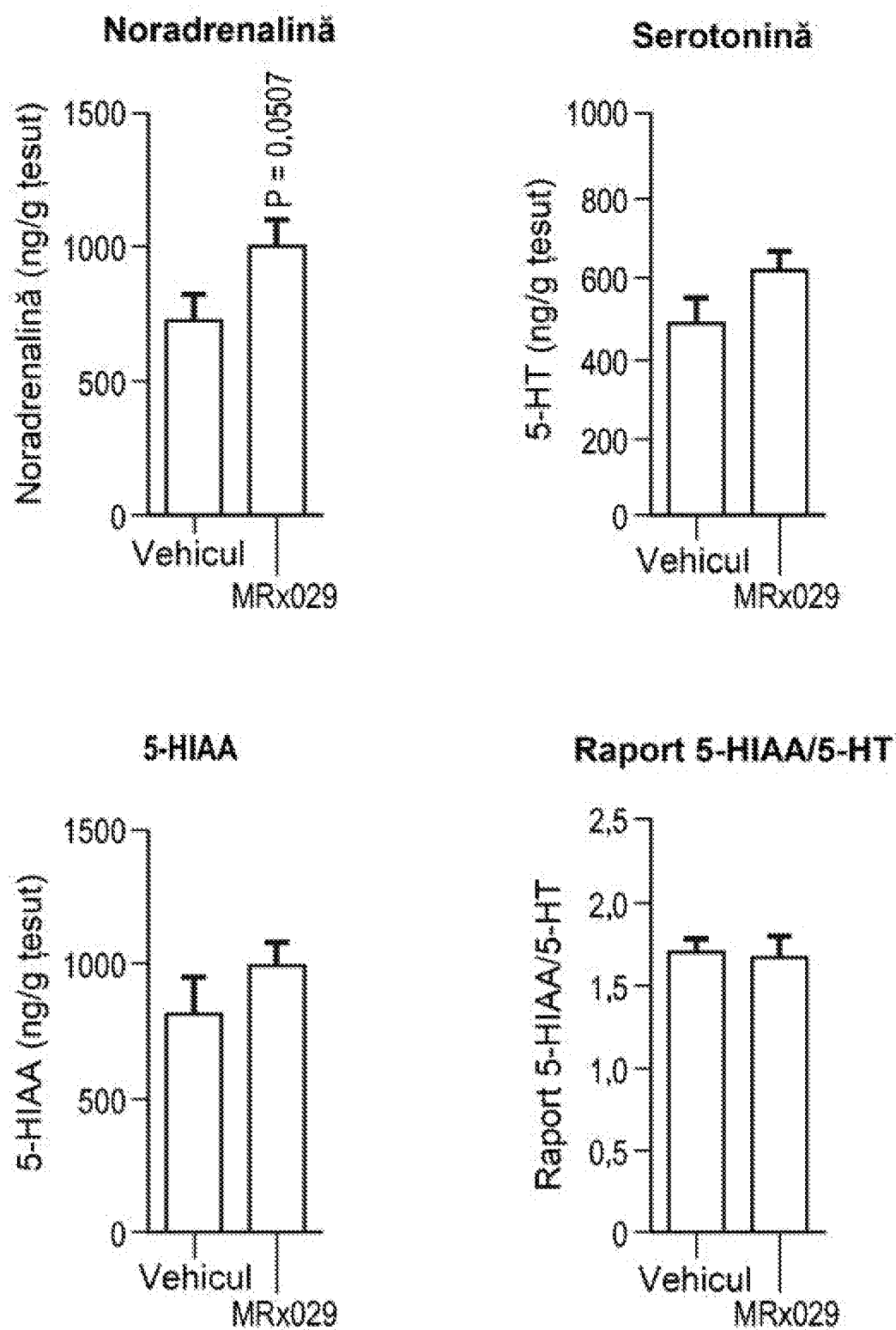
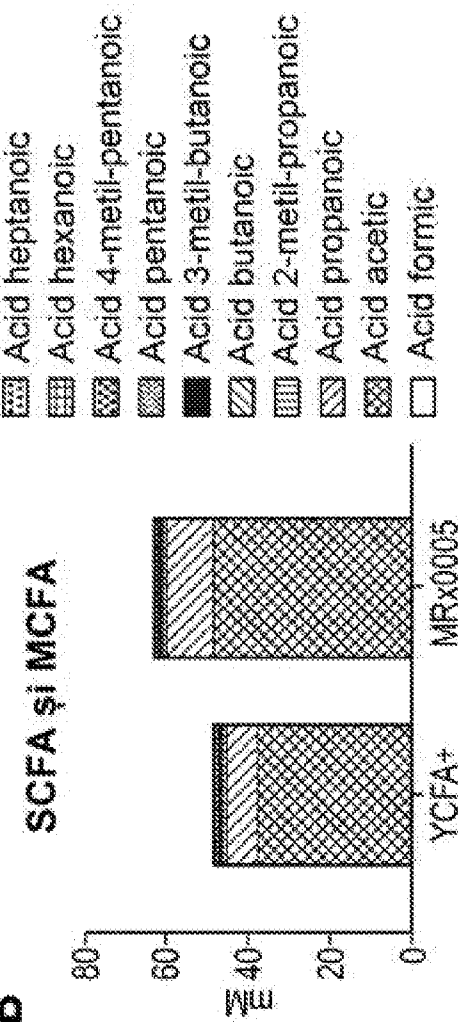
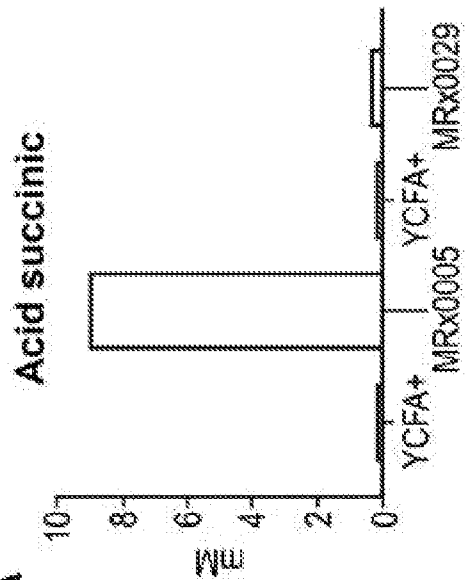
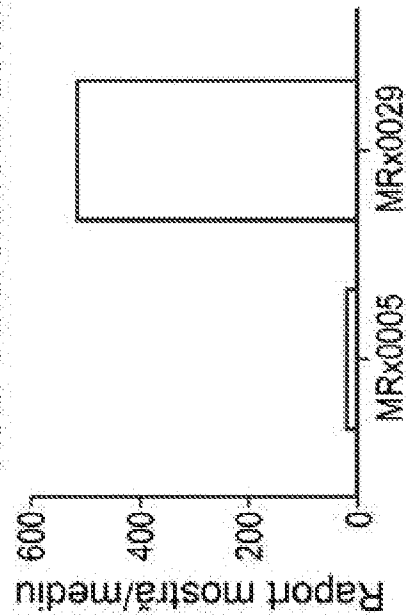
FIG. 11 Neuroprotecție - viabilitate celulară

FIG. 12 Producție de neurotransmițători în creier



Acid 4-hidroxi-fenil acetic



SCFA și MCFA

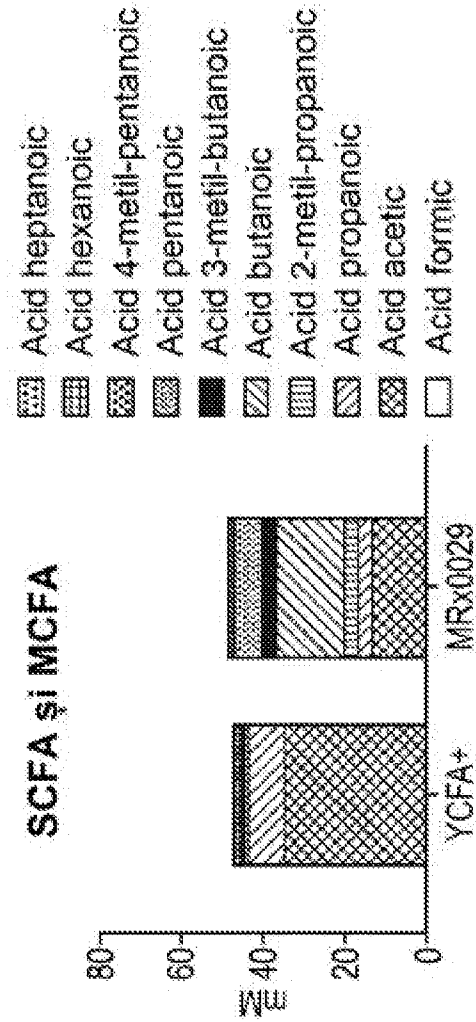
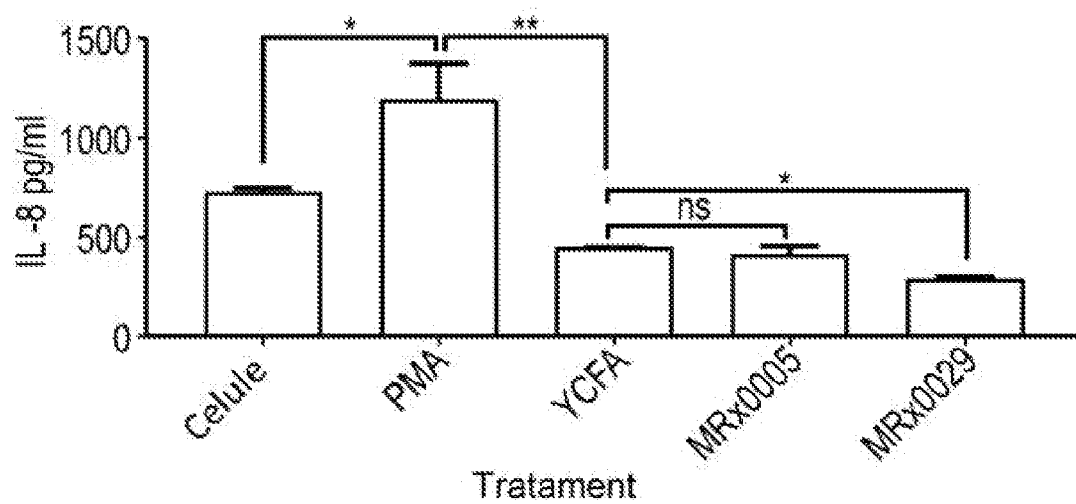


FIG. 14A



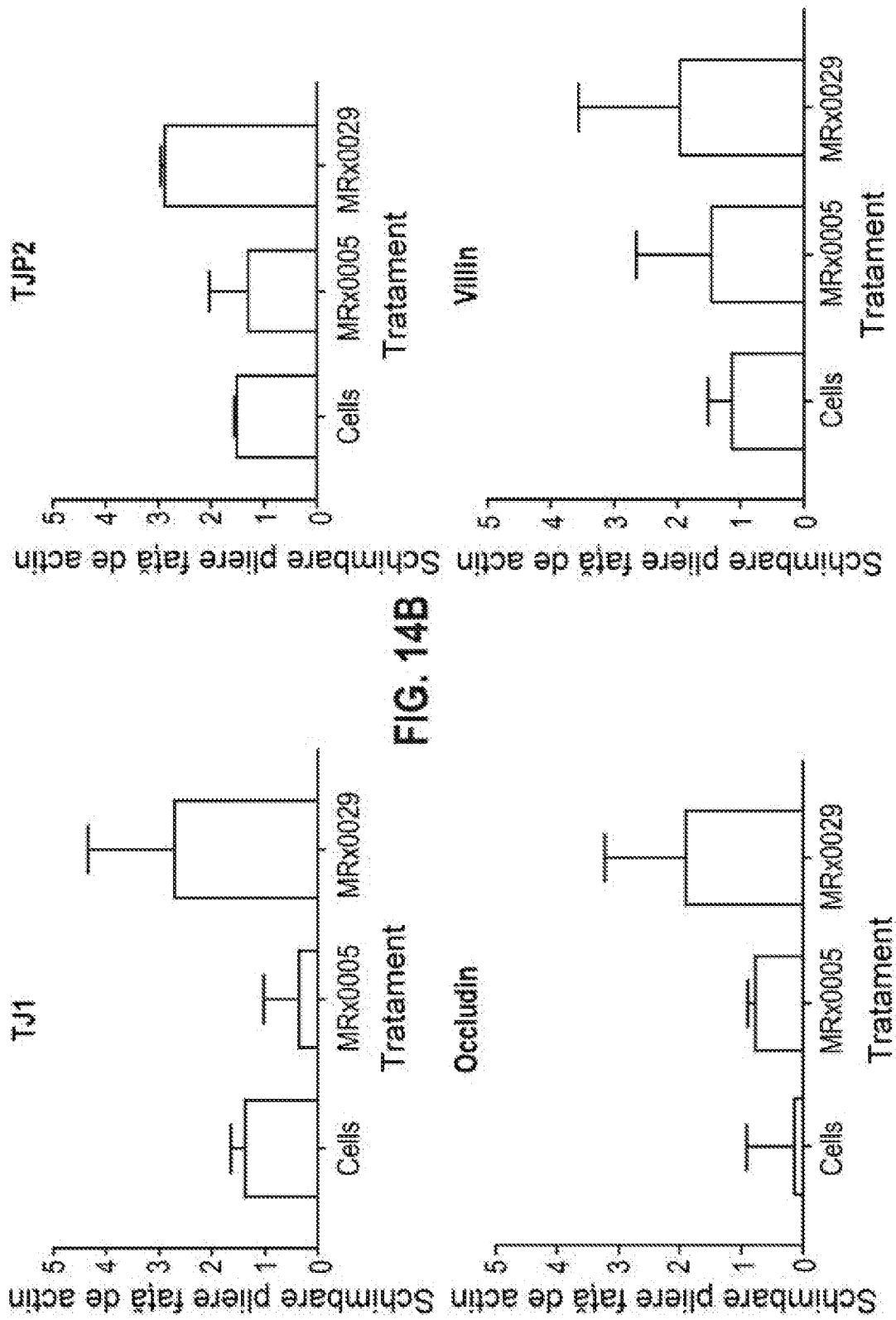


FIG. 14C

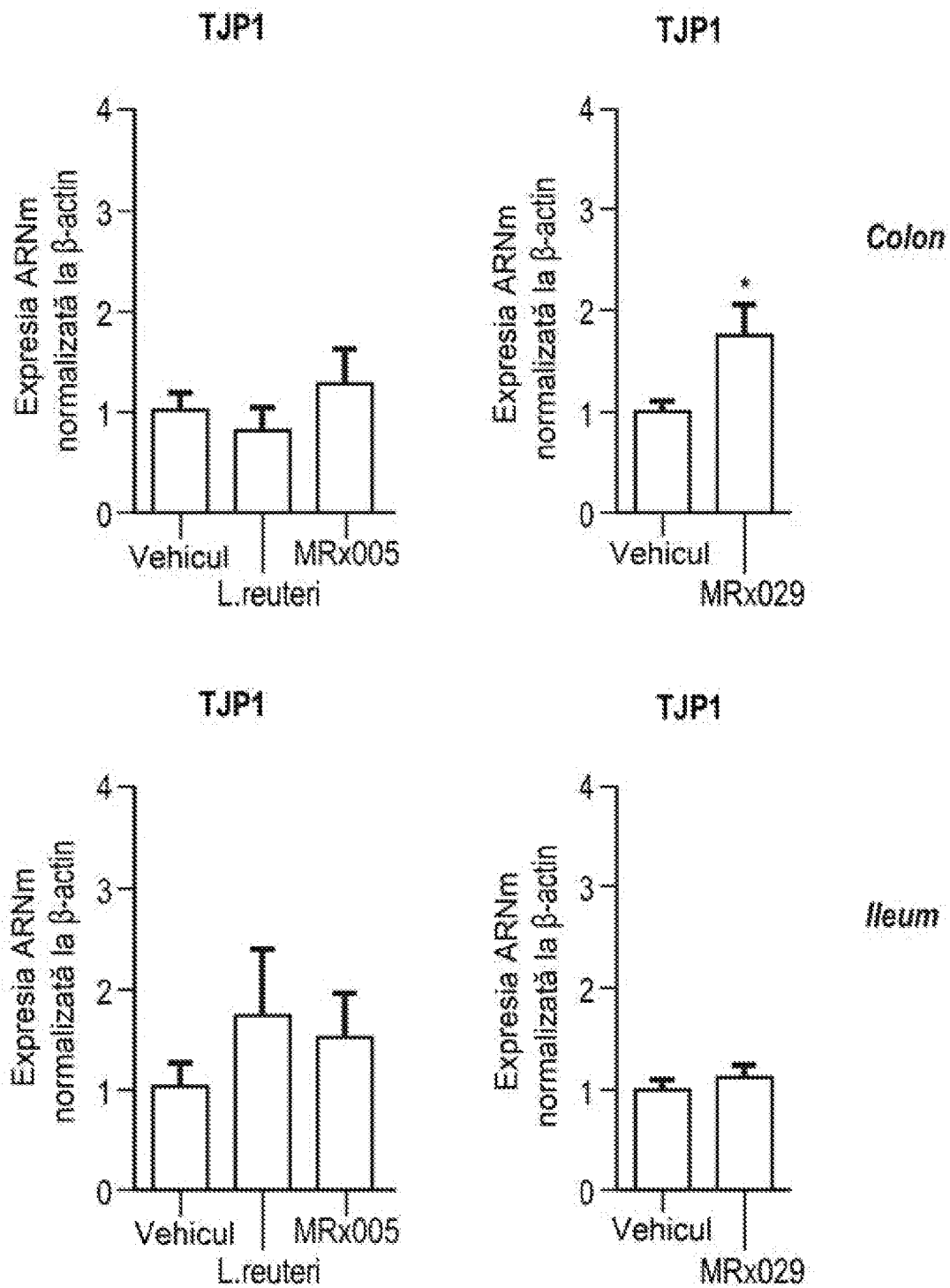


FIG. 14D

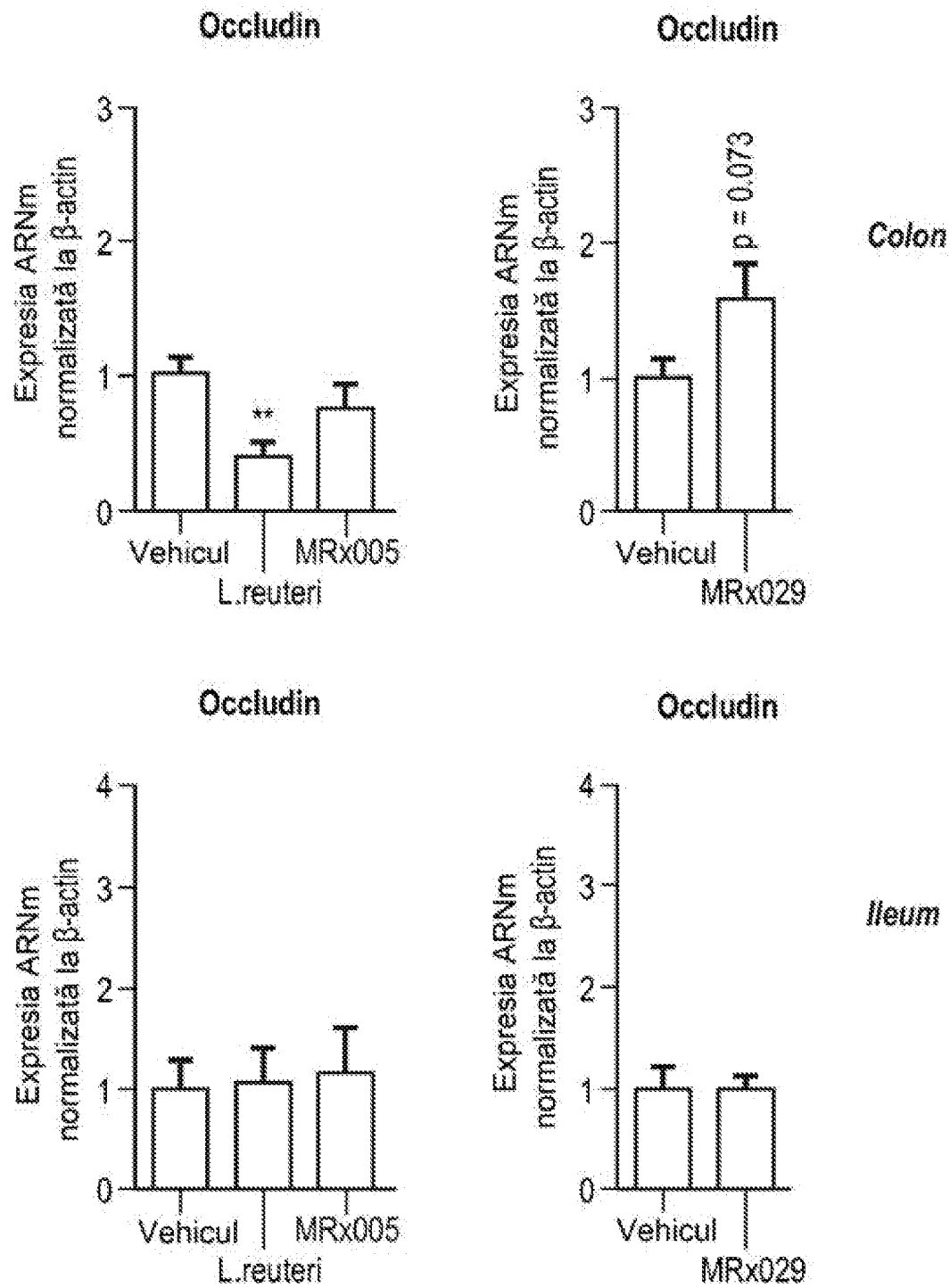


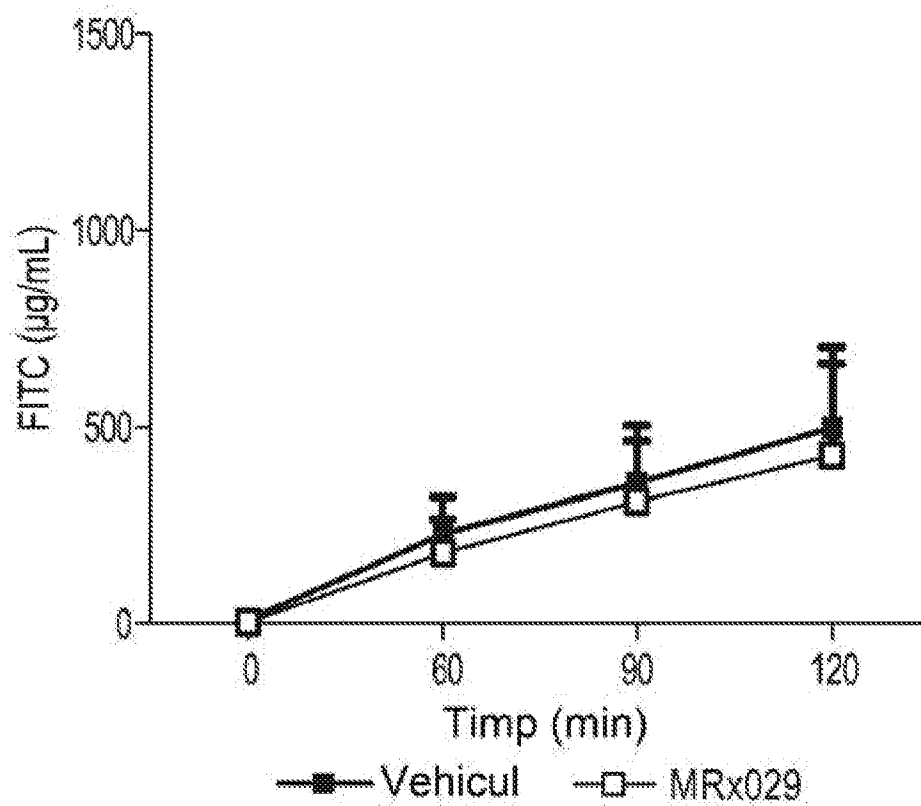
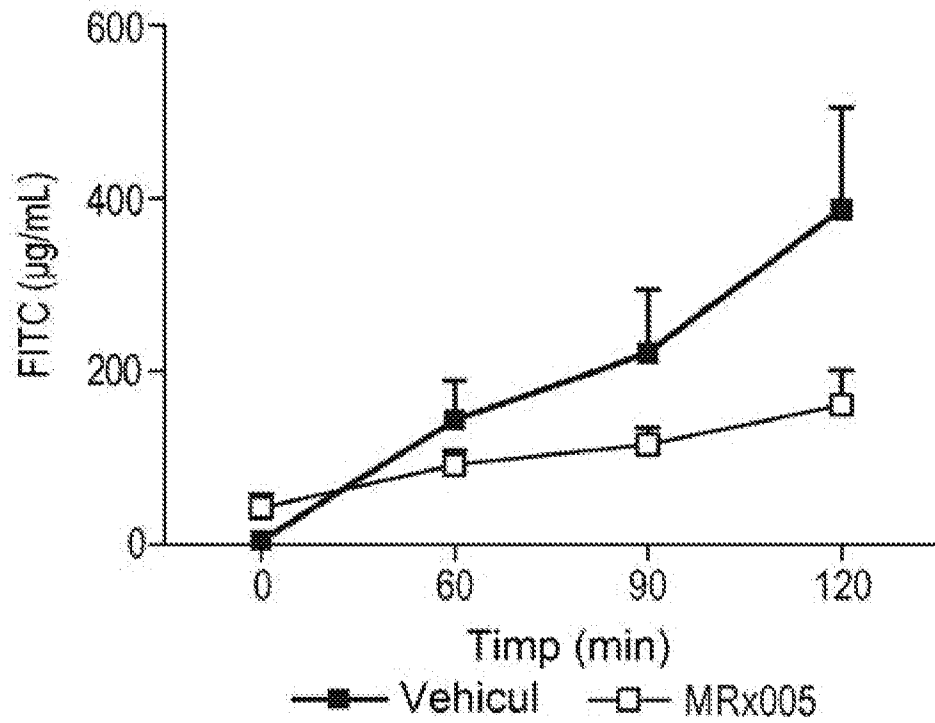
FIG. 14E Permeabilitate în ileum

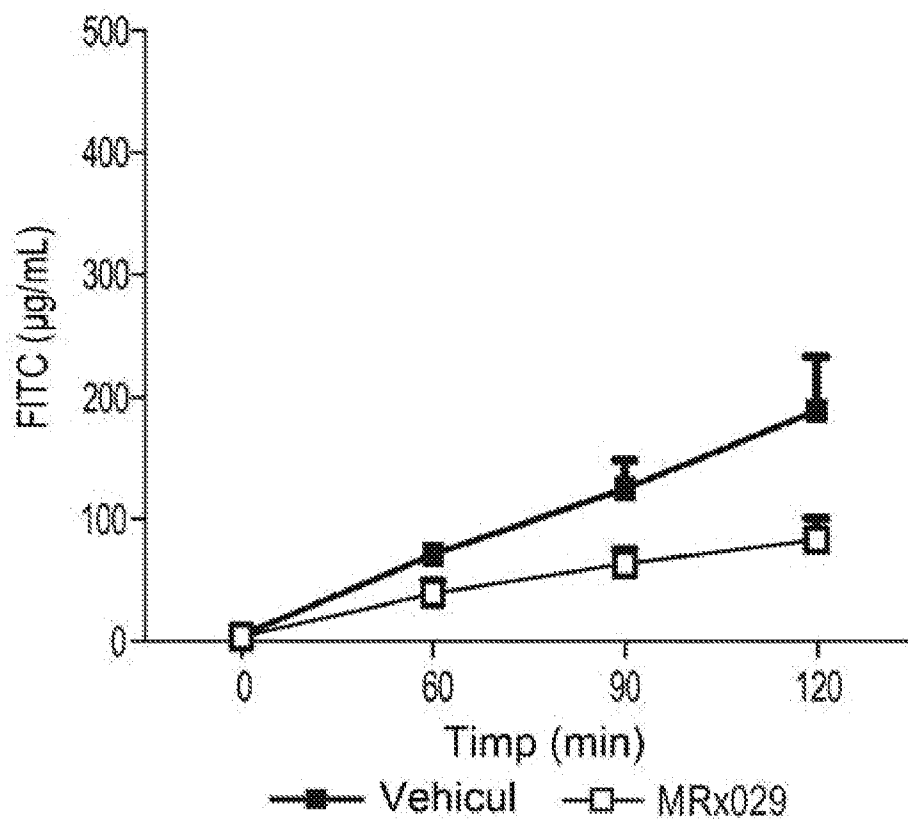
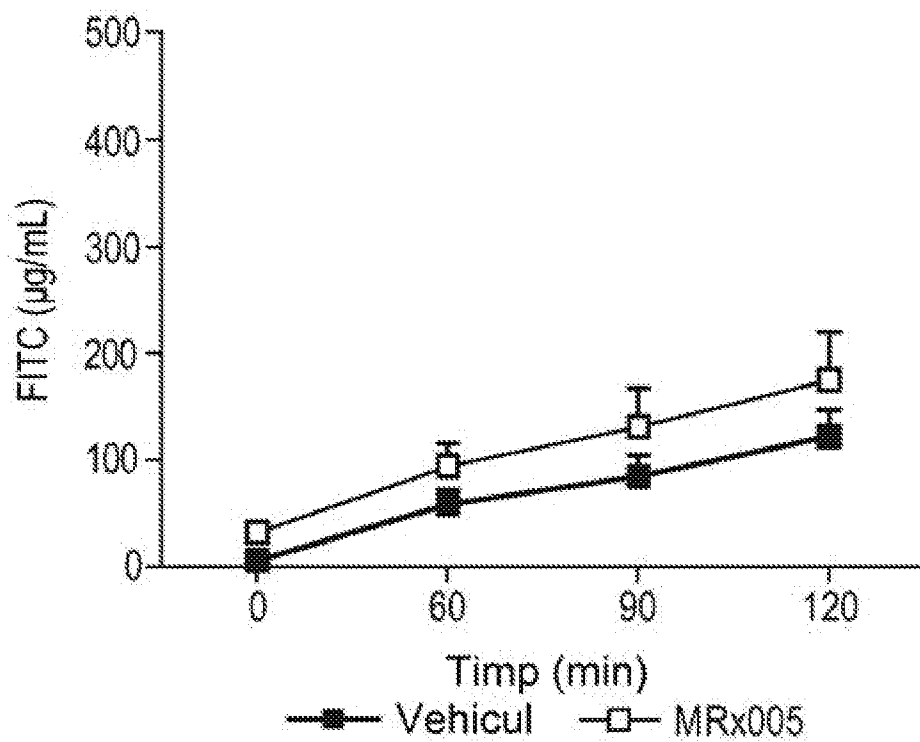
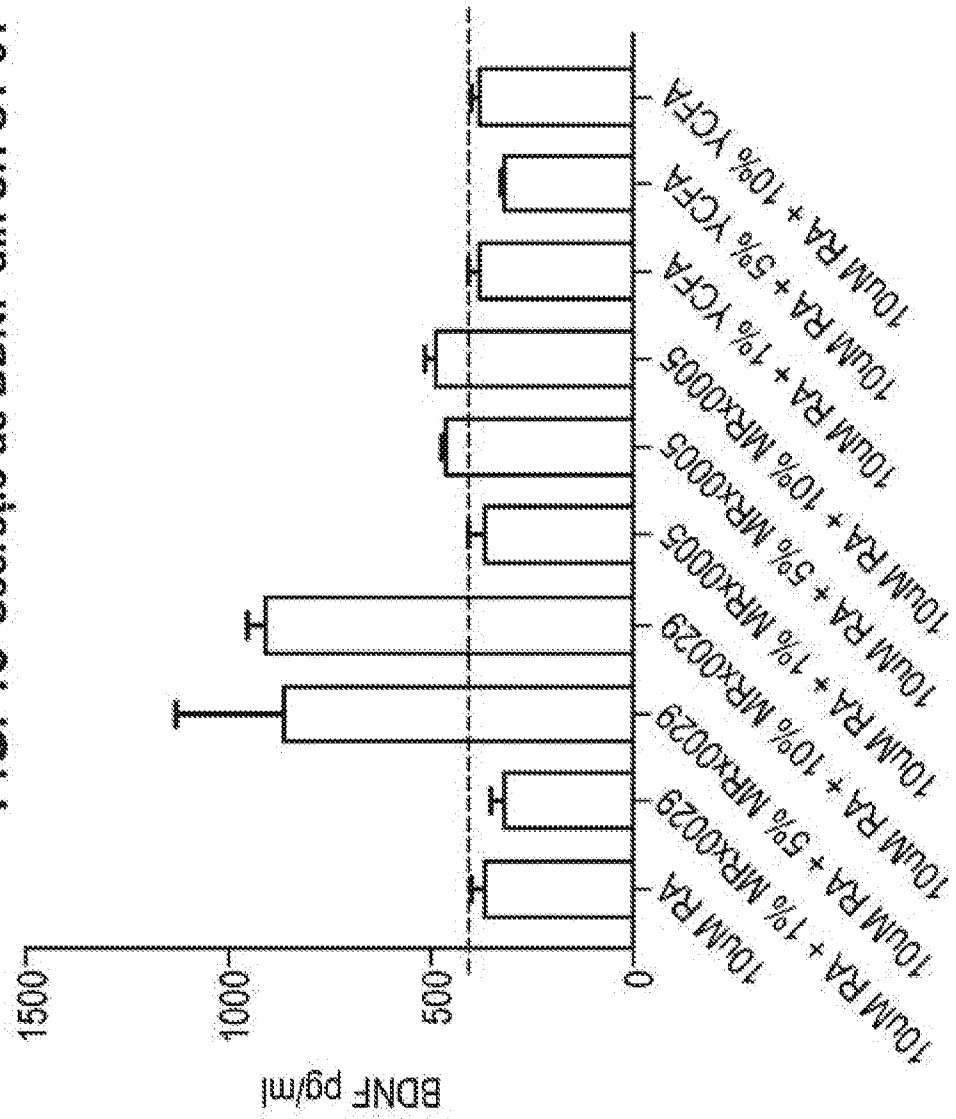
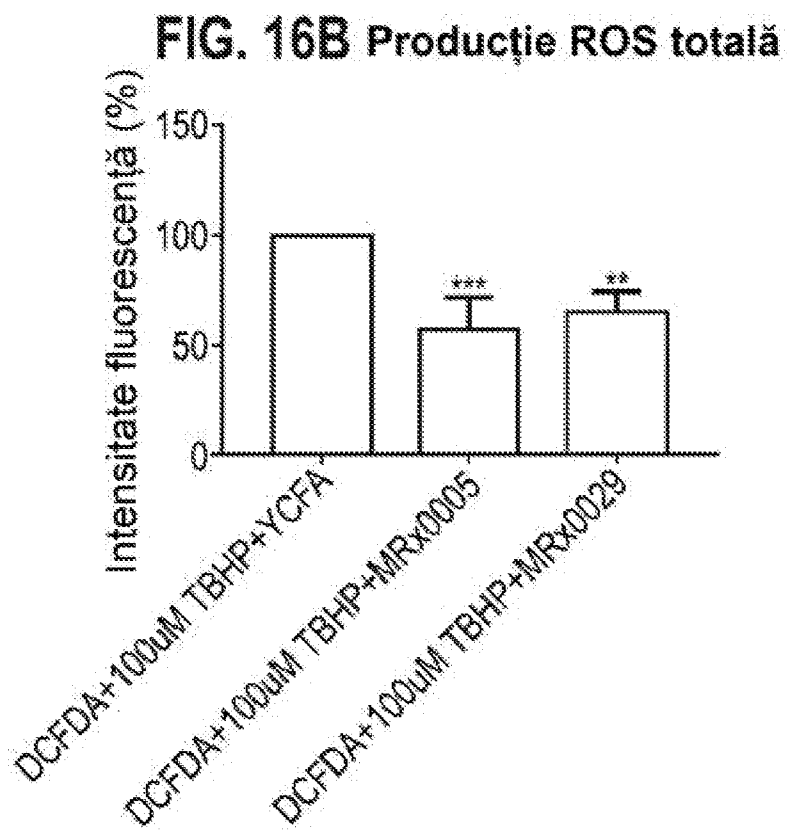
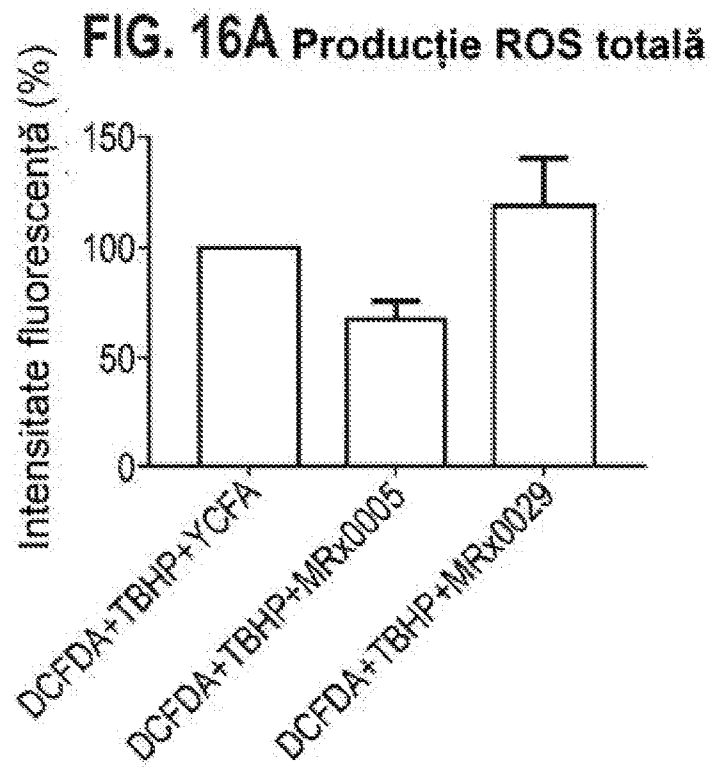
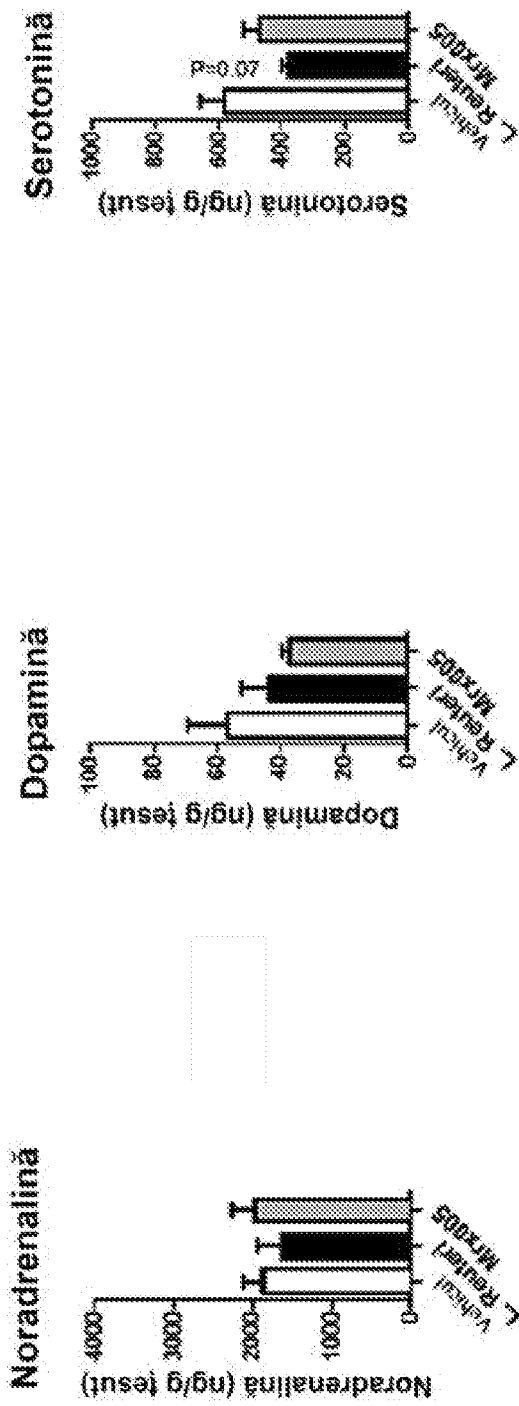
FIG. 14F Permeabilitate în colon

FIG. 15 Secreție de BDNF din SH-SY-5Y





Index 5-HIAA/5-HT de metabolism serotonină

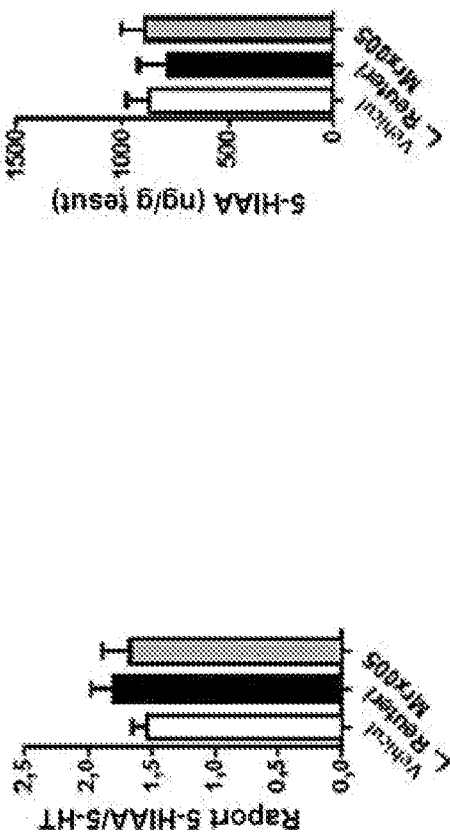
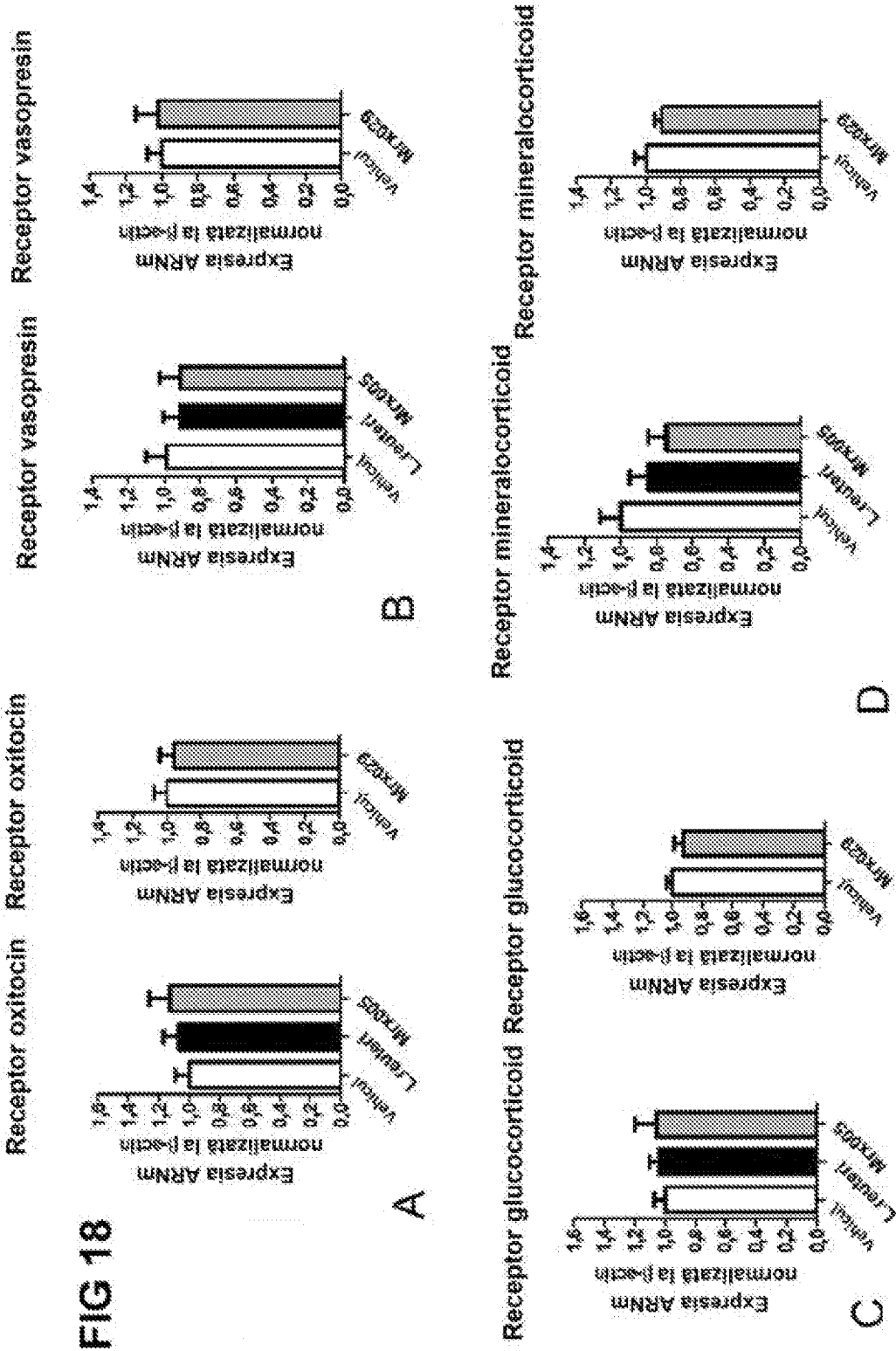
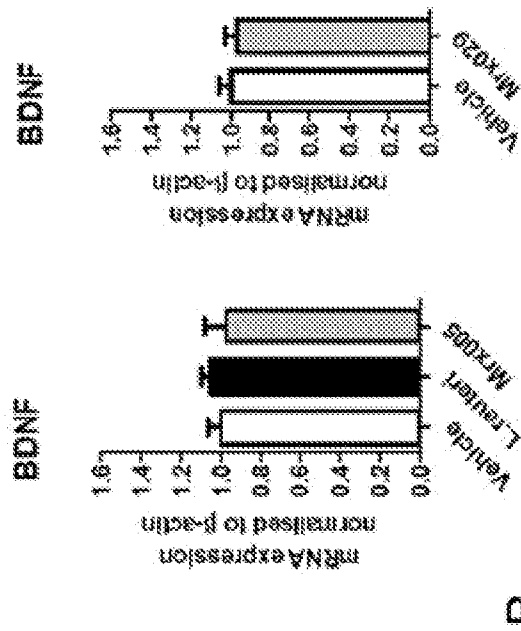
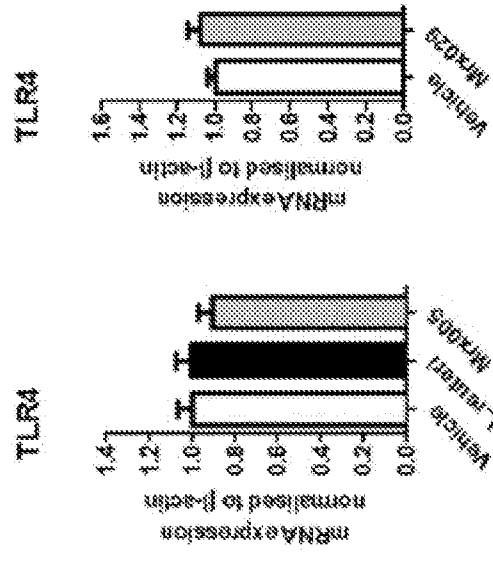
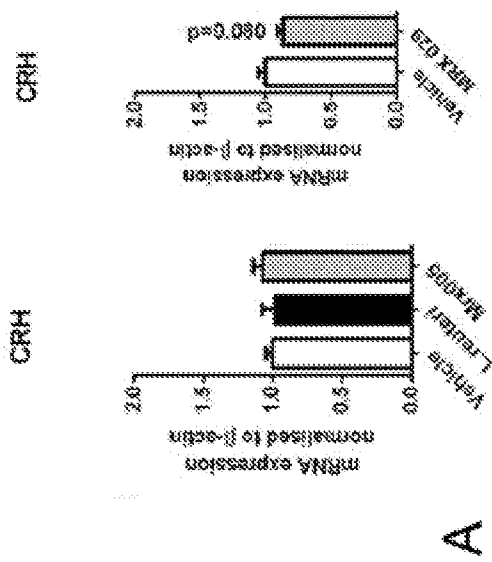


FIG 17



**FIG 19**

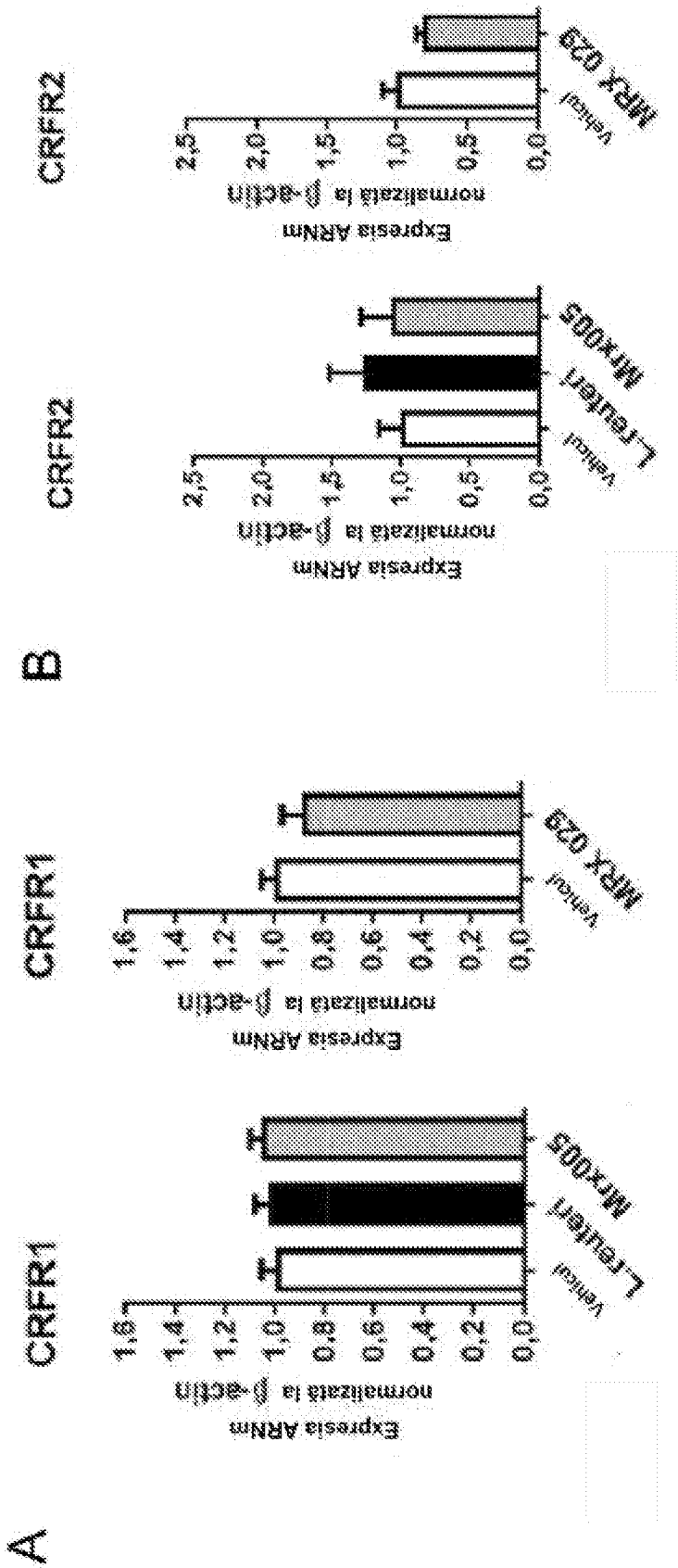


FIG 20

Factor-α de necroză tumorală Factor-α de necroză tumorală

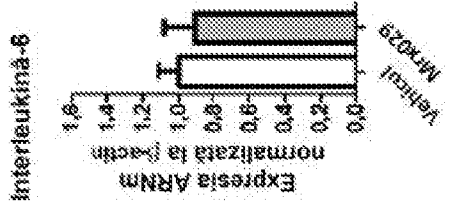
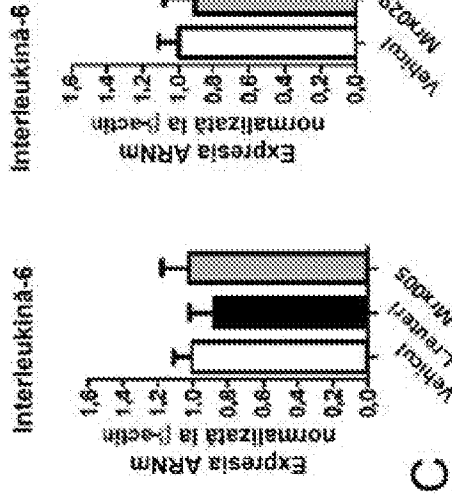
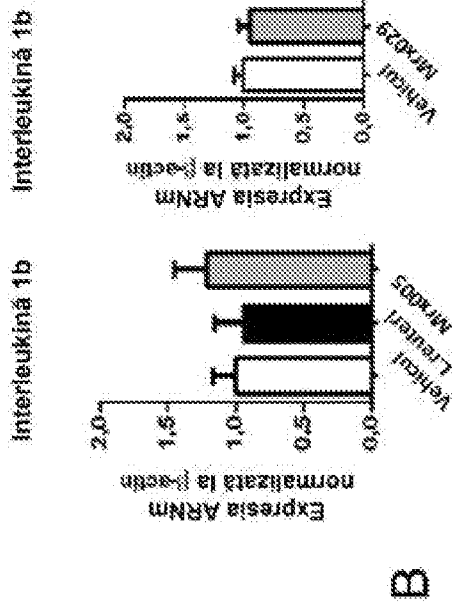
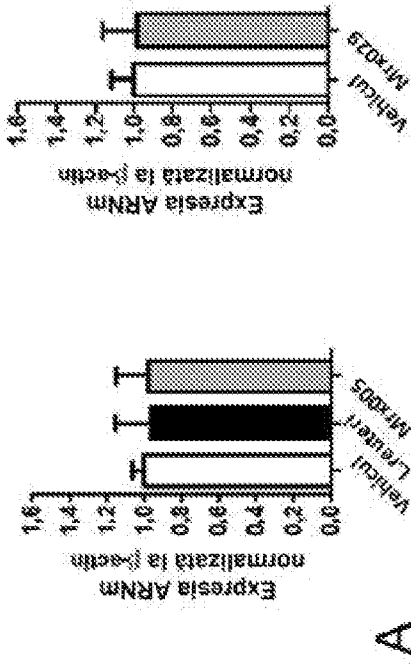


FIG 21

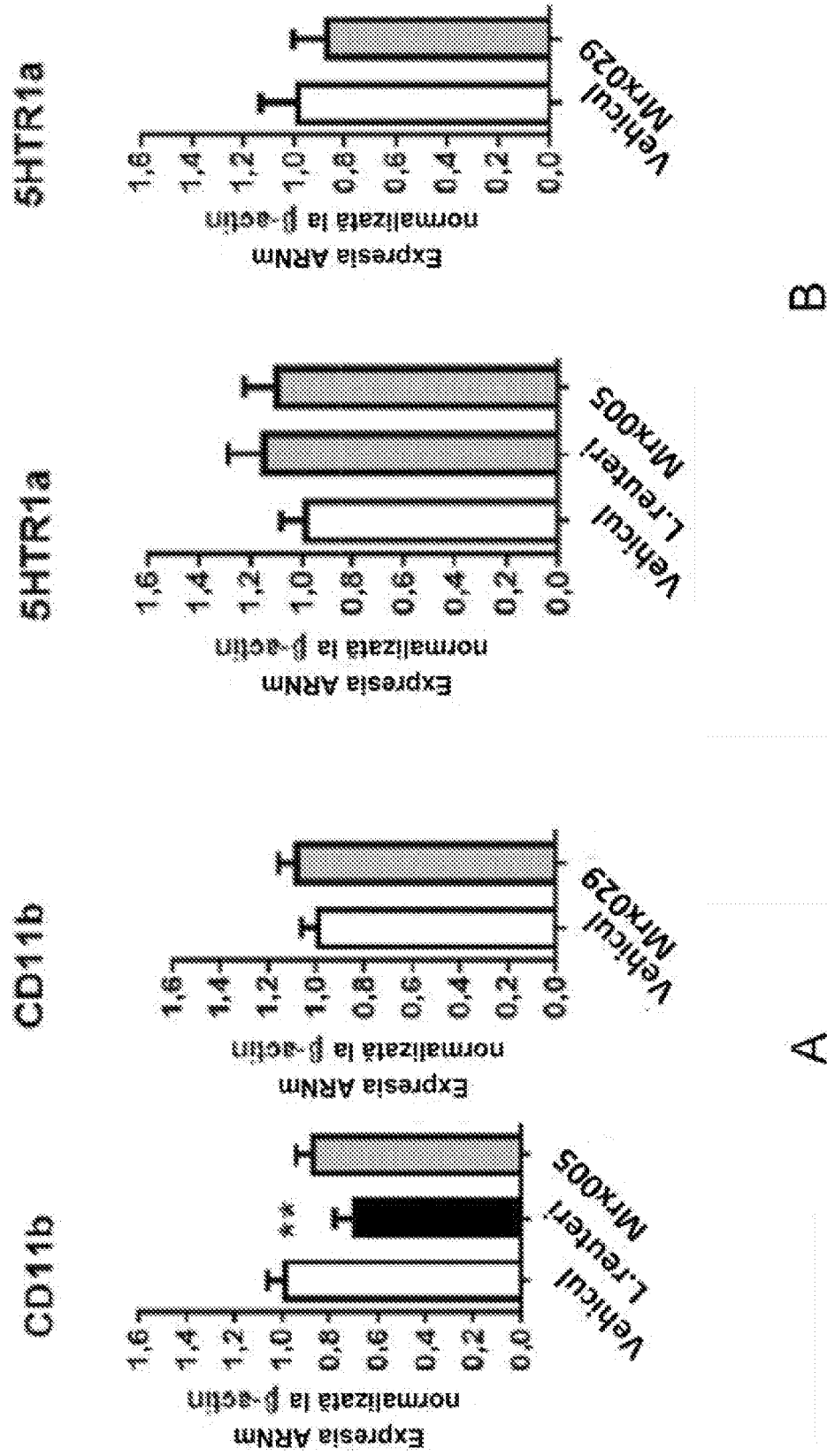


FIG 22

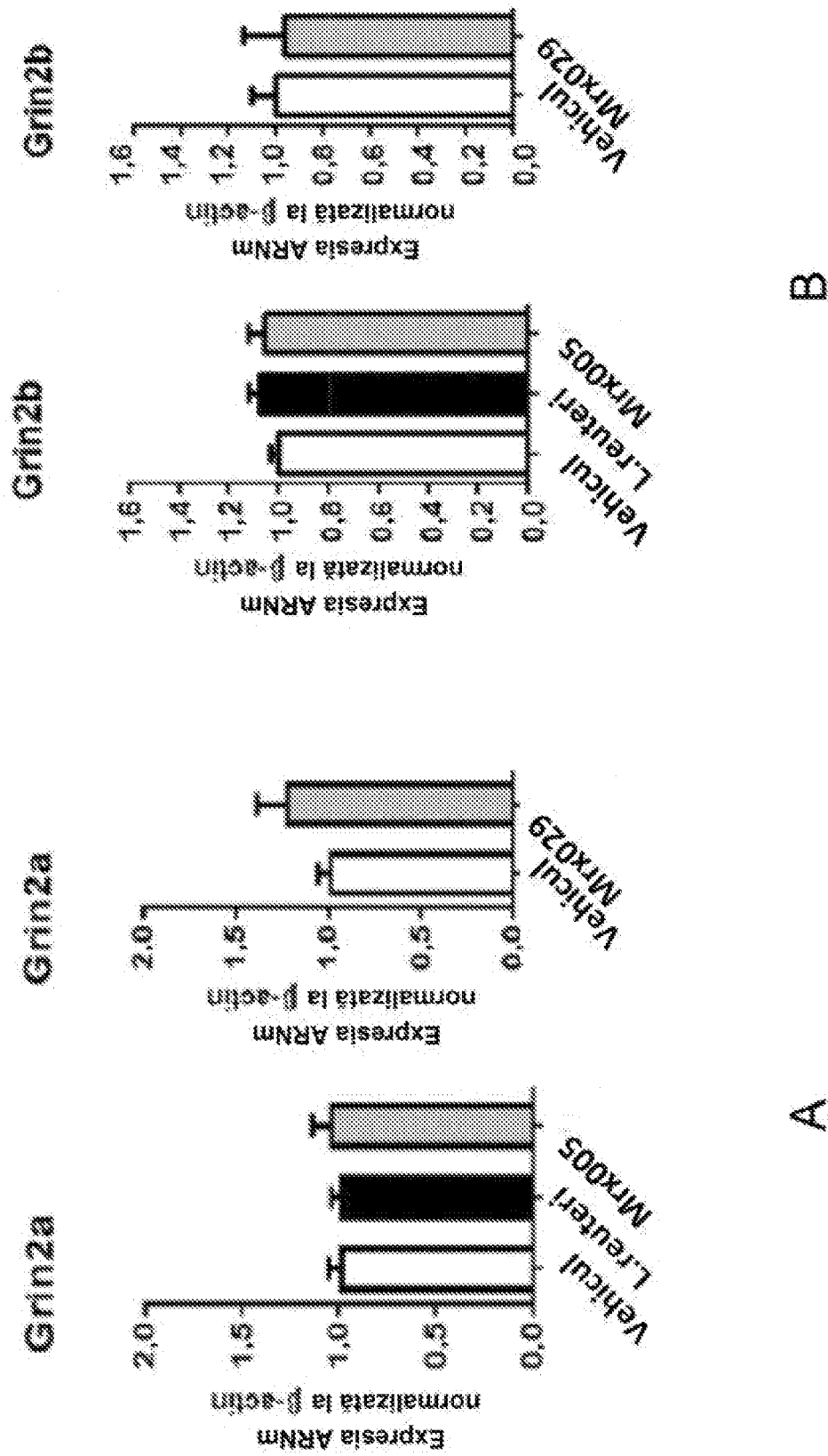
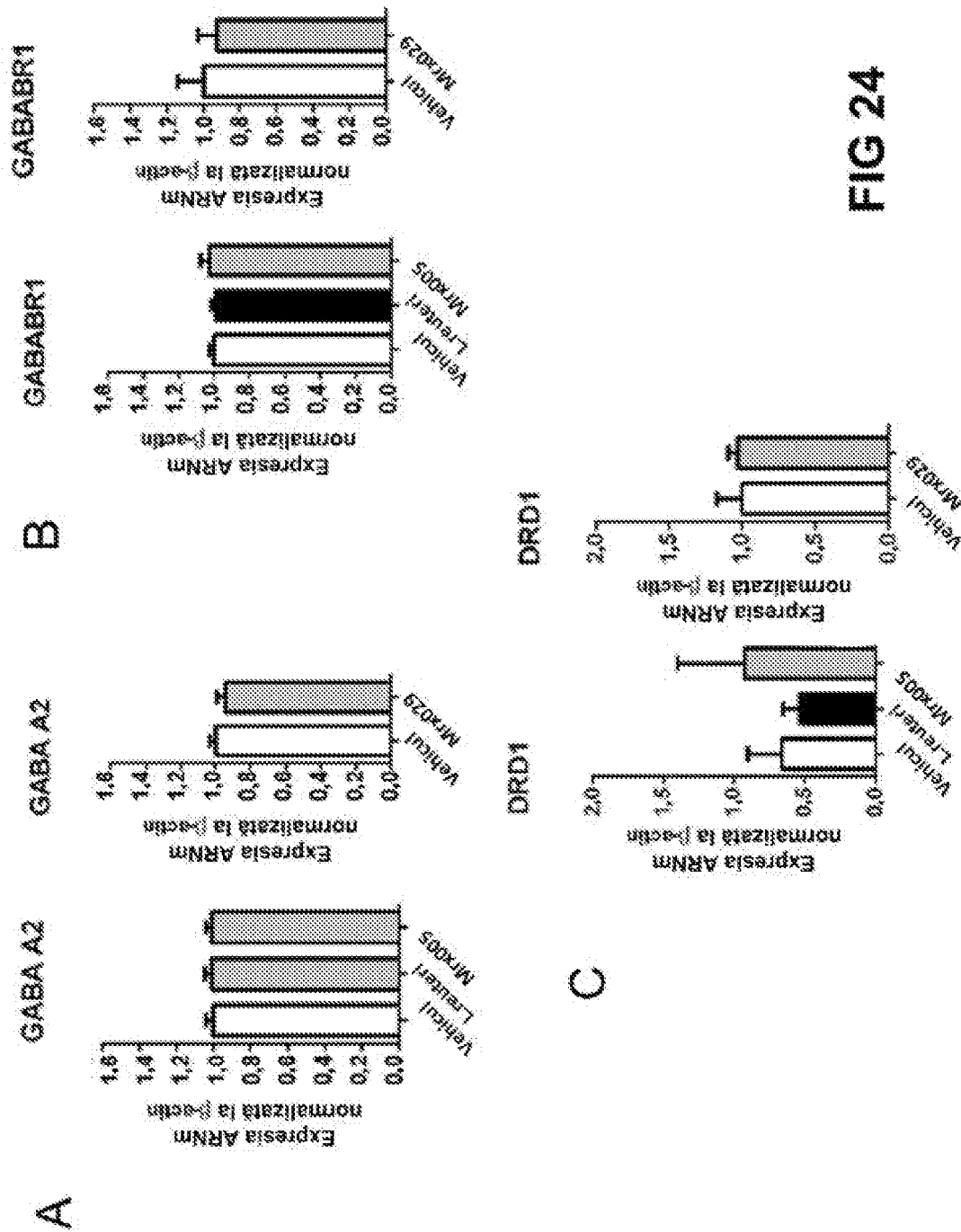
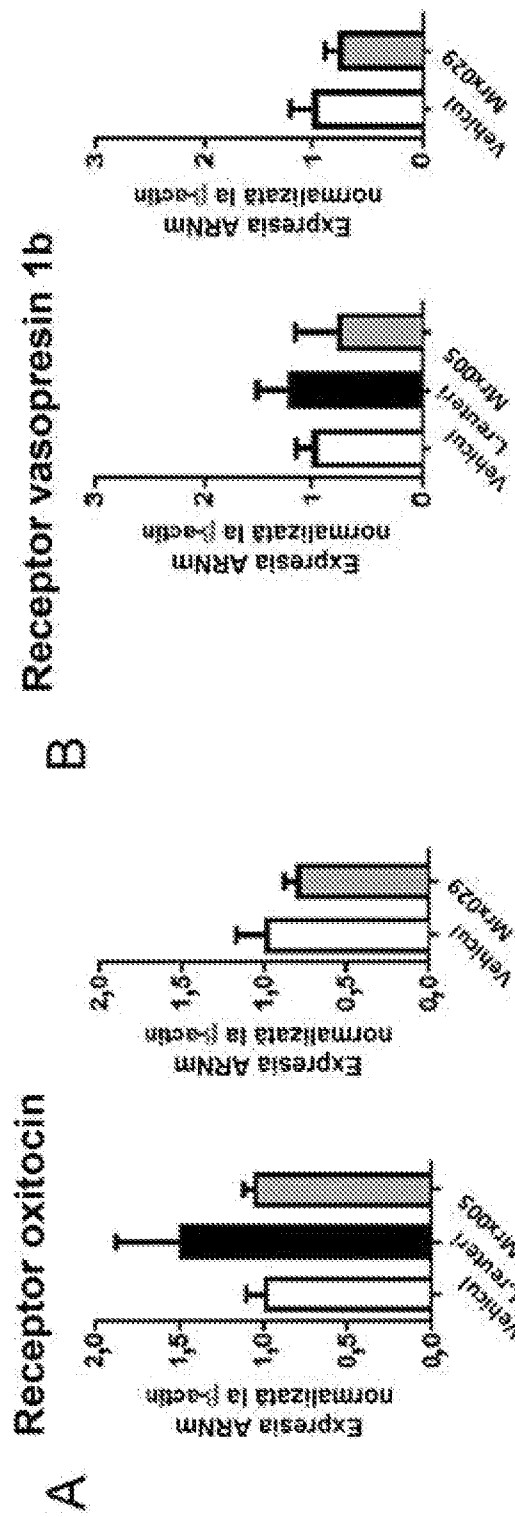
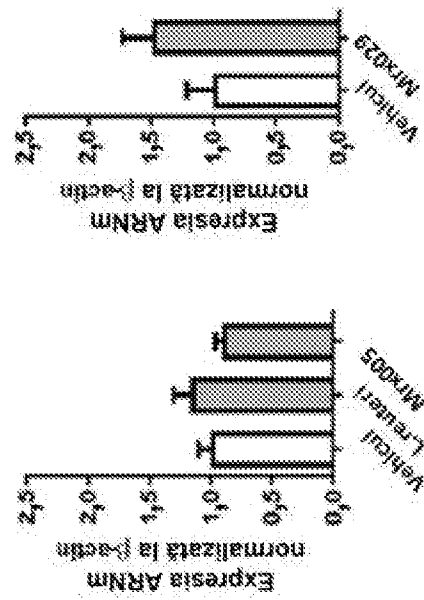


FIG 23





C Receptor glucocorticoid



D Receptor mineralocorticoid

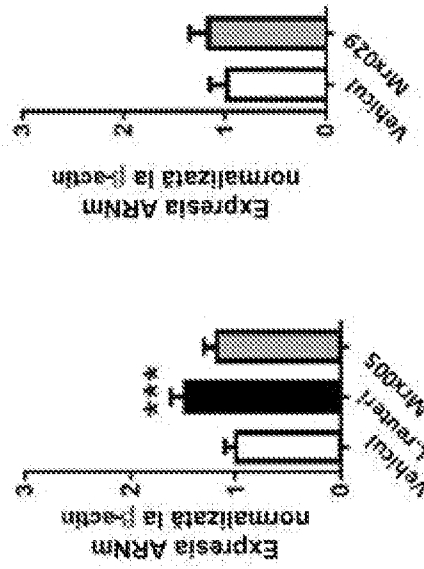
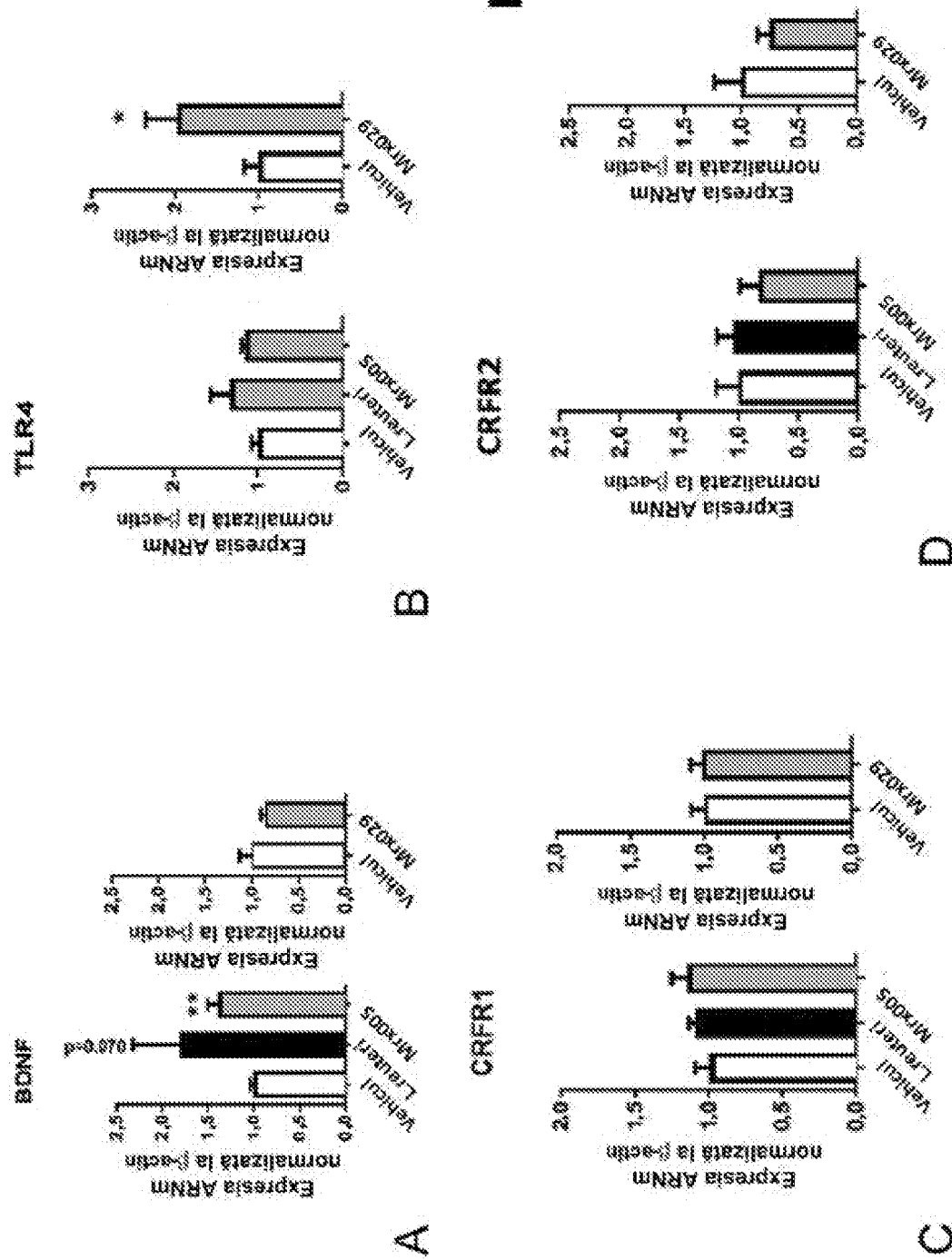


FIG 25

FIG 26



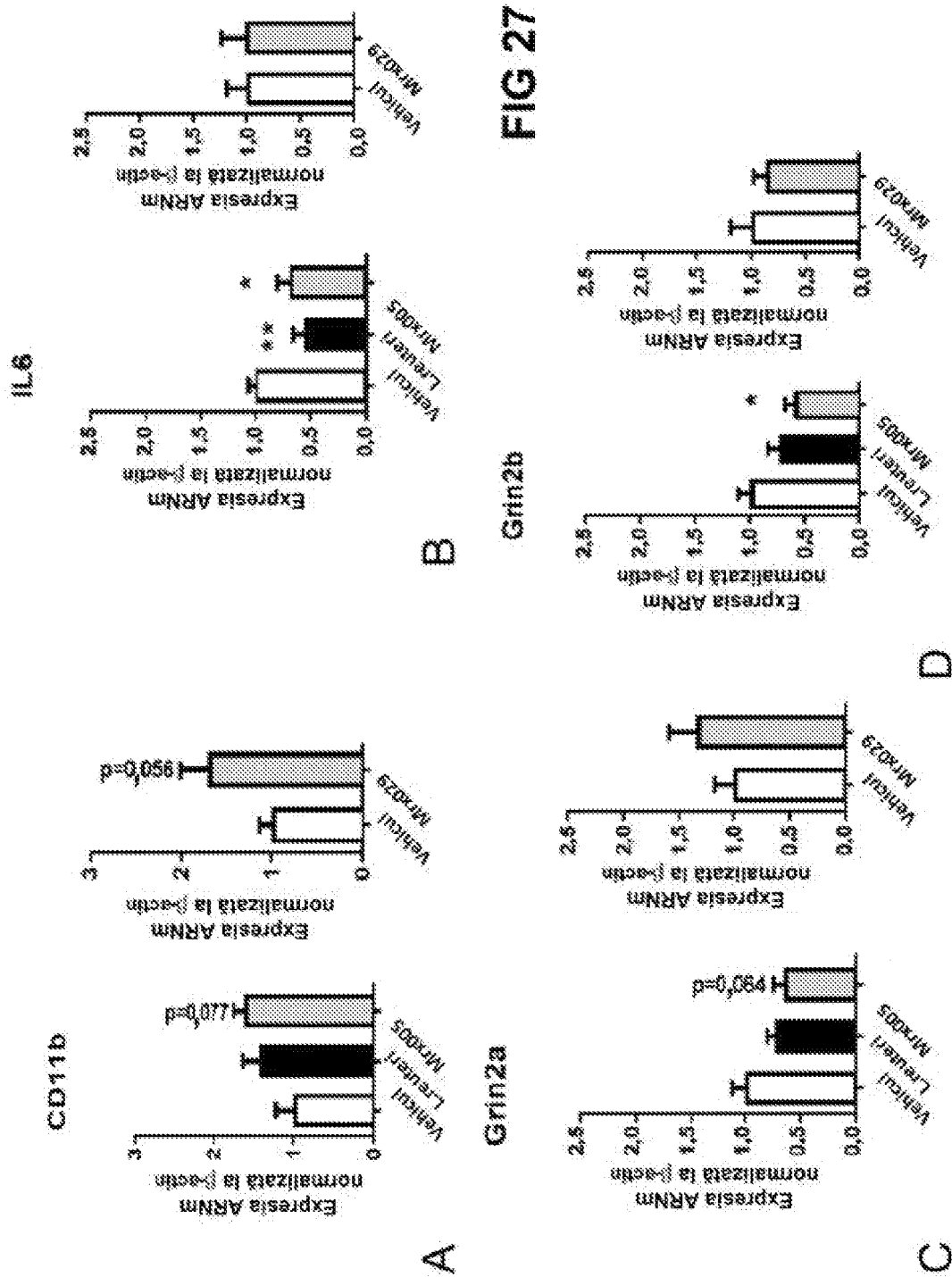
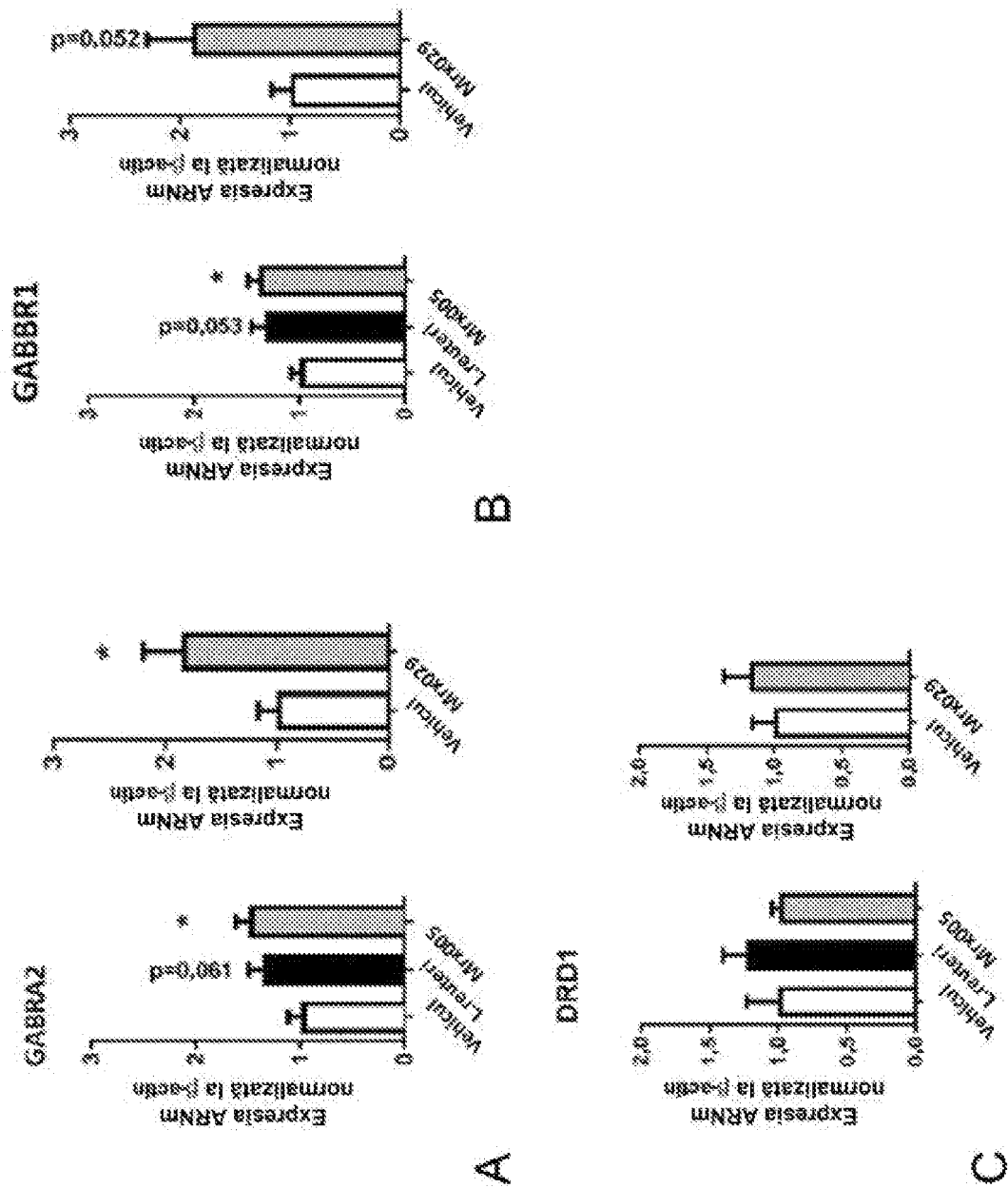


FIG 28



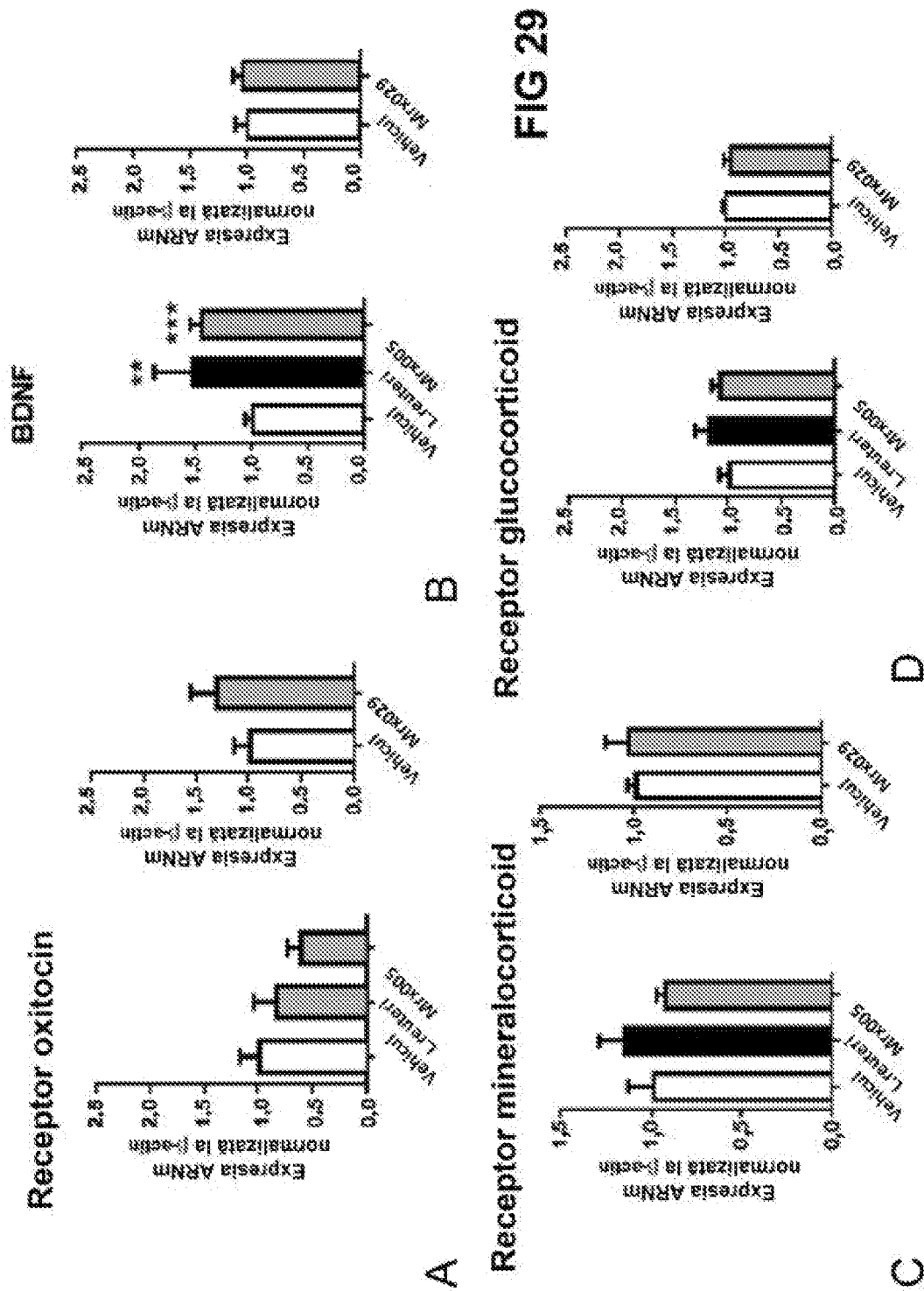


FIG 30

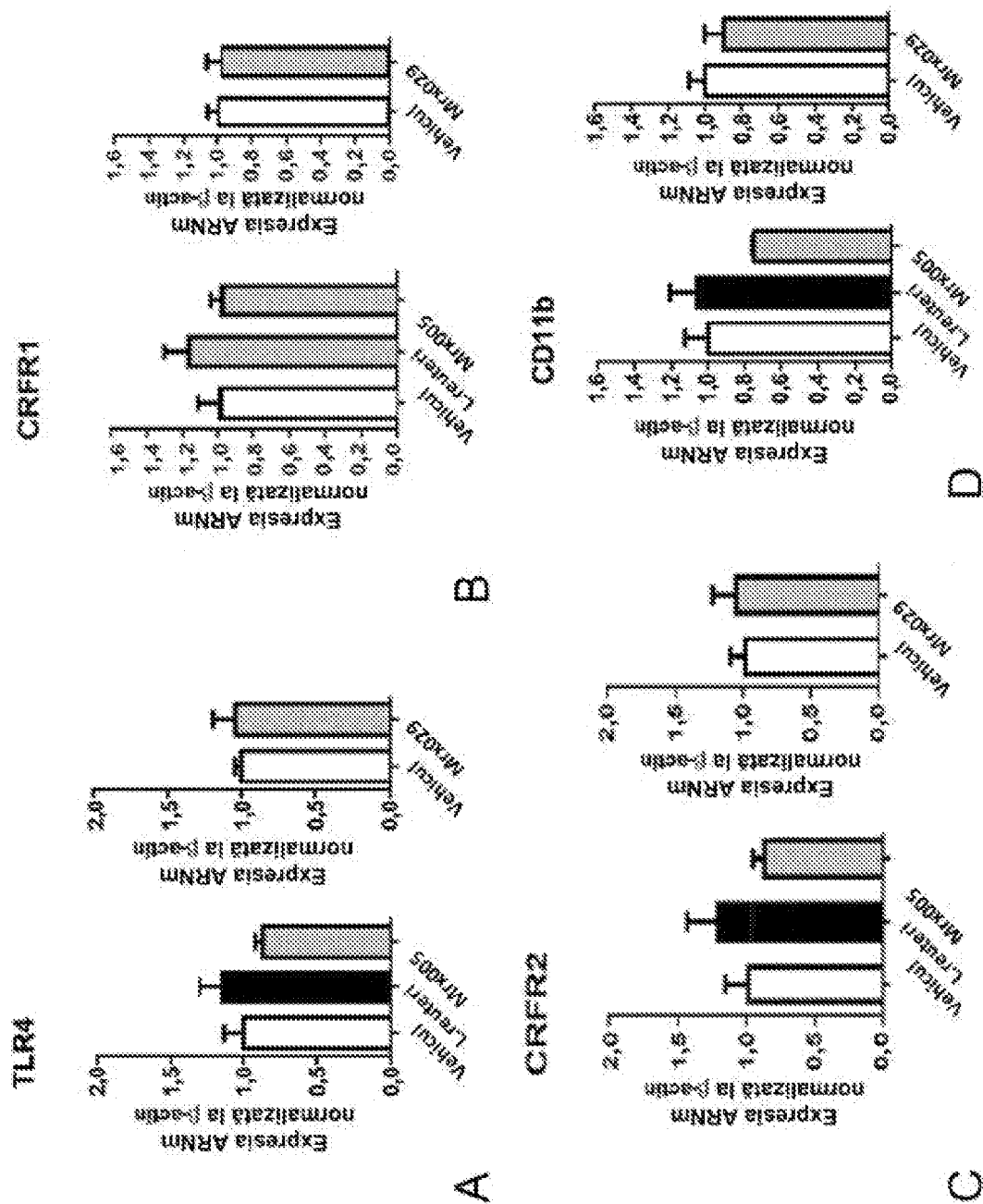
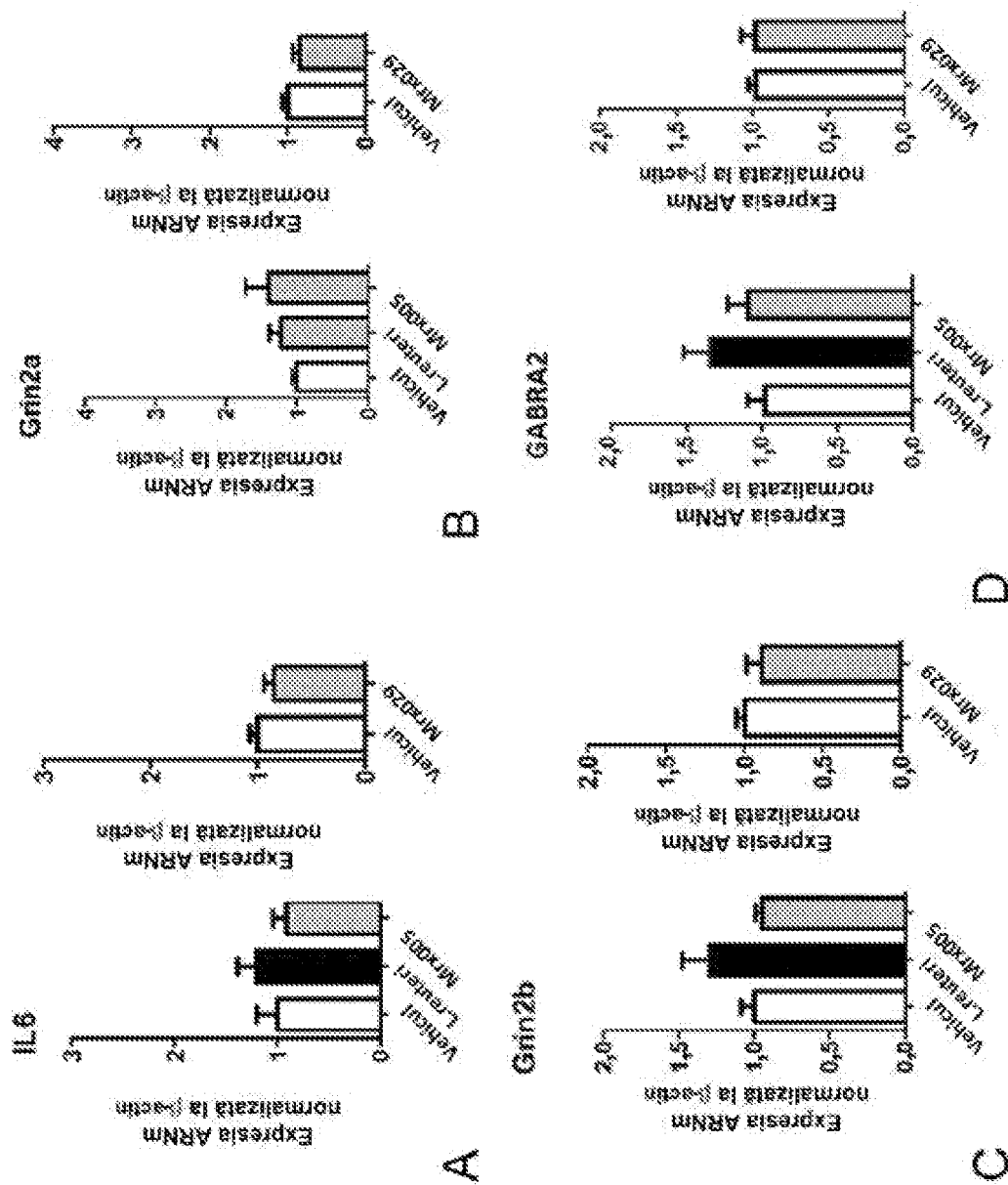


FIG 31



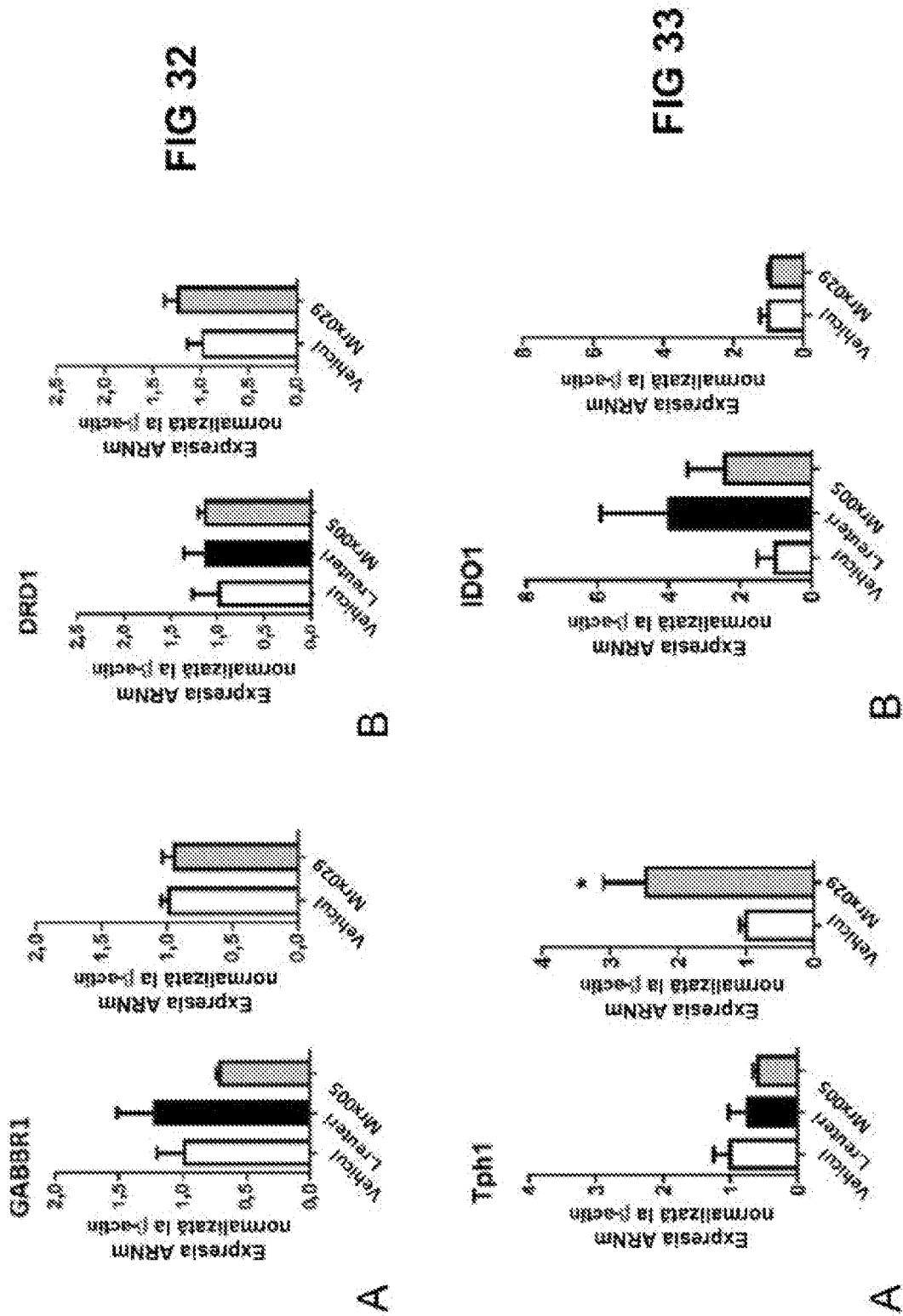
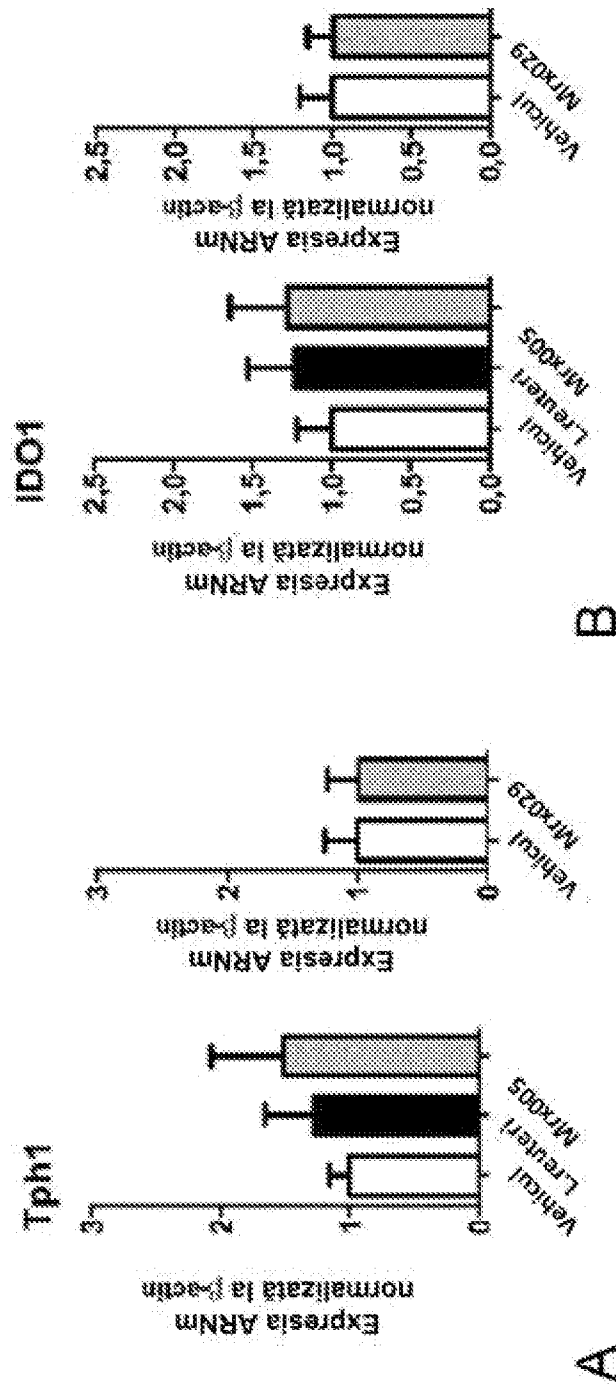
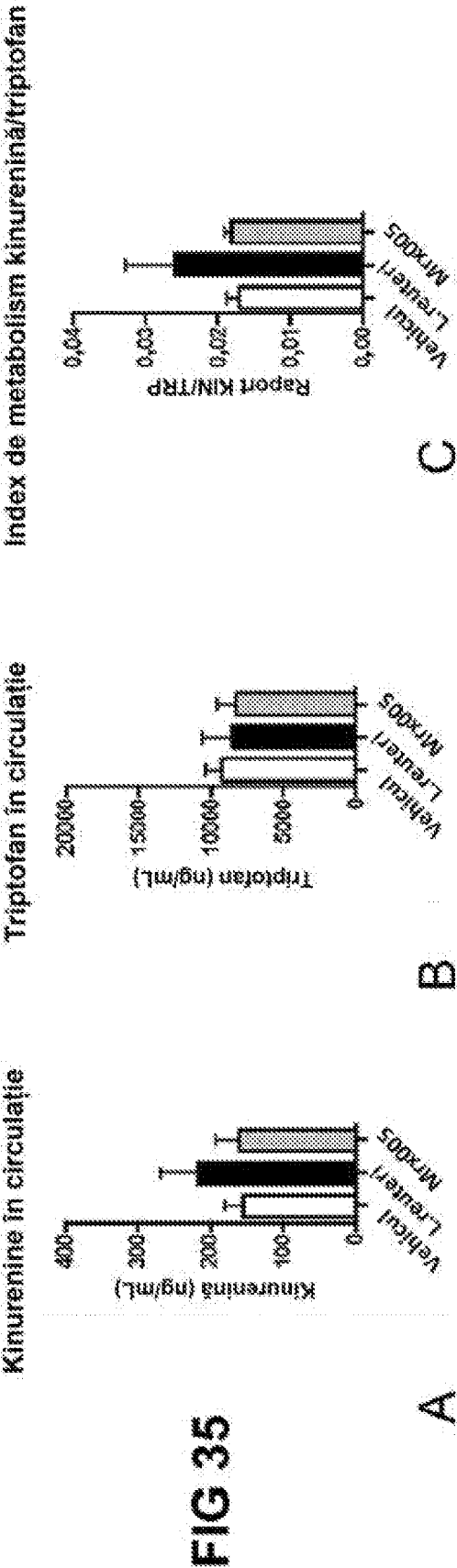


FIG 34





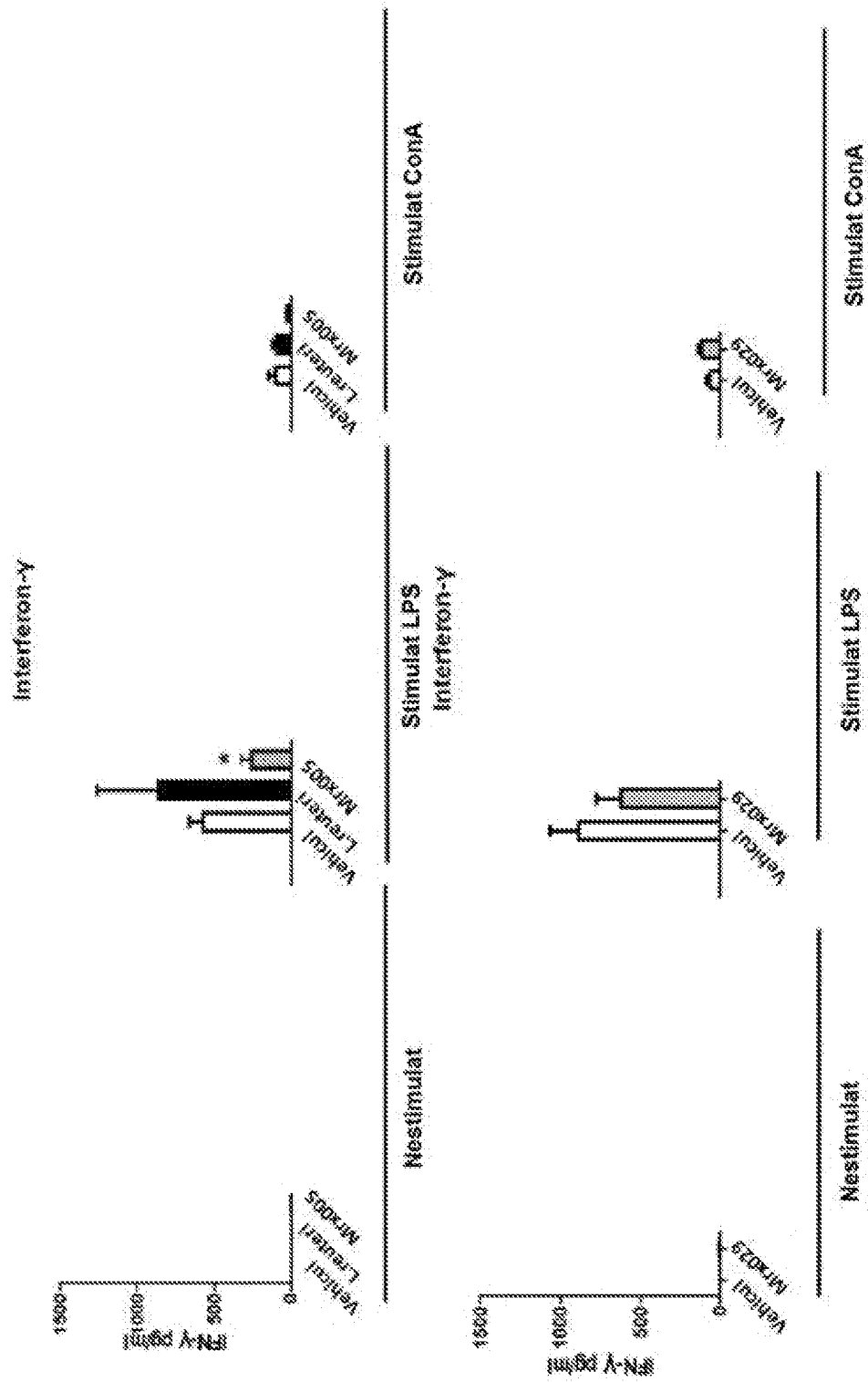


FIG 36

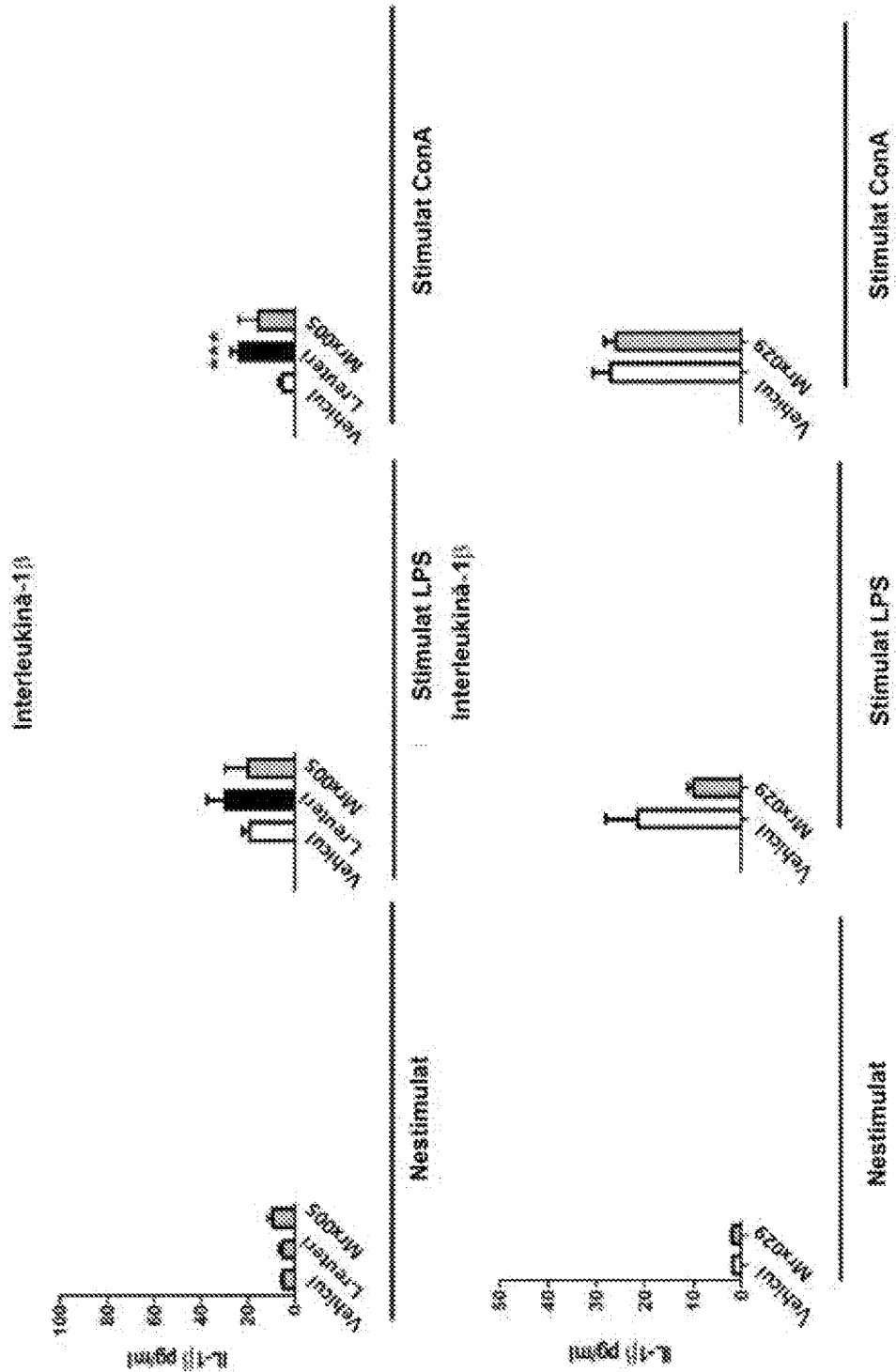
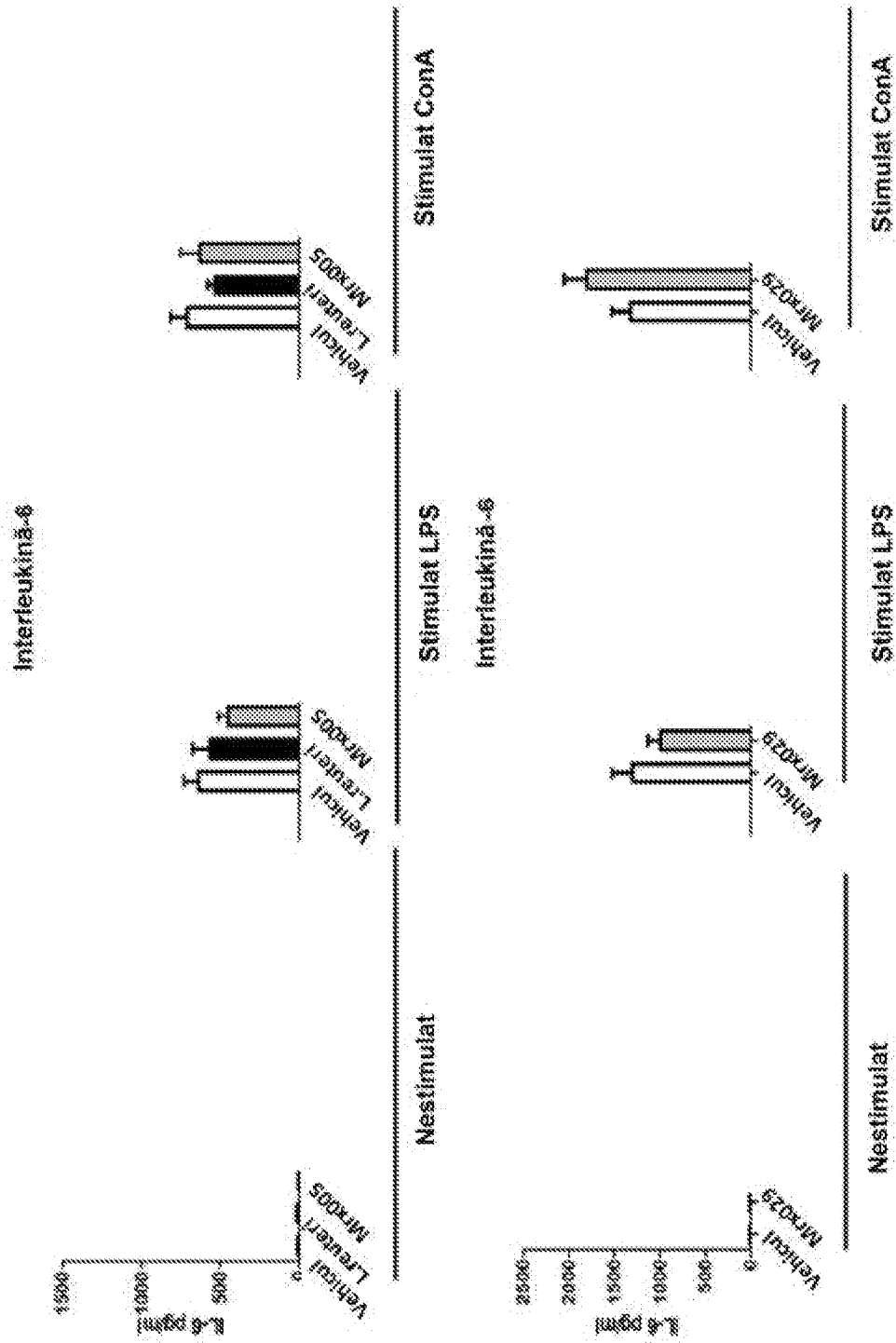


FIG 37

83
GLE

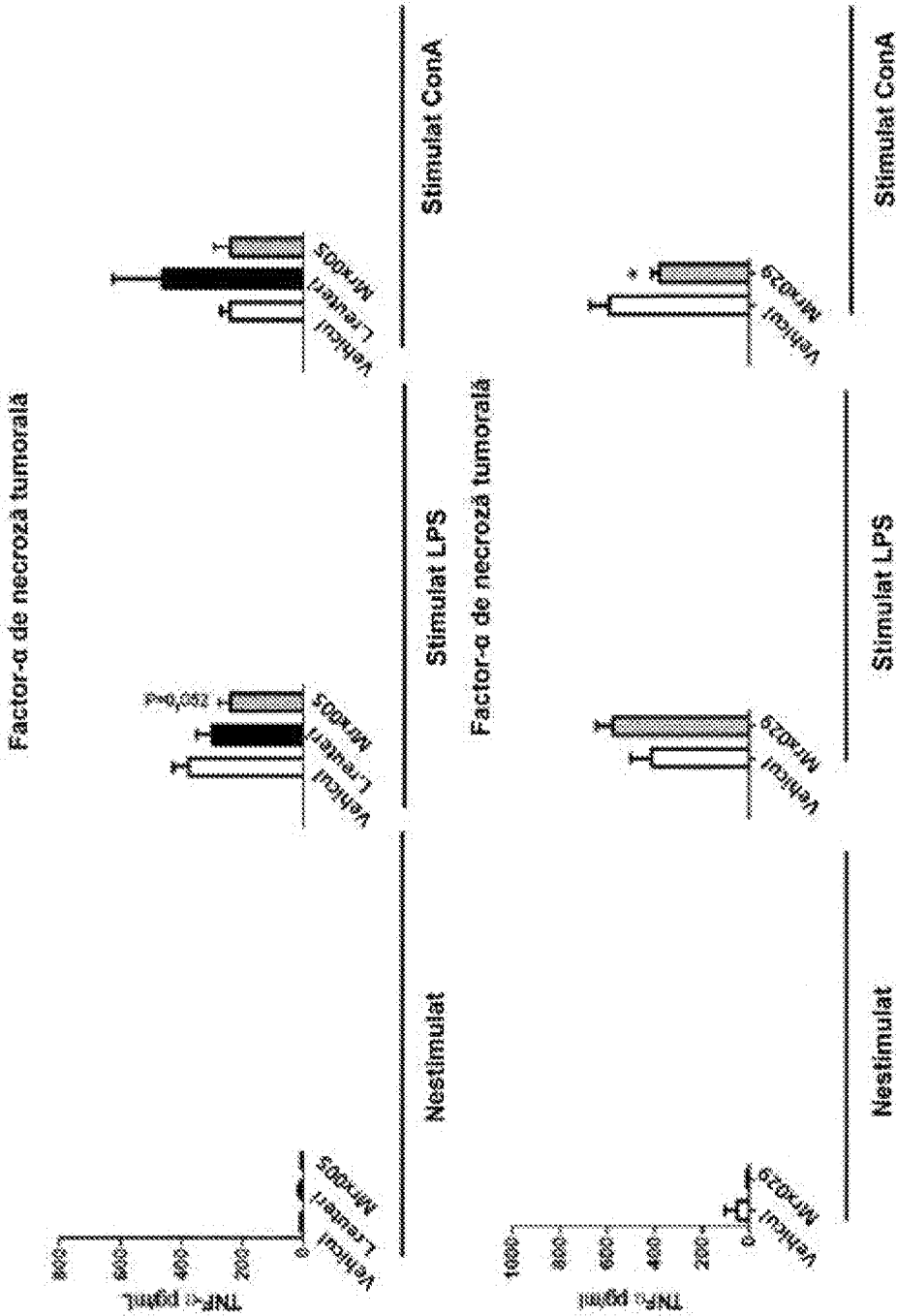


FIG 39

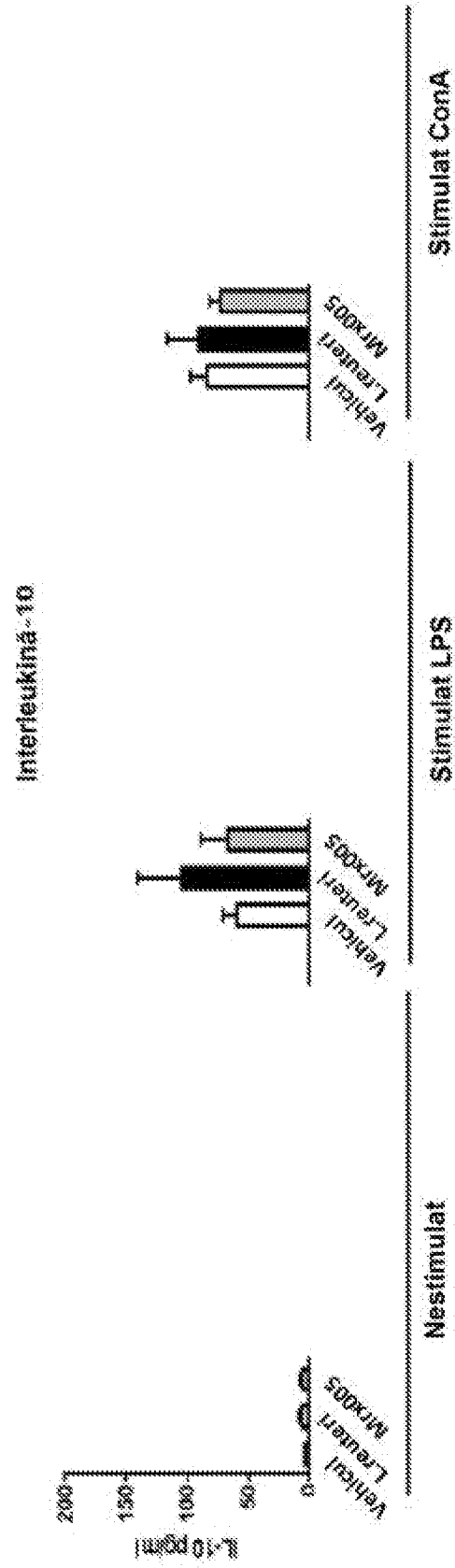


FIG 40

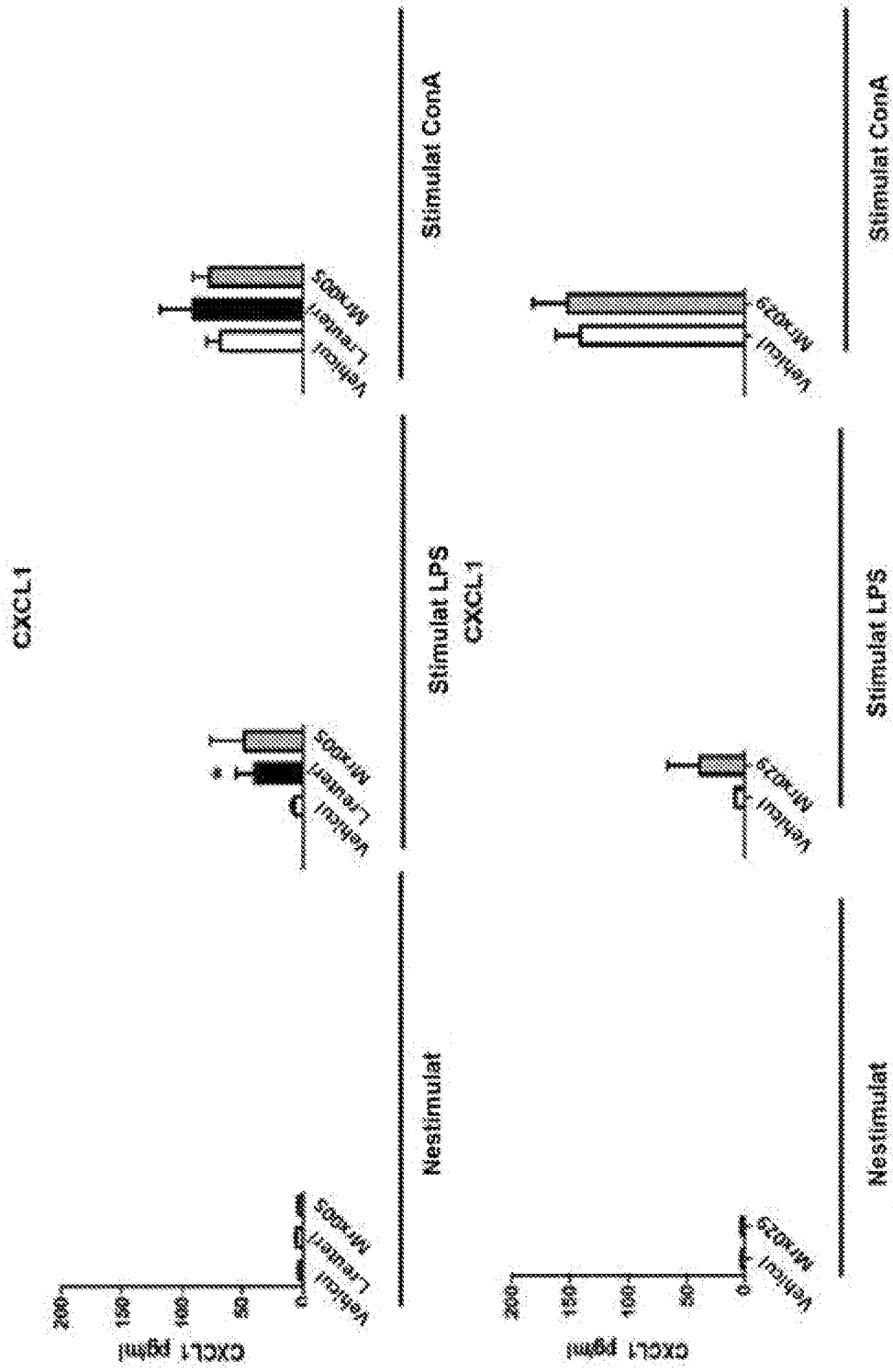


FIG 42

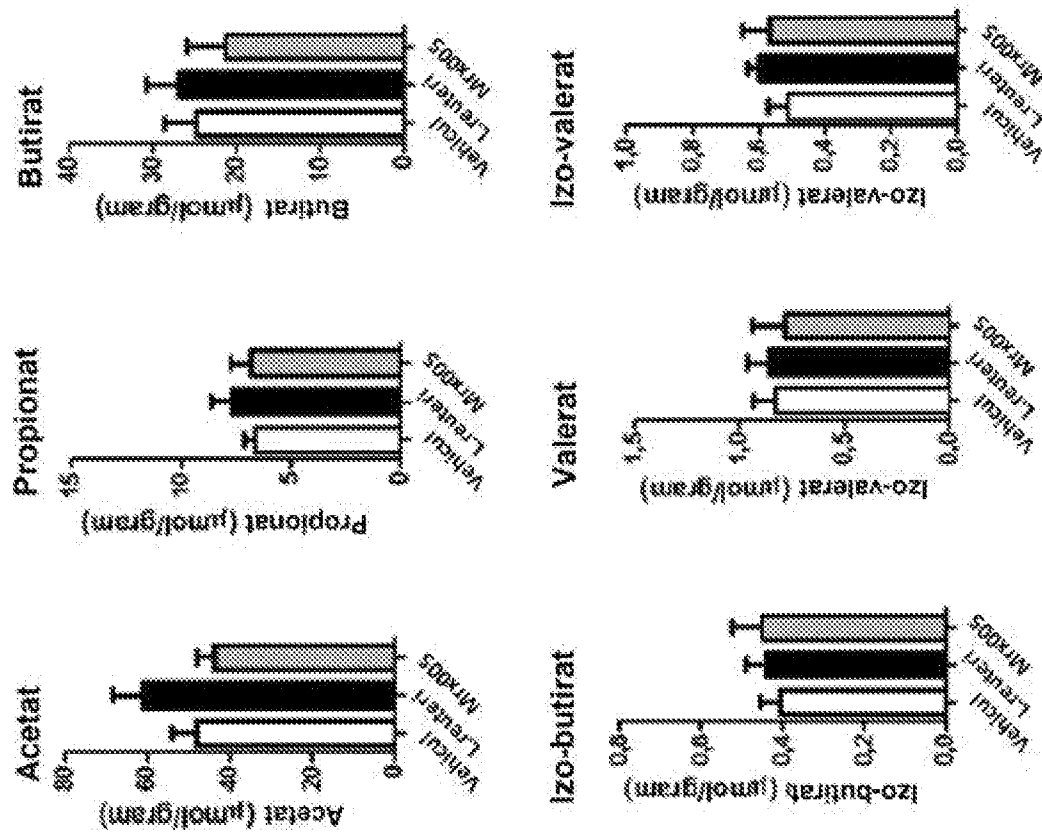
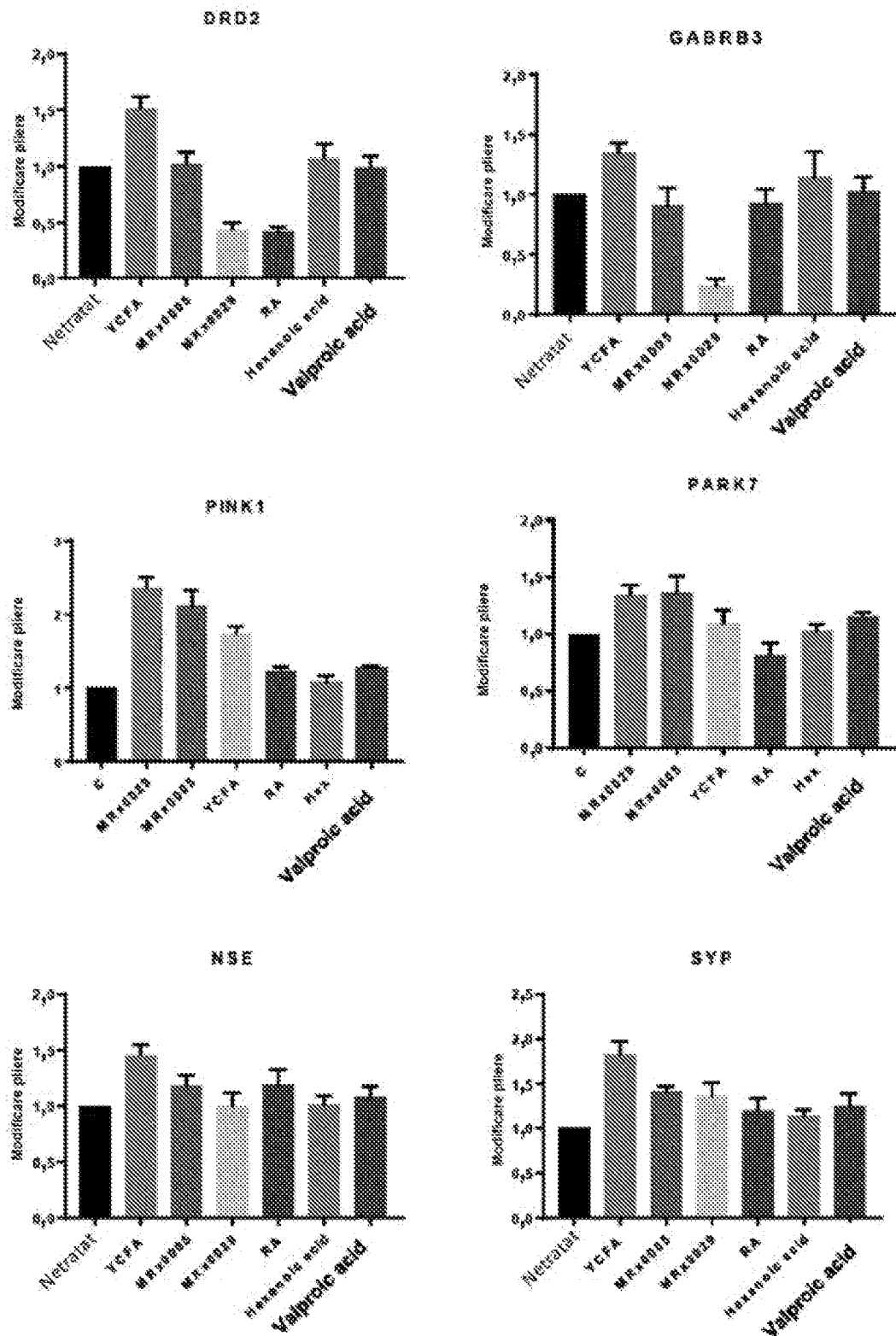


FIG 43



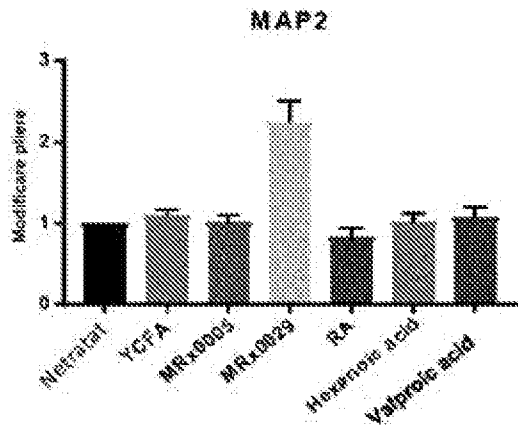


FIG 43 continuare

FIG 44

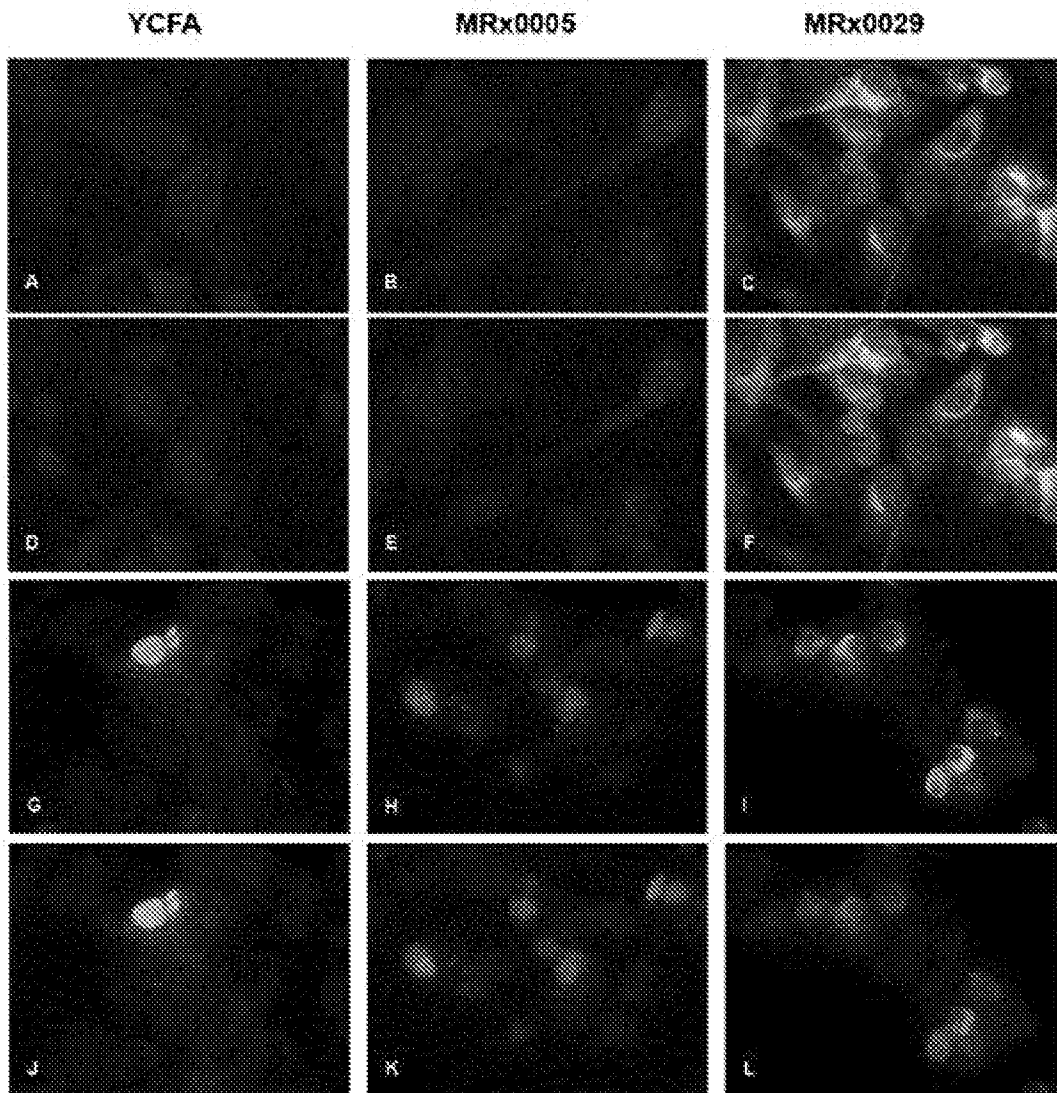


FIG 44 continuare

