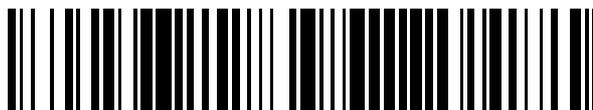


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 766 867**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016 E 18165143 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3360559**

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

30 Prioridad:

15.06.2015 GB 201510467

20.11.2015 GB 201520501

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

15.06.2020

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 2 766 867 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden cepas bacterianas

5 CAMPO TÉCNICO

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

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El intestino humano se cree que es estéril en el útero, pero está expuesto a una gran variedad de maternos y microbios ambientales inmediatamente después del nacimiento. A partir de entonces, se produce un período dinámico de colonización y sucesión microbiana, que está influenciado por factores como el modo de entrega, el medio ambiente, la dieta y el genotipo del huésped, todos los cuales impactan en la composición de la microbiota intestinal, particularmente durante los primeros años de vida. Posteriormente, la microbiota se estabiliza y se convierte en un adulto [1]. La microbiota intestinal humana contiene más de 500-1000 filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a dos divisiones bacterianas principales, los Bacteroidetes y los Firmicutes [2]. Las exitosas relaciones simbióticas 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 los componentes dietéticos que de otro modo no serían digeribles se degradan con la liberación de subproductos que proporcionan una importante fuente de nutrientes para el huésped. Del mismo modo, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es bien reconocida y se ejemplifica en animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado que se reconstituye funcionalmente después de la introducción de bacterias comensales [3-5].

[0003] Los cambios dramáticos en la composición de la microbiota se han documentado en los trastornos gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Por ejemplo, los niveles de la bacteria de cluster XIVa *Clostridium* 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 patobiosis dentro del intestino [6-9]. Curiosamente, esta disbiosis microbiana también se asocia con desequilibrios en las poblaciones de células efectoras T.

[0004] En reconocimiento del efecto positivo potencial que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino animal, varias cepas se han propuesto para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, p. ej., [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.

[0005] Los documentos WO2011/110918 y WO2011/149335 describen estudios clínicos que usan probióticos en el tratamiento de dermatitis atópica y alergias. El documento WO2009/072889 describe estudios clínicos que usan probióticos en el tratamiento del asma alérgica.

[0006] Existe 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.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] La invención proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria que tiene una secuencia de 16s ARNr que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, para uso en un método de tratamiento o prevención del asma neutrofílica.

[0008] 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 Th17. En particular, los inventores han identificado una nueva cepa bacteriana que es efectiva para reducir la respuesta inflamatoria Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de ratón de asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple. Como también se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el tamaño del tumor en modelos de cáncer de ratón que pueden estar asociados con la respuesta inflamatoria Th17.

[0009] Los inventores han identificado que el tratamiento con tales cepas bacterianas puede reducir los niveles de citocinas que son parte de la vía Th17, incluyendo IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria Th17 y puede

proporcionar beneficios clínicos en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias y autoinmunes mediadas por IL-17 y la vía Th17.

[0010] En un ejemplo particular, la divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste en: esclerosis múltiple; artritis, tal 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, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. El efecto que se muestra para la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 en la respuesta inflamatoria Th17 puede proporcionar beneficios terapéuticos para enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 y la vía Th17, como las enumeradas anteriormente.

[0011] Como se señaló anteriormente, la invención proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo número NCIMB 42380 o una bacteria que tiene una secuencia de 16s ARNr que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1, para uso en un método de tratamiento o prevención del asma neutrofílica. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han probado y demostrado la eficacia de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 en modelos de asma en ratones. 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 neutrófila y el asma eosinofílico. De hecho, en ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica, o la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención de asma neutrofílica. Se muestra que la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 tiene un efecto particularmente pronunciado sobre los neutrófilos en los modelos de asma y el tratamiento con esta bacteria puede ser particularmente eficaz para tratar el asma neutrofílica.

[0012] La presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoide y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las composiciones que usan la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser particularmente efectivas para tratar la artritis reumatoide.

[0013] La presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. En realizaciones preferidas, la descripción proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que usan la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser particularmente efectivas para tratar la esclerosis múltiple.

[0014] La presente divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo mismo, para uso en un método de tratamiento o prevención de cáncer, como el cáncer de mama, de pulmón o de hígado. Los inventores han identificado que el tratamiento con la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede reducir el crecimiento tumoral en modelos de ratón de cáncer de mama, pulmón e hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento del tumor en el tratamiento del cáncer.

[0015] En ciertas realizaciones, las composiciones de la descripción son para su uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. En particular, las composiciones de la divulgación 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 o asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, cáncer o uveítis. Preferiblemente, la divulgación proporciona composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de asma, artritis reumatoide o esclerosis múltiple. La divulgación también proporciona composiciones que comprenden la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para su uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del cáncer.

[0016] En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un paciente con niveles de IL-17 elevados o células Th17. El efecto sobre la respuesta inflamatoria Th17 que se muestra para la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.

[0017] En formas de realización preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. Cepas bacterianas de biotipo también se pueden usar, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16S que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntico a SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 1.

[0018] En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas descritas en el presente documento puede ser eficaz para tratar enfermedades y afecciones mediadas por la vía IL-17 o Th17. Además, la administración oral es conveniente para pacientes y profesionales y permite la entrega y/o colonización parcial o total del intestino.

[0019] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

[0020] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica efectiva y conveniente para preparar composiciones estables que permiten el suministro de bacterias.

[0021] En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se describe anteriormente.

[0022] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.

[0023] En el desarrollo de la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. La bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 se muestra eficaz para tratar las enfermedades descritas en este documento, tales como artritis, asma y esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado del mismo. La divulgación también proporciona composiciones que comprenden tales células, o cultivos biológicamente puros de tales células. La divulgación también proporciona una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado del mismo, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento. La bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 también se muestra efectiva para tratar el cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

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

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

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.

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.

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.
- 5 **Figura 10:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Recuento total de células de líquido BAL.
- Figura 11:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Recuento total de eosinófilos en BALF.
- 10 **Figura 12:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Proporción de eosinófilos en BALF.
- Figura 13:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Recuento total de macrófagos en BALF.
- Figura 14:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Proporción de macrófagos en BALF.
- 15 **Figura 15:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Recuento total de neutrófilos en BALF.
- Figura 16:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Proporción de neutrófilos en BALF.
- 20 **Figura 17:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Recuento total de linfocitos en BALF.
- Figura 18:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Proporción de linfocitos en BALF.
- 25 **Figura 19:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Pesos corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como porcentajes promedio de \pm SEM de los pesos corporales iniciales (día -14). Significación estadística: \blacktriangle $p < 0,05$ y $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,0001$ cuando se compara con el grupo tratado con vehículo.
- 30 **Figura 20:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Pesos corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como porcentajes promedio de \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.
- 35 **Figura 21:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Puntajes clínicos. Los datos se presentan como \pm SEM media. $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,0001$ en comparación con el día 21 en el grupo tratado con vehículo. \blacklozenge , \circ $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo en un día determinado.
- 40 **Figura 22:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Respuesta proliferativa de esplenocitos al colágeno II. Los medios de fondo restados [estimulados por CII - medios de fondo] cuentan por minuto en función de la incorporación de 3H-TdR. Todos los datos se presentan como \pm SEM media. $\blacklozenge\blacklozenge$ $p < 0,01$ en comparación con el grupo de vehículos.
- 45 **Figura 23:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Niveles de IFN γ en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- Figura 24:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Niveles de IL-17A en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- 50 **Figura 25:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- Figura 26:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Niveles de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- 55 **Figura 27:** Sistema de puntuación de histopatología.
- 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 de polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en suero
- 60 **Figura 30:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de 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
- 65 **Figura 32:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar

- Figura 33:** Modelo de ratón de ácaros del polvo doméstico- asma inducida - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración perivascular
- 5 **Figura 34:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación inflamatoria media (Promedio de puntuación de infiltración peribronquiolar y perivascular)
- Figura 35:** Modelo de ratón de ácaros inducidos por ácaros del polvo doméstico asma - Análisis histológico - Puntuación de moco
- 10 **Figura 36:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en tejido pulmonar
- Figura 37:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1a en tejido pulmonar
- 15 **Figura 38:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IFNg en tejido pulmonar
- Figura 39:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de IL-17A en tejido pulmonar
- 20 **Figura 40:** Modelo de ratón de ácaros del polvo doméstico asma inducida - Nivel de IL-4 en tejido pulmonar
- Figura 41:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en tejido pulmonar
- 25 **Figura 42:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1b en tejido pulmonar
- 30 **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 - MIP-1a nivel en tejido pulmonar
- 35 **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 de polvo doméstico - Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar
- 40 **Figura 47:** Modelo de ratón de graves asma neutrofílica - IgG1 específica de HDM en suero
- Figura 48:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG2a específica de HDM en suero
- 45 **Figura 49:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG1 específica de HDM en BALF
- Figura 50:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG2a específica de HDM en BALF
- 50 **Figura 51:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa – Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar
- Figura 52:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración perivascular
- 55 **Figura 53:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntuación inflamatoria media (Promedio de puntuación de infiltración peribronquiolar y perivascular)
- Figura 54:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de TNFa en tejido pulmonar
- 60 **Figura 55:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-1a en tejido pulmonar
- Figura 56:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IFNg en tejido pulmonar
- 65 **Figura 57:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

- 5 **Figura 58:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-1b en tejido pulmonar
- Figura 59:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel RANTES en tejido pulmonar
- Figura 60:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar
- Figura 61:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de KC en tejido pulmonar
- 10 **Figura 62:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa: Nivel de IL-17A en tejido pulmonar
- Figura 63:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa: Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar
- Figura 64:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa: Nivel de IL-33 en tejido pulmonar
- 15 **Figura 65:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: Plantilla visual para la puntuación de histopatología. Imágenes representativas que muestran puntajes compuestos de las articulaciones tarsales del ratón en un estudio de artritis inducida por colágeno.
- 20 **Figura 66:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: Puntajes de inflamación. Los datos se presentan como \pm SEM media. ** p <0,01 en comparación con el grupo tratado con vehículo.
- Figura 67:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: Puntajes de cartílago. Los datos se presentan como \pm SEM media. *** p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.
- 25 **Figura 68:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: Puntajes óseos. Los datos se presentan como \pm SEM media. *** p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.
- Figura 69:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: Puntajes totales. Los datos se presentan como \pm SEM media. * p <0,05, *** p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.
- 30 **Figura 70:** 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.
- 35 **Figura 71:** Modelo de ratón de esclerosis múltiple: Puntuación clínica.
- Figura 72:** Modelo de ratón de esclerosis múltiple - Incidencia de enfermedad.
- 40 **Figura 73:** Modelo de ratón de cáncer de mama - Volumen tumoral.
- Figura 74:** Modelo de ratón de cáncer de pulmón - Volumen tumoral.
- 45 **Figura 75:** Modelo de ratón de cáncer de hígado - Peso del hígado.
- Figura 76:** Fijación de cepas de tipo MRX004 y *B. breve* a células humanas.
- Figura 77:** Ensayo de producción de exopolisacárido.
- 50 **Figura 78:** Producción de exopolisacáridos unidos y liberados por MRX004.
- Figura 79:** Fijación de MRX004 a las células Caco-2.
- 55 **Figura 80:** Perfil de ID rápida 32 A de MRX004 solo (A) y en comparación con cepas de tipo *B. breve* (B). Blanco = reacción negativa (sin cambio de color), sombreado hacia abajo = reacción positiva intermedia (cambio de color débil) y negro = reacción positiva (fuerte cambio de color apropiado).
- 60 **Figura 81:** Análisis API® 50 CH de MRX004. Sombreado cruzado hacia arriba = reacción negativa (sin cambio de color), sombreado cruzado hacia abajo = reacción positiva intermedia (cambio de color débil), negro = reacción positiva (cambio de color apropiado fuerte) y blanco = reacción dudosa (cambio de color inesperado).

65 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Cepas bacterianas

[0025] Las composiciones de la invención comprenden la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria que tiene una secuencia de 16S ARNr que es al menos 98% idéntica a SEQ ID NO: 1. Los ejemplos demuestran que tales bacterias son útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Los ejemplos también demuestran que tales bacterias son útiles para tratar o prevenir el cáncer. La cepa bacteriana preferida es la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.

[0026] La bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 se probó en los ejemplos y también se denomina en este documento como la cepa 751 o MRX004. En la SEQ ID NO: 1 se proporciona una secuencia parcial de ARNr 16S para la cepa 751 que se probó. La cepa 751 fue depositada ante la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 12 de marzo de 2015 y se le asignó la adhesión número NCIMB 42380. GT Biologics Ltd. posteriormente cambió su nombre a 4D Pharma Research Limited.

[0027] Una secuencia del genoma de la cepa 751 se proporciona en SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias publicado con el documento WO 2016/203223.

[0028] También se espera que cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 sean efectivas para tratar o prevenir el cáncer. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o muy similares.

[0029] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de 16s ARNr que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica al SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 1.

[0030] Alternativamente, las cepas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 y que se divulga en el presente documento pueden identificarse secuenciando otras secuencias de nucleótidos para la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380. Por ejemplo, sustancialmente todo el genoma puede secuenciarse y una cepa de biotipo descrita en el presente documento puede tener al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en al menos 80% de su genoma completo (p. ej., en al menos 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Otras secuencias adecuadas para usar en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas tales como BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP o [i]. Cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.

[0031] En ciertos casos, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un genoma con identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223. En casos preferidos, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un genoma con una identidad de secuencia de al menos 90% (p. ej., al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de secuencia identidad) a SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en al menos 60% (p. ej., al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99 % o 100%) de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223. Por ejemplo, la cepa bacteriana para usar en la invención puede tener un genoma con al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 en el 70% de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223, o en al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2016/203223 a través del 80% de la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del WO 2016/203223 90% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en 100% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en el 70% de la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 del WO 2016/203223 en 80 % de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en 90% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en el 100% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 98% de secuencia e identidad con la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en el 70% de la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en el 80% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223 en 90% de SEQ ID NO: 2 de WO 2016/203223, o al menos 98% de secuencia identidad con la SEQ ID NO: 2 del WO 2016/203223 en el 100% de la SEQ ID NO: 2 del WO 2016/203223.

[0032] Alternativamente, las cepas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse usando el análisis de fragmentos de restricción y depósito del número de acceso NCIMB 42380 y/o análisis de PCR, por ejemplo mediante el uso de un polimorfismo fluorescente amplificado de longitud de fragmento (FAFLP) y el elemento repetitivo de ADN (rep)-huellas dactilares de PCR, o perfil de proteínas, o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s. En realizaciones preferidas, tales técnicas se pueden utilizar para identificar las cepas de la misma especie como la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.

- 5 **[0033]** En ciertas realizaciones, las cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que son adecuadas para usar en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 cuando se analizan mediante análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para ejemplos de métodos y orientación, ver, por ejemplo, [17]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos como la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.
- 10 **[0034]** Las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 y que son útiles en las composiciones y los métodos de la invención pueden identificarse utilizando cualquier método o estrategia apropiados, incluidos los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, los biotipos para usar 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 la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 pueden ser útiles en la invención. Una cepa de biotipo tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42380. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad por cáncer y efectos comparables en los niveles de citocinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en el Ejemplos.
- 15 **[0035]** Una cepa particularmente preferida de la invención es la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380. Esta es la cepa ejemplar 751 ensayada en los ejemplos y se muestra para ser eficaz para tratar la enfermedad. La divulgación proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado de la misma. La divulgación también proporciona una composición que comprende una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado de la misma. La divulgación también proporciona un cultivo biológicamente puro de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380. La divulgación también proporciona una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado de la misma, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas aquí.
- 20 **[0036]** Un derivado de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonaron) de la original. Un derivado de una cepa de la descripción puede modificarse, por ejemplo a nivel genético, sin eliminar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la divulgación es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42380. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad por cáncer y los mismos efectos comparables en los niveles de citoquinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en los ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42380 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42380.
- 25 **[0037]** Las referencias a las células de la bacteria depositadas con el número de acceso NCIMB 42380 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42380, y dichas células están abarcadas por la invención.
- 30 **[0038]** En realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.
- 35 **[0039]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2. En una realización preferida, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular a las células Caco-2, en YCFA en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención exhibe adherencia de menos de 1% del total de cultivo, tales como preferiblemente menos de 0,5% o menos de 0,3%, cuando se prueba en las condiciones descritas en el Ejemplo 12.
- 40 **[0040]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce exopolisacáridos, p. ej., en donde los exopolisacáridos están unidos a la superficie extracelular de la cepa bacteriana. En ciertas realizaciones, la producción de los exopolisacáridos unidos aumenta la adhesión de la cepa bacteriana para usar en la invención al moco o a la superficie de las células epiteliales, por ejemplo las células epiteliales intestinales humanas. En una realización preferida, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.
- 45 **[0041]** En una realización preferida, la cepa bacteriana para uso en la invención tanto tiene una baja adherencia a células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2, en YCFA en comparación con *Bifidobacteria*, en particular *B. breve* (tales como adherencia de menos de 1% del cultivo total, tal como preferiblemente menos del 0,5% o menos del 0,3%, cuando se prueba en las condiciones descritas en el Ejemplo 12), y produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.
- 50 **[0042]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.
- 55 **[0043]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.
- 60 **[0044]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.
- 65 **[0045]** En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención produce más exopolisacáridos de superficie unida en comparación con las *Bifidobacterias*, en particular *B. breve*.

[0042] En ciertas realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la invención es capaz de fermentar el polisacárido rafinosa, por ejemplo cuando se cultivan en un medio de suspensión apropiado (tal como medio de suspensión API) a 37°C durante 4 h.

[0043] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención ha reducido la capacidad de fermentar α -glucosidasa y/o β -glucosidasa en comparación con *Bifidobacteria*, en particular *B. breve*, por ejemplo cuando se cultivan en un apropiado medio de suspensión (tal como medio de suspensión API) a 37°C durante 4 h.

[0044] En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1, tales como 5, 10, 20, 50 o todos los genes en la Tabla 1. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que están resaltados con un subrayado único, como el componente transmembrana BL0694 del módulo de activación del transportador de ECF predicho y/o el componente ATPasa duplicado BL0693 del módulo de activación del transportador de ECF predicho. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la invención comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que están resaltados con doble subrayado y en negrita, tales como 1,2,3, 4 o 5 genes seleccionados de: maltodextrina glucosidasa (EC 3,2,1,20), galactosidasa putativa, celulosa sintasa (formadora de UDP) (EC 2,4,1,12), quitinasa (EC 3,2,1,14) y caja sensorial/proteína de la familia GGDEF. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para usar en la invención comprende uno o más de los genes enumerados en la Tabla 1 que están resaltados en cursiva, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 genes seleccionados de: subunidad de ácido graso poliinsaturado sintasa omega-3 PfaA, poliquétido sintasa tipo I, glucosilo hidrolasa putativa de función desconocida (DUF1680), componente ATPasa BioM del módulo energizante del transportador ECF de biotina, familia de ATPasa E1-E2 transportadora de cationes, proteína de permeasa del sistema de transporte Ribosa RbsC (TC 3.A,1,2,1), proteína de unión al ATP del sistema de transporte Ribosa ABC RbsA (TC 3.A,1,2,1), oligoribonucleasa 3'-a-5' (orn), relacionada con la proteína de membrana a la proteína Actinobacillus (1944168).

[0045] En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para uso en la invención comprende uno o más (p. ej., 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 o todos) genes seleccionados de: 2-succinilo 5-enolpiruvilo-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-ácido carboxílico sintasa (EC 2,2,1,9); oligoribonucleasa 3' a 5' (orn); Alfa-galactosidasa (EC 3,2,1,22); Componente ATPasa del módulo de energización general de transportadores ECF; componente ATPasa STY3233 del módulo de activación del transportador ECF regulado por queuosina; ADN helicasa dependiente de ATP recG (EC 3,6,1,-); Beta-glucosidasa (EC 3,2,1,21); Celulosa sintasa (formadora de UDP) (EC 2,4,1,12); Quitinasa (EC 3,2,1,14); COG1309: regulador transcripcional; D-alanilo-D-alanina carboxipeptidasa (EC 3,4,16,4); Componente ATPasa duplicado BL0693 del módulo de activación del transportador de ECF predicho; Fructoquinasa (EC 2,7,1,4); Glucosa/manosa: Symporter H+ GlcP; Glicosiltransferasa (EC 2,4,1,-); GMP sintasa [glutamina-hidrolizante] (EC 6,3,5,2); quinasa de azúcar hipotética en clúster con indigoidina sintasa indA, familia de quinasas PfkB; Inosina-uridina que prefiere la hidrolasa de nucleósido (EC 3,2,2,1); Proteína ribosómica L31p @ LSU proteína ribosómica LSU L31p, independiente del zinc; Proteína ribosómica L33p @ LSU proteína ribosómica LSU L33p, independiente del zinc; maltodextrina glucosidasa (EC 3,2,1,20); Proteína de membrana, relacionada con la proteína Actinobacillus (1944168); Precursor de transglucosilasa D de mureína lítica unida a membrana (EC 3,2,1,-); Metiltransferasa (EC 2,1,1,-); Butanol deshidrogenasa A dependiente de NADH (EC 1,1,1,-); Fosfoglicolato fosfatasa (EC 3,1,3,18); Fosforibosilantranilato isomerasa (EC 5,3,1,24); Glucosilo hidrolasa putativa de función desconocida (DUF1680); Permeasa de translocación de polisacárido que contiene ramnosa; Riboquinasa (EC 2,7,1,15); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A,1,2,1); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A,1,2,1); Sistema de transporte Ribosa ABC, RbsD de permeasa de alta afinidad (TC 3.A,1,2,1); Sistema de transporte de ribosa ABC, proteína de unión a ribosa periplásmica RbsB (TC 3.A,1,2,1); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permease RbsC (TC 3.A,1,2,1); Sistema de transporte Ribosa ABC, proteína permeasa RbsC (TC 3.A,1,2,1); Sorbitol deshidrogenasa (EC 1,1,1,14); SSU proteína ribosomal S14p (S29e) @ SSU proteína ribosomal S14p (S29e), independiente del zinc; componente STY3230 específico del sustrato del transportador ECF regulado por queuosina; Sacarosa-6-fosfato hidrolasa (EC 3,2,1,B3); Proteína de unión a ATP de exportación de ácido teicoico TagH (EC 3,6,3,40); Componente transmembrana BL0694 del módulo energizante del transportador ECF predicho; Componente transmembrana STY3231 del módulo energizante del transportador ECF regulado por queuosina; Regulador de respuesta de dos componentes colocalizado con transportador HrtAB; Sistema de restricción-modificación de tipo I, subunidad de ADN-metiltransferasa M (EC 2,1,1,72); Sistema de restricción-modificación de tipo I, subunidad de restricción R (EC 3,1,21,3); Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3,1,21,3); Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3,1,21,3); Sistema de modificación de la restricción de tipo I, subunidad de especificidad S (EC 3,1,21,3); Xilitol deshidrogenasa (EC 1,1,1,9); y transportador Xilosa ABC, proteína de unión a xilosa periplásmica XylF. En realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para usar en la invención comprende uno o más genes (como 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o todos) que se enumeran en la oración anterior y que no se destacan en la Tabla 1.

Usos terapéuticos

[0046] Como se demuestra en los ejemplos, las composiciones bacterianas de la invención son eficaces para la reducción de la respuesta inflamatoria Th17. En particular, el tratamiento con composiciones de la invención logra una reducción en los niveles de IL-17A y otras citocinas de la ruta Th17, y mejoras clínicas en modelos animales de

afecciones mediadas por IL-17 y la ruta Th17. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17. En particular, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de IL-17.

[0047] Las células Th17 son un subconjunto de células T auxiliares que producen, p. ej., IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. La diferenciación de células Th17 y la expresión de IL-17 pueden ser conducidas por IL-23. Estas citocinas y otras forman partes importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye y subyace a una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (como se describe, p. ej., [18-23]). Las enfermedades en las que se activa la ruta Th17 son enfermedades mediadas por la ruta Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden mejorarse o aliviarse reprimiendo la vía Th17, que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción en el nivel de las citocinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por el aumento de los niveles de citocinas producidas por las células Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisado en [24]). Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por una mayor expresión de genes relacionados con Th-17, como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden estar asociadas con mayores niveles de células Th17.

[0048] La IL-17 es una citocina proinflamatoria que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes. IL-17 como se usa en el presente documento puede referirse a cualquier miembro de la familia IL-17, incluidos 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 los altos niveles de IL-17 o un aumento en los niveles de IL-17, y que se alivian con bajos niveles de IL-17 o una reducción en los niveles de IL-17. La respuesta inflamatoria de IL-17 puede ser local o sistémica.

[0049] Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden estar mediadas por IL-17 o la ruta Th17 incluyen esclerosis múltiple; artritis, tal 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, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis; escleritis; vasculitis; Enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento se usan para tratar o prevenir una o más de estas afecciones o enfermedades. En realizaciones preferidas adicionales de la divulgación, estas afecciones o enfermedades están mediadas por IL-17 o la vía Th17.

[0050] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en este documento son para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde dicho tratamiento o prevención se logra al reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde el paciente tiene niveles elevados de IL-17 o células Th17 elevadas o exhibe una respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, el paciente puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica, o la composición descrita en el presente documento puede usarse para prevenir una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune que se convierta en una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección puede no responder al tratamiento con inhibidores de TNF- α . Estos usos de la composición divulgada en el presente documento pueden aplicarse a cualquiera de las enfermedades o afecciones específicas enumeradas en el párrafo anterior.

[0051] La ruta de IL-17 y Th17 a menudo se asocia con enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones crónicas como se enumeran anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas.

[0052] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar enfermedades y condiciones mediadas por IL-17 o la vía Th17 y para hacer frente a la respuesta inflamatoria Th17, por lo que las composiciones descritas en este documento pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir la enfermedad crónica, tratamiento o prevenir la enfermedad en pacientes que no han respondido a otras terapias (como el tratamiento con inhibidores de TNF- α) y/o tratar o prevenir el daño tisular y los síntomas asociados con las células IL-17 y Th17. Por ejemplo, se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartilago y el tejido óseo e IL-17

tiene un efecto inhibitor sobre la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago.

[0053] 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 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 citocinas puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular las mediadas por IL-17 o la vía Th17.

[0054] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención proporciona un bloque de la unión a o la invasión de células humanas, por ejemplo células epiteliales humanas por células patógenas, p. ej., *E. coli* y/o *S. enteritidis*.

[0055] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención reduce o impide la unión de células patógenas, por ejemplo *E. coli* y/o *S. enteritidis*, a las células epiteliales humanas, por ejemplo células epiteliales intestinales humanas.

[0056] En ciertas realizaciones, la producción y liberación de exopolisacáridos por las cepas bacterianas de las composiciones de la invención pueden tener efectos protectores contra especies patógenas, por ejemplo *E. coli* y/o *S. enteritidis*. En ciertas realizaciones, la producción y liberación de exopolisacáridos por las cepas bacterianas de las composiciones de la invención puede mediar el efecto de las bacterias en la vía IL-17 o Th17 y puede influir en la respuesta inmune del huésped. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la producción de exopolisacáridos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17.

[0057] En ciertas realizaciones, la baja adherencia a las células epiteliales intestinales humanas, en particular las células Caco-2, de las cepas bacterianas de las composiciones de la invención pueden aumentar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención en la IL-17 o la vía Th17 y en enfermedades mediadas por IL-17 o la vía Th17.

[0058] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una mayor fermentación de rafinosa en el intestino. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones de la invención fermentan el polisacárido rafinosa, y la fermentación de la rafinosa puede conferir efectos sobre el huésped tales como un aumento de butirato cecal y una mayor proliferación gastrointestinal. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para aumentar la fermentación de rafinosa en el intestino en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17.

Asma

[0059] Las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del asma neutrofílica. 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 descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede estar mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

[0060] En ciertas realizaciones de la divulgación, el asma es eosinofílica o asma alérgica. El asma eosinofílica y alérgica se caracteriza por un mayor número de eosinófilos en la sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y se asocia patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la capacidad de respuesta a los corticosteroides [25]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de eosinófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinófilo y alérgico.

[0061] Las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o la 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 neutrofílica.

[0062] El asma eosinofílica y neutrofílica no son condiciones y tratamientos mutuamente excluyentes que ayudan a abordar las respuestas de eosinófilos y neutrófilos pueden ser útiles para tratar el asma en general.

[0063] Los niveles aumentados de IL-17 y la activación de la ruta Th17 están asociados con asma grave, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma grave o para tratar el asma grave.

[0064] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en los métodos de reducción de una eosinofílica respuesta inflamatoria en el tratamiento o prevención de asma, o para su uso en métodos para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma. Como se señaló anteriormente, los altos niveles de eosinófilos en el asma se asocian patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal, por lo que la reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o la prevención del asma puede abordar específicamente esta característica de la enfermedad. Además, los neutrófilos elevados, ya sea en combinación con eosinófilos elevados o en su ausencia, se 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.

[0065] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento reducen la infiltración peribronquial en el asma alérgica, o son para uso en la reducción de la infiltración peribronquial en el tratamiento de asma alérgica. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención reducen la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el asma neutrofílica, o se usan para reducir la infiltración peribronquiolar y/o perivascular en el tratamiento del asma neutrofílica alérgica.

[0066] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o previene una elevación en niveles de IL-1 β , IFN γ , RANTES, MIP-1 α o IL-8.

[0067] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método para tratar el asma neutrofílica que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a tratar tiene, o se ha identificado previamente que tiene, niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, p. ej., según se identifica mediante muestreo de sangre o análisis de esputo.

[0068] Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en un recién nacido cuando se administra a un 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 neutrofílica de inicio en adultos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para controlar o aliviar el asma neutrofílica. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se agrava por los alérgenos, tales como los ácaros del polvo doméstico.

[0069] El tratamiento o la prevención del asma pueden referirse, p. ej., a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

[0070] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción de las concentraciones de fenilalanina y/o histidina, p. ej., en los intestinos o en el plasma. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones de la invención dieron positivo para la fermentación de aminoácidos, que incluyen fenilalanina e histidina, y se ha informado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina e histidina se asocia con efectos adversos en el asma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para reducir las concentraciones plasmáticas de fenilalanina y/o histidina en el tratamiento del asma neutrofílica, y en particular en el tratamiento de la producción de histamina o la hiperreactividad de las vías respiratorias asociadas con el asma neutrofílica.

[0071] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción en las concentraciones de galactosa y/o fructosa, por ejemplo en los intestinos. Los ejemplos demuestran que las cepas bacterianas de las composiciones de la invención fermentan sustratos de carbohidratos que incluyen galactosa y fructosa, y la galactosa α -1,3-galactosa derivada de fuentes de carne es un alérgeno conocido y agente causante de anafilaxia, y niveles de ingesta de fructosa en la dieta. Están correlacionados con una mayor gravedad del asma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de concentraciones de galactosa y/o fructosa en el tratamiento del asma, y en particular en el tratamiento del asma neutrofílica severa.

Artritis

[0072] En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o prevención de artritis reumatoide (RA). Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento logran una reducción en los signos clínicos de RA en un modelo de ratón, reducen el daño de cartílago y hueso, y reducen la respuesta inflamatoria de IL-17, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de RA. La RA es un trastorno inflamatorio sistémico que afecta principalmente a las articulaciones. La RA está asociada con una respuesta inflamatoria que produce hinchazón de las articulaciones, hiperplasia sinovial y destrucción del cartílago y el hueso. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la RA, p. ej., porque IL-17 inhibe la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos y activa la producción y función de las metaloproteinasas de la matriz y porque la actividad de la enfermedad de RA está correlacionada con los niveles de

IL-17 y Th -17 números de células [26, 27], por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la RA.

[0073] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción de niveles de IL-17 o la prevención de la elevación de los niveles de IL-17 en el tratamiento o la prevención de RA. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IL-17, en particular los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IFN- γ o IL-6.

[0074] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la hinchazón de articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en pacientes con articulaciones inflamadas o pacientes identificados como en riesgo de tener articulaciones inflamadas. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para usar en un método para reducir la hinchazón articular en la RA.

[0075] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en el cartílago dañado o daño óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones de lo descrito aquí son para uso en la reducción o prevención del cartílago o daño óseo en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con RA severa que están en riesgo de cartílago o daño óseo.

[0076] El aumento de niveles de IL-17 y el número de células Th17 están asociadas con el cartílago y la destrucción ósea en la RA [26,27]. 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 matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que exhiben erosión ósea o daño del cartílago o pacientes identificados como en riesgo de erosión ósea o daño del cartílago.

[0077] El TNF- α también está asociado con la RA, pero el TNF- α no está involucrado en la patogénesis de las etapas posteriores de la enfermedad. Por el contrario, IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [28]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento de la RA crónica o la RA en etapa tardía, tal como una enfermedad que incluye la destrucción articular y la pérdida de cartílago. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento 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 .

[0078] Las composiciones descritas en este documento pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas realizaciones, las composiciones según la invención son para uso en la prevención de RA en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de RA, o que ha sido diagnosticado con RA en etapa temprana. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de RA.

[0079] Las composiciones según la invención puede ser útil para la gestión o el alivio de la RA. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el hinchazón articular o la destrucción ósea. El tratamiento o la prevención de la RA pueden referirse, p. ej., a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Esclerosis múltiple

[0080] En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de múltiples esclerosis. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en la presente memoria 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. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, p. ej., debido a que los niveles de IL-17 pueden correlacionarse con lesiones de esclerosis múltiple, IL-17 puede alterar las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y las células Th17 pueden migrar hacia el centro sistema nervioso y causar pérdida neuronal [29,30]. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

[0081] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la enfermedad incidencia o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción de la incidencia de enfermedad o

5 gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento evita una disminución de la función motora o da como resultado una función motora mejorada. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para usar en la prevención de una disminución de la función motora o para mejorar la función motora. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento evita el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas aquí son para uso en la prevención de la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

10 **[0082]** Las composiciones descritas en este documento pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas realizaciones, las composiciones según la invención son para uso en la prevención de la esclerosis múltiple en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de esclerosis múltiple, o que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple en etapa temprana o esclerosis múltiple "recurrente-remite". Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de esclerosis. De hecho, los ejemplos muestran que la administración de las composiciones descritas en el presente documento evitó el desarrollo de la enfermedad en muchos ratones.

15 **[0083]** Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para la gestión o el alivio de la esclerosis múltiple. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple pueden referirse, p. ej., a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

Tratamiento del cáncer

20 **[0084]** En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. Los ejemplos demuestran que la administración de las composiciones descritas en el presente documento pueden conducir a una reducción en el crecimiento tumoral en varios modelos tumorales.

25 **[0085]** En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en el tamaño del tumor o una reducción en el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción del tamaño del tumor o en la reducción del crecimiento del tumor. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces para reducir el tamaño o el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas aquí son para uso en pacientes con tumores sólidos. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción o prevención de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. Las células IL-17 y Th17 tienen funciones centrales en la angiogénesis. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la prevención de metástasis.

30 **[0086]** En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de mama. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces para tratar el cáncer de mama. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción del tamaño del tumor, el crecimiento del tumor o la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de mama. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma mamario. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama en estadio IV.

35 **[0087]** En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de pulmón. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en este documento pueden ser eficaces para tratar el cáncer de pulmón. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la reducción del tamaño del tumor, el crecimiento del tumor o la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de pulmón. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de pulmón.

40 **[0088]** En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de cáncer de hígado. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces para tratar el cáncer de hígado. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del tumor o reducir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de hígado. En realizaciones preferidas, el cáncer es hepatoma (carcinoma hepatocelular).

45 **[0089]** En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de carcinoma. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces para tratar numerosos tipos de carcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer no inmunogénico. Los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces para tratar cánceres no inmunogénicos.

50 **[0090]** La IL-17 y la vía Th17 tienen funciones centrales en el desarrollo y progresión del cáncer y, aunque las funciones de las células IL-17 y Th17 en el cáncer no se comprenden completamente, numerosos efectos pro-tumorales de las

células IL-17 y Th17 son conocidos. Por ejemplo, las células Th17 y la IL-17 pueden promover la angiogénesis, aumentar la proliferación y la supervivencia de las células tumorales y activar los factores de transcripción que promueven el tumor [39-41]. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar o prevenir el cáncer. Además, los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento son eficaces para reducir el volumen tumoral en el cáncer de mama, pulmón e hígado, y las células IL-17 y Th17 tienen papeles importantes en estos tipos específicos de cáncer [42-44].

[0091] Los efectos terapéuticos de las composiciones descritas en el presente documento sobre el cáncer pueden ser mediados por un mecanismo pro-inflamatorio. La inflamación puede tener un efecto supresor del cáncer [45] y las citocinas proinflamatorias como el TNF α se están investigando como terapias contra el cáncer [46]. Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles para tratar el cáncer mediante un mecanismo similar. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden provocar una respuesta de tipo IFN γ . IFN γ es un potente factor de activación de macrófagos que puede estimular la actividad tumoricida [47], y CXCL9 y CXCL10, p. ej., también tienen efectos anticancerígenos [48-50]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para promover la inflamación en el tratamiento del cáncer. En realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la promoción de la inflamación Th1 en el tratamiento del cáncer. Las células Th1 producen IFN γ y tienen potentes efectos anticancerígenos [45]. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas aquí son para uso en el tratamiento de un cáncer en etapa temprana, tal como un cáncer que no ha hecho metástasis, o un cáncer en el Paso 0 o Paso 1. Promover la inflamación puede ser más efectivo contra los cánceres en etapa temprana [45]. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para promover la inflamación para potenciar el efecto de un segundo agente anticancerígeno.

[0092] En realizaciones adicionales, las composiciones descritas en este documento son para uso en el tratamiento o prevención de leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma de células basales, cáncer hepático, cáncer de vejiga, tumor óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco cerebral, tumor cerebral, cerebelo astrocitoma, astrocitoma cerebral/maligno glioma, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, cáncer endometrial, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, glioma, vía visual infantil e hipotálamo, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de células renales, cáncer de laringe, leucemias, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de orofaringe, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, faringe, adenoma pituitario, neoplasia de células plasmáticas, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de tiroides o cáncer uterino.

[0093] Las composiciones según la invención pueden ser particularmente eficaces cuando se utilizan en combinación con otros agentes terapéuticos. Los efectos inmunomoduladores de las composiciones descritas en el presente documento pueden ser eficaces cuando se combinan con agentes anticancerígenos más directos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma y un agente anticancerígeno. En realizaciones preferidas, el agente anticancerígeno es un inhibidor del punto de control inmunario, una inmunoterapia con anticuerpos dirigidos, una terapia con células CAR-T, un virus oncolítico o un fármaco citostático. En realizaciones preferidas, la composición comprende un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en: Yervoy (ipilimumab, BMS); Keytruda (pembrolizumab, Merck); Opdivo (nivolumab, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Tremelimumab (AZ/MedImmune); CT-011 (pidilizumab, CureTech); BMS-986015 (lirilumab, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (varilumab; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (indoximod, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH₂201 (Inmoterapéutica innata/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-VISTA (JnJ); Epcadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Universidad de Pensilvania); MGA271 (Macrogenix); Emactuzumab (Roche/Genentech); Galunisertib (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Bavixumab (productos farmacéuticos peregrinos); CC90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Ewha Women's University, Corea); Vemurafenib (Plexxikon); Dabrafenib (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Centro de Cáncer Memorial Sloan-Kettering); Unituxin (dinutuximab, United Therapeutics Corporation); Blincyto (blinatumomab, Amgen); Cyramza (ramucirumab, Eli Lilly); Gazyva (obinutuzumab, Roche/Biogen); Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine, Roche/Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche/Genentech); Adcetris (brentuximab vedotin, Takeda/Millennium); Arzerra (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastin (bevacizumab, Roche/Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS/Merck); Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalin (ibritumomab tiuxetano, Biogen); Campath (alemtuzumab, Bayer); Mylotarg (gemtuzumab ozogamicina, Pfizer); Herceptin (trastuzumab, Roche/Genentech); Rituxan (rituximab, Genentech/Biogen); volociximab (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Eliotuzumab (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Ozaralizumab (Ablynx); Actimab-C (actinio); Actimab-P (actinio); Milatuzumabdox

(Actinium); Emab-SN-38 (actinio); Naptumonmab estafenatox (biotecnología activa); AFM13 (afirmado); AFM11 (Afimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (samalizumab, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); 5 AMG110 (Amgen); AMG232 (adecatumumab, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Rilotumumab (Amgen); Denosumab (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Anetumab ravtansina 10 (Bayer); vantictumab (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Sibrotuzumab (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BIIB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT062 (Biotech) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Necitumumab (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo); nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 15 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Ramucirumab (Eli Lilly); Tabalumab (Eli Lilly); Zanolimumab (biosolución emergente); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Galaad); GS-6624 (Galaad); OMP-21M18 (demcizumab, GSK); mapatumumab (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); milatuzumabdox (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); 25 Epratuzumab (Immunomedics); Clivatuzumab (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Daratumumab (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (siltuximab, Janssen); KB004 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (ecromeximab, Life Science); Sonepcizumab (Lpath); Margetuximab (Macrogenics); Enoblituzumab (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); MK-0646 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); D11E6 (Merck Serono); MOR208 30 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmab5574 (Morphosys); BPC-1C (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); vantictumab (Oncomed/Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicina, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab, Regeneron/Sanofi); REGN421 (enoticumab, Regeneron/Sanofi); RG7, RG7156, RG7156, RG7116, RG7116, RG7116, 35 RG7456, RG7988, RG7599, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7596, RGS9610, RGS96, RGS96, RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi); SGN-LIV1A (linituzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotina, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ibritumomab tiuxetan (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ganitumab (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (Thrombogics); VB4-845 (Viventia); Xmab2512 (Xencor); Xmab5574 (Xencor); nimotuzumab (YM Biosciences); Carlumab (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19CAR (Kite Pharma); UCART19 (Collectis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTCK20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); 45 Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNATRIX); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Adl (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Reolysin (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, ácido folínico, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, Zykadia (Novartis), Tafinlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehrceva Ingel) (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespi (Synta Pharma), Tergentpumatucel-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), Tivantinib (ArQule); Citoxan (BMS); Oncovin (Eli Lilly); Adriamicina (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); taxótero (Sanofi); 55 Nexavar (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion); Cometriq (Exellxis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); y TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

Modos de administración

- 60 **[0094]** Preferiblemente, las composiciones de la invención son para ser administradas al tracto gastrointestinal con el fin de permitir la entrega y colonización/o 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.
- 65 **[0095]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se pueden administrar en forma de espuma, como una pulverización o un gel.

[0096] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en forma de un aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (por ejemplo Suppocire, Witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol o composición de glicerina de jabón.

[0097] En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra en el tracto gastrointestinal a través de un tubo, tal como un tubo nasogástrico, sonda orogástrica, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG), o un puerto, como un puerto de pared torácica que proporciona acceso al estómago, el yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

[0098] Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o se pueden administrar de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención deben administrarse diariamente.

[0099] En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento según la invención está acompañada por la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra el suministro y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención de manera que no se observe la eficacia, o el tratamiento puede cesar si el suministro y/o la colonización parcial o total es exitosa y se observa la eficacia.

[0100] En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal preñado, p. ej., un mamífero tal 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.

[0101] 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 Th17, o que se ha identificado como en riesgo de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17 en un paciente sano.

[0102] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado por tener una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede haber reducido o ausentado colonización por la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42380.

[0103] Las composiciones de la invención se pueden administrar como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

[0104] En general, las composiciones de la invención son para el tratamiento de humanos, aunque pueden usarse para tratar animales que incluyen mamíferos monogástricos tales 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 administran a animales, se puede usar sonda oral.

Composiciones

[0105] Generalmente, la composición de la invención comprende bacterias. En realizaciones preferidas de la invención, la composición se formula en forma liofilizada. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprenden una cepa bacteriana de la invención.

[0106] Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y se dispone de orientación relevante en, p. ej., referencias [51-53].

[0107] Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo y activo.

[0108] En realizaciones preferidas, la composición de la invención se encapsula para permitir el suministro de la cepa bacteriana al intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la entrega en la ubicación diana a través, p. ej., de la ruptura con estímulos químicos o físicos como la presión, la actividad enzimática o la desintegración física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de soporte sólidas, autoagregulación 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, p. ej., en las referencias [54] y [55].

[0109] La composición se puede administrar por vía oral y puede estar en la forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 puede ser un anaerobio. Se pueden incluir otros ingredientes (como la vitamina C, por ejemplo), como captadores de oxígeno

y sustratos prebióticos para mejorar el suministro 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 alimento o producto nutricional, tal como leche o lácteos fermentados a base de suero producto, o como producto farmacéutico.

5 **[0110]** La composición puede formularse como un probiótico.

[0111] Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana de la invención. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un paciente. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar lugar a la administración y/o colonización parcial o total del intestino del paciente.

10 **[0112]** 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 (CFU); p. ej., de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^{10} CFU; en otro ejemplo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} CFU.

15 **[0113]** En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{11} CFU/g, con respecto al peso de la composición; p. ej., de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{10} CFU/g. La dosis puede ser, p. ej., 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

20 **[0114]** Típicamente, un probiótico, tal como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico. Un compuesto prebiótico suele ser un carbohidrato no digerible, como un oligo o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

25 **[0115]** En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30% en peso, con respecto a la composición de peso total (p. ej., de 5 a 20% en peso). Los carbohidratos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: fructo-oligosacáridos (o FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, goma de almendra 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 mostrada a continuación como FOSs-c.c); dichos FOSs-c.c no son carbohidratos digeribles, generalmente obtenidos por la conversión del azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

35 **[0116]** Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [56]. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, p. ej., en la referencia [57]. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente se puede seleccionar con respecto a la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante(s) adecuado, lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s). Los 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, estabilizadores, 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.

40 **[0117]** 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 al ser más similar a un producto alimenticio común, que 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, p. ej., 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 las bebidas de suero, las leches fermentadas, las leches condensadas, las leches infantiles o para bebés; leches aromatizadas, helados; alimentos que contienen leche, como dulces.

65 **[0118]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana. Dichas composiciones pueden comprender solo cantidades

mínimas o biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Dichas composiciones pueden ser un cultivo que esté sustancialmente libre de otras especies de organismos.

5 **[0119]** Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden o pueden no requerir la aprobación de comercialización.

[0120] En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito aquí.

10 **[0121]** Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 **[0122]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, 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.

25 **[0123]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo 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 Th17. En realizaciones preferidas, dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, juvenil artritis idiopática, 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 aloinjertos.

35 **[0124]** 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.

40 **[0125]** 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.

[0126] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en oral, rectal, subcutáneo, nasal, bucal y sublingual.

45 **[0127]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

50 **[0128]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

55 **[0129]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, acacia, tragacanto, sodio alginato, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

[0130] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizador.

60 **[0131]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste en benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

65 **[0132]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde dicha cepa bacteriana se liofiliza.

[0133] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde cuando la composición se almacena en un recipiente sellado a aproximadamente 4°C o aproximadamente 25°C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene una humedad relativa del 50%, a al menos el 80% de la cepa bacteriana, medida en unidades formadoras de colonias, permanece después de un período de al menos aproximadamente: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.

Métodos de cultivo

[0134] Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden cultivarse usando técnicas de microbiología estándar como se detalla, p. ej., en las referencias [58-60].

[0135] El medio sólido o líquido utilizado para el cultivo puede ser agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄·7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), ácido *p*-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) y piridoxamina (15 µg).

Cepas bacterianas para uso en composiciones de vacunas

[0136] Los inventores han identificado que las cepas bacterianas descritas en este documento son útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen sobre el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones descritas en el presente documento también pueden ser útiles para prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17, cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención se pueden matar, inactivar o atenuar. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración por inyección, tal como por inyección subcutánea.

General

[0137] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, p. ej., las referencias [61] y [62-68], etc.

[0138] El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo. una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, p. ej., X + Y.

[0139] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico *x* es opcional y significa, p. ej., $x \pm 10\%$.

[0140] 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.

[0141] Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, p. ej., los descritos en la sección 7,7,18 de la ref. [69] El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman determina una alineación preferida usando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio abierto de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología SmithWaterman se describe en la ref. [70]

[0142] 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 de intervención adicionales. Además, los pasos se pueden combinar, omitir o realizar en un orden alternativo, si corresponde.

[0143] En este documento se describen diversas 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 aquí como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

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

Resumen

5 **[0144]** Los ratones fueron administrados con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y fueron posteriormente desafiados con extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) para producir una respuesta inflamatoria alérgica. La respuesta inflamatoria a HDM incluye componentes eosinofílicos y neutrofílicos, está mediada por IL-17 y la vía Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con las composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria y reducen el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, lo que indica que pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 tales como eosinofilia, neutrofilia y asma.

10 Cepa

[0145] 751: bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380.

15 Diseño del estudio:

Grupos:

[0146]

- 20
- 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).
 - 4. Tratamiento con cepa 751 de inóculo bacteriano terapéutico (por vía oral).
 - 7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).
 - 8. Grupo de control no tratado.

25 Número de ratones por grupo = 5.

[0147] Día -14 a día 13: Administración diaria de control del vehículo por vía oral (Grupo 1).

[0148] Día -14 a día 13: Administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 2-6).

30 **[0149]** Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de 15ug HDM (extracto de ácaros del polvo doméstico - Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) En un volumen de 30ul PBS por nasal (Grupo 1-8).

35 **[0150]** Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de dexametasona (ip, 3 mg/kg, Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159) (Grupo 7).

[0151] Día 14 Sacrificio de todos los animales para análisis.

40 **[0152]** Número total de ratones = 40.

Criterios de valoración y análisis

45 **[0153]** El día 14 se sacrificaron los animales mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) inmediatamente seguido de un lavado broncoalveolar (BAL).

[0154] Las células fueron aisladas de los recuentos de células de fluido y diferenciales BAL (lavado broncoalveolar) realizados (200 células cuentas/muestras).

50 Material y Métodos

[0155] Ratones. Se compraron 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: "The Sealsafe™ - IVC cage. 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 monitorearon 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. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Servicio de Consumo y Asuntos Veterinarios del Cantón de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal fueron observadas según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza bajo la ordenanza 455,163 de la FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

65 **[0156] 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 Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de anaeróbico YCFA Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos de Hungate se incubaron luego (estática) a 37°C durante 16 H(cepa 751).

5 **[0157] Cultivo del control del vehículo.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.

[0158] Administración de inóculo bacteriano o control de vehículo. Se administraron 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

10 **[0159] Sensibilización intranasal.** Los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y se administraron con 15 ug de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) En un volumen de 30ul PBS por nasal.

15 **[0160] Preparación y administración del compuesto de control positivo Dexametasona.** La dexametasona 21-fosfato sal de disodio (Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159, Lote N° SLBD,1030V) se resolvió en H₂O y se administra a los animales en una dosis de 3 mg/kg en un volumen de 200 ul por oral en días indicado en el protocolo de estudio anterior.

20 **[0161] 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.

25 **[0162] 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.

30 **[0163] Gráficos y análisis estadístico.** Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism Versión 6 y se aplicó un ANOVA unidireccional. 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

35 **[0164]** Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 1-9.

[0165] No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Los dos controles, el tratamiento del 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.

40 **[0166]** Los resultados más importantes de este experimento se muestran en las Figuras 6 y 7, que informan sobre el número total y el porcentaje de neutrófilos detectados en el lavado bronquiolar después del desafío con HDM. La cepa 751 redujo los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en BAL en relación con el control de solo vehículo.

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

45 Resumen

50 **[0167]** Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se sensibilizaron con las 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 severa. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con las composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención para aliviar la respuesta inflamatoria, y en particular para reducir el reclutamiento de neutrófilos, de una manera comparable con el control positivo que comprende administraciones de anticuerpos anti-IL-17. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 y Th17 tales como neutrofilia y asma.

Cepa

60 **[0168]** 751: bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380

Diseño del estudio:

Grupos:

65 **[0169]**

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

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

10 **[0170]** Día -14 al día 17: Administración diaria de control del vehículo por vía oral (Grupo 1).

[0171] Día -14 a día 17: Administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 2-6).

15 **[0172]** Día 0: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).

[0173] Día 7: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).

[0174] Día 13, 15, 17: Administración de anticuerpo neutralizante anti-IL-17 por i.p. (Grupo 7).

20 **[0175]** Día 14, 15, 16, 17: Desafío con HDM en 30ul PBS por nasal (Grupo 1-8).

[0176] Día 18: Sacrificio de todos los animales para análisis.

25 **Crterios de valoración y análisis:**

[0177] En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbitol (Streuli PharmaAG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL). Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos de células diferenciales (200 recuentos de células/muestras).

30 **Material y métodos.**

[0178] Ratones. Se compraron 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: "The SealsafeTM - IVC cage. 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 monitorearon 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. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Servicio de Consumo y Asuntos Veterinarios del Cantón de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se observaron según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455,163 del FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

45 **[0179] 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 Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos de Hungate se incubaron luego (estáticos) a 37°C durante 16 H (cepa 751).

50 **[0180] Cultivo de control de vehículos.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.

55 **[0181] Administración de inóculo bacteriano o control de vehículo.** Se administraron 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

60 **[0182] Sensibilización HDM.** 50 µg de HDM (Número de catálogo: XPB70D3A25, Número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) En PBS se emulsionó en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, EE.UU.) y se administró por vía subcutánea en un volumen de 200 µl, dos veces durante dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y luego recibieron desafíos intranasales de 15 µg de HDM en un volumen de 30ul PBS en 4 días consecutivos. El análisis se realizó un día después del desafío final.

65 **[0183] Preparación y administración del compuesto de control positivo anti-anticuerpo IL-17 de ratón.** El

anticuerpo neutralizante anti-IL-17 se obtuvo de Bio X Cell y se almacenó a 4°C (Clon 17F3, Cat. Número 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.

5 **[0184] Procedimiento terminal.** El día 18 se sacrificaron los animales mediante inyección i.p. letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) inmediatamente seguido de lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

10 **[0185] 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.

[0186] Gráficos y análisis estadístico. Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism Versión 6 y se aplicó un ANOVA unidireccional. 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).

15 Resultados y análisis

[0187] Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 10-18.

20 **[0188]** No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la cepa 751 fue altamente eficaz para aliviar la magnitud de la respuesta inflamatoria neutrofílica. De hecho, el tratamiento con la cepa 751 mostró resultados comparables al tratamiento con anticuerpos anti-IL-17. Además, la cepa 751 redujo el número de eosinófilos en relación con los controles, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

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

Materiales y métodos

30 **Cepas**

[0189] 751: bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380

Cultivos bacterianos

35 **[0190]** Se cultivaron cultivos bacterianos para administración en una estación de trabajo anaeróbica (Don Whitley Scientific).

40 **[0191]** La cepa bacteriana nº 751 fue cultivada utilizando reservas de glicerol. Las reservas de glicerol se almacenaron a -80°C. Tres veces por semana, las reservas de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se tiñeron 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.

45 **[0192]** Las soluciones a administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas para tratamientos de mañana (AM) y tarde (PM). Se recogió una colonia bacteriana de la placa rayada y se transfirió a un tubo que contenía medio YCFA. La cepa bacteriana nº 751 se dejó crecer durante 16 horas antes de las administraciones de AM. Las bacterias se subcultivaron al 1% en medios YCFA para administraciones de PM. Los valores de OD se registraron para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de mañana y tarde.

50 **Modelo de ratón de artritis inducida por colágeno tipo II**

55 **[0193]** Se asignaron aleatoriamente ratones machos adultos DBA/1 a grupos experimentales y se les permitió aclimatarse durante dos semanas. El día 0, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con 100 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de colágeno tipo II (CII) en adyuvante incompleto de Freund suplementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. El día 21, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante de Freund incompleto.

60 **[0194]** Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa de administración a continuación. Desde el día 14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se pesaron tres veces por semana. Desde el día 21 hasta el final del experimento, se calificó a los animales tres veces por semana para que los signos clínicos de artritis incluyeran hinchazón de las patas traseras y delanteras, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y las articulaciones tibio-tarsales (tobillo).

65 **[0195]** El día 45 se sacrificaron ratones y se tomaron muestras de sangre terminal para análisis de citocinas.

[0196] En el día -14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales para análisis microbiológico, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C.

5 [0197] El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón bien establecido para la artritis reumatoide [71]. La inmunización con CII causa una patogénesis que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoide, incluida la hiperplasia sinovial, la infiltración de células mononucleares y la degradación del cartilago. Significativamente, el desarrollo de CIA está mediado por células Th17 a través de la secreción de IL-17A [72]. La respuesta inmune subyacente en el modelo de artritis se ve reforzada por el uso del adyuvante de Freund complementado con *Mycobacterium tuberculosis*.

10 [0198] En el día 21, se recogieron bazos de tres animales satélites en cada grupo. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Las citocinas, que incluyen TNF- α , IL-6, IFN- 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.

Grupos de tratamiento y dosis

20 [0199] Todos los grupos fueron n = 15 (n= 12 para el grupo principal de estudio y n = 3 para grupos satélite).

[0200] El vehículo utilizado para la bioterapéutica fue medio de extracto de levadura-ácidos grasos de casitona (YCFA).

	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de enfermedad	
			Ruta	Régimen		
25	1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID: Día -14-Fin	Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC
	2	Bioterapéutico n° 751	5 ml/kg	PO	BID: Día -14-Fin	Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC

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

30

Pesos corporales

[0201] Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se pesaron tres veces por semana. Los datos fueron graficados (\pm SEM media).

35

Observaciones clínicas no específicas

[0202] Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se verificaron diariamente para detectar signos clínicos no específicos que incluyan una postura anormal (encorvada), una condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (reducida o aumento de la actividad).

40

Observaciones clínicas

45 [0203] Desde el día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se puntuaron tres veces por semana para detectar signos clínicos de artritis que incluyan hinchazón de las patas traseras y frontales, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y articulaciones tibio-tarsales (tobillo). Cada miembro se puntuó utilizando la siguiente escala: (0) normal, (1) hinchazón leve, (2) hinchazón suave, (3) hinchazón moderada y (4) hinchazón severa. Se calculó una puntuación clínica sumando cada puntuación de extremidad. La puntuación clínica máxima posible para un animal fue (16). Los animales con un puntaje igual a (12) en dos ocasiones consecutivas y los animales con un puntaje mayor a (12) en cualquier ocasión fueron sacrificados. Los datos fueron graficados (media \pm SEM).

50

Análisis de proliferación celular

55 [0204] En el día 21, se sacrificaron tres animales satélite 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 fueron graficados (media \pm SEM). Se tomaron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de citocinas clave.

Análisis de citoquinas

[0205] Sobrenadantes terminales de los cultivos de células de bazo se pusieron a prueba con el fin de cuantificar el TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 por Luminex. Los datos fueron graficados (media \pm SEM).

Análisis microbiológico

65

[0206] En el día 14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales de cada animal, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C. Caeca (incluido el contenido) se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Una prueba de identificación bacteriana se realizó diariamente mediante el recubrimiento de la bacteria.

5 Histopatología

[0207] 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 calificadas por un histopatólogo calificado, ciego al diseño experimental, para que los signos de artritis incluyan inflamación, daño del cartílago articular y daño al hueso metafisario subyacente. Se utilizó un sistema de puntuación detallado (ver más abajo). Los datos fueron graficados (media \pm SEM). Se proporcionaron datos brutos y analizados, así como imágenes representativas.

Tabla 1: Sistema de puntuación de histopatología

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial leve con inflamación dominada por neutrófilos. Bajos números de neutrófilos y macrófagos en el espacio articular.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que involucra neutrófilos y macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio articular; pueden ser algunos restos 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.
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 formación extensa de pannus.
Daño al hueso metafisario subyacente	
0	Articulación normal
1	Sin cambios en el hueso metafisario subyacente.
2	Puede ser necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
3	Interrupción o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensiva, necrosis o fibrosis que se extiende al espacio medular de la metafisis

45 Resultados y análisis

Supervivencia y observaciones clínicas no específicas

[0208] Algunos animales fueron sacrificados 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.

[0209] Tres animales fueron sacrificados o encontrados muertos o sacrificados durante el período de pretratamiento (Día -14 al Día 0): un animal en el Grupo 1 (tratado con vehículo, el animal llegó del proveedor con una pierna rota y fue sacrificado) y dos animales en el Grupo 2 (tratamiento Bioterapéutico n° 751, posible dosificación pulmonar en el primer día de pretratamiento y signos clínicos posteriores a la dosis en el segundo día de pretratamiento).

[0210] Ocho animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis: cinco animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y tres animales en el Grupo 2 (tratados con Bioterapéutico n° 751).

[0211] Cuatro animales fueron sacrificados debido a la severidad de los signos clínicos no específicos, incluyendo postura anormal (encorvada), condición anormal del pelaje (piloerección), niveles anormales de actividad (actividad reducida): tres animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y un animal en el Grupo 2 (Bioterapéutico n° 751 tratado).

Pesos corporales

65

[0212] Datos del 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 la 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.

[0213] En comparación con el día 14, las administraciones dos veces al día por sonda oral indujeron una pérdida de peso corporal significativa en el grupo tratado con vehículo el día 9 y el día 7.

[0214] Los pesos corporales medidos entre el día 14 y el día -1 en los grupos tratados con bioterapia no diferían de los pesos corporales medidos en el grupo tratado con vehículo en un día determinado.

[0215] 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 vehículos y luego para 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 unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para realizar comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo.

[0216] La aparición de signos clínicos de artritis se asoció con una pérdida de peso corporal significativa el día 26 y el día 28 ($p < 0,0001$) en comparación con el día 0 en el grupo tratado con vehículo.

[0217] No hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales en el día 35 o el día 42.

Observaciones clínicas

[0218] 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 que para comparaciones múltiples entre grupos experimentales y el grupo tratado con vehículo cada día. Los datos se presentan en la Figura 21. Los datos registrados de animales sacrificados antes del final del experimento se excluyeron del análisis. Cuando los animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis, se informó la última puntuación registrada para los días siguientes y se utilizó en los análisis estadísticos.

[0219] 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.

[0220] Bioterapéutico n° 751 indujo una reducción de las puntuaciones clínicas en comparación al grupo tratado con vehículo desde el día 31 hasta el día 45, aunque la diferencia no fue significativa.

Análisis de proliferación celular

[0221] Para validar el ensayo, se cultivaron esplenocitos en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 solubles (antiCD3/CD28) como estímulos de control positivo para confirmar el potencial proliferativo de las células.

[0222] Se observaron fuertes respuestas proliferativas 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.

[0223] 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 Sydak para 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 grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 22.

[0224] CII induce un aumento muy significativo de ^3H -timidina (cpm) en comparación con los esplenocitos no estimulados en el grupo tratado con vehículo ($p < 0,0001$).

[0225] Los grupos tratados con bioterapéutico n° 751 demostraron niveles significativamente más bajos de proliferación de esplenocitos inducida por CII que el grupo tratado con vehículo.

Niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo de tejidos

[0226] Los niveles de cada citocina se midieron en sobrenadantes de cultivo de tejidos derivados de cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 mediante análisis luminex. Estos mostraron respuestas robustas para todas las citocinas medidas (los niveles medios en el grupo de vehículos fueron los siguientes: IL-4 = 6406 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).

[0227] 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 por CII se realizaron utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Sidak para comparaciones múltiples, mientras que se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por CII en grupos tratados con bioterapia 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 utilizado (n= 3).

[0228] Con el fin de presentar con mayor precisión la distribución de los datos para las citocinas con una distribución sustancial de los datos del documento, estos se presentan como gráficos de dispersión.

[0229] Las medias grupales de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con CII fueron <5pg/ml. Estos no se consideran biológicamente significativos y no se incluyen aquí. Las medias grupales de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con colágeno estaban por debajo del límite de cuantificación.

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (FIG. 23)

[0230] Junto con IL-17, IFN- γ es la principal enfermedad que conduce a las citocinas en el modelo de la 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 más alta para el grupo tratado con vehículo en comparación con el bioterapéutico. El resultado atípico del mismo sujeto del grupo 2 es responsable de la mediana más alta en este grupo para IFN- γ e IL-10.

Niveles de sobrenadante de IL-17A (FIG. 24)

[0231] Los niveles de IL-17A fueron 50 pg/ml en cultivos estimulados con CII para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de esta citocina parecían ser más bajos en el grupo bioterapéutico en comparación con el tratado con el vehículo.

Niveles de sobrenadante de IL-10 (FIG. 25)

[0232] 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 citocina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo porque la inflamación y la inducción de citocinas proinflamatorias podrían estar acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatoria.

Niveles de sobrenadante de IL-6 (FIG. 26)

[0233] Las citocinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- α no se producen típicamente a 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.

Análisis microbiológico

[0234] 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.

[0235] Siguiendo el método mejorado de preparación bacteriana, se administraron consistentemente altas dosis de cepa bacteriana desde el día -2 y el día -3 como se indica por los altos valores de OD medidos.

[0236] Se recogieron muestras fecales y se congelaron instantáneamente el Día -14, Día 0 y al finalizar.

Histopatología

[0237] Los resultados de histopatología se muestran en las Figuras 66-70. 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.

[0238] La naturaleza de la patología fue como se esperaba para este modelo, con una extensa inflamación crónica activa mixta de la sinovial y la bolsa que se extiende para involucrar los tejidos blandos periarticulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico). En las articulaciones más severamente 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.

[0239] La incidencia de cambios histopatológicos fue: vehículo - 80% (16/20); Bioterapéutico nº 751 - 45% (9/20). El tratamiento con Bioterapéutico nº 751 redujo la incidencia de puntajes histopatológicos en las extremidades posteriores del ratón en comparación con el grupo tratado con vehículo (ver Figuras 66-69). Los puntajes de histopatología se analizaron mediante ANOVA unidireccional para datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) seguido de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo. Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de los puntajes de inflamación articular observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,01$). Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño de cartílago observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño óseo observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). Bioterapéutico nº 751 indujo una reducción significativa de los puntajes de histopatología total en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,01$).

Resumen

[0240] 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 nº 751 demostró ser efectivo en el tratamiento de la artritis en este modelo y el Bioterapéutico nº 751 fue efectivo para reducir la severidad de los puntajes clínicos. Bioterapéutico nº 751 también fue eficaz para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se demostró en el análisis histopatológico.

[0241] Se observaron respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. La respuesta específica de colágeno se redujo significativamente después del tratamiento con Bioterapéutico nº 751 (Grupo 2).

[0242] La mayoría de las citocinas de células T probadas 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 bioterapia. Esto apoya ampliamente las respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II descritas anteriormente.

[0243] Hubo evidencia de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patogénica en este modelo y en la RA humana. La correlación de niveles reducidos de citocinas 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 con aumentos en la citocina inmunomoduladora, IL-10.

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

[0244] 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 alérgica al asma.

Materiales y métodos

[0245] **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.

[0246] **Extracción de órganos el día 14.** Recolección del lóbulo izquierdo del pulmón en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación rápida y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló rápidamente para el análisis de seguimiento.

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL

[0247] La producción total de anticuerpos IgG1 específicos para IgE y ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en BAL y suero mediante ensayo ELISA.

Aislamiento del pulmón y análisis histológico

[0248] Los lóbulos del pulmón izquierdo 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 calificó con el siguiente sistema de clasificación:

0 – normal

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

[0249] En cada campo de visión, las vías aéreas fueron medidas en tamaño y se cuantificaron los números de células mucosas/um.

Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar

[0250] 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

[0251] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 28-46.

[0252] En apoyo de los hallazgos descritos en El Ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de ratones tratados con la cepa 751 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en la puntuación media de inflamación (ver Figuras 32 y 34).

[0253] Se analizaron los niveles de anticuerpos en el fluido BAL y suero (véanse las Figuras 28-31). No se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de anticuerpos en suero. Esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. Además, los niveles basales de anticuerpos en suero podrían haber enmascarado cualquier cambio.

[0254] De manera similar, no se observó ningún efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citocinas en el tejido pulmonar (véanse las Figuras 36-46). Nuevamente, esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. También es posible que el mecanismo de acción involucrado influya en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido 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 los inóculos bacterianos en el modelo de ratón de asma neutrofílica severa

[0255] 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 severa.

Materiales y métodos

[0256] **Extracción de órganos el día 18.** Recolección del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación rápida y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló rápidamente para el análisis de seguimiento.

[0257] **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 rápidamente 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.

[0258] **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 el BAL y el suero mediante ensayo ELISA.

[0259] 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 cegado 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 calificó con el siguiente sistema de clasificación:

- 10 0 – normal
- 1 - infiltrados inflamatorios leves
- 2 - infiltrados inflamatorios moderados
- 15 3 - infiltrados inflamatorios marcados
- 4 - infiltrados inflamatorios severos
- 20 5- infiltrados inflamatorios muy graves

Resultados y análisis

[0260] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 47-64.

[0261] Un análisis adicional de los niveles de anticuerpos reveló que la eficacia de la cepa bacteriana 751 también se reflejó en niveles reducidos de IgG1 específica de HDM en el fluido y suero BAL (véanse las 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 global reducida, en oposición a un efecto selectivo sobre el cambio de isotipo de anticuerpo.

[0262] El análisis histológico apoyó los recuentos diferenciales de células del fluido BAL, mostrando un infiltrado celular reducido en ratones tratados con Cepa 751 (ver Figuras 51-53).

[0263] En relación con los niveles de citoquinas, como para 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 se esperaría necesariamente. 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 la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se demostró un claro efecto antiinflamatorio sobre los niveles de citoquinas para la cepa 751, y el control positivo anti-IL-17 Ab se comportó generalmente como se esperaba.

[0264] 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, y en particular la cepa 751 puede lograr una reducción en los niveles de IL-1b, IFNg, RANTES, MIP-1a y KC (el ortólogo de ratón de la IL-8 humana), que pueden ser indicativos de un mecanismo de acción relacionado con las influencias en 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 Th17. Tomando este conjunto de datos juntos, se puede llegar a una conclusión clara de que Cepa 751 fue altamente eficaz para proteger a los ratones contra la inflamación en este modelo de asma neutrofílica severa.

Ejemplo 6 - Eficacia de la inoculación bacteriana en un modelo de ratón de esclerosis múltiple

Resumen

[0265] Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas según la invención y los ratones se inmunizaron posteriormente con glucoproteína de oligodendrocitos de mielina para inducir encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). EAE es el modelo experimental más utilizado para la esclerosis múltiple humana. Se encontró que las composiciones de la invención tienen un efecto sorprendente sobre la incidencia y la gravedad de la enfermedad.

Cepa

[0266] 751: bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380

Diseño del estudio

Grupos:

5

[0267]

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).
4. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 751 (por vía oral).
9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).
10. Grupo de control no tratado.

10

Número de ratones por grupo = 10

15

[0268] Días -14 a día 27: Administración diaria de control del vehículo por vía oral (Grupo 1).

[0269] Días -14 a día 27: administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 4).

20

[0270] Días 0-28: administración de dexametasona (i.p.) tres veces a la semana (Grupo 9)

[0271] Día 0: MOG35-55 (mielina de oligodendrocitos glicoproteína - 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 µl de la mezcla péptido-CFA por vía subcutánea en cada pata trasera. Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

25

[0272] Día 1: La administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

[0273] Días 7 en adelante: Medición de la incidencia y el peso de la enfermedad tres veces por semana.

30

Criterios de valoración y análisis

[0274] Los ratones se analizaron para determinar la incidencia y la gravedad de la enfermedad tres veces por semana. La puntuación se realizó a ciegas. La gravedad de la enfermedad se evaluó utilizando una puntuación clínica que oscila entre 0 y 5, donde 5 indica un ratón muerto (ver el sistema de puntuación clínica a continuación).

35

Monitorización

[0275] En los días indicados, se pesaron los ratones y se observó su puntuación de actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

40

[0276] Observaciones de puntuación de actividad de la enfermedad:

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

45

0,5 - La punta de la cola está floja.

1,0 - Cola floja.

1,5 - Inhibición de la cola y la pata trasera.

50

2,0 - La cola floja y la debilidad de las patas traseras.

0 - Hay signos obvios de inclinación de la cabeza cuando se observa la caminata. El equilibrio es pobre.

2,5 - La cola floja y arrastre de las patas traseras.

55

- 0 - Hay una fuerte inclinación de la cabeza que ocasiona que el ratón se caiga ocasionalmente.

3,0 - La cola floja y total parálisis de las patas traseras.

60

3,5 - La cola floja y total parálisis de las patas traseras.

Además de: el ratón se mueve alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no puede enderezarse. Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo.

4,0 - La cola floja, pata trasera completa y parálisis parcial de la pata delantera.

65

- El ratón se mueve mínimamente alrededor de la jaula pero parece alerta y se alimenta

4,5 - Parálisis completa de la pata delantera y parcial, 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 severa.

[0277] 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

[0278] Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 71 y 72.

[0279] La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo fue exitosa con puntuaciones altas mostradas por el control del vehículo y el control no tratado. El efecto del tratamiento con la cepa 751 fue sorprendente y los ratones tratados con la cepa 751 exhibieron 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 751 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

Ejemplo 7 - Eficacia de inóculos bacterianos en modelos de cáncer en ratones

Resumen

[0280] Este estudio probó la eficacia de composiciones que comprenden cepas bacterianas según la invención en cuatro tumores modelos.

Materiales

[0281] **Sustancia de prueba** - Cepa bacteriana nº MRX004 (cepa 751).

[0282] **Sustancia de referencia** - Anticuerpo anti-CTLA-4 (clon: 9H10, catálogo: BE0131, isotipo: hámster sirio IgG1, Bioxcell).

[0283] **Vehículos de sustancias de prueba y referencia:** Medio de cultivo bacteriano (extracto de levadura, casitona, medio de ácido graso (YCFA)). Cada día de inyección a ratones, el anticuerpo se diluyó con PBS (ref: BE14-516F, Lonza, Francia).

[0284] **Dosis de tratamiento** - Bacterias: 2×10^8 en 200 μ L. El a-CTLA-4 se inyectó a 10 mg/kg/inj. Anti-CTLA-4 se administró a un volumen de dosis de 10 ml/kg/adm (es decir, para un ratón que pesa 20 g, se administrarán 200 μ L de sustancia de prueba) de acuerdo con el peso corporal más reciente de los ratones.

[0285] **Vías de administración:** El inóculo bacteriano se administró por sonda oral (per os, PO) a través de una cánula. Las cánulas se descontaminaron todos los días. Se inyectó anti-CTLA-4 en la cavidad peritoneal de ratones (intraperitonealmente, IP).

[0286] **Las condiciones de cultivo de la cepa bacteriana** - Las condiciones de cultivo para la cepa bacteriana fueron las siguientes:

- Pipeta de 10 ml de YCFA (de la prepararon 10 ml de botellas de laboratorio E&O) en tubos Hungate
- Sellar los tubos y al ras con CO₂ utilizando una entrada de jeringa y sistema de escape
- Autoclave los tubos Hungate
- Cuando se enfríe, inocular los tubos Hungate con 1 ml de las reservas de glicerol
- Colocar los tubos en una incubadora estática a 37°C durante aproximadamente 16 horas
- El día siguiente, tomar 1 ml de este subcultivo e inocular 10 ml de YCFA (tubos de Hungate enrojecidos pre-calentados de nuevo, todo por duplicado)
- Colocarlos en una incubadora estática 37° durante 5 a 6h

Línea celular de cáncer y condiciones de cultivo -

[0287] Las líneas celulares que se usaron se detallan en la tabla a continuación:

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

[0288] La línea celular EMT-6 se estableció a partir de un carcinoma mamario murino trasplantable que surgió en un ratón BALB/cCRGL después de la implantación de un nódulo alveolar mamario hiperplásico [73].

5 [0289] La línea celular LL/2 (LLC1) se estableció a partir del pulmón de un ratón c57BL con un tumor resultante de una implantación de carcinoma primario de pulmón de Lewis [74].

[0290] La línea celular Hepa 1-6 es un derivado del hepatoma de ratón BW7756 que surgió en un ratón c57/L [75].

10 [0291] **Condiciones de cultivo celular** - Todas las líneas celulares se cultivaron como monocapa a 37°C en una atmósfera humidificada (5% de CO₂, 95% de aire). El medio de cultivo y el suplemento se indican en la tabla a continuación:

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

25 [0292] Para uso experimental, las células tumorales adherentes se separaron del matraz de cultivo mediante un tratamiento de 5 minutos con tripsina-verseno (ref: BE17-161E, Lonza), en medio de Hanks sin calcio ni magnesio (ref: BE10-543F, Lonza) y neutralizado mediante la adición de medio de cultivo completo. Las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad se evaluará mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano al 0,25%.

30 **Uso de animales -**

[0293] Se obtuvieron ratones Balb/C (BALB/cByJ) hembras sanos, de peso y edad similares, de CHARLES RIVER (L'Arbresles) para los experimentos con el modelo EMT6.

35 [0294] Se obtuvieron ratones hembra sanos^{c57BL/6} (C57BL16J), de peso y edad similares, de CHARLES RIVER (L'Arbresles) para los experimentos modelo LL/2 (LLC1) y Hepal-6.

40 [0295] Los animales se mantuvieron en estado de salud SPF de acuerdo con las pautas de FELASA, y se siguieron los procedimientos experimentales y de alojamiento de animales de acuerdo con las regulaciones francesas y europeas y la Guía NRC para el cuidado y uso de animales de laboratorio [76,77]. Los animales se mantuvieron en habitaciones de alojamiento en condiciones ambientales controladas: temperatura: 22 ± 2°C, humedad 55 ± 10%, fotoperíodo (12 h de luz/12 h de oscuridad), aire filtrado HEPA, 15 intercambios de aire por hora sin recirculación. Los recintos de animales se proporcionaron con un espacio estéril y adecuado con material de cama, alimentos y agua, enriquecimiento ambiental y social (alojamiento grupal) como se describe: jaulas de 900 cm² (ref: verde, Tecniplast) en bastidores ventilados, ropa de cama Epicea (SAFE), 10 Dieta irradiada kGy (A04-10, SAFE), alimento completo para roedores inmunocompetentes - Extruido R/MH, agua de botellas de agua.

45 Diseño experimental y tratamientos

50 **Actividad antitumoral, modelo EMT6**

[0296] Programa de tratamiento - El inicio de la primera dosis se consideró como D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron según su peso corporal individual en grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales EMT-6 como se describe a continuación. En D24, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0297] El programa de tratamiento se resume en la tabla a continuación:

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

[0298] El seguimiento de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0299] La inducción de tumores EMT6 en animales - En D14, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de 1×10^6 EMT-6 células en 200 μ L RPMI 1640 en el flanco derecho de los ratones.

[0300] Eutanasia: Cada ratón se sacrificó cuando alcanzó un punto final humano como se describe a continuación, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

[0301] Programa de tratamiento - El inicio de la primera dosis se consideró como D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9/8 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibirán vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales LL/2 como se describe a continuación. En D27, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0302] El programa de tratamiento se resume en la siguiente tabla:

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

[0303] El seguimiento de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0304] La inducción de tumores LL/2 (LLC1) en animales - En D14, los tumores fueron inducidos por inyección subcutánea de 1×10^6 células LL/2 (LLC1) en 200 μ L RPMI 1640 en el flanco derecho de los ratones.

[0305] Eutanasia: Cada ratón se sacrificó cuando alcanzó un punto final humano como se describe a continuación, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6

[0306] Programa de tratamiento - El inicio de la primera dosis se consideró como D0. En D0, los ratones no injertados se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal individual en 7 grupos de 9 utilizando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). En D0, los ratones recibieron vehículo (medio de cultivo) o cepa bacteriana. En D14, todos los ratones fueron injertados con células tumorales Hepa 1-6 como se describe a continuación. En D16, los ratones del grupo de control positivo recibieron tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4.

[0307] El programa de tratamiento se resume en la siguiente tabla:

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

[0308] El seguimiento de los animales se realizó como se describe a continuación.

[0309] La inducción ortotópica de las células tumorales Hepa 1-6 en animales mediante la inyección intraesplénica - En D14, un millón (1×10^6) células Hepa 1-6 tumorales en 50 μ L RPMI 1640 se trasplantaron a través de inyección intraesplénica en los ratones. Brevemente, se realizó una pequeña incisión en el costado subcostal izquierdo y se exteriorizó el bazo. El bazo se expuso en una gasa estéril, y se inyectó bajo control visual con la suspensión celular con una aguja de calibre 27. Después de la inoculación celular, se extirpó el bazo.

[0310] Eutanasia: cada ratón se sacrificó cuando alcanzó un punto final humano como se describe en la sección a continuación, o después de un máximo de 6 semanas después del inicio de la dosificación.

[0311] Evaluación de la carga tumoral en la eutanasia: en el momento de la terminación, se recolectaron y pesaron los hígados.

Monitoreo en animales

[0312] Monitoreo clínico: la longitud y el ancho del tumor se midieron dos veces por semana con calibradores y el volumen del tumor se estimó mediante esta fórmula [78]:

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

[0313] Puntos finales humanos [79]: Signos de dolor, sufrimiento o angustia: postura de dolor, mascarilla para el dolor, comportamiento; tumor superior al 10% del peso corporal normal, pero no superior a 2000 mm³; tumores que interfieren con la deambulaci3n o la nutrici3n; tumor ulcerado o erosi3n tisular; 20% de p3rdida de peso corporal restante durante 3 d3as consecutivos; malcondici3n corporal, emaciaci3n, caquexia, deshidrataci3n; ausencia prolongada de respuestas voluntarias a est3mulos externos; respiraci3n trabajosa r3pida, anemia, sangrado significativo; signos neurol3gicos: c3rculos, convulsiones, par3lisis; disminuci3n sostenida de la temperatura corporal; distensi3n abdominal.

[0314] Anestesia: se us3 anestesia con gas isoflurano para todos los procedimientos: cirug3a o inoculaci3n de tumores, inyecciones intravenosas, extracci3n de sangre. La anestesia con ketamina y xilazina se utilizaron para el procedimiento quir3rgico de estereotaxia.

[0315] Analgesia: el protocolo de analgesia carprofeno o carprofeno/buprenorfina multimodal se adapt3 a la gravedad del procedimiento quir3rgico. Se brind3 atenci3n no farmacol3gica para todos los procedimientos dolorosos. Adem3s, se prest3 atenci3n farmacol3gica que no interfiere con los estudios (tratamiento tem3tico) por recomendaci3n del veterinario a cargo.

[0316] Eutanasia: la eutanasia de animales se realiz3 mediante sobredosis de gas anest3sico (isoflurano) seguido de luxaci3n o desangrado cervical.

Resultados

Actividad antitumoral, modelo EMT6

[0317] Los resultados se muestran en la Figura 73. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invenci3n condujo a una clara reducci3n en el volumen del tumor con respecto a ambos controles negativos. El control positivo tambi3n condujo a una reducci3n en el volumen del tumor, como era de esperar.

Actividad antitumoral, modelo LL/2 (LLC1)

[0318] Los resultados se muestran en la Figura 74. Los controles negativos y positivos no aparecen como se esperaba, porque el volumen del tumor fue mayor en los ratones tratados con el control positivo que en el grupo de control negativo. Sin embargo, el volumen tumoral en los ratones tratados con la cepa bacteriana de la invenci3n fue comparable al grupo de control positivo, lo que es consistente con un efecto terap3utico 3til.

Actividad antitumoral, modelo Hepa1-6

[0319] Los resultados se muestran en la Figura 75. El control negativo no tratado no aparece como se esperaba, porque el peso del h3gado fue menor en este grupo que en los otros grupos. Sin embargo, el control negativo del veh3culo y los grupos de control positivo aparecen como era de esperar, porque los ratones tratados con veh3culo solo ten3an h3gados m3s grandes que los ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA4, lo que refleja una mayor carga tumoral en el grupo de control negativo del veh3culo. El tratamiento con la cepa bacteriana de la invenci3n condujo a una clara reducci3n en el peso del h3gado (y, por lo tanto, la carga tumoral) en relaci3n con los ratones en el grupo de control negativo del veh3culo.

[0320] Estos datos indican que la cepa 751/MRX004 puede ser 3til para tratar o prevenir el c3ncer, y en particular para reducir el volumen tumoral en los c3nceres de mama, pulm3n e h3gado.

Ejemplo 8 - Uni3n a c3lulas humanas en medio YCFA

Resumen

[0321] El nivel de uni3n de la cepa 751 y varias cepas breves de *Bifidobacterium* a c3lulas humanas se determin3 en 3 puntos de tiempo distintos en medio YCFA. Las bacterias unidas a las c3lulas humanas se resuspendieron en medio y luego se analiz3 la densidad 3ptica del medio: cuanto mayor es la densidad 3ptica, mayor es el n3mero de c3lulas

bacterianas y, por lo tanto, mayor es el nivel de unión de las células bacterianas a células humanas. Se descubrió que la cepa 751 mostraba una unión reducida a las células humanas en comparación con las cepas de referencia de *Bifidobacterium breve*.

5 Resultados y análisis

[0322] Los resultados del experimento se muestran en la Figura 76.

10 [0323] Como se muestra en la Figura 76, las cepas de *Bifidobacterium breve* muestran un alto nivel de unión a las células humanas en todos los puntos de tiempo. Por otro lado, la cepa 751 tiene un nivel de unión drásticamente reducido a las células humanas. Por lo tanto, la baja adherencia a las células humanas de la cepa 751 puede aumentar el efecto beneficioso de las composiciones de la invención en la ruta IL-17 o Th17 y en enfermedades mediadas por la ruta IL-17 o Th17.

15 **Ejemplo 9 - Ensayo que detecta la producción de exopolisacáridos**

Resumen

20 [0324] El nivel de producción de exopolisacárido (EPS) por la cepa bacteriana de la invención (751) y varias cepas de *Bifidobacterium breve* se analizaron a 37°C durante 48 horas y a 30°C durante 72 horas. Los EPS son polisacáridos producidos por ciertas bacterias que se unen a la superficie exterior de la célula bacteriana. El nivel de EPS en la superficie de las bacterias se puede determinar usando un ensayo de Congo Red que se une a los polisacáridos. Una mayor intensidad de la absorbancia del Congo Red indica una mayor concentración de EPS en la superficie de la bacteria. Se descubrió que la cepa bacteriana de la invención produce y se une a más EPS que las cepas breves de *Bifidobacterium*.

Resultados y análisis

30 [0325] Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 77.

35 [0326] Como se muestra en la Figura 77, la cepa bacteriana de la invención mostró una mayor absorbancia del Congo Red que las cepas de *Bifidobacterium breve* a temperaturas y puntos temporales. Por lo tanto, la tensión de la invención muestra una mayor producción de EPS y un mayor nivel de EPS extracelulares unidos. Como los EPS permiten que las bacterias se unan al moco y las células epiteliales, la cepa bacteriana de la invención puede ser útil para competir con las células patógenas por los sitios de unión en las células epiteliales y dentro de las membranas mucosas. Por lo tanto, la cepa bacteriana de la invención puede ser útil para modular el microbioma y tratar una serie de enfermedades asociadas con el microbioma.

40 **Ejemplo 10 - Prueba de estabilidad**

45 [0327] Una composición descrita en este documento que contiene al menos una cepa bacteriana descrita en este documento se almacena en un recipiente sellado a 25°C o 4°C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana permanecerá medido en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

Ejemplo 11 - Ensayo de producción de exopolisacárido unido y liberado de MRX004

50 [0328] Para la extracción con EPS, MRX004 se cultivó en 10 ml de YCFA hasta que alcanzó la fase exponencial tardía, cuando las células bacterianas y los sobrenadantes se separaron por centrifugación. Las células se lavaron una vez con PBS para eliminar cualquier medio de cultivo restante. El EPS secretado o liberado (EPS-R) se precipitó de los sobrenadantes del cultivo mediante tratamiento con hielo helado al 100% de etanol (durante la noche a 4°C con agitación suave). Para extraer EPS capsular o unido (EPS-B), las células se incubaron con EDTA 0,05 M (durante la noche a 4°C con agitación suave), y los sobrenadantes de este tratamiento se recogieron y posteriormente se trataron con etanol 100% helado (durante la noche a 4°C con agitación suave) para precipitar EPS-B. Los precipitados EPS-B y EPS-R se sedimentaron por centrifugación y se dejaron secar brevemente en una campana laminar antes de resuspenderlos en suficiente agua ultrapura estéril para lograr una solución uniforme. Para purificar aún más las muestras, se dializaron contra agua ultrapura estéril en una proporción de 1:100 durante 48 horas con 3 cambios de tampón. EPS-B y EPS-R se cuantificaron usando el método del ácido fenol-sulfúrico usando glucosa como estándar. Usando este ensayo, se encontró que MRX004 produce una mayor cantidad de EPS-R (115 µg) que EPS-B (17 µg) (FIG. 78).

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

65 [0329] Se analizó la unión de MRX004 a células huésped usando un ensayo de cocultivo *in vitro* con células epiteliales intestinales Caco-2. Se sembraron células Caco-2 a una densidad de 1×10^6 . Se cultivaron bacterias en 10 ml de YCFA

hasta que alcanzaron una fase exponencial tardía, cuando se granularon, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo celular libre de antibióticos. La densidad bacteriana se ajustó para obtener una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 10:1 (que se confirmó mediante un recubrimiento en agar YCFA usando el protocolo estándar WASP), y MRX004 se incubó conjuntamente con células Caco-2 en condiciones anaeróbicas a 37°C durante 2 h. Posteriormente se eliminó el medio y se eliminaron las bacterias no unidas lavando las células Caco-2 tres veces con PBS. Las células Caco-2 unidas a las bacterias se lisaron y se retiraron del recipiente usando tratamiento con Triton X-100 al 0,1%, y se sembraron en placas de 50 µl de lisado diluido en agar YCFA usando el WASP. La unión se calculó contando el número de bacterias recuperadas del lisado y expresándolo como un porcentaje del total de bacterias. Se encontró que MRX004 mostraba una adherencia de bajo nivel (0,3% del cultivo total) a las células Caco-2 (FIG. 79).

Ejemplo 13 - Caracterización de la actividad enzimática

[0330] El sistema de prueba del Índice de Perfil Analítico (API®) consiste en tiras que contienen pruebas bioquímicas miniaturizadas que analizan la actividad enzimática en especies bacterianas. MRX004 (cepa 751, la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380) se caracterizó mediante dos sistemas de prueba API: ID rápida 32A: este sistema está diseñado específicamente para especies anaeróbicas y abarca pruebas de metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y nitratos, así como actividad de fosfatasa alcalina; y API® 50 CH: este sistema prueba la fermentación de 49 fuentes de carbohidratos y se puede utilizar junto con el medio API® CHL para el análisis de especies anaeróbicas.

[0331] La prueba rápida ID 32A se llevó a cabo en colonias bacterianas según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las bacterias se cultivaron en agar YCFA durante 24 horas a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica. Las colonias se retiraron de las placas usando un asa de inoculación estéril de 5 µl y se resuspendieron en una ampolla de 2 ml de medio de suspensión API® hasta que se logró una densidad aproximadamente equivalente a la del estándar McFarland N° 4. Se añadieron cincuenta y cinco microlitros de suspensión bacteriana a cada cápsula en una tira Rapid ID 32A, y la prueba de ureasa se superpuso con dos gotas de aceite mineral. Las tiras se cubrieron con una tapa de plástico y se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 4 h, después de lo cual se desarrolló la fila inferior de cúpulas utilizando los siguientes reactivos: NIT: 1 gota de NIT1 y NIT2; IND: 1 gota de reactivo James; todas las cápsulas restantes: 1 gota de reactivo FastBlue. Las tiras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, después de lo cual se registró el color de cada cápsula y se le asignó un valor negativo, positivo intermedio o positivo.

[0332] Los resultados del análisis Rapid ID 32A se muestran en la Figura 80. MRX004 dio positivo para la fermentación de varias fuentes de carbohidratos, a saber, α-galactosidasa y β-galactosidasa, α-glucosidasa y β-glucosidasa, α-arabinosa, manosa y rafinosa, así como los aminoácidos arginina, prolina, fenilalanina, leucina, tirosina, glicina e histidina. Curiosamente, se han reportado roles para algunos de estos aminoácidos en el asma. Por ejemplo, se ha informado que el aumento de las concentraciones plasmáticas de fenilalanina e histidina se asocia con efectos adversos en el asma, incluido un aumento de la inflamación, la producción de histamina y la hiperreactividad de las vías respiratorias. Además, el metabolismo de la arginina está implicado en la patogénesis del asma, ya que se han reportado niveles aumentados del metabolito de arginina L-ornitina en pacientes pediátricos, y la administración de arginina atenúa la inflamación en un modelo de asma *in vivo*. Según estos informes, es posible que el metabolismo de los aminoácidos por MRX004 esté involucrado en los efectos antiasmáticos de esta cepa.

[0333] Análisis comparativo Rapid ID 32A se llevó a cabo entre MRX004 y cuatro cepas de tipo *B. breve*, que están anotadas en la Figura 80B como Bif Ref 1 (DSM 20091), Bif Ref 2 (DSM 20213), Bif Ref 6 (JCM 7017) y Bif Ref 7 (UCC2003). Este análisis demostró que MRX004 fue la única cepa probada para fermentar el polisacárido rafinosa, lo que puede ser significativo, porque la rafinosa está involucrada en la producción de componentes bacterianos como los exopolisacáridos, y la fermentación de la rafinosa también puede conferir efectos en el huésped, como el aumento de ciego butirato, aumento de la proliferación gastrointestinal y pérdida de peso.

[0334] La prueba API® 50 CH se llevó a cabo para examinar más a fondo el metabolismo de carbohidratos en MRX004. Según las instrucciones del fabricante, las bacterias se cultivaron en 10 ml de caldo YCFA durante 16-18 horas a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica. Este cultivo se diluyó en 10 ml de medio API® CHL para lograr una densidad aproximadamente equivalente al estándar McFarland N° 2, y se usaron 110 µl de esta mezcla para inocular cada cápsula en un conjunto de tiras reactivas API® 50 CH. Las tiras reactivas se incubaron en una caja de incubación humidificada a 37°C en una estación de trabajo anaeróbica durante 48 horas, después de lo cual se registró el color de cada cápsula y se le asignó un valor negativo, intermedio positivo, positivo o dudoso.

[0335] Utilizando API® 50, MRX004 dio positivo por la utilización de las siguientes fuentes de carbohidratos: amidón (almidón), amigdalina, arbutina, celobiosa, esculina, galactosa, gentiobiosa, glucosa, glucógeno, fructosa, fucosa, lactosa, maltosa, manosa, manitol, melibiosa, melezitosa, metilo α-D-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, ribosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trehalosa, turanosa y xilitol. Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos para la prueba Rapid ID 32A en que MRX004 demostró la fermentación de galactosa, glucosa, manosa y rafinosa en ambos sistemas de prueba. Curiosamente, algunos sustratos de carbohidratos MRX004, a saber, galactosa y fructosa, pueden estar implicados en el mecanismo de acción de esta cepa, en función de sus efectos reportados en la literatura. La galactosa α-1,3-galactosa se deriva de fuentes de carne es un alérgeno conocido y un agente causante de la

anafilaxia, y los niveles de ingesta de fructosa en la dieta están correlacionados con una mayor gravedad del asma. En conjunto, ambos conjuntos de datos API® para MRX004 sugieren que el metabolismo de esta cepa puede desempeñar un papel en sus efectos antiasmáticos.

5 Ejemplo 14 - Análisis del genoma

[0336] Se realizó una comparación del contenido del genoma de la cepa MRX004 y las cepas de referencia de *B. breve*, 1, 2, 6 y 7 usando blastn como parte del conjunto de programas BLAST + 2,3,0. Se empleó una puntuación máxima de corte del valor E de 10E-5 durante todo el análisis.

[0337] Se identificaron 333 genes (Tabla 1) que están presentes en el genoma de la cepa MRX004 pero están ausentes de las cepas de referencia 1 de *B. breve* (DSM 20091), 2 (DSM 20213), 6 (JCM 7017) y 7 (UCC2003). Muchos de los genes enumerados en la Tabla 1 se observan con frecuencia como hipervariables entre las cepas de *B. breve* [80]. Como era de esperar, las regiones de variabilidad incluyen genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de carbohidratos, genes asociados a fagos, elementos móviles, así como 173 genes predichos para codificar proteínas o genes de función desconocida.

[0338] Los genes que están presentes en MRX004 pero ausentes de cepas *B. breves* de referencia 1,2, 6 y 7 se enumeran en la Tabla 1. Los genes que no están resaltados están ausentes en más de una de las cuatro cepas de referencia. El gran número de genes que están presentes en MRX004 pero que no están presentes en numerosas cepas de referencia de *B. breve* sugiere que MRX004 es distinto y/o distinguible de estas cepas de *B. breve* conocidas. Los genes resaltados con subrayado simple están presentes en MRX004 pero ausentes en cepa *B. breve* de referencia 1. Los genes resaltados con doble subrayado y en negrita están presentes en MRX004 pero ausentes en cepa *B. breve* de referencia 2. Los genes resaltados con cursiva están presentes en MRX004 pero ausente en *B. breve* cepa de referencia 6. Se empleó una puntuación de corte de valor E máximo de 10E-5 para el análisis de la explosión.

Tabla 1

4DBb_0021c	Transportador ABC de azúcar múltiple, proteína de unión al sustrato
4DBb_0023	Probable regulador transcripcional de tipo LacI
4DBb_0024	Sacarosa-6-fosfato hidrolasa (EC 3,2,1.B3)
4DBb_0026c	Maltodextrina glucosidasa (EC 3,2,1,20)
4DBb_0036c	Proteína hipotética
4DBb_0038c	Proteína reguladora del operón MSM (metabolismo múltiple del azúcar)
4DBb_0119c	Proteína hipotética
4DBb_0120c	Proteína hipotética
<i>4DBb_0187</i>	<i>Proteína hipotética</i>
<i>4DBb_0188</i>	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0203c	Proteína de división celular FtsL
4DBb_0204c	Proteína hipotética
4DBb_0205c	Proteína hipotética
4DBb_0206c	Regulador transcripcional, familia Hx1R
4DBb_0207	NADH-flavina reductasa ligada a RrF ₂
4DBb_0208	Proteína relacionada con RecG helicasa de ADN dependiente de ATP
4DBb_0209c	Proteína hipotética
<i>4DBb_0210</i>	<i>Transportador putativo</i>
<i>4DBb_0211</i>	<i>Subunidad de la sintasa de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, PfaA</i>
<i>4DBb_0212</i>	<i>Poliquétido sintasa tipo I</i>
<i>4DBb_0213c</i>	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0214c	Proteína hipotética
4DBb_0215	Proteína hipotética
4DBb_0216c	Proteína hipotética conservada
4DBb_0218c	Proteína hipotética
4DBb_0219c	ADN-citosina metiltransferasa
4DBb_0220c	Proteína hipotética
4DBb_0221c	Proteína hipotética
4DBb_0222c	Proteína hipotética
<i>4DBb_0223c</i>	<i>Integrasa</i>
<i>4DBb_0256</i>	<i>Proteína hipotética</i>
4DBb_0257c	Regulador transcripcional tipo LacI
<i>4DBb_0258</i>	<i>Glucosilo hidrolasa putativa de función desconocida (DUF1680)</i>
4DBb_0284	Regulador transcripcional, familia AraC
4DBb_0285	Sistema de transporte N-acetilo-D-glucosamina ABC, proteína de unión al azúcar

ES 2 766 867 T3

(Continuación)

5	4DBb_0286	Transportador de azúcar ABC permease
	4DBb_0287	Sistema de transporte ABC de N-acetilo-D-glucosamina, proteína permeasa 2
	4DBb_0288	Alfa-galactosidasa (EC 3,2,1,22)
	4DBb_0329c	Componente ATPasa BioM del módulo energizante del transportador de biotina ECF
	4DBb_0330	Superfamilia de facilitadores principales MFS_1
10	4DBb_0368	GMP sintasa[hidrolización de glutamina] (EC 6,3,5,2)
	4DBb_0369c	Proteína de fago similar a Mu gp29
	4DBb_0410	Galactosidasa putativa
	4DBb_0419	Proteína hipotética
	4DBb_0421	Glycosyltransferase SypP
15	4DBb_0422	Proteína de biosíntesis de polisacárido capsular
	4DBb_0423	Proteína hipotética
	4DBb_0424	Glicosiltransferasa
	4DBb_0425	Proteína de membrana implicada en la exportación de antígeno O, ácido teicoico, ácidos lipoteicoicos
20	4DBb_0426	Glicosiltransferasa (EC 2,4,1.-)
	4DBb_0427	Ácido 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexeno-1-ácido carboxílico (EC 2,2,1,9)
	4DBb_0428	Proteína hipotética
	4DBb_0429	Proteína de elemento móvil
25	4DBb_0430	Proteína hipotética
	4DBb_0431c	Proteína hipotética
	4DBb_0432c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0433c	Proteína hipotética
	4DBb_0434c	Proteína hipotética
30	4DBb_0435	Proteína hipotética
	4DBb_0436	Proteína hipotética
	4DBb_0437c	Proteína hipotética
	4DBb_0438c	Proteína de elemento móvil
35	4DBb_0439c	Proteína hipotética
	4DBb_0440c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0518c	Proteína de dominio PIN
	4DBb_0519c	Proteína hipotética
40	4DBb_0555c	Proteína hipotética
	4DBb_0556c	Proteína hipotética
	4DBb_0557c	LSU proteína ribosómica L31p @ LSU proteína ribosómica L31p, independiente del zinc
	4DBb_0558c	SSU proteína ribosomal S14p (S29e) @ SSU proteína ribosomal S14p (S29e), independiente del zinc
45	4DBb_0559c	LSU ribosomal protein L33p @ LSU ribosomal protein L33p, zinc-independent
	4DBb_0560c	Proteína hipotética
	4DBb_0561	Proteína hipotética
	4DBb_0613c	Celulosa sintasa (formadora de UDP) (EC 2,4,1,12)
50	4DBb_0614	Quitinasa (EC 3,2,1,14)
	4DBb_0615	Caja sensorial/proteína de la familia GGDEF
	4DBb_0660	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0662	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0663c	Neuraminidase NanP
55	4DBb_0664	Proteína hipotética
	4DBb_0665	Proteína hipotética
	4DBb_0666	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0667	Proteína de elemento móvil
60	4DBb_0668	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0718	Proteína reguladora de biotina prevista BioR (familia GntR)
	4DBb_0719	Proteína hipotética
	4DBb_0720	Proteína hipotética
	4DBb_0778	Proteína hipotética
65	4DBb_0789c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_0790c	Proteína de elemento móvil

ES 2 766 867 T3

(Continuación)

	<u>4DBb_0837c</u>	<i>Posible Proteína de membrana integral conservada.</i>
	4DBb_0840	Proteína de flujo de macrólidos
5	4DBb_0866	ATPasa transportadora de cationes, familiae1-E2
	4DBb_0867	Proteína hipotética
	<u>4DBb_0872</u>	<i>Proteína hipotética</i>
	4DBb_0879c	Regulador transcripcional, familia Cro/CI
10	4DBb_0880c	Proteína de membrana integral
	4DBb_0946	Transportador general de sustrato MFS
	4DBb_0947c	Proteína de membrana putativa
	4DBb_0948c	Proteína de elemento móvil
15	4DBb_0952c	Proteína hipotética
	4DBb_0953	Proteína hipotética
	4DBb_0954c	Proteína hipotética
	4DBb_0955c	Proteína hipotética
	4DBb_0956c	Permeases previstos
	4DBb_0957	Proteína hipotética estrechamente conservada
20	4DBb_0958c	Proteína hipotética conservada
	4DBb_0986c	Proteína hipotética
	<u>4DBb_0987c</u>	<u>Componente ATPasa duplicado BL0693 del módulo de activación del transportador de ECFprevisto</u>
25	<u>4DBb_0988c</u>	<u>Componente transmembrana BL0694 del módulo energizante del transportador ECFprevisto</u>
	4DBb_1009c	Fago holin
	4DBb_1010c	Precursor de transglucosilasa D de mureína lítica unida a membrana (EC 3,2,1.-)
	4DBb_1011c	Proteína hipotética
30	4DBb_1012	Proteína hipotética
	4DBb_1013c	Proteína hipotética
	4DBb_1014c	Proteína hipotética
	4DBb_1015c	Proteína hipotética
	4DBb_1016c	Proteína hipotética
35	4DBb_1017c	Proteína de la cola del fago
	4DBb_1018c	Proteína de cinta métrica de longitud de cola de fago
	4DBb_1019c	Proteína hipotética
	4DBb_1020c	Proteína hipotética
40	4DBb_1021c	Proteína hipotética
	4DBb_1022c	Proteína hipotética
	4DBb_1023c	Proteína hipotética
	4DBb_1024c	Proteína hipotética
	4DBb_1025c	Proteína hipotética
45	4DBb_1026c	Proteína hipotética
	4DBb_1027c	Proteína hipotética
	4DBb_1028c	Proteína hipotética
	4DBb_1029c	Proteína hipotética
	4DBb_1030c	Proteína de fago
50	4DBb_1031c	Fase terminal, subunidad grande nº Pham2
	4DBb_1032c	Fase terminal, subunidad grande
	4DBb_1033c	Proteína hipotética
	4DBb_1034	Proteína hipotética
	4DBb_1035	Proteína hipotética
55	4DBb_1036c	FIG00424913: Proteína hipotética
	4DBb_1037c	Proteína hipotética
	4DBb_1038c	Proteína hipotética
	4DBb_1039c	Proteína hipotética
60	4DBb_1040c	Proteína hipotética
	4DBb_1041c	Proteína hipotética
	4DBb_1042c	Proteína hipotética
	4DBb_1043c	Proteína hipotética
	4DBb_1044c	Proteína hipotética
65	4DBb_1045c	Proteína hipotética

(Continuación)

	4DBb_1046c	Proteína hipotética
5	4DBb_1047c	Proteína de reparto de cromosomas (plásmidos) ParB
	4DBb_1048c	Proteína hipotética
	4DBb_1049c	Proteína hipotética
	4DBb_1050c	Proteína de unión a ADN monocatenaria
	4DBb_1051c	Proteína hipotética
10	4DBb_1052c	Proteína hipotética
	4DBb_1053c	Proteína hipotética
	4DBb_1054c	Proteína hipotética
	4DBb_1055c	Proteína hipotética
	4DBb_1056	Proteína hipotética
15	4DBb_1057c	Proteína hipotética
	4DBb_1058c	Proteína hipotética
	4DBb_1059	Proteína hipotética
	4DBb_1060	Proteína hipotética
20	4DBb_1061	Proteína hipotética
	4DBb_1062c	Proteína hipotética
	4DBb_1063c	Proteína hipotética
	4DBb_1064	supuesta integrasa de fagos
	4DBb_1113	Permeases de la superfamilia de facilitadores principales
25	4DBb_1142	Proteína hipotética
	4DBb_1143c	Proteína hipotética
	4DBb_1172	Integrasa
	4DBb_1173c	Proteína hipotética
	4DBb_1174c	Proteína hipotética estrechamente conservada
30	4DBb_1175	Proteína hipotética
	4DBb_1176c	Proteína hipotética
	4DBb_1177	Transportador ABC, Proteína de unión a ATP
	4DBb_1178	Proteína hipotética
35	4DBb_1179	Proteína hipotética
	4DBb_1180	Proteína hipotética
	4DBb_1181	Proteína hipotética
	4DBb_1182	sensor de sistema de dos componentes quinasa
	4DBb_1183	Proteína hipotética
40	4DBb_1203c	Proteína reguladora, LacI
	4DBb_1204c	FIG01131316: Proteína hipotética
	4DBb_1205c	sistema de transporte permease
	4DBb_1206c	Sistema de transporte ABC de oligosacárido de ramnosa previsto, componente 2 de permeasa
45	4DBb_1207c	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 1
	4DBb_1212c	Proteína hipotética
	4DBb_1213c	Proteína hipotética
	4DBb_1214	Proteína de elemento móvil
50	4DBb_1215	Proteína de elemento móvil
	4DBb_1219	Proteína hipotética
	4DBb_1220c	Proteína hipotética,
	4DBb_1221c	Proteína de función desconocida familia DUF262
	4DBb_1222c	Proteína hipotética
55	4DBb_1223	Proteína hipotética
	4DBb_1224	Proteína de elemento móvil
	4DBb_1234c	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico
	4DBb_1235	Proteína hipotética
	4DBb_1328c	Integrasa de fago putativo
60	4DBb_1329	Proteína hipotética
	4DBb_1330	Proteína hipotética
	4DBb_1331c	Proteína hipotética
	4DBb_1332	Proteína hipotética
	4DBb_1333	Proteína hipotética
65	4DBb_1334	Proteína hipotética

ES 2 766 867 T3

(Continuación)

	4DBb_1335c	Proteína hipotética
5	4DBb_1336c	Regulador negativo de la expresión de beta-lactamasa
	4DBb_1337c	Proteína hipotética
	4DBb_1338c	Proteína hipotética
	4DBb_1339c	Proteína hipotética
	4DBb_1340c	Proteína hipotética
10	4DBb_1341c	Proteína hipotética
	4DBb_1342c	Proteína hipotética
	4DBb_1343c	Proteína hipotética
	4DBb_1344	Proteína hipotética
	4DBb_1345c	Proteína de fibra de cola de fago
15	4DBb_1346c	Proteína hipotética
	4DBb_1347c	Fago de Proteína de cola menor
	4DBb_1348c	Proteína hipotética
	4DBb_1349c	Proteína hipotética
20	4DBb_1350c	Proteína de fago
	4DBb_1351c	Proteína de fago
	4DBb_1352c	Proteína de fago
	4DBb_1353c	Proteína de fago
	4DBb_1354c	Proteína hipotética
25	4DBb_1355c	Proteína hipotética
	4DBb_1356c	Proteína de la cápside del fago principal nº Fam0025 nº Pham164
	4DBb_1357c	Proteasa de proa del fago putativo
	4DBb_1358c	Proteína portal de fagos
	4DBb_1359c	gp2, terminaase
30	4DBb_1360c	Proteína hipotética
	4DBb_1361c	Proteína hipotética
	4DBb_1362c	Proteína hipotética
	4DBb_1363c	Proteína hipotética
35	4DBb_1364c	Proteína hipotética
	4DBb_1365c	Proteína hipotética
	4DBb_1366c	Proteína hipotética
	4DBb_1367c	Proteína hipotética
	4DBb_1368c	Proteína hipotética
40	4DBb_1369c	Proteína hipotética
	4DBb_1370c	Proteína hipotética
	4DBb_1371c	Proteína hipotética
	4DBb_1372c	Proteína de unión a ADN monocatenaria
	4DBb_1373c	Proteína hipotética
45	4DBb_1374c	Recombinacional de reparación de ADN de la Proteína RecT (asociada a profágicos)
	4DBb_1375c	Proteína relacionada con fagos
	4DBb_1376c	Proteína hipotética
	4DBb_1377c	Proteína hipotética
50	4DBb_1378c	Proteína hipotética
	4DBb_1379c	Proteína hipotética
	4DBb_1380c	Metiltransferasa (EC 2,1,1.-)
	4DBb_1381c	Proteína hipotética
	4DBb_1382c	Proteína hipotética
55	4DBb_1383c	Proteína hipotética
	4DBb_1384	Proteína hipotética
	4DBb_1385	Proteína hipotética
	4DBb_1386	Proteína hipotética
	4DBb_1387	Proteína hipotética
60	4DBb_1388	Proteína hipotética
	4DBb_1456	Sacarosa permease, superfamilia facilitadora principal
	4DBb_1486c	Esterasa/lipasa
	4DBb_1487c	Glucosa/manosa: H ⁺ symporter GlcP
65	4DBb_1488c	Regulador de respuesta de dos componentes <i>sIN</i>

(Continuación)

	4DBb_1533c	Proteína hipotética
	4DBb_1534c	Proteína hipotética
5	4DBb_1535c	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de restricción R(EC 3,1,21,3)
	4DBb_1536c	ADN helicasa dependiente de ATP recG (EC 3,6,1.-)
	4DBb_1537c	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S(EC 3,1,21,3)
10	4DBb_1538c	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad M de ADN-metiltransferasa (EC 2,1,1,72)
	4DBb_1539c	Proteína hipotética
	4DBb_1540	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S(EC 3,1,21,3)
	4DBb_1541	Integrasa
	4DBb_1542c	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad de especificidad S(EC 3,1,21,3)
15	4DBb_1545c	Sistema de transporte Ribosa ABC, permeasa de alta afinidad RbsD (TC 3.A,1,2,1)
	4DBb_1546c	Sistema de transporte de ribosa ABC, Proteína de unión a ribosa periplásmica RbsB (TC 3.A,1,2,1)
	4DBb_1547c	Sistema de transporte de ribosa ABC, Proteína permeasa RbsC (TC 3.A,1,2,1)
	4DBb_1548c	Sistema de transporte de ribosa ABC, Proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A,1,2,1)
20	4DBb_1550c	Proteína hipotética
	4DBb_1551	Proteína hipotética
	4DBb_1552c	Regulador transcripcional tipo <i>Lacl</i>
	4DBb_1553c	Similar a la Proteína de resistencia a la tetraciclina
25	4DBb_1554c	Riboquinasa (EC 2,7,1,15)
	4DBb_1555c	Butanol deshidrogenasa A dependiente de NADH (EC 1,1,1.-)
	4DBb_1556c	Fosfoglicolato fosfatasa (EC 3,1,3,18)
	4DBb_1557c	Inosina-uridina que prefiere la nucleósido hidrolasa (EC 3,2,2,1)
	4DBb_1558c	Fructoquinasa (EC 2,7,1,4)
30	4DBb_1559c	Fosforibosilntranilato isomerasa (EC 5,3,1,24)
	4DBb_1560c	Componente ATPasa STY3233 del módulo energizante del transportador ECFregulado por queuosina
	4DBb_1561c	Componente ATPasa del módulo de energización general de transportadores ECF
35	4DBb_1562c	Componente transmembrana STY3231 del módulo energizante del transportador ECFregulado por queuosina
	4DBb_1563c	Componente STY3230 específico del sustrato del transportador ECFregulado por queuosina
40	4DBb_1564	Hipotética azúcar quinasa en racimo con indigoidina sintasa indA, familia de quinasas PfkB
	4DBb_1569	Regulador transcripcional, familia TetR
	4DBb_1570c	Esterasa/lipasa
	4DBb_1571c	Proteína hipotética
	4DBb_1572c	Proteína hipotética
45	4DBb_1573	COG1309: regulador transcripcional
	4DBb_1574c	Proteína hipotética
	4DBb_1578c	Proteína portadora de melibiosa
	4DBb_1579c	Proteína hipotética
50	4DBb_1580c	Regulador transcripcional, familia TetR
	4DBb_1581	Proteína hipotética
	4DBb_1582	Regulador de respuesta de dos componentes colocalizado con transportador HrtAB
	4DBb_1583	Proteína hipotética
	4DBb_1584c	Proteína hipotética
55	4DBb_1585	Sensor histidina quinasa
	4DBb_1586	Mg (2+) transporte ATPasa Proteína C
	4DBb_1587	Regulador transcripcional, familia AbrB
	4DBb_1588	Proteína hipotética
60	4DBb_1620c	3'-a-5'oligoribonucleasa (<i>orn</i>)
	4DBb_1769c	Activador transcripcional MltR
	4DBb_1770c	Xilitol deshidrogenasa (EC 1,1,1,9)
	4DBb_1771c	Transportador de ribitol/xilitol/arabitol, superfamilia MFS
	4DBb_1773c	Proteína de la familia de la glioxalasa
	4DBb_1774c	Transportador de ribitol/xilitol/arabitol, superfamilia MFS
65	4DBb_1775c	Sorbitol deshidrogenasa (EC 1,1,1,14)

(Continuación)

	4DBb_1926c	Proteína de membrana, relacionada con la Proteína Actinobacillus (1944168)
	4DBb_1928c	Glicosiltransferasa, Proteína de la familia del grupo 2
5	4DBb_1929c	Exportación de ácido teicoico ATH Proteína de unión a TagH (EC 3,6,3,40)
	4DBb_1930c	Permeasa de translocación de polisacárido que contiene ramnosa
	4DBb_1934c	Proteína hipotética
	4DBb_1935	Posible glicosiltransferasa
10	4DBb_1936c	Proteína de la familia de anclaje superficial de la pared celular
	4DBb_1937c	D-alanilo-D-alanina carboxipeptidasa (EC 3,4,16,4)
	4DBb_1965	Proteína hipotética
	4DBb_2010c	Proteína de elemento móvil
	4DBb_2011	Regulador transcripcional, familia LacI
15	4DBb_2012	Transportador ABC de xilosa, Proteína de unión a xilosa periplásmica XylF
	4DBb_2013	Sistema de transporte de ribosa ABC, Proteína de unión a ATP RbsA (TC 3.A,1,2,1)
	4DBb_2014	Sistema de transporte de ribosa ABC, Proteína permeasa RbsC (TC 3.A,1,2,1)
	4DBb_2015	Proteína hipotética
	4DBb_2016	Proteína de elemento móvil
20	4DBb_2028c	Beta-glucosidasa (EC 3,2,1,21)

Secuencias

25 [0339]

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

30 GGGACAGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGATCCATCGGGCTTTGCCT
 GGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACG
 GGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTGGGAAAGCCTTTGCGGCATGGGATGGGGTTCGCG
 TCCTATCAGCTTGATGGCGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC
 ACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
 TGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACTTT
 35 GTGTTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAAGC
 GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCCGCTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC
 GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCCTGAGGGAGACTGGAATTCGCGGTGTAACGGTGGAA
 TGTGATATCGGGAAGAACAACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACCGTGAAGAGCGAAAGCG
 40 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCC
 ACGGGTTCGCTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGA
 AATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCT
 TGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGTC
 AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCGTGTGCCAGCGGATTGTG
 45 CCGGGAACCTCACGGGGGACCGCGGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTA
 CGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGCGCGAGCTGGAGCGGATCCCTGA
 AAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAG
 CAACGTCGCGGTGAATGCGTTCGCGGGCCTTGACACACCGCCGTCAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAA
 50 GCCGGTGGCCTAACCCCTGCGGGAGGGAGCCKC

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

REFERENCIAS

55 [0340]

60 [1] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.
 [2] Eckburg et al. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.
 [3] Macpherson et al. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35
 [4] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.
 [5] Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122(1):107-18.
 [6] Frank et al. (2007) PNAS 104(34):13780-5.
 [7] Scanlan et al. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.
 65 [8] Kang et al. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16(12):2034-42.
 [9] Machiels et al. (2013) Gut. 63(8):1275-83.

- [10] WO 2013/050792
 [11] WO 03/046580
 [12] WO 2013/008039
 [13] WO 2014/167338
 5 [14] Goldin and Gorbach (2008) Clin Infect Dis. 46 Suppl 2:S96-100.
 [15] Azad et al. (2013) BMJ. 347:f6471.
 [16] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
 [17] Srůtková et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
 [18] Ye et al. (2015) PLoS One. 10(1):e0117704.
 10 [19] Fabro et al. (2015) Immunobiology. 220(1):124-35.
 [20] Yin et al. (2014) Immunogenetics. 66(3):215-8.
 [21] Cheluvappa et al. (2014) Clin Exp Immunol. 175(2):316-22.
 [22] Schieck et al. (2014) J Allergy Clin Immunol. 133(3):888-91.
 [23] Balato et al. (2014) J Eur Acad Dermatol Venereol. 28(8):1016-24.
 15 [24] Monteleone et al. (2011) BMC Medicine. 2011, 9:122.
 [25] Fahy (2009) Proc Am Thorac Soc 6.256-259
 [26] Miossec and Kolls (2012) Nat Rev Drug Discov. 11(10):763-76.
 [27] Yang et al. (2014) Trends Pharmacol Sci. 35(10):493-500.
 [28] Koenders et al. (2006) J. Immunol. 176:6262-6269.
 20 [29] Amedei et al. (2012) Int J Mol Sci. 13(10):13438-60.
 [30] Shabgah et al. (2014) Postepy. Dermatol. Alergol. 31(4):256-61.
 [39] Numasaki et al. (2003) Blood. 101:2620-2627.
 [40] Zhang et al. (2008) Biochem. Biophys. Res. Commun. 374: 533-537.
 [41] Karin (2006) Nature. 441: 431-436.
 25 [42] Faghih et al. (2013). Iranian Journal of Immunology. 10(4):193-204.
 [43] Numasaki et al. (2005) J. Immunol. 175: 6177-6189
 [44] Hammerich and Tacke (2014) Clin Exp Gastroenterol. 7:297-306.
 [45] Haabeth et al. (2012) OncolImmunology 1(1):1146-1152.
 [46] Lejeune et al. (2006) Cancer Immun. 6:6
 30 [47] Pace et al. (1983) PNAS. 80:8782-6.
 [48] Sgadari et al. (1996) PNAS. 93:13791-6.
 [49] Arenberg et al. (1996) J. Exp. Med. 184:981-92.
 [50] Sgadari et al. (1997) Blood. 89:2635-43.
 [51] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) J. Gen. Appl. Microbiol., 54, 9-24.
 35 [52] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
 [53] Leslie et al. (1995) Appl. Environ. Microbiol. 61, 3592-3597.
 [54] Mitropoulou et al. (2013) J Nutr Metab. (2013) 716861.
 [55] Kailasapathy et al. (2002) Curr Issues Intest Microbiol. 3(2):39-48.
 [56] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller
 40 [57] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [58] Handbook of Microbiological Media, 4ª Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 [59] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 [60] Strobel (2009) Methods Mol Biol. 581:247-61.
 [61] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª Edición, ISBN: 0683306472.
 45 [62] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
 [63] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 [64] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 50 [65] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 [66] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [67] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª Edición (Current Protocols).
 [68] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 55 [69] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
 [70] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
 [71] Brand et al. (2007) Nature Protocols. 2(5):1269-1275
 [72] Jiao et al. (2014) Immunopathology and Infectious Diseases. 184(4): 1085-93.
 [73] Rockwell et al., (1972) J Natl Cancer Inst. 49:735-49.
 60 [74] Bertram and Janik (1980) Cancer Lett. 11:63-73.
 [75] Darlington (1987) Meth Enzymol. 151:19-38.
 [76] Principe d'éthique de l'experimentation animale, Directive n°2010/63 CEE 22 septiembre 2010, Décret n°2013-118 1 febrero 2013.
 [77] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8ª Edición. The National Academies Press; 2011
 65 [78] Simpson-Herren and Lloyd (1970) Cancer Chemother Rep. 54:143-74.

[79] Workman et al. (2010) Br. J. Cancer. 102:1555-77.

[80] Bottacini et al (2014) BMC Genomics. 15:170, DOI: 10.1186/1471-2164-15-170, PMID: 24581150

REALIZACIONES DE LA DESCRIPCIÓN

5

[0341]

10

1. Una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma, para usar en un método de tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17.

15

2. La composición de la realización 1, en donde la composición es para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en asma, tal como asma alérgica o asma neutrófila; artritis, tal 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); cáncer, como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto.

20

3. La composición de la realización 2, en donde la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrófila o asma alérgica.

25

4. La composición de la realización 3, en donde la composición es para usar en un método para reducir la neutrofilia o la eosinofilia en el tratamiento del asma.

30

5. La composición de la realización 2, en donde la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de artritis reumatoide.

6. La composición de la realización 5, en donde la composición es para usar en un método para reducir la inflamación articular en la artritis reumatoide.

7. La composición de la realización 2, en donde la composición se usa en un método para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

40

8. La composición de la realización 7, en donde la composición es para usar en un método para reducir la incidencia o la gravedad de la enfermedad.

9. La composición de la realización 2, en donde la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer de hígado.

35

10. La composición de la realización 9, en donde la composición es para usar en un método para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento del tumor, prevenir la metástasis o prevenir la angiogénesis.

11. La composición de la realización 2, en donde la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de la uveítis.

12. La composición de la realización 11, en donde la composición es para usar en un método para reducir o prevenir el daño retiniano en la uveítis.

45

13. La composición de cualquier realización precedente, en donde la composición es para usar 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 ruta Th17.

14. La composición de cualquier realización precedente, en donde la composición es para usar en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17.

15. La composición de cualquier realización precedente, en donde el biotipo tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de la bacteria depositado con el número de acceso NCIMB 42380.

16. La composición de cualquiera de las realizaciones 1-14, en donde el biotipo tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica al SEQ ID NO: 1.

50

17. La composición de cualquier realización precedente, en donde la composición es para administración oral.

18. La composición de cualquier realización precedente, en donde la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

19. La composición de cualquier realización precedente, en donde la cepa bacteriana se liofiliza.

55

20. Un producto alimenticio que comprende la composición de cualquier realización anterior, para el uso de cualquier realización anterior.

21. Una composición de vacuna que comprende la composición de cualquier realización precedente, para el uso de cualquier realización precedente.

60

22. Un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la ruta Th17, que comprende administrar una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o un biotipo de la misma.

23. Una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado del mismo.

24. Una composición que comprende la célula de la realización 23.

25. La composición de la realización 24, que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

65

26. Un cultivo biológicamente puro de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado del mismo.

27. Una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, o un derivado de la misma, para uso en terapia.

28. La célula de la realización 27, en donde la célula es para usar en un método definido en cualquiera de las realizaciones 1-14.

5

LISTA DE SECUENCIAS

[0342]

10

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120> COMPOSICIONES QUE CONTIENEN CEPAS BACTERIANAS

15

<130> P066263WO

<150> GB 1510467.2

<151> 2015-06-15

20

<150> GB 1520501.6

<151> 2015-11-20

<160> 1

25

<170> SeqWin2010, versión 1,0

<210> 1

<211> 1439

<212> ADN

<213> Desconocido

30

<220>

<223> Cepa 751 consenso 16S secuencia de ARNr

35

<400> 1

35

```

gggacaggct caggatgaac gccggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgggatcc 60
atcgggcttt gcctgggtgt gagagtggcg aacgggtgag taatgcgtga ccgacctgcc 120
ccatgcaccg gaatagctcc tggaaacggg tggtaatgcc ggatgctcca tcacaccgca 180
tggtgtgttg gaaagcctt tgcggcatgg gatggggtcg cgtcctatca gcttgatggc 240
gggtaaacgg cccaccatgg cttcgacggg tagccggcct gagagggcga cgggccacat 300
tgggactgag atacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg 360
ggcgcaagcc tgatgcagcg acgccgcgtg agggatggag gccttcgggt tgtaaacctc 420
ttttgttagg gagcaaggca ctttgtgttg agtgtacctt tccaataagc accggctaac 480
tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattgggctg 540
aaagggctcg taggcgggtc gtgcgctccg gtgtgaaagt ccatcgctta acggtggatc 600
cgcgccgggt acgggcgggc ttgagtgcgg taggggagac tggattccc ggtgtaacgg 660
tggaatgtgt agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggtctctg ggccgttact 720
gacgctgagg agcgaagcg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc 780
gtaaaccggt gatgctggat gtggggcccg ttccacgggt tccgtgtcgg agctaaccgg 840
ttaagcatcc cgcctgggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg 900
cccgcaaacg cggcgggagca tgcggattaa ttcatgcaa cgcgaagAAC cttacctggg 960
cttgacatgt tcccagcatg cccagagatg gggtttccct tcggggcggg ttcacagggtg 1020
gtgcatggtc gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtccgc aacgagcgca 1080
accctcggcc cgtgttgcca gcggattgtg ccgggaactc acgggggacc gccgggggta 1140
actcggagga aggtggggat gacgtcagat catcatgccc cttacgtcca gggcttcacg 1200
catgctacaa tggccgggtac aacgggatgc gacagcgcga gctggagcgg atccctgaaa 1260
accggtctca gttcggatcg cagtctgcaa ctccactgcg tgaaggcggg gtcgctagta 1320
atcgcaatc agcaacgtcg cggatgaatgc gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca 1380
agtcatgaaa gtgggcagca cccgaagccg gtggcctaac ccctgcggga gggagcckc 1439

```

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición que comprende la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380 o una bacteria que tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98% idéntica a la SEQ ID NO: 1, para usar en un método de tratamiento o prevención del asma neutrofílica.
- 2.** La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, para usar en un método de tratamiento o prevención del asma no eosinofílica.
- 10 **3.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un método para tratar o prevenir el asma neutrofílica de inicio en adultos.
- 4.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un método para reducir la neutrofilia en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica.
- 15 **5.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica.
- 6.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica.
- 20 **7.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un paciente con niveles elevados de neutrófilos, tal como se identifica mediante muestreo de sangre o análisis de esputo.
- 25 **8.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, para usar en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17.
- 9.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la bacteria tiene una secuencia de ARNr de 16 segundos que es al menos 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 30 **10.** La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde (i) la composición es para administración oral, y/o en donde (ii) la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y/o en donde (iii) la cepa bacteriana se liofiliza.
- 35 **11.** Un producto alimenticio o composición de vacuna que comprende la composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de cualquier reivindicación precedente.
- 12.** Una célula de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42380, para usar en un método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 40

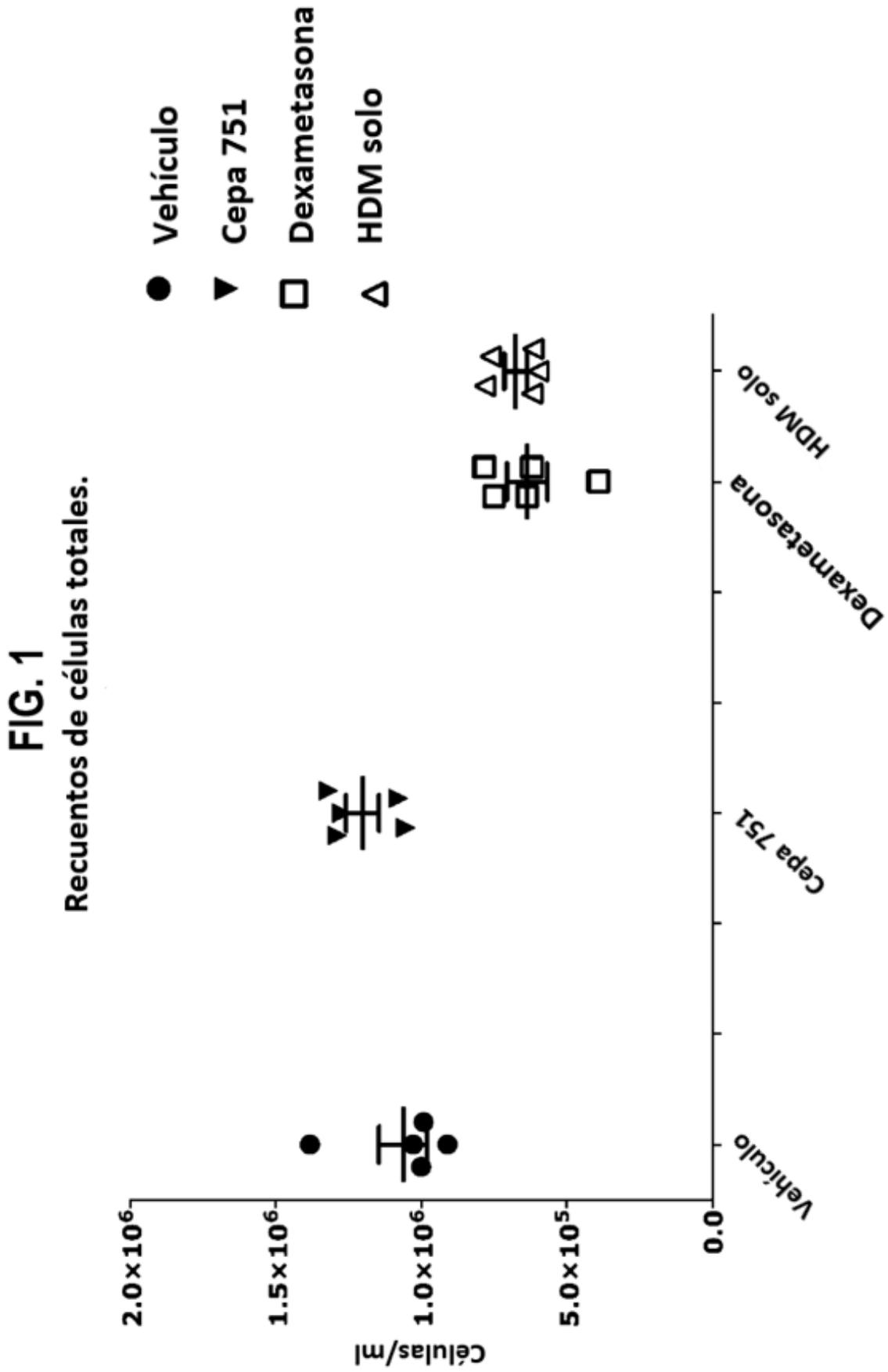
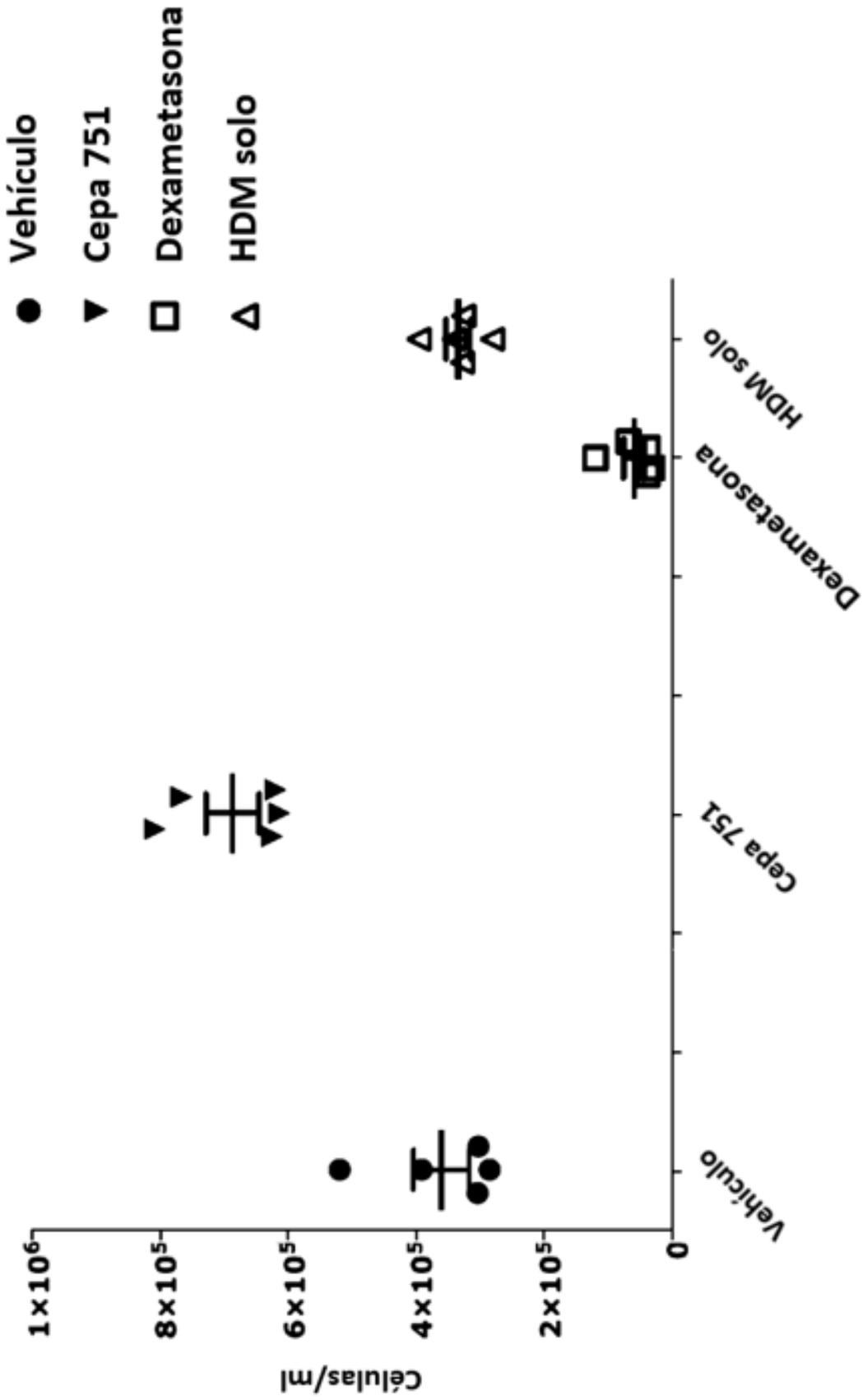


FIG. 2
Eosinófilos totales



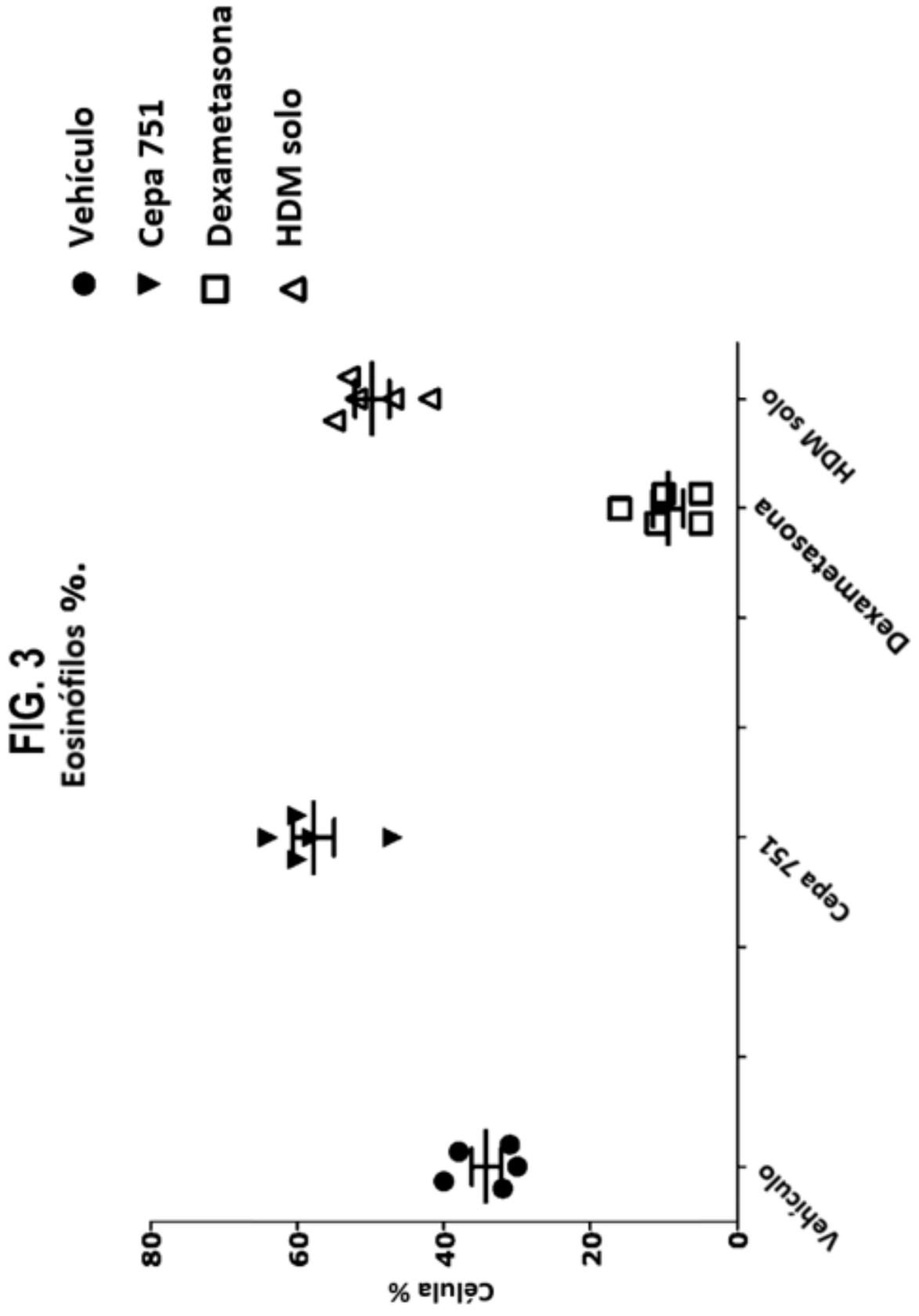
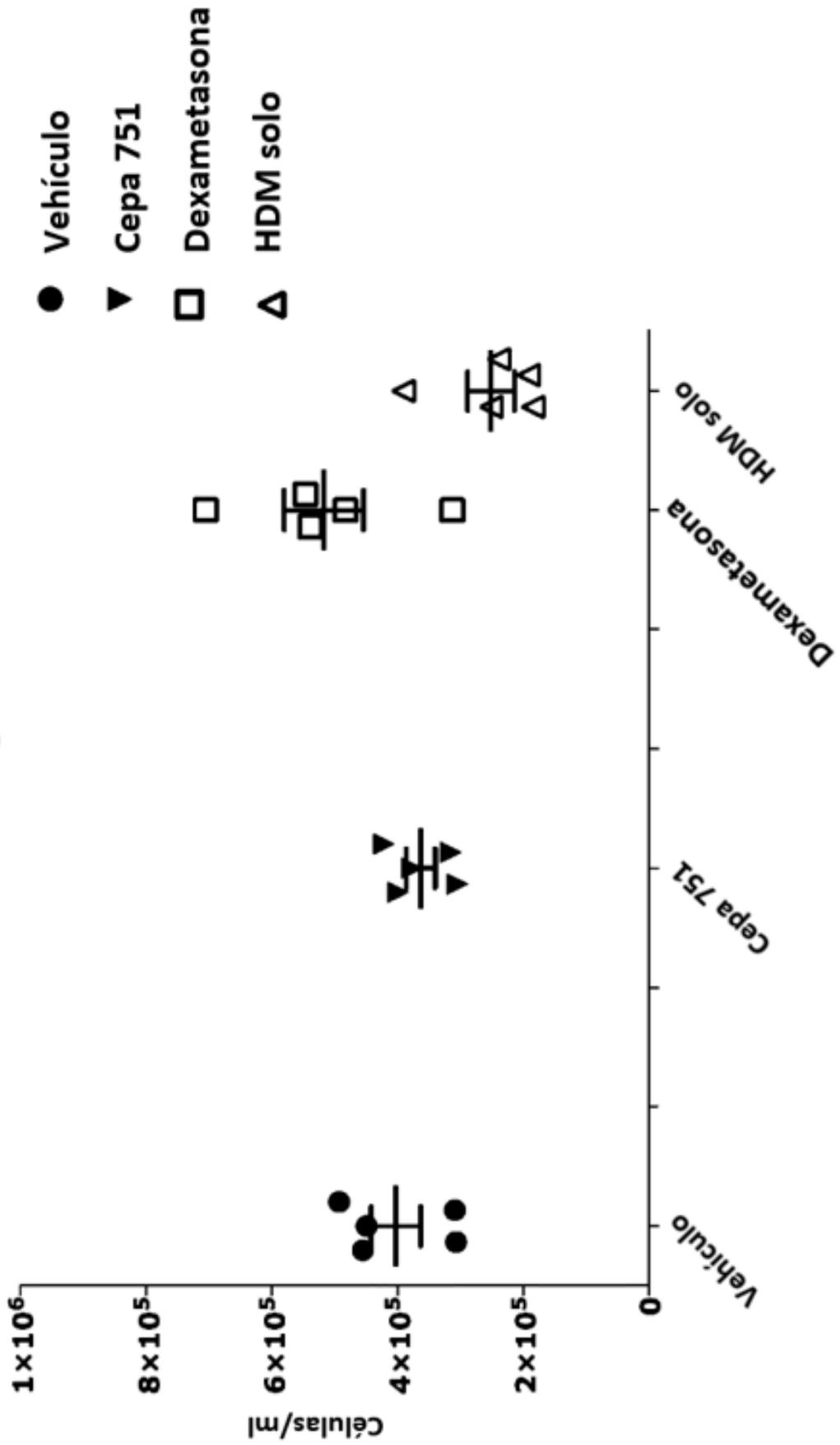
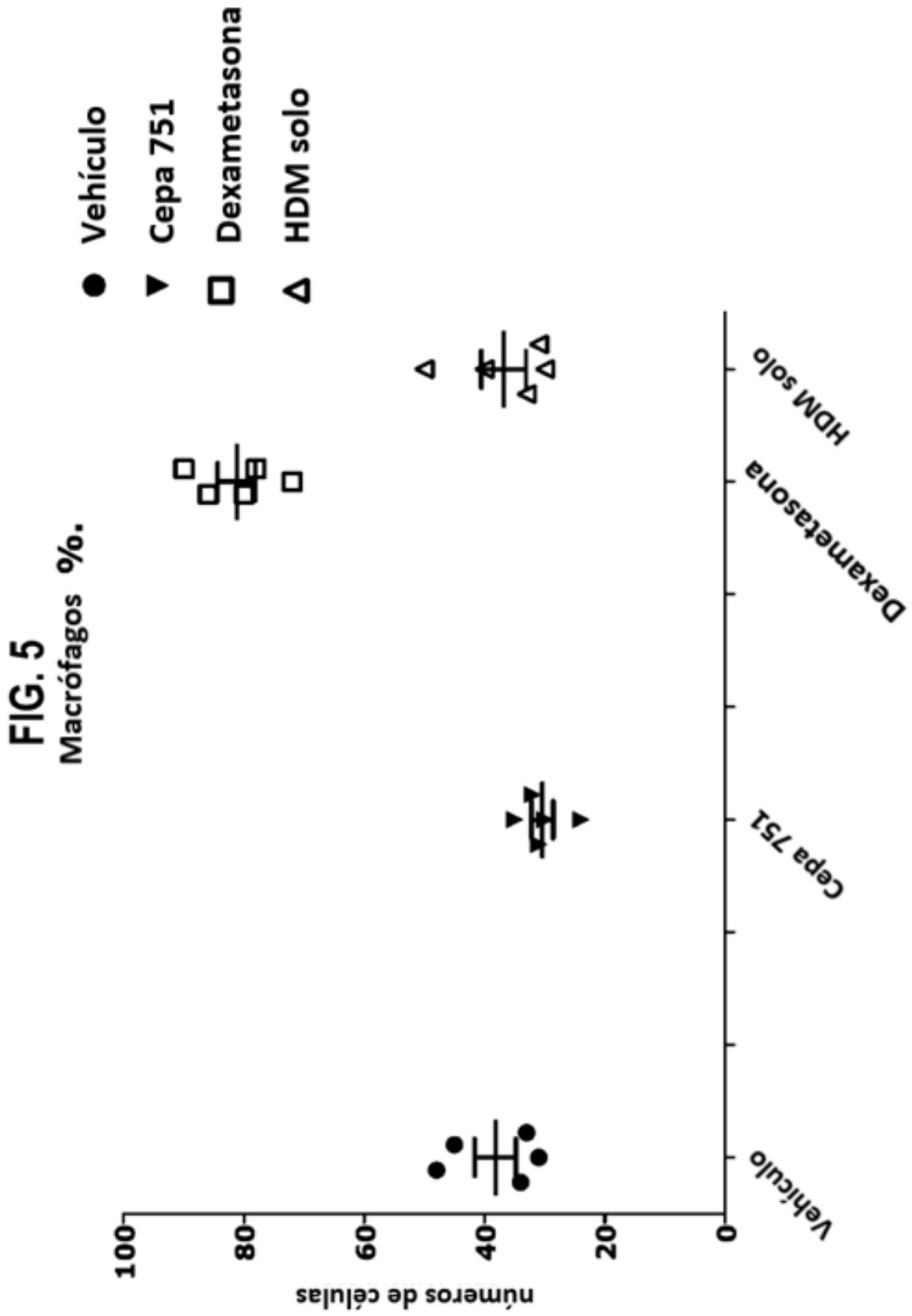
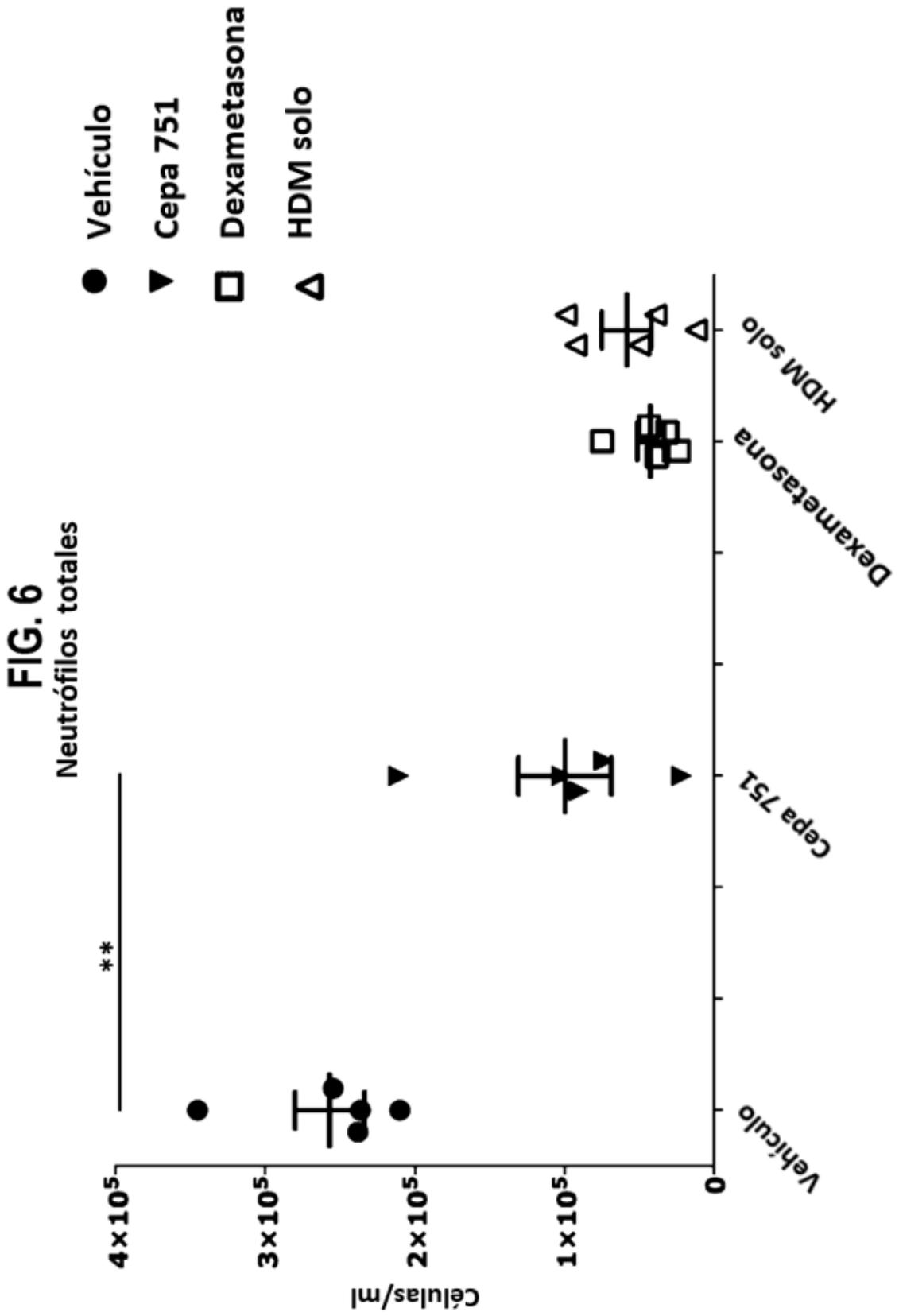
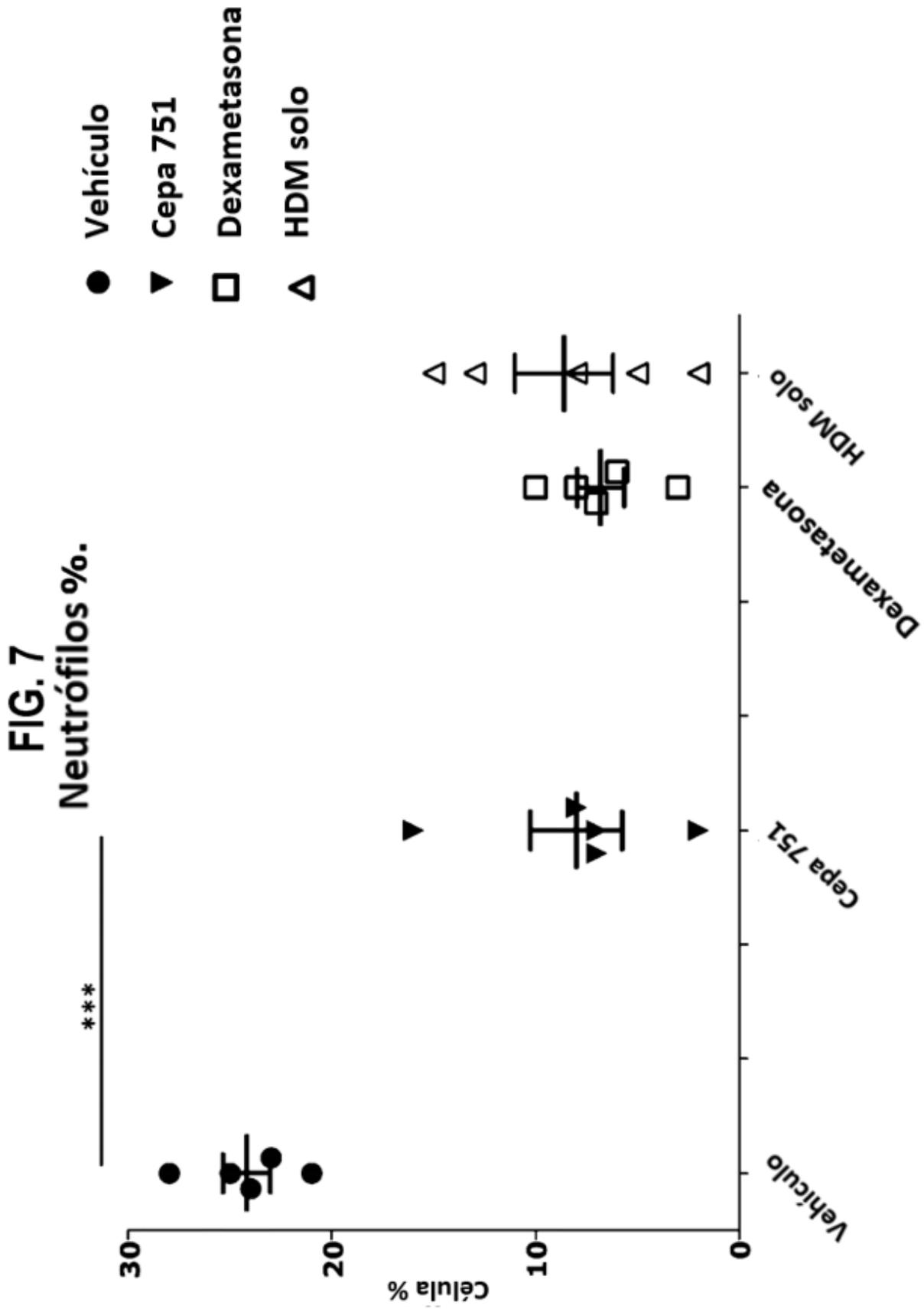


FIG. 4
Macrófagos totales









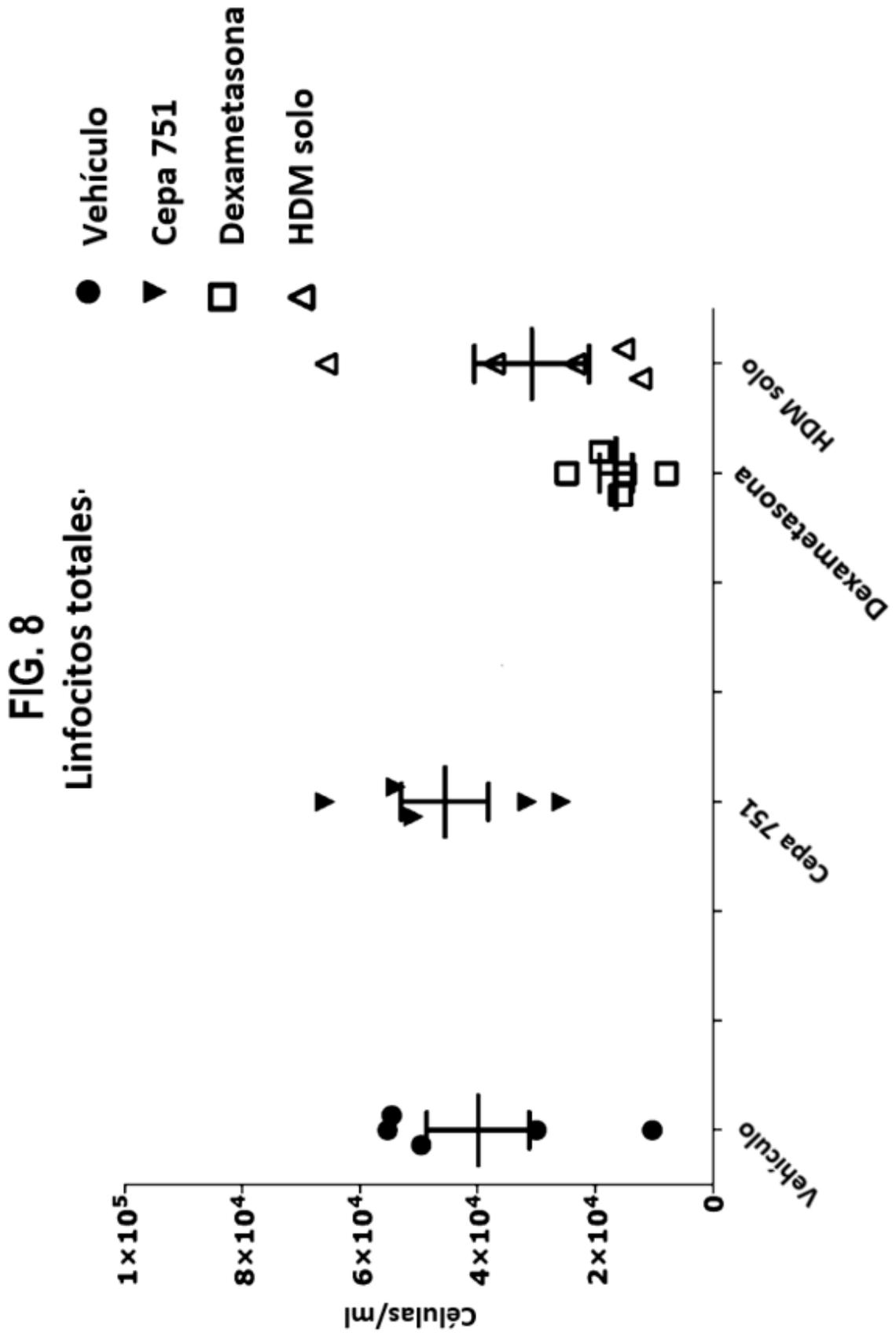


FIG. 9
Linfocitos %.

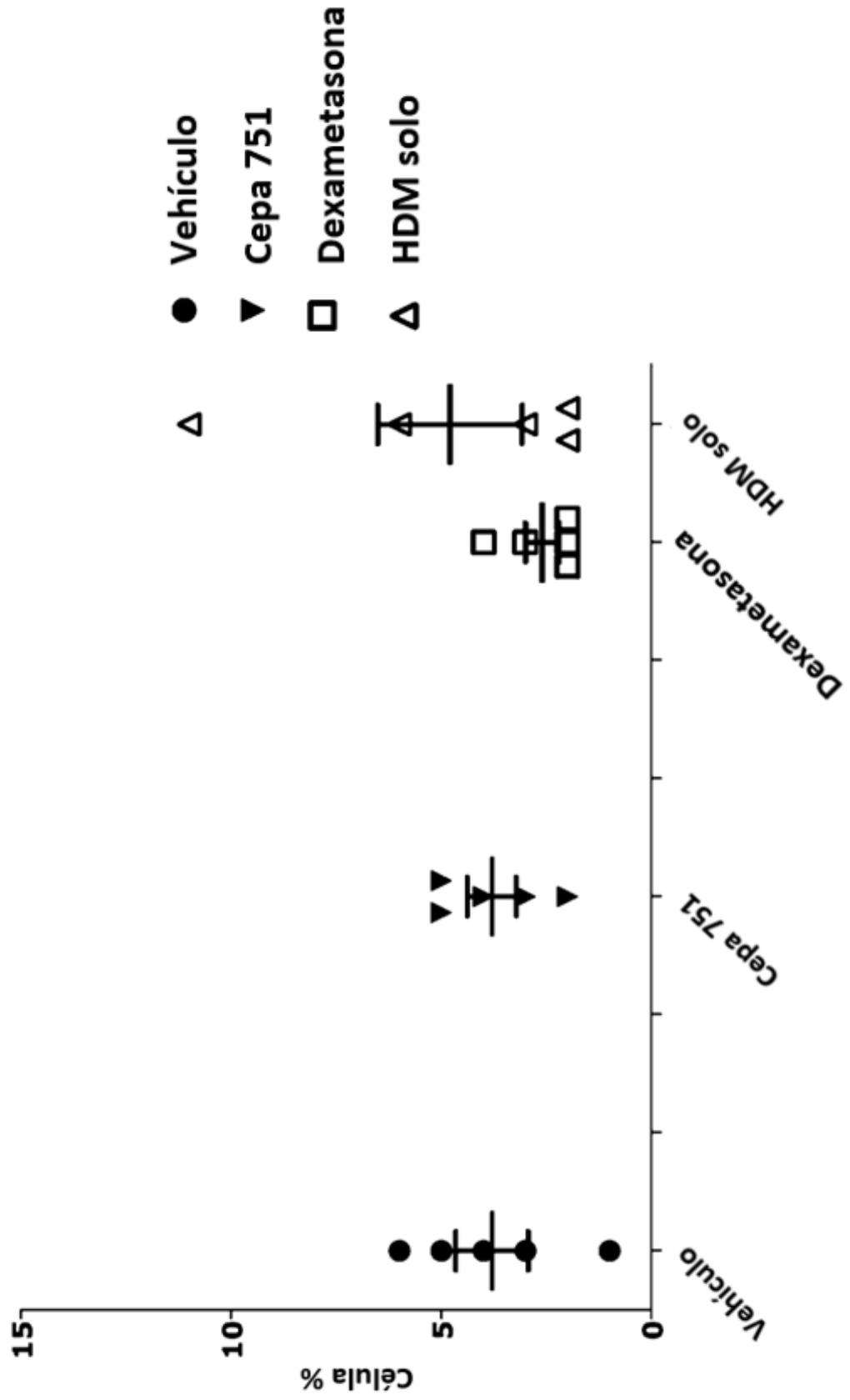
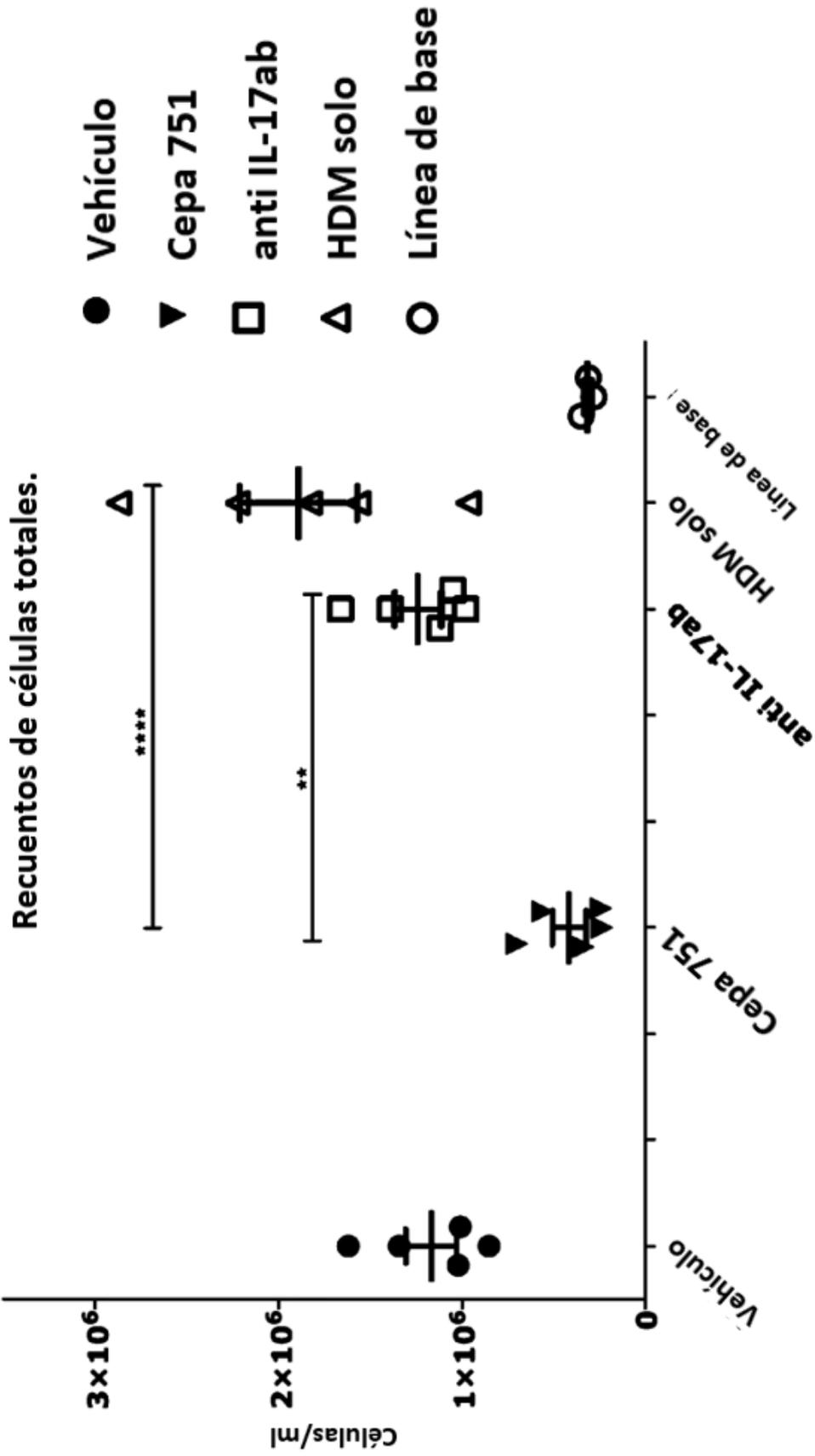


FIG. 10



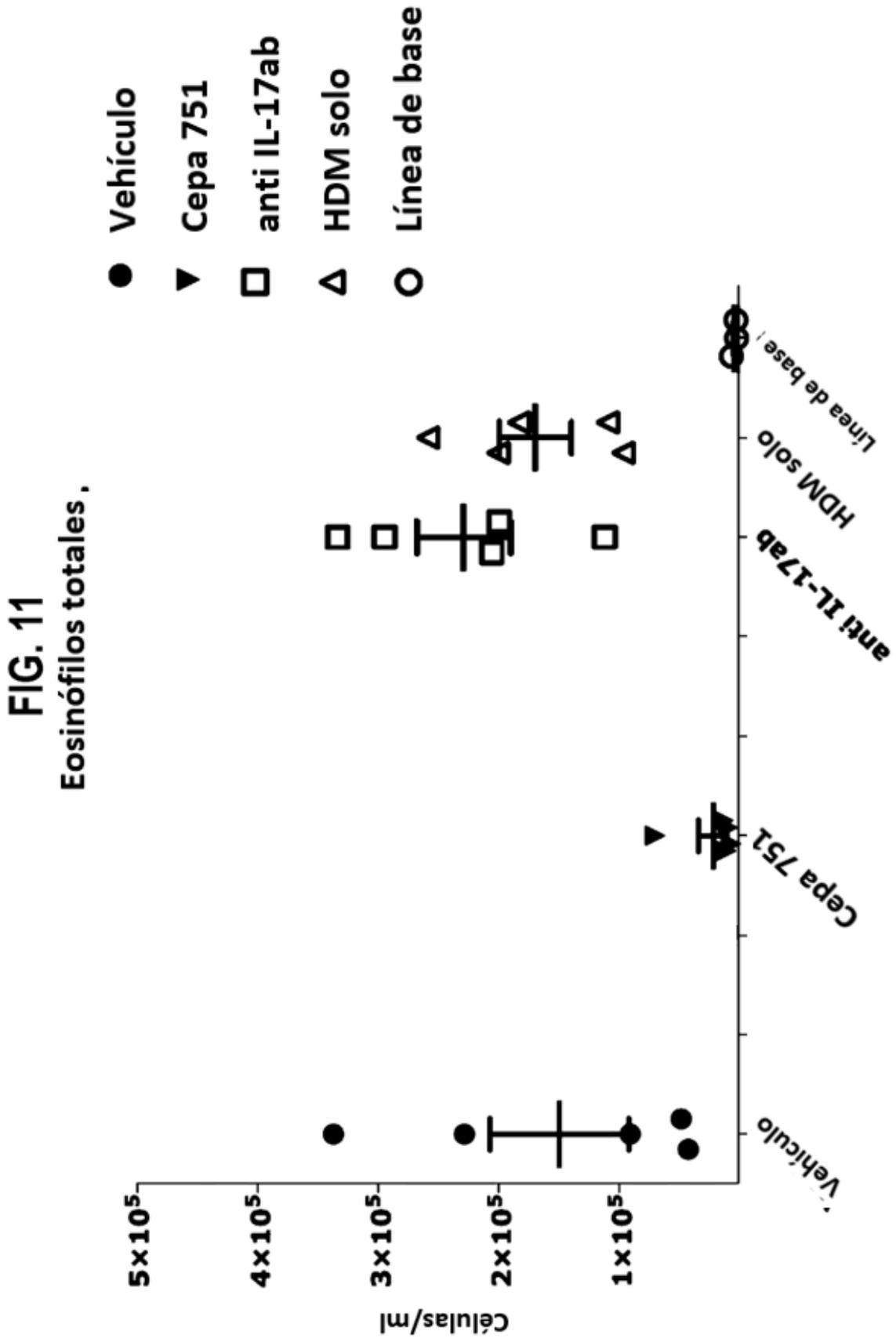


FIG. 12
Eosinófilos %.

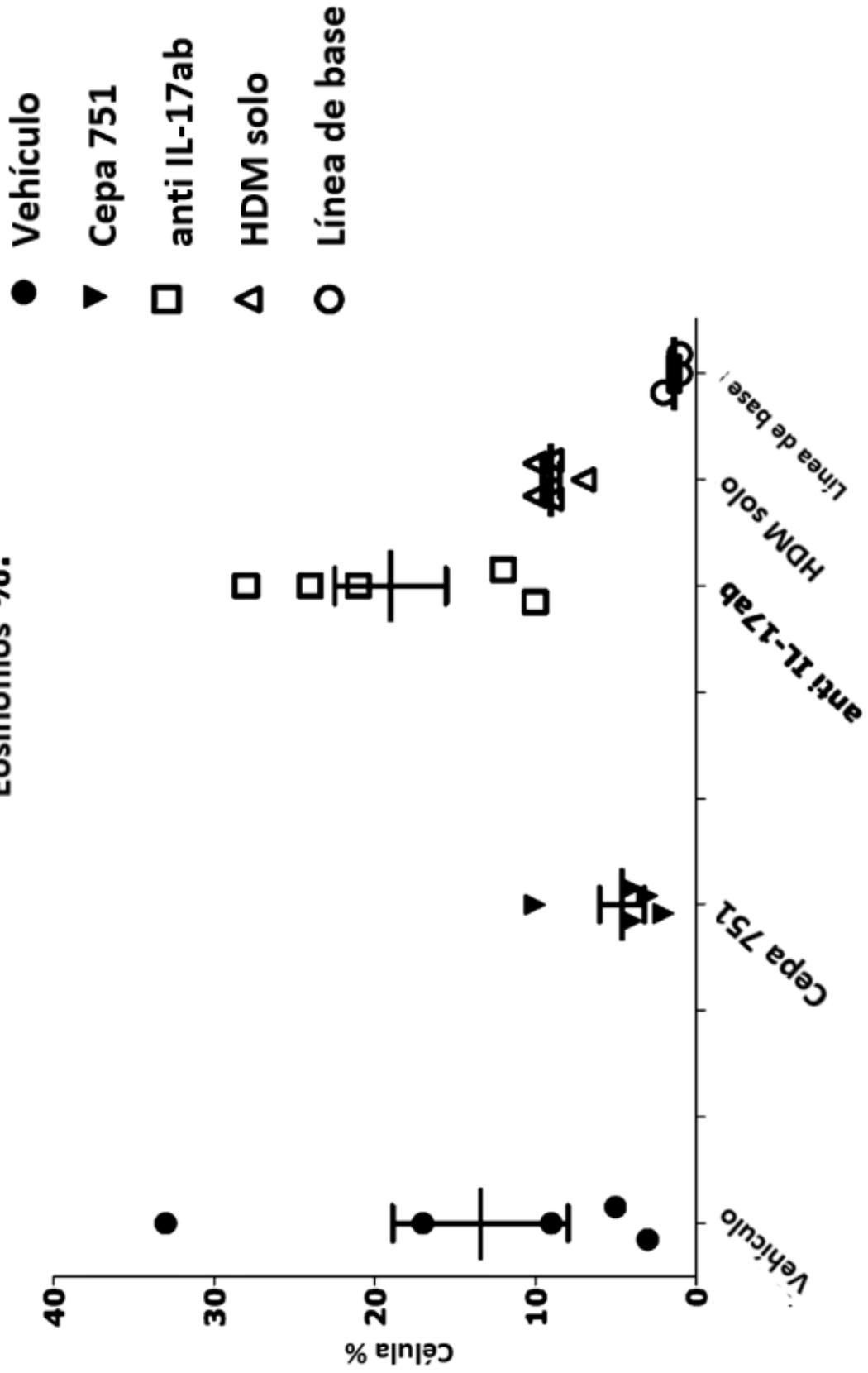
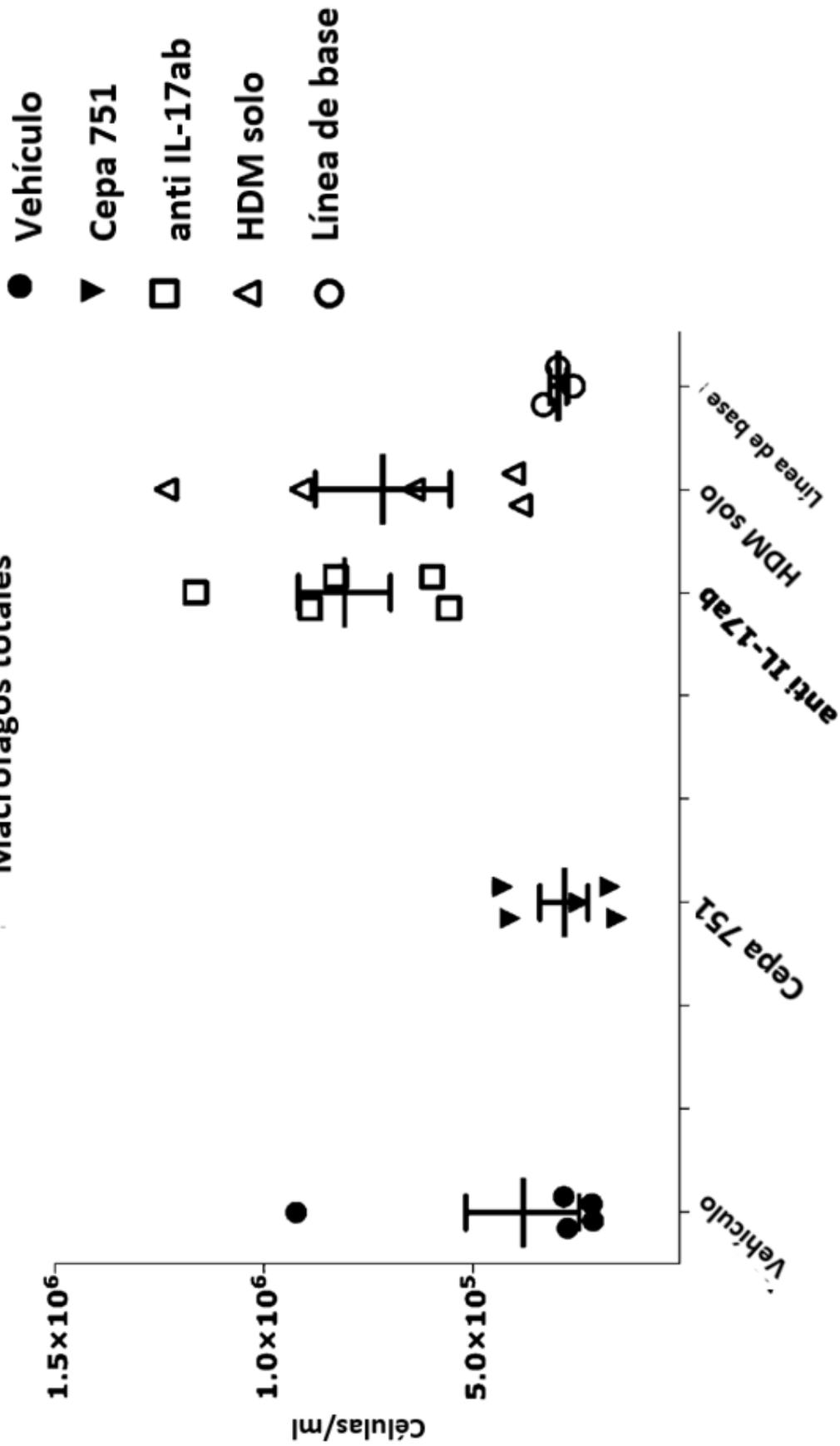


FIG. 13
Macrófagos totales



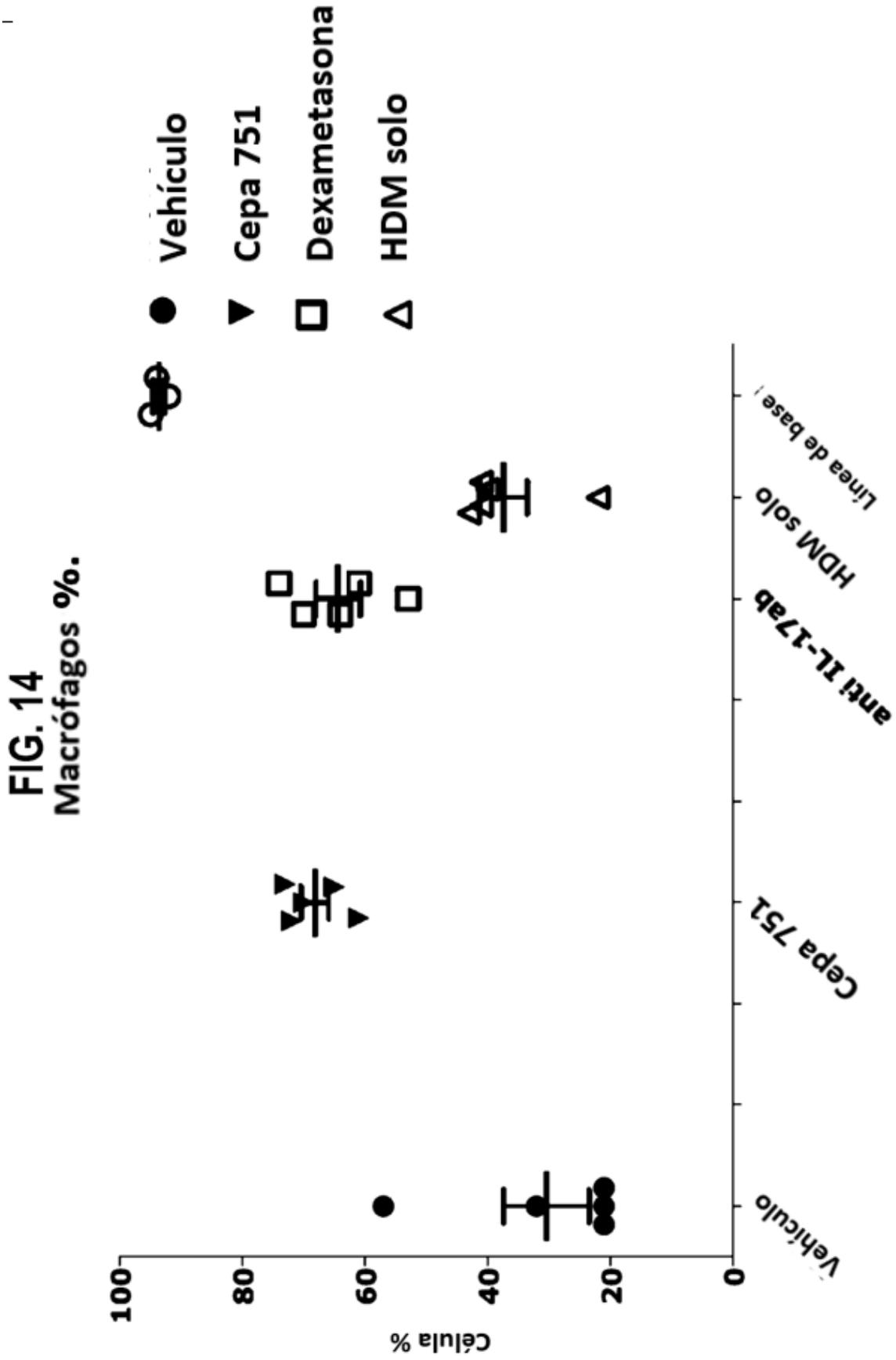


FIG. 15
Neutrófilos totales

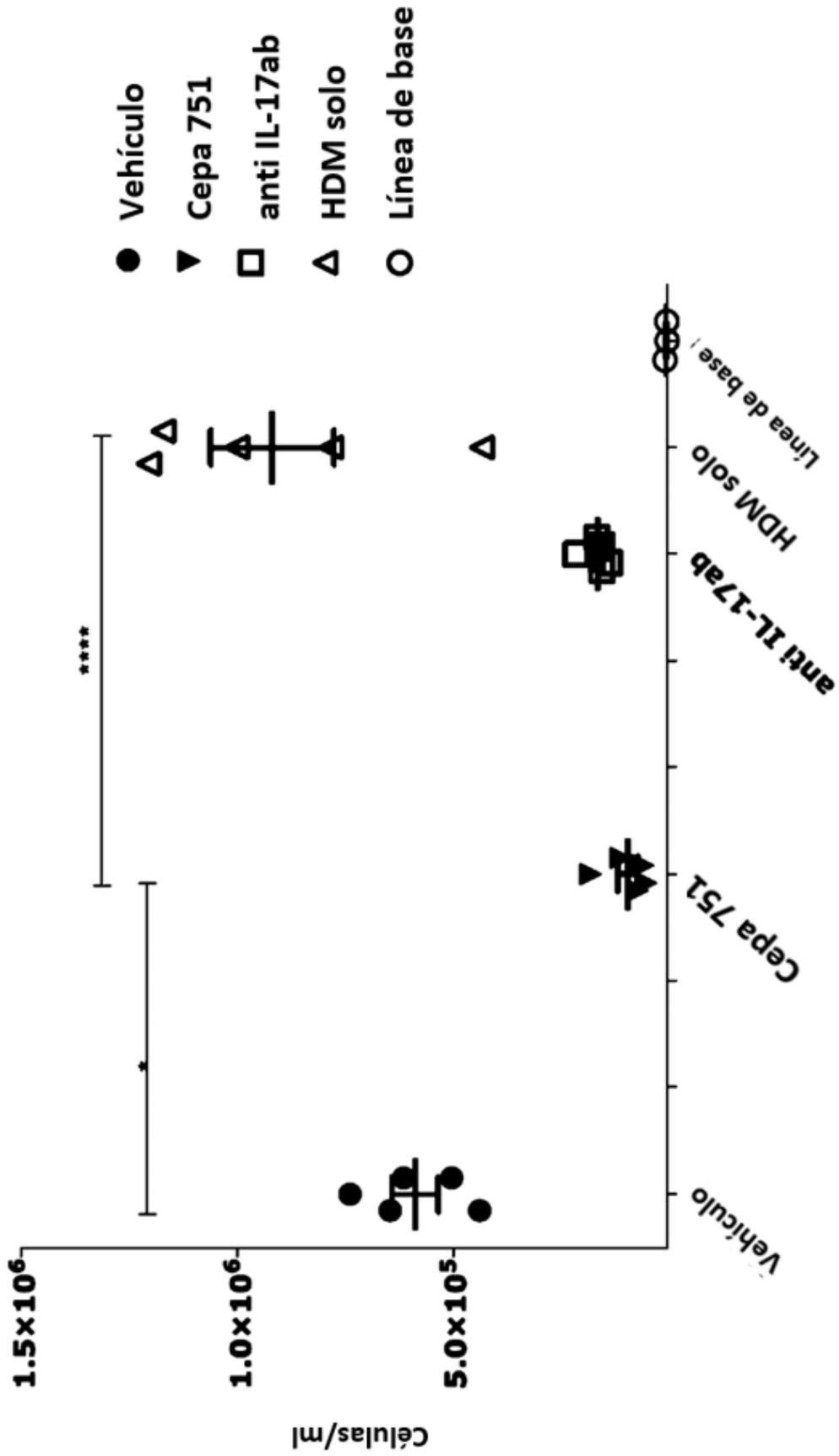


FIG. 16
Neutrófilos %.

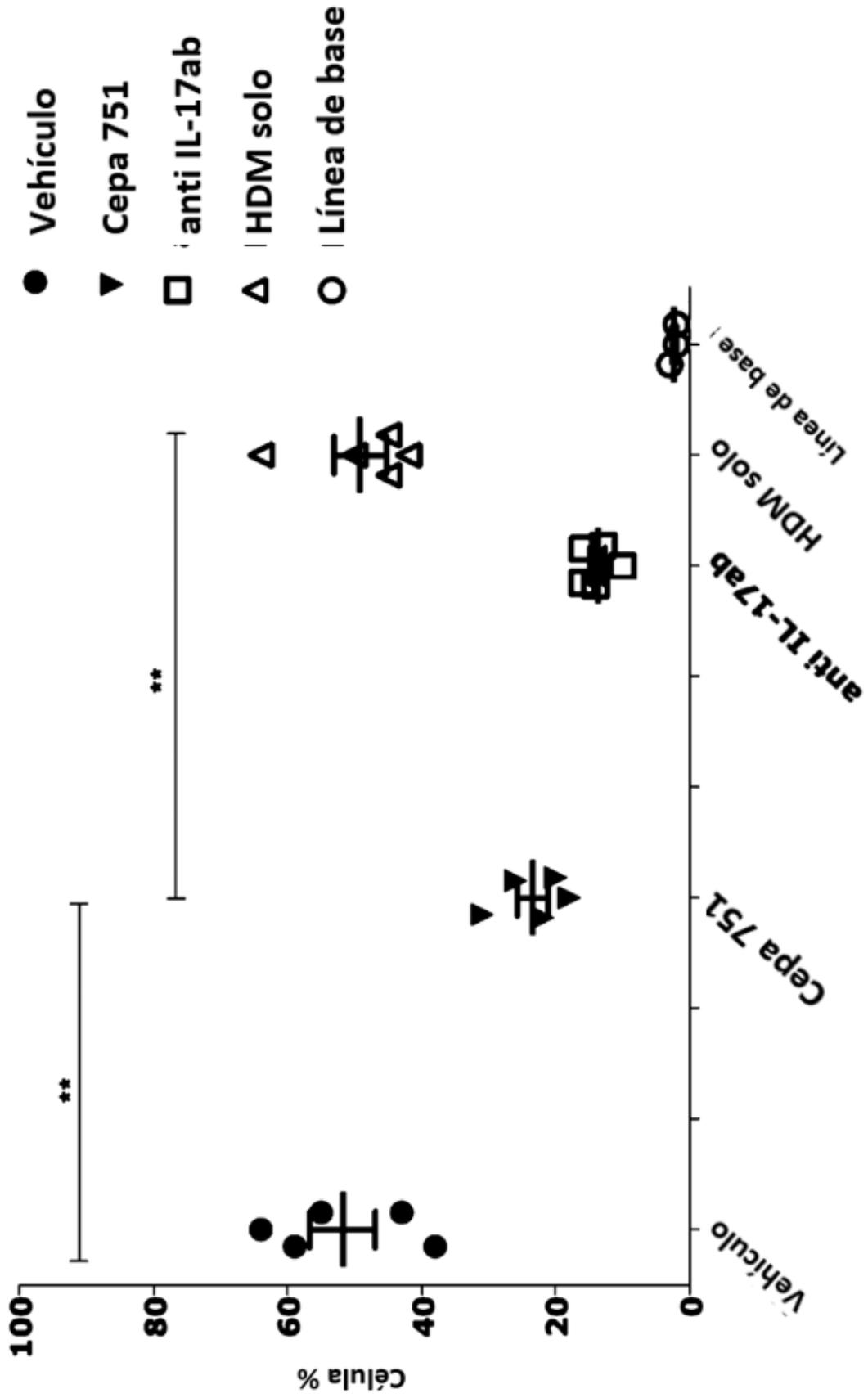


FIG. 17

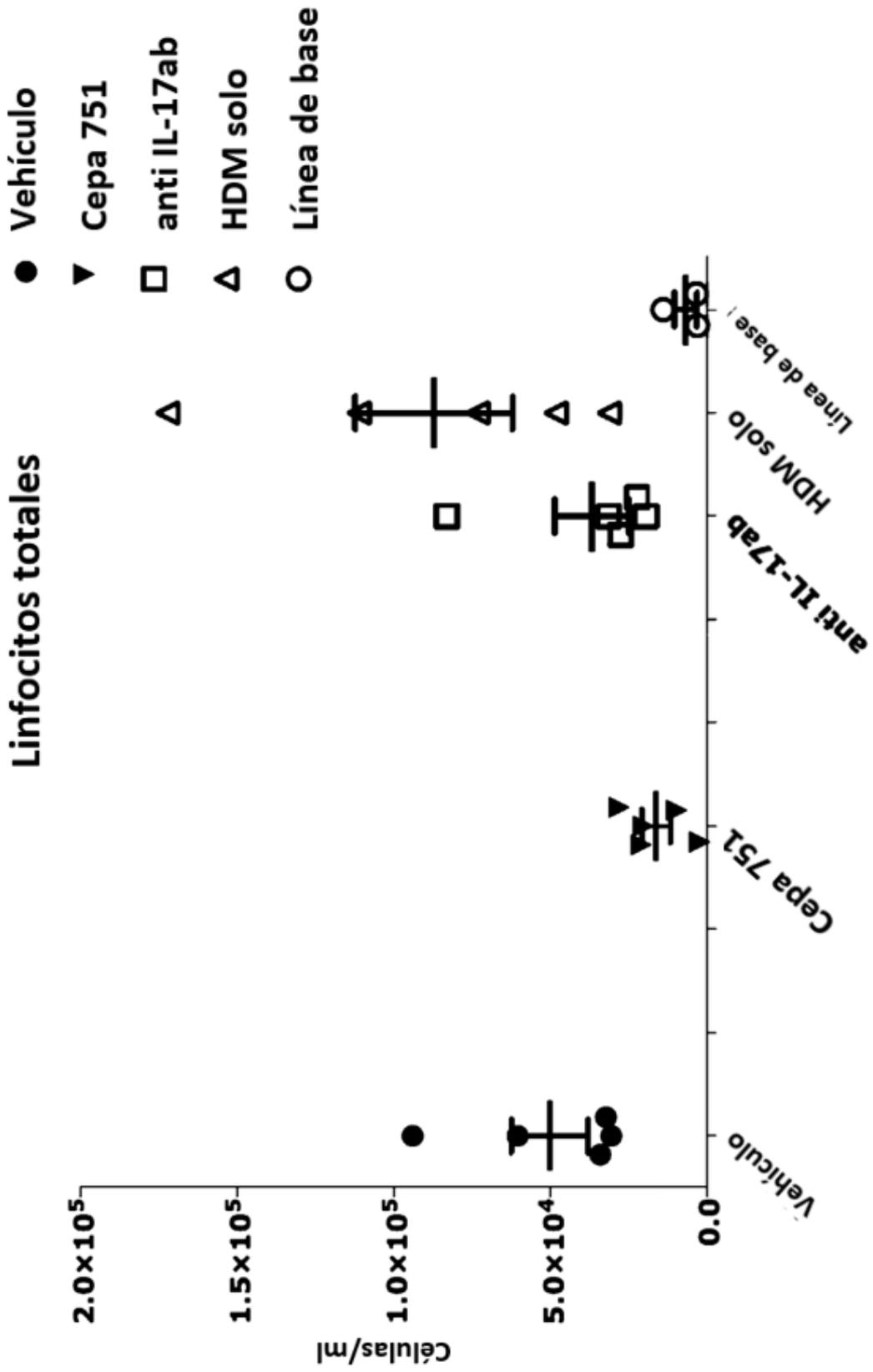


FIG. 18
Linfocitos %.

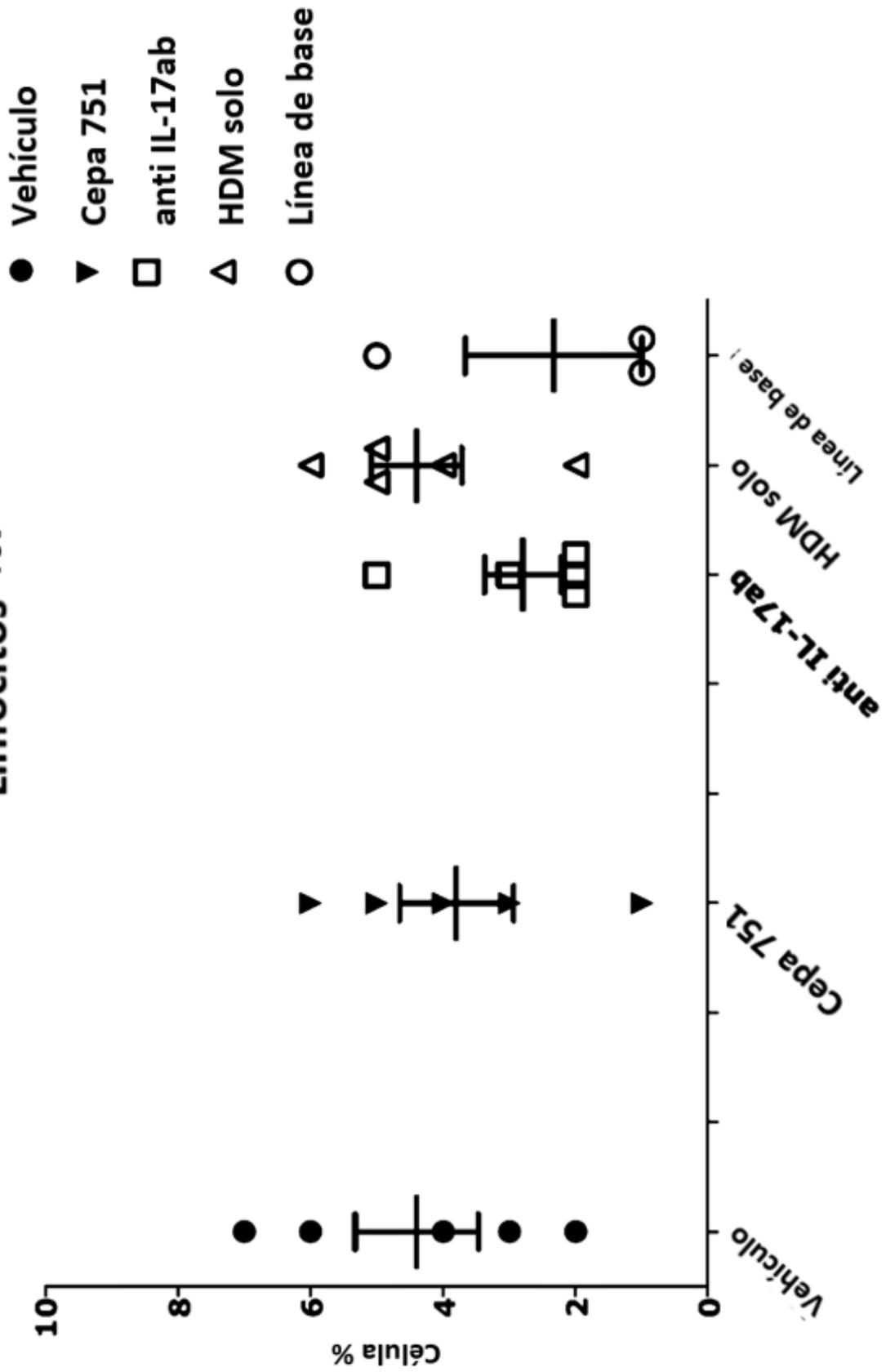


FIG. 19
Pesos corporales

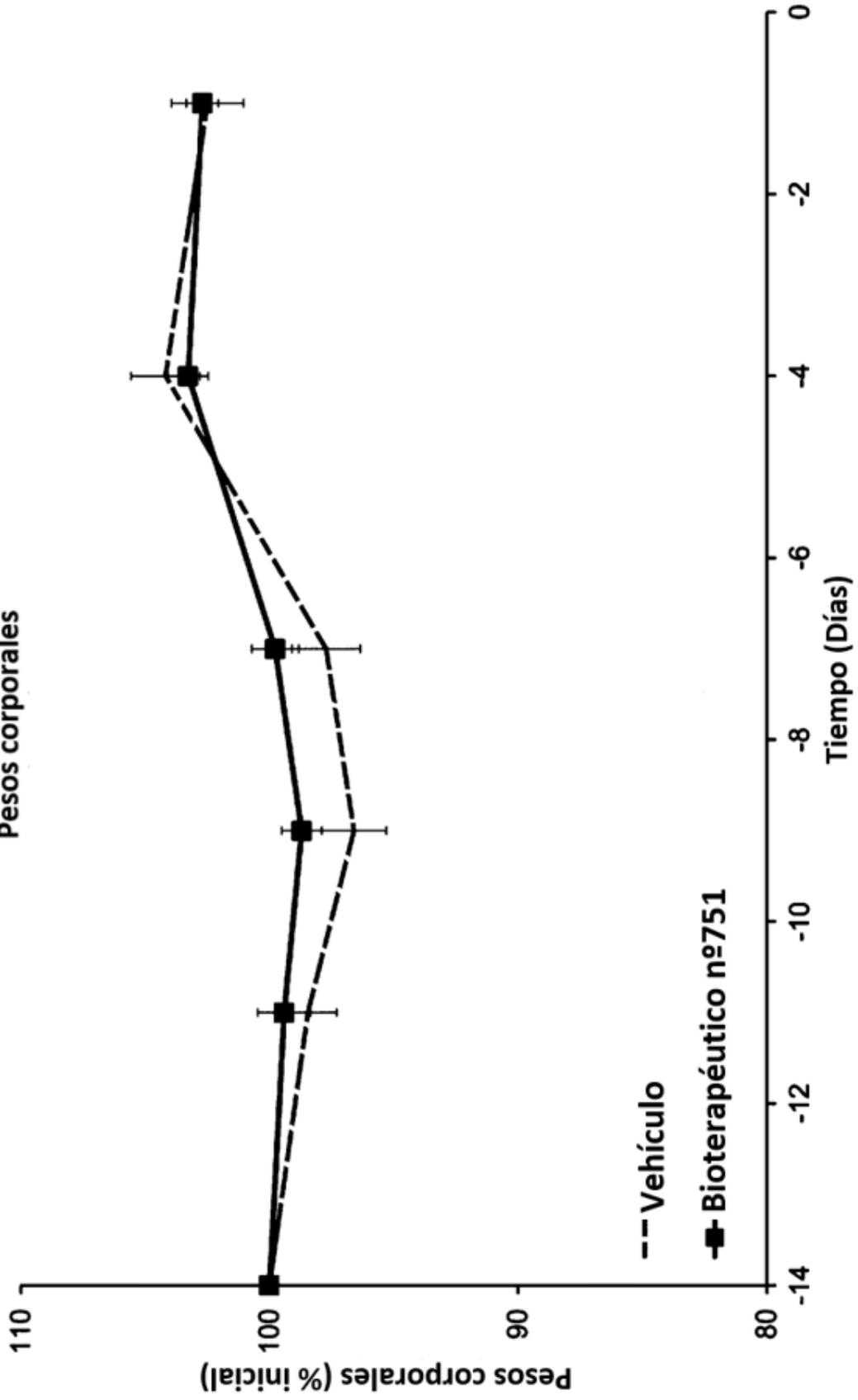


FIG. 20
Pesos corporales

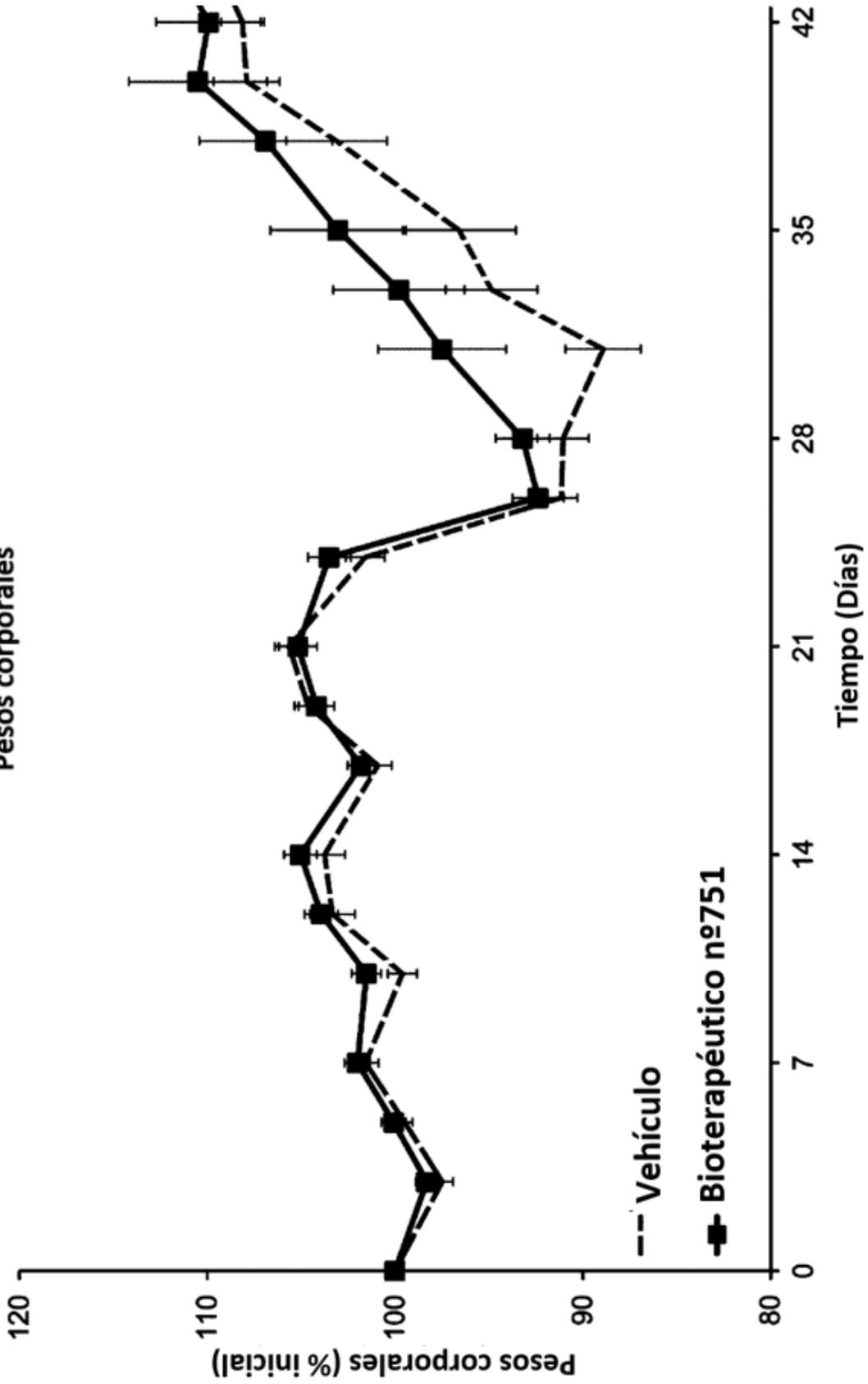


FIG. 21
Puntuaciones clínicas

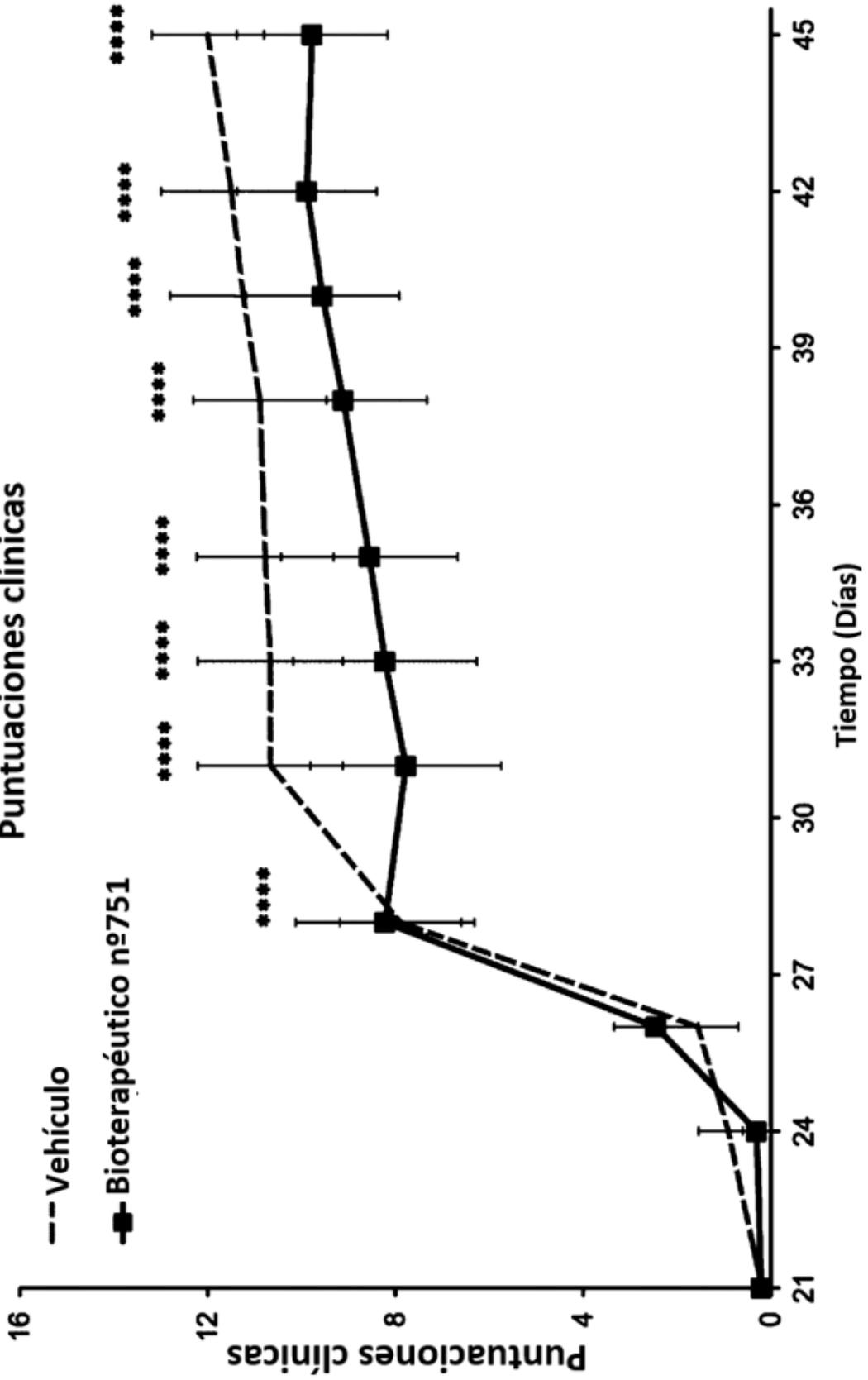


FIG. 22
Proliferación de esplenocitos a colágeno II

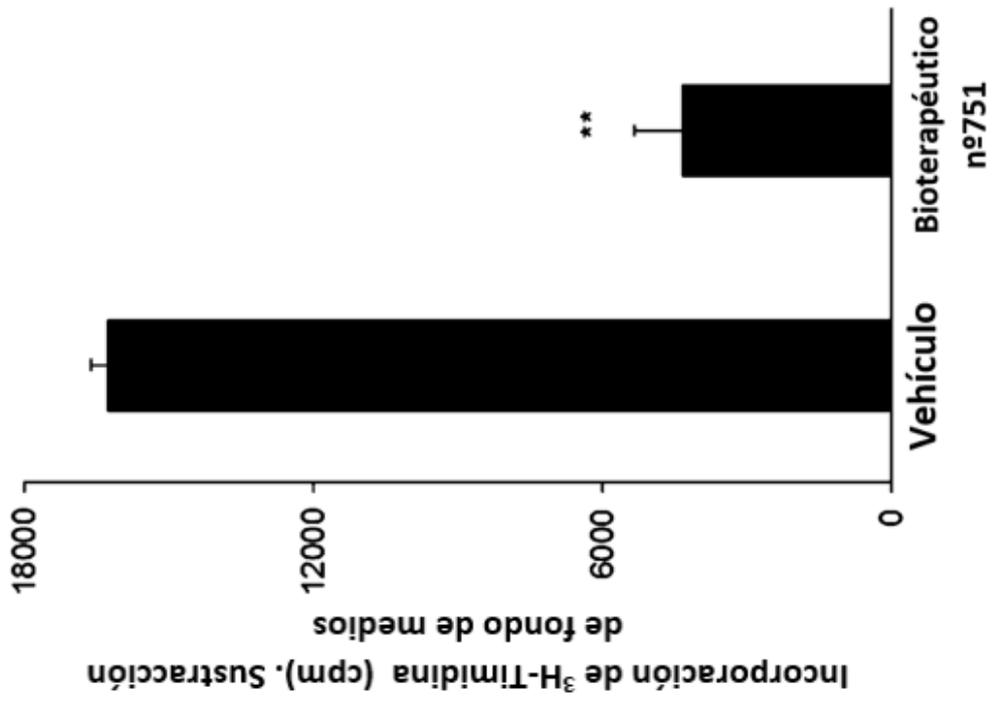
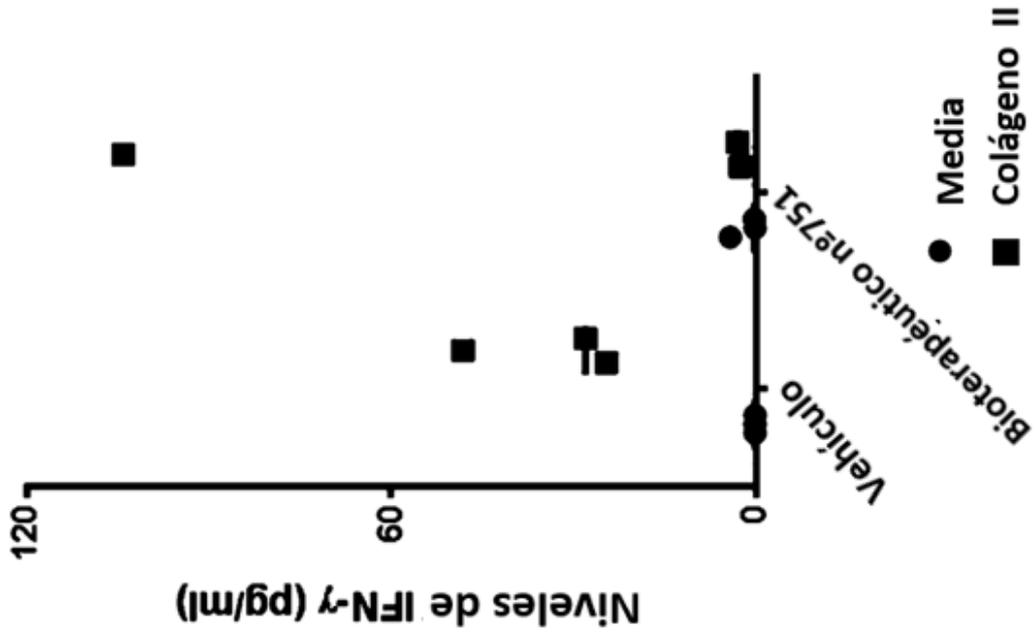


FIG. 23



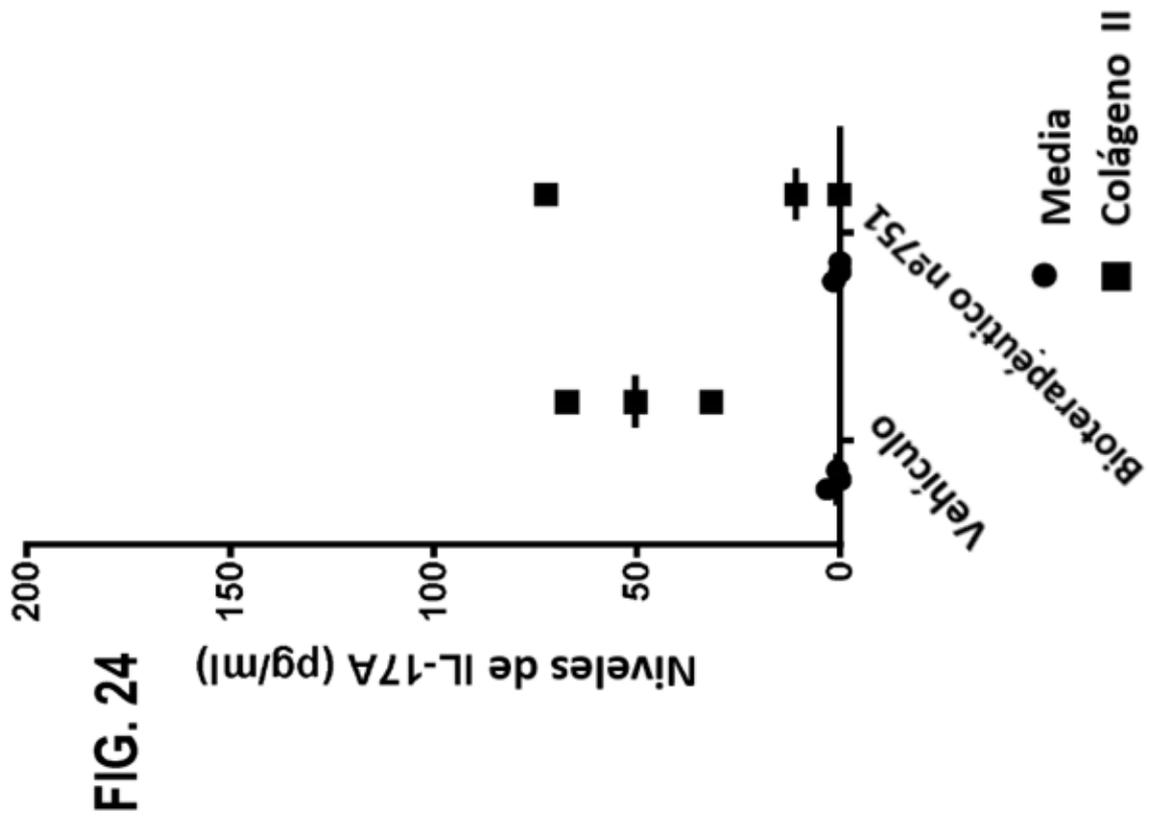
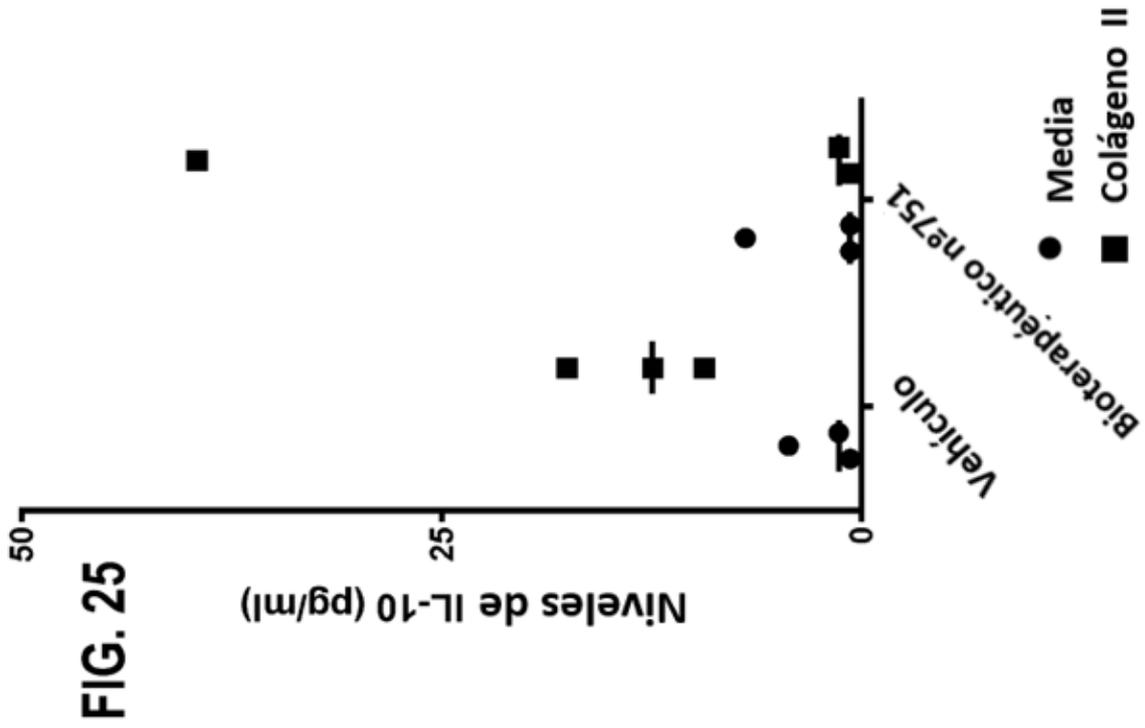


FIG. 26

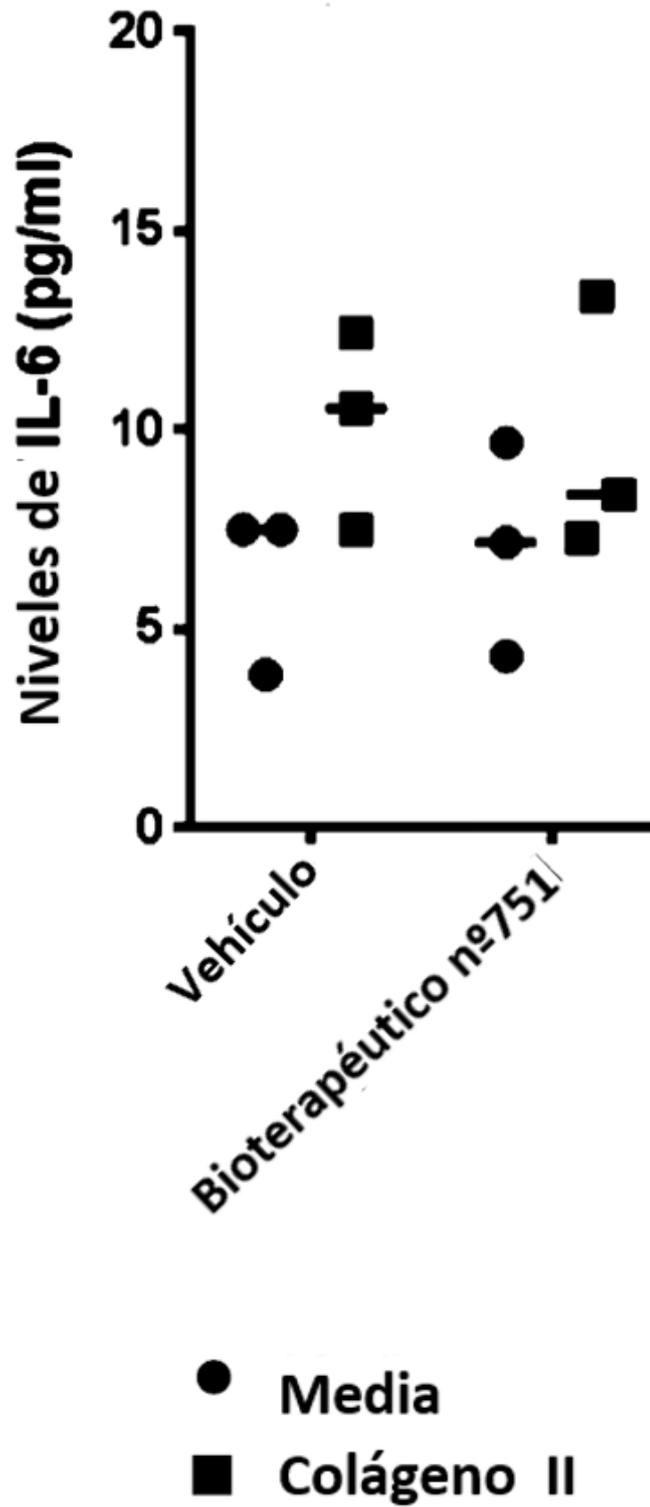


FIG. 27

Sistema de puntuación de histopatología

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial suave con inflamación dominada por neutrófilos. Bajos número de neutrófilos y macrófagos en espacio conjunto.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que implica tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en espacio conjunto; puede haber ciertos residuos de tejido necrótico.
3	Hiperplasia sinovial con inflamación marcada que implica tanto neutrófilos como macrófagos. Pérdida de revestimiento sinoviocítico. La inflamación puede extender desde el sinovio a tejido circundante que incluye músculo. Numerosos neutrófilos y macrófagos en espacio conjunto, junto con residuos de tejido necrótico significativo.
Daño de cartílago articular	
0	Articulación normal
1	Cartílago articular muestra cambio solo ligeramente degenerativo. Formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente
2	Cartílago articular muestra cambio moderadamente degenerativo y pérdida focal. Formación de pannus está presente focalmente
3	Disrupción significativa y pérdida de cartílago articular con formación de pannus extensivo
Daño al hueso metafisario subyacente	
0	Articulación normal
1	Sin cambio a hueso metafisario subyacente
2	Puede ser necrosis focal o fibrosis de hueso metafisario
3	Disrupción o colapso de hueso metafisario. Inflamación extensiva, necrosis o fibrosis que se extiende al espacio medular de metáfisis

FIG. 28
IgE total en suero

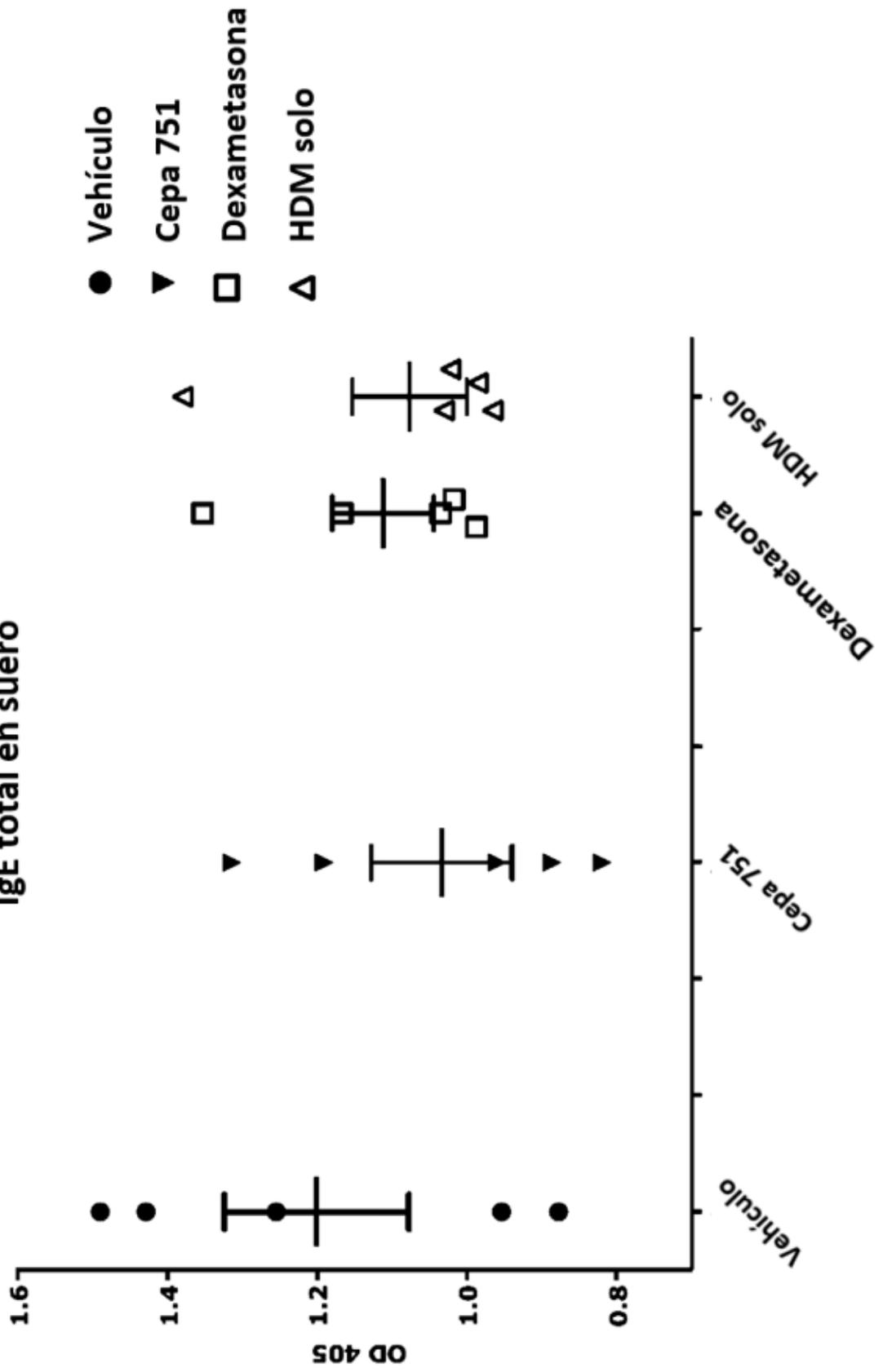
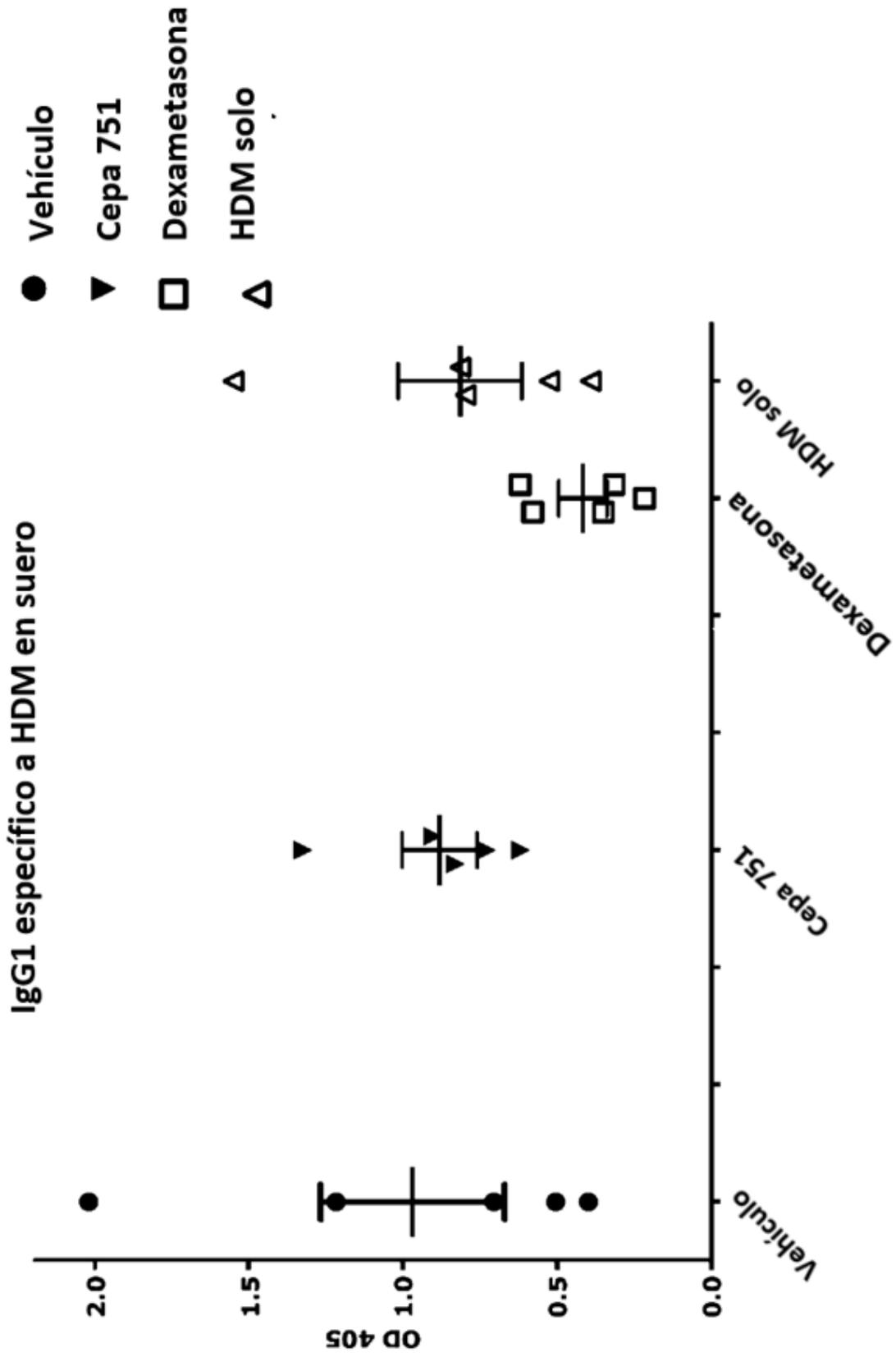


FIG. 29



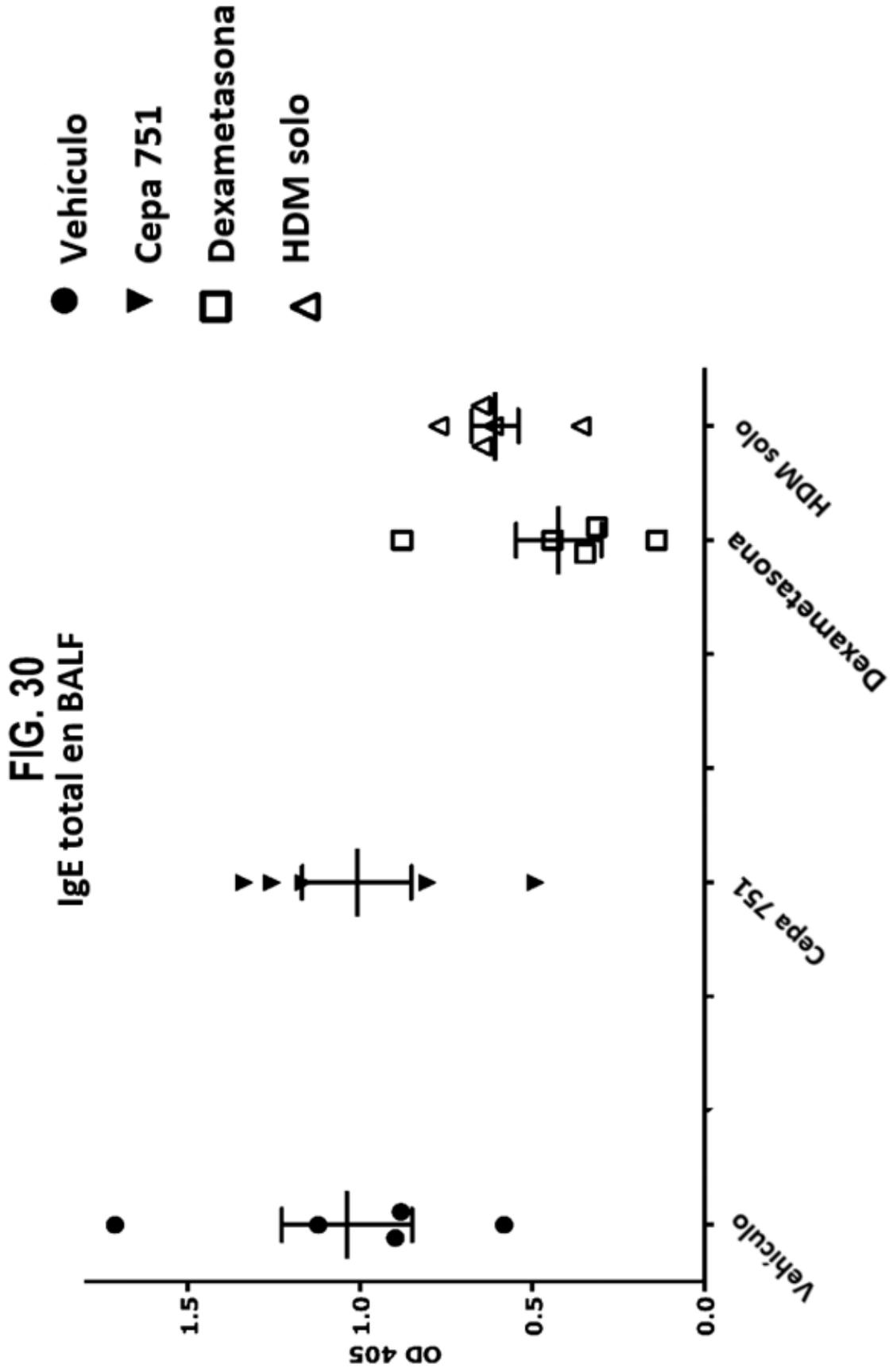


FIG. 31
IgG1 específico a HDM en BALF

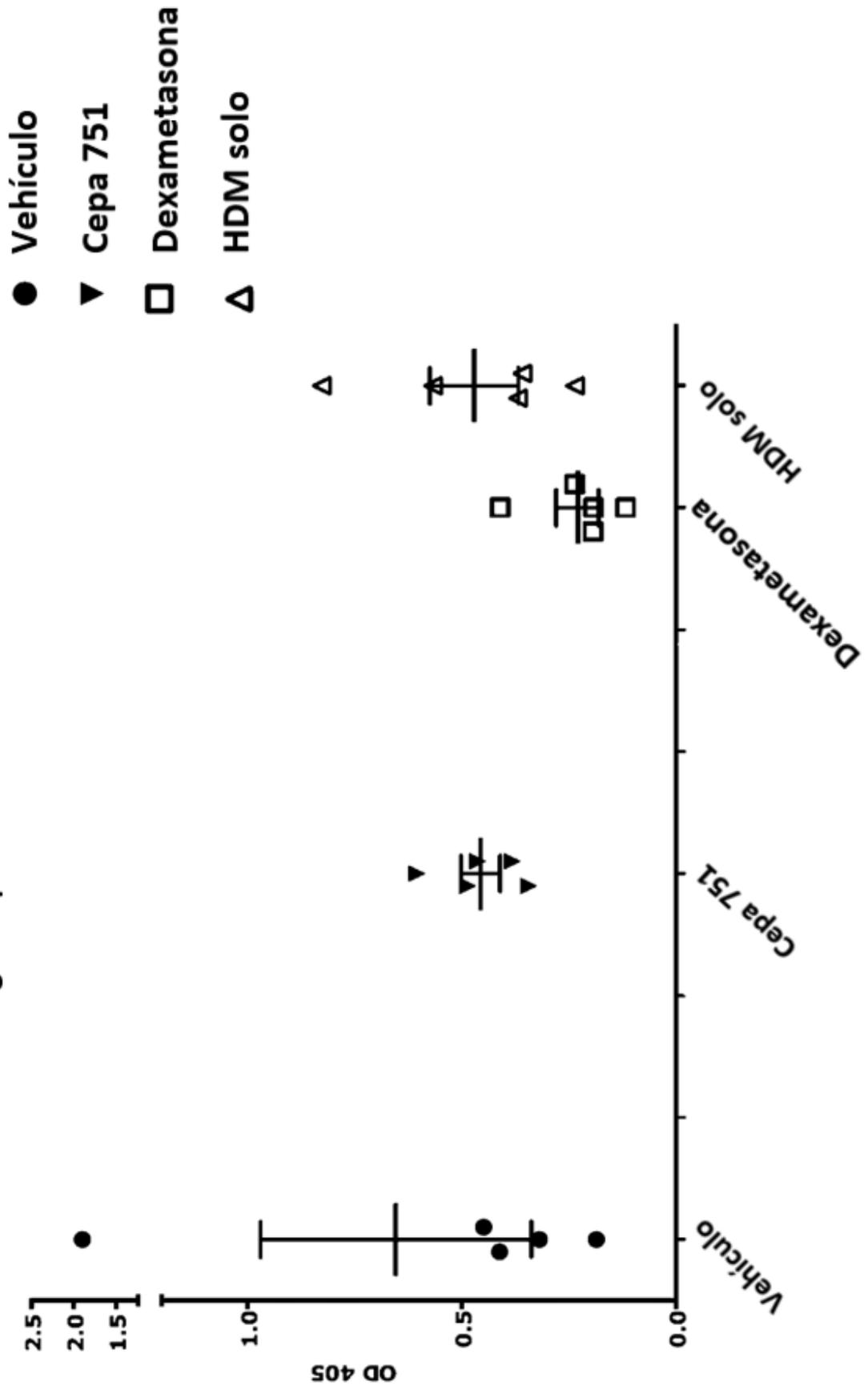


FIG. 32 Análisis histológico – Puntuación de infiltración peribronquiolar media

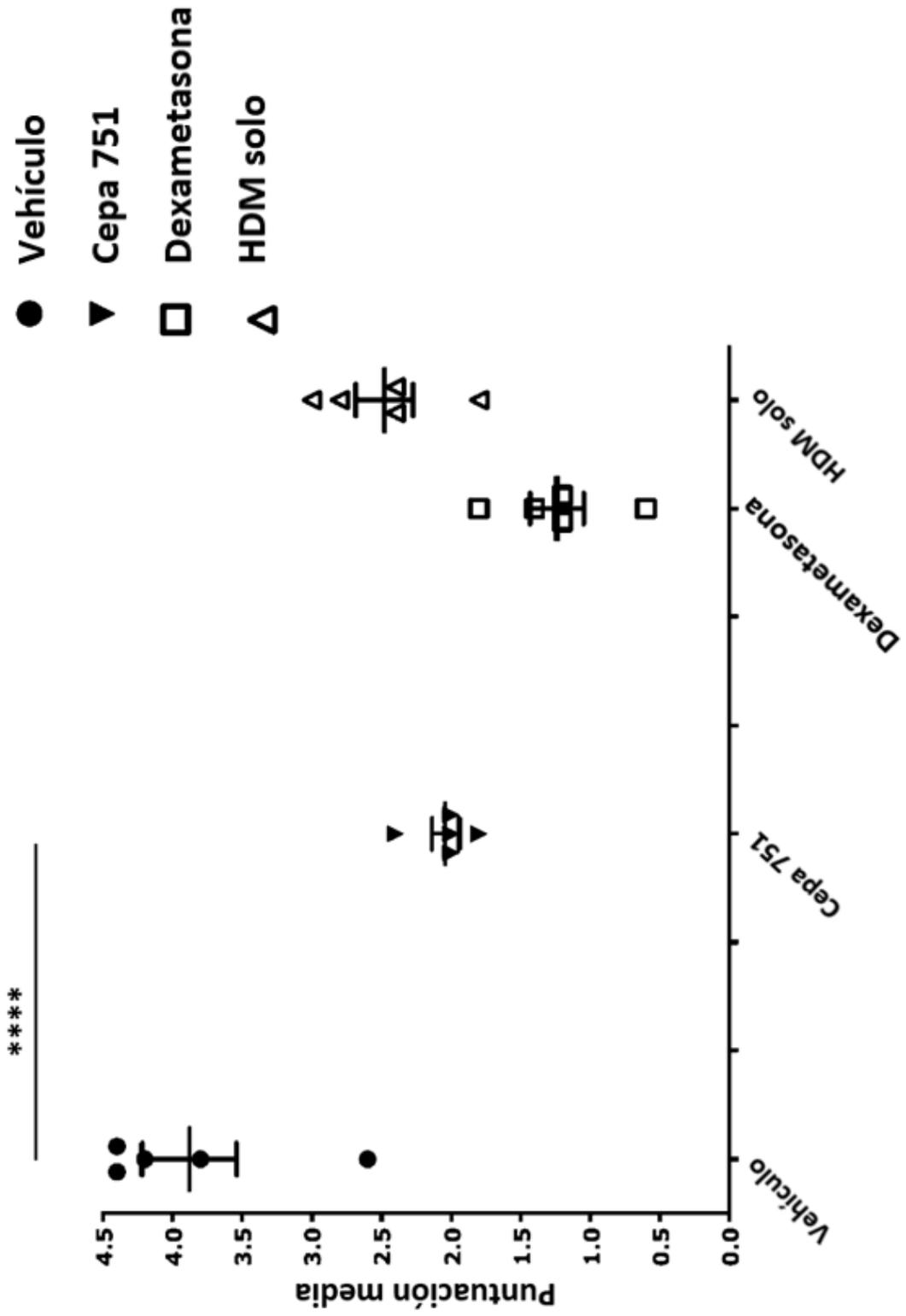


FIG. 33

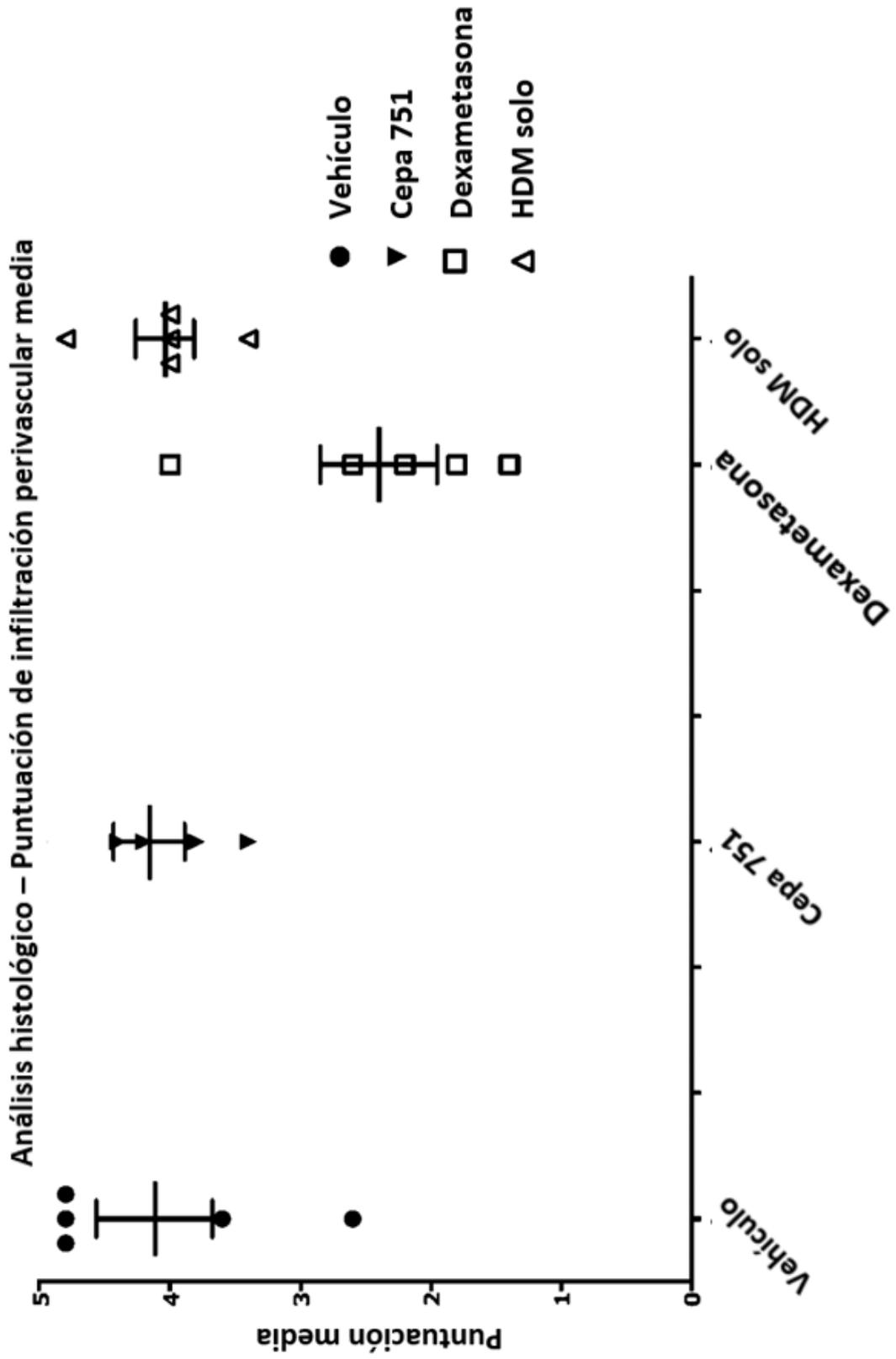


FIG. 34

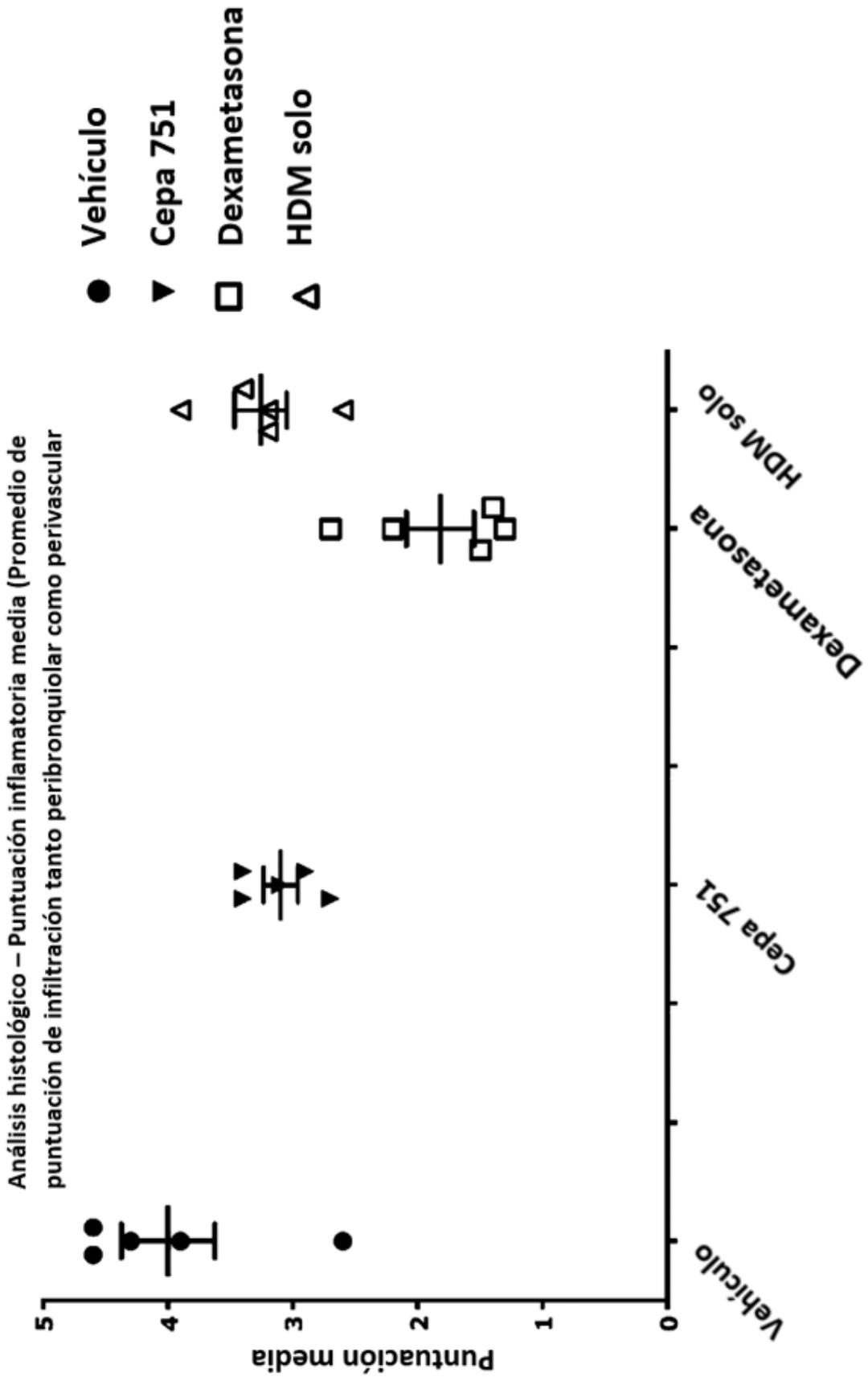


FIG. 35

Análisis histológico – Puntuación mucosa

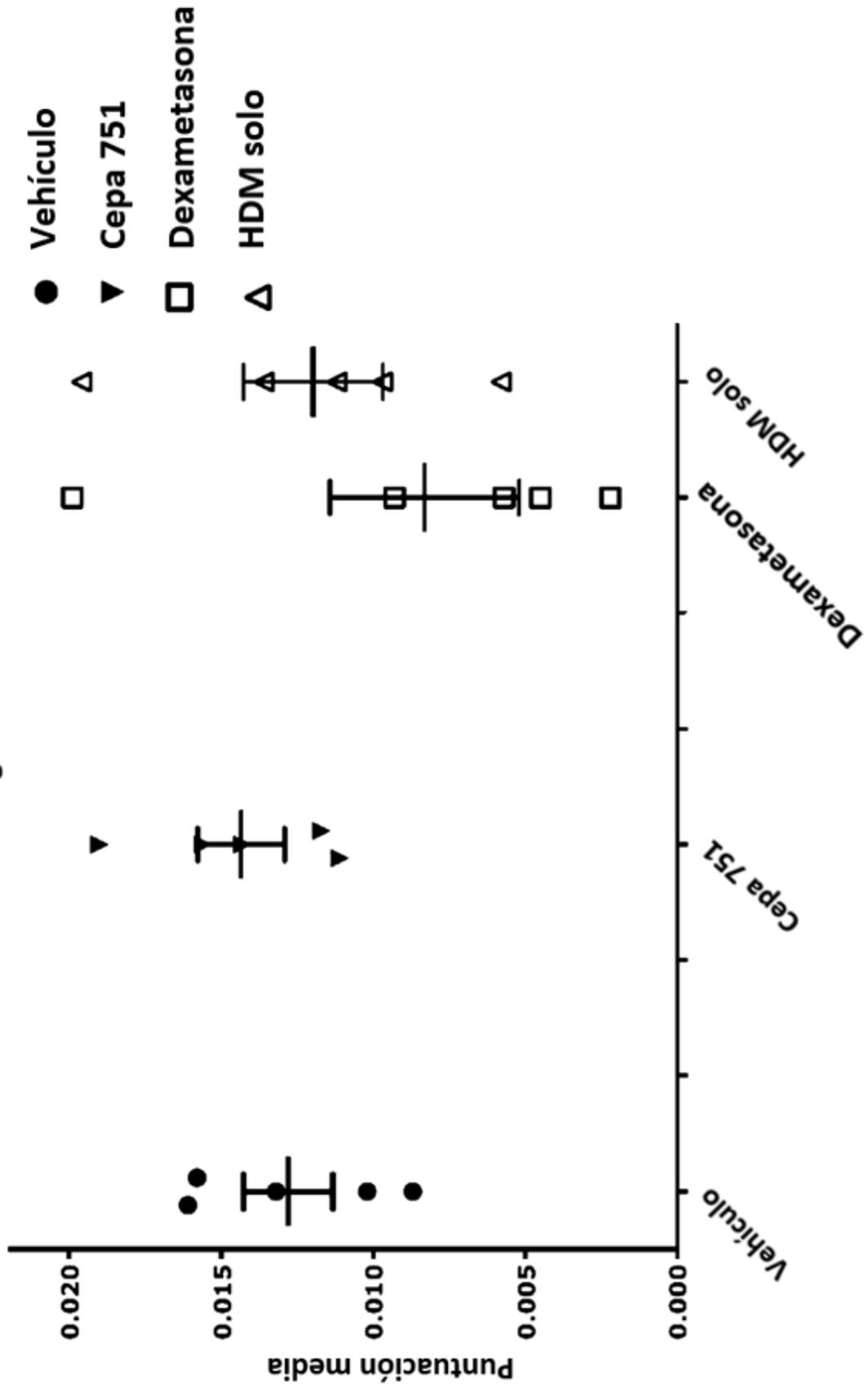


FIG. 36
Nivel de IL-9 en tejido pulmonar

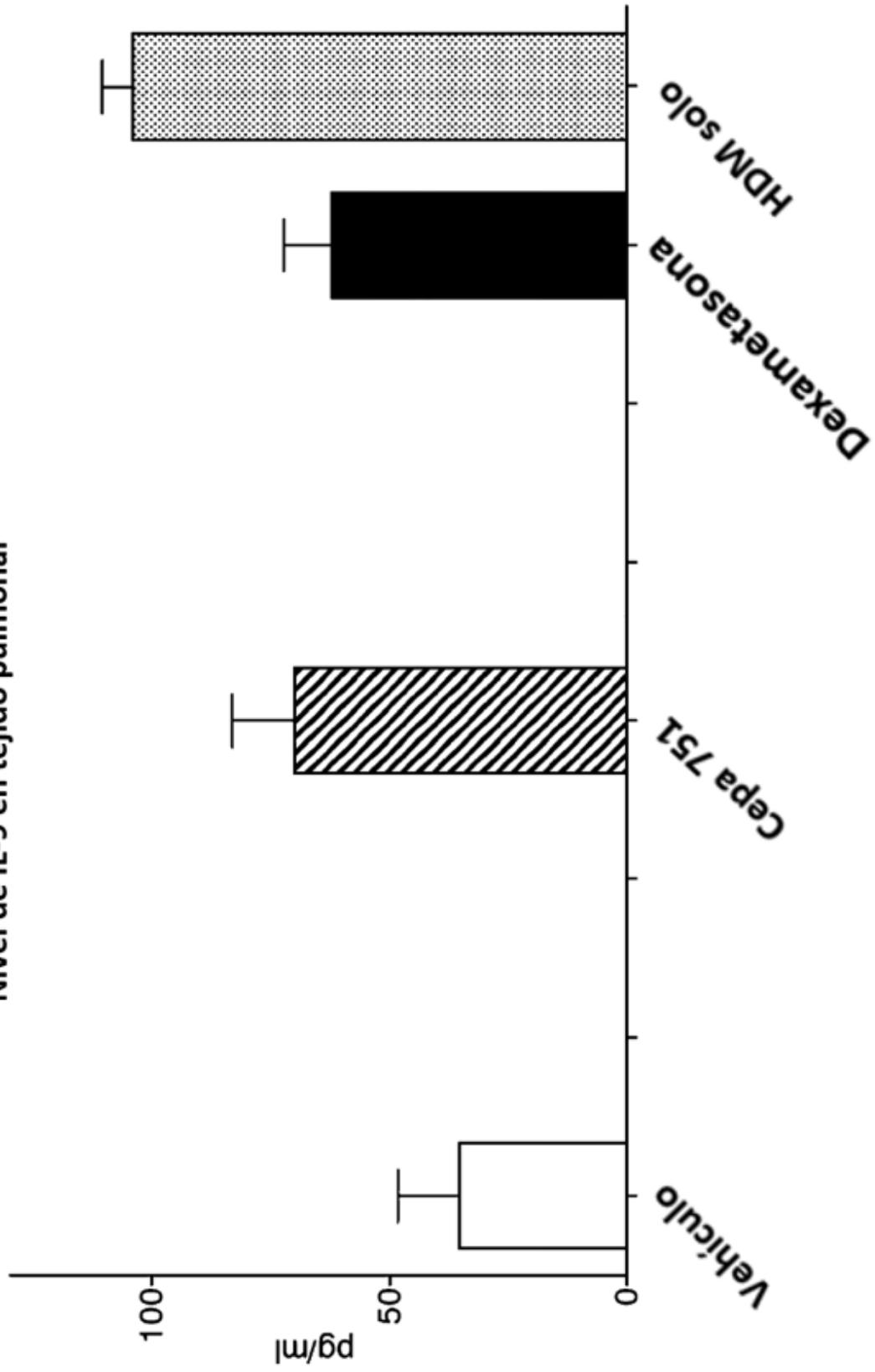


FIG. 37
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

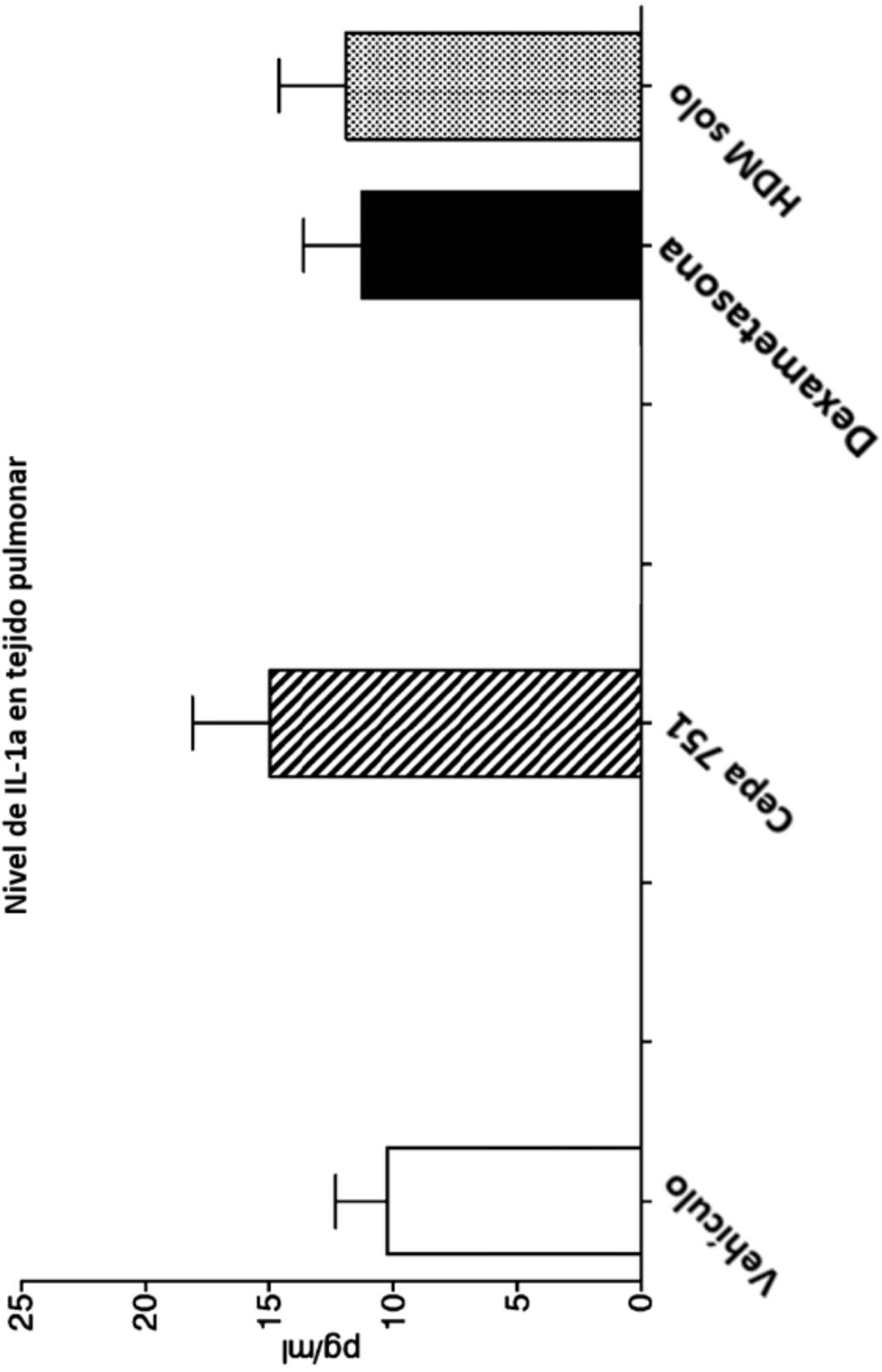


FIG. 38
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

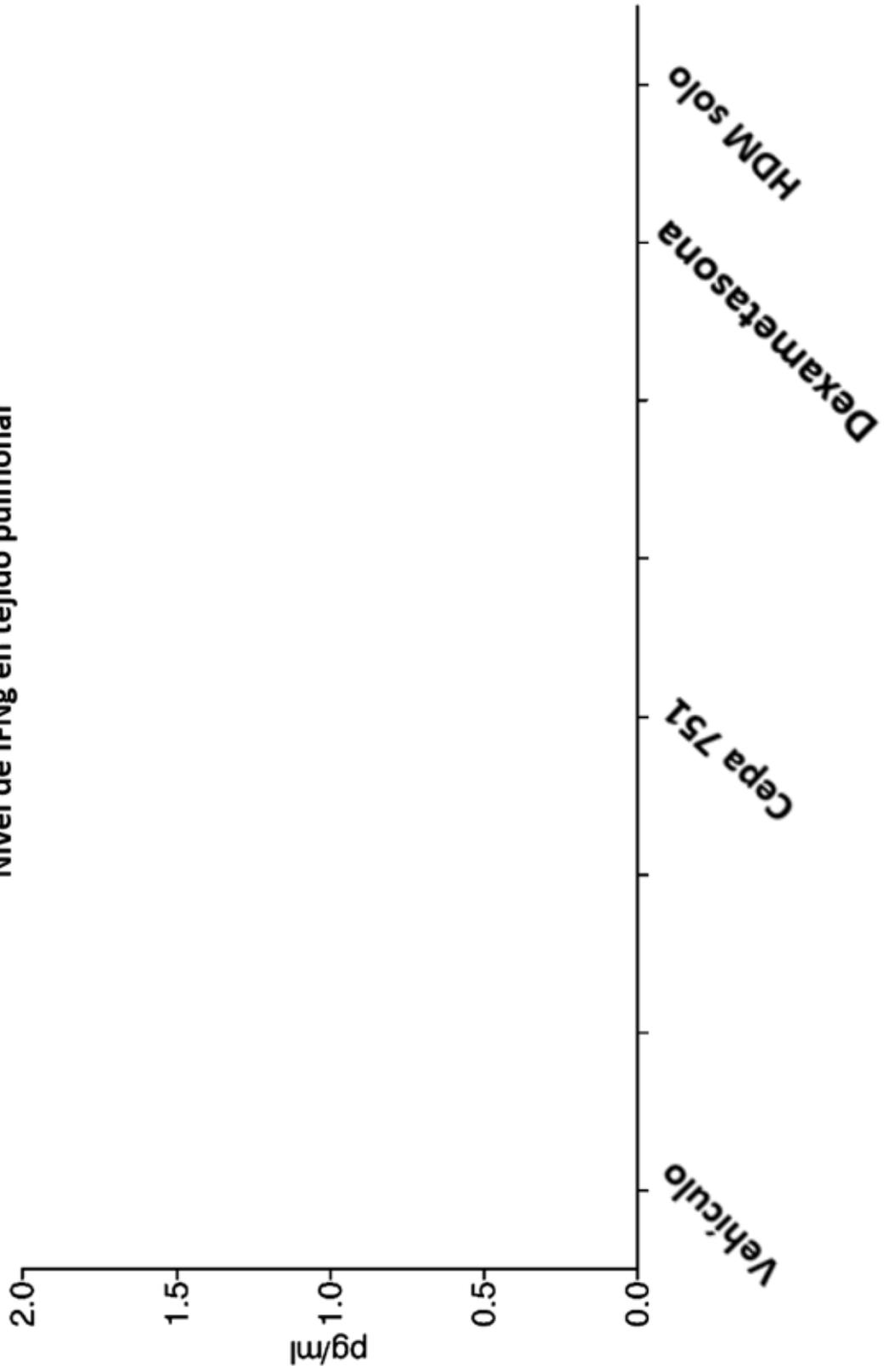


FIG. 39
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

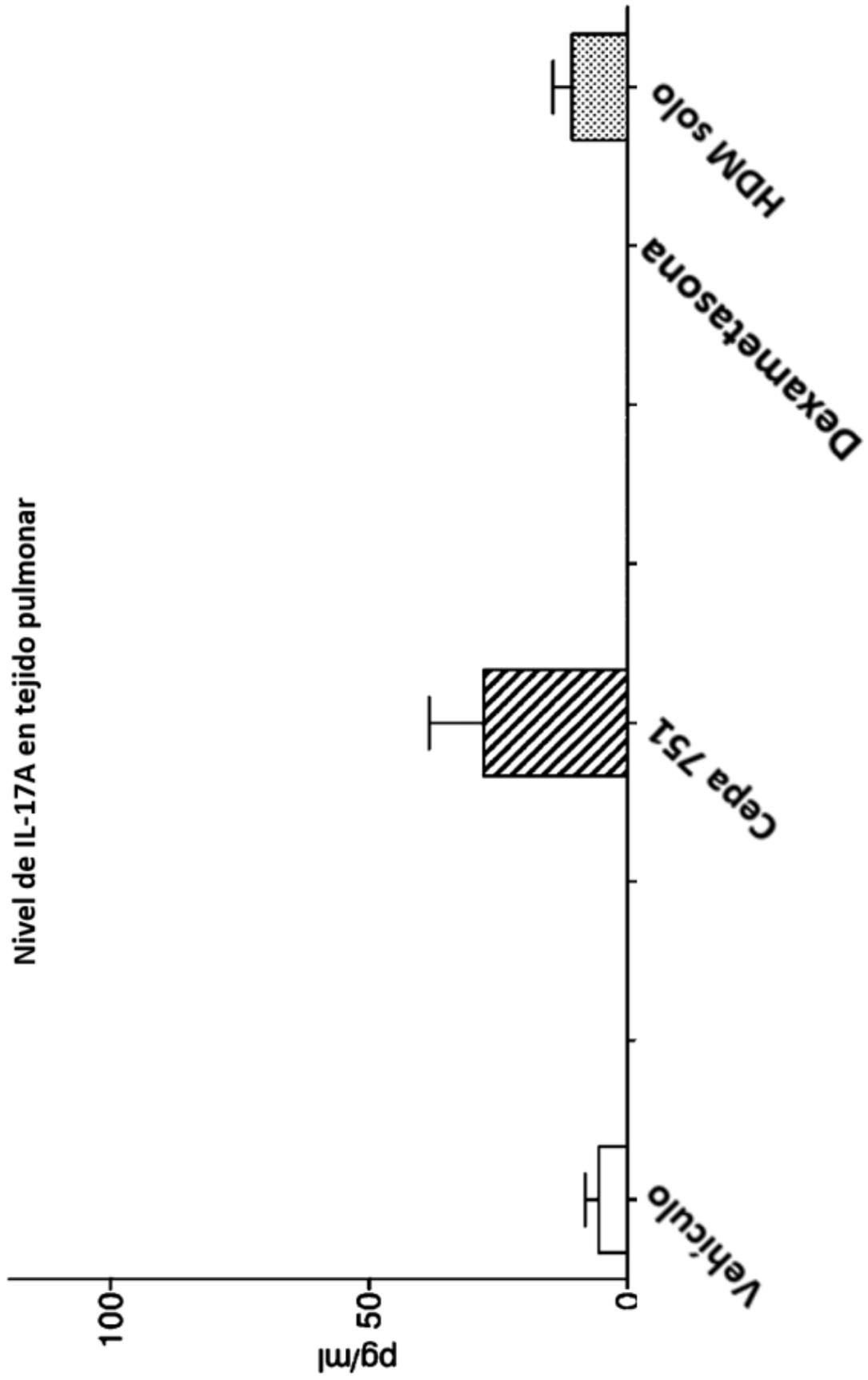


FIG. 40
Nivel de IL-4 en tejido pulmonar

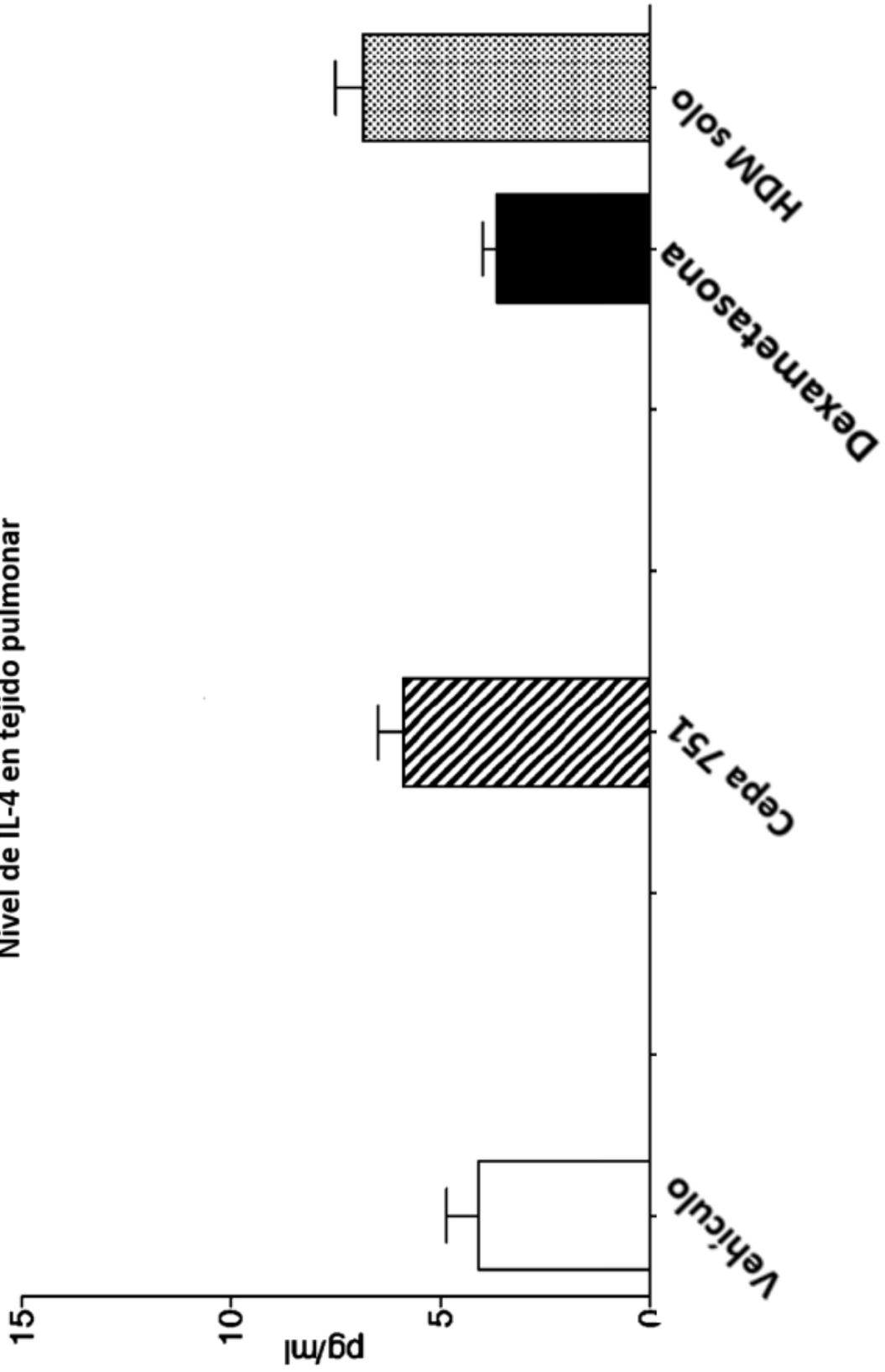


FIG. 41
Nivel de IL-5 en tejido pulmonar

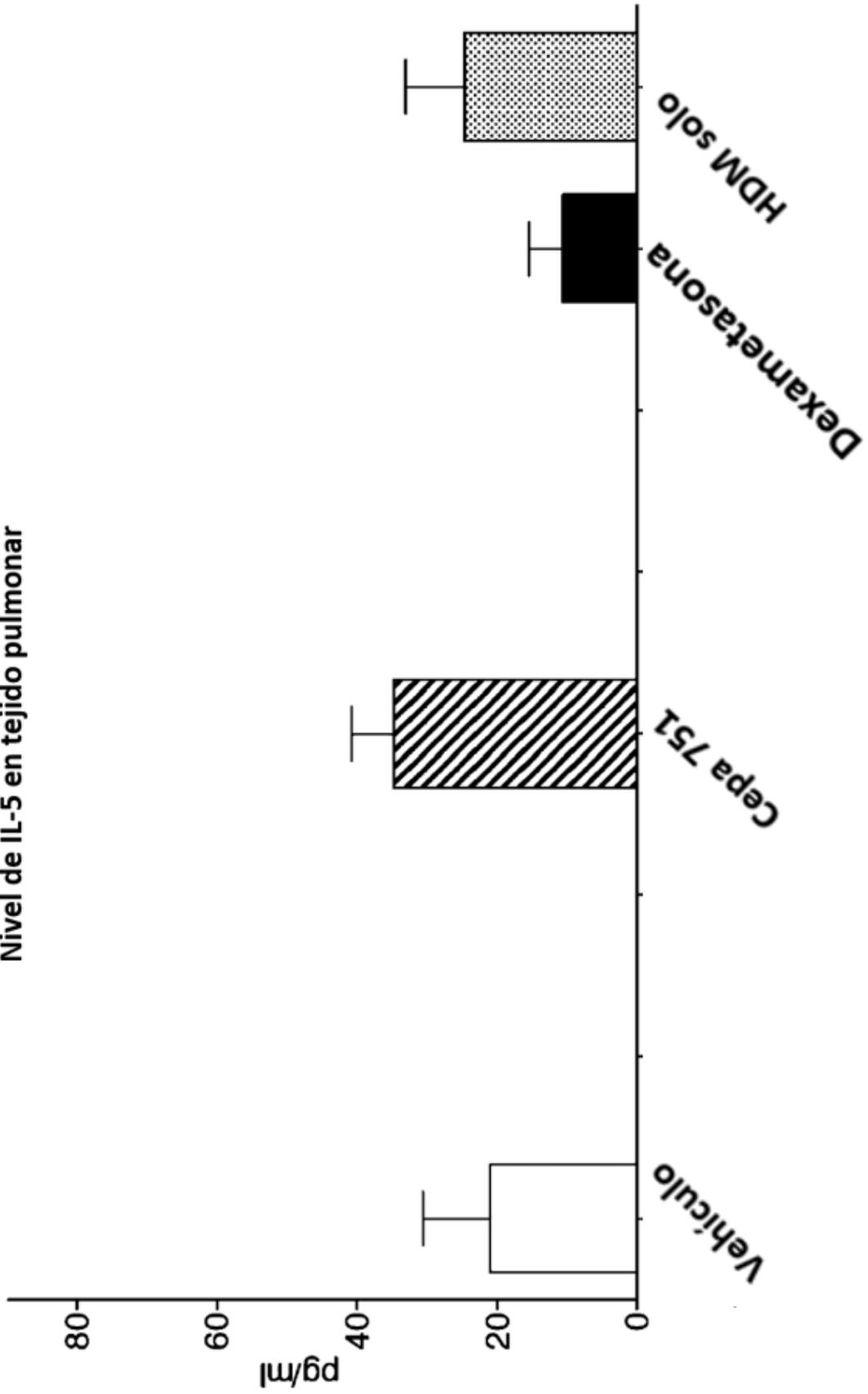


FIG. 42
Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

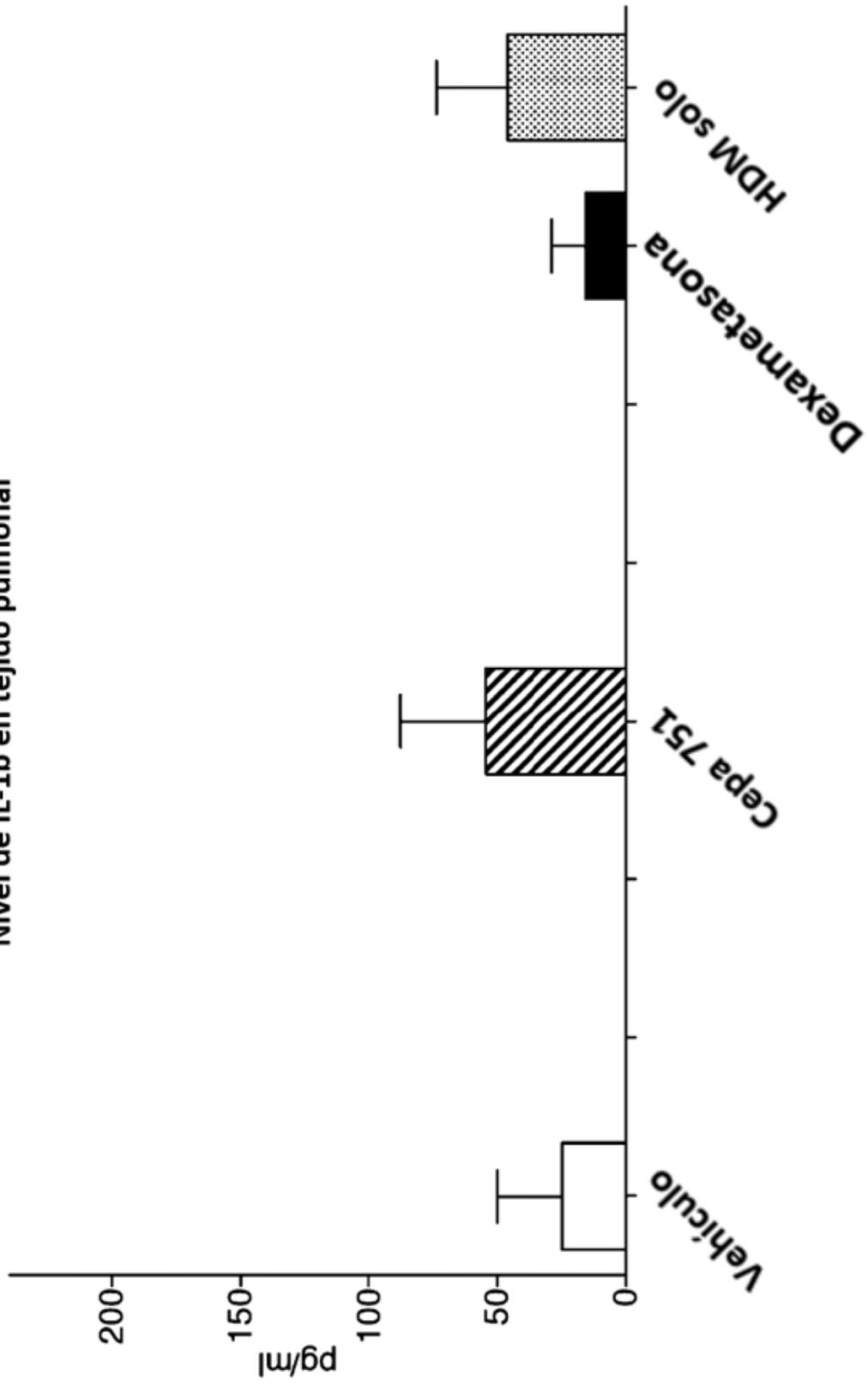


FIG. 43

Nivel de RANTES en tejido pulmonar

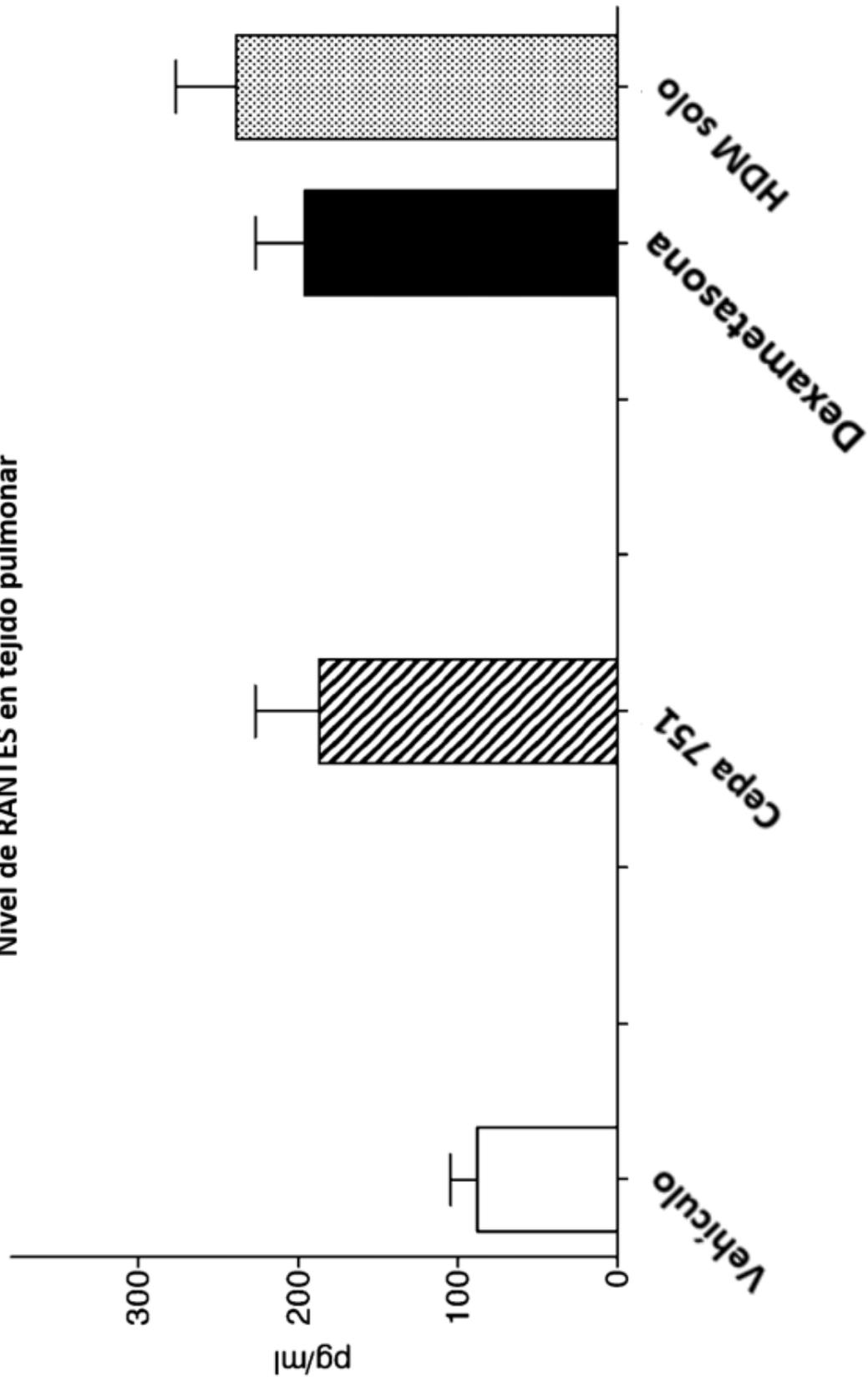


FIG. 44
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

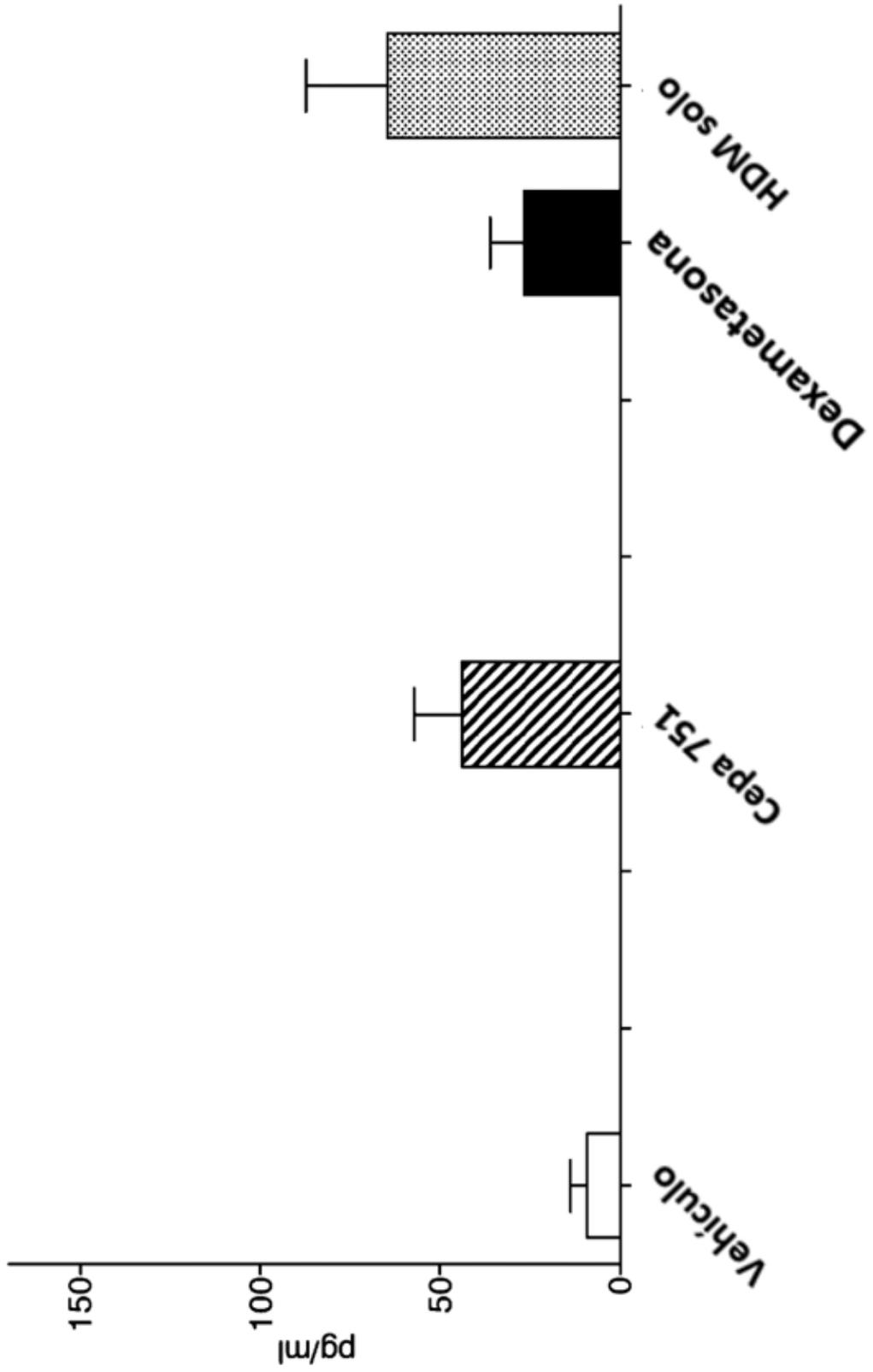


FIG. 45

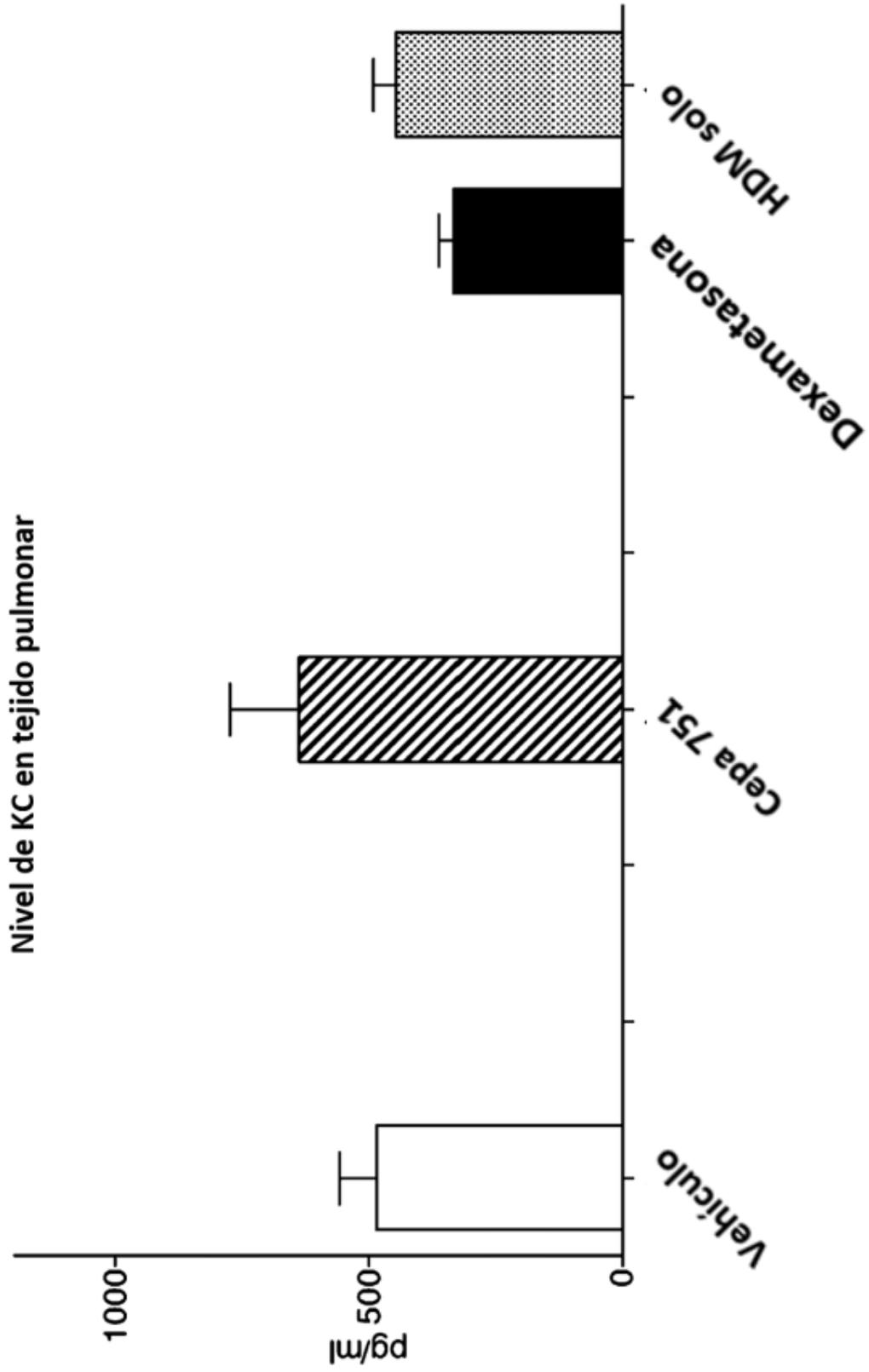
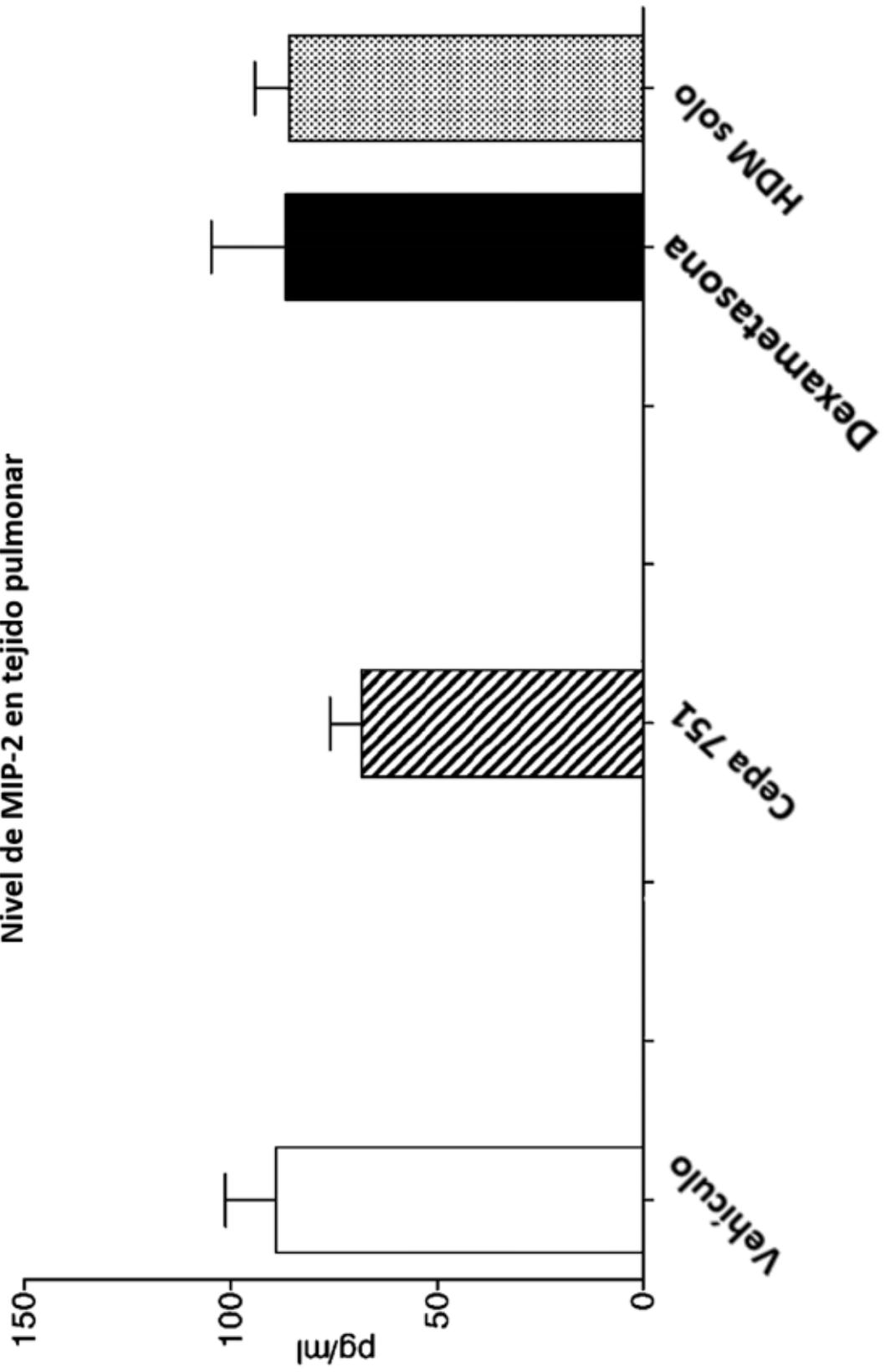


FIG. 46
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar



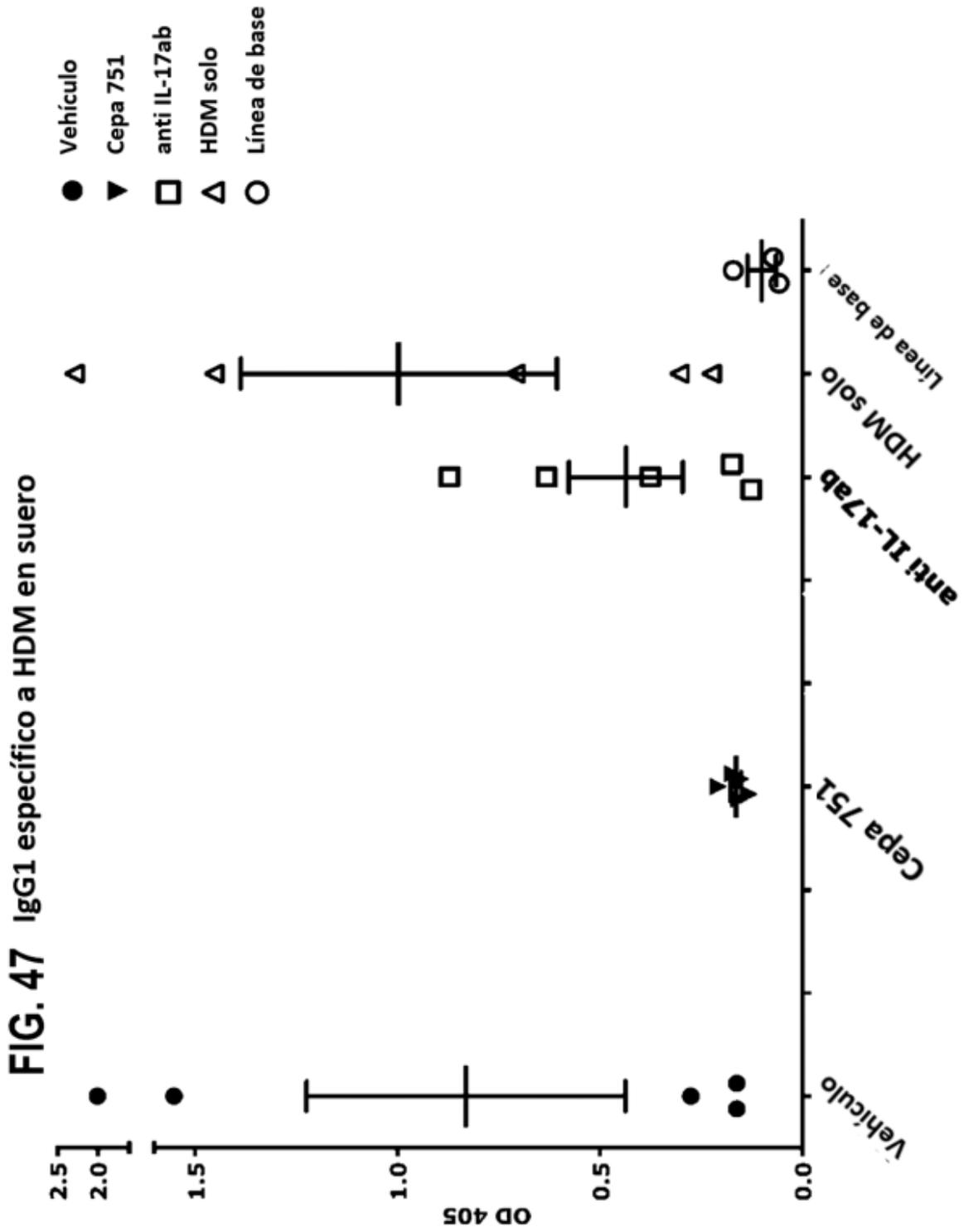


FIG. 48 IgG2a específico a HDM en suero

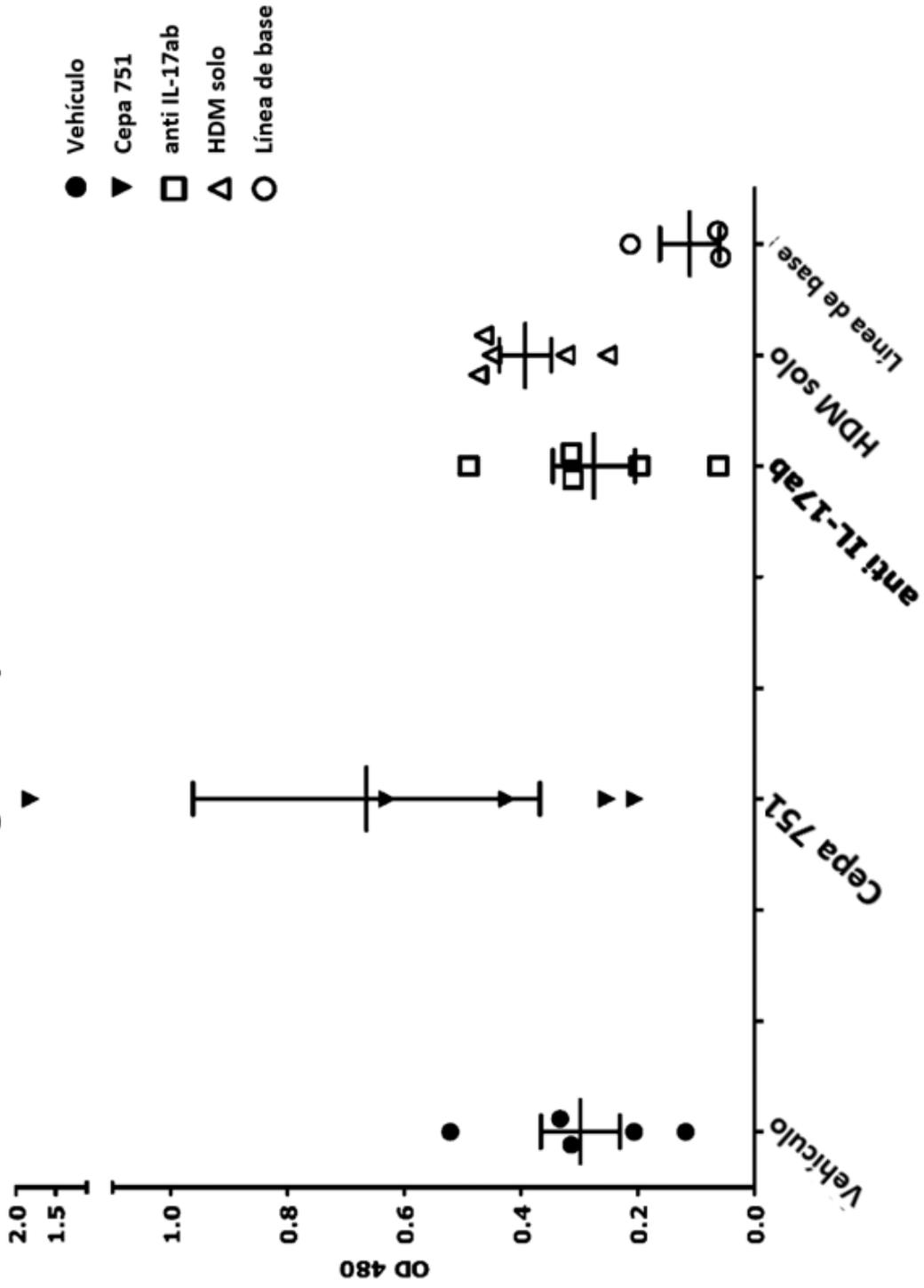
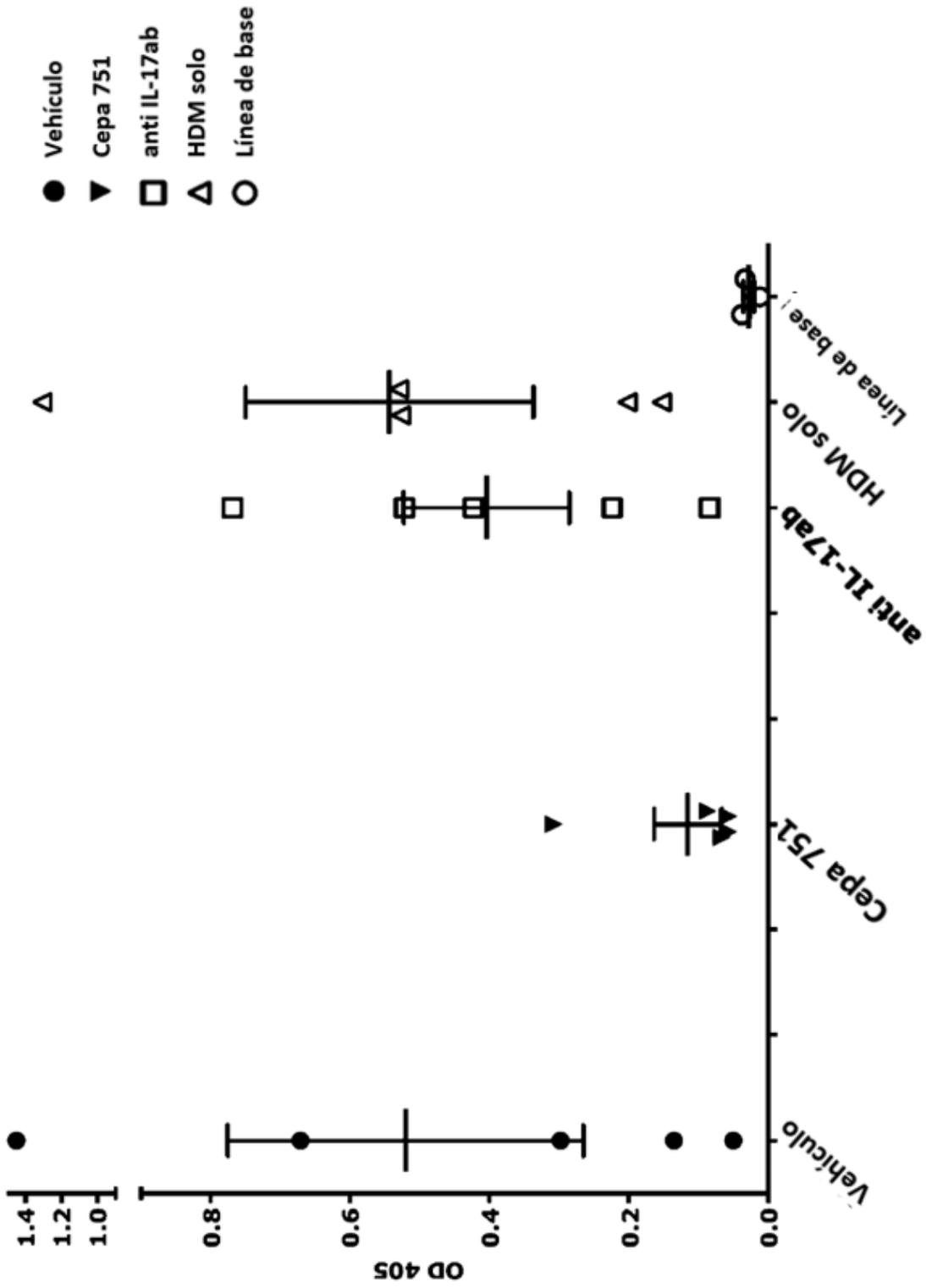
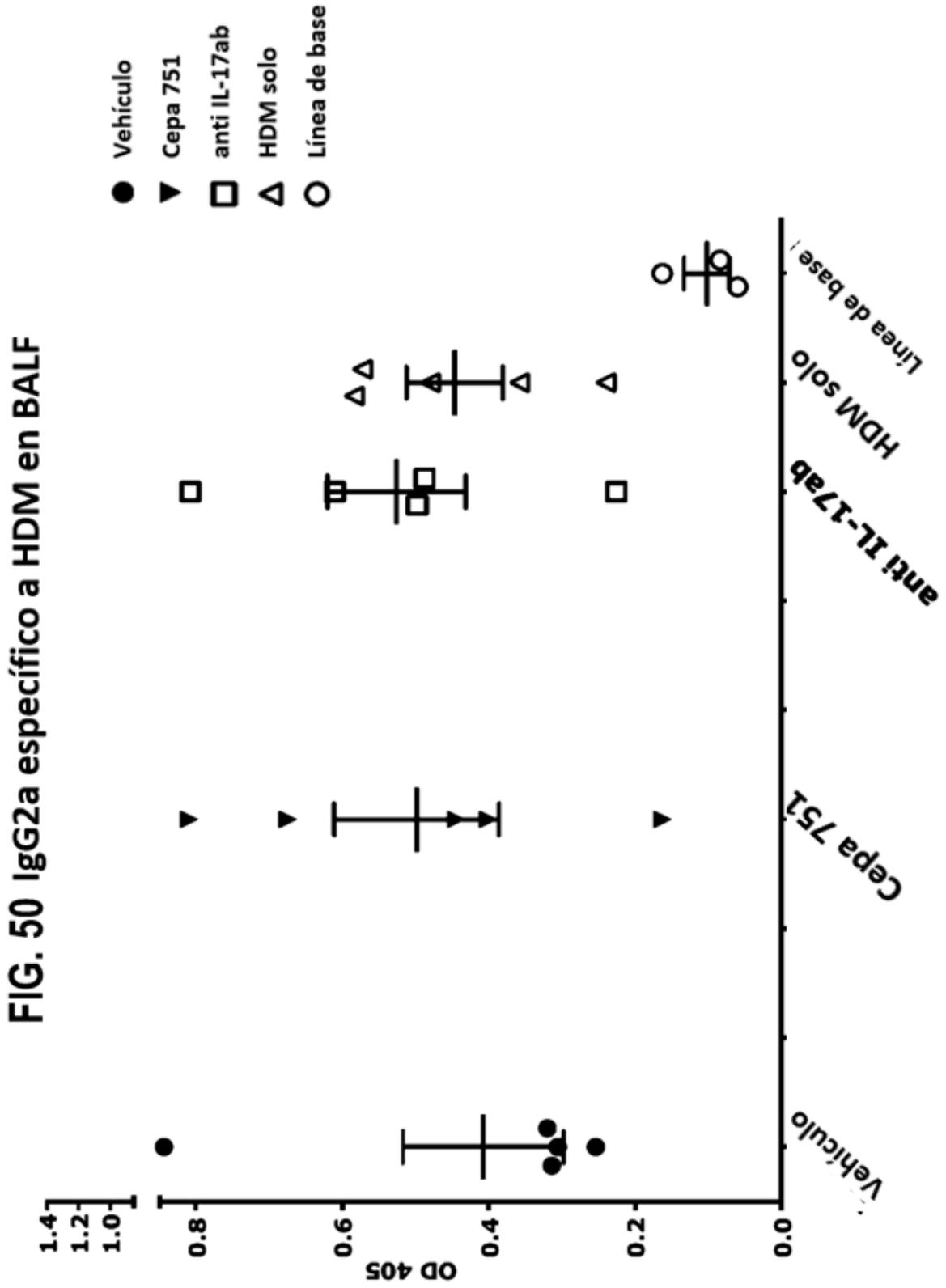


FIG. 49 IgG1 específico a HDM en BALF





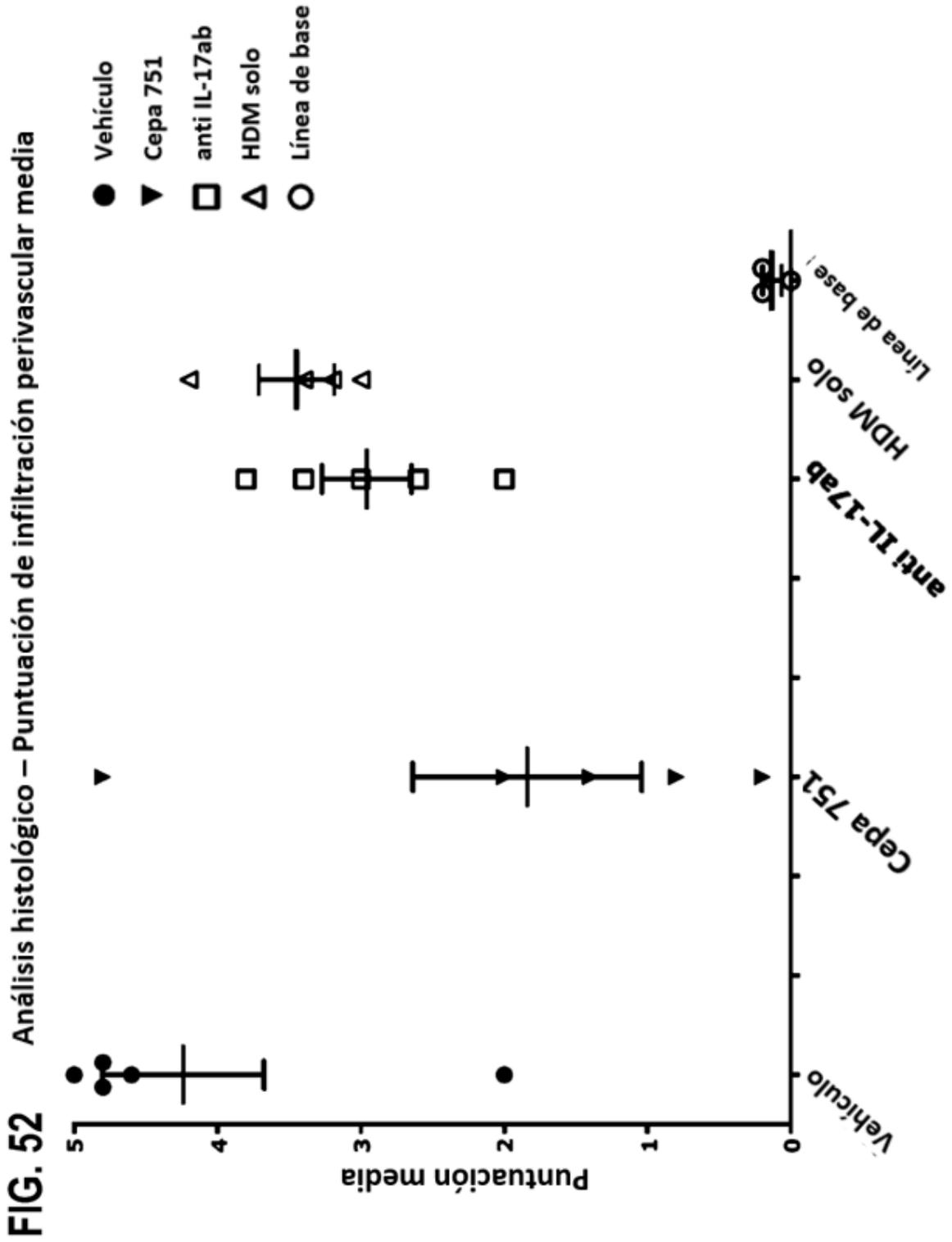


FIG. 53 Análisis histológico – Puntuación inflamatoria media (promedio de puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)

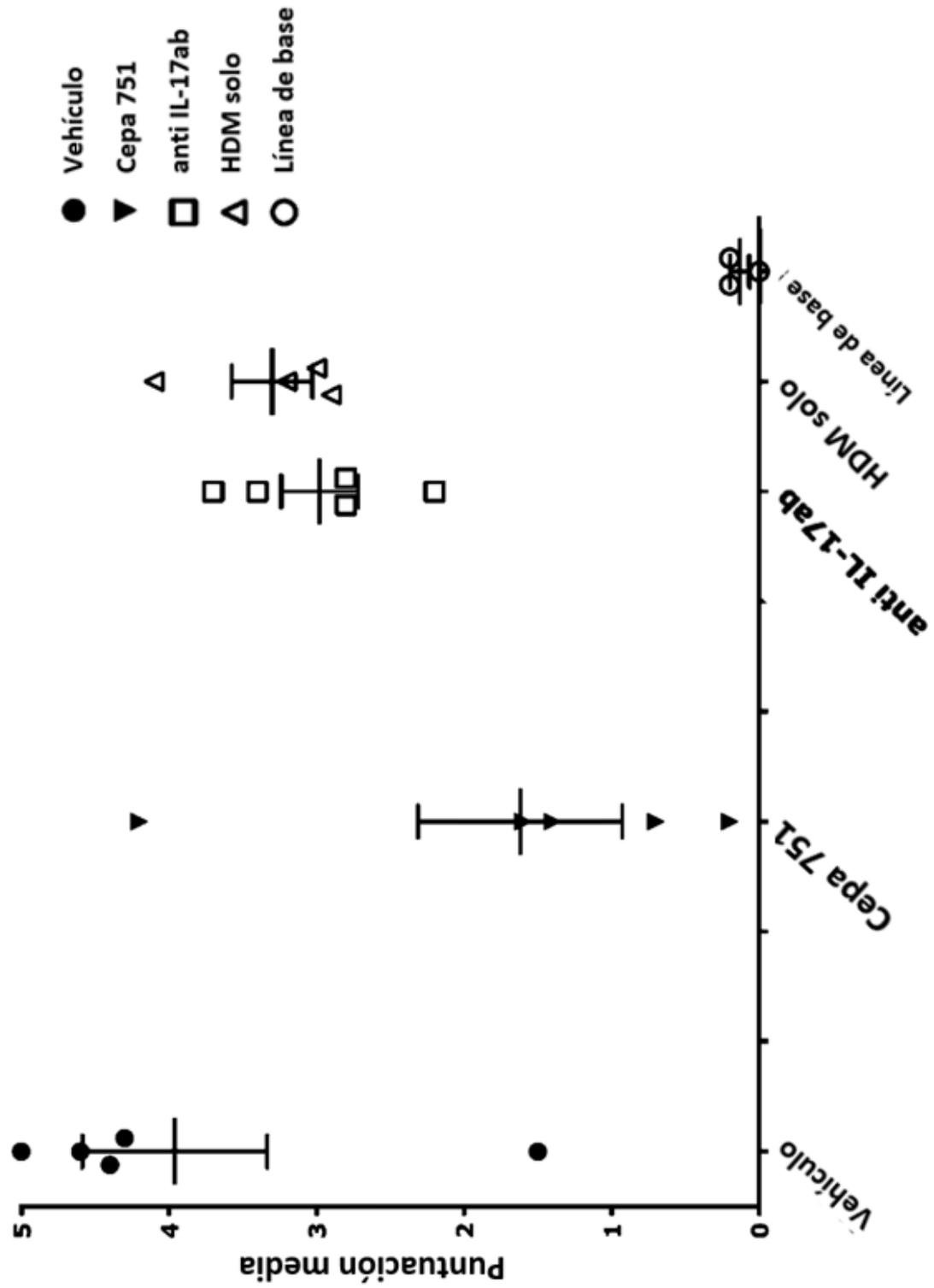


FIG. 54
Nivel de TNFa en tejido pulmonar

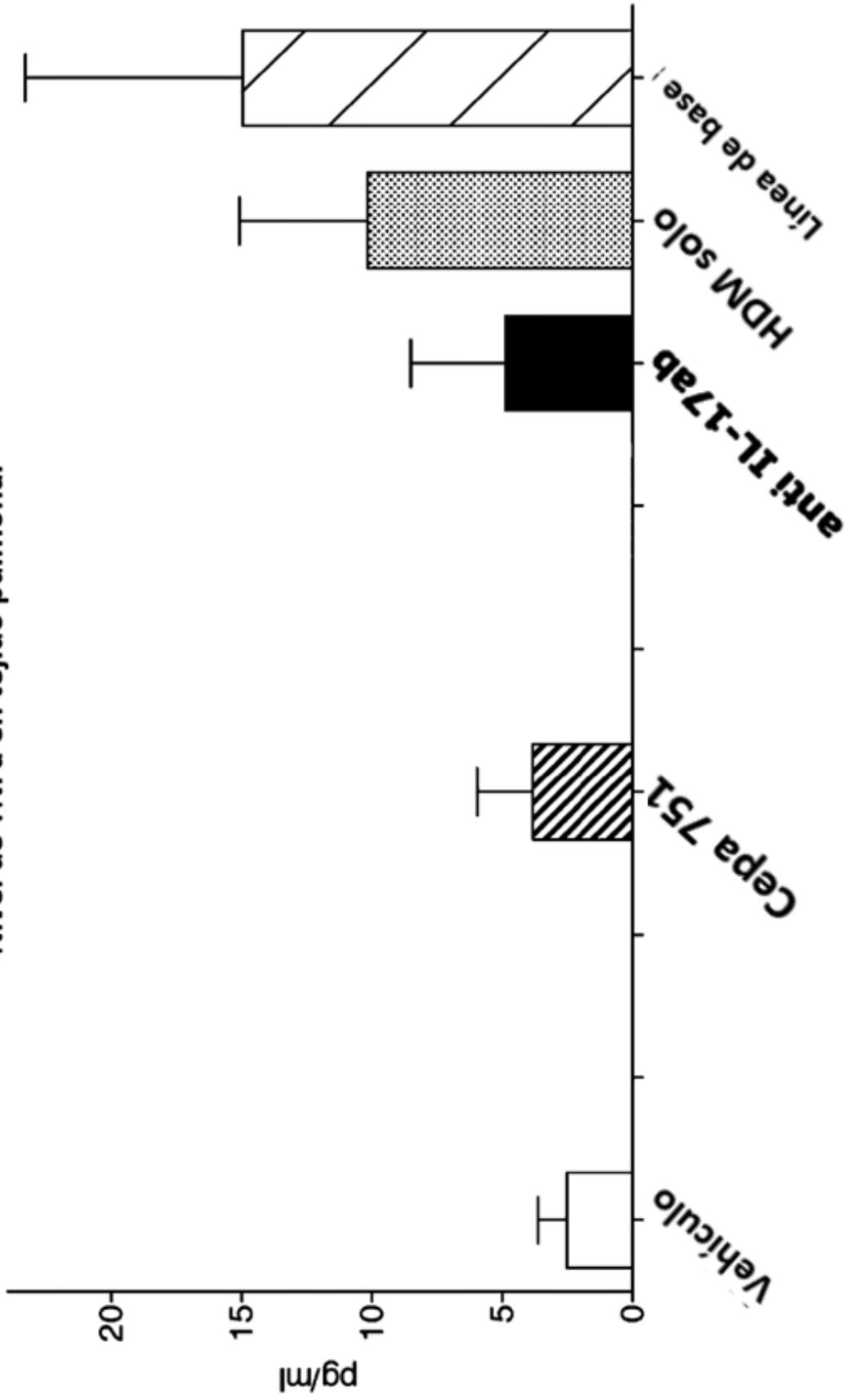


FIG. 55
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

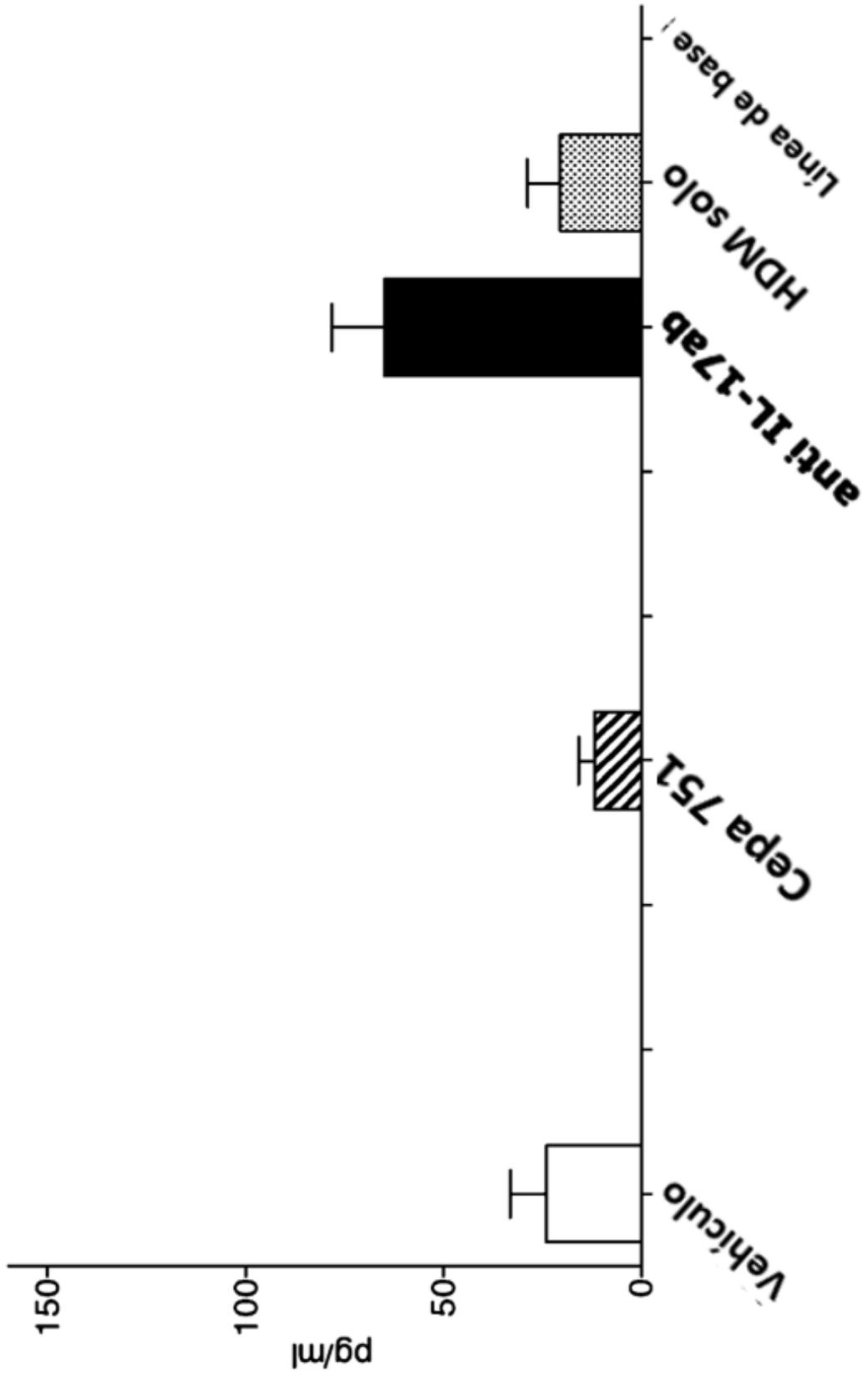


FIG. 56
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

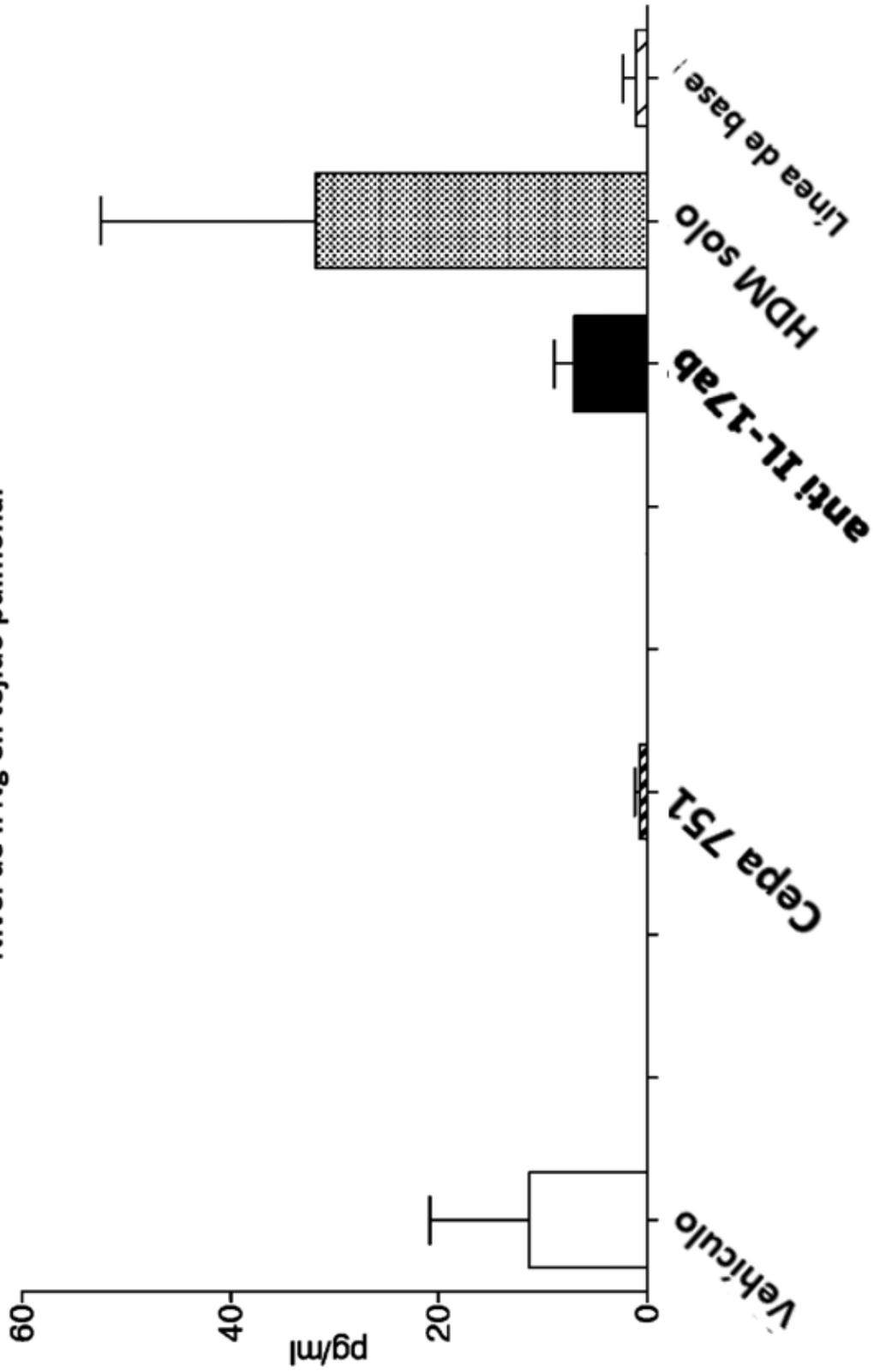


FIG. 57
Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

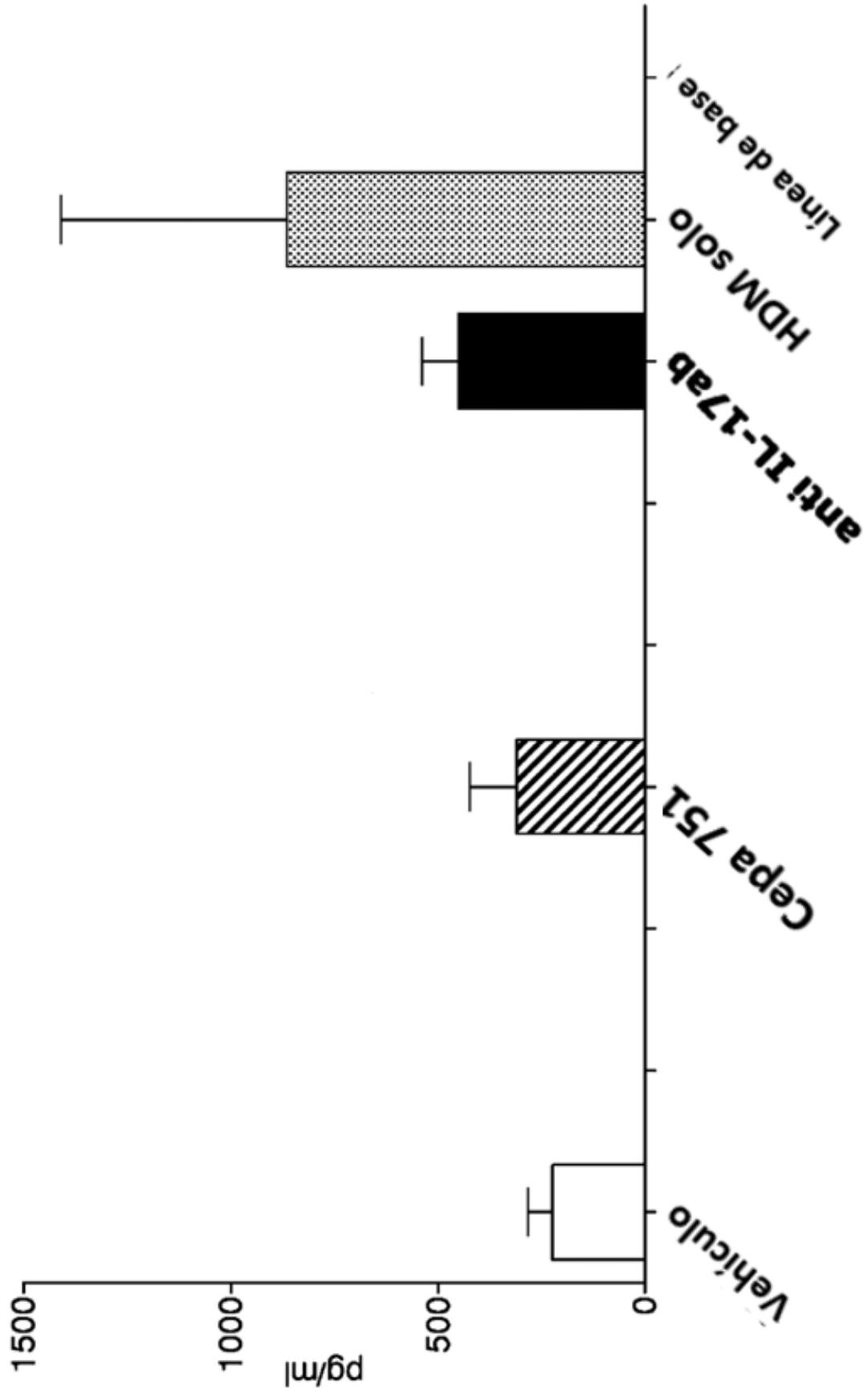


FIG. 58

Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

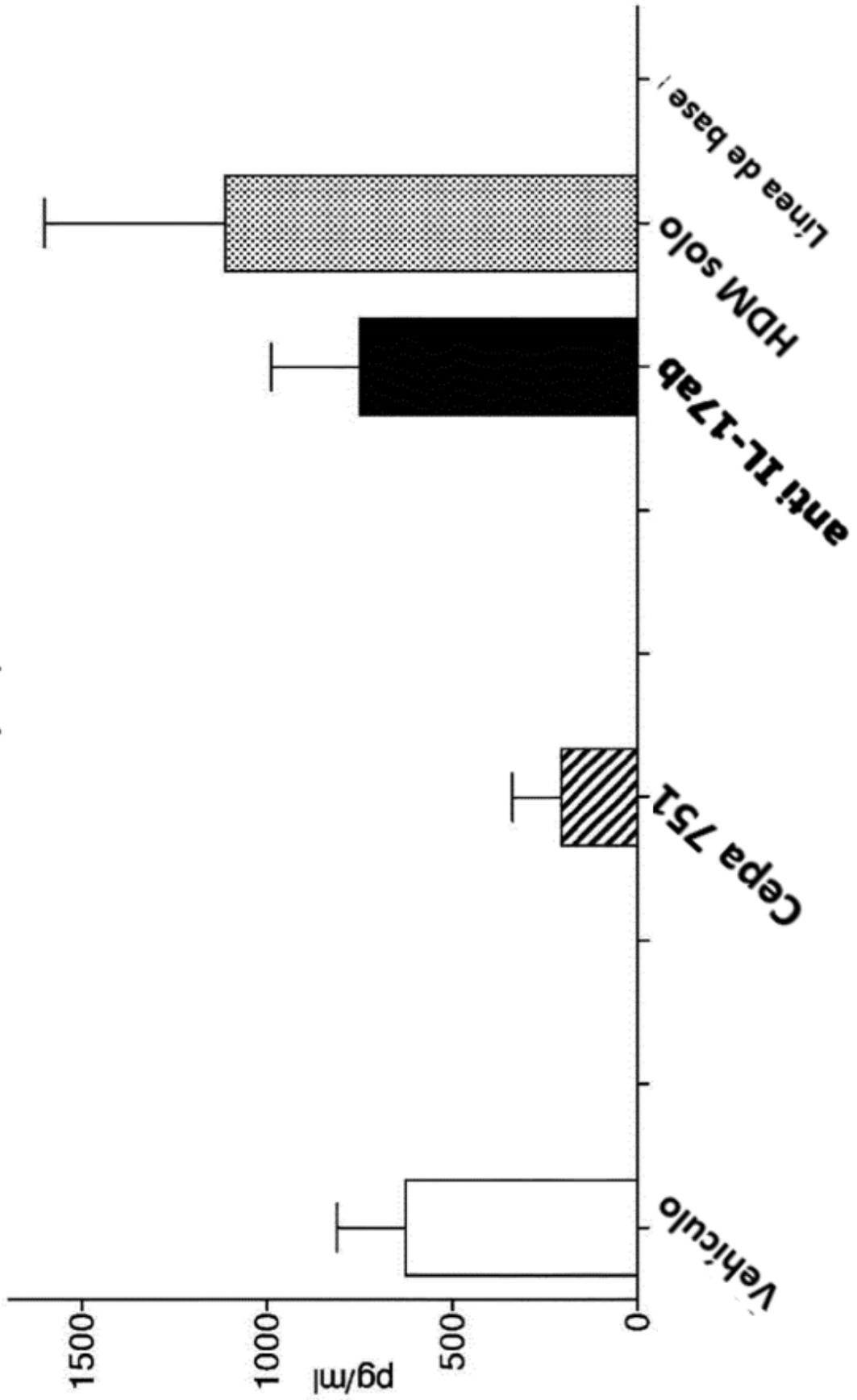


FIG. 59
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

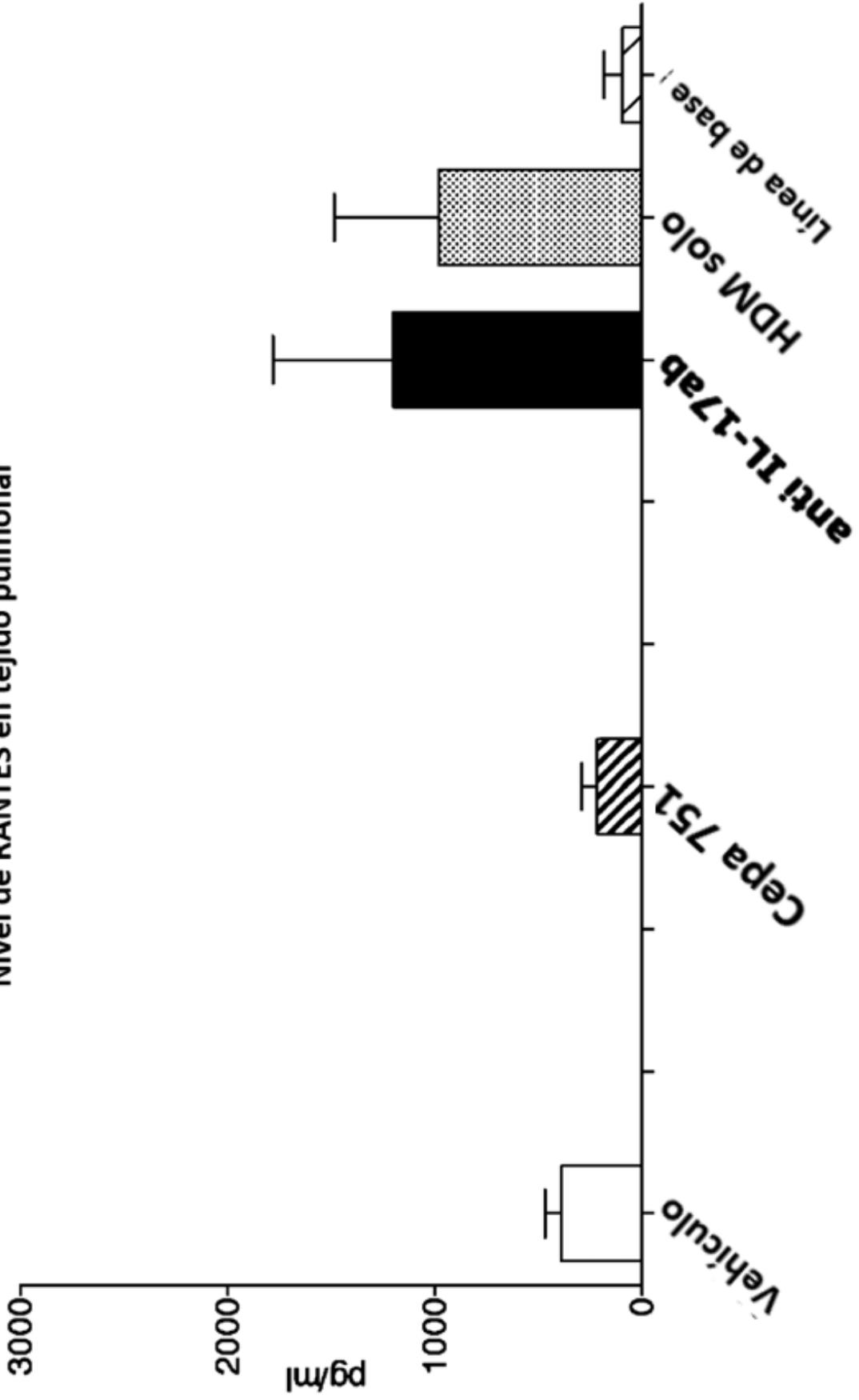


FIG. 60
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

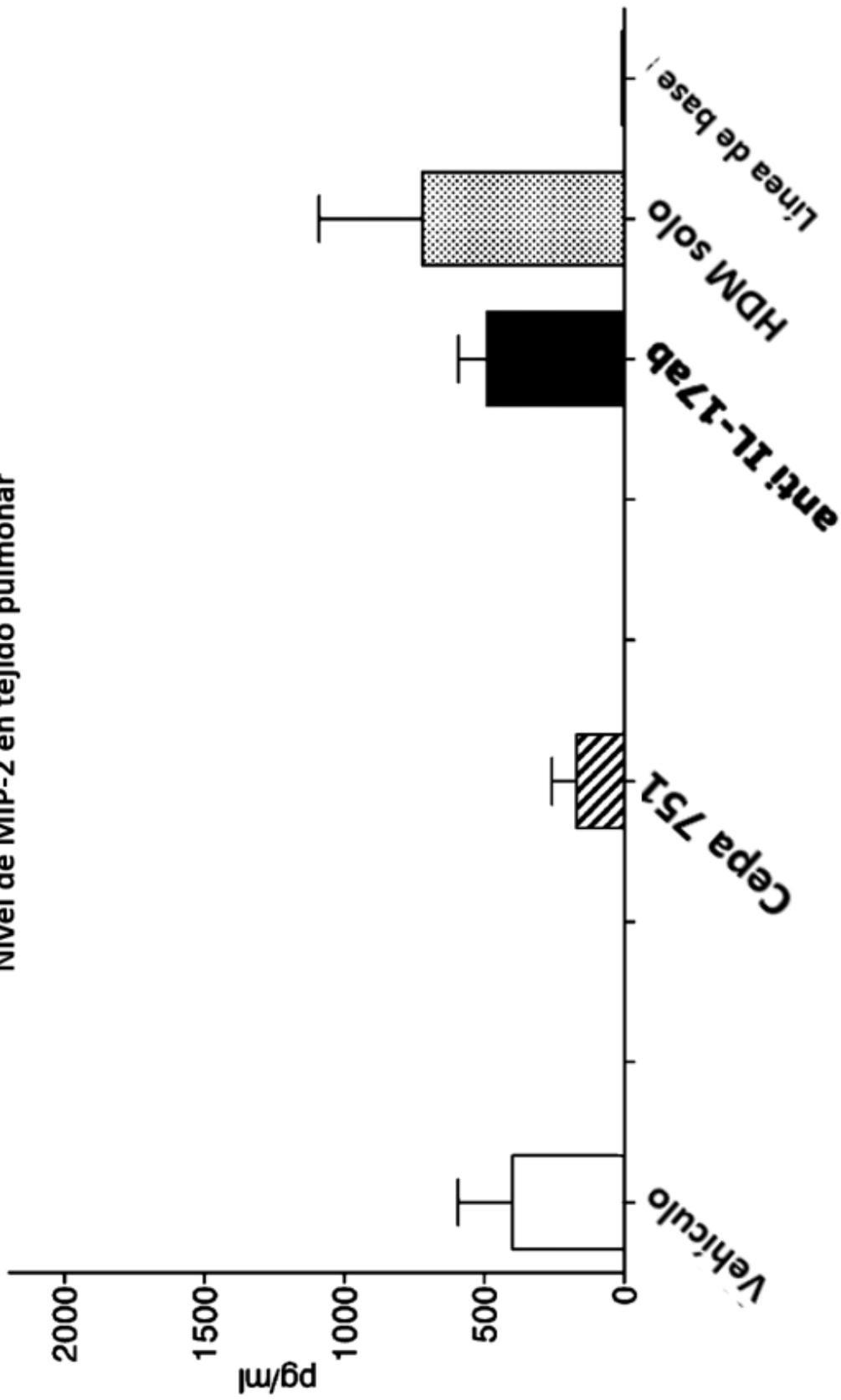


FIG. 61
Nivel de KC en tejido pulmonar

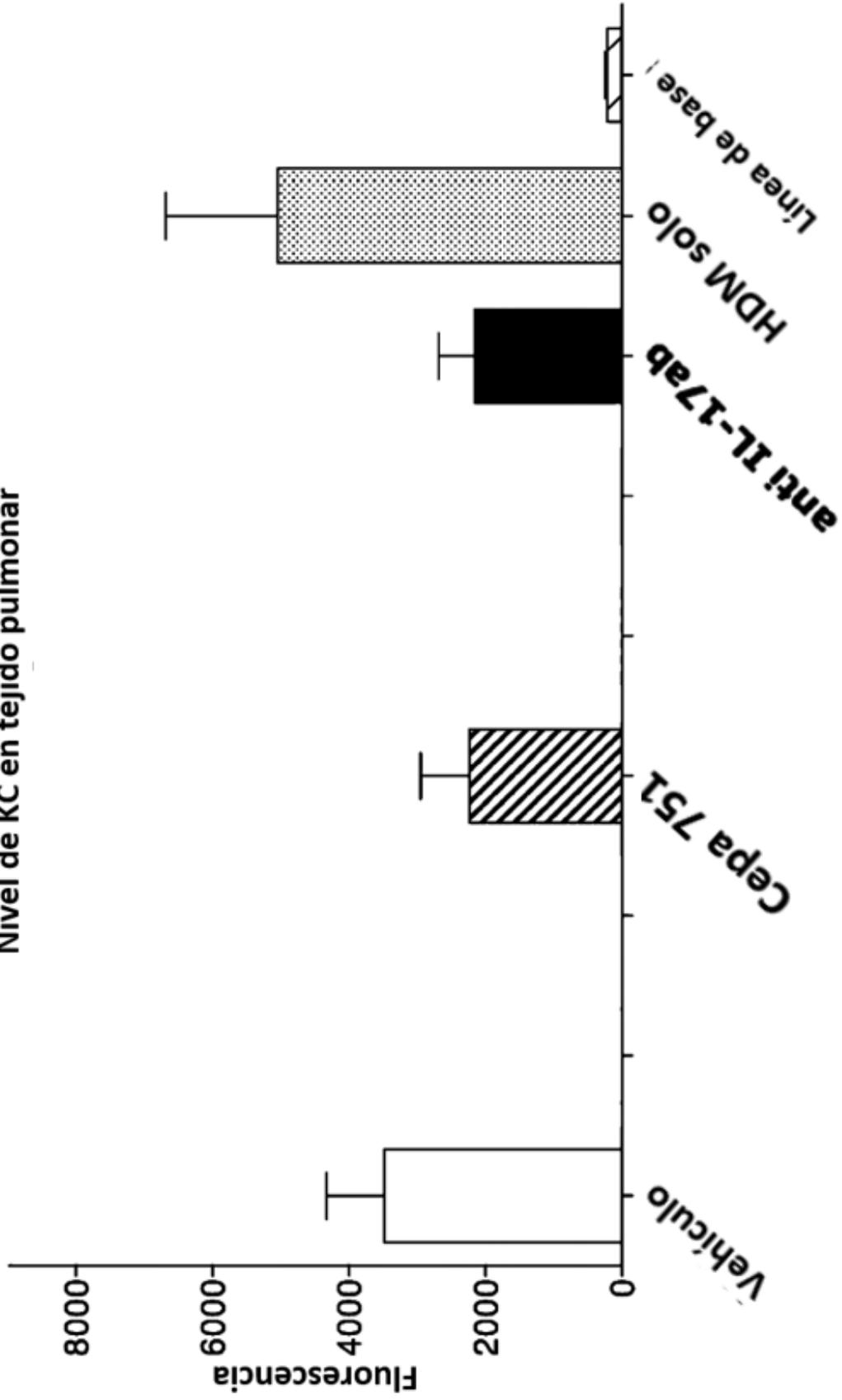


FIG. 62

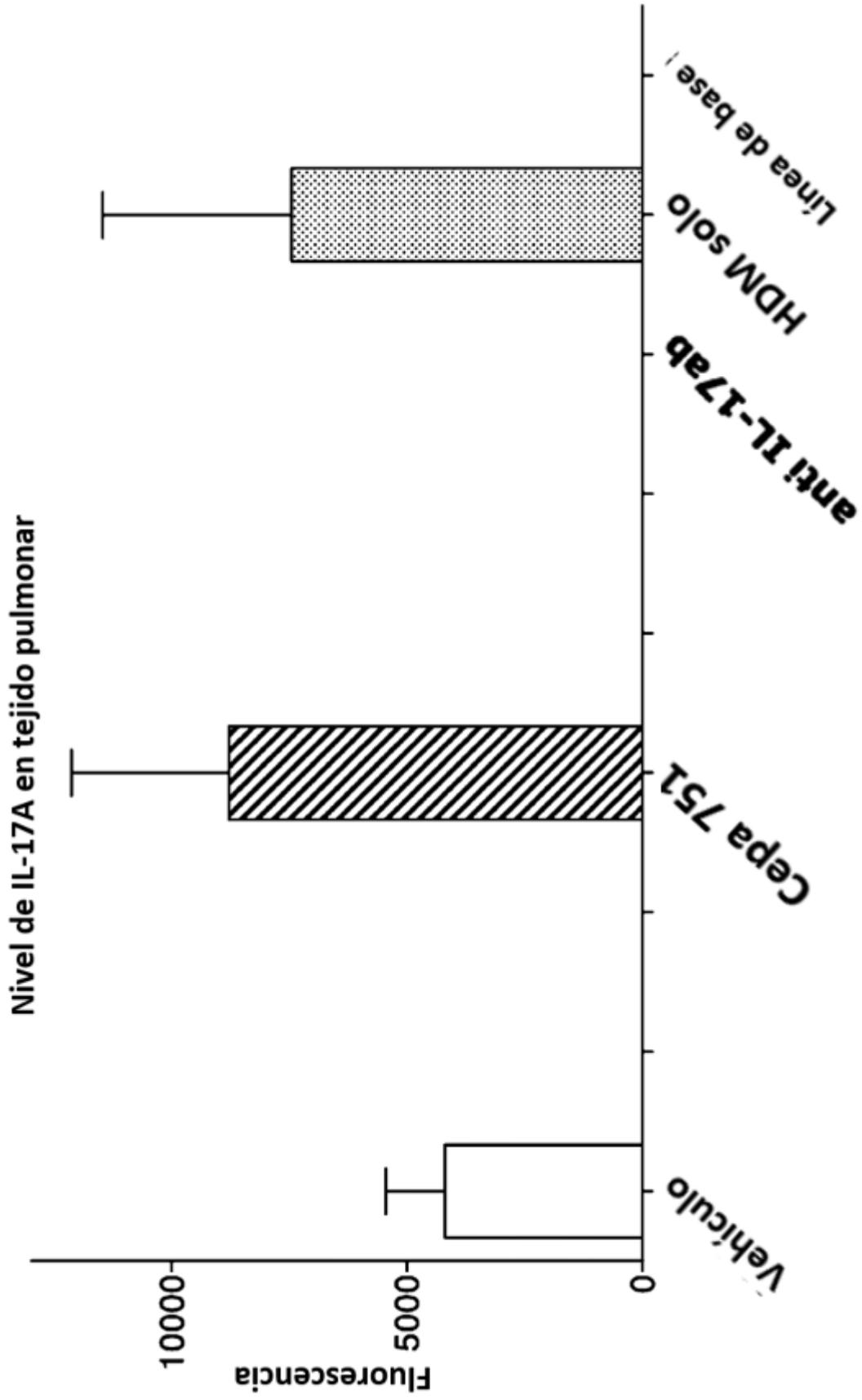


FIG. 63
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

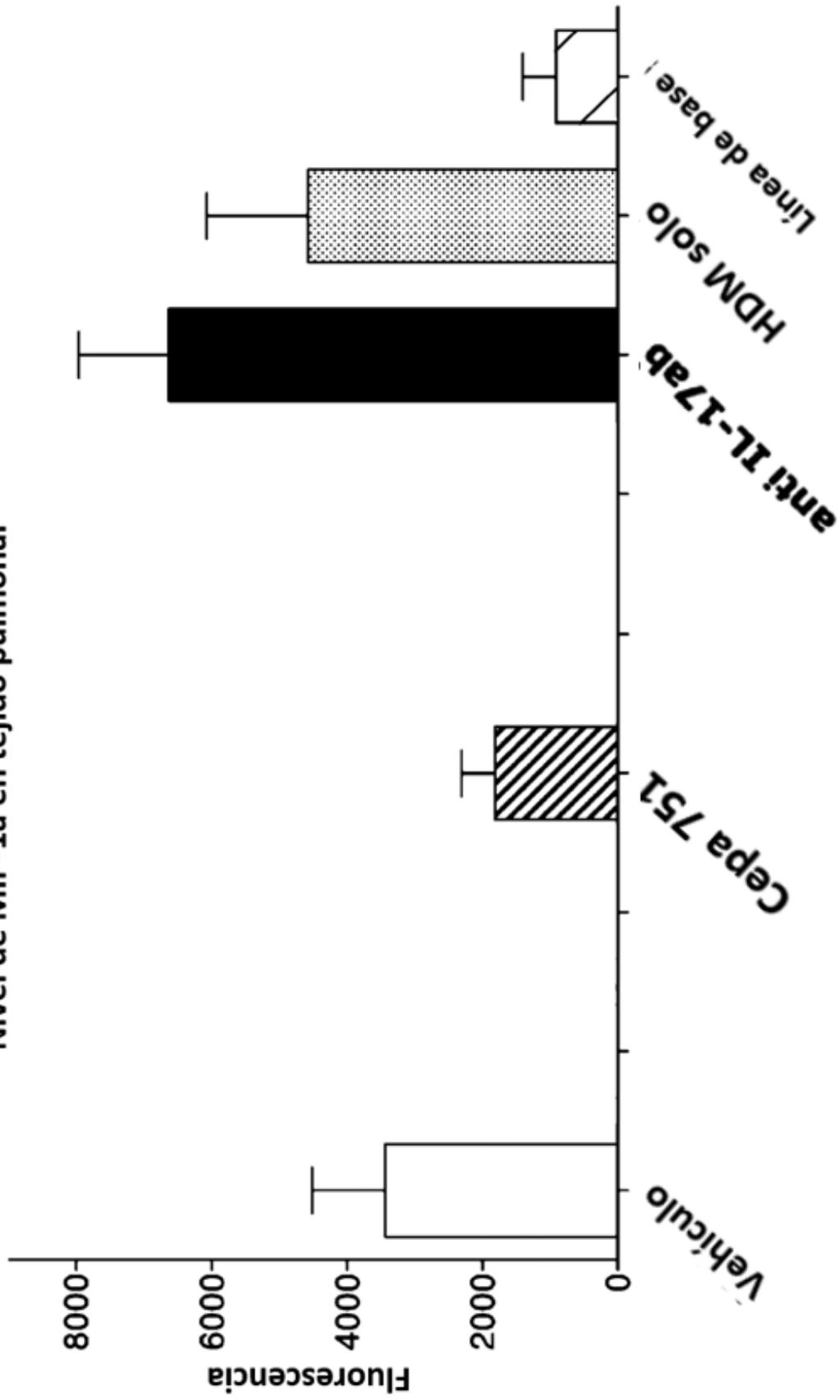


FIG. 64
Nivel de IL-33 en tejido pulmonar

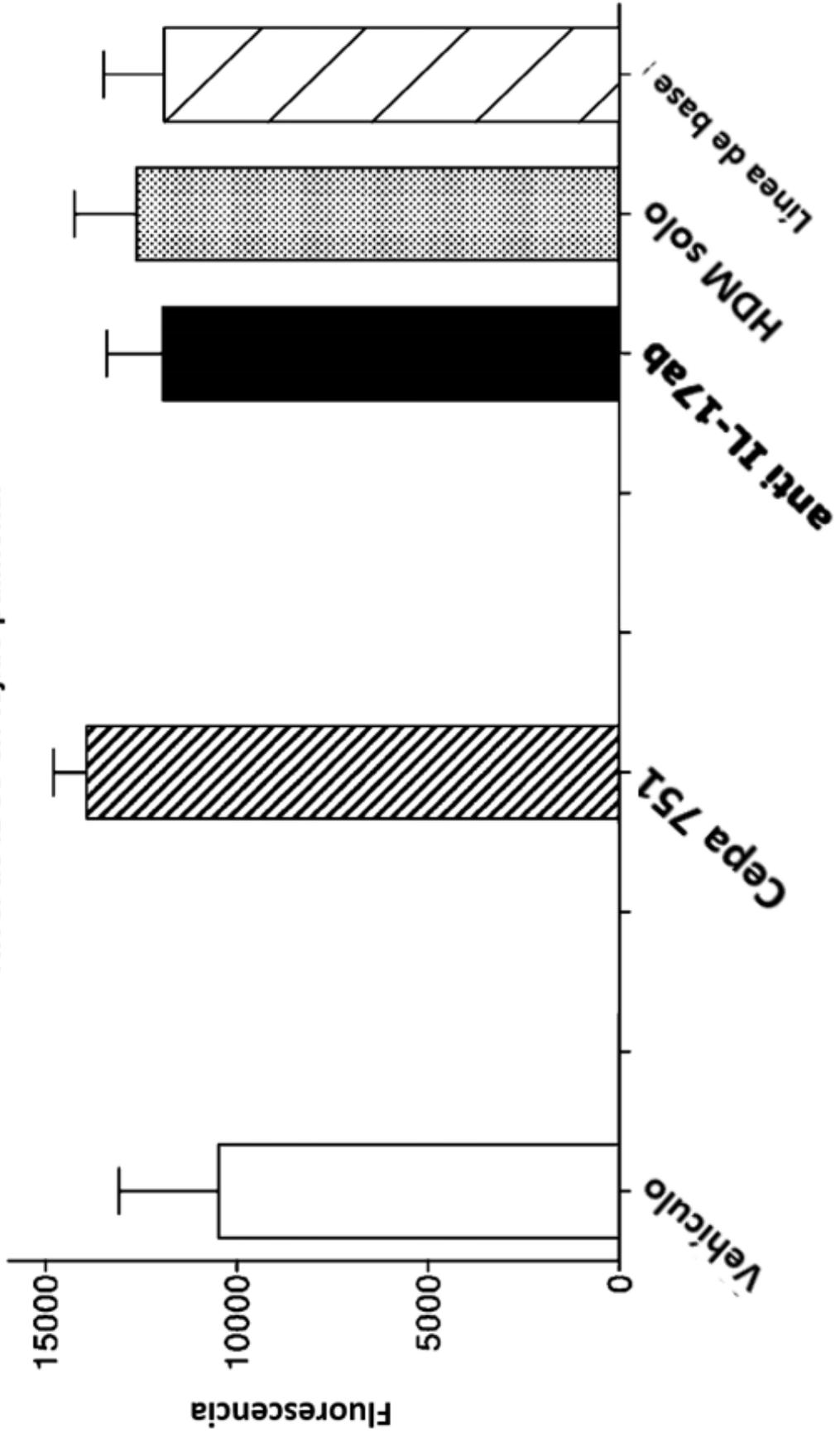
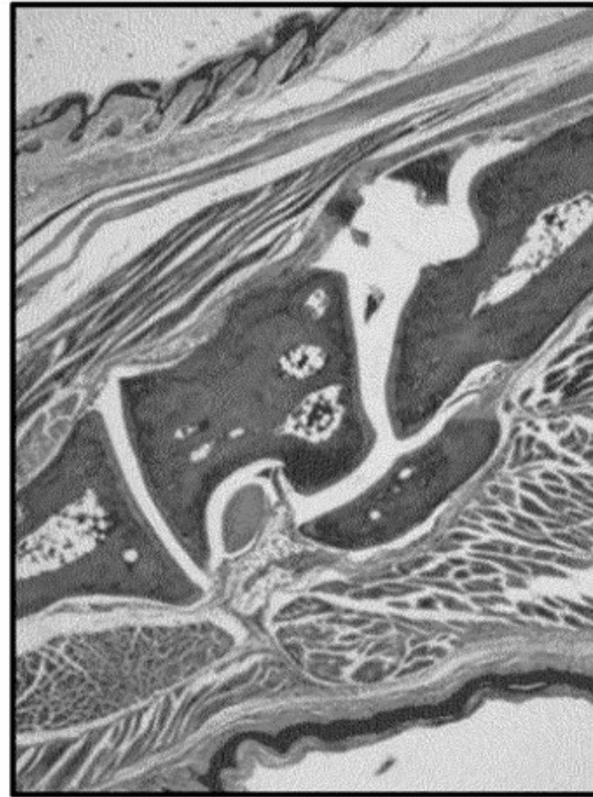
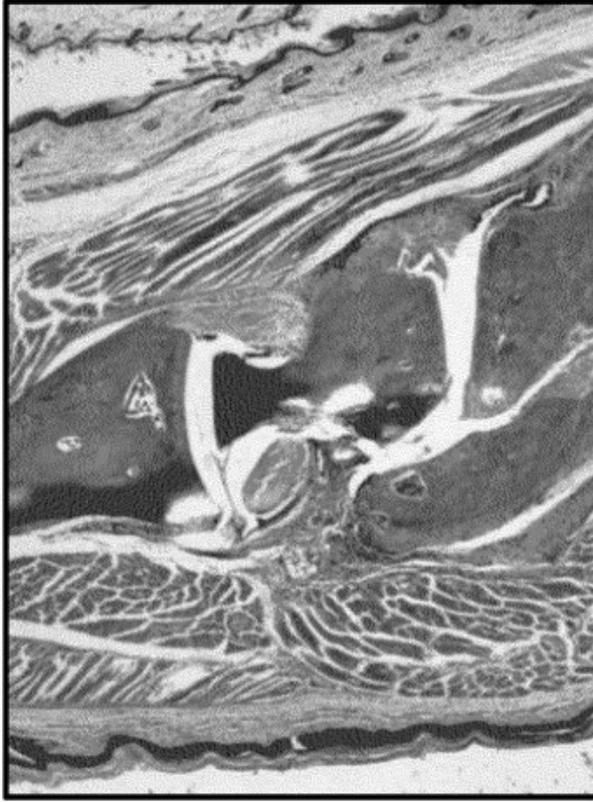


FIG. 65

Plantilla visual para la puntuación de histopatología

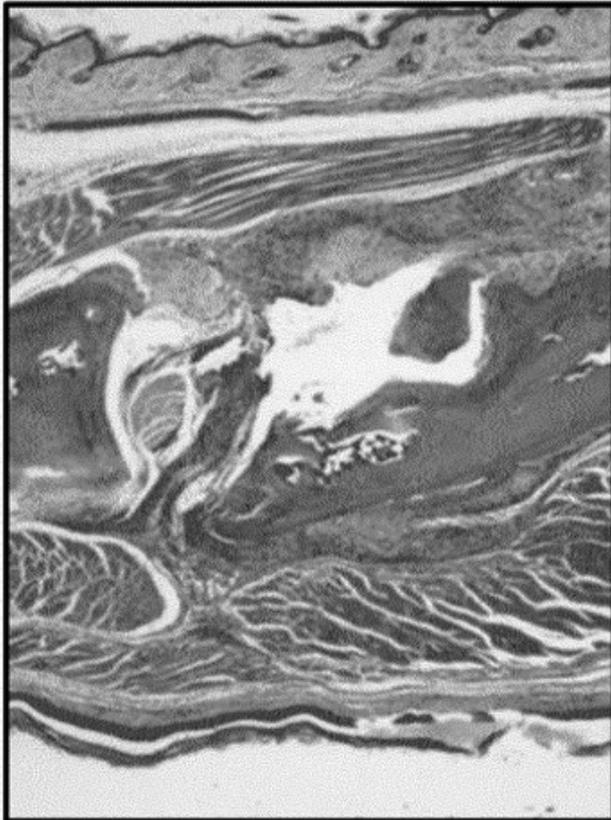


Grado 0

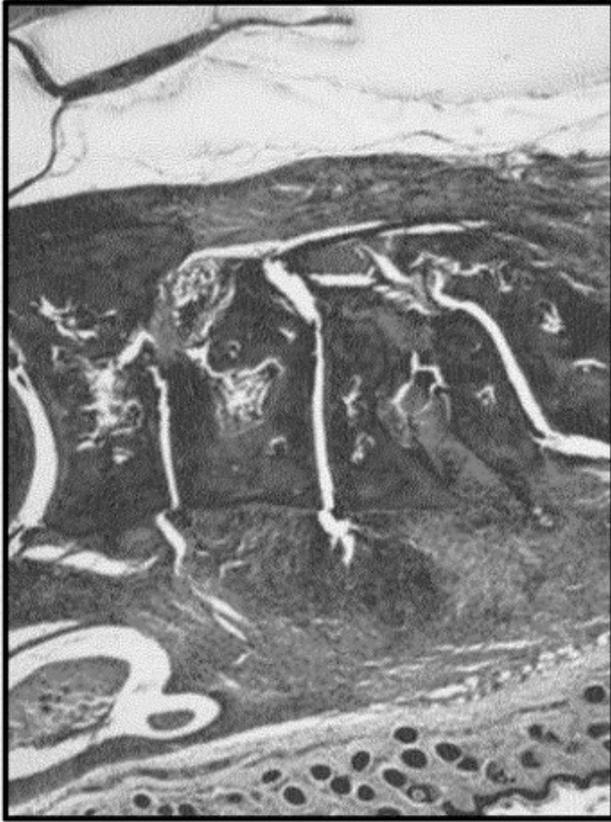


Grado 1

FIG. 65(contd.)



Grado 4



Grado 7

FIG. 66

Puntuación de histopatología: inflamación

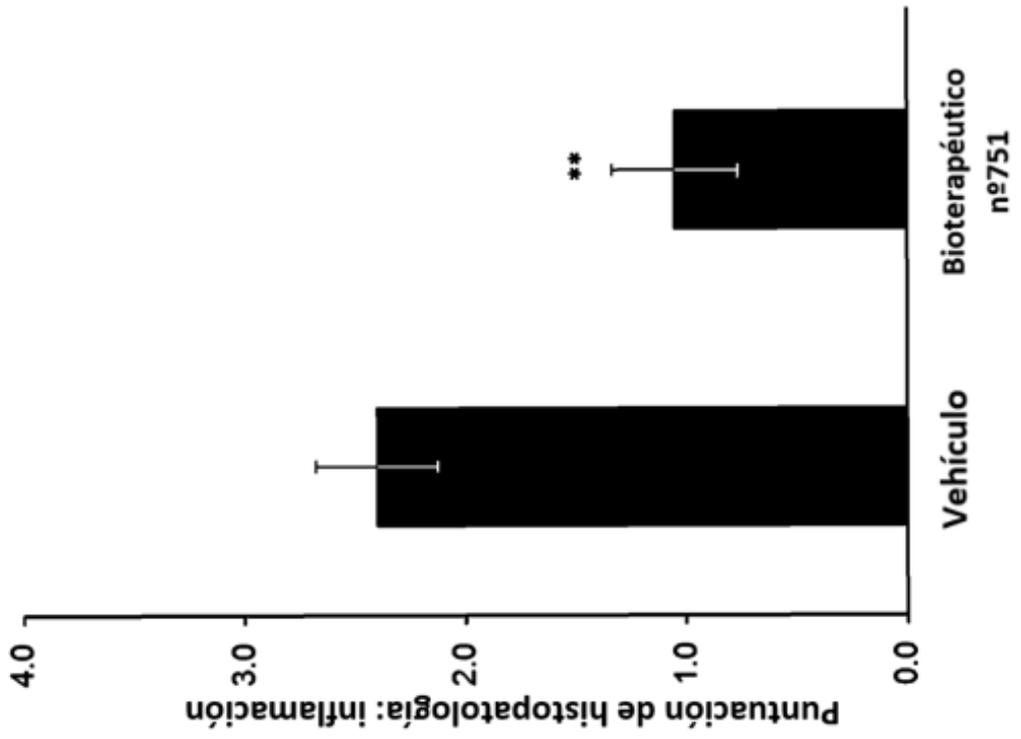


FIG. 67

Puntuación de histopatología: cartílago

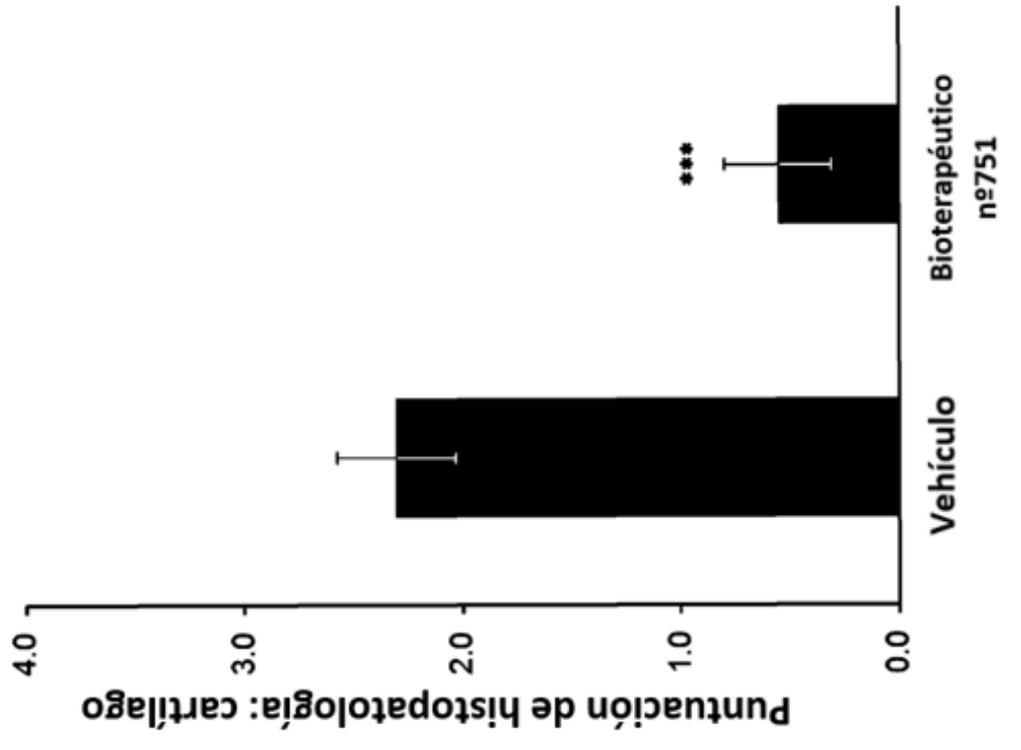


FIG. 68

Puntuaciones Histopatología: Hueso

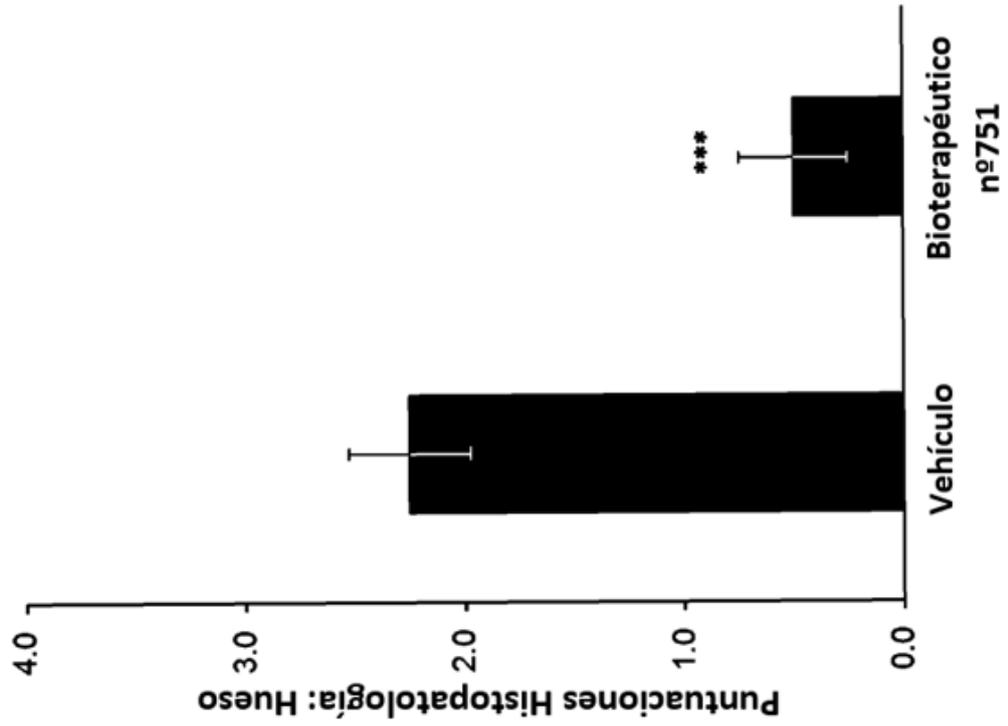


FIG. 69

Puntuaciones Histopatología: Total

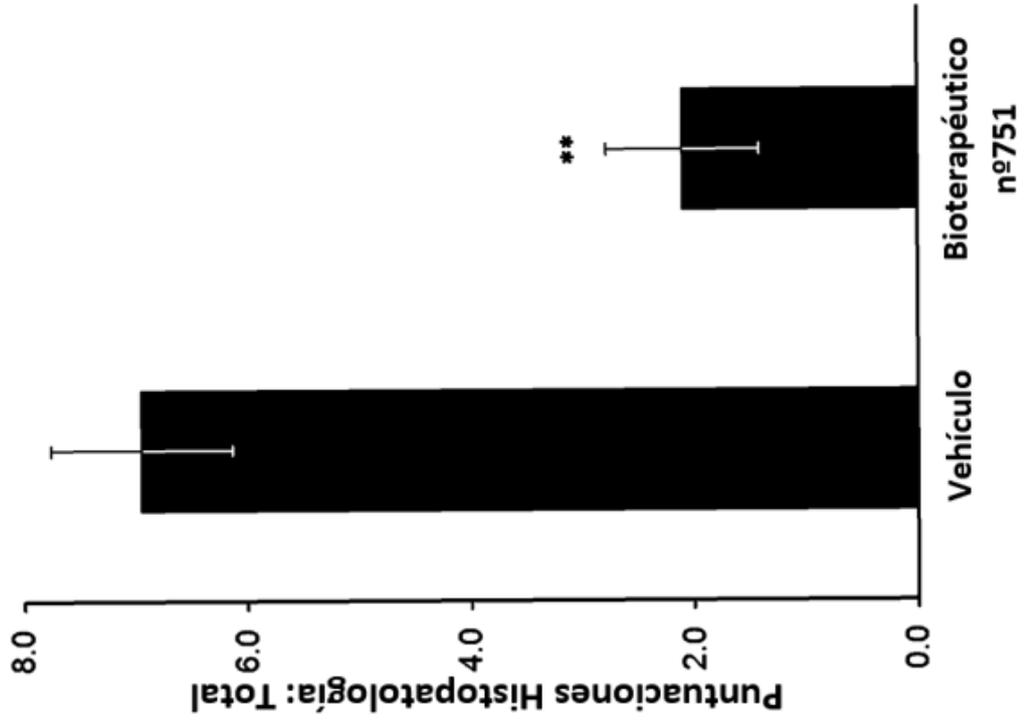
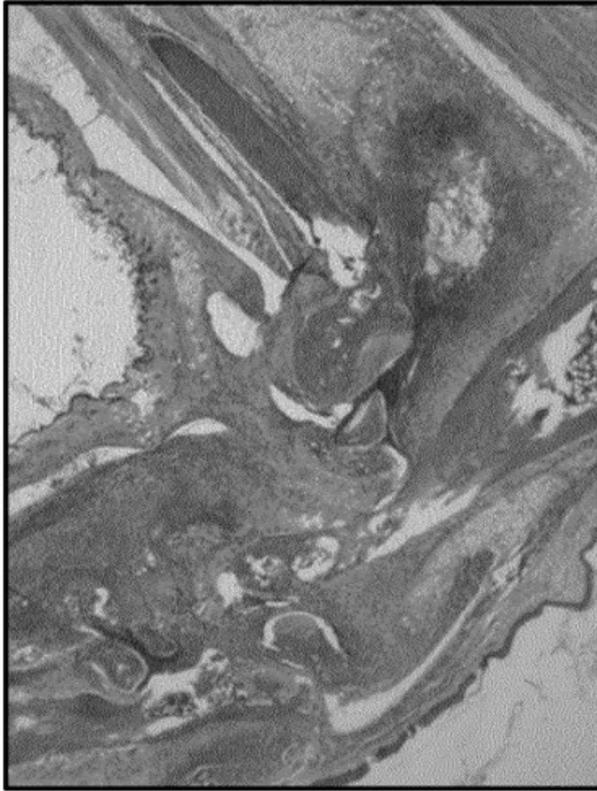
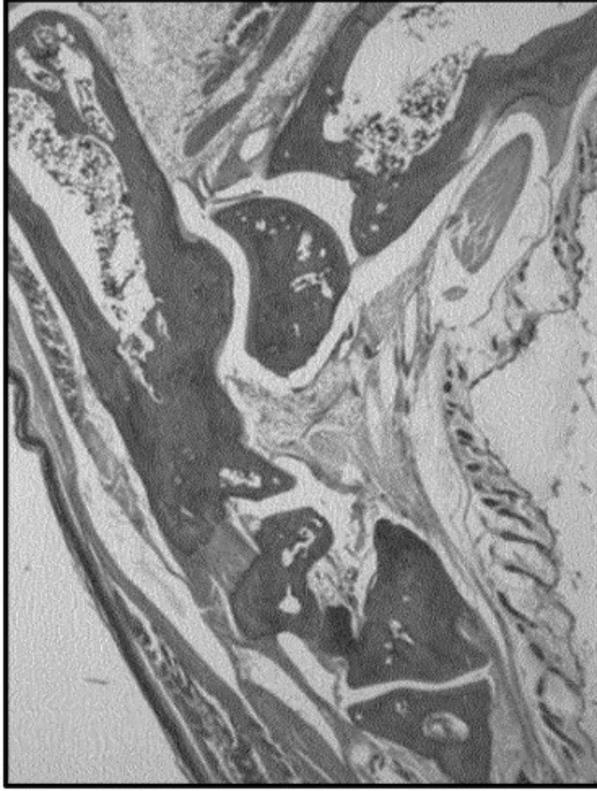


FIG. 70



Vehículo (nº 1.1. 1R, Grado 9)



Cepa nº751 (nº 2.7R, Grado 0)

FIG. 71

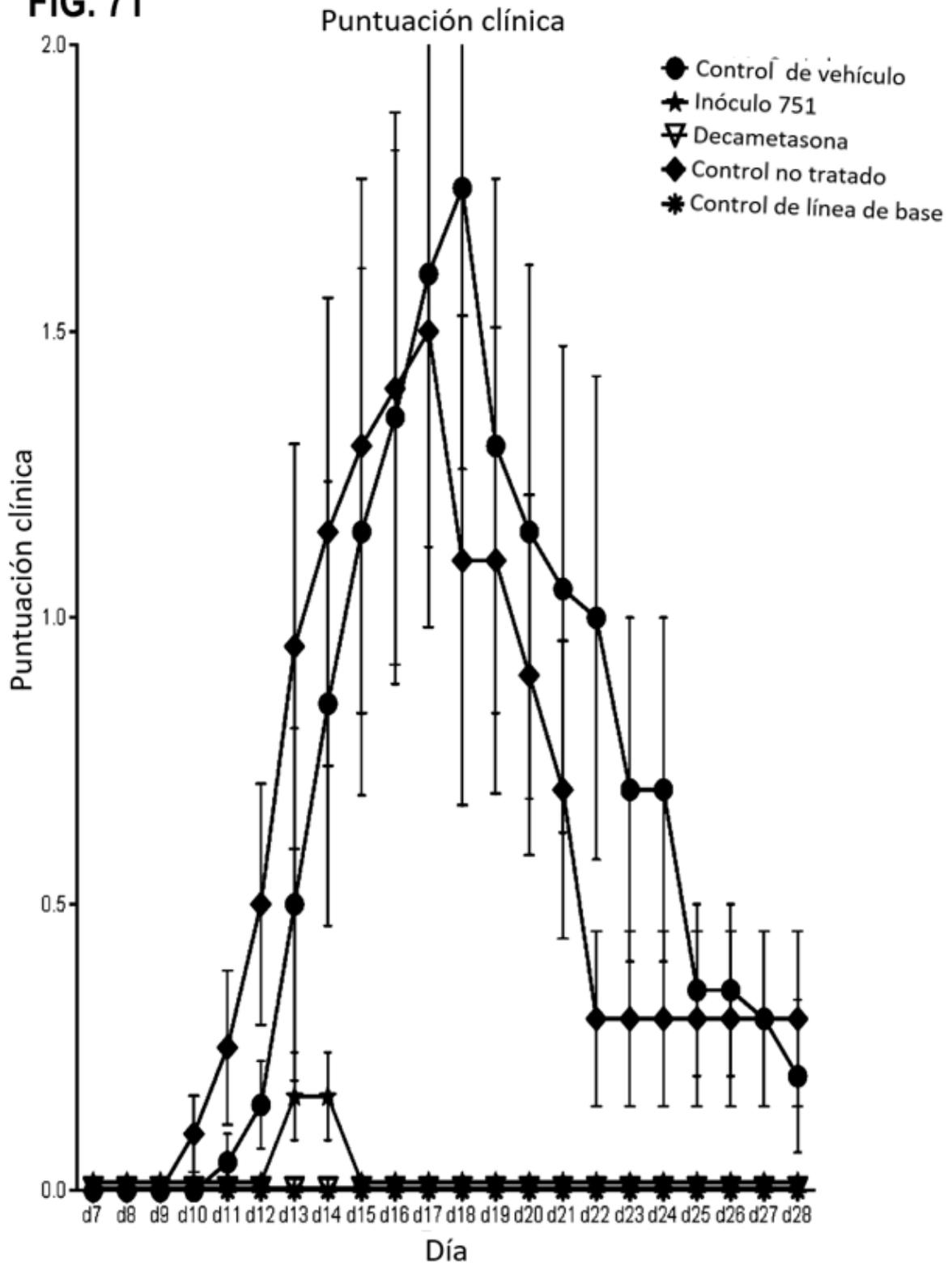
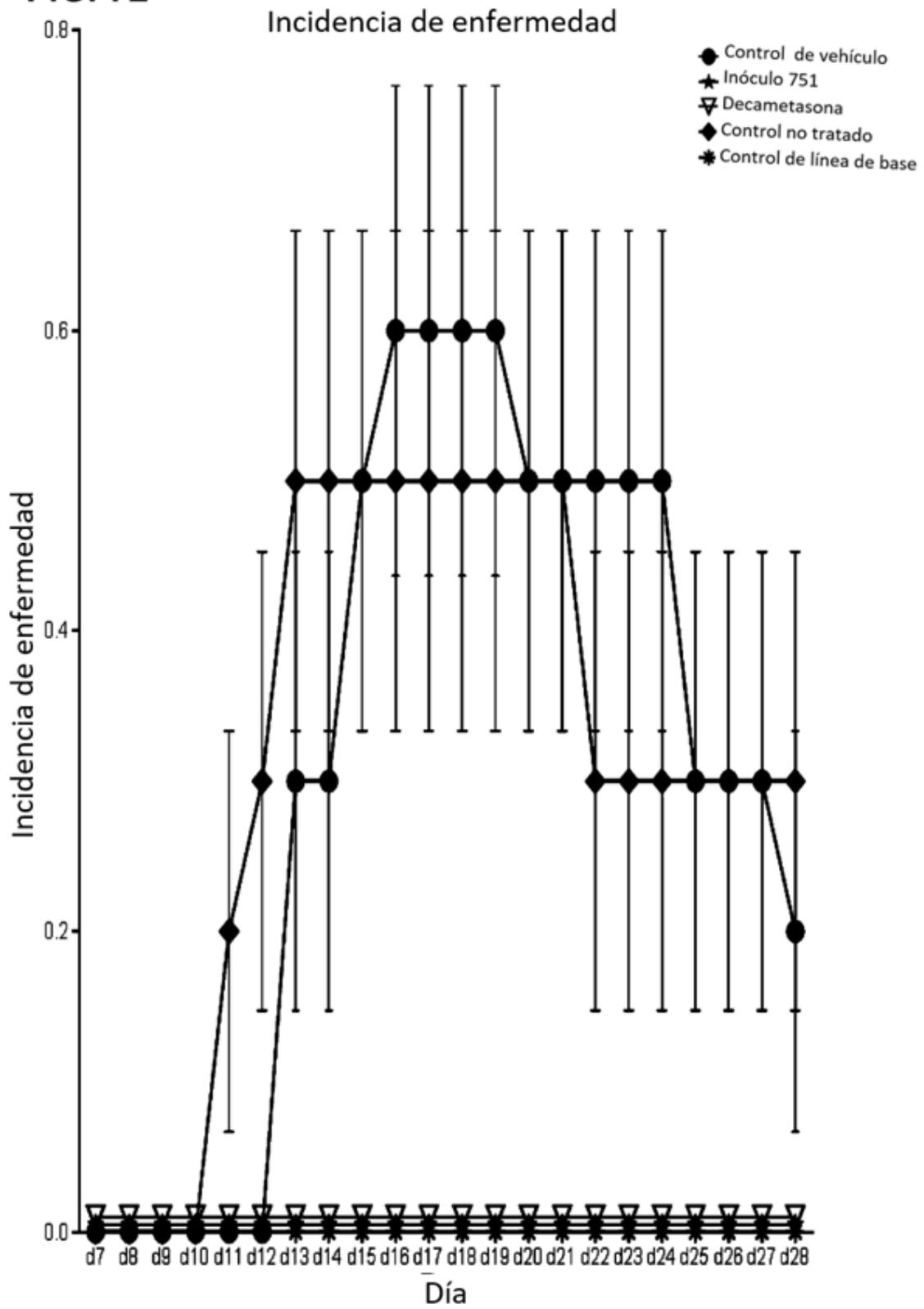


FIG. 72



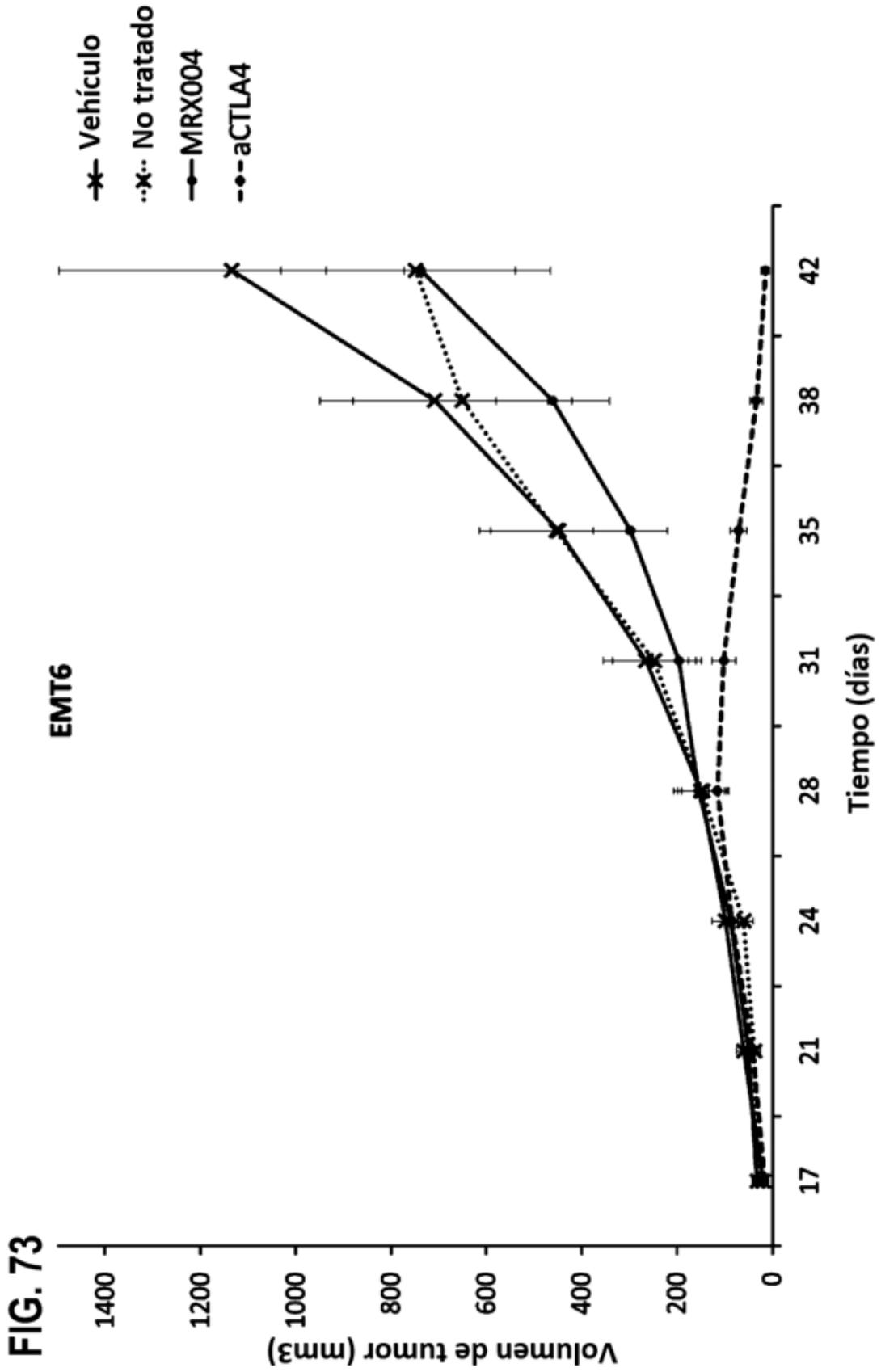


FIG. 74
LLC

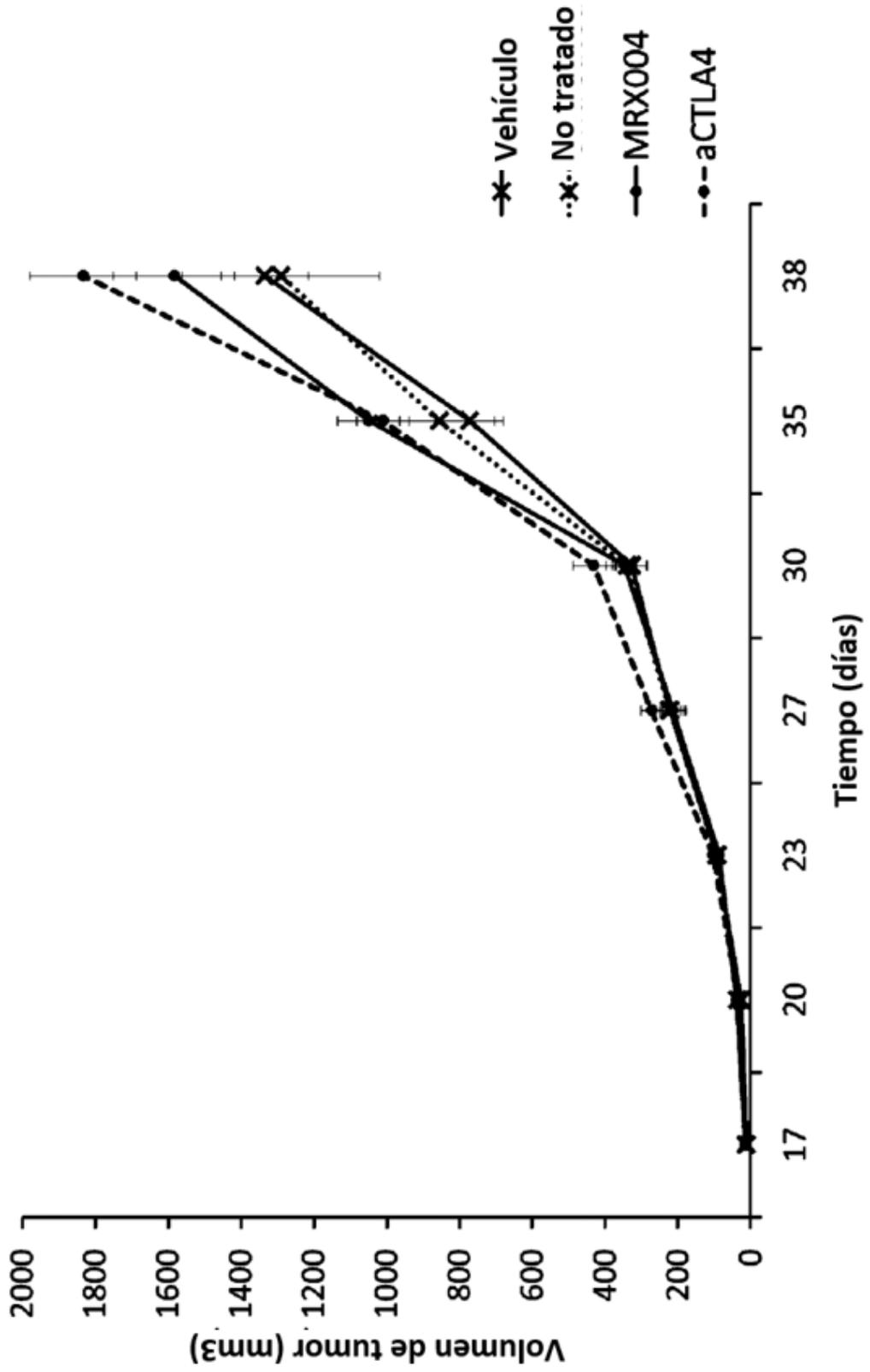
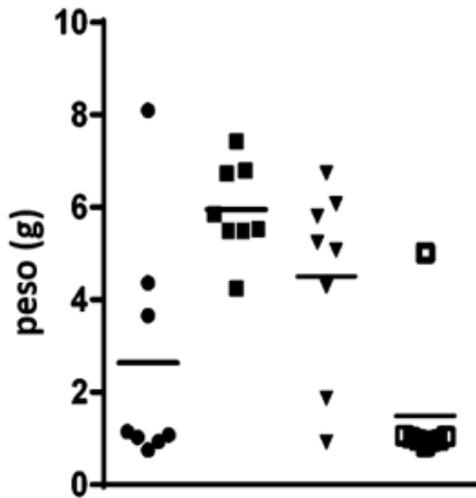


FIG. 75

Pesos de hígado en eutanasia (g)



- G1 no tratado
- G2 vehículo (medios) PO Q1Dx42
- ▼ G4 Cepa bacteriana nº2 (MRX004) 2×10^8 bacteria PO Q1Dx42
- G7 Anti-CTLA4 10 mg/kg IP TWx2

FIG. 76 Adhesión a células humanas
Adhesión en YCFA (2 repeticiones biológicas, normalizadas)

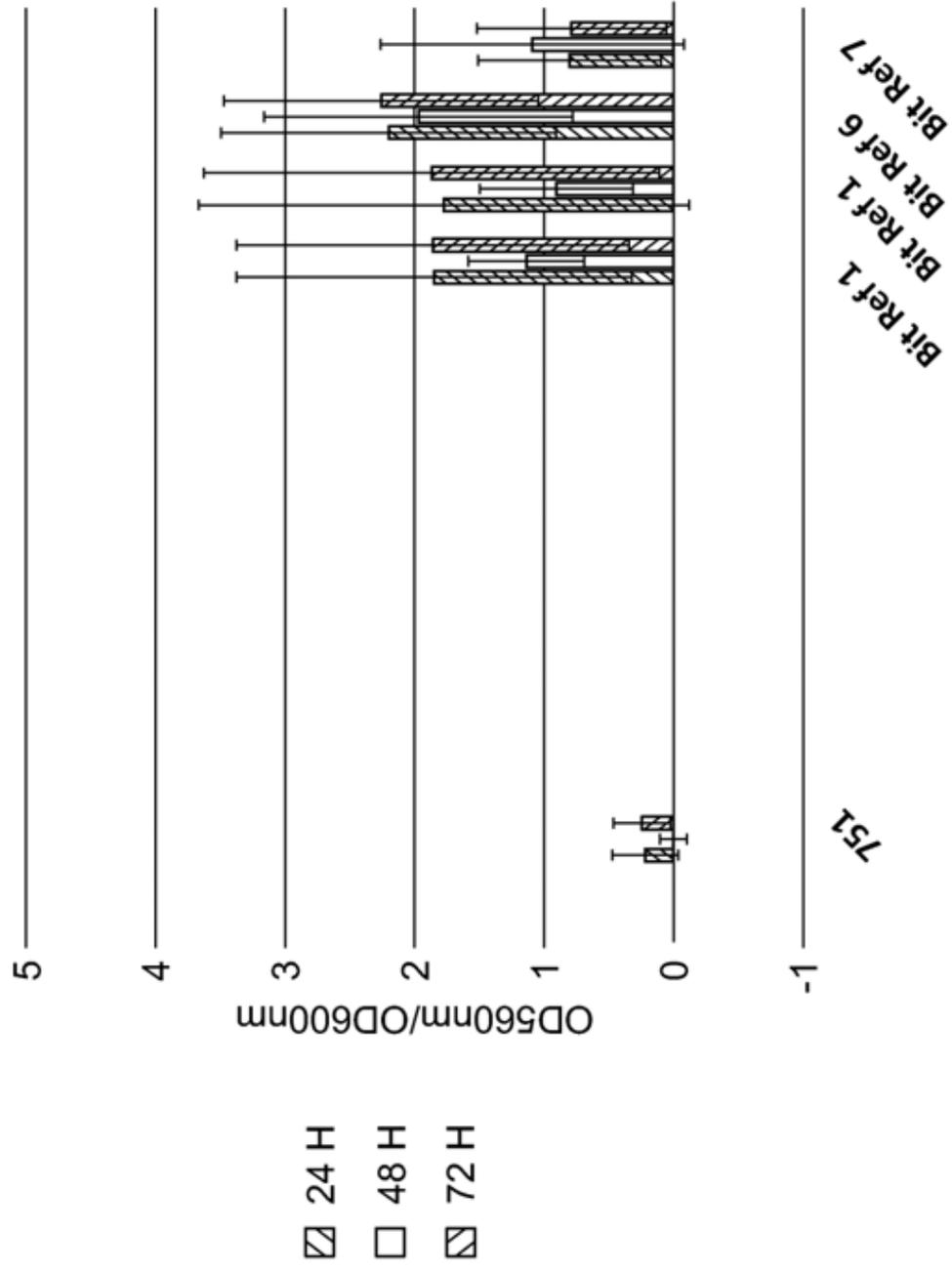


FIG. 76 (contd.) Adhesión a células humanas
Adhesión en YCFA (2 repeticiones biológicas, no normalizadas)

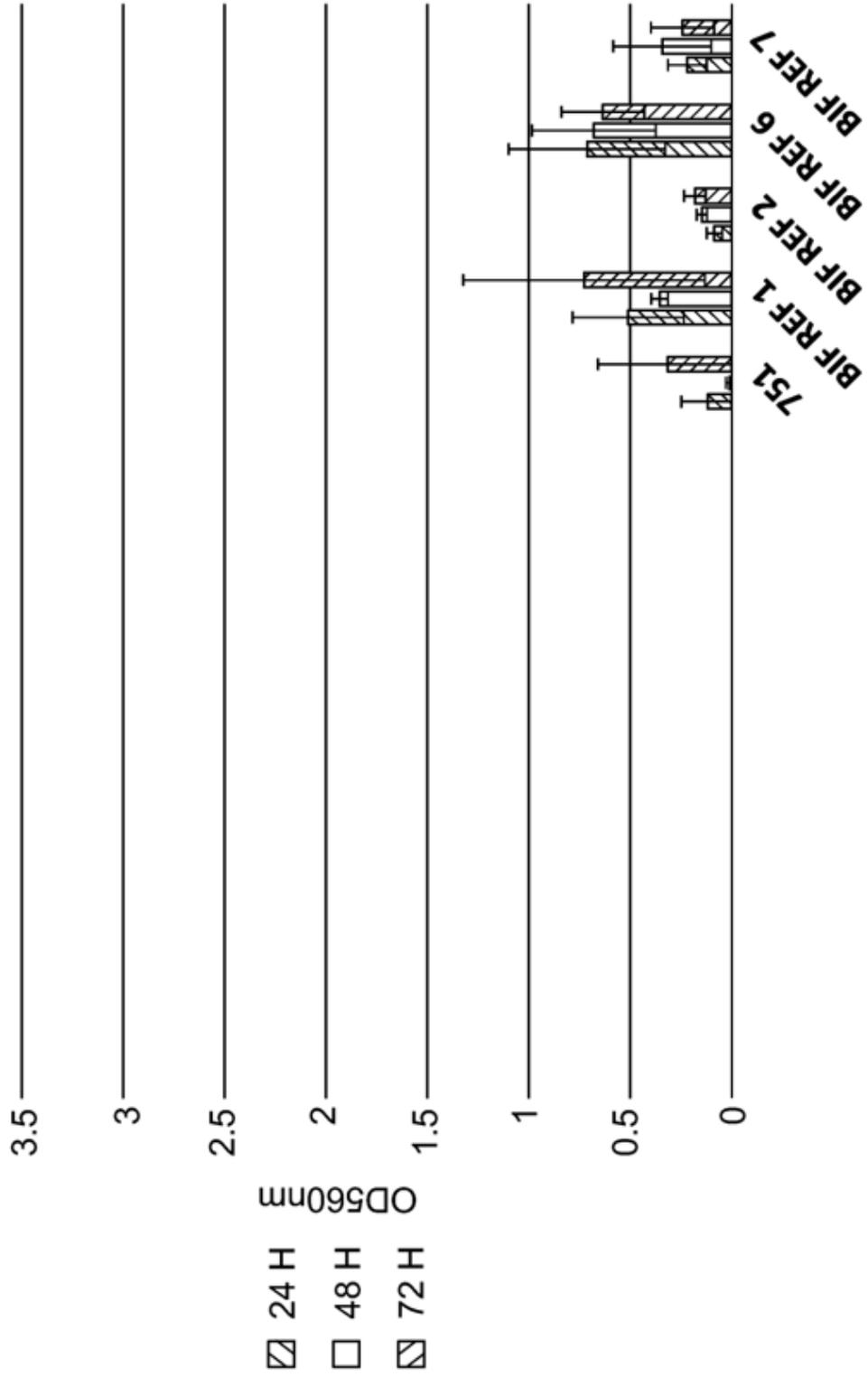


FIG. 77 Producción de EPS enlazada
Producción de EPS enlazada en YCFA (2 repeticiones biológicas, normalizadas)

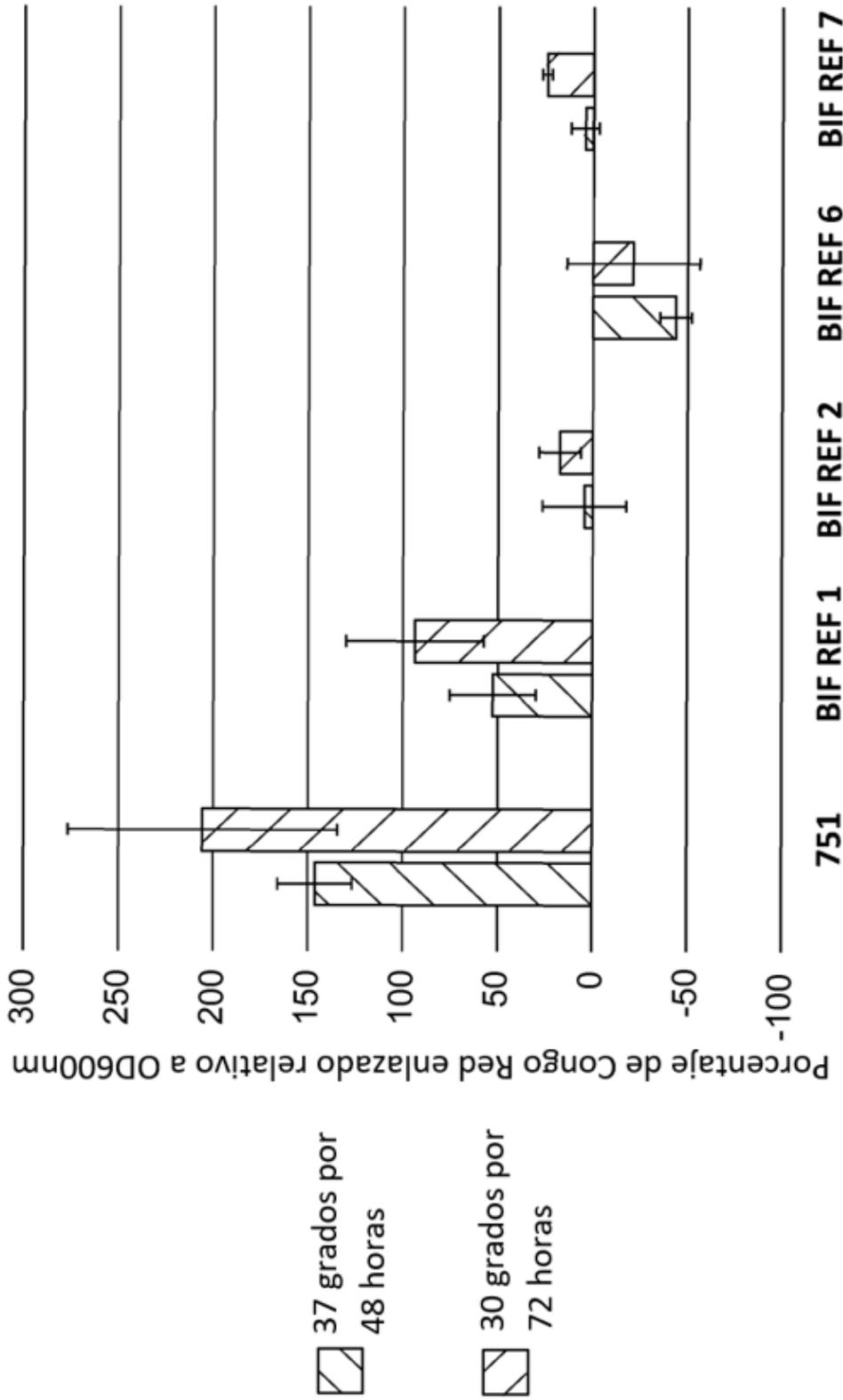


FIG. 77 (contd.) Producción de EPS
Producción de EPS vinculada en YCFA (2 replicaciones biológicas, no normalizadas)

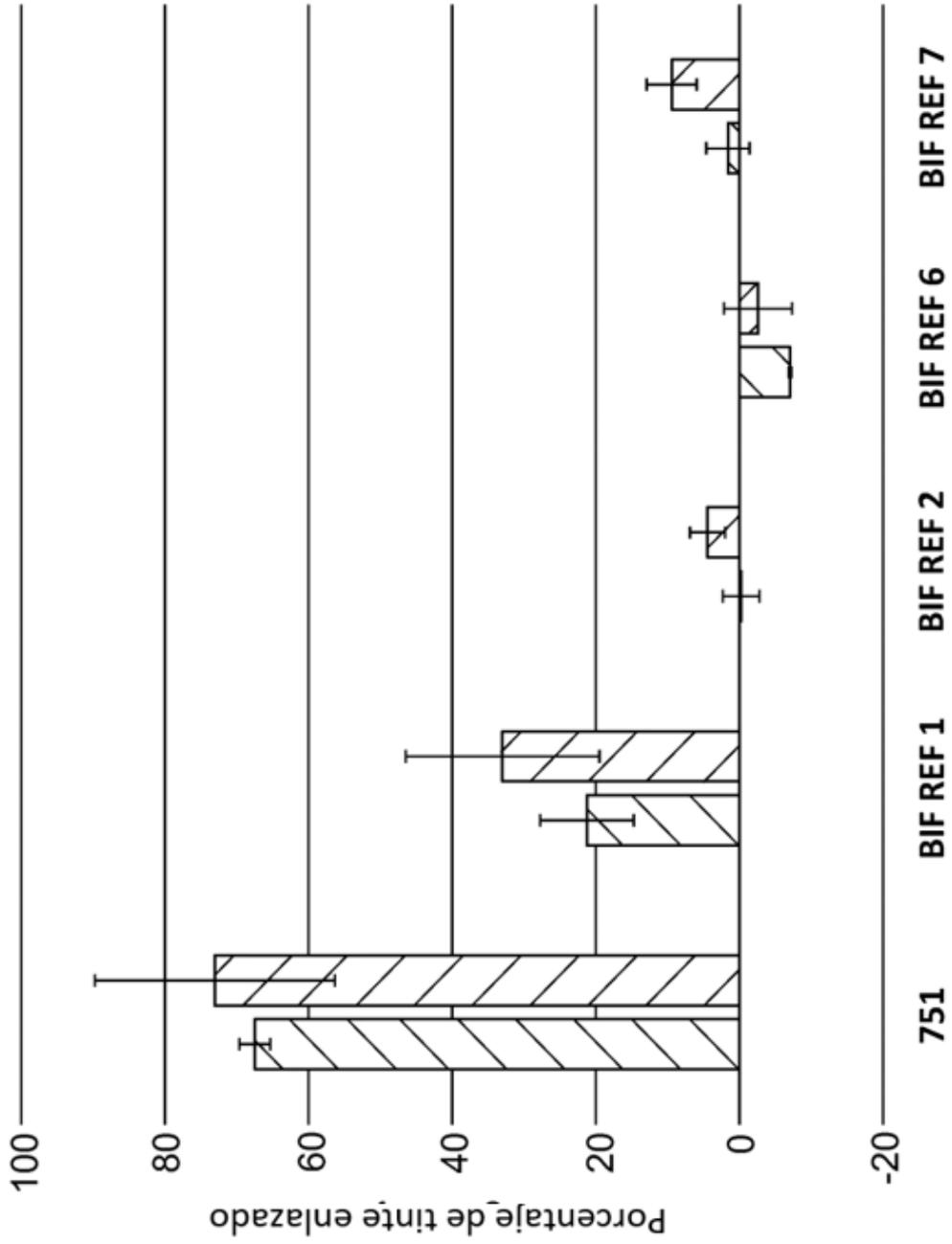


FIG. 78 Producción de exopolisacárido enlazado y liberado por MRX004

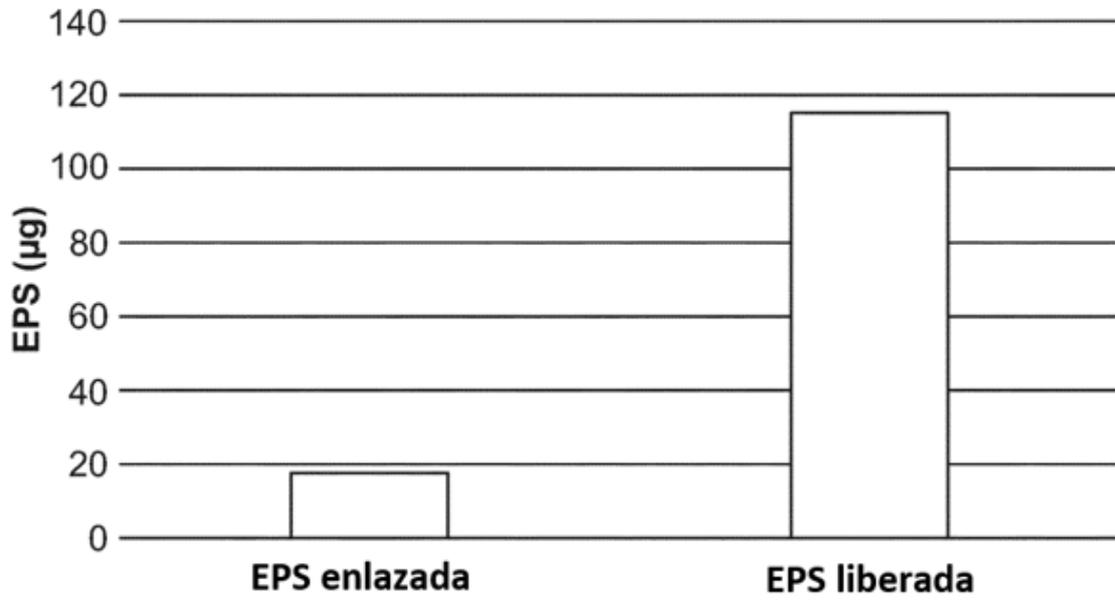


FIG. 79 Adhesión de MRX004 a células Caco-2

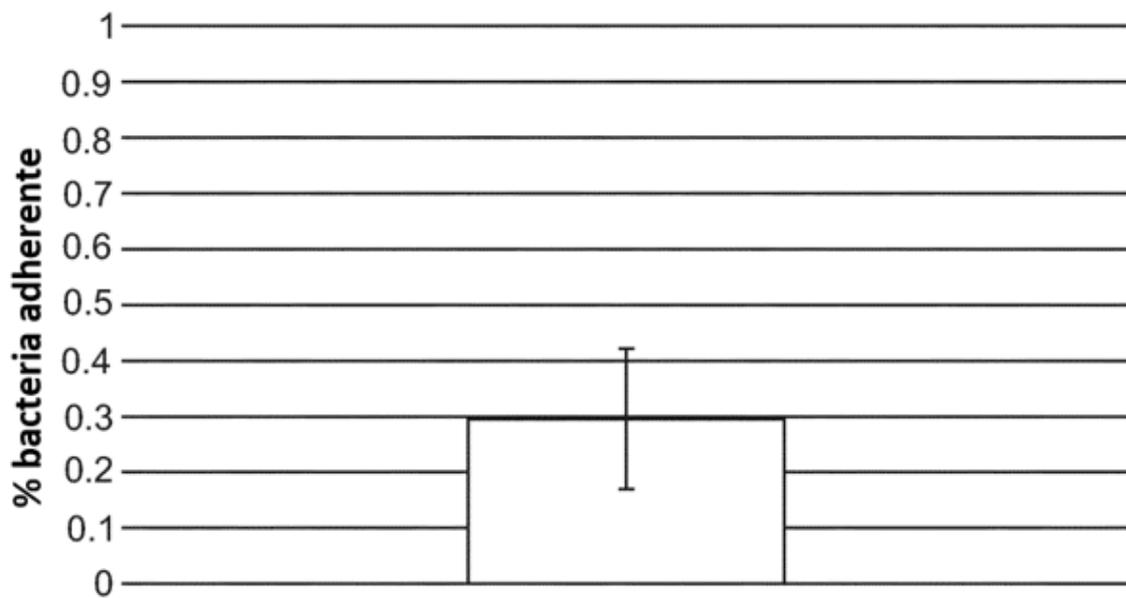


FIG. 80 ID 32 rápido Un perfil de cepas de tipo MRX004 vs *Bifidobacterium breve*

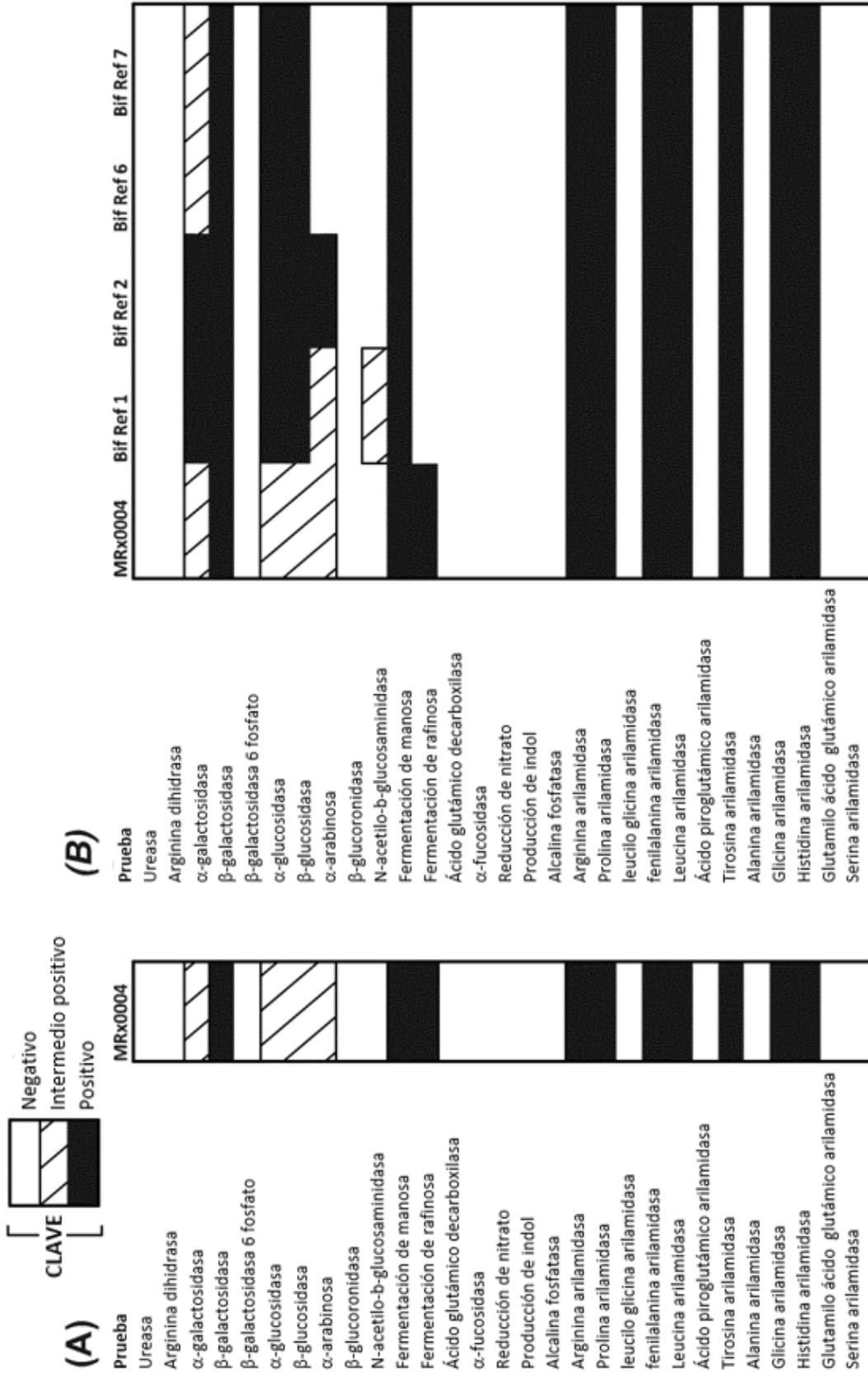


FIG. 81 Análisis API® 50 CH de MRX004

