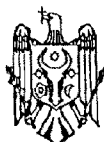




MD/EP 3804737 T2 2022.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3804737 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 35/74** (2015.01.01)
A61K 9/00 (2006.01.01)
A61K 9/19 (2006.01.01)
A61P 25/00 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)
C12N 1/20 (2006.01.01)
C12R 1/01 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2021 0810 (22) Data de depozit: 2018.06.14 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 20189452.4, 2018.06.14 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3804737, 2021.04.14 (31) Numărul cererii prioritare: 201709468; 201709534; 201712851; 201803826; 201805989; 201805991; 201805990; 201806779; 201806780 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.06.14; 2017.06.15; 2017.08.10; 2018.03.09; 2018.04.11; 2018.04.11; 2018.04.11; 2018.04.25; 2018.04.25 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB; GB; GB; GB; GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 10/2022, 2022.10.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 20/2022, 2022.05.18 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2021, 2021.09.30
(71) Solicitant: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (72) Inventatori: MULDER Imke Elisabeth, GB; YUILLE Samantha, 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 care conțin tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

Invenția furnizează compoziții cuprinzând tulpini bacteriene pentru tratarea și prevenirea tulburărilor neurodegenerative.

Secvențe: 37
Revendicări: 12
Figuri: 50

MD/EP 3804737 T2 2022.10.31

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

1

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

2

Sequences: 37

Claims: 12

Fig.: 50

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

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

FUNDALUL INVENȚIEI

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 microbiană și succesiune, care este influențată de factori cum ar fi modul de livrare, mediul, dieta și genotipul gazdei, care toate impactează compoziția microbiotei intestinale, în special în primii ani de viață. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare cu cea a unui adult [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 500-1000 de filotipuri diferite aparținând în mod esențial la două divizii bacteriene majore, Bacteroidete și Firmicute [2]. Relațiile 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. Sporirea activității metabolice a intestinului colonizat asigură că, componente alimentare altfel indigerabile sunt degradate cu eliberarea produselor secundare furnizând o sursă de nutriție importantă pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este 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 bacterie *Clostridium* cluster XIVa sunt reduse la pacienții cu IBD în timp ce numărul de *E. coli* este crescut, sugerând un defazaj în echilibrul simbiionților și patobionților din intestin [6-9].

În recunoașterea potențialului efect pozitiv pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animalului, diferite tulpini au fost propuse 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). Totuși, relația între diferite boli și diferite tulpini bacteriene, și efectele precise ale anumitor tulpini bacteriene asupra intestinului și la un nivel sistemic și pe orice tip particular de boli este slab caracterizată, în special pentru tulburările neurodegenerative.

Recent, s-a manifestat un interes crescut în domeniu referitor la alterările din microbiomul intestinal care poate juca un rol patofiziologic în bolile creierului uman [16]. Dovezile preclinice și clinice sugerează puternic o legătură între dezvoltarea creierului și microbiotă [17]. Un corp în creștere din literatura preclinică a demonstrat semnalizarea bidirecțională între creier și microbiomul intestinal, care implică multiple sisteme de semnalizare neurocrine și endocrine. Într-adevăr, nivelurile crescute de specii *Clostridium* în microbiome au fost legate de tulburări ale creierului [18], și un dezechilibru de filă *Bacteroidete* și *Firmicute* a fost de asemenea implicat în dezvoltarea tulburărilor creierului.

Sugestiile că nivelurile alterate de comensale intestinale, incluzându-le pe cele de *Bifidobacterie*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* și *Ruminococcus* genera și ale familiei de *Alcaligenaceae* sunt implicate în tulburările imuno-mediate ale sistemului nervos central (CNS), sunt investigate prin studii sugerând o lipsă de alterare la microbiotă între pacienți și subiecții sănătoși [19]. S-a sugerat de asemenea că administrarea de probiotice poate fi benefică în tratamentul tulburărilor neurologice. Totuși, aceste studii au eșuat în a concluziona că compozițiile probiotice *per se* pot obține beneficii terapeutice față de tratamentul neurodegenerării și nu au prezentat nici un efect util pentru nici o bacterie particulară [20, 21]. Acest lucru indică faptul că, 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 a cerință în domeniu pentru noi metode pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative. Există de asemenea o cerință pentru caracterizarea efectelor potențiale ale bacteriei intestinale astfel încât să poată fi dezvoltate noi terapii utilizând bacteria intestinală.

US 2004/005304 descrie o compoziție pentru tratamentul unei tulburări neurologice și a afecțiunii gastrointestinale asociate. US 2004/170617 descrie o metodă de tratare sau prevenire a unei boli asociate cu o floră gastrointestinală anormală. US 2004/120963 descrie un aliment sau hrană cuprinzând o compoziție care cuprinde ca un ingredient activ bacteria sau produse procesate ale acesteia capabile să transforme acidul lactic în acid butiric. Padmanabhan, R. și colab., Standards in Genomic Sciences 8(3) (p.525-538), descriu tulpina NP3 de *Megasphaera massiliensis*. Nallabelli N. și colab., Scientific Reports 6(1), descriu analiza secvenței genome de tulpină DISK18 de *Megasphaera* sp.. US 2016/271188 descrie compoziții probiotice pentru tratamentul tulburărilor gastrointestinale.

REZUMATUL INVENȚIEI

Invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare în terapie.

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

Inventatorii au identificat de asemenea că *Megasphaera massiliensis* produce anumiți acizi organici incluzând acidul hexanoic, acidul valeric și acidul 4-hidroxifenilacetic. Inventatorii au descoperit de asemenea că *Megasphaera massiliensis* poate crește activarea de citokine pro-inflamatorii IL-8, care poate ajuta la promovarea mielinării neuronale. Inventatorii au identificat de asemenea că tratamentul cu o combinație de *Megasphaera massiliensis* și acid retinoic poate crește secreția factorului neurotrofic derivat din creier (BDNF), care poate ajuta la promovarea neurogenezei și neuritogenezei și/sau preveni moartea celulei. Inventatorii au identificat de asemenea că tratamentul cu *Megasphaera massiliensis*, care poate produce acid valeric, poate reduce deacetilarea histonă, care poate ajuta la reducerea morții celulei și apoptozei. Mai mult, inventatorii au descoperit de asemenea că *Megasphaera massiliensis* poate produce acid hexanoic, care poate fi neuroprotector sau neurorestaurator, de exemplu prin promovarea creșterii de neurite. Inventatorii au descoperit că *Megasphaera massiliensis* care poate produce acid hexanoic, crește expresia de MAP2 (proteină 2 asociată cu microtuburi), despre care se crede că este esențială pentru formarea de microtuburi în neuritogeneză. Prin urmare, inventatorii au descoperit că *Megasphaera massiliensis* care poate produce acid hexanoic, poate fi utilizată pentru a promova creșterea neuritelor. *Megasphaera massiliensis* și alte bacterii care produc acizi organici ca acidul hexanoic, acidul valeric și acidul 4-hidroxifenilacetic pot fi prin urmare utile pentru tratarea tulburărilor neurodegenerative.

Într-o primă realizare, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare în terapie, cum ar fi într-o metodă de tratare sau prevenire a unei tulburări neurodegenerative.

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând tulpina bacteriană de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: boală Parkinson, incluzând pralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, incluzând sindromul Benson; scleroză multiplă; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală neuronală motoare; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, incluzând corp Lewy, demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV și degenerare corticobasală.

În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând tulpina bacteriană de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson, cum ar fi Parkinsonul din mediu, sau familial asociat cu stări inflamatorii generale. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Megasphaera* poate reduce activarea moleculelor proinflamatorii, cum ar fi NFκB și IL-6, prin LPS și α-sinucleină mutantă în modelele in vitro ale Parkinsonului din mediu și familial. În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană a speciilor *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare în tratamentul bolii Parkinson. Compozițiile utilizând *Megasphaera massiliensis* pot fi în special eficiente pentru tratarea Parkinsonului.

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

Tulpina bacteriană din compoziție este de *Megasphaera massiliensis*. Preferabil, tulpina bacteriană are o secvență 16S rARN care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1 sau 2. Preferabil, identitatea de secvență este cu SEQ ID NO: 2. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are secvența 16S rARN reprezentată de SEQ ID NO:2.

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 sau purtători acceptabili farmaceutic.

În anumite realizări, compoziția invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea de compoziții 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 dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este în special utilă pentru terapie. Tulpina *Megasphaera massiliensis* a invenției este prezentată a fi eficientă pentru tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi bolile neurodegenerative.

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 2: Reglarea negativă a secreției de IL-6

Figura 3: Secreție de IL-8

Figura 4: Inhibare de secreție IL-6 și IL-8 α -sinucleină

Figura 5: Inhibare de α -sinucleină indusă de activarea promotorului NF κ B

Figura 6: Inhibare de LPS indusă de activarea promotorului NF κ B

Figura 7: Modificare în capacitatea antioxidantă

Figura 8: Modificare în capacitatea antioxidantă totală (oxidare lipidă)

Figura 9: Modificare în activitatea de deacetilază histonă (HDAC)

Figura 10: Nivel producție de indol

Figura 11: Nivel de producție de Kirunenine

Figura 12: Niveluri medii de dopamină (DA) (Figura 12A), niveluri de DOPAC (Figura 12B) și niveluri de HVA (Figura 12C) în striatum. Date sunt afișate ca medie + SEM.

Figura 13: Promovarea creșterii de neurite: microscopie luminoasă și expresia genei MAP2 (Figura 13A), imunomicroscopie cu fluorescență faloidină (Figura 13B)

Figura 14: Modificare în nivelurile ROS în (a) celulele U373 și (b) celulele SHSY-5Y

Figura 15: Neuroprotecție - viabilitate celulară. Figura 15 prezintă același date ca Figura 1.

Figura 16: Modificări induse de tulpină în activitatea de deacetilază histonă a întregii celule și a lizatului celular (Figura 16A), modificări induse de acid în activitatea de deacetilază histonă (Figura 16B), producția de metaboliți de către tulpini (Figura 16C)

Figura 17: Inhibare HDAC1 (Figura 17A), inhibare HDAC2 (Figura 17B), inhibare HDAC3 (Figura 17C)

Figura 18: Inhibare de HDAC de clasă I (Figura 18A); inhibare de HDAC1 (Figura 18B); inhibare de HDAC2 (Figura 18C); inhibare de HDAC3 (Figura 18D)

Figura 19: Nivel de producție de BDNF

Figura 20: Niveluri de producție de metaboliți - neurotransmițători în creier

Figura 21: Niveluri de producție de metaboliți - acizi organici în supernatant

Figura 22: Efect asupra funcționării barierei intestinale.

Figura 23: Producție de neurotransmițători în creier

Figura 24: Modificări în expresia receptorului hipocampal - A) receptor de oxitocină, B) receptor vasopresină, C) receptor glucocorticoid și D) receptor mineralocorticoid

Figura 25: Modificări în expresia hipocampală de A) hormon de eliberare a corticotropinei (CRH), B) expresia BDNF și C) TLR4

Figura 26: A) Modificări în expresia hipocampală a receptorului 1 hormonal de eliberare a corticotropinei (CRFR1) și B) expresia receptorului 2 hormonal de eliberare a corticotropinei (CRFR2)

Figura 27: Modificări în expresia hipocampală de A) factor de necroză tumorală, B) interleukină 1b și C) IL-6

Figura 28: A) Modificări în expresia hipocampală a integrinei Alfa M (CD11b) și B) Modificări în expresia hipocampală a receptorului de serotonin 1A (receptor 5-HT1A)

Figura 29: A) Modificări în subunitatea 2A de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat hipocampal (Grin2A) și B) expresia subunității 2B de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2B)

Figura 30: Modificări în expresia hipocampală de A) receptor 2 de acid A gama-aminobutiric (GABA A2), B) receptor 1 de acid B gama-aminobutiric (GABA BR1) și C) receptor 1 de dopamină (DRD1)

Figura 31: Modificări în expresia receptorului de amigdale - A) receptor de oxitocină, B) receptor de vasopresină, C) receptor de glucocorticoid și D) receptor de mineralocorticoid

Figura 32: Modificări în expresia de amigdale de A) factor neurotrofic derivat din creier (BDNF), B) receptor 4 asemănător cu Toll (TLR-4), C) receptor 1 hormonal de eliberarea corticotropinei (CRFR1) și D) receptor 2 hormonal de eliberarea corticotropinei (CRFR2)

Figura 33: Modificări în expresia de amigdale de A) integrină Alfa M (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 34: Modificări în expresia de amigdale de A) subunitate 2 alfa a receptorului GABA-A (GABRA2), B) subunitate 1 a receptorului de tip B GABA-A (GABBR1) și C) receptor 1 de dopamină (DRD1)

Figura 35: Modificări în expresia cortexului prefrontal de A) receptor de oxitocină, B) factor neurotrofic derivat din creier (BDNF), C) receptor de mineralocorticoid și D) receptor de glucocorticoid

Figura 36: Modificări în expresia cortexului prefrontal de A) receptor 4 asemănător cu Toll (TLR-4), B) receptor 1 hormonal de eliberarea corticotropinei (CRFR1), C) receptor 2 hormonal de eliberarea corticotropinei (CRFR2) și D) integrină Alfa M (CD11b)

Figura 37: Modificări în expresia cortexului prefrontal de A) interleukină-6 (IL-6), B) subunitate 2A de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2A), C) subunitate 2B de tip NMDA a receptorului ionotrop glutamat (Grin2B) și D) subunitate 2 alfa a receptorului GABA-A (GABRA2)

Figura 38: Modificări în expresia cortexului prefrontal de A) subunitate 1 a receptorului de tip B a receptorului GABA-A (GABBR1) și B) receptor 1 de dopamină (DRD1)

Figura 39: Modificări în expresia colonului de A) triptofan hidroxilază-1 (Tph1) și B) indolamină2,3-dioxigenază-1 (IDO1)

Figura 40: Modificări în expresia ileumului de A) triptofan hidroxilază-1 (Tph1) și B) indolamină2,3-dioxigenază-1 (IDO1)

Figura 41: Modificări în circulația nivelurilor metabolite de triptofan A) Kinurenine, B) triptofan și C) indicele Kinurenină/triptofan de metabolism

Figura 42: Efect asupra producției de interferon- γ de la splenocitele de șoarece de la șoarecii alimentați cu MRx0029

Figura 43: Efect asupra producției de interleukină-1 β de la splenocite

Figura 44: Efect asupra producției de interleukină-6 de la splenocite

Figura 45: Efect asupra producției de factor de necroză tumorală de la splenocite

Figura 46: Efect asupra producției de interleukină-10 de la splenocite

Figura 47: Efect asupra producției de chemoattractant CXCL1 de la splenocite

Figura 48: Modificări în nivelurile de acid gras ale catenei scurte cecale

Figura 49: Modificări induse de MRx0029 și MRX005 în nivelurile de expresie ale genei de actină, vilin, ocludin TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 și NSE.

Figura 50: Diferențiere celulară SHSY5Y indusă de MRx0005 și MRx0029. (A-C) Imagini reprezentative de celule etichetate imuno cu faloidină și MAP2. (D-F) imagini ale A-C îmbinate cu imagini DAPI. Celule imunoetichetate cu tuburi β 3 (G-I). (J-L) îmbinate cu imagini DAPI. Amplificare x630. Analiză de pete Western a efectelor tratamentului MRx0005 și MRx0029 pe celule SHSY5Y. Membranele petelor Western au fost sondate cu anticorpi la MAP2 (M) și tuburi β 3 (N). Actina a fost utilizată ca control de încărcare. Panourile de jos: pete reprezentative de la unul din șase experimente separate; panourile de sus: intensitate densitometrică relativă.

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis*. Exemplele demonstrează că bacteriile din genul *Megasphaera* sunt utile pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative.

Megasphaera sunt microbi gastrointestinali obligatoriu anaerobi, de fermentare a lactatelor de către mamifere rumegătoare și nerumegătoare, incluzând oamenii.

Tulpina de tip *M. massiliensis* este NP3 (=CSUR P245=DSM 26228)[22]. Numărul de acces GenBank pentru secvența genetică 16S rRNA de tulpină NP3 de *M. massiliensis* este JX424772.1 (divulgată aici ca SEQ ID NO:1).

Bacteria *Megasphaera massiliensis* testată în exemple este referită în acest document ca tulpină MRx0029. O secvență 16S rARN pentru tulpina MRx0029 care a fost testată este prevăzută în SEQ ID NO:2.

Tulpina MRx0029 a fost depozitată cu autoritatea de depozitare internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences

Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) pe 13 iulie 2017 ca „*Megasphaera massiliensis* MRx0029” și i-a fost asignat numărul de acces NCIMB 42787.

Tulpinile bacteriene strâns înrudite cu tulpina testată în exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative. În anumite realizări, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență 16S rARN care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența 16S rARN a unei tulpini bacteriene de *Megasphaera massiliensis*. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o secvență 16S rARN care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1 sau 2. Preferabil, identitatea de secvență este cu SEQ ID NO: 2. Preferabil, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are secvența 16S rARN reprezentată de SEQ ID NO:2.

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri de tulpini MRx0029 sau NP3 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative. Un biotip este o tulpină strâns înrudită care are aceleași sau foarte similare caracteristici fiziologice și biochimice.

Tulpinile care sunt biotipuri de tulpini MRx0029 sau NP3 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotidă pentru tulpinile MRx0029 sau NP3. De exemplu, substanțial întregul genom poate fi secvențiat și o tulpină biotip pentru utilizare în invenție poate avea cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență de-a lungul a cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu de-a lungul a cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99%, sau de-a lungul întregului său genom). Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinilor biotip pot include hsp60 sau secvențe repetitive cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)₅, sau REP sau [23]. Tulpinile biotip pot avea secvențe cu cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a tulpinilor MRx0029 sau NP3.

Alternativ, tulpinile care sunt biotipuri de tulpini MRx0029 sau NP3 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin utilizarea tulpinilor MRx0029 sau NP3 și analiza de fragment restricționat și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea de polimorfism cu lungimea fragmentului amplificat fluorescent (FAFLP) și amprentă (rep)-PCR a elementului ADN repetitiv, sau profilare de proteină, sau secvențiere 16S parțială sau 23S ADN. În realizările preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini *Megasphaera massiliensis*.

În anumite realizări, tulpinile care sunt biotipuri de tulpini MRx0029 sau NP3 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același tipar ca tulpinile MRx0029 sau NP3 când sunt analizate prin analiză amplificată de restricție ADN ribozomală (ARDRA), de exemplu când se utilizează enzima de restricție Sau3AI (pentru exemple de metode și ghidare vezi, de exemplu, [24]). Alternativ, tulpinile biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași tipare de fermentare ale carbohidratului ca tulpinile MRx0029 sau NP3.

Biotipurile de tulpini MRx0029 sau NP3, pot fi identificate utilizând orice metodă adecvată sau strategie, incluzând testele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin cultivare cu celule neuroblastom și apoi evaluând nivelurile de citokine și nivelurile de neuroprotecție sau neuroproliferare. În particular, tulpinile bacteriene care au tipare de creștere similare, antigeni de tip metabolic și/sau de suprafață cu tulpinile MRx0029 sau NP3 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea activitate modulatorie imună comparabilă cu a tulpinilor MRx0029 sau NP3. În particular, o tulpină biotip va declanșa efecte comparabile asupra modelelor de boală neurodegenerative și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea de protocoale de cultivare și administrare descrise în exemple.

O tulpină în special preferată a invenției este tulpina *Megasphaera massiliensis* MRx0029 sau un derivat al acesteia. Aceasta este exemplul de tulpină testat în exemple și prezentat pentru a fi eficient în tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, de tulpină *Megasphaera massiliensis* MRx0029 sau un derivat al acesteia. Invenția furnizează de asemenea o compoziție cuprinzând o celulă de tulpină *Megasphaera massiliensis* MRx0029 sau un derivat al acesteia. Invenția furnizează de asemenea o cultură biologică pură de tulpină *Megasphaera massiliensis* MRx0029. Invenția furnizează de asemenea o celulă de tulpină *Megasphaera massiliensis* MRx0029 sau un derivat al acesteia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise aici.

O tulpină în special preferată a invenției este tulpina *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787. Aceasta este exemplul de tulpină MRx0029 testat în exemple și prezentat pentru a fi eficient în tratarea bolii.

Un derivat al tulpinei invenției poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din cea originală. Un derivat al unei tulpini a invenției poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără îndepărtarea de la activitatea biologică. În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea activitate terapeutică comparabilă cu cea a tulpinii MRx0029. În particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile asupra modelelor de boală neurodegenerative și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în exemple,

care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple. Un derivat de tulpină MRx0029 va fi în general un biotip de tulpină MRx0029.

Referirile la celulele de tulpină *Megasphaera massiliensis* MRx0029 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpina MRx0029, 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 de *Megasphaera massiliensis* reduc activarea citokinelor inflamatorii cum ar fi IL-6 și cresc activarea de citokine inflamatorii IL-8. IL-8 au fost implicate în formarea tecii de mielină [25]. Inflamația 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 sporirea activării de IL-6. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative caracterizate prin demielinizare. Multe boli neurodegenerative sunt caracterizate prin demielinizare. Demielinizarea împiedică propagarea potențialelor de acțiune în neuroni, afectând comunicarea eficientă în sistemul nervos. IL-8 s-a arătat că contribuie pozitiv la formarea și refacerea tecii de mielină. Prin urmare, compozițiile invenției sunt în special benefice în tratamentul sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative caracterizate de demielinizare, cum ar fi scleroza multiplă.

Inventatorii au descoperit că tulpinile de *Megasphaera massiliensis* ale invenției atenuează simptomele bolilor neurodegenerative în modele de boală. De exemplu, inventatorii au descoperit că tulpinile de *Megasphaera massiliensis* promovează crșterea neuritelor in vitro, și pot fi utilizate prin urmare în promovarea restaurării neuronale pentru tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative. Astfel, tulpinile bacteriene ale invenției sunt pentru utilizare în tratamentul sau prevenirea bolilor neurodegenerative.

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

O bacterie suplimentară care poate fi utilizată în compozițiile invenției este specia *Parabacteroides distasonis*. Exemplele demonstrează că *Parabacteroides distasonis* și *Megasphaera massiliensis* au ambele activități neuroprotectoare, dar produc diferiți metaboliți 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 din specia *Parabacteroides distasonis* și o tulpină din specia *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 16S rARN pentru tulpina MRx0005 care a fost testată este prevăzută în SEQ ID NO:17. Tulpina MRx0005 a fost depozitată cu autoritatea de depozitare internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) pe 12 martie 2015 ca „*Parabacteroides sp 755*” și i-a fost asignat numărul de acces NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând tulpina depozitată la NCIMB sub numărul de acces NCIMB 42787, sau un derivat sau biotip ai acesteia, și tulpina depozitată la NCIMB sub numărul de acces NCIMB 42382, sau un derivat sau biotip ai 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 crește neuro-proliferarea 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 scade activarea promotorilor 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 de la adenină la treonină conduce la pliarea incorectă a α-sinucleinei. α-sinucleina incorect pliată 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

din expunerea la mediu. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru tratamentul Parkinsonului familial. Activarea de promotori NFκB este mediată prin ligandul TLR4. TLR4 este cunoscut pentru medierea morții celulei în modelul MPTP la șoarece, care simulează boala Parkinson. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a inhiba abilitatea de semnalizare TLR4 pentru a activa promotorul NFκB. De o anumită relevanță pentru PD, ambii TLR2 și TLR4 au fost găsiți ca fiind reglați pozitiv în creierul pacienților cu PD [26]. Mai mult α-sin a fost descris ca ligand pentru TLR2 [27] și am demonstrat că α-sin este de asemenea un ligand pentru TLR4 utilizând celule HEK-TLR4 [28].

Compozițiile invenției scad secreția de citokine pro-inflamatorii cum ar fi IL-6, care poate fi indusă de lipopolizaharidă (LPS). Tratamentul celulelor cu LPS simulează Parkinsonul cauzat de factorii de mediu. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru a scădea secreția de IL-6. Compozițiile invenției pot fi utilizate pentru tratamentul Parkinsonului de mediu.

Exemple de boli neurodegenerative pentru a fi tratate cu compozițiile invenției includ: boală Parkinson, incluzând paralizie supranucleară progresivă, paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, incluzând sindromul Benson; scleroză multiplă; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală neuronală motoare; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, incluzând corp Lewy, demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV, și degenerare corticobasală. O altă boală pentru a fi tratată cu compozițiile invenției este neuropatia inflamatorie progresivă.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea morții neuronilor, în particular, în tratamentul tulburărilor neurodegenerative. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în protejarea neuronilor, în particular în tratamentul tulburărilor neurodegenerative.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea sau prevenirea pierderii de celule dopaminergice în substantia nigra. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea sau prevenirea degenerării neuronilor dopaminergici în substantia nigra pars compacta. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea sau prevenirea degenerării neuronilor dopaminergici în *substantia nigra pars compacta* și pierderea ulterioară a fibrelor lor nervoase proiectate în striatum. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea sau prevenirea pierderii de neuroni dopaminergici nigrostriatali.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor de dopamină. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor de DOPAC (acid 3,4-dihidroxifeniacetic). În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor de dopamină și DOPAC. În anumite realizări, nivelurile de dopamină și/sau DOPAC sunt crescute în striatum. Nivelurile de dopamină și DOPAC pot fi măsurate utilizând orice metodă adecvată cunoscută în domeniu, cum ar fi o metodă radioenzimatică, de exemplu în plasmă sau CSF (de exemplu cum s-a descris în [29]), sau o metodă HPLC cu fază inversă, probabil cu detecție electrochimică, de exemplu în plasmă sau CSF (de exemplu cum s-a descris în [30]).

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

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

Compozițiile terapeutice ale invenției pot crește activarea de BDNF. BDNF acționează asupra anumitor neuroni ai sistemului nervos central pentru a susține supraviețuirea neuronilor existenți și a ajuta creșterea și dezvoltarea de noi neuroni și sinapse. BDNF este activ în hipocampus, cortex și partea din față a creierului bazal, și este important pentru memoria pe termen lung. Compozițiile invenției pot fi utilizate prin urmare pentru a crește secreția de BDNF. Compozițiile pot fi utilizate prin urmare 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 mitocondrială 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. Dovezile 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 implică disfuncția axei microbiotă-intestin-creier în dezvoltarea de tulburări și afecțiuni ale sistemului nervos central [16],[19],[31].

Comunicația bidirecțională între creier și intestin (*adică* axa intestin-creier) include sistemul nervos central, sistemele neuroendocrin și neuroimunitar, incluzând axa hipotalamus-pituitară-adrenală (HPA), brațele simpatice și parasimpatice ale sistemului nervos autonom (ANS), incluzând 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 acele tulburări și afecțiuni asociate cu disfuncția axei microbiotă-intestin-creier.

În anumite realizări, compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din: boală Parkinson, incluzând paralizie supranucleară progresivă, paralizie supranucleară progresivă, sindrom Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalee cu presiune normală, parkinsonism vascular sau arteriosclerotic și parkinsonism indus de medicamente; boală Alzheimer, incluzând sindromul Benson; scleroză multiplă; boală Huntington; scleroză laterală amiotrofică; boală Lou Gehrig; boală neuronală motoare; boală prion; ataxie spinocerebrală; atrofie musculară spinală; demență, incluzând corp Lewy, demență vasculară și frontotemporală; afazie progresivă primară; depreciere cognitivă ușoară; depreciere cognitivă asociată cu HIV, și degenerare corticobasală.

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 tratament cu Levodopa, agoniști de dopamină, inhibitori MAO-B, inhibitori COMT, antagoniști glutamat, și/sau anticolinergice), și/sau tratarea sau prevenirea deteriorării țesutului și simptome 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 neuroendocrină și neuroimună. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de metaboliți comensali și/sau permeabilitatea gastrointestinală a unui subiect.

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 de luminal 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 ENS activează aferentele vagale care influențează funcțiile CNS.

În unele realizări, compozițiile invenției reglează activitatea celulelor enterocromafine.

Boli neurodegenerative

Boala Parkinson

Boala Parkinson este o boală neurodegenerativă uzuală caracterizată neuropatologic prin degenerarea populațiilor eterogene de celule neurale (celule care produc dopamină). Diagnosticul clinic al bolii Parkinson necesită bradikinezie și cel puțin unul dintre următoarele simptome de bază: tremur de repaus; rigiditate musculară și depreciere reflexivă posturală. Alte semne și simptome care pot fi prezente sau se pot dezvolta în timpul progresului bolii sunt tulburările autonome (sialoree, seboore, 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, 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 de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson. Compozițiile cuprinzând o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis* pot îmbunătăți funcțiile

motoare și cognitive în modele de boală Parkinson. Tratamentul cu tulpini de *Megasphaera massiliensis* poate modula semnalizarea în sistemele nervoase central, autonom și enteric; poate modula activitatea căii axei HPA; poate modula căile de neuroendocrine și/sau neuroimune; și poate modula nivelurile de metaboliți comensali, markeri inflamatori și/sau permeabilitatea gastrointestinală a unui subiect, care sunt toate implicate în neuropatologia bolii Parkinson. În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană a speciilor *Megasphaera massiliensis* pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson. Compozițiile utilizând *Megasphaera massiliensis* 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 previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome de bază 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 de repaus; rigiditatea musculară și/sau deprecierea reflexivă posturală la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome asociate cu progresul bolii Parkinson selectate dintre 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.

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, fluența verbală și/sau anxietatea.

În alte realizări 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 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 a 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 scară simptomatică sau de diagnoză. În anumite realizări, testele pentru evaluarea îmbunătățirii simptomatice a funcției motoare în boala Parkinson sunt constituite de scara de notare unificată a bolii Parkinson. În particular, UPDRS II consideră activitatea de viață zilnică și UPDRS III consideră examinarea motoare.

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele asociate cu PDD în conformitate cu un test simptomatic sau de diagnosticare și/sau scară. În anumite realizări, testul sau scara sunt selectate dintre testul de învățare verbală Hopkins - revizuit (HVL-T-R); sistemul de funcții executive Delis-Kaplan (D-KEFS) testul de interferență culoare-cuvânt; scara de notare a depresiei Hamilton (HAM-D 17; depresie); scara de notare a anxietății Hamilton (HAM-A; anxietate) și scara de notare unificată a bolii Parkinson (UPDRS; severitatea simptomului PD).

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc scara de impresie clinică globală - îmbunătățire globală (CGI-I) pentru evaluare psihiatrică și tulburări neurologice. În unele realizări, compozițiile invenției afișează un efect pozitiv asupra deprecierei sociale globale și ocupaționale a subiectului cu boală Parkinson.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică reducerea sau prevenirea pierderii de celule dopaminergice în substantia nigra. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică reducerea sau prevenirea degenerării neuronilor dopaminergici în substantia nigra pars compacta. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică reducerea sau prevenirea degenerării neuronilor dopaminergici în substantia nigra pars compacta și pierderea ulterioară a fibrei lor nervoase de proiectare în striatum. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică reducerea sau prevenirea pierderii de neuroni dopaminergici nigrostriatali.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică creșterea nivelurilor de dopamină. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică creșterea nivelurilor de DOPAC. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea tulburărilor neurologice cum ar fi boala Parkinson la un subiect în care respectiva utilizare implică creșterea nivelurilor de dopamină și DOPAC. În anumite realizări, nivelurile de dopamină și/sau DOPAC sunt crescute în striatum.

Boala Alzheimer și demența

În DSM-5, termenul demență a fost înlocuit cu termenii de tulburare neurocognitivă majoră și tulburare neurocognitivă ușoară. Tulburarea neurocognitivă este o clasă eterogenă de boli psihiatrice. Cea mai uzuală tulburare neurocognitivă este boala Alzheimer, urmată de demența vasculară sau forme amestecate din cele 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 încât efectele neuroprotectoare și neuroproliferative prezentate în exemplele pentru compozițiile invenției au indicat că acestea pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea acestor afecțiuni.

Criteriile simptomatice pentru demență sub DSM-5 sunt dovada scăderii cognitive semnificative de la un nivel anterior de performanță în unul sau mai multe domenii cognitive selectate dintre: învățare și memorie; limbaj; funcție executivă; atenție complexă; cogniție perceptuală-motoare și socială. Deficitul cognitiv trebuie să interfere cu independența activității 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, agresiune, depresie, anxietate, apatie, psihoză și perturbări ale ciclului 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 demențele vasculare; 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.

În realizări 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 perceptuală-motoare și socială. În unele 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 perturbări ale ciclului somn-veghe.

În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează boala simptomatică prin intervenția în mecanismele patogene suspectate la o etapă preclinică. 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 în întârzierea sublinierii procesului neuropatologic. În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele tulburărilor neurodegenerative cuprinzând sporiri cognitive și îmbunătățiri funcționale. În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele comportamentale și psihiatrice de demență (BPSD). În realizările preferate, compozițiile invenției îmbunătățesc abilitatea unui subiect cu tulburare neurodegenerativă de a întreprinde activitățile zilnice.

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

În unele realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc simptomele tulburărilor neurodegenerative în conformitate cu un test simptomatic sau de diagnoză. În anumite realizări, testele

pentru evaluarea îmbunătățirii simptomatice a bolii Alzheimer (și a altor tulburări neurodegenerative) sunt selectate dintre obiectiv cognitiv, activități de trai zilnice, modificări de evaluare globală, teste de sănătate asociate cu calitatea vieții și teste de evaluare a simptoamelor comportamentale și psihiatrice ale tulburărilor neurodegenerative.

În anumite realizări, testele de obiectiv cognitiv pentru evaluarea îmbunătățirilor simptomatice utilizează subscara cognitivă a scării de evaluare a bolii Alzheimer (ADAS-cog) și scara ADAS clasică. În anumite realizări, îmbunătățirea simptomatică a cogniției este evaluată utilizând bateria de test neurofiziologic pentru utilizare în boala Alzheimer (NTB).

În unele realizări, evaluarea globală a testului de modificare utilizează scara de impresie clinică globală - îmbunătățire globală (CGI-I) pentru evaluare psihiatrică și tulburări neurologice. În unele realizări, scara globală este impresia pe bază de interviu a medicului referitoare la plus modificări (CIBIC-plus). În unele realizări, scara globală este impresia globală a medicului din unitatea de studiu a asociației bolii referitoare la modificări (ADCS-CGIC).

În anumite realizări, măsurile de sănătate asociate cu calitatea vieții sunt QOL asociat cu boala Alzheimer (ADRQL) și QOL al bolii Alzheimer (QOL-AD).

În anumite realizări, testele de evaluare a simptoamelor comportamentale și psihiatrice ale tulburărilor neurodegenerative sunt selectate de scara de notare a bolii Alzheimer în patologia comportamentală (BEHAVE-AD); scara de notare comportamentală pentru demență (BRSD); inventarul neuropsihiatric (NPI); și inventarul de agitație Cohen-Mansfield (CMAI).

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

Scleroza multiplă

Scleroza multiplă (MS) este o boală de demielinare în care teaca de mielină care înconjoară neuronii din creier și măduva spinării este deteriorată. Cauzele exacte de bază ale MS nu sunt cunoscute, dar se crede că variază între indivizi. Anumite forme de MS sunt ereditare. Factorii de mediu se crede de asemenea că contribuie la MS. La unii indivizi, o combinație atât genetică cât și de factori de mediu poate declanșa debutul de MS.

Există o largă varietate a simptoamelor asociate cu MS. Subiecții pot prezenta aproape orice simptom neurologic asociat cu deprecierea controlului autonom, vizual, motor sau senzorial. Simptoamele exacte vor varia depinzând de locul deteriorării/demielinării neuronale.

IL-8 au fost implicat în formarea tecilor de mielină. Compozițiile invenției pot fi prin urmare utilizate în remielinarea neuronilor la subiecții cu MS. Compozițiile invenției pot fi de asemenea utilizate pentru a proteja neuronii de demielinare. Cu alte cuvinte, compozițiile invenției pot fi utilizate într-o metodă de tratare sau prevenire a sclerozei multiple prin refacerea sau prevenirea pierderii de teci de mielină neuronală.

În unele realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome ale MS la un subiect. În unele realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează oboseala la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează tremurul de repaus, slăbiciunea mușchilor, spasmul muscular, rigiditatea mușchilor, paraestezia și/sau ataxia la un subiect. În anumite realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome asociate cu progresul MS selectate din lista constând din tulburări autonome: constipație, tulburări de micțiune, funcționare sexuală, disfație, disartrie, sincopă, vârtej și/sau amețeală; tulburări de somn; și tulburări în sens de miros sau în sens de temperatură. În unele realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează unul sau mai multe simptome oculare asociate cu MS. În unele realizări, simptomul ocular este selectat din lista constând din pierderea vederii, durere oculară, orbire la culoare, vedere dublă și/sau mișcări involuntare ale ochiului la un subiect.

În unele realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează amețeala, vârtejul, durerea neuropată, durerea musculoskeletală, disfuncția cognitivă, incontinența intestinală, disfația, disartria, sau orice combinație a acestora.

În unele realizări, compozițiile invenției previn, reduc sau atenuează simptomele depresive sau de anxietate comorbide cu MS.

În unele realizări, îmbunătățirea simptoamelor este determinată utilizând criteriile McDonald 2017 pentru diagnosticarea MS.

În anumite realizări, tratamentul cu compozițiile invenției conduce la o reducere în incidența MS sau severitatea MS. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea incidenței de recidivă sau a severității de recidivă. În anumite realizări, tratamentul cu compozițiile invenției previne o scădere în funcționarea motoare sau conduce la îmbunătățirea funcționării motoare asociate cu MS. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea scăderii în

funcționarea motoare sau pentru utilizare în îmbunătățirea funcționării motoare în tratamentul MS. În anumite realizări, tratamentul cu compozițiile invenției previne dezvoltarea paraliziei în MS. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea paraliziei în tratamentul MS.

În anumite realizări compozițiile invenției sunt pentru utilizare în prevenirea sclerozei multiple la un pacient care a fost identificat cu risc de scleroză multiplă, sau care a fost diagnosticat cu scleroză multiplă în stadiu timpuriu sau cu scleroză multiplă cu „recidivare-remitere”. Compozițiile invenției pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării de MS. Compozițiile invenției pot fi utile pentru prevenirea progresului de MS. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare la un pacient identificat ca având o predispoziție genetică la MS, cum ar fi complexul fenotip de clasă II al complexului de histocompatibilitate major (MHC), antigenul de leucocită uman (HLA)-DR2 sau HLA-DR4.

Compozițiile invenției pot fi utile pentru gestionarea sau atenuarea sclerozei multiple. Compozițiile invenției pot fi în special utile pentru reducerea simptomelor asociate cu scleroza multiplă. Tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple se pot referi la, de exemplu, o ameliorare a severității simptomelor sau la o reducere în frecvența de exacerbare sau la intervalul de declanșare care sunt o problemă pentru pacient. În anumite realizări, compozițiile invenției încetinesc sau stopează progresul bolii.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea MS cu recidivă-remisie. În realizări alternative, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea MS progresive, cum ar fi MS progresivă secundară (SPMS), care se dezvoltă în timpul urmăririi diagnosticului de RRMS, MS progresivă primară (PPMS) care prezintă deteriorare neurologică continuă graduală și MS cu recidivă progresivă (PRMS), care este similară cu PPMS dar care se suprapune cu recidiva.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unuia sau mai multor simptome de MS selectate din grupul constând din: oboseală, probleme de vedere, amorțeală, furnicăături, spasm muscular, rigiditate musculară, slăbiciune a mușchilor, probleme de mobilitate, durere, probleme de gândire, învățare și planificare, depresie și anxietate, probleme sexuale, probleme de vezică, probleme intestinale, dificultăți de vorbire și înghițire.

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 la boli neurodegenerative. Experimentele efectuate de inventatori au indicat că administrarea de specii de *Megasphaera*, și în particular de *Megasphaera massiliensis*, 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 de metaboliți ai acestora. În realizările preferate metabolitul este kinurenina. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează kinurenina, care este calea principală de metabolism a triptofanului, care servește ca o cale pentru producția de dinucleotidă adenină nicotinamidă (NAD⁺). Kinurenina poate fi metabolizată la compuși neuroactivi cum ar fi acidul kinurenic (KYNA) și 3-hidroxi-1-kinurenină (3-OH-1-KYN), și în etape suplimentare la acid chinolinic (QUIN). Dereglarea căii de kinurenină poate conduce la activarea sistemului imunitar și la acumularea de potențiali compuși neurotoxici. Alterările în metabolismul kinureninelor pot fi implicate în dezvoltarea bolii Parkinson. S-a demonstrat că nivelurile de kinurenină au scăzut în cortexul frontal, putamen și substantia nigra pars compacta ale pacienților cu PD [32]. Prin urmare, în anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în creșterea nivelurilor de kinurenină în tratamentul bolii Parkinson.

În anumite realizări ale invenției compozițiile invenției pot crește nivelurile de kinurenină. S-a arătat că nivelurile crescute de kinurenină au atenuat moartea celulei neuronale indusă de MPP⁺ in vitro la o linie celulară de neuroblastom dopaminergic uman [33]. În anumite realizări kinurenina și acidul kinurenic, pot activa receptorul de hidrocarbură aril GI activat (Ahr) și receptorii GPR35. Activarea receptorului Ahr induce producția de IL-22, care poate inhiba inflamația locală. Activarea de GPR35 induce producția de trifosfat de inozitol și mobilizarea de Ca²⁺.

În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de indol. În realizări preferate metabolitul este kinurenină. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează kynurenina, care este principala cale a metabolismului triptofanului.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către nivelurile 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 către nivelurile 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, GABA derivat din comensale traversează bariera hematoencefalică și afectează direct neurotransmiterea. În anumite realizări, compozițiile invenției conduc la o reducere a GABA în hipocampus, amigdale și/sau locus coeruleus. În anumite realizări, compozițiile invenției conduc la o creștere a GABA în regiunile corticale.

Răspuns imun

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către alterări în răspunsul imun și factorii și markerii 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 de citokine pro-inflamatorii și inflamația. 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 NFκB. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt capabile să moduleze activarea producției de IL-6 prin lipopolizaharidă endotoxină pro-inflamatoare potentă (LPS). În anumite realizări, compozițiile invenției sunt capabile să moduleze activarea prootorului NFκB prin LPS și proteine mutante α-sinucleine cum ar fi A53T. Creșterea nivelurilor de circulație ale citokinelor sunt strâns asociate cu diferite tulburări neurodegenerative, incluzând Parkinson, demență și Alzheimer. În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea nivelurilor de IL-6 niveluri și/sau a nivelurilor de NFκB în tratamentul unei tulburări neurodegenerative.

În unele realizări, compozițiile invenției cresc secreția de IL-8. IL-8 s-a arătat că induce formarea sau refacerea tecii de mielină sau conservă eficient comunicația neuronală. 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.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de către nivelurile de metaboliți comensali. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile sistemice de metaboliți microbiotă. 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 acid butiric (BA) (sau butirat). În unele realizări, SCFA este acid propionic (PPA). În unele realizări, SCFA este acid acetic. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează abilitatea SCFA de a traversa bariera hematoencefalică.

Acetilarea și deacetilarea histonă sunt regulatori epigenetici importanți ai expresiei genetice. Un dezechilibru în acetilarea și deacetilarea histonă poate conduce la apoptoză. Dereglarea unor astfel de histone acetiltransferază a fost implicată în patogeneza asociată cu bolile neurodegenerative asociate cu vârsta, cum ar fi boala Parkinson, boala Huntington, boala Alzheimer, scleroza laterală amiotrofică și scăderea cognitivă [34]. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției pot modula acitivitatea 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 a lipidei. Lipida este vulnerabilă la oxidarea prin specii reactive de oxigen, și creierul este bogat în acizi grași polinesaturați. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției pot modula peroxidarea lipidei. În anumite realizări, compozițiile invenției pot reduce peroxidarea lipidei. Reducerea deteriorării oxidative cauzată de speciile reactive de oxigen poate fi utilizată pentru a ținti devreme stadiile bolilor 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 utilizate la un pacient care a fost identificat cu risc de a dezvolta o tulburare neurodegenerativă.

Semnalizarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de nivelurile de permeabilitate gastrointestinală. Corespunzător, în unele realizări, compozițiile invenției alterează integritatea epitelului tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează permeabilitate 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 de metaboliți comensali și a moleculelor de semnalizare inflamatorii în fluxul sanguin din lumenul tractului gastrointestinal.

Semnalezarea axei microbiotă-intestin-creier este modulată de compoziția microbiomă din tractul gastrointestinal. Corespunzător, în anumite realizări, compozițiile invenției modulează compoziția microbiomă a tractului gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției previn disbioza microbiomă și creșterea asociată în metaboliții toxici (de exemplu LPS). În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile de Clostridium din tractul gastrointestinal. În realizările preferate, compozițiile invenției reduc nivelul de Clostridium din tractul gastrointestinal. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc nivelurile de jejuni campilobacterii. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează proliferarea bacteriilor anaerobe nocive și producția de neurotoxine produsă de aceste bacterii. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile microbiome de lactobacili și/sau bifidobacterii. În anumite realizări, compozițiile invenției modulează nivelurile microbiome de Sutterella, Prevotella, Ruminococcus genera și/sau din familia Alcaligenaceae. În anumite realizări, compozițiile invenției cresc nivelul de Lactobacillus plantarum și/sau Saccharomyces boulardii.

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 [35] și inhibarea HDAC poate preveni leziunea materiei albe [36], deci 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 dobândită a creierului. 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 hipoxia cerebrală. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea leziunii creierului care rezultă din anoxia cerebrală.

În realizările preferate, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral. Efectele prezentate în exemple sunt în special relevante pentru tratamentul accidentului vascular cerebral. Accidentul vascular cerebral are loc când curgerea sângelui în cel puțin o parte a creierului este întreruptă. Fără o alimentare adecvată cu sânge pentru a furniza oxigen și nutrienți țesutului cerebral și pentru a îndepărta deșeurile produse din țesutul cerebral, celulele creierului încep să moară rapid. Simptoamele accidentului vascular cerebral sunt dependente de regiunea creierului care este afectată de curgerea inadecvată a sângelui. Simptoamele includ paralizie, amorțeală sau slăbiciune a mușchilor, pierderea echilibrului, amețală, dureri de cap severe bruște, deprecierea vorbirii, pierdere de memorie, pierderea abilității de mișcare, confuzie bruscă, deprecierea vederii, comă sau chiar deces. Un accident vascular cerebral este de asemenea referit ca atac cerebral sau accident cardiovascular (CVA). Simptoamele accidentului vascular cerebral pot fi scurte dacă curgerea adecvată a sângelui este restabilită într-o perioadă scurtă de timp. Totuși, dacă curgerea inadecvată a sângelui continuă pe o perioadă de timp semnificativă, simptoamele pot fi permanente.

În unele realizări, accidentul vascular cerebral este ischemia cerebrală. Ischemia cerebrală apare când există o curgere insuficientă de sânge la țesuturile creierului pentru a îndeplini cererea metabolică. În unele realizări, ischemia cerebrală este ischemie cerebrală focală, adică limitată la o regiune specifică a creierului. În unele realizări ischemia cerebrală este ischemie cerebrală globală, adică care cuprinde o zonă largă a țesutului cerebral. Ischemia cerebrală focală are loc în mod obișnuit când un vas cerebral devine blocat, 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 trombă 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 trece 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 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 ischemie cerebrală globală. În unele realizări, subiectul diagnosticat cu leziunea creierului a suferit hioperfuzie. 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 un 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 în înconjurul 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 sângerarea care apare exterior 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 vascular cerebral hemoragic este un rezultat al unui anevrism al creierului. 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 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 diagnosticat cu leziunea creierului a suferit un anevrism al creierului. 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 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 al creierului. În unele realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în tratarea unui AVM cerebral.

Restabilirea 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 o lipsă de oxigen și nutrienți, și restabilirea bruscă a curgerii sângelui poate conduce la inflamație și deteriorare oxidativă prin inducerea de stres oxidativ. Acest lucru este cunoscut ca leziune de reperfuzie, și este bine documentat, nu numai după un accident vascular cerebral, ci de asemenea și după un atac de cord sau altă deteriorare a țesutului când aportul de sânge se întoarce în 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 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 mini-accident 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. 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 ridicat din sânge, un istoric familial al accidentului vascular cerebral, bolile de inimă, diabetul, anevrismul creierului, malformațiile arteriovenoase, boala celulei sickle, vasculita, tulburările de sângerare, utilizarea unor medicamente anti-inflamatoare nonsteroidiene (NSAID), fumatul, consumul mare de cantități de alcool, utilizarea medicamentelor

ilegale, obezitatea, lipsa de activitate fizică și o dietă nesănătoasă sunt toate considerate a fi factori de risc pentru accidentul vascular cerebral. În particular, scăderea presiunii sanguine a fost prezentată ca o concluzie pentru a preveni atât accidentul vascular cerebral ischemic cât și pe cel hemoragic [37, 38]. 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 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 ridicat 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 al creierului. În unele realizări subiectul are malformații arteriovenoase. În unele realizări subiectul are vasculită. În unele realizări subiectul are boala celulei sickle. În unele realizări subiectul are o tulburare de sângerare. În unele realizări subiectul are un istoric de utilizare a unor medicamente anti-inflamatoare 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 realizări subiectul are o dietă nesănătoasă.

Exemplele au indicat că compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea leziunii creierului și ajută la recuperare când se administrează înainte de a avea loc evenimentul leziunii. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi în special utile pentru tratarea leziunii creierului când se administrează la subiecții cu risc de leziune a creierului, cum ar fi accidentul vascular cerebral.

În anumite realizări, compozițiile invenției sunt pentru utilizare în reducerea deteriorării cauzate de o potențială leziune a creierului, preferabil 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.

Exemplele au indicat că compozițiile invenției pot fi utile pentru tratarea leziunii creierului și ajuta la recuperare când se administrează după ce are loc evenimentul leziunii. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi în special utile pentru tratarea leziunii creierului când se administrează la subiecți după o leziune a creierului, cum ar fi accidentul vascular cerebral.

În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin reducerea deteriorării motorii. În unele realizări, compozițiile invenției tratează leziunea creierului prin îmbunătățirea funcționării motorii. 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 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 simptoamelor. Tratamentul leziunii creierului se poate referi de asemenea la o reducere a deprecierei neurologice după accidentul vascular cerebral. Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate către subiect înaintea debutului accidentului vascular cerebral, de exemplu la un pacient identificat cu risc de accident vascular cerebral. Compozițiile invenției pentru utilizare în tratarea accidentului vascular cerebral pot fi furnizate după ce accidentul 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 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).

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 cu un activator plasminogen al țesutului (tPA). Alți agenți secundari includ alte antitrombotice (cum ar fi clopidogrel), anticoagulanți (cum ar fi heparin, warfarin, apixaban, dabigatran, edoxaban sau rivaroxaban), antihipertensive (cum ar fi diuretice, inhibitori ai ACE, blocanți ai 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 asupra țesuturilor. În anumite realizări, compozițiile invenției reduc cantitatea de țesut deteriorată cauzată de ischemie. În anumite realizări, țesuturile deteriorate de ischemie sunt țesuturi cerebrale. În anumite realizări, 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 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 anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc recuperarea țesutului deteriorat de ischemie. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc viteza de îndepărtare a celulelor necrotice și/sau celulelor apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc eficacitatea îndepărtării celulelor necrotice și/sau a celulelor apoptotice. În anumite realizări, compozițiile invenției îmbunătățesc înlocuirea și/sau regenerarea celulelor în țesuturi. În anumite 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 în 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 pot 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 în forma unui ulei de teobromă (unt de cacao), grăsime sintetică dură (de exemplu suppicire, witepsol), glicerol-gelatină, polietilen glicol, sau compoziție de săpun cu glicerol.

În anumite realizări, compoziția invenției este administrată în tractul gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nasogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub de jejunostomie (tub J), gastrostomie endoscopică percutanată (PEG), sau un port, cum ar fi un port pe peretele pieptului care furnizează acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

Compozițiile invenției pot fi administrate o dată, sau 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 intestinale a pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina invenției nu este obținută astfel încât nu se observă eficacitatea, sau tratamentul poate fi oprit dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală este cu succes și se observă eficacitatea.

În anumite realizări, compoziția invenției poate fi administrată unui animal însărcinat, 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 unui pacient care a fost diagnosticat cu o boală neurodegenerativă, sau care a fost identificat cu risc de o boală neurodegenerativă. Compozițiile pot fi de asemenea administrate ca măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea bolii 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 de *Megasphaera*, și în particular de *Megasphaera massiliensis*.

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 păsările de curte, porcii, pisicile, câinii, caii sau iepurii. Compozițiile invenției pot fi utile pentru amplificarea creșterii și performanței animalelor. Dacă sunt administrate la animale, poate fi utilizat gavajul oral.

Compoziții

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 [39], [], [41].

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 la căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost omorâtă, de exemplu, nu a fost omorâtă la căldură. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost atenuată, de exemplu, nu a fost atenuată la căldură. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției nu a fost omorâtă, inactivată și/sau atenuată. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este vie. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă. De exemplu, în unele realizări, tulpină bacteriană din

compoziția invenției este capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană din compoziția invenției este viabilă și capabilă să colonizeze parțial sau total intestinul.

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

În realizările preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene în intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la 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 solide purtătoare, auto-agregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare, și conținutul mecanic de după o membrană sau microcapsulă microporoasă. Ghidarea pe încapsulare care poate fi utilă pentru prepararea compozițiilor invenției este disponibilă în, de exemplu, referirile [42] și [43].

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

Compoziția poate fi formulată ca probiotic.

O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană a invenției. O cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutică 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 uman, 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 tulpina 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, isomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, gumă arabică modificată și amidonuri rezistente, polidextroze, D-tagatoze, fibre de acacia, roșcovă, ovăz, și fibre citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate prezentate 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 de 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, suplimentul nutrițional cuprinde sau constă din vitamine nutriționale. În anumite realizări, vitaminele sunt vitamina B6, magneziu, dimetilglicină (vitamină 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 terapii convenționale cum ar fi Levodopa, agoniști de dopamină, inhibitori MAO-B, inhibitori COMT, antagoniști de glutamat, sau anticolinergice, care sunt exemple de agenți secundari pentru a fi administrați în combinație (secvențial sau în același timp) cu compozițiile invenției.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemple de astfel de excipienți adecvați pot fi găsite în referința [44]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru

utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referința [45]. 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, excipientului sau diluantului farmaceutic, poate fi selectată cu privire la calea de administrare intenționată și practica farmaceutică standard. 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 cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitori din porumb, gume naturale și sintetice, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilen glicol. 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. Antioxidanții și agenții de punere în suspensie pot fi de asemenea utilizați.

Compozițiile invenției pot fi formulate ca produse alimentare. De exemplu, un produs alimentar poate furniza beneficii nutriționale în plus față de efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-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 asemănătoare cu un produs 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 semi-solid, care are 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 orice procesare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurtul, laptele prins, cașul, laptele acru, laptele acru integral, laptele de unt și alte produse de lapte acru. 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 care conține alimente cum ar fi dulciurile.

În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene din specia *Megasphaera massiliensis* și nu conțin bacterii din nici o altă specie, sau care cuprind numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii dintr-o altă specie. Astfel, în unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând una sau mai multe tulpini bacteriene din specia *Megasphaera massiliensis*, care nu conține bacterii din nici o altă specie sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii dintr-o altă specie, pentru utilizare în terapie.

În unele realizări, compozițiile invenției cuprind una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Megasphaera massiliensis* și nu conțin bacterii din nici o altă specie *Megasphaera*, sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii din alte specii *Megasphaera*. Astfel, în unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând una sau mai multe tulpini bacteriene ale speciilor *Megasphaera massiliensis*, care nu conține bacterii din nici o altă specie *Megasphaera* sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii dintr-o altă specie *Megasphaera*, pentru utilizare în terapie.

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 de alte tulpini bacteriene sau specii. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial fără alte specii de organisme.

În unele realizări, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o singură tulpină bacteriană a speciilor *Megasphaera massiliensis*, care nu conține bacterii din nici o altă tulpină sau care cuprinde numai *de minimis* sau cantități irelevante biologic de bacterii de la o altă tulpină pentru utilizare în terapie.

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 aceeași specie (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 de la nici o altă specie. În unele realizări, compozițiile invenției cuprind mai puțin de 50 tulpini din aceeași specie (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 de la aceeași specie și, opțional, nu conțin bacterii de la nici o altă specie. Invenția cuprinde orice combinație a celor anterioare.

În unele realizări, compoziția cuprinde un consorțiu microbial. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde tulpina bacteriană *Megasphaera massiliensis* ca parte a unui consorțiu microbial. De exemplu, în unele realizări, tulpina bacteriană *Megasphaera massiliensis* 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 alt gen, cu care ea poate trăi simbiotic in vivo în intestin. De exemplu, în unele realizări, compoziția cuprinde o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis* în combinație cu o tulpină bacteriană dintr-un gen diferit. 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 de la mostre de excremente de la cel puțin două organisme diferite. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt de la aceeași specie, de exemplu de la doi oameni diferiți. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un copil uman și un adult uman. În unele realizări, cele două organisme diferite sunt un om și un mamifer non-uman.

În unele realizări, compoziția invenției cuprinde suplimentar o tulpină bacteriană care are aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpina MRx0029, dar care nu este MRx0029, sau care nu este o *Megasphaera massiliensis*.

În unele realizări în care compoziția invenției cuprinde mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen, tulpinile bacteriene individuale, speciile sau genurile pot fi pentru administrare separată, simultană sau secvențială. De exemplu, compoziția poate cuprinde toate din cele mai mult de o tulpină bacteriană, specie sau gen, sau tulpinile bacteriene, speciile sau genurile pot fi depozitate separat și pot fi 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*. Bacteria poate a fost cultivată ulterior de a fi obținută din excremente de adult uman și de a fi utilizată într-o compoziție a invenției.

Cum s-a menționat mai sus, în unele realizări, una sau mai multe tulpini bacteriene *Megasphaera massiliensis* este/sunt singurul agent activ terapeutic într-o compoziție a invenției. În unele realizări, tulpina bacteriană din compoziție este singurul agent activ terapeutic într-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 să colonizeze parțial sau total intestinul. 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 să colonizeze parțial sau total intestinul.

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

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

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

În anumite realizări, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; 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 a coloniilor pe gram față de greutatea compoziției.

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.

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.

În anumite realizări, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză curgătoare liber, 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.

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 de acid p-hidroxibenzoic.

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 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 a 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.

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 o sticlă. În unele realizări, compoziția invenției este furnizată într-o seringă cuprinzând o compoziție cum s-a descris aici.

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

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.

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

În unele realizări formularea farmaceutică este o formulare enterică, adică o formulare gastro-rezistentă (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 degradarea în 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, gastro-rezistentă 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 metilceluloză, hidroximetilceluloză sau hidroxipropilmetilceluloză (HPMC). În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă care nu conține nici un polimer de formare a filmului. În unele realizări, capsula cuprinde o carcasă și carcasa cuprinde hidroxipropilmetilceluloză și nu cuprinde nici un polimer de formare a filmului (de exemplu vezi [46]). 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 agenților de înmuiere, cum ar fi, de exemplu, glicerol, sorbitol, maltitol și polietilen glicoli, prezenți în carcasa capsulei, să aibă o anumită elasticitate și molicieune. Capsulele moi pot fi produse, de exemplu, pe baza 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 pot avea diferite forme, ele pot fi, de exemplu, rotunde, ovale, alungite sau în formă de torpilă. Capsulele moi pot fi produse prin procedee convenționale, cum ar fi, de exemplu, procedeul Scherer, procedeul Accogel sau procedeul picătură sau suflare.

Metode de cultivare

Tulpinile bacteriene pentru utilizare din prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici microbiologice standard cum s-a detaliat în, de exemplu, referirile [47], [] și [49].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (pe 100ml, valori aproximative): Casitone (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), şi piridoxamină (15 µg).

Tulpini bacteriene pentru utilizare în compozițiile vaccinului

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 se administrează ca compoziții vaccin. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției pot fi omorâte, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de realizări, compozițiile pot cuprinde un vaccin adjuvant. În anumite realizări, compozițiile sunt pentru administrare prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

General

Practica din prezenta invenție va utiliza, dacă nu este indicat altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, din domeniul tehnicii. Astfel de tehnici sunt explicate complet în literatură. Vezi, *de exemplu*, referirile [50] și [51, 57], etc.

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

Termenul „aproximativ” în relație 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 de la 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 de identitate de secvență pot fi determinate utilizând programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7,7,18 din ref. [58]. O aliniere preferată este determinată prin algoritmul de căutare de omologie Smith-Waterman utilizând o căutare cu gol afin cu o penalizare de deschidere a golului de 12 și o penalizare de extensie a golului de 2, matricea BLOSUM de 62. Algoritmul de căutare de omologie Smith-Waterman este divulgat în ref. [59].

Dacă nu se specifică explicit, 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.

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 (exceptând situația când ele se exclud reciproc).

MODURI DE EFECTUARE A INVENȚIEI

Exemplul 1 - Eficacitatea inoculării bacteriene de a acționa ca neuroprotector

Rezumat

Celulele neuroblastom au fost tratate cu compoziții cuprinzând tulpini 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 de asemenea tratate cu 1-metil-4-fenilpiridiniu neurotoxin dopaminergic (MPP), care induce permanent simptomele bolii Parkinson în celulele neuroblastom. A fost investigată abilitatea tulpinilor bacteriene de a acționa ca neuroprotector împotriva MPP.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRx0029; Parabacteroides distasonis MRX0005

Linie celulară

Celulele neuroblastom SH-SY5Y au fost cumpărate de la ECCACC (Cat. no: 94030304) și au fost crescute în MEM (Sigma Aldrich, cat n. M2279) suplimentate cu Nutrient Amestec F-12 Ham (Sigma Aldrich, cat n. N4888).

Metodă

Odată crescute, celulele neuroblastom SH-SY5Y au fost placcate pe o 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 10 uM acid retinoic (Sigma Aldrich, cat. n. R2625-100MG). Mediul de diferențiere a fost înlocuit în fiecare altă zi și celule au fost recoltate la 7 zile de diferențiere. Celulele au

fost pretratate cu sau fără MPP (Sigma Aldrich, cat. n. D048-1G) timp de 8 ore. Ulterior, celulele au fost tratate cu 10% supernatant bacterian și incubate peste noapte. Viabilitatea celulară a fost măsurată utilizând reactivul CCK-8 (Sigma Aldrich, trusă de numărare celulară - 8, cat. n. 96992-3000TESTS-F) și citită la o lungime de undă de 450 nm.

5 Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 1. Tratamentul celulelor neuroblastom cu MRx0029 sau MRX0005 a condus la o creștere în proliferarea neuronilor. 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 tulpina bacteriană poate acționa ca neuroprotector. Efectul protector a fost mai mare pentru celulele tratate cu MRX0029, care au salvat viabilitatea mai mult decât celulele de control pozitiv tratate cu Quercetin. Aceste date arată că tulpinile bacteriene pot acționa ca neuroprotektori.

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

15 Rezumat

Activarea citokinelor proinflamatoare a fost asociată cu deteriorarea neuronilor în boala neurodegenerativă. Lipopolizaharida (LPS) este un stimulator cunoscut de citokine 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.

20 Material și metode

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRx0029

Linie celulară

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 de aminoacid neesențial MEM IX și piruvat de sodiu IX.

Metodă

Odată crescute, celulele MG U373 au fost placcate pe o placă cu 24 de godeuri la 100.000 celule/godeu. Celulele au fost tratate cu LPS (1 ug/mL) singur sau cu 10% supernatant de bacterie din MRx0029 timp de 24 ore. A fost efectuat de asemenea un control unde celulele au fost incubate în mediu netratat. După aceea celulele fără supernatanți au fost colectate, centrifugate la 10.000g timp de 3min la 4°C. IL-6 a fost măsurat utilizând trusa ELISA IL-6 umană de la Peprotech (cat n.#900-K16) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului.

35 Rezultate

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

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

40 Rezumat

Deoarece neuro-inflamația joacă un rol pivotal în bolile neurodegenerative și IL-8 s-a arătat că are efecte neuro-pozitive, 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.

45 Material și Metode

Tulpini bacteriene

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linie celulară

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 de aminoacid neesențial MEM IX și piruvat de sodiu IX.

Metodă

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

55 Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figura 3. Tratamentul celulelor neuroblastom cu tulpinile bacteriene conduce la o creștere a secreției de IL-8 independent de prezența LPS.

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

Rezumat

Neuroinflamația joacă un rol pivotal în boala Parkinson și α -sinucleina a arătat că induce neuroinflamația *in vivo*. Prin urmare, a fost evaluată abilitatea tulpinilor bacteriene ale invenției de a inhiba inflamația indusă de α -sinucleină. O co-cultură de celule astrocitom glioblastom umane și celule neuroblastom a fost expusă la α -sinucleina de tip sălbatic și la 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 indusă de α -sinucleină de IL-6.

Material și Metode**Tulpini bacteriene**

Megasphaera massiliensis MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linie celulară

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 de aminoacid neesențial MEM IX și piruvat de sodiu IX.

SH-SY5Y este o linie celulară de 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 F-12 Ham de amestec de nutrient suplimentat cu 2mM L-glutamină, 10% căldură inactivată de FBS, 100 U/ml penicilină, 100 μ g/ml streptomycină. Celulele din mediul de creștere au fost placcate pe o 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.

Metodă

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 F-12 Ham de amestec nutrient suplimentat cu 2mM L-glutamină, 10% căldură inactivată de FBS, 100 U/ml penicilină, 100 μ g/ml streptomycină. Celulele din mediul de creștere au fost placcate pe o placă cu 96 de godeuri la 11.000 celule/godeu și plasate în incubator. După 2 zile, 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 și celulele au fost utilizate după 7 zile de diferențiere. U373 a fost placat pe plăci cu 12 trangodeuri (membrană de poliester de 0,4 μ m, Costar) la o densitate de 50.000celule/godeu timp de 72 ore. Celule au fost co-cultivate împreună timp de 24 ore înainte de tratamentul în mediul 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. Celulele fără supernatanti au fost colectate, centrifugate la 10000g timp de 3 min la 4°C, alicate și depozitate 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 4. Tratamentul celulelor cu α -sinucleină de tip sălbatic și cu izomorfele mutante E46K și A53T a indus o secreție moderată de IL-6 (Figura 4A). Secreția indusă de α -sin de IL-6 a fost inhibată în celulele tratate cu tulpinile bacteriene (Figura 4A). Reducerea secreției de IL-6 a fost cea mai mare la administrarea de MRX0029.

Exemplul 3 - Eficacitatea inoculării bacteriene de 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 cu 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 de mediu. A fost investigată abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției de a inhiba activarea promotorului NF κ B.

Material și Metode**Tulpină bacteriană**

Megasphaera massiliensis MRx0029

Linie celulară

TLR4 albastru Hek uman a fost cumpărat de la InvivoGen (cat n. hkb-htr4). TLR4 albastru Hek uman a fost crescut în DMEM bogat în glucoză (Sigma Aldrich, cat n. D-6171) suplimentat cu 10% FBS, 1% Pen Strep, 4mM L-glut, normocin și soluție de selecție albastră HEK IX.

Metodă

Odată crescute, celulele albastre Hek umane au fost placcate în plăci cu 96 de godeuri la 25.000 celule/godeu în 4 replicare. Un set al celulelor a fost tratat cu α -sinucleină A53T (1 μ g/mL) singur sau cu 10% supernatant de bacterie din MRx0029 timp de 22 ore. Al doilea set al celulelor a fost tratat cu LPS

(10 ng/mL, de la serotipul enteric Salmonella Typhimurium, Sigma Aldrich, cat n. L6143) singur sau cu 10% supernatant de bacterie din MR029 timp de 22 ore. Celulele au fost ulterior centrifugate și 20ul de supernatant a fost amestecat cu 200ul de reactiv albastru Quanti (InvivoGen, cat n. rep-qb2), incubate timp de 2 ore și s-a citit absorbanta la 655nm.

Rezultate

Rezultatele acestor experimente sunt prezentate în Figurile 5 și 6. Figura 5 arată că activarea promotorului NFκB de către α-sinucleină este inhibată de MRx0029. Figura 6 arată că activarea promotorului NFκB de către LPS este inhibată de MRx0029.

Exemplul 4 - Eficacitatea inoculării bacteriene de a altera capacitatea antioxidantă

Rezumat

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

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRx0029

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 de pelet). 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 7. Figura 7 arată că MRx0029 are o capacitate antioxidantă de aproximativ 2mM în comparație cu Trolox.

Exemplul 5 - Eficacitatea inoculării bacteriene de a altera nivelurile de peroxidare ale lipidei

Rezumat

A fost investigată abilitatea compozițiilor cuprinzând tulpinile bacteriene conform invenției de a altera nivelurile de peroxidare ale lipidei. Testul substanțelor reactive tiobarbiturice (TBAR) a fost utilizat pentru a măsura produsele secundare ale peroxidării lipidei.

Material și Metode

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRx0029

Metodă

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

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 8. Figura 8 arată că MRx029 este capabilă să inhibe peroxidarea lipidei cu aproximativ 20 %, care este o capacitate antioxidantă mai ridicată decât a controlului 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

Megasphaera massiliensis MRx0029

Linie celulară

Linia celulară HT-29 a fost utilizată deoarece este prezentă deacetilaza histonă.

Metodă

Celulele fără supernatanți din culturi celulare de fază staționară au fost izolate prin centrifugare și filtrare într-un filtru de 0,22 μm. Celulele HT-29 au fost utilizate 3 zile post confluență și lăsate în 1 mL DTS 24 ore înainte de începerea experimentului. Celulele HT-29 au fost provocate cu 10 % supernatant fără celule diluat în DTS și au fost lăsat 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 9. Figura 9 arată că MRx0029 este capabilă să reducă nivelurile activității de deacetilază histonă.

Exemplul 7 - Nivel de 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****Megasphaera massiliensis MRx0029**

ATCC 11775 este o tulpină bacteriană de referință care este cunoscută pentru producerea de 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 triptofan ca substrat pentru a produce indol. După o perioadă de incubare de 48 ore, supernatantul a fost îndepărtat și adăugat la reactivul Kovac pentru cuantificarea indolului. Standardele, soluțiile stoc și reactivii au fost preparați utilizând metode standardizate validate in-house.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 10. Figura 10 arată că MRx0029 are capacitatea de a produce indol din triptofan, la concentrații de aproximativ 0,2mM.

Exemplul 8 - Nivelul de producție de kinurenine în bacterie**Rezumat**

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

Tulpină bacteriană**Megasphaera massiliensis MRx0029**

DSM 17136 este o tulpină de *Bacteroides copricola* care este cunoscută pentru producerea de kinurenine.

Metodă

Supernatanții fără celule din culturi celulare de fază staționară au fost izolați prin centrifugare și filtrare într-un filtru de 0,22 μ M și congelați până la utilizare. Kinureninele standard, soluțiile stoc și reactivii au fost preparați utilizând metode standardizate validate in-house. Mostra a fost tratată cu acid tricloroacetic și centrifugată la 10.000xg timp de 10 minute la 4°C. Supernatantul a fost colectat și dispensat pe o placă cu 96 godeuri. Pentru detecția kinureninelor a fost utilizat reactivul Ehrlich și a fost adăugat într-un raport de 1:1.

Rezultate

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 11. Figura 11 arată că MRx0029 are capacitatea de a produce kinureninele la o concentrație de aproximativ 40 μ M.

Exemplul 9 - Nivelurile de dopamină, DOPAC și HVA în striatum la șoarecii MPTP tratați cu bacterie

Boala Parkinson este o tulburare neurodegenerativă obișnuită ale cărei caracteristici clinice cardinale includ tremurul, încetinirea mișcării, rigiditatea, și instabilitatea posturală. Aceste simptome sunt cele care pot fi atribuite în primul rând degenerării neuronilor dopaminergici din substantia nigra pars compacta și pierderea ulterioară a fibrei lor nervoase de proiectare în striatum [60]. Șoarecii tratați cu MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridină) pierd selectiv numere semnificative de neuroni dopaminergici nigrostriatali [61]. MPTP a indus pierderea de celule dopaminergice în substantia nigra imitând condițiile clinice din boala Parkinson și este prin urmare un model util pentru a testa medicamentele anti-parkinson.

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele bacteriilor anaerobe MRX0029 utilizând șoareci lezați cu MPTP.

48 de șoareci masculi au fost alocați până la 4 grupuri diferite de tratament (grupurile A, B, E și I, cu n=12 animale în fiecare grup). Grupurile de tratament sunt prezentate în Tabelul 1 de mai jos și programul de proiect este prezentat mai jos.

Tabelul 1: Grupurile de tratament

Grup n		Tratament				Leziune				
		Substanță	Nivel siguranță	Doză	Cale	Program	Substanță	Doză	Cale	Program
A	12	Vehicul (PBS)	-	-	p.o.	18 zile; ziua(-14) -	Vehicul (0,9%		i.p.	ziua0

Grup	n	Tratament				Leziune				
		Substanță	Nivel siguranță	Doză	Cale	Program	Substanță	Doză	Cale	Program
						ziua3	sol.salină)			
B	12	Vehicul (PBS)	-	-	p.o.	18 zile: ziua(-14) - ziua3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	ziua0
E	12	MRx0029 <i>Megasphaera</i> <i>sp.</i> (gly)	S1/S2	2 x 10^8 bacterii	p.o.	18 zile: ziua(-14) - ziua3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	ziua0
I	12	Vehicul (PBS)	-	-	p.o.	18 zile: ziua(-14) - ziua3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	ziua0
		7-nitroindazol	-	50 mg/kg	i.p.	ziua0 (2x i.p.)				

Grupurile A, B, E și I au fost tratate zilnic timp de 18 zile prin gavaj oral cu bacterie (MRx0029 - grupul E), sau cu vehicul (PBS). Tratamentul oral a început cu 14 zile înainte de leziunea MPTP. Grupul I de animale a primit un vehicul zilnic de tratament (PBS) p.o. (per oral) și a fost injectat i.p. (intraperitoneal) cu medicament de referință cu 30 min înainte și la 90 min după prima MPTP în ziua 0. Volumul de aplicație pentru p.o. și tratamentul cu vehicul a fost de 200 μl pe șoarece. Tulpina bacteriană a grupului E a fost din stocuri de glicerol (gly). Pentru tratamentul oral, gavajele pentru aplicații au fost depozitate într-o fiolă conținând 70% etanol și au fost spălate înainte și după fiecare utilizare cu apă distilată. Fiecare grup de tratament a avut propriul gavaj și fiolă de etanol și fiolă de apă distilată. Tuburile și gavajele nu au fost modificate între grupuri. Direct înainte de tratament, fiecare seringă a fost spălată cu N₂.

În ziua 0, MPTP (20 mg/kg greutate corporală (b.w.) de 4 ori, interval de inter-tratament de 2 ore) a fost injectat i.p. la animalele din grupurile B, E și I. Un grup de animale (A) a fost fals lezat prin administrare i.p. de vehicul MPTP (0,9% sol. salină). Volumul de aplicație a fost de 10 μl pe g de greutate corporală. Cântărirea animalelor a fost efectuată înainte de tratamentul MPTP, pentru a doza animalele în conformitate cu greutatea lor corporală actuală. După aceea animalele au primit zilnic tratamentul p.o..

Formularea preparărilor pentru dozarea și prepararea stocurilor de glicerol pentru dozare [0252]

Nume de tulpină bacteriană:	MRx0029 <i>Megasphaera</i> sp.
Condiții/stabilitate de depozitare:	-80 °C
Vehicul:	1x PBS
Dozaje de tratament:	2 x 10 ⁸ bacterii
Administrare:	200μl
Număr lot:	n/a

Pentru grupul de tratament E (MRx0029)

- 1.) 1 stoc de glicerol a fost luat din congelator la -80°C și plasat în condiții anaerobe (pliculeț cu jar anaerobic) la 37°C pentru dezghețare (aceasta aluat 30-40 minute).
- 2.) Stocul de glicerol dezghețat complet a fost centrifugat la 6000 x g timp de 10 min la temperatura camerei.
- 3.) Supernatantul a fost eliminat fără deranjarea peletului (de exemplu utilizând o pipetă).
- 4.) S-au adăugat 4,22 mL de 1 x PBS steril pre-încălzit (37°C) și s-a amestecat ușor utilizând o pipetă.
- 5.) Șoarecii au fost dozați cu 200 μL de soluție bacteriană. Animalele au fost dozate la 15 minute după resuspendarea peletului cu PBS.

Referința formulării grupului de medicament

Nume articol de referință:	7-Nitroindazol
Condiții/stabilitate de depozitare:	-20°C
Vehicul:	Ulei de arahide
Dozaje de tratament:	50 mg/kg
Administrare:	i.p. (cu 30 min înainte și la 90 min după primul tratament MPTP)
Număr lot:	MKBS6671V

Cantitatea adecvată de 7-nitroindazol a fost dizolvată în ulei de arahide pentru a atinge concentrația finală de 50 mg/kg.

Materiale și Metode

Animale

5

Linie de șoarece:	C57BL/6J (tulpină de șoarece JAX™) număr stoc de șoarece JAX™
Furnizor:	Charles River Laboratories
Vârsta de start:	~10 săptămâni
Sex:	Masculin
Număr de animale:	48

Manipularea specifică a animalelor și randomizarea

10 Mănușile au fost modificate între fiecare grup de tratament și pulverizate cu 70% soluție de etanol între fiecare cușcă a aceluiași grup pentru a minimiza riscul de contaminare indiferent de cum au fost manipulate animalele (de exemplu: tratament, testare comportamentală, curățarea și luarea unei mostre de țesut).

Tratamentul a fost randomizat și alternat zilnic astfel încât să împiedice ca aceleași grupuri să fie tratate în același timp în fiecare zi. Animalele au fost randomizate pe cușcă la luarea unei mostre de țesut.

Luarea unei mostre de țesut și procesare

15 În ziua 4, animalele din toate grupurile au fost sacrificate și creierele au fost colectate. Prin urmare, șoarecii au fost anesteziați profund cu injecție de Pentobarbital (600mg/kg).

20 Sângele (aproximativ 500 μ l) a fost colectat prin punctură în inimă. Șoarecii au fost apoi perfuzați transcardiac cu 0,9% soluție salină și creierele au fost îndepărtate și hemisectate. Hemisfera lăsată a fost subdivizată în țesut striatal (pentru HPLC), țesutul de substanția nigra precum și creierul rezidual, cântărite și congelate imediat și depozitate la -80°C. Instrumentele și suprafețele care au fost în contact cu animalele au fost curățate cu 70% etanol înainte ca următorul animal să fie disecat.

Analiza biochimică a nivelurilor de dopamină, DOPAC și HVA cu HPLC în striatum

25 Mostra striatală (n=6 de la fiecare grup de tratament; în total 24 mostre) a fost amestecată la un raport de 1:10 (m/v) cu 0,2 M acid percloric incluzând 100 μ M EDTA-2Na și omogenizată la 0°C într-un omogenizator cu micropistil de sticlă. După ce a stat timp de 30 min la gheață, omogenații au fost centrifugați la 10.000 RPM timp de 10 minute într-o centrifugă congelatoare Biofuge Fresco (Heraeus Instruments, Germania). Supernatanții au fost aspirați cu grijă și amestecați cu tampon 0,4 M acetat de Na, pH 3 la un raport 1:2 (v/v) și filtrați printr-un filtru centrifugal de 0,22 μ m (Merck Millipore, Germania) timp de 4 min la 14.000 g la 4°C. Filtratele au fost depozitate la -80°C înainte de analiza HPLC.

30

Analiza HPLC

35 Concentrațiile de DA, DOPAC și HVA în mostrele striatale au fost determinate prin cromatografie de lichide pe coloană cu detecție electrochimică [62;63]. A fost utilizat sistemul HPLC (HTEC-500, Eicom Corp., Kyoto, Japonia) incluzând o pompă de microflux fără impulsuri, un degazor și un detector amperometric echipat cu un electrod de carbon sticlos care operează la +0,45 V vs. un electrod de referință Ag/AgCl. Mostrele au fost injectate prin utilizarea unui microșantier CMA/200 (CMA/Microdialysis, Stockholm, Suedia). Cromatogramele au fost înregistrate și integrate prin utilizarea unui sistem computerizat de achiziție de date (DataApex, Praga, Republica Cehă). DA, DOPAC și HVA au fost separate pe o coloană 150 x 2,1 i.d. mm (CA5-ODS, Eicom Corp., Kyoto, Japonia). Faza mobilă a constat în 0,1 M tampon fosfat la pH 6,0, 0,13 mM EDTA, 2,3 mM sodiu-1-octansulfonat și 20 % (v/v) metanol. Limita de detecție (raport semnal-zgomot = 3) pentru DA a fost estimată până la 0,5 fmol în 15 μ l (0,03 nM) injectați pe coloană.

40

Rezultate

45 Administrarea de tulpini bacteriene a fost bine tolerată de animalele. Pe ziua de leziune MPTP și dacă este necesar pe ziua de după aceea, a fost utilizată o lumină roșie pentru a încălzi animalele. Dacă animale au fost în condiții rele (au simțit frig, au fost deshidratate, au avut un comportament anormal), ele au fost alimentate cu hrană umedă și tratate cu soluție salină subcutanată dacă a fost necesar.

50 Pentru analiza nivelurilor de dopamină, DOPAC și HVA, a fost utilizat țesutul striatal de la 6 animale pe grup de tratament. Datele au fost analizate utilizând testul Kruskal-Wallis urmat de testul ulterior comparației multiple Dunn sau de analiza unifactorială a varianței urmată de testul ulterior Bonferroni (A vs. tot(*), B vs. tot, I vs. tot (#)). */# = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001.

55 Animalele sănătoase din grupul A au avut niveluri ridicate de dopamină, DOPAC și HVA în timp ce tratamentul MPTP la grupul B a redus acest număr și controlul pozitiv (grupul I) a recuperat producția într-o oarecare măsură (Figura 12). Animale din grupul I tind să aibă niveluri de dopamină mai ridicate decât grupul tratat cu bacterie și grupul B. Nivelurile de DOPAC (un metabolit de dopamină) au

fost în general semnificativ mai scăzute la animalele din grupul B în comparație cu nivelurile de DOPAC de la animalele nelezate din grupul A (Figura 12B).

Semnificativ, s-a descoperit că tratamentul cu MRx0029 (grupul E) recuperează producția de dopamină și DOPAC (Figurile 12A și respectiv 12B). Tratamentul cu MRx0029 poate fi prin urmare util pentru tratarea sau prevenirea tulburărilor neurodegenerative.

Exemplul 10 - Eficacitatea bacteriei de a altera creșterea neuritelor

Rezumat

Creșterea neuritelor este un proces important pentru dezvoltarea de conexiuni între neuroni. A fost testată prin urmare abilitatea tulpinilor bacteriene și a acizilor organici de a induce creșterea neuritelor prin măsurarea nivelurilor transcripționale de proteină MAP2 asociată microtuburilor, un marker specific de diferențiere neuronală.

Tulpină bacteriană

Megasphaera massiliensis MRX0029.

Metodă

SHSY5Y au fost placcate în plăci Petri de 10cm 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 de bacterie sau YCFA+, 10uM RA, 200uM acid hexanoic sau 200uM acid valproic, timp de 17 ore. După aceea, au fost luate imagini reprezentative utilizând un microscop de detaliu EVOS XL cu contrast de fază la o amplificare de 40X/0,65. Celulele au fost colectate, și ARN-ul total a fost izolat în conformitate cu protocolul minitrusei RNeasy (Qiagen). ADNc-urile au fost făcute utilizând trusa de transcripție inversă ADNc de mare capacitate (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 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Imunofluorescență și microscopie confocală

Celulele au fost înșămânțate pe lamele cameră cu 8 godeuri (Marienfeld Laborator 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 10nM acid retinoic timp de 5 zile înainte de tratarea cu supernatant bacterian. Celulele au fost apoi 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 temperatura camerei înainte de adăugarea de anticorp anti-MAP2 (sc-74421, 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, urmat de incubare cu conjugat anti-șoarece Alexa Flour 488 (Molecular Probes Inc) și Alexa Flour 594 conjugat faloidin (ab176757, Abcam) timp de 1 oră la temperatura camerei. După spălarea 3X cu PBS, lamelele au fost montate cu Vectorshield conținând DAPI (Sigma, Aldrich). Lamelele au fost văzute utilizând un microscop Zeiss Axioscope echipat cu un obiectiv 63x/1,2 W Korr și seturi de filtre adecvate pentru detecția fluorocromilor utilizați. Timpii manuali de expunere pentru achiziția digitală de imagini imunoetichetate cu MAP-2 au fost ținuti constanți permițând comparația între diferite godeuri și tratamente. Timpii de expunere la faloidin (F-actină) și DAPI au variat pentru a se potrivi domeniul de vedere. Domeniile randomizate de vedere au fost dobândite utilizând o cameră QImaging controlată de software-ul Image Pro Plus. Imaginile au fost salvate ca TIF și deschise în Adobe Photoshop CC 2015,1.2 și se suprapun peste imaginile MAP-2, DAPI și faloidin suprapuse și îmbinate. Imaginile reprezentative au fost selectate pentru a ilustra diferențele în abundență și localizare ale proteinelor examinate.

Rezultate

Rezultatele sunt prezentate în Figura 13. Figura 13A prezintă imagini microscopice reprezentative de celule SHSY-5Y nediferențiate incubate cu fiecare din acizii și supernatanții de bacterii. Tratamentul celulelor cu MRX0029 a indus un fenotip asemănător neuronului, prezentând caracteristici similare cu celulele tratate cu acid retinoic (care este utilizat pentru diferențierea terminală a celulelor neuroblastom), unde corpurile celulelor sunt mai mari și în formă piramidală, cu neuritele și procesate ramificându-se în rețea cu celulele vecine. Figura 13B arată că MRx0029 reglează pozitiv semnificativ MAP2 în celulele neuroblastom nediferențiate. Colorarea suplimentară a faloidinului (un agent de legare la actina citoskeleton) a furnizat un aranjament diferit al structurii citoskeletale în celulele tratate cu MRx0029, care susțin suplimentar ipoteza de diferențiere neuronală pentru MRx0029 (Fig. 13B).

Exemplul 11 - Eficacitatea inoculării bacteriene de a reduce nivelurile 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 SHSY-5Y și U373 diferențiate de speciile reactive de oxigen (ROS) generate prin tratamentul cu terț-butil peroxid de hidrogen (TBHP).

Material și Metode**Tulpină bacteriană****Megasphaera massiliensis MRX0029****Metodă**

- 5 Celulele SHSY-5Y au fost placcate într-o placă neagră cu fund plat cu 96 godeuri la densitatea de 5000 celule/godeu și plasate într-un incubator cu CO₂. După 24 ore, mediul a fost înlocuit cu mediu de diferențiere (mediu de creștere conținând 1% FBS) și 10 μM 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 pre-încălzit și colorate cu o sondă moleculară DCFDA de 10μM timp de 20 minute în mediu de creștere conținând 1% FBS. Apoi celulele au fost spălate din nou cu PBS pre-încălzit și tratate cu 100uM TBHP în prezența sau absența a 10% supernatant de bacterie timp de 2 ore. Intensitatea fluorescență a fost măsurată utilizând un cititor de placă TECAN la Ex/Em 485/530 nm.

Rezultate

- 15 Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figura 14. Figura 14b arată că MRX0029 este capabil să inhibe producția de ROS în celulele neuroblastom SHSY-5Y diferențiate. MRX0029 nu a avut un efect asupra generării de ROS în celulele astroglblastom U373 (Figura 14a). Acest lucru arată că acest aspect al efectului antioxidant este specific neuronal.

Exemplul 12 - neuroprotecția

- 20 Celulele SHSY-5Y diferențiate RA au fost tratate cu MPP+, metabolitul activ al MPTP, un produs chimic utilizat pe larg pentru a imita *in vitro* și *in vivo* unele din caracteristicile patologiei PD. Viabilitatea celulară a fost măsurată ca rată a respirației mitocondriilor (Figura 15). Ambele MRx0005 și MRx0029 au prezentat efecte semnificative și promovează *per se* o creștere a activității metabolice a mitocondriilor în celulele SHSY-5Y. MRX0029 a prezentat protecție completă față de MPP+, refăcând viabilitatea celulară aproape la același nivel de celule netratate și mai ridicat decât controlul pozitiv cu quercetin. Protecția cu MRx0005 a fost de aproximativ 20% în comparație cu mostra tratată cu YCFA-MPP+, aproximativ aceeași observată pentru controlul pozitiv cu quercetin (Fig. 15).

Exemplul 13 - Analiză suplimentară a mecanismului de inhibare a deacetilării histone**Introducere**

- 30 Microbiota intestinală, cu capacitatea sa imensă de diversitate și metabolică, reprezintă un rezervor metabolic uriaș pentru producția unei vaste varietăți de molecule cu potențial de a influența activitatea HDAC. Câteva studii au evaluat activitatea inhibitorilor HDAC a metaboliților derivați microbiali, alții decât butiratul, care au arătat că inhibă HDAC și sunt asociați cu îmbunătățirea funcționării motoare în boala Huntington [64]. Inventatorii au căutat prin urmare să determine care metaboliți sunt responsabili pentru inhibarea HDAC și să elucideze mai departe mecanismul prin care este obținută inhibarea.

Material și Metode**Cultura bacteriană și colecție de supernatant fără celule**

- 40 Culturile pure de bacterii au fost crescute anaerobic în bulion YCFA până când ele au atins faza lor de creștere staționară. Culturile au fost centrifugate la 5.000 x g timp de 5 minute și supernatantul fără celule (CFS) a fost filtrat utilizând un filtru de 0,2 μM (Millipore, UK). O alicotă de 1 mL de CFS a fost depozitată la -80°C până la utilizare. Butiratul de sodiu, acizii hexanoic și valerice au fost obținuți de la Sigma Aldrich (UK) și suspensiile au fost preparate în bulion YCFA.

Cuantificarea SCFA și MCFA a supernatanților bacterieni

- 45 Acizii grași cu catenă scurtă (SCFA) și acizii grași cu catenă medie (MCFA) din supernatanții bacterieni au fost analizați și cuantificați prin MS Omics APS după cum urmează. Mostrele au fost acidulate utilizând acid clorhidric, și s-au adăugat standarde interne etichetate cu deuteriu. Toate mostrele au fost analizate într-o ordine randomizată. Analiza a fost efectuată utilizând o coloană cu polaritate ridicată (Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. Coloană 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) instalată într-un GC (7890B, Agilent) cuplat cu un detector cvadripol (59977B, Agilent). Sistemul a fost controlat de ChemStation (Agilent). Seriile de date au fost convertite în format netCDF utilizând Chemstation (Agilent), înainte ca datele să fie importate și procesate în Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) utilizând software-ul PARADISE descris în [65].

Analiza specifică a activității HDAC

- 55 Activitatea specifică de inhibare HDAC a fost analizată pentru HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 utilizând truse de test fluorogenice pentru fiecare tip de HDAC (BPS Bioscience, CA). Testele au fost efectuate în conformitate cu instrucțiunile fabricantului și fiecare mostră a fost efectuată în replicat. Supernatanții fără celule au fost diluați 1 în 10 și expuși la proteine HDAC specifice furnizate în trusă pentru a menține consistența între metode.

Rezultate**Metaboliții microbieni comensali intestinali care inhibă deacetilaza histonă sunt butiratul și acidul valeric**

MRx0029, al căror supernatant a prezentat o puternică inhibare HDAC atât în celulele întregi HT29 cât și în lizatele celulare HT29, au produs acid valeric și acid hexanoic la concentrații medii de 5,08 mM și respectiv 1,60 mM (Figurile 16A și C).

Pentru a investiga care metaboliți au fost responsabili pentru inhibarea HDAC indusă de tulpină, au fost măsurate diferite concentrații de acid hexanoic, acid valeric și butirat de sodiu pentru inhibarea lor HDAC a celulelor HT-29 întregi și a lizatelor celulare HT-29. Rezultatele din Fig. 16B arată o inhibare semnificativă ($P < 0,05$) a activității HDAC de către butiratul de sodiu asupra celulelor întregi precum și asupra lizatelor celulare, în timp ce acidul hexanoic nu a arătat o activitate inhibitoare semnificativă. Acidul valeric a inhibat total activitatea HDAC (* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,005$), *** ($P < 0,001$), **** ($p < 0,0001$)).

Inhibitorii potenți de HDAC total au investigat HDAC din clasa I de ținte.

A fost investigat profilul specific de inhibare HDAC al tulpinii bacteriene de test. Testele specifice de inhibare HDAC (BPS Biosciences, CA) au fost efectuate pentru HDAC din clasa I și clasa II. Abilitatea tulpinii bacteriene de a inhiba enzimele HDAC a fost comparată cu cea a butiratului, și a acizilor hexanoic și valeric. Rezultatele noastre demonstrează că MRX0029, este un inhibitor foarte puternic al enzimelor HDAC din clasa I (HDAC 1, 2 și 3). Inhibarea HDAC din clasa II nu a fost la fel de semnificativă (datele nu sunt prezentate).

Discuție

Tulpina cu activitate inhibitoare HDAC a produs cantități semnificative de acid valeric și acid hexanoic precum și cantități semnificative de butirat de sodiu (Figura 16C). Când au fost testate ca substanțe pure, acidul valeric și butiratul de sodiu au condus la o inhibare HDAC semnificativă ($p < 0,0001$).

Interesant, rezultatele pentru activitatea HDAC specifică arată că tulpina testată este un inhibitor puternic de HDAC din clasa I, și în special de HDAC2 (Figura 17 și 18). HDAC din clasa I (HDAC1, 2, 3 și 8) rezidă în nucleu și sunt exprimate omniprezent în câteva tipuri de celule umane. HDAC 1-3 partajează mai mult de 50% omologie, dar au structuri și funcții celulare distincte [66]. Ele sunt implicate în primul rând în supraviețuirea, proliferarea și diferențierea celulei, și astfel inhibarea lor poate fi utilă într-o largă matrice a bolilor [67]; [68]; [69]; [70]; [71].

Exemplul 14 - Nivelul de secreție BDNF în celulele SHSY-5Y**Fundal**

Factorul neurotrofic derivat din creier (BDNF) este o moleculă omniprezentă în creier, asociată cu dezvoltarea neurală, neuro-protecția și neuro-regenerarea. BDNF nu numai că protejează împotriva neurodegenerării, dar de asemenea și împotriva tulburărilor mentale de depresie și anxietate, care sunt destul de comune între pacienții diagnosticați cu PD sau AD.

Metode

SH-SY5-SY au fost placcate în plăci 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 deplin de creștere și 50 μ l de bacterie SN au fost adăugați pentru a trata godeurile sau a fost adăugat YCFA+ ca control negativ.

Rezultate

Rezultatele sunt prezentate în Figura 19, care arată că administrarea de MRX0029 în combinație cu acidul retinoic crește secreția de BDNF din celulele neuroblastom diferențiate. Compozițiile cuprinzând bacterii comensale și acizi organici pot fi prin urmare utile în terapie.

Exemplul 15 - Producția de metaboliți - metaboliți în creier**Fundal**

Metaboliții prezenți în supernatanții bacterieni pot influența direct răspunsul gazdei la stresul oxidativ, la comunicația celulă cu celulă și la neuroprotecție. Metaboliții care joacă un rol cheie în procesele neurologice au fost măsurați în timpul urmăririi *ex vivo* a țesutului cerebral al șoarecilor alimentați cu MRx0005 și MRx0029.

Metode**Animale**

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

Conceperea studiului

Animalele au fost lăsate să habiteze în camera lor de găzduire timp de o săptămână după sosirea în unitatea de animale. Ele primesc gavaj oral (doză de 200µL) 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 experimente.

Colectarea de țesut

Animale au fost sacrificate într-o manieră aleatoare referitoare la tratament și afecțiunea de testat; luarea unei mostre a avut loc între 9,00 a.m. și 1:00 p.m. Coloana de sânge a fost colectată în tuburi EDTA (acid etilen diamin tetra acetic) de potasiu și centrifugată timp de 15 min la 4000 g. Plasma a fost izolată și depozitată la -80°C pentru analiza ulterioară. Creierul a fost repede excizat, disecat și fiecare regiune a creierului a fost congelată înclichetat pe gheață uscată și depozitată la -80°C pentru analiza ulterioară. Splina a fost îndepărtată și procesată imediat după sacrificare pentru stimulare imună *ex-vivo*. Țesutul intestinal (2 cm segmente de ileum și colon cele mai apropiate de cecum au fost excizate, și a fost utilizat cel mai îndepărtat 1cm de țesut de cecum) a fost montat în camere de utilizare pentru testul intestinal de permeabilitate. Cecumul a fost îndepărtat, cântărit și depozitat la -80°C pentru analiza SCFA.

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 stopită 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, plută) 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 controlor de sistem SCL 10-Avp, un detector electrochimic LECD 6A (Shimadzu), o pompă LC-10AS, un cuptor CTO-10A, un autoinjector SIL-10A (cu mostră 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, Fenomenex) menținută la 30°C a fost utilizată în separare (debit de 0,9 ml/min). Electrocul de lucru din carbon sticlos combinat cu un electrod de referință de Ag/AgCl (Shimadzu) operat +0,8V și cromatogramele generate au fost analizate utilizând software-ul de clasă-VP5 (Shimadzu). Neurotransmițătorii au fost identificați prin timpii lor de retenție caracteristici după cum s-a determinat prin injecții standard, care se desfășoară la intervale regulate în timpul analizei mostrei. Au fost măsurate rapoartele înălțimilor maxime ale analitului versus standardul intern și comparate cu injecția standard. Rezultatele au fost exprimate ca ng de neurotransmițător pe g de greutate proaspătă de țesut.

Analiza metaboliților

Pentru analiza GC a metaboliților, mostrele de supernatanți bacterieni au fost derivate cu cloroformat de metil utilizând o versiune puțin modificată a protocolului descris în [72]. Toate mostrele au fost analizate într-o ordine randomizată. Analiza a fost efectuată utilizând GC (7890B, Agilent) cuplat cu un detector cvadripol (59977B, Agilent). Sistemul a fost controlat de ChemStation (Agilent). Seriile de date au fost convertite în format netCDF utilizând Chemstation (Agilent), înainte ca datele să fie importate și procesate în Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) utilizând software-ul PARADISE descris în [65].

Pentru analiza acidului gras, mostre au fost acidulate utilizând acid clorhidric, și s-au adăugat standarde interne etichetate cu deuteriu. Toate mostrele au fost analizate într-o ordine randomizată. Analiza a fost efectuată utilizând o coloană cu polaritate ridicată (Zebron™ ZB-FFAP, GC Cap. Coloană 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalată într-un GC (7890B, Agilent) cuplat cu un detector cvadripol (59977B, Agilent). Sistemul a fost controlat de ChemStation (Agilent). Seria de date a fost convertită în format netCDF utilizând Chemstation (Agilent), înainte ca datele să fie importate și procesate în Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) utilizând software-ul PARADISE descris în [65].

Rezultate - producția de neurotransmițători

Rezultatele sunt prezentate în Figura 20, care arată că în creierele șoarecilor alimentați cu MRx0029, nivelurile de noradrenalină sunt crescute ($p=0,0507$), însoțite de o ușoară creștere a serotoninei și 5-HIAA. Aceste date susțin analiza metaboliților prezentată mai jos, sugerând că MRx0029 este un producător major de acid 4-hidroxifenilacetic, un antioxidant cunoscut [73]. Mai important, acidul 4-hidroxifenilacetic este un intermediar sintetic de dopamină și norepinefrină și o moleculă bio-activă importantă [74]. De fapt, în PD, modificările degenerative se extind dincolo de sistemul dopaminergic, afectând în mod egal sistemele serotoninergic și noradrenergic, care conduc în schimb la niveluri scăzute de serotonină (5-hidroxitriptamină, 5-HT) și noradrenalină (norepinefrină) atât în structurile striatale cât și extra-striatale [75]. L-DOPA țintește în principal caracteristicile legate de dopamină ale PD, totuși nu adresează scăderile nici în 5-HT și nici în noradrenalină. În plus față de acestea este că cu cât mai lungă este durata tratamentului de L-DOPA, cu atât mai vizibil este un interval de complicații motoare și nonmotoare (de exemplu dischinezie, simptome psihiatrice) [76]. Prin urmare, aceste date demonstrează

că bacteria care produce acizi organici, cum ar fi acidul 4-hidroxifenilacetic, poate fi utilă în terapie, în particular în tratamentul bolilor neurodegenerative.

Rezultate - producția de metaboliți

Metaboliții prezenți în supernatanții bacterieni pot influența direct răspunsul gazdei la stresul oxidativ, la comunicația celulă cu celulă și la neuroprotecție în special. Metaboliții din supernatantul de culturi de MRX0029 și MRX0005 au fost analizați și rezultatele sunt prezentate în Figura 21.

Câțiva 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. 21A).

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 cele ramificate (Fig. 21B). Cele două tulpini au arătat foarte diferit și în particular, producția de acid succinic și acid 4-hidroxifenilacetic de către MRX0005 și respectiv MRX0029 a fost notabilă (Figura 21A). Mai mult, MRX0005 pare să producă mai mulți acizi grași cu catenă scurtă C2 și C3, în timp ce MRX0029 a produs mai mult C4 (butirat) și atât acizi grași cu catenă medie liniară cât și ramificată, incluzând acidul hexanoic.

Acidul succinic este un metabolit de ciclu 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 [77]. Disfuncția sa a fost raportată în tulburările neurodegenerative incluzând boala Alzheimer, boala Parkinson și ataxia spinocerebrală de tip 1 [78]. Aceste descoperiri sunt în special interesante deoarece acidul succinic poate augmenta activitatea mitocondrială și susține neuronii vulnerabili din boala neurodegenerativă în legătură cu proteinele pliate anormal incluzând PD [79]. BDNF și acidul succinic au ambele o activitate protectoare similară nu numai în neuro-degenerare ci de asemenea și în tulburările mentale ca depresia și anxietatea, care sunt destul de obișnuite la pacienții diagnosticați cu PD sau AD.

Figura 21B 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 [80]. Această proprietate a MRX0029 (și a altor bacterii neuroprotectoare) poate contribui la eficacitatea sa.

Exemplul 16 - Modularea expresiei ARNm a proteinelor de joncțiune strânsă de către MRX0029

Deoarece dovezile recente sugerează că disfuncția intestinală și inflamația constituie un simptom non-motor asociat cu PD, a fost investigată abilitatea tulpinilor bacteriene ale invenției de a cauza orice disfuncție a barierei intestinale. HT29-mtx epitelial, monostraturile celulare de producere a mucinei [81] 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 supernatanții bacterieni MRX0005 și MRX0029, a indus o secreție chiar mai scăzută de IL-8 comparativ cu celulele atât tratate cât și netratate cu YCFA (Fig. 22A).

A fost apoi investigată abilitatea MRX0005 și MRX0029 de reglare a permeabilității epiteliale prin modificarea transducției semnalului intracelular implicată în expresia și localizarea proteinelor implicate în formarea barierei intestinale.

ARN a fost izolat și s-a efectuat analiza RT-PCR cantitativă (qRT-PCR) pentru a caracteriza modificările în expresia genei de proteine de joncțiune strânsă în timpul incubării cu MRX0005 și MRX0029. Administrarea de MRX0029 a sporit expresia ARNm de ocludin, vllin, proteine 1 și 2 de joncțiune strânsă (respectiv TJP1 și TJP2) după 2 ore de incubare (Fig. 22B). În contrast, expunerea la MRX0005 nu a alterat expresia genei de proteine de joncțiune strânsă care arată că cele două tulpini acționează diferit asupra barierei intestinale.

Rezultatele *in vitro* au fost comparate cu datele de la analiza paralelă *ex vivo* pe intestinul șoarecilor alimentați cu MRX0005 și MRX0029. Expresia genei de TJP2 și ocludin a fost cuantificată în colon și ileum. Datele *ex vivo* oglindesc perfect datele *in vitro*, că MRX0029 a fost capabilă să regleze pozitiv semnificativ TJP1 și ocludin ($p=0,073$) în regiunea colonului intestinului murin (Fig. 22C+22D). MRX0029 a fost de asemenea capabil să scadă funcția de permeabilitate din colon la aceiași șoareci (Fig. 22E+22F).

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 de ARN a fost determinată prin absorbantă la 260/280nm utilizând un spectrofotometru (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE). Pentru analiza expresiei de ARNm, ADNc a fost preparat din ARN total utilizând trusa de transcripție inversă ADNc de mare capacitate (Applied Biosystems, UK) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Reacțiile de transcripție inversă au fost efectuate într-un termociclator (Biometra, Germania) la 25°C timp de 10min, 37°C timp de 120min, și 85°C timp de 5 min, menținute la 4°C. 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 6 flex (Applied Biosystems, UK) utilizând un profil standardizat (denaturare inițială de 95°C timp de 10 minute, urmată de 40 cicluri de 15 secunde de denaturare la 95°C și 60 secunde de recoacere/extensie la 60/65°C, depinzând de inițiatori. S-a adăugat o etapă de disociere după 40 de cicluri pentru a genera o curbă de topire. Analiza a fost efectuată utilizând software-ul în timp real Applied Biosystems QuantStudio PCR v1.2. Secvențele inițiatore pentru actină, vilină, TJP1 și TJP2 de ocludin sunt furnizate în lista de secvențe.

Exemplul 16 - Testarea stabilității

O compoziție descrisă aici conținând cel puțin o 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 cum s-a măsurat în unitățile de formare a coloniilor determinată de protocoale standard.

Exemplul 17

Metode

Animale

Animalele și conceperea studiului utilizate au fost aceleași ca în exemplul 15.

Tulpini bacteriene

- 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)
- *Megasphaera massiliensis* (MRX0029)

Colectarea țesutului

Animale au fost sacrificate într-o manieră aleatoare referitoare la tratament și afecțiunea testată; luarea unei mostre a avut loc între 9,00 a.m. și 2:30 p.m. Coloana de sânge a fost colectată în tuburi EDTA (acid etilen diamin tetra acetic) de potasiu și centrifugate 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 înclichetat pe gheață uscată și depozitată la -80°C pentru analiză ulterioară. Splina a fost îndepărtată, colectată în 5 mL de 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 s-au utilizat cei mai îndepărtați 1cm-2cm de țesut de cecum) a fost montat în camere de utilizare pentru testul intestinal de permeabilitate. Cecumul a fost îndepărtat, cântărit și depozitat la -80°C pentru analiza SCFA.

Analiza monoaminei

Concentrația de neurotransmițător a fost analizată cum s-a descris în Exemplul 10.

Testul de citokine splinale

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

Analiza expresiei genei

ARN total a fost extras utilizând trusa de izolare ARMmi mirVana™ (Ambion/Life tehnologii, Paisley, UK) și tratat DNase (Turbo ADN-liber, Ambion/Life Technologies) în conformitate cu recomandările fabricantului. ARN a fost cuantificat utilizând un spectrofotometru NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, SUA) în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Calitatea ARN a fost evaluată utilizând bioanalizor Agilent (Agilent, Stockport, UK) în conformitate cu procedura fabricantului și s-a 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 multiscrisă (50 U/μL) (1)(2)(1)(10) a fost adăugată ca o parte din amestecul principal la temperatura camerei, incubată la 25°C timp de 10 min, la 37°C timp de 2 ore, la 85°C timp de 5 min și depozitată la 4°C. PCR cantitativ a fost efectuată utilizând sonde (6 carboxi fluoresceină - FAM) concepute de Applied Biosystems la genele de șoarece țintite specific, în timp ce s-a utilizat β-actină ca un control endogen. Reacțiile de amplificare au conținut 1 μl

ADNc, 5 µl de amestec principal 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 godeuri pe sistemul LightCycler®480. Condițiile ciclice termice au fost cum s-au recomandat de fabricant (Roche) pentru 55 cicluri. Pentru a verifica contaminarea cu amplicon, fiecare rulare nu a

5 conținut controale șablon în triplicat pentru fiecare sondă utilizată. Valorile pragului de ciclu (Ct) au fost înregistrate. Datele au fost normalizate utilizând β-actină și transformate utilizând metoda 2-ΔΔCT și prezentate ca modificare de pliere vs. grupul de control.

Analiza acizilor grași cu catenă scurtă în conținutul cecal

Conținutul cecumului a fost amestecat și vortexat cu apă MilliQ și incubat la temperatura

10 camerei timp de 10 min. Supernatanții au fost obținuți prin centrifugare (10000 g, 5 min, 4°C) la bacteria peletului și la alte solide și prin filtrare de 0,2µm. A fost transferat la o fiolă GC transparentă și acidul 2-etilbutiric (Sigma) a fost utilizat ca standard intern. Concentrația de SCFA a fost analizată utilizând un sistem de ionizare cu flacără Varian 3500 GC, ajustat cu o coloană ZB-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25

15 mm; Fenomenex). S-a construit o curbă standard cu diferite concentrații ale unui amestec standard conținând acetat, propionat, iso-butirat, n-butirat, isovalerat și valerat (Sigma). Maximele au fost integrate prin utilizarea software-ului versiunea 6.0 de pe stația de lucru Varian Star Chromatography. Toate datele SCFA sunt exprimate ca µmol/g.

Analiza statistică

Datele distribuite normal sunt prezentate ca medie ± SEM; seturile de date neparametrice sunt

20 prezentate ca mediană cu interval inter-cvartale. S-au aplicat teste t bidirecționale neîmperecheate pentru a analiza datele parametrice și testul Mann-Whitney a fost utilizat pentru cele neparametrice. Coeficientul de corelație al gradului Spearman a fost utilizat pentru analiza corelației în seturile de date grupate. O valoare p < 0,05 a fost considerată semnificativă în toate cazurile.

Rezultate - Producția de neurotransmițători

Rezultatele din Figura 23 prezintă efectul tratamentului cu MRx005 asupra concentrației de neurotransmițători în creierul șoarecilor. Cel mai notabil, tratamentul cu MRx005 conduce la o scădere a

25 dopaminei.

Rezultate - expresia genei

Expresia genelor pentru receptorii neurotransmițători [receptor serotonin 1a(5-HT1a),

30 receptorul D1 dopamină, subunitatea B1 a receptorului GABA, receptorul GABAA, receptorii NMDA2A (Grin2A) și NMDA2B (Grin2b)], markerii inflamatori [IL-1β, IL6, CD11b, TNFα și TLR4], și markerii endocriini [factor de eliberare al corticosteronului (CRF), receptorii 1 și 2 ai factorului de eliberare al corticosteronului (CRFR1, CRFR2), factorul neurotrofin derivat din creier (BDNF), receptorul vasopresin, receptorul oxitocin, receptorul glucocorticoid și receptorul mineralocorticoid] a fost analizată

35 în țesutul cerebral din hipocampus, amigdale și cortexul prefrontal.

Figurile 24-38 arată modificările în expresia genei după tratamentul cu MRX005 sau MRX0029 în hipocampal, amigdale și cortexul prefrontal. Tratamentul cu MRx0029 a condus la o creștere în expresia receptorului glucocorticoid în amigdale (Figura 31C). Figura 32A arată că MRx005 a crescut semnificativ expresia de BDNF în amigdale, în timp ce tratamentul cu MRx0029 a crescut semnificativ

40 expresia de TLR4 în amigdale (Figura 32).

Ambele MRx005 și MRx0029 pot crește expresia de CD11b în amigdale (Figura 33A), în timp ce expresia de IL-6, Grin2a și Grin2b este redusă după tratamentul cu MRx005 (Figurile 33B-D). În plus, MRx005 și MRx0029 au crescut semnificativ expresia de GABRA2 și au crescut expresia de GABBR1 în

45 amigdale.

Tratamentul cu MRx005 a condus la o creștere semnificativă în expresia de BDNF în cortexul prefrontal (Figura 35B).

Discuție

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

Rezultate - Efectul asupra expresiei de Tph1 și IDO-1

Figura 39 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 (Figura 40). Indolamină-pirol 2,3-dioxigenază-1 (IDO-1) este prima enzimă și limitatoare de viteză în calea triptofan/kinurenină în timp ce triptofan hidroxilază 1 (Tph1), o izoformă a enzimei triptofan hidroxilază, este responsabilă de sinteza de serotonină. Aceste date sugerează că MRx0029 și MRx005 pot afecta nivelurile de serotonină și calea triptofan/kinurenină.

55

Rezultate - Efectul asupra nivelurilor metabolite de triptofan

Figura 41 prezintă efectul tratamentului cu MRx005 asupra nivelurilor de kinurenine și triptofan în circulație.

Rezultate - Efectul asupra expresiei de citokine din splenocite

60

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 42). În plus, MRX005 a redus nivelurile de interleukină-6 și factor de necroză tumorală după o provocare cu LPS (Figurile 44 și respectiv 45). Tratamentul cu MRx0029 a condus la o reducere în interferon- γ , interleukină-1 β și interleukină-6 după o provocare cu LPS (Figurile 42, 43 și respectiv 44).

Tratamentul cu MRx005 și MRx0029 a condus la o creștere în nivelurile de chemoattractant CXCL1 (Figura 47).

Rezultate - Efectul asupra nivelurilor cecale ale acizilor grași cu catenă scurtă

Acizii grași cu catenă scurtă (SCFA) sunt produși când fibrele nedigerabile din dietă sunt fermentate de bacterii în intestin. Efectele administrării de MRX005 sunt prezentate în Figura 48.

Exemplul 18- Analiza ulterioară a modificărilor induse de MRX029 și MRX005 în nivelurile de expresie ale genei

Metode

Linie celulară

Celule SH-SY5Y

Tulpini bacteriene

- 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005)
- *Megasphaera massiliensis* (MRX0029)

qPCR

SHSY5Y au fost placcate în plăci Petri de 10cm 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% supernatant 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 detaliu EVOS XL cu contrast de fază la 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 mare capacitate (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-etichetarea și imaginea celulei

Celulele au fost însămânțate pe lamele cameră cu 8 godeuri (Marienfeld Laborator 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 a fi tratate 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 temperatura camerei 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, urmate de incubare cu conjugat anti-șoarece Alexa Flour 488 (Molecular Probes Inc) și conjugat faloidin Alexa Flour 594 (ab176757, Abcam) timp de 1 oră la temperatura camerei. După spălarea 3X cu PBS, lamelele au fost colorate cu DAPI și montate cu Vectashield® (Vector Laboratories). Lamelele au fost urmărite utilizând un microscop Axioskop 50 (Zeiss) echipat cu un obiectiv 63x/1,2 W Korr și seturi de filtre adecvate pentru detecție fluorocromilor utilizați. Timpii manuali de expunere pentru achiziția digitală de imagini imuno-etichetate cu MAP-2 au fost ținuti constanți permițând comparația între diferite godeuri și tratamente. Timpii de expunere cu faloidin (F-actină) și DAPI au variat pentru a se adapta domeniului de vedere. Domeniile randomizate de vedere au fost dobândite utilizând o cameră QImaging controlată de software-ul Image Pro Plus. Imaginile au fost salvate ca fișiere TIFF și deschise în Adobe Fotoshop CC 2015,1.2. Imaginile de MAP-2, DAPI și imaginile faloidin au fost apoi suprapuse și îmbinate. Imaginile reprezentative au fost selectate pentru a ilustra diferențele în abundență și localizare ale proteinelor examinate.

Imunopătarea

Celulele SH-SY5Y cultivate în condițiile indicate descrise mai sus, au fost 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. Membrana a fost apoi blocată cu 5% lapte uscat fără grăsime sau 5% BSA și incubată peste noapte la 4°C cu anticorpi primari (respectiv MAP2 și β 3-tubulină). Petele au fost apoi incubate cu anticorp secundar conjugat (HRP) din peroxidază din hrean adecvată, și proteinele au fost detectate prin trusa de detecție a

chemiluminiscenței (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Pentru ambele MAP2 și β 3-tubulină, β -actina a servit drept control pentru a monitoriza variabilitatea de încărcare a proteinei între mostre.

Rezultate și discuție

Expresia genei

- 5 Figurile 13a (inserție grafică) și 49 arată că modificările induse de MRx0029 și MRX005 în expresia nivelurilor de actină, vilin, ocludin TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 și NSE.

Microscopie și imunopătare

- 10 Figura 50 prezintă modificarea în nivelul expresiei de MAP2 în celulele SHSY5Y după cum s-a determinat prin microscopie confocală. Nivelurile de expresie ale MAP2 și B3-tubulinei au fost de asemenea cuantificate prin analiză de imunopătare. Rezultatele prezentate în figurile 50M și N au indicat că MRX029 induce o creștere în expresia nivelului de MAP2.

Secvențe

15

SEQ ID NO:1 (Gena *megasphaera massiliensis* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: NP3 - JX424772.1)

```

1   agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggggtgc ttaacacatg caagtcgaac
61 gagagagat gagaagcttg cttctatca attcgsgtgg caaacgggtg agtaacgct
121 aagcaacctg ccttcagat ggggacaaca gctggaacg gctgctaata ccgaatacgt

```

```

181 tctttccgcc gcatgacggg aagaagaaag ggaggccttc gggctttcgc tggaggaggg
241 gcttgcgctc gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg atcagtagcc
301 ggtctgagag gatgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg
361 cagcagtggg gaatcttcog caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgaacga
421 tgacggcctt cgggttgtaa agttctgtta tatgggacga acagggcacg ggtaataacc
481 cgggtgtctt gacggtagcg taagagaaag ccacggctaa ctacgtgccg gcagccgcgg
541 taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcgg taaagggcgc gcaggcggca
601 tcgcaagtcg gtcttaaaag tgcggggcct aaccccgta ggggaccgaa actgtgaagc
661 tcgagtgctg gagaggaaag cggatttctt agtgtagcgg tgaatgcgt agatattagg
721 aggaacacca gtggcgaaag cgctttctg gacgacaact gacgtgagg cgcgaaagcc
781 aggggagcaa acgggattag ataccocggt agtcctggcc gtaaacgatg gatactaggt
841 gtaggaggta tcgactcctt ctgtgccgga gttaacgcaa taagtatccc gcctggggag
901 tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagtat
961 gtggtttaat tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagcc ttgacattga ttgctacgga
1021 aagagatttc cggttcttct tcggaagaca agaaaacagg tgggtgcacg ctgtcgtcag
1081 ctggtgtcgt gagatgttgg gttaaagccc gcaacgagcg caaccctat cttctgttgc
1141 cagcacctcg ggtggggact cagaagagac tgccgcagac aatgcggagg aaggcgggga
1201 tgacgtcaag tcatcatgcc ccttatggct tgggctacac acgtactaca atggctctta
1261 atagagggac gcgaaggagc gatccggagc aaaccccaaa aacagagtcc cagttcggat
1321 tgcaggctgc aactcgctg catgaagcag gaatcgctag taatcgagcgc tcagcatact
1381 gcggtgaata cgttcccggg ccttgtaacac accgccgctc acaccacgaa agtcattcac
1441 acccgaagcc ggtgaggcaa ccgcaaggaa ccagccgctc aaggtggggg cgatgattgg
1501 ggtgaagtcg taacaaggt

```

SEQ ID NO:2 (consens secvență 16S ARNr pentru tulpina *megasphaera massiliensis* MRx0029)

TGGGAAGCTTGTCTTCTATCGATTCTAGTGGCAACCGGTGAGTAACCGCTAAGCAACCTGCGCTTCCAGTGGGAC
 AACAGCTGGGAACCGCTCTCTAATACCGAATGCTTTCTTCCCGCGCATGACGGGAAAGGGAAGGGAGCGCTTCTGGG
 CTTTCCGCTGGAGAGGGGCTTGGCTCTGATTAAGCTAGTGGAGGGGTAACGGGCCACACAGGGGACGATCAGTAGCC
 GGTCTGAGAGGATGAACCGGCACATGGGACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGATCTT
 CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAAGCAACCGCGCTGAAACGATGACGGGCTTCGGCTTGTAAAGTTCTGTATATG
 GGACGAACAGGACATCGCTTAATAACCGGTGTCTTTGACGGTACGGTAAGGAAAGCCACGGCTAACTACGTGECAG
 CAGCCCGCGTAAATACGTAGGTGCAACCGCTTGTCCGGATTAATTGGGCGTAAAGGGGCGGCAAGCGCATCGCAAGT
 CGGTCTTAAAGTTCGGGGGCTTAACCCCGTGAAGGGGACCGAAGCTGTGAAGCTCGAGTGTCCGAGAGGAAAGCGGAA
 TTCCCTAGCTGTAGCGGTGAAATCGCTAGTATTAGGAGCAACACAGTGGCGAAAGGGGCTTTCTGGACGACAACCTGA
 CGCTGAGGGCGCGAAAGCGCGGAGCAAAACGGGATTAGATAACCGGTAGTCTCTGCGGTAAAGCATGGATACTAGG
 TGTAGGAGGTATCGACCTCTCTGTGCGGAGTTAAACGCAATGAATATCCCGCTCGGGAGTACCGCCCGCAAGGCTG
 AACTCTCAAGGAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGTTTTATTCGACGCAACCGGAGAGGCTTAA
 CCAAGGCTTGAATATGATGTCTAGCGGAAGGATTTTCGGTCTCTCTCGGAAGGCAAGAAACAGGTTGGTGCACCG
 CTGTGCTCAGCTGGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAGGAGCGGCAACCGCTATCTCTGTTCGCGACCG
 TCGGGTGGGGCTCAGAGGAGACTGCTCCAGACAAATCGGAGGAAAGCGGGGATGAGCTCAAGTCACTCTGCCCCCTT
 ATGGCTTGGGCTACACAGTACTACAAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGGAGGAGCGGATCCGGAGCAAGCCCAAAA
 ACAGAGTCCCGCTTCGATTCGAGGCTGCAACTCGCTGCTGTAAGGAGGAAATCGCTAGTAAATCGCGGCTCAGCATTA
 CTGCGGTGAATACGTTCCCGGCGCTTGTACACACCGCGCGTACACCGGAGAGTCAATTCACACCGGAGGCGGCTGA
 GCAACCGCGAAG

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

Nume	Secvență directă	Secvență inversă
ACTB	GATCAAGATCATTTGCTCCTC (3)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAAC (4)
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (5)	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTC (6)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (7)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (8)
Ocludin	AAGAGGAATTTTGACACTGG (9)	GCCATGTACTCTTCACTTTC (10)
TJ1	AAGTCACACTGGTGAAATCC (11)	CTCTTGCTGCCAAACTATCT (12)
TJP2	CCCTCCCCCTGGATCAGGAT (13)	GCCATCAAACCTCGTCCATCA (14)
Vilin	CATTACCTGCTCTACGTTTG (15)	AGATGGACATAAGATGAGGTG (16)

SEQ ID NO:17 (consens secvență 16S ARNr pentru tulpina *parabacteroides distasonis* MRX0005)

AACCGGGTGGCGACCGGGCGACGGGTGAGTAACCGGTATGCAACTTGGCTATCAGAGGGGGATACCCGGCGAAAGT
 CGGACTAATGCCGATGAAGCAGGGATCCCGGCTGGGAATATTTGGTAAAGATTATCCCTGATAGATGGCATGGG
 TTCCATTGCGCATTTGGCGGGTAAAGGCCACCAACCGACGATGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCTCCACA
 TTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCTTAAGGGAGGCAAGCAGTGAAGGATATTGGTCAATGGGGTGAACCTGAAAC
 AGCCAGGTGCGGTGAAGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATGAAGTCCGGGACGTGTCC
 CGTTTGTATGTACCTTATGAATAGGATCGGCTAACTCCGTGACAGGCGCGGTAAATACGGAGGATCCGGGCGT
 TATCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGGTAAAGGGGCTTTTAAAGTCAGCGGTGAAGGCTCTGTGGCTCAACCTAG
 BATTCGGTTGAAGCTGGAGGCTTGAAGTATGTTGAGGCAAGCGGGAATGCGTGTGTAGCGGTGAATGCGATAGAT
 ATCAGCGCAGAACCCGATTCGGAAGGCAAGCTGCCAAGGCTTACTGACGCTGATGACAGAAAGCGTGGGATCRAA
 CAGGATTAGATACCTGGTATGTCAGGCAAGTAAAGATGATCACTAGGCTTTTGGGATACACTGTAAAGCGGCACAGC
 GAAAGGCTTAGGTGATCCACTGGGGAGTACGCGGCAACGCTGAAGTCAAAAGGAATTGACGCGGGCGCGCAAG
 CGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAAGCTTACCGCGTTTGAAGCGATTCGGAAGGAATGGGA
 BCACATTTTCTAGCAATAGCCATTTGCGAGGTGCTGCGTGTGTGCTGAGCTGCTGCGGTGAGGCTGTGCGCTTAAG
 TGCCATAACGGGCGCAACCTTTGCCACTGTTACTTACAGGTAAGGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGGTAAG
 CTGCAAGGAGGCGGGGATGACCTCAAAATCAGCAGGCGCTTACATCGGGGGGACACAGGTTTACATGCGGTG
 ACAAGGGAAGGCACTTGGCGACAGGAGCGAATCCCAAAACCAAGCTCTCAGTTTGGGATCGGAATCTGCAACCGGAC
 TCGGTGAAGCTGGGATTCCTAGTAATGCGCATCAGGCTGCGCGGTAAGGCTTCCCGGGCTTGTACACACCG
 CCGGTCAAGGCTAGGAGCGGGGATCGTGAAGTCCGTAACCGGAGGATCGGCTAGGTAAGGTAAGTGGTGAAGTGG

Inițiatori și sonde utilizate pentru qPCR *ex vivo* (cu SEQ ID NO în paranteze)

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

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

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

5 REFERIRI

- [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.
- [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
- [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
- [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.
- US2004/005304
- US2004/170617
- Padmanabhan și colab. (2013) Standards in Genomic Sciences 8:525-538
- Masco și colab. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
- Srůtková și colab. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
- Kadi și colab (2006) J Neuroimunol 174: 133-46
- Pal R și colab (2016) Neurol Res. 38(12):1111-1122
- Daniele și colab (2015) Sci Semnal 8(376):ra45
- Ahmed și colab, manuscris în preparare
- Baraczka și colab. (1983) J Neural Transm. 58(3-4):299-304.
- Eldrup și colab. (1995) Acta Neurol Scand. 92(2):116-21.
- Wang și colab. (2016) J Neurogastroenterol Motil 22: 589-605.
- Zadori și colab (2012) Journal of Neural Transmission, 119, 2, 275-283
- Lee și colab (2008) European J. Cell Biology 87:389-397
- Pirooznia și Elefant (2013) Front Cell Neurosci. 7: 30.

- Tang, și colab. (2017) *J Am Heart Assoc*, 6(10).
Wang și colab. (2015) *PNAS*, 112(9):2583-2858
Psaty și colab. (2003) *JAMA*, 289(19):2534-44
Lancet. (1995) 346(8991-8992):1647-53
- 5 Miyamoto-Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
Kailasapathy și colab. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- 10 Handbook of Pharmaceutical Excipients, ediția a 2-a, (1994), editat de A Wade și PJ Weller
Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
US 2016/0067188
Handbook of Microbiological Media, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- 15 Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția 20, ISBN: 0683306472.
Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 20 Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
Sambrook și colab. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- 25 Ausubel și colab. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel și colab., eds., 1987) Supliment 30
Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
Pakkenberg și colab. (1991) *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54(1):30-3.
- 30 Przedborski și colab. (2000). *Restor Neurol Neurosci.* 16(2):135-142.
Kehr J. (1999) Monitoring chemistry of brain microenvironment: biosensors, microdialysis and related techniques. Chapter 41. In: Modern techniques in neuroscience research. (Eds. U. Windhorst and H. Johansson) Springer-Verlag GmbH., Heidelberg, Germany. 1149-1198.
Kehr J., și Yoshitake T. (2006) Monitoring brain chemical signals by microdialysis. In: Encyclopedia of
- 35 Sensors, Vol. 6. (Eds. C.A. Grimes, E.C. Dickey and M.V. Pishko) American Scientific Publishers, USA. 287-312.
Abel și Zukin (2008) *Curr Opin Pharmacol*, 2008. 8(1): 57-64
Johnsen și colab (2017) *Journal of Chromatography A*. 1503: 57-64
West și Johnstone (2014) *J Clin Invest.* 124, 30-39
- 40 Glauben și colab. (2006) *J Immunol*, 176: 5015-5022
Angiolilli și colab. (2017) *Ann Rheum Dis*, 76: 277-285
Gonneaud și colab. (2014) *J Inflamm*, 11: 43
Alenghat și colab. (2013) *Nature*, 504: 153-157
Felice și colab. (2015) *Ailment Pharmacol Ther*, 41: 26-38
- 45 Smart și colab (2010) *Nature Protocols*. 10:1709-29
Weon și colab. (2016)
Huot și colab., (2015) *Parkinson's Disease*
Scatton și colab. (1983) *Brain Res*, 275(2): 321-8
Hely și colab. (2005) *Mov Disord*. 20(2): 190-9
- 50 Budd și Nicholls (1998) *Essays Biochem*. 33:43-52
Ebadi și colab (2001) *Biol Signals Recept.* 10(3-4):224-253
Ferro și colab (2017) *PLoS One* 2017, 12(12):e0188425
Michel și Prat (2016) *Ann Transl Med*. 4(1): 15.
Gagnon și colab (2013) *J Microbiological Methods*. 94: 274-279

LISTĂ DE SECVENȚE

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120> COMPOZIȚII CUPRINZÂND TULPINI BACTERIENE

<130> P078132EP

<150> 1709468,1

<151> 14-06-2017

<150> 1709534,0

<151> 15-06-2017

<150> 1712851,3

<151> 10-08-2017

<150> 1803826,5

<151> 09-03-2018

<150> 1805989,9

<151> 11-04-2018

<150> 1805991,5

<151> 11-04-2018

<150> 1805990,7

<151> 11-04-2018

<150> 1806780,1

<151> 25-04-2018

<150> 1806779,3

<151> 25-04-2018

<160> 37

<170> SeqWin2010, versiune 1.0

<210> 1

<211> 1519

<212> ADN

<213> Tulpină de *Megasphaera massiliensis* NP3

<400> 1

agagtttgat	cctggctcag	gacgaacgct	ggcggcgtgc	ttacacatg	caagtcgaac	60
gagaagagat	gagaagcttg	cttcttatca	attcgagtg	caaacgggtg	agtaacgcgt	120
aagcaacctg	cccttcagat	ggggacaaca	gctggaaacg	gctgctaata	ccgaatacgt	180
tctttccgcc	gcatgacggg	aagaagaaa	ggaggccttc	gggctttcgc	tggaggagg	240
gcttgcgctc	gattagctag	ttggaggggt	aacggcccac	caaggcgacg	atcagtagcc	300
ggtctgagag	gatgaacggc	cacattggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	360
cagcagtg	gaatcttc	caatggacga	aagtctgacg	gagcaacgcc	gcgtgaacga	420
tgacggcctt	cgggttgtaa	agttctgtta	tatgggacga	acagggcatc	ggttaatacc	480
cgggtgtctt	gacggtaccg	taagagaaa	ccacggctaa	ctacgtgcca	gcagccgcg	540
taatacgtag	gtggcaagcg	ttgtccggaa	ttattggg	taaagggcgc	gcagggcgca	600
tcgcaagtcg	gtcttaaaa	tgccgggctt	aaccccgta	ggggaccgaa	actgtgaagc	660
tcgagtgctg	gagaggaaa	cgggaattcct	agtgtagcgg	tgaatg	agatattagg	720
aggaacacca	gtggcgaaa	cggctttctg	gacgacaact	gacgctgagg	cgcgaaagcc	780
aggggagcaa	acgggattag	ataccccggt	agtcctggcc	gtaaacgatg	gatactaggt	840
gtaggaggta	tcgactcctt	ctgtgccgga	gttaacgcaa	taagtatccc	gcctggggag	900
tacggccgca	aggctgaaac	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggtggagtat	960
gtggtttaat	tcgacgcaac	gcgaagaacc	ttaccaagcc	ttgacattga	ttgctacgga	1020
aagagatttc	cggttcttct	tcggaagaca	agaaaacagg	tggtgcacgg	ctgtcgtcag	1080

ctcgtgtcgt	gagatgttgg	gttaagtccc	gcaacgagcg	caaccctat	cttctgttgc	1140
cagcacctcg	ggtggggact	cagaagagac	tgccgcagac	aatgcggagg	aaggcgggga	1200
tgacgtcaag	tcatcatgcc	ccttatggct	tggtctacac	acgtactaca	atggctctta	1260
atagaggggac	gcgaaggagc	gatccggagc	aaaccccaaa	aacagagtcc	cagttcggat	1320
tgcaggctgc	aactcgccctg	catgaagcag	gaatcgctag	taatcgcagg	tcagcatact	1380
gcggtgaata	cgttcccggg	ccttgtagac	accgccgctc	acaccacgaa	agtcattcac	1440
acccgaagcc	ggtgaggcaa	ccgcaaggaa	ccagccgctc	aaggtggggg	cgatgattgg	1500
ggtgaagtgc	taacaagggt					1519

<210> 2

<211> 1398

<212> ADN

<213> Tulpină de Megasphaera massiliensis MRX0029

<400> 2

tgagaagctt	gcttcttatac	gattctagt	gcaaacgggt	gagtaacgcg	taagcaacct	60
gcccttcaga	tggggacaac	agctggaaac	ggctgcta	accgaatacg	ttctttccgc	120
cgcatgacgg	gaagaagaaa	gggaggcctt	cgggctttcg	ctggaggagg	ggcttgcgtc	180
tgattagcta	ggttgagggg	taacggccca	ccaaggcgac	gatcagtagc	cggtctgaga	240
ggatgaacgg	ccacattggg	actgagacac	ggcccagact	cctacgggag	gcagcagtg	300
ggaatcttcc	gcaatgggac	aaagtctgac	ggagcaacgc	cgctgaaacg	atgacggcct	360
tcgggttgta	aagttctgtt	atatgggacg	aacaggacat	cggttaatac	ccggtgtctt	420
tgacggtagc	gtaagagaaa	gccacggcta	actacgtgcc	agcagccgcg	gtaatacgt	480
ggtggcaagc	ggtgtccgga	attattgggc	gtaaaaggcg	cgcaggcggc	atcgcaagtc	540
ggtcttaaaa	gtgcggggct	taaccccgctg	aggggaccga	aactgtgaag	ctcgagtgtc	600
ggagaggaaa	gcggaattcc	tagtgtagcg	gtgaaatgcg	tagatattag	gaggaacacc	660
agtggcgaaa	gcggctttct	ggacgacaac	tgacgctgag	gcgcgaaagc	caggggagca	720
aacgggatta	gataccccgg	tagtcctggc	cgtaaacgat	ggatactagg	tgtaggaggt	780
atcgactcct	tctgtgccgg	agttaacgca	ataagtatcc	cgctgggga	gtacggccgc	840
aaggctgaaa	ctcaaaggaa	ttgacggggg	cccgcacaa	cggtggagta	tgtggtttaa	900
ttcgacgcaa	cggaagaagc	cttaccgaag	cttgacattg	attgctacgg	aaagagattt	960
ccggttcttc	ttcggaagac	aagaaaacag	gtggtgcacg	gctgtcgtca	gctcgtgtcg	1020
tgagatgttg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	gcaaccctta	tcttctgttg	ccagcacctc	1080
gggtggggac	tcagaagaga	ctgccgcaga	caatgcggag	gaaggcgggg	atgacgtcaa	1140
gtcatcatgc	cccttatggc	ttgggctaca	cacgtactac	aatggctctt	aatagaggga	1200
agcgaaggag	cgatccggag	caaaccocaa	aaacagagtc	ccagttcgga	ttgcaggctg	1260
caactcgctt	gcatgaagca	ggaatcgcta	gtaatcgtag	gtcagcatac	tgcggtgaat	1320
acgttcccg	gccttgtaga	caccgcccgt	cacaccacga	aagtcattca	caccgaagc	1380
cggtgaggca	accgcaag					1398

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 3

gatcaagatc attgtcctc 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 4

ttgtcaagaa aggggtgaac 20

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 5

ggtatcgtgg aaggactcat g 21

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 6

atgccagtga gcttcccgtt c 21

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 7

ctcagcaccg ctaacagagg 20

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 8

cattggcgct tctctctc 19

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 9

aagaggaatt ttgacactgg 20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>
<223>
<400> 10
gccatgtact cttcactttc 20
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223>
<400> 11
aagtcacact ggtgaaatcc 20
<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223>
<400> 12
ctcttgctgc caaactatct 20
<210> 13
<211> 19
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223>
<400> 13
ccctcccctg gatcaggat 19
<210> **14**
<211> 20
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223>
<400> **14**
gccatcaaac tcgtccatca 20
<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secvență artificială
<220>
<223>
<400> 15

cattacctgc tctacgtttg 20

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 16

agatggacat aagatgaggt g 21

<210> 17

<211> 1403

<212> ADN

<213> Tulpină de Parabacteroides distasonis MRX0005

<400> 17

amccgggtgg	cgaccggcgc	acgggtgagt	aacgcgtatg	caacttgcct	atcagagggg	60
gataaccccg	cgaaaagtcg	actaataccg	catgaagcag	ggatcccga	tgggaatatt	120
tgctaaagat	tcatcgctga	tagataggca	tgcgttccat	taggcagttg	gccccgtaac	180
ggcccaccaa	accgacgatg	gataggggtt	ctgagaggaa	ggccccccac	attggtactg	240
agacacggac	caaactccta	cgggaggcag	cagtgaggaa	tattgggtcaa	tgggcgtgag	300
cctgaaccag	ccaagtcgcg	tgagggatga	aggttctatg	gatcgtaaac	ctcttttata	360
aggggaataaa	gtgcgggacg	tgtcccgttt	tgtatgtacc	ttatgaataa	ggatcggcta	420
actccgtgcc	agcagccgcg	gtaatacggg	ggatccgagc	gttatccgga	tttattgggt	480
ttaaagggtg	cgtagcgggc	cttttaagtc	agcggtgaaa	gtctgtggct	caaccataga	540
attgccgttg	aaactgggag	gcttgagtat	gtttgaggca	ggcgggaatgc	gtggtgtagc	600
ggtgaaatgc	atagatatca	cgcagaaccc	cgattgcgaa	ggcagcctgc	caagccatta	660
ctgacgctga	tgacgaaaag	cgtggggatc	aaacaggatt	agataccctg	gtagtccacg	720
cagtaaacga	tgatcactag	ctgtttgcga	tacactgtaa	gcggcacagc	gaaagcgtaa	780
agtgatccac	ctggggagta	cgcgggcaac	ggtgaaactc	aaaggaattg	acggggggccc	840
gcacaagcgg	aggaacatgt	ggtttaattc	gatgatacgc	gaggaacctt	acccgggttt	900
gaacgcattc	ggacmgakgt	ggaaacacat	tttctagcaa	tagccatttg	cgaggtgctg	960
catggttgtc	gtcagctcgt	gccgtgaggt	gtcggcttaa	gtgccataac	gagcgcaacc	1020
cttgccacta	gttactaaca	ggtaaagctg	aggactctgg	tgggactgcc	agcgtaaagct	1080
gcgaggaagg	cggggatgac	gtcaaatacag	cacggccctt	acatccgggg	cgacacacgt	1140
gttacaatgg	cgtggacaaa	gggaagccac	ctggcgacag	ggagcgaatc	cccaaaccac	1200
gtctcagttc	ggatcggagt	ctgcaacccg	actccgtgaa	gctggattcg	ctagtaatcg	1260
cgcatacagc	atggcgcggt	gaatacgttc	ccgggccttg	tacacaccgc	ccgtcaagcc	1320
atgggagccg	ggggtacctg	aagtcctgaa	ccgcgaggat	cggcctaggg	taaaactggt	1380
gactggggct	aagtcgtacg	ggg				1403

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 18

gattactgct ctggctocta g 21

<210> 19

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 19

gactcatcgt actcctgctt g 21

<210> 20

<211> 22

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 20

ctggcctcac tgtccacctt cc 22

<210> 21

<211> 19

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 21

aatggtgaag gtcggtgtg 19

<210> 22

<211> 24

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 22

gtggagtcac actggaacac gtag 24

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 23

tgcaaatggc agccctggtg 20

<210> 24

<211> 23

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 24

gctgccttga tgtttacttt gac 23

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 25

gcaaccgaag tatgaaataa cca 23

<210> 26

<211> 27

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 26

accaggtgag aagagtgatg accatcc 27

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 27

agccagagtc cttcagaga 19

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 28

tccttagcca ctccttctgt 20

<210> 29

<211> 26

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 29

cctaccccaa ttccaatgc tctcct 26

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 30

ccctgtatcg taagaacggt 20

<210> 31

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 31

gccaccattg atcacgttga 20

<210> 32

<211> 19

<212> ADN

<213>

<400> 32

cccaagcaac tagcccctc 19

<210> 33

<211> 20

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 33

ggcagcacat cagggtagtc 20

<210> 34

<211> 21

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 34

gtagccgtga tgtggtcatt t 21

<210> 35

<211> 19

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223>

<400> 35
 ctgtgcgccc agattacct 19
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223>
 <400> 36
 ctcggctttg tgaaggtgct 20
 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secvență artificială
 <220>
 <223>
 <400> 37
 ggcttcattg catcaacttc a 21

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- ROSHAN PADMANABHAN ET AL: "Non-contiguous finished genome sequence and description of *Megasphaera massiliensis* sp. nov.", STANDARDS IN GENOMIC SCIENCES, vol. 8, no. 3, 7 August 2013 (2013-08-07), pages 525-538, XP055504182, DOI: 10.4056/sigs.4077819 & DATABASE EMBL [Online] 2 October 2012 (2012-10-02), "Megasphaera massiliensis strain NP3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.", retrieved from EBI accession no. EM_STD:JX424772 Database accession no. JX424772
- US-A1- 2004 005 304
- NAYUDU NALLABELLI ET AL: "Biochemical and genome sequence analyses of *Megasphaera* sp. strain DISK18 from dental plaque of a healthy individual reveals commensal lifestyle", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 6, no. 1, 21 September 2016 (2016-09-21), XP055504215, DOI: 10.1038/srep33665 & DATABASE EMBL [Online] 7 January 2016 (2016-01-07), "Megasphaera sp. MTCC 12521 partial 16S rRNA gene, strain MTCC 12521, isolate DISK 18", retrieved from EBI accession no. EM_STD:LN998020 Database accession no. LN998020
- US-A1- 2004 120 963
- US-A1- 2004 170 617
- US-A1- 2016 271 188

(57) Revendicări:

1. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană de *Megasphaera massiliensis*, pentru utilizare în terapie.
2. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli neurodegenerative.
3. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1 sau 2, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau afecțiuni selectate din grupul constând din boala Parkinson, incluzând paralizia supranucleară progresivă, sindromul Steele-

Richardson-Olszewski, hidrocefalea cu presiune normală, parkinsonismul vascular sau arteriosclerotic și parkinsonismul indus de medicamente; boala Alzheimer, incluzând sindromul Benson; scleroza multiplă; boala Huntington; scleroza laterală amiotrofică; boala Lou Gehrig; boala neuronului motor; boala prion; ataxia spinocerebelară; atrofia musculară spinală; demența, incluzând cu corpi Lewy, demența vasculară și frontotemporală; afazia progresivă primară; deficit cognitiv minor; deficit cognitiv asociat cu HTV și degenerarea corticobasală.

4. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 3, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a bolii Parkinson.

5. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare dintre revendicările 1-4, în care compoziția este pentru utilizare în:

- (a) o metodă de tratare sau prevenire a unei boli neurodegenerative cu debut timpuriu,
- (b) reducerea morții neuronilor sau protejarea neuronilor,
- (c) o metodă de prevenire sau întârziere a debutului sau progresiei unei boli neurodegenerative,
- (d) o metodă de reducere a nivelului IL-6 și/sau a nivelului NFκB în tratamentul sau prevenirea unei boli neurodegenerative, și/sau
- (e) o metodă de creștere a dopaminei și/sau a nivelului DOPAC în tratamentul sau prevenirea unei tulburări neurodegenerative.

6. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare a leziunii creierului.

7. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 6, în care leziunea creierului este accidentul vascular cerebral, cum ar fi ischemia cerebrală, ischemia cerebrală focală, accidentul vascular cerebral ischemic sau accidentul vascular cerebral hemoragic.

8. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările 1-7, în care tulpina bacteriană are o secvență 16s ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1 sau 2, în care opțional, tulpina bacteriană are o secvență 16s ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 2, sau în care tulpina bacteriană are secvența 16s ARNr reprezentată prin SEQ ID NO: 2.

9. 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 sau purtători acceptabili farmaceutici.

10. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este liofilizată.

11. Compoziția pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este tulpina bacteriană *Megasphaera massiliensis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42787.

12. Un produs alimentar sau compoziție pentru vaccin cuprinzând compoziția în conformitate cu oricare din revendicările precedente, pentru utilizare în conformitate cu oricare din revendicările precedente.

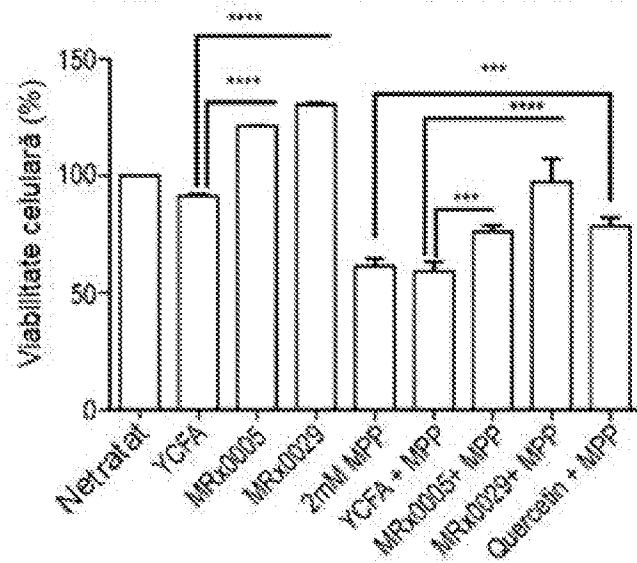
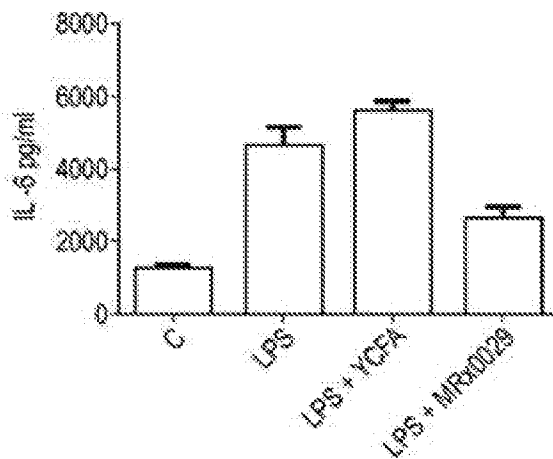
Fig 1. Protecție împotriva neurotoxicității**Fig 2.** Inhibarea secreției de IL-6 indusă de LPS în celulele U373

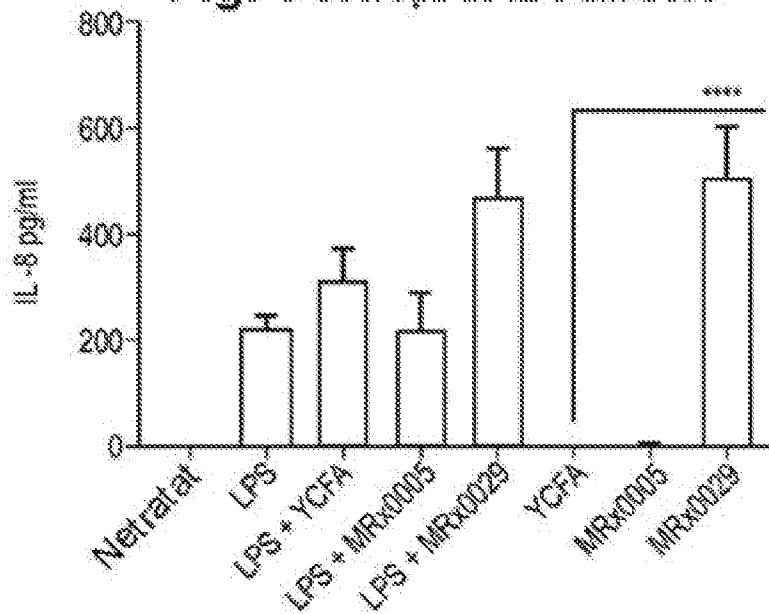
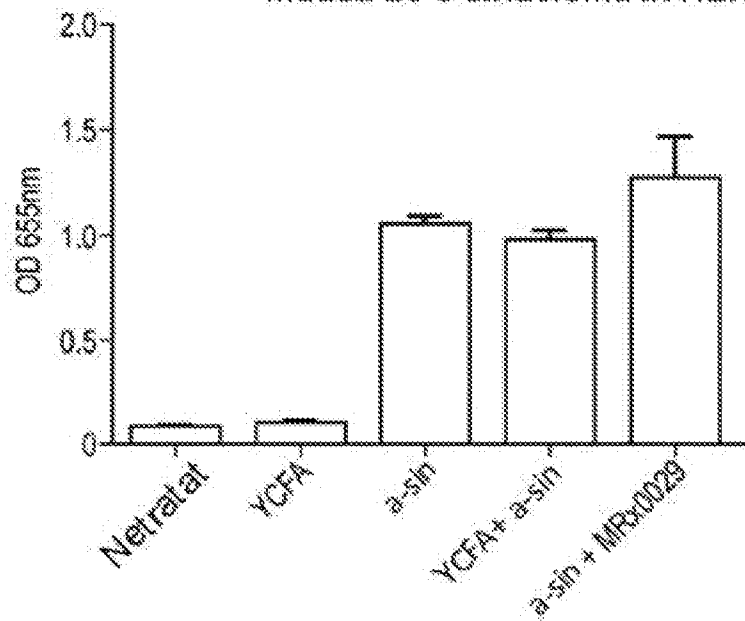
Fig. 3 secreția de IL-8 din U373**FIG. 5** Inhibarea activării de NFkB-AP1
indusă de o sinucleină în HEK-TLR4

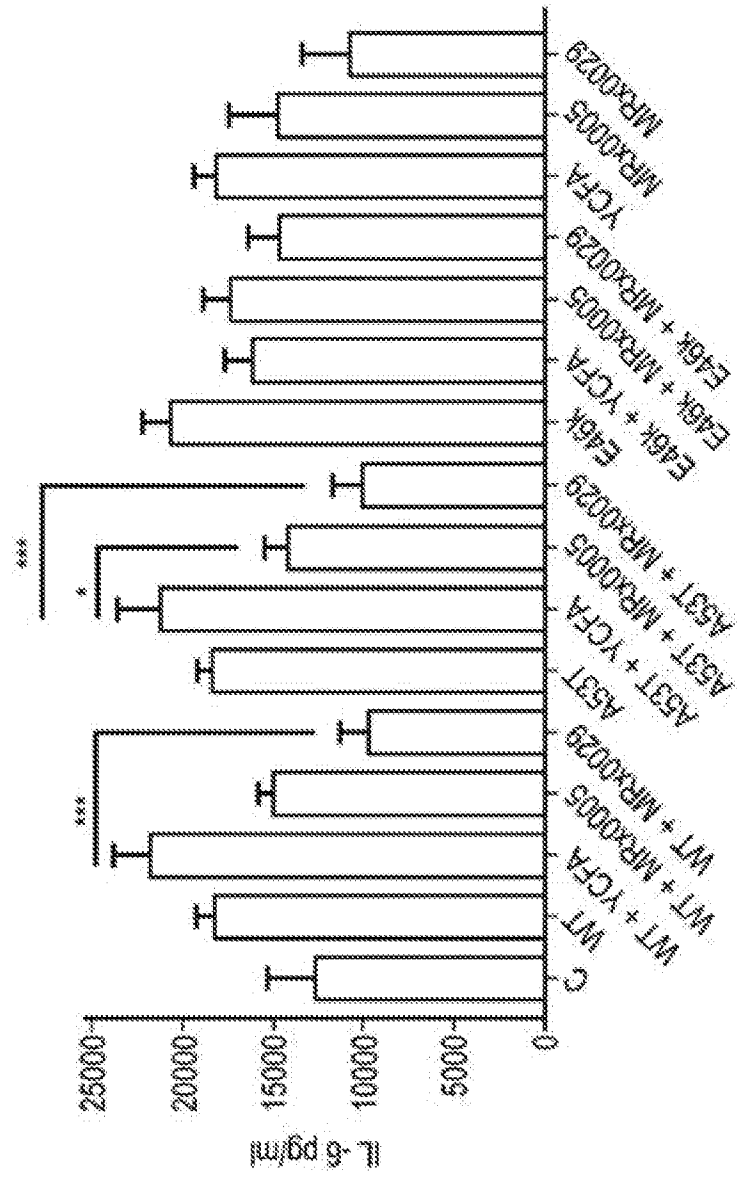
Fig. 4A Secreția de IL-6 din U373

FIG. 4B Secreția de IL-8 din U373

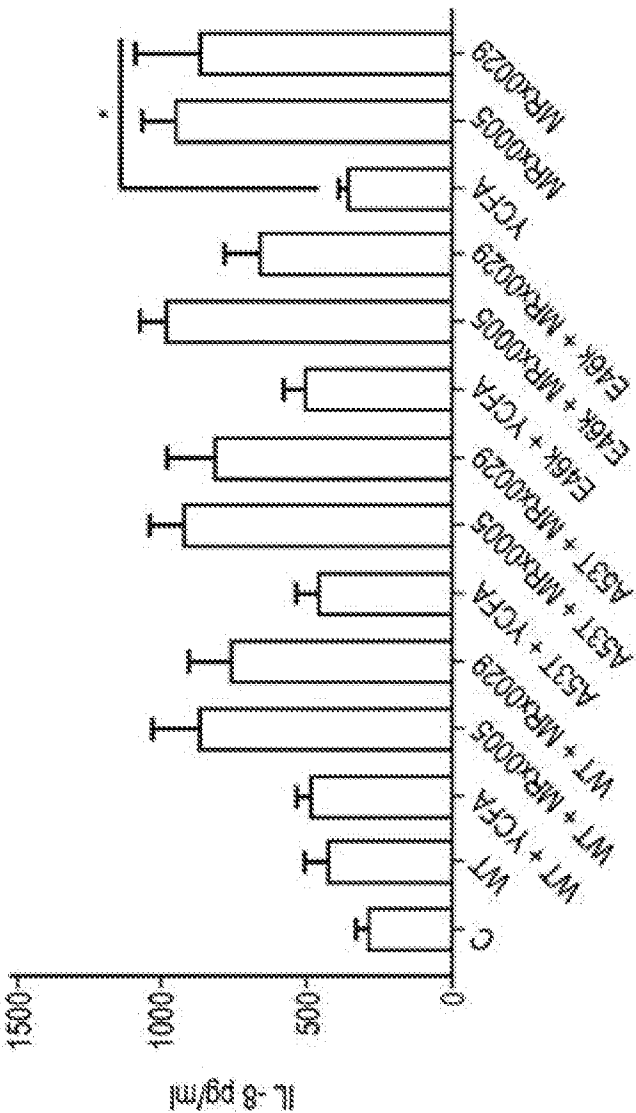


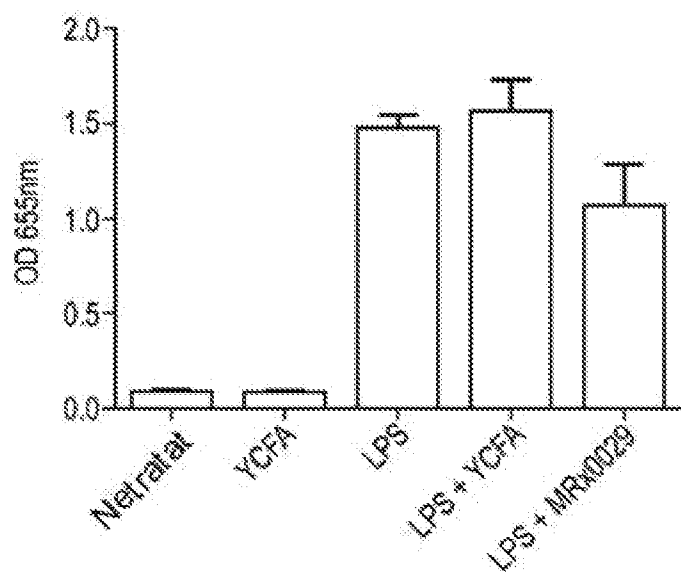
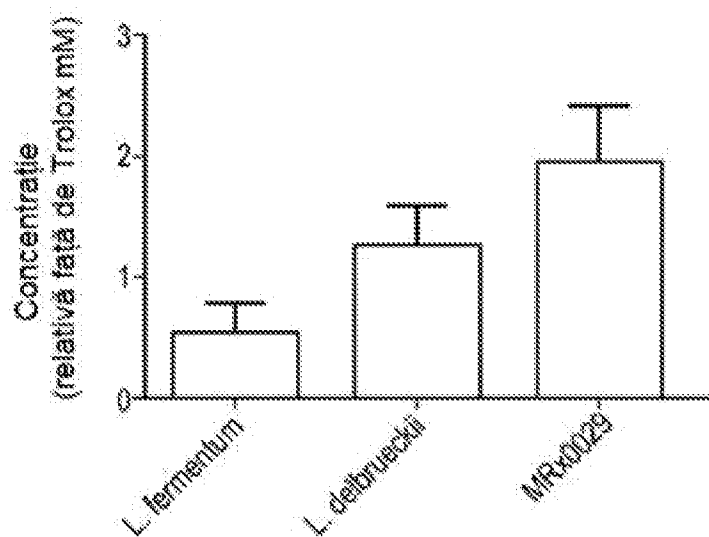
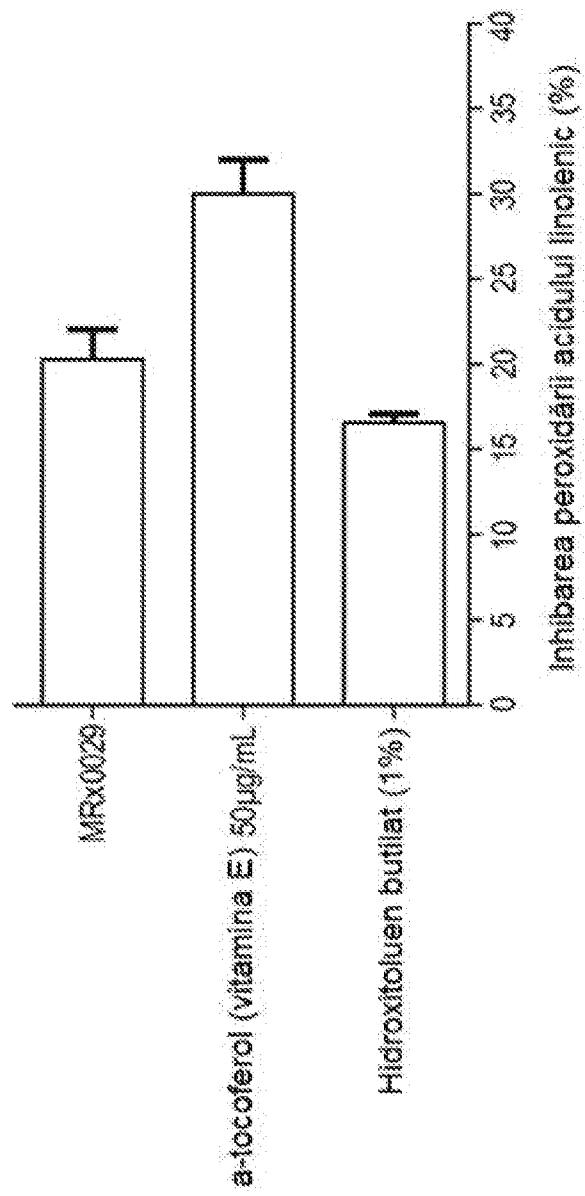
FIG. 6 Inhibirea activării NFkB-AP1 indusă de LPS în HEK-TLR4**FIG. 7** Test de capacitate antioxidantă

FIG. 8 Capacitatea antioxidantă totală

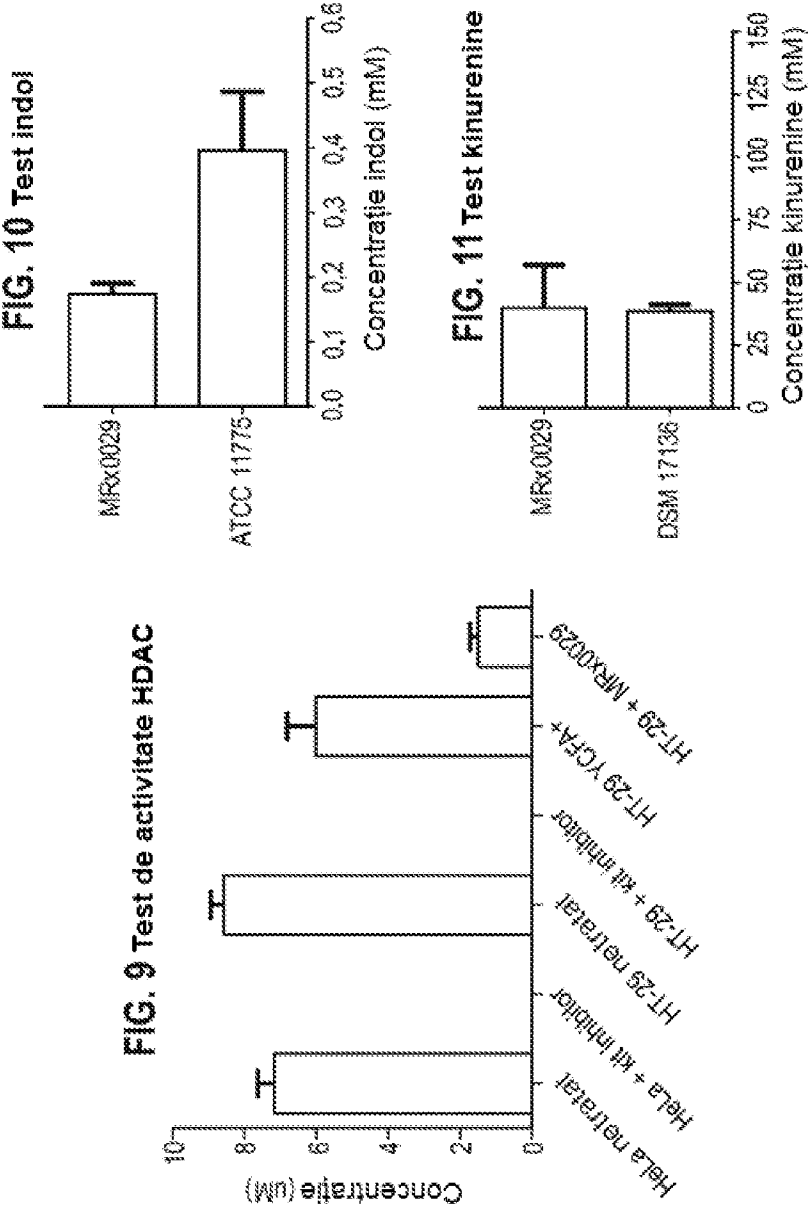


FIG. 12A DA

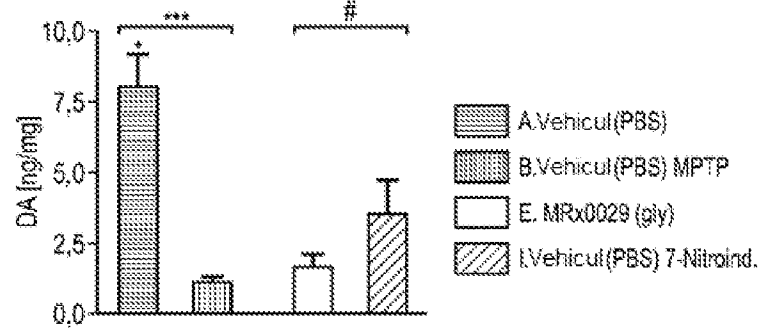


FIG. 12B DOPAC

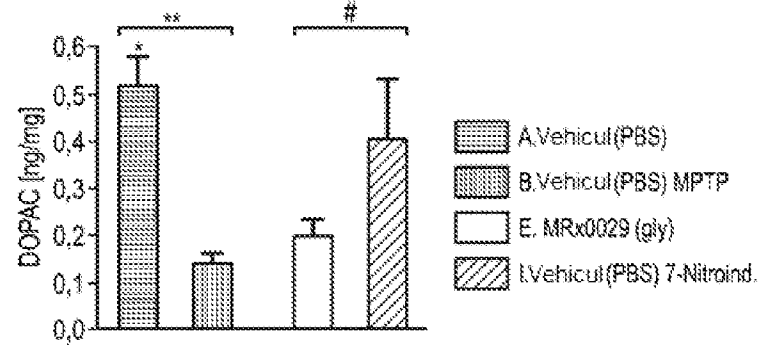
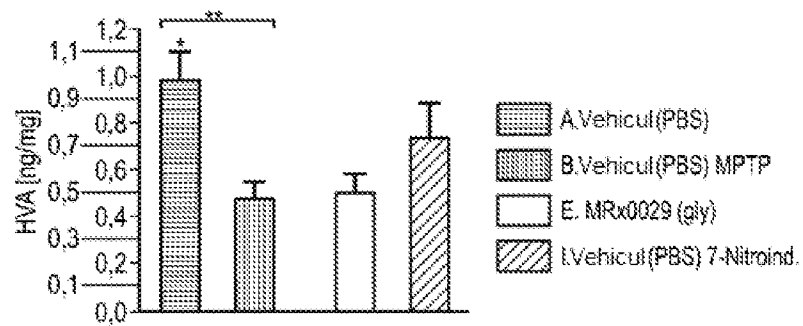


FIG. 12C HVA



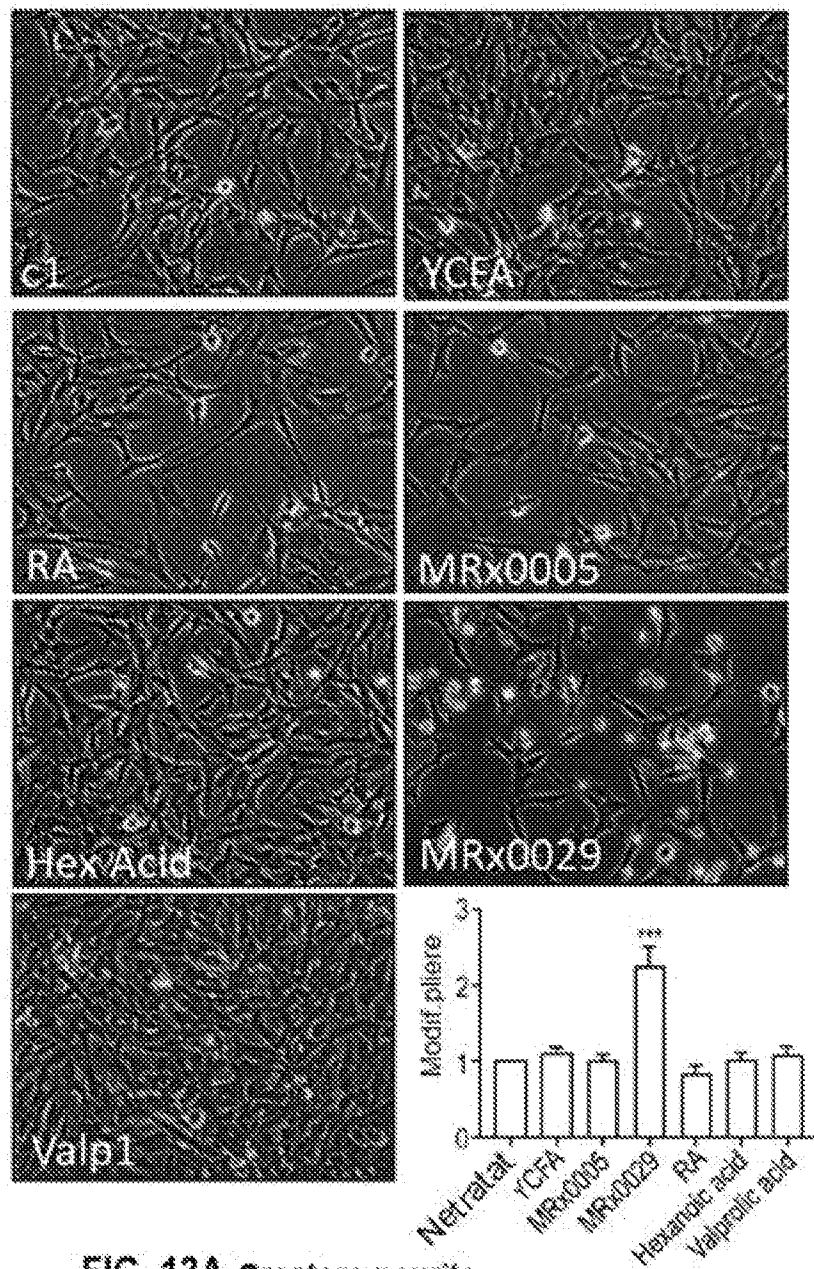


FIG. 13A Creștere neurite

FIG. 13B

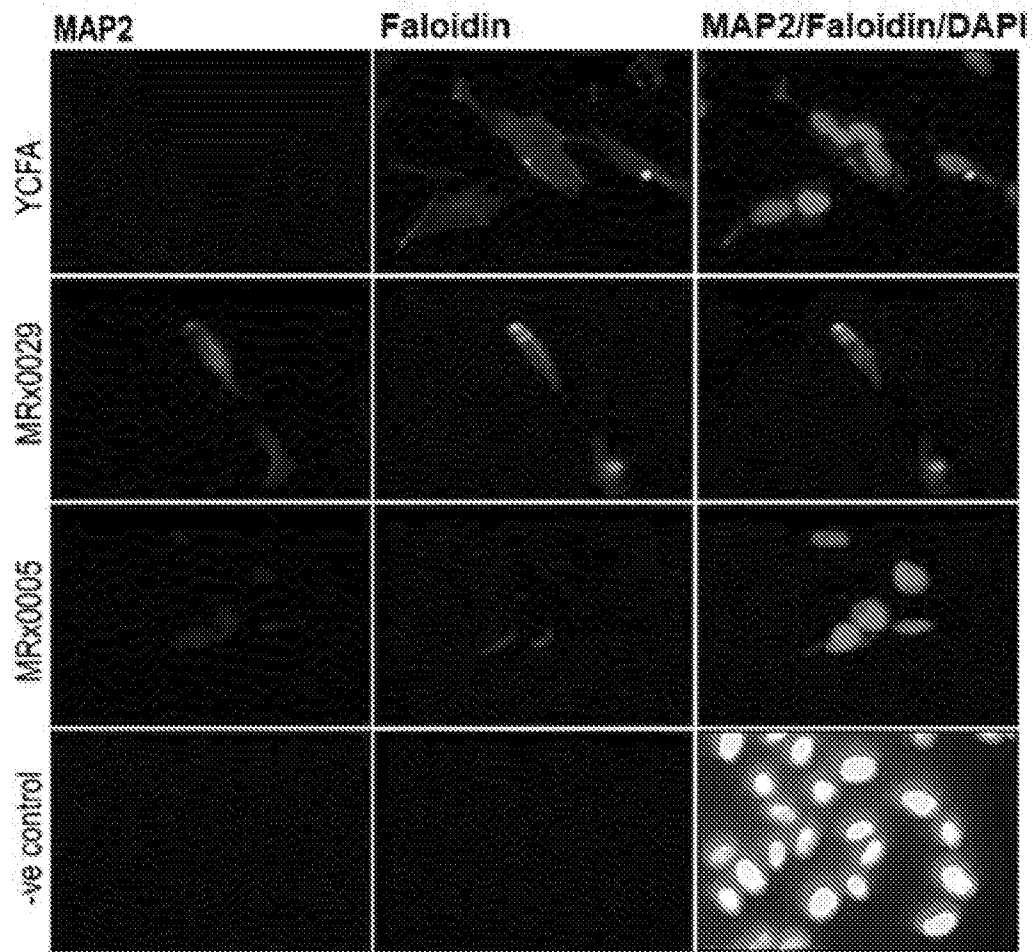


FIG. 13B (cont.)

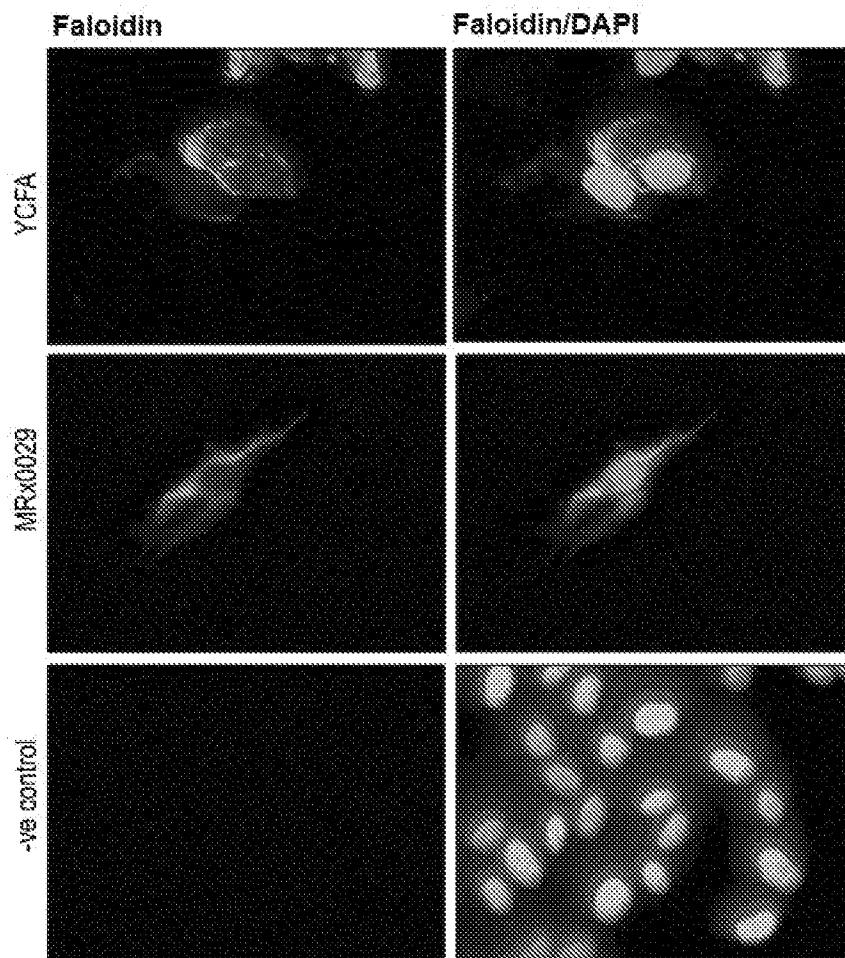


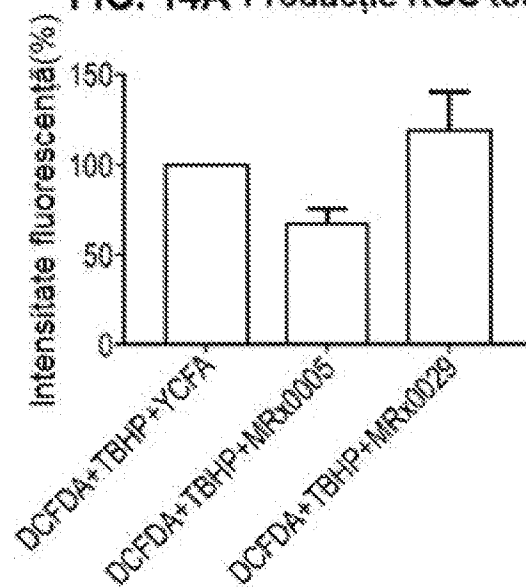
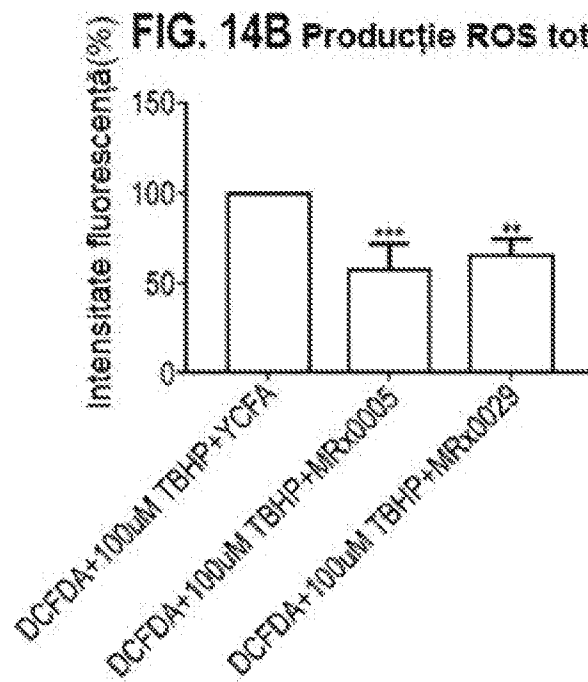
FIG. 14A Producție ROS totală**FIG. 14B** Producție ROS totală

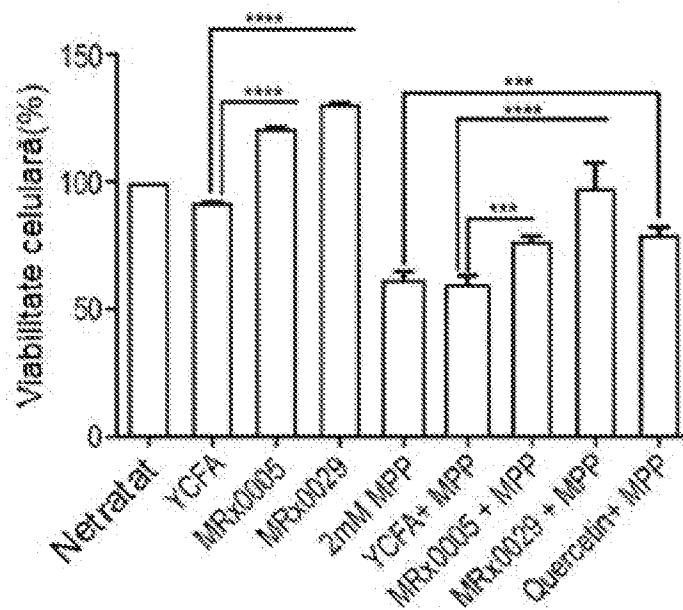
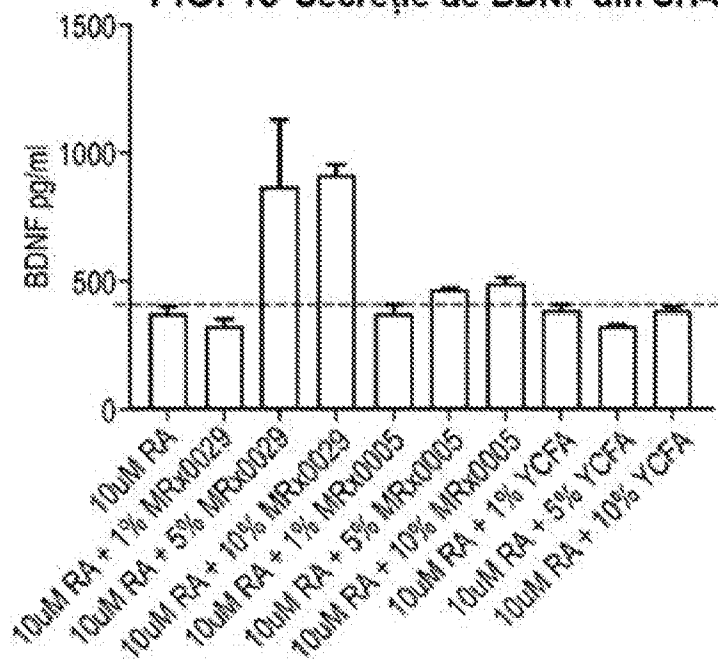
FIG. 15 Neuroprotecție-viabilitate celulară**FIG. 19** Secreție de BDNF din SH-SY-5Y

FIG. 16A

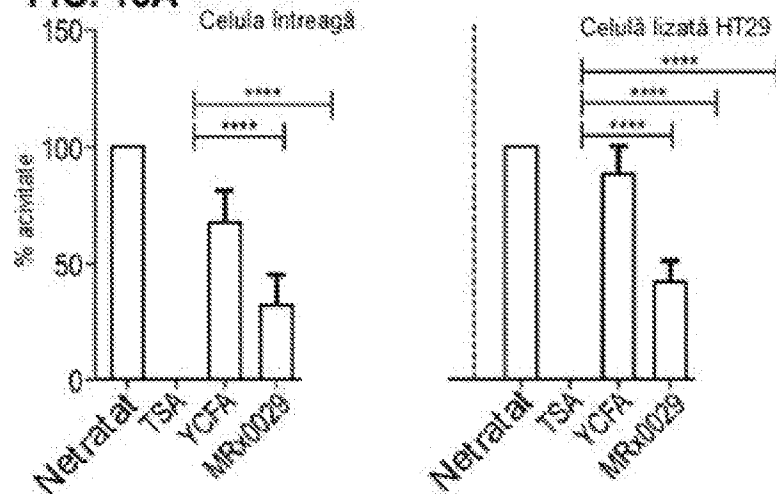


FIG. 16B

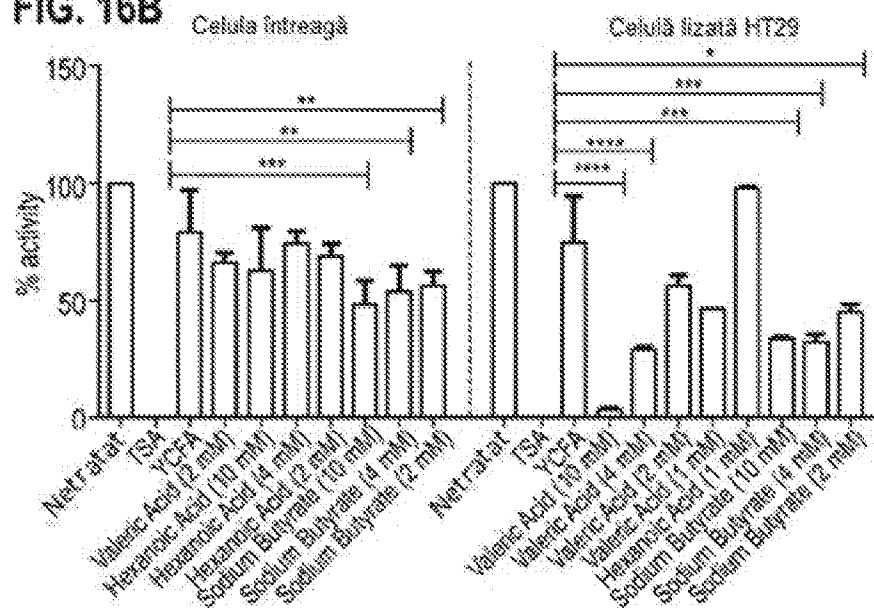
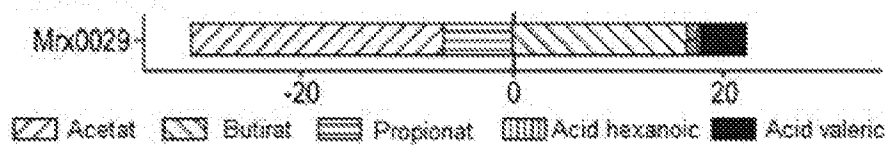


FIG. 16C



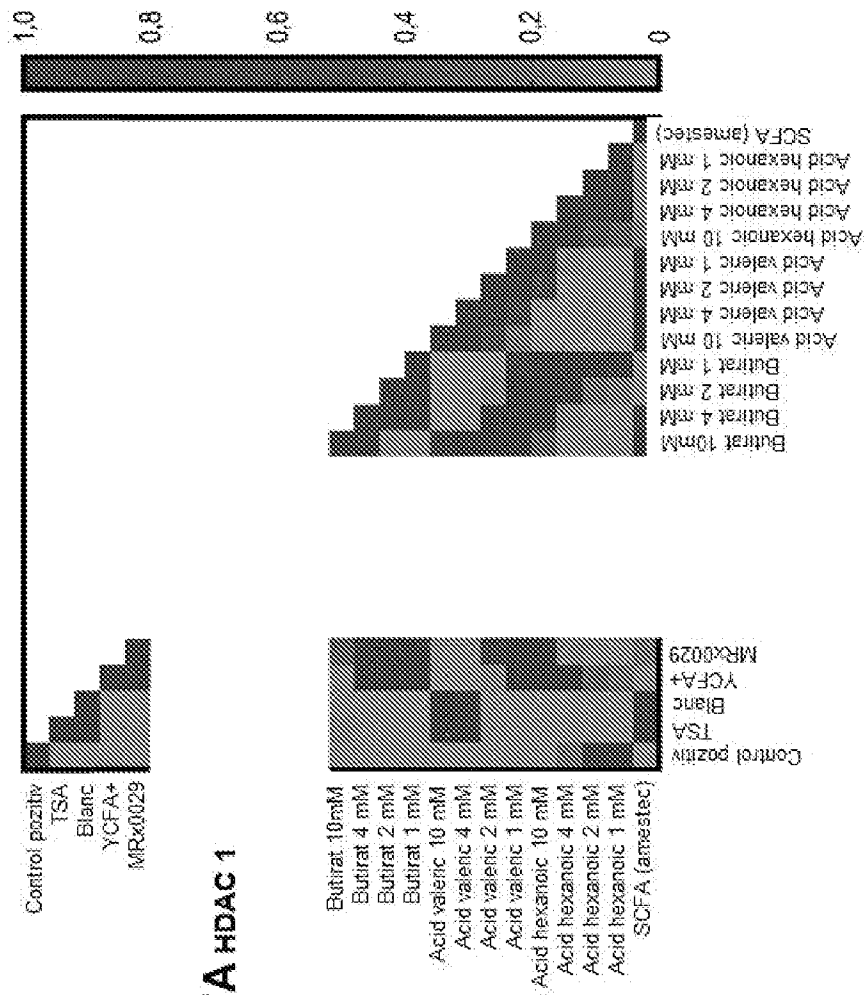


Fig. 17A HDAC 1

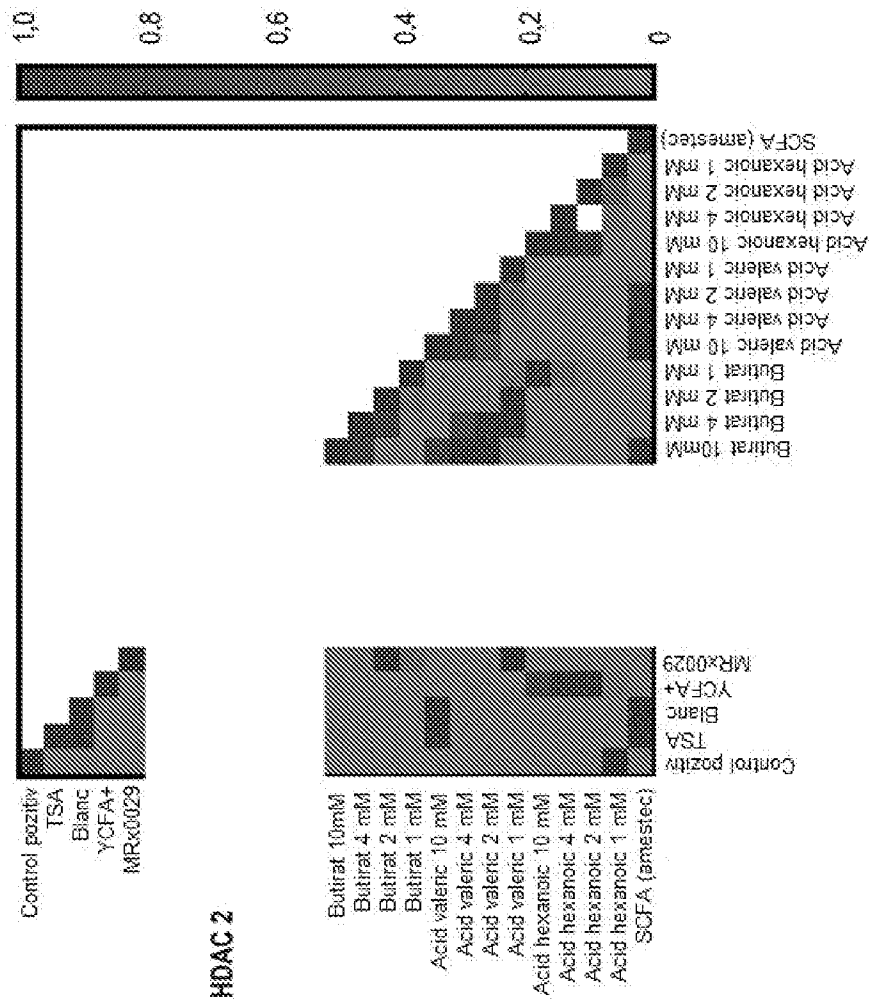


FIG. 17B HDAC 2

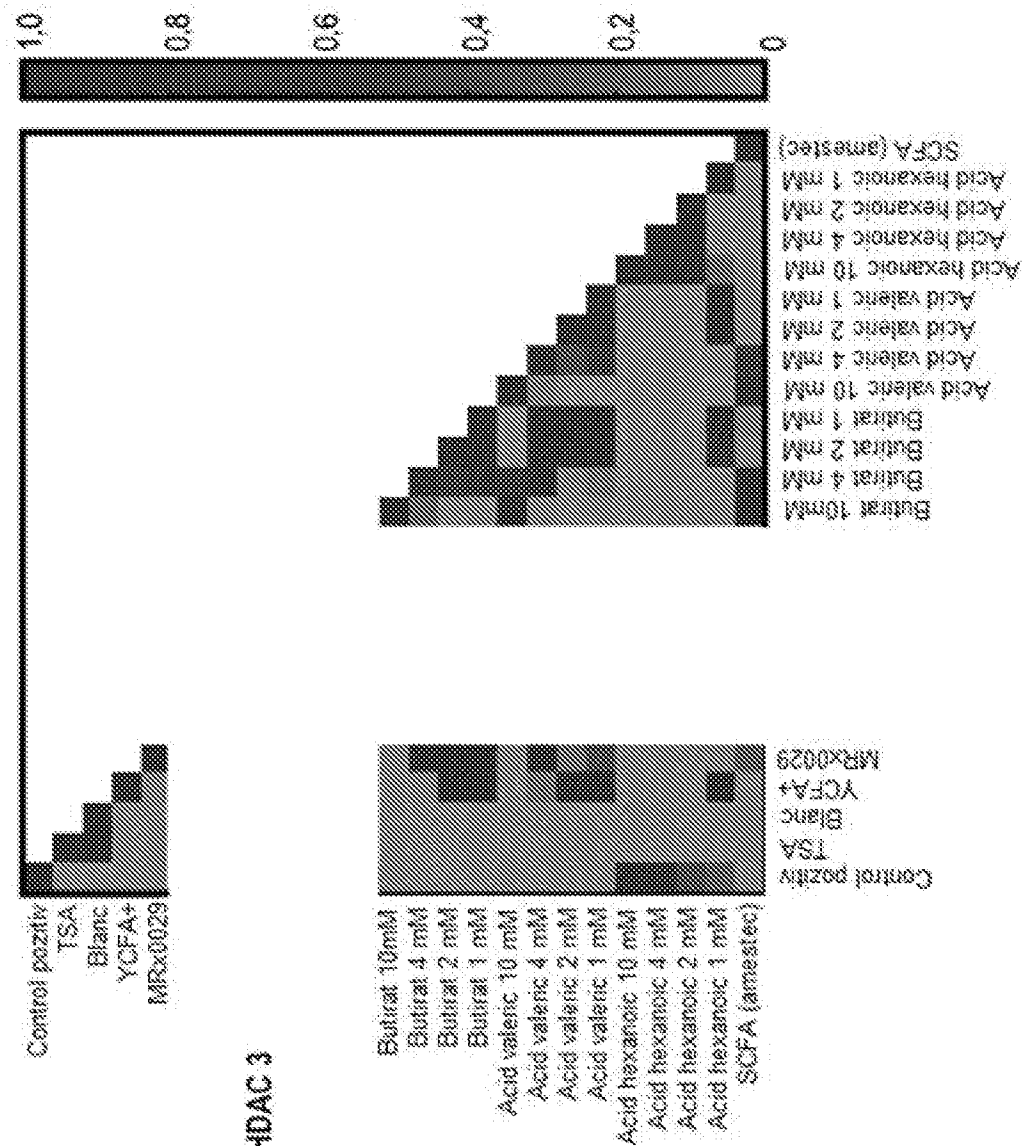


FIG. 17C HDAC 3

FIG. 18A

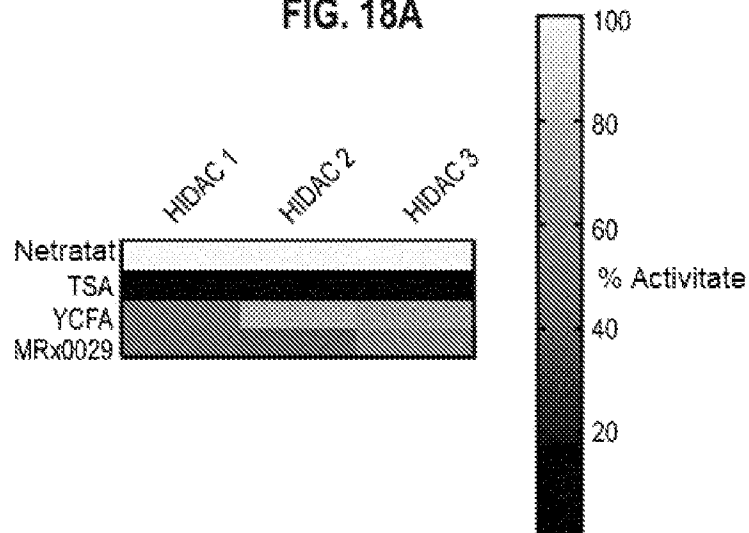


FIG. 18B

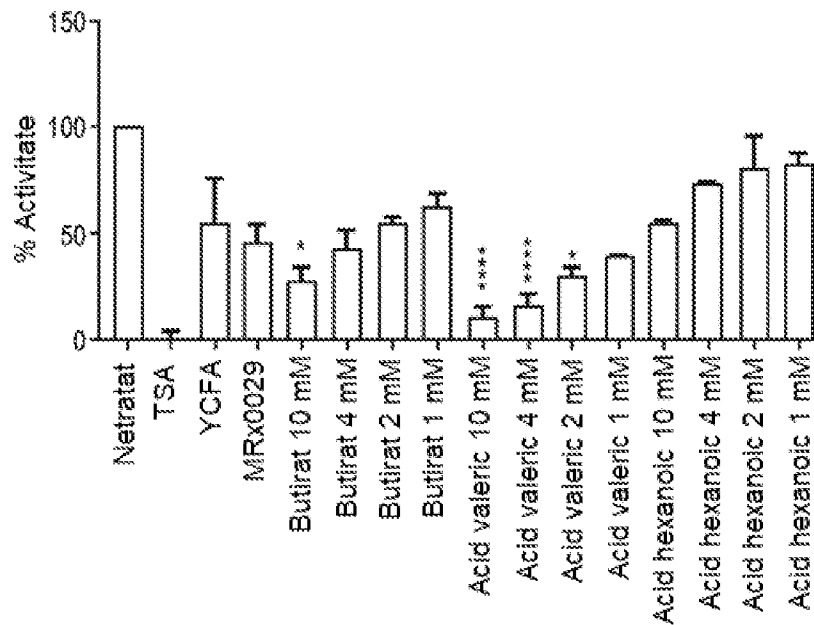


FIG. 18C

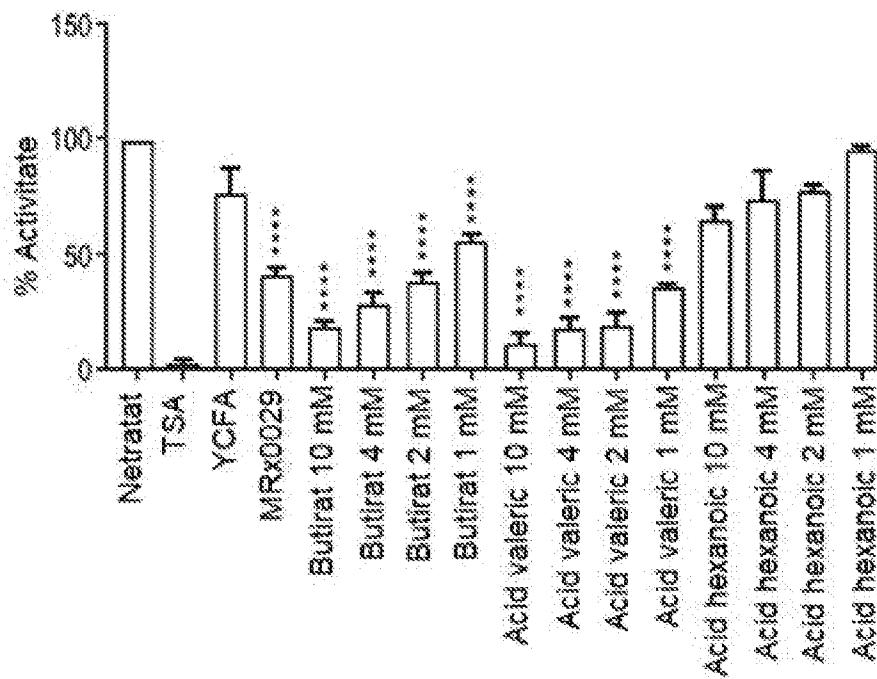


FIG. 18D

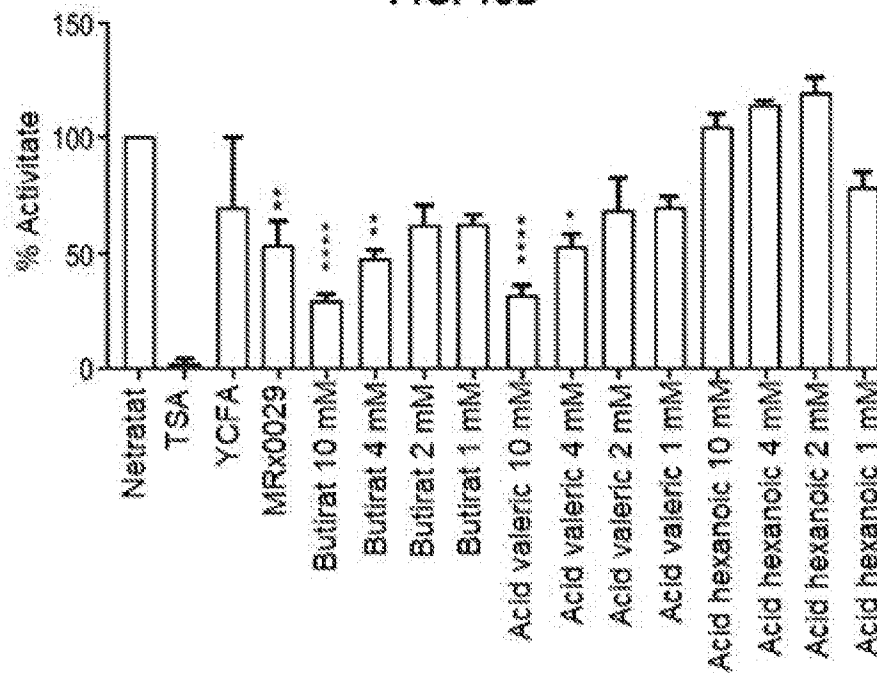
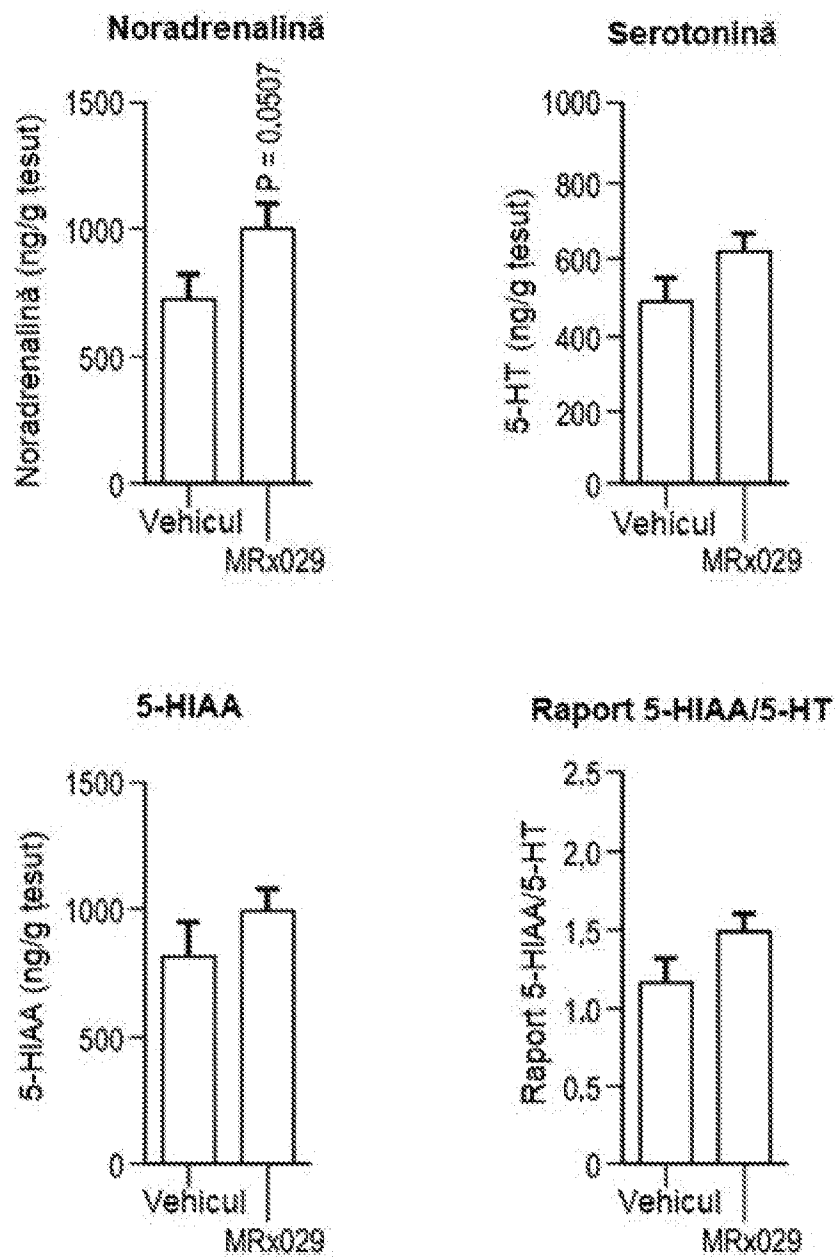


FIG. 20 Producția de neurotransmițători în creier

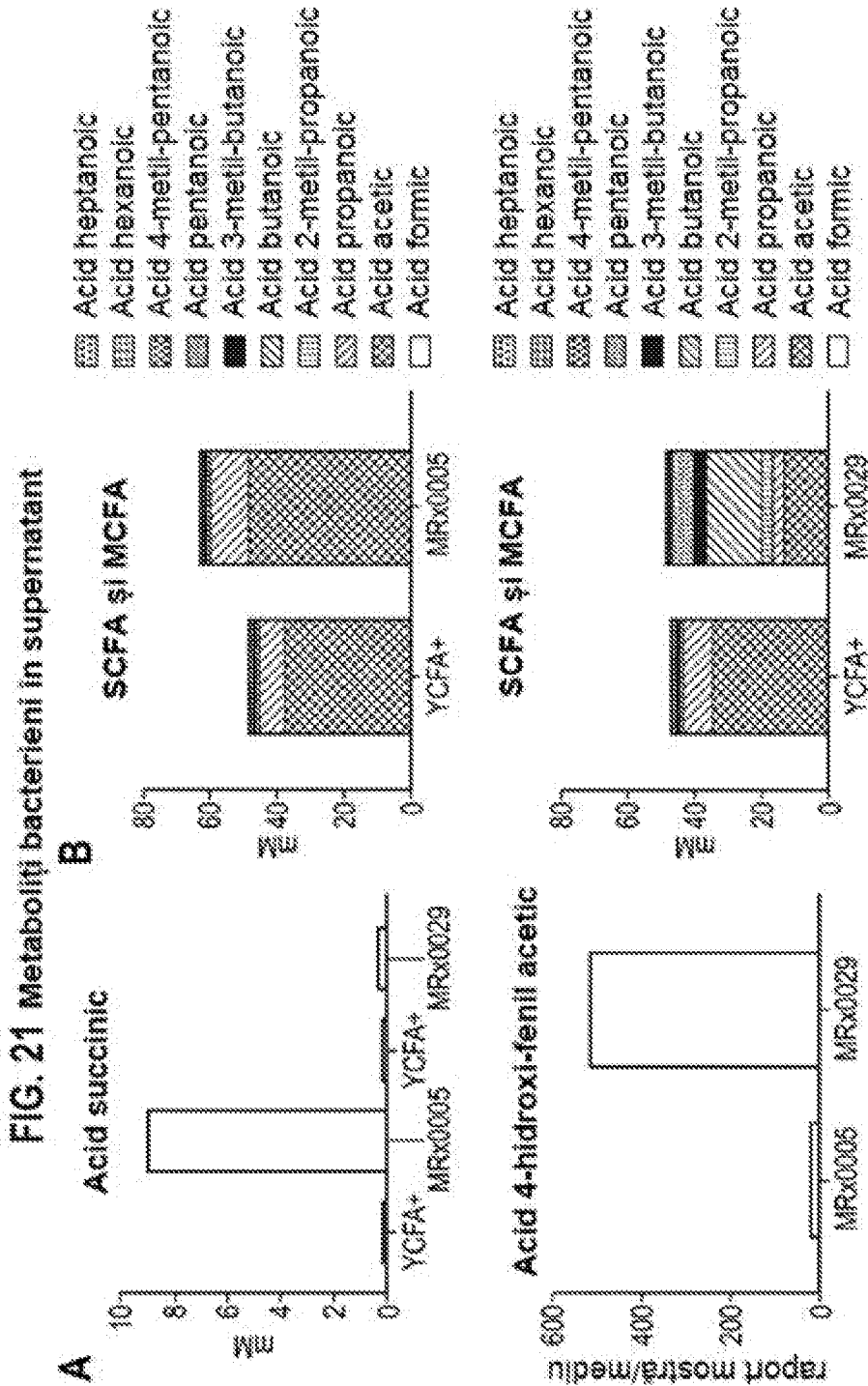
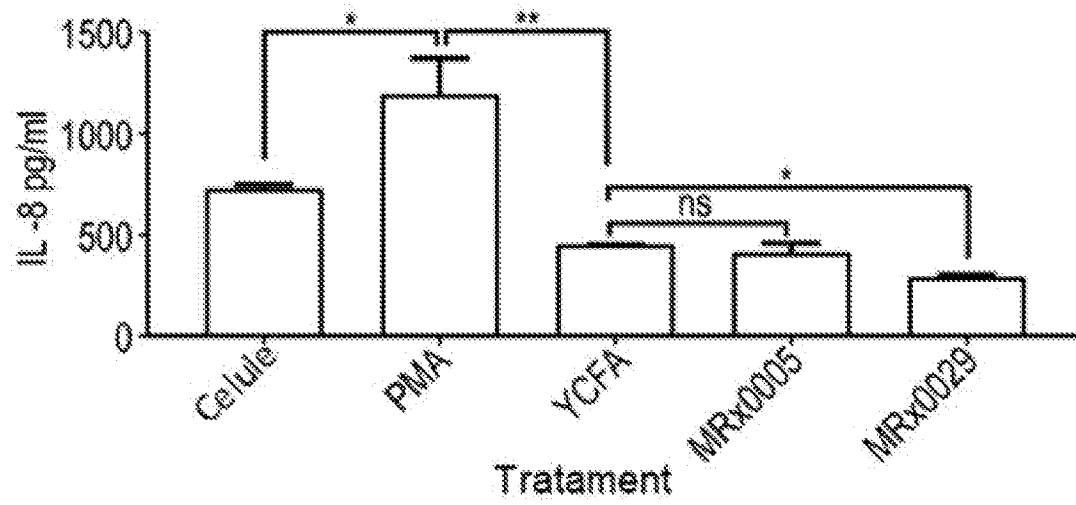


FIG. 22A



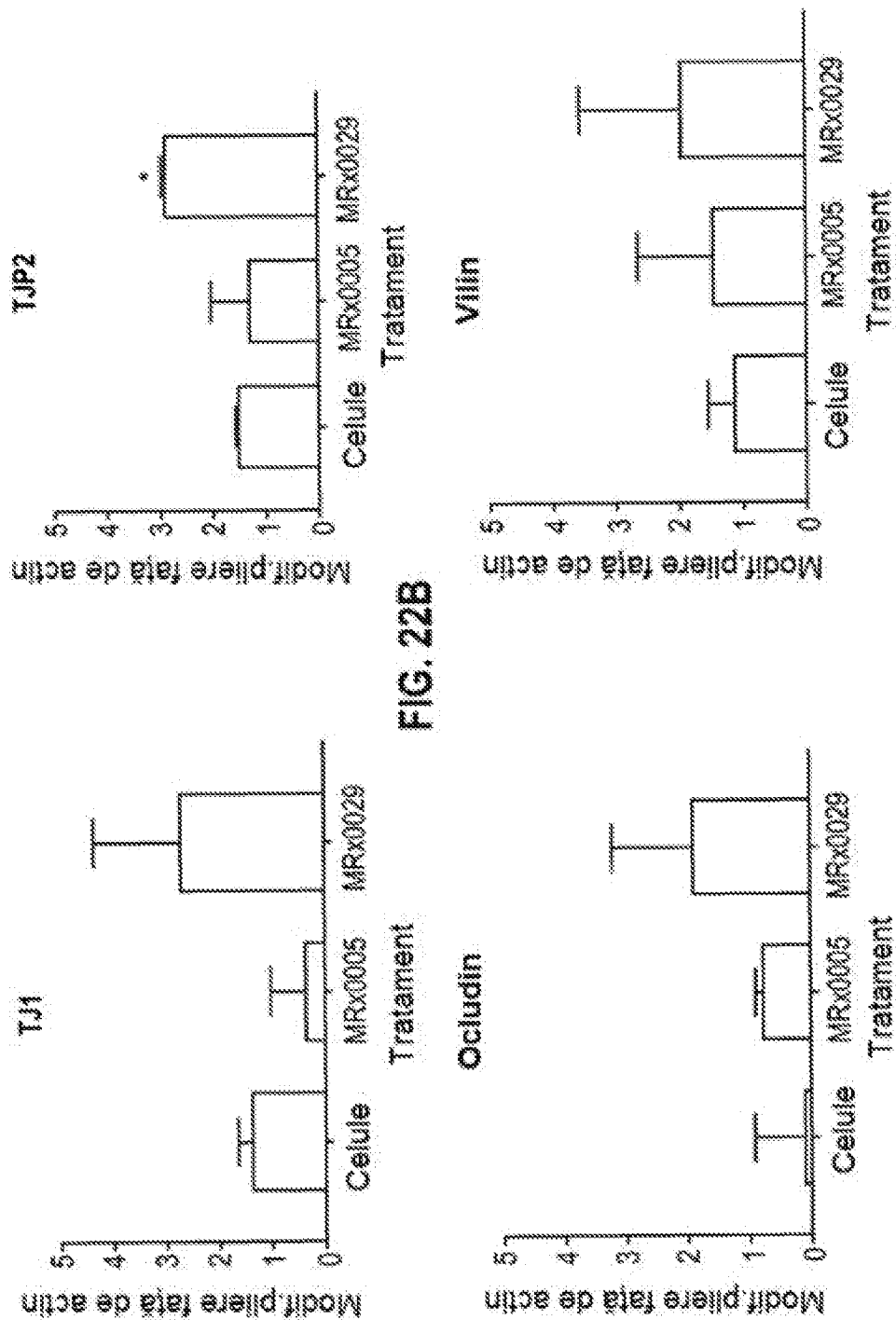


FIG. 22C

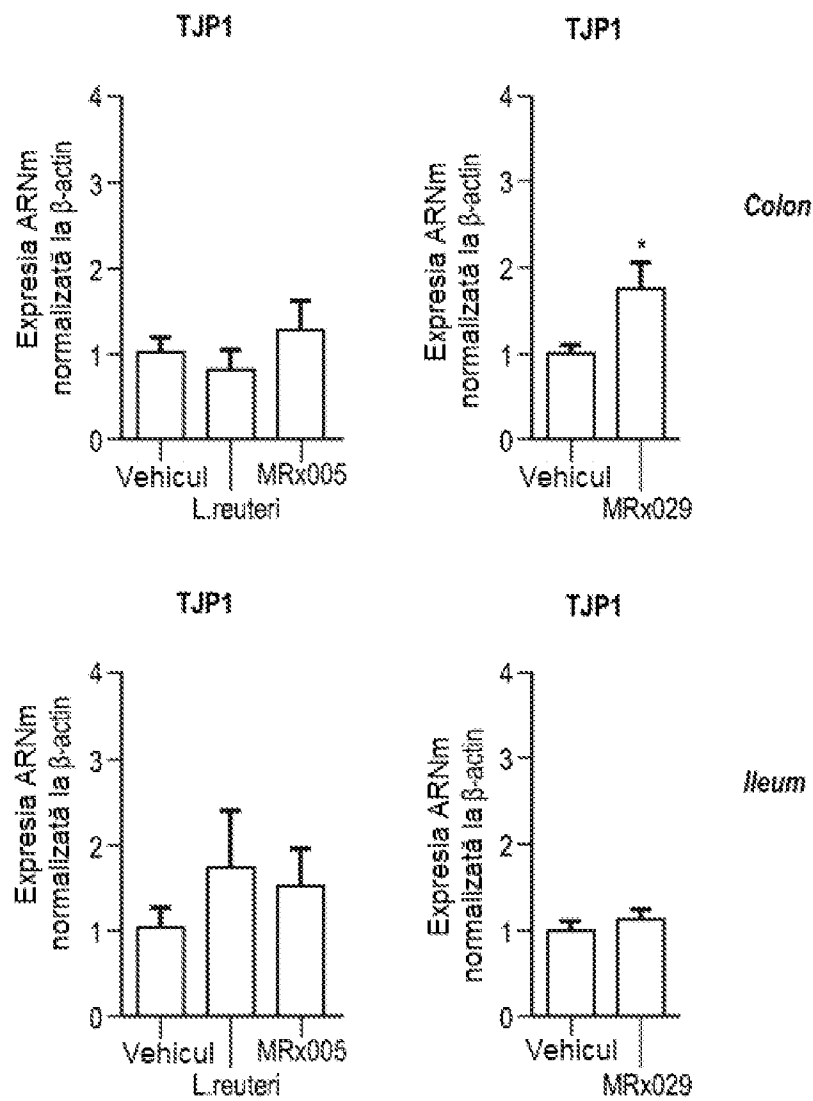


FIG. 22D

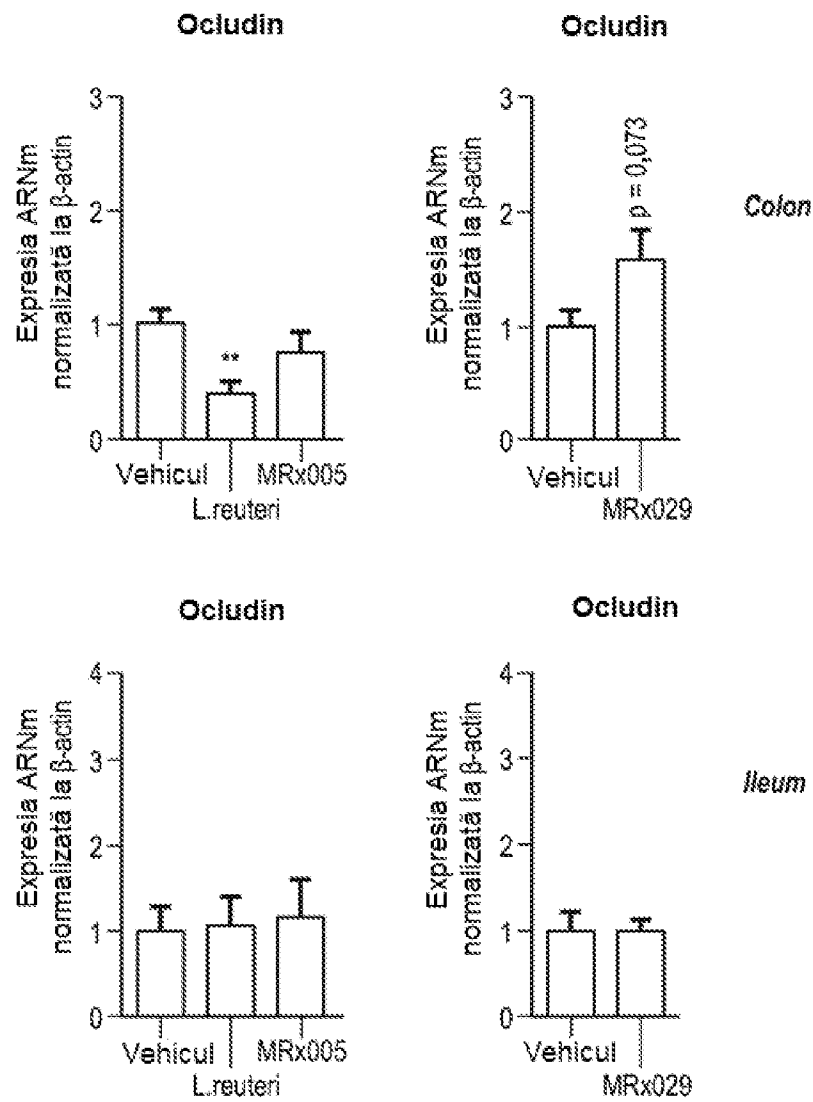


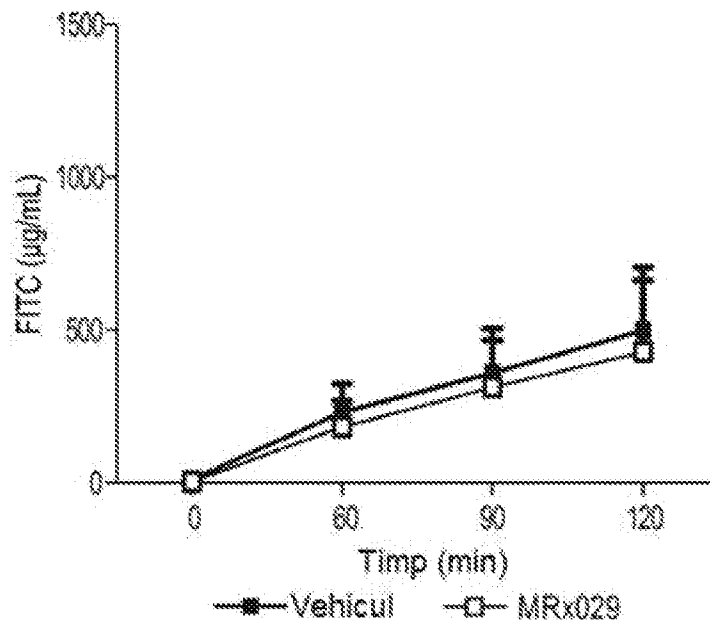
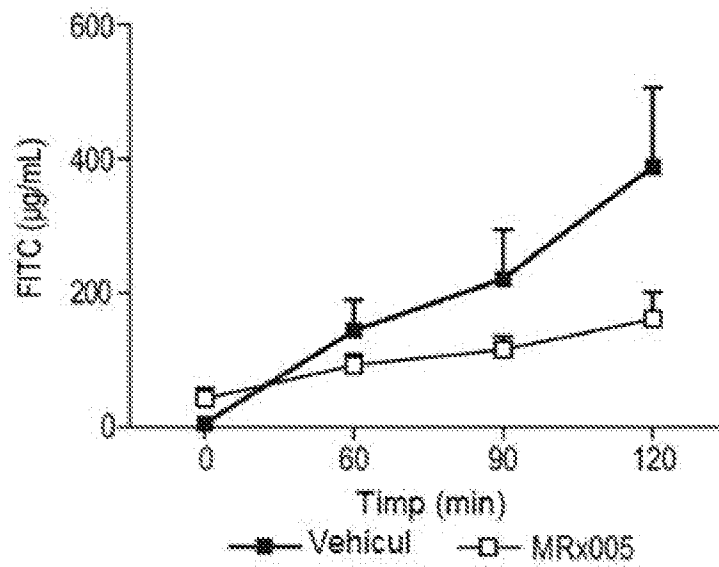
FIG. 22E Permeabilitatea în ileum

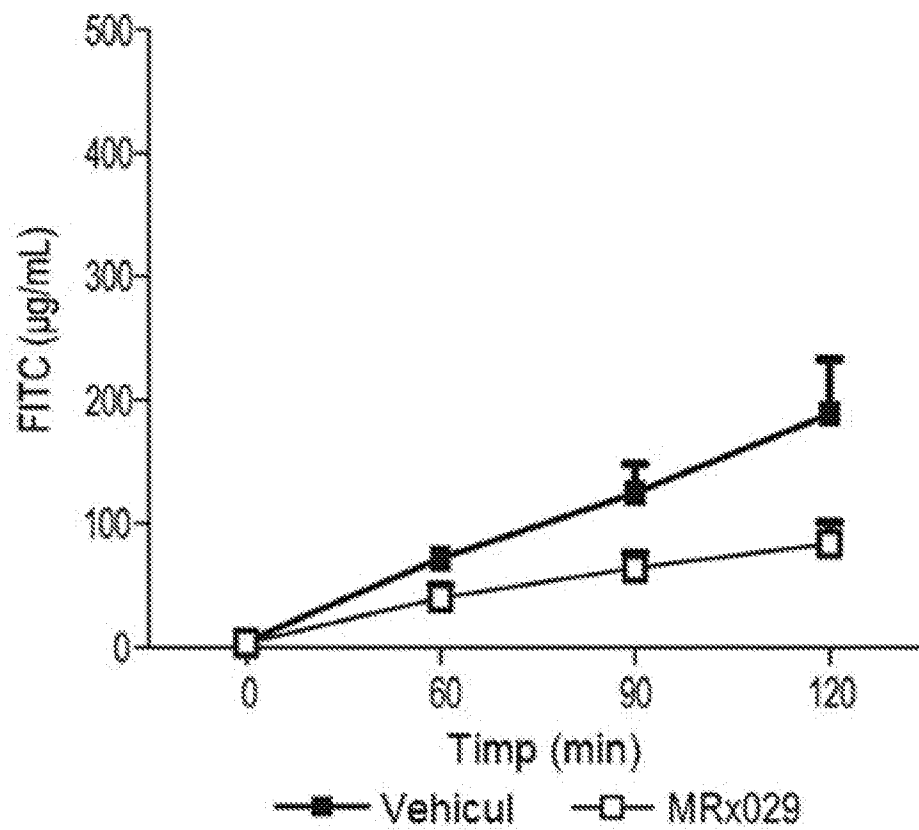
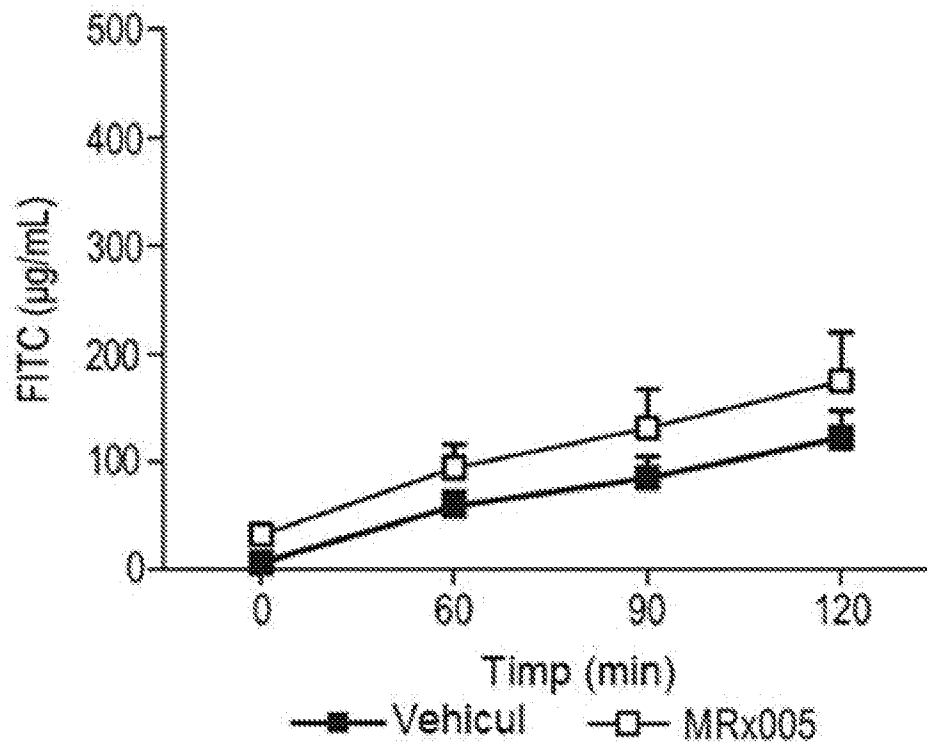
FIG. 22F Permeabilitatea în colon

FIG 23

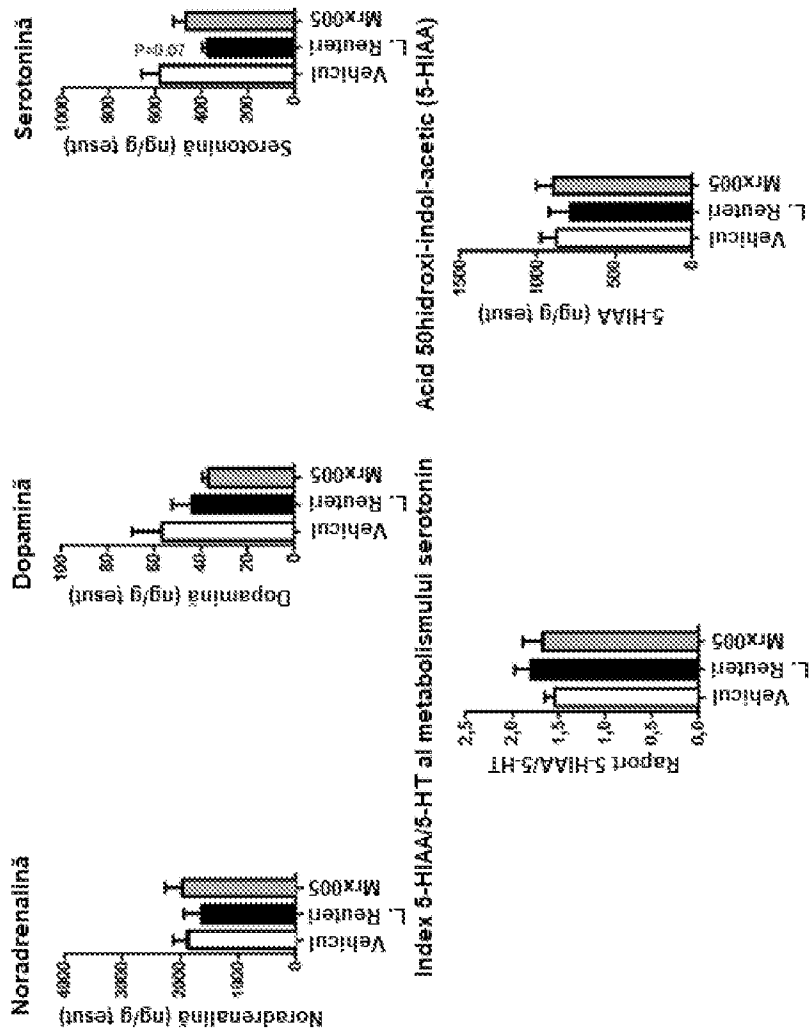


FIG 24

A

Receptor vasopresin

Receptor oxitocin

Expresia ARNm normalizată la β-actin

Vehicul L.Reuteri Mix005 Mrx029

B

Receptor vasopresin

Receptor vasopresin

Expresia ARNm normalizată la β-actin

Vehicul L.Reuteri Mix005 Mrx029

C

Receptor glucocorticoid

Receptor glucocorticoid

Expresia ARNm normalizată la β-actin

Vehicul L.Reuteri Mix005 Mrx029

D

Receptor mineralocorticoid

Receptor mineralocorticoid

Expresia ARNm normalizată la β-actin

Vehicul L.Reuteri Mix005 Mrx029

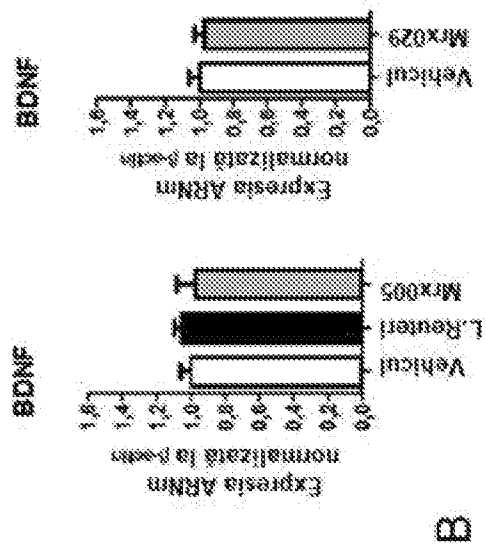
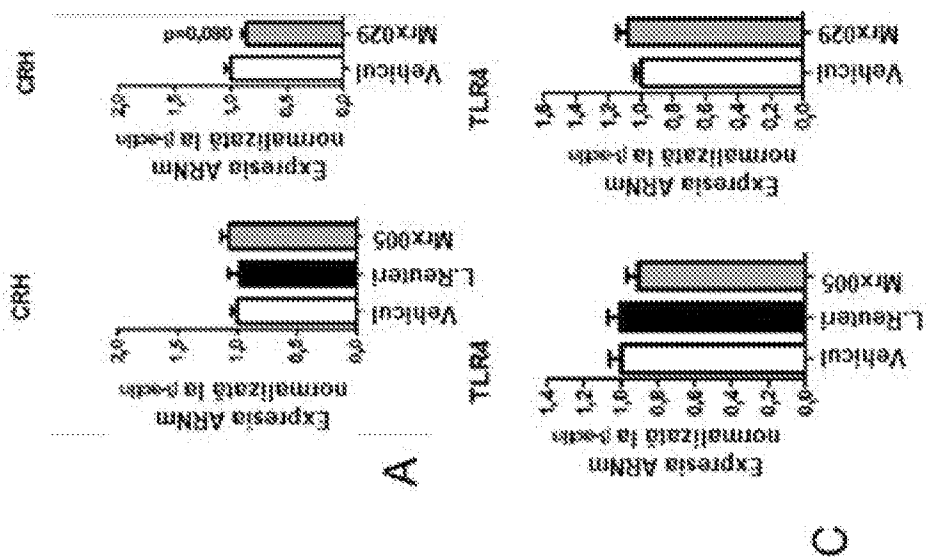


FIG 25



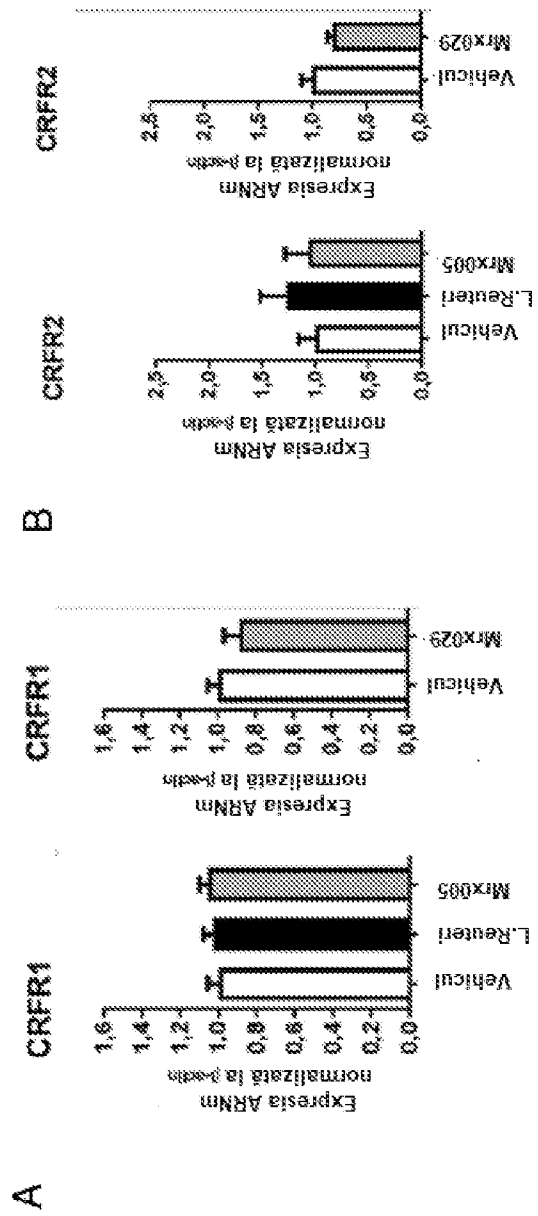
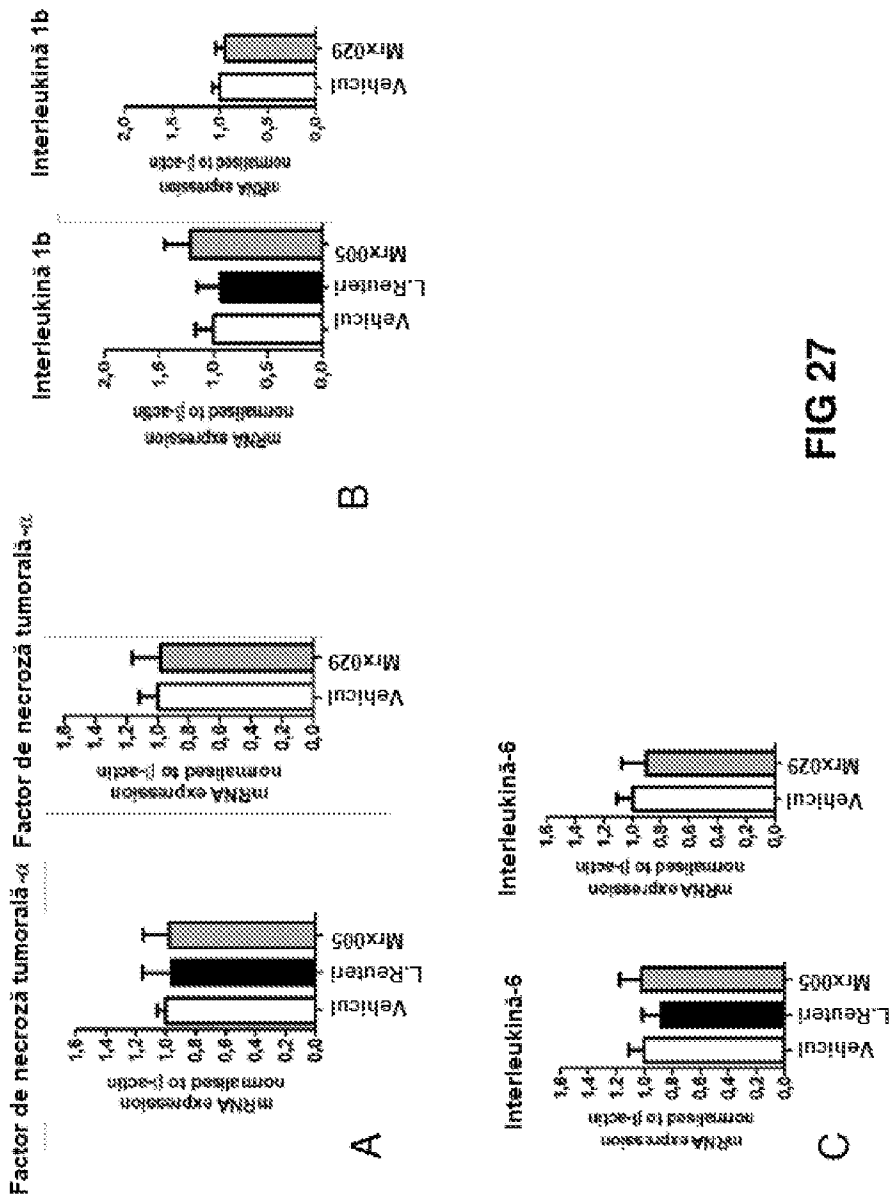
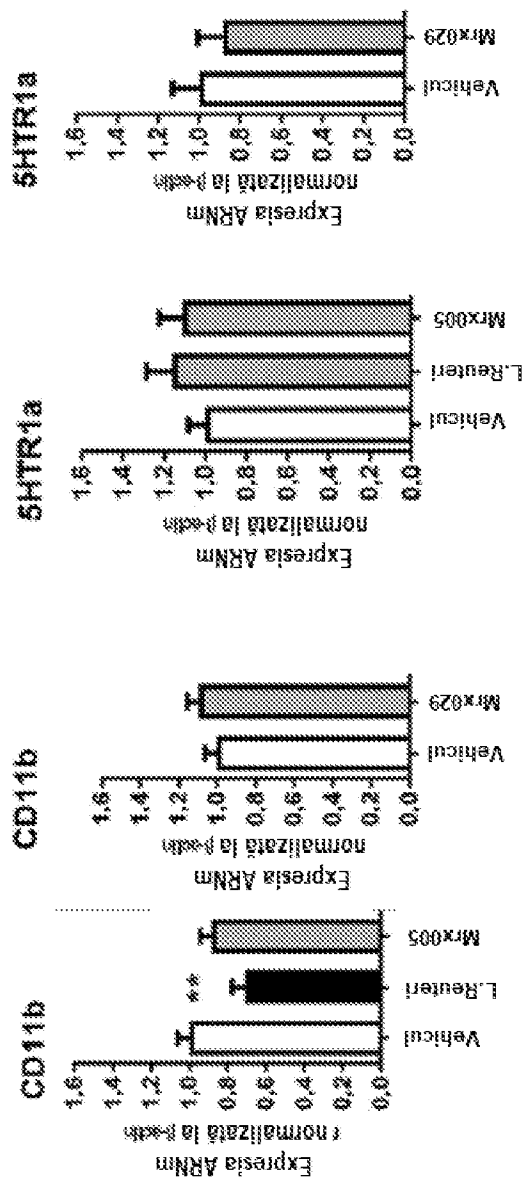


FIG 26





B

A

FIG 28

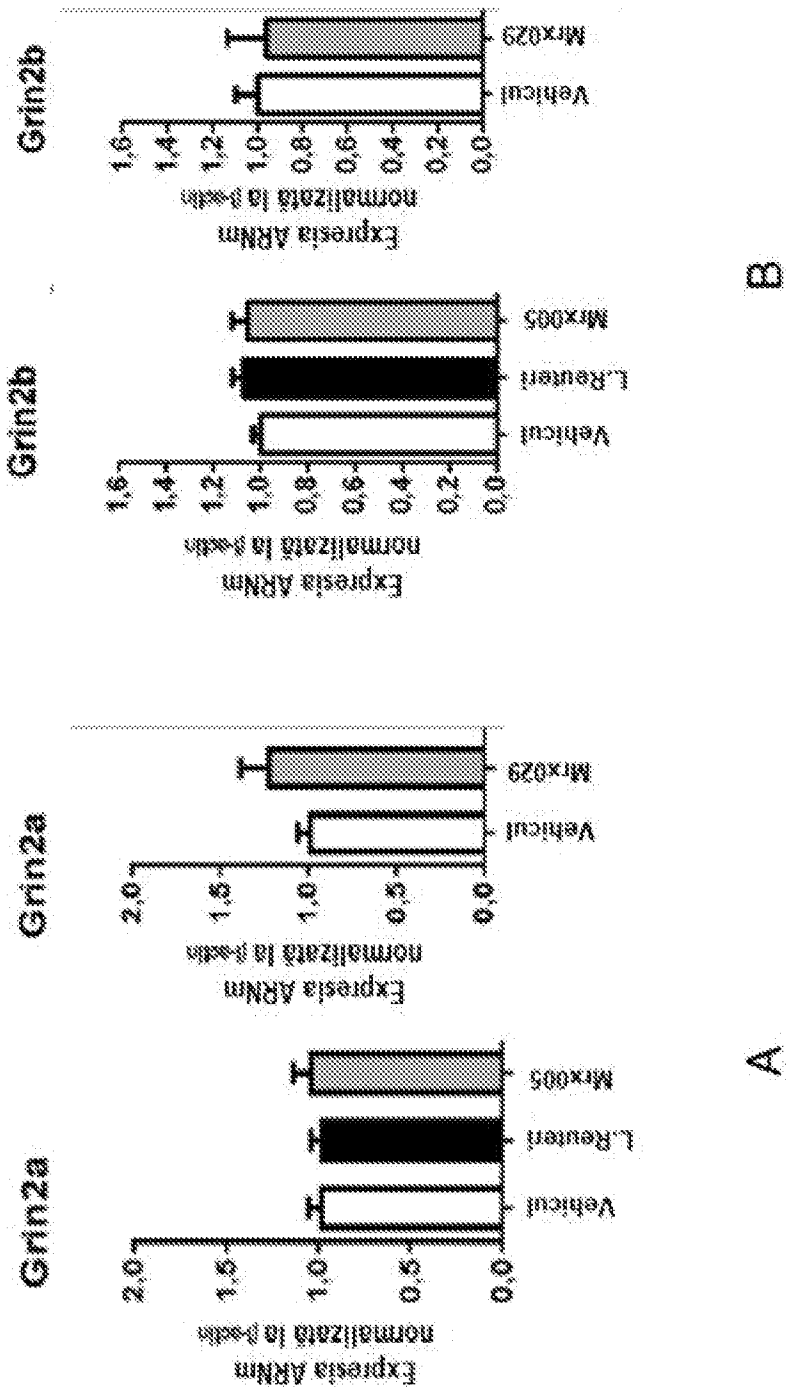
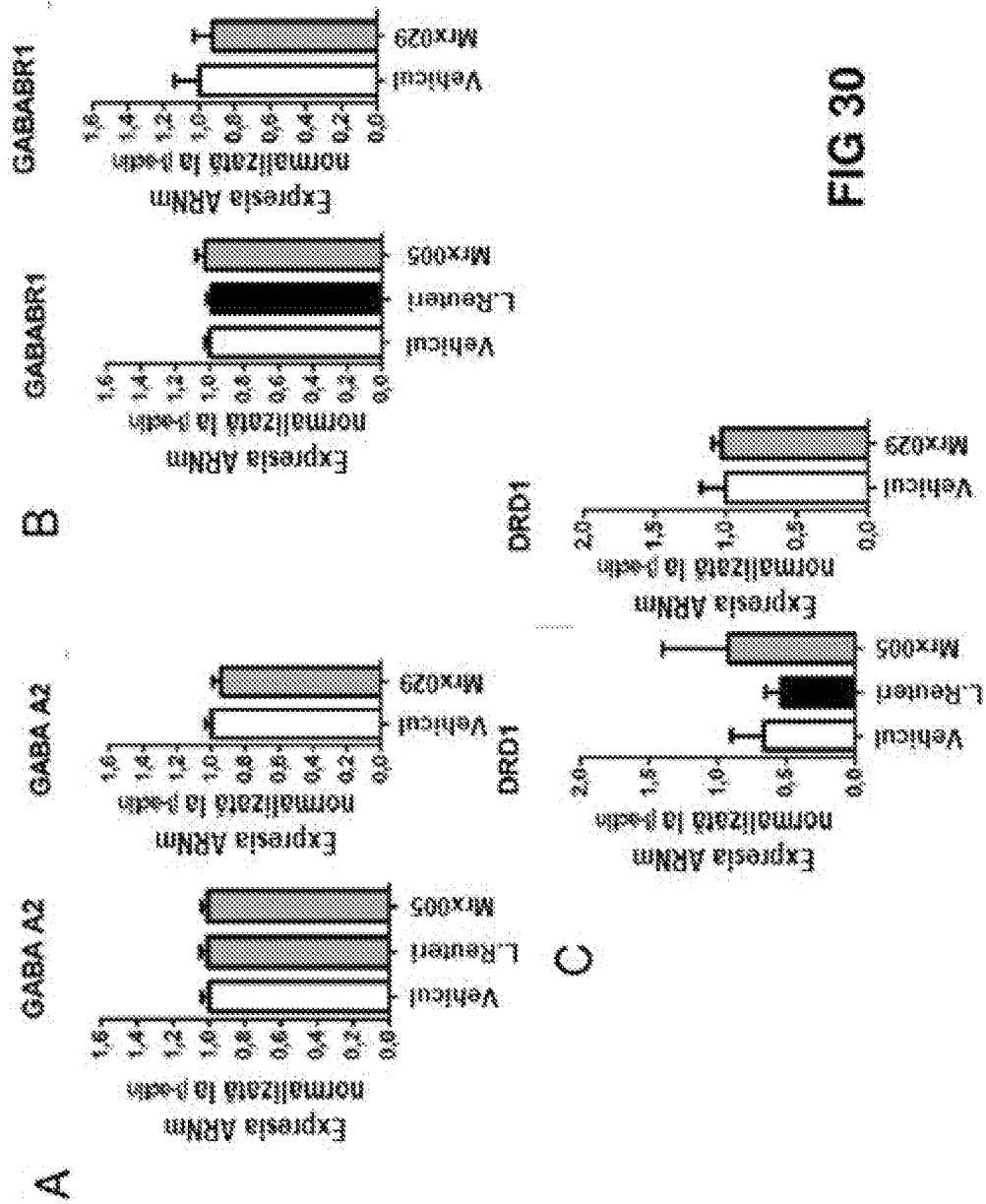


FIG 29



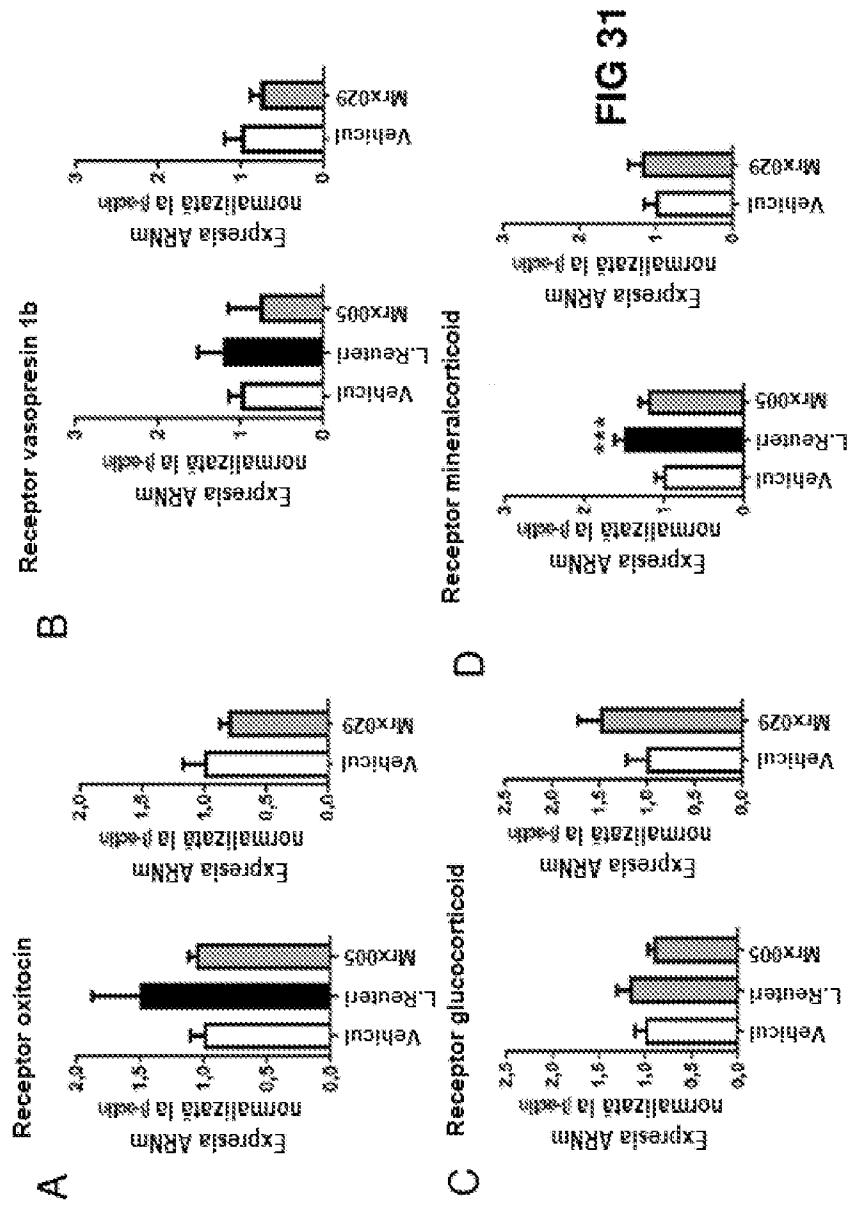


FIG 32

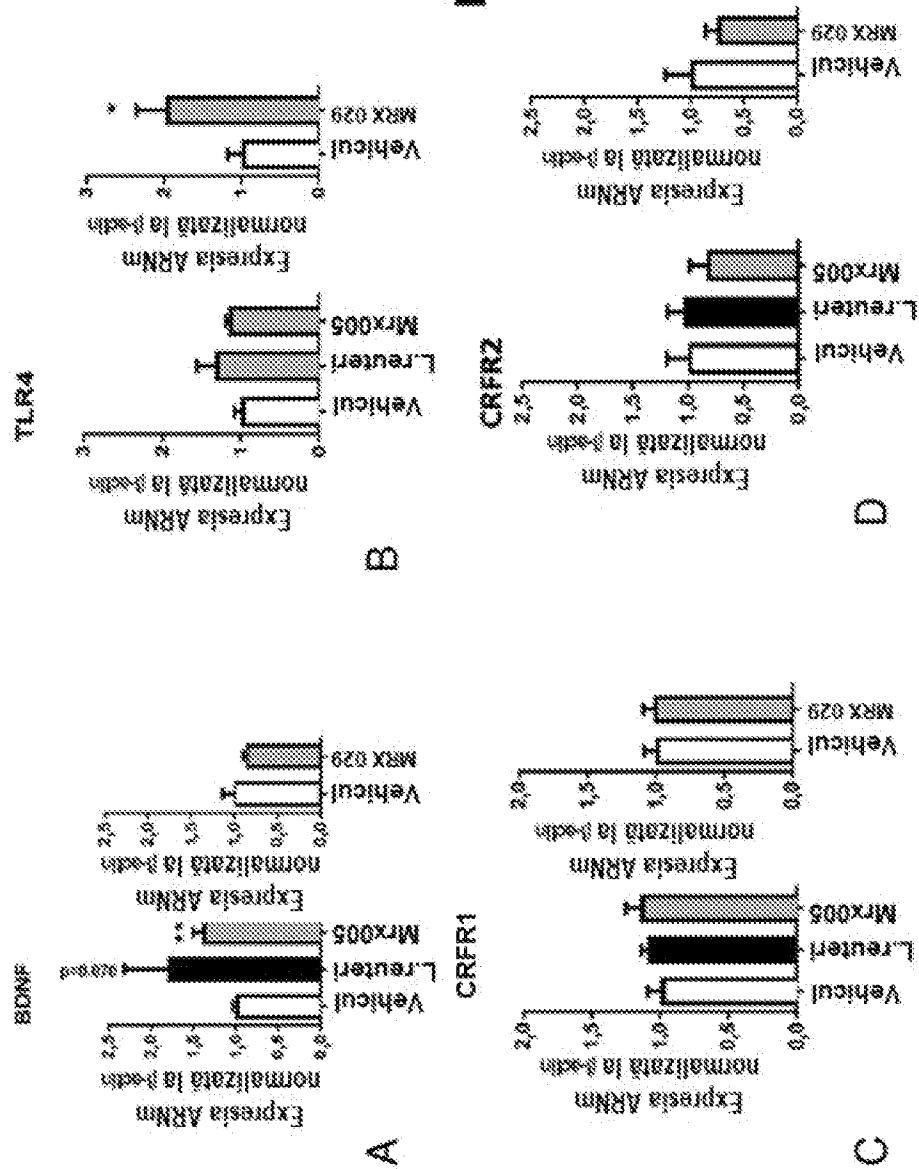


FIG 33

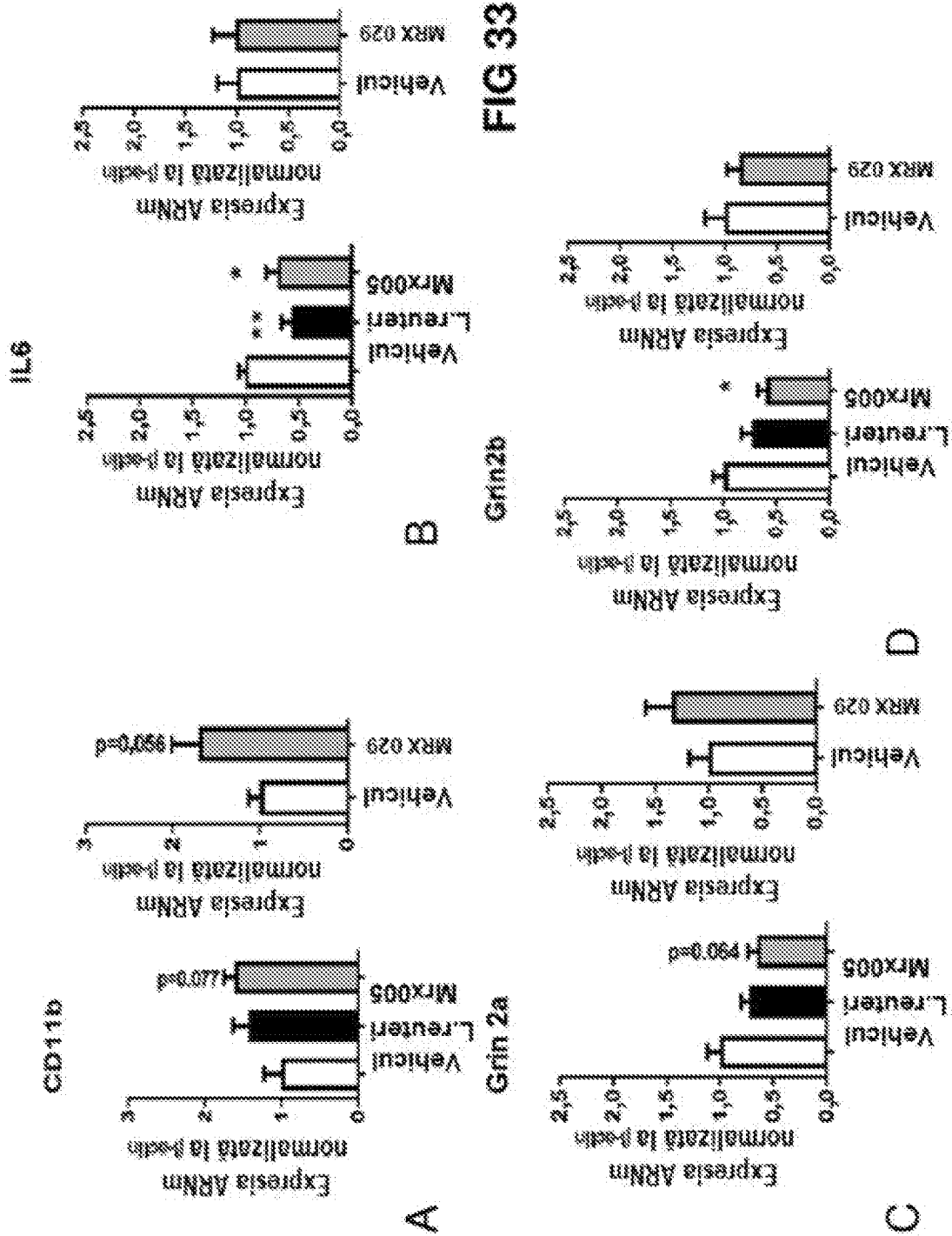
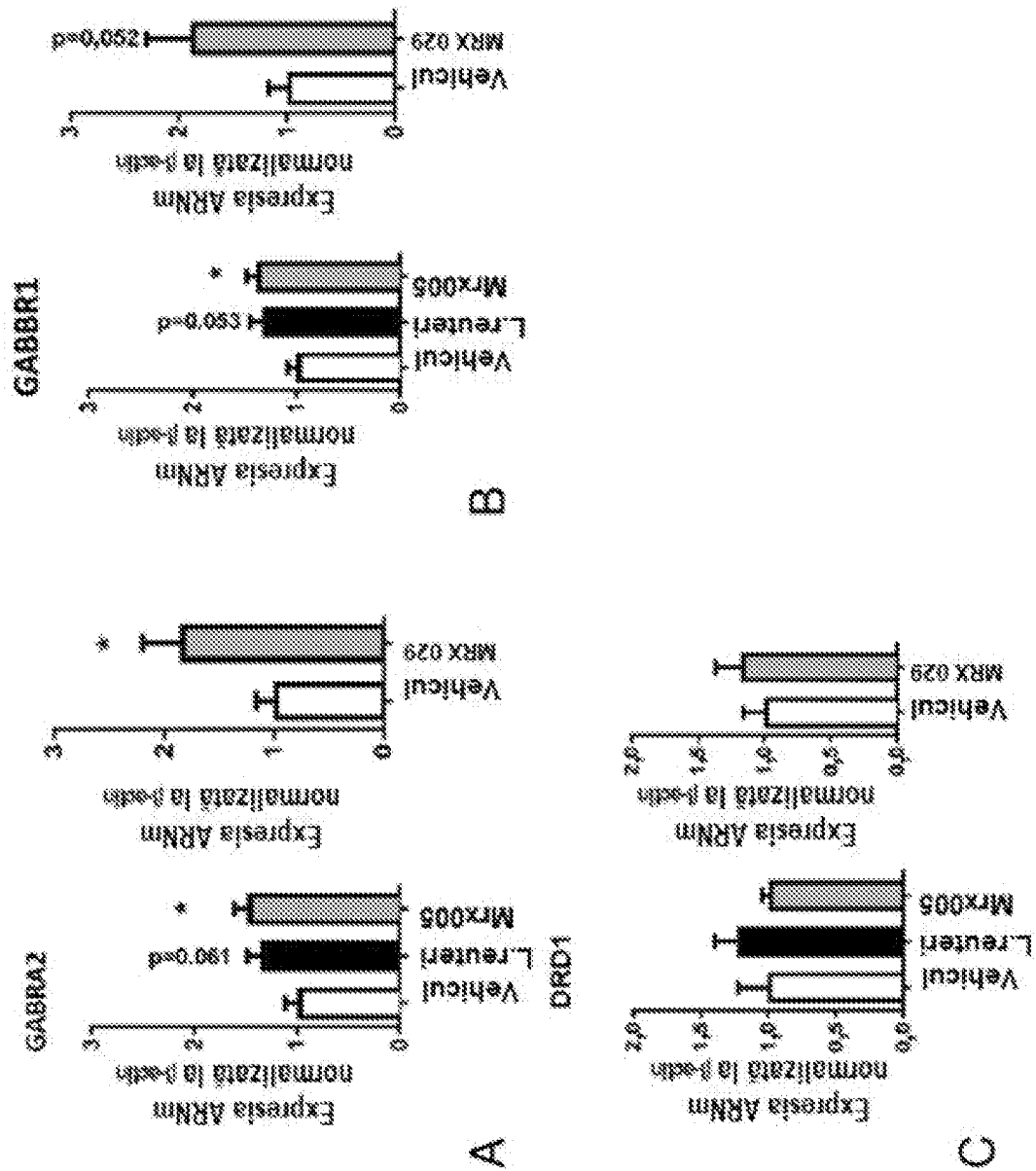


FIG 34



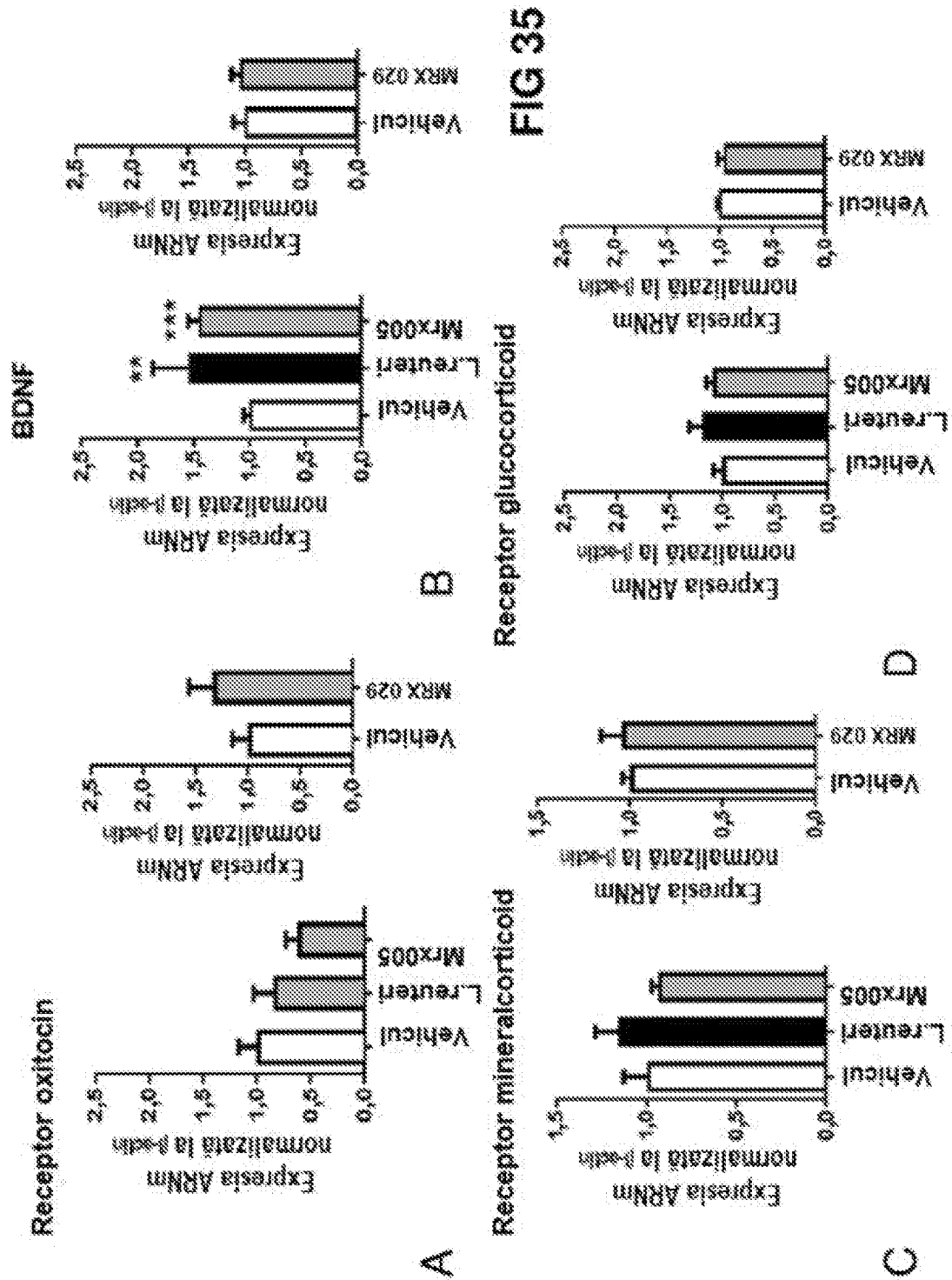


FIG 36

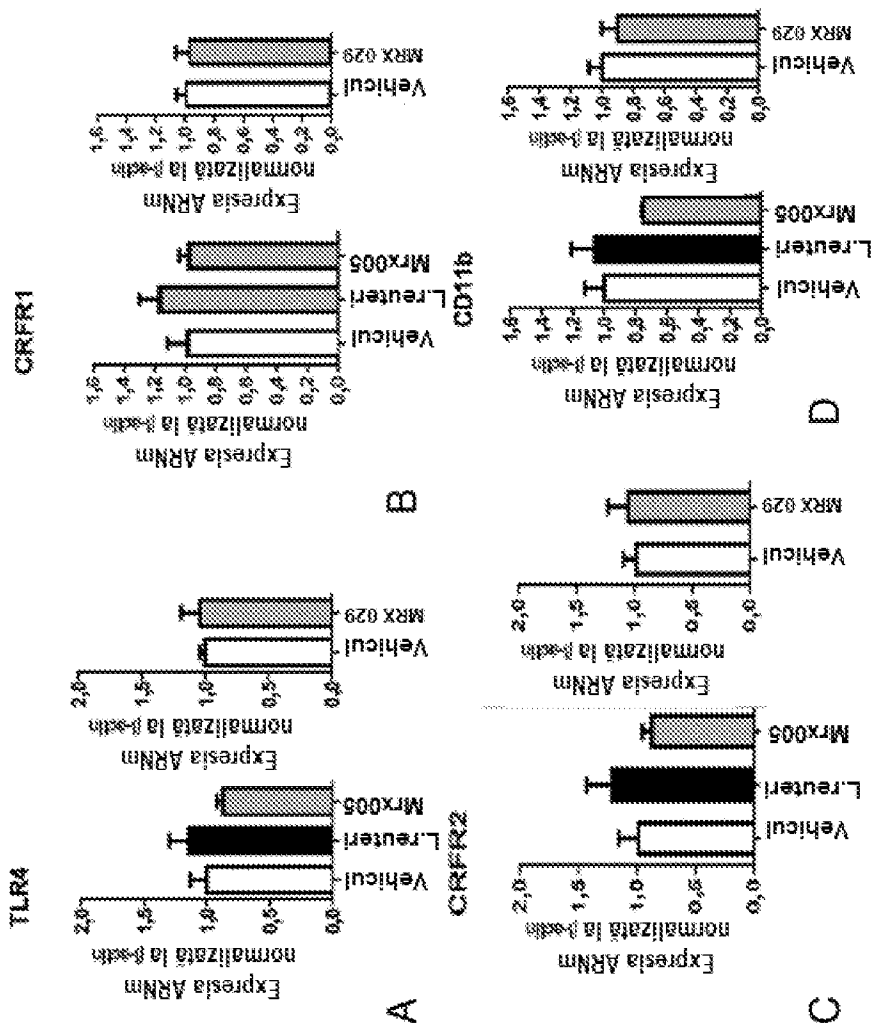
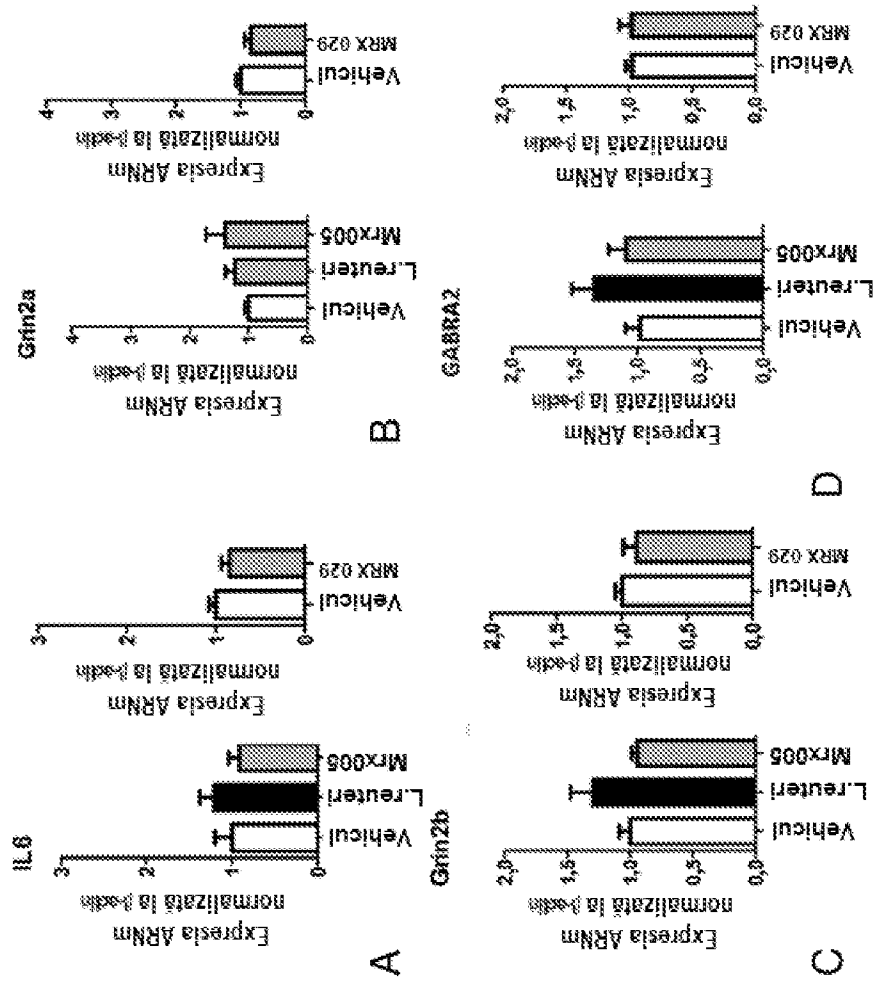


FIG 37



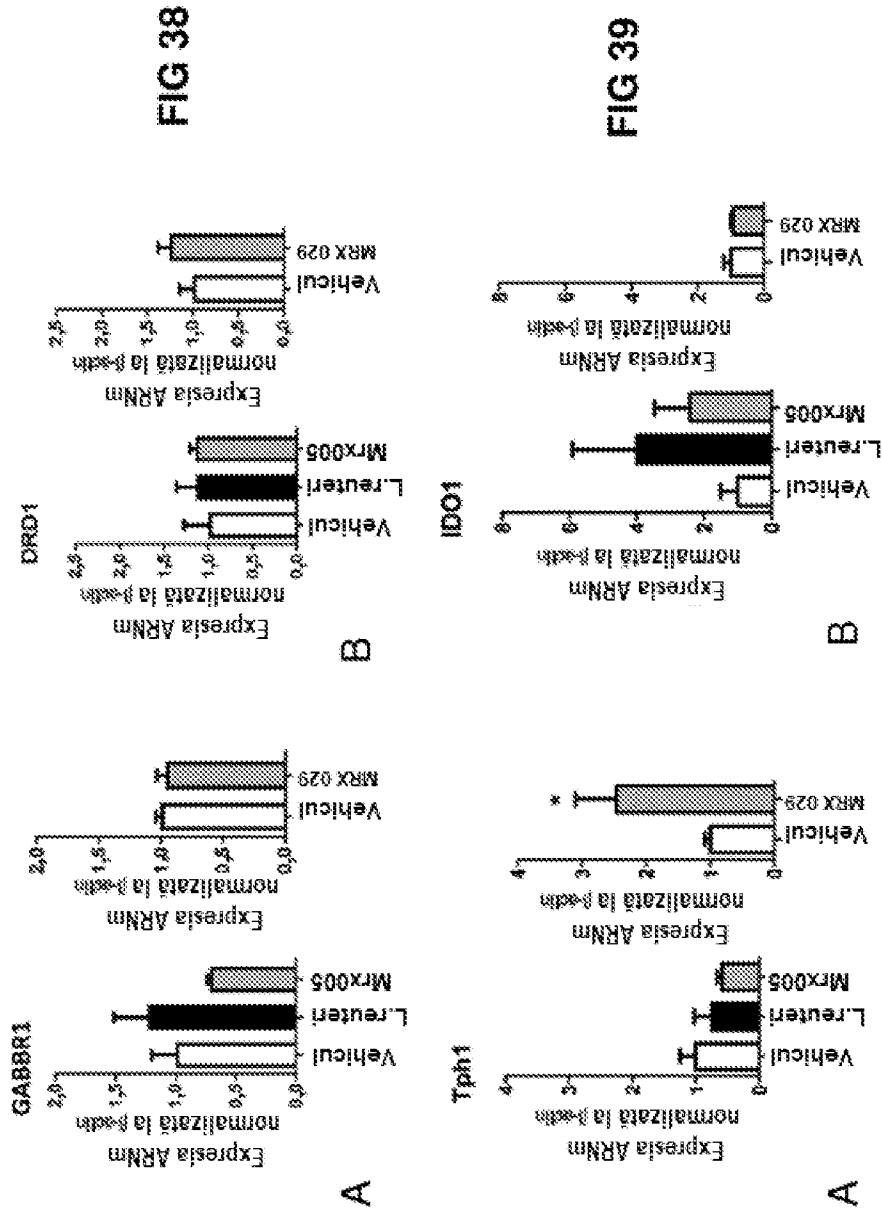
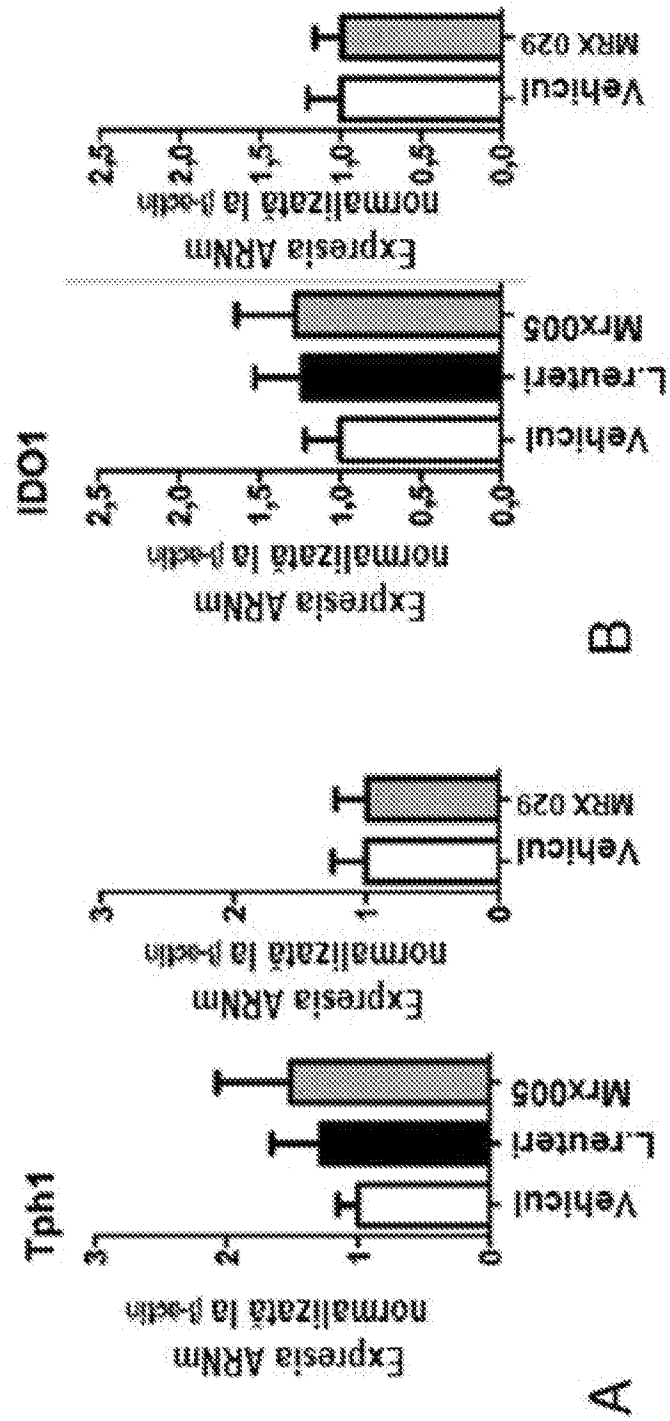
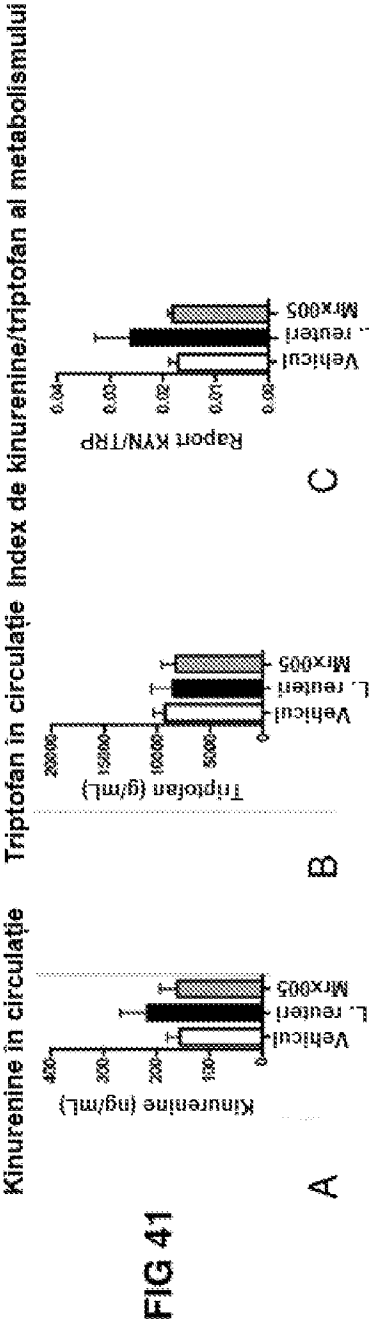


FIG 40





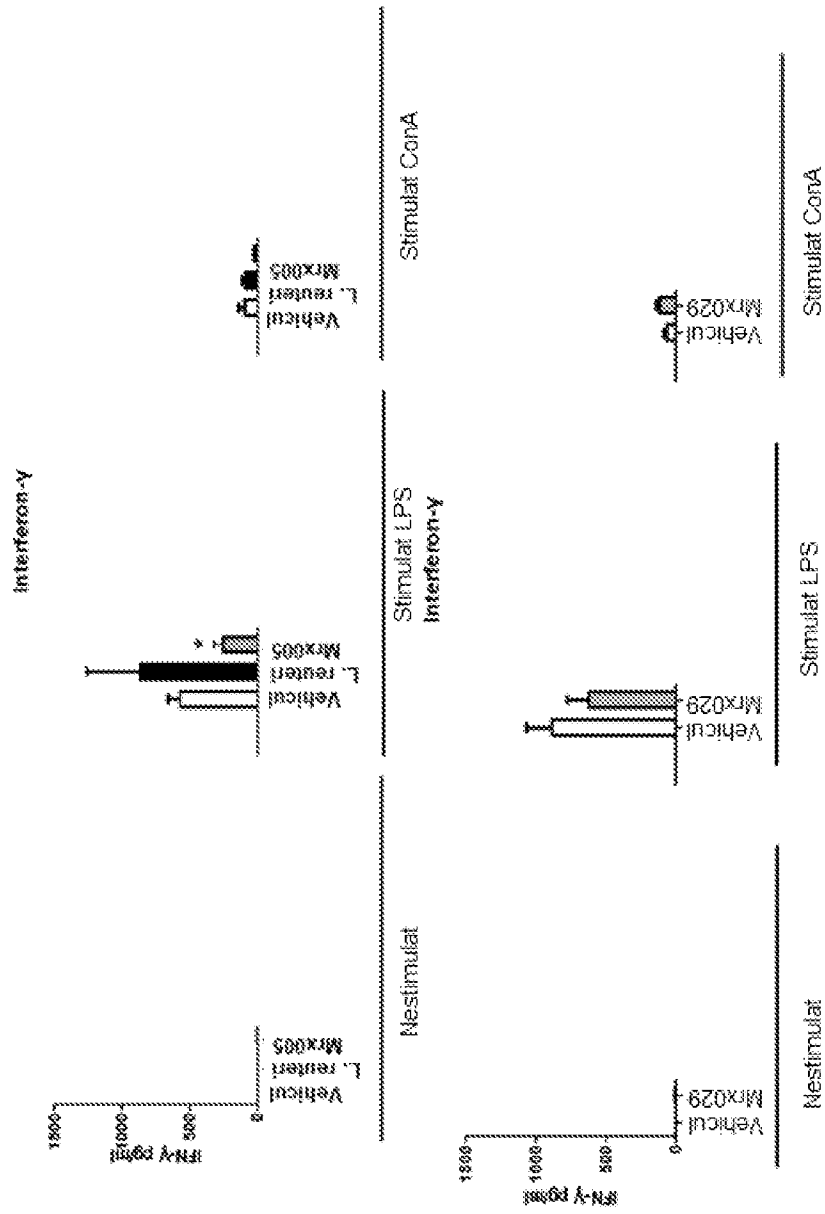


FIG 42

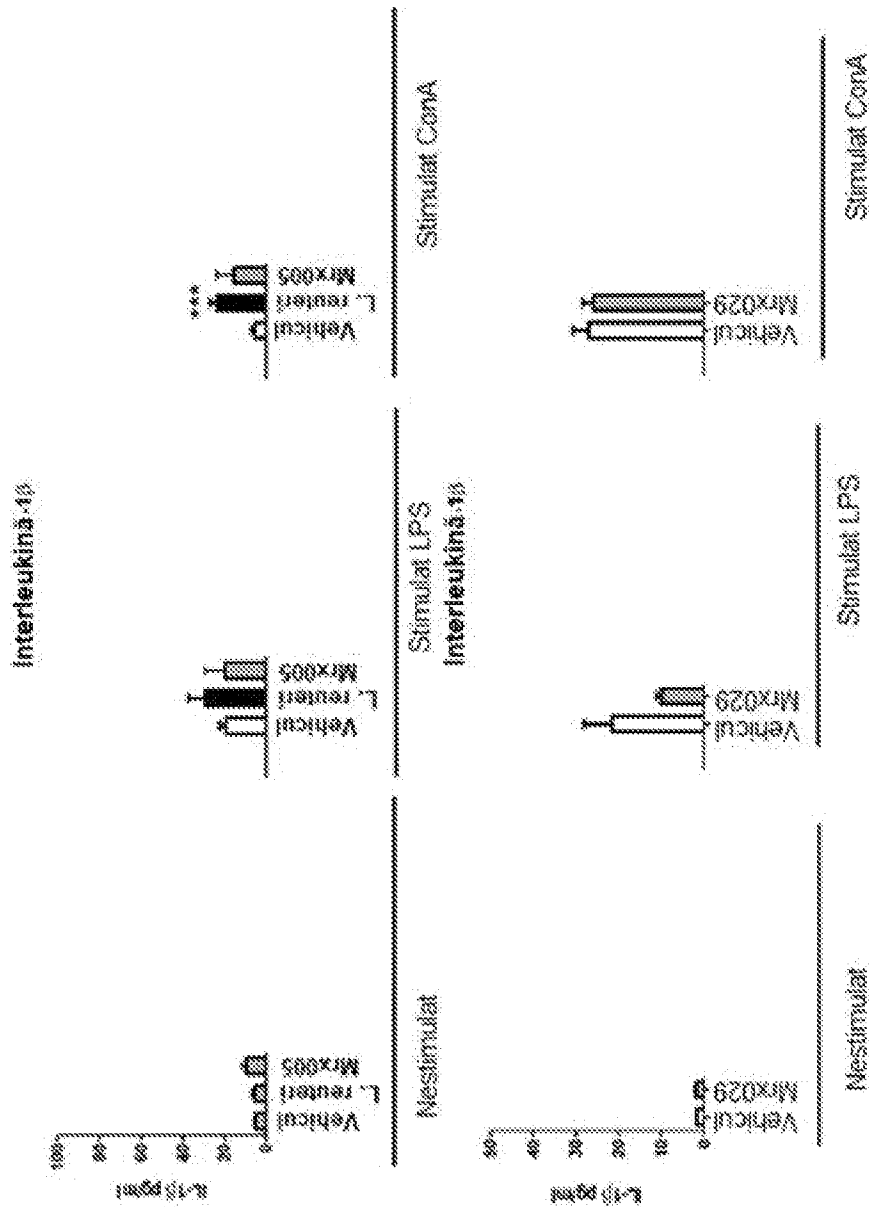


FIG 43

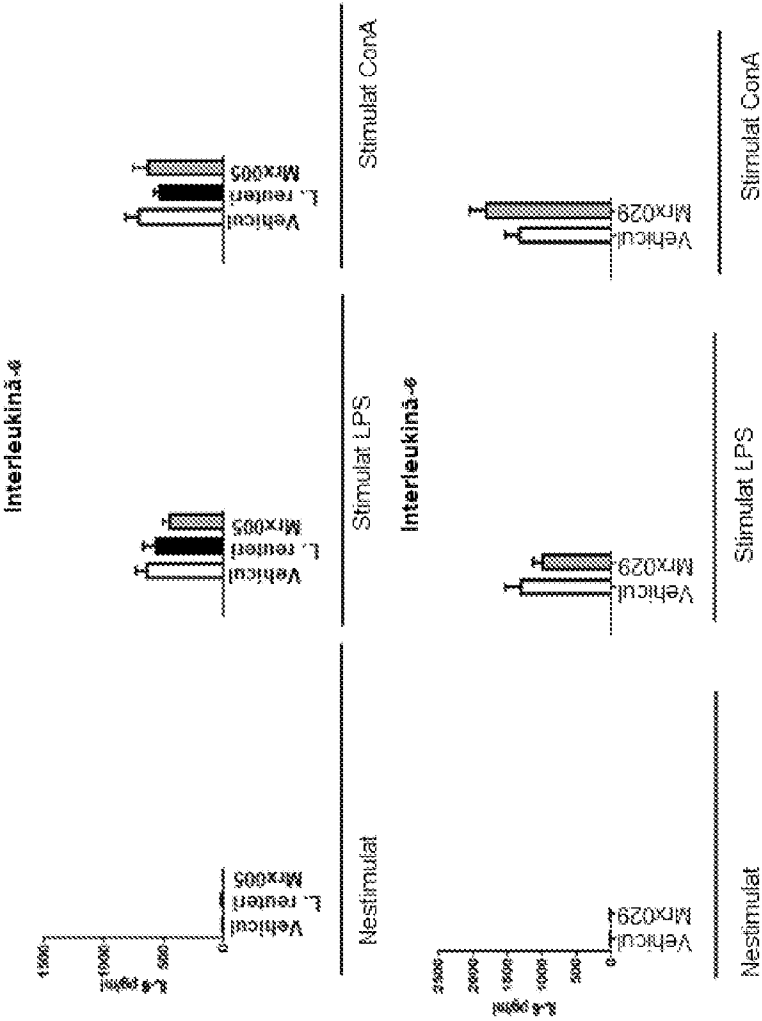


FIG 44

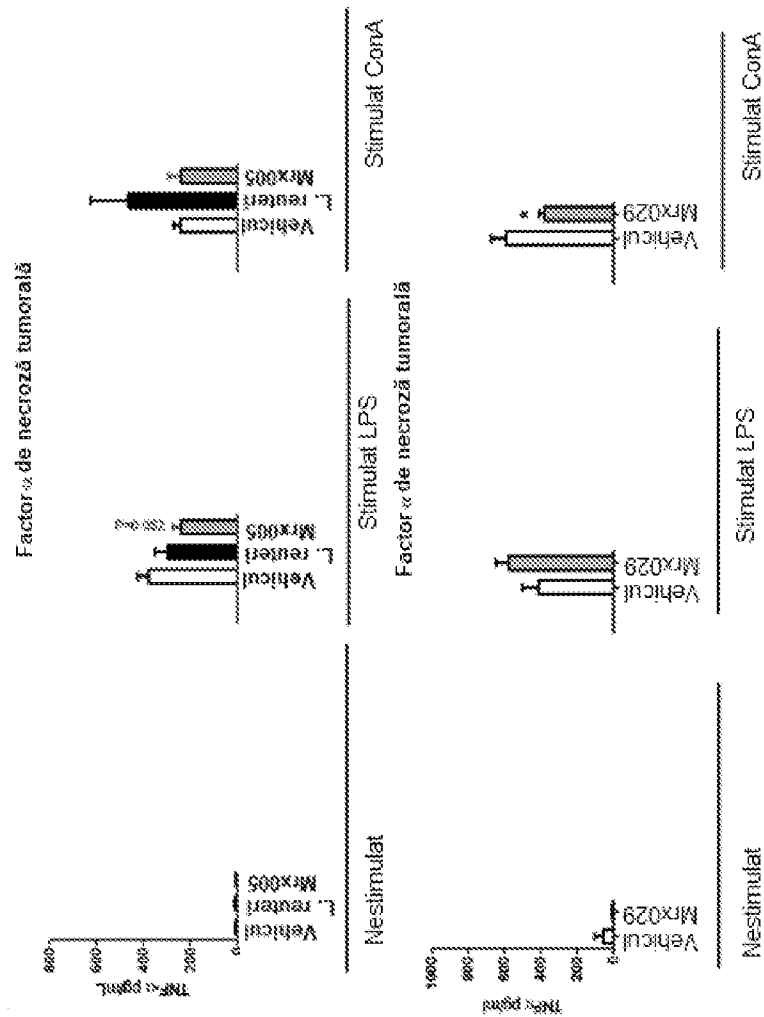


FIG 45

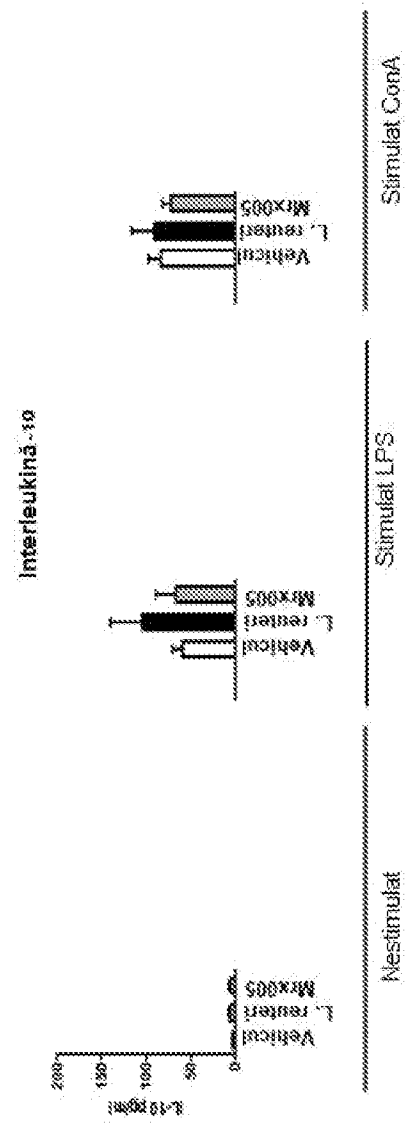


FIG 46

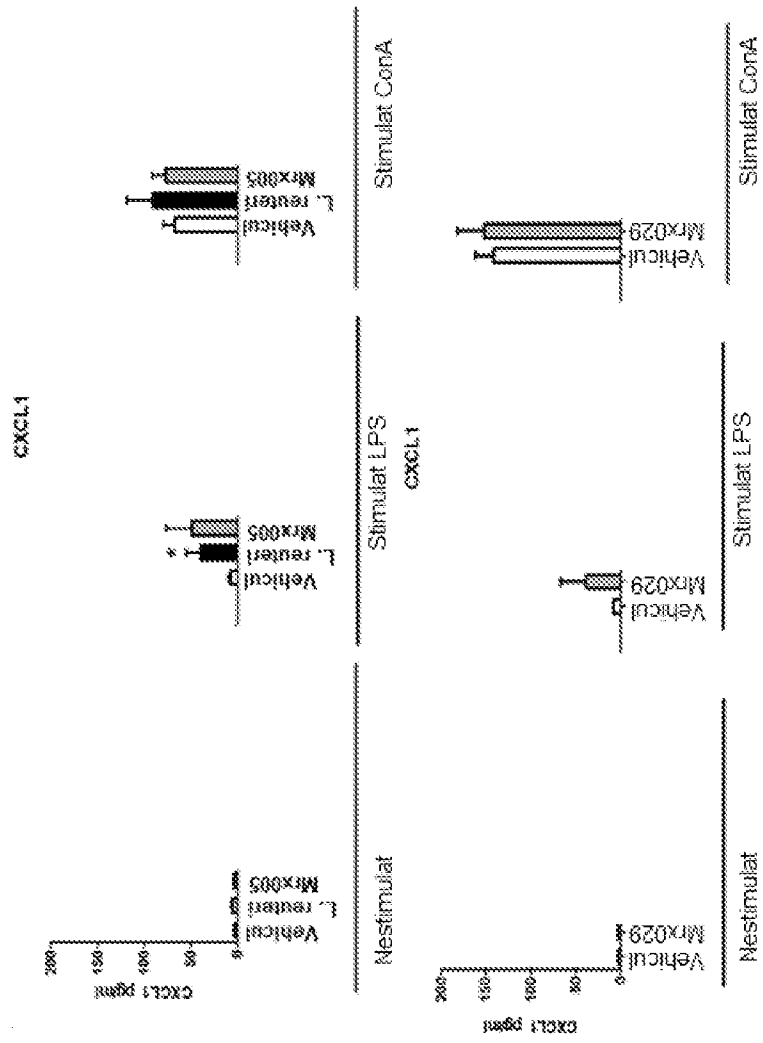


FIG 47

FIG 48

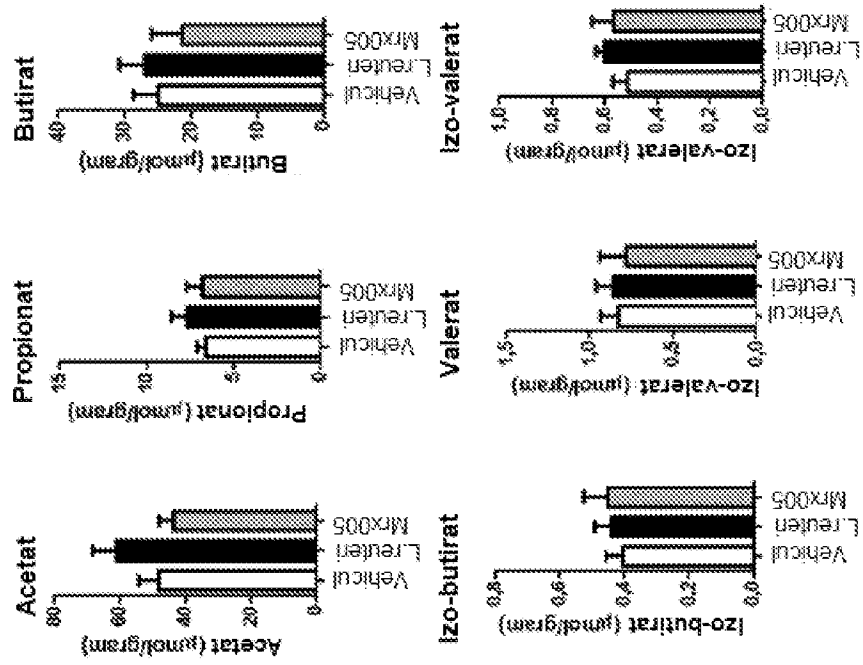


FIG 49

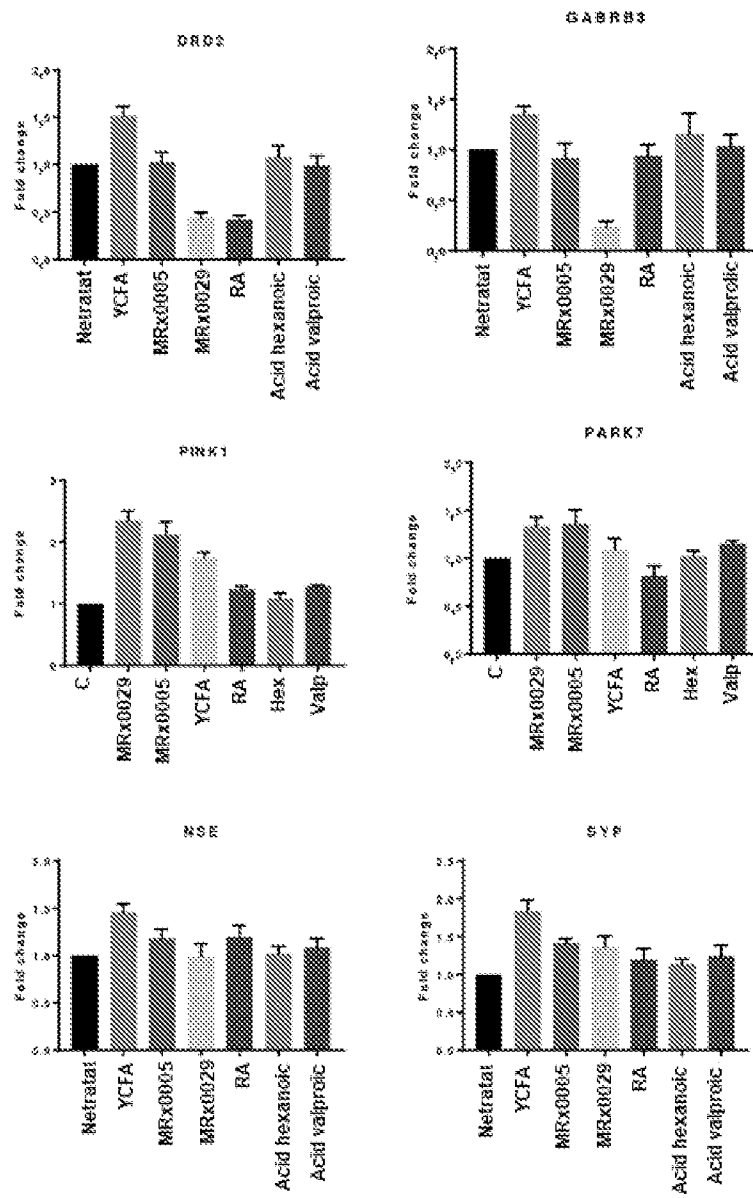


FIG 50

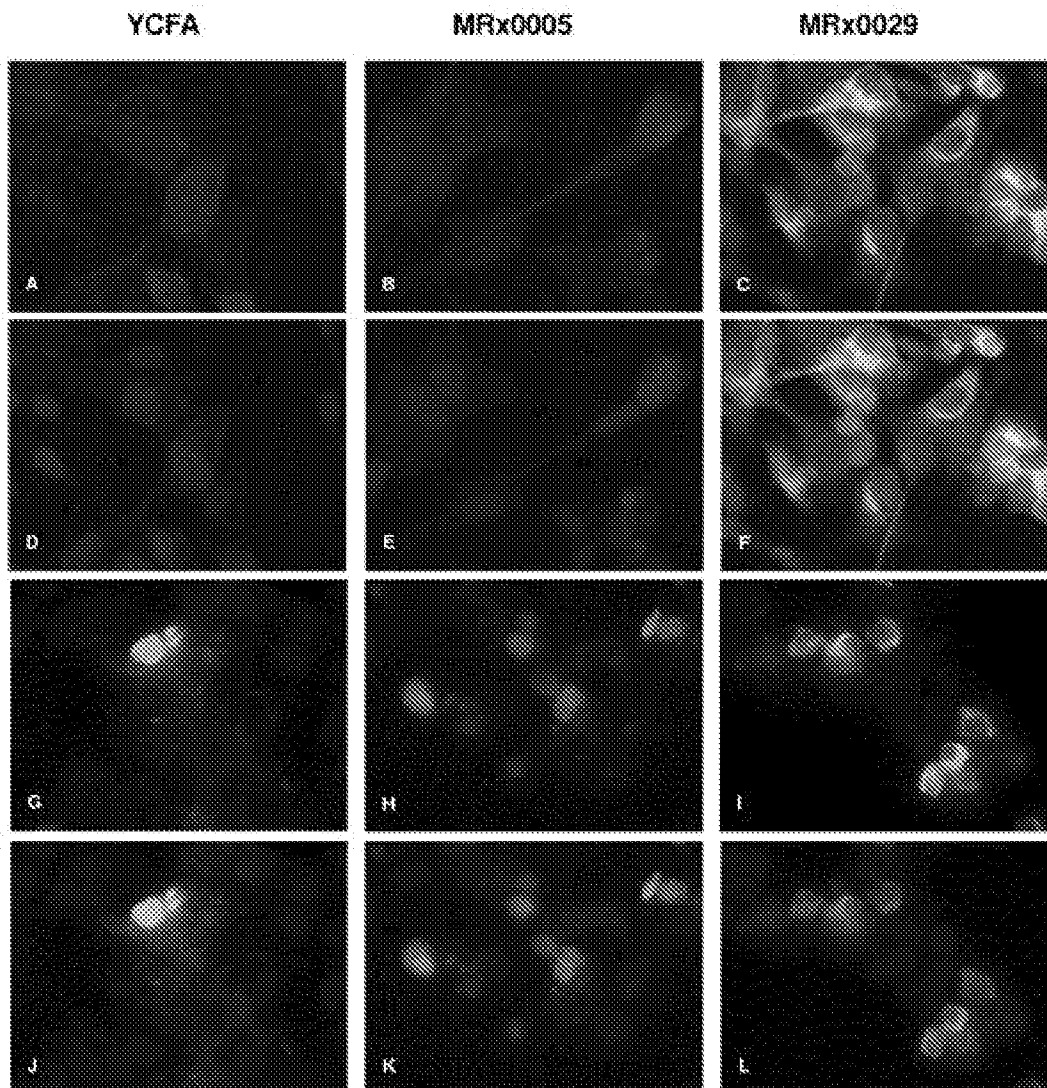


FIG 50 continuare

