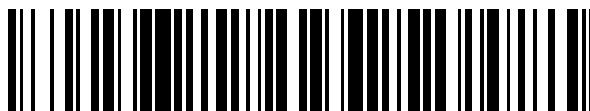


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 514**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2016** **PCT/GB2016/051776**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016** **WO16203223**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016** **E 16731268 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 3206700**

54 Título: **Composiciones que comprenden cepas bacterianas**

30 Prioridad:

15.06.2015 GB 201510467
20.11.2015 GB 201520501

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.02.2020

73 Titular/es:

4D PHARMA RESEARCH LIMITED (100.0%)
Life Sciences Innovation Building, Cornhill Road
Aberdeen, Aberdeenshire AB25 2ZS, GB

72 Inventor/es:

GRANT, GEORGE;
PATTERSON, ANGELA MARGARET;
MULDER, IMKE;
MCCLUSKEY, SEANIN y
RAFTIS, EMMA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 742 514 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden cepas bacterianas

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] Esta invención está en el campo de las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas en el tracto digestivo de los mamíferos y el uso de tales composiciones en el tratamiento de la enfermedad.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se cree que el intestino humano es estéril en el útero, pero se expone a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. A partir de entonces, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciada por factores como el modo de administración, el entorno, la dieta y el genotipo del huésped, todos los cuales influyen en la composición de la microbiota intestinal, especialmente durante la vida temprana. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se vuelve similar a la de un adulto [1]. La microbiota intestinal humana contiene más de 500-1000 filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a dos divisiones bacterianas principales, los Bacteroidetes y los Firmicutes [2]. Las relaciones simbióticas exitosas que surgen de la colonización bacteriana del intestino humano han producido una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales, protectoras y otras funciones beneficiosas. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que, de lo contrario, los componentes de la dieta no digeribles se degraden con la liberación de subproductos que proporcionan una importante fuente de nutrientes para el huésped. De manera similar, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien reconocida y se ejemplifica en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado que se reconstituye funcionalmente después de la introducción de bacterias comensales [3-5].

[0003] Los cambios dramáticos en la composición de la microbiota se han documentado en los trastornos gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Por ejemplo, los niveles de bacteria *Clostridium* cluster XIVa se reducen en los pacientes con EII, mientras que el número de *E. coli* aumenta, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiosis y patobiosis dentro del intestino [6-9]. Curiosamente, esta disbiosis microbiana también está asociada con desequilibrios en las poblaciones de células T efectoras.

[0004] En reconocimiento del efecto positivo potencial que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino de los animales, se han propuesto diversas cepas para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [10-13]). Además, se han propuesto ciertas cepas, que incluyen principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes que no están directamente relacionadas con los intestinos (ver [14] y [15] para revisiones). Sin embargo, la relación entre diferentes enfermedades y diferentes cepas bacterianas, y los efectos precisos de determinadas cepas bacterianas en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están mal caracterizadas.

[0005] KR 2010 0129168 describe cepas bacterianas aisladas de heces infantiles que son capaces de producir ácido linoleico conjugado.

[0006] El documento WO 2015/012936 describe una formulación de probióticos y sus efectos sobre el crecimiento del carcinoma hepatocelular.

[0007] Existe un requisito en la técnica para nuevos métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. También existe un requisito para que los efectos potenciales de las bacterias intestinales se caractericen de modo que puedan desarrollarse nuevas terapias que usen bacterias intestinales.

50 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención proporciona una composición que comprende una bacteria viable depositado bajo el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria viable que tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, para uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer.

[0009] Los inventores han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento y la prevención de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. En particular, los inventores han identificado una nueva cepa bacteriana que es efectiva para reducir la respuesta inflamatoria Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple en ratones. Como también se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el tamaño del tumor en modelos de cáncer de ratón que pueden estar asociados con la respuesta inflamatoria Th17.

[0010] Los inventores han identificado que el tratamiento con tales cepas bacterianas puede reducir los niveles de citocinas que son parte de la vía Th17, incluyendo IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria Th17 y puede proporcionar beneficios clínicos en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias y autoinmunes mediada por IL-17 y la vía Th17.

[0011] En realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección seleccionada del grupo constituido por: esclerosis múltiple; artritis, como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la artritis psoriásica o la artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerativa; enfermedad celíaca; asma, como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. El efecto mostrado para la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 en la respuesta inflamatoria de Th17 puede proporcionar beneficios terapéuticos para enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 y la vía de Th17, como las enumeradas anteriormente.

[0012] La presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrofílica o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han ensayado y demostrado la eficacia de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 en modelos de ratón con asma. En ciertas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es para uso en un método para tratar o prevenir el asma neutrofílica o el asma eosinofílica. El efecto mostrado para las composiciones descritas en el presente documento sobre neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente eficaces para tratar o prevenir el asma neutrófilo y el asma eosinófila. De hecho, en ciertas realizaciones, la composición descrita en el presente documento es para uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para uso en el tratamiento del asma. En realizaciones especialmente preferidas, la descripción proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380, para uso en el tratamiento del asma, y en particular asma neutrofílica. Se ha demostrado que la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 tiene un efecto particularmente pronunciado sobre los neutrófilos en los modelos de asma y el tratamiento con esta bacteria puede ser particularmente efectivo para tratar el asma neutrofílica.

[0013] En realizaciones adicionales preferidas, la presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoide y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las composiciones que utilizan la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser particularmente efectivas para tratar la artritis reumatoide.

[0014] En realizaciones adicionales preferidas, la presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple en ratones. En realizaciones preferidas, la descripción proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que utilizan la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser particularmente efectivas para tratar la esclerosis múltiple.

[0015] Como se señaló anteriormente, la invención proporciona una composición que comprende una bacteria viable depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria viable que tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, como el cáncer de mama, pulmón o hígado. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el crecimiento de tumores en modelos de ratón de cáncer de mama, pulmón e hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento del tumor en el tratamiento del cáncer.

[0016] En ciertas realizaciones, las composiciones de la descripción son para su uso en un método de reducción de

IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. En particular, las composiciones de la divulgación se pueden usar para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple o del asma, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, el cáncer o la uveítis. Preferiblemente, la descripción proporciona composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo del mismo, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o en la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o la prevención del asma, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. La descripción también proporciona composiciones que comprenden la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo del mismo, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o en la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del cáncer.

[0017] En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un paciente con niveles elevados IL-17 o células Th17. El efecto sobre la respuesta inflamatoria Th17 mostrada para la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.

[0018] En realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. Cepas bacterianas de Biotipo pueden utilizarse también, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98%, 99% 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 1.

[0019] En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas del presente documento puede ser eficaz para tratar enfermedades y afecciones mediadas por la vía de IL-17 o Th17. Además, la administración oral es conveniente para los pacientes y los médicos y permite el suministro a la colonización parcial o total del intestino.

[0020] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más vehículos farmacéuticamente excipientes o vehículos aceptables.

[0021] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica eficaz y conveniente para preparar composiciones estables que permiten el suministro de bacterias.

[0022] En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se describe anteriormente.

[0023] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se describe arriba.

[0024] En el desarrollo de la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. La bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 ha demostrado ser eficaz para tratar las enfermedades descritas en este documento, como la artritis, el asma y la esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. La invención también proporciona composiciones que comprenden dichas células, o cultivos biológicamente puros de dichas células. La invención también proporciona una célula de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 para uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento. La bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 también se muestra eficaz para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

[0025]

Figura 1: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Recuento total de células de fluido BAL.

Figura 2: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Recuento total de eosinófilos en BALF.

Figura 3: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Proporción de eosinófilos en BALF.

Figura 4: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Recuento total de macrófagos en BALF.

Figura 5: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Proporción de macrófagos en

BALF.

Figura 6: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Recuento total de neutrófilos en BALF.

Figura 7: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Proporción de neutrófilos en BALF.

Figura 8: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Recuento total de linfocitos en BALF.

Figura 9: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Proporción de linfocitos en BALF.

Figura 10: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave: Recuento total de células de líquido BAL.

Figura 11: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave: Recuento total de eosinófilos en BALF.

Figura 12: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Proporción de eosinófilos en BALF.

Figura 13: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Recuento total de macrófagos en BALF.

Figura 14: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Proporción de macrófagos en BALF.

Figura 15: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Recuento total de neutrófilos en BALF.

Figura 16: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Proporción de neutrófilos en BALF.

Figura 17: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Recuento total de linfocitos en BALF.

Figura 18: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Proporción de linfocitos en BALF.

Figura 19: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: pesos corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como porcentajes $\pm$ SEM medios de los pesos corporales iniciales (día -14). Significación estadística: $\blacktriangle$ $p < 0,05$ y $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,0001$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 20: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: pesos corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como media de los porcentajes $\pm$ SEM de los pesos corporales iniciales (día 0). $\blacktriangle$ $p < 0,05$, $\blacklozenge$ $p < 0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0,0001$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 21: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Puntuaciones clínicas. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. $****$ $p < 0,0001$ en comparación con el Día 21 en el grupo tratado con vehículo. $\blacklozenge$, O $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo en un día determinado.

Figura 22: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Respuesta proliferativa de esplenocitos al colágeno II. El fondo de los medios restó los recuentos por minuto [estimulados por CII - fondo de los medios] en función de la incorporación 3H-TdR. Todos los datos se presentan como media $\pm$ SEM. $**$ $p < 0,01$ en comparación con el grupo de vehículos.

Figura 23: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: niveles de $IFN\gamma$ en sobrenadantes de cultivos tisulares. Las líneas representan valores medianos de grupo.

Figura 24: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: niveles de IL-17A en sobrenadantes de cultivos tisulares. Las líneas representan valores medianos de grupo.

Figura 25: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivos tisulares. Las líneas representan valores medianos de grupo.

Figura 26: Modelo de ratón de la artritis reumatoide: niveles de IL-6 en sobrenadantes de cultivos tisulares. Las líneas representan valores medianos de grupo.

Figura 27: Sistema de puntuación histopatológica.

Figura 28: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en suero

Figura 29: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica para HDM

en suero

Figura 30: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en BALF

5 **Figura 31:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica para HDM en BALF

10 **Figura 32:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar

Figura 33: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración perivascular

15 **Figura 34:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación inflamatoria media (media de la puntuación de infiltración peribronquiolar y perivascular)

Figura 35: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación de moco

20 **Figura 36:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en el tejido pulmonar

Figura 37: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-1a en el tejido pulmonar

25 **Figura 38:** modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IFN γ en el tejido pulmonar

30 **Figura 39:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-17A en el tejido pulmonar

Figura 40: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-4 en el tejido pulmonar

35 **Figura 41:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-5 en el tejido pulmonar

Figura 42: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-1b en el tejido pulmonar

40 **Figura 43:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de RANTES en el tejido pulmonar

45 **Figura 44:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de MIP-1a en el tejido pulmonar

Figura 45: modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de KC en el tejido pulmonar

50 **Figura 46:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel MIP-2 en el tejido pulmonar

Figura 47: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - IgG1 específica para HDM en suero

55 **Figura 48:** Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - IgG2a específica en HDM en suero

Figura 49: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - IgG1 específica de HDM en BALF

60 **Figura 50:** Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - IgG2a específica de HDM en BALF

Figura 51: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar

65 **Figura 52:** Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración perivascular

Figura 53: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Análisis histológico - Puntuación inflamatoria media (Promedio de puntuación de infiltración peribronquiolar y perivascular)

Figura 54: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de TNF α en el tejido pulmonar

Figura 55: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IL-1 α en el tejido pulmonar

Figura 56: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IFN γ en el tejido pulmonar

Figura 57: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IL-17F en tejido pulmonar

Figura 58: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IL-1 β en el tejido pulmonar

Figura 59: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de RANTES en el tejido pulmonar

Figura 60: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

Figura 61: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de KC en el tejido pulmonar

Figura 62: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IL-17A en tejido pulmonar

Figura 63: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - MIP-1 α nivel en tejido pulmonar

Figura 64: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - nivel de IL-33 en el tejido pulmonar

Figura 65: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - plantilla visual para la puntuación de histopatología. Imágenes representativas que muestran puntuaciones compuestas de las articulaciones tarsales de ratones en un estudio de artritis inducida por colágeno.

Figura 66: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones de inflamación. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 67: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones de cartílago. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 68: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones óseas. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 69: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Histopatología: puntajes totales. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 70: Modelo de ratón de la artritis reumatoide - Histopatología: imágenes representativas. La identificación del animal (#n.n) y la extremidad (R para la derecha, L para la izquierda) se indican entre paréntesis. Imagen superior izquierda (vehículo): destrucción extensa de las articulaciones y los huesos con inflamación y fibrosis que se extiende a los tejidos blandos periarticulares.

Figura 71: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - puntuación clínica.

Figura 72: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - incidencia de la enfermedad.

Figura 73: Modelo de ratón de cáncer de mama - volumen tumoral.

Figura 74: Modelo de ratón de cáncer de pulmón - volumen tumoral.

Figura 75: Modelo de ratón de cáncer de hígado - peso del hígado.

Figura 76: Unión de cepas de tipo MRX004 y *B. breve* a células humanas.

Figura 77: Ensayo de producción de exopolisacáridos.

Figura 78: Producción de exopolisacáridos ligados y liberados por MRX004.

Figura 79: Fijación de MRX004 a células Caco-2.

Figura 80: Perfil ID 32 A rápido de MRX004 solo (A) y en comparación con cepas de tipo *B. breve* (B). Blanco = reacción negativa (sin cambio de color), descendente hacia abajo = reacción positiva intermedia (cambio

de color débil) y negro = reacción positiva (cambio de color apropiado fuerte).

Figura 81: Análisis API® 50 CH del MRX004. Cruce cruzado ascendente = reacción negativa (sin cambio de color), trama cruzada descendente = reacción positiva intermedia (cambio de color débil), Negro = reacción positiva (cambio de color apropiado fuerte) y Blanco = reacción dudosa (cambio de color inesperado).

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

[0026] Las composiciones de la invención comprenden una bacteria viable depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria viable que tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1. Los ejemplos demuestran que tales bacterias son útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. Los ejemplos también demuestran que tales bacterias son útiles para tratar o prevenir el cáncer. La cepa bacteriana preferida es la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

[0027] La bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 fue ensayada en los ejemplos y también se denomina en este documento como cepa 751 o MRX004. Se proporciona una secuencia de ARNr 16S parcial para la cepa 751 que se ensayó en la SEQ ID NO: 1. La cepa 751 se depositó en la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 12 de marzo de 2015 y se le asignó la adhesión número NCIMB 42380. Posteriormente, GT Biologics Ltd. cambió su nombre a 4D Pharma Research Limited.

[0028] Una secuencia del genoma de la cepa 751 se proporciona en la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias publicadas con WO 2016/203223.

[0029] También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 para ser eficaz para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 también se espera que sean efectivas para tratar o prevenir el cáncer. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene características fisiológicas y bioquímicas iguales o muy similares.

[0030] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16S que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 1.

[0031] Alternativamente, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que según la invención pueden ser identificadas por la secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. Por ejemplo sustancialmente todo el genoma puede ser secuenciado y una cepa de biotipo descrita aquí puede tener al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en al menos el 80% de su genoma completo (por ejemplo, en al menos el 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Otras secuencias adecuadas para su uso en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)s, o REP o [16]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

[0032] En ciertos casos, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un genoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223. En casos preferidos, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un genoma con al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de secuencia de identidad) a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en al menos el 60% (por ejemplo, al menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223. Por ejemplo, la cepa bacteriana para uso en la invención puede tener un genoma con al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en un 70% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o en al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 80% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 El 90% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos el 90% de la identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 100% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos 95% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 a través del 70% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos el 95% de identidad de la secuencia a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en 80 % de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos el 95% de la identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 90% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos el 95 % de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 100% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos un 98% de secuencia e identidad a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 70% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos un 98% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 80% de La SEQ ID NO: 2 del

documento WO 2016/203223, o al menos el 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 90% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o al menos el 98% de la secuencia identidad a la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 100% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223.

[0033] Alternativamente, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que son adecuadas para uso en la invención pueden identificarse usando el análisis de depósito y fragmentos de restricción número de acceso NCIMB 42380 y/o análisis de PCR, por ejemplo mediante el uso de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) y elemento de ADN repetitivo (rep): huellas digitales de PCR, o perfil de proteínas, o secuenciación parcial de ADN de 16S o 23S. En realizaciones preferidas, tales técnicas pueden usarse para identificar cepas de la misma especie que la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

[0034] En ciertas realizaciones, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 cuando se analizaron por análisis de restricción ribosomal amplificado de ADN (ARDRA), por ejemplo, cuando se utiliza la enzima de restricción Sau3AI (para ver ejemplos y orientación, ver, por ejemplo, [17]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

[0035] Las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que son útiles en las composiciones y métodos de la invención pueden identificarse usando cualquier método o estrategia apropiada, incluyendo los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, los biotipos para uso en la invención pueden identificarse cultivando YCFA anaeróbico y/o administrando la bacteria al modelo de ratón con artritis inducida por colágeno tipo II y luego evaluando los niveles de citoquinas. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie similares a la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser útiles en la invención. Una cepa de biotipo tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42380. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad de cáncer y efectos comparables en los niveles de citoquinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse mediante el uso de los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

[0036] Una cepa particularmente preferida de la invención es la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. Esta es la cepa ejemplar 751 ensayada en los ejemplos y demostrada ser eficaz para tratar enfermedades. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. La invención también proporciona un cultivo de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. La invención también proporciona una célula de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 para uso en la terapia, en particular para las enfermedades descritas en este documento.

[0037] Un derivado de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) del original. Un derivado de una cepa de la divulgación puede modificarse, por ejemplo, a nivel genético, sin eliminar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la divulgación es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42380. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad de cáncer y los mismos efectos comparables en los niveles de citoquinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en los ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42380 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42380.

[0038] Las referencias a células de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que la cepa depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380, y dichas células están abarcadas por la invención.

[0039] Las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.

[0040] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2. En una realización preferida, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una baja adherencia a células epiteliales intestinales humanas, en particular células Caco-2, en YCFA en comparación con *Bifidobacteria*, en particular *B. breve*. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención exhibe adherencia de menos de 1% de total de cultivo, tal como preferiblemente menos de 0,5% o menos de 0,3%, cuando se prueba en las condiciones descritas en el Ejemplo 12.

[0041] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce exopolisacáridos, por ejemplo,

en donde los exopolisacáridos están unidos a la superficie extracelular de la cepa bacteriana. En ciertas realizaciones, la producción de los exopolisacáridos unidos aumenta la adhesión de la cepa bacteriana para uso en la invención al moco o a la superficie de las células epiteliales, por ejemplo, células epiteliales intestinales humanas. En una realización preferida, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.

[0042] En una realización preferida, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2, en comparación con YCFA *Bifidobacteria*, en particular *B. breve* (tales como adherencia de menos del 1% del cultivo total, tal como preferiblemente menos del 0,5% o menos del 0,3%, cuando se analiza en las condiciones descritas en el Ejemplo 12), y produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con *Bifidobacteria*, en particular *B. breve*.

[0043] En ciertas realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la invención es capaz de fermentar la rafinosa polisacárido, por ejemplo cuando se cultivan en un medio de suspensión apropiado (tal como medio de suspensión API) a durante 4 horas.

[0044] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención ha reducido la capacidad de fermentar α -glucosidasa y/o β -glucosidasa en comparación con *Bifidobacteria*, en particular *B. breve*, por ejemplo cuando se cultivan en un medio de suspensión apropiado (tal como medio de suspensión API) a 37°C durante 4 horas.

[0045] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana descrita en este documento comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1, tales como 5, 10, 20, 50 o todos los genes de la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la cepa bacteriana divulgada aquí comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que están resaltados con un subrayado único, como el componente Transmembrana BL0694 del módulo de energización del transportador de ECF predicho y/o el componente de la ATPasa Duplicada BL0693 del módulo de energización del transportador de ECF predicho. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana descrita en este documento comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que están resaltados con doble subrayado y en negrita, como 1, 2, 3, 4 o 5 genes seleccionados de: maltodextrina glucosidasa (EC 3.2.1.20), galactosidasa putativa, celulosa sintasa (formación UDP) (EC 2.4.1.12), quitinasa (EC 3.2.1.14) y caja sensorial/proteína de la familia GGDEF. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana descrita en el presente documento comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que se resaltan con cursiva, como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 genes seleccionados de: omega-3 subunidad PfaA de la sintasa de ácidos grasos poliinsaturados, policétido sintasa tipo I, hidrolasa de glicosil putativa de función desconocida (DUF1680), componente de ATPasa BioM del módulo de energización del transportador ECF de biotina, familia de ATPasa E1-E2 que transporta catión, sistema de transporte proteína de Ribosa ABC de la proteína RbsC (TC 3.A.1.2.1), sistema de transporte de la ribosa ABC. Proteína de unión a la ATP RbsA (TC 3.A.1.2.1), 3'-a-5' oligorribonucleasa (orn), proteína de membrana relacionada con la proteína Actinobacillus (1944168).

[0046] En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana descrita en este documento comprende uno o más (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 o todos) genes seleccionados de: 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-ácido carboxílico sintasa (EC 2.2.1.9); 3'-a-5' oligorribonucleasa (orn); Alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); Componente ATPasa de módulo de energización general de los transportadores de ECF; el componente STY3233 de la ATPasa del módulo de energización del transportador de ECF regulado por queosa; Helicasa recG dependiente de ATP (EC 3.6.1.-); Beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21); Sintasa de celulosa (formación UDP) (EC 2.4.1.12); Quitinasa (EC 3.2.1.14); COG1309: regulador transcripcional; D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (EC 3.4.16.4); componente ATPasa duplicado BL0693 del módulo de energización del transportador de ECF previsto; fructoquinasa (EC 2.7.1.4); Glucosa/manosa: H + symporter GlcP; Glicosiltransferasa (EC 2.4.1.-); GMP sintasa [glutamina-hidrolizante] (EC 6.3.5.2); Cinasa de azúcar hipotética en grupo con indigoidina sintasa indA, familia de quinasas PfkB; Inosina-uridina que prefiere la hidrolasa de nucleósido (EC 3.2.2.1); LSU proteína ribosomal L31p @ LSU proteína ribosomal L31p, independiente de zinc; LSU proteína ribosomal L33p @ LSU proteína ribosomal L33p, independiente del zinc; Maltodextrina glucosidasa (EC 3.2.1.20); Proteína de membrana, relacionada con la proteína Actinobacillus (1944168); Mureína lítica unida a la membrana de la transglicosilasa precursora D (EC 3.2.1.-); Metiltransferasa (EC 2.1.1.-); Butanol deshidrogenasa A dependiente de NADH (EC 1.1.1.-); Fosfatasa de fosfoglicolato (EC 3.1.3.18); Isomerasa de fosforribosilano-tranilato (EC 5.3.1.24); Hidrolasa de glicosil putativa de función desconocida (DUF1680); Permeasa de translocación de polisacárido que contiene ramnosa; Ribocinasa (EC 2.7.1.15); Sistema de transporte ABC de ribosa, proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A.1.2.1); Sistema de transporte ABC de ribosa, proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A.1.2.1); Sistema de transporte Ribosa ABC, permeasa de alta afinidad RbsD (TC 3.A.1.2.1); Sistema de transporte ABC de ribosa, proteína de unión a ribosa periplásmica RbsB (TC 3.A.1.2.1); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permeasa RbsC (TC 3.A.1.2.1); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permeasa RbsC (TC 3.A.1.2.1); Sorbitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.14); SSU proteína ribosomal S14p (S29e) @ SSU proteína ribosomal S14p (S29e), independiente del zinc; Componente STY3230 específico del sustrato del transportador ECF regulado por queosaina; Hidrolasa de sacarosa-6-fosfato (EC 3.2.1.B3); Proteína TeH de unión a ATP de exportación de ácido teicoico (EC 3.6.3.40); Componente de membrana transmisora BL0694 del módulo de energización del transportador de ECF previsto; Componente de transmembrana STY3231 del módulo de energización del transportador de ECF regulado por queosa; Regulador de respuesta de dos componentes colocado junto con el transportador HrtAB; Sistema de modificación-modificación tipo I, subunidad M de ADN-metiltransferasa (EC 2.1.1.72); Sistema de modificación-modificación tipo I, subunidad de restricción R (EC 3.1.21.3); Sistema de modificación-restricción tipo I, subunidad de

especificidad S (EC 3.1.21.3); Sistema de modificación-restricción tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3.1.21.3); Sistema de modificación/modificación de tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3.1.21.3); Xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9); y transportador Xilosa ABC, proteína de unión a xilosa periplásmica XylF. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana descrita en el presente documento comprende uno o más (como 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o todos) genes que se enumeran en la oración anterior y que no se destacan en la Tabla 1.

Usos terapéuticos

[0047] Como se demuestra en los ejemplos, las composiciones bacterianas de la invención son eficaces para reducir la respuesta inflamatoria Th17. En particular, el tratamiento con composiciones de la invención logra una reducción en los niveles de IL-17A y otras citocinas de la vía Th17, y mejoras clínicas en modelos animales de afecciones mediadas por la IL-17 y la vía Th17. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17. En particular, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de IL-17.

[0048] Las células Th17 son un subconjunto de células T auxiliares que producen, por ejemplo, IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. La diferenciación de células Th17 y la expresión de IL-17 pueden ser dirigidas por IL-23. Estas citoquinas y otras forman partes importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye a varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes (como se describe en, por ejemplo, [18-23]). Las enfermedades en las que se activa la vía Th17 son las enfermedades mediadas por la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden mejorarse o aliviarse reprimiendo la vía Th17, que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción en el nivel de citoquinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 se pueden caracterizar por niveles aumentados de citoquinas producidas por las células Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisadas en [24]). Las enfermedades mediadas por la vía Th17 se pueden caracterizar por una mayor expresión de los genes relacionados con Th-17, como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden estar asociadas con niveles elevados de células Th17.

[0049] La IL-17 es una citoquina proinflamatoria que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes. IL-17, como se usa en este documento, puede referirse a cualquier miembro de la familia IL-17, incluyendo IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Las enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 se caracterizan por la alta expresión de IL-17 y/o la acumulación o presencia de células positivas a IL-17 en un tejido afectado por la enfermedad o afección. De manera similar, las enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 son enfermedades y afecciones que se ven agravadas por los altos niveles de IL-17 o un aumento en los niveles de IL-17, y que se alivian por los bajos niveles de IL-17 o una reducción en los niveles de IL-17. La respuesta inflamatoria de la IL-17 puede ser local o sistémica.

[0050] Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden estar mediadas por la IL-17 o la vía Th17 incluyen esclerosis múltiple; artritis, como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la artritis psoriásica o la artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad intestinal inflamatoria, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis escleritis; vasculitis; Enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento se usan para tratar o prevenir una o más de estas afecciones o enfermedades. En realizaciones preferidas adicionales de la divulgación, estas afecciones o enfermedades están mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

[0051] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde dicho tratamiento o prevención se logra reduciendo o previniendo la elevación de la respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde el paciente tiene niveles elevados de IL-17 o células Th17 elevadas o presenta una respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, el paciente puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica, o la composición descrita en el presente documento puede usarse para prevenir una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune que se convierte en una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección puede no responder al tratamiento con inhibidores de TNF- α . Estos usos de la composición descrita en el presente documento se pueden aplicar a cualquiera de las enfermedades o condiciones específicas enumeradas en el párrafo anterior.

[0052] Las vías de IL-17 y Th17 se asocian a menudo con enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir

enfermedades o afecciones crónicas como se enumeran anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas.

[0053] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar enfermedades y condiciones mediadas por IL-17 o la vía Th17 y para hacer frente a la respuesta inflamatoria Th17, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir las enfermedades crónicas, el tratamiento o la prevención de la enfermedad en pacientes que no han respondido a otras terapias (como el tratamiento con inhibidores de TNF- α) y/o tratar o prevenir el daño tisular y los síntomas asociados con las células IL-17 y Th17. Por ejemplo, se sabe que la IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo y la IL-17 tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de la matriz en los condrocitos y los osteoblastos, por lo que las composiciones descritas en este documento pueden ser útiles para tratar o prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago..

[0054] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de los niveles de IL-17, en particular, los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IFN- γ , IL-1 β , RANTES, MIP-1 α , IL-8 o IL-6. Dicha reducción o prevención de niveles elevados de estas citoquinas pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular aquellas mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

[0055] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención proporciona un bloque de la fijación a o la invasión de células humanas, por ejemplo células epiteliales humanas por las células patógenas, por ejemplo *E. coli* y/o *S. enteritidis*.

[0056] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención reduce o impide la unión de células patógenas, por ejemplo *E. coli* y/o *S. enteritidis*, a las células epiteliales humanas, por ejemplo células epiteliales intestinales humanas.

[0057] En ciertas realizaciones, la producción y liberación de exopolisacáridos por las cepas bacterianas de las composiciones de la invención pueden tener efectos protectores contra especies patógenas, por ejemplo *E. coli* y/o *S. enteritidis*. En ciertas realizaciones, la producción y liberación de exopolisacáridos por las cepas bacterianas de las composiciones de la invención pueden mediar el efecto de las bacterias en la ruta de IL-17 o Th17 y puede influir en la respuesta inmune del huésped. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la producción de exopolisacáridos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17.

[0058] En ciertas realizaciones, la baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2, de las cepas bacterianas de las composiciones de la invención pueden aumentar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención sobre la IL-17 o la vía Th17 y sobre las enfermedades mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

[0059] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona un aumento de la fermentación de la rafinosa en el intestino. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones de la invención fermentan la rafinosa polisacárida, y la fermentación de la rafinosa puede conferir efectos sobre el huésped, como el aumento de butirato cecal y el aumento de la proliferación gastrointestinal. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para aumentar la fermentación de la rafinosa en el intestino en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por la IL-17.

Asma

[0060] En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en este documento logran una reducción en el reclutamiento de neutrófilos y/o eosinófilos en las vías respiratorias después de la sensibilización y el desafío con el extracto de ácaro del polvo doméstico, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención del asma. El asma es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación y la restricción de las vías respiratorias. La inflamación en el asma puede estar mediada por células IL-17 y/o Th17, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede estar mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

[0061] En ciertas realizaciones, el asma es eosinofílica o asma alérgica. El asma eosinófilo y alérgico se caracteriza por un mayor número de eosinófilos en la sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y se asocia patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la capacidad de respuesta a los corticosteroides [25]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o la activación de eosinófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinofílica y alérgica.

[0062] En realizaciones adicionales, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención del asma neutrofílica (o el asma no eosinofílica). Los números altos de neutrófilos se asocian con asma grave que puede ser insensible al tratamiento con corticosteroides. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de neutrófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma neutrófilo.

[0063] El asma eosinófilo y neutrófilo no son condiciones mutuamente excluyentes y los tratamientos que ayudan a abordar las respuestas de eosinófilos y neutrófilos pueden ser útiles para tratar el asma en general.

[0064] El aumento de los niveles de IL-17 y la activación de la vía Th17 están asociados con el asma grave, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma grave o para tratar el asma grave.

[0065] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en los métodos de reducción de una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma, o para su uso en métodos para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma. Como se señaló anteriormente, los altos niveles de eosinófilos en el asma se asocian patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal, por lo que la reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o la prevención del asma puede abordar específicamente esta característica de la enfermedad. Además, los neutrófilos elevados, ya sea en combinación con eosinófilos elevados o en su ausencia, se asocian con asma grave y estrechamiento de las vías respiratorias crónicas. Por lo tanto, reducir la respuesta inflamatoria neutrofílica puede ser particularmente útil para tratar el asma grave.

[0066] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento reducir la infiltración peribronquial en el asma alérgica, o son para uso en la reducción de la infiltración peribronquial en el tratamiento de asma alérgica. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento reducen la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el asma neutrofílica, o se usan para reducir la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el tratamiento del asma neutrofílica alérgica.

[0067] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones según la invención proporciona una reducción o impide una elevación en IL, -1 β , IFN γ , RANTES, MIP-1 α o niveles IL-8.

[0068] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en un método de tratamiento del asma que se traduce en una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a tratar tiene, o se ha identificado previamente que tiene niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, por ejemplo, como se identificó a través de un muestreo de sangre o un análisis de esputo.

[0069] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en un recién nacido cuando se administra al neonato o a una mujer embarazada. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en niños. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma de aparición en adultos. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para controlar o aliviar el asma. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se agrava por los alérgenos, tales como los ácaros del polvo doméstico.

[0070] El tratamiento o la prevención del asma pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

[0071] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en este documento proporciona una reducción de las concentraciones de fenilalanina y/o histidina, por ejemplo, en los intestinos o en el plasma. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones descritas en el presente documento dieron positivo para la fermentación de aminoácidos, incluyendo fenilalanina e histidina, y se ha informado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina e histidina se asocia con efectos adversos en el asma. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina y/o histidina en el tratamiento del asma, y en particular en el tratamiento de la producción de histamina o la hiperreactividad de las vías aéreas asociadas con el asma.

[0072] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones según la invención proporciona una reducción en las concentraciones de galactosa y/o fructosa, por ejemplo en los intestinos. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones de la invención fermentan sustratos de carbohidratos que incluyen galactosa y fructosa, y galactosa α -1,3-galactosa derivada de fuentes cárnicas es un conocido alérgeno y agente causante de la anafilaxia, y los niveles de ingesta de fructosa en la dieta están relacionados con una mayor gravedad del asma. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento son para uso en la reducción de concentraciones de galactosa y/o fructosa en el tratamiento del asma, y en particular en el tratamiento del asma grave.

Artritis

[0073] En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o prevención de la artritis reumatoide (AR). Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en este documento logran una reducción en los signos clínicos de la AR en un modelo de ratón, reducen el daño del cartílago y del hueso y reducen la respuesta inflamatoria de la IL-17, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la AR. La AR es un trastorno inflamatorio sistémico que afecta principalmente a las articulaciones. La AR se asocia con una respuesta inflamatoria que produce hinchazón de las articulaciones, hiperplasia sinovial y destrucción del cartílago y el hueso. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la AR, por ejemplo, porque la IL-17 inhibe la producción de matriz en los condrocitos y los osteoblastos y activa la producción y función de las metaloproteinasas de la matriz y porque la actividad de la enfermedad de la RA está correlacionada con los niveles de IL-17 y Th -17 números de células [26, 27], por lo que las composiciones descritas en este documento pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar la AR.

[0074] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción de niveles de IL-17 o la prevención de la elevación de los niveles de IL-17 en el tratamiento o la prevención de AR. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones descritas en el presente documento proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IL-17, en particular los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones descritas en este documento proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IFN- γ o IL-6.

[0075] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la hinchazón de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en pacientes con articulaciones inflamadas o pacientes identificados con riesgo de tener articulaciones inflamadas. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento son para uso en un método para reducir la hinchazón de las articulaciones en la AR.

[0076] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en el daño del cartílago o daño óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones del presente documento son para uso en la reducción o prevención del daño del cartílago o del hueso en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con AR grave que están en riesgo de daño al cartílago o al hueso.

[0077] El aumento de los niveles de IL-17 y los números de células Th17 están asociados con la destrucción de cartílago y hueso en la AR [26,27]. Se sabe que la IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo y la IL-17 tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de la matriz en los condrocitos y los osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la prevención de la erosión ósea o el daño del cartílago en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que presentan erosión ósea o daño del cartílago o pacientes identificados con riesgo de erosión ósea o daño del cartílago.

[0078] El TNF- α también está asociado con la AR, pero el TNF- α no está involucrado en la patogénesis de las últimas etapas de la enfermedad. En contraste, la IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [28]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de la AR crónica o la AR en etapa tardía, como una enfermedad que incluye la destrucción articular y la pérdida de cartílago. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento son para tratar pacientes que han recibido previamente terapia anti-TNF- α . En ciertas realizaciones, los pacientes a tratar no responden o dejan de responder a la terapia anti-TNF- α .

[0079] Las composiciones descritas en este documento pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas formas de realización las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la prevención de RA en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de AR, o que ha sido diagnosticado con AR de etapa temprana. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de AR.

[0080] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para la gestión o el alivio de la AR. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la inflamación de las articulaciones o la destrucción ósea. El tratamiento o la prevención de la AR pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Esclerosis múltiple

[0081] En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento logran una reducción en la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple en ratones (el modelo EAE), por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es un trastorno inflamatorio asociado con el daño a las

vainas de mielina de las neuronas, particularmente en el cerebro y la columna vertebral. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, que es progresivamente incapacitante y que evoluciona en los episodios. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, por ejemplo, debido a que los niveles de IL-17 pueden correlacionarse con lesiones de esclerosis múltiple, IL-17 puede alterar las uniones de células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y las células Th17 pueden migrar al sistema nervioso central y causar pérdida neuronal [29,30]. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

[0082] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la incidencia de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción de la incidencia de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento evita una disminución en la función motora o da como resultado una función motora mejorada. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento son para uso en la prevención de una disminución en la función motora o para uso en la mejora de la función motora. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento previene el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la prevención de la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

[0083] Las composiciones descritas en este documento pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas formas de realización las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la prevención de la esclerosis múltiple en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de esclerosis múltiple, o que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple en etapa temprana o esclerosis múltiple "recurrente-remitente". Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de esclerosis. De hecho, los ejemplos muestran que la administración de las composiciones descritas en este documento previno el desarrollo de la enfermedad en muchos ratones.

[0084] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para la gestión o el alivio de la esclerosis múltiple. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Tratando el cancer

[0085] Las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. Los ejemplos demuestran que la administración de las composiciones de la invención puede conducir a una reducción en el crecimiento del tumor en una serie de modelos de tumores.

[0086] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el tamaño del tumor o una reducción en el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor o reducir el crecimiento del tumor. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir el tamaño o el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en pacientes con tumores sólidos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. Las células IL-17 y Th17 tienen funciones centrales en la angiogénesis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de metástasis.

[0087] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de mama. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del tumor o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es el carcinoma mamario. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama en etapa IV.

[0088] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de pulmón. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de pulmón. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del tumor o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de pulmón. En realizaciones preferidas, el cáncer es el carcinoma de pulmón.

[0089] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer de hígado. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar el cáncer de hígado. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del tumor o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de hígado. En realizaciones preferidas, el cáncer es hepatoma (carcinoma hepatocelular).

[0090] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de carcinoma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar numerosos tipos de carcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer no inmunogénico. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención pueden ser eficaces para tratar cánceres no inmunogénicos.

[0091] Las vías de IL-17 y Th17 tienen funciones centrales en el desarrollo y la progresión del cáncer y, aunque las funciones de las células IL-17 y Th17 en el cáncer no se entienden completamente, numerosos efectos pro-tumorales de las células IL-17 y Th17 son conocidos. Por ejemplo, las células Th17 y la IL-17 pueden promover la angiogénesis, aumentar la proliferación y la supervivencia de las células tumorales y activar los factores de transcripción que promueven el tumor [39-41]. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir el cáncer. Además, los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención son efectivas para reducir el volumen del tumor en cáncer de mama, pulmón e hígado, y las células IL-17 y Th17 tienen funciones importantes en estos tipos específicos de cáncer [42-44].

[0092] Los efectos terapéuticos de las composiciones de la invención sobre el cáncer pueden ser mediados por un mecanismo pro-inflamatorio. La inflamación puede tener un efecto supresor del cáncer [45] y las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α están siendo investigadas como terapias contra el cáncer [46]. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar el cáncer a través de un mecanismo similar. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden provocar una respuesta de tipo IFN β . IFN β es un potente factor activador de macrófagos que puede estimular la actividad tumoricida [47], y CXCL9 y CXCL10, por ejemplo, también tienen efectos contra el cáncer [48-50]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la promoción de la inflamación en el tratamiento del cáncer. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en la promoción de la inflamación Th1 en el tratamiento del cáncer. Las células Th1 producen IFN β y tienen potentes efectos contra el cáncer [45]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de un cáncer en etapa temprana, tal como un cáncer que no ha hecho metástasis, o un cáncer en etapa 0 o etapa 1. La promoción de la inflamación puede ser más efectiva contra los cánceres en etapa temprana [45]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la promoción de la inflamación para mejorar el efecto de un segundo agente anticáncer.

[0093] En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de leucemia aguda linfoblástica (ALL), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, tumor de hueso, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer del colon, linfoma cutáneo de células T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, glioma, vía visual infantil e hipotalámico, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, leucemias, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de faríngeo, adenoma hipofisario, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer de útero.

[0094] Las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces cuando se utiliza en combinación con otros agentes terapéuticos. Los efectos inmunomoduladores de las composiciones de la invención pueden ser eficaces cuando se combinan con agentes anticancerígenos más directos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma y un agente anticancerígeno. En realizaciones preferidas, el agente anticancerígeno es un inhibidor del punto de control inmunitario, una inmunoterapia dirigida contra anticuerpos, una terapia con células CAR-T, un virus oncolítico o un fármaco citostático. En realizaciones preferidas, la composición comprende un agente anticáncer seleccionado del grupo que consiste en: Yervoy (ipilimumab, BMS); Keytruda (pembrolizumab, Merck); Opdivo (nivolumab, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Tremelimumab (AZ/MedImmune); CT-011 (pidilizumab, CureTech); BMS-986015 (lirilumab, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Pri- ma Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (varilumab; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (indoximod, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-VISTA (JnJ); Epcadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Universidad de Pensilvania); MGA271 (MacroGenix); Emactuzumab (Roche/Genentech); Galunisertib (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Bavixumab (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Universidad de Mujeres Ewha, Corea); Vemurafenib (plexxikon); Dabrafenib (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering); Unituxin (dinutuximab, United Therapeutics Corporation); Blincyto (blinatumomab, Amgen); Cyramza (ramucirumab, Eli Lilly); Gazyva

(obinutuzumab, Roche/Biogen); Kadcylla (ado-tras-tuzumab emtansine, Roche/Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche/Genentech); Adcetris (brentuximab vedotin, Dama/Milenio); Arzerra (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastin (bevacizumab, Roche/Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS/Merck); Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalin (ibritumomab tiuxetan, Biogen); Camino de cam (alemtuzumab, Bayer); Mylotarg (gemtuzumab ozogamicina, Pfizer); Herceptin (trastuzumab, Roche/Genentech); Rituxan (rituximab, Genentech/Biogen); volociximab (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Elotuzumab (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Ozaralizumab (Ablynx); Actimab-C (Actinio); Actimab-P (actinio); Milatuzumab-dox (actinio); Emab-SN-38 (actinio); Naptumomab estafenatox (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (samalizumab, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (adecatumumab, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Rilotumumab (Amgen); Denosumab (amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Anetumab ravtansine (Bayer); vantictumab (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Sibrotuzumab (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BILB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvento); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Necitumumab (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo); nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Ramucirumab (eli lilly); Tabalumab (Eli Lilly); Zanolimumab (Biosolución Emergente); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius Biotech); IMAB362 (GananyMed); IMAB027 (GananyMed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Galaad); GS-6624 (Galaad); OMP-21M18 (demcizumab, GSK); mapatumumab (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (MedImmune); milatuzumab-dox (MedImmune); IMMU-115 (MedImmune); IMMU-132 (MedImmune); IMMU-106 (MedImmune); IMMU-102 (MedImmune); Epratuzumab (MedImmune); Clivatuzumab (Inmunomédicos); IPH41 (inmunoterapéuticos innatos); Daratumumab (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (siltuximab, Janssen); KB004 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirin); KW-2871 (ecromeximab, Life Science); Sonepcizumab (Lpath); Margetuximab (MacroGenics); Enoblituzumab (MacroGenics); MGD006 (MacroGenics); MGF007 (macrogenicos); MK-0646 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmap5574 (Morphosys); BPC-1C (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); vantictumab (Oncomed/Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicina, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab, Regeneron/Sa-nofi); REGN421 (enoticumab, Regeneron/Sa-nofi); RG7221, RG7356, RG7154, RG7444, RG7116, RG7636, RG7636, RG7414, RG7414, RG7414, RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi); SGN-LIV1A (linituzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ibritumomab tiuxetan (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ganitumab (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (trombogénico); VB4-845 (Viventia); Xmap2512 (Xencor); Xmap5574 (Xencor); nimotuzumab (YM Biosciences); Carlumab (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Collectis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunway-bio); DNX-2401 (DNAtrix); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Adl (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virtu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Reolisina (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, ácido folínico, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, Zykadia (Novartis), Tafenlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Petropina, Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespi (Synta Pharma), Tergenpumatucl-L (NewLink Genetics), Vcc-GemVax), Tivantinib (ArQule); Cytosan (BMS); Oncovin (Eli Lilly); Adriamicina (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (daño de Debiop); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IMMU-132 (MedImmune); E7449 (Eisai); Termodoxo (celsion); Cometriq (exelixis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); y TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

Modos de administración

[0095] Preferiblemente, las composiciones de la invención son para ser administradas al tracto gastrointestinal con el fin de permitir la entrega a y colonización/o parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. En general, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal o bucal o sublingual.

[0096] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse en forma de espuma, como una pulverización o un gel.

[0097] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en forma de un aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo, suppcire, witepsol), Glicero-gelatina, polietilenglicol o composición de jabón glicerina.

[0098] En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra en el tracto gastrointestinal a través de un tubo, tal como un tubo nasogástrico, sonda orogástrica, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG), o un puerto, como un puerto de pared torácica que proporciona acceso al estómago, yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

[0099] Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o se pueden administrar de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención deben administrarse diariamente.

[0100] En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento según la invención está acompañada por la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra el suministro de y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención, de manera que no se observa eficacia, o el tratamiento puede cesar si el suministro y/o la colonización parcial o total son exitosas y se observa eficacia.

[0101] En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal gestante, por ejemplo, un mamífero como un ser humano para prevenir el desarrollo de una enfermedad inflamatoria o autoinmune en su hijo *en el útero* y/o después de que nazca.

[0102] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17, o que ha sido identificado como en riesgo de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17 en un paciente sano.

[0103] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado por tener una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener una colonización reducida o ausente por la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.

[0104] Las composiciones de la invención se pueden administrar como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

[0105] En general, las composiciones de la invención son para el tratamiento de seres humanos, aunque se pueden usar para tratar a los animales, incluidos los mamíferos monogástricos, como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para potenciar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede usar una sonda oral.

Composiciones

[0106] Generalmente, la composición de la invención comprende bacterias. En realizaciones preferidas de la invención, la composición se formula en forma liofilizada. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprenden una cepa bacteriana de la invención.

[0107] Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de las bacterias es un procedimiento bien establecido y se dispone de orientación relevante, por ejemplo, en las referencias [51-53].

[0108] Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano activo vivo.

[0109] En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la entrega de la cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta el suministro en la ubicación de destino a través de, por ejemplo, la ruptura con estímulos químicos o físicos, como la presión, la actividad enzimática o la desintegración física, que puede desencadenarse por cambios en el pH. Se puede utilizar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de portadores sólidos, autoagregación por floculación o con agentes

de reticulación, y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La orientación sobre la encapsulación que puede ser útil para preparar composiciones de la invención está disponible, por ejemplo, en las referencias [54] y [55].

[0110] La composición se puede administrar por vía oral y puede estar en la forma de un comprimido, cápsula o polvo. Los productos encapsulados se prefieren porque la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede ser un anaerobio. Otros ingredientes (como la vitamina C, por ejemplo), pueden incluirse como eliminadores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar la administración y/o la colonización y supervivencia parcial o total *in vivo*. Alternativamente, la composición probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, tal como leche o un producto lácteo fermentado a base de suero de leche, o como un producto farmacéutico.

[0111] La composición puede formularse como un probiótico.

[0112] Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana de la invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un paciente. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar lugar a la administración y/o la colonización parcial o total del intestino del paciente.

[0113] Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para un ser humano adulto, puede ser de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU); por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} CFU; en otro ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} CFU.

[0114] En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{11} UFC/g, con respecto al peso de la composición; por ejemplo, desde aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 1×10^{10} UFC/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

[0115] Típicamente, un probiótico, tales como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es generalmente un carbohidrato no digerible, como un oligo o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como inulina y transgalactooligosacáridos.

[0116] En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 30% en peso, respecto a la composición de peso total, (por ejemplo de 5 a 20% en peso). Los carbohidratos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: fructooligosacáridos (o FOS), fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, isomaltoligosacáridos, pectinas, xilooligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, almidones modificables y resistentes a la goma de cultivo, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras de cítricos. En un aspecto, los prebióticos son los fructooligosacáridos de cadena corta (por simplicidad que se muestra a continuación como FOSs-c.c); dichos FOSs-c.c no son carbohidratos digeribles, generalmente obtenidos por la conversión del azúcar de remolacha e incluyendo una molécula de sacarosa a la que están enlazadas tres moléculas de glucosa.

[0117] Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En la referencia [56] se pueden encontrar ejemplos de tales excipientes adecuados. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [57]. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del portador, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión(es), agente(s) de revestimiento, agente(s) de solubilización. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

[0118] Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, tal como en un suplemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer que la composición sea más atractiva para consumir al ser más similar a un artículo alimenticio común, en lugar de a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier

producto a base de leche o suero líquido o semisólido que tenga un contenido de grasa variable. El producto a base de leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado, como yogur, leche cuajada, leche cuajada agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos lácteos. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como las bebidas de suero de leche, las leches fermentadas, las leches condensadas, las leches para bebés; leche con sabor, helado; alimentos que contienen leche como los dulces.

[0119] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no contienen otras cepas bacterianas o especies. Dichas composiciones pueden comprender solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Tales composiciones pueden ser un cultivo que está sustancialmente libre de otras especies de organismos.

[0120] Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir la aprobación de comercialización.

[0121] En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito aquí.

[0122] Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0123] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; en el que la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis sistémica, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behcet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica y rechazo de aloinjerto.

[0124] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. En realizaciones preferidas, dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celiaca, asma alérgica, asma neutrofílica, artrosis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, artritis idiopática, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behcet, aterosclerosis, dermatitis bacteriana, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica y rechazo de aloinjerto.

[0125] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, donde la cantidad de la cepa bacteriana es de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo de formación con respecto a un peso de la composición.

[0126] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en el que la composición se administra a una dosis de 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

[0127] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en administración oral, rectal, subcutánea, nasal, bucal y sub-lingual.

[0128] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

[0129] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

[0130] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste de almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, acacia, tragacanto, sodio alginato, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

[0131] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizador.

[0132] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste en benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

5 [0133] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que dicha cepa bacteriana está liofilizada.

10 [0134] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a aproximadamente 4°C o aproximadamente 25°C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene 50% de humedad relativa, a al menos el 80% de la cepa bacteriana, medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de al menos aproximadamente 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

Métodos de cultivo

15 [0135] Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden ser cultivadas utilizando técnicas estándar de microbiología como se detalla en, por ejemplo, las referencias [58-60].

20 [0136] El medio sólido o líquido utilizado para el cultivo puede ser agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): Casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄·7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), ácido p-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) y piridoxamina (15 µg).

25 Cepas bacterianas para uso en composiciones de vacunas.

[0137] Los inventores han identificado que las cepas bacterianas descritas en este documento son útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento también pueden ser útiles para prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17, cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención se pueden matar, inactivar o atenuar. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración mediante inyección, tal como mediante inyección subcutánea.

35 General

[0138] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas son explicadas completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, las referencias [61] y [62-68], etc.

[0139] El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste" por ejemplo, una composición que comprende "X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

45 [0140] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x 6 10%.

50 [0141] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

[0142] Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo en la comparación de las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. [69]. Una alineación preferida está determinada por el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman utilizando una búsqueda de huecos afines con una penalización de espacio libre de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, una matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se describe en la ref. [70].

60 [0143] A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosos pasos puede comprender pasos adicionales al principio o al final del método, o puede comprender pasos adicionales de intervención. Además, los pasos pueden combinarse, omitirse o realizarse en un orden alternativo, si corresponde.

65 [0144] En el presente documento se describen varias realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características específicas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas aquí como adecuadas, típicas o

preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1: eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico

Resumen

10 **[0145]** Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se expusieron con extracto de ácaro del polvo doméstico (HDM) para provocar una respuesta inflamatoria alérgica. La respuesta inflamatoria a HDM incluye componentes eosinófilos y neutrófilos, está mediada por IL-17 y la vía Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria mostrada por los ratones tratados con composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria y reducen el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, lo que indica que pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 tales como eosinofilia, neutrofilia y asma.

Cepa

20 **[0146]** 751: bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380

Diseño del estudio

25 Grupos:

[0147]

- 30 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control de vehículo (por vía oral).
4. Tratamiento con cepa de inóculo de bacterias terapéuticas 751 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (ip).
8. Grupo de control no tratado.

Número de ratones por grupo = 5

35 Día -14 al 13: administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).
Día -14 al día 13: administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 2-6).
Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de 15 ug de HDM (extracto de ácaro del polvo doméstico - Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) en un volumen de 30ul PBS por nasal (Grupo 1-8).
40 Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de dexametasona (i.p., 3mg/kg, Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159) (Grupo 7).
Día 14 Sacrificio de todos los animales para su análisis. Número total de ratones = 40.

Puntos finales y análisis

[0148] En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL).

50 **[0149]** Las células fueron aisladas de los fluidos y diferenciales de recuentos de células de BAL (lavado broncoalveolar) realizados (200 recuentos de células /muestras).

Material y métodos

55 **[0150] Ratones.** Se compraron ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas para un total de 5 ratones por jaula (Jaulas ventiladas de Indulab AG, Gams, Suiza Tipo de jaula: "La jaula SealsafeTM - IVC. Número de producto 1248L). Las jaulas se marcaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorizaron semanalmente y se aclimataron a la instalación durante los 7 días previos al inicio del estudio (día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el día de estudio -14. los alimentos estaban disponibles ad libitum. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con la licencia local número de licencia 2283.1 (expedida y aensayada por: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se renovaron una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se observaron según lo dictado por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455.163 del FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales modificados genéticamente y métodos de experimentación con animales.

[0151] Cultivo de inóculo de bacterias. Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un crio-vial de bacterias al calentarlo con una mano enguantada y se inyectaron < 0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (Cat Number, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de material anaeróbico YCFA. Usualmente se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron (estáticos) a 37°C durante 16 h (cepa 751).

[0152] Cultivo de control de vehículos. Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.

[0153] Administración de inóculo de bacterias o control de vehículo. Se administraron 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

[0154] Sensibilización intranasal. Los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y se administraron con 15 ug de HDM (Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE. UU.) En un volumen de 30ul PBS por nasal.

[0155] Preparación y administración del compuesto de control positivo Dexametasona. La dexametasona sal de sodio de fosfato 21 (Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159, N° de Lote SLBD.1030V) se resolvió en H₂O y se administró a los animales en una dosis de 3 mg/kg en un volumen de 200 ul por oral en días indicados en el protocolo de estudio anterior.

[0156] Procedimiento terminal. En el día 14, los animales se sacrificaron mediante inyección i.p. letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) inmediatamente seguido por lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

[0157] Medida de infiltrados celulares en BAL. Se aislaron células del fluido BAL y se realizaron recuentos celulares diferenciales en función de criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

[0158] Gráficos y análisis estadístico. Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism versión 6 y se aplicó un ANOVA de una vía. Los resultados del análisis estadístico se proporcionaron con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Resultados y analisis

[0159] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 1-9.

[0160] Se observó la morbilidad o la mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Los dos controles, tratamiento de vehículo (control negativo) y el tratamiento con dexametasona (control positivo) se comportaron como se esperaba, y se observó alteración de la eosinofilia y la neutrofilia después del tratamiento con dexametasona.

[0161] Los resultados más importantes de este experimento se muestran en las Figuras 6 y 7, que informe sobre el número total y el porcentaje de neutrófilos en el lavado detectado bronquiolar después de la estimulación con HDM. La tensión 751 redujo los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en BAL en relación con el control de solo vehículo.

Ejemplo 2: Eficacia de inóculos bacterianos en un modelo de ratón de asma neutrofílica grave

Resumen

[0162] Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se sensibilizaron con administraciones subcutáneas de extracto de ácaro del polvo doméstico (HDM) y se desafiaron con una administración intranasal de HDM para modelar la respuesta inflamatoria del asma neutrofílica grave. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria mostrada por los ratones tratados con composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se descubrió que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria, y en particular reducen el reclutamiento de neutrófilos, de una manera comparable al control positivo que comprende la administración de anticuerpos anti-IL-17. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 y Th17, tales como neutrofilia y asma.

Cepa

[0163] 751: bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380

Diseño del estudio

Grupos:

[0164]

- 5 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control de vehículo (por vía oral).
 4. Tratamiento con cepa de inóculo de bacterias terapéuticas 751 (por vía oral).
 7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (i.p.).
 8. Grupo de control no tratado.
 9: Ratones sanos (línea de base).

10 Número de ratones por grupo (Grupo 1-8) = 5

- Día 14 al 17: Administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).
 Día 14 a 17: Administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 2-6).
 15 Día 0: Sensibilización con HDM en CFA (sc) (Grupo 1-8).
 Día 7: Sensibilización con HDM en CFA (sc) (Grupo 1-8).
 Día 13, 15, 17: Administración de anticuerpos neutralizantes anti IL-17 por i.p. (Grupo 7).
 Día 14, 15, 16, 17: desafío con HDM en 30ul PBS por nasal (Grupo 1-8).
 Día 18: Sacrificio de todos los animales para su análisis.

20 Puntos finales y análisis:

- [0165]** En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli PharmaAG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL). Las células se
 25 aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos celulares diferenciales (200 recuentos celulares/muestras).

Material y métodos.

- [0166] Ratones.** Se compraron ratones hembra C57BL/6 de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se
 30 asignaron aleatoriamente a jaulas para un total de 5 ratones por jaula (Jaulas ventiladas de Indulab AG, Gams, Tipo
 de jaula Suiza: "The Sealsafe™ - IVC cage. Product number 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de
 estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorizaron semanalmente y se
 aclimataron a la instalación durante los 7 días anteriores al inicio del estudio (día de estudio -14). Los animales tenían
 8 semanas de edad el día de estudio -14. El agua potable y los alimentos estaban disponibles ad libitum. El
 35 enriquecimiento de la jaula estaba presente. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con la licencia
 local número de licencia 2283.1 (expedida y aensayada por: Service de consommation et des affaires vétérinaires du
 Canton de Vaud). y los alimentos estaban disponibles ad libitum y se refrescaban una vez al día. El enriquecimiento
 de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se observaron según lo daban las autoridades
 oficiales de Suiza bajo la ordenanza 455.163 de la e FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de
 40 laboratorio, producción de animales modificados genéticamente y métodos de experimentación con animales.

- [0167] Cultivo de inóculo de bacterias.** Dentro de una estación de trabajo estéril, un crío-vial de bacterias fue
 descongelado por calentamiento en mano enguantada y ~ 0,7 ml de contenido inyectado en un tubo Hungate (Cat
 Number, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contiene 8 ml de YCFA anaeróbico.
 45 Usualmente se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron (estáticos) a 37°C durante 16 h (cepa
 751).

- [0168] Cultivo de control de vehículos.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático)
 a 37°C durante 16 h.

- 50 **[0169] Administración de inóculo de bacterias o control de vehículo.** Se administraron 400 ul de inóculo de
 bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

- [0170] Sensibilización a HDM.** 50 µg de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer
 Laboratories, Lenoir, NC, EE. UU.) En PBS se emulsionaron en igual volumen de adyuvante completo de Freund (CFA
 Chondrex Inc. Washington, EE. UU.) y se administraron por vía subcutánea en un Volumen de 200 µl, dos veces en
 dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones se anestesiaron
 mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xylasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y luego
 se les administraron pruebas intranasales de 15 µg de HDM en un volumen de 30ul PBS en 4 días consecutivos. El
 60 análisis se realizó un día después del desafío final.

- [0171] Preparación y administración del compuesto de control positivo anti-anticuerpo IL-17 de ratón.** El
 anticuerpo neutralizante anti-IL-17 se obtuvo de la célula Bio X y se almacenó a 4°C (Clon 17F3, número de catálogo
 BE0173, célula Bio X) y se administró por i.p. a una dosis de 12,5 mg/kg en los días indicados en el estudio protocolo
 65 anterior.

[0172] Procedimiento terminal. El día 18, los animales se sacrificaron mediante inyección i.p. letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) inmediatamente seguido de lavado broncoalveolar (BAL) en 500 µl de solución salina.

5 **[0173] Medición de infiltrados celulares en BAL.** Se aislaron células del fluido BAL y se realizaron recuentos celulares diferenciales en función de criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

10 **[0174] Gráficos y análisis estadístico.** Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism versión 6 y se aplicó un ANOVA de una vía. Los resultados del análisis estadístico se proporcionan con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Resultados y analisis

15 **[0175]** Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 10-18.

[0176] No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la cepa 751 fue altamente eficaz para aliviar la magnitud de la respuesta inflamatoria neutrofílica. De hecho, el tratamiento con la cepa 751 mostró resultados comparables al tratamiento con anticuerpos anti-IL-17. Además, la cepa 751 redujo los números de eosinófilos en relación con los controles, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

Ejemplo 3 - Eficacia de inóculos bacterianos para tratar la artritis en un colágeno de tipo II inducida por la artritis modelo de ratón

25 Materiales y métodos

Cepas

30 **[0177]** 751: bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380

Cultivos bacterianos

35 **[0178]** Los cultivos bacterianos se cultivaron para la administración en una estación de trabajo anaeróbico (Don Whitley Scientific).

[0179] Cepa bacteriana # 751 se cultivó utilizando reservas de glicerol. Las reservas de glicerol se almacenaron a -80°C. Tres veces por semana, las existencias de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se sembraron en placas de YCFA. Se utilizó una nueva alícuota de glicerol en cada ocasión. Las bacterias se dejaron crecer en una placa dada durante un máximo de 72 horas.

40 **[0180]** Las soluciones para administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas para los tratamientos matutinos (AM) y vespertinos (PM). Se recogió una colonia bacteriana de la placa rayada y se transfirió a un tubo que contenía medio YCFA. La cepa bacteriana n. ° 751 se dejó crecer durante 16 horas antes de las administraciones de AM. Las bacterias se subcultivaron al 1% en medios YCFA para administraciones de PM. Se registraron los valores de OD para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de la mañana y la tarde.

Artritis tipo II inducida por colágeno modelo de ratón

50 **[0181]** Ratones DBA/1 machos adultos fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales y se dejaron aclimatar por dos semanas. En el día 0, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con 100 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de colágeno tipo II (CII) en adyuvante de Freund incompleto suplementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. El día 21, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante incompleto de Freund.

55 **[0182]** Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa de administración a continuación. Desde el Día -14 hasta el final del experimento en el Día 45, los animales se pesaron tres veces por semana. Desde el Día 21 hasta el final del experimento, los animales se calificaron tres veces por semana para detectar signos clínicos de artritis que incluyeron hinchazón de las patas delanteras y traseras, articulaciones radio-carpales (muñeca) y articulaciones tibio-tarsales (tobillo).

60 **[0183]** El día 45 los ratones se eligieron y se tomaron muestras de sangre terminales para el análisis de citoquinas.

65 **[0184]** En el Día -14, Día 0 y el Día 45, se recogieron muestras fecales para el análisis microbiológico, inmediatamente congeladas y almacenadas a -80°C.

[0185] El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón bien establecido para la artritis reumatoide [71]. La inmunización con CII causa una patogenia que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoide, incluida la hiperplasia sinovial, la infiltración de células mononucleares y la degradación del cartilago. Significativamente, el desarrollo de la CIA está mediado por las células Th17 a través de la secreción de IL-17A [72]. La respuesta inmunitaria subyacente al modelo de artritis se ve reforzada por el uso de adyuvante de Freund suplementado con *Mycobacterium tuberculosis*.

[0186] En el Día 21, los bazo se recogieron a partir de tres animales por satélite en cada grupo. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Las citocinas, que incluyen TNF- α , IL-6, IFN- β , IL-4, IL-10 e IL-17, se cuantificaron en sobrenadantes de cultivo y en suero terminal mediante Luminex. La proliferación celular se cuantificó utilizando un método de incorporación de timidina tritiada.

Grupos de tratamiento y dosis

[0187] Todos los grupos fueron n = 15 (n = 12 para el grupo de estudio principal y n = 3 para los grupos de satélite)

[0188] El vehículo utilizado para bioterapéuticos era extracto de medio de levadura-casitona-ácidos grasos (YCFA).

Grupo	Dosis	Administración		Inducción de la enfermedad
		Ruta	Régimen	
1 Vehículo	5 ml/kg	PO	BID: Día -14-final	Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC
2 Bioterapéutico # 751	5 ml/kg	PO	BID: Día -14-final	Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC

PO: sonda oral, SC: inyección subcutánea, BID: dos veces al día, CFA: adyuvante completo de Freund.

Peso corporal

[0189] Desde el día -14 hasta el final del experimento, los animales se pesaron tres veces por semana. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

Observaciones clínicas no específicas

[0190] Desde el Día -14 hasta el final del experimento, los animales se comensaron diariamente para detectar signos clínicos no específicos para incluir postura anormal (encorvada), condición del pelaje anormal (piloerección) y los niveles de actividad anormales (reducción o aumento de la actividad).

Observaciones clínicas

[0191] Desde el día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se calificaron tres veces por semana para detectar signos clínicos de artritis que incluyen hinchazón de las patas delanteras y traseras, articulaciones radio-carpales (de la muñeca) y articulaciones tibio-tarsales (tobillo). Cada miembro se puntuó utilizando la siguiente escala: (0) normal, (1) hinchazón leve, (2) hinchazón leve, (3) hinchazón moderada y (4) hinchazón severa. Se calculó una puntuación clínica agregando cada puntuación de extremidades. La puntuación clínica máxima posible para un animal fue (16). Los animales con un puntaje igual a (12) en dos ocasiones consecutivas y los animales con un puntaje mayor que (12) en cualquier ocasión fueron sacrificados. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

Análisis de proliferación celular

[0192] En el día 21, tres animales por grupo de satélites fueron sacrificados y los bazo fueron disecados. Las células del bazo se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Después de 72 horas, las células se pulsaron durante la noche en presencia de timidina tritiada. La proliferación celular se cuantificó midiendo la incorporación de timidina. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM). Los sobrenadantes fueron tomados y ensayados para detectar la presencia de citoquinas clave.

Análisis de citocinas

[0193] Los sobrenadantes terminales de los cultivos de células de bazo se analizaron para cuantificar TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 de Luminex. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

Análisis microbiológico

[0194] En el Día -14, Día 0 y el Día 45, las muestras fecales se recogieron de cada animal, inmediatamente se congelaron y se almacenaron a -80°C. Los ceca (incluido el contenido) se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80°C. Se realizó una prueba de identificación bacteriana diariamente al sembrar las bacterias.

Histopatología

[0195] Al final del experimento, las patas traseras se almacenaron en un fijador de tejido. Las muestras se transfirieron a solución de descalcificación. Las muestras de tejido se procesaron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron calificadas por un histopatólogo calificado, ciego al diseño experimental, para que los signos de artritis incluyan inflamación, daño del cartílago articular y daño al hueso metafisario subyacente. Se utilizó un sistema de puntuación detallado (ver más abajo). Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM). Se proporcionaron datos crudos y analizados, así como imágenes representativas.

Tabla 1: Sistema de puntuación de histopatología

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial suave con inflamación dominada por neutrófilos. Números bajos de neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que involucra tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación; puede consistir en residuos de tejido necrótico.
3	Hiperplasia sinovial con inflamación marcada que involucra tanto neutrófilos como macrófagos. Pérdida de revestimiento sinoviocítico. La inflamación puede extender desde el sinovio al tejido circundante que incluye musculatura. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación, junto con residuos de tejido necrótico.
Daño de cartílago articular	
0	Articulación normal
1	Cartílago articular muestra solo cambio degenerativo suave. Formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente.
2	Cartílago articular muestra cambio degenerativo moderado y pérdida focal. Formación de pannus está presente focalmente.
3	Alteración significativa y pérdida de cartílago articular con formación extensiva de pannus.
Daño al hueso metafisario subyacente	
0	Articulación normal
1	Ningún cambio hueso metafisario subyacente.
2	Puede ser necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
3	Alteración o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensiva, necrosis o fibrosis que se extiende al espacio medular de metáfisis.

Resultados y análisis

Supervivencia y observaciones clínicas no específicas.

[0196] Algunos animales se sacrificaron antes del final programado del estudio debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis o debido a la gravedad de las observaciones clínicas no específicas.

[0197] Tres animales fueron sacrificados o encontrados muertos o sacrificados durante el período de tratamiento previo (Día -14 a Día 0): un animal en el Grupo 1 (tratado con vehículo, el animal llegó del proveedor con la pata rota y fue sacrificado) y dos animales en el Grupo 2 (tratamiento bioterapéutico n° 751, posible dosificación pulmonar en el primer día antes del tratamiento y signos clínicos posteriores a la dosis en el segundo día antes del tratamiento).

[0198] Ocho animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis: cinco animales en el grupo 1 (tratados con vehículo) y tres animales del Grupo 2 (bioterapéutico # 751-tratados).

[0199] Se sacrificaron cuatro animales debido a la gravedad de los signos clínicos inespecíficos que incluyen postura anormal (encorvada), condición anormal del pelaje (piloerección), niveles de actividad anormales (actividad reducida): tres animales en el Grupo 1 (tratado con vehículo) y un animal en el Grupo 2 (tratamiento bioterapéutico # 751).

Pesos corporales

[0200] Los datos de peso corporal registrados desde el Día -14 hasta el Día 0 y expresados como un porcentaje de los pesos corporales iniciales (Día -14) se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Dunnett para múltiples comparaciones con el Día -14 y luego para comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 19. Los datos de los animales sacrificados antes del final programado del experimento se excluyeron de los análisis.

[0201] Cuando se compara con el día -14, administraciones dos veces al día por sonda oral indujeron una pérdida significativa de peso corporal en el grupo tratado con vehículo en el día -9 y el Día -7.

[0202] Los pesos corporales medidos entre el Día -14 y el Día -1 en los grupos tratados con bioterapia no difirieron de los pesos corporales medidos en el grupo tratado con vehículo en un día cualquiera.

[0203] Los datos de peso corporal registrados desde el día 0 hasta el día 28 y expresados como un porcentaje del peso inicial del cuerpo (día 0) se analizaron mediante ANOVA de dos vías, seguido de la prueba posterior de Dunnett para múltiples comparaciones con el día 0 en el grupo de vehículos luego para comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 20. Los datos de los animales sacrificados antes del final programado del experimento y de los animales Satélite se excluyeron de los análisis. Los datos del día 28, el día 35 y el día 42 se analizaron adicionalmente mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo.

[0204] La aparición de signos clínicos de la artritis se asoció con una pérdida de peso corporal significativa en el Día 26 y el Día 28 ($p < 0,0001$) en comparación con el día 0 en el grupo tratado con vehículo.

[0205] No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en el día 35 o el día 42.

Observaciones clínicas

[0206] Los datos de la puntuación clínica se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba posterior de Dunnett para múltiples comparaciones entre días en el grupo tratado con vehículo y luego para comparaciones múltiples entre grupos experimentales y el grupo tratado con vehículo cada día. Los datos se presentan en la Figura 21. Los datos registrados de animales sacrificados antes del final del experimento se excluyeron del análisis. Cuando los animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis, la última puntuación registrada se informó para los días siguientes y se utilizó en los análisis estadísticos.

[0207] Se observó un aumento significativo de las puntuaciones clínicas en el grupo tratado con vehículo desde el día 28 hasta el día 45 ($p < 0,0001$) en comparación con el día 21.

[0208] Bioterapéuticos nº 751 indujo una reducción de las puntuaciones clínicas en comparación al grupo tratado con vehículo desde el día 31 hasta el día 45, aunque la diferencia no fue significativa.

Análisis de proliferación celular

[0209] Para validar el ensayo, los esplenocitos se cultivaron en presencia de soluble anti-CD3 y anti-CD28 (anti-CD3/CD28) como estímulos de control positivo para confirmar el potencial proliferativo de las células.

[0210] Respuestas proliferativas fuertes a anti-CD3/CD28 se observaron en todos los grupos experimentales, que muestran que las células estaban sanas, viables y capaces de responder a las señales de activación.

[0211] Para ensayar la respuesta proliferativa en presencia de colágeno II (CII), los esplenocitos se cultivaron en presencia de CII a 50 µg/ml. La respuesta proliferativa de los esplenocitos a la CII se analizó mediante un ANOVA bidireccional seguido de la prueba posterior de Sydak para comparaciones múltiples entre los esplenocitos estimulados no estimulados y la CII y el ANOVA de una vía, seguido de la prueba posterior de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por la CII en diferentes grupos experimentales Con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 22.

[0212] La CII indujo un aumento altamente significativo de la incorporación de ³H-timidina (cpm) en comparación con los esplenocitos no estimulados en el grupo tratado con vehículo ($p < 0,0001$).

[0213] Los grupos tratados con bioterapéutico # 751 demostraron niveles significativamente más bajos de la proliferación de esplenocitos inducida por CII que el grupo tratado con vehículo.

Niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de tejidos.

[0214] Los niveles de cada citoquina se midieron en sobrenadantes de cultivos tisulares derivados de cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 mediante análisis luminex. Estos mostraron respuestas robustas para todas las citocinas medidas (los niveles medios en el grupo del vehículo fueron los siguientes: IL-4 = 6,406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10,987 pg/ml; IL-17A = 11,447 pg/ml; IFN-γ = 15,581 pg/ml; TNF-α = 76 pg/ml).

[0215] Las siguientes secciones resumen los datos obtenidos de los cultivos estimulados-II de colágeno. Donde corresponda, se realizaron análisis estadísticos de las diferencias entre los niveles de citoquinas en sobrenadantes de esplenocitos no estimulados y estimulados con CII utilizando ANOVA de dos vías, seguido de la prueba posterior de Sidak para comparaciones múltiples, mientras que de ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett

se usó para comparar la respuesta estimulada por CII en grupos tratados con bioterapéuticos con el grupo tratado con vehículo. No hubo diferencia significativa en los niveles de citoquinas entre los grupos en ambos casos. Esto es probablemente debido al pequeño tamaño de muestra utilizado ($n = 3$).

- 5 **[0216]** Con el fin de presentar con mayor precisión la distribución de los datos para las citoquinas con una distribución sustancial de los datos, estos se presentan como gráficos de dispersión.

- 10 **[0217]** El grupo de los medios de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con CII fueron <5 pg/ml. Estos no se consideran biológicamente significativos y no se incluyen aquí. Las medias grupales de TNF- α en sobrenadantes de cultivos tisulares después de la estimulación con colágeno estaban por debajo del límite de cuantificación.

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (Figura 23)

- 15 **[0218]** Junto con IL-17, el IFN- γ es la principal enfermedad que conduce a las citoquinas en el modelo CIA. El diagrama de dispersión en la Figura 23 demuestra los niveles de IFN- γ después de la estimulación de la CII, con una mediana del grupo mayor para el grupo tratado con vehicle en comparación con el tratamiento bioterapéutico. El resultado atípico del mismo grupo del sujeto 2 es responsable de la mediana más alta en este grupo para IFN- γ e IL-10.

20 Niveles de sobrenadante de IL-17A (Figura 24)

[0219] Los niveles de IL-17A fueron 50 pg/ml en cultivos estimulados con CII para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de esta citoquina parecían ser más bajos en el grupo bioterapéutico en comparación con el vehículo tratado.

25 Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

- 30 **[0220]** Los niveles de IL-10 en el grupo tratado con vehículo fueron 13 pg/ml y 2,1 pg/ml para cultivos estimulados con CII y de control de medios, respectivamente. Se pueden esperar niveles más altos de IL-10 (que es una citoquina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo porque la inflamación y la inducción de citoquinas proinflamatorias podrían ir acompañadas de un mecanismo de retroalimentación antiinflamatoria.

Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

- 35 **[0221]** Las citocinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α no se producen típicamente a niveles elevados en los cultivos anti-CII. Sin embargo, sus niveles pueden verse alterados como resultado de la modulación inmune. Los niveles de IL-6 en los cultivos estimulados con CII fueron modestos, alcanzando 10 pg/ml. Aunque eran más altas que en los cultivos de control de medios, estas diferencias eran demasiado pequeñas para proporcionar una razón para realizar análisis estadísticos.

40 Análisis microbiológico

[0222] El crecimiento bacteriano se confirmó midiendo la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro. La identidad bacteriana se confirmó comparando imágenes de placas con rayas con imágenes de referencia.

- 45 **[0223]** Siguiendo el método mejorado de preparación bacteriana, se administraron dosis consistentemente altas de cepa bacteriana desde el Día -2 y el Día -3 según lo indicado por los altos valores de OD medidos.

[0224] Las muestras fecales se recogieron y se congelaron instantáneamente el día -14, el día 0 y al final.

50 Histopatología

[0225] Los resultados de histopatología se muestran en las Figuras 66-70. Como se esperaba para este modelo, se observó una variabilidad intraindividual e interindividual en términos de la presencia/ausencia de artritis o la severidad del cambio presente.

- 55 **[0226]** La naturaleza de la patología era como se esperaba para este modelo, con extensa inflamación crónica-activa mezclada de la membrana sinovial y la bolsa se extiende a implicar a los tejidos blandos peri-articulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico).

- 60 **[0227]** En las articulaciones más gravemente afectadas hubo degeneración y pérdida del cartílago articular con residuos intraarticulares e inflamación y rotura de la articulación y la estructura ósea por fibrosis e inflamación.

- 65 **[0227]** La incidencia de los cambios histopatológicos fue: vehículo - 80% (16/20); bioterapéutica n° 751 - 45% (9/20). El tratamiento con Bioterapéutico n° 751 redujo la incidencia de puntuaciones histopatológicas en las extremidades posteriores del ratón cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo (ver Figuras 66-69). Las puntuaciones de

histopatología se analizaron mediante ANOVA de una vía para datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) seguidos de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo. La bioterapéutica nº 751 indujo una reducción significativa de las puntuaciones de inflamación articular observadas en histopatología cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,01$). Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de las puntuaciones de daño del cartílago observadas en histopatología cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). Bioterapéutico Nº 751 indujo una reducción significativa de las puntuaciones de daño óseo observadas en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de las puntuaciones totales de histopatología cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,01$).

Resumen

[0228] Se observó un aumento en las puntuaciones clínicas a partir del día 28 después de la primera administración de colágeno de tipo II, como se espera en este modelo de artritis en ratones DBA/1. Bioterapéutico nº 751 demostró ser eficaz en el tratamiento de la artritis en este modelo y Bioterapéutico Nº 751 fue efectivo para reducir la gravedad de las puntuaciones clínicas. Bioterapéutico Nº 751 también fue efectivo para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se demostró en el análisis histopatológico.

[0229] Las respuestas de recuerdo proliferativo al colágeno II se observaron en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. La respuesta específica al colágeno se redujo significativamente después del tratamiento con el producto bioterapéutico nº 751 (Grupo 2).

[0230] La mayoría de las citoquinas de células T ensayadas mostraron aumentos detectables entre el colágeno II estimulado y controles de medios en el grupo tratado con vehículo. Estos aumentos no fueron tan obvios en el grupo tratado con terapia bioterapéutica. Esto apoya ampliamente las respuestas de recuerdo proliferativo al colágeno II descrito anteriormente.

[0231] Hubo evidencia de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patógena en este modelo y en la AR humana. La correlación de niveles reducidos de citoquinas con proliferación reducida sugiere una modulación inmune. No hubo pruebas de que esta modulación fuera resultado de niveles aumentados de IL2 asociada a Th2 o con aumentos en la citoquina moduladora inmune, la IL-10.

Ejemplo 4 - Análisis adicional del efecto de los inóculos bacterianos en el modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico

[0232] Los ratones ensayados en el Ejemplo 1 se sometieron a análisis adicionales para caracterizar adicionalmente el efecto de las composiciones de la invención sobre la respuesta inflamatoria de asma alérgica.

Materiales y métodos

[0233] Extracción de sangre y preparación de suero el día 14. Se recogieron muestras de sangre de animales mediante punción cardíaca. El suero se aisló de la muestra de sangre mediante centrifugación durante 5 min a 14.000 g y se almacenó a -20°C .

[0234] Extracción de órganos en el día 14. Recolección del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación instantánea y análisis de seguimiento. El fluido de BAL restante se congeló instantáneamente para el análisis de seguimiento.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y líquido BAL

[0235] La producción de anticuerpos IgG1 específicos de IgE total y ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en el BAL y el suero por ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y análisis histológico.

[0236] Los lóbulos del pulmón izquierdo se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para la inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y la producción de moco. La infiltración inflamatoria se puntuó con el siguiente sistema de clasificación:

0 - normal

1 - infiltrados inflamatorios leves

2 - Infiltrados inflamatorios moderados

3 - Infiltrados inflamatorios marcados

4 - Infiltrados inflamatorios severos

5 - Infiltrados inflamatorios muy severos

[0237] En cada campo de visión, las vías respiratorias se midieron en números de tamaño y de células de moco se cuantificaron/ um.

Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar.

[0238] Los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores inflamatorios se congelaron instantáneamente para la medición posterior de CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 y CCL5 mediante ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados y analisis

[0239] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 28-46.

[0240] En apoyo de los hallazgos descritos en el Ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de ratones tratados con la cepa 751 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en el puntaje medio de inflamación (ver Figuras 32 y 34).

[0241] Se analizaron los niveles de anticuerpos en el fluido BAL y el suero (ver Figuras 28-31). No se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de anticuerpos séricos. Esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la dispersión de los datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. Además, los niveles basales de anticuerpos séricos podrían haber enmascarado cualquier cambio.

[0242] De forma similar, no se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citoquinas en el tejido pulmonar (ver Figuras 36-46). Nuevamente, esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. También es posible que el mecanismo de acción involucrado influya en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido completamente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución parcheada de la inflamación.

Ejemplo 5 - Análisis adicional del efecto de los inóculos bacterianos en el modelo de ratón de asma neutrofílica grave

[0243] Los ratones analizados en el Ejemplo 2 se sometieron a análisis adicionales para caracterizar aún más el efecto de las Composiciones de la invención sobre la respuesta neutrofílica asociada con asma grave.

Materiales y métodos

[0244] **Extracción de órganos en el día 18.** Recolección del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación instantánea y análisis de seguimiento. El fluido de BAL restante se congeló instantáneamente para el análisis de seguimiento.

[0245] **Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar (análisis de seguimiento).** Los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores inflamatorios se congelaron instantáneamente para la medición posterior de IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 e IL-33 mediante ensayo múltiple disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0246] **Medición de los niveles de anticuerpos en suero y líquido BAL (análisis de seguimiento).** La producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos del ácaro del polvo doméstico (HDM) se midió en el BAL y el suero mediante un ensayo ELISA.

[0247] **Aislamiento de pulmón e análisis histológico (análisis de seguimiento).** Los lóbulos del pulmón izquierdo

se fijaron en formalina, seguido de una inserción en parafina, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para la inflamación (infiltración peri bronquial e infiltración perivascular) y la producción de moco. La infiltración inflamatoria se puntuó con el siguiente sistema de clasificación:

- 0 - normal
- 1 - infiltrados inflamatorios leves
- 2 - infiltrados inflamatorios moderados
- 3 - infiltrados inflamatorios marcados
- 4 - infiltrados inflamatorios severos
- 5 - infiltrados inflamatorios muy severos

Resultados y analisis

[0248] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 47-64.

[0249] El análisis adicional de los niveles de anticuerpos reveló que la eficacia de la cepa bacteriana 751 también se reflejó en niveles reducidos de IgG1 específicos de HDM en el fluido y suero BAL (ver Figuras 47 y 49). No se pueden extraer conclusiones firmes sobre un efecto en los niveles de IgG2a. En general, los datos del análisis de anticuerpos sugieren una reducción relacionada con una respuesta inflamatoria reducida en general, en oposición a un efecto selectivo en el cambio de isotipo de anticuerpos.

[0250] El análisis histológico confirmó los recuentos celulares diferenciales del fluido BAL, mostrando un infiltrado celular reducido en ratones tratados con la cepa 751 (ver Figuras 51-53).

[0251] En relación con los niveles de citoquinas, como para el Ejemplo 4, la propagación de los datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y no parece que se han comportado los controles positivos y negativos como necesariamente sería de esperar. También es posible que el mecanismo de acción implique influir en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido completamente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución parcheada de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se mostró un claro efecto antiinflamatorio en los niveles de citoquinas para la cepa 751, y el control positivo anti-IL-17 Ab generalmente se comportó como se esperaba.

[0252] Con las salvedades anteriores, los datos de las Figuras 56, 58, 59, 61 y 63 sugieren que el tratamiento con las cepas bacterianas de la invención, y en particular la cepa 751 puede lograr una reducción en los niveles de IL-1b, IFNg, RANTES, MIP-1a y KC (el ortólogo de ratón de la IL-8 humana), que puede ser indicativo de un mecanismo de acción relacionado con las influencias en la liberación de quimioquinas (y, por lo tanto, en el reclutamiento de células) por las células inmunes estromales o innatas. Estas citoquinas son parte de la vía Th17. Tomando este conjunto de datos juntos, se puede sacar una conclusión clara de que la Cepa 751 fue altamente eficaz para proteger a los ratones contra la inflamación en este modelo de ratón de asma neutrofílica grave.

Ejemplo 6 - Eficacia de inóculos bacterianos en un modelo de ratón de esclerosis múltiple

Resumen

[0253] Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y los ratones se inmunizaron posteriormente con glicoproteína de oligodendrocito de mielina para inducir una encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). EAE es el modelo experimental más utilizado para la esclerosis múltiple humana. Se descubrió que las composiciones de la invención tienen un efecto sorprendente sobre la incidencia y la gravedad de la enfermedad.

Cepa

[0254] 751: bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380

Diseño del estudio

Grupos:

[0255]

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control de vehículo (por vía oral).
4. Tratamiento con cepa de inóculo de bacterias terapéuticas 751 (por vía oral).
9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (ip).
10. Grupo de control no tratado.

Número de ratones por grupo = 10

- Días -14 a día 27: Administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).
Días -14 a día 27: Administración diaria de inóculo de bacterias terapéuticas por vía oral (Grupo 4).
Días 0-28: administración de Dexametasona (i.p.) tres veces a la semana (Grupo 9)
Día 0: MOG35-55 (glicoproteína oligodendrocita de mielina - 2 mg/ml) y CFA (2 mg/ml MTB) se mezclaron 1:1 dando como resultado 1 mg/ml soluciones. Se inyectaron 100 µl de la mezcla de péptido-CFA por vía subcutánea en cada pata trasera. Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).
Día 1: Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).
Días 7 en adelante: medición de la incidencia de la enfermedad y el peso tres veces por semana.

Puntos finales y análisis

[0256] Los ratones se analizaron para determinar la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad tres veces a la semana. La puntuación se realizó a ciegas. La gravedad de la enfermedad se evaluó mediante una puntuación clínica que oscila entre 0 y 5, y 5 indican un ratón muerto (consulte el sistema de puntuación clínica a continuación).

Monitorización

[0257] En los días indicados, los ratones se pesaron y se observaron para la puntuación de actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

[0258] Observaciones de puntuación de actividad de la enfermedad:

0 - No hay cambios evidentes en la función motora en comparación con los ratones no inmunizados.

0.5 - La punta de la cola es floja.

1.0 - Cola floja.

1.5 - Cola floja e inhibición de la pata trasera.

2.0 - Cola floja y debilidad de las patas traseras.

O: hay signos evidentes de inclinación de la cabeza cuando se observa la caminata. El equilibrio es malo.

2.5 - Cola floja y arrastre de patas traseras.

- O - Hay una inclinación fuerte de la cabeza que hace que el ratón se caiga de vez en cuando.

3.0 - Cola floja y parálisis completa de las patas traseras.

3.5 - Cola floja y parálisis completa de las patas traseras.

Además de: el ratón se está moviendo alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no puede enderezarse.

Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo.

4.0 - Cola floja, pata trasera completa y parálisis parcial de la pata delantera.

- El ratón se está moviendo mínimamente alrededor de la jaula pero parece estar alerta y se alimenta

4.5 - Parálisis completa posterior y parcial de la pata delantera, sin movimiento alrededor de la jaula. El ratón se sacrifica inmediatamente y se retira de la jaula.

5.0 El ratón es sacrificado debido a una parálisis severa.

[0259] Cuando un animal tiene una puntuación de actividad de la enfermedad igual o mayor de 1, se considera que tiene una puntuación de incidencia de enfermedad positiva.

Resultados

[0260] Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 71 y 72.

[0261] La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo fue exitosa con puntajes altos mostrados por el control del vehículo y el control no tratado. El efecto del tratamiento con la cepa 751 fue sorprendente y los ratones tratados con la cepa 751 mostraron una incidencia notablemente reducida de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad. De hecho, la reducción en la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad fue comparable al grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 751 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

Ejemplo 7: Eficacia de los inóculos bacterianos en modelos de cáncer de ratónResumen

[0262] Este estudio ensayó la eficacia de composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención en cuatro modelos de tumores.

Materiales

[0263] **Sustancia de ensayo** - Cepa bacteriana n° MRX004 (cepa 751).

[0264] **Sustancia de referencia** - Anticuerpo anti-CTLA-4 (clon: 9H10, catálogo: BE0131, isotipo: Syrian Hamster IgG1, Bioxcell).

[0265] **Vehículos de prueba y sustancias de referencia** - medio de cultivo bacteriano (extracto de levadura, casitona, medio de ácido graso (YCFA)). Cada día de inyección en ratones, el anticuerpo se diluyó con PBS (ref: BE14-516F, Lonza, Francia).

[0266] **Dosis de tratamiento** - Bacterias: 2×10^8 en 200 μ L. La α -CTLA-4 se inyectó a 10 mg/kg/iny. Se administró anti-CTLA-4 a un volumen de dosis de 10 ml/kg/adm (es decir, para un ratón que pesa 20 g, se administrarán 200 μ L de sustancia de prueba) de acuerdo con el peso corporal más reciente de los ratones.

[0267] **Rutas de administración:** El inóculo bacteriano se administró mediante sonda oral (per os, PO) a través de una cánula. Las cánulas fueron descontaminadas todos los días. Anti-CTLA-4 se inyectó en la cavidad peritoneal de ratones (Intraperitoneal, IP).

[0268] **Condiciones de cultivo de la cepa bacteriana** - Las condiciones de cultivo para la cepa bacteriana fueron las siguientes:

- Pipetee 10 ml de YCFA (de las botellas preparadas de laboratorio de 10 ml E&O) en tubos Hungate
- Selle los tubos y enjuague con CO₂ con una jeringa y un sistema de escape
- Autoclave de los tubos Hungate.
- Cuando se enfríe, inocule los tubos Hungate con 1 ml de las reservas de glicerol
- Coloque los tubos en una incubadora estática a 37°C durante aproximadamente 16 horas.
- Al día siguiente, tome 1 ml de este subcultivo e inocule 10 ml de YCFA (tubos Hungate enjuagados precalentados
- de nuevo, todo por duplicado)
- Colóquelos en una incubadora estática a 37°C durante 5 a 6 h.
- Línea celular del cáncer y condiciones de cultivo.

[0269] Las líneas celulares que se usaron se detallan en la siguiente tabla:

Línea celular	Tipo	Cepa de ratón	Origen
EMT-6	Carcinoma de mama	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Carcinoma pulmonar	C57BL/6	ATCC CRL1642
Hepa1-6	Carcinoma hepatocelular	C57BL/6	IPSEN INNOVATION

[0270] La línea celular EMT-6 se estableció a partir de un carcinoma mamario murino transplantable que surgió en un ratón BALB/cCRGL después de la implantación de un nódulo alveolar mamario hiperplásico [73].

[0271] La línea celular LL/2 (LLC1) se estableció a partir del pulmón de un ratón C57BL con un tumor resultante de una implantación de carcinoma de pulmón de Lewis primario [74].

[0272] La línea de células Hepa 1-6 es un derivado de la hepatoma BW7756 de ratón que surgió en una C57/L de ratón [75].

[0273] **Condiciones de cultivo celular** - Todas las líneas celulares se cultivaron como monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire). El medio de cultivo y el suplemento se indican en la siguiente tabla:

Línea celular	Medio de cultivo	Suplemento
EMT6	RPMI 1640 que contiene L-glutamina 2 mM (ref: BE12-702F, Lonza)	10% de suero fetal bovino (ref: n° 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640 que contiene L-glutamina 2 mM (ref: BE12-702F, Lonza)	10% de suero fetal bovino (ref: n° 3302, Lonza)
Hepa1-6	DMEM (ref: 11960-044, Gibco)	Suero bovino fetal al 10% (ref: n° 3302, Lonza) penicilina-estreptomicina L-glutamina 2 mM (Sigma G-6784)

[0274] Para el uso experimental, las células tumorales adherentes se desprendieron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-verseno (ref: BE17-161E, Lonza), en medio de Hanks sin calcio o magnesio (ref: BE10-543F, Lonza) y se neutralizaron por adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad se evaluará mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano al 0,25%.

Uso de animales –

[0275] Se obtuvieron ratones Balb/C hembra (BALB/cByJ) sanos, de peso y edad coincidentes de CHARLES RIVER (L'Arbresles) para los experimentos del modelo EMT6.

[0276] Ratones hembra sanos C57BL/6 (C57BL16J), de peso y edad coincidentes, se obtuvieron de Charles River (L'Arbresles) para los experimentos de modelo LL/2 (LLC1) y Hepal-6.

[0277] Los animales se mantuvieron en estado sanitario SPF de acuerdo con las directrices de FELASA, y se siguieron los procedimientos experimentales y de alojamiento de los animales de acuerdo con los Reglamentos francés y europeo y la Guía NRC para el cuidado y uso de animales de laboratorio [76,77]. Los animales se mantuvieron en habitaciones de alojamiento en condiciones ambientales controladas: temperatura: 22 ± 2°C, humedad 55 ± 10%, fotoperíodo (12h luz/12h oscuridad), aire filtrado HEPA, 15 intercambios de aire por hora sin recirculación. Los recintos de animales se proporcionaron con espacio estéril y adecuado con material de cama, alimentos y agua, enriquecimiento ambiental y social (alojamiento de grupo) como se describe: jaulas de 900 cm² (ref: verde, Tecniplast) en estantes ventilados, ropa de cama Epicea (SAFE), 10 kGy Dieta irradiada (A04-10, SAFE), alimento completo para roedores inmunocompetentes - Extruido R/MH, agua de botellas de agua.

Diseño experimental y tratamientos.

Actividad antitumoral, modelo EMT6.

[0278] Programa de tratamiento: el inicio de la primera dosificación se consideró D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales EMT-6 como se describe a continuación. En D24, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0279] El programa de tratamiento se resume en la siguiente tabla:

Grupo	Nº de animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Horario de Tratamiento
1	8	No tratado	-	-	-
2	8	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Cepa bacteriana nº 1 (MRX004)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

[0280] Se realizó el seguimiento de los animales como se describe a continuación.

[0281] La inducción de tumores EMT6 en animales - En D14, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de 1x10⁶ EMT- 6 células en 200 µL de RPMI 1640 en el flanco derecho de los ratones.

[0282] La eutanasia - Cada ratón fue sometido a eutanasia cuando alcanzó un punto final humano como se describe más adelante, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

[0283] Protocolo de tratamiento - El inicio de la primera dosificación se consideró como D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Coutermon, Francia). En D0, los ratones recibirán vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales LL/2 como se describe a continuación. En la D27, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0284] El esquema de tratamiento se resume en la tabla siguiente:

Grupo	No animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Horario de Tratamiento
1	8	No tratado	-	-	-
2	9	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
3	9	Cepa bacteriana nº 1 (MRX004)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

[0285] Se realizó el seguimiento de los animales como se describe a continuación.

[0286] La inducción de tumores LL/2 (LLC1) en animales - En D14, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de 1x10⁶ LL/2 (LLC1) células en 200 µL de RPMI 1640 en el flanco derecho de los ratones.

[0287] La eutanasia - Cada ratón fue sometido a eutanasia cuando alcanzó un punto final humano como se describe más adelante, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6.

[0288] Protocolo de tratamiento - El inicio de la primera dosificación se consideró como D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couter-non, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales Hepa 1-6 como se describe a continuación. En D16, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0289] El programa de tratamiento se resume en la siguiente tabla:

Grupo	Nº de animales	Tratamiento	Dosis	Ruta	Horario de Tratamiento
1	9	No tratado	-	-	-
2	9	Vehículo (medios)	-	PO	Q1Dx42
4	9	Cepa bacteriana nº 2 (MRX004)	2x10 ⁸ bacterias	PO	Q1Dx42
7	9	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TWx2

[0290] Se realizó el seguimiento de los animales como se describe a continuación.

[0291] Inducción ortotópica de células tumorales Hepa 1-6 en animales mediante inyección intrasplénica - En D14, un millón (1x10⁶) células tumorales Hepa 1-6 en 50 µl de medio RPMI 1640 se transplantaron a través de inyección intra-

esplénica en ratones. Brevemente, se realizó una pequeña incisión en el costado subcostal izquierdo y el bazo se exteriorizó. El bazo se expuso en una almohadilla de gasa estéril y se inyectó bajo control visual con la suspensión celular con una aguja de calibre 27. Después de la inoculación celular, se extirpó el bazo.

5 **[0292]** La eutanasia - Cada ratón fue sometido a eutanasia cuando alcanzó un punto final humano como se describe en la siguiente sección, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

[0293] La evaluación de la carga tumoral en la eutanasia - En el momento de la terminación, se recogieron y pesaron los hígados.

10 **Monitoreo de animales**

[0294] Monitoreo clínico: la longitud y la anchura del tumor se midieron dos veces a la semana con calibradores y el volumen del tumor se estimó mediante esta fórmula [78]:

$$\text{Volumen de tumor} = \frac{\text{anchura}^2 \times \text{longitud}}{2}$$

20 **[0295]** Puntos finales [79]: signos de dolor, sufrimiento o angustia: postura del dolor, máscara facial para el dolor, comportamiento; Tumor que excede el 10% del peso corporal normal, pero no excede los 2000 mm³; Tumores que interfieren con la deambulación o la nutrición; Tumor ulcerado o erosión tisular; 20% de pérdida de peso corporal restante durante 3 días consecutivos; mala condición corporal, separación, caquexia, deshidratación; ausencia prolongada de respuestas voluntarias a estímulos externos; respiración agitada rápida, anemia, sangrado significativo; 25 signos neurológicos: círculos, convulsiones, parálisis; disminución sostenida de la temperatura corporal; distensión abdominal.

[0296] Anestesia - anestesia de gas isoflurano se utilizaron para todos los procedimientos: cirugía o la inoculación del tumor, las inyecciones IV, recogida de sangre. Se utilizó anestesia con ketamina y xilazina para el procedimiento quirúrgico de estereotaxia.

[0297] Analgesia - carprofeno o protocolo analgesia carprofeno/buprenorfina multimodal fueron adaptados a la gravedad del procedimiento quirúrgico. Se proporcionó atención no farmacológica para todos los procedimientos dolorosos. Además, la atención farmacológica que no interfiere con los estudios (tratamiento del tema) se brindó por recomendación del veterinario asistente.

[0298] Eutanasia – La eutanasia de los animales se realizó mediante sobre-dosificación de anestesia gas (isoflurano), seguido por dislocación cervical o exanguinación.

40 Resultados

Actividad antitumoral, modelo EMT6.

45 **[0299]** Los resultados se muestran en la Figura 73. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invención condujo a una clara reducción en el volumen del tumor con relación a ambos controles negativos. El control positivo también condujo a una reducción en el volumen del tumor, como se esperaba.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

50 **[0300]** Los resultados se muestran en la Figura 74. Los controles positivos y negativos no aparecen como era de esperar, porque el volumen del tumor fue mayor en los ratones tratados con el control positivo que en los grupos de control negativo. Sin embargo, el volumen del tumor en los ratones tratados con la cepa bacteriana de la invención fue comparable al grupo de control positivo, que es consistente con un efecto terapéutico útil.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6.

60 **[0301]** Los resultados se muestran en la Figura 75. El control negativo no tratada no aparece como sería de esperar, ya que el peso del hígado fue menor en este grupo de que los otros grupos. Sin embargo, el control negativo del vehículo y los grupos de control positivo aparecen como se esperaba, porque los ratones tratados con vehículo solo tenían hígados más grandes que los ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA4, lo que refleja una mayor carga tumoral en el grupo de control negativo del vehículo. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invención condujo a una clara reducción del peso del hígado (y, por lo tanto, de la carga tumoral) en relación con los ratones en el grupo de control negativo del vehículo.

65 **[0302]** Estos datos indican que la cepa 751/MRX004 puede ser útil para tratar o prevenir el cáncer, y en particular para reducir el volumen del tumor en los cánceres de mama, pulmón e hígado.

Ejemplo 8 - Acoplamiento a células humanas en medio YCFAResumen

[0303] El nivel de unión de la cepa 751 y un número de cepas *Bifidobacterium breve* a las células humanas se determinó a 3 puntos de tiempo distintos en medio YCFA. Las bacterias unidas a las células humanas se resuspendieron en medio y luego se analizó la densidad óptica del medio: cuanto mayor sea la densidad óptica, mayor será el número de células bacterianas y, por lo tanto, mayor será el nivel de unión de las células bacterianas a las células humanas. Se encontró que la cepa 751 mostraba una unión reducida a las células humanas en comparación con las cepas de referencia *Bifidobacterium breve*.

Resultados y analisis

[0304] Los resultados del experimento se muestran en la Figura 76.

[0305] Como se muestra en la Figura 76, las cepas de *Bifidobacterium breve* muestran un alto nivel de unión a células humanas en todos los puntos de tiempo. Por otro lado, la cepa 751 tiene un nivel de unión a las células humanas drásticamente reducido. Por lo tanto, la baja adherencia a las células humanas de la cepa 751 puede aumentar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención sobre la vía de IL-17 o Th17 y sobre las enfermedades mediadas por la vía de IL-17 o Th17.

Ejemplo 9 - Ensayo que detecta la producción de exopolisacáridosResumen

[0306] El nivel de producción de exopolisacárido (EPS) por la cepa bacteriana de la invención (751) y un número de cepas de *Bifidobacterium breve* se analizó a 37°C durante 48 horas y a 30°C durante 72 horas. Los EPS son polisacáridos producidos por ciertas bacterias que se unen a la superficie exterior de la célula bacteriana. El nivel de EPS en la superficie de las bacterias se puede determinar utilizando un ensayo de Congo Red que se une a los polisacáridos. Una mayor intensidad de la absorbancia del Congo Red indica una mayor concentración de EPS en la superficie de las bacterias. Se encontró que la cepa bacteriana de la invención produce y se enlaza con más EPS que las cepas de *Bifidobacterium breve*.

Resultados y analisis

[0307] Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 77.

[0308] Como se muestra en la Figura 77, la cepa bacteriana de la invención mostró una mayor absorbancia del Congo Red que las cepas *Bifidobacterium breve* a temperaturas y puntos temporales. Por lo tanto, la cepa de la invención muestra una mayor producción de EPS y un mayor nivel de EPS unidas extracelulares. Como los EPS permiten que las bacterias se unan al moco y las células epiteliales, la cepa bacteriana de la invención puede ser útil para competir con las células patógenas por los sitios de unión en las células epiteliales y dentro de las membranas mucosas. Por lo tanto, la cepa bacteriana de la invención puede ser útil para modular el microbioma y tratar varias enfermedades asociadas con el microbioma.

Ejemplo 10 - Pruebas de estabilidad

[0309] Una composición descrita en el presente documento que contiene al menos una cepa bacteriana descrita en el presente documento se almacena en un recipiente sellado a 25°C o 4°C y el recipiente se coloca en una atmósfera con 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, 2.5 años o 3 años, al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana permanecerá medida en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Ejemplo 11 - Ensayo de producción de exopolisacáridos unidos a MRX004 y liberados

[0310] Para la extracción de EPS, MRX004 se cultivó en 10 ml de YCFA hasta que se alcanzó la fase exponencial tardía, cuando las células bacterianas y los sobrenadantes fueron separados por centrifugación. Las células se lavaron una vez con PBS para eliminar cualquier medio de cultivo restante. Las EPS secretadas o liberadas (EPS-R) se precipitaron de los sobrenadantes del cultivo por tratamiento con etanol al 100% helado (durante la noche a 4°C con agitación suave). Para extraer el EPS capsular o unido (EPS-B), las células se incubaron con EDTA 0,05 M (toda la noche a 4°C con agitación suave), y los sobrenadantes de este tratamiento se recogieron y posteriormente se trataron con etanol helado al 100% (toda la noche a 4°C con agitación suave) para precipitar EPS-B. Las EPS-B precipitadas y la EPS-R se sedimentaron por centrifugación y se dejaron secar brevemente en una campana laminar antes de resuspenderse en suficiente agua ultrapura estéril para lograr una solución uniforme. Para purificar más las muestras, se dializaron contra agua ultrapura estéril en una proporción de 1:100 durante 48 horas con 3 cambios de tampón. EPS-B y EPS-R se cuantificaron utilizando el método de ácido fenol-sulfúrico utilizando glucosa como estándar.

Usando este ensayo, se encontró que MRX004 produce una mayor cantidad de EPS-R (115 µg) que EPS-B (17 µg) (Figura 78).

Ejemplo 12 - Ensayo de unión de MRX004 a células Caco-2

[0311] La unión de MRX004 a células huésped se analizó usando un ensayo de co-cultivo *in vitro* con células epiteliales intestinales Caco-2. Las células Caco-2 se sembraron a una densidad de 1×10^6 . Las bacterias se cultivaron en 10 ml de YCFA hasta que alcanzaron la fase exponencial tardía, cuando se sedimentaron, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo celular sin antibióticos. La densidad bacteriana se ajustó para obtener una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 10:1 (lo que se confirmó mediante la siembra en placa en agar YCFA utilizando el protocolo estándar WASP), y MRX004 se incubó conjuntamente con células Caco-2 en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 2 horas. Posteriormente se eliminó el medio y las bacterias no unidas se eliminaron lavando las células Caco-2 tres veces con PBS. Las células Caco-2 unidas a las bacterias se lisaron y se retiraron del recipiente utilizando un tratamiento con Triton X-100 al 0,1%, y se colocaron 50 µl de volúmenes de lisado diluido en agar YCFA utilizando el WASP. El acoplamiento se calculó contando los números de bacterias recuperadas del lisado y expresando esto como un porcentaje del total de bacterias. Se encontró que MRX004 muestra una adherencia de bajo nivel (0,3% del cultivo total) a las células Caco-2 (Figura 79).

Ejemplo 13 - Caracterización de la actividad enzimática

[0312] El sistema de prueba de índice de perfil analítico (API®) se compone de tiras que contienen pruebas bioquímicas miniaturizadas que ensayan para la actividad enzimática en especies bacterianas. MRX004 (cepa 751, la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380) se caracterizó mediante dos sistemas de prueba API: Rapid ID 32A: este sistema está diseñado específicamente para especies anaeróbicas y abarca pruebas para el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y nitratos, así como actividad de fosfatasa alcalina; y API® 50 CH: este sistema ensaya la fermentación de 49 fuentes de carbohidratos y puede utilizarse junto con el medio API® CHL para el análisis de especies anaeróbicas.

[0313] La prueba de Rapid ID 32A se llevó a cabo en colonias bacterianas según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las bacterias se cultivaron en agar YCFA durante 24 horas a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica. Las colonias se eliminaron de las placas utilizando un bucle de inoculación estéril de 5 µl y se resuspendieron en una ampolla de 2 ml de Medio de Suspensión API® hasta obtener una densidad aproximadamente equivalente a la del estándar N° 4 de McFarland. Se agregaron cincuenta y cinco microlitros de suspensión bacteriana a cada cúpula en una tira de Rapid ID 32A, y la prueba de ureasa se cubrió con dos gotas de aceite mineral. Las tiras se cubrieron con una tapa de plástico y se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 4 horas, después de lo cual se desarrolló la fila inferior de cúpulas utilizando los siguientes reactivos: NIT: 1 gota cada una de NIT1 y NIT2; IND: 1 gota de reactivo de James; todas las cúpulas restantes: 1 gota de reactivo FastBlue. Las tiras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual se registró el color de cada cúpula y se le asignó un valor negativo, intermedio positivo o positivo.

[0314] Los resultados del análisis de Rapid ID 32A se muestran en la Figura 80. MRX004 dieron positivo para la fermentación de varias fuentes de hidratos de carbono, a saber, α -galactosidasa y β -galactosidasa, α -glucosidasa y β -glucosidasa, α -arabinosa, manosa y rafinosa, así como los aminoácidos arginina, prolina, fenilalanina, leucina, tirosina, glicina e histidina. Curiosamente, se han informado roles para algunos de estos aminoácidos en el asma. Por ejemplo, se ha informado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina e histidina se asocia con efectos adversos en el asma, incluido el aumento de la inflamación, la producción de histamina y la hipersensibilidad de las vías respiratorias. Además, el metabolismo de la arginina está implicado en la patogénesis del asma, ya que se han informado niveles elevados del metabolito de la arginina L-ornitina en pacientes pediátricos y la administración de la inflamación atenuada con arginina en un modelo de asma *in vivo*. Según estos informes, es posible que el metabolismo de los aminoácidos por MRX004 pueda estar involucrado en los efectos anti-asma de esta cepa.

[0315] Análisis comparativo Rapid ID 32A se llevó a cabo entre MRX004 y cuatro cepas de tipo *B. breve*, que están anotadas en la Figura 80B como Bif Ref 1 (DSM 20091), Bif Ref 2 (DSM 20213), Bif Ref 6 (JCM 7017) y Bif Ref 7 (UCC2003). Este análisis demostró que MRX004 fue la única cepa ensayada para fermentar la polisacárida rafinosa, lo que puede ser significativo, porque la rafinosa está involucrada en la producción de componentes bacterianos como exopolisacáridos, y la fermentación de la rafinosa también puede reportar efectos en el huésped, como aumento del butirato cecal, aumento de la proliferación gastrointestinal y pérdida de peso.

[0316] La prueba API® 50 CH se llevó a cabo para examinar más a fondo el metabolismo de los carbohidratos en MRX004. Según las instrucciones del fabricante, las bacterias se cultivaron en 10 ml de caldo YCFA durante 16-18 horas a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica. Este cultivo se diluyó en 10 ml de Medio API® CHL para alcanzar una densidad aproximadamente equivalente al estándar N° 2 de McFarland, y se usaron 110 µl de esta mezcla para inocular cada cúpula en un conjunto de tiras reactivas API® 50 CH. Las tiras reactivas se incubaron en una caja de incubación humidificada a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica durante 48 horas, después de lo cual se registró el color de cada cúpula y se le asignó un valor negativo, intermedio positivo, positivo o dudoso.

[0317] Usando API® 50, MRX004 dio positivo para la utilización de las siguientes fuentes de carbohidratos: almidón (almidón), amigdalina, arbutina, celobiosa, esculina, galactosa, gentiobiosa, glucosa, glucógeno, fructosa, fucosa, lactosa, maltosa, manosa, manitol, melibiosa, melezitosa, metil α -D-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, ribosa, sacarosa (sucrosa), salicina, sorbitol, trehalosa, turanosa y xilitol. Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos para la prueba Rapid ID 32A en que MRX004 demostró la fermentación de galactosa, glucosa, manosa y rafinosa en ambos sistemas de prueba. Curiosamente, algunos sustratos de carbohidratos MRX004, como la galactosa y la fructosa, pueden estar implicados en el mecanismo de acción de esta cepa, en función de sus efectos informados en la literatura. La galactosa α -1,3-galactosa derivada de fuentes cárnicas es un conocido alérgeno y agente causante de la anafilaxia, y los niveles de ingesta de fructosa en la dieta están relacionados con una mayor gravedad del asma. Tomados en conjunto, ambos conjuntos de datos API® para MRX004 sugieren que el metabolismo de esta cepa puede desempeñar un papel en sus efectos contra el asma.

Ejemplo 14 - Análisis del genoma

[0318] Una comparación del contenido genoma de la cepa MRX004 y las cepas de referencia de *B. breve*, 1, 2, 6 y 7 se realizó utilizando blastn como parte de la BLAST + 2.3.0 conjunto de programas. A lo largo del análisis se empleó una puntuación de corte de valor E máximo de 10E-5.

[0319] Se identificaron 333 genes (Tabla 1) que están presentes en el genoma de la cepa MRX004 pero están ausentes de las cepas *B. breve* de referencia 1 (DSM 20091), 2 (DSM 20213), 6 (JCM 7017) y 7 (UCC2003). Muchos de los genes enumerados en la Tabla 1 se observan con frecuencia como hipervariables entre las cepas de *B. breve* [80]. Como se esperaba, las regiones de variabilidad incluyen genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de carbohidratos, genes asociados a fagos, elementos móviles, así como 173 genes predichos para codificar proteínas o genes de función desconocida.

[0320] Los genes que están presentes en MRX004 pero ausentes de cepas *B. breve* de referencia 1, 2, 6 y 7 se enumeran en la Tabla 1. Los genes que no se resaltan están ausentes en más de una de las cuatro cepas de referencia. La gran cantidad de genes que están presentes en MRX004 pero que no están presentes en numerosas cepas de referencia de *B. breve* sugieren que MRX004 es distinto y/o distinguible de estas cepas de *B. breve* conocidas. Los genes resaltados con un subrayado único están presentes en MRX004 pero ausentes en la cepa de referencia *B. breve* 1. Los genes resaltados con doble subrayado y en negrita están presentes en MRX004 pero ausentes en la cepa de referencia *B. breve* 2. Los genes resaltados con cursiva están presentes en MRX004 pero ausentes en la cepa de referencia de *B. breve* 6. Se empleó un puntaje máximo de valor E de 10E-5 para el análisis blastn.

Tabla 1

4DBb_0021c	Transportador ABC de azúcares múltiples, proteína de unión al sustrato
4DBb_0023	Regulador transcripcional de tipo lacI probable
4DBb_0024	Hidrolasa de sacarosa-6-fosfato (EC 3.2.1.B3)
4DBb_0026c	Maltodextrina glucosidasa (EC 3.2.1.20)
4DBb_0036c	Proteína hipotética
4DBb_0038c	MSM (metabolismo múltiple del azúcar) proteína reguladora del operón
4DBb_0119c	Proteína hipotética
4DBb_0120c	Proteína hipotética
4DBb_0187	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0188	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0203c	División celular de la proteína FTS
4DBb_0204c	Proteína hipotética
4DBb_0205c	Proteína hipotética
4DBb_0206c	Regulador transcripcional, familia HxIR
4DBb_0207	Reducción de NADH-flavina ligada a Rrf2
4DBb_0208	ATP dependiente de ADN helicasa proteína relacionada con RecG
4DBb_0209c	Proteína hipotética
4DBb_0210	<i>Transportador putativo</i>
4DBb_0211	<i>Subunidad de la sintasa de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, PfaA</i>
4DBb_0212	<i>Policétido sintasa tipo I</i>
4DBb_0213c	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0214c	Proteína hipotética

	4DBb_0215	Proteína hipotética
	4DBb_0216c	Proteína hipotética conservada
5	4DBb_0218c	Proteína hipotética
	4DBb_0219c	ADN-citosina metiltransferasa
	4DBb_0220c	Proteína hipotética
	4DBb_0221c	Proteína hipotética
10	4DBb_0222c	Proteína hipotética
	4DBb_0223c	Integrasa
	4DBb_0256	Proteína hipotética
	4DBb_0257c	Regulador transcripcional tipo lacI
15	4DBb_0258	Hidrolasa de glicosil putativa de función desconocida (DUF1680)
	4DBb_0284	Regulador transcripcional, familia araC
	4DBb_0285	Sistema de transporte ABC de N-acetil-D-glucosamina, proteína de unión al azúcar
	4DBb_0286	Azúcar ABC transportador Permeasa
20	4DBb_0287	Sistema de transporte ABC de N-acetil-D-glucosamina, proteína permeasa 2
	4DBb_0288	Alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22)
	4DBb_0329c	Componente ATPasa BioM del módulo energizante de biotina ECF transportador
	4DBb_0330	Superfamilia de facilitadores principales MFS_1
25	4DBb_0368	GMP sintasa [glutamina-hidrolizante] (EC 6.3.5.2)
	4DBb_0369c	Proteína profago gp29 tipo Mu
	4DBb_0410	Galactosidasa putativa
	4DBb_0419	Proteína hipotética
30	4DBb_0421	Glicosiltransferasa SypP
	4DBb_0422	Proteína de biosíntesis de polisacárido capsular
	4DBb_0423	Proteína hipotética
	4DBb_0424	Glucosiltransferasa
35	4DBb_0425	Proteína de membrana involucrada en la exportación de antígeno O, ácidos lipoteicoicos del ácido teicoico
	4DBb_0426	Glicosiltransferasa (EC 2.4.1.-)
	4DBb_0427	2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-carboxil-acidosasa (EC 2.2.1.9)
	4DBb_0428	Proteína hipotética
40	4DBb_0429	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0430	Proteína hipotética
	4DBb_0431c	Proteína hipotética
	4DBb_0432c	Proteína de elemento móvil
45	4DBb_0433c	Proteína hipotética
	4DBb_0434c	Proteína hipotética
	4DBb_0435	Proteína hipotética
	4DBb_0436	Proteína hipotética
50	4DBb_0437c	Proteína hipotética
	4DBb_0438c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0439c	Proteína hipotética
	4DBb_0440c	Proteína de elemento móvil
55	4DBb_0518c	Proteína de dominio PIN
	4DBb_0519c	Proteína hipotética
	4DBb_0555c	Proteína hipotética
	4DBb_0556c	Proteína hipotética
60	4DBb_0557c	LSU proteína ribosomal L31p @ LSU proteína ribosomal L31p, independiente del zinc
	4DBb_0558c	SSU proteína ribosomal S14p (S29e) @ SSU proteína ribosomal S14p (S29e), independiente del zinc
	4DBb_0559c	LSU proteína ribosomal L33p @ LSU proteína ribosomal L33p, independiente del zinc
65	4DBb_0560c	Proteína hipotética

	4DBb_0561	Proteína hipotética
	4DBb_0613c	Celulosa sintasa (formación UDP) (EC 2.4.1.12)
5	4DBb_0614	Quitinasa (EC 3.2.1.14)
	4DBb_0615	Caja sensorial/proteína de la familia GGDEF
	4DBb_0660	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0662	Proteína de elemento móvil
10	4DBb_0663c	Neuraminidasa NanP
	4DBb_0664	Proteína hipotética
	4DBb_0665	Proteína hipotética
	<i>4DBb_0666</i>	<i>Proteína de elemento móvil</i>
15	<i>4DBb_0667</i>	<i>Proteína de elemento móvil</i>
	4DBb_0668	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0718	Predicción de la proteína reguladora de biotina BioR (familia GntR)
	4DBb_0719	Proteína hipotética
20	4DBb_0720	Proteína hipotética
	<i>4DBb_0778</i>	<i>Proteína hipotética</i>
	4DBb_0789c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0790c	Proteína de elemento móvil
25	<i>4DBb_0837c</i>	<i>Posible proteína de membrana integral conservada.</i>
	4DBb_0840	Proteínas de macrólidos
	<i>4DBb_0866</i>	<i>ATPasa transportadora de cationes, familia E1-E2</i>
	4DBb_0867	Proteína hipotética
	<i>4DBb_0872</i>	<i>Proteína hipotética</i>
30	4DBb_0879c	Regulador transcripcional, familia Cro/Ci
	4DBb_0880c	Proteína de membrana integral
	4DBb_0946	Transportador de sustrato general MFS
	4DBb_0947c	Proteína putativa de membrana
35	4DBb_0948c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0952c	Proteína hipotética
	4DBb_0953	Proteína hipotética
	4DBb_0954c	Proteína hipotética
40	4DBb_0955c	Proteína hipotética
	4DBb_0956c	Permeasas predichas
	4DBb_0957	Proteína hipotética estrechamente conservada
	4DBb_0958c	Proteína hipotética conservada
45	4DBb_0986c	Proteína hipotética
	4DBb_0987c	Componente ATPasa duplicado BL0693 del módulo de energización del transportador de ECF previsto
	4DBb_0988c	Componente transmembrana BL0694 del módulo de energización del transportador de ECF previsto
50	4DBb_1009c	Fago holin
	4DBb_1010c	Mureína lítica unida a la membrana transglicosilasa precursora D (EC 3.2.1.-)
	4DBb_1011c	Proteína hipotética
	4DBb_1012	Proteína hipotética
55	4DBb_1013c	Proteína hipotética
	4DBb_1014c	Proteína hipotética
	4DBb_1015c	Proteína hipotética
	4DBb_1016c	Proteína hipotética
60	4DBb_1017c	Proteína de la cola del fago
	4DBb_1018c	Phage cola longitud de la cinta métrica de proteína
	4DBb_1019c	Proteína hipotética
	4DBb_1020c	Proteína hipotética
65	4DBb_1021c	Proteína hipotética

	4DBb_1022c	Proteína hipotética
	4DBb_1023c	Proteína hipotética
5	4DBb_1024c	Proteína hipotética
	4DBb_1025c	Proteína hipotética
	4DBb_1026c	Proteína hipotética
	4DBb_1027c	Proteína hipotética
10	4DBb_1028c	Proteína hipotética
	4DBb_1029c	Proteína hipotética
	4DBb_1030c	Proteína fago
	4DBb_1031c	Fase terminal, subunidad grande nº Pham2
15	4DBb_1032c	Fase terminal, subunidad grande
	4DBb_1033c	Proteína hipotética
	4DBb_1034	Proteína hipotética
	4DBb_1035	Proteína hipotética
20	4DBb_1036c	FIG00424913: proteína hipotética
	4DBb_1037c	Proteína hipotética
	4DBb_1038c	Proteína hipotética
	4DBb_1039c	Proteína hipotética
25	4DBb_1040c	Proteína hipotética
	4DBb_1041c	Proteína hipotética
	4DBb_1042c	Proteína hipotética
	4DBb_1043c	Proteína hipotética
30	4DBb_1044c	Proteína hipotética
	4DBb_1045c	Proteína hipotética
	4DBb_1046c	Proteína hipotética
35	4DBb_1047c	Cromosoma (plásmido) partición proteína ParB
	4DBb_1048c	Proteína hipotética
	4DBb_1049c	Proteína hipotética
	4DBb_1050c	Proteína de unión a ADN monocatenaria
40	4DBb_1051c	Proteína hipotética
	4DBb_1052c	Proteína hipotética
	4DBb_1053c	Proteína hipotética
	4DBb_1054c	Proteína hipotética
45	4DBb_1055c	Proteína hipotética
	4DBb_1056	Proteína hipotética
	4DBb_1057c	Proteína hipotética
	4DBb_1058c	Proteína hipotética
50	4DBb_1059	Proteína hipotética
	4DBb_1060	Proteína hipotética
	4DBb_1061	Proteína hipotética
	4DBb_1062c	Proteína hipotética
55	4DBb_1063c	Proteína hipotética
	4DBb_1064	fago integrasa putativa
	4DBb_1113	Permeasas de la superfamilia facilitadora principal.
	4DBb_1142	Proteína hipotética
60	4DBb_1143c	Proteína hipotética
	4DBb_1172	Integrasa
	4DBb_1173c	Proteína hipotética
	4DBb_1174c	Proteína hipotética estrechamente conservada
65	4DBb_1175	Proteína hipotética

	4DBb_1176c	Proteína hipotética
	4DBb_1177	ABC transportador, proteína de unión a ATP
5	4DBb_1178	Proteína hipotética
	4DBb_1179	Proteína hipotética
	4DBb_1180	Proteína hipotética
	4DBb_1181	Proteína hipotética
10	4DBb_1182	sensor de sistema de dos componentes cinasa
	4DBb_1183	Proteína hipotética
	4DBb_1203c	proteína reguladora, lacI
	4DBb_1204c	FIG01131316: proteína hipotética
	4DBb_1205c	sistema de transporte permease
15	4DBb_1206c	Sistema de transporte ABC oligosacárido de ramnosa pronosticado, componente permeasa 2
	4DBb_1207c	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 1
	4DBb_1212c	Proteína hipotética
	4DBb_1213c	Proteína hipotética
20	4DBb_1214	Proteína de elemento móvil
	4DBb_1215	Proteína de elemento móvil
	4DBb_1219	Proteína hipotética
	4DBb_1220c	Proteína hipotética,
25	4DBb_1221c	Proteína de función desconocida de la familia DUF262.
	4DBb_1222c	Proteína hipotética
	4DBb_1223	Proteína hipotética
	4DBb_1224	Proteína de elemento móvil
30	4DBb_1234c	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico.
	4DBb_1235	Proteína hipotética
	4DBb_1328c	Fago integrasa putativa
	4DBb_1329	Proteína hipotética
35	4DBb_1330	Proteína hipotética
	4DBb_1331c	Proteína hipotética
	4DBb_1332	Proteína hipotética
	4DBb_1333	Proteína hipotética
40	4DBb_1334	Proteína hipotética
	4DBb_1335c	Proteína hipotética
	4DBb_1336c	Regulador negativo de la expresión de beta-lactamasa.
	4DBb_1337c	Proteína hipotética
45	4DBb_1338c	Proteína hipotética
	4DBb_1339c	Proteína hipotética
	4DBb_1340c	Proteína hipotética
	4DBb_1341c	Proteína hipotética
50	4DBb_1342c	Proteína hipotética
	4DBb_1343c	Proteína hipotética
	4DBb_1344	Proteína hipotética
	4DBb_345c	Proteína de la fibra de la cola del fago
	4DBb_1346c	Proteína hipotética
55	4DBb_1347c	Proteína de la cola de fago menor.
	4DBb_1348c	Proteína hipotética
	4DBb_1349c	Proteína hipotética
	4DBb_1350c	Proteína fago
60	4DBb_1351c	Proteína fago
	4DBb_1352c	Proteína fago
	4DBb_1353c	Proteína fago

	4DBb_1354c	Proteína hipotética
	4DBb_1355c	Proteína hipotética
5	4DBb_1356c	Proteína de la cápside mayor del fago nº Fam0025 nº Pham164
	4DBb_1357c	Proteasa del fago procabeza putativa
	4DBb_1358c	Proteína portal fago
	4DBb_1359c	gp2, terminasa
10	4DBb_1360c	Proteína hipotética
	4DBb_1361c	Proteína hipotética
	4DBb_1362c	Proteína hipotética
	4DBb_1363c	Proteína hipotética
	4DBb_1364c	Proteína hipotética
15	4DBb_1365c	Proteína hipotética
	4DBb_1366c	Proteína hipotética
	4DBb_1367c	Proteína hipotética
	4DBb_1368c	Proteína hipotética
20	4DBb_1369c	Proteína hipotética
	4DBb_1370c	Proteína hipotética
	4DBb_1371c	Proteína hipotética
	4DBb_1372c	Proteína de unión a ADN monocatenaria
25	4DBb_1373c	Proteína hipotética
	4DBb_1374c	Reparación recombinacional de la proteína de ADN RecT (profago asociado)
	4DBb_1375c	Proteína relacionada con fagos
	4DBb_1376c	Proteína hipotética
30	4DBb_1377c	Proteína hipotética
	4DBb_1378c	Proteína hipotética
	4DBb_1379c	Proteína hipotética
	4DBb_1380c	Metiltransferasa (EC 2.1.1.-)
35	4DBb_1381c	Proteína hipotética
	4DBb_1382c	Proteína hipotética
	4DBb_1383c	Proteína hipotética
	4DBb_1384	Proteína hipotética
40	4DBb_1385	Proteína hipotética
	4DBb_1386	Proteína hipotética
	4DBb_1387	Proteína hipotética
	4DBb_1388	Proteína hipotética
45	4DBb_1456	Permeasa de sacarosa, superfamilia facilitadora principal
	4DBb_1486c	Esterasa/lipasa
	4DBb_1487c	Glucosa/manosa: H + symporter GlcP
	4DBb_1488c	Regulador de respuesta de dos componentes yesN
50	4DBb_1533c	Proteína hipotética
	4DBb_1534c	Proteína hipotética
	4DBb_1535c	Sistema de modificación/modificación tipo I, subunidad de restricción R (EC 3.1.21.3)
	4DBb_1536c	Helicasa recG dependiente de ATP (EC 3.6.1.-)
55	4DBb_1537c	Sistema de modificación/modificación tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3.1.21.3)
	4DBb_1538c	Sistema de modificación/modificación de tipo I, subunidad M de ADN-metiltransferasa (EC 2.1.1.72)
	4DBb_1539c	Proteína hipotética
	4DBb_1540	Sistema de modificación/modificación tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3.1.21.3)
60	4DBb_1541	Integrasa
	4DBb_1542c	Sistema de modificación/modificación tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3.1.21.3)
	4DBb_1545c	Sistema de transporte Ribosa ABC, permease de alta afinidad RbsD (TC 3.A.1.2.1)
65	4DBb_1546c	Sistema de transporte ABC de la ribosa, proteína de unión a la ribosa periplásmica RbsB (TC 3.A. 1.2.1)

5	4DBb_1547c	– Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permeasa RbsC (TC 3.A.1.2.1)
	4DBb_1548c	– Sistema de transporte Ribosa ABC, una proteína de unión a TP RbsA (TC 3.A.1.2.1)
	4DBb_1550c	– Proteína hipotética
10	4DBb_1551	Proteína hipotética
	4DBb_1552c	– Regulador transcripcional tipo <i>lacI</i>
	4DBb_1553c	Similar a la proteína de resistencia a la tetraciclina
15	4DBb_1554c	Ribocinasa (EC 2.7.1.15)
	4DBb_1555c	Butanol deshidrogenasa A dependiente de NADH (EC 1.1.1.-)
	4DBb_1556c	Fosfatasa fosfatasa (EC 3.1.3.18)
20	4DBb_1557c	Inosina-uridina que prefiere la hidrolasa de nucleósido (EC 3.2.2.1)
	4DBb_1558c	Fructoquinasa (EC 2.7.1.4)
	4DBb_1559c	Isomerasa de fosforribosilano-tranilato (EC 5.3.1.24)
25	4DBb_1560c	Componente de ATPasa STY3233 del módulo de energización del transportador de ECF regulado por queosa
	4DBb_1561c	Componente ATPasa del módulo de energización general de los transportadores de ECF
	4DBb_1562c	Componente transmembrana STY3231 del módulo de energización del transportador de ECF regulado por queosina
30	4DBb_1563c	Componente STY3230 específico del sustrato del transportador de ECF regulado por queosina
	4DBb_1564	Cinasa de azúcar hipotética en grupo con indigoidina sintasa <i>indA</i> , familia de quinasas PfkB
	4DBb_1569	Regulador transcripcional, familia TetR
35	4DBb_1570c	Esterasa/lipasa
	4DBb_1571c	Proteína hipotética
	4DBb_1572c	Proteína hipotética
40	4DBb_1573	COG1309: regulador transcripcional
	4DBb_1574c	Proteína hipotética
	4DBb_1578c	Proteína portadora de la melibiosa
45	4DBb_1579c	Proteína hipotética
	4DBb_1580c	Regulador transcripcional, familia TetR
	4DBb_1581	Proteína hipotética
50	4DBb_1582	Regulador de respuesta de dos componentes colocado junto con el transportador HrtAB
	4DBb_1583	Proteína hipotética
	4DBb_1584c	Proteína hipotética
55	4DBb_1585	Sensor de histidina quinasa
	4DBb_1586	Mg (2+) transporte ATPasa proteína C
	4DBb_1587	Regulador transcripcional, familia AbrB
60	4DBb_1588	Proteína hipotética
	4DBb_1620c	3' a 5' oligorribonucleasa (<i>orn</i>)
	4DBb_1769c	Activador Transcripcional MltR
65	4DBb_1770c	Xilitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.9)
	4DBb_1771c	Transportador de ribitol/xilitol/arabitol, superfamilia MFS
	4DBb_1773c	Proteína de la familia glioxalasa
	4DBb_1774c	Transportador de ribitol/xilitol/arabitol, superfamilia MFS
	4DBb_1775c	Sorbitol deshidrogenasa (EC 1.1.1.14)
	4DBb_1926c	Proteína de membrana, relacionada con la proteína <i>Actinobacillus</i> (1944168)
	4DBb_1928c	Glicosil transferasa, proteína del grupo 2
	4DBb_1929c	Exportación de ácido teicoico proteína A de unión a ATP (EC 3.6.3.40)
	4DBb_1930c	Permisón de la translocación de polisacárido que contiene ramnosa
	4DBb_1934c	Proteína hipotética
	4DBb_1935	Posible glicosiltransferasa

4DBb_1936c	Proteína de la familia del anclaje de la superficie de la pared celular
4DBb_1937c	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (EC 3.4.16.4)
4DBb_1965	Proteína hipotética
4DBb_2010c	Proteína de elemento móvil
4DBb_2011	Regulador transcripcional, familia lacI
4DBb_2012	Xilosa ABC transportador, proteína de unión a xilosa periplásmica XylF
4DBb_2013	Sistema de transporte ABC de la ribosa, proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A. 1.2.1)
4DBb_2014	Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permeasa RbsC (TC 3.A.1.2.1)
4DBb_2015	Proteína hipotética
4DBb_2016	Proteína de elemento móvil
4DBb_2028c	Beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21)

Secuencias

[0321]

SEQ ID NO: 1 (secuencia de ARNr consenso 16S para la cepa 751)

```

GGGACAGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCGGGCTTTGCCT
GGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACG
GGTGGTAATGCCGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTTGGGAAAGCCTTTGCGGCATGGGATGGGGTCGCG
TCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCC
ACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACTTT
GTGTTGAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCTGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC
GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAAACGGTGGAA
GTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCC
ACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACCGTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGA
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCT
TGACATGTTCCCGACGATCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCTGTCGTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTGTG
CCGGGAACACACGGGGACCGCCGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTA
CGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGCGCGAGCTGGAGCGGATCCCTGA
AAACCGGTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAG
CAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAA
GCCGGTGGCCTAACCCCTGCGGGAGGGAGCCKC

```

SEQ ID NO: 2 (secuencia del genoma de la cepa 751) - vea la lista electrónica de secuencias del documento WO 2016/203223

REFERENCIAS

[0322]

- [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] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [17] Srutková et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [18] Ye et al. (2015) *PLoS One*. 10(1):e0117704.
- 5 [19] Fabro et al. (2015) *Immunobiology*. 220(1):124-35.
- [20] Yin et al. (2014) *Immunogenetics*. 66(3):215-8.
- [21] Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol*. 175(2):316-22.
- [22] Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol*. 133(3):888-91.
- [23] Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 28(8):1016-24.
- 10 [24] Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine*. 2011, 9:122.
- [25] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6:256-259
- [26] Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov*. 11(10):763-76.
- [27] Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sci*. 35(10):493-500.
- [28] Koenders et al. (2006) *J. Immunol*. 176:6262-6269.
- 15 [29] Amedei et al. (2012) *Int J Mol Sci*. 13(10):13438-60.
- [30] Shabgah et al. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol*. 31(4):256-6
- [39] Numasaki et al. (2003) *Blood*. 101:2620-2627.
- [40] Zhang et al. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 374: 533-537.
- [41] Karin (2006) *Nature*. 441: 431-436.
- 20 [42] Faghih et al. (2013). *Iranian Journal of Immunology*. 10(4):193-204.
- [43] Numasaki et al. (2005) *J. Immunol*. 175: 6177-6189
- [44] Hammerich and Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol*. 7:297-306.
- [45] Haabeth et al. (2012) *Oncol Immunology* 1(1):1146-1152.
- [46] Lejeune et al. (2006) *Cancer Immun*. 6:6
- 25 [47] Pace et al. (1983) *PNAS*. 80:8782-6.
- [48] Sgadari et al. (1996) *PNAS*. 93:13791-6.
- [49] Arenberg et al. (1996) *J. Exp. Med*. 184:981-92.
- [50] Sgadari et al. (1997) *Blood*. 89:2635-43.
- [51] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 30 [52] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [53] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 3592-3597.
- [54] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.
- [55] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol*. 3(2):39-48.
- [56] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2^a Edición, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- 35 [57] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [58] *Handbook of Microbiological Media*, 4^a Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [59] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [60] Strobel (2009) *Methods Mol Biol*. 581:247-61.
- [61] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20^a edición, ISBN: 0683306472.
- 40 [62] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [63] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [64] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [65] Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3^a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 45 [66] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [67] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5^a edición (Current Protocols).
- [68] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2^a ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [69] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- 50 [70] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math*. 2: 482-489.
- [71] Brand et al. (2007) *Nature Protocols*. 2(5):1269-1275
- [72] Jiao et al. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184(4): 1085-93.
- [73] Rockwell et al., (1972) *J Natl Cancer Inst*. 49:735-49.
- [74] Bertram and Janik (1980) *Cancer Lett*. 11:63-73.
- 55 [75] Darlington (1987) *Meth Enzymol*. 151:19-38.
- [76] Principe d'éthique de l'expérimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22nd September 2010, Décrêt n°2013-118 1st February 2013.
- [77] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*: 8^a Edición. The National Academies Press; 2011
- [78] Simpson-Herren and Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep*. 54:143-74.
- 60 [79] Workman et al. (2010) *Br. J. Cancer*. 102:1555-77.
- [80] Bottacini et al (2014) *BMC Genomics*. 15:170, DOI: 10.1186/1471-2164-15-170, PMID: 24581150

ES 2 742 514 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

[0323]

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

5 <130> P066263WO

<150> GB 1510467.2

<151> 2015-06-15

10 <150> GB 1520501.6

<151> 2015-11-20

<160> 1

15 <170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 1439

<212> ADN

20 <213> Desconocido

<220>

<223> Secuencia ARNr de cepa 751 consenso 16S

25 <400> 1

	gggacaggct	caggatgaac	gccggcgggc	tgcttaacac	atgcaagtcg	aacgggatcc	60
	atcgggcttt	gcctggtggt	gagagtggcg	aacgggtgag	taatgcgtga	ccgacctgcc	120
	ccatgcaccg	gaatagctcc	tggaaacggg	tggtaatgcc	ggatgctcca	tcacaccgca	180
30	tggtgtgttg	ggaaagcctt	tgcggcatgg	gatggggtcg	cgctctatca	gcttgatggc	240
	ggggtaacgg	cccaccatgg	cttcgacggg	tagccggcct	gagagggcga	ccggccacat	300
	tgggactgag	atacggccca	gactcctacg	ggaggcagca	gtggggaata	ttgcacaatg	360
	ggcgcaagcc	tgatgcagcg	acgccgcgtg	agggatggag	gccttcgggt	tgtaaacctc	420
	ttttgttagg	gagcaaggca	ctttgtgttg	agtgtacctt	tcgaataagc	accggctaac	480
35	tacgtgccag	cagccgcggg	aatacgtagg	gtgcaagcgt	tatccggaat	tattgggcgt	540
	aaagggctcg	taggcggttc	gtcgcgtccg	gtgtgaaagt	ccatcgctta	acggtggatc	600
	cgcgccgggt	acgggcgggc	ttgagtgcgg	taggggagac	tggaattccc	ggtgtaacgg	660
	tggaatgtgt	agatatcggg	aagaacacca	atggcggaag	caggtctctg	ggccgttact	720
40	gacgctgagg	agcgaagcgg	tggggagcga	acaggattag	ataccctggt	agtccacgcc	780
	gtaaacgggt	gatgctggat	gtggggcccg	ttccacgggt	tccgtgtcgg	agctaacgcg	840
	ttaagcatcc	cgcctgggga	gtacggccgc	aaggctaaaa	ctcaaagaaa	ttgacggggg	900
	ccgcacaaag	cggcggagca	tgcggattaa	ttcgatgcaa	cgcgaagaac	cttacctggg	960
	cttgacatgt	tcccgcagat	cccagagatg	gggtttccct	tcggggcggg	ttcacagggt	1020
45	gtgcatggtc	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	gatgttgggt	taagtcccgc	aacgagcgca	1080
	accctcgccc	cgtgttgcca	gcggattgtg	ccgggaactc	acgggggacc	gccgggggta	1140
	actcggagga	aggtggggat	gacgtcagat	catcatgccc	cttacgtcca	gggcttcacg	1200
	catgctacaa	tggccgggtac	aacgggatgc	gacagcgcga	gctggagcgg	atccctgaaa	1260
	accggtctca	gttcggatcg	cagtctgcaa	ctcgactgcg	tgaaggcgga	gtcgctagta	1320
50	atcgcgaatc	agcaacgtcg	cgggtgaatgc	gttcccgggc	cttgtacaca	ccgcccgtca	1380
	agtcatgaaa	gtgggcagca	cccgaagccg	gtggcctaac	ccctgcggga	gggagcckc	1439

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una bacteria viable depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria viable que tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 1, para uso en un método de tratamiento o prevención del cáncer.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición es para uso en un método para tratar o prevenir el cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer de hígado, y en el que la composición es para uso en un método para reducir el tamaño del tumor, reduciendo el crecimiento tumoral, previniendo metástasis o previniendo angiogénesis.

3. La composición para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición es para uso en un método para reducir producción de IL-17 o reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del cáncer.

4. La composición para el uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición es para uso en un paciente con niveles de IL-17 elevada o células Th17.

5. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la bacteria tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1.

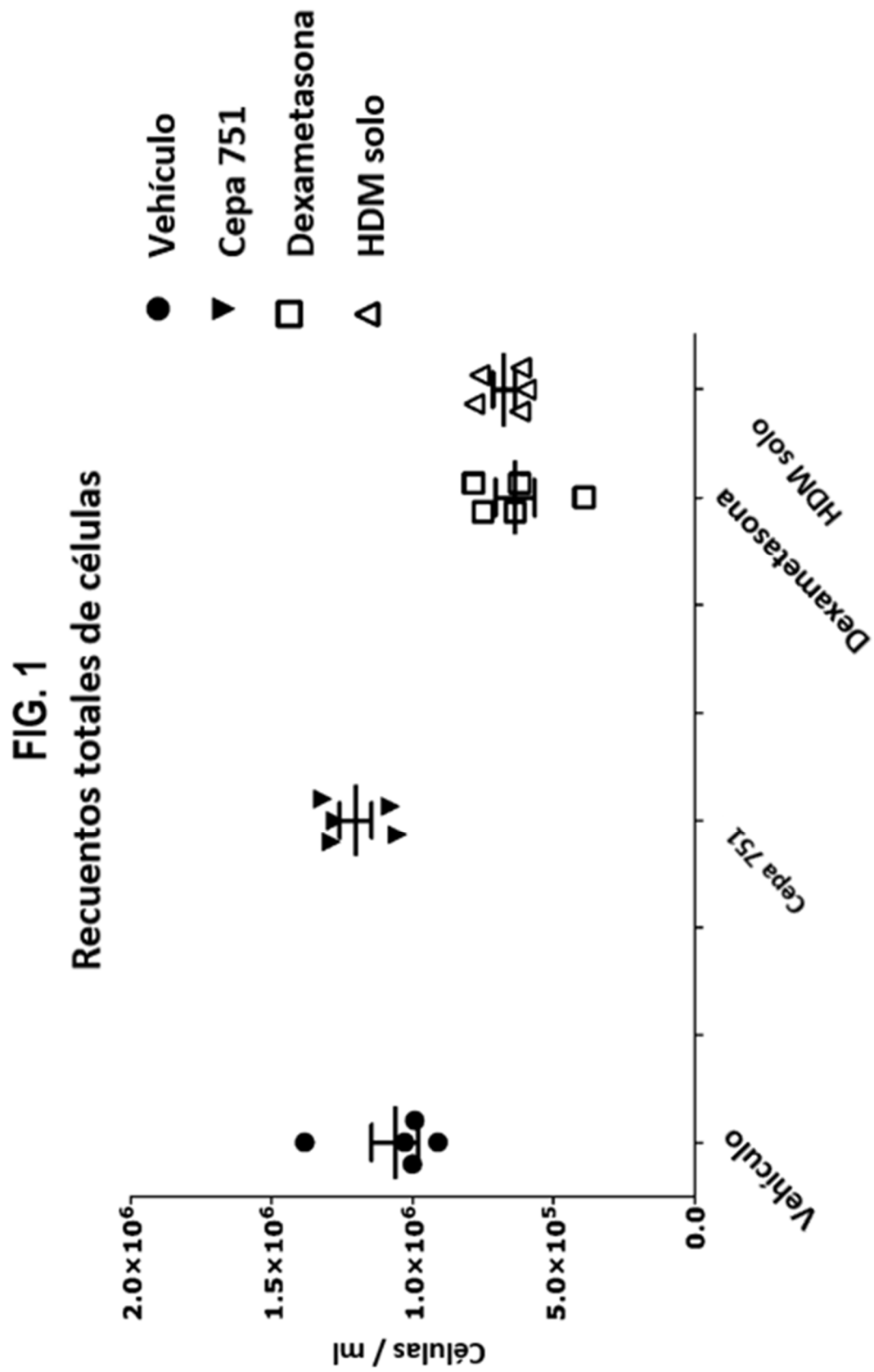
6. La composición para uso de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición es para administración oral, en donde la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y/o en los que la cepa está liofilizada.

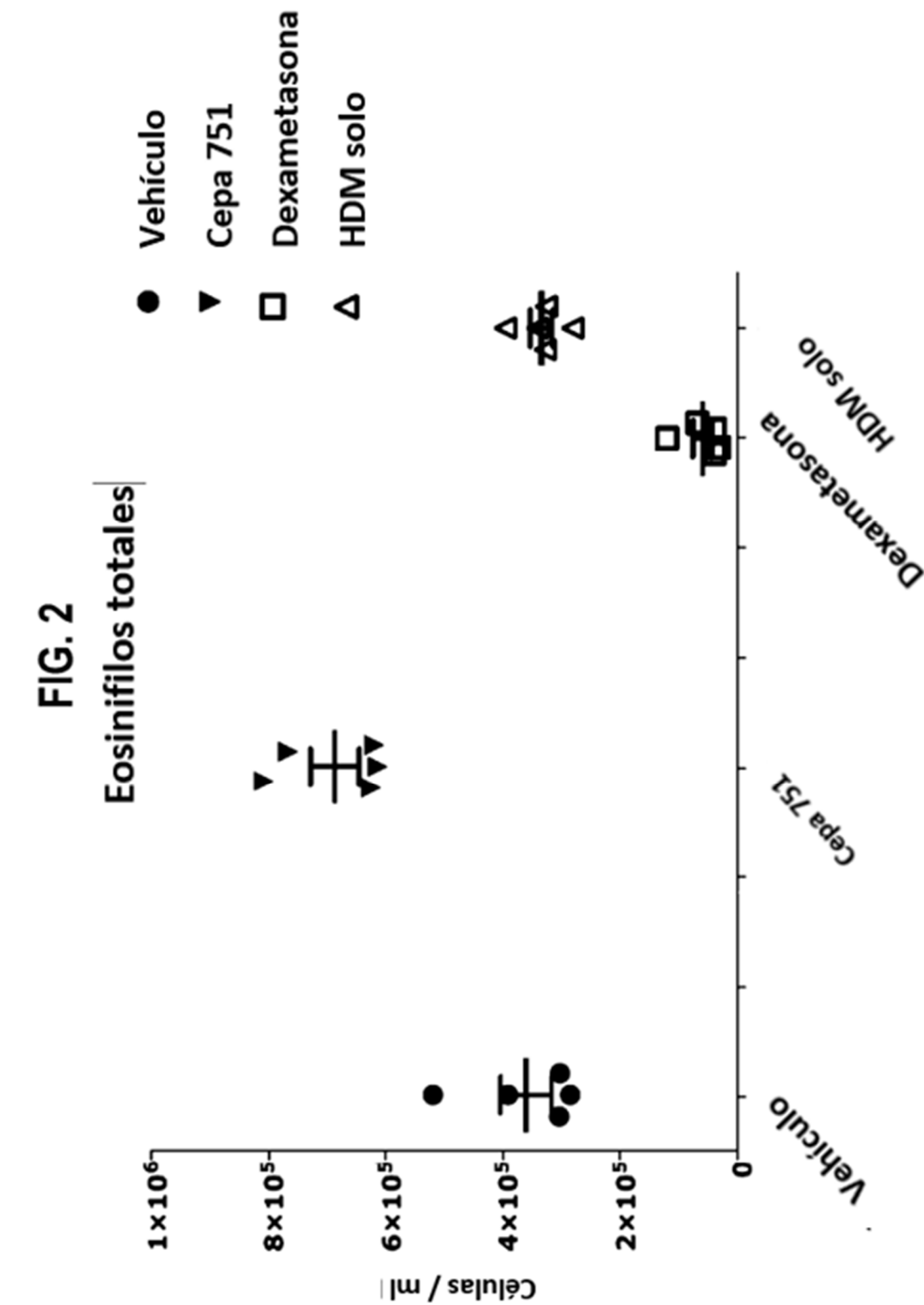
7. Un producto alimenticio o una composición de vacuna que comprende la composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de cualquier reivindicación anterior.

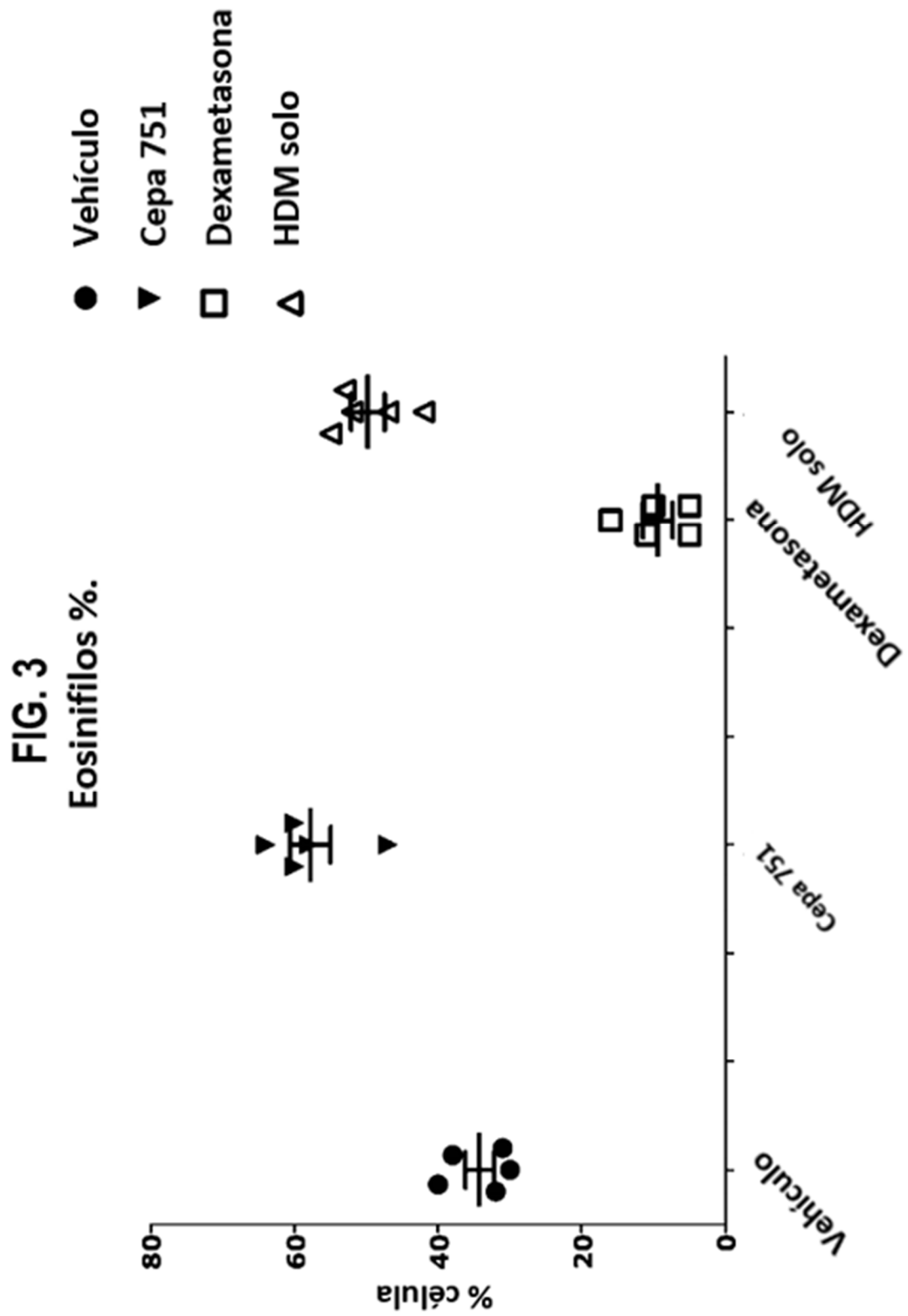
8. Una célula o un cultivo biológicamente puro de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

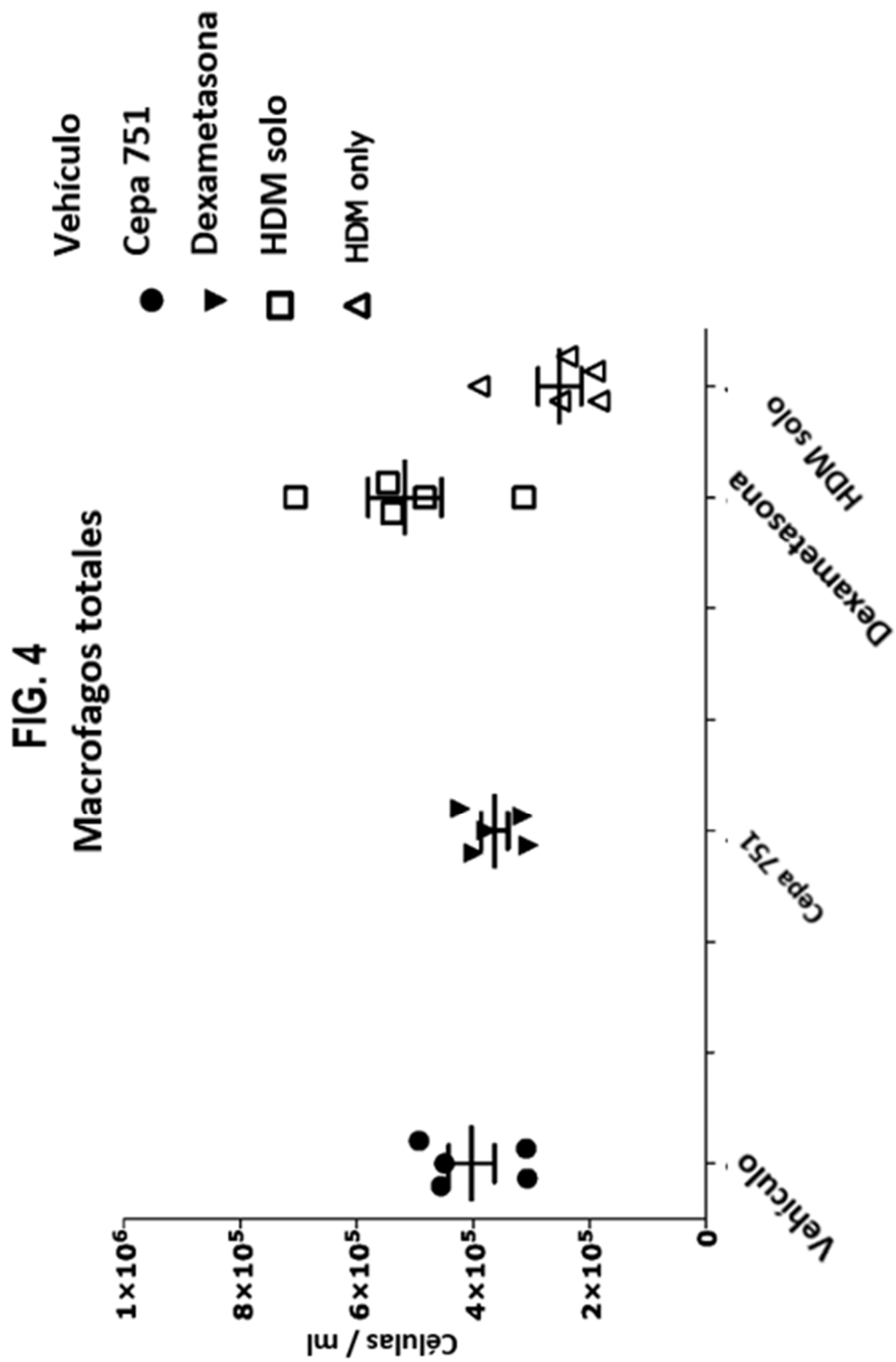
9. Una composición que comprende la célula de la reivindicación 8, que comprende opcionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

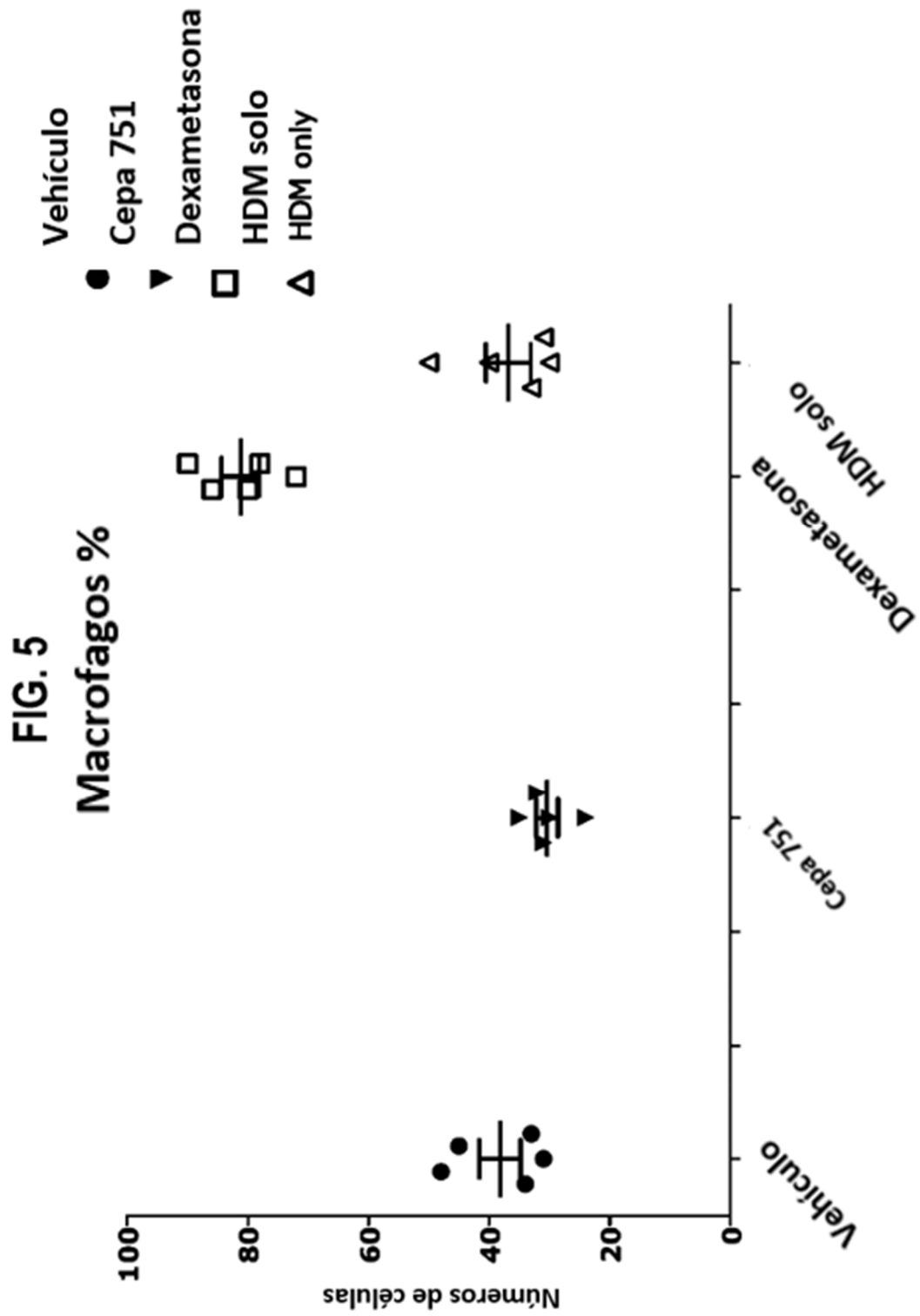
10. Una célula de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380, para uso en terapia, opcionalmente en donde la célula es para uso en un método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

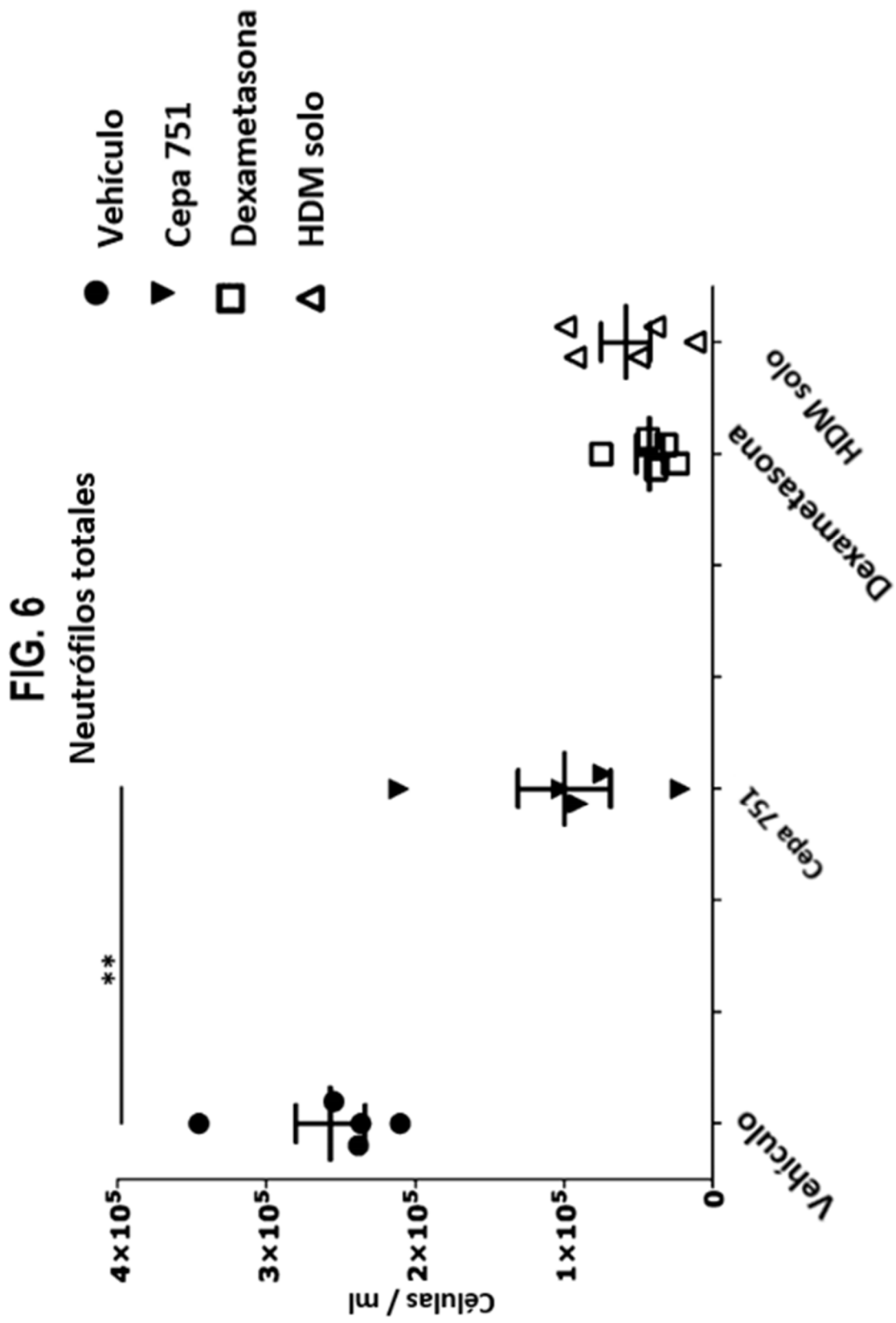












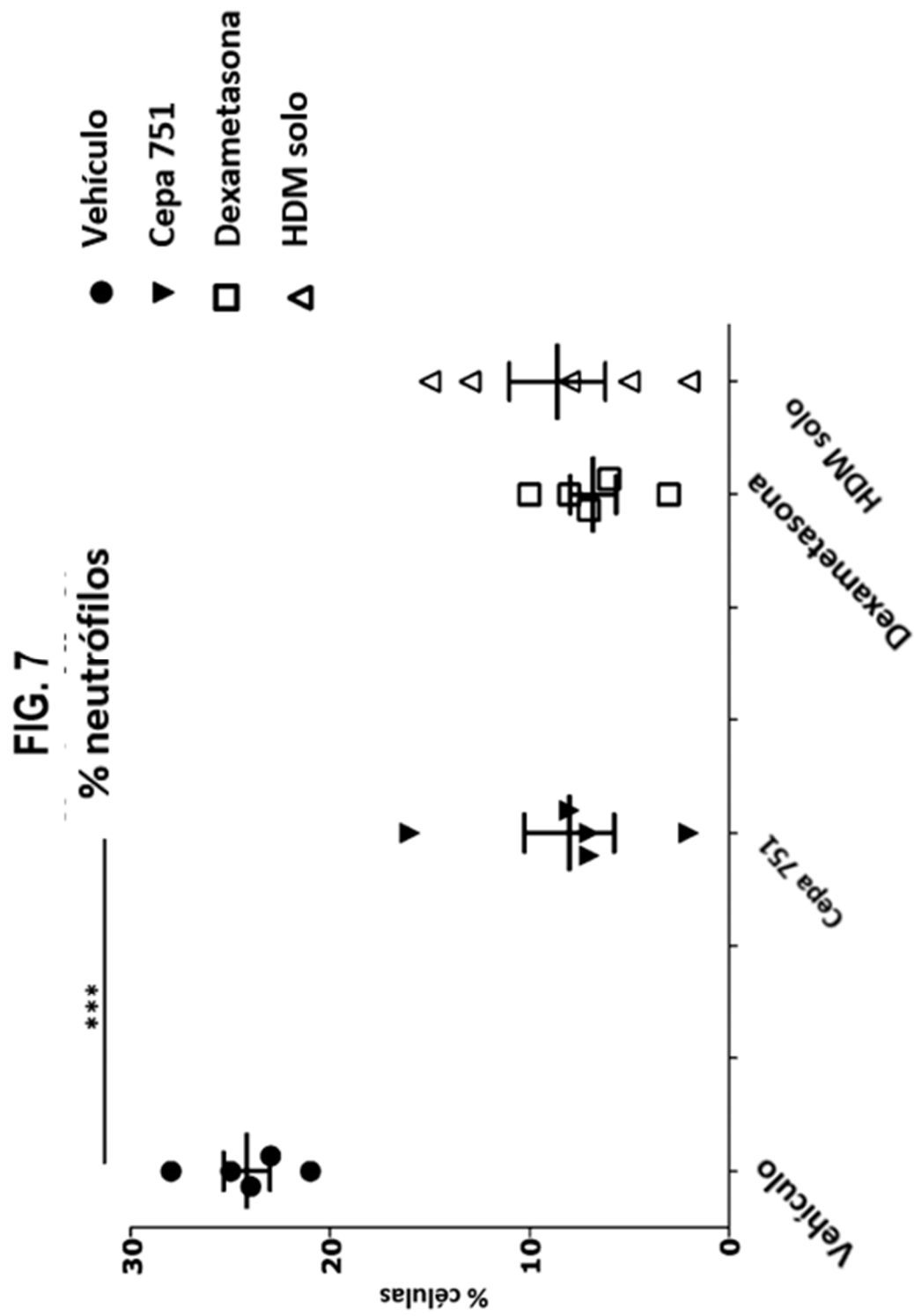


FIG. 8

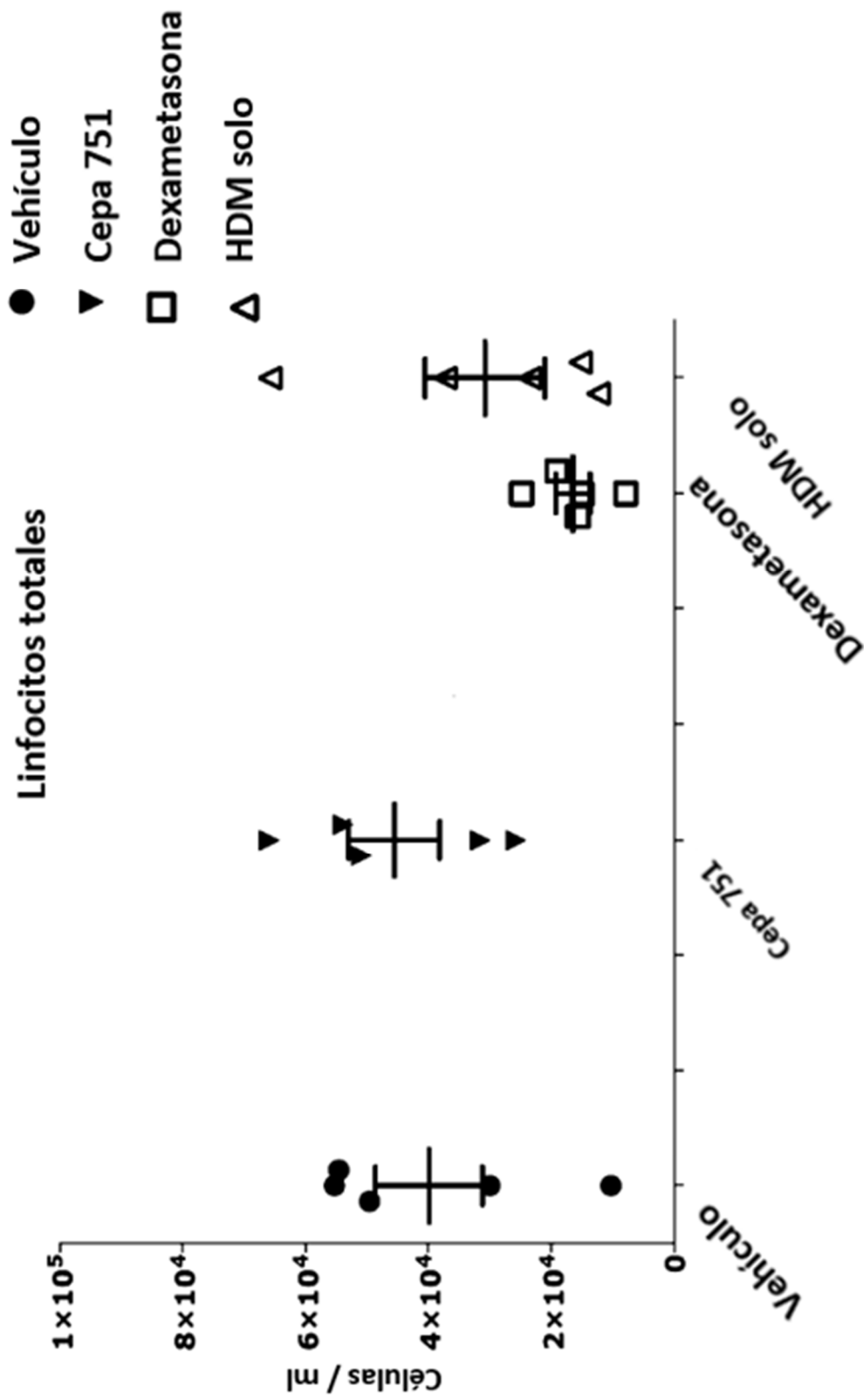


FIG. 9
% Linfocitos

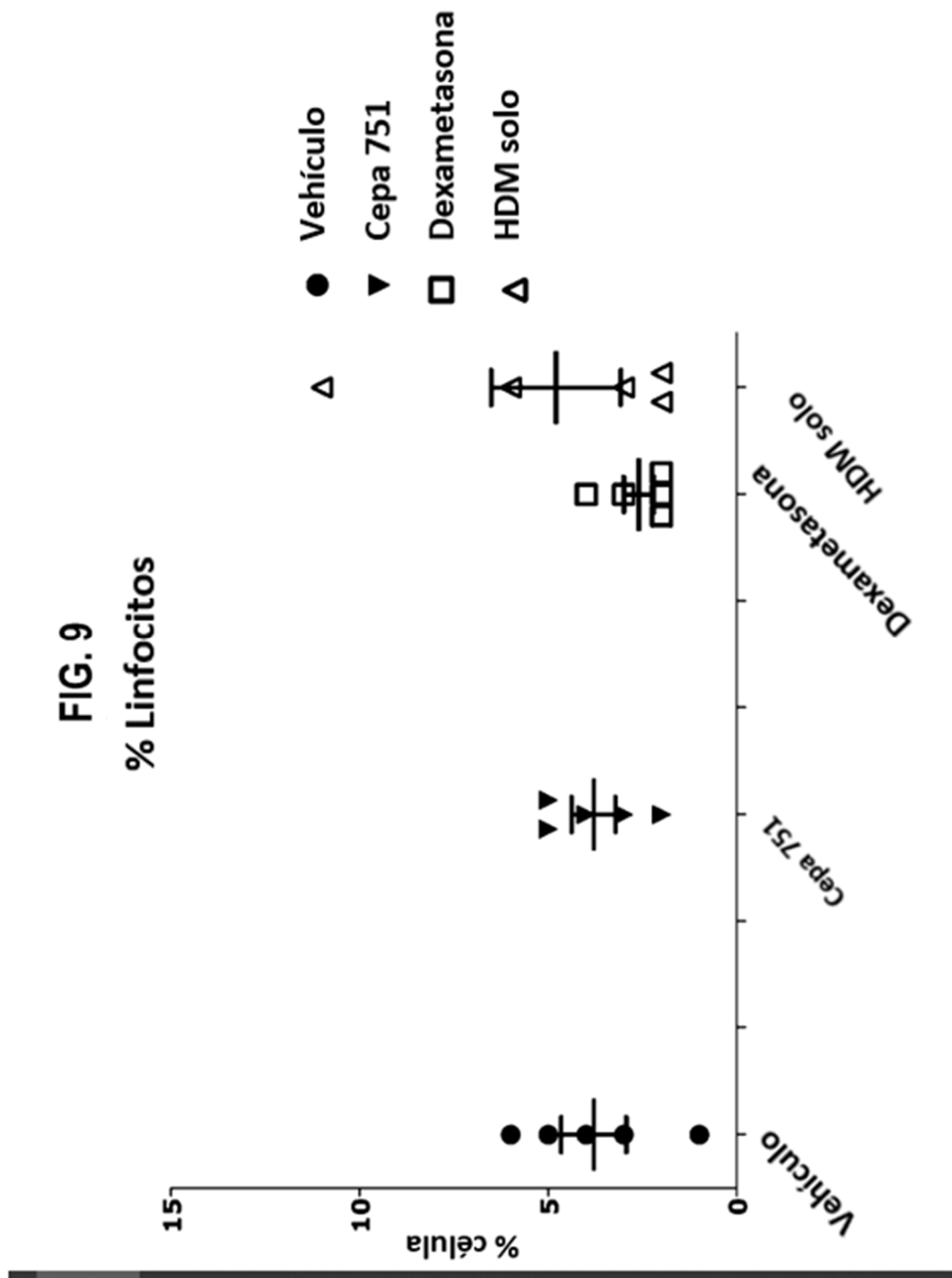
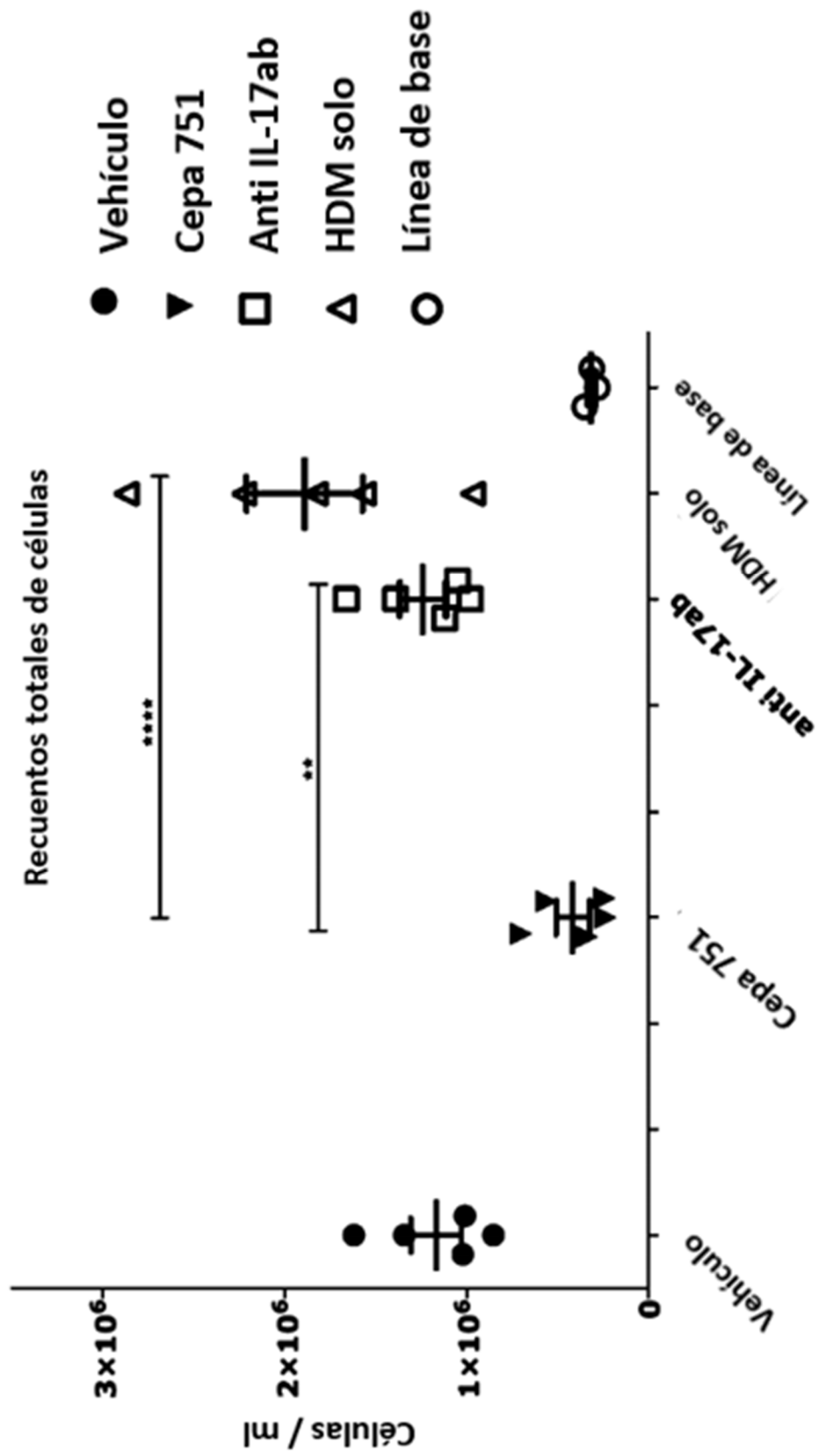
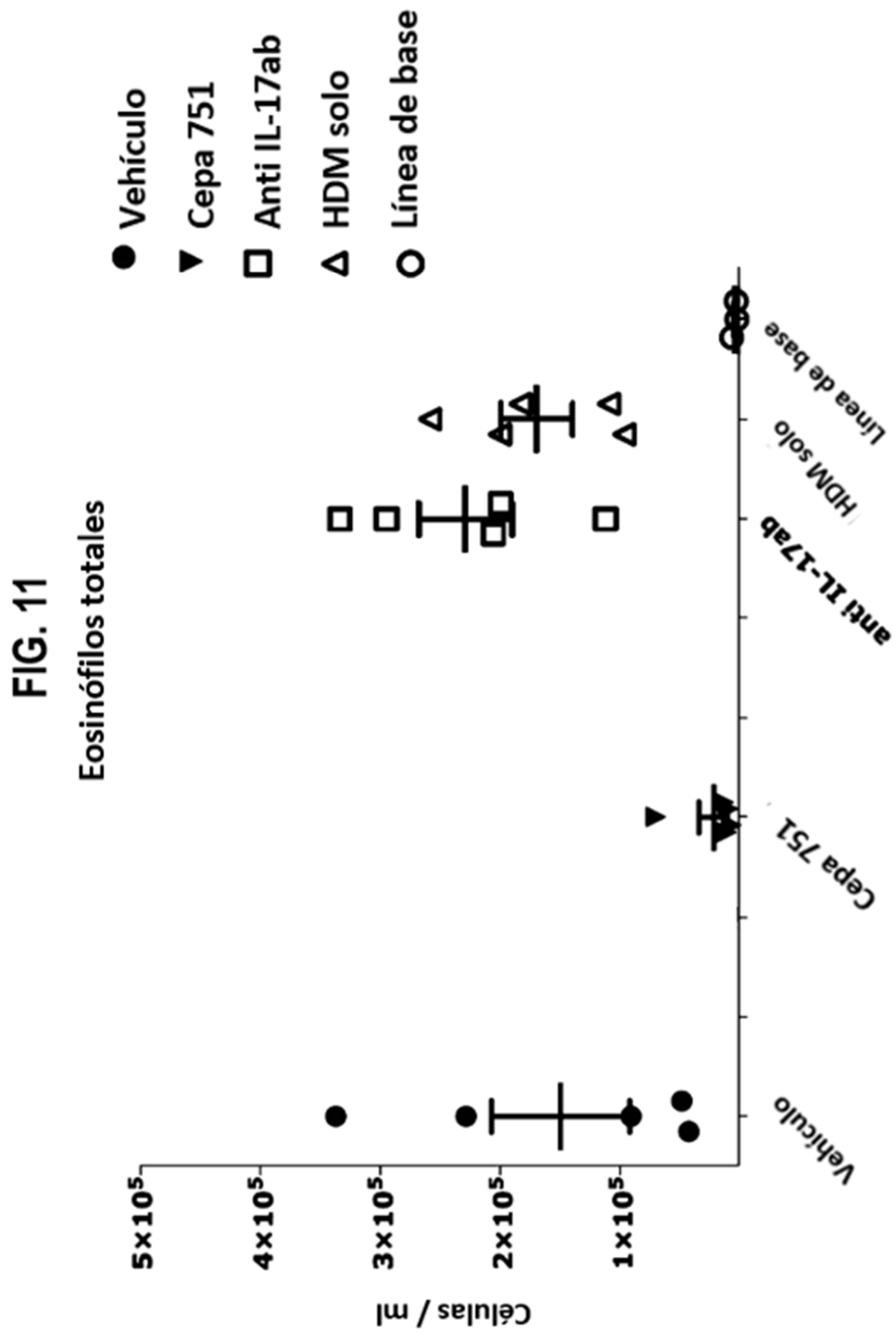
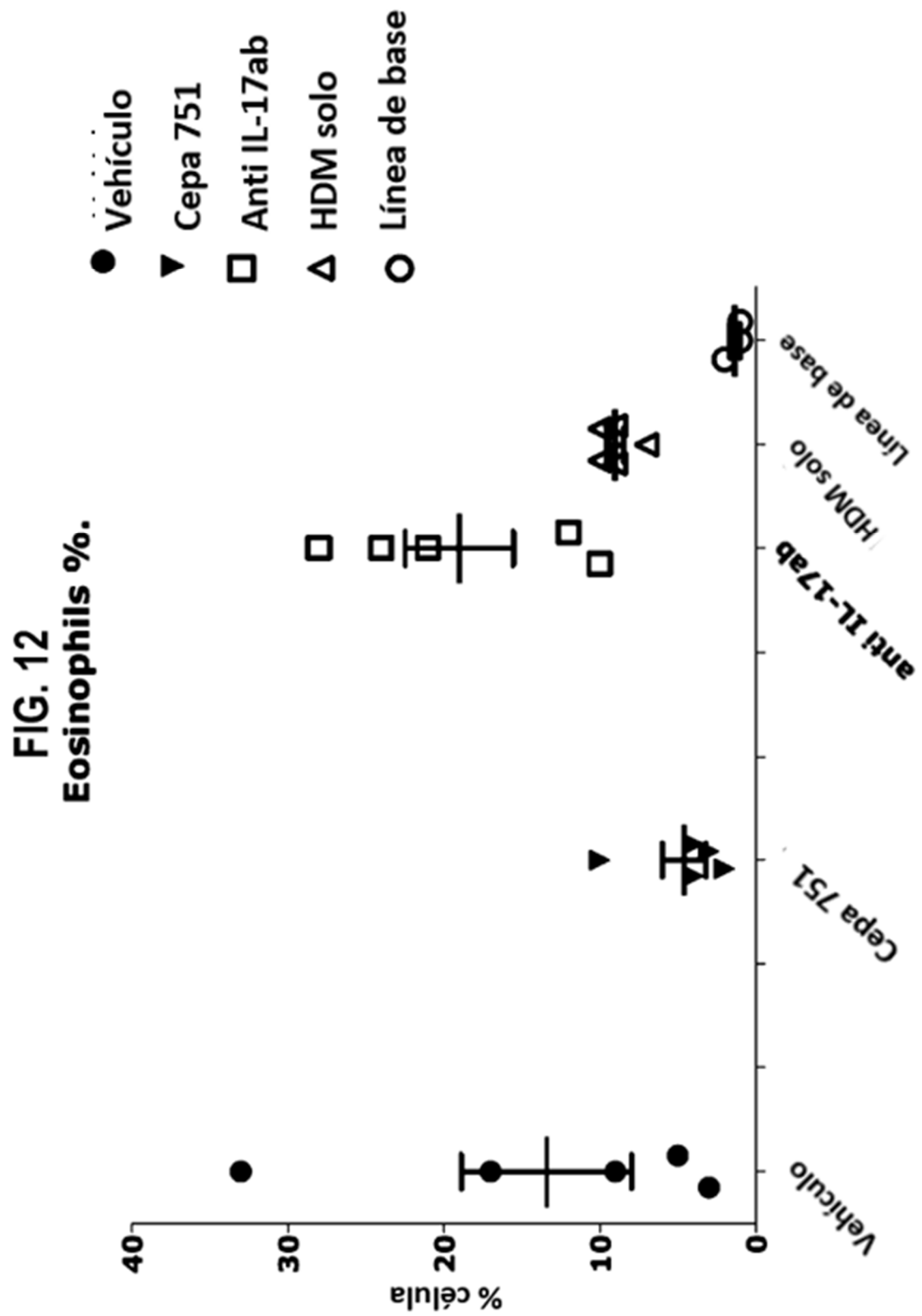
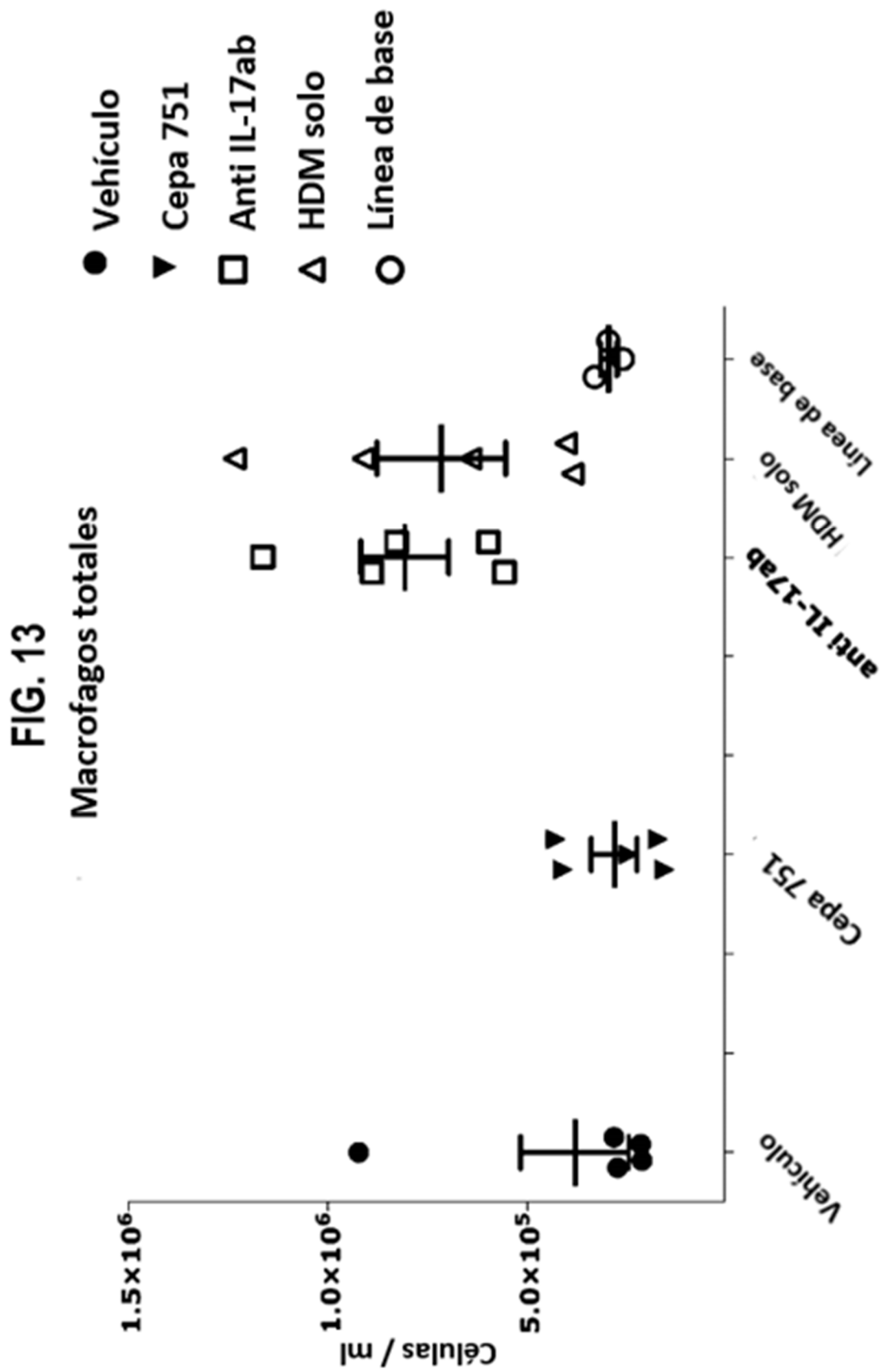


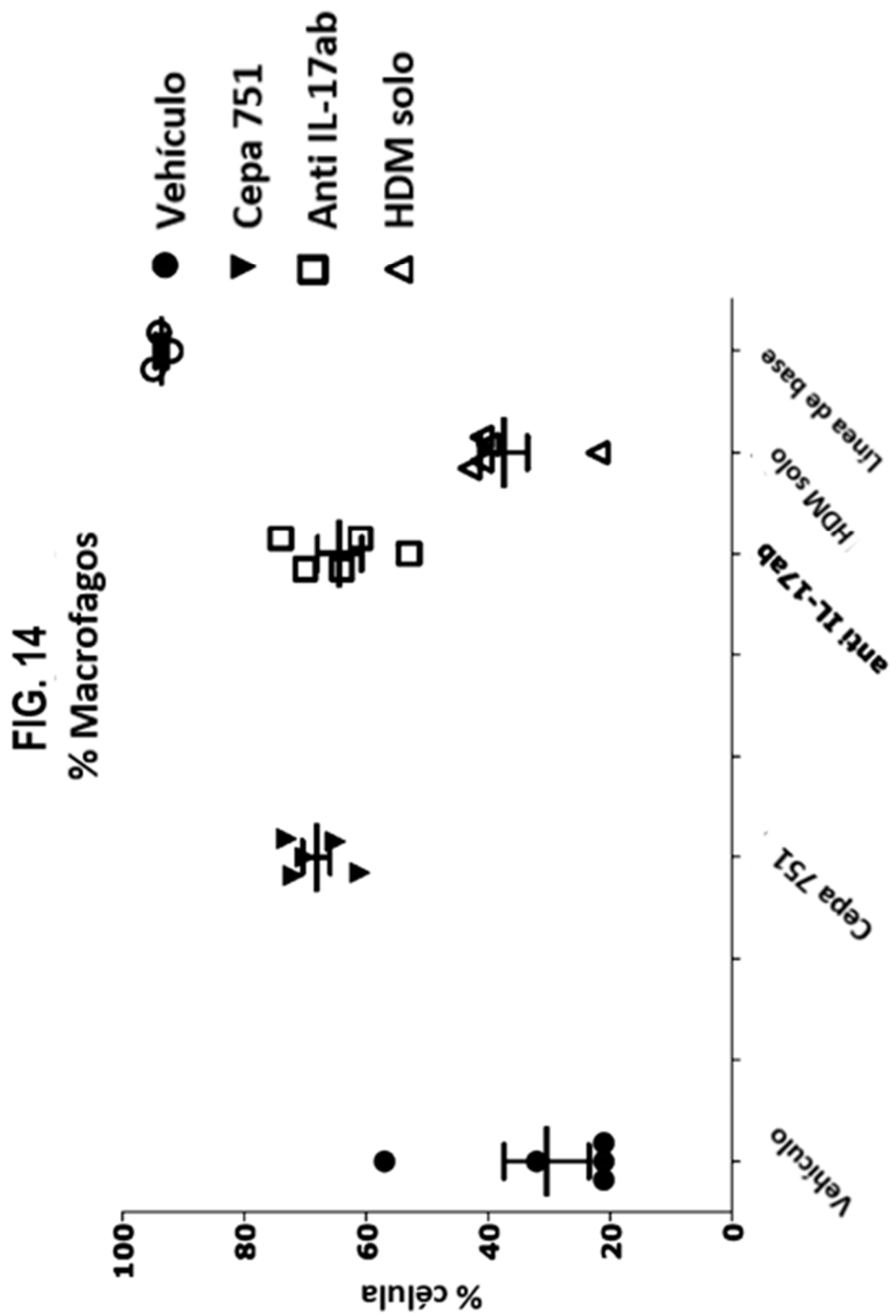
FIG. 10

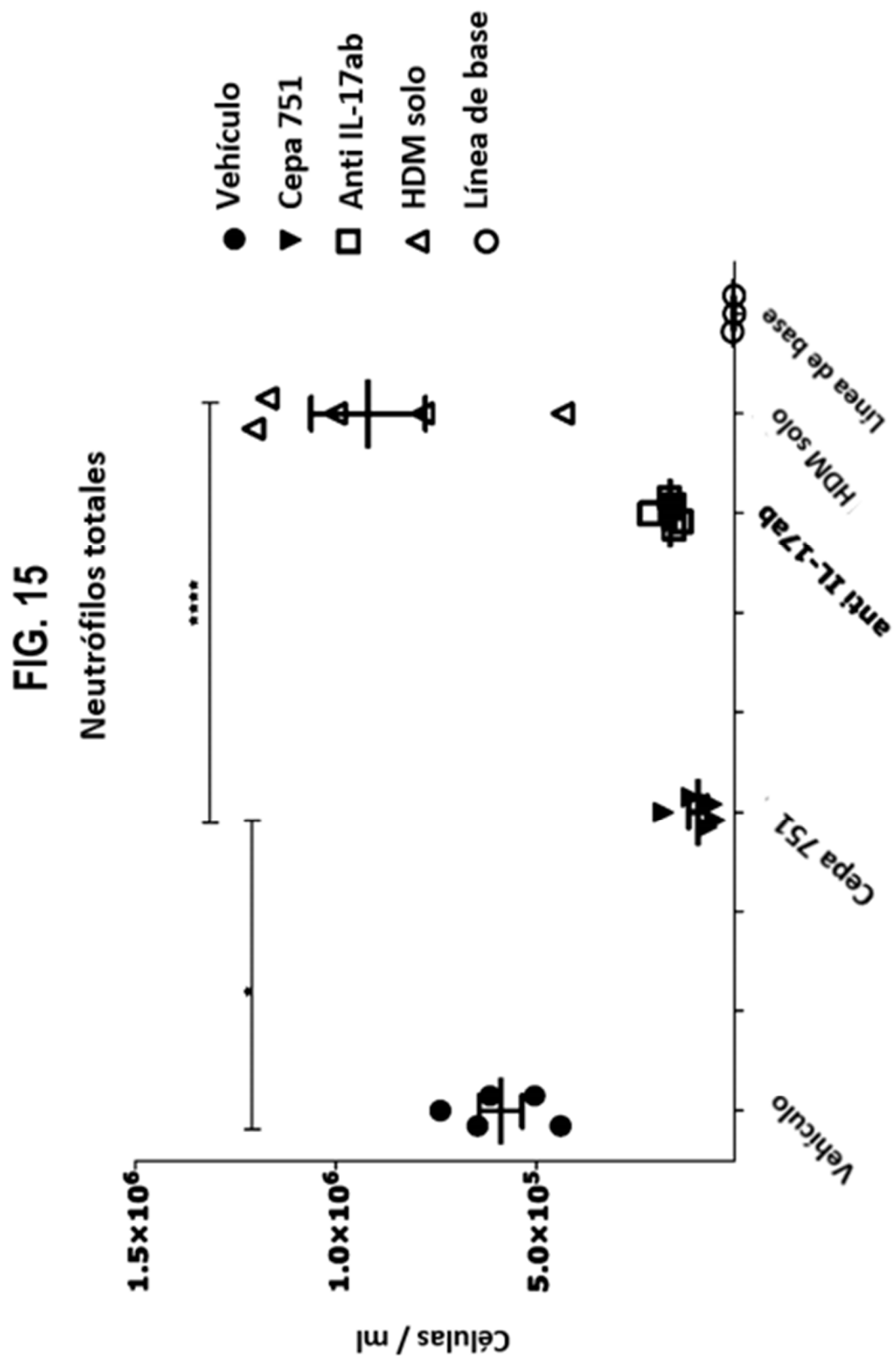












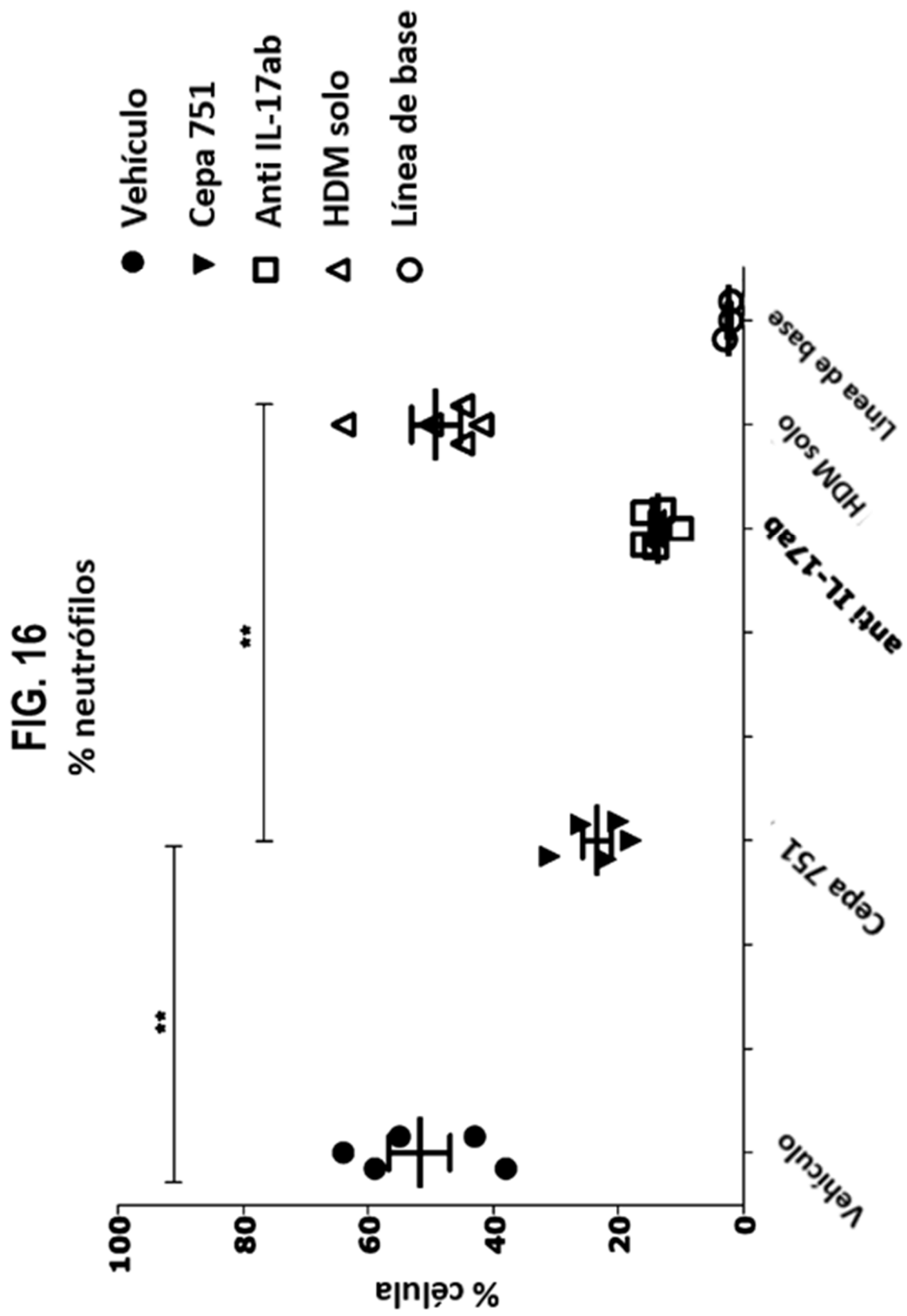
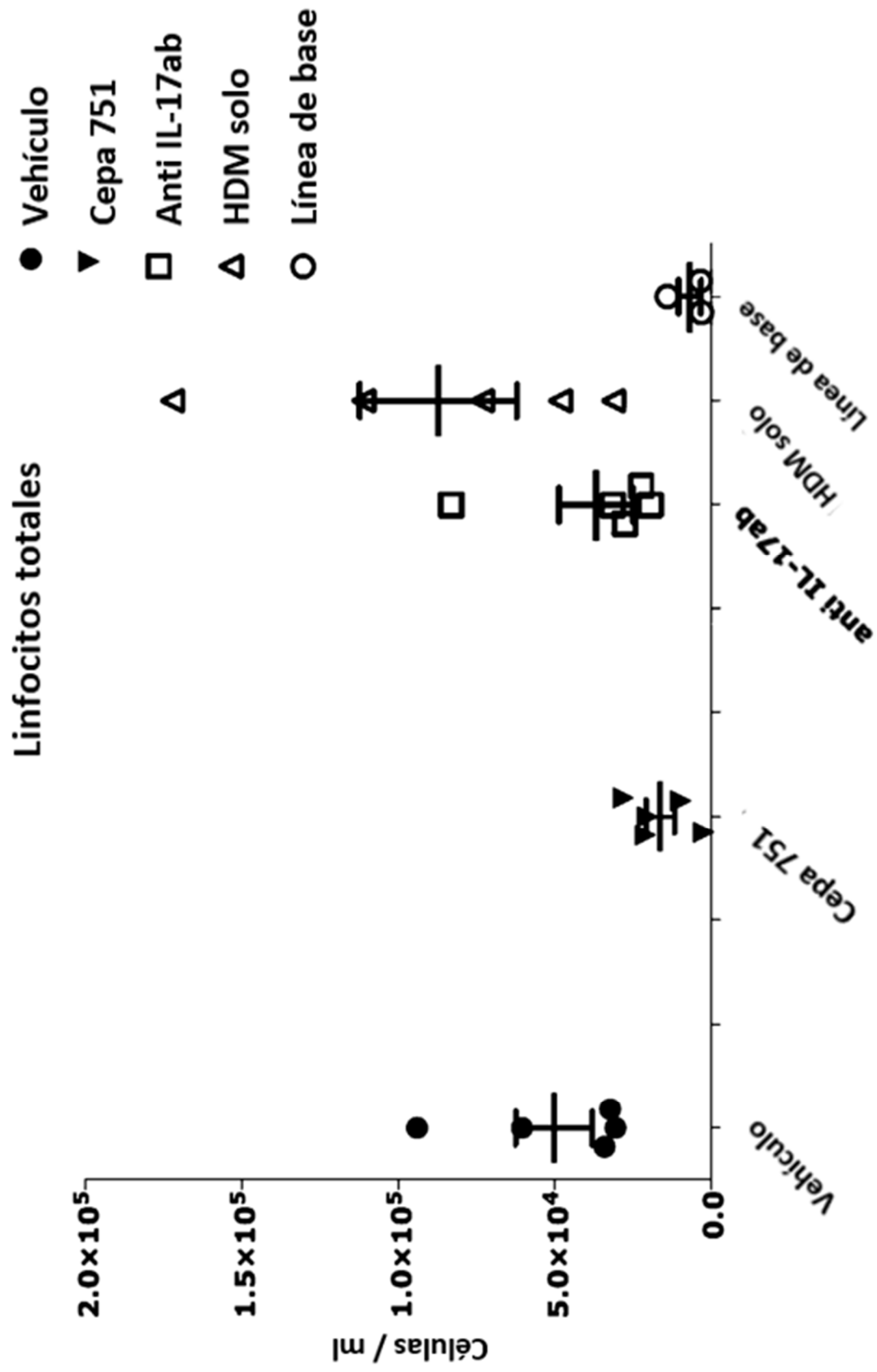


FIG. 17



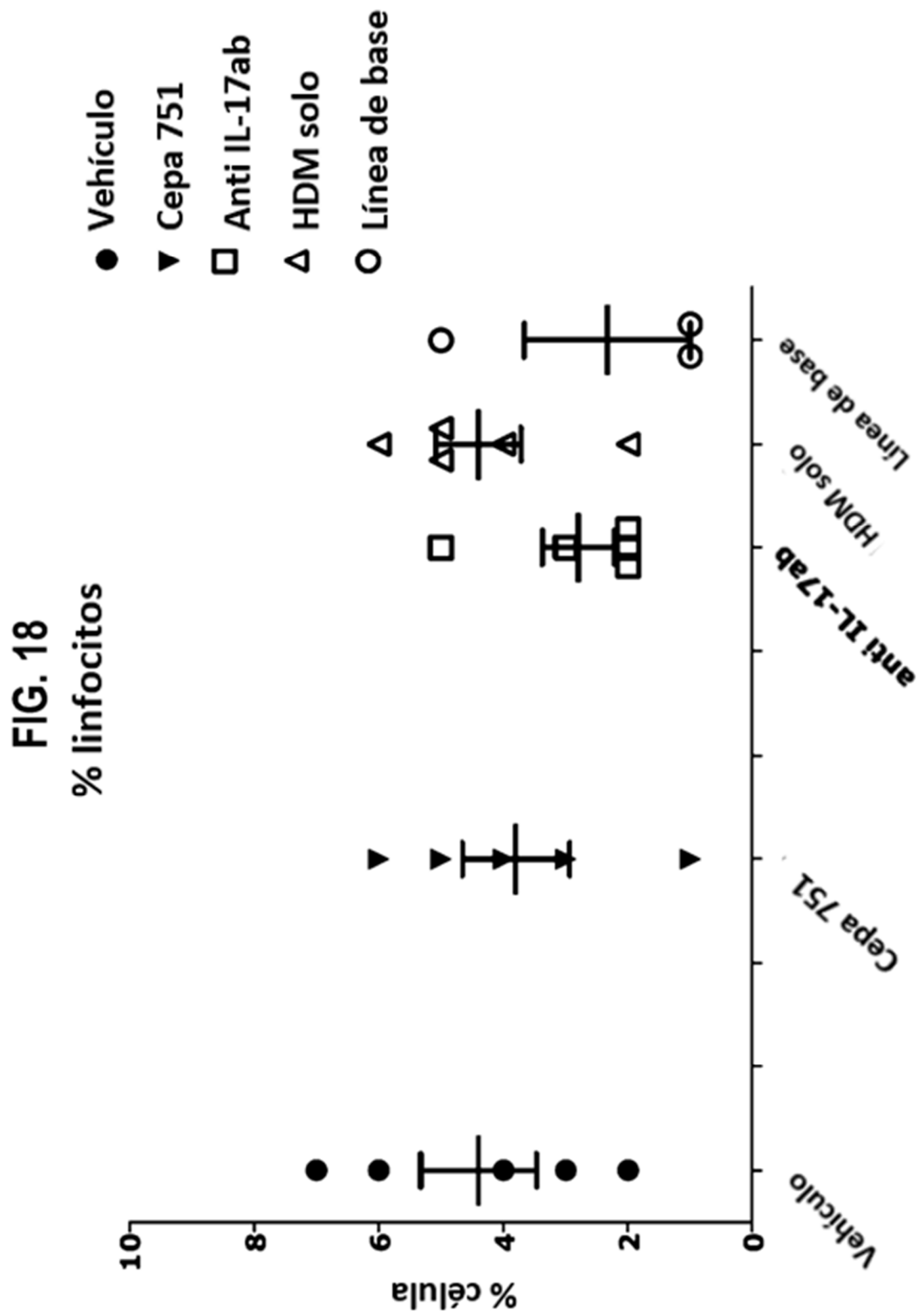


FIG. 19
Pesos corporales

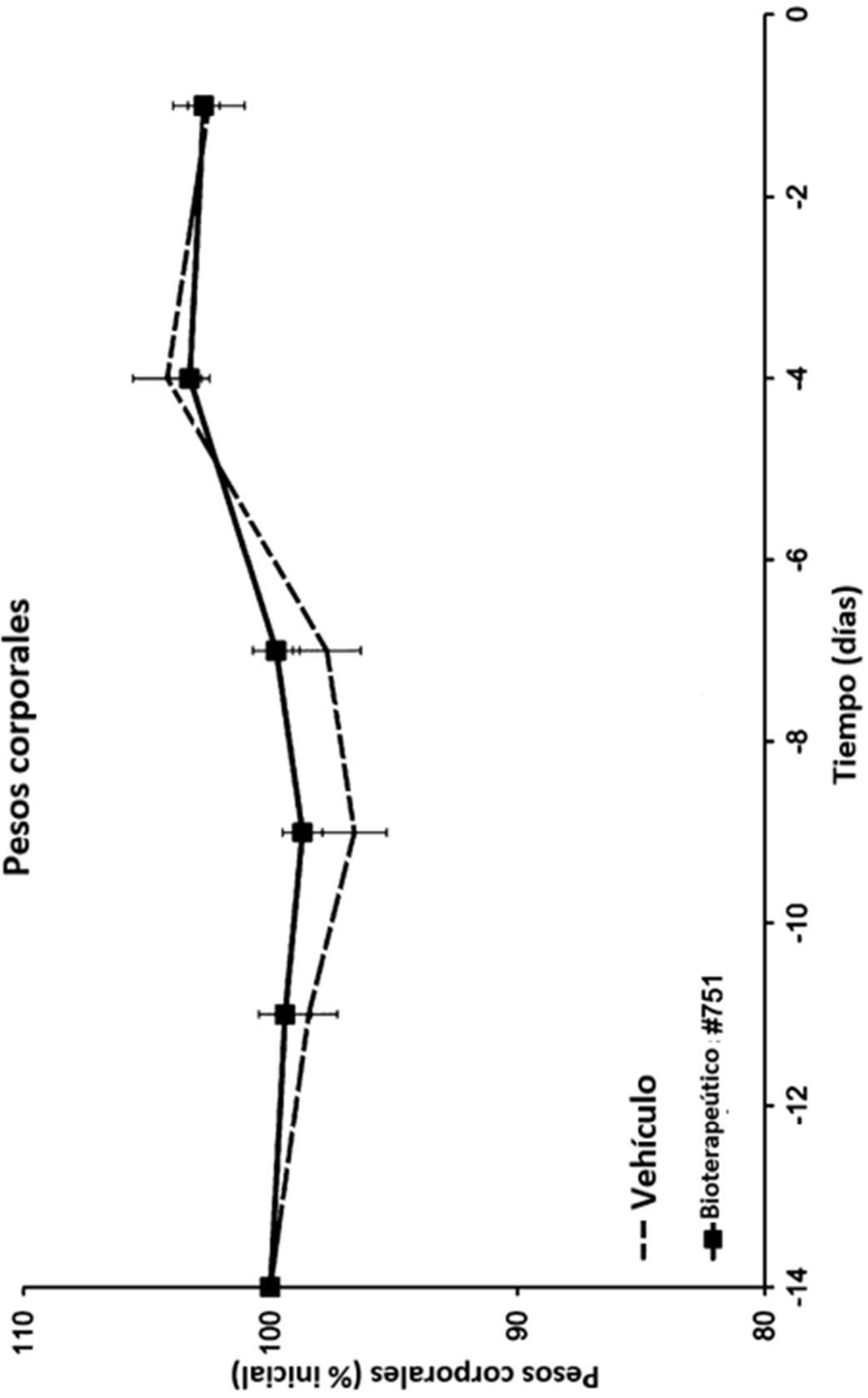


FIG. 20
Pesos corporales

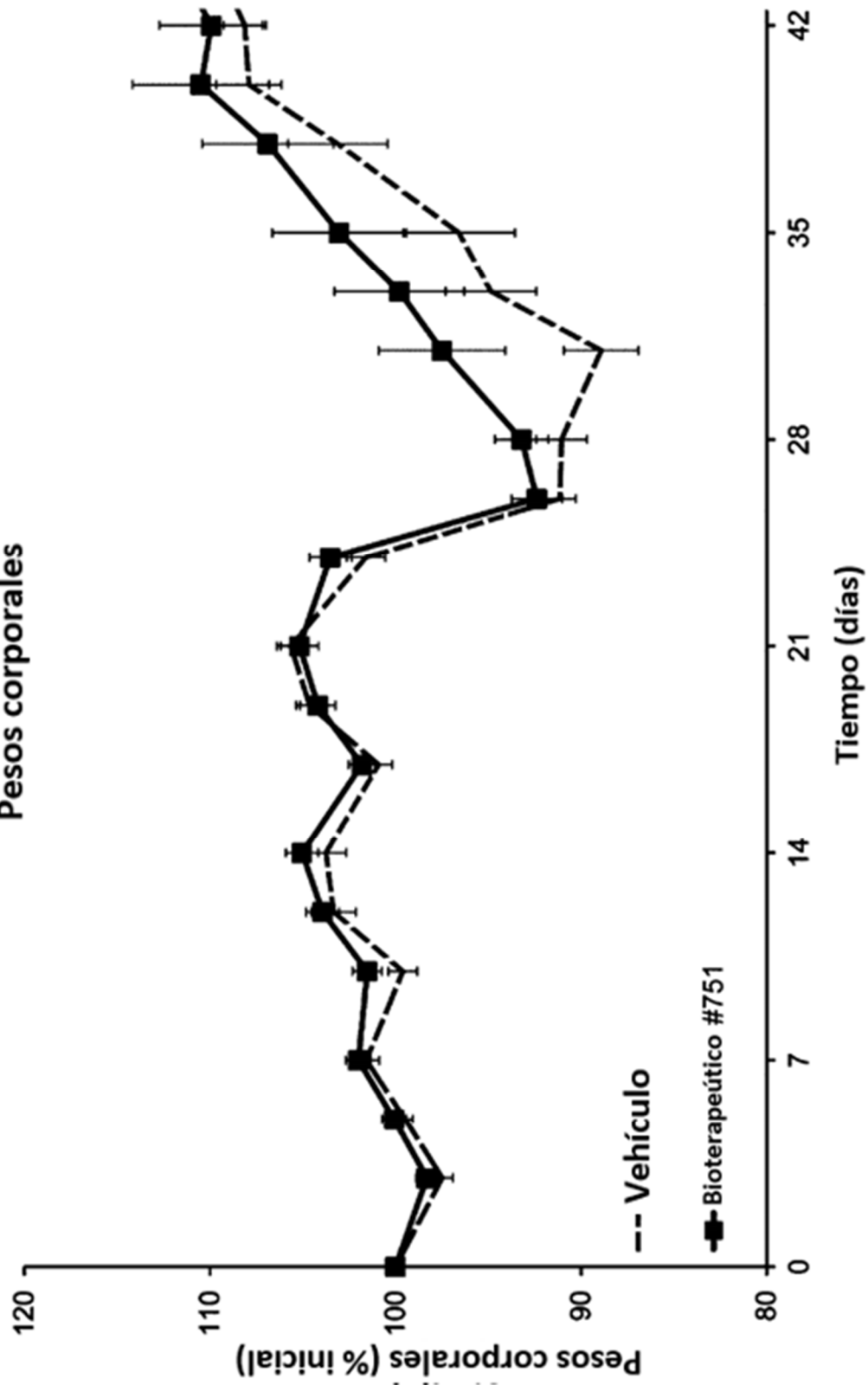


FIG. 21
Puntuaciones clínicas

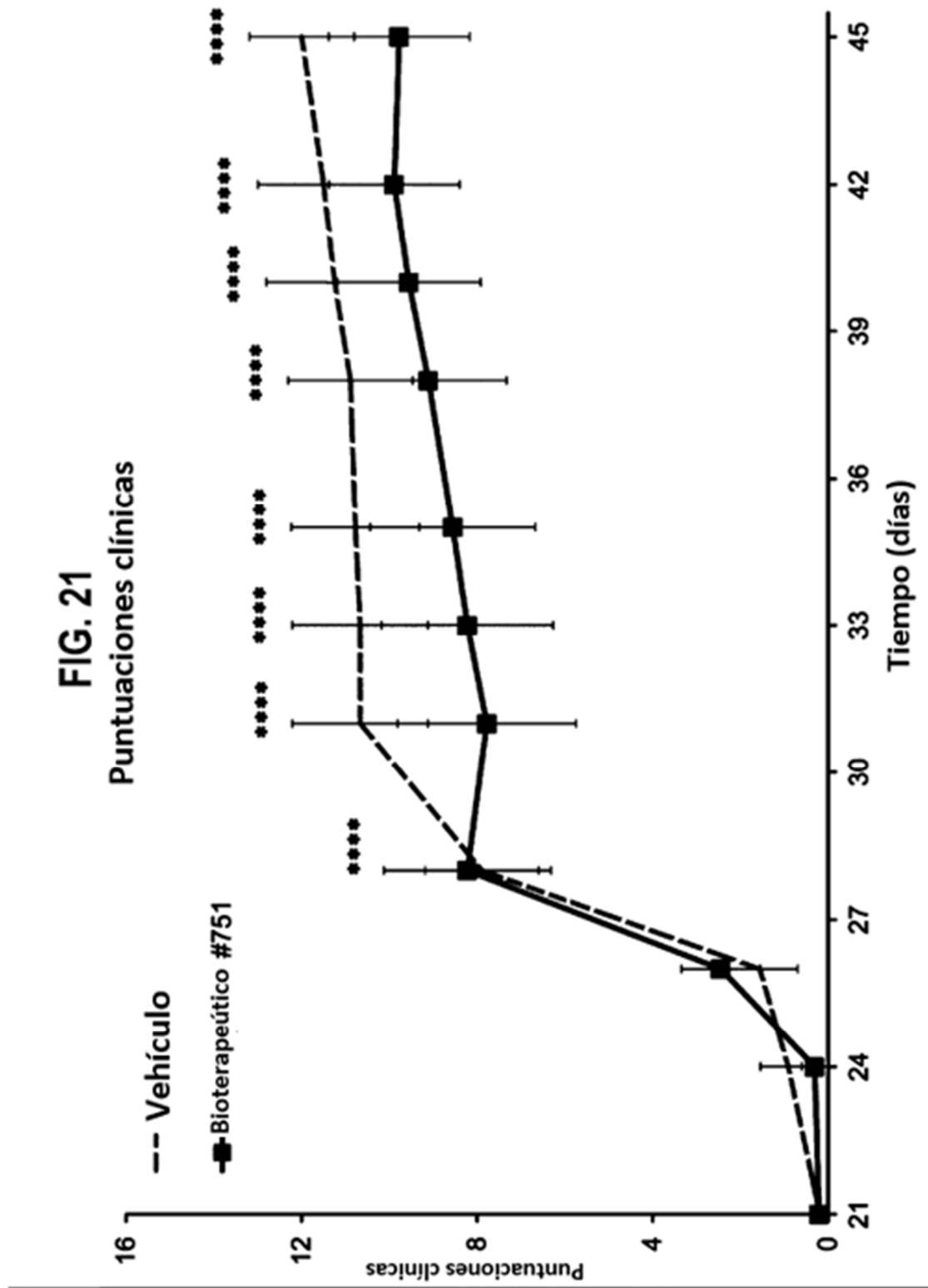


FIG. 22

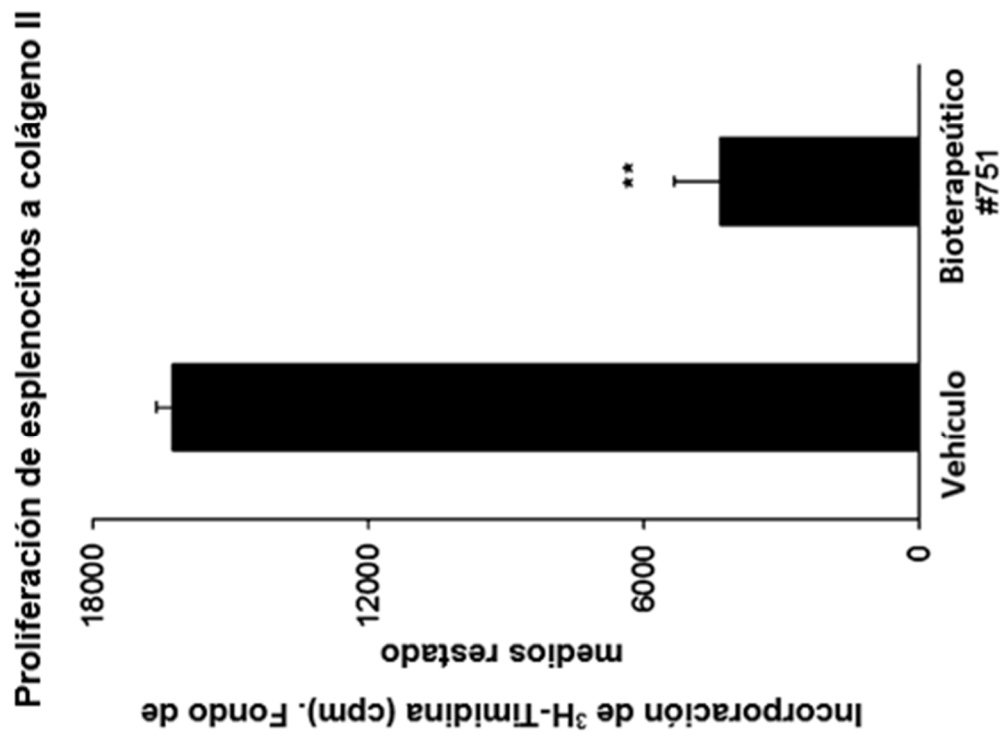
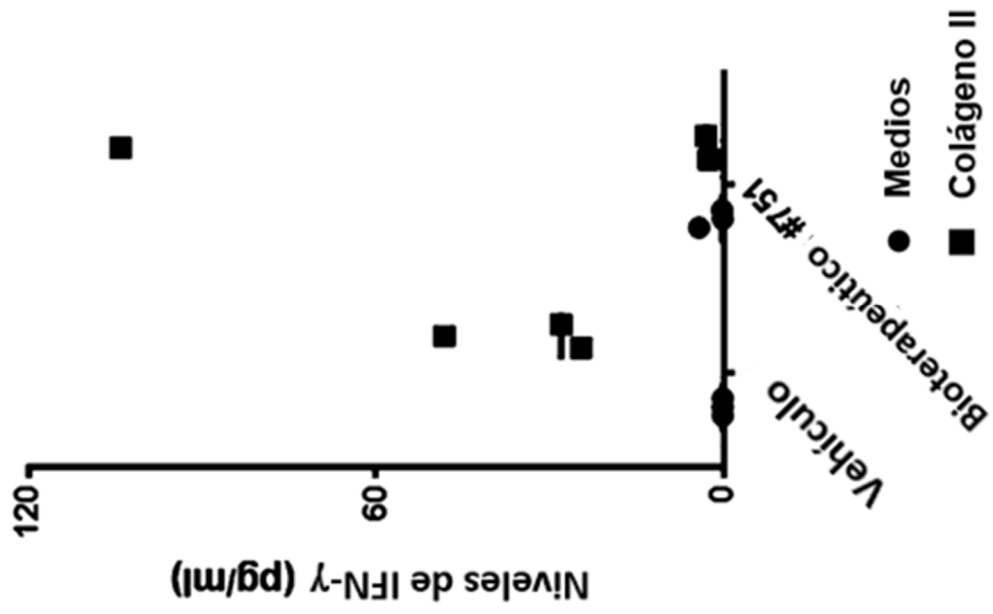


FIG. 23



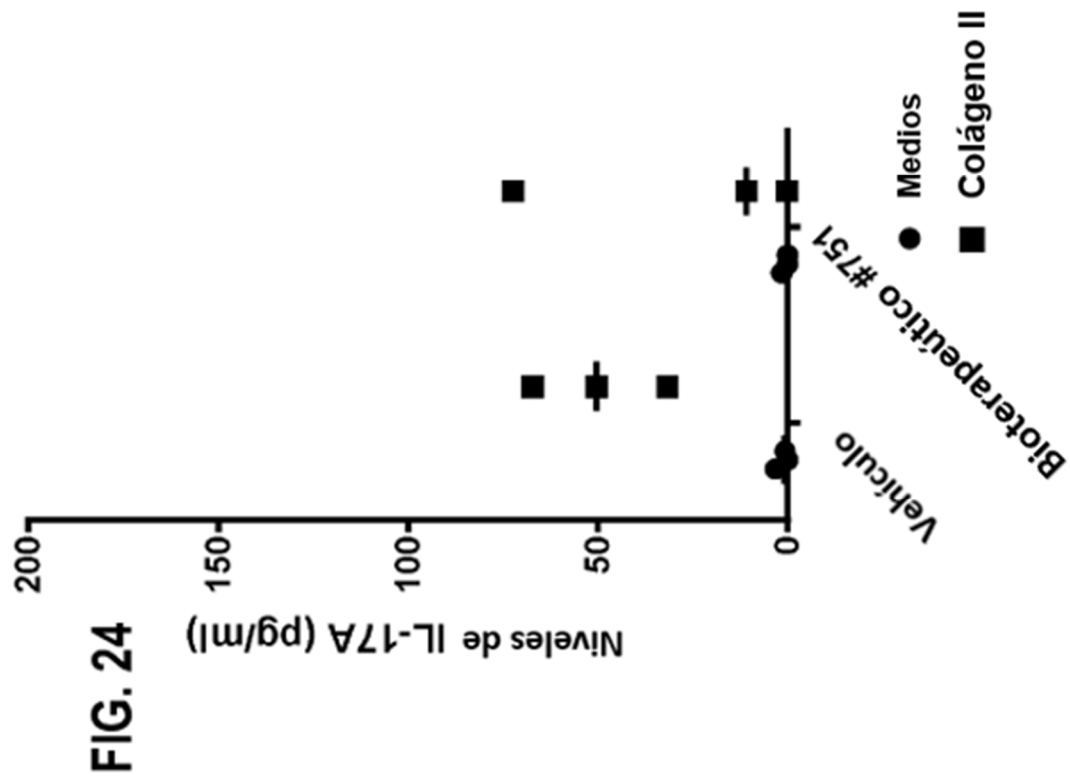
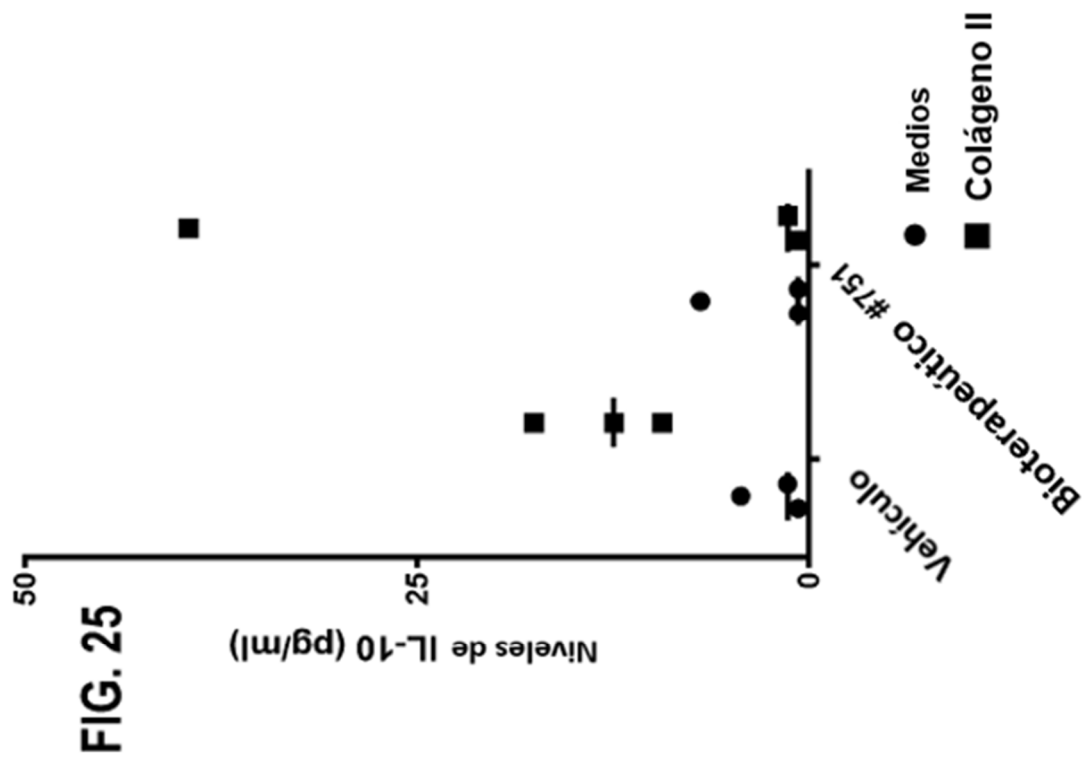


FIG. 26

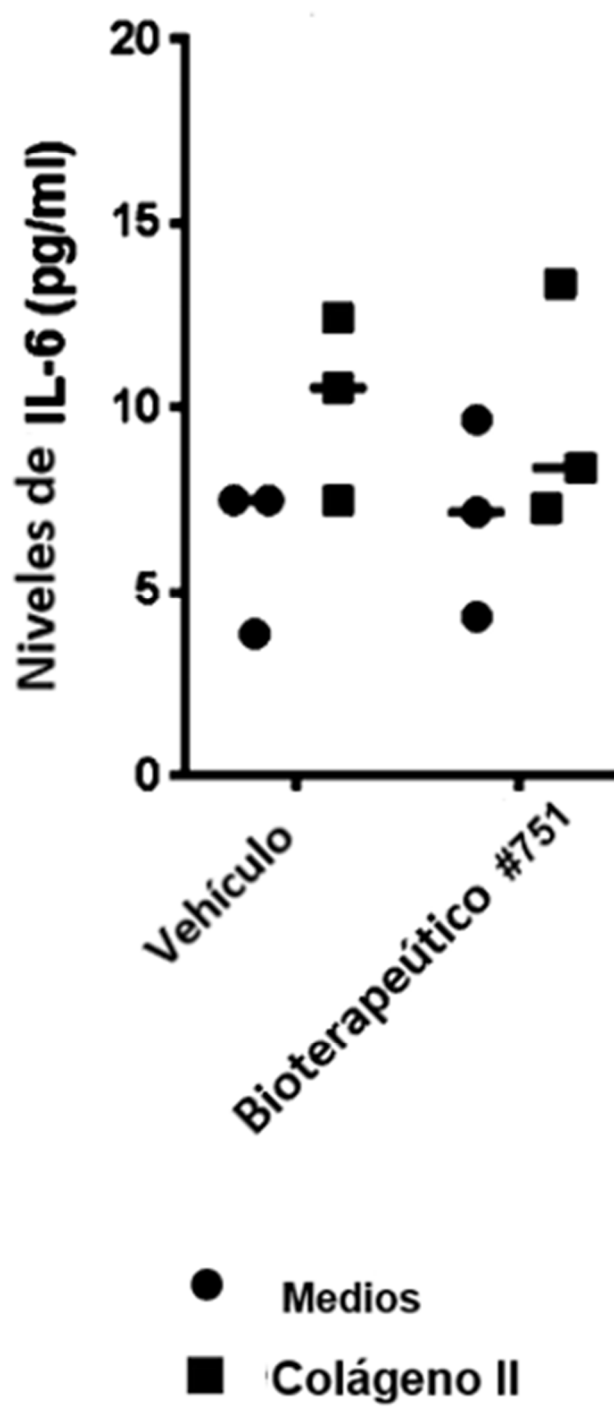
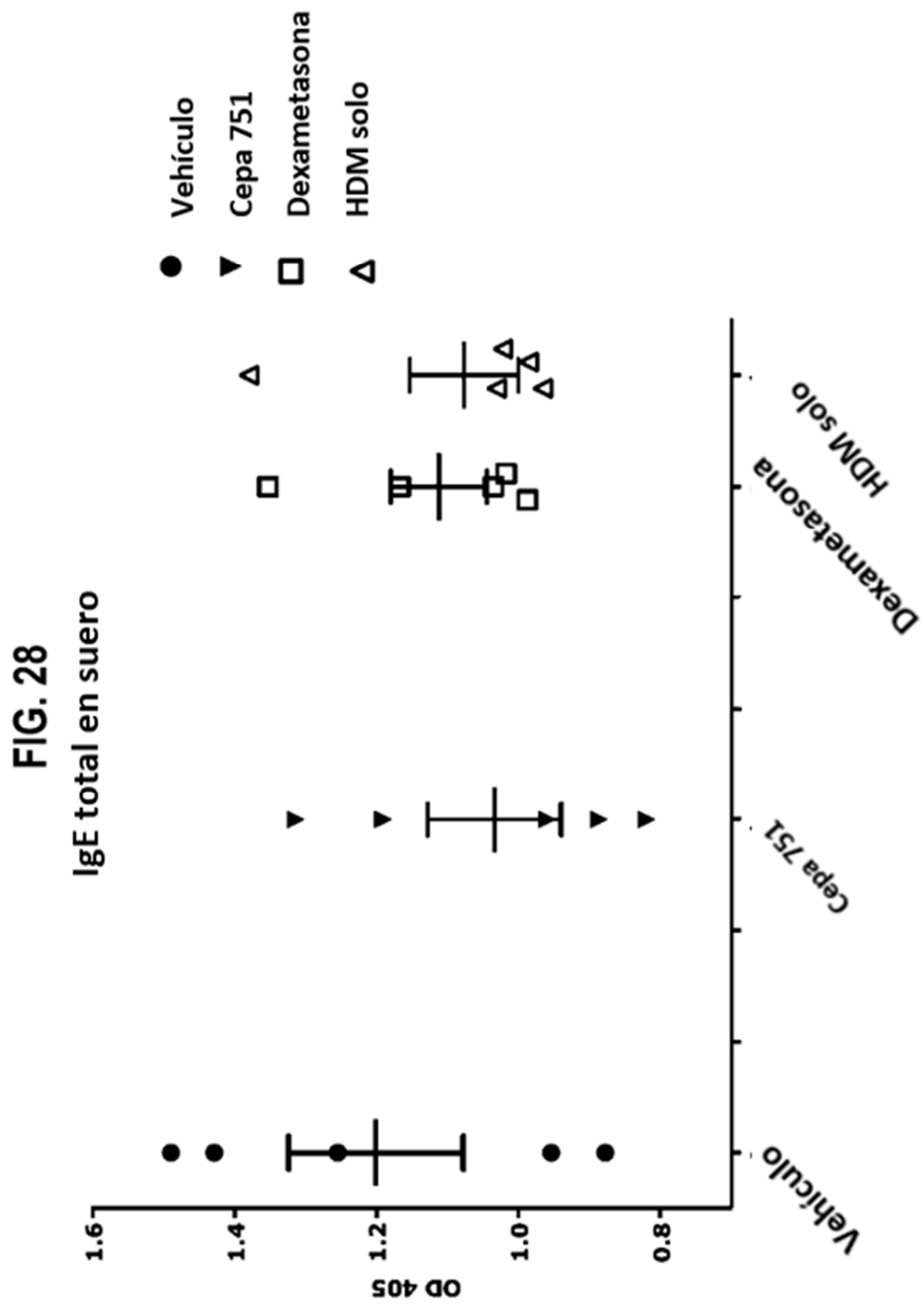
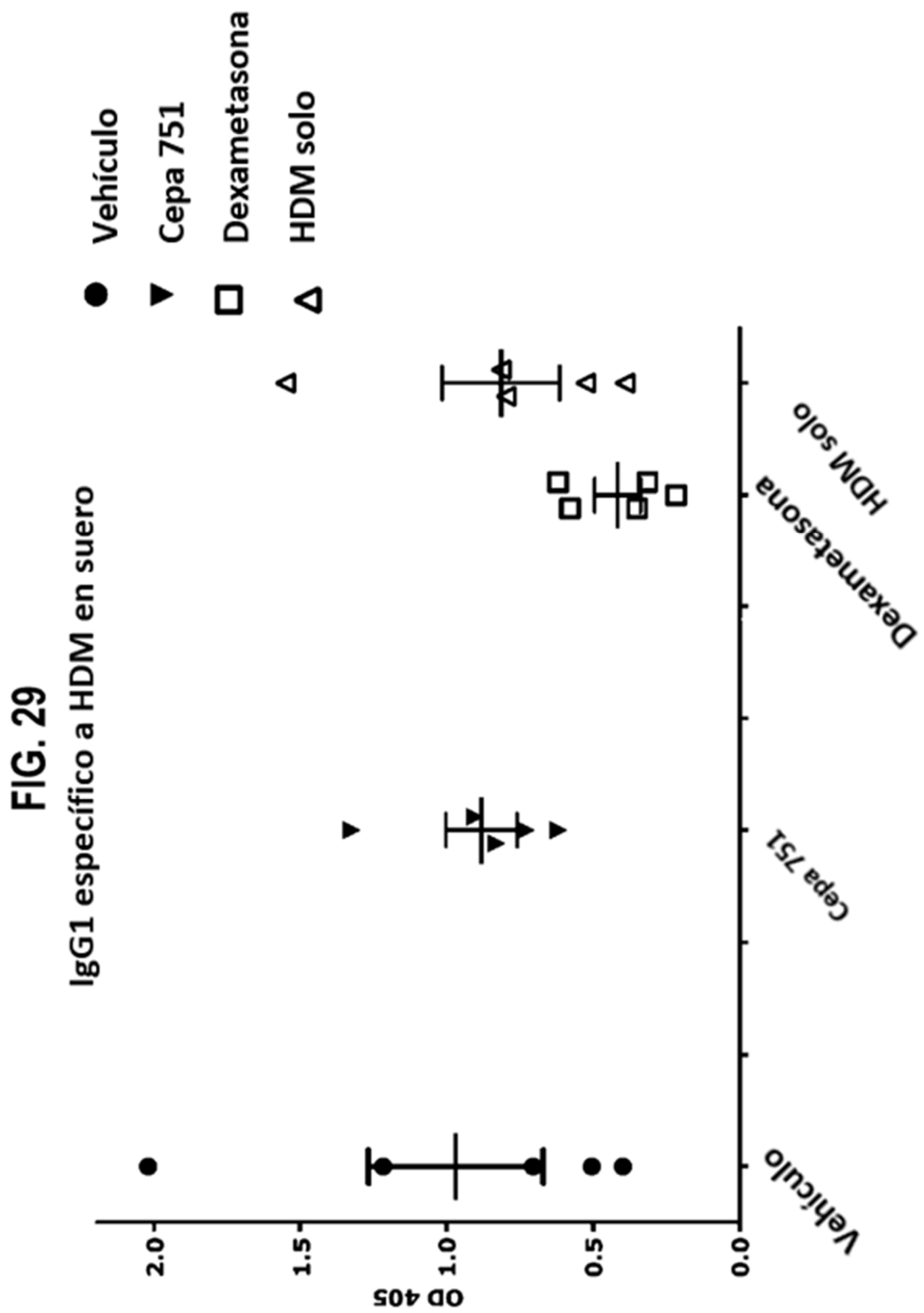


FIG. 27

Sistema de puntuación de histopatología

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial suave con inflamación dominada por neutrófilos. Números bajos de neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que involucra tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación; puede consistir en residuos de tejido necrótico.
3	Hiperplasia sinovial con inflamación marcada que involucra tanto neutrófilos como macrófagos. Pérdida de revestimiento sinoviocítico. La inflamación puede extenderse desde el sinovio al tejido circundante que incluye musculatura. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio de articulación, junto con residuos de tejido necrótico.
Daño de cartílago articular	
0	Articulación normal
1	Cartílago articular muestra solo cambio degenerativo suave. Formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente.
2	Cartílago articular muestra cambio degenerativo moderado y pérdida focal. Formación de pannus está presente focalmente.
3	Alteración significativa y pérdida de cartílago articular con formación extensiva de pannus.
Daño al hueso metafisario subyacente	
0	Articulación normal
1	Ningún cambio hueso metafisario subyacente.
2	Puede ser necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
3	Alteración o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensiva, necrosis o fibrosis que se extiende al espacio medular de metáfisis.





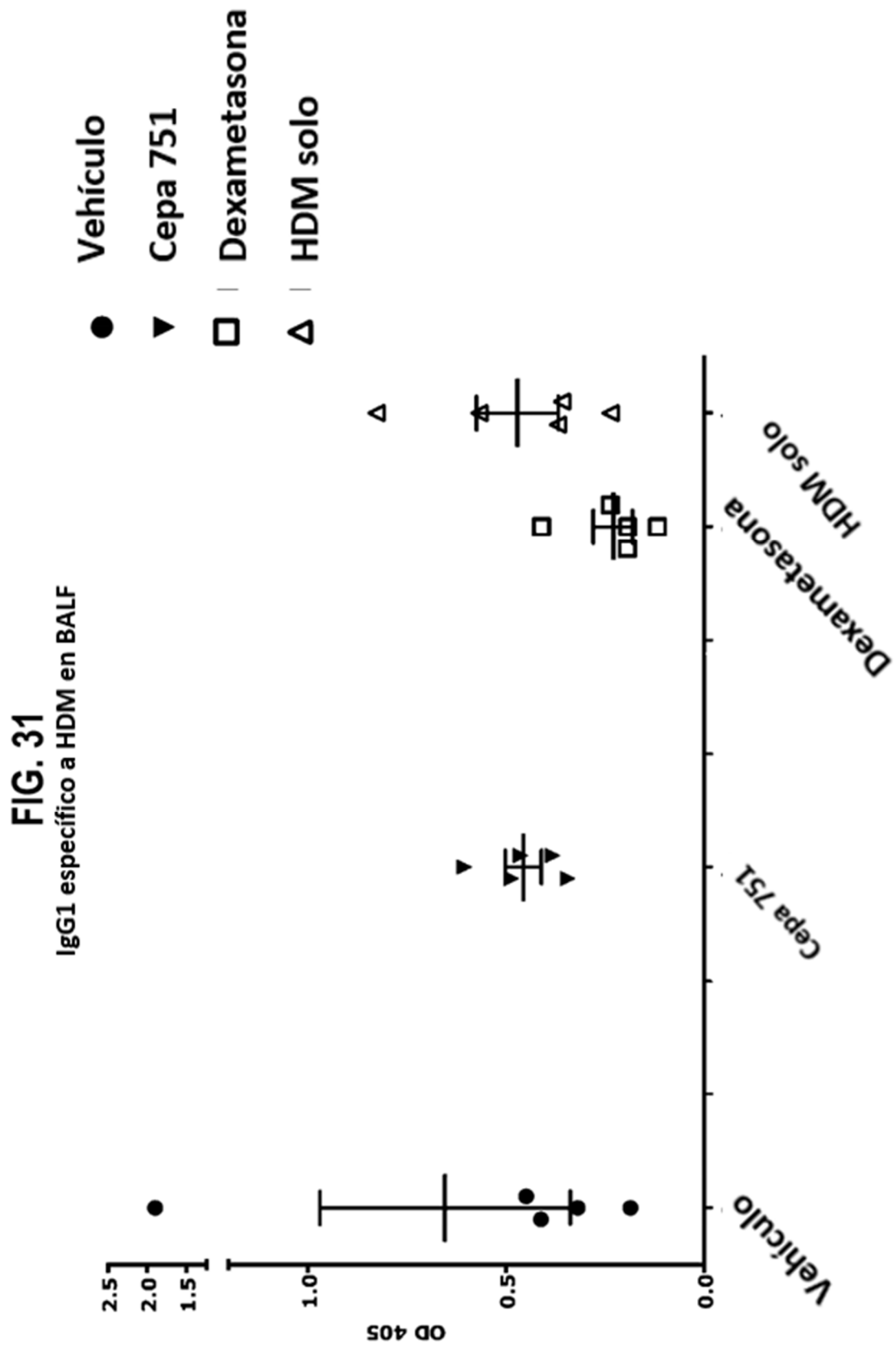
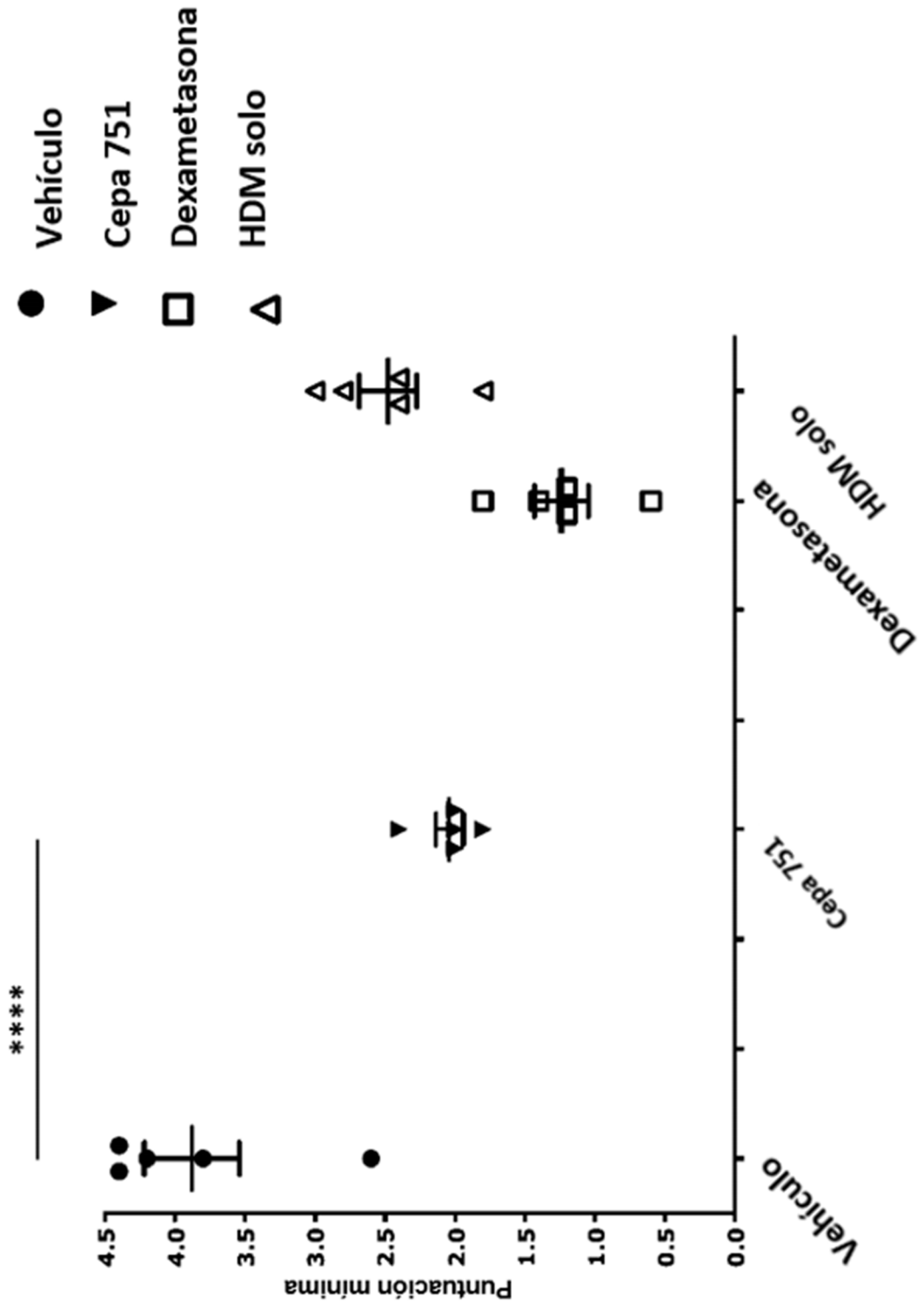


FIG. 32 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar



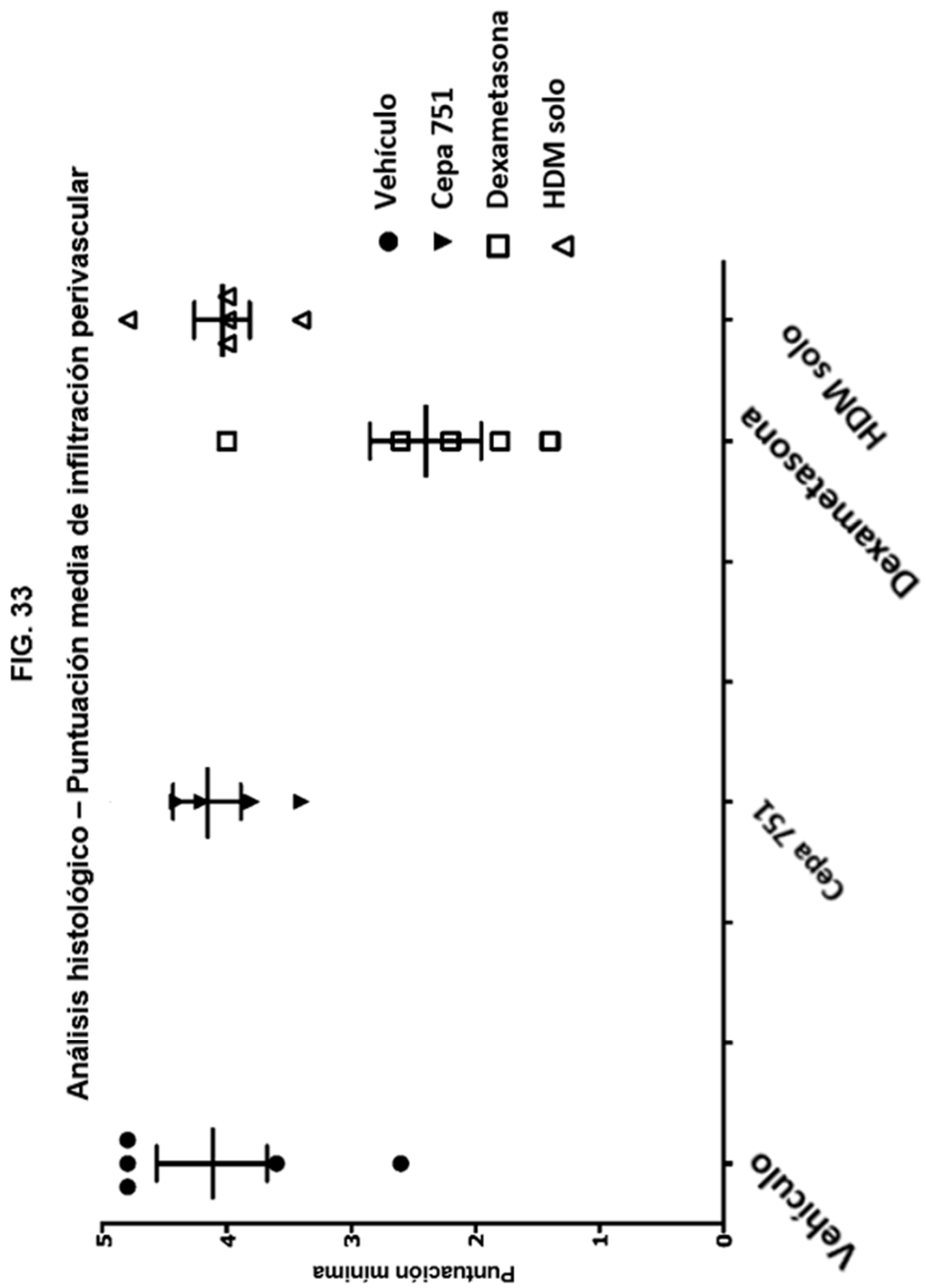


FIG. 34

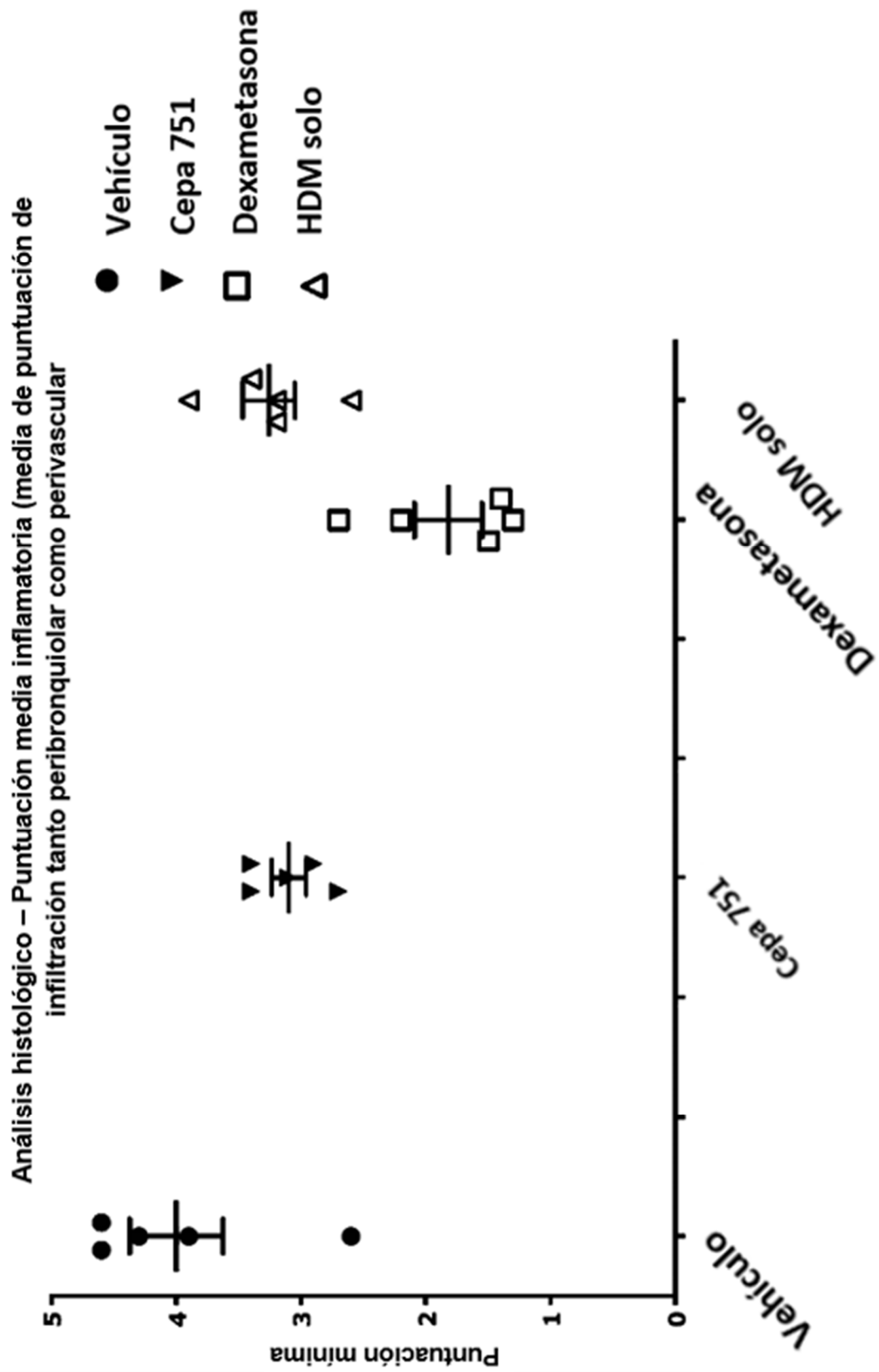


FIG. 35

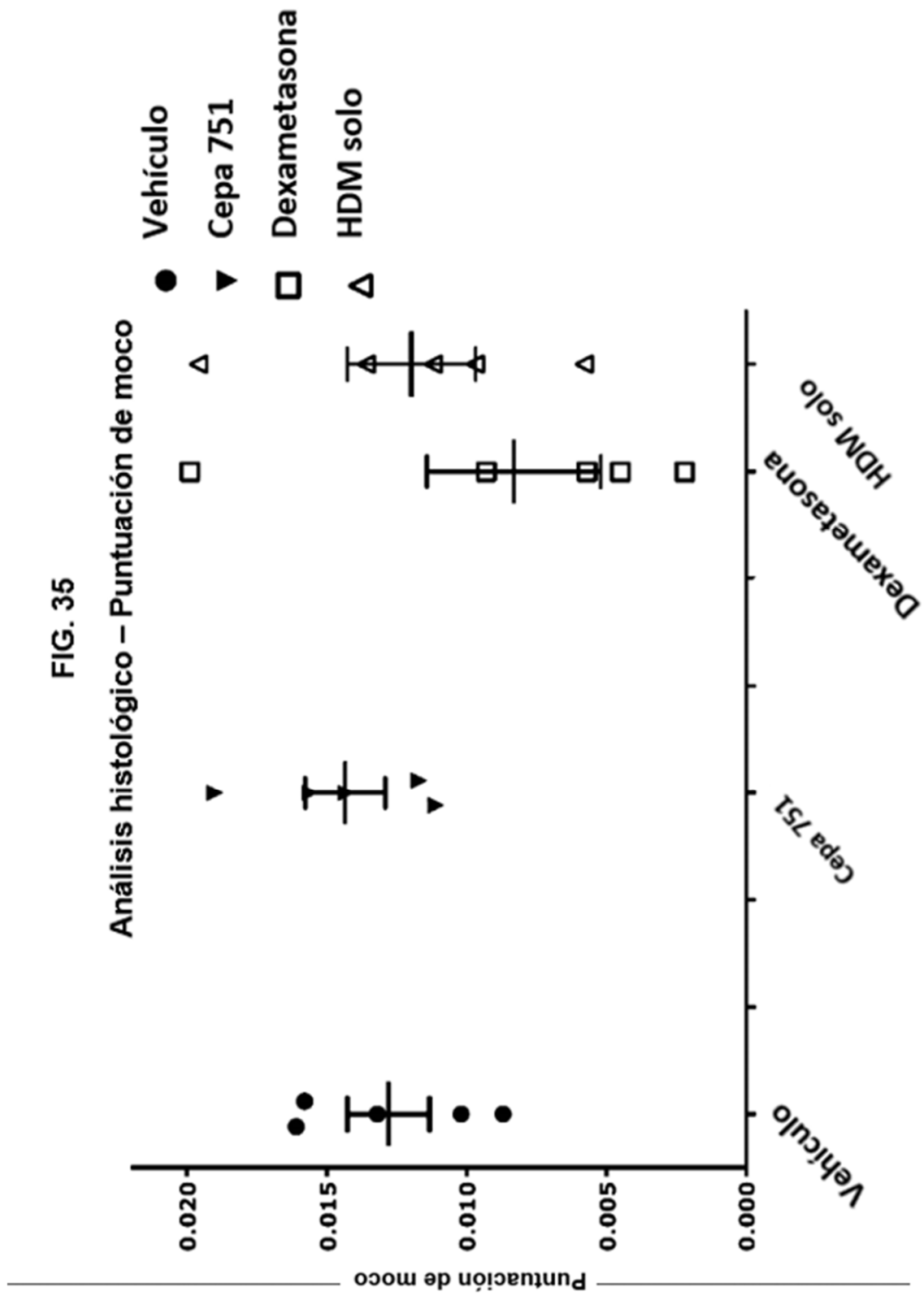


FIG. 36

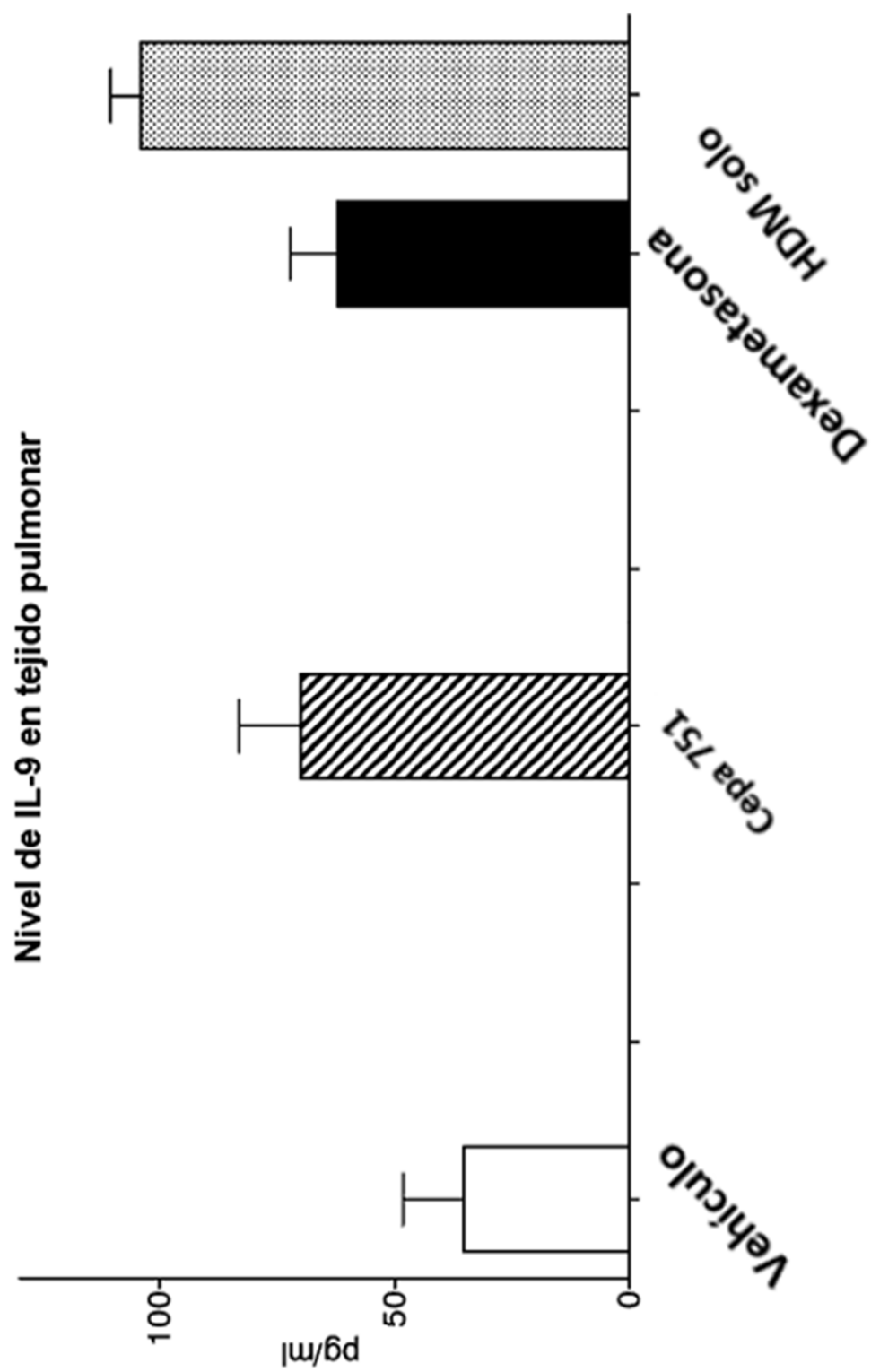
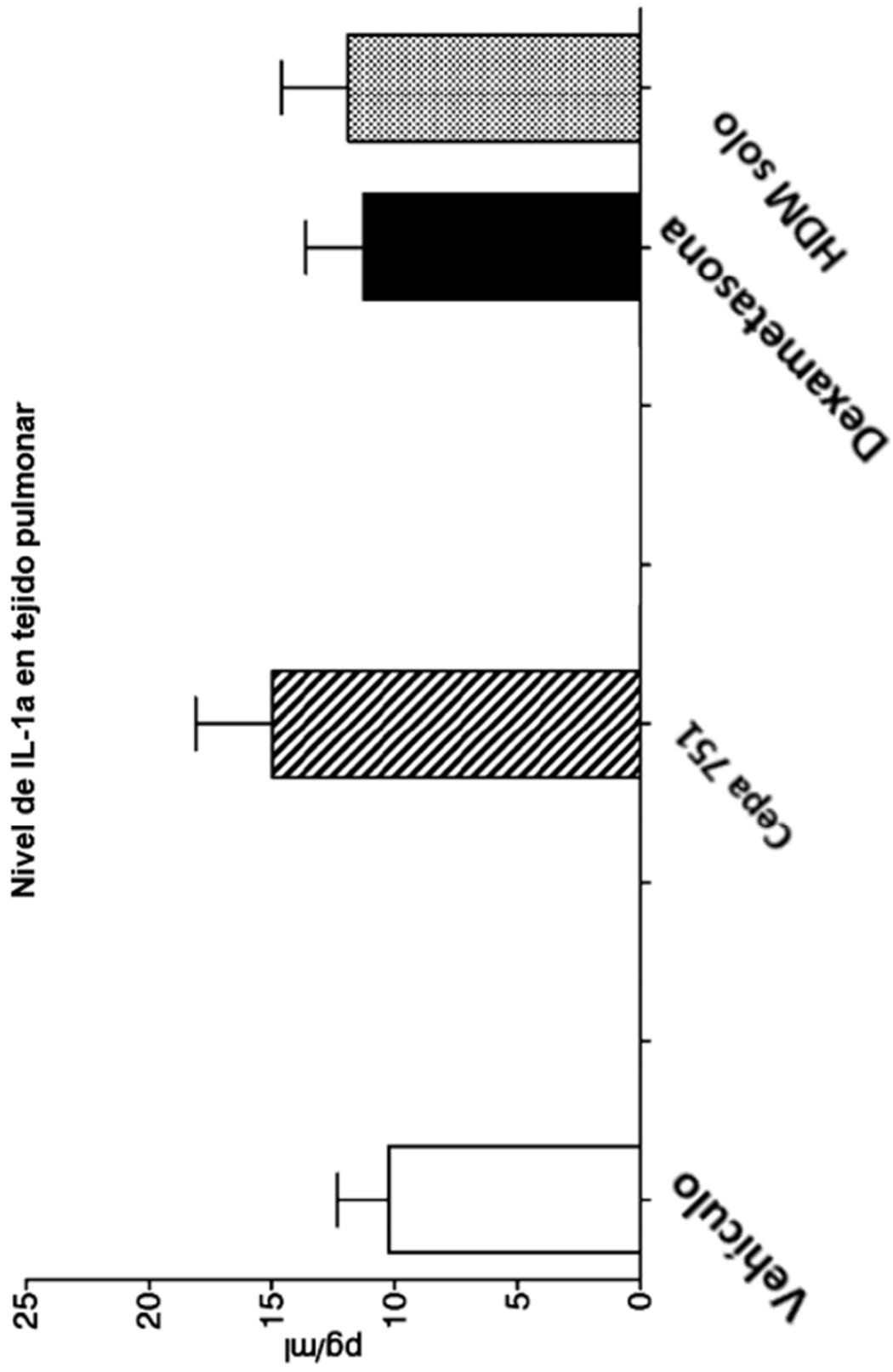


FIG. 37



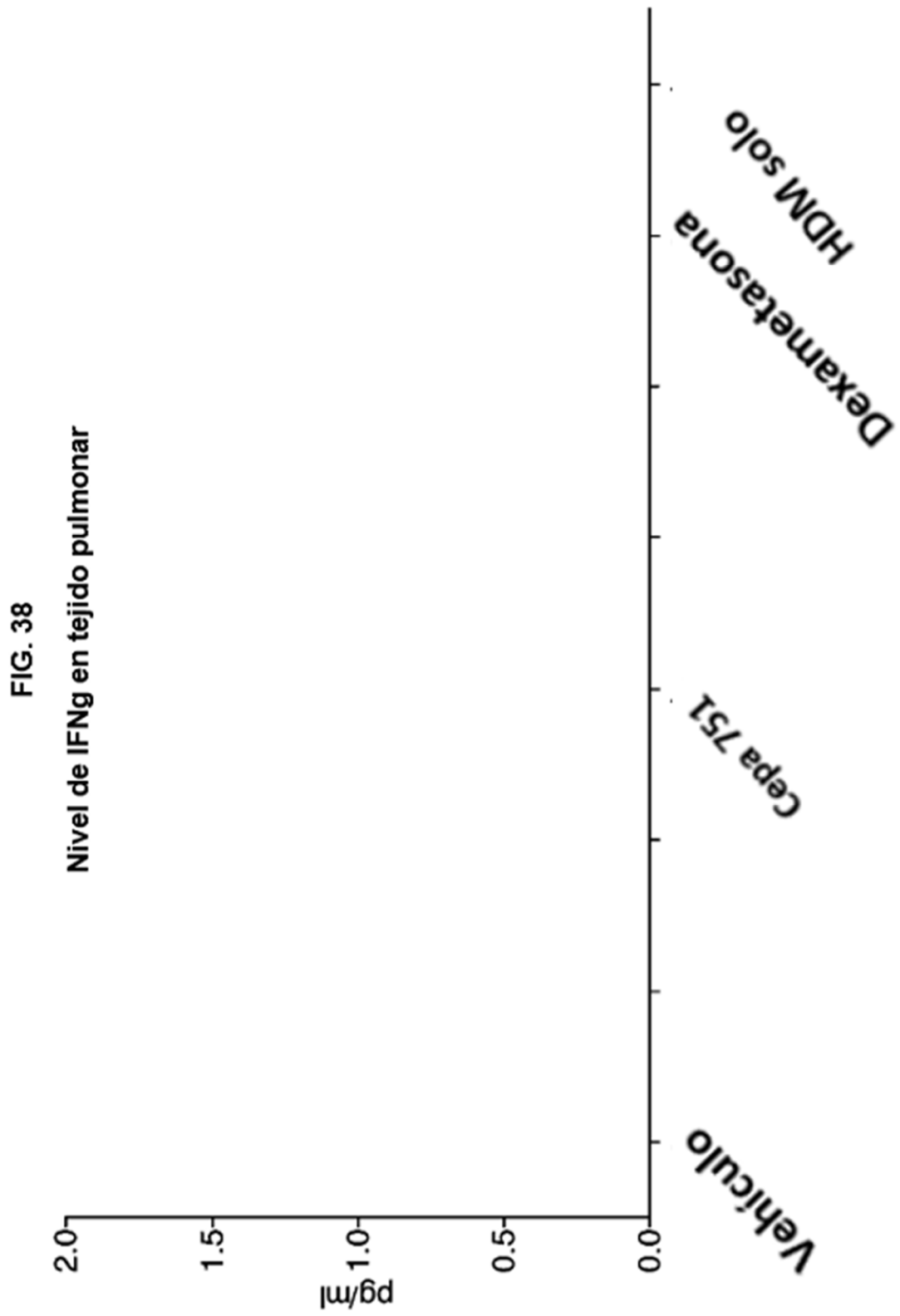


FIG. 39
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

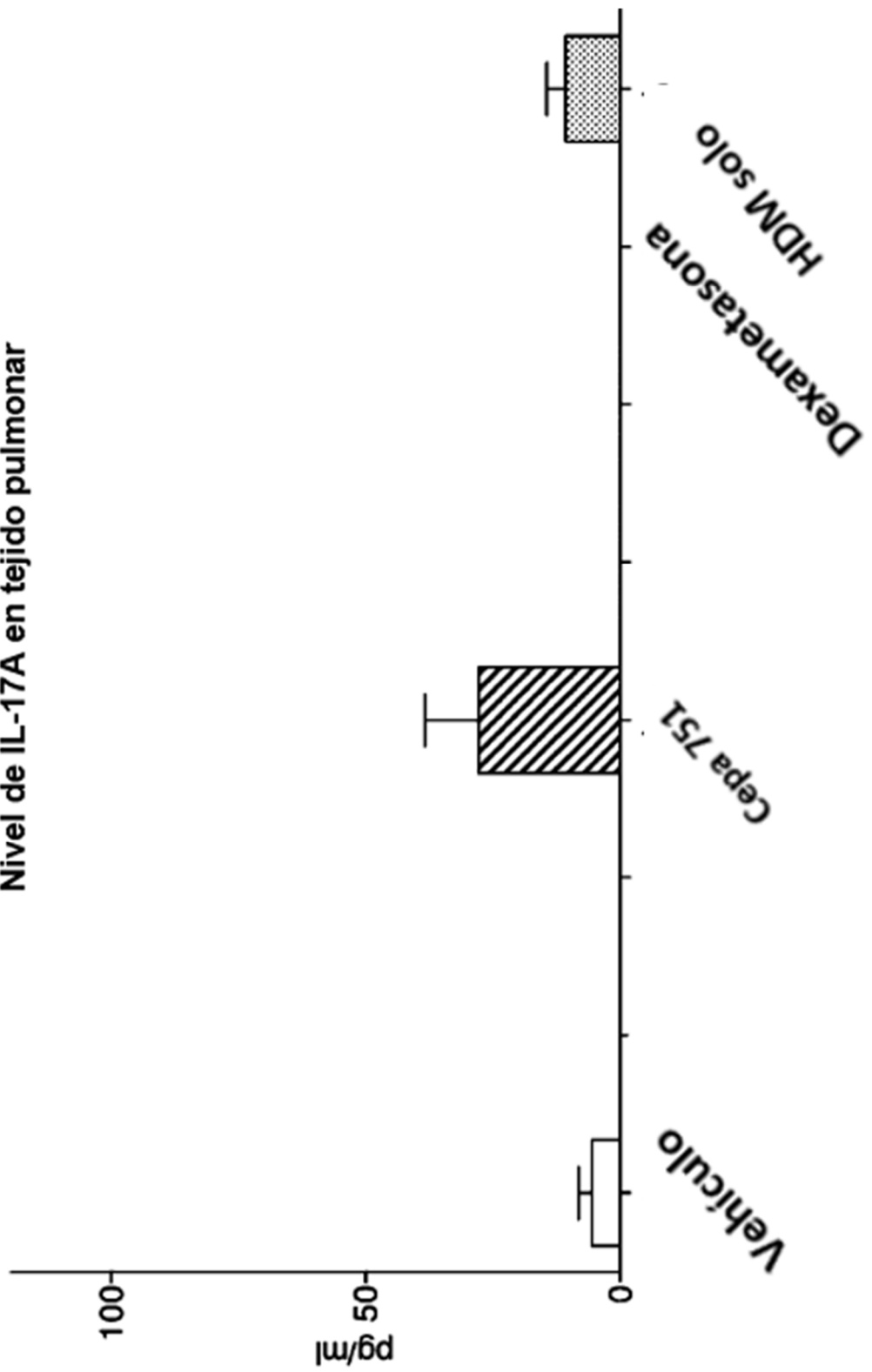


FIG. 40
Nivel de IL-4 en tejido pulmonar

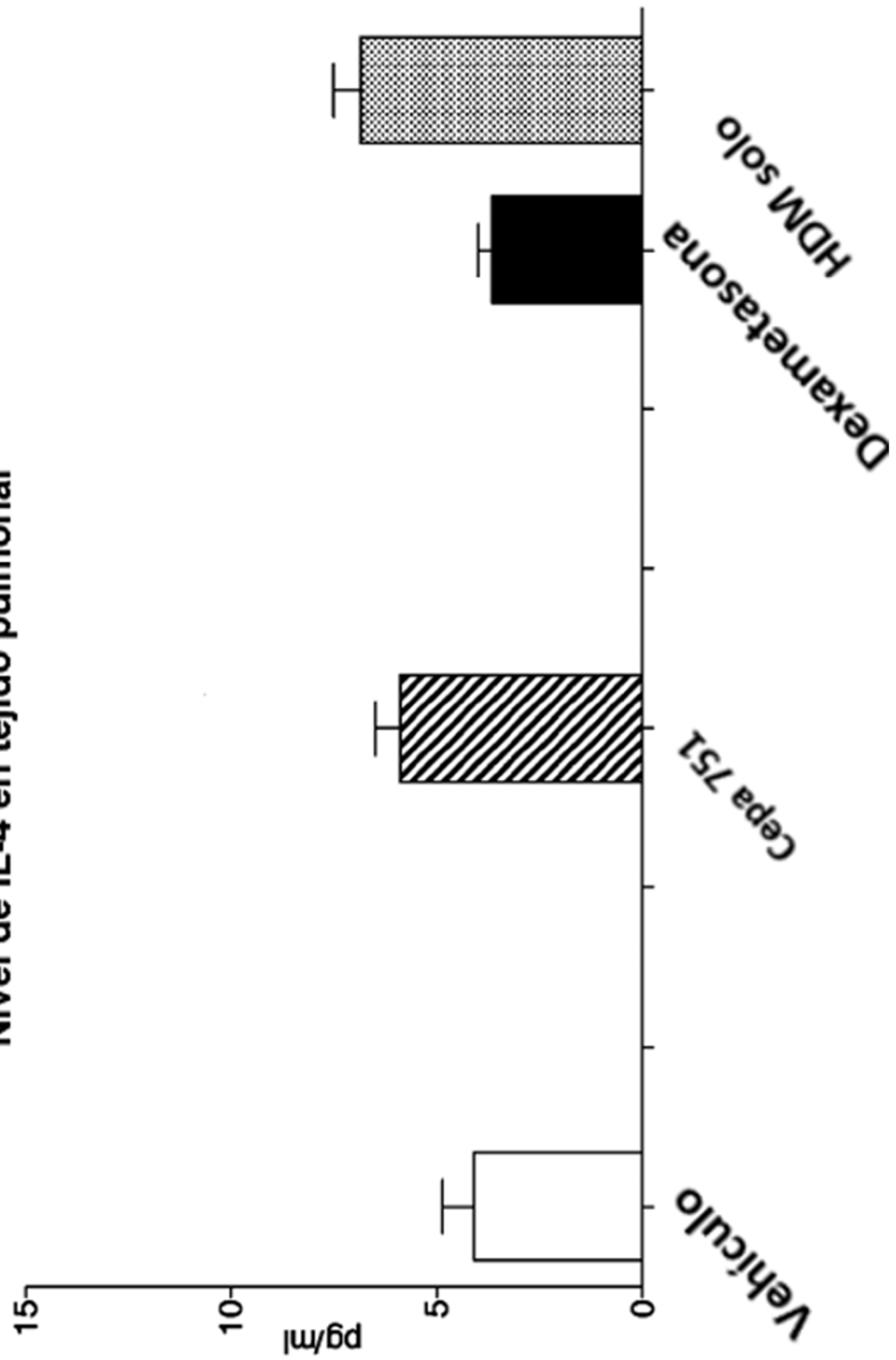


FIG. 41
Nivel de IL-5 en tejido pulmonar

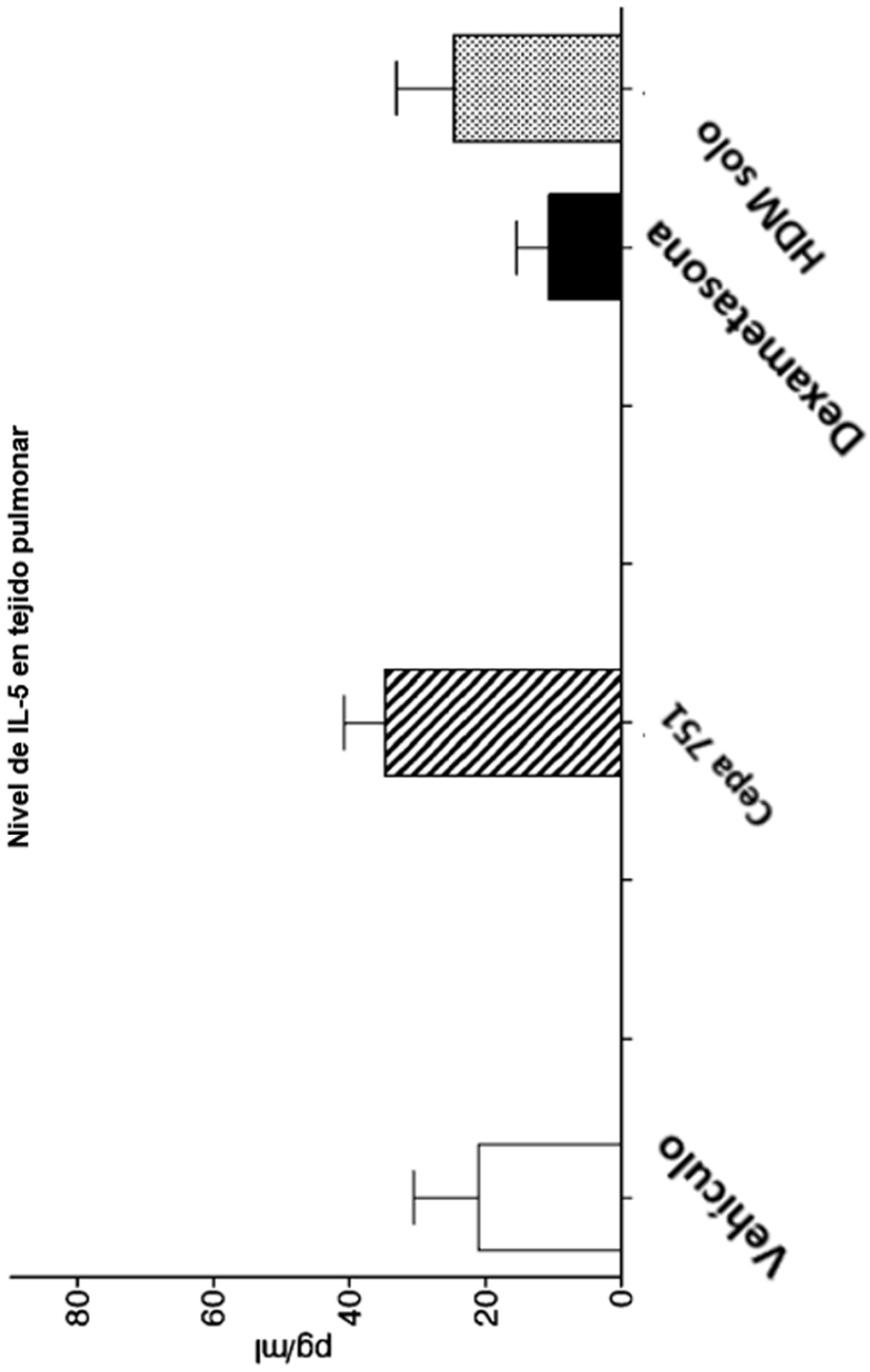


FIG. 42
Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

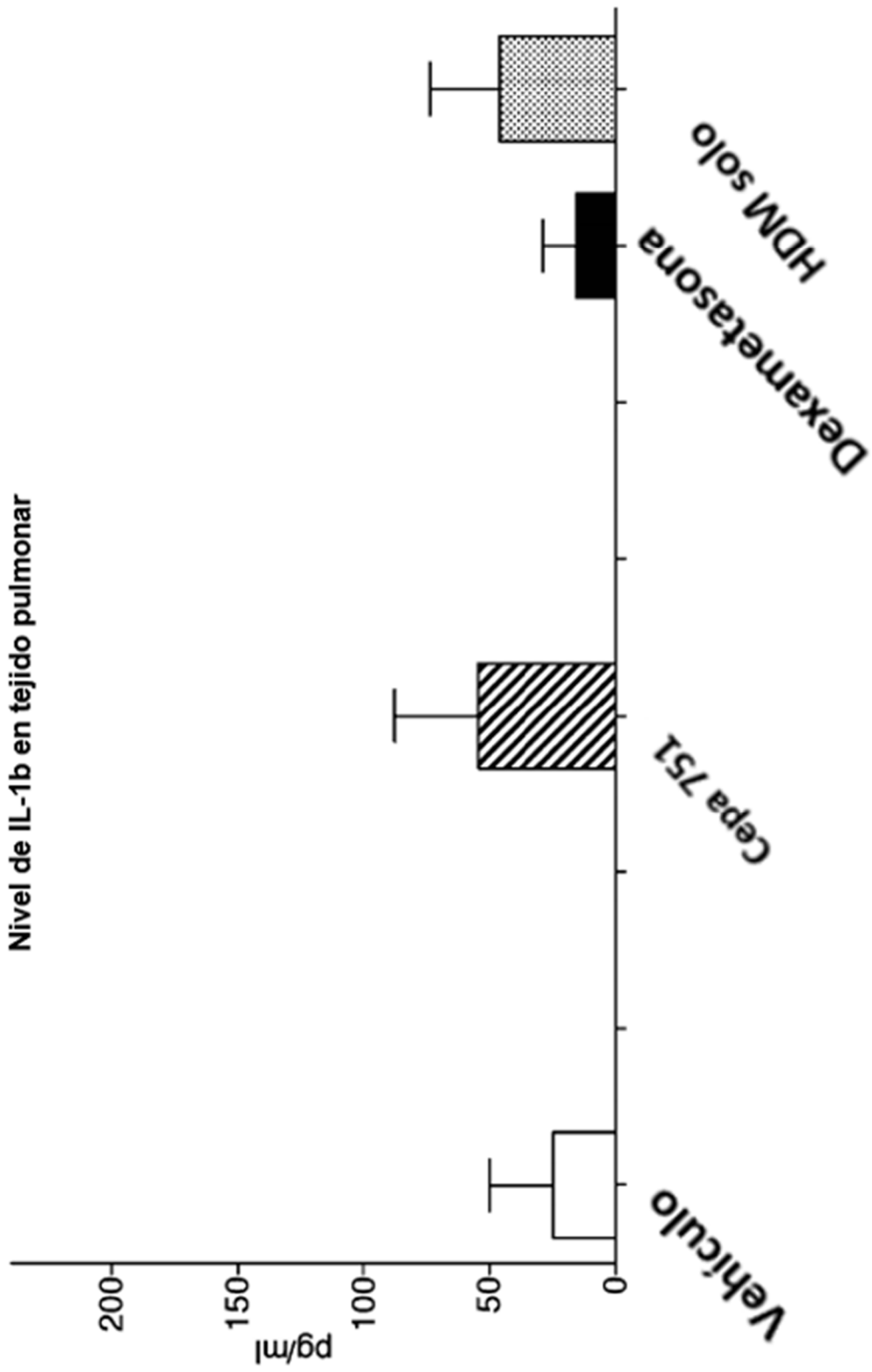


FIG. 43
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

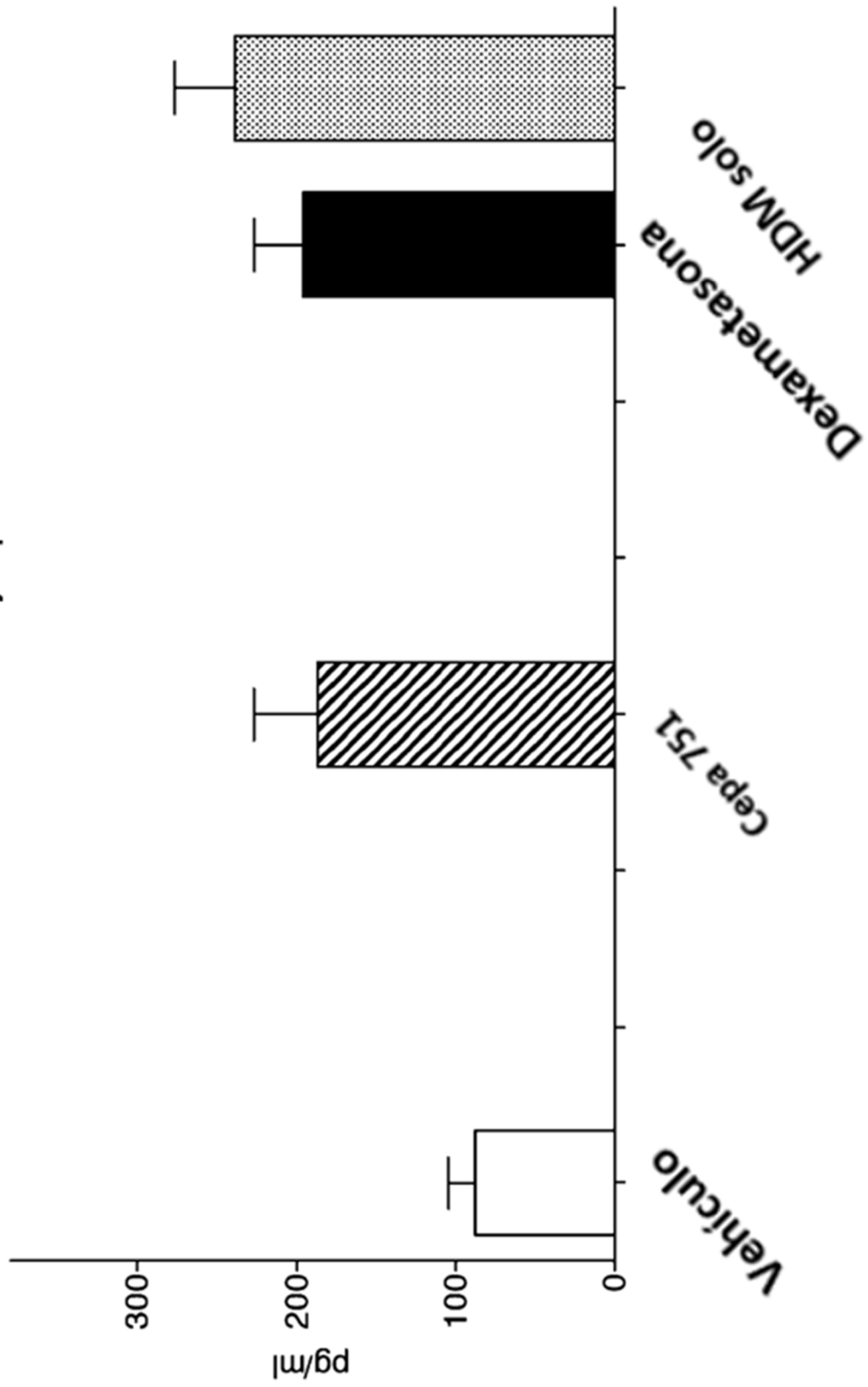


FIG. 44
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

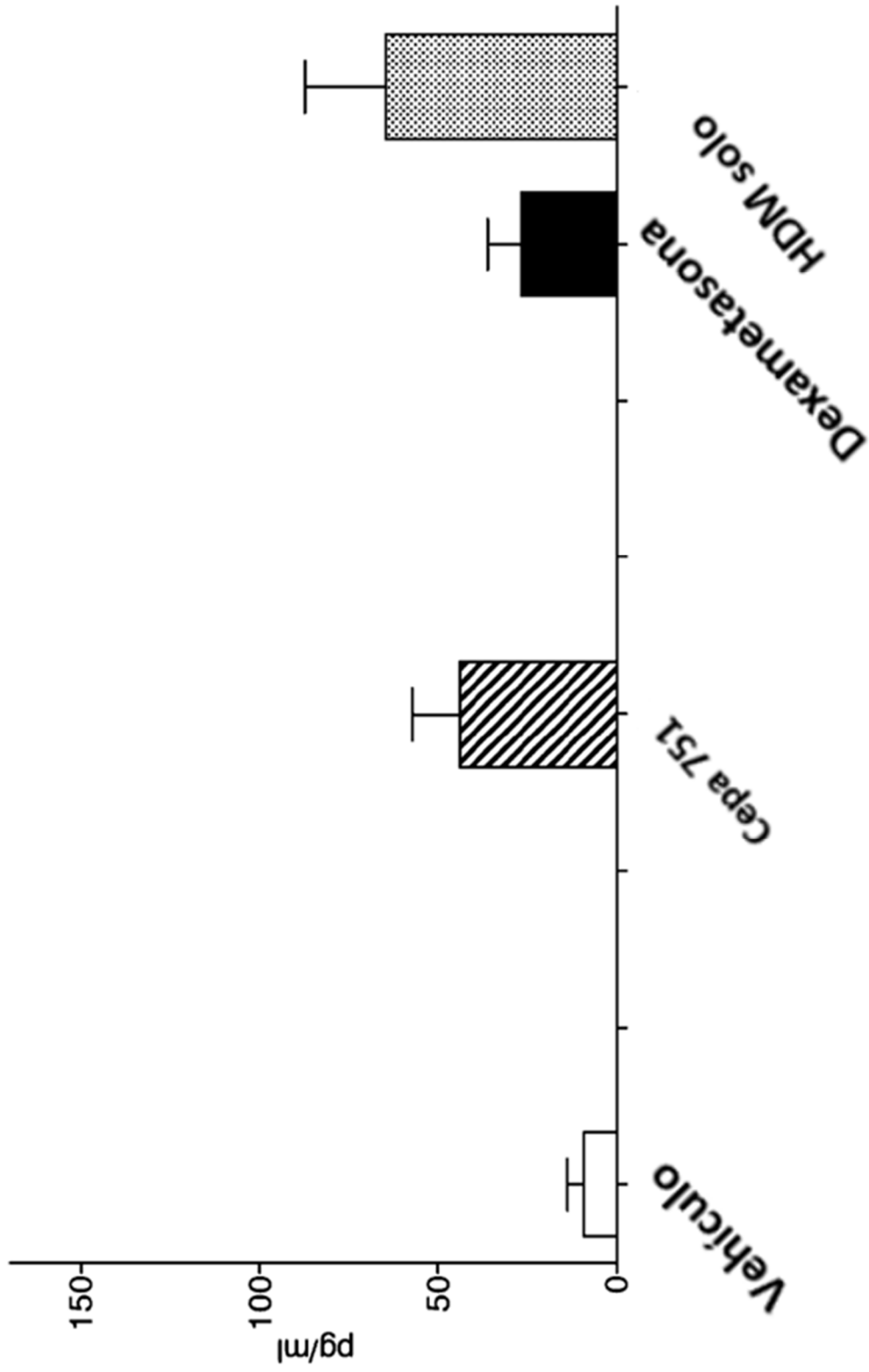


FIG. 45
Nivel de KC en tejido pulmonar

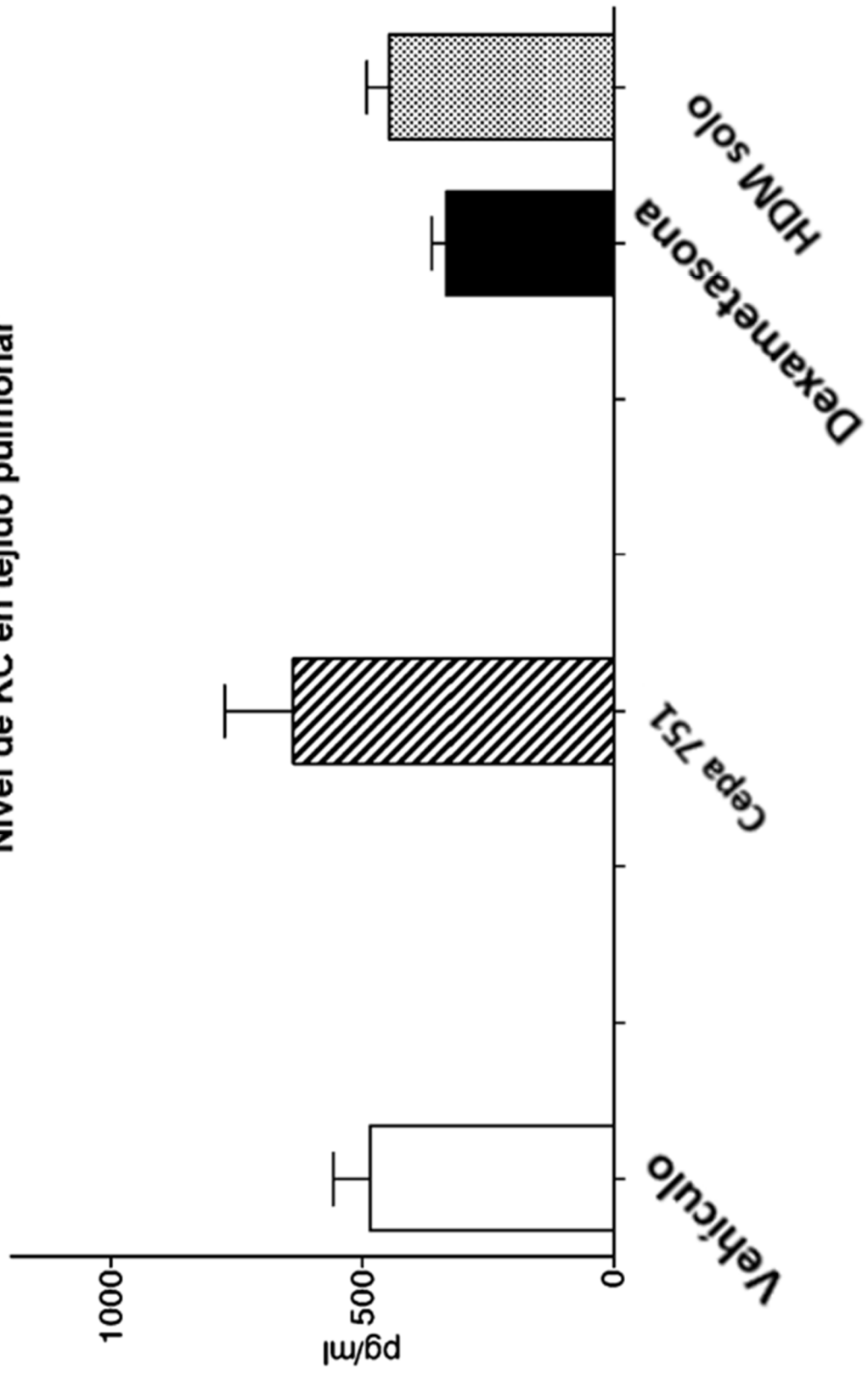
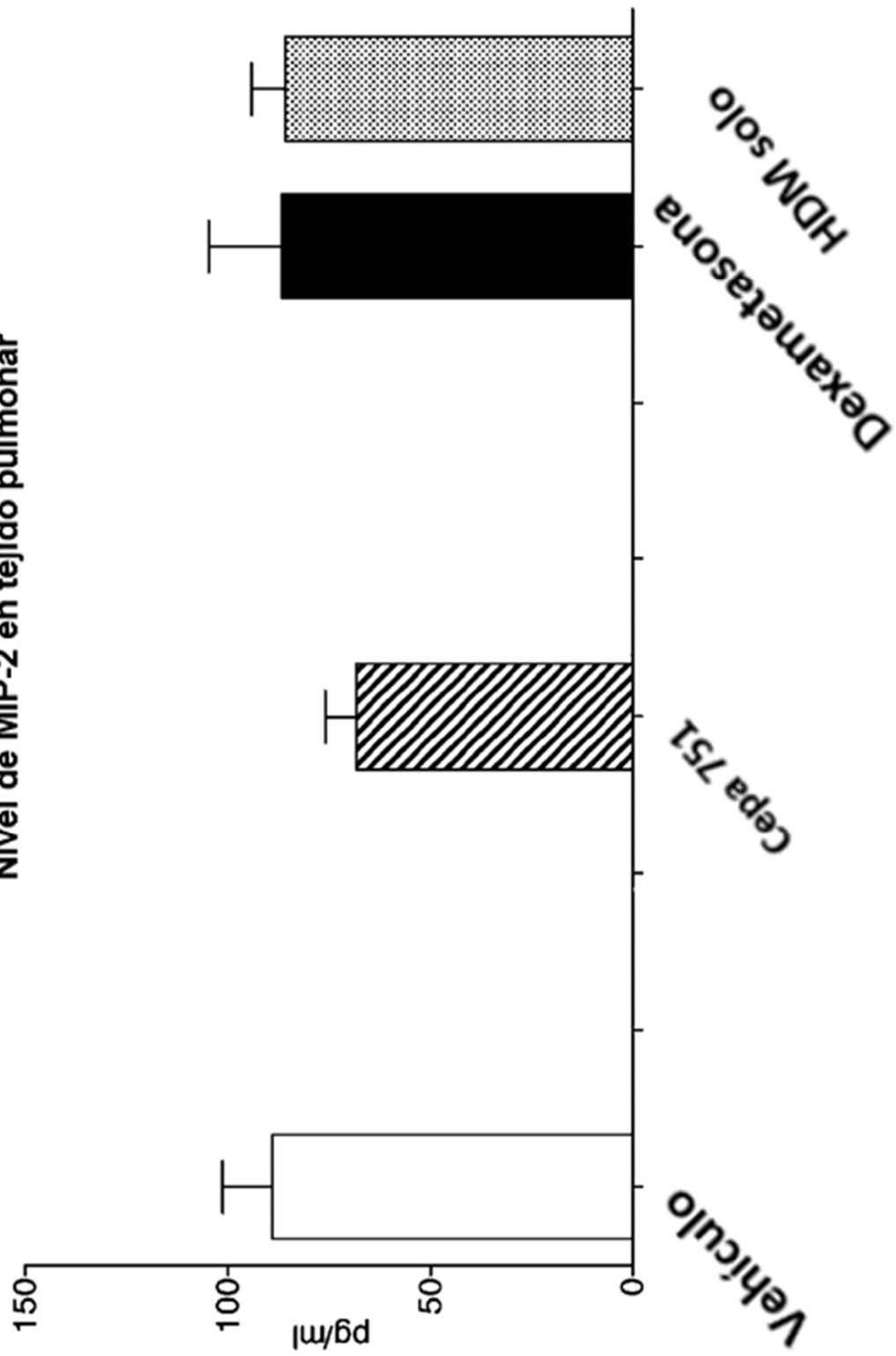


FIG. 46
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar



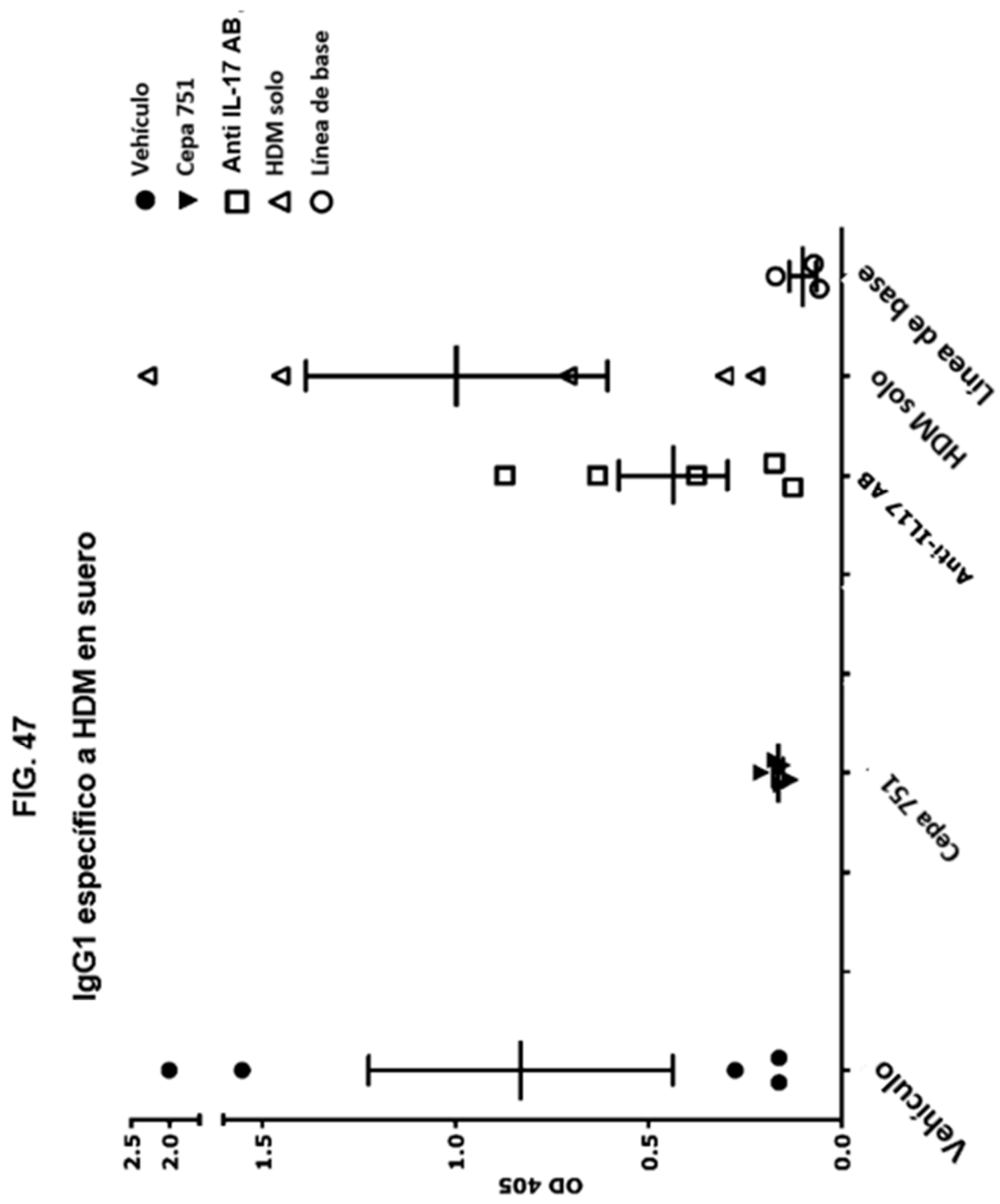


FIG. 48 IgG2a específico a HDM en suero

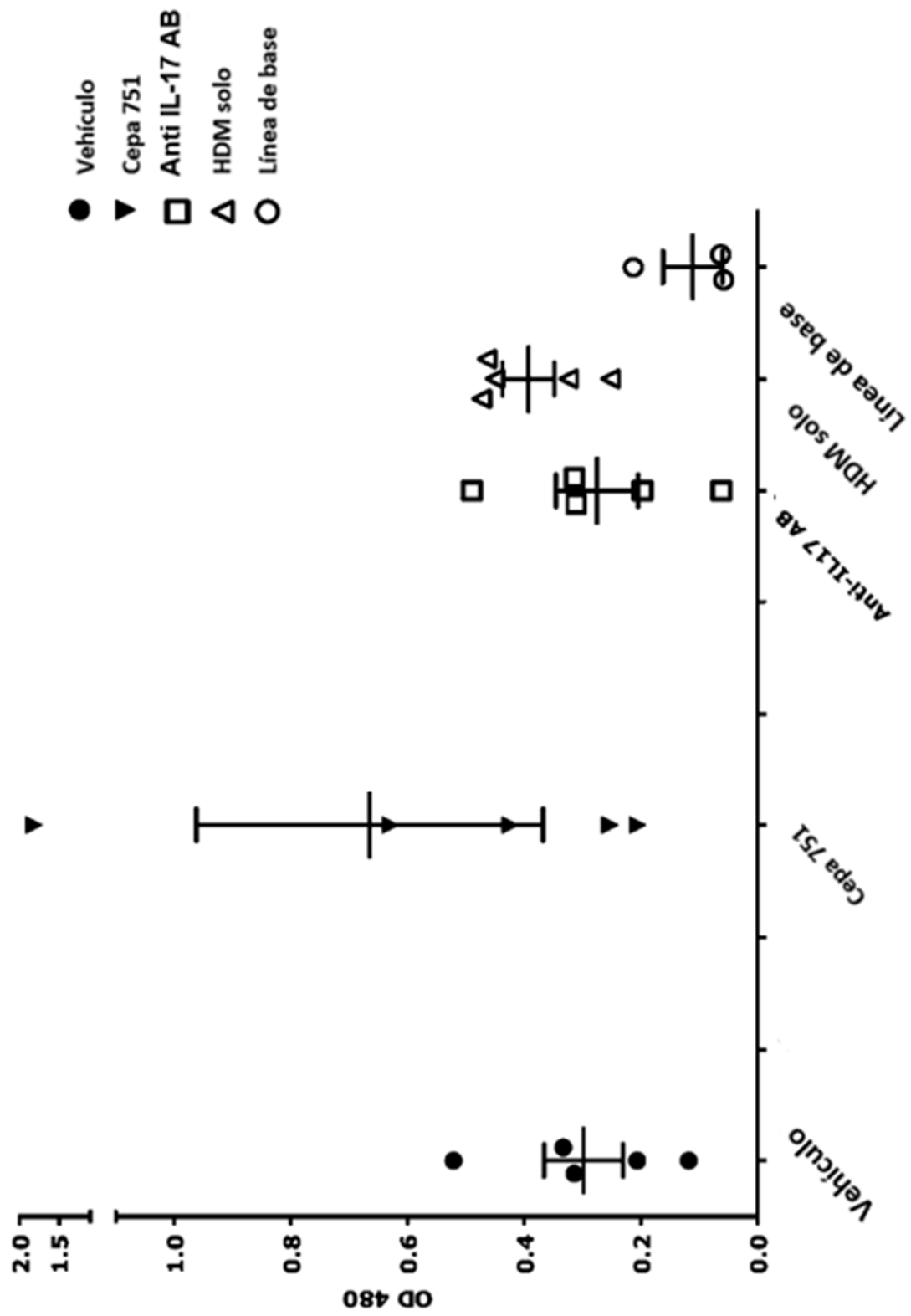
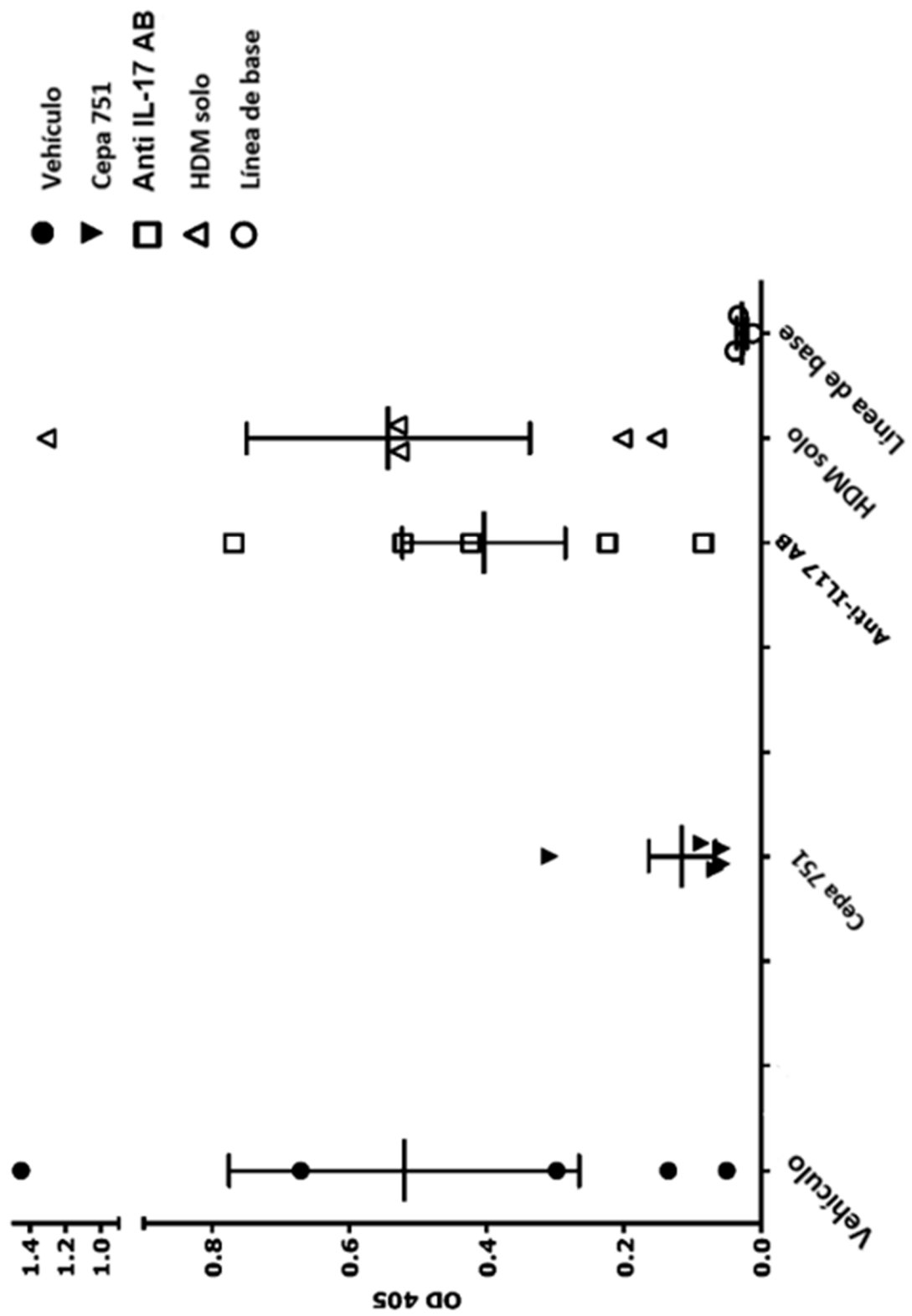


FIG. 49 IgG1 específico a HDM en BALF



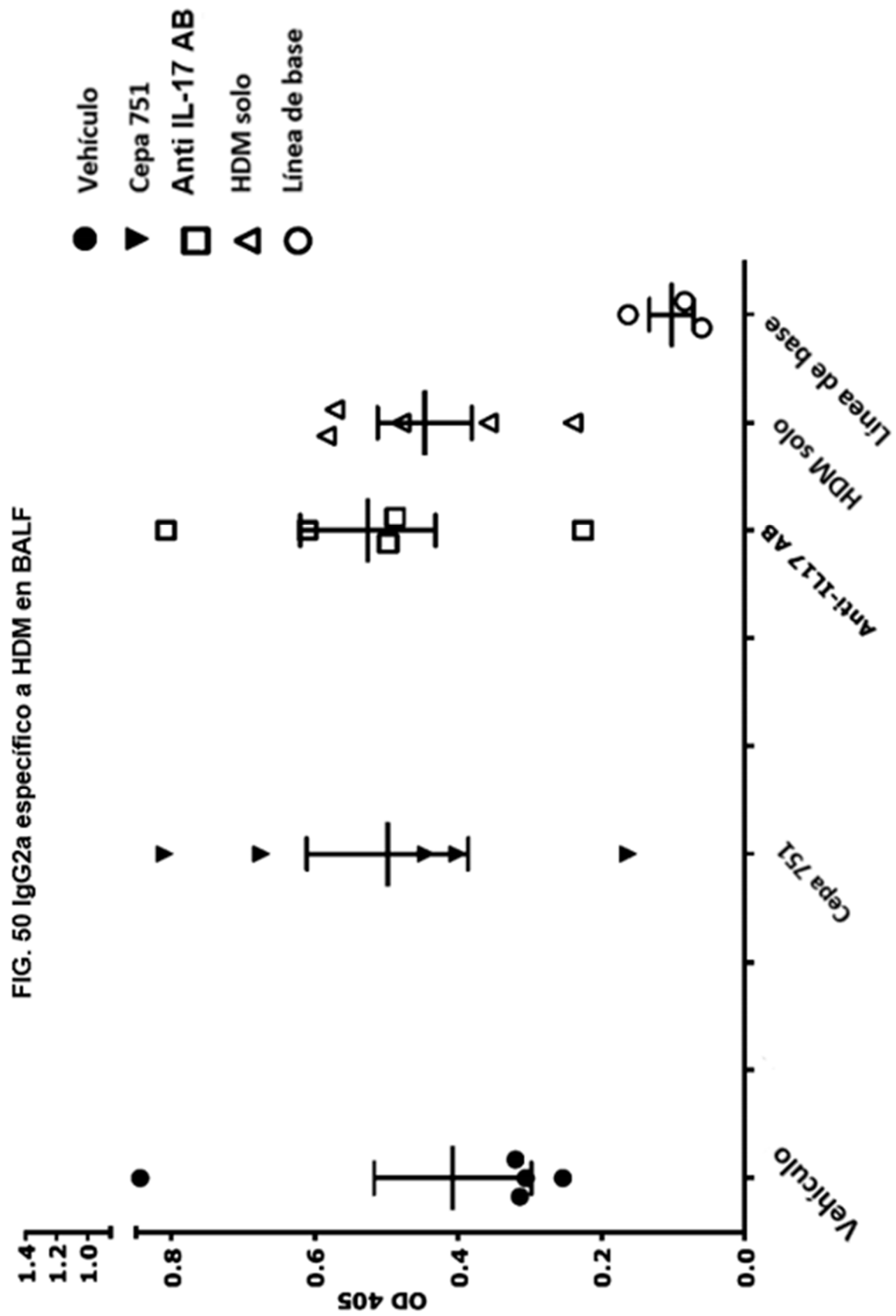


FIG. 51 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar

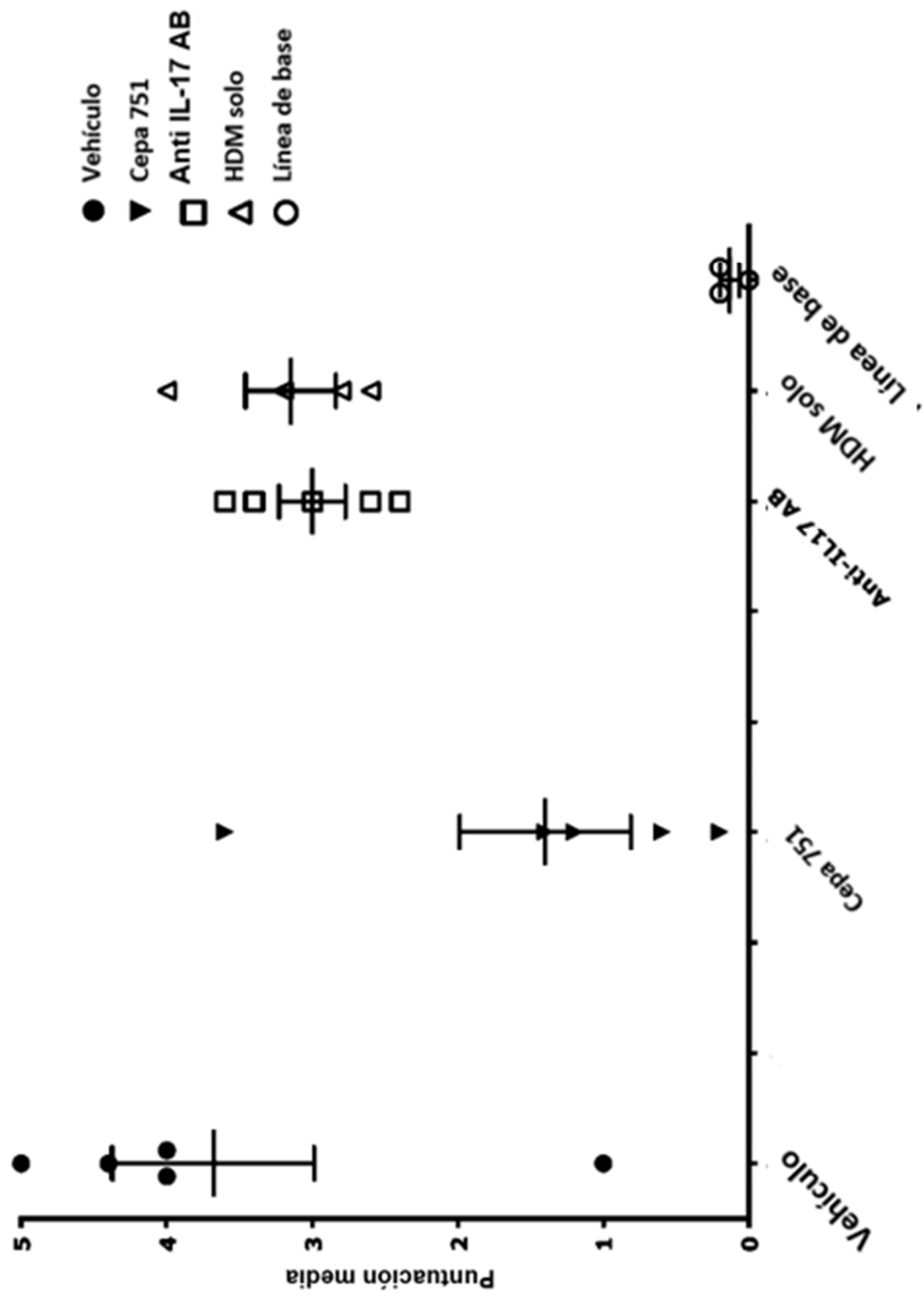


FIG. 52 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración perivascular

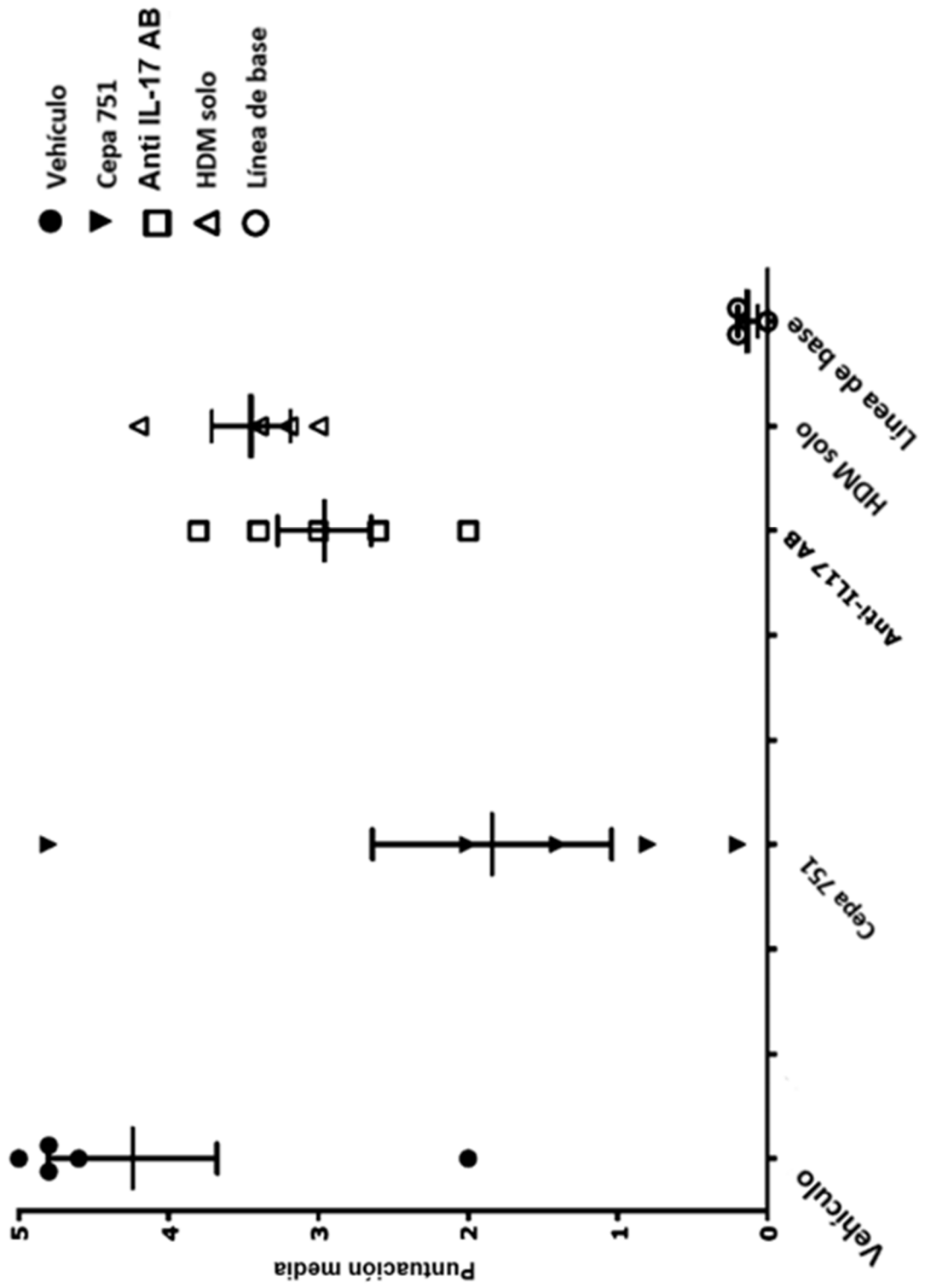


FIG. 53 Análisis histológico – Puntuación media inflamatoria (media de

Puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular

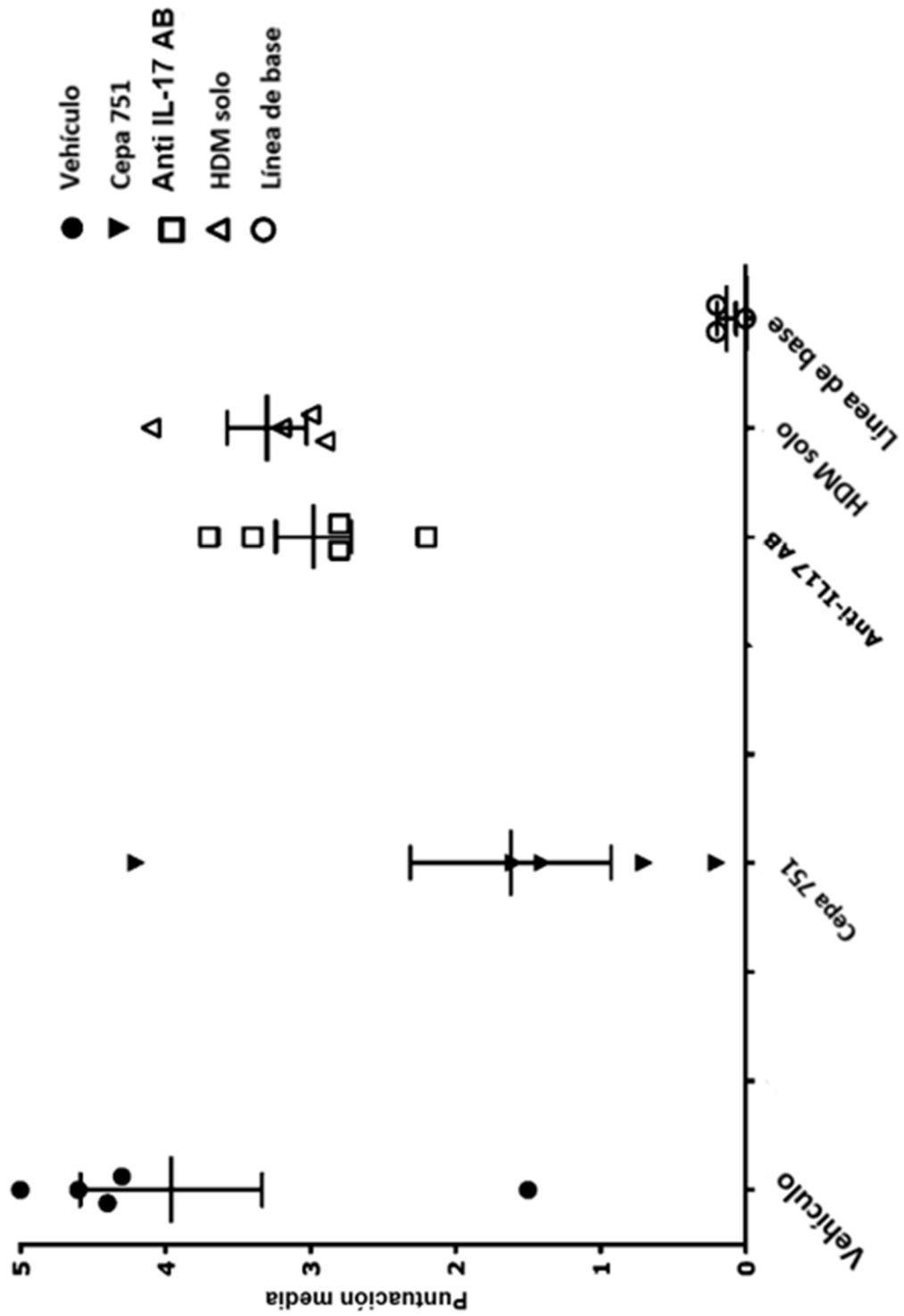


FIG. 54
Nivel de TNFa en tejido pulmonar

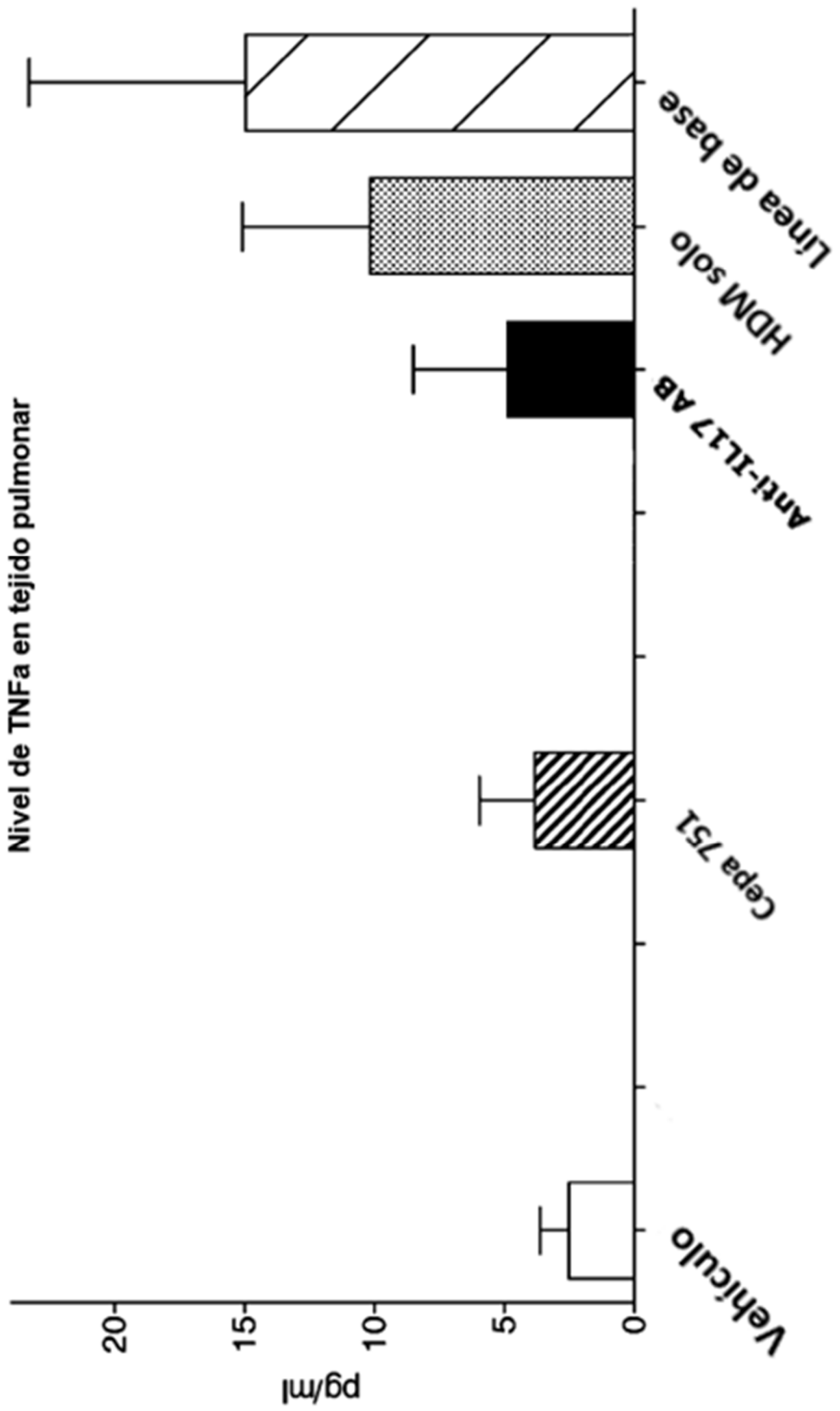


FIG. 55
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

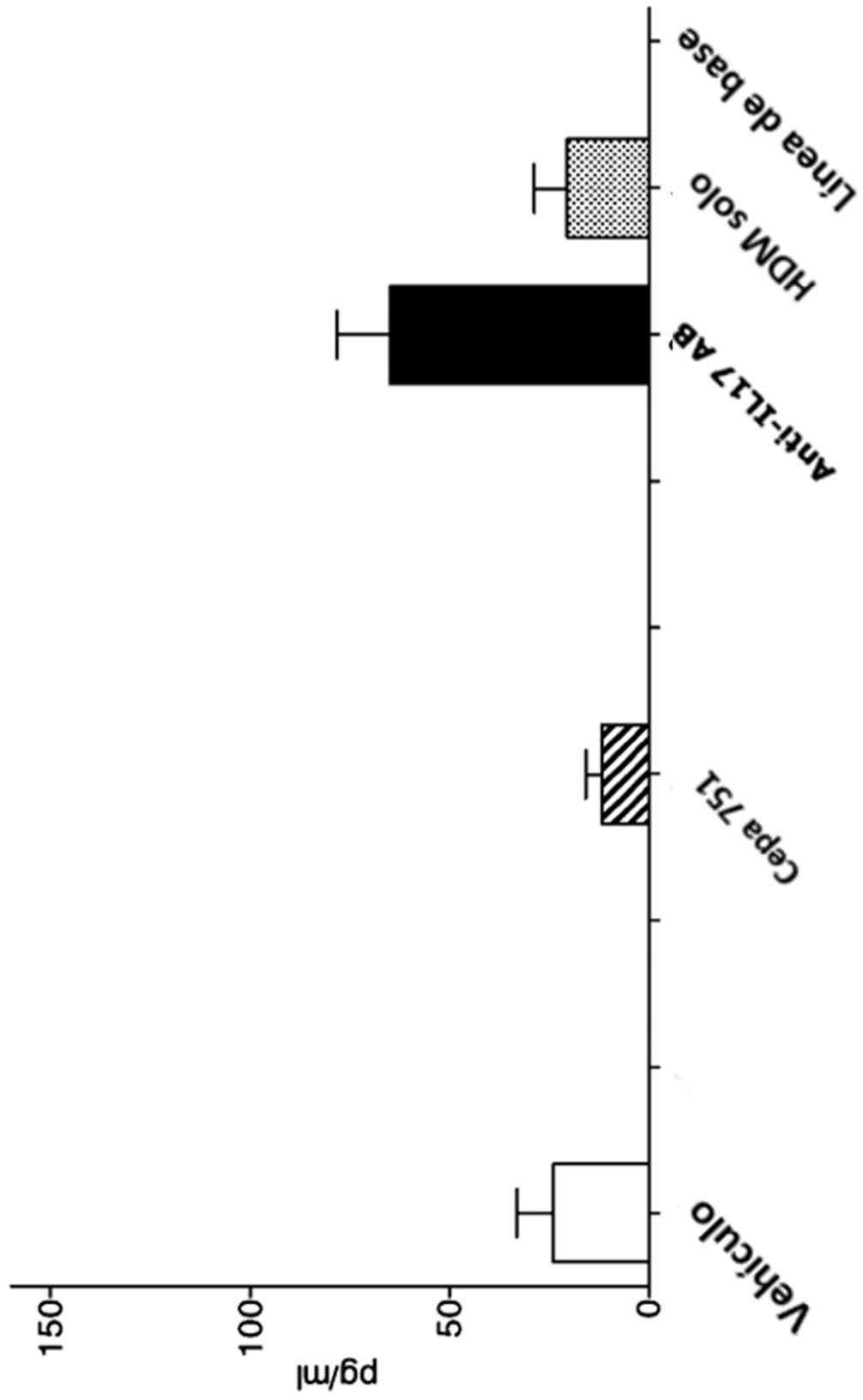


FIG. 56

Nivel de IFNg en tejido pulmonar

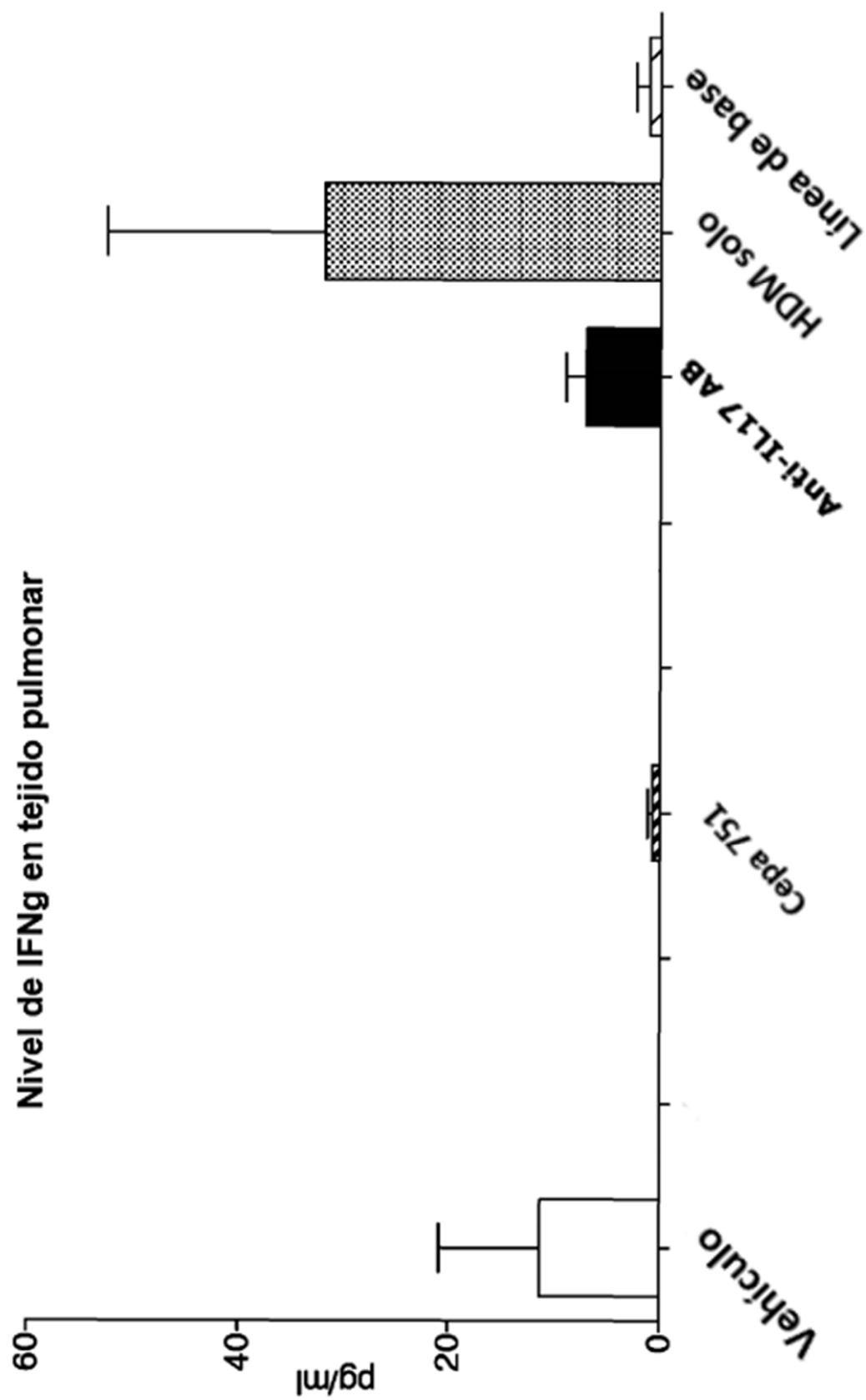


FIG. 57
Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

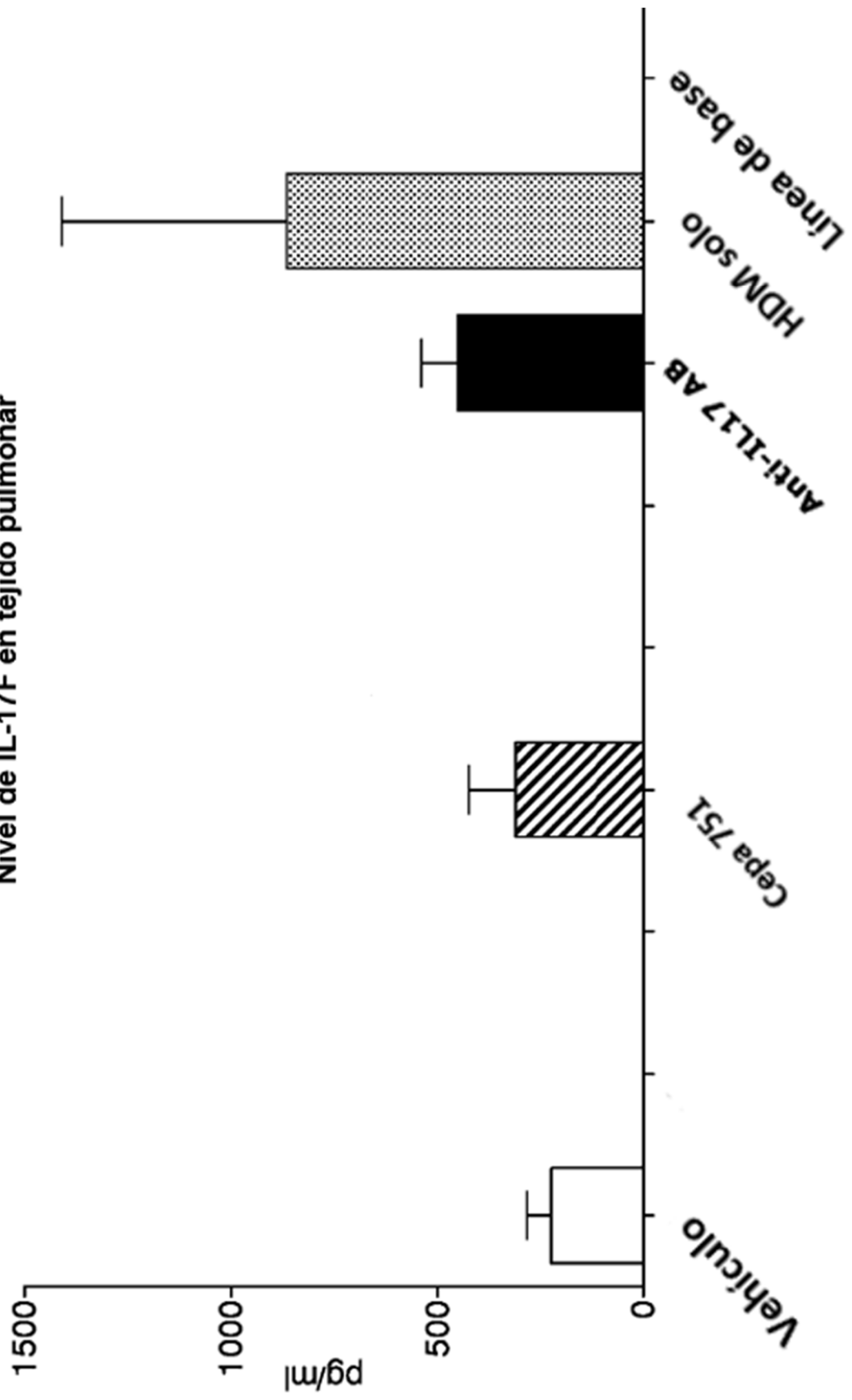


FIG. 58
Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

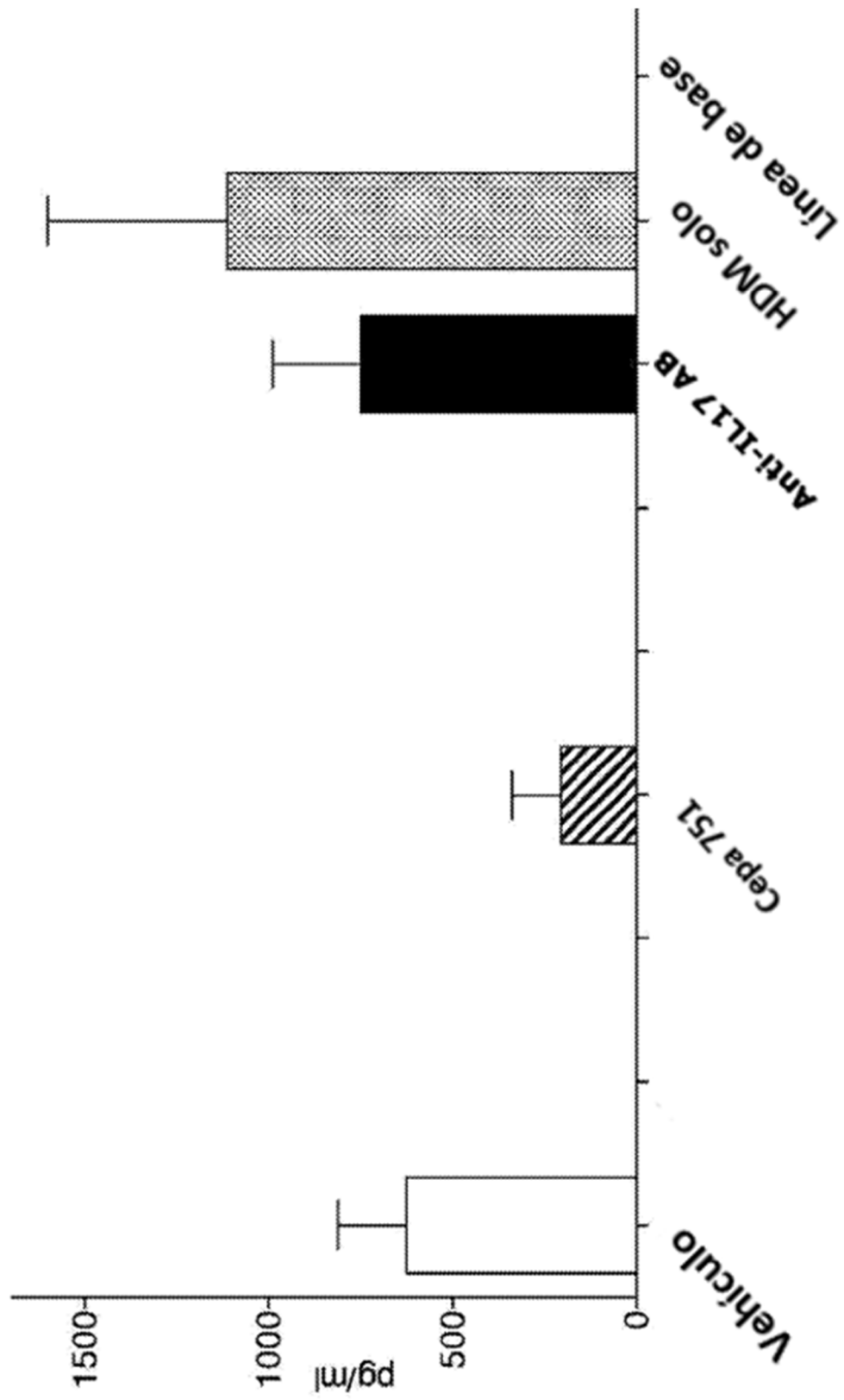


FIG. 59
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

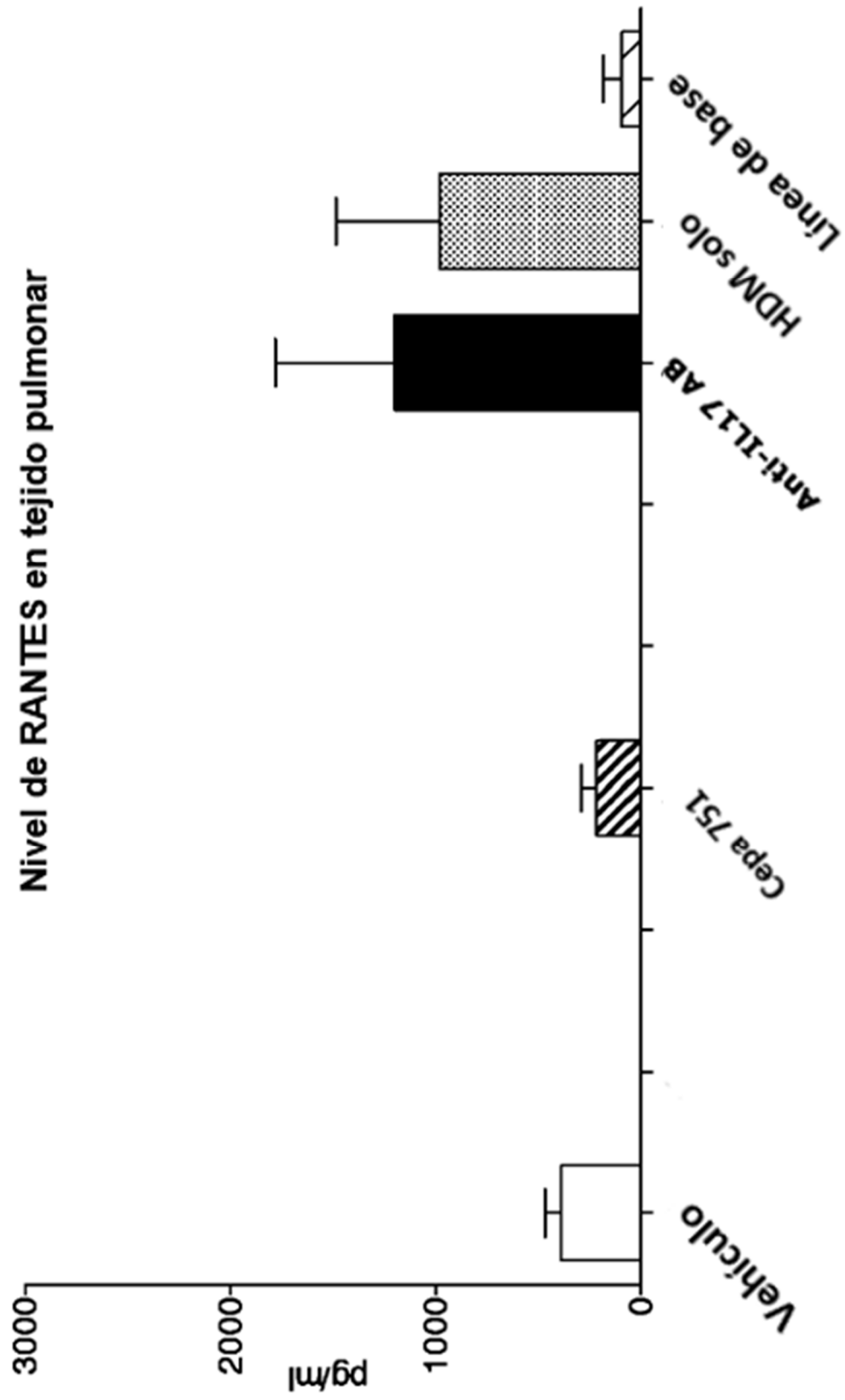


FIG. 60
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

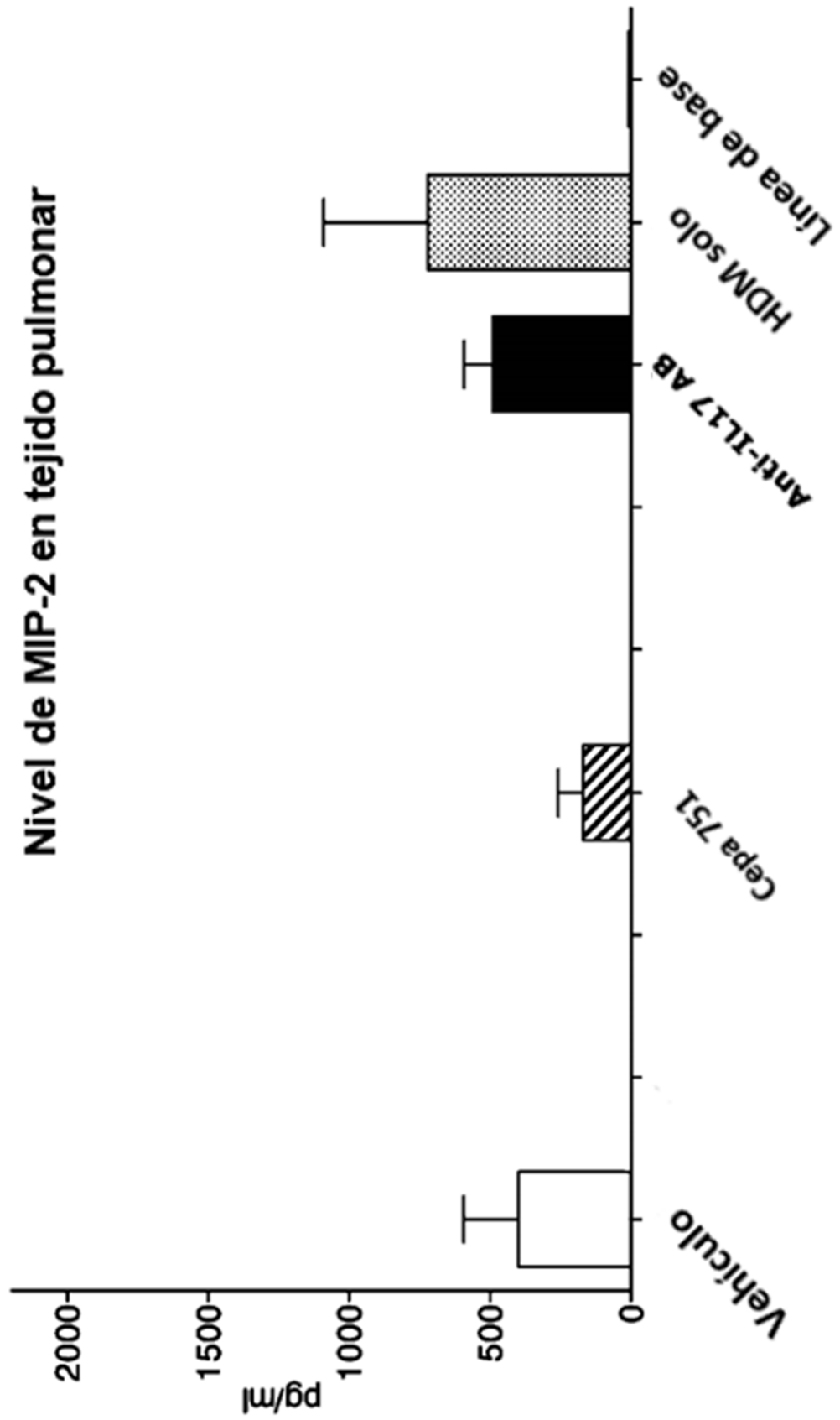


FIG. 61

Nivel de KC en tejido pulmonar

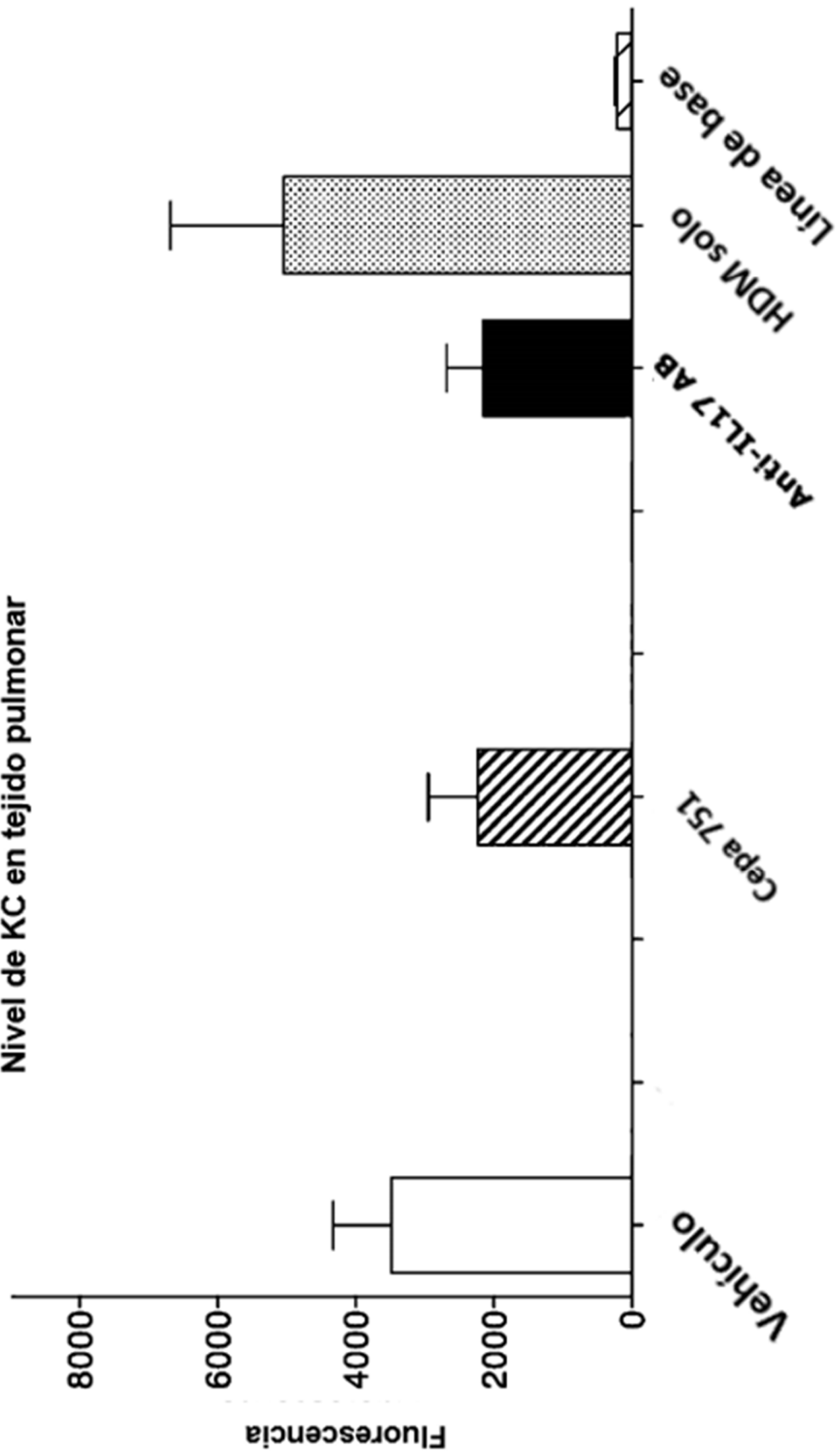


FIG. 62
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

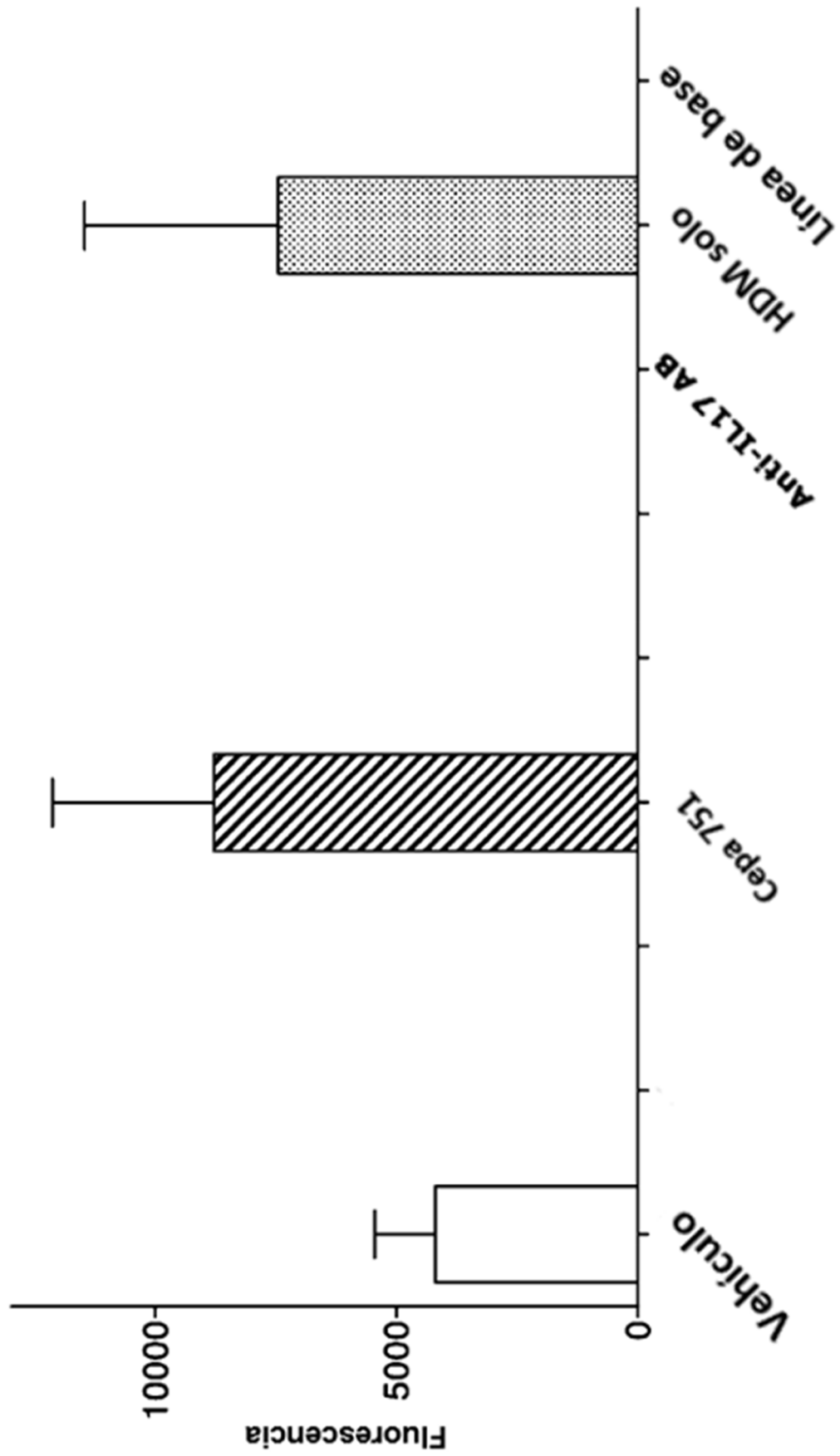


FIG. 63
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

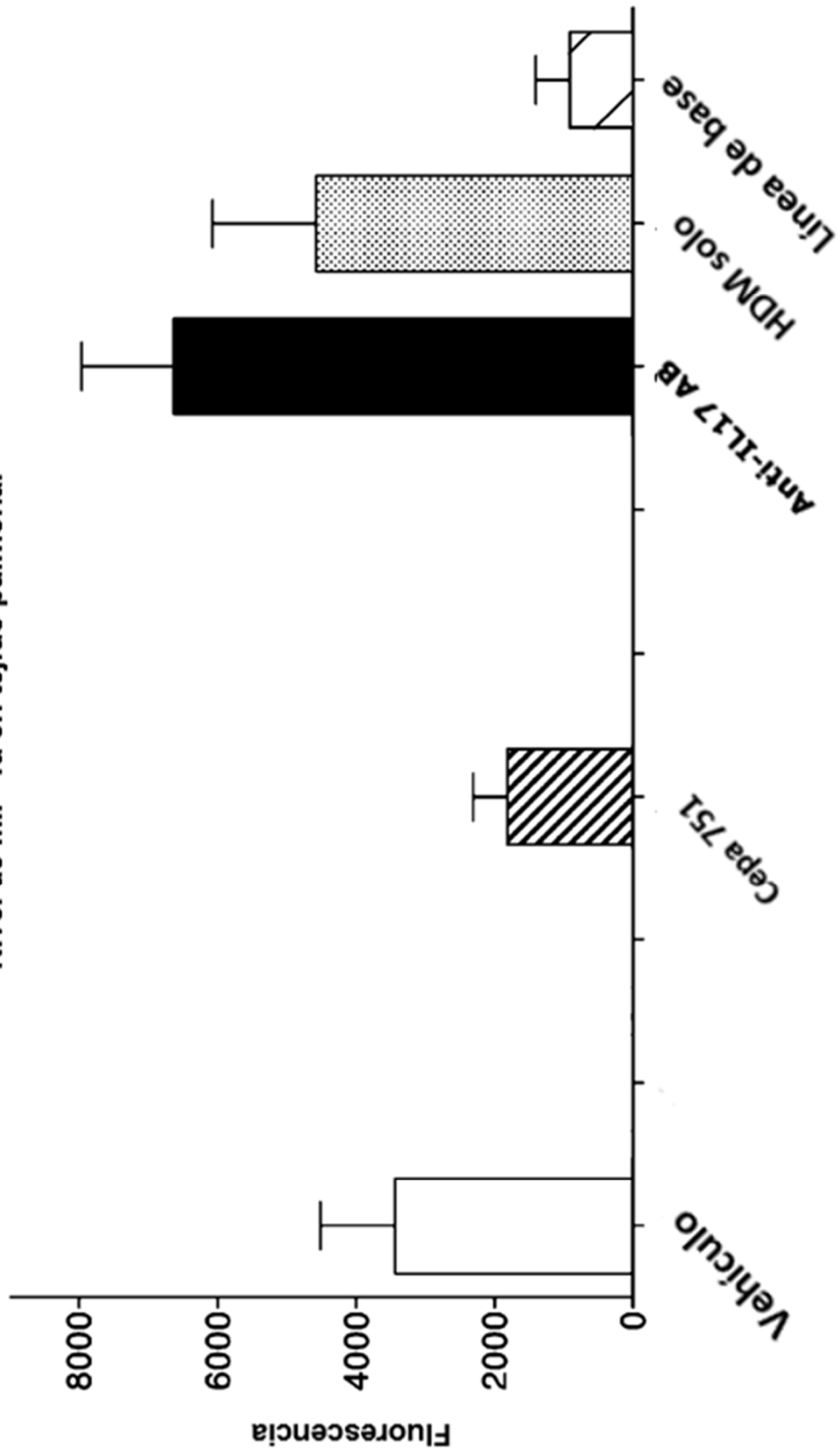


FIG. 64
Nivel de IL-33 en tejido pulmonar

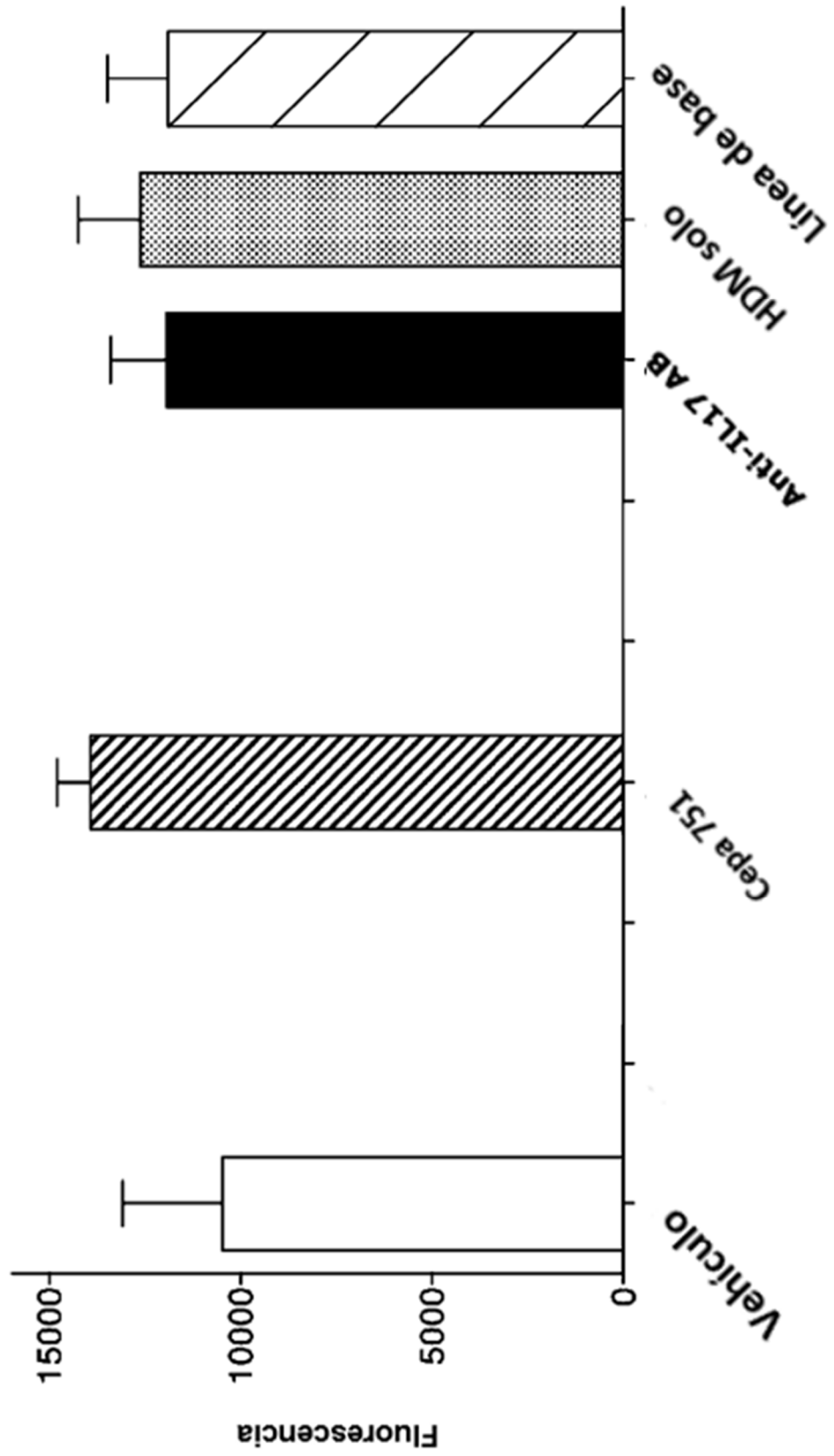
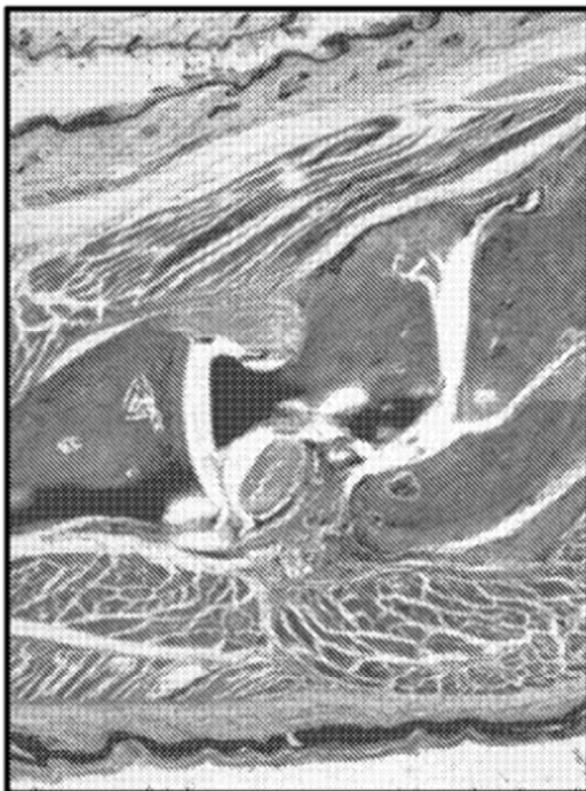


FIG. 65
Plantilla visual para la puntuación de histopatología

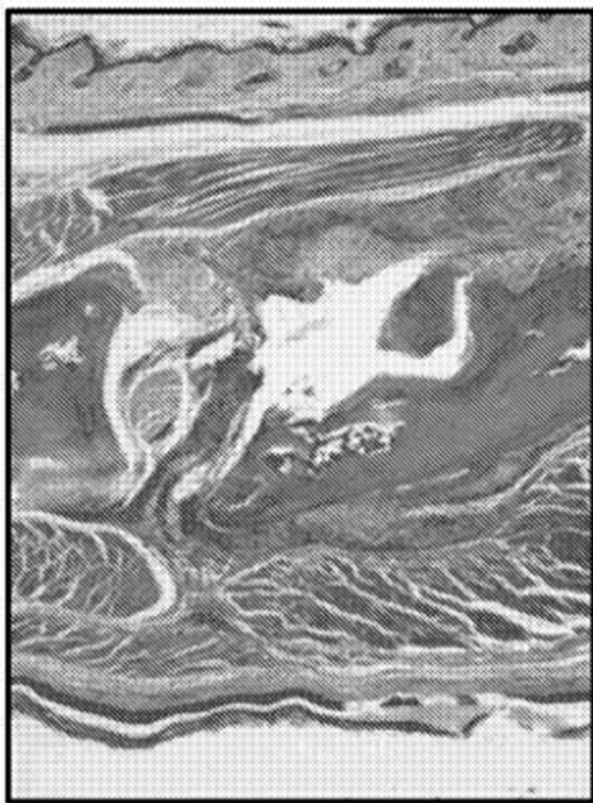


Grado 0



Grado 1

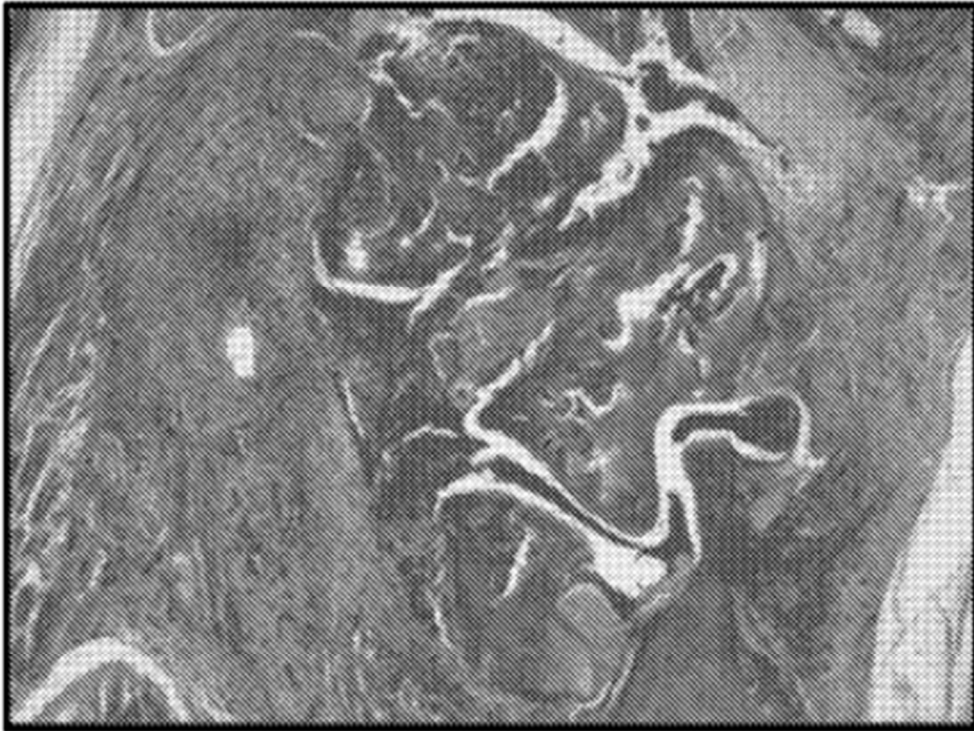
FIG. 65(contd.)



Grado 4



Grado 7



Grado 9

FIG. 65(contd.)

FIG. 66

Histopatología: puntuaciones de inflamación

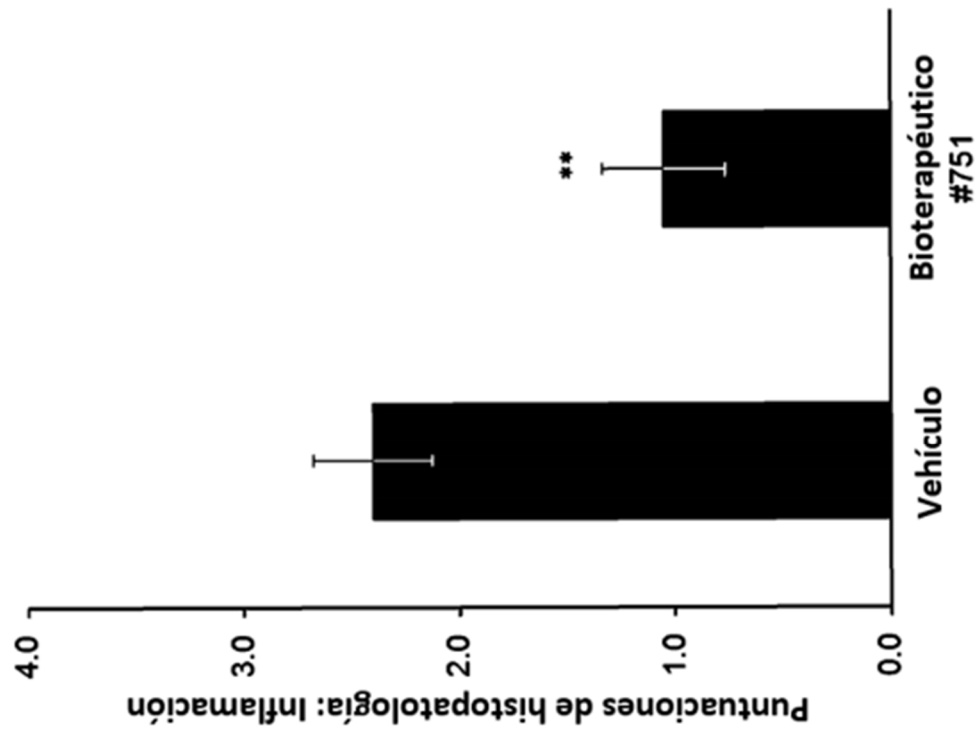


FIG. 67

Histopatología: puntuaciones de cartílago

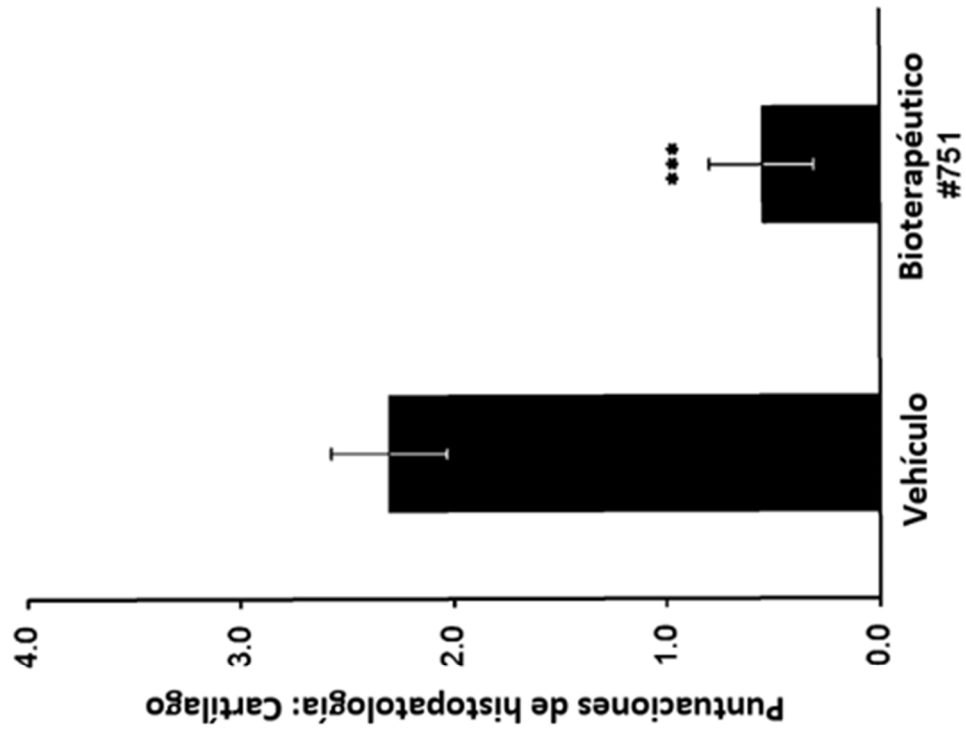


FIG. 68

Histopatología: Puntuaciones de hueso

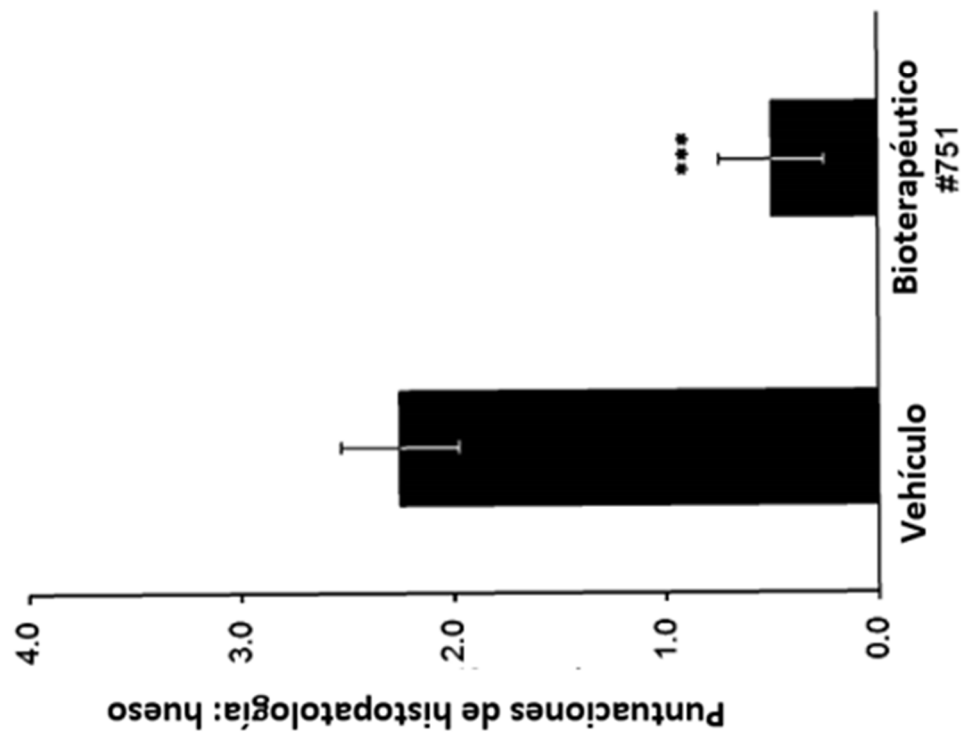


FIG. 69

Histopatología: Puntuaciones totales

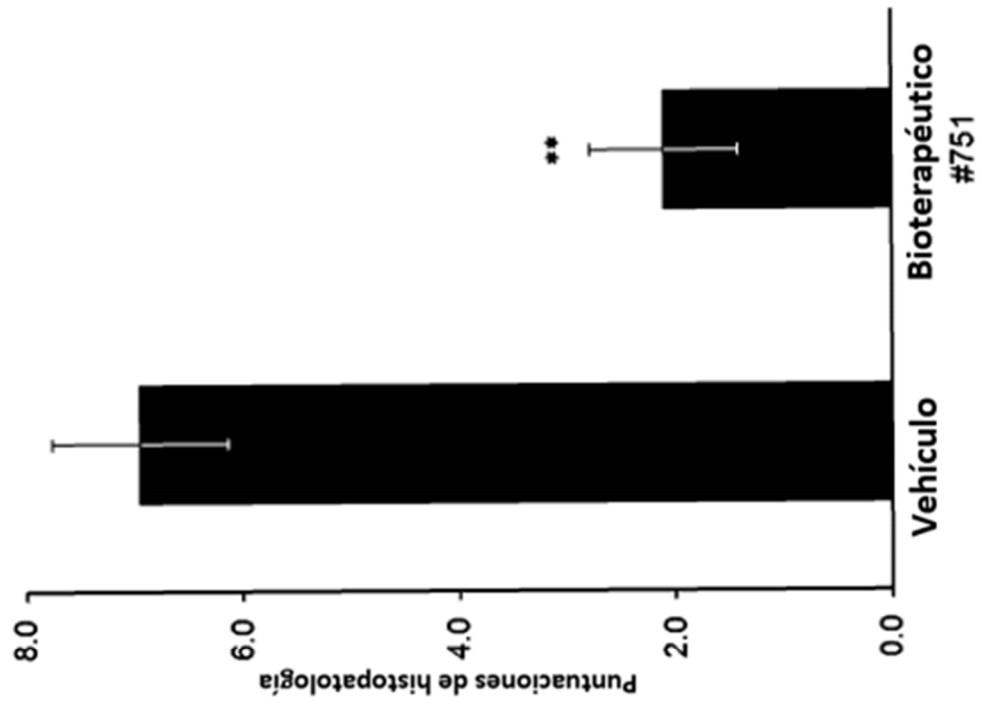
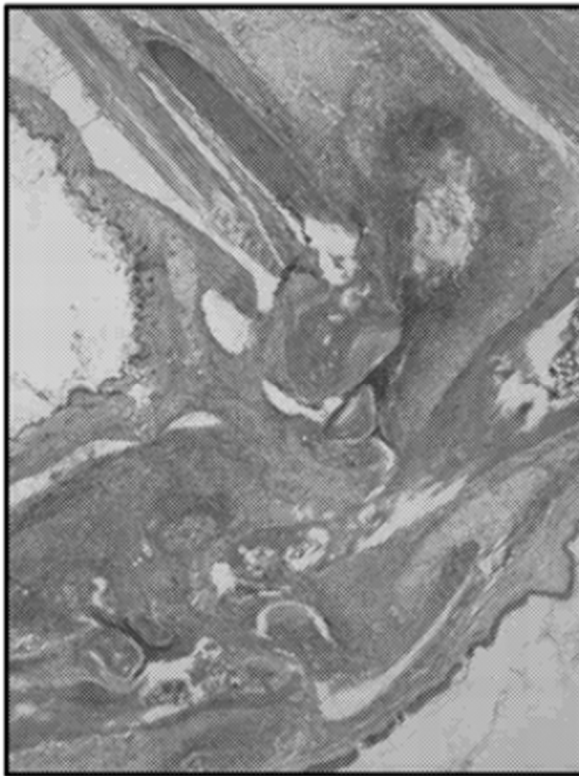
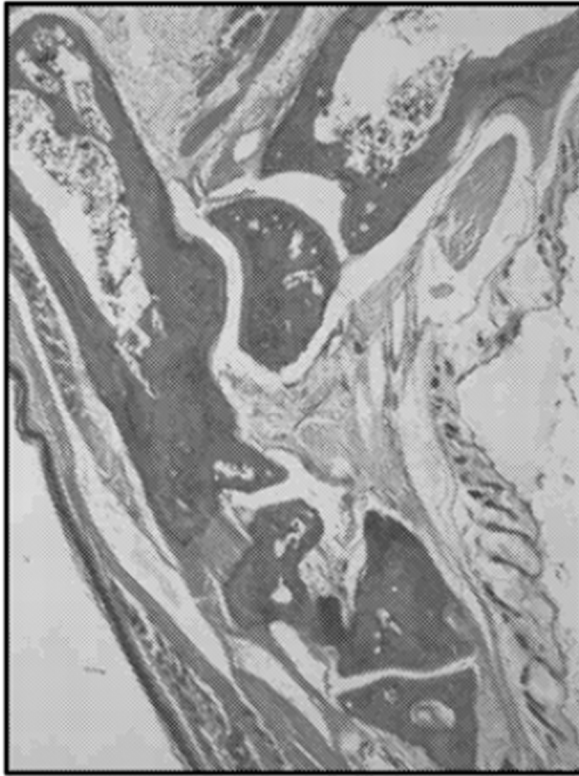


FIG. 70



Vehículo (#1.1 1R, Grado 9)



Cepa #751 (#2.7R, Grado 0)

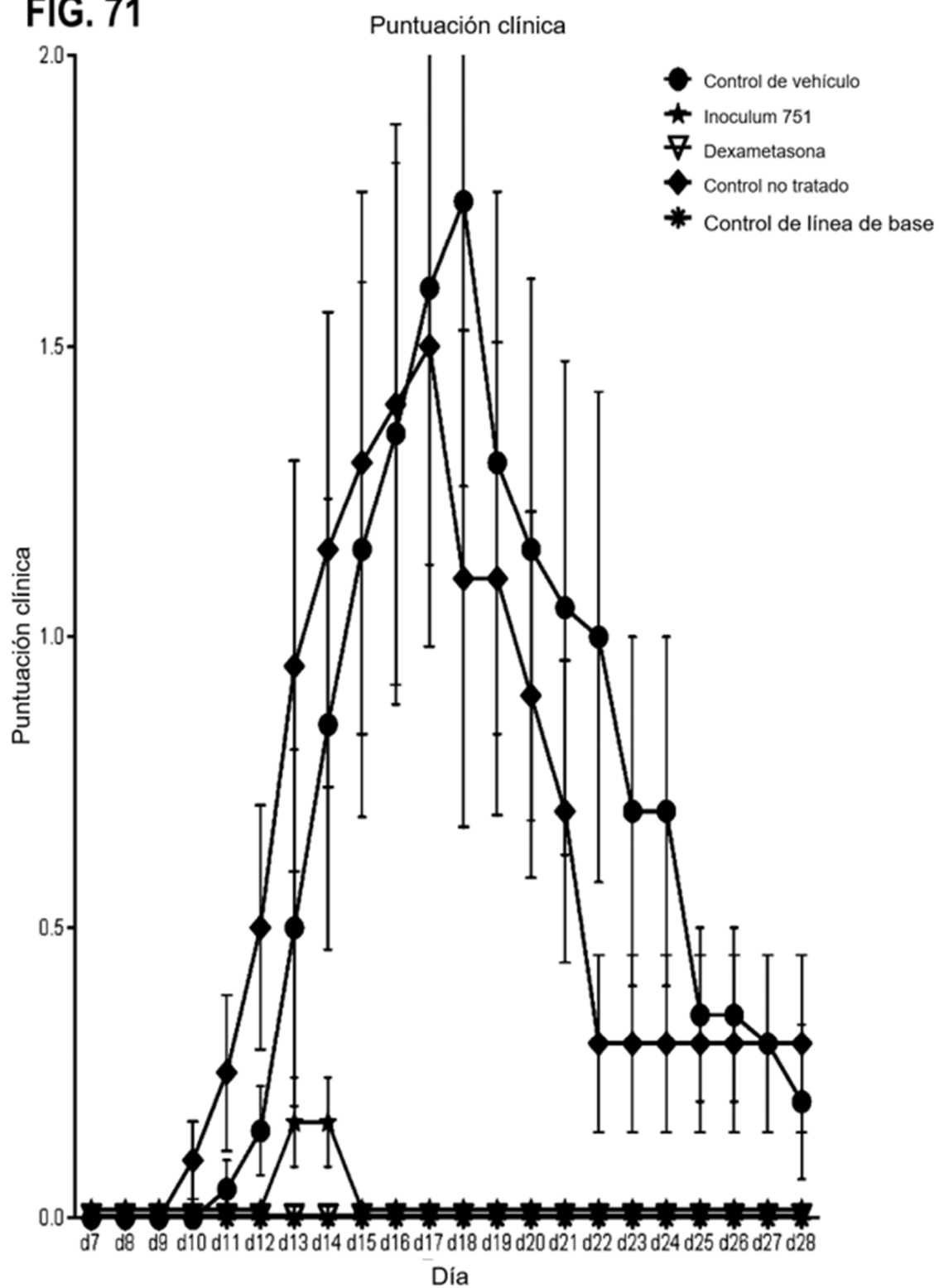
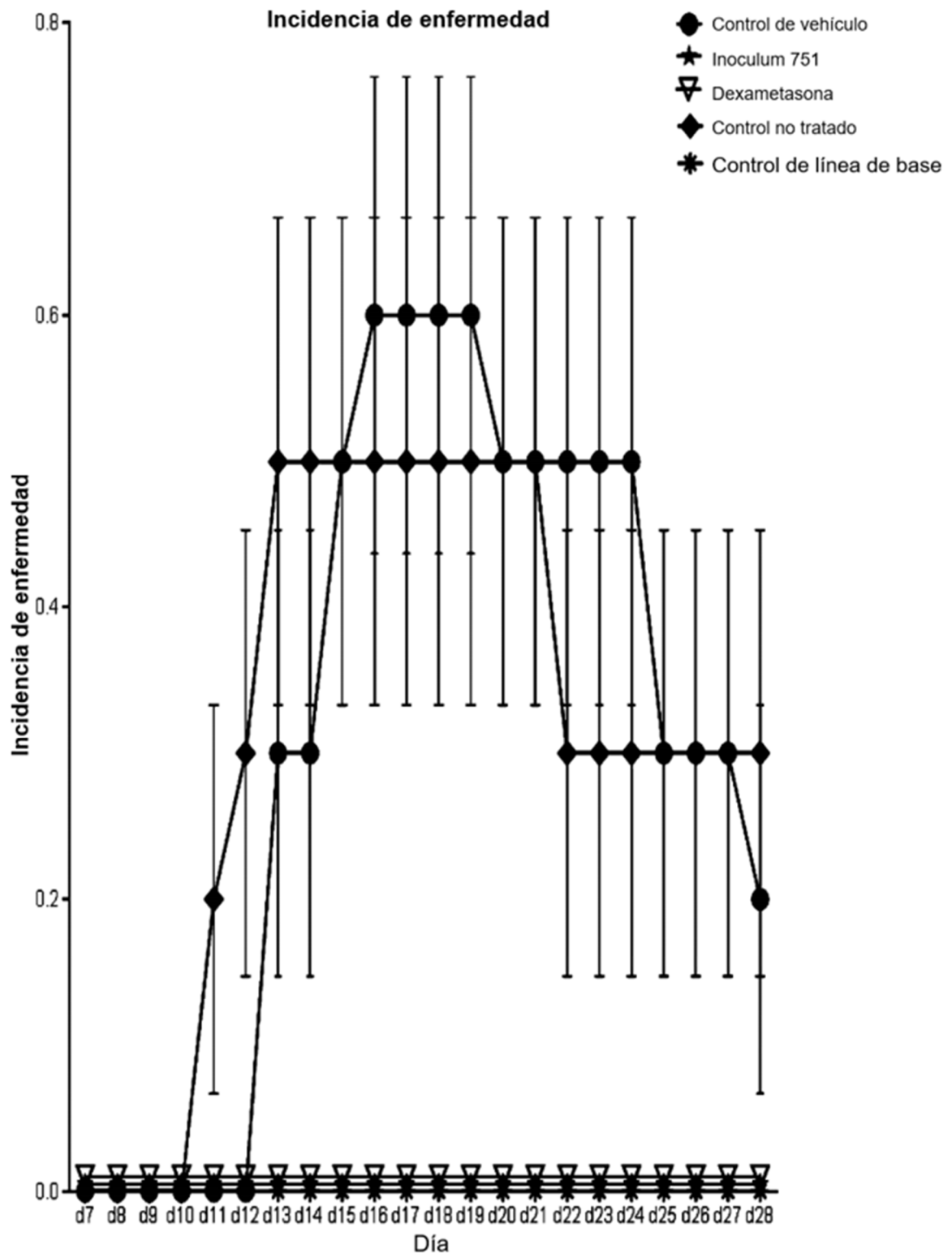
FIG. 71

FIG. 72



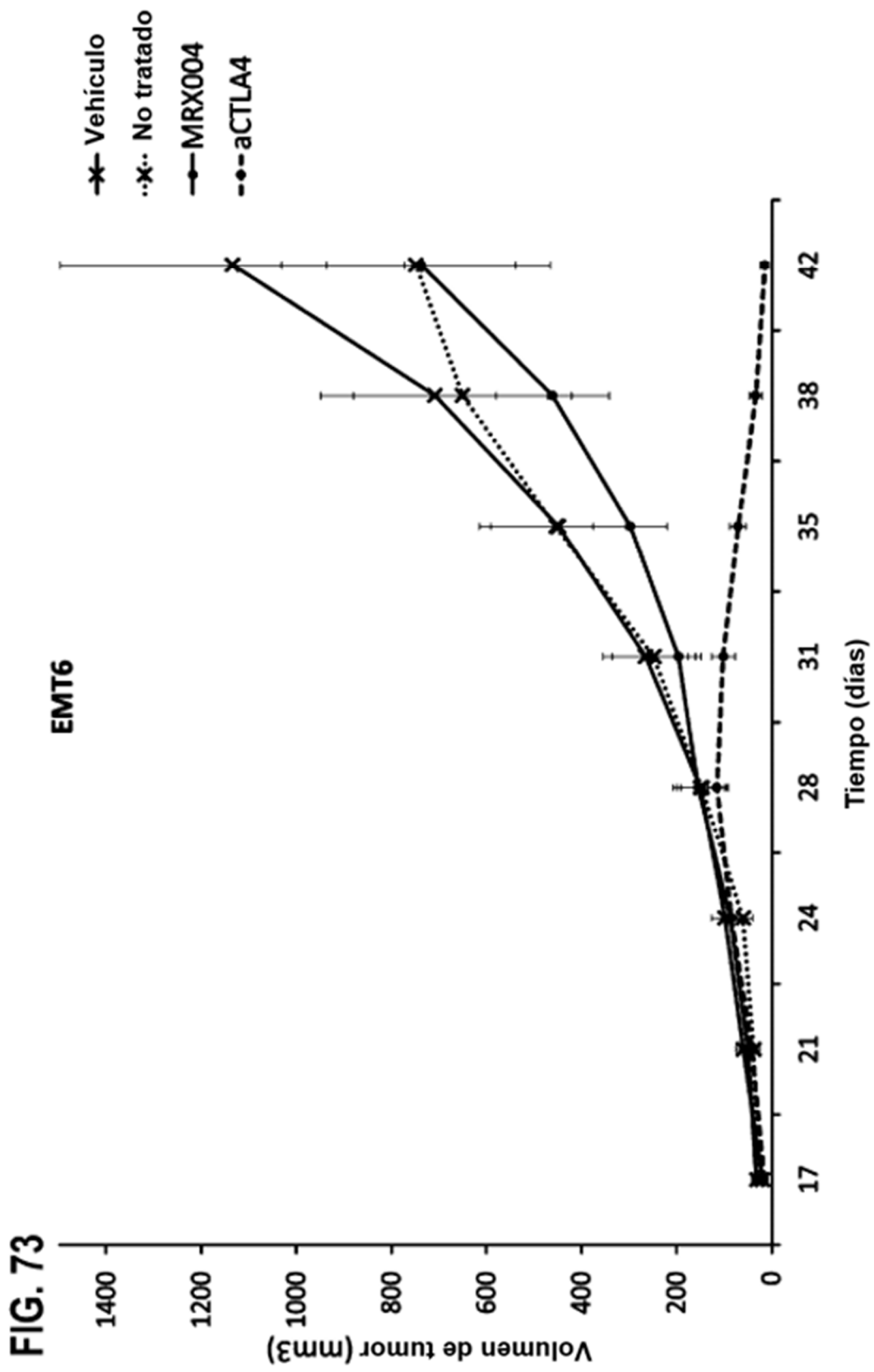


FIG. 74
LLC

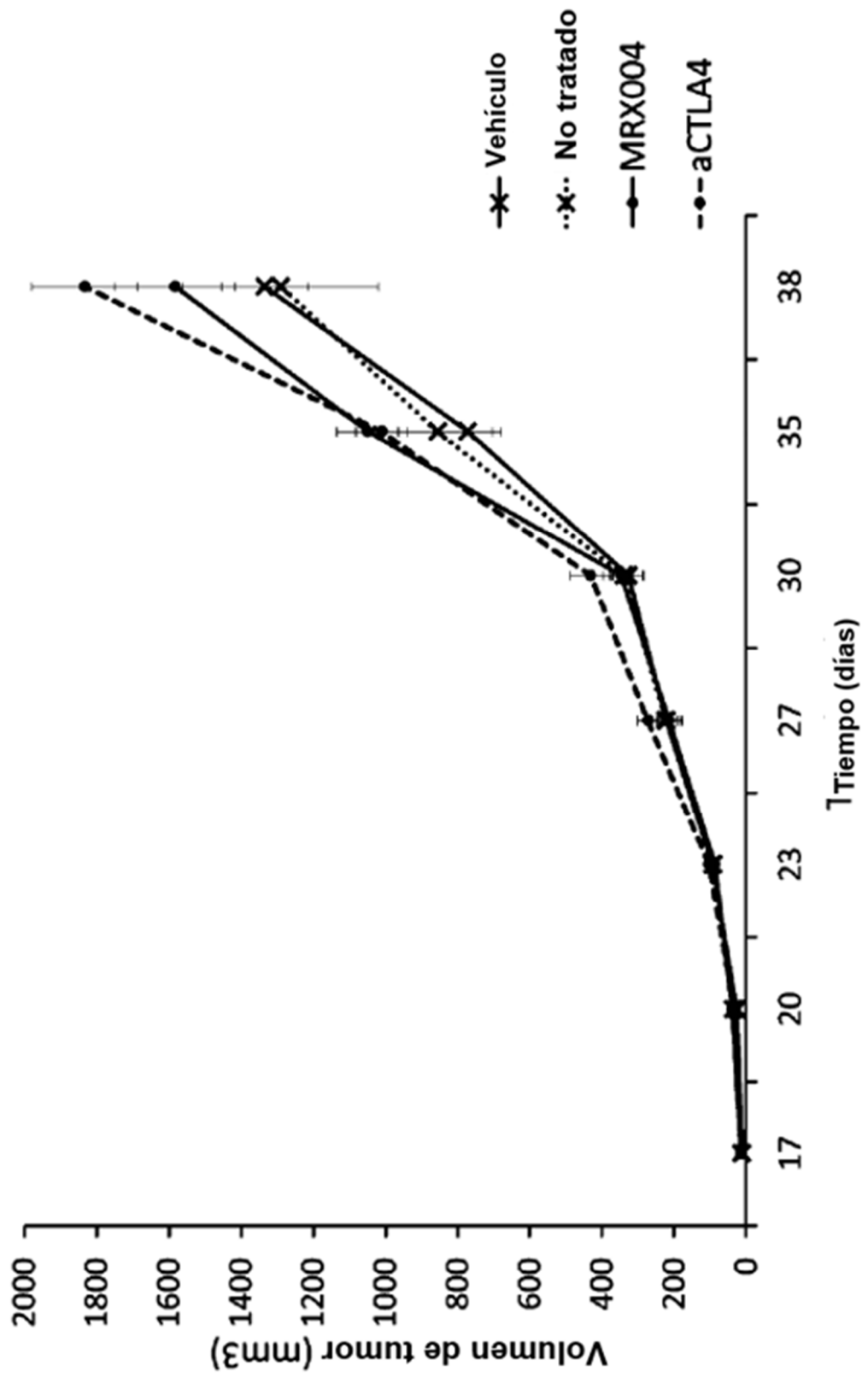
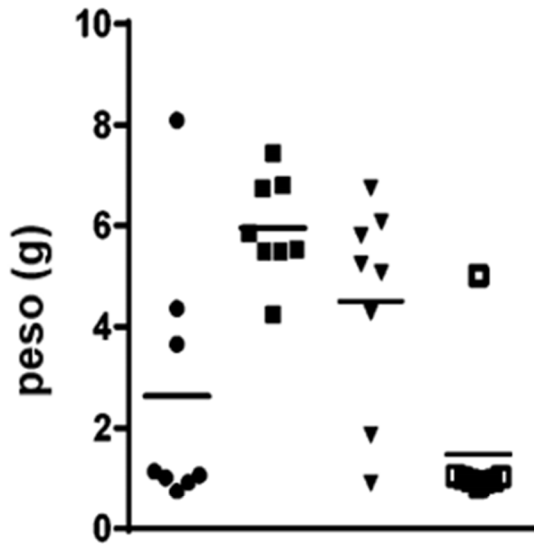


FIG. 75

Pesos de hígado en eutanasia (g)



- G1 No tratado
- G2 Vehículo (medios) PO Q1Dx42
- ▼ G4 Cepa bacteriana n°2 (MRX004) 2x10e8bacteria PO Q1Dx42
- G7 Anti-CTLA4 10 mg/kg IP TWx2

FIG. 76 Adjunto a células humanas
Adjunto en YCFA (2 replicados biológicos, normalizados

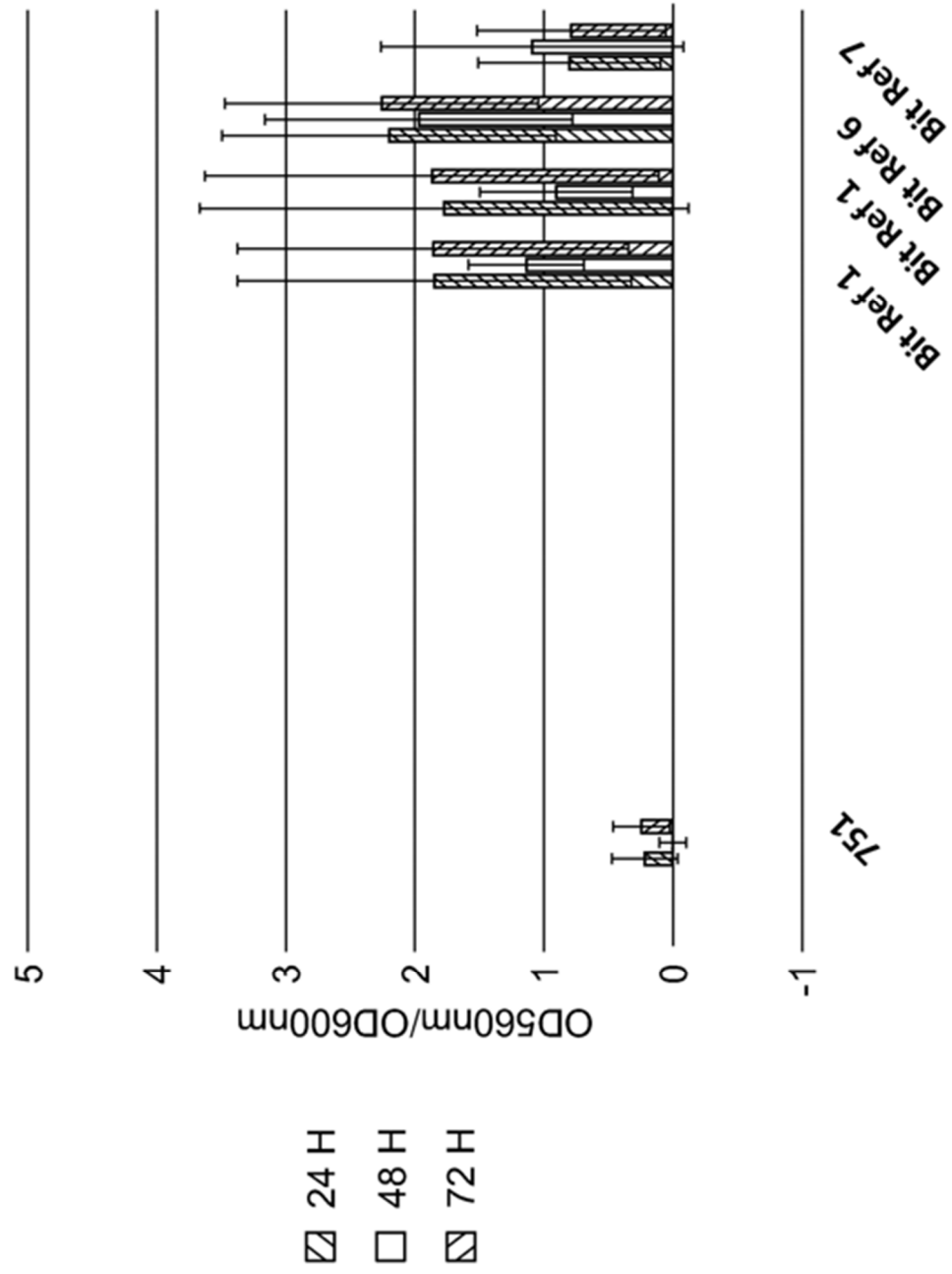


FIG. 76 (contd) Adjunto a células humanas
Adjunto en YCFA (2 replicados biológicos, no normalizados)

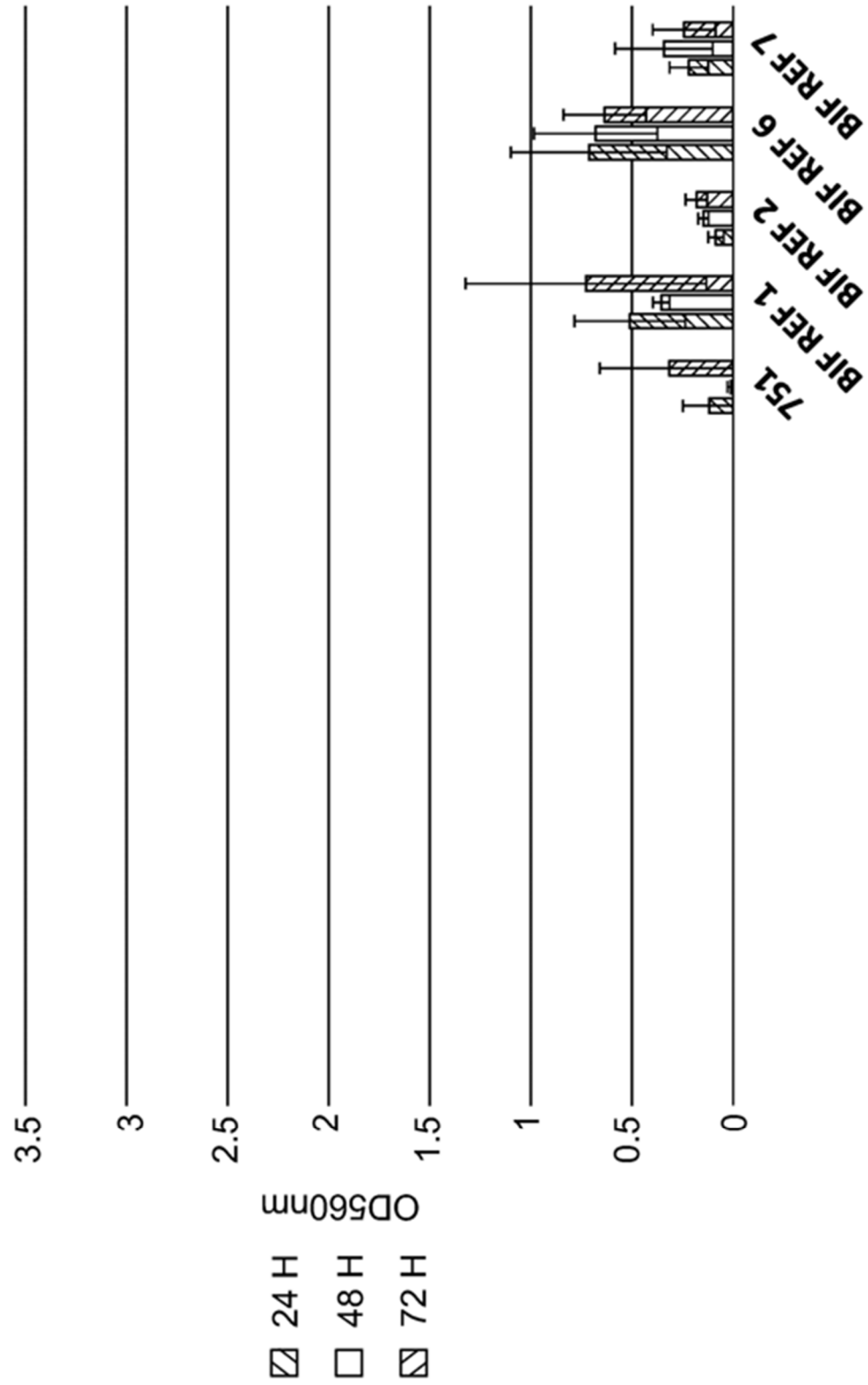


FIG. 77 Producción de EPS enlazada

Producción de EPS enlazada en YCFA (2 replicados biológicos, normalizados

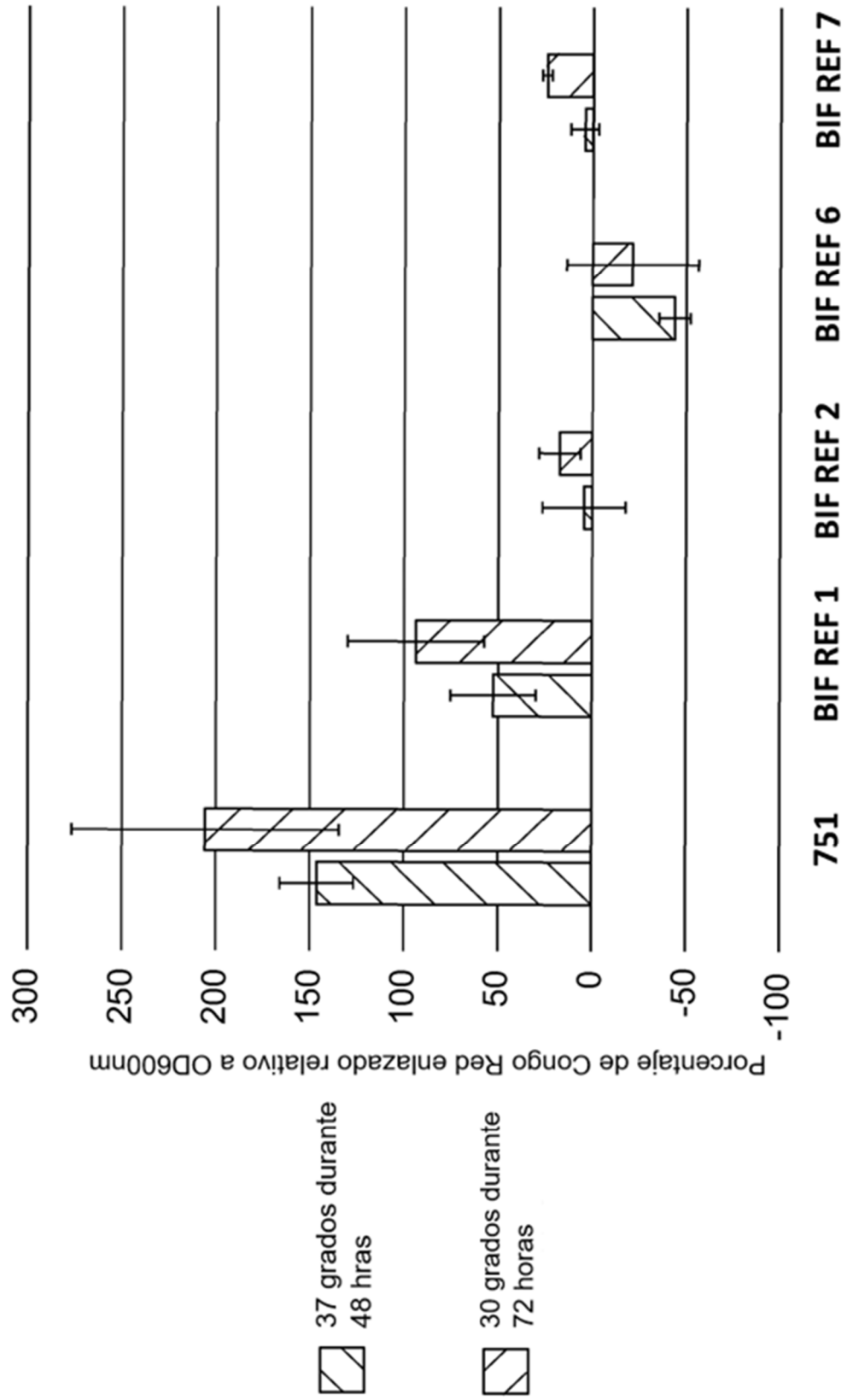


FIG. 77 (contd) Producción de EPS enlazada
Producción de EPS enlazada en YCFA (2 replicados biológicos, no normalizados)

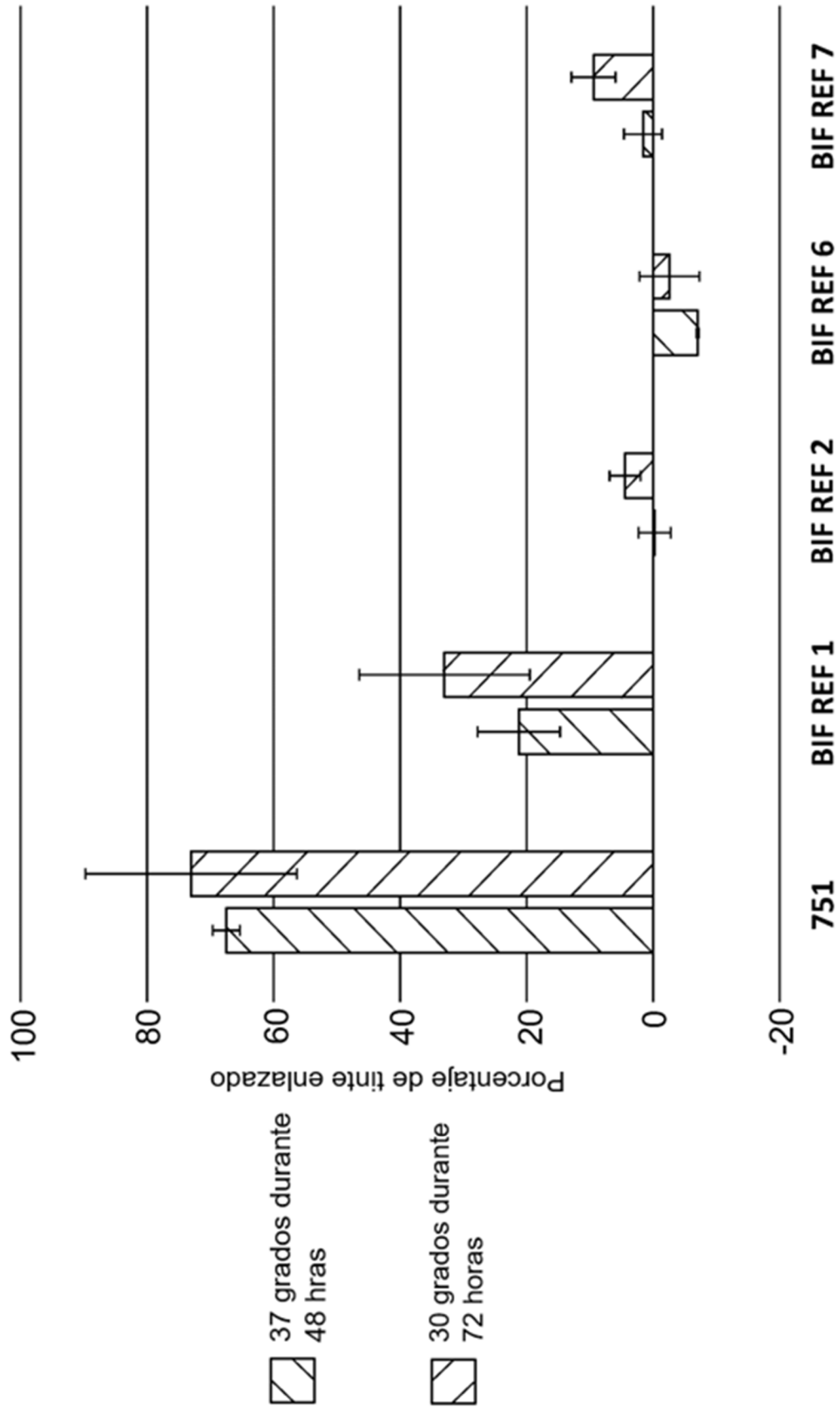


FIG. 78 Producción de exopolisacárido enlazado y liberado por MRX004

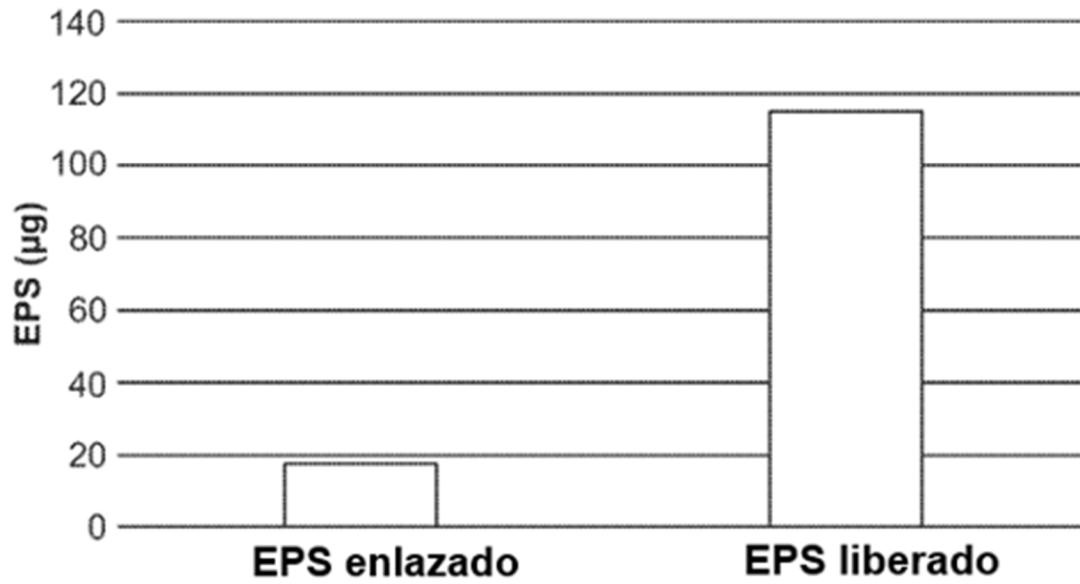


FIG. 79 Adjunto de MRX004 a células Caco-2

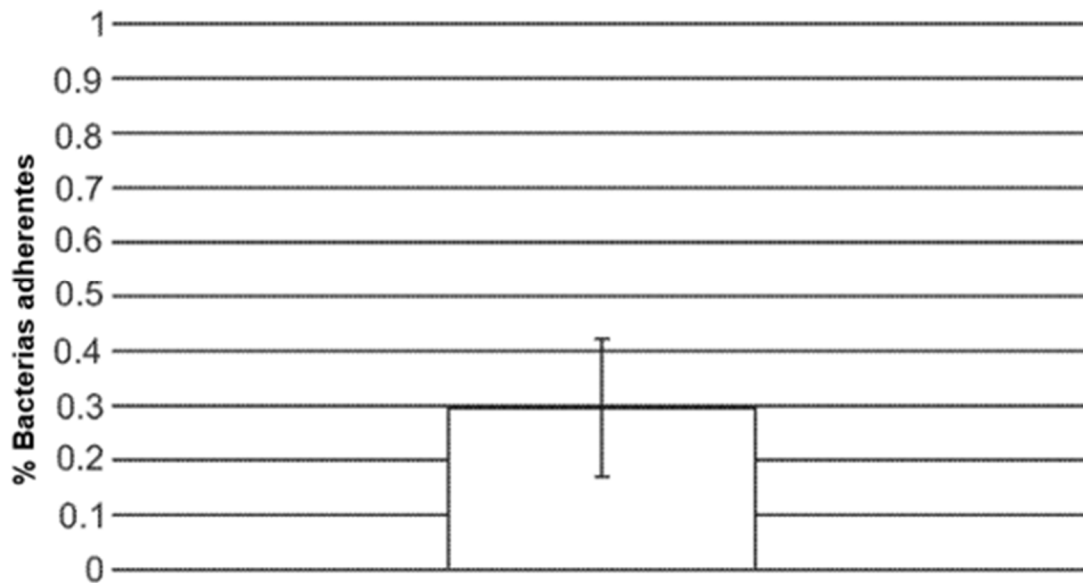


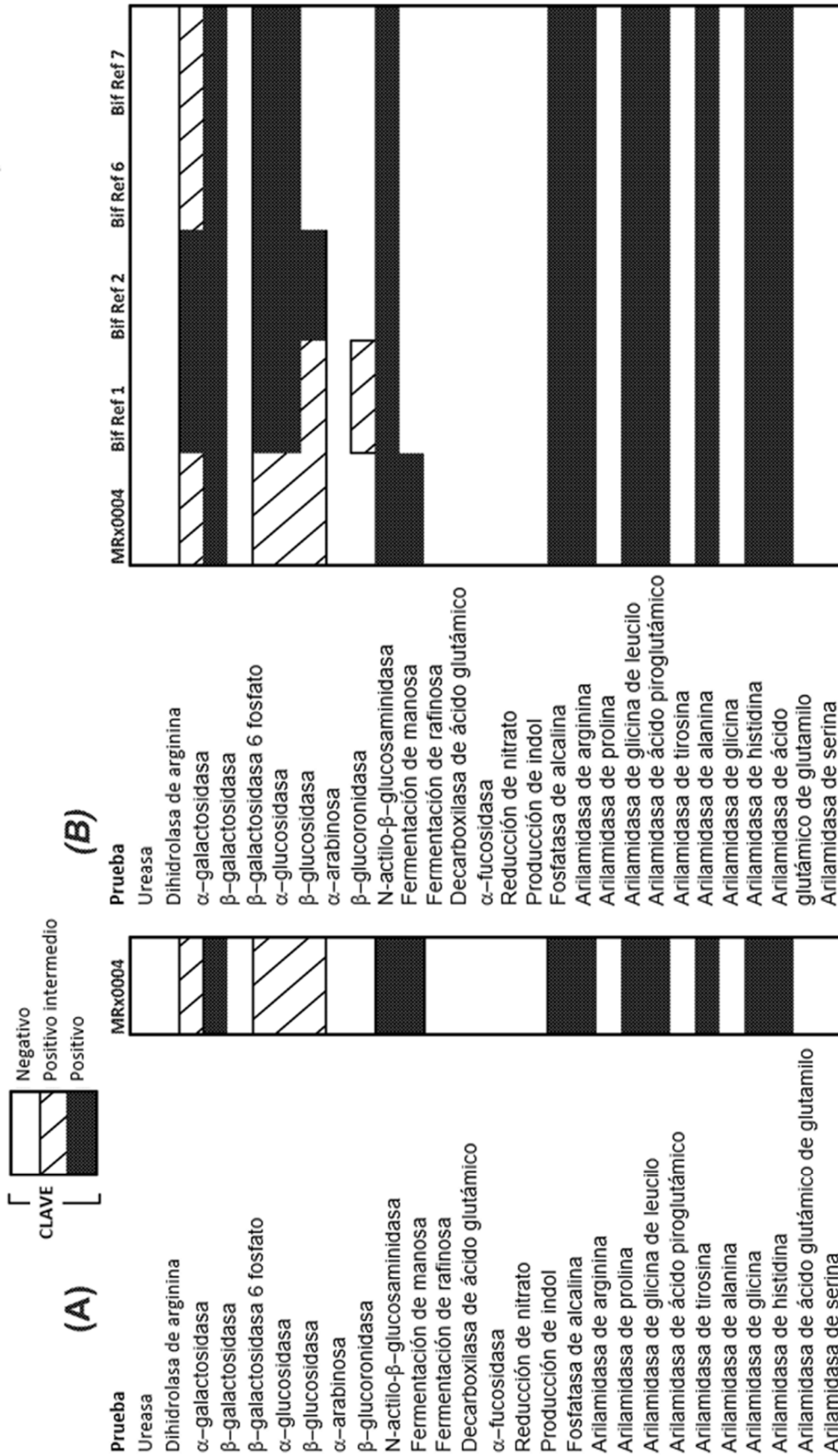
FIG. 80 Perfil Rapid ID 32 A de MRX004 vs cepas de tipo *Bifidobacterium breve*

FIG. 81 Análisis de API® 50 CH de MRX004

