I812624

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I812624 B

(45)公告日： 中華民國 112 (2023) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：107120441 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 06 月 14 日

(51)Int. Cl.： *A61K35/74 (2015.01)*

(30)優先權：

2017/06/14	英國	1709468.1
2017/06/15	英國	1709534.0
2017/08/10	英國	1712851.3
2018/03/09	英國	1803826.5
2018/04/11	英國	1805989.9
2018/04/11	英國	1805991.5
2018/04/11	英國	1805990.7
2018/04/25	英國	1806780.1
2018/04/25	英國	1806779.3

(71)申請人：南韓商希杰生物科技股份有限公司 (南韓) CJ BIOSCIENCE, INC. (KR)
南韓

(72)發明人：慕得 映姆科 伊莉莎白 MULDER, IMKE ELISABETH (NL)；伊勒 莎曼莎 YUILLE, SAMANTHA (GB)；艾托爾 安娜 ETTORRE,ANNA (IT)；亞曼德 蘇艾德 AHMED, SUAAD (NL)；富迪亞度 帕爾席娜 FOTIADOU, PARTHENA (GR)；爾西亞 喬瑟夫 露比 艾里根 URCIA, JOSEPH ROBY IRINGAN (PH)；薩維尼亞克 伊蓮娜 SAVIGNAC, HELENE (FR)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910743 2016 年 09 月 20 日

(56)參考文獻：

US 2004/005304A1 US 2004/170617A1

US 2004/230963A1

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：34 項 圖式數：50 共 168 頁

(54)名稱

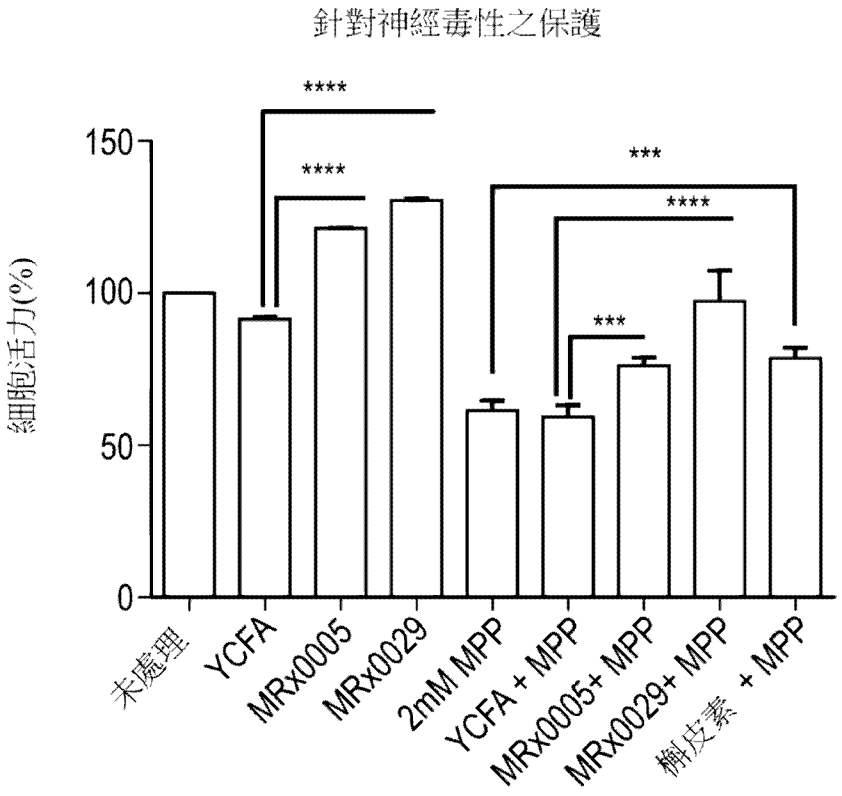
包含細菌品系之組成物

(57)摘要

本發明提供包含細菌品系之組成物，其用於治療及預防神經退行性病症。

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

指定代表圖：


針對神經毒性之保護
細胞活力(%)
150
100
50
0
****
****
***
****
***
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
2mM MPP
YCFA + MPP
MRx0005+ MPP
MRx0029+ MPP
槲皮素 + MPP

【圖 1】

I812624

【發明摘要】

【中文發明名稱】包含細菌品系之組成物

【英文發明名稱】COMPOSITIONS COMPRISING BACTERIAL STRAINS

【中文】

本發明提供包含細菌品系之組成物，其用於治療及預防神經退行性病症。

【英文】

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

【指定代表圖】圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】包含細菌品系之組成物

【英文發明名稱】COMPOSITIONS COMPRISING BACTERIAL STRAINS

【技術領域】

【0001】 本發明處於包含自哺乳動物消化道單離之細菌品系的組成物及此類組成物在治療疾病中之用途的領域。

【先前技術】

【0002】 認為人類腸在子宮內為無菌的，但在出生後立即暴露於多種多樣的母體及環境微生物。此後，微生物移生及演替之動態期發生，其受諸如分娩方式、環境、飲食、及宿主基因型之因素影響，所有該等因素皆影響腸微生物區之組成，特別是在生命早期。隨後，微生物區穩定，且變得像成人一樣[1]。人類腸微生物區含有多於 500-1000 種不同的演化型，其基本上屬於兩個主要細菌分類(擬桿菌門(Bacteroidetes)及厚壁菌門(Firmicutes))[2]。由人類腸之細菌移生引起的成功共生關係已經產生廣泛多種代謝、結構、保護、及其他有益功能。經移生之腸之代謝活動增強確保否則難消化之膳食組分降解，同時伴有副產物之釋放，由此提供用於宿主之重要營養源。類似地，腸微生物區之免疫學重要性為公認的，且在免疫系統受損之無菌動物中例證，該免疫系統在引入共生細菌後在功能上復原[3-5]。

【0003】 已在胃腸病症諸如炎性腸病(IBD)中記錄微生物區組成之顯著變化。例如，在 IBD 患者中，梭菌屬(*Clostridium*)群集 XIVa 細菌之水準降低，而大腸桿菌(*E. coli*)之數目增加，提示腸內共生生物與致病生物(pathobiont)之平衡的偏移[6-9]。

【0004】 鑒於某些細菌品系可對動物腸具有潛在的積極作用，已提出將各種品系用於治療各種疾病(參見例如[10-13])。同樣，已提出將某些品系(包括大多數乳桿菌(*Lactobacillus*)及雙叉桿菌(*Bifidobacterium*)品系)用於治療各種與腸無直接關聯的炎性及自體免疫疾病(參見[14]及[15]之綜述)。然而，不同疾病與不同細菌品系之間的關係，以及具體細菌品系對腸及在全身水準下及對任何具體類型疾病之確切作用尚未充分表徵，尤其是對神經退行性病症而言。

【0005】 最近，在關於可在人類腦部疾病中起病理生理學作用的腸微生物組之改變的技術方面的關注有所增加[16]。臨床前及臨床證據強烈表明腦部發育與微生物區之間的聯繫[17]。日益增多的臨床前文獻已說明腦與腸微生物組之間的雙向傳訊，其涉及多個神經分泌及內分泌傳訊系統。實際上，微生物組中增加水準的梭菌屬種與腦部病症相關聯[18]，且腦部發展病症中亦牽涉擬桿菌門及厚壁菌門之不平衡[19]。腸共生物之水準(包括雙叉桿菌屬、乳桿菌屬、薩特氏菌屬(*Sutterella*)、普雷沃氏菌屬(*Prevotella*)、及瘤胃球菌屬(*Ruminococcus*)之水準及產鹼桿菌科(*Alcaligenaceae*)之水準)改變涉及免疫介導之中樞神經系統(CNS)病症的提議受到研究質疑，該等研究表明患者與健康受試者之間的微生物區沒有變化[19]。亦已提出，投與益生菌可有益於治療神經病症。然而，這些研究無法推斷益生菌組成物本身是否可達成關於神經退化之治療益處且未顯示任何針對任何具體細菌之實用作用[20, 21]。這指示，目前，對微生物組與人類腦部疾病之間的關聯之實際作用的特徵描述還不夠。據此，需要更直接的分析研究來鑒別改變微生物組隊神經退行性病症的治療性影響。

【0006】 此項技術中需要新的治療神經退行性病症之方法。亦需要對腸細菌之潛在作用進行特徵描述，以便可開發出使用腸細菌之新療法。

【發明內容】

【0007】 發明人已開發出新的用於治療及預防神經退行性病症之療法。發明人已鑒別出，來自巨球型菌(*Megasphaera*)屬之細菌品系可有效治療神經退行性疾病。如實例中所述，投與包含芽孢巨球型菌(*Megasphaera massiliensis*)之組成物可保護免遭活性含氧物影響且預防炎症，因此充當神經保護劑。發明人亦已鑒別出，以芽孢巨球型菌之治療可減少促炎性分子諸如 NFκB 及 IL-6 被 LPS 及突變 α-突觸核蛋白活化。發明人已鑒別出，以芽孢巨球型菌之治療可減少體外組蛋白去乙醯活性及脂質過氧化，其可幫助減少細胞死亡及凋亡。發明人亦已鑒別出，芽孢巨球型菌可產生可減弱炎症及氧化壓力的吲哚。此外，發明人已證明，以芽孢巨球型菌之治療可增加犬尿胺酸水準。

【0008】 發明人亦鑒別出，芽孢巨球型菌產生某些有機酸，包括己酸、戊酸、及 4-羥苯基乙酸。發明人亦發現，芽孢巨球型菌可增加促炎性細胞介素 IL-8 之活化，從而可幫助促進神經元髓鞘形成。發明人亦鑒別出，以芽孢巨球型菌及視網酸之組合之治療可增加腦衍生神經營養因子(BDNF)之分泌，從而可幫助促進神經生成及神經突生及/或防止細胞死亡。發明人亦鑒別出，以可產生戊酸的芽孢巨球型菌之治療可減少組蛋白去乙醯，從而可幫助減少細胞死亡及凋亡。此外，發明人亦發現，芽孢巨球型菌可產生己酸，其可具有神經保護性或神經修復性，例如藉由促進神經突長出(neurite outgrowth)。發明人發現，可產生己酸的芽孢巨球型菌增加 MAP2 (微管締合蛋白 2)之表現，其被認為是神經突生成中微管形成所必需的。因此，發明人發現，可產生己酸的芽孢巨球型菌可用於促進神經突長出。芽孢巨球型菌及其他產生有機酸如己酸、戊酸、及 4-羥苯基乙酸之細菌因此可實用於治療神經退行性病症。

【0009】 在第一實施例中，本發明提供一種包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物，以用於療法中，諸如用於治療或預防神經退行性病症之方法。

【0010】 在具體實施例中，本發明提供一種包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物，該組成物用於治療或預防選自由以下組成之群之疾病或病況：帕金森氏病，包括進行性核上性麻痹、進行性核上性麻痹、斯蒂爾-瑞查森-歐爾雪夫斯基症候群、常壓性水腦症、血管性或動脈硬化性帕金森氏病、及藥物誘導之帕金森氏病；阿茲海默氏病，包括本森氏症候群；多發性硬化症；杭丁頓氏病；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症；路格里氏病；運動神經元病；普里昂疾病；脊髓小腦性失調症；脊髓性肌萎縮；失智症，包括路易士體性失智症、血管性失智症、及額顳葉型失智症；原發性進行性失語症；輕度認知障礙；HIV 相關之認知障礙；及皮質基底核退化症。

【0011】 在較佳實施例中，本發明提供一種包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物，該組成物用於治療或預防帕金森氏病，諸如環境性、家族性帕金森氏病、或與一般炎性狀態相關聯之帕金森氏病。發明人已鑒別出，以巨球型菌品系之治療可減少環境性及家族性帕金森氏病之體外模型中促炎性分子諸如 NFκB 及 IL-6 被 LPS 及突變 α-突觸核蛋白活化。在較佳實施例中，本發明提供一種包含芽孢巨球型菌種之細菌品系之組成物，該組成物用於治療帕金森氏病。使用芽孢巨球型菌之組成物可尤其有效治療帕金森氏病。

【0012】 在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防早發神經退行性疾病之方法。在一些實施例中，本發明之組成物係用於預防或延緩神經退行性病症之發作或進展之方法。

【0013】 在本發明之較佳實施例中，組成物中之細菌品系屬於芽孢巨球型菌。亦可使用密切相關之品系，諸如具有與芽孢巨球型菌之細菌品系之 16S rRNA 序列至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%一致的 16S rRNA 序列之細菌品系。較佳的是，細菌品系具有與 SEQ ID NO:1 或 2 至少

95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%一致的 16S rRNA 序列。較佳的是，序列一致性為相較於 SEQ ID NO:2 之序列一致性。較佳的是，用於本發明之細菌品系具有由 SEQ ID NO:2 表示之 16S rRNA 序列。

【0014】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於經口投與。經口投與本發明之品系可對神經退行性病症有效。再者，口服投與對於患者及從業者較為便利，且允許遞送至及/或部分或完全移生於腸。

【0015】 在某些實施例中，本發明之組成物包含一或多種醫藥上可接受之賦形劑或載劑。

【0016】 在某些實施例中，本發明之組成物包含已凍乾之細菌品系。凍乾為用於製備允許細菌遞送之穩定組成物的有效且便利的技術。

【0017】 在某些實施例中，本發明提供一種包含如上所述之組成物的食物產品。

【0018】 在某些實施例中，本發明提供一種包含如上所述之組成物的疫苗組成物。

【0019】 另外，本發明提供一種治療或預防神經退行性病症之方法，其包含投與包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物。

【0020】 在開發上文發明中，發明者已鑒別並表徵出尤其實用於療法之細菌品系。本發明之芽孢巨球型菌顯示有效治療本文所述之疾病，諸如神經退行性疾病。因此，在另一態樣中，本發明提供一種以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系或其衍生物之細胞。本發明亦提供包含此類細胞或此類細胞之生物純培養物之組成物。本發明亦提供以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系或其衍生物之細胞，以用於療法中，尤其是用於本文所述之疾病中。

【0021】 在本發明之某些實施例中，該組成物係用於治療腦損傷。本發明之組成物之神經保護活性及其減小組蛋白去乙醯酶活性(HDAC)水準之能力可使其實用於治療腦損傷。在較佳實施例中，本發明之組成物係用於治療中風，諸如治療由中風引起之腦損傷。

【圖式簡單說明】

【0022】 **圖 1**：神經胚細胞瘤細胞之細胞活力

【0023】 **圖 2**：IL-6 分泌之下調

【0024】 **圖 3**：IL-8 之分泌

【0025】 **圖 4**：α-突觸核蛋白誘導之 IL-6(圖 4A)及 IL-8(圖 4B)分泌之抑制

【0026】 **圖 5**：α-突觸核蛋白誘導之 NFκB 啟動子活化之抑制

【0027】 **圖 6**：LPS 誘導之 NFκB 啟動子活化之抑制

【0028】 **圖 7**：抗氧化能力之變化

【0029】 **圖 8**：總抗氧化能力(脂質氧化)之變化

【0030】 **圖 9**：組蛋白去乙醯酶(HDAC)活性之變化

【0031】 **圖 10**：吲哚產生之水準

【0032】 **圖 11**：犬尿胺酸產生之水準

【0033】 **圖 12**：紋狀體中平均多巴胺(DA)水準(圖 12A)、DOPAC 水準(圖 12B)、及 HVA 水準(12C)。數據顯示為平均值 + SEM。

【0034】 **圖 13**：促進神經突長出：光學顯微法及 MAP2 基因表現(圖 13A)，鬼筆環肽免疫螢光顯微法(圖 13B)

【0035】 **圖 14**：(a) U373 細胞及(b) SHSY-5Y 細胞中 ROS 水準之變化

【0036】 **圖 15**：神經保護 - 細胞活力。圖 15 顯示之資料與圖 1 相同。

【0037】 **圖 16** 全細胞及細胞溶解產物組蛋白去乙醯酶活性之品系誘導之變化(圖 16A)，組蛋白去乙醯酶活性之酸誘導之變化(圖 16B)，品系之代謝物產生(圖 16C)

【0038】 **圖 17**HDAC1 抑制(圖 17A)、HDAC2 抑制(圖 17B)、HDAC3 抑制(圖 17C)

【0039】 **圖 18**I 類 HDAC 之抑制(圖 18A)；HDAC1 之抑制(圖 18B)；HDAC2 之抑制(圖 18C)；HDAC3 之抑制(圖 18D)

【0040】 **圖 19**：BDNF 產生之水準

【0041】 **圖 20**：代謝物產生之水準 - 腦中之神經傳遞物

【0042】 **圖 21**：代謝物產生之水準 - 上清液中之有機酸

【0043】 **圖 22**：對腸障壁功能之作用。

【0044】 **圖 23**：腦中神經傳遞物之保護

【0045】 **圖 24**：海馬受體表現之變化 - A)催產素受體，B)升壓素受體，C)糖皮質素受體，及 D)礦皮質素受體

【0046】 **圖 25**：A)促腎上腺皮質素釋素(CRH)，B) BDNF 表現，及 C) TLR4 之海馬表現之變化

【0047】 **圖 26**：A)海馬促腎上腺皮質素釋素受體 1 (CRFR1)表現之變化及 B)促腎上腺皮質素釋素受體 2 (CRFR2)表現

【0048】 **圖 27**：A)腫瘤壞死因子，B)介白素 1b，及 C) IL-6 之海馬表現之變化

【0049】 **圖 28**：A)海馬整合素 α M (CD11b)表現之變化及 B)海馬血清素 1A 受體(5-HT1A 受體)表現之變化

【0050】 **圖 29**：A)海馬麩胺酸鹽離子型(Ionotropic)受體 NMDA 型離子亞單元 2A (Grin2A)之變化及 B)麩胺酸鹽離子型受體 NMDA 型離子亞單元 2B (Grin2B)表現

【0051】 **圖 30**：A) γ-胺基丁酸 A 受體 2 (GABA A2)，B) γ-胺基丁酸 B 受體 1 (GABA BR1)，及 C)多巴胺受體 1 (DRD1)之海馬表現之變化

【0052】 **圖 31**：扁桃體受體表現之變化 - A)催產素受體，B)升壓素受體，C)糖皮質素受體，及 D)礦皮質素受體

【0053】 **圖 32**：A)大腦衍生神經滋養因數(BDNF)，B)類鐸受體 4 (TLR-4)，C)促腎上腺皮質素釋素受體 1 (CRFR1)，及 D)促腎上腺皮質素釋素受體 2 (CRFR2)之扁桃體表現之變化

【0054】 **圖 33**：A)整合素 α M (CD11b)，B)介白素-6 (IL-6)，C)麩胺酸鹽離子型受體 NMDA 型離子亞單元 2A (Grin2A)，及 D)麩胺酸鹽離子型受體 NMDA 型離子亞單元 2B (Grin2B)之扁桃體表現之變化

【0055】 **圖 34**：A) GABA-A 受體 α 2 離子亞單元(GABRA2)，B) GABA-A B 型受體 1 離子亞單元(GABBR1)，及 C)多巴胺受體 1 (DRD1)之扁桃體表現之變化

【0056】 **圖 35**：A)催產素受體，B)大腦衍生神經滋養因數(BDNF)，C)礦皮質素受體，及 D)糖皮質素受體之前額葉皮質表現之變化

【0057】 **圖 36**：A)類鐸受體 4 (TLR-4)，B)促腎上腺皮質素釋素受體 1 (CRFR1)，C)促腎上腺皮質素釋素受體 2 (CRFR2)及 D)整合素 α M (CD11b)之前額葉皮質表現之變化

【0058】 **圖 37**：A)介白素-6 (IL-6)，B)麩胺酸鹽離子型受體 NMDA 型離子亞單元 2A (Grin2A)，C)麩胺酸鹽離子型受體 NMDA 型離子亞單元 2B

(Grin2B)，及 D) GABA-A 受體 α 2 離子亞單元(GABRA2)之前額葉皮質表現之變化

【0059】 **圖 38**：A) GABA-A 受體 B 型受體離子亞單元 1 (GABBR1)及 B)多巴胺受體 1 (DRD1)之前額葉皮質表現之變化

【0060】 **圖 39**：A)色胺酸氫化酶-1 (Tph1)及 B)吲哚胺 2,3-二氧酶-1 (IDO1)之結腸表現之變化

【0061】 **圖 40**：A)色胺酸氫化酶-1 (Tph1)及 B)吲哚胺 2,3-二氧酶-1 (IDO1)之回腸表現之變化

【0062】 **圖 41**：計算色胺酸代謝物水準 A)犬尿胺酸，B)色胺酸，及 C)犬尿胺酸/色胺酸代謝指數之變化

【0063】 **圖 42**：對飼喂 MRx0029 之小鼠之小鼠脾細胞之干擾素-γ 產生之作用

【0064】 **圖 43**：對脾細胞之介白素-1β 產生之作用

【0065】 **圖 44**：對脾細胞之介白素-6 產生之作用

【0066】 **圖 45**：對脾細胞之腫瘤壞死因子產生之作用

【0067】 **圖 46**：對脾細胞之介白素-10 產生之作用

【0068】 **圖 47**：對脾細胞之化學吸引因數 CXCL1 產生之作用

【0069】 **圖 48**：盲腸短鏈脂肪酸水準之變化

【0070】 **圖 49**：肌動蛋白、絨毛蛋白、密封蛋白 TJP1、TJP2、MAP2、DRD2、GABRB3、SYP、PINK1、PARK7、及 NSE 之基因表現水準之 MRx0029 及 MRX005 誘導之變化。

【0071】 **圖 50**：MRx0005 及 MRx0029 誘導之 SHSY5Y 細胞分化。(A-C)以鬼筆環肽(Phalloidin)及 MAP2 之免疫標記細胞之代表性影像。(D-F) A-C 與

DAPI 影像合併之影像。(G-I) β3 微管蛋白免疫標記細胞。(J-L)與 DAPI 影像合併。放大率 x630。M-N) MRx0005 及 MRx0029 處理對 SHSY5Y 細胞之作用之西方墨點法分析。以對 MAP2 (M)即 b3 微管蛋白(N)之抗體探索西方墨點膜。將肌動蛋白用作上樣對照。下圖：六個單獨實驗之一之代表性墨點；上圖：相對密度強度。

【實施方式】

細菌品系

【0072】 本發明之組成物包含巨球型菌屬之細菌品系。實例說明，此屬之細菌實用於治療或預防神經退行性病症。較佳細菌品系屬於芽孢巨球型菌種。

【0073】 用於本發明之巨球型菌種之實例包括埃氏巨球型菌(*Megasphaera elsdenii*)、釀酒巨球型菌(*Megasphaera cerevisiae*)、芽孢巨球型菌、印度巨球型菌(*Megasphaera indica*)、少食巨球型菌(Megasphaera paucivorans)、瑞典巨球型菌 (Megasphaera sueciensis) 、及小核桃形巨球型菌 (*Megasphaera micronuciformis*)。用於本發明之巨球型菌種之另一實例為己酸巨球型菌(*Megasphaera hexanoica*)。巨球型菌為反芻動物或非反芻動物(包括人類)之專性厭氧、乳酸發酵的胃腸微生物。

【0074】 芽孢巨球型菌(*M. massiliensis*)之模式品系為 NP3 (=CSUR P245=DSM 26228)[22]。芽孢巨球型菌品系 NP3 之 16S rRNA 基因序列之 GenBank 登錄號為 JX424772.1 (本文揭示為 SEQ ID NO:1)。

【0075】 實例中所測試之芽孢巨球型菌細菌在本文稱為品系 MRx0029。SEQ ID NO:2 中提供所測試之 MRx0029 品系之 16S rRNA 序列。

【0076】 品系 MRx0029 於 2017 年 7 月 13 日作為「芽孢巨球型菌 MRx0029」由 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building,

Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)寄存於國際寄存機構 NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)，且經分配登錄號 NCIMB 42787。

【0077】 亦預期與實例中測試之品系密切相關之細菌品系有效治療或預防神經退行性病症。在某些實施例中，用於本發明中之細菌品系具有與芽孢巨球型菌之細菌品系之 16S rRNA 序列至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%一致的 16S rRNA 序列。較佳的是，用於本發明中之細菌品系具有與 SEQ ID NO:1 或 2 至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%一致的 16S rRNA 序列。較佳的是，序列一致性為相較於 SEQ ID NO:2 之序列一致性。較佳的是，用於本發明之細菌品系具有由 SEQ ID NO:2 表示之 16S rRNA 序列。

【0078】 亦預期作為品系 MRx0029 或 NP3 之生物型的細菌品系有效治療或預防神經退行性病症。生物型為具有相同或非常相似的生理及生化特徵之緊密相關之品系。

【0079】 作為品系 MRx0029 或 NP3 之生物型且合適用於本發明之品系可藉由對品系 MRx0029 或 NP3 之其他核苷酸序列進行測序來鑒別。例如，實質上可對全基因組進行定序，且用於本發明中之生物型品系可在其全基因組之至少 80%內(例如，在至少 85%、90%、95%、或 99%內，或在其全基因組內)具有至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%序列一致性。用於鑒別生物型品系之其他合適序列可包括 hsp60 或重複序列，諸如 BOX、ERIC、$(GTG)_5$ 或 REP 或[23]。生物型品系可具有與品系 MRx0029 或 NP3 之相應序列具有至少 95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、或 99.9%序列一致性的序列。

【0080】 或者，作為以品系 MRx0029 或 NP3 之生物型且合適用於本發明中之品系可藉由使用品系 MRx0029 或 NP3 及限制片段分析及/或 PCR 分析，例如藉由使用螢光擴增片段長度多型性(FAFLP)及重複 DNA 元件(rep)-PCR 指紋分析或蛋白剖析或部分 16S 或 23S rDNA 定序來鑒別。在較佳實施例中，此類技術可用於鑒別其他芽孢巨球型菌品系。

【0081】 在某些實施例中，當藉由擴增之核糖體 DNA 限制分析(ARDRA)來分析時，例如當使用 Sau3AI 限制酶時(對於示範性方法及指導，參見例如[24])，作為以品系 MRx0029 或 NP3 之生物型且合適用於本發明中之品系為提供與品系 MRx0029 或 NP3 相同的模式之品系。或者，將生物型品系鑒別為具有與品系 MRx0029 或 NP3 相同碳水化合物發酵模式之品系。

【0082】 實用於本發明之組成物及方法中之其他巨球型菌品系，諸如品系 MRx0029 或 NP3 之生物型，可使用任何適當方法或策略(包括實例中所述之檢定)來鑒別。例如，用於本發明之品系可藉由與神經胚細胞瘤細胞一起培養，然後評定神經保護或神經增生之細胞介素水準來鑒別。具體而言，細菌品系與以品系 MRx0029 或 NP3 具有類似生長模式、代謝類型、及/或表面抗原之細菌品系可實用於本發明中。實用之品系將具有與品系 MRx0029 或 NP3 相當的免疫調節活性。具體而言，生物型品系將對神經退行性疾病模型產生與實例中所示效果相當之效果且對細胞介素水準產生與實例中所示效果相當之效果，此可藉由使用實例中所述之培養及投與方案來鑒別。

【0083】 本發明之尤其較佳品系為芽孢巨球型菌 MRx0029 品系。此為實例中測試之示範性品系且經顯示有效治療疾病。因此，本發明提供芽孢巨球型菌品系 MRx0029 或其衍生物之細胞(諸如經單離之細胞)。本發明亦提供包含芽孢巨球型菌品系 MRx0029 或其衍生物之細胞之組成物。本發明亦提供芽孢巨球

型菌品系 MRx0029 之生物純培養物。本發明亦提供芽孢巨球型菌品系 MRx0029 或其衍生物之細胞，以用於療法中，尤其是用於本文所述之疾病中。

【0084】 本發明之一尤其較佳品系為以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系。此為實例中測試之示範性 MRx0029 品系且經顯示有效治療疾病。因此，本發明提供以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系或其衍生物之細胞(諸如經單離之細胞)。本發明亦提供包含以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系或其衍生物之細胞之組成物。本發明亦提供以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系之生物純培養物。本發明亦提供以登錄號 NCIMB 42787 寄存之芽孢巨球型菌品系或其衍生物之細胞，以用於療法中，尤其是用於本文所述之疾病中。

【0085】 本發明之品系之衍生物可為子代品系(後代)或自原始品系培養(次選殖)之品系。本發明之品系之衍生物可例如在遺傳層面上進行修飾，而不消除生物活性。具體而言，本發明之衍生品系具有治療活性。衍生品系將具有與 MRx0029 品系相當的治療活性。具體而言，衍生品系將對神經退行性疾病模型產生與實例中所示效果相當之效果且對細胞介素水準產生與實例中所示效果相當之效果，此可藉由使用實例中所述之培養及投與方案來鑒別。MRx0029 品系之衍生物通常將為 MRx0029 品系之生物型。

【0086】 對芽孢巨球型菌 MRx0029 品系之細胞的提及涵蓋與品系 MRx0029 具有相同安全性及治療功效特徵的任何細胞，且此類細胞由本發明所涵蓋。

【0087】 在較佳實施例中，本發明組合物中之細菌品系為有生活力的，且能夠部分或完全移生於腸。

【0088】 發明人已發現，芽孢巨球型菌品系減少炎性細胞介素諸如 IL-6 之活化且增加炎性細胞介素 IL-8 之活化。IL-8 牽涉髓鞘形成[25]。由 IL-6 誘導之慢

性炎症最後可引起細胞死亡。因此，本發明之細菌品系尤其實用於治療或預防神經退行性病症。在一些實施例中，細菌品系實用於治療特徵在於 IL-6 之活化增強之病況。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防特徵在於脫髓鞘之神經退行性疾病。許多神經退行性疾病之特徵在於脫髓鞘。脫髓鞘阻礙神經元內動作電位之傳播，影響神經系統內之有效通信。已顯示 IL-8 確實有助於髓鞘形成及修復。因此，本發明之組成物尤其有利於治療或預防特徵在於脫髓鞘之神經退行性病症諸如多發性硬化症。

【0089】 發明人已發現，本發明之芽孢巨球型菌品系減輕疾病模型中神經退行性疾病之症狀。例如，發明人已發現，芽孢巨球型菌品系促進體外神經突長出，且因此可用於促進神經元恢復以供治療或預防神經退行性疾病。因此，本發明之細菌品系係用於治療或預防神經退行性疾病。

【0090】 發明人亦發現，本發明之細菌品系增加 BDNF 之活化。BDNF 為已顯示增強神經元分化及存活之神經營養生長因子。因此，本發明之組成物可用於在治療或預防神經退行性疾病中增強神經細胞存活之方法。

【0091】 可用於本發明之組成物之另一細菌為人羅斯拜瑞氏菌(*Parabacteroides distasonis*)種。實例說明，吉氏副類桿菌及芽孢巨球型菌均具有神經保護活性，但產生不同的代謝物，且可具有不同的作用機制及特定神經保護活性。因此，這些種當組合使用時可尤其有效。在較佳實施例中，該組成物包含吉氏副類桿菌種之品系及芽孢巨球型菌種之品系。

【0092】 以登錄號 NCIMB 42382 寄存之吉氏副類桿菌細菌於實例中經測試且亦在本文指代為品系 MRx0005。MRX0005、MRX005、MRx005、及 MRx0005 在本文可互換使用。SEQ ID NO:17 中提供所測試之 MRx0005 品系之 16S rRNA 序列。品系 MRx0005 於 2015 年 3 月 12 日作為「副類桿菌種 755」

由 GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scotland)寄存於國際寄存機構 NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scotland)，且經分配登錄號 NCIMB 42382。GT Biologics Ltd.隨後更名為 4D Pharma Research Limited。

【0093】 在較佳實施例中，本發明提供一種組成物，其包含以登錄號 NCIMB 42787 在 NCIMB 寄存之品系或其衍生物或生物型及以登錄號 NCIMB 42382 在 NCIMB 寄存之品系或其衍生物或生物型，該組成物較佳用於療法，較佳用於治療神經退行性疾病諸如帕金森氏病。

治療用途

【0094】 如實例中所說明，本發明之細菌組成物有效治療神經退行性病症。具體而言，以本發明之組成物之治療增加神經增生且充當對抗破壞多巴胺能神經元之藥劑之神經保護劑。因此，本發明之組成物可實用於治療或預防由神經元死亡所致的神經退行性病症。

【0095】 本發明之組成物可降低活化細胞介素(例如 IL-1β、IL-1α、IL-18、TNFα、及 IL-6)產生之 NFκB 啟動子之活化。以突變 α-突觸核蛋白治療細胞為家族性帕金森氏病之模型。在位置 53 腺嘌呤至蘇胺酸之點突變引起 α-突觸核蛋白錯誤折疊。不正確折疊之 α-突觸核蛋白隨後聚集成不溶性原纖維，其形成路易士體。因此，本發明之組成物可實用於治療或預防由神經炎症、蛋白錯誤折疊、及/或環境暴露引起之神經退行性病症。本發明之組成物可用於治療家族性帕金森氏病。NFκB 啟動子之活化係透過 TLR4 配體來介導。已知 TLR4 介導模擬帕金森氏病之小鼠模型 MPTP 中之細胞死亡。本發明之組成物可用於抑制 TLR4 傳訊以活化 NFκB 啟動子之能力。在對於 PD 之具體相關性中，發現 PD

患者之腦中 TLR2 及 TLR4 經上調[26]。此外 α-syn 已被描述為 TLR2 之配體[27]且已使用 HEK-TLR4 細胞說明 α-syn 亦為 TLR4 之配體[28]。

【0096】 本發明之組成物減少由脂多醣(LPS)誘導之促炎性細胞介素諸如 IL-6 之分泌。以 LPS 治療細胞模擬由環境因素引起之帕金森氏病。本發明之組成物可用於減少 IL-6 分泌。本發明之組成物可用於治療環境性帕金森氏病。

【0097】 欲藉由本發明之組成物治療之神經退行性疾病之實例包括：帕金森氏病，包括進行性核上性麻痹、進行性核上性麻痹、斯蒂爾-瑞查森-歐爾雪夫斯基症候群、常壓性水腦症、血管性或動脈硬化性帕金森氏病、及藥物誘導之帕金森氏病；阿茲海默氏病，包括本森氏症候群；多發性硬化症；杭丁頓氏病；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症；路格里氏病；運動神經元病；普里昂疾病；脊髓小腦性失調症；脊髓性肌萎縮；失智症，包括路易士體性失智症、血管性失智症、及額顳葉型失智症；原發性進行性失語症；輕度認知障礙；HIV 相關之認知障礙；及皮質基底核退化症。欲藉由本發明之組成物治療之另一疾病為進行性炎性神經病變。

【0098】 在某些實施例中，本發明之組成物用於具體而言在治療神經退行性病症中減少神經元死亡。在某些實施例中，本發明之組成物用於具體而言在治療神經退行性病症中保護神經元。

【0099】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於減少或預防黑質中多巴胺細胞之損失。在某些實施例中，本發明之組成物係用於減少或預防黑質緻密部中多巴胺神經元之退化。在某些實施例中，本發明之組成物係用於減少或預防黑質緻密部中多巴胺神經元之退化及因而紋狀體中其投射神經纖維之損失。在某些實施例中，本發明之組成物係用於減少或預防黑質紋狀體多巴胺神經元之損失。

【0100】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於增加多巴胺水準。在某些實施例中，本發明之組成物係用於增加 DOPAC (3,4-二羥苯基乙酸)水準。在某些實施例中，本發明之組成物係用於增加多巴胺及 DOPAC 水準。在某些實施例中，紋狀體中多巴胺及/或 DOPAC 水準係增加的。多巴胺及 DOPAC 水準可使用此項技術中已知的任何適當方法來測量，諸如放射酶方法，例如在血漿或 CSF 中，(例如，如[29]中所述)；或逆相 HPLC 法，或許在電化學偵測之情況下，例如在血漿或 CSF 中 (例如，如[30]中所述)。

【0101】 如實例中所示之本發明之組成物之神經保護性質意謂，該等組成物可尤其有效治療神經退行性病症或延遲其發作或進展。在某些實施例中，本發明之組成物用於延遲神經退行性病症之發作或進展。

【0102】 本發明之組成物可增加 IL-8 之分泌。已顯示 IL-8 在神經元髓鞘形成中起作用。在一些實施例中，本發明之組成物可用於增加 IL-8 分泌。

【0103】 本發明之治療性組成物可增加 BDNF 之活化。BDNF 對中樞神經系統之某些神經元起作用以支持現有神經元之存活並幫助新神經元及突觸之生長及發展。BDNF 在海馬體、皮質、及前腦基體中具有活性，且對於長期記憶來說是重要的。因此本發明之組成物可用於增加 BDNF 之分泌。該等組成物可因此用於治療與長期記憶之障礙相關之神經退行性疾病。本發明之組成物可用於改善長期記憶，尤其用於改善受神經退行性疾病損害之長期記憶。

【0104】 在某些實施例中，本發明之組成物增加神經元細胞中粒線體代謝活性。

微生物區-腸-腦軸之調節

【0105】 腸與腦之間的通信(微生物區-腸-腦軸)經由雙向神經液遞通信系統而發生。最近的證據顯示，位於腸中之微生物區可調節腦發育且經由微生物區-

腸-腦軸產生行為表型。實際上，許多評述表明微生物區-腸-腦軸在維持中樞神經系統功能性中之作用且暗示微生物區-腸-腦軸在中樞神經系統病症及病況之發展中之功能異常[16],[19],[31]。

【0106】 腦與腸之間的雙向通信(亦即，腸-腦軸)包括中樞神經系統、神經內分泌系統、及神經免疫系統，包括下視丘-垂體-腎上腺(HPA)軸、自主神經系統(ANS)之交感及副交感臂(包括腸神經系統(ENS)及迷走神經)、及腸微生物區。

【0107】 如實例中所說明，本發明之組成物可調節微生物區-腸-腦軸且減少與神經退行性病症相關之細胞死亡。據此，本發明之組成物可實用於治療或預防神經退行性病症，尤其是與微生物區-腸-腦軸之功能異常相關之病症及病況。

【0108】 在具體實施例中，本發明之組成物可實用於治療或預防選自由以下組成之疾病或病況：帕金森氏病，包括進行性核上性麻痹、進行性核上性麻痹、斯蒂爾-瑞查森-歐爾雪夫斯基症候群、常壓性水腦症、血管性或動脈硬化性帕金森氏病、及藥物誘導之帕金森氏病；阿茲海默氏病，包括本森氏症候群；多發性硬化症；杭丁頓氏病；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症；路格里氏病；運動神經元病；普里昂疾病；脊髓小腦性失調症；脊髓性肌萎縮；失智症，包括路易士體性失智症、血管性失智症、及額顳葉型失智症；原發性進行性失語症；輕度認知障礙；HIV 相關之認知障礙；及皮質基底核退化症。

【0109】 本發明之組成物可尤其實用於治療或預防慢性疾病，治療或預防對其他療法(諸如以左旋多巴(Levodopa)、多巴胺促效劑、MAO-B 抑制劑、COMT 抑制劑、麩胺酸鹽拮抗劑、及/或抗膽鹼劑之治療)沒有反應的患者之疾病，及/或治療或預防與微生物區-腸-腦軸之功能異常相關之組織損傷及症狀。

【0110】 在某些實施例中，本發明之組成物調節 CNS。在一些實施例中，本發明之組成物調節自主神經系統(ANS)。在一些實施例中，本發明之組成物調節腸神經系統(ENS)。在一些實施例中，本發明之組成物調節下視丘-垂體-腎上腺(HPA)軸。在一些實施例中，本發明之組成物調節神經內分泌路徑。在一些實施例中，本發明之組成物調節神經免疫路徑。在一些實施例中，本發明之組成物調節 CNS、ANS、ENS、HPA 軸、及/或神經內分泌及神經免疫路徑。在某些實施例中，本發明之組成物調節共生代謝物之水準及/或受試者之胃腸滲透性。

【0111】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由神經系統調節。據此，在一些實施例中，本發明之組成物調節神經系統中之傳訊。在某些實施例中，本發明之組成物調節中樞神經系統之傳訊。在一些實施例中，本發明之組成物調節感覺神經元中之傳訊。在其他實施例中，本發明之組成物調節運動神經元中之傳訊。在一些實施例中，本發明之組成物調節 ANS 中之傳訊。在一些實施例中，ANS 為副交感神經系統。在較佳實施例中，本發明之組成物調節迷走神經之傳訊。在其他實施例中，ANS 為交感神經系統。在其他實施例中，本發明之組成物調節腸神經系統之傳訊。在某些實施例中，ANS 及 ENS 神經元之傳訊對胃腸道之管腔內容物有直接反應。在其他實施例中，ANS 及 ENS 神經元之傳訊對管腔細菌所產生之神經化學物質有間接反應。在其他實施例中，ANS 及 ENS 神經元之傳訊對管腔細菌及腸內分泌細胞所產生之神經化學物質有反應。在某些較佳實施例中，ENS 之神經元活化影響 CNS 之功能之迷走神經傳入(vagal afferent)。在一些實施例中，本發明之組成物調控腸親鉻細胞之活性。

神經退行性疾病

帕金森氏病

【0112】 帕金森氏病為神經病理學特徵在於異質神經細胞群體(產多巴胺細胞)之退化的常見神經退行性疾病。帕金森氏病之臨床診斷需要運動遲緩及以下核心症狀之至少一者：靜止性震顫；肌強硬；及姿勢反射障礙。可在疾病之進展期間存在或發展的其他徵象及症狀為自主紊亂(過度流口水症(sialorrhoea)、皮脂漏、便秘、排尿紊亂、性功能、起立性低血壓、多汗症(hyperhydrosis))、睡眠紊亂、及嗅覺或對溫度感覺的紊亂。帕金森氏病為可由於微生物區-腸-腦軸之功能異常而發展或持續的神經退行性疾病。因此，在較佳實施例中，本發明之組成物用於治療或預防受試者之帕金森氏病。

【0113】 在另外較佳實施例中，本發明提供一種包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物，其用於治療或預防帕金森氏病之方法。包含巨球型菌屬之細菌品系之組成物可改善帕金森氏病模型之運動及認知功能。以巨球型菌品系之治療可調節中樞、自主、及腸神經體統中之傳訊；可調節 HPA 軸路徑之活性；可調節神經內分泌及/或神經免疫路徑；且可調節受試者之共生代謝物、炎性標誌物、及/或胃腸滲透性之水準，其所有均牽涉帕金森氏病之神經病理學。在較佳實施例中，本發明提供一種包含芽孢巨球型菌種之細菌品系之組成物，其用於治療或預防帕金森氏病之方法。使用芽孢巨球型菌之組成物可尤其有效治療帕金森氏病。

【0114】 在較佳實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之帕金森氏病之一或多個症狀。在較佳實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之帕金森氏病之一或多個核心症狀。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之運動遲緩。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之靜止性震顫；肌強硬；及/或姿勢反射障礙。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕一或多個與選自以下之帕

金森氏病進展相關之症狀：自主紊亂(過度流口水症、皮脂漏、便秘、排尿紊亂、性功能、起立性低血壓、多汗症)、睡眠紊亂、及嗅覺或對溫度感覺的紊亂。

【0115】 在較佳實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕與帕金森氏病併發之憂鬱症狀。在某些實施例中，本發明之組成物改善語文記憶及/或執行功能。在某些實施例中，本發明之組成物改善注意、工作記憶、語文流暢性、及/或焦慮。

【0116】 在其他較佳實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕與帕金森氏病併發之認知功能異常。

【0117】 在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕帕金森氏病進展。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕晚年運動併發症。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕晚年運動波動。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕神經元損失。在某些實施例中，本發明之組成物改善帕金森氏病失智症(PDD)之症狀。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕執行功能、注意、及/或工作記憶之障礙。在某些實施例中，本發明之組成物改善多巴胺神經傳遞。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受損之多巴胺神經傳遞。

【0118】 在一些實施例中，根據症狀或診斷量表，本發明之組成物改善帕金森氏病之症狀。在某些實施例中，用於評定帕金森氏病之運動功能之症狀改善之測試為統一帕金森氏病評定量表(Unified Parkinson's Disease Rating Scale)。具體而言，UPDRS II 考慮到日常生活活動性，且 UPDRS III 考慮到運動檢查。

【0119】 在一些實施例中，根據症狀或診斷測試及/或量表，本發明之組成物改善與 PDD 相關之症狀。在某些實施例中，測試或量表選自：霍普金斯詞匯

學習測驗-修訂版(the Hopkins Verbal Learning Test - Revised, HVLT-R)；戴利斯-卡普蘭執行功能系統(D-KEFS)色字干擾測試(Delis-Kaplan Executive Function System (D-KEFS) Color-Word Interference Test)；漢氏抑鬱評定量表(Hamilton Depression Rating Scale, HAM-D 17；抑鬱)；漢氏焦慮評定量表(Hamilton Anxiety Rating Scale, HAM-A；焦慮)；及統一帕金森氏病評定量表(UPDRS；PD 症狀嚴重性)。

【0120】 在一些實施例中，本發明之組成物改善用於評定精神及神經病症之臨床整體印象-整體改善(Clinical Global Impression - Global Improvement, CGI-I)量表。在一些實施例中，本發明之組成物顯示對具有帕金森氏病之受試者之整體社交及職業障礙之積極效應。

【0121】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及減少或預防黑質中多巴胺細胞之損失。在某些實施例中，本發明之組成物係用於在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及減少或預防黑質緻密部中多巴胺神經元之退化。在某些實施例中，本發明之組成物係用於在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及減少或預防黑質緻密部中多巴胺神經元之退化及因而紋狀體中其投射神經元之損失。在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及減少或預防黑質紋狀體多巴胺神經元之損失。

【0122】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及增加多巴胺水準。在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用

途涉及增加 DOPAC 水準。在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療或預防受試者之神經病症諸如帕金森氏病，其中該用途涉及增加多巴胺及 DOPAC 水準。在某些實施例中，紋狀體中多巴胺及/或 DOPAC 水準係增加的。

阿茲海默氏病及失智症

【0123】 在 DSM-5 中，將術語失智症以術語重性神經認知病症及輕度神經認知病症置換。神經認知病症為精神疾病之異質類別。最常見的神經認知病症為阿茲海默氏病，其次為血管失智症，或兩者之混合形式。神經退行性病症之其他形式(例如路易士體疾病、額顳葉型失智症、帕金森氏失智症、庫賈氏(Creutzfeldt-Jakob)病、杭丁頓氏病、及魏尼凱-高沙可夫(Wernicke-Korsakoff)症候群)伴隨著失智症。

【0124】 阿茲海默氏病及失智症亦特徵在於神經元損失，所以本發明之組成物之實例中所示之神經保護及神經增殖效應指示，其可實用於治療或預防這些病況。

【0125】 根據 DSM-5 之失智症之症狀標準為與選自以下之一或多個認知領域中之先前表現水準相比之顯著認知下降之證據：學習及記憶；語言；執行功能；注意力；知覺-運動；及社會認知。認知缺乏必定干擾日常活動之獨立性。此外，認知缺乏不僅發生於譫妄之情形，而且不被另一精神病症(例如 MDD 或思覺失調症)更好地解釋。

【0126】 除原發性症狀之外，具有神經退行性病症之受試者顯示包括以下之行為及精神症狀：精神激動、攻擊、抑鬱、焦慮、冷漠、精神病、及睡眠清醒週期紊亂。

【0127】 神經退行性病症可由於微生物區-腸-腦軸之功能異常而發展或持續。因此，在較佳實施例中，本發明之組成物用於治療或預防受試者之神經退

行性病症。在較佳實施例中，神經退行性病症為阿茲海默氏病。在其他實施例中，神經退行性病症選自：血管失智症；阿茲海默氏病及血管失智症之混合形式；路易士體病；額顳葉型失智症；帕金森氏失智症；庫賈氏病；杭丁頓氏病；及魏尼凱-高沙可夫症候群。

【0128】 在較佳實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之神經退行性病症之一或多個症狀。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之認知下降至發生。在某些實施例中，本發明之組成物改善一或多個選自以下之認知領域中具有神經退行性病症之受試者之表現水準：學習及記憶；語言；執行功能；注意力；知覺-運動；及社會認知。在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕與選自以下之神經退行性病症有關之一或多個行為及精神症狀之發生：精神激動、攻擊、抑鬱、焦慮、冷漠、精神病、及睡眠清醒週期紊亂。

【0129】 在某些實施例中，本發明之組成物藉由在臨床前階段之懷疑致病機制中之介入來預防、減少、或減輕症狀性疾病。在某些實施例中，本發明之組成物改善疾病改進(disease modification)，即症狀進展之減慢或停止。在一些實施例中，症狀進展之減慢或停止與延緩潛在神經病理學過程中之證據相關。在較佳實施例中，本發明之組成物改善神經退行性病症之症狀，其包含認知增強及功能改善。在較佳實施例中，本發明之組成物改善失智症之行為及精神症狀(BPSD)。在較佳實施例中，本發明之組成物改善具有神經退行性病症之受試者進行日常活動之能力。

【0130】 在較佳實施例中，本發明之組成物改善具有阿茲海默氏病之受試者之認知及功能。在一些實施例中，本發明之組成物改善具有阿茲海默氏病之受試者之認知終點。在一些實施例中，本發明之組成物改善具有阿茲海默氏病之

受試者之功能終點。在較佳實施例中，本發明之組成物改善具有阿茲海默氏病之受試者之認知及功能終點。在另外較佳實施例中，本發明之組成物改善具有阿茲海默氏病之受試者之總體臨床反應(整體終點)。

【0131】 在一些實施例中，根據症狀或診斷測試，本發明之組成物改善神經退行性病症之症狀。在某些實施例中，用於評定阿茲海默氏病(及其他神經退行性病症)之症狀改善之測試選自：客觀認知；日常生活活動；變化之整體評定；健康相關生活品質測試；及評定神經退行性病症之行為及精神症狀之測試。

【0132】 在某些實施例中，用於評定症狀改善之客觀認知測試使用阿茲海默氏病評定量表認知子量表(ADAS-cog)及經典 ADAS 量表。在某些實施例中，使用用於阿茲海默氏病之神經生理學測試組合(Neurophysiological Test Battery, NTB)評定認知之症狀改善。

【0133】 在一些實施例中，變化之整體評定測試使用用於評定精神及神經病症之臨床整體印象-整體改善量表。在一些實施例中，整體量表為基於臨床醫師訪視之印象變化加(Clinician's Interview Based Impression of Change plus, CIBIC-plus)。在一些實施例中，整體量表為阿茲海默氏病合作研究單位臨床醫師整體印象變化(Alzheimer's Disease Cooperative Study Unit Clinician's Global Impression of Change, ADCS-CGIC)。

【0134】 在某些實施例中，健康相關生活品質量度為阿茲海默氏病相關 QOL (ADRQL)及 QOL-阿茲海默氏病(QOL-AD)。

【0135】 在某些實施例中，評定神經退行性病症之行為及精神症狀之測試選自：阿茲海默氏病行為病理學評定量表(Behavioural pathology in Alzheimer's Disease Rating Scale, BEHAVE-AD)；失智症行為評定量表(BRSD)；神經精神量

表(Neuropsychiatric Inventory, NPI)；及柯恩-曼斯菲爾德激動情緒行為量表(Cohen-Mansfield Agitation Inventory, CMAI)。

【0136】 在一些實施例中，當與另一用於治療神經退行性病症之療法組合使用時，本發明之組成物尤其有效預防、減少、或減輕神經退行性病症。在某些實施例中，此類療法包括乙醯膽鹼酯酶抑制劑(包括多奈派齊(donepezil, Aricept®)、加蘭他敏(galantamine, Razadyne®)、及利佛斯狄明(rivastigmine, Exelon®))及美金剛胺。

多發性硬化症

【0137】 多發性硬化症(MS)為腦及脊髓中髓鞘周圍神經元受損之髓鞘脫失疾病。MS 之確切潛在病因為未知的，但認為在個體之間是不同的。MS 之某些形式為遺傳性的。亦認為環境因素導致 MS。在一些個體中，遺傳及環境因素之組合可觸發 MS 之發作。

【0138】 有多種與 MS 相關之症狀。受試者可表現出與自主、視覺、運動、或感覺控制之障礙相關之幾乎任何神經症狀。確切症狀將取決於神經元損傷/脫髓鞘之部位而有所不同。

【0139】 IL-8 牽涉髓鞘之形成。本發明之組成物因此可用於具有 MS 之受試者之神經元之髓鞘再生。本發明之組成物亦可用於保護神經元免遭脫髓鞘。換言之，本發明之組成物可用於藉由恢復神經元髓鞘或預防神經元髓鞘之損失來治療或預防多發性硬化症之方法。

【0140】 在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之 MS 之一或多個症狀。在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之疲勞。在某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕受試者之靜止性震顫、肌肉無力、肌肉痙攣、肌肉僵硬、感覺異常、及/或失調症。在

某些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕一或多個選自由以下組成之清單之與 MS 進展相關之症狀：自主紊亂(便秘、排尿紊亂、性功能、吞嚥困難、發音不良、暈厥、眩暈、及/或暈眩)；睡眠紊亂；及嗅覺或對溫度感覺的紊亂。在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕一或多個與 MS 相關之眼睛症狀。在一些實施例中，眼睛症狀選自由以下組成之清單：受試者之視力損失、眼睛疼痛、色盲、雙瞳、及/或不隨意眼睛移動。

【0141】 在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕暈眩、眩暈、神經性疼痛、肌肉骨骼疼痛、認知功能異常、糞便失禁、吞嚥困難、發音不良、或其任何組合。

【0142】 在一些實施例中，本發明之組成物預防、減少、或減輕與 MS 併發之憂鬱症狀或焦慮。

【0143】 在一些實施例中，使用診斷 MS 之 2017 McDonald 標準確定症狀之改良。

【0144】 在某些實施例中，以本發明之組成物之治療導致 MS 發生率或 MS 嚴重性減小。在某些實施例中，本發明之組成物係用於減小復發發生率或復發嚴重性。在某些實施例中，以本發明之組成物之治療預防與 MS 相關聯之動作功能之衰退或實現改進之動作功能。在某些實施例中，本發明之組成物係在 MS 之治療中用於預防動作功能之衰退或用於改進動作功能。在某些實施例中，以本發明之組成物之治療預防 MS 中麻痹之發展。在某些實施例中，本發明之組成物係用於在 MS 之治療中預防麻痹。

【0145】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於預防已鑒別為處於多發性硬化症之風險、或已診斷具有早期多發性硬化症或「復發性-緩解型」多發性硬化症之患者之多發性硬化症。本發明之組成物可實用於預防 MS 之發展。本發

明之組成物可實用於預防 MS 之進展。在某些實施例中，本發明之組成物係用於鑒別為具有 MS 遺傳傾向(諸如主要組織相容性基因複合體(MHC) II 類表型、人類白血球抗原(HLA)-DR2、或 HLA-DR4)之患者。

【0146】 本發明之組成物可實用於管理或減輕多發性硬化症。本發明之組成物可尤其實用於減少與多發性硬化症相關聯之症狀。多發性硬化症之治療或預防可指的是例如症狀嚴重性減輕、或惡化發生率減少、或作為患者之問題的觸發範圍減小。在某些實施例中，本發明之組成物減緩或停止疾病之進展。

【0147】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療復發性-緩解型 MS。在替代實施例中，本發明之組成物係用於治療進行性 MS，諸如繼發性進行性 MS (SPMS)，其在 RRMS 之診斷之後隨時間推移而發展；原發性進行性 MS (PPMS)，其表現出漸進性持續性神經功能惡化；及進行性復發性 MS (PRMS)，其相似於 PPMS 但具有同時發生的復發。

【0148】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療選自由以下組成之群之 MS 症狀之一或多者：疲勞，視覺問題，麻木，刺痛，肌肉痙攣，肌肉僵硬，肌肉無力，靈活性問題，疼痛，思考、學習、及計劃問題，抑鬱症及焦慮，性問題，膀胱問題，腸問題，說話及吞咽困難。

神經化學因子、神經肽、及神經傳導物、以及微生物區-腸-腦軸

【0149】 如上文所概述，微生物區-腸-腦軸由許多不同生理學系統調節。微生物區-腸-腦軸由許多傳訊分子調節。這些傳訊分子之水準之改變導致神經退行性疾病。發明人進行之實驗指示，投與巨球型菌種(且尤其芽孢巨球型菌)可調節吲哚及犬尿胺酸之水準。這些代謝物之調節異常可引起神經退行性疾病，諸如帕金森氏病。

【0150】 在某些實施例中，本發明之組成物調節腦單胺及其代謝物之水準。在較佳實施例中，代謝物為犬尿胺酸。在某些實施例中，本發明之組成物調節犬尿胺酸，其為色胺酸代謝之主要途徑，色胺酸代謝用作菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)產生之途徑。犬尿胺酸可代謝成神經活性化合物諸如犬尿酸(KYNA)及 3-羥基-l-犬尿胺酸(3-OH-l-KYN)，且在其他步驟中代謝成喹啉酸(QUIN)。犬尿胺酸路徑之調節異常可引起免疫系統之活化及潛在神經毒性化合物之累積。犬尿胺酸代謝之改變可涉及帕金森氏病之發展。犬尿胺酸水準已顯示在具有 PD 之患者之額葉皮質、殼核、及黑質緻密部中減少[32]。因此，在某些實施例中，本發明之組成物用於在帕金森氏病之治療中增加犬尿胺酸水準。

【0151】 在本發明之某些實施例中，本發明之組成物可增加犬尿胺酸之水準。增加水準之犬尿胺酸已顯示減少人類多巴胺神經胚細胞瘤細胞株中之體外 MPP+誘導之神經元細胞死亡[33]。在某些實施例中，犬尿胺酸及犬尿酸可活化 GI 芳烴受體(Ahr)及 GPR35 受體。Ahr 受體之火花誘導 IL-22 產生，其可抑制局部炎症。GPR35 之活化誘導三磷酸肌醇之產生及 Ca2+流動。

【0152】 在某些實施例中，本發明之組成物調節吲哚之水準。在較佳實施例中，代謝物為犬尿胺酸。在某些實施例中，本發明之組成物調節犬尿胺酸，其為色胺酸代謝之主要途徑。

【0153】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由神經化學因子、神經肽、及神經傳遞物之水準調節。據此，在某些實施例中，本發明之組成物調節神經化學因子、神經肽及神經傳遞物之水準。據此，在某些較佳實施例中，本發明之組成物直接改變 CNS 生物化學。

【0154】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由 γ-胺基丁酸(GABA)之水準調節。據此，在較佳實施例中，本發明之組成物調節 GABA 之水準。GABA 為減小神經元興

奮性之抑制性神經傳遞物。在某些實施例中，本發明之組成物增加 GABA 之水準。在某些實施例中，本發明之組成物減小 GABA 之水準。在某些實施例中，本發明之組成物改變 GABAergic 神經傳遞。在某些實施例中，本發明之組成物調節中樞神經系統之不同區域中 GABA 轉錄之水準。在某些實施例中，共生物衍生之 GABA 跨越血腦障壁且直接影響神經傳遞。在某些實施例中，本發明之組成物引起海馬體、扁桃體、及/或藍斑核中 GABA 減少。在某些實施例中，本發明之組成物引起皮質區中 GABA 增加。

免疫反應

【0155】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由免疫反應以及炎性因子及標誌物之改變調節。據此，在某些實施例中，本發明之組成物可調節免疫反應。在某些實施例中，本發明之組成物調節循環免疫傳訊分子之全身水準。在某些較佳實施例中，本發明之組成物調節促炎性細胞介素產生及炎症。在某些實施例中，本發明之組成物調節炎性狀態。在某些實施例中，本發明之組成物減少 IL-6 產生及分泌。在某些實施例中，本發明之組成物減少 NFκB 啟動子之活化。在某些實施例中，本發明之組成物能夠調節藉由有效促炎性內毒素脂多醣(LPS)之 IL-6 產生之活化。在某些實施例中，本發明之組成物能夠調節藉由 LPS 及 α-突觸核蛋白突變蛋白諸如 A53T 之 NFκB 啟動子之活化。增加的細胞介素之循環水準與各種神經退行性病症包括帕金森氏病、失智症、及阿茲海默氏症密切相關。在某些實施例中，本發明之組成物用於在神經退行性病症之治療中減少 IL-6 水準及/或 NFκB 水準。

【0156】 在一些實施例中，本發明之組成物增加 IL-8 之分泌。已顯示 IL-8 誘導髓鞘形成且恢復或保持有效神經元通信。因此，在一些實施例中，本發明之組成物用於在神經退行性疾病之治療中誘導髓鞘形成。在一些實施例中，本

發明之組成物用於恢復神經元通信。在一些實施例中，本發明之組成物用於保持神經元通信。

【0157】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由共生代謝物之水準調節。據此，在某些實施例中，本發明之組成物調節微生物區代謝物之全身水準。在某些較佳實施例中，本發明之組成物調節短鏈脂肪酸(SCFA)之水準。在某些實施例中，SCFA 之水準增加或減少。在一些實施例中，SCFA 為丁酸(BA) (或丁酸鹽)。在一些實施例中，SCFA 為丙酸(PPA)。在一些實施例中，SCFA 為乙酸。在某些實施例中，本發明之組成物調節 SCFA 跨越血腦障壁之能力。

【0158】 組蛋白乙醯化及去乙醯為基因表現之重要表觀遺傳調控物。組蛋白乙醯化及去乙醯之不平衡可導致凋亡。此類組蛋白乙醯轉移酶之調節異常牽涉與年齡相關神經退行性疾病(諸如帕金森氏病、杭丁頓氏病、阿茲海默氏病、肌肉萎縮性脊髓側索硬化症、及認知下降)有關之發病原理[34]。據此，在某些實施例中，本發明之組成物可調節組蛋白去乙醯酶活性。在某些實施例中，本發明之組成物可減少組蛋白去乙醯酶活性。在某些實施例中，本發明之組成物可減少組蛋白乙醯酶活性。

【0159】 具有神經退行性疾病(包括帕金森氏病、杭丁頓氏病、阿茲海默氏病、及肌肉萎縮性脊髓側索硬化症)之患者表現出高水準的脂質過氧化。脂質易受活性含氧物氧化，且腦部富含多不飽和脂肪酸。據此，在某些實施例中，本發明之組成物可調節脂質過氧化。在某些實施例中，本發明之組成物可減少脂質過氧化。減少由活性含氧物所致之氧化損傷可用於靶向早期神經退行性疾病。據此，在某些實施例中，本發明之組成物用於治療早期神經退化。同樣據此，在某些實施例中，本發明之組成物用於預防神經退行性病症之發展。在此

類實施例中，本發明之組成物可用於已鑒別為處於發展神經退行性病症之風險的患者。

【0160】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由胃腸滲透性之水準調節。據此，在一些實施例中，本發明之組成物改變胃腸道上皮之完整性。在某些實施例中，本發明之組成物調節胃腸道之滲透性。在某些實施例中，本發明之組成物調節胃腸道之障壁功能及完整性。在某些實施例中，本發明之組成物調節胃腸道流動性。在某些實施例中，本發明之組成物調節共生代謝物及炎性傳訊分子自胃腸道管腔至血流中之易位。

【0161】 微生物區-腸-腦軸之傳訊由胃腸道中微生物組組成調節。據此，在某些實施例中，本發明之組成物調節胃腸道之微生物組組成。在某些實施例中，本發明之組成物預防微生物組生態失衡及毒性代謝物(例如 LPS)之有關增加。在某些實施例中，本發明之組成物調節胃腸道中梭菌屬之水準。在較佳實施例中，本發明之組成物減少胃腸道中梭菌屬之水準。.在某些實施例中，本發明之組成物減少空腸曲桿菌(Campylobacter jejuni)之水準。在某些實施例中，本發明之組成物調節有害厭氧細菌之增殖及這些細菌產生之神經毒素之產生。在某些實施例中，本發明之組成物調節乳桿菌及/或雙叉桿菌之微生物組水準。在某些實施例中，本發明之組成物調節薩特氏菌屬、普雷沃氏菌屬、瘤胃球菌屬、及/或產鹼桿菌科之微生物組水準。在某些實施例中，本發明之組成物增加胚芽乳酸菌(Lactobacillus plantarum)及/或布拉酵母菌(Saccharomyces boulardii)之水準。

腦損傷

【0162】 實例說明，本發明之組成物具有神經保護性且具有 HDAC 抑制活性。HDAC2 為自中風的功能恢復之關鍵靶標[35]，且 HDAC 抑制可預防白質損傷[36]，所以本發明之組成物可實用於治療腦損傷。

【0163】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於治療腦損傷。在一些實施例中，腦損傷為創傷性腦損傷。在一些實施例中，腦損傷為後天性腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由創傷引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由腫瘤引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由中風引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由腦出血引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由腦炎引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由大腦低氧症引起之腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由大腦缺氧引起之腦損傷。

【0164】 在較佳實施例中，本發明之組成物係用於治療中風。實例中所示之效果係尤其與中風之治療相關。當至腦之至少一部分之血流中斷時，發生中風。在無足夠的血液供應以向腦組織提供氧及營養素並自腦組織移除廢物之情況下，腦細胞快速開始死亡。中風之症狀取決於受血流不足影響的腦之區域。症狀包括麻痹、肌肉麻木或虛弱、平衡損失、眩暈、突然嚴重的頭痛、語言障礙、記憶損失、推理能力損失、突然精神錯亂、視覺障礙、昏迷、或甚至死亡。中風亦稱為腦中風(brain attack)或腦血管意外(CVA)。若在短時期內恢復足夠的血流，則中風症狀可為短暫的。然而，若不足的血流繼續達很長時間，則症狀可為永久的。

【0165】 在一些實施例中，中風為大腦缺血。當無足夠至腦組織之血流以滿足代謝需要時，發生大腦缺血。在一些實施例中，大腦缺血為局部性大腦缺

血，亦即局限於腦部之特定區域。在一些實施例中，大腦缺血為全域性大腦缺血，亦即涵蓋大面積的腦組織。當大腦血管部分或完全阻斷，減少至腦部特定區域之血流時，發生局部性大腦缺血。在一些實施例中，該大腦缺血為局部性缺血性中風。在一些實施例中，缺血性中風為血栓性的，亦即由血栓或血凝塊引起，其在大腦血管中發展且限制或阻斷血流。在一些實施例中，缺血性中風為血栓性中風。在一些實施例中，缺血性中風為栓塞性的，亦即由栓塞或未附接團塊引起，該為附接團塊行進通過血流且在遠離血流之原始點的部位限制或阻斷血流。在一些實施例中，缺血性中風為栓塞性中風。當至腦之血流整體經阻斷或減少時，通常發生全域性大腦缺血。在一些實施例中，全域性大腦缺血係由灌流不足(hypoperfusion)引起，亦即歸因於休克。在一些實施例中，全域性大腦缺血係由於心跳停止。

【0166】 在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患大腦缺血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患局部性大腦缺血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患缺血性中風。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患血栓性中風。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患栓塞性中風。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患全域性大腦缺血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患灌流不足。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患心跳停止。

【0167】 在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療大腦缺血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療局部性大腦缺血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療缺血性中風。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療血栓性中風。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療栓塞性中風。

在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療全域性大腦缺血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療灌流不足。

【0168】 在一些實施例中，該中風為出血性中風。出血性中風係由至腦部中或附近之出血，導致腦部之腫脹、壓力及對細胞與組織之損害所引起。出血性中風通常係由於弱化血管破裂並出血至周圍腦中。在一些實施例中，出血性中風係大腦內出血，亦即由在腦組織自身內之出血引起。在一些實施例中，大腦內出血係由實質內出血引起。在一些實施例中，大腦內出血係由室內出血引起。在一些實施例中，出血性中風係蜘蛛膜下出血，亦即發生在腦組織外部但仍在顱骨內的出血。在一些實施例中，出血性中風係由於大腦類澱粉血管病變。在一些實施例中，出血性中風係由於腦部動脈瘤。在一些實施例中，出血性中風係由於大腦動靜脈畸形(AVM)。

【0169】 在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患出血性中風。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患大腦內出血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患實質內出血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患室內出血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患蜘蛛膜下出血。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患大腦類澱粉血管病變。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患腦部動脈瘤。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患大腦 AVM。

【0170】 在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療出血性中風。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療大腦內出血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療實質內出血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療室內出血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療蜘蛛膜下出血。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療大腦類澱粉血管病變。在一些實施

例中，本發明之組成物係用於治療腦部動脈瘤。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療大腦 AVM。

【0171】 在中斷期之後恢復足夠的血流至腦部，儘管有效緩解中風相關症狀，但是可能矛盾地導致對腦部組織之進一步損害。在中斷期期間，受影響之組織罹患缺乏氧及營養素，且血流之突然恢復可透過氧化壓力之誘導導致發炎及氧化損害。這被稱為再灌注損傷，且不僅在中風之後，而且在缺血或缺氧期之後血液供應返回至組織時的心臟病發作或其他組織損害之後經充分證明。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患由中風引起之再灌注損傷。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療由中風引起之再灌注損傷。

【0172】 短暫性缺血性發作(TIA)常稱為小中風，為更嚴重中風之公認的警示徵象。因此罹患一或多次 TIA 之受試者處於較大中風風險。在一些實施例中，診斷具有腦損傷之受試者已罹患 TIA。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療 TIA。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療已罹患 TIA 之受試者之腦損傷。

【0173】 高血壓、高血膽固醇、中風家族病史、心臟病、糖尿病、腦部動脈瘤、動靜脈畸形、鐮形血球貧血症、血管炎、出血病症、使用非類固醇消炎藥(NSAID)、吸煙、大量飲酒、使用非法藥物、肥胖、缺乏體能活動、及不健康飲食全部被視為中風之風險因素。具體而言，已確定地顯示降低血壓預防缺血性及出血性中風[37, 38]。在一些實施例中，本發明之組成物係用於治療具有至少一個中風風險因素之受試者之腦損傷。在一些實施例中，受試者具有兩個中風風險因素。在一些實施例中，受試者具有三個中風風險因素。在一些實施例中，受試者具有四個中風風險因素。在一些實施例中，受試者具有多於四個中風風險因素。在一些實施例中，受試者患有高血壓。在一些實施例中，受試者

患有高血膽固醇。在一些實施例中，受試者患有中風家族病史。在一些實施例中，受試者患有心臟病。在一些實施例中，受試者患有糖尿病。在一些實施例中，受試者患有腦部動脈瘤。在一些實施例中，受試者患有動靜脈畸形。在一些實施例中，受試者患有血管炎。在一些實施例中，受試者患有鐮形血球貧血症。在一些實施例中，受試者患有出血病症。在一些實施例中，受試者具有使用非類固醇消炎藥(NSAID)之歷史。在一些實施例中，受試者吸煙。在一些實施例中，受試者大量飲酒。在一些實施例中，受試者使用非法藥物。在一些實施例中，受試者肥胖。在一些實施例中，受試者超重。在一些實施例中，受試者缺乏體能活動。在一些實施例中，受試者具有不健康飲食。

【0174】 實例指示，本發明之組成物可實用於在發生損傷事件之前投與時治療腦損傷及幫助恢復。因此，本發明之組成物可尤其實用於在向處於腦損傷諸如中風風險之受試者投與時治療腦損傷。

【0175】 在某些實施例中，本發明之組成物係用於減少由潛在腦損傷較佳中風引起之損害。該等組成物可減少在發生潛在腦損傷之前投與時，具體而言當向鑒別為處於腦損傷風險之患者投與時引起之損害。

【0176】 實例指示，本發明之組成物可實用於在發生損傷事件之後投與時治療腦損傷及幫助恢復。因此，本發明之組成物可尤其實用於在向腦損傷諸如中風之後之受試者投與時治療腦損傷。

【0177】 在一些實施例中，本發明之組成物藉由減少運動損害來治療腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物藉由改善動作功能來治療腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物藉由改善肌肉強度來治療腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物藉由改善記憶來治療腦損傷。在一些實施例中，本發明之

組成物藉由改善社交辨認來治療腦損傷。在一些實施例中，本發明之組成物藉由改善神經功能來治療腦損傷。

【0178】 腦損傷之治療可指例如症狀嚴重性之緩解。腦損傷之治療可指減少中風之後的神經傷害。用於治療中風之本發明之組成物可先於中風發病提供於受試者，例如鑒別為處於中風風險之患者。用於治療中風之本發明之組成物可在發生中風之後，例如在恢復期間提供。用於治療中風之本發明之組成物可在恢復之急性期期間(亦即至多中風之後一週)提供。用於治療中風之本發明之組成物可在恢復之亞急性期期間(亦即中風之後一週至三個月)提供。用於治療中風之本發明之組成物可在恢復之慢性期期間(自中風之後三個月)提供。

【0179】 在某些實施例中，本發明之組成物係與二級活性劑組合使用。在某些實施例中，本發明之組成物係與組織纖溶酶原致活劑(tPA)一起使用。其他二級藥劑包括其他抗血小板劑(諸如保栓通(clopidogrel))、抗凝血劑(諸如肝素、華法林(warfarin)、阿哌沙班(apixaban)、達比加群(dabigatran)、依度沙班(edoxaban)、或利伐沙班(rivaroxaban))、降血壓劑(諸如利尿劑、ACE 抑制劑、鈣離子通道阻斷劑、β-阻斷劑、或 α-阻斷劑)、或斯他汀。本發明之組成物可改進患者對二級活性劑之反應。

【0180】 在某些實施例中，本發明之組成物減小缺血對組織之作用。在某些實施例中，本發明之組成物減少由缺血引起之對組織之損害之量。在某些實施例中，受缺血損害之組織為大腦組織。在某些實施例中，本發明之組成物減少壞死或壞死細胞數。在某些實施例中，本發明之組成物減少細胞凋亡或細胞凋亡細胞數。在某些實施例中，本發明之組成物減少壞死細胞及細胞凋亡細胞數。在某些實施例中，本發明之組成物預防因壞死及/或細胞凋亡之細胞死亡。在某些實施例中，本發明之組成物預防因由缺血引起之壞死及/或細胞凋亡之細

胞死亡。在某些實施例中，本發明之組成物改善受缺血損害之組織之恢復。在某些實施例中，本發明之組成物改善壞死細胞及/或細胞凋亡細胞之清除速度。在某些實施例中，本發明之組成物改善壞死細胞及/或細胞凋亡細胞之清除功效。在某些實施例中，本發明之組成物改善組織內細胞之置換及/或再生。在某些實施例中，本發明之組成物改善組織內受缺血損害之細胞之置換及/或再生。在某些實施例中，本發明之組成物改善組織之總體組織學(例如在生檢時)。

投與方式

【0181】 較佳的是，本發明之組成物欲向胃腸道投與以使得能夠用本發明之細菌品系遞送至及/或部分或完全移生於腸。通常，本發明之組成物係經口投與，但其亦可以直腸、鼻內或經頰或舌下途徑投與。

【0182】 在某些實施例中，本發明之組成合物可作為泡沫劑、作為噴霧劑、或凝膠劑來投與。

【0183】 在某些實施例中，本發明之組成物可作為栓劑(諸如直腸栓劑，例如呈可可油(可可脂)、合成硬脂肪(例如，suppocire、witepsol)、甘油-明膠、聚乙二醇或皂甘油組合物之形式)來投與。

【0184】 在某些實施例中，本發明之組成物經由管(諸如鼻胃管、口胃管、胃管、空腸管(J 管))、經皮內窺鏡胃造口術(PEG)或口(諸如提供胃、空腸之進入的胸壁口及其他合適進入口)來向胃腸道投與。

【0185】 本發明之組成物可投與一次，或其可作為治療方案之一部分來依次投與。在某些實施例中，將每日投與本發明之組成物。

【0186】 在本發明之某些實施例中，根據本發明之治療伴隨著對患者腸道微生物區之評估。若未達成本發明之品系之遞送及/或用本發明之品系進行的部分

或完全移生以致於未觀察到功效，則重複治療，或者若遞送及/或部分或完全移生成功且觀察到功效，則可停止治療。

【0187】 在某些實施例中，可向懷孕動物(例如哺乳動物，諸如人類)投與本發明之組成物以預防在其子宮內的兒童中發展及/或在該兒童出生後發展之炎性或自體免疫疾病。

【0188】 本發明之組成物可向已診斷具有神經退行性疾病或已鑒別為處於神經退行性疾病之風險的患者投與。該等組成物亦可作為防治性措施投與，以防止健康患者中發展神經退行性疾病。

【0189】 本發明之組成物可向已鑒別為具有異常腸道微生物區之患者投與。例如，該患者可具有減少的或不存在巨球型菌之移生，且特別是芽孢巨球型菌之移生。

【0190】 本發明之組成物可作為食物產品諸如營養補充劑投與。

【0191】 通常，本發明之組成物係用於治療人類，但其可用於治療包括單胃哺乳動物(諸如家禽、豬、貓、狗、馬或兔)之動物。本發明之組成物可實用於增強動物之生長及表現。若向動物投與，則可使用口服管飼法。

組成物

【0192】 通常，本發明之組成物包含細菌。在本發明之較佳實施例中，組成物以冷凍乾燥形式調配。例如，本發明之組成物可包含有包含本發明之細菌品系的顆粒或明膠膠囊，例如硬明膠膠囊。

【0193】 較佳的是，本發明之組成物包含凍乾細菌。細菌之凍乾為一種良好確立的程序，且相關指導可在例如參考文獻[39]、[]、[41]]中獲得。

【0194】 或者，本發明之組成物可包含活的、活性細菌培養物。

【0195】 在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系未經滅活，例如未經熱滅活。在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系未經殺滅，例如未經熱殺滅。在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系未經減毒，例如未經熱減毒。例如，在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系未經殺滅、滅活及/或減毒。例如，在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系為活的。例如，在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系為有生活力的。例如，在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系能夠部分或完全移生於腸。例如，在一些實施例中，本發明之組成物中之細菌品系為有生活力的，且能夠部分或完全移生於腸。

【0196】 在一些實施例中，組成物包含活的細菌品系與已經殺滅之細菌品系的混合物。

【0197】 在較佳實施例中，本發明之組成物經封裝以使細菌品系能夠遞送至腸。封裝保護組成物免受降解直至經由例如用化學或物理刺激(諸如壓力、酶活性或物理崩解(其可由 pH 值變化觸發))破裂來在目標位置處遞送。可使用任何適當封裝方法。示範性封裝技術包括包埋在多孔基質內、附著或吸附在固體載劑表面上、藉由絮凝或用交聯劑進行自聚集、及機械容納在多微孔膜或微膠囊後面。關於可實用於製備本發明之組成物之封裝的指導可在例如參考文獻[42]及[43]中獲得。

【0198】 組成物可經口投與且可為錠劑、膠囊、或散劑之形式。封裝產品為較佳的，因為巨球型菌為厭氧菌。可包括其他成分(例如，諸如維生素 C)作為氧清除劑及益生元受質以改善活體內遞送及/或部分或完全移生及存活。或者，本發明之益生菌組成物可作為食物或營養產品(諸如基於乳或乳清之發酵乳產品)或作為醫藥產品經口投與。

【0199】 組成物可經調配為益生菌。

【0200】 本發明之組成物包括治療有效量的本發明之細菌品系。治療有效量的細菌品系足以對患者施加有益作用。治療有效量的細菌品系可足以造成遞送至及/或部分或完全移生於患者之腸。

【0201】 例如對於成人，合適之細菌日劑量可為約 1×10^3 至約 1×10^{11} 個菌落形成單位(CFU)；例如，約 1×10^7 至約 1×10^{10} CFU；在另一實例中，約 1×10^6 至約 1×10^{10} CFU。

【0202】 在某些實施例中，相對於組成物之重量，組成物含有約 1×10^6 至約 1×10^{11} CFU/g 之量的細菌品系；例如約 1×10^8 至約 1×10^{10} CFU/g。劑量可為例如 1 g、3 g、5 g、及 10 g。

【0203】 通常，益生菌(諸如本發明之組成物)視情況與至少一種合適的益生元化合物組合。益生元化合物通常為不可消化之碳水化合物，諸如寡糖或多糖或糖醇，其不會在上消化道中降解或吸收。已知益生元包括商業產品，諸如菊糖及反式半乳寡糖。

【0204】 在某些實施例中，相對於總重量組成物，本發明之益生菌組成物包括約 1 重量%至約 30 重量%(例如，5 重量%至 20 重量%)之量的益生元化合物。碳水化合物可選自由以下所組成之群：果寡糖(或 FOS)、短鏈果寡糖、菊糖、異麥芽寡糖、果膠、木寡糖(或 XOS)、幾丁聚糖-寡糖(或 COS)、β-葡聚糖、阿拉伯膠、改質及耐受性澱粉、聚葡萄糖、D-塔格糖、阿拉伯膠纖維、角豆樹、燕麥、及柑橘纖維。在一個態樣中，益生元為短鏈果寡糖(為簡單起見，在下文中示為 FOSs-c.c)；該 FOSs-c.c.為不可消化之碳水化合物，一般藉由甜菜糖之轉化獲得，且包括三個葡萄糖分子所鍵結之蔗糖分子。

【0205】 在某些實施例中，本發明之組成物與另一用於治療或預防神經退行性病症之治療性化合物組合使用。在一些實施例中，本發明之組成物與調節神經保護或神經增生之營養補充劑一起投與。在較佳實施例中，營養補充劑包含營養維生素或由其組成。在某些實施例中，維生素為維生素 B6、鎂、二甲基甘胺酸(維生素 B16)、及維生素 C。在某些實施例中，本發明之組成物與另一益生菌組合投與。

【0206】 在某些實施例中，本發明之組成物用於增強第二藥劑對神經退行性疾病之效應。本發明之組成物之免疫調節效應可使腦更易感於習知療法諸如左旋多巴、多巴胺促效劑、MAO-B 抑制劑、COMT 抑制劑、麩胺酸鹽拮抗劑、或抗膽鹼劑，其為與本發明之組成物組合(順序或同時)投與之示範性二級藥劑。

【0207】 本發明之組成物可包含醫藥上可接受之賦形劑或載劑。此等合適賦形劑之實例可見於參考文獻[44]。用於治療用途的可接受之載劑或稀釋劑為醫藥技術領域中熟知的，且描述於例如參考文獻[45]中。合適載劑之實例包括乳糖、澱粉、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、甘露醇、山梨醇、及其類似物。合適稀釋劑之實例包括乙醇、甘油、及水。醫藥載劑、賦形劑、或稀釋劑之選擇可關於預期投與途徑及標準醫藥實踐來選擇。醫藥組成物可包含任何合適的一種(或多種)黏合劑、潤滑劑、懸浮劑、塗佈劑、增溶劑作為載劑、賦形劑或稀釋劑，或包含除了任何合適的一種(或多種)黏合劑、潤滑劑、懸浮劑、塗佈劑、增溶劑以外的載劑、賦形劑或稀釋劑。合適黏合劑之實例包括澱粉、明膠、天然糖(諸如葡萄糖、無水乳糖、自由流動乳糖、β-乳糖)、玉米甜味劑、天然及合成膠(諸如阿拉伯膠、黃蓍膠或海藻酸鈉)、羧甲基纖維素、及聚乙二醇。合適潤滑劑之實例包括油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、乙酸

鈉、氯化鈉、及類似者。可在醫藥組成物中提供防腐劑、穩定劑、染料、及甚至調味劑。防腐劑之實例包括苯甲酸鈉、山梨酸、及對羥基苯甲酸酯。亦可使用抗氧化劑及懸浮劑。

【0208】 本發明之組成物可經調配為食物產品。例如，除了本發明之治療作用外，食物產品亦可諸如在營養補充劑中提供營養益處。類似地，可調配食物產品以增強本發明組成物之味道，或藉由更加類似於普通食物而非醫藥組成物來使組成物更具消費吸引力。在某些實施例中，本發明之組成物經調配成乳基產品。術語「乳基產品」意指具有不同脂肪含量的基於任何液體或半固體乳或乳清之產品。乳基產品可為例如牛乳、山羊乳、綿羊乳、脫脂乳、全乳、不經任何處理而由乳粉及乳清重組之乳、或加工產品諸如酸奶、凝結乳(curdled milk)、凝乳、酸乳、酸全乳、黃油乳、及其他酸乳產品。另一重要群包括乳飲料，諸如乳清飲料、發酵乳、濃縮乳、嬰兒奶或幼兒乳；調味乳、冰淇淋；含乳食物，諸如糖果。

【0209】 在一些實施例中，本發明之組成物包含巨球型菌屬之一或多個細菌品系，且不含有來自任何其他屬之細菌，或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個屬之細菌。因此，在一些實施例中，本發明提供包含巨球型菌屬之一或多個細菌品系之組成物，其不含有來自任何其他屬之細菌或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個屬之細菌，該組成物用於療法中。

【0210】 在一些實施例中，本發明之組成物包含芽孢巨球型菌種之一或多個細菌品系且不含有來自任何其他種之細菌，或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個種之細菌。因此，在一些實施例中，本發明提供包含芽孢巨球型菌種之一或多個細菌品系之組成物，其不含有來自任何其他種之細菌或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個種之細菌，該組成物用於療法中。

【0211】 在一些實施例中，本發明之組成物包含芽孢巨球型菌種之一或多個細菌品系且不含有來自任何其他巨球型菌種之細菌，或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一巨球型菌種之細菌。因此，在一些實施例中，本發明提供包含芽孢巨球型菌種之一或多個細菌品系之組成物，其不含有來自任何其他巨球型菌種之細菌或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一巨球型菌種之細菌，該組成物用於療法中。

【0212】 在某些實施例中，本發明之組成物含有單個細菌品系或種，且不含有任何其他細菌品系或種。此類組成物可僅包含微小量的或生物不相關量的其他細菌品系或種。此類組成物可為實質上不含其他種類有機體之培養物。

【0213】 在一些實施例中，本發明提供包含巨球型菌屬之單一個細菌品系之組成物，其不含有來自任何其他品系之細菌或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個品系之細菌，該組成物用於療法中。

【0214】 在一些實施例中，本發明提供包含芽孢巨球型菌種之單一個細菌品系之組成物，其不含有來自任何其他品系之細菌或其僅包含微小量的或生物不相關量的來自另一個品系之細菌，該組成物用於療法中。

【0215】 在一些實施例中，本發明之組成物包含多於一個細菌品系。例如，在一些實施例中，本發明之組成物包含來自同一種內之多於一個品系(例如，多於 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、或 45 個品系)，且視情況不含來自任何其他種之細菌。在一些實施例中，本發明之組成物包含來自同一種內之小於 50 個品系(例如，小於 45、40、35、30、25、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、或 3 個品系)，且視情況不含來自任何其他種之細菌。在一些實施例中，本發明之組成物包含來自同一種內之 1-40、1-30、1-20、1-19、1-18、1-15、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-

50、2-40、2-30、2-20、2-15、2-10、2-5、6-30、6-15、16-25、或 31-50 個品系，且視情況不含來自任何其他種之細菌。本發明包含前述者之任何組合。

【0216】 在一些實施例中，組成物包含微生物共同體。例如，在一些實施例中，組合物包含巨球型菌細菌品系作為微生物共同體之一部分。例如，在一些實施例中，巨球型菌細菌品系與一或多個(例如，至少 2、3、4、5、10、15、或 20 個)來自可與其共生生活於活體內的其他屬之其他細菌品系組合存在於腸中。例如，在一些實施例中，組成物包含與來自不同屬之細菌品系組合的巨球型菌之細菌品系。在一些實施例中，微生物共同體包含自單個有機體(例如人類)之糞便樣本獲得之兩個或更多個細菌品系。在一些實施例中，微生物共同體未在自然界中一起發現。例如，在一些實施例中，微生物共同體包含自至少兩個不同有機體之糞便樣本獲得之細菌品系。在一些實施例中，兩個不同有機體來自同一物種，例如兩個不同的人。在一些實施例中，兩個不同的有機體為人類嬰兒及成年人類。在一些實施例中，兩個不同的有機體為人類及非人類哺乳動物。

【0217】 在一些實施例中，本發明之組成物另外包含一細菌品系，其具有與品系 MRx0029 相同的安全性及治療功效特徵，但其非為 MRx00029，或其非為芽孢巨球型菌。

【0218】 在本發明之組成物包含多於一個細菌品系、種、或屬之一些實施例中，各個細菌品系、種、或屬可用於分開的、同時的、或依序的投與。例如，組成物可包含多於一個細菌品系、種、或屬之全部，或細菌品系、種、或屬可分開儲存且可分開、同時、或依序投與。在一些實施例中，多於一個細菌品系、種、或屬分開儲存，但在使用前混合在一起。

【0219】 在一些實施例中，用於本發明之細菌品系獲自人類成人糞便。在本發明之組成物包含多於一個細菌品系之一些實施例中，所有細菌品系皆獲自人類成人糞便，或若存在其他細菌品系，則該等其他細菌品系僅以微小量存在。細菌可在自人類成人糞便中獲得之後培養，且在本發明之組成物中使用。

【0220】 如上文所提及，在一些實施例中，一或多個巨球型菌細菌品系為本發明組成物中唯一的一種(或多種)治療活性劑。在一些實施例中，組成物中之一個(或多個)細菌品系為本發明組成物中唯一的一種(或多種)治療活性劑。

【0221】 根據本發明使用之組成物可需要或不需要行銷核可。

【0222】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾的。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為噴霧乾燥的。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾或噴霧乾燥的，且其中其為活的。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾或噴霧乾燥的，且其中其為有生活力的。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾或噴霧乾燥的，且其中其能夠部分或完全移生於腸。在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾或噴霧乾燥的，且其中其為有生活力的且能夠部分或完全移生於腸。

【0223】 在一些情況下，經凍乾之細菌品系在投與前經復原。在一些情況下，復原係藉由使用本文所述之稀釋劑來進行。

【0224】 本發明之組成物可包含醫藥上可接受之賦形劑、稀釋劑、或載劑。

【0225】 在某些實施例中，本發明提供一種醫藥組成物，其包含：本發明之細菌品系；及醫藥上可接受之賦形劑、載劑、或稀釋劑；其中該細菌品系之量足以當向有需要之受試者投與時治療神經退行性病症。

【0226】 在某些實施例中，本發明提供醫藥組成物，其包含：本發明之細菌品系；及醫藥上可接受之賦形劑、載劑、或稀釋劑；其中該細菌品系之量足以治療或預防神經退行性病症。

【0227】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中相對於組合物之重量，細菌品系之量為每克約 1×10^3 至約 1×10^{11} 個菌落形成單位。

【0228】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成合物，其中組成物以 1 g、3 g、5 g、或 10 g 之劑量投與。

【0229】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中組成物藉由選自由以下所組成之群的方法來投與：經口、直腸、皮下、鼻、經頰及舌下。

【0230】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其包含選自由以下所組成之群的載劑：乳糖、澱粉、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、甘露醇、及山梨醇。

【0231】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其包含選自由以下所組成之群的稀釋劑：乙醇、甘油、及水。

【0232】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其包含選自由以下所組成之群的賦形劑：澱粉、明膠、葡萄糖、無水乳糖、自由流動乳糖、β-乳糖、玉米甜味劑、阿拉伯膠、黃蓍膠、海藻酸鈉、羧甲基纖維素、聚乙二醇、油酸鈉、硬脂酸鈉、硬脂酸鎂、苯甲酸鈉、乙酸鈉、及氯化鈉。

【0233】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其進一步包含防腐劑、抗氧化劑、及穩定劑中之至少一者。

【0234】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其包含選自由以下所組成之群的防腐劑：苯甲酸鈉、山梨酸、及對羥基苯甲酸酯。

【0235】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中該細菌品系為凍乾的。

【0236】 在某些實施例中，本發明提供以上醫藥組成物，其中當組合物在約4℃或約 25℃下儲存在密封容器中且容器置於具有 50%相對濕度之氣氛中時，如以菌落形成單位所量測，至少 80%細菌品系在至少約 1 個月、3 個月、6 個月、1 年、1.5 年、2 年、2.5 年或 3 年之時期後剩餘。

【0237】 在一些實施例中，本發明之組成物在包含如本文所述之組成物的密封容器中提供。在一些實施例中，密封容器為小袋或瓶子。在一些實施例中，本發明之組成物在包含如本文所述之組成物的注射器中提供。

【0238】 在一些實施方式中，本發明之組成物可作為醫藥調配物提供。例如，組成物可作為錠劑或膠囊提供。在一些實施例中，膠囊為明膠膠囊(「凝膠帽」)。

【0239】 在一些實施例中，本發明之組成物係經口投與。經口投與可涉及吞咽以使化合物進入胃腸道及/或經頰、經舌或舌下投與以使化合物直接從口腔進入血流。

【0240】 適用於經口投與之醫藥調配物包括固體栓、固體微粒、半固體及液體(包括多相或分散系統)，諸如錠劑；含有多微粒或奈米微粒之軟膠囊或硬膠囊、液體(例如水溶液)、乳劑或散劑；口含錠(包括液體填充的)；咀嚼劑；凝膠；快速分散劑型；膜劑；卵形體；噴霧劑；及頰/黏膜黏附貼劑。

【0241】 在一些實施例中，醫藥調配物為腸溶調配物，亦即適用於藉由經口投與來將本發明組成物遞送至腸的胃耐受性調配物(例如，耐受胃 pH)。當組成物之細菌或其他組分為酸敏感性的(在胃條件下易於降解)時，腸溶調配物可尤其有用。

【0242】 在一些實施例中，腸溶調配物包含腸溶塗層。在一些實施例中，調配物為腸溶塗佈之劑型。例如，調配物可為腸溶塗佈之錠劑或腸溶塗佈之膠囊或類似物。腸溶塗層可為習知腸溶塗層，例如用於錠劑、膠囊或類似物以進行經口傳遞之習知塗層。調配物可包含膜塗層，例如腸溶聚合物(例如酸不溶性聚合物)之薄膜層。

【0243】 在一些實施例中，腸溶調配物為固有腸溶的，例如胃耐受性的，而無需腸溶塗層。因此，在一些實施例中，調配物為不包含腸溶塗層之腸溶調配物。在一些實施例中，調配物為由熱膠凝材料製成之膠囊。在一些實施例中，熱膠凝材料為纖維質材料，諸如甲基纖維素、羥甲基纖維素、或羥丙基甲基纖維素(HPMC)。在一些實施例中，膠囊包含不含任何成膜聚合物之殼。在一些實施例中，膠囊包含殼，且該殼包含羥丙基甲基纖維素且不包含任何成膜聚合物(例如，參見[46])。在一些實施例中，調配物為固有腸溶膠囊(例如，來自Capsugel之Vcaps®)。

【0244】 在一些實施例中，調配物為軟膠囊。軟膠囊為可由於添加軟化劑(諸如例如膠囊殼中存在之甘油、山梨醇、麥芽糖醇、及聚乙二醇)而具有一定彈性及柔軟度之膠囊。軟膠囊可例如在明膠或澱粉之基礎上生產。基於明膠之軟膠囊可由不同供應商購得。視投與方法(諸如，例如經口或直腸)而定，軟膠囊可具有各種形狀，可為例如圓形、橢圓形、長方形、或魚雷形。軟膠囊可藉由習知方法，諸如例如藉由 Scherer 方法、Accogel 方法或微滴或吹製方法來生產。

培養方法

【0245】 用於本發明之細菌品系可使用如在例如參考文獻[47]、[]、及[49]中所詳述之標準微生物學技術來培養。

【0246】 用於培養之固體或液體培養基可為 YCFA 瓊脂或 YCFA 培養基。YCFA 培養基可包括(每 100 ml，近似值)：酪胨(1.0 g)、酵母提取物(0.25 g)、$NaHCO_3$ (0.4 g)、半胱胺酸(0.1 g)、K_2HPO_4 (0.045 g)、KH_2PO_4 (0.045 g)、NaCl (0.09 g)、$(NH_4)_2SO_4$ (0.09 g)、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.009 g)、$CaCl_2$ (0.009 g)、刃天青(0.1 mg)、氯高鐵血紅素(1 mg)、生物素(1 μg)、鈷胺素(1 μg)、對胺基苯甲酸(3 μg)、葉酸(5 μg)、及吡哆胺(15 μg)。

用於疫苗組成物之細菌品系

【0247】 發明人已鑒別出，本發明之細菌品系實用於治療或預防神經退行性病症。此可能係由於本發明之細菌品系對宿主免疫系統具有作用。因此，當作為疫苗組成物投與時，本發明之組成物亦可實用於預防神經退行性病症。在某些此類實施例中，本發明之細菌品系可經殺傷、滅活、或減毒。在某些此類實施例中，該等組成物可包含疫苗佐劑。在某些實施例中，組成物係用於經由注射(諸如經由皮下注射)來投與。

總則

【0248】 除非另外指示，否則本發明之實踐將採用此技術之技能範圍內之化學、生物化學、分子生物學、免疫學、及藥理學之習知方法。此類技術在文獻中得到充分說明。參見例如，參考文獻[50]及[51,57]等。

【0249】 術語「包含」涵蓋「包括」以及「由…組成」，例如「包含」X 之組成物可僅由 X 組成，或可包括另外者，例如 X + Y。

【0250】 關於數值 x 之術語「約」為可選的，且意指例如 $x \pm 10\%$。

【0251】 詞「實質上」不排除「完全」，例如「實質上不含」Y 之組合物可完全不含 Y。必要時，詞「實質上」可從本發明之定義中省略。

【0252】 對兩個核苷酸序列之間的序列一致性百分比之提及意指當比對時，核苷酸百分比在比較兩個序列方面為相同的。此比對及同源性或序列一致性百分比可使用此項技術中已知的軟體程式，例如參考文獻[58]之 7.7.18 節所述之彼等軟體程式來判定。較佳比對係藉由 Smith-Waterman 同源性搜索算法，使用空隙開放罰分為 12 且空隙延伸罰分為 2、BLOSUM 矩陣為 62 的仿射空隙搜索來判定。Smith-Waterman 同源性搜索算法揭示於參考文獻[59]中。

【0253】 除非特別說明，否則包含許多步驟之過程或方法可包含方法開始或結束時的另外步驟，或可包括另外的介入步驟。而且，若適當，則可將步驟組合、省略或以替代性順序執行。

【0254】 本發明之各種實施例係描述於本文中。應當理解，各實施例中指定之特徵可與其他指定特徵組合，以提供進一步的實施例。具體而言，本文中強調為合適、一般或較佳的實施例可彼此組合(除了當該等實施例互相排斥時)。

進行本發明之方式

實例 1 - 細菌接種物充當神經保護劑之功效

概述

【0255】 將神經胚細胞瘤以包含根據本發明之細菌品系之組成物處理。所用之 SH-SY5Y 神經胚細胞瘤細胞為產多巴胺細胞，且呈用於研究神經退行性疾病之體外模型經良好建立。觀察細菌品系增加神經增殖之能力。亦將神經胚細胞瘤細胞以誘導神經胚細胞瘤細胞之帕金森氏病之永久症狀的多巴胺神經毒素 1-甲基-4-苯基吡啶(MPP)處理。研究該等細菌品系充當針對 MPP 之神經保護劑之能力。

材料及方法

細菌品系

【0256】 芽孢巨球型菌 MRx0029；吉氏副類桿菌 MRX0005

細胞株

【0257】 SH-SY5Y 神經胚細胞瘤細胞購自 ECCACC (Cat. no: 94030304)，且使其生長於補充有營養素混合物 F-12 Ham (Sigma Aldrich, cat n. N4888)之 MEM (Sigma Aldrich, cat n. M2279)中。

方法

【0258】 一旦生長，便將 SH-SY5Y 神經胚細胞瘤細胞以 11,000 個細胞/孔鋪板於 96 孔盤上且孵育 2 天。然後將細胞轉移至分化培養基(其含有 1% FBS)及 10 uM 視網酸(Sigma Aldrich, cat. n. R2625-100MG)。每隔一天更換分化培養基，且在分化第 7 天收穫細胞。將細胞在有或沒有 MPP (Sigma Aldrich, cat. n. D048-1G)之情況下預處理 8 小時。隨後，將細胞以 10%細菌上清液處理且孵育隔夜。藉由使用 CCK-8 試劑(Sigma Aldrich, 細胞計數套組 - 8, cat. n. 96992-3000TESTS-F)測量細胞活力且在 450 nm 波長下讀取。

結果

【0259】 這些實驗之結果顯示於圖 1 中。以 MRx0029 或 MRX0005 處理神經胚細胞瘤細胞導致神經元之增殖增加。以 MPP 與該細菌品系一起處理之神經胚細胞瘤細胞與單獨以 MPP 處理之細胞(其活力減小)相比細胞活力增加。這些數據顯示，該細菌品系可充當神經保護劑。對於 MRX0029 處理之細胞之保護作用較大，其減小之活力多於以槲皮素處理之陽性對照細胞。這些數據顯示，該等細菌品系可充當神經保護劑。

實例 2 - 細菌接種物減少 IL-6 分泌之功效

概述

【0260】 促炎性細胞介素之活化與神經退行性疾病之神經元損傷相關。脂多醣(LPS)為促炎性細胞介素 IL-6 之已知刺激物。將人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞以包含根據本發明之細菌品系以及 LPS 之組成物處理以觀測其調節 IL-6 水準之能力。

材料及方法

細菌品系

【0261】 芽孢巨球型菌 MRx0029

細胞株

【0262】 MG U373 為衍生自惡性腫瘤之人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤且購自 Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL)。使 MG U373 人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞生長於補充有 10% FBS、1% Pen Strep、4mM L-Glut、1X MEM 非必需胺基酸溶液、及 1X 丙酮酸鈉之 MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279)中。

方法

【0263】 一旦生長，便將 MG U373 細胞以 100,000 個細胞/孔鋪板於 24 孔盤上。將細胞以 LPS (1 ug/mL)單獨地或與 10%來自 MRx0029 之細菌上清液一起處理 24 h。亦進行對照，其中將細胞於未處理培養基中孵育。然後，收集無細胞上清液，在 4℃下以 10,000 g 離心 3 min。根據製造商說明書，使用來自 Peprotech 之人類 IL-6 ELISA 套組(cat n.#900-K16)測量 IL-6。

結果

【0264】 這些實驗之結果顯示於圖 2 中。以 LPS 及該細菌品系處理神經胚細胞瘤細胞導致分泌之 IL-6 之水準減小。

實例 2b - 細菌接種物調節 IL-8 分泌之功效

概述

【0265】 因為神經炎症在神經退行性疾病中起關鍵作用且已顯示 IL-8 具有神經陽性作用，所以評定包含本發明之細菌品系及 LPS 之組成物對 IL-8 之活化的作用。將人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞以包含根據本發明之細菌品系以及 LPS 之組成物處理以觀測其調節 IL-8 水準之能力。

材料及方法

細菌品系

【0266】 芽孢巨球型菌 MRX0029；吉氏副類桿菌 MRX0005

細胞株

【0267】 MG U373 為衍生自惡性腫瘤之人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤且購自 Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL)。使 MG U373 人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞生長於補充有 10% FBS、1% Pen Strep、4mM L-Glut、1X MEM 非必需胺基酸溶液、及 1X 丙酮酸鈉之 MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279) 中。

方法

【0268】 一旦生長，便將 MG U373 細胞以 100,000 個細胞/孔鋪板於 24 孔盤上。將細胞以 LPS (1 ug/mL)單獨地或與 10%來自 MRX0029 之細菌上清液一起處理 24 h。然後，收集無細胞上清液，在 4℃下以 10,000 g 離心 3 min。根據製造商說明書，使用來自 Peprotech 之人類 IL-8 ELISA 套組(cat n.#900-K18)測量 IL-8。

結果

【0269】 這些實驗之結果顯示於圖 3 中。以該等細胞品系處理神經胚細胞瘤細胞引起 IL-8 分泌之增加，與 LPS 是否存在無關。

實例 2C - 細菌接種物減少 α-突觸核蛋白誘導之炎症之功效

概述

【0270】 神經炎症在帕金森氏病中起關鍵作用，且已顯示 α-突觸核蛋白誘導體內神經炎症。因此，評定本發明之細菌品系抑制 α-突觸核蛋白誘導之神經炎症之能力。將人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞及神經胚細胞瘤細胞之共同培養物暴露於野生型 α-突觸核蛋白及突變體同功型 E46K 及 A53T，且以包含根據本發明之細菌品系之組成物處理。然後測試該等細菌品系抑制 α-突觸核蛋白誘導之 IL-6 分泌之能力。

材料及方法

細菌品系

【0271】 芽孢巨球型菌 MRX0029；吉氏副類桿菌 MRX0005

細胞株

【0272】 MG U373 為衍生自惡性腫瘤之人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤且購自 Sigma-Aldrich (cat n. 08061901-1VL)。使 MG U373 人類神經膠母細胞瘤星形細胞瘤細胞生長於補充有 10% FBS、1% Pen Strep、4mM L-Glut、1X MEM 非必需胺基酸溶液、及 1X 丙酮酸鈉之 MEM (Sigma Aldrich, cat n. M-2279) 中。

【0273】 SH-SY5Y 為衍生自惡性神經胚細胞瘤之人類神經胚細胞瘤細胞株，且可購自 Sigma-Aldrich (cat n. 94030304-1VL)。使細胞生長於補充有 2 mM L-Glutamine、10%熱滅活 FBS、100 U/ml 青黴素、100 μg/ml 鏈黴素之 50% MEM 及 50% 營養素混合物 F-12 Ham 培養基中。將生長培養基上之細胞以 11,000 個細胞/孔鋪板於 96 孔盤上並放置於孵育器中。2 天之後，將培養基更換

為分化培養基(含有 1% FBS 之生長培養基)及 10 μM 視網酸。每隔一天更換分化培養基，且在分化 7 天后使用細胞。

方法

【0274】 將 SHSY5Y 細胞以 50,000 個細胞/孔之密度鋪板於 12 孔盤上。使細胞生長於補充有 2 mM L-Glutamine、10%熱滅活 FBS、100 U/ml 青黴素、100 μg/ml 鏈黴素之 50% MEM 及 50% 營養素混合物 F-12 Ham 培養基中。將生長培養基上之細胞以 11,000 個細胞/孔鋪板於 96 孔盤上並放置於孵育器中。2 天之後，將培養基更換為分化培養基(含有 1% FBS 之生長培養基)及 10 μM 視網酸。每隔一天更換分化培養基，且在分化 7 天后使用細胞。將 U373 以 50,000 個細胞/孔之密度鋪板於 12 透孔(transwell)盤(0.4 μm 聚酯膜, Costar)上達 72 h。將細胞在一起共同培養 24 h，之後於分化培養基(含有 1% FBS 而無視網酸之生長培養基)中處理。

【0275】 之後，將細胞在存在或不存在 10%細菌上清液之情況下以 25 μg/ml α-突觸核蛋白(Wt, A53T, E46K)處理 48 h。收集無細胞上清液，在 4℃下以 10000 g 離心沉降 3 min，等分試樣且在-80℃下儲存。如上文所述測量人類 IL-6 及 IL-8。

結果

【0276】 這些實驗之結果顯示於圖 4 中。以野生型 α-突觸核蛋白及突變體同功型 E46K 及 A53T 處理細胞誘導中等的 IL-6 分泌(圖 4A)。α-syn 誘導之 IL-6 分泌在以該等細菌品系處理之細胞中受到抑制(圖 4A)。在投與 MRX0029 時，IL-6 分泌之減少最大。

實例 3 - 細菌接種物減少 NFκB 活化之功效

概述

【0277】 NFκB 啟動子之活化引起促炎性細胞介素(包括 IL-1β、IL-1α、IL-18、TNFα、及 IL-6)之產生。NFκB 啟動子可被 α-突觸核蛋白及 LPS 藉由刺激 TLR4 配體來活化。α-突觸核蛋白(諸如 α-突觸核蛋白 A53T)之突變牽涉家族性帕金森氏病。以 LPS 治療神經元細胞模擬由環境因素引起之帕金森氏病。研究包含根據本發明之細菌品系之組成物抑制 NFκB 啟動子之活化之能力。

材料及方法

細菌品系

【0278】 芽孢巨球型菌 MRx0029

細胞株

【0279】 人類 Hek blue TLR4 購自 InvivoGen (cat n. hkb-htlr4)。使人類 Hek blue TLR4 生長於補充有 10% FBS、1% Pen Strep、4 mM L-Glut、Normocin、及 1X HEK Blue 選擇溶液之 DMEM 高葡萄糖(Sigma Aldrich, cat n. D-6171)中。

方法

【0280】 一旦生長，便將人類 Hek blue 細胞以 25,000 個細胞/孔一式四份鋪板於 96 孔盤中。將一組細胞以 α-突觸核蛋白 A53T (1 ug/mL)單獨地或與 MRx0029 之 10%細菌上清液一起處理 22 h。將第二組細胞以 LPS (10 ng/mL, 來自鼠傷寒腸道沙門氏菌血清型(Salmonella enterica serotype Typhimurium), Sigma Aldrich, cat n. L6143)單獨地或與 MR029 之 10%細菌上清液一起處理 22 h。隨後將細胞離心沉降，且將 20 ul 上清液與 200 ul Quanti Blue 試劑(InvivoGen, cat n. rep-qb2)混合，孵育 2 h 且在 655 nm 下讀取吸光度。

結果

【0281】 這些實驗之結果顯示於圖 5 及 6 中。圖 5 顯示 NFκB 啟動子被 α-突觸核蛋白活化受 MRx0029 抑制。圖 6 顯示 NFκB 啟動子被 LPS 活化受 MRx0029 抑制。

實例 4 - 細菌接種物改變抗氧化能力之功效

概述

【0282】 包含根據本發明之細菌品系之組成物改變抗氧化能力之能力。使用熟知之 ABTS (2,2'-次偶氮基-雙(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))檢定確立細菌品系之抗氧化能力。

細菌品系

【0283】 芽孢巨球型菌 MRx0029

方法

【0284】 收集細菌細胞(10^6 或更大)並離心。將其再懸浮於檢定緩衝液(使用三倍團塊體積)中。將懸浮液於冰上聲處理 5 分鐘，然後以 12,000 x g 離心沉降 10 分鐘。根據製造商之說明書，將上清液移除，並使用 Sigma Aldrich 生產之 ABTS 檢定套組(編碼 CS0790)進行測量。

結果

【0285】 這些實驗之結果顯示於圖 7 中。圖 7 顯示 MRx0029 具有相較於 Trolox 大約 2 mM 之抗氧化能力。

實例 5 - 細菌接種物改變脂質過氧化水準之功效

概述

【0286】 研究包含根據本發明之細菌品系之組成物改變脂質過氧化水準之能力。使用硫巴比妥酸反應性物質檢定(TBAR)測量脂質過氧化之副產物。

材料及方法

細菌品系

【0287】 芽孢巨球型菌 MRx0029

方法

【0288】 收集細菌細胞(10^6 或更大)並離心，以等滲鹽水進行洗滌步驟，之後將團塊再懸浮於氯化鉀檢定緩衝液中。將懸浮液於冰上聲處理 10 分鐘，然後以 10,000 x g 離心沉降 10 分鐘。將上清液移除，並使用硫巴比妥酸反應性物質檢定評估脂質過氧化水準。

結果

【0289】 實驗之結果顯示於圖 8 中。圖 8 顯示 MRx029 能夠抑制脂質過氧化大約 20 %，其抗氧化能力高於陽性對照丁基化羥基甲苯(1% w/v)。

實例 6 - 細菌接種物對組蛋白去乙醯酶活性之功效

概述

【0290】 研究包含根據本發明之細菌品系之組成物改變組蛋白去乙醯酶活性之能力。組蛋白去乙醯酶之調節異常牽涉與年齡相關神經退行性疾病有關之發病原理。

材料及方法

細菌品系

【0291】 芽孢巨球型菌 MRx0029

細胞株

【0292】 使用細胞株 HT-29，因為存在組蛋白去乙醯酶。

方法

【0293】 藉由離心及於 0.22 uM 過濾器中過濾來單離靜止相細菌培養物之無細胞上清液。匯合後 3 天使用 HT-29 細胞，且在開始實驗之前 24 小時於 1 mL

DTS 中縮小。以 10%稀釋於 DTS 中之無細胞上清液攻擊 HT-29 細胞，且使其孵育 48 小時。然後使用 Sigma Aldrich 核酸酶提取套組來提取核酸酶蛋白，且將樣本速凍，之後進行 HDAC 活性測量。使用 Sigma Aldrich (UK)套組螢光評定 HDAC 活性。

結果

【0294】 實驗之結果顯示於圖 9 中。圖 9 顯示 MRx0029 能夠減小組蛋白去乙醯酶活性之水準。

實例 7 - 細菌中吲哚產生之水準

概述

【0295】 研究本發明之細菌產生吲哚之能力。吲哚牽涉減輕炎症及氧化壓力。

材料及方法

細菌品系

【0296】 芽孢巨球型菌 MRx0029

【0297】 ATCC 11775 為已知產生吲哚之細菌參考品系。

方法

【0298】 將以靜止相之完整細菌細胞以 6 mM 色胺酸孵育 48 小時。具有色胺酸酶之細菌種將利用色胺酸作為產生吲哚之受質。48 小時孵育期之後，將上清液移除並添加至柯瓦克試劑(Kovac's reagent)中以供吲哚之定量。使用內部驗證之標準化方法製備標準物、儲備溶液、及試劑。

結果

【0299】 實驗之結果顯示於圖 10 中。圖 10 顯示 MRx0029 具有在大約 0.2 mM 之濃度下由色胺酸產生吲哚之能力。

實例 8 - 細菌中犬尿胺酸產生之水準

概述

【0300】 研究本發明之細菌產生犬尿胺酸之能力。犬尿胺酸路徑之調節異常可引起免疫系統之活化及潛在神經毒性化合物之累積。犬尿胺酸代謝之改變可涉及帕金森氏病之發展。

細菌品系

【0301】 芽孢巨球型菌 MRx0029

【0302】 DSM 17136 為已知產生犬尿胺酸之類桿菌屬品系 copricola。

方法

【0303】 藉由離心及於 0.22 uM 過濾器中過濾來單離靜止相細菌培養物之無細胞上清液並冷凍直至使用。使用內部驗證之標準化方法製備犬尿胺酸標準物、儲備溶液、及試劑。將樣本以三氯乙酸處理，並在 4℃下以 10,000xg 離心 10 分鐘。收集上清液並分配之 96 孔盤中。將艾利希試劑用於犬尿胺酸偵測並以 1:1 之比率添加。

結果

【0304】 實驗之結果顯示於圖 11 中。圖 11 顯示 MRx0029 具有以大約 40 μM 之濃度產生犬尿胺酸之能力。

實例 9 - 細菌處理之 MPTP 小鼠之紋狀體中多巴胺、DOPAC、及 HVA 之水準

【0305】 帕金森氏病為一種常見神經退行性病症，其主要臨床特種包括震顫、運動緩慢、僵硬、及姿勢不穩定。這些症狀主要可歸因於黑質緻密部中多巴胺神經元之退化及因而紋狀體中其投射神經纖維之損失[60]。以 MPTP (1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氫吡啶)處理之小鼠選擇性地損失大量黑質紋狀體多巴胺神

經元[61]。MPTP 誘導黑質中多巴胺細胞之損失，模擬帕金森氏病之臨床病況，且因此為測試抗巴金森氏病藥物之實用模式。

【0306】 此研究之目的為使用 MPTP 損害之小鼠評估 MRX0029 厭氧菌之作用。

【0307】 將 48 只雄性小鼠分配於 4 個不同的處理組(組 A、B、E、及 I，各組中具有 n=12 只動物)。處理組顯示於以下表 1 中，且計劃時程在以下概述。

表 1：處理組

組別	n	處理					損傷			
		物質	安全性水準	劑量	途徑	排程	物質	劑量	途徑	排程
A	12	媒劑(PBS)	-	-	p.o.	18 天：第(-14)天 - 第 3 天	媒劑(0.9%鹽水)		i.p.	第 0 天
B	12	媒劑(PBS)	-	-	p.o.	18 天：第(-14)天 - 第 3 天	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	第 0 天
E	12	MRx0029 巨球型菌種(gly)	S1/S2	2 x 10^8 個細菌	p.o.	18 天：第(-14)天 - 第 3 天	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	第 0 天
I	12	媒劑(PBS)	-	-	p.o.	18 天：第(-14)天 - 第 3 天	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	第 0 天
		7-硝基吲唑	-	50 mg/kg	i.p.	第 0 天(2x i.p.)				

【0308】 將組 A、B、E、及 I 經由口服管飼細菌(MRx0029 - 組 E)或媒劑(PBS)每日處理達 18 天。口服處理進行 14 天，之後進行 MPTP 損傷。組 I 動物以 p.o. (經口)處理每日接受媒劑(PBS)且在第一次 MPTP 第 0 天之前 30 min 及之後 90 min i.p. (腹膜內)注射參考藥物。p.o.及媒劑處理之應用體積為每只小鼠 200 μl。組 E 之細菌品系係來自甘油儲料(gly)。對於口服處理，將應用之管飼

物儲存於含有 70%乙醇之小瓶且在每次使用之前及之後以蒸餾水沖洗。每個處理組具有其特有管飼物以及乙醇小瓶及蒸餾水小瓶。組之間的管及管飼物無變化。就在處理之前，將各注射器以 N2 沖洗。

【0309】 在第 0 天，將 MPTP (20 mg/kg 體重(b.w.) 4 次，2 h 處理間間隔) i.p.注射於組 B、E、及 I 之動物中。將一組動物(A)藉由 i.p.投與 MPTP 媒劑(0.9%鹽水)進行偽損傷。應用體積為 10 μl 每 g 體重。在 MPTP 處理之前進行動物之稱重，以根據其實際體重向動物給藥。然後，動物接受每日 p.o.處理。

用於給藥之製劑及用於給藥之甘油儲料之製劑之調配

細菌品系之名稱：	MRx0029 巨球型菌種
儲存條件/穩定性：	-80℃
媒劑：	1x PBS
處理劑量：	2 x 10^8 個細菌
投與：	200 μl
批號：	n/a

對於治療組 E (MRx0029)

1.) 將 1 種甘油儲料取自-80℃冷凍器且放置於 37℃之缺氧條件(具有小袋之缺氧罐)以解凍(此舉進行 30-40 min)。

2.) 在室溫下將完全解凍之甘油儲料在 6000 x g 下離心 10 min。

3.) 將上清液捨棄，但不捨棄團塊(例如，使用吸量管)。

4.) 添加 4.22 mL 無菌、經預熱(37℃)之 1 x PBS 且使用吸量管溫和地混合。

5.) 將小鼠給藥 200 μL 細菌溶液。在以 PBS 再懸浮團塊之後，在 15 min 內將動物給藥。

參考藥物組調配

參考項之名稱：	7-硝基吲唑
儲存條件/穩定性：	-20℃
媒劑：	花生油
處理劑量：	50 mg/kg

投與：	i.p.(在第一次 MPTP 處理之前 30 min 及之後 90 min)
批號：	MKBS6671V

【0310】 將適當量 7-硝基吲唑溶解於花生油中以達到最終濃度 50 mg/kg。

材料及方法

動物

小鼠系：	C57BL/6J (JAX™ Mice Strain) JAX™ 小鼠庫存編號 000664
提供方：	Charles River Laboratories
開始時年齡：	約 10 週
性別：	雄性
動物數：	48

動物之具體處理及隨機化

【0311】 各處理組之間更換手套，且在相同組之各籠子之間噴灑 70%乙醇溶液，以使污染風險最小，無論何時處理動物(例如，處理、行為測試、清潔、及組織取樣)。

【0312】 隨機地進行處理且每天交替，以便防止相同的組在各天相同時間經處理。在組織取樣時，將每個籠子的動物隨機化。

組織取樣及處理

【0313】 在第 4 天，將所有組之動物殺死且收集腦。因此，藉由戊巴比妥注射(600 mg/kg)將小鼠深度麻醉。

【0314】 藉由心臟穿刺收集血液(大約 500 μl)。然後將小鼠以 0.9%鹽水穿心灌注，且將腦移除並對半切。將左半球細分成紋狀體組織(用於 HPLC)、黑質組織、以及剩餘腦，稱重，且立即冷凍並在-80℃下儲存。與動物接觸的儀器及表面必須以 70%乙醇清潔，之後解剖下一隻動物。

紋狀體中以 HPLC 之多巴胺、DOPAC、及 HVA 水準之生化分析

【0315】 將紋狀體樣本(各處理組 n=6；總計 24 個樣本)以比率 1:10 (w/v)與包括 100 μM EDTA-2Na 之 0.2 M 過氯酸混合，且在 0℃下於玻璃-杵型微量均質機中均質化。在冰上靜置 30 min 之後，將均質物於冷凍離心機 Biofuge Fresco (Heraeus Instruments, Germany)中以 10,000 RPM 離心 10 分鐘。將上清液小心吸出，且與 pH 3 0.4 M 乙酸鈉緩衝液以比率 1:2 (v/v)混合，且在 4℃下透過 0.22 μm 離心過濾器(Merck Millipore, Germany)在 14 000 g 下過濾 4 min。將濾液在-80℃下儲存，之後進行 HPLC 分析。

HPLC 分析

【0316】 藉由管柱液相層析法與電化學偵測確定紋狀體樣本中 DA、DOPAC、及 HVA 之濃度[62;63]。使用配備有在+0.45 V 對 Ag/AgCl 參考電極下運行之玻碳電極的 HPLC 系統(HTEC-500, Eicom Corp., Kyoto, Japan)，其包括無脈衝微流量泵、除氣機、及安培偵測器。藉由使用 CMA/200 Refrigerated Microsampler (CMA/Microdialysis, Stockholm, Sweden)注射樣本。記錄層析圖且藉由使用電腦化數據收集系統(DataApex, Prague, Czech Republic)進行整合。在 150 x 2.1 i.d. mm 管柱(CA5-ODS, Eicom Corp., Kyoto, Japan)上分離 DA、DOPAC、及 HVA。流動相由 pH 6.0 之 0.1 M 磷酸鹽緩衝液、0.13 mM EDTA、2.3 mM 1-辛烷磺酸鈉、及 20 % (v/v)甲醇組成。評估 DA 之偵測極限(訊噪比=3)為注射至管柱上之 15 μl (0.03 nM)中為 0.5 fmol。

結果

【0317】 注射細菌品系被動物良好耐受。在 MPTP 損傷日且必要時之後的一天，使用紅光使動物升溫。若動物處於不良病況(感覺冷、脫水、行為異常)，則必要時將其補給含水食物及皮下鹽水處理。

【0318】 對於多巴胺、DOPAC、及 HVA 水準之分析，使用每個處理組 6 只動物之紋狀體組織。藉由使用克-瓦二氏檢定(Kruskal-Wallis test)，接著鄧恩多重比較事後檢定(Dunn's multiple comparison post hoc test)，或單向變異數分析，接著邦弗朗尼事後檢定(Bonferroni post hoc test)來分析數據(A 對所有(*)，B 對所有，I 對所有(#))。*/# = $p<0.05$；** = $p<0.01$；*** = $p<0.001$。

【0319】 組 A 中之健康動物具有高水準之多巴胺、DOPAC、及 HVA，而組 B 中之 MPTP 處理使此減小，且陽性對照(組 I)使產量恢復至相同程度(圖 12)。組 I 之動物傾向於具有高於細菌處理之組及組 B 之多巴胺水準。相較於組 A 之未損傷動物之 DOPAC (多巴胺代謝物)水準，組 B 之動物之 DOPAC 水準一般顯著較低(圖 12B)。

【0320】 顯著地，發現以 MRx0029 之治療(組 E)恢復多巴胺及 DOPAC 之產生(分別為圖 12A 及 12B)。因此以 MRx0029 之治療實用於治療或預防神經退行性病症。

實例 10 - 細菌改變神經突長出之功效

概述

【0321】 神經突長出為神經元之間的連接之發展之重要過程。因此，藉由測量微管相關蛋白 MAP2 (特異性神經元分化標記物)之轉錄水準來測量細菌品系及有機酸誘導神經突長出之能力。

細菌品系

【0322】 芽孢巨球型菌 MRX0029。

方法

【0323】 將 SHSY5Y 以 2×10^6 個細胞之密度鋪板於 10 cm 培養皿中。24 h 之後，將細胞於具有 10%細菌上清液或 YCFA+、10 uM RA、200 uM 己酸或 200

uM 丙戊酸之分化培養基(含有 1% FBS 而無 RA 之生長培養基)中處理 17 h。之後，使用相位差 EVOS XL 核顯微鏡以 40X/0.65 放大率取得代表性影像。收集細胞，且根據 RNeasy 迷你套組規程(Qiagen)單離總 RNA。使用大容量 cDNA 反轉錄套組(Applied Biosystems)製成 cDNA。使用 qPCR 測量基因表現。將 GAPDH 用作內部對照。根據 $2^{(-\Delta\Delta ct)}$方法計算倍數變化。

免疫螢光及共焦顯微法

【0324】 將細胞以 5×10^4 個細胞/孔接種於 8 孔培養玻片(chamber slide)(Marienfeld Laboratory Glassware)上且以 10%細菌上清液處理 24 h。對於分化，將細胞以 10 nM 視網酸處理 5 天，之後以細菌上清液處理 24 h。然後，在室溫(RT)下將細胞以 4%於 PBS 中之多聚甲醛固定 20 分鐘。將固定之細胞以 PBS 洗滌，且以 1%於 PBS 中之曲通 X-100 透化 10 分鐘。以 PBS 洗滌之後，將玻片在 RT 下以阻斷緩衝液(4% BSA/PBS)孵育 1 h，之後在 4℃下添加稀釋於 1% BSA/PBS 中之抗 MAP2 抗體(sc-74421, Santa Cruz Biotechnology Inc)達 12 h。然後將其以 PBS 洗滌兩次，接著在 RT 下與 Alexa Flour 488 綴合之抗小鼠(Molecular Probes Inc)及 Alexa Flour 594 綴合之鬼筆環肽(ab176757, Abcam)孵育 1 h。以 PBS 洗滌 3X 之後，將玻片以含有 DAPI (Sigma, Aldrich)之 Vectorshield 封固。使用配備有 63x/1.2 W Korr 物鏡及合適於偵測所用之螢光染料之濾光器組之 Zeiss Axioscope 顯微鏡觀察玻片。使數位獲取以 MAP-2 免疫標記之影像之人工暴露時間保持一致，從而實現孔與處理之間的比較。鬼筆環肽(F-肌動蛋白)及 DAPI 暴露時間變化以適合視場。使用 Image Pro Plus 軟體控制之 QImaging 照相機獲得隨機化之視場。將影像保存為 TIF 且於 Adobe Photoshop CC 2015.1.2 中打開，且將 MAP-2、DAPI、及 Phalloidion 影像之重疊進行重疊且合併。選擇代表性影像以說明所檢查之蛋白之豐度及位置之差異。

結果

【0325】 結果顯示於圖 13 中。圖 13A 顯示與酸及細菌上清液之各者孵育之未分化 SHSY-5Y 細胞之代表性顯微術影像。以 MRX0029 處理細胞誘導類神經元之表型，其顯示與以視網酸(其用於神經胚細胞瘤細胞之末端分化)處理之細胞類似的特徵，其中細胞本體較大且為錐形，其具有神經突且經處理向外分枝以與相鄰細胞形成網絡。圖 13B 顯示 MRx0029 顯著上調未分化神經胚細胞瘤細胞中之 MAP2。鬼筆環肽(肌動蛋白細胞骨架結合劑)染色進一步提供以 MRx0029 處理之細胞中細胞骨架結構之不同排列，進一步支持 MRx0029 之神經元分化假說(圖 13B)。

實例 11 - 細菌接種物減小細胞中氧化水準之功效

背景

【0326】 活性含氧物之生成有助於神經退行性疾病之病理學。研究細菌品系保護經分化 SHSY-5Y 及 U373 細胞免遭藉由以第三丁基過氧化氫(TBHP)處理所生成之活性含氧物(ROS)影響之能力。

材料及方法

細菌品系

【0327】 芽孢巨球型菌 MRX0029

方法

【0328】 將 SHSY-5Y 細胞以 5000 個細胞/孔之密度鋪板於黑色平底 96 孔盤中且放置於 CO2 孵育器中。24 h 之後，將培養基更換為分化培養基(含有 1% FBS 之生長培養基)及 10 μM 視網酸。每隔一天更換分化培養基。在第 10 天，將分化培養基移除，且將細胞以經預熱之 PBS 洗滌並以 10 uM DCFDA 分子探針於含有 1% FBS 之生長培養基中染色 20 min。然後將細胞再次以經預熱之

PBS 洗滌並以 100 uM TBHP 在存在或不存在 10%細菌上清液之情況下處理 2 h。使用 TECAN 盤讀取器在 Ex/Em 485/530 nm 下測量螢光強度。

結果

【0329】 實驗之結果顯示於圖 14 中。圖 14b 顯示，MRX0029 能夠抑制經分化之 SHSY-5Y 神經胚細胞瘤細胞中之 ROS 產生。MRX0029 對 U373 星形神經膠母細胞瘤細胞中 ROS 之產生無作用(圖 14a)。此顯示抗氧化作用之態樣具有神經元特異性。

實例 12 - 神經保護

【0330】 將 RA 分化之 SHSY-5Y 細胞以 MPP+、MPTP 之活性代謝物、廣泛用於體外及體內模擬 PD 病理學之一些特徵之化學品處理。呈粒線體呼吸速率測量細胞活力(圖 15)。MRx0005 及 MRx0029 兩者均顯示顯著作用且本質上促進 SHSY-5Y 細胞中粒線體代謝活性之增加。MRX0029 顯示完全保護免遭 MPP+，將細胞活力修復至接近於未處理細胞之相同水準且高於槲皮素陽性對照。與 YCFA-MPP+處理之樣本相比 MRx0005 保護為約 20%，約與針對槲皮素陽性對照所觀察到的相同(圖 15)。

實例 13 - 組蛋白去乙醯抑制之機制之進一步分析

介紹

【0331】 腸微生物區(其多樣性及代謝能力很好)代表產生各種各樣可能影響 HDAC 活性之分子的大型代謝庫。一些研究已評估除丁酸鹽之外的微生物衍生代謝物之 HDAC 抑制活性，已顯示丁酸鹽抑制 HDAC 且與杭丁頓氏病之運動功能之改良相關[64]。因此發明人試圖確定哪些代謝物負責 HDAC 抑制且進一步解釋達成抑制的機制。

材料及方法

細菌培養物及無細胞上清液收集

【0332】 使細菌之純培養物缺氧地生長於 YCFA 肉湯中，直至其達成其靜止生長期。將培養物在 5,000 x g 下離心 5 分鐘，且使用 0.2 μM 過濾器(Millipore, UK)過濾無細胞上清液(CFS)。將 1 mL 等分試樣的 CFS 在-80℃下儲存直至使用。丁酸鈉、己酸、及戊酸獲自 Sigma Aldrich (UK)，且懸浮液係於 YCFA 肉湯中製備。

細菌上清液之 SCFA 及 MCFA 量化

【0333】 如下藉由 MS Omics APS 分析且量化來自細菌上清液之短鏈脂肪酸(SCFA)及中鏈脂肪酸(MCFA)。使用鹽酸將樣本酸化，且添加氘標記之內標準。將所有樣本以隨機次序進行分析。使用安裝於耦聯四極偵測器(59977B, Agilent)之 GC (7890B, Agilent)中之高極性管柱(Zebron™ ZB-FFAP, GC Cap.管柱 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)進行分析。藉由 ChemStation (Agilent)控制系統。將原始數據使用 Chemstation (Agilent)轉換成 netCDF 格式，之後輸入數據且於 Matlab R2014b (Mathworks, Inc.)中使用[65]中所述之 PARADISe 軟體處理。

特異性 HDAC 活性分析

【0334】 使用各 HDAC 類型之螢光檢定套組(BPS Bioscience, CA)分析 HDAC1、2、3、4、5、6、9 之特異性 HDAC 抑制活性。根據製造商之說明書進行鑒定，且重複進行各樣本。以 1/10 稀釋無細胞上清液，且暴露於套組中所提供之特異性 HDAC 蛋白，以保持方法之間的一致性。

結果

組蛋白去乙醯酶抑制腸共生微生物代謝物為丁酸鹽及戊酸

【0335】 其在 HT29 全細胞及 HT29 細胞溶解產物中之上清液顯示強 HDAC 抑制的 MRx0029 產生分別以平均濃度 5.08 mM 及 1.60 mM 之戊酸及己酸(圖 16A 及 C)。

【0336】 為研究哪些代謝物負責品系誘導之 HDAC 抑制，測量 HT-29 全細胞上及 HT-29 細胞溶解產物上己酸、戊酸、及丁酸鈉對於其 HDAC 抑制的不同濃度。圖 16B 中之結果顯示全細胞上以及細胞溶解產物上丁酸鈉顯著($P<0.05$)抑制 HDAC 活性，而己酸不顯示顯著的抑制活性。戊酸抑制總 HDAC 活性(* ($p<0.05$)，** ($p<0.005$)，*** ($P<0.001$)，**** ($p<0.0001$))。

所研究之有效總 HDAC 抑制劑靶向 I 類 HDAC。

【0337】 研究測試細菌品系之特異性 HDAC 抑制概況。進行 I 類及 II 類 HDAC 之特異性 HDAC 抑制檢定(BPS Bioscience, CA)。將細菌品系抑制 HDAC 酶之能力與丁酸鹽、己酸、及戊酸相比較。結果說明 MRX0029 為 1 類 HDAC 酶(HDAC1、2、及 3)之非常有效的抑制劑。II 類 HDAC 之抑制不那麼顯著(數據未圖示)。

討論

【0338】 具有 HDAC 抑制活性之品系產生大量的戊酸及己酸以及大量的丁酸鈉(圖 16C)。當作為純物質測試時，戊酸及丁酸鈉產生顯著的 HDAC 抑制($p<0.0001$)。

【0339】 有趣的是，特異性 HDAC 活性之結果顯示，測試之品系為 I 類 HDAC 且尤其 HDAC2 之有效抑制劑(圖 17 及 18)。I 類 HDAC (HDAC1、2、3、及 8)位於細胞核中且普遍地表現於若干人類細胞型中。HDAC 1-3 共有多於 50%同源性，但具有不同的結構及細胞功能[66]。其主要涉及細胞存活、增

殖、及分化，且因此其抑制可實用於一系列廣泛的疾病[67]；[68]；[69]；[70]；[71]。

實例 14 - SHSY-5Y 細胞中 BDNF 分泌之水準

背景

【0340】 腦衍生之神經營養因子(BDNF)為腦中普遍存在的與神經發展、神經保護、及神經再生相關之分子。BDNF 不僅防止神經退化，而且還防止精神病症如抑鬱及焦慮(其在診斷具有 PD 或 AD 之患者中相當常見)。

方法

【0341】 將 SH-SY5-SY 以 60,000 個細胞/孔之密度鋪板於 24 孔盤中且放置於孵育器中。24 h 之後，將培養基更換為分化培養基(含有 1% FBS 之生長培養基)及 10 μM 視網酸。每隔一天更換分化培養基，且在分化第 10 天使用細胞。對於處理，將分化培養基移除且更換為 450 ul 全生長培養基，且將 50 μl 細菌 SN 添加至處理孔中，或添加 YCFA+作為陰性對照。

結果

【0342】 結果顯示於圖 19 中，該圖顯示投與 MRX0029 以及視網酸增加自經分化神經胚細胞瘤之細胞之 BDNF 之分泌。包含共生細菌及有機酸之組成物因此可實用於療法中。

實例 15 - 代謝物產生 - 腦中之代謝物

背景

【0343】 細菌上清液中存在之代謝物可回應於氧化壓力、細胞間通信、及神經保護而直接影響宿主。在飼喂 MRx0005 及 MRx0029 之小鼠之腦組織中之離體篩選期間測量在神經過程中起關鍵作用的代謝物。

方法

動物

【0344】 將 BALBc (Envigo, UK)成年雄性小鼠在 12 h 日夜週期下群養；隨意供應標準齧齒動物食物及水。在科克大學動物實驗倫理委員會(University College Cork Animal Ethics Experimentation Committee)同意之後，根據歐洲指導進行所有實驗。在實驗開始時動物為 8 週齡。

研究設計

【0345】 使動物在到達動物中心(animal unit)之後習慣於其飼養室(holding room)達一週。其在 15:00 與 17:00 之間連續 6 天以 1×10^9 CFU 之劑量接受口服管飼(200 μL 劑量)的活體生物治療劑。第 7 天，將動物砍頭，且收穫組織以供實驗。

組織收集

【0346】 將動物關於處理及測試條件以隨機方式處死；在 9.00 a.m.與 1:00 p.m 之間進行取樣。於 EDTA (四乙酸乙二胺)鉀鹽中收集軀幹血且以 4000 g 旋轉 15 min。將血漿單離且在-80℃下儲存以供進一步分析。將腦快速切除，解剖且將各腦區域在乾冰上速凍且在-80℃下儲存以供進一步分析。將脾移除且在揀選之後立即處理以供離體免疫刺激。將腸組織(切除最接近盲腸之回腸及結腸之 2 cm 區段，且使用距盲腸最遠的 1 cm 組織)安裝於尤斯灌流室(Using chamber)中以供腸滲透性檢定。將盲腸移除，稱重且在-80℃下儲存以供 SCFA 分析。

單胺分析

【0347】 藉由 HPLC 分析來自腦幹之樣本上之神經傳遞物濃度。簡言之，將腦幹組織於 500 μl 摻有 4 ng/40 μl N-甲基 5-HT (Sigma Chemical Co., UK)之冷卻移動相中聲處理作為內標準。移動相含有 0.1 M 檸檬酸、5.6 mM 辛烷-1-磺酸(Sigma)、0.1 M 磷酸二氫鈉、0.01 mM EDTA (Alkem/Reagecon, Cork)、及 9%

(v/v)甲醇(Alkem/Reagecon)，且使用 4 N 氫氧化鈉(Alkem/Reagecon)調整至 pH 2.8。然後將均質物在 4℃下以 22,000 × g 離心 15 min，且將 40 μl 上清液注射至由以下組成之 HPLC 系統上：SCL 10-Avp 系統控制器、LECD 6A 電化學偵測器(Shimadzu)、LC-10AS 泵、CTO-10A 烘箱、SIL-10A 自動注射器(其中樣本冷卻器維持在 40 C)、及線上 Gastorr 除氣機(ISS, UK)。分離中採用維持在 30℃之反相管柱(Kinetex 2.6 u C18 100 × 4.6 mm, Phenomenex)(流速 0.9 ml/min)。玻碳工作電極與 Ag/AgCl 參考電極(Shimdazu)組合在+0.8 V 下操作，且使用 Class-VP 5 軟體(Shimadzu)分析生成之層析圖。如藉由標準注射物所確定，藉由神經傳遞物之特徵保留時間鑒別神經傳遞物，標準注射物在樣本分析期間以規律的間隔運行。測量分析物對內標準之峰高比，且將其與標準注射物比較。將結果表述為 ng 神經傳遞物每 g 鮮重組織。

代謝物分析

【0348】 對於 GC-代謝物分析，使用[72]中所述之規程之略修改版本以氯甲酸甲酯衍生細菌上清液之樣本。將所有樣本以隨機次序進行分析。使用耦聯四極偵測器(59977B, Agilent)之 GC (7890B, Agilent)進行分析。藉由 ChemStation (Agilent)控制系統。將原始數據使用 Chemstation (Agilent)轉換成 netCDF 格式，之後輸入數據且於 Matlab R2014b (Mathworks, Inc.)中使用[65]中所述之 PARADISe 軟體處理。

【0349】 對於脂肪酸分析，使用鹽酸將樣本酸化，且添加氘標記之內標準。將所有樣本以隨機次序進行分析。使用安裝於耦聯四極偵測器(59977B, Agilent)之 GC (7890B, Agilent)中之高極性管柱(Zebron™ ZB-FFAP, GC Cap.管柱 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)進行分析。藉由 ChemStation (Agilent)控制系統。將原始數

據使用 Chemstation (Agilent)轉換成 netCDF 格式，之後輸入數據且於 Matlab R2014b (Mathworks, Inc.)中使用[65]中所述之 PARADISe 軟體處理。

結果 - 神經傳遞物產生

【0350】 結果顯示於圖 20 中，該圖顯示在飼喂 MRx0029 之小鼠之腦中，去甲腎上腺素水準增加(p=0.0507)，伴隨著血清素及 5-HIAA 略微增加。這些數據支持以下闡述之代謝物分析，表明 MRx00029 為 4-羥苯基乙酸(已知的抗氧化劑[73])之主要生產者。更重要的是，4-羥苯基乙酸為多巴胺及正腎上腺素之合成中間物且為重要是生物活性分子[74]。事實上，在 PD 中，退化性變化不僅影響多巴胺系統，還同等地影響血清素及去甲腎上腺素系統，其繼而引起紋狀體及外紋狀體(extra-striatal)結構中血清素(5-羥基色胺, 5-HT)及去甲腎上腺素(正腎上腺素)之水準減小[75]。L-DOPA 主要靶向 PD 之多巴胺相關特徵，然而其並不解決 5-HT 及去甲腎上腺素之減少。而且，L-DOPA 處理之持續時間越長，運動及非運動併發症(例如運動困難、精神症狀)之範圍越明顯[76]。因此，這些資料說明產生有機酸(諸如 4-羥苯基乙酸)之細菌可實用於療法尤其是神經退行性疾病之治療中。

結果 - 代謝物產生

【0351】 細菌上清液中存在之代謝物具體而言可回應於氧化壓力、細胞間通信、及神經保護而直接影響宿主。分析 MRX0029 及 MRX0005 之培養物之上清液中之代謝物，且結果顯示於圖 21 中。

【0352】 一些代謝物顯示所分析之兩種品系之間的顯著差異。MRx0005 中琥珀酸之濃度尤其高。有趣的是，針對 4-羥苯基乙酸之樣本/培養基比率顯著高於 MRx0029 中(圖 21A)。

【0353】 上清液中之脂肪酸分析顯示兩種品系中之有趣的二元現象：MRx0005 主要產生乙酸及丙酸，而 MRx0029 產生丁酸、戊酸、及己酸，兩者均以線性及分枝形式(圖 21B)。兩種品系看起來非常不同，且具體而言，琥珀酸及 4-羥苯基乙酸分別由 MRx0005 及 MRx0029 產生是顯著的(圖 21A)。此外，MRx0005 似乎產生更多 C2 及 C3 短鏈脂肪酸，而 MRx00029 產生更多 C4 (丁酸鹽)及線性與分枝中等鏈脂肪酸，包括己酸。

【0354】 琥珀酸為克雷布斯(Krebs)循環代謝物，其涉及氧化磷酸化。氧化磷酸化複合物為突觸將蛋白及囊泡運輸至近側及遠側區域之關鍵步驟[77]。神經退行性病症(包括阿茲海默氏病、帕金森氏病、及 1 型脊髓小腦性失調症)中已報導其功能異常[78]。這些發現為尤其有趣的，因為琥珀酸可加強粒線體活性並支持與錯誤折疊蛋白相關之神經退行性疾病(包括 PD)中之脆弱神經元[79]。BDNF 及琥珀酸不僅在神經退行中而且在精神病症如抑鬱及焦慮(其在診斷具有 PD 或 AD 之患者中相當常見)中均具有類似的保護活性。

【0355】 圖 21B 亦說明 MRX0029 為丁酸鹽(丁酸)產生者。這可為顯著的，因為已知丁酸鹽在減少血腦障壁之不滲透性中起作用，其具有神經保護作用[80]。MRx0029 (及其他神經保護障壁)之這種性質可有助於其功效。

實例 16 - 藉由 MRx0029 之緊密接合蛋白之 mRNA 表現之調節

【0356】 因為最近證據表明，腸功能異常及炎症為與 PD 相關之非運動症狀，所以研究本發明之細菌品系引起任何腸障壁功能異常之能力。將 HT29-mtx 上皮產黏蛋白細胞單層[81]用作以 MRx0005 及 MRx0029 處理之後評估腸障壁破裂及免疫刺激之體外模型。暴露於佛波醇 12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)之經分化 HT29-mtx 細胞分泌大量 IL-8；在以 MRx005 及 MRx0029 細菌

上清液之達 24 h 之對比處理中，與未處理及 YCFA 處理之細胞相比，誘導甚至更少的 IL-8 分泌(圖 22A)。

【0357】 然後研究 MRx0005 及 MRx0029 藉由修改細胞內信號轉導來調控上皮滲透性之能力，該細胞內信號轉導涉及腸障壁形成所涉及之蛋白之表現及定位。

【0358】 將 RNA 單離，且進行定量 RT-PCR (qRT-PCR)分析以表徵以 MRx0005 及 MRx0029 孵育期間緊密接合蛋白之基因表現之變化。在 2 h 孵育之後，MRx0029 之投與增強密封蛋白、絨毛蛋白、緊密接合蛋白 1 及 2 (分別為 TJP1 及 TJP2) mRNA 表現(圖 22B)。相反，於 MRx0005 之暴露不改變緊密接合蛋白之基因表現，其指示兩種品系對腸障壁起不同作用。

【0359】 將體外結果與飼喂 MRx0005 及 MRx0029 之小鼠之腸之離體平行分析之數據相比較。定量結腸及回腸中 TJP2 及密封蛋白之基因表現。離體數據完美地反映出體外數據，因為 MRx0029 能夠顯著上調鼠類腸之結腸區域中之 TJP1 及密封蛋白(p=0.073) (圖 22C+22D)。MRx0029 亦能夠減小相同小鼠之結腸中之滲透性功能(圖 22E+22F)。

材料及方法 - RNA 提取及 qPCR 分析

【0360】 根據生產商之說明書，使用 RNeasy 迷你套組(Qiagen, Manchester, JUK)提取總 RNA，且使用分光光度計(nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE)藉由在 260/280 nm 下之吸光度確定 RNA 濃度。對於 mRNA 表現分析，根據製造商之說明書，使用大容量 cDNA 逆轉錄套組(Applied Biosystems, UK)由總 RNA 製備 cDNA。於 Thermo 循環器 (Biometra, Germany) 在 25℃下達 10 min、37℃下達 120 min、及 85℃下達 5 min，保持在 4℃來進行逆轉錄反應。藉由 SYBR-Green PCR 檢定一式兩份地擴增所得 cDNA，且在

QuantStudio 6 flex 即時 PCR 機器(Applied Biosystems, UK)上使用標準化概況(95℃初始變性 10 分鐘，接著進行 40 個 95℃變性 15 秒且取決於引物之 60/65℃退火/伸長 60 秒之循環)偵測產物。40 個循環之後增加解離階段以產生熔化曲線。使用 Applied Biosystems QuantStudio 即時 PCR 軟體 v1.2 進行分析。序列表中提供肌動蛋白、絨毛蛋白、密封蛋白 TJP1 及 TJP2 之引物序列。

實例 16 - 穩定性測試

【0361】 將本文所述之含有至少一種本文所述之細菌品系之組成物於密封容器中在 25℃或 4℃下儲存，且將容器放置於具有 30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、90%、或 95%相對濕度之氣氛中。1 個月、2 個月、3 個月、6 個月、1 年、1.5 年、2 年、2.5 年、或 3 年之後，應剩餘至少 50%、60%、70%、80%、或 90%細菌品系，如以藉由標準方案所確定之菌落形成單位所量測。

實例 17

方法

動物

【0362】 所用之動物及研究設計與實例 15 相同。

細菌品系

【0363】 755: *人羅斯拜瑞氏菌(MRX005)*

【0364】 *芽孢巨球型菌(MRX0029)*

組織收集

【0365】 將動物關於處理及測試條件以隨機方式處死；在 9.00 a.m.與上午 02:30 p.m 之間進行取樣。於 EDTA (四乙酸乙二胺)鉀鹽中收集軀幹血且以 4000 g 旋轉 15 min。將血漿單離且在-80℃下儲存以供進一步分析。將腦快速切除，

解剖且將各腦區域在乾冰上速凍且在-80℃下儲存以供進一步分析。將脾移除，於 5 mL RPMI 培養基(具有 L-麩醯胺及碳酸氫鈉，R8758 Sigma + 10 % FBS (F7524, Sigma) + 1% Pen/Strep (P4333, Sigma))中收集，且在揀選之後立即處理以供離體免疫刺激。將腸組織(切除最接近盲腸之回腸及結腸之 2 3cm 區段，且使用距盲腸最遠的 1cm 2cm 組織)安裝於尤斯灌流室(Ussing chamber)中以供腸滲透性檢定。將盲腸移除，稱重且在-80℃下儲存以供 SCFA 分析。

單胺分析

【0366】 如實例 10 中所述分析神經傳遞物濃度

脾細胞介素檢定

【0367】 在殺死之後立即於 5 mL RPMI 培養基中收集脾且立即培養。首先將脾細胞於此 RPMI 培養基中勻化，接著以 1 ml RBC 溶解緩衝液(11814389001 ROCHE, Sigma)孵育 5 min。再添加 10 ml RPMI 培養基，接著進行 200G 離心達 5 min。然後將上清液透過 40 um 濾器過濾。對細胞進行計數且接種(4,000,000/mL 培養基)。2.5 h 適應之後，以脂多醣(LPS-2 μg/ml)或伴刀豆球蛋白 A (ConA-2.5 μg/ml)刺激細胞達 24 h。刺激之後，收穫上清液以使用促炎性組 1 (小鼠) V-PLEX 套組(Meso Scale Discovery, Maryland, USA)評定 TNFα、IL-10、IL-1β、干擾素 γ、CXCL2、及 IL6 之細胞介素釋放。使用 MESO QuickPlex SQ 120、SECTOR 成像器 2400、SECTOR 成像器 6000、SECTOR S 600 進行分析。

基因表現分析

【0368】 根據製造商之建議，使用 mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion/Llife technologies, Paisley, UK)提取總 RNA 且進行 DNase 處理(Turbo DNA-free, Ambion/life technologies)。根據製造商之說明書，使用 NanoDrop™

分光光度計(Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA)定量 RNA。根據製造商之程序，使用 Agilent 生物分析儀(Agilent, Stockport, UK)評定 RNA 品質且計算 RNA 完整數(RNA integrity number, RIN)。將 RIN 值>7 之 RNA 用於後續實驗。根據製造商之說明書，使用 Applied Biosystems 大容量 cDNA 套組(Applied Biosystems, Warrington, UK)將 RNA 反轉錄成 cDNA。簡言之，添加 Multiscribe 反轉錄酶(50 U/μL) (1)(2)(1)(10)作為 RT 主要混合物之一部分，在 25℃下孵育 10 min，37℃下孵育 2 h，85℃下孵育 5 min，且在 4℃下儲存。使用 Applied Biosystems 針對小鼠特定靶向基因設計之探針(6 羧基螢光素 - FAM)進行定量 PCR，同時使用 β-肌動蛋白作為內源性對照。擴增反應含有 1 μl cDNA、5 μl 2X PCR 主要混合物(Roche)、900 nM 各引物，且藉由添加無 RNase 水來達到總計 10 μl。使用 96 孔盤於 LightCycler®480 系統上一式三份地進行所有反應。熱循環條件係如製造商(Roche)所建議達 55 個循環。為了核查擴增子污染，對於所使用之各探針而言，各運行不含有一式三份之模板對照。記錄循環臨限(Ct)值。將數據使用 β-肌動蛋白正規化，且使用 2−ΔΔCT 方法轉型，並呈現為對對照組之倍數變化。

盲腸內容物中之短鏈脂肪酸分析

【0369】 將盲腸內容物與 MilliQ 水混合並渦旋，且在室溫下孵育 10 min。藉由離心(10000 g, 5 min, 4℃)以使細菌及其他固體成團並藉由 0.2 μm 過濾來獲得上清液。將其轉移至澄清 GC 小瓶中且將 2-乙基丁酸(Sigma)用作內標準。使用配合有 ZB-FFAP 管柱(30 m x 0.32 mm x 0.25 mm; Phenomenex)之 Varian 3500 GC 火焰離子化系統分析 SCFA 濃度。以不同濃度的含有乙酸鹽、丙酸鹽、異丁酸鹽、正丁酸鹽、異戊酸鹽、及戊酸鹽之標準混合物(Sigma)建立標準曲線，

該標準混合物。藉由使用 Varian Star 層析工作站 6.0 版軟體對峰進行積分。所有 SCFA 數據表述為 μmol/g。

統計分析

【0370】 正交分佈之數據呈現為平均值± SEM；非參數數據集呈現為中位數與四分位距。將不成對之雙尾 t 檢定用於分析參數數據，且將曼恩-惠尼(Mann-Whitney)檢定用於分析非參數數據。將斯皮爾曼等級相關係數(Spearman's rank correlation coefficient)用於彙集之數據集之相關分析。認為 p 值< 0.05 在所有情況下是顯著的。

結果－神經傳遞物產生

【0371】 圖 23 中之結果顯示 MRx005 處理對小鼠腦中神經傳遞物濃度之作用。最明顯的是，以 MRx005 之處理引起多巴胺減少。

結果－基因表現

【0372】 分析來自海馬體、扁桃體、及前額葉皮質之腦組織中神經傳遞物受體[血清素受體 1a (5-HTR1a)、多巴胺 D1 受體、GABA 受體離子亞單元 B1、GABAA 受體、NMDA2A (Grin2A)、及 NMDA2B (Grin2b)受體]、炎性標記物[IL-1β、IL6、CD11b、TNFα、及 TLR4]、及內源性標記物[促腎上腺皮質素釋放因子(CRF)、促腎上腺皮質素釋放因子受體 1 及 2 (CRFR1, CRFR2)、大腦衍生神經滋養因數(BDNF)、升壓素受體、催產素受體、糖皮質素受體、及礦皮質素受體]之基因表現。

【0373】 圖 24-38 顯示海馬、扁桃體、及前額葉皮質中 MRX005 或 MRX0029 處理之後基因表現之變化。以 MRx0029 之處理引起扁桃體中糖皮質素受體表現之增加(圖 31C)。圖 32A 顯示 MRx005 顯著增加扁桃體中 BDNF 之表現，同時以 MRx0029 之處理顯著增加扁桃體中 TLR4 之表現(圖 32)。

【0374】 MRx005 及 MRx0029 可增加扁桃體中 CD11b 之表現(圖 33A)，同時 MRx005 處理之後 IL-6、Grin2a、及 Grin2b 之表現減少(圖 33B-D)。此外，扁桃體中 MRx005 及 MRx0029 顯著增加 GABRA2 之表現且增加 GABBR1 之表現。

【0375】 以 MRx005 之處理引起前額葉皮質中 BDNF 之表現之顯著增加(圖 35B)。

討論

【0376】 MRx005 及 MRx0029 投與引起基因表現之變化，尤其是引起扁桃體中基因表現之變化。

結果－對 Tph1 及 IDO-1 表現之作用

【0377】 圖 39 顯示 MRx0029 可顯著增加結腸中色胺酸氫化酶-1 (Tph1)之表現，且 MRX005 處理可增加結腸中 IDO-1 表現。以 MRX005 之處理增加盲腸中 Tph1 及 IDO1 之表現(圖 40)。

【0378】 吲哚胺-吡咯 2,3-二氧酶-1 (IDO-1)為色胺酸/犬尿胺酸路徑中之第一且速率限制酶，而色胺酸氫化酶 1 (Tph1)為色胺酸氫化酶之同功型，負責血清素之合成。這些數據表明，MRx0029 及 MRx005 可影響血清素水準及色胺酸/犬尿胺酸路徑。

結果 - 對色胺酸代謝物水準之作用

【0379】 圖 41 顯示以 MRx005 之處理對循環犬尿胺酸及色胺酸之水準。

結果－對來自脾細胞之細胞介素表現之作用

【0380】 離體脾細胞檢定涉及以模擬細菌或病毒攻擊來攻擊脾細胞(單離自脾(涉及免疫防禦之主要器官)之細胞)。

【0381】 在以 LPS 之攻擊之後，MRX005 顯著減小脾細胞中干擾素-γ 之水準(圖 42)。此外，在以 LPS 之攻擊之後，MRX005 減小介白素-6 及腫瘤壞死因子之水準(分別為圖 44 及 45)。在以 LPS 之攻擊之後，以 MRx0029 之處理引起干擾素-γ、介白素-1β、及介白素-6 之減少(分別為圖 42、43、及 44)。

【0382】 以 MRx005 及 MRx0029 之處理引起化學吸引因數 CXCL1 水準之增加(圖 47)。

結果－對盲腸短鏈脂肪酸水準之作用

【0383】 當飲食之不可消化纖維被腸中之細菌發酵時產生短鏈脂肪酸(SCFA)。MRX005 投與之作用顯示於圖 48 中。

實例 18 - 基因表現水準中 MRX029 及 MRX005 誘導之變化之進一步分析

方法

細胞株

【0384】 SH-SY5Y 細胞

細菌品系

【0385】 755: *人羅斯拜瑞氏菌(MRX005)*

【0386】 *芽孢巨球型菌(MRX0029)*

qPCR

【0387】 將 SHSY5Y 以 2×10^6 個細胞之密度鋪板於 10 cm 培養皿中。24 h 之後，將細胞於具有 10%細菌上清液或 YCFA+、10 uM RA、200 uM 己酸或 200 uM 丙戊酸之分化培養基(含有 1% FBS 而無 RA 之生長培養基)中處理 17 h。之後，使用相位差 EVOS XL 核顯微鏡以 40X/0.65 放大率取得代表性影像。收集細胞，且根據 RNeasy 迷你套組規程(Qiagen)單離總 RNA。使用大容量 cDNA 反轉錄套組(Applied Biosystems)製成 cDNA。使用 qPCR 測量基因表現。將

GAPDH 用作內部對照。根據 $2^{(-\Delta\Delta ct)}$方法計算倍數變化。MAP2、DRD2、GABRB3、SYP、PINK1、PARK7、及 NSE 之引物序列提供於序列表中。

免疫標記及細胞成像

【0388】 將細胞以 5×10^4 個細胞/孔接種於 8 孔培養玻片(chamber slide)(Marienfeld Laboratory Glassware)上且以 10%細菌上清液處理 24 h。對於分化，將細胞以 10 nM RA 處理 5 天，之後以無細胞細菌上清液處理 24 h。然後，在室溫(RT)下將細胞以 4%於 PBS 中之多聚甲醛固定 20 分鐘。將固定之細胞以 PBS 洗滌，且以 1%於 PBS 中之曲通 X-100 透化 10 分鐘。以 PBS 洗滌之後，將玻片在 RT 下以阻斷緩衝液(4% BSA/PBS)孵育 1 h，之後在 4℃下添加稀釋於 1% BSA/PBS 中之抗 MAP2 抗體或 β3-微管蛋白(分別為 sc-74421 及 sc-80005，Santa Cruz Biotechnology Inc)達 12 h。然後將其以 PBS 洗滌兩次，接著在 RT 下與 Alexa Flour 488 綴合之抗小鼠(Molecular Probes Inc)及 Alexa Flour 594 綴合之鬼筆環肽(ab176757, Abcam)孵育 1 h。在以 PBS 洗滌 3X 之後，將玻片以 DAPI 染色且以 Vectashield® (Vector Laboratories)封固。使用配備有 63x/1.2 W Korr 物鏡及合適於偵測所用之螢光染料之濾光器組之 Axioskop 50 顯微鏡(Zeiss)觀察玻片。使數位獲取以 MAP-2 免疫標記之影像之人工暴露時間保持一致，從而實現孔與處理之間的比較。鬼筆環肽(F-肌動蛋白)及 DAPI 暴露時間變化以適合視場。使用 Image Pro Plus 軟體控制之 QImaging 照相機獲得隨機化之視場。將影像保存為 TIFF 檔且於 Adobe Photoshop CC 2015.1.2 中打開。然後將 MAP-2、DAPI、及鬼筆環肽之影像重疊且合併。選擇代表性影像以說明所檢查之蛋白之豐度及位置之差異。

免疫墨點法

【0389】 將 SH-SY5Y 細胞在上文所述之指示條件下培養，以 MRx0005 及 MRx0029 處理 24 h，然後於含有蛋白酶抑制劑(Roche Diagnostics, UK)之混合物之 RIPA 緩衝液中溶解。使用 BCA 蛋白檢定套組(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)評估蛋白濃度，藉由 SDS-PAGE 分離，且轉移至 PVDF 膜。然後將膜以 5%脫脂乳粉或 5% BSA 阻斷且在 4℃下與一級抗體(分別為 MAP2 及 β3-微管蛋白)孵育隔夜。然後將墨點與適當山葵過氧化酶(HRP)綴合之二級抗體孵育，且藉由化學發光偵測套組(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)偵測蛋白。對於 MAP2 及 β3-微管蛋白，將 β-肌動蛋白保存為對照以監測樣本中蛋白負載變異性。

結果及討論

基因表現

【0390】 圖 13a (插圖)及 49 顯示肌動蛋白、絨毛蛋白、密封蛋白 TJP1、TJP2、MAP2、DRD2、GABRB3、SYP、PINK1、PARK7、及 NSE 之表現水準之 MRx0029 及 MRX005 誘導之變化。

顯微法及免疫墨點法

【0391】 圖 50 顯示如共焦顯微法所確定之 SHSY5Y 細胞中 MAP2 表現之水準之變化。亦藉由免疫墨點分析定量 MAP2 及 B3-微管蛋白之表現水準。顯示於 50M 及 N 中之結果指示，MRX029 誘導 MAP2 表現水準之增加。

序列

SEQ ID NO:1 (16S 核糖體 RNA 之芽孢巨球型菌基因，部分序列，品系：NP3 - JX424772.1)

```
   1 agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac
  61 gagaagagat gagaagcttg cttcttatca attcgagtgg caaacgggtg agtaacgcgt
 121 aagcaacctg cccttcagat ggggacaaca gctggaaacg gctgctaata ccgaatacgt
 181 tctttccgcc gcatgacggg aagaagaaag ggaggccttc gggctttcgc tggaggaggg
 241 gcttgcgtct gattagctag ttggaggggt aacgcccac caaggcgacg atcagtagcc
 301 ggtctgagag gatgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg
 361 cagcagtggg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgaacga
 421 tgacggcctt cgggttgtaa agttctgtta tatgggacga acagggcatc ggttaatacc
 481 cggtgtcttt gacggtaccg taagagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg
 541 taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagggcgc gcaggcggca
 601 tcgcaagtcg gtcttaaaag tgcggggctt aaccccgtga ggggaccgaa actgtgaagc
 661 tcgagtgtcg gagaggaaag cggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg
 721 aggaacacca gtggcgaaag cggctttctg gacgacaact gacgctgagg cgcgaaagcc
 781 aggggagcaa acgggattag ataccccggt 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 tggtgcacgg ctgtcgtcag
1081 ctcgtgtcgt gagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caacccctat cttctgttgc
1141 cagcacctcg ggtggggact cagaagagac tgccgcagac aatgcggagg aaggcgggga
1201 tgacgtcaag tcatcatgcc ccttatggct tgggctacac acgtactaca atggctctta
1261 atagagggac gcgaaggagc gatccggagc aaaccccaaa aacagagtcc cagttcggat
1321 tgcaggctgc aactcgcctg catgaagcag gaatcgctag taatcgcagg tcagcatact
1381 gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccacgaa agtcattcac
1441 acccgaagcc ggtgaggcaa ccgcaaggaa ccagccgtcg aaggtggggg cgatgattgg
1501 ggtgaagtcg taacaaggt
```

SEQ ID NO:2 (芽孢巨球型菌品系 MRx0029 之共同 16S rRNA 序列)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGAC
AACAGCTGGAAACGGCTGCTAATACCGAATACGTTCTTTCCGCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGG
CTTTCGCTGGAGGAGGGGCTTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCC
GGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTT
CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTATATG
GGACGAACAGGACATCGGTTAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCATCGCAAGT
CGGTCTTAAAAGTGCGGGGCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTCGGAGAGGAAAGCGGAA
TTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTTTCTGGACGACAACTGA
CGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCGTAAACGATGGATACTAGG
TGTAGGAGGTATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGGAAAGAGATTTCCGGTTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGCACGG
CTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTCTGTTGCCAGCACC
TCGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTT
ATGGCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAAA
ACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATA
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCATTCACACCCGAAGCCGGTGA
GGCAACCGCAAG

用於 qPCR 之引物(括號中為 SEQ ID NO)

名稱	正向序列	逆向序列
ACTB	GATCAAGATCATTGCTCCTC (3)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAC (4)
GAPDH	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (5)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (6)
MAP2	CTCAGCACCGCTAACAGAGG	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (8)

	(7)	
密封蛋白	AAGAGGAATTTTGACACTGG (9)	GCCATGTACTCTTCACTTTC (10)
TJ1	AAGTCACACTGGTGAAATCC (11)	CTCTTGCTGCCAAACTATCT (12)
TJP2	CCCTCCCCTGGATCAGGAT (13)	GCCATCAAACTCGTCCATCA (14)
絨毛蛋白	CATTACCTGCTCTACGTTTG (15)	AGATGGACATAAGATGAGGTG (16)

SEQ ID NO:17 (吉氏副類桿菌品系 MRX0005 之共同 16S rRNA 序列)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGTAACCTGCCCTATCAGAGGGGGATAACCCGGGGAAAC
CGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCGCATGGGAATATTTGCCAAAGATTCATCGCTGATAGATAGGCATGCG
TTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAACCGGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACA
TTGGTACTGAGACACGGACCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACC
AGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTCATAAGGGAATAAAGTGCGGGATGTGTCC
GGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTTTTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGGCTCAACCATAG
AATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTTGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
ATCAGGAGAACACCGGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCGATTACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCACTAGCTGTTTCGGATACACTGTAAGCGCGCAGCG
GAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAG
CGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACGCATTCGGACGAGACGTGGAA
ACAGATTTTCTAGTAATAGCGATTTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGGCTAAG
TGCCATAACGAGCGCAACCCTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTCGTGGGATGCCCGAGGTAAG
TTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACATCCCGGGGCGACACATGTGTTACAATGGCGTGG
ACAAAGGGAAGCGAGCTTGCGCACAGGGAGCGAATCCCCAAACCAGCCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC
TGTGTGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGTGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGGTACCTGAAGTCGTAACCGCCGAGGATTGGCCTAGGGTAAAACTGGTGACTGG
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGCGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCG

用於離體 qPCR 之引物及探針(括號中為 SEQ ID NO)

離體：

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)
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)
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)
AGC CAG AGT CCT TCA GAG A (27)	TCC TTA GGC ACT CCT TCT GT (28)	56-FAM/CCT ACC CCA /ZEN/ATT TCC AAT GCT CTC CT /3IABkFQ (29)

用於 qPCR 之額外引物(括號中為 SEQ ID NO)

基因 ID	正向序列	逆向序列
NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATTT (34)	CTGTGCGCCCAGATTACCT (35)

SYP	CTCGGCTTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTTCA (37)

參考文獻

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

[40] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
[41] Leslie *et al.*(1995) *Appl.Environ.Microbiol.*61, 3592-3597.
[42] Mitropoulou *et al.*(2013) *J Nutr Metab.*(2013) 716861.
[43] Kailasapathy *et al.*(2002) *Curr Issues Intest Microbiol.*3(2):39-48.
[44] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
[45] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit.1985)
[46] US 2016/0067188
[47] *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition (*2010) Ronald Atlas, CRC Press.
[48] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
[49] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.*581:247-61.
[50] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.*20th edition, ISBN: 0683306472.
[51] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
[52] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
[53] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M.Weir and C.C.Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
[54] Sambrook *et al.*(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
[55] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
[56] Ausubel *et al.*(eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
[57] *PCR (Introduction to Biotechniques Series*), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
[58] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M.Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
[59] Smith & Waterman (1981) *Adv.Appl.Math.*2: 482-489.
[60] Pakkenberg *et al.*(1991) *J Neurol Neurosurg Psychiatry,* 54(1):30-3.
[61] Przedborski *et al.*(2000).*Restor Neurol Neurosci.*16(2):135-142.
[62] 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.
[63] Kehr J., and Yoshitake T. (2006) Monitoring brain chemical signals by microdialysis.In: Encyclopedia of Sensors, Vol. 6.(Eds.C.A.Grimes, E.C.Dickey and M.V.Pishko) American Scientific Publishers, USA.287-312.
[64]Abel and Zukin (2008) *Curr Opin Pharmacol*, 2008.8(1):57-64

[65] Johnsen *et al* (2017) *Journal of Chromatography A*. 1503: 57-64
[66] West and Johnstone (2014) *J Clin Invest.*124, 30-39
[67] Glauben *et al.*(2006) *J Immunol,* 176: 5015-5022
[68] Angiolilli *et al.*(2017) *Ann Rheum Dis,* 76: 277-285
[69] Gonneaud *et al.*(2014) *J Inflamm,* 11: 43
[70] Alenghat *et al.*(2013) *Nature,* 504: 153-157
[71] Felice *et al.*(2015) *Ailment Pharmacol Ther,* 41: 26-38
[72] Smart *et al* (2010) *Nature Protocols*.10:1709-29
[73] Weon *et al.*(2016)
[74] Huot *et al.*, (2015) *Parkinson' s Disease*
[75] Scatton *et al.*(1983) *Brain Res,* 275(2): 321-8
[76] Hely *et a.* (2005) *Mov Disord.*20(2):190-9
[77] Budd and Nicholls (1998) *Essays Biochem.*33:43-52
[78] Ebadi *et al* (2001) *Biol Signals Recept.*10(3-4):224-253
[79] Ferro *et al* (2017) *PLoS One* 2017, **12**(12):e0188425
[80] Michel and Prat (2016) *Ann Transl Med.*4(1):15.

[81] Gagnon *et al* (2013) *J Microbiological Methods*.94: 274-279

【生物材料寄存】

<u>國外寄存</u>

GB 英國；National Collections of Industria, Food and Marine Bacteria (NCIMB)；2015/03/12；NCIMB 42382

GB 英國；National Collections of Industria, Food and Marine Bacteria (NCIMB)；2017/07/13；NCIMB 42787

<u>國內寄存</u>

食品工業發展研究所；105年9月20日；BCRC 910743

【序列表】

<110> 英商4D製藥研究有限公司(4D PHARMA RESEARCH LIMITED)

<120> 包含細菌品系之組成物

<130> P077072

<140> 107120441
<141> 2018-06-13

<150> 1709468.1
<151> 2017-06-14

<150> 1709534.0
<151> 2017-06-15

<150> 1712851.3
<151> 2017-08-10

<150> 1803826.5
<151> 2018-03-09

<150> 1805989.9
<151> 2018-04-11

<150> 1805991.5
<151> 2018-04-11

<150> 1805990.7
<151> 2018-04-11

<150> 1806780.1
<151> 2018-04-25

<150> 1806779.3
<151> 2018-04-25

<160> 37

<170> SeqWin2010, 1.0版

<210> 1
<211> 1519
<212> DNA
<213> 芽孢巨球型菌品系NP3

<400> 1
agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg caagtcgaac 60

gagaagagat gagaagcttg cttcttatca attcgagtgg caaacgggtg agtaacgcgt 120
aagcaacctg cccttcagat ggggacaaca gctggaaacg gctgctaata ccgaatacgt 180
tctttccgcc gcatgacggg aagaagaaag ggaggccttc gggctttcgc tggaggaggg 240
gcttgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg atcagtagcc 300
ggtctgagag gatgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg 360
cagcagtggg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgaacga 420
tgacggcctt cgggttgtaa agttctgtta tatgggacga acagggcatc ggttaatacc 480
cggtgtcttt gacggtaccg taagagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg 540
taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagggcgc gcaggcggca 600
tcgcaagtcg gtcttaaaag tgcggggctt aaccccgtga ggggaccgaa actgtgaagc 660
tcgagtgtcg gagaggaaag cggaattcct agtgtagcgg tgaaatgcgt agatattagg 720
aggaacacca gtggcgaaag 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 caacccctat cttctgttgc 1140
cagcacctcg ggtggggact cagaagagac tgccgcagac aatgcggagg aaggcgggga 1200
tgacgtcaag tcatcatgcc ccttatggct tgggctacac acgtactaca atggctctta 1260
atagagggac gcgaaggagc gatccggagc aaaccccaaa aacagagtcc cagttcggat 1320
tgcaggctgc aactcgcctg catgaagcag gaatcgctag taatcgcagg tcagcatact 1380
gcggtgaata cgttcccggg ccttgtacac accgcccgtc acaccacgaa agtcattcac 1440
acccgaagcc ggtgaggcaa ccgcaaggaa ccagccgtcg aaggtggggg cgatgattgg 1500
ggtgaagtcg taacaaggt 1519

<210> 2
<211> 1398
<212> DNA
<213> 芽孢巨球型菌品系MRX0029

<400> 2
tgagaagctt gcttcttatc gattctagtg gcaaacgggt gagtaacgcg taagcaacct 60
gcccttcaga tggggacaac agctggaaac ggctgctaat accgaatacg ttctttccgc 120
cgcatgacgg gaagaagaaa gggaggcctt cgggctttcg ctggaggagg ggcttgcgtc 180
tgattagcta gttggagggg taacggccca ccaaggcgac gatcagtagc cggtctgaga 240
ggatgaacgg ccacattggg actgagacac ggcccagact cctacgggag gcagcagtgg 300
ggaatcttcc gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgaacg atgacggcct 360
tcgggttgta aagttctgtt atatgggacg aacaggacat cggttaatac ccggtgtctt 420
tgacggtacc gtaagagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta 480
ggtggcaagc gttgtccgga attattgggc gtaaagggcg cgcaggcggc atcgcaagtc 540
ggtcttaaaa gtgcggggct taaccccgtg 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 cgcctgggga gtacggccgc 840
aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagta tgtggtttaa 900
ttcgacgcaa cgcgaagaac cttaccaagc cttgacattg attgctacgg aaagagattt 960
ccggttcttc ttcggaagac aagaaaacag gtggtgcacg gctgtcgtca gctcgtgtcg 1020
tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccccta tcttctgttg ccagcacctc 1080

gggtggggac tcagaagaga ctgccgcaga caatgcggag gaaggcgggg atgacgtcaa 1140
gtcatcatgc cccttatggc ttgggctaca cacgtactac aatggctctt aatagaggga 1200
agcgaaggag cgatccggag caaaccccaa aaacagagtc ccagttcgga ttgcaggctg 1260
caactcgcct gcatgaagca ggaatcgcta gtaatcgcag gtcagcatac tgcggtgaat 1320
acgttcccgg gccttgtaca caccgcccgt cacaccacga aagtcattca cacccgaagc 1380
cggtgaggca accgcaag 1398

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 3
gatcaagatc attgctcctc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 4
ttgtcaagaa agggtgtaac 20

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 5
ggtatcgtgg aaggactcat g 21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 6
atgccagtga gcttcccgtt c 21

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 7
ctcagcaccg ctaacagagg 20

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 8
cattggcgct tctctcctc 19

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 9
aagaggaatt ttgacactgg 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 10
gccatgtact cttcactttc 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 11
aagtcacact ggtgaaatcc 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 12
ctcttgctgc caaactatct 20

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 13
ccctcccctg gatcaggat 19

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 14
gccatcaaac tcgtccatca 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 15
cattacctgc tctacgtttg 20

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 16
agatggacat aagatgaggt g 21

<210> 17
<211> 1403
<212> DNA
<213> 吉氏副類桿菌品系MRX0005

<400> 17
amccgggtgg cgaccggcgc acgggtgagt aacgcgtatg caacttgcct atcagagggg 60
gataacccgg cgaaagtcgg actaataccg catgaagcag ggatcccgca tgggaatatt 120
tgctaaagat tcatcgctga tagataggca tgcgttccat taggcagttg gcggggtaac 180
ggcccaccaa accgacgatg gatagggggtt ctgagaggaa ggtcccccac attggtactg 240
agacacggac caaactccta cgggaggcag cagtgaggaa tattggtcaa tgggcgtgag 300
cctgaaccag ccaagtcgcg tgagggatga aggttctatg gatcgtaaac ctcttttata 360
agggaataaa gtgcgggacg tgtcccgttt tgtatgtacc ttatgaataa ggatcggcta 420
actccgtgcc agcagccgcg gtaatacgga ggatccgagc gttatccgga tttattgggt 480
ttaaagggtg cgtaggcggc cttttaagtc agcggtgaaa gtctgtggct caaccataga 540
attgccgttg aaactgggag gcttgagtat gtttgaggca ggcggaatgc gtggtgtagc 600
ggtgaaatgc atagatatca cgcagaaccc cgattgcgaa ggcagcctgc caagccatta 660
ctgacgctga tgcacgaaag cgtggggatc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 720
cagtaaacga tgatcactag ctgtttgcga tacactgtaa gcggcacagc gaaagcgtta 780
agtgatccac ctggggagta cgccggcaac ggtgaaactc aaaggaattg acgggggccc 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 agcgtaagct 1080
gcgaggaagg cggggatgac gtcaaatcag cacggccctt acatccgggg cgacacacgt 1140
gttacaatgg cgtggacaaa gggaagccac ctggcgacag ggagcgaatc cccaaaccac 1200
gtctcagttc ggatcggagt ctgcaacccg actccgtgaa gctggattcg ctagtaatcg 1260
cgcatcagcc atggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc 1320
atgggagccg ggggtacctg aagtccgtaa ccgcgaggat cggcctaggg taaaactggt 1380
gactggggct aagtcgtacg ggg 1403

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 18
gattactgct ctggctccta g 21

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 19
gactcatcgt actcctgctt g 21

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 20
ctggcctcac tgtccacctt cc 22

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 21
aatggtgaag gtcggtgtg 19

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 22
gtggagtcat actggaacat gtag 24

<210> 23
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 23
tgcaaatggc agccctggtg 20

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 24
gctgccttga tgtttacttt gac 23

<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 25
gcaaccgaag tatgaaataa cca 23

<210> 26
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 26
accaggtgag aagagtgatg accatcc 27

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 27

agccagagtc cttcagaga 19

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 28
tccttagcca ctccttctgt 20

<210> 29
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 29
cctaccccaa tttccaatgc tctcct 26

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 30
ccctgtatcg taagaacggt 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 31
gccaccattg atcacgttga 20

<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213>

<400> 32
cccaagcaac tagcccctc 19

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 33
ggcagcacat cagggtagtc 20

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 34
gtagccgtga tgtggtcatt t 21

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 35
ctgtgcgccc agattacct 19

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 36
ctcggctttg tgaaggtgct 20

<210> 37
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>

<400> 37
ggcttcatgg catcaacttc a 21

【發明申請專利範圍】

【請求項1】　一種包含巨球型菌屬(genus *Megasphaera*)之細菌品系之組合物之用途，其用於製備治療或預防神經退化性病症之製劑，其中該細菌品系具有與SEQ ID NO:2至少95%一致的16s rRNA序列。

【請求項2】　如請求項1之用途，其中該製劑用於治療或預防選自由以下組成之群之疾病或病況：帕金森氏病；阿茲海默氏病；多發性硬化症；杭丁頓氏病；肌肉萎縮性脊髓側索硬化症；路格里氏病(Lou Gehrig's disease)；普里昂疾病；脊髓小腦性失調症；脊髓性肌萎縮；失智症；原發性進行性失語症；輕度認知障礙；HIV相關之認知障礙；及皮質基底核退化症。

【請求項3】　如請求項2之用途，其中該帕金森氏病包括進行性核上性麻痹、斯蒂爾-瑞查森-歐爾雪夫斯基症候群(Steele-Richardson-Olszewski syndrome)、常壓性水腦症、血管或動脈硬化性帕金森氏病、藥物誘導之帕金森氏病；該阿茲海默氏病包括本森氏症候群；及該失智症包括路易士體性失智症、血管性失智症及額顳葉型失智症。

【請求項4】　如請求項1之用途，其中該製劑用於治療或預防運動神經元病。

【請求項5】　如請求項2之用途，其中該製劑用於治療或預防帕金森氏病。

【請求項6】　如請求項1至4中任一項之用途，其中該製劑係用於治療或預防早發神經退化性疾病。

【請求項7】　如請求項1至4中任一項之用途，其中該製劑係用於預防或延緩神經退化性病症之發作或進展。

【請求項8】　一種包含巨球型菌屬之細菌品系之組合物之用途，其用於製備治療腦損傷之製劑，其中該細菌品系具有與SEQ ID NO:2至少95%一致的

16s rRNA序列。

【請求項9】　如請求項8之用途，其中該腦損傷為中風。

【請求項10】　如請求項8之用途，其中該腦損傷為大腦缺血、局部性大腦缺血、缺血性中風或出血性中風。

【請求項11】　如請求項1-4及8-10中任一項之用途，其中該細菌品系為芽孢巨球型菌(*Megasphaera massiliensis*)。

【請求項12】　如請求項1-4及8-10中任一項之用途，其中該細菌品系具有與SEQ ID NO:2至少96%、97%、98%、99%、99.5%或99.9%一致的16s rRNA序列，或其中該細菌品系具有由SEQ ID NO:2表示之16s rRNA序列。

【請求項13】　如請求項1之用途，其中該組合物包含芽孢巨球型菌(*Megasphaera massiliensis*)菌種之細菌品系，且該製劑用於治療或預防帕金森氏病。

【請求項14】　如請求項8之用途，其中該組合物包含芽孢巨球型菌(*Megasphaera massiliensis*)菌種之細菌品系，且該製劑用於治療中風導致之腦損傷。

【請求項15】　如請求項1-4、8-10、13及14中任一項之用途，其中該製劑用於經口服投與。

【請求項16】　如請求項1-4、8-10、13及14中任一項之用途，其中該製劑包含一或多種醫藥上可接受之賦形劑或載劑。

【請求項17】　如請求項1-4、8-10、13及14中任一項之用途，其中該細菌品系為凍乾的。

【請求項18】　如請求項1-4、8-10、13及14中任一項之用途，其中該製劑為食品產品。

【請求項19】　一種以登錄號NCIMB 42787寄存之芽孢巨球型菌品系之細胞。

【請求項20】　一種組合物，其包含如請求項19之細胞。

【請求項21】　如請求項20之組合物，其包含醫藥上可接受之載劑或賦形劑。

【請求項22】　一種以登錄號NCIMB 42787寄存之芽孢巨球型菌品系之生物純培養物。

【請求項23】　一種以登錄號NCIMB 42787寄存之芽孢巨球型菌品系之細胞用於製備醫藥品之用途。

【請求項24】　如請求項23之用途，其中該醫藥品係用於如請求項1至10中任一項中所定義之用途。

【請求項25】　一種包含芽孢巨球型菌菌種之乾燥細菌品系之醫藥組合物，其中該細菌品系包含與SEQ ID NO:2之聚核苷酸序列至少96%序列一致的16s rRNA基因序列，其藉由Smith-Waterman同源性搜索演算法，使用空隙開放罰分(gap open penalty)為12且空隙延伸罰分(gap extension penalty)為2的仿射空隙搜索(affine gap search)來判定；及醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑或載劑。

【請求項26】　如請求項25之醫藥組合物，其中該細菌品系，相對於該醫藥組合物之總重量，以包含自約1×10^{3}至約1×10^{11}菌落形成單位(CFU)/g之量的該細菌品系存在於該醫藥組合物中。

【請求項27】　如請求項25之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調配以供經口、直腸、鼻、頰、舌下或皮下投與。

【請求項28】　如請求項25之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經調配以供遞送至個體之腸。

【請求項29】　如請求項25之醫藥組合物，其中該醫藥組合物係經封裝(encapsulated)。

【請求項30】　如請求項25之醫藥組合物，其中該醫藥組合物包含腸溶塗層(enteric coating)。

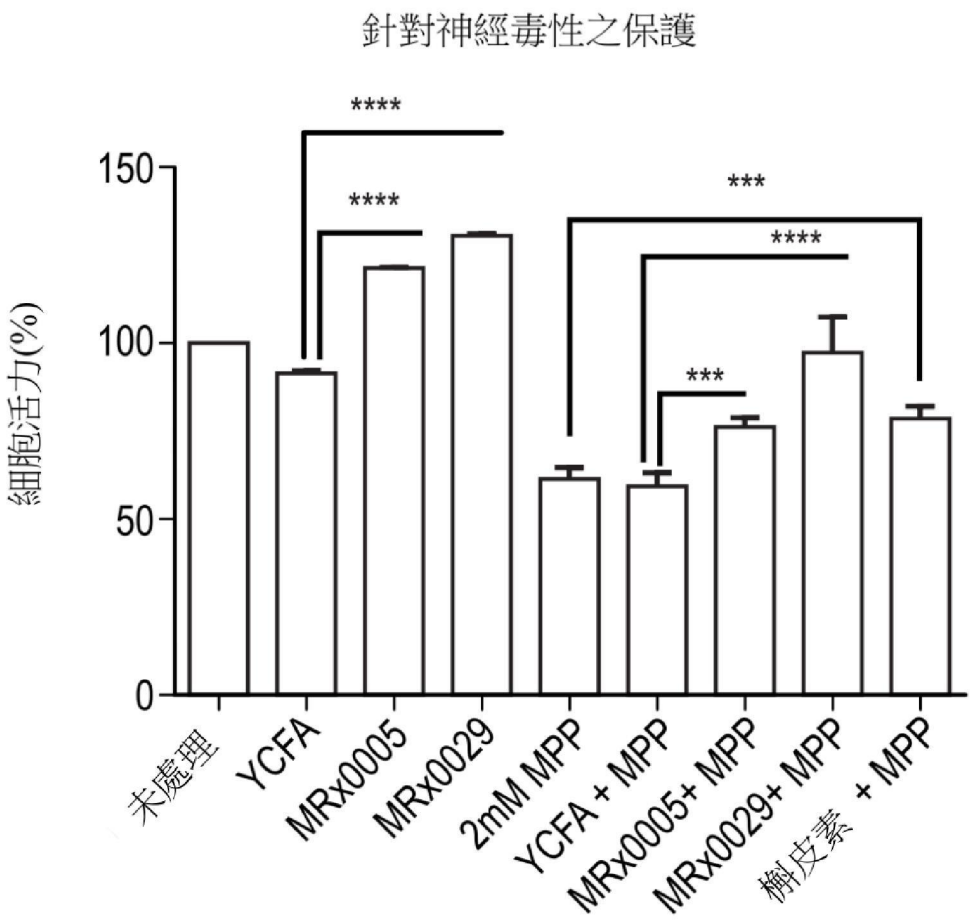
【請求項31】　如請求項25之醫藥組合物，其進一步包含額外治療劑。

【請求項32】　如請求項25之醫藥組合物，其中該細菌品系包含與SEQ ID NO:2之聚核苷酸序列至少99%序列一致的16s rRNA基因序列，其藉由Smith-Waterman同源性搜索演算法，使用空隙開放罰分(gap open penalty)為12且空隙延伸罰分(gap extension penalty)為2的仿射空隙搜索(affine gap search)來判定。

【請求項33】　如請求項25之醫藥組合物，其中該細菌品系包含16S rRNA基因序列，該16S rRNA基因序列為SEQ ID NO:2之聚核苷酸序列。

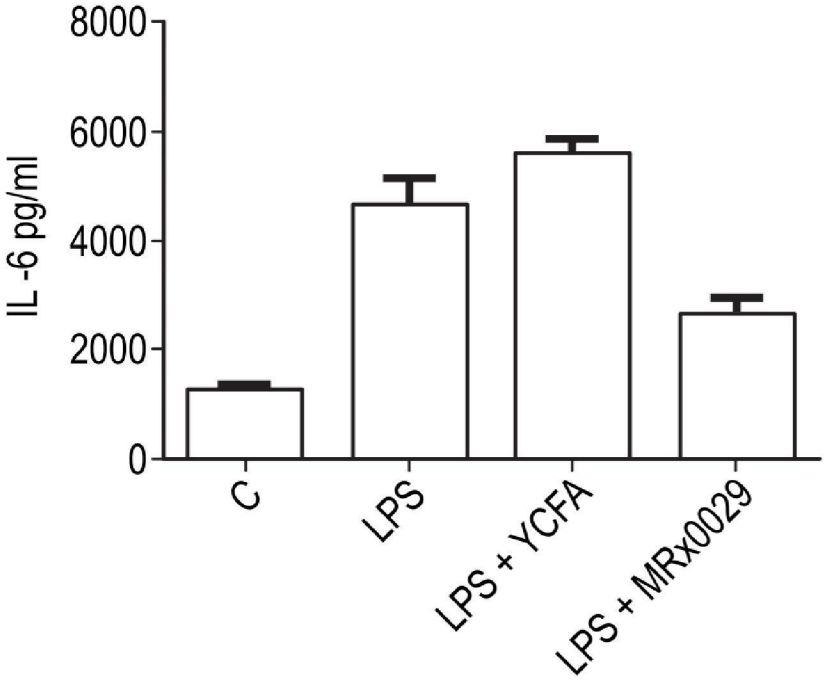
【請求項34】　如請求項25之醫藥組合物，其中該細菌品系以登錄號NCIMB 42787寄存。

【發明圖式】

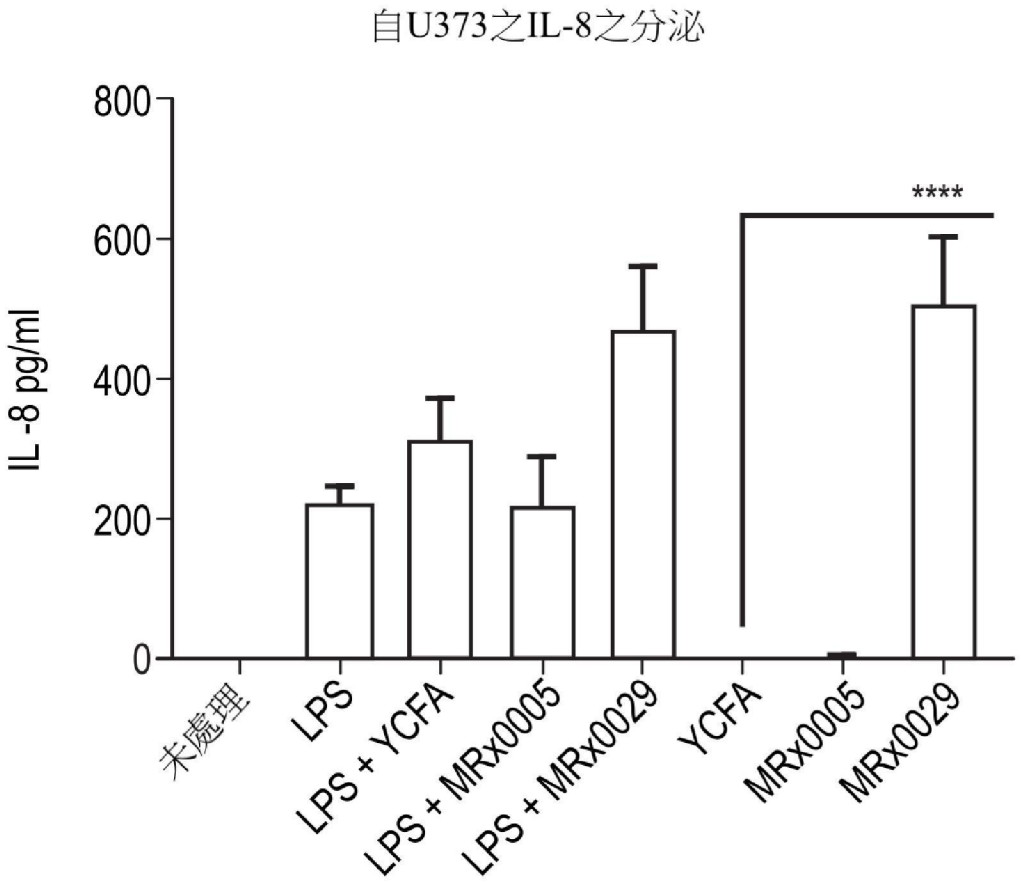

針對神經毒性之保護
細胞活力(%)
150
100
50
0
****
****
***
****
***
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
2mM MPP
YCFA + MPP
MRx0005+ MPP
MRx0029+ MPP
槲皮素 + MPP

【圖 1】

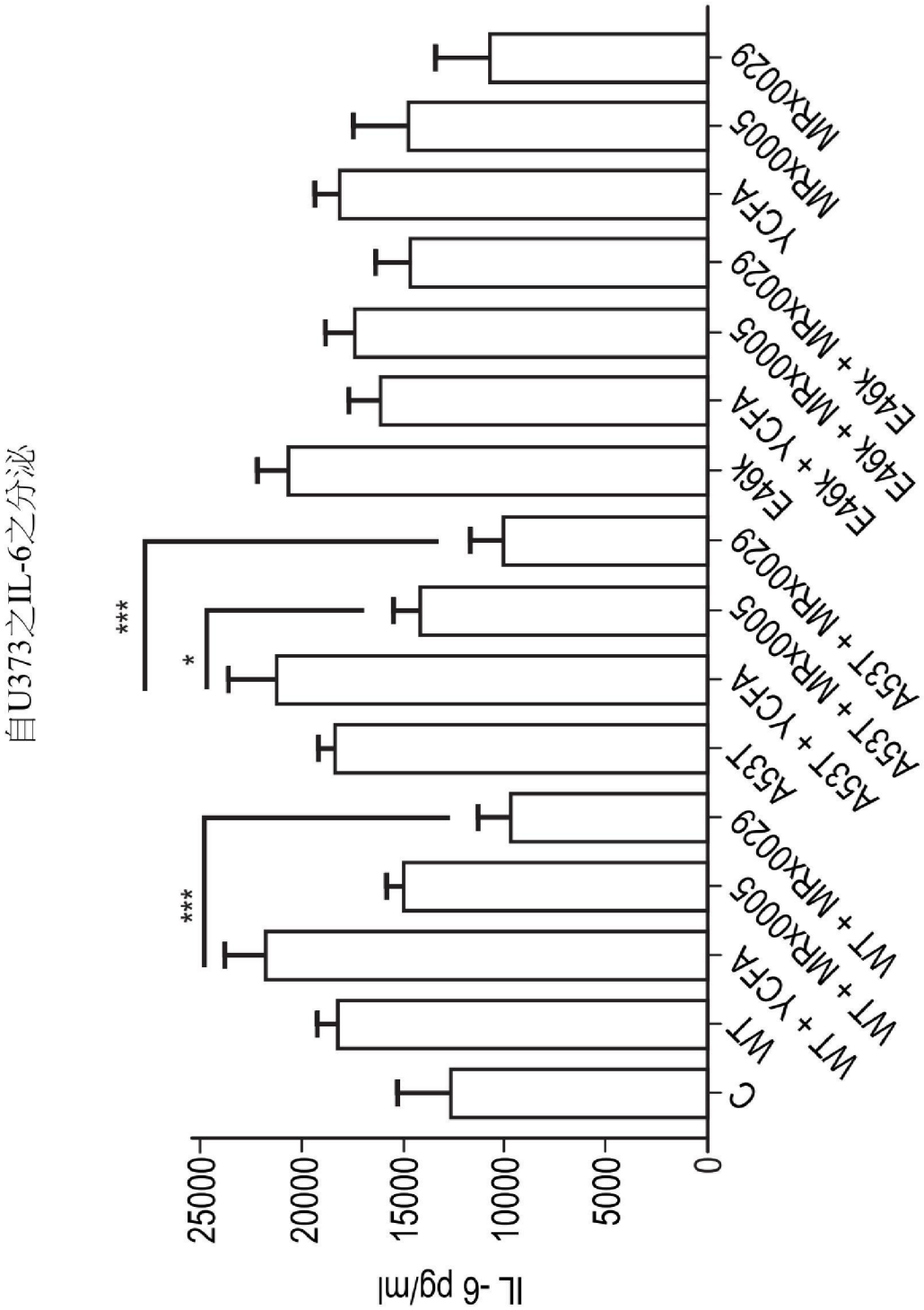
MG U373細胞中LPS誘導之IL-6分泌之抑制



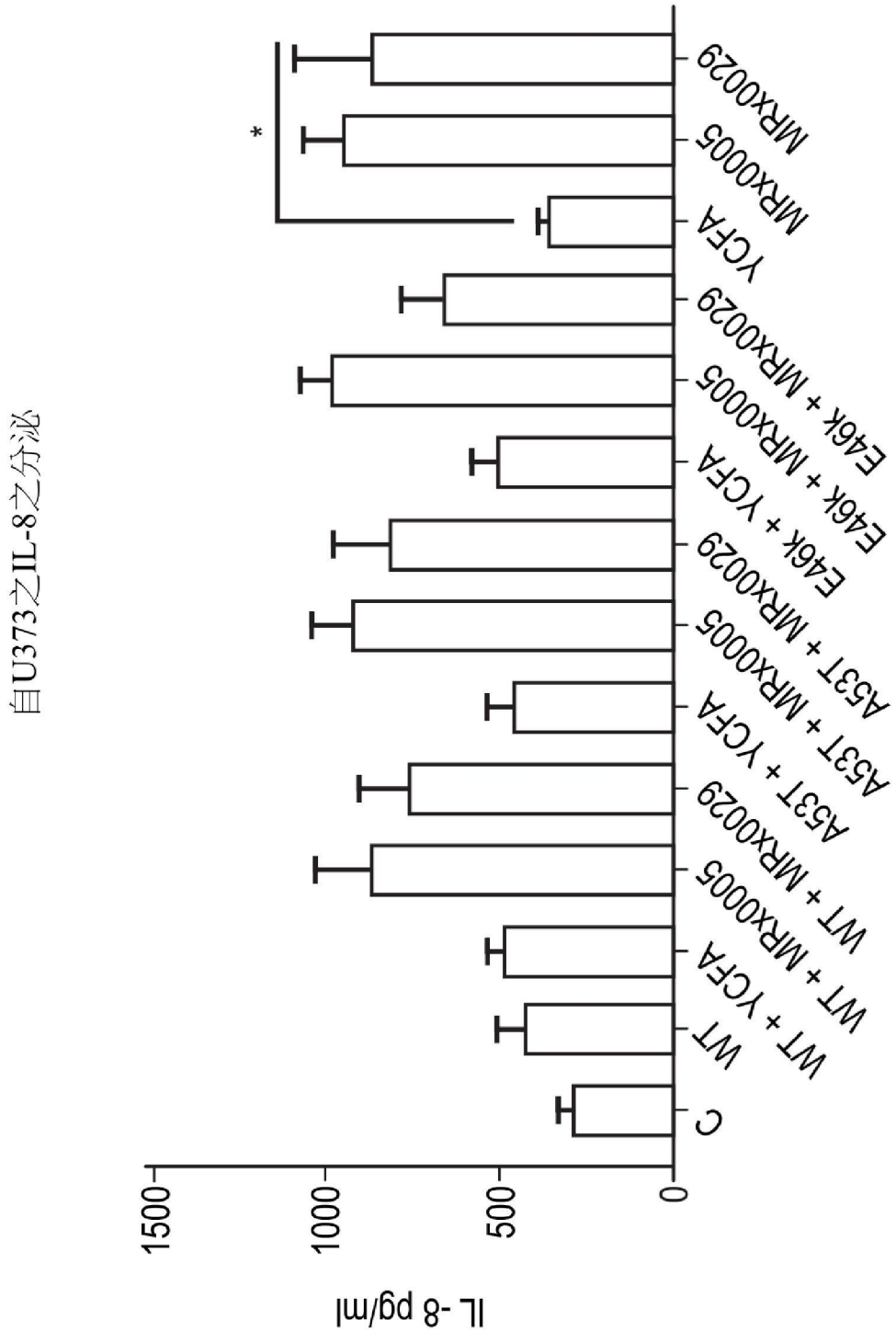
【圖 2】


自U373之IL-8之分泌
IL -8 pg/ml
800
600
400
200
0
****
未處理
LPS
LPS + YCFA
LPS + MRx0005
LPS + MRx0029
YCFA
MRx0005
MRx0029

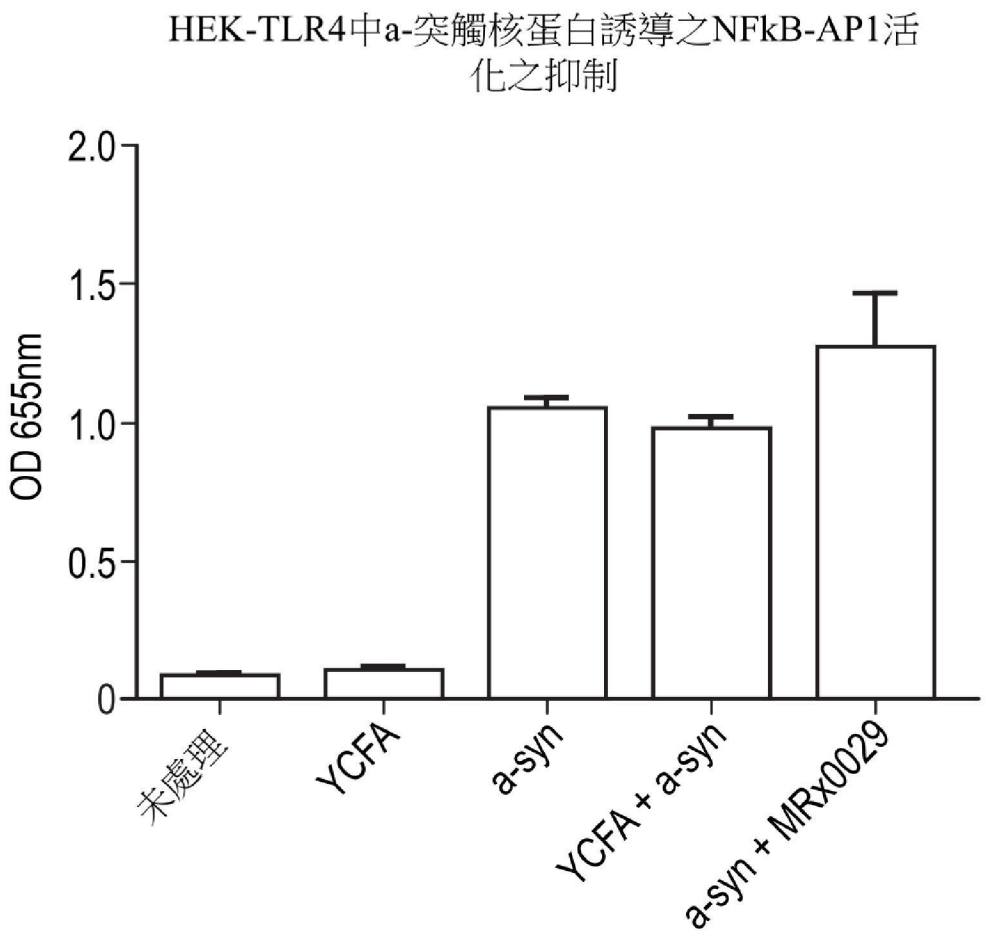
【圖 3】


自U373之IL-6之分泌
IL -6 pg/ml
25000
20000
15000
10000
5000
0
***
*
***
C
WT
WT + YCFA
WT + MRx0005
WT + MRx0029
A531T
A531T + YCFA
A531T + MRx0005
A531T + MRx0029
E46k
E46k + YCFA
E46k + MRx0005
E46k + MRx0029
YCFA
MRx0005
MRx0029

【圖 4A】

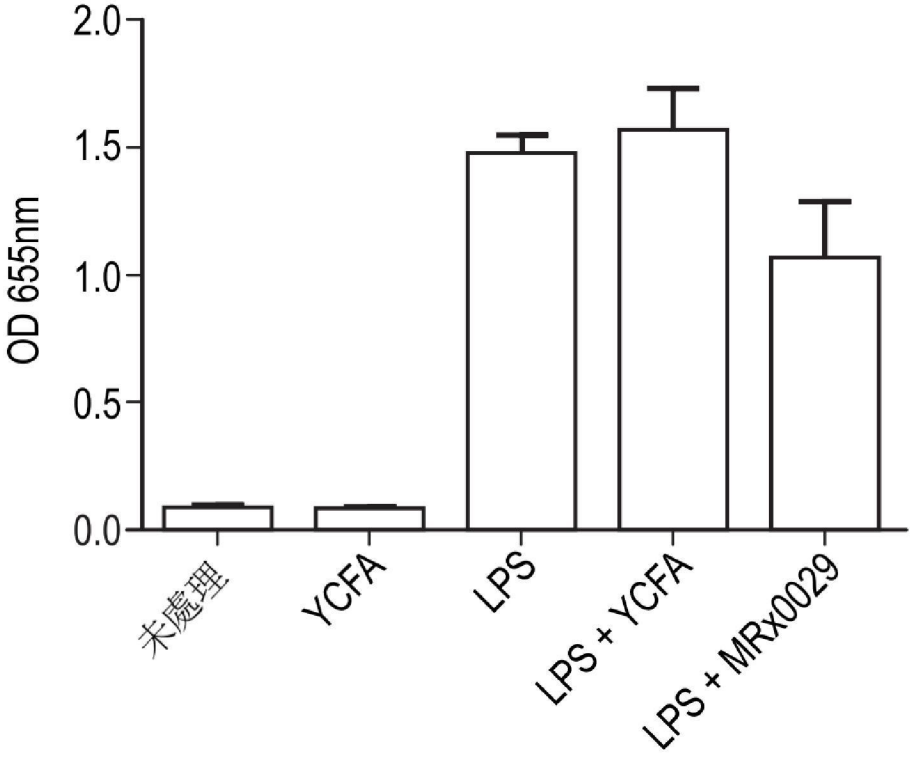

自U373之IL-8之分泌
IL -8 pg/ml
1500
1000
500
0
C
WT
WT + YCFA
WT + MRX0005
WT + MRX0029
A531T + YCFA
A531T + MRX0005
A531T + MRX0029
E46k + YCFA
E46k + MRX0005
E46k + MRX0029
YCFA
MRX0005
MRX0029
*

【圖 4B】

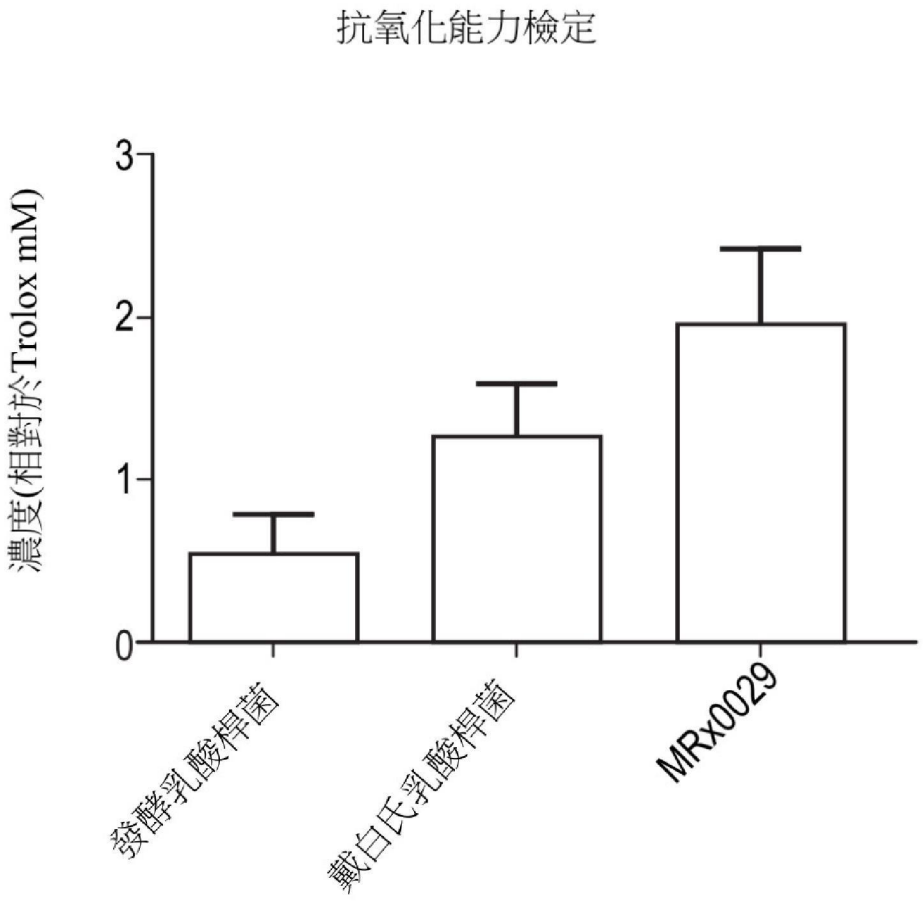

HEK-TLR4中a-突觸核蛋白誘導之NFkB-AP1活化之抑制
OD 655nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0
未處理
YCFA
a-syn
YCFA + a-syn
a-syn + MRx0029

【圖 5】

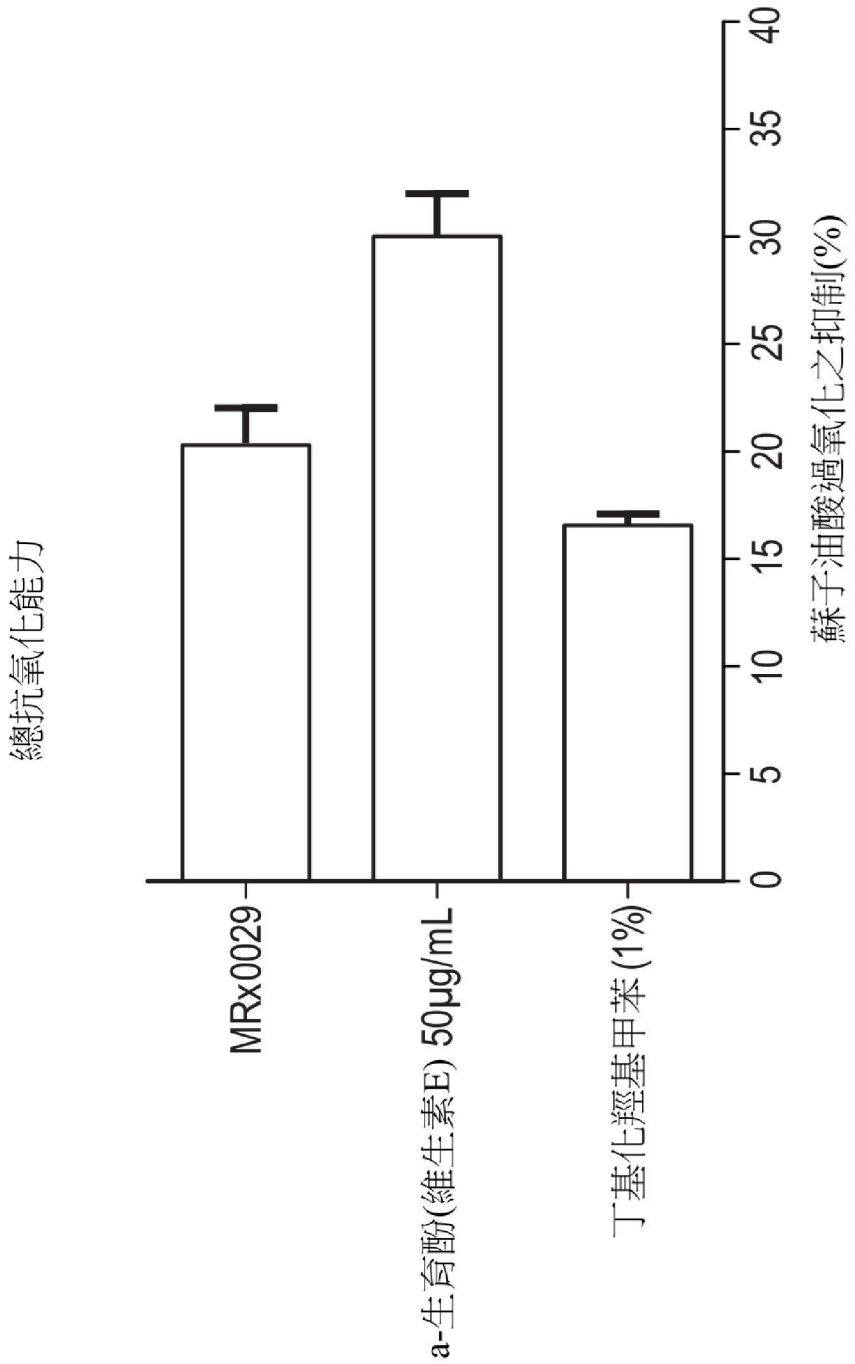
HEK-TLR4中LPS誘導之NFkB-AP1活化之抑制



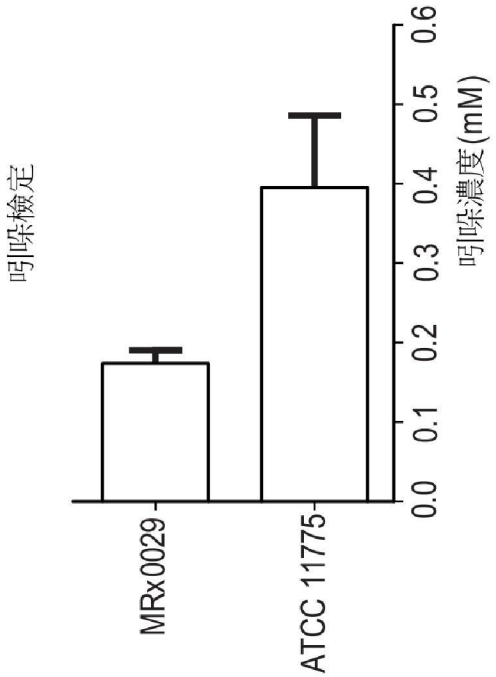
【圖 6】



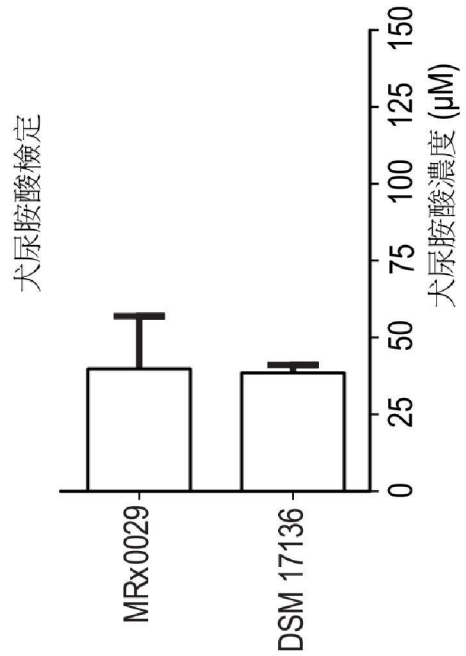
【圖 7】


總抗氧化能力
MRx0029
a-生育酚(維生素E) 50μg/mL
丁基化羥基甲苯 (1%)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
蘇子油酸過氧化之抑制(%)

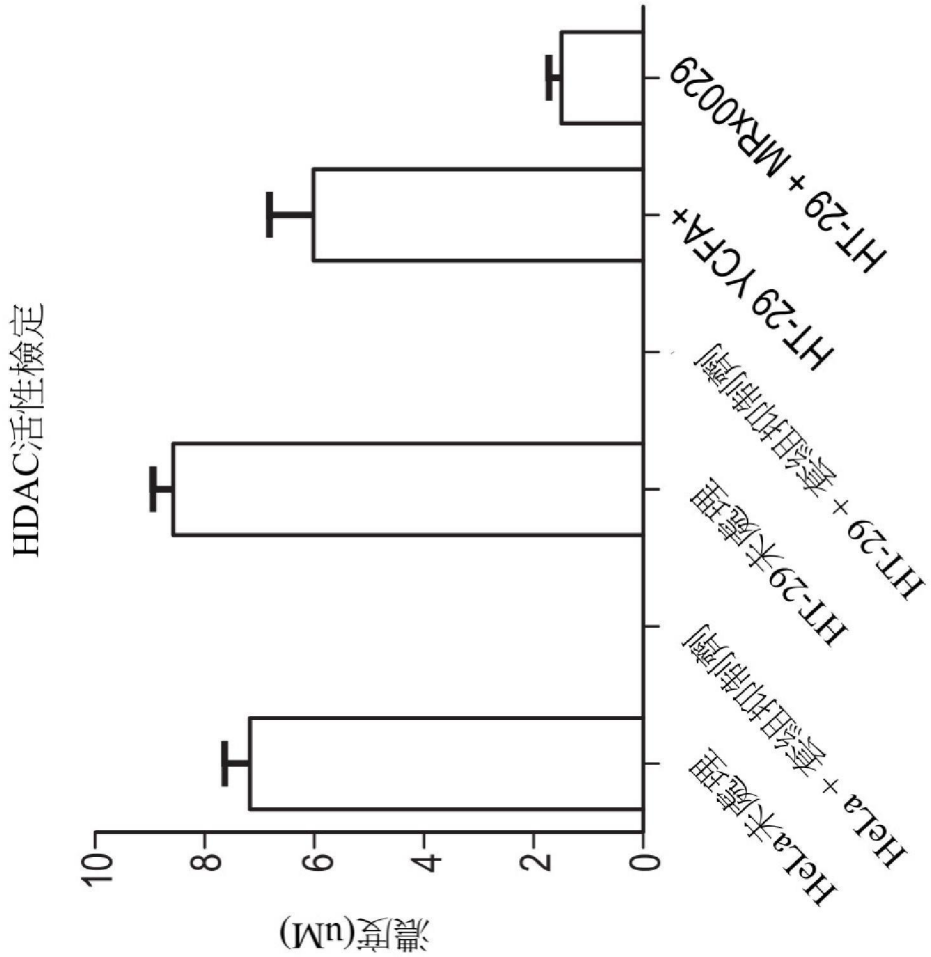
【圖8】


吲哚檢定
MRx0029
ATCC 11775
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
吲哚濃度(mM)

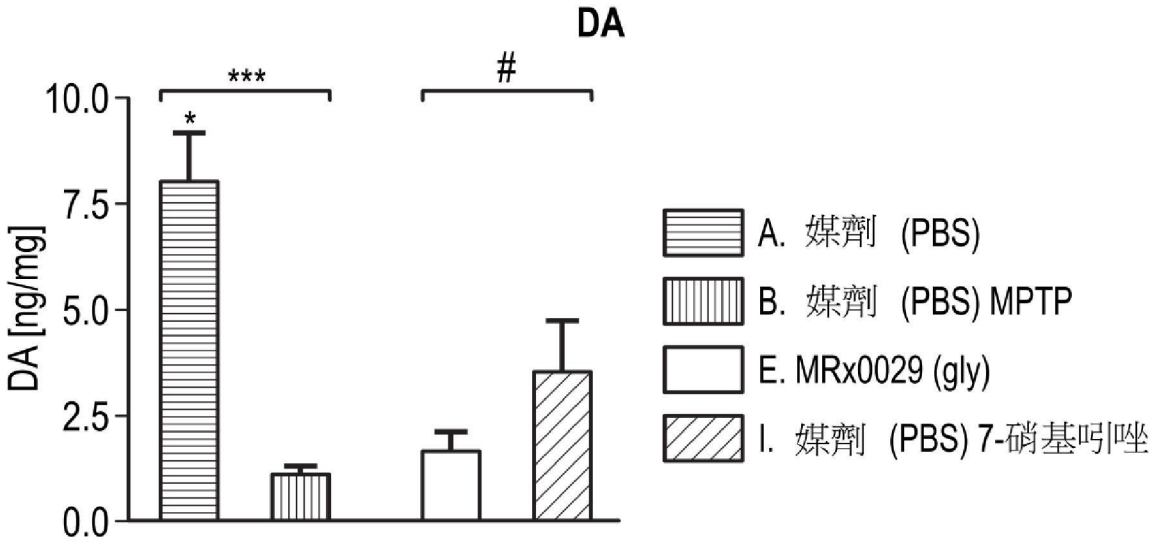
【圖 10】


尿胺酸檢定
MRx0029
DSM 17136
0
25
50
75
100
125
150
尿胺酸濃度 (μM)

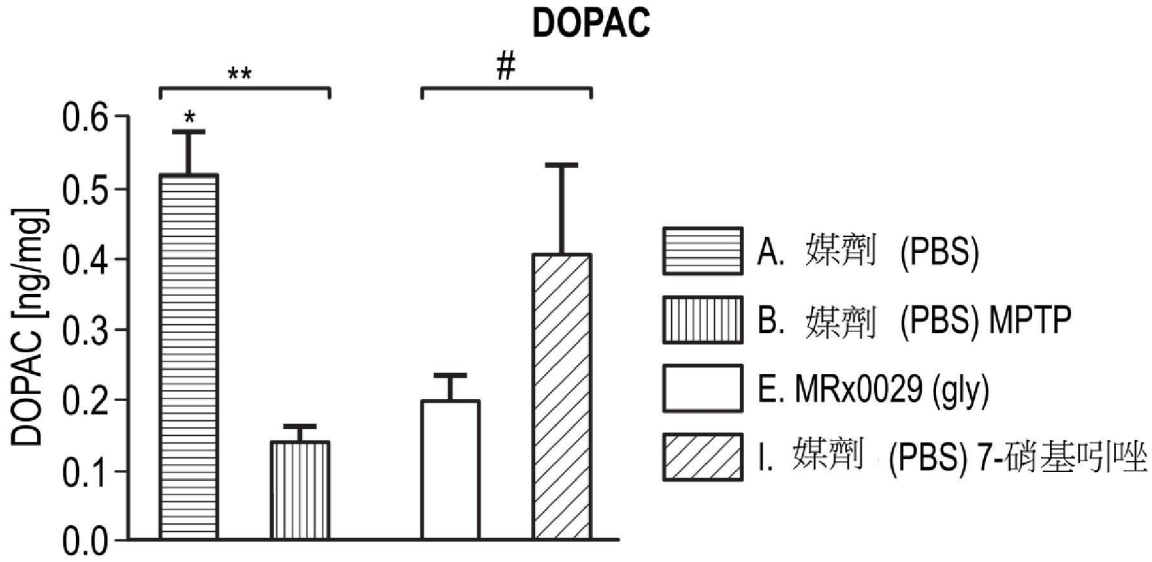
【圖 11】


HDAC活性檢定
濃度(uM)
0
2
4
6
8
10
HeLa未處理
HeLa + 癲痲抑制劑
HT-29未處理
HT-29 + 癲痲抑制劑
HT-29 YCFA+
HT-29 + MRx0029

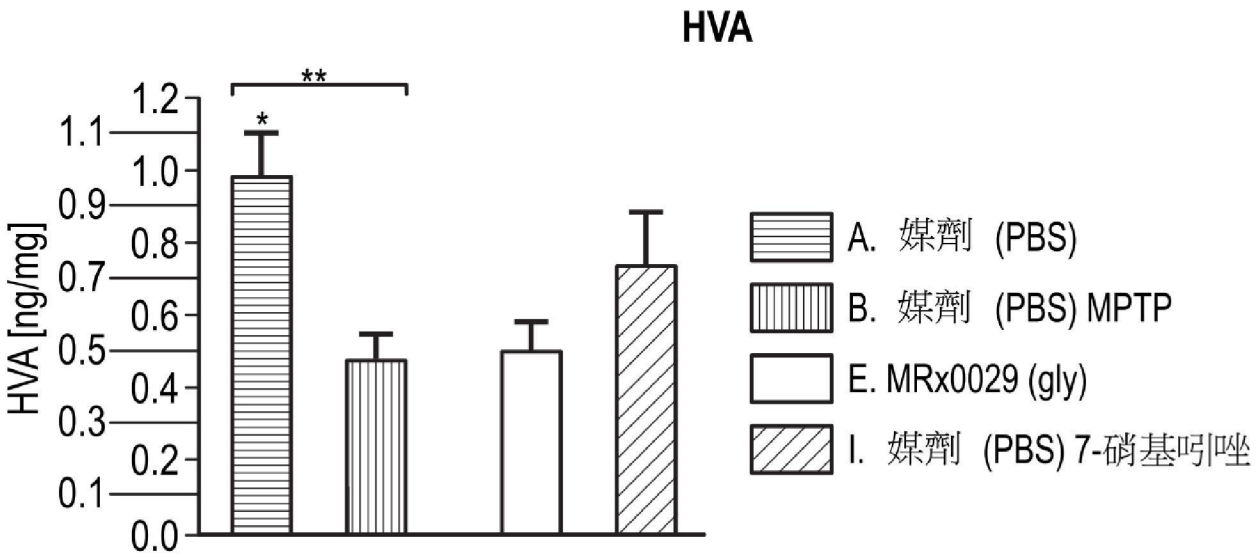
【圖 9】


DA
***
#
*
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
DA [ng/mg]
A. 媒劑 (PBS)
B. 媒劑 (PBS) MPTP
E. MRx0029 (gly)
I. 媒劑 (PBS) 7-硝基吲唑

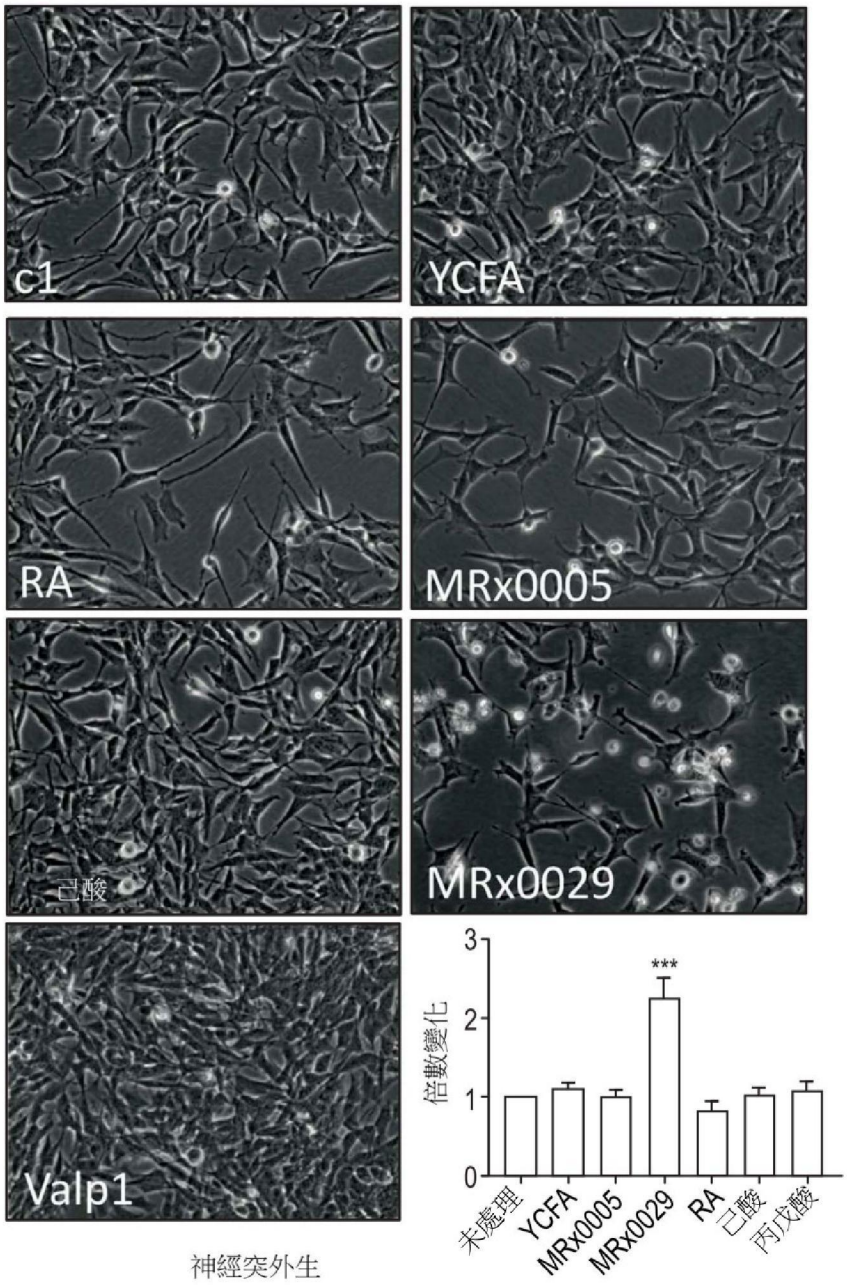
【圖 12A】


DOPAC
**
#
*
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
DOPAC [ng/mg]
A. 媒劑 (PBS)
B. 媒劑 (PBS) MPTP
E. MRx0029 (gly)
I. 媒劑 (PBS) 7-硝基吲唑

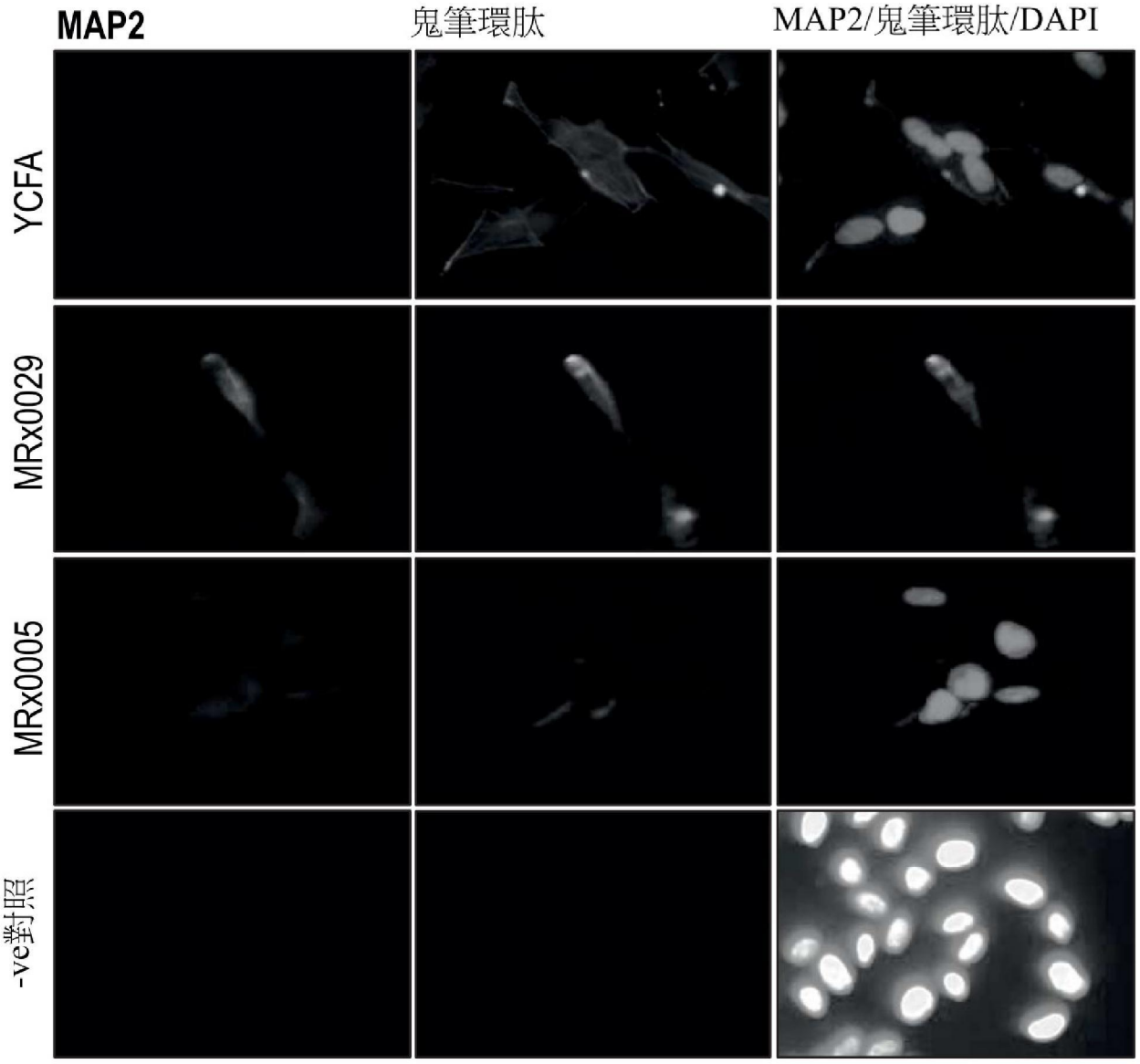
【圖 12B】


HVA
HVA [ng/mg]
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
**
*
A. 媒劑 (PBS)
B. 媒劑 (PBS) MPTP
E. MRx0029 (gly)
I. 媒劑 (PBS) 7-硝基吲唑

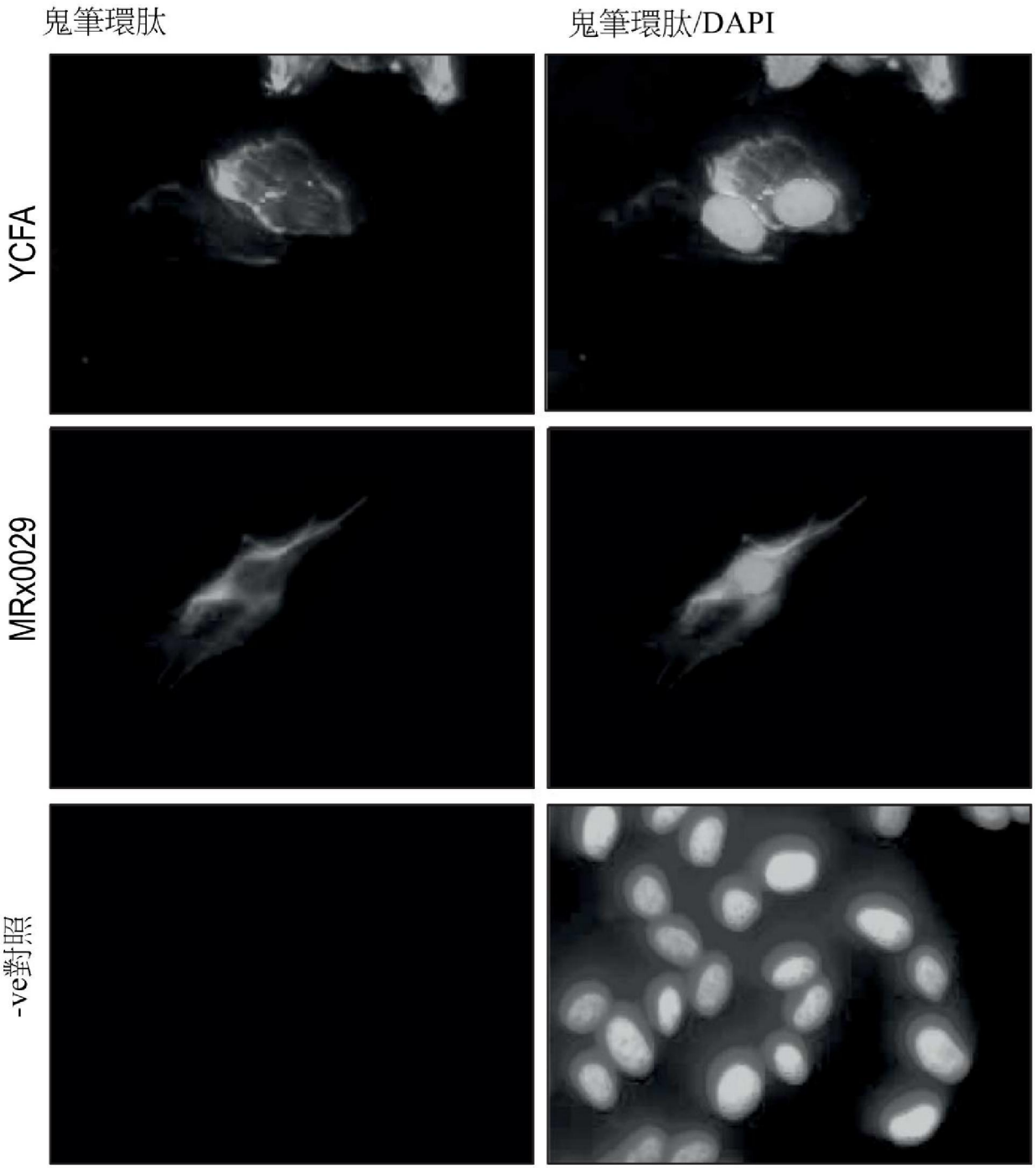
【圖 12C】


c1
YCFA
RA
MRx0005
己酸
MRx0029
Valp1
神經突外生
3
2
1
0
***
倍數變化
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
RA
己酸
丙戊酸

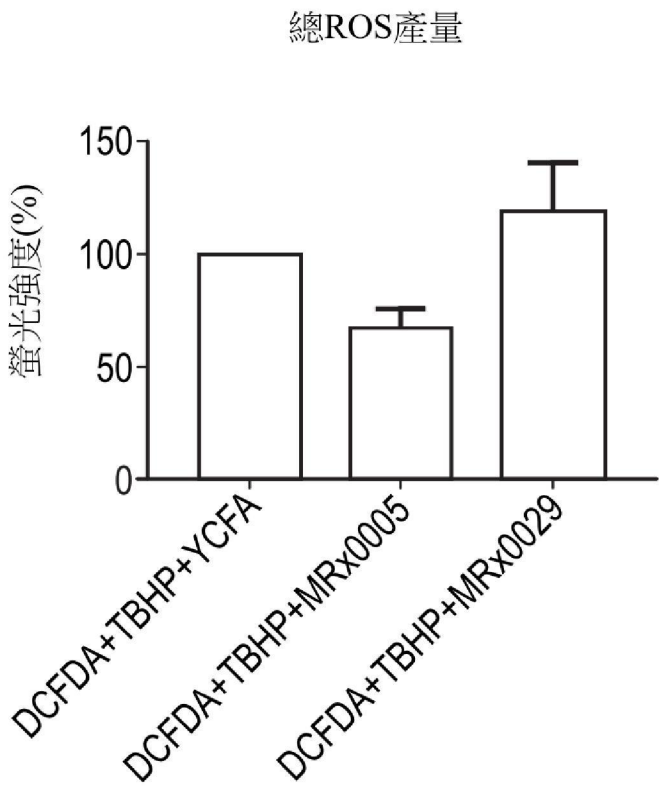
【圖 13A】



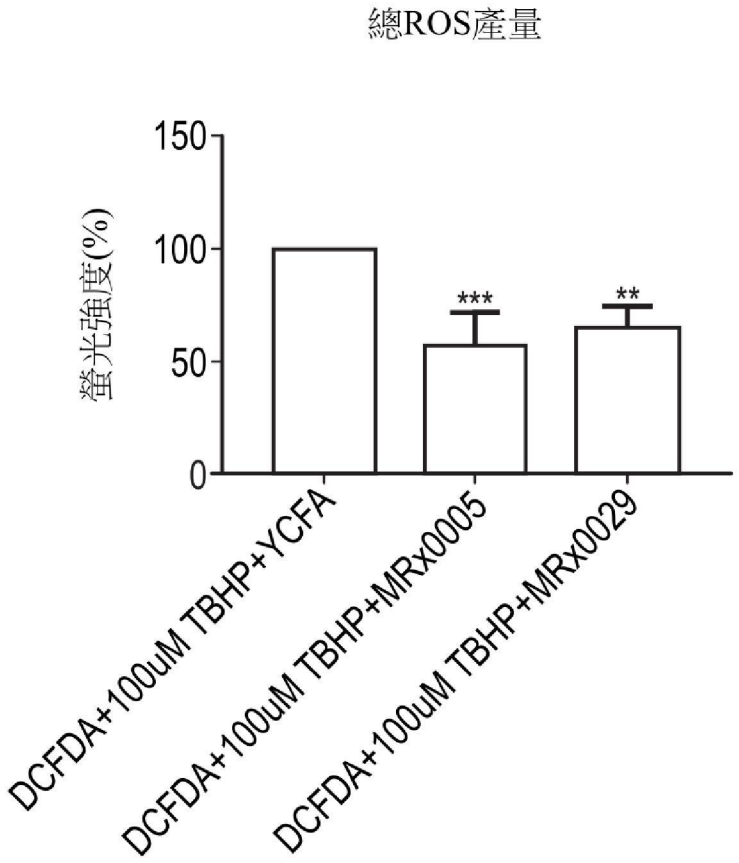
【圖 13B】



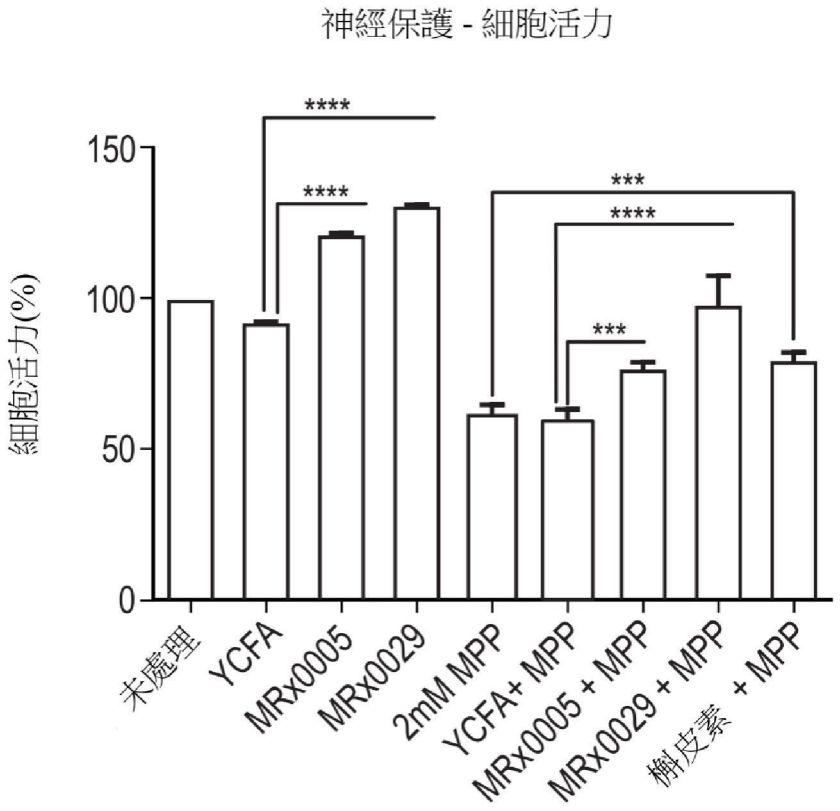
【圖 13B(續)】


總ROS產量
螢光強度(%)
150
100
50
0
DCFDA+TBHP+YCFA
DCFDA+TBHP+MRx0005
DCFDA+TBHP+MRx0029

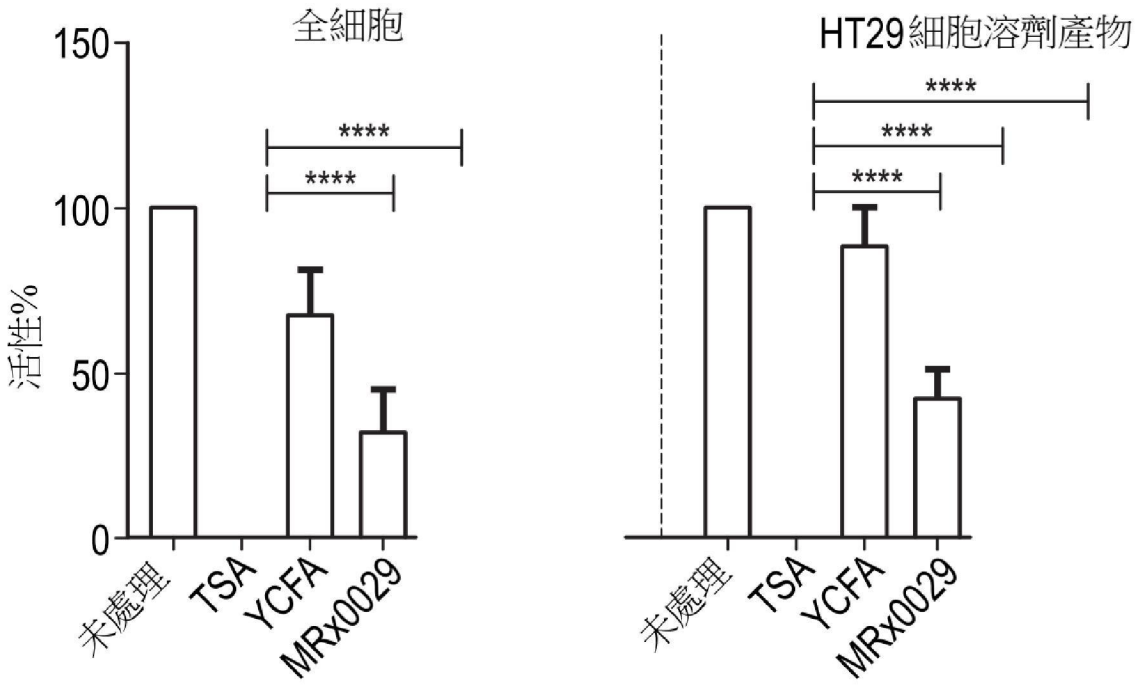
【圖 14A】


總ROS產量
螢光強度(%)
150
100
50
0
***
**
DCFDA+100uM TBHP+YCFA
DCFDA+100uM TBHP+MRx0005
DCFDA+100uM TBHP+MRx0029

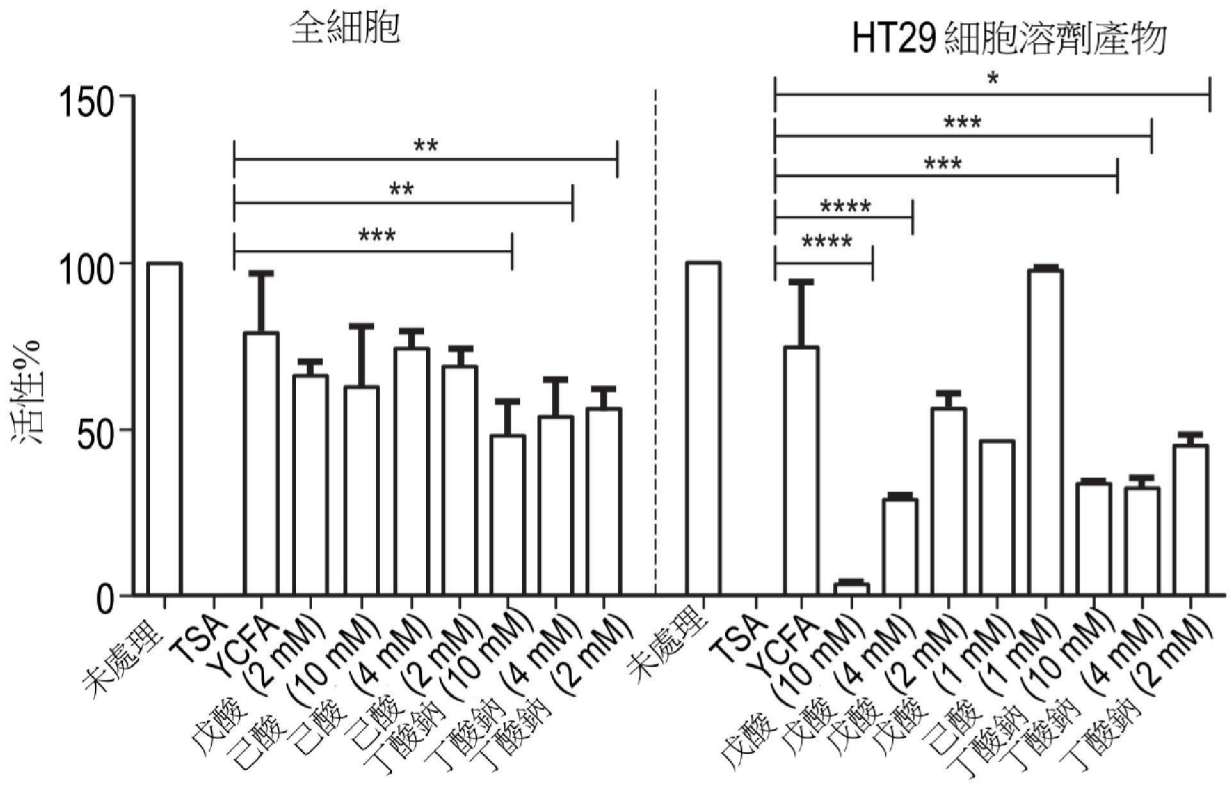
【圖 14B】


神經保護 - 細胞活力
細胞活力(%)
150
100
50
0
****
****
***
****
***
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
2mM MPP
YCFA+ MPP
MRx0005 + MPP
MRx0029 + MPP
槲皮素 + MPP

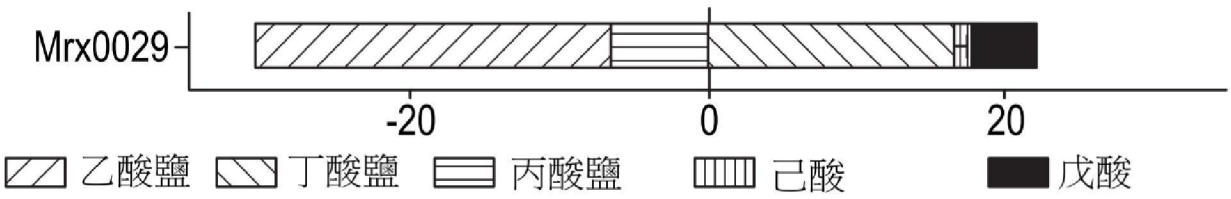
【圖 15】


全細胞
HT29細胞溶劑產物
活性%
150
100
50
0
****
****
****
****
****
未處理
TSA
YCFA
MRx0029
未處理
TSA
YCFA
MRx0029

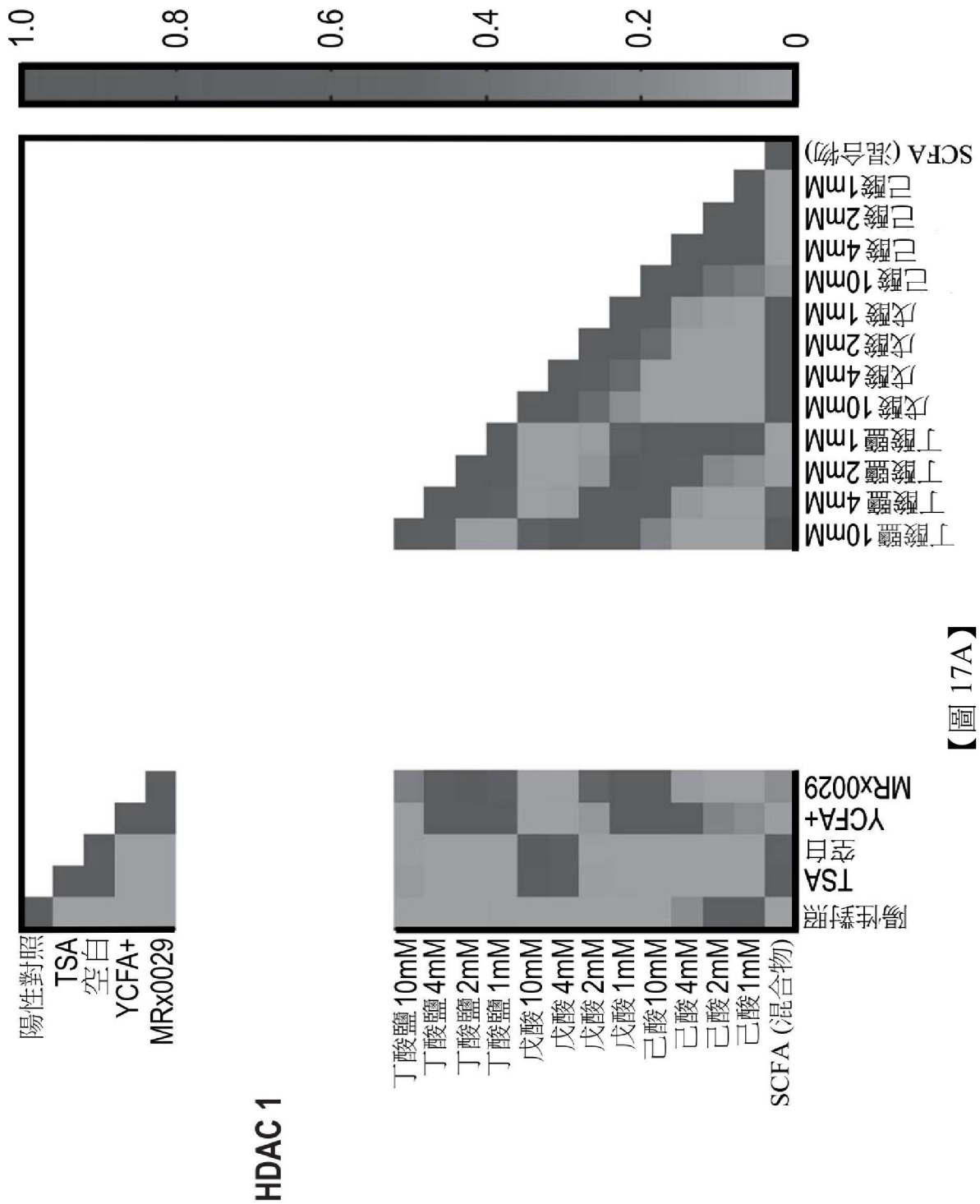
【圖 16A】


全細胞
HT29細胞溶劑產物
活性%
150
100
50
0
**
**
***
*
***
***
****
****
未處理
TSA
YCFA
戊酸 (2 mM)
己酸 (10 mM)
己酸 (4 mM)
己酸 (2 mM)
丁酸鈉 (10 mM)
丁酸鈉 (4 mM)
丁酸鈉 (2 mM)
未處理
TSA
YCFA
戊酸 (10 mM)
戊酸 (4 mM)
戊酸 (2 mM)
戊酸 (1 mM)
己酸 (1 mM)
丁酸鈉 (10 mM)
丁酸鈉 (4 mM)
丁酸鈉 (2 mM)

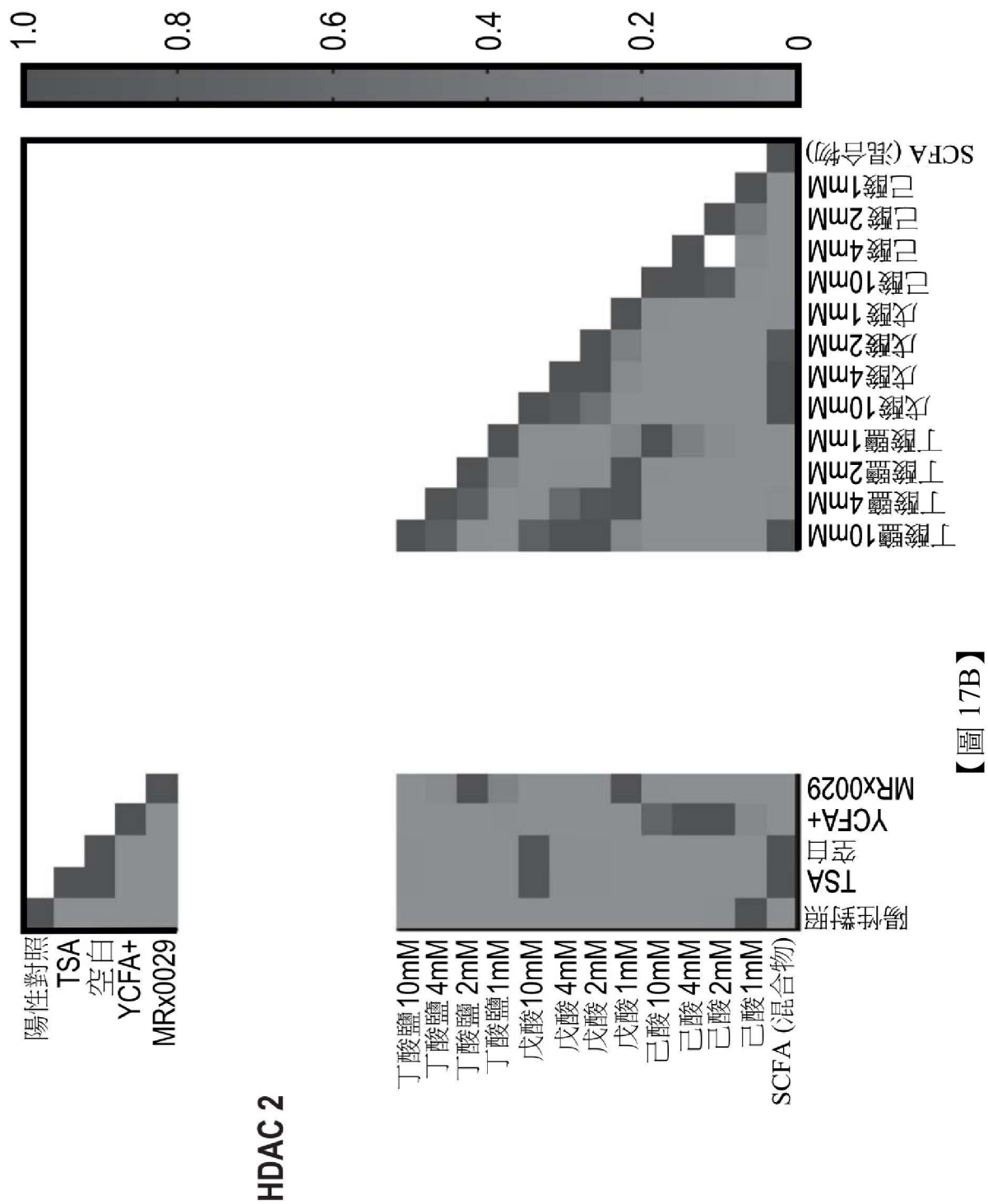
【圖 16B】



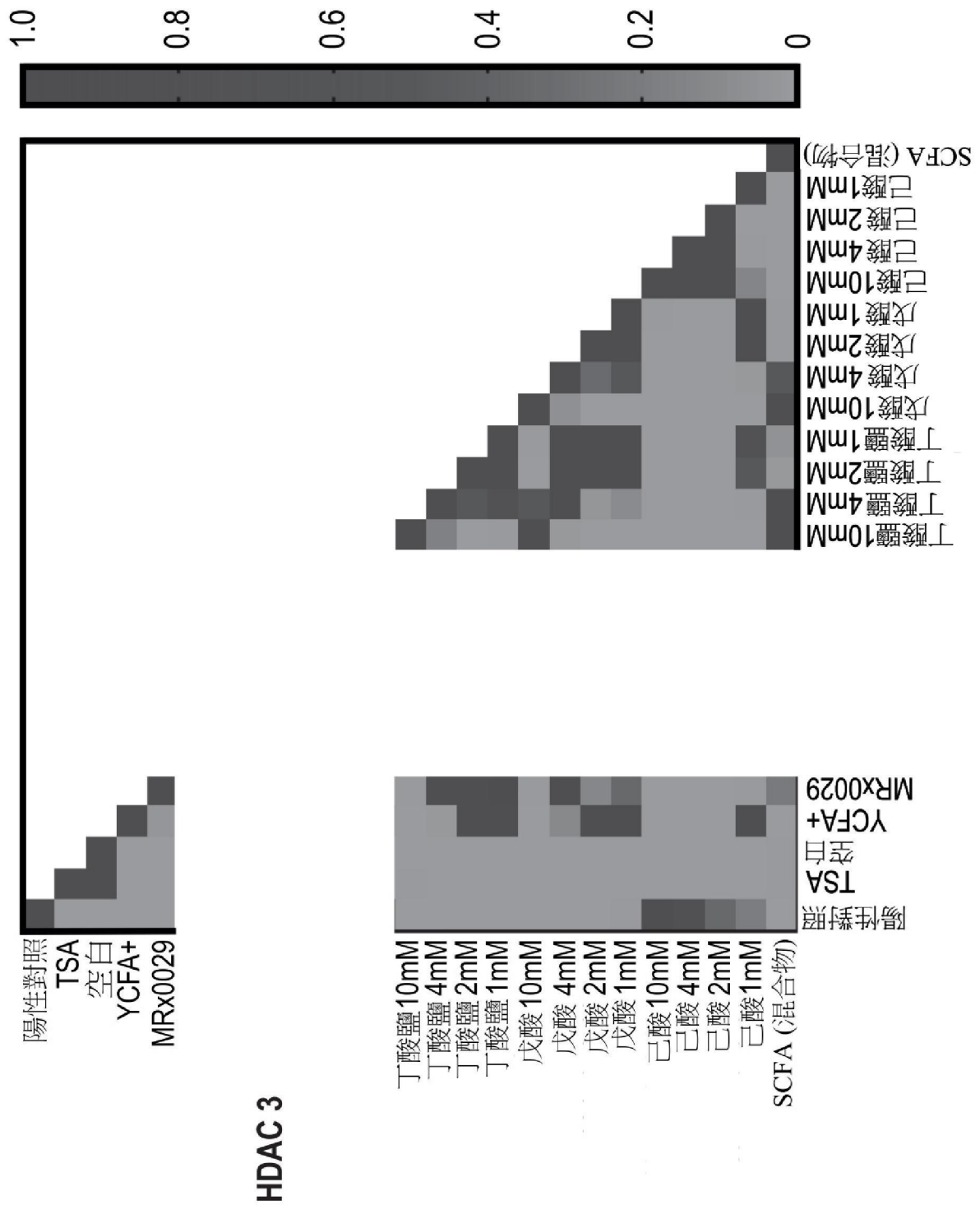
【圖 16C】


HDAC 1
陽性對照
TSA
空白
YCFA+
MRx0029
丁酸鹽10mM
丁酸鹽4mM
丁酸鹽2mM
丁酸鹽1mM
戊酸10mM
戊酸4mM
戊酸2mM
戊酸1mM
己酸10mM
己酸4mM
己酸2mM
己酸1mM
SCFA (混合物)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0

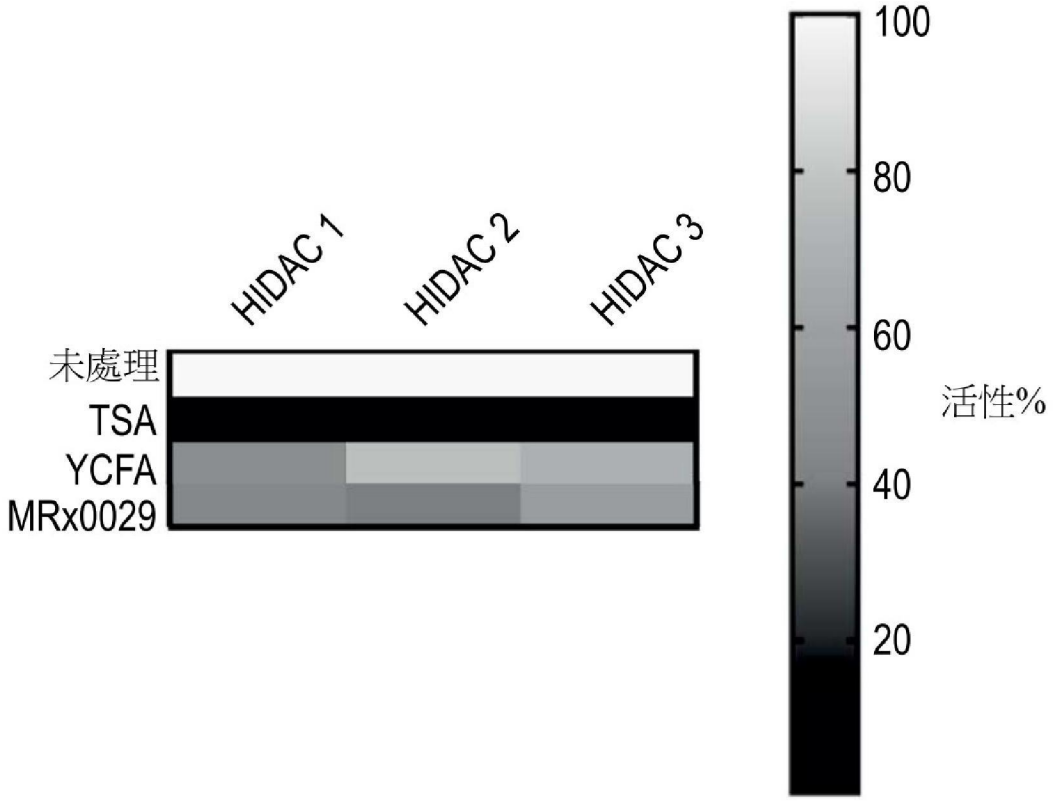
【圖 17A】


HDAC 2
陽性對照
TSA
空白
YCFA+
MRx0029
丁酸鹽10mM
丁酸鹽 4mM
丁酸鹽 2mM
丁酸鹽1mM
戊酸10mM
戊酸 4mM
戊酸 2mM
戊酸 1mM
己酸 10mM
己酸 4mM
己酸 2mM
己酸 1mM
SCFA (混合物)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
丁酸鹽10mM
丁酸鹽4mM
丁酸鹽2mM
丁酸鹽1mM
戊酸10mM
戊酸4mM
戊酸2mM
戊酸1mM
己酸10mM
己酸4mM
己酸2mM
己酸1mM
SCFA (混合物)

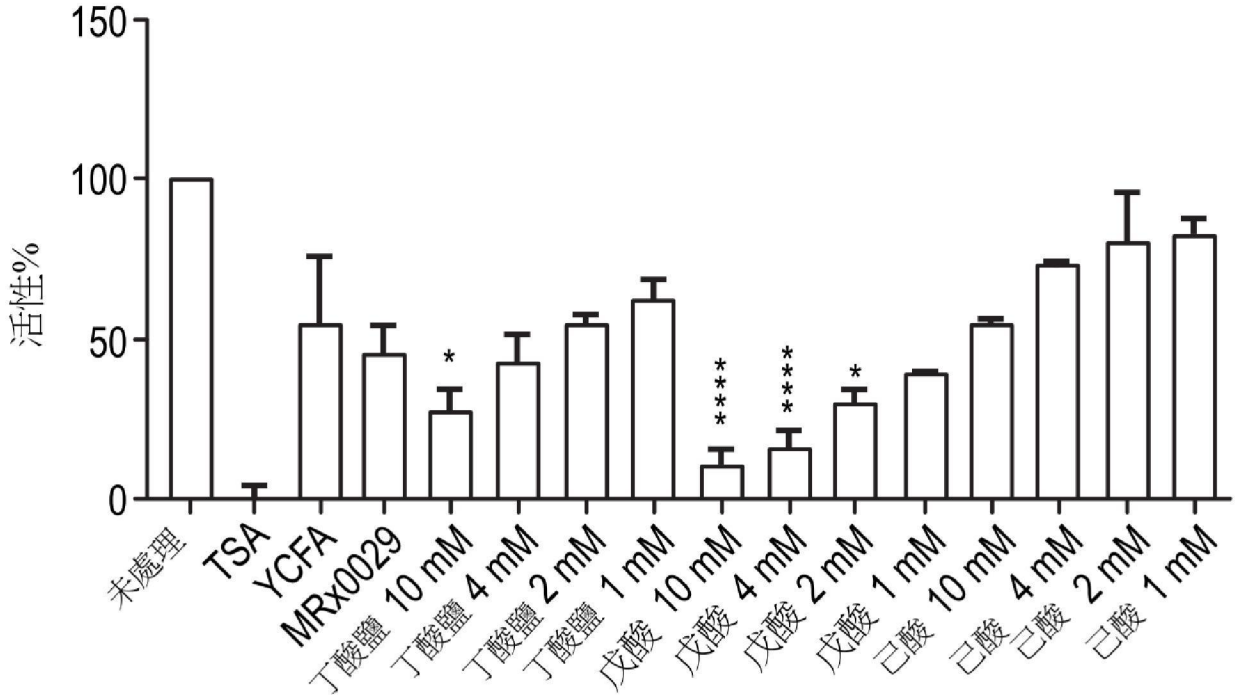
【圖 17B】


HDAC 3
陽性對照
TSA
空白
YCFA+
MRx0029
丁酸鹽10mM
丁酸鹽4mM
丁酸鹽2mM
丁酸鹽1mM
戊酸10mM
戊酸4mM
戊酸2mM
戊酸1mM
己酸10mM
己酸4mM
己酸2mM
己酸1mM
SCFA (混合物)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0

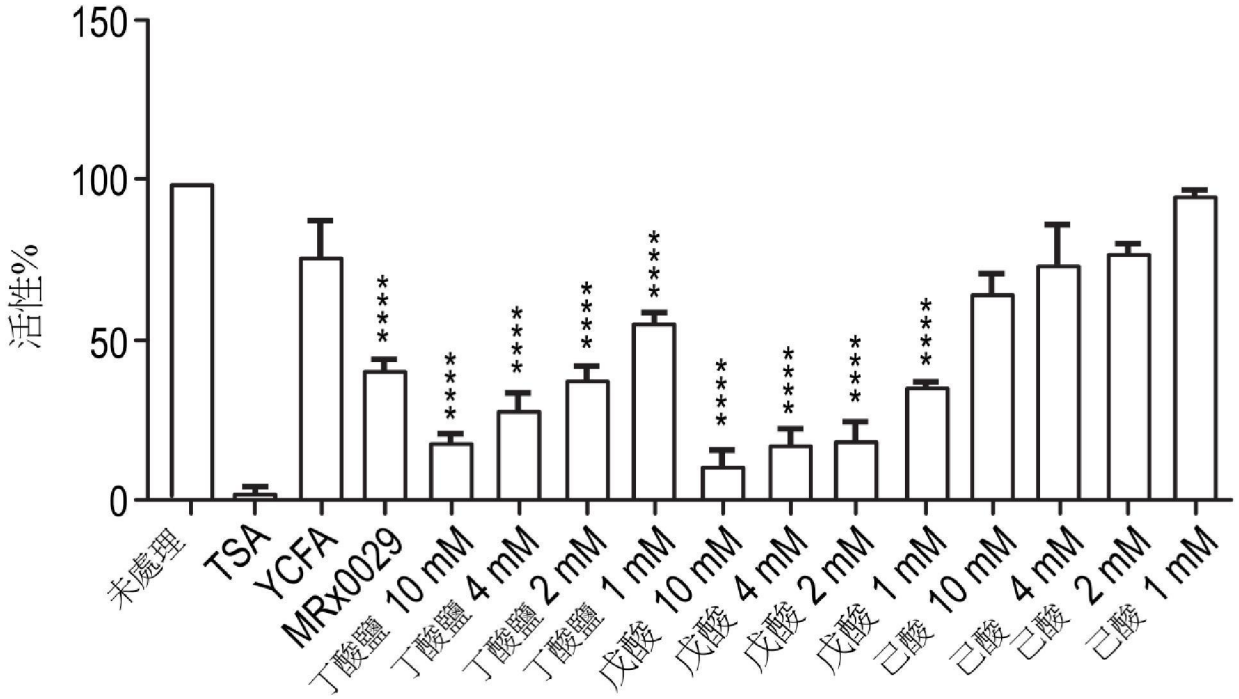
【圖 17C】


HIDAC 1
HIDAC 2
HIDAC 3
未處理
TSA
YCFA
MRx0029
100
80
60
40
20
活性%

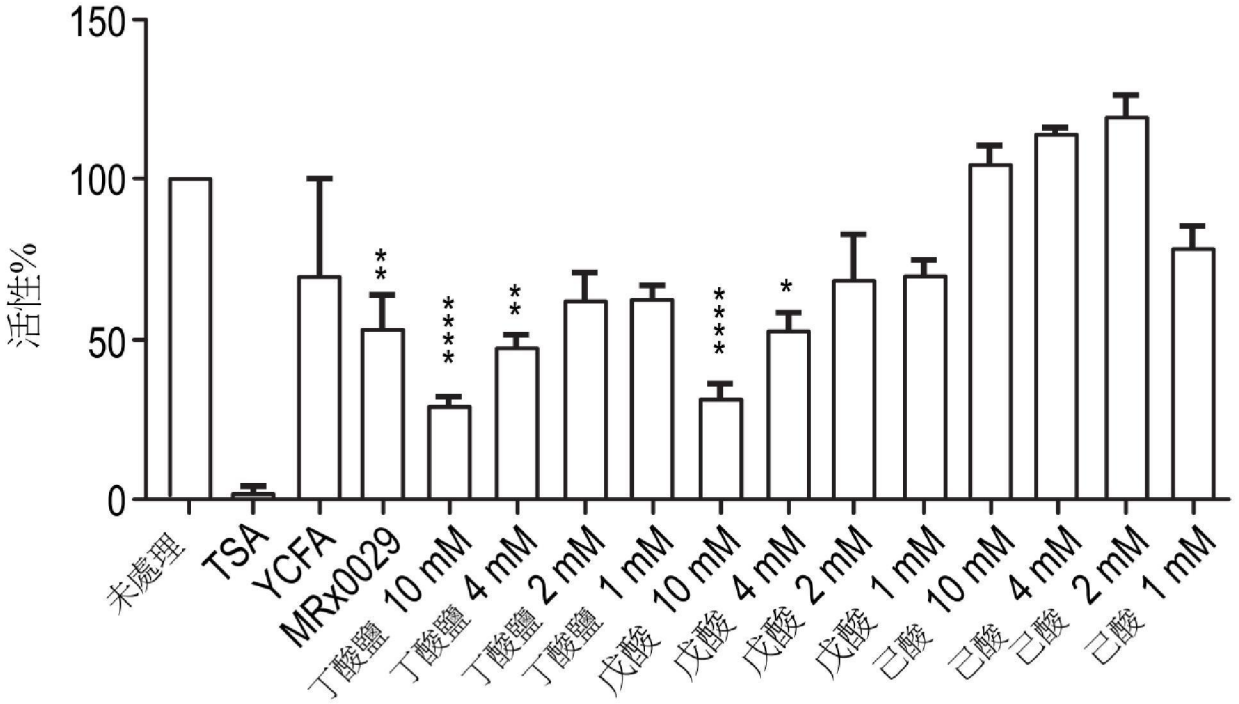
【圖 18A】


150
100
50
0
活性%
未處理
TSA
YCFA
MRx0029
丁酸鹽 10 mM
丁酸鹽 4 mM
丁酸鹽 2 mM
丁酸鹽 1 mM
戊酸 10 mM
戊酸 4 mM
戊酸 2 mM
戊酸 1 mM
己酸 10 mM
己酸 4 mM
己酸 2 mM
己酸 1 mM

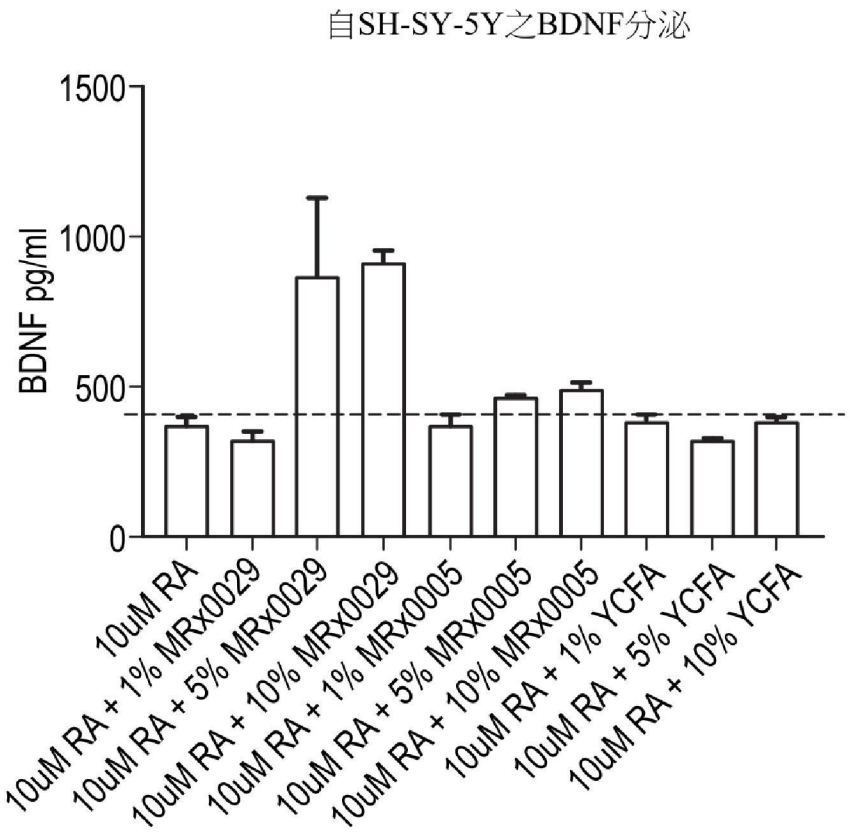
【圖 18B】


150
100
50
0
活性%
未處理
TSA
YCFA
MRx0029
丁酸鹽 10 mM
丁酸鹽 4 mM
丁酸鹽 2 mM
丁酸鹽 1 mM
戊酸 10 mM
戊酸 4 mM
戊酸 2 mM
戊酸 1 mM
己酸 10 mM
己酸 4 mM
己酸 2 mM
己酸 1 mM

【圖 18C】

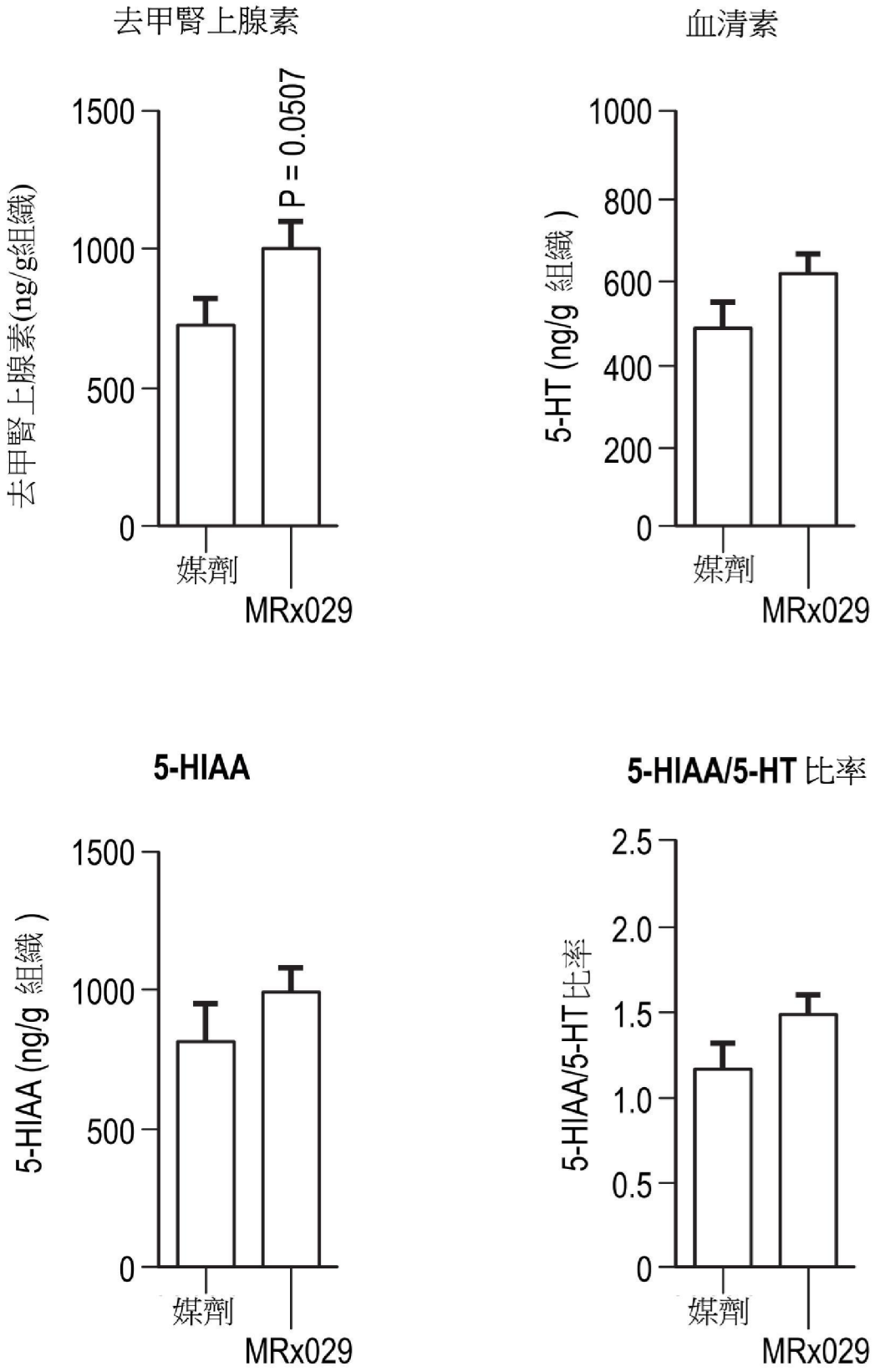

150
100
50
0
活性%
未處理
TSA
YCFA
MRx0029
丁酸鹽 10 mM
丁酸鹽 4 mM
丁酸鹽 2 mM
丁酸鹽 1 mM
戊酸 10 mM
戊酸 4 mM
戊酸 2 mM
戊酸 1 mM
己酸 10 mM
己酸 4 mM
己酸 2 mM
己酸 1 mM

【圖 18D】

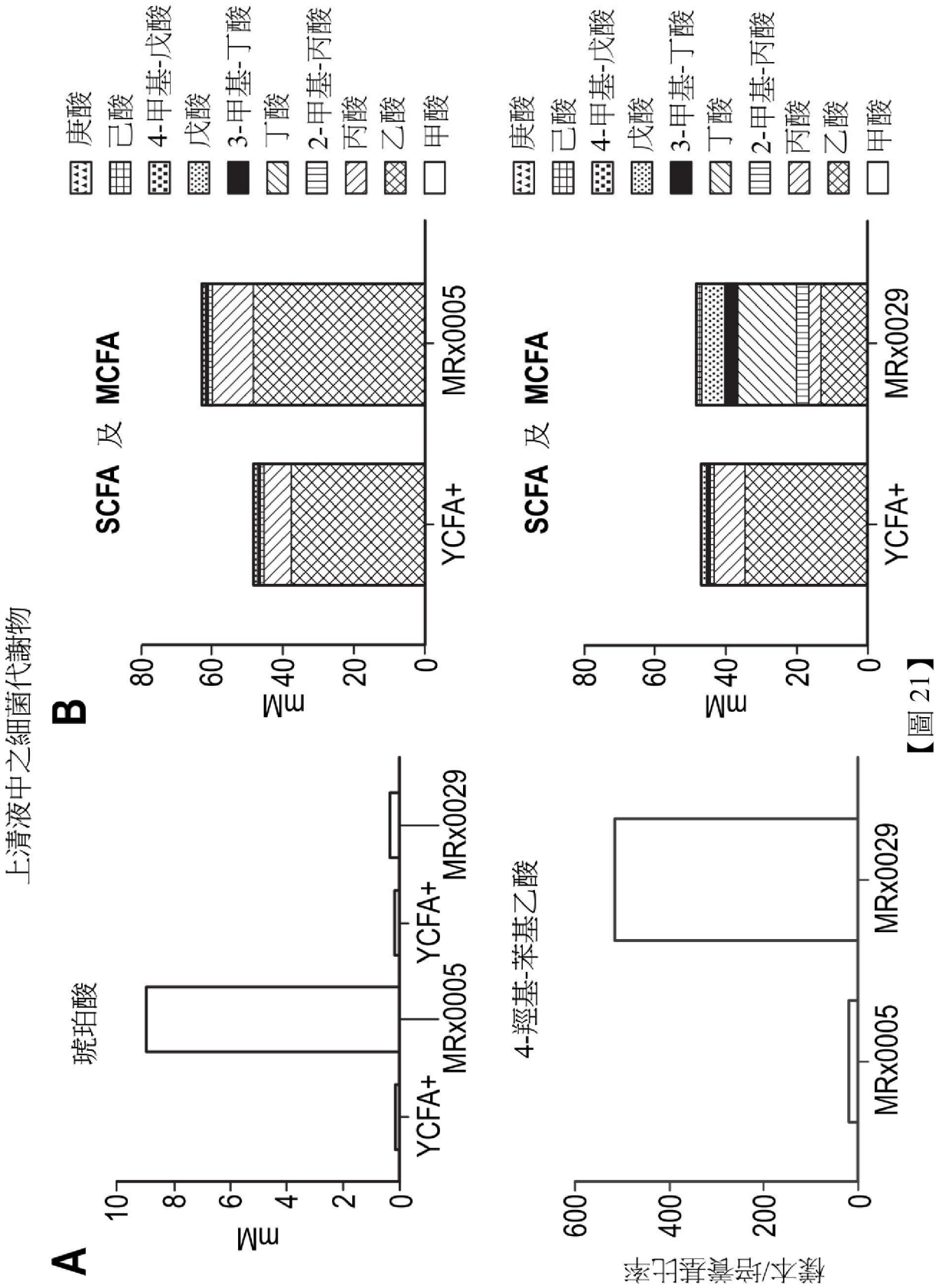

自SH-SY-5Y之BDNF分泌
BDNF pg/ml
1500
1000
500
0
10uM RA
10uM RA + 1% MRx0029
10uM RA + 5% MRx0029
10uM RA + 10% MRx0029
10uM RA + 1% MRx0005
10uM RA + 5% MRx0005
10uM RA + 10% MRx0005
10uM RA + 1% YCFA
10uM RA + 5% YCFA
10uM RA + 10% YCFA

【圖 19】

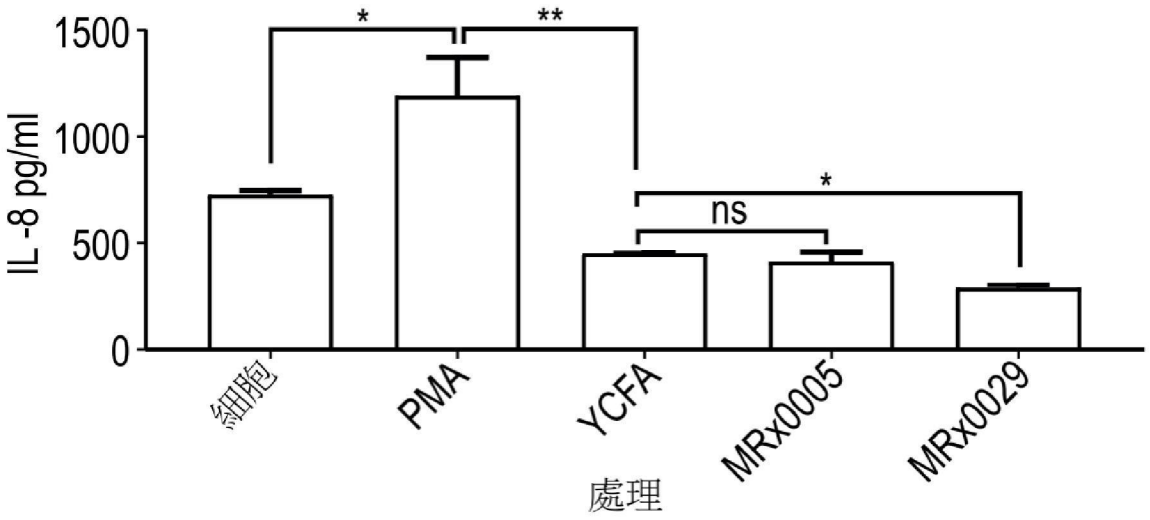
腦中神經傳遞物之產生



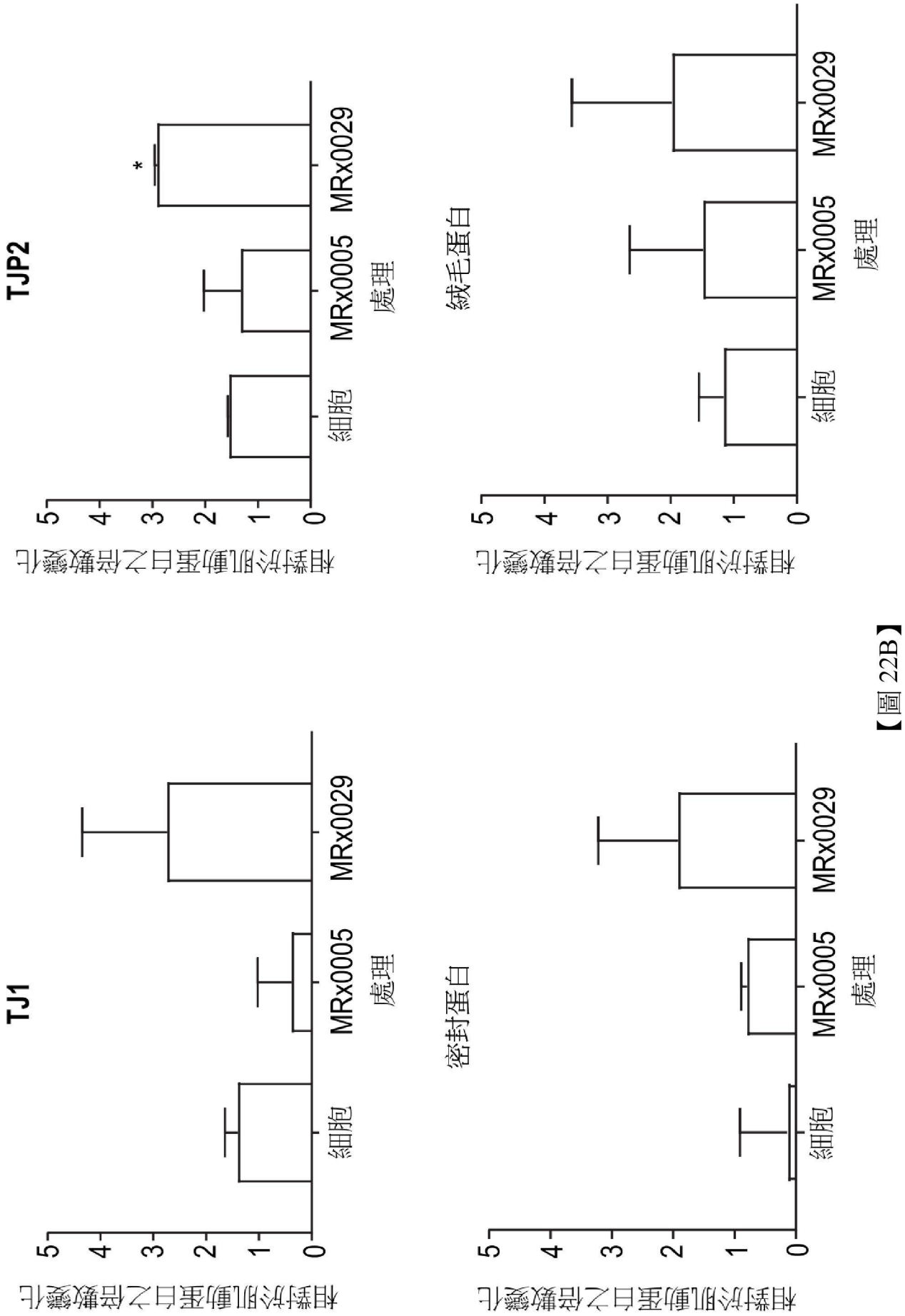
【圖 20】


上清液中之細菌代謝物
A
琥珀酸
mM
10
8
6
4
2
0
YCFA+
MRx0005
YCFA+
MRx0029
B
SCFA 及 MCFA
mM
80
60
40
20
0
YCFA+
MRx0005
庚酸
己酸
4-甲基-戊酸
戊酸
3-甲基-丁酸
丁酸
2-甲基-丙酸
丙酸
乙酸
甲酸
4-羥基-苯基乙酸
600
400
200
0
MRx0005
MRx0029
樣本/培養基比率
SCFA 及 MCFA
mM
80
60
40
20
0
YCFA+
MRx0029
庚酸
己酸
4-甲基-戊酸
戊酸
3-甲基-丁酸
丁酸
2-甲基-丙酸
丙酸
乙酸
甲酸

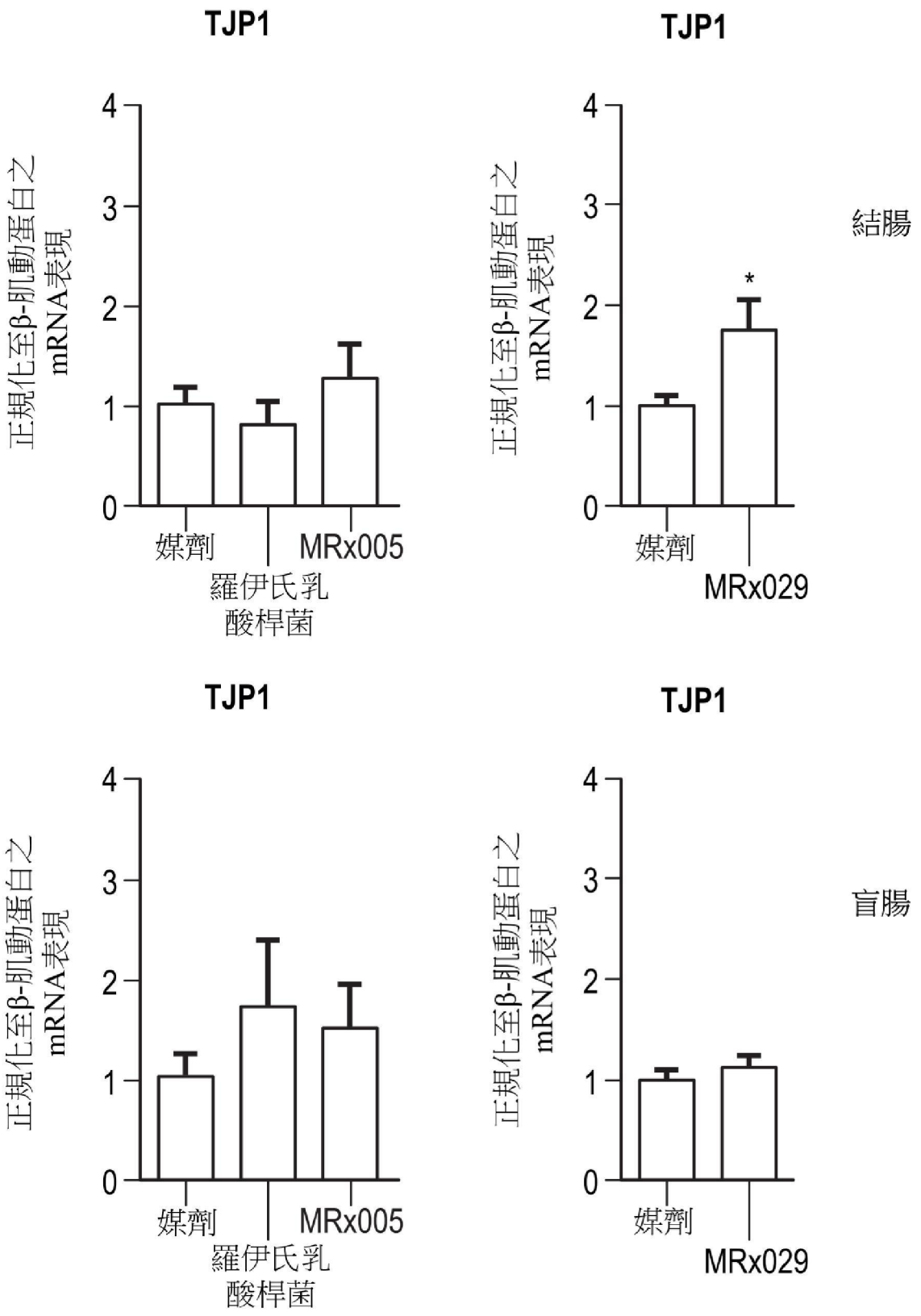
【圖 21】



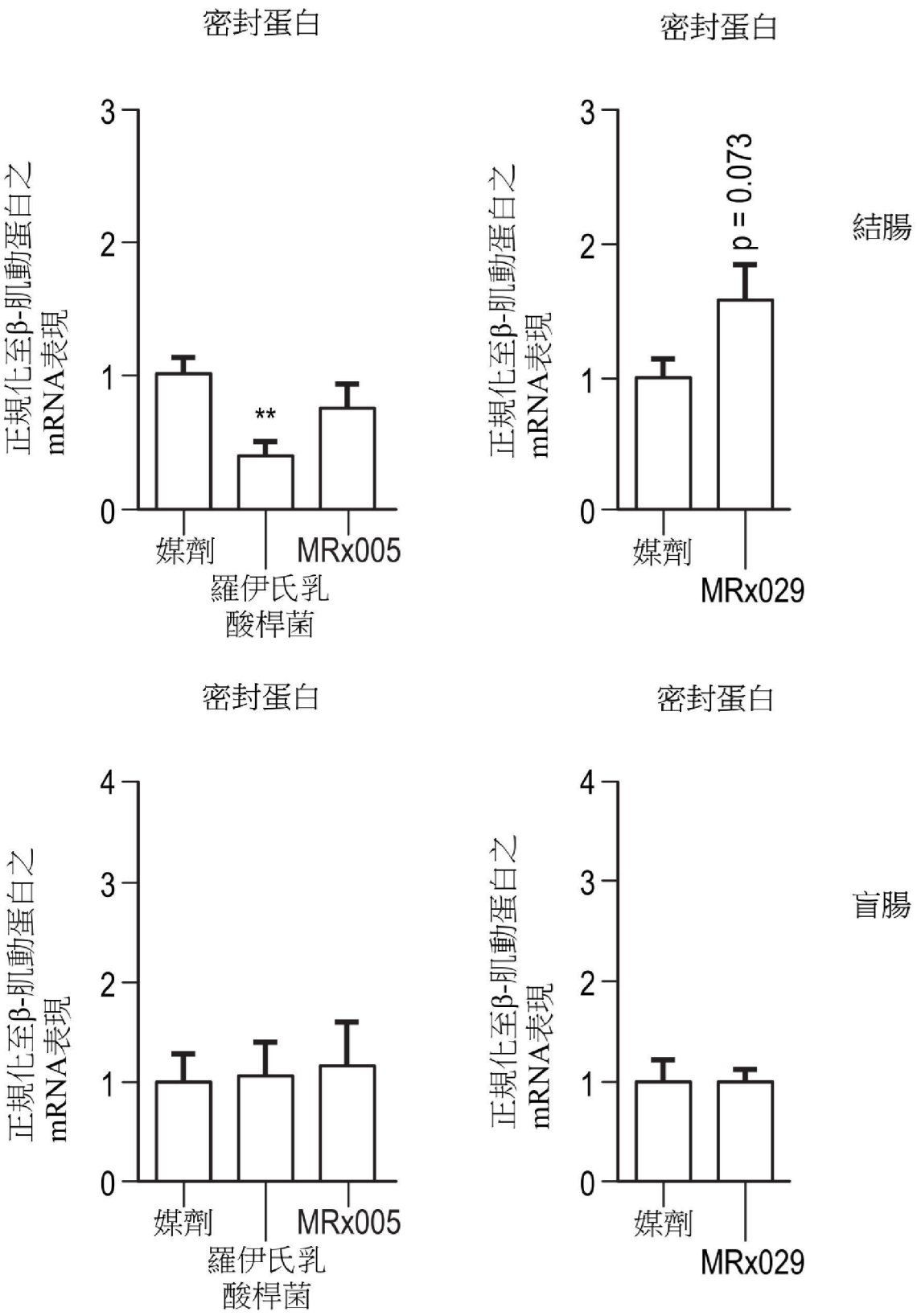
【圖 22A】


TJP2
相對於肌動蛋白之倍數變化
0
1
2
3
4
5
*
細胞
MRx0005
MRx0029
處理
絨毛蛋白
相對於肌動蛋白之倍數變化
0
1
2
3
4
5
細胞
MRx0005
MRx0029
處理
TJ1
相對於肌動蛋白之倍數變化
0
1
2
3
4
5
細胞
MRx0005
MRx0029
處理
密封蛋白
相對於肌動蛋白之倍數變化
0
1
2
3
4
5
細胞
MRx0005
MRx0029
處理

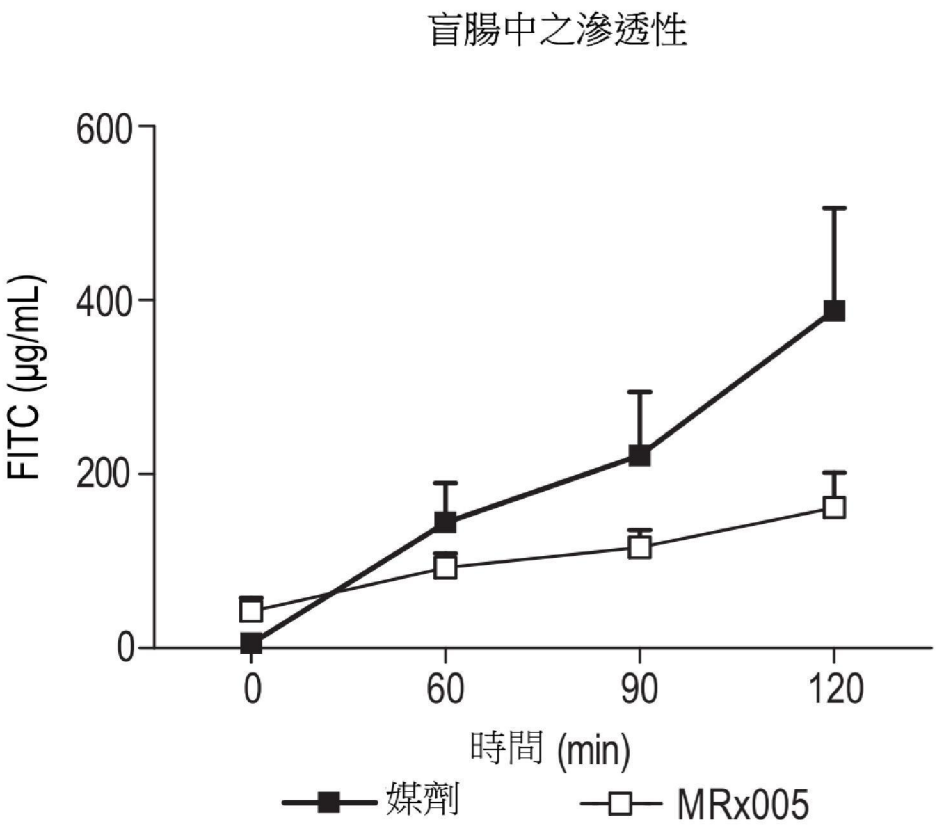
【圖 22B】

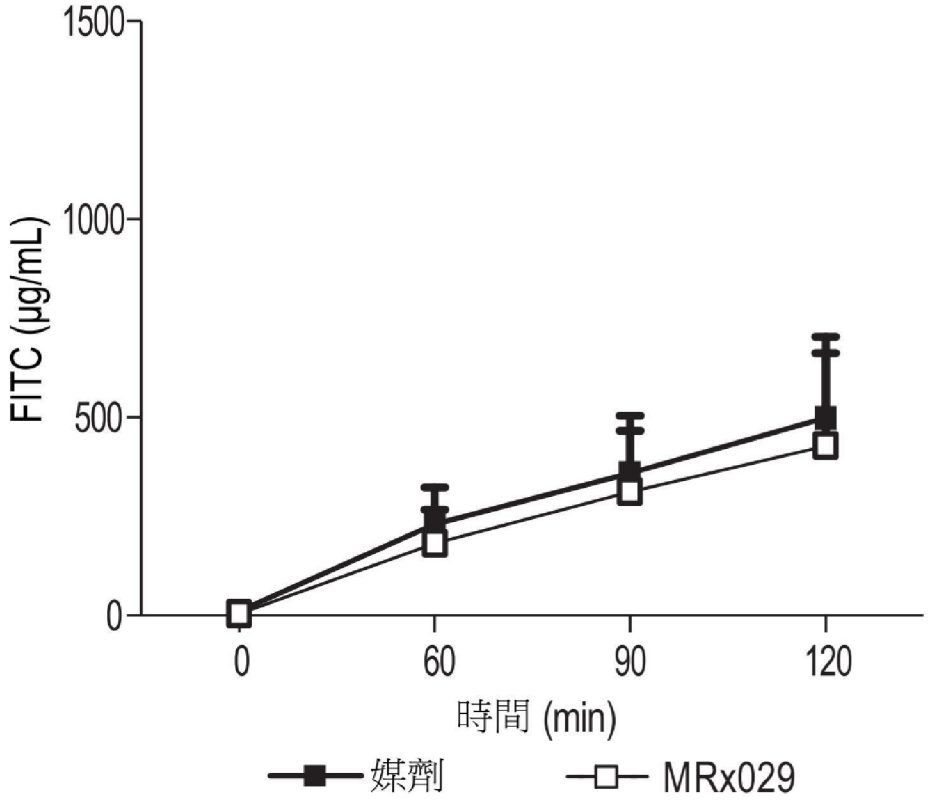

TJP1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
3
2
1
0
媒劑
MRx005
羅伊氏乳酸桿菌
TJP1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
3
2
1
0
*
媒劑
MRx029
結腸
TJP1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
3
2
1
0
媒劑
MRx005
羅伊氏乳酸桿菌
TJP1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
3
2
1
0
媒劑
MRx029
盲腸

【圖 22C】

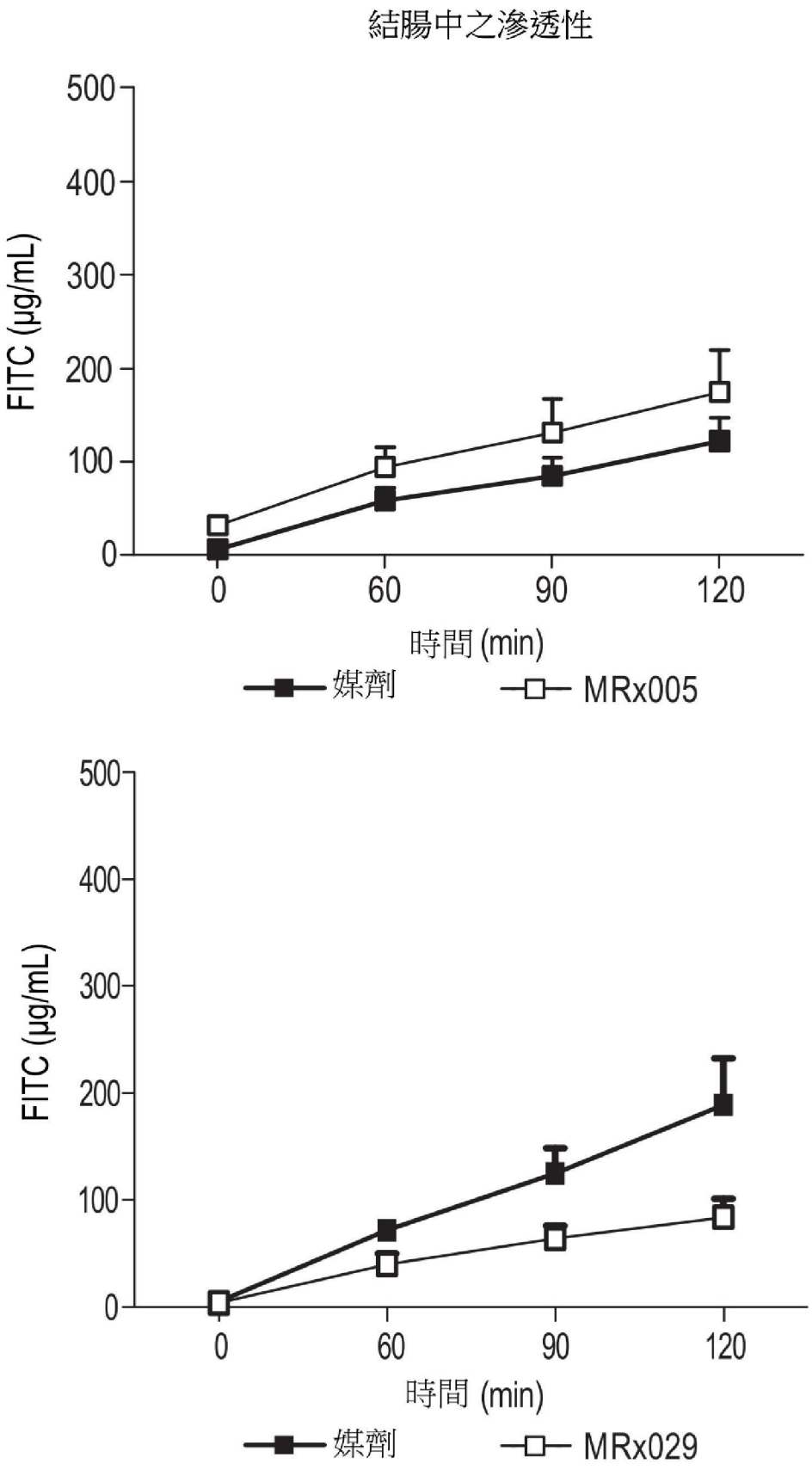

密封蛋白
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
3
2
1
0
**
媒劑
MRx005
羅伊氏乳酸桿菌
密封蛋白
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
p = 0.073
結腸
媒劑
MRx029
密封蛋白
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
媒劑
MRx005
羅伊氏乳酸桿菌
密封蛋白
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
盲腸
媒劑
MRx029

【圖 22D】

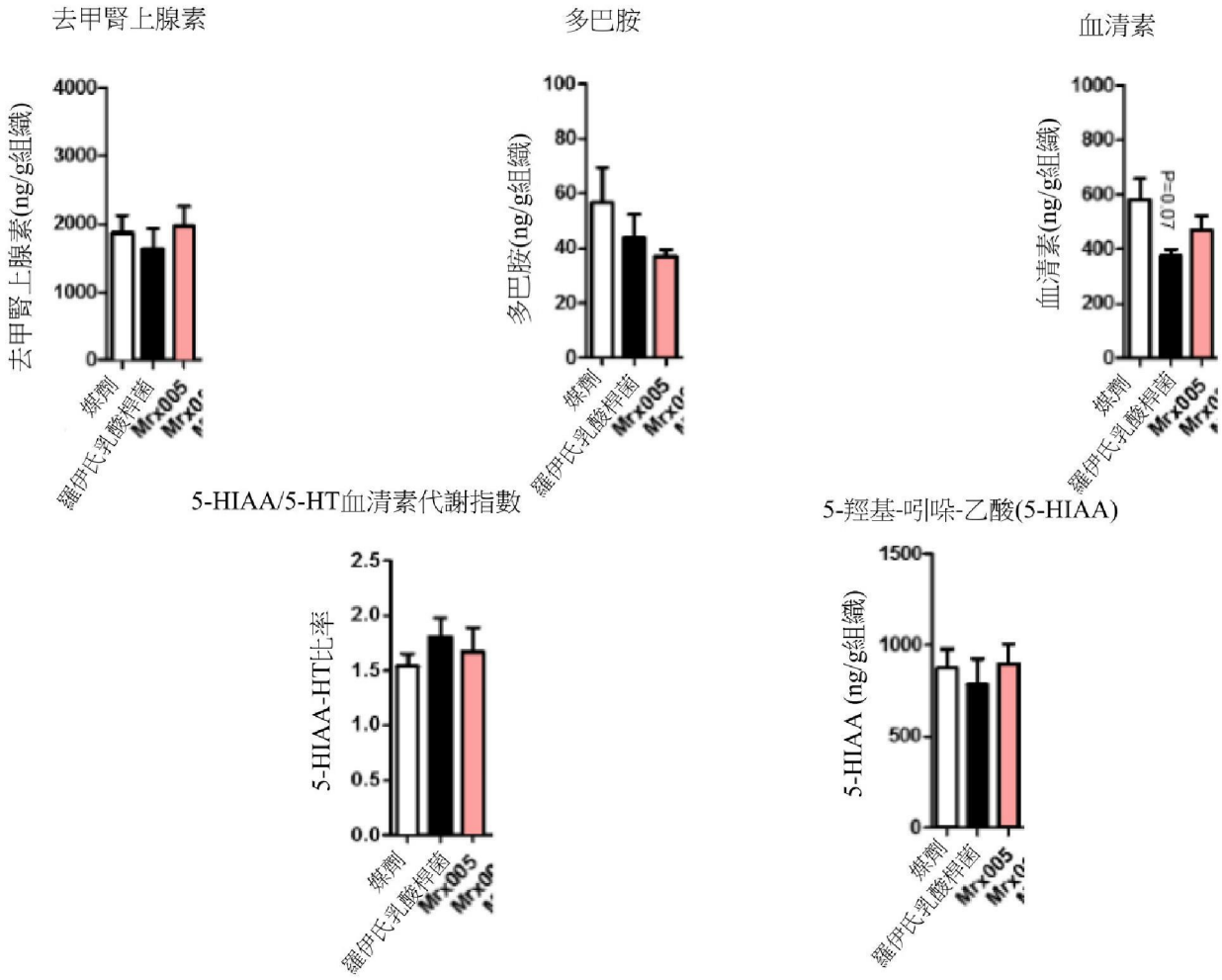

盲腸中之滲透性
600
400
200
0
FITC (μg/mL)
0
60
90
120
時間 (min)
媒劑
MRx005


1500
1000
500
0
FITC (μg/mL)
0
60
90
120
時間 (min)
媒劑
MRx029

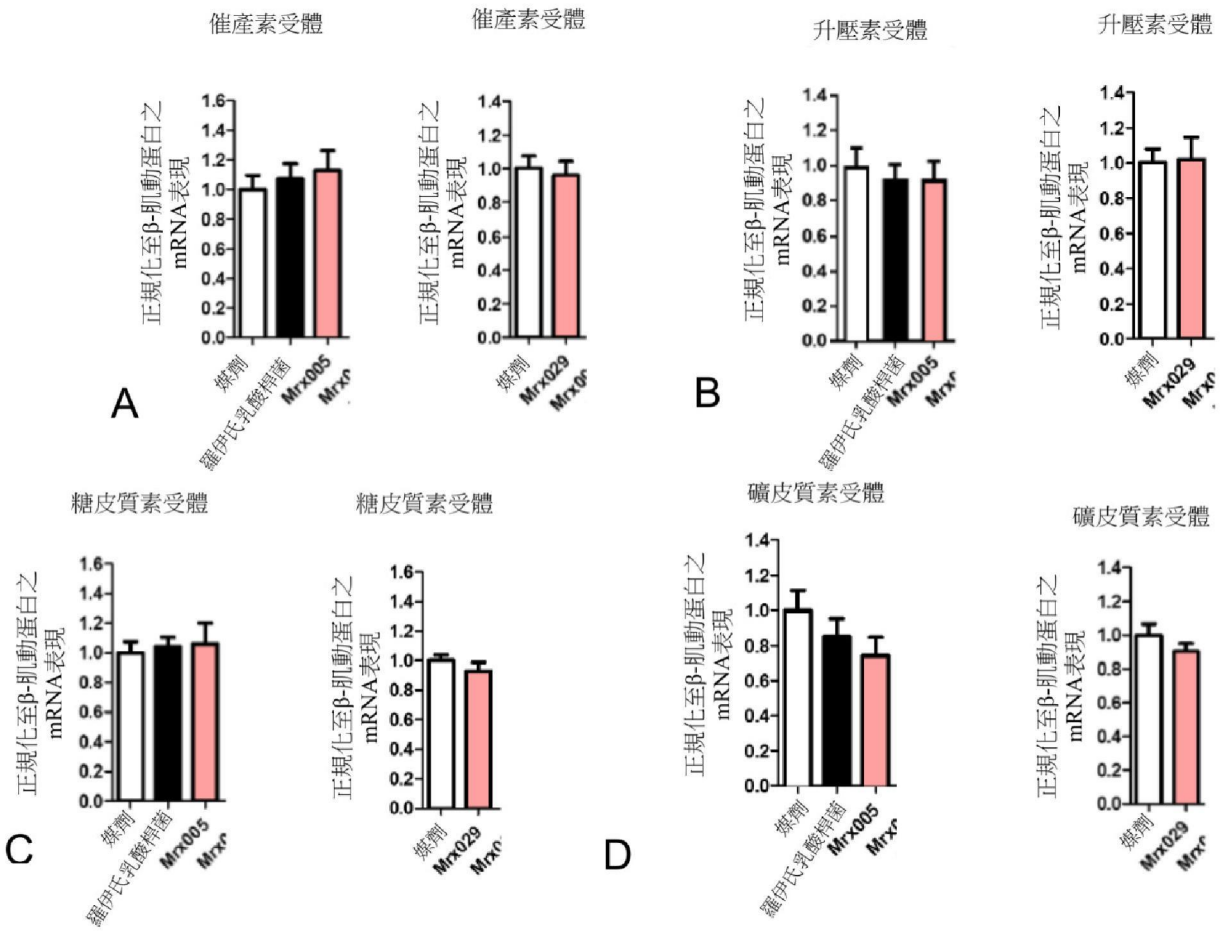
【圖 22E】


結腸中之滲透性
500
400
300
200
100
0
FITC (μg/mL)
0
60
90
120
時間 (min)
媒劑
MRx005
500
400
300
200
100
0
FITC (μg/mL)
0
60
90
120
時間 (min)
媒劑
MRx029

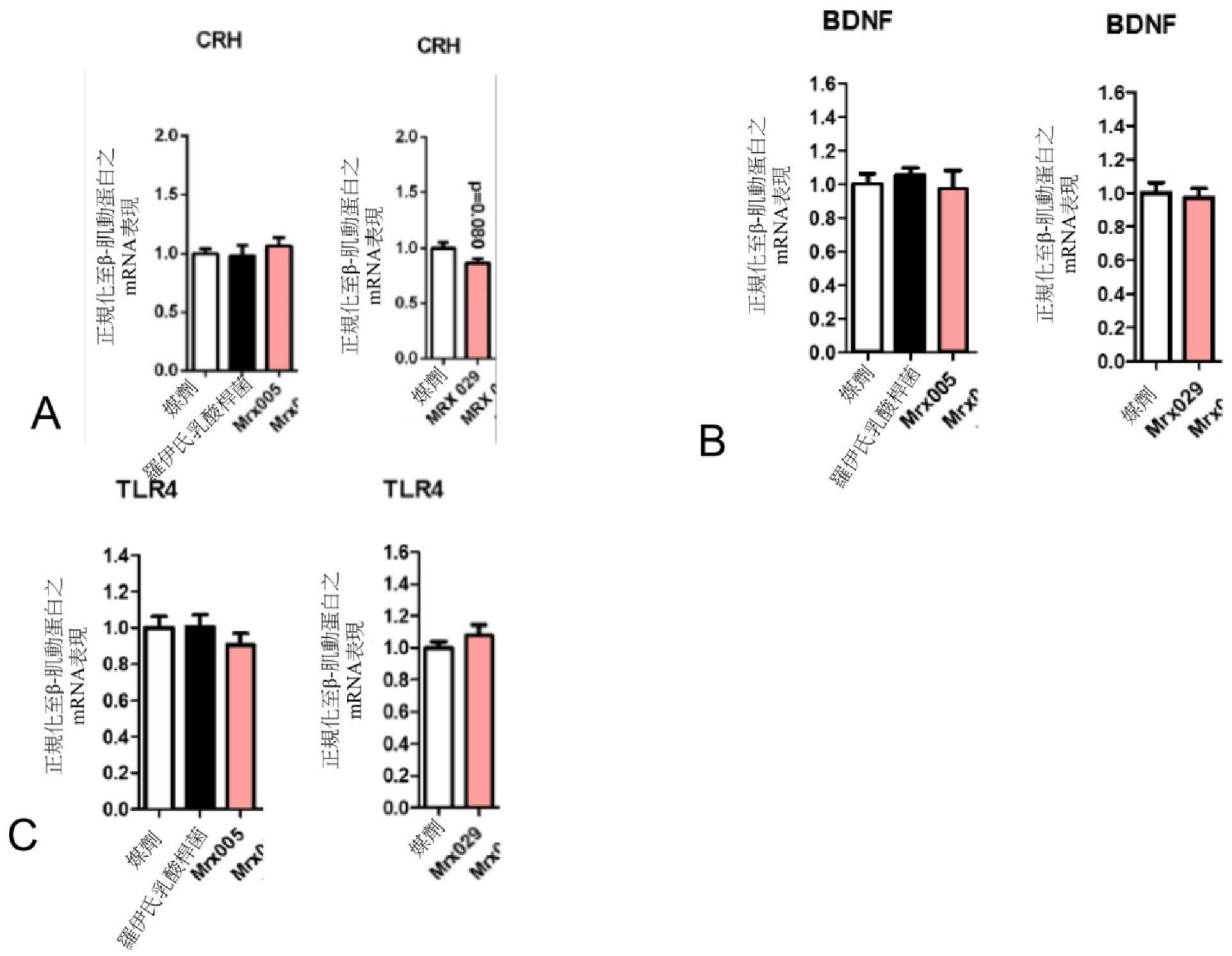
【圖 22F】


去甲腎上腺素
去甲腎上腺素(ng/g組織)
4000
3000
2000
1000
0
煤劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
多巴胺
多巴胺(ng/g組織)
100
80
60
40
20
0
血清素
血清素(ng/g組織)
1000
800
600
400
200
0
P=0.07
5-HIAA/5-HT血清素代謝指數
5-HIAA-HT比率
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
5-羥基-吲哚-乙酸(5-HIAA)
5-HIAA (ng/g組織)
1500
1000
500
0

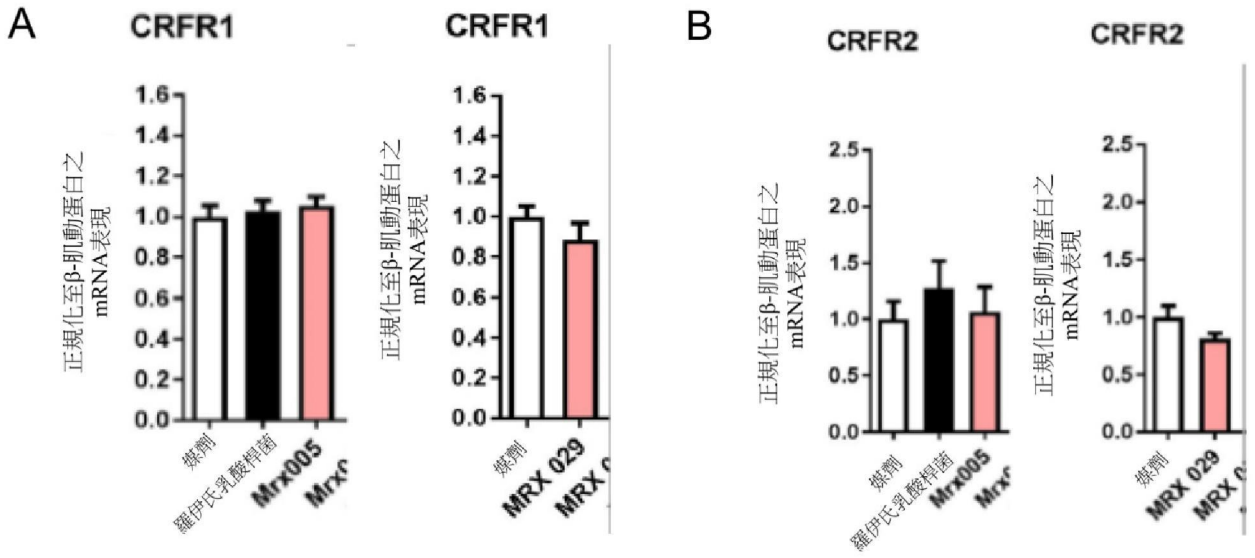
【圖 23】


催產素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
煞劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
A
催產素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
Mrx029
升壓素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
B
升壓素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
Mrx029
糖皮質素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
C
糖皮質素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
Mrx029
礦皮質素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
D
礦皮質素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煞劑
Mrx029

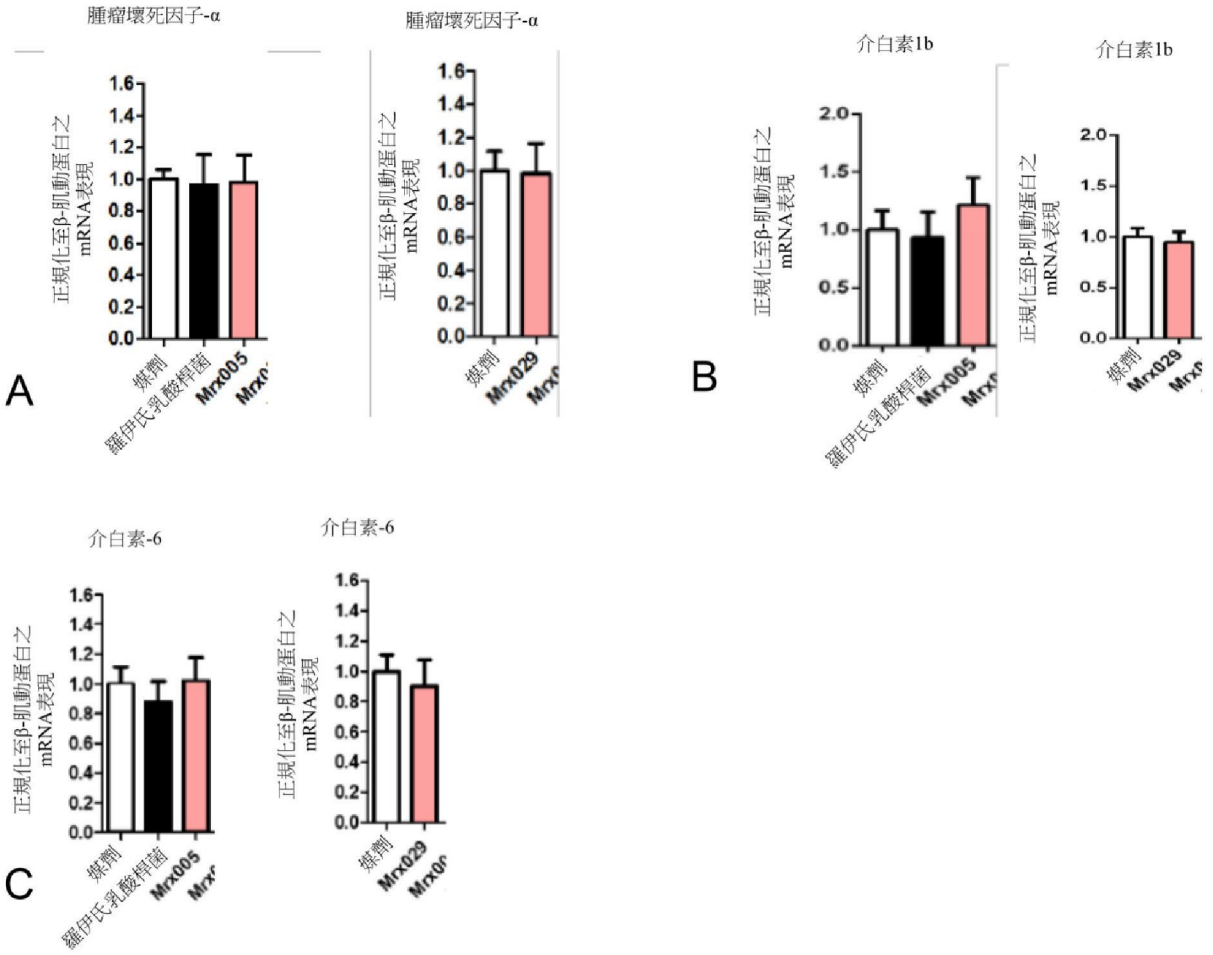
【圖 24】


A
CRH
CRH
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
煤劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
B
BDNF
BDNF
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Mrx029
C
TLR4
TLR4
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Mrx029

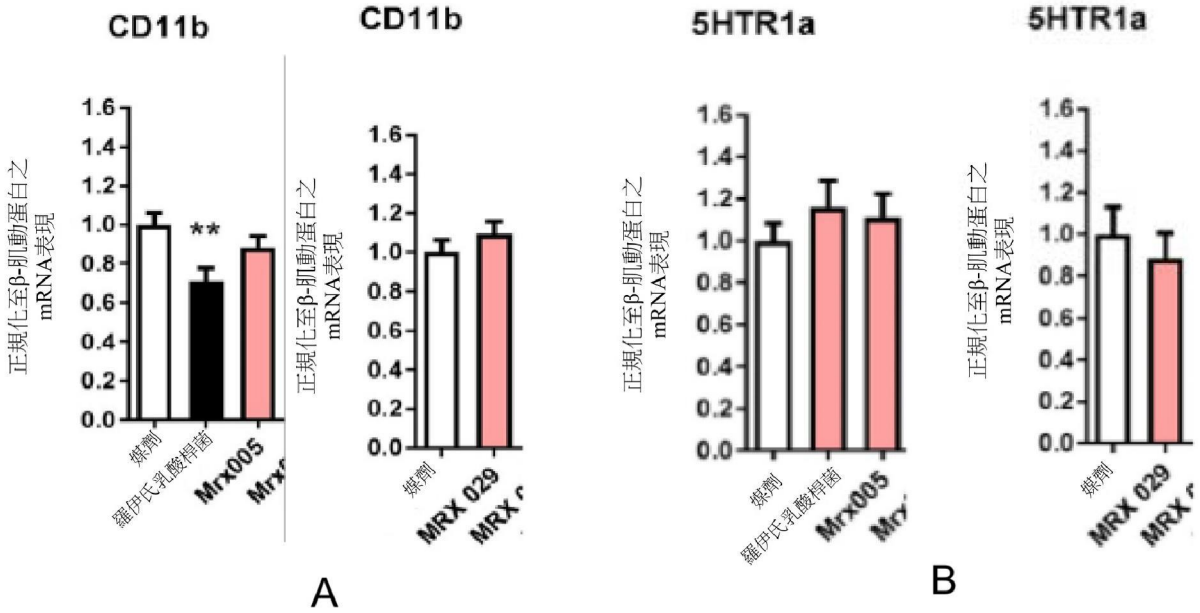
【圖 25】


A
CRFR1
CRFR1
B
CRFR2
CRFR2
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029

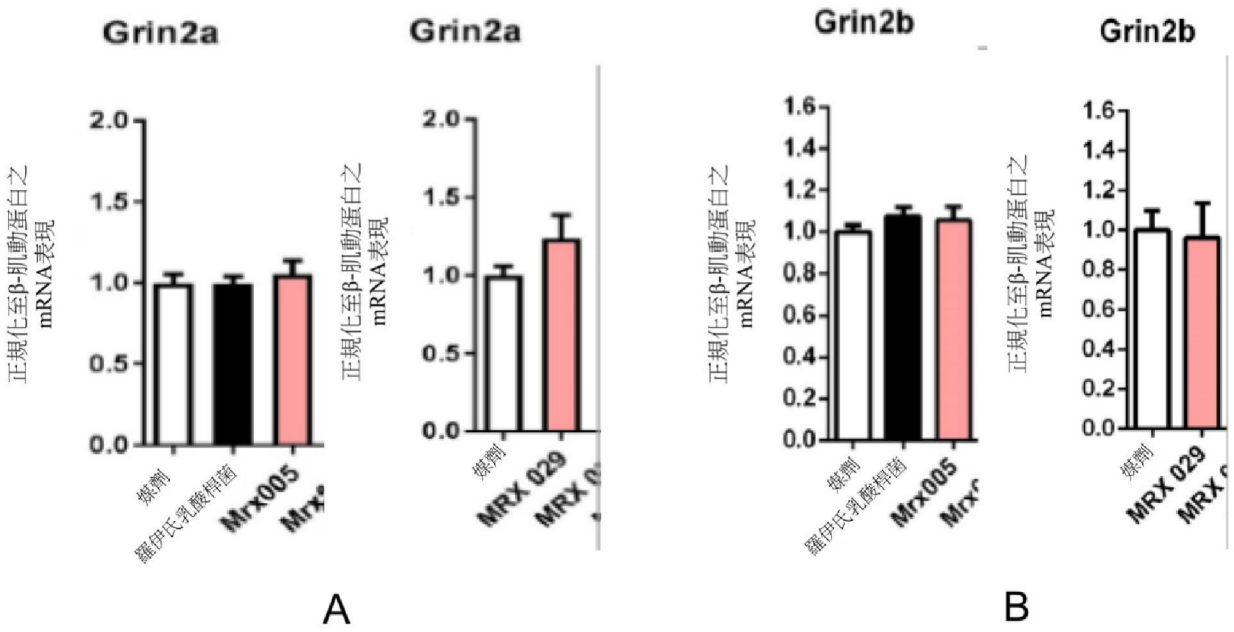
【圖 26】


腫瘤壞死因子-α
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
腫瘤壞死因子-α
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
Mrx029
A
介白素1b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
介白素1b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
Mrx029
B
介白素-6
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
介白素-6
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
Mrx029
C

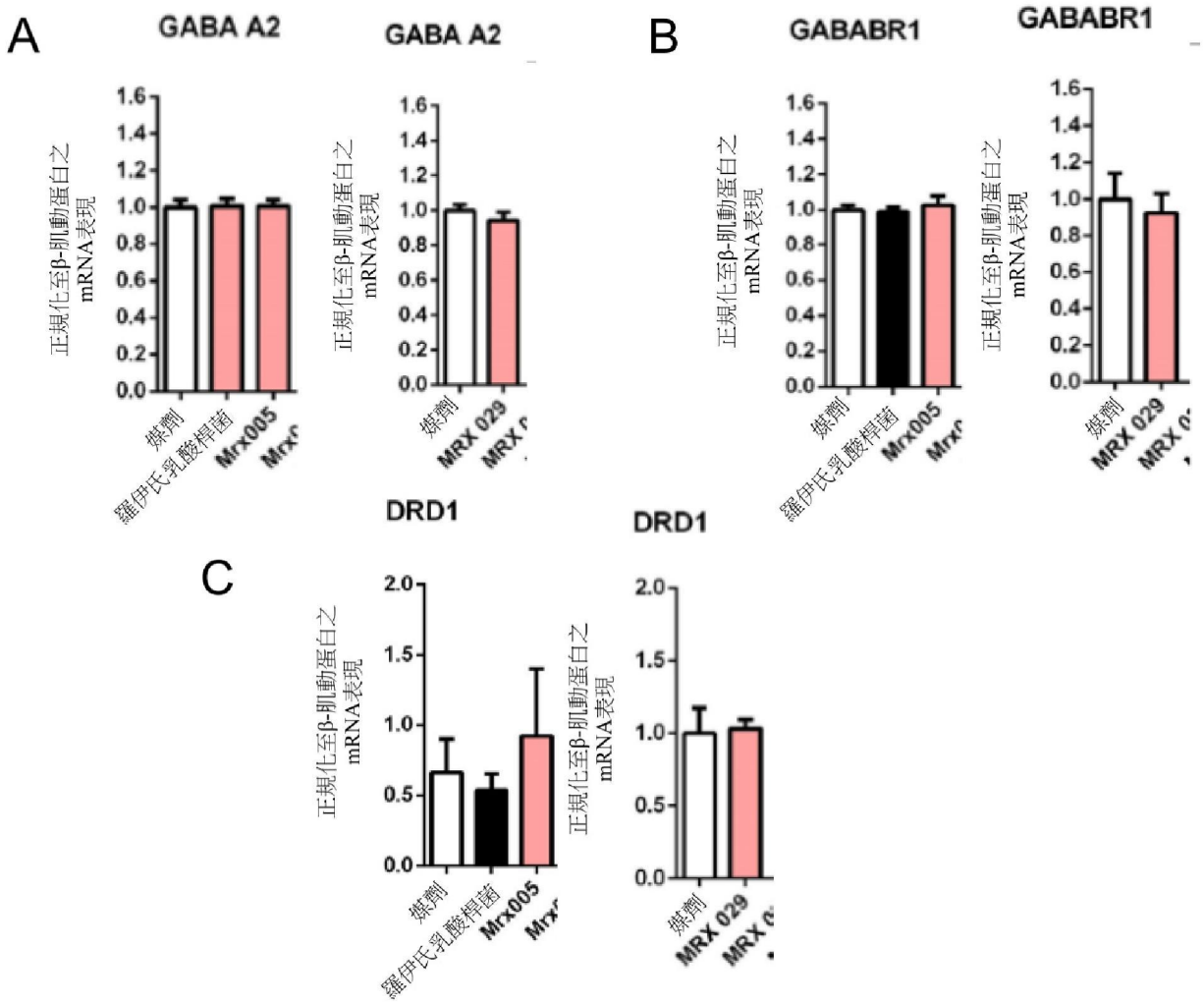
【圖 27】


CD11b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
煤劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
CD11b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煤劑
MRX 029
A
5HTR1a
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煤劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
5HTR1a
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
煤劑
MRX 029
B

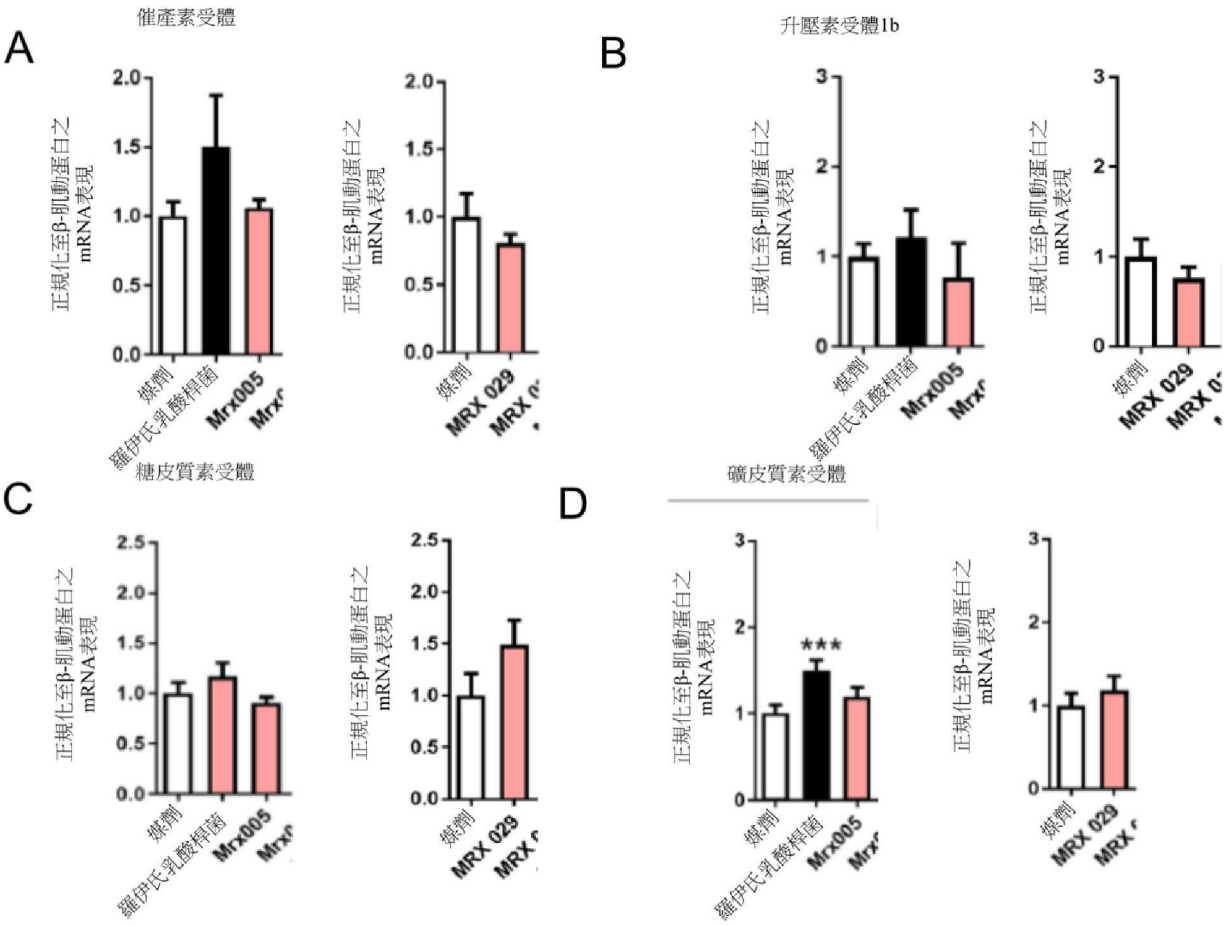
【圖 28】


Grin2a
Grin2a
Grin2b
Grin2b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1.6
1.4
1.2
0.8
0.6
0.4
0.2
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
B

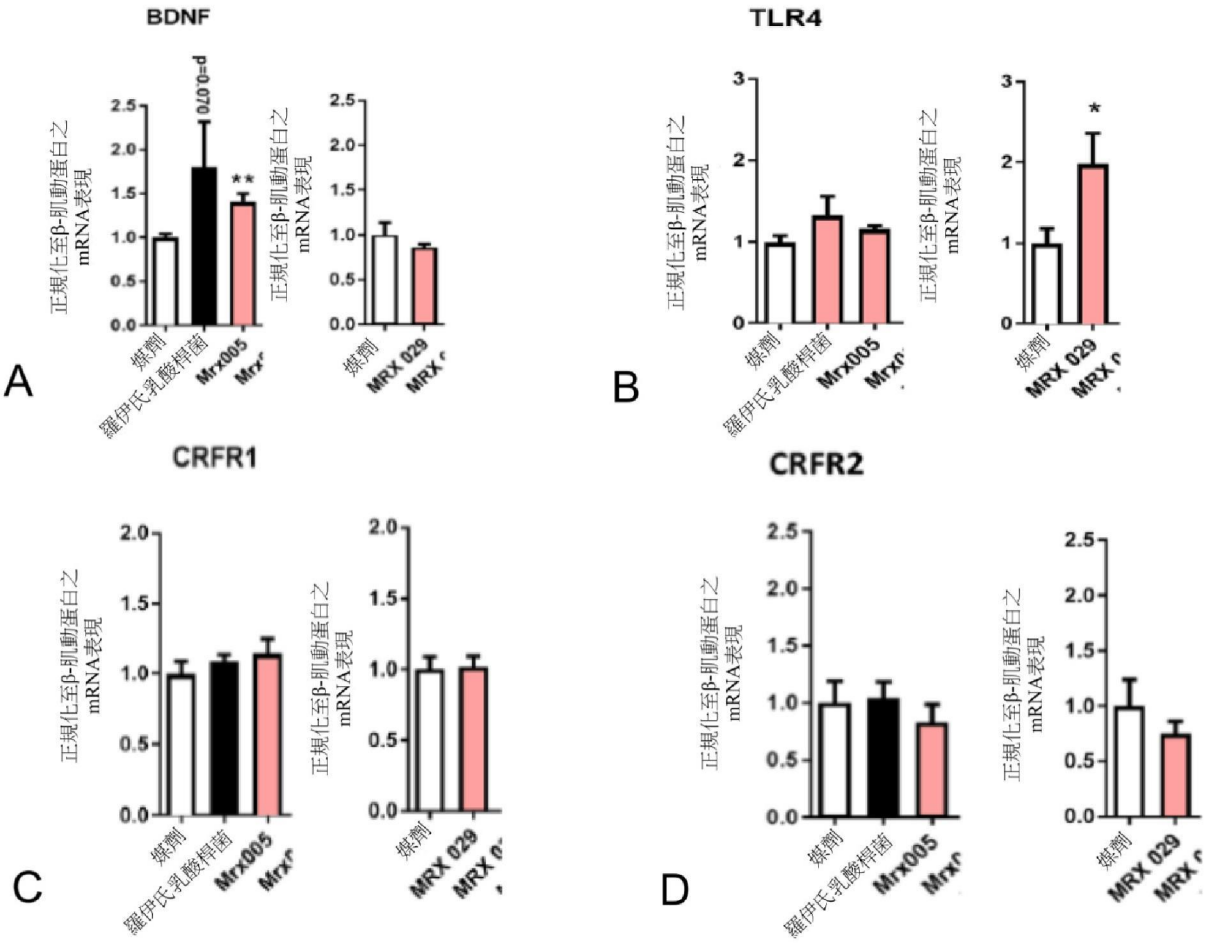
【圖 29】


A
GABA A2
GABA A2
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
B
GABABR1
GABABR1
C
DRD1
DRD1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

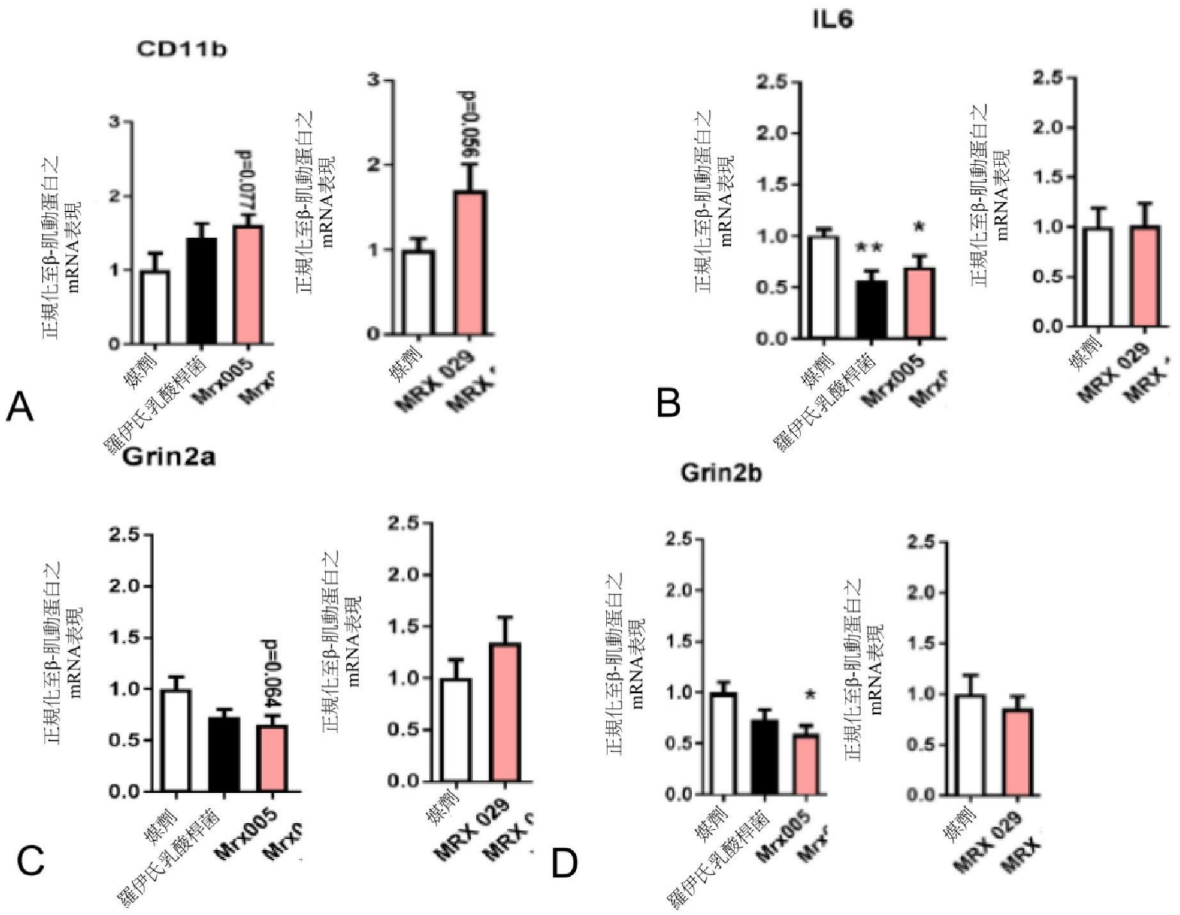
【圖 30】


A
催產素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
B
升壓素受體1b
3
2
1
0
C
糖皮質素受體
2.5
D
礦皮質素受體
***

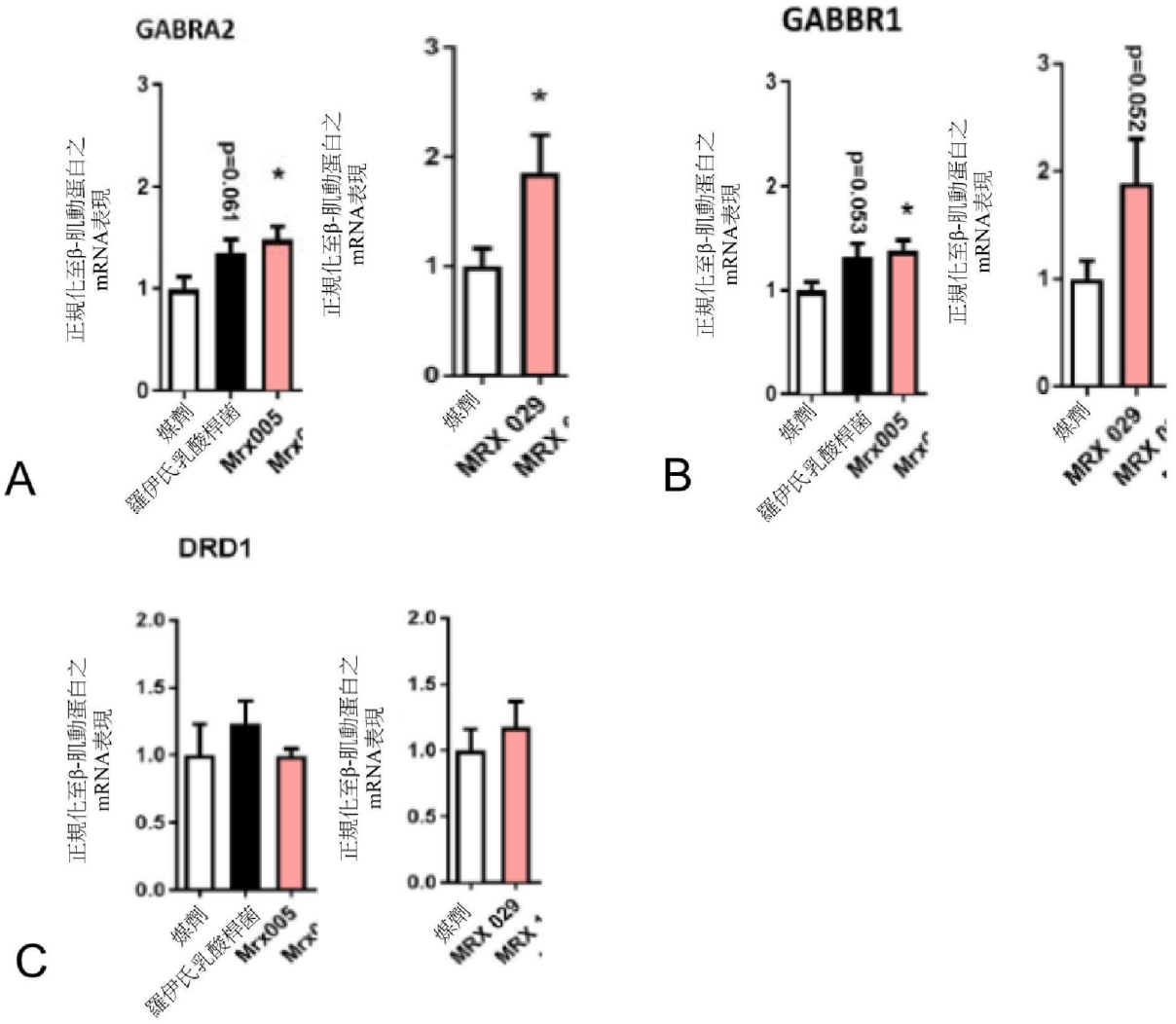
【圖 31】


BDNF
TLR4
CRFR1
CRFR2
A
B
C
D
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
p=0.070
**
*
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029

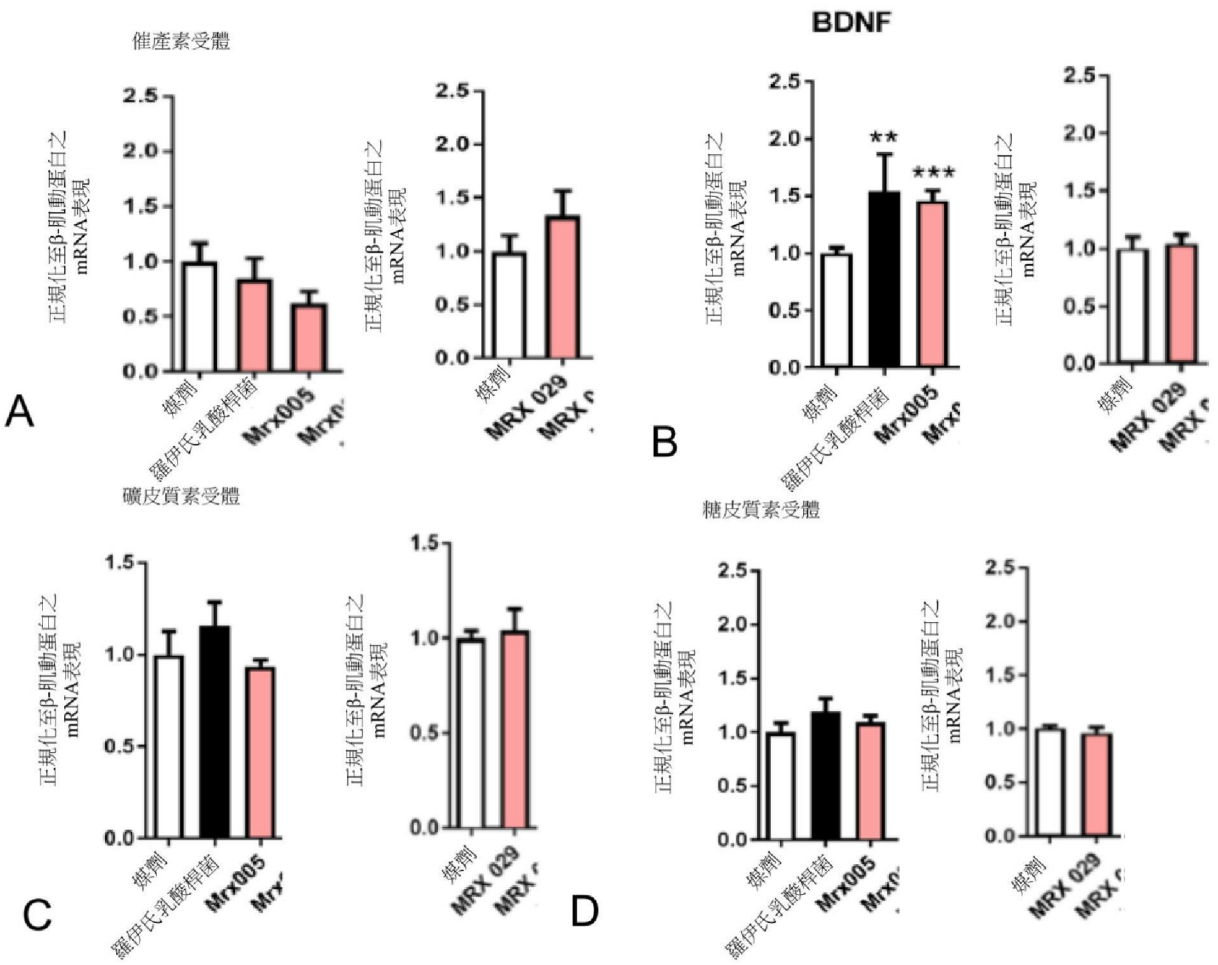
【圖 32】


CD11b
IL6
Grin2a
Grin2b
A
B
C
D
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
p=0.077
p=0.066
p=0.064
**
*
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029

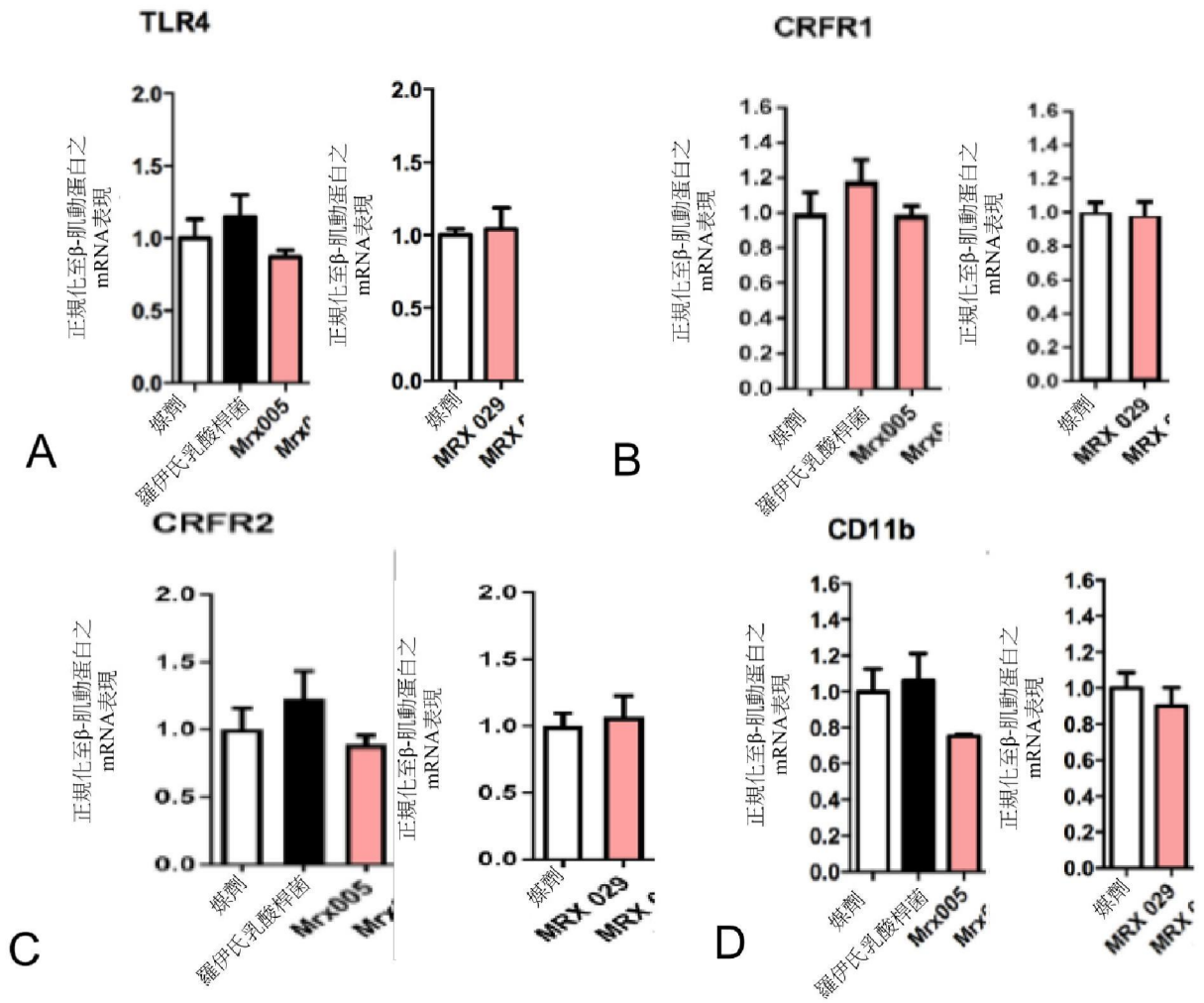
【圖 33】


GABRA2
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
p=0.061
*
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
GABBR1
p=0.053
p=0.052
B
DRD1
C

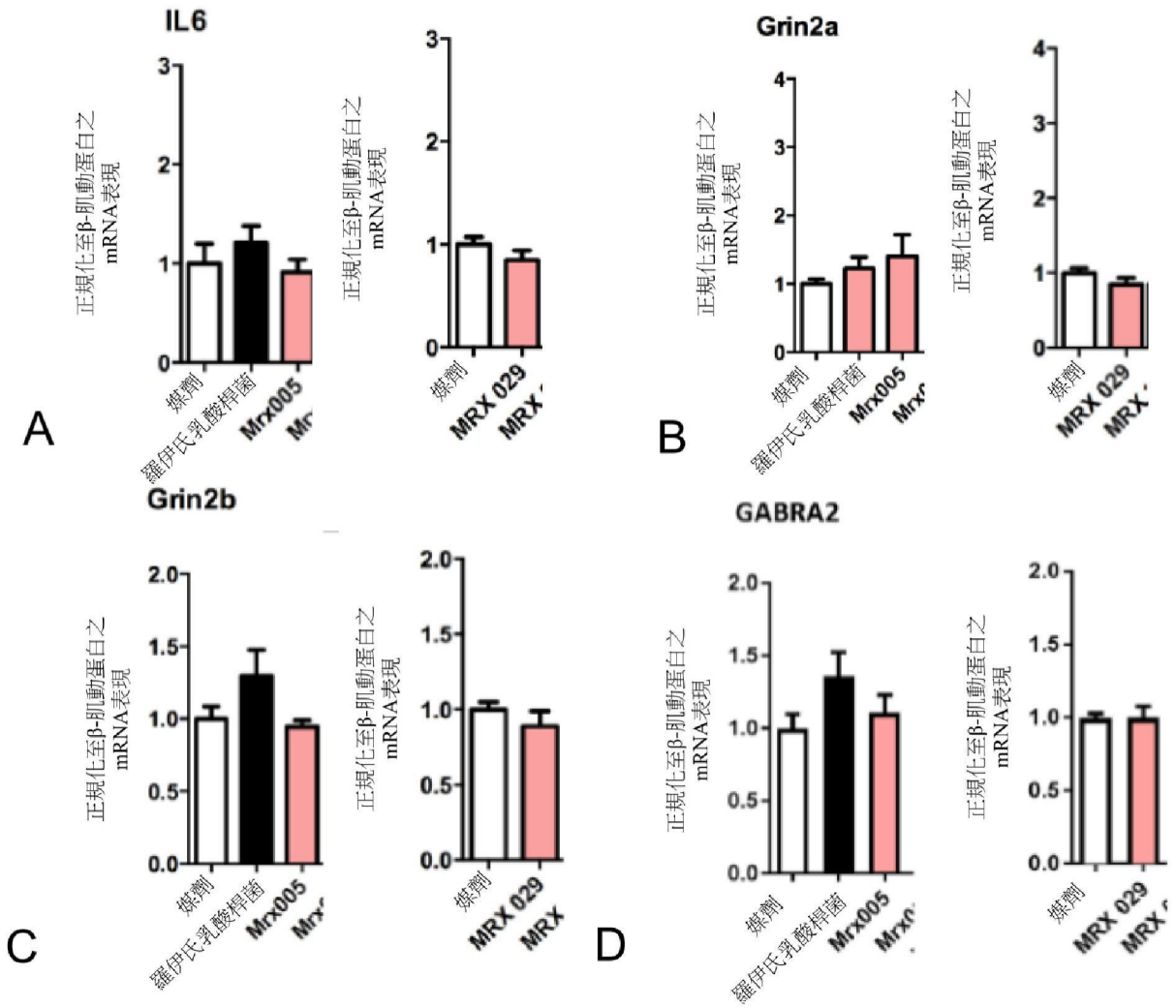
【圖 34】


BDNF
催產素受體
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
B
**
***
礦皮質素受體
糖皮質素受體
C
D

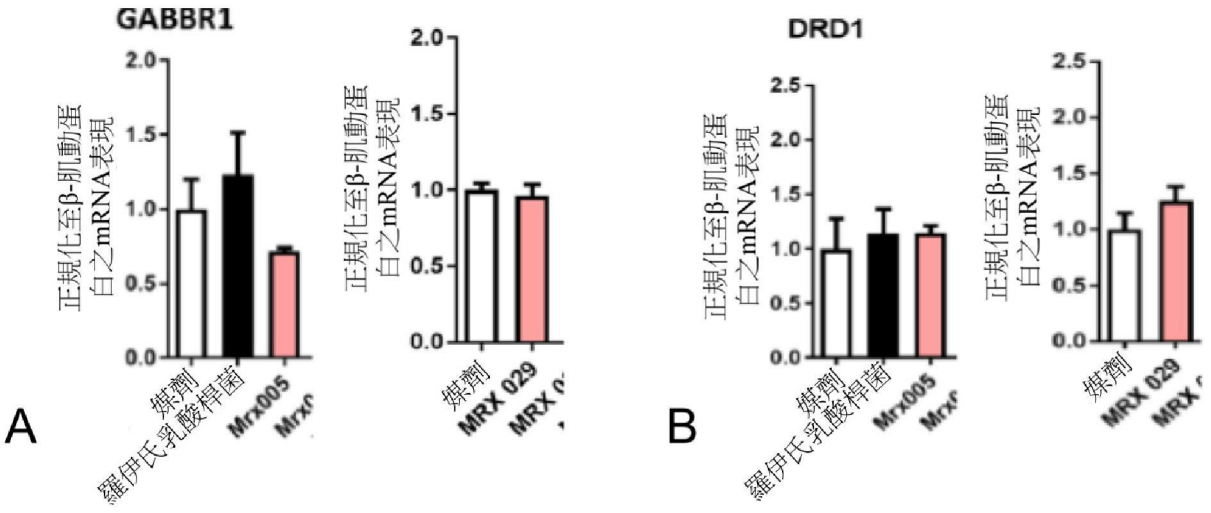
【圖 35】


TLR4
CRFR1
CRFR2
CD11b
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
B
C
D

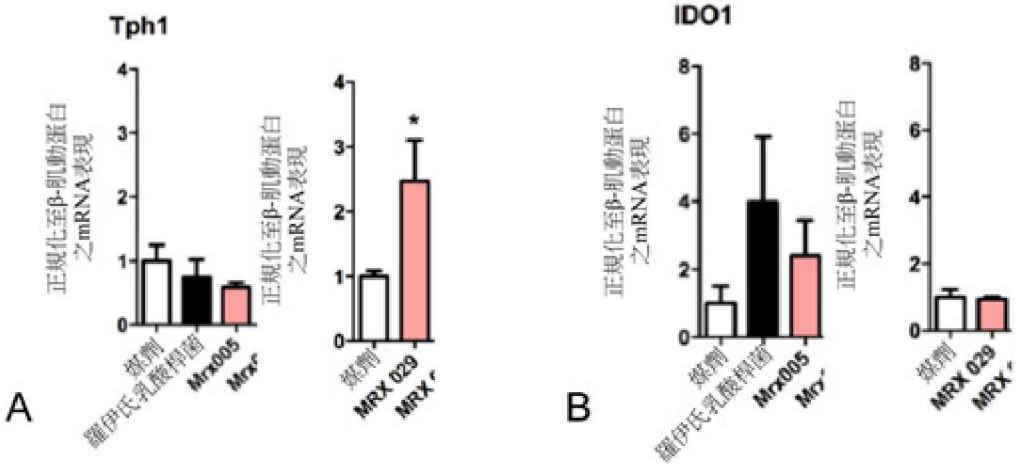
【圖 36】


IL6
Grin2a
Grin2b
GABRA2
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
B
C
D

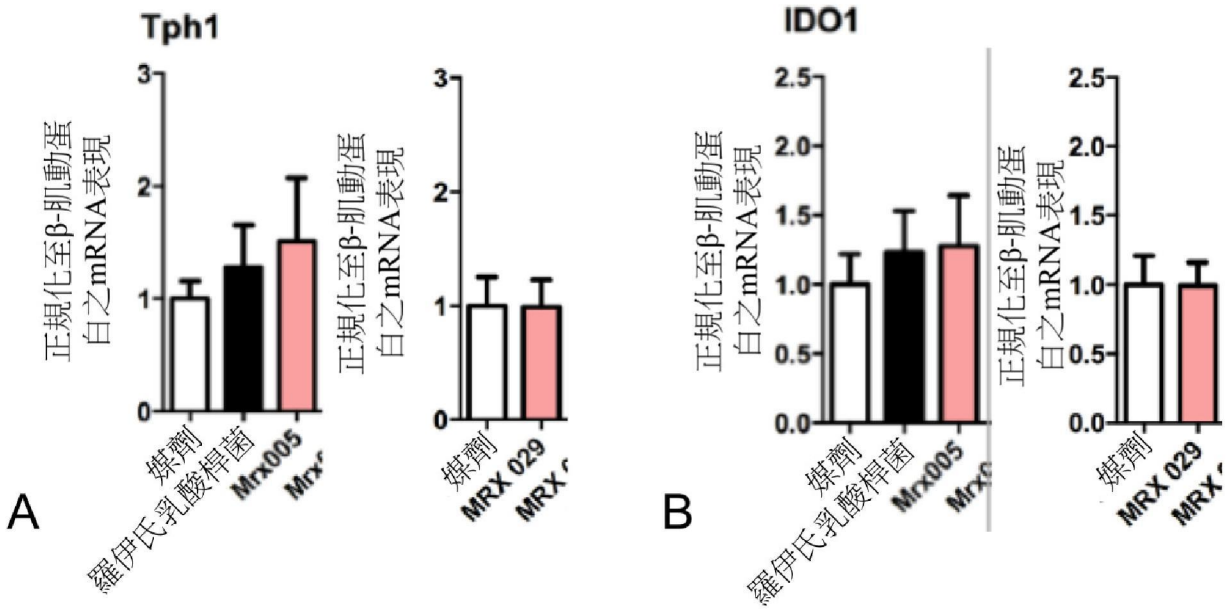
【圖 37】


GABBR1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
A
媒劑
MRX 029
DRD1
2.5
B

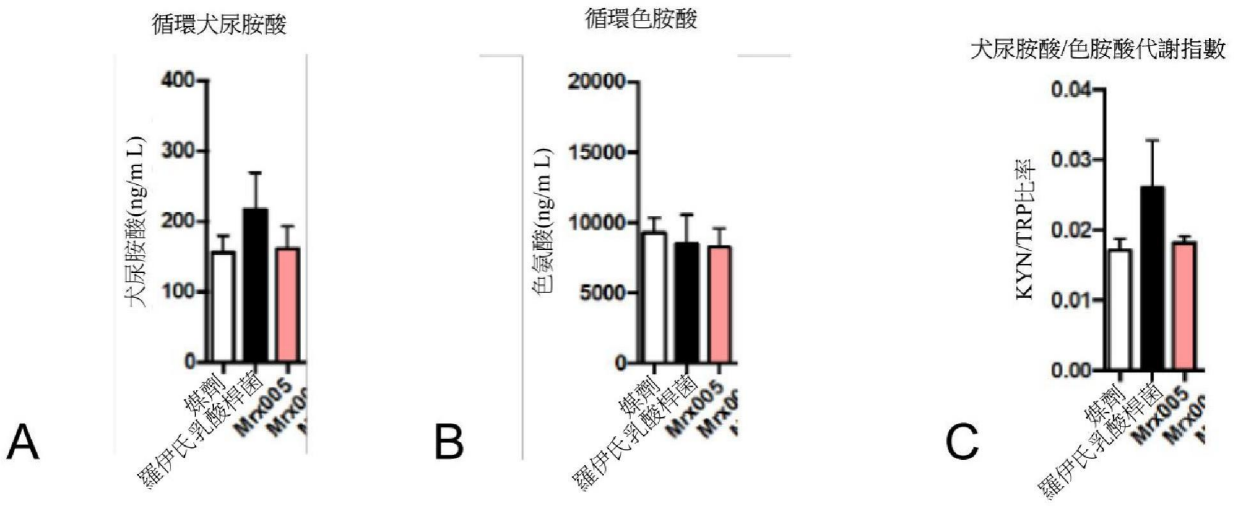
【圖 38】


Tph1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
4
3
2
1
0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
A
MRX 029
*
IDO1
8
6
B

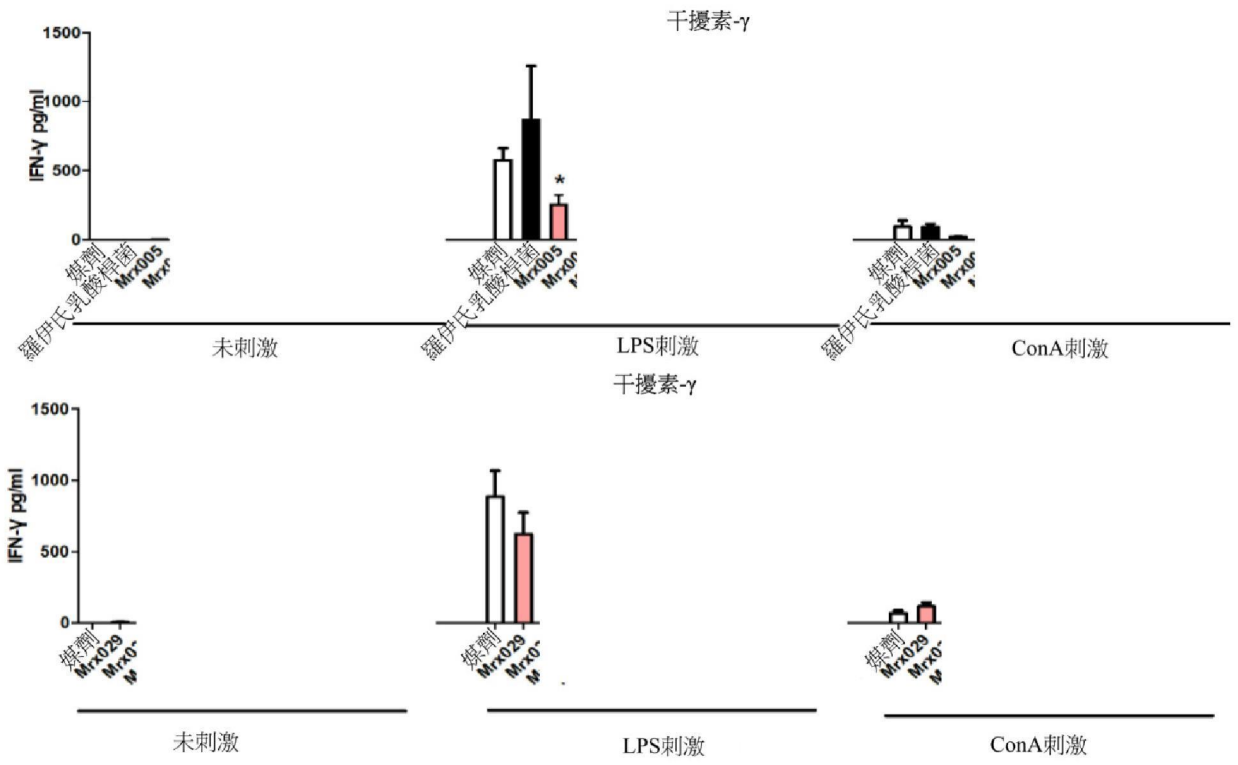
【圖 39】


Tph1
正規化至β-肌動蛋白之mRNA表現
3
2
1
0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
MRX 029
A
IDO1
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
B

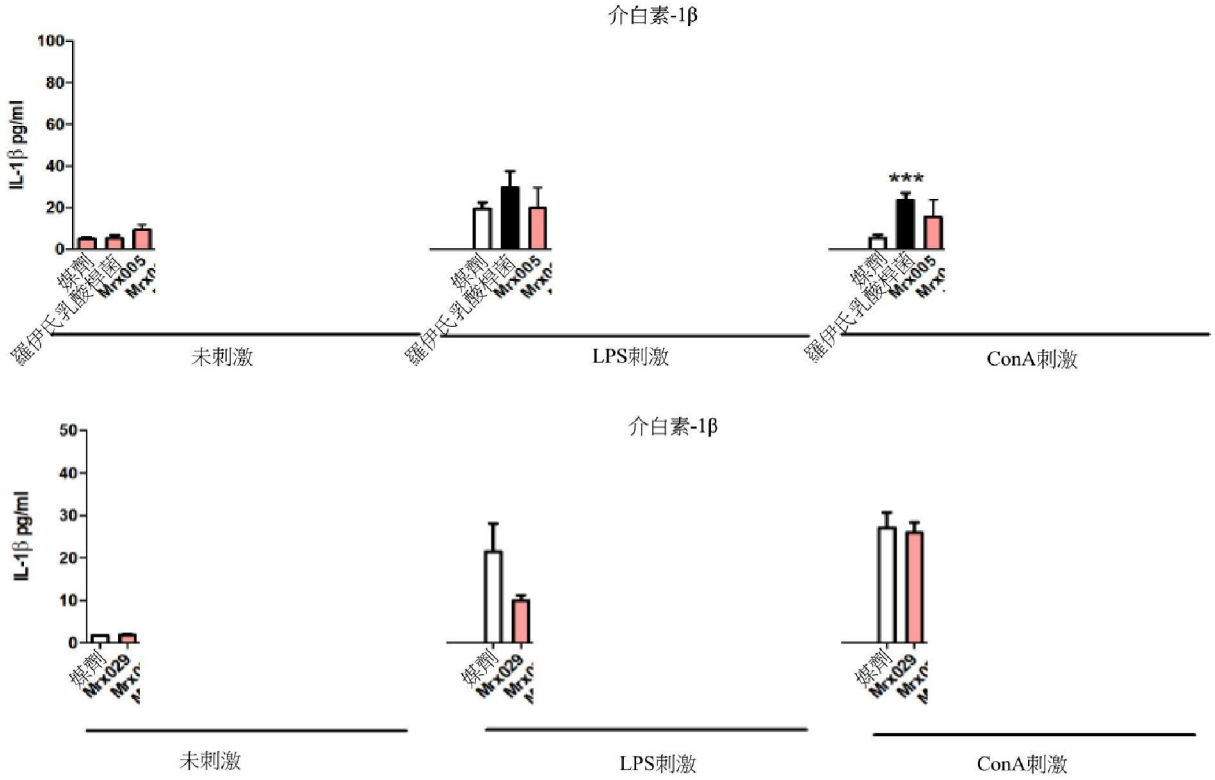
【圖 40】


循環犬尿胺酸
犬尿胺酸(ng/m L)
400
300
200
100
0
A
循環色胺酸
色氨酸(ng/m L)
20000
15000
10000
5000
0
B
犬尿胺酸/色胺酸代謝指數
KYN/TRP比率
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
C
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005

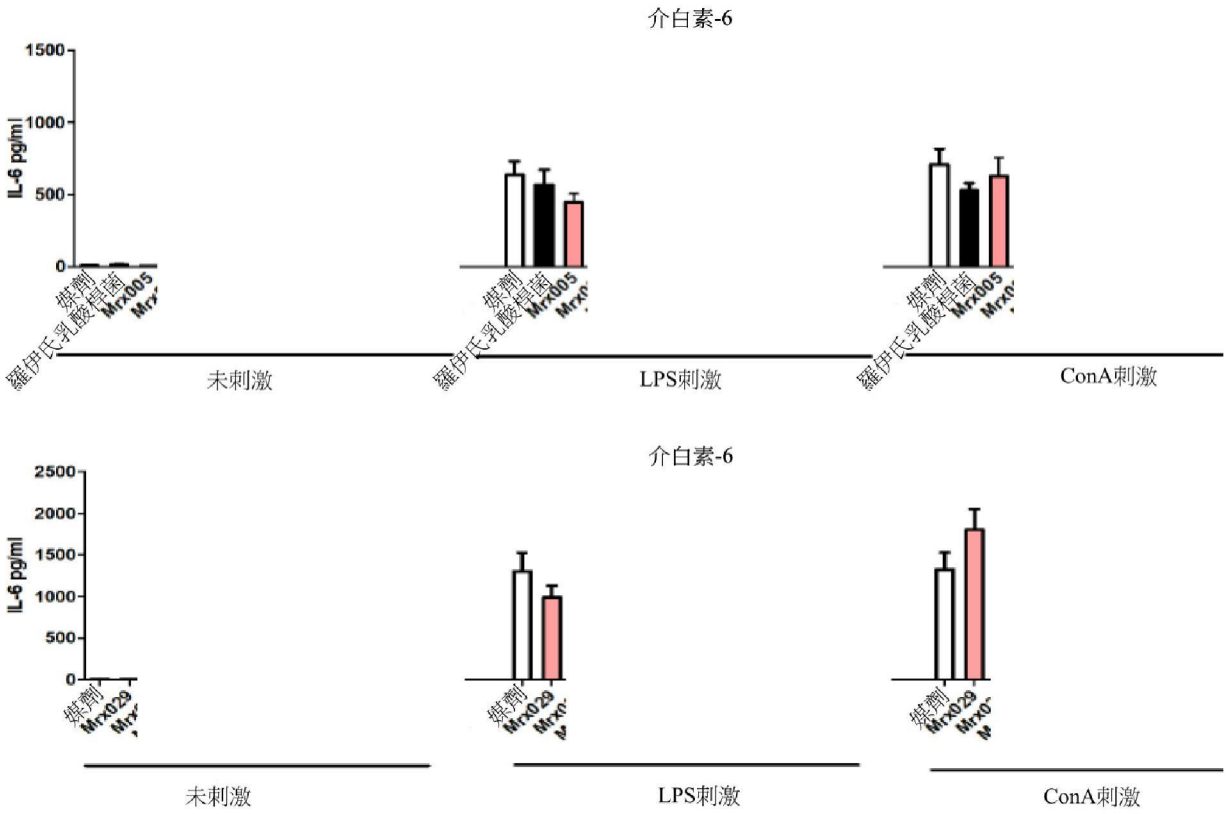
【圖 41】


干擾素-γ
IFN-γ pg/ml
1500
1000
500
0
煙劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
未刺激
LPS刺激
ConA刺激
干擾素-γ
IFN-γ pg/ml
1500
1000
500
0
煙劑
Mrx029
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

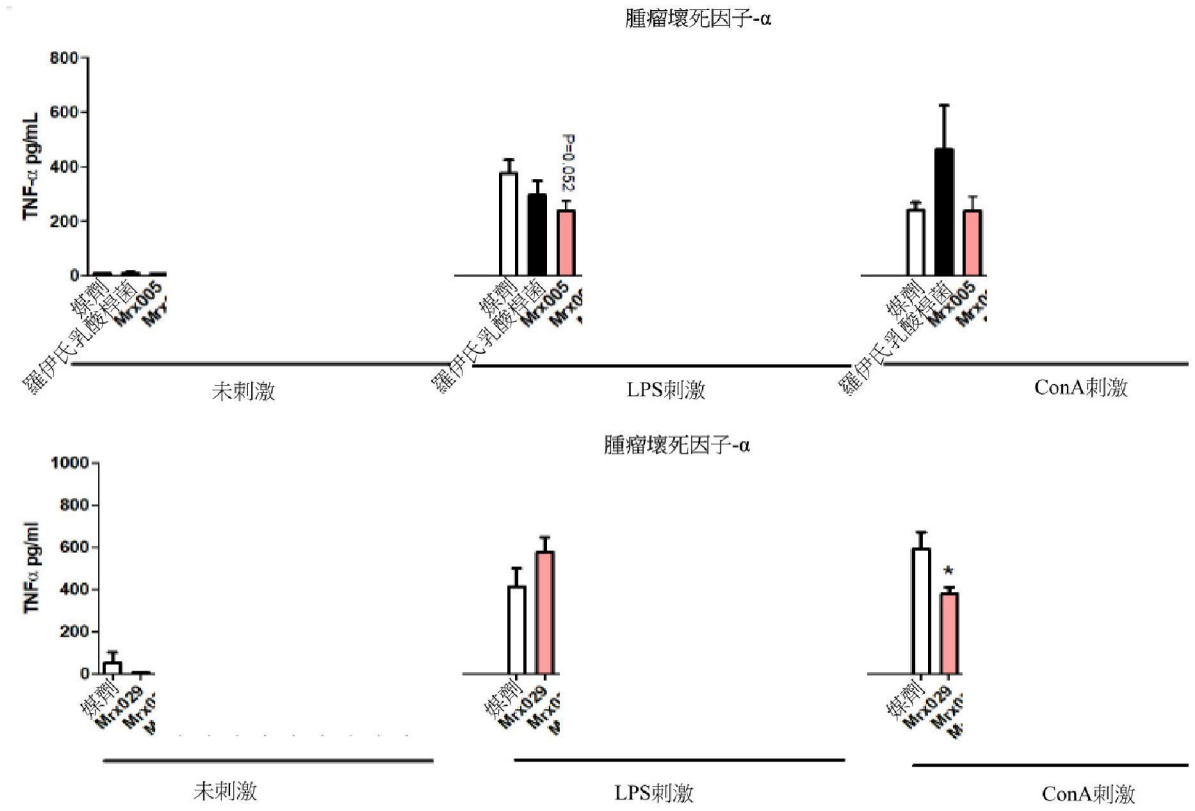
【圖 42】


介白素-1β
IL-1β pg/ml
100
80
60
40
20
0
***
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
未刺激
LPS刺激
ConA刺激
介白素-1β
IL-1β pg/ml
50
40
30
20
10
0
媒劑
Mrx029
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

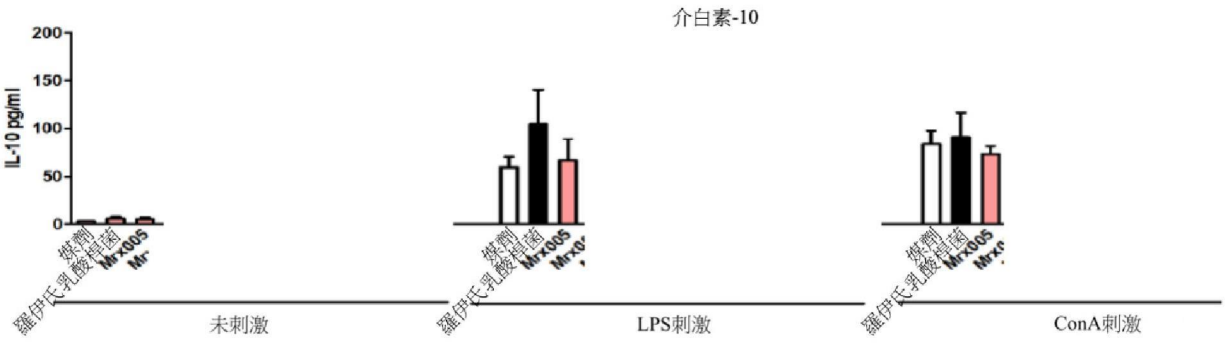
【圖 43】


介白素-6
IL-6 pg/ml
1500
1000
500
0
羅伊氏乳酸桿菌
未刺激
LPS刺激
ConA刺激
介白素-6
IL-6 pg/ml
2500
2000
1500
1000
500
0
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

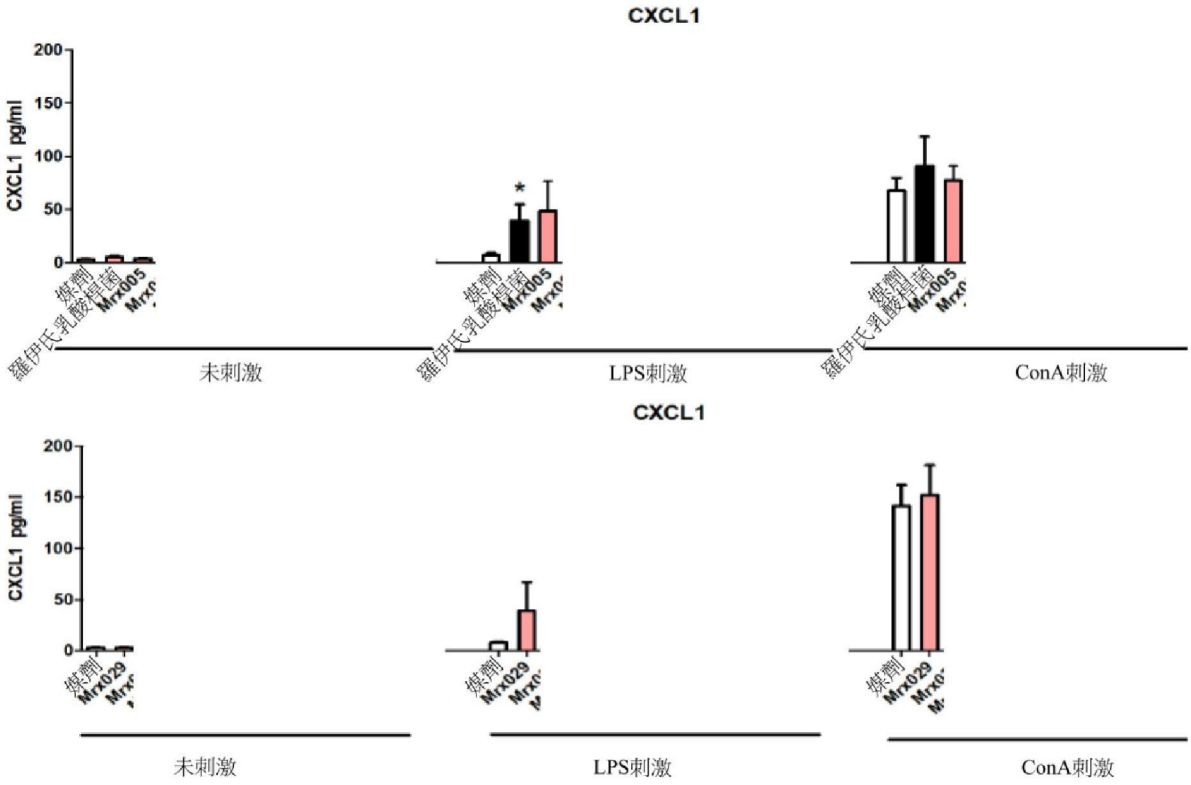
【圖 44】


腫瘤壞死因子-α
TNF-α pg/mL
800
600
400
200
0
P=0.052
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
未刺激
LPS刺激
ConA刺激
腫瘤壞死因子-α
TNFα pg/ml
1000
800
600
400
200
0
*
媒劑
Mrx029
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

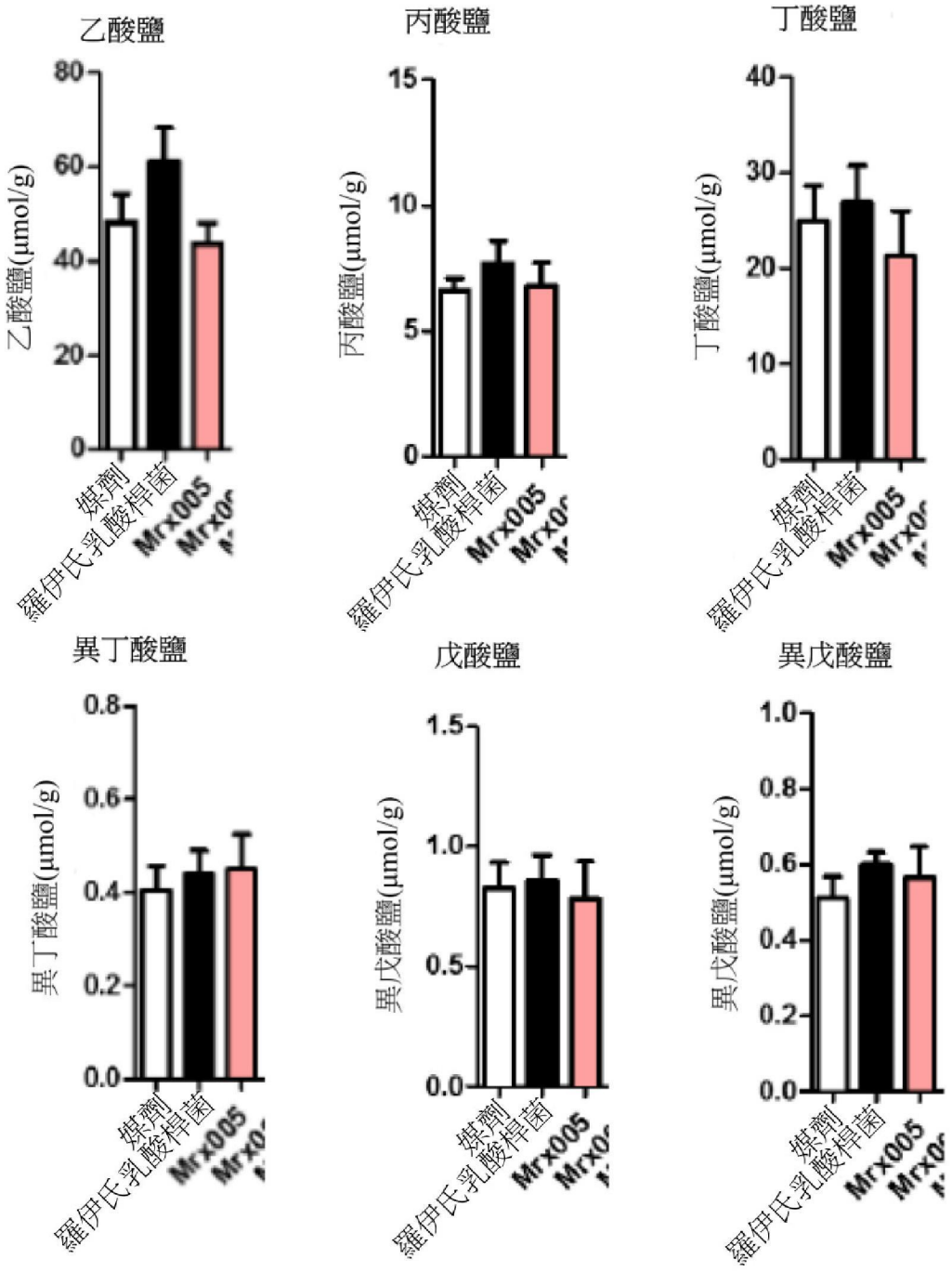
【圖 45】


介白素-10
IL-10 pg/ml
200
150
100
50
0
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

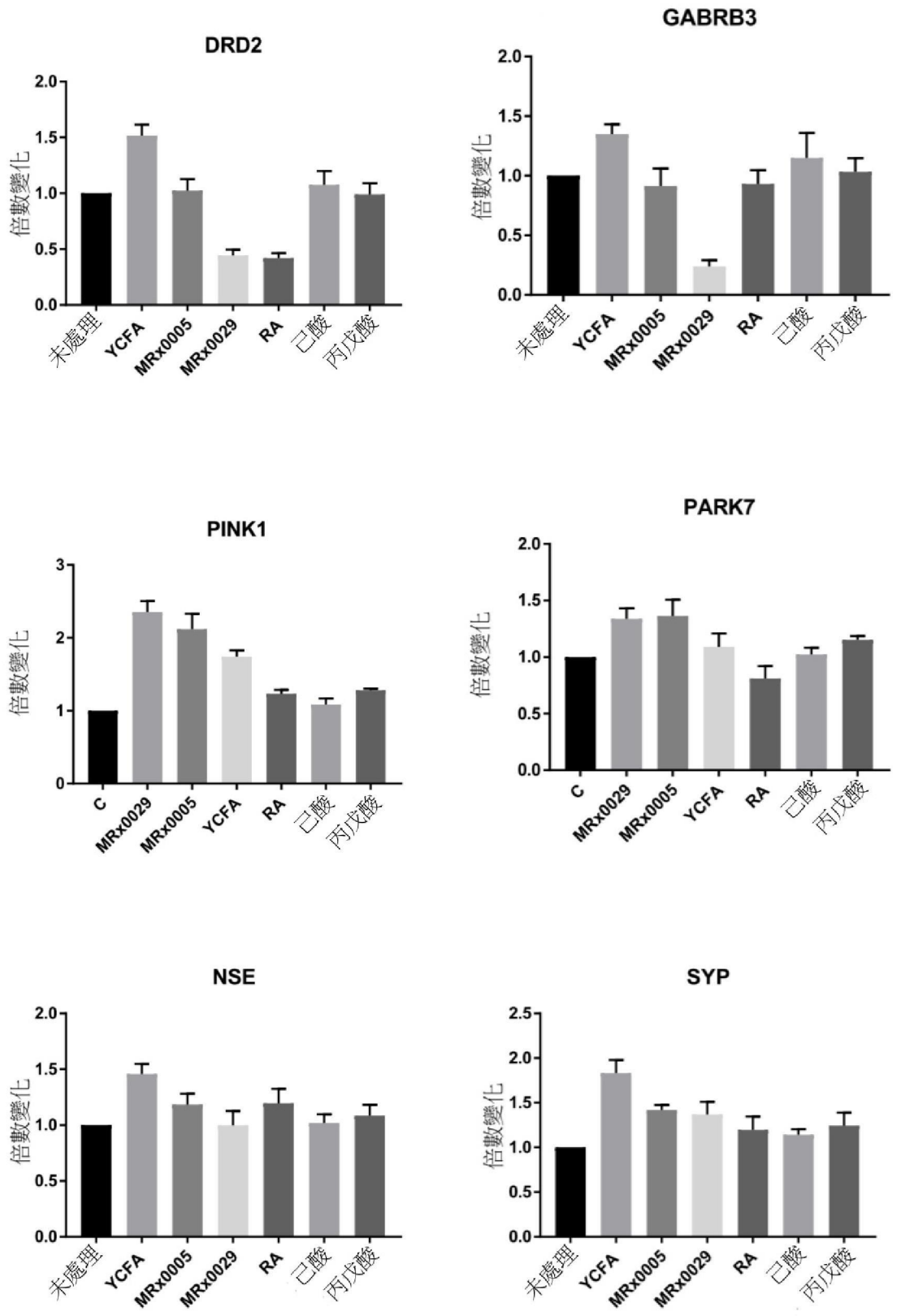
【圖 46】


CXCL1
CXCL1 pg/ml
200
150
100
50
0
*
未刺激
LPS刺激
ConA刺激
CXCL1
CXCL1 pg/ml
200
150
100
50
0
未刺激
LPS刺激
ConA刺激

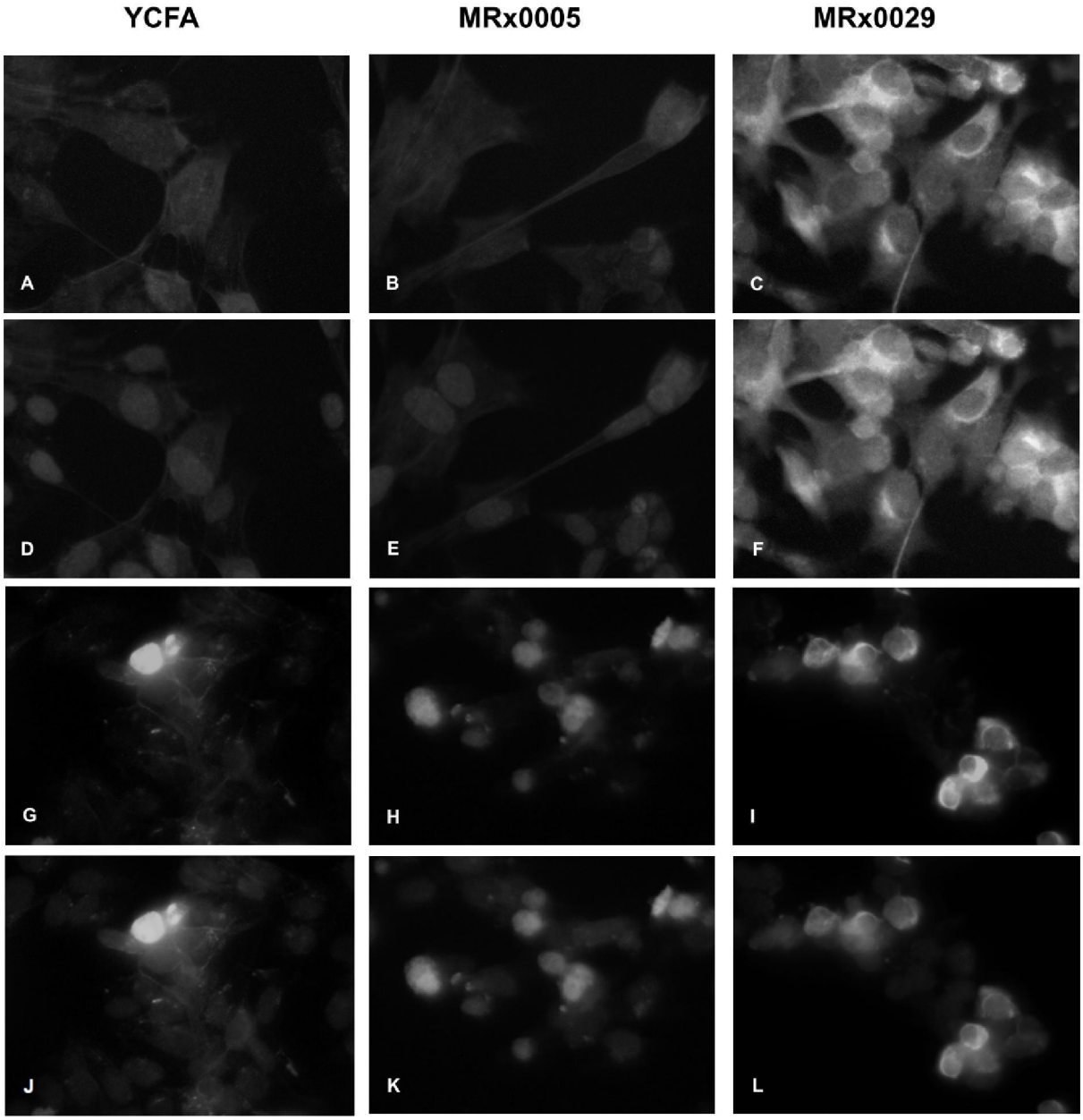
【圖 47】


乙酸鹽
乙酸鹽(μmol/g)
80
60
40
20
0
丙酸鹽
丙酸鹽(μmol/g)
15
10
5
0
丁酸鹽
丁酸鹽(μmol/g)
40
30
20
10
0
異丁酸鹽
異丁酸鹽(μmol/g)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
戊酸鹽
異戊酸鹽(μmol/g)
1.5
1.0
0.5
0.0
異戊酸鹽
異戊酸鹽(μmol/g)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
媒劑
羅伊氏乳酸桿菌
Mrx005

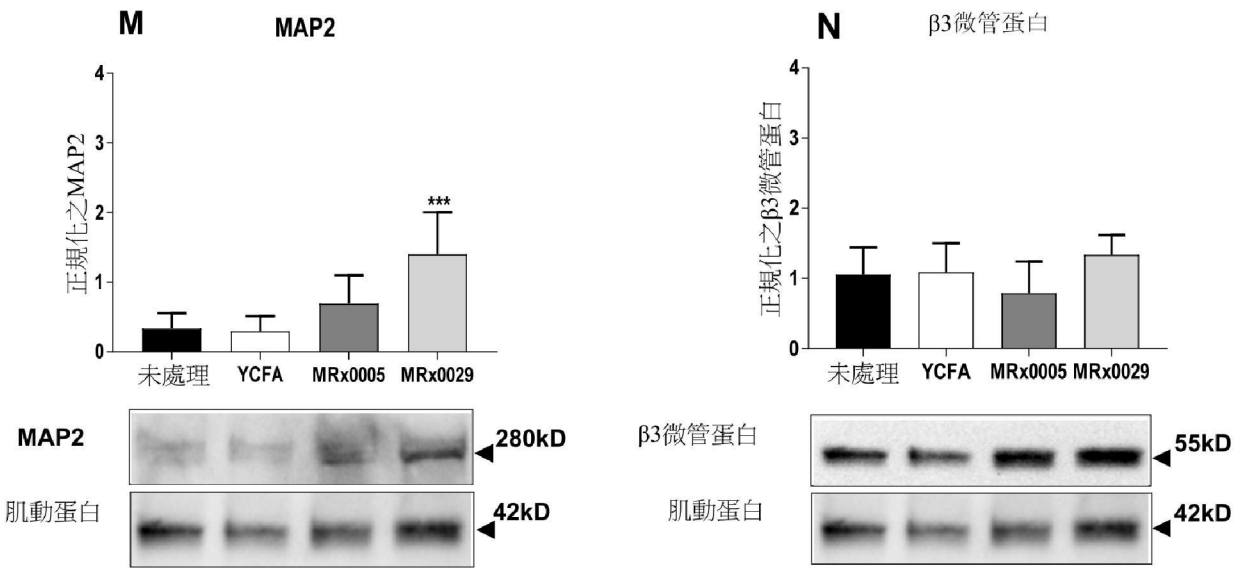
【圖 48】


DRD2
GABRB3
PINK1
PARK7
NSE
SYP
倍數變化
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
RA
己酸
丙戊酸
C

【圖 49】



【圖 50】


M
MAP2
正規化之MAP2
4
3
2
1
0
***
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
MAP2
280kD
肌動蛋白
42kD
N
β3微管蛋白
正規化之β3微管蛋白
4
3
2
1
0
未處理
YCFA
MRx0005
MRx0029
β3微管蛋白
55kD
肌動蛋白
42kD

【圖 50(續)】