

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038133**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.07.12

(21) Номер заявки
201992647

(22) Дата подачи заявки
2018.06.14

(51) Int. Cl. **A61K 35/74** (2015.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ШТАММЫ

(31) 1709465.7; 1709526.6; 1805990.7;
1805989.9; 1805991.5; 1806780.1;
1806779.3

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

(33) GB

(43) 2020.03.31

(86) PCT/EP2018/065809

(87) WO 2018/229189 2018.12.20

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
4Д ФАРМА РИСЕРЧ ЛИМИТЕД (GB)

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

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

(56) WO-A1-2016203220

YANG FANG ET AL.: "The clinical significance of the imbalance of Th17 and Treg cells and their related cytokines in peripheral blood of Parkinson's disease patients", INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE 2015, E-CENTURY PUBLISHING CORPORATION, US, vol. 9, no. 9, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 17946-17951, XP009507459, ISSN: 1940-5901 Retrieved from the Internet: URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/d9d5/cb54bbbadceb6d3f0f2e77b0290a0e0759d1.pdf> [retrieved on 2018-08-15] abstract discussion

WAISMAN ARI ET AL.: "The role of IL-17 in CNS diseases", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 129, no. 5, 26 February 2015 (2015-02-26), pages 625-637, XP035481826, ISSN: 0001-6322, DOI: 10.1007/S00401-015-1402-7 [retrieved on 2015-02-26] abstract IL-17 in ischemic brain injury

WO-A1-2017079450

WO-A1-2016203218

SATORU HASEGAWA ET AL.: "Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease", PLOS ONE, vol. 10, no. 11, 5 November 2015 (2015-11-05), page e0142164, XP055468390, DOI: 10.1371/journal.pone.0142164 the whole document

SAKAMOTO M.: "Reclassification of Bacteroides distasonis, Bacteroides goldsteinii and Bacteroides merdae as Parabacteroides distasonis gen. nov., comb. nov., Parabacteroides goldsteinii comb. nov. and Parabacteroides merdae comb. nov.", INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 56, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1599-1605, XP055312207, GB, ISSN: 1466-5026, DOI: 10.1099/ijs.0.64192-0 the whole document

(57) В изобретении предложены композиции, содержащие бактериальные штаммы, для лечения и предупреждения нейродегенеративного заболевания.

B1

038133

038133 B1

Область техники

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

Уровень техники

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

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

Учитывая потенциальный положительный эффект, который определенные бактериальные штаммы могут оказывать на кишечник животного, различные штаммы были предложены для применения в лечении различных заболеваний (см., например, [10-13]). Кроме того, определенные штаммы, в том числе главным образом штаммы *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, были предложены для применения в лечении различных воспалительных и аутоиммунных заболеваний, которые непосредственно не связаны с кишечником (см. [14] и [15] в целях ознакомления). В то же время, связь между различными заболеваниями и различными бактериальными штаммами, а также точные эффекты определенных бактериальных штаммов на кишечник и на системном уровне и на любые определенные типы заболеваний недостаточно охарактеризованы, особенно в случае нейродегенеративных нарушений.

В последнее время отмечался повышенный интерес в данной области техники касательно изменений в микробиоме кишечника, которые могут играть патофизиологическую роль в заболеваниях головного мозга человека [16]. Результаты доклинических и клинических исследований в значительной степени предполагают наличие связи между развитием головного мозга и микробиотой [17]. Все большее число фактов из доклинической литературы продемонстрировали двунаправленную передачу сигналов между головным мозгом и микробиомом, включающую нейрокринные и эндокринные сигнальные системы. Действительно повышенные уровни видов *Clostridium* в микробиоме были связаны с нарушениями головного мозга [18], а нарушение баланса типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* также наблюдалось при нарушениях развития головного мозга [19]. Предположения касательно того, что измененные уровни комменсалов кишечника, в том числе таковых родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* и *Ruminococcus* и семейства *Alcaligenaceae* играют роль в иммуноопосредованных нарушениях центральной нервной системы (ЦНС), оценивали в исследованиях, предполагающих отсутствие изменения в микробиоте у пациентов и здоровых субъектов [10]. *Parabacteroides distasonis* была предложена для лечения ряда нарушений, в том числе астмы, ревматоидного артрита и рассеянного склероза [20].

Аналогично астме и ревматоидному артриту, рассеянный склероз опосредован главным образом иммунной системой. Иммунная система атакует миелиновые аксоны в центральной нервной системе, разрушая образуемые миелином бляшки или повреждения. Демиелинизация происходит, в частности, в зрительных нервах, расположенных под мягкой оболочкой мозга, стволом головного мозга, мозжечком и юкстакортикальными и перивентрикулярными участками белого вещества.

В связи с этим рассеянный склероз имеет другой патогенез по сравнению с другими нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или деменция. Например, рассеянный склероз обычно диагностируется у пациентов в возрасте от 20 до 30 лет, в то время как многие другие нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и деменция, диагностируются главным образом у пациентов в возрасте старше 65 лет.

Болезнь Паркинсона, аналогично многим нейродегенеративным заболеваниям, опосредована главным образом накоплением неправильно свернутого белка. Болезнь Паркинсона представляет собой синуклеинопатологию, которая включает в себя накопление α -синуклеина, который агрегирует в виде не-

растворимых фибрил в тельцах Леви в цитоплазме тела нейрона. Накопление α -синуклеина является токсическим и приводит к нарушению функций митохондрий, лизосом и эндоплазматической сети, а также приводит к нарушению транспорта микротрубочек.

Нестероидные противовоспалительные препараты (NSAID), такие как ибупрофен, были исследованы в отношении их эффективности при лечении ряда неврологических заболеваний, однако клиническое влияние NSAID на нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, остается неясным. Несмотря на то, что некоторые исследования показали, что хроническое применение NSAID оказывает защитный эффект в отношении болезни Паркинсона, другие исследования не смогли подтвердить наличие значительной связи. Недавний мета-анализ показал, что применение неаспириновых NSAID, в частности ибупрофена, приводит к снижению риска PD на 15%, в то время как применение аспирина не показало какого-либо эффекта [21].

В настоящее время практический эффект связи между микробиомом и заболеваниями головного мозга человека является слабо охарактеризованным. Соответственно более прямые аналитические исследования требуются для идентификации терапевтического влияния изменения микробиомы на нейродегенеративные нарушения.

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

Краткое описание сущности изобретения

Авторы данного изобретения разработали новые виды терапии для лечения и предупреждения нейродегенеративных нарушений. Авторы данного изобретения обнаружили, что бактериальные штаммы из рода *Parabacteroides* могут быть эффективными для лечения нейродегенеративных заболеваний. Как описано в примерах, введение композиций, содержащих *Parabacteroides distasonis*, может приводить к защите от активных форм кислорода, тем самым выступая в качестве нейропротектора. Авторы данного изобретения также обнаружили, что лечение *Parabacteroides distasonis* может приводить к снижению активации провоспалительных молекул, таких как NF κ B и IL-6, с помощью LPS и мутантного α -синуклеина A53T. Авторы данного изобретения обнаружили, что лечение *Parabacteroides distasonis* может приводить к снижению активности деацетилирования гистонов и перекисного окисления липидов *in vitro*, которые могут способствовать снижению клеточной смерти и апоптоза. Авторы данного изобретения также обнаружили, что *Parabacteroides distasonis* может продуцировать индол, который может ослаблять воспаление и окислительный стресс. Кроме того, авторы данного изобретения продемонстрировали, что лечение *Parabacteroides distasonis* может приводить к повышению уровней кинуренина.

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

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм рода *Pambacteroides*, для применения в лечении или предупреждении болезни Паркинсона, такой как болезнь Паркинсона в результате действия факторов окружающей среды, семейная болезнь Паркинсона или болезнь Паркинсона, ассоциированная с общим воспалительным статусом. Авторы данного изобретения обнаружили, что лечение штаммами *Parabacteroides* может приводить к активации провоспалительных молекул, таких как NF κ B и IL-6, с помощью LPS и мутантного α -синуклеина A53T в моделях *in vitro* болезни Паркинсона в результате действия факторов окружающей среды и семейной болезни Паркинсона. В предпочтительных вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая бактериальный штамм вида *Parabacteroides distasonis*, для

применения в лечении болезни Паркинсона. Композиции, в которых используется *Parabacteroides distasonis*, могут быть особенно эффективными для лечения болезни Паркинсона.

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

В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения бактериальный штамм в композиции представляет собой *Parabacteroides distasonis*. Также могут быть использованы близкородственные штаммы, которые имеют последовательность 16S рРНК, которая по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% идентична последовательности 16S рРНК бактериального штамма *Parabacteroides distasonis*. Предпочтительно бактериальный штамм имеет последовательность 16S рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8 или 9. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 9. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16S рРНК, представленную SEQ ID NO: 9.

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

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

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

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

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

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

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

Краткое описание графических материалов

- Фиг. 1 - жизнеспособность клеток нейробластомы,
- фиг. 2А - снижение секреции IL-6,
- фиг. 2В - снижение секреции IL-8,
- фиг. 3 - ингибирование секреции IL-6 и IL-8 α -синуклеином,
- фиг. 4 - ингибирование индуцированной α -синуклеином активации промотора NF κ B,
- фиг. 5 - ингибирование индуцированной LPS активации промотора NF κ B,
- фиг. 6 - изменение антиоксидантной способности,
- фиг. 7 - изменение суммарной антиоксидантной способности (окисление липидов),
- фиг. 8 - изменение активности деацетилазы гистонов (HDAC),
- фиг. 9 - уровень продуцирования индола,
- фиг. 10 - уровень продуцирования кинуренина,
- фиг. 11 - нейропротекция - жизнеспособность клеток. На фиг. 11 продемонстрированы те же самые данные, что и на фиг. 1,
- фиг. 12 - уровни продуцирования метаболитов - нейромедиаторы в головном мозге,
- фиг. 13 - уровни продуцирования метаболитов - органические кислоты в супернатанте,
- фиг. 14 - влияние на функцию кишечного барьера,
- фиг. 15 - уровень продуцирования BDNF,
- фиг. 16 - изменение уровней ROS в (А) клетках U373, (В) клетках SH-SY5Y,
- фиг. 17 - продуцирование нейромедиаторов в головном мозге,
- фиг. 18 - изменения в экспрессии рецепторов в гиппокампе А) рецептора окситоцина, В) рецептора вазопрессина, С) глюкокортикоидного рецептора и D) минералокортикоидного рецептора,

фиг. 19 - изменения экспрессии в гиппокампе А) кортикотропин-рилизинг гормона (CRH), В) экспрессии BDNF и С) TLR4,

фиг. 20 - А) изменения экспрессии рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1) и В) экспрессии рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2) в гиппокампе,

фиг. 21 - изменения экспрессии в гиппокампе А) фактора некроза опухоли, В) интерлейкина 1b и С) IL-6,

фиг. 22 - А) изменения экспрессии в гиппокампе интегрин α M (CD11b) и В) изменения экспрессии в гиппокампе серотонинового рецептора 1A (рецептор 5-HT1A),

фиг. 23 - А) изменения экспрессии субъединицы 2A глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA в гиппокампе (Grin2A) и В) экспрессии субъединицы 2B глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B) в гиппокампе,

фиг. 24 - изменения экспрессии в гиппокампе А) А-рецептора 2 γ -аминомасляной кислоты (GABA A2), В) В-рецептора 1 γ -аминомасляной кислоты (GABABR1) и С) дофамина рецептора 1 (DRD1),

фиг. 25 - изменения в экспрессии рецепторов в миндалинах А) рецептора окситоцина, В) рецептора вазопрессина, С) глюкокортикоидного рецептора и D) минералокортикоидного рецептора,

фиг. 26 - изменения в экспрессии в миндалинах А) нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), В) Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4), С) рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1) и D) рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2),

фиг. 27 - изменения экспрессии в миндалинах А) интегрин α M (CD11b), В) интерлейкина 6 (IL-6), С) субъединицы 2A глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2A) и D) субъединицы 2B глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B),

фиг. 28 - изменения экспрессии в миндалинах А) субъединицы α 2 рецептора ГАМК-А (GABRA2), В) субъединицы рецептора 1 типа В ГАМК-А (GABBR1) и С) дофамина рецептора 1 (DRD1),

фиг. 29 - изменения экспрессии в префронтальной коре А) рецептора окситоцина, В) нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), С) минералокортикоидного рецептора и D) глюкокортикоидного рецептора,

фиг. 30 - изменения экспрессии в префронтальной коре А) Toll-подобного рецептора 4 (TLR-4), В) рецептора 1 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR1), С) рецептора 2 кортикотропин-рилизинг гормона (CRFR2) интегрин α M (CD11b),

фиг. 31 - изменения экспрессии в префронтальной коре А) интерлейкина 6 (IL-6), В) субъединицы 2A глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2A), С) субъединицы 2B глутаматного ионотропного рецептора типа NMDA (Grin2B) и D) субъединицы α 2 рецептора ГАМК-А (GABRA2),

фиг. 32 - изменения экспрессии в префронтальной коре А) субъединицы рецептора 1 типа В ГАМК-А (GABBR1) и В) дофамина рецептора 1 (DRD1),

фиг. 33 - изменения экспрессии в толстой кишке А) триптофангидролазы 1 (Tph1) и В) индоламин-2,3-диоксигеназы-1 (IDO1),

фиг. 34 - изменения экспрессии в подвздошной кишке А) триптофангидролазы 1 (Tph1) и В) индоламин-2,3-диоксигеназы-1 (IDO1),

фиг. 35 - изменения уровней циркулирующих метаболитов триптофана А) кинуренина, В) триптофана и С) показателя метаболизма кинуренин/триптофан,

фиг. 36 - влияние на продуцирование интерферона γ из спленоцитов мышей, получающих в пищу MRx0005 и MRx0029,

фиг. 37 - влияние на продуцирование интерлейкина 1 β из спленоцитов,

фиг. 38 - влияние на продуцирование интерлейкина 6 из спленоцитов,

фиг. 39 - влияние на продуцирование фактора некроза опухоли из спленоцитов,

фиг. 40 - влияние на продуцирование интерлейкина 10 из спленоцитов,

фиг. 41 - влияние на продуцирование хемоаттрактанта CXCL1 из спленоцитов,

фиг. 42 - изменения уровней короткоцепочечных жирных кислот в слепой кишке,

фиг. 43 - индуцированные MRx0029 и MRx0005 изменения уровней экспрессии генов актина, виллина, окклюдина, TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE,

фиг. 44 - дифференцировка клеток SHSY5Y, индуцированная MRx0005 и MRx0029. (A-C) Иллюстративные изображения иммуномеченных фаллоидином и MAP2 клеток. (D-F) Изображения A-C при слиянии с изображениями с DAPI. (G-I) Иммуномеченные β 3 тубулином клетки. (J-L) Изображения при слиянии с изображениями с DAPI. Увеличение $\times 630$. (J-K) Вестерн-блоттинг эффектов обработки MRx0005 и MRx0029 на клетки SHSY5Y. Мембраны для вестерн-блоттинга зондировали антителами к MAP2 (M) и β 3 тубулину (N). Актин использовали в качестве контроля нагрузки. Нижние панели: иллюстративные блоты на основе одного из шести отдельных экспериментов; верхние панели: относительная денситометрическая интенсивность.

Подробное описание сущности изобретения

Бактериальные штаммы.

Композиции по данному изобретению содержат бактериальный штамм рода Parabacteroides. Ука-

занные примеры демонстрируют, что бактерии данного рода являются пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. Предпочтительные бактериальные штаммы представляют собой вид *Parabacteroides distasonis*.

Примеры видов *Parabacteroides* для применения в данном изобретении включают в себя *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* и *Parabacteroides johnsonii*. *Parabacteroides* напоминают *Bacteroides* и являются грамотрицательными, облигатно анаэробными, неспорообразующими, неподвижными и палочковидными, а также имеют размер 0,8-1,6×1,2-12 мкм. *Parabacteroides distasonis* представляет собой один из наиболее распространенных видов в кале человека. Типовой штамм *P. distasonis* представляет собой JCM 5825^T (=CCUG 4941^T=DSM 20701^T=ATCC 8503^T). Номера доступа в GenBank/EMBL/DDBJ последовательностей генов 16S рРНК штаммов *P. distasonis* JCM 5825^T, JCM 13400, JCM 13401, JCM 13402, JCM 13403 и JCM 13404, а также штаммов *P. merdae* JCM 9497^T и JCM 13405 представляют собой АВ238922-АВ238929 соответственно (раскрыты в данном документе в виде SEQ ID NO:1-8). Иллюстративные штаммы также описаны в [22].

Бактерию *Parabacteroides distasonis*, депонированную под номером доступа NCIMB 42382, исследовали в разделе примеры и также обозначили в данном документе как штамм 755 или MRx0005. Последовательность 16S рРНК штамма 755, который был исследован, предложена в SEQ ID NO: 9. Штамм 755 был депонирован с разрешения международного депозитария NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия) GT Biologies Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 12 марта 2015 г. в виде "*Parabacteroides* sp 755" и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42382. GT Biologies Ltd. впоследствии изменила свое название на 4D Pharma Research Limited.

В WO 2016/203220 описано введение штамма 755 мышам и показано, что он может влиять на течение заболевания за пределами кишечника (например, астму и артрит). Штамм 755 также влияет на течение заболевания за пределами кишечника при лечении нейродегенеративных нарушений, описанных в данном документе.

Геномная последовательность штамма 755 предложена в SEQ ID NO: 10. Указанную последовательность получали с помощью платформы PacBio RS II.

Бактериальные штаммы, близкородственные штамму, исследованному в примерах, также, как предполагается, будут эффективными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Parabacteroides distasonis*. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Предпочтительно идентичность последовательности определяют по отношению к SEQ ID NO: 9. Предпочтительно бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 9.

Бактериальные штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа 42382, также, как предполагается, будут эффективными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений. Биотип представляет собой близкородственный штамм, который имеет те же самые или очень похожие физиологические и биохимические характеристики.

Штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью секвенирования других нуклеотидных последовательностей бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382. Например, по сути весь геном может быть секвенирован, а биотиповой штамм для применения в данном изобретении может иметь по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичность последовательности в пределах по меньшей мере 80% своего всего генома (например, в пределах по меньшей мере 85, 90, 95 или 99% или в пределах своего всего генома). Другие подходящие последовательности для применения в идентификации биотиповых штаммов могут включать в себя *hsp60* или повторяющиеся последовательности, такие как BOX, ERIC, (GTG)₅ или REP или [23]. Биотиповые штаммы могут иметь последовательности по меньшей мере с 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентичностью последовательности с соответствующей последовательностью бактерии, депонированной под номером доступа 42382 в NCIMB.

В определенных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении имеет геном с идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10. В предпочтительных вариантах осуществления бактериальный штамм для применения по данному изобретению имеет геном по меньшей мере с 90% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичностью последовательности) по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении по меньшей мере 60% (например, по меньшей мере, 65, 70, 75, 80, 85, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%) SEQ ID NO: 10. Например, бактериальный штамм для применения в данном изобретении может иметь геном по меньшей мере с 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 70% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 80% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 90% идентично-

стью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 90% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 100% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 70% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 80% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 90% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 100% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 70% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 80% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 90% SEQ ID NO: 10, или по меньшей мере 98% идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 10 на протяжении 100% SEQ ID NO: 10.

В качестве альтернативы штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, могут быть идентифицированы с помощью номера доступа депозита NCIMB 42382 и рестрикционного анализа фрагментов и/или ПЦР, например, с помощью полиморфизма длины флуоресцентных амплифицированных фрагментов (FAFLP) и ПЦР-фингерпринтинга повторяющихся ДНК-элементов (rep), или профилирования белков, или частичного секвенирования 16S или 23S rDNA. В предпочтительных вариантах осуществления такие методики могут быть использованы для идентификации других штаммов *Parabacteroides distasonis*.

В определенных вариантах осуществления штаммы, которые представляют собой биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382, и которые являются подходящими для применения в данном изобретении, представляют собой штаммы, которые обеспечивают тот же самый паттерн, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42382, при анализе с помощью рестрикционного анализа амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), например, при использовании фермента рестрикции *Sau3AI* (иллюстративные способы и руководство см., например, [24]). В качестве альтернативы биотиповые штаммы идентифицируют в виде штаммов, которые имеют те же самые паттерны сбраживания углеводов, что и бактерия, депонированная под номером доступа NCIMB 42382.

Другие штаммы *Parabacteroides*, которые являются пригодными в композициях и способах по данному изобретению, такие как биотипы бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382, могут быть идентифицированы с помощью любого подходящего способа или стратегии, в том числе анализов, описанных в примерах.

Например, штаммы для применения в данном изобретении могут быть идентифицированы с помощью культивирования с клетками нейробластомы и последующей оценки уровней цитокинов и уровней нейропротекции или нейропролиферации. В частности, бактериальные штаммы, которые имеют аналогичные паттерны роста, метаболический тип и/или поверхностные антигены к бактерии, депонированной под номером доступа NCIMB 42382, могут быть пригодными в данном изобретении. Пригодный штамм будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность по отношению к штамму NCIMB 42382. В частности, биотиповой штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в отношении моделей нейродегенеративных заболеваний и сопоставимые эффекты в отношении уровней цитокинов, что и эффекты, продемонстрированные в разделе примеры, которые могут быть идентифицированы с помощью использования протоколов культивирования и введения, описанных в разделе примеры.

Особенно предпочтительным штаммом по данному изобретению является штамм *Parabacteroides distasonis*, депонированный под номером доступа NCIMB 42382. Он представляет собой иллюстративный штамм 755, исследуемый в примерах, и, как показано, является эффективным для лечения заболеваний. Таким образом, в данном изобретении предложена клетка, такая как выделенная клетка, штамм *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42382, или его производного. В данном изобретении также предложена композиция, содержащая клетку штамма *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42382, или его производного. В данном изобретении также предложена биологически чистая культура штамма *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42382. В данном изобретении также предложена клетка штамма *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42382, или его производного для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

Производное штамма, депонированного под номером доступа NCIMB 42382, может представлять собой дочерний штамм (потомство) или штамм, культивированный (субклонированный) из исходного штамма. Производное штамма по данному изобретению может быть модифицированным, например, на генетическом уровне, без устранения биологической активности. В частности, производный штамм по данному изобретению является терапевтически активным. Производное штамма будет иметь сопоставимую иммуномодулирующую активность по отношению к исходному штамму NCIMB 42382. В частности, производный штамм будет вызывать сопоставимые эффекты в отношении моделей нейродегенеративных заболеваний и сопоставимые эффекты в отношении уровней цитокинов, что и эффекты, проде-

монстрированные в разделе примеры, которые могут быть идентифицированы с помощью использования протоколов культивирования и введения, описанных в разделе примеры. Производное штамма NCIMB 42382 будет, как правило, представлять собой биотип штамма NCIMB 42382.

Ссылки на клетки штамма *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42382, охватывают любые клетки, которые имеют те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штаммы, депонированные под номером доступа NCIMB 42382, и такие клетки охвачены данным изобретением.

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

Авторы данного изобретения обнаружили, что штаммы *Parabacteroides distasonis* приводят к снижению секреции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и IL-8. IL-8 был связан с образованием миелиновых оболочек. Хроническое воспаление, индуцированное IL-6, может в конечном итоге приводить к клеточной смерти. Таким образом, бактериальные штаммы по данному изобретению являются особенно пригодными в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений. В некоторых вариантах осуществления бактериальные штаммы являются пригодными в лечении патологических состояний, характеризующихся повышенной активацией IL-6. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся демиелинизацией. Многие нейродегенеративные заболевания характеризуются демиелинизацией. Демиелинизация препятствует передаче потенциалов действия в нейронах, нарушая эффективное взаимодействие в нервной системе. Было показано, что IL-8 положительно влияет на образование и репарацию миелиновых оболочек. MRx0029 сам по себе приводит к повышению секреции IL-8. Таким образом, композиции по данному изобретению являются особенно эффективными в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений, характеризующихся демиелинизацией.

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

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

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

Штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированный под номером доступа NCIMB 42787, представляет собой иллюстративный штамм MRx0029, исследуемый в примерах и, как показано, являющийся эффективным для лечения заболеваний. Штамм NCIMB 42787 был депонирован с разрешения международного депозитария NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Шотландия) 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Шотландия) 13 июля 2017 г. в виде "*Megasphaera massiliensis MRx0029*" и ему был присвоен номер доступа NCIMB 42787. Таким образом, в данном изобретении предложена клетка, такая как выделенная клетка, штамм *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также предложена композиция, содержащая клетку штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного. В данном изобретении также предложена биологически чистая культура штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787. В данном изобретении также предложена клетка штамма *Megasphaera massiliensis*, депонированного под номером доступа NCIMB 42787, или его производного, для применения в лечении, в частности, заболеваний, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложена композиция, содержащая штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42787, или его производное или биотип, и штамм, депонированный в NCIMB под номером доступа NCIMB 42382, или его производное или био-

тип, предпочтительно для применения в лечении, предпочтительно для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Паркинсона.

Терапевтическое применение.

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

Композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активации промотора NFκB, который приводит к активации продуцирования цитокинов, например IL-1β, IL-1α, IL-18, TNF α и IL-6. Обработка клеток мутантным α-синуклеином представляет собой модель семейной болезни Паркинсона. Точечная мутация в положении 53 от аденина до треонина приводит к неправильной укладке α-синуклеина. Некорректно уложенный α-синуклеин впоследствии приводит к агрегации в нерастворимые фибриллы, которые образуют тельца Леви. Таким образом, композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения нейродегенеративных нарушений, которые являются результатом нейровоспаления, неправильной укладки белков и/или среднего воздействия. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для лечения семейной болезни Паркинсона. Активация промотора NFκB опосредована лигандом TLR4. Как известно, TLR4 опосредует клеточную смерть в мышинной модели MPTP, которая имитирует болезнь Паркинсона. Композиции по данному изобретению могут быть использованы для ингибирования способности передачи сигнала с участием TLR4 активировать промотор NFκB. Следует особенно отметить, что в случае PD как TLR2, так и TLR4, как было обнаружено, активированы в головном мозге пациентов с PD [25]. Кроме того, α-syn был описан в качестве лиганда TLR2 [26] и с помощью клеток НЕК-TLR4 было продемонстрировано, что α-syn также представляет собой лиганд TLR4.

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

Была выдвинута гипотеза, что хемокины имеют важные функции в центральной нервной системе (ЦНС), помимо их основной роли направленной миграции лейкоцитов. В мышинной линии клеток-предшественниц олигодендроцитов хемокин MCP-1 не приводит к повышению пролиферации предшественников олигодендроцитов. При первичной миелинизации культуры MCP-1 не приводили к усилению образования миелиновых сегментов в указанной системе. Авторы данного изобретения обнаружили, что MRx0005 приводит к повышению уровней MCP-1. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней MCP-1 при лечении заболеваний.

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть эффективными для лечения нейродегенеративных нарушений, которые возникают у пациентов пожилого возраста. Указанные примеры показывают, что композиции по данному изобретению могут приводить к лечению болезни Паркинсона, которая главным образом диагностируется у пациентов в возрасте старше 65 лет. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для лечения пациентов в возрасте 65 лет или старше. В других определенных вариантах осуществления возраст пациентов составляет от 40 до 65 лет. В других вариантах осуществления возраст пациентов составляет старше 40 лет. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении заболевания, ассоциированного с пожилым возрастом, например, заболевания, диагностированного в возрасте старше 50 лет.

В определенных вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению предназначены

для лечения нейродегенеративного заболевания, опосредованного или характеризующегося накоплением белка, в частности неправильно свернутого белка.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с потерей нейронов в сером веществе головного мозга. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для лечения нейродегенеративного заболевания, которое не ассоциировано с повреждениями белого вещества головного мозга.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с необратимыми симптомами.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, которое не представляет собой аутоиммунное нарушение. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенеративного заболевания, которое не представляет собой рассеянный склероз.

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

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

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

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

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

Модуляция оси микробиота-кишечник-головной мозг.

Взаимодействие между кишечником и головным мозгом (ось микробиота-кишечник-головной мозг) происходит с помощью двунаправленной нейрогуморальной системы взаимодействия. Последние данные показывают, что микробиота, которая находится в кишечнике, может приводить к модуляции развития головного мозга и появлению поведенческих фенотипов посредством оси микробиота-кишечник-головной мозг. Действительно, ряд обзоров предполагает роль оси микробиота-кишечник-головной мозг в поддержании функциональности центральной нервной системы и предполагает нарушение функции оси микробиота-кишечник-головной мозг в развитии нарушений и патологических состояний центральной нервной системы [16-27].

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

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранных из группы, состоящей из: болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича,

синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; множественного склероза; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцереbellарной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

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

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

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

Нейродегенеративные заболевания.

Таупатии представляют собой нейродегенеративные заболевания, ассоциированные с патологической агрегацией тау-белка в нейрофибрилярных или глиофибрилярных клубках в головном мозге человека. Болезнь Альцгеймера представляет собой пример таупатологии. Синуклеопатии (также называемые α -синуклеопатии) представляют собой нейродегенеративные заболевания, характеризующиеся аномальным накоплением агрегатов α -синуклеина в нейронах, нервных волокнах или глиальных клетках. Болезнь Паркинсона представляет собой пример синуклеинопатологии.

Имеет место клиническая и патологическая параллель между указанными двумя патологиями. Пациенты с болезнью Паркинсона часто имеют деменцию, а пациенты с болезнью Альцгеймера часто проявляют паркинсонизм [28]. Например, прогрессирующий надъядерный паралич (также известный как синдром Стила-Ричардсона-Ольшевского) имеет таупатологию, однако также приводит к значительному

паркинсонизму [29]. Мутации в LRRK2, которые, как известно, вызывают паркинсонизм, ассоциированы с накоплением синуклеина, тау, ни одного из них или обоих белков [30].

Болезнь телец Леви (LBD) представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое является одной из наиболее распространенных причин деменции у лиц пожилого возраста. LBD представляет собой пример существования преемственности между тау- и синуклеинопатологиями. LBD имеет общие клинические и патологические свойства с болезнью Паркинсона, деменцией, обусловленной болезнью Паркинсона, и болезнью Альцгеймера [28].

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения таупатий и/или синуклеинопатий. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения таупатий. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения синуклеинопатий. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения заболевания или патологического состояния, выбранных из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; и деменции; в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции.

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть пригодными для лечения или предупреждения деменции; в том числе деменции с тельцами Леви; сосудистой и лобно-височной деменции.

Болезнь Паркинсона.

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких симптомов болезни Паркинсона у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению одного или нескольких основных симптомов болезни Паркинсона у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению брадикинезии у субъекта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению, снижению или ослаблению тремора в покое; мышечной ригидности и/или нарушения постурального рефлекс у

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к нормализации симптомов болезни Паркинсона в соответствии с симптоматической или диагностической шкалой. В определенных вариантах осуществления тесты для оценки симптоматического улучшения двигательной функции болезни Паркинсона представляют собой унифицированную шкалу оценки болезни Паркинсона. В частности, UPDRS II учитывает активность в повседневной жизни, а UPDRS III учитывает двигательную активность.

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

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

Болезнь Альцгеймера и деменция.

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

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

Симптоматические критерии деменции в соответствии с DSM-5 указывают на значительное снижение когнитивных способностей по сравнению с предыдущим уровнем функционирования в одной или

нескольких областях, выбранных из обучения и памяти; языка; исполнительной функции; комплексного внимания; перцептивно-двигательного и социального познания. Когнитивные дефициты должны нарушать самостоятельность в повседневной активности. Кроме того, когнитивные дефициты не возникают исключительно в контексте делирия и более подходящим образом не объясняются с точки зрения другого психического нарушения (например, MDD или шизофрении).

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

Нейродегенеративные нарушения могут развиваться или продолжаться в результате нарушения функции оси микробиота-кишечник-головной мозг. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении или предупреждении нейродегенеративных нарушений у субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера. В других вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбирают из сосудистых деменций; смешанной формы болезни Альцгеймера и сосудистой деменции; деменции с тельцами Леви; лобно-височной деменции; деменции при болезни Паркинсона; болезни Крейтцфельда-Якоба; болезни Гентингтона и синдрома Вернике-Корсакова.

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления в объективных когнитивных тестах для оценки симптоматической нормализации применяют когнитивную подшкалу шкалы оценки тяжести болезни Альцгеймера (ADAS-cog - Alzheimer's disease Assessment Scale cognitive sub scale) и классическую шкалу ADAS.

В определенных вариантах осуществления симптоматическую нормализацию когнитивных функций оценивают с помощью нейропсихологической батареи тестов для применения при болезни Альцгеймера (NTB).

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

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

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

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

Рассеянный склероз.

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

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

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

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

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

ции.

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

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

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении рассеянного склероза у пациента, который был идентифицирован как имеющий риск развития рассеянного склероза, или которому был поставлен диагноз рассеянного склероза ранней стадии или "рецидивирующе-ремиттирующий" рассеянный склероз. Композиции по данному изобретению могут быть пригодными для предупреждения развития MS. Композиции по данному изобретению могут быть пригодными для предупреждения прогрессирования MS. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения у пациента, идентифицированного как имеющего генетическую предрасположенность к MS, такую как фенотип основного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса, лейкоцитарный антиген человека (HLA)-DR2 или HLA-DR4.

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

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней моноаминов головного мозга и их метаболитов. В предпочтительных вариантах осуществления указанным метаболитом является кинурерин. В определенных вариантах осуществления композиции по указанному изобретению приводят к модулированию кинуренина, что представляет собой основной путь метаболизма триптофана, который выступает в качестве пути для продуцирования никотинамидадениндинуклеотида (НАД+). Кинуренин может быть метаболизирован до нейроактивных соединений, таких как кинуреиновая кислота (KYNA) и 3-гидрокси-1-кинуренин (3-OH-1-KYN), и в до-

полнительных стадиях до хинолиновой кислоты (QUIN). Нарушение регуляции кинуренинового пути может приводить к активации иммунной системы и накоплению потенциально нейротоксических соединений. Изменения кинуренинового метаболизма может быть связано с развитием болезни Паркинсона. Как было продемонстрировано, уровни кинуренина снижены во фронтальной коре, скорлупе и компактной части черной субстанции пациентов с PD [31]. Таким образом, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в повышении уровней кинуренина при лечении болезни Паркинсона.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения композиции по данному изобретению могут приводить к повышению уровней кинуренина. Как было показано, повышенные уровни кинуренина приводят к ослаблению индуцированной MPP+ гибели нейронов *in vitro* в клеточной линии дофаминергической нейробластомы человека [32]. В определенных вариантах осуществления кинуренин и кинурениновая кислота могут приводить к активации арил-углеводородного рецептора GI (Ahg) и рецепторов GPR35. Активация рецептора Ahg приводит к индукции продуцирования IL-22, который может приводить к ингибированию местного воспаления. Активация GPR35 приводит к индукции продуцирования инозитолтрифосфата и мобилизации Ca²⁺.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней индола. В предпочтительных вариантах осуществления указанным метаболитом является кинурерин. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию путей с участием кинуренина, которые представляют собой основной путь метаболизма триптофана.

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

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней ГАМК. ГАМК представляет собой ингибирующий нейромедиатор, который приводит к снижению возбудимости нейронов. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению уровней ГАМК. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровней ГАМК. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к изменению ГАМКергической нейропередачи. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию транскрипции ГАМК в различных участках центральной нервной системы. В определенных вариантах осуществления происходящая от комменсалов ГАМК проникает через гематоэнцефалический барьер и непосредственно воздействует на нейропередачу. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению ГАМК в гиппокампе, миндалинах и/или голубом пятне. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению ГАМК в областях коры головного мозга.

Иммунный ответ.

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

ративного заболевания.

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

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

Ацетилирование и деацетилирование гистонов представляют собой важные эпигенетические регуляторы экспрессии генов. Нарушение баланса ацетилирования и деацетилирования гистонов может приводить к апоптозу. Нарушение регуляции таких гистонацетилтрансфераз играет роль в патогенезе, ассоциированном с возрастными нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, болезнь Альцгеймера, амиотрофический латеральный склероз и снижение когнитивных функций [33]. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию активности гистондеацетилазы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активности гистондеацетилазы. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению активности гистондеацетилазы.

Пациенты с нейродегенеративными заболеваниями, в том числе болезнью Паркинсона, болезнью Гентингтона, болезнью Альцгеймера и амиотрофическим латеральным склерозом, проявляют высокие уровни перекисного окисления липидов. Липиды являются восприимчивыми к окислению активными формами кислорода, а головной мозг имеет высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к модулированию перекисного окисления липидов. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут приводить к снижению перекисного окисления липидов. Снижение окислительного повреждения, вызванного реактивными формами кислорода, может быть использовано для целенаправленного воздействия на нейродегенеративных заболеваний ранней стадии. Соответственно в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении нейродегенерации ранней стадии. Кроме того, соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в предупреждении развития нейродегенеративного заболевания. В таких вариантах осуществления композиции по данному изобретению могут быть предназначены для применения у пациента, который был идентифицирован как имеющий риск развития нейродегенеративного заболевания.

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

Передача сигнала по оси микробиота-кишечник-головной мозг модулируется уровнями состава микробиома в желудочно-кишечном тракте. Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию состава микробиома желудочно-кишечного тракта. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению дисбиоза микробиома и сопутствующему повышению токсических метаболитов (например, LPS). В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней Clostridium в желудочно-кишечном тракте. В предпочтительных

вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровня *Clostridium* в желудочно-кишечном тракте. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению уровней *Campylobacter jejuni*. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию пролиферации вредных анаэробных бактерий и продуцированию нейротоксинов, продуцируемых указанными бактериями. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней *Lactobacillus* и/или *Bifidobacterium* в микробиоме. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к модулированию уровней родов *Sutterella*, *Prevotella*, *Ruminococcus* и/или семейства *Alcaligenaceae* в микробиоме. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению уровня *Lactobacillus plantarum* и/или *Saccharomyces boulardii*.

Повреждение головного мозга.

Указанные примеры демонстрируют, что композиции по данному изобретению являются нейропротекторными и имеют ингибирующую активность в отношении HDAC. HDAC2 представляет собой основную мишень в случае функционального восстановления от инсульта [34], а ингибирование HDAC может предупреждать повреждение белого вещества [35], поэтому композиции по данному изобретению могут быть пригодными в лечении повреждения головного мозга.

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

В предпочтительных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении инсульта. Эффекты, показанные в примерах, особенно связаны с лечением инсульта. Инсульт возникает в случае, когда кровоток по меньшей мере к части головного мозга нарушается. Без надлежащего снабжения кровью с целью обеспечения кислорода и питательных веществ в ткань головного мозга и удаления побочных продуктов из ткани головного мозга клетки головного мозга начинают погибать. Симптомы инсульта зависят от участка головного мозга, который нарушается в результате недостаточного кровотока. Симптомы включают в себя паралич, онемение или слабость мышц, потерю равновесия, головокружение, внезапную сильную головную боль, нарушение речи, потерю памяти, потерю способности рассуждать, внезапную спутанность сознания, нарушение зрения, кому или даже смерть. Инсульт также обозначается как приступ головного мозга или нарушение мозгового кровообращения (CVA). Симптомы инсульта могут быть кратковременными в случае, если достаточный кровоток восстанавливается в пределах короткого периода времени. В то же время, если недостаточный кровоток продолжается в течение значительного периода времени, то симптомы могут быть необратимыми.

В некоторых вариантах осуществления инсульт представляет собой ишемию головного мозга. Ишемия головного мозга происходит в случае, когда имеет место недостаточный кровоток в ткани головного мозга с целью соответствия метаболических потребностей. В некоторых вариантах осуществления ишемия головного мозга представляет собой фокальную ишемию головного мозга, т.е. ограниченную определенной областью головного мозга. В некоторых вариантах осуществления ишемия головного мозга представляет собой глобальную ишемию головного мозга, т.е. охватывающую обширную площадь ткани головного мозга. Фокальная ишемия головного мозга обычно происходит в случае, если сосуд головного мозга становится закупоренным либо частично, либо полностью, приводя к снижению тока крови к определенному участку головного мозга. В некоторых вариантах осуществления фокальная ишемия головного мозга представляет собой ишемический инсульт. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт является тромботическим, т.е. вызванным тромбом или кровавым сгустком, который развивается в сосуде головного мозга и ограничивает или блокирует кровоток. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт представляет собой тромботический инсульт. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт является эмболическим, т.е. вызванным эмболом или непри-

крепленной массой, которая проходит через кровоток и ограничивает или блокирует кровоток в участке, удаленном от своего места происхождения. В некоторых вариантах осуществления ишемический инсульт представляет собой эмболический инсульт. Глобальная ишемия головного мозга возникает, если кровоток к головному мозгу в целом блокируется или ограничивается. В некоторых вариантах осуществления глобальная ишемия головного мозга вызвана гипоперфузией, например, в результате шока. В некоторых вариантах осуществления глобальная ишемия головного мозга представляет собой результат сердечного приступа.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении геморрагического инсульта. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении кровоизлияния в головной мозг. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении интрапаренхиматозного кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении внутрижелудочкового кровоиз-

лияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении субарахноидального кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении церебральной амилоидной ангиопатии. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении аневризмы головного мозга. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении церебральной АVM.

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

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

Высокое кровяное давление, высокий уровень холестерина в крови, семейный анамнез инсульта, заболевание сердца, сахарный диабет, аневризмы головного мозга, артериовенозные мальформации, серповидно-клеточная анемия, васкулит, нарушения свертываемости крови, применение нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID), курение табака, употребление большого количества алкоголя, употребление запрещенных наркотиков, ожирение, отсутствие физической активности и неправильное питание считаются факторами риска инсульта. В частности, как было убедительно показано, снижение кровяного давления приводит к предупреждению как ишемических, так и геморрагических инсультов [36, 37]. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в лечении повреждения головного мозга у субъекта, который имеет по меньшей мере один фактор риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет два фактора риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет четыре фактора риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет более четырех факторов риска инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет высокое кровяное давление. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет высокий уровень холестерина в крови. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет семейный анамнез инсульта. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание сердца. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет сахарный диабет. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет аневризму головного мозга. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет артериовенозные мальформации. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет васкулит. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет серповидно-клеточную анемию. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет нарушение свертываемости крови. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет историю применения нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAID). В некоторых вариантах осуществления субъект курит табак. В некоторых вариантах осуществления субъект употребляет большие количества алкоголя. В некоторых вариантах осуществления субъект употребляет запрещенные наркотики. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет избыточную массу тела. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет отсутствие физической активности. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет неправильное питание.

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в снижении повреждения, вызванного потенциальным повреждением головного мозга, предпочтительно инсультом. Указанные композиции могут приводить к снижению вызванного повреж-

дения при введении до наступления потенциального повреждения головного мозга, в частности при введении пациенту, идентифицированному как имеющему риск повреждения головного мозга.

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

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

Лечение повреждения головного мозга может относиться, например, к облегчению тяжести симптомов. Лечение повреждения головного мозга может также относиться к снижению неврологических нарушений после инсульта. Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены субъекту до начала инсульта, например пациенту, идентифицированному как имеющему риск инсульта. Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены после инсульта, например во время восстановления. Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время острой фазы восстановления (т.е. до одной недели включительно после инсульта). Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время подострой фазы восстановления (т.е. от одной недели до трех месяцев включительно после инсульта). Композиции по данному изобретению для применения в лечении инсульта могут быть предложены во время хронической фазы восстановления (от трех месяцев после инсульта).

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению влияния ишемии на ткани. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению степени повреждения на ткани, вызванные ишемией. В определенных вариантах осуществления ткани, повреждаемые в результате ишемии, представляют собой ткани головного мозга. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению некроза или числа некротических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению апоптоза или числа апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к снижению числа некротических или апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению клеточной смерти в результате некроза и/или апоптоза. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к предупреждению клеточной смерти в результате некроза и/или апоптоза, вызываемых в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к восстановлению ткани, поврежденной в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению скорости выведения некротических клеток и/или апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к повышению эффективности выведения некротических клеток и/или апоптотических клеток. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к замещению и/или регенерации клеток в тканях. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к замещению и/или регенерации клеток в тканях, поврежденных в результате ишемии. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению приводят к улучшению общего гистологического состояния ткани (например, при биопсии).

Пути введения.

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

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

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления композиция по данному изобретению может быть введена беременному животному, например млекопитающему, такому как человек, с целью предупреждения воспалительного или аутоиммунного заболевания, развивающегося у его ребенка *in utero* и/или после рождения.

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

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

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

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

Композиции.

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

Предпочтительно композиция по данному изобретению содержит лиофилизированные бактерии. Лиофилизация бактерий представляет собой общепризнанную процедуру, а соответствующее руководство доступно, например, в литературных источниках [38-40].

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

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

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

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

В предпочтительных вариантах осуществления композиция по данному изобретению является инкапсулированной с целью обеспечения доставки бактериального штамма в кишечник. Инкапсулирование приводит к защите композиции от распада до введения в целевой участок, с помощью, например, разрыва в результате химических или физических стимулов, например давления, ферментативной активности или физической дезинтеграции, которые могут быть активированы изменениями pH. Может быть использован любой подходящий способ инкапсулирования. Иллюстративные методики инкапсулирования включают в себя захват в пористый матрикс, прикрепление или адсорбцию на твердых поверхностях носителя, самоагрегацию в результате флокуляции или с помощью сшивающих агентов, а также механического сдерживания за микропористой мембраной или микрокапсулой. Руководство по инкапсулированию, которое может быть пригодным для получения композиций по данному изобретению, доступно, например, в литературных источниках [41] и [42].

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

Указанная композиция может быть составлена в виде пробиотика.

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

Подходящая суточная доза бактерии, например, для взрослого человека, может составлять от приблизительно 1×10^3 до приблизительно 1×10^{11} колониеобразующих единиц (КОЕ); например от приблизительно 1×10^7 до приблизительно 1×10^{10} КОЕ; в другом примере от приблизительно 1×10^6 до приблизительно 1×10^{10} КОЕ.

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

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

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

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению используют в комбинации с другим терапевтическим соединением для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания. В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят с пищевыми добавками, которые приводят к модулированию нейропротекции или нейропролиферации. В предпочтительных вариантах осуществления пищевые добавки содержат или состоят из полезных

для здоровья витаминов. В определенных вариантах осуществления указанные витамины представляют собой витамин В6, магний, диметилглицин (витамин В16) и витамин С. В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят в комбинации с другим пробиотиком.

В определенных вариантах осуществления композиции по данному изобретению предназначены для применения в усилении эффекта второго агента в отношении нейродегенеративного заболевания. Иммуномодулирующие эффекты композиций по данному изобретению могут приводить к тому, что мозг становится более восприимчивым к стандартным препаратам, таким как леводопа, агонисты дофаминовых рецепторов, ингибиторы МАО-В, ингибиторы СОМТ, антагонисты глутамата и/или антихолинэргические препараты), которые представляют собой иллюстративные вспомогательные средства, подлежащие введению в комбинации (последовательно или одновременно) с композициями по данному изобретению.

Композиции по данному изобретению могут содержать фармацевтически приемлемые наполнители или носители. Примеры таких подходящих наполнителей могут быть найдены в источнике литературы [43]. Приемлемые носители или разбавители для терапевтического применения хорошо известны в фармацевтической области и описаны, например, в источнике литературы [44]. Примеры подходящих носителей включают в себя лактозу, крахмал, глюкозу, метилцеллюлозу, стеарат магния, маннит, сорбит и т.п. Примеры подходящих разбавителей включают в себя этанол, глицерин и воду. Выбор фармацевтического носителя, наполнителя или разбавителя может быть выполнен на основании предполагаемого пути введения и стандартной фармацевтической практики. Фармацевтические композиции могут содержать в качестве или в качестве дополнения носителя, наполнителя или разбавителя любое (любые) подходящий (подходящие) связывающее (связывающие) вещество (вещества), смазывающее (смазывающие) вещество (вещества), суспендирующий (суспендирующие) агент (агенты), покрывающий (покрывающие) агент (агенты), солюбилизующий (солюбилизующие) агент (агенты). Примеры подходящих связывающих веществ включают в себя крахмал, желатин, природные сахара, такие как глюкоза, безводная лактоза, свободно сыпучая лактоза, β -лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические смолы, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза или полиэтиленгликоль. Примеры подходящих смазывающих веществ включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия и т.п. Консерванты, стабилизаторы, красители и даже ароматизаторы могут быть предложены в фармацевтической композиции. Примеры консервантов включают в себя бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты. Также могут быть использованы антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Композиции по данному изобретению могут быть составлены в виде продукта питания. Например, продукт питания может обеспечивать питательный эффект в дополнение к терапевтическому эффекту по данному изобретению, например, в пищевой добавке. Аналогичным образом, продукт питания может быть составлен с целью усиления вкуса композиции по данному изобретению или с целью создания более привлекательной для потребления композиции в результате большего сходства с распространенным продуктом питания, а не с фармацевтической композицией. В определенных вариантах осуществления композицию по данному изобретению составляют в виде продукта на основе молока. Термин "продукт на основе молока" означает любой жидкий или полужидкий продукт на основе молока или сыворотки, имеющий варьирующее содержание жира. Продукт на основе молока может представлять собой коровье молоко, козье молоко, овечье молоко, обезжиренное молоко, цельное молоко, молоко, воссоединенное с порошковым молоком и сывороткой без какой-либо обработки, или обработанный продукт, такой как йогурт, простокваша, сырный сгусток, кислое молоко, кислое цельное молоко, пахта и другие кисломолочные продукты. Другая важная группа включает в себя молочные напитки, такие как напитки из молочной сыворотки, кисломолочные продукты, сгущенное молоко, молоко для молочные смеси для младенцев или новорожденных; молоко со вкусовыми наполнителями, мороженое; молокосодержащие продукты, такие как конфеты.

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению содержат один или

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиция по данному изобретению дополнительно содержит бактериальный штамм, который имеет те же самые характеристики безопасности и терапевтической эффективности, что и штамм MRX005, однако который не представляет собой MRx0005, или который не представляет собой *Parabacteroides distasonis*.

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

В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм для применения в данном изобретении получают из кала взрослого человека. В некоторых вариантах осуществления, в которых композиция по данному изобретению содержит более чем один бактериальный штамм, все из бактериальных штаммов получают из кала взрослого человека, или если присутствуют другие бактериальные штаммы, то они

присутствуют лишь в незначительных количествах. Бактерии могли быть культивированы после получения из кала взрослого человека и могут быть применены в композиции по данному изобретению.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В определенных вариантах осуществления в данном изобретении предложена упомянутая выше фармацевтическая композиция, содержащая наполнитель, выбранный из группы, состоящей из крахмала,

желатина, глюкозы, безводной лактозы, свободно сыпучей лактозы, β -лактозы, кукурузного подсластителя, аравийской камеди, трагаканта, альгината натрия, карбоксиметилцеллюлозы, полиэтиленгликоля, олеата натрия, стеарата магния, бензоата натрия, ацетата натрия и хлорида натрия.

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления композиции по данному изобретению вводят перорально. Пероральное введение может включать в себя проглатывание, в результате чего соединение проникает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное, лингвальное или сублингвальное введение, с помощью которых соединение проникает в кровоток непосредственно из ротовой полости.

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимый состав является по своей природе кишечнорастворимым, например устойчивым к действию желудочного сока, без необходимости кишечнорастворимого покрытия. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой кишечнорастворимый состав, который не содержит кишечнорастворимое покрытие. В некоторых вариантах осуществления указанный состав представляет собой капсулу, изготовленную из термогелевого материала. В некоторых вариантах осуществления указанный термогелевый материал представляет собой целлюлозный материал, такой как метилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу или гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC). В некоторых вариантах осуществления указанная капсула содержит оболочку, которая не содержит никакого пленкообразующего полимера. В некоторых вариантах осуществления указанная капсула содержит оболочку и указанная оболочка содержит гидроксипропилметилцеллюлозу и не содержит никакого пленкообразующего полимера (например, см. [45]). В неко-

торых вариантах осуществления указанный состав представляет собой по своей природе кишечнорастворимую капсулу (например, Vcaps® от Capsugel).

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

Способы культивирования.

Бактериальные штаммы для применения в данном изобретении могут быть культивированы с помощью стандартных микробиологических методик, как подробно описано, например, в литературных источниках [46-48].

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

Бактериальные штаммы для применения в вакцинных композициях.

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

Общие указания.

Практическое применение указанного изобретения будет осуществляться, если не указано иное, с помощью стандартных способов химии, биохимии, молекулярной биологии, иммунологии и фармакологии, в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе. См., например, литературные источники [49] и [50-56] и др.

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

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

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

Ссылки на процент идентичности последовательности между двумя нуклеотидными последовательностями означает, что при выравнивании указанный процент нуклеотидов является тем же самым при сравнении с указанными двумя последовательностями. Указанное выравнивание и указанный процент гомологии или идентичности последовательности могут быть определены с помощью компьютерных программ, известных в данной области техники, например программ, описанных в разделе 7.7.18 источника литературы [57]. Предпочтительное выравнивание определяют с помощью алгоритма поиска гомологии Smith-Waterman с использованием поиска аффинных гэпов, при этом штраф за открытие гэпа составляет 12 и штраф за продление гэпа составляет 2, матрица BLOSUM составляет 62. Алгоритм поиска Smith-Waterman раскрыт в литературном источнике [58].

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

Различные варианты осуществления описаны в данном документе. Необходимо понимать, что характеристики, определенные в каждом варианте осуществления, могут быть комбинированы с другими

определенными характеристиками, для обеспечения дополнительных вариантов осуществления. В частности, варианты осуществления, выделенные в данном документе как подходящие, типичные или предпочтительные, могут быть комбинированы друг с другом (кроме случаев, когда они являются взаимоисключающими).

Пути осуществления изобретения

Пример 1. Эффективность бактериального инокулята при действии в качестве нейропротектора.

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*, *Megasphaera massiliensis* MRx0029.

Клеточная линия.

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

Способ.

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

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 1. Обработка клеток нейробластомы MRx0005 или MRx0029 приводила к повышению пролиферации нейронов. Клетки нейробластомы, которые обрабатывали MPP совместно с бактериальным штаммом, имели повышенную жизнеспособность клеток по сравнению с клетками, обработанными только MPP (которые имели сниженную жизнеспособность). Указанные данные демонстрируют, что указанные бактериальные штаммы могут выступать в качестве нейропротектора.

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

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

Клеточная линия.

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

Способ.

После выращивания клетки MG U373 высевали на 24-луночный планшет по 100000 клеток/лунка. Клетки обрабатывали только LPS (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRx0005 в течение 24 ч. Также выполняли контроль в случае, если клетки инкубировали в необработанных средах. После этого не содержащие клеток супернатанты центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин при 4°C. IL-6 измеряли с помощью набора для ИФА IL-6 человека от Peprotech (№ в кат. 900-K16) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты.

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

Пример 2В. Эффективность бактериального инокулята в модулировании секреции IL-8.

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальные штаммы *Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005.

Клеточная линия.

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

Способ.

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

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 2В.

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

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальные штаммы *Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005.

Клеточная линия.

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

SH-SY5Y представляет собой клеточную линию нейробластомы человека, происходящую из злокачественной нейробластомы, и может быть приобретена в Sigma-Aldrich (№ в кат. 94030304-1VL). Клетки выращивали в 50% MEM и 50% питательной смеси F-12 среды Хэма с добавлением 2 mM L-глутамин, 10% термоинактивированной FBS, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки на среде для выращивания клеток высевали на 96-луночном планшете по 11000 клеток/лунка и помещали в инкубатор. Через 2 дня среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали через 7 дней дифференцировки.

Способ.

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

После этого клетки обрабатывали 25 мкг/мл α -синуклеина (ДТ, A53T, E46K) в присутствии или в отсутствие 10% бактериального супернатанта в течение 48 ч. Не содержащие клеток супернатанты собирали, центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин при 4°C, разделяли на аликвоты и хранили при

-80°C. IL-6 и IL-8 человека измеряли, как описано выше.

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 3. Обработка клеток α -синуклеином дикого типа и мутантными изоформами E46K и A53T приводила к индукции умеренной секреции IL-6. Индуцированную α -syn секрецию IL-6 ингибировали в клетках, обработанных бактериальными штаммами.

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

Краткое описание.

Активация промотора NF κ B приводит к продуцированию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-1 α , IL-18, TNF α и IL-6. Промотор NF κ B может быть активирован с помощью α -синуклеина, а LPS с помощью стимуляции лиганда TLR4. Мутации α -синуклеина, такие как α -синуклеин A53T, связаны с семейной болезнью Паркинсона. Обработка нейронов LPS имитирует болезнь Паркинсона, вызванную факторами окружающей среды. Изучали способность композиций, содержащих бактериальные штаммы в соответствии с данным изобретением, приводить к ингибированию активации промотора NF κ B.

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

Клеточная линия.

Hek blue TLR4 человека приобретали в InvivoGen (№ в кат. hkb-htlr4). Hek blue TLR4 человека выращивали в DMEM с высоким содержанием глюкозы (Sigma Aldrich, № в кат. D-6171) с добавлением 10% FBS, 1% Pen Strep, 4 mM L-глутамин, нормоцин и 1X раствора для селекции HEK Blue.

Способ.

После выращивания клетки Hek blue человека высевали на 96-луночные планшеты по 25000 клеток/луночка в 4 повторах. Одну группу клеток обрабатывали только α -синуклеином A53T (1 мкг/мл) или 10% бактериальным супернатантом из MRx0005 в течение 22 ч. Вторую группу клеток обрабатывали LPS (10 нг/мл, из *Salmonella enterica* серотип Typhimurium, Sigma Aldrich, № в кат. L6143) отдельно или с помощью 10% бактериального супернатанта из MRx0005 в течение 22 ч. После этого клетки центрифугировали и 20 мкл супернатанта смешивали с 200 мкл реагента Quanti Blue (InvivoGen, № в кат. ger-qb2), инкубировали в течение 2 ч и считывали поглощение при 655 нм.

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 4 и 5. На фиг. 4 продемонстрировано, что активация промотора NF κ B α -синуклеином ингибируется MRx0005. На фиг. 5 продемонстрировано, что активация промотора NF κ B LPS не ингибируется MRx0005.

Пример 4. Эффективность бактериального инокулята в изменении антиоксидантной способности.

Краткое описание.

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

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

Способ.

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

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 6. На фиг. 6 продемонстрировано, что MRx0005 имеет антиоксидантную способность, составляющую примерно 0.5 mM, по сравнению с тролоксом.

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

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

Способ.

Бактериальные клетки (10⁶ или более) собирали и центрифугировали, этап промывки выполняли с использованием изотонического солевого раствора до ресуспендирования осадка в аналитическом буфе-

ре хлорида натрия. Суспензию подвергали воздействию ультразвука на льду в течение 10 мин и затем центрифугировали при 10 000×g в течение 10 мин. Супернатант удаляли и уровень перекисного окисления липидов оценивали с помощью анализа веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 7. На фиг. 7 продемонстрировано, что MRx0005 способен ингибировать перекисное окисление липидов на примерно 20%, что представляет собой более высокую антиоксидантную способность, чем положительный контроль, бутилированный гидрокситолуол (1% мас./об.).

Пример 6. Эффективность бактериального инокулята в отношении активности гистондеацетилазы.

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

Клеточная линия.

Использовали клеточную линию HT-29, поскольку присутствовала гистондеацетилаза.

Способ.

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

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 8. На фиг. 8 продемонстрировано, что MRx0005 способен приводить к снижению уровней активности гистондеацетилазы.

Пример 7. Уровень продуцирования индола в бактериях.

Краткое описание.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

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

Способ.

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

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 9. На фиг. 9 продемонстрировано, что MRx0005 имеет способность продуцировать индол из триптофана в концентрациях, составляющих примерно 0,2 мМ.

Пример 8. Уровень продуцирования кинуренина в бактериях.

Краткое описание.

Исследовали способность бактерий по данному изобретению продуцировать кинуренин. Нарушение регуляции кинуреинового пути может приводить к активации иммунной системы и накоплению потенциально нейротоксических соединений. Изменения кинуреинового метаболизма может быть связано с развитием болезни Паркинсона.

Бактериальный штамм 755: *Parabacteroides distasonis*.

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

Способ.

Не содержащие клеток супернатанты бактериальных культур в стационарной фазе выделяли с помощью центрифугирования и фильтровали на 0,22 мкМ фильтре, а до использования замораживали. Стандарты, рабочие растворы кинуренина и реагенты готовили с помощью стандартизированных спосо-

бов, валидированных во внутрилабораторных условиях. Образцы обрабатывали трихлоруксусной кислотой и центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 10 мин при $4^\circ C$. Супернатант собирали и распределяли в 96-лучночный планшет. Реактив Эрлиха использовали для детекции кинуренина и добавляли в соотношении 1:1.

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 10. На фиг. 10 продемонстрировано, что MRx0005 имеет способность продуцировать кинуренин в концентрации, составляющей примерно 70 мкМ.

Пример 9. Нейропротекция.

РА-дифференцированные клетки SHSY-5Y обрабатывали MPP+, активным метаболитом МРТР, химическим соединением, широко используемым для имитации *in vitro* и *in vivo* некоторых характеристик патологии PD. Жизнеспособность клеток измеряли в виде скорости дыхания в митохондриях (фиг. 11). Как MRx0005, так и MRx0029 продемонстрировали значимые эффекты и сами по себе способствуют повышению метаболической активности в митохондриях в клетках SHSY-5Y. Защита MRx0005 составляла приблизительно 20% по сравнению с образцом, обработанным YCFA-MPP+, приблизительно то же самое наблюдали в случае положительного контроля кверцетином (фиг. 11).

Пример 10. Продуцирование метаболитов - метаболиты в головном мозге.

Предпосылки.

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

Способы.

Животные.

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

Схема исследования.

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

Сбор тканей.

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

Анализ моноаминов.

Концентрацию нейромедиаторов анализировали с помощью ВЭЖХ в отношении образцов из ствола головного мозга. Вкратце, ткань ствола головного мозга подвергали ультразвуковой обработке в 500 мкл охлажденной подвижной фазы с добавлением 4 нг/40 мкл N-метил-5-НТ (Sigma Chemical Co., Великобритания) в качестве внутреннего стандарта. Подвижная фаза содержала 0,1М лимонной кислоты, 5,6 мМ октан-1-сульфоновой кислоты (Sigma), 0,1М натрия дигидрофосфата, 0,01 мМ ЭДТА (Alkem/Reagecon, Корк) и 9% (об./об.) метанола (Alkem/Reagecon) и доводили до pH 2,8 с помощью 4N гидроксида натрия (Alkem/Reagecon). Затем гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при $22000 \times g$ при $4^\circ C$ и 40 мкл супернатанта вводили в систему ВЭЖХ, которая состояла из системного контроллера SCL 10-Aвр, электрохимического детектора LECD 6A (Shimadzu), насоса LC-10AS, печи СТО-10А, автоинжектора SIL-10А (с охладителем проб, содержащимся при $40^\circ C$) и онлайн дегезатором Gastorg (ISS, Великобритания). Колонку с обращенной фазой (Kinetex 2.6 мкм C18 $100 \times 4,6$ мм, Phenomenex) поддерживаемую при $30^\circ C$, использовали в разделении (скорость потока 0,9 мл/мин). Стеклоуглеродный рабочий углерод в комбинации с референтным электродом Ag/AgCl (Shimadzu), функционирующем при +0,8 В и полученные хроматограммы анализировали с помощью компьютерной программы Class-VP 5 (Shimadzu). Нейромедиаторы идентифицировали по их характерному времени удерживания, определен-

ному с помощью внутренних инъекций, которые хроматографировали через равные промежутки во время анализа образцов. Отношения высот пиков аналита по сравнению с внутренним стандартом измеряли и сравнивали со стандартной инъекцией. Результаты выражали в виде нг на г массы сырой ткани.

Анализ метаболитов.

В случае анализа GC-метаболитов образцы бактериальных супернатантов дериватизировали метилхлорформатом с помощью слегка модифицированной версии протокола, описанного Smart et al. (DOI: 10.1038/nprot.2010.108). Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью GC (7890B, Agilent), соединенного с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent), до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного Johnsen et. al (DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052).

В случае анализа жирных кислот образцы подкисляли с помощью хлористоводородной кислоты и добавляли меченые дейтерием внутренние стандарты. Все образцы анализировали в случайном порядке. Анализ выполняли с помощью высокополярной колонки (колонка Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), установленная в GC (7890B, Agilent), соединенном с квадрупольным детектором (59977B, Agilent). Систему контролировали с помощью ChemStation (Agilent). Первичные материалы преобразовывали в формат netCDF с помощью Chemstation (Agilent) до того, как данные импортировали и обрабатывали в Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) с использованием программного обеспечения PARADISE, описанного Johnsen et al. (DOI: 10.1016/j.chroma.2017.04.052).

Результаты - продуцирование нейромедиаторов.

Результаты продемонстрированы на фиг. 12, которая показывает, что в головном мозге мышей, которые получали в пищу MRx0029, уровни норадреналина повышались ($p=0,0507$), что сопровождалось незначительным повышением серотонина и 5-Н1АА.

Указанные данные подтверждают анализ метаболитов, изложенный ниже, предполагая, что MRx0029 представляет собой основной продуцент 4-гидроксифенилуксусной кислоты, известного антиоксиданта (Weon et al., 2016). Гораздо более важно, что 4-гидроксифенилуксусная кислота представляет собой синтетическое промежуточное соединение дофамина и норэпинефрина и важную биоактивную молекулу (Huot et al., Parkinson's Disease 2015). Фактически при PD дегенеративные изменения распространяются за пределы дофаминергической системы, влияя в одинаковой степени на серотонинергические и норадренергические системы, что, в свою очередь, приводит к повышенным уровням серотонина (5-гидрокситриптамина, 5-НТ) и норадреналина (норэпинефрина) как в структурах полосатого тела, так и в экстрастриарных структурах (Scatton B, Javoy-Agid F, Rouquier L, Dubois B, Agid Y Brain Res. 1983 Sep 26; 275(2):321-8.). L-DOPA целенаправленно воздействует главным образом на характеристики PD, в том же время она не направлена на снижение как 5-НТ, так и норадреналина. Помимо этого, чем более длительной является продолжительность обработки L-DOPA, тем более видимыми являются диапазон двигательных и недвигательных осложнений (например, дискинезия, психиатрические симптомы) (Hely M.A., Morris J.G., Reid W.G., Trafficante R., Mov Disord. 2005 Feb; 20(2): 190-9.) Таким образом, указанные данные демонстрируют, что бактерии, которые продуцируют органические кислоты, такие как 4-гидроксифенилуксусная кислота или янтарная кислота, могут быть пригодными в лечении, в частности, в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Результаты - продуцирование метаболитов.

Метаболиты, присутствующие в бактериальных супернатантах, могут непосредственно влиять на ответ хозяина на окислительный стресс, межклеточное взаимодействие и нейропротекцию особым образом. Анализировали метаболиты в супернатанте культур MRX0029 и MRX0005, а результаты продемонстрированы на фиг. 13.

Незначительное количество метаболитов демонстрировали выраженную разницу между двумя анализируемыми штаммами. Концентрация янтарной кислоты была особенно повышенной в MRx0005. Интересно, что отношение образец/среда в случае 4-гидроксифенилуксусной кислоты была значительно выше в MRx0029 (фиг. 13).

Анализ жирных кислот в супернатантах обнаружил интересную дихотомию в двух штаммах: MRx0005 продуцировали главным образом уксусную и пропановую кислоту, в то время как MRx0029 продуцировал бутановую, пентановую и гексановую кислоту, при этом оба в линейной и разветвленной формах (фиг. 14B). Эти оба штамма значительно различались и, в частности, продуцирование 4-гидроксифенилуксусной кислоты MRx0005 и MRx0029 соответственно было примечательным (фиг. 14A). Кроме того, MRx0005, по-видимому, продуцирует больше C2 и C3 короткоцепочечных жирных кислот, в то время как MRx0029 продуцировал больше C4 (бутират) и как линейные, так и разветвленные среднецепочечные жирные кислоты, в том числе гексановую кислоту.

Янтарная кислота представляет собой метаболит цикла Кребса, участвующий в окислительном фосфорилировании. Комплекс окислительного фосфорилирования представляет собой основной этап синаптической передачи белков и везикул в проксимальные и дистальные участки (Budd S.L. and Nichols,

1998). Нарушение его функционирования было описано при нейродегенеративных нарушениях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и спиноцеребеллярной атаксии 1 типа (Manczak M. et al. 2004; Ebadi et al., 2001). Указанные результаты являются особенно интересными, поскольку янтарная кислота может приводить к усилению митохондриальной активности и поддерживать восприимчивые нейроны при нейродегенеративном заболевании, связанном с неправильной укладкой белков, в том числе PD (Ferroet al., Plos one, 2017). Как BDNF, так и янтарная кислота имеют аналогичную защитную активность не только при нейродегенерации, но также и при психических расстройствах, таких как депрессия и тревожность, которые являются довольно распространенными среди пациентов, диагностированных PD или AD.

На фиг. 14В также продемонстрировано, что MRX0029 представляет собой продуцент бутирата (бутановой кислоты). Это может иметь больше значение, поскольку бутират имеет известную роль в снижении непроницаемости гематоэнцефалического барьера, что оказывает нейропротекторный эффект [59]. Указанное свойство MRX0029 (и других нейропротекторных бактерий) может способствовать его эффективности.

Пример 11. Модулирование экспрессии мРНК белков плотных контактов.

Поскольку последние данные свидетельствуют о том, что нарушение функционирования и воспаление кишечника представляет собой недвигательный симптом, ассоциированный с PD, изучали способность бактериальных штаммов по данному изобретению вызывать любое нарушение функции кишечного барьера. Монослой эпителиальных муцин-продуцирующих клеток HT29-mtx (Gagnon et al., J. Microbiological Methods, 2013) использовали в качестве модели *in vitro* для оценки повреждения кишечного барьера и иммуностимуляции после обработки MRX0005 и MRX0029. Дифференцированные клетки HT29-mtx, подверженные воздействию форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA), секретировали значительное количество IL-8; в отличие от этого, обработка в течение 24 ч бактериальными супернатантами MRX0005 и MRX0029 приводила к индукции даже более секреции IL-8 по сравнению с необработанными клетками и клетками, обработанными YCFA (фиг. 14А).

Изучали способность MRX0005 и MRX0029 регулировать проницаемость эпителия в результате модификации внутриклеточной передачи сигнала включала в себя экспрессию и локализацию белков, участвующих в образовании кишечного барьера.

РНК выделяли и количественный анализ RT-PCR (qRT-PCR) выполняли для характеристики изменений экспрессии генов белков плотных контактов во время инкубации с MRX0005 и MRX0029. Введение MRX0029 приводило к повышению экспрессии мРНК окклюдина, виллина, белка плотных контактов 1 и 2 (соответственно TJP1 и TJP2) через 2 ч после инкубации (фиг. 14В). В отличие от этого воздействие MRX0005 не приводило к изменению экспрессии генов белков плотных контактов, указывая на то, что указанные два штамма функционируют различным образом на кишечный барьер.

Результаты *in vitro* сравнивали с данными из параллельного анализа *ex vivo* в отношении кишечника мышей, получавших в пищу MRX0005 и MRX0029. Экспрессию генов TJP2 и окклюдина количественно оценивали в толстой кишке и подвздошной кишке. Данные *ex vivo* точно отражают данные *in vitro*, поскольку MRX0029 был способен значимо повысить активность TJP1 и окклюдина ($p=0,073$) в участке толстой кишки в кишечнике мыши (фиг. 14С+14D). MRX0029 также был способен снижать функцию проницаемости в толстой кишке тех же самых мышей (фиг. 14Е+14F).

Материалы и способы - экстракция РНК и анализ qPCR.

Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора RNeasy (Qiagen, Манчестер, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя, и концентрацию РНК определяли с помощью поглощения при 260/280 нм с использованием спектрофотометра (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Вилмингтон, Делавер). В случае анализа экспрессии мРНК кДНК получали из 2000 нг суммарной РНК с помощью высокопроизводительного набора для обратной транскрипции (Thermo Fisher, Лафборо) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции обратной транскрипции выполняли в термоциклере (Biometra, Германия) при 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 120 мин и 85°C в течение 5 мин. Полученную в результате кДНК амплифицировали в двух повторах с помощью ПНР-анализа SYBR-Green, а продукты выявляли на приборе осуществления ПНР в реальном времени QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Великобритания) с помощью стандартизированного профиля (исходная денатурация при 95°C в течение 10 мин, с последующими 40 циклами по 10 с денатурации при 95°C и 30 с отжига/удлинения при 60°C). Стадию диссоциации добавляли через 40 циклов с целью получения кривой плавления. Анализ выполняли с помощью программного обеспечения для ПЦР в реальном времени Applied Biosystems QuantStudio v1.2. Праймерные последовательности актина, виллина, окклюдина, TJP1 и TJP2 предложены в перечне последовательностей.

Пример 12. Уровень секреции BDNF в клетках SHSY-5Y.

Предпосылки.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) представляет собой универсальную молекулу в головном мозге, ассоциированную с развитием нейронов, нейропротекцией и нейродегенерацией. BDNF не только приводит к защите от нейродегенерации, но также и психических расстройств, таких как де-

прессия и тревожность, которые довольно распространены среди пациентов, диагностированных PD или AD.

Способы.

SH-SY5-SY высевали в 24-луночных планшетах с плотностью 60000 клеток/лунка и помещали в инкубатор. Через 24 ч среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты.

Среду для дифференцировки заменяли через день и клетки собирали на день 10 дифференцировки. В случае обработки среду для дифференцировки удаляли и заменяли 450 мкл полной средой для выращивания клеток и 50 мкл бактерий SN добавляли к обработанным лункам или YCFA+ добавляли в качестве отрицательного контроля.

Результаты.

Результаты продемонстрированы на фиг. 15, на которой показано, что введение MRX0005 в комбинации с ретиноевой кислотой приводит к повышению секреции BDNF из дифференцированных клеток нейробластомы.

Пример 13. Эффективность бактериального инокулята в снижении окислительных уровней в клетках.

Предпосылки.

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

Материалы и методы.

Бактериальный штамм *Megasphaera massiliensis* MRX0029.

Способ.

Клетки SHSY-5Y высевали в черном плоскодонном 96-луночном планшете с плотностью 5000 клеток/лунка и помещали в инкубатор CO₂. Через 24 ч среду заменяли средой для дифференцировки (среда для выращивания клеток, содержащая 1% FBS) и 10 мкМ ретиноевой кислоты. Среду для дифференцировки заменяли через день. На день 10 среду для дифференцировки заменяли и клетки промывали предварительно подогретым PBS и окрашивали 10 мкМ молекулярным зондом DCFDA в течение 20 мин в среде для выращивания клеток, содержащей 1% FBS. Затем клетки повторно промывали предварительно подогретым PBS и обрабатывали 100 мкМ ТВНР в присутствии или в отсутствие 10% бактериального супернатанта в течение 2 ч. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью планшет-ридера TECAN при Ex/Em 485/530 нм.

Результаты.

Результаты указанных экспериментов продемонстрированы на фиг. 16. На фиг. 16b продемонстрировано, что MRX0005 способен ингибировать продуцирование ROS в дифференцированных клетках нейробластомы SHSY-5Y. MRX0005 также приводит к снижению образования ROS в клетках астроглиобластомы (фиг. 16a). Это показывает то, что MRX0005 имеет общую антиоксидантную активность.

Пример 14. Исследование стабильности.

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

Пример 15.

Способы.

Животные.

Используемые животные и схема исследования были такими же, что и в примере 10.

Бактериальные штаммы 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005), *Megasphaera massiliensis* (MRX0029).

Сбор тканей.

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

помещали в камеры Ussing для анализа кишечной проницаемости. Слепую кишку удаляли, взвешивали и хранили при -80°C для анализа SCFA.

Анализ моноаминов.

Концентрацию нейромедиаторов анализировали, как описано в примере 10.

Анализ цитокинов в селезенке.

Селезенку извлекали незамедлительно в 5 мл среды RPMI после умерщвления и незамедлительно культивировали. Клетки селезенки вначале гомогенизировали в указанной среде RPMI, затем инкубировали в течение 5 мин с 1 мл буфера для лизиса RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). Добавляли еще 10 мл среды RPMI, затем с последующим 200G центрифугированием в течение 5 мин. Затем супернатант фильтровали через 40 мкм сито. Клетки подсчитывали и высевали (4000000/мл среды). Через 2,5 ч после адаптации клетки стимулировали липополисахаридом (LPS-2 мкг/мл) или конкавалином А (ConA-2,5 мкг/мл) в течение 24 ч. После стимуляции супернатанты собирали для оценки высвобождения цитокинов с использованием набора для провоспалительной панели 1 (мышь) V-PLEX Kit (Meso Scale Discovery, Мериленд, США) в случае TNF α , IL-10, IL-1 β , интерферона γ , CXCL2 и IL6. Анализы выполняли с помощью MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S600.

Анализ экспрессии генов.

Суммарную РНК экстрагировали с помощью набора для выделения miRNA mirVana™ (Ambion/Life technologies, Пейсли, Великобритания) и обрабатывали ДНКазой (Turbo DNA-free, Ambion/life technologies) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК количественно оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Уилмингтон, Делавэр, США) в соответствии с инструкциями производителя. Качество РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent Bioanalyzer (Agilent, Стокпорт, Великобритания) в соответствии с процедурой производителя и рассчитывали число целостности РНК (RIN). РНК со значением RIN >7 использовали для последующих экспериментов. РНК обратно транскрибировали в кДНК с помощью высокопроизводительного набора кДНК Applied Biosystems (Applied Biosystems, Уоррингтон, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, обратную транскриптазу Multiscribe (50 Ед/мкл) (1)(2)(1)(10) добавляли в виде части мастер-микса при КТ, инкубировали при 25°C в течение 10 мин, при 37°C в течение 2 ч, при 85°C в течение 5 мин и хранили при 4°C . Количественную ПНР проводили с помощью зондов (6-карбоксивлуоресцеин - FAM), сконструированных Applied Biosystems для специфических целевых генов мыши, в то время как β -актин использовали в качестве эндогенного контроля. Реакционные смеси для амплификации содержали 1 мкл кДНК 5 мкл 2X мастер-микс для ПНР (Roche), 900 нМ каждого праймера и составляли в общей сложности 10 мкл при добавлении не содержащей РНКазы воды. Все реакции осуществляли в тройном повторе с помощью 96-луночных планшетов в системе LightCycler®480. Условия термоциклирования были такими, как рекомендовано производителем (Roche) для 55 циклов. Для проверки загрязнения при амплификации в каждом цикле содержались не содержащие матриц контроли в тройном повторе для каждого использованного зонда. Фиксировали значения порогового цикла (Ct). Данные нормализовали с помощью β -актина и преобразовывали с помощью способа 2- $\Delta\Delta\text{CT}$ и представляли в виде кратного изменения по сравнению с контрольной группой.

Анализ короткоцепочечных жирных кислот в содержимом слепой кишки.

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

Статистический анализ.

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

Результаты - продуцирование нейромедиаторов.

Результаты на фиг. 17 демонстрируют влияние обработки MRx005 на концентрацию нейромедиаторов в головном мозге мышей. Наиболее примечательно, что обработка MRx005 приводит к снижению дофамина.

Результаты - экспрессия генов.

Экспрессию генов рецепторов нейромедиаторов [серотониновый рецептор 1a(5-HT1a), дофаминовый рецептор D1, субъединица B1 рецептора GABA, рецептор GABAA, рецептор NMDA2A (Grin2A) и NMDA2B (Grin2b)], маркеров воспаления [IL-1 β , IL6, CD11b, TNF α и TLR4] и эндокринных маркеров [кортикостерон-релизинг фактора (CRF), кортикостерон-релизинг фактора 1 и 2 (CRFR1, CRFR2), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), рецептора вазопрессина, рецептора окситоцина, глюкокортикоидного рецептора и минералокортикоидного рецептора] анализировали в ткани головного мозга из гиппокампа, миндалина и префронтальной коры.

На фиг. 18-32 продемонстрированы изменения экспрессии генов после обработки MRX005 или MRX0029 в области гиппокампа, миндалина и префронтальной коры. Обработка MRX0029 приводила к повышению экспрессии глюкокортикоидного рецептора в миндалине (фиг. 25C). На фиг. 26A продемонстрировано, что MRX005 приводил к значимому повышению экспрессии BDNF в миндалине, в то время как обработка MRX0029 приводила к значимому повышению экспрессии TLR4 в миндалине (фиг. 26B).

Как MRX005, так и MRX0029 могут приводить к повышению экспрессии CD11b в миндалине (фиг. 27A), в то время как экспрессия IL-6, Grin2a и Grin2b снижается после обработки MRX005 (фиг. 27B-D). Кроме того, MRX005 и MRX0029 приводили к значимому повышению экспрессии GABRA2 и повышению экспрессию GABBR1 в миндалине.

Обработка MRX005 приводила к значимому повышению экспрессии BDNF в префронтальной коре (фиг. 29B).

Обсуждение.

Введение MRX005 и MRX0029 вызывало изменения экспрессии генов, особенно в миндалине.

Результаты - влияние на экспрессию Trp1 и IDO-1.

На фиг. 33 продемонстрировано, что MRX0029 может приводить к значимому повышению экспрессии триптофангидроксилазы-1 (Trp1) в толстой кишке, а обработка MRX005 может приводить к повышению экспрессии IDO-1 в толстой кишке. Обработка MRX005 приводила к повышению экспрессии Trp1 и IDO-1 в подвздошной кишке, в то время как MRX029 не оказывал никакого эффекта на экспрессию указанных генов в подвздошной кишке (фиг. 34).

Индоламинпиррол-2,3-диоксигеназа-1 (IDO-1) представляет собой первый и ограничивающий скорость фермент в пути триптофан/кинуренин, в то время как триптофангидроксилаза 1 (Trp1), изоформа фермента триптофангидролазы, отвечает за синтез серотонина. Указанные данные свидетельствуют о том, что MRX0029 и MRX005 могут влиять на уровни серотонина и путь триптофан/кинуренин.

Результаты - влияние на уровни метаболита триптофана.

На фиг. 35 продемонстрировано влияние обработки MRX005 на уровни циркулирующего кинуренина и триптофана.

Результаты - влияние на экспрессию цитокинов из спленоцитов.

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

MRX005 приводил к значимому снижению уровней интерферона γ в спленоцитах после воздействия LPS (фиг. 36). Кроме того, MRX005 приводил к значимому снижению уровней интерлейкина 6 и фактора некроза опухоли после воздействия LPS (фиг. 38 и 39 соответственно). Обработка MRX0029 приводила к снижению интерферона γ , интерлейкина 1 β и интерлейкина 6 после воздействия LPS (фиг. 36, 37 и 38 соответственно).

Обработка MRX005 и MRX0029 приводила к повышению уровней хемоаттрактанта CXCL1 (фиг. 41).

Результаты - влияние на уровни короткоцепочечных жирных кислот в слепой кишке.

Короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA) продуцировались, если трудноусваиваемые волокна из пищи сбразивались бактериями в кишечнике. Результаты введения MRX005 продемонстрированы на фиг. 42.

Пример 16. Дополнительный анализ индуцированных MRX029 и MRX005 изменений уровней экспрессии генов.

Способы.

Клеточная линия.

Клетки SH-SY5Y.

Бактериальные штаммы 755: *Parabacteroides distasonis* (MRX005), *Megasphaera massiliensis* (MRX0029).

qPCR.

SH-SY5Y высевали в 10 см чашки Петри с плотностью 2×10^6 клеток. Через 24 ч клетки обрабатывали средой для дифференцировки (среда для дифференцировки, содержащая 1% FBS без RA) с 10% бактериальными супернатантами или YCFA+, 10 мкМ RA, 200 мкМ гексановой кислоты или 200 мкМ вальпроевой кислоты в течение 17 ч. Затем были получены иллюстративные изображения с помощью фазо-

во-контрастного микроскопа EVOS XL при увеличении 40X/0,65. Клетки собирали и суммарную РНК выделяли в соответствии с протоколом для мининабора RNeasy (Qiagen). кДНК получали с помощью высокоэффективного набора для обратной транскрипции кДНК (Applied Biosystems). Экспрессию генов измеряли с помощью qPCR. GAPDH использовали в качестве внутреннего контроля. Кратность изменения рассчитывали в соответствии со способом $2^{(-\Delta\Delta ct)}$. Праймерные последовательности MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE предложены в перечне последовательностей.

Иммуномечение и визуализация клеток.

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

Иммуноблоттинг.

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

Результаты и обсуждение.

Экспрессия генов.

На фиг. 43 продемонстрированы индуцированные MRx0029 и MRX005 изменения уровней экспрессии актина, виллина, окклюдина, TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 и NSE.

Результаты - микроскопия и иммуноблоттинг.

На фиг. 44 продемонстрировано изменение уровня экспрессии MAP2 в клетках SHSY5Y, определенное с помощью конфокальной микроскопии. Уровни экспрессии MAP2 и β 3-тубулина также количественно оценивали с помощью иммуноблоттинга. Результаты, продемонстрированные на фиг. 44M и N, свидетельствуют о том, что MRX029 приводит к индукции повышения уровня экспрессии MAP2.

Последовательности.

Дополнительные праймеры, используемые в qPCR (с SEQ ID NO в скобках)		
ID гена	Прямая последовательность	Обратная последовательность
NSE	CCSTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATTT (34)	CTGTGCGCCCAGATTACCT (35)
SYP	STCGGCTTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTTCA (37)

Последовательности.

SEQ ID NO: 1 (ген *Parabacteroides distasonis* 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 5825 - AB238922)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcgggg ttagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgctatgac
 121 aactgccta tcagaggggg ataaccggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
 181 gatcccgcat gggaaatatt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttcatt
 241 aggcagttgg cgggtaacg gccaccaaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
 301 gtccccaca ttgtactga gacacggacc aaactctac gggaggcagc agtgaggaat
 361 attggtcaat gggcgtaac ctgaaccagc caagtcgctg gagggatgaa ggttctatgg
 421 atcgtaaacc tctttataa ggaataaag tgcgggagct gtccccgttt gtatgtacct
 481 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcca gcagccgagg taatacggag gatccgagcg
 541 ttatccggat ttattgggtt taaagggtgc gtaggcggcc tttaagtca cgggtgaaag
 601 tctgtggctc aaccatagaa ttgccgtga aactgggggg cttgagtatg ttgaggcag
 661 gcggaatgcg tgggtgagcg gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag
 721 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta
 781 gataccctgg tagtccagc agtaaacgat gatcactagc tgtttcgat aactgtaag
 841 cggcacagcg aaagcgttaa gtgatccacc tggggagtag cccggcaacg gtgaaactca
 901 aaggaattga cggggggccc cacaagcggg ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg
 961 aggaacctta cccgggttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat
 1021 agccgtttgc gaggtgctgc atgggtgctg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
 1081 tgccataacg agcgaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt
 1141 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaaggc ggggatgacg tcaaatcagc acggccctta
 1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaaag ggaggccacc tggcgacagg
 1261 gagcgaatcc ccaaaccagc tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccgca ctccgtgaag
 1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt
 1381 acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtagctga agtccgtaac cgaagggatc
 1441 ggcttagggt aaaactgggt actggggcta agtcgtaaca aggtaacc

SEQ ID NO: 2 (ген *Parabacteroides distasonis* 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13400 - AB238923)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag ttagcaatac cgggtggcga ccggcgacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgatgg ggatattgca taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt gttactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc tttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgtttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgtgaaa ctggggggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgctg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgca ttcggaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctgcta gtccacgag taaacgatga tcactagctg tttcgatc agtgaagcg
 841 gcacagcga agcgttaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg gggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgt gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcggg ccgaggtgga aacaccttt ctagcaatag
 1021 ccgtttcgca ggtgctgcat ggtgtgctg agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagt actaacaggt aaagctgagg actctggtg

1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aatcagcac ggccttaca
 1201 tccggggcga cacactgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccactg gcgacagga
 1261 gcgaatcccc aaaccagtc tcagttcga tcggagtctg caaccgact cctgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttccc ggccttgatc
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 ctagggtaa aactggtgac tgggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 3 (ген Parabacteroides distasonis 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13401 - AB238924)

1 agagttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgcggcga cggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttcctatc agaggggat aaccggcga aagtcggact aataccgat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatattgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagca agtcgctga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaacctc tttataagg gaataaagtg tgggacgtg cctgtttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcgctaact cctgcccagc agcccggtg ataccgagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggtta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgtgaaa ctgggaggct tgagtatgt tgaggcaggc
 661 ggaatgctg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccgca ttgcaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggtg gtccagcag taaacgatga tcactagctg ttgctgatac actgtaagcg
 841 gcacagcga agcgtaagt gatccactg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaa
 901 ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtgtt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaacctacc cgggttgaa cgcattcga cggaggtgga aacacctt tagcaatag
 1021 cgtttgca ggtgctgcat ggtgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcctaagt
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagt actaacagg gtgctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aatcagcac ggccttaca
 1201 tccggggcga cacactgtt acaatggcgt ggacaaaggg atgcccactg gcgacagga
 1261 gcgaatcccc aaaccagtc tcagttcga tcggagtctg caaccgact cctgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttccc ggccttgatc
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 ctagggtaa aactggtgac tgggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 4 (ген Parabacteroides distasonis 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13402 - AB238925)

1 agagttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga cggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agaggggat aaccggcga aagtcggact aataccgat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatattgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt

301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc tttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgtttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg ataccggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagt
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgtgaaa ctgggaggct tgagtatgt tgaggcaggc
 661 ggaatgctg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatacgc agaacccca ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatg acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggtg gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcga agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaa
 901 ggaattgacg ggggcccgc caagcggagg aacatgtgtt ttaattcgt gatacgcgag
 961 gaaacttacc cgggtttgaa cgcattcggg cagaggtgga aacaccttt ctagcaatag
 1021 ccgtttcgca ggtgctgcat ggtgtcgtc agctcgtcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacactgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacagggg
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttccc ggcctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 ctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 5 (ген Parabacteroides distasonis 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13403 - AB238926)

1 agagttgat cctggctcag gatgaacgct agccagcaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgatgg ggatattgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc tttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgtttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg ataccggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagt
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgtgaaa ctgggaggct tgagtatgt tgaggcaggc
 661 ggaatgctg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatacgc agaacccca ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatg acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggtg gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcga agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaa
 901 ggaattgacg ggggcccgc caagcggagg aacatgtgtt ttaattcgt gatacgcgag
 961 gaaacttacc cgggtttgaa cgcattcggg cagaggtgga aacaccttt ctagcaatag
 1021 ccgtttcgca ggtgctgcat ggtgtcgtc agctcgtcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacactgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacagggg
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttccc ggcctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 ctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 6 (ген Parabacteroides distasonis 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13404 - AB238927)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga cggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatattgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaataf
 361 tggatcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaacctc tttataagg gaataaagtg tgggacgtg cccgtttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggtaact ccgtgccagc agccgggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt atgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgctg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccccgga ttgcaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 tacctgcta gtcacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccactg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaa
 901 ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaacctacc cgggtttgaa cgcattcga cagaggtgga aacaccttt ctgcaatag
 1021 ccgtttcga ggtgtgcat ggtgtcgtc agctcgtcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccaaacgag cgcaaccctt gccactagt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactccagc gtaagctgc aggaaggcgg ggatgacgtc aatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaagggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatccc aaaccacgtc tcagttcga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgtcccc ggccctgtac
 1381 acaccgccc taaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 7 (ген Parabacteroides merdae 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 9497 - AB238928)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgct
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgtaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc

241 cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaacgcagc atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag
 361 gaatattggt caatggccga gaggctgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aactctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt tttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttggt gctcaacat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctgtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaagcg ttaagtaac cacctgggga gtacccggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtgaaaca ctcttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtccat aacgagcga accctatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga agtggggat gacgtcaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctcaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcatca gccatggcgc ggtgaatac tcccgggccc
 1381 ttgtacacac cggccgtcaa gccatgggag cgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag
 1441 gatcggccta ggttaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO: 8 (ген Parabacteroides merdae 16S рибосомальной РНК, частичная последовательность, штамм: JCM 13405 - AB238929)

1 agagtttgat cctgctcag gatgaacgct agcgcagggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagca tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggtagacc cggcgaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggttcc gcatgggaat atttgttaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaacgcagc atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag
 361 gaatattggt caatggccga gaggctgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aactctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt tttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttggt gctcaacat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctgtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaagcg ttaagtaac cacctgggga gtacccggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtgaaaca ctcttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtccat aacgagcga accctatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga agtggggat gacgtcaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctcaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcatca gccatggcgc ggtgaatac tcccgggccc
 1381 ttgtacacac cggccgtcaa gccatgggag cgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag
 1441 gatcggccta ggttaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO: 9 (консенсусная последовательность 16S рPHK штамма *Parabacteroides distasonis* 755)

AMCCGGGTGGCGACCGGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCTAT
CAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAGTCGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCC
GCATGGGAATATTTGCTAAAGATTCATCGCTGATAGATAGGCATGCGTTCCATTAGG
CAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAA
GGTCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGA
GGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACCAGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAG
GTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCGGGACGTGTCCCCTT
TTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTTAAAGGGTGCCTAGGCGGCCTT
TTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAGAATTGCCGTTGAAACTGGGA
GGCTTGAGTATGTTTGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGA
TATCACGCAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGAT
GCACGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAA
CGATGATCACTAGCTGTTTTCGATACACTGTAAGCGGCACAGCGAAAGCGTTAAGT
GATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCG
CGCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCG
GGTTTGAACGCATTCGGACMGAKGTGGAAACACATTTTCTAGCAATAGCCATTTGC
GAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATA
ACGAGCGCAACCCTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAGCTGAGGACTCTGGTGGG
ACTGCCAGCGTAAGCTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTT
ACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGGACAAAGGGAAGCCACCTGGCG
ACAGGGAGCGAATCCCCAAACCACGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
TCCGTGAAGCTGGATTGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTC
CGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAAACCTGGTGACTGGGGCTAAGTCGTACGG
GG

SEQ ID NO: 10 (геномная последовательность штамма 755) - см. электронный перечень последовательностей.

SEQ ID NO: 11 (консенсусная последовательность 16S рPHK штамма *Megasphaera massiliensis* MRX0029)

TGAGAAGCTTGCTTCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACGCGTA
 AGCAACCTGCCCTTCAGATGGGGACAACAGCTGGAACGGCTGCTAATACCGAATA
 CGTTCTTTCCGCCGCATGACGGGAAGAAGAAAGGGAGGCCTTCGGGCTTTTCGCTGG
 AGGAGGGGCTTGCCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGAC
 GATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCA
 GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAACGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTGTTATATGGGAC
 GAACAGGACATCGGTTAATACCCGGTGTCTTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCAC
 GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCCGCATCGCAAGTCGGTCTTAAAAGTGCGGG
 GCTTAACCCCGTGAGGGGACCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTCCGAGAGGAAAGCG
 GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAA
 AGCGGCTTTCTGGACGACAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACG
 GGATTAGATACCCCGGTAGTCTGGCCGTAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGT
 ATCGACTCCTTCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGGC
 CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGT
 GGTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCCTTGACATTGATTGCTACGG
 AAAGAGATTTCCGGTCTTCTTCGGAAGACAAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTC
 GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCCTATCT
 TCTGTTGCCAGCACCTCGGGTGGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGACAATGCGGA
 GGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGGCTTGGGCTACACACGT
 ACTACAATGGCTCTTAATAGAGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCAAA
 AACAGAGTCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCG
 CTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACC
 GCCCGTCACACCAGAAAGTCAATTCACACCCGAAGCCGGTGAGGCAACCGCAAG

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

Название	Прямая последовательность	Обратная последовательность
АСТВ	GATCAAGATCATTGTCCTC (12)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAC (13)
ГАРДН	GGTATCGTGGAAGGACTCATG (14)	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC (15)
МАР2	СТСАГСАССГСТААСАГАГГ (16)	САТТГГСГСТТСТССТС (17)
Окклюдин	ААГАГГААТТТТГАСАСТГГ (18)	ГССАТГАСТТСТСАСТТТС (19)
ТJ1	ААГТСАСАСТГГТГАААТСС (20)	СТСТТГСТГССАААСТАТСТ (21)
ТJР2	СССТСССТГГАТСАГГАТ (22)	ГССАТСАААСТСГТССАТСА (23)
Виллин	САТТАССТГСТТАСГТТТГ (24)	АГАТГГАСАТААГАТГАГГТГ (25)

Список литературы

1. Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
2. Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
3. Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
5. Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
6. Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
9. Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
10. WO 2013/050792
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. WO2016/203220
21. Chapter 38 - Nonsteroidal anti-inflammatory drugs exposure and the central nervous system (2014) *Handbook of Clinical Neurology* 119, 577-584
22. Sakamoto and Benno (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 7):1599-605.
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. Pal R *et al.* *Neurol Res* 2016, 38(12):1111-1122
26. Daniele SG *et al.* *Sci Signal* 2015, 8(376):ra45
27. Wang *et al.* (2016) *J Neurogastroenterol Motil* 22: 589-605.
28. Foguem & Manckoundia (2018) *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18: 24
29. Ludolph *et al.* (2009) *Eur J Neurol.* 16(3): 297-309.
30. Galpern & Lang (2006) *Neurological Progress* 59 (3) 449-458
31. Zadori *et al.* (2012) *Journal of Neural Transmission*, 119, 2, 275-283
32. Lee *et al.* (2008) *European J. Cell Biology* 87:389-397
33. Pirooznia and Elefant (2013) *Front Cell Neurosci.* 7: 30.
34. Tang, *et al.* (2017) *J Am Heart Assoc*, 6(10).
35. Wang *et al.* (2015) *PNAS* 112(9):2583-2858
36. Psaty *et al.* (2003) *JAMA*, 289(19):2534-44
37. *Lancet.* (1995) 346(8991-8992):1647-53
38. Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
40. Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
41. Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
42. Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
43. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
44. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
45. US 2016/0067188
46. *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
48. Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
49. Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 20th edition, ISBN: 0683306472.
50. *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
56. *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
57. *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
58. Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
59. Michel and Prat (2016) *Ann Transl Med.* 4(1): 15.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Parabacteroides*, для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцеребеллярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

2. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанная композиция предназначена для лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

3. Применение композиции по п.1 или 2, отличающееся тем, что указанная композиция предназначена для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, наступающего в раннем возрасте.

4. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная композиция предназначена для предупреждения или задержки начала или прогрессирования нейродегенеративного заболевания.

5. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм представляет собой *Parabacteroides distasonis*.

6. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична последовательности 16s рРНК бактериального штамма *Parabacteroides distasonis*.

7. Применение композиции по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9.

8. Применение композиции по п.7, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, которая по меньшей мере на 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9% идентична SEQ ID NO: 9, или отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм имеет последовательность 16s рРНК, представленную SEQ ID NO: 9.

9. Применение композиции по п.1, отличающееся тем, что указанная композиция содержит бактериальный штамм вида *Parabacteroides distasonis* для лечения или предупреждения болезни Паркинсона.

10. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная композиция предназначена для перорального введения.

11. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанная композиция содержит один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей или носителей.

12. Применение композиции по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный бактериальный штамм является лиофилизированным.

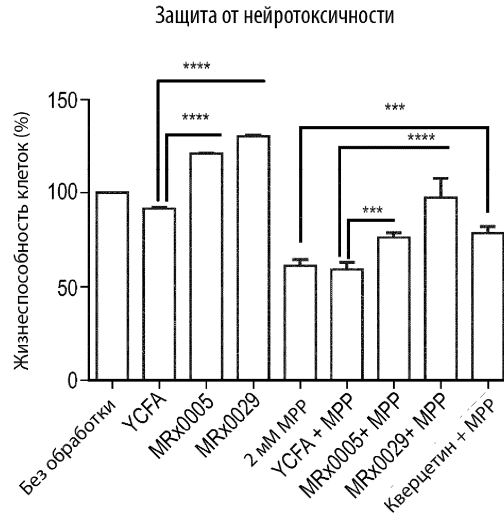
13. Применение пищевой добавки, содержащей бактериальный штамм рода *Parabacteroides*, для предупреждения нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцеребеллярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации.

14. Способ лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцеребеллярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации, включающий введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Parabacteroides*, пациенту, нуждающемуся в этом.

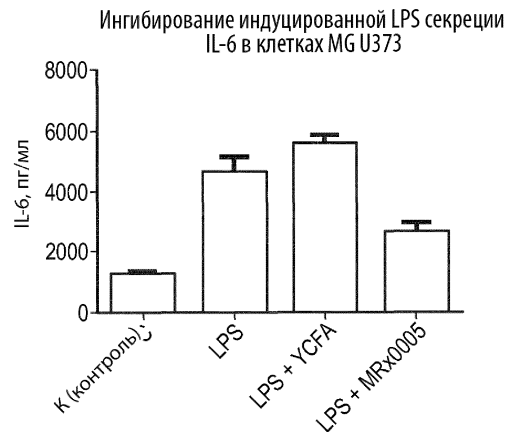
15. Применение клетки штамма *Parabacteroides distasonis*, депонированного под номером доступа

NCIMB 42382, для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, выбранного из группы, состоящей из болезни Паркинсона, в том числе прогрессирующего надъядерного паралича, синдрома Стила-Ричардсона-Ольшевского, нормотензивной гидроцефалии, сосудистого или артериосклеротического паркинсонизма и лекарственного паркинсонизма; болезни Альцгеймера, в том числе синдрома Бенсона; болезни Гентингтона; амиотрофического латерального склероза; болезни Лу Герига; заболевания двигательных нейронов; прионного заболевания; спиноцеребеллярной атаксии; спинальной мышечной атрофии; деменции, в том числе деменции с тельцами Леви, сосудистой и лобно-височной деменции; первичной прогрессирующей афазии; легкого когнитивного нарушения; ВИЧ-обусловленного когнитивного нарушения и кортикобазальной дегенерации, включающее введение композиции, содержащей бактериальный штамм рода *Parabacteroides*, пациенту, нуждающемуся в этом.

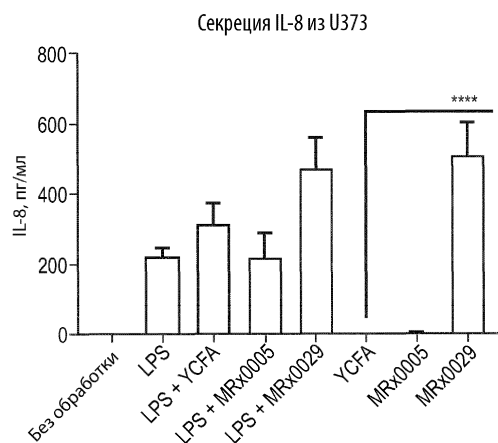
16. Клетка по п.15, отличающаяся тем, что нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Паркинсона.



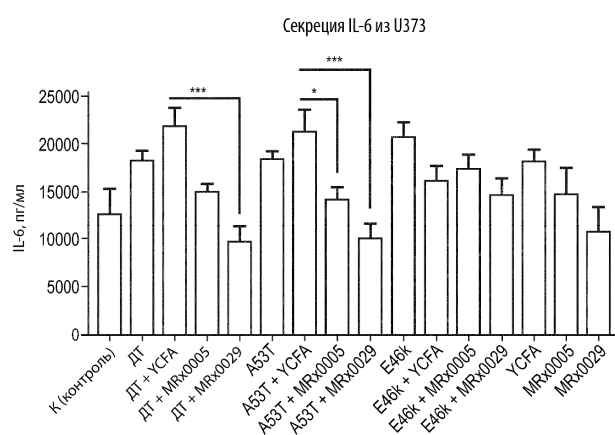
Фиг. 1



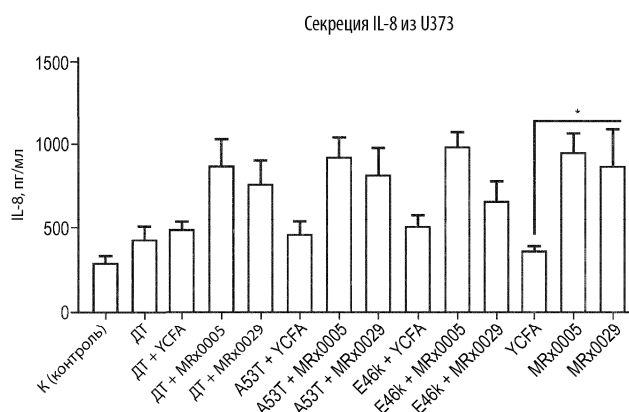
Фиг. 2А



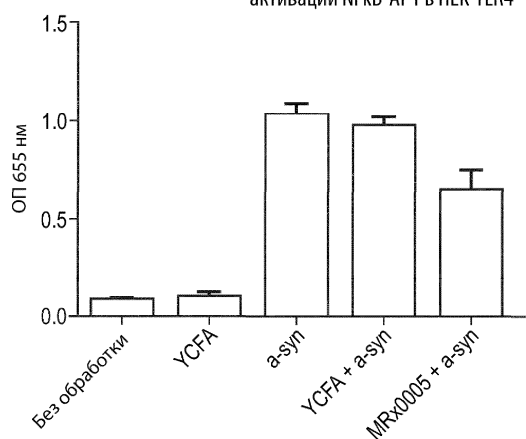
Фиг. 2В



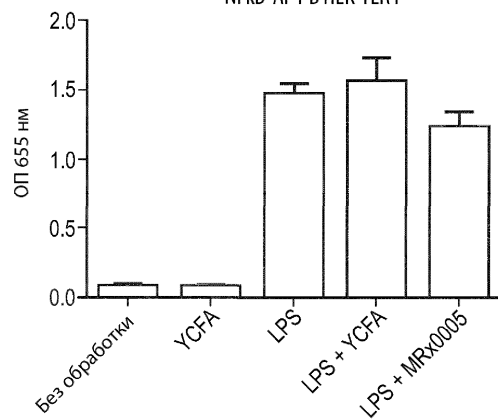
Фиг. 3А



Фиг. 3В

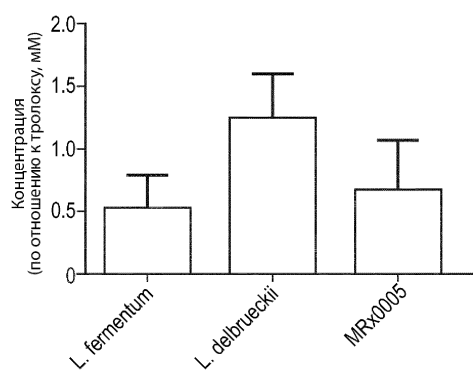
Ингибирование индуцированной α -синуклеином активации NF κ B-AP1 в HEK-TLR4

Фиг. 4

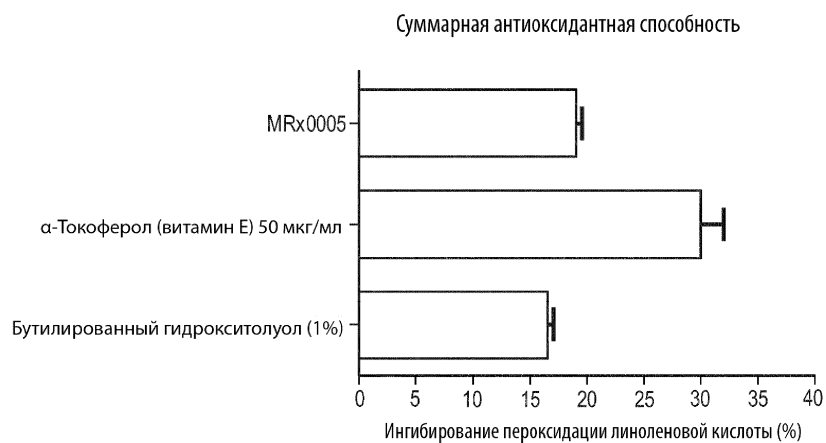
Ингибирование индуцированной LPS активации NF κ B-AP1 в HEK-TLR4

Фиг. 5

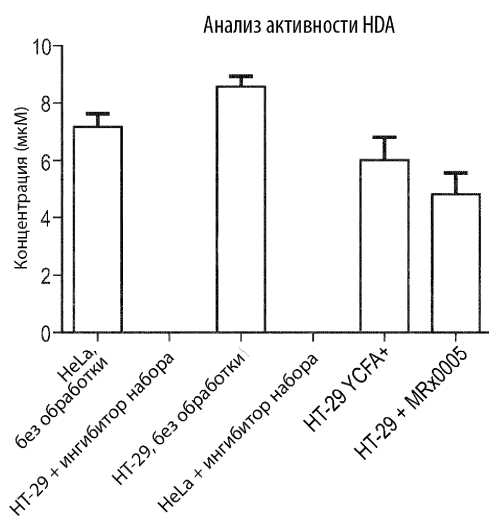
Анализ антиоксидантной способности



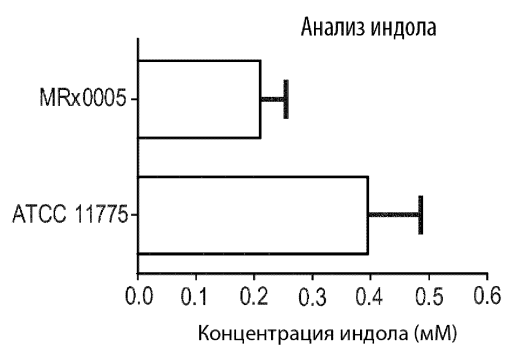
Фиг. 6



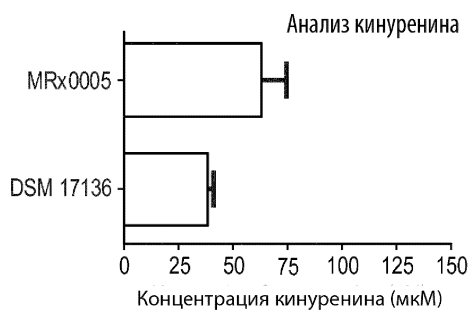
Фиг. 7



Фиг. 8

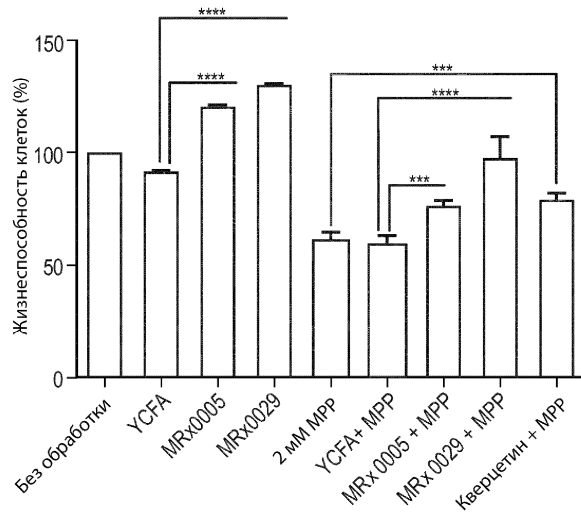


Фиг. 9



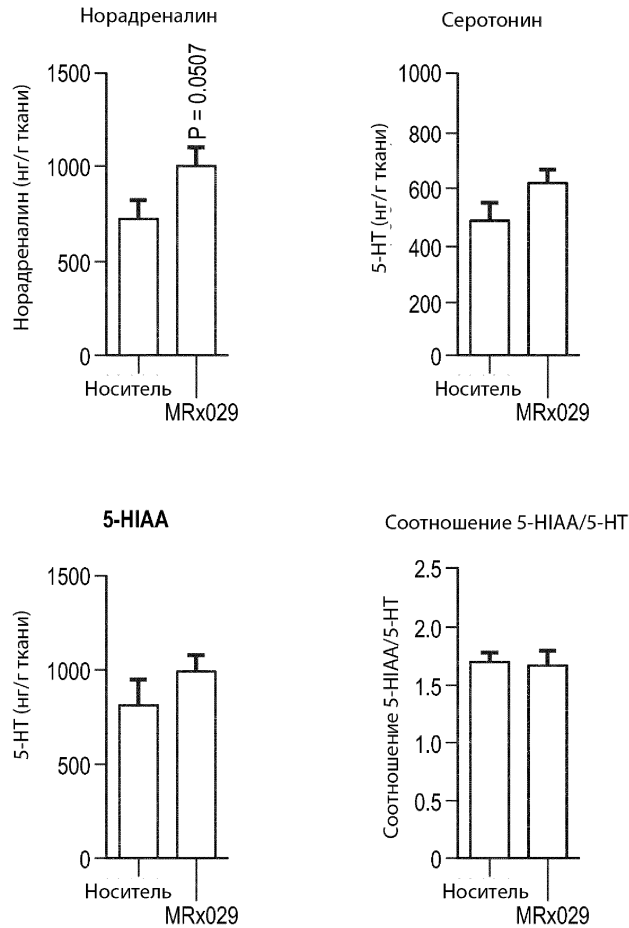
Фиг. 10

Нейропротекция – жизнеспособность клеток

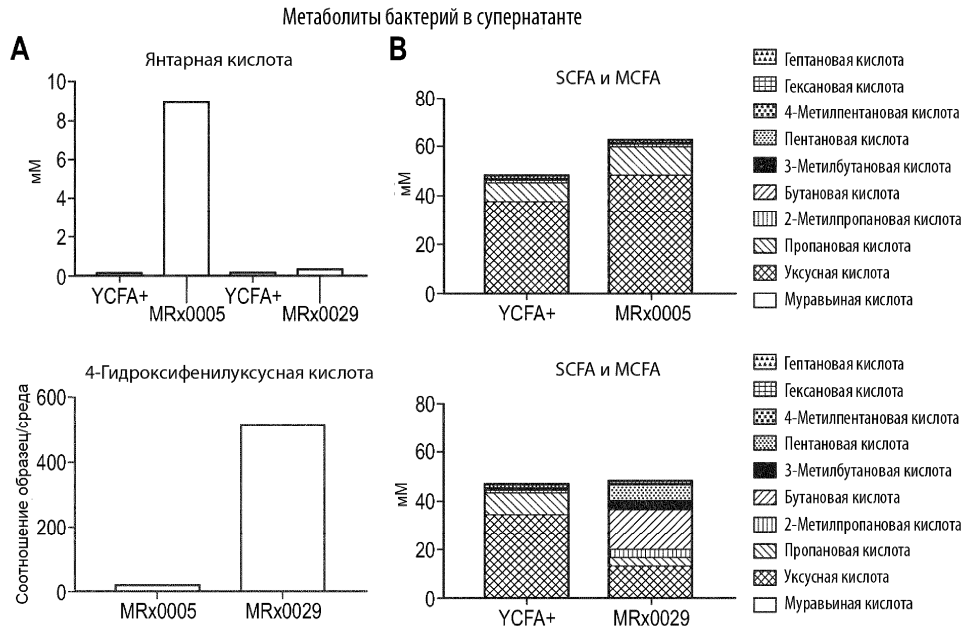


Фиг. 11

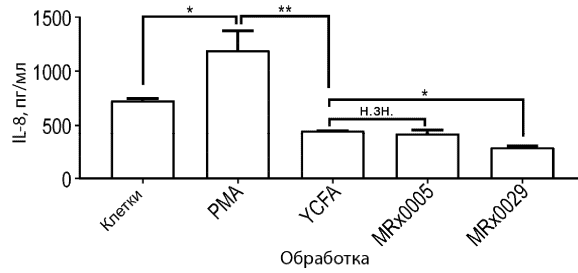
Продуцирование нейромедиаторов в головном мозге



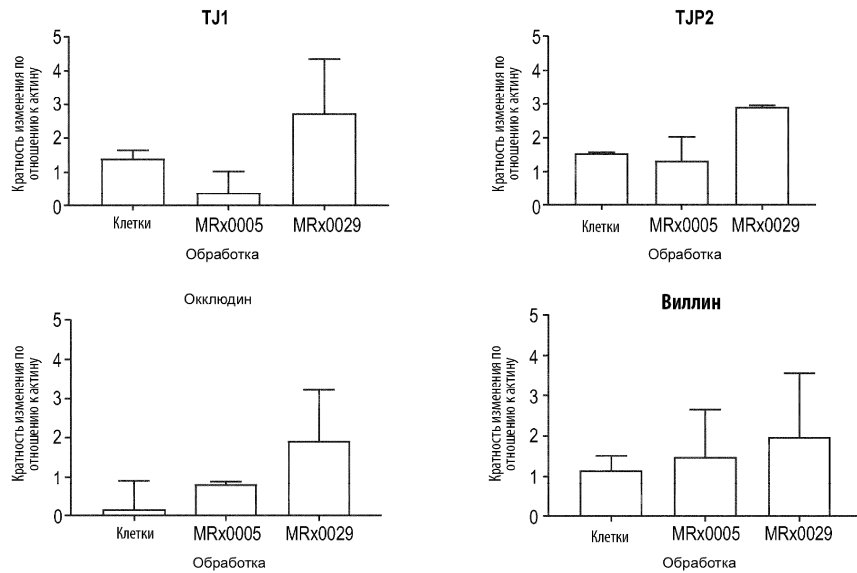
Фиг. 12



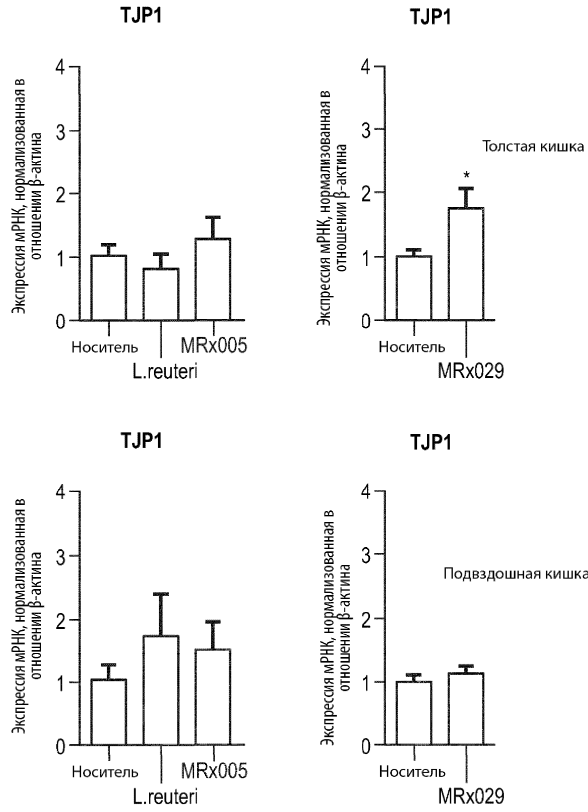
Фиг. 13



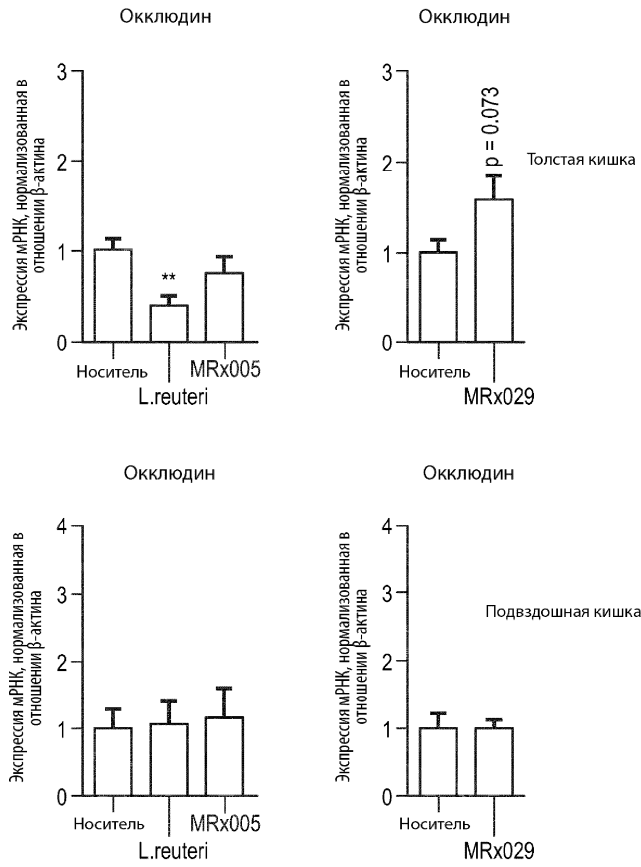
Фиг. 14А



Фиг. 14В

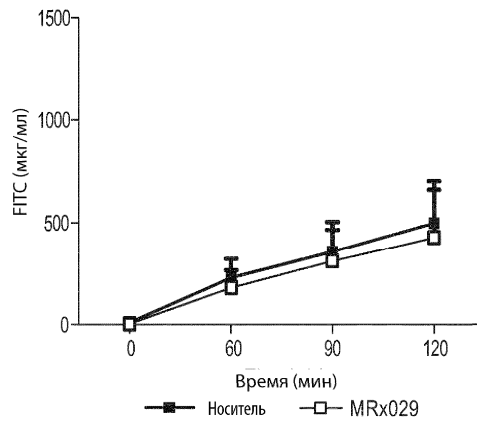
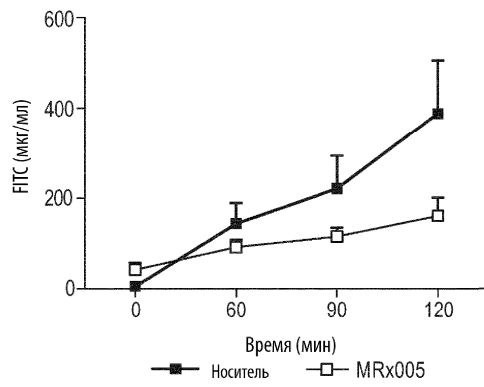


Фиг. 14С



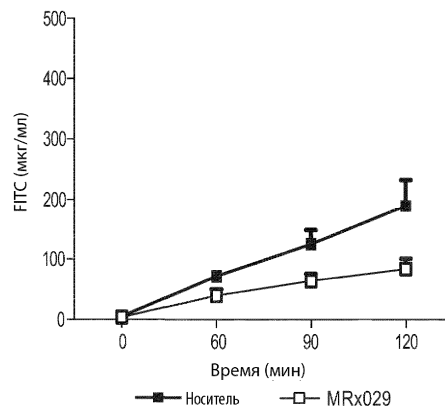
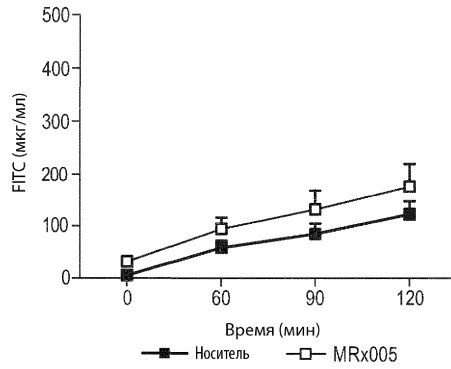
Фиг. 14D

Проницаемость в подвздошной кишке

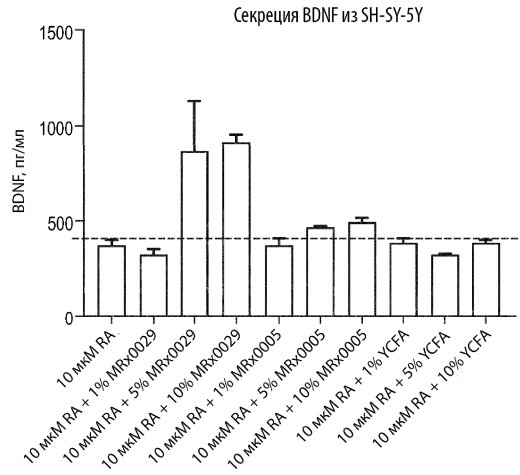


Фиг. 14Е

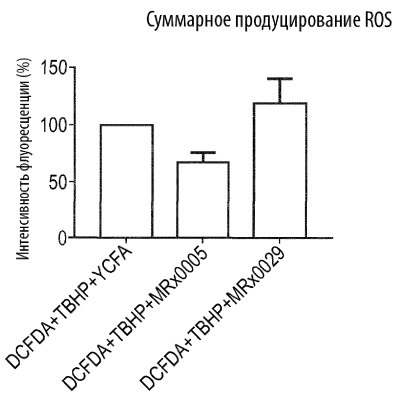
Проницаемость в толстой кишке



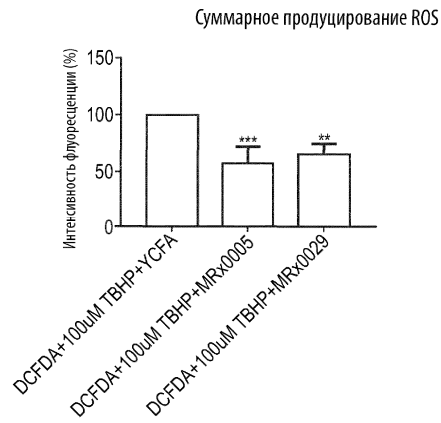
Фиг. 14F



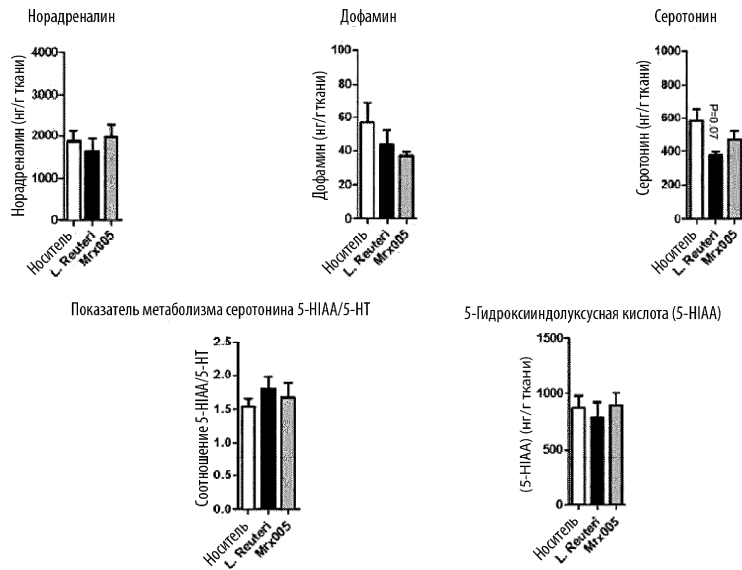
Фиг. 15



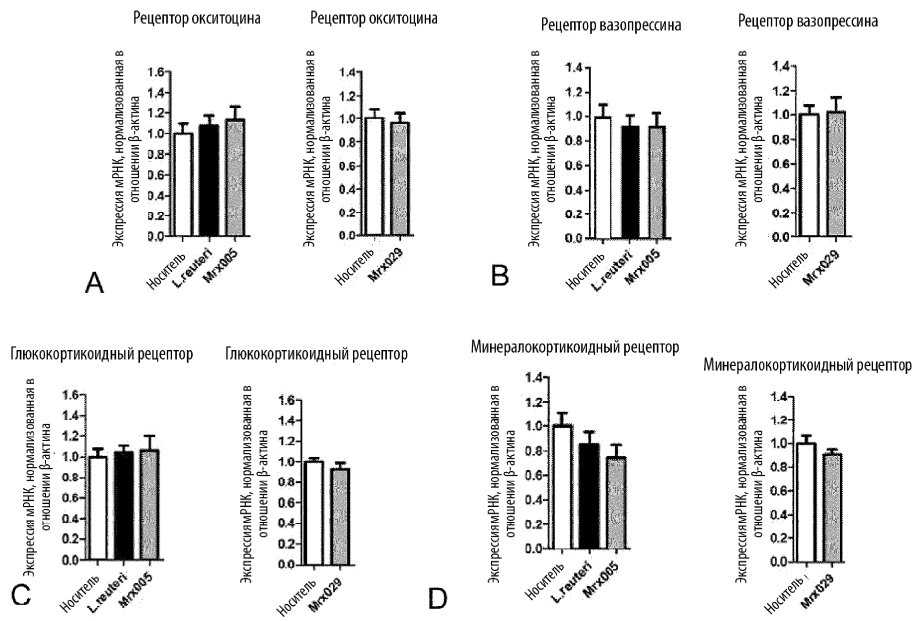
Фиг. 16А



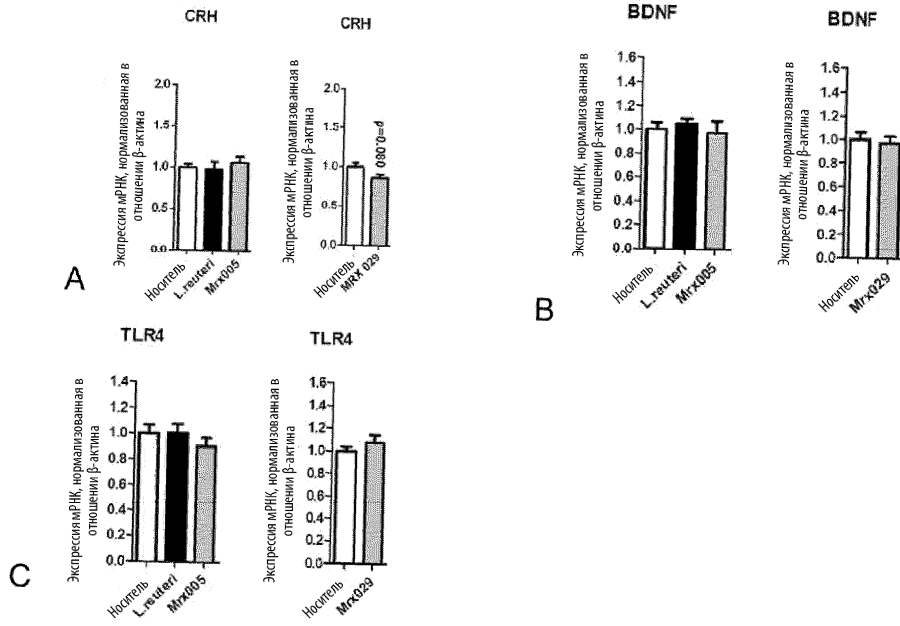
Фиг. 16В



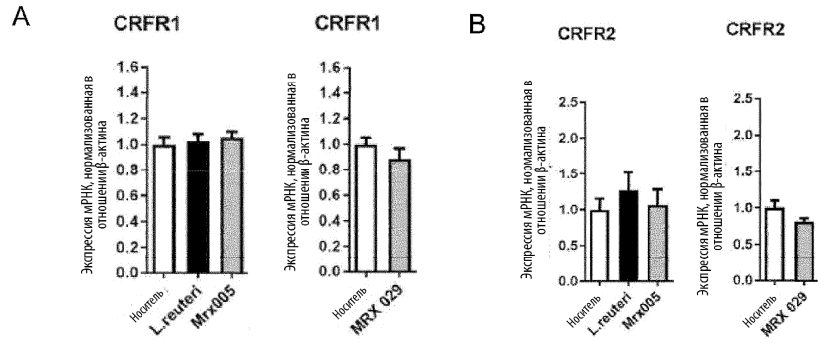
Фиг. 17



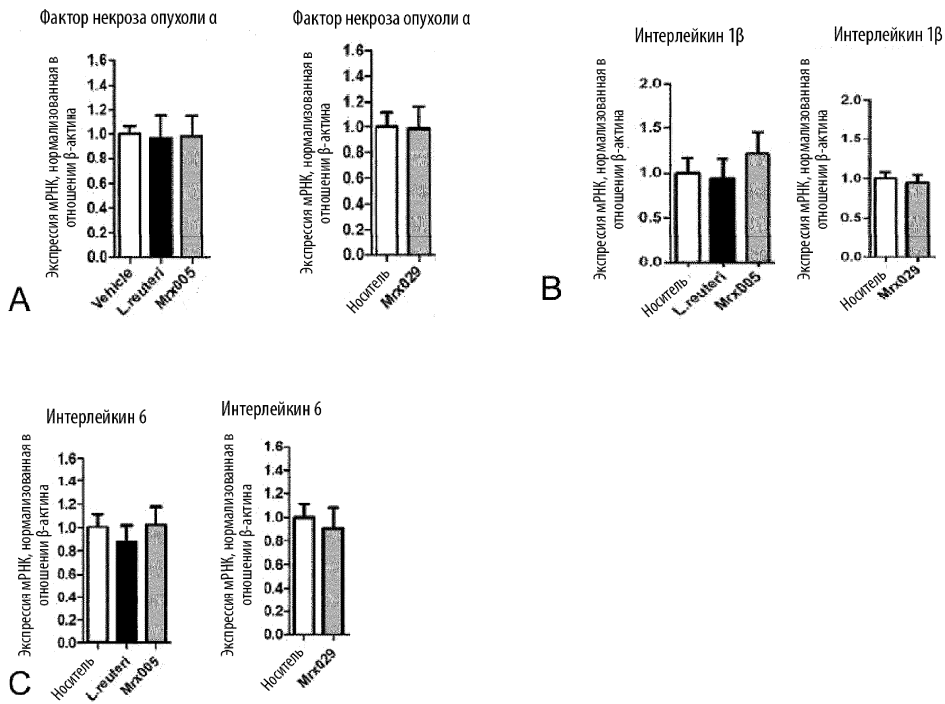
Фиг. 18



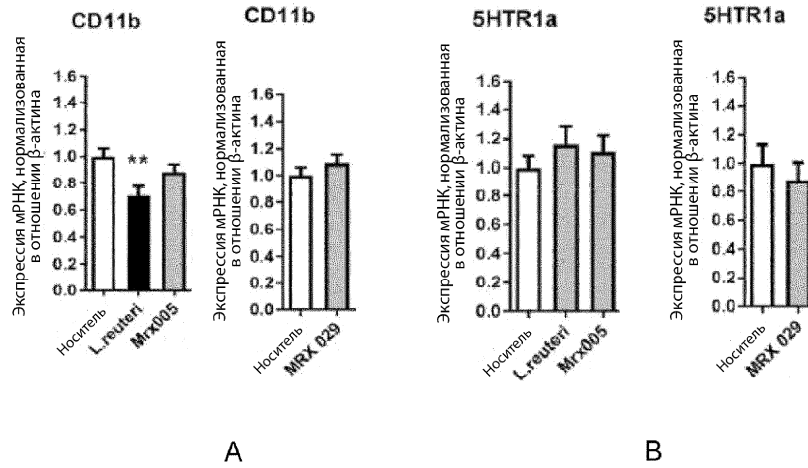
Фиг. 19



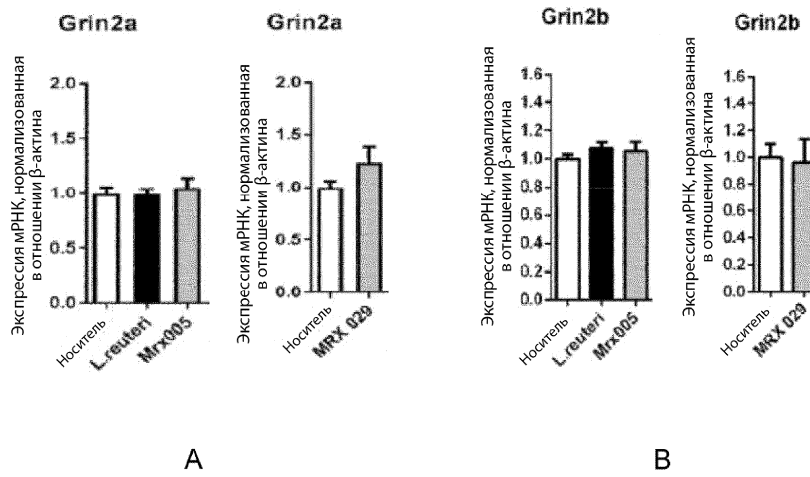
Фиг. 20



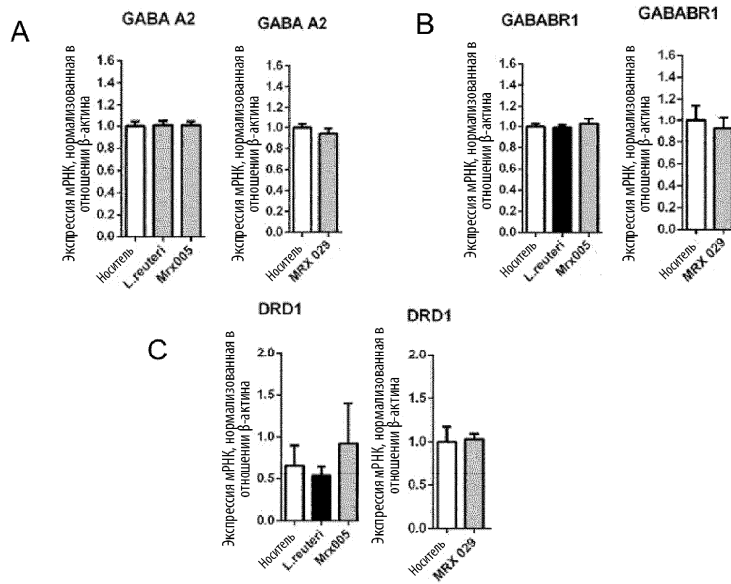
Фиг. 21



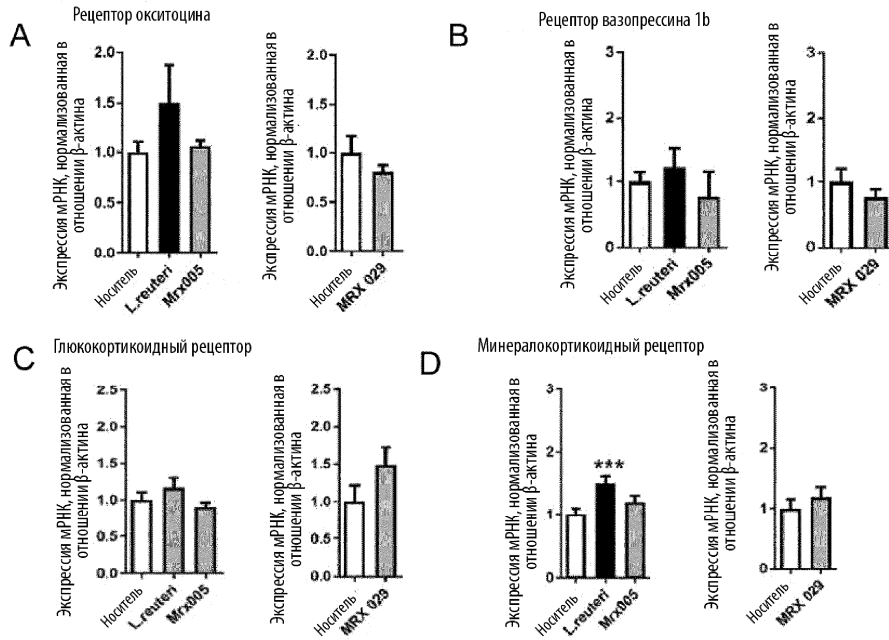
Фиг. 22



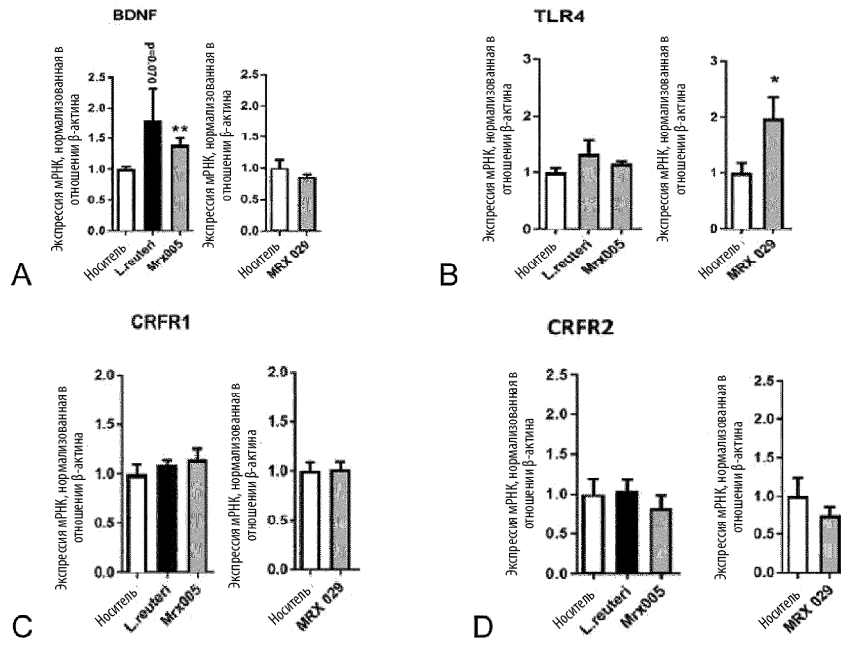
Фиг. 23



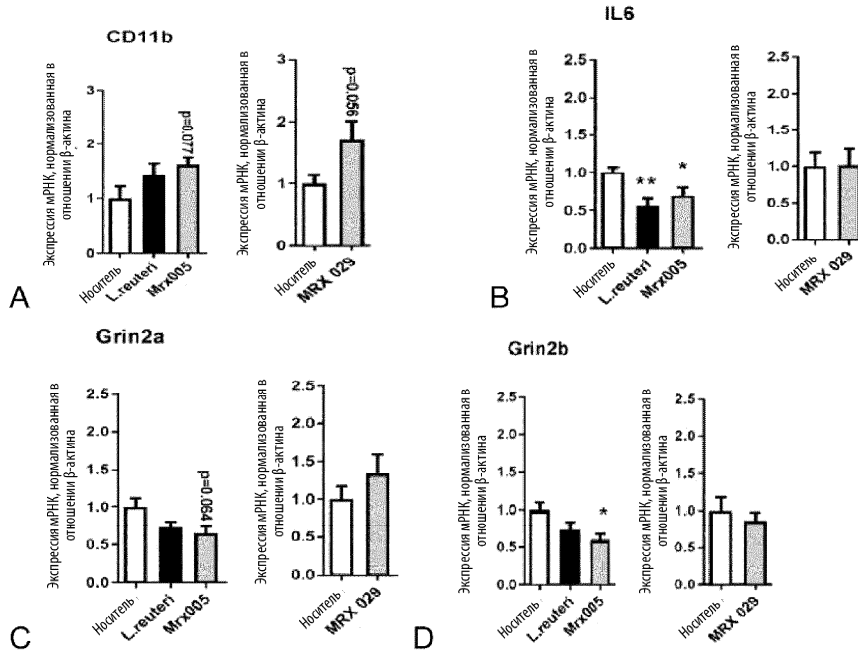
Фиг. 24



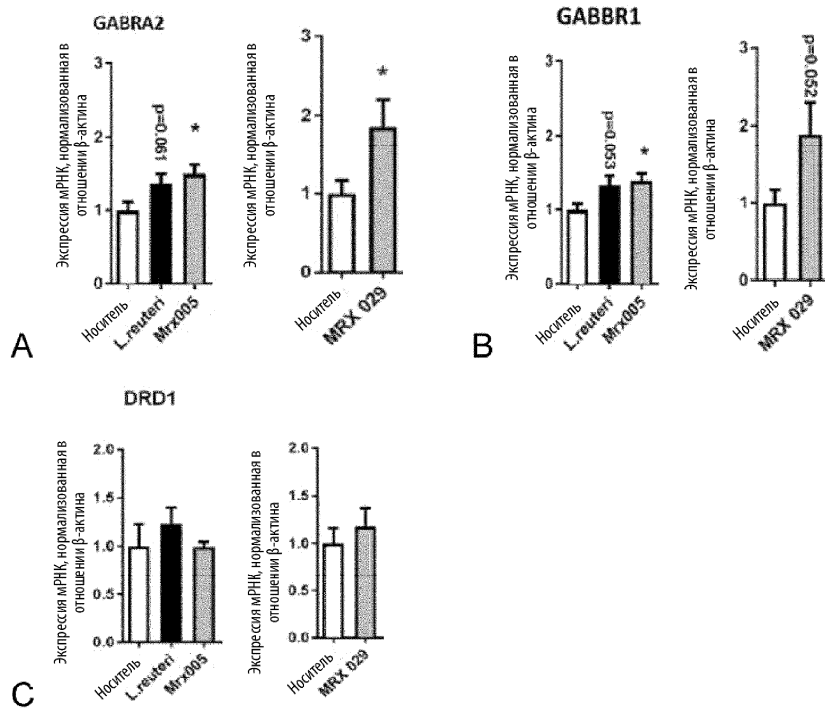
Фиг. 25



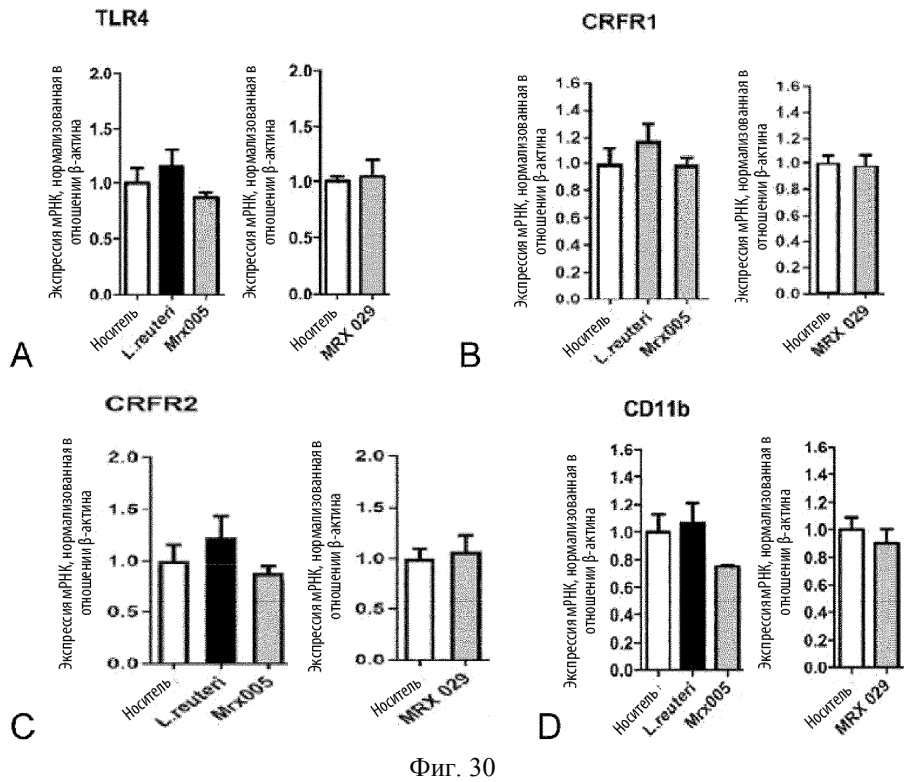
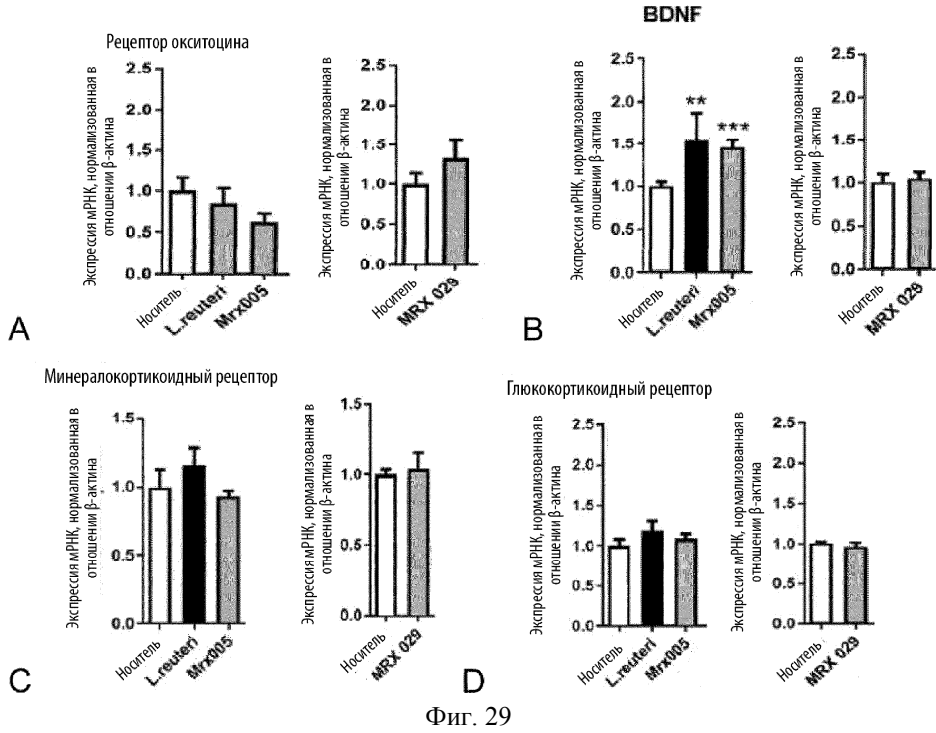
Фиг. 26

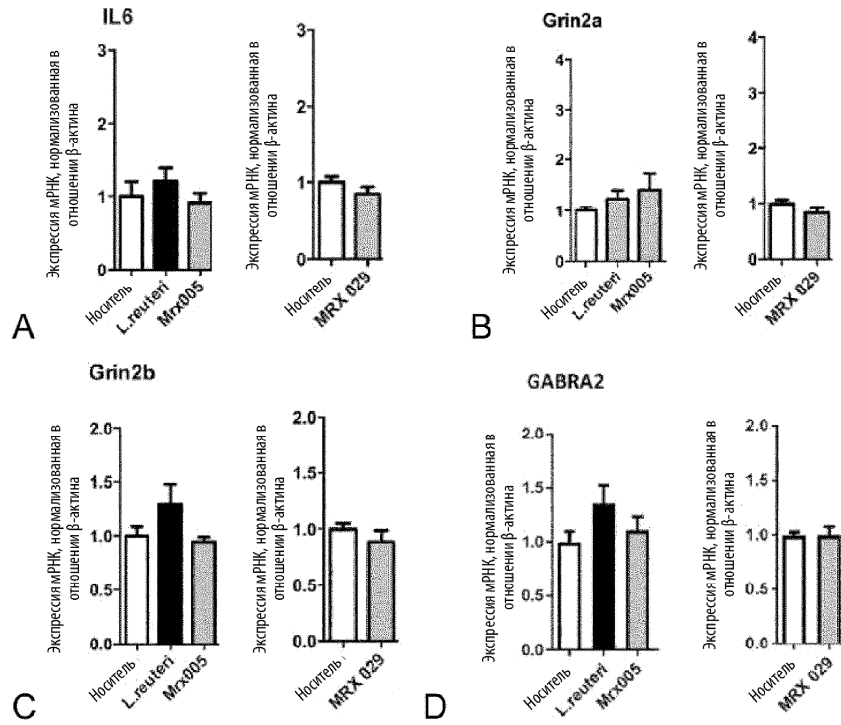


Фиг. 27

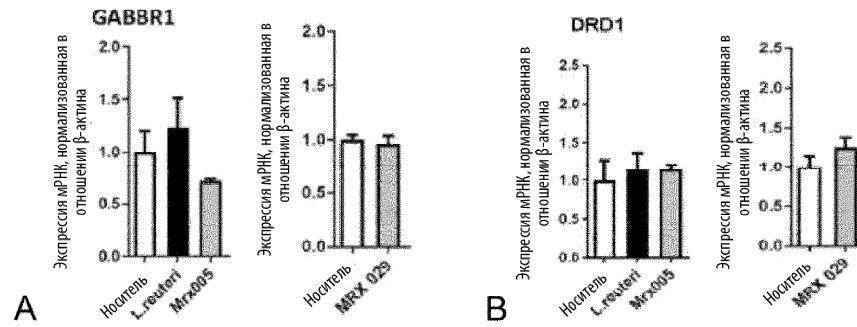


Фиг. 28

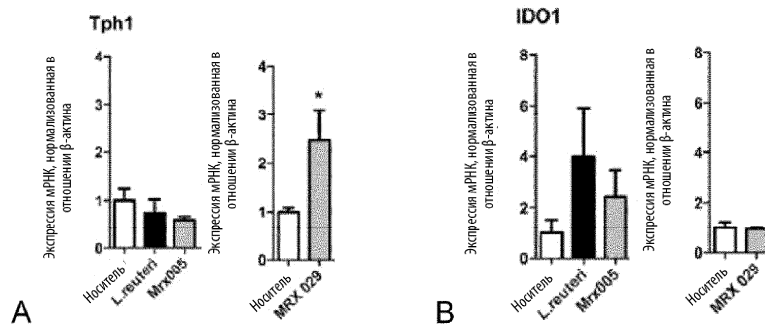




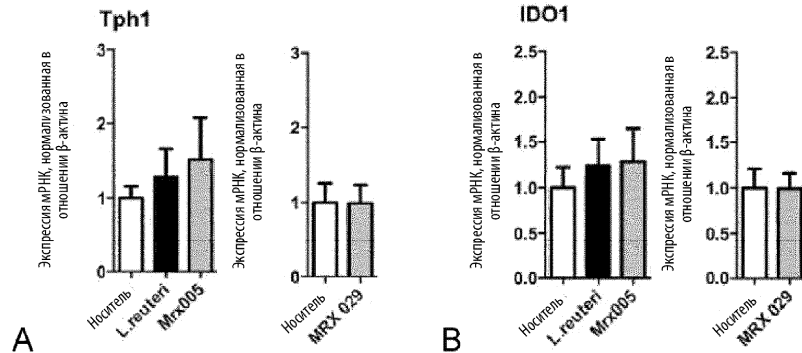
Фиг. 31



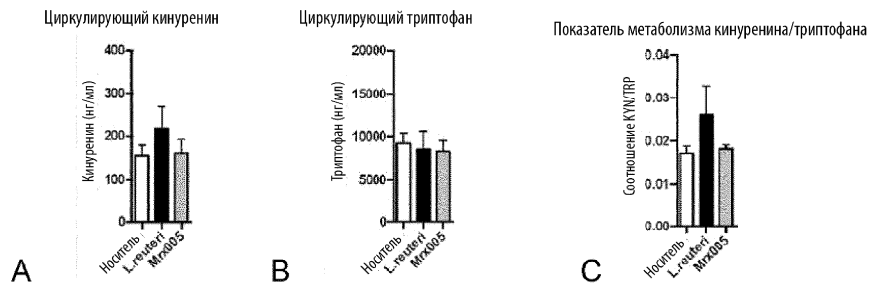
Фиг. 32



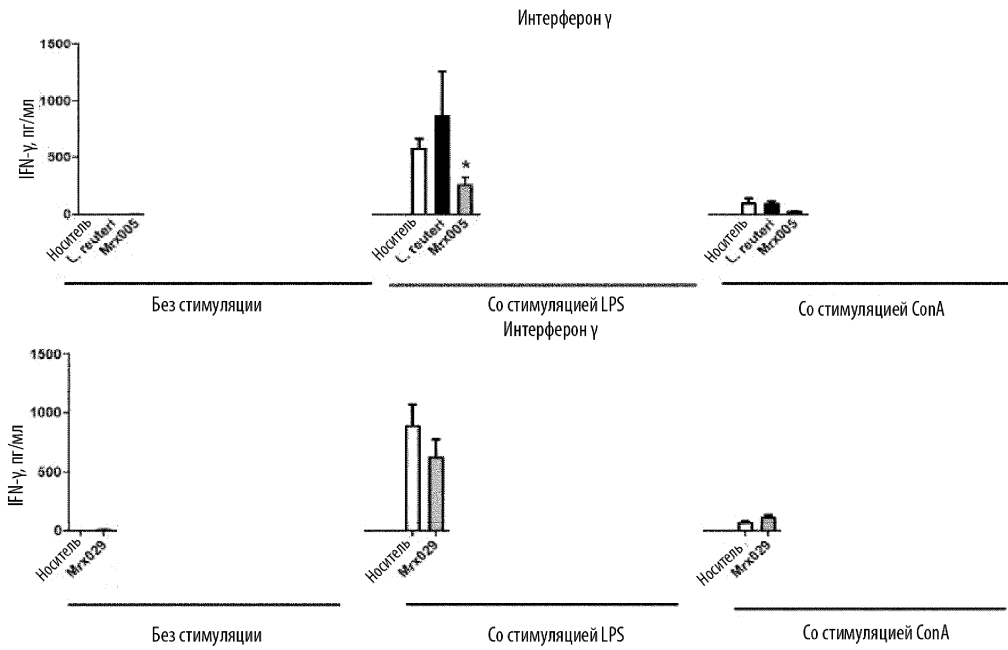
Фиг. 33

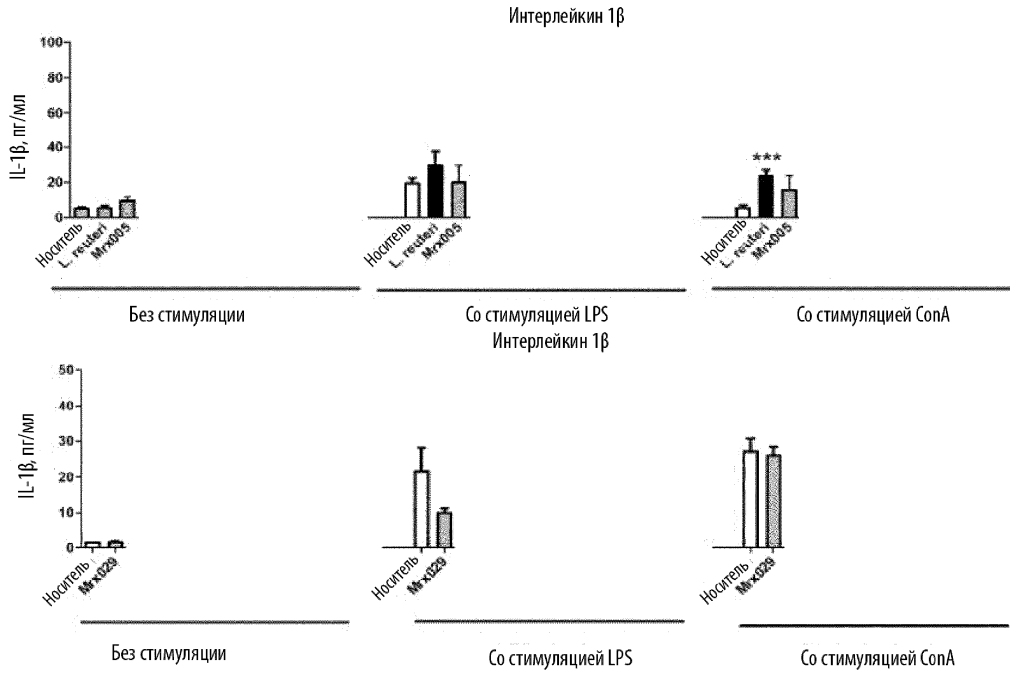


Фиг. 34

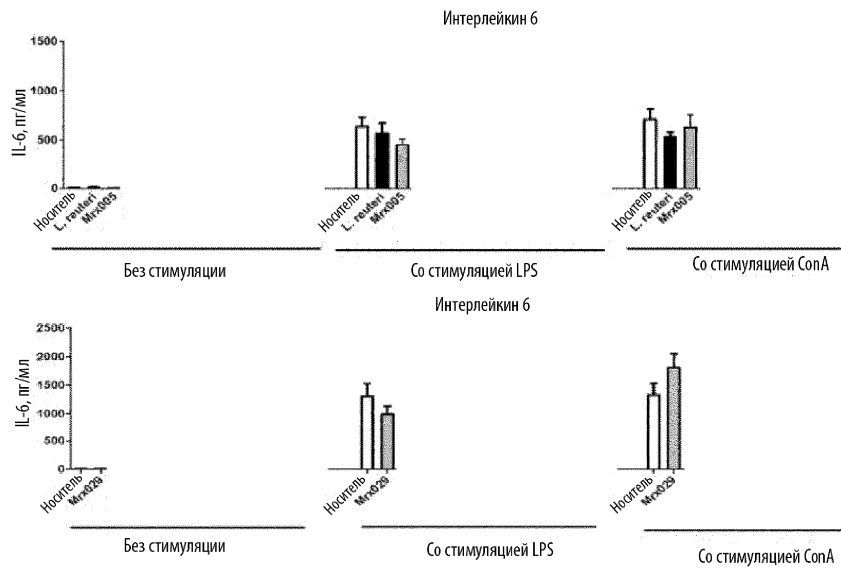


Фиг. 35

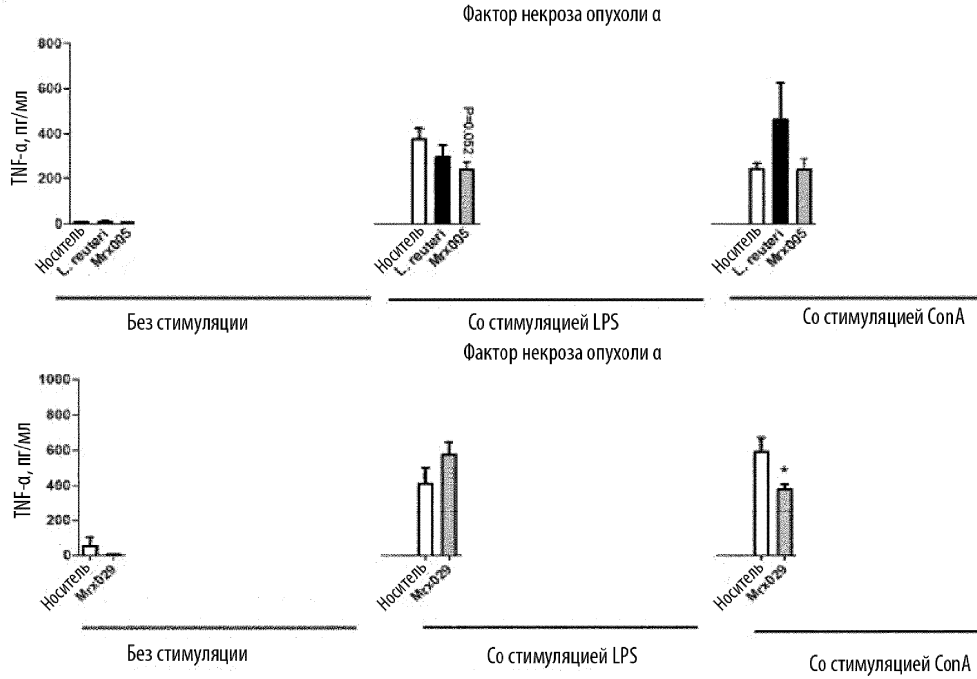




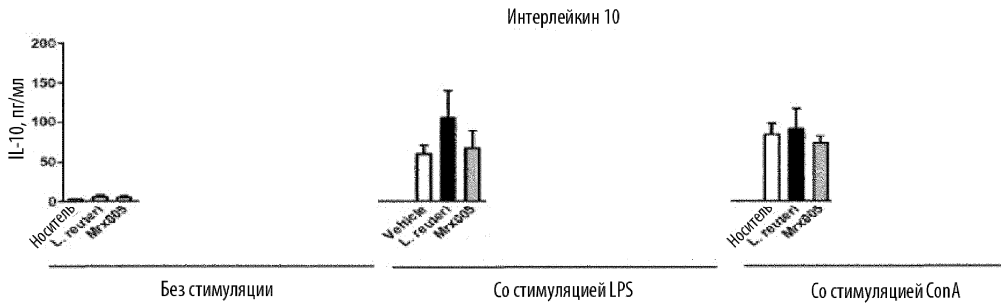
Фиг. 37



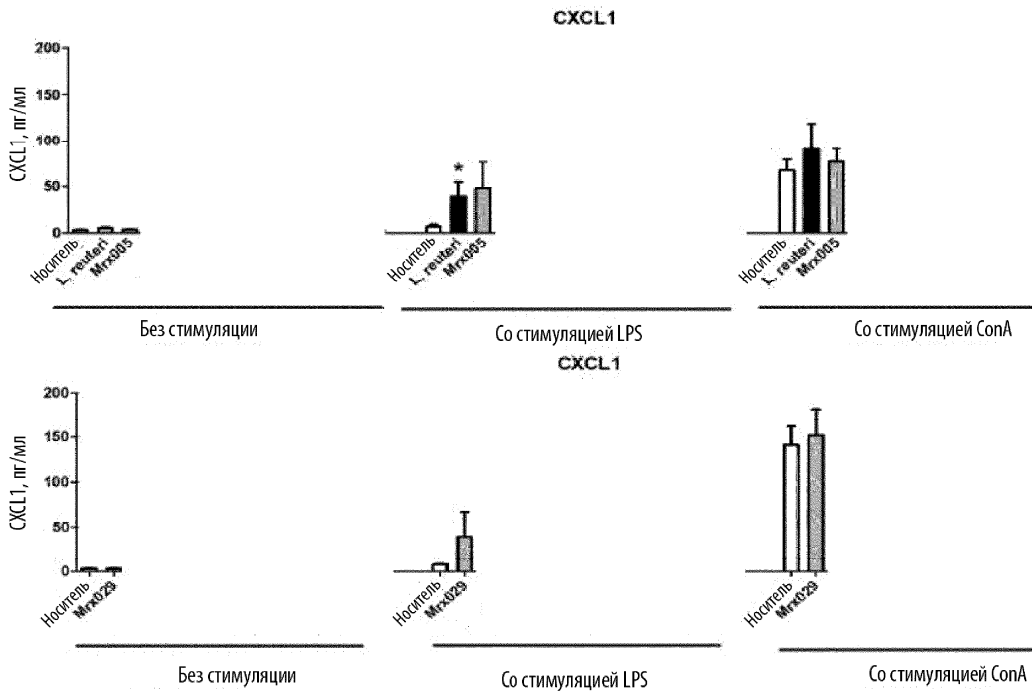
Фиг. 38



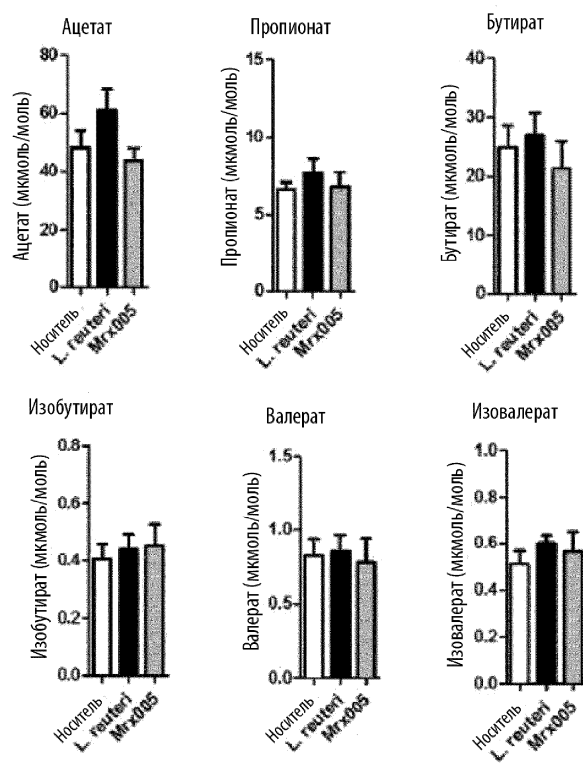
Фиг. 39



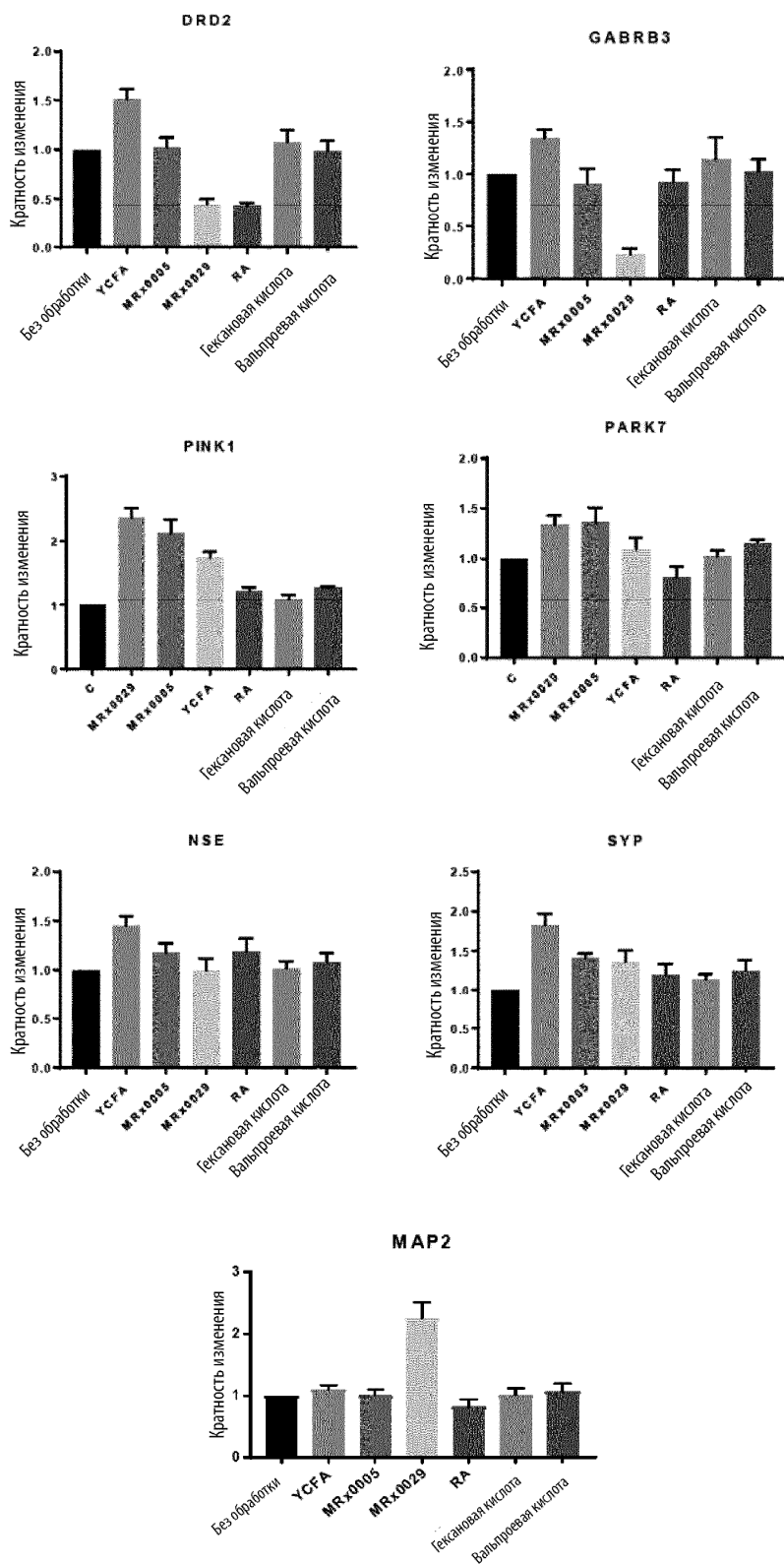
Фиг. 40



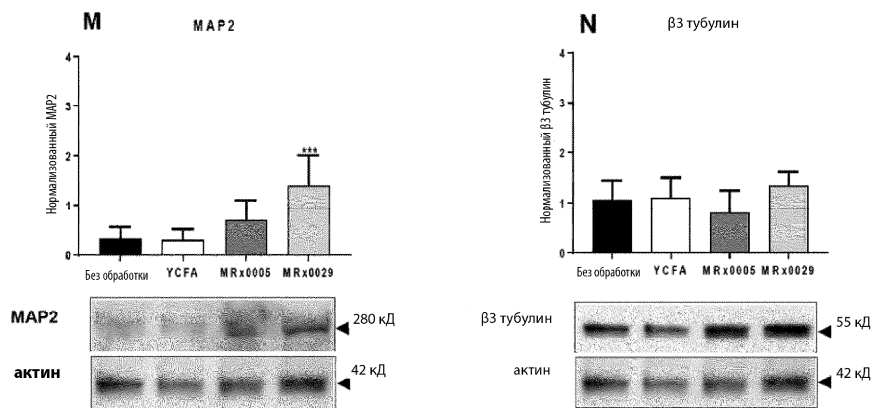
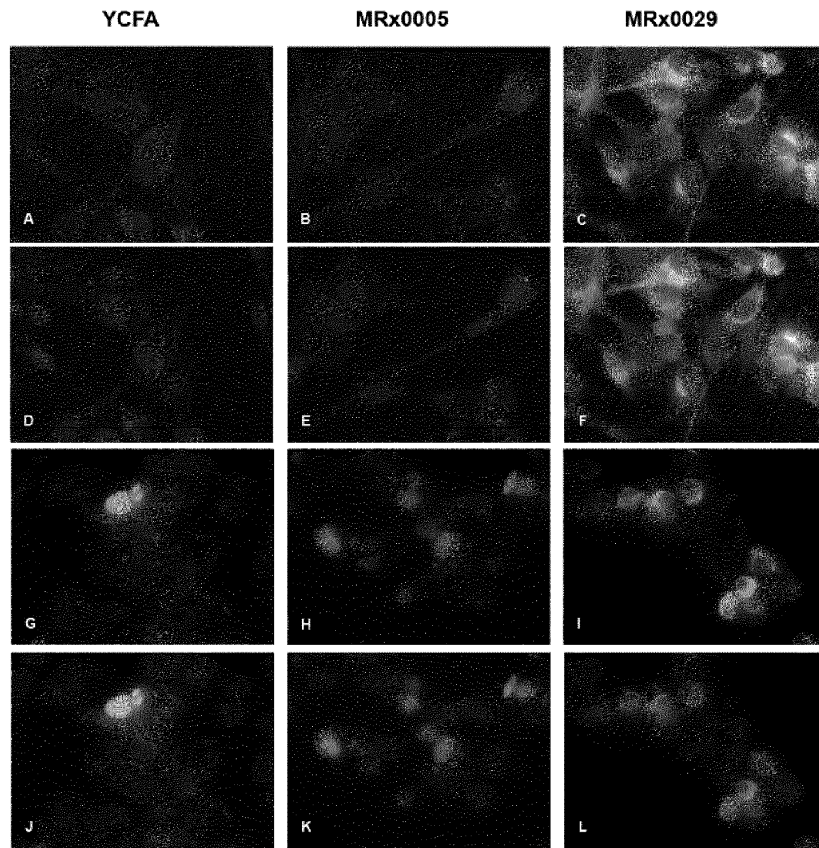
Фиг. 41



Фиг. 42



Фиг. 43



Фиг. 44