

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 826**

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/GB2016/051768**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16203217**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016 E 16731639 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3204024**

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

30 Prioridad:

15.06.2015 GB 201510470
20.11.2015 GB 201520510
04.03.2016 GB 201603786

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2020

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 2 748 826 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**

Esta invención pertenece al campo de las composiciones que comprenden cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo de mamíferos y el uso de tales composiciones en el tratamiento de enfermedades.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Se cree que el intestino humano es estéril en el útero, pero está expuesto a una gran variedad de microbios maternos y ambientales inmediatamente después del nacimiento. A partir de entonces, tiene lugar un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores como el modo de administración, el medio ambiente, la dieta y el genotipo del huésped, todos los cuales impactan sobre la composición de la microbiota intestinal, particularmente durante los primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se vuelve adulta [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 beneficiosas. Las actividades metabólicas mejoradas del intestino colonizado aseguran que componentes dietéticos que de otro modo no serían digeribles se degraden con la liberación de subproductos que proporcionan una fuente de nutrientes importante 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].

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

En reconocimiento del posible efecto positivo que ciertas cepas bacterianas pueden tener sobre el intestino del animal, se han propuesto diversas cepas para su uso en el tratamiento de varias enfermedades (ver, por ejemplo, [10-13]). Además, ciertas cepas, incluidas principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han propuesto 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 cepas bacterianas particulares en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están pobremente caracterizados.

Hay un requisito en la técnica para nuevos métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. También hay un requisito para que los efectos potenciales de las bacterias intestinales se caractericen para que se puedan desarrollar nuevas terapias que usen bacterias intestinales.

La WO 2011/153226 describe productos farmacéuticos que usan componentes celulares de varias especies de *Bacteroides*.

La US 2014/335131, la CN 104546935, la CN 103156888 y la CN 104546942 describen el uso de *Bacteroides fragilis*, *thetaiotaomicron*, *vulgatus* y *dorei* en terapia.

La US 9011834 describe la preparación de una población de esporas bacterianas tratadas con etanol.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir 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 de Th17. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Bacteroides* pueden ser eficaces para reducir la respuesta inflamatoria de Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Bacteroides coprocola* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluyendo la respuesta inflamatoria de Th17, en modelos de ratón de asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas bacterianas de este género puede reducir los niveles de citoquinas que forman parte de la vía de Th17, incluyendo IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria de Th17 y puede proporcionar beneficios clínicos en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias y autoinmunes mediadas por IL-17 y la vía de Th17.

En realizaciones particulares, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste de: esclerosis múltiple; artritis como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. El efecto mostrado para las cepas bacterianas del género *Bacteroides* 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.

En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método de tratamiento o prevención de asma, como asma neutrófilo o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* 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 probado y demostrado la eficacia de cepas de *Bacteroides* en modelos de asma en ratones. En ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un método de tratamiento o prevención de asma neutrófilo o asma eosinofílico. El efecto mostrado para las composiciones de la invención sobre neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente eficaces para tratar o prevenir el asma neutrófilo y el asma eosinofílico. De hecho, en ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para su uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su uso en el tratamiento del asma, y en particular del asma neutrofílica.

En realizaciones preferidas adicionales, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método para tratar o prevenir la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoide y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las composiciones que usan *Bacteroides coprocola* pueden ser particularmente eficaces para tratar la artritis reumatoide.

En realizaciones preferidas adicionales, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método para tratar o prevenir la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Bacteroides* puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que usan *Bacteroides coprocola* pueden ser particularmente eficaces para tratar la esclerosis múltiple.

En realizaciones preferidas adicionales, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método para tratar o prevenir la uveítis, como uveítis posterior. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su uso en el tratamiento de la uveítis.

En ciertas realizaciones, las composiciones divulgadas en la presente son para su uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de Th17. En particular, las composiciones divulgadas en la presente pueden usarse para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de asma, artritis reumatoide o esclerosis múltiple. Preferiblemente, la divulgación proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Bacteroides coprocola*, para su 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 asma, artritis reumatoide o esclerosis múltiple, o del asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple,

uveítis o cáncer. En ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17. El efecto sobre la respuesta inflamatoria de Th17 que se muestra para las cepas de *Bacteroides* puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.

5 En realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides coprocola*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:4. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

10 En realizaciones preferidas adicionales de la divulgación, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides thetaiotaomicron*. También se pueden usar cepas estrechamente relacionadas, como las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:5. Preferiblemente, la cepa bacteriana divulgada en la presente tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:5.

15 En realizaciones preferidas adicionales divulgadas en la presente, la cepa bacteriana en la composición es de *Bacteroides fragilis*. También pueden usarse cepas estrechamente relacionadas, como las cepas bacterianas que tienen un genoma con identidad de secuencia para CR626927.1.

20 En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas de la invención puede ser eficaz para tratar enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. Además, la administración oral es conveniente para pacientes y profesionales y permite la administración y/o colonización parcial o total del intestino.

25 En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

30 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 la administración de bacterias.

35 En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.

40 En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.

45 Al desarrollar la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. Se muestra que la cepa de la invención es eficaz para tratar las enfermedades descritas en la presente como artritis, asma y esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células, o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408 para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

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

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

- Figura 9:** Modelo de ratón de 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 fluido 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 artritis reumatoide: pesos corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como porcentajes medios \pm SEM 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 artritis reumatoide: pesos corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como porcentajes medios \pm SEM de los pesos corporales iniciales (día 0). \blacktriangle p <0,05, \blacklozenge p <0,05, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ p <0,001, $\blacklozenge\blacklozenge$ p <0,0001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.
- Figura 21:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Puntuaciones clínicas. Los datos se presentan como media \pm SEM. $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ 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 artritis reumatoide: respuesta proliferativa de esplenocitos al colágeno II. Recuentos de medios de fondo restados [estimulados por CII - medios de fondo] por minuto en base a la incorporación de $^3\text{H-TdR}$. Todos los datos se presentan como media \pm SEM.
- Figura 23:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Niveles de IFN γ en sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan los valores medianos del grupo.
- Figura 24:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Niveles de IL-17A en sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan los valores medianos del grupo.
- Figura 25:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan los valores medianos del grupo.
- Figura 26:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Niveles de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con vehículo. Las líneas representan los valores medianos del grupo.
- Figura 27:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Niveles de citoquina en sobrenadantes de cultivo de tejidos del grupo tratado con bioterapéutico N° 675 (Grupo 4). Las líneas representan los valores medianos del grupo.
- Figura 28:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en suero
- Figura 29:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en suero
- Figura 30:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en BALF
- Figura 31:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en BALF
- Figura 32:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar
- Figura 33:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración perivascular
- Figura 34:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media inflamatoria (media de puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)
- Figura 35:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación de moco
- Figura 36:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en tejido pulmonar
- Figura 37:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1a en tejido pulmonar
- Figura 38:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IFN- γ en tejido pulmonar
- Figura 39:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-17A en tejido pulmonar
- Figura 40:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-4 en tejido pulmonar
- Figura 41:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en tejido pulmonar
- Figura 42:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1b en tejido pulmonar
- Figura 43:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de RANTES en tejido pulmonar
- Figura 44:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de MIP-1a en tejido

pulmonar

Figura 45: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de KC en tejido pulmonar

Figura 46: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

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

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

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

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

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 media inflamatoria (media de puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)

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

Figura 55: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

Figura 56: Modelo de ratón de asma neutrofílica grave - Nivel de IFN γ en 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-1b en 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 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 grave - Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

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

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

Figura 66: Modelo de ratón de 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 artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones de cartílago de grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Figura 68: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones óseas. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Figura 69: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntuaciones totales. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Figura 70: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: cepa N° 675. Los datos se presentan como media \pm SEM.

Figura 71: Modelo de ratón de 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 articulaciones y huesos con inflamación y fibrosis que se extienden a los tejidos blandos periarticulares. Imagen inferior (cepa N° 675): sinovitis y bursitis que se extienden focalmente a los tejidos periarticulares, daño leve del cartílago articular y restos intraarticulares, estructura ósea no afectada.

Figura 72: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - puntuación clínica.

Figura 73: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - incidencia de la enfermedad.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

Las composiciones de la invención comprenden una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4. Los ejemplos demuestran que las bacterias de este género son útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. Las cepas bacterianas preferidas son de la especie *Bacteroides coprocola*.

Los ejemplos de especies de *Bacteroides* divulgadas en la presente incluyen *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Bacteroides caccae*. Un ejemplo adicional de una especie de *Bacteroides* divulgada en la presente es *Bacteroides fragilis*. Las *Bacteroides* es un género de bacterias gramnegativas, obligatoriamente bacterias anaeróbicas. Las especies de *Bacteroides* son bacilos que no forman endosporas, y pueden ser móviles o no móviles, dependiendo de la especie. Las especies de *Bacteroides* constituyen una parte sustancial de la flora gastrointestinal de los mamíferos y son esenciales para procesar moléculas complejas.

Las células de *Bacteroides coprocola* cultivadas en placas de agar de sangre EG son estrictamente anaeróbicas, no forman esporas, no son móviles y son gramnegativas. Los bastones cortos o células con forma de bastón tienen una anchura de aproximadamente 0-8 µm y una longitud variable, generalmente en el intervalo de 1-4 µm. Cepas ejemplares de especies *Bacteroides coprocola* se describen en [16]. La cepa tipo, M16^T (= JCM 12979^T=DSM 17136^T), se aisló de las heces de un ser humano sano. Se incluyen dos cepas adicionales [M11 (=JCM 12980) y M156 (=JCM 12981)] en esta especie. Los números de acceso de GenBank/EMBL/DDBJ para la secuencia génica ARNr 16S de estas cepas de *Bacteroides coprocola* son AB200223, AB200224 y AB200225 (divulgadas en la presente como SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3).

La bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 se probó en los Ejemplos y también es referida en la presente como cepa 675. Una secuencia de ARNr 16S para la cepa 675 que se probó se proporciona en la SEQ ID NO:4. La cepa 675 se depositó ante la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building,, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. ((Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 13 de mayo de 2015 como "*Bacteroidales* 675" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42408.

El genoma de la cepa 675 comprende un cromosoma y un plásmido. Una secuencia de cromosoma para la cepa 675 se proporciona en la SEQ ID NO:6 en el listado de secuencias publicado con la WO 2016/203217. Una secuencia de plásmido para la cepa 675 se proporciona en la SEQ ID NO:7 en el listado de secuencias publicado con la WO 2016/203217. Estas secuencias se generaron usando la plataforma PacBio RS II.

También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa probada en los ejemplos sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:4. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

Una cepa bacteriana preferida adicional divulgada en la presente es la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* depositada con el número de acceso NCIMB 42341. Esta cepa se depositó en la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) el 3 de diciembre de 2014.

Cepas de *Bacteroides thetaiotaomicron* preferidas adicionales divulgadas en la presente son la cepa de tipo ATCC 29148 = CCUG 10774 = CIP 104206 = DSM 2079 = JCM 5827 = NCTC 10582 = VPI 5482 y la cepa WAL 2926 = ATCC 29741. Una cepa de *Bacteroides thetaiotaomicron* preferida adicional divulgada en la presente es la cepa descrita en la EP1448995. El número de acceso para la secuencia génica de ARNr 16S de la cepa WTA 2926 de *Bacteroides thetaiotaomicron* es M58763 (divulgada en la presente como SEQ ID NO:5).

En ciertos casos, la cepa bacteriana divulgada en la presente tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Preferiblemente, la cepa bacteriana divulgada en la presente tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO:5. Preferiblemente, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:5.

Una cepa de *Bacteroides fragilis* preferida divulgada en la presente es la cepa tipo ATCC 25285 = CCUG 4856 = CIP 77.16 = DSM 2151 = JCM 11019 = LMG 10263 = NCTC 9343. El número de acceso para el genoma completo de la cepa *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 es CR626927.1 (versión: CR626927.1 GI: 60491031).

En ciertos casos, la cepa bacteriana divulgada en la presente tiene un genoma con identidad de secuencia para CR626927.1. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana divulgada en la presente tiene un genoma con por lo menos un 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos un 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) con CR626927.1 en por lo menos el 60% (por ejemplo, por lo menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de CR626927.1. Por ejemplo, la cepa bacteriana divulgada en la presente puede tener un genoma con por lo menos un 90% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 70% de CR626927.1, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 80% de CR626927.1, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 90% de CR626927.1, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 100% de CR626927.1, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 70% de CR626927.1, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 80% de CR626927.1, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 90% de CR626927.1, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 100% de CR626927.1, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 70% de CR626927.1, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 80% de CR626927.1, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 90% de CR626927.1, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con CR626927.1 en el 100% de CR626927.1.

En ciertos casos, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217. En los casos preferidos, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene un cromosoma con por lo menos un 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos el 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en por lo menos el 60% (por ejemplo, por lo menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217. Por ejemplo, la cepa bacteriana para su uso en la invención puede tener un cromosoma con por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de la WO 2016/203217 en el 70% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 70% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217.

En ciertos casos, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene un plásmido con identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217. En casos preferidos, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene un plásmido con por lo menos un 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, por lo menos el 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en por lo menos el 60% (por ejemplo, por lo menos el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217. Por ejemplo, la cepa bacteriana para su uso en la invención puede tener un plásmido con por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7 de la WO 2016/203217 en el 70% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 70% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 70% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 80% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 90% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217, o por lo menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217 en el 100% de la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217.

En ciertos casos, la cepa bacteriana para su uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 de la WO 2016/203217 y un plásmido con identidad de secuencia con la SEQ ID NO:7 de la WO 2016/203217.

También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso 42408 sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o unas muy similares.

Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse secuenciando otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408. Por ejemplo, sustancialmente todo el genoma puede secuenciarse y una cepa de biotipo para su uso en la invención puede tener por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en por lo menos el 80% de su genoma completo (por ejemplo, en por lo menos el 85%, 90%, 95% o 99%, o en su genoma completo). Otras secuencias adecuadas para su uso en la

identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP o [17]. Las cepas de biotipo pueden tener secuencias con por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408.

Alternativamente, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse usando el depósito con número de acceso NCIMB 42408 y análisis de fragmentos de restricción y/o análisis de PCR, por ejemplo usando polimorfismo de longitud de fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) y determinación de huellas genéticas (rep)-PCR de elementos de ADN repetitivos, o realización de perfiles de proteínas, o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s.

En ciertas realizaciones, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 y que son adecuadas para su uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 cuando se analizan mediante análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para métodos y orientación ejemplares, ver, por ejemplo, [18]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408.

Otras cepas de *Bacteroides* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, como los biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408, pueden identificarse usando cualquier método o estrategia apropiados, incluyendo los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para su uso en la invención pueden identificarse cultivando en YCFA anaeróbico y/o administrando las bacterias al modelo de ratón de 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 una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42408 y son útiles en la invención. Una cepa útil tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42408. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de enfermedad de asma, artritis y esclerosis múltiple y efectos comparables sobre los niveles de citoquinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408. Esta es la cepa ejemplar 675 probada en los ejemplos y que se mostró eficaz para tratar la enfermedad. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, como una célula aislada, de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408. La invención también proporciona una célula de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en la presente.

Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) del original. Un derivado de una cepa de la invención puede modificarse, por ejemplo a nivel genético, sin extirpar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42408 original. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables sobre los modelos de enfermedad de asma, artritis y esclerosis múltiple y efectos comparables sobre los niveles de citoquinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42408 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42408. Un derivado del NCIMB 42341 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42341.

Las referencias a las células de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42408, y tales células están abarcadas por la invención. Las referencias a células de la cepa *Bacteroides thetaiotaomicron* depositadas con los números de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42341, ATCC 29148 o ATCC 29741.

En realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.

Usos terapéuticos

Como se demuestra en los ejemplos, las composiciones bacterianas de la invención son eficaces para reducir la respuesta inflamatoria de Th17. En particular, el tratamiento con composiciones de la invención logra una reducción en los niveles de IL-17A y otras citoquinas de la vía de Th17, y mejoras clínicas en modelos animales de

afecciones mediadas por IL-17 y la vía de Th17. Por lo tanto, las composiciones de la invención 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 de la invención pueden ser útiles para reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de IL-17.

5 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 impulsadas por IL-23. Estas citoquinas y otras forman partes importantes de la vía de Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye y subyace en una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (como se describe, por ejemplo, [19-24]). Las enfermedades en las que se activa la vía de Th17 son enfermedades mediadas por la vía de Th17. Las enfermedades mediadas por la vía de Th17 pueden mejorarse o aliviarse reprimiendo la vía de 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 las citoquinas de la vía de Th17. Las enfermedades mediadas por la vía de Th17 pueden caracterizarse por niveles aumentados de citoquinas producidas por las células Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisado en [25]) Las enfermedades mediadas por la vía de Th17 pueden caracterizarse por una expresión aumentada de genes relacionados con Th-17, como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía de Th17 pueden estar asociadas con niveles aumentados de células Th17.

20 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 la presente puede referirse a cualquier miembro de la familia de 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 una alta expresión de IL-17 y/o la acumulación o presencia de células positivas para IL-17 en un tejido afectado por la enfermedad o afección. De manera similar, las enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 son enfermedades y afecciones que se ven exacerbadas por niveles de IL-17 altos o un aumento en los niveles de IL-17, y que se alivian con niveles de IL-17 bajos o una reducción en los niveles de IL-17. La respuesta inflamatoria de IL-17 puede ser local o sistémica.

30 Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden estar mediadas por IL-17 o la vía de Th17 incluyen esclerosis múltiple; artritis como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención se usan para tratar o prevenir una o más de estas afecciones o enfermedades. En realizaciones preferidas adicionales, estas afecciones o enfermedades están mediadas por IL-17 o la vía de Th17.

40 En ciertos casos, las composiciones divulgadas en la presente son para su uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde dicho tratamiento o prevención se logra reduciendo o previniendo la elevación de la respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su 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 muestra una respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas realizaciones, al paciente se le puede haber diagnosticado una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica, o la composición de la invención puede usarse para prevenir una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune que se desarrolla 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 invención pueden aplicarse a cualquiera de las enfermedades o afecciones específicas enumeradas en el párrafo anterior.

55 IL-17 y la vía de Th17 se asocian a menudo con enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir las enfermedades o afecciones crónicas enumeradas anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas.

60 Las composiciones divulgadas en la presente pueden ser útiles para tratar enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17 y para abordar la respuesta inflamatoria de Th17, por lo que las composiciones divulgadas en la presente pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir enfermedades crónicas, tratar o prevenir enfermedades 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 IL-17 y células Th17. Por ejemplo, se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibitor sobre la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos, por lo que las composiciones divulgadas en la presente pueden ser útiles para tratar o prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago..

65

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención 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 las 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 puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular las mediadas por IL-17 o la vía de Th17.

Asma

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención 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 ácaros del polvo doméstico, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención del asma. El asma es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación y 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 de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede estar mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

En ciertas realizaciones, el asma es asma eosinofílica o alérgica. El asma eosinofílico y alérgico se caracteriza número aumentados 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 [26]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de eosinófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinófilo y alérgico.

En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica (o asma no eosinofílica). Los altos números 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 neutrofílico.

El asma eosinofílico y neutrofílico 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.

Los niveles de IL-17 aumentados y la activación de la vía de Th17 están asociados con asma grave, por lo que las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma grave o para tratar el asma grave.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en métodos que reducen 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 ha indicado anteriormente, los niveles altos 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 asocia con asma grave y estrechamiento crónico de las vías respiratorias. Por lo tanto, reducir la respuesta inflamatoria neutrofílica puede ser particularmente útil para tratar el asma grave.

En ciertas realizaciones, las composiciones reducen la infiltración peribronquiolar en el asma alérgica, o son para su uso en la reducción de la infiltración peribronquiolar en el tratamiento del asma alérgica. En ciertas realizaciones, las composiciones reducen la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el asma neutrofílica, o son para su uso en la reducción de la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el tratamiento del asma neutrofílica alérgica.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IL-1 β , IFN γ , RANTES, MIP-1 α o IL-8.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método de tratamiento del asma que da como resultado una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a tratar tiene, o se ha identificado anteriormente que tiene, niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, por ejemplo, como se identifica mediante muestreo de sangre o análisis de esputo. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en un recién nacido cuando se administra al recién nacido, o a una mujer embarazada. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en niños. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma de aparición en adultos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para controlar o aliviar el asma. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se agravan por

alérgenos, como ácaros del polvo doméstico

El tratamiento o la prevención del asma pueden referirse, por ejemplo, a una mejora de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el intervalo de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Artritis

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de la artritis reumatoide (AR). Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en los signos clínicos de AR en un modelo de ratón, reducen el daño al cartílago y los huesos, y reducen la respuesta inflamatoria de 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 está asociada con una respuesta inflamatoria que da como resultado una hinchazón de las articulaciones, hiperplasia sinovial y destrucción del cartílago y el hueso. La IL-17 y las células Th17 pueden tener un papel clave en la AR, por ejemplo, como la IL-17 inhibe la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos y activa la producción y la función de las metaloproteinasas de la matriz y como la actividad de la enfermedad de AR está correlacionada con niveles de IL-17 y números de células Th 17 [27, 28], las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la AR.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción de los niveles de IL-17 o para prevenir la elevación de los niveles de IL-17 en el tratamiento o prevención de la AR. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o previene una elevación en 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 previene una elevación en los niveles de IFN- γ o IL-6.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la hinchazón de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en pacientes con articulaciones inflamadas o pacientes identificados como en riesgo de tener articulaciones inflamadas. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método para reducir la hinchazón articular en la AR.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en el daño al cartílago o el daño óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción o prevención del daño al cartílago u óseo en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en el tratamiento de pacientes con AR grave que están en riesgo de daño al cartílago o al hueso.

Los niveles de IL-17 y el número de células Th17 aumentados se asocian con la destrucción del cartílago y el hueso en la AR [27,28]. Se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de la erosión ósea o el daño al cartílago en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en el tratamiento de pacientes que muestran erosión ósea o daño al cartílago o pacientes identificados en riesgo de erosión ósea o daño al cartílago.

El TNF- α también está asociado con AR, pero el TNF- α no está involucrado en la patogénesis de las etapas tardías de la enfermedad. Por el contrario, IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [29]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su 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 de la invención son para tratar pacientes que han recibido previamente terapia anti-TNF- α . En ciertas realizaciones, los pacientes a tratar no responden o ya no responden a la terapia anti-TNF- α .

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para modular el sistema inmunitario de un paciente, por lo que, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de la AR en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de AR, o que ha sido diagnosticado con AR de etapa temprana. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de AR.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para gestionar o aliviar la AR. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la hinchazón articular 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 exacerbaciones o el intervalo de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Esclerosis múltiple

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple en ratones (el modelo EAE), y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o 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 incapacita progresivamente y evoluciona en episodios. La IL-17 y las células 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, la IL-17 puede interrumpir las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y las células Th17 pueden migrar hacia el sistema nervioso central y provocar pérdida neuronal [30,31]. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la incidencia o gravedad de una enfermedad. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción de la incidencia o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención previene una disminución en la función motora o da como resultado una función motora mejorada. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de una disminución en la función motora o para su uso en la mejora de la función motora. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención previene el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para modular el sistema inmunitario de un paciente, por lo que, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de la esclerosis múltiple en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de tener esclerosis múltiple o que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple en etapa temprana o esclerosis múltiple "recurrente-remitente". Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de la esclerosis. De hecho, los ejemplos muestran que la administración de composiciones de la invención previno el desarrollo de la enfermedad en muchos ratones.

Las composiciones de la invención pueden ser útiles para manejar o aliviar la esclerosis múltiple. Las composiciones de la invención 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 exacerbaciones o el intervalo de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Uveítis

En realizaciones preferidas adicionales, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención de la uveítis. Las composiciones de la invención pueden lograr una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo animal de uveítis y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la uveítis. La uveítis es la inflamación de la úvea y puede provocar la destrucción del tejido retiniano. Puede presentarse en diferentes formas anatómicas (anterior, intermedia, posterior o difusa) y ser el resultado de causas diferentes, pero relacionadas, que incluyen trastornos autoinmunes sistémicos. La IL-17 y la vía de Th17 están centralmente involucradas en la uveítis, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la uveítis. Las referencias [38-45] describen niveles en suero elevados de interleucina-17A en pacientes con uveítis, la asociación específica de variantes genéticas de IL17A con la panuveítis, el papel de las citoquinas asociadas con Th17 en la patogénesis de la uveítis autoinmune experimental, el desequilibrio entre células Th17 reguladoras y células T reguladores durante la uveítis experimental monofásica, la regulación por incremento de IL-17A en pacientes con uveítis y enfermedades de Adamantiades-Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) activas, el tratamiento de uveítis no infecciosa con secukinumab (anticuerpo anti-IL-17A), y Th17 en ojos uveícticos.

En ciertas realizaciones, la uveítis es uveítis posterior. La uveítis posterior se presenta principalmente con inflamación de la retina y la coroides y las composiciones de la invención pueden ser eficaces para reducir la inflamación y el daño de la retina.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en el daño retiniano. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción o prevención del daño retiniano en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en el tratamiento de pacientes con uveítis grave que están en riesgo de daño retiniano. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la

reducción o prevención de la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción de la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado que se mantenga o mejore la visión. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en el mantenimiento o mejora de la visión.

En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en el tratamiento o prevención de la uveítis asociada con una enfermedad no infecciosa o autoinmune, como la enfermedad de Behçet, la enfermedad de Crohn, la iridociclitis heterocromática de Fuchs, la granulomatosis con poliangitis, la uveítis relacionada con HLA-B27, la artritis idiopática juvenil, sarcoidosis, espondiloartritis, oftalmia simpática, nefritis tubulointersticial y síndrome de uveítis o síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. Se ha demostrado que IL-17A está involucrado, por ejemplo, en las enfermedades de Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada.

El tratamiento o la prevención de la uveítis pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una prevención de la recaída.

Modos de administración

Preferiblemente, las composiciones de la invención se administrarán al tracto gastrointestinal para permitir el suministro y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. Generalmente, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal o por vía bucal o sublingual.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como una espuma, como un spray o un gel.

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

En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra al tracto gastrointestinal a través de un tubo, como un tubo nasogástrico, tubo orogástrico, 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.

Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o pueden administrarse secuencialmente como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para administrarse diariamente.

En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento de acuerdo con la invención se acompaña de una evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra la administración 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 la administración y/o la colonización parcial o total tiene éxito y se observa la eficacia.

En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal embarazado, por ejemplo, un mamífero como un ser humano para evitar que se desarrolle una enfermedad inflamatoria o autoinmune en su hijo en el útero y/o después de que nazca.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de Th17, o que se ha identificado que está en riesgo de tener una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de 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 de Th17 en un paciente sano.

Las composiciones de la invención pueden administrarse a un paciente que se ha identificado que tiene una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener una colonización reducida o ausente por *Bacteroides*, y en particular *Bacteroides coprocola*.

Las composiciones de la invención pueden administrarse como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de humanos, aunque pueden usarse para tratar animales que incluyen mamíferos monogástricos como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento

de los animales. Si se administra a animales, puede usarse alimentación forzada oral.

Composiciones

5 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 duras, que comprenden una cepa bacteriana de la invención.

10 Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y la orientación relevante está disponible, por ejemplo, en las referencias [46-48].

15 Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo y activo.

En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la administración de la cepa bacteriana al intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la administración en la localización objetivo a través, por ejemplo, de la ruptura con estímulos químicos o físicos como la presión, la actividad enzimática o la disgregación física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Puede usarse 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, auto-agregación 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 en, por ejemplo, las referencias [49] y [50]

25 La composición puede administrarse por vía oral y puede estar en forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque los *Bacteroides* son anaerobios. Se pueden incluir otros ingredientes (como vitamina C, por ejemplo), como captadores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar la administración y/o la colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo*. Alternativamente, la composición probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, como la leche o producto lácteo fermentado a base de suero, o como un producto farmacéutico.

30 La composición puede formularse como un probiótico.

35 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 eficaz de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar como resultado la administración y/o colonización parcial o total del intestino del paciente.

40 Una dosis diaria adecuada de la bacteria, por ejemplo para un humano adulto, puede ser de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC); por ejemplo, de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} UFC; en otro ejemplo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} UFC.

45 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, de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{10} UFC/g. La dosis puede ser, por ejemplo, de 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

50 Típicamente, un probiótico, como la composición de la invención, se combina opcionalmente con por lo menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es habitualmente 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 como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

55 En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 30% en peso, con respecto a la composición en peso total (por ejemplo, del 5 al 20% en peso). Los carbohidratos pueden seleccionarse del grupo que consiste de: fructo-oligosacáridos (o FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, goma cultivada modificada y almidones resistentes, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena, y fibras cítricas. En un aspecto, los prebióticos son los fructo-oligosacáridos de cadena corta (por simplicidad mostrados en la presente a continuación como FOSs-cc); dichos FOSs-cc son carbohidratos no digeribles, obtenidos generalmente mediante la conversión de azúcar de remolacha y que incluyen una molécula de sacarosa con la que se unen tres moléculas de glucosa.

65

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Se pueden encontrar ejemplos de tales excipientes adecuados en la referencia [51]. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [52]. Los ejemplos de portadores 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 pretendida 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, agente(s) de recubrimiento, agente(s) de solubilización adecuados. Ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, 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. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. 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.

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, 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 el consumo siendo más similar a un producto 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 tiene un contenido variable de grasa. 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 a partir de leche en polvo y suero sin ningún procesamiento, o un producto procesado, como yogur, leche cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como bebidas de suero, leches fermentadas, leches condensadas, leches infantiles o para bebés; leches aromatizadas, helados; alimentos que contienen leche como dulces.

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

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

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 en la presente.

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

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 un trastorno cuando se administra a un sujeto con necesidad de ello; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste de asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, 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.

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 IL-17 o la vía de Th17. En realizaciones preferidas, dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste de artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, 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.

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

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

10 En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste de oral, rectal, subcutáneo, nasal, bucal y sublingual.

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

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

20 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, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

25 En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además por lo menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizante.

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

En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde dicha cepa bacteriana se liofiliza.

35 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 con un 50% de humedad relativa, por lo menos el 80% de la cepa bacteriana medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de por lo menos aproximadamente: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

40 **Métodos de cultivo**

45 Las cepas bacterianas para su uso en la presente invención pueden cultivarse usando técnicas de microbiología estándar como se detalla, por ejemplo, en las referencias [53-55].

Las cepas bacterianas del género *Bacteroides* pueden cultivarse usando un método como el que se resume a continuación, que puede proporcionar un buen crecimiento y fiabilidad. Este método es particularmente útil para cultivar cepas de la especie *Bacteroides coprocola*.

50 Las cepas bacterianas del género *Bacteroides*, y en particular de la especie *Bacteroides coprocola*, pueden cultivarse usando un stock líquido para inocular la placa (o un cultivo líquido más grande), en lugar de un raspado de stock congelado como puede usarse generalmente (ver, por ejemplo, referencia [56]). El establecimiento de colonias maduras es fiable y rápido si las reservas congeladas de cepas de *Bacteroides* se descongelan y se usan como cultivo líquido.

55 Un método adecuado para cultivar una cepa bacteriana del género *Bacteroides*, puede comprender:

- (a) proporcionar un stock congelado de la cepa bacteriana;
- (b) descongelar el stock congelado para proporcionar un stock líquido;
- 60 (c) añadir el stock líquido a un medio sólido o líquido; y
- (d) incubar el medio sólido o líquido para proporcionar un cultivo de la cepa bacteriana.

Este método es particularmente útil para cultivar cepas bacterianas de *Bacteroides coprocola*.

65 El stock congelado puede ser un stock de glicerol congelado. El medio sólido o líquido 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).

La incubación en el paso (d) puede realizarse durante por lo menos 36 horas, tal como 48 o 72 horas. La incubación en el paso (d) puede realizarse en un entorno anaeróbico, como una campana anaeróbica. El cultivo proporcionado en el paso (d) puede usarse para subcultivar un cultivo más grande de la cepa bacteriana. Tal subcultivo permite que se preparen mayores cantidades de bacterias y puede ser útil para proporcionar composiciones de la invención a una escala comercial.

La descongelación en el paso (b) puede realizarse a temperatura ambiente o con calentamiento manual.

La cantidad de stock líquido añadido en el paso (c) puede estar entre 300 µl y 5 ml, como 500 µl. El stock puede ser un stock de glicerol al 20%.

El método anterior puede usarse para preparar una composición farmacéutica o un producto alimenticio, en cuyo caso el método puede comprender pasos adicionales de aislar la cepa bacteriana, opcionalmente liofilizar la cepa bacteriana, y combinar la cepa bacteriana con uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, o una o más sustancias alimenticias. Esta composición farmacéutica o producto alimenticio preparado por el método puede usarse en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de Th17.

Un método ejemplar para cultivar cepas bacterianas del género *Bacteroides*, y en particular de la especie *Bacteroides coprocola*, puede comprender:

1. Se colocan en placas 500 µl de stock de glicerol al 20% sobre agar YCFA.
2. Las placas se dejan en la campana anaeróbica durante 48/72 horas para generar colonias maduras.
3. Las bacterias se cultivan en volúmenes de 10 ml, ya sea de una colonia individual o de un subcultivo líquido al 1%.
4. Las placas con colonias se usan solo durante 2/3 días después de que se logra la morfología de la colonia madura.

Cepas bacterianas para su uso en composiciones de vacunas

Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la invención son útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17. Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen sobre el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la invención también pueden ser útiles para prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía de Th17, cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención pueden matarse, inactivarse o atenuarse. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración por inyección, como por inyección subcutánea.

General

La puesta 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 la habilidad de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. ver, por ejemplo, las referencias [57] y [58-64], etc.

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

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x ± 10%.

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.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa

que, cuando se alinean, ese porcentaje de los nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia pueden determinarse usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7.18 de la ref. [65]. Una alineación preferida se determina mediante el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización de hueco abierto de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se divulga en la ref. [66]

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 intermedios adicionales. Además, los pasos pueden combinarse, omitirse o realizarse en un orden alternativo, si es apropiado.

En la presente se describen varias realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas en la presente como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando sean mutuamente excluyentes).

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Eficacia de inóculos bacterianos en un modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico

Resumen

A los ratones se les administraron composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se desafiaron con el extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) para provocar una respuesta inflamatoria alérgica. La respuesta inflamatoria a HDM incluye componentes eosinofílicos y neutrofilicos, está mediada por IL-17 y la vía de Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria mostrada por los ratones tratados con las composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se descubrió 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 y Th17 tales como eosinofilia, neutrofilia y asma.

Cepa

675

Diseño del estudio

Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control de vehículo (por vía oral).
3. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 675 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).
8. Grupo de control no tratado.

Número de ratones por grupo = 5

Día -14 al día 13: Administración diaria del control de vehículo por vía oral (Grupo 1).

Día -14 al día 13: Administración diaria de inóculo bacteriano terapéutico por vía oral (Grupo 2-6).

Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de 15ug de HDM (extracto de ácaros del polvo doméstico - Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) en un volumen de 30ul PBS por vía nasal (Grupo 1-8).

Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de dexametasona (i.p., 3 mg/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

El día 14 los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL).

Las células se aislaron del fluido BAL (lavado broncoalveolar) y se realizaron recuentos celulares diferenciales (200 recuentos celulares/muestras).

Material y métodos

Ratones. Se adquirieron ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas obtenidas de Indulab AG, Gams, Suiza Tipo de jaula: "jaula The SealsafeTM-IVC. Número de producto 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 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el Día de estudio -14. Los alimentos estaban disponibles a voluntad El enriquecimiento de la jaula estaba presente. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con la licencia de autorización local número 2283.1 (emitida y aprobada por: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). El agua potable y el alimento estaban disponibles a voluntad y se renovaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estuvo presente. Se cumplieron las regulaciones de bienestar animal como se dispusieron por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455.163 de la FVO (Federal Veterinary Office) en la cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo de inóculo bacteriano. Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolo con una mano enguantada y se inyectaron ~0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (número de catálogo, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron luego (estáticos) a 37° C durante hasta 24-26 horas (para la cepa 675).

Como se descubrió que las OD bacterianas del inóculo de la cepa 675 eran variables, se realizaron 3 enfoques de cultivo diferentes cada día. Se cultivaron 2 viales como se ha descrito anteriormente y se cultivó una tercera muestra utilizando una alícuota de 400 ul del cultivo del día anterior para la siembra. En 4 días de tratamiento se utilizó el último enfoque, debido al escaso crecimiento del stock congelado. Es de destacar que este enfoque dio como resultado un crecimiento robusto de la cepa bacteriana 675 en todas las ocasiones.

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

Administración de inóculo bacteriano o vehículo de control. Se administraron 400 ul de inóculo bacteriano cultivado o vehículo de control por día por alimentación forzada.

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 les administraron 15 µg de HDM (Número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) en un volumen de 30ul PBS por nasal.

Preparación y administración del compuesto de control positivo Dexametasona. la sal disódica 21-fosfato Dexametasona (Sigma-Aldrich, Número de catálogo D1159, Lote N° 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 vía oral en los días indicados en el protocolo de estudio anterior.

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

Medición de infiltrados celulares en BAL. Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos diferenciales de células en base a criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

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 análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en Figuras 1-9.

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Los dos controles, el tratamiento con vehículo (control negativo) y el tratamiento con dexametasona (control positivo) se comportaron como se esperaba, con eosinofilia y neutrofilia alteradas observadas después del tratamiento con dexametasona.

Los resultados más importantes de este experimento se muestran en las Figuras 6 y 7, que informan del

número total y el porcentaje de neutrófilos detectados en el lavado bronquiolar después del desafío con HDM. La cepa 675 redujo los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en BAL con respecto al control de solo vehículo.

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

Resumen

A los ratones se les administraron composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se sensibilizaron con administraciones subcutáneas de extracto de ácaros 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 las 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 administraciones de anticuerpos anti-IL-17. Los datos indican por lo tanto que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 y Th17 como neutrofilia o asma.

Cepa

675

Diseño del estudio

Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con vehículo de control (por vía oral).
3. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 675 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (i.p.).
8. Grupo de control no tratado.
- 9: ratones sanos (valor de referencia).

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

- Día -14 al día 17: Administración diaria del vehículo de control por vía oral (Grupo 1).
 Día -14 al día 17: administración diaria del inóculo bacteriano terapéutico por vía oral (Grupo 2-6).
 Día 0: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).
 Día 7: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).
 Día 13, 15, 17: Administración de anticuerpo neutralizante anti IL-17 por i.p. (Grupo 7).
 Día 14, 15, 16, 17: Desafío con HDM en 30ul de PBS por vía nasal (Grupo 1-8).
 Día 18: Sacrificio de todos los animales para su análisis.

Puntos finales y análisis:

El día 14 los animales se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli PharmaAG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL). Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos celulares diferenciales (200 recuentos celulares/muestras).

Material y métodos.

Ratones. Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas de Indulab AG, Gams, Suiza Tipo de jaula: " jaula The SealsafeTM-IVC. Número de producto 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio del experimento. Los ratones se monitorizaron semanalmente y se aclimataron a la instalación durante 7 días antes del 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 a voluntad. Estaba presente el enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó de acuerdo con el número de licencia de autorización local 2283.1 (emitida y aprobada por: S Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). El agua potable y los alimentos estaban disponibles a voluntad y se renovaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se cumplieron de acuerdo con lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455.163 de la FVO (Federal Veterinary Office) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo de inóculo bacteriano. Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolo con una mano enguantada y se inyectaron ~0,7 ml del contenido en un tubo Hungate (Número de catálogo, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA

anaeróbico. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron luego (estáticos) a 37° C durante hasta 24-26 horas (para la cepa 675).

5 Como los OD bacterianos de la cepa de inóculo 675 fueron variables, se realizaron 3 enfoques de cultivo diferentes cada día. Se cultivaron 2 viales como se ha descrito anteriormente y se cultivó una tercera muestra utilizando una alícuota de 400 ul del cultivo del día anterior para la siembra. En 4 días de tratamiento se utilizó el último enfoque, debido al pobre crecimiento del stock congelado. Es de destacar que este enfoque dio como resultado un crecimiento robusto de la cepa bacteriana 675 en todas las ocasiones.

10 **Cultivo de control de vehículo.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37° C durante 16 h.

15 **Administración de inóculo bacteriano o control de vehículo.** Se administraron 400 ul de inóculo bacteriano cultivado o control de vehículo por día mediante alimentación forzada oral.

20 **Sensibilización de HDM.** Se emulsionaron 50 µg de HDM (Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA) en PBS en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, USA) y se administraron por vía subcutánea en un volumen de 200 µl, dos veces durante dos semanas en costados opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Suiza) y luego se les administraron desafíos intranasales de 15 µg de HDM en un volumen de 30 ul de PBS en 4 días consecutivos. El análisis se realizó un día después del desafío final.

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

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

35 **Medición de infiltrados celulares en BAL.** Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos celulares diferenciales en base a criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

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).

40 Resultados y análisis

Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 10-18.

45 No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 15 y dieciséis, la cepa 675 mostró un efecto fuerte y redujo el número total de neutrófilos con respecto a los controles negativos. Además, la cepa 675 redujo el número de eosinófilos con respecto a los controles, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

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

Materiales y métodos

55 **Cepa**

675

Cultivos bacterianos

60 Los cultivos bacterianos se cultivaron para su administración en una estación de trabajo anaeróbica (Don Whitley Scientific) de acuerdo con el esquema de crecimiento siguiente.

- 65
- Lunes/miércoles/viernes: transferir el stock de glicerol al hielo y poner en rayas en una placa YCFA del stock de glicerol. Usar la placa de la siguiente manera por un máximo de 3 días.
 - PM diario: Elegir una colonia individual de cada cepa de cultivos en placa, transferir a un tubo hungate

- de 8 ml que contiene YCFA durante la noche (ON1)
- AM: Subcultivar 80 ul (1%) ON1 en un tubo nuevo de 8 ml (DC1). Utilizar cultivo ON1 para alimentación forzada oral AM.
- PM: Utilizar el cultivo DC1 para alimentación forzada oral PM.

5

La cepa bacteriana N° 675 se cultivó usando stocks de glicerol.

10 Los stocks de glicerol se almacenaron a -80° C. Tres veces a la semana, las reservas de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se pusieron en rayas en placas YCFA. Se usó una nueva alícuota de glicerol en cada ocasión. Se permitió que las bacterias crecieran en una placa dada durante hasta 72 horas.

15 Las soluciones a administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas para los tratamientos de la mañana (AM) y la tarde (PM). Se recogió una colonia bacteriana de la placa con rayas y se transfirió a un tubo que contenía medio YCFA. La cepa bacteriana N° 675 se dejó crecer durante 16 horas antes de las administraciones AM. Las bacterias se subcultivaron al 1% en medios YCFA para administraciones PM. Los valores de OD se registraron para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de la mañana y la tarde.

Modelo de ratón de artritis inducida por colágeno tipo II

20 Se asignaron aleatoriamente ratones DBA/1 macho adultos a grupos experimentales y se les permitió aclimatarse durante dos semanas. El día 0, se les administraron a los animales mediante inyección subcutánea 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, se les administró a los animales mediante inyección subcutánea una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante de Freund incompleto.

30 Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa de administración siguiente. Desde el día -14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se pesaron tres veces a la semana. Desde el día 21 hasta el final del experimento, se puntuó a los animales tres veces por semana para los signos clínicos de artritis que incluían hinchazón de las patas traseras y delanteras, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y las articulaciones tibio-tarsales (tobillo).

El día 45 se sacrificaron los ratones y se tomaron muestras de sangre terminal para análisis de citoquinas.

35 El día -14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales para análisis microbiológicos, se congelaron al instante inmediatamente y se almacenaron a -80° C.

40 El modelo de ratón para la artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón bien establecido para la artritis reumatoide [67]. La inmunización con CII provoca una patogénesis que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoide, incluyendo la hiperplasia sinovial, la infiltración de células mononucleares y la degradación del cartilago. Significativamente, el desarrollo de la CIA está mediado por células Th17 a través de la secreción de IL-17A [68]. La respuesta inmune subyacente en el modelo de artritis se ve reforzada por el uso del adyuvante de Freund suplementado con *Mycobacterium tuberculosis*.

45 El día 21, se recogieron los bazo de tres animales satélites en cada grupo. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Las citoquinas, incluyendo TNF-α, IL-6, IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-17, se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo y en suero terminal por Luminex. La proliferación celular se cuantificó usando un método de incorporación de timidina tritiada.

50 Grupos de tratamiento y dosis

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

55 El vehículo usado para los productos bioterapéuticos fue el medio de extracto de levadura-casitona-ácidos grasos (YCFA).

	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de enfermedad
			Vía	Régimen	
60	1 Vehículo	5 ml /kg	PO	BID: Día -14 * -Fin	Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC
	4 Bioterapéutico N° 675	5 ml /kg			Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC
PO: alimentación forzada oral, SC: inyección subcutánea, BID: dos veces al día, CFA: adyuvante completo de Freund. * Excepto el Grupo 4 tratado desde el Día 0.					

65 Pesos corporales

Desde el día -14 hasta el final del experimento, los animales se pesaron tres veces a la semana. Los datos se presentaron en gráficos (Media \pm SEM).

5 **Observaciones clínicas no específicas**

Desde el día -14 hasta el final del experimento, los animales se revisaron diariamente para detectar signos clínicos inespecíficos que incluyan postura anormal (encorvado), condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles de actividad anormales (actividad reducida o aumentada).

10

Observaciones clínicas

Desde el día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se puntuaron tres veces a la semana para detectar signos clínicos de artritis que incluyen inflamación de las patas traseras y delanteras, articulaciones radiocarpianas (muñeca) y articulaciones tibio-tarsales (tobillo). Cada extremidad se puntuó usando la escala siguiente: (0) normal, (1) hinchazón ligera, (2) hinchazón leve, (3) hinchazón moderada y (4) hinchazón grave. Se calculó una puntuación clínica sumando cada puntuación de extremidad. La puntuación clínica máxima posible para un animal fue (16). Los animales con un puntuación igual a (12) en dos ocasiones consecutivas y los animales con un puntuación mayor de (12) en cualquier ocasión fueron sacrificados. Los datos se representaron en gráficos (Media \pm SEM).

15

20

Análisis de proliferación celular

El día 21, se sacrificaron tres animales satélites por grupo y se diseccionaron los bazos. Las células de 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 se representaron en gráficos (Media \pm SEM). Se tomaron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de citoquinas clave.

25

30 **Análisis de citoquinas**

Los sobrenadantes terminales de los cultivos de células de bazo se probaron para cuantificar TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 por Luminex. Los datos se representaron en gráficos (Media \pm SEM).

35

Análisis microbiológico

El día -14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales de cada animal, se congelaron al instante inmediatamente y se almacenaron a -80° C. El intestino ciego (incluido el contenido) se congeló inmediatamente y se almacenó a -80° C. Una prueba de identificación bacteriana se realizó diariamente mediante colocación en placas de la bacteria.

40

Histopatología

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

50

Tabla 1: Sistema de puntuación de histopatología

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial leve con inflamación dominada por neutrófilos. Bajo número de neutrófilos y macrófagos en el espacio articular.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que involucra tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio articular; puede haber algún resto de tejido necrótico.
3	Hiperplasia sinovial con marcada inflamación que involucra neutrófilos y macrófagos. Pérdida de revestimiento de sinoviocitos. La inflamación puede extenderse desde la sinovial al tejido circundante, incluido el músculo. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio articular, junto con importantes restos de tejido necrótico.

55

60

65

(continuación)

Grado	Descripción
Inflamación	
Daño del cartílago articular	
0	Articulación normal
1	El cartílago articular muestra solo un cambio degenerativo leve. La formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente.
2	El cartílago articular muestra un cambio degenerativo moderado y pérdida focal. La formación de Pannus está presente focalmente.
3	Interrupción significativa y pérdida de cartílago articular con amplia formación de pannus.
Daño al hueso metafisario subyacente	
0	Articulación normal
1	Ningún cambio en el hueso metafisario subyacente.
2	Puede haber necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
3	Interrupción o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensa, necrosis o fibrosis que se extiende hasta el espacio medular de la metafisis.

Resultados y análisis**Supervivencia y observaciones clínicas no específicas**

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

Un animal en el Grupo 1 fue sacrificado (tratado con vehículo, el animal llegó del proveedor con la pierna rota).

Once animales se sacrificaron debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis: cinco animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y seis animales en el Grupo 4 (tratados con bioterapéutico N° 675).

Cinco animales se sacrificaron debido a la gravedad de los signos clínicos inespecíficos, incluyendo postura anormal (encorvado), condición anormal del pelaje (piloerección), niveles de actividad anormales (actividad reducida): tres animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y dos animales en el Grupo 4 (tratados con bioterapéutico N° 675).

Pesos corporales

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 comparaciones múltiples 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 animales sacrificados antes del final programado del experimento se excluyeron de los análisis.

En comparación con el día -14, las administraciones dos veces al día por alimentación forzada oral indujeron una pérdida de peso corporal significativa en el grupo tratado con vehículo el día -9 y el día -7.

Los pesos corporales del grupo 4 (no tratados hasta el día 0 y luego tratados con bioterapéutico N° 675) fueron significativamente más altos que en el grupo tratado con vehículo desde el día -11 hasta el día -1 ($p < 0,0001$ excepto el día -4 donde $p < 0,05$).

Los pesos corporales medidos entre el día -14 y el día -1 en los grupos tratados con bioterapéuticos no diferían de los pesos corporales medidos en el grupo tratado con vehículo en un día determinado.

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

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.

En comparación con el grupo tratado con vehículo, los pesos corporales fueron significativamente mayores en el Grupo 4 (tratado con bioterapéutico N° 675) el día 3, día 5, día 10 ($p < 0,05$) y el día 26 ($p < 0,001$).

Al analizar los datos mediante ANOVA de una vía, los pesos corporales fueron significativamente más altos en el Grupo 4 (tratado con bioterapéutico N° 675) en comparación con el grupo tratado con vehículo el día 28 ($p < 0,01$). No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en el día 35 o el día 42.

Observaciones clínicas

Los datos de la puntuación clínica se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples 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 presentaron 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 artritis, se informó la última puntuación registrada para los días siguientes y se usó en los análisis estadísticos.

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.

El bioterapéutico N° 675 no redujo las puntuaciones clínicas en comparación con el grupo tratado con vehículo. Los animales de este grupo fueron inmunizados en un momento diferente en comparación con otros grupos experimentales, lo que puede explicar las puntuaciones clínicas más altas observadas.

Análisis de proliferación celular

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

Se observaron respuestas proliferativas fuertes a anti-CD3/CD28 en todos los grupos experimentales, mostrando que las células eran sanas, viables y capaces de responder a las señales de activación.

Para probar la respuesta proliferativa en presencia de colágeno II (CII), se cultivaron esplenocitos en presencia de CII a 50 $\mu\text{g/ml}$. La respuesta proliferativa de esplenocitos a CII se analizó mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Sidak para realizar comparaciones múltiples entre esplenocitos no estimulados y estimulados por CII y ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparar la respuesta estimulada por CII en diferentes grupos experimentales con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 22.

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

La proliferación de esplenocitos para el grupo tratado con bioterapéutico N° 675 se estableció en un día diferente, por lo tanto, la comparación con el grupo tratado con vehículo no se realizó, aunque se observó una reducción notable.

Niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de tejidos

Se midieron los niveles de cada citoquina en sobrenadantes de cultivo de tejidos derivados de cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 mediante análisis luminex. Estos mostraron respuestas robustas para todas las citoquinas medidas (los niveles medios en el grupo de vehículos 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).

Las siguientes secciones resumen los datos obtenidos de los cultivos estimulados con Colágeno II. En su caso, los análisis estadísticos de las diferencias entre los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de esplenocitos no estimulados y estimulados con CII se realizaron usando ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Sidak para comparaciones múltiples, mientras que se usó ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por CII en grupos tratados con bioterapéuticos con el grupo tratado con vehículo. No hubo diferencias significativas en los niveles de citoquinas entre los grupos en ambos casos. Esto probablemente se deba al pequeño tamaño de muestra usado ($n = 3$).

Para presentar con más precisión la distribución de los datos para las citoquinas con una distribución sustancial de los datos, estos se presentan como diagramas de dispersión.

Las medias de grupo de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con CII fueron <5pg/ml. Estas no se consideran biológicamente significativas y no se incluyen aquí. Las medias de grupo de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con colágeno estaban por debajo del límite de cuantificación.

5

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (Figura 23)

Junto con IL-17, IFN- γ es la principal enfermedad de conducción de citoquinas en el modelo de CIA. El diagrama de dispersión en la Figura 23 demuestra los niveles de IFN- γ después de la estimulación con CII, siendo la mediana del grupo mayor para el grupo tratado con vehículo en comparación con el bioterapéutico (ver Figura 27)

10

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

Los niveles de IL-17A fueron de 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 de bioterapéutico en comparación con el grupo tratado con vehículo (ver Figura 27)

15

Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

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. Pueden esperarse 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 estar acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatorio.

20

Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

Las citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α no se producen típicamente en niveles altos en cultivos anti-CII. Sin embargo, sus niveles pueden verse alterados como resultado de la modulación inmune. Los niveles de IL-6 en cultivos estimulados con CII fueron modestos, alcanzando 10pg/ml. Aunque mayor que en los cultivos de control de medios, estas diferencias fueron demasiado pequeñas para proporcionar una justificación para realizar análisis estadísticos.

30

Sobrenadantes de cultivo de tejidos en el Grupo 4 - Bioterapéutico N° 675 (Figura 27)

Los cultivos de esplenocitos para este grupo se establecieron en un día diferente y, por lo tanto, están separados del grupo tratado con vehículo. Aunque las comparaciones directas pueden no ser apropiadas, parece que el tratamiento con Bioterapéutico N° 675 fue eficaz para reducir los niveles de IFN- γ , IL-17A e IL-6.

35

Análisis microbiológico

40

El crecimiento bacteriano se confirmó midiendo la densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro. La identidad bacteriana se confirmó comparando imágenes de placas rayadas con imágenes de referencia.

Siguiendo el método mejorado de preparación bacteriana, se administraron consistentemente altas dosis de cepa bacteriana desde el día -2 y día -3 (excepto la cepa N° 675 del día 0) como se indica por los altos valores de OD medidos.

45

Se recogieron muestras fecales y se congelaron al instante el día 14, día 0 y a la finalización.

Histopatología

50

Los resultados de la histopatología se muestran en las Figuras 66-71. Como se esperaba para este modelo, se observó variabilidad intraindividual e interindividual en términos de la presencia/ausencia de artritis o la gravedad del cambio presente.

55

La naturaleza de la patología fue como se esperaba para este modelo, con una inflamación crónica activa mixta extensa de la sinovial y la bolsa extendiéndose para involucrar los tejidos blandos periarticulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico). En las articulaciones más gravemente afectadas, hubo degeneración y pérdida de cartílago articular con restos intraarticulares e inflamación, y alteración de la estructura articular y ósea por fibrosis e inflamación.

60

La incidencia de cambios histopatológicos fue: vehículo - 80% (16/20); Bioterapéutico N° 675 - 83% (20/24). El bioterapéutico # 675 fue eficaz para reducir el daño histopatológico observado en las articulaciones de las extremidades posteriores y reducir las puntuaciones de inflamación articular, puntuaciones de daño al cartílago, puntuaciones de daño óseo y puntuaciones de histopatología total (ver la Figura 70), aunque no se pudieron realizar

65

comparaciones estadísticas con el grupo de vehículo.

Resumen

5 Se observaron puntuaciones clínicas aumentadas desde el día 28 después de la primera administración de colágeno tipo II, como se esperaba en este modelo de artritis en ratones DBA/1. El bioterapéutico N° 675 demostró ser eficaz en el tratamiento de la artritis en este modelo. Los animales tratados con bioterapéutico N° 675 se inmunizaron en un momento diferente en comparación con el grupo tratado con vehículo, lo que puede explicar las puntuaciones clínicas más altas observadas. Sin embargo, el bioterapéutico N° 675 fue eficaz para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se demostró en el análisis histopatológico.

10 Se observaron respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. No se realizaron estadísticas para cultivos del bioterapéutico N° 675, ya que se establecieron en un momento diferente, pero se observó una reducción en la respuesta específica de colágeno con respecto al control.

15 La mayoría de las citoquinas de células T analizadas mostraron aumentos detectables entre los controles estimulados con Colágeno II y los medios en el grupo tratado con vehículo. Estos aumentos no fueron tan obvios en el grupo tratado con bioterapéutico. Esto apoya ampliamente las respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II descritas anteriormente. Hubo evidencia de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patogénica en este modelo y en la AR humana. La correlación de niveles reducidos de citoquinas con proliferación reducida sugiere una modulación inmune. No hubo evidencia de que esta modulación fuera resultado de niveles mejorados de IL-4 asociada a Th2 o de aumentos en la citoquina inmunomoduladora, IL-10.

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

Los ratones probados en el Ejemplo 1 se sometieron a análisis adicionales para caracterizar aún más el efecto de las composiciones de la invención sobre la respuesta inflamatoria al asma alérgica.

30 Materiales y métodos

Extracción de sangre y preparación de suero en 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 minutos a 14000 g y se almacenó a -20° C.

Extracción de órganos el día 14. Recogida del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para análisis histológico de seguimiento. Recogida de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación instantánea y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló al instante para análisis de seguimiento.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL

45 La producción de anticuerpos IgG1 específicos para IgE total y ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en BAL y suero mediante ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y análisis histológico.

50 Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento, y tinción 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 inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y producción de moco. La infiltración inflamatoria se puntuó con el siguiente sistema de clasificación:

- 55 0 - normal
1 - infiltrados inflamatorios leves
2 - infiltrados inflamatorios moderados
3 - infiltrados inflamatorios marcados
4 - infiltrados inflamatorios graves
60 5 - infiltrados inflamatorios muy graves

En cada campo de visión, se midió el tamaño de las vías respiratorias y se cuantificaron los números de células mucosas/um.

65 **Medición de mediadores inflamatorios en el tejido pulmonar.**

Los lóbulos pulmonares derechos (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 por ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados y análisis

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

En apoyo de los descubrimientos descritos en el Ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de ratones tratados con la cepa 675 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en la puntuación de inflamación media (ver Figuras 32 y 34)

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 en suero. Esto puede reflejar un fallo 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 esperaría. Además, los niveles de anticuerpos en suero basales podrían haber enmascarado cualquier cambio.

De manera similar, no se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citoquinas en el tejido pulmonar (ver Figuras 36-46). De nuevo, esto puede reflejar un fallo 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 esperaría. También es posible que el mecanismo de acción involucrado influya en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de las vías aéreas HDM. Se debe tener cuidado cuando se interpretan 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 totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación.

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

Los ratones probados 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

Extracción de órganos el día 18. Recogida del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para análisis histológico de seguimiento. Recogida de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación instantánea y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló instantáneamente para análisis de seguimiento.

Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar (análisis de seguimiento). Los lóbulos pulmonares derechos (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 por ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL (análisis de seguimiento). La producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en BAL y suero mediante ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y análisis histológico (análisis de seguimiento). Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento y tinción 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 inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y 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 graves
- 5 - infiltrados inflamatorios muy graves

Resultados y análisis

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

5 Un análisis adicional de los niveles de anticuerpos reveló que la eficacia de la cepa bacteriana 675 también se reflejó en niveles reducidos de IgG1 específica de HDM en el fluido BAL y el suero (ver Figuras 47 y 49). No se pueden extraer conclusiones firmes con respecto a un efecto sobre los niveles de IgG2a. En general, los datos del análisis de anticuerpos sugieren una reducción relacionada con una respuesta inflamatoria reducida global, en oposición a un efecto selectivo sobre el cambio de isotipo de anticuerpo.

10 El análisis histológico apoyó el recuento diferencial de células del fluido BAL, mostrando un infiltrado celular reducido en ratones tratados con la Cepa 675 (ver Figuras 51-53)

15 En relación con los niveles de citoquinas, como en el Ejemplo 4, la propagación de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como necesariamente se esperaría. También es posible que el mecanismo de acción implique influir en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de vías respiratorias de HDM. Se debe tener cuidado cuando se interpretan 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 totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se mostró un efecto antiinflamatorio claro sobre los niveles de citoquinas para la cepa 675, y el control positivo anti-IL-17 Ab se comportó generalmente como se esperaba.

25 Con las advertencias anteriores, los datos en las Figuras 56, 58, 59, 61 y 63 sugieren que el tratamiento con las cepas bacterianas de la invención puede lograr una reducción en los niveles de IL-1b, IFN γ , RANTES, MIP-1a y KC (el ortólogo de ratón de la IL-8 humana), lo que puede ser indicativo de un mecanismo de acción relacionada con las influencias sobre la liberación de quimiocinas (y, por lo tanto, el reclutamiento de células) por las células inmunes estromales o innatas. Estas citoquinas son parte de la vía de Th17. Tomando estos conjuntos de datos juntos, se puede llegar a una conclusión clara de que la Cepa 675 fue altamente eficaz para proteger a los ratones contra la inflamación en este modelo de asma neutrofílica grave.

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

35 A los ratones se les administraron composiciones que comprendían cepas bacterianas de acuerdo con la invención y los ratones se inmunizaron posteriormente con glucoproteína oligodendrocítica de mielina para inducir encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es el modelo experimental más comúnmente usado 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

45 675: bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 42408

Diseño del estudio

50 Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con vehículo de control (por vía oral).
3. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 675 (por vía oral).
9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).
10. Grupo de control no tratado.

55 Número de ratones por grupo = 10

60 Días -14 a día 27: administración diaria del control de vehículo por vía oral (Grupo 1).
 Días -14 a día 27: administración diaria de inóculo bacteriano terapéutico por vía oral (Grupo 4).
 Días 0-28: administración de dexametasona (i.p.) tres veces por semana (Grupo 9)
 Día 0: MOG35-55 (glicoproteína de oligodendrocitos de mielina - 2 mg/ml) y CFA (2 mg/ml de MTB) se mezclaron 1:1 dando como resultado soluciones de 1 mg/ml. Se inyectaron 100 μ l de la mezcla 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).
 65 Días 7 en adelante: medición de la incidencia de la enfermedad y el peso tres veces por semana.

Puntos finales y análisis

5 Los ratones se analizaron para determinar la incidencia y la gravedad de la enfermedad tres veces a la semana. La puntuación se realizó a ciegas. La gravedad de la enfermedad se evaluó usando una puntuación clínica que varía de 0 a 5, donde 5 indica un ratón muerto (ver el sistema de puntuación clínica a continuación).

Monitorización

10 En los días indicados, se pesaron los ratones y se observó la puntuación de actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

Observaciones de puntuación de actividad de la enfermedad:

- 15 0 - No hay cambios obvios en la función motora en comparación con los ratones no inmunizados.
 0.5 - La punta de la cola está flácida.
 1.0 - Cola flácida.
 1.5 - Cola flácida e inhibición de la pata trasera.
 20 2.0 - Cola flácida y debilidad de las patas traseras.
 O - Hay signos obvios de inclinación de la cabeza cuando se observa la marcha. El equilibrio es pobre.
 2.5 - Cola flácida y arrastre de las patas traseras.
 25 - O - hay una fuerte inclinación de la cabeza que ocasiona que el ratón se caiga ocasionalmente.
 3.0 - Cola flácida y parálisis completa de las patas traseras.
 3.5 - Cola flácida y parálisis completa de las patas traseras.
 Además de: el ratón se mueve alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no es capaz de enderezarse.
 30 Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo.
 4.0 - Cola flácida, parálisis completa de pata trasera y parcial de la pata delantera.
 - El ratón se mueve mínimamente alrededor de la jaula, pero parece estar alerta y alimentándose
 35 4.5 - Parálisis completa de las patas traseras y parcial de las frontales, sin movimiento alrededor de la jaula.
 El ratón se sacrifica inmediatamente y se retira de la jaula.
 5.0 El ratón se sacrifica debido a una parálisis grave.

40 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

45 Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 72 y 73.

50 La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo tuvo éxito con puntuaciones altas mostradas por el vehículo de control y el control no tratado. El efecto del tratamiento con la cepa 675 fue sorprendente y los ratones tratados con la cepa 675 mostraron una incidencia y gravedad de la enfermedad notablemente reducidas. De hecho, la reducción en la incidencia y la gravedad de la enfermedad fue comparable al grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 675 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

Ejemplo 7-Prueba de estabilidad

55 Una composición descrita en la presente que contiene por lo menos una cepa bacteriana descrita en la presente se almacena en un recipiente sellado a 25° C o 4° C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses,
 60 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, por lo menos un 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana permanecerá medido en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Secuencias

65 SEQ ID NO:1 (gen de *Bacteroides coprocola* para ARNr 16S, secuencia parcial, cepa: M11 - AB200223)

ES 2 748 826 T3

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt
 5 121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga aagattaata cctgatagta
 181 tggtgagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc
 241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctgcga tggatagggg ttctgagagg
 301 aagggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg
 10 361 aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta
 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta cgtgtaggat tttgtatgta
 481 ccgatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacag gaggatgcga
 15 541 gcgttatccg gattttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga
 601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggt ttccttgagt gcagttgagg
 661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag
 20 721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacggt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga
 781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctgttggc gatatactgt
 841 cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac
 901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac
 25 961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaaactt gtaagccgca
 1021 aggcgtctgt gaagggtgctg catggttgtc gtcagctcgt gccgtgaggt gtcggcttaa
 1081 gtgccataac gagcgcaacc ctcgtggtca gttactaaca ggttaagctg agggctctgg
 30 1141 ccagactgcc atcgtaatgat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatacag cacggccctt
 1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggccgctac ccggcaacgg
 1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaacccg actccacgaa
 35 1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg
 1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag
 1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca aggtaaccaa g

40 SEQ ID NO:2 (gen de *Bacteroides coprocola* para ARNr 16S, secuencia parcial, cepa: M16 - AB200224)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt
 45 121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga aagattaata cctgatagta

ES 2 748 826 T3

181 tgggtgagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc
 241 attaggtagt agggcgggta acggcccacc tagcctgcga tggatagggg ttctgagagg
 301 aagggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg
 5 361 aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta
 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta cgtgtaggat tttgtatgta
 481 ccgtatgaat aagcatcggc taactcctg ccagcagccg cggtaatac gaggatgcga
 10 541 gcgttatccg gattttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga
 601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggg ttccttgagt gcagttgagg
 661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag
 15 721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga
 781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctggtggc gatatactgt
 841 cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac
 20 901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac
 961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaaactt gtaagccgca
 1021 aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgct gtcagctcgt gccgtgaggg gtcggcttaa
 1081 gtgccataac gagcgcgaacc ctcgtggtca gttactaaca ggttaagctg agggctctgg
 25 1141 ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatcag cacggccctt
 1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggccgctac ccggcaacgg
 1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaacccg actccacgaa
 30 1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg
 1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagcc ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag
 1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca aggtaaccaa

35 SEQ ID NO:3 (gen de *Bacteroides coprocola* para ARNr 16S, secuencia parcial, cepa: M158 - AB200225)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt
 40 121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga aagattaata cctgatagta
 181 tgggtgagatt gcatgatagc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc
 241 attaggtagt agggcgggta acggcccacc tagcctncga tggatagggg ttctgagagg
 301 aagggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg
 45 361 aatattggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta
 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtatccta cgtgtaggat tttgtatgta
 481 ccgtatgaat aagcatcggc taactcctg ccagcagccg cggtaatac gaggatgcga
 50 541 gcgttatccg gattttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga
 601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggg ttccttgagt gcagttgagg
 661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag
 55 721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga
 781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctggtggc gatatactgt
 841 cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac
 901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac
 60 961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaaactt gtaagccgca
 1021 aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgct gtcagctcgt gccgtgaggg gtcggcttaa
 1081 gtgccataac gagcgcgaacc ctcgtggtca gttactaaca ggttaagctg aggactctgg
 65 1141 ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatcag cacggccctt

ES 2 748 826 T3

1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggcagctac cgggcgacgg
 1261 gatgccaate cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaacccg actccacgaa
 1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc cggggccttg
 1381 tacacaccgc cegtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag
 1441 cgccctaggg taaaaccggg aattggggct aagtcgtaac aaggtaacca a

SEQ ID NO:4 (secuencia de ARNr 16S de consenso para cepa 675)

10 GTCTGGCTCAKGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGAACTTAGCTTGCTAAGT
 TTGATGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTCCCGCTTACTCAGGAATAGCCTTTTCGAAAGAAAG
 ATTAATGCCTGATGGTATCTTAAGCACACATGTAATTAAGATTAAGATTTATCGGTAAGCGATGGGGATGCGTTCC
 15 ATTAGGTAGTAGGCGGGTAACGGCCACCTAGCCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCCACATTGG
 AACTGAGACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAGCCTGAACCAGCC
 AAGTAGCGTGAAGGATGAAGGTCCATGGATTGTAACTTCTTTTATACGGGAATAAAGTGGTCCACGTGTGGGCCT
 TTGCATGTACCGTATGAATAAGCATCGGCTAACCTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGATGCCAGCGTTATC
 20 CGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGGATTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGGCTCAACCGTAAATTT
 GCAGTTGATACTGGTTCCCTTGAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA
 CGAAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCTGTAAC TGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGG
 ATTAGATAACCTGGTAGTCCACACGGTAAACGATGGATACTCGCTGTTGGCGATATACTGTCAGCGGCCAAGCGAAA
 GCATTAAGTATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGA
 25 GGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTAAATTGCAGACGAATTACTTGAAACAG
 GTAAGCCGCAAGGCGTCTGTGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCAT
 AACGAGCGCAACCTCGTGGCCAGTTACTAGCAGGTAACGCTGAGGACTCTGGCCAGACTGCCATCGTAAGATGCGA
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGAGGTACAGAA
 30 GGCAGCTACCCGGCGACGGGATGCCAATCTCAAAGCCTCTCTCAGTTCCGACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACG
 AAGCTGGATTGCTTAGTAATCGCGCATCAGCCACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCCGCCGTC
 AAGCCATGAAAGCCGGGAGTACCTGAAGTGCCTAACCGCAAGGAGCGCCCTAGGGTAAAACCGGTAATTGGGGCTAA
 GTCNTACGGGG

SEQ ID NO:5 (gen de *Bacteroides thetaiotaomicron* para ARNr 16S, secuencia parcial - M58763)

35 1 cttntacaat gaagagtttg atcctggctc aggatnaacg ctagctacag gcttaacaca
 61 tgcaagtcna ggggcagcat ttcagtttgc ttgcaaactg gagatggcga cgggcgacag
 121 ggtgagtaac acgtatccaa cctgocgata actcggggat agcctttcga aagaagatt
 40 181 aatacccnat ggtataatca gaccgcatng tcttrttatt aaagaatttc ggttatcgat
 241 ggggatgcgt tccattaggc agttggtag gtaacggctc acnnaacctt cgatggatag
 301 gggttctgag aggaaggtcc cccacattgg aactgagaca cgggtccaaac tcctacggga
 45 361 ggcagcagtg aggaatattg gtcaatgggc gcaggcctga accagccaag tagcgtgaag
 421 gatgactgcc ctatgggttg taaacttctt ttatatggga ataaagtttt ccacgtgtgg
 481 aatthttgat gtaccatatg aataaggatc ggctaactcc gtgccagcag ccncgnatn
 50 541 acggagnatc cgagcgttat cgggatttat tgggttttaa gggagcgtag gtggacagtt
 601 aagtcagttg tgaagtttg cggctcaacc gtaaaattgc agttgatact ggctgtcttg
 661 agtacagtag aggtgggocg aattcgtggt gtagcgggta aatgcttaga tatcacgaag
 721 aactccgatt gcgaaggcag ctcactggac tgcaactgac actgatgctc gaaagtgtgg
 55 781 gtatcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacacagta aacgatgaat actcgtgtt
 841 tgcgatatac agtaagcggc caagcgaaag cattaagtat tccacctggg gagtacgccg
 901 gcaacggtga aactcaaagg aattgacggg ggcncgcaca agcggaggaa catgtggttt
 60 961 aattcagatga tacgagagga accttaccg ggcctaaatt gcatttgaat atattggaaa
 1021 cagtatagcc gyaaggcaaa tgtgaaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga
 1081 ggtgtcggct taagtgccat aacgagcgca accttatct ttagttacta acaggtcatg
 65 1141 ctgaggactc tagagagact gcgctcgtaa gatgtgagga aggtggggat gacgtcaaat

1201 cagcacngcc cntacgtccg gggctacaca cgtggtacaa tgggggggtac agaaggcagc
 1261 tacctggtga caggatgcta atccccaaaag cctctctcag ttcggatcga agtctgcaac
 5 1321 ccgacttcgt gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg
 1381 ttcccgggcn ttgtacacac cgcccgtcaa gccatgaaag ccgggggtac ctgaagtacg
 1441 taaccgcaag gagcgtccta gggtaaaact ggtaattggg gc

10 SEQ ID NO:6 (secuencia de cromosomas de la cepa 675) - ver listado de secuencia electrónico de la WO 2016/203217.

SEQ ID NO:7 (secuencia de plásmidos de la cepa 675) - ver listado de secuencia electrónico de la WO 2016/203217

15 **REFERENCIAS**

[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
 20 [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.
 25 [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
 30 [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
 [15] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
 [16] Kitahara et al. (2005) *Int J Syst Evol Microbiol.* 55(Pt 5):2143-7.
 [17] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
 [18] Srutková *et al.* (2011) *J Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
 35 [19] Ye et al. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
 [20] Fabro et al. (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
 [21] Yin et al. (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
 [22] Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.
 [23] Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
 40 [24] Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
 [25] Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
 [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
 [27] Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
 [28] Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.
 45 [29] Koenders et al. (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
 [30] Amedei et al. (2012) *Int J Mol Sci.* 13(10):13438-60.
 [31] Shabgah et al. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
 [38] Zhang (2015) *Inflammation.* Aug 23.
 [39] Sun et al. (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
 50 [40] Mucientes et al. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
 [41] Jawad et al. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
 [42] Maya et al. (2014) *J Ophthalmology.* 310329
 [43] Chi et al. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
 [44] Chi et al. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
 55 [45] Luger and Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143.
 [46] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.
 [47] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,* ed. by Day and McLellan, Humana Press.
 [48] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
 [49] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
 60 [50] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
 [51] *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* 2ª Edición, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
 [52] *Remington's Pharmaceutical Sciences,* Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [53] *Handbook of Microbiological Media,* Cuarta Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 /54/ *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 65 [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.

- 5 [56] "Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term Storage of Plasmids" Addgene - <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/create-glycerol-stock/>
- [57] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
- [58] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [59] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [60] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- 10 [61] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [62] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [63] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
- [64] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [65] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Suplemento 30
- 15 [66] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- [67] Brand et al. (2007) Nature Protocols. 2(5):1269-1275
- [68] Jiao et al. (2014) Immunopathology and Infectious Diseases. 184(4): 1085-93.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
- <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS
- 25 <130> P065778WO
- <150> GB 1510470.6
- <151> 2015-06-15
- 30 <150> GB 1520510.7
- <151> 2015-11-20
- <150> GB 1603786.3
- <151> 2016-03-04
- 35 <160> 5
- <170> SeqWin2010, versión 1.0
- 40 <210> 1
- <211> 1491
- <212> ADN
- <213> Bacteroides coprocola
- 45 <400> 1

ES 2 748 826 T3

	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agctacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcatga	acttagcttg	ctaagtttga	tggcgaccgg	cgcacgggtg	agtaaacacgt	120
	atccaacctt	ccgtttactc	agggatagcc	tttcgaaaga	aagattaata	cctgatagta	180
5	tggtgagatt	gcatgatggc	accattaaag	atattattgg	aaacgatggg	gatgcttcc	240
	attaggtagt	aggcggggta	acggcccacc	tagcctgcga	tggatagggg	ttctgagagg	300
	aaggtcccc	acattggaac	tgagacacgg	tccaaactcc	tacgggaggc	agcagtgagg	360
	aatattggtc	aatgggag	agcctgaacc	agccaagtag	cgtgaaggat	gaaggtccta	420
	cggattgtaa	acttctttta	tacgggaata	aagtttccta	cgtgtaggat	tttgtatgta	480
10	ccgtatgaat	aagcatcggc	taactccgtg	ccagcagccg	cggtaatac	gaggatgcga	540
	gcgttatccg	gatttattgg	gtttaaagg	agcgcagacg	ggagattaag	tcagttgtga	600
	aagtttgcg	ctcaaccgta	aaattgcagt	tgatactggt	ttccttgagt	gcagttgagg	660
	caggcgaat	tcgtggtgta	gcggtgaaat	gcttagatat	cacgaagaac	cccgattgag	720
	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacggt	catgctcgaa	agtgtgggta	tcaaacagga	780
15	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact	cgctggtggc	gatatactgt	840
	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag	tacgcccggc	acggtgaaac	900
	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat	gtggtttaat	tcgatgatac	960
	gcgaggaacc	ttaccggggc	ttaaattgca	gacgaattac	gaggaaactt	gtaagccgca	1020
	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgtc	gtcagctcgt	gccgtgaggt	gtcggcttaa	1080
20	gtgccataac	gagcgaacc	ctcgtggtca	gttactaaca	ggttaagctg	agggctctgg	1140
	ccagactgcc	atcgtaagat	gtgaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcag	cacggccctt	1200
	acgtccgggg	ctacacacgt	gttacaatgg	gaggtacaga	aggccgctac	ccggcaacgg	1260
	gatgccaatc	cccaaaacct	ctctcagttc	ggactggagt	ctgcaaccgg	actccacgaa	1320
	gctggattcg	ctagtaatcg	cgcatcagcc	acggcgcggt	gaatacgttc	ccgggccttg	1380
25	tacacaccgc	ccgtcaagcc	atgaaagccg	ggggtacctg	aagtgcgtaa	ccgcaaggag	1440
	cgccctaggg	taaaaccggt	aattggggct	aagtctaaca	aggtaaccaa	g	1491

30 <210> 2
 <211> 1490
 <212> ADN
 <213> Bacteroides coprocola

35	<400> 2						
	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agctacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcatga	acttagcttg	ctaagtttga	tggcgaccgg	cgcacgggtg	agtaaacacgt	120
	atccaacctt	ccgtttactc	agggatagcc	tttcgaaaga	aagattaata	cctgatagta	180
40	tggtgagatt	gcatgatggc	accattaaag	atattattgg	aaacgatggg	gatgcttcc	240
	attaggtagt	aggcggggta	acggcccacc	tagcctgcga	tggatagggg	ttctgagagg	300
	aaggtcccc	acattggaac	tgagacacgg	tccaaactcc	tacgggaggc	agcagtgagg	360
	aatattggtc	aatgggag	agcctgaacc	agccaagtag	cgtgaaggat	gaaggtccta	420
	cggattgtaa	acttctttta	tacgggaata	aagtttccta	cgtgtaggat	tttgtatgta	480
45	ccgtatgaat	aagcatcggc	taactccgtg	ccagcagccg	cggtaatac	gaggatgcga	540
	gcgttatccg	gatttattgg	gtttaaagg	agcgcagacg	ggagattaag	tcagttgtga	600
	aagtttgcg	ctcaaccgta	aaattgcagt	tgatactggt	ttccttgagt	gcagttgagg	660
	caggcgaat	tcgtggtgta	gcggtgaaat	gcttagatat	cacgaagaac	cccgattgag	720
50	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacggt	catgctcgaa	agtgtgggta	tcaaacagga	780
	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact	cgctggtggc	gatatactgt	840
	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag	tacgcccggc	acggtgaaac	900
	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat	gtggtttaat	tcgatgatac	960
	gcgaggaacc	ttaccggggc	ttaaattgca	gacgaattac	gaggaaactt	gtaagccgca	1020
55	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgtc	gtcagctcgt	gccgtgaggt	gtcggcttaa	1080
	gtgccataac	gagcgaacc	ctcgtggtca	gttactaaca	ggttaagctg	agggctctgg	1140
	ccagactgcc	atcgtaagat	gtgaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcag	cacggccctt	1200
	acgtccgggg	ctacacacgt	gttacaatgg	gaggtacaga	aggccgctac	ccggcaacgg	1260
	gatgccaatc	cccaaaacct	ctctcagttc	ggactggagt	ctgcaaccgg	actccacgaa	1320
60	gctggattcg	ctagtaatcg	cgcatcagcc	acggcgcggt	gaatacgttc	ccgggccttg	1380
	tacacaccgc	ccgtcaagcc	atgaaagccg	ggggtacctg	aagtgcgtaa	ccgcaaggag	1440
	cgccctaggg	taaaaccggt	aattggggct	aagtctaaca	aggtaaccaa	g	1490

65 <210> 3

ES 2 748 826 T3

<211> 1491
 <212> ADN
 <213> Bacteroides coprocola

5 <400> 3

	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agctacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcatga	acttagcttg	ctaagtttga	tggcgaccgg	cgcacgggtg	agtaaacacgt	120
	atccaacctt	ccgtttactc	agggatagcc	tttcgaaaga	aagattaata	cctgatagta	180
10	tggtgagatt	gcatgatagc	accattaag	atattattggt	aaacgatggg	gatgcttcc	240
	attaggtagt	aggcggggta	acggcccacc	tagcctncga	tggatagggg	ttctgagagg	300
	aaggtcccc	acattggaac	tgagacacgg	tccaaactcc	tacgggaggg	agcagtgagg	360
	aatattggtc	aatgggag	agcctgaacc	agccaagtag	cgtgaaggat	gaaggtccta	420
15	cggattgtaa	acttctttaa	tacgggaata	aagtatccta	cgtgtaggat	tttgtatgta	480
	ccgtatgaat	aagcatcggc	taactccgtg	ccagcagccg	cggtaatacg	gaggatgcga	540
	gcgttatccg	gatttattgg	gtttaaaggg	agcgcagacg	ggagattaag	tcagttgtga	600
	aagtttgcg	ctcaaccgta	aaattgcagt	tgatactggt	ttccttgagt	gcagttgagg	660
	caggcggaa	tcgtggtgta	gcggtgaaat	gcttagatat	cacgaagaac	cccgattgcg	720
20	aaggcagctt	gctaaactgt	aactgacggt	catgctcgaa	agtgtgggta	tcaaacagga	780
	ttagataccc	tggtagtcca	cacggtaaac	gatggatact	cgctggtggc	gatatactgt	840
	cagcggccaa	gcgaaagcat	taagtatccc	acctggggag	tacgccggca	acggtgaaac	900
	tcaaaggaat	tgacgggggc	ccgcacaagc	ggaggaacat	gtggtttaat	tcgatgatac	960
	gcgaggaacc	ttaccggggc	ttaaattgca	gacgaattac	gaggaaactt	gtaagccgca	1020
25	aggcgtctgt	gaaggtgctg	catggttgtc	gtcagctcgt	gccgtgaggt	gtcggcttaa	1080
	gtgccataac	gagcgcaacc	ctcgtggtca	gttactaaca	ggttaagctg	aggactctgg	1140
	ccagactgcc	atcgtaaagat	gtgaggaagg	tggggatgac	gtcaaatcag	cacggccctt	1200
	acgtccgggg	ctacacacgt	gttacaatgg	gaggtacaga	aggcagctac	ccggcgacgg	1260
30	gatgccaatc	cccaaacctt	ctctcagttc	ggactggagt	ctgcaaccgg	actccacgaa	1320
	gctggattcg	ctagtaatcg	cgcatcagcc	acggcgcggg	gaatacgttc	ccgggccttg	1380
	tacacaccgc	ccgtcaagcc	atgaaagccg	ggggtacctg	aagtgcgtaa	ccgcaaggag	1440
	cgccttaggg	taaaaccggt	aattggggct	aagtcgtaac	aaggtaacca	a	1491

35 <210> 4
 <211> 1474
 <212> ADN
 <213> Bacteroides

40 <400> 4

	gtctggctca	kgatgaacgc	tagctacagg	cttaacacat	gcaagtcgag	gggcagcatg	60
	aacttagctt	gctaagtttg	atggcgaccg	gcgcacgggt	gagtaaacacg	tatccaacct	120
45	cccgttact	caggaatagc	ctttcgaaag	aaagattaat	gcctgatggt	atcttaagca	180

ES 2 748 826 T3

5
 10
 15
 20
 25

cacatgtaat	taagattaaa	gatttatcgg	taagcgatgg	ggatgcgttc	cattaggtag	240
taggcggggg	aacggccac	ctagccgacg	atggataggg	gttctgagag	gaaggtcccc	300
cacattggaa	ctgagacacg	gtccaaactc	ctacgggagg	cagcagtgag	gaatattggt	360
caatggggcg	gagcctgaac	cagccaagta	gcgtgaagga	tgaaggtcct	atggattgta	420
aacttctttt	atacgggaat	aaagtgggcc	acgtgtgggc	ctttgcatgt	accgtatgaa	480
taagcatcgg	ctaactccgt	gccagcagcc	gcggtaatac	ggaggatgcg	agcgttatcc	540
ggatttattg	ggtttaaagg	gagcgcagac	gggggattaa	gtcagttgtg	aaagtttgcg	600
gctcaaccgt	aaaattgcag	ttgatactgg	ttcccttgag	tgcagttgag	gcagggcgaa	660
ttcgtggtgt	agcggtgaaa	tgcatagata	tcacgaagaa	ccccgattgc	gaagggcagcc	720
tgctaagctg	taactgacgt	tgaggctcga	aagtgtgggt	atcaaacagg	attagatacc	780
ctggtagtc	acacggtaaa	cgatggatac	tcgctggtgg	cgatatactg	tcagcggcca	840
agcgaagca	ttaagtatcc	cacctgggga	gtacgccggc	aacggtgaaa	ctcaaaggaa	900
ttgacggggg	ccgcacaag	cggaggaaca	tgtggtttaa	ttcgatgata	cgcgaggaac	960
cttaccgggg	cttaaattgc	agacgaatta	cttggaaaca	ggtaagccgc	aaggcgtctg	1020
tgaaggtgct	gcatggttgt	cgtcagctcg	tgccgtgagg	tgtcggctta	agtgccataa	1080
cgagcgcaac	cctcgtggcc	agttactagc	aggtaacgct	gaggactctg	gccagactgc	1140
catcgtaaga	tgcgaggaag	gtggggatga	cgtcaaatca	gcacggccct	tacgtccggg	1200
gctacacacg	tgttacaatg	ggaggtacag	aaggcagcta	cccggcgacg	ggatgccaat	1260
ctccaaaagcc	tctctcagtt	cggactggag	tctgcaaccc	gactccacga	agctggattc	1320
gctagtaatc	gcgcatcagc	cacggcgcg	tgaatacgtt	cccgggcctt	gtacacaccg	1380
cccgtcaagc	catgaaagcc	gggagtacct	gaagtgcgta	accgcaagga	gcgccctagg	1440
gtaaaaccgg	taattggggc	taagtcntac	gggg			1474

<210> 5
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Bacteroides thetaiotaomicron

30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

cttntacaat	gaagagtttg	atcctggctc	aggatnaacg	ctagctacag	gcttaacaca	60
tgcaagtana	ggggcagcat	ttcagtttgc	ttgcaactg	gagatggcga	ccggcgcacg	120
ggtgagtaac	acgtatccaa	cctgccgata	actcggggat	agcctttcga	aagaaagatt	180
aatacccnat	ggtataatca	gaccgcatng	tcttrttatt	aaagaatttc	ggttatcgat	240
ggggatgcgt	tccattaggg	agttggtgag	gtaacggctc	acnnaacctt	cgatggatag	300
gggttctgag	aggaaggtcc	cccacattgg	aactgagaca	cggccaaac	tcctacggga	360
ggcagcagtg	aggaatattg	gtcaatgggc	gcagggcctga	accagccaag	tagcgtgaag	420
gatgactgcc	ctatgggttg	taaacttctt	ttatatggga	ataaagtfff	ccacgtgtgg	480
aattttgtat	gtaccatag	aataaggatc	ggctaactcc	gtgccagcag	ccncgntnat	540
acggagnatc	cgagcgttat	ccggatttat	tgggttttaa	gggagcgtag	gtggacagtt	600
aagtcagttg	tgaagtttg	cggctcaacc	gtaaaattgc	agttgatact	ggctgtcttg	660
agtacagtag	aggtgggcgg	aattcgtggt	gtagcgggta	aatgcttaga	tatcacgaag	720
aactccgatt	gcgaaggcag	ctcactggac	tgcaactgac	actgatgctc	gaaagtgtgg	780
gtatcaaaca	ggattagata	ccctggtagt	ccacacagta	aacgatgaat	actcgctggt	840
tgcgatatac	agtaagcggc	caagcgaag	cattaagtat	tccacctggg	gagtacgccg	900
gcaacggtga	aactcaaagg	aattgacggg	ggcncgcaca	agcggaggaa	catgtggttt	960
aattcagatga	tacgcgagga	accttaccgg	ggcttaaatt	gcatttgaat	atattggaaa	1020
cagtatagcc	gyaaggcaaa	tgtgaaggtg	ctgcatggtt	gtcgtcagct	cgtgccgtga	1080
ggtgtcggct	taagtccat	aacgagcgca	acccttatct	ttagttacta	acaggtcatg	1140
ctgaggactc	tagagagact	gccgtcgtaa	gatgtgagga	aggtggggat	gacgtcaaat	1200
cagcacngcc	cntacgtccg	gggctacaca	cgtgttacia	tgggggggtac	agaaggcagc	1260
tacctggtga	caggatgcta	atcccaaaag	cctctctcag	ttcggatcga	agtctgcaac	1320
ccgacttctg	gaagctggat	tcgctagtaa	tcgcgcatca	gccatggcgc	ggtgaatacg	1380
ttcccgggcn	ttgtacacac	cgcccgtcaa	gccatgaaag	ccgggggtac	ctgaagtacg	1440
taaccgcaag	gagcgtccta	gggtaaaact	ggtaattggg	gc		1482

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Bacteroides* que tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 98% idéntica a la SEQ ID NO:4, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune.
- 10 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste de asma como asma alérgica o asma neutrofílica; artritis como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; esclerosis múltiple; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); uveítis escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto.
- 15 3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir el asma como asma neutrofílica o asma alérgica, y en donde la composición es para su uso en un método para reducir la neutrofilia o eosinofilia en el tratamiento del asma.
- 20 4. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir la artritis reumatoide, y en donde la composición es para su uso en un método para reducir la hinchazón articular en la artritis reumatoide.
- 25 5. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir la esclerosis múltiple, y en donde la composición es para su uso en un método para reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad.
- 30 6. La composición para el uso de la reivindicación 2, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir la uveítis, y en donde la composición es para su uso en un método para reducir o prevenir el daño retiniano en la uveítis.
- 35 7. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para su uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria o autoinmune.
- 40 8. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para su uso en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17.
- 45 9. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la cepa bacteriana es de la especie *Bacteroides coprocola*.
- 50 10. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 4, o en donde la cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.
- 55 11. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para administración oral, en donde la composición comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, y/o en donde la cepa bacteriana está liofilizada.
12. Un producto alimenticio o una composición de vacuna que comprende la composición de cualquier reivindicación anterior, para el uso de cualquier reivindicación anterior.
13. Un cultivo celular o biológicamente puro de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408.
14. Una composición que comprende la célula de la reivindicación 13, que comprende opcionalmente un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Una célula de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42408 para su uso en terapia, opcionalmente en donde la célula es para su uso en un método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

FIG. 2
Eosinofilos totales.

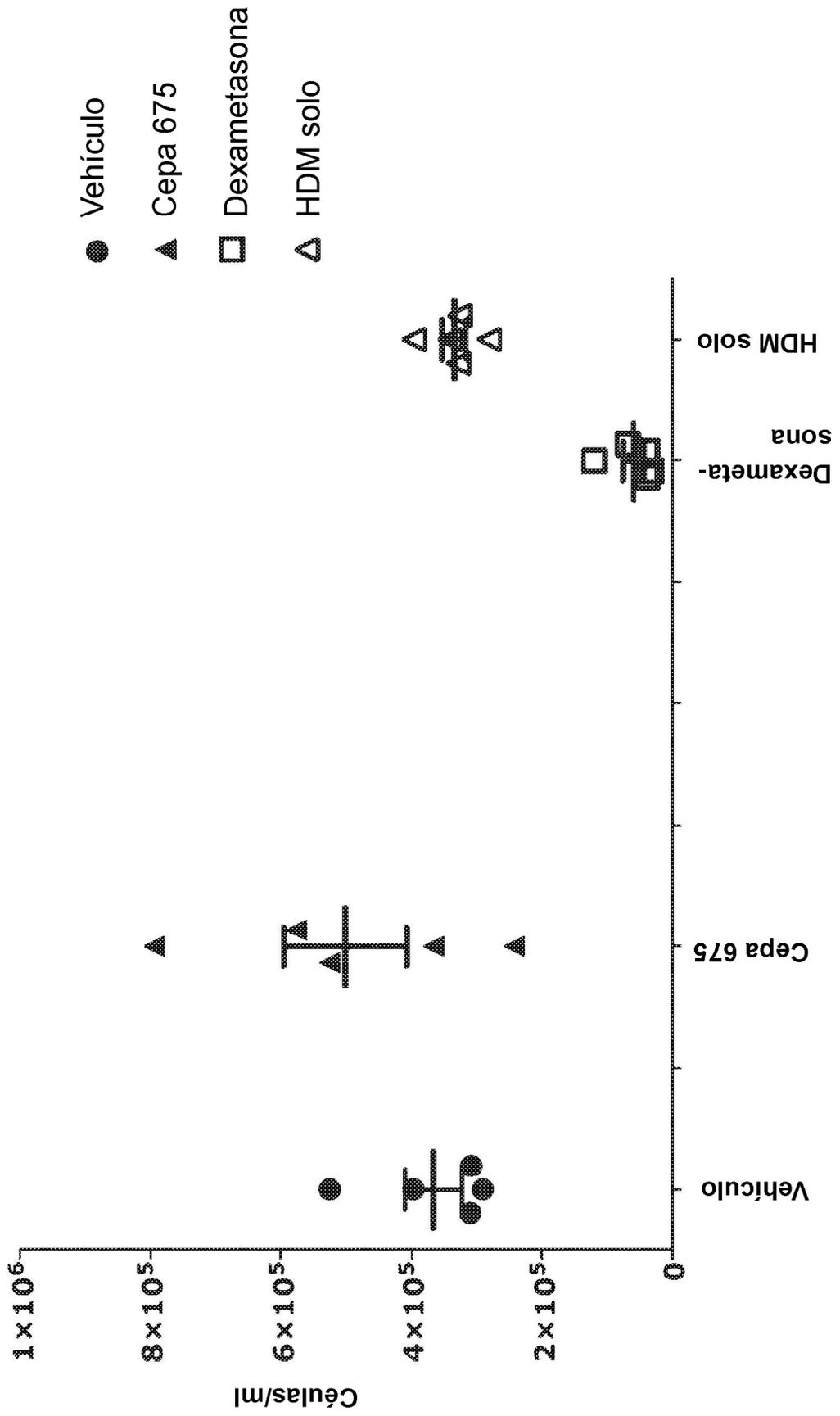


FIG. 3
% de eosinofilos.

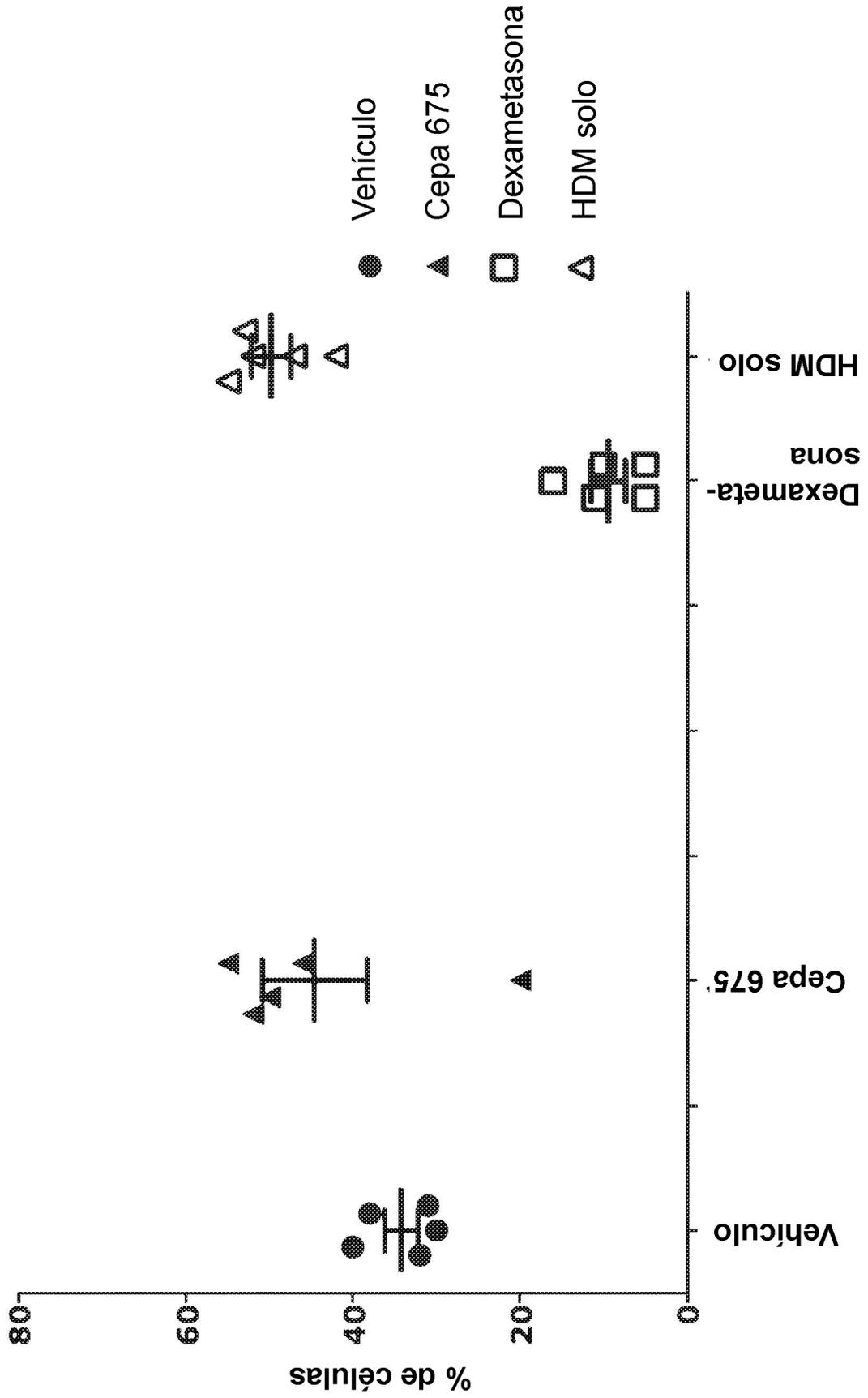


FIG. 4
Macrofagos totales.

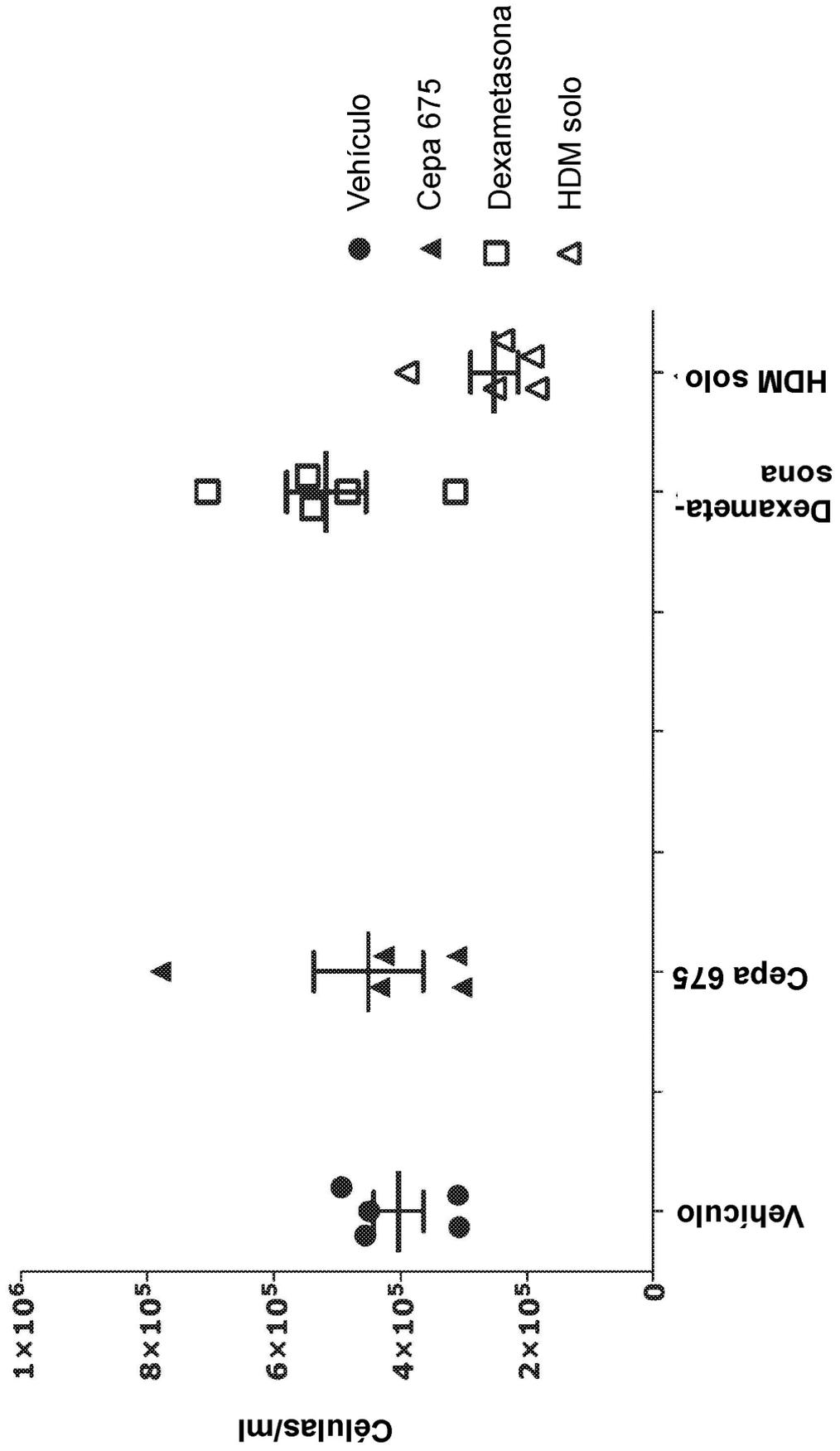


FIG. 5
% de macrófagos

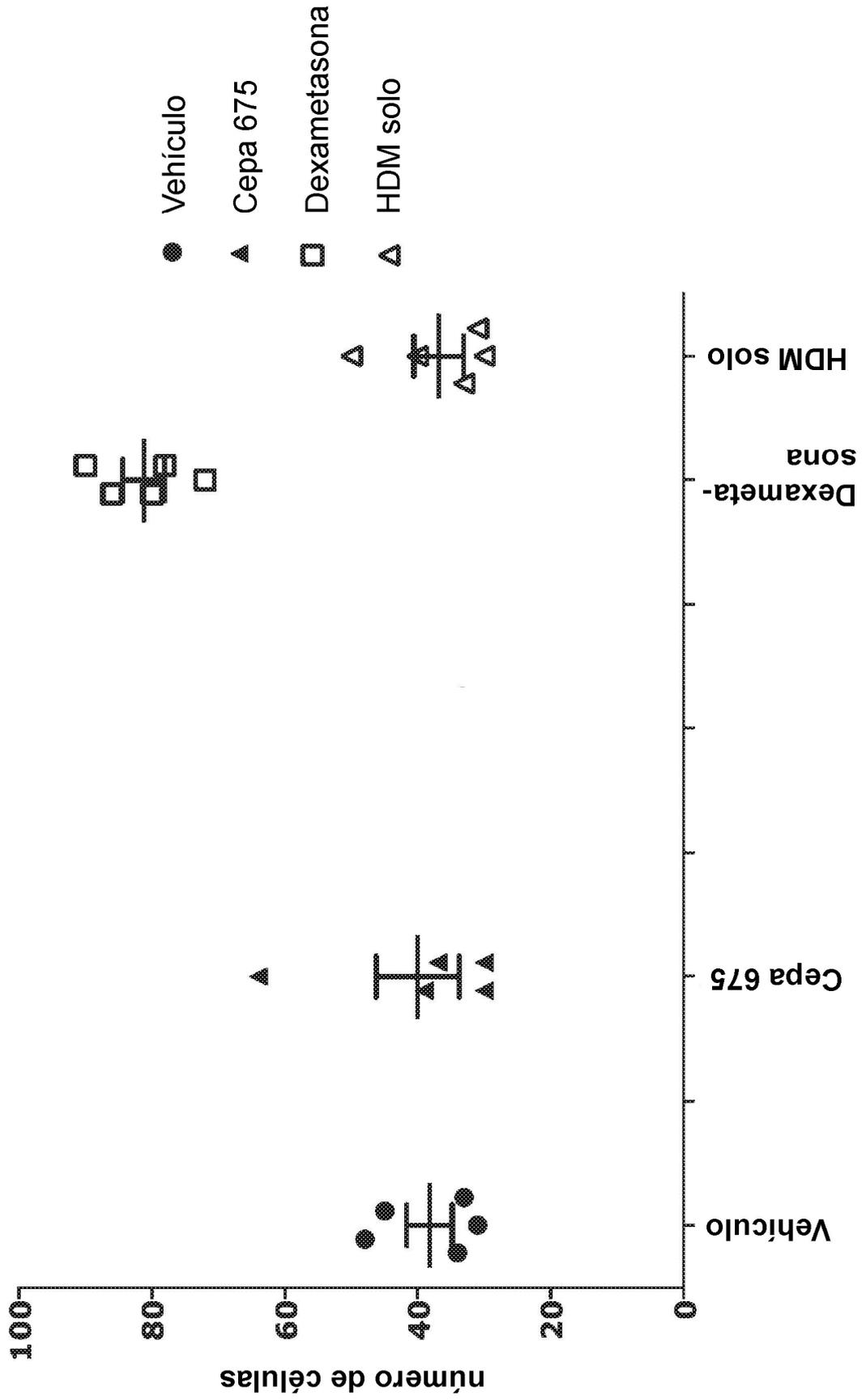


FIG. 6
Neutrófilos totales.

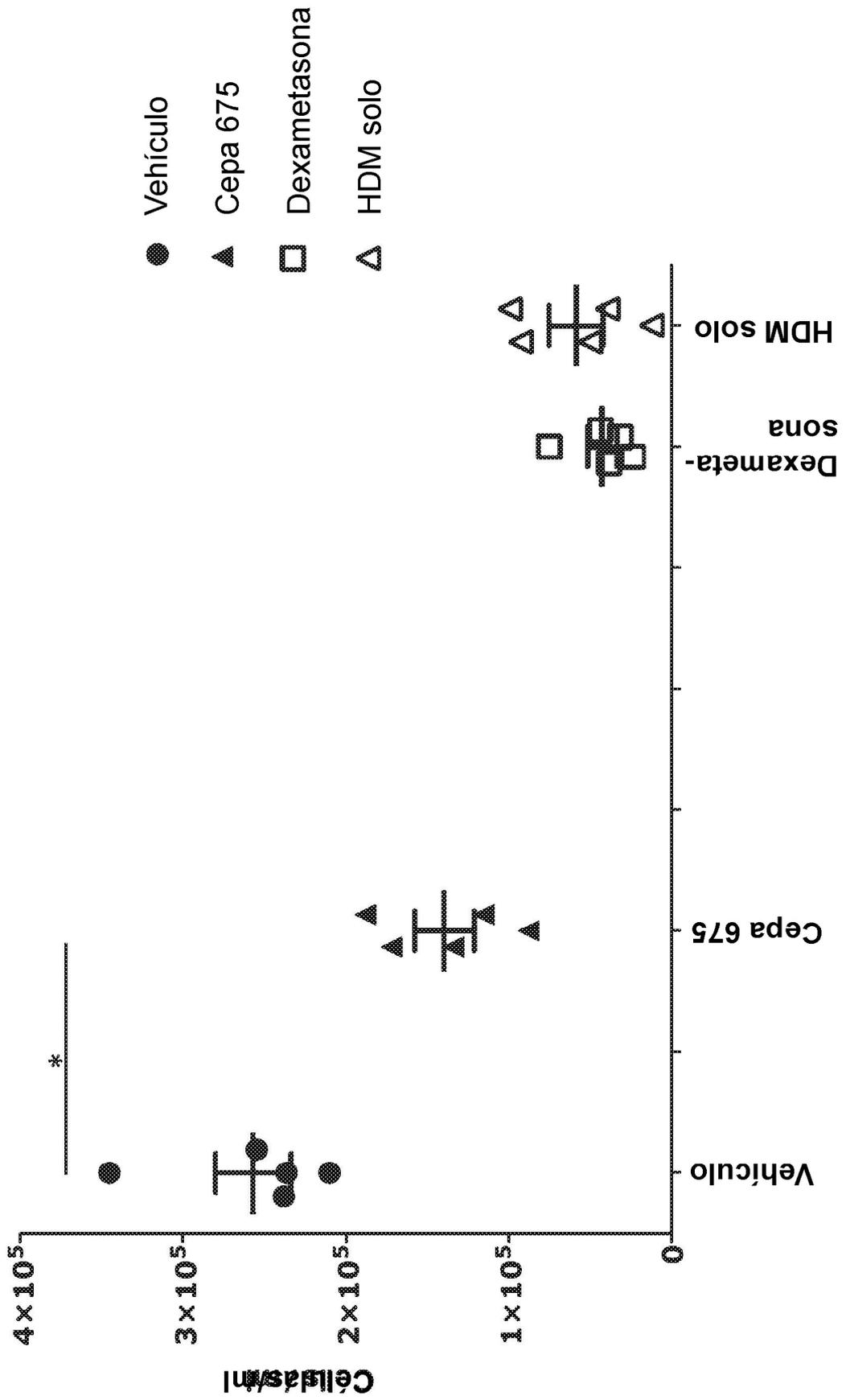


FIG.7
% de neutrófilos.

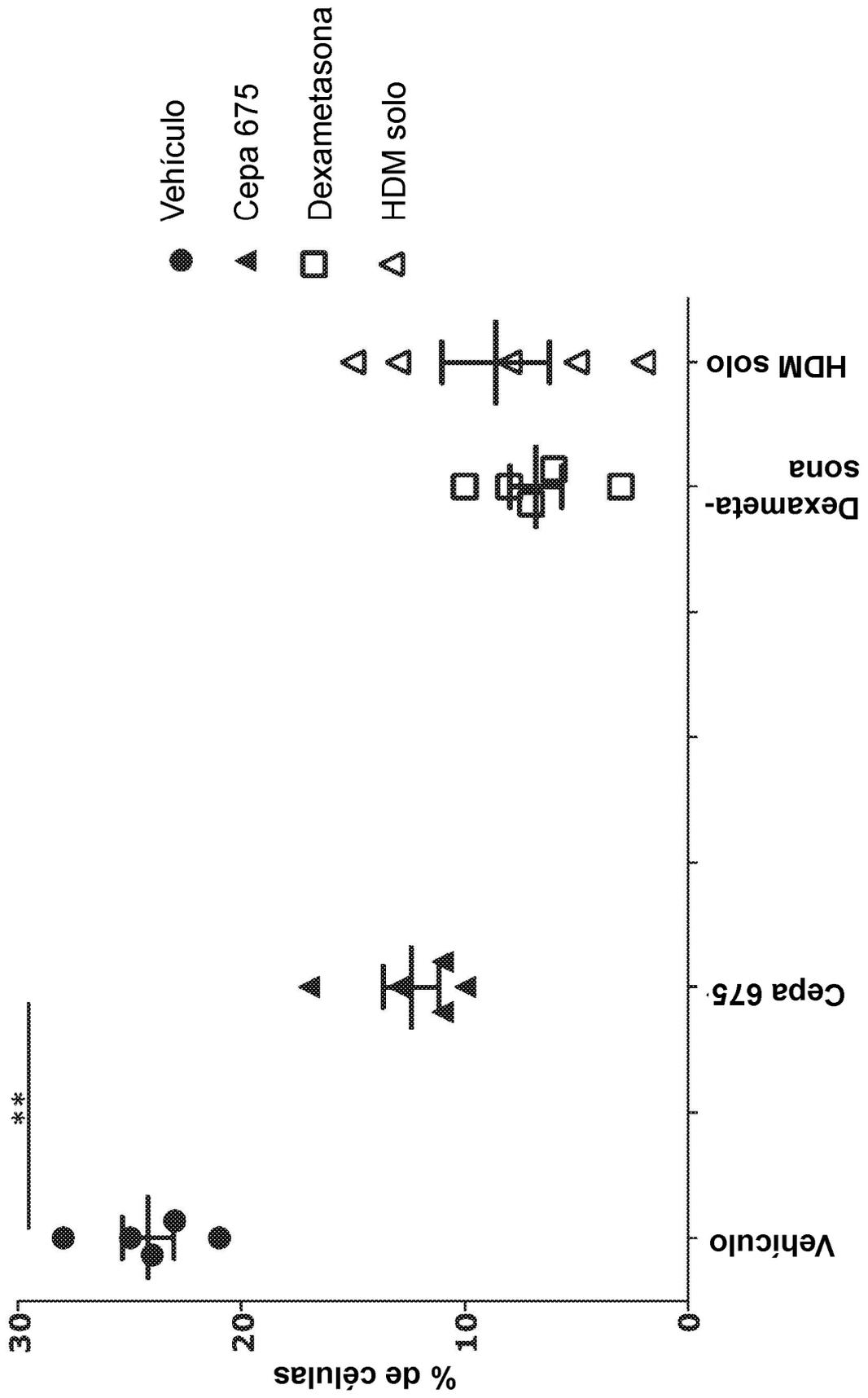


FIG. 8
Linfocitos totales.

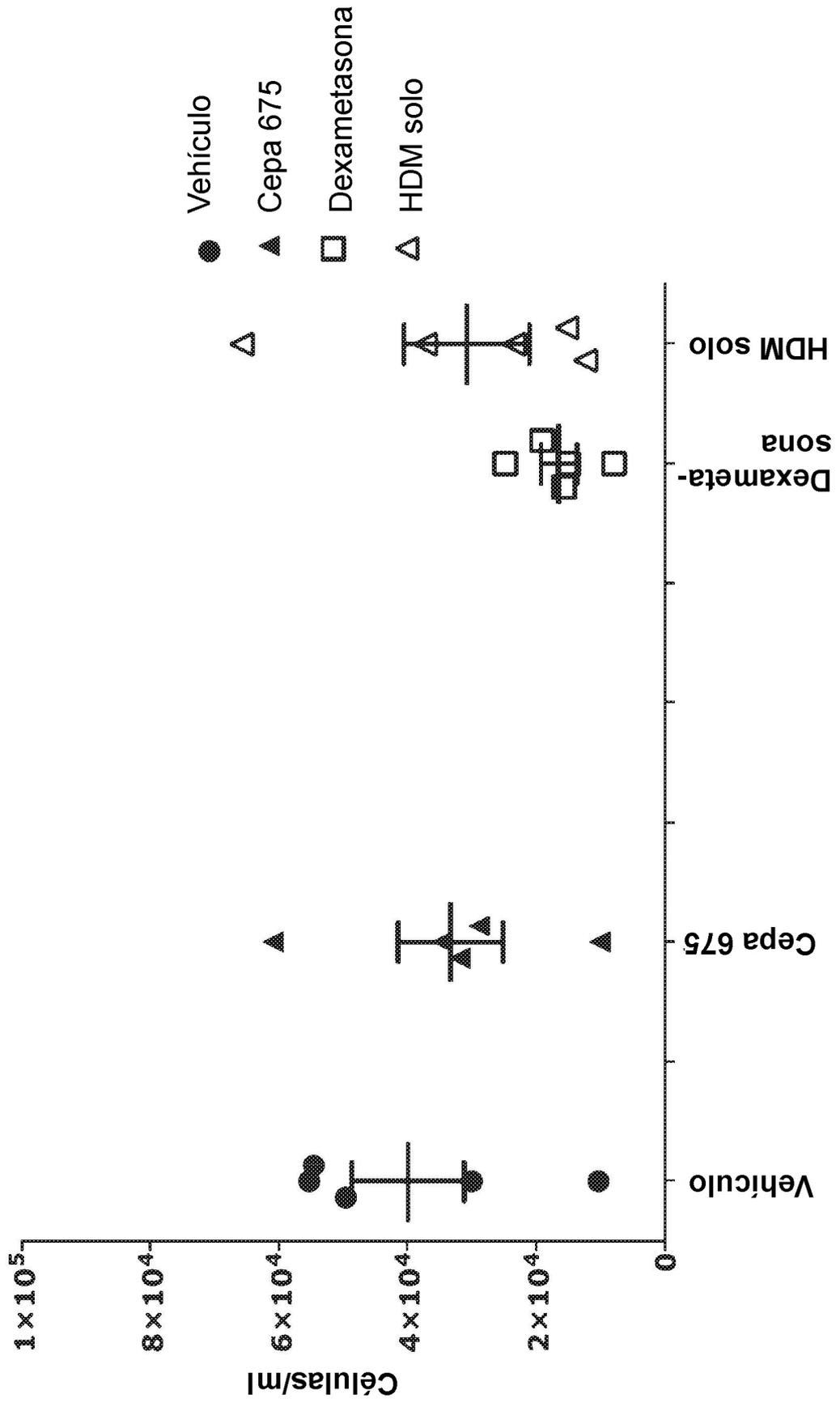


FIG. 9
% de linfocitos.

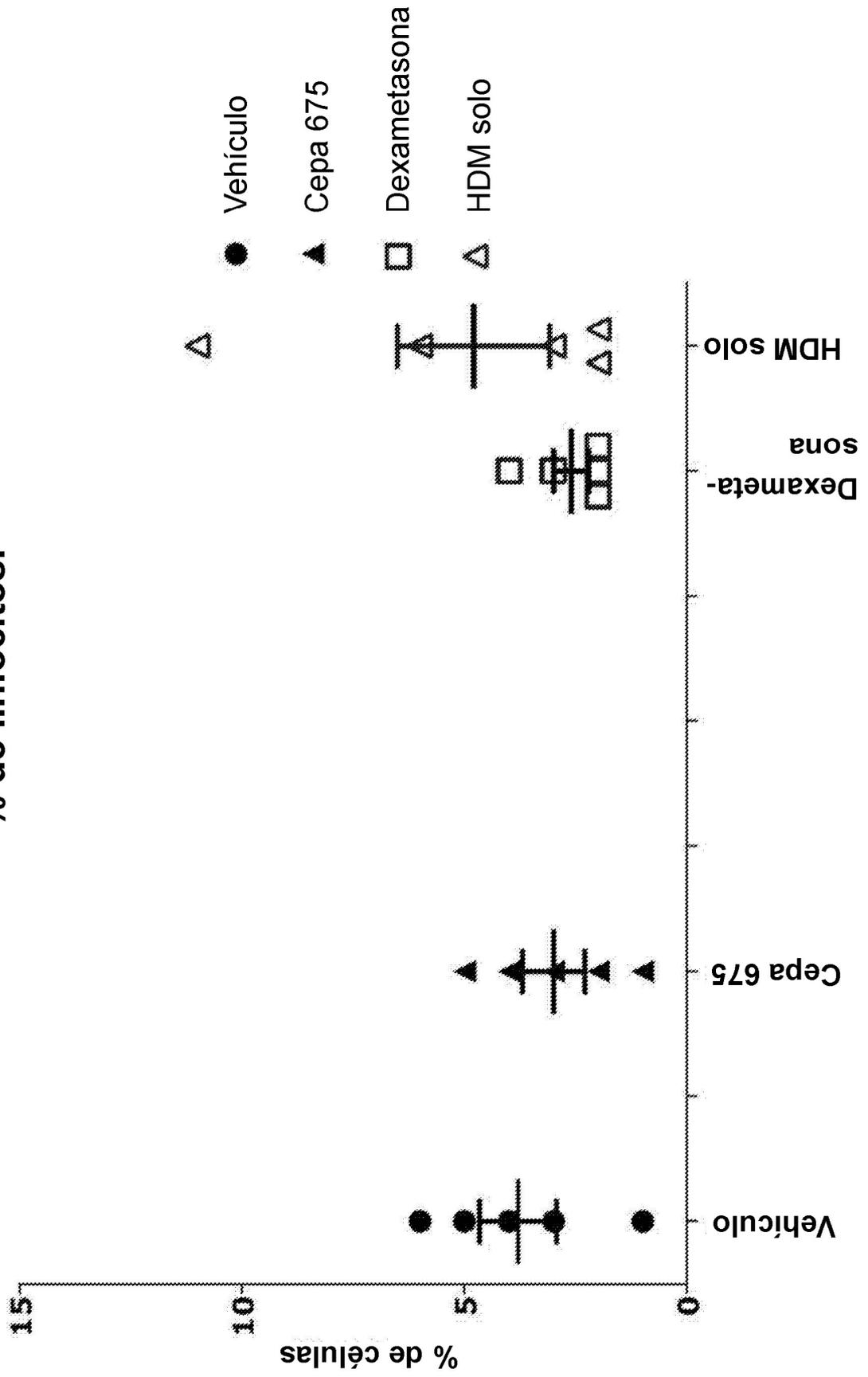


FIG. 10
Recuentos celulares totales.

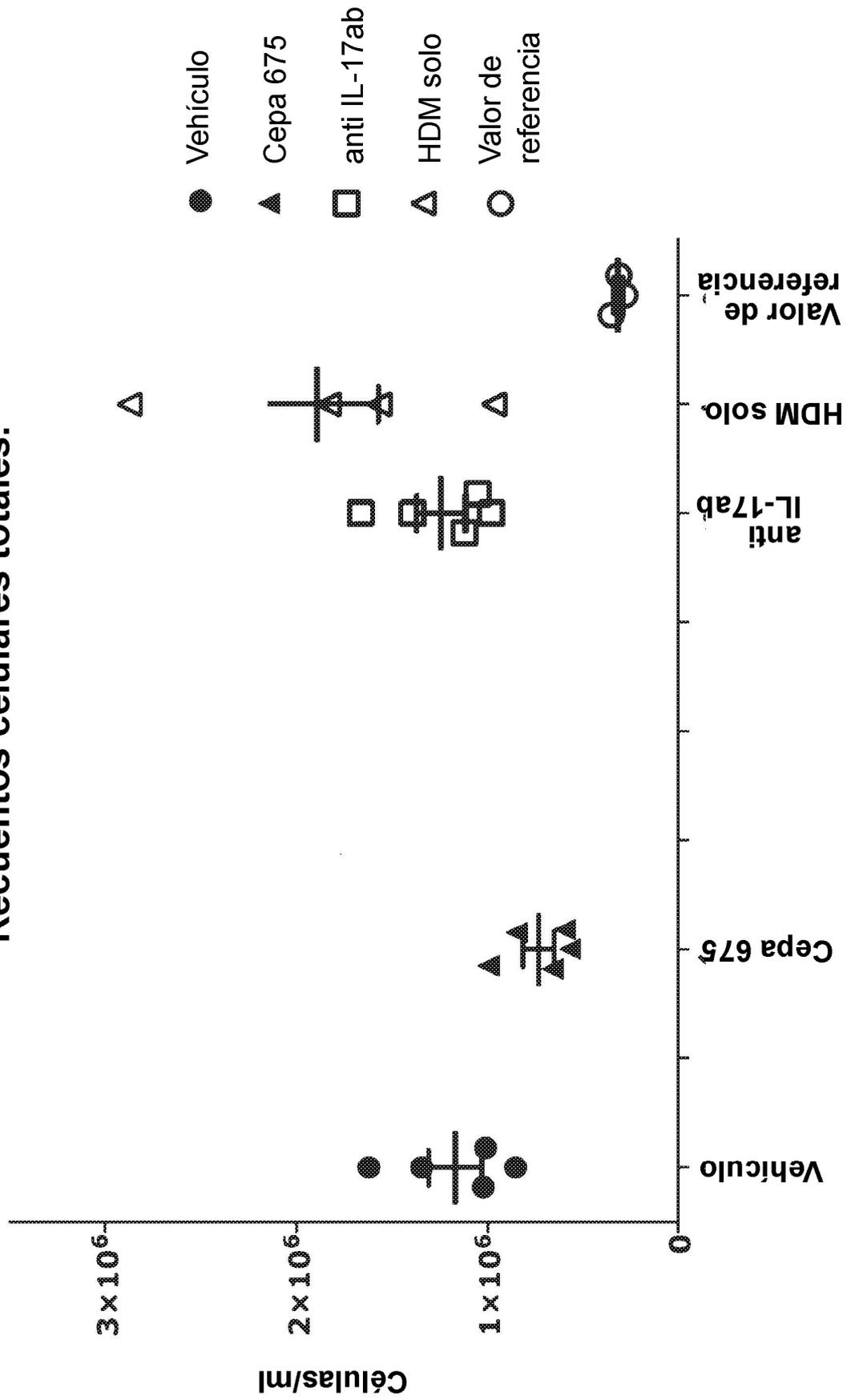


FIG. 11
Eosinófilos totales.

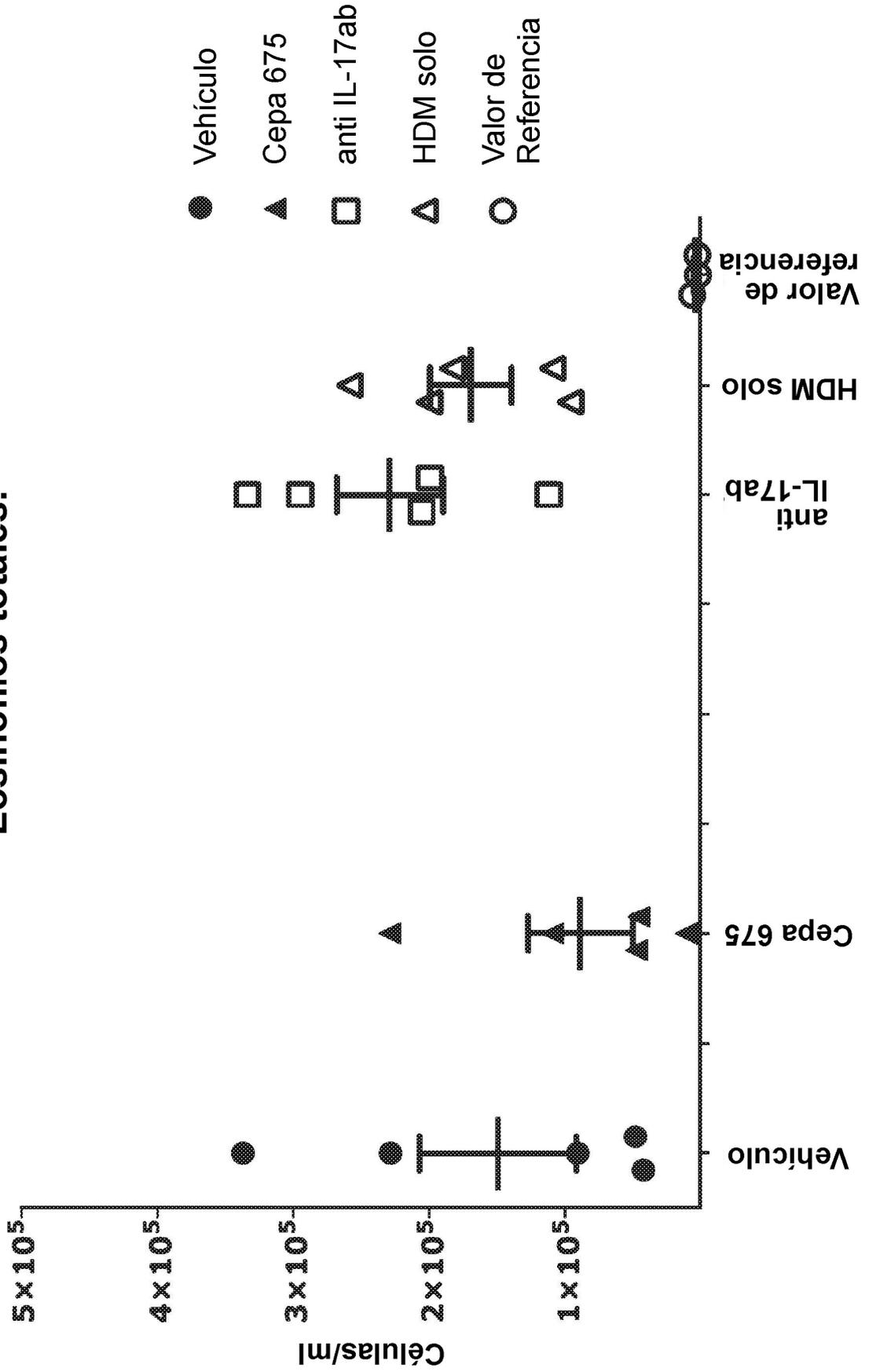


FIG. 13
Macrófagos totales.

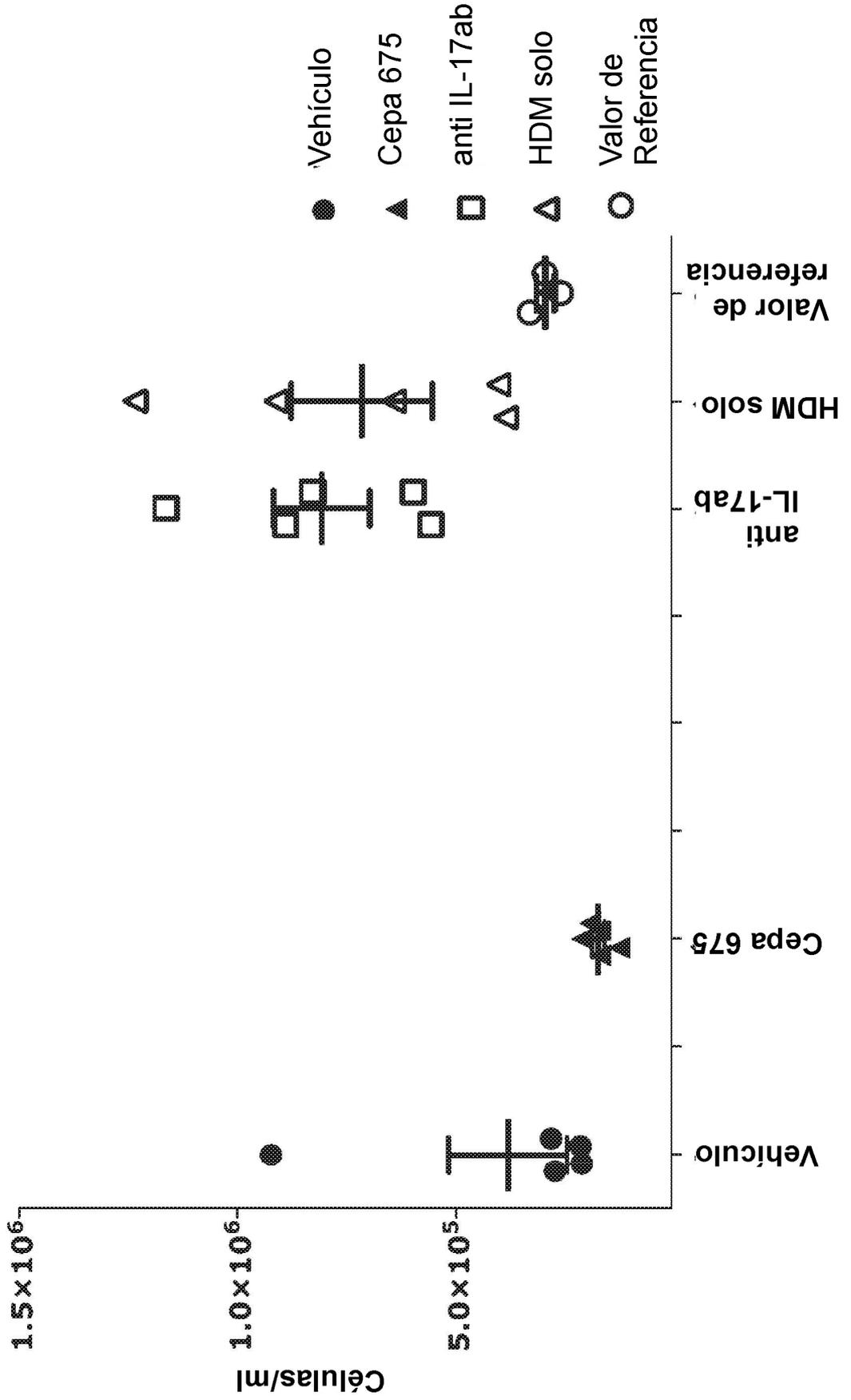


FIG. 14
% de macrófagos.

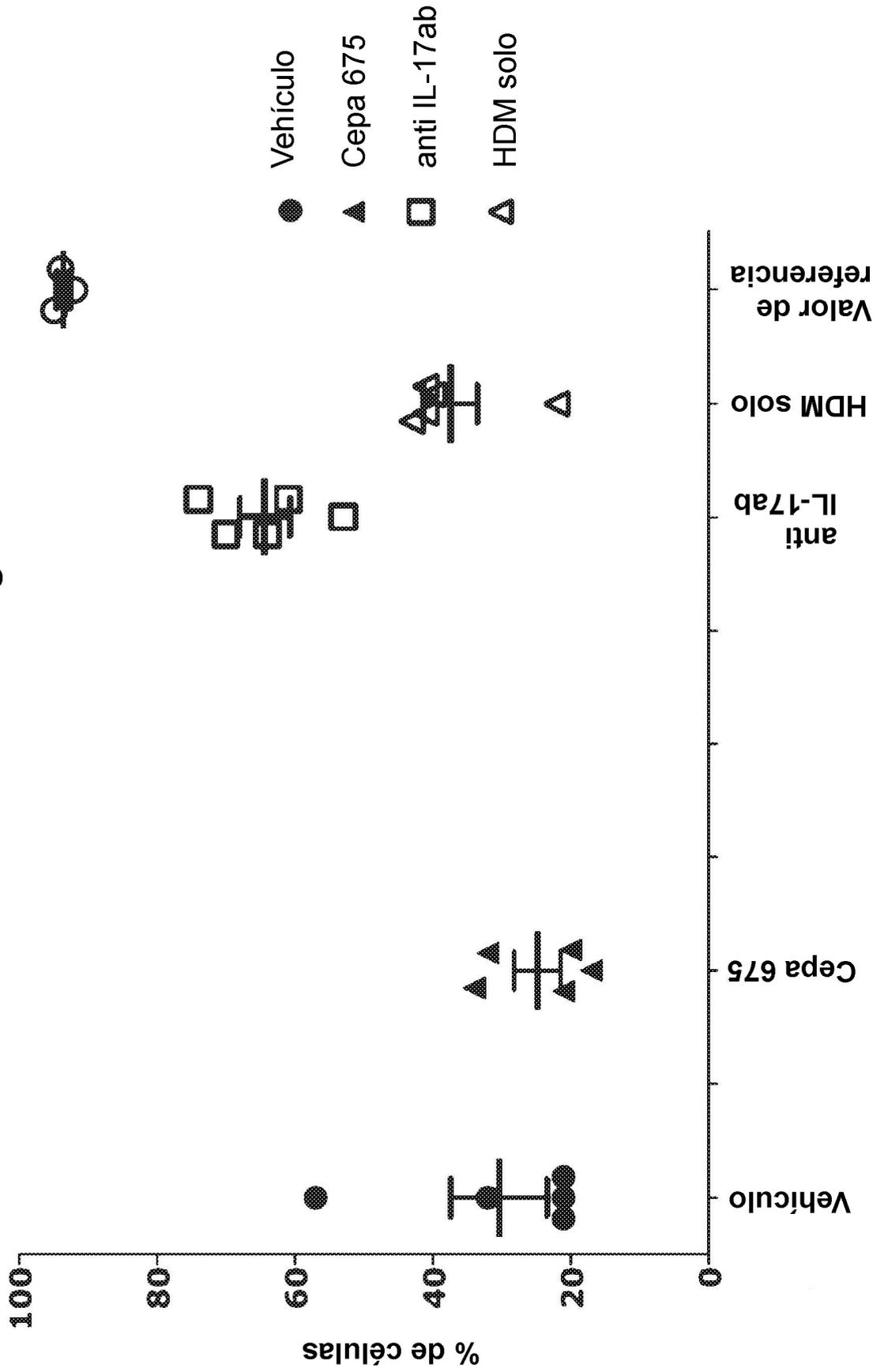


FIG. 15
Neutrófilos totales.

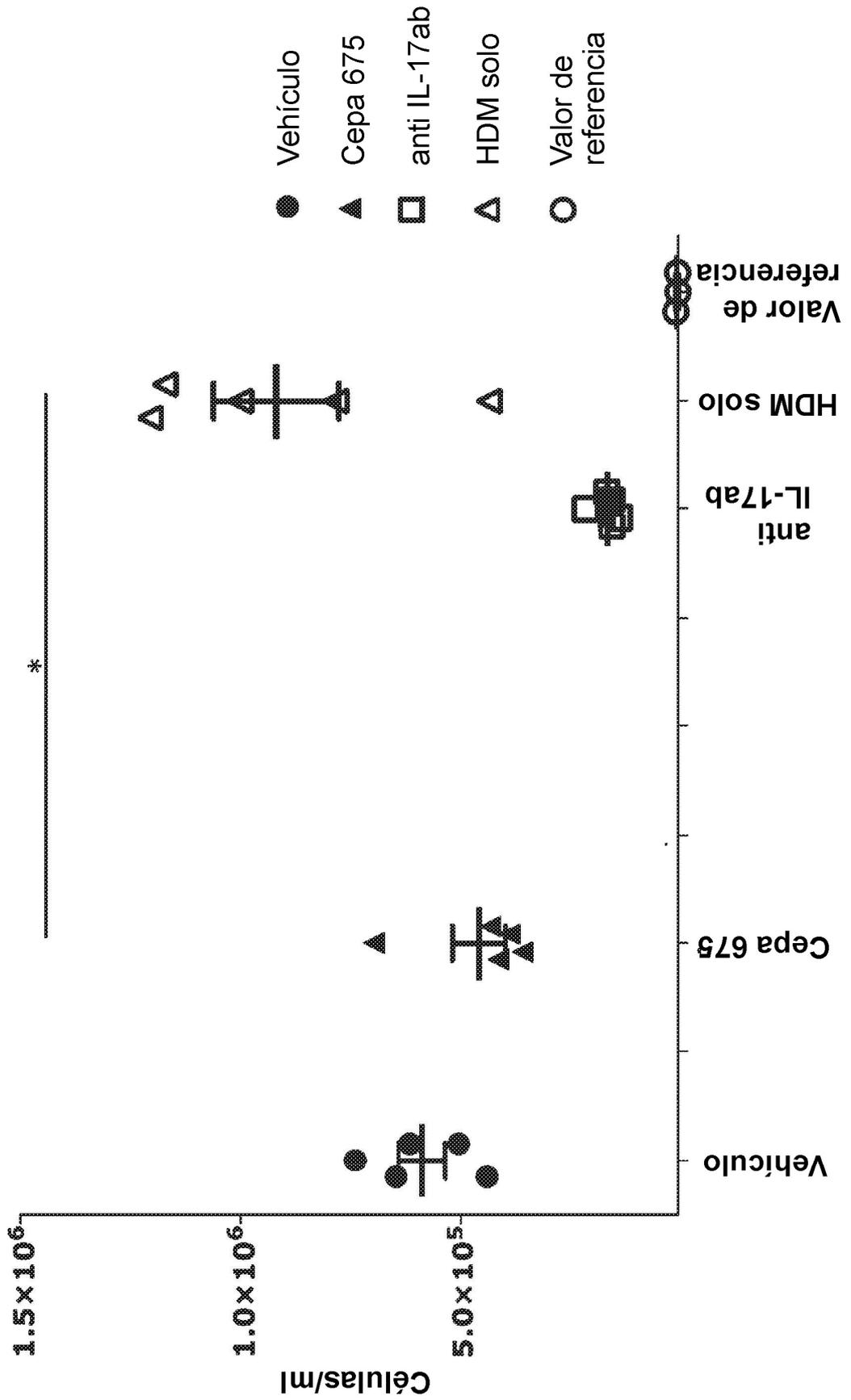


FIG. 16
% de neutrófilos.

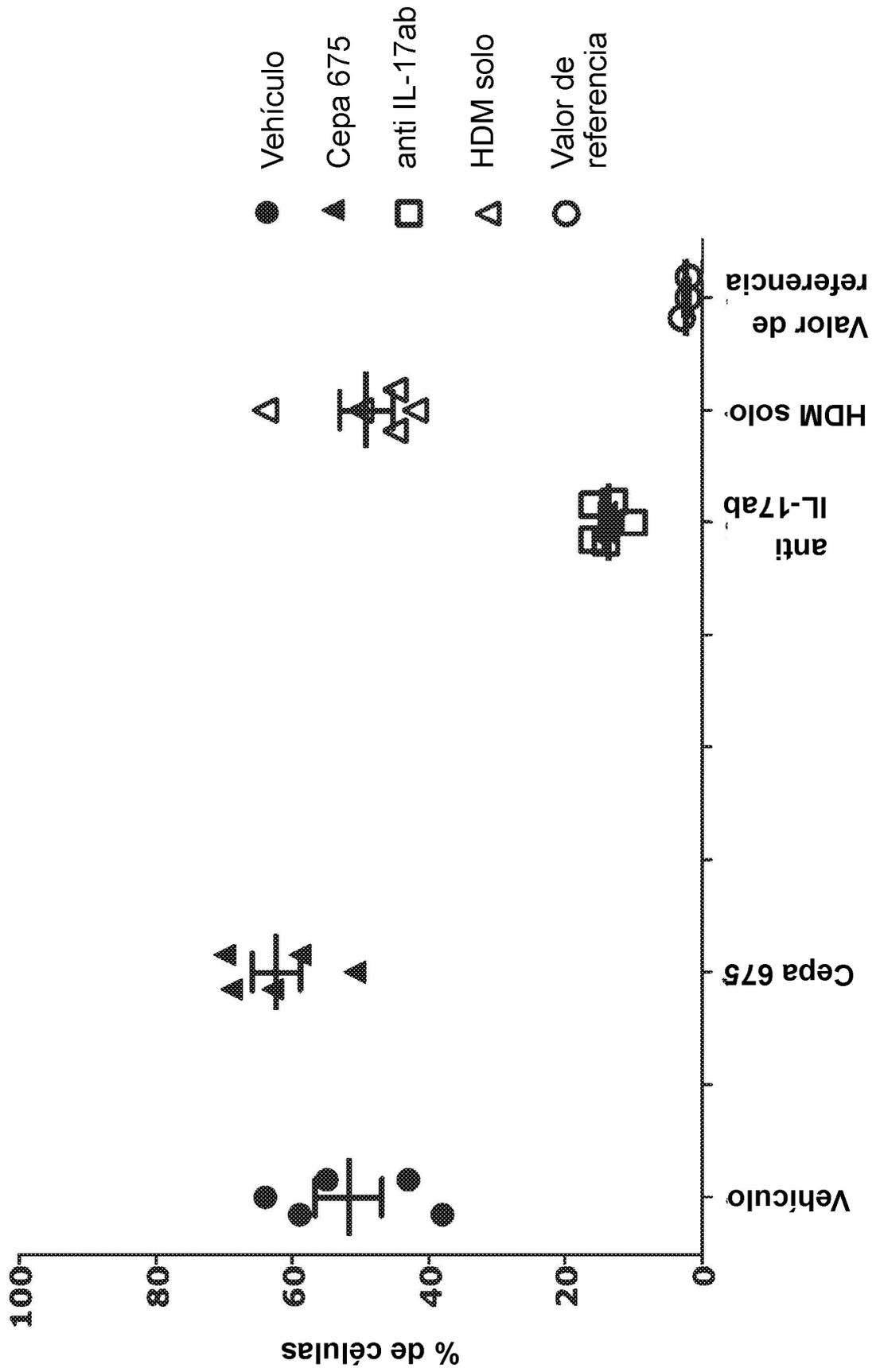


FIG. 17
Linfocitos totales.

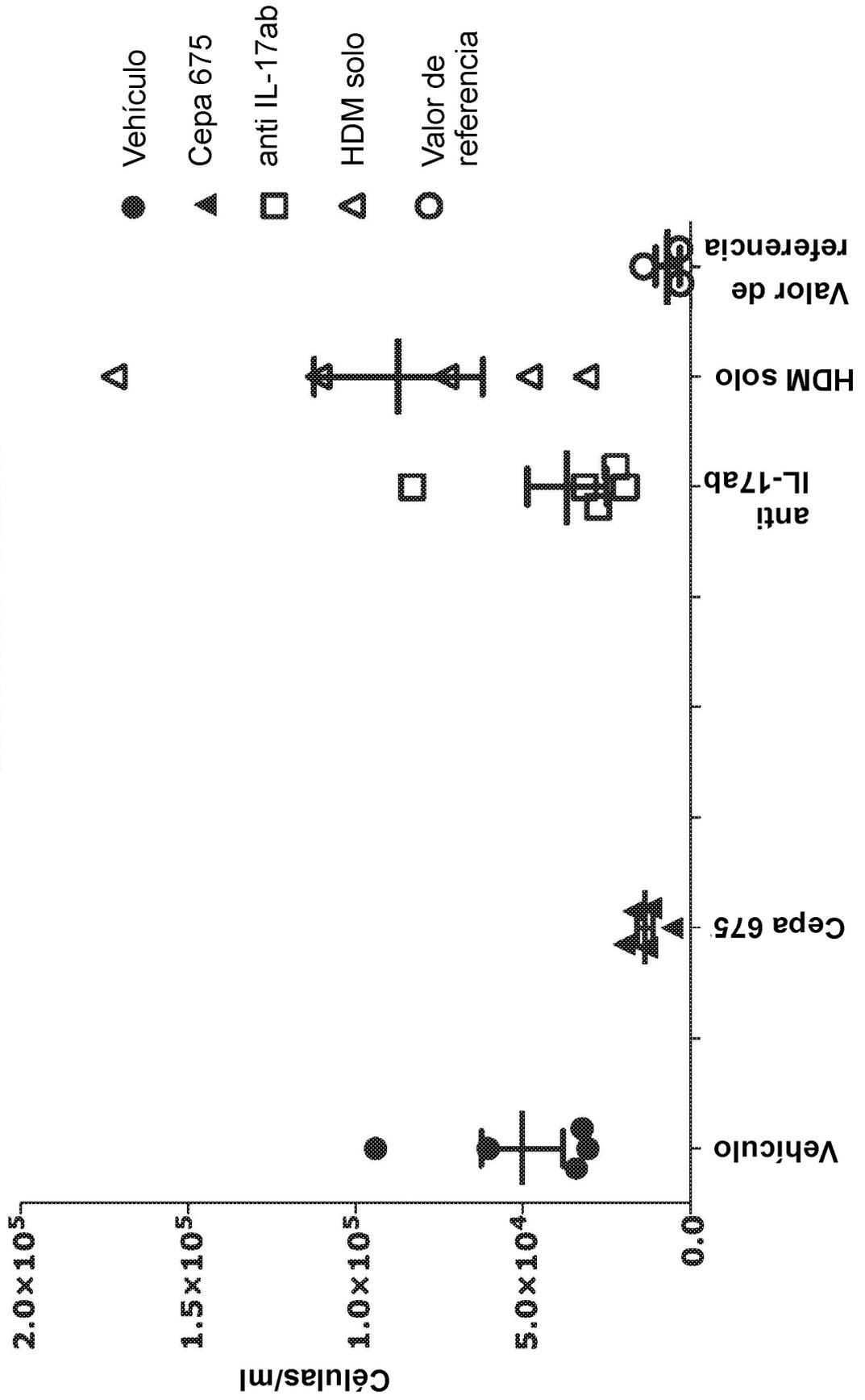


FIG. 18
% de linfocitos.

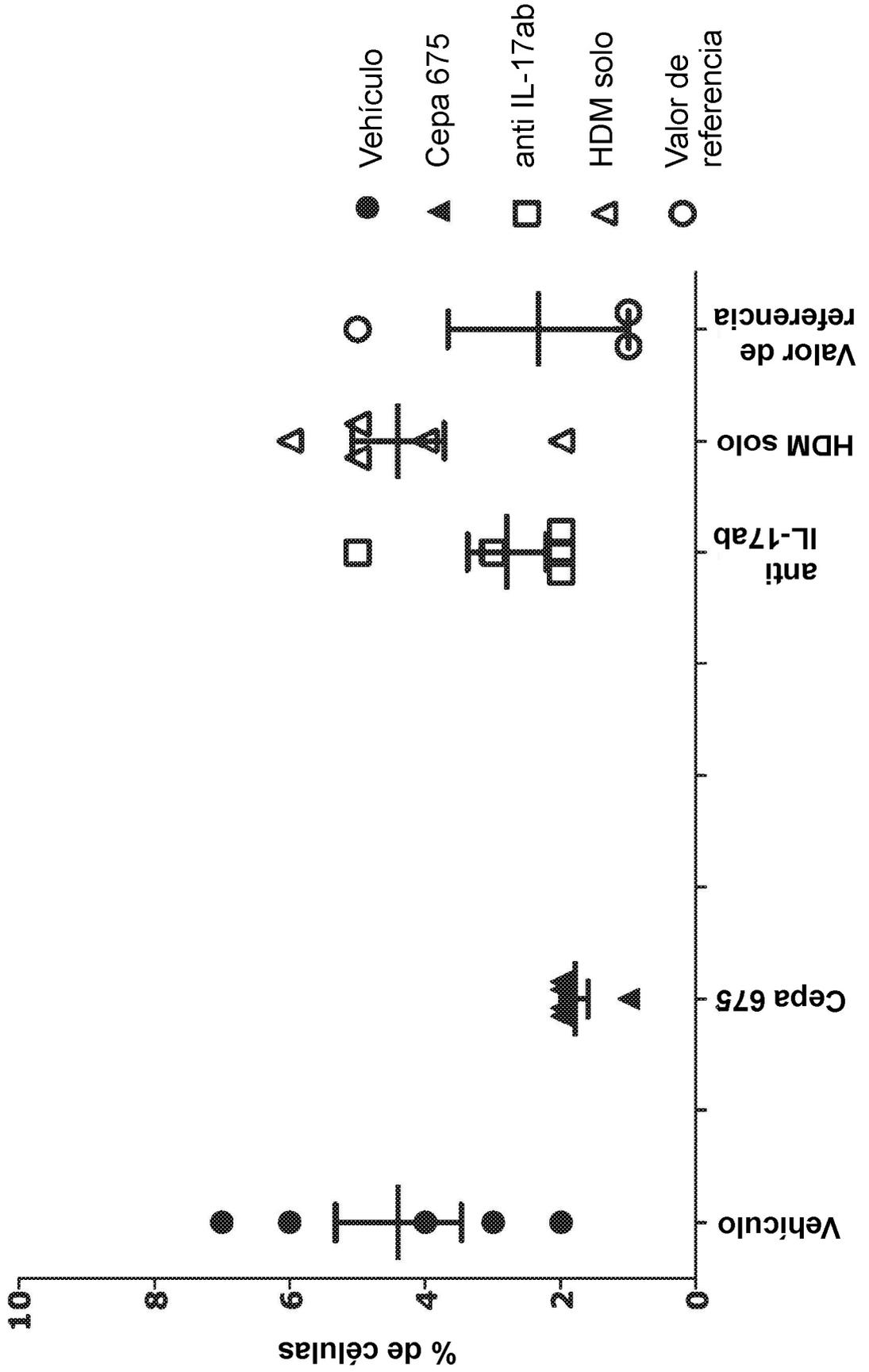


FIG. 19
Pesos corporales

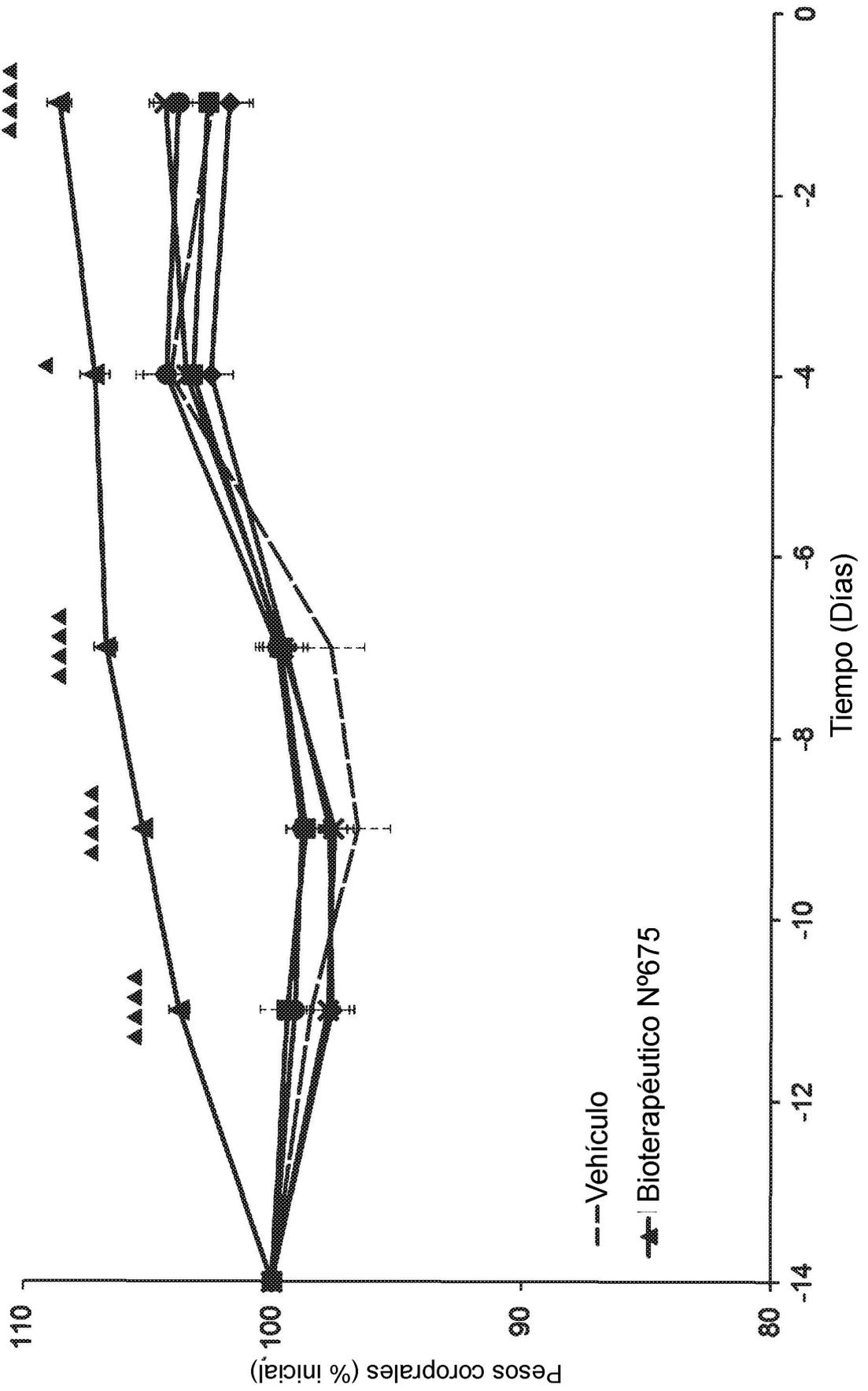


FIG. 20
Pesos corporales

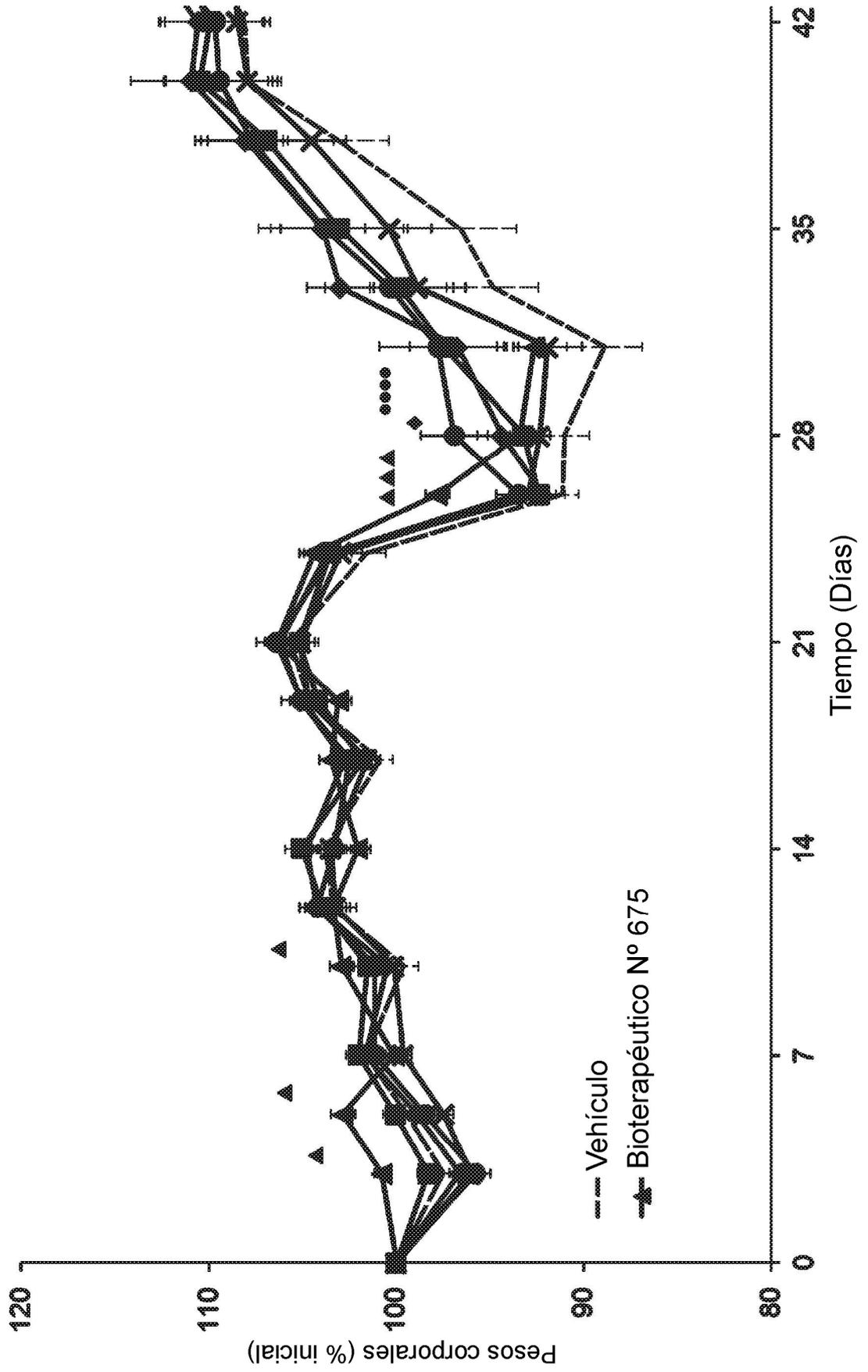


FIG. 21
Puntuaciones clínicas

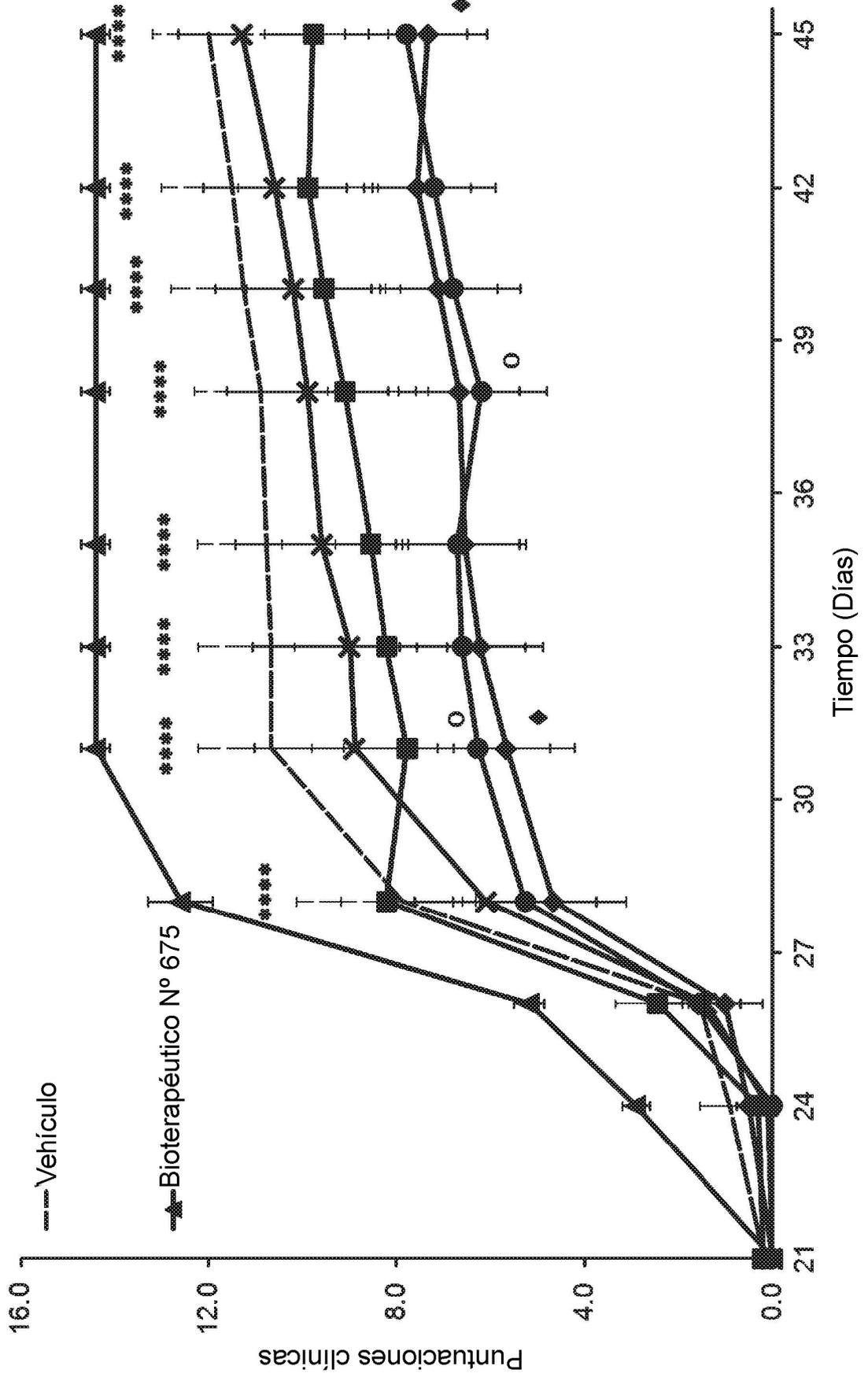


FIG. 22

Proliferación de esplenocitos para Colágeno II

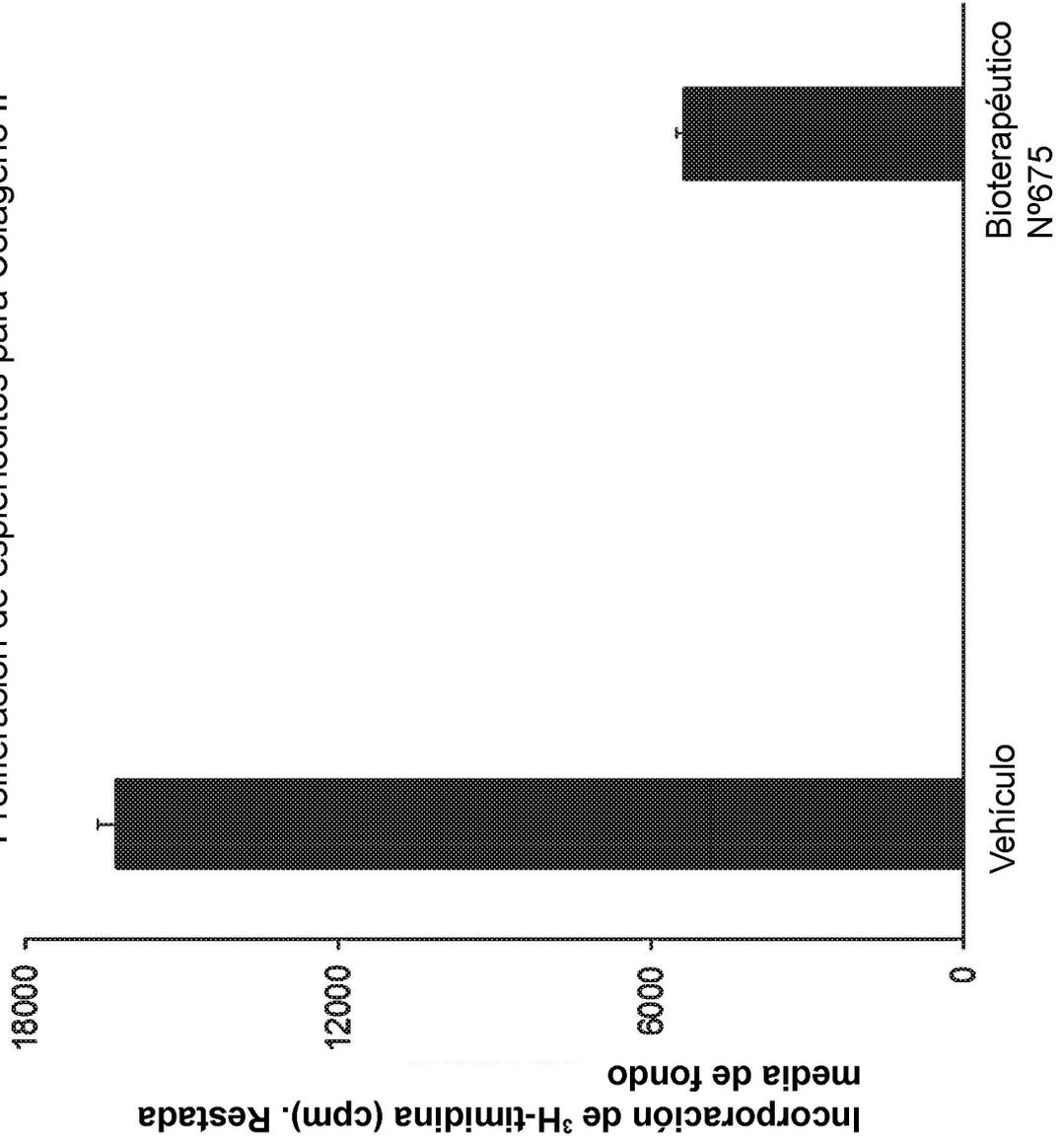
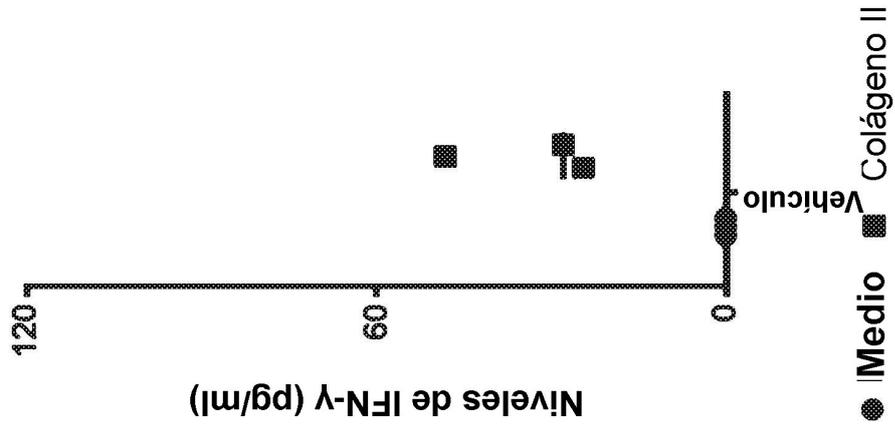


FIG. 23



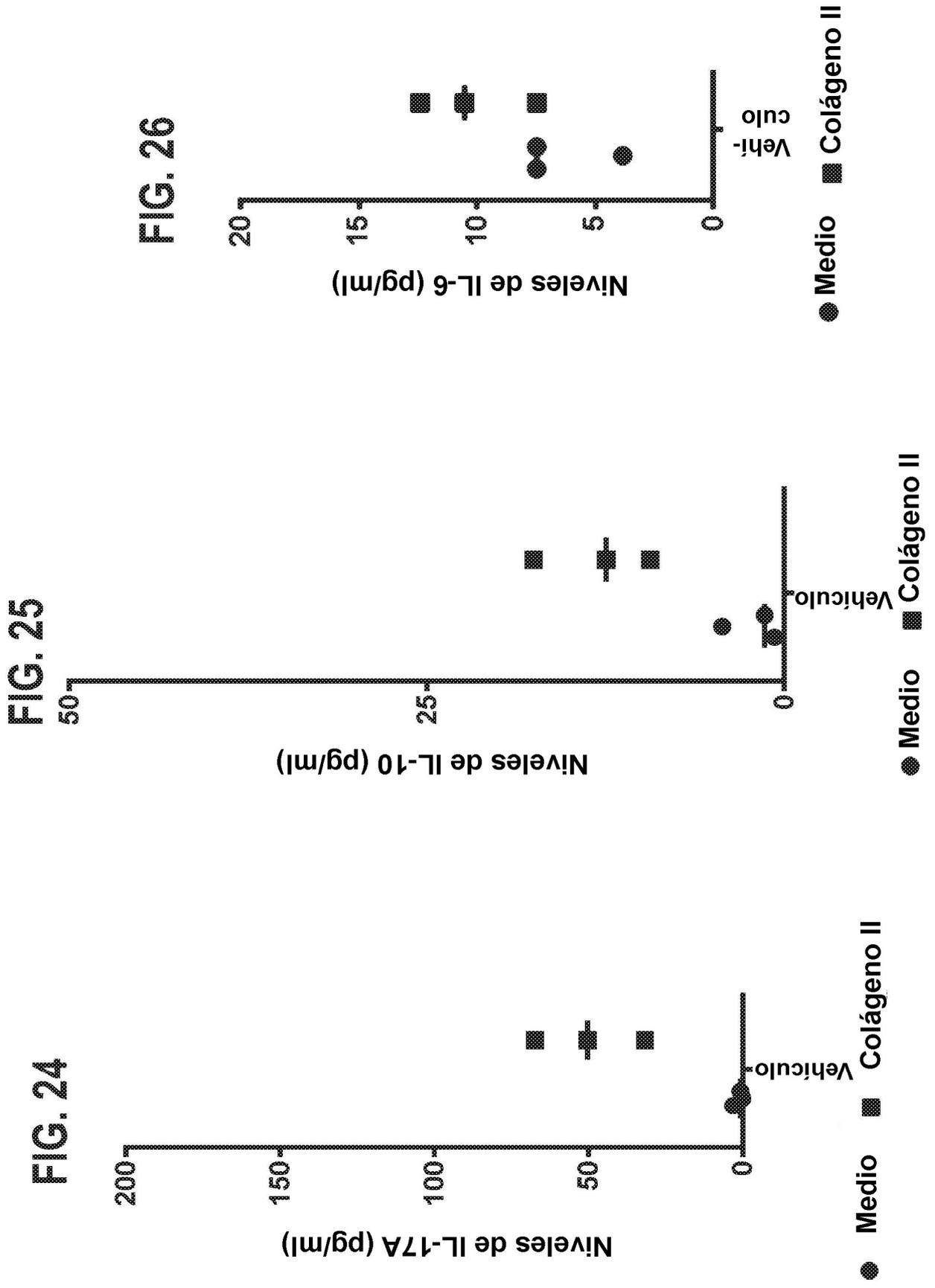
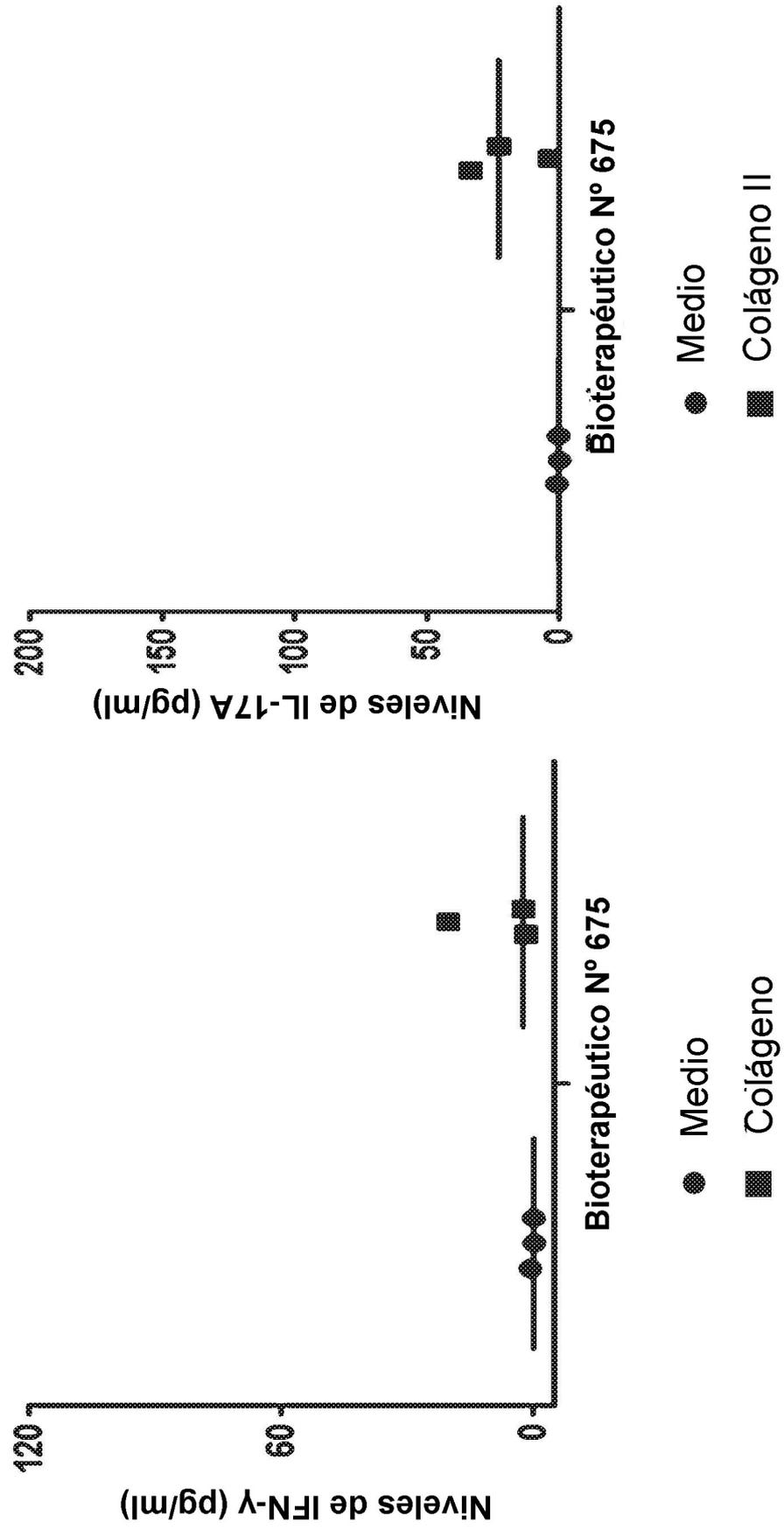


FIG. 27



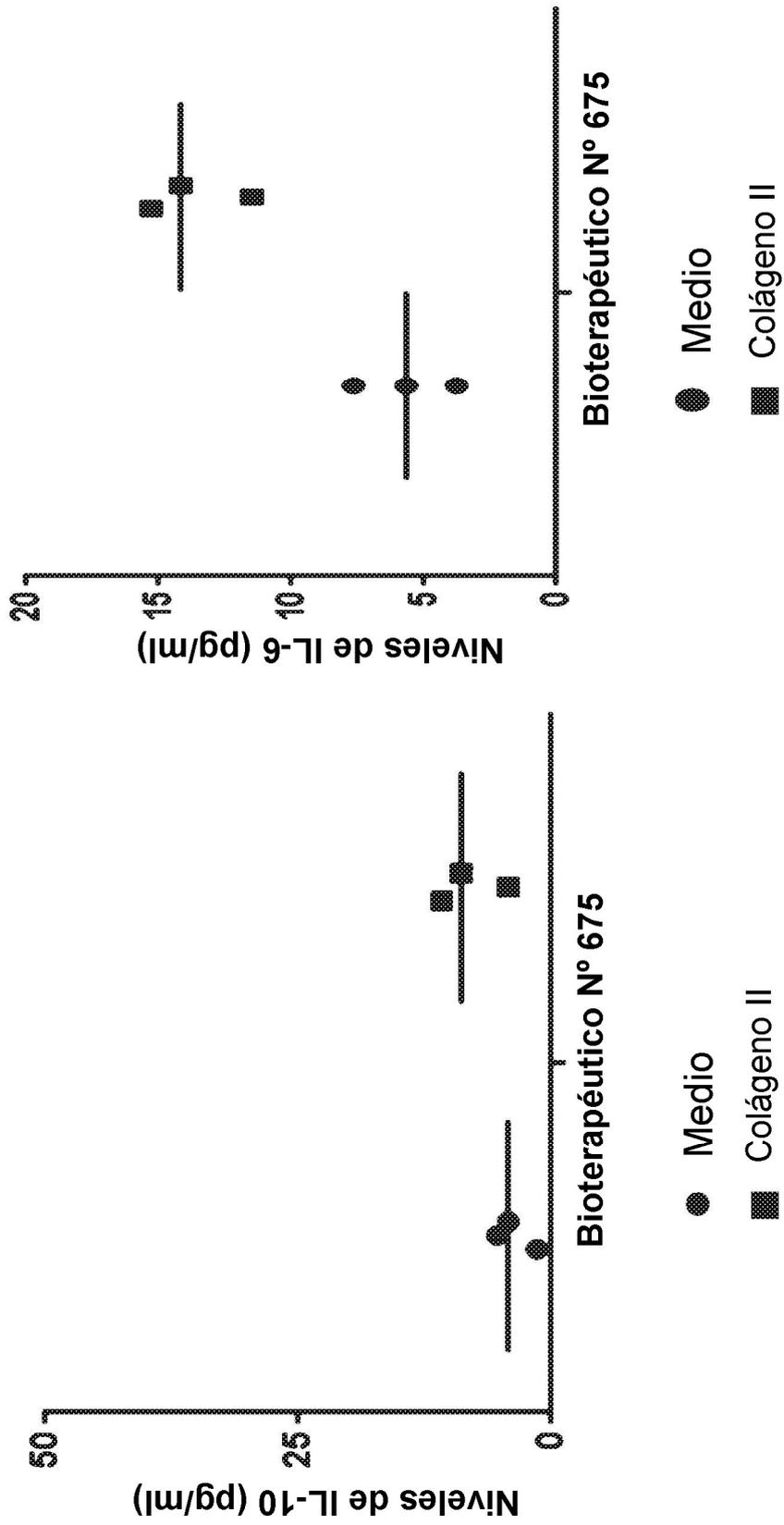


FIG. 27 (cont.)

FIG. 28
IgE total en suero

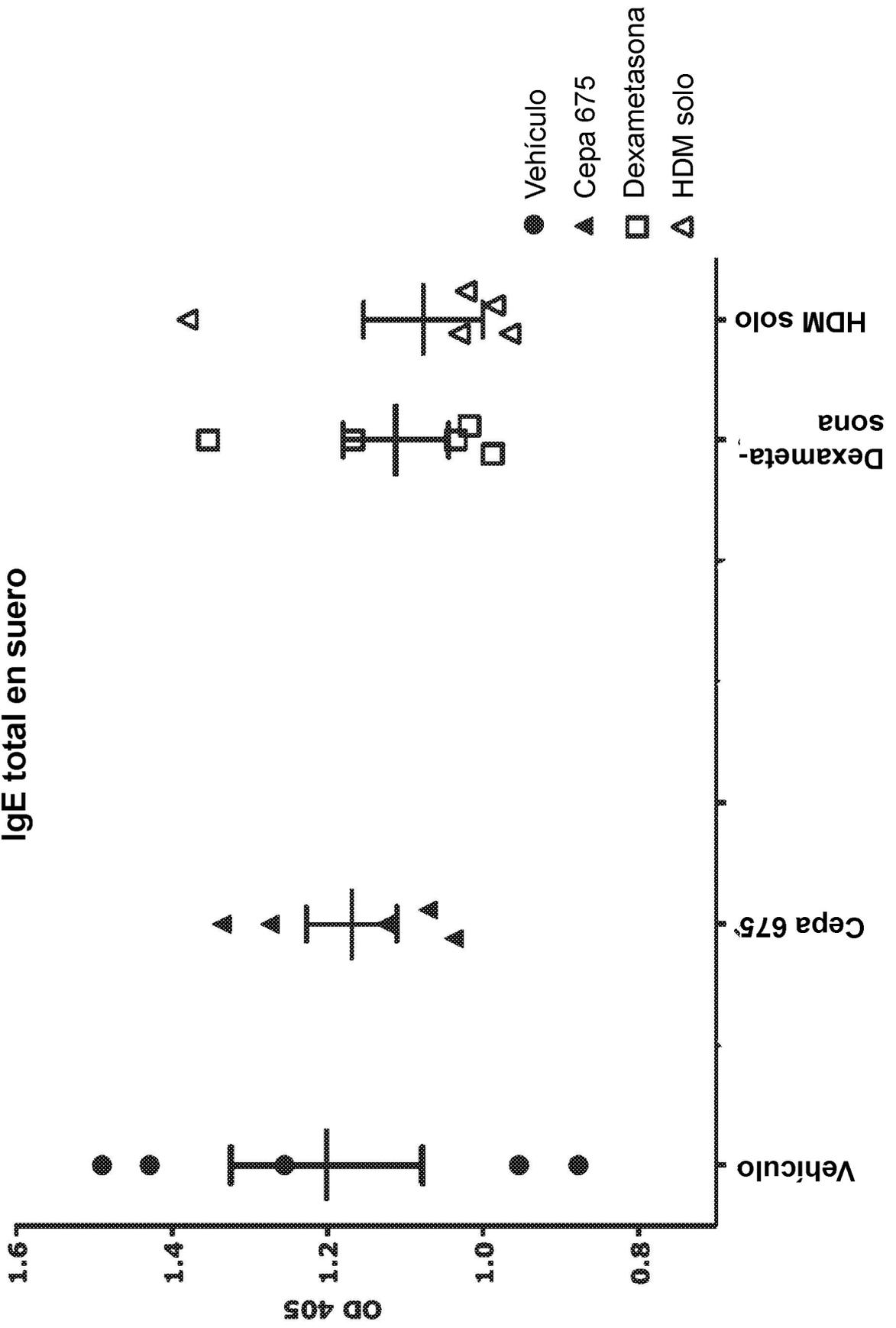


FIG. 29 IgG1 específico de HDM en suero

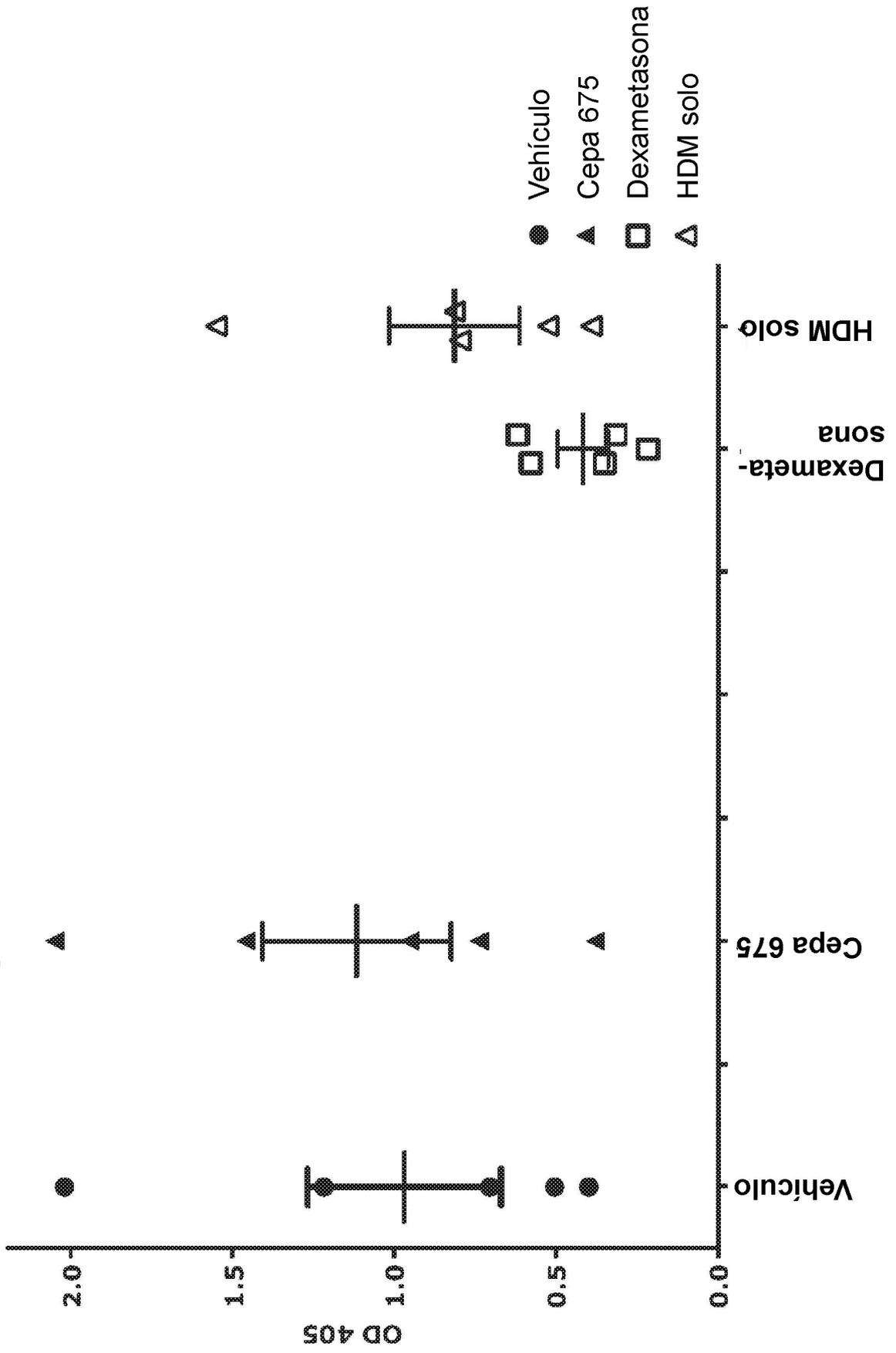


FIG. 30
IgE total en BALF

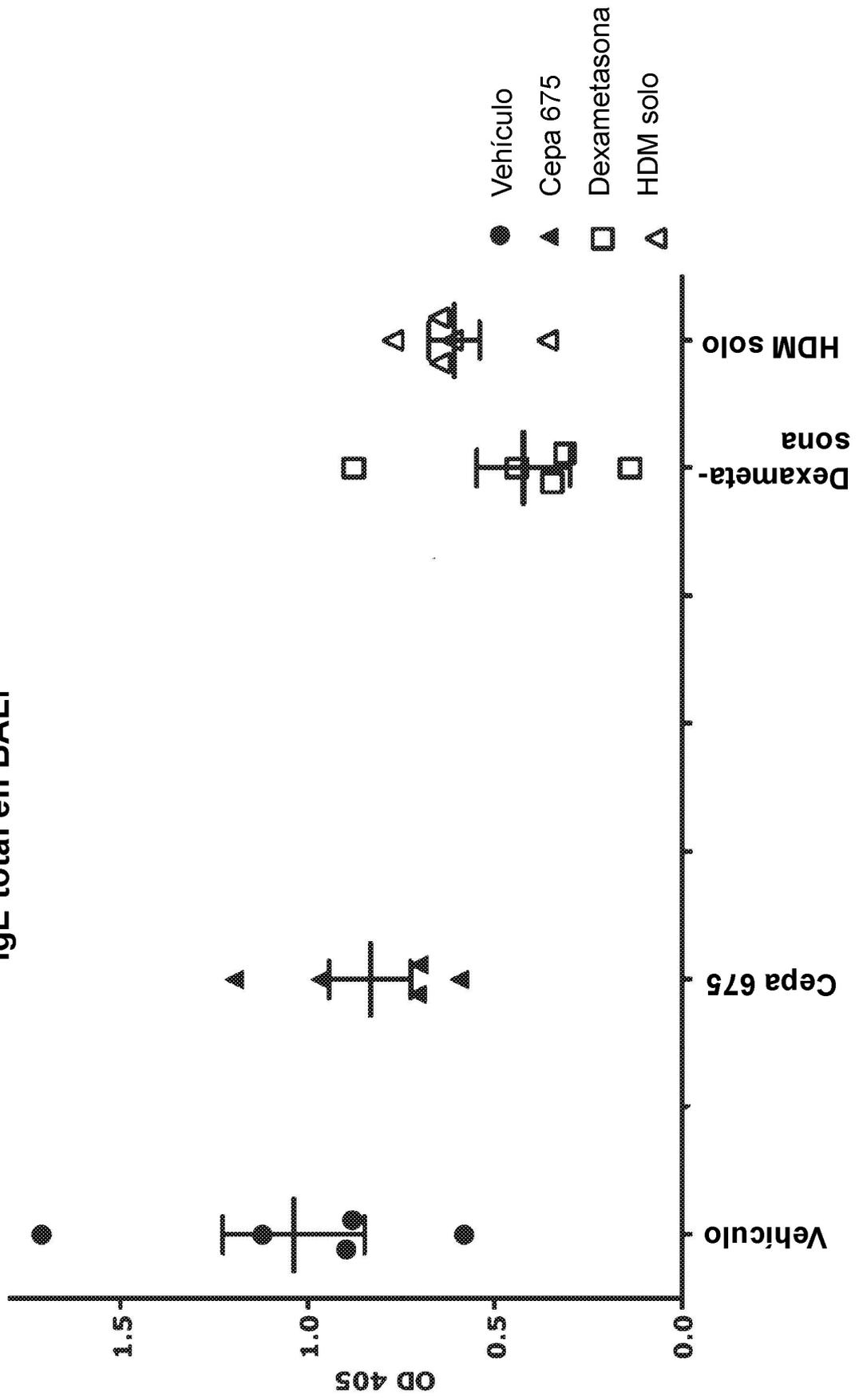


FIG. 31
IgG1 específica de HDM en BALF

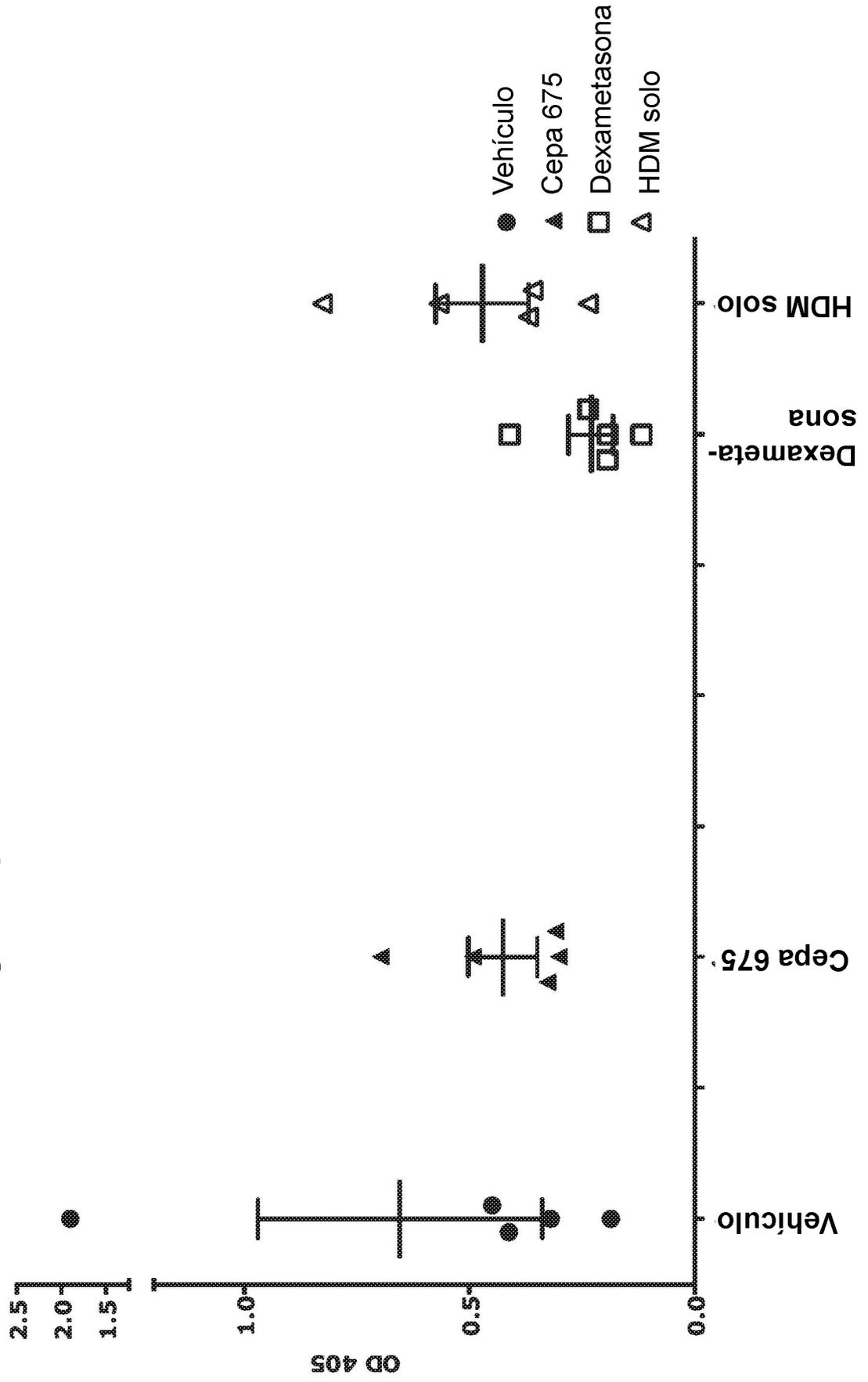


FIG. 32 Análisis histológico - Puntuación de Infiltración peribronquiolar media

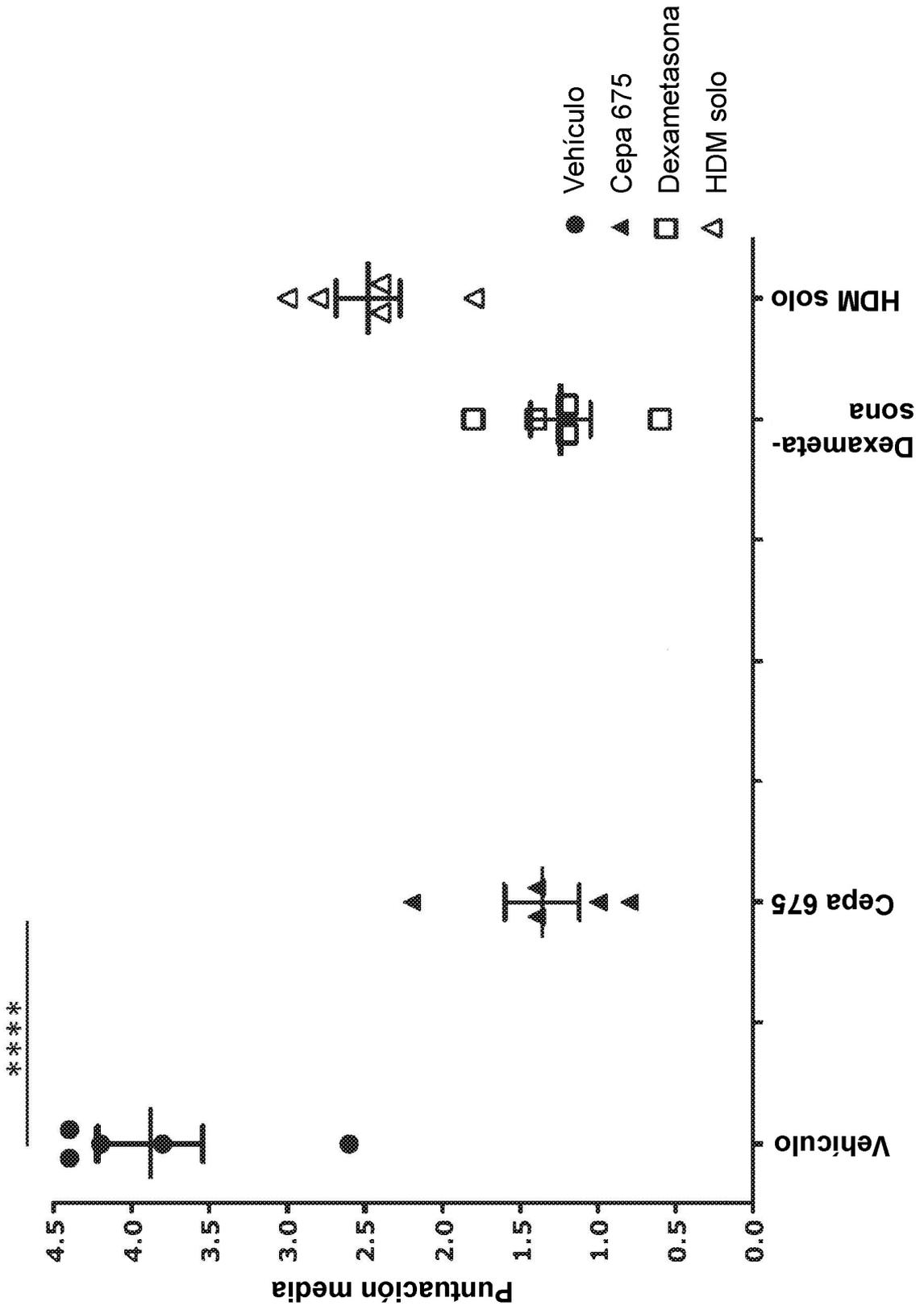


FIG. 33 Análisis histológico - Puntuación de infiltración perivascular media

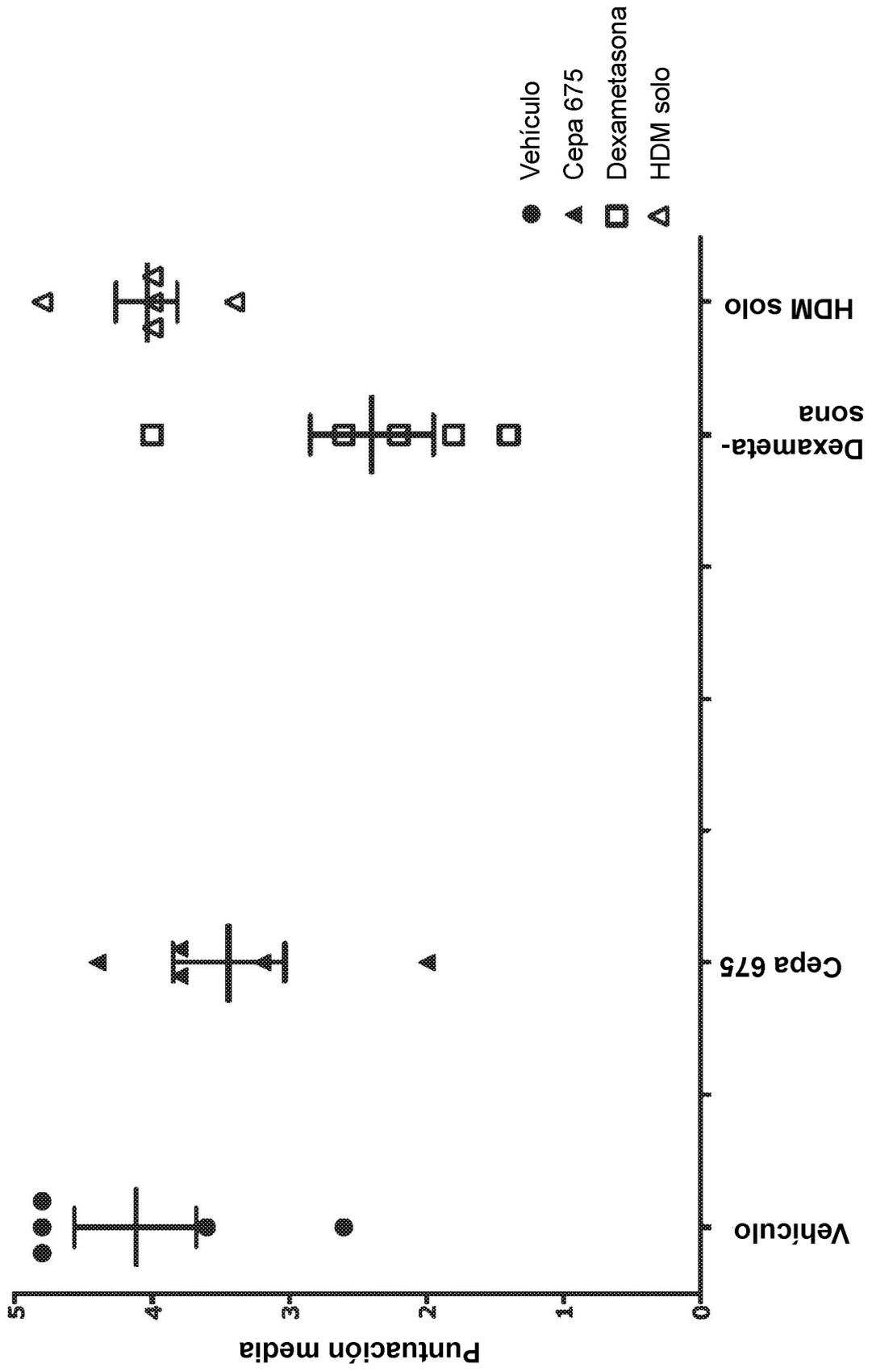


FIG. 34 Análisis Histológico - Puntuación Inflamatoria Media (Promedio de Puntuación de Infiltración tanto Peribronquial como Perivascular)

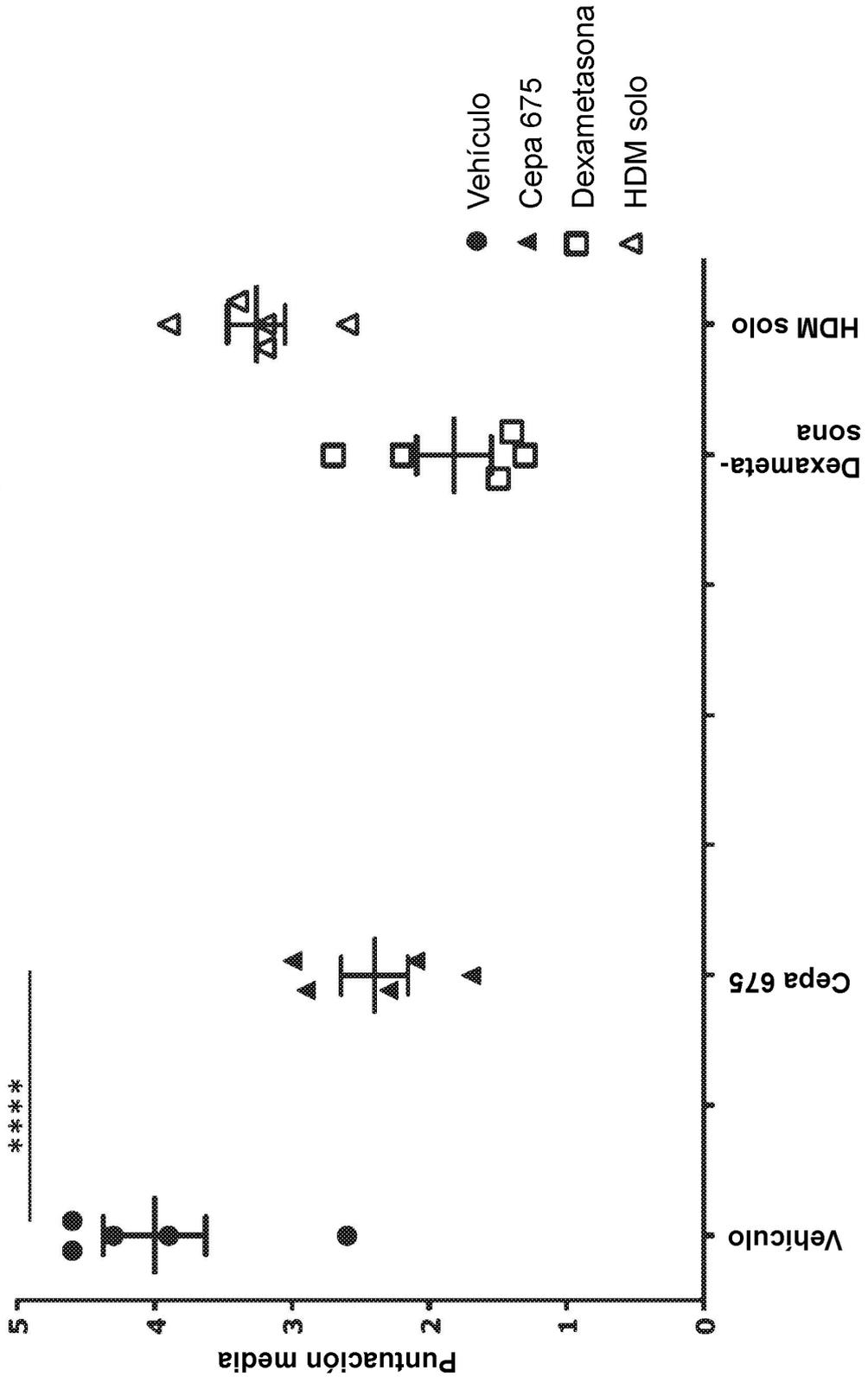


FIG. 35
Análisis Histológico - Puntuación de Moco

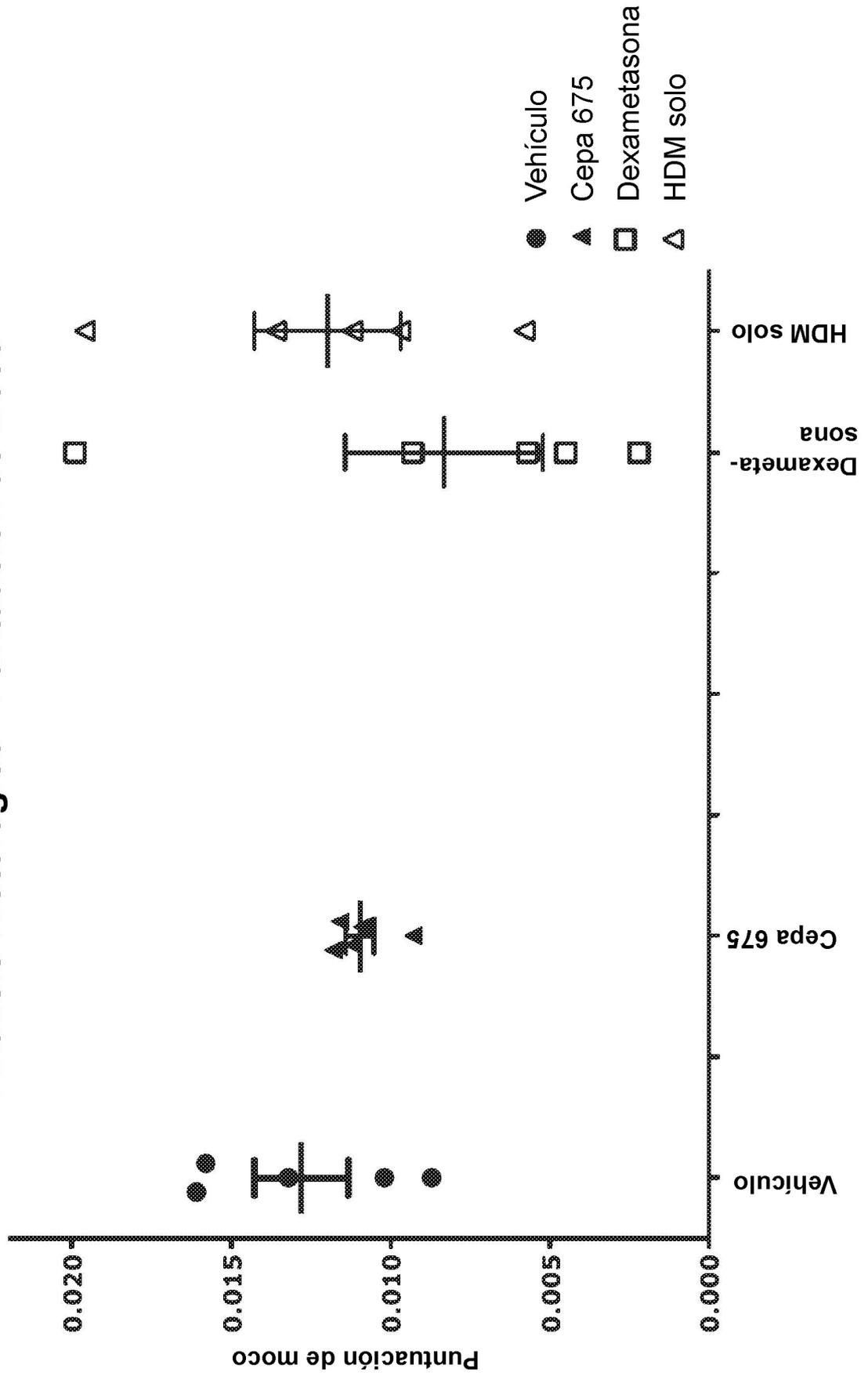


FIG. 36
Nivel de IL-9 en tejido pulmonar

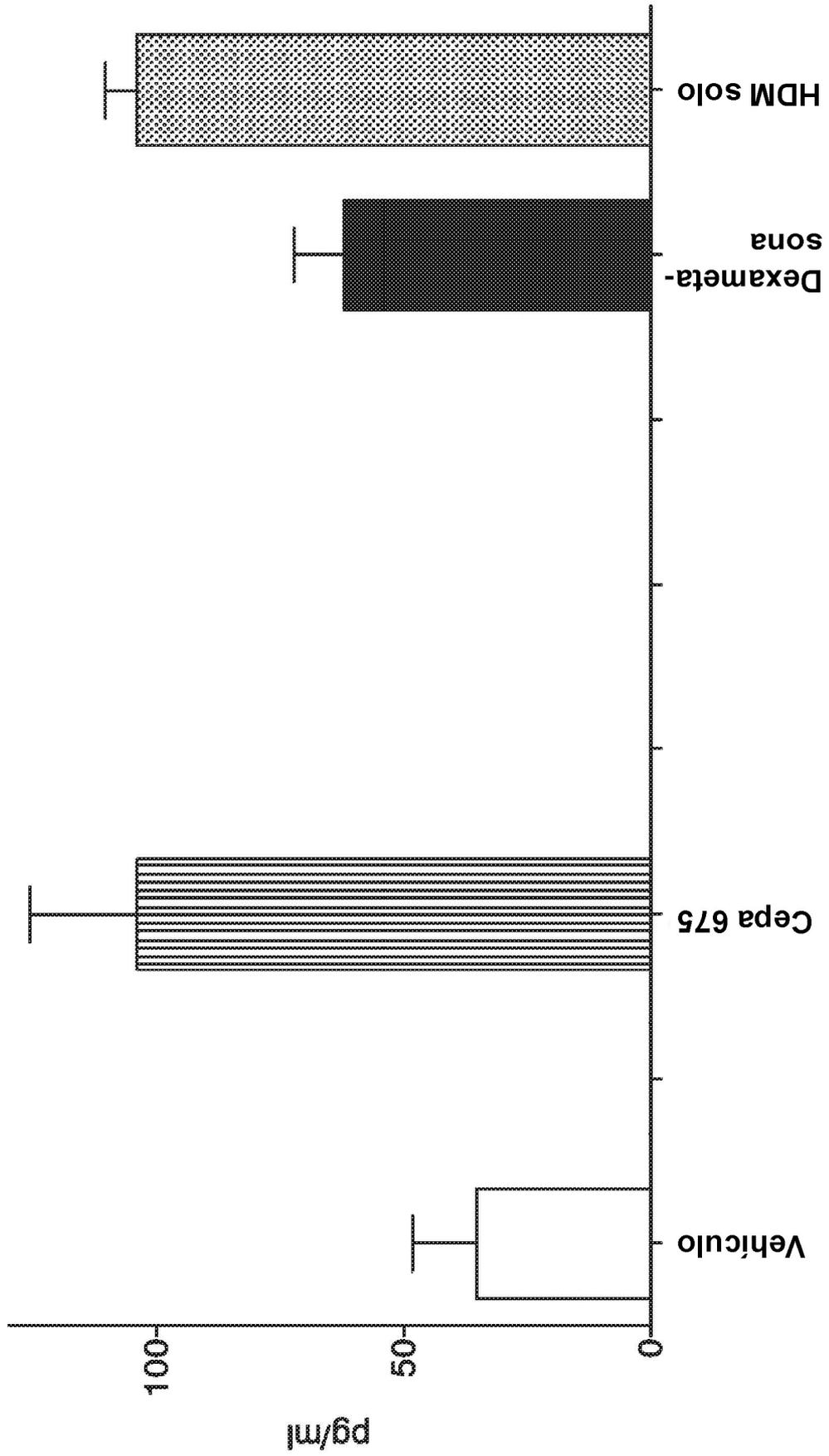


FIG. 37
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

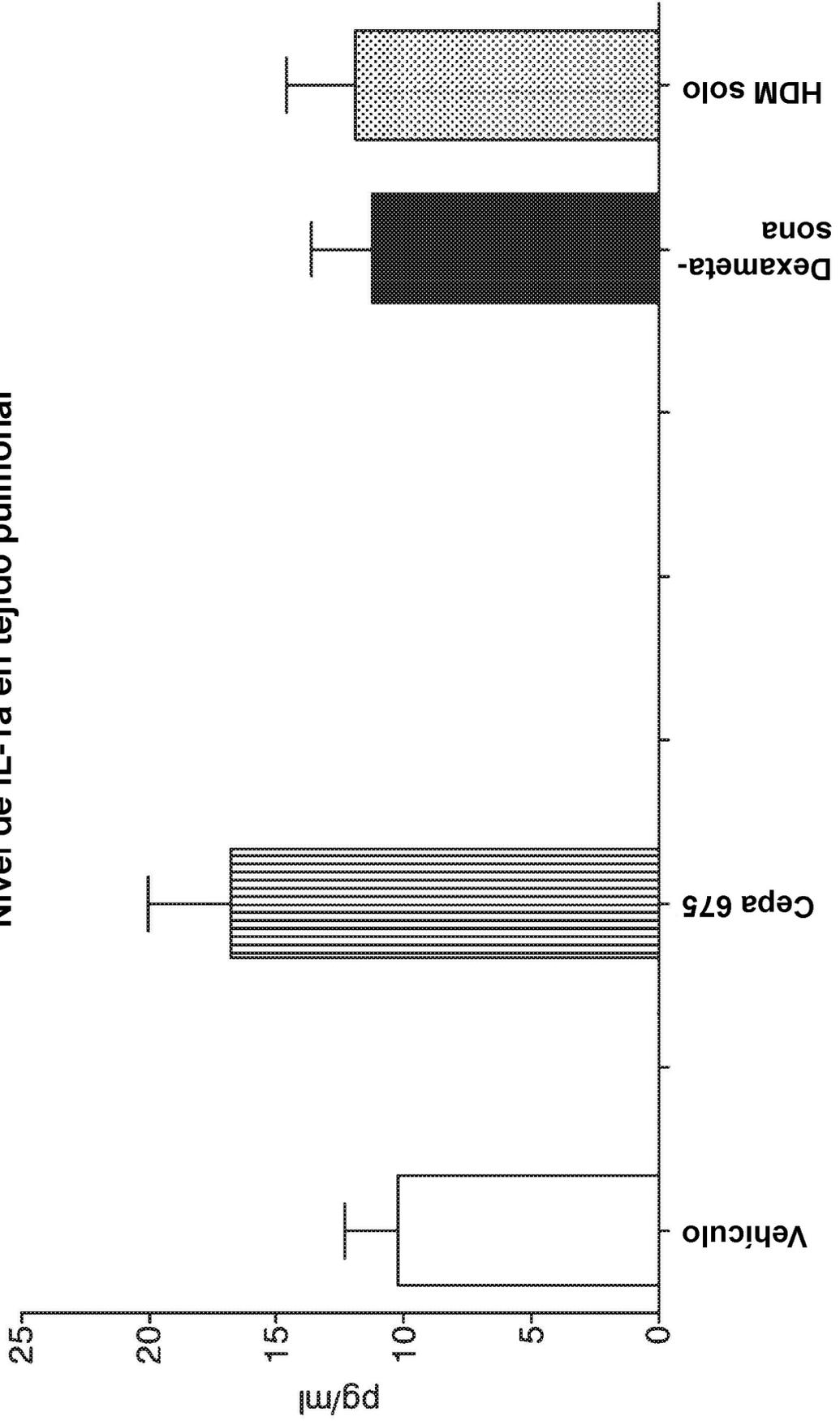


FIG. 38
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

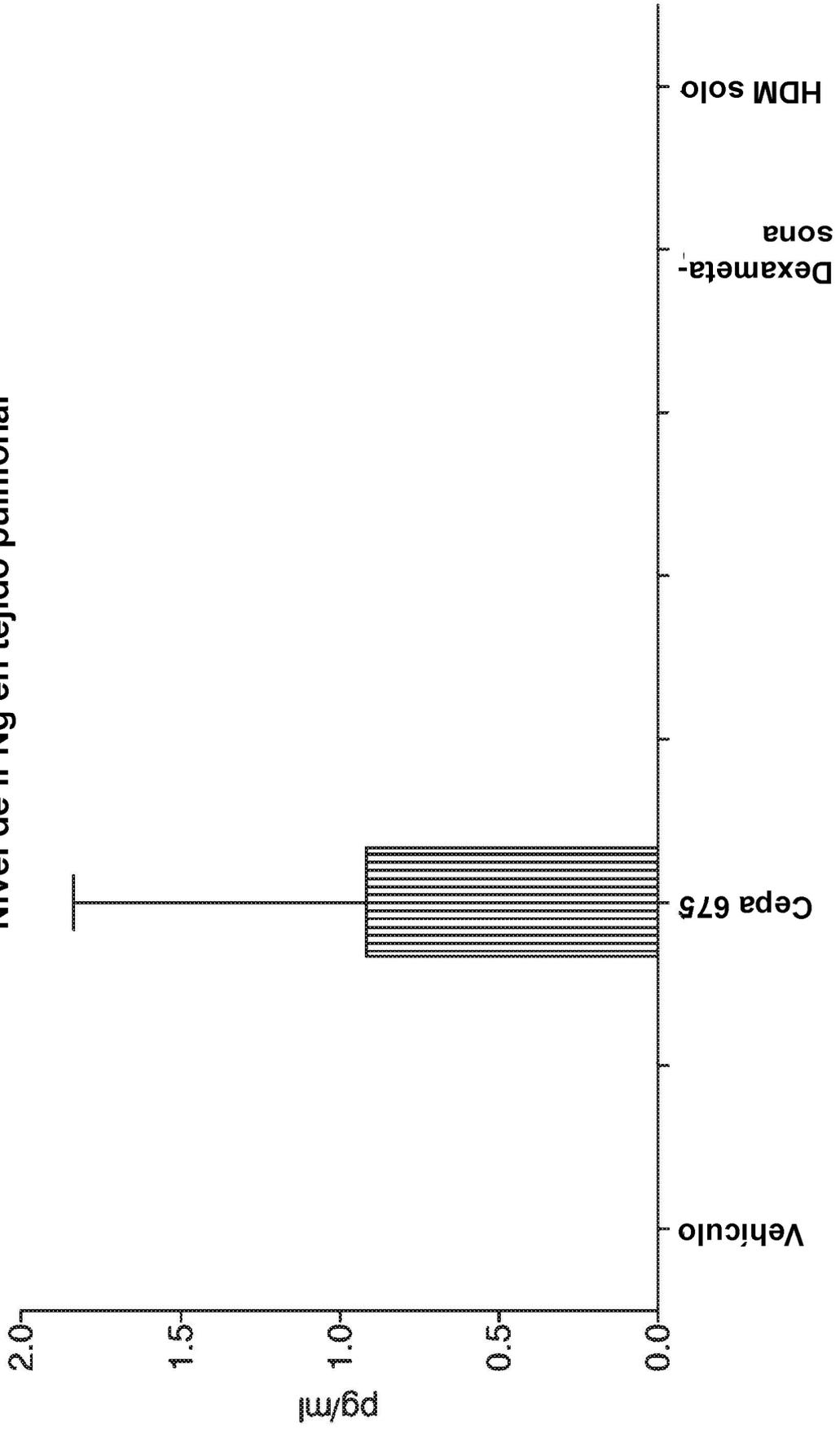


FIG. 39
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

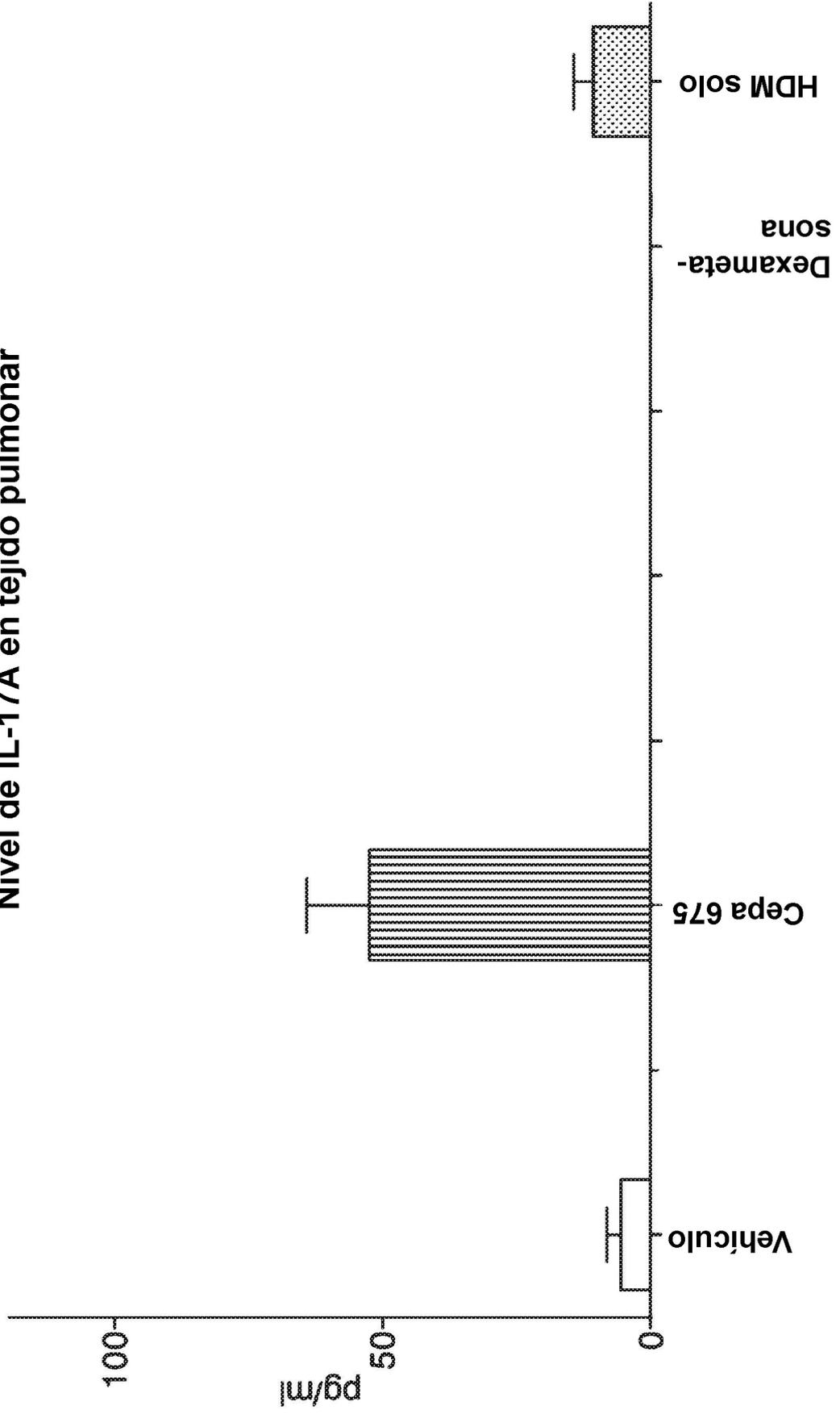


FIG. 40
Nivel de IL-4 en tejido pulmonar

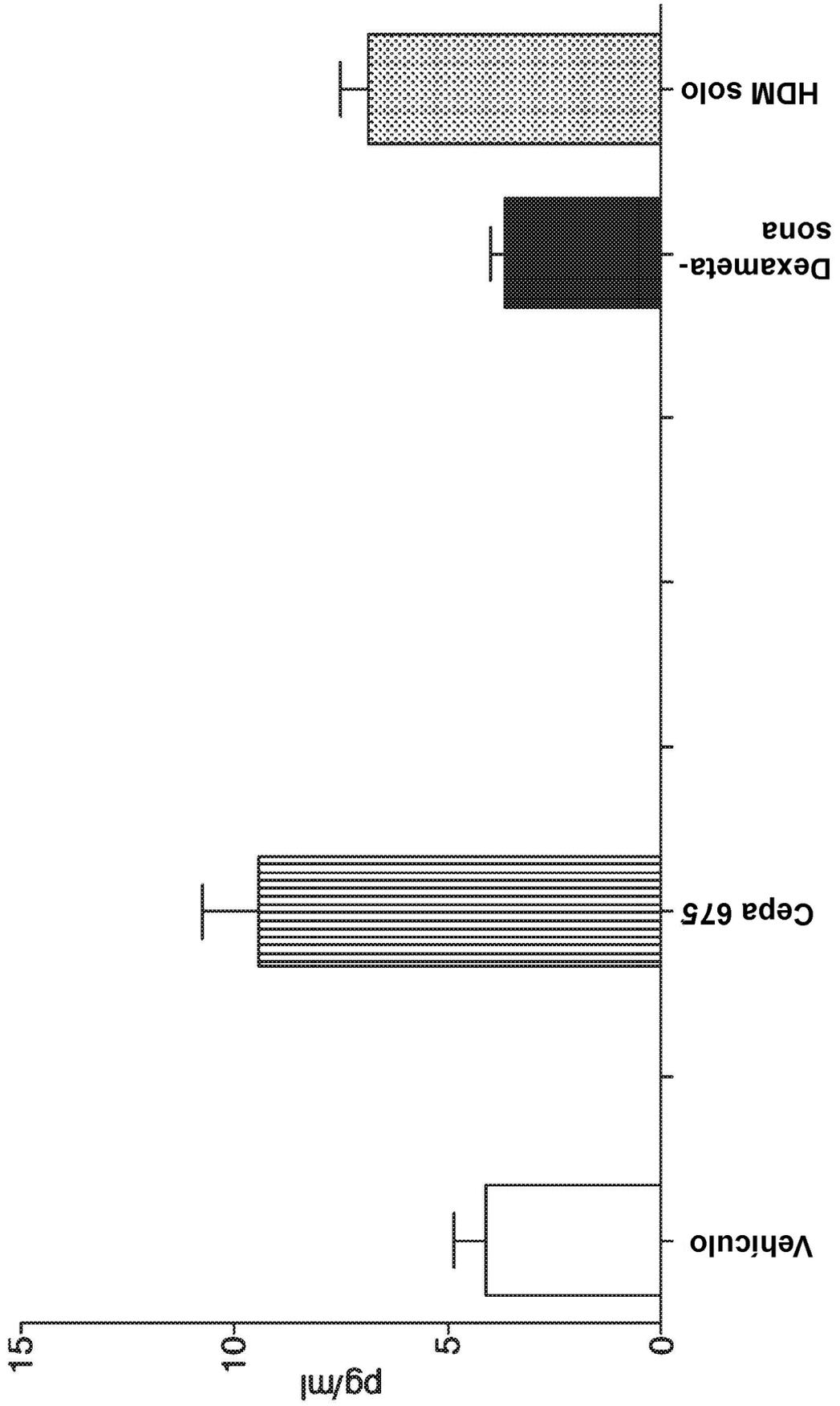


FIG. 41
Nivel de IL-5 en tejido pulmonar

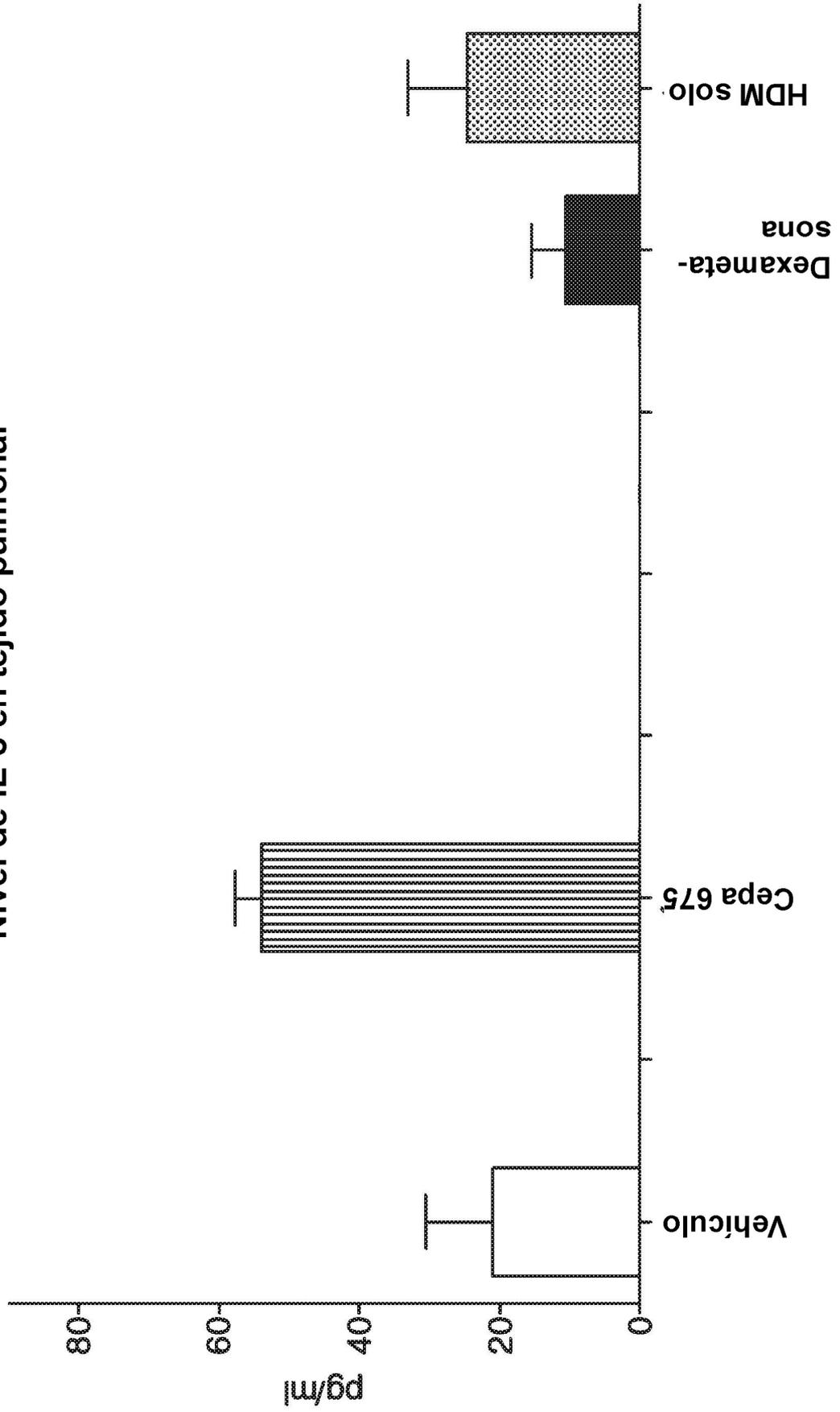


FIG. 42
Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

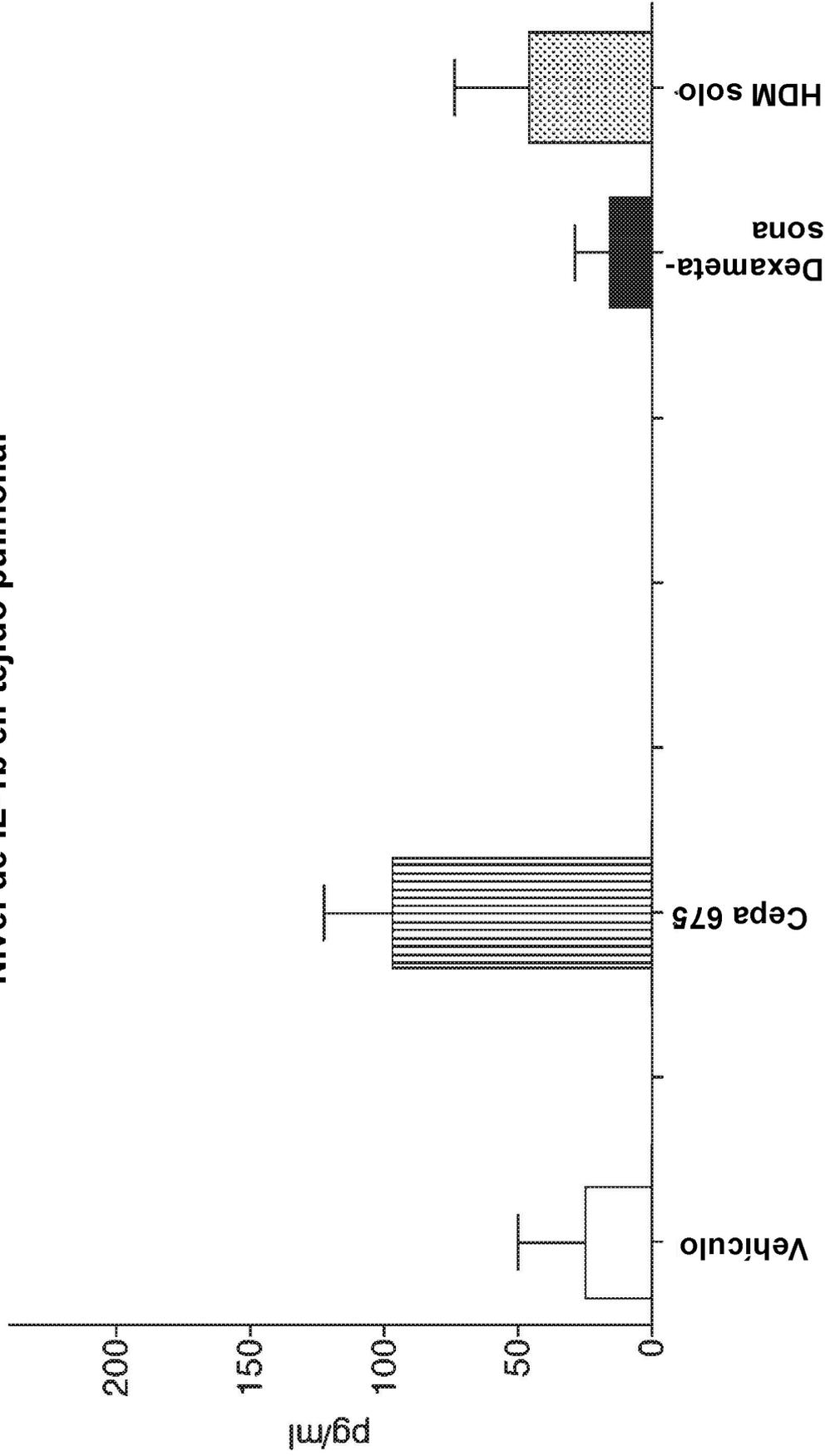


FIG. 43
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

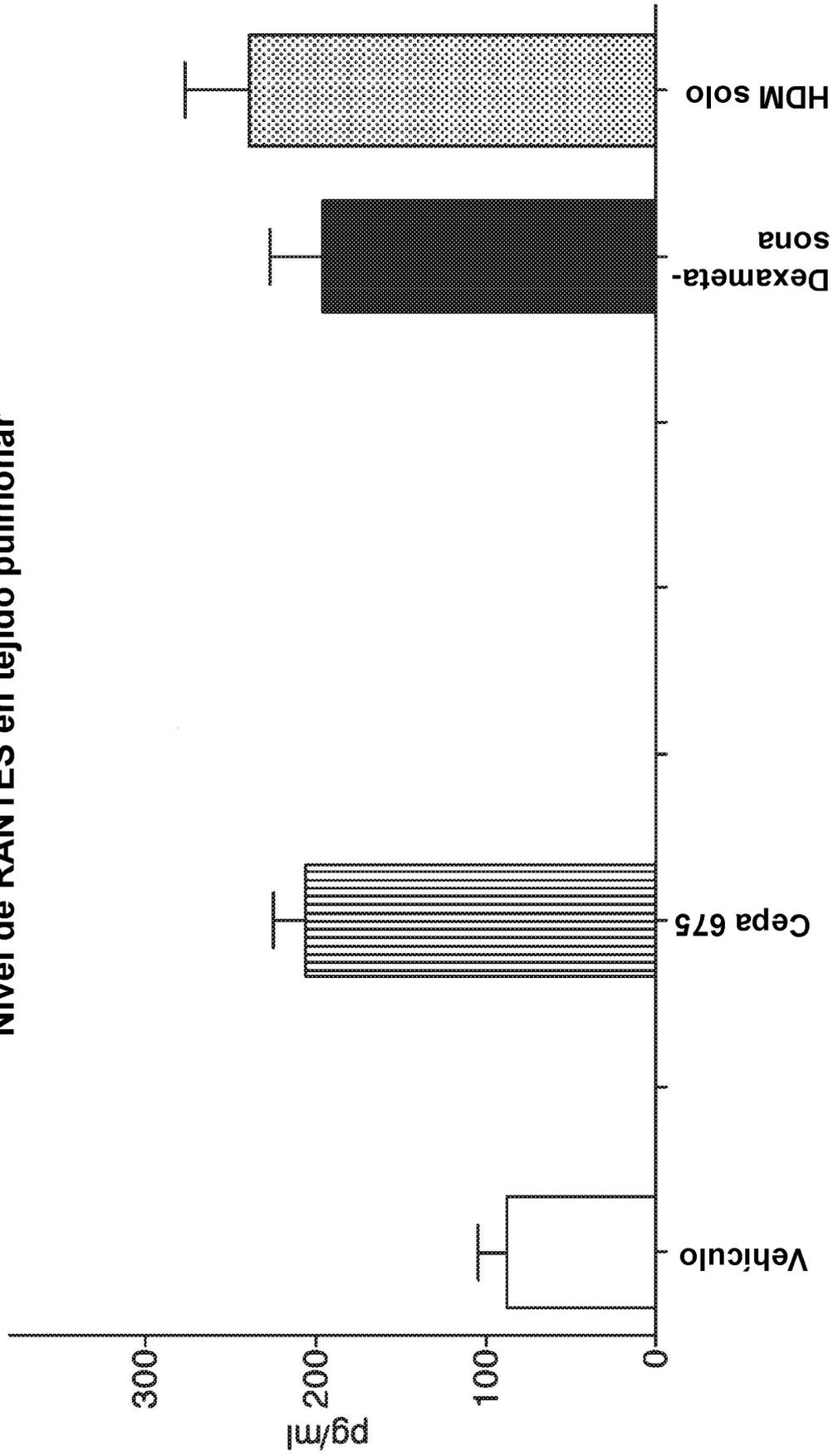


FIG. 44
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

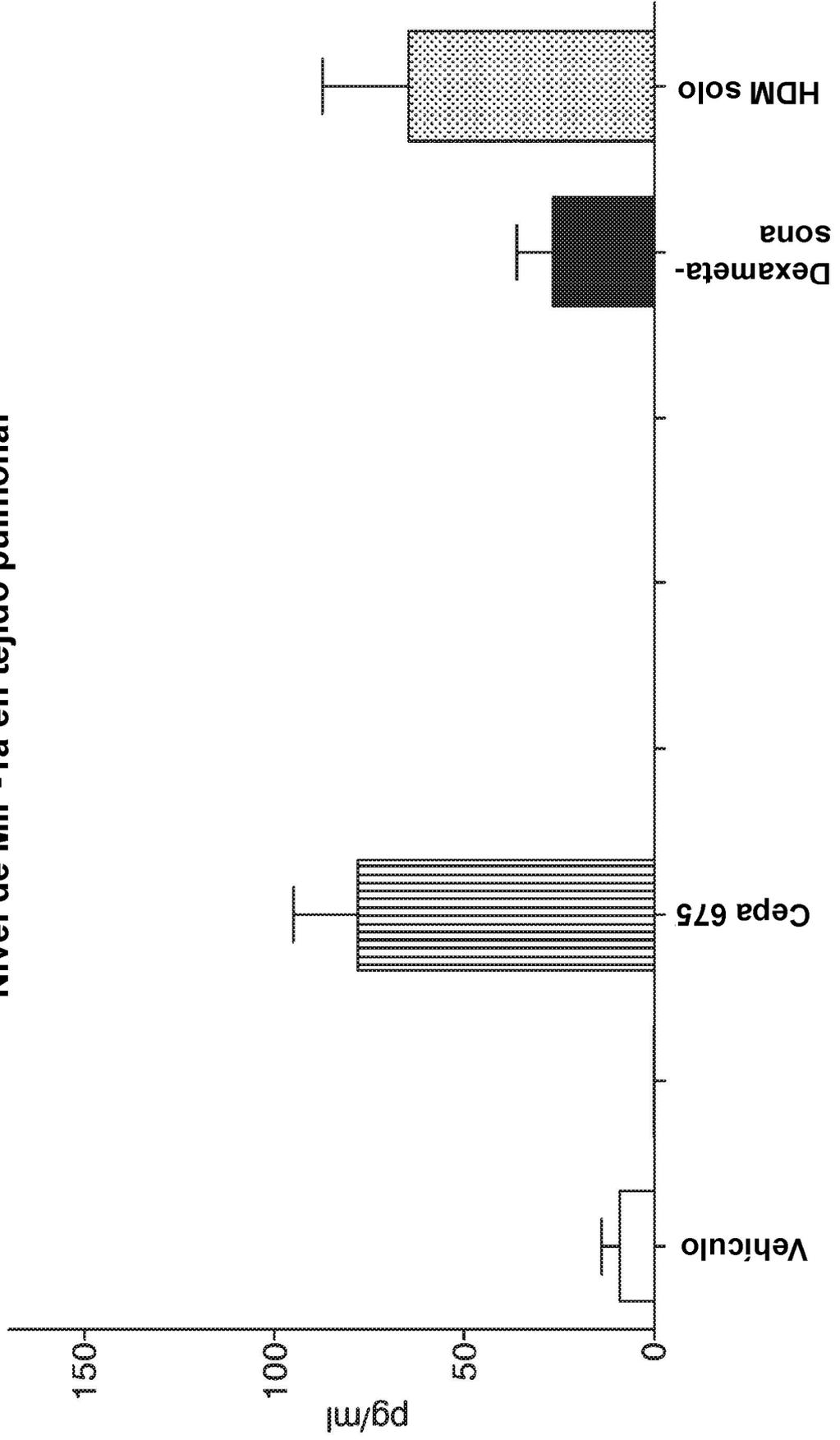


FIG. 45
Nivel de KC en tejido pulmonar

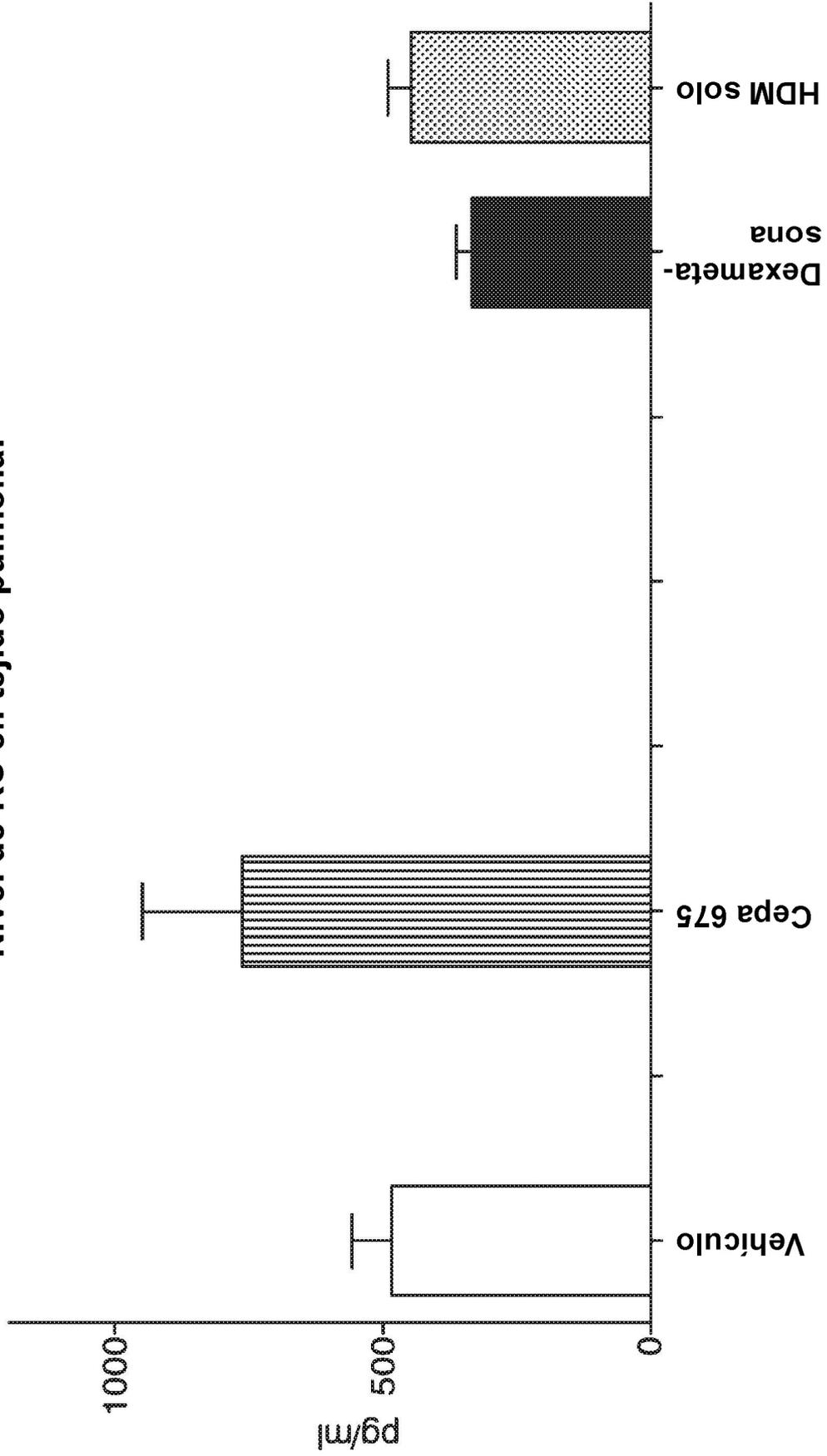


FIG. 46
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

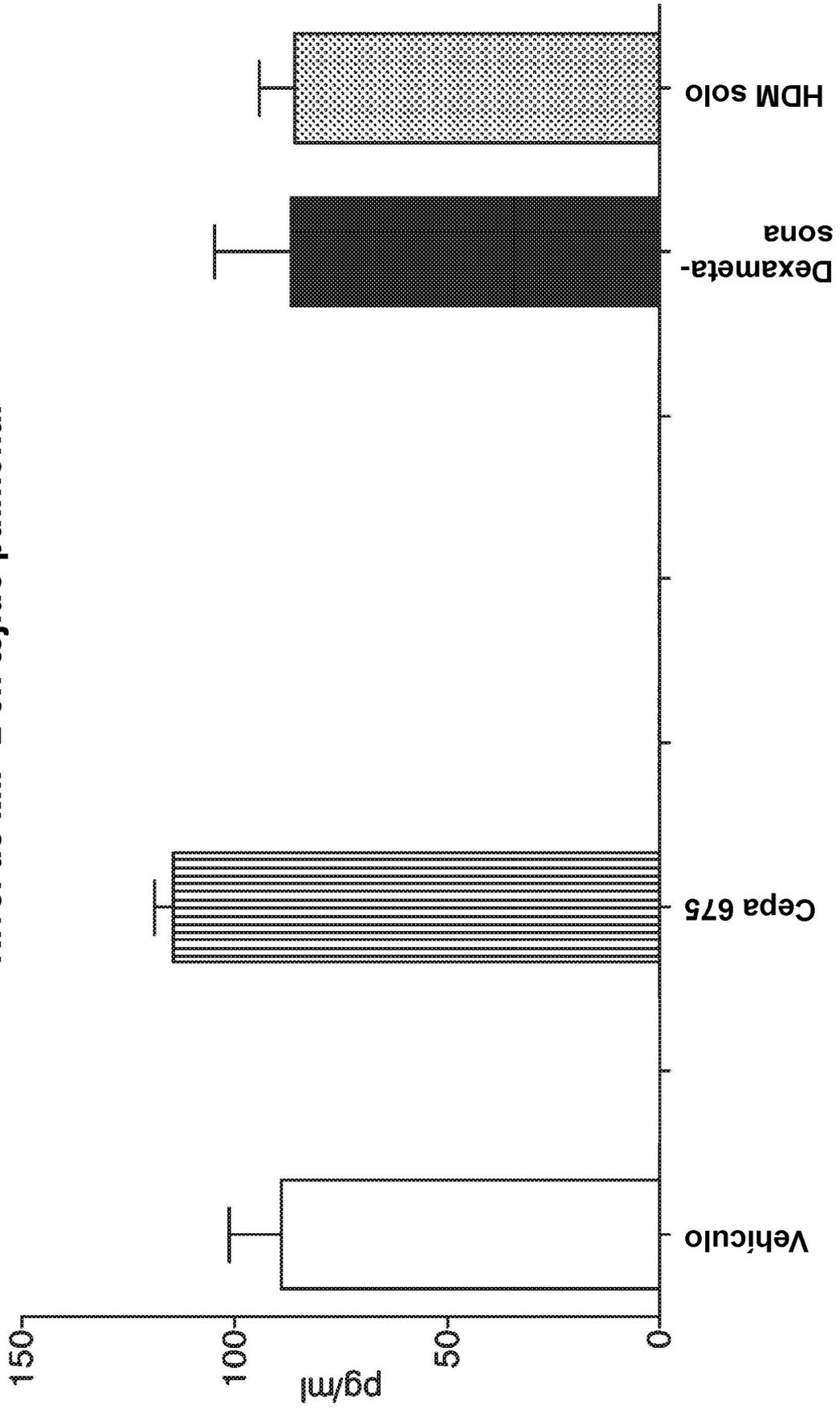


FIG. 47 IgG1 específica de HDM en suero

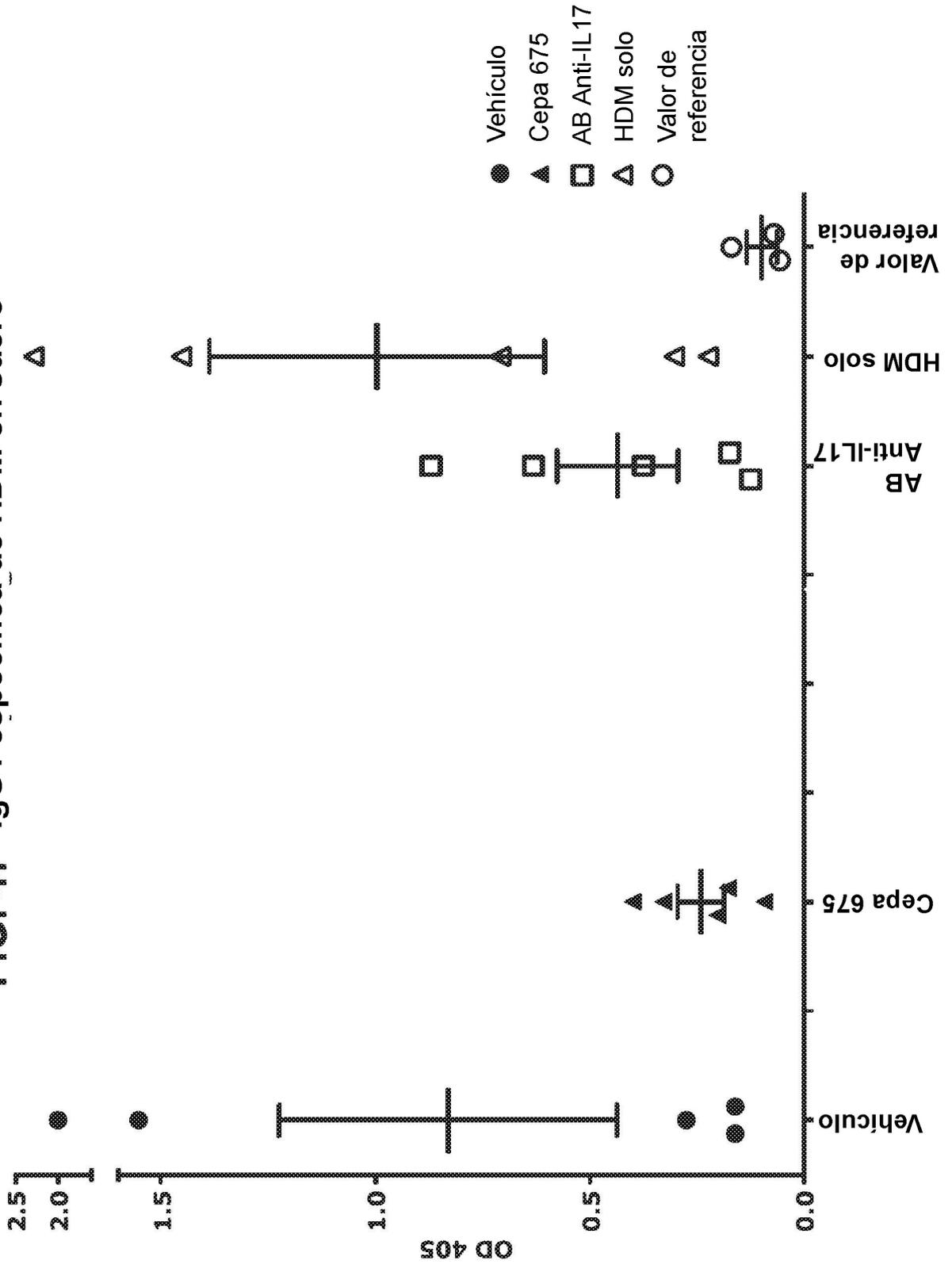


FIG. 48 IgG2a específica de HDM en suero

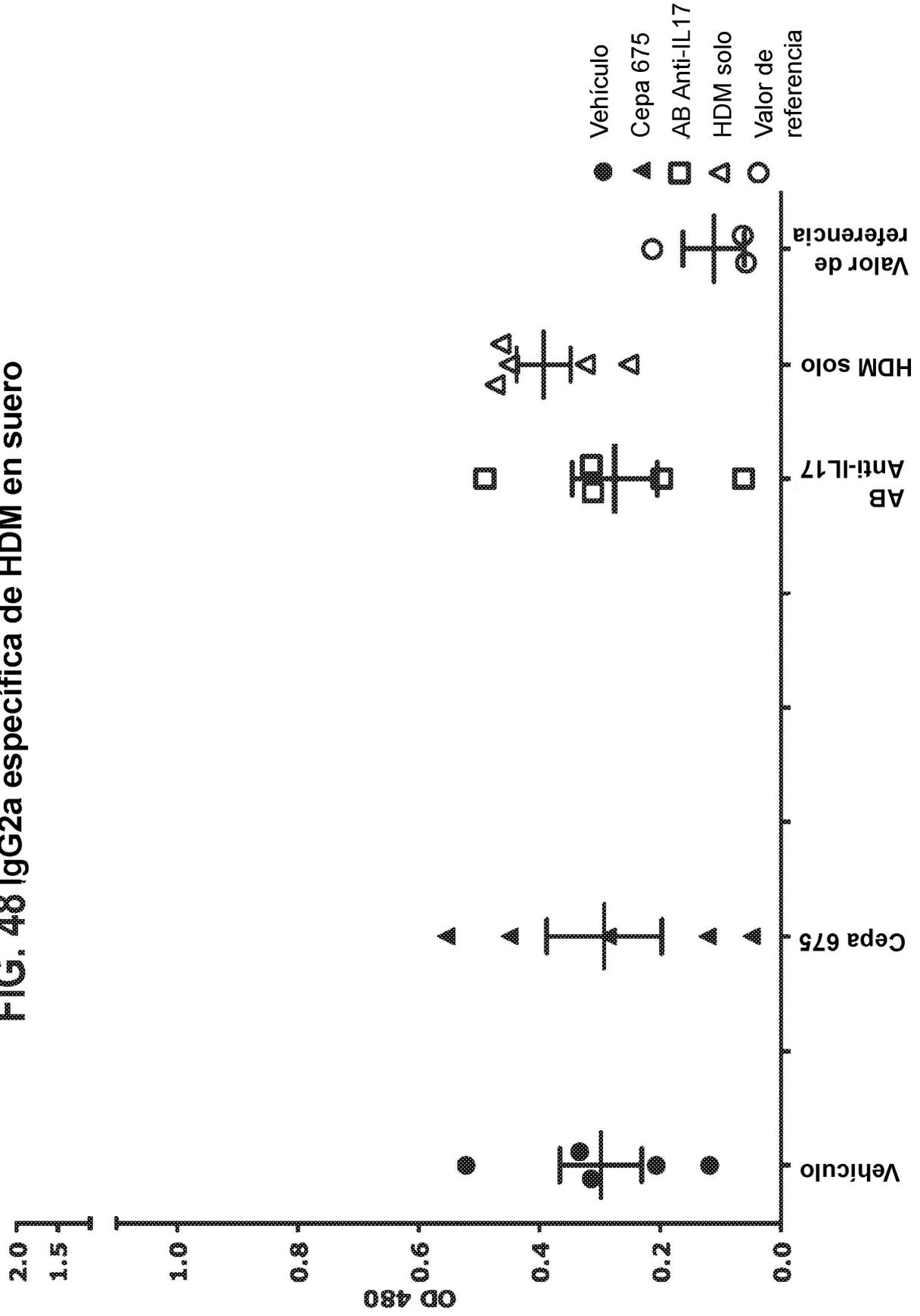


FIG. 50
IgG2a específica de HDM en BALF

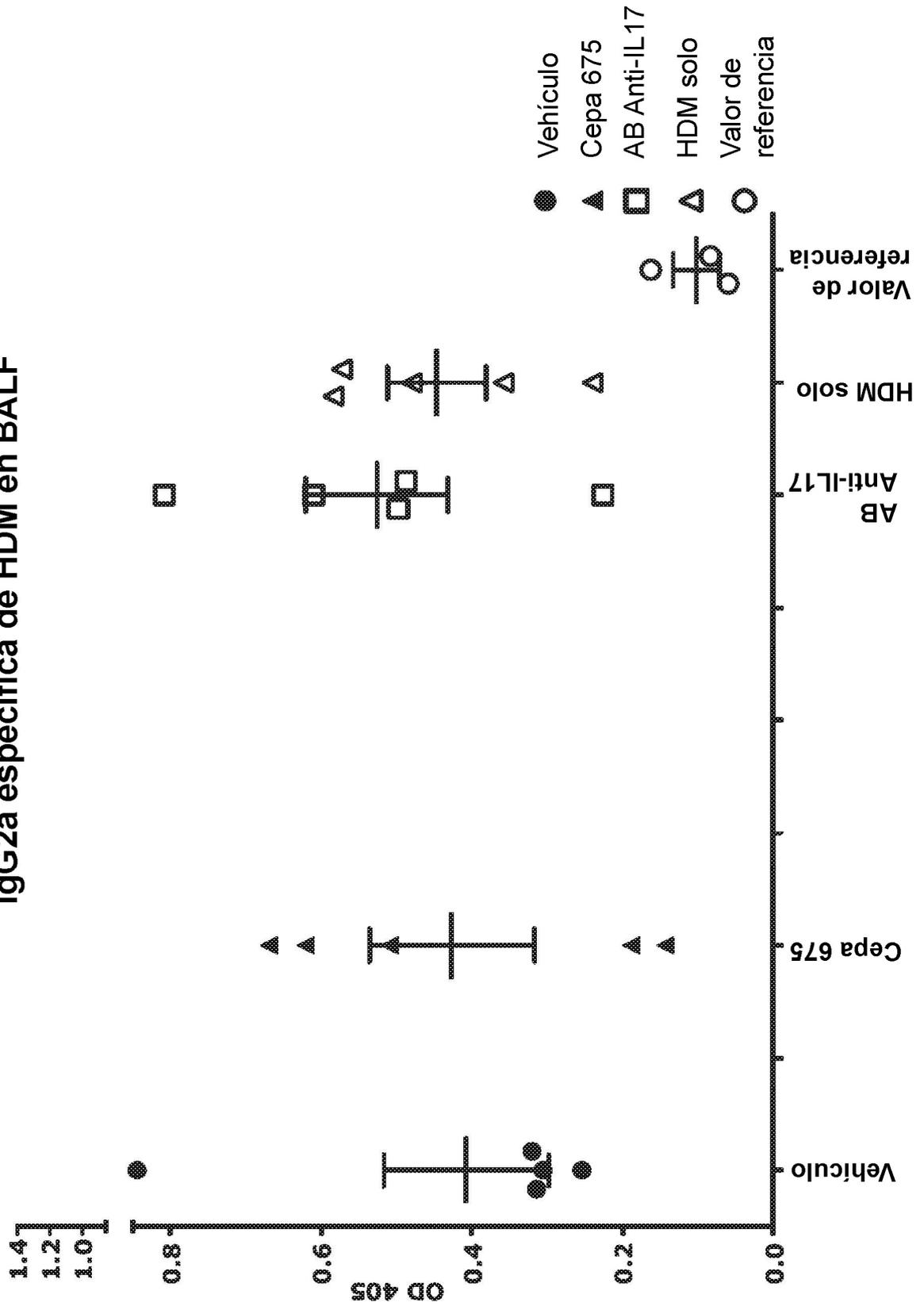


FIG. 51 Análisis Histológico - Puntuación de Infiltración Peribronquilar Media

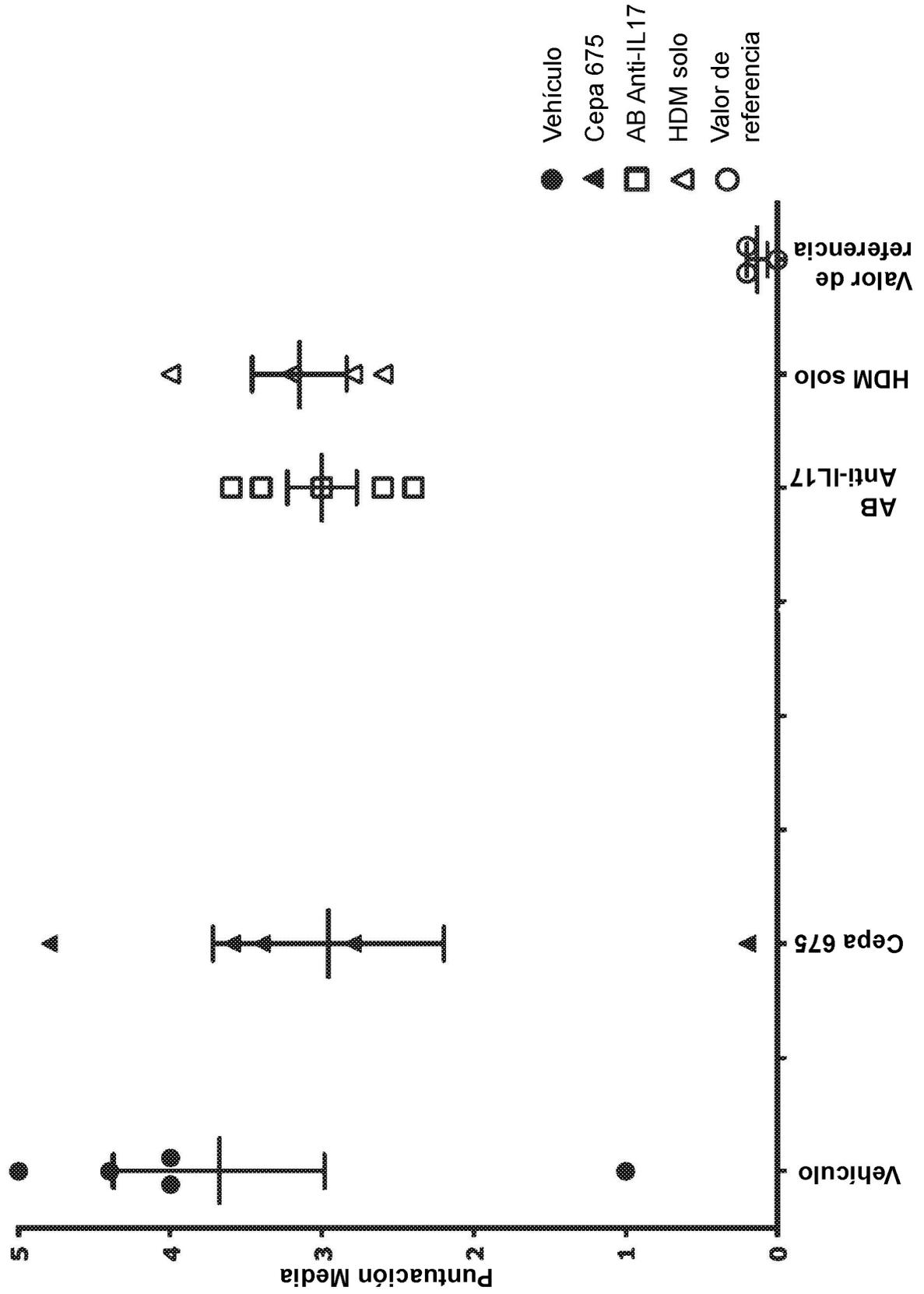


FIG. 52 Análisis Histológico - Puntuación de Infiltración Perivascular Media

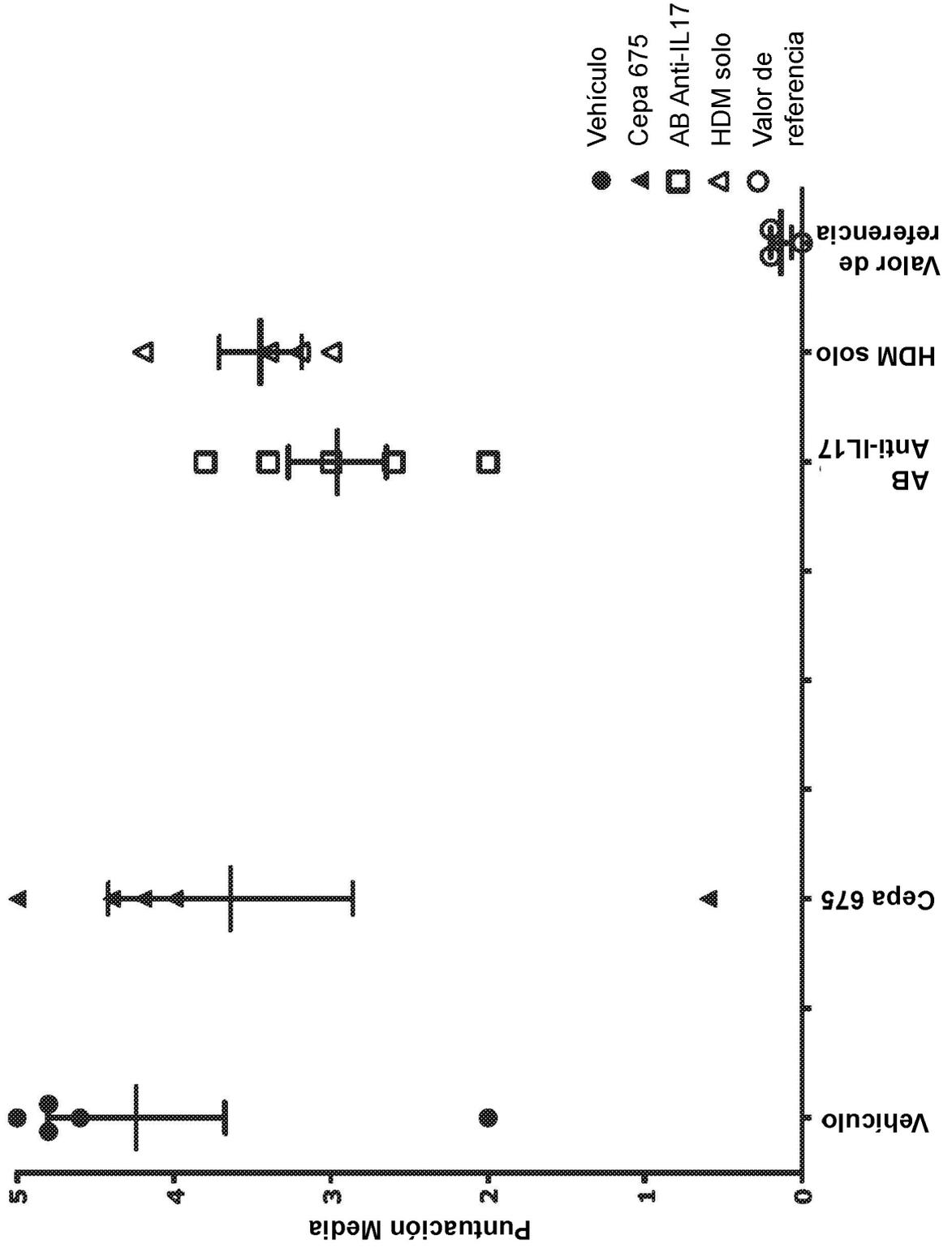


FIG. 53 Análisis Histológico - Puntuación Inflamatoria Media (Promedio de Puntuación de Infiltración tanto Peribronquiolar como Perivascular)

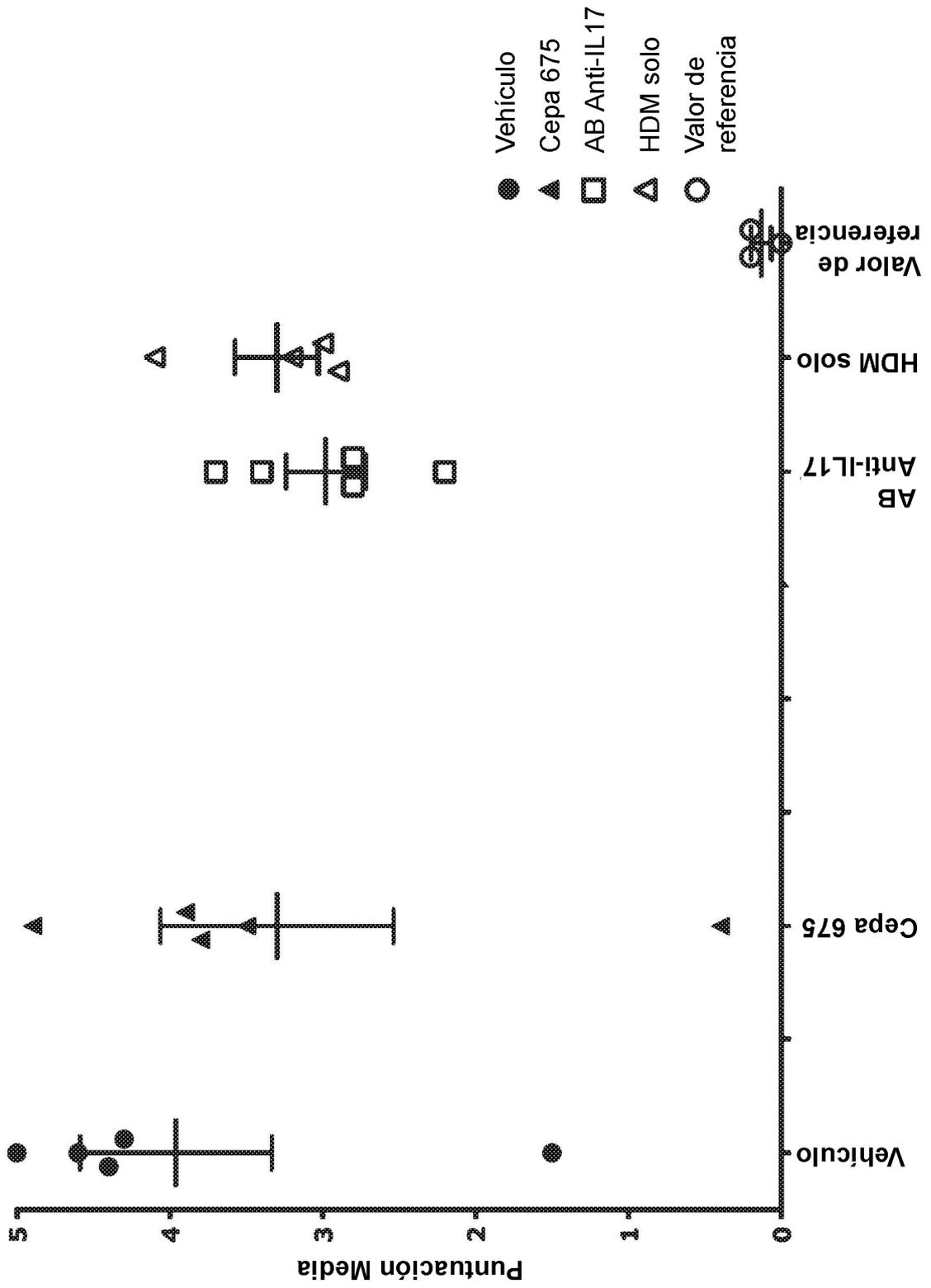


FIG. 54
Nivel de TNFa en tejido pulmonar

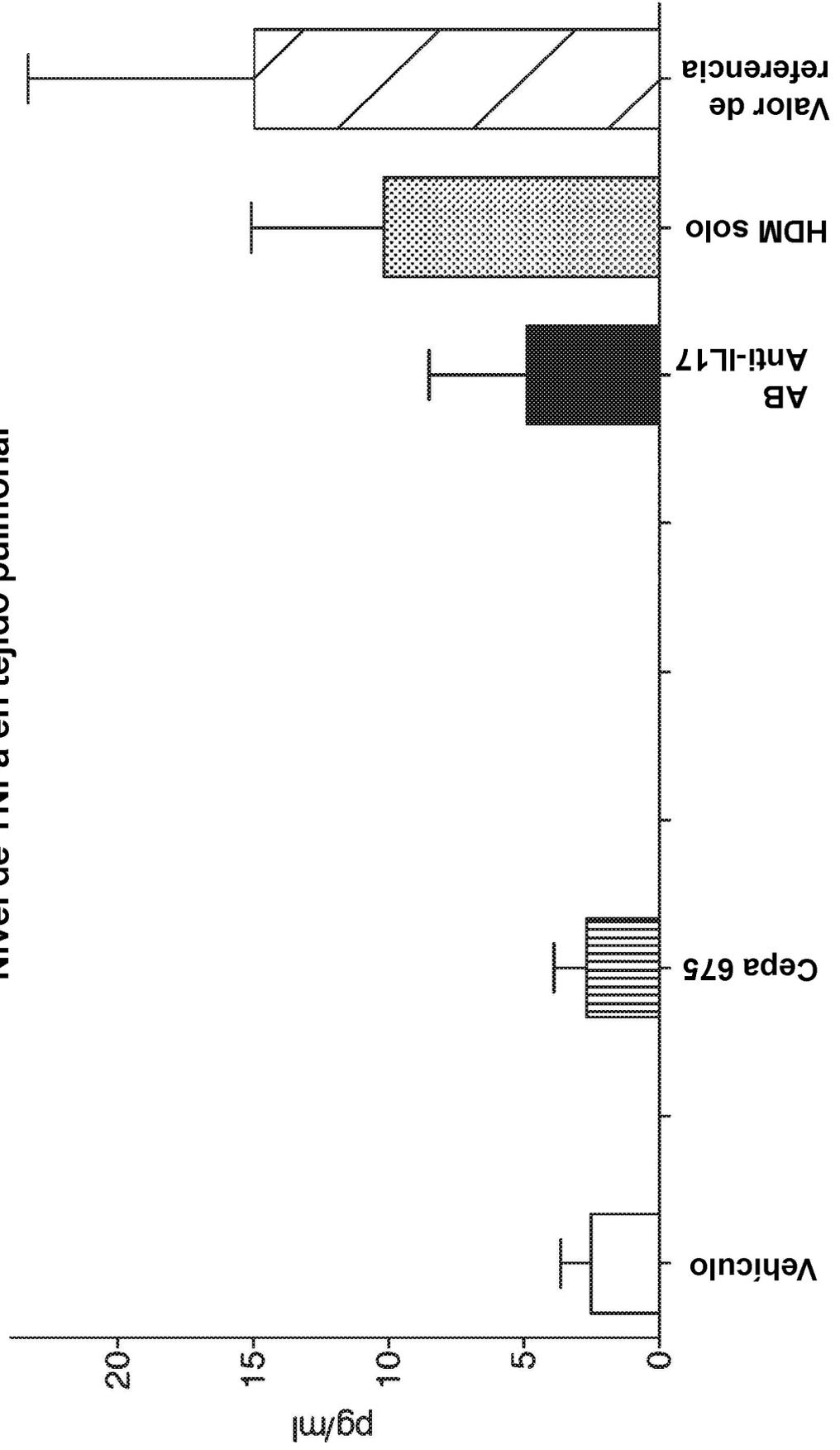


FIG. 55
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

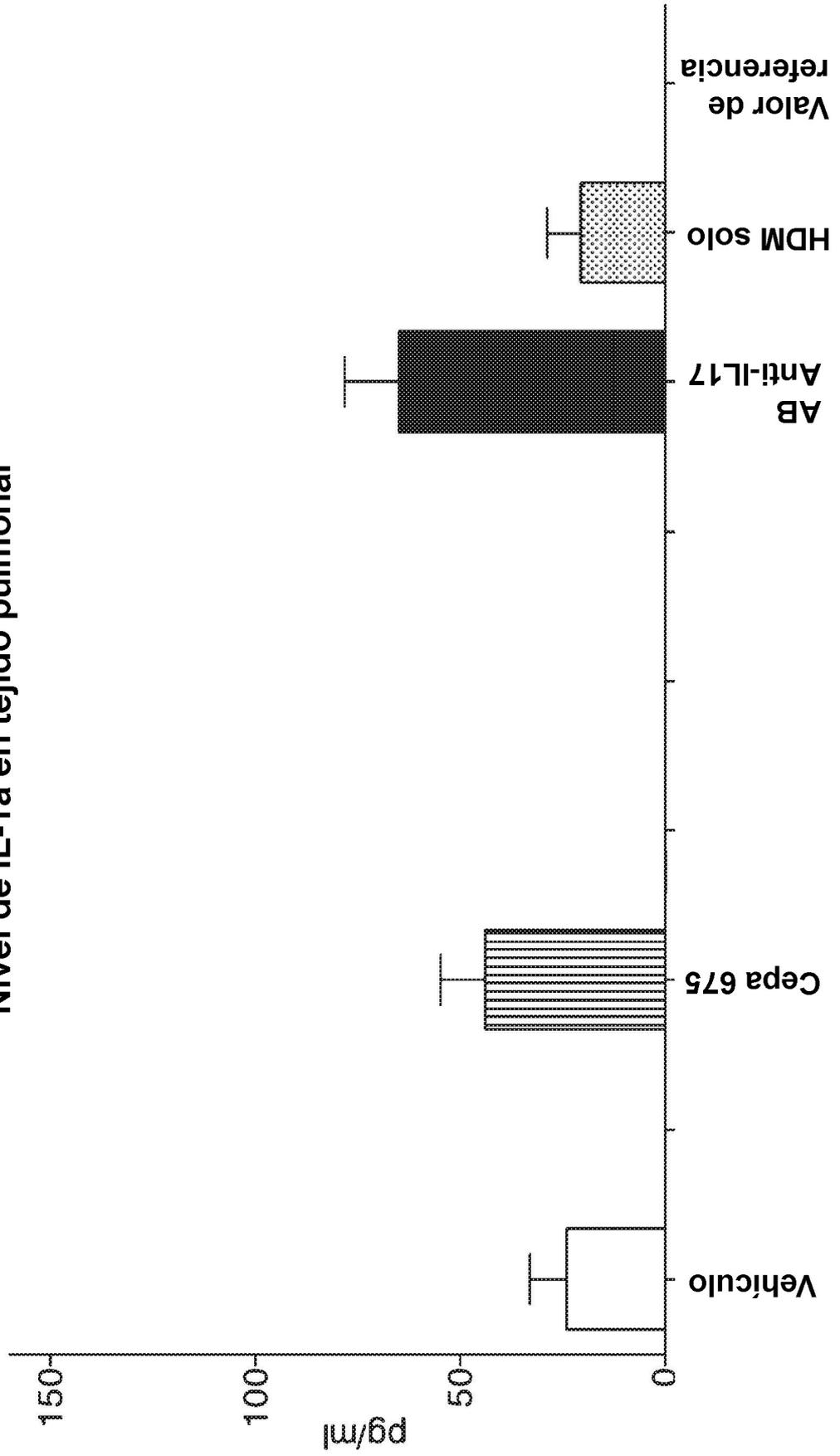


FIG. 56
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

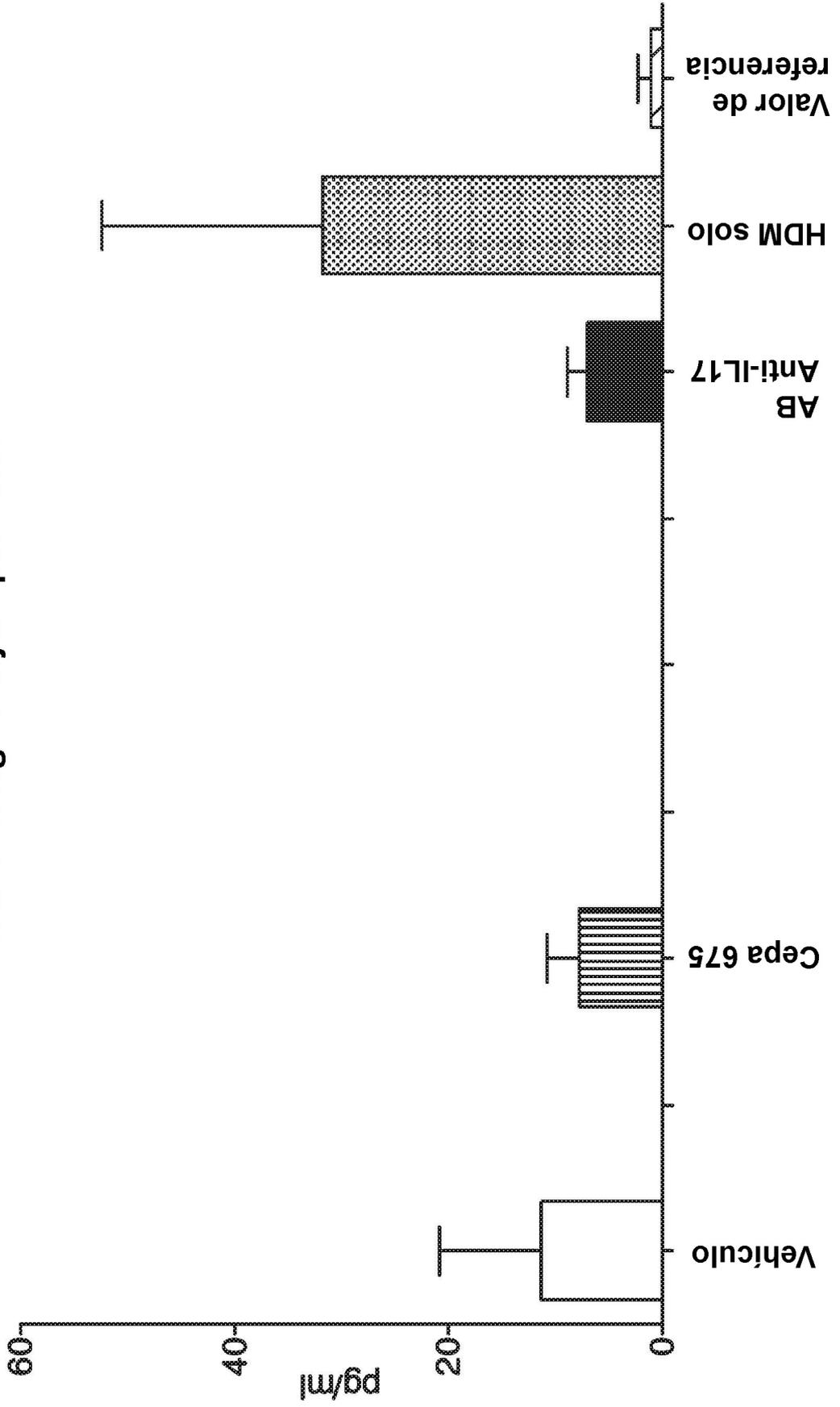


FIG. 57
Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

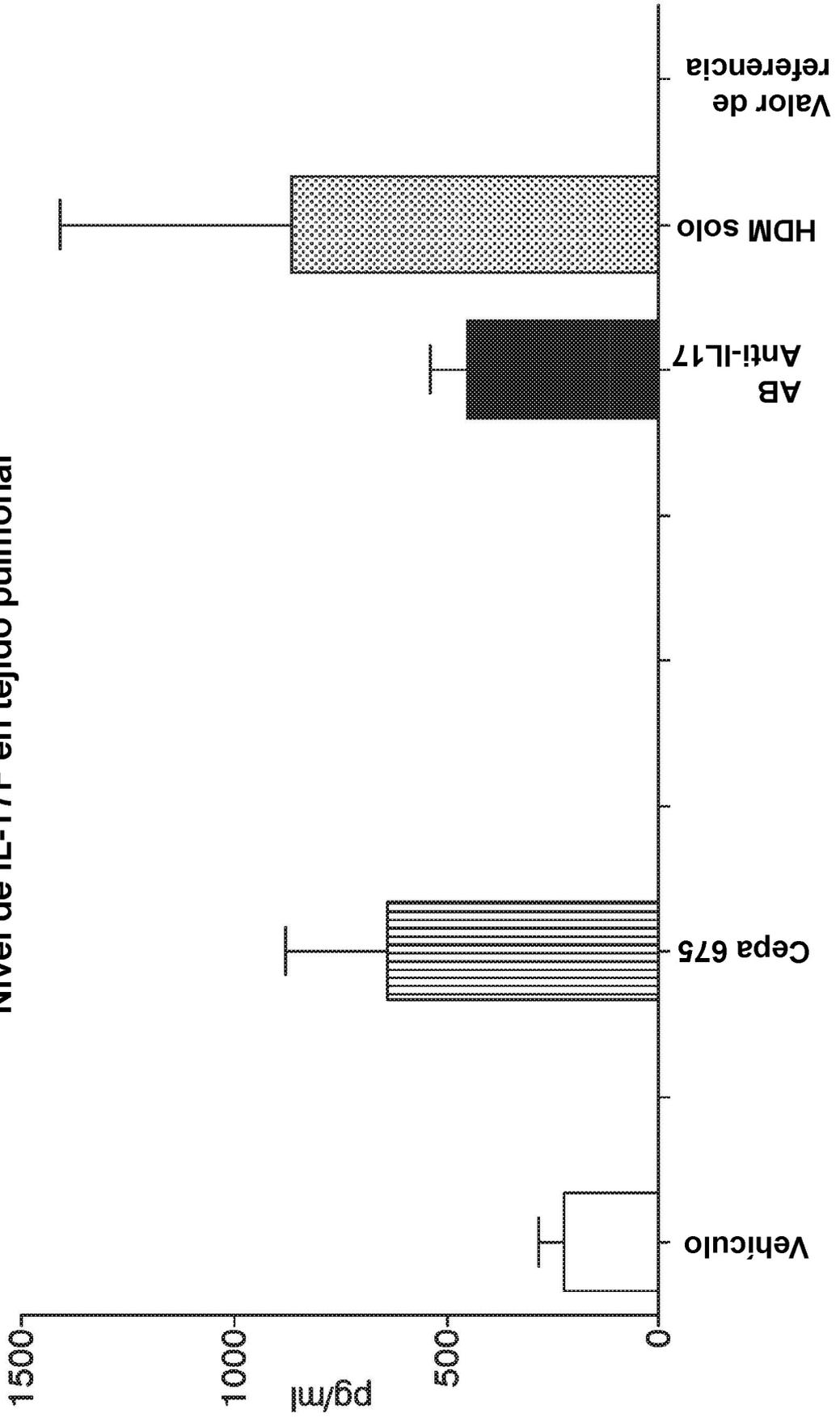


FIG. 58
Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

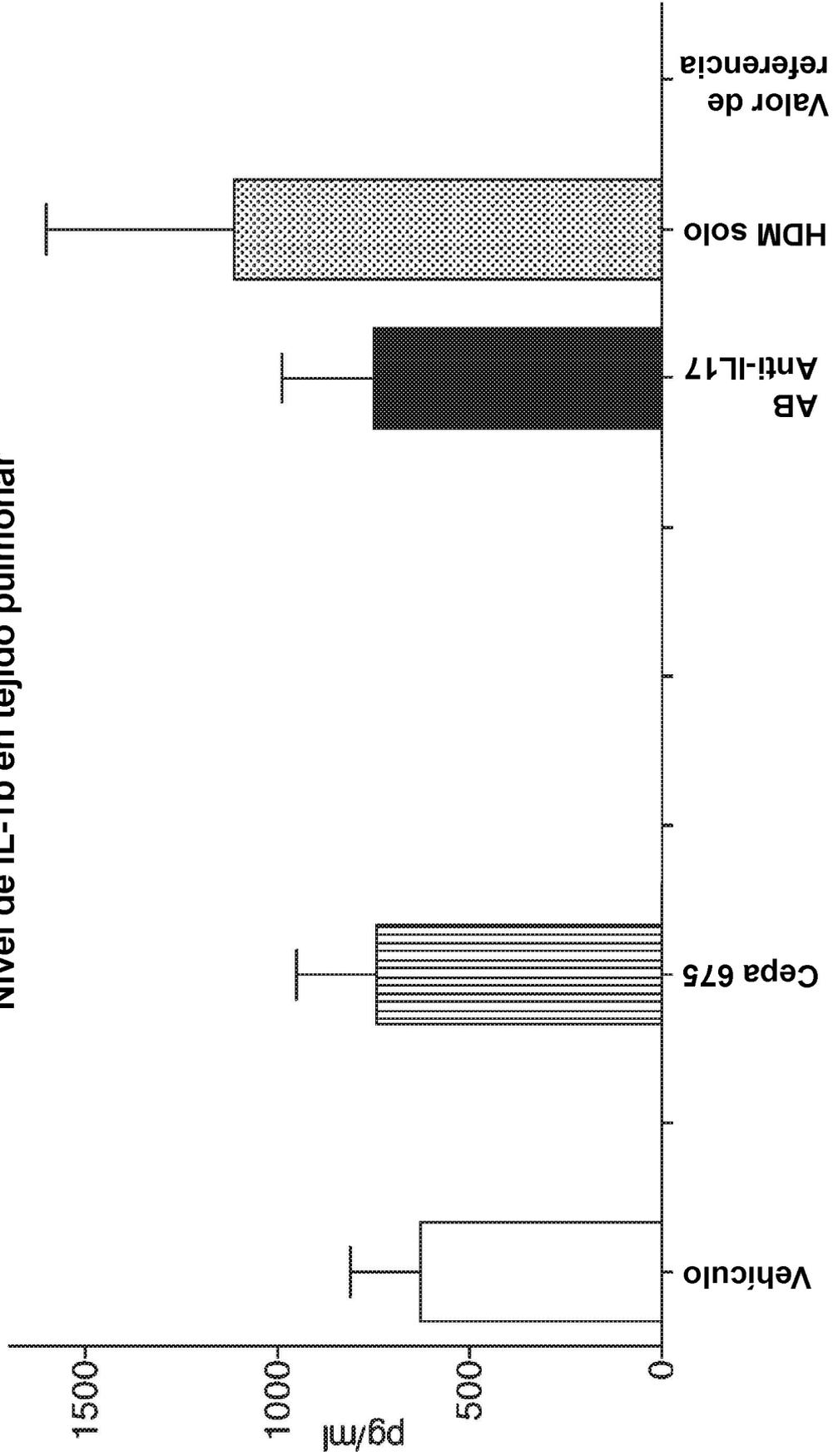


FIG. 59
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

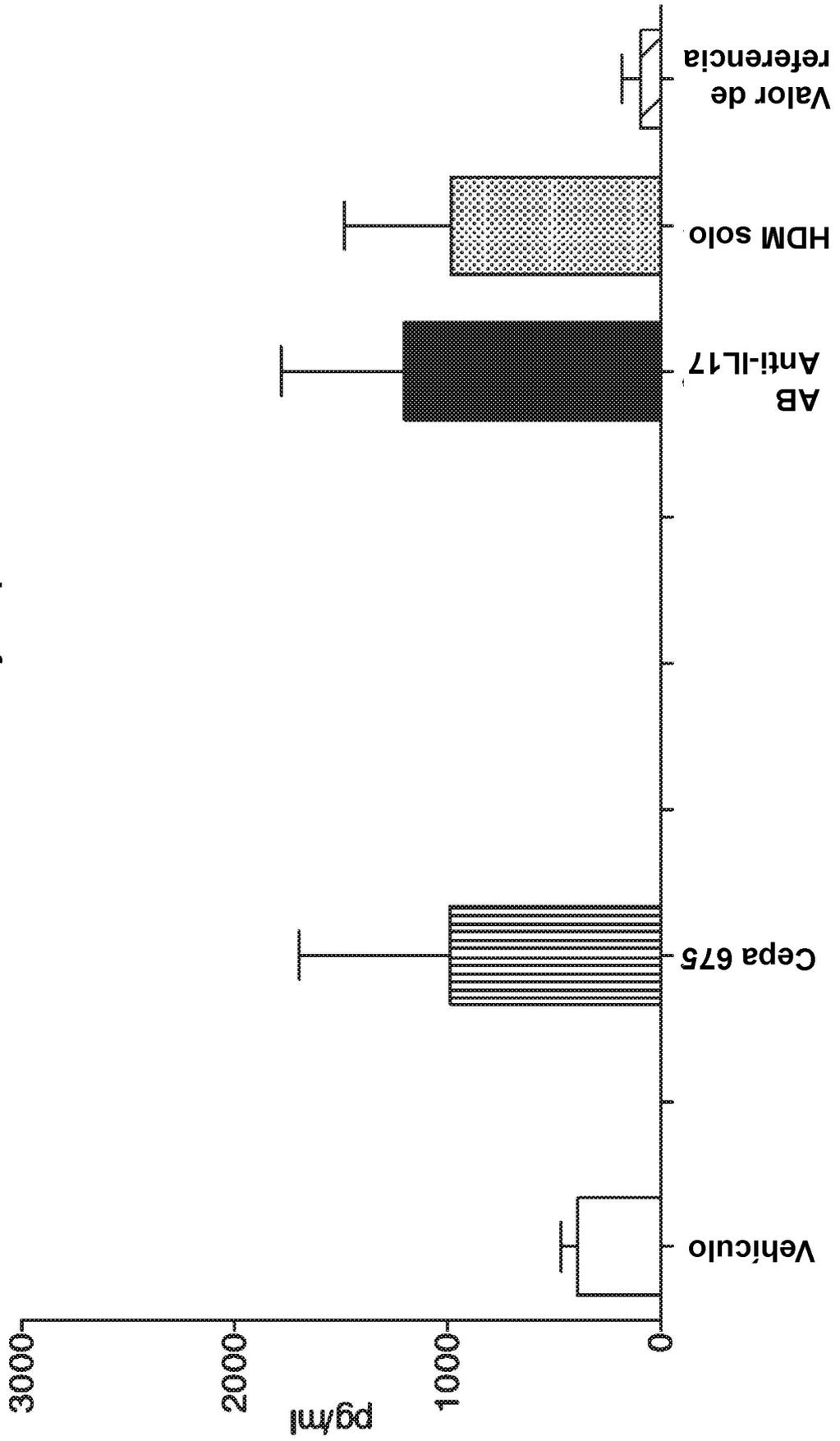


FIG. 60
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

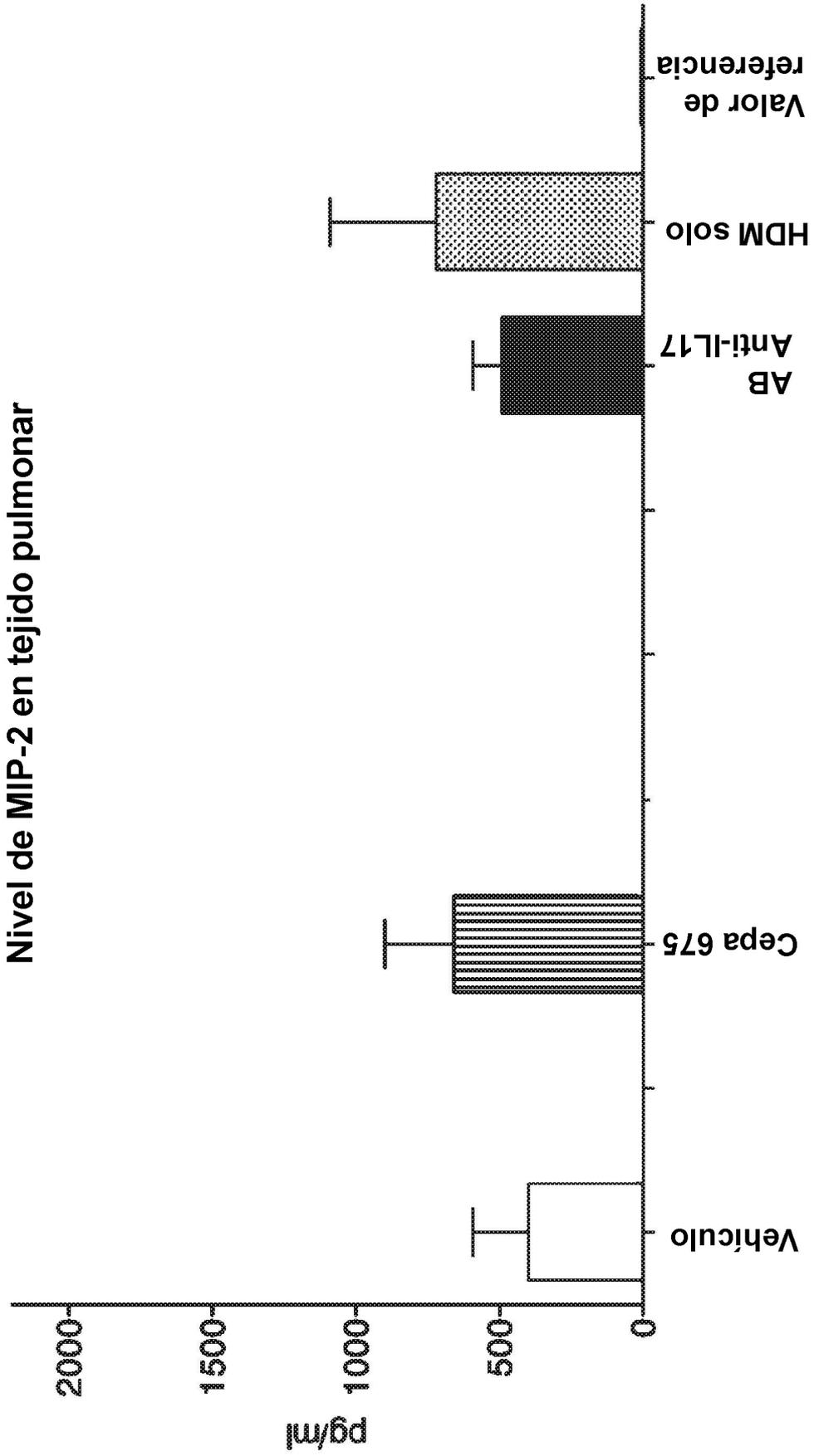


FIG. 61
Nivel de KC en tejido pulmonar

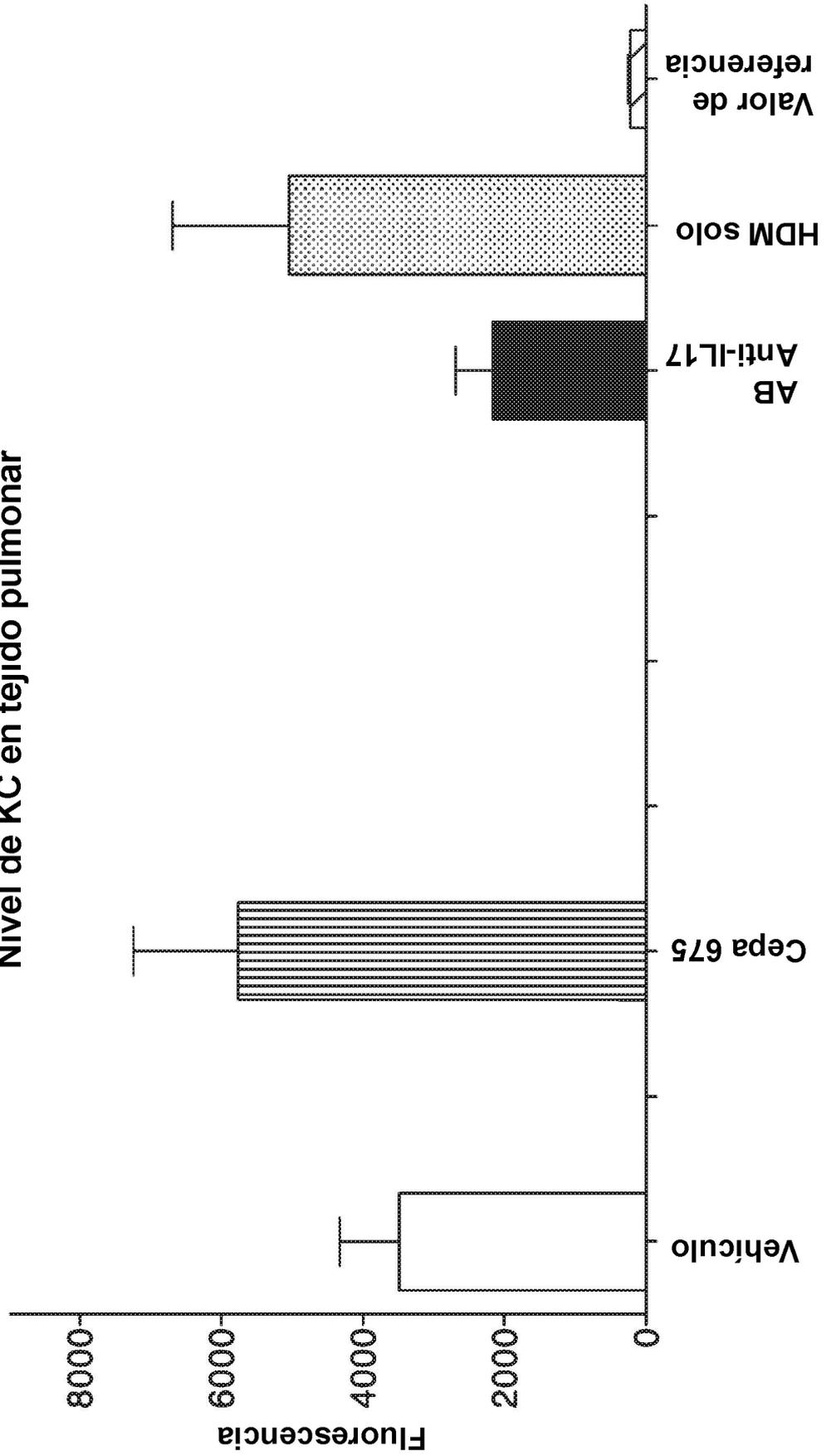


FIG. 62
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

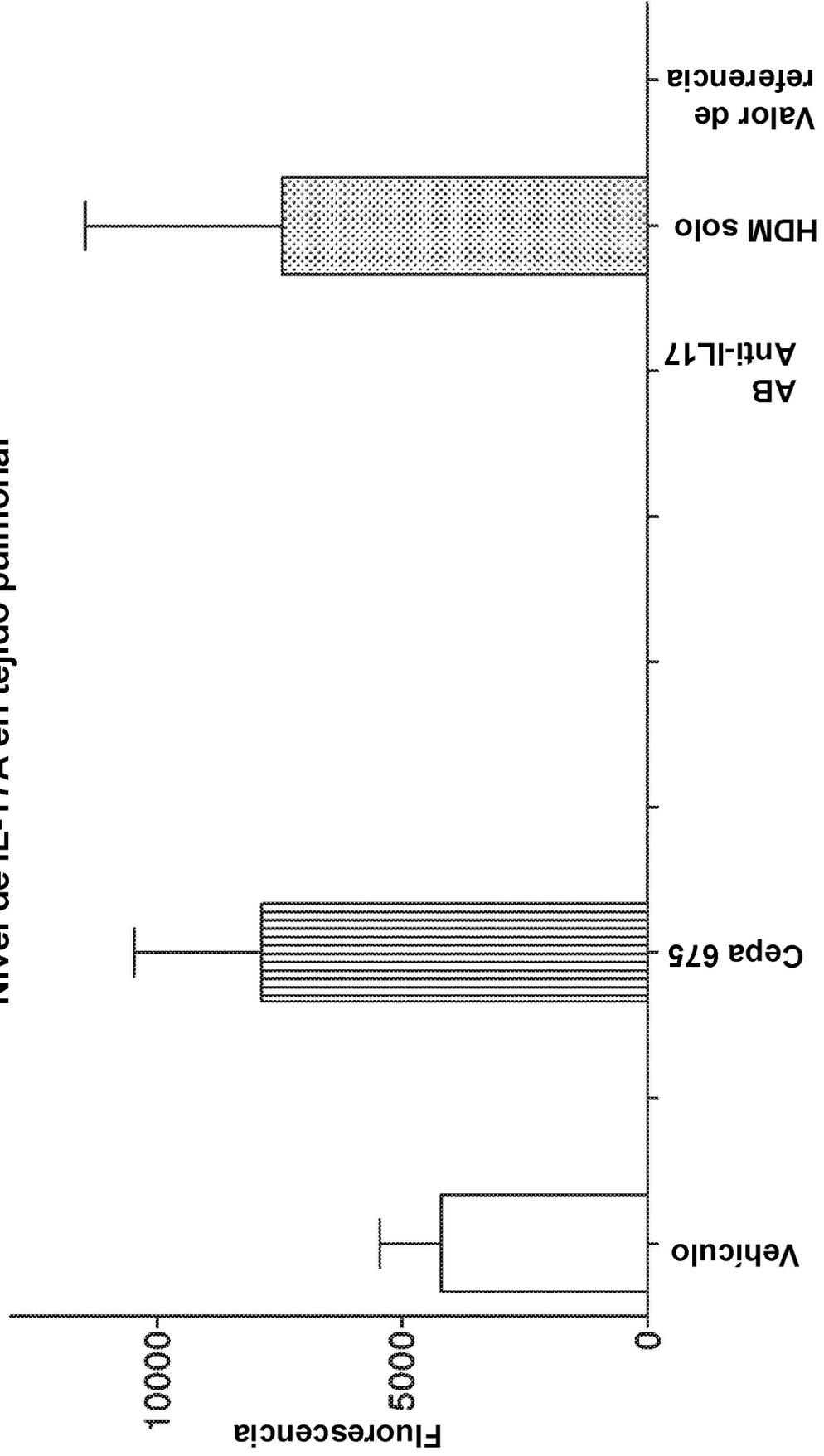


FIG. 63
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

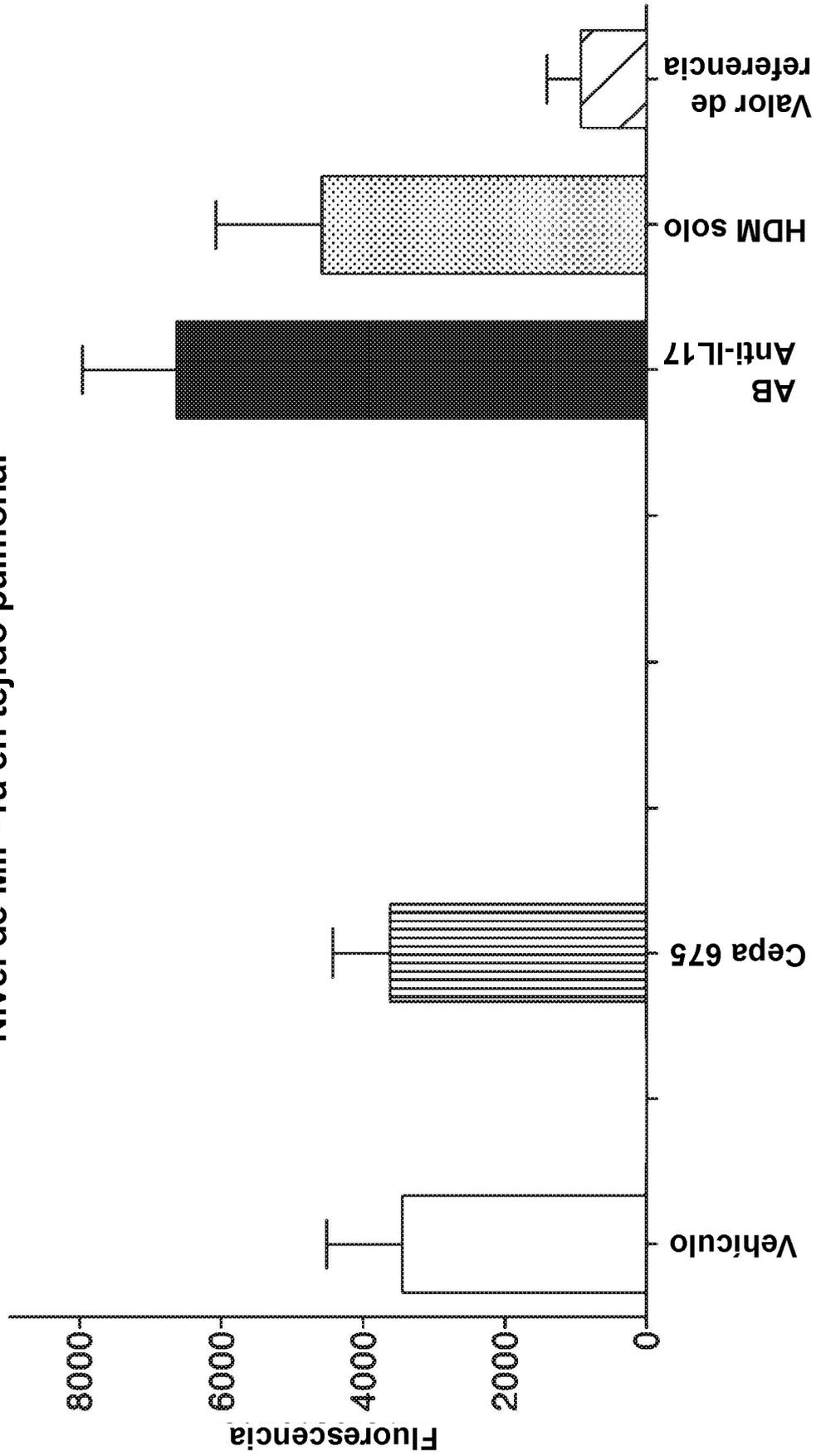


FIG. 64
Nivel de IL-33 en tejido pulmonar

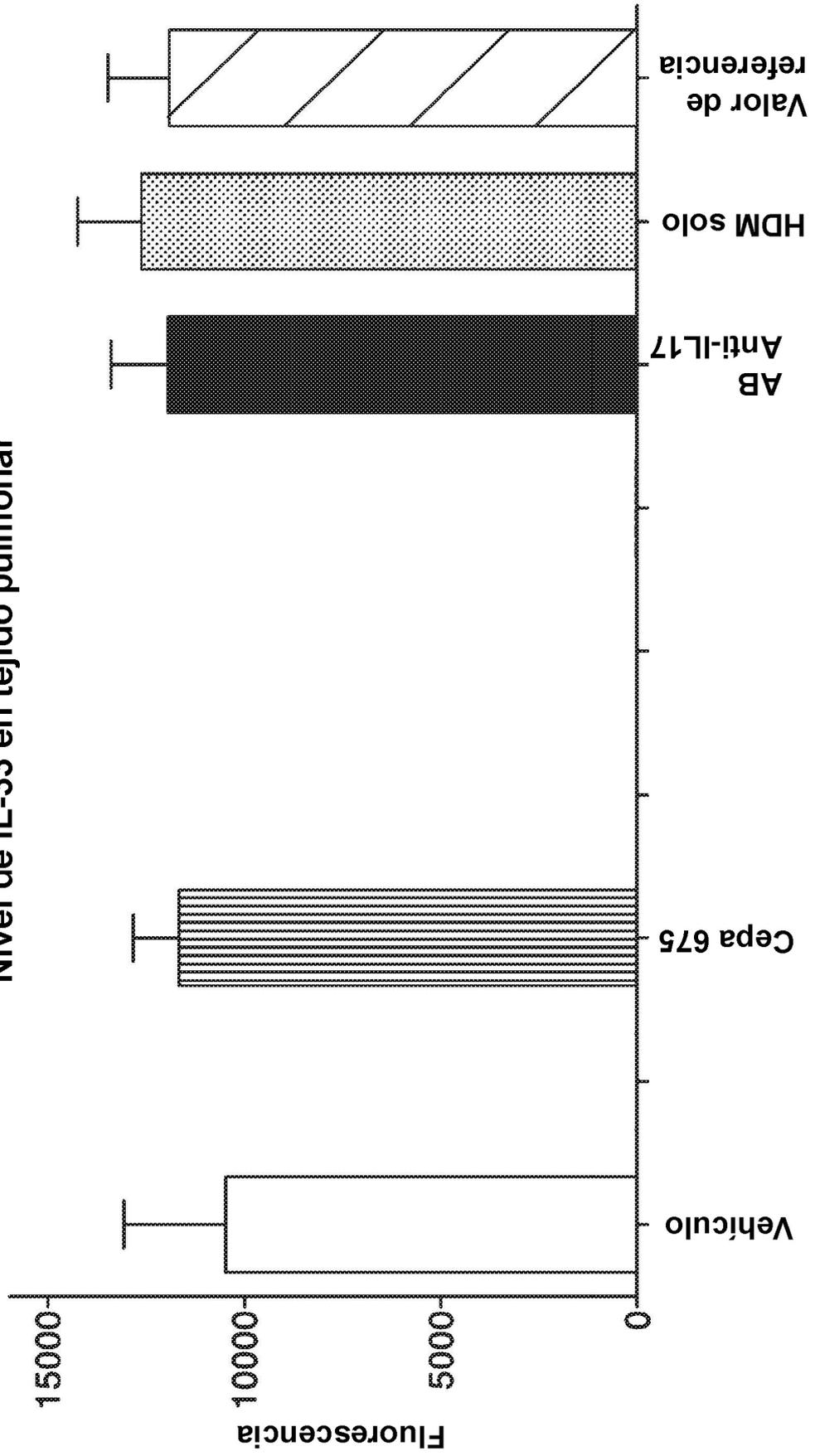
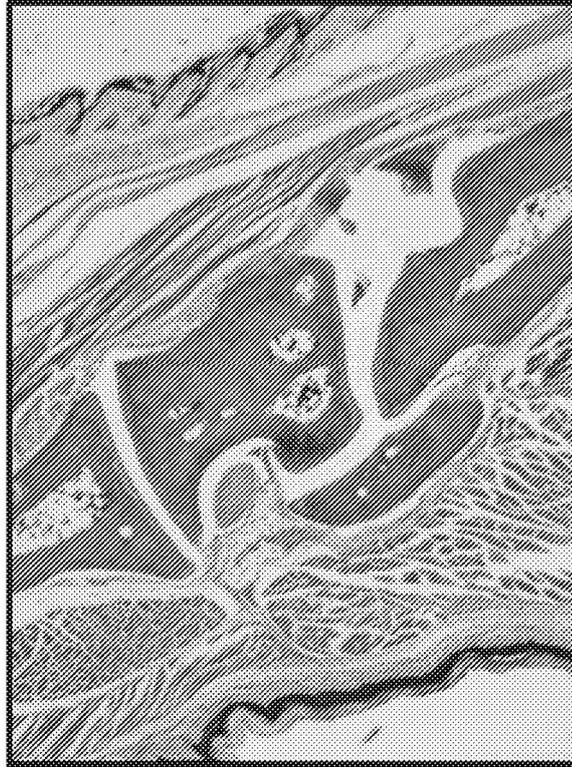
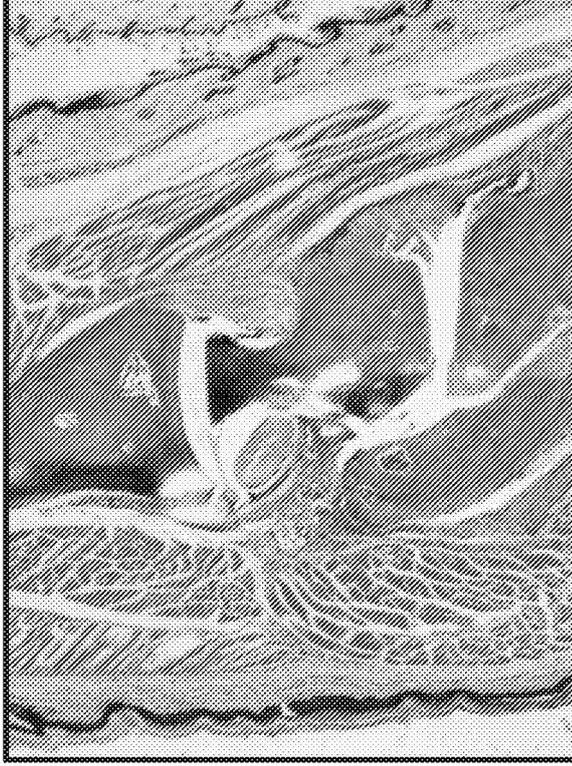


FIG. 65
Plantilla Visual para Puntuación Histopatológica



Grado 0



Grado 1

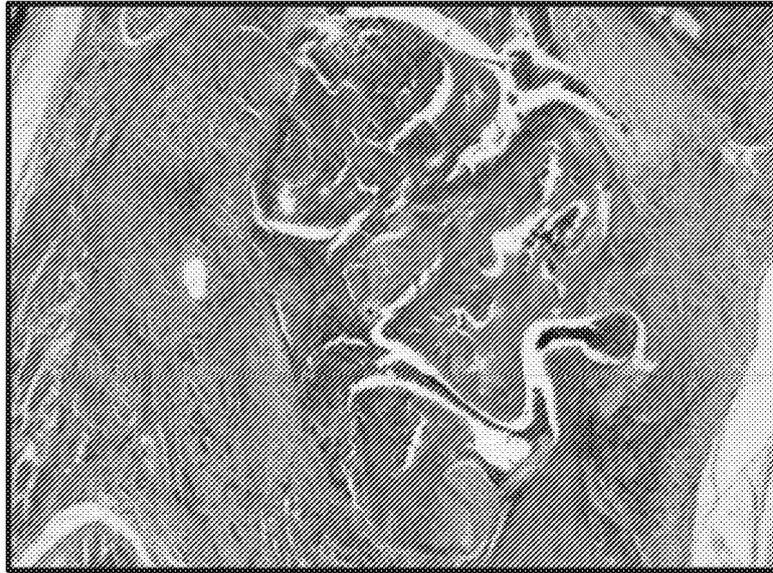
FIG. 65(cont.)



Grado 4



Grado 7



Grado 9

FIG. 65(cont.)

FIG. 66
Histopatología: Puntuaciones de Inflamación

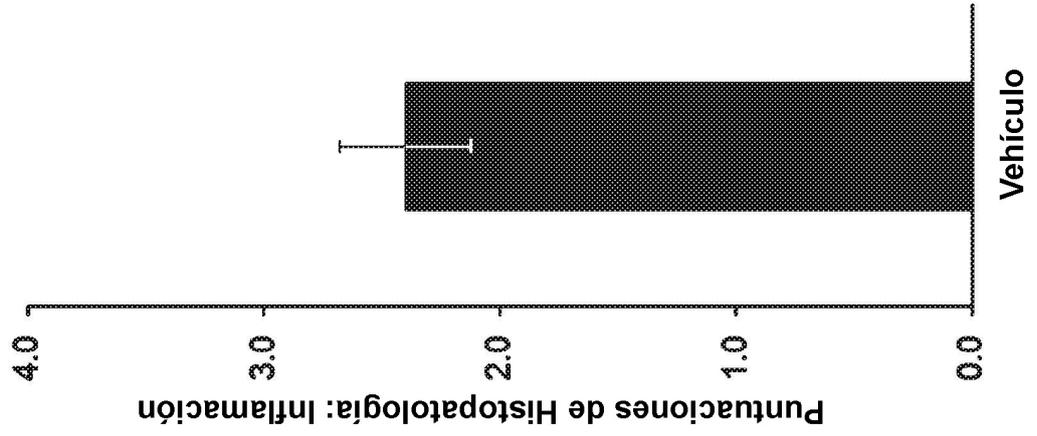


FIG. 67
Histopatología: Puntuaciones de Catílago

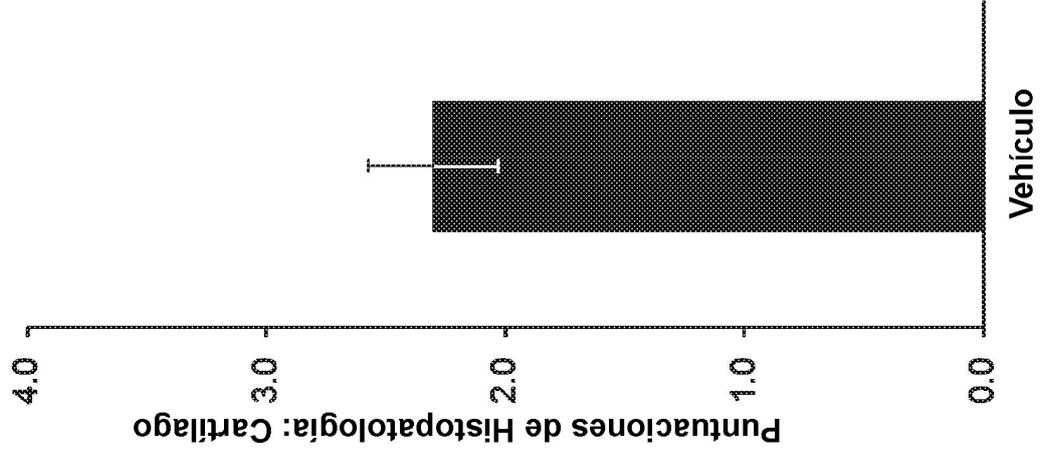


FIG. 68

Histopatología: Puntuaciones de Hueso

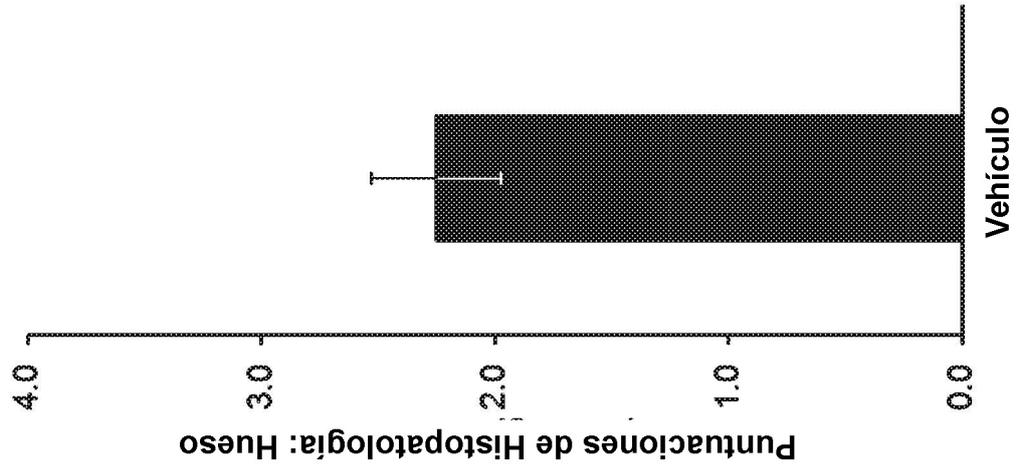


FIG. 69

Histopatología: Puntuaciones Totales

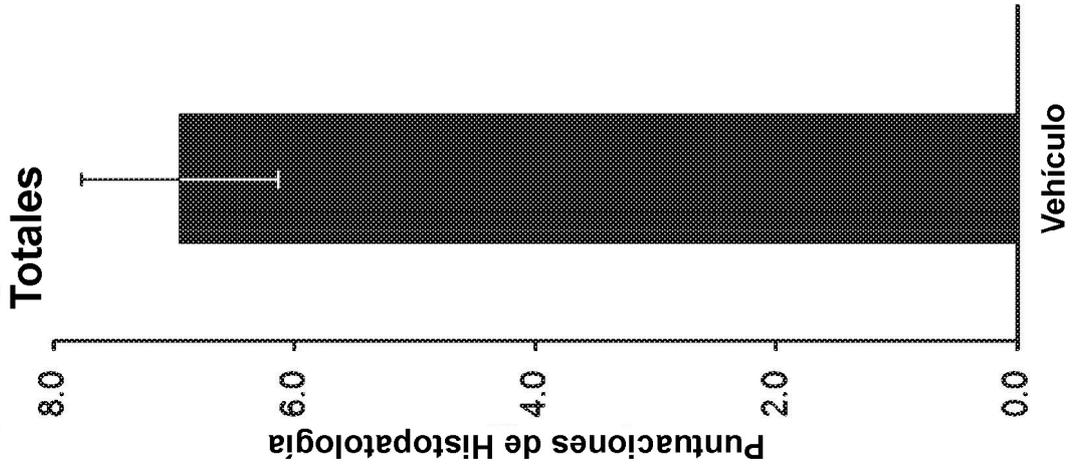


FIG. 70
Histopatología: Cepa N° 675

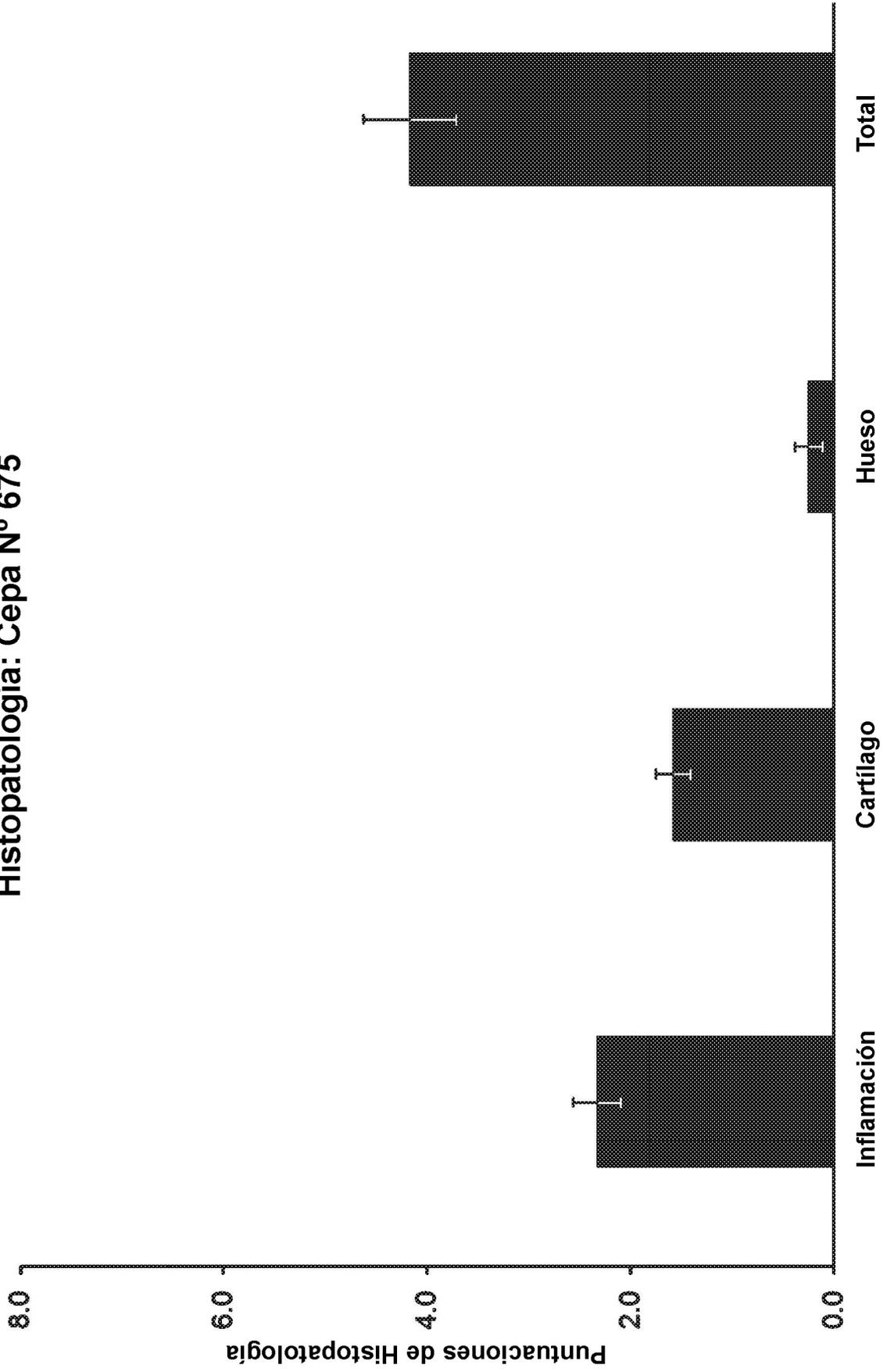
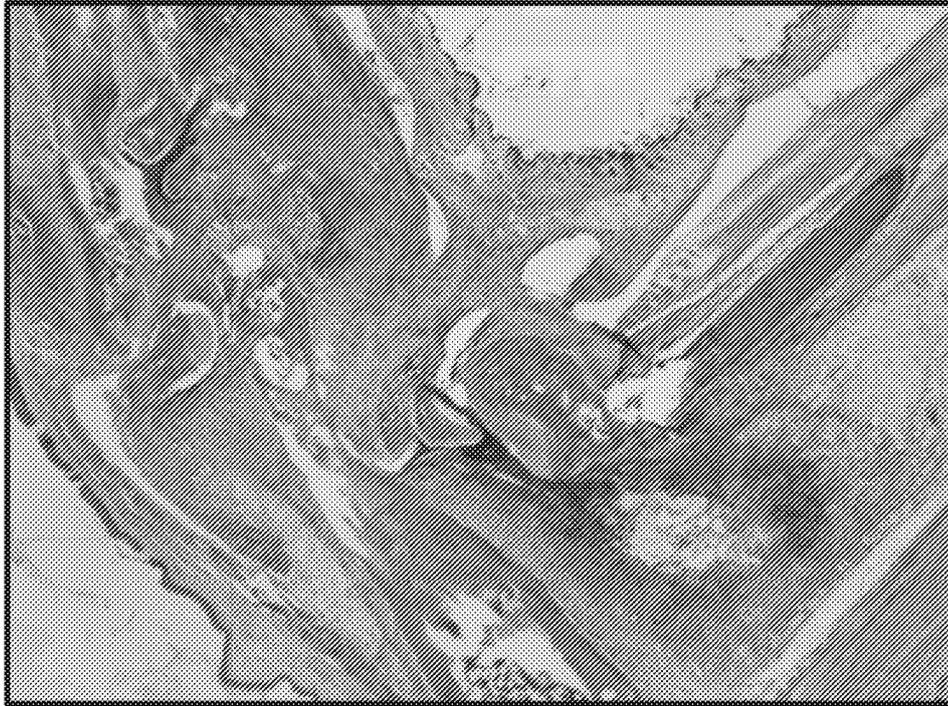
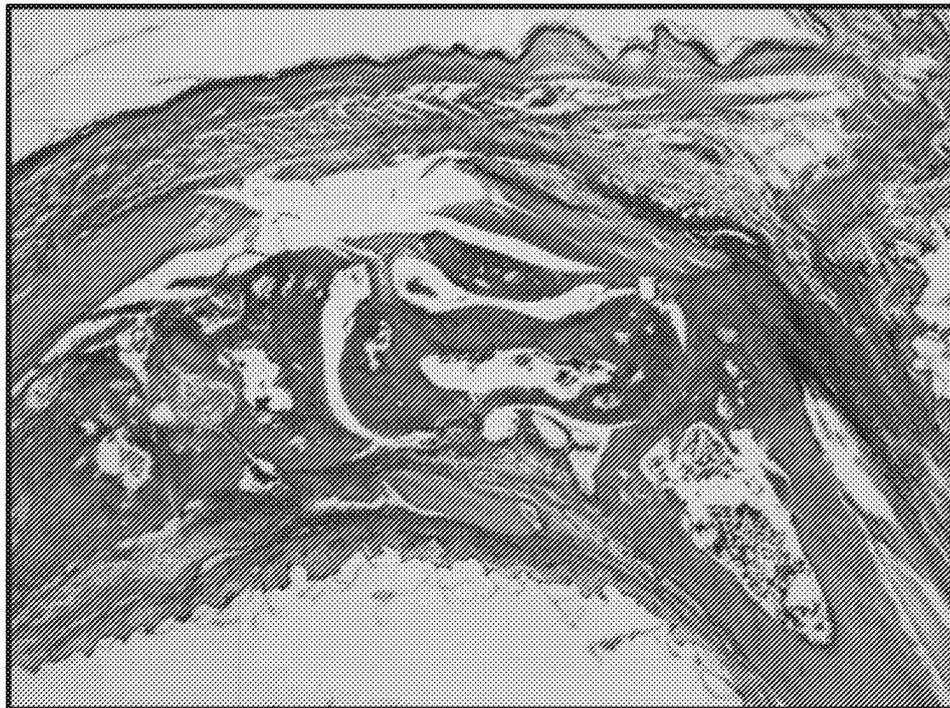


FIG. 71



Vehículo (N° 1.11R, Grado 9)



Cepa N° 675 (N°4.9L, Grado 5)

FIG. 72

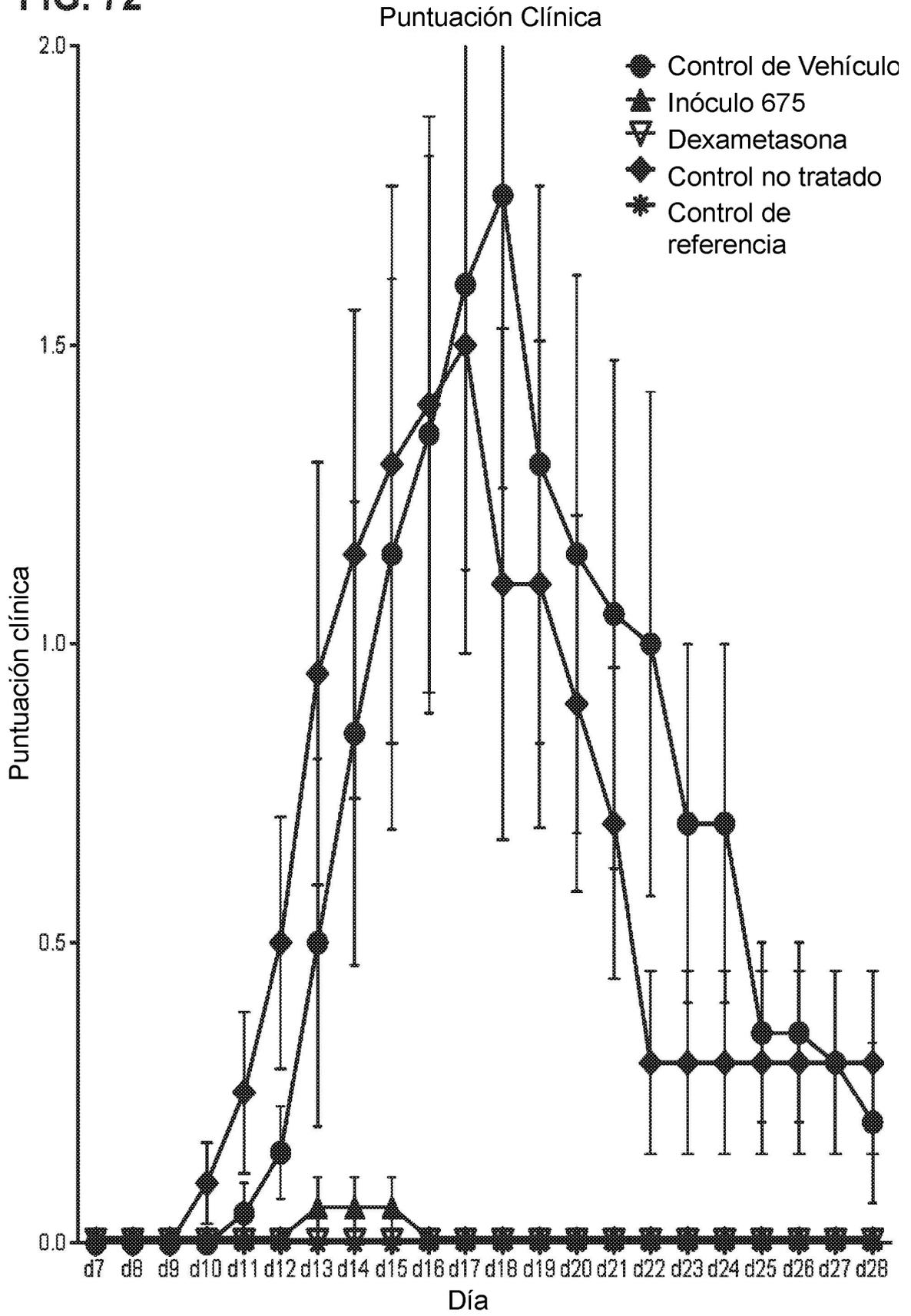


FIG. 73

