



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019026677-1 A2



\* B R 1 1 2 0 1 9 0 2 6 6 7 7 A 2 \*

(22) Data do Depósito: 14/06/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/06/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CEPAS BACTERIANAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/74; A61K 35/745; A61K 35/747; A61K 31/19; A61K 31/192; (...).

(30) Prioridade Unionista: 09/03/2018 GB 1803826.5; 10/08/2017 GB 1712851.3; 11/04/2018 GB 1805991.5; 11/04/2018 GB 1805990.7; 11/04/2018 GB 1805989.9; (...).

(71) Depositante(es): 4D PHARMA RESEARCH LIMITED.

(72) Inventor(es): IMKE ELISABETH MULDER; ANNA ETTORRE; SUAAD AHMED; PARTHENA FOTIADOU; SAMANTHA YUILLE; JOSEPH ROBY IRINGAN URCIA; HELENE SAVIGNAC.

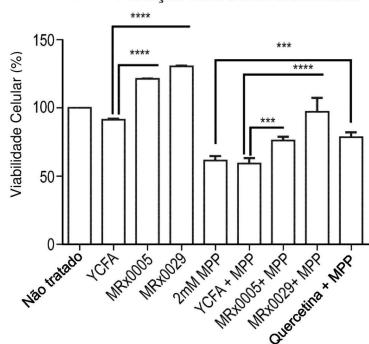
(86) Pedido PCT: PCT EP2018065903 de 14/06/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/229236 de 20/12/2018

(85) Data da Fase Nacional: 13/12/2019

(57) Resumo: A invenção fornece composições que compreendem cepas bacterianas comensais e ácidos orgânicos e usos dos mesmos no tratamento de doenças.

FIG. 1 Proteção contra neurotoxicidade



**"COMPOSIÇÕES      COMPREENDENDO      CEPAS  
BACTERIANAS".**

**CAMPO TÉCNICO**

[001] Esta invenção está no campo das composições compreendendo cepas bacterianas isoladas do trato digestivo de mamíferos e o uso destas composições no tratamento de doenças.

**FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

[002] O intestino humano é considerado estéril in utero, mas é exposto a uma ampla variedade de micróbios maternos e ambientais imediatamente após o nascimento. A partir daí, ocorre um período dinâmico de colonização e sucessão microbiana, que é influenciado por fatores como modo de transmissão, ambiente, dieta e genótipo do hospedeiro, os quais impactam na composição da microbiota intestinal, particularmente no início da vida. Posteriormente, a microbiota se estabiliza e amadurece [1]. A microbiota intestinal humana contém mais de 500-1000 filotipos diferentes pertencentes essencialmente a duas principais divisões bacterianas, os *Bacteroidetes* e os *Firmicutes* [2]. As relações simbióticas bem-sucedidas que surgem da colonização bacteriana do intestino humano produziram uma ampla variedade de funções metabólicas, estruturais, protetoras e outras funções benéficas. As atividades metabólicas aprimoradas do intestino colonizado garantem que componentes outrora indigeríveis sejam degradados com a liberação de subprodutos, fornecendo uma importante fonte de nutrientes para o hospedeiro. Da mesma forma, a importância imunológica da microbiota intestinal é bem reconhecida e é exemplificada em animais livres de germes que têm um sistema imunológico debilitado que é funcionalmente reconstituído após a introdução de bactérias comensais [3-5].

[003] Mudanças dramáticas na composição da microbiota foram documentadas em distúrbios gastrointestinais, como a doença

inflamatória intestinal (DII). Por exemplo, os níveis de bactérias *Clostridium cluster XIVa* são reduzidos em sujeitos com DII, enquanto os números de *E. coli* são elevados, sugerindo uma mudança no equilíbrio de simbiontes e patobiontes dentro do intestino [6-9].

[004] Em reconhecimento do potencial efeito positivo que certas cepas bacterianas podem ter no intestino animal, várias cepas têm sido propostas para uso no tratamento de várias doenças (ver, por exemplo, [10-13]). Além disso, certas cepas, incluindo principalmente as de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, foram propostas para uso no tratamento de várias doenças inflamatórias e autoimunes que não estão diretamente ligadas ao intestino (ver [14] e [15] para análise). Entretanto, a relação entre diferentes doenças e diferentes cepas bacterianas, e os efeitos precisos de cepas bacterianas específicas no intestino e a um nível sistêmico e em quaisquer tipos específicos de doenças são mal caracterizados, particularmente para distúrbios neurodegenerativos.

[005] Recentemente, houve um interesse crescente na técnica em relação a alterações no microbioma intestinal que podem desempenhar um papel fisiopatológico nas doenças cerebrais humanas [16]. Evidências pré-clínicas e clínicas estão sugerindo fortemente uma ligação entre o desenvolvimento do cérebro e a microbiota [17]. Um crescente corpo de literatura pré-clínica demonstrou sinalização bidirecional entre o cérebro e o microbioma intestinal, envolvendo vários sistemas de sinalização neurócrina e endócrina. De fato, níveis elevados de espécies de *Clostridium* no microbioma foram associados a distúrbios cerebrais [18], e um desequilíbrio dos filos *Bacteroidetes* e *Firmicutes* também foi implicado em distúrbios do desenvolvimento cerebral [19]. Sugestões de que níveis alterados de comensais intestinais, incluindo os dos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Sutterella*, *Prevotella* e *Ruminococcus* e da família *Alcaligenaceae*

estejam envolvidos em distúrbios imunomediados do sistema nervoso central (SNC), são questionadas por estudos que sugerem uma falta de alteração na microbiota entre pacientes e sujeitos saudáveis [19]. Também houve sugestões de que a administração de probióticos pode ser benéfica no tratamento de distúrbios neurológicos. No entanto, esses estudos falharam em concluir que as composições probióticas por si só podem alcançar benefícios terapêuticos com relação ao tratamento da neurodegeneração e não mostraram efeitos úteis para nenhuma bactéria em particular [20, 21]. Isso indica que, atualmente, o efeito prático da relação entre o microbioma e as doenças cerebrais humanas é pouco caracterizado. Consequentemente, são necessários estudos analíticos mais diretos para identificar o impacto terapêutico da alteração do microbioma nos distúrbios neurodegenerativos.

[006] Existe uma necessidade na técnica de novos métodos de tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Existe também uma necessidade de que os potenciais efeitos das bactérias intestinais sejam caracterizados, de modo que novas terapias que usem bactérias intestinais possam ser desenvolvidas.

## **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[007] Os inventores desenvolveram novas terapias para o tratamento e a prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Em particular, os inventores identificaram que as bactérias comensais que produzem certos ácidos orgânicos têm atividades neuroprotetoras e podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas. Relacionado a isso, os inventores também identificaram que a adição de ácidos orgânicos a composições compreendendo bactérias comensais ou o uso de ácidos orgânicos em combinação com bactérias comensais, podem proporcionar efeitos terapêuticos aprimorados, em particular no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

[008] Os inventores identificaram que cepas bacterianas

comensais que produzem um ou mais ácidos orgânicos com a fórmula  $R^x\text{-COOH}$ , em que  $R^x$  compreende um grupo alquila compreendendo na faixa de 4 a 11 carbonos, ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4, pode ser eficaz para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Em outro aspecto da invenção, os inventores descobriram que uma combinação de uma cepa bacteriana comensal e um ácido orgânico pode ser eficaz no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas. Como aqui utilizado, os termos "a combinação da invenção", "a combinação terapêutica da invenção" e "a combinação terapêutica" podem ser usados de forma intercambiável e referem-se a uma combinação terapêutica de: (a) uma composição compreendendo uma cepa bacteriana comensal; e (b) uma composição compreendendo um ácido orgânico. Deve ser entendido que o termo "combinação" no contexto da combinação terapêutica não significa necessariamente que os componentes (a) e (b) da combinação estão na mesma composição e/ou sendo administrados ao mesmo tempo.

[009] Como descrito nos exemplos, a administração de composições compreendendo *Megasphaera massiliensis* pode proteger contra espécies reativas de oxigênio e prevenir a inflamação, atuando como um neuroprotetor. Os inventores identificaram que a *Megasphaera massiliensis* produz certos ácidos orgânicos, incluindo ácido hexanoico, ácido valérico e ácido 4-hidroxifenilacético. Os inventores também identificaram que o tratamento com *Megasphaera massiliensis* pode reduzir a ativação de moléculas pró-inflamatórias, como NF $\kappa$ B e IL-6, por LPS e  $\alpha$ -sinucleína mutante. Os inventores também descobriram que a *Megasphaera massiliensis* pode aumentar a ativação da citocina pró-inflamatória IL-8, que pode ajudar a promover a mielinização dos neurônios. Os inventores também identificaram que

o tratamento com uma combinação de *Megasphaera massiliensis* e ácido retinoico pode aumentar a secreção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o que pode ajudar a promover a neurogênese e a neuritogênese e/ou prevenir a morte celular. Os inventores identificaram que o tratamento com *Megasphaera massiliensis* pode atenuar o estresse oxidativo, reduzir a atividade de desacetilação de histonas e peroxidação lipídica in vitro, o que pode ajudar a reduzir a morte celular e a apoptose. Em particular, os inventores identificaram que o tratamento com *Megasphaera massiliensis*, que pode produzir ácido valérico, pode reduzir a desacetilação de histonas, o que pode ajudar a reduzir a morte celular e a apoptose. Os inventores também identificaram que a *Megasphaera massiliensis* pode produzir indol, que pode atenuar a inflamação e o estresse oxidativo. Os inventores também demonstraram que o tratamento com a *Megasphaera massiliensis* pode aumentar os níveis de quinurenina. Além disso, os inventores também descobriram que a *Megasphaera massiliensis* pode produzir ácido hexanoico, que pode ser neuroprotetor ou neurorestorativo, por exemplo, ao promover o desenvolvimento de neurites. Os inventores descobriram que a *Megasphaera massiliensis*, que pode produzir ácido hexanoico, aumenta a expressão de MAP2 (proteína associada a microtúbulo 2), que é considerada essencial para a formação de microtúbulos na neuritogênese. Portanto, os inventores descobriram que a *Megasphaera massiliensis*, que pode produzir ácido hexanoico, pode ser usada para promover o desenvolvimento de neurites. *Megasphaera massiliensis* e outras bactérias que produzem ácidos orgânicos como ácido hexanoico, ácido valérico e ácido 4-hidroxifenilacético podem, portanto, ser úteis no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

[0010] Assim, em um primeiro aspecto, a invenção descreve uma composição compreendendo uma cepa bacteriana comensal para uso

em um método de tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo, em que a cepa produz um ou mais ácidos orgânicos, cada um com a seguinte fórmula:  $R^x\text{-COOH}$ , em que  $R^x$  compreende um grupo alquila compreendendo pelo menos 4 carbonos, ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4.

[0011] Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana comensal e um ou mais ácidos orgânicos com a fórmula  $R^n\text{-COOH}$  ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos. Em modalidades preferidas, a composição compreende um ou mais dos ácidos orgânicos ácido valproico, ácido valérico, ácido hexanoico, ácido retinoico e ácido 4-hidroxifenilacético ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos. Os exemplos demonstram que essas combinações têm benefícios terapêuticos.

[0012] Em algumas modalidades, a invenção descreve uma composição compreendendo uma cepa bacteriana comensal para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença em um sujeito, em que a composição deve ser administrada em combinação com um ou mais ácidos orgânicos ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos. Os exemplos demonstram que essas combinações podem ser particularmente eficazes.

[0013] Em algumas modalidades, a invenção descreve uma composição compreendendo um ou mais ácidos orgânicos ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença em um sujeito, em que a composição deve ser administrada em combinação com uma cepa bacteriana comensal. Os exemplos demonstram que essas combinações podem ser particularmente eficazes.

[0014] As modalidades preferidas de ambos os aspectos da

invenção são discutidas abaixo e ao longo da aplicação.

[0015] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal produz um ácido graxo de cadeia curta. De preferência, o ácido graxo de cadeia curta é o ácido butírico. O butirato pode contribuir para reduzir a impermeabilidade da barreira hematoencefálica, que tem um efeito neuroprotetor.

[0016] Em algumas modalidades, a composição é para uso em um método de tratamento ou prevenção de doenças.

[0017] Em algumas modalidades, as composições são para uso em um método de tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo.

[0018] Em modalidades específicas, as composições são para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; Doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; Doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência frontotemporal e vascular; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; Comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, neuropatia inflamatória progressiva, e degeneração corticobasal.

[0019] Em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson, tal como ambiental, familiar ou de Parkinson associado a estado inflamatório geral. Os inventores identificaram que o tratamento com as composições da invenção pode reduzir a ativação de moléculas

pró-inflamatórias, tais como NFkB e IL-6, por LPS e  $\alpha$ -sinucleína mutante em modelos in vitro de Parkinson ambiental e familiar.

[0020] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso em um método de tratamento ou prevenção de doença neurodegenerativa de início precoce. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso em um método para prevenir ou retardar o início ou a progressão de um distúrbio neurodegenerativo.

[0021] Em modalidades preferidas, a invenção fornece uma combinação compreendendo uma cepa bacteriana da espécie *Megasphaera massiliensis* e um ácido orgânico selecionado da lista que consiste em ácido hexanoico, ácido valérico, ácido valproico, ácido retinoico ou ácido 4-hidroxifenilacético para uso no tratamento da doença de Parkinson. Combinações usando *Megasphaera massiliensis* e ácido hexanoico podem ser particularmente eficazes para uso em um método de tratamento de doenças neurodegenerativas, em particular Parkinson. Composições preferidas da invenção compreendem uma bactéria comensal e ácido retinoico. Outras composições preferidas da invenção compreendem bactérias comensais e ácido hexanoico. Outras composições preferidas da invenção compreendem bactérias comensais e ácido valérico

[0022] Em algumas modalidades da invenção, a cepa bacteriana comensal é do gênero selecionado da lista que consiste em *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcus* ou *Peptococcus*, ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal é do gênero *Megasphaera*. Em algumas modalidades preferidas, a cepa é da espécie *Megasphaera massiliensis*. Cepas estreitamente relacionadas também podem ser usadas, tais como as cepas bacterianas que têm uma sequência de 16s

rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à sequência de 16s rRNA de uma cepa bacteriana de *Megasphaera massiliensis*. Preferencialmente, a cepa bacteriana tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 2. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem a sequência de 16s rRNA representada pela SEQ ID NO:2.

[0023] Em modalidades preferidas, a cepa para uso na invenção produz um ou mais ácidos orgânicos, cada um com a seguinte fórmula: R<sup>x</sup>-COOH, em que R<sup>x</sup> compreende um grupo alquila compreendendo pelo menos 4 carbonos, ou em que R<sup>x</sup> compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4, em que o ácido orgânico é eficaz no tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo. Em algumas modalidades, a cepa para uso na invenção produz um ácido orgânico selecionado da lista que consiste em ácido hexanoico, ácido valérico, ácido valproico, ácido retinoico ou ácido 4-hidroxifenilacético. Preferencialmente, as cepas da invenção são capazes de aumentar a ativação de IL-8 e reduzir a ativação de IL-6.

[0024] Em algumas modalidades da invenção, a cepa bacteriana comensal da composição é manipulada para produzir o ácido orgânico da invenção.

[0025] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para administração oral. A administração oral das cepas da invenção e, quando aplicável, do ácido orgânico da invenção pode ser eficaz para distúrbios neurodegenerativos. Além disso, a administração oral é conveniente para pacientes e profissionais e permite a distribuição para e/ou colonização parcial ou total do intestino.

[0026] Em certas modalidades, a composição da invenção compreende um ou mais excipientes ou veículos farmaceuticamente

aceitáveis.

[0027] Em certas modalidades, a composição da invenção compreende uma cepa bacteriana comensal que foi liofilizada. A liofilização é uma técnica eficaz e conveniente para preparar composições estáveis que permitem a distribuição de bactérias.

[0028] Em certas modalidades, a invenção fornece um produto alimentício compreendendo qualquer uma das composições como descritas acima.

[0029] Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição de vacina compreendendo a composição como descrita acima.

[0030] Além disso, a invenção fornece um método de tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas, compreendendo a administração de uma composição que compreende uma cepa bacteriana comensal que produz um ou mais ácidos orgânicos, cada um com a seguinte fórmula:  $R^x\text{-COOH}$ , em que  $R^x$  compreende um grupo alquila compreendendo pelo menos 4 carbonos, ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4.

[0031] A invenção também fornece um método de tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas compreendendo a administração de uma combinação de uma cepa bacteriana comensal e um ácido orgânico ou um sal ou éster farmaceuticamente aceitáveis do mesmo.

[0032] No desenvolvimento da invenção acima, os inventores identificaram e caracterizaram uma cepa bacteriana que é particularmente útil para terapia. A cepa de *Megasphaera massiliensis* da invenção é demonstrada como sendo eficaz no tratamento das doenças aqui descritas, tais como doenças neurodegenerativas. Portanto, em outro aspecto, a invenção fornece uma célula da cepa de

*Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado da mesma. A invenção também fornece composições que compreendem essas células ou culturas biologicamente puras de tais células. A invenção também fornece uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado da mesma, para uso em terapia, em particular para as doenças aqui descritas.

[0033] Em certas modalidades de qualquer aspecto da invenção, a composição é para uso no tratamento de lesão cerebral. A atividade neuroprotetora das composições da invenção e sua capacidade de reduzir os níveis de atividade da histona desacetilase (HDAC) podem torná-las úteis no tratamento de lesões cerebrais. Em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento de derrame, tal como tratamento de lesão cerebral resultante de um derrame.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

- [0034] **Figura 1:** Viabilidade celular de células de neuroblastoma
- [0035] **Figura 2:** Regulação negativa da secreção de IL-6
- [0036] **Figura 3:** Secreção de IL-8
- [0037] **Figura 4:** Inibição da secreção de  $\alpha$ -sinucleína IL-6 e IL-8
- [0038] **Figura 5:** Inibição da ativação do promotor de NF $\kappa$ B induzido por  $\alpha$ -sinucleína
- [0039] **Figura 6:** Inibição da ativação do promotor NF $\kappa$ B induzido por LPS
- [0040] **Figura 7:** Promoção do desenvolvimento de neurites: microscopia de luz e expressão do gene MAP2 (Figura 7A), microscopia de imunofluorescência de Faloidina (Figura 7B)
- [0041] **Figura 8:** Mudança na capacidade antioxidante
- [0042] **Figura 9:** Mudança na capacidade antioxidante total (oxidação lipídica)

- [0043] **Figura 10:** Alteração dos níveis de ERO nas (a) células U373 e (b) células SHSY-5Y
- [0044] **Figura 11:** Neuroproteção – viabilidade celular. A Figura 11 mostra os mesmos dados da Figura 1.
- [0045] **Figura 12:** Alteração na atividade da histona desacetilase (HDAC)
- [0046] **Figura 13:** Alterações induzidas por cepas na atividade de histona desacetilase de células inteiras e lisados celulares (Figura 13A), alterações induzidas por ácido na atividade de histona desacetilase (Figura 13B), produção de metabólitos por cepas (Figura 13C)
- [0047] **Figura 14:** Inibição de HDAC1 (Figura 14A), inibição de HDAC2 (Figura 14B), inibição de HDAC3 (Figura 14C)
- [0048] **Figura 15:** Inibição de HDACs de Classe I (Figura 15A); inibição de HDAC1 (Figura 15B); inibição de HDAC2 (Figura 15C); inibição de HDAC3 (Figura 15D)
- [0049] **Figura 16:** Nível de produção de Indol
- [0050] **Figura 17:** Nível de produção de Quinurenina
- [0051] **Figura 18:** Nível de produção de BDNF
- [0052] **Figura 19:** Níveis de produção de metabólitos – neurotransmissores no cérebro
- [0053] **Figura 20:** Níveis de produção de metabólitos – ácidos orgânicos no sobrenadante
- [0054] **Figura 21:** Níveis médios de dopamina (DA) (Figura 21A), níveis de DOPAC (Figura 21B) e níveis de HVA (Figura 21C) no estriado. Os dados são exibidos como Média + SEM.
- [0055] **Figura 22:** Efeito na função da barreira intestinal.
- [0056] **Figura 23:** Produção de neurotransmissores no cérebro
- [0057] **Figura 24:** Alterações na Expressão Hipocampal de Receptor – A) Receptor de Ocitocina, B) Receptor de Vasopressina, C) Receptor de Glicocorticoide e D) Receptor de Mineralocorticoide

- [0058] **Figura 25:** Alterações na Expressão Hipocampal de A) Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH), B) Expressão de BDNF e C) TLR4
- [0059] **Figura 26:** A) Alterações na Expressão Hipocampal do Receptor 1 do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRFR1) e B) Expressão do Receptor 2 do Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRFR2)
- [0060] **Figura 27:** Alterações na Expressão Hipocampal de A) Fator de Necrose Tumoral, B) Interleucina 1b e C) IL-6
- [0061] **Figura 28:** A) Alterações na Expressão Hipocampal da Integrina Alfa M (CD11b) e B) Alterações na Expressão Hipocampal do Receptor de Serotonina 1A (receptor 5-HT1A)
- [0062] **Figura 29:** A) Alterações na Expressão Hipocampal da Subunidade 2A do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A) e da B) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B)
- [0063] **Figura 30:** Alterações na Expressão Hipocampal de A) Receptor de Ácido Gama-Aminobutírico A2 (GABA A2), B) Receptor de Ácido Gama-Aminobutírico B1 (GABA BR1) e C) Receptor 1 de Dopamina (DRD1)
- [0064] **Figura 31:** Alterações na Expressão de Receptor na Amígdala – A) Receptor de Ocitocina, B) Receptor de Vasopressina, C) Receptor de Glicocorticoide e D) Receptor de Mineralocorticoide
- [0065] **Figura 32:** Alterações na Expressão na Amígdala de A) Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), B) Receptor do Tipo Toll 4 (TLR-4), C) Receptor 1 do Hormônio Liberador de corticotrofina (CRFR1) e D) Receptor 2 do Hormônio Liberador de corticotrofina (CRFR2)
- [0066] **Figura 33:** Alterações na Expressão na Amígdala de A) Integrina Alfa M (CD11b), B) Interleucina-6 (IL-6), C) Subunidade 2A do

Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A) e D) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B)

[0067] **Figura 34:** Alterações na Expressão na Amígdala de A) Subunidade Alfa 2 do Receptor de GABA-A (GABRA2), B) Subunidade do Receptor 1 Tipo B de GABA-A (GABBR1) e C) Receptor 1 de Dopamina (DRD1)

[0068] **Figura 35:** Alterações na Expressão no Córtex Pré-frontal de A) Receptor de Ocitocina, B) Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), C) Receptor Mineralocorticoide e D) Receptor Glicocorticoide

[0069] **Figura 36:** Alterações na Expressão do Córtex Pré-Frontal de A) Receptor do Tipo Toll 4 (TLR-4), B) Receptor Hormonal Liberador de Corticotrofina 1 (CRFR1), C) Receptor Hormonal Liberador de Corticotrofina 2 (CRFR2) e D) Integrina Alfa M (CD11b)

[0070] **Figura 37:** Alterações na Expressão do Córtex Pré-frontal de A) Interleucina-6 (IL-6), B) Subunidade 2A do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2A), C) Subunidade 2B do Receptor Ionotrópico de Glutamato Tipo NMDA (Grin2B) e D) Subunidade Alfa 2 do Receptor de GABA-A (GABRA2)

[0071] **Figura 38:** Alterações na Expressão no Córtex Pré-frontal de A) Subunidade 1 do Receptor Tipo B do Receptor GABA-A (GABBR1) e B) Receptor 1 da Dopamina (DRD1)

[0072] **Figura 39:** Alterações na Expressão no Cólono de A) Triptofano Hidroxilase-1 (Tph1) e B) Indoleamina2,3-Dioxigenase-1 (IDO1)

[0073] **Figura 40:** Alterações na Expressão no Íleo de A) Triptofano Hidroxilase-1 (Tph1) e B) Indoleamina2,3-Dioxigenase-1 (IDO1)

[0074] **Figura 41:** Alterações nos Níveis Circulantes de Metabólitos do Triptofano A) Quinurenina, B) Triptofano e C) Índice de Metabolismo de Quinurenina/Triptofano

[0075] **Figura 42:** Efeito na Produção de Interferon- $\gamma$  a partir de Esplenócitos de camundongos alimentados com MRx0029

[0076] **Figura 43:** Efeito na produção de interleucina-1 $\beta$  a partir de Esplenócitos

[0077] **Figura 44:** Efeito na Produção de Interleucina-6 a partir de Esplenócitos

[0078] **Figura 45:** Efeito na Produção do Fator de Necrose Tumoral a partir de Esplenócitos

[0079] **Figura 46:** Efeito na Produção de Interleucina-10 a partir de Esplenócitos

[0080] **Figura 47:** Efeito na Produção de Quimioatrativos CXCL1 a partir de Esplenócitos

[0081] **Figura 48:** Alterações nos Níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta no Ceco

[0082] **Figura 49:** Alterações induzidas por MRx0029 e MRX005 nos níveis de expressão gênica de Actina, Villina, Ocludina TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 e NSE.

[0083] **Figura 50:** Diferenciação de células SHSY5Y induzida por MRx0005 e MRx0029. (A-C) Imagens representativas de células imunomarcadas com Faloidina e MAP2. (D—F) Imagens de A-C mescladas com imagens DAPI. (G—I) Células imunomarcadas com  $\beta$ 3 tubulina. (J-L) mesclado com imagens DAPI. Ampliação x630. Análise western blot dos efeitos do tratamento com MRx0005 e MRx0029 em células SHSY5Y. As membranas de western blot foram sondadas com anticorpos para MAP2 (M) e b3 tubulina (N). Actina foi usada como um controle de carregamento. Painéis inferiores: blots representativos de uma das seis experiências separadas; painéis superiores: intensidade densitométrica relativa.

## DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

*Cepas bacterianas*

[0084] As composições da invenção compreendem uma cepa bacteriana comensal útil para tratar ou prevenir doenças. Em um primeiro aspecto, as cepas bacterianas comensais da invenção produzem um ou mais ácidos orgânicos, cada um com a seguinte fórmula:  $R^x\text{-COOH}$ , em que  $R^x$  compreende um grupo alquila compreendendo pelo menos 4 carbonos, ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4. Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana comensal e um ou mais ácidos orgânicos com a fórmula  $R\text{-COOH}$ , ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos. A cepa bacteriana comensal do segundo aspecto pode ou não produzir um ácido orgânico de acordo com a invenção.

[0085] Os inventores descobriram que certas cepas bacterianas comensais reduzem a ativação de citocinas inflamatórias como IL-6 e aumentam a ativação da citocina inflamatória IL-8. A IL-8 está implicada na formação da bainha de mielina. A inflamação crônica induzida por IL-6 pode levar à morte celular. Portanto, as cepas bacterianas comensais da invenção são particularmente úteis no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Em algumas modalidades, as espécies bacterianas comensais são úteis no tratamento de condições caracterizadas pela ativação aprimorada de IL-6. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas caracterizadas por desmielinização. Muitas doenças neurodegenerativas são caracterizadas por desmielinização. A desmielinização impede a propagação de potenciais de ação dentro dos neurônios, prejudicando a comunicação eficaz dentro do sistema nervoso. Demonstrou-se que a IL-8 contribui positivamente para a formação e reparo da bainha de mielina [22]. Portanto, as composições da invenção são particularmente

benéficas no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos caracterizados por desmielinização, como Esclerose Múltipla.

[0086] Os inventores descobriram que as bactérias comensais da invenção aliviam sintomas de doenças neurodegenerativas em modelos da doença. Por exemplo, os inventores descobriram que as cepas de bactérias comensais específicas promovem o desenvolvimento de neurites *in vitro* e podem, portanto, ser usadas na promoção da restauração de neurônios para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas. Assim, as cepas bacterianas comensais da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[0087] A cepa bacteriana comensal do primeiro aspecto da invenção pode produzir um ou mais dos ácidos orgânicos da invenção e ser administrada em combinação com um ou mais dos ácidos orgânicos da invenção.

[0088] As cepas bacterianas comensais do segundo aspecto que são benéficas para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas podem ser administradas em combinação com um ácido orgânico que possui as propriedades neorrestauradoras ou neuroprotetoras aqui descritas.

[0089] As cepas bacterianas comensais do primeiro e do segundo aspecto da invenção compreendem aquelas que exibem efeitos benéficos através do eixo IL-6/IL-8, independentemente de a cepa bacteriana comensal produzir um ou mais dos ácidos orgânicos de acordo com a invenção.

[0090] Os inventores também descobriram que as cepas bacterianas comensais da invenção aumentam a ativação do BDNF. O BDNF é um fator de crescimento neurotrófico que demonstrou aumentar a diferenciação e a sobrevivência dos neurônios. O efeito é observado

com maior destaque quando uma cepa bacteriana comensal é administrada em combinação com o ácido orgânico da invenção. Assim, as composições da invenção podem ser utilizadas em um método para melhorar a sobrevivência das células nervosas no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[0091] Como usado neste documento, "aumentar" ou "diminuir" "ativação" refere-se a elevar ou reduzir a concentração de biomoléculas bioativas disponíveis para a execução de funções fisiológicas, preferencialmente após a administração no trato gastrointestinal. Em outras palavras, "aumentar" ou "diminuir" referem-se à modulação do nível de uma biomolécula, de modo que uma resposta fisiológica seja adequadamente modificada. Isto pode ser alcançado, por exemplo, modulando a expressão ou secreção da biomolécula.

[0092] As composições da invenção compreendem uma cepa bacteriana comensal. Uma cepa bacteriana comensal é um simbionte derivado do trato gastrointestinal de um mamífero, como um humano. Exemplos de gêneros dos quais a cepa bacteriana comensal pode ser derivada incluem *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcus* ou *Peptococcus*. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal é do gênero *Megasphaera*. De preferência, as espécies *Megasphaera* para utilização na invenção incluem *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera cerevisiae*, *Megasphaera massiliensis*, *Megasphaera indica*, *Megasphaera paucivorans*, *Megasphaera sueciensis* e *Megasphaera micronuciformis*. Um outro exemplo de uma espécie de *Megasphaera* para utilização na invenção é a *Megasphaera hexanoica*. *Megasphaera* são micróbios gastrointestinais obrigatoriamente anaeróbicos, fermentadores de lactato, de mamíferos ruminantes e não ruminantes, incluindo humanos.

De preferência, a cepa bacteriana é derivada das espécies às quais a composição se destina a ser administrada.

[0093] O tipo de cepa da *M. massiliensis* é NP3 (=CSUR P245=DSM 26228) [23]. O número de acesso do GenBank para as sequências do gene 16S rRNA da cepa NP3 do *M. massiliensis* é JX424772.1 (aqui divulgado como SEQ ID NO:1).

[0094] A bactéria *Megasphaera massiliensis* testada nos Exemplos é aqui referida como cepa MRx0029. MRX0029 e MRx0029 são aqui utilizados de forma intercambiável. Uma sequência 16S rRNA para a cepa MRx0029 que foi testada é fornecida na SEQ ID NO:2. Preferencialmente, as bactérias para uso na invenção são da espécie *Megasphaera massiliensis*, em particular a cepa MRx0029.

[0095] A cepa MRx0029 foi depositada junto da autoridade internacional de depósitos NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escócia) por 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road, Aberdeen, AB25 2ZS, Escócia) em 13 de julho de 2017 como “*Megasphaera massiliensis* MRx0029” e recebeu o número de acesso NCIMB 42787.

[0096] Espera-se que as cepas bacterianas estreitamente relacionadas com a cepa testada nos exemplos também sejam eficazes para tratar ou prevenir doenças neurodegenerativas. Em certas modalidades, a cepa bacteriana para uso na invenção tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à sequência de 16s rRNA de uma cepa bacteriana de *Megasphaera massiliensis*. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem uma sequência de 16s RNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO: 2. Preferencialmente, a cepa bacteriana para uso na invenção tem a sequência de 16s rRNA representada pela SEQ ID NO:2.

[0097] Também se espera que cepas bacterianas comensais que são biótipos das cepas MRx0029 sejam eficazes no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. Um biótipo é uma cepa estreitamente relacionada que tem as mesmas características, ou características fisiológicas e bioquímicas muito semelhantes.

[0098] As cepas que são biótipos de MRx0029 e que são adequadas para utilização na invenção podem ser identificadas sequenciando-se outras sequências nucleotídicas para as cepas MRx0029. Por exemplo, substancialmente todo o genoma pode ser sequenciado e uma cepa de biótipo para uso na invenção pode ter pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% de identidade de sequência em pelo menos 80% de todo o seu genoma (por exemplo, em pelo menos 85%, 90%, 95% ou 99%, ou em todo o seu genoma). Outras sequências adequadas para uso na identificação de cepas de biótipo podem incluir hsp60 ou sequências repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)<sub>5</sub>, ou REP [24]. As cepas de biótipo podem ter sequências com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% de identidade de sequência com a sequência correspondente da cepa MRx0029.

[0099] Em algumas modalidades, uma cepa bacteriana comensal útil na invenção é aquela que produz ácidos orgânicos da invenção. Tais biótipos podem ser identificados através do perfil da produção de metabólitos de uma cepa bacteriana. A criação de perfil de metabólito pode ser usada para identificar cepas bacterianas candidatas que produzem os ácidos orgânicos neuroestimuladores da invenção. A criação de perfil de metabólito pode ser realizada por espectrometria de massa. As cepas candidatas que produzem o ácido orgânico e que são adequadas para os usos aqui descritos podem então ser identificadas através da realização dos métodos e ensaios, conforme estabelecido nos exemplos.

[00100] Alternativamente, biótipos adequados capazes de produzir

um ácido orgânico da invenção são aqueles que contêm vias metabólicas que produzem os ácidos orgânicos. Tais cepas podem ser identificadas por análise genômica, por exemplo, determinando se a cepa bacteriana codifica enzimas necessárias para a biossíntese dos ácidos orgânicos desejados. Por exemplo, a produção de ácido hexanoico é um processo catalítico de várias etapas que requer a presença de várias enzimas. Uma etapa crucial na produção de ácido hexanoico é a condensação de acetil-CoA e butírico-CoA para formar um intermediário C6 acil-CoA, como o 3-cetohexanoil-CoA. As enzimas necessárias para a produção de precursores de C4 e C2-CoA são bem conhecidas por uma pessoa versada na técnica. Um exemplo de uma enzima adequada para a condensação de precursores C2 e C4 é a Beta-cetotiolase. Sabe-se que as vias enzimáticas para a formação de C4 CoA possuem atividade com substratos C6. Portanto, uma vez formado o intermediário C6, as enzimas que catalisam a produção de C4 butiril-CoA também são adequadas para a geração de ácido hexanoico. Como tal, biótipos adequados são aqueles que codificam enzimas de produção de C4-CoA e C2-CoA e uma enzima com atividade de beta-cetotiolase. As cepas adequadas podem ser identificadas utilizando-se bancos de dados de pesquisa de sequências de homologia, tais como BLASTP ou UNIPROT KB, utilizando-se sequências de consulta de enzimas conhecidas envolvidas na produção de ácido hexanoico.

[00101] Listadas abaixo estão as bactérias que produzem ácidos orgânicos de uso de acordo com a invenção, juntamente com as referências de suporte. Usando essas listas e documentos referenciados, outras cepas e espécies úteis para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos podem ser identificadas.

[00102] Sabe-se que as seguintes espécies e cepas produzem ácido hexanoico e podem ser úteis nas composições da invenção. De

preferência, as composições da invenção compreendem uma cepa bacteriana de uma espécie selecionada dentre: *Megasphaera hexanoica* [25], em particular a cepa *Megasphaera hexanoica* KFCC11466P (KR101745084B1); *Megasphaera* sp. MH [26]; *Megasphaera elsdenii* [27] e [28], em particular a cepa *Megasphaera elsdenii* NCIMB 702410 [29]; *Clostridium kluyveri* [30]; *Clostridium* sp. BS-1 [31], CPB6 (*Ruminococcaceae bacterium*, *Clostridium* cluster IV) [32]; *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1 [33]; *Pediococcus acidilactici* [34]; *Lysinibacillus* spp. Y20 [35] ou *Eubacterium pyruvativorans* (I-6) [36].

[00103] Sabe-se que o *Bacillus cereus* produz ácido retinoico e pode ser útil nas composições da invenção [37]. Em certas modalidades, a composição da invenção compreende uma cepa da espécie *Bacillus cereus*.

[00104] Sabe-se que os seguintes gêneros, espécies e linhagens produzem ácido (4)-hidroxifenilacético e, portanto, podem ser úteis nas composições da invenção. Preferencialmente, as composições da invenção compreendem uma cepa bacteriana do gênero *Clostridia* [38] e [39], preferencialmente uma cepa bacteriana das espécies *C. difficile* [40] e [41], em particular as cepas *C. difficile* CDC A567 [42], *C. difficile* DSM 101085 [43], *C. difficile* DSM 102978 [43], *C. difficile* DSM 102860 [43], e *C. difficile* DSM 28666 [43]; *C. putrefaciens* [44]); *C. stricklandii* [44] e Great Plains Lab, Teste de Ácido Orgânico, Perfil Nutricional e Metabólico, Marcadores Bacterianos de *Clostridia*; *C. lituseburensense* [44] e Great Plains Lab, Teste de Ácidos Orgânicos, Perfil Nutricional e Metabólico, Marcadores Bacterianos de *Clostridia*; *C. subterminale* [45], [46] e [44]; *C. propionicum* [44] [46]; *C. clostridiiforme* [46]; *C. cochlearium* [46]; *C. glycolicum* [46]; *C. hastiforme* [46]; *C. irregularis* [46]; *C. perfringens* [47]; ou *C. botuliem um* Tipo G [48] e [49]. Preferencialmente, as composições da invenção compreendem uma

cepa bacteriana de uma espécie selecionada dentre: *Bacteroides fragilis* [50] e [51]); *Bacteroides tetaiotaomicron* [51]; *Bacteroides eggerthii* [51]; *Bacteroides ovatus* [51]; *Parabacteroides distasonis* [51]; *Eubacterium hallii* [51]; *Clostridium bartlettii* [51]; *Porphyromonas gingivalis* [52]; *Flavobacterium* sp. [53]; *Desulfitobacterium dehalogenans* [54] e [55]; *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2 [54]; ou *Streptomyces sentonii* [56].

[00105] As bactérias comensais que têm propriedades neuroprotetoras, mas não produzem ácidos orgânicos de acordo com o primeiro aspecto da invenção, podem ser úteis no segundo aspecto da invenção, em composições em combinação com um ácido orgânico. As bactérias que podem ser empregadas nas composições do segundo aspecto da presente invenção incluem aquelas pertencentes aos gêneros *Roseburia* (por exemplo, *Roseburia hominis*), *Bacteroides*, *Parabacteroides* (por exemplo, *Parabacteroides distasonis*), *Blautia* (por exemplo, *Blautia hydrogenotrophica*, *Blautia stercoris*, *Blautia wexlerae*), *Ruminococcus* (por exemplo, *Ruminococcus albus* [57]), *Clostridium* (por exemplo, *Clostridium butyricum* [58]), *Lactococcus* (por exemplo, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus rhamnosus*), *Bifidobacterium* (por exemplo, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*), *Lactobacillus* (por exemplo, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) ou *Streptococcus* (por exemplo, *Streptococcus thermophilus*) ([59], [60]),

[00106] Alternativamente, as cepas que são biótipos das cepas MRX0029 e que são adequadas para uso na invenção podem ser identificadas usando as cepas MRX0029 e análise de fragmentos de restrição e/ou análise de PCR, por exemplo, usando-se polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) e

impressão digital (rep)-PCR repetitiva de elemento de DNA, ou perfil de proteínas, ou sequenciamento parcial de 16S ou 23S rDNA. Em modalidades preferidas, essas técnicas podem ser utilizadas para identificar outras cepas de *Megasphaera massiliensis*.

[00107] Em certas modalidades, cepas que são biótipos das cepas MRX0029 e que são adequadas para uso na invenção são cepas que fornecem o mesmo padrão das cepas MRX0029 quando analisadas por análise de restrição de DNA ribossomal amplificada (ARDRA), por exemplo, ao usar a enzima de restrição Sau3AI (para métodos e orientações exemplares, consulte, por exemplo, [61]). Alternativamente, as cepas de biótipo são identificadas como cepas que possuem os mesmos padrões de fermentação de carboidratos que as cepas MRX0029.

[00108] Outras cepas bacterianas comensais que são úteis nas composições e métodos da invenção, tais como biótipos de MRX0029, podem ser identificadas usando qualquer método ou estratégia apropriados, incluindo os ensaios descritos nos exemplos. Por exemplo, as cepas para utilização na invenção podem ser identificadas cultivando-se com células de neuroblastoma e depois avaliando os níveis de citocinas e os níveis de neuroproteção ou neoproliferação. Em particular, cepas bacterianas que têm padrões de crescimento semelhantes, tipo metabólico e/ou抗ígenos de superfície que MRX0029 podem ser úteis na invenção. Uma cepa útil terá atividade moduladora imunológica comparável à MRX0029. Em particular, uma cepa de biótipo irá induzir efeitos comparáveis no modelo de hipersensibilidade visceral aos efeitos mostrados nos Exemplos, que podem ser identificados usando os protocolos de cultura e administração descritos nos Exemplos.

[00109] Uma cepa particularmente preferida da invenção é a cepa MRX0029 da *Megasphaera massiliensis*. Esta é a cepa exemplificativa

testada nos exemplos e que se mostrou eficaz no tratamento de doenças. Portanto, a invenção fornece uma célula, como uma célula isolada, da cepa MRX0029 da *Megasphaera massiliensis*, ou um derivado da mesma. A invenção também fornece uma composição que compreende uma célula da cepa MRX0029 de *Megasphaera massiliensis*, ou um derivado da mesma. A invenção também fornece uma cultura biologicamente pura da cepa MRX0029 de *Megasphaera massiliensis*. A invenção também fornece uma célula da cepa MRX0029 de *Megasphaera massiliensis*, ou um derivado da mesma, para uso em terapia, em particular para as doenças aqui descritas.

[00110] Uma cepa particularmente preferida da invenção é a cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787. Esta é a cepa MRx0029 exemplificada testada nos exemplos e que se mostrou eficaz para o tratamento de doenças. Portanto, em outro aspecto, a invenção fornece uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado da mesma. A invenção também fornece uma composição compreendendo uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado da mesma. A invenção também fornece uma cultura biologicamente pura da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787. A invenção também fornece uma célula da cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado da mesma, para uso em terapia, em particular para as doenças aqui descritas.

[00111] Um derivado da cepa da invenção pode ser uma cepa filha (descendência) ou uma cepa cultivada (subclonada) a partir da original. Um derivado de uma cepa da invenção pode ser modificado, por exemplo, a nível genético, sem ablação da atividade biológica. Particularmente, uma cepa derivada da invenção é terapeuticamente

ativa. Uma cepa derivada terá atividade terapêutica comparável à cepa MRX0029. Particularmente, uma cepa de biótipo irá induzir efeitos comparáveis nos modelos de doença neurodegenerativa e efeitos comparáveis nos níveis de citocina aos efeitos mostrados nos Exemplos, que podem ser identificados usando os protocolos de cultura e administração descritos nos Exemplos. Um derivado da cepa MRX0029 geralmente será um biótipo da cepa MRX0029.

[00112] As referências a células da cepa *Megasphaera massiliensis* MRX0029 abrangem todas as células que possuem as mesmas características de segurança e eficácia terapêutica que a cepa MRX0029, e essas células são abrangidas pela invenção.

[00113] Nas modalidades preferidas, as cepas bacterianas nas composições da invenção são viáveis e capazes de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[00114] Uma outra bactéria comensal que pode ser utilizada nas composições da invenção é a espécie *Parabacteroides distasonis*. Os exemplos demonstram que a *Parabacteroides distasonis* e a *Megasphaera massiliensis* têm atividades neuroprotetoras, mas produzem metabólitos diferentes e podem ter diferentes mecanismos de ação e atividades neuroprotetoras específicas. Portanto, essas espécies podem ser particularmente eficazes quando usadas em combinação. Em modalidades preferidas, a composição compreende uma cepa da espécie *Parabacteroides distasonis* e uma cepa da espécie *Megasphaera massiliensis*. A composição também pode incluir um ácido orgânico, como aqui definido.

[00115] A bactéria *Parabacteroides distasonis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42382 foi testada nos Exemplos e também é aqui referida como cepa MRx0005. MRX0005, MRX005, MRx005 e MRx0005 são aqui utilizados de forma intercambiável. Uma sequência 16S rRNA para a cepa MRx0005 que foi testada é fornecida na SEQ ID

NO:17. A cepa MRx0005 foi depositada com a autoridade internacional de depósitos NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escócia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escócia) em 12 de março de 2015 como “*Parabacteroides sp 755*” e recebeu o número de acesso NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. Posteriormente mudou seu nome para 4D Pharma Research Limited.

[00116] Em modalidades preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42787, ou um derivado ou biótipo da mesma, e a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42382, ou um derivado ou biótipo da mesma, preferencialmente para uso em terapia, preferencialmente para uso no tratamento de uma doença neurodegenerativa como a doença de Parkinson.

[00117] Em certas modalidades, a composição da invenção não comprehende uma cepa bacteriana do gênero *Megasphaera*. Em certas modalidades, a composição da invenção não comprehende uma cepa bacteriana da espécie *Megasphaera massiliensis*. Em certas modalidades, a composição da invenção não comprehende a cepa de *Megasphaera massiliensis* depositada sob o número de acesso NCIMB 42787.

### **Ácidos orgânicos**

[00118] Como demonstrado nos Exemplos, um ou mais ácidos orgânicos aqui descritos têm propriedades neuroprotetoras e/ou neurorestauradoras. Por exemplo, os ácidos orgânicos da invenção podem promover o desenvolvimento de neurites. O desenvolvimento de neurites é o processo de neuritogênese, que se refere à formação de projeções axonais ou dendríticas do corpo celular de um neurônio. Axônios e dendritos são responsáveis por receber e transmitir potenciais de ação. Assim, o aumento do desenvolvimento de neurites pode

restaurar ou preservar a comunicação eficaz nas redes neurais do sistema nervoso. Portanto, em algumas modalidades, ácidos orgânicos adequados para uso na invenção são aqueles capazes de promover o desenvolvimento de neurites. Tais ácidos orgânicos podem ser utilizados em um método de prevenção de doenças. Em algumas modalidades, os ácidos orgânicos são para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa.

[00119] Os um ou mais ácidos orgânicos compreendem a seguinte fórmula: R-COOH.

[00120] Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquila. Como referido neste documento, um grupo alquila é uma cadeia de hidrocarboneto linear, ramificada ou cíclica saturada ou qualquer substituinte derivado da mesma. Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquenila. Como referido neste documento, um grupo alquenila é um hidrocarboneto linear, ramificado ou cíclico insaturado compreendendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono, ou qualquer substituinte derivado do mesmo. Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquinila. Como referido neste documento, um grupo alquinil é um hidrocarboneto linear, ramificado ou cíclico insaturado compreendendo pelo menos uma ligação tripla carbono-carbono ou qualquer substituinte derivado da mesma. Em algumas modalidades, R compreende um grupo arila. Como referido neste documento, um grupo arila é um hidrocarboneto linear, ramificado ou cíclico aromático ou qualquer substituinte derivado do mesmo.

[00121] Como referido neste documento, um substituinte é um átomo ou grupo de átomos que substitui um ou mais hidrogênios da cadeia de hidrocarboneto original. Em algumas modalidades, R compreende um ou mais substituintes. Em algumas modalidades, os um ou mais substituintes são selecionados da lista que consiste em hidroxila, carbonila, aldeído, haloformila, éster de carbonato, carboxilato,

carboxila, éster, metóxi, hidroperóxi, peróxi, éter, hemiacetal, hemiciclo, acetal, cetal, ortoéster, metilenodioxi, carboxamida, amina, imina, nitrato, nitrila, nitrito, piridila, sulfidrila, sulfureto, dissulfeto, sulfinila, sulfonila, sulfino, sulfo, carbonotioila, catecol ou uma combinação destes.

[00122] Em algumas modalidades, R compreende pelo menos 4 átomos de carbono. Em algumas modalidades, R compreende pelo menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ou 19 átomos de carbono. Em algumas modalidades, R compreende na faixa de 4 a 19 átomos de carbono.

[00123] Em algumas modalidades, R compreende na faixa de 4 a 11 carbonos. Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquila que consiste em 5 átomos de carbono. Em algumas modalidades, os um ou mais ácidos orgânicos incluem o ácido hexanoico. Os inventores descobriram que o ácido hexanoico e as cepas bacterianas aqui descritas que produzem ácido hexanoico aumentam o desenvolvimento de neurites. Como tal, esses ácidos orgânicos podem ser usados para promover o desenvolvimento de neurites. Em algumas modalidades, esses ácidos orgânicos podem ser usados para promover o desenvolvimento de neurites no tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa. Cepas bacterianas exemplares da invenção que produzem ácido hexanoico compreendem aquelas do gênero *Megasphaera*.

[00124] Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquila que consiste em 4 átomos de carbono. Em algumas modalidades, os um ou mais ácidos orgânicos compreendem o ácido valérico. O ácido valérico e o ácido pentanoico são aqui utilizados de forma intercambiável. Os inventores descobriram que o ácido valérico e as cepas bacterianas comensais aqui descritas que produzem ácido valérico podem reduzir a desacetilação da histona. Em particular, os

inventores descobriram que o ácido valérico é um inibidor de histona desacetilase. As histona desacetilases (HDACs) regulam a expressão gênica modulando a acetilação da cromatina. A superexpressão de diferentes isoformas de HDACs foi encontrada em vários tipos de células cancerígenas, bem como em patologias neurológicas e inflamatórias. Em humanos, há um total de 13 HDACs, que são categorizadas em quatro classes principais - Classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), Classe IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e Classe IIb (HDACs 6 e 10), Classe III (sirt1-sirt7) e classe IV (HDAC 11). Os inventores descobriram que o ácido valérico é um inibidor da HDAC de classe 1.

[00125] Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquila ramificado. Em algumas modalidades, R compreende pelo menos 5 átomos de carbono. Em algumas modalidades, R compreende na faixa de 5 a 9 átomos de carbono. Em algumas modalidades, R compreende um grupo butírico. Em algumas modalidades, R consiste em um grupo butila e um grupo propila. Em algumas modalidades, os um ou mais ácidos orgânicos incluem o ácido valproico. Os inventores mostraram aumentos no desenvolvimento de neurites e, portanto, podem ser utilizados em um método de restauração neurológica. Também foi demonstrado que o ácido valproico ajuda na restauração neurológica em um modelo de rato com DP [62], embora não em combinação com uma terapia bacteriana. Foi demonstrado que o ácido valproico aumenta a expressão de MAP2.

[00126] Em algumas modalidades, R compreende um grupo arila. Em algumas modalidades, o grupo arila é um grupo fenila. Em algumas modalidades, o grupo fenila compreende um grupo hidroxila. Em algumas modalidades, o grupo hidroxila está na posição 2, 3, 4, 5 ou 6 do anel. Em algumas modalidades, o grupo hidroxila está na posição 4 do anel. Em algumas modalidades, R consiste em um grupo 4-hidroxifenilacetila. Em algumas modalidades, o um ou mais ácidos

orgânicos compreendem ácido 4-hidroxifenilacético. Os inventores mostraram que este ácido orgânico ou cepas bacterianas aqui descritos que produzem esse ácido orgânico podem ser usados para promover o desenvolvimento de neurites. O ácido 4-hidroxifenilacético também é um antioxidante. Em algumas modalidades, o um ou mais ácidos orgânicos compreendendo ácido 4-hidroxifenilacético podem ser utilizados no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos para reduzir o estresse oxidativo. O ácido 4-hidroxifenilacético é um intermediário da dopamina e da norepinefrina. A dopamina e a norepinefrina (também conhecida como noradrenalina) são neurotransmissores que atuam no sistema nervoso simpático. Os níveis de dopamina e norepinefrina são reduzidos em sujeitos que sofrem de doenças neurodegenerativas, como por exemplo doença de Parkinson. Os inventores descobriram que as cepas bacterianas comensais aqui descritas que produzem ácido 4-hidroxifenilacético aumentam os níveis de noradrenalina, serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) no cérebro. Portanto, o ácido 4- hidroxifenilacético pode ser útil no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas caracterizadas por níveis mais baixos de norepinefrina, dopamina, serotonina ou 5-hidroxitriptamina. Em algumas modalidades, o ácido 4-hidroxifenilacético pode ser útil no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[00127] Em algumas modalidades, R compreende um grupo alquenila. Em algumas modalidades, o grupo alquenila é pelo menos parcialmente cílico. Como referido neste documento, um grupo "parcialmente cílico" é uma cadeia de hidrocarboneto compreendendo uma porção de cadeia linear e uma porção de cadeia cílica. Em algumas modalidades, o grupo alquenila parcialmente cílico compreende 19 átomos de carbono. Em algumas modalidades, R compreende na faixa de 1 a 8 grupos substituintes metila. Em algumas

modalidades, R compreende na faixa de 1 a 8 ligações duplas carbono-carbono. Em algumas modalidades, o ácido orgânico é ácido retinoico ou um derivado do mesmo. Os inventores descobriram que esses ácidos orgânicos quando administrados em combinação com as cepas bacterianas da invenção aumentam a ativação do BDNF. Como tal, em algumas modalidades, esses ácidos orgânicos podem ser usados para aumentar a ativação do BDNF. Em algumas modalidades, esses ácidos orgânicos podem ser usados para aumentar a ativação do BDNF no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas.

[00128] Os ácidos orgânicos para uso na invenção podem ser identificados usando os protocolos de cultura e administração descritos nos Exemplos. Por exemplo, os ácidos orgânicos para utilização na invenção podem ser identificadas ao se cultivar com células de neuroblastoma e depois avaliando os níveis de citocinas e os níveis de neuroproteção ou neuroproliferação e neuritogênese. Um ácido orgânico útil pode aumentar a atividade de desenvolvimento de neurites pelo menos comparável ao ácido valproico, ácido hexanoico ou ácido retinoico, como mostrado nos Exemplos. Em particular, um ácido orgânico útil pode provocar efeitos comparáveis nos modelos de doenças neurodegenerativas e efeitos comparáveis nos níveis de citocina e fator de crescimento, aos efeitos mostrados nos Exemplos, quando o ácido orgânico é administrado em combinação com uma cepa bacteriana comensal da invenção. Por exemplo, ácidos orgânicos adequados aumentarão a ativação de BDNF comparável ao ácido retinoico quando administrado em combinação com uma cepa bacteriana da invenção. No primeiro aspecto, o ácido orgânico é produzido pela cepa bacteriana comensal da invenção.

[00129] Em algumas modalidades, ácidos orgânicos adequados da invenção como aqueles que atuam em conjunto com a cepa bacteriana comensal da invenção para aprimorar uma resposta terapêutica. Por

exemplo, os Exemplos mostram que a administração de ácido valproico juntamente com MRX0029 aumenta a secreção de BDNF. O BDNF pode ajudar a apoiar a sobrevivência de neurônios existentes e ajuda no crescimento e desenvolvimento de novos neurônios e sinapses. Portanto, certos ácidos orgânicos da invenção podem ser utilizados em métodos de neuropreservação, ou em outras palavras, para evitar a morte de neurônios.

[00130] As composições da invenção podem ainda compreender ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Os AGCC são ácidos orgânicos que compreendem um grupo ácido carboxílico ligado a um grupo alquila de hidrocarboneto linear ou ramificado que consiste em 0 a 4 átomos de carbono. Demonstrou-se que os AGCCs regulam a permeabilidade da barreira hematoencefálica. Em particular, foi mostrado que os AGCCs corrigem a permeabilidade BBB defeituosa, restaurando assim a permeabilidade a níveis fisiologicamente adequados. Em algumas modalidades, o AGCC é selecionado da lista que consiste em ácido fórmico, ácido etanoico, ácido propanoico, ácido butírico, ácido 2-metilpropanoico, ácido isovalérico, ou sais ou ésteres dos mesmos. Em algumas modalidades, o AGCC faz parte da combinação terapêutica. Em algumas modalidades, o AGCC é produzido pela cepa bacteriana comensal da invenção.

[00131] Em algumas modalidades, o AGCC para uso na invenção é ácido butírico ou um sal do mesmo. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal produz ácido butírico ou um sal do mesmo. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal que produz ácido butírico ou um sal do mesmo é a cepa de *M. massiliensis* aqui referida como cepa MRX0029. Os biótipos adequados da cepa bacteriana que produzem o AGCC podem ser identificados usando qualquer um dos outros métodos descritos na seção anterior, por exemplo, perfil de metabólitos, análise de genoma, ou análise de restrição do DNA

ribossômico amplificada.

[00132] Em algumas modalidades, as composições da invenção podem ainda compreender ácido succínico ou um sal do mesmo. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal produz ácido succínico ou um sal do mesmo. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana comensal que produz ácido succínico é a cepa aqui referida como cepa MRX0005. O ácido succínico é um metabólito do ciclo de Krebs envolvido na fosforilação oxidativa. Foi relatada disfunção da fosforilação oxidativa em distúrbios neurodegenerativos, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ataxia espinocerebelar tipo 1 [63, 64]). Portanto, aumentar a disponibilidade de ácido succínico pode reverter defeitos na fosforilação oxidativa e aumentar a atividade mitocondrial para melhorar a saúde dos neurônios sujeitos a doenças neurodegenerativas, como a DP [65].

### ***Usos terapêuticos***

[00133] Como demonstrado nos exemplos, as composições bacterianas da invenção são eficazes no tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em particular, o tratamento com composições da invenção aumenta a neuroproliferação ou neuritogênese ou atua como um neuroprotetor contra agentes que destroem neurônios, como neurônios dopaminérgicos. Portanto, as composições da invenção podem ser úteis para tratar ou prevenir doenças neurodegenerativas que são o resultado da morte de neurônios.

[00134] As composições da invenção podem diminuir a ativação do promotor NF $\kappa$ B, que ativa a produção de citocinas, por exemplo IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-18, TNF $\alpha$  e IL-6. O tratamento de células com  $\alpha$ -sinucleína mutante é um modelo para o Parkinson familiar. Uma mutação pontual na posição 53 de adenina para treonina leva a um enovelamento anormal da  $\alpha$ -sinucleína. A  $\alpha$ -sinucleína enovelada incorretamente posteriormente se agrega em fibrilas insolúveis que formam corpos de

Lewy. Portanto, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos que são resultado de neuroinflamação, enovelamento anormal de proteínas e/ou exposição ambiental. As composições da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de Parkinson familiar. A ativação do promotor NF<sub>k</sub>B é mediada através do ligante de TLR4. Sabe-se que o TLR4 media a morte celular no modelo de camundongo MPTP, que simula a doença de Parkinson. As composições da invenção podem ser usadas para inibir a capacidade do TLR4 de ativar o promotor NF<sub>k</sub>B. De particular relevância para a DP, tanto o TLR2 quanto o TLR4 foram encontrados regulados positivamente no cérebro de pacientes com DP [66]. Além disso, a  $\alpha$ -syn foi descrita como um ligante para TLR2 [67] e demonstramos que a  $\alpha$ -syn também é um ligante para TLR4 usando células HEK-TLR4 [68].

[00135] As composições da invenção diminuem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, que podem ser induzidas por lipopolissacarídeo (LPS). O tratamento de células com LPS simula Parkinson causado por fatores ambientais. As composições da invenção podem ser usadas para diminuir a secreção de IL-6. As composições da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de Parkinson ambiental.

[00136] As composições da invenção podem aumentar a secreção de IL-8. Foi demonstrado que a IL-8 desempenha um papel na mielinização dos neurônios. Em algumas modalidades, as composições da invenção podem ser usadas para aumentar a secreção de IL-8.

[00137] As composições terapêuticas da invenção podem aumentar a ativação do BDNF. O BDNF atua em certos neurônios do sistema nervoso central para apoiar a sobrevivência dos neurônios existentes e ajudar no crescimento e desenvolvimento de novos neurônios e sinapses. O BDNF é ativo no hipocampo, no córtex e no prosencéfalo

basal e é importante para a memória de longo prazo. As composições da invenção podem, portanto, ser utilizadas para aumentar a secreção de BDNF. As composições podem, portanto, ser utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ao comprometimento da memória de longo prazo. As composições da invenção podem ser utilizadas para melhorar a memória de longo prazo, em particular para melhorar a memória de longo prazo que é prejudicada por uma doença neurodegenerativa.

[00138] Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam a atividade metabólica das mitocôndrias nas células neuronais.

[00139] Exemplos de doenças neurodegenerativas a serem tratadas pelas composições da invenção incluem: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia por pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; Doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; Doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência vascular e frontotemporal; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; Comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, neuropatia inflamatória progressiva e degeneração corticobasal.

[00140] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução da morte de neurônios, em particular no tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na proteção de neurônios, em particular no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.

[00141] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução ou prevenção de perda de células dopaminérgicas na substância negra. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução ou prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução ou prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra e na consequente perda de suas fibras nervosas projetadas no estriado. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução ou prevenção de perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais.

[00142] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de dopamina. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de DOPAC (ácido 3,4-diidroxifenilacético). Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de dopamina e DOPAC. Em certas modalidades, os níveis de dopamina e/ou DOPAC são aumentados no estriado. Os níveis de dopamina e DOPAC podem ser medidos usando qualquer método apropriado conhecido na técnica, como um método radioenzimático, por exemplo no plasma ou LCR (por exemplo, como descrito em [69]), ou um método HPLC de fase reversa, talvez com detecção eletroquímica, por exemplo, no plasma ou no LCR (por exemplo, conforme descrito em [70]).

[00143] As propriedades neuroprotetoras das composições da invenção, como mostrado nos Exemplos, significam que as composições podem ser particularmente eficazes para prevenir ou retardar o início ou a progressão de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em retardar o início ou a progressão de distúrbios neurodegenerativos.

#### Modulação do eixo microbiota-intestino-cérebro

[00144] A comunicação entre o intestino e o cérebro (o eixo microbiota-intestino-cérebro) ocorre através de um sistema de comunicação neuro-humoral bidirecional. Evidências recentes mostram que a microbiota que reside no intestino pode modular o desenvolvimento do cérebro e produzir fenótipos comportamentais através do eixo microbiota-intestino-cérebro. De fato, várias revisões sugerem um papel do eixo microbiota-intestino-cérebro na manutenção da funcionalidade do sistema nervoso central e da disfunção implicada do eixo microbiota-intestino-cérebro no desenvolvimento de distúrbios e condições do sistema nervoso central [16], [19], [71].

[00145] A comunicação bidirecional entre o cérebro e o intestino (ou seja, o eixo intestino-cérebro) inclui o sistema nervoso central, sistemas neuroendócrinos e neuroimunes, incluindo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), braços simpáticos e parassimpáticos do sistema nervoso autônomo. (SNA), incluindo o sistema nervoso entérico (SNE) e o nervo vago e a microbiota intestinal.

[00146] Como demonstrado nos exemplos, as composições da presente invenção podem modular o eixo microbiota-intestino-cérebro e reduzir a morte celular associada a distúrbios neurodegenerativos. Por conseguinte, as composições da invenção podem ser úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos, em particular aqueles distúrbios e condições associados à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro.

[00147] Em modalidades particulares, as composições são para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença ou condição selecionada do grupo que consiste em: doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármacos; Doença de Alzheimer, incluindo síndrome de

Benson; esclerose múltipla; Doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; Doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do prón; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência frontotemporal e vascular; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; Comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, neuropatia inflamatória progressiva, e degeneração corticobasal.

[00148] As composições da invenção podem ser particularmente úteis para tratar ou prevenir doenças crônicas, tratar ou prevenir doenças em pacientes que não responderam a outras terapias (como tratamento com Levodopa, agonistas da dopamina, inibidores de MAO-B, inibidores de COMT, antagonistas do glutamato, e/ou anticolinérgicos) e/ou tratamento ou prevenção dos danos e sintomas teciduais associados à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro.

[00149] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o SNC. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o sistema nervoso autônomo (SNA). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o sistema nervoso entérico (SNE). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o eixo hipotalâmico, pituitário, adrenal (HPA). Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a via neuroendócrina. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a via neuroimune. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam o SNC, o SNA, o SNE, o eixo HPA e/ou as vias neuroendócrinas e neuroimunes. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de metabólitos comensais e/ou a permeabilidade gastrointestinal de um sujeito.

[00150] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por sistemas neurais. Por conseguinte, em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em

sistemas neurais. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização do sistema nervoso central. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em neurônios sensoriais. Em outras modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização em neurônios motores. Em algumas modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização no SNA. Em algumas modalidades, o SNA é o sistema nervoso parassimpático. Em modalidades preferidas, as composições da invenção modulam a sinalização do nervo vago. Em outras modalidades, o SNA é o sistema nervoso simpático. Em outras modalidades, as composições da invenção modulam a sinalização no sistema nervoso entérico. Em certas modalidades, a sinalização dos neurônios SNA e SNE responde diretamente ao conteúdo luminal do trato gastrointestinal. Em outras modalidades, a sinalização dos neurônios SNA e SNE responde indiretamente aos neuroquímicos produzidos por bactérias luminais. Em outras modalidades, a sinalização dos neurônios SNA e SNE responde a neuroquímicos produzidos por bactérias luminais ou células enteroendócrinas. Em certas modalidades preferidas, os neurônios do SNE ativam aferentes vagais que influenciam as funções do SNC. Em algumas modalidades, as composições da invenção regulam a atividade das células enterocromafinas.

### Doenças Neurodegenerativas

#### Doença de Parkinson

[00151] A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa comum caracterizada neuropatologicamente pela degeneração de populações heterogêneas de células neurais (células produtoras de dopamina). O diagnóstico clínico da doença de Parkinson requer bradicinesia e pelo menos um dos seguintes sintomas principais: tremor em repouso; rigidez muscular e comprometimento do reflexo postural.

Outros sinais e sintomas que podem estar presentes ou se desenvolver durante a progressão da doença são distúrbios autonômicos (sialorreia, seborreia, constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, hipotensão ortostática, hiperidrose), distúrbios do sono e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura. A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa que pode se desenvolver ou persistir devido à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro. Portanto, em modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção da doença de Parkinson em um sujeito.

[00152] Em outras modalidades preferidas, as composições da invenção são para utilização em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson. As composições da invenção podem melhorar as funções motoras e cognitivas em modelos da doença de Parkinson. O tratamento com as composições pode modular a sinalização nos sistemas nervosos central, autonômico e entérico; pode modular a atividade da via do eixo HPA; pode modular vias neuroendócrinas e/ou neuroimunes; e pode modular os níveis de metabólitos comensais, marcadores inflamatórios e/ou permeabilidade gastrointestinal de um sujeito, todos os quais estão implicados na neuropatologia da doença de Parkinson. Em formas de realização preferidas, a invenção fornece uma composição compreendendo uma cepa bacteriana da espécie *Megasphaera massiliensis* para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson. As composições usando *Megasphaera massiliensis* podem ser particularmente eficazes no tratamento da doença de Parkinson. A composição pode ainda compreender um ácido orgânico.

[00153] Em modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais dos sintomas da doença de Parkinson em um sujeito. Em modalidades preferidas, as composições

da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas principais da doença de Parkinson em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a bradicinesia em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam o tremor em repouso; rigidez muscular e/ou comprometimento do reflexo postural em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas associados à progressão da doença de Parkinson selecionados a partir de distúrbios autonômicos (sialorreia, seborreia, constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, hipotensão ortostática, hiperidrose), distúrbios de sono e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura.

[00154] Em modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam sintomas depressivos comórbidos com a doença de Parkinson. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a memória verbal e/ou as funções executivas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a atenção, memória de trabalho, fluência verbal e/ou ansiedade.

[00155] Em outras modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam disfunções cognitivas comórbidas com a doença de Parkinson.

[00156] Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a progressão da doença de Parkinson. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam complicações motoras posteriores. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam flutuações motoras tardias. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a perda neuronal. Em certas modalidades, as composições da invenção

melhoram os sintomas da demência da doença de Parkinson (DDP). Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam o comprometimento da função executiva, atenção e/ou memória de trabalho. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a neurotransmissão dopaminérgica. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a neurotransmissão dopaminérgica prejudicada.

[00157] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas da doença de Parkinson de acordo com uma escala sintomática ou diagnóstica. Em certas modalidades, os testes para avaliar a melhora sintomática da função motora na doença de Parkinson são a Escala Unificada de Classificação da Doença de Parkinson. Em particular, a UPDRS II considera a atividade da vida diária e a UPDRS III considera o exame motor.

[00158] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas associados à DDP de acordo com um teste e/ou escala sintomáticos ou diagnósticos. Em certas modalidades, o teste ou escala são selecionados entre o Teste de Aprendizagem Verbal de Hopkins - Revisado (HVLT-R); o Sistema de Função Executiva Denis-Kaplan (D-KEFS); a Escala de Avaliação de Depressão de Hamilton (HAM-D 17; depressão); a Escala de Avaliação de Ansiedade de Hamilton (HAM-A; ansiedade) e a Escala Unificada de Avaliação de Doença de Parkinson (UPDRS; gravidade dos sintomas da DP).

[00159] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram a escala da Impressão Global Clínica - Melhora Global (CGI-I) para avaliar distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Em algumas modalidades, as composições da invenção exibem um efeito positivo no comprometimento social e ocupacional global do sujeito com doença de Parkinson.

[00160] Em certas modalidades, as composições da invenção são

para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve reduzir ou prevenir a perda de células dopaminérgicas na substância negra. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve a redução ou prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve a redução ou prevenção da degeneração de neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra e a consequente perda de suas fibras nervosas projetadas no estriado. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve reduzir ou prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais.

[00161] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve níveis crescentes de dopamina. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve níveis crescentes de DOPAC. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurológicos, como a doença de Parkinson, em um sujeito em que o referido uso envolve o aumento dos níveis de dopamina e DOPAC. Em certas modalidades, os níveis de dopamina e/ou DOPAC são aumentados no estriado.

Doença de Alzheimer e demência

[00162] No DSM-5, o termo demência foi substituído pelos termos distúrbio neurocognitivo maior e distúrbio neurocognitivo leve. O distúrbio neurocognitivo é uma classe heterogênea de doenças psiquiátricas. O distúrbio neurocognitivo mais comum é a doença de Alzheimer, seguida por demências vasculares ou formas mistas das duas. Outras formas de distúrbios neurodegenerativos (por exemplo, doença do corpo de Lewy, demência frontotemporal, demência de Parkinson, doença de Creutzfeldt-Jakob, doença de Huntington e síndrome de Wernicke-Korsakoff) são acompanhadas por demência.

[00163] A doença de Alzheimer e a demência também são caracterizadas por perda neuronal, de modo que os efeitos neuroprotetores e neuroproliferativos mostrados nos exemplos para as composições da invenção indicam que eles podem ser úteis no tratamento ou prevenção dessas condições.

[00164] Os critérios sintomáticos para demência sob o DSM-5 são evidências de declínio cognitivo significativo de um nível anterior de desempenho em um ou mais domínios cognitivos selecionados dentre: aprendizado e memória; língua; função executiva; atenção complexa; cognição perceptivo-motora e social. Os déficits cognitivos devem interferir na independência nas atividades cotidianas. Além disso, os déficits cognitivos não ocorrem exclusivamente no contexto de um delírio e não são mais bem explicados por outro transtorno mental (por exemplo, DDM ou esquizofrenia).

[00165] Além do sintoma primário, os sujeitos com distúrbios neurodegenerativos apresentam sintomas comportamentais e psiquiátricos, incluindo agitação, agressão, depressão, ansiedade, apatia, psicose e distúrbios do ciclo de vigília.

[00166] Os distúrbios neurodegenerativos podem se desenvolver ou persistir devido à disfunção do eixo microbiota-intestino-cérebro. Portanto, em modalidades preferidas, as composições da invenção são

para uso no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos em um sujeito. Em formas modalidades preferidas, o distúrbio neurodegenerativo é a doença de Alzheimer. Em outras modalidades, o distúrbio neurodegenerativo é selecionado a partir de demências vasculares; doença de Alzheimer de forma mista e demência vascular; doença do corpo de Lewy; demência frontotemporal; Demência de Parkinson; Doença de Creutzfeldt-Jakob; Doença de Huntington; e síndrome de Wernicke-Korsakoff.

[00167] Em modalidades preferidas, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais dos sintomas de distúrbios neurodegenerativos um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a ocorrência de declínio cognitivo em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram o nível de desempenho de um sujeito com distúrbios neurodegenerativos em um ou mais domínios cognitivos selecionados dentre: aprendizado e memória; língua; função executiva; atenção complexa; cognição perceptivo-motora e social. Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a ocorrência de um ou mais sintomas comportamentais e psiquiátricos associados a distúrbios neurodegenerativos selecionados dentre agitação, agressão, depressão, ansiedade, apatia, psicose e distúrbios do ciclo de vigília.

[00168] Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam doenças sintomáticas por intervenção em mecanismos patogênicos suspeitos em um estágio pré-clínico. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a modificação da doença, com desaceleração ou interrupção da progressão dos sintomas. Em algumas modalidades, a desaceleração ou interrupção da progressão dos sintomas se correlacionam com evidências no atraso do processo neuropatológico subjacente. Em

modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram os sintomas de distúrbios neurodegenerativos compreendendo melhoria cognitiva e funcional aprimorada. Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram os sintomas comportamentais e psiquiátricos da demência (SCPD). Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a capacidade de um sujeito com distúrbio neurodegenerativo de realizar atividades diárias.

[00169] Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a cognição e o funcionamento de um sujeito com doença de Alzheimer. Em algumas modalidades, a composição da invenção melhora o desfecho cognitivo em um sujeito com doença de Alzheimer. Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram o desfecho funcional em um sujeito com doença de Alzheimer. Em modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram o desfecho cognitivo e funcional em um sujeito com doença de Alzheimer. Em ainda outras modalidades preferidas, as composições da invenção melhoram a resposta clínica geral (o desfecho global) em um sujeito com doença de Alzheimer.

[00170] Em algumas modalidades, as composições da invenção melhoram os sintomas de distúrbios neurodegenerativos de acordo com um teste sintomático ou diagnóstico. Em certas modalidades, os testes para avaliar a melhora sintomática da doença de Alzheimer (e outros distúrbios neurodegenerativos) são selecionados a partir de cognições objetivas, atividades da vida diária, avaliação global de mudanças, testes de qualidade de vida relacionados à saúde e testes para avaliar sintomas comportamentais e psiquiátricos de distúrbios neurodegenerativos.

[00171] Em certas modalidades, os testes cognitivos objetivos para avaliação da melhoria sintomática usam a subescala cognitiva da Escala de Avaliação da doença de Alzheimer (ADAS-cog) e a escala

ADAS clássica. Em certas modalidades, a melhora sintomática da cognição é avaliada usando-se a Bateria de Teste Neurofisiológico para Uso na Doença de Alzheimer (BTN).

[00172] Em algumas modalidades, a avaliação global do teste de mudança usa a escala da Impressão Global Clínica – Melhora Global (CGI-I) para avaliar distúrbios psiquiátricos e neurológicos. Em algumas modalidades, a escala global é a Impressão de Mudança Baseada na Entrevista com o Clínico Plus (CIBIC-plus). Em algumas modalidades, a escala global é a Impressão Global de Mudança do Clínico da Unidade de Estudo Cooperativo para a Doença de Alzheimer (ADCS-CGIC).

[00173] Em certas modalidades, as medidas de qualidade de vida relacionadas à saúde são a QOL Relacionada à Doença de Alzheimer (ADRQL) e a QOL de Doença de Alzheimer (QOL-AD).

[00174] Em certas modalidades, os testes que avaliam sintomas comportamentais e psiquiátricos de distúrbios neurodegenerativos são selecionados dentre a Escala de Classificação de patologia Comportamental na Doença de Alzheimer (BEHAVE-AD); a Escala de Avaliação Comportamental para Demência (BRSD); o Inventário Neuropsiquiátrico (NPI); e o Inventário de Agitação de Cohen-Mansfield (CMAI).

[00175] Em algumas modalidades, as composições da invenção são particularmente eficazes na prevenção, redução ou alívio de distúrbios neurodegenerativos quando usadas em combinação com outra terapia para o tratamento de distúrbios neurodegenerativos. Em certas modalidades, essas terapias incluem inibidores da acetilcolinesterase, incluindo donepezil (Aricept®), galantamina (Razadyne®) e rivastigmina (Exelon®) e memantina.

#### Esclerose Múltipla

[00176] A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, na qual a bainha de mielina que circunda os neurônios no cérebro e na

medula espinhal é danificada. As causas exatas subjacentes da EM são desconhecidas, mas acredita-se que variem entre os indivíduos. Certas formas de EM são hereditárias. Acredita-se também que fatores ambientais contribuam para a EM. Em alguns indivíduos, uma combinação de fatores genéticos e ambientais pode desencadear o aparecimento da EM.

[00177] Há uma grande variedade de sintomas associados à EM. Os sujeitos podem exibir quase qualquer sintoma neurológico associado ao comprometimento dos controles autonômico, visual, motor ou sensorial. Os sintomas exatos variam de acordo com o local do dano neuronal/desmielinização.

[00178] A IL-8 tem sido implicada na formação de bainhas de mielina. As composições da invenção podem, portanto, ser utilizadas na remielinização de neurônios em sujeitos com EM. As composições da invenção também podem ser usadas para proteger os neurônios da desmielinização. Em outras palavras, as composições da invenção podem ser utilizadas em um método de tratamento ou prevenção da esclerose múltipla, restaurando ou prevenindo a perda de bainhas de neurônios mielina.

[00179] Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas de EM em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam a fadiga em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam tremores em repouso, fraqueza muscular, espasmos musculares, rigidez muscular, parestesia e/ou ataxia em um sujeito. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas associados à progressão da EM selecionados na lista que consiste em distúrbios autonômicos: constipação, distúrbios de micção, funcionamento sexual, disfagia, disartria, síncope, vertigem e/ou

tontura; distúrbios do sono; e distúrbios no sentido do olfato ou na sensação de temperatura. Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam um ou mais sintomas oculares associados à EM. Em algumas modalidades, o sintoma ocular é selecionado da lista que consiste em perda de visão, dor ocular, daltonismo, visão dupla e/ou movimentos oculares involuntários em um sujeito.

[00180] Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam tontura, vertigem, dores neuropáticas, dores musculoesqueléticas, disfunção cognitiva, incontinência intestinal, disfagia, disartria ou qualquer combinação das mesmas.

[00181] Em algumas modalidades, as composições da invenção previnem, reduzem ou aliviam sintomas depressivos ou ansiedade comórbida com EM.

[00182] Em algumas modalidades, as composições da invenção, a melhoria dos sintomas são determinadas usando os critérios de McDonald de 2017 para o diagnóstico de EM.

[00183] Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção resulta em uma redução na incidência ou gravidade da EM. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução da incidência ou gravidade da recaída. Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção previne um declínio na função motora ou resulta em uma função motora melhorada associada à EM. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de um declínio na função motora ou para uso na melhoria da função motora no tratamento de EM. Em certas modalidades, o tratamento com as composições da invenção previne o desenvolvimento de paralisia na EM. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de paralisia no tratamento de EM.

[00184] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção de esclerose múltipla em um paciente que foi identificado como em risco de esclerose múltipla, ou que foi diagnosticado com esclerose múltipla em estágio inicial ou esclerose múltipla "remitente-recorrente". As composições da invenção podem ser úteis para impedir o desenvolvimento de EM. As composições da invenção podem ser úteis para impedir a progressão da EM. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em um paciente identificado como tendo uma predisposição genética para a EM, como o fenótipo de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), antígeno leucocitário humano (HLA) -DR2 ou HLA-DR4.

[00185] As composições da invenção podem ser úteis para gerenciar ou aliviar a esclerose múltipla. As composições da invenção podem ser particularmente úteis para reduzir os sintomas associados à esclerose múltipla. O tratamento ou a prevenção podem se referir, por exemplo, a uma atenuação da gravidade dos sintomas ou a uma redução na frequência das exacerbações ou na gama de desencadeantes que são um problema para o paciente. Em certas modalidades, as composições da invenção retardam ou interrompem a progressão da doença.

[00186] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de EM remitente-recorrente. Em modalidades alternativas, as composições da invenção são para uso no tratamento de EM progressiva, como EM secundária progressiva (EMSP), que se desenvolve ao longo do tempo após o diagnóstico de EMRR, EM primária progressiva MS (EMPP), que exibe deterioração neurológica contínua gradual, e EM recaída progressiva (EM), que é semelhante à EMPP, mas com recaídas sobrepostas.

[00187] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um ou mais dos sintomas de EM

selecionados do grupo que consiste em: fadiga, problemas de visão, dormência, formigamento, espasmos musculares, rigidez muscular, fraqueza muscular, problemas de mobilidade, dor, problemas de pensamento, aprendizado e planejamento, depressão e ansiedade, problemas sexuais, problemas de bexiga, problemas intestinais, dificuldades de fala e deglutição.

Fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores e o eixo microbiota-intestino-cérebro

[00188] Como descrito acima, o eixo microbiota-intestino-cérebro é modulado por vários sistemas fisiológicos diferentes. O eixo microbiota-intestino-cérebro é modulado por várias moléculas de sinalização. Alterações nos níveis dessas moléculas sinalizadoras resultam em doenças neurodegenerativas. As experiências realizadas pelos inventores indicam que a administração de cepas bacterianas comensais de *Megasphaera*, e em particular *Megasphaera massiliensis*, pode modular os níveis de indol e quinurenina. A desregulação desses metabólitos pode levar a doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson.

[00189] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de monoaminas cerebrais e seus metabólitos. Em modalidades preferidas, o metabólito é quinurenina. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a quinurenina, que é a principal via do metabolismo do triptofano, que serve como uma rota para a produção de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD<sup>+</sup>). A quinurenina pode ser metabolizada em compostos neuroativos, como o ácido cinurênico (KYNA) e 3-hidroxi-1-quinurenina (3-OH-1-KYN) e, em outras etapas, no ácido quinolínico (QUIN). A desregulação da via da quinurenina pode levar à ativação do sistema imunológico e ao acúmulo de compostos potencialmente neurotóxicos. Alterações no metabolismo da quinurenina podem estar envolvidas no desenvolvimento das

doenças de Parkinson. Demonstrou-se que os níveis de quinurenina diminuíram no córtex frontal, no putâmen e na pars compacta da substância negra de pacientes com DP (doença de Parkinson) [72]. Portanto, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento dos níveis de quinurenina no tratamento da doença de Parkinson.

[00190] Em certas modalidades da invenção, as composições da invenção podem aumentar os níveis de quinurenina. Demonstrou-se que níveis aumentados de quinurenina atenuam a morte celular neuronal induzida por MPP<sup>+</sup> in vitro em uma linhagem celular de neuroblastoma dopaminérgico humano [73]. Em certas modalidades, a quinurenina e o ácido quinurênico, podem ativar o receptor GI de aril hidrocarboneto (Ahr) e os receptores GPR35. Ativação do receptor Ahr induz a produção de IL-22, que pode inibir a inflamação local. Ativação do GPR35 induzindo a produção de trifosfato de inositol e mobilização de Ca<sup>2+</sup>.

[00191] Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de indol. Em modalidades preferidas, o metabólito é quinurenina. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a quinurenina, que é a principal via do metabolismo do triptofano.

[00192] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção modulam níveis de fatores neuroquímicos, neuropeptídeos e neurotransmissores. Por conseguinte, em certas modalidades preferidas, as composições da invenção alteram diretamente a bioquímica do SNC.

[00193] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada pelos níveis de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Por

conseguinte, em formas de realização preferidas, as composições da invenção modulam os níveis de GABA. O GABA é um neurotransmissor inibitório que reduz a excitabilidade neuronal. Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam os níveis de GABA. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem os níveis de GABA. Em certas modalidades, as composições da invenção alteram a neurotransmissão GABAérgica. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o nível de transcrição de GABA em diferentes regiões do sistema nervoso central. Em certas modalidades, o GABA derivado comensal atravessa a barreira hematoencefálica e afeta diretamente a neurotransmissão. Em certas modalidades, as composições da invenção levam a uma redução de GABA no hipocampo, amígdala e/ou *locus coeruleus*. Em certas modalidades, as composições da invenção levam a um aumento de GABA nas regiões corticais.

#### Resposta imune

[00194] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por alterações na resposta imune e em fatores e marcadores inflamatórios. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a resposta imune. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis sistêmicos das moléculas de sinalização neuroimune circulantes. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a produção e inflamação de citocinas pró-inflamatórias. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam o estado inflamatório. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem a produção e secreção de IL-6. Em certas modalidades, as composições da invenção diminuem a ativação do promotor de NFkB. Em certas modalidades, as composições da invenção são capazes de modular a ativação da produção de IL-6 pelo potente lipopolissacarídeo (LPS) de endotoxina

pró-inflamatório. Em certas modalidades, as composições da invenção são capazes de modular a ativação do promotor de NF $\kappa$ B por proteínas mutantes de LPS e  $\alpha$ -sinucleína, como a A53T. Níveis circulantes aumentados de citocinas estão intimamente associados a vários distúrbios neurodegenerativos, incluindo Parkinson, demência e Alzheimer. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução dos níveis de IL-6 e/ou NF $\kappa$ B no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo. Em algumas modalidades, as composições da invenção aumentam a secreção de IL-8. Foi demonstrado que a IL-8 induz a formação da bainha de mielina e restaura ou preserva a comunicação neuronal eficaz. Assim, em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na indução da formação de bainha de mielina no tratamento de doenças neurodegenerativas. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na restauração da comunicação neuronal. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso na preservação da comunicação neuronal.

[00195] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de metabólitos comensais. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis sistêmicos dos metabólitos da microbiota. Em certas formas de realização preferidas, as composições da invenção modulam o nível de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Em certas modalidades, o nível de AGCCs é aumentado ou diminuído. Em algumas modalidades, o nível de AGCCs é aumentado. Em algumas modalidades, o AGCC é ácido butírico (AB) (ou butirato). Em algumas modalidades, o AGCC é ácido propiônico (APP). Em algumas modalidades, o AGCC é ácido acético. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a capacidade dos AGCCs de atravessar a barreira hematoencefálica.

[00196] A acetilação e desacetilação de histonas são importantes

reguladores epigenéticos da expressão gênica. Um desequilíbrio na acetilação e desacetilação de histonas pode resultar em apoptose. A desregulação dessas histona acetiltransferases tem sido implicada na patogênese associada a doenças neurodegenerativas associadas à idade, como doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e declínio cognitivo [74]. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a atividade da histona desacetilase. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a atividade da histona desacetilase. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a atividade da histona acetilase. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a atividade da histona desacetilase de classe 1.

[00197] Pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Parkinson, doença de Huntington, doença de Alzheimer e esclerose lateral amiotrófica, apresentam altos níveis de peroxidação lipídica. Os lipídios são vulneráveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio, e o cérebro é rico em ácidos graxos poli-insaturados. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção podem modular a peroxidação lipídica. Em certas modalidades, as composições da invenção podem reduzir a peroxidação lipídica. A redução do dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio pode ser usada para atingir precocemente os estágios das doenças neurodegenerativas. Dessa forma, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de neurodegeneração em estágio inicial. Também dessa forma, em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na prevenção do desenvolvimento de um distúrbio neurodegenerativo. Em tais modalidades, as composições da invenção podem ser usadas em um paciente que foi identificado como em risco de desenvolver um distúrbio

neurodegenerativo.

[00198] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada por níveis de permeabilidade gastrointestinal. Por conseguinte, em algumas modalidades, as composições da invenção alteram a integridade do epitélio do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a permeabilidade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a função de barreira e a integridade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a motilidade do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a translocação de metabólitos comensais e moléculas de sinalização inflamatória para a corrente sanguínea a partir do lúmen do trato gastrointestinal.

[00199] A sinalização do eixo microbiota-intestino-cérebro é modulada pela composição do microbioma no trato gastrointestinal. Por conseguinte, em certas modalidades, as composições da invenção modulam a composição de microbioma do trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção evitam a disbiose do microbioma e aumentos associados de metabólitos tóxicos (por exemplo, LPS). Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de *Clostridium* no trato gastrointestinal. Em modalidades preferidas, as composições da invenção reduzem o nível de *Clostridium* no trato gastrointestinal. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem os níveis de *Campylobacter jejuni*. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam a proliferação de bactérias anaeróbicas prejudiciais e a produção de neurotoxinas produzidas por essas bactérias. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de microbioma de *Lactobacillus* e/ou *Bifidobacterium*. Em certas modalidades, as composições da invenção modulam os níveis de microbioma dos

gêneros *Sutterella*, *Prevotella*, *Ruminococcus* e/ou da família *Alcaligenaceae*. Em certas modalidades, as composições da invenção aumentam o nível de *Lactobacillus plantarum* e/ou *Saccharomyces boulardii*.

#### Lesão cerebral

[00200] Os exemplos demonstram que as composições da invenção são neuroprotetoras e possuem atividade inibidora de HDAC. O HDAC2 é um alvo crucial para a recuperação funcional do derrame [75] e a inibição do HDAC pode prevenir lesões na substância branca [76], de modo que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais.

[00201] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral. Em algumas modalidades, a lesão cerebral é uma lesão cerebral traumática. Em algumas modalidades, a lesão cerebral é uma lesão cerebral adquirida. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de trauma. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de um tumor. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de um derrame. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de uma hemorragia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de encefalite. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de hipóxia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral resultante de anóxia cerebral.

[00202] Nas modalidades preferidas, as composições da invenção são para uso no tratamento de derrame. Os efeitos mostrados nos

exemplos são particularmente relevantes para o tratamento de derrame. O derrame ocorre quando o fluxo sanguíneo para pelo menos uma parte do cérebro é interrompido. Sem um suprimento adequado de sangue para fornecer oxigênio e nutrientes ao tecido cerebral e remover resíduos do tecido cerebral, as células cerebrais rapidamente começam a morrer. Os sintomas do derrame dependem da região do cérebro afetada pelo fluxo sanguíneo inadequado. Os sintomas incluem paralisia, dormência ou fraqueza dos músculos, perda de equilíbrio, tontura, dores de cabeça súbitas e graves, comprometimento da fala, perda de memória, perda de capacidade de raciocínio, confusão súbita, comprometimento da visão, coma ou até morte. Um derrame também é conhecido como ataque cerebral ou acidente vascular cerebral (AVC). Os sintomas do AVC podem ser breves se o fluxo sanguíneo adequado for restaurado dentro de um curto período de tempo. No entanto, se o fluxo sanguíneo inadequado continuar por um período significativo, os sintomas podem ser permanentes.

[00203] Em algumas modalidades, o derrame é isquemia cerebral. A isquemia cerebral ocorre quando há fluxo sanguíneo insuficiente para os tecidos do cérebro para atender à demanda metabólica. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral é isquemia cerebral focal, ou seja, confinada a uma região específica do cérebro. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral é isquemia cerebral global, ou seja, abrangendo uma ampla área do tecido cerebral. A isquemia cerebral focal geralmente ocorre quando um vaso cerebral fica bloqueado, parcial ou completamente, reduzindo o fluxo sanguíneo para uma região específica do cérebro. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral focal é um acidente vascular cerebral isquêmico. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é trombótico, isto é, causado por um trombo ou coágulo sanguíneo, que se desenvolve em um vaso cerebral e restringe ou bloqueia o fluxo sanguíneo. Em

algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é um acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é embólico, isto é, causado por um êmbolo ou uma massa não acoplada que viaja através da corrente sanguínea e restringe ou bloqueia o fluxo sanguíneo em um local distante do seu ponto de origem. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral isquêmico é um acidente vascular cerebral embólico. A isquemia cerebral global ocorre geralmente quando o fluxo sanguíneo no cérebro como um todo é bloqueado ou reduzido. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral global é causada por hipoperfusão, ou seja, devido a choque. Em algumas modalidades, a isquemia cerebral global é resultado de uma parada cardíaca.

[00204] Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral focal. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral isquêmico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral embólico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu isquemia cerebral global. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu hipoperfusão. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma parada cardíaca.

[00205] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral focal. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico.

Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral trombótico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral embólico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de isquemia cerebral global. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de hipoperfusão.

[00206] Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral é acidente vascular cerebral hemorrágico. O acidente vascular cerebral hemorrágico é causado pelo sangramento dentro ou ao redor do cérebro, resultando em inchaço, pressão e danos às células e tecidos do cérebro. O acidente vascular cerebral hemorrágico é geralmente o resultado de um vaso sanguíneo enfraquecido que se rompe e sangra no cérebro circundante. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é uma hemorragia intracerebral, ou seja, causada por sangramento dentro do próprio tecido cerebral. Em algumas modalidades, a hemorragia intracerebral é causada por uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, a hemorragia intracerebral é causada por uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é uma hemorragia subaracnoidea, isto é, sangramento que ocorre fora do tecido cerebral, mas ainda dentro do crânio. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o acidente vascular cerebral hemorrágico é resultado de malformação arteriovenosa (MAV) cerebral.

[00207] Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um acidente vascular cerebral hemorrágico. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral

sofreu uma hemorragia intracerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu uma hemorragia subaracnoidea. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu MAV cerebral.

[00208] Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de acidente vascular cerebral hemorrágico. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intracerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intraparenquimatosa. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia intraventricular. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma hemorragia subaracnoidea. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de uma angiopatia amiloide cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de MAV cerebral.

[00209] A restauração do fluxo sanguíneo adequado para o cérebro após um período de interrupção, embora eficaz no alívio dos sintomas associados ao derrame, pode paradoxalmente resultar em mais danos ao tecido cerebral. Durante o período de interrupção, o tecido afetado sofre com a falta de oxigênio e nutrientes, e a repentina restauração do fluxo sanguíneo pode resultar em inflamação e danos oxidativos pela

indução de estresse oxidativo. Isso é conhecido como lesão de reperfusão e está bem documentado não apenas após o derrame, mas também após um ataque cardíaco ou outro dano tecidual quando o suprimento sanguíneo retorna ao tecido após um período de isquemia ou falta de oxigênio. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu lesão de reperfusão como resultado de derrame. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão por reperfusão como resultado de derrame.

[00210] Um ataque isquêmico transitório (AIT), geralmente chamado de mini-AVC, é um sinal de alerta reconhecido para um ataque mais grave. Os indivíduos que sofreram um ou mais AITs estão, portanto, em maior risco de derrame. Em algumas modalidades, o sujeito diagnosticado com lesão cerebral sofreu um AIT. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de um AIT. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral em um sujeito que sofreu um AIT.

[00211] Pressão alta, colesterol alto, histórico familiar de acidente vascular cerebral, doenças cardíacas, diabetes, aneurismas cerebrais, malformações arteriovenosas, doença das células falciformes, vasculite, distúrbios hemorrágicos, uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), tabagismo, fumo de tabaco, consumo de grandes quantidades de álcool, uso de drogas ilegais, obesidade, falta de atividade física e dieta não saudável são considerados fatores de risco para derrame. Em particular, foi demonstrado que a redução da pressão arterial evita AVCs isquêmicos e hemorrágicos [77], [78]. Em algumas modalidades, as composições da invenção são para uso no tratamento de lesão cerebral em um sujeito que possui pelo menos um fator de risco para acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o

sujeito tem dois fatores de risco para acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem três fatores de risco para acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem quatro fatores de risco para acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem mais de quatro fatores de risco para acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem pressão alta. Em algumas modalidades, o sujeito tem colesterol alto no sangue. Em algumas modalidades, o sujeito tem um histórico familiar de acidente vascular cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma doença cardíaca. Em algumas modalidades, o sujeito tem diabetes. Em algumas modalidades, o sujeito tem um aneurisma cerebral. Em algumas modalidades, o sujeito tem malformações arteriovenosas. Em algumas modalidades, o sujeito tem vasculite. Em algumas modalidades, o sujeito tem doença falciforme. Em algumas modalidades, o sujeito tem um distúrbio hemorrágico. Em algumas modalidades, o sujeito tem um histórico de uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Em algumas modalidades, o sujeito fuma tabaco. Em algumas modalidades, o sujeito consome grandes quantidades de álcool. Em algumas modalidades, o sujeito usa drogas ilegais. Em algumas modalidades, o sujeito é obeso. Em algumas modalidades, o sujeito está acima do peso. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma falta de atividade física. Em algumas modalidades, o sujeito tem uma dieta não saudável.

[00212] Os exemplos indicam que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais e auxiliar na recuperação quando administradas antes da ocorrência do evento de lesão. Portanto, as composições da invenção podem ser particularmente úteis no tratamento de lesão cerebral quando administradas a indivíduos em risco de lesão cerebral, como acidente vascular cerebral.

[00213] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso na redução do dano causado por uma potencial lesão cerebral, preferencialmente um acidente vascular cerebral. As composições podem reduzir o dano causado quando são administradas antes da ocorrência de uma potencial lesão cerebral, em particular quando administrada a um paciente identificado como em risco de uma lesão cerebral.

[00214] Os exemplos indicam que as composições da invenção podem ser úteis no tratamento de lesões cerebrais e auxiliar na recuperação quando administradas depois da ocorrência do evento de lesão. Portanto, as composições da invenção podem ser particularmente úteis no tratamento de lesão cerebral quando administradas a indivíduos em risco de lesão cerebral, como acidente vascular cerebral.

[00215] Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais reduzindo o dano motor. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a função motora. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a força muscular. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a memória. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar o reconhecimento social. Em algumas modalidades, as composições da invenção tratam lesões cerebrais ao melhorar a função neurológica.

[00216] O tratamento de lesão cerebral pode se referir, por exemplo, a um alívio da gravidade dos sintomas. O tratamento de lesões cerebrais também pode se referir à redução das deficiências neurológicas após o AVC. As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas ao sujeito antes do início do acidente vascular cerebral, por exemplo, em

um paciente identificado como estando em risco de acidente vascular cerebral. As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas após a ocorrência de um acidente vascular cerebral, por exemplo, durante a recuperação. As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas durante a fase aguda da recuperação (isto é, até uma semana após o acidente vascular cerebral). As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas durante a fase subaguda de recuperação (isto é, de uma semana a três meses após o acidente vascular cerebral). As composições da invenção para uso no tratamento de acidente vascular cerebral podem ser fornecidas durante a fase crônica de recuperação (três meses após o acidente vascular cerebral).

[00217] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em combinação com um agente ativo secundário. Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso em combinação com aspirina ou ativador de plasminogênio tecidual (tPA). Outros agentes secundários incluem outras antiplaquetas (como o clopidogrel), anticoagulantes (como heparinas, varfarina, apixaban, dabigatran, edoxaban ou rivaroxaban), anti-hipertensivos (como diuréticos, inibidores da ECA, bloqueadores dos canais de cálcio, betabloqueadores ou alfa-bloqueadores) ou estatinas. As composições da invenção podem melhorar a resposta do paciente ao agente ativo secundário.

[00218] Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem o efeito da isquemia nos tecidos. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem a quantidade de danos nos tecidos causados por isquemia. Em certas modalidades, os tecidos danificados pela isquemia são os tecidos cerebrais. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem a necrose ou o número de células

necróticas. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem a apoptose ou o número de células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção reduzem o número de células necróticas e apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem a morte celular por necrose e/ou apoptose. Em certas modalidades, as composições da invenção previnem a morte celular por necrose e/ou apoptose causada por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a recuperação do tecido danificado por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a velocidade de depuração de células necróticas e/ou células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a eficácia da depuração de células necróticas e/ou células apoptóticas. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a substituição e/ou regeneração de células dentro dos tecidos. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a substituição e/ou regeneração de células dentro de tecidos danificados por isquemia. Em certas modalidades, as composições da invenção melhoram a histologia geral do tecido (por exemplo, em uma biópsia).

### ***Modos de administração***

[00219] Preferencialmente, as composições da invenção devem ser administradas no trato gastrointestinal para permitir a distribuição para e/ou a colonização parcial ou total do intestino com a cepa bacteriana da invenção. Geralmente, as composições da invenção são administradas oralmente, mas podem ser administradas por via retal, intranasal ou por via bucal ou sublingual. Em algumas modalidades, uma composição compreende a cepa e o ácido orgânico da invenção. Em algumas modalidades, são fornecidas composições separadas do ácido orgânico e da cepa bacteriana comensal.

[00220] Em certas modalidades, as composições da invenção podem

ser administradas como uma espuma, como um spray ou um gel.

[00221] Em certas modalidades, as composições da invenção podem ser administradas como um supositório, tal como um supositório retal, por exemplo na forma de um óleo de teobroma (manteiga de cacau), gordura dura sintética (por exemplo, suppocire, witepsol), glicerolatina, polietilenoglicol ou composição de glicerina de sabão.

[00222] Em certas modalidades, a composição da invenção é administrada ao trato gastrointestinal através de um tubo, tal como um tubo nasogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de jejunostomia (tubo J), gastronomia endoscópica percutânea (PEG), ou uma porta, tal como uma porta de parede torácica que fornece acesso ao estômago, jejuno e outras portas de acesso adequadas.

[00223] As composições da invenção podem ser administradas uma vez, ou podem ser administradas sequencialmente como parte de um regime de tratamento. Em certas modalidades, as composições da invenção devem ser administradas diariamente.

[00224] Em certas modalidades da invenção, o tratamento de acordo com a invenção é acompanhado por avaliação da microbiota intestinal do paciente. O tratamento pode ser repetido se a transmissão e/ou colonização parcial ou total com a cepa da invenção não for alcançada de modo que a eficácia não seja observada, ou o tratamento pode ser interrompido se a transmissão e/ou colonização parcial ou total for bem-sucedida e se for observada eficácia.

[00225] Em certas modalidades, a composição da invenção pode ser administrada a um animal gestante, por exemplo, a um mamífero tal como uma humana para prevenir uma doença inflamatória ou autoimune de se desenvolver em seu filho in utero e/ou após o nascimento.

[00226] As composições da invenção podem ser administradas a um paciente que foi diagnosticado com uma doença neurodegenerativa ou

que foi identificado como estando em risco de uma doença neurodegenerativa. As composições também podem ser administradas como uma medida profilática para prevenir o desenvolvimento de doença neurodegenerativa em um paciente saudável.

[00227] As composições da invenção podem ser administradas a um paciente que tenha sido identificado como tendo uma microbiota intestinal anormal. Por exemplo, o paciente pode ter colonização reduzida ou ausente por *Megasphaera*, e em particular *Megasphaera massiliensis*.

[00228] As composições compreendendo a bactéria da invenção podem ser administradas como um produto alimentício, tal como um suplemento nutricional.

[00229] Em algumas modalidades, uma composição compreendendo um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do ácido orgânico pode ser administrada por via intravenosa. Em algumas modalidades, o ácido orgânico é liofilizado e administrado por via oral.

[00230] Em algumas modalidades, a composição compreendendo a cepa bacteriana comensal e a composição compreendendo o ácido orgânico devem ser administradas simultaneamente, separadamente ou sequencialmente. Cada uma das diferentes composições pode ser administrada por qualquer combinação dos modos de administração aqui descritos. Geralmente, as composições da invenção são para o tratamento de humanos, embora possam ser usadas para tratar animais incluindo mamíferos monogástricos tais como aves domésticas, porcos, gatos, cães, cavalos ou coelhos. As composições da invenção podem ser úteis para melhorar o crescimento e desempenho dos animais. Se administrado a animais, a gavagem oral pode ser usada.

### **Composições**

[00231] Geralmente, a composição da invenção compreende bactérias. Em algumas modalidades, a composição compreende ainda

um ácido orgânico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo. Nas modalidades preferidas da invenção, a composição é formulada sob a forma liofilizada. Por exemplo, a composição da invenção pode compreender grânulos ou cápsulas de gelatina, por exemplo, cápsulas de gelatina duras, compreendendo uma cepa bacteriana da invenção e/ou um ácido orgânico da invenção. Em algumas modalidades, o ácido orgânico da invenção e as bactérias da invenção são formuladas como composições separadas. Em algumas modalidades, cada uma das composições separadas é formulada em uma forma liofilizada. Orientações gerais sobre a formulação das composições da invenção podem ser encontradas, por exemplo, em Aulton Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines.

[00232] Preferencialmente, a composição da invenção compreende bactérias liofilizadas. A liofilização de bactérias é um procedimento bem estabelecido e uma orientação relevante está disponível, por exemplo, nas referências [79], [80], [81].

[00233] Alternativamente, a composição da invenção pode compreender uma cultura bacteriana ativa e viva.

[00234] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi inativada, por exemplo, não foi inativada por calor. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi morta, por exemplo, não foi morta por calor. Em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi atenuada, por exemplo, não foi atenuada pelo calor. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção não foi morta, inativada e/ou atenuada. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é viva. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é viável. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é capaz de

colonizar parcial ou totalmente o intestino. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana na composição da invenção é viável e capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[00235] Em algumas modalidades, a composição compreende uma mistura de cepas bacterianas vivas e cepas bacterianas que foram mortas.

[00236] Em modalidades preferidas, a composição da invenção é encapsulada para permitir a distribuição da estirpe bacteriana e/ou do ácido orgânico ou de um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo no intestino. A encapsulação protege a composição da degradação até sua transmissão no local alvo através de, por exemplo, ruptura com estímulos químicos ou físicos tais como pressão, atividade enzimática ou desintegração física, que podem ser desencadeados por mudanças no pH. Qualquer método de encapsulação apropriado pode ser usado. Exemplos de técnicas de encapsulação incluem aprisionamento dentro de uma matriz porosa, ligação ou adsorção em superfícies carreadoras sólidas, autoagregação por floculação ou com agentes de reticulação e contenção mecânica atrás de uma membrana microporosa ou uma microcápsula. As orientações sobre encapsulação que podem ser úteis para preparar as composições da invenção estão disponíveis, por exemplo, nas referências [82] e [83].

[00237] A composição pode ser administrada oralmente e pode estar sob a forma de um comprimido, cápsula ou pó. Produtos encapsulados são preferidos porque *Megasphaera* são anaeróbicas. Outros ingredientes (como a vitamina C, por exemplo), podem ser incluídos como eliminadores de oxigênio e substratos prebióticos para melhorar a distribuição e/ou a colonização parcial ou total e a sobrevivência in vivo. Alternativamente, a composição probiótica da invenção pode ser administrada oralmente como um produto alimentício ou nutricional, tal como leite ou produto lácteo fermentado à base de soro de leite, ou

como um produto farmacêutico.

[00238] A composição pode ser formulada como um probiótico.

[00239] Uma composição da invenção inclui uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa bacteriana da invenção e/ou uma quantidade terapeuticamente eficaz, um ácido orgânico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo da invenção. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa bacteriana e/ou de um ácido orgânico da invenção é suficiente para exercer um efeito benéfico sobre um paciente. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa bacteriana pode ser suficiente para resultar na distribuição e/ou colonização parcial ou total do intestino do paciente.

[00240] Uma dose diária adequada da bactéria, por exemplo, para um ser humano adulto, pode ser de cerca de  $1 \times 10^3$  a cerca de  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colônias (UFC); por exemplo, de cerca de  $1 \times 10^7$  a cerca de  $1 \times 10^{10}$  UFC; em outro exemplo, de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^{10}$  UFC.

[00241] Em certas modalidades, a composição contém a cepa bacteriana em uma quantidade de cerca de  $1 \times 10^6$  a cerca de  $1 \times 10^{11}$  UFC/g, em relação ao peso da composição; por exemplo, de cerca de  $1 \times 10^8$  a cerca de  $1 \times 10^{10}$  UFC/g. A dose pode ser, por exemplo, 1 g, 3g, 5g e 10g. Tipicamente, um probiótico, como a composição da invenção, é opcionalmente combinado com pelo menos um composto prebiótico adequado. Um composto prebiótico é geralmente um carboidrato não digerível, como um oligo- ou polissacarídeo, ou um álcool de açúcar, que não é degradado ou absorvido no trato digestivo superior. Os prebióticos conhecidos incluem produtos comerciais tais como inulina e trans-galacto-oligossacarídeos.

[00242] Em certas modalidades, a composição probiótica da presente invenção inclui um composto prebiótico em uma quantidade de cerca de 1 a cerca de 30% em peso, em relação à composição do

peso total (por exemplo, de 5 a 20% em peso). Os carboidratos podem ser selecionados dentre o grupo que consiste em: fruto-oligossacarídeos (ou FOS), fruto-oligossacarídeos de cadeia curta, inulina, isomalto-oligossacarídeos, pectinas, xilo-oligossacarídeos (ou XOS), oligossacarídeos de quitosana (ou COS), beta-glucanos, amidos de goma arábica modificada e resistente, polidextrose, D-tagatose, fibras de acácia, alfarroba, aveia e fibras de citrinos. Em um aspecto, os prebióticos são os fruto-oligossacarídeos de cadeia curta (para simplicidade, mostrado abaixo como FOSs-c.c); os referidos FOSs-c.c não são carboidratos digestíveis, geralmente obtidos pela conversão do açúcar de beterraba e incluindo uma molécula de sacarose à qual três moléculas de glicose são ligadas.

[00243] Em algumas modalidades, o ácido orgânico é fornecido como um sal liofilizado ou éster do mesmo. O produto de ácido orgânico liofilizado pode ser formulado em uma forma de dosagem única. O ácido orgânico liofilizado pode ser formulado em uma forma de dosagem repetida. O produto de ácido orgânico liofilizado pode ser formulado com as bactérias liofilizadas em uma forma de dosagem única. Alternativamente, o produto de ácido orgânico pode ser formulado com as bactérias liofilizadas em uma forma de dosagem repetida.

[00244] Em algumas modalidades, o produto de ácido orgânico pode ser formulado como uma composição de "liberação lenta" ou "liberação rápida". As composições de "liberação lenta" resultam em aumentos iniciais mais baixos nas concentrações séricas no plasma do produto de ácido orgânico, mas têm um efeito mais sustentado, com níveis plasmáticos elevados do ácido orgânico permanecendo por mais tempo. Por outro lado, as composições de "liberação rápida" são formuladas para fornecer uma dose inicial alta do produto de ácido orgânico, resultando em maior concentração inicial no plasma, mas com um efeito de duração mais curto.

[00245] Em algumas modalidades, o ácido orgânico é administrado por via intravenosa. Por exemplo, o ácido orgânico pode ser valproato de sódio e pode ser administrado a um sujeito em uma infusão de 60 min a uma taxa não superior a 20 mg/min. Uma dose diária típica do ácido orgânico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo irá variar dependendo das características físicas do sujeito, da via de administração e/ou da duração desejada do efeito da composição. Em certas modalidades, as composições da invenção são usadas em combinação com outro composto terapêutico para tratar ou prevenir o distúrbio neurodegenerativo.

[00246] Em algumas modalidades, as composições da invenção são administradas com suplementos nutricionais que modulam neuroproteção ou neuroproliferação. Em modalidades preferidas, os suplementos nutricionais compreendem ou consistem em vitaminas nutricionais. Em certas modalidades, as vitaminas são vitamina B6, magnésio, dimetilglicina (vitamina B16) e vitamina C. Em certas modalidades, as composições da invenção são administradas em combinação com outro probiótico.

[00247] Em certas modalidades, as composições da invenção são para uso no aumento do efeito de um segundo agente em uma doença neurodegenerativa. Os efeitos imunomoduladores das composições da invenção podem tornar o cérebro mais suscetível a terapias convencionais, como Levodopa, agonistas da dopamina, inibidores da MAO-B, inibidores da COMT, antagonistas do glutamato ou anticolinérgicos, que são agentes secundários exemplares a serem administrados em combinação (sequencialmente ou contemporaneamente) com as composições da invenção.

[00248] As composições da invenção podem compreender excipientes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis. Os exemplos de tais excipientes adequados podem ser encontrados na referência [84].

Os transportadores ou diluentes aceitáveis para uso terapêutico são bem conhecidos na técnica farmacêutica e estão descritos, por exemplo, na referência [85]. Os exemplos de transportadores adequados incluem lactose, amido, glucose, metilcelulose, estearato de magnésio, manitol, sorbitol e semelhantes. Exemplos de diluentes adequados incluem etanol, glicerol e água. A escolha do transportador, excipiente ou diluente farmacêutico pode ser selecionada em relação à via de administração pretendida e à prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como, ou em adição, o veículo, excipiente ou diluente quaisquer ligantes, lubrificantes, agentes de suspensão, agentes de revestimento e agentes solubilizantes adequados. Exemplos de ligantes adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glucose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, edulcorantes de milho, gomas naturais e sintéticas, tais como acácia, tragacanto ou alginato de sódio, carboximetilcelulose e polietilenoglicol. Exemplos de lubrificantes adequados incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e semelhantes. Conservantes, estabilizantes, corantes e mesmo agentes aromatizantes podem ser fornecidos na composição farmacêutica. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Antioxidantes e agentes de suspensão também podem ser usados.

[00249] As composições da invenção podem ser formuladas como um produto alimentício. Por exemplo, um produto alimentício pode fornecer um benefício nutricional para além do efeito terapêutico da invenção, tal como em um suplemento nutricional. De um modo semelhante, um produto alimentício pode ser formulado para melhorar o sabor da composição da invenção ou para tornar a composição mais atrativa para o consumo ao torná-la mais semelhante a um artigo

alimentício comum, em vez de uma composição farmacêutica. Em certas modalidades, a composição da invenção é formulada como um produto à base de leite. O termo "produto à base de leite" significa qualquer produto à base de leite ou soro de leite líquido ou semissólido com um teor de gordura variável. O produto à base de leite pode ser, por exemplo, leite de vaca, leite de cabra, leite de ovelha, leite desnatado, leite integral, leite reconstituído a partir de leite em pó e soro de leite sem qualquer processamento, ou um produto processado, como iogurte, leite coalhado, coalhada, leite azedo, leite integral azedo, leitelho e outros produtos lácteos azedos. Outro grupo importante inclui bebidas lácteas, como bebidas de soro de leite, leites fermentados, leites condensados, leites infantis ou para bebês; leites aromatizados, sorvetes; alimentos contendo leite, como doces.

[00250] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas do gênero *Megasphaera* e não contêm bactérias de nenhum outro gênero, ou que compreendem apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outro gênero. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas do gênero *Megasphaera*, que não contém bactérias de nenhum outro gênero ou que compreende apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outro gênero, para uso em terapia.

[00251] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Megasphaera massiliensis* e não contêm bactérias de nenhuma outra espécie, ou que compreendem apenas quantidades *de minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra espécie. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas da espécie

*Megasphaera massiliensis*, que não contém bactérias de nenhuma outra espécie ou que compreende apenas quantidades minimizadas ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outras espécies, para uso em terapia.

[00252] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Megasphaera massiliensis* e não contêm bactérias de nenhuma outra espécie *Megasphaera*, ou que compreendem apenas quantidades de *minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outras espécies *Megasphaera*. Assim, em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma ou mais cepas bacterianas da espécie *Megasphaera massiliensis*, que não contém bactérias de nenhuma outra espécie *Megasphaera* ou que compreende apenas quantidades de *minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outras espécies *Megasphaera*, para uso em terapia.

[00253] Em certas modalidades, as composições da invenção contêm uma única cepa ou espécie bacteriana e não contêm quaisquer outras cepas ou espécies bacterianas. Tais composições podem compreender apenas quantidades de *minimis* ou biologicamente irrelevantes de outras cepas ou espécies bacterianas. Tais composições podem ser uma cultura que é substancialmente isenta de outras espécies de organismos.

[00254] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma única cepa bacteriana do gênero *Megasphaera*, que não contém bactérias de nenhuma outra cepa ou que compreende apenas quantidades de *minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra cepa para uso em terapia.

[00255] Em algumas modalidades, a invenção fornece uma composição compreendendo uma única cepa bacteriana da espécie *Megasphaera massiliensis*, que não contém bactérias de nenhuma

outra cepa ou que compreende apenas quantidades de *minimis* ou biologicamente irrelevantes de bactérias de outra cepa para uso em terapia.

[00256] Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem mais de uma cepa bacteriana. Por exemplo, em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem mais de uma cepa dentro da mesma espécie (por exemplo, mais de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ou 45 cepas), e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem menos de 50 cepas dentro da mesma espécie (por exemplo, menos de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 ou 3 cepas) e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. Em algumas modalidades, as composições da invenção compreendem 1-40, 1-30, 1-20, 1-19, 1-18, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 6-30, 6-15, 16-25, ou 31-50 cepas dentro da mesma espécie e, opcionalmente, não contêm bactérias de qualquer outra espécie. A invenção compreende qualquer combinação dos precedentes.

[00257] Em algumas modalidades, a composição compreende um consórcio microbiano. Por exemplo, em algumas modalidades, a composição compreende a cepa bacteriana *Megasphaera* comensal como parte de um consórcio microbiano. Por exemplo, em algumas modalidades, a cepa bacteriana *Megasphaera* comensal está presente em combinação com uma ou mais (por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 10, 15 ou 20) outras cepas bacterianas de outros gêneros com os quais pode viver simbioticamente *in vivo* no intestino. Por exemplo, em algumas modalidades, a composição compreende uma cepa bacteriana comensal de *Megasphaera* da invenção em combinação com uma cepa bacteriana de um gênero diferente. Em algumas modalidades, o

consórcio microbiano compreende duas ou mais cepas bacterianas obtidas a partir de uma amostra de fezes de um único organismo, por exemplo, um humano. Em algumas modalidades, o consórcio microbiano não é encontrado em conjunto na natureza. Por exemplo, em algumas modalidades, o consórcio microbiano compreende cepas bacterianas obtidas a partir de amostras de fezes de pelo menos dois organismos diferentes. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são da mesma espécie, por exemplo, dois seres humanos diferentes. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são um ser humano infantil e um humano adulto. Em algumas modalidades, os dois organismos diferentes são um humano e um mamífero não humano.

[00258] Em algumas modalidades, a composição da invenção compreende adicionalmente uma cepa bacteriana que possui as mesmas características de segurança e eficácia terapêutica que a cepa MRX0029, mas que não é MRX0029 ou que não é uma *Megasphaera massiliensis*.

[00259] Em algumas modalidades em que a composição da invenção compreende mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos, as cepas, espécies ou gêneros bacterianos individuais podem ser destinados a administração separada, simultânea ou sequencial. Por exemplo, a composição pode compreender todas as mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos, ou as cepas, espécies ou gêneros bacterianos podem ser armazenados separadamente e ser administrados separadamente, simultaneamente ou sequencialmente. Em algumas modalidades, as mais de uma cepa, espécie ou gênero bacterianos são armazenadas separadamente, mas são misturadas antes da utilização.

[00260] Em algumas modalidades, a cepa bacteriana para utilização na invenção é obtida a partir de fezes humanas adultas. Em algumas

modalidades em que a composição da invenção compreende mais de uma cepa bacteriana, todas as cepas bacterianas são obtidas a partir de fezes humanas adultas ou se estiverem presentes outras cepas bacterianas, estão presentes apenas em quantidades *de minimis*. As bactérias podem ter sido cultivadas após serem obtidas a partir das fezes humanas adultas e serem utilizadas em uma composição da invenção.

[00261] Como mencionado acima, em algumas modalidades, as uma ou mais cepas bacterianas comensais de *Megasphaera* comensal é/são o(s) único(s) agente(s) terapeuticamente ativo(s) em uma composição da invenção. Em algumas modalidades, a(s) cepa(s) bacteriana(s) na composição é/são o(s) único(s) agente(s) terapeuticamente ativo(s) em uma composição da invenção.

[00262] As composições para uso de acordo com a invenção podem ou não requerer aprovação comercial.

[00263] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é liofilizada. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é seca por pulverização. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que está viva. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que está viva. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que é capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino. Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a cepa bacteriana é liofilizada ou seca por pulverização e em que é viável e capaz de colonizar parcial ou totalmente o intestino.

[00264] Em alguns casos, a cepa bacteriana liofilizada é reconstituída antes da administração. Em alguns casos, a reconstituição é feita através de um diluente descrito neste documento.

[00265] As composições da invenção podem compreender excipientes, diluentes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis.

[00266] Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo: uma cepa bacteriana da invenção; e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável; em que a cepa bacteriana está em uma quantidade suficiente para tratar um distúrbio neurodegenerativo quando administrado a um sujeito em necessidade da mesma.

[00267] Em certas modalidades, a invenção fornece composição farmacêutica compreendendo: uma cepa bacteriana da invenção; e um excipiente, veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável; em que a cepa bacteriana está em uma quantidade suficiente para tratar ou prevenir um distúrbio neurodegenerativo.

[00268] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a quantidade da cepa bacteriana é de cerca de  $1 \times 10^3$  a cerca de  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colônias por grama em relação ao peso da composição.

[00269] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a composição é administrada em uma dose de 1 g, 3 g, 5 g ou 10 g.

[00270] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a composição é administrada por um método selecionado dentre o grupo que consiste em oral, retal, subcutânea, nasal, bucal e sublingual.

[00271] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um transportador selecionado dentre o grupo que consiste em lactose, amido, glucose, metilcelulose,

estearato de magnésio, manitol e sorbitol.

[00272] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um diluente selecionado dentre o grupo que consiste em etanol, glicerol e água.

[00273] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um excipiente selecionado dentre o grupo que consiste em amido, gelatina, glucose, lactose anidra, lactose de fluxo livre, beta-lactose, edulcorante de milho, acácia, tragacanto, alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietilenoglicol, oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio e cloreto de sódio.

[00274] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo ainda pelo menos um dentre um conservante, um antioxidante e um estabilizador.

[00275] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, compreendendo um conservante selecionado dentre o grupo que consiste em benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

[00276] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que a referida cepa bacteriana é liofilizada.

[00277] Em certas modalidades, a invenção fornece a composição farmacêutica acima, em que quando a composição é armazenada em um recipiente vedado a cerca de 4°C ou cerca de 25°C e o recipiente é colocado em uma atmosfera com 50% de umidade relativa, pelo menos 80% da cepa bacteriana medida em unidades formadoras de colônias permanece após um período de pelo menos cerca de: 1 mês, 3 meses, 6 meses, 1 ano, 1,5 anos, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos.

[00278] Em algumas modalidades, a composição da invenção é fornecida em um recipiente vedado compreendendo uma composição como descrita neste documento. Em algumas modalidades, o recipiente

vedado é um sachê ou garrafa. Em algumas modalidades, a composição da invenção é fornecida em uma seringa compreendendo uma composição como descrita neste documento.

[00279] A composição da presente invenção pode, em algumas modalidades, ser fornecida como uma formulação farmacêutica. Por exemplo, a composição pode ser fornecida como um comprimido ou cápsula. Em algumas modalidades, a cápsula é uma cápsula de gelatina (“gel-cap”).

[00280] Em algumas modalidades, as composições da invenção são administradas por via oral. A administração oral pode envolver a deglutição, de modo que o composto entre no trato gastrointestinal e/ou a administração bucal, lingual ou sublingual, através das quais o composto entra na corrente sanguínea diretamente a partir da boca.

[00281] Formulações farmacêuticas adequadas para administração oral incluem tampões sólidos, micropartículas sólidas, semissólidos e líquidos (incluindo múltiplas fases ou sistemas dispersos) tais como comprimidos; cápsulas moles ou duras contendo multi ou nanopartículas, líquidos (por exemplo, soluções aquosas), emulsões ou pós; pastilhas (incluindo cheias de líquido); mastigáveis; géis; formas de dosagem de dispersão rápida; películas; óvulos; sprays; e adesivos bucais/mucoadesivos.

[00282] Em algumas modalidades, a formulação farmacêutica é uma formulação entérica, isto é, uma formulação gastro-resistente (por exemplo, resistente ao pH gástrico) que é adequada para a transmissão da composição da invenção para o intestino por administração oral. As formulações entéricas podem ser particularmente úteis quando as bactérias ou outro componente da composição forem sensíveis ao ácido, por exemplo, propensos à degradação em condições gástricas.

[00283] Em algumas modalidades, a formulação entérica compreende um revestimento entérico. Em algumas modalidades, a

formulação é uma forma de dosagem com revestimento entérico. Por exemplo, a formulação pode ser um comprimido com revestimento entérico ou uma cápsula com revestimento entérico, ou semelhante. O revestimento entérico pode ser um revestimento entérico convencional, por exemplo, um revestimento convencional para um comprimido, cápsula ou semelhante para transmissão oral. A formulação pode compreender um revestimento de película, por exemplo, uma camada de película fina de um polímero entérico, por exemplo, um polímero insolúvel em ácido.

[00284] Em algumas modalidades, a formulação entérica é intrinsecamente entérica, por exemplo, gastro-resistente sem a necessidade de um revestimento entérico. Assim, em algumas modalidades, a formulação é uma formulação entérica que não compreende um revestimento entérico. Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula feita de um material termogelante. Em algumas modalidades, o material de termogelação é um material celulósico, tal como metilcelulose, hidroximetilcelulose ou hidroxipropilmetylcelulose (HPMC). Em algumas modalidades, a cápsula compreende um invólucro que não contém qualquer polímero formador de película. Em algumas modalidades, a cápsula compreende um invólucro e o invólucro compreende hidroxipropilmetylcelulose e não compreende qualquer polímero formador de película (por exemplo, ver [86]). Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula intrinsecamente entérica (por exemplo, Vcaps® da Capsugel).

[00285] Em algumas modalidades, a formulação é uma cápsula mole. Cápsulas moles são cápsulas que podem, devido a adições de amaciadores, tais como, por exemplo, glicerol, sorbitol, maltitol e polietilenoglicóis, presentes no invólucro da cápsula, ter certa elasticidade e suavidade. Cápsulas moles podem ser produzidas, por exemplo, com base em gelatina ou amido. Cápsulas moles à base de

gelatina estão comercialmente disponíveis através de vários fornecedores. Dependendo do método de administração, tal como, por exemplo, por via oral ou retal, as cápsulas moles podem ter várias formas, podem ser, por exemplo, redondas, ovais, oblongas ou em forma de torpedo. As cápsulas moles podem ser produzidas por processos convencionais, tais como, por exemplo, pelo processo Scherer, pelo processo Accogel ou pelo processo de gotejamento ou sopro.

### ***Métodos de cultura***

[00286] As cepas bacterianas para utilização na presente invenção podem ser cultivadas utilizando-se técnicas convencionais de microbiologia, como detalhado, por exemplo, nas referências [87], [] e [89].

[00287] O meio sólido ou líquido utilizado para a cultura pode ser, por exemplo, meio de ágar YCFA ou meio YCFA. O meio YCFA pode incluir (por 100 ml, valores aproximados): Casitone (1,0 g), extrato de levedura (0,25 g), NaHCO<sub>3</sub> (0,4 g), cisteína (0,1 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,045 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,09 g), MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (0,009 g), CaCl<sub>2</sub> (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), p- ácido aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) e piridoxamina (15 µg).

### ***Cepas bacterianas para serem usadas em composições de vacinas***

[00288] Os inventores identificaram que as cepas bacterianas da invenção são úteis para o tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos. É provável que isto seja um resultado do efeito que as cepas bacterianas da invenção têm no sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, as composições da invenção também podem ser úteis para prevenir distúrbios neurodegenerativos, quando administradas como composições de vacina. Em certas tais modalidades, as cepas bacterianas da invenção podem ser mortas,

inativadas ou atenuadas. Em certas tais modalidades, as composições podem compreender um adjuvante de vacina. Em certas modalidades, as composições são para administração via injeção, tal como através de injeção subcutânea.

### **Geral**

[00289] A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado em contrário, métodos convencionais da química, bioquímica, biologia molecular, imunologia e farmacológica, dentro do âmbito da técnica. Essas técnicas são totalmente explicadas na literatura. Veja, por exemplo, referências [90] e [91, 97], etc.

[00290] O termo "compreendendo" engloba "incluindo" bem como "consistindo", por exemplo, uma composição "compreendendo" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional, por exemplo, X + Y.

[00291] O termo "cerca de" em relação a um valor numérico x é opcional e significa, por exemplo,  $x \pm 10\%$ .

[00292] A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode estar completamente livre de Y. Quando necessário, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

[00293] Referências a uma identidade de sequência percentual entre duas sequências nucleotídicas significa que, quando alinhadas, essa percentagem de nucleotídeos é a mesma na comparação das duas sequências. Este alinhamento e a percentagem de homologia ou identidade de sequência podem ser determinadas utilizando programas de software conhecidos na técnica, por exemplo os descritos na secção 7.7.18 das ref. [98]. Um alinhamento preferido é determinado pelo algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman, utilizando uma pesquisa de lacuna afim com uma penalidade de abertura de lacuna de 12 e uma penalidade de extensão de lacuna de 2, matriz de

BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é divulgado nas ref. [99].

[00294] A menos que especificamente indicado, um processo ou método compreendendo inúmeras etapas pode compreender etapas adicionais no início ou no fim do método, ou pode compreender etapas intervenientes adicionais. Além disso, as etapas podem ser combinadas, omitidas ou executadas em uma ordem alternativa, se apropriado.

[00295] Várias modalidades da invenção são descritas neste documento. Será apreciado que as características especificadas em cada modalidade podem ser combinadas com outras características especificadas, para fornecer outras modalidades. Em particular, as modalidades destacadas neste documento como sendo adequadas, típicas ou preferidas, podem ser combinadas umas com as outras (exceto quando forem mutuamente exclusivas).

## **MODOS PARA REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO**

***Exemplo 1 - Eficácia da inoculação bacteriana para atuar como neuroprotetora***

### **Sumário**

[00296] As células de neuroblastoma foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção. As células de neuroblastoma SH-SY5Y utilizadas são produtoras de dopamina e estão bem estabelecidas como modelo in vitro para o estudo de doenças neurodegenerativas. Foi observada a capacidade das cepas bacterianas de aumentar a neuroproliferação. As células do neuroblastoma foram tratadas com neurotoxina dopaminérgica 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP), que induz sintomas permanentes da doença de Parkinson nas células do neuroblastoma. A capacidade das cepas bacterianas de agir como um neuroprotetor contra MPP foi investigada.

Material e Métodos

Cepas bacterianas

[00297] *Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linhagem celular

[00298] As células de neuroblastoma SH-SY5Y foram adquiridas na ECCACC (Cat. No: 94030304) e foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M2279) suplementado com Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma Aldrich, cat. N4888).

Método

[00299] Uma vez cultivadas, as células de neuroblastoma SH-SY5Y foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e incubadas por 2 dias. As células foram então transferidas para o meio de diferenciação (que contém FBS a 1%) e 10 uM de ácido retinoico (Sigma Aldrich, cat. N. R2625-100MG). O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram colhidas aos 7 dias de diferenciação. As células foram pré-tratadas com ou sem MPP (Sigma Aldrich, cat. N° D048-1G) durante 8 horas. Posteriormente, as células foram tratadas com sobrenadante bacteriano a 10% e incubadas durante a noite. A viabilidade celular foi medida usando o reagente CCK-8 (Sigma Aldrich, Cell Counting Kit - 8, cat. N° 96992-3000TESTS-F) e lida a 450nm de comprimento de onda.

Resultados

[00300] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 1. O tratamento de células de neuroblastoma com MRX0029 ou MRX0005 levou a um aumento na proliferação de neurônios. As células de neuroblastoma que foram tratadas com MPP em conjunto com a cepa bacteriana aumentaram a viabilidade celular em comparação com as células tratadas apenas com MPP (que tiveram viabilidade reduzida). O efeito protetor foi maior para as células tratadas com MRX0029, que

resgataram a viabilidade mais do que as células de controle positivo tratadas com Quercetina. Esses dados mostram que as cepas bacterianas podem atuar como um neuroprotetor.

***Exemplo 2a - Eficácia do inóculo bacteriano para reduzir a secreção de IL-6.***

**Sumário**

[00301] A ativação de citocinas pró-inflamatórias tem sido associada a danos nos neurônios em doenças neurodegenerativas. O lipopolissacarídeo (LPS) é um estimulador conhecido da citocina pró-inflamatória IL-6. As células de astrocitoma de glioblastoma humano foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção em combinação com LPS para observar sua capacidade de modular os níveis de IL-6.

**Material e Métodos**

**Cepas bacterianas**

[00302] *Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

**Linhagem celular**

[00303] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1X de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

**Método**

[00304] Uma vez cultivadas, as células MG U373 foram plaqueadas em placas de 24 poços a 100.000 células/poço. As células foram tratadas com LPS (1ug/mL) isoladamente ou com 10% de bactérias sobrenadantes de MRX0029 ou MRX0005 por 24h. Também foi

realizado um controle onde as células foram incubadas em meio não tratado. Depois, os sobrenadantes livres de células foram coletados, centrifugados a 10.000g por 3min a 4°C. A IL-6 foi medida usando o kit IL-6 ELISA humano da Peprotech (cat # 900-K16) de acordo com as instruções do fabricante.

### Resultados

[00305] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 2. O tratamento de células de neuroblastoma com LPS e as cepas de bactérias levou a uma diminuição no nível de IL-6 secretada.

### ***Exemplo 2b – Eficácia da inoculação bacteriana para modular a secreção de IL-8.***

#### Sumário

[00306] Como a neuroinflamação desempenha um papel central nas doenças neurodegenerativas e a IL-8 demonstrou ter efeitos neuropositivos, o efeito de composições compreendendo cepas bacterianas da invenção e LPS na ativação da IL-8 foi avaliado. As células de astrocitoma de glioblastoma humano foram tratadas com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção em combinação com LPS para observar sua capacidade de modular os níveis de IL-8.

#### Material e Métodos

##### Cepas bacterianas

[00307] *Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

##### Linhagem celular

[00308] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1X

de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

### Método

[00309] Uma vez cultivadas, as células MG U373 foram plaqueadas em placas de 24 poços a 100.000 células/poço. As células foram tratadas com LPS (1ug/mL) isoladamente ou com 10% de bactérias sobrenadantes de MRX0029 por 24h. Depois, os sobrenadantes livres de células foram coletados, centrifugados a 10.000g por 3min a 4°C. A IL-8 foi medida usando o Kit Humano IL-8 ELISA da Peprotech (cat # 900-K18) de acordo com as instruções do fabricante.

### Resultados

[00310] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 3. O tratamento de células de neuroblastoma com as cepas de bactérias leva a um aumento na secreção de IL-8 independentemente da presença de LPS.

### ***Exemplo 2C – Eficácia da inoculação bacteriana para reduzir a inflamação induzida por α-sinucleína.***

### Sumário

[00311] A neuroinflamação desempenha um papel central na doença de Parkinson e a α-sinucleína demonstrou induzir neuroinflamação in vivo. Portanto, foi avaliada a capacidade das cepas de bactéria da invenção de inibir a neuroinflamação induzida por α-sinucleína. Uma co-cultura de células de astrocitoma de glioblastoma humano e células de neuroblastoma foi exposta à α-sinucleína do tipo selvagem e às isoformas mutantes E46K e A53T e tratada com composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção. A capacidade das cepas de bactérias para inibir a secreção de IL-6 induzida por α-sinucleína foi então testada.

### Material e Métodos

#### Cepas bacterianas

*Megasphaera massiliensis* MRX0029; *Parabacteroides distasonis* MRX0005

Linhagem celular

[00312] MG U373 é um astrocitoma de glioblastoma humano derivado de um tumor maligno e foi adquirido de Sigma-Aldrich (cat. 08061901-1VL). As células de astrocitoma de glioblastoma humano MG U373 foram cultivadas em MEM (Sigma Aldrich, cat. M-2279) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, 1X de solução de Aminoácido Não essencial de MEM e 1X de Piruvato de Sódio.

[00313] SH-SY5Y é uma linhagem celular de neuroblastoma humano derivada de um neuroblastoma maligno e pode ser adquirida de Sigma-Aldrich (cat. 94030304-1VL). As células foram cultivadas em 50% de MEM e 50% de meio de mistura de nutrientes F-12 Ham suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS inativado pelo calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. As células no meio de crescimento foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e colocadas na incubadora. Após 2 dias, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas após 7 dias de diferenciação.

Método

[00314] As células SHSY5Y foram plaqueadas em placas de 12 poços a uma densidade de 50.000 células/poço. As células foram cultivadas em 50% de MEM e 50% de meio de mistura de nutrientes F-12 Ham suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de FBS inativado pelo calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina. As células no meio de crescimento foram plaqueadas em placas de 96 poços a 11.000 células/poço e colocadas na incubadora. Após 2 dias,

os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas após 7 dias de diferenciação. Os U373 foram plaqueados em 12 placas transpoço (membrana de poliéster de 0,4 µm, Costar) a uma densidade de 50.000 células/poço por 72 horas. As células foram co-cultivadas em conjunto por 24 horas antes do tratamento em meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS sem ácido retinoico).

[00315] Posteriormente, as células foram tratadas com 25-µg/ml de α-sinucleína (Wt, A53T, E46K) na presença ou ausência de 10% de bactérias sobrenadantes durante 48 horas. Os sobrenadantes livres de células foram coletados, centrifugados a 10000g por 3 min a 4°C, divididos em alíquotas e armazenados a -80 0C. A IL-6 e IL-8 humanas foram medidas como descrito acima.

### Resultados

[00316] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 4. O tratamento de células com α-sinucleína do tipo selvagem e as isoformas mutantes E46K e A53T induziu secreção moderada de IL-6 (Figura 4A). A secreção de IL-6 induzida por α-syn foi inibida em células tratadas com as cepas de bactéria (Figura 4A). A redução na secreção de IL-6 foi maior na administração de MRX0029.

### ***Exemplo 3 – Eficácia de inóculos bacterianos para reduzir a ativação de NFκB***

#### Sumário

[00317] A ativação do promotor NFκB leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1β, IL-1α, IL-18, TNFα e IL-6. O promotor de NFκB pode ser ativado por α-sinucleína e LPS, estimulando o ligando de TLR4. Mutações na α-sinucleína, como a α-sinucleína A53T, estão implicadas no Parkinson familiar. O tratamento de células neuronais

com LPS simula Parkinson causado por fatores ambientais. A capacidade das composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para inibir a ativação do promotor NFkB foi investigada.

### Material e Métodos

#### Cepa bacteriana

[00318] *Megasphaera massiliensis* MRX0029

#### Linhagem celular

[00319] O TLR4 azul Hek humano foi adquirido da InvivoGen (cat. N. Hkb-htlr4). O TLR4 de Hek blue humano foi cultivado em DMEM com alta glicose (Sigma Aldrich, cat. D-6171) suplementado com 10% de FBS, 1% de Pen Strep, 4mM de L-Glut, Normocina e solução de seleção 1X HEK Blue.

#### Método

[00320] Uma vez cultivadas, as células azuis Human Hek foram plaqueadas em placas de 96 poços a 25.000 células/poço em 4 repetições. Um conjunto de células foi tratado com  $\alpha$ -sinucleína A53T (1ug/mL) sozinho ou com 10% de bactérias sobrenadantes do MRX0029 por 22h. O segundo conjunto de células foi tratado com LPS (10 ng/mL, do sorotipo Typhimurium de *Salmonella enterica*, Sigma Aldrich, gato nº L6143) sozinho ou com 10% de bactérias sobrenadantes do MR029 por 22 h. As células foram subsequentemente centrifugadas e 20uL do sobrenadante foram misturados com 200uL de reagente Quanti Blue (InvivoGen, gato n. rep-qb2), incubados por 2 h e a absorvência lida a 655 nm.

#### Resultados

[00321] Os resultados destes experimentos são mostrados nas Figuras 5 e 6. A Figura 5 mostra que a ativação do promotor NFkB por  $\alpha$ -sinucleína não é inibida por MRX0029. A Figura 6 mostra que a ativação do promotor NFkB por LPS é inibida por MRX0029.

***Exemplo 4 – Eficácia das bactérias para alterar o desenvolvimento de neurites***

**Sumário**

[00322] O desenvolvimento de neurites é um processo importante para o desenvolvimento de conexões entre neurônios. A capacidade de cepas bacterianas e ácidos orgânicos de induzir o desenvolvimento de neurites foi, portanto, testada medindo os níveis transcricionais da proteína MAP2 associada a microtúbulos, um marcador específico de diferenciação neuronal.

**Cepa bacteriana**

*Megasphaera massiliensis* MRX0029.

**Método**

[00323] As SHSY5Y foram plaqueadas em placas de Petri de 10cm com uma densidade de  $2 \times 10^6$  células. Após 24h, as células foram tratadas em meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS sem RA) com 10% de sobrenadantes de bactérias ou YCFA+, 10uM RA, 200uM ácido hexanoico ou 200uM ácido valproico, por 17 horas. Depois, foram obtidas imagens representativas usando o microscópio de núcleo EVOS XL com contraste de fase com ampliação de 40X/0,65. As células foram coletadas e o RNA total foi isolado de acordo com o protocolo do mini kit RNeasy (Qiagen). Os cDNAs foram feitos usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems). A expressão gênica foi medida usando qPCR. GAPDH foi utilizado como controle interno. A modulação foi calculada de acordo com o método  $2^{(-\Delta\Delta ct)}$ .

**Microscopia confocal e de imunofluorescência**

[00324] As células foram semeadas em lâminas de câmara de 8 poços (Marienfeld Laboratory Glassware) a  $5 \times 10^4$  células/ poço durante a noite e foram tratadas com sobrenadante bacteriano a 10% por 24 horas. Para diferenciação, as células foram tratadas com ácido retinoico

10nM por 5 dias antes de serem tratadas com sobrenadante bacteriano. As células foram então fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS durante 20 minutos à temperatura ambiente (TA). As células fixas foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 1% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com tampão de bloqueio (4% BSA/PBS) por 1 hora à temperatura ambiente antes de adicionar anticorpo anti-MAP2 (sc-74421, Santa Cruz Biotechnology Inc) diluído em 1% de BSA/PBS por 12 horas a 4°C. Eles foram então lavados duas vezes com PBS, seguido de incubação com anti-camundongo conjugado Alexa Flour 488 (Molecular Probes Inc) e faloidina conjugada Alexa Flour 594 (ab176757, Abcam) por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem 3X com PBS, as lâminas foram montadas com Vectorshield<sup>□</sup> contendo DAPI (Sigma, Aldrich). As lâminas foram visualizadas usando um microscópio Zeiss Axioscope equipado com uma objetiva Korr de 63x/1,2 W e conjuntos de filtros adequados para a detecção dos fluorocromos utilizados. Os tempos de exposição manual para a aquisição digital de imagens imunomarcadas com MAP-2 foram mantidos constantes, permitindo a comparação entre diferentes poços e tratamentos. Os tempos de exposição à faloidina (F-actina) e DAPI variaram de acordo com o campo de visão. Os campos de visão randomizados foram adquiridos usando uma câmera QImaging controlada pelo software Image Pro Plus. As imagens foram salvas como TIFs e abertas no Adobe Photoshop CC 2015.1.2 e as sobreposições das imagens MAP-2, DAPI e faloidina foram sobrepostas e mescladas. Imagens representativas foram selecionadas para ilustrar as diferenças de abundância e localização das proteínas examinadas.

### Resultados

[00325] Os resultados são mostrados na Figura 7. A Figura 7A mostra imagens representativas de microscopia de células SHSY-5Y indiferenciadas incubadas com cada um dos ácidos e bactérias

sobrenadantes. O tratamento de células com MRX0029 induziu um fenótipo semelhante a um neurônio, mostrando características semelhantes às células tratadas com ácido retinoico (que é usado para diferenciação terminal de células de neuroblastoma), onde os corpos celulares são maiores e de forma piramidal, com neurites e ramificações processadas formando redes com células vizinhas. A Figura 7B mostra que o MRx0029 aumenta positivamente o MAP2 em células de neuroblastoma indiferenciadas. A coloração da faloidina (um agente de ligação ao citoesqueleto de actina) provou ainda um arranjo diferente da estrutura citoesquelética nas células tratadas com MRx0029, apoiando ainda mais a hipótese de diferenciação neuronal para MRx0029 (Fig. 7B)

***Exemplo 5 - Eficácia de inóculos bacterianos para alterar a capacidade antioxidante***

**Sumário**

[00326] A capacidade de composições compreendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar a capacidade antioxidante. A capacidade antioxidante da cepa bacteriana foi estabelecida usando o conhecido ensaio ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).

**Cepa bacteriana**

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

**Método**

[00327] As células bacterianas ( $10^6$  ou superior) foram coletadas e centrifugadas. Eles foram ressuspensos em tampão de ensaio (usando três vezes o volume de sedimento). A suspensão foi sonicada em gelo por 5 minutos e depois centrifugada a  $12.000 \times g$  por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e medido usando o kit de ensaio ABTS produzido pela Sigma Aldrich (código CS0790), de acordo com as instruções do fabricante.

### Resultados

[00328] Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 8. A Figura 8 mostra que o MRX0029 tem uma capacidade antioxidante de aproximadamente 2mM em comparação com o Trolox.

### ***Exemplo 6 – Eficácia de inóculos bacterianos para alterar os níveis de peroxidação lipídica***

#### Sumário

[00329] A capacidade das composições comprendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar os níveis de peroxidação lipídica foi investigada. O ensaio de substâncias reativas tiobarbitúricas (TBARs) foi utilizado para medir os subprodutos da peroxidação lipídica.

#### Material e Métodos

##### Cepa bacteriana

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

##### Método

[00330] As células bacterianas ( $10^6$  ou superior) foram coletadas e centrifugadas, uma etapa de lavagem foi realizada com solução salina isotônica antes do sedimento ser ressuspensão em tampão de ensaio de cloreto de potássio. A suspensão foi sonicada em gelo por 10 minutos e depois centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o nível de peroxidação lipídica avaliado usando o ensaio de substâncias reativas tiobarbitúricas.

### Resultados

[00331] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 9. A Figura 9 mostra que o MRx0029 é capaz de inibir a peroxidação lipídica em aproximadamente 20%, que é uma capacidade antioxidante mais alta que o controle positivo, hidroxitolueno butilado (1% p/v).

### ***Exemplo 7a – Eficácia de inóculos bacterianos para reduzir os níveis oxidativos nas células***

### Fundamentos

[00332] A geração de espécies reativas de oxigênio contribui para a patologia de doenças neurodegenerativas. Investigou-se a capacidade das cepas bacterianas de proteger células SHSY-5Y e U373 diferenciadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pelo tratamento com Peróxido de Hidrogênio Terc-Butílico (PHTB).

### Material e Métodos

#### Cepa bacteriana

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

#### Método

[00333] As células SHSY-5Y foram plaqueadas em uma placa preta de fundo plano de 96 poços com densidade de 5000 células/poço e colocadas na incubadora de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias. No Dia 10, o meio de diferenciação foi removido e as células foram lavadas com PBS pré-aquecido e coradas com sonda molecular 10uM DCFDA por 20 minutos em meio de crescimento contendo 1% de FBS. Em seguida, as células foram lavadas com PBS pré-aquecido novamente e tratadas com 100 uM de TBHP na presença ou ausência de 10% de sobrenadante bacteriano por 2h. A intensidade da fluorescência foi medida usando o leitor de placas TECAN em Ex/Em 485/530 nm.

### Resultados

[00334] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 10. A Figura 10b mostra que o MRX0029 é capaz de inibir a produção de ERO em células diferenciadas de neuroblastoma SHSY-5Y. MRX0029 não teve efeito na geração de ERO em células de astrocitoma U373 (Figura 10a). Isso mostra que esse aspecto do efeito antioxidante é específico do neurônio.

### ***Exemplo 7b - neuroproteção***

[00335] As células SHSY-5Y diferenciadas de RA foram tratadas com MPP+, o metabólito ativo do MPTP, um produto químico amplamente utilizado para imitar *in vitro* e *in vivo* algumas das características da patologia da DP. A viabilidade celular foi medida como a taxa de respiração das mitocôndrias (Figura 11). Tanto o MRx0005 quanto o MRx0029 mostraram efeitos significativos e promovem per se um aumento da atividade metabólica das mitocôndrias nas células SHSY-5Y. MRX0029 mostrou proteção completa contra MPP+, restaurando a viabilidade celular quase no mesmo nível de células não tratadas e maior que o controle positivo de quercetina. A proteção MRx0005 foi de cerca de 20% em comparação com a amostra tratada com YCFA-MPP+, aproximadamente a mesma observada para o controle positivo de quercetina (Fig. 11).

### ***Exemplo 8 - Eficácia da inoculação bacteriana na atividade da histona desacetilase***

#### Sumário

[00336] A capacidade das composições comprendendo cepas bacterianas de acordo com a invenção para alterar a atividade da histona desacetilase foi investigada. A desregulação da histona desacetilase tem sido implicada na patogênese associada a doenças neurodegenerativas associadas à idade.

#### Material e Métodos

##### Cepa bacteriana

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

##### Linhagem celular

[00337] A linhagem celular HT-29 foi usada porque a histona desacetilase está presente.

##### Método

[00338] Os sobrenadantes isentos de células de culturas bacterianas

de fase estacionária foram isolados por centrifugação e filtração em um filtro de 0,22 uM. As células HT-29 foram usadas 3 dias após a confluência e foram reduzidos em 1 mL de DTS 24 horas antes do início do experimento. As células HT-29 foram expostas com sobrenadante livre de células a 10% diluído em DTS e este foi deixado a incubar por 48 horas. As proteínas nuclease foram então extraídas usando o kit de extração Sigma Aldrich Nuclease e as amostras foram congeladas rapidamente antes da medição da atividade do HDAC. O kit de atividade HDAC foi avaliado fluorometricamente usando o kit Sigma Aldrich (Reino Unido).

### Resultados

[00339] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 12. A Figura 12 mostra que o MRX0029 é capaz de reduzir os níveis de atividade da histona desacetilase.

### ***Exemplo 8a – Análise adicional do mecanismo de inibição da desacetilação de histonas***

#### Introdução

[00340] A microbiota intestinal, com sua imensa diversidade e capacidade metabólica, representa um enorme reservatório metabólico para a produção de uma vasta variedade de moléculas com potencial para influenciar a atividade do HDAC. Poucos estudos avaliaram a atividade inibitória do HDAC de metabólitos derivados de bactérias, além do butirato, que demonstrou inibir o HDAC e está associado à melhora da função motora na doença de Huntington [100]. Os inventores procuraram, portanto, determinar quais metabólitos são responsáveis pela inibição de HDAC e elucidar ainda mais os mecanismos pelos quais a inibição é alcançada.

#### Material e Métodos

##### *Cultura bacteriana e coleta de sobrenadante sem células*

[00341] Culturas puras de bactérias foram cultivadas

anaerobicamente em caldo YCFA até atingirem sua fase de crescimento estacionário. As culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante livre de células (CFS) foi filtrado usando um filtro de 0,2 µM (Millipore, Reino Unido). Alíquotas de 1 mL do CFS foram armazenadas a -80°C até o uso. Butirato de sódio, ácido hexanoico e valérico foram obtidos da Sigma Aldrich (Reino Unido) e as suspensões foram preparadas em caldo YCFA.

*Quantificação de SCFA e MCFA de sobrenadantes bacterianos*

[00342] Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e ácidos graxos de cadeia média (AGCMs) de sobrenadantes bacterianos foram analisados e quantificados pelo MS Omics APS da seguinte maneira. As amostras foram acidificadas com ácido clorídrico e os padrões internos marcados com deutério foram adicionados. Todas as amostras foram analisadas em ordem aleatória. A análise foi realizada usando uma coluna de alta polaridade (Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. Coluna 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada em um GC (7890B, Agilent) acoplado a um detector de quadropolo (59977B, Agilent). O sistema foi controlado pela ChemStation (Agilent). Os dados brutos foram convertidos para o formato netCDF usando o Chemstation (Agilent), antes de os dados serem importados e processados no Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) usando o software PARADISe descrito em [101].

*Análise de atividade específica do HDAC*

[00343] A atividade de inibição específica do HDAC foi analisada para HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 usando kits de ensaio fluorogênico para cada tipo de HDAC (BPS Bioscience, CA). Os ensaios foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante e cada amostra foi realizada em réplicas. Os sobrenadantes isentos de células foram diluídos 1 em 10 e expostos a proteínas HDAC específicas fornecidas no kit para manter a consistência entre os métodos.

**Resultados**

[00344] Os metabólitos microbianos comensais do intestino que inibem a histona desacetilase são butirato e ácido valérico

[00345] MRx0029, cujo sobrenadante mostrou forte inibição de HDAC em ensaios com células inteiras HT29 ou com lisado celular HT29, produziu ácido valérico e ácido hexanoico em concentrações médias de 5,08 mM e 1,60 mM, respectivamente (Figura 13A e C).

[00346] Para investigar quais metabólitos foram responsáveis pela inibição da HDAC induzida por cepa, mediram-se diferentes concentrações de ácido hexanoico, ácido valérico e butirato de sódio para a inibição da HDAC em células HT-29 inteiras e no lisado de células HT-29. Os resultados na Fig. 13B mostram uma inibição significativa ( $P<0,05$ ) da atividade de HDAC pelo butirato de sódio em células inteiras, bem como no lisado celular, enquanto o ácido hexanoico não mostrou atividade inibidora significativa. O ácido valérico inibiu a atividade total de HDAC (\* ( $p<0,05$ ), \*\* ( $p<0,005$ ), \*\*\* ( $P<0,001$ ), \*\*\*\* ( $p<0,0001$ )).

*Inibidores potentes do HDAC total investigaram HDACs classe I alvo.*

[00347] O perfil de inibição HDAC específico da cepa de bactérias em teste foi investigado. Ensaios específicos de inibição de HDAC (BPS Bioscience, CA) foram realizados para HDACs Classe I e Classe II. A capacidade da cepa bacteriana de inibir as enzimas HDAC foi comparada ao butirato, ácido hexanoico e valérico (Figuras 14 e 15). Nossos resultados demonstram que o MRX0029 é um inibidor muito potente das enzimas HDAC Classe 1 (HDAC1, 2 e 3). A inibição de HDACs classe II não foi tão significativa (dados não mostrados).

### Discussão

[00348] A cepa com atividade inibidora do HDAC produziu quantidades significativas de ácido valérico e ácido hexanoico, bem como quantidades significativas de butirato de sódio (Figura 13C). Quando testado como substância pura, o ácido valérico e o butirato de

sódio resultaram em significativa inibição da HDAC ( $p<0,0001$ ).

[00349] Curiosamente, os resultados para a atividade específica do HDAC mostram que a cepa testada é um potente inibidor dos HDACs Classe I, e particularmente do HDAC2. Os HDACs Classe I (HDAC1, 2, 3 e 8) residem no núcleo e são expressos em todos os tipos de células humanas. Os HDAC 1–3 compartilham mais de 50% de homologia, mas possuem estruturas e funções celulares distintas [102]. Eles estão envolvidos principalmente na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular e, portanto, a inibição pode ser útil em uma ampla gama de doenças [103]; [104]; [105]; [106]; [107].

#### ***Exemplo 9 - Nível de produção de indol em bactérias***

##### Sumário

[00350] A capacidade das bactérias da invenção de produzir indol foi investigada. O indol tem sido implicado na atenuação da inflamação e do estresse oxidativo.

##### Material e Métodos

###### Cepa bacteriana

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

[00351] ATCC 11775 é uma cepa de referência bacteriana que é conhecida por produzir indol.

###### Método

[00352] As células bacterianas intactas em fase estacionária foram incubadas com triptofano 6mM por 48 horas. As espécies bacterianas que possuem a enzima triptofanase utilizarão o triptofano como substrato para produzir indol. Após o período de incubação de 48 horas, o sobrenadante foi removido e adicionado ao reagente de Kovac para quantificação de indol. Padrões, soluções de estoque e reagentes foram preparados usando métodos padronizados validados internamente.

###### Resultados

[00353] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 16.

A Figura 16 mostra que o MRX0029 tem a capacidade de produzir indol a partir do triptofano, em concentrações de aproximadamente 0,2mM.

### ***Exemplo 10 – Nível de produção de quinurenina em bactérias***

#### Sumário

[00354] A capacidade das bactérias da invenção de produzir indol foi investigada. A desregulação da via da quinurenina pode levar à ativação do sistema imunológico e ao acúmulo de compostos potencialmente neurotóxicos. Alterações no metabolismo da quinurenina podem estar envolvidas no desenvolvimento das doenças de Parkinson.

#### Cepa bacteriana

*Megasphaera massiliensis* MRX0029

[00355] O DSM 17136 é uma cepa de *Bacteroides copricola* que é conhecida por produzir quinurenina.

#### Método

[00356] Os sobrenadantes isentos de células de culturas bacterianas de fase estacionária foram isolados por centrifugação e filtração em um filtro de 0,22 uM e congelados até o uso. Padrões, soluções de estoque e reagentes de quinurenina foram preparados usando métodos padronizados validados internamente. As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético e centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dispensado em uma placa de 96 poços. O reagente de Ehrlich foi utilizado para a detecção de quinurenina e adicionado na proporção de 1:1.

#### Resultados

[00357] Os resultados das experiências são mostrados na Figura 17. A Figura 17 mostra que o MRX0029 tem capacidade para produzir quinurenina a uma concentração de aproximadamente 40 µM.

### ***Exemplo 11 - Níveis de dopamina, DOPAC e HVA no estriado em camundongos MPTP tratados com bactérias***

[00358] A doença de Parkinson é um distúrbio neurodegenerativo

comum, cujas características clínicas principais incluem tremor, lentidão de movimento, rigidez e instabilidade postural. Esses sintomas são atribuíveis principalmente à degeneração dos neurônios dopaminérgicos na pars compacta da substância negra e à consequente perda de suas fibras nervosas projetadas no estriado [108]. Os camundongos tratados com MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) perdem seletivamente um número significativo de neurônios dopaminérgicos nigrostriatais [109]. A perda induzida por MPTP de células dopaminérgicas na substância negra imita a condição clínica na doença de Parkinson e, portanto, é um modelo útil para testar fármacos antiparkinsônicos.

[00359] O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos das bactérias anaeróbias MRX0029 usando camundongos lesados por MPTP.

[00360] 48 camundongos machos foram alocados em 4 grupos de tratamento diferentes (grupos A, B, E e I, com n=12 animais em cada grupo). Os grupos de tratamento são mostrados na Tabela 1 abaixo e o curso do tempo do projeto é descrito abaixo.

**Tabela 1: Grupos de tratamento**

Grupo	n	Tratamento					Lesão				
		Substância	Nível de segurança	Dose	Via	Cronograma	Substância	Dose	Via	Cronograma	
A	12	Veículo (PBS)	-	-	p.o.	18 dias: dia(-14) – dia 3	Veículo (solução salina a 0,9%)		i.p.	dia 0	
B	12	Veículo (PBS)	-	-	p.o.	18 dias: dia(-14) – dia 3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	dia 0	
E	12	MRx0029 <i>Megasphaera sp.</i> (gly)	S1/S2	2 x 10^8 bactérias	p.o.	18 dias: dia(-14) – dia 3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	dia 0	
I	12	Veículo (PBS)	-	-	p.o.	18 dias: dia(-14) – dia 3	MPTP	4x 20 mg/kg	i.p.	dia 0	
		7-	-	50 mg/kg	i.p.	dia 0 (2x)					

[00361] Os grupos A, B, E e I foram tratados diariamente por 18 dias por gavagem oral com bactérias (MRx0029 – grupo E) ou veículo (PBS).

O tratamento oral foi iniciado 14 dias antes da lesão de MPTP. Os animais do grupo I receberam um tratamento diário com veículo (PBS) p.o. (por via oral) e foram injetados i.p. (intraperitoneal) com o fármaco de referência 30 minutos antes e 90 minutos após o primeiro MPTP no dia 0. O volume de aplicação para tratamento de p.o. e veículo foi de 200 µl por camundongo. As cepas de bactérias do grupo E provinham de reservas de glicerol (gly). Para tratamento oral, gavagens para aplicações foram armazenadas em frascos contendo 70% de Etanol e lavadas antes e após cada uso com água destilada. Cada grupo de tratamento teve seu próprio frasco de gavagem e etanol e frasco de água destilada. Os tubos e gavagens não foram trocados entre os grupos. Imediatamente antes do tratamento, cada seringa foi lavada com N2.

[00362] No dia 0, foi injetado MPTP (20 mg/kg de peso corporal (p.c.) 4 vezes, 2 h de intervalo entre tratamentos) i.p. nos animais dos grupos B, E e I. Um grupo de animais (A) foi simulado pela administração i.p. do veículo MPTP (solução salina a 0,9%). O volume de aplicação foi de 10 µl por g de peso corporal. A pesagem dos animais foi realizada antes do tratamento com MPTP para dosar os animais de acordo com seu peso corporal real. Posteriormente, os animais receberam o tratamento de p.o. diário.

Formulação de preparações para dosagem e preparação de reservas de glicerol para dosagem

Nome da cepa de Bactéria:	MRx0029 <i>Megasphaera</i> sp.
Estabilidade/condição de armazenamento:	-80°C
Veículo:	1x PBS
Dosagens de tratamento:	2 x 10 <sup>8</sup> bactérias
Administração:	200µl
Número de Lote:	n/a

Para o grupo de tratamento E (MRx0029)

- 1.) 1 estoque de glicerol foi retirado do freezer a -80°C e colocado em condições anaeróbicas (frasco anaeróbico com sachê) a 37°C para descongelar (isso levou 30-40 minutos).
- 2.) O estoque de glicerol completamente descongelado foi centrifugado a 6000 x g por 10 min à temperatura ambiente.
- 3.) O sobrenadante foi descartado sem perturbar o sedimento (por exemplo, usando uma pipeta).
- 4.) Foram adicionados 4,22 mL de PBS 1 x pré-aquecido estéril (37°C) e misturados suavemente usando uma pipeta.
- 5.) Os camundongos foram dosados com 200 µL da solução bacteriana. Os animais foram dosados dentro de 15 minutos após ressuspensão do sedimento com PBS.

Formulação de grupo de fármacos de referência

Estabilidade/condição	- 20°C
Veículo:	Óleo de amendoim
Dosagens de	50 mg/kg
administração:	i.p. (30 min antes e 90 min após o 1º tratamento)
Número de lote:	MKBS6671V

[00363] A quantidade apropriada de 7-Nitroindazol foi dissolvida em óleo de amendoim para atingir a concentração final de 50 mg/kg.

Materiais e MétodosAnimais

Linha de camundongo:	C57BL/6J (Cepa de Camundongo JAX™) Número de Estoque de Camundongos JAX™ 000664
Fornecedor:	Laboratórios Charles River
Idade na Data de Início:	~10 semanas
Sexo:	Masculino
Número de animais:	48

Manuseio específico de Animais e Randomização

[00364] As luvas foram trocadas entre cada grupo de tratamento e pulverizadas com solução de etanol a 70% entre cada gaiola do mesmo grupo para minimizar o risco de contaminação sempre que os animais eram manuseados (por exemplo: tratamento, testes comportamentais, limpeza e amostragem de tecidos).

[00365] O tratamento foi aleatório e alternado diariamente, a fim de impedir que os mesmos grupos fossem tratados no mesmo horário todos os dias. Os animais foram randomizados por gaiola na amostragem de tecido.

Amostragem e processamento de tecidos

[00366] No dia 4, animais de todos os grupos foram sacrificados e os cérebros foram coletados. Portanto, os camundongos foram anestesiados profundamente por injeção de Pentobarbital (600mg/kg).

[00367] O sangue (aproximadamente 500 µl) foi coletado por punção cardíaca. Os camundongos foram então perfundidos transcardialmente com solução salina a 0,9% e os cérebros foram removidos e hemissecados. O hemisfério esquerdo foi subdividido em tecido estriatal (para HPLC), tecido substância negra e cérebro residual, pesado e imediatamente congelado e armazenado a -80°C. Os instrumentos e superfícies que estavam em contato com os animais tiveram que ser limpos com etanol a 70% antes que o próximo animal fosse dissecado.

Análise bioquímica dos níveis de dopamina, DOPAC e HVA com HPLC no estriado

[00368] As amostras estriatais (n=6 de cada grupo de tratamento; total de 24 amostras) foram misturadas na proporção de 1:10 (p/v) com ácido perclórico 0,2 M, incluindo 100 µM EDTA-2Na e homogeneizadas a 0°C em um micro-homogeneizador de pistilo de vidro. Após repousar 30 minutos em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 minutos em uma centrífuga refrigerada Biofuge Fresco

(Heraeus Instruments, Alemanha). Os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e misturados com tampão Na-acetato 0,4 M, pH 3 na proporção de 1:2 (v/v) e filtrados através de um filtro centrífugo de 0,22 µm (Merck Millipore, Alemanha) por 4 min a 14.000 g a 4°C. Os filtrados foram armazenados a -80°C antes da análise por HPLC.

#### Análise HPLC

[00369] As concentrações de DA, DOPAC e HVA nas amostras estriatais foram determinadas por cromatografia líquida de coluna com detecção eletroquímica [110;111]. O sistema HPLC (HTEC-500, Eicom Corp., Kyoto, Japão) incluindo uma bomba de microfluxo sem pulso, um desgaseificador e um detector amperométrico equipado com um eletrodo de carbono vítreo operando a +0,45 V vs. um eletrodo de referência Ag/AgCl foi utilizado. As amostras foram injetadas usando um Microsampler Refrigerado CMA/200 (CMA/Microdiálise, Estocolmo, Suécia). Os cromatogramas foram registrados e integrados pelo uso de um sistema computadorizado de aquisição de dados (DataApex, Praga, República Tcheca). DA, DOPAC e HVA foram separados em uma coluna de 150 x 2,1 i.d. mm (CA5-ODS, Eicom Corp., Kyoto, Japão). A fase móvel consistiu em tampão fosfato 0,1 M a pH 6,0, EDTA 0,13 mM, 1-octanossulfonato de sódio 2,3 mM e metanol a 20% (v/v). O limite de detecção (razão sinal-ruído = 3) para DA foi estimado em 0,5 fmol em 15 µl (0,03 nM) injetado na coluna.

#### Resultados

[00370] A administração de cepas de bactéria foi bem tolerada pelos animais. No dia da lesão do MPTP e, se necessário, no dia seguinte, uma luz vermelha foi usada para aquecer os animais. Se os animais estivessem em más condições (com frio, desidratados, comportamento anormal), receberiam comida úmida e tratamento salino subcutâneo, se necessário.

[00371] Para análise dos níveis de Dopamina, DOPAC e HVA, foi

utilizado tecido estriatal de 6 animais por grupo de tratamento. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de comparação múltipla de Dunn ou pela análise de variância unidirecional, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni (A vs. todos (\*), B vs. todos, I vs. todos (#)). \*/# = p<0,05; \*\*= p<0,01; \*\*\*= p<0,001.

[00372] Os animais saudáveis do grupo A apresentaram altos níveis de Dopamina, DOPAC e HVA, enquanto o tratamento com MPTP no grupo B reduziu isso e o controle positivo (grupo I) recuperou a produção em algum grau (Figura 21). Os animais do grupo I tenderam a ter níveis mais elevados de Dopamina do que o grupo tratado com bactérias e o grupo B (Figura 21A). Os níveis de DOPAC (um metabólito da Dopamina) em geral foram significativamente mais baixos nos animais do grupo B em comparação com os níveis de DOPAC de animais não isolados do grupo A (Figura 21B).

[00373] Significativamente, verificou-se que o tratamento com MRx0029 (grupo E) recuperou a produção de Dopamina e DOPAC (Figuras 21A e 21B, respectivamente). O tratamento com MRx0029 pode, portanto, ser útil no tratamento ou prevenção de distúrbios neurodegenerativos.

### ***Exemplo 12 – Teste de estabilidade***

[00374] Uma composição descrita neste documento contendo pelo menos uma cepa bacteriana descrita neste documento é armazenada em um recipiente vedado a 25°C ou 4°C e o recipiente é colocado em uma atmosfera com 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% ou 95% de umidade relativa. Após 1 mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 ano, 1,5 anos, 2 anos, 2,5 anos ou 3 anos, pelo menos 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% da cepa bacteriana deve permanecer como medida em unidades de formação de colônias determinadas por protocolos padrão.

### ***Exemplo 13 – Nível de secreção de BDNF nas células SHSY-5Y***

#### **Fundamentos**

[00375] O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma molécula onipresente no cérebro associada ao desenvolvimento neural, neuroproteção e neurorregeneração. O BDNF não apenas protege contra a neurodegeneração, mas também distúrbios mentais como depressão e ansiedade, que são bastante comuns entre pacientes diagnosticados com DP ou DA.

### Métodos

[00376] As placas SH-SY5-SY foram plaqueadas em placas de 24 poços com densidade de 60.000 célula /poço e colocadas na incubadora. Após 24 h, os meios foram substituídos por meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS) e 10 µM de ácido retinoico. O meio de diferenciação foi substituído a cada dois dias e as células foram usadas no dia 10 de diferenciação. Para o tratamento, o meio de diferenciação foi removido e substituído por 450 µL de meio de crescimento completo e 50 µL de bactérias SN foram adicionadas aos poços tratados ou YCFA+ foi adicionado como Controle negativo.

### Resultados

[00377] Os resultados são mostrados na Figura 18, que mostra que a administração de MRX0029 em combinação com ácido retinoico aumenta a secreção de BDNF de células de neuroblastoma diferenciadas. As composições compreendendo bactérias comensais e ácidos orgânicos podem, portanto, ser úteis na terapia.

### ***Exemplo 14 – Produção de metabólitos – metabólitos no cérebro***

#### Fundamentos

[00378] Os metabólitos presentes nos sobrenadantes das bactérias podem influenciar diretamente a resposta do hospedeiro ao estresse oxidativo, comunicação célula-célula e neuroproteção. Os metabólitos que desempenham um papel fundamental nos processos neurológicos foram medidos durante a triagem ex vivo no tecido cerebral de

camundongos alimentados com MRx0005 e MRx0029.

### Métodos

#### Animais

[00379] Os camundongos machos adultos BALBc (Envigo, UK) foram alojados em um ciclo de 12 horas claro-escuro; comida padrão para roedores e água estavam disponíveis ad libitum. Todas as experiências foram realizadas de acordo com as diretrizes europeias após a aprovação pelo Comitê de Experimentação de Ética Animal da University College Cork. Os animais tinham 8 semanas de idade no início do experimento.

#### Projeto de Estudo

[00380] Os animais foram autorizados a habituar-se à sua sala de espera por uma semana após a chegada à unidade animal. Eles recebem gavagem oral (dose de 200 µL) de bioterapêuticos vivos na dose de  $1 \times 10^9$  UFC por 6 dias consecutivos entre as 15:00 e as 17:00. No dia 7, os animais são decapitados e os tecidos são colhidos para experimentação.

#### Coleta de Tecidos

[00381] Os animais foram sacrificados de maneira aleatória em relação ao tratamento e condição de teste; a amostragem ocorreu entre 9h e 13h. O sangue do tronco foi coletado em tubos de EDTA de potássio (ácido etilenodiaminotetracético) e girado por 15 min a 4000 g. O plasma foi isolado e armazenado a -80°C para análise posterior. O cérebro foi rapidamente excisado, dissecado e cada região do cérebro foi congelada rapidamente em gelo seco e armazenada a -80°C para análise posterior. O baço foi removido e processado imediatamente após o abate para estimulação imune ex vivo. O tecido intestinal (segmentos de 2 cm de íleo e cólon mais próximos do ceco foram excisados e o mais distante 1cm de tecido do ceco foi usado) foram montados nas câmaras Ussing para o ensaio de permeabilidade

intestinal. O ceco foi removido, pesado e armazenado a -80°C para análise de AGCCs.

#### Análise de Monoamina

[00382] A concentração de neurotransmissores foi analisada por HPLC em amostras do tronco cerebral. Resumidamente, o tecido do tronco encefálico foi sonicado em 500 µl de fase móvel refrigerada com 4 ng/40 µl de N-metil 5-HT (Sigma Chemical Co., Reino Unido) como padrão interno. A fase móvel continha ácido cítrico 0,1 M, ácido octano-1-sulfônico 5,6 mM (Sigma), di-hidrogenofosfato de sódio 0,1 M, EDTA 0,01 mM (Alkem/Reagecon, Cork) e 9% (v/v) de metanol (Alkem/Reagecon) e foi ajustado para pH 2,8 usando hidróxido de sódio 4 N (Alkem/Reagecon). Os homogenatos foram então centrifugados por 15 min a 22.000 × g a 4°C e 40 µl do sobrenadante injetado no sistema HPLC que consistia em um controlador de sistema SCL 10-Avp, detector eletroquímico LECD 6A (Shimadzu), uma bomba LC-10AS, um forno CTO-10A, um autoinjetor SIL-10A (com o resfriador de amostras mantido a 40°C) e um desgaseificador Gastorr on-line (ISS, Reino Unido). Uma coluna de fase reversa (Kinetex 2,6 u C18 100 × 4,6 mm, Phenomenex) mantida a 30°C foi empregada na separação (Vazão 0,9 ml/min). O eletrodo de trabalho de carbono vítreo combinado com um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Shimadzu) operou a +0,8 V e os cromatogramas gerados foram analisados usando o software Class-VP 5 (Shimadzu). Os neurotransmissores foram identificados por seus tempos de retenção característicos, determinados por injeções padrão, que são executadas em intervalos regulares durante a análise da amostra. As razões das alturas dos picos de analito versus padrão interno foram medidas e comparadas com a injeção padrão. Os resultados foram expressos em ng de neurotransmissor por g de peso fresco de tecido.

#### Análise metabólica

[00383] Para análise do metabólito de GC, amostras de sobrenadantes bacterianos foram derivatizadas com cloroformiato de metila usando uma versão ligeiramente modificada do protocolo descrito em [112]. Todas as amostras foram analisadas em ordem aleatória. A análise foi realizada usando GC (7890B, Agilent) acoplado a um detector de quadropolo (59977B, Agilent). O sistema foi controlado pela ChemStation (Agilent). Os dados brutos foram convertidos para o formato netCDF usando o Chemstation (Agilent), antes de os dados serem importados e processados no Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) usando o software PARADISe descrito em [101].

[00384] Para análise de ácidos graxos, amostras foram acidificadas com ácido clorídrico e os padrões internos marcados com deutério foram adicionados. Todas as amostras foram analisadas em ordem aleatória. A análise foi realizada usando uma coluna de alta polaridade (Zebtron™ ZB-FFAP, GC Cap. Coluna 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) instalada em um GC (7890B, Agilent) acoplado a um detector de quadropolo (59977B, Agilent). O sistema foi controlado pela ChemStation (Agilent). Os dados brutos foram convertidos para o formato netCDF usando o Chemstation (Agilent), antes de os dados serem importados e processados no Matlab R2014b (Mathworks, Inc.) usando o software PARADISe descrito em [101].

#### Resultados – produção de neurotransmissores

[00385] Os resultados são mostrados na Figura 19, que mostra que no cérebro de camundongos alimentados com MRx0029, os níveis de noradrenalina aumentam ( $p=0,0507$ ), acompanhados de um leve aumento de serotonina e 5-HIAA. Esses dados apoiam a análise metabólica apresentada abaixo, sugerindo que o MRx00029 é o maior produtor de ácido 4-hidroxifenilacético, um antioxidante conhecido [113]. Mais importante, o ácido 4-hidroxifenilacético é um intermediário sintético da dopamina e da noradrenalina e uma importante molécula

bioativa [114]. De fato, na DP, as alterações degenerativas se estendem além do sistema dopaminérgico, afetando igualmente os sistemas serotonérgicos e noradrenérgicos, o que, por sua vez, leva a níveis reduzidos de serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e noradrenalina (norepinefrina) em estruturas estriatais e extraestriatais [115]. O L-DOPA tem como principais alvos as características da DP relacionadas à dopamina, no entanto, não aborda as reduções na 5-HT e na noradrenalina. Além disso, quanto maior a duração do tratamento com L-DOPA, mais visíveis são uma gama de complicações motoras e não motoras (por exemplo, discinesia, sintomas psiquiátricos) [116]. Portanto, esses dados demonstram que as bactérias que produzem ácidos orgânicos, como o ácido 4-hidroxifenilacético, podem ser úteis na terapia, em particular no tratamento de doenças neurodegenerativas.

#### Resultados – produção de metabólitos

[00386] Os metabólitos presentes nos sobrenadantes das bactérias podem influenciar diretamente a resposta do hospedeiro ao estresse oxidativo, comunicação célula-célula e neuroproteção especificamente. Os metabólitos no sobrenadante das culturas de MRX0029 e MRX0005 foram analisados e os resultados são mostrados na Figura 20.

[00387] Alguns metabólitos mostraram uma diferença impressionante entre as duas linhagens analisadas. A concentração de ácido succínico foi particularmente elevada no MRx0005. Curiosamente, a razão amostra/meio para ácido 4-hidroxifenilacético foi significativamente maior no MRx0029 (Fig. 20A).

[00388] A análise de ácidos graxos nos sobrenadantes revelou uma dicotomia interessante nas duas linhagens: MRx0005 produziu principalmente ácido acético e propanoico, enquanto MRx0029 produziu ácido butanoico, pentanoico e hexanoico, nas formas linear e ramificada (Fig. 20B). As duas linhagens pareciam muito diferentes e, em particular, a produção de ácido succínico e ácido 4-hidroxifenilacético

por MRx0005 e MRx0029, respectivamente, foi notável (Figura 20A). Além disso, o MRx0005 parece produzir mais ácidos graxos de cadeia curta C2 e C3, enquanto o MRx00029 produziu mais C4 (butirato) e ácidos graxos de cadeia média lineares e ramificados, incluindo o ácido hexanoico.

[00389] O ácido succínico é um metabólito do ciclo de Krebs envolvido na fosforilação oxidativa. O complexo de fosforilação oxidativa é um passo fundamental para o tráfego sináptico de proteínas e vesículas nas regiões proximal e distal [117]. Sua disfunção tem sido relatada em distúrbios neurodegenerativos, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson e ataxia espinocerebelosa tipo 1 [63]. Esses achados são particularmente interessantes, pois o ácido succínico pode aumentar a atividade mitocondrial e apoiar neurônios vulneráveis em doenças neurodegenerativas relacionadas a proteínas mal dobradas, incluindo DP [65]. O BDNF e o ácido succínico têm uma atividade protetora semelhante, não apenas na neurodegeneração, mas também em transtornos mentais como depressão e ansiedade, que são bastante comuns entre pacientes diagnosticados com DP ou DA.

[00390] A Figura 20B também demonstra que o MRX0029 é um produtor de butirato (ácido butanoico). Isso pode ser significativo porque o butirato tem um papel conhecido na redução da impermeabilidade da barreira hematoencefálica, que tem um efeito neuroprotetor [118]. Essa propriedade do MRx0029 (e outras bactérias neuroprotetoras) pode contribuir para sua eficácia.

#### ***Exemplo 15 - Modulação da expressão de mRNA de proteínas de junção estreita por MRx0029***

[00391] Visto que evidências recentes sugerem que a disfunção e inflamação intestinal é um sintoma não motor associado à DP, foi investigada a capacidade das cepas bacterianas da invenção de causar qualquer disfunção da barreira intestinal. As monocamadas celulares

epiteliais HT29-mtx produtoras de mucina [119] foram usadas como modelo *in vitro* para avaliar a ruptura da barreira intestinal e a estimulação imunológica após o tratamento com MRx0005 e MRx0029. Células HT29-mtx diferenciadas expostas ao forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) secretam uma quantidade significativa de IL-8; em contraste, o tratamento por 24h com os sobrenadantes bacterianos de MRx005 e MRx0029, induziu uma secreção ainda menor de IL-8 em comparação com as células não tratadas e tratadas com YCFA (Fig. 22A).

[00392] A capacidade do MRx0005 e do MRx0029 de regular a permeabilidade epitelial modificando a transdução de sinal intracelular envolvida na expressão e localização de proteínas envolvidas na formação da barreira intestinal foi então investigada.

[00393] O RNA foi isolado e a análise quantitativa de RT-PCR (qRT-PCR) foi realizada para caracterizar as alterações na expressão gênica de proteínas de junção estreita durante a incubação com MRx0005 e MRx0029. A administração de MRx0029 melhorou a expressão do mRNA de Ocludina, Vilina, Proteína de Junção Estreita 1 e 2 (respectivamente TJP1 e TJP2) após incubação de 2h (Fig. 22B). Por outro lado, a exposição ao MRx0005 não alterou a expressão gênica de proteínas de junção estreita, indicando que as duas cepas agem de maneira diferente na barreira intestinal.

[00394] Os resultados *in vitro* foram comparados com dados da análise paralela *ex vivo* no intestino de camundongos alimentados com MRx0005 e MRx0029. A expressão gênica de TJP2 e ocludina foi quantificada no cólon e no íleo. Os dados *ex vivo* refletem perfeitamente os dados *in vitro*, pois o MRx0029 foi capaz de regular significativamente o TJP1 e a ocludina ( $p=0,073$ ) na região do cólon do intestino murino (Fig. 22C+22D). MRx0029 também foi capaz de diminuir a função de permeabilidade no cólon dos mesmos camundongos (Fig. 22E+22F).

### Materiais e métodos - extração de RNA e análise de qPCR

[00395] O RNA total foi extraído usando o mini-kit RNeasy (Qiagen, Manchester, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante, e a concentração de RNA determinada por absorbância a 260/280nm usando um espectrofotômetro (nano-Drop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE) Para análise da expressão do mRNA, o cDNA foi preparado a partir do RNA total usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de transcrição reversa foram realizadas em um termociclador (Biometra, Alemanha) a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, mantendo-se a 4°C. O cDNA resultante foi amplificado em duplicatas pelo ensaio SYBR-Green PCR e os produtos foram detectados na QuantStudio 6 flex real-time PCR machine (Applied Biosystems, Reino Unido) usando um perfil padronizado (desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 60 segundos de anelamento/extensão a 60/65°C, dependendo dos iniciadores. Uma etapa de dissociação foi adicionada após os 40 ciclos para gerar uma curva de fusão. A análise foi realizada usando o software de Applied Biosystems QuantStudio Real-Time PCR Software v1.2. As sequências iniciadoras para Actina, Vilina, Ocludina, TJP1 e TJP2 são fornecidas na listagem de sequência.

### **Exemplo 16**

#### Métodos

##### *Animais*

[00396] Os animais e o projeto de estudo utilizados foram os mesmos do Exemplo 14.

##### *Cepas bacterianas*

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

### *Coleta de Tecidos*

[00397] Os animais foram sacrificados de maneira aleatória em relação ao tratamento e condição de teste; a amostragem ocorreu entre 9:00 e 14:30. O sangue do tronco foi coletado em tubos de EDTA de potássio (ácido etilenodiaminotetracético) e girado por 15 min a 4000 g. O plasma foi isolado e armazenado a -80°C para análise posterior. O cérebro foi rapidamente excisado, dissecado e cada região do cérebro foi congelada rapidamente em gelo seco e armazenada a -80°C para análise posterior. O baço foi removido, coletado em 5 mL de meio RPMI (com L-glutamina e bicarbonato de sódio, R8758 Sigma + 10% de FBS (F7524, Sigma) + 1% de Pen / Strep (P4333, Sigma)) e processado imediatamente após abates para estimulação imune ex-vivo. O tecido intestinal (2 segmentos de 3cm de íleo e cólon mais próximos do ceco foram excisados e o mais distante 1cm 2cm de tecido do ceco foi usado) foram montados nas câmaras Ussing para o ensaio de permeabilidade intestinal. O ceco foi removido, pesado e armazenado a -80°C para análise de AGCCs.

### *Análise de Monoamina*

[00398] A concentração de neurotransmissores foi analisada como descrito no Exemplo 10

### *Ensaio de Citocinas do Baço*

[00399] Os baços foram coletados imediatamente em meio RPMI de 5 mL após o sacrifício e cultivados imediatamente. As células do baço foram homogeneizadas pela primeira vez neste meio RPMI, seguidas de 5 minutos de incubação com 1 mL de tampão de lise RBC (11814389001 ROCHE, Sigma). Foram adicionados mais 10 mL de meio RPMI, seguidos de centrifugação 200G por 5 minutos. O sobrenadante foi então filtrado através de um filtro de 40um. As células foram contadas e semeadas (4.000.000/mL de meio). Após 2,5 h de adaptação, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS-2 µg/ml) ou

concanavalina A (ConA-2,5 µg/ml) por 24 h. Após a estimulação, os sobrenadantes foram colhidos para avaliar a liberação de citocinas usando o Kit V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (camundongo) (Meso Scale Discovery, Maryland, EUA) para TNF $\alpha$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , interferon  $\gamma$ , CXCL2 e IL6. As análises foram realizadas usando o MESO QuickPlex SQ 120, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000, SECTOR S 600.

#### *Análise da Expressão Gênica*

[00400] O RNA total foi extraído usando o mirVana™ miRNA Isolation kit (Ambion/Life technologies, Paisley, Reino Unido) e tratado com DNase (Turbo DNA-free, Ambion/life technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada usando o Agilent Bioanalyzer (Agilent, Stockport, Reino Unido) de acordo com o procedimento do fabricante e um número de integridade de RNA (RIN) foi calculado. O RNA com valor de RIN>7 foi usado para experiências subsequentes. O RNA foi transscrito de modo reverso para cDNA usando o Applied Biosystems High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a Transcriptase Reversa Multiscribe (50 U / µL)(1)(2)(1)(10) foi adicionada como parte da mistura principal de RT, incubada a 25°C por 10 min, 37°C por 2 h, 85°C por 5 min e armazenado a 4°C. A PCR quantitativa foi realizada utilizando sondas (6-carboxifluoresceína - FAM) projetadas pela Applied Biosystems para genes alvo específicos de camundongos, enquanto se utilizava  $\beta$ -actina como controle endógeno. As reações de amplificação continham 1 µL de cDNA, 5 µL da 2X PCR Master Mix (Roche), 900 nM de cada iniciador e foram levadas a um total de 10 µL pela adição de água livre de RNase. Todas as reações foram realizadas

em triplicado usando placas de 96 poços no sistema LightCycler®480. As condições de ciclagem térmica foram como recomendadas pelo fabricante (Roche) por 55 ciclos. Para verificar a contaminação de amplicons, cada execução não continha controles de modelo em triplicado para cada sonda usada. Os valores do limiar do ciclo (Ct) foram registrados. Os dados foram normalizados usando a  $\beta$ -actina e transformados pelo método  $2-\Delta\Delta CT$  e apresentados como uma modulação vs. grupo controle.

#### *Análise de Ácidos Graxos de Cadeia Curta no Conteúdo Cecal*

[00401] O conteúdo de ceco foi misturado e agitado no vórtex com água MilliQ e incubado em temperatura ambiente por 10 min. Os sobrenadantes foram obtidos por centrifugação (10000 g, 5 min, 4°C) para aglomerar bactérias e outros sólidos e filtração por 0,2  $\mu$ m. Foi transferido para um frasco de GC claro e o ácido 2-etilbutírico (Sigma) foi usado como padrão interno. A concentração de AGCC foi analisada usando um sistema de ionização por chama Varian 3500 GC, equipado com uma coluna ZB-FFAP (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm; Phenomenex). Uma curva padrão foi construída com diferentes concentrações de uma mistura padrão contendo acetato, propionato, isobutirato, n-butirato, isovalerato e valerato (Sigma). Os picos foram integrados usando o software Varian Star Chromatography Workstation versão 6.0. Todos os dados do AGCC são expressos em  $\mu$ mol/g.

#### *Análise Estatística*

[00402] Os dados normalmente distribuídos são apresentados como média  $\pm$  SEM; Conjuntos de dados não paramétricos são apresentados como mediana com intervalo interquartil. O teste t bicaudal não pareado foi aplicado para analisar os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi usado para não paramétricos. O coeficiente de correlação de classificação de Spearman foi empregado para a análise de correlação nos conjuntos de dados agrupados. Um valor de  $p<0,05$  foi

considerado significativo em todos os casos.

Resultados – Produção de neurotransmissores

[00403] Os resultados na Figura 23 mostram o efeito do tratamento com MRx005 na concentração de neurotransmissores no cérebro de camundongos. Mais notavelmente, o tratamento com MRx005 leva a uma diminuição da dopamina.

Resultados – Expressão gênica

[00404] Expressão de genes para receptores de neurotransmissores [receptor de serotonina 1a(5-HTR1a), receptor de dopamina D1, subunidade B1 do receptor GABA, receptor GABAA, receptor NMDA2A (Grin2A) e receptor NMDA2B (Grin2b)], marcadores inflamatórios [IL-1 $\beta$ , IL6, CD11b, TNF $\alpha$  e TLR4] e marcadores endócrinos [fator de liberação de corticosterona (CRF), receptores 1 e 2 do fator de liberação de corticosterona (CRFR1, CRFR2), fator de neurotrofina derivado do cérebro (BDNF), receptor de vasopressina, receptor de ocitocina, receptor de glicocorticoide e receptor de mineralocorticoide] foram analisados no tecido cerebral do hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal.

[00405] As Figuras 24-38 mostram as alterações na expressão gênica após o tratamento com MRX005 ou MRX0029 no hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. O tratamento com MRx0029 levou a um aumento na expressão do receptor de glicocorticoide na amígdala (Figura 31C). A Figura 32A mostra que o MRx005 aumentou significativamente a expressão de BDNF na amígdala, enquanto o tratamento com MRx0029 aumentou significativamente a expressão de TLR4 na amígdala (Figura 32).

[00406] Tanto o MRx005 quanto o MRx0029 podem aumentar a expressão de CD11b na amígdala (Figura 33A), enquanto que a expressão de IL-6, Grin2a e Grin2b é reduzida após o tratamento com MRx005 (Figuras 33B-D). Além disso, MRx005 e MRx0029 aumentaram

significativamente a expressão de GABRA2 e aumentaram a expressão de GABBR1 na amígdala.

[00407] O tratamento com MRx005 levou a um aumento significativo na expressão de BDNF no córtex pré-frontal (Figura 35B).

#### Discussão

[00408] A administração de MRx005 e MRx0029 causou alterações na expressão gênica, especialmente na amígdala.

#### Resultados – Efeito na expressão de Tph1 e IDO-1

[00409] A Figura 39 mostra que o MRx0029 pode aumentar significativamente a expressão triptofano hidroxilase-1 (Tph1) no cólon e que o tratamento com MRX005 pode aumentar a expressão de IDO-1 no cólon. O tratamento com MRX005 aumentou a expressão de Tph1 e IDO1 no íleo (Figura 40).

[00410] Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase-1 (IDO-1), a primeira enzima limitadora de taxa na via do triptofano/quinurenina, enquanto a triptofano hidroxilase 1 (Tph1), uma isoforma da enzima triptofano hidroxilase, responsável pela síntese da serotonina. Esses dados sugerem que o MRx0029 e o MRx005 podem afetar os níveis de serotonina e a via do triptofano/quinurenina.

#### Resultados – Efeito nos níveis do metabolito do triptofano

[00411] A Figura 41 mostra o efeito do tratamento com MRx005 nos níveis de quinurenina e triptofano em circulação.

#### Resultados – Efeito na expressão de citocinas de esplenócitos

[00412] O ensaio de esplenócitos ex-vivo envolve desafiar os esplenócitos (células isoladas do baço - um órgão principal envolvido na defesa imune), com um desafio mimético bacteriano ou mimético viral.

[00413] MRX005 reduziu significativamente os níveis de interferon- $\gamma$  nos esplenócitos após um desafio com LPS (Figura 42). Além disso, o MRX005 reduziu os níveis de interleucina-6 e o fator de necrose tumoral após um desafio com LPS (Figuras 44 e 45, respectivamente). O

tratamento com MRx0029 levou a uma redução no interferon- $\gamma$ , na interleucina-1 $\beta$  e na interleucina-6 após um desafio com LPS (Figuras 42, 43 e 44, respectivamente).

[00414] O tratamento com MRx005 e MRx0029 levou a um aumento nos níveis do quimioatrativo CXCL1 (Figura 47).

Resultados - Efeito nos Níveis de Ácidos Graxos de Cadeia Curta do Ceco

[00415] Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) são produzidos quando fibras não digeríveis da dieta são fermentadas por bactérias no intestino. Os efeitos da administração do MRX005 são mostrados na Figura 48.

***Exemplo 17 – Análise adicional das alterações induzidas por MRX029 e MRX005 nos níveis de expressão gênica***

Métodos

Linhagem celular

Células SH-SY5Y

Cepas bacterianas

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

*qPCR*

[00416] As SHSY5Y foram plaqueadas em placas de Petri de 10cm com uma densidade de  $2 \times 10^6$  células. Após 24h, as células foram tratadas em meio de diferenciação (meio de crescimento contendo 1% de FBS sem RA) com 10% de sobrenadantes de bactérias ou YCFA+, 10uM RA, 200uM ácido hexanoico ou 200uM ácido valproico, por 17 horas. Depois, foram obtidas imagens representativas usando o microscópio de núcleo EVOS XL com contraste de fase com ampliação de 40X/0,65. As células foram coletadas e o RNA total foi isolado de acordo com o protocolo do mini kit RNeasy (Qiagen). Os cDNAs foram feitos usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade

(Applied Biosystems). A expressão gênica foi medida usando qPCR. GAPDH foi utilizado como controle interno. A modulação foi calculada de acordo com o método  $2^{(-\Delta\Delta ct)}$ . As sequências iniciadoras para MAP2, DRD2, GABRB3, SYP, PINK1, PARK7 e NSE são fornecidas na listagem de sequências.

*Imunomarcação e imagem celular*

[00417] As células foram semeadas em lâminas de câmara de 8 poços (Marienfeld Laboratory Glassware) a  $5 \times 10^4$  células/poço durante a noite e foram tratadas com sobrenadante bacteriano a 10% por 24 h. Para diferenciação, as células foram tratadas com 10 nM de RA por 5 dias antes de serem tratadas com sobrenadante bacteriano livre de células por 24 h. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente (TA). As células fixas foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 1% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com tampão de bloqueio (4% BSA/PBS) por 1 hora à temperatura ambiente antes de adicionar anticorpo anti-MAP2 ou  $\beta$ 3-tubulina (sc-74421 e sc-80005 respectivamente, Santa Cruz Biotechnology Inc) diluído em 1% de BSA/PBS por 12 h a 4°C. Eles foram então lavados duas vezes com PBS, seguido de incubação com conjugado Alexa Flour 488 anti-camundongo (Molecular Probes Inc) e faloidina conjugada Alexa Flour 594 (ab176757, Abcam) por 1 h à temperatura ambiente. Após serem lavadas 3X com PBS, as lâminas foram coradas com DAPI e montadas com Vectashield® (Vector Laboratories). As lâminas foram visualizadas usando um microscópio Axioskop 50 (Zeiss) equipado com uma objetiva Korr de 63x/1,2 W e conjuntos de filtros adequados para a detecção dos fluorocromos utilizados. Os tempos de exposição manual para a aquisição digital de imagens imunomarcadas com MAP-2 foram mantidos constantes, permitindo a comparação entre diferentes poços

e tratamentos. Os tempos de exposição à faloidina (F-actina) e DAPI variaram de acordo com o campo de visão. Os campos de visão randomizados foram adquiridos usando uma câmera QImaging controlada pelo software Image Pro Plus. As imagens foram salvas como arquivos TIFF e abertas no Adobe Photoshop CC 2015.1.2. Imagens das imagens de MAP-2, DAPI e Phalloidin foram então sobrepostas e fundidas. Imagens representativas foram selecionadas para ilustrar as diferenças de abundância e localização das proteínas examinadas.

#### *Imunoblotting*

[00418] Células SH-SY5Y cultivadas nas condições indicadas descritas acima, tratadas com MRx0005 e MRx0029 por 24h e depois lisadas em tampão RIPA contendo coquetel de inibidores de protease (Roche Diagnostics, Reino Unido). A concentração de proteína foi estimada usando o kit de ensaio de proteína BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), separada por SDS-PAGE e transferida para uma membrana de PVDF. As membranas foram então bloqueadas com 5% de leite seco sem gordura ou 5% de BSA e incubadas durante a noite a 4°C com os anticorpos primários (respectivamente MAP2 e β3-tubulina). Os blots foram então incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano silvestre (HRP) e as proteínas foram detectadas pelo kit de detecção por quimioluminescência (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Para MAP2 e β3-tubulina, a β-actina serviu como controle para monitorar a variabilidade da carga de proteínas entre as amostras.

#### Resultados e Discussão

##### Expressão gênica

[00419] As Figuras 7a (inserção do gráfico) e 49 mostram as alterações induzidas por MRx0029 e MRX005 nos níveis de expressão de Actina, Vilina, Ocludina, TJP1, TJP2, MAP2, DRD2, GABRB3, SYP,

PINK1, PARK7 e NSE.

#### Microscopia e Imunoblotting

[00420] A Figura 50 mostra a alteração no nível de expressão de MAP2 nas células SHSY5Y, conforme determinado por microscopia confocal. Os níveis de expressão de MAP2 e B3-tubulina também foram quantificados por análise de imunoblot. Os resultados mostrados nas Figuras 50M e 50N indicam que MRX029 induz um aumento na expressão de nível de MAP2.

#### Sequências

[00421] SEQ ID NO:1 (gene de *Megasphaera massiliensis* para RNA ribossômico 16S, sequência parcial, cepa: NP3 - JX424772.1)

1 agagttgat cctggctcag gacgaacgct ggccgcgtgc ttaacacatg  
caagtgcgaac

61 gagaagagat gagaagcttg cttcttatca attcgagtgg caaacgggtg  
agtaacgcgt

121 aagcaacctg cccttcagat ggggacaaca gctggaaacg gctgctaata  
ccgaatacgt

181 tcttccgcc gcatgacggg aagaagaaag ggaggcctc gggcttcgc  
tggaggaggg

241 gctgcgtct gattagctag ttggaggggt aacggcccac caaggcgacg  
atcagtagcc

301 ggtctgagag gatgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc  
ctacgggagg

361 cagcagtggg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc  
gcgtgaacga

421 tgacggcctt cgggttgtaa agttctgtta tatggacga acagggcatc  
ggtaataacc

481 cggtgtctt gacggtaccg taagagaaaag ccacggctaa ctacgtgcc  
gcagccgcgg

541 taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcgc taaagggcgc

gcaggcggca

601 tcgcaagtgcgtctaaaag tgccgggctt aaccccgta ggggaccgaa  
actgtgaagc

661 tcgagtgtcg gagaggaaag cgaaattcct agtgtacgg tgaaatgcgt  
agatattagg

721 aggaacacca gtggcgaaag cggcttctg gacgacaact gacgctgagg  
cgcgaaagcc

781 aggggagcaa acgggattag ataccccggt agtcctggcc gttaacgatg  
gatacttagt

841 taggaggtt tcgactcctt ctgtgccgga gttaacgcaa taagtatccc  
gcctggggag

901 tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacggggc ccgcacaagc  
ggtgagat

961 tggtttaat tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagcc ttgacattga  
ttgctacgga

1021 aagagatttc cggttctct tcggaagaca agaaaacagg tggtcacgg  
ctgtcgtcag

1081 ctcgtgtcgtagatgttgg gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat  
cttctgtgc

1141 cagcacctcg ggtggggact cagaagagac tgccgcagac aatgcggagg  
aaggcgggaa

1201 tgacgtcaag tcatcatgcc ctttatggct tggctacac acgtactaca  
atggcttta

1261 atagagggac gcgaaggagc gatccggagc aaacccaaaa aacagagtcc  
cagttcggat

1321 tgcaggctgc aactcgctg catgaagcag gaatcgctag taatcgagg  
tcagcatact

1381 gcggtgaata cggtccggg cttgtacac accgccccgtc acaccacgaa  
agtcatcact

1441 acccgaagcc ggtgaggcaa ccgcaaggaa ccagccgtcg aagggtgggg

cgatgattgg

1501 ggtgaagtgcg taacaaggt

[00422] SEQ ID NO:2 (sequência 16S de rRNA de consenso para a cepa MRX0029 de *Megasphaera massiliensis*)

TGAGAAGCTTGCCTTATCGATTCTAGTGGCAAACGGGTGAGTA  
ACCGCGTAAGCAACCTGCCCTTCAGATGGGACAACAGCTGGAAA  
CGGCTGCTAATACCGAATACGTTCTTCCGCCGATGACGGGAAG  
AAGAAAGGGAGGCCTCGGGCTTCGCTGGAGGAGGGGCTTGCG  
TCTGATTAGCTAGTTGGAGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGA  
TCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGACTGAG  
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAACGATGA  
CGGCCTCGGGTTGTAAGTTCTGTTATATGGGACGAACAGGACA  
TCGGTTAACCCGGTGTCTTGACGGTACCGTAAGAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAA  
GCGTTGTCCCGAATTATTGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCAT  
CGCAAGTCGGTCTTAAAGTGCAGGCTTAACCCGTGAGGGGA  
CCGAAACTGTGAAGCTCGAGTGTGGAGAGGAAAGCGGAATTCC  
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGG  
CGAAAGCGGCTTCTGGACGACAACGTGACGCTGAGGCGCGAAAG  
CCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATAACCCGGTAGTCCTGGCCGT  
AAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACTCCTCTGTGCC  
GGAGTTACGCAATAAGTATCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAA  
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGG  
AGTATGTGGTTAACCGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCC  
TTGACATTGATTGCTACGGAAAGAGATTCCGGTTCTTCGGAA  
GACAAGAAAACAGGTGGTGCACGGCTGTCGTAGCTCGTGTGCGT  
GAGATGTTGGGTTAACGCAACGCGAAGCGCAACCCCTATCTTCT  
GTTGCCAGCACCTCGGGTGGGACTCAGAAGAGACTGCCGCAGA  
CAATGCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCT

TATGGCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGCTCTTAATAGAGGG  
 AAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCAAACCCCCAAAAACAGAGTCCC  
 GTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCAGGAATCG  
 CTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCGGGC  
 CTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAAAGTCATTCACACCCGA  
 AGCCGGTGAGGCAACCGCAAG

[00423] Iniciadores usados para qPCR (com SEQ ID NO entre colchetes)

Nome	Sequência forward	Sequência reverse
<b>ACTB</b>	GATCAAGATCATTGCTCCTC (3)	TTGTCAAGAAAGGGTGTAAAC (4)
<b>GAPDH</b>	GGTATCGTGGAAAGGACTCATG (5)	ATGCCAGTGAGCTTCCGTTC (6)
<b>MAP2</b>	CTCAGCACCGCTAACAGAGG (7)	CATTGGCGCTTCTCTCCTC (8)
<b>Ocludina</b>	AAGAGGAATTTGACACTGG (9)	GCCATGTACTCTTCACTTC (10)
<b>TJ1</b>	AAGTCACACTGGTGAAATCC (11)	CTCTTGCTGCCAAACTATCT (12)
<b>TJP2</b>	CCCTCCCTGGATCAGGAT (13)	GCCATCAAACTCGTCCATCA (14)
<b>Vilina</b>	CATTACCTGCTTACGTTG (15)	AGATGGACATAAGATGAGGTG (16)

[00424] SEQ ID NO:17 (sequência de consenso de 16S rRNA para a cepa MRX0005 de *Parabacteroides distasonis*)

AMCCGGGTGGCGACC GGCGCACGGGTGAGTAAC GCGTATGCAA  
 CTTGCCTATCAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAGTCGGACTAATAC  
 CGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTGCTAAAGATTCA  
 TCGCTGATAGATAGGCATGCGTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTA  
 ACGGCCCACCAAACCGACGATGGATAGGGTTCTGAGAGGAAGG  
 TCCCCCACATTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTACGGGAG  
 GCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGCGTGAGCCTGAACCA  
 CCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTATGGATCGTAAACCTCTT  
 TTATAAGGAATAAGTGCAGGTACCGTGTCCGTTTGTATGTACC  
 TTATGAATAAGGATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAT  
 ACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTATTGGTTAAAGGGTG  
 CGTAGGCGGCCTTTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACC

ATAGAATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTGAGGCA  
 GGCGGAATGCGTGGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACGCA  
 GAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCT  
 GATGCACGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTA  
 GTCCACGCAGTAAACGATGATCACTAGCTGTTGCGATAACTGT  
 AAGCGGCACAGCGAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGAGTACG  
 CCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA  
 CGGGAGGAACATGTGGTTAACCGATGATACGCGAGGAACCTTA  
 CCCGGGTTAACGCATTCGGACMGAKGTGGAAACACATTCTA  
 GCAATAGCCATTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTG  
 CCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGAACCCCTGC  
 CACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGACTGCC  
 AGCGTAAGCTGCGAGGAAGGCGGGATGACGTCAAATCAGCACG  
 GCCCTTACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGGACA  
 AAGGGAAGCCACCTGGCGACAGGGAGCGAATCCCCAAACACGT  
 CTCAGTTGGATCGGAGTCTGCAACCCGACTCCGTGAAGCTGGAT  
 TCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCC  
 GGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGTA  
 CCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAAAGTGGT  
 GACTGGGGCTAAGTCGTACGGGG

[00425] Iniciadores e sondas usados para qPCR ex vivo (com SEQ ID NO entre colchetes)

**Ex vivo:**

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

Iniciadores adicionais usados em qPCR (com SEQ ID NO entre colchetes)

ID de gene	Sequência forward	Sequência reverse
NSE	CCCTGTATCGTAAGAACGGT (30)	GCCACCATTGATCACGTTGA (31)
PINK1	CCCAAGCAACTAGCCCCTC (32)	GGCAGCACATCAGGGTAGTC (33)
PARK7	GTAGCCGTGATGTGGTCATT (34)	CTGTGCGCCCAGATTACCT (35)
SYP	CTCGGCTTGTGAAGGTGCT (36)	GGCTTCATGGCATCAACTTCA (37)

## REFERÊNCIAS

- [1] Spor *et al.* (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg *et al.* (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson *et al.* (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson *et al.* (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian *et al.* (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank *et al.* (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan *et al.* (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang *et al.* (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels *et al.* (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad *et al.* (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Mayer *et al* (2014) *The Journal of Neuroscience* 34(46):15490 – 15496
- [17] Cryan and Dinan (2015) *Neuropsychopharmacology*, 40: 241-2.
- [18] Zhou and Foster (2015) *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11: 715–723.
- [19] Wang and Kasper (2014) *Brain Behav Immun.* 38: 1–12.
- [20] US2004/005304
- [21] US2004/170617
- [22] Kadi *et al* (2006) *J Neuroimmunol* 174: 133-46

- [23] Padmanabhan *et al.* (2013) Standards in Genomic Sciences 8:525-538
- [24] Masco *et al.* (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563
- [25] Jeon, (2017) Int J Syst Evol Microbiol, 67, 2114-2120
- [26] Jeon (2016) Biotechnol Biofuels, 9, 129
- [27] Nelson (2017) Fermentation, 3, 10
- [28] Roddick and Britz (1999) Chem Technol and Biotech, 69 (3), 383
- [29] Choi (2013) Apply Biochem Biotechnol, 171 (5), 1094-1107
- [30] Kenealy and Weimer 1995) Appl Microbial Cell Physiol, 44, 507-513
- [31] Jeon (2010) Appl Microbiol Biotechnol, 88 (5) 1161-1167
- [32] Zhu (2017) Biotechnol Biofuels, 10, 102
- [33] Corsetti (1998) Appl Microbiol Biotechnol, 50(2), 253-6)
- [34] Yuliana and Garcia (2009), Indian J Biotechnol 8 304-310)
- [35] Xue (2014) J Chem Pharm Res, 6(7), 2021-2025
- [36] Wallace (2004) Microbiology 150, 2921-2930
- [37] Hong (2016) Appl Environ Microbiol, 82(13) 3940-3946
- [38] Xiong (2016) BioMed Res Int, Article ID 9485412
- [39] Shaw (2010) Nutr Neurosci 13(3)
- [40] Guerrant (1982) J Clin Microbiol, 16(2) 355-360
- [41] Elsden (1976) Arch Microbiol 107(3), 283-288
- [42] Moss and Nunez-Montiel (1982) J Clin Microbiol, 15(2) 308-311
- [43] Riedel (2017) Int J Med Microbiol, 307(6), 311-320
- [44] Shaw (2015) Great Plains Laboratory
- [45] Elsden (1979) Arch Microbiol, 123(2), 137-41
- [46] G.E. Lewis Eds (1981), Biomedical Aspects of Botulism, p211
- [47] Shortt (2017) Eur J Nutr, DOI 10.1007/s00394-017-1546-4
- [48] Moss (1980) J Clin Microbiol, 11(6), 743-745
- [49] Elsden (1979), Arch Microbiol, 123(2), 137-41
- [50] Russell (2013) Mol Nutr Food Res, 57(3), 523-535

- [51] Guerrant (1982) *J Clin Microbiol*, 16(2) 355-360
- [52] Takahama (2013) *Adv Mol Toxicology*, 7, 129-177, Section 4.3.3
- [53] van den Tweel (1988) *Arch Microbiol*, 149(3) 207-213
- [54] Neilson and Allard (2013) *Organic Chemicals in The Environment, Mechanisms of Degredation and Transformation* 2<sup>a</sup> Ed, p851
- [55] Utkin (1994) *Int J Sys Bacteriol* 44(4) 612-9
- [56] Neilson and Allard, *Organic Chemicals in The Environment, Mechanisms of Degredation and Transformation* 2<sup>a</sup> Ed 2013, p655
- [57] Park et al. (2017) *Scientific Reports*. DOI 10.1038/s41598-017-15163-57
- [58] Sun (2017) *Neurogastroenterology and Motility*. DOI: 10.1111/nmo.13260OI
- [59] Tankou et al (2018) *MS Journal* 24(1), 58-63
- [60] Bonfili et al. (2018) *Mol Neurobiol* DOI 10.1007/s12035-018-0973-4
- [61] Srútková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [62] Harrison et al. (2015) *British Journal of Pharmacology*, 172:4200–4215
- [63] Manczak et al. (2004)
- [64] Ebadi et al (2001) *Biol Signals Recept*. 10(3-4):224-253
- [65] Ferro et al (2017) *Plos One*. 12(12):e0188425
- [66] Pal R et al (2016) *Neurol Res*. 38(12):1111-1122
- [67] Daniele et al (2015) *Sci Signal* 8(376):ra45
- [68] Ahmed et al, manuscript in preparation
- [69] Baraczka et al. (1983) *J Neural Transm*. 58(3-4):299-304
- [70] Eldrup et al. (1995) *Acta Neurol Scand*. 92(2):116-21.
- [71] Wang et al. (2016) *J Neurogastroenterol Motil* 22: 589-605.
- [72] Zadori et al (2012) *Journal of Neural Transmission*, 119, 2, 275–283
- [73] Lee et al (2008) *European J. Cell Biology* 87:389–397
- [74] Pirooznia and Elefant (2013) *Front Cell Neurosci*. 7: 30.
- [75] Tang, et al. (2017) *J Am Heart Assoc*, 6(10).

- [76] Wang *et al.* (2015) PNAS 112(9):2583-2858
- [77] Psaty *et al.* (2003) JAMA, 289(19):2534–44
- [78] Lancet. (1995) 346(8991–8992):1647–53
- [79] Miyamoto-Shinohara *et al.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- [80] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. por Day e McLellan, Humana Press.
- [81] Leslie *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- [82] Mitropoulou *et al.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [83] Kailasapathy *et al.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [84] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>a</sup> Edição, (1994), editado por A Wade e PJ Weller
- [85] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [86] US 2016/0067188
- [87] *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [88] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [89] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [90] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* 20<sup>a</sup> edição, ISBN: 0683306472.
- [91] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press).
- [92] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [93] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [94] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>a</sup> edição (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- [95] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [96] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5<sup>a</sup> edição (Current Protocols).
- [97] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2<sup>a</sup> ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [98] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
- [99] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [100] Abel and Zukin (2008) *Curr Opin Pharmacol*, 2008. 8(1): 57-64
- [101] Johnsen *et al* (2017) *Journal of Chromatography A*. 1503: 57-64
- [102] West and Johnstone (2014) *J Clin Invest.* 124, 30-39
- [103] Glauben *et al.* (2006) *J Immunol*, 176: 5015-5022
- [104] Angiolilli *et al.* (2017) *Ann Rheum Dis*, 76: 277-285
- [105] Gonneaud *et al.* (2014) *J Inflamm*, 11: 43
- [106] Alenghat *et al.* (2013) *Nature*, 504: 153-157
- [107] Felice *et al.* (2015) *Ailment Pharmacol Ther*, 41: 26-38
- [108] Pakkenberg *et al.* (1991) *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54(1):30-3.
- [109] Przedborski *et al.* (2000). *Restor Neurol Neurosci*. 16(2):135-142.
- [110] Kehr J. (1999) Monitoring chemistry of brain microenvironment: biosensors, microdialysis and related techniques. Chapter 41. In: Modern techniques in neuroscience research. (Eds. U. Windhorst and H. Johansson) Springer-Verlag GmbH., Heidelberg, Germany. 1149-1198.
- [111] Kehr J., and Yoshitake T. (2006) Monitoring brain chemical signals by microdialysis. In: Encyclopedia of Sensors, Vol. 6. (Eds. C.A. Grimes, E.C. Dickey and M.V. Pishko) American Scientific Publishers, USA. 287-312.
- [112] Smart *et al* (2010) *Nature Protocols*. 10:1709-29

- [113] Weon *et al.* (2016)
- [114] Huot *et al.* (2015) *Parkinson's Disease*
- [115] Scatton *et al.* (1983) *Brain Res*, 275(2): 321-8
- [116] Hely MA, Morris JG, Reid WG, Trafficante R, Mov Disord. 2005 Feb; 20(2):190-9
- [117] Budd and Nicholls (1998) *Essays Biochem.* 33:43-52
- [118] Michel and Prat (2016) *Ann Transl Med.* 4(1): 15.
- [119] Gagnon et al (2013) *J Microbiological Methods.* 94: 274-279

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

- (i) uma cepa bacteriana comensal e
- (ii) um ou mais ácidos orgânicos com a seguinte

fórmula:

$R^n\text{-COOH}$ ; ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  compreende um grupo alquila, alquenila, alquinila ou arila.

3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  é um hidrocarboneto linear, ramificado, cíclico, parcialmente cíclico ou aromático.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  compreende pelo menos 5 átomos de carbono.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  compreende na faixa de 5 a 20 carbonos.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  é  $R^1$  e  $R^1$  é um grupo alquila compreendendo 5 carbonos.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que  $R^n$  é  $R^1$  e  $R^1$  é uma alquila e consiste em 5 átomos de carbono.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o um ou mais ácidos orgânicos compreendem ácido hexanoico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>2</sup> e R<sup>2</sup> compreende um grupo arila compreendendo um grupo fenila.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o grupo fenila compreende um substituinte de hidroxila, em que opcionalmente o grupo hidroxila está na posição 4.

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o um ou mais ácidos orgânicos compreendem o ácido 4-hidroxifenilacético.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>3</sup> e R<sup>3</sup> compreende um grupo alquila ramificado.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>3</sup> e R<sup>3</sup> compreende pelo menos 5 átomos de carbono, em que opcionalmente R<sup>3</sup> compreende na faixa de 5 a 9 átomos de carbono.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 e 13, caracterizada pelo fato de que R<sup>3</sup> compreende um grupo butila.

15. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 14, caracterizada pelo fato de que R<sup>3</sup> compreende ainda um grupo propila.

16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o um ou mais ácidos orgânicos compreendem ácido valproico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo.

17. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>4</sup> e R<sup>4</sup> compreende um grupo alquenila parcialmente cílico.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que R<sup>4</sup> compreende na faixa de 14 a 21 carbonos.

19. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 e 18, caracterizada pelo fato de que R<sup>4</sup> compreende na faixa de 1 a 8 grupos metila substituintes.

20. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, caracterizada pelo fato de que R<sup>4</sup> compreende na faixa de 1 a 8 ligações duplas carbono-carbono.

21. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o um ou mais ácidos orgânicos compreendem ácido retinoico ou um derivado do mesmo, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo.

22. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>5</sup> e R<sup>5</sup> é um grupo alquila compreendendo 4 átomos de carbono.

23. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que R<sup>n</sup> é R<sup>5</sup> e R<sup>5</sup> é um grupo alquila que consiste em 4 átomos de carbono.

24. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o um ou mais ácidos orgânicos compreendem ácido valérico ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo.

25. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição induz uma ou mais funções fisiológicas selecionadas da lista que consiste em: promover desenvolvimento de neurites, restauração neurológica, neuroproteção, inibir a desacetilação de histonas, aumentar a ativação de BDNF, aumentar a produção de indol, reduzir a ativação de IL-6 e aumentar ativação de IL-8.

26. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana comensal produz um ácido graxo de cadeia curta.

27. Composição, de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que o ácido graxo de cadeia curta é ácido butírico.

28. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana comensal produz ácido succínico.

29. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana comensal é de um gênero selecionado da lista que consiste em *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Megasphaera*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Faecalibacterium*, *Peptostreptococcus* ou *Peptococcus*.

30. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a cepa é do gênero *Megasphaera* ou é da espécie *Megasphaera massiliensis*.

31. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO:2.

32. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a bactéria comensal é a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42787.

33. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a bactéria comensal é capaz de aumentar a ativação de IL-8 quando administrada

no trato gastrointestinal.

34. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que é para uso em medicina.

35. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa bacteriana comensal para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença em um sujeito, em que a composição deve ser administrada em combinação com um ácido orgânico, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou éster do mesmo.

36. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um ou mais ácidos orgânicos ou sais farmaceuticamente aceitáveis ou ésteres dos mesmos para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença em um sujeito, em que a composição deve ser administrada em combinação com uma cepa bacteriana comensal.

37. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que é para uso em um método de tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa.

38. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35 e 36 ou 37 quando dependente de qualquer uma das reivindicações 35 e 36, caracterizada pelo fato de que o ácido orgânico tem a seguinte fórmula: R-COOH, em que R compreende um grupo alquila, alquenila, alquinila ou arila e compreende na faixa de 4 a 20 átomos de carbono.

39. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa de uma bactéria comensal para uso no tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo em um sujeito, em que a cepa produz um ou mais ácidos orgânicos com a seguinte fórmula: R<sup>x</sup>-COOH,

em que R<sup>x</sup> compreende um grupo alquila compreendendo na

faixa de 4 a 11 carbonos,

ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, opcionalmente em que o grupo hidroxila está na posição 4.

40. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa de uma bactéria comensal para uso no tratamento de lesão cerebral em um sujeito, em que a cepa produz um ou mais ácidos orgânicos com a seguinte fórmula:  $R^x\text{-COOH}$ ,

em que  $R^x$  compreende um grupo alquila compreendendo na faixa de 4 a 11 carbonos,

ou em que  $R^x$  compreende um grupo fenila com um grupo hidroxila substituinte, opcionalmente em que o grupo hidroxila está na posição 4.

41. Composição, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizada pelo fato de que a cepa produz ácido hexanoico.

42. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 41, caracterizada pelo fato de que a cepa produz ácido 4-hidroxifenilacético.

43. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 42, caracterizada pelo fato de que a cepa produz ácido valérico.

44. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 43, caracterizada pelo fato de que a cepa produz ácido hexanoico, ácido valérico e ácido 4-hidroxifenilacético.

45. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 44, caracterizada pelo fato de que a cepa também produz um ácido graxo de cadeia curta.

46. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 45, caracterizada pelo fato de que o ácido graxo de cadeia curta é o ácido butírico.

47. Composição para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 46, caracterizada pelo fato de que a cepa também produz ácido succínico.

48. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 47, caracterizada pelo fato de que a cepa é do gênero *Megasphaera*, ou é da espécie *Megasphaera massiliensis*.

49. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 48, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO:2.

50. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 49, caracterizada pelo fato de que a bactéria comensal é capaz de aumentar a ativação de IL-8 quando administrado no trato gastrointestinal.

51. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 50, caracterizada pelo fato de que a bactéria comensal é a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42787.

52. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 51, caracterizada pelo fato de que a composição compreende duas ou mais cepas de bactérias comensais.

53. Composição, de acordo com a reivindicação 52, caracterizada pelo fato de que a composição compreende uma cepa da espécie *Parabacteroides distasonis* e uma cepa da espécie *Megasphaera massiliensis*.

54. Composição, de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que a cepa da espécie *Parabacteroides distasonis* tem uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO:17, ou em que a cepa da espécie *Parabacteroides distasonis* possui a

sequência de 16s rRNA representada pela SEQ ID NO:17, e em que a cepa da espécie *Megasphaera massiliensis* possui uma sequência de 16s rRNA que é pelo menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,9% idêntica à SEQ ID NO:2, ou em que a cepa da espécie *Megasphaera massiliensis* tem a sequência de rRNA 16s representada pela SEQ ID NO:2.

55. Composição, de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que compreende a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42787 e a cepa depositada no NCIMB sob o número de acesso NCIMB 42382.

56. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de um distúrbio neurodegenerativo e o distúrbio neurodegenerativo é selecionado do grupo que consiste na doença de Parkinson, incluindo paralisia supranuclear progressiva, paralisia supranuclear progressiva, síndrome de Steele-Richardson-Olszewski, hidrocefalia de pressão normal, parkinsonismo vascular ou arteriosclerótico e parkinsonismo induzido por fármaco; doença de Alzheimer, incluindo síndrome de Benson; esclerose múltipla; doença de Huntington; esclerose lateral amiotrófica; doença de Lou Gehrig; doença do neurônio motor; doença do príon; ataxia espinocerebelar; atrofia muscular espinhal; demência, incluindo corpo de Lewy, demência vascular e demência frontotemporal; afasia progressiva primária; comprometimento cognitivo leve; comprometimento cognitivo relacionado ao HIV, neuropatia inflamatória progressiva e degeneração corticobasal.

57. Composição para uso, de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de tratamento ou prevenção da doença de Parkinson.

58. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de tratamento ou prevenção de doença neurodegenerativa de início precoce.

59. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para prevenir ou retardar o início ou a progressão de um distúrbio neurodegenerativo.

60. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para reduzir a inflamação no tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa.

61. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso na redução da morte de neurônios ou na proteção de neurônios.

62. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para prevenir ou retardar o início ou a progressão de um distúrbio neurodegenerativo.

63. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de redução da inflamação mediada por IL-6 no tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa.

64. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método de redução dos níveis de IL-6 e/ou NFκB no tratamento ou prevenção de um distúrbio neurodegenerativo.

65. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para aumentar a neuritogênese em um sujeito

no tratamento ou prevenção de uma doença neurodegenerativa.

66. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso em um método para aumentar a neuritogênese por indução da atividade de MAP2.

67. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso na redução da morte neuronal no sujeito.

68. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de lesão cerebral em um sujeito.

69. Composição, de acordo com a reivindicação 40 ou 68, caracterizada pelo fato de que a composição é para uso no tratamento de lesão cerebral e a lesão cerebral é acidente vascular cerebral, como isquemia cerebral, isquemia cerebral focal, acidente vascular cerebral isquêmico ou acidente vascular cerebral hemorrágico.

70. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 39 a 69, caracterizada pelo fato de que a cepa bacteriana comensal é projetada para produzir o ácido orgânico.

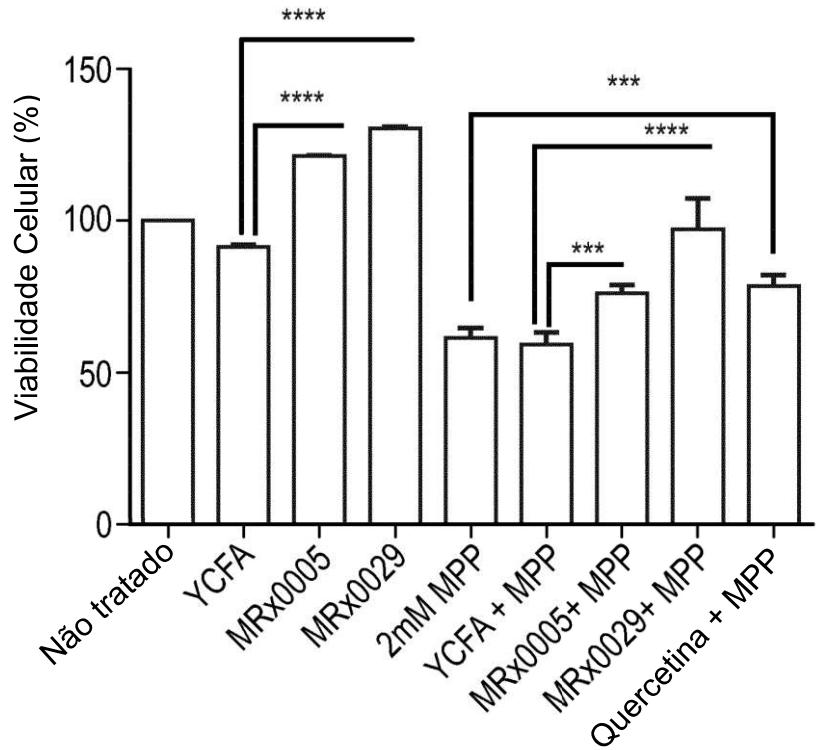
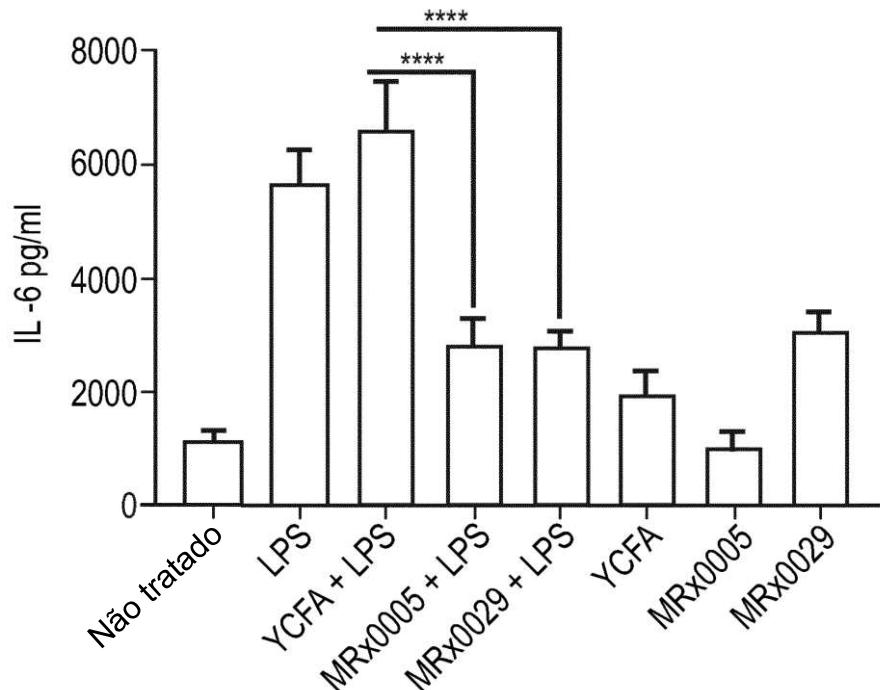
71. Produto alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores, para o uso como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores.

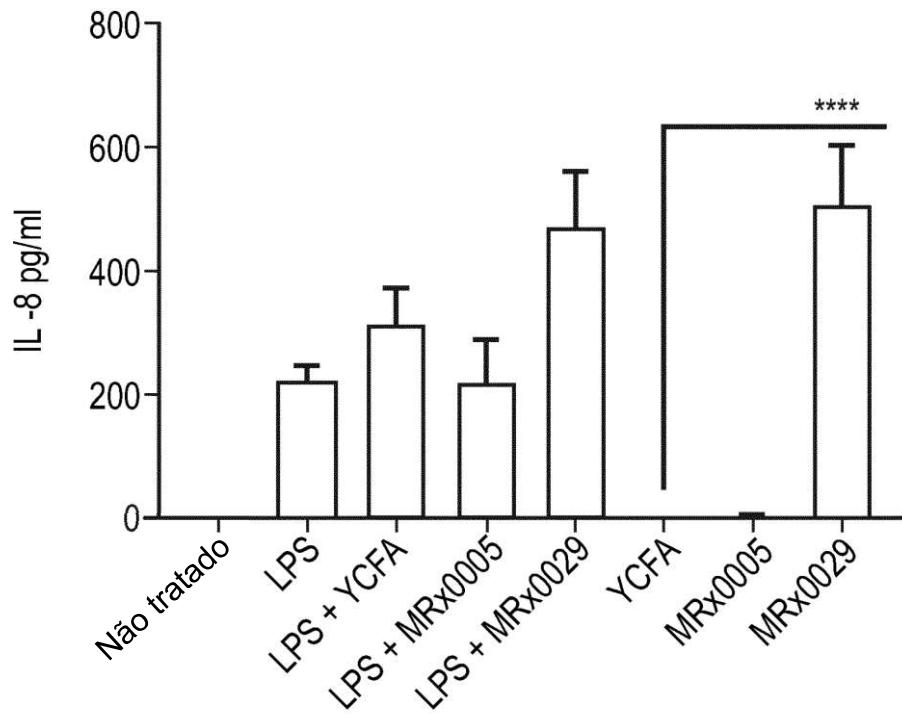
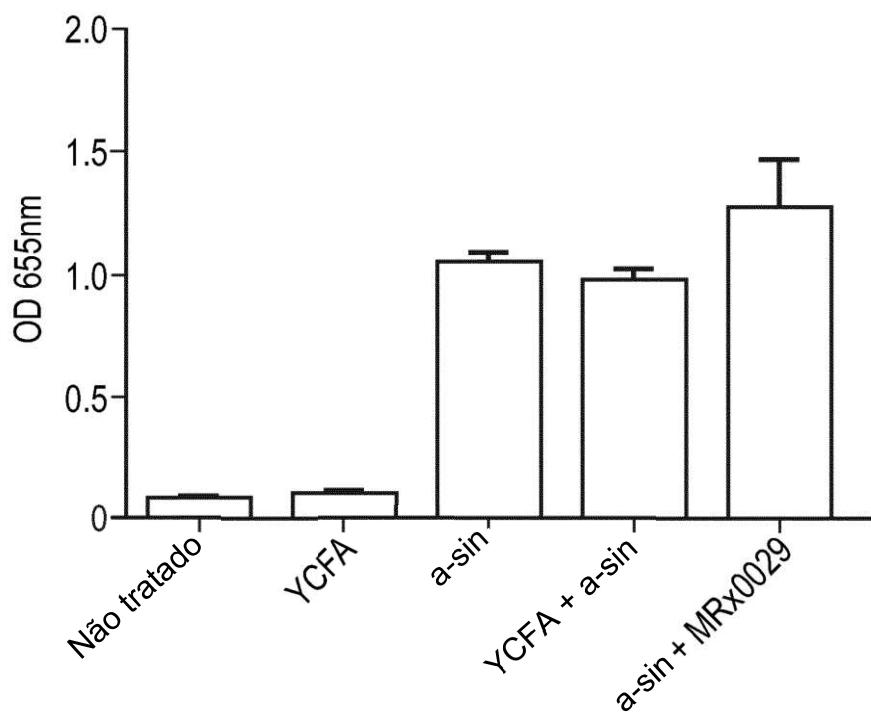
72. Composição de vacina, caracterizada pelo fato de que compreende a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores, para o uso como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores.

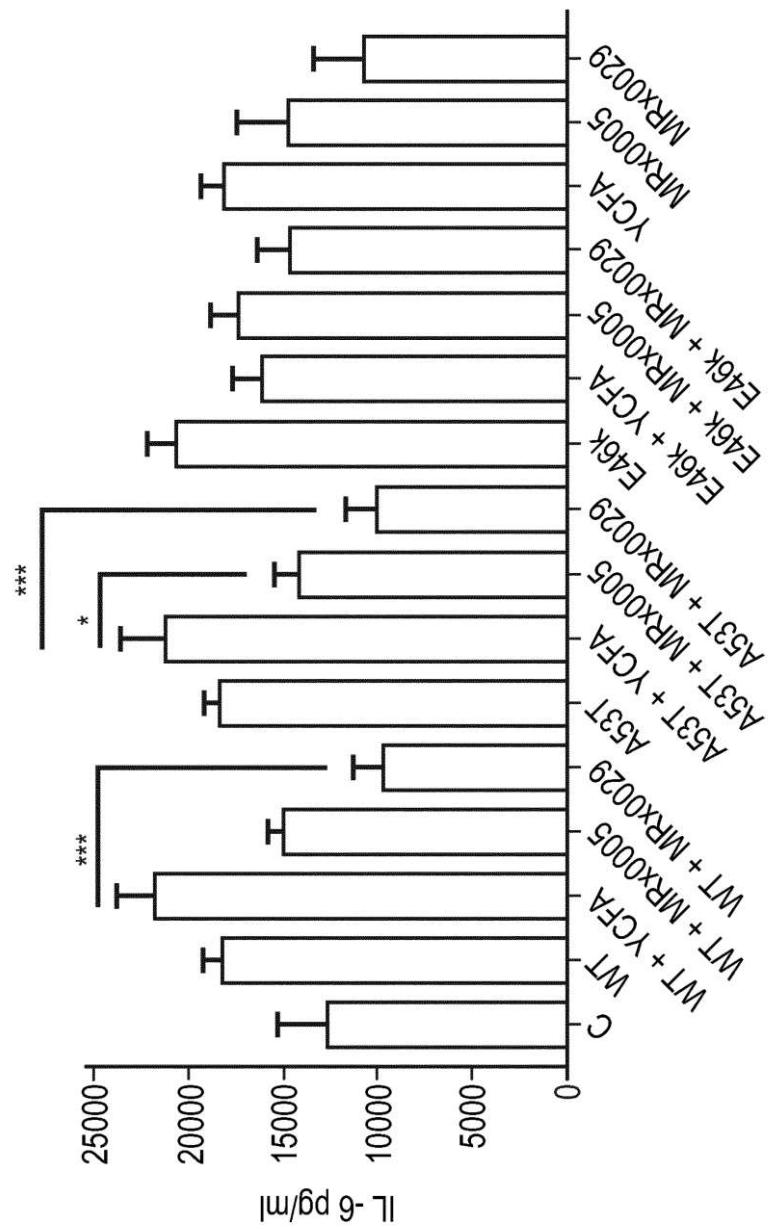
73. Método para tratar ou prevenir um distúrbio neurodegenerativo, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma composição como definida em qualquer uma das

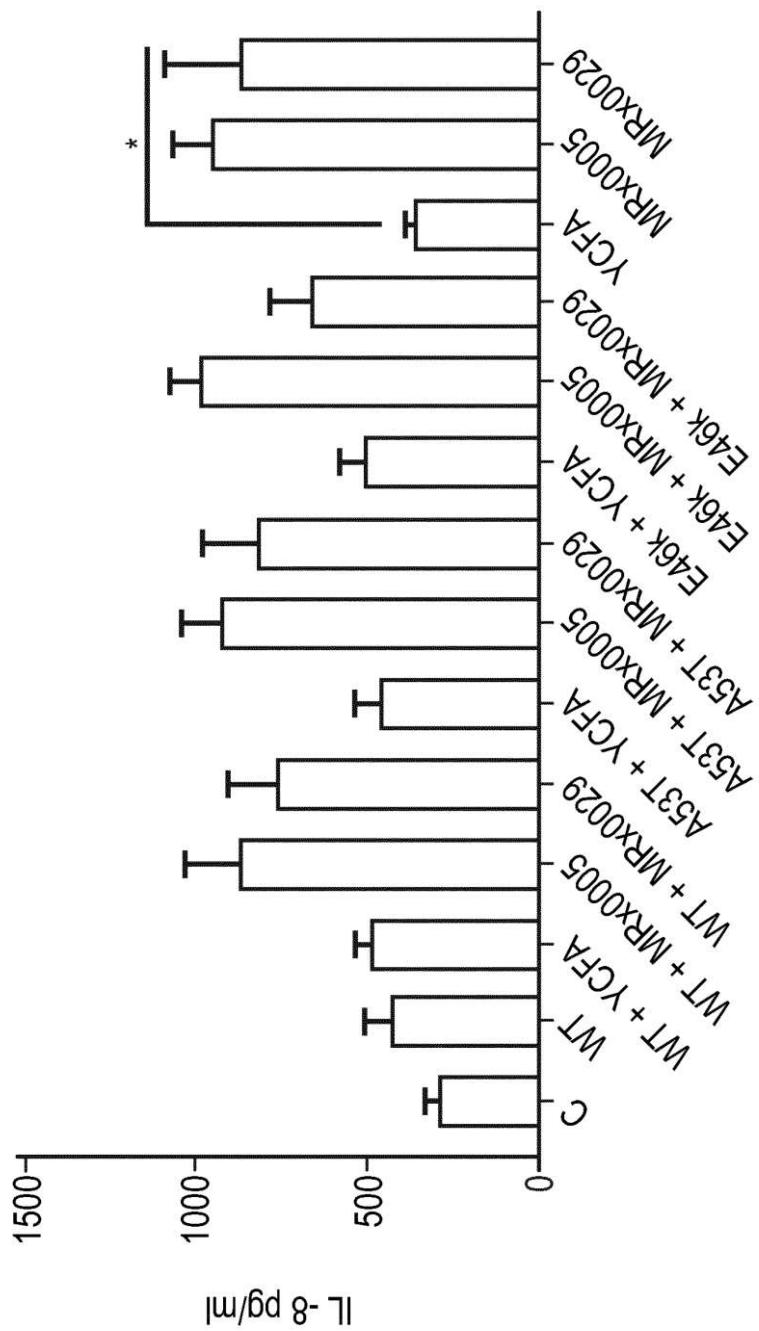
reivindicações anteriores, a um paciente em necessidade da mesma.

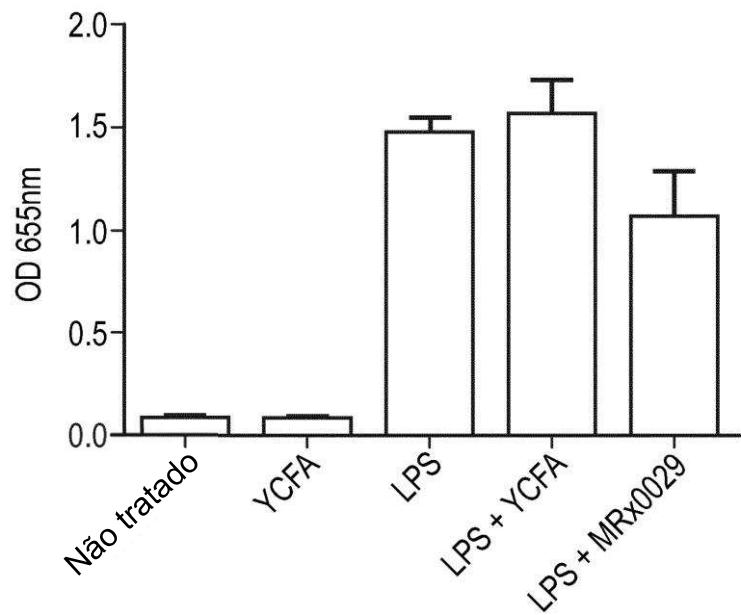
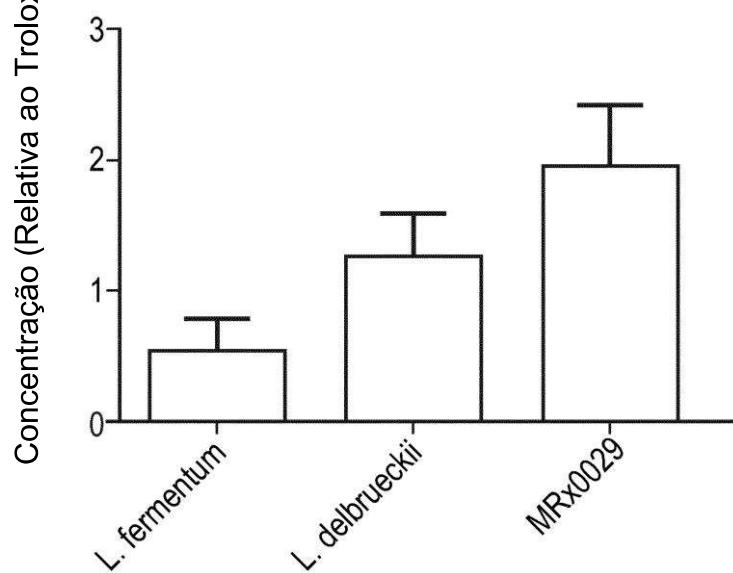
74. Método para tratar lesão cerebral, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações anteriores, a um paciente em necessidade da mesma.

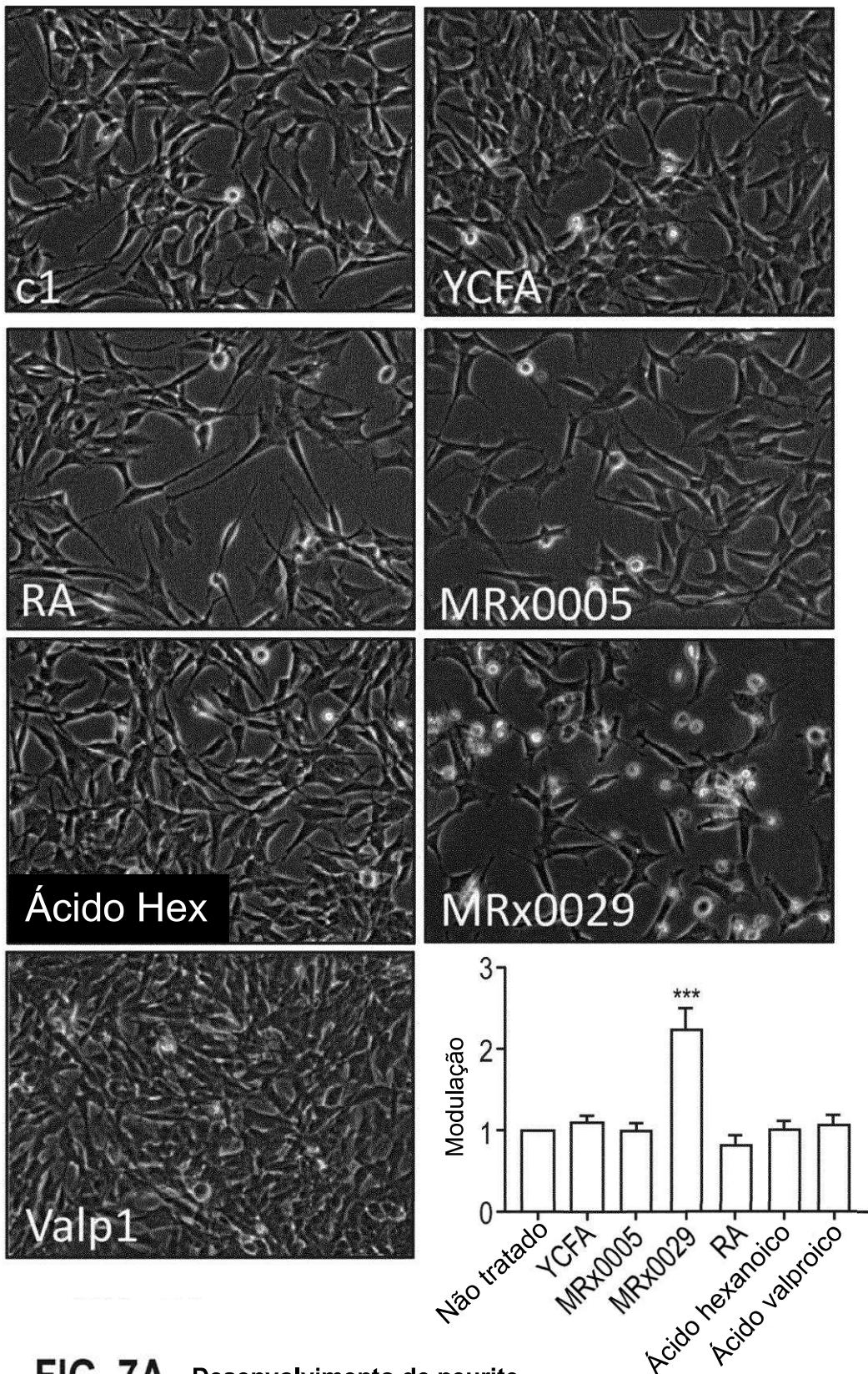
**FIG. 1** Proteção contra neurotoxicidade**FIG. 2** Secreção de IL-6 de U373

**FIG. 3 Secreção de IL-8 de U373****FIG. 5 Inibição de ativação de NFkB-AP1 induzido por  $\alpha$ -sinucleína em HEK-TLR4**

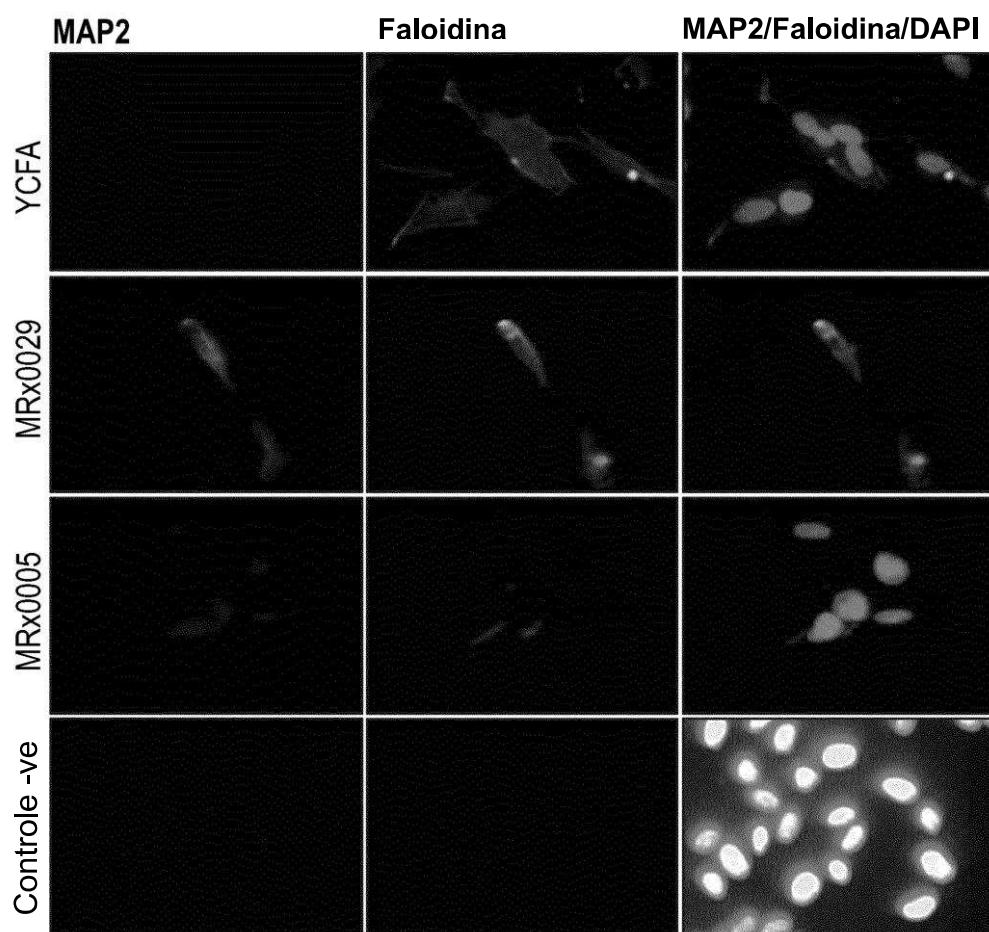
**FIG. 4A Secreção de IL-6 de U373**

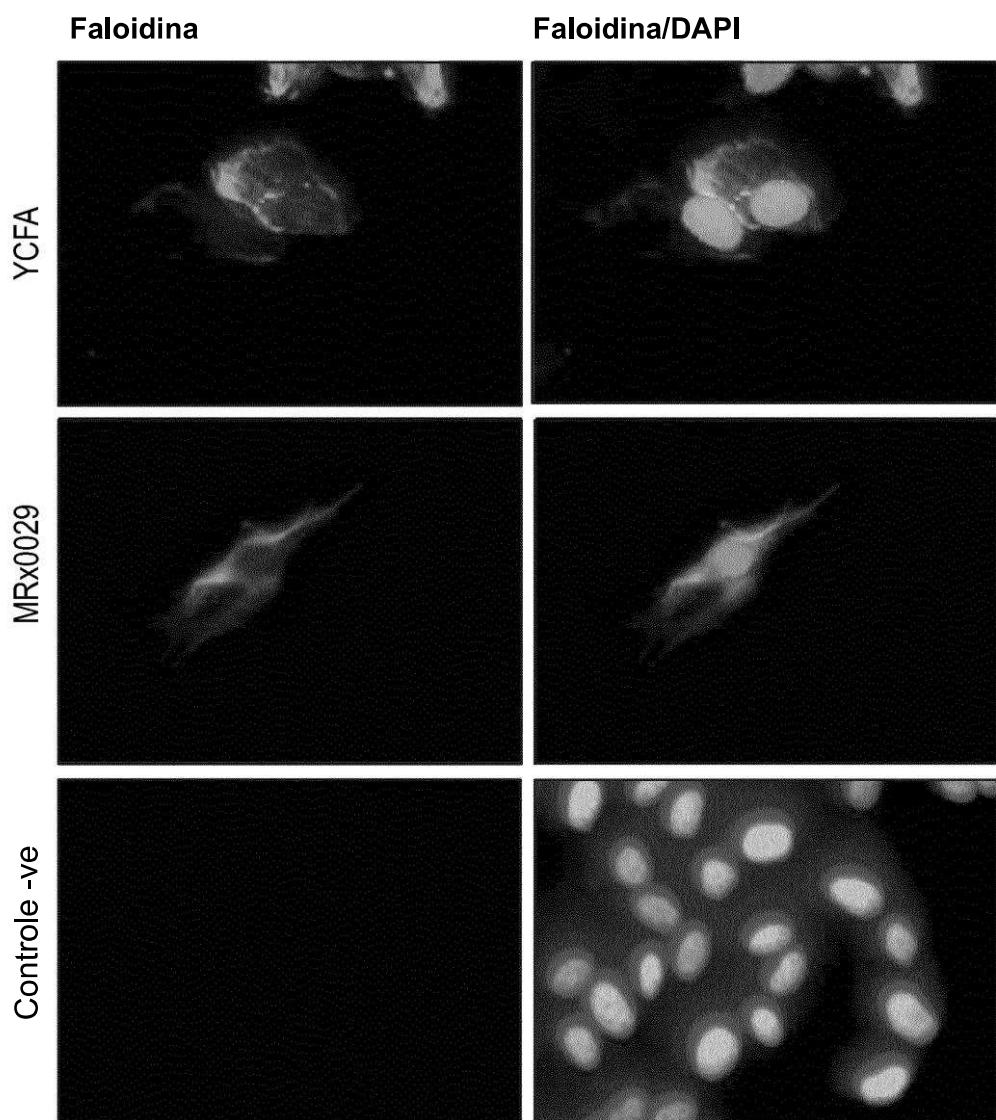
**FIG. 4B Secreção de IL-8 de U373**

**FIG. 6** Inibição de ativação de NFkB-AP1 induzido por LPS em HEK-TLR4**FIG. 8** Ensaio de Capacidade Antioxidante

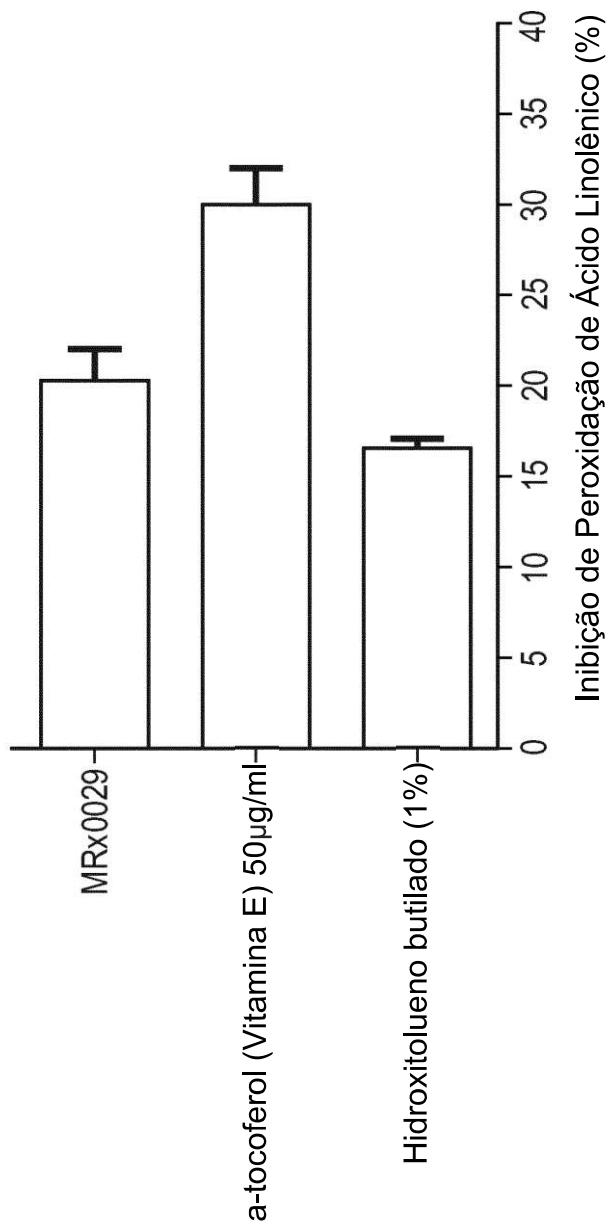


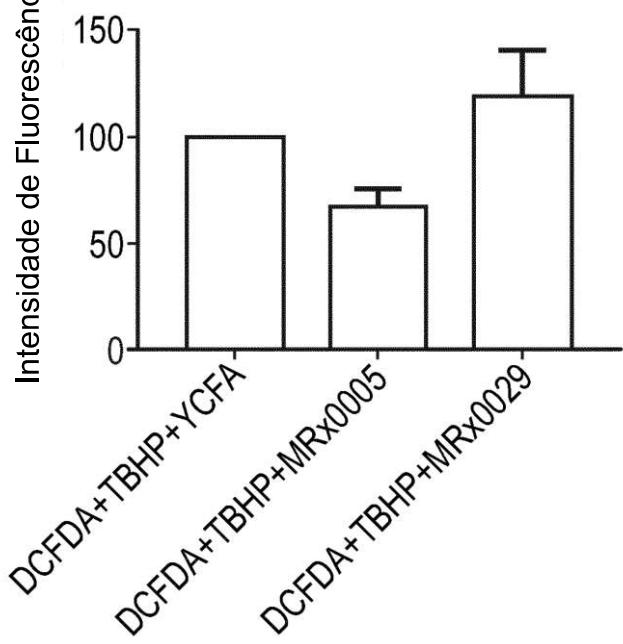
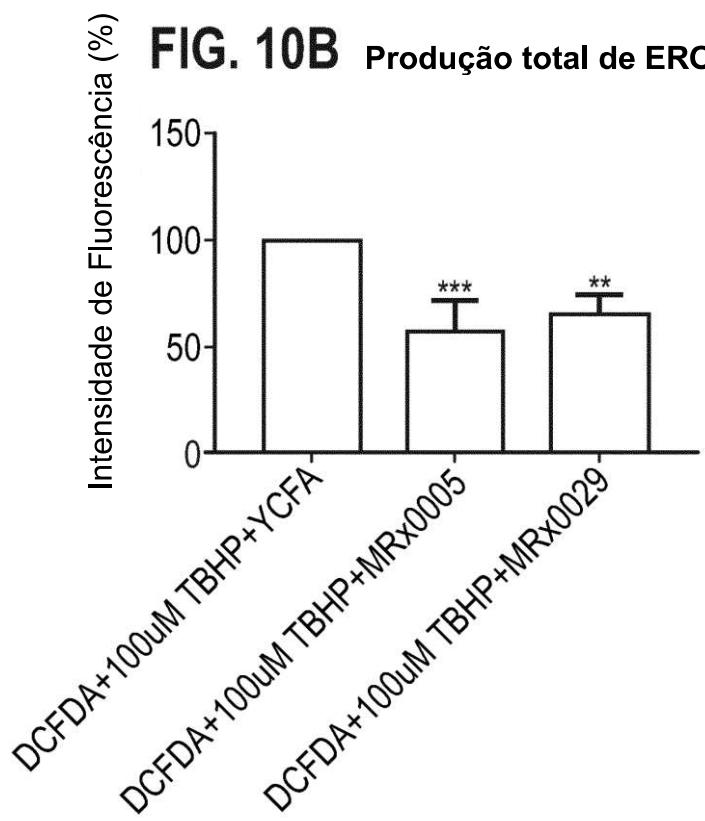
**FIG. 7A Desenvolvimento de neurite**

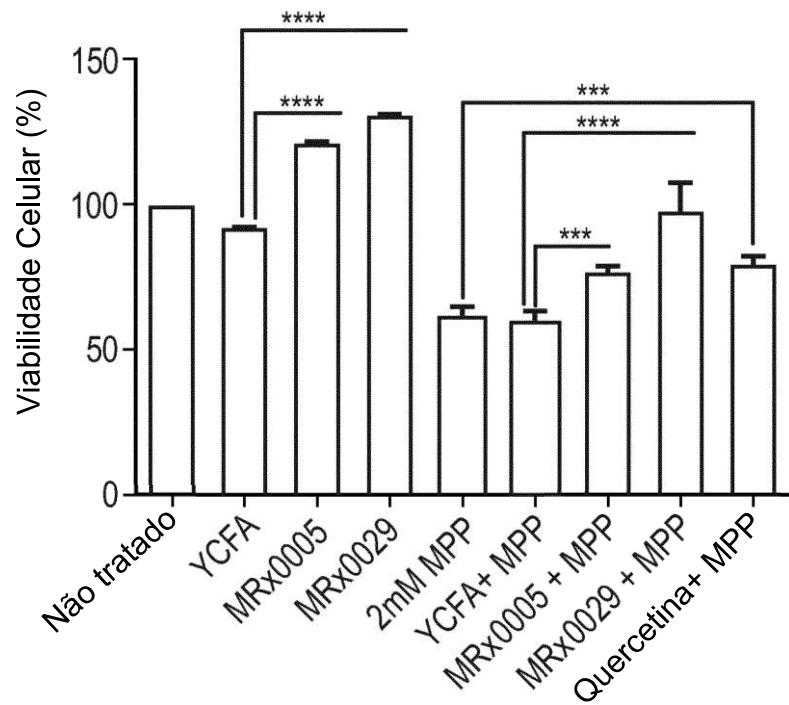
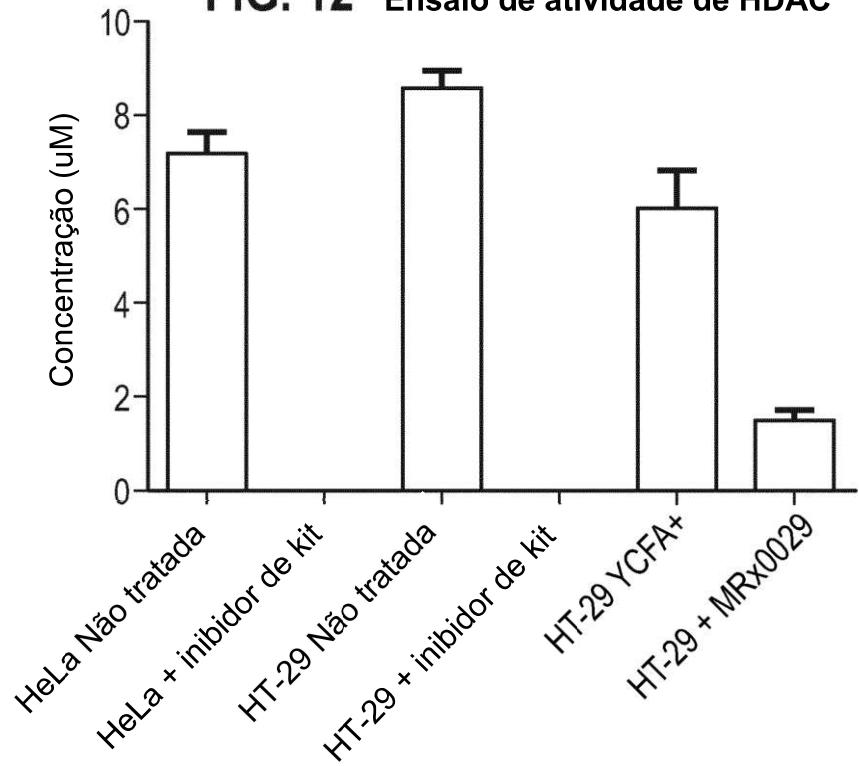
**FIG. 7B**

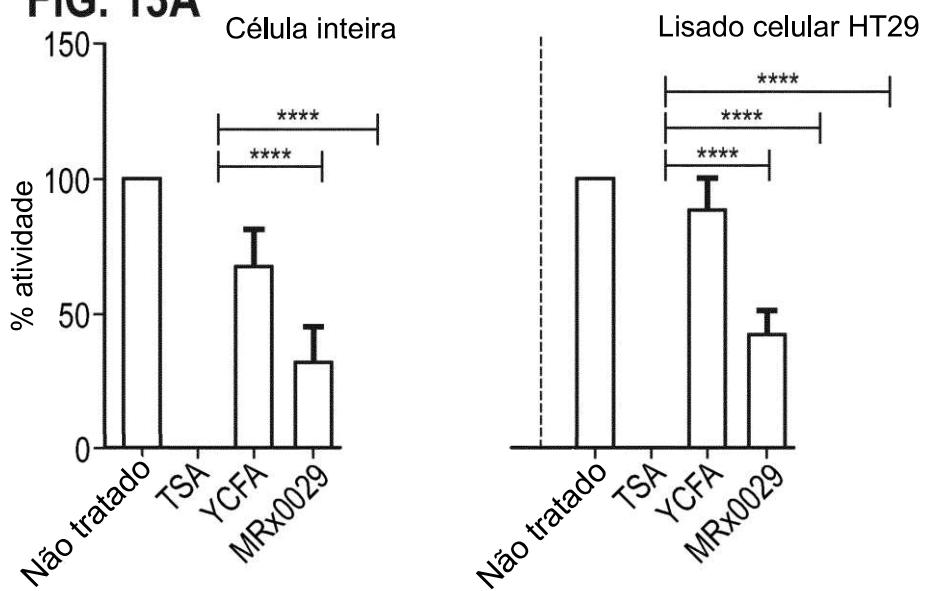
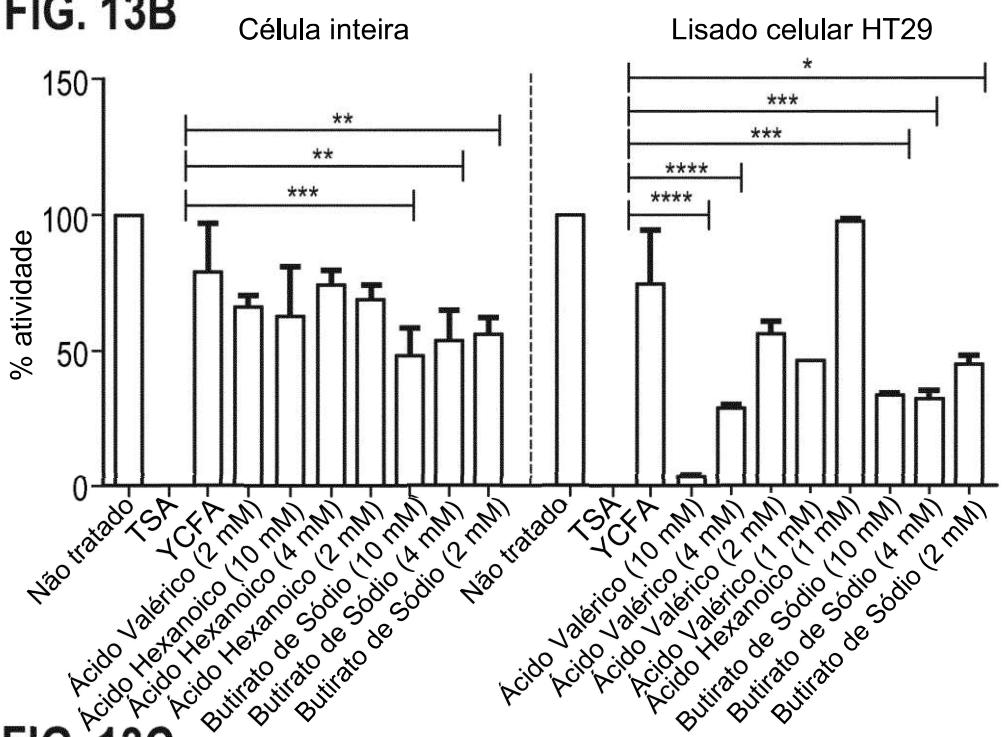
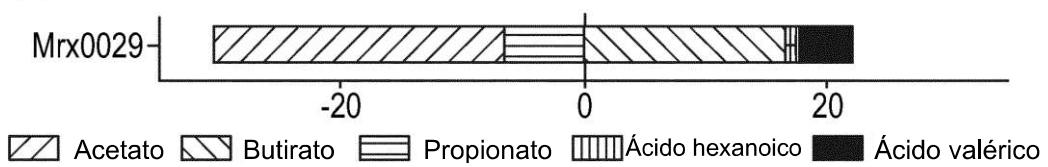
**FIG. 7B (continuação)**

**FIG. 9 Capacidade Antioxidante Total**



**FIG. 10A** Produção total de ERO**FIG. 10B** Produção total de ERO

**FIG. 11** Neuroproteção – viabilidade celular**FIG. 12** Ensaio de atividade de HDAC

**FIG. 13A****FIG. 13B****FIG. 13C**

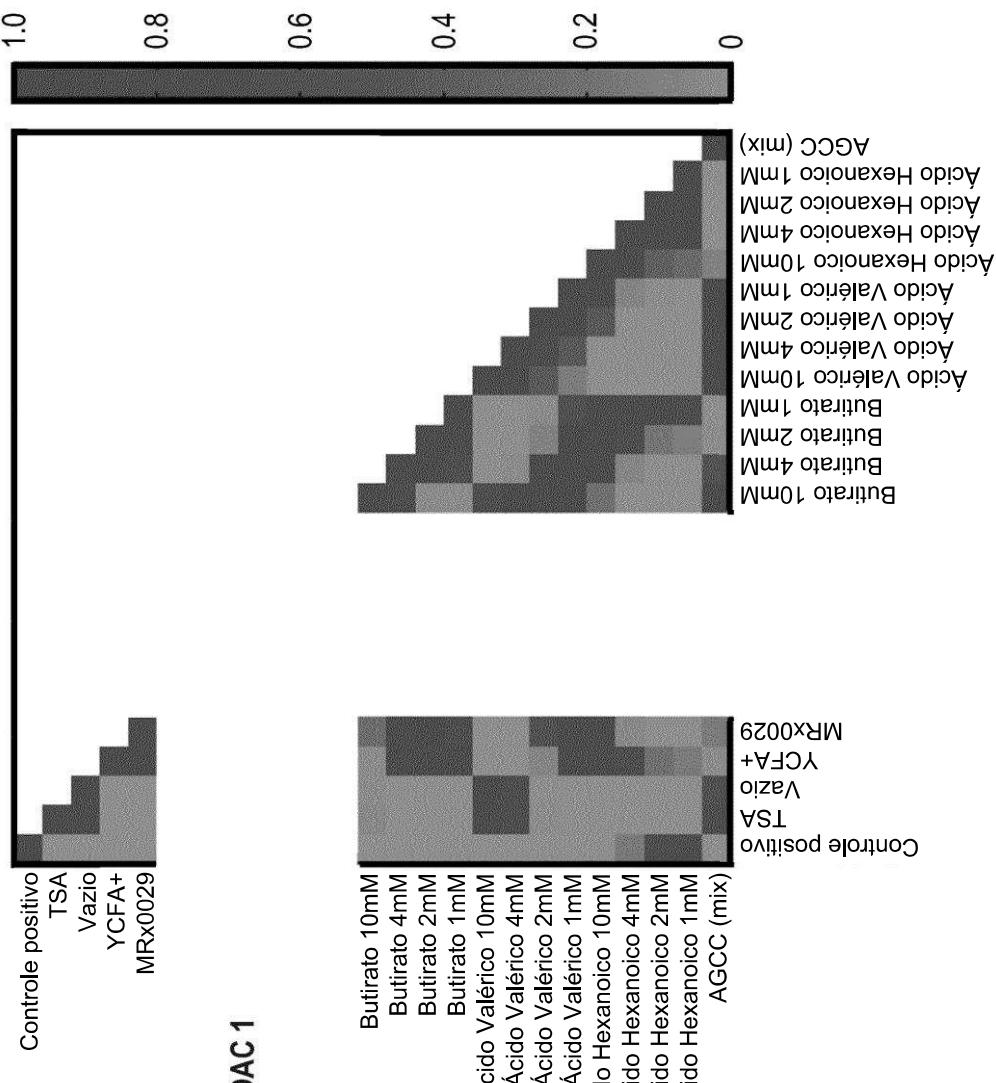
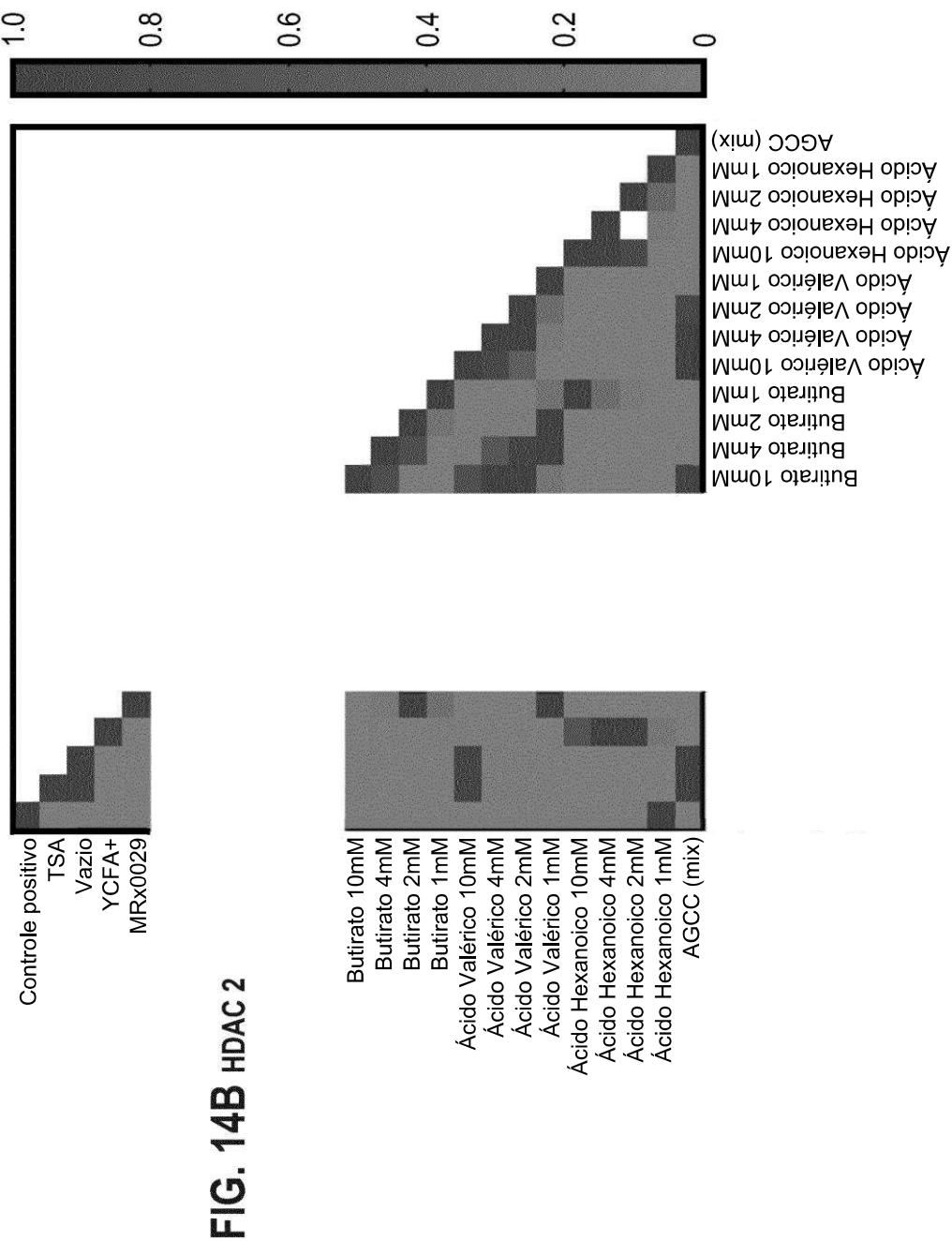
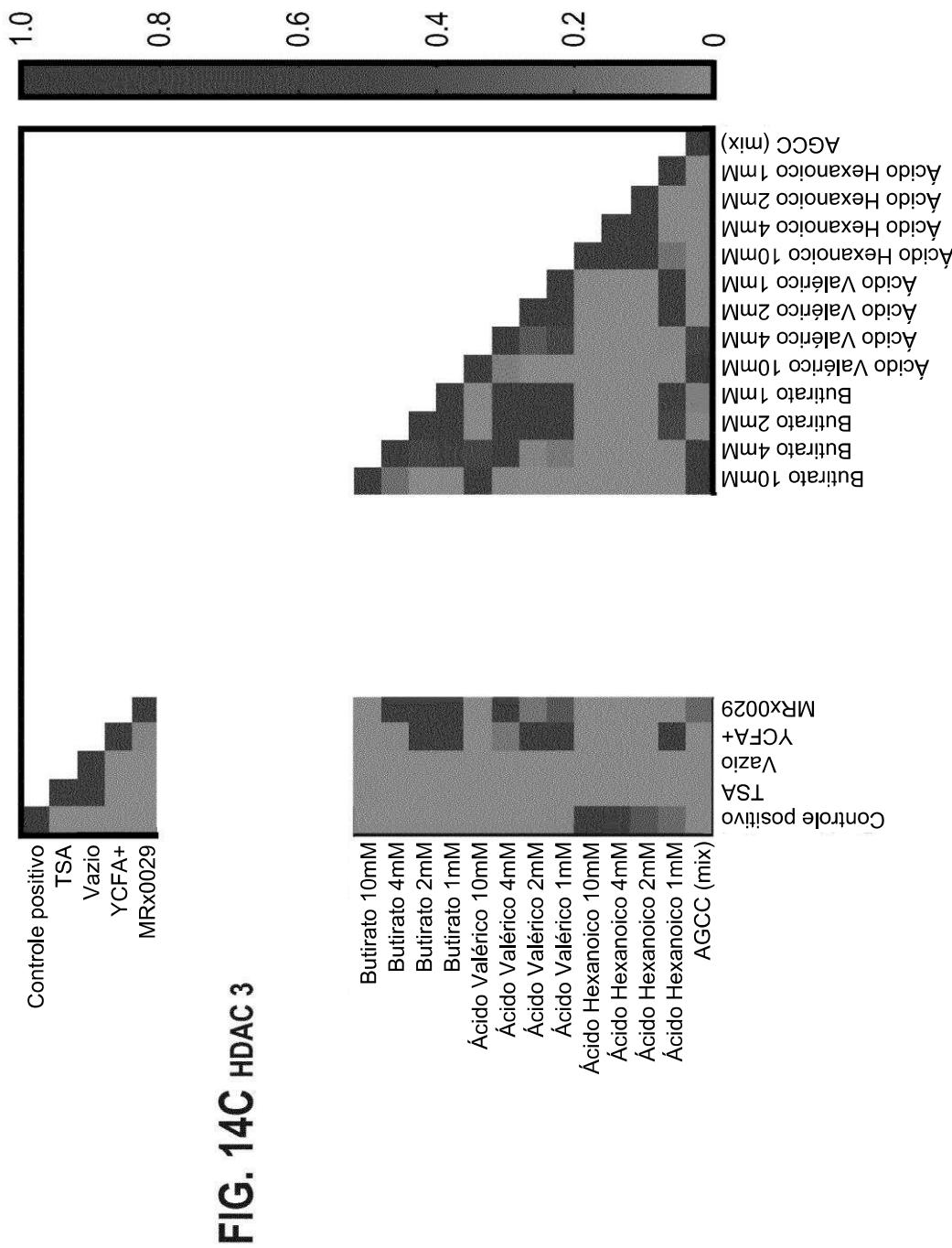
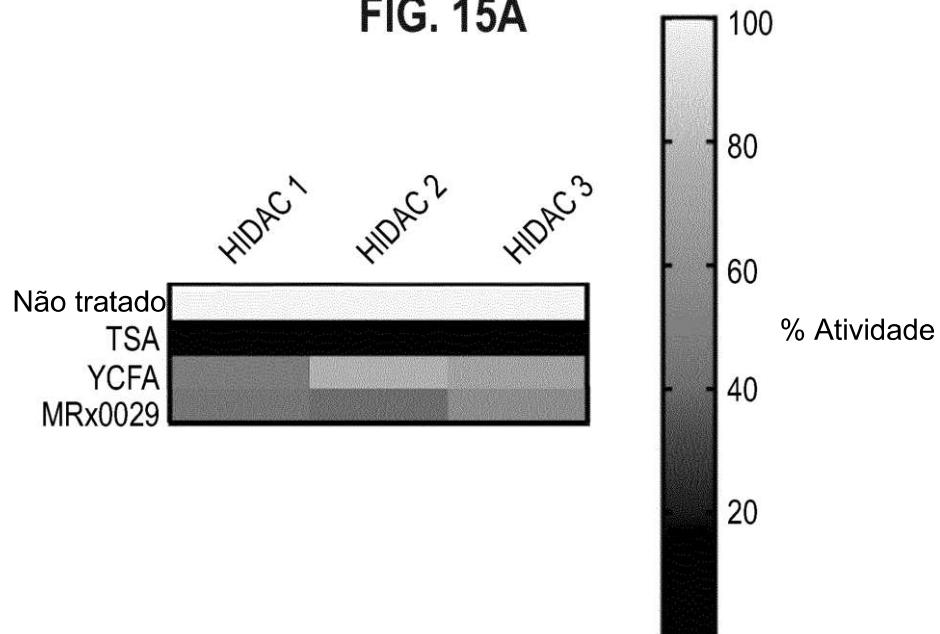
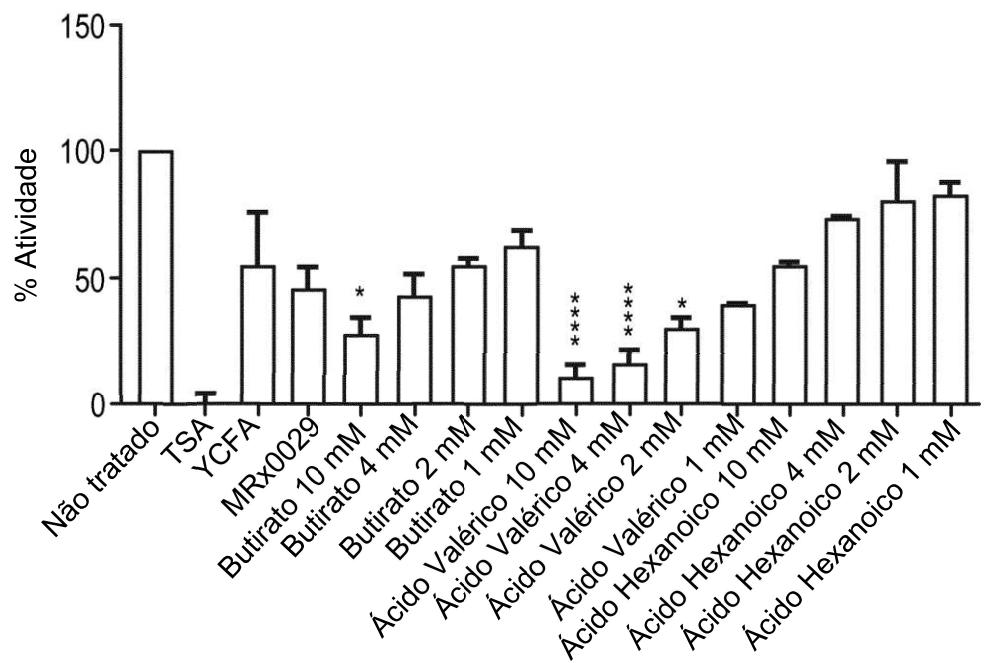
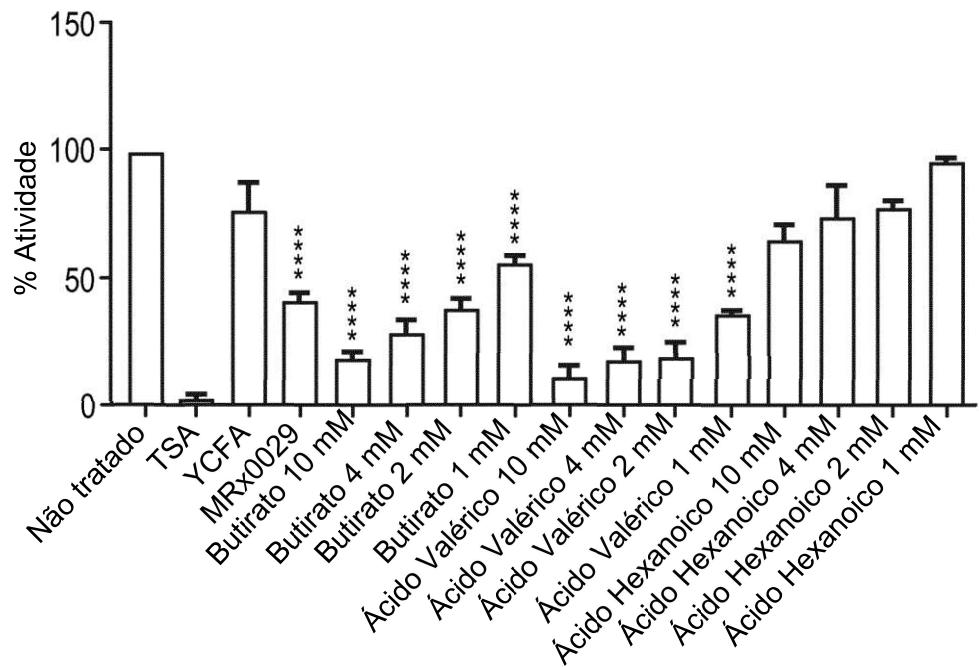
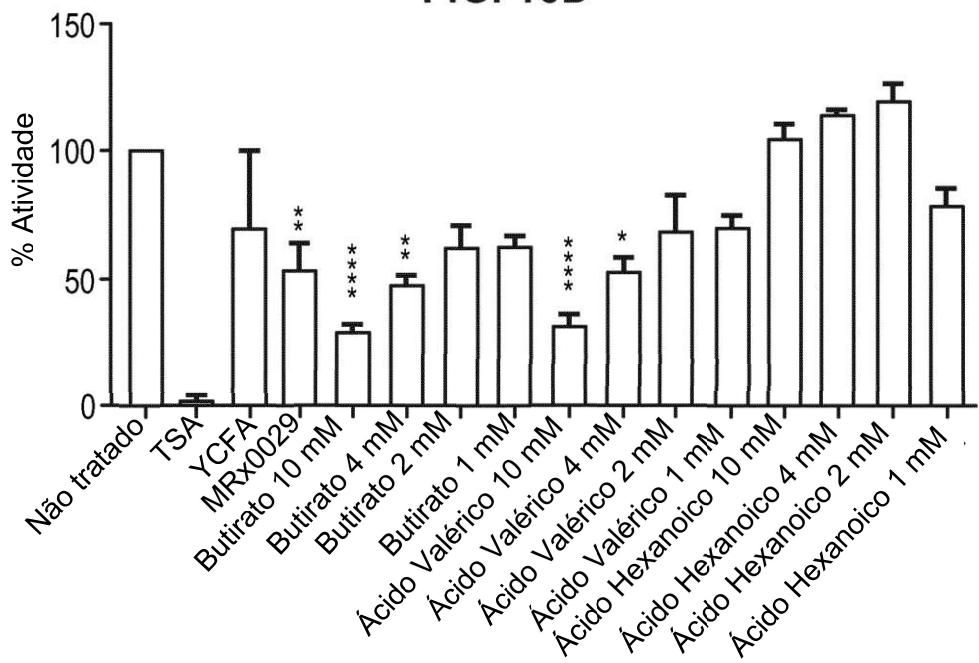


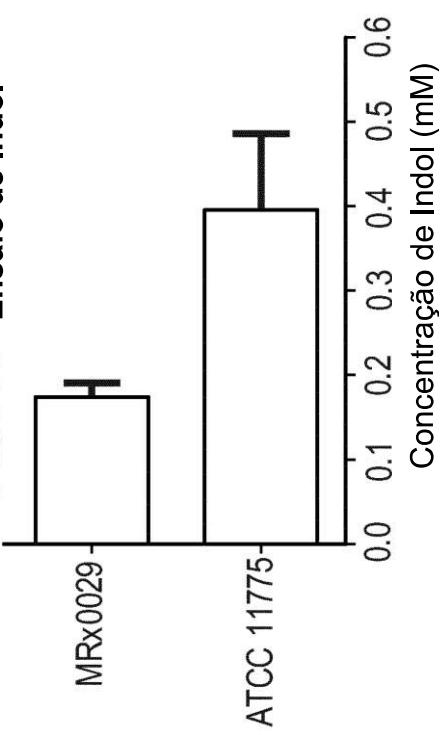
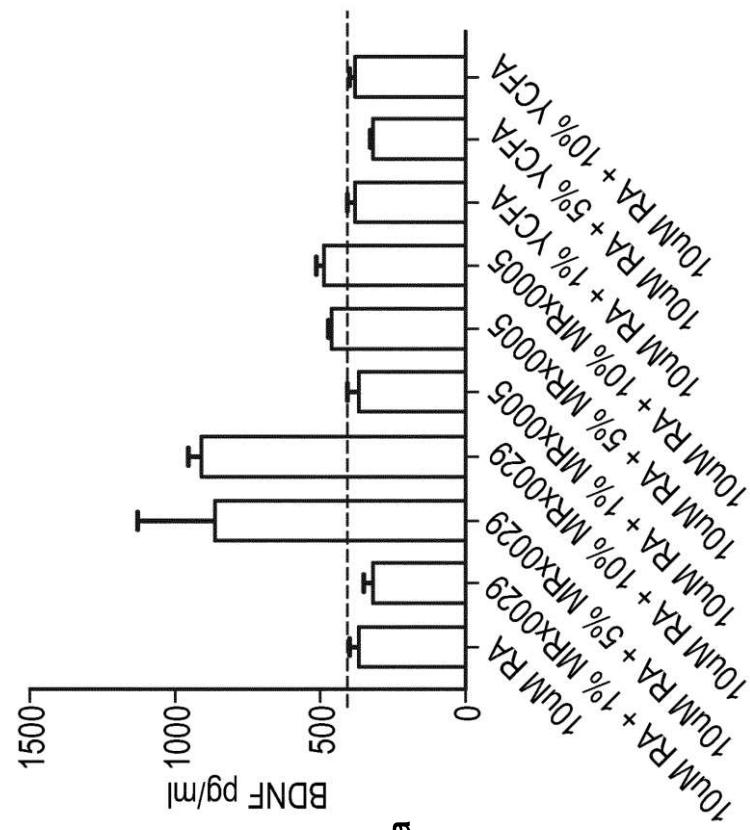
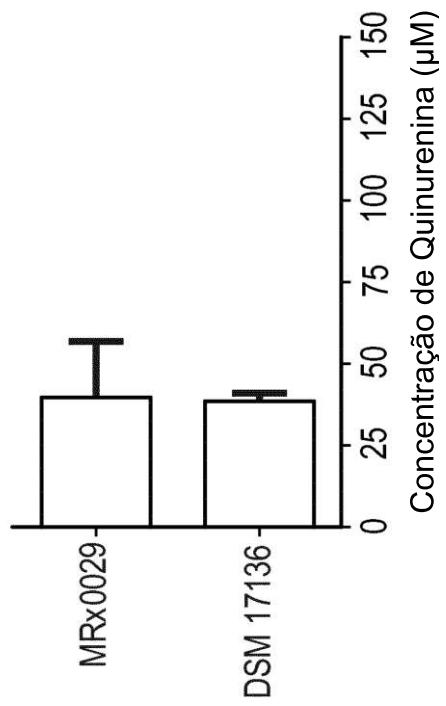
FIG. 14A HDAC 1



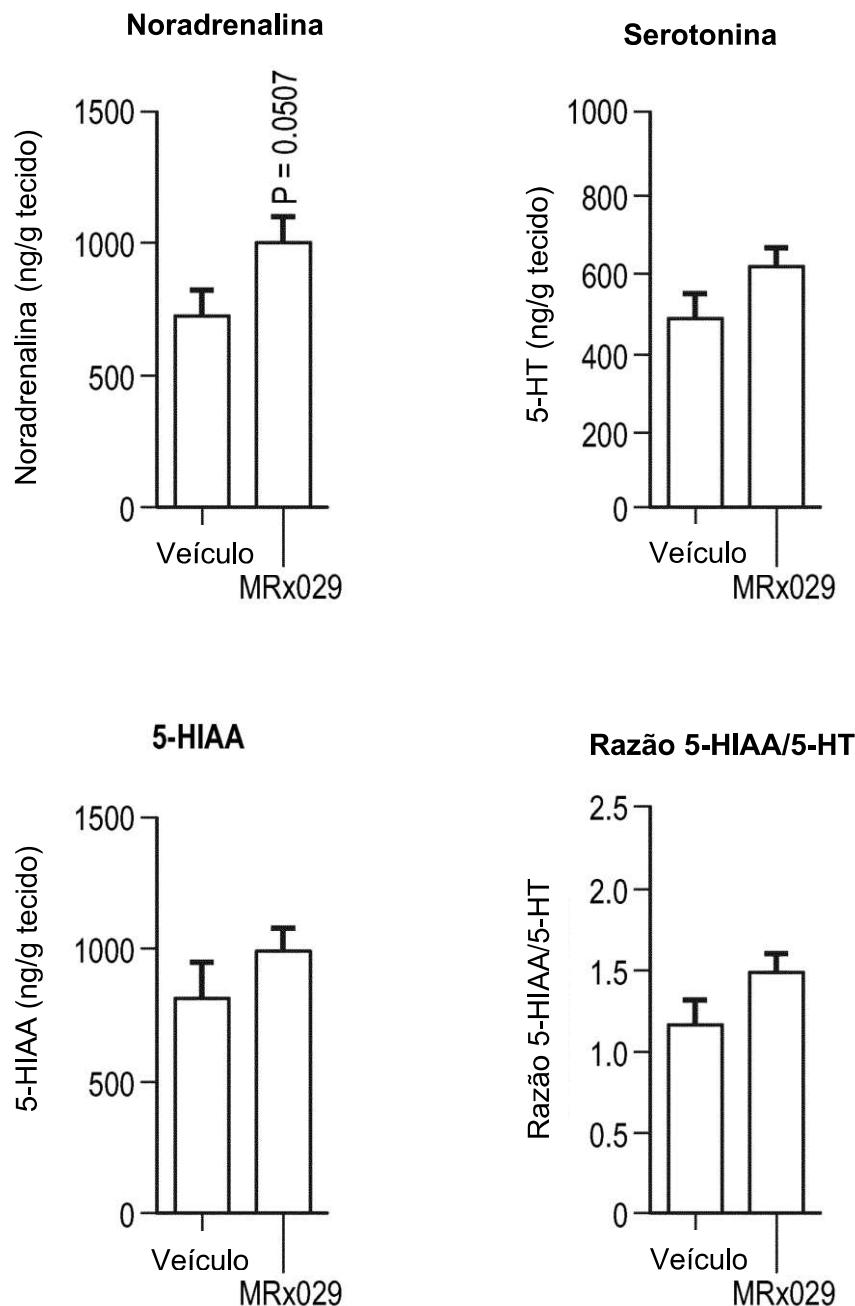


**FIG. 15A****FIG. 15B**

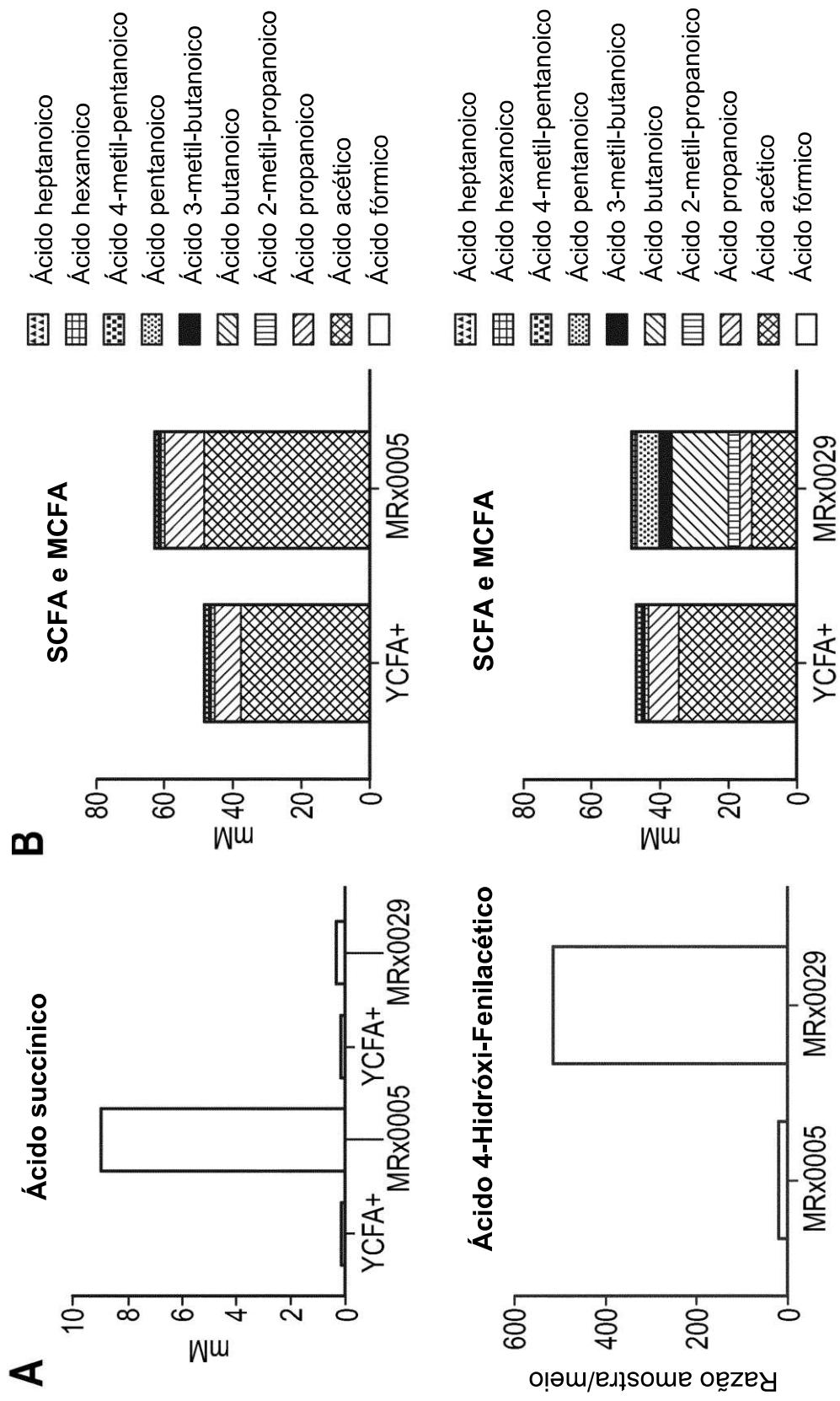
**FIG. 15C****FIG. 15D**

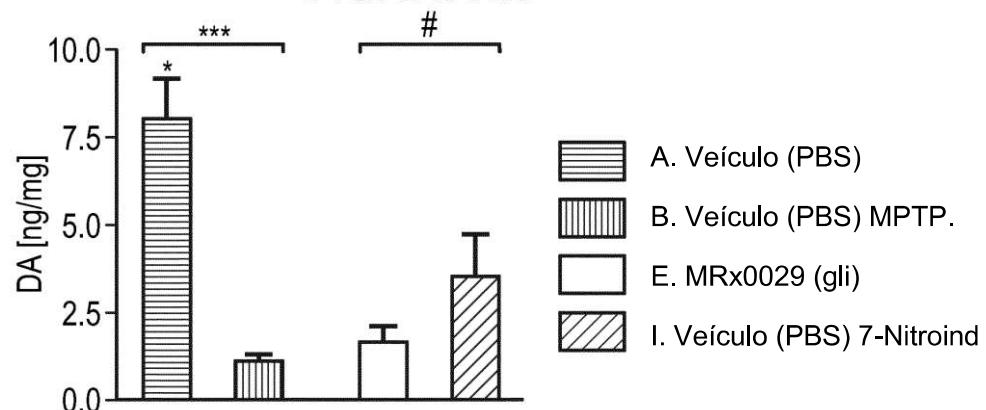
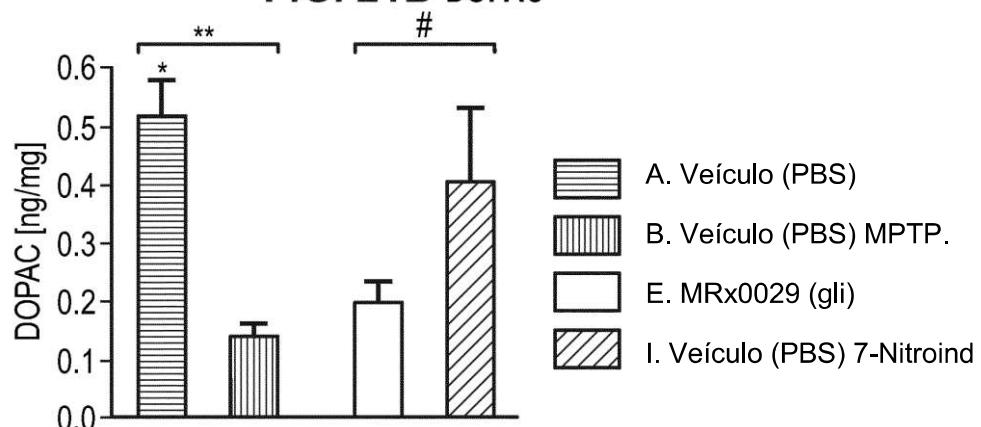
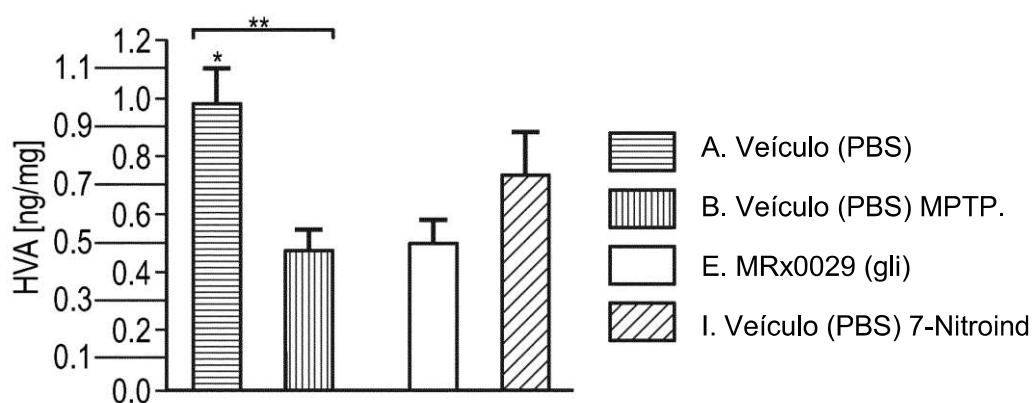
**FIG. 16** Ensaio de Indol**FIG. 18** Secreção de BDNF de SH-SY-5Y**FIG. 17** Ensaio de Quinurenina

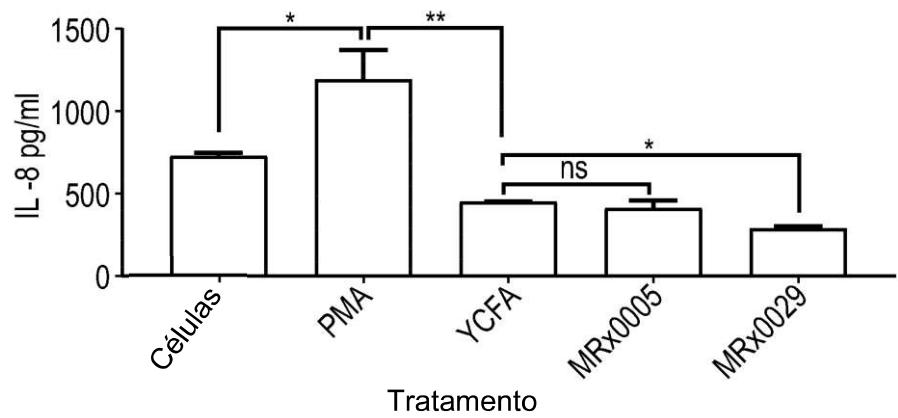
**FIG. 19** Produção de neurotransmissores no cérebro

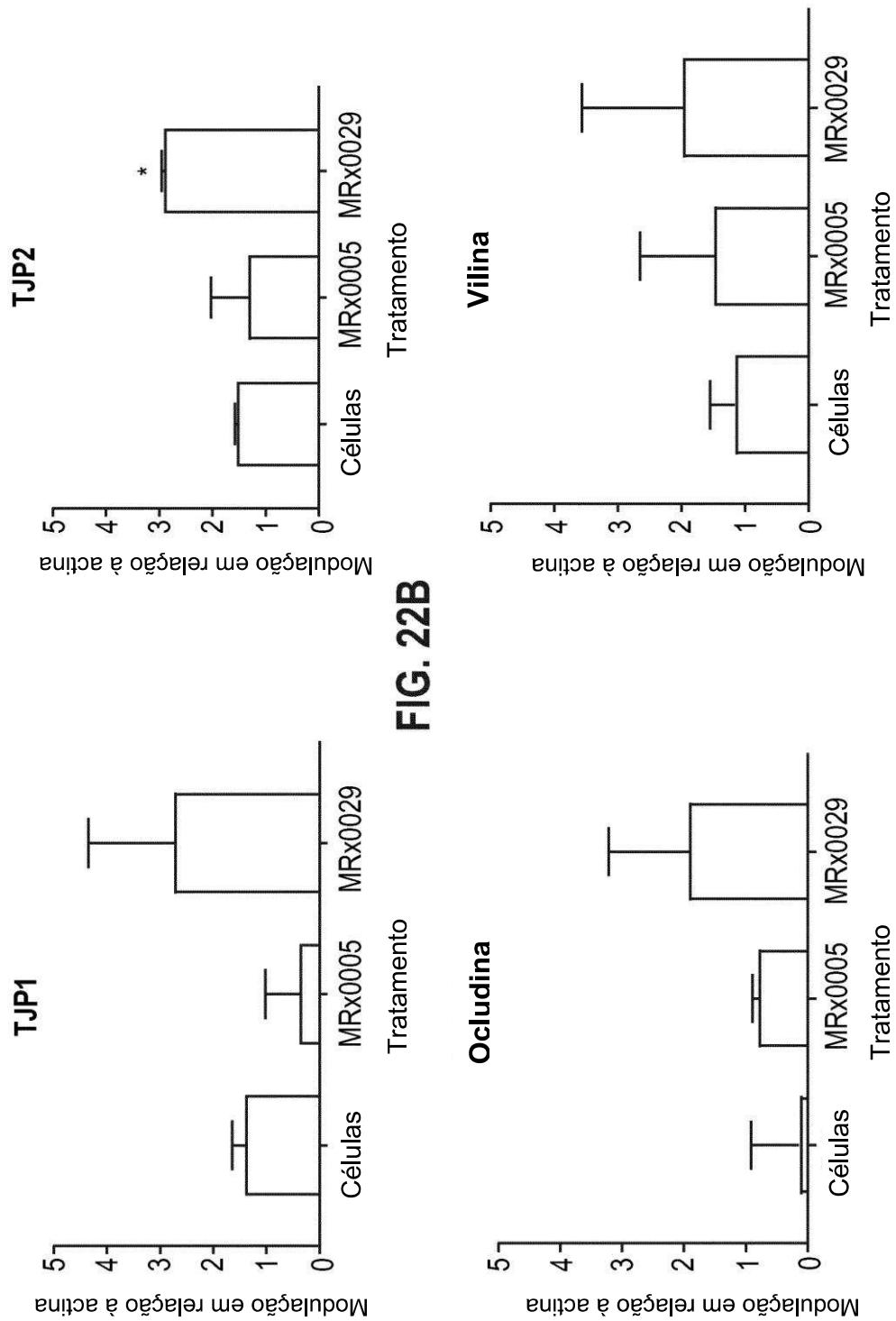


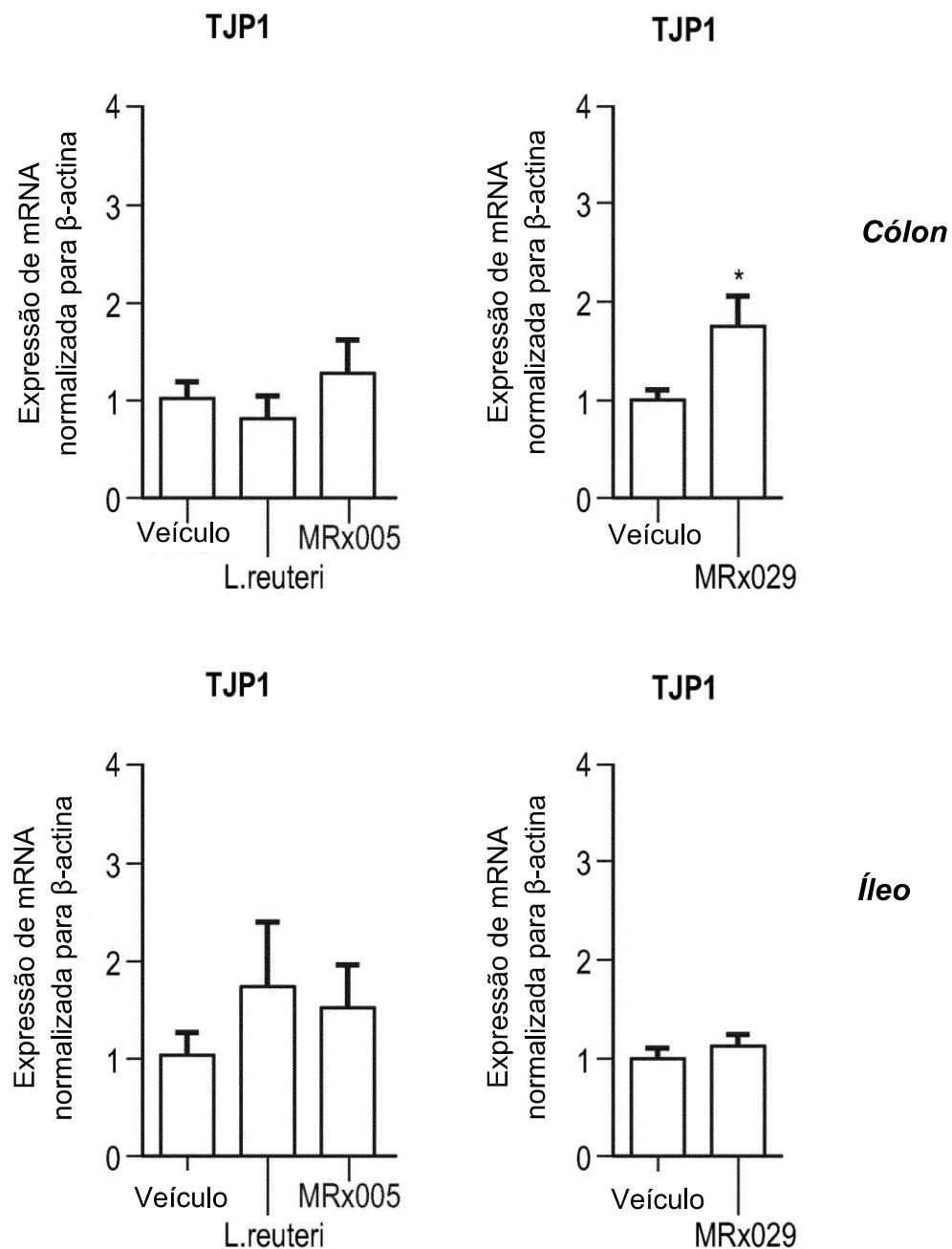
**FIG. 20** Metabólitos bacterianos no sobrenadante

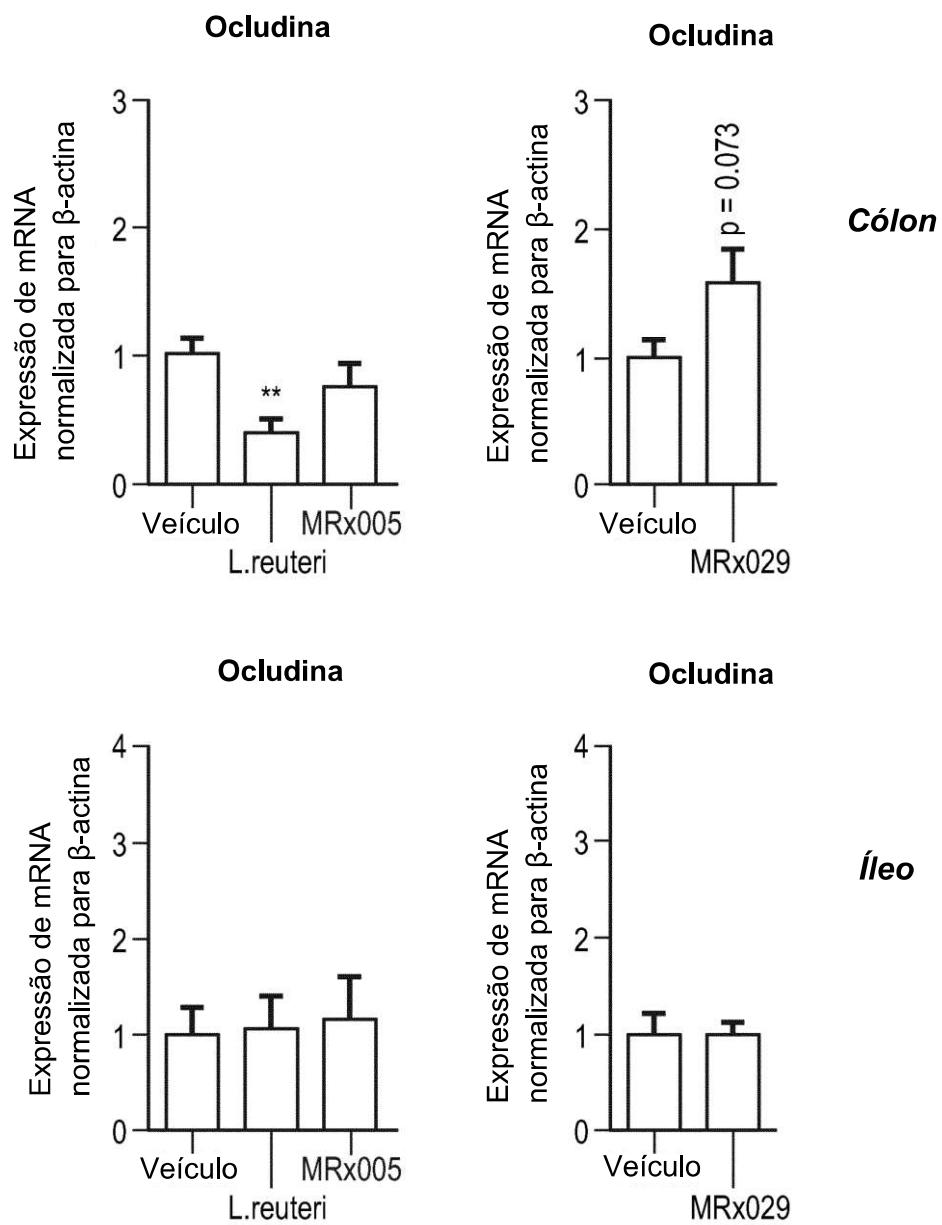


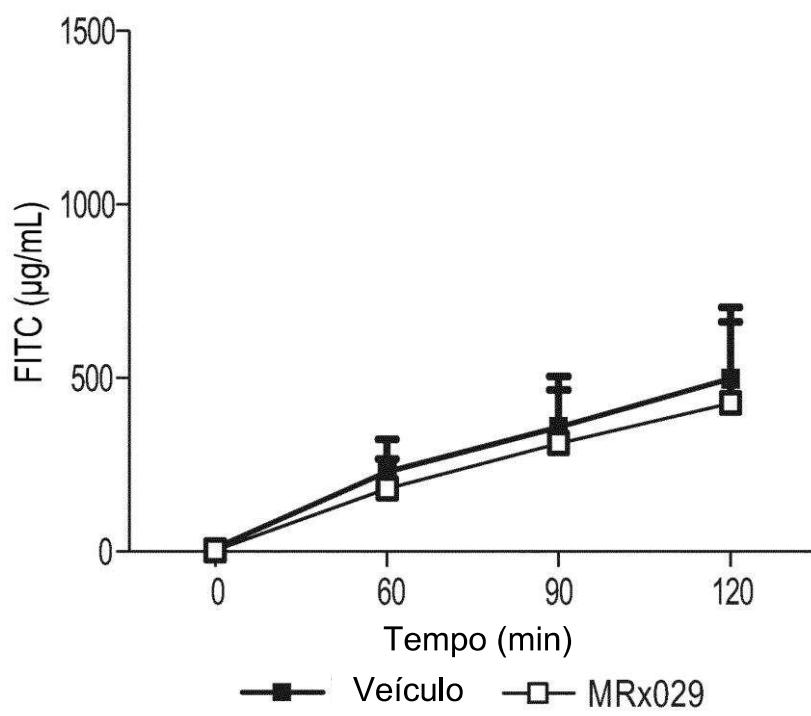
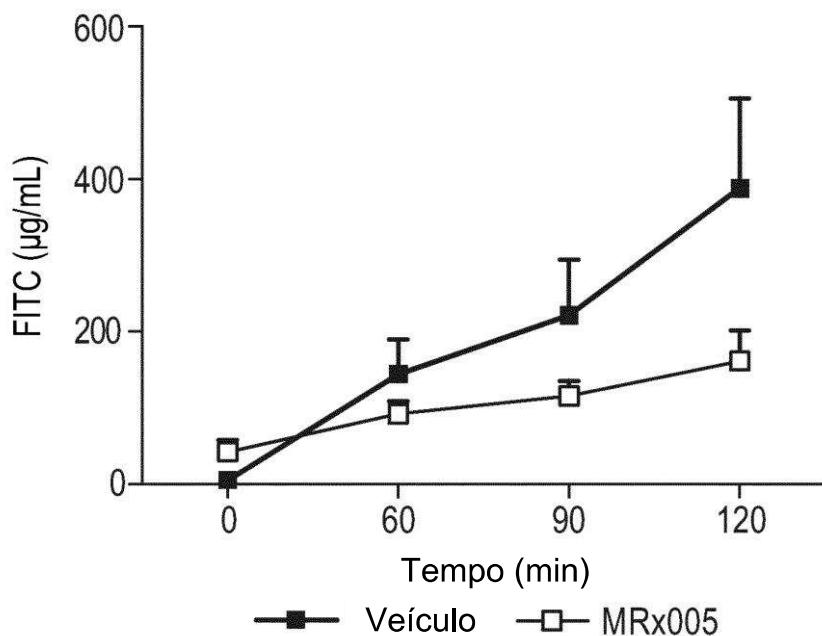
**FIG. 21A DA****FIG. 21B DOPAC****FIG. 21C HVA**

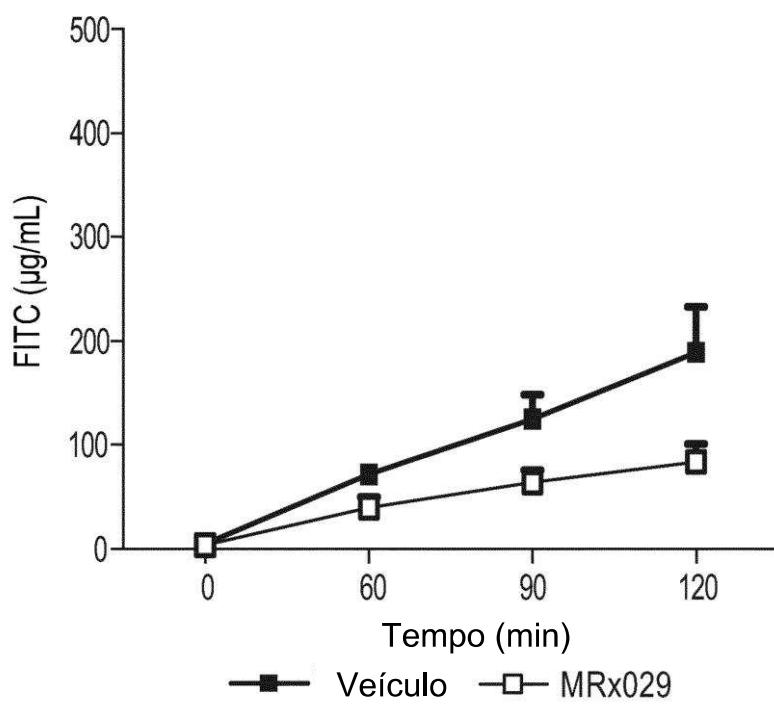
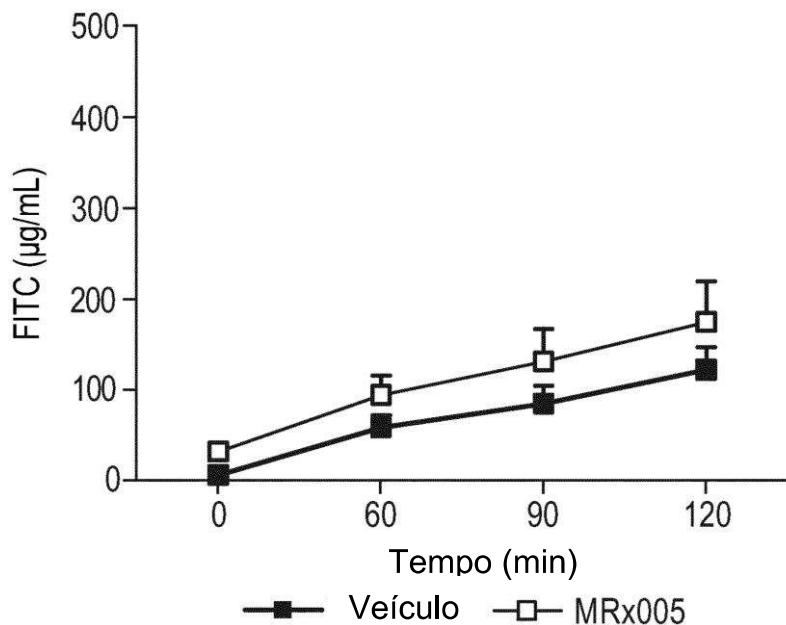
**FIG. 22A**

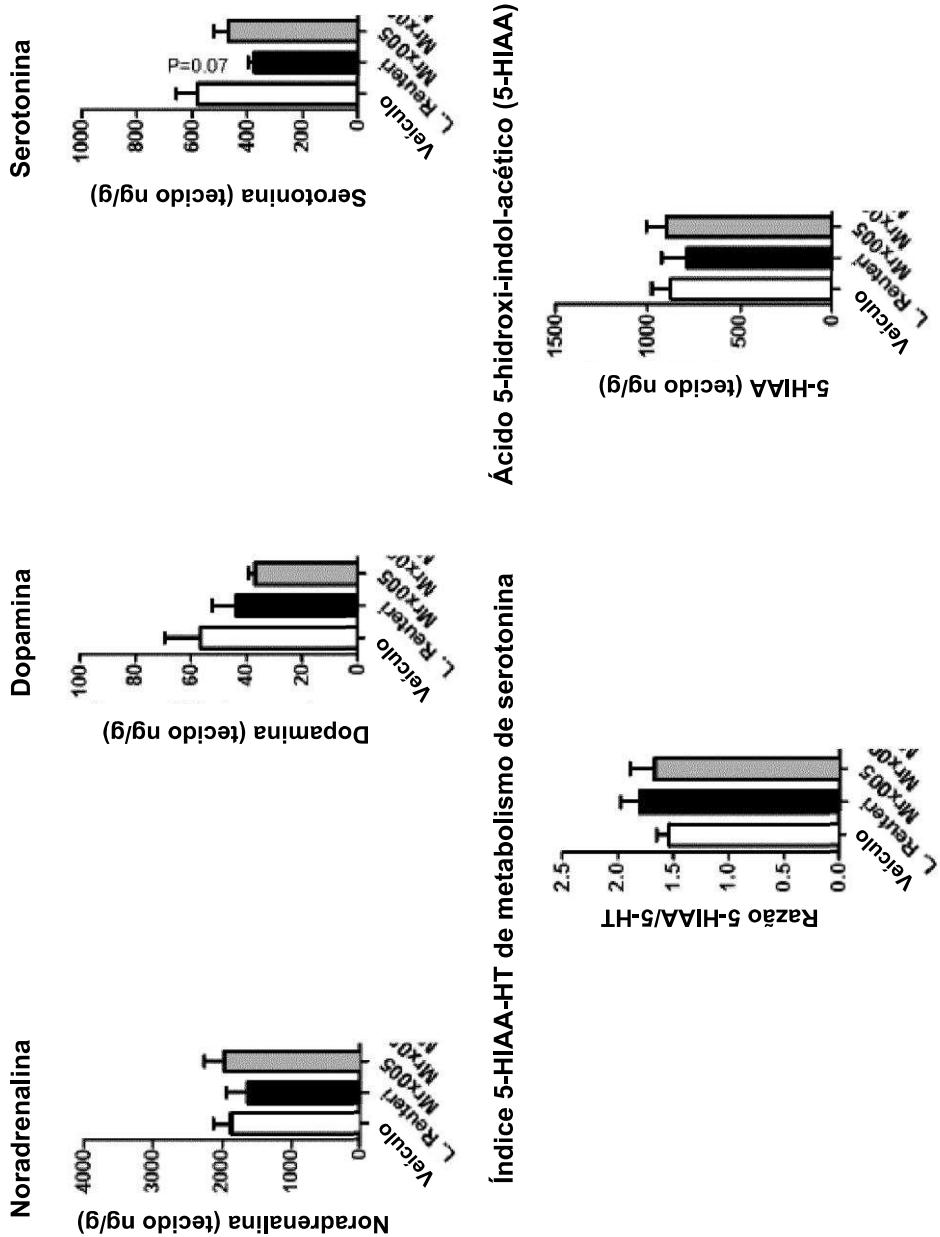


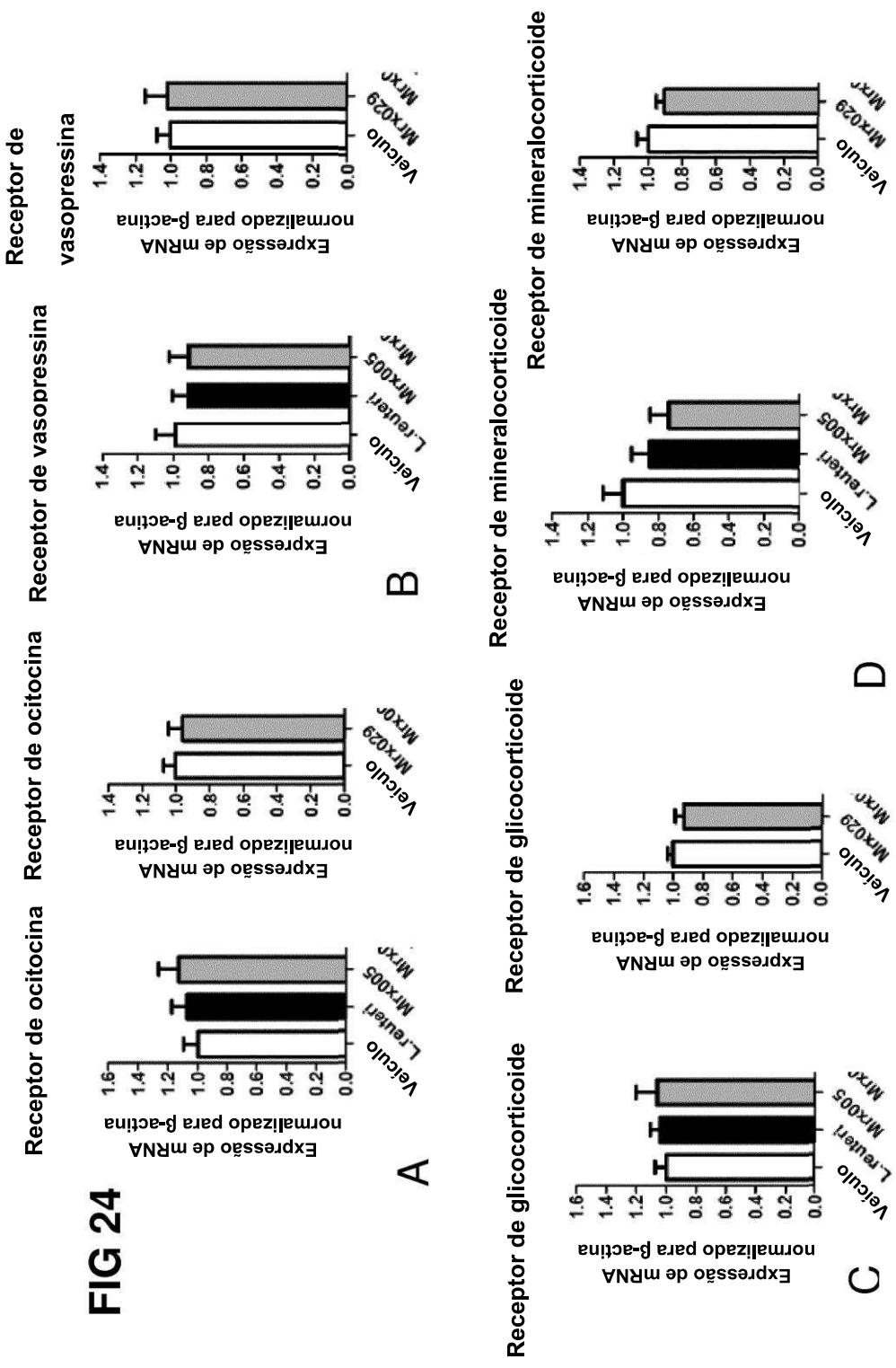
**FIG. 22C**

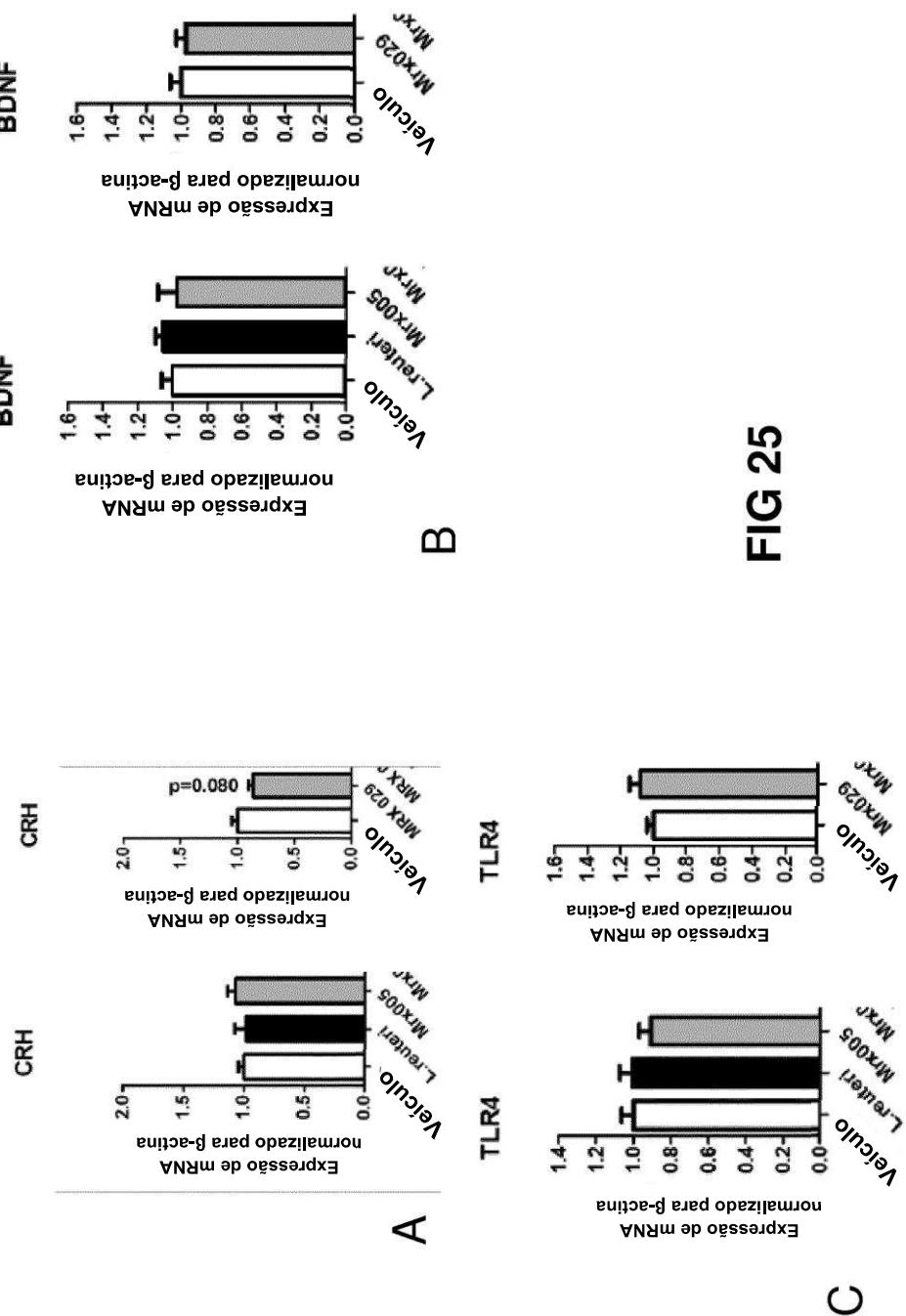
**FIG. 22D**

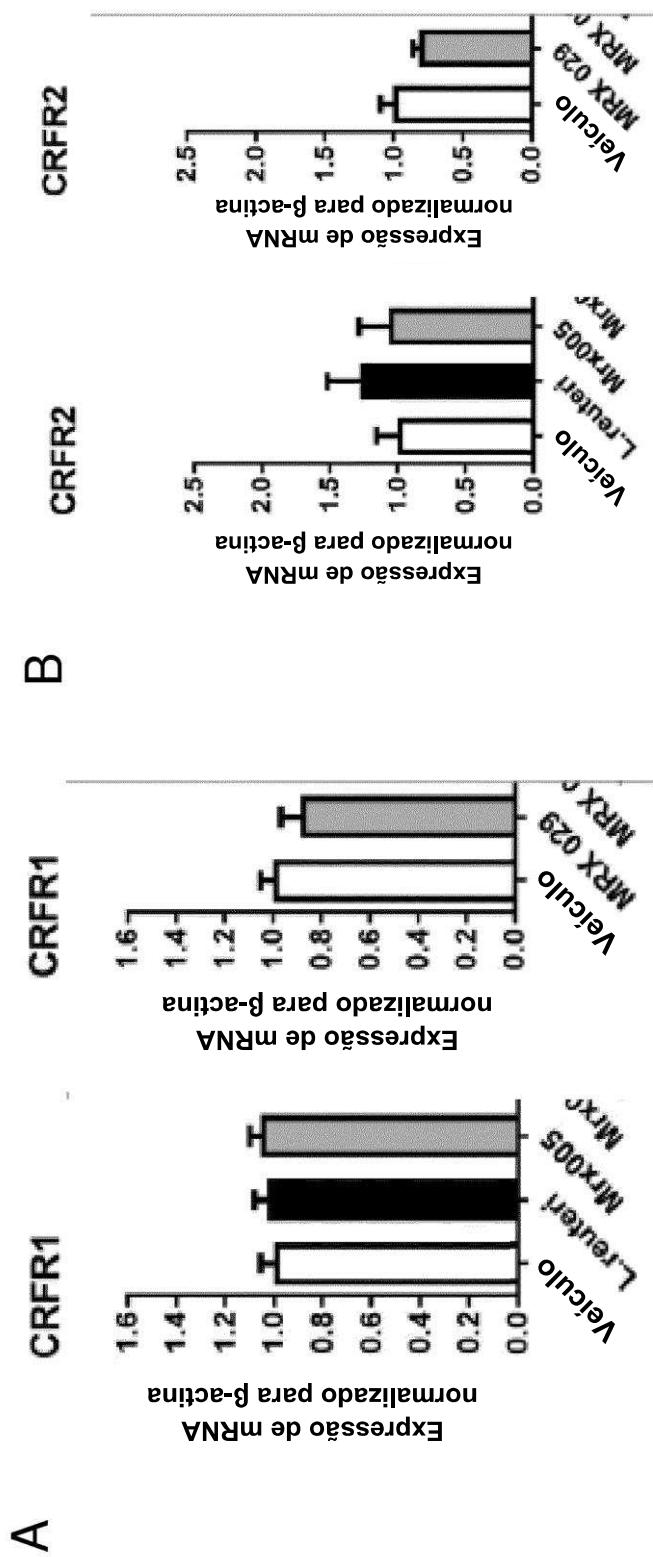
**FIG. 22E Permeabilidade no íleo**

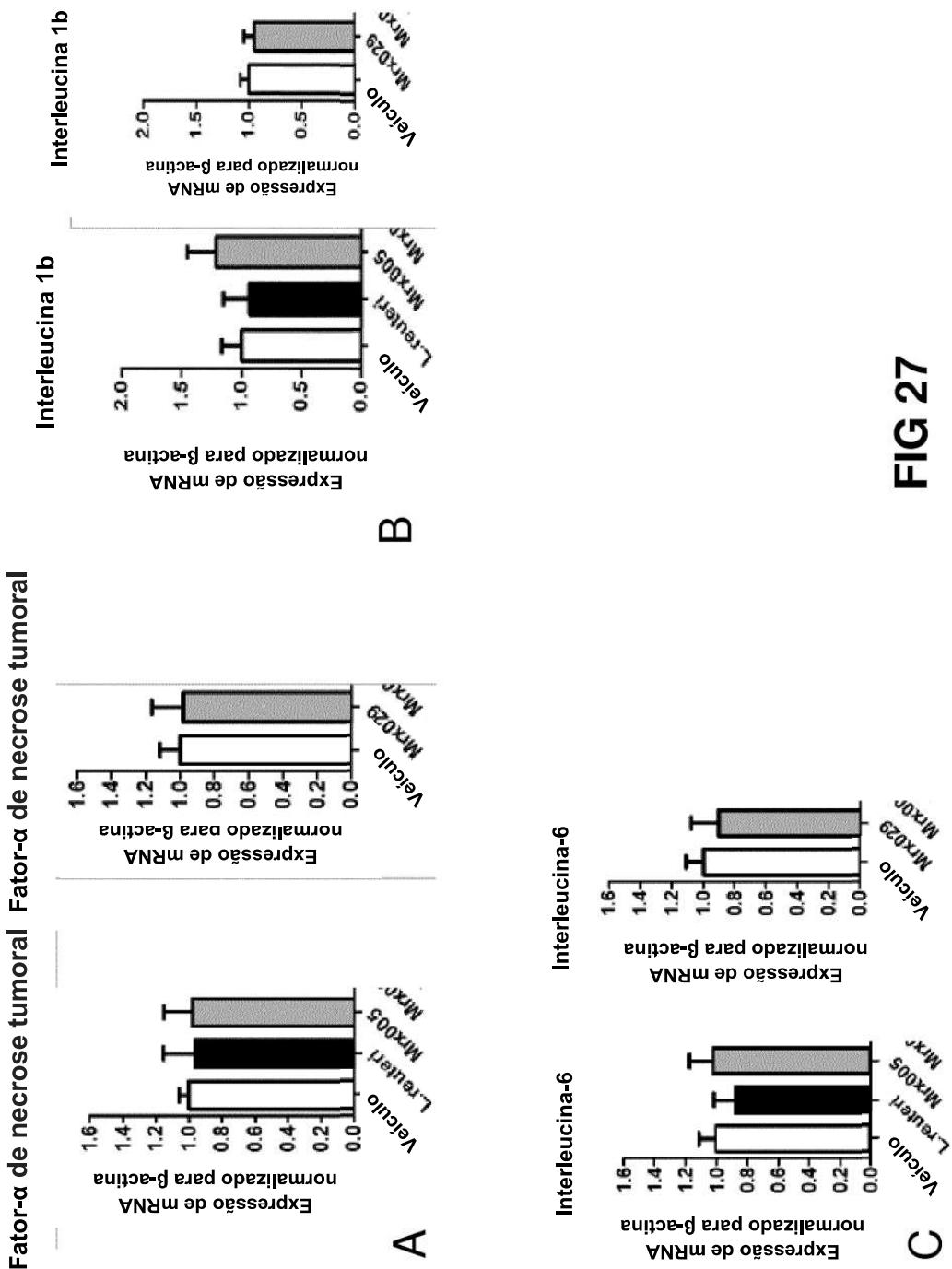
**FIG. 22F Permeabilidade no Côlon**

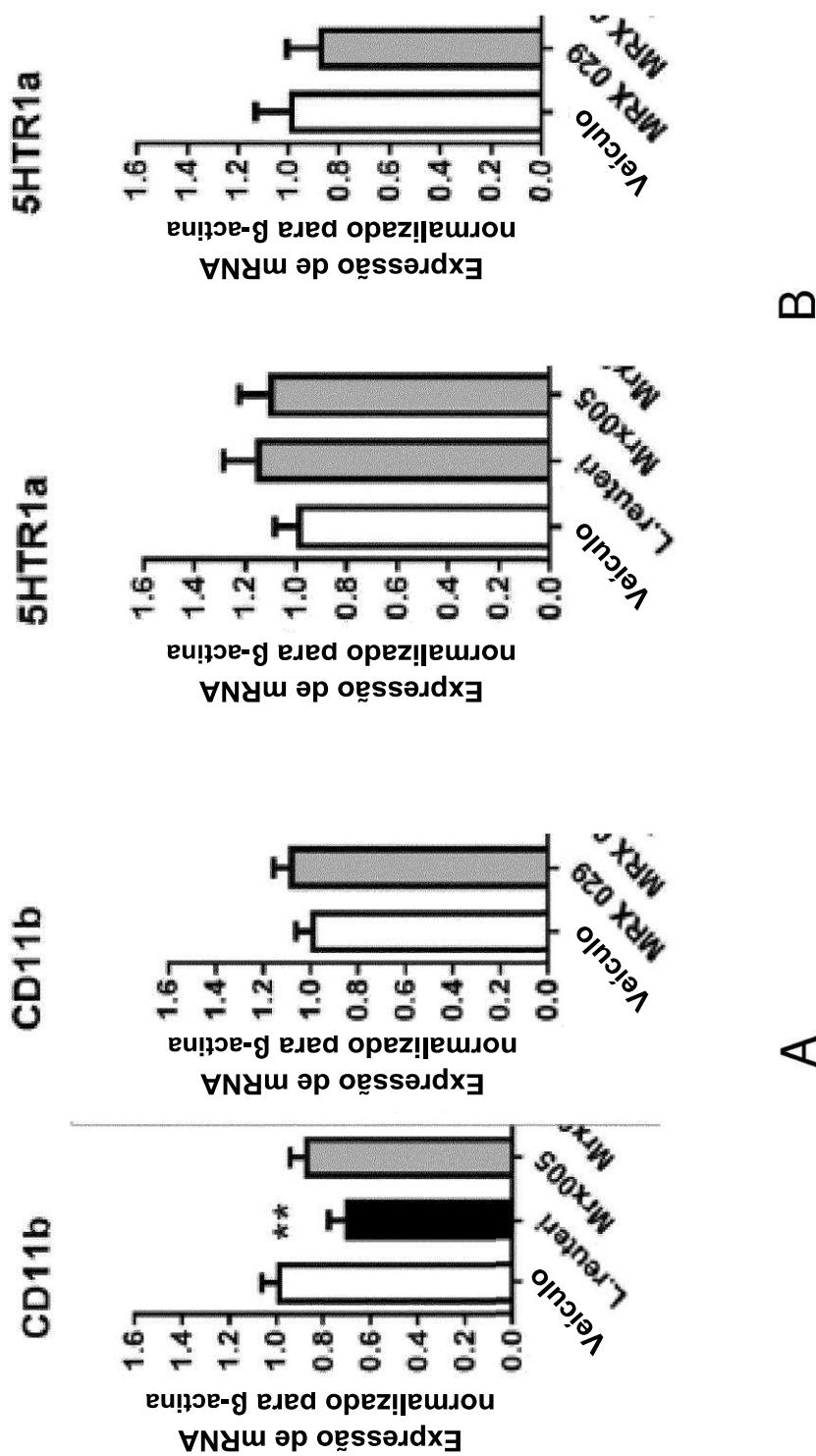
**FIG 23**

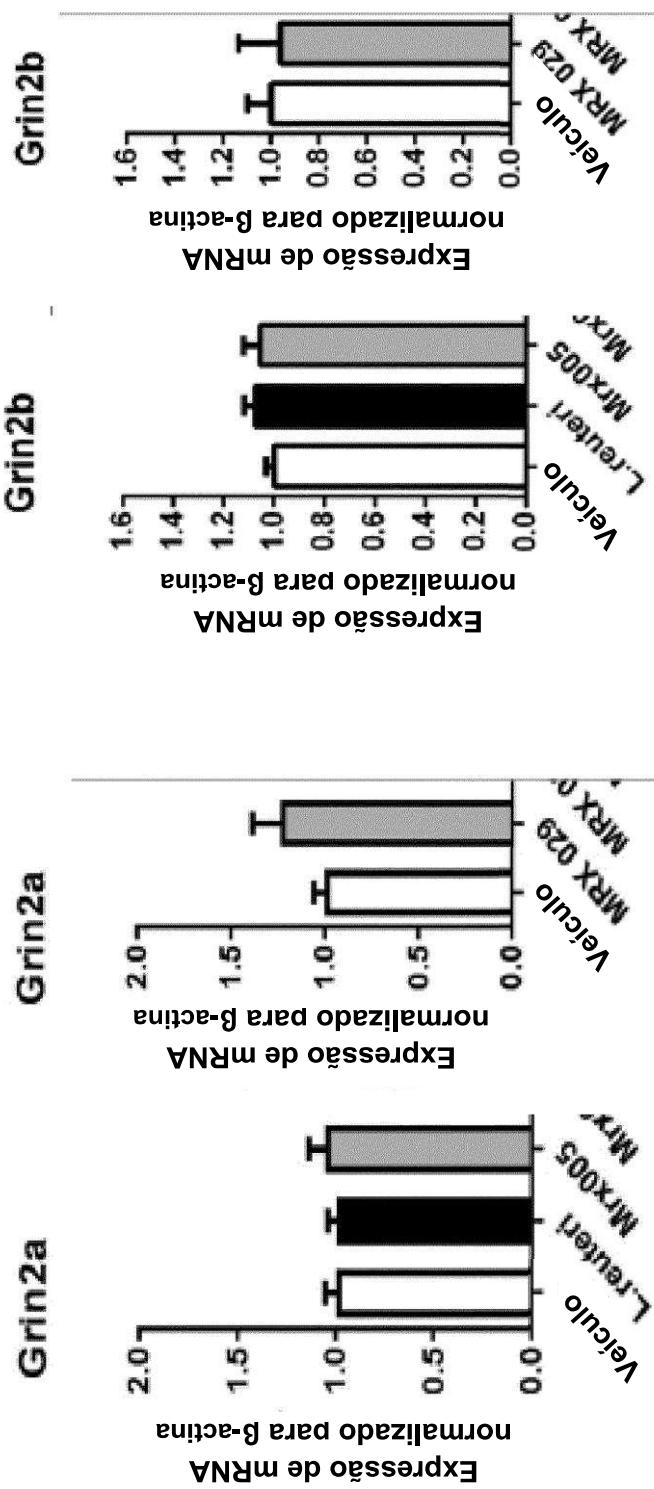
**FIG 24**

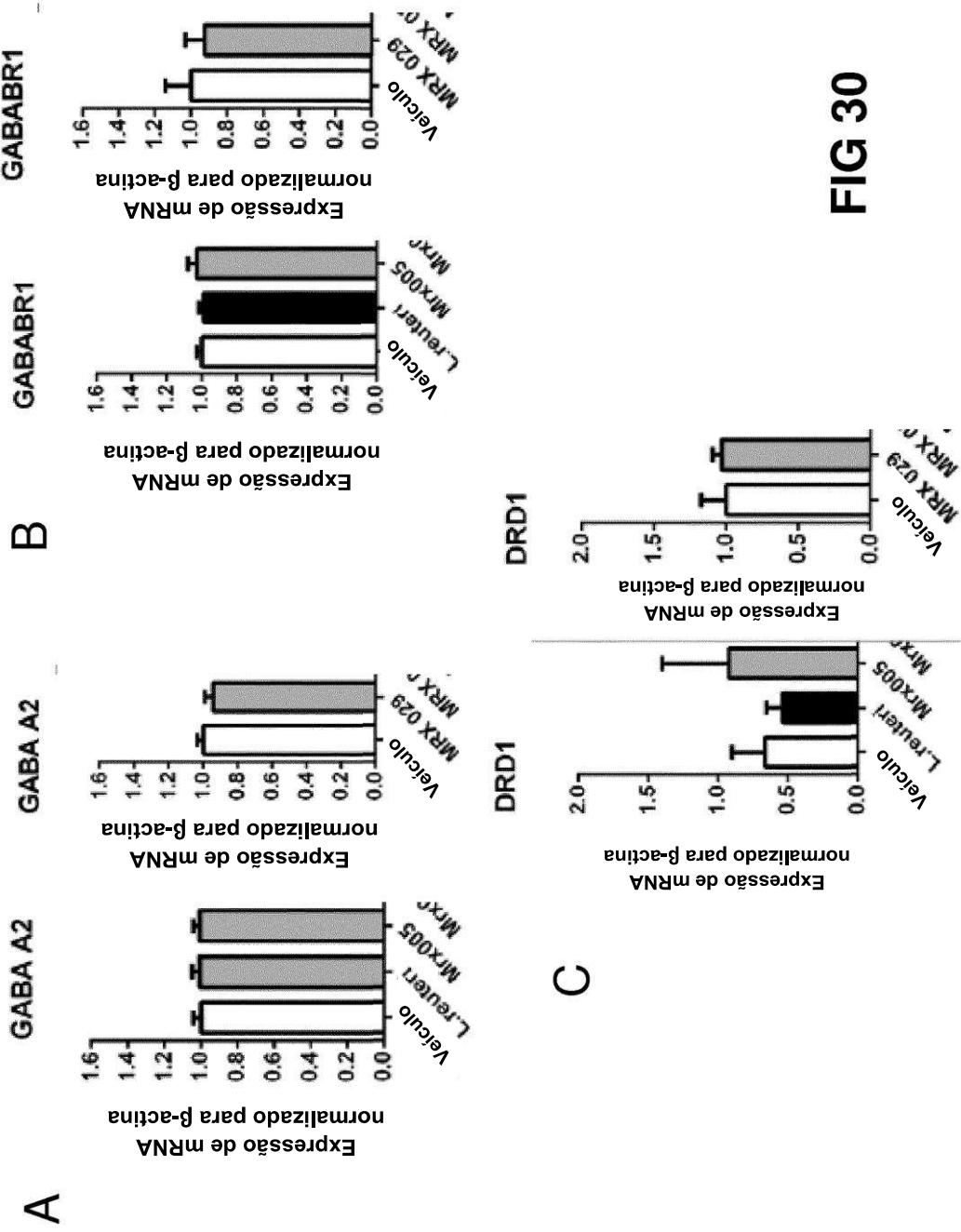
**FIG 25**

**FIG 26**





**FIG 29****B**



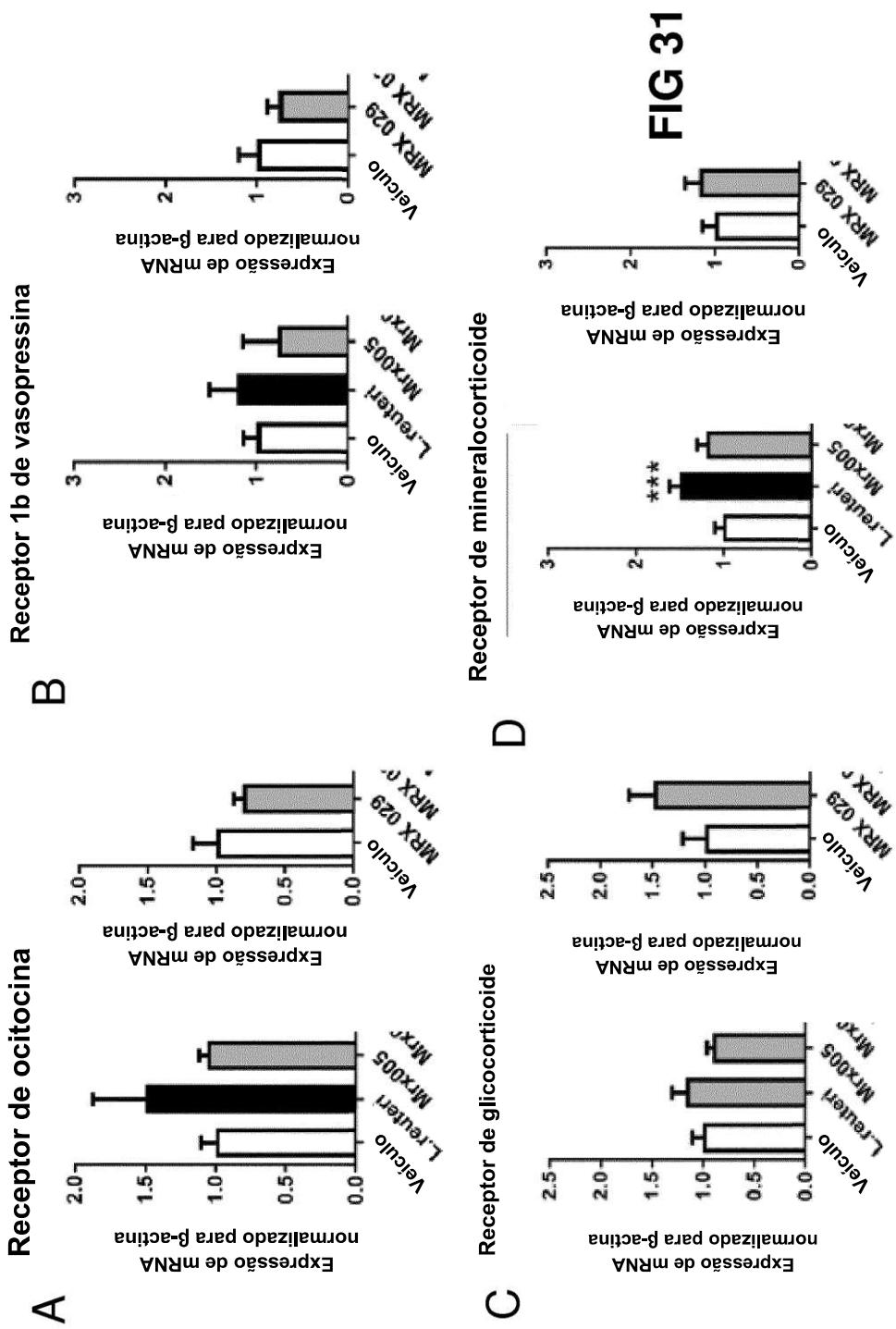
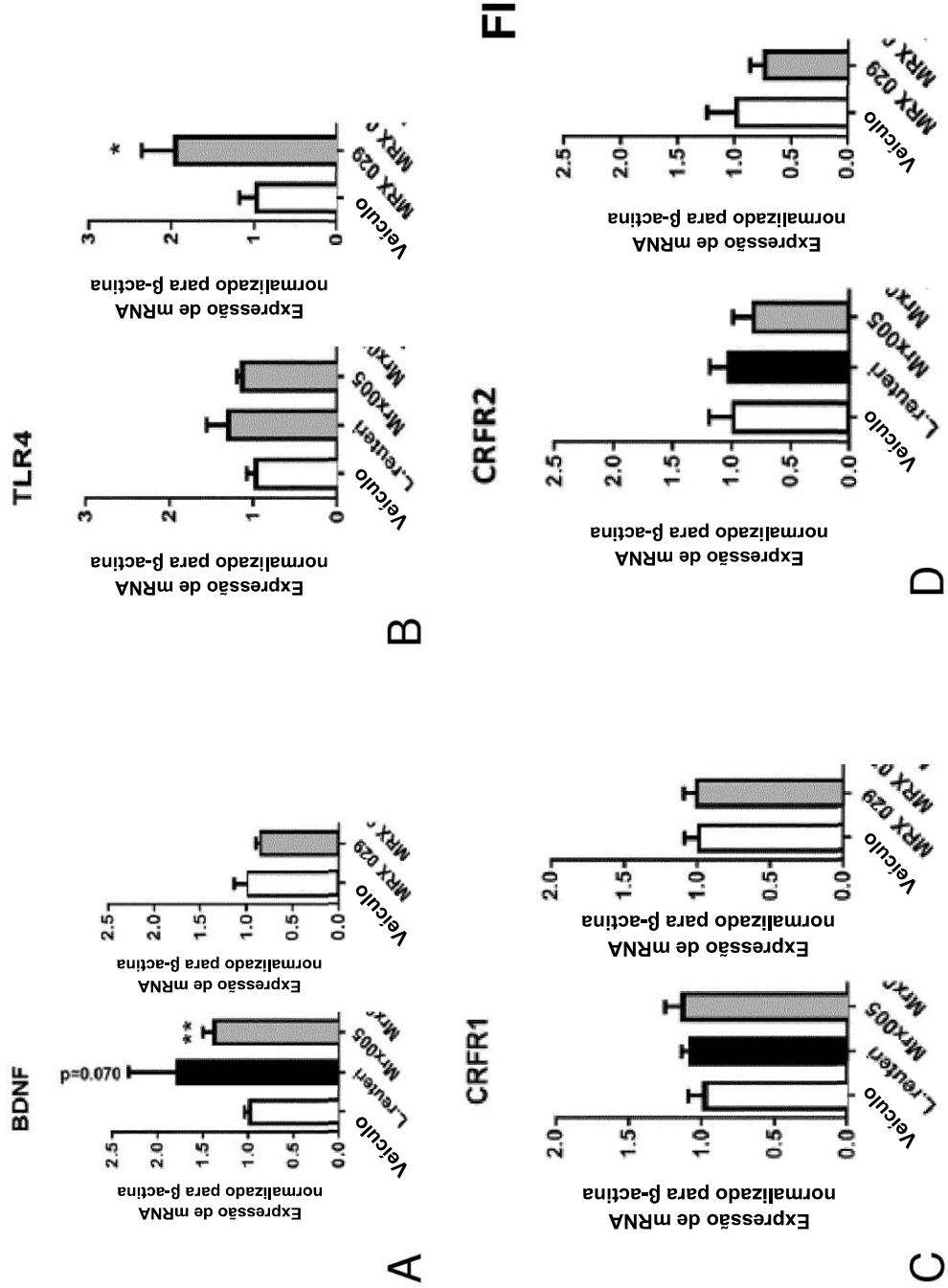
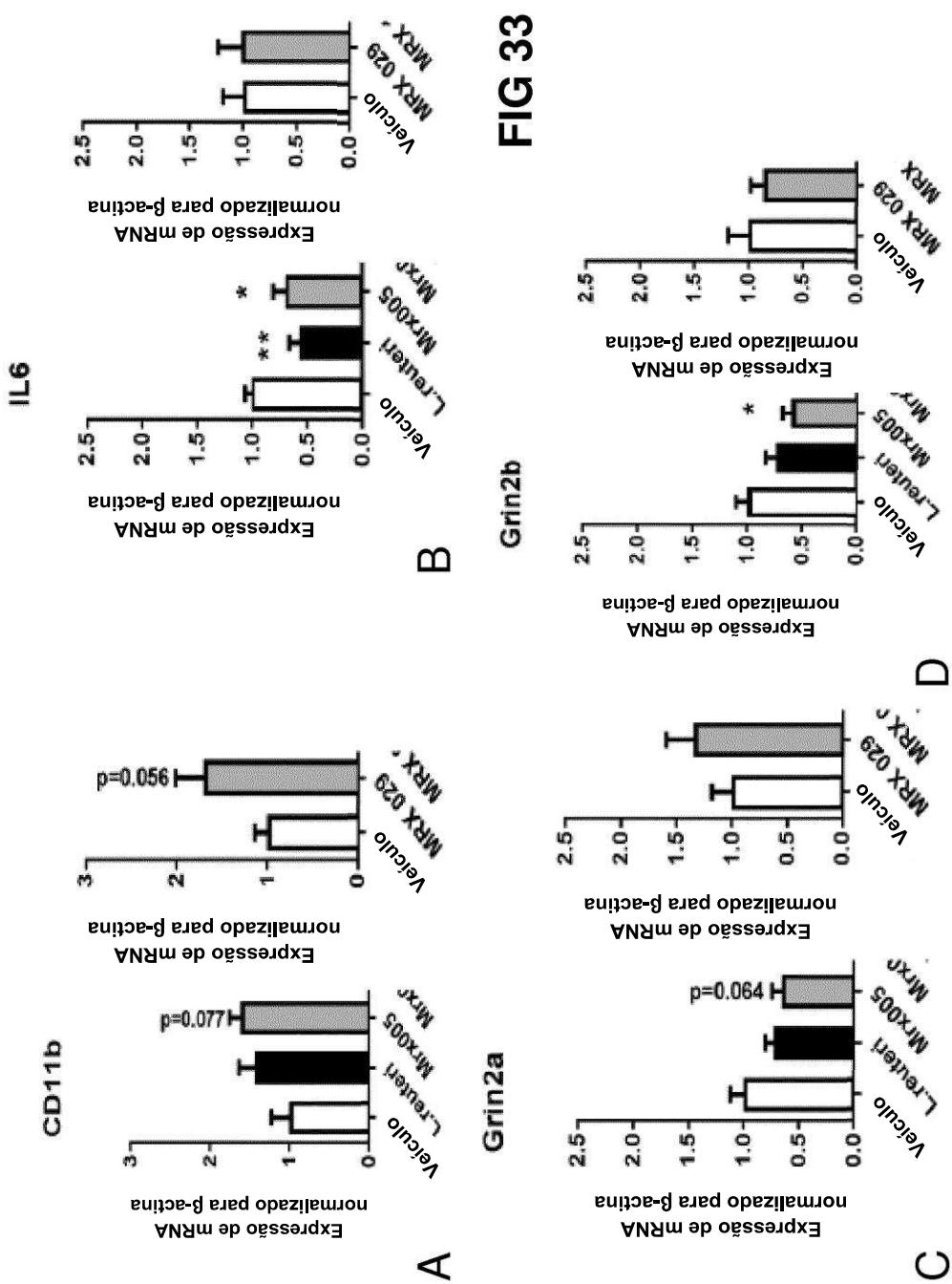
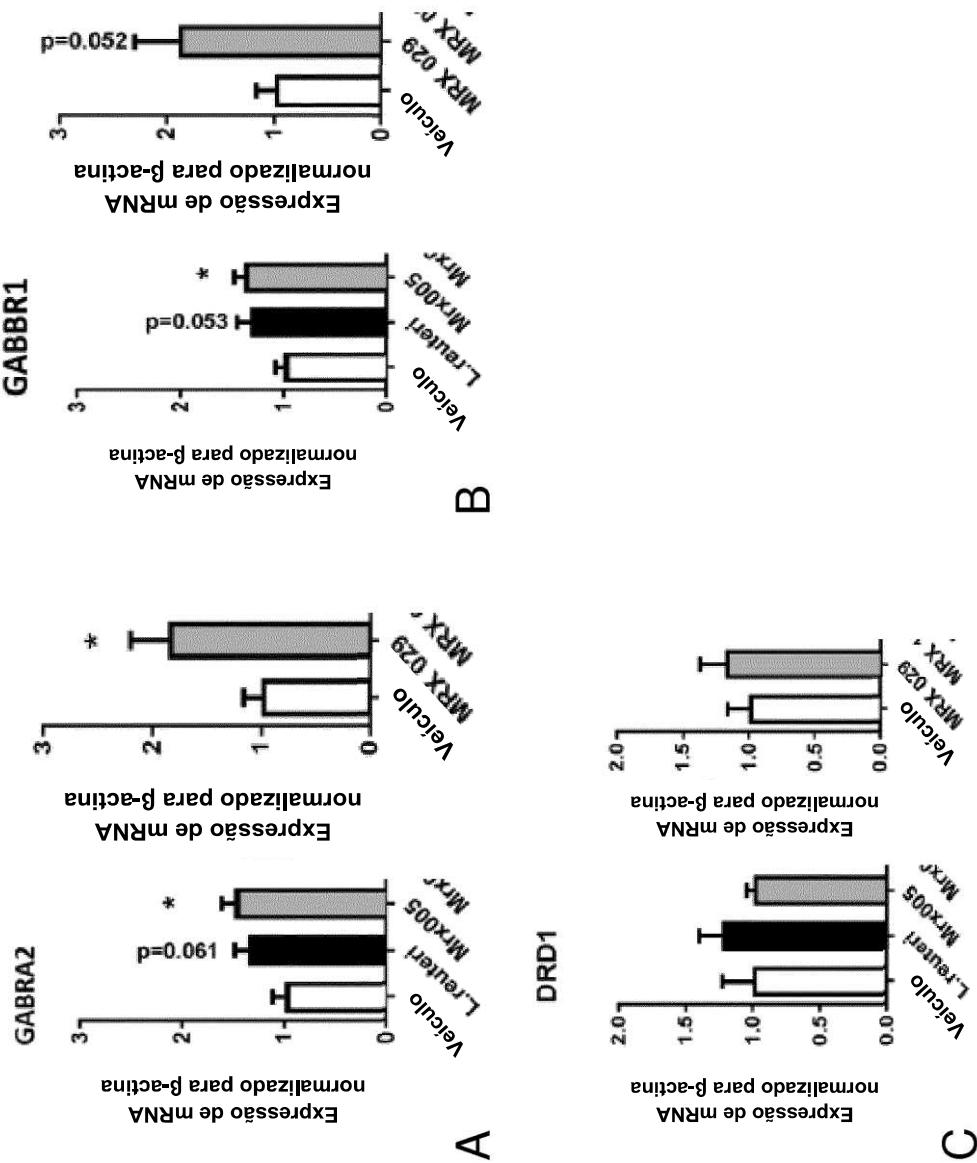


FIG 32





**FIG 34**

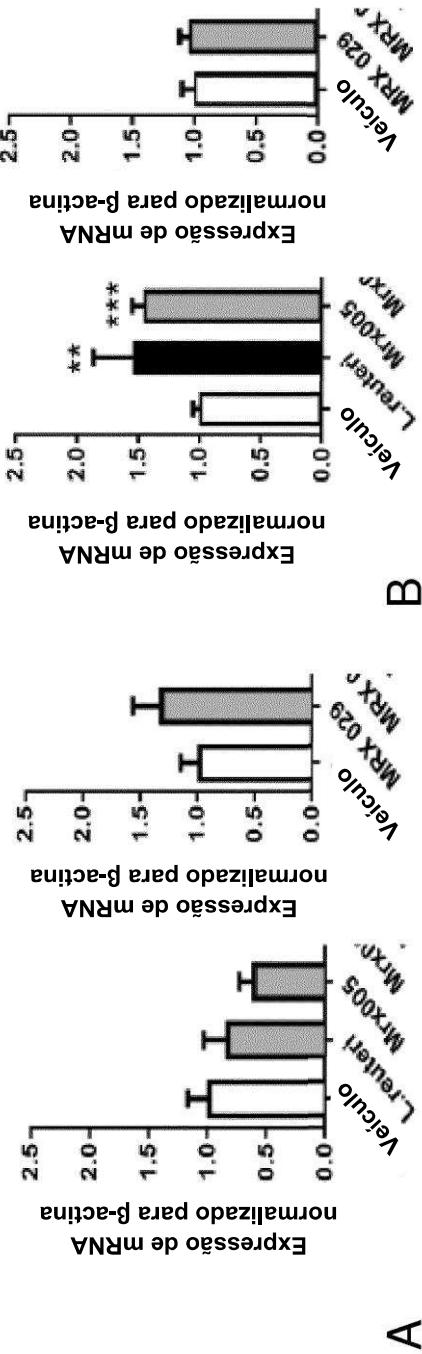
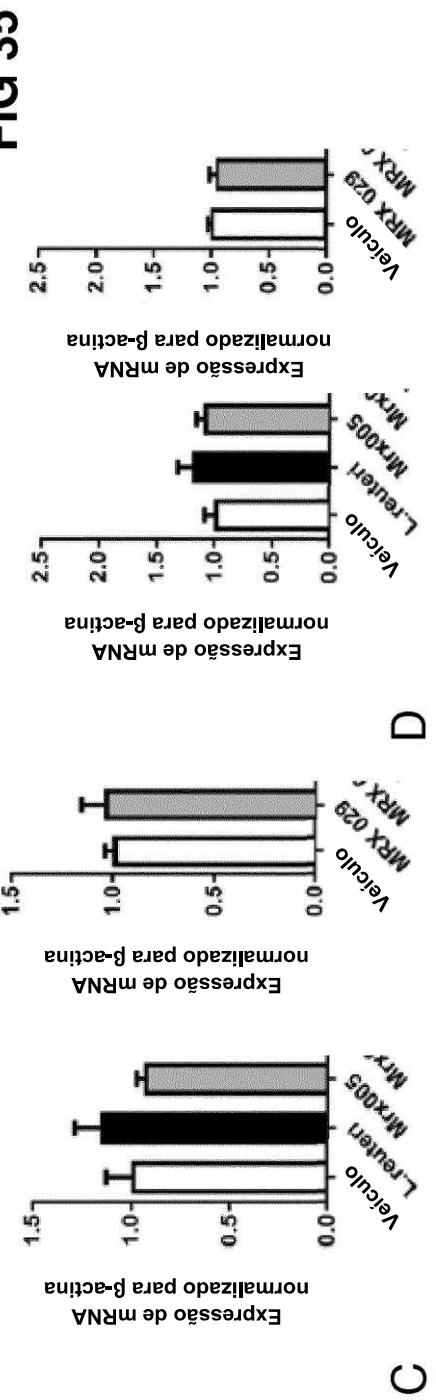
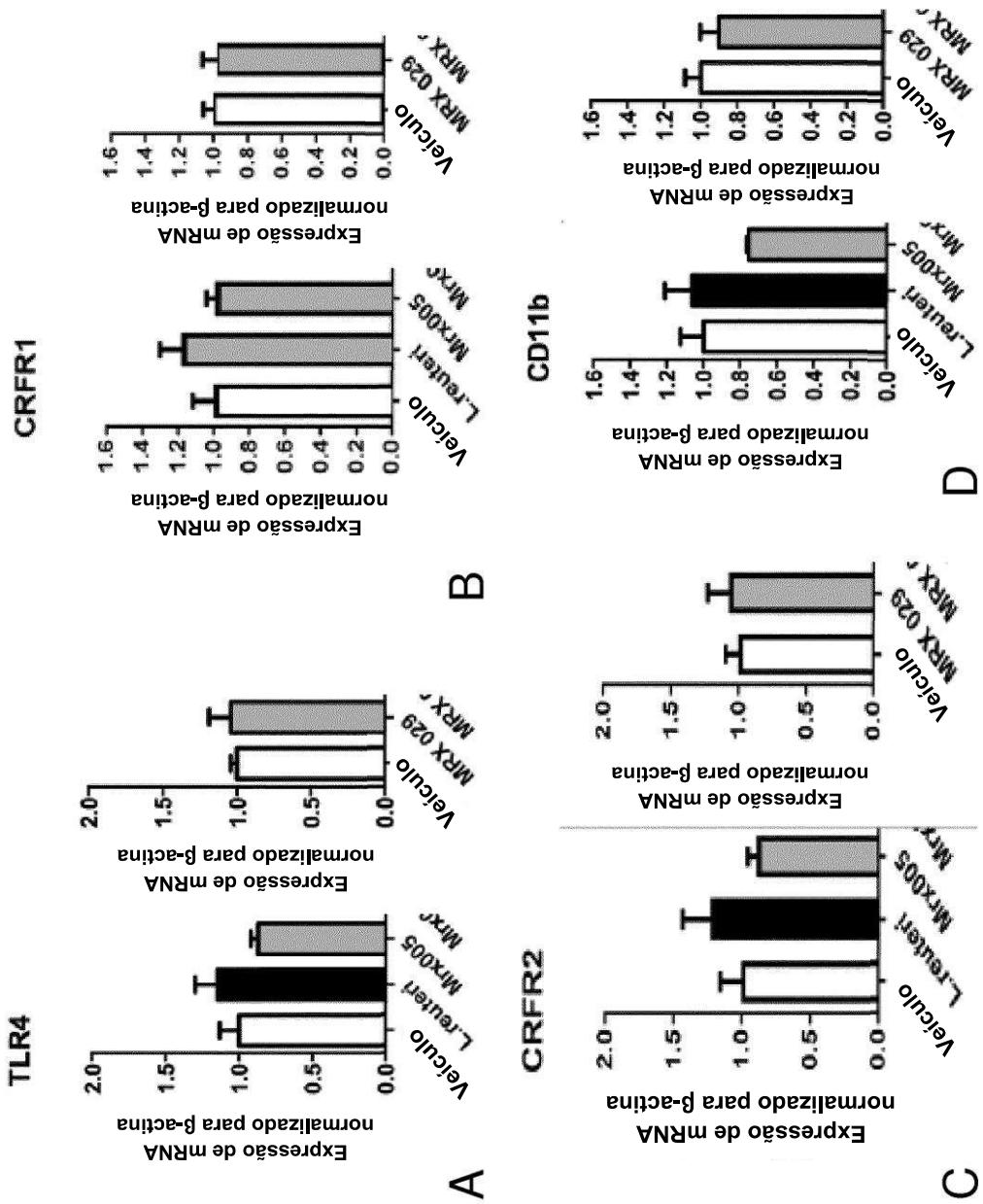
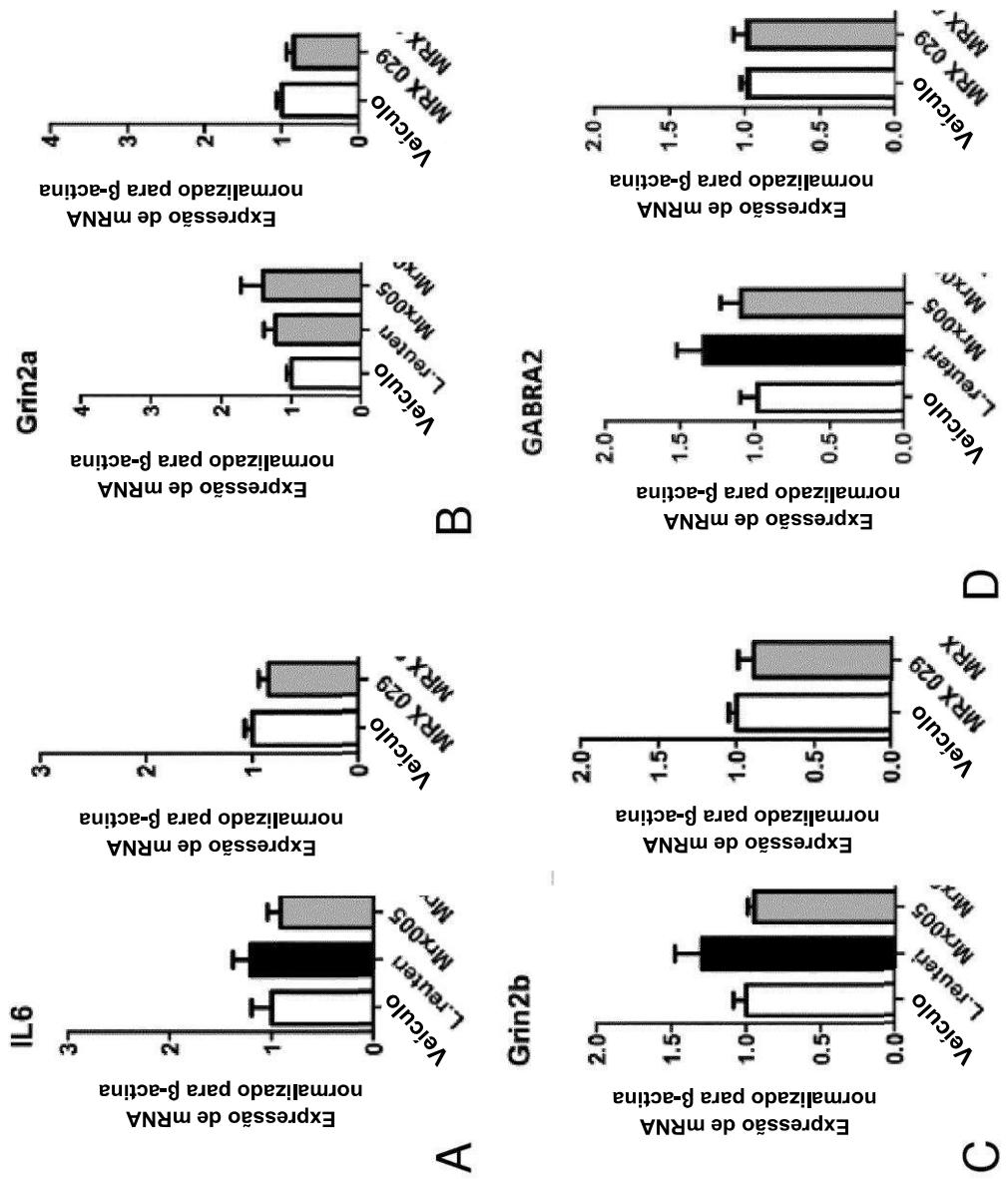
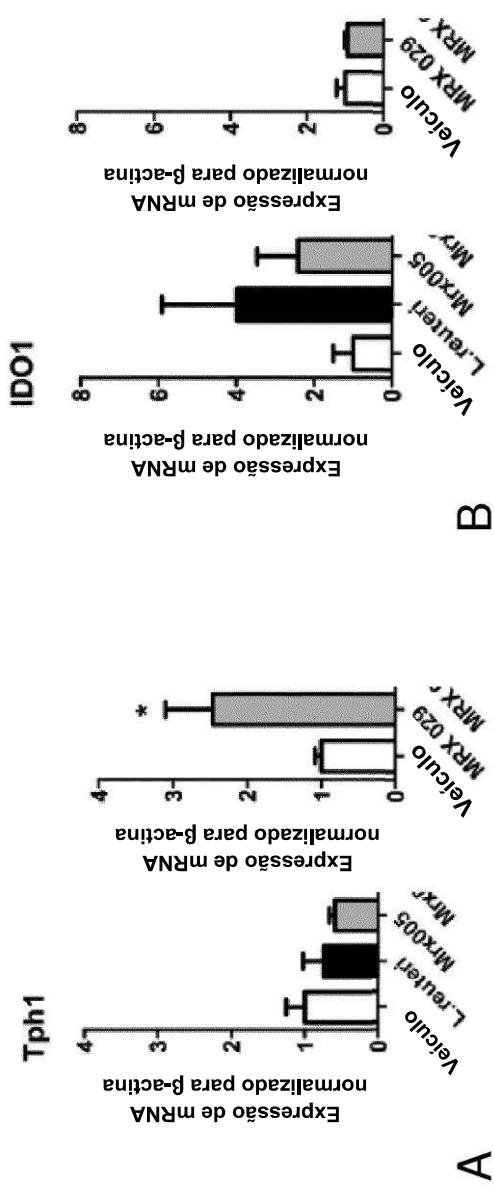
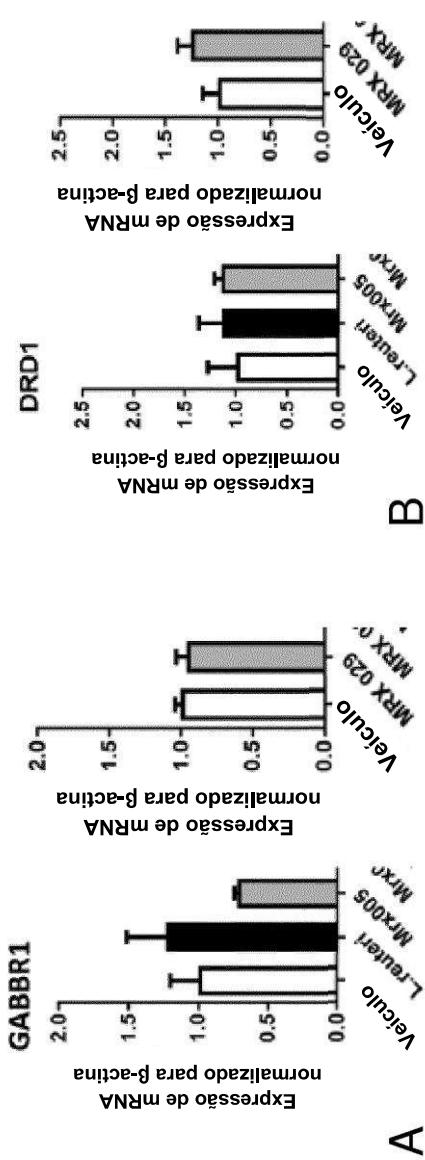
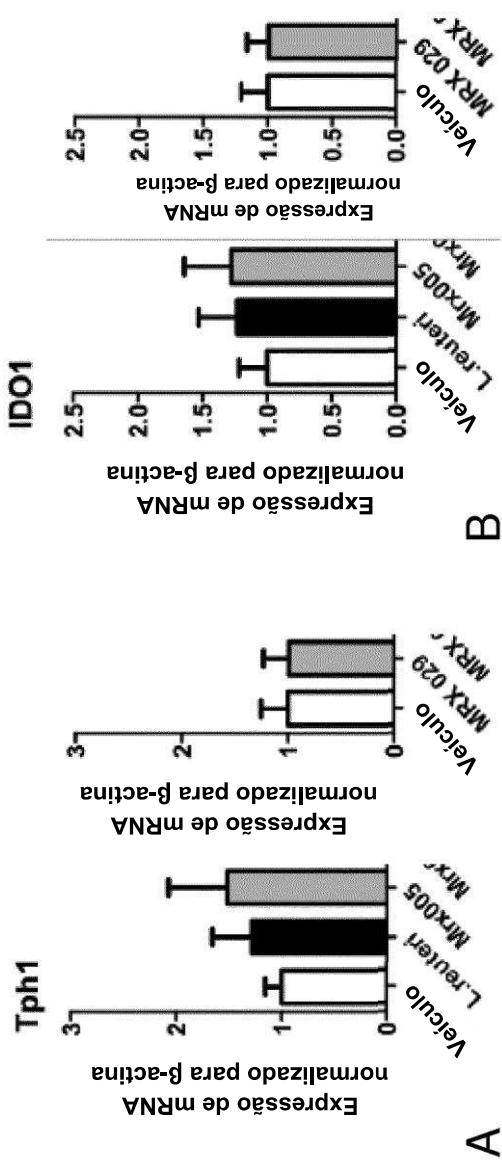
**Receptor de Oxitocina****Receptor de mineralocorticoide****FIG 35**

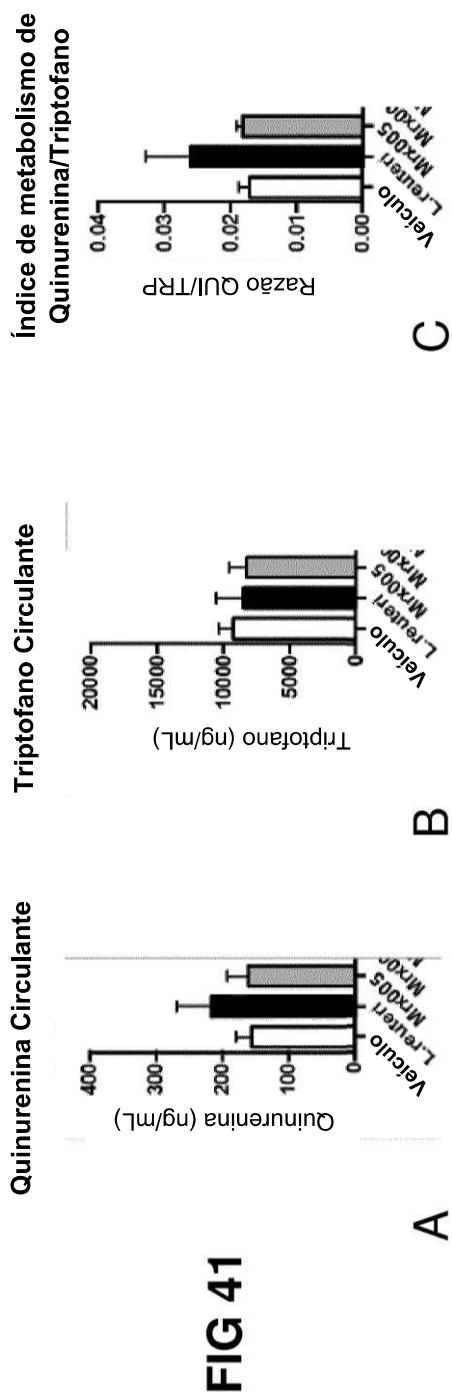
FIG 36

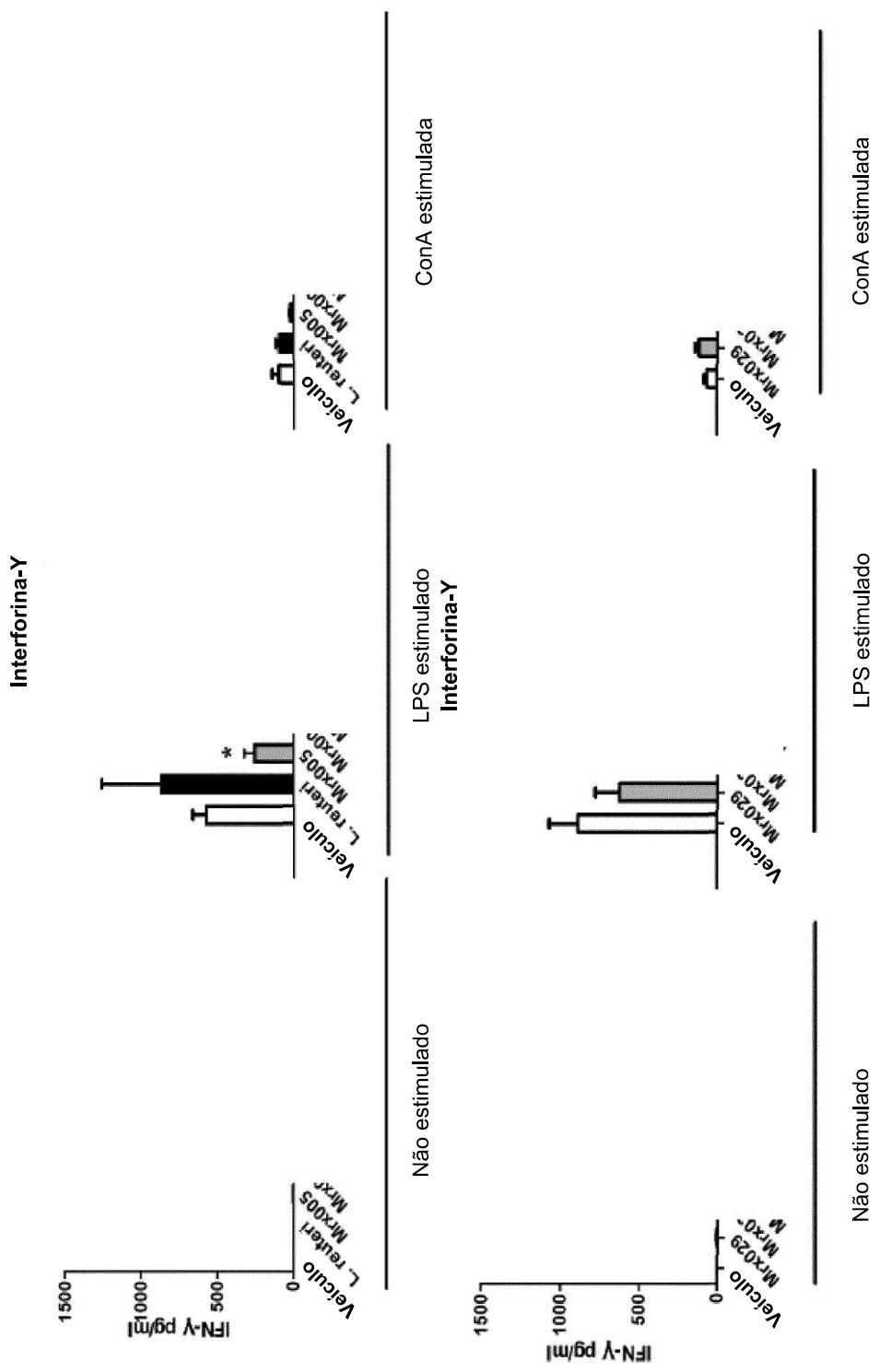


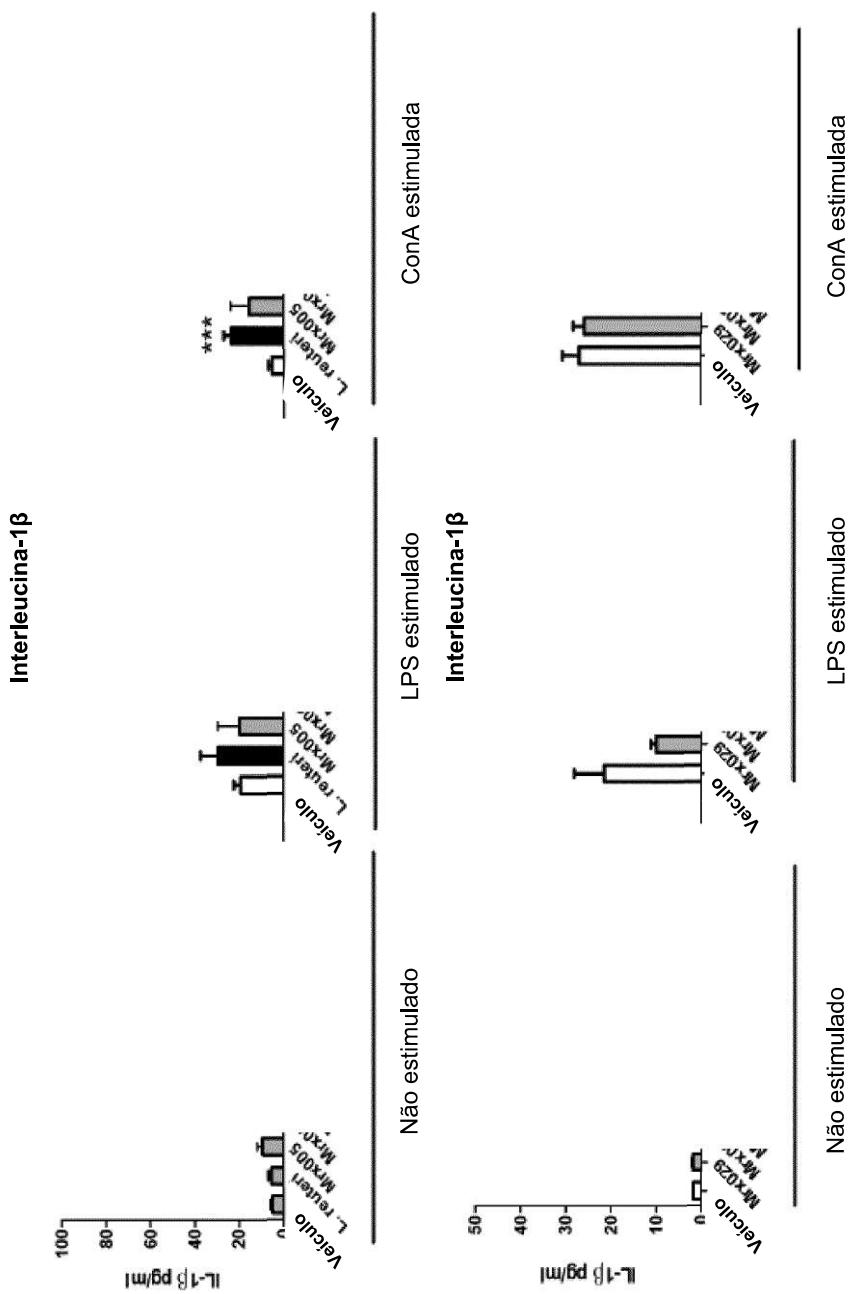
**FIG 37**

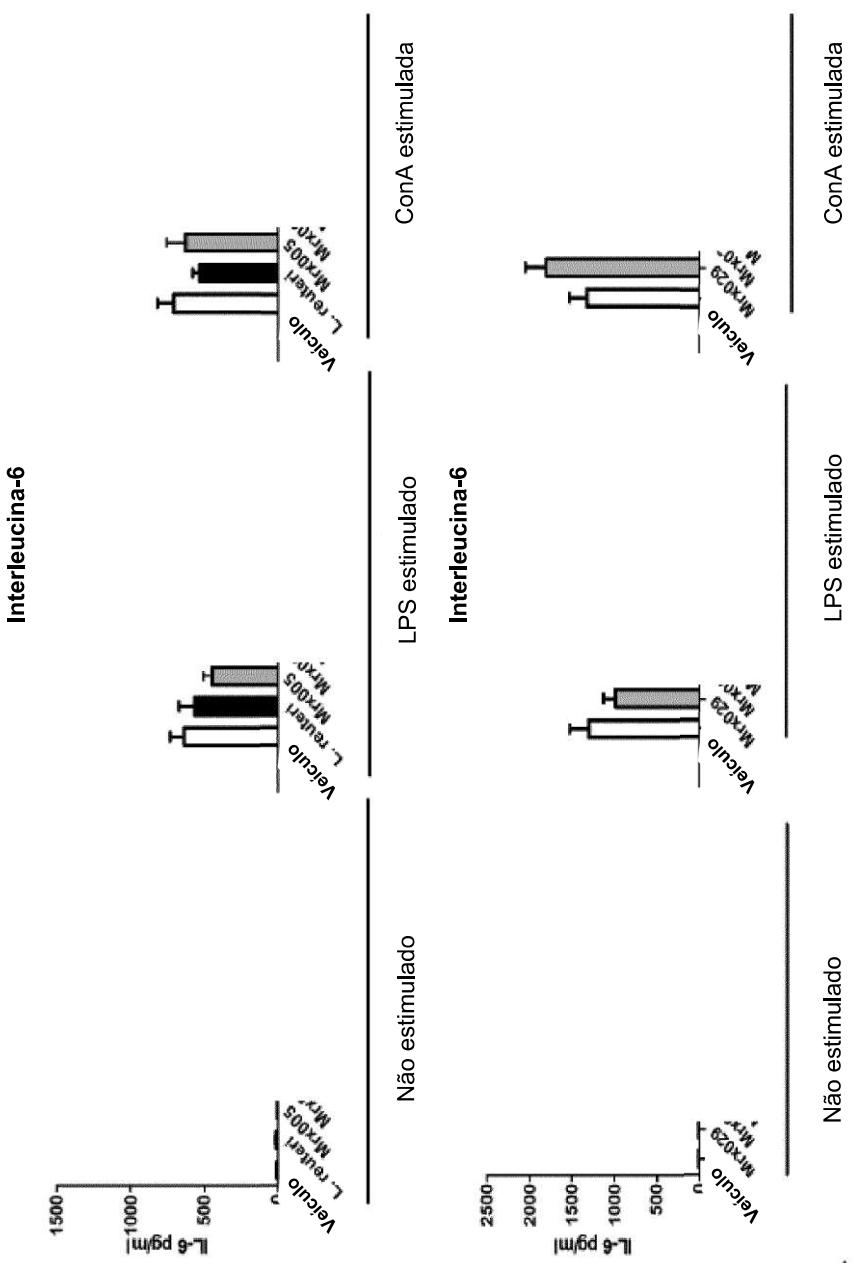
**FIG 39****FIG 38**

**FIG 40****A**



**FIG 42**

**FIG 43**

**FIG 44**

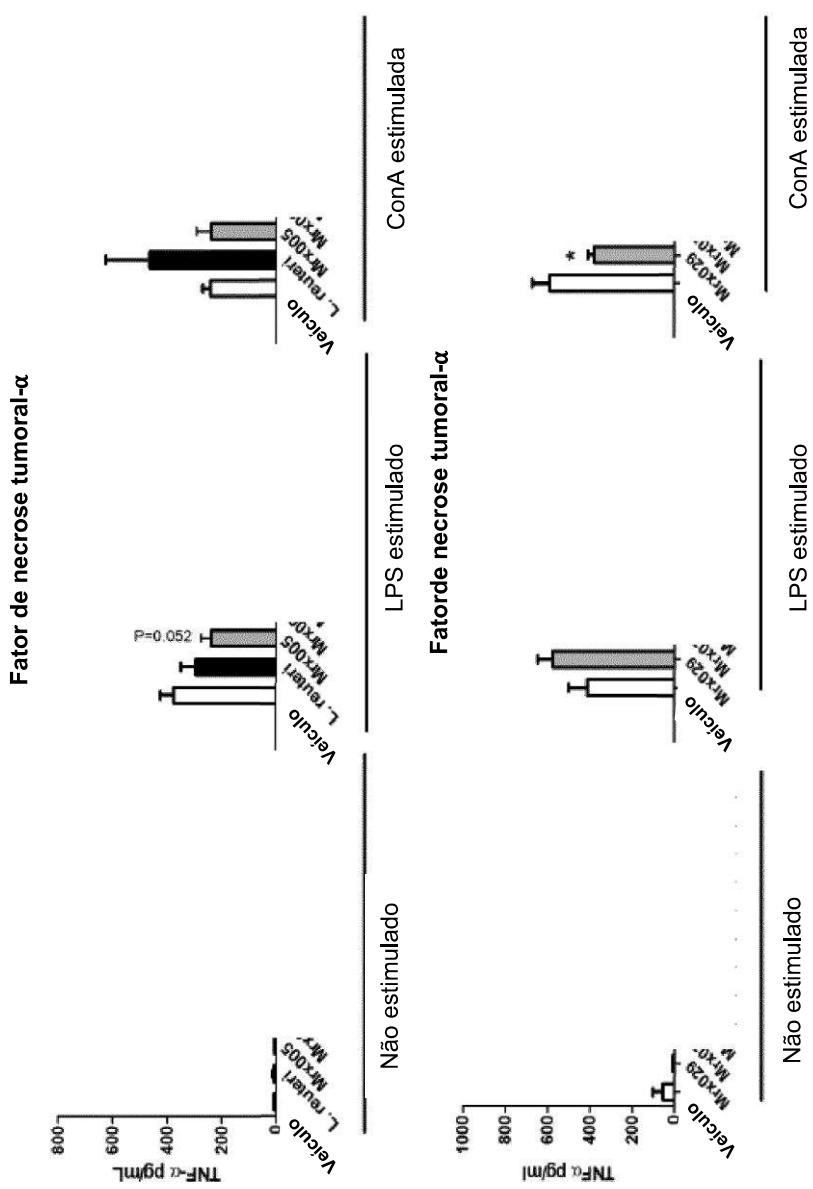
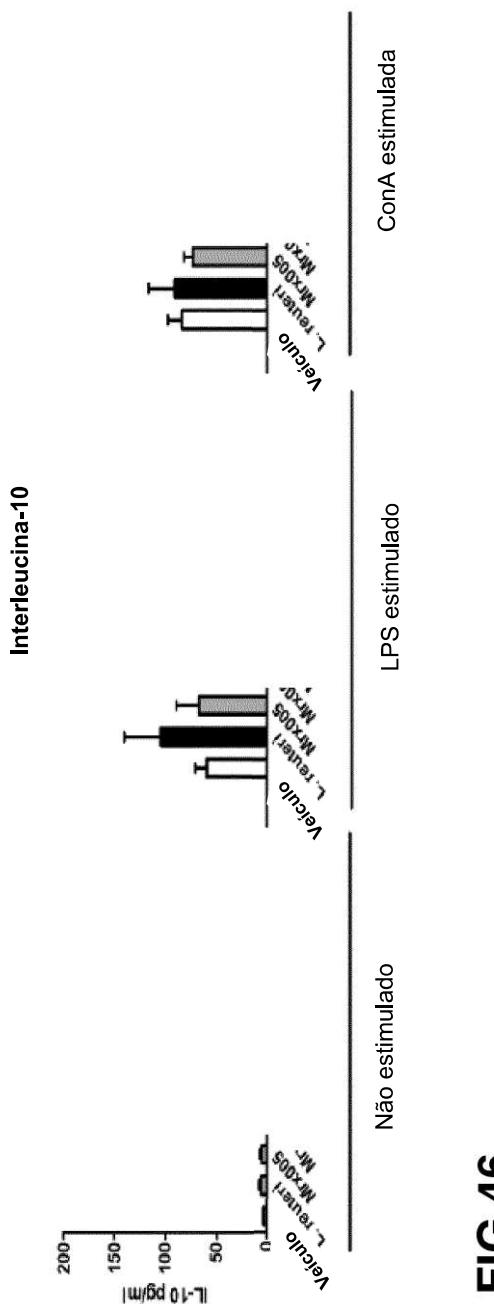
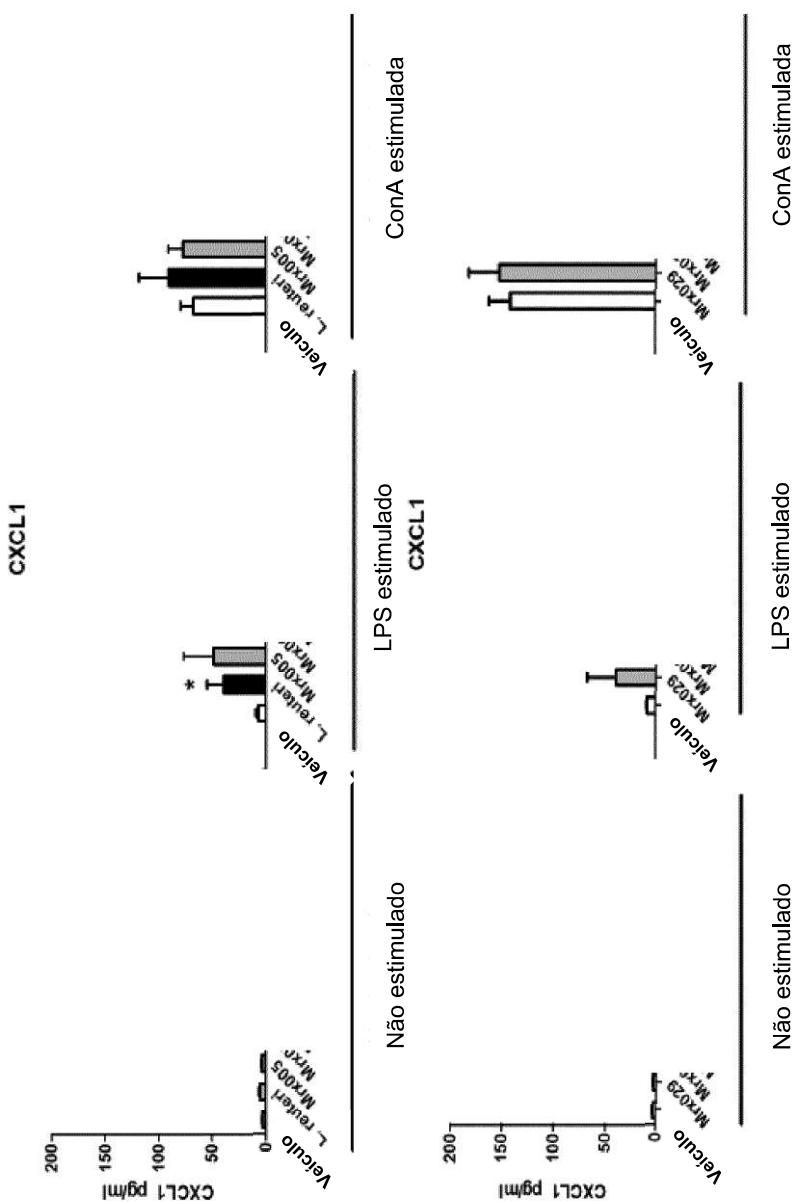
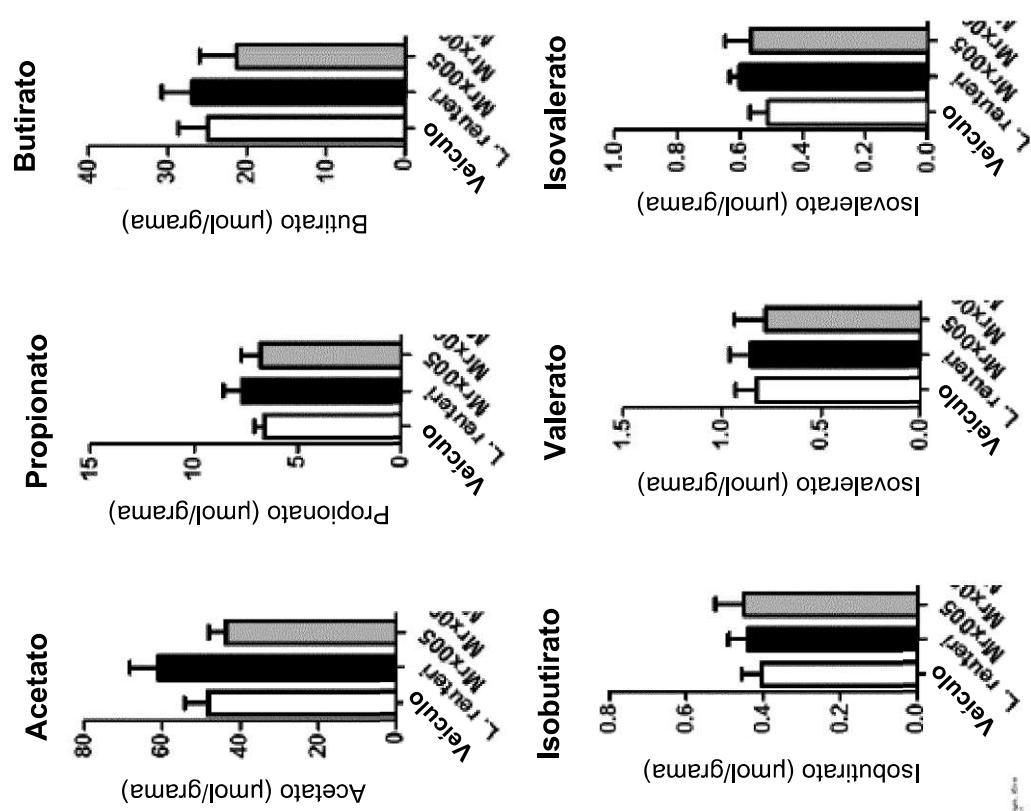


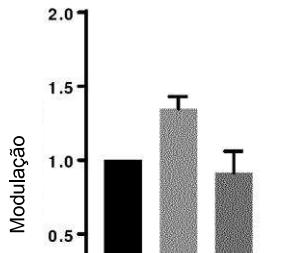
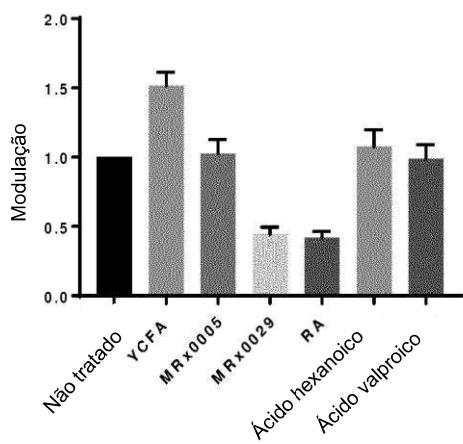
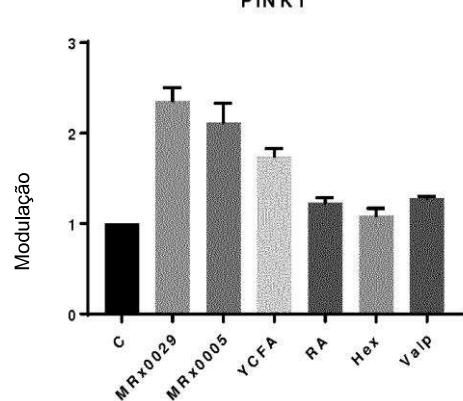
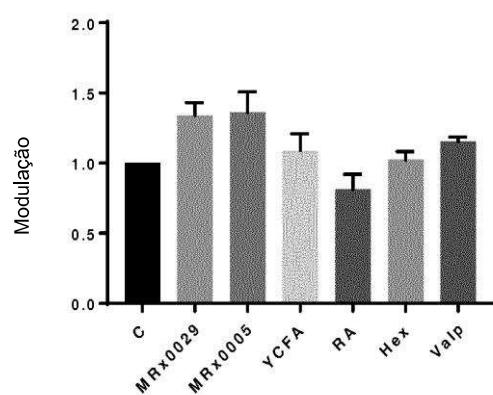
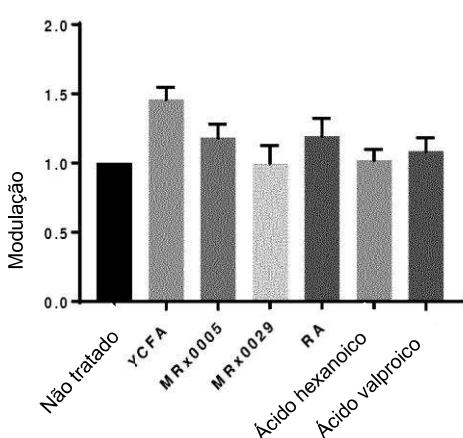
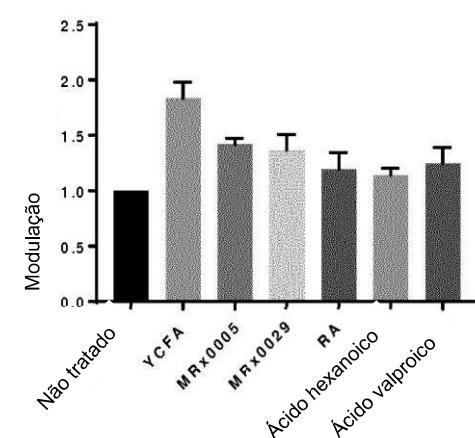
FIG 45

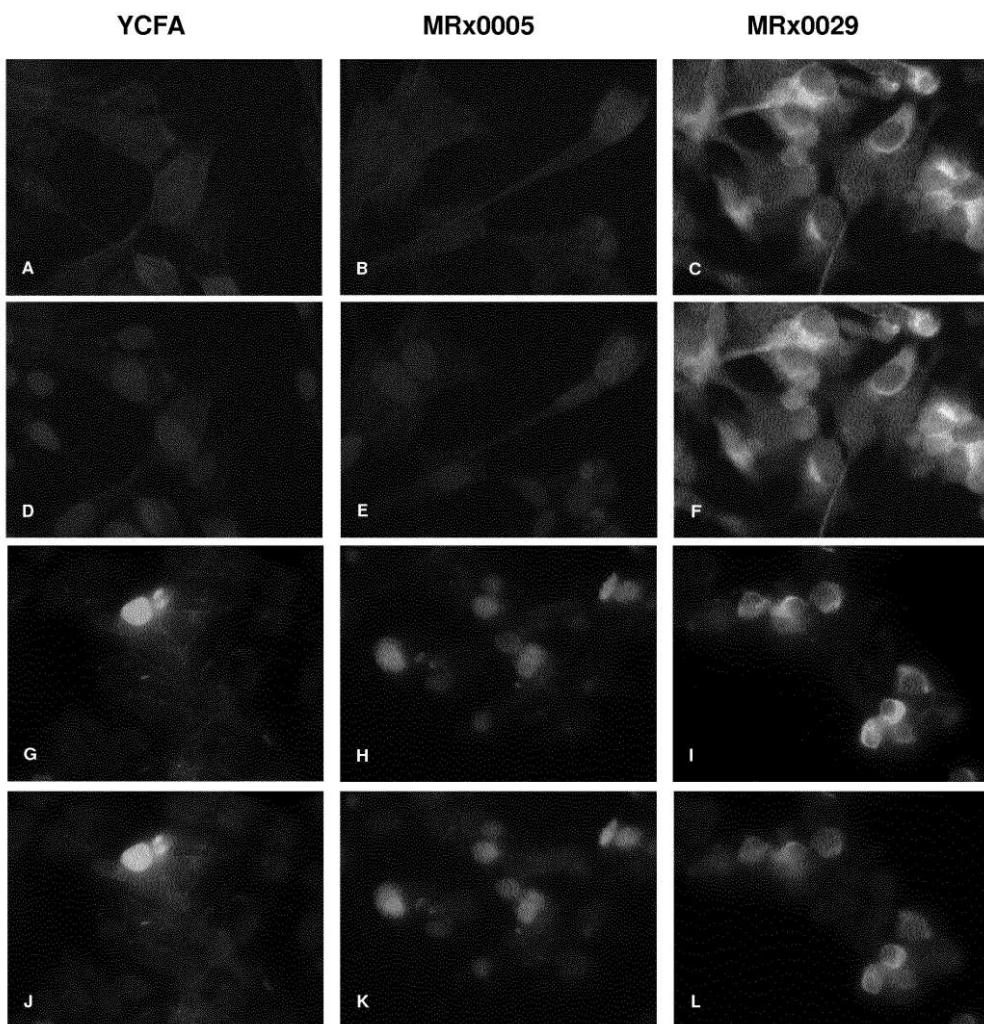


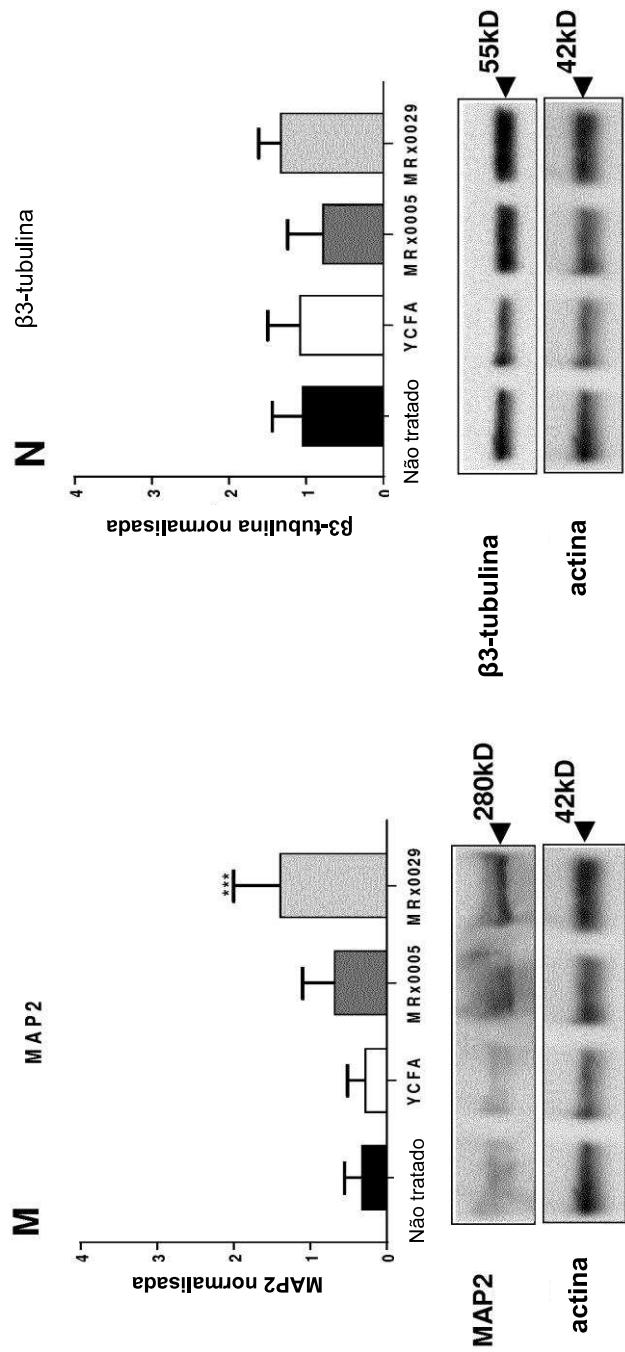
**FIG 46**

**FIG 47**

**FIG 48**

**FIG 49****G A B R B 3****D R D 2****P I N K 1****P A R K 7****N S E****S Y P**

**FIG 50**

**FIG 50** continuação

## RESUMO

### "COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CEPAS BACTERIANAS".

A invenção fornece composições que compreendem cepas bacterianas comensais e ácidos orgânicos e usos dos mesmos no tratamento de doenças.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - P244285.TXT
- Data de Geração do Código: 13/12/2019
- Hora de Geração do Código: 17:52:05
- Código de Controle:
  - Campo 1: 3C3793815C801BCB
  - Campo 2: 2794F4FC76BF39DE