

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.10.08	(73) Titular(es): 4D PHARMA RESEARCH LIMITED LIFE SCIENCES INNOVATION BUILDING, CORNHILL ROAD ABERDEEN, AB25 2ZS GB
(30) Prioridade(s): 2011.10.07 GB 201117313	
(43) Data de publicação do pedido: 2014.08.13	(72) Inventor(es): DENISE KELLY GB IMKE MULDER GB
(45) Data e BPI da concessão: 2016.04.20 116/2016	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **BACTÉRIA PARA USO COMO UM PROBIÓTICO PARA APLICAÇÕES NUTRICIONAIS E MÉDICA**

(57) Resumo:

UM PRIMEIRO ASPETO DA INVENÇÃO REFERE-SE À ESPÉCIE BACTERIANA ROSEBURIA HOMINIS PARA USO EM:  REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE UM SUJEITO;  TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO IMUNE;  TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO INTESTINAL;  MELHORIA DA MICROFLORA INTESTINAL;  REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE INATO DE UM SUJEITO;  REGULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO DE UM SUJEITO;  REGULAÇÃO DO APETITE NUM SUJEITO;  PROMOÇÃO DE TREGS E TOLERÂNCIA IMUNE;  PROMOÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL NUM SUJEITO; E/OU  MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASIA IMUNE NUM SUJEITO. ASPETOS ADICIONAIS DA INVENÇÃO REFEREM-SE A COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO ROSEBURIA HOMINIS

RESUMO

"BACTÉRIA PARA USO COMO UM PROBIÓTICO PARA APLICAÇÕES NUTRICIONAIS E MÉDICAS"

Um primeiro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso em: • regulação do sistema imune de um sujeito; • tratamento de um distúrbio imune; • tratamento de um distúrbio intestinal; • melhoria da microflora intestinal; • regulação do sistema imune inato de um sujeito; • regulação do sistema imune adaptativo de um sujeito; • regulação do apetite num sujeito; • promoção de Tregs e tolerância imune; • promoção da saúde intestinal num sujeito; e/ou • manutenção da homeostasia imune num sujeito. Aspetos adicionais da invenção referem-se a composições compreendendo *Roseburia hominis*.

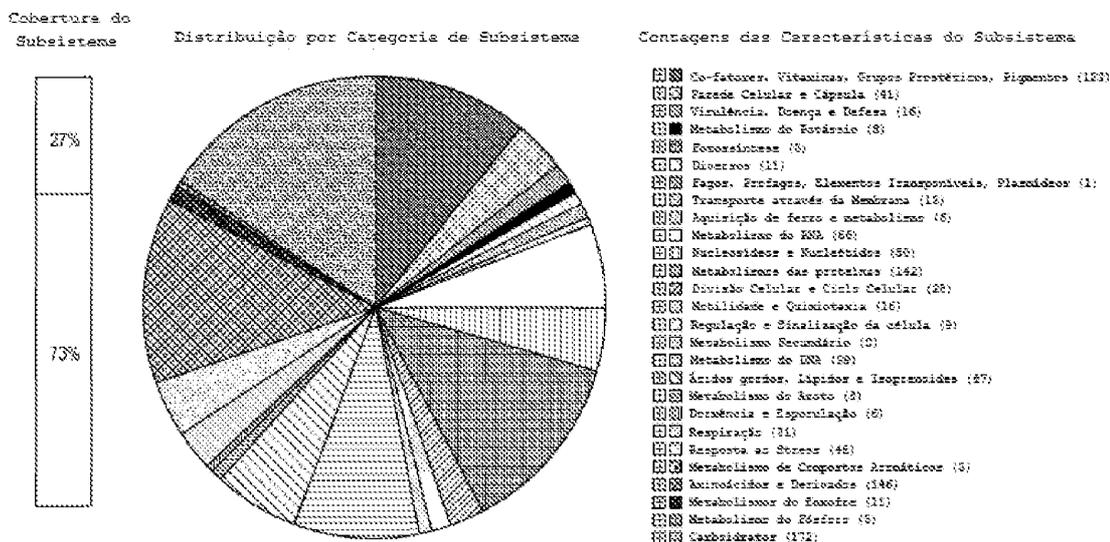


FIG. 15

DESCRIÇÃO

"BACTÉRIA PARA USO COMO UM PROBIÓTICO PARA APLICAÇÕES NUTRICIONAIS E MÉDICAS"

A presente invenção refere-se à espécie *Roseburia hominis* e seus variados usos nutricionais e terapêuticos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O intestino humano, que se pensava ser inicialmente estéril *in utero*, está exposto a uma grande variedade de micróbios maternos e ambientais imediatamente após o nascimento. Os eventos de colonização e sucessão subsequentes no intestino permanecem dinâmicos ao longo dos primeiros anos de vida, após os quais a microflora se torna do tipo adulto e relativamente estável (1). A microflora do intestino humano contém mais de 500 filotipos diferentes pertencendo essencialmente a duas divisões bacterianas principais, os *Bacteroidetes* e os *Firmicutes* (2). As relações simbióticas bem sucedidas que surgem da colonização bacteriana do intestino humano produziram uma vasta variedade de funções metabólicas, estruturais, protetoras e outras benéficas. As atividades metabólicas intensificadas do intestino colonizado asseguram que os componentes dietéticos, que são de outra forma indigeríveis, são degradadas com os bioproductos libertados proporcionando uma fonte de nutrientes importante para o hospedeiro. Similarmente, a importância imunológica da flora intestinal é bem reconhecida e exemplificada em animais livres de germes que têm um sistema imune comprometido que é funcionalmente reconstituído após a introdução de bactérias comensais (3-5).

Em contraste acentuado à produção de IgA intestinal secretora, que é influenciada pela colonização microbiana *per se* (6, 7), o desenvolvimento e diferenciação das células T parece requerer colonização de microrganismos comensais específicos. As espécies de *Clostridium*, em particular as bactérias filamentosas segmentadas produtoras de esporos (SFB), parecem ser um condutor principal para a maturação das Th1, Th17 e Tregs intestinais (8, 9). Estudos recentes mostraram agora, contudo, que outras bactérias intestinais incluindo aquelas da flora Schaedler alterada podem induzir geração *de novo* de Tregs enquanto a monocolonização com *Bacteroides fragilis* pode corrigir o desequilíbrio de Th1/Th2 em camundongos livres de germes pela promoção da expansão de Tregs (5,10).

A presente invenção procura elucidar outras bactérias intestinais residentes que podem modular a atividade metabólica no intestino e/ou desempenhar um papel em processos imunorregulatórios.

AFIRMAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção centra-se na atividade da espécie bacteriana *Roseburia hominis*, um membro do filo Firmicutes. Estudos pelo requerente demonstraram que esta espécie bacteriana desempenha um papel importante na imunorregulação e atividade metabólica no intestino, bem como tem um efeito nos genes do apetite e saciedade. Os papéis dos genes bacterianos que participam na colonização e adaptação ao intestino murino, bem como os genes do hospedeiro que respondem à colonização por esta bactéria são descritos em mais detalhe abaixo.

Os aspetos da invenção, em conjunto com as formas de realização preferenciais, são apresentados nas reivindicações acompanhantes.

Um primeiro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na regulação do sistema imune de um sujeito.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso no tratamento de um distúrbio selecionado de um distúrbio inflamatório, um distúrbio imune e um distúrbio intestinal.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na promoção da saúde intestinal através da restauração da homeostasia imune.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na melhoria da microflora intestinal num sujeito.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na regulação do sistema imune inato de um sujeito.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na regulação do sistema imune adaptativo de um sujeito.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na promoção de Tregs e tolerância imune de um sujeito.

Outro aspecto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso em medicina.

Outro aspecto da invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis* e um excipiente, transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Outro aspecto da invenção refere-se a um suplemento nutricional compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis* e um excipiente, transportador ou diluente nutricionalmente aceitável.

Outro aspecto da invenção refere-se a uma composição probiótica compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis*.

Outro aspecto da invenção refere-se a uma ração, produto alimentar, suplemento nutricional, suplemente dietético ou aditivo alimentar compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis*.

Outro aspecto da invenção refere-se a um processo para produção de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção, compreendendo o processo referido a mistura da espécie bacteriana *Roseburia hominis* com um excipiente, transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Outro aspecto da invenção refere-se a um processo para produção de um suplemento nutricional de acordo com a invenção, compreendendo o processo referido a mistura da espécie bacteriana *Roseburia hominis* com um excipiente, transportador ou diluente nutricionalmente aceitável.

Outro aspecto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na manutenção da homeostasia imune num sujeito.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como mencionado acima, um aspecto da invenção refere-se à *Roseburia hominis* para uso em um ou mais de:

- tratamento de um distúrbio imune;
- tratamento de um distúrbio intestinal;
- melhoria da microflora intestinal;
- regulação do sistema imune inato de um sujeito;
- regulação do sistema imune adaptativo de um sujeito;
- promoção de Tregs e tolerância imune;
- promoção da saúde intestinal num sujeito; e/ou
- manutenção da homeostasia imune num sujeito.

Roseburia hominis

Roseburia hominis, um anaeróbio intestinal comensal do Agrupamento filogenético XIVa no filo *Firmicutes* descrito recentemente, pertence a um grupo dominante de bactérias no intestino humano e é também um produtor de butirato principal (11). O presente requerente elucidou a sequência completa de genoma e anotação para esta bactéria. Estudos adicionais investigaram as respostas do transcriptoma tanto bacteriano como do hospedeiro em camundongos livres de germes monocolonizados com *R. Hominis*. Os papéis de genes bacterianos que participam na colonização e adaptação do intestino murino, bem como de genes do hospedeiro respondendo à colonização por esta bactéria são aqui descritos.

Experiências pelo Requerente mostraram que a atividade da *Roseburia hominis* é altamente específica. Estudos mostraram que genomas importantes da espécie *Roseburia* são muito diferentes, indicando funcionalidade diversa. De facto, experiências mostraram que as bactérias do Agrupamento XIVA de *Clostridium*, incluindo as espécies bacterianas *Roseburia intestinalis*, *Roseburia hominis* e *Eubacterium rectale* (todas as quais são produtoras de butirato) surpreendentemente induzem efeitos muito diferentes e distintos nas células intestinais.

Numa forma de realização preferencial, a espécie bacteriana é a estirpe depositada sob os termos do Tratado de Budapeste da National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB) na NCIMB Ltd, Ferguson Building, Condado de Craibstone, Bucksburn, Aberdeen, RU, AB21 9YA, em 21 de Outubro de 2004 em nome do Rowett Research Institute of Nutrition and Health, University of Aberdeen, Greenburn Road, Aberdeen, AB21 9SB, Escócia, RU, sob o número de acesso de NCIMB 14029^T *Roseburia hominis* A2-183^T (DSM = 16839^T).

A espécie bacteriana é preferencialmente *Roseburia hominis* como descrito em Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., & Flint, H. J. (2006) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2437-2441.

Numa forma de realização preferencial, a espécie bacteriana está na forma de uma população bacteriana viva, uma população bacteriana liofilizada, uma preparação bacteriana inviável, ou os seus componentes celulares. Preferencialmente, onde a espécie bacteriana está na forma de uma preparação bacteriana inviável, esta é selecionada

de bactérias mortas pelo calor, bactérias irradiadas ou bactérias lisadas.

Numa forma de realização preferencial, a espécie bacteriana está na forma de bactérias vivas ou seus componentes celulares.

Numa forma de realização preferencial, a espécie bacteriana está na forma isolada. Como usado aqui, o termo "isolado" significa isolado do seu ambiente nativo.

Numa forma de realização preferencial, a espécie bacteriana está na forma biologicamente pura. Como usado aqui, o termo "biologicamente puro" refere-se a uma cultura laboratorial que está substancialmente livre de outras espécies de organismo. Preferencialmente, a espécie bacteriana está na forma de uma cultura de uma espécie única do organismo.

A invenção também engloba o uso de mutantes da espécie bacteriana ou estirpes aqui descritas. Como usado aqui, o termo "mutante" inclui estirpes bacterianas derivadas tendo pelo menos homologia de 93%, preferencialmente pelo menos homologia de 96%, preferencialmente homologia de 98% para a sequência de polinucleótidos de uma estirpe referenciada, mas de outra forma compreendendo mutações noutras sequências no genoma bacteriano. Os mutantes são obteníveis por técnicas de engenharia genética inferindo alteração do material genético das estirpes da invenção ou inferindo uma recombinação do material genético das estirpes da invenção com outras moléculas. Tipicamente, de modo a obter tais estirpes mutantes, um perito na técnica pode usar técnicas de mutagênese padrão tais como radiação UV ou exposição a produtos químicos mutagénicos.

Como usado aqui, o termo "mutações" inclui mutações naturais ou induzidas compreendendo pelo menos alterações de base única incluindo deleções, inserções, transversões, e outras modificações conhecidas para aqueles peritos na técnica, incluindo modificação genética introduzida numa sequência mãe de nucleótido ou aminoácidos enquanto mantendo pelo menos homologia de 50% para a sequência mãe. Preferencialmente, a sequência compreendendo a mutação ou mutações tem pelo menos 60%, mais preferencialmente pelo menos 75%, ainda mais preferencialmente homologia de 85% com a sequência mãe. Como usado aqui, a "homologia" da sequência pode ser determinada usando técnicas padrão conhecidas para aqueles peritos na técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada usando o programa "BLAST" de algoritmo de homologia *on-line*, disponível publicamente em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

A invenção também engloba o uso de homólogos das espécies bacterianas ou estirpes aqui descritas. Como usado aqui o termo "homólogo" refere-se a uma estirpe bacteriana tendo uma sequência de nucleótidos tendo um grau de identidade de sequência ou homologia de sequência com a sequência de nucleótidos da estirpe bacteriana mãe (doravante referida como uma "sequência(s) homóloga(s)"). Aqui, o termo "homólogo" significa uma entidade tendo uma certa homologia com a sequência de nucleótidos do sujeito. Aqui, o termo "homologia" pode ser equiparado a "identidade".

No presente contexto, uma sequência homóloga é tirada para incluir uma sequência de nucleótidos que pode ser pelo menos 50, 60, 70, 75, 80, 85 ou 90 % idêntica, preferencialmente pelo menos 95%, 97%, 98% ou 99% idêntica à sequência de nucleótidos da estirpe bacteriana mãe (a sequência do sujeito).

As comparações de homologia podem ser conduzidas a olho, ou mais habitualmente, com a ajuda de programas de comparação de sequências prontamente disponíveis. Estes programas de computador comercialmente disponíveis podem calcular a % de homologia entre duas ou mais sequências.

A % de homologia podem ser calculada em sequências contíguas, *i.e.*, uma sequência é alinhada com a outra sequência e cada aminoácido numa sequência é diretamente comparado com o aminoácido correspondente na outra sequência, um resíduo de cada vez. Isto é chamado um alinhamento sem intervalos. Tipicamente, tais alinhamentos sem quebras são realizados apenas sobre um número relativamente reduzido de resíduos.

Apesar de ser um método muito simples e consistente, este falha em levar em consideração que, por exemplo, num par de sequências idênticas de outra forma, uma inserção ou deleção levará os resíduos de aminoácidos seguintes a serem colocados fora do alinhamento, deste modo resultando potencialmente numa grande redução na % de homologia quando um alinhamento global é realizado.

O cálculo da % de homologia máxima requer primeiramente, portanto, a produção de um alinhamento ótimo, tendo em consideração as penalidades de intervalo. Um programa de computador adequado para levar a cabo tal alinhamento é o Vetor NTI (Invitrogen Corp.). Exemplos de *software* que podem realizar comparações de sequências incluem, mas não são limitados a, o pacote BLAST (ver Ausubel *et al.* 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Edição - Capítulo 18), BLAST 2 (ver *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8), FASTA (Altschul *et al* 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) e AlignX, por exemplo. Pelo

menos os BLAST, BLAST 2 e FASTA estão disponíveis para pesquisa *offline* e *online* (ver Ausubel *et al* 1999, páginas 7-58 a 7-60).

Preferencialmente, o grau de identidade no que diz respeito a uma sequência de nucleótidos é determinado em pelo menos 20 nucleótidos contíguos, preferencialmente em pelo menos 30 nucleótidos contíguos, preferencialmente em pelo menos 40 nucleótidos contíguos, preferencialmente em pelo menos 50 nucleótidos contíguos, preferencialmente em pelo menos 60 nucleótidos contíguos, preferencialmente em pelo menos 100 nucleótidos contíguos. Preferencialmente, o grau de identidade no que diz respeito a uma sequência de nucleótidos pode ser determinado em toda a sequência.

A identificação tradicional de bactérias com base de características fenotípicas geralmente não é tão exata como a identificação baseada em métodos genotípicos. A comparação da sequência bacteriana do gene de rRNA 16S emergiu como uma técnica genética preferencial e permite que novas estirpes sejam identificadas por comparação de sequências com sequências conhecidas de DNA bacteriano usando o BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A sequência do gene de rRNA 16S é universal nas bactérias, e por isso podem ser medidas relações entre muitas bactérias diferentes. Em geral, a comparação da sequência de rRNA de 16S permite a diferenciação entre organismos ao nível do género entre todos os principais filós de bactérias, além de classificar as estirpes em múltiplos níveis, incluindo nível de espécies e subespécies. A sequência de rRNA de 16S foi determinada para um grande número de estirpes. O GenBank, o maior banco de dados de sequências de nucleótidos, tem mais de 20 milhões de sequências depositadas, dos quais mais de 90.000 são genes de rRNA de 16S. Isto significa que existem muitas

sequências previamente depositadas, com as quais a sequência de uma estirpe desconhecida pode ser comparada.

Como usado aqui, o termo "identidade de rRNA de 16S" refere-se à percentagem de identidade com uma estirpe bacteriana conhecida. Numa forma de realização preferencial, a estirpe bacteriana tem uma identidade de RNA de 16S de pelo menos 99,5% com a estirpe depositada sob o número de acesso acima.

A invenção também engloba estirpes mutantes, que podem ser obtidas a partir da estirpe depositada mencionada acima, e estirpes exibindo uma homologia DNA-DNA de pelo menos 70% e/ou uma identidade de RNA de 16S de pelo menos 99,5% com a estirpe depositada sob o número de acesso acima.

No contexto da presente invenção, o termo "homologia DNA-DNA" refere-se a quão intimamente relacionadas duas ou mais cadeias de DNA separadas são uma para a outra, com base na sua sequência de nucleótidos. Tipicamente, isto é medido em termos de % de identidade. Numa forma de realização preferencial, a estirpe bacteriana tem uma homologia DNA-DNA de pelo menos 70% com a estirpe depositada sob o número de acesso acima.

Numa forma de realização altamente preferencial, a estirpe bacteriana tem uma homologia DNA-DNA de pelo menos 70% e uma identidade de rRNA de 16S de pelo menos 99,5% com a estirpe depositada sob o número de acesso acima.

Aplicações terapêuticas

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *R. hominis* para uso em medicina.

Mais particularmente, a espécie bacteriana *Roseburia hominis* é para uso no tratamento de um distúrbio selecionado de um distúrbio inflamatório, um distúrbio imune e um distúrbio intestinal num sujeito.

Como usado aqui, o termo "medicamento" engloba medicamentos para uso tanto humano como animal em medicina humana e veterinária. Além disso, o termo "medicamento" como usado aqui significa qualquer substância que proporcione um efeito terapêutico e/ou benéfico. O termo "medicamento" como usado aqui não é necessariamente limitado a substâncias que precisam de Aprovação de Comercialização, mas pode incluir substâncias que podem ser usadas em cosméticos, nutracêuticos, alimentos (incluindo rações e bebidas por exemplo), culturas de probióticos, suplementos nutricionais e remédios naturais. Além disso, o termo "medicamento" como usado aqui engloba um produto desenhado para incorporação em ração animal, por exemplo, alimentação para gado e/ou alimentos para animais de estimação.

Numa forma de realização preferencial da invenção, o distúrbio é selecionado de síndrome do intestino irritável (IBS), colite, distúrbio inflamatório do intestino (IBD), incluindo doença de Crohn e colite ulcerosa, bolsite, dispepsia funcional, obstipação funcional, diarreia funcional (incluindo diarreia associada a antibióticos, diarreia do viajante e diarreia pediátrica), dor abdominal funcional, meteorismo funcional, Síndrome da Dor Epigástrica, Síndrome da Irritabilidade Pós-prandial, doença do refluxo gastrointestinal (GERD), doenças autoimunes tais como diabetes, artrite, esclerose múltipla e psoríase, alergias, doenças atópicas p.ex. dermatite atópica, enterocolite necrotizante, outras infecções e suas combinações.

Numa forma de realização particularmente preferencial, o distúrbio é um distúrbio inflamatório. Preferencialmente, a expressão de genes pró-inflamatórios é infrarregulada no sujeito hospedeiro. Detalhes adicionais destes estudos são apresentados abaixo.

Mais preferencialmente, o distúrbio inflamatório é colite, ainda mais preferencialmente, doença de Crohn, colite ulcerosa ou bolsite.

Numa forma de realização particularmente preferencial, o distúrbio intestinal é IBS. A patofisiologia precisa da IBS continua por ser elucidada. Estudos recentes descreveram inflamação da mucosa e alterações na microflora intestinal em pacientes com IBS e uma correlação da doença com infecções intestinais.

Numa forma de realização particularmente preferencial, o distúrbio intestinal é IBD. Preferencialmente, a expressão de genes de barreira está intensificada no sujeito hospedeiro. Detalhes adicionais destes estudos são apresentados abaixo.

Numa forma de realização particularmente preferencial, o distúrbio intestinal é a doença de Crohn.

Numa forma de realização particularmente preferencial, o distúrbio é um distúrbio imune. Preferencialmente, o distúrbio imune é selecionado de colite ulcerosa, bolsite, outras condições autoimunes incluindo artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, alergias, incluindo doença celíaca, dermatite atópica e rinite.

Numa forma de realização, a espécie bacteriana *Roseburia hominis* é para uso na regulação do sistema imune de um

sujeito. Sabe-se que a regulação imune por espécie bacteriana é elevadamente específica da espécie (8). Em particular, o efeito regulatório imune das bactérias do Agrupamento XIVA e VI é muito complicado, e independente da produção de butirato (41).

Numa forma de realização preferencial, o sistema imune inato do sujeito é modulado.

Noutra forma de realização preferencial, o sistema imune adaptativo do sujeito é modulado no sentido da regulação imune (e não ativação imune, deste modo reduzindo a inflamação).

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para melhoria da microflora intestinal num sujeito.

A microflora intestinal refere-se a microrganismos que vivem no trato digestivo de animais hospedeiros. Estes microrganismos realizam uma vasta variedade de funções metabólicas, estruturais, protetoras e outras benéficas. Como usado aqui, "melhoria da microflora intestinal" refere-se a aumento do número e/ou do tipo de microrganismos presentes no intestino de um hospedeiro, e/ou aumento da atividade dos microrganismos referidos em termos das suas funções metabólicas, estruturais, protetoras e outras benéficas.

Preferencialmente, a *Roseburia hominis* coloniza o cólon e/ou íleon, mais preferencialmente o cólon.

Numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* regula a expressão de pelo menos um gene de mobilização ou quimiotaxia.

Mais preferencialmente, a *Roseburia hominis* sobrerregula a expressão de pelo menos um gene de mobilização ou quimiotaxia. Ainda mais preferencialmente, o gene de mobilização e quimiotaxia é selecionado de *MobA* e *MobL*.

Noutra forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* regula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *FlaA1*, *FlaA2*, *Fla3* e *FlaB*.

Anticorpos séricos específicos para as proteínas do tipo FLA estão presentes na doença inflamatória do intestino. Deste modo, numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* é para uso no tratamento de doença inflamatória do intestino.

Noutra forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* regula a expressão de um ou mais dos seguintes: acetil-CoA acetiltransferase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, butiril-CoA desidrogenase, subunidade beta da flavoproteína transportadora de eletrões, subunidade alfa da flavoproteína transportadora de eletrões.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para regulação do sistema imune inato de um sujeito.

Como usado aqui, o termo "sistema imune inato", também conhecido como o sistema imune não específico, compreende as células e mecanismos que proporcionam ao hospedeiro defesa imediata contra infeção por outros organismos numa maneira não específica. Isto significa que as células do sistema inato reconhecem e respondem a patogénios numa forma genérica, mas ao contrário do sistema imune

adaptativo, isto não confere imunidade de longa duração ou protetora ao hospedeiro.

Como usado aqui, o termo "regulação do sistema imune inato" significa indução da atividade do sistema imune inato e/ou aumento do nível de atividade relativamente ao nível basal de atividade de tal modo que promova a homeostasia imune.

Perda ou desregulação da função imune inata, tanto devido a perda da barreira epitelial, péptido imunes inatos tais como defensinas, quimiocinas e citocinas ou sinalização TLR defeituosa estão associados a risco aumentado de doenças inflamatórias, em diversos órgãos do corpo incluindo o intestino. Tais doenças incluem doença inflamatória do intestino. Deste modo, numa forma de realização altamente preferencial, a *Roseburia hominis* é para uso no tratamento da doença inflamatória do intestino.

Numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* regula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*, *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Mag3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* e *Tcfe2a*. Muitos deste genes são genes barreira do intestino e antimicrobianos e por isso trabalham para reduzir a invasividade de patogénios intestinais e também reduzem os números de patogénios viáveis.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para regulação do sistema imune adaptativo de um sujeito.

Como usado aqui, o termo "sistema imune adaptativo", de outra forma conhecido como o "sistema imune específico"

refere-se a células sistémicas altamente especializadas e processos que eliminam ou previnem o crescimento patogénico. A resposta imune adaptativa proporciona ao sistema imune vertebrado a capacidade de reconhecer e recordar patogénios específicos (para gerar imunidade), e montar ataques mais fortes cada vez que o patogénio é encontrado.

Como usado aqui, o termo "regulação do sistema imune adaptativo" significa indução da atividade do sistema imune adaptativo, e/ou promoção de mecanismos homeostático imunes através do aumento do nível de atividade em relação ao nível basal de atividade. Preferencialmente, o sistema imune adaptativo é modulado no sentido da regulação imune (e não ativação imune deste modo reduzindo a inflamação).

Os defeitos e distúrbios associados com o sistema imune adaptativo, particularmente relacionados com a função das células T, estão associados a muitas doenças inflamatórias e autoimunes. As respostas das células T associadas a Th1, Th2 e Th17 estão associadas a doenças atópicas, inflamatórias e autoimunes. As terapias que melhoram ou aumentam as populações de células T reguladoras (Tregs) são importantes no controlo de doenças conduzidas por respostas excessivas de células Th1, Th2 e Th17.

Numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* ativa pelo menos uma gene de resposta imune no cólon ou íleon.

Numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* regula o sistema imune adaptativo através da modulação da expressão de genes associados à regulação de células T, mais preferencialmente no cólon. Mais preferencialmente, a *Roseburia hominis* induz células T reguladoras (Tregs). Um

aumento nos números de Treg combaterá os efeitos de outras células T efectoras, tais como Th1, Th17 e Th2 que conduzem inflamação, autoimunidade e condições alérgicas/atópicas. Deste modo, esta propriedade da *R. hominis* pode ser explorada para abordar muitas doenças onde o equilíbrio Tef/Treg está perdido, p.ex., Crohn e colite ulcerosa.

Numa forma de realização particularmente preferencial, a *Roseburia hominis* sobrerregula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Ly6g6c* e *Ly6g6e* no cólon ascendente. A depleção de *Ly6g6c* e *Ly6g6e* aumenta o risco de infeção, tanto no intestino como no trato respiratório e está associada a doenças tais como neutropenia. Deste modo, numa forma de realização preferencial, a *Roseburia hominis* é para uso no tratamento de neutropenia.

Outro aspeto da invenção refere-se à espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso na manutenção da homeostasia imune num sujeito. Como usado aqui "manutenção da homeostasia imune" refere-se à autorregulação do sistema imune do corpo para manter a tolerância oral ou estabilidade imune em resposta a condições mutáveis. A tolerância oral refere-se às respostas imunes normais a alimentos e bactérias comensais no intestino saudável. Estas estão perdidas na doença celíaca e Doenças Inflamatórias do Intestino tais como doença de Crohn e colite ulcerosa. Deste modo, numa forma de realização particularmente preferencial, a *Roseburia hominis* é para uso no tratamento de doença celíaca e Doenças Inflamatórias do Intestino tais como doença de Crohn e colite ulcerosa.

Como usado aqui, "regulação do apetite" refere-se á capacidade de modular (p.ex. aumentar ou diminuir) o desejo do hospedeiro de comer alimentos. Preferencialmente, a

Roseburia hominis exerce um efeito estimulatório no apetite do hospedeiro por infrarregulação da expressão de genes associados à supressão do apetite. Preferencialmente, a *Roseburia hominis* infrarregula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Agt*, *Cartpt*, *Cck*, *Cxcl12* e *Gcg*. Mais preferencialmente, a *Roseburia hominis* infrarregula a expressão das hormonas da saciedade *Cck* e *Gcg*.

As espécies bacterianas de acordo com a invenção podem ser usadas em aplicações profiláticas. Em aplicações profiláticas, as espécies bacterianas ou composições de acordo com a invenção são administradas a um paciente susceptível a, ou de outro modo em risco de, uma doença particular numa quantidade que é suficiente para reduzir pelo menos parcialmente o risco de desenvolver uma doença. Tal quantidade é definida como sendo "uma dose efetiva profilática". As quantidades precisas dependem de um número de fatores específicos do paciente tais como o estado de saúde e peso do paciente.

A presente invenção é adicionalmente descrita através das figuras seguintes, em que:

A Figura 1 mostra a abundância e localização de *R. hominis* no cólon ascendente. (A) Cólon ascendente de camundongo colonizado com *R. hominis* mostrando associação próxima de bactérias com o epitélio do hospedeiro, usando a prova de FISH A2-183. Ampliação original 630x. (B) PCR usando iniciadores específicos de *R. hominis* mostrou um sinal positivo forte no DNA fecal após colonização, enquanto as fezes de animais GF foram negativas para a presença de quaisquer bactérias. (C) Análise por PCR em tempo real mostrando os níveis de colonização de fezes com *R. hominis*/mg de fezes.

A Figura 2 mostra a sequência e anotação do genoma de *R. hominis*. (A) Mapa circular do genoma de *R. hominis* com a localização das experiências de PCR indicada nas regiões visadas pelos iniciadores. As faixas no mapa do genoma, começando na faixa exterior 0, são: faixa 0 - (azul) Experiências de PCR em tempo real indicadas pelas marcas de escala numeradas; faixa 1 - (azul pálido) CDS direto; faixa 2 - (azul pálido) CDS reverso; faixa 3 - (azul) rRNA; faixa 4 - (verde) tRNA; faixa 5 (vermelho) regiões que marcam STS visadas por PCR em tempo real; gráfico 1 - conteúdo de GC; gráfico 2 - viés de GC. (B) Anotação funcional do genoma de *R. hominis*.

A Figura 3 identifica transcriptos expressos diferencialmente em *R. hominis* após colonização e adaptação ao intestino de murino. (A) O RNA bacteriano foi isolado de conteúdos do cego de camundongos, marcado com ou dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 durante a síntese de cDNA e hibridizado para lâminas de microarranjos incorporando uma troca de corante. Os dados foram considerados significativos quando mudança de vezes >2 e $P < 0,05$. 50 genes expressos diferencialmente (*in vivo vs. in vitro*) foram revelados por análise por microarranjos. (B) Validação por PCR em tempo real de genes envolvidos na transferência por conjugação/mobilização. (C) Validação por PCR em tempo real de genes envolvidos na Motilidade e Quimiotaxia. (D) *Western blot* do conteúdo de intestino ascendente imunocolorido com anticorpo Fla2 purificado por afinidade ao d14 (faixa 1: *ladder*, faixas 2-6: conteúdos do intestino de animais 1-5, faixas 7-8: vazias, faixas 9-10: biomassa de *R. hominis* (controle positivo)). Figura de *R. hominis* mostrando flagelos (setas pretas) e (E) Validação por PCR em tempo real de genes envolvidos no metabolismo do butirato. (F) Análise por PCR em tempo real de transcriptos de *R. hominis* durante

exposição *in vitro* a células epiteliais intestinais humanas. Os resultados da PCR em tempo real são médias de triplicados, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A Figura 4 identifica transcriptos expressos diferencialmente no intestino murino após monoassociação com *R. hominis*. (A) Análise por microarranjos Affymetrix de genes expressos diferencialmente camundongos colonizados com *R. hominis* em relação a GF. Os gráficos de barras representam o número de genes mais e menos expressos após 14 e 28 dias. (B) Mapa de calor gerado a partir de genes expressos diferencialmente com significância funcional - entre GF e camundongos colonizados com *R. hominis* aos d14 e d28. As colunas representam ensaios individuais, e as linhas genes específicos de interesse. O Z-core ilustra uma medida de distância, em desvios padrão, a partir da média. O valor relativo para cada gene é ilustrado por intensidade de cor, com o verde indicando expressão mais elevada e o vermelho ilustrando expressão mais reduzida. (C) Validação por PCR em tempo real de genes que se mostraram ser significativamente diferentes entre os camundongos colonizados com *R. hominis* e os GF. Os resultados da PCR em tempo real são médias de triplicados, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A Figura 5 mostra a expressão e localização de marcadores de células T no cólon. Imunofluorescência e análise das células da lâmina própria marcadas com antiLy6G (A), antiCD3 (B) e antiCD11b (C) na lâmina própria de camundongos GF e camundongos tratados com *R. hominis*. * $P < 0,05$.

A Figura 6 mostra os efeitos anti-inflamatórios da *R. hominis* num modelo experimental de colite. Camundongos IL-

10KO foram doseados três vezes por semana durante 14 semanas. (A) Camundongos IL-10KO não tratados tiveram forte elevação de todos os genes em comparação com camundongos do tipo selvagem, enquanto a expressão diferencial de genes foi mais reduzida em animais tratados com *R. hominis*. Os resultados da PCR em tempo real são médias de triplicados, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. (B) Pesos corporais de IL-10KO não tratados e animais IL-10KO tratados com *R. hominis* no fim do estudo. (C) Cólon ascendente (corado com hematoxilina/eosina) de animais IL-10KO e IL-10KO tratados com *R. hominis*. Ampliação original 100x.

A Figura 7 mostra análise por PCR em tempo real de níveis de mRNA de IL-10, IL-17 e IFN- γ . PCR em tempo real foi realizada no tecido do cólon ascendente para medição dos marcadores de células T. Os resultados de PCR em tempo real são médias de triplicados, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

A Figura 8 mostra os efeitos da monoassociação de camundongos GF com *R. hominis* na composição do peso corporal. Foi realizada análise do peso corporal seco e carcaça de lípidos. (A) Os pesos secos da carcaça de camundongos associados a *R. hominis* eram significativamente mais pesados em comparação com animais GF. (B) Análise adicional da carcaça de lípidos mostrou que a adiposidade total era também significativamente mais elevada em animais tratados com *R. hominis* ao d14.

A Figura 9 ilustra uma comparação dos dados da expressão de genes para três estirpes do Agrupamento XIVA (*Firmicutes*), nomeadamente *Roseburia hominis*, *E. rectale* and *Roseburia intestinalis*.

A Figura 10 mostra que a *Roseburia hominis* induz A20, um regulador negativo da sinalização NF- κ B com atividade anti-inflamatória potente, enquanto outras estirpes bacterianas não têm efeito. A fração de flagelina da *Roseburia hominis* (FLA1 de *Roseburia hominis*) também induz A20 ao contrário daquela da *Eubacterium rectale*, uma bactéria relacionada. Em mais detalhe, a Figura 10 mostra a indução de vezes de A20 para *E. rectale*, *R. hominis*, FLA da *E. rectale*, FLA1 da *R. hominis*, EAV9, FLA da SV1400 em relação aos controles.

A Figura 11 mostra a Distribuição por Categoria de Subsistema para *R. hominis* A2-183 como determinado por RAST, mostrando os subsistemas funcionais e o número de genes em cada subcategoria.

A Figura 12 mostra a Distribuição por Categoria de Subsistema para *R. inulinivorans* DSM 16841 A2-183 como determinado por RAST, mostrando os subsistemas funcionais e o número de genes em cada subcategoria.

A Figura 13 mostra a Distribuição por Categoria de Subsistema para *R. intestinalis* L1-82 como determinado por RAST, mostrando os subsistemas funcionais e o número de genes em cada subcategoria.

A Figura 14 mostra a Distribuição por Categoria de Subsistema para *R. intestinalis* M50/1 como determinado por RAST, mostrando os subsistemas funcionais e o número de genes em cada subcategoria.

A Figura 15 mostra a Distribuição por Categoria de Subsistema para *Eubacterium rectale* ATCC 33656 como determinado por RAST, mostrando os subsistemas funcionais e o número de genes em cada subcategoria.

A *R. hominis* coloniza preferencialmente o cólon

Camundongos livres de germes (GF) C3H/HeN adultos saudáveis foram inoculados com três gavagens de *R. hominis* em dias consecutivos. Foi atingida colonização bem sucedida usando um meio de inoculação contendo ácido ascórbico a 3% e cisteína a 2% para proteger a bactéria da exposição a oxigênio. Análise do tecido intestinal por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) revelou que a *R. hominis* colonizou tanto o íleon como o cólon, mas foi encontrada em números muito mais elevados no cólon. As bactérias também foram encontradas intimamente associadas à mucosa colônica (Fig. 1A). A colonização foi adicionalmente validada e quantificada por PCR usando iniciadores específicos de *R. hominis* com números próximos de 1×10^{10} bactérias/g de fezes (Fig. 1B e 1C). As fezes de animais GF testaram negativas para a presença de qualquer bactéria.

O genoma de *R. hominis* revela genes únicos promotores de interações com o hospedeiro

A sequência completa do genoma de *R. hominis* A2-183 foi elucidada (Fig. 2A) que está representada por um cromossoma com 125 pb, 3,592 único (Fig. 2B). Anotação automatizada e manual do genoma usando a plataforma RAST revelou a presença de quatro operões ribossomais, 66 RNAs e 3.273 proteínas previstas. O maior grupo de genes pertencia à Categoria de Subsistema Carboidratos (271 genes), codificando proteínas envolvidas no metabolismo dos carboidratos, seguido por Metabolismo de Proteínas (197) e Aminoácido e Derivados (175) (Fig. 2B). Outras categorias funcionais importantes incluíram Motilidade e Quimiotaxia (49) e Dormência e Esporulação (12). Análise genômica comparativa estabeleceu que o parente mais próximo em

termos de estrutura genómica e função entre os genomas bacterianos completos é *Eubacterium rectale* (12), o que não é surpreendente dada a próxima relação taxonómica destes organismos (11, 13). Reconstrução comparativa destes dois genomas com 1.095 genes revelou que estes diferiam por aproximadamente 25% dos genes. Em particular, estas diferenças englobavam genes codificando funções importantes para interação com o hospedeiro. Por exemplo, os genes de Motilidade e Quimiotaxia codificando proteínas de montagem fimbrial do tipo IV PiIB e PiIC estavam presentes na *E. rectale* mas ausentes na *R. hominis* enquanto a proteína da haste do corpo basal flagelar FlgC, proteína do complexo gancho-corpo basal flagelar FliE, proteína flagelina FlaB e proteína interruptora do motor flagelar FliG eram únicas para a *R. hominis*. Os dois genomas bacterianos também diferiram por 42 genes de carboidratos, refletindo os seus requerimentos nutricionais divergentes.

***R. hominis* responde ao ambiente intestinal por sobrerregulação dos genes de mobilização e quimiotaxia**

Para determinar os genes expressos diferencialmente por *R. hominis* em resposta à associação com o hospedeiro e dieta, foi construído um microarranjo usando 6.000 fragmentos de PCR da biblioteca de sequenciação de reduzido tamanho de inserção. Foi realizada validação por PCR em tempo real subsequente em 42 genes expressos diferencialmente que se agrupam em regiões específicas do genoma de *R. hominis* como ilustrado na Fig. 2B. Para distinguir entre os efeitos do ambiente intestinal e componentes dietéticos, o RNA bacteriano foi isolado de quatro condições experimentais diferentes: (i) *in vivo*, do cego de camundongos monoassociados; (ii) *in vitro*, de bactérias crescidas em meio cultural; (iii) *in vitro*, de bactérias crescidas na

presença de componentes dietéticos; e (iv) de bactérias incubadas na superfície de células Caco-2 e HT-29 confluentes.

Cinquenta genes expressos diferencialmente foram identificados (*in vivo vs. in vitro*) (Fig. 3A). A descoberta mais surpreendente foi uma sobrerregulação extremamente elevada *in vivo* de genes envolvidos na transferência por conjugação/mobilização, os genes do tipo *mobA* e *mobL* (Fig. 3B). A presença de tais genes nos estudos transcricionais foi surpreendente visto que nenhum gene identificável foi atribuído a Fagos, Profagos, Elementos Transponíveis e Plasmídeos na característica da Categoria de Subsistema. Esta diferença na detecção e alocação de genes é provavelmente devida às limitações reconhecidas na anotação de Categoria de Subsistema. O efeito estimulador dos compostos dietéticos foi muito menos pronunciado, sugerindo que o ambiente intestinal *per se* é um indutor principal dos genes envolvidos na transferência de genes horizontal.

Outros subsistemas induzidos pelo ambiente intestinal incluíram Transporte através da Membrana, em particular o transporte de magnésio, e Motilidade e Quimiotaxia incluindo múltiplas proteínas de quimiotaxia aceitadoras de metilo e genes do operão flagelar (Fig. 3C). *R. hominis* possui múltiplos genes de flagelina *flaA1*, *flaA2*, *flaA3*, e *flaB* e, curiosamente, crescimento no ambiente intestinal de camundongo promoveu a expressão de flagelinas nesta bactéria como visto por *western-blotting* de bactérias isoladas de camundongos colonizados *in vivo* usando anticorpos contra a flagelina específica de *R. hominis* (Fig. 3D). Isto é consistente com relatos prévios indicando

que apenas certos subconjuntos de *Firmicutes* produzem flagelos *in vivo* (14).

Não surpreendentemente, a expressão de genes do metabolismo catabólico em *R. hominis* no ambiente intestinal foi maioritariamente afetada pelos compostos dietéticos (Fig. 3E). Os genes envolvidos incluíram acetil-CoA acetiltransferase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, butiril-CoA desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxicinase [ATP]. Apesar da regulação destes genes ser maioritariamente conduzida pela dieta, no último ponto de recolha o efeito do hospedeiro também foi aparente. Inesperadamente, o ambiente do hospedeiro infrarregulou alguns genes participantes no metabolismo de substâncias derivadas do hospedeiro tais como glucoronato, que é comum em cadeias de carboidratos dos proteoglicanos da mucosa.

Para investigar adicionalmente os efeitos da adaptação do hospedeiro no transcriptoma de *R. hominis*, foi realizada estimulação *in vitro* de células epiteliais intestinais humanas (Caco-2 e HT-29). Isto mostrou que o gene de transferência por conjugação/mobilização *mobAlmobL proteína 1*, que foi induzido por adaptação ao intestino do camundongo, também estava aumentado em ambas as linhas de células (Fig. 3F). Consistente com os dados *in vivo*, o gene da flagelina *MotA* estava sobrerregulado em células Caco-2. Os genes envolvidos no metabolismo do butirato mostraram diferenças entre as duas linhas de células, com infrarregulação vista nas células Caco-2 e sobrerregulação nas células HT-29.

***R. hominis* afeta as vias das células T principalmente no cólon**

A colonização de camundongos GF com *R. hominis* correlacionou-se com aumento da expressão de genes no intestino que era mais elevada no cólon. (Fig. 4A). Expressão diferencial foi mais profunda ao d28 após colonização, com 159 genes sobrerregulados e 143 infrarregulados. O número de genes expressos diferencialmente no íleon ao d14 era similar ao cólon ascendente, com 79 genes sobrerregulados e 119 genes infrarregulados. Expressão diferencial no íleon era muito reduzida ao d28, consistente com níveis de colonização reduzidos. A resposta transcriptômica diferiu nos dois pontos temporais, como mostrado pela separação clara de transcriptos significativos por análise de mapa de calor (Fig. 4B). A validação por PCR em tempo real de dados Affymetrix é mostrada na Fig. 4C.

A maioria das vias afetadas ao d14 no íleon e no cólon ascendentes agruparam-se nas categorias diferenciação de células, regulação do ciclo celular e remodelação do tecido. Importaneamente, a resposta imune foi o principal grupo de vias induzido ao d28 no cólon ascendente. As 36 vias significativamente afetadas nesta categoria estavam maioritariamente envolvidas na função da célula T e incluíram a via de sinalização de IL-10, a via ICOS na célula T auxiliar e regulação da função da célula T por CTLA-4. Os genes envolvidos nestas vias mostraram tanto sobrerregulação como infrarregulação, por isso, enquanto estas vias foram significativamente afetadas pela presença de *R. hominis*, os efeitos funcionais líquidos precisos na diferenciação de célula T requer investigação adicional. Contudo, IL-10, CD3 ϵ e IL-13 intensificadas e expressão

mudada de IFN- γ foram confirmadas por PCR em tempo real (Fig. 7), sugerindo que a colonização por *R. hominis* pode favorecer as vias de diferenciação de células Treg e Th2. Foi aplicada análise de Ontologia Génica para obter informação adicional sobre a classificação funcional de genes regulados diferencialmente. O processo GO para "polimerização de actina" (GO:0030041) (*Arpc3*, *Capg*, *Cdc42ep5* e *Rhoc*) estava sobrerregulado ao d28 no cólon em camundongos colonizados com *R. hominis* (Fig. 8). A polimerização de actina na sinapse imune é requerida para a ativação e função efetora da célula T. A indução de genes foi confirmada adicionalmente por PCR em tempo real (Fig. 4C). No geral, estes dados indicam que a *R. hominis* afeta ativamente a resposta imune adaptativa no cólon por influenciar positivamente a regulação de células T.

Relacionada com estes resultados foi a indução de membros da família Ly6 no cólon ascendente. Em particular, o produto génico de *Ly6g6c* ancorado a GPI estava sobrerregulado 25 vezes, e o gene relacionado *Ly6g6e* estava sobrerregulado 2 vezes ao d28. A maioria das células hematopoiéticas expressam um ou mais membros da família Ly6 incluindo neutrófilos e células dendríticas plasmacitoides. Adicionalmente, foi proposto um possível papel de Ly6 na ativação, diferenciação e maturação de células T (15).

A imunocitoquímica confirmou a presença aumentada de células Ly6G⁺, CD11b⁺ e CD3⁺ em camundongos colonizados com *R. hominis* (Fig. 5). Consistente com os dados mostrando vias de células T principalmente dominadas por respostas de Treg, estava um aumento estatisticamente significativo de células T duplamente positivas CD3⁺ FoxP3⁺ no cólon de camundongos inoculados com *R. hominis*. Claramente a colonização de *R. hominis*, como uma espécie bacteriana

única, induziu um aumento significativo numa população de células CD3⁺ FoxP3⁺, particularmente no cólon destes camundongos.

***R. hominis* modula os genes de resposta imune inata tanto no íleo como no cólon e atenua a colite em camundongos IL10KO**

Os genes envolvidos na imunidade inata e função de barreira do intestino foram significativamente induzidos pela presença de *R. hominis* no cólon ascendente. O processo GO "resposta imune inata" (GO:0045087) foi sobrerregulado e incluiu os genes relacionados com TLR *Tlr5*, *Tlr1* e *Vnn1*. A sobrerregulação de *Tlr5* foi interessante, particularmente dada a indução correspondente de genes flagelares e a presença da proteína flagelina em *R. hominis* durante a colonização do intestino, e pode inferir um papel para esta via de sinalização inata na mediação de outras respostas imunes inatas e adaptativas. O acoplamento entre a sinalização de TLR5 e as respostas das células T CD4⁺ foi recentemente demonstrado para patogénios flagelados (16). Similarmente, mostrou-se o papel de TLR2 em facilitar a colonização de *Bacteroides fragilis*, propagação de Treg e homeostasia imune (17).

Outros genes imunes inatos afetados no cólon por *R. hominis* incluíram os péptidos antimicrobianos *Defb37*, *Pla2g3*, *Muc16* e *Itln* e os genes de função de barreira do intestino *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3* e *Magi3*. Os genes imunes inatos mostrando sobrerregulação no íleon em resposta a *R. hominis* incluíram *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* e *Tcfe2a*. Curiosamente, o *Pcgf2* regula negativamente a expressão de diferentes citocinas, quimiocinas, e recetores de quimiocinas e pode desempenhar um papel importante no controlo de respostas inflamatórias nos tecidos

intestinais, em resposta a esta bactéria comensal. Curiosamente, também mostrámos regulação negativa da via de NF- κ B (GO:0043124) pela *R. hominis*, que, tal como *B. thetaiotaomicron* (19), pode contribuir para a homeostasia imune por infrarregulação desta cascata inflamatória.

O modelo de camundongo *knockout* para IL-10 foi usado para testar a eficácia terapêutica de *R. hominis*, devido ao controlo das vias inflamatórias bem como aos efeitos positivos na indução de Treg em camundongos monoassociados. Os camundongos foram doseados (~50 μ L, 10^{10} CFU) três vezes por semana a partir do desmame ao d20 de idade durante um período de 14 semanas. A expressão de genes de um painel de biomarcadores pró-inflamatórios mostrou que camundongos IL-10KO não tratados tiveram forte elevação de todos os genes investigados em comparação com os camundongos do tipo selvagem, com indução de genes variando de 4 a 49 vezes (Fig. 6A). A indução de genes pró-inflamatórios estava significativamente mais reduzida em camundongos tratados com *R. hominis* em comparação com não tratados, indicando benefícios terapêuticos fortes da administração oral de *R. hominis*. Os pesos corporais de animais tratados com *R. hominis* também eram mais pesados no fim do estudo em comparação com animais não tratados, e este efeito foi estatisticamente significativo em machos (Fig.6B). Finalmente, a análise histológica mostrou a presença de inflamação severa no cólon ascendente de IL-10KO não tratados, enquanto animais tratados com *R. hominis* tinham uma mucosa colónica com aparência relativamente saudável.

A colonização com *R. hominis* influencia os genes de saciedade e a composição corporal

Também foram evidentes ações metabólicas significativas de *R. hominis* em camundongos monoassociados. Os processos GO 'regulação negativa da resposta a alimentos' (GO:0032096), 'regulação negativa do apetite' (GO:0032099), e 'regulação da secreção de catecolaminas' (GO:0050433) estavam todos infrarregulados no cólon ascendente após colonização com *R. hominis*. Estes dados inferem que a *R. hominis* exerce um efeito estimulador no apetite do hospedeiro. Os genes envolvidos nestes processos foram *Agt*, *Cartpt*, *Cck* e *Cxcl12*, com mudanças de vezes variando de 2 a 12 vezes. O *Cck*, em particular, desempenha um papel principal na digestão e saciedade como um supressor de fome. O *Gcg* também mostrou infrarregulação neste local do intestino.

Para estabelecer se estas mudanças génicas tiveram relevância fisiológica em relação à ingestão de alimentos e composição corporal, foram realizadas análises do peso seco da carcaça e composição. Curiosamente, os pesos secos da carcaça de camundongos associados a *R. hominis* eram significativamente mais pesados em comparação com animais GF, e as diferenças eram mais discerníveis ao d14. Análise adicional da carcaça de lípidos mostrou que a adiposidade total também era significativamente mais elevada em animais tratados com *R. hominis* ao d14. Estes achados são consistentes com os dados recentes que revelam o papel dos *Firmicutes* na colheita de energia através de fermentação dietética, mas também apoia a noção que as bactérias intestinais podem de facto modular o eixo cérebro-intestino e as hormonas reguladoras do apetite.

Discussão

A co-evolução a longo prazo do mutualismo hospedeiro-micróbio conduziu provavelmente a seleção de espécies bacterianas funcionalmente importantes no intestino, a maioria das quais não estão elevadamente representadas noutros ecossistemas. Atualmente, existe informação limitada no que diz respeito à contribuição de membros individuais da comunidade microbiana para as funções intestinais, particularmente em relação ao desenvolvimento do sistema imune da mucosa.

Trabalho recente usando um modelo de colonização reversível baseado em *E. coli* (HA 107) demonstrou que são requeridas bactérias vivas em números próximos de 10^8 CFUs por grama de conteúdo para os efeitos indutores de imunidade em IgA (20). Recentemente, as funções específicas de SFB e *Bacteroides fragilis* foram investigadas no intestino do camundongo para definir as suas contribuições individuais para a biologia da célula T e mostrou-se que ambas estas bactérias são indutores potentes de células Tregs e Th17 (5, 8, 9). Os efeitos de membros individuais dos *Firmicutes* do Agrupamento XIVA não foram relatados previamente, apesar de se ter notado a sua presença na ASF que também afeta a diferenciação de células T (10).

O requerente demonstrou aqui a primeira monoassociação bem sucedida de intestino do camundongo livre de germes com uma bactéria anaeróbia, *R. hominis*, que é um membro do filo *Firmicutes*. A sensibilidade extrema ao oxigénio de bactérias como *Roseburia* requer técnicas estritas de cultura anaeróbia, tornando difícil realizar caracterização funcional. O requerente estabeleceu monocolonização estável de *R. hominis* em camundongos livres de germes e produziu a

sequência genômica completa anotada para revelar a sua organização metabólica, fisiologia, e propriedades simbióticas. Descobriu-se que as respostas transcricionais de *R. hominis* após colonização podem ser atribuídas tanto ao ambiente intestinal do hospedeiro como à dieta. Os efeitos conduzidos pelo hospedeiro dominaram a resposta de *R. hominis* na sequência da monoassociação. Estes incluíram subsistemas de transferência de genes, transporte através da membrana, quimiotaxia e motilidade. A forte sobrerregulação dos genes envolvidos na transferência por mobilização apoia a perspectiva de que o ambiente intestinal é altamente conducente à troca horizontal de genes entre membros da microflora intestinal. Deste modo, este ambiente pode acelerar a disseminação de genes importantes para a sobrevivência bacteriana, colonização e função no ecossistema intestinal.

O papel da motilidade e aparelho flagelar na colonização do hospedeiro está bem elaborado para bactérias patogénicas mas muito menos é conhecido acerca do papel das proteínas flagelares em bactérias comensais. Experiências *in vivo* revelaram um efeito estimulador do ambiente intestinal do hospedeiro na expressão de genes de flagelina. Os sinais de flagelina são recebidos pelos recetores TLR5 do hospedeiro (24) e muitas estruturas de flagelina patogénicas induzem respostas pró-inflamatórias fortes (24). A sinalização através de TLR5 em resposta a por comensais flagelados residentes pode ser importante para a homeostasia, visto que a deleção de TLR5 resulta em colite espontânea em camundongos (25). A expressão intensificada da flagelina de *R. hominis in vivo* é, portanto, de interesse potencial. Outro trabalho mostrou que os mutantes de flagelina de *E. coli* têm uma vantagem de colonização sobre as estirpes flageladas do tipo selvagem, possivelmente devido à

ausência de reconhecimento inato pela sinalização TLR5 (26, 27). O requerente mostrou que para certos *Firmicutes*, a sobrerregulação de flagelina é uma resposta natural à colonização do intestino. A proteína flagelina de *R. hominis* permanece expressa *in vivo* e correlaciona-se com colonização sustentada, ausência de inflamação evidente e expansão de células T de fenótipo regulador. Assim, as estruturas comensais de flagelina através de TLR5 podem ajudar a dirigir respostas de tolerância imune. Dados adicionais baseados em TLR5KO e mutantes de flagelina de *R. hominis* irão adicionalmente clarificar a importância de flagelinas comensais em relação à homeostasia imune mas o efeito protetor observado de *R. hominis* em camundongos IL-10KO apoia esta hipótese, apesar de outras frações de sinalização tal como butirato também possam contribuir para a regulação imune.

Foi estabelecido um papel claro para *R. hominis* na promoção da função de barreira do intestino e imunidade inata no cólon de camundongo. Junções apertadas, junções de hiato e junções aderentes operam para limitar a translocação bacteriana para a camada subepitelial (28). Tanto a doença de Crohn como a colite ulcerosa são caracterizadas por perda da função de barreira e integridade da junção apertada. Curiosamente, a disbiose da microflora do intestino na IBD está associada a uma redução dos *Firmicutes* (1, 29). A observação de que a *R. hominis* intensifica ativamente a expressão dos genes barreira sugere que a sua perda em pacientes com IBD pode ser funcionalmente significativa. A ativação de complexos de junção apertada não é apenas prerrogativo de *R. hominis*; outros comensais, tais como *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Lactobacillus acidophilus*, também intensificam a função

barreira da mucosa (18, 30), inferindo oportunidades probióticas com estas bactérias na IBD humana.

Os efeitos de *R. hominis* no sistema imune do intestino foram intrigantes. Os efeitos mais fortes foram notados no cólon ascendente e os genes tais como *Ly6g6c* estavam fortemente sobrerregulados, bem como as vias envolvidas na regulação e diferenciação das células T e polimerização de actina na sinapse imune, as quais estão implicadas na ativação de células T e funções efetoras. Apesar de a expressão de genes de Treg em resposta à colonização com *R. hominis* não ser muito forte, as vias das células T mais afetadas incluíram aquelas relacionadas com IL-10, ICOS e CTLA-4, que estão todas envolvidas no apoio da diferenciação de Treg. Importantemente, o requerente foi capaz de demonstrar aumentos significativos nas células CD3⁺FoxP3⁺ nos cólones deste camundongo. Estes achados complementam os dados recentes noutras espécies de *Clostridium* que conduzem a diferenciação Treg. Claramente, *R. hominis* pode promover expansão de células T na mucosa e tem impacto na diferenciação de células T.

Foi interessante notar que estes efeitos imunes fortes no cólon em comparação com o íleon, especialmente ao d28 após monocolonização com *R. hominis*. Os dados transcriptómicos ao d14 sugerem que alguma iniciação pode ser iniciada no íleon neste ponto temporal. Os efeitos nos diferentes subconjuntos de células T no cólon ascendente ao d28 podem deste modo refletir um tráfego e alojamento de células do íleon para o linfonodo mesentérico para o cólon.

Um interessante efeito biológico adicional da colonização com *R. hominis* foi a regulação de genes influenciadores de respostas a alimentos e controlo do apetite. Em particular,

as hormonas de saciedade *Cck* e *Gcg* estavam significativamente reduzidas. Os efeitos da *Cck* na ingestão de alimentos são mediados através da via aferente vagal. Esta é a principal via neural através da qual a informação acerca dos nutrientes ingeridos atinge o sistema nervoso central para influenciar tanto a função intestinal como o comportamento alimentar. A *Cck* atua no sistema vagal para diminuir a expressão de moléculas que estimulam o apetite e alimentação, e para aumentar a expressão de moléculas que inibem a alimentação e diminuem o apetite (*Npy2r* e *Cartpt*, ambas infrarreguladas duas vezes no estudo atual). Não foi relatado nenhuma ligação entre *Cck*, *Gcg* e as bactérias comensais até agora, contudo, tanto os ácidos gordo como as proteínas são potentes indutores de *Cck* e *Gcg* (31). *R. hominis* produz ácidos gordos de cadeia curta tais como butirato com caudas alifáticas de menos de seis carbonos; foi relatado que esta atividade metabólica reduz o efeito estimulador na *Cck* plasmática, observado com ácidos gordo de cadeia mais longa (32). Curiosamente, a análise do peso da carcaça revelou que tanto o peso corporal como o conteúdo em lípidos estava de facto significativamente aumentado com *R. hominis*, consistente com os aumentos do peso corporal observados em convencionalização de camundongos livres de germes (33). Resta saber se este é um efeito direto da redução nas hormonas de saciedade como visto no estudo atual, visto que o envolvimento de *Cck* e *Gcg* não foi relatado previamente. Contudo, é importante reconhecer que já foi mostrada previamente uma ligação entre a colonização com microflora e a colheita de energia da dieta, em parte através da libertação de SCFAs (34). Dado que *R. hominis* é um produtor de butirato principal, este mecanismo provavelmente também contribui para a eficiência metabólica observada após tratamento com *R. hominis*.

Em resumo, a monoassociação do intestino murino com *R. hominis* induziu eventos de expressão génica bidirecional consistentes com mudanças no transporte bacteriano através de membrana, quimiotaxia e motilidade desta bactéria adaptada ao intestino e uma ativação concomitante dos sistemas imunes inato e adaptativo do hospedeiro. Esta bactéria metabolicamente ativa também exerce efeitos importantes nos genes de apetite e saciedade que se correlacionaram com ganho de peso corporal intensificado em camundongos colonizados.

Composições

Outro aspeto da invenção refere-se a uma composição compreendendo uma espécie bacteriana como descrito acima e um excipiente, transportador ou diluente farmacologicamente aceitável. Excipientes, diluentes, transportadores adequados são descritos acima.

A composição pode ser qualquer composição, mas é preferencialmente uma composição para ser administrada oralmente, entericamente ou por via rectal. Por exemplo, a composição pode ser uma composição comestível. "Comestível" significa um material que está aprovado para consumo humano ou animal.

Outro aspeto da invenção refere-se a uma composição probiótica compreendendo uma espécie bacteriana como descrito acima.

Como usado aqui, o termo "probiótico" significa preparações celulares microbianas ou componentes de células microbianas com um efeito benéfico na saúde ou bem-estar do hospedeiro. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. *et al.* "Probiotics: how

should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107-10).

Preferencialmente, a composição probiótica é uma composição administrável oralmente de bactérias probióticas metabolicamente ativas, *i.e.*, vivas e/ou liofilizadas, ou inviáveis mortas por calor, irradiadas ou lisadas. A composição probiótica pode conter outros ingredientes. A composição probiótica da invenção pode ser administrada oralmente, *i.e.*, na forma de um comprimido, cápsula ou pó. Produtos encapsulados são favorecidos para *R. hominis* visto que é um anaeróbio. Outros ingredientes (tais como vitamina C, por exemplo), podem ser incluídos como sequestrantes de oxigénio. Substratos prebióticos como estes melhoram a colonização e sobrevivência *in vivo*. Alternativamente, a composição probiótica da invenção pode ser administrada oralmente como um alimento ou produto nutricional, tal como leite ou produtos lácteos fermentados à base de soro de leite, ou como um produto farmacêutico.

Uma dose diária adequada das bactérias probióticas é desde cerca de 1×10^3 até cerca de 1×10^{11} unidades de formação de colónias (CFU), mais preferencialmente desde cerca de 1×10^7 até cerca de 1×10^{10} CFU, mais preferencialmente, desde cerca de 1×10^6 até cerca de 1×10^{10} CFU.

Numa forma de realização preferencial, a composição contém a espécie bacteriana e/ou seus componentes celulares, como ingredientes ativos, numa quantidade de desde cerca de 1×10^6 até cerca de 1×10^{11} CFU/g, no que diz respeito ao peso da composição, preferencialmente desde cerca de 1×10^8 até cerca de 1×10^{10} CFU/g. A dose pode ser de 1 g, 3 g, 5 g e 10 g.

Tipicamente, um probiótico é opcionalmente combinado com pelo menos um composto prebiótico adequado. Um prebiótico é habitualmente um carboidrato não digerível tal como um oligo ou polissacarídeo, ou um álcool de açúcar, que não é degradado ou absorvido no trato digestivo superior. Prebióticos conhecidos incluem produtos comerciais tais como inulina e transgalacto-oligossacarídeos.

Preferencialmente, a composição da presente invenção inclui um prebiótico numa quantidade de desde cerca de 1 até cerca de 30% por peso, no que diz respeito à composição do peso total, preferencialmente desde 5 a 20% por peso. Carboidratos preferenciais são selecionados de: fruto-oligossacarídeos (ou FOS), fruto-oligossacarídeos de cadeia curta, inulina, isomalto-oligossacarídeos, pectinas, xilo-oligossacarídeos (ou XOS), quitosano-oligossacarídeos (ou COS), beta-glucanos, goma arábica modificada e amidos resistentes, polidextrose, D-tagatose, fibras de acácia, alfarroba, aveia, e fibras de citrinos. Prebióticos particularmente preferenciais são os fruto-oligossacarídeos de cadeia curta (pela simplicidade mostrada adiante como FOSs-c.c); os FOSs-c.c. referidos são carboidratos não digeríveis, geralmente obtidos pela conversão do açúcar de beterraba e incluindo uma molécula de sacarose à qual estão ligadas três moléculas de glicose.

Rações/produtos

Um aspeto adicional da invenção refere-se a produtos alimentares, suplementos dietéticos, nutracêuticos, fórmulas nutricionais, bebidas e medicamentos contendo uma espécie bacteriana como definido acima, e seu uso.

Numa forma de realização preferencial, a composição compreende adicionalmente pelo menos um outro tipo de

bactéria de outro grau alimentar, em que a bactéria de outro grau de comida é preferencialmente selecionada de um grupo que consiste em bactérias de ácido láctico, bifidobactérias, propionibactérias ou suas misturas.

Um aspeto da invenção relaciona-se com um produto alimentar compreendendo a espécie bacteriana definida acima. O termo "produto alimentar" pretende cobrir todos os produtos consumíveis que podem ser sólidos, gelatinosos ou líquidos. Produtos alimentares adequados podem incluir, por exemplo, produtos alimentares funcionais, composições alimentares, alimentos para animais de estimação, alimentação para gado, alimentos saudáveis, rações e similares. Numa forma de realização preferencial, o produto alimentar é um alimento saudável.

Como usado aqui, o termo "produto alimentar funcional" significa alimento que é capaz de proporcionar não apenas um efeito nutricional, mas é também capaz de proporcionar um efeito benéfico adicional ao consumidor. Conformemente, alimentos funcionais são alimentos comuns que têm componentes ou ingredientes (tais como aqueles aqui descritos) incorporados em si que transmitem aos alimentos um efeito funcional específico - p.ex., benefício médico ou fisiológico - além de um puramente nutricional.

Exemplos de produtos alimentares específicos que são aplicáveis à presente invenção incluem produtos à base de leite, sobremesas prontas a comer, pós para reconstituição com, p.ex., leite ou água, bebidas de leite com chocolate, bebidas de malte, pratos prontos a comer, pratos ou bebidas instantâneos para humanos ou composições alimentares representando uma dieta completa ou parcial destinada a animais de estimação ou gado.

Numa forma de realização preferencial, a composição de acordo com a presente invenção é um produto alimentar destinado a humanos, animais de estimação ou gado. A composição pode ser destinada a animais selecionados do grupo que consiste em cães, gatos, porcos, gado bovino, cavalos, cabras, ovelhas ou aves. Numa forma de realização preferencial, a composição é um produto alimentar destinado a espécies adultas, em particular adultos humanos.

Na presente invenção, "produto à base de leite" significa qualquer produto à base de leite ou soro de leite líquido ou semissólido que tem um conteúdo de gordura variável. O produto à base de leite pode ser, p.ex., leite de vaca, leite de cabra, leite de ovelha, leite desnatado, leite gordo, leite recombinado de leite em pó e soro de leite sem qualquer processamento, ou um produto processado, tal como iogurte, leite coalhado, coalho, leite azedo, leite gordo azedo, leitelho e outros produtos de leite azedo. Outro grupo importante inclui bebidas de leite, tais como bebidas de soro de leite, leites fermentados, leites condensados, leites para recém-nascidos ou bebês; leites com sabor, gelado; alimentos contendo leite tal como doces.

Um aspeto da invenção refere-se a uma ração ou alimentação de animal compreendo a espécie bacteriana definida acima.

As composições da presente invenção podem ser - ou podem ser adicionadas a - suplementos alimentares, também referidos aqui como suplementos dietéticos ou nutricionais. Deste modo, outro aspeto da invenção refere-se a um suplemento dietético ou aditivo alimentar compreendendo uma ou mais estirpes bacterianas de acordo com a invenção.

As espécies bacterianas e composições probióticas de acordo com a invenção também podem ser usadas em nutrição animal

(p.ex. em nutrição de porco), particularmente no período de desaleitamento precoce e período de engorda. Espera-se que os probióticos reforcem a função imune, reduzam e previnam doenças infecciosas, alterem benéficamente a composição da microflora, e melhorem o crescimento e desempenho de animais, por exemplo, através de eficiência aumentada de conversão alimentar.

Diluentes, excipientes e transportadores

Como mencionado acima, a invenção também se refere a composições, mais preferencialmente composições farmacêuticas ou suplementos nutricionais, compreendendo as espécies bacterianas definidas acima, e seu uso. A espécie bacteriana é geralmente administrada em mistura com um transportador, excipiente ou diluente farmacêuticamente ou nutricionalmente aceitável, particularmente para terapia humana. As composições farmacêuticas podem ser para uso humano ou animal em medicina humana ou veterinária.

Exemplos de tais excipientes adequados para as várias formas diferentes de composições farmacêuticas aqui descritas podem ser encontradas no *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2ª Edição, (1994), Editado por A Wade e PJ Weller.

Transportadores ou diluentes aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica, e são descritos, por exemplo, em *Remington's pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

Exemplos de transportadores adequados incluem lactose, amido, glicose, celulose de metilo, estearato de magnésio,

manitol, sorbitol e similares. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água.

A escolha do transportador, excipiente ou diluente farmacêutico pode ser selecionada no que diz respeito à via de administração pretendida e prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como, ou em adição ao, transportador, excipiente ou diluente quaisquer ligando(s), lubrificante(s), agente(s) de suspensão, agente(s) de revestimento, agente(s) de solubilização adequados.

Exemplos de ligandos adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glicose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, adoçantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, celulose de carboximetilo e polietileno glicol.

Exemplos de lubrificantes adequados incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e similares.

Conservantes, estabilizadores, corantes e até agentes aromatizantes podem ser fornecidos na composição farmacêutica. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido *p*-hidroxibenzoico. Também podem ser usados antioxidantes e agentes de suspensão.

Transportadores, diluentes e excipientes nutricionalmente aceitáveis incluem aqueles adequados para consumo humano ou animal e que são usados como padrão na indústria alimentar. Transportadores, diluentes e excipientes nutricionalmente

aceitáveis típicos serão familiares para um perito na técnica.

Administração

As composições da presente invenção podem ser adaptadas para vias de administração oral, rectal, vaginal, parentérica, intramuscular, intraperitoneal, intra-arterial, intratecal, intrabronquial, subcutânea, intradérmica, intravenosa, nasal, bucal ou sublingual. Preferencialmente, as composições da presente invenção estão adaptadas para vias de administração oral, rectal, vaginal, parentérica, nasal, bucal ou sublingual.

Para administração oral, é feito uso particular de comprimidos prensados, pílulas, comprimidos, cápsulas gelatinosas, gotas e cápsulas.

Outras formas de administração compreendem soluções ou emulsões que podem ser injetadas intravenosamente, intra-arterialmente, intratecalmente, subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente ou intramuscularmente, e que são preparadas a partir de soluções estéreis ou esterilizáveis. As composições farmacêuticas da presente invenção também podem ser na forma de supositórios, pessários, suspensões, emulsões, loções, pomadas, cremes, géis, sprays, soluções ou pós para polvilhar.

Um meio alternativo de administração transdérmica é pelo uso de um adesivo para a pele. Por exemplo, o ingrediente ativo pode ser incorporado num creme consistindo numa emulsão aquosa de polietileno glicóis ou parafina líquida. A estirpe bacteriana também pode ser incorporada numa

pomada consistindo numa cera branca ou base de parafina mole branca junto com quantos estabilizadores e conservantes quanto forem necessários.

As composições podem ser formuladas na forma de dosagem unitária, *i.e.*, na forma de porções discretas contendo uma dose unitária, ou um múltiplo ou subunidade de uma dose unitária.

Dosagem

Um perito ordinário na técnica pode determinar facilmente uma dose apropriada de uma das composições instantâneas para administrar a um sujeito sem experimentação indevida. Tipicamente, um médico determinará a dosagem real que será mais adequada para um paciente individual e dependerá de uma variedade de fatores incluindo a atividade da estirpe bacteriana empregada específica, a estabilidade metabólica e extensão de ação dessa estirpe, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, modo e tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármacos, a severidade da condição particular, e o indivíduo submetido a terapia. As dosagens aqui divulgadas são exemplares do caso médio. Podem obviamente existir casos individuais onde intervalos de dosagem maior ou menor são merecidos, e esses estão dentro do âmbito desta invenção.

A dose diária efetiva habitual em humanos é desde cerca de 1×10^3 até cerca de 1×10^{11} , mais preferencialmente, desde cerca de 1×10^7 até cerca de 1×10^{11} , ainda mais preferencialmente, desde cerca 1×10^6 até cerca de 1×10^{10} CFU.

Combinações

Numa forma de realização particularmente preferencial, as composições da invenção são administradas em combinação com um ou mais outros agentes ativos. Em tais casos, as composições da invenção podem ser administradas consecutivamente, simultaneamente ou sequencialmente com ou mais outros agentes ativos.

A presente invenção é adicionalmente descrita por meio dos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

Condições de crescimento bacteriano

R. hominis A2-183^T (=DSM 16839^T=NCIMB 14029^T) foi crescida anaerobicamente em meios YCFA sintético ou M2GSC complexo. A cultura foi inoculada a partir de *stock* congelado em tubos Hungate e incubada durante a noite a 37 °C. As bactérias foram crescidas em placas de agar M2GSC durante 48h numa estação de trabalho anaeróbia MACS-MG-1000 (Don Whitley Scientific) sob N₂ a 80%, CO₂ a 10%, and H₂ a 10% a 37 °C. O efeito da mucina foi investigado pela adição de mucina de estômago porcino do tipo III a 0,5% (p/v) (Sigma-Aldrich) ao meio YCFA.

Para a colonização de camundongos livres de germes, *R. hominis* foi crescida em meio YCFA durante a noite a 37 °C. A cultura foi centrifugada e o sedimento foi ressuspenso em um mL de meio YCFA, suplementado com cisteína a 2% (p/v, Sigma-Aldrich) e ácido ascórbico a 3% (p/v, Sigma-Aldrich).

Experiências em animais

Experiências em animais livres de germes foram realizadas no criatório de roedores gnotobióticos INRA em Jouy-en-Josas (plataforma ANAXEM, Institut Micalis, INRA, Jouy-en-Josas, França). Todas as experiências em animais foram aprovadas pelo comité de ética local. Dezoito camundongos machos C3H/HeN livres de germes foram alocados nos grupos de controlo (N=8) e tratamento (N=10) e enjaulados individualmente em isoladores de plástico. Os camundongos foram alimentados *ad libitum* com uma dieta comercial esterilizada (R03-40; UAR). Ao dia 0, foram dados 100 µL de uma cultura de *R. hominis* aos animais no grupo de tratamento por gavagem, enquanto foram dados 100 µL de meio YCFA aos animais de controlo. Aos dias 14 e 28, quatro animais de controlo e cinco animais tratados com *R. hominis* foram sacrificados. As experiências C57/BL6 IL-10KO foram realizadas no Rowett Institute of Nutrition and Health (Aberdeen, Escócia, RU). Camundongos do tipo selvagem (N=8), IL-10KO (N=12) e IL-10KO + *R. hominis* (N=11) foram analisados 14 semanas após o início da experiência. Resumidamente, a *R. hominis* foi administrada 3 vezes por semana a 10⁹ CFU/dia.

O íleon, cólon ascendente e cólon descendente foram divididos em quatro partes iguais e transferidos para RNAlater (Ambion), formalina tamponada neutra (Sigma-Aldrich) ou azoto líquido. O cego inteiro e cólon transversal foram transferidos para RNAlater. A histopatologia também foi avaliada nos camundongos IL-10KO.

Experiências em culturas de tecido

Todos os reagentes de cultura de células, salvo especificação em contrário, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. 2×10^5 células Caco-2 ou HT29 em 1,5 mL de meio DMEM (alto teor de glicose, HEPES) suplementado com soro bovino fetal inativado pelo calor (Gibco), penicilina, estreptomicina, anfotericina B e L-glutamina foram semeadas nos compartimentos superiores de um placa Transwell de seis poços (Corning). Os compartimentos inferiores continham 3,0 mL do mesmo meio. As células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera com CO₂ a 5% até 3 dias após a confluência, lavadas com solução de Hank para remover antibióticos e FCS e reduzidas em DMEM suplementado com L-glutamina, selenito de sódio e transferrina durante 24h sem antibióticos. As inserções Transwell foram depois transferidas para uma caixa de cultura anaeróbia na estação de trabalho anaeróbia a 37 °C. O compartimento superior de cada inserção foi preenchido com meio celular DMEM anaeróbio, enquanto o compartimento inferior foi preenchido com DMEM oxigenado.

R. hominis A2-183 foi colhida na fase exponencial por centrifugação a 3.500xg durante 5 min. O sedimento foi lavado e ressuspenso em 0,8 mL de DMEM anaeróbio. Cem microlitros de suspensão bacteriana (10⁸ CFU/mL) foram adicionados aos poços experimentais. Os poços de controlo receberam a mesma quantidade de meio sem células bacterianas. O controlo adicional incluiu células bacterianas incubadas sem células Caco-2 ou HT29.

Célula bacterianas e eucarióticas foram colhidas após incubação de 2h e 4h. Tanto as bactérias não aderentes como as aderentes foram aspiradas e armazenadas em RNAlater. A viabilidade das células *R. hominis* foi testada por

plaqueamento em placas YCFA. As células Caco-2 ou células HT29 foram colhidas dos poços e também armazenadas em RNAlater.

Construção da biblioteca de *R. hominis*

DNA cromossômico de *R. hominis* para construção de biblioteca de tamanho reduzido e pirosequenciação foi isolado usando o UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories Inc) e DNA de elevado peso molecular para bibliotecas de fosmídeos foi isolado usando um estojo Wizard Genomic DNA Purification (Promega). A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel.

O DNA foi mecanicamente cortado usando um estojo Nebulizar (Invitrogen) e fracionado por eletroforese em gel. Os fragmentos de DNA do tamanho desejado foram excisados do gel e purificados usando um Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). A reparação das extremidades foi feita com um DNA Terminator End Repair Kit (Lucigen). Fragmentos de 1,5-3,5 kb foram clonados usando um estojo CloneSmart® LCamp (Lucigen) e uma biblioteca de 4-8 kb foi construída usando o vetor pJAZZ®-OC (Lucigen). Foram construídas bibliotecas de fosmídeos usando o CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre Biotechnologies). As colônias foram selecionadas usando um selecionador de colônias automatizado (BioRobotics BioPick, Genomic Solutions) e arquivadas em placas de microtitulação de 384 poços contendo 70 µL de meio 2xLB suplementado com glicerol a 10% e antibiótico correspondente. As células foram crescidas durante a noite a 36 °C com agitação e armazenadas a -80 °C.

Sequenciação, montagem, e anotação

Modelos para a sequenciação de bibliotecas de tamanho reduzido foram gerados por PCR usando um μ L de biomassa de clone e iniciadores SL1 e SR2 circundando o local de clonização de pSMART-LCAmp. Os produtos de PCR foram purificados usando placas de filtração Multiscreen PCR Clean-up (Millipore). O DNA recombinante dos clones de pJAZZ®-OC foi isolado usando o Wizard® SV 96 Plasmid DNA Purification System (Promega). O DNA de fósideo foi isolado usando o FosmidMAX™ DNA Purification Kit (Epicentre). As extremidades dos fragmentos de DNA das bibliotecas WGS de *R. hominis* com diferentes tamanhos de inserção foram obtidas usando sequenciadores de DNA CEQ8000 (Beckman Coulter) e ABI 3770 (Applied Biosystems). O DNA genómico de *R. hominis* também foi sequenciado usando sequenciadores 454 GS20 (454 Life Sciences) e 454 FLX (Roche). Os dados de Sanger e 454 foram recolhidos com a versão 3 de MIRA (<http://chevreux.org/projects/mira.html>; (35)). A conduta de anotação RAST (<http://rast.nmpdr.org>; (36)) foi usada para anotação automática e manual do genoma e para análises genómicas comparativas. A sequência genómica anotada de *R. hominis* A2-183 foi submetida ao GenBank sob o número de acesso CP003040.

Análises por microarranjos

Microarranjo bacteriano

O RNA bacteriano foi isolado a partir de conteúdos do cego de camundongos usando o estojo RNeasy mini, e adicionalmente processado com o estojo MICROBEnrich™ (Ambion), o estojo de enriquecimento de mRNA bacteriano MICROBExpress™ (Ambion), e o estojo de amplificação de RNA

bacteriano MessageAmp™ II (Applied Biosystems). O RNA foi marcado com ou dCTP-Cy3 ou dCTP-Cy5 durante a síntese de cDNA (estojo de marcação CyScribe First Strand cDNA; Amersham). Os produtos marcados foram purificados usando o estojo de purificação CyScribe GFX (Amersham). Os produtos de PCR amplificados a partir de 6.000 clones na biblioteca RA8 foram dispostos em duplicado em lâminas de microscópio revestidas com aminosilano (Corning) usando um MicroGrid II TAS (BioRobotics). Fragmentos amplificados dos genes *housekeeping* *rpoD* e *gyrA* foram distribuídos aleatoriamente na matriz como controles. A hibridação de microarranjos por realizada na estação de hibridação GeneTAC (Genomic Solutions). A marcação de corante foi trocada por uma segunda hibridização, e uma purificação de RNA separada foi também marcada e hibridizada duas vezes, para assegurar reprodutibilidade e para obter resultados estatisticamente significativos. No total, quatro lâminas foram hibridizadas para cada comparação, para um total de 12 pontos de hibridação por clone amplificado. A fluorescência foi medida em dois canais usando um GeneTAC LS IB (Genomic Solutions) com o *software* GeneTac Integrator versão 3.0.1. As intensidades dos locais foram transformadas em logaritmo e foi aplicada normalização de Loess para remover diferenças na marcação de sondas e eficiências de hibridação. Testes t de uma amostra foram usados nos valores de razão log para testar para expressão diferencial. Os dados foram considerados significativos quando mudança de vezes >2 e $P < 0,05$.

Análise por microarranjo de camundongo

Foi removido tecido de íleon e cólon ascendente do RNAlater e lisado em Trizol (Invitrogen). O RNA foi isolado usando passos de clorofórmio:isopropanol padrão. O RNA total foi adicionalmente purificado com o estojo RNeasy (Qiagen),

incluindo um passo de digestão com DNase I isenta de RNase (Qiagen). A integridade do RNA foi determinada usando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). O RNA total foi processado em cRNA marcado com biotina usando um One-Cycle Target Labeling Kit (Affymetrix). Foi realizada hibridação para o GeneChip Mouse Genome Array (Affymetrix) num GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) no Institute of Medical Sciences Microarray Core Facility (University of Aberdeen, RU). Os *chips* foram rastreados com um Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix). A análise de qualidade de imagem foi realizada usando o Gene Chip Operating Software (GCOS) (Affymetrix). Foi realizada análise de dados adicional com os pacotes de *software* gratuitamente disponíveis R (<http://r-project.org>) e Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). O teste de F moderado proporcionado pelo Bioconductor package *limma* foi usado para testar para expressão diferencial. Os dados foram considerados significativos quando $P < 0,05$ usando o método de falsas descobertas de Benjamini e Hochberg. Foi realizada análise estatística separadamente para cada um dos dois tempos temporais. Todos os genes expressos diferencialmente ($P > 0,05$) foram importados para o *software* analítico MetaCore (GeneGo, St Joseph, MI) para gerar mapas de vias. Análise de enriquecimento de vias integrada foi realizada usando vias canônicas baseadas em conhecimento e vias metabólicas endógenas. A classificação das vias integradas relevantes foi baseada em valores *p* calculados usando distribuição hipergeométrica. Os valores *p* representaram a probabilidade de um dado número de genes da lista introduzida corresponder a um certo número de genes no mapa por acaso, considerando os números de genes na experiência *versus* o número de genes no mapa no conjunto completo de todos os genes em mapas.

Interpretação funcional dos dados baseada em Ontologia Génica (GO) foi realizada usando DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>), uma versão expandida do programa original acessível na rede (37). Transcritos significativamente diferentes ($P < 0,05$) foram alocados na categoria GO "Processo Biológico" para descobrir padrões de expressão de genes significativamente enriquecidos para termos de GO específicos.

Os dados dos microarranjos foram submetidos ao National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (número de acesso GSE25544; <http://ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

Análise por RT-PCR

Os iniciadores de PCR bacterianos foram desenhados usando a ferramenta *on-line* Primer3Plus (38) e adquiridos da Sigma-Aldrich. A análises por PCR em tempo real foi realizada usando um 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). A PCR foi realizada como se segue: um ciclo a 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 seg e 60 °C durante 1 min, acabando com um passo de dissociação. Todas as amostras foram corridas em triplicado. Foi usado GyrA como um gene de referência para normalização devido à sua reduzida variação entre amostras.

Para expressão de genes do hospedeiro, 2 µg de RNA eucariótico total isolado do íleon e cólon ascendente foi transcrito reversamente em cDNA usando o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) com iniciadores aleatórios. Foi realizada análise por PCR em tempo real usando um 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) com o Quantifast SYBR Green PCR Kit

(Qiagen) e QuantiTect Primer Assays (Qiagen). As condições de ciclização de PCR foram como se segue: um ciclo a 95 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 10 s e a 60 °C durante 30 s, acabando com um passo de dissociação. Todas as amostras foram corridas em triplicado. O Hprt foi selecionado como um gene de referência para normalização devido à sua reduzida variação entre amostras. Todos os dados de RT-PCR foram analisados numa escala logarítmica com base 2 pelo teste t de Student permitindo variâncias desiguais com um limiar de significância de $P < 0,05$. As diferenças foram retransformadas para calcular as mudanças de vezes.

Western blot

Anticorpos policlonais de coelho imunopurificados contra a Fla2 de *Roseburia hominis* foram produzidos como descrito em Duck *et al.* (39). Em suma, coelhos fêmeas brancos New Zealand foram imunizados com péptido sintético em adjuvante de Freund completo e impulsionado diversas vezes. Foram usados péptido 261-275 (C-AQYNDDAKSVLEILK-COOH) e péptido 58-71 (C-GLNKASRNSQDGIS-CONH₂) para fla2 de *R. hominis*. Após imunização, os anticorpos foram purificados numa coluna de imunoafinidade preparada por acoplamento de péptidos a 1 mL de esférulas de sefarose ativadas.

Para o *western blot*, os conteúdos intestinais do cólon ascendente foram suspensos em tampão laemmli contendo ureia a 8M. A biomassa de *R. hominis* (controlo positivo) foi diluída no mesmo tampão. Trinta µL de cada amostra foram carregados em poços de um gel Bis-Tris a 4-12% NuPAGE® Novex® (Invitrogen) e submetidos a eletroforese, seguido por processamento adicional usando o WesternBreeze Chemiluminescent Immunodetection System (Invitrogen). O

anticorpo contra Fla2 foi diluído a 1:1000 em diluente de anticorpo e incubado durante a noite a 4 °C, seguido por 1h à temperatura ambiente com antioelho conjugado com fosfatase alcalina. A detecção foi atingida usando o sistema de imagem Fuji LAS3000.

Peso corporal seco e análise da carcaça de lípidos

A carcaça de camundongo eviscerado foi pesada, liofilizada para peso constante e depois moída para análise. O conteúdo em lípidos foi determinado por extração (1:100 p/v) com clorofórmio/metanol (2:1 v/v) como descrito previamente (40).

Análise por FISH

Foi realizada análise por FISH em secções de tecido intestinal usando uma prova bacteriana Eub338 e uma prova específica de *R. hominis* A2-183 recentemente desenhada.

Os tecidos fixados em formalina tamponada neutra foram incorporados em Technovit 8100 (Heraeus Kulzer). Secções de dois microns foram cortadas usando um micrótomo rotacional (Leica/Reichert Autocut). Foram tiradas 3 secções por lâmina a 100 µm, 200 µm e 300 µm no tecido, resultando em nove secções por animal.

As lâminas foram desidratadas por incubação consecutiva em etanol a 50% (v/v), 80% e 96% e secas à temperatura ambiente. As provas de FISH de rRNA 16S usadas foram uma prova bacteriana geral Eub338 (GCTGCCTCCCGTAGGAGT; Cy3) e uma prova específica de *R. hominis* A2-183 recentemente desenhada (GTACATTACATACTCTGTCAGTG; FITC), que foi extensivamente testada para especificidade contra um painel

de isolados bacterianos intestinais. Foi aplicada prova de dez microlitros (30 ng/mL) em 100 μ L de tampão de hibridação à amostra desidratada e incubada à temperatura específica de prova. As lâminas foram lavadas em tampão de lavagem a 50°C durante 30 min, mergulhadas em água gelada para remover tampão de lavagem residual e secas sob fluxo de ar comprimido. Foi realizada contracoloração 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories Inc) e as lâminas foram montadas com Vectashield Mounting Medium para fluorescência (Vector Laboratories Inc) para prevenir desbotamento. As bactérias foram visualizadas usando um microscópio de fluorescência Leica DM RBE (Leitz GMBH) e fotografado com uma câmara Penguin 600CL (Pixera) e *software* Viewfinder 3.0 (Studio Lite). Imagens de elevada ampliação (63x) foram recuperadas usando um sistema Apochromatics (Leica).

Imunofluorescência

A imunolocalização de marcadores de células T foi examinada em crio-seções (8 μ m). As seções foram fixadas ou em metanol pré-arrefecido durante 30 min a -20 °C (Ly6G FITC, CD3 FITC, CD11b FITC, todos a 1:50 (BD Biosciences)), ou, para as FoxP3 duplamente marcadas (1:500, Abcam) com CD3 FITC (1:100, BD Biosciences) fixadas em paraformaldeído a 1 % (PFA) durante 2 min à temperatura ambiente seguido por 3 min em Triton X em PBS a 0,01%. Todas as seções foram bloqueadas com BSA a 10% (Sigma) contendo soros pré-ímmunes relevantes em PBS a 10% (pH 7,4). Tecidos fixados em metanol foram incubados com anticorpos primários durante 1 h à temperatura ambiente. Seções fixadas em PFA foram incubadas durante a noite a 4 °C. FoxP3 foi visualizada usando Alexa goat anti rabbit 594 (1:1000, Molecular Probes). As seções foram contramarcadas com DAPI e

montadas com Vectashield (Vector Laboratories). Para quantificação das células positivas, um mínimo de cinco campos de visualização de cada secção de camundongo foi examinado, usando o *software* de imagem e as configurações do microscópio descritas acima.

Histologia

As amostras de tecido foram fixadas durante três horas em fixante de Carnoy (etanol a 60% (v/v), clorofórmio a 30% (v/v) e ácido acético glacial a 10% (v/v)) à temperatura ambiente com agitação constante. As amostras foram transferidas para etanol a 70% e armazenadas à temperatura ambiente até orientadas para secção transversa e incorporadas em resina de vulcanização a frio usando Technovit 8100 (Heraeus Kulzer) de acordo com as instruções do fabricante. O tecido incorporado foi montado em Histoblocs usando Technovit 3040 (Heraeus Kulzer). Secções de quatro microns foram cortadas usando um micrótomo rotacional (Leica Autocut) equipado com uma faca de vidro (TAAB Laboratories Equipment Ltd.). As secções de tecido foram corada usando métodos de hematoxilina/eosina padrão e examinadas com um microscópio Zeiss Axioskop equipado com objetivas de 10x e 20x. Foram tiradas imagens usando uma câmara QImaging e *software* Image Pro Plus.

Comparação de genomas de espécies e estirpes relacionadas com *Roseburia*

O Requerente produziu uma sequência completa de genoma de *R. hominis* A2-183, que é representado por um cromossoma com 125 bp, 3,592 único. Anotação automatizada e manual do genoma usando a plataforma RAST revelou a presença de quatro operões ribossomais, 66 RNAs e 3.273 proteínas

previstas. A Distribuição por Categoria de Subsistema para *R. hominis* A2-183, *R. inulinivorans* DSM 16841, *R. intestinalis* L1-82, *R. intestinalis* M50/1 e *Eubacterium rectale* ATCC 33656 é mostrada nas Figuras 11-15 respectivamente.

Esta informação ilustra as diferenças no número de genes (apresentados entre parêntesis) em cada subsistema funcional. Estes genes são muito importantes na mediação da resposta do hospedeiro a cada bactéria individual. Importaneamente, estes genes são diferentes, tanto em número como em função, entre as várias estirpes. Os resultados estão resumidos abaixo:

R. hominis A2-183

Parede Celular e Cápsula (57)
Transporte através da Membrana (24)
Motilidade e Quimiotaxia (49)
Regulação e Sinalização da célula (16)
Dormência e Esporulação (12)
Carboidratos (271)

E. rectale ATCC 33656

Parede Celular e Cápsula (41)
Transporte através da Membrana (13)
Motilidade e Quimiotaxia (16)
Regulação e Sinalização da célula (9)
Dormência e Esporulação (6)
Carboidratos (172)

***R. intestinalis* L1-82**

Parede Celular e Cápsula (35)
Transporte através da Membrana (36)
Motilidade e Quimiotaxia (15)

Regulação e Sinalização da célula (10)
 Dormência e Esporulação (17)

***R. intestinalis* M50/1**

Parede Celular e Cápsula (28)
 Transporte através da Membrana (37)
 Motilidade e Quimiotaxia (17)
 Regulação e Sinalização da célula (10)
 Dormência e Esporulação (17)
 Carboidratos (201)

***R. inulinovorans* DSM 16841**

Parede Celular e Cápsula (69)
 Transporte através da Membrana (26)
 Motilidade e Quimiotaxia (14)
 Regulação e Sinalização da célula (9)
 Dormência e Esporulação (17)
 Carboidratos (160)

Porcentagem da identidade de sequência de >3000 genes encontrada em contig 1 destaca a diferença entre o genoma bacteriano de *R. hominis* e o bacteriano de *E. rectale*, *R. intestinalis* e *R. inulinivorans*

As comparações foram feitas entre os genomas de várias espécies de *Roseburia* e a espécie relacionada *Eubacterium rectale*, o parente mais próximo de *R. hominis*.

Genoma de referência de *R. hominis* 585394.12

Genoma de *E. rectale* ATCC336556 515619.3

R. intestinalis L1-82166486.4

R. intestinalis M50/1166486.5

R. inulinovorans DSM16841 622312.3

A percentagem de identidade de genes potenciais entre os vários genomas de *Roseburia* varia desde 0% até cerca de 90% da sequência de identidade. Muitos genes são hipotéticos e variam entre as estirpes. Estão presentes grandes números de genes nos genomas de *R. hominis* que estão ausentes nos genomas de outras espécies de *Roseburia*.

Roseburia hominis tem 924 genes que não são encontrados nos outros genomas de outras espécies de *Roseburia* (identidade de 0%), indicando que quase 25% do seu genoma é único para *R. hominis*. Também a reduzida homologia entre os outros genes (<10-70%) indica que é provável que as funções de muitos outros genes também difiram.

A informação proporciona evidências convincente de que estas bactérias são muito diferentes numa perspetiva de genoma e funcional, e não podem ser agrupadas para além da sua relação filogenética, que é geralmente baseada no gene conservado ribossomal 16S que é uma parte conservada de DNA procariótico encontrado em todas as bactérias. As sequências do gene rRNA 16S são usadas para filogenia bacteriana e estudos de taxonomia (marcador genético partilhado).

Funcionalidade em relação à resposta e imunidade do hospedeiro é específica da estirpe bacteriana

A figura 9 ilustra a comparação dos dados de expressão génica destas três estirpes de bactérias do Agrupamento XIVa (*Firmicutes*), nomeadamente *Roseburia hominis*, *E. rectale* e *Roseburia intestinalis*. Os dados indicam os números de genes únicos expressos pelas estirpes bacterianas filogeneticamente relacionadas após exposição a células epiteliais humanas. A expressão génica foi

determinada pelo uso de microarranjos humanos Affymetrix contendo 56.000 genes. Esta diferença reflete as diferenças nos seus genomas respectivos. [Estas experiências são similares às aquelas descritas noutra local na especificação usando microarranjos de camundongo, mas usando microarranjos humanos]. O GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array é o primeiro e mais abrangente ensaio de expressão de genoma humano completo. O microarranjo Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (HG-U133 Plus 2.0) compreende 1.300.000 características únicas de oligonucleótidos cobrindo mais de 47.000 transcriptos e variantes, que, por sua vez, representam aproximadamente 39.000 dos genes humanos melhor caracterizados. As linhas de células usadas para avaliar as respostas de sinalização induzidas por bactérias comensais diferentes incluem as células Caco-2 e células HT-29 da linha de células do cólon humano e bactérias incluindo *R. hominis*, *E. rectale* e *R. intestinalis* quando comparadas com *Salmonella enteritidis*, um patógeno entérico.

Diferenças funcionais nas bactérias do Agrupamento XIVa - comparação entre *R. hominis* e *E. rectale*

A figura 10 mostra que a *Roseburia hominis* induz A20, um regulador negativo da sinalização NF- κ B atividade anti-inflamatória potente enquanto outras estirpes bacterianas não têm efeito. A fração da flagelina da *Roseburia hominis* também induz A20 ao contrário daquela da *Eubacterium rectale*, uma bactéria relacionada.

Reagentes de cultura de células, salvo se especificação em contrário, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. As linhas de células Caco-2 (ECACC Cat No. 860102002) e HT29 (ATCC) cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)

suplementado com Soro Bovino Fetal a 10% (FBS) (Gibco, RU), L-glutamina a 200 mM e antibióticos/antimicóticos a 1% foram semeados em placas Transwell de seis poços (Corning). As células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera de CO₂ a 5% até 3 dias após confluência, lavadas com solução de Hanks para remover os antibióticos e FBS e reduzidas para DMEM suplementado com L-glutamina, selenito de sódio e transferrina durante 24h sem antibióticos. As inserções de Transwell foram depois transferidas para uma caixa de cultura anaeróbia numa estação de trabalho anaeróbia a 37 °C. O compartimento superior de cada inserção foi preenchido com meio celular DMEM anaeróbio, enquanto o compartimento inferior foi preenchido com DMEM oxigenado.

Roseburia hominis A2-183 e *E. rectale* ATCC336556 em meios de cultura YCFA e M2 padrão e *Salmonella enteric* do serotipo *enteritidis* cultivada em caldo de LB foram colhidas em fase exponencial por centrifugação a 3.500xg durante 5 min. O sedimento foi lavado e ressuspenso em DMEM anaeróbio. Cem microlitros de suspensão bacteriana (10⁸ CFU/mL) foram adicionados a poços experimentais. Os poços de controlo receberam a mesma quantidade de meio sem células bacterianas. O controlo adicional incluiu células bacterianas incubadas sem células Caco-2 ou HT-29.

Células bacterianas e eucarióticas foram colhidas após incubação de 2h e 4h. Tanto bactérias não aderentes como aderentes foram aspiradas e armazenadas em RNAlater. As células Caco-2 e HT-29 foram colhidas dos poços e também armazenadas em RNAlater.

Ensaio da Luciferase para determinação da expressão do gene da luciferase A20

O reagente de transfeção Fugene® 6 (Roche, RU) foi usado para a transfeção de células HT-29 com os plasmídeos carregando o gene repórter da luciferase sob o controlo do promotor A20 pLuc-A20 e pLuc-A20A NF-κB (mutado em 3 nucleótidos na região promotora A20) e o gene repórter de GFP sob o controlo do promotor A20 pCAGGS-GFP1A20 e pLuc-GL2\NF-κB. Após 48 h, as células foram estimuladas com bactérias vivas *R. hominis*, *E. rectale* e *S. enteritidis* flagelinas recombinantes; *S. enteritidis* e *R. hominis* (*Fla 1*) (100 ng/mL) durante 9, 12 e 24 h. As flagelinas recombinantes foram geradas usando sequências de comprimento total clonadas em vetores apropriados e expressas em *E. coli* JM109, BL21 e Rosetta. As atividades da luciferase (Pirilampo - f - Luc e *renilla* - r - Luc) foram determinadas usando o sistema de ensaio da luciferase Dual-Glo® (Promega, RU) e um Envision 2102 Multilabel Reader. A atividade relativa do repórter de luciferase foi obtida por normalização para controlo *renilla*.

Diversas modificações e variações dos aspetos descritos da invenção serão aparentes para aqueles peritos na técnica sem se afastar do âmbito e espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com formas de realização preferenciais específicas, deve ser entendido que a invenção como reivindicada não deve ser indevidamente limitada a tais formas de realização específicas. De facto, diversas modificações dos modos descritos de levar a cabo a invenção, que são óbvios para aqueles peritos nos campos relevantes, destinam-se a estar no âmbito das reivindicações seguintes.

REFERÊNCIAS

1. Spor, A., Koren, O., & Ley, R. (2011) *Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. Nat. Rev. Microbiol.* 9: 279-290.
2. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005) *Diversity of the human intestinal microbial flora. Science* 308: 1635-1638.
3. Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., & Lamarre, A. (2001) *IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. Microbes. Infect.* 3: 1021-1035.
4. Macpherson, A. J., Martinic, M. M., & Harris, N. (2002) *The functions of mucosal T cells in containing the indigenous commensal flora of the intestine. Cell Mol. Life Sci.* 59: 2088-2096.
5. Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005) *An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. Cell* 122: 107-118.
6. Chung, H. & Kasper, D. L. (2010) *Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. Curr. Opin. Immunol.* 22: 455-460.
7. Macpherson, A. J. (2006) *IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308: 117-136.

8. Gaboriau-Routhiau, V., Rakotobe, S., Lecuyer, E., Mulder, I., Lan, A., Bridonneau, C., Rochet, V., Pisi, A., De, P. M., Brandi, G. *et al.* (2009) *The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. Immunity.* 31: 677-689.
9. Ivanov, I. I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E. L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K. C., Santee, C. A., Lynch, S. V. *et al.* (2009) *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. Cell* 139: 485-498.
10. Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2011) *Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. Immunity.*
11. Duncan, S. H., Aminov, R. I., Scott, K. P., Louis, P., Stanton, T. B., & Flint, H. J. (2006) *Proposal of Roseburia faecis sp. nov., Roseburia hominis sp. nov. and Roseburia inulinivorans sp. nov., based on isolates from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2437-2441.
12. Mahowald, M. A., Rey, F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., Wollam, A., Shah, N., Wang, C., Magrini, V., Wilson, R. K. *et al.* (2009) *Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 5859-5864.
13. Aminov, R. I., Walker, A. W., Duncan, S. H., Harmsen, H. J., Welling, G. W., & Flint, H. J. (2006) *Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of*

human gut bacteria related to Roseburia spp. or Eubacterium rectale. Appl. Environ. Microbiol. 72: 6371-6376.

14. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008) *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host. Microbe* 3: 213-223.

15. Mallya, M., Campbell, R. D., & Aguado, B. (2006) *Characterization of the five novel Ly-6 superfamily members encoded in the MHC, and detection of cells expressing their potential ligands. Protein Sci.* 15: 2244-2256.

16. Letran, S. E., Lee, S. J., Atif, S. M., Flores-Langarica, A., Uematsu, S., Akira, S., Cunningham, A. F., & McSorley, S. J. (2011) *TLR5-deficient mice lack basal inflammatory and metabolic defects but exhibit impaired CD4 T cell responses to a flagellated pathogen. J Immunol.* 186: 5406-5412.

17. Round, J. L., Lee, S. M., Li, J., Tran, G., Jabri, B., Chatila, T. A., & Mazmanian, S. K. (2011) *The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. Science* 332: 974-977.

18. Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001) *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science* 291: 881-884.

19. Kelly, D., Campbell, J. I., King, T. P., Grant, G., Jansson, E. A., Coutts, A. G., Pettersson, S., & Conway, S. (2004) *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate*

inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and ReIA. Nat. Immunol. 5: 104-112.

20. Hapfelmeier, S., Lawson, M. A., Slack, E., Kirundi, J. K., Stoel, M., Heikenwalder, M., Cahenzli, J., Velykoredko, Y., Balmer, M. L., Endt, K. et al. (2010) *Reversible microbial colonization of germ-free mice reveals the dynamics of IgA immune responses. Science 328: 1705-1709.*

21. Elkins, C. A., Moser, S. A., & Savage, D. C. (2001) *Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in Lactobacillus johnsonii 100-100 and other Lactobacillus species. Microbiology 147: 3403-3412.*

22. Louis, P., McCrae, S. I., Charrier, C., & Flint, H. J. (2007) *Organization of butyrate synthetic genes in human colonic bacteria: phylogenetic conservation and horizontal gene transfer. FEMS Microbiol. Lett. 269: 240-247.*

23. Peterson, G., Kumar, A., Gart, E., & Narayanan, S. (2011) *Catecholamines increase conjugative gene transfer between enteric bacteria. Microb. Pathog.*

24. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., & Aderem, A. (2001) *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410: 1099-1103.*

25. Vijay-Kumar, M., Sanders, C. J., Taylor, R. T., Kumar, A., Aitken, J. D., Sitaraman, S. V., Neish, A. S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I. R. et al. (2007) *Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. J Clin. Invest 117: 3909-3921.*

26. De, P. M., Gaboriau-Routhiau, V., Rainteau, D., Rakotobe, S., Taddei, F., & Cerf-Bensussan, N. (2011) *Trade-off between bile resistance and nutritional competence drives Escherichia coli diversification in the mouse gut. PLoS Genet.* 7: e1002107.
27. Giraud, A., Arous, S., De, P. M., Gaboriau-Routhiau, V., Bambou, J. C., Rakotobe, S., Lindner, A. B., Taddei, F., & Cerf-Bensussan, N. (2008) *Dissecting the genetic components of adaptation of Escherichia coli to the mouse gut. PLoS Genet.* 4: e2.
28. Werth, M., Walentin, K., Aue, A., Schonheit, J., Wuebken, A., Pode-Shakked, N., Vilianovitch, L., Erdmann, B., Dekel, B., Bader, M. et al. (2010) *The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. Development* 137: 3835-3845.
29. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. et al. (2010) *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature* 464: 59-65.
30. Ukena, S. N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G. et al. (2007) *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. PLoS. One.* 2: e1308.
31. Geraedts, M. C., Troost, F. J., Tinnemans, R., Soderholm, J. D., Brummer, R. J., & Saris, W. H. (2010) *Release of satiety hormones in response to specific dietary*

proteins is different between human and murine small intestinal mucosa. Ann. Nutr. Metab 56: 308-313.

32. McLaughlin, J., Grazia, L. M., Jones, M. N., D'Amato, M., Dockray, G. J., & Thompson, D. G. (1999) *Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. Gastroenterology* 116: 46-53.

33. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006) *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature* 444: 1027-1031.

34. Tremaroli, V., Kovatcheva-Datchary, P., & Backhed, F. (2010) *A role for the gut microbiota in energy harvesting? Gut* 59: 1589-1590.

35. Chevreux, B., Wetter, T., & Suhai, S. (1999) *Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB)* 99: 45-56.

36. Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M. et al. (2008) *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics* 9: 75.

37. Dennis, G., Jr., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003) *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. Genome Biol.* 4: 3.

38. Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. A. (2007) *Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3*. *Nucleic Acids Res.* 35: W71-W74.

39. Duck, L. W., Walter, M. R., Novak, J., Kelly, D., Tomasi, M., Cong, Y., & Elson, C. O. (2007) *Isolation of flagellated bacteria implicated in Crohn's disease*. *Inflamm. Bowel. Dis.* 13: 1191-1201.

40. Olivera, L., Canul, R. R., Pereira-Pacheco, F., Cockburn, J., Soldani, F., McKenzie, N. H., Duncan, M., Olvera-Novoa, M. A., & Grant, G. (2003) *Nutritional and physiological responses of young growing rats to diets containing raw cowpea seed meal, protein isolate (globulins), or starch*. *J Agric. Food Chem.* 51: 319-325.

41. Sokol H., et al, *PNAS*, 28 de outubro, 2008, Vol 105, No 43, 16731-16736.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> GT Biologies Ltd

<120> Bactéria para Uso como um Probiótico para Aplicações Nutricionais e Médicas

<130> P043712PCT

<140> PCT/GB2012/052495

<141> 2012-10-08

<150> GB 1117313.5

<151> 2011-10-07

<160> 4

<170> PatentIn versão 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> *Roseburia hominis*

<400> 1

Ala	Gln	Tyr	Asn	Asp	Asp	Ala	Lys	Ser	Val	Leu	Glu	Ile	Leu	Lys
1				5					10					15

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> *Roseburia hominis*

<400> 2

Gly	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Arg	Asn	Ser	Gln	Asp	Gly	Ile	Ser
1				5					10				

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Prova bacteriana geral Eub338

<400> 3

gctgcctccc gtaggagt 18

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Prova específica para *Roseburia hominis* A2-183

<400> 4

gtacattaca tactctgtca gtg 23

Lisboa, 6 de junho de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso em medicina.
2. Uma composição farmacêutica compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis* e um excipiente, transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.
3. Um suplemento nutricional compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis* e um excipiente, transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.
4. Uma composição probiótica compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis*.
5. Uma ração, produto alimentar, suplemento dietético, suplemento nutricional ou aditivo alimentar compreendendo a espécie bacteriana *Roseburia hominis*.
6. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso na regulação do sistema imune de um sujeito.
7. A espécie bacteriana para uso de acordo com a reivindicação 6 em que a regulação do sistema imune é a regulação do sistema imune adaptativo de um sujeito.
8. A espécie bacteriana para uso de acordo com a reivindicação 6 em que a regulação do sistema imune é a regulação do sistema imune inato de um sujeito.

9. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso na manutenção da homeostasia imune num sujeito.
10. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso no tratamento de um distúrbio imune num sujeito.
11. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 10, em que o distúrbio imune é selecionado de colite ulcerosa, bolsite, outras condições autoimunes incluindo artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla, alergias incluindo doença celíaca, dermatite atópica e rinite.
12. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso no tratamento de um distúrbio selecionado de um distúrbio inflamatório, um distúrbio imune e um distúrbio intestinal num sujeito.
13. A espécie bacteriana para uso de acordo com reivindicação 12, em que o distúrbio é selecionado de síndrome do intestino irritável (IBS), distúrbio inflamatório do intestino (IBD), incluindo doença de Crohn e colite ulcerosa, bolsite, dispepsia funcional, obstipação funcional, diarreia funcional (incluindo diarreia associada a antibióticos, diarreia do viajante e diarreia pediátrica), dor abdominal funcional, meteorismo funcional, Síndrome da Dor Epigástrica, Síndrome da Irritabilidade Pós-prandial, doença do refluxo gastrointestinal (GERD), doenças

autoimunes tais como diabetes, artrite, esclerose múltipla e psoríase, alergias, doenças atópicas, p.ex., dermatite atópica, enterocolite necrotizante, outras infecções e suas combinações.

14. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso na melhoria da microflora intestinal num sujeito.

15. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso na promoção da saúde intestinal num sujeito.

16. A espécie bacteriana *Roseburia hominis* para uso de acordo com a reivindicação 1 em que a espécie bacteriana é para uso na promoção de células Treg e mecanismos de tolerância no sistema imune de um sujeito.

17. A espécie bacteriana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que a espécie bacteriana:

(i) regula a indução e/ou expressão de pelo menos um gene de mobilização ou quimiotaxia, mais preferencialmente sobrerregulando a expressão de um gene selecionado de *MobA* e *MobL*; ou

(ii) regula pelo menos um gene selecionado de *FlaA1*, *Fla2*, *FlaA3*, e *FlaB*; ou

(iii) regula a expressão de pelo menos um dos seguintes: acetil-CoA acetiltransferase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, butiril-CoA

desidrogenase, subunidade beta da flavoproteína de transferência de eletrões, subunidade alfa da flavoproteína de transferência de eletrões; ou

(iv) infrarregula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Agt*, *Cartpt*, *Cck*, *Cxcl12* e *Gcg*; ou

(v) ativa pelo menos um gene de resposta imune no cólon ou íleon; ou

(vi) ativa a resposta imune adaptativa pela regulação da indução e/ou expressão de genes associados à regulação de células T; ou

(vii) sobrerregula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Ly6g6c* e *Ly6g6e* no cólon ascendente; ou

(viii) regula a expressão de pelo menos um gene selecionado de *Tlr5*, *Tlr1*, *Vnn1*, *Defb37*, *Pla2g*, *Muc16*, *Itln*, *Sprrla*, *Cldn4*, *Pmp22*, *Crb3*, *Mag3*, *Marveld3*, *Mpp7*, *Defcr20*, *Pcgf2*, *Ltbp4*, *Igsf8* e *Tcfe2a*.

18. A espécie bacteriana para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, em que o sujeito é um mamífero, preferencialmente um humano.
19. Um processo para produção de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, compreendendo o processo referido mistura da espécie bacteriana *Roseburia hominis* com um excipiente, transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.
20. Um processo para produção de um suplemento nutricional de acordo com a reivindicação 3, compreendendo o processo referido mistura da espécie bacteriana *Roseburia hominis* com um excipiente, transportador ou diluente nutricionalmente aceitável.

Lisboa, 6 de junho de 2016

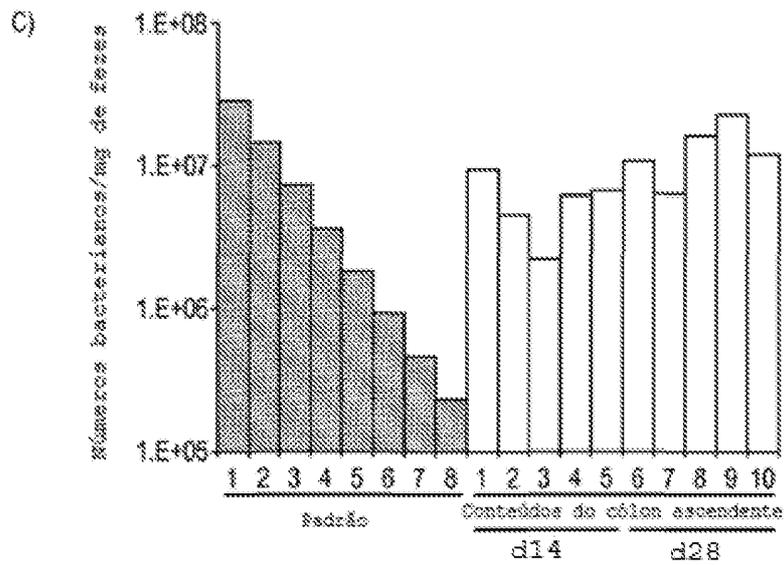
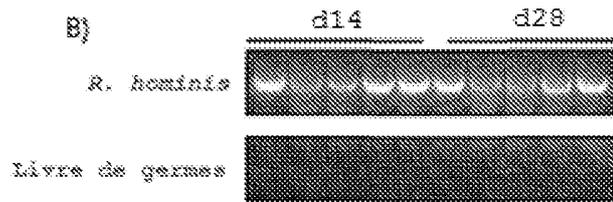
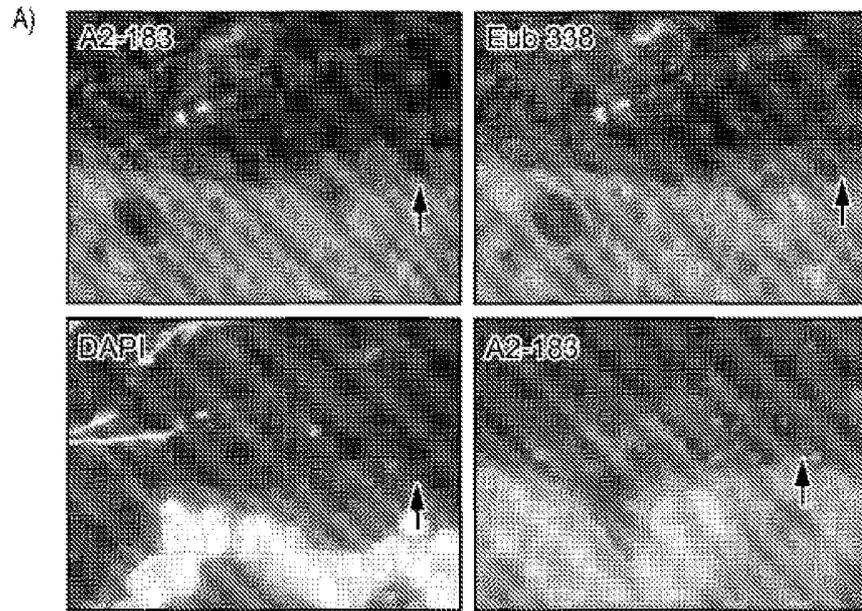


FIG. 1

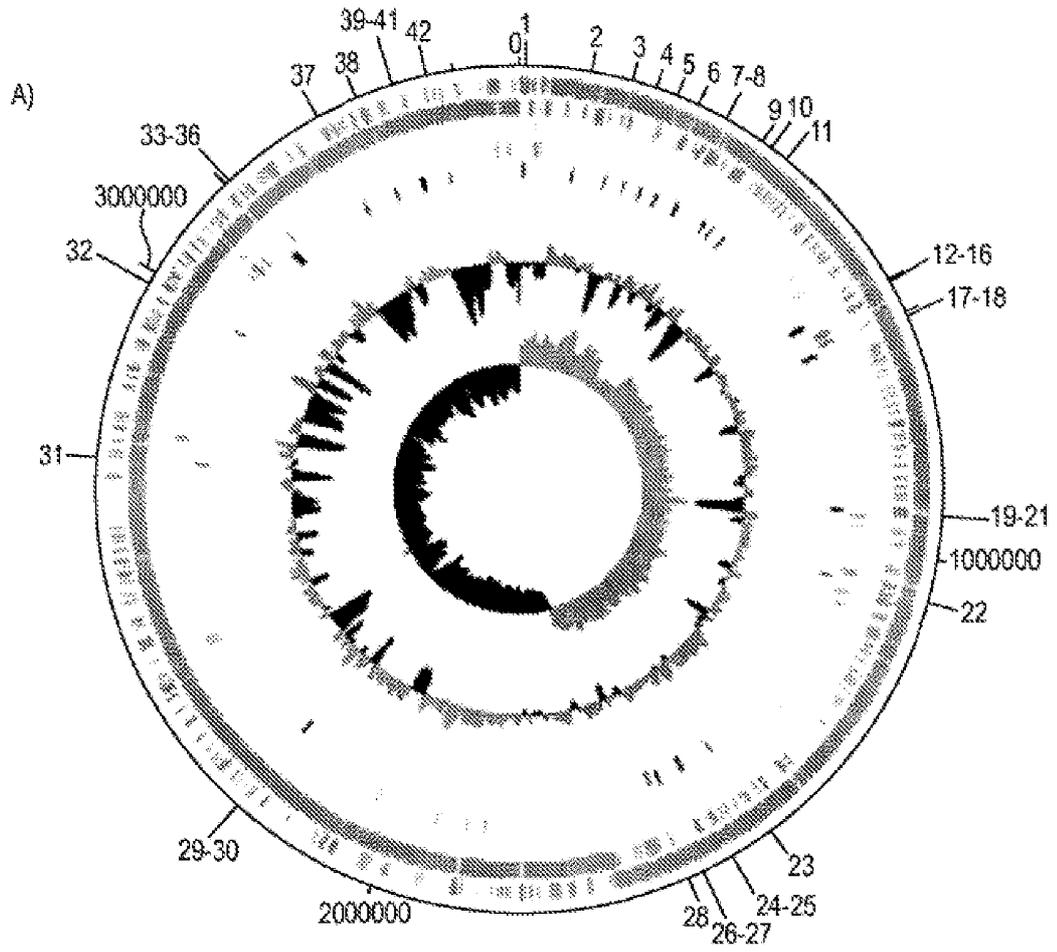


FIG. 2

Contagens das Características do Subistema

- Co-fatores, Vitaminas, Grupos Protéticos, Pigmentos (61)
- Parede Celular e Cápsula (57)
- Virulência, Doença e Defesa (22)
- Metabolismo do Fósforo (7)
- Fotossíntese (2)
- Diversos (35)
- Fagos, Fagócitos, Elementos Transponíveis, Filamentos (2)
- Transporte através da Membrana (24)
- Aquisição de ferro e metabolismo (9)
- Metabolismo do DNA (61)
- Nucleotídeos e Nucleotídeos (50)
- Metabolismo das proteínas (127)
- Divisão Celular e Ciclo Celular (90)
- Mobilidade e Quimiotaxia (49)
- Regulação e Sinalização da célula (22)
- Metabolismo Secundário (2)
- Metabolismo do DNA (27)
- Ácidos gordos, Lipídeos e Isoprenóides (65)
- Metabolismo do Açúcar (12)
- Dormência e Esporulação (12)
- Respiração (29)
- Resposta ao Stress (29)
- Metabolismo de Compostos Aromáticos (2)
- Aminoácidos e derivados (175)
- Metabolismo do Enxofre (11)
- Metabolismo do Fósforo (15)
- Carboidratos (271)

Distribuição por Categoria de Subistema

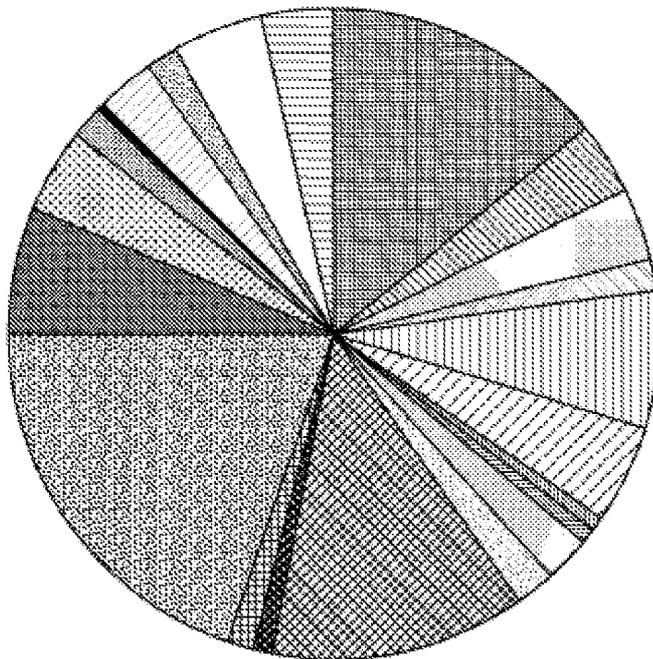


FIG. 2

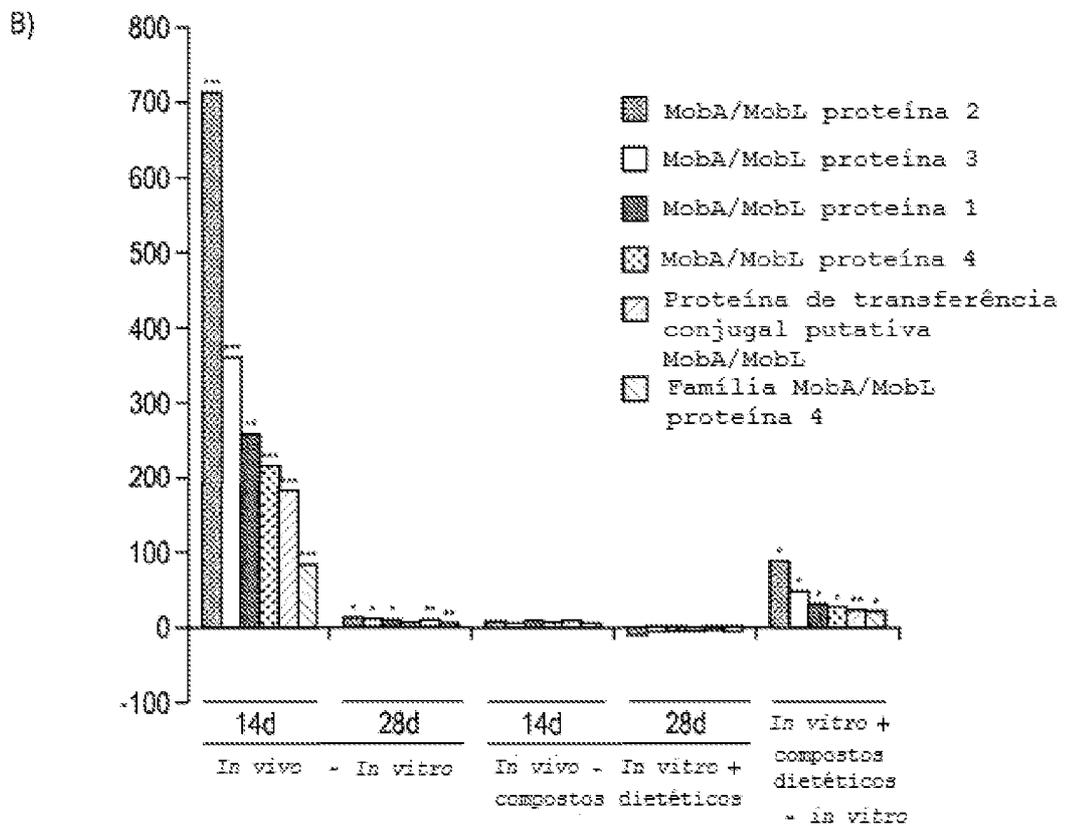
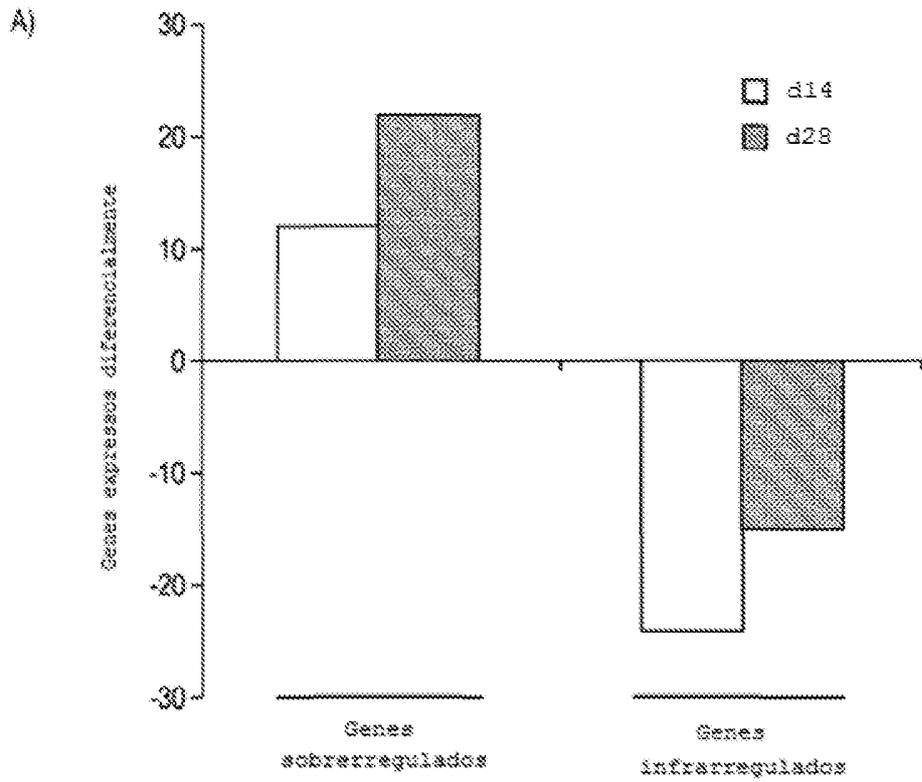


FIG. 3

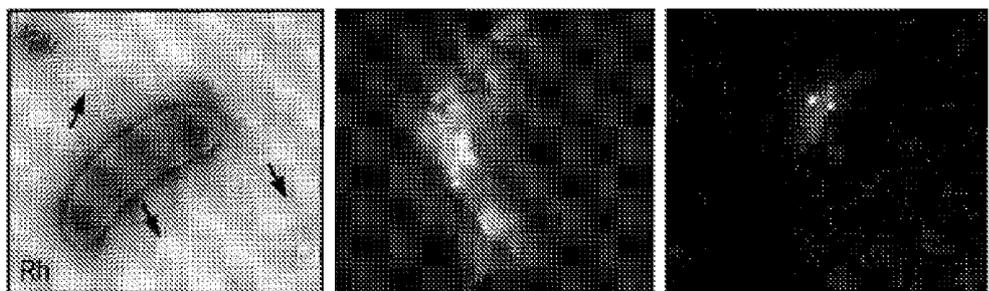
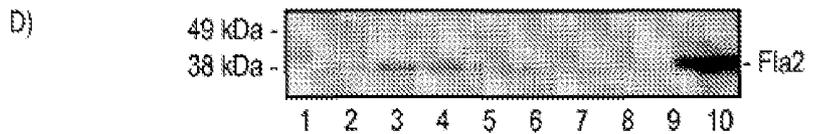
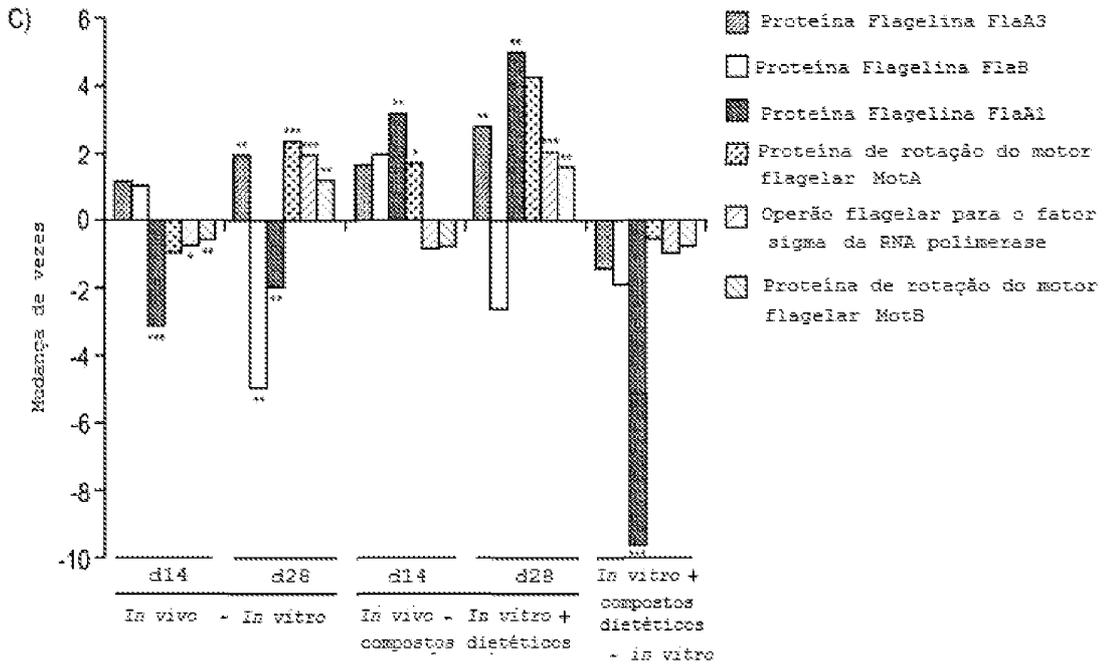


FIG. 3

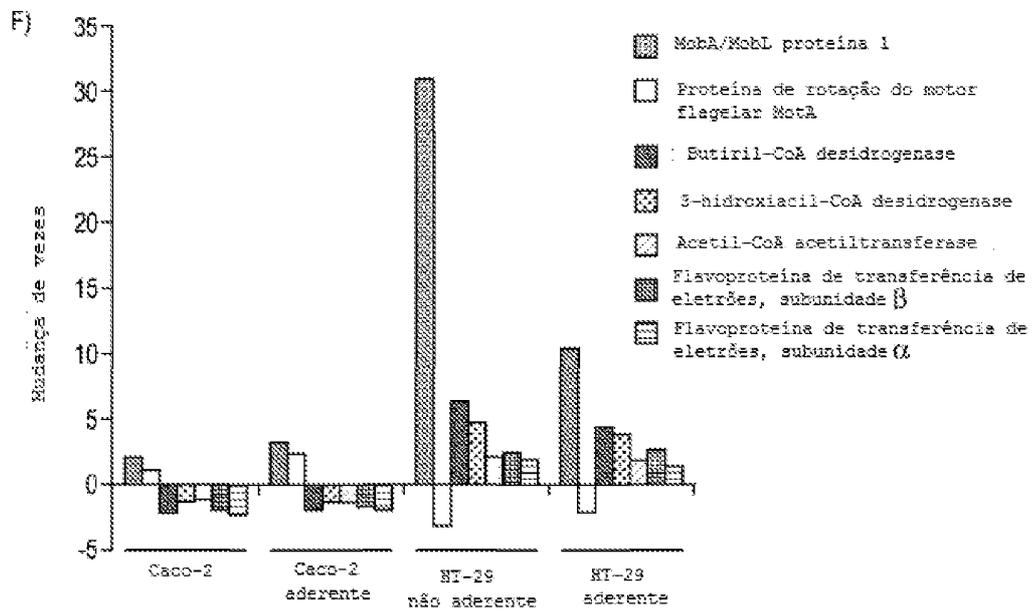
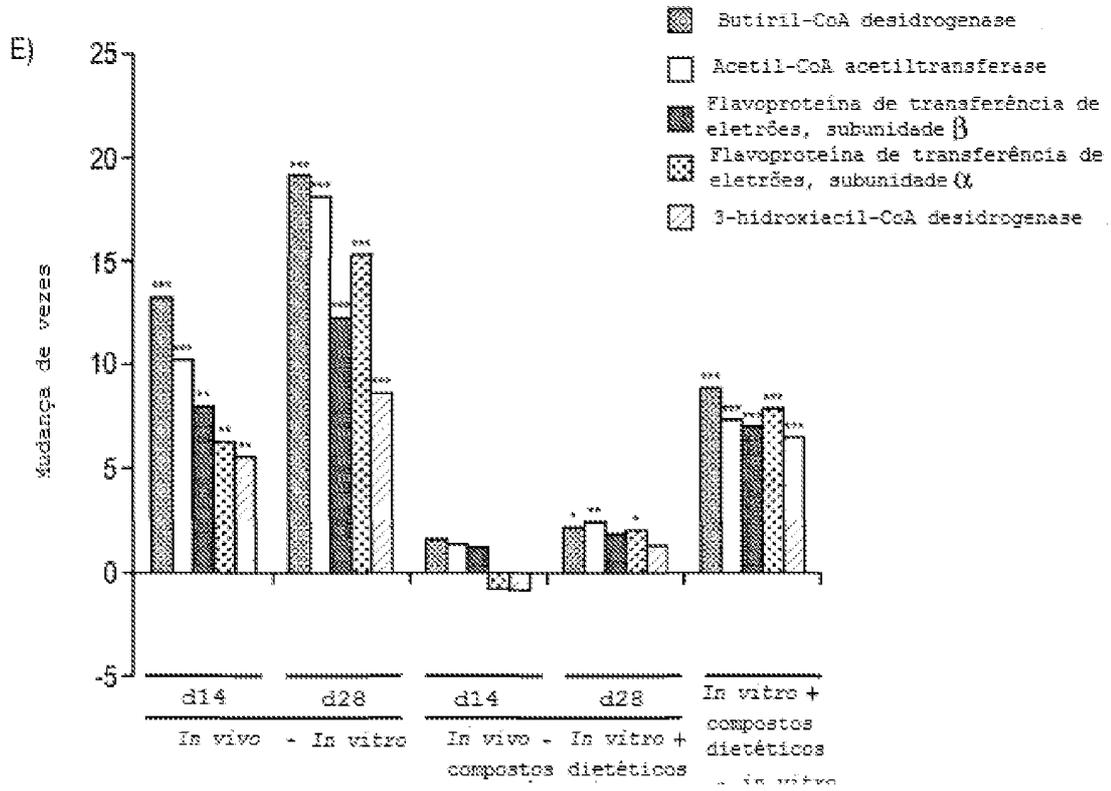


FIG. 3

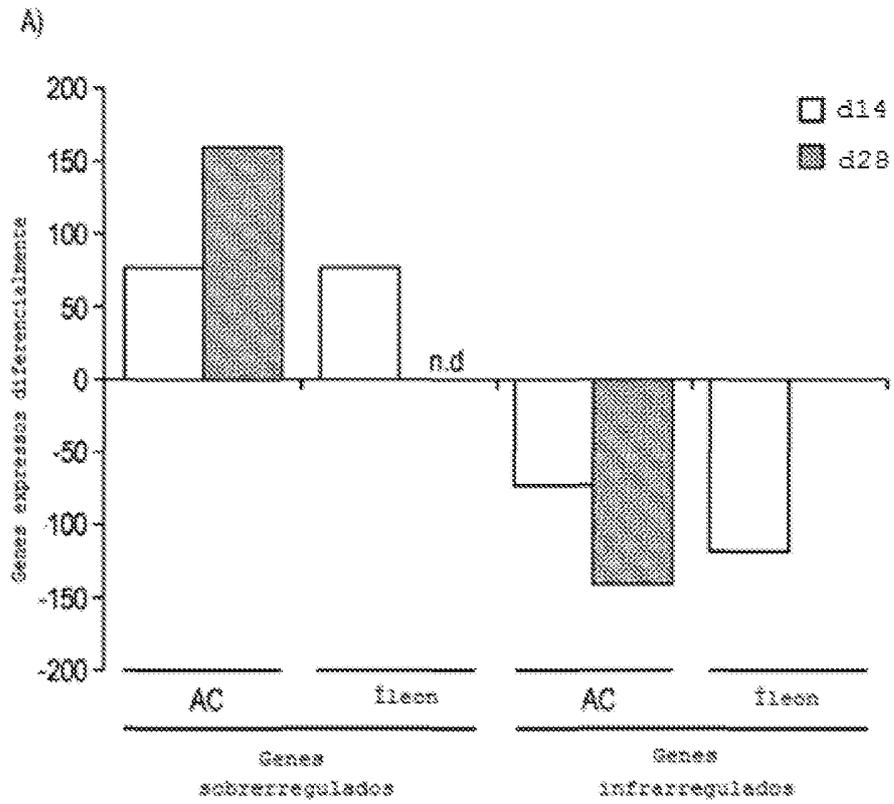


FIG. 4

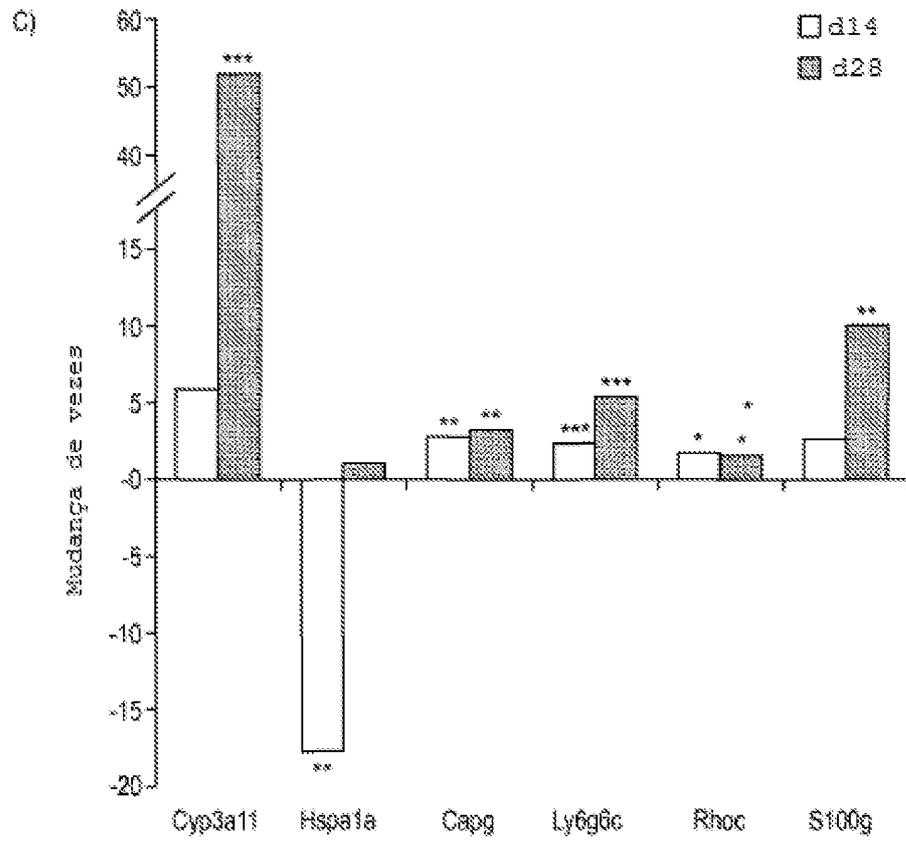


FIG. 4

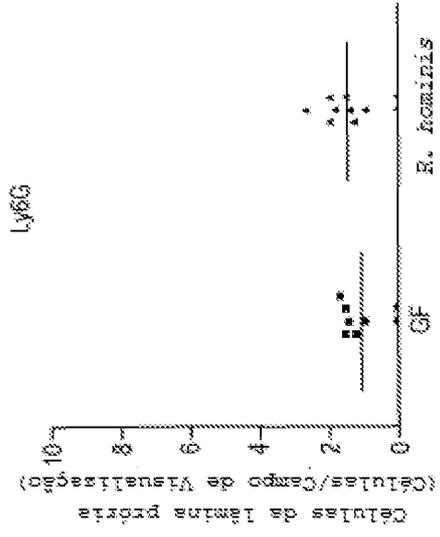
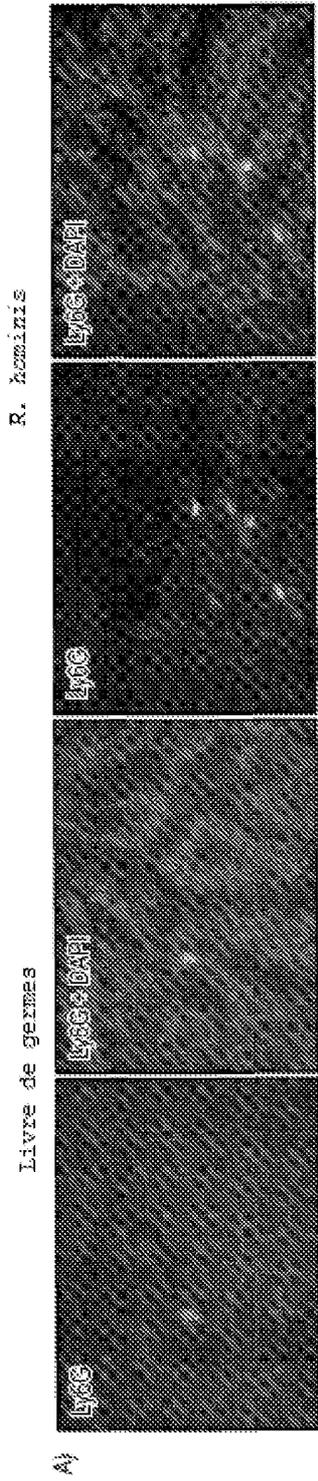
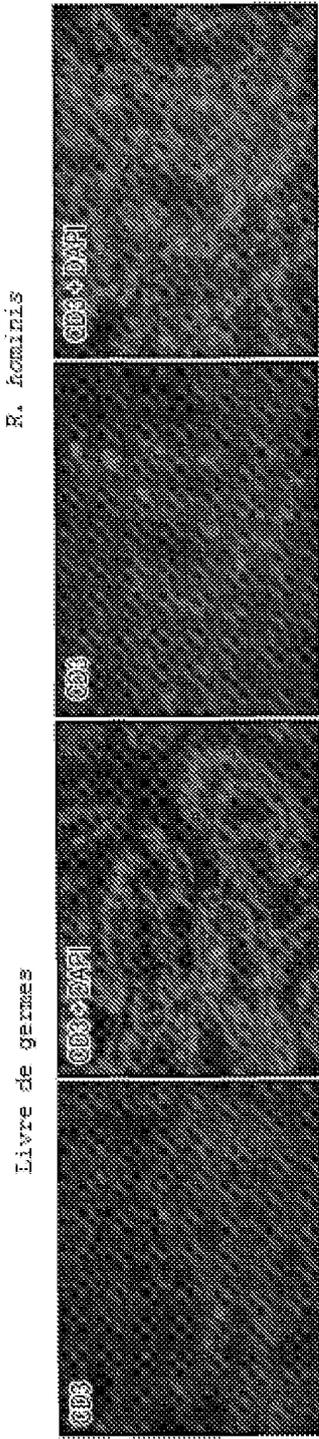


FIG. 5



3)

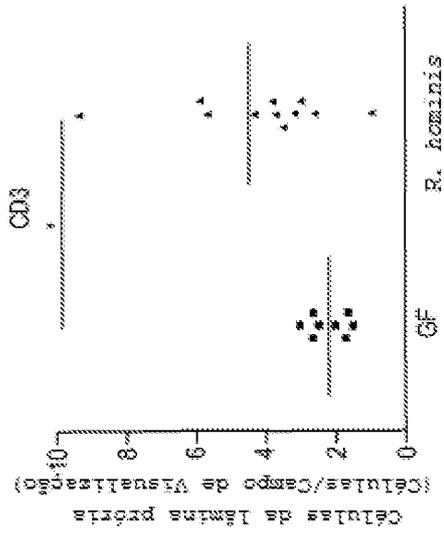


FIG. 5

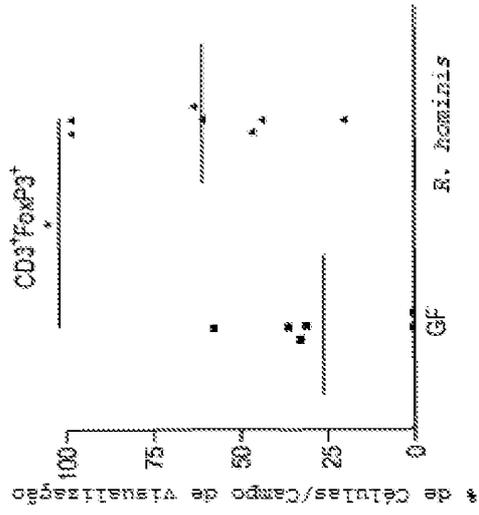
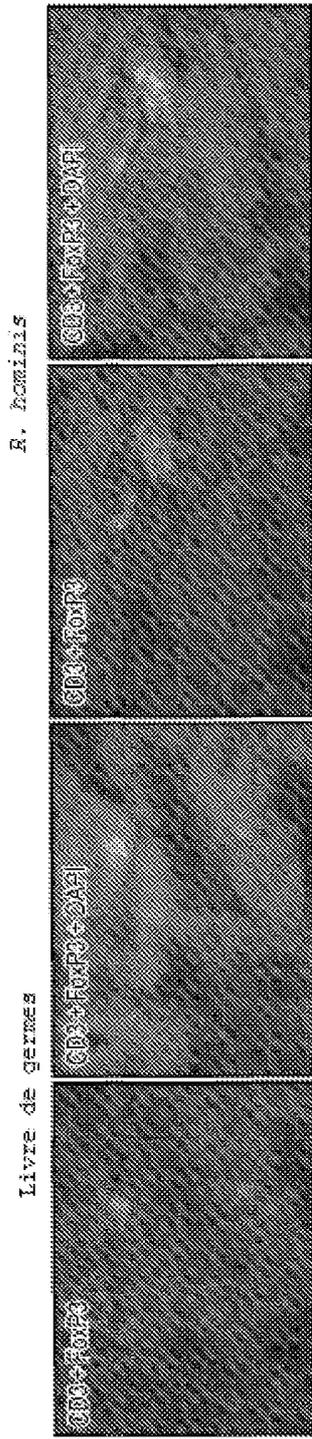


FIG. 5

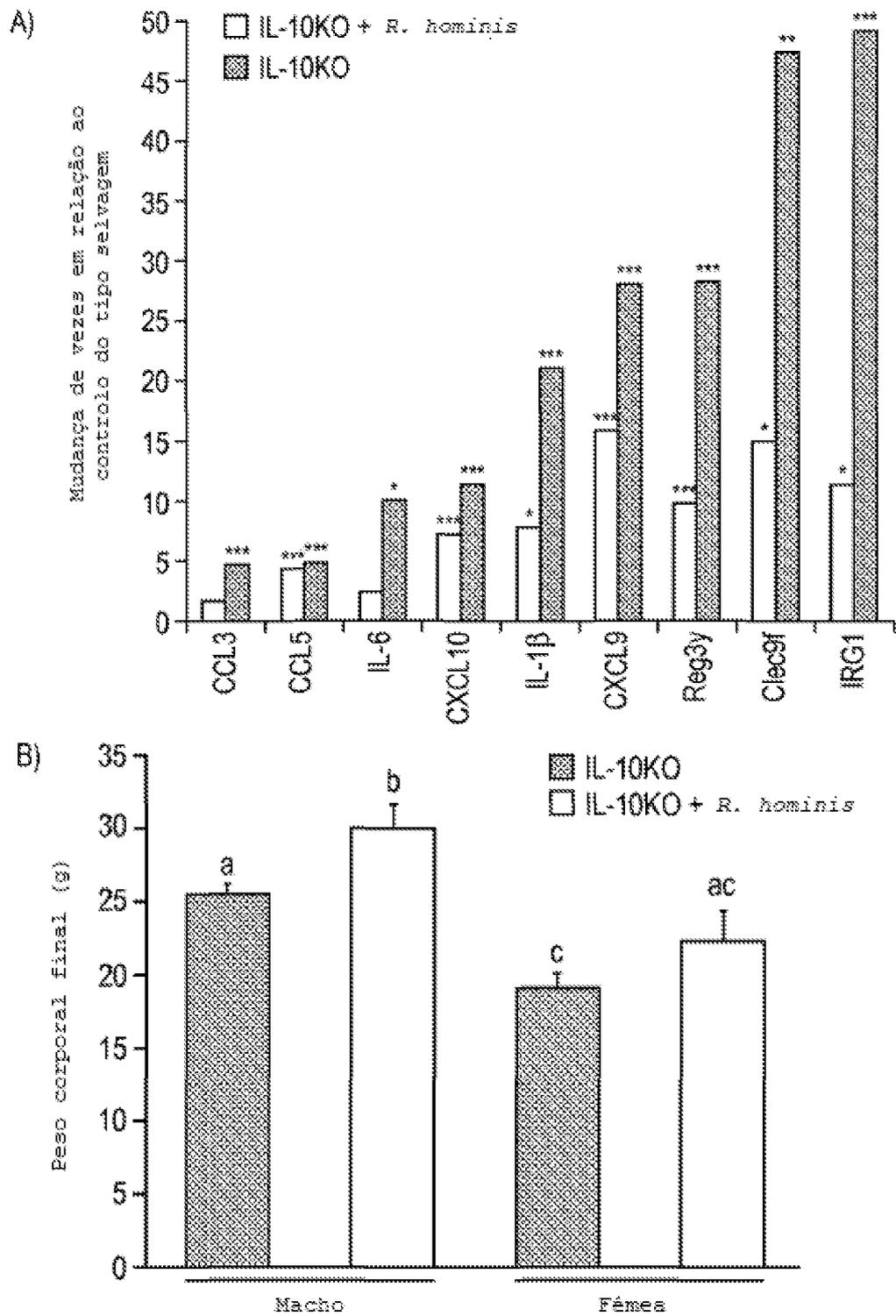


FIG. 6

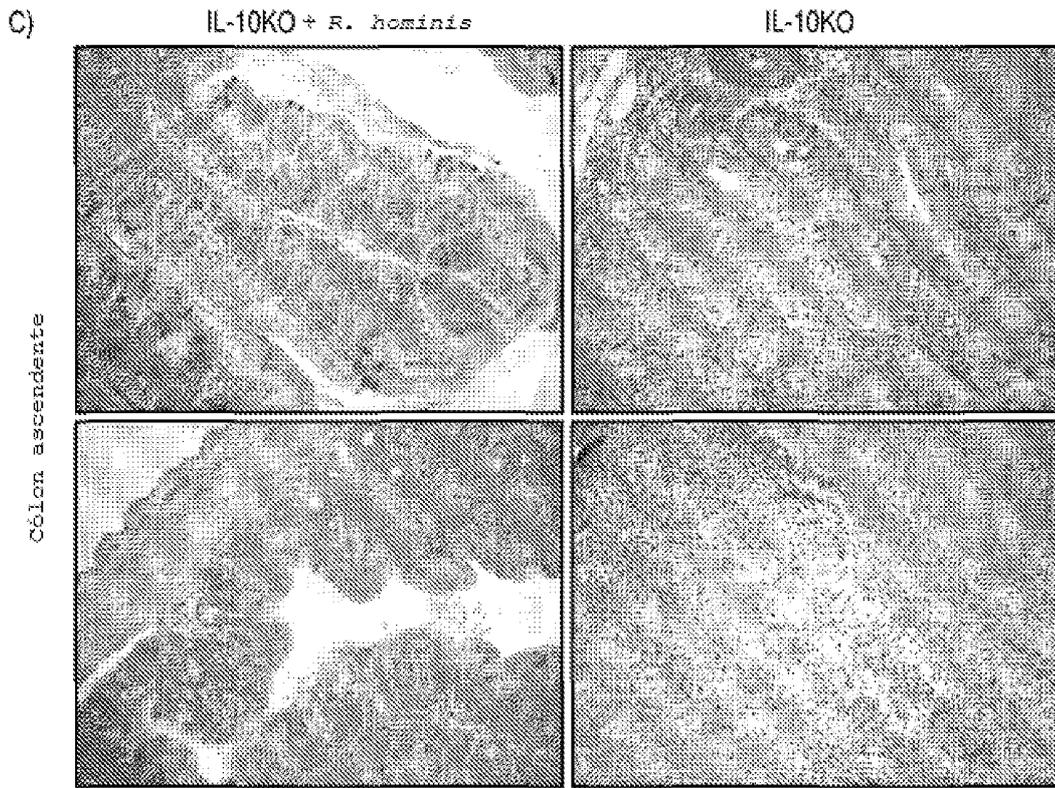


FIG. 6

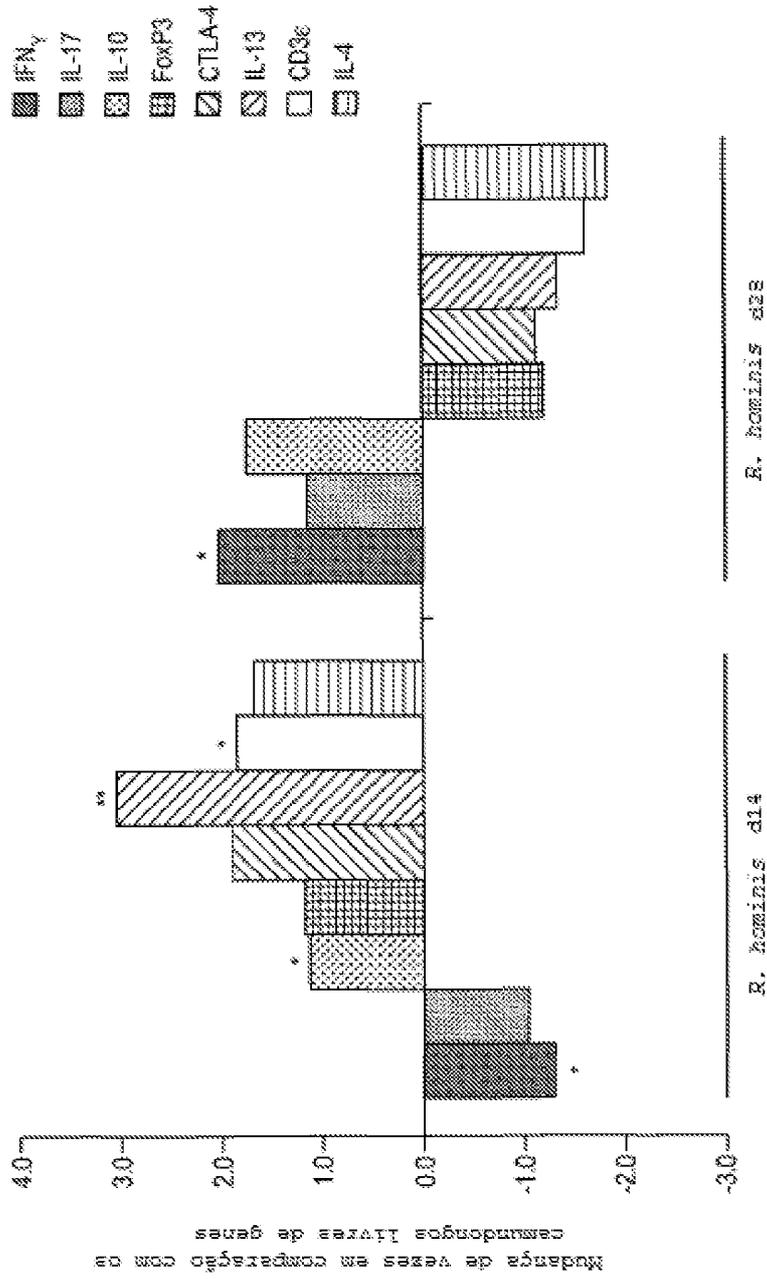


FIG. 7

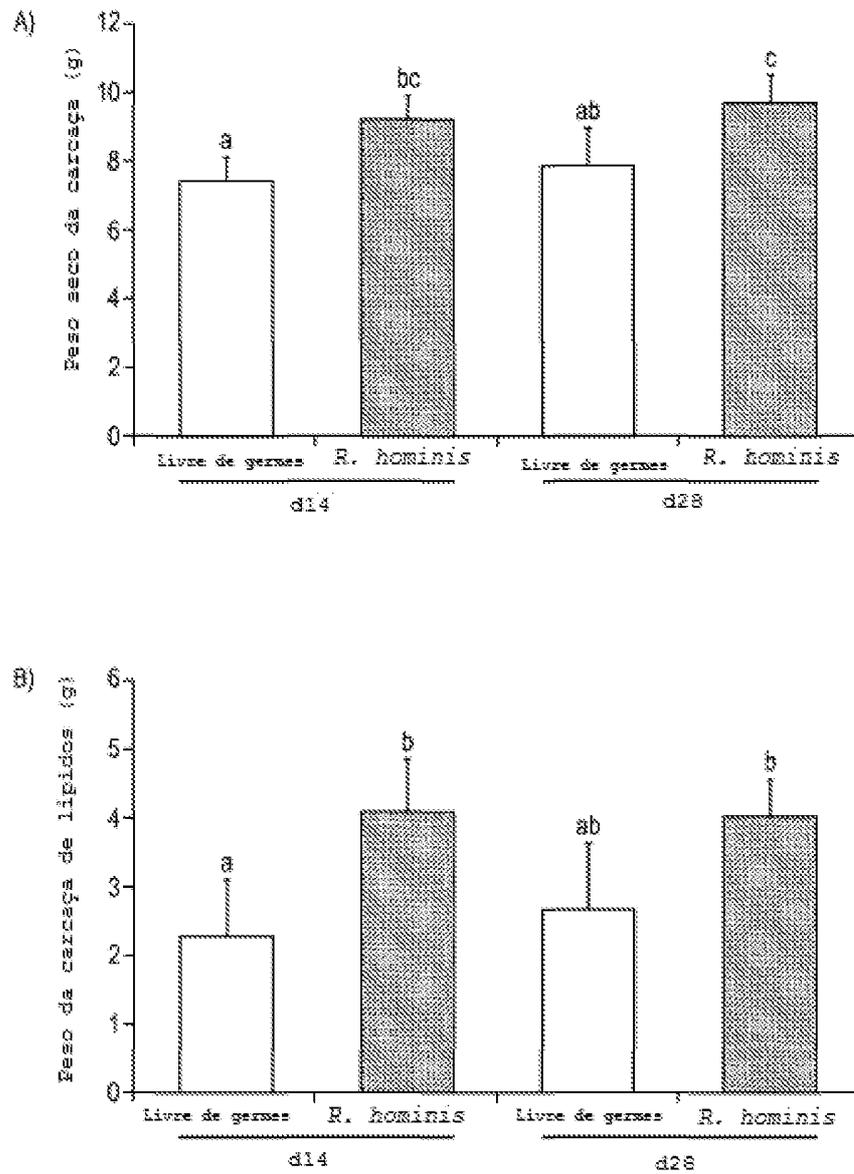


FIG. 8

#	Cor	Nome da experiência	Espécie
1		<i>R. hominis</i> - Nenhum controle	<i>Mus musculus</i>
2		<i>E. rectale</i> - Nenhum controle	<i>Mus musculus</i>
3		<i>R. intestinalis</i> - Nenhum controle	<i>Mus musculus</i>

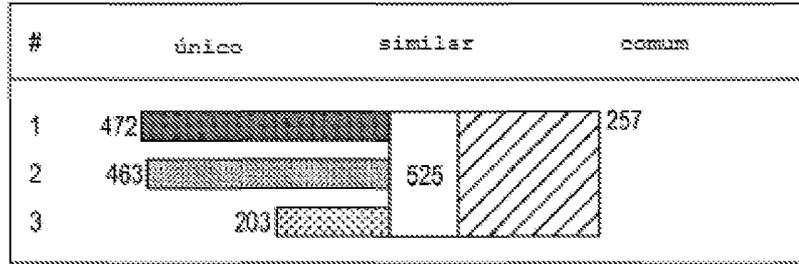


FIG. 9

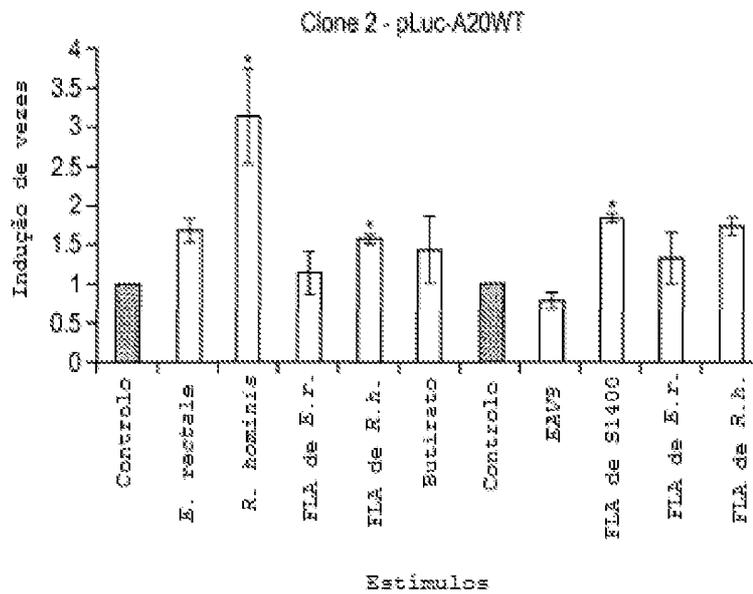


FIG. 10

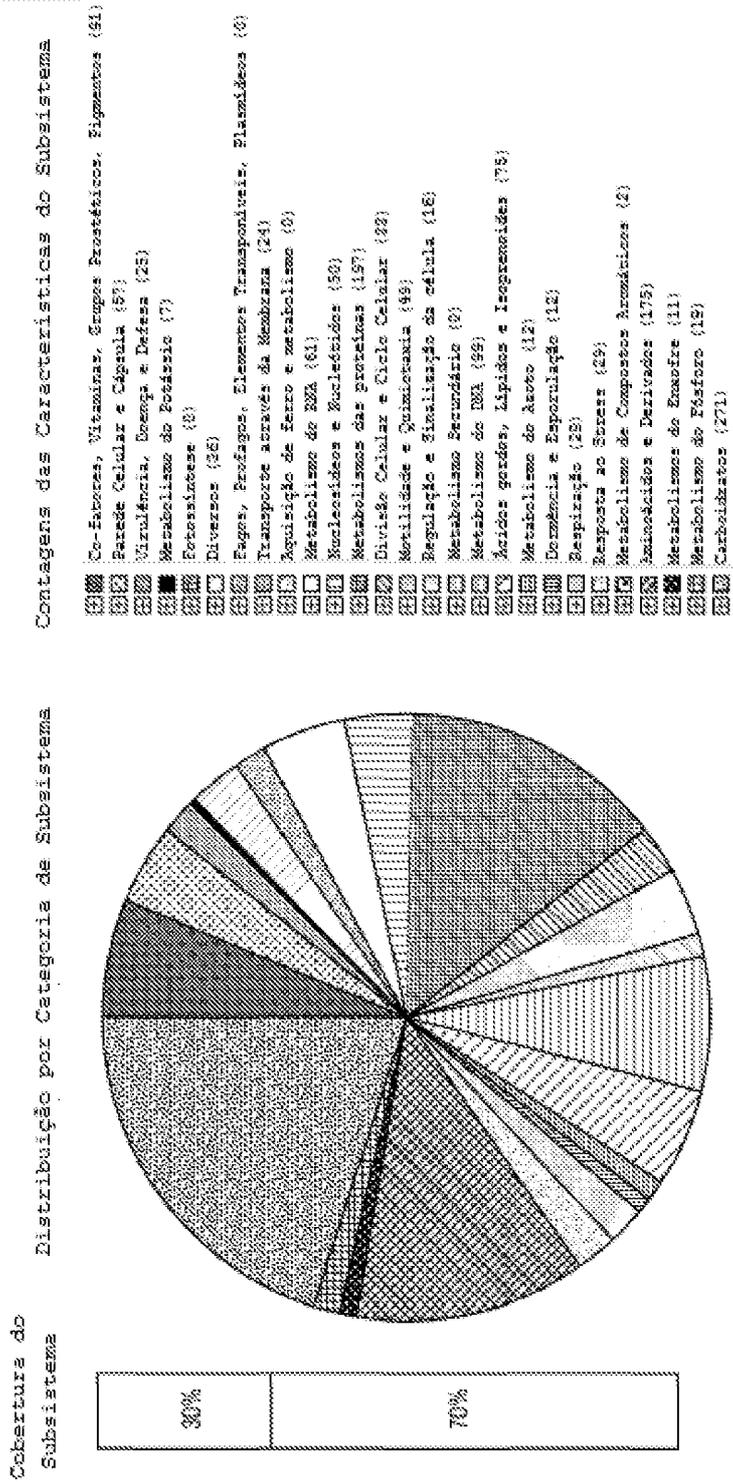
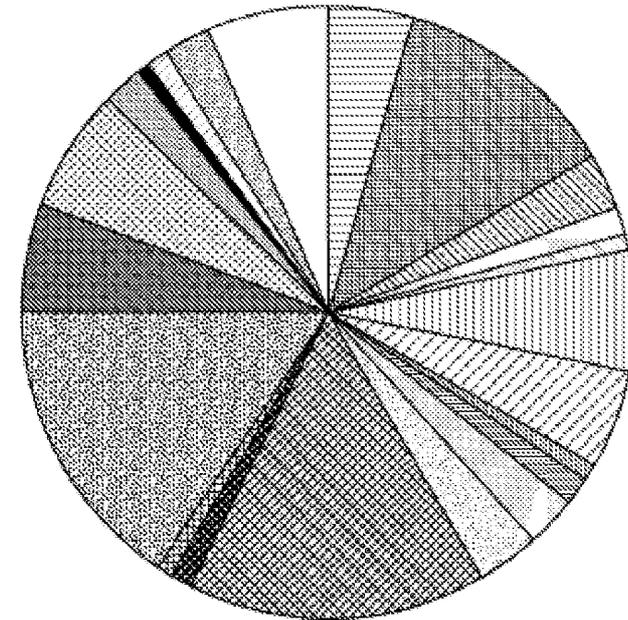


FIG. 11

Cobertura do Subsistema



Distribuição por Categoria de Subsistema

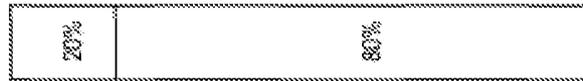


Conteúdo das Características do Subsistema

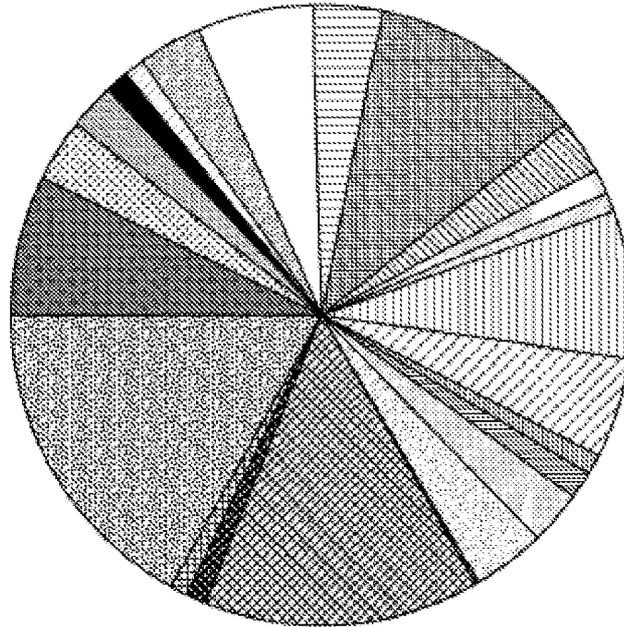
- 0000 Co-fatores, Vitaminas, Grupos Enzimáticos, Pigmentos (52)
- 0001 Parede Celular e Cápsula (59)
- 0002 Virulência, Doença e Defesa (21)
- 0003 Metabolismo do Nitrato (8)
- 0004 Fotossíntese (3)
- 0005 Diversos (11)
- 0006 Água, Eletrólitos, Elementos Transportáveis, Flasmídeos (8)
- 0007 Transporte através da Membrana (26)
- 0008 Aquisição de Ferro e Metabolismo (1)
- 0009 Metabolismo do RNA (66)
- 0010 Nucleotídeos e Nucleótidos (43)
- 0011 Metabolismo das proteínas (126)
- 0012 Divisão Celular e Ciclo Celular (31)
- 0013 Motilidade e Quimiotaxia (14)
- 0014 Regulação e Sinalização da célula (2)
- 0015 Metabolismo Secundário (2)
- 0016 Metabolismo do DNA (67)
- 0017 Ácidos gordos, Lipídios e Isoprenóides (56)
- 0018 Metabolismo do Azoto (8)
- 0019 Domância e Esporulação (17)
- 0020 Respiração (23)
- 0021 Resposta ao Stress (34)
- 0022 Metabolismo de Compostos Aromáticos (9)
- 0023 Anionídios e Derivados (163)
- 0024 Metabolismo do Enxofre (12)
- 0025 Metabolismo do Fósforo (19)
- 0026 Carbohidratos (162)

FIG. 12

Cobertura do Subsistema



Distribuição por Categoria de Subsistema



Conteúdo das Características do Subsistema

- Co-fatores, Vitaminas, Grupos Protéicos, Pigmentos (82)
- Parede Celular e Célula (26)
- Virulência, Doença e Defesa (27)
- Metabolismo do Potássio (12)
- Fermentação (9)
- Diversos (10)
- Fagos, Profagos, Elementos Transponíveis, Plasmídeos (2)
- Transporte através da Membrana (26)
- Aquiação de ferro e metabolismo (2)
- Metabolismo do RNA (65)
- Nucleossídeos e Nucleótidos (40)
- Metabolismo das proteínas (122)
- Divisão Celular e Ciclo Celular (31)
- Motilidade e Quimiotaxia (15)
- Regulação e Sinalização da célula (10)
- Metabolismo Secundário (8)
- Metabolismo do DNA (85)
- Ácidos Gordos, Lípidos e Isoprenóides (57)
- Metabolismo do Açúcar (12)
- Dormência e Esporulação (17)
- Respiração (28)
- Resposta ao Estresse (41)
- Metabolismo de Compostos Aromáticos (4)
- Aminoácidos e Derivados (154)
- Metabolismo do Enxofre (13)
- Metabolismo do Fósforo (8)
- Carbohidratos (182)

FIG. 13

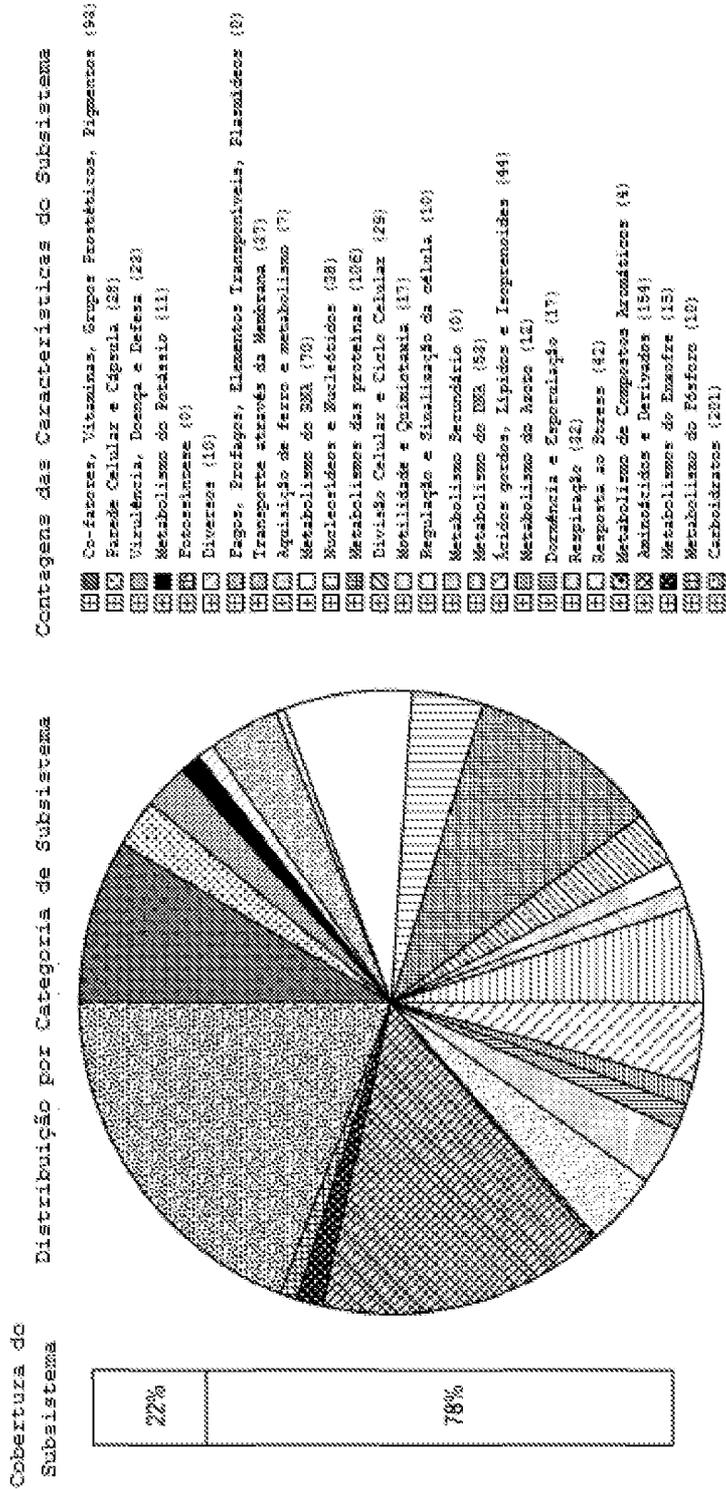


FIG. 14

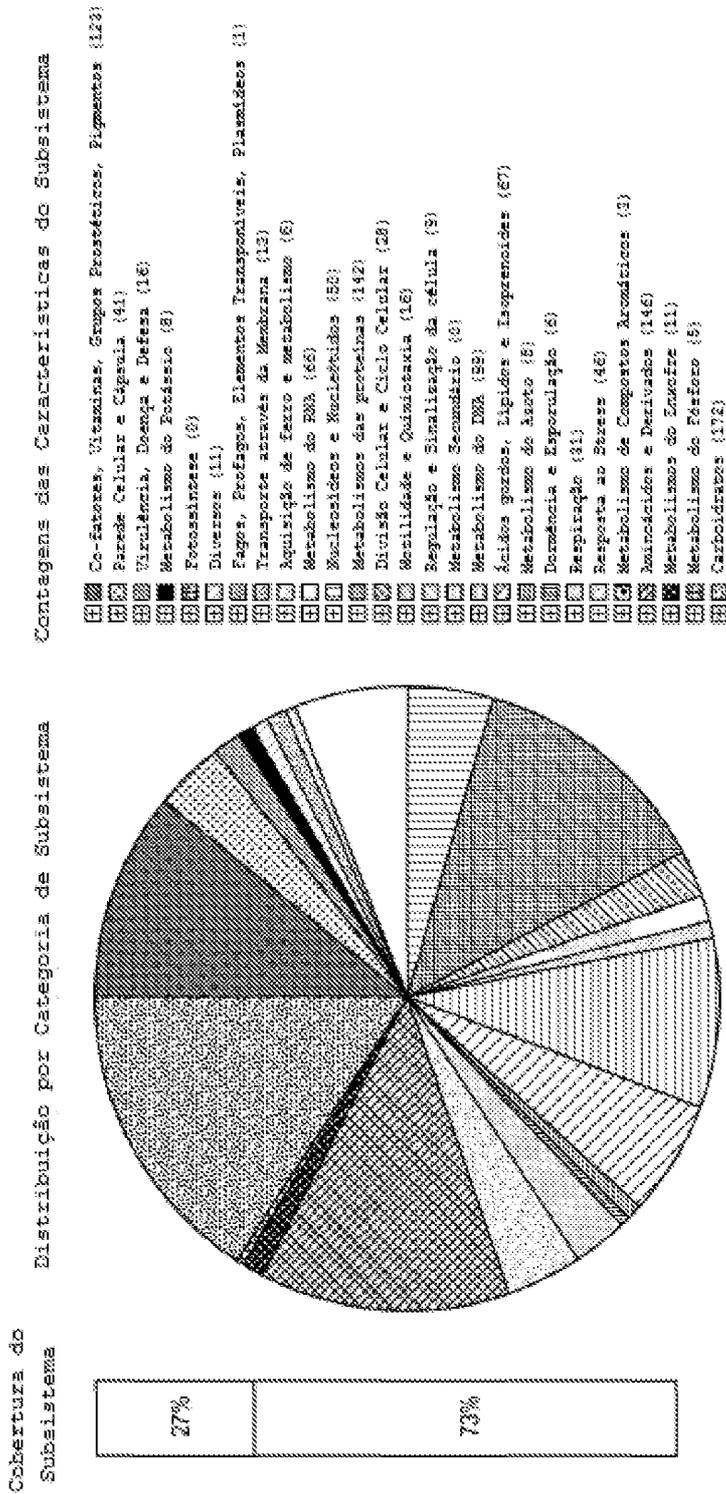


FIG. 15