



MD/EP 3369425 T2 2021.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3369425 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 35/74 (2015.01.01)

A61P 1/00 (2006.01.01)

A61P 11/06 (2006.01.01)

A61P 29/00 (2006.01.01)

A61P 19/02 (2006.01.01)

A61P 25/28 (2006.01.01)

A61P 35/00 (2006.01.01)

A61P 27/02 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0453 (22) Data de depozit: 2016.06.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18167277.5, 2016.06.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3369425, 2018.09.05 (31) Numărul cererii prioritare: 201510469; 201520628; 201604566 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.15; 2015.11.23; 2016.03.17 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2021, 2021.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 04/2021, 2021.01.27 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2019, 2019.04.30
(71) Solicitant: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (72) Inventatori: GRANT George, GB; PATTERSON Angela Margaret, GB; MULDER Imke, GB; MCCLUSKEY Seanin, GB; RAFTIS Emma, GB (73) Titular: 4D PHARMA RESEARCH LIMITED, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții care cuprind tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

Invenția furnizează compoziții cuprinzând tulpini bacteriene pentru tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii sau autoimune.

Secvențe: 9
Revendicări: 16
Figuri: 73

2

MD/EP 3369425 T2 2021.07.31

(54) Compositions comprising bacterial strains**(57) Abstract:**

1

The invention provides compositions comprising bacterial strains for treating and preventing inflammatory and autoimmune diseases.

2

Sequences: 9

Claims: 16

Fig.: 73

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL TEHNIC**

- 5 Această invenție este în domeniul compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene izolate de tractul digestiv mamifer și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolii.

FUNDALUL INVENȚIEI

- 10 Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o mare varietate de microbi materni și de mediu imediat după naștere. După aceea are loc o perioadă dinamică de colonizare microbiană și de succesiune, care este influențată de factori cum ar fi modul de livrare, mediul, dieta și genotipul gazdă, al cărui impact asupra compoziției microbiotei intestinale toate, în special la începutul vieții. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare adulților [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 500-1000 de filotipuri diferite aparținând în esență a două diviziuni bacteriene majore, Bacteroidite și Firmicute [2]. Relațiile simbiotice de succes care decurg din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o mare varietate de funcții metabolice, structurale, protectoare și alte funcții benefice. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură degradarea componentelor dietetice indigestibile, cu eliberarea de produse secundare care furnizează o sursă importantă de nutrienți pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată la animalele nepurtătoare de germeni care au un sistem imun slăbit, care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriilor comensale [3-5].

- 20 Modificările majore ale compoziției microbiotei au fost documentate în afecțiuni gastro-intestinale, cum ar fi boala inflamatorie a intestinului (IBD). De exemplu, nivelurile de bacterii *Clostridium* cluster XIVa sunt reduse la pacienții cu IBD, în timp ce numărul de *E. coli* este crescut, ceea ce sugerează o schimbare la nivelul echilibrului de simbioză și patobionți în intestin [6-9]. Interesant este faptul că această disbioză microbiană este asociată și cu dezechilibre la nivelul populațiilor de celule efectoare T.

- 25 În recunoașterea efectului pozitiv potențial pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animal, au fost propuse diverse tulpini pentru utilizarea în tratamentul a diferite boli (vezi, de exemplu, [10-13]). De asemenea, anumite tulpini, inclusiv în special tulpini de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor boli inflamatorii și autoimune care nu sunt legate direct de intestine (a se vedea [14] și [15] pentru recenzii). Cu toate acestea, relația dintre diferite boli și diferite tulpini bacteriene și efectele precise ale tulpinilor bacteriene particulare asupra intestinului și la nivel sistemic și asupra oricărui tip particular de boli, sunt slab caracterizate.

35 Există cerere în domeniu de noi metode de tratare a bolilor inflamatorii și autoimune. Există, de asemenea, o cerință ca efectele potențiale ale bacteriilor intestinale să fie caracterizate astfel încât să se poată dezvolta noi terapii care utilizează bacterii intestinale.

SUMARUL INVENȚIEI

- 40 Prezenta invenție este definită prin revendicări. Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii. În special, inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de linia IL-17 sau Th17. În special, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Parabacteroides* pot fi eficiente în reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Parabacteroides distasonis* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv răspunsul inflamator Th17, la modele de astm de șoarece, artrită reumatoidă și scleroză multiplă. De asemenea, așa cum este descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Parabacteroides distasonis* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv a răspunsului inflamator Th17, la modelele de uveită la șoarece.

- 50 Inventatorii au identificat ca tratamentul cu tulpini bacteriene din acest gen poate reduce nivelul de citokine care fac parte din linia Th17, inclusiv IL-17, poate atenua răspunsul inflamator Th17 și poate oferi beneficii clinice în cazuri de boli inflamatorii și autoimune mediate de IL-17 și linia Th17 la șoareci.

- 55 În anumite variante de realizare, divulgarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau a unei afecțiuni selectate din grupul constând din: scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondilo-artrita; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boli inflamatorii intestinale, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boala celiaca; astm, cum ar fi astmul alergic sau astm bronșic; boală pulmonară obstructivă cronică

(BPOC); cancerul, cum ar fi cancerul la sân, cancerul la colon, cancerul pulmonar sau cancerul ovarian; uveita; sclerită; vasculită; Boala Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor. Efectul indicat pentru tulpinile bacteriene din genul *Parabacteroides* asupra răspunsului inflamator Th17 poate oferi beneficii terapeutice în cazul bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 și linia Th17, cum ar fi cele enumerate mai sus.

În variante preferate de realizare, dezvoltarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului, cum ar fi astmul bronșic sau astmul alergic. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Parabacteroides* poate reduce recrutarea de neutrofile și eozinofile în plămâni, ceea ce poate ajuta la tratarea sau prevenirea astmului. Mai mult, inventatorii au testat și demonstrat eficacitatea tulpinilor de *Parabacteroides* la modelele de astm de șoarece. În anumite variante de realizare, compoziția este utilizată într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului bronșic sau a astmului eozinofil. Efectul arătat pentru compozițiile invenției asupra neutrofilelor și eozinofilelor înseamnă că acestea pot fi deosebit de eficiente în tratarea sau prevenirea astmului bronșic și a astmului eozinofil. Într-adevăr, în anumite variante de realizare, compoziția este utilizată într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator bronșic în tratamentul sau prevenirea astmului, sau compoziția se utilizează într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator eozinofil în tratamentul sau prevenirea astmului. În variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis* pentru utilizarea în tratamentul astmului, în special a astmului bronșic. Se arată că *Parabacteroides distasonis* are un efect deosebit de pronunțat asupra neutrofilelor în cazurile de astm, iar tratamentul cu *Parabacteroides distasonis* poate fi deosebit de eficient în tratarea astmului bronșic.

În alte variante preferate de realizare, dezvoltarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini *Parabacteroides* poate oferi beneficii clinice într-un model de artrită reumatoidă și poate reduce inflamarea articulațiilor la șoareci. În variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, destinată utilizării în tratamentul artritei reumatoide. Compozițiile care utilizează *Parabacteroides distasonis* pot fi deosebit de eficiente în tratarea artritei reumatoide.

În alte variante de realizare preferate, dezvoltarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a sclerozei multiple. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Parabacteroides* poate reduce incidența bolii și severitatea bolii la un model de scleroză multiplă la șoareci. În variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, destinată utilizării în tratamentul sclerozei multiple. Compozițiile care utilizează *Parabacteroides distasonis* pot fi deosebit de eficiente în tratarea sclerozei multiple.

În alte variante preferate de realizare, divulgarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a uveitei, cum ar fi uveita posterioară. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Parabacteroides* poate reduce incidența bolii și severitatea bolii la un caz de uveită la șoarece și poate preveni sau reduce deteriorarea retinei. În realizările preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din speciile *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare în tratamentul uveitelor.

În realizări preferate suplimentare, dezvoltarea furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului, cum ar fi cancerul de sân, de plămâni, sau de ficat. Compozițiile cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides* pot reduce creșterea tumorii în modelele pe șoareci de cancer la sân, la plămâni și la ficat. În anumite realizări, compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a dimensiunii tumorii sau de prevenire a creșterii tumorii în tratamentul cancerului. În anumite realizări, divulgarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, destinată utilizării în tratamentul cancerului.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de IL-17 sau linia Th17. În special, compozițiile invenției pot fi utilizate în reducerea producției de IL-17 sau în reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, a artritei reumatoide sau a sclerozei multiple, sau uveitei. De preferință, invenția furnizează compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare în reducerea producției de IL-17 sau reducerea

diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, a artritei reumatoide sau a sclerozei multiple. Invenția prevede, de asemenea, compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizarea în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea uveitei.

5 In anumite variante de realizare, compoziția este utilizată la un pacient cu niveluri IL-17 ridicate sau celule Th17. Efectul asupra răspunsului inflamator Th17 indicat pentru tulpinile de *Parabacteroides* poate fi deosebit de benefic pentru acești pacienți.

10 In conformitate cu invenția, tulpina bacteriană din compoziție este *Parabacteroides distasonis*. Se pot utiliza și tulpini strâns legate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu secvența 16S ARNr a unei tulpini bacteriene de *Parabacteroides distasonis*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau 9. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 9. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 9.

15 In anumite variante de realizare, compoziția invenției este destinată administrării orale. Administrarea orală a tulpinilor invenției poate fi eficientă în tratarea afecțiunilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite transmiterea în și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

20 In anumite variante de realizare, compoziția invenției cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili din punct de vedere farmaceutic.

In anumite variante de realizare, compoziția invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă în prepararea compozițiilor stabile care permit eliberarea bacteriilor.

25 In anumite variante de realizare, invenția furnizează un produs alimentar care cuprinde compoziția descrisă mai sus.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție de vaccin care cuprinde compoziția descrisă mai sus.

30 In plus, invenția asigură tratarea sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de IL-17 sau de linia Th17, cuprinzând administrarea unei compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*.

35 In dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă în terapie. Tulpina de *Parabacteroides distasonis* din invenție se dovedește a fi eficientă în tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul, scleroza multiplă și uveita. Prin urmare, într-un alt aspect, dezvoltarea furnizează o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții care cuprind astfel de celule sau culturi biologice pure de astfel de celule. Invenția oferă, de asemenea, o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pentru utilizare în
40 terapie, în special pentru bolile descrise aici.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

- 45 **Figura 1:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de celule de fluid BAL.
Figura 2: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de eozinofile în BALF.
Figura 3: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de eozinofile în BALF.
Figura 4: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de macrofage în BALF.
Figura 5: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția macrofagelor în BALF.
Figura 6: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de neutrofile în BALF.
Figura 7: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de neutrofile în BALF.
50 **Figura 8:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de limfocite în BALF.
Figura 9: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de limfocite în BALF.
Figura 10: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de celule fluid BAL.
Figura 11: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Număr total de eozinofile în BALF.
Figura 12: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de eozinofile în BALF.
55 **Figura 13:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de macrofage în BALF.
Figura 14: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de macrofage în BALF.
Figura 15: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de neutrofile în BALF.
Figura 16: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de neutrofile în BALF.
Figura 17: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de limfocite în BALF.
60 **Figura 18:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de limfocite în BALF.

- Figura 19:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Greutăți corporale, zile de la 14 la 0. Datele sunt prezentate ca procente $\pm$ SEM mediu ale greutăților inițiale (Ziua 14).
- Figura 20:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Greutăți corporale, zilele 0 până la 42. Datele sunt prezentate ca procente medii $\pm$ SEM din greutatea inițială (ziua 0). **** p < 0,0001 în comparație cu grupul tratat cu vehicul.
- Figura 21:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Scoruri clinice. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. **** p < 0,0001 în comparație cu ziua 21 din grupul tratat cu vehicul. ♦, O p < 0,05 în comparație cu grupul tratat cu vehicul într-o anumită zi.
- Figura 22:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Răspunsul proliferativ al splenocitelor la collagen II. S-a scăzut fundalul mediului [CII-stimulat - fundal al mediului] contează pe minut în funcție de incorporarea ^3H -TdR. Toate datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. **** p < 0,001 comparativ cu grupul de vehicule.
- Figura 23:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IFN γ în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.
- Figura 24:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-17A în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valori medii ale grupului.
- Figura 25:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-10 în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valori medii ale grupului.
- Figura 26:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-6 în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valori medii ale grupului.
- Figura 27:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Total IgE în ser
- Figura 28:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - HDM specific IgG1 în ser
- Figura 29:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Total IgE în BALF
- Figura 30:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - HDM specific IgG1 în BALF
- Figura 31:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Analiza histologică- Scor de infiltrare peribronhiolară mediu
- Figura 32:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Analiza histologică- Scor de infiltrare perivasculară mediu
- Figura 33:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Analiza histologică- Scorul inflamator mediu (Media scorului de infiltrare peribronhiolară, cât și perivasculară)
- Figura 34:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Analiza histologică- Scorul mucusului
- Figura 35:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-9 în țesutul pulmonar
- Figura 36:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-1a în țesutul pulmonar
- Figura 37:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IFN γ în țesutul pulmonar
- Figura 38:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-17A în țesutul pulmonar
- Figura 39:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-4 în țesutul pulmonar
- Figura 40:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-5 în țesutul pulmonar
- Figura 41:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de IL-1b în țesutul pulmonar
- Figura 42:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul RANTES în țesutul pulmonar
- Figura 43:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de MIP-1a în țesutul pulmonar
- Figura 44:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul KC în țesutul pulmonar
- Figura 45:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Nivelul de MIP-2 în țesutul pulmonar
- Figura 46:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - IgG1 specific HDM în ser
- Figura 47:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - IgG2a specific HDM în ser
- Figura 48:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - IgG1 specific HDM în BALF
- Figura 49:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - IgG2a specific HDM în BALF
- Figura 50:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Analiza histologică- Scor de infiltrare peribronhiolară mediu
- Figura 51:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Analiza histologică- Scor de infiltrare perivasculară mediu
- Figura 52:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Analiza histologică- Scorul inflamator mediu (Media scorului de infiltrare peribronhiolară, cât și perivasculară)
- Figura 53:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de TNF α în țesutul pulmonar
- Figura 54:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de IL-1a în țesutul pulmonar
- Figura 55:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de IFN γ în țesutul pulmonar
- Figura 56:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de IL-17F în țesutul pulmonar
- Figura 57:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de IL-1b în țesutul pulmonar
- Figura 58:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul RANTES în țesutul pulmonar
- Figura 59:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de MIP-2 în țesutul pulmonar
- Figura 60:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de KC în țesutul pulmonar
- Figura 61:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Nivelul de IL-17A în țesutul pulmonar

Figura 62: Caz de astm bronșic sever la șoareci – Nivelul de MIP-1a în țesutul pulmonar

Figura 63: Caz de astm bronșic sever la șoareci – Nivelul de IL 33 în țesutul pulmonar

Figura 64: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Șablon vizual pentru notare cu histopatologie. Imaginile reprezentative care prezintă scoruri compozite din articulațiile tarsale de șoareci la un studiu de artrită indusă de colagen.

Figura 65: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: Scoruri de inflamare. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 66: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: Scoruri de cartilaj. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 67: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: Scoruri osoase. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 68: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: Scoruri totale. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 69: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: imagini reprezentative. ID-ul animalului (# n.n) și membrul (R pentru dreapta, L pentru stânga) sunt indicate între paranteze. Imaginea stângă (vehicul): distrugerea articulară și osoasă extinsă cu inflamație și fibroză care se extinde până la țesuturile moi peri-articulare.

Figura 70: Caz de scleroză multiplă la șoareci - scor clinic.

Figura 71: Caz de scleroză multiplă la șoareci – incidenta bolii.

Figura 72: Caz de uveită la șoareci - Scoruri TEFI în grupul de control. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM.

Figura 73: Caz de uveită la șoareci - Scoruri TEFI în ziua 28. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM.

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile dezvoltării cuprind o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*. Exemplele demonstrează că bacteriile din acest gen sunt utile în tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Tulpinile bacteriene pentru utilizare în invenție sunt din speciile *Parabacteroides distasonis*.

Exemple de specii de *Parabacteroides* pentru utilizare în dezvoltare includ *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* și *Parabacteroides johnsonii*. *Parabacteroides* se aseamănă cu *Bacteroides* și sunt Gram negative, anaeroabe obligatorii, care nu formează spori, nemotilice și în formă de tijă, și de dimensiune 0,8-1,6x1,2-12 μ m. *Parabacteroides distasonis* este una din cele mai comune specii în excrementele umane. Tulpina de tip *P. distasonis* este JCM 5825^T (=CCUG 4941^T = DSM 20701^T = ATCC 8503^T). Numerele de înregistrare la GenBank/EMBL/DDBJ pentru secvențele de gene ARNr 16S de tulpini *P. distasonis* JCM 5825^T, JCM 13400, JCM13401, JCM13402, JCM13403 și JCM13404 și de tulpini *P. merdae* JCM9497^T și JCM13405 sunt AB238922-AB238929, respectiv (dezvăluite aici ca SEQ. ID. Nos: 1-8). Exemple de tulpini sunt de asemenea descrise în [16].

Bacteria *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 a fost testată în exemple și este, de asemenea, menționată aici sub formă de tulpină 755 sau MRX005. O secvență 16S ARNr pentru tulpina 830 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 9. Tulpina 755 a fost depusă la autoritatea depozitară internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) la 12 martie 2015 sub denumirea de „*Parabacteroides sp* 755” și a primit numărul de înregistrare NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

O secvență genom pentru tulpina 755 este furnizată în SEQ ID NO: 10 a WO2016/203220. Această secvență a fost generată folosind platforma PacBio RS II.

Tulpinile bacteriene strâns legate de tulpina testată în exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente în tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. În anumite variante de realizare, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența 16S ARNr a unei tulpini bacteriene de *Parabacteroides distasonis*. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau 9. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 2. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 9.

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare 42382 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente în tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Un biotip este o tulpină strâns înrudită, care are caracteristici fiziologice și biochimice identice sau foarte similare.

5 Tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotide pentru bacteria depusă sub numărul de autorizare NCIMB 42382. De exemplu, în mod substanțial întregul genom poate fi secvențiat și o tulpină de biotip pentru
10 de secvență pe cel puțin 80% din întregul său genom (de ex. pe cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99% sau pe întregul său genom). Alte secvențe adecvate pentru utilizare în identificarea tulpinilor de biotipuri pot include hsp60 sau secvențe repetitive, cum ar fi BOX, ERIC, (GTG), sau REP sau [17]. Tulpinile biotipice pot avea secvențe cu cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență la secvența corespunzătoare a bacteriei depuse sub numărul de
15 înregistrare NCIMB 42382.

În anumite realizări, tulpina bacteriană utilizată în dezvoltare are un genom cu identitatea de secvență la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220. În realizările preferate, tulpina bacteriană utilizată în dezvoltare are un genom cu cel puțin 90% identitate de secvență (de exemplu cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) la SEQ ID NO:10 din
20 WO 2016/203220 de-a lungul a cel puțin 60% (de exemplu cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220. De exemplu, tulpina bacteriană utilizată în invenție poate avea un genom de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SRQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220.

În mod alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate folosind numărul de înregistrare depozit NCIMB 42382 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismului amplificat fluorescent cu lungimea fragmentului (FAFLP) și a ADN-ului (Rep) - amprentare repetitivă (Rep) -PCR, sau
45 profilarea proteinei, sau secvențiere parțială a ADNr 16S sau 23s. În anumite variante de realizare preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini de *Parabacteroides distasonis*.

În anumite variante de realizare, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același model ca o bacterie depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 atunci când este analizată prin amplificare analiza de restricție a ADN-ului ribozomal (ARDRA), de exemplu atunci când se folosește enzima de restricție Sau3AI (pentru metode
50 exemplare și orientare a se vedea, de exemplu, [20]). Alternativ, tulpinile de biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentație a carbohidraților ca bacteria depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382.

Alte tulpini de *Parabacteroides* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipurile bacteriei depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pot fi identificate folosind orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv analizele descrise în exemple. De exemplu,
60 tulpinile utilizate în invenție pot fi identificate prin cultivarea în YCFA anaerobă și/sau

administrarea bacteriilor la cazul de artrită indusă de colagen de tip II la șoarece și apoi evaluarea nivelurilor de citokine.

5 În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere similare, tip metabolic și/sau antigene de suprafață cu bacteria depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie imună comparabilă cu tulpina NCIMB 42382. În special, o tulpină de biotip va provoca efecte comparabile asupra modelelor de astm, artrită, scleroză multiplă și boala uveită și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine la efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple.

10 O tulpină preferată în special a invenției este tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Acesta este exemplul de tulpină 755 testat în exemple și dovedit a fi eficient în tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia. Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă a tulpinei *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia. Invenția furnizează o cultură biologic pură a tulpinii *Parabacteroides distasonis* depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, sau un derivat al acesteia, pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

20 Un derivat al tulpinii depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 42382 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al tulpinii invenției poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără să elimine activitatea biologică. În particular, un derivat al tulpinii invenției este activ terapeutic. Un derivat al tulpinii va avea activitate imuno modulatorie comparabilă cu a tulpinii originale NCIMB 42382. În particular, un derivat al tulpinii va obține efecte comparabile asupra astmului, artritelor, sclerozei multiple sau modelelor de boală uveită, și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine, cu efectele prezentate în exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultivare și administrare descrise în exemple. Un derivat al tulpinii NCIMB 42382 va fi în general un biotip al tulpinii NCIMB 42382.

30 Referirile la celulele tulpinei de *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, conțin orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și de eficiență terapeutică ca tulpinile depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, și astfel de celule sunt cuprinse în invenție.

35 În anumite variante de realizare preferate, tulpinile bacteriene în compozițiile conform invenției sunt viabile și capabile să colonizeze intestinul parțial sau total.

Utilizări terapeutice

Așa cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene ale invenției sunt eficiente în reducerea răspunsului inflamator Th17. În particular, tratamentul cu compoziții ale invenției obține o reducere a nivelurilor IL-17A și a altor citokine ale liniei Th17 și îmbunătățiri clinice ale modelelor animale ale condițiilor mediate de IL-17 și linia Th17. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi utile în tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii și, în special, în boli mediate de IL-17. În particular, compozițiile invenției ar putea fi utile în reducerea sau prevenirea creșterii răspunsului inflamator IL-17.

45 Celulele Th17 sunt un subset de celule auxiliare T care produc, de exemplu, IL-17A, IL-17F, IL-21 și IL-22. Diferențierea celulelor Th17 și linia IL-17 poate fi determinată de IL-23. Aceste citokine și altele formează părți importante ale liniei Th17, care este o linie de semnalizare a inflamației confirmată, care contribuie și stă la baza unui număr de boli inflamatorii și autoimune (așa cum este descris, de exemplu, [19-24]). Bolile în care linia Th17 este activată sunt boli mediate de linia Th17. Bolile mediate de linia Th17 pot fi ameliorate sau atenuate prin suprimarea liniei Th17, care poate fi printr-o reducere a diferențierii celulelor Th17 sau o reducere a activității lor sau o reducere a nivelului de citokine a liniei Th17. Bolile mediate de linia Th17 pot fi caracterizate de niveluri crescute de citokine produse de celulele Th17, cum ar fi IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revizuit în [25]). Bolile mediate de linia Th17 pot fi caracterizate prin exprimarea crescută a genelor asociate Th-17, cum ar fi Stat3 sau IL-23R. Bolile mediate de linia Th17 pot fi asociate cu niveluri crescute de celule Th17.

55 IL-17 este o citokină pro-inflamatorie care contribuie la patogeniza mai multor boli inflamatorii și autoimune. IL-17, așa cum este utilizat aici, se poate referi la orice membru al familiei IL-17, inclusiv IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E și IL-17F. Bolile și afecțiunile mediate de IL-17 sunt caracterizate prin exprimarea ridicată a IL-17 și/sau prin acumularea sau prezența celulelor pozitive IL-17 într-un țesut afectat de boală sau afecțiune. În mod similar, bolile și condițiile mediate de IL-17 sunt boli și afecțiuni care sunt exacerbate de nivelurile ridicate de

IL-17 sau o creștere a nivelurilor IL-17 și care sunt atenuate de nivelurile scăzute de IL-17 sau de o reducere a nivelurilor IL-17. Răspunsul inflamator IL-17 poate fi local sau sistemic.

Exemple de boli și afecțiuni care pot fi mediate de IL-17 sau linia Th17 includ scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondilo-artrita; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boala inflamatorie a intestinului, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boala celiaca; astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul bronșic; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); cancer, cum ar fi cancerul la sân, cancerul de colon, cancerul de plamani sau cancerul ovarian; uveită; sclerită; vasculită; Boala Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor. În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea uneia sau mai multor aceste afecțiuni sau boli. În anumite variante de realizare preferate, aceste afecțiuni sau boli sunt mediate de IL-17 sau linia Th17.

În anumite variante de realizare, compozițiile dezvoltării sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de IL-17 sau linia Th17. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea unei boli inflamatorii, în care respectivul tratament sau prevenire se realizează prin reducerea sau prevenirea creșterii răspunsului inflamator Th17. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea unui pacient cu o boală inflamatorie, în care pacientul are niveluri de IL-17 crescute sau celule Th17 crescute sau prezintă un răspuns inflamator Th17. În anumite variante de realizare, pacientul poate fi diagnosticat cu o boală sau afecțiune inflamatorie sau autoimună cronică sau compoziția invenției poate fi utilizată în prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune sau a unei afecțiuni care se dezvoltă într-o boală sau afecțiune inflamatorie sau autoimună cronică. În anumite variante de realizare, boala sau starea poate să nu răspundă la tratamentul cu inhibitori de TNF- α . Aceste utilizări ale compozițiilor invenției pot fi aplicate oricăreia dintre bolile sau afecțiunilor specifice enumerate în paragraful precedent.

IL-17 și linia Th17 sunt adesea asociate cu boli inflamatorii cronice și autoimune, astfel încât compozițiile pot fi deosebit de utile în tratarea sau prevenirea bolilor sau afecțiunilor cronice, așa cum sunt enumerate mai sus. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate la pacienții cu boală cronică. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în prevenirea dezvoltării bolii cronice.

Compozițiile pot fi utile în tratarea bolilor și a afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17 și pentru abordarea răspunsului inflamator Th17, astfel încât compozițiile invenției pot fi deosebit de utile în tratarea sau prevenirea bolilor cronice, tratarea sau prevenirea bolii la pacienții care nu au răspuns la alte terapii (cum ar fi tratamentul cu inhibitori TNF- α) și/sau tratarea sau prevenirea deteriorării țesutului și a simptomelor asociate cu celulele IL-17 și Th17. De exemplu, IL-17 este cunoscut că activează distrugerea matricei în cartilaj și țesutul osos, iar IL-17 are un efect inhibitor asupra producției de matrice în condrocite și osteoblaste, astfel că compozițiile invenției pot fi utile în tratarea sau prevenirea eroziunii osoase sau a deteriorării cartilajului.

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției prevede o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IL-17, în special a nivelurilor IL-17A. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției oferă o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de TNF α , IL-1 β sau IL-6. O astfel de reducere sau prevenire a nivelurilor ridicate ale acestor citokine poate fi utilă în tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor inflamatorii și autoimune, în special a celor mediate de IL-17 sau linia Th17.

Astm

În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea astmului. Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a recrutării de neutrofile și/sau eozinofile în căile respiratorii în urma sensibilizării și administrării de extract de acarieni de praf și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea astmului.

Astmul este o boală cronică caracterizată prin inflamație și restricționarea căilor respiratorii. Inflamația în astm poate fi mediată de celulele IL-17 și/sau Th17, astfel încât compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea astmului. Inflamația în astm poate fi mediată de eozinofile și/sau neutrofile.

În anumite variante de realizare, astmul este astm eozinofil sau alergic. Astmul eozinofil și alergic se caracterizează printr-un număr crescut de eozinofile în sângele periferic și în secrețiile căilor respiratorii și este asociat patologic cu îngroșarea zonei membranei subsolului și farmacologic prin reacția la corticosteroizi [26]. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea eozinofilelor pot fi utile în tratarea sau prevenirea astmului eozinofil și alergic.

În realizări suplimentare, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea astmului bronșic (sau a astmului non-eozinofil). Numărul ridicat de neutrofile este asociat cu astm sever, care pot fi insensibile la tratamentul cu corticosteroizi. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea neutrofilelor pot fi utile în tratarea sau prevenirea astmului bronșic .

Astmul eozinofil și bronșic nu sunt condiții reciproc excluzive și tratamentele care ajută la rezolvarea fie a răspunsurilor eozinofile, cât și la neutrofile pot fi utile în tratarea astmului în general.

Nivelurile crescute de IL-17 și activarea liniei Th17 sunt asociate cu astm sever, deci compozițiile invenției pot fi utile în prevenirea dezvoltării astmului sever sau pentru tratarea astmului sever.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate în metode de reducere a unui răspuns inflamator eozinofil în tratamentul sau prevenirea astmului sau pentru utilizarea în metode de reducere a unui răspuns inflamator bronșic în tratamentul sau prevenirea astmului. După cum s-a menționat mai sus, nivelurile ridicate de eozinofile în astm sunt asociate patologic cu îngroșarea zonei membranei subsolului, astfel încât reducerea răspunsului inflamator eozinofilic în tratamentul sau prevenirea astmului poate fi în măsură să abordeze în mod specific această caracteristică a bolii. De asemenea, neutrofilele crescute, fie în combinație cu eozinofile crescute, fie în absența lor, sunt asociate cu astmul sever și îngustarea cronică a căilor respiratorii. Prin urmare, reducerea răspunsului inflamator bronșic poate fi deosebit de utilă pentru abordarea astmului sever.

În anumite variante de realizare, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară în astmul alergic sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare în tratamentul astmului alergic. În anumite variante de realizare, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară și/sau perivasculară în astmul bronșic sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare și/sau perivasculară în tratamentul astmului alergic bronșic .

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IL-1 β sau IFN γ .

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate într-o metodă de tratare a astmului care duce la reducerea răspunsului inflamator eozinofil și/sau bronșic . În anumite variante de realizare, pacientul care urmează să fie tratat este sau a fost identificat anterior ca având valori crescute de neutrofile sau eozinofile, de exemplu, identificate prin prelevarea de sange sau analiza sputei.

Compozițiile invenției pot fi utile în prevenirea dezvoltării astmului la nou-născut atunci când sunt administrate nou-născutului sau gravidei. Compozițiile pot fi utile în prevenirea dezvoltării astmului la copii. Compozițiile invenției pot fi utile în tratarea sau prevenirea astmului cu debut adult. Compozițiile invenției pot fi utile în combaterea sau ameliorarea astmului. Compozițiile invenției pot fi utile în special pentru reducerea simptomelor asociate astmului, care este agravat de alergeni, cum ar fi acarienii de praf.

Tratamentul sau prevenirea astmului se poate referi, de exemplu, la o atenuare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatoare care reprezintă o problemă pentru pacient.

Artrita

În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea artritei reumatoide (RA). Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a semnelor clinice ale RA într-un caz la șoarece, reduc deteriorările cartilajelor și oaselor și reduc răspunsul inflamator IL-17, deci pot fi utile în tratamentul sau prevenirea RA. RA este o tulburare inflamatorie sistemică care afectează în primul rând articulațiile. RA este asociată cu un răspuns inflamator care duce la umflarea articulațiilor, hiperplazie sinovială și distrugerea cartilajului și a oaselor. Celulele IL-17 și Th17 pot avea un rol cheie în RA, de exemplu, deoarece IL-17 inhibă producția de matrice în condrocite și osteoblaste și activează producția și funcția metaloproteinazelor matriceale și pentru că activitatea bolii RA este corelată cu nivelurile IL-17 și numere de celule Th 17 [27,28], astfel încât compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea RA.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru scăderea nivelului IL-17 sau pentru prevenirea creșterii nivelurilor IL-17 în tratamentul sau prevenirea RA. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției prevede o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IL-17, în special a nivelurilor IL-17A. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției oferă o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IFN- γ sau IL-6.

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a umflării articulațiilor. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt

utilizate la pacienții cu articulații umflate sau la pacienții identificați cu riscul de a avea articulații umflate. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate într-o metodă de reducere a umflării articulațiilor în RA.

5 În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a deteriorării cartilajelor sau a oaselor. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea cartilajului sau a deteriorării osoase în tratamentul RA. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacientului cu RA severă care prezintă risc de deteriorare a cartilajului sau osului.

10 Nivelurile crescute de IL-17 și numărul crescut de celule Th17 sunt asociate cu distrugerea cartilajului și oaselor în RA [27,28]. IL-17 este cunoscută că activează distrugerea matricei în cartilaj și țesutul osos, iar IL-17 are un efect inhibitor asupra producției matricei în condrocite și osteoblaste. Prin urmare, în anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru prevenirea eroziunii osoase sau deteriorarea cartilajului în tratamentul RA. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacienților care prezintă

15 eroziune osoasă sau leziuni ale cartilajelor sau pacienți identificați cu risc de eroziune osoasă sau deteriorare a cartilajelor.

TNF- α este asociată și cu RA, dar TNF- α nu este implicat în patogeneza etapelor ulterioare ale bolii. În schimb, IL-17 are un rol în toate etapele bolii cronice [29]. Prin urmare, în anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru tratarea RA cronică sau

20 RA în stadiu tardiv, cum ar fi boala care include distrugerea articulară și pierderea cartilajului. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt destinate tratării pacienților care au primit anterior o terapie anti-TNF- α . În anumite variante de realizare, pacienții care urmează a fi tratați nu răspund sau nu mai răspund la terapia anti-TNF- α .

25 Compozițiile invenției pot fi utile în modularea sistemului imunitar al unui pacient, astfel încât în anumite variante, compozițiile invenției sunt utilizate pentru prevenirea RA la un pacient care a fost identificat cu risc de RA, sau care a fost diagnosticat precoce cu RA. Compozițiile invenției pot fi utile în prevenirea dezvoltării RA.

30 Compozițiile invenției pot fi utile în gestionarea sau atenuarea RA. Compozițiile invenției pot fi utile în special pentru reducerea simptomelor asociate cu umflarea articulației sau distrugerea oaselor. Tratamentul sau prevenirea RA poate face referire, de exemplu, la o atenuare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatoare care reprezintă o problemă pentru pacient.

Scleroza multiplă

35 În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple. Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii la un caz de șoarece cu scleroză multiplă (cazul EAE) și, astfel, pot fi utile în tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple. Scleroza multiplă este o afecțiune inflamatorie asociată cu deteriorarea tecilor de mielină ale neuronilor, în special la nivelul creierului și coloanei vertebrale. Scleroza multiplă este o boală cronică, care reduce

40 capacitatea progresiv și care evoluează în episoade. Celulele IL-17 și Th17 pot avea un rol cheie în scleroza multiplă, de exemplu, deoarece nivelurile de IL-17 pot fi corelate cu leziunile sclerozei multiple, IL-17 poate perturba joncțiunile strânse ale celulelor endoteliale ale barierei cerebrale sanguine, iar celulele Th17 pot migra în sistemul nervos central și pot cauza pierderi neuronale [30,31]. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea

45 sclerozei multiple.

50 În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a incidenței sau a gravității bolii. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate în reducerea incidenței bolii sau a gravității bolii. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției previne o scădere a funcției motrice sau duce la îmbunătățirea funcției motrice. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt destinate utilizării pentru prevenirea declinului funcției motrice sau pentru utilizarea în îmbunătățirea funcției motrice. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției împiedică dezvoltarea paraliziei. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru prevenirea paraliziei în tratamentul sclerozei multiple.

55 Compozițiile invenției pot fi utile în modularea sistemului imunitar al unui pacient, astfel încât în anumite variante, compozițiile invenției sunt utilizate pentru prevenirea sclerozei multiple la un pacient care a fost identificat cu risc de scleroză multiplă sau care a fost diagnosticat cu scleroză multiplă în stadiu incipient sau scleroză multiplă „recidivă-remitentă“. Compozițiile invenției pot fi utile în prevenirea dezvoltării sclerozei. Într-adevăr, exemplele arată că

60 administrarea compozițiilor conform invenției a împiedicat dezvoltarea bolii la mulți șoareci.

Compozițiile invenției pot fi utile în gestionarea sau ameliorarea sclerozei multiple. Compozițiile invenției pot fi utile în special pentru reducerea simptomelor asociate cu scleroza multiplă. Tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple se poate referi, de exemplu, la o atenuare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatoare care reprezintă o problemă pentru pacient.

Uveita

În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei. Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii într-un caz de uveită la animal și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea uveitei. Uveita este inflamația uveei și poate duce la distrugerea țesutului retinian. Se poate prezenta sub diferite forme anatomice (anterior, intermediar, posterior sau difuz) și poate rezulta din cauze diferite, dar înrudite, inclusiv tulburări autoimune sistemice. IL-17 și linia Th17 sunt implicate central în uveită, astfel încât compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea uveitei. Referințele [32-39] descriu niveluri serice crescute de interleukină-17A la pacienții cu uveită, asocierea specifică a variantelor genetice IL17A cu panuveită, rolul citokinelor asociate Th17 în patogeneza uveitei autoimune experimentale, dezechilibrul dintre celulele Th17 și celulele T reglatoare în timpul uveitei autoimune monofazice experimentale, reglarea în sus a IL-17A la pacienții cu uveită și boli active Adamantiades-Behcet și Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), tratamentul uveitei infecțioase cu secukinumab (anticorp anti-IL-17A) și Th17 la ochii cu uveită.

În anumite variante de realizare, uveita este uveită posterioară. Uveita posterioară se prezintă în primul rând ca fiind inflamația retinei și coroidelor și exemplele demonstrează că compozițiile invenției sunt eficiente în reducerea inflamației și afectării retinei.

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a leziunilor retiniene. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea leziunilor retiniene în tratamentul uveitei. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacienților cu uveită severă care prezintă riscul de deteriorare a retinei. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a inflamației discului optic. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea inflamației discului optic. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a infiltrării țesutului retinian de către celule inflamatorii. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate în reducerea infiltrării țesutului retinian de către celulele inflamatorii. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat menținerea sau îmbunătățirea vederii. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru menținerea sau îmbunătățirea vederii.

În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei asociate cu o boală non-infecțioasă sau autoimună, cum ar fi boala Behcet, boala Crohn, iridociclita heterocromică Fuchs, granulomatoza cu poliangită, uveită asociată HLA-B27, artrita idiopatică minoră, sarcoidoză, spondiloartrită, oftalmie simpatică, nefrită tubulointerstițială și sindrom de uveită sau sindrom Vogt-Koyanagi-Harada. S-a dovedit că IL-17A este implicată în, de exemplu, în bolile Behcet și Vogt-Koyanagi-Harada.

Tratamentul sau prevenirea uveitei se poate referi, de exemplu, la o atenuare a gravității simptomelor sau la prevenirea recidivei.

Moduri de administrare

Compozițiile invenției trebuie administrate pe tractul gastrointestinal pentru a permite transmiterea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană a invenției. În general, compozițiile invenției sunt administrate oral, dar pot fi administrate pe cale rectală, intranasală sau pe căi bucale sau sublinguale.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției pot fi administrate sub formă de spumă, sub formă de spray sau de gel.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției pot fi administrate ca un supozitor, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unui ulei de teobrom (unt de cacao), grăsimi sintetice dure (de exemplu, suppcire, witepsol), glicero-gelatină, polietilenglicol sau compoziție de glicerină de săpun.

În anumite variante de realizare, compoziția invenției este administrată tractului gastro-intestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nazogastric, tub orogastric, tub gastric, tub de jejunostomie (tub J), gastrostomie endoscopică percutanată (PEG) sau port, cum ar fi ca un port de perete toracic care oferă acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

Compozițiile invenției pot fi administrate o singură dată sau pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției trebuie administrate zilnic.

5 În anumite variante de realizare ale invenției, tratamentul conform invenției este însoțit de evaluarea microbiotei intestinale a pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina invenției nu este obținută astfel încât eficacitatea să nu fie observată, sau tratamentul poate fi încetat dacă livrarea și/sau colonizarea parțială sau totală are succes și eficacitatea este observată.

10 În anumite variante de realizare, compoziția invenției poate fi administrată unui animal gestant, de exemplu un mamifer, cum ar fi un om, pentru a preveni o boală inflamatorie sau autoimună care se dezvoltă la copilul ei *in utero* și/sau după ce se naște.

15 Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost diagnosticat cu o boală sau afecțiune mediată de IL-17 sau linia Th17, sau care a fost identificat ca fiind în pericol de o boală sau o afecțiune mediată de IL-17 sau linia Th17. Compozițiile pot fi, de asemenea, administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea de boli sau afecțiuni mediate de IL-17 sau linia Th17 la un pacient sănătos.

Compozițiile invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea colonizare redusă sau absentă de *Parabacteroides*, în special *Parabacteroides distasonis*.

20 Compozițiile invenției pot fi administrate ca un produs alimentar, cum ar fi un supliment nutrițional.

25 În general, compozițiile invenției sunt destinate tratamentului oamenilor, deși pot fi utilizate pentru a trata animale inclusiv mamifere monogastrice, cum ar fi păsări de curte, porci, pisici, caini, cai sau iepuri. Compozițiile invenției pot fi utile în îmbunătățirea creșterii și performanței animalelor. Dacă se administrează la animale, se poate utiliza gavaj oral.

Compoziții

30 În general, compoziția invenției cuprinde bacterii. În variantele preferate ale invenției, compoziția este formulată sub formă uscată prin congelare. De exemplu, compoziția invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină dură, cuprinzând o tulpină bacteriană a invenției.

De preferință, compoziția invenției cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine stabilită și sunt disponibile îndrumări relevante în, de exemplu, referințe [46-48].

Alternativ, compoziția invenției poate cuprinde o cultură bacteriană activă vie.

35 În anumite variante de realizare preferate, compoziția invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene către intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la eliberarea la locația vizată prin, de exemplu, ruptura cu stimuli chimici sau fizici, cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificări ale pH-ului. Poate fi folosită orice metodă adecvată de încapsulare. Tehnicile de încapsulare exemplificative includ înfășurarea în cadrul unei matrice poroase, atașarea sau absorbția pe suprafețe purtătoare solide, autoagregarea prin floculare sau cu agenți de legătură încrucișată și retenție mecanică în spatele unei membrane microporoase sau a unei microcapsule. Îndrumări privind încapsularea care pot fi utile în prepararea compozițiilor invenției sunt disponibile, de exemplu, în referințe [49] și [50].

45 Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate, deoarece *Parabacteroides* sunt anaerobe. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse ca recuperatori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți livrarea și/sau colonizarea și supraviețuirea parțială sau totală și *in vivo*. Alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată oral ca aliment sau produs nutritiv, cum ar fi lactat fermentat pe bază de lapte sau zer sau ca produs farmaceutic.

Compoziția poate fi formulată ca un probiotic.

50 O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană a invenției. O cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a duce la administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

60 O doză zilnică adecvată din bacterie, de exemplu la un om adult, poate fi de la aproximativ 1×10^3 la aproximativ 1×10^{11} unități ce formează colonii (UFC); de exemplu, de la aproximativ 1×10^7 la aproximativ 1×10^{10} UFC; în alt exemplu de la aproximativ 1×10^6 la aproximativ 1×10^{10} UFC.

În anumite variante de realizare, compoziția conține tulpina bacteriană într-o cantitate de aproximativ 1×10^6 până în jur de 1×10^{11} UFC/g, cu privire la greutatea compoziției; de exemplu, de la aproximativ 1×10^8 până la aproximativ 1×10^{10} UFC/g. Doza poate fi, de exemplu, 1 g, 3g, 5g, și 10g.

De obicei, un probiotic, cum ar fi compoziția invenției, este combinat opțional cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este de obicei un carbohidrat nedigerabil, cum ar fi o oligo- sau polizaharidă sau un alcool din zahar, care nu este degradat sau absorbit în tractul digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale, cum ar fi inulina și transgalacto-oligozaharidele.

În anumite variante de realizare, compoziția probiotică a prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% în greutate, în raport cu compoziția totală a greutății (de exemplu, de la 5 la 20% în greutate). Carbohidrații pot fi selectați din grupul format din: fructo oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu lanț scurt, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, amidon modificat și rezistent la gumă, polidextroză, D-tagatoză, fibre de salcâm, carob, ovăz și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharidele cu lanț scurt (pentru simplitatea prezentată mai jos ca FOSs-c.c); FOS-c.c.-urile respective nu sunt carbohidrați digerabili, obținuți în general prin conversia zahărului din sfeclă și incluzând o moleculă de zaharoză la care sunt legate trei molecule de glucoză.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemple de astfel de excipienți potriviți pot fi găsiți în referință [51]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referință [52]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și altele asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi selectată în ceea ce privește calea de administrare prevăzută și practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de purtător, excipient sau diluant orice liant (lianti) adecvat (adecvați), lubrifiant (lubrifianți), agent (agenți) de suspendare, agent (agenți) de acoperire, agent (agenți) de solubilizare. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale precum glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta-lactoză, îndulcitori de porumb, gumă naturală și sintetică, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetilceluloză și polietilenglicol. Exemple de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și altele asemenea. În compoziția farmaceutică pot fi furnizați conservanți, stabilizanți, coloranți și chiar agenți aromatizanți. Exemple de conservanți includ benzoatul de sodiu, acidul sorbic și esterii acidului p-hidroxibenzoic. Se mai pot folosi antioxidanți și agenți de suspendare.

Compozițiile invenției pot fi formulate ca un produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate oferi beneficii nutritive pe lângă efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-un supliment nutrițional. În mod similar, un produs alimentar poate fi formulat pentru a îmbunătăți gustul compoziției invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru a fi consumată prin a fi mai asemănătoare cu un produs alimentar obișnuit, mai degrabă decât pentru o compoziție farmaceutică. În anumite variante de realizare, compoziția invenției este formulată ca un produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” înseamnă orice produs lichid sau semisolid sau pe bază de lapte sau zer având un conținut diferit de grăsimi. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, lapte integral, lapte recombinat din lapte praf și zer, fără nicio prelucrare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurt, lapte coapte, caș, lapte acru, lapte integral acru, lapte cu unt și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include băuturi din lapte, cum ar fi băuturile din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru sugari sau pentru bebeluși; lapte aromat, înghețată; alimente care conțin lapte, cum ar fi dulciurile.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției conțin o tulpină sau specie bacteriană unică și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot cuprinde numai cantități de minimis sau biologice irelevante din alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial lipsită de alte specii de organism.

Compozițiile pentru utilizare în conformitate cu invenția pot avea sau nu nevoie de aprobare de introducere pe piață.

În unele cazuri, tulpina bacteriană liofilizată este reconstituită înainte de administrare. În unele cazuri, reconstituirea se face prin utilizarea unui diluant descris aici.

Compozițiile invenției pot cuprinde excipienți, diluanți sau purtători acceptabili farmaceutic.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare atunci când este administrată unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este selectată

5 din grupul constând din astm, astm alergic, astm bronșic, osteoartrită, artrită psoriazică, artrită idiopatică juvenilă, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos, sistemic, boală pulmonară boală (BPOC), cancer, cancer la sân, cancer de colon, cancer la plămâni, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, parodontită, rinită alergică și respingerea alogrefei.

10 In anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata sau a preveni o boală sau o afecțiune mediata de IL-17 sau linia Th17. In anumite variante de realizare preferate, boala sau starea respectivă este selectată din grupul constând din artrită reumatoidă, scleroză multiplă,

15 psoriazis, boală inflamatorie a intestinului, boala Crohn, colită ulcerosă, boală celiacă, astm, astm alergic, astm bronșic, osteoartrită, artrită psoriazică, juvenil artrita idiopatică, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC), cancer, cancer la sân, cancer de colon, cancer la plămâni, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, periodontită, rinită alergică, și respingere de alogrefă.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de aproximativ 1×10^3 pana la aproximativ 1×10^{11} colonii care formează unități pe gram în raport cu greutatea compoziției.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus,

25 in care compoziția este administrată într-o doză de 1 g, 3 g, 5 g sau 10 g.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, in care compoziția este administrată printr-o metodă selectată din grupul constând din metoda orală, rectală, subcutanată, nazală, bucală și sublinguală.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată

30 mai sus, cuprinzând un purtător ales din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzand un diluant selectat din grupul constand din etanol, glicerol și apă.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată

35 mai sus, cuprinzand un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, salcâm, tragacant, alginat de sodiu, carboximetilceluloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată

40 mai sus, cuprinzand in plus cel puțin unul dintre conservanți, un antioxidant și un stabilizator.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, cuprinzand un conservant selectat din grupul constand din benzoat de sodiu, acid sorbic și esterii ai acidului p-hidroxibenzoic.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată

45 mai sus, în care tulpina bacteriană menționată este liofilizată.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, in care compoziția este păstrată într-un recipient sigilat la aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă cu 50% umiditate relativă, cel puțin 80% din tulpina bacteriană măsurată în unitățile formatoare de colonii, rămâne după o perioadă de

50 cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

Metode de cultură

Tulpinile bacteriene utilizate in prezenta invenție pot fi cultivate folosind tehnici standard de microbiologie, așa cum sunt detaliate, de exemplu, în referințe [53-55].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi agar YCFA sau mediu YCFA.

55 Mediul YCFA poate include (la 100 ml, valori aproximative): Casitonă (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), NaHCO_3 (0,4 g), cisteina (0,1 g), K_2HPO_4 (0,045 g), KH_2PO_4 (0,045 g), NaCl (0,09 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,09 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,009 g), CaCl_2 (0,009 g), resazurină (0,1 mg), hemină (1 mg), biotină (1 μg), cobalamină (1 μg), acid p-aminobenzoic (3 μg), acid folic (5 μg), și piridoxamină (15 μg).

60 **Tulpini bacteriene pentru utilizare in compoziții de vaccin**

Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene ale invenției sunt utile în tratarea sau prevenirea bolilor sau afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Acesta este probabil rezultatul efectului pe care tulpinile bacteriene din invenție îl au asupra sistemului imunitar gazdă. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi de asemenea utile în prevenirea bolilor sau afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17, atunci când sunt administrate sub formă de compoziții de vaccin. În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenției pot fi ucise, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de realizări, compozițiile pot cuprinde un adjuvant pentru vaccin. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt destinate administrării prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

10 **Generalități**

Practica prezentei invenții va utiliza, dacă nu se indică altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în baza abilității din domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate pe deplin în literatura de specialitate. A se vedea, de exemplu, referințele [56] și [57-63], etc.

15 Termenul „cuprinzând” cuprinde „inclusiv”, precum și „alcătuit”, de ex. o compoziție „care cuprinde” X poate consta exclusiv din X sau poate include ceva suplimentar e.g. X + Y.

Termenul „aproximativ” în raport cu o valoare numerică x este opțional și înseamnă, de exemplu, $x \pm 10\%$.

20 Cuvântul „substanțial” nu exclude „complet” de ex. o compoziție care este „substanțial liberă” de Y poate fi complet lipsită de Y. Când este necesar, cuvântul „substanțial” poate fi omis din definiția invenției.

Referirile la o identitate de secvență procentuală între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, acel procent de nucleotide este același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și procentul de omologie sau identitate de secvență pot fi determinate folosind programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [64]. O aliniere preferată este determinată de algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman folosind o căutare a diferenței afine cu o penalitate deschisă de diferență de 12 și o pedeapsă de extensie a golului de 2, matricea BLOSUM din 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este dezvăluit în ref. [65].

30 Cu excepția cazului în care se specifică în mod special, un proces sau o metodă care cuprinde numeroase etape poate cuprinde pași suplimentari la începutul sau sfârșitul metodei sau poate cuprinde pași suplimentari de intervenție. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este cazul.

35 Prezentele variante de realizare ale invenției sunt descrise aici. De apreciat că caracteristicile specificate în fiecare variantă de realizare pot fi combinate cu alte caracteristici specificate, pentru a oferi realizări suplimentare. În particular, realizările evidențiate aici ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate între ele (cu excepția cazurilor în care acestea se exclud reciproc).

MODURI DE REALIZARE A INVENȚIEI

40 ***Exemplul 1- Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un caz de astm indus de acarieni la șoarece***

Sumar

Șoarecilor li s-au administrat compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției și au fost ulterior tratați cu extract de acarieni de praf (HDM) pentru a provoca un răspuns inflamator alergic. Răspunsul inflamator la HDM include componente eozinofile și neutrofile, este mediat de IL-17 și linia Th17 și este un caz de astm. Mărirea și caracteristicile răspunsului inflamator al șoarecilor tratați cu compoziții ale invenției au fost comparate cu grupele de control. S-a constatat că compozițiile invenției atenuează răspunsul inflamator și reduc recrutarea eozinofilelor și neutrofilelor, indicând că pot fi utile în tratarea afecțiunilor mediate de IL-17 și Th17, cum ar fi eozinofilia, neutrofilie și astm.

50 **Tulpina**

755: *Parabacteroides distasonis*

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (oral).
- 55 5. Tratamentul cu tulpina de inoculum a bacteriilor terapeutice 755 (oral).
7. Grup de control pozitiv. Tratament cu Dexametazonă (i.p.).
8. Grup de control netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 5

60 Ziua 14 până în ziua 13: Administrarea zilnică a vehiculului de control pe cale orală (grupul 1).

Ziua 14 până în ziua 13: Administrarea zilnică a inoculului de bacterii terapeutice pe cale orală (grupul 2-6).

5 Ziua 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administrarea de 15 ml HDM (extract de acarieni de praf - Număr de catalog: XPB70D3A25, Număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) în volum de 30 l PBS pe cale nazală (Grupul 1-8).

Ziua 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administrare de dexametazonă (i.p., 3mg/kg, Sigma-Aldrich, număr de catalog D1159) (grupul 7).

Ziua 14 Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Numărul total de șoareci = 40.

10 **Obiective și analiză**

În ziua a 14 animalele au fost sacrificate prin injecție letală intraperitoneală cu pentobarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de o spălare bronhoalveolară (BAL).

15 Celulele au fost izolate de lichidul BAL (spălarea bronhoalveolară) și s-au recoltat numărul de celule diferențiale (200 de număr de celule/probe).

Materiale și metode

20 **Șoareci.** Șoarecii BALB/c în vârstă de 7 săptămâni au fost achiziționați de la laboratoarele Charles River și au fost repartizați aleatoriu în cuști având în total 5 șoareci pe cușcă (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Elveția). Cuștile au fost etichetate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și aclimatizați la instalație timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua de studiu 14). Animalele aveau 8 săptămâni în ziua de studiu 14, iar apa potabilă și alimentele erau disponibile ad libitum. Cușca a fost îmbogățită. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată conform numărului de autorizație locală 2283.1 (eliberat și aprobat de: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apa potabilă și alimentele au fost disponibile ad libitum și reîmprospătate o dată pe zi. Cușca a fost îmbogățită. Normele privind bunăstarea animalelor au fost respectate conform autorităților oficiale din Elveția în baza ordonanței 455.163 FVO (Oficiul Federal Veterinar) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare a animalelor.

30 **Cultivarea inoculilor bacterieni.** În cadrul unei stații de lucru sterile, s-a dezghețat un flacon de bacterii încălzindu-se în mână cu mânășă și injectat 0,7 ml de conținut într-un tub Hungate (Numărul Cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), conținând 8 ml de anaerobe YCFA. De obicei s-au preparat două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la 37°C timp de 16 ore (pentru tulpina 755).

35 **Cultivarea vehiculului de control.** S-a incubat un tub Hungate care conține 8 ml de YCFA anaerobă (static) la 37°C timp de 16 ore.

Administrarea inoculilor bacterieni sau vehicul de control. 400 ul de inoculi bacterieni de cultură sau vehicul de control au fost administrate pe zi, prin gavaj oral.

40 **Sensibilizare intranasală.** Șoarecii au fost aneșteziți cu o injecție i.p. cu 9,75 mg xilasol și 48,75 mg ketasol per kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Elveția) și li s-a administrat 15 ml de HDM (Număr de catalog: XPB70D3A25, Număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) în volum de 30 PBS pe cale nazală.

45 **Pregătirea și administrarea compusului de control pozitiv Dexameta-zona.** Fosfatul disodic de dexametazonă 21- (Sigma-Aldrich, număr de catalog D1159, lot N ° SLBD.1030V) a fost rezolvat în H₂O și administrat animalelor în doză de 3mg/kg într-un volum de 200ul pe cale orală în zilele indicate în studiu pentru protocolul de mai sus.

Procedura de încheiere. În ziua a 14 animalele au fost sacrificate printr-o injecție letală i.p. injecție cu pentobarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavaj bronhoalveolar (BAL) în 500 ul de soluție salină.

50 **Măsurarea infiltrărilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate din fluidul BAL și numărarea celulelor diferențiale s-a efectuat pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard.

55 **Grafice și analize statistice.** Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism Versiunea 6 și a fost aplicat un ANOVA unidirecțional. Rezultatele analizei statistice au fost furnizate cu tabelele de date individuale. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei (SEM).

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figurile 1-9.

60 Nu s-a observat niciun caz de morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteriile sau vehiculul. Cele două controale, tratamentul vehiculului (control negativ) și tratamentul cu

dexametazonă (control pozitiv) s-au comportat așa cum era de așteptat, cu eozinofilie afectată și neutrofile notate în urma tratamentului cu dexametazonă.

Cele mai importante rezultate ale acestui experiment sunt prezentate în Figurile 6 și 7, care raportează numărul total și procentul de neutrofile detectate în spălarea bronhiolară în urma administrării de HDM. Administrarea de tulpină 755 a dus la o reducere statistic semnificativă a neutrofilelor totale și a proporției de neutrofile în BAL în raport cu vehiculul de control.

Exemplul 2 - Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un caz de astm bronșic sever la șoarece

Sumar

Șoarecilor li s-au administrat compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției și au fost ulterior sensibilizați cu administrări subcutanate de extract de praf acvatic (HDM) și li s-a administrat intranasal HDM, pentru a constata răspunsul inflamator al astmului bronșic sever. Mărimea și caracteristicile răspunsului inflamator expus de șoarecii tratați cu compoziții ale invenției au fost comparate cu grupele de control. S-a descoperit că compozițiile invenției atenuează răspunsul inflamator și, în special, reduc recrutarea neutrofilelor, într-o manieră comparabilă cu controlul pozitiv care cuprinde administrări de anticorpi anti-IL-17. De aceea, datele indică faptul că compozițiile invenției pot fi utile în tratarea afecțiunilor mediate de IL-17 și Th17, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Tulpina

755: *Parabacteroides distasonis*

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehiculul de control (pe cale orală).

5. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 755 (pe cale orală).

7. Grup de control pozitiv. Tratament anti-IL-17 (i.p.).

8. Grup de control netratat.

9: Șoareci sănătoși (linie de bază).

Numărul șoarecilor pe grup (grupul 1-8) = 5

Ziua 14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a vehiculului de control pe cale orală (grupul 1).

Ziua 14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a inoculului de bacterii terapeutice pe cale orală (grupul 2-6).

Ziua 0: Sensibilizare cu HDM în CFA (s.c.) (grupul 1-8).

Ziua 7: Sensibilizare cu HDM în CFA (s.c.) (grupul 1-8).

Zilele 13, 15, 17: Administrarea anticorpului de neutralizare anti IL-17 per i.p. (Grupul 7).

Zilele 14, 15, 16, 17: Administrare de HDM în 30ul PBS pe cale nazală (grupul 1-8).

Ziua 18: Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Obiective și analiză:

În ziua a 14-a animalele au fost sacrificate prin injecție letală intraperitoneală cu pentobarbital (Streuli PharmaAG, Uznach, Cat: 1170139A), urmată imediat de un lavaj bronhoalveolar (BAL). Celulele au fost izolate de fluidul BAL și s-au numărat celulele diferențiale (200 de celule/probe).

Material și metode.

Șoareci. Șoarecii în vârstă de 7 săptămâni C57BL/6 de sex feminin au fost achiziționați de la laboratoarele Charles River și au fost repartizați aleatoriu în cuști având în total 5 șoareci pe cușcă (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Elveția. Cuștile au fost etichetate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și aclimatizați la instalație timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua de studiu 14). Animalele aveau 8 săptămâni în ziua studiului 14. Apa potabilă și alimentele erau disponibile ad libitum. Cușca a fost îmbogățită. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată conform numărului de autorizație locală 2283.1 (eliberat și aprobat de: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apa potabilă și alimentele au fost disponibile ad libitum și reîmprospătate o dată pe zi. Cușca a fost îmbogățită. Normele privind bunăstarea animalelor au fost respectate conform autorităților oficiale din Elveția în baza ordonanței 455.163 FVO (Oficiul Federal Veterinar) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare a animalelor.

Cultivarea inoculilor bacterieni. În cadrul unei stații de lucru sterile, s-a dezghețat un flacon de bacterii prin încălzire în mâna cu mânășă și s-au injectat 0,7 ml de conținut într-un tub Hungate (Numărul Cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lengler, Germania), conținând 8 ml de anaerobe YCFA. De obicei s-au preparat două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la 37°C timp de 16 ore (pentru tulpina 755).

Cultivarea vehiculului de control. S-a incubat un tub Hungat care conține 8 ml de YCFA anaerobă (static) la 37°C timp de 16 ore.

Administrarea inoculilor bacterieni sau vehicul de control. Inoculul de bacterii de cultură sau vehicul de control a fost administrat ziua, prin gavaj oral.

5 **Sensibilizare HDM.** 50 ?g de HDM (Număr de catalog: XPB70D3A25, Număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) din PBS a fost emulsionat în volum egal de adjuvant complet Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, SUA) și administrat subcutanat în volum de 200 ?l, de două ori peste două săptămâni pe flancurile opuse. La o săptămână după a

10 două imunizare, șoarecii au fost anesteziați cu injecție i.p. cu 9,75 mg xilasol și 48,75 mg ketasol pe kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Elveția) și apoi li s-a administrat intranasal 15 ?g de HDM în volum de 30 l PBS în 4 zile consecutive. Analiza a fost efectuată la o zi după administrarea finală.

15 **Pregătirea și administrarea anticorpului IL-17 de șoarece combinat de control pozitiv.** Anticorpul de neutralizare anti-IL-17 a fost administrat din Bio X Cell și a fost păstrat la 4°C (Clona 17F3, Numărul Cat. BE0173, Bio X Cell) și administrat i.p. în doză de 12,5 mg/kg în zilele indicate în protocolul de studiu de mai sus.

Procedura de încheiere. În ziua a 18 animalele au fost sacrificate prin injecție letală i.p. cu pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavaj bronhoalveolar (BAL) în 500 ul de soluție salină.

20 **Măsurarea infiltrărilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate de fluidul BAL și numărarea de celule diferențiale a fost efectuată pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard.

Grafice și analize statistice. Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism

Versiunea 6 și a fost aplicat un ANOVA unidirecțional. Rezultatele analizei statistice sunt

furnizate cu tabelele de date individuale. Barele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei

(SEM).

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figurile 10-18.

30 Nu s-a observat nicio morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteriile sau vehiculul. Așa cum se arată în Figurile 15 și 16, tulpina 755 a fost foarte eficientă în atenuarea măririi răspunsului inflamator neutrofil. În plus, tulpina 755 a redus numărul de eozinofile față de controale, după cum se arată în Figurile 11 și 12.

Exemplul 3 - Eficacitatea inoculilor bacterieni în tratarea artritei într-un caz de artrită indusă de collagen de tip II la șoarece

Materiale și metode

35 **Tulpina**

755: *Parabacteroides distasonis*

Culturi bacteriene

Culturile bacteriene au fost crescute pentru administrare într-o stație de lucru anaerobă (Don Whitley Scientific).

40 Tulpina bacteriană # 755 a fost crescută folosind stocuri de glicerol. Stocurile de glicerol au fost depozitate la -80°C. De trei ori pe săptămână, stocurile de glicerol au fost dezghețate la temperatura camerei și întinse pe plăcile YCFA. Cu fiecare ocazie a fost utilizată o nouă alicotă de glicerol. Bacteriile au fost lăsate să crească pe o placă dată timp de până la 72 de ore.

45 Soluțiile care trebuie administrate animalelor au fost preparate de două ori pe zi, cu un interval de opt ore pentru tratamentele de dimineață (AM) și după-amiază (PM). O colonie bacteriană a fost preluată din placa întinsă și transferată într-un tub care conține media YCFA. Tulpina bacteriană # 755 a fost lăsată să crească timp de 24 de ore înainte de administrarea AM. Bacteriile au fost subcultivate la 1% în media YCFA pentru administrațiile PM. Valorile OD au fost înregistrate pentru fiecare tulpină după preparatele de tratament dimineață și după-amiaza.

50 **Model de artrită indusă de collagen de tip II la șoarece**

55 Șoarecii adulți DBA/1 de sex masculin au fost repartizați aleatoriu în grupuri experimentale și au fost lăsați să se aclimatizeze timp de două săptămâni. În ziua 0, animalelor li s-a administrat prin injecție subcutanată 100 de microlitri dintr-o emulsie care conține 100 micrograme de collagen de tip II (CII) în adjuvantul Freund incomplet suplimentat cu 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H37Ra. În ziua 21, animalelor li s-a administrat prin injecție subcutanată o emulsie rapel care conține 100 ?g de collagen de tip II în adjuvant Freund incomplet.

60 Tratamentele au fost administrate conform graficului de administrare de mai jos. Din ziua 14 până la sfârșitul experimentului în ziua 45, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost urmărite de trei ori pe săptămână pentru semne clinice de artrită, incluzând umflarea labei posterioare și anterioare, articulații radio-carpene (încheietura mainii) și articulații tibio-tarsale (gleznă).

În ziua 45, șoarecilor li s-au recoltat probe de sange terminale pentru analiza citokinei.

În ziua 14, ziua 0 și ziua 45, s-au recoltat probe fecale pentru analiză microbiologică, care au fost înghețate imediat și păstrate la -80°C.

Modelul de artrită indusă de collagen (CIA) la șoarece este un model bine cunoscut de artrita reumatoidă la șoarece [66]. Imunizarea cu CII provoacă o patogeneză care include câteva caracteristici patologice importante ale artritei reumatoide, inclusiv hiperplazia sinovială, infiltrarea celulelor mononucleare și degradarea cartilajului. În mod semnificativ, dezvoltarea CIA este mediată de celulele Th17 prin secreția de IL-17A [67]. Răspunsul imun care stă la baza modelului de artrită este îmbunătățit prin utilizarea adjuvantului Freund complet

cu *Mycobacterium tuberculosis*. În ziua 21, au fost recoltate splinele a trei animale satelit din fiecare grup. Celulele au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau absența collagenului de tip II. Citokinele, incluzând TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 și IL-17, au fost cuantificate în Luminax în supernatanții de cultură și în serul terminal. Proliferarea celulară a fost cuantificată folosind o metodă de incorporare a timidinei tritiate.

Grupuri și doze de tratament

Toate grupurile au fost $n = 15$ ($n = 12$ pentru grupul principal de studiu și $n = 3$ pentru grupurile satelit)

Vehiculul utilizat pentru bioterapie a fost mediu de extract de drojdie-Casitone-Fatty Acids (YCFA).

	Group	Doză	Administrare		Inducerea bolii
			Rută	Regim	
1	Vehicul	5 ml/kg	PO	Ziua -14- Sfârșit	Ziua 0: Collagen/CFA, o dată, SC Ziua 21: Collagen/IFA, o dată, SC
5	Bioterapeutic #755	5 ml/kg			

PO: gavaj oral, SC: injecție subcutanată, BID: de două ori pe zi, CFA: adjuvant Freund complet.

Greutăți corporale

Din ziua 14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Datele au fost înregistrate (Media $\pm$ SEM).

Observații clinice nespecifice

Începând cu ziua 14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost verificate zilnic pentru semne clinice nespecifice care includ postura anormală (cocoșat), starea anormală a straturii (piloerecție) și nivelurile de activitate anormale (activitate redusă sau crescută).

Observații clinice

Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului din ziua 45, animalele au fost notate de trei ori pe săptămână pentru semne clinice de artrită, incluzând umflarea labei posterioare și anterioare, articulații radio-carpene (încheietura mainii) și articulațiile tibio-tarsale (gleznă). Fiecare membru a fost notat folosind următoarea scală: (0) normal, (1) umflare ușoară, (2) umflare ușoară, (3) umflare moderată și (4) umflare severă. Un scor clinic a fost calculat adăugând fiecare scor al membrului. Scorul clinic maxim posibil pentru un animal a fost (16). Au fost sacrificate animale cu un scor egal cu (12) în două ocazii consecutive și animale cu un scor mai mare de (12) cu orice ocazie. Datele au fost înregistrate (Media $\pm$ SEM).

Analiza proliferării celulare

În ziua 21, trei animale din grupul satelit au fost sacrificate și splina a fost disecată. Celulele splenice au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau absența collagenului de tip II. După 72 de ore, celulele au fost pulsate în timpul nopții în prezența timidinei tritiate. Proliferarea celulară a fost cuantificată prin măsurarea incorporării timidinei. Datele au fost înregistrate (medie $\pm$ SEM). Supernatanții au fost recoltați și testați pentru prezența citokinelor cheie.

Analiza citokinelor

Supernatanții terminali din culturile de celule ale splinei au fost testați pentru a cuantifica TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 și IL-17 prin Luminex. Datele au fost înregistrate (Media $\pm$ SEM).

Analiza microbiologică

În ziua 14, ziua 0 și ziua 45, s-au recoltat probe fecale de la fiecare animal, s-au înghețat imediat și s-au păstrat la -80°C. Caeca (inclusiv conținutul) a fost congelat imediat și a fost păstrat la -80°C. Un test de identificare bacteriană a fost efectuat zilnic prin placarea bacteriilor.

Histopatologie

- La sfârșitul experimentului, etichete posterioare au fost depozitate în țesut fixator. Probele au fost transferate în soluție de decalcifiere. Probele de țesut au fost prelucrate, secționate și colorate cu Haematoxină și Eozină. Secțiunile au fost marcate de un histopatolog calificat, neinformați de proiectul experimental, privind semnele de artrită care includ inflamații, leziuni ale cartilajelor articulare și leziuni ale osului metafizeal subiacent. A fost utilizat un sistem detaliat de notare (vezi mai jos). Datele au fost înregistrate (medie $\pm$ SEM). Au fost furnizate date brute și analizate, precum și imagini reprezentative.

Tabelul 1: Sistemul de scoring histopatologic

Grad	Descriere
Inflamație	
0	Articulație normală
1	Hiperplazie ușoară sinovială cu inflamație dominată de neutrofile. Număr redus de neutrofile și macrofage în spațiul comun.
2	Hiperplazie sinovială cu inflamație moderată până la marcată care implică atât neutrofile cât și macrofage. Neutrofile și macrofage în spațiul articular; pot fi unele resturi de țesuturi necrotice.
3	Hiperplazie sinovială cu inflamație marcată care implică atât neutrofile cât și macrofage. Pierderea căptușelii din sinoviocite. Inflamația se poate extinde de la sinoviu la țesutul înconjurător, inclusiv la nivelul mușchiului. Numeroase neutrofile și macrofage în spațiul articular, împreună cu resturi de țesuturi necrotice semnificative.
Vătămarea cartilajului articular	
0	Articulație normală
1	Cartilajul articular prezintă doar modificări degenerative ușoare. Formarea timpurie a panusului poate fi prezentă periferic.
2	Cartilajul articular prezintă o modificare degenerativă moderată și o pierdere focală. Formarea panusului este prezentă în mod focal.
3	Întreruperea semnificativă și pierderea cartilajului articular cu formarea extensivă a panusului.
Deteriorarea oaselor metafizeale subiacente	
0	Articulație normală
1	Nicio modificare a osului metafizeal subiacent.
2	Poate apărea necroza focală sau fibroza osului metafizeal.
3	Întreruperea sau ruperea osului metafizeal. Inflamație extinsă, necroză sau fibroză care se extinde în spațiul medular al metafizei.

Rezultate și analiză**Supraviețuire și observații clinice ne-specifice**

- 15 Unele animale au fost sacrificate înainte de sfârșitul programat al studiului din cauza gravității semnelor clinice ale artritei sau din cauza gravității observațiilor clinice nespecifice.

Trei animale au fost sacrificate sau au fost găsite moarte în perioada de pre-tratament (ziua 14 până în ziua 0): un animal din grupul 1 (tratată cu vehicul, animal sosit de la furnizor cu piciorul rupt a fost sacrificat) și două animale din grupul 5 (tratate cu bioterapeutic #755).

- 20 Șapte animale au fost sacrificate din cauza gravității semnelor clinice ale artritei: cinci animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și două animale din grupul 3 (tratate bioterapeutic # 755).

Șase animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) au fost sacrificate din cauza gravității semnelor clinice nespecifice incluzând postura anormală (cocoșat), starea anormală a stratului (piloerecție), niveluri de activitate anormale (activitate redusă).

- 25 **Greutăți corporale**

Datele privind greutatea corporală înregistrate din ziua 14 până în ziua 0 și exprimate ca procent din greutatea inițială (ziua 14) au fost analizate prin ANOVA bidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple cu Ziua 14, apoi pentru comparație multiplă cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în figura 19. Datele de la animale sacrificate înainte de sfârșitul programat al experimentului au fost excluse din analize.

- 30 În comparație cu Ziua 14, administrările de două ori pe zi, prin gavaj oral, au indus o pierdere semnificativă a greutății corporale în grupul tratat cu vehicul în ziua 9 și ziua 7.

- 35 Datele privind greutatea corporală înregistrate începând cu ziua 0 până în ziua 28 și exprimate ca procent din greutatea inițială (ziua 0) au fost analizate prin ANOVA bidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple cu Ziua 0 în grupul Vehicul, apoi pentru comparație multiplă cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în figura 20. Datele de la animale sacrificate înainte de sfârșitul programat al experimentului și de la animalele satelit

au fost excluse din analize. Datele din ziua 28, ziua 35 și ziua 42 au fost analizate în continuare de ANOVA în mod unidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul.

Debutul semnelor clinice de artrită a fost asociat cu o pierdere semnificativă de greutate corporală în ziua 26 și ziua 28 ($p < 0,0001$) în comparație cu ziua 0 în grupul tratat cu vehicul.

În comparație cu grupul tratat cu vehicul, greutatea corpului a fost semnificativ mai mare în grupul 5 (tratată cu bioterapeutic #755) în ziua 28 ($< 0,0001$).

Observații clinice

Datele scorului clinic au fost analizate prin ANOVA bidirecțional, urmate de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple între zile în grupul tratat cu vehicul, apoi pentru comparații multiple între grupurile experimentale și grupul tratat cu vehicul în fiecare zi. Datele sunt prezentate în figura 21. Datele înregistrate de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul experimentului au fost excluse din analiză. Când animalele au fost sacrificate din cauza gravității semnelor clinice ale artritei, ultimul scor înregistrat a fost raportat pentru următoarele zile și utilizat în analizele statistice.

O creștere semnificativă a scorurilor clinice a fost observată în grupul tratat cu vehicul din ziua 28 până în ziua 45 ($p < 0,0001$) în comparație cu ziua 21.

Bioterapeuticul # 755 a indus o reducere a scorurilor clinice în comparație cu grupul tratat cu vehicul din ziua 28 până în ziua 45. Reducerea a fost semnificativă statistic în ziua 31 și ziua 38 ($p < 0,05$).

Analiza proliferării celulare

Pentru a valida analiza, splenocitele au fost cultivate în prezența anti-CD3 solubilă și anti-CD28 (anti-CD3/CD28) ca stimuli de control pozitivi pentru a confirma potențialul proliferativ al celulelor.

Răspunsuri puternice proliferative la anti-CD3/CD28 au fost observate la toate grupurile experimentale, arătând că celulele sunt sănătoase, viabile și capabile să răspundă la semnalele de activare.

Pentru a testa răspunsul proliferativ în prezența collagenului II (CII), s-au cultivat splenocite în prezența CII la 50 $\mu\text{g/ml}$. Răspunsul proliferativ al splenocitelor la CII au fost analizate prin ANOVA bidirecțional, urmat de post-testul lui Sidak pentru comparații multiple între splenocitele nestimulate și stimulate cu CII și ANOVA unidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat CII în diferite grupuri experimentale cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în figura 22.

CII a indus o creștere semnificativă a incorporării ^3H -timidinei (cpm) în comparație cu splenocitele nestimulate din grupul tratat cu vehicul ($p < 0,0001$).

Grupurile tratate cu bioterapeutic # 755 au demonstrat niveluri semnificativ mai mici de proliferare a splenocitului indus de CII decât grupul tratat cu vehicul.

Niveluri de citokine în supernatanții unei culturi de țesut

Nivelurile fiecărei citokine au fost măsurate în supernatanții culturii de țesut derivate din culturile stimulate anti-CD3/CD28 prin analiza luminex. Acestea au arătat răspunsuri solide pentru toate citokinele măsurate (nivelurile medii din grupul de vehicule au fost următoarele: IL-4 = 6,406 pg/ml ; IL-6 = 306 pg/ml ; IL-10 = 10,987 pg/ml ; IL-17A = 11,447 pg/ml ; IFN- γ = 15,581 pg/ml ; TNF- α = 76 pg/ml).

Următoarele secțiuni sintetizează datele obținute din culturile stimulate cu collagen II. Dacă este cazul, au fost efectuate analize statistice ale diferențelor dintre nivelurile de citokine la supernatanții splenocitelor nestimulate și stimulate CII folosind ANOVA cu două sensuri, urmată de post-testul lui Sidak pentru comparații multiple, în timp ce ANOVA cu un singur sens, urmată de post-testul lui Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat CII în grupuri tratate bioterapeutic cu grupul tratat cu vehicul. În ambele cazuri nu a existat nicio diferență semnificativă între nivelurile de citokine între grupuri. Acest lucru se datorează probabil dimensiunii mici a eșantionului utilizat ($n=3$).

Pentru a prezenta mai exact distribuția datelor privind citokinele cu o răspândire substanțială a datelor, acestea sunt prezentate sub formă de loturi dispersate.

Mediile pe grup ale IL-4 în supernatanții unei culturi de țesut după stimularea cu CII au fost $< 5 \text{pg/ml}$. Acestea nu sunt considerate semnificative la nivel biologic și nu sunt incluse aici. Mediile pe grup ale TNF- α în supernatanții culturii de țesut după stimularea cu collagen au fost sub limita de cuantificare.

Nivelele de supernatanți IFN- γ (Figura 23)

Alături de IL-17, IFN- γ este principala citokină care cauzează boli în cazul CIA. Graficul dispersat din figura 23 demonstrează nivelurile de IFN- γ după stimularea CII, media grupului fiind mai mare pentru grupul tratat cu vehicul în comparație cu grupul bioterapeutic.

Nivelurile de supernatanți IL-17A (Figura 24)

- 5 Nivelurile de IL-17A au fost 50pg/ml în culturile stimulate de CII pentru grupul tratat cu vehicul. Nivelurile acestei citokine păreau a fi mai scăzute în grupul bioterapeutic comparativ cu grupul tratat cu vehiculul.

Niveluri de supernatanți IL-10 (Figura 25)

- 10 Nivelurile de IL-10 în grupul tratat cu vehicul au fost de 13 pg/ml și 2,1 pg/ml pentru CII, respectiv de culturi de control a mediului. Pot fi așteptate niveluri mai mari de IL-10 (care este o citokină antiinflamatorie) pentru grupul tratat cu vehicul, deoarece inflamația și inducerea pro-inflamatorie a citokinei ar putea fi însoțite de un mecanism de feedback antiinflamator.

Niveluri de supernatanți IL-6 (Figura 26)

- 15 Citokinele inflamatorii, cum ar fi IL-6 și TNF- α , nu se produc în mod obișnuit la niveluri ridicate în culturile anti-CII. Cu toate acestea, nivelurile lor pot fi modificate ca urmare a modulației imunitare. Nivelurile de IL-6 în culturile stimulate cu CII au fost modeste, ajungând la 10pg/ml. Deși mai mari decât în culturile de control media, aceste diferențe erau prea mici pentru a oferi o justificare pentru efectuarea analizelor statistice.

Analiza microbiologică

- 20 Creșterea bacteriană a fost confirmată prin măsurarea densității optice la 600 nm cu ajutorul unui spectrofotometru. Identitatea bacteriană a fost confirmată prin compararea imaginilor de plăci întinse cu imaginile de referință.

După metoda îmbunătățită de preparare bacteriană, s-au administrat doze mari de tulpină bacteriană constant din ziua 2 și ziua 3, așa cum indică valorile mari de OD măsurate.

- 25 Probele fecale au fost recoltate și congelate rapid în ziua 14, ziua 0 și la final.

Histopatologie

Rezultatele histopatologiei sunt prezentate în Figurile 65-69. Așa cum era de așteptat în acest caz, variabilitate intra-individuală și interindividuală a fost observată în ceea ce privește prezența/absența artritei sau severitatea schimbării prezente.

- 30 Natura patologiei a fost așa cum era de așteptat în acest caz, cu o inflamație cronică-mixtă extinsă a sinovialului și bursa extinsă până la țesuturile moi peri-articulare (mușchi, țesut adipos, collagen dermic). În articulațiile cele mai afectate a aparut degenerarea și pierderea cartilajului articular cu resturi intra-articulare și inflamații și perturbarea structurii articulare și osoase prin fibroză și inflamație.

- 35 Incidența modificărilor histopatologice a fost: vehicul - 80% (16/20); Bioterapeutic # 755 - 41% (9/22). Tratamentul cu Bioterapeutic # 830 a redus incidența scorurilor histopatologice la membrele posterioare ale șoarecilor în comparație cu grupul tratat cu vehicul (vezi Figurile 65-68). Scorurile de histopatologie au fost analizate de ANOVA unidirecțional pentru date non-parametrice (testul Kruskal-Wallis) urmate de post-testul lui Dunn pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul. Bioterapeutic # 755 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de inflamație articulară observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,05$). Bioterapeutic # 755 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de deteriorare a cartilajelor observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,05$). Bioterapeutic # 755 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de afectare osoasă observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,05$). Bioterapeutic # 755 a indus o reducere semnificativă a scorurilor totale de histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,05$).

Sumar

- 50 Scorurile clinice crescute au fost observate începând cu ziua 28 după prima administrare de collagen de tip II, așa cum era de așteptat în acest caz de artrită la DBA/1 șoareci. S-a demonstrat că bioterapeutic # 755 este eficient în tratarea artritei în acest caz. Bioterapeutic # 755 a fost eficient în reducerea severității scorurilor clinice și în reducerea bolii patologice la nivelul articulațiilor, așa cum s-a demonstrat în analiza histopatologică.

- 55 Răspunsurile proliferative de revenire la collagen II au fost observate în culturile splenocitelor din toate grupurile experimentale. Răspunsul specific collagenului a fost redus în mod semnificativ în urma tratamentului cu bioterapeutic # 755 (grupul 5).

- Majoritatea citokinelor cu celule T testate au arătat creșteri detectabile între controlul stimulat de collagen II și mediile din grupul tratat cu vehicul. Aceste creșteri nu au fost la fel de evidente în grupul tratat bioterapeutic. Aceasta susține în mare măsură răspunsurile proliferative de revenire la collagen II descrise mai sus.

Au existat dovezi de suprimare a axei Th1/Th17, care este răspunsul patogen în acest caz și în RA umană. Corelarea nivelurilor reduse de citokine cu proliferare redusă este sugestivă pentru constatarea imunității. Nu a existat nicio dovadă că această constatare a rezultat fie din niveluri crescute de IL-4 asociat Th2, fie de creșteri ale citokinei modulatorie imune, IL-10.

5 ***Exemplul 4 - Analiză suplimentară a efectului inoculilor bacterieni la cazul de astm indus de acarienii de praf la șoareci***

Șoarecii testați în exemplul 1 au fost supuși unor analize suplimentare pentru a caracteriza în continuare efectul compozițiilor invenției asupra răspunsului inflamator al astmului alergic.

Materiale și metode

10 **Recoltarea sangelui și prepararea serului în ziua 14.** Probele de sange ale animalelor au fost recoltate prin puncție cardiacă. Serul a fost izolat din proba de sânge prin centrifugare timp de 5 min la 14000g și păstrat la 20°C.

Eliminarea organelor în ziua 14. Recoltarea lobului pulmonar stang in formol pentru analiza histologică ulterioară. Recoltarea lobilor plămânului drept (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea rapidă și analiza ulterioară. Lichidul BAL rămas a fost înghețat pentru analize ulterioare.

Măsurarea nivelului de anticorpi in ser și lichid BAL

Producția totală de IgE și acarieni de praf acvatic (HDM) de anticorpi IgG1 specifici au fost măsurate în BAL și ser prin test ELISA.

20 **Izolarea analizei pulmonare și histologice**

Lobii plămânului stang au fost fixați în formol urmată de înglobarea în parafină, secționare și colorare cu hematoxină și eozină și PAS. Scorurile histologice ulterioare au fost efectuate in orb după cum urmează: Cinci imagini aleatorii pe eșantion au fost notate pentru inflamație (infiltrare peribronchială și infiltrare perivasculară) și producție de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost notată după următorul sistem de clasificare:

- 0 - normal
- 1 - infiltrări inflamatorii ușoare
- 2 - infiltrări inflamatorii moderate
- 3 - infiltrări inflamatorii importante
- 30 4 - infiltrări inflamatorii severe
- 5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

În fiecare câmp vizual, căile respiratorii au fost măsurate ca mărime și numărul de celule de mucus a fost cuantificat/um.

Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar

35 Lobii pulmonari dreپti (toți lobii rămași) izolați pentru cuantificarea mediatorilor inflamatori au fost înghețați pentru măsurarea ulterioară a CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL 17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 și CCL5 prin test multiplex disponibil comercial (Merck-Millipore). Analiza a fost efectuată conform instrucțiunilor producătorului.

Rezultate și analiză

40 Rezultatele experimentelor sunt prezentate in Figurile 27-45.

In sprijinul descoperirilor descrise in Exemplul 1, analiza infiltrațiilor celulare din țesutul pulmonar al șoarecilor tratați cu tulpina 755 a arătat o reducere notabilă și statistic semnificativă a scorului mediu al inflamației (vezi Figurile 31 și 33).

45 Au fost analizate nivelurile de anticorpi din lichidul BAL și ser (vezi Figurile 27 30). Nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelului de anticorpi serici. Acest lucru poate reflecta un eșec al experimentului, deoarece diseminarea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar controalele pozitive și negative nu par să se comporte așa cum ar fi fost de așteptat. De asemenea, nivelurile de anticorp seric de bază ar fi putut masca orice schimbare.

50 In mod similar, nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelurilor de citokine din țesutul pulmonar (vezi Figurile 35-45). Din nou, acest lucru poate reflecta un eșec al experimentului, deoarece diseminarea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar controalele pozitive și negative nu par să se comporte așa cum ar fi fost de așteptat. Este, de asemenea, posibil ca mecanismul de acțiune implicat să influențeze răspunsurile anterioare de citokine care nu mai erau detectabile in ziua a 4-a de după administrarea finală a câilor aeriene HDM. Trebuie acordată o anumită atenție la interpretarea datelor citokinei din studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate ar putea fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru diferitele analize și, astfel, un lob pulmonar nu ar fi putut fi pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob la alți șoareci, datorită distribuției incomplete a inflamației.

Exemplul 5 - Analiza suplimentară a efectului inoculilor bacterieni la cazul de astm bronșic sever la șoarece

Șoarecii testați în exemplul 2 au fost supuși unor analize suplimentare pentru a caracteriza în continuare efectul compozițiilor invenției asupra răspunsului bronșic asociat cu astmul sever.

5 **Materiale și metode**

Eliminarea organelor în ziua 18. Recoltarea lobului pulmonar stâng în formol pentru analiza histologică ulterioară. Recoltarea lobilor plămânului drept (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea rapidă și analiza ulterioară. Lichidul BAL rămas a fost înghețat pentru analize ulterioare.

10 **Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar (analize ulterioare).** Lobii pulmonari dreپți (toți lobii rămași) izolați pentru cuantificarea mediatorilor inflamatori au fost înghețați pentru măsurarea ulterioară a IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 și IL 33 prin test multiplex disponibil comercial (Merck-Millipore). Analiza a fost efectuată conform instrucțiunilor producătorului.

15 **Măsurarea nivelului de anticorpi în ser și lichid BAL (analiză ulterioară).** Producția de anticorpi specifici IgG1 și IgG2a de acarieni de praf (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin test ELISA.

Izolarea analizei pulmonare și histologice (analiza ulterioară). Lobii plămânului stâng au fost puși în formol urmată de înglobarea în parafină, secționare și colorare cu hematoxină și eozină și PAS. Scorurile histologice ulterioare au fost efectuate în orb după cum urmează: Cinci campuri aleatorii pe eșantion au fost urmărite privind inflamația (infiltrare peribronchială și infiltrare perivasculară) și producție de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost notată cu următorul sistem de clasificare:

- 0 - normal
- 25 1 - infiltrări inflamatorii ușoare
- 2 - infiltrări inflamatorii moderate
- 3 - infiltrări inflamatorii importante
- 4 - infiltrări inflamatorii severe
- 5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

30 **Rezultate și analiză**

Rezultatele experimentelor sunt indicate în Figurile 46-63.

Analiza suplimentară a nivelurilor de anticorpi a arătat că eficacitatea tulpinii bacteriene 755 s-a reflectat de asemenea în reducerea nivelurilor IgG1 specifice HDM în fluidul BAL și ser (vezi Figurile 46 și 48). Nu se pot trage concluzii ferme cu privire la un efect asupra nivelurilor IgG2. Per global, datele din analiza anticorpilor sunt sugestive pentru reducerea legată de reducerea globală a răspunsului inflamator, opusă unui efect selectiv asupra comutației izotopului anticorp.

Analiza histologică suportată de numărarea celulelor diferențiale din lichidul BAL, a arătat o reducere a infiltrațiilor celulare la șoarecii tratați cu tulpina 755 (vezi Figurile 50-52).

40 În raport cu nivelurile de citokine, ca în exemplul 4, răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar controalele pozitive și negative nu par să se fi comportat așa cum ar fi de așteptat. Este de asemenea posibil ca mecanismul de acțiune să implice influențarea răspunsurilor anterioare de citokine care nu mai erau detectabile în ziua a 4-a după provocarea finală a căilor aeriene cu HDM. Trebuie interpretată o anumită atenție la interpretarea datelor citokinei din studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate ar putea fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru diferitele analize și, astfel, un lob pulmonar nu ar fi putut fi pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob la alți șoareci, datorită distribuției incomplete a inflamației. În ciuda acestei variabilități, s-a arătat un efect antiinflamator clar asupra nivelurilor de citokine pentru tulpina 755, iar controlul pozitiv anti-IL-17 Ab s-a comportat în general așa cum era de așteptat.

50 Cu avizele de mai sus, datele din figurile 55 și 57 sugerează că tratamentul cu tulpina 755 poate atinge o reducere a nivelurilor de IL-1β și IFNγ, ceea ce poate indica un mecanism de acțiune legat de influențele asupra eliberării de chemokină (și, prin urmare, de recrutare a celulelor) de către celulele stromale sau celulele imune innascute. Aceste citokine sunt parte din linia Th17. Luând împreună acest set de date, poate fi trasă o concluzie clară că tulpina 755 a fost foarte eficientă în protejarea șoarecilor împotriva inflamației în acest model de astm bronșic sever la șoarece.

Exemplul 6 - Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un caz de scleroză multiplă la șoarece

Sumar

60 Șoarecilor li s-au administrat compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției, iar șoarecii au fost ulterior imunizați cu glicoproteină oligodendrocitară a mielinei pentru a li se

induce encefalomielite autoimună experimentală (EAE). EAE este cel mai frecvent utilizat caz experimental pentru scleroza multiplă umană. S-a descoperit că compozițiile invenției au un efect izbitor asupra incidenței bolii și gravității bolii.

Tulpina

- 5 755: bacterii depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 43282

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (oral).
5. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 755 (oral).
10 9. Grup de control pozitiv. Tratament cu Dexametazonă (i.p.).
10. Grup de control netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 10

- Zilele 14 la ziua 27: Administrarea zilnică a vehiculului de control pe cale orală (grupul 1).
15 Zilele 14 până în ziua 27: Administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupul 5).
Zilele 0-28: administrarea Dexametazonei (de exemplu) de trei ori pe săptămână (grupul 9)
Ziua 0: MOG35-55 (glicoproteină oligodendrocitară a mielinei - 2mg/ml) și CFA (2mg/ml MTB) s-au amestecat 1: 1 rezultând soluții 1mg/ml. S-au injectat subcutanat 100 μ l de amestec peptidă-CFA în fiecare laba posterioară. Administrarea toxinei pertussice intraperitoneal (300ng).
20 Ziua 1: Administrarea toxinei de pertussis intraperitoneal (300ng).
Zilele 7-înainte: Măsurarea incidenței bolii și a gravității de trei ori pe săptămână.

Obiective și analiză

- 25 Șoarecii au fost analizați pentru incidența bolii și severitatea bolii de trei ori pe săptămână. Scoringul a fost efectuat în orb. Severitatea bolii a fost evaluată folosind un scor clinic cuprins între 0 și 5, 5 indicând un șoarece mort (a se vedea sistemul de notare clinică de mai jos).

Monitorizare

- In zilele indicate, șoarecii au fost cântăriți și observați pentru scorul activității bolii și incidența bolii.
30 Observații privind scorul activității bolii:
0 - Nu există modificări evidente ale funcției motrice în comparație cu șoarecii neimunizați.
0,5 - Varful cozii este bleg.
1,0 - Coadă bleagă.
1,5 - Coadă bleagă și laba posterioară slăbită.
35 2,0 - Coadă bleagă și laba posterioară slăbită.
SAU - Există semne evidente de înclinare a capului atunci când se observă mersul. Echilibrul este slab.
2,5 - Coadă bleagă și târârea labelor posterioare.
- SAU - Există o înclinare puternică a capului care face ca șoarecele să cadă ocazional.
40 3,0 - Coadă bleagă și paralizie completă a labelor posterioare.
3,5 - Coadă bleagă și paralizie completă a labelor posterioare.
In plus: șoarecele se mișcă în jurul cuștii, dar atunci când este așezat pe flanc, nu este în stare să se îndrepte.
Labelle posterioare sunt ținute împreună pe o parte a corpului.
45 4,0 - Coadă bleagă, paralizie totală a labei posterioare și paralizie parțială a labei anterioare.
- Șoarecele se mișcă minim în jurul cuștii, dar este alert și se hrănește
4,5 - Paralizie completă a labelor posterioare și paralizie parțială a labelor anterioare, nicio mișcare în jurul cuștii.
Șoarecele este eutanasiat imediat și scos din cușcă.
50 5,0 Șoarecele este eutanasiat din cauza paraliziei severe.
Atunci când un animal are un scor al bolii egal sau mai mare de 1, se consideră că are un scor pozitiv al incidenței bolii.

Rezultate

- Rezultatele studiului sunt indicate în Figurile 70 și 71.
55 Inducerea bolii în grupurile de control negativ a avut succes cu scoruri ridicate arătate de controlul cu vehicul și de controlul netratat. Efectul tratamentului cu tulpina 755 a fost izbitor, iar șoarecii tratați cu tulpina 755 au prezentat o reducere a incidenței bolii și severității bolii. Într-adevăr, reducerea incidenței bolii și severității bolii au fost comparabile cu grupul de control pozitiv. Aceste date indică faptul că tulpina 755 poate fi utilă în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple.
60

Exemplul 7 - Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un caz de uveită la șoarece

Sumar

Acest studiu a utilizat un caz de uveită indusă de proteina de legare la interfotoreceptor retinoid (IRBP) la șoarece pentru a testa efectele administrării bacteriene asupra uveitei. Uveita este o afecțiune care pune în pericol vederea rezultatului inflamației intraoculare și distrugerii țesutului retinian. Această boală poate fi studiată la rozătoare într-un caz de uveoretinită autoimună experimentală (EAU) [68]. EAU este o afecțiune specifică organului în care celulele Th1/Th17 sunt direcționate către antigene retiniene și produc citokine care activează celulele mononucleare rezidente și care se infiltrează ducând la distrugerea țesutului. EAU poate fi indusă la șoareci prin administrarea cu antigene retiniene, inclusiv peptida proteică de legare la interfotoreceptor retinoid (IRBPp). Debutul bolii apare în mod normal în ziua 8-9 și maximele după zilele 14-15. Semnele bolii clinice pot fi monitorizate folosind imagini fundale endoscopice topice (TEFI).

Tulpina

MRX005: *Parabacteroides distasonis*, bacterie înregistrată sub numărul de înregistrare NCIMB 42382.

Bioterapeutic a fost furnizat în stoc de glicerol. Mediul de creștere microbiologic (YCFA) a fost utilizat pentru cultura agentului.

Șoareci

Șoarecii au fost tulpina C57BL/6 și aveau peste 6 săptămâni la începutul studiului. S-au folosit 72 de șoareci (+ 36 de animale prin satelit). Animalele nesănătoase au fost excluse din studiu. Animalele au fost adăpostite în condiții specifice lipsite de patogeni (spf), într-o cameră de monitorizare monitorizată termostatic ($22 \pm 4^\circ\text{C}$). Animalelor li s-a permis să se aclimatizeze în condiții standard de casă a animalelor timp de cel puțin o săptămână înainte de utilizare. Starea de sănătate a animalelor a fost monitorizată în toată această perioadă, iar aptitudinea fiecărui animal pentru utilizare experimentală a fost evaluată înainte de începerea studiului. Șoarecii au fost adăpostiți în grupuri de până la 10 animale pe cușcă pe toată durata studiului. Dieta de palet iradiat (dieta Lab, dieta rozătoarelor 22%, 5LF5) și apa au fost disponibile ad libitum pe parcursul perioadelor de aclimatizare și de studiu. Este puțin probabil ca orice component al dietei sau al apei să intervină în studiu.

Sumarul experimentului

Șoarecii adulți C57BL/6 au fost repartizați aleatoriu în grupuri experimentale și au fost lăsați să se aclimatizeze timp de o săptămână. Tratamentele au fost administrate conform graficului de mai jos. În ziua 0, animalelor li s-a administrat o emulsie conținând 200 μg de proteină de legare la interfotoreceptor retinoid 1-20 (IRBP p1-20) în adjuvant Freund complet (CFA) completat cu 2,5 mg/ml Mycobacterium Tuberculosis H37 Ra prin injecție subcutanată. Tot în ziua 0, animalelor li s-a administrat 1,5 mg de toxină Bordetella Pertussis prin injecție intra-peritoneală. Din ziua 14, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Din ziua 1 până la sfârșitul experimentului în ziua 42, animalele sunt monitorizate de două ori pe săptămână pentru semne clinice de uveită folosind imagistică de fundal endoscopică topică (TEFI).

Graficul administrării

Toate grupurile sunt $n=12$

Vehiculul pentru administrare orală este mediu YCFA.

Volumul de administrare pentru administrare orală de două ori pe zi este de 5 ml/kg.

Grup	Tratament	Doza	Ruta	Frecvența	Inducerea bolii
1	Vehicul	5 ml/kg	PO	BID	Ziua 0: IRBP/CFA, SC
2	MRX005	5 ml/kg		Ziua 14-sfarsit	Ziua 0: PTx, IP

PO: administrare orală, BID: de două ori pe zi, SC: injecție subcutanată, IP: injecție intra-peritoneală, IRBP: proteină de legare interfotoreceptor, CFA: adjuvant complet Freund, PTx: toxina Pertussis

Un grup de control pozitiv a fost, de asemenea, testat folosind tratamentul cu medicamentul ciclosporină A.

Rezultate

Greutatea corporala. Din ziua 14, animalele sunt cântărite de trei ori pe săptămână. Animalele cu o pierdere de greutate corporală egală sau mai mare de 15% din greutatea lor inițială (ziua 0) în două ocazii consecutive sunt sacrificate.

Observații clinice nespecifice. Începând cu ziua 14 până la sfârșitul experimentului, animalele sunt verificate zilnic dacă există semne clinice nespecifice care includ postură anormală (cocoșat), stare anormală a blănii (piloerecție) și niveluri de activitate anormale (activitate redusă sau crescută).

Scoruri clinice: imagistica retiniană prin imagistică de fundal endoscopică topică (TEFI). Din ziua 1 până la sfârșitul experimentului, animalele sunt urmărite de două ori pe

săptămână pentru semne clinice de uveită. Imaginile retiniene sunt capturate utilizând TEFI la animale neanesteziate, dar restranse, după dilatarea pupilei folosind Tropicamidă 1%, apoi clorhidrat de fenilfrină 2,5%. Imaginile retiniene sunt evaluate folosind următorul sistem. Scorul maxim cumulat este de 20.

Scor	Inflamația discului optic	Vase retiniene	Infiltrarea țesutului retinian	Vătămare structurală
1	Minimă	1-4 infiltrări usoare	1-4 leziuni mici sau 1 leziune liniară	Leziuni retiniene sau atrofie a $\frac{1}{4}$ până la $\frac{3}{4}$ a zonei retiniene
2	Redusă	>4 manșete ușoare sau 1-3 infiltrări moderate	5-10 leziuni mici sau 2-3 leziuni liniare	Atrofie panretiniană cu leziuni mici multiple (cicatrici) sau ≤ 3 leziuni liniare (cicatrici)
3	Moderată	>3 infiltrări moderate	>10 leziuni mici sau >3 leziuni liniare	Atrofie panretiniană cu >3 leziuni liniare sau leziuni confluențe (cicatrici)
4	Severă	>1 infiltrări severe	leziune retiniană confluentă	Detașare retiniană cu pliere
5	Nevizibilă (white-out sau detașare severă)			

5

Rezultate

Rezultatele studiului sunt indicate în Figurile 72 și 73.

Scoruri clinice: imagistica retiniană prin imagistică fundală endoscopică topică (TEFI). Datele scorurilor TEFI măsurate în grupul de control din ziua 0 până în ziua 28 au fost analizate prin testul Kruskal-Wallis pentru datele non-parametrice urmate de post-testul lui Dunn pentru comparații multiple între zilele experimentale.

Administrarea IRBP a indus o creștere semnificativă a scorurilor TEFI măsurate începând cu ziua 14 ($p < 0,01$) și în ziua 28 ($p < 0,0001$) în comparație cu ziua 0 în grupul Control (Figura 72).

Scorurile TEFI măsurate în toate grupele experimentale în ziua 28 au fost analizate utilizând un ANOVA unidirecțional. După cum era de așteptat, s-a observat o descreștere semnificativă în scorurile din grupul ciclosporinei A de control pozitiv. A existat de asemenea o descreștere statistic semnificativă în scorurile grupului tratat cu MRX005 ($p < 0,01$) față de controlul negativ (Figura 73).

Concluzii. Scorurile clinice determinate de TEFI au crescut începând cu ziua 14, așa cum era de așteptat în acest caz de uveită indusă de IRBP. Până în ziua 28, o reducere izbitoare și statistic semnificativă a incidenței bolii și a gravității bolii, a fost observată în grupul tratat cu MRX005, care a fost comparabilă cu cea care a fost observată pentru grupul de control pozitiv. În special, aceste date indică faptul că tratamentul cu tulpina MRX005 a redus deteriorarea retinei, inflamația discului optic și/sau infiltrarea țesutului retinian de către celulele inflamatorii (a se vedea sistemul de evaluare a imaginii retiniene TEFI de mai sus). Aceste date indică faptul că tulpina MRX005 poate fi utilă în tratarea sau prevenirea uveitei.

Exemplul 8 - Testarea stabilității

O compoziție descrisă aici care conține cel puțin o tulpină bacteriană descrisă aici este păstrată într-un recipient sigilat la 25°C sau 4°C și recipientul este plasat într-o atmosferă având 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% sau 95% umiditate relativă. După 1 lună, 2 luni, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani, cel puțin 50%, 60%, 70%, 80% sau 90% din tulpina bacteriană trebuie să rămână măsurată în unități de formare a coloniei determinate prin protocoale standard.

35

Secvențe

SEQ ID NO:1 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal 16S, secvența parțială, tulpină: JCM 5825 – AB238922)

1 agagtttcat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcgggg tgtagcaata caccgcccgc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc
 121 aacttgccta tcagaggggg ataaccggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
 181 gatcccgcat gggaatatgt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt
 241 aggcagttgg cggggtaacg gccaccacaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
 301 gtccccaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat
 361 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgctg gagggatgaa ggttctatgg
 421 atcgtaaaac tcttttataa gggaataaag tgccggacgt gtcccgtttt gtatgtacct
 481 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcca gcagccggcg taatacggag gatccgagcg
 541 ttatccggat ttattgggtt taaaggggtg gtaggcgccc ttttaagtca gcggtgaaag
 601 tctgtggctc aaccatagaa ttgcccgtga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag
 661 gcggaatgag tgggtgtagc gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag
 721 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta
 781 gataccctgg tagtccacgc agtaaagcat gatcactagc tgtttgcgat acactgtaag
 841 cggcacagcg aaagcgtaa gtgatccacc tggggagtag gccggcaacg gtgaaactca
 901 aaggaattga cggggggccc cacaagcgga ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg
 961 aggaacctta cccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat
 1021 agccgtttgc gaggtgctgc atgggtgtcg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
 1081 tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt
 1141 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaagcg ggggatgacg tcaaatcagc acggccctta
 1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaag ggaggccacc tggcgacagg
 1261 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccgca ctccgtgaag
 1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcacagacca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt
 1381 acacaccggc cgtcaagcca tgggagccgg gggtaacctg agtccgtaac cgaaaggatc
 1441 ggcctagggt aaaactgggt actggggcta agtcgtaaca aggttaacc

SEQ ID NO:2 (GenBank *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13400 - AB238923)

1 agagtttcat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gogtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatgttc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacg gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgta gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gcggttgaaa ctggggggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tccactagct tttgcgatac agtgaagcgc
 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctcgc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggtgacgct aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtta aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:3 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13401 - AB238924)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
  61 ggcagcacag gtagcaatac ccgccggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacgac ccaccaaacg gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgta gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggatth attgggttta aagggtgctg agcgggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccg ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccttggtg gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga cggaggtgga aacacctttt ctagcaatag
1021 ccgtttgoga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt gatgctgagg actctggtgg
1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg atgccacctg gcgacaggga
1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag
1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

```

SEQ ID NO:4 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13402 - AB238925)

1 agagtttcat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggacca aactcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt ccggttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgaag ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtgc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagc actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:5 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal a6S, secvență parțială, tulpină: JCM 13403 - AB238926)

1 agagtttcat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga cacggacca aactcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt ccggttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccggcgta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgcaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgaag ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtgc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagc actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO:6 (Gena *Parabacteroides distasonis* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 13404 - AB238927)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa
121 cttacctatc agagggggat aaccggcga aagtcggact aataccgat gaagcagggg
181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
241 gcagttggcg gggtaacggc ccacaaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
361 tggatcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
421 cgtaaacctc tttataagg gaataaagtg tgggacgtgt ccggtttgt atgtacctta
481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
541 atccgatttt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc
721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tctactagctg tttgcgatac attgtaagcg
841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
901 ggaattgacg ggggcccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcggg ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgctgct agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca
1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaagg aggccacctg gcgacagggg
1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcggg tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggcttcttac
1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

```

SEQ ID NO:7 (Gena *Parabacteroides merdae* pentru ARN ribosomal 16S, secvență parțială, tulpină: JCM 9497 - AB238928)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgttaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcgggtt aacggccac caaaccgacg atggatagg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggtt ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtga
 361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt tttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtagg ggtgatttaa gtcagcgggtg
 601 aaagtttggt gctcaacatc aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttaa ttogatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttaact acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatcog ggcgacaca cgtgttacaa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccgatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttccggggcc
 1381 ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag
 1441 gatcgcccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO:8 (Gena *Parabacteroides merdae* pentru ARN ribosomal a6S, secvență parțială, tulpină: JCM 13405 - AB238929)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata cccataaaa
 181 caggggttcc gcatgggaat atttgttaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcgggtt aacggccac caaaccgacg atggatagg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggtt ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtga
 361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt tttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtagg ggtgatttaa gtcagcgggtg
 601 aaagtttggt gctcaacatc aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttaa ttogatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttaact acaggtgaag ctgaggactc
 1141 tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatcog ggcgacaca cgtgttacaa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccgatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttccggggcc
 1381 ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag
 1441 gatcgcccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

5

SEQ ID NO:9 (secvență ARN 16S de consens pentru *Parabacteroides distasonis* tulpină 755)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCATATCAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAGT
 CGGATTAATACGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTGCTAAAGATTTCATCGCTGATAGATAGGCATGCG
 TTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCAACCGACGATGGATAGGGGTTCAGAGGGAAGGTCCCCACA
 TTGGTACTGAGACACGGACCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACC
 AGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCAGGACGTGTCC
 CGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGT
 TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGGTAGGCGGCCTTTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAG
 AATTGCCGTTGAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTTGGAGGCAGGCGGAATCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
 ATCAGCAGAAACCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATCACTAGCTGTTTGGCATACACTGTAAGCGGCACAGC
 GAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
 CGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGTTTGAACGCATTCCGACMGAKGTGGAA
 ACACATTTTCTAGCAATAGCCATTTCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAG
 TGCCATAACGAGCGCAACCTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGCGTAAG
 CTGCGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCAGCAGGCCCTTACATCCGGGGCGACACAGTGTACAATGGCGTGG
 ACAAGGGAAGCCACCTGGCGACAGGGAGCGAATCCCAAAACCACGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
 TCCGTGAAGCTGGATTTCGTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAACTGGTGACTGG
 GGCTAAGTCGTACGGGG

SEQ ID NO:10 (tulpină 755 secvență genom) – vezi secvența electronică listată.

REFERINȚE

- 5 [1] Spor și colab. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg și colab. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson și colab. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson și colab. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian și colab. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- 10 [6] Frank și colab. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan și colab. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang și colab. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels și colab. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- 15 [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad și colab. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- 20 [16] Sakamoto and Benno (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 7):1599-605.
- [17] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
- [18] Srůtkova și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
- [19] Ye și colab. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [20] Fabro și colab. (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
- 25 [21] Yin și colab. (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
- [22] Cheluvappa și colab. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.
- [23] Schieck și colab. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
- [24] Balato și colab. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [25] Monteleone și colab. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- 30 [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6:256-259
- [27] Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [28] Yang și colab. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.
- [29] Koenders și colab. (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [30] Amedei și colab. (2012) *Int J MolSci.* 13(10):13438-60.
- 35 [31] Shabgah și colab. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- [32] Zhang (2015) *Inflammation.* Aug 23.
- [33] Sun și colab. (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
- [34] Mucientes și colab. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
- [35] Jawad și colab. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
- 40 [36] Maya și colab. (2014) *J. Ophthalmology.* 310329
- [37] Chi și colab. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
- [38] Chi și colab. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
- [39] Luger and Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143
- [40] Numasaki et al. (2003) *Blood.* 101:2620-2627.
- 45 [41] Zhang et al. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 533-537.

- [42] Karin (2006) *Nature*. 441: 431-436.
- [43] Faghih et al. (2013). *Iranian Journal of Immunology*. 10(4):193-204.
- [44] Numasaki et al. (2005) *J. Immunol*. 175: 6177-6189
- [45] Hammerich and Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol*. 7:297-306.
- 5 [46] Miyamoto-Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- [47] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [48] Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 3592-3597.
- [49] Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.
- [50] Kailasapathy și colab. (2002) *Cur Issues Intest Microbiol*. 3(2):39-48.
- 10 [51] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Ediția a 2-a, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- [52] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [53] *Handbook of Microbiological Media*, Ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [54] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera,
- 15 Academic Press
- [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol*. 581:247-61.
- [56] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
- [57] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream și colab., eds., 1998,
- 20 Academic Press).
- [58] *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [59] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [60] Sambrook și colab. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ediția a 3-a (Cold
- 25 Spring Harbor Laboratory Press).
- [61] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [62] Ausubel și colab. (ed) (2002) *Short protocols în molecular biology*, ediția a 5-a (Curent Protocols).
- [63] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997,
- 30 Springer Verlag)
- [64] *Curent Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel și colab., eds., 1987) Supplement 30
- [65] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math*. 2: 482-489.
- [66] Brand și colab. (2007) *Nature Protocols*. 2(5):1269-1275
- [67] Jiao și colab. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184(4):1085-93.
- 35 [68] Caspi (2003) *Cur Protoc Immunol*. Chapter 15:Unit 15.6.

LISTARE SECVENȚE

- <110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
- 40 <120> COMPOZIȚII CARE CUPRIND TULPINI BACTERIALE
- <130> P072554EP
- <150> GB 1510469,8
- <151> 2015-06-15
- <150> GB 1520628,7
- 45 <151> 2015-11-23
- <150> GB 1604566,8
- <151> 2016-03-17
- <160> 9
- <170> SeqWin2010, versiune 1.0
- 50 <210> 1
- <211> 1488
- <212> DNA
- <213> Parabacteroides distasonis
- <400> 1

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcgggg tgtagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc 120
aacttgcccta tcagagggggg ataaccggcg gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg 180
gatcccgcat ggggaatattt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt 240
aggcagtttg cggggtaacg gccaccacaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag 300
gtccccaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat 360
attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtgcgct gagggatgaa ggttctatgg 420
atcgtaaac tcttttataa ggggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct 480
tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcc gacgccggcg taatacggag gatccgagcg 540
ttatccggat ttattgggtt taaaggggtg gtaggcggcc ttttaagtca gcggtgaaag 600
tctgtggctc aaccatagaa ttgcccgtga aactgggggg ottgagtatg tttgaggcag 660
gcggaatgcg tgggtgtagcg gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag 720
gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta 780
gataccctgg tagtccacgc agtaaacgat gatcactagc tgtttgcgat acactgtaag 840
cggcacagcg aaagcgtaa gtgatccacc tggggagtac gccggcaacg gtgaaactca 900
aaggaattga cggggggccc cacaagcggg ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg 960
aggaacctta ccggggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat 1020
agccgtttgc gaggtgctgc atggttgcg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggtttaag 1080
tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggg 1140
gggactgccg gcgtaagctg cgaggaaggg ggggatgacg tcaaatcagc acggccctta 1200
catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaag ggagggcacc tggcgacagg 1260
gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccoga ctccgtgaag 1320
ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt 1380
acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtacctga agtccgtaac cgaaaggatc 1440
ggcctagggt aaaactggtg actggggcta agtcgtaaca aggtaacc 1488

```

<210> 2

<211> 1486

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides distasonis

<400> 2

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
cccgcgatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaac gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
cccacacatt ggtactgaga caccgaccaa actoctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tccgctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt agggcgccct ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggggct tgagtatggt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagct tttgcgatac agtgaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccgcg caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctgggtg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacagga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccocgact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg ggcttgttac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggttaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1488

```

<210> 3

10 <211> 1486

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 3

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac ccggcgcgca ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttgccatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacatt ggtactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggt aataggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac actgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaacctacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctacgaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt gatgctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaagg atgccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccggact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggcttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 4

<211> 1486

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides distasonis

<400> 4

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac ccgggtggcg ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacatt ggtactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggt aataggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac actgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaacctacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctacgaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaagg atggccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccggact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggcttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 5

<211> 1486

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 5

10

agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgacag	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
cttacctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtgcgctga	gggatgaagg	ttctatggat	420
cgtaaacctc	ttttataagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cccgttttgt	atgtacctta	480
tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggtg	atacgaggga	tcgagcgtt	540
atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatggt	tgaggcaggc	660
ggaatgcgtg	gtgtagcggg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaaccccca	ttgcgaaggc	720
agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	attgtaagcg	840
gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
ggaattgacg	ggggcccgca	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
ccgtttgcga	ggtgctgcat	ggttgcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgct	ggcttaagt	1080
ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	aaagctgagg	actctggtgg	1140
gactgccagc	gtaagctcgc	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
tccggggcga	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaaggg	aggccacctg	gcgacaggga	1260
gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
ggattcgcta	gtaatcgcgc	atcagccatg	gcgcggtgaa	tacgttcccg	ggccttgtac	1380
acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
cctaagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

<210> 6

<211> 1486

5 <212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 6

agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgacag	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
cttacctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtgcgctga	gggatgaagg	ttctatggat	420
cgtaaacctc	ttttataagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cccgttttgt	atgtacctta	480
tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggtg	atacgaggga	tcgagcgtt	540
atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatggt	tgaggcaggc	660
ggaatgcgtg	gtgtagcggg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaaccccca	ttgcgaaggc	720
agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	attgtaagcg	840
gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
ggaattgacg	ggggcccgca	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
ccgtttgcga	ggtgctgcat	ggttgcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgct	ggcttaagt	1080
ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	aaagctgagg	actctggtgg	1140
gactgccagc	gtaagctcgc	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
tccggggcga	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaaggg	aggccacctg	gcgacaggga	1260
gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
ggattcgcta	gtaatcgcgc	atcagccatg	gcgcggtgaa	tacgttcccg	ggccttgtac	1380
acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
cctaagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

10 <210> 7

<211> 1492

<212> ADN

<213> Parabacteroides merdae

<400> 7

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
caggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag 300
gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag 360
gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatat ggaggatgag 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaaag gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcgggt 600
aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcggaa tgcgtggtgt agcgtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
taagctctac agcgaagcgg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacgggtgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtgttttaa ttcatgata 960
cgcgaggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtgcgtcagc cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcagggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccggtcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacac gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag 1440
gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

<210> 8

<211> 1492

<212> ADN

5 <213> Parabacteroides merdae

<400> 8

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
caggggttcc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattaggcag ttggcggggt aacggccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag 300
gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag 360
gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatat ggaggatgag 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaaag gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcgggt 600
aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcggaa tgcgtggtgt agcgtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
taagctctac agcgaagcgg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacgggtgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtgttttaa ttcatgata 960
cgcgaggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtgcgtcagc cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcagggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttccggtcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacac gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag 1440
gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

<210> 9

10 <211> 1403

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 9

```

amccgggtgg cgaccggcgc acgggtgagt aacgcgtatg caacttgcc atcagagggg 60
gataaccggg cgaaagtcgg actaataccg catgaagcag ggatcccgca tgggaatatt 120
tgctaaagat tcatcgctga tagataggca tgcgttccat taggcagttg gcggggtaac 180
ggcccaccaa accgacgatg gataggggtt ctgagaggaa ggtcccccac attggtactg 240
agacacggac caaactccta cgggaggcag cagtggaggaa tattggtcaa tgggcgtgag 300
cctgaaccag ccaagtcgcg tgagggatga aggttctatg gatcgtaaac ctctttata 360
agggataaaa gtgcgggacg tgtccggtt tgtatgtacc ttatgaataa ggatcggcta 420
actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggatccgagc gttatccgga tttattgggt 480
ttaaaggggt cgtaggcggc cttttaagtc agcggtgaaa gtctgtggct caaccataga 540
attgccgttg aaactgggag gcttgagtat gtttgaggca ggcggaatgc gtggtgtagc 600
ggtgaaatgc atagatatca cgcagaaccc cgattgcgaa ggcagcctgc caagccatta 660
ctgacgctga tgcacgaaag cgtggggatc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 720
cagtaaacga tgatcactag ctgtttgcga tacactgtaa gcggcacagc gaaagcggtta 780
agtatccac ctggggagta cgcggcgaac ggtgaaactc aaaggaattg acggggggccc 840
gcacaagcgg aggaacatgt ggtttaattc gatgatacgc gaggaacctt acccgggttt 900
gaacgcattc ggacmgakgt ggaacacatc tttctagcaa tagccatttg cgaggtgctg 960
catggttgtc gtcagctcgt gccgtgaggt gtcggcttaa gtgccataac gacgcgaacc 1020
cttgccacta gttactaaca ggtaaagctg aggactctgg tgggactgcc agcgtaaagct 1080
gcgaggaagg cggggatgac gtcaaactcag caccggccctt acatccgggg cgacacacgt 1140
gttacaatgc cgtggacaaa gggaaagccac ctggcgacag ggagcgaatc cccaaaccac 1200
gtctcagttc ggatcggagt ctgcaacccg actccgtgaa gctggattcg ctagtaatcg 1260
cgcatcagcc atggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc 1320
atgggagccg ggggtacctg aagtcggtaa ccgcgaggat cggcctaggg taaaactggt 1380
gactggggct aagtcgtacg ggg 1403

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- NAAMAH L. ZITOMERSKY ET AL: "CHARACTERIZATION OF ADHERENT BACTEROIDALES FROM INTESTINAL BIOPSIES OF CHILDREN AND YOUNG ADULTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE", PLOS ONE, VOL. 8, NO. 6, 11 JUNE 2013 (2013-06-11), PAGE E63686, XP055295108, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0063686
- CN-A- 104 546 934
- M. KVERKA ET AL: "ORAL ADMINISTRATION OF PARABACTEROIDES DISTASONIS ANTIGENS ATTENUATES EXPERIMENTAL MURINE COLITIS THROUGH MODULATION OF IMMUNITY AND MICROBIOTA COMPOSITION", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOL. 163, NO. 2, 19 FEBRUARY 2011 (2011-02-19), PAGES 250-259, XP055295102, GB ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/J.1365-2249.2010.04286.X
- US-A1- 2014 147 425

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din speciile *Parabacteroides distasonis*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli inflamatorii în care metoda cuprinde administrarea compoziției în tractul gastrointestinal.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care boala inflamatorie nu este o boala inflamatorie a intestinului.

3. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1 sau 2, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau preveirea unei boli inflamatorii selectată din grupul constând din astm; artrită; scleroză multiplă; neuromielită optică (boală Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus sistemic eritematos; boala pulmonară obstructivă cronică (COPD); uveită; sclerită; vasculită; boala Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; periodontită; rinită alergică; și respingere de alogrefă.

4. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 3, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli inflamatorii selectată din grupul constând din astm, artrită, scleroză multiplă, și uveită.

5. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 4, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofilic sau astmul alergic, în care opțional compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a neutrofiliei sau eosinofiliei în tratamentul astmului.

6. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 4, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a artritei reumatoide, în care opțional compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a umflăturii articulațiilor în artrita reumatoidă.

7. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 4, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a sclerozei multiple, în care opțional compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a incidenței bolii sau a severității bolii.

8. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 4, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire în care boala inflamatorie este uveită, în care opțional compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere sau prevenire a deteriorării retinei în uveită.

9. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția este pentru utilizare la un pacient cu niveluri de IL-17 sau celule Th17 crescute, și/sau în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulare Th17 în tratamentul sau prevenirea bolii inflamatorii.

10. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, sau 9, preferabil în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:9, mai preferabil în care tulpina bacteriană are secvența ARNr 16s reprezentată de SEQ ID NO:9, mai preferabil în care tulpina bacteriană este de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382.

11. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare, în care compoziția este pentru administrare orală, și/sau în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptibili farmaceutic, și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată.

12. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările anterioare, în care metoda cuprinde administrarea compoziției în tractul gastrointestinal oral; printr-un tub, cum ar fi un tub nazogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub de jejunostomie (tub J), gastronomie endoscopică percutanată (PEG); sau un port, cum ar fi un port de perete toracic; preferabil în care metoda cuprinde administrarea compoziției oral în tractul gastrointestinal.

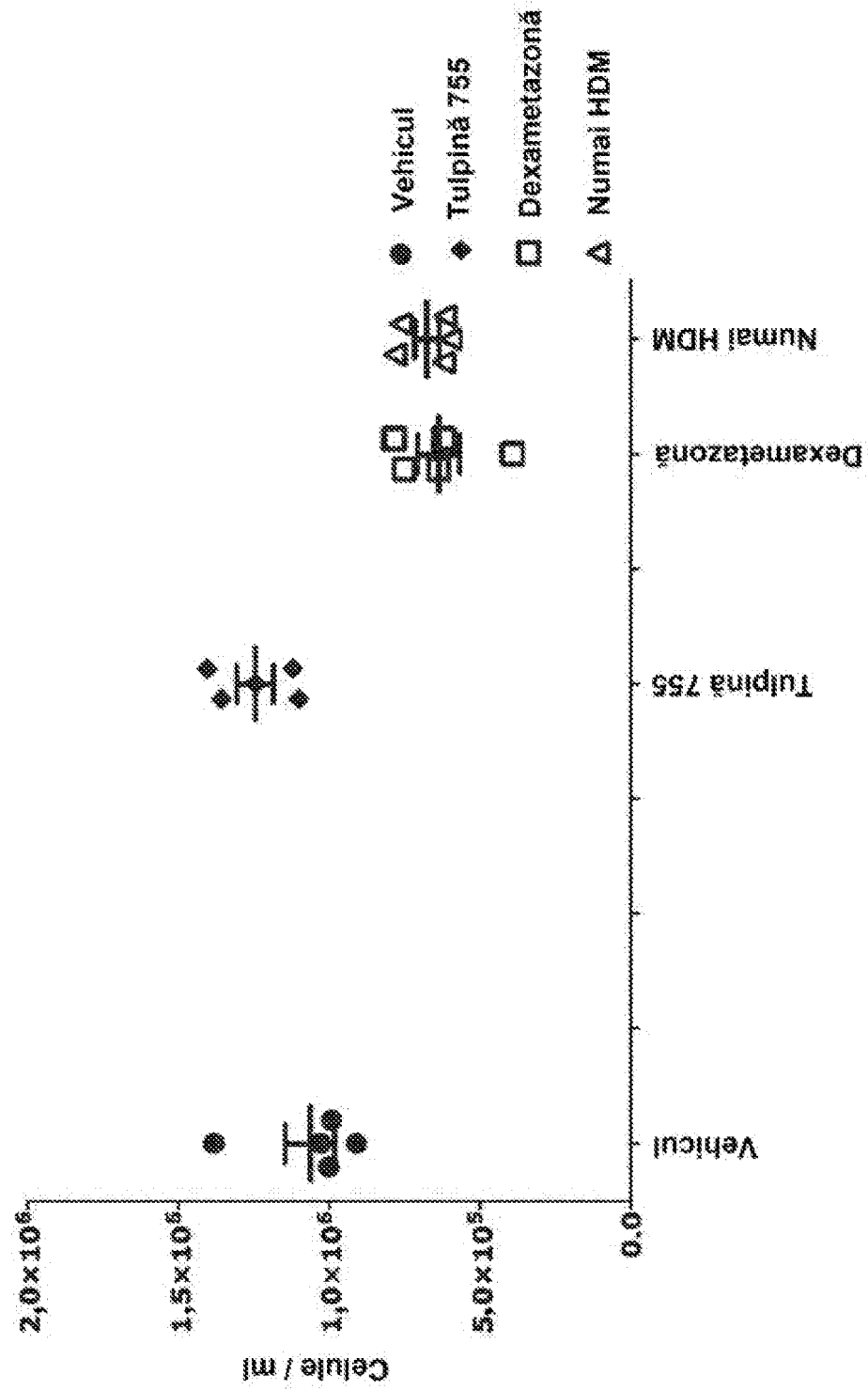
13. Un produs alimentar sau o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția conform oricăreia din revendicările 1, sau 7-12, pentru utilizare conform oricăreia din revendicările 1 sau 7-12.

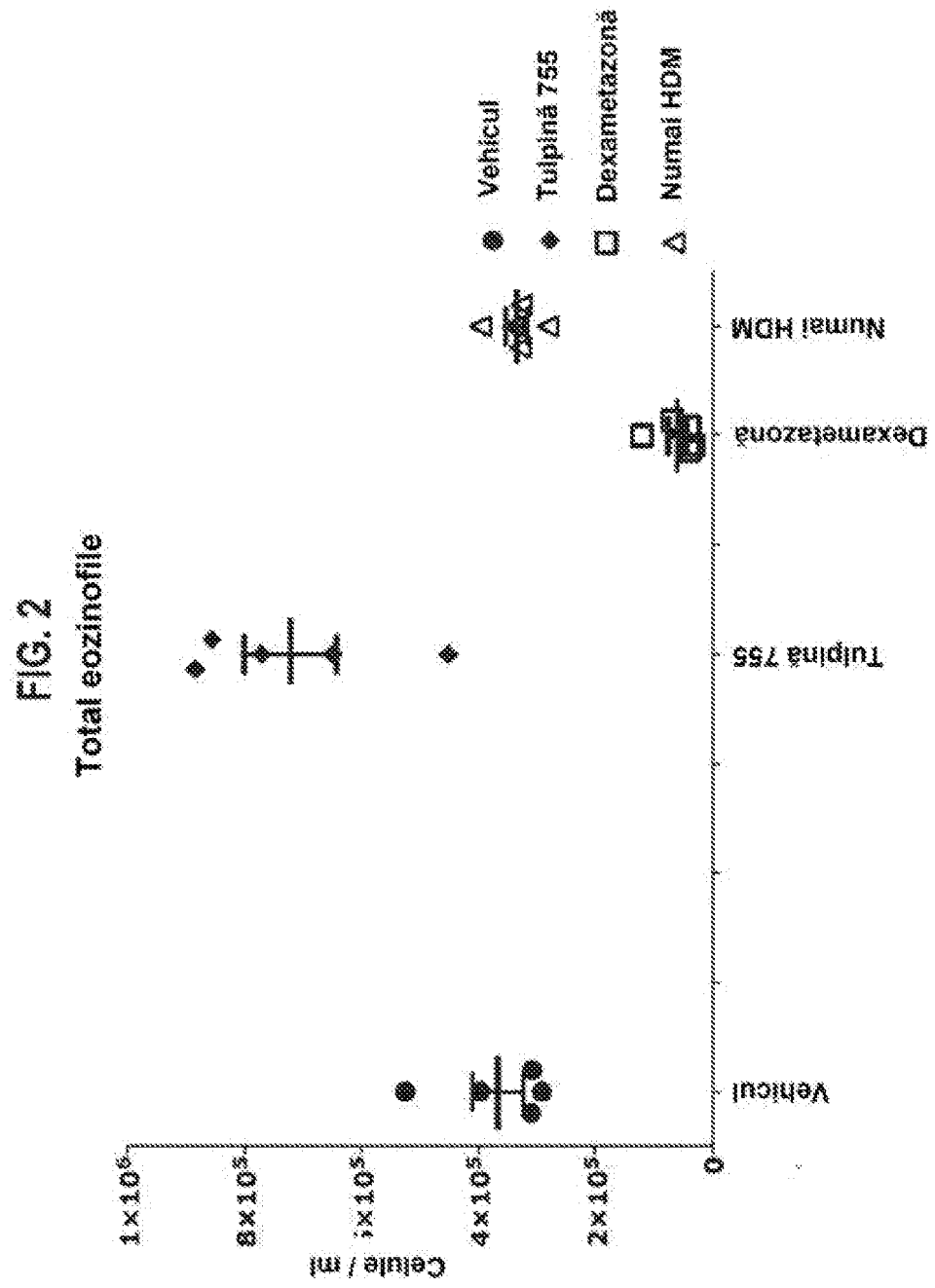
14. O compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană de *Parabacteroides distasonis* având o secvență ARNr 16s cel puțin 99,5% identică cu SEQ ID NO: 9, pentru utilizare în terapie, în care terapia cuprinde administrarea compoziției în tractul gastrointestinal.

15. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 14, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16s cel puțin 99,9% identică cu SEQ ID NO: 9, preferabil în care tulpina bacteriană are secvența ARNr 16s reprezentată de SEQ ID NO: 9, mai preferabil în care tulpina bacteriană este de tulpină *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de acces NCIMB 42382.

16. Compoziția conform revendicării 14 sau 15, în care compoziția este pentru administrare orală, și/sau în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptibili farmaceutic, și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată; în care opțional compoziția este pentru utilizare într-o metodă cum s-a definit în oricare din revendicările 1, sau 7-9.

FIG. 1
Număr total de celule





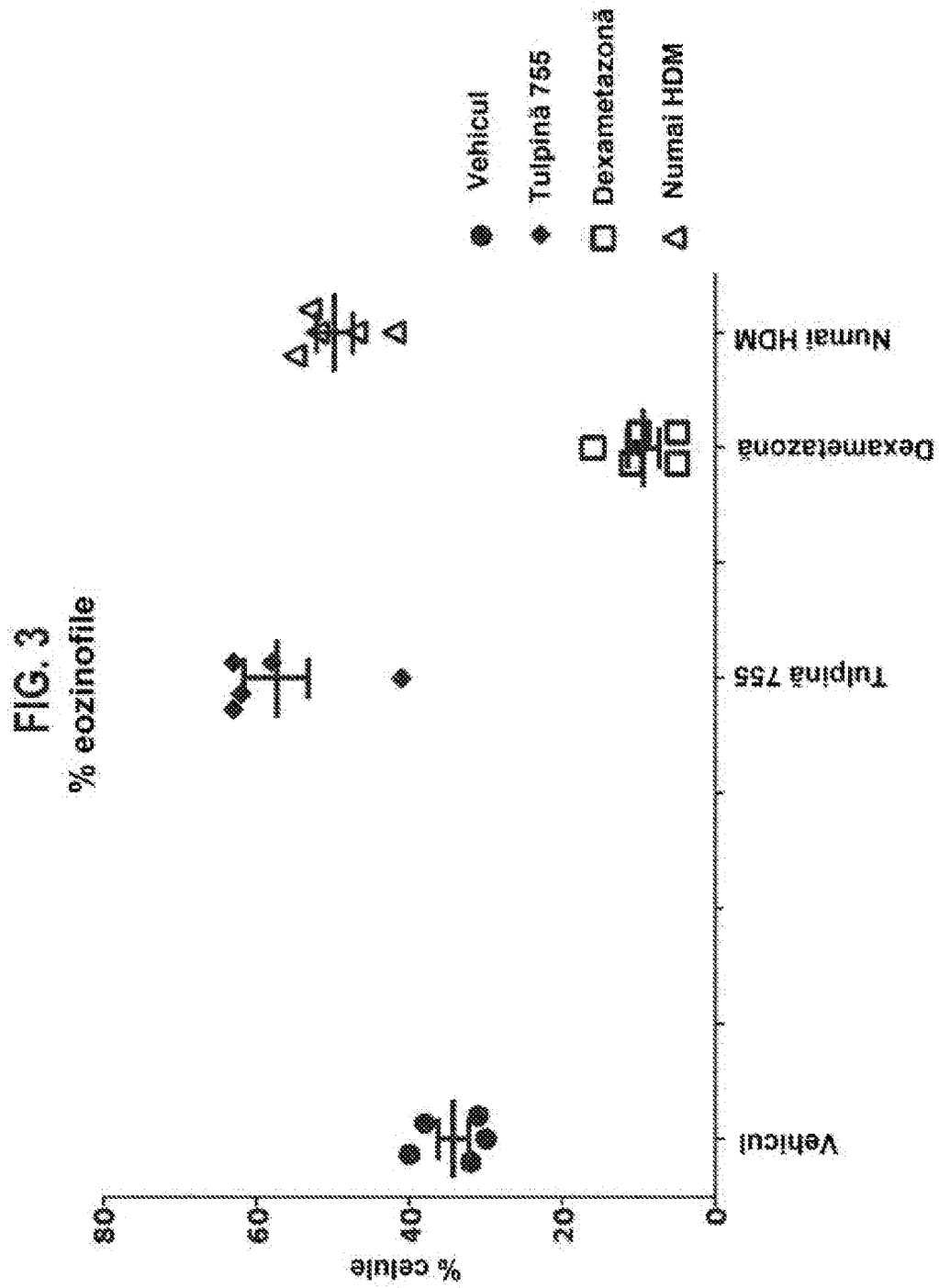
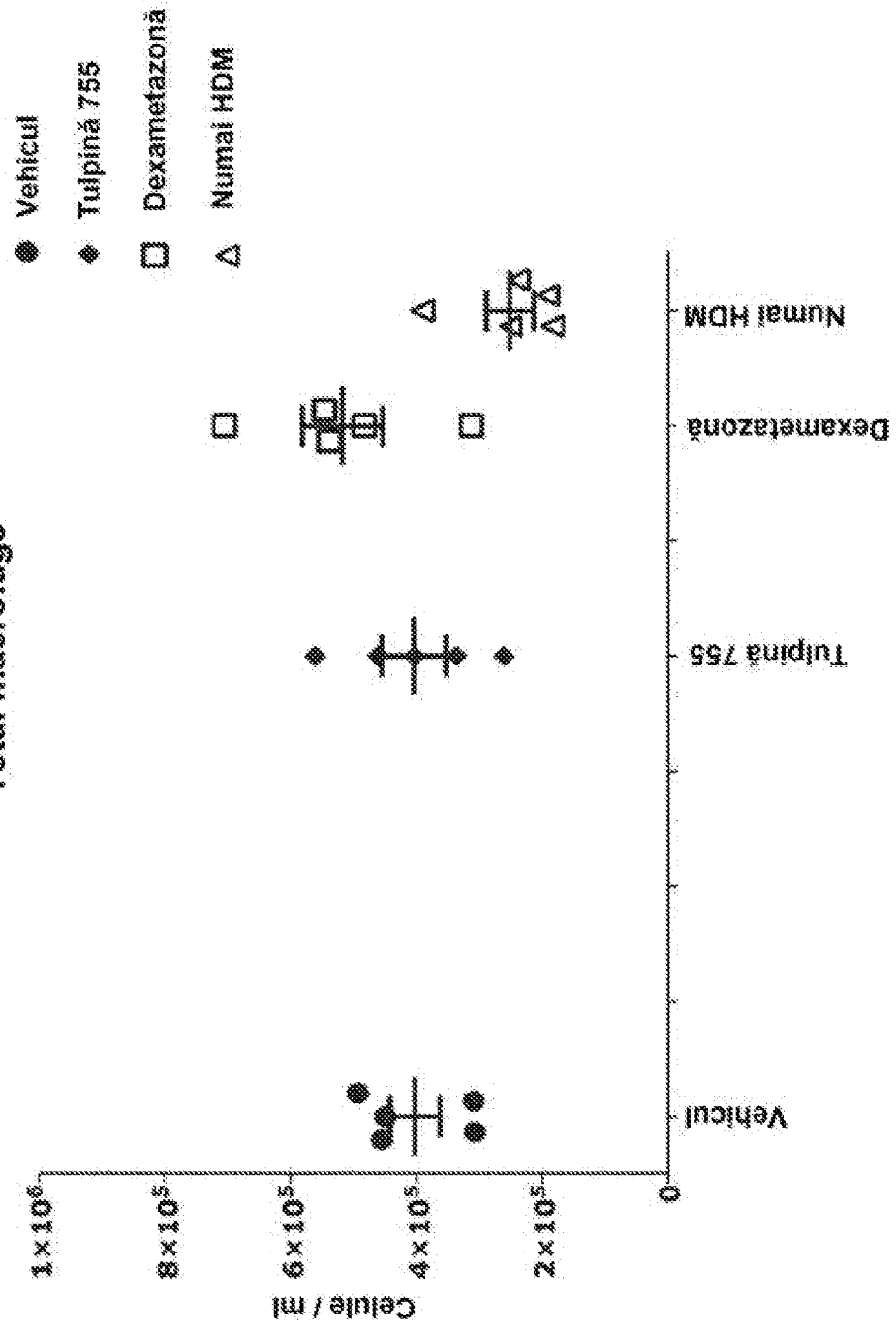
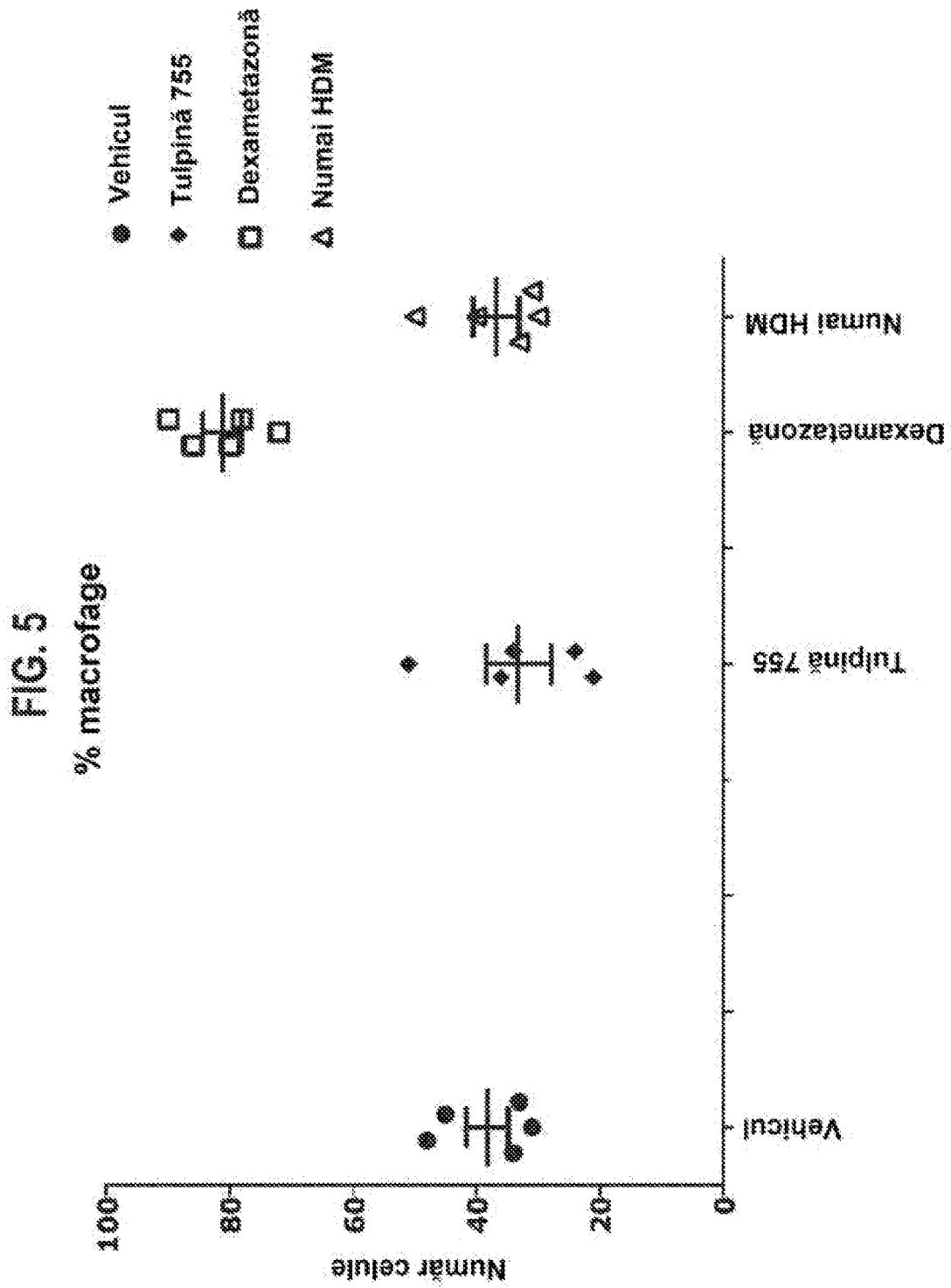
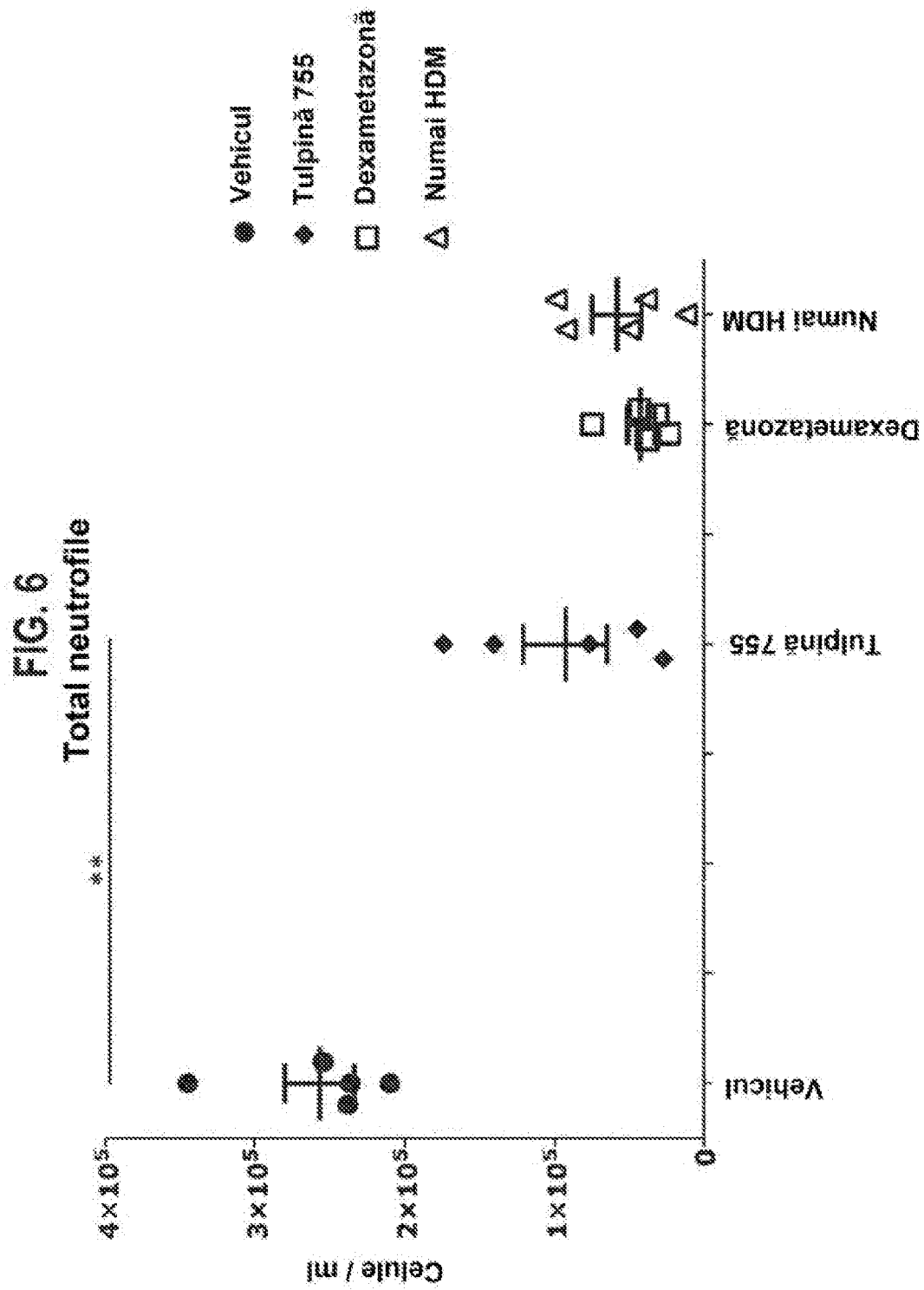


FIG. 4
Total macrophage







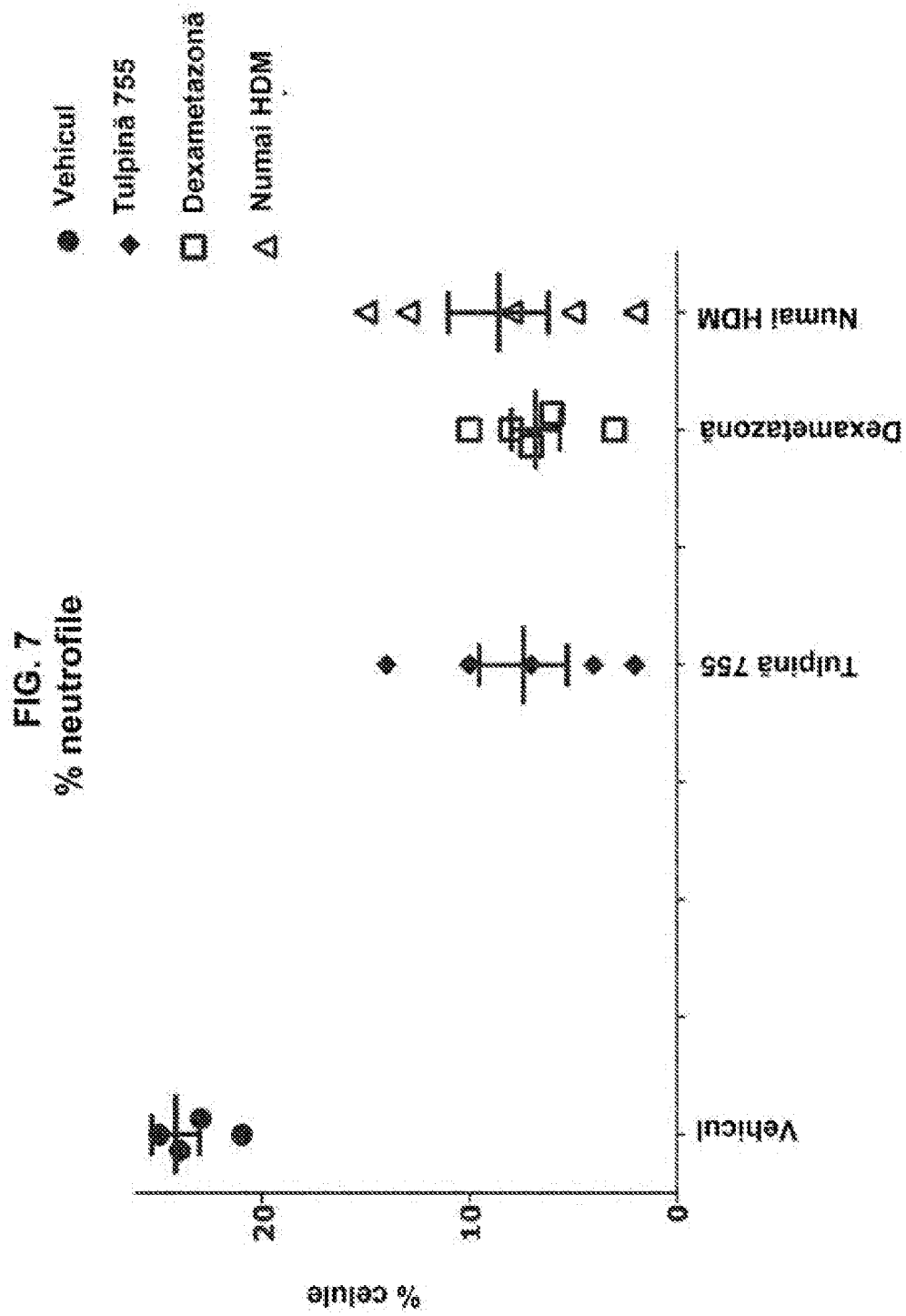


FIG. 8
Total limfocite

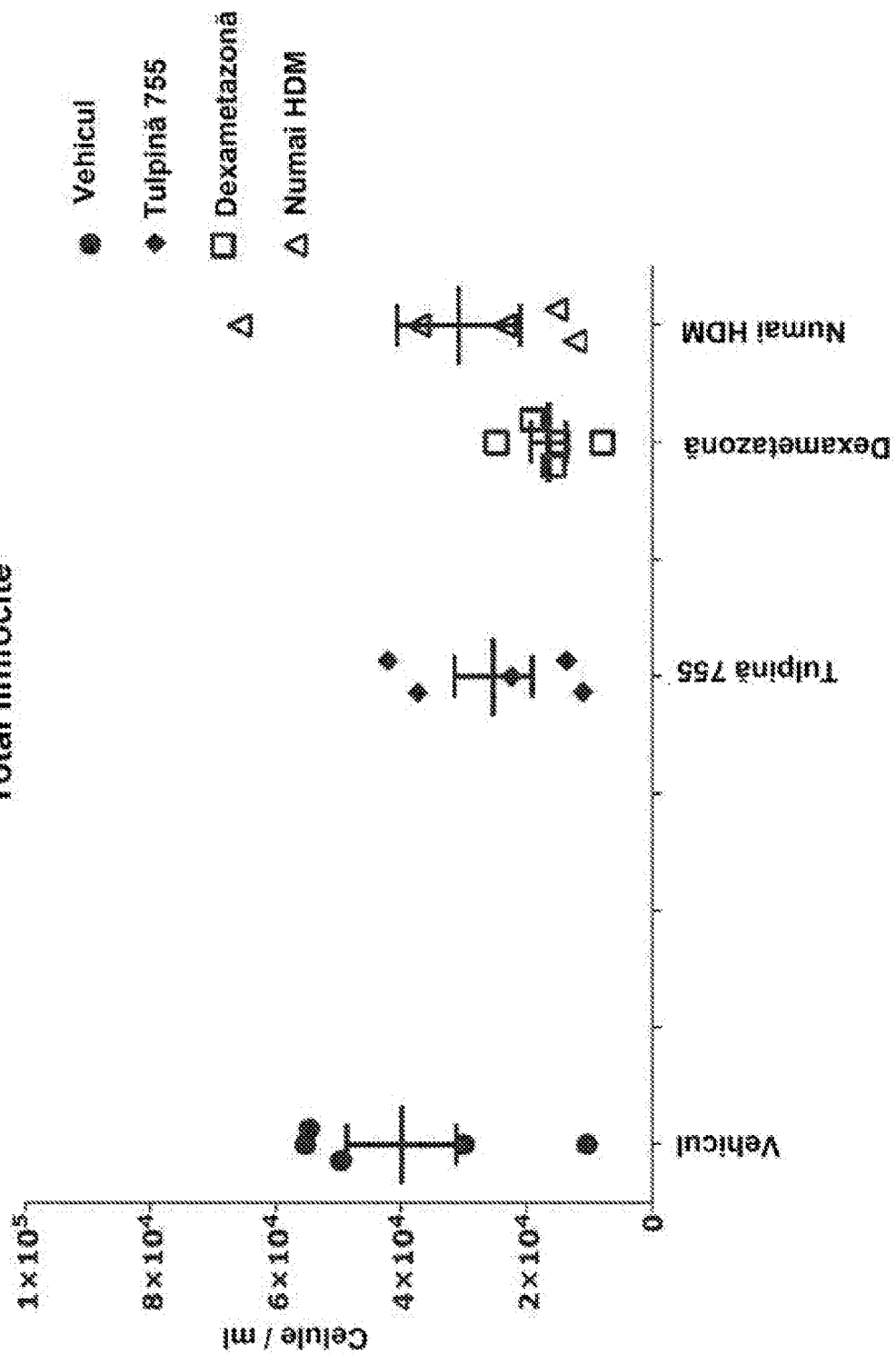


FIG. 9
% limfocite

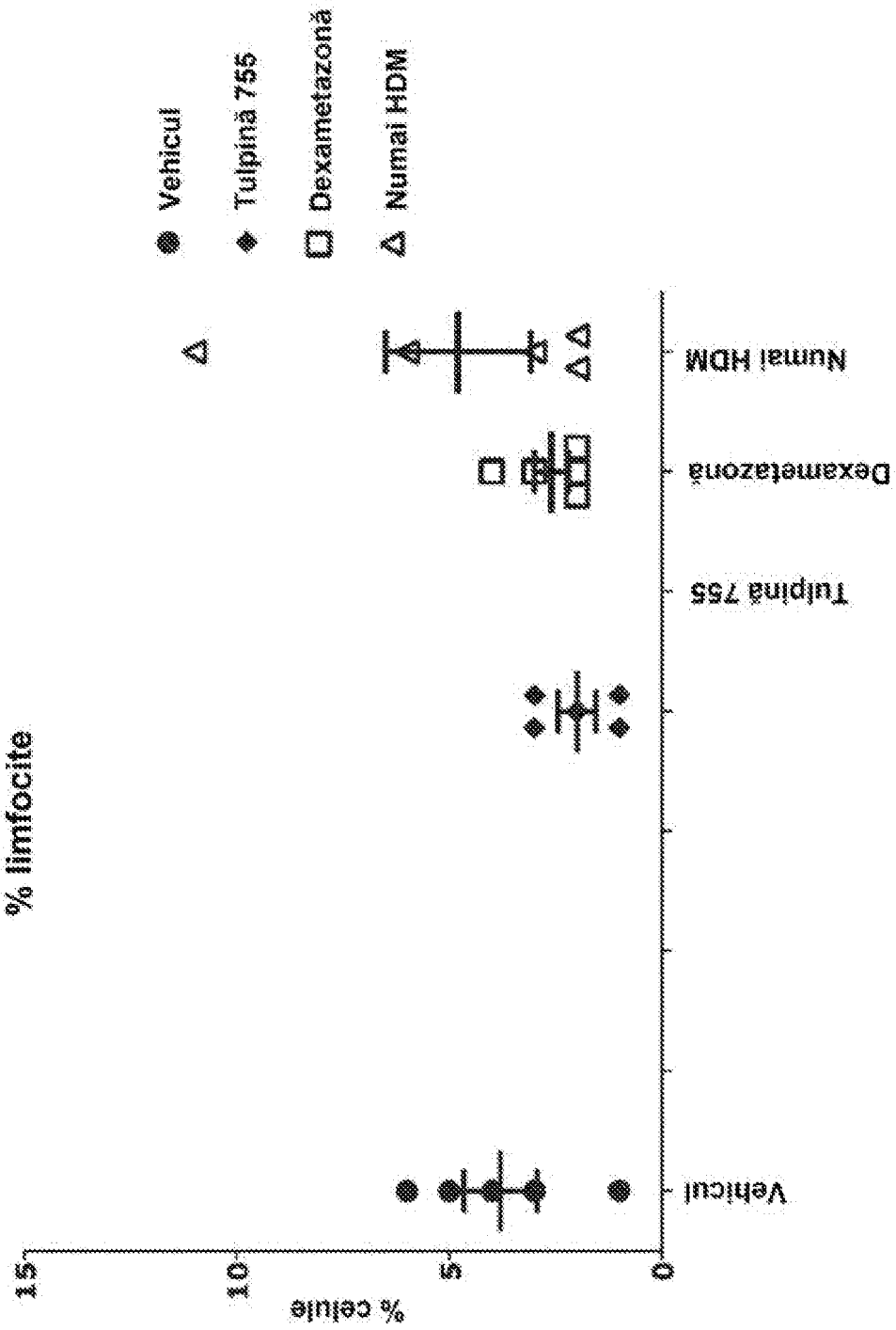


FIG. 10
Număr total de celule

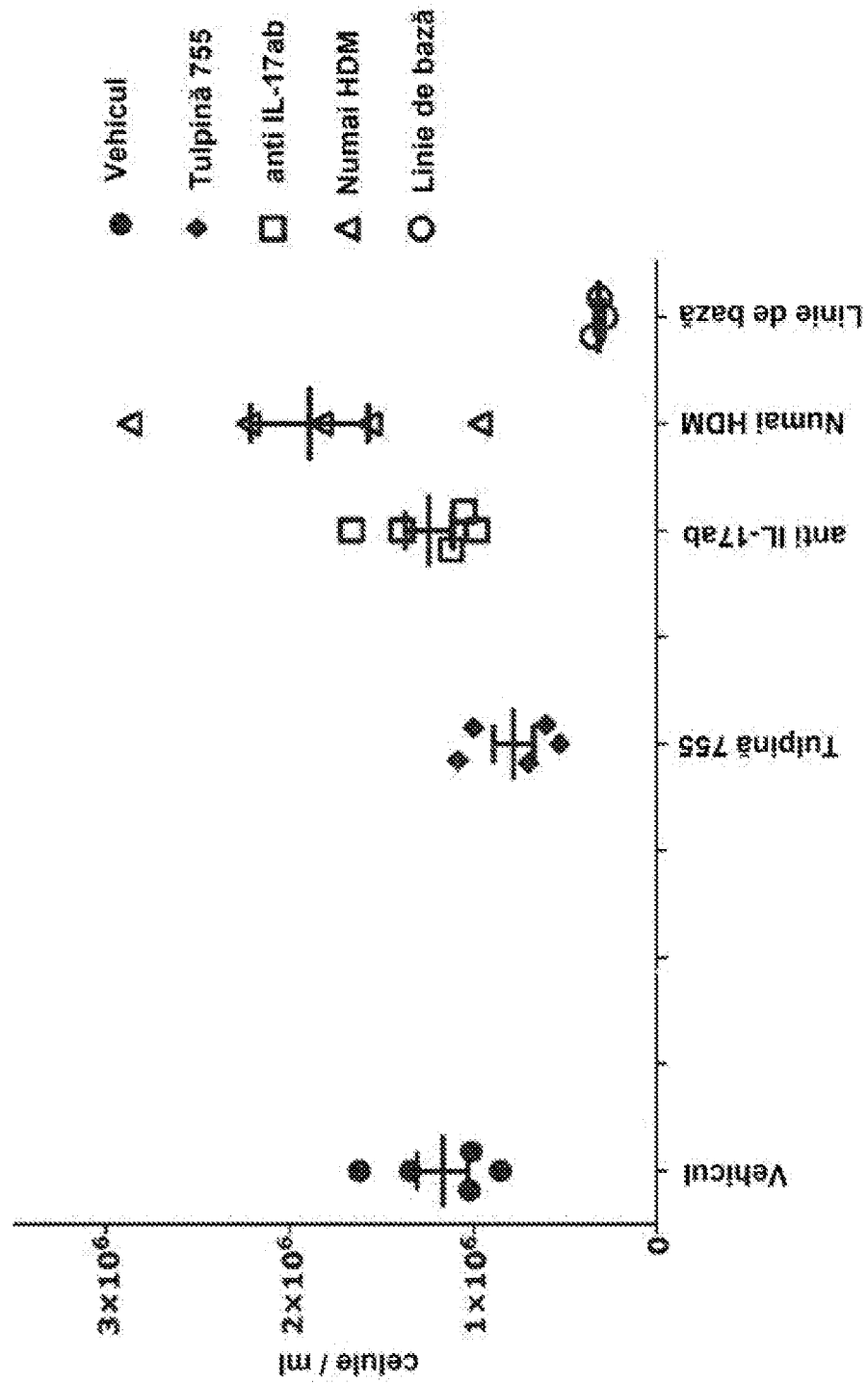
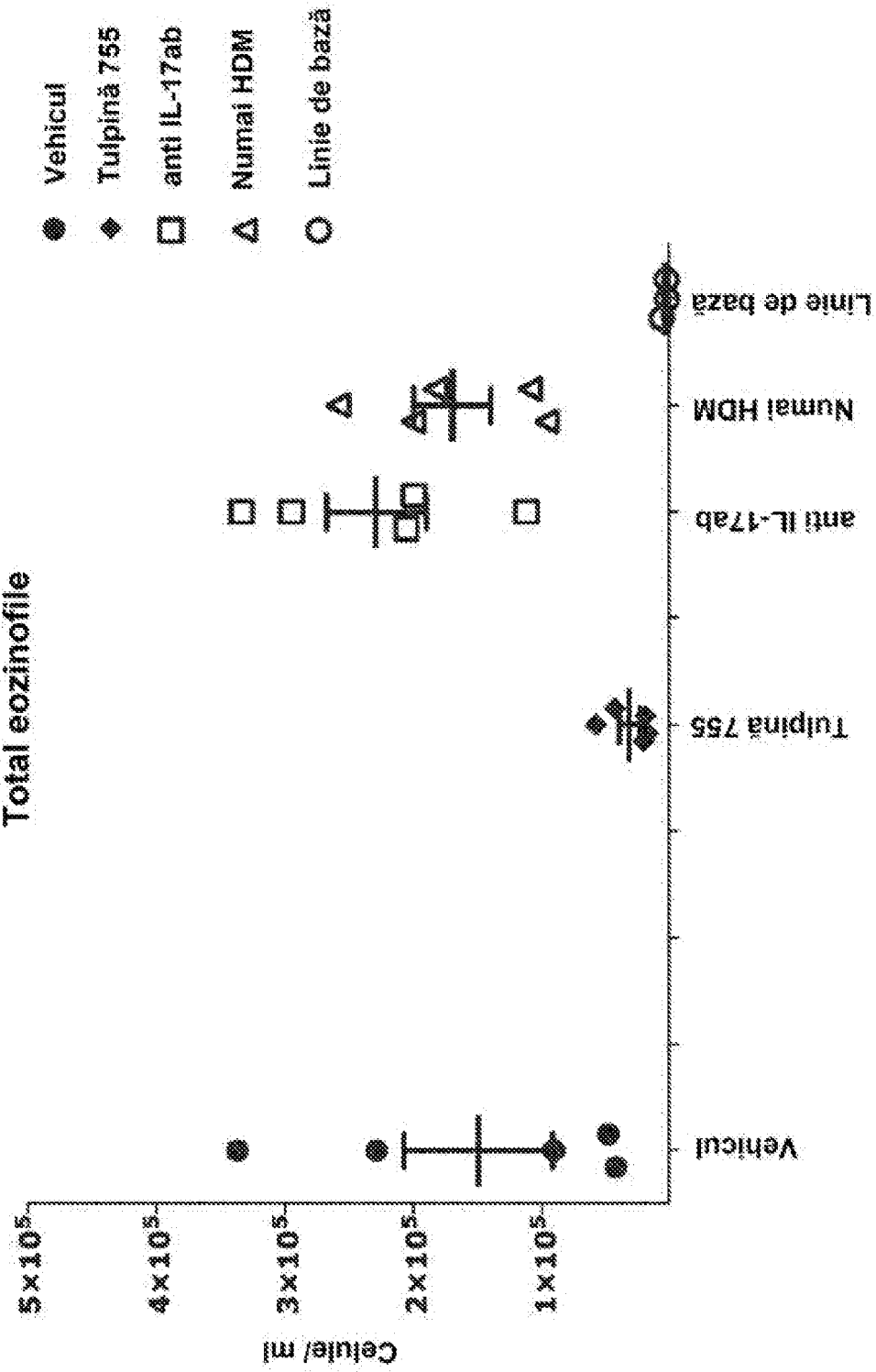


FIG. 11
Total eozinofile



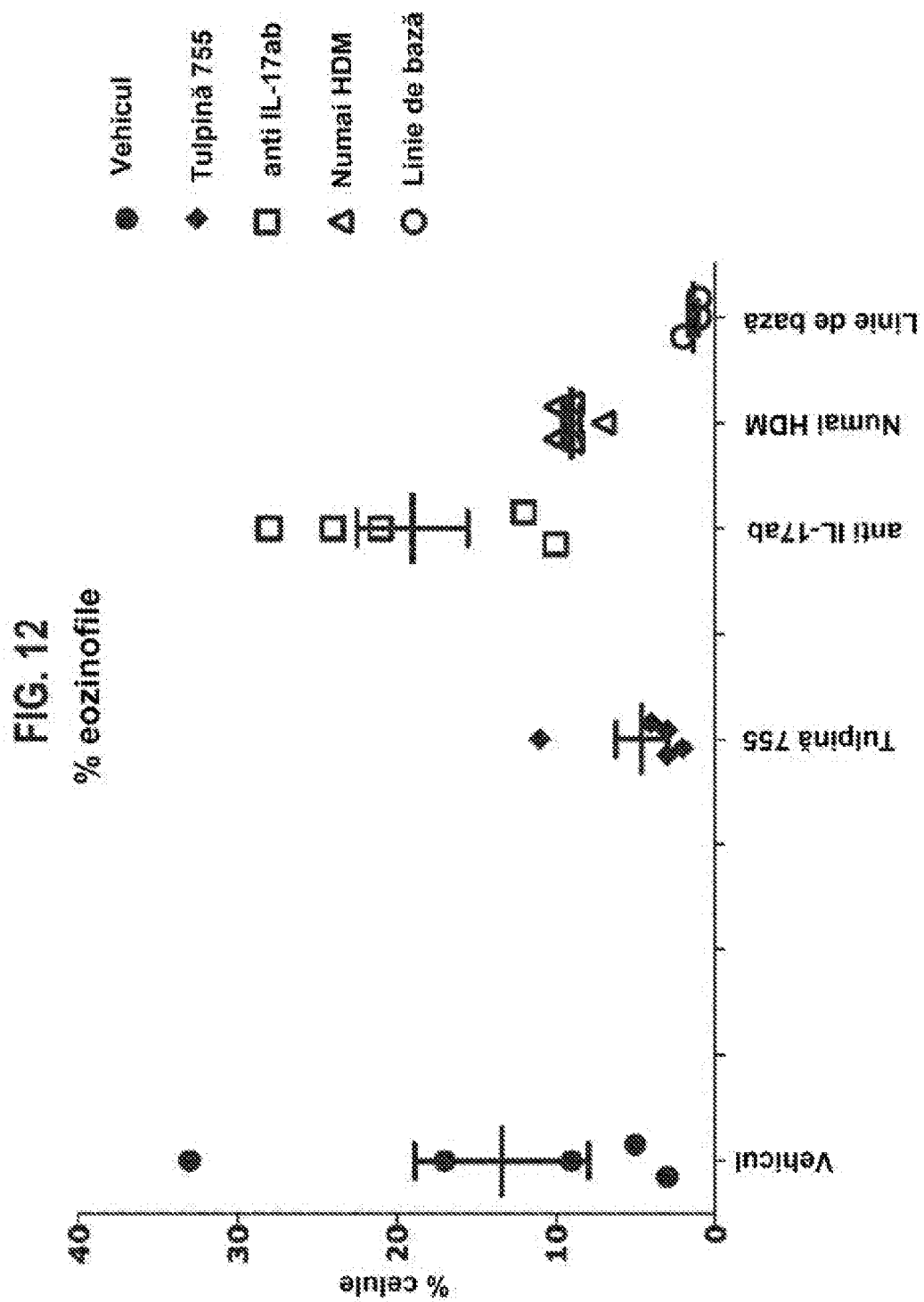
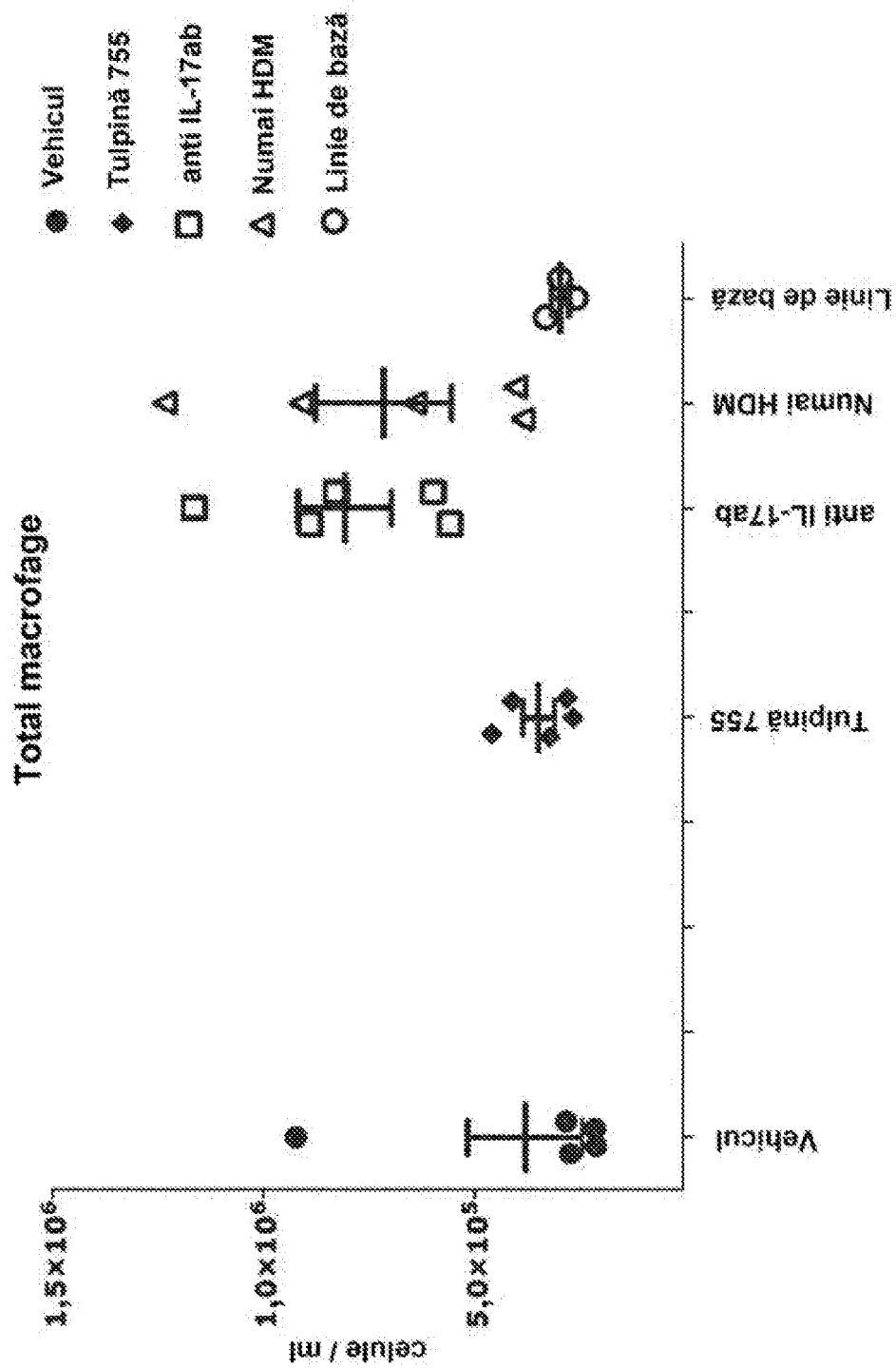


FIG. 13



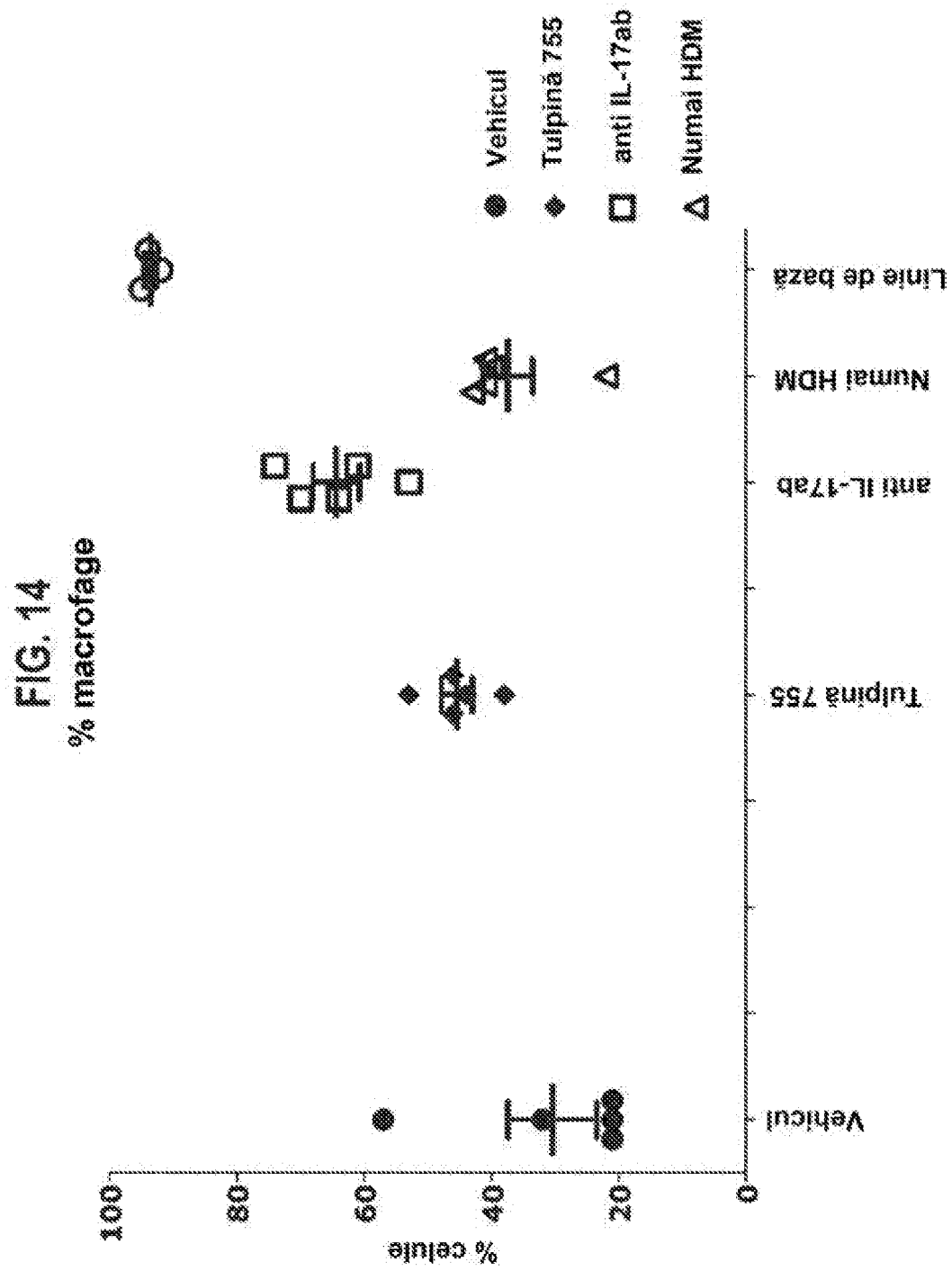


FIG. 15
Total neutrofile

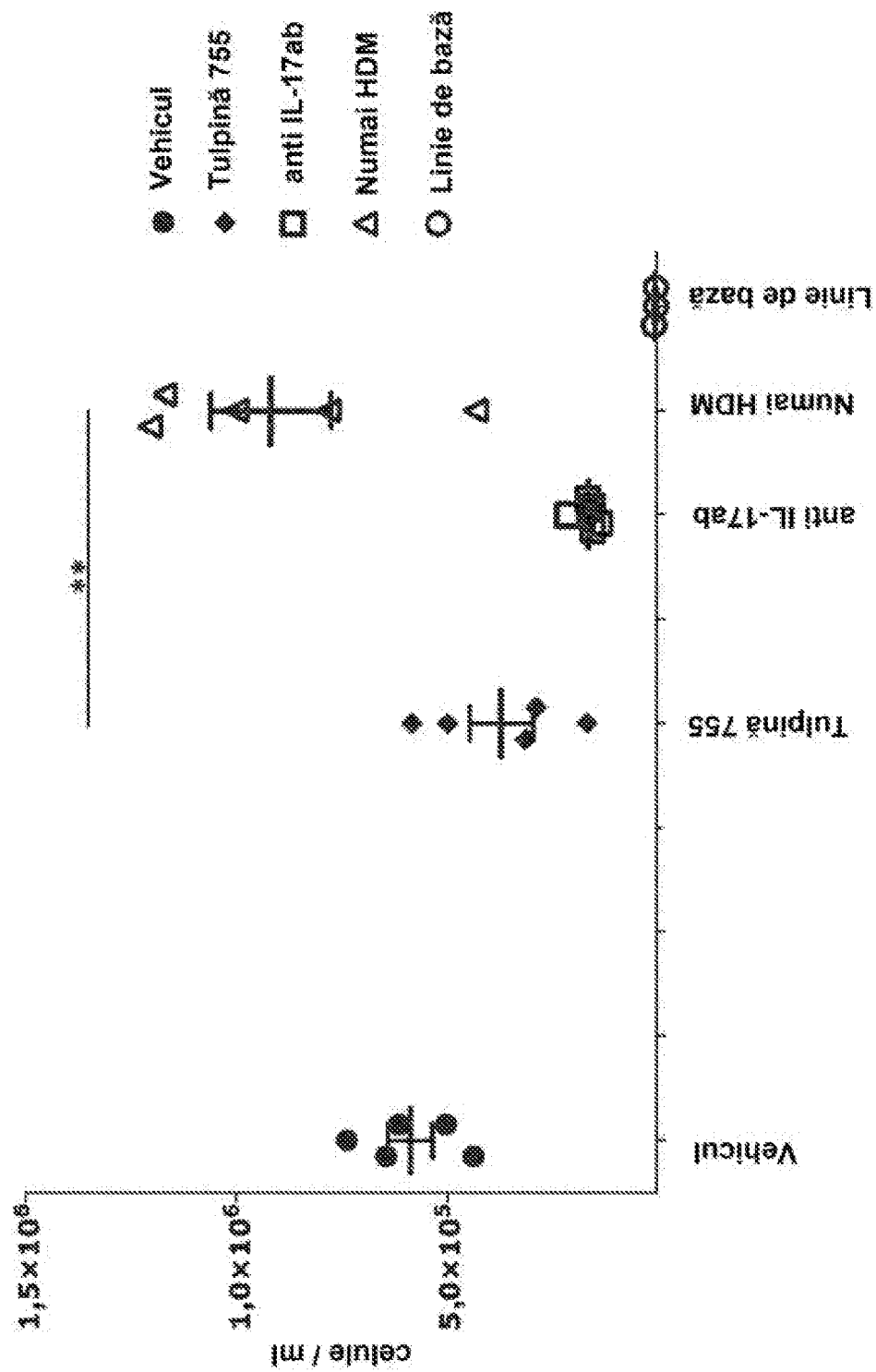


FIG. 16
% neutrofile

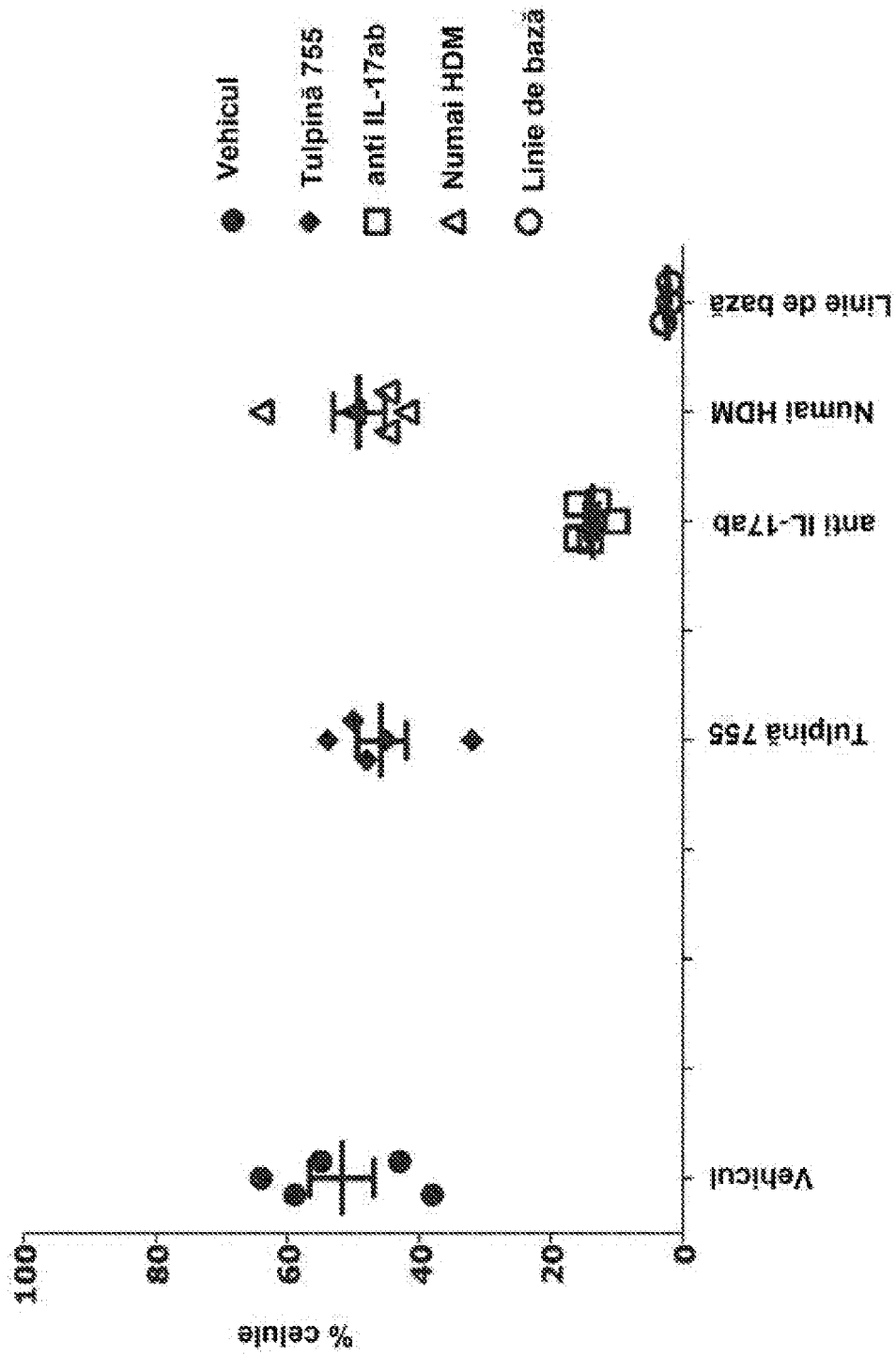


FIG. 17
Total limfocite

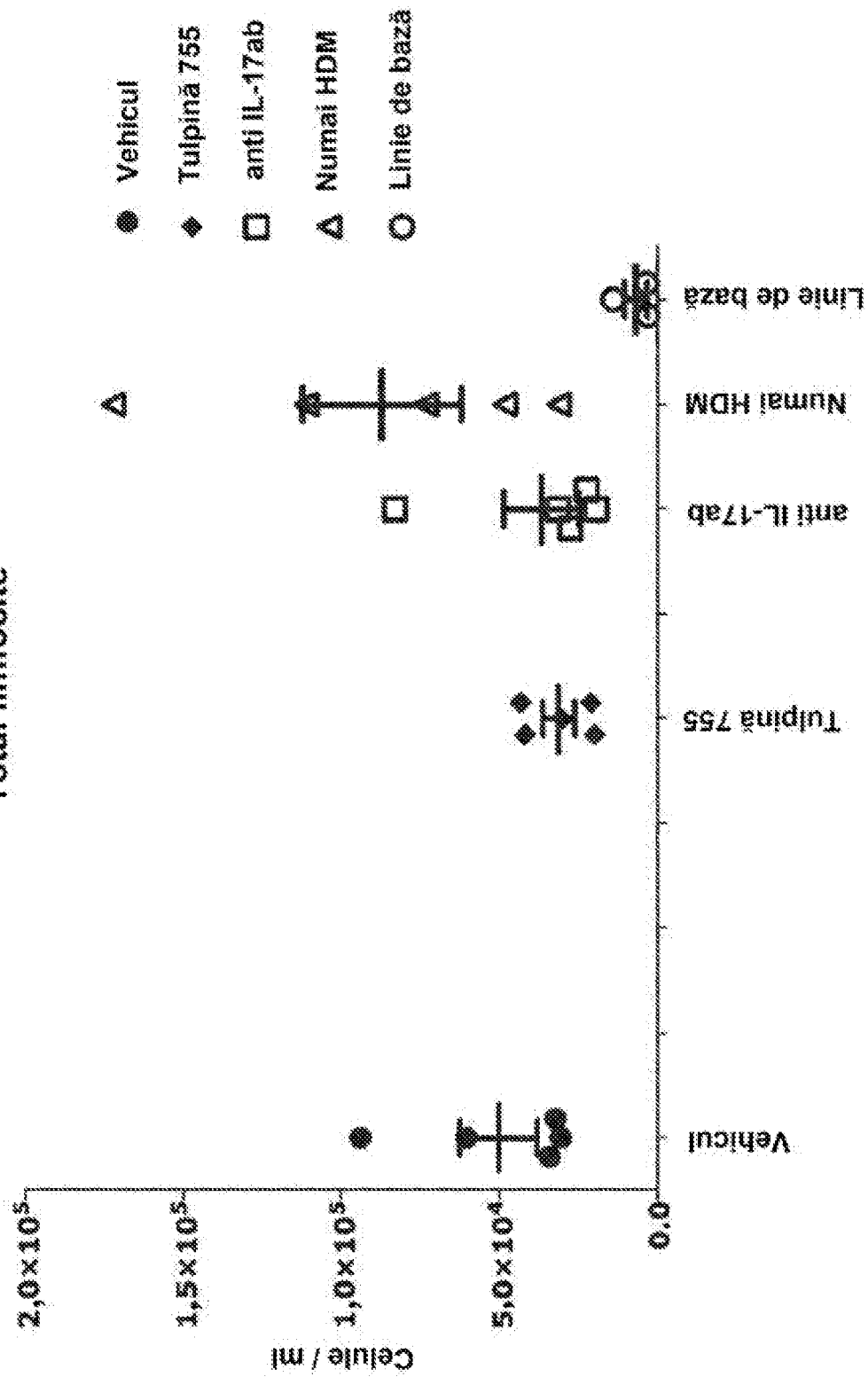


FIG. 18
% limfocite

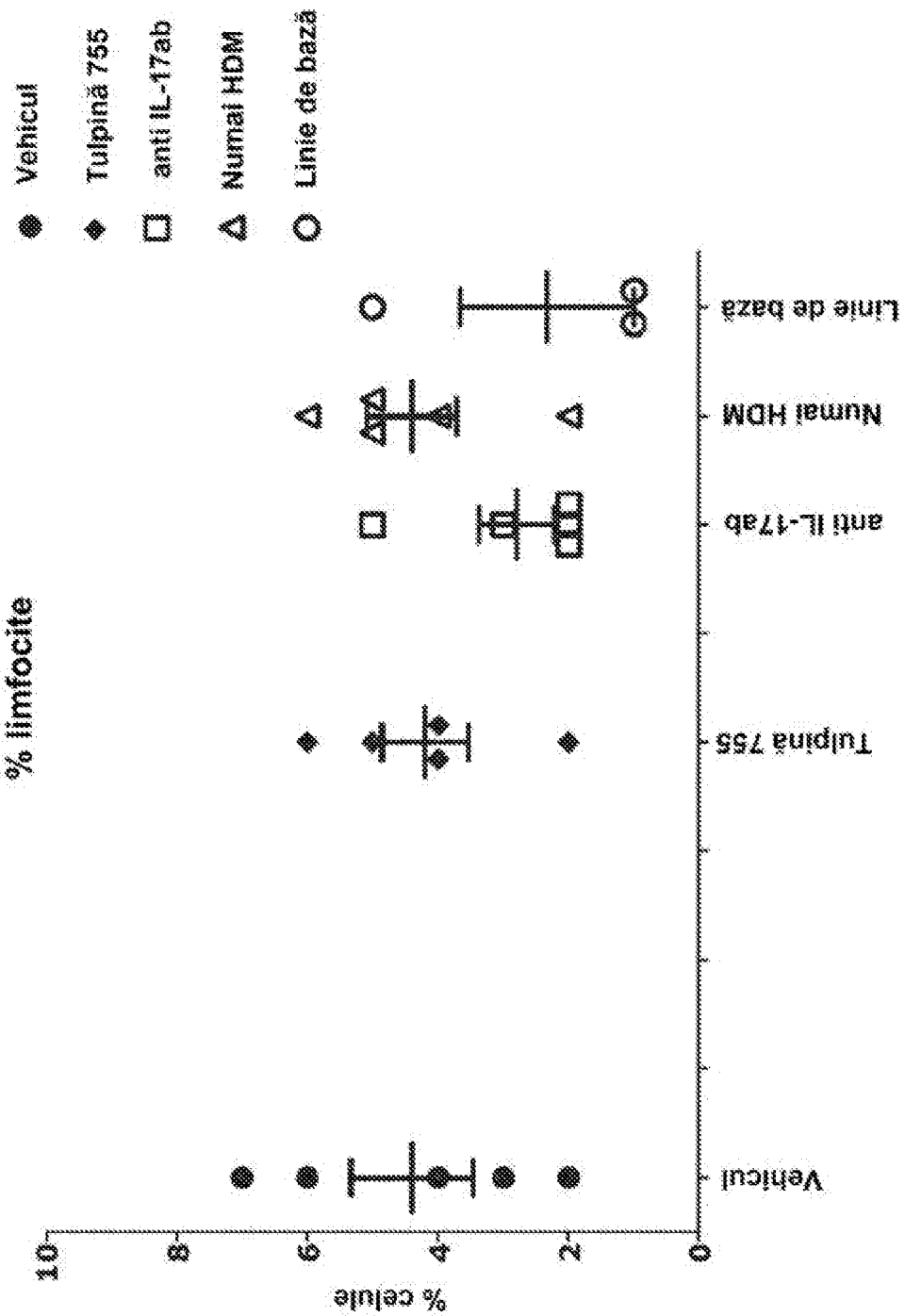


FIG. 19 Greutate corporală

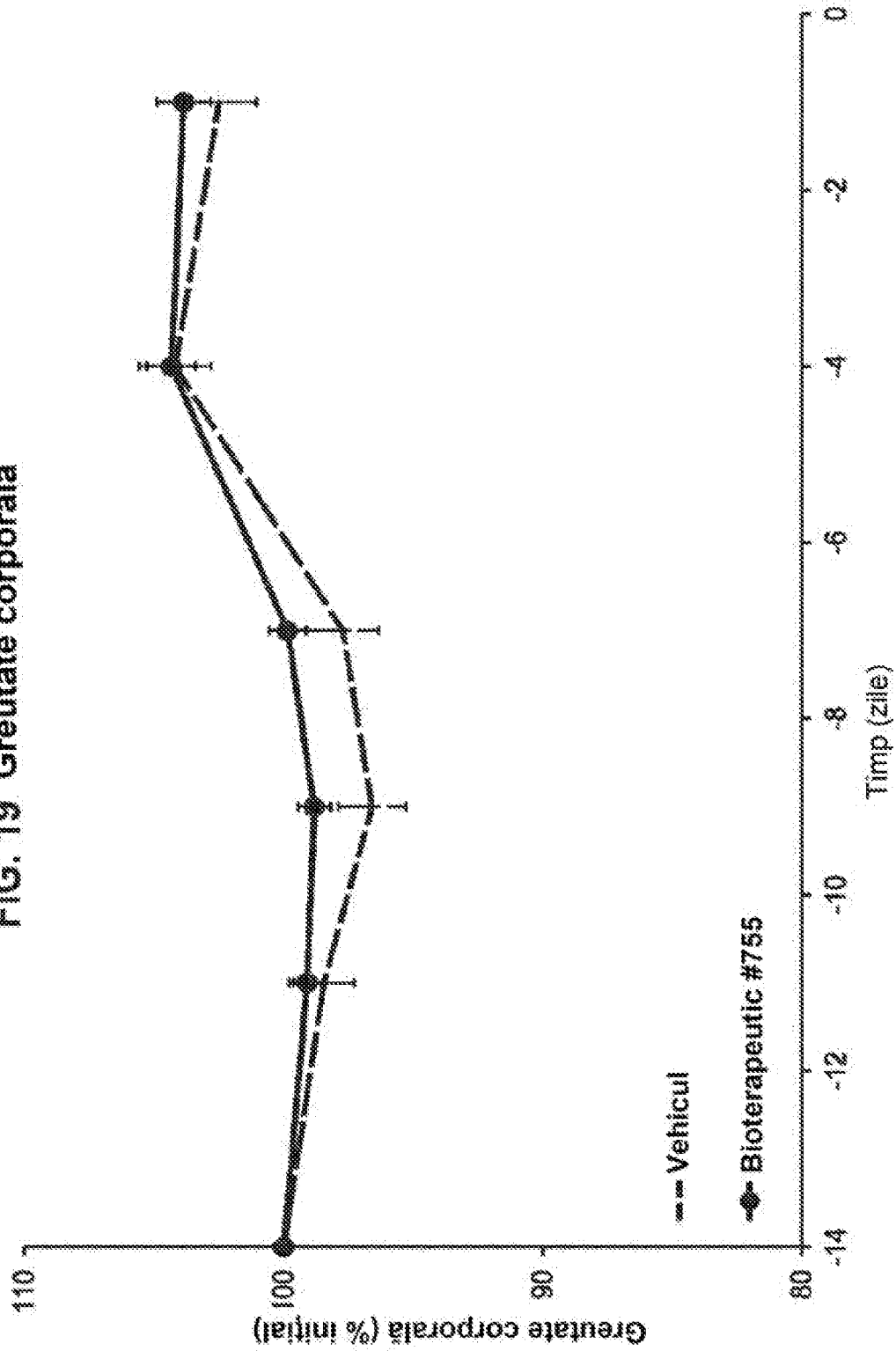
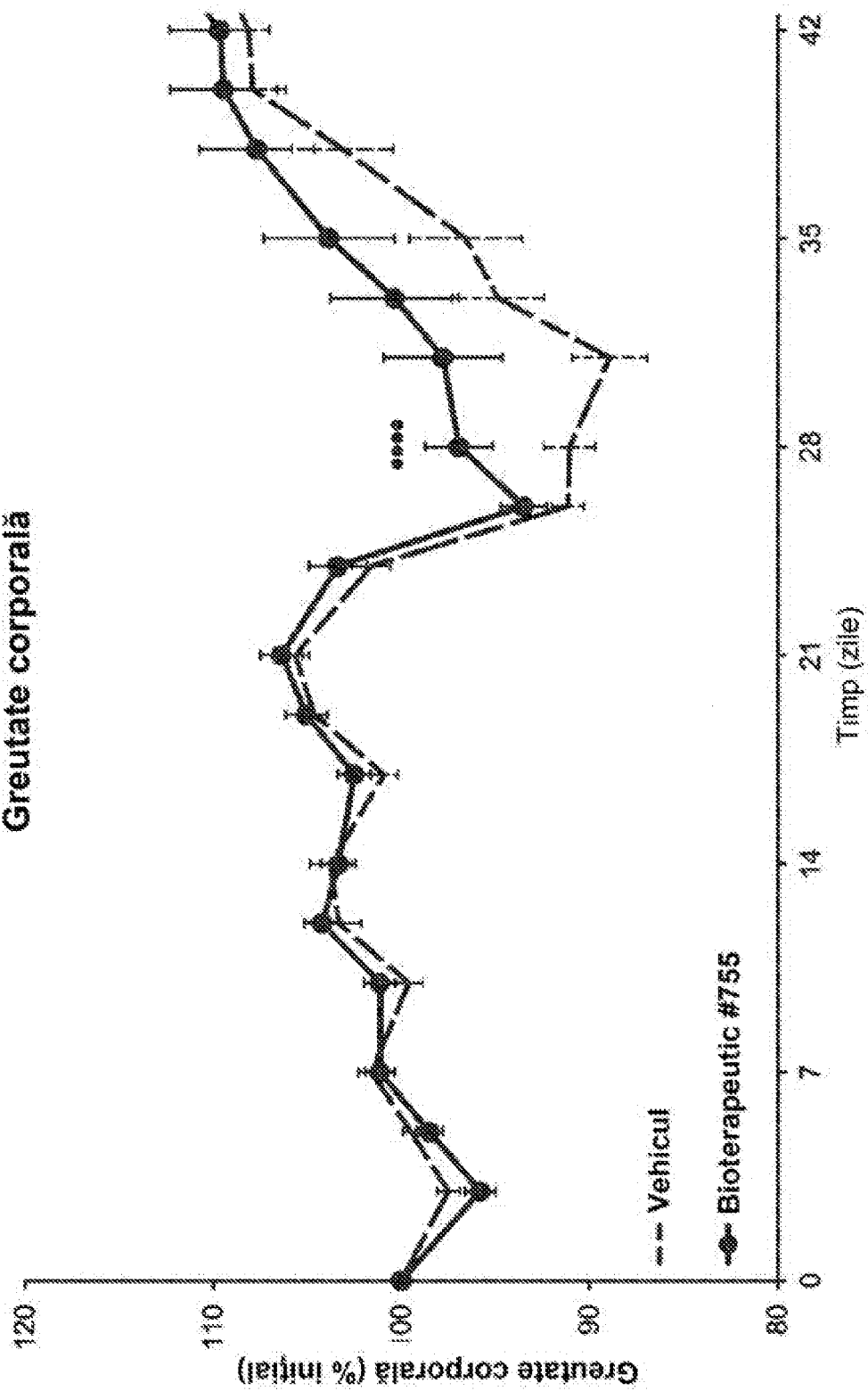


FIG. 20
Greutate corporală



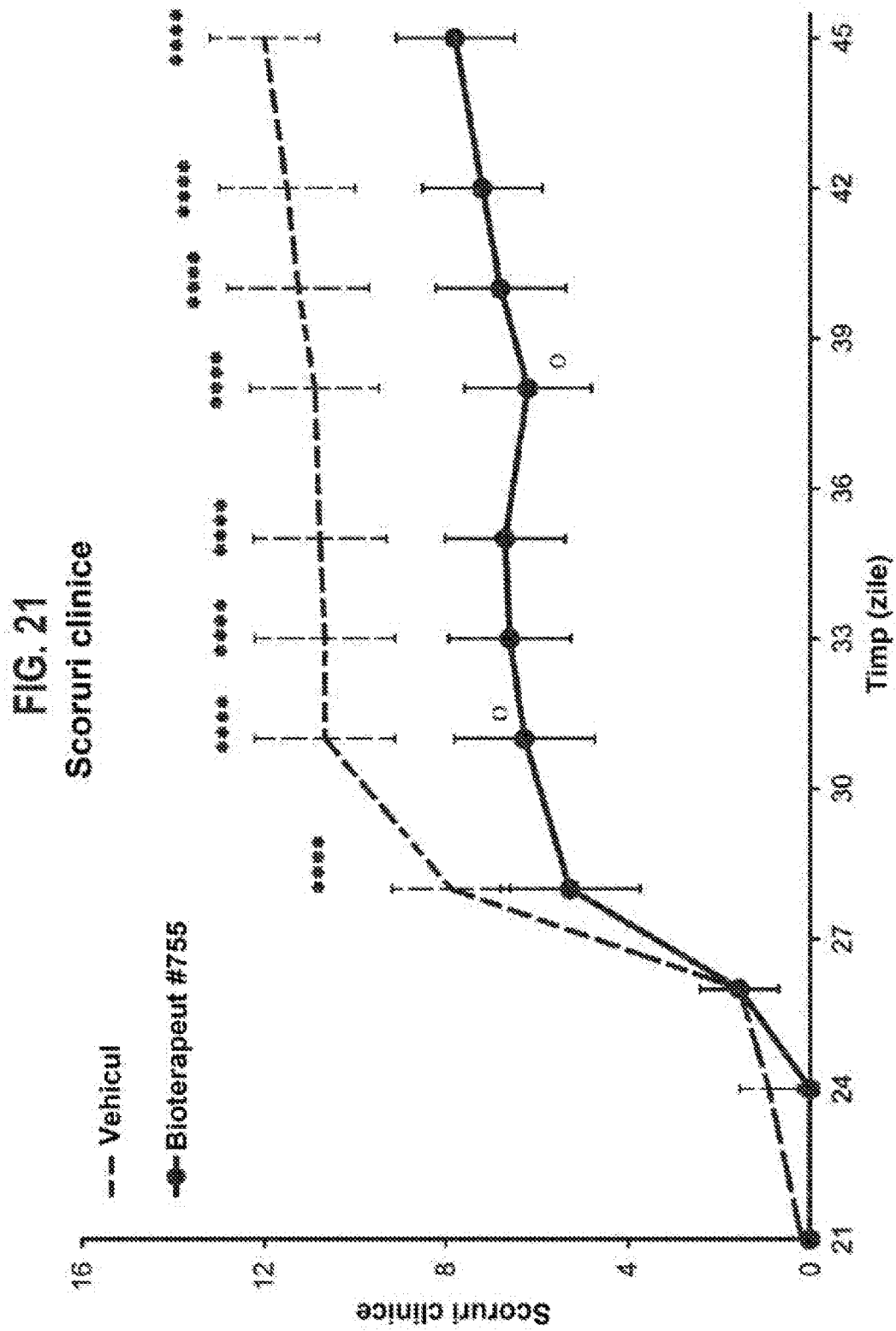


FIG. 23

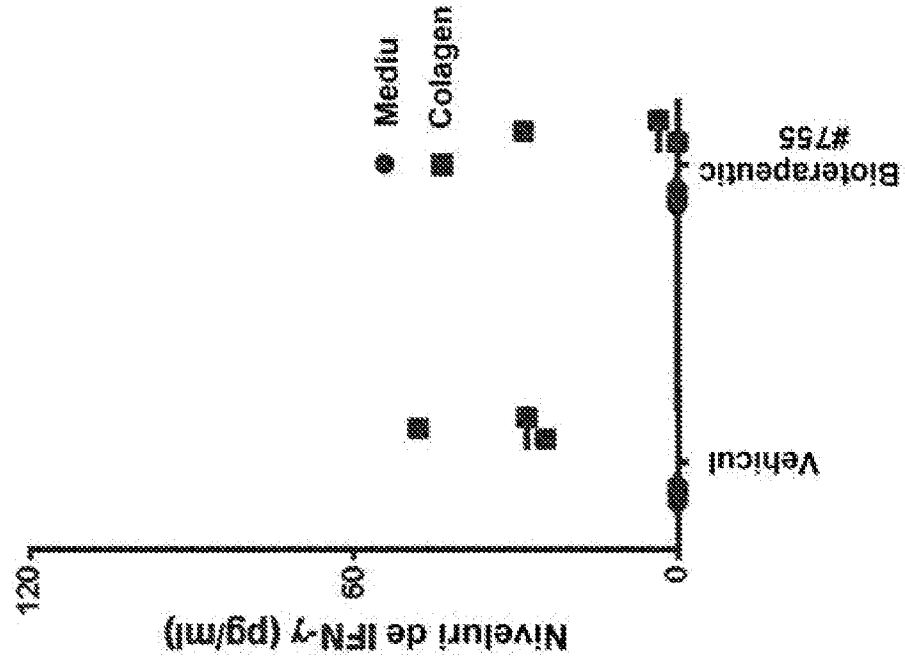
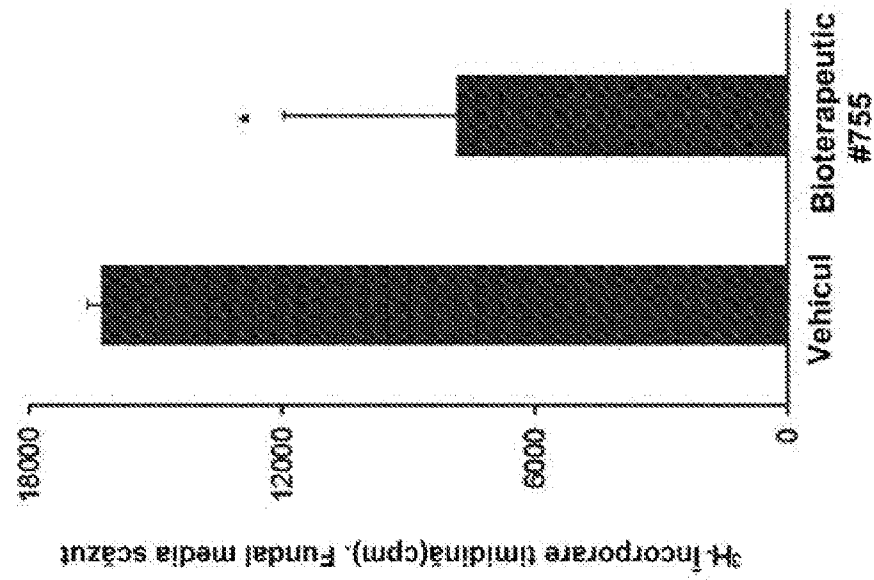
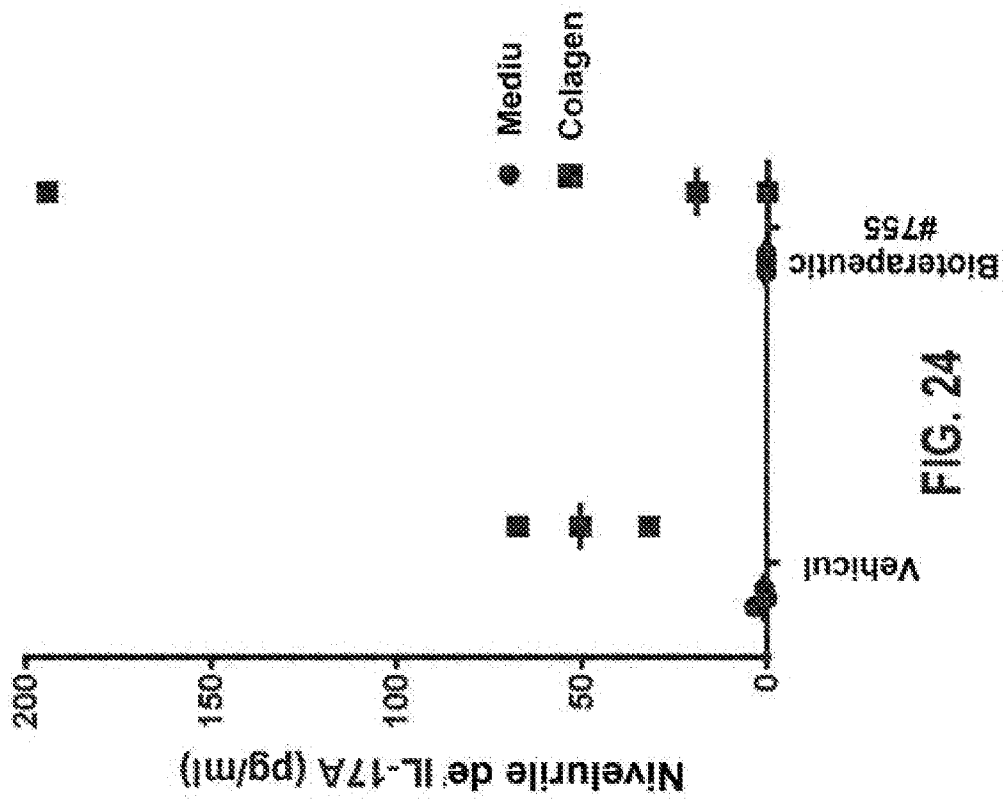
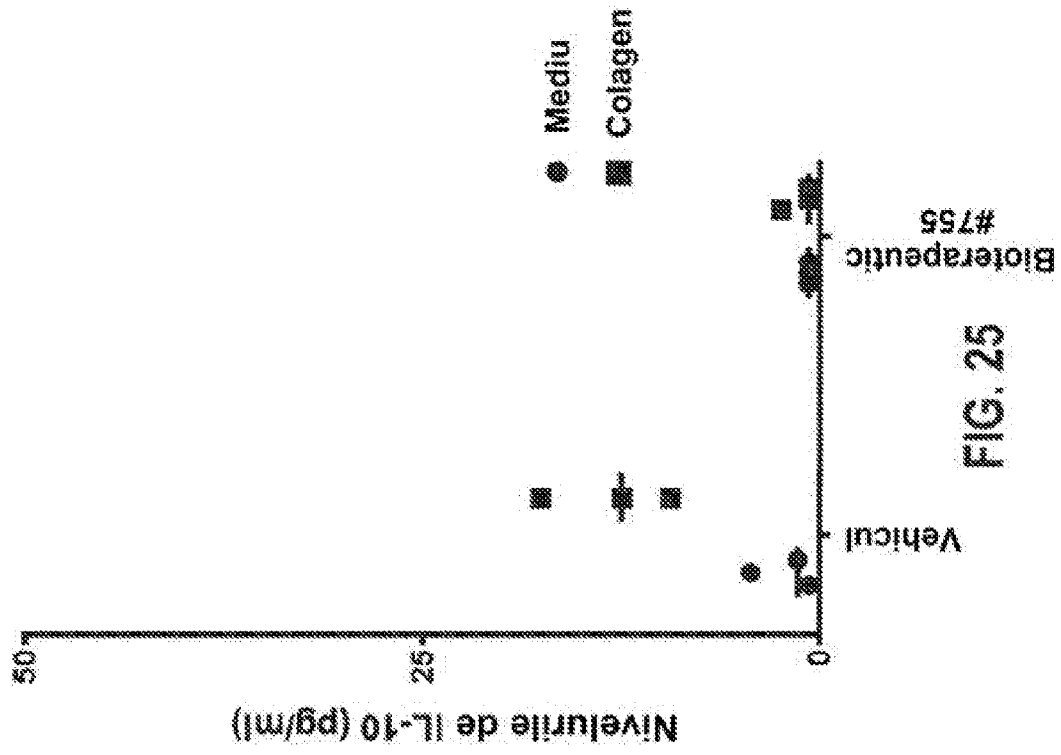


FIG. 22

Proliferarea splenocitelor la collagen II





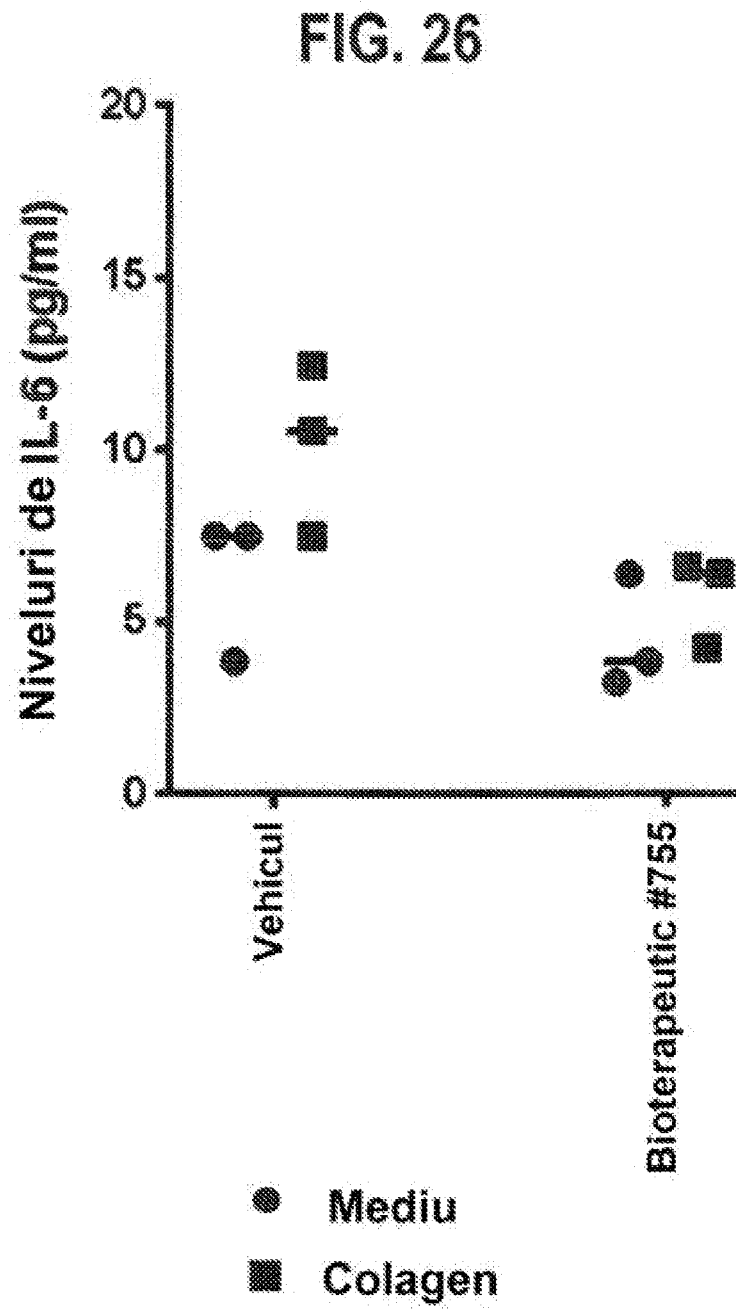
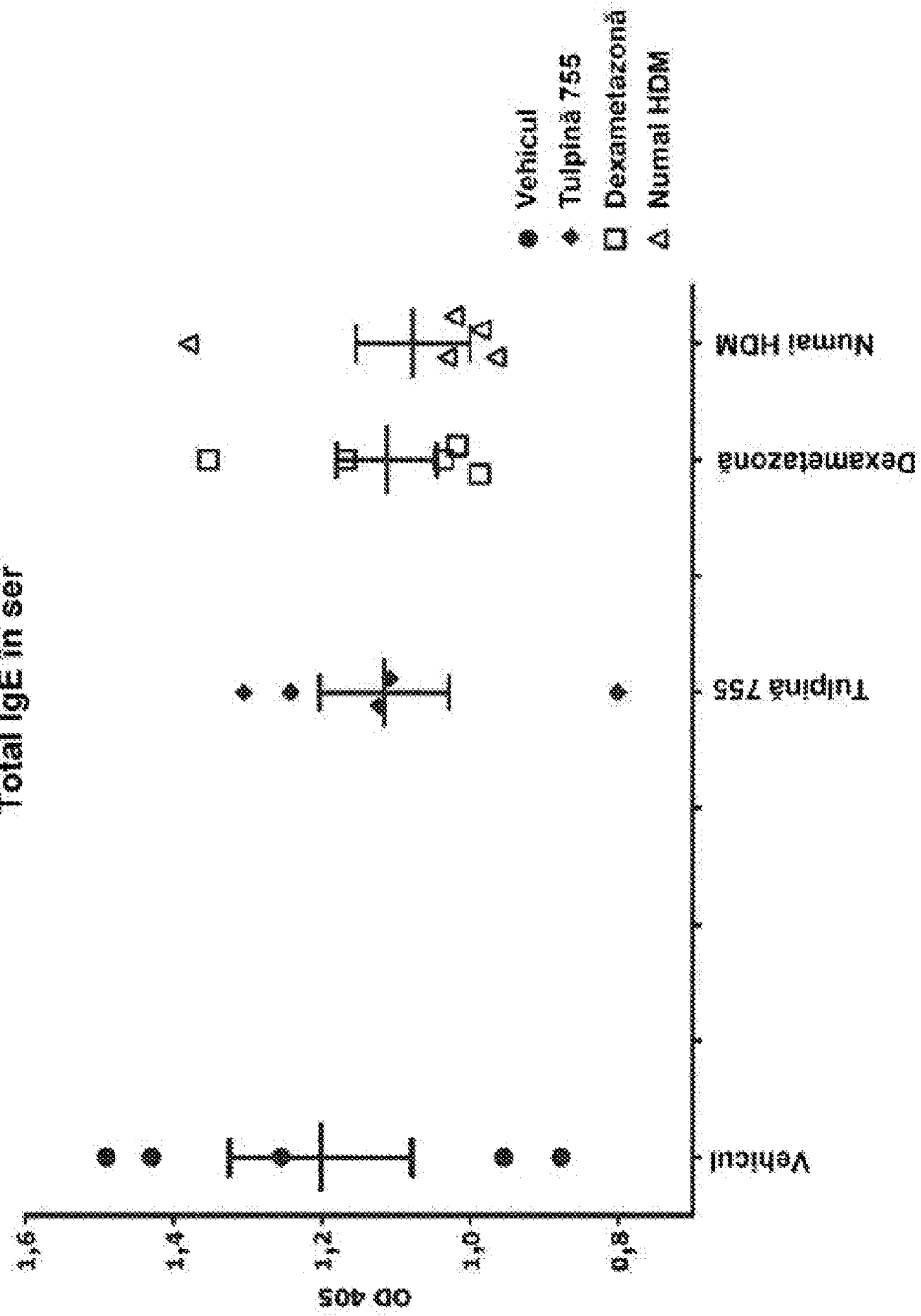
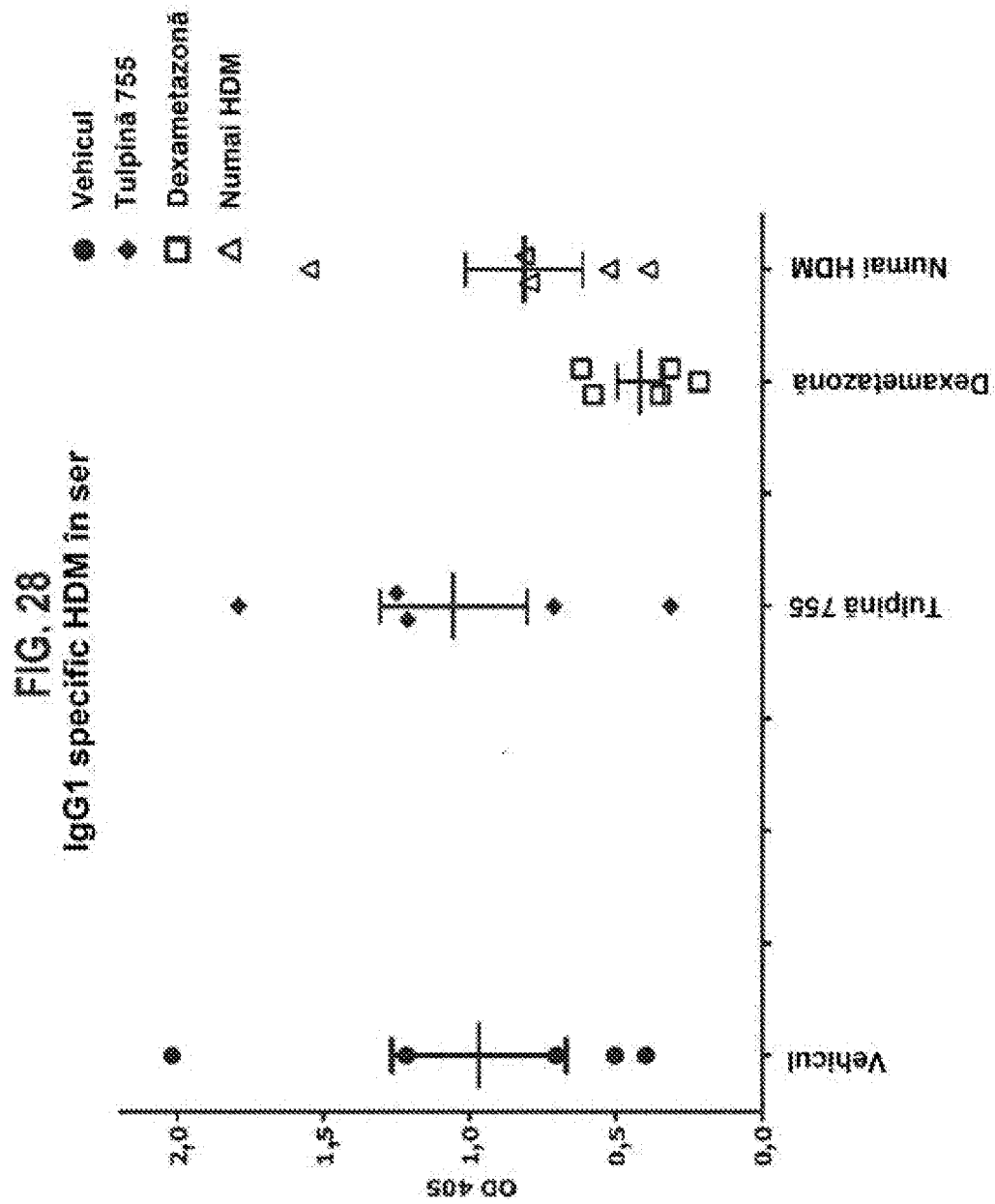


FIG. 27
Total IgE în ser





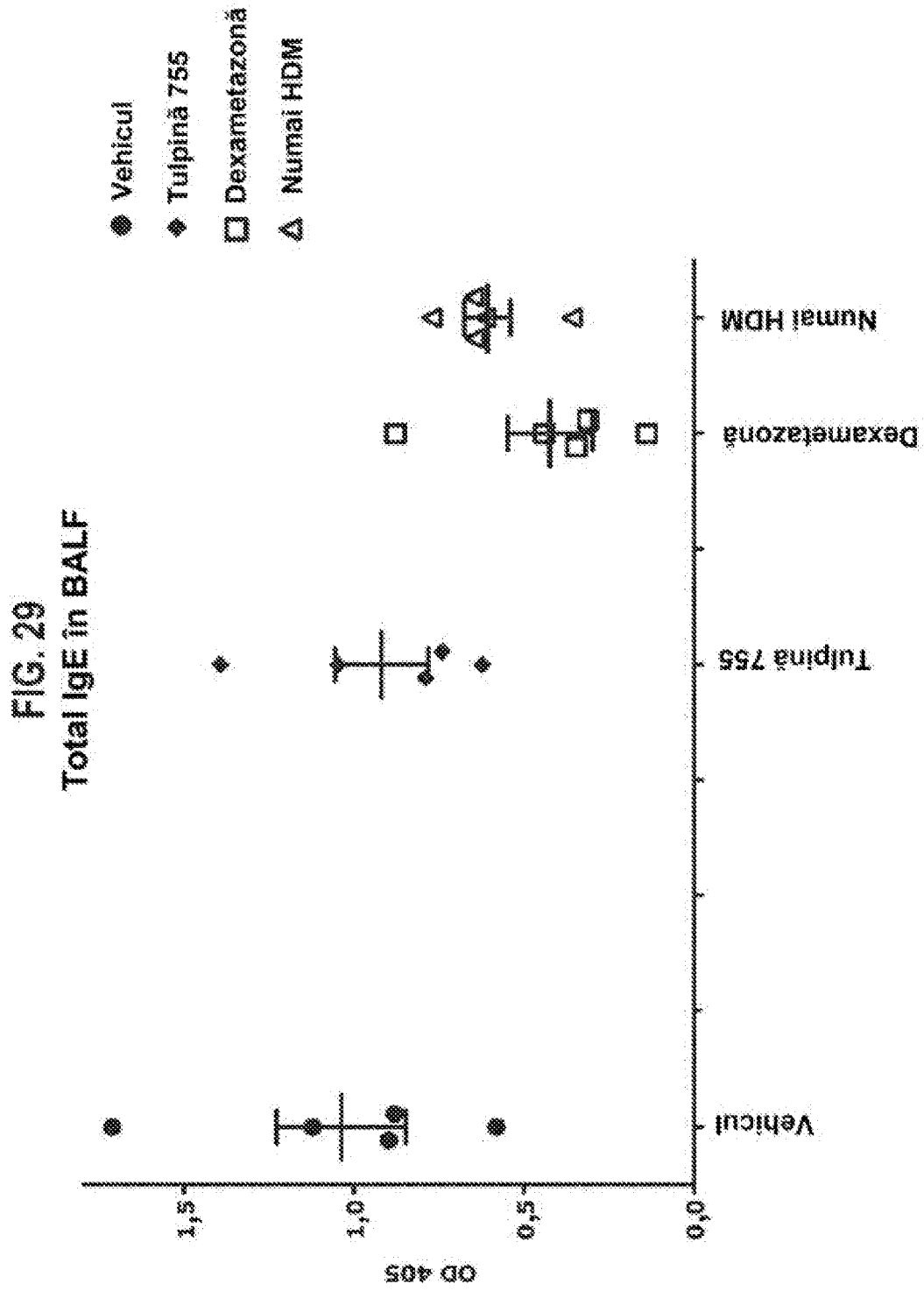


FIG. 30
IgG1 specific HDM in BALF

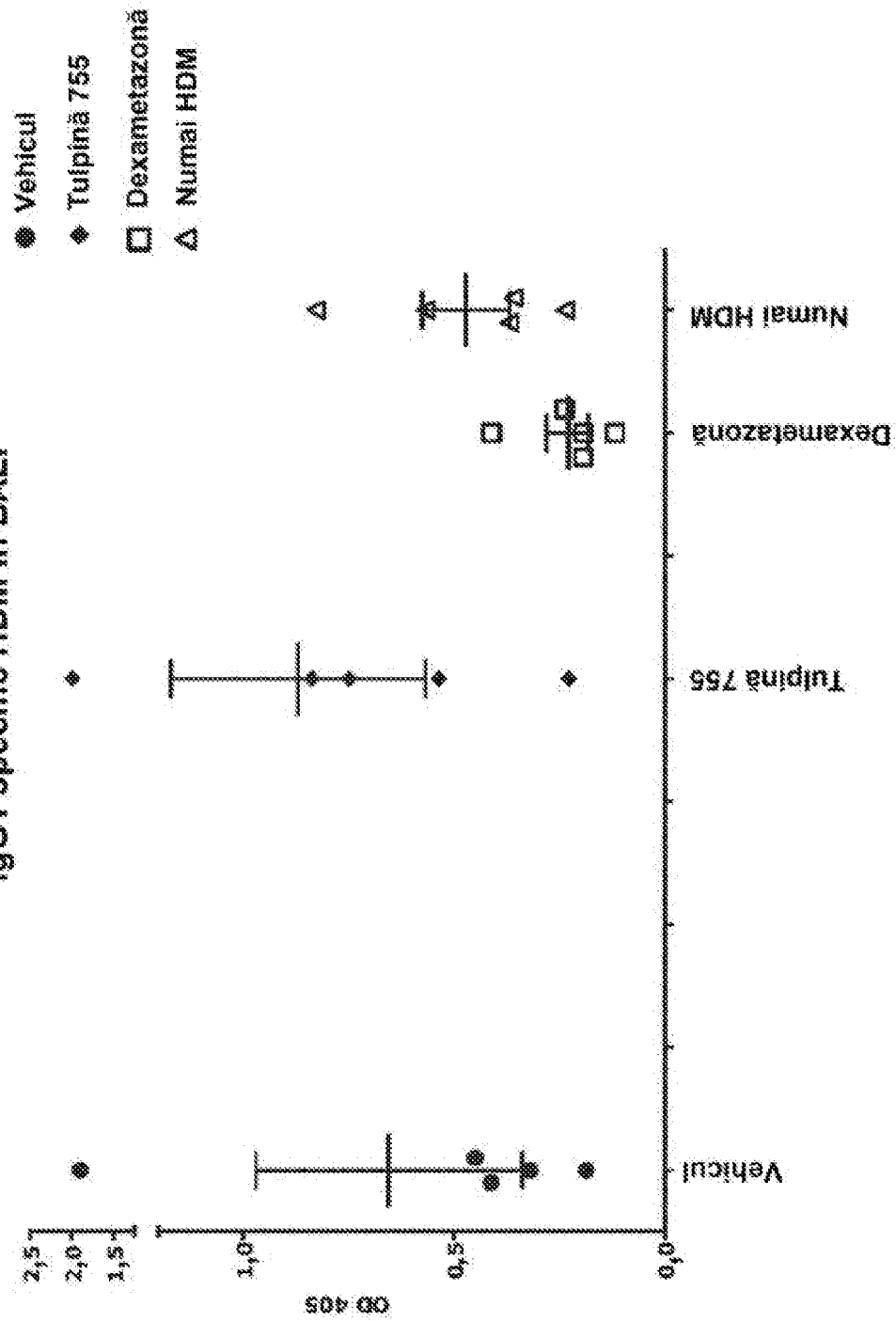


FIG. 31 Analiză histologică - scorurile medii de infiltrare peribronheolare

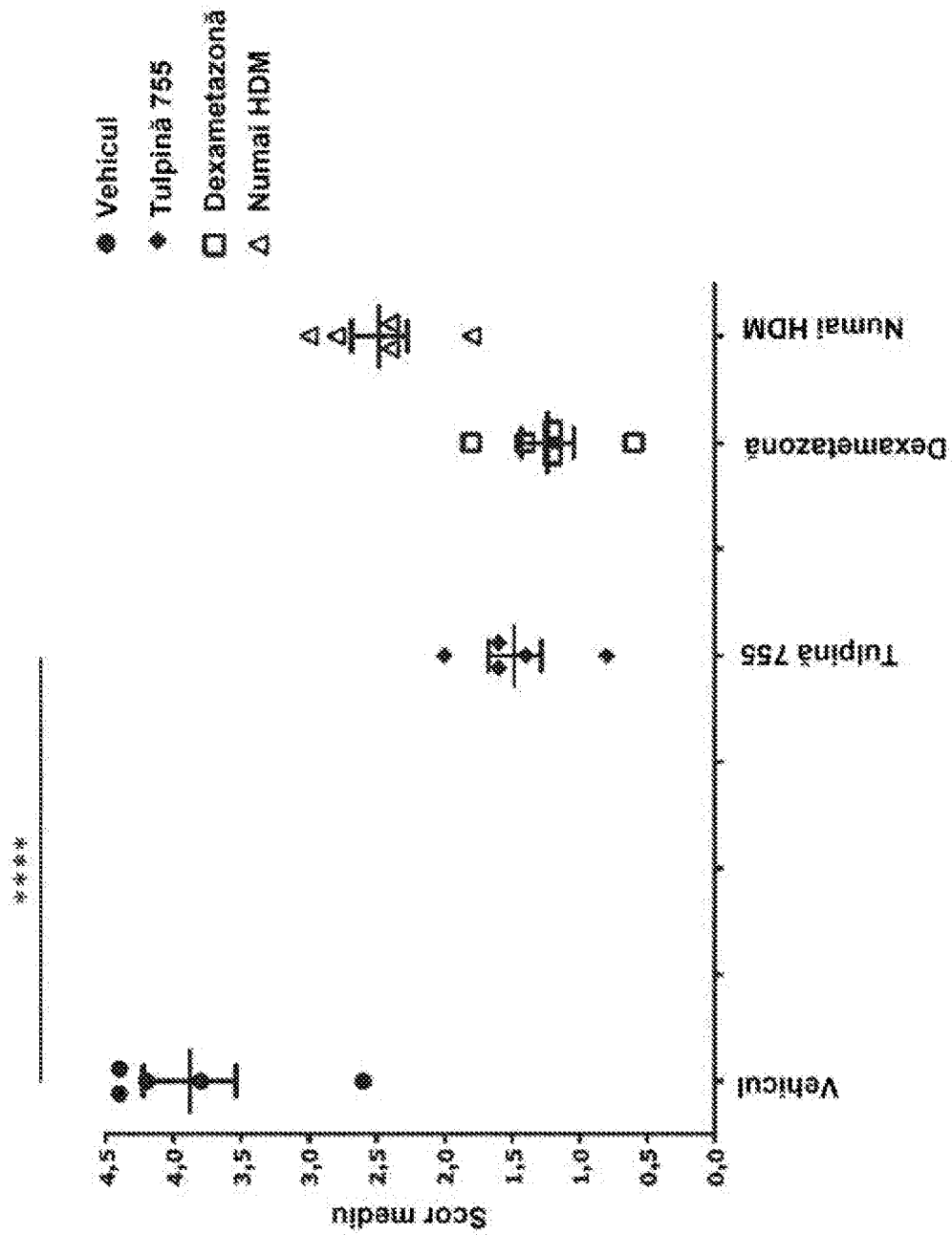
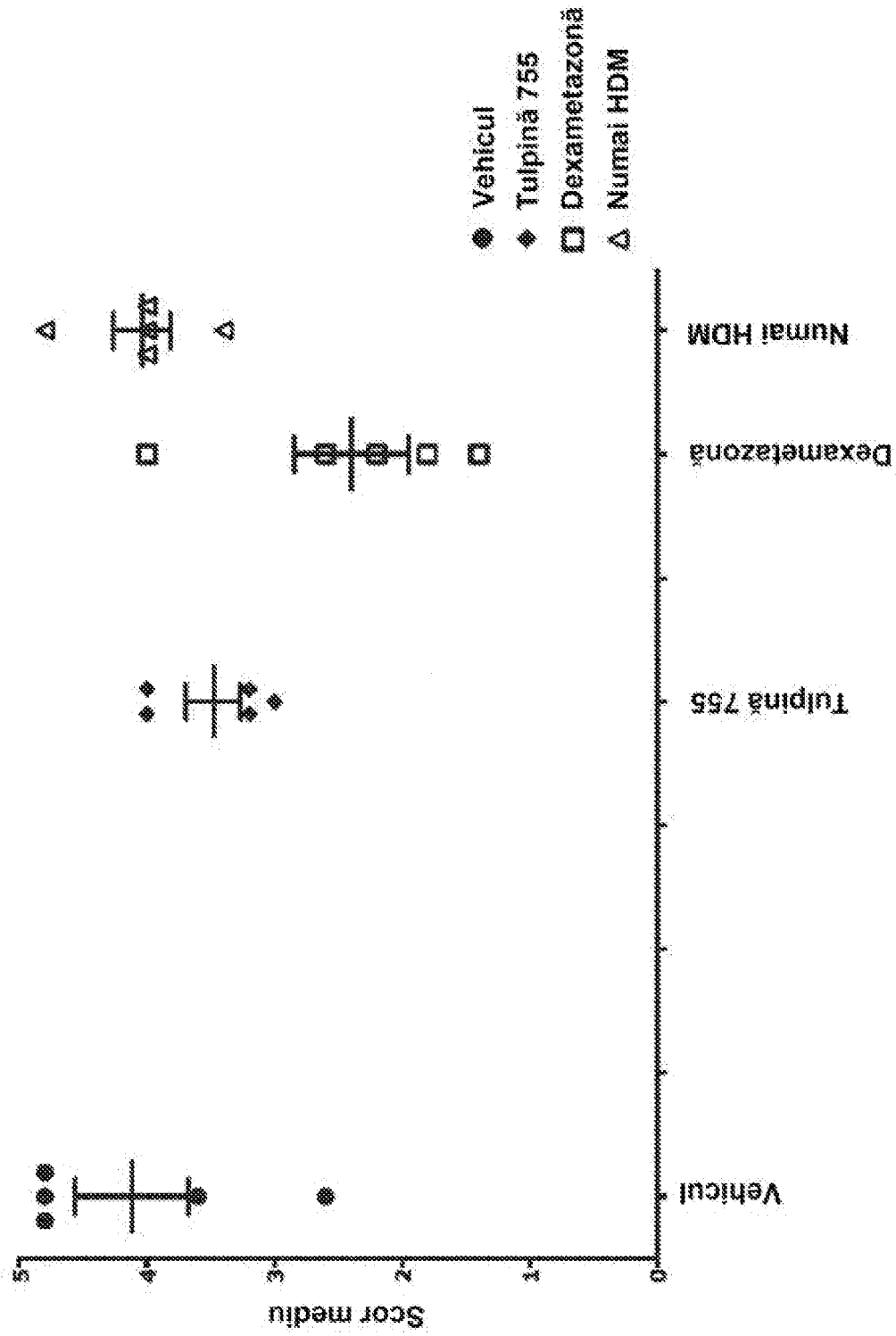
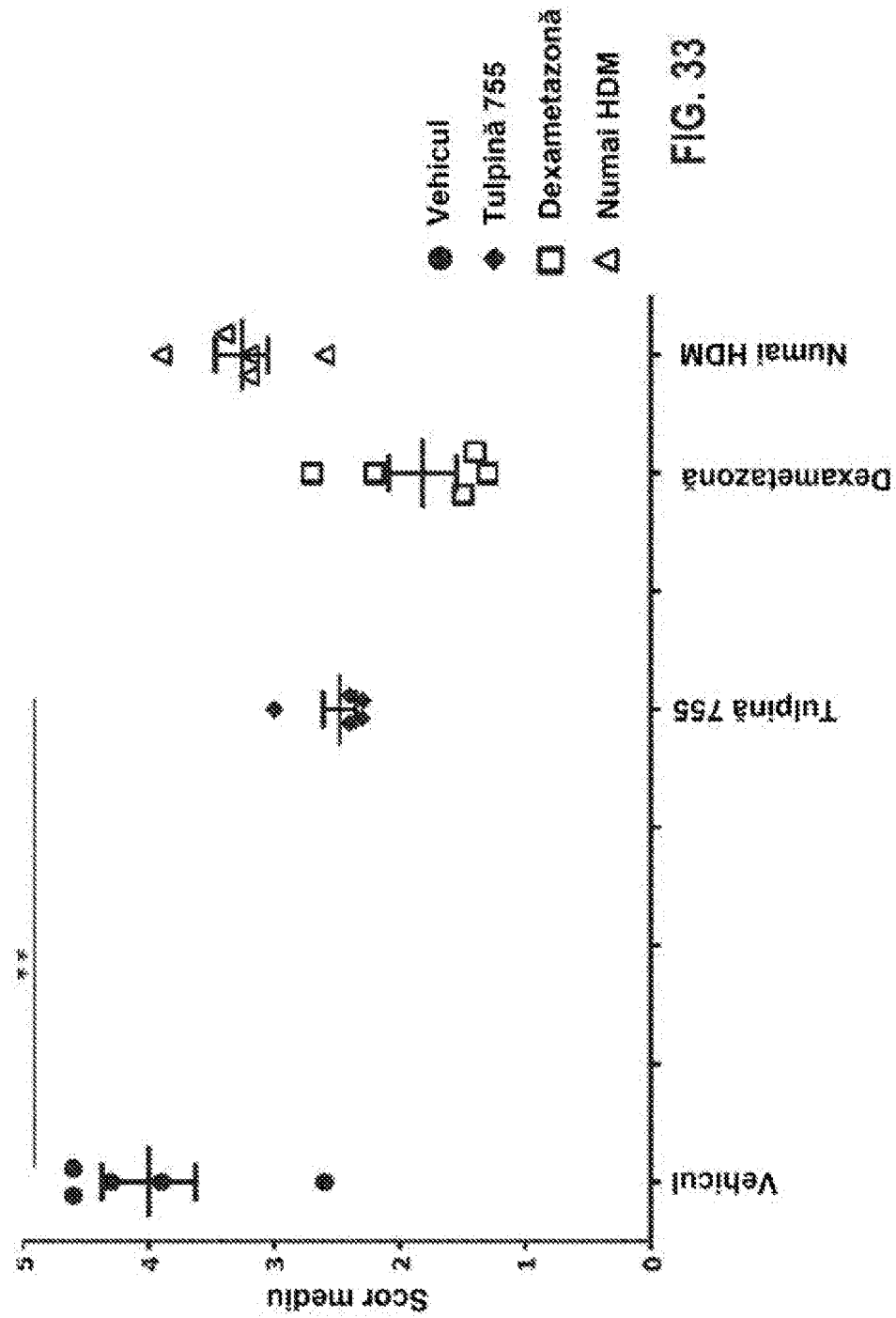


FIG. 32 Analiză histologică - scorurile medii ale infiltrărilor perivasculare



Analiză histologică - Scor inflamatoriu mediu (media scorurilor de infiltrare peribronheolare și perivasculară)



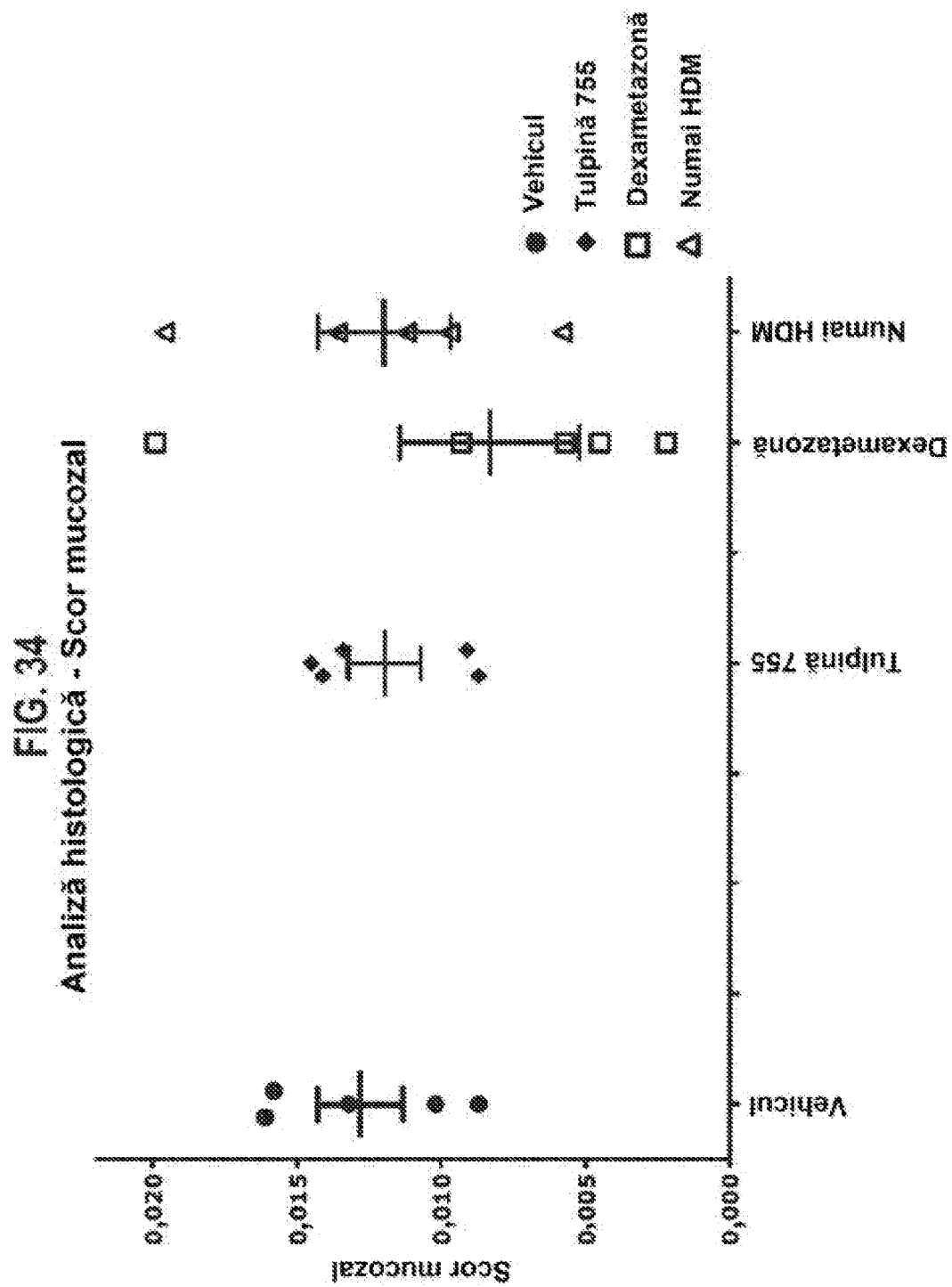


FIG. 35
Nivel IL-9 în țesutul pulmonar

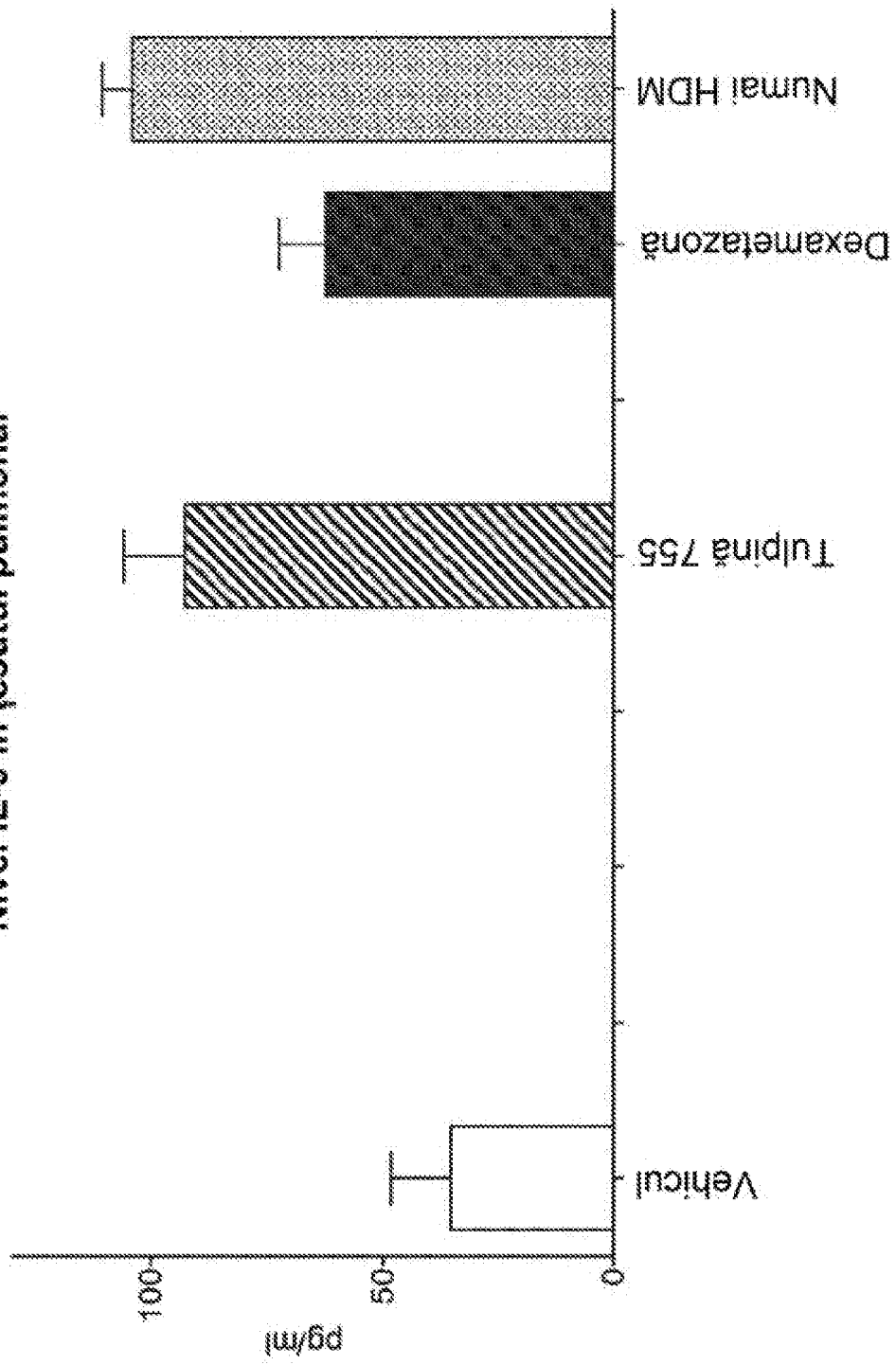


FIG. 36
Nivel IL-1a în țesutul pulmonar

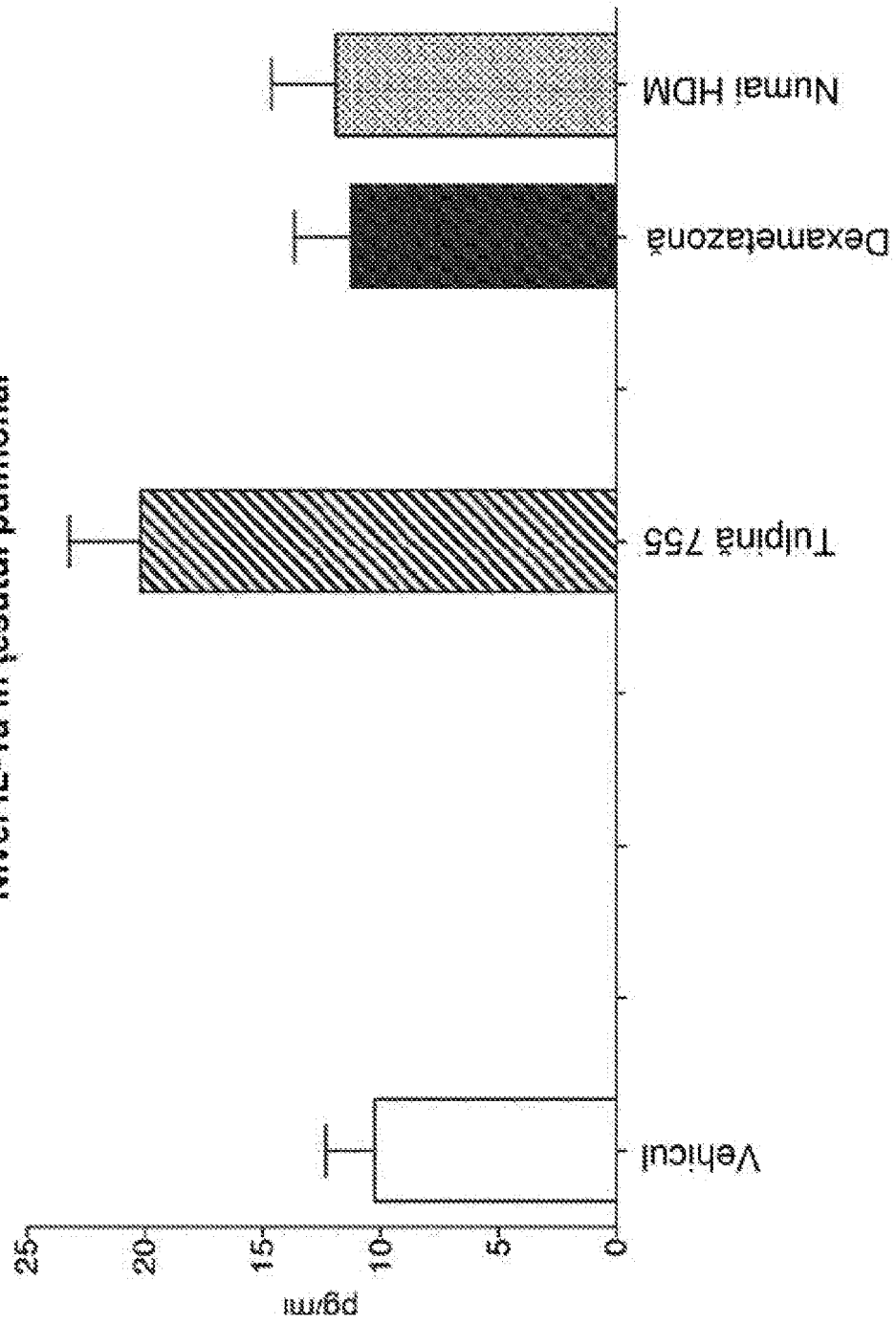


FIG. 37
Nivel IFNg în țesutul pulmonar

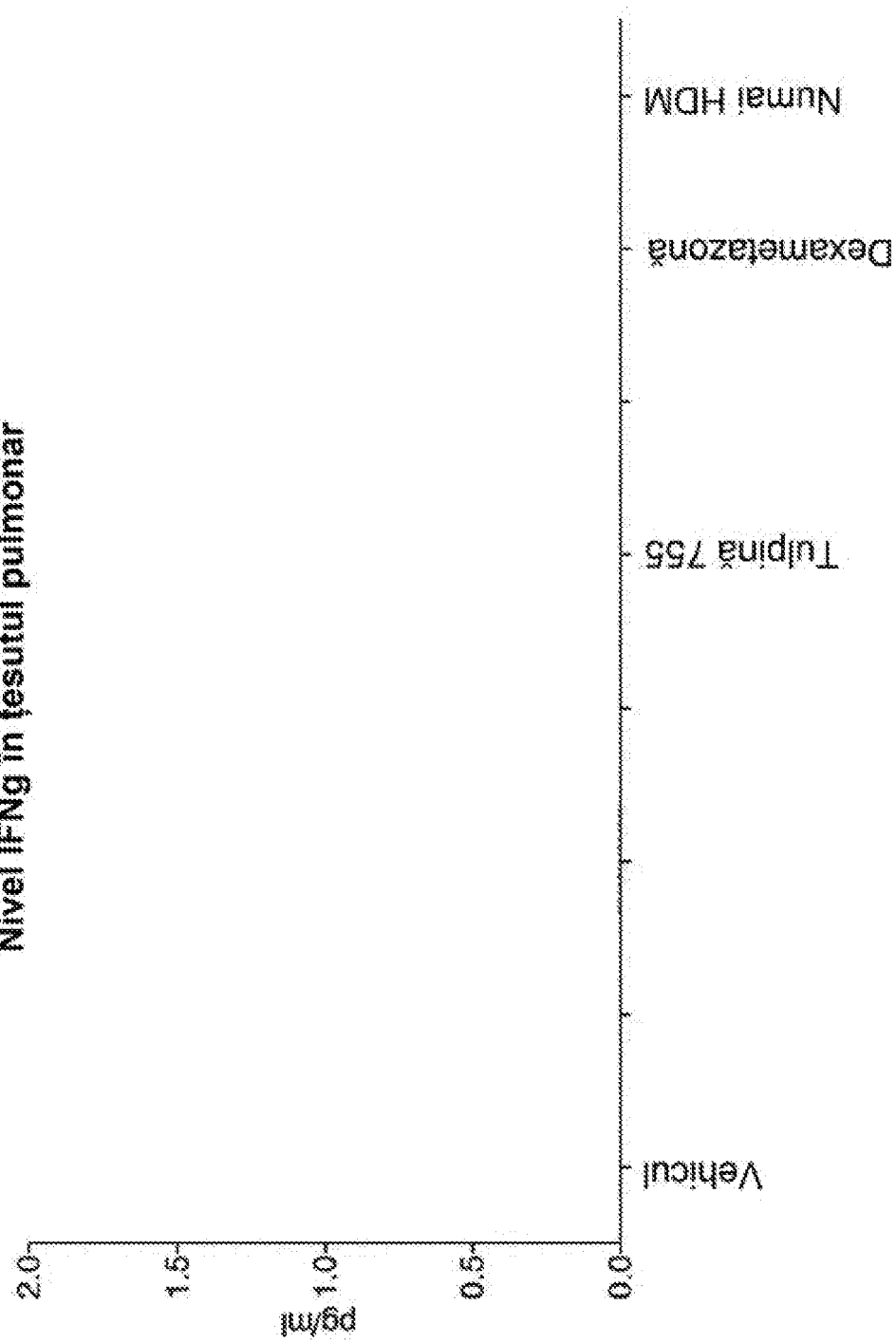
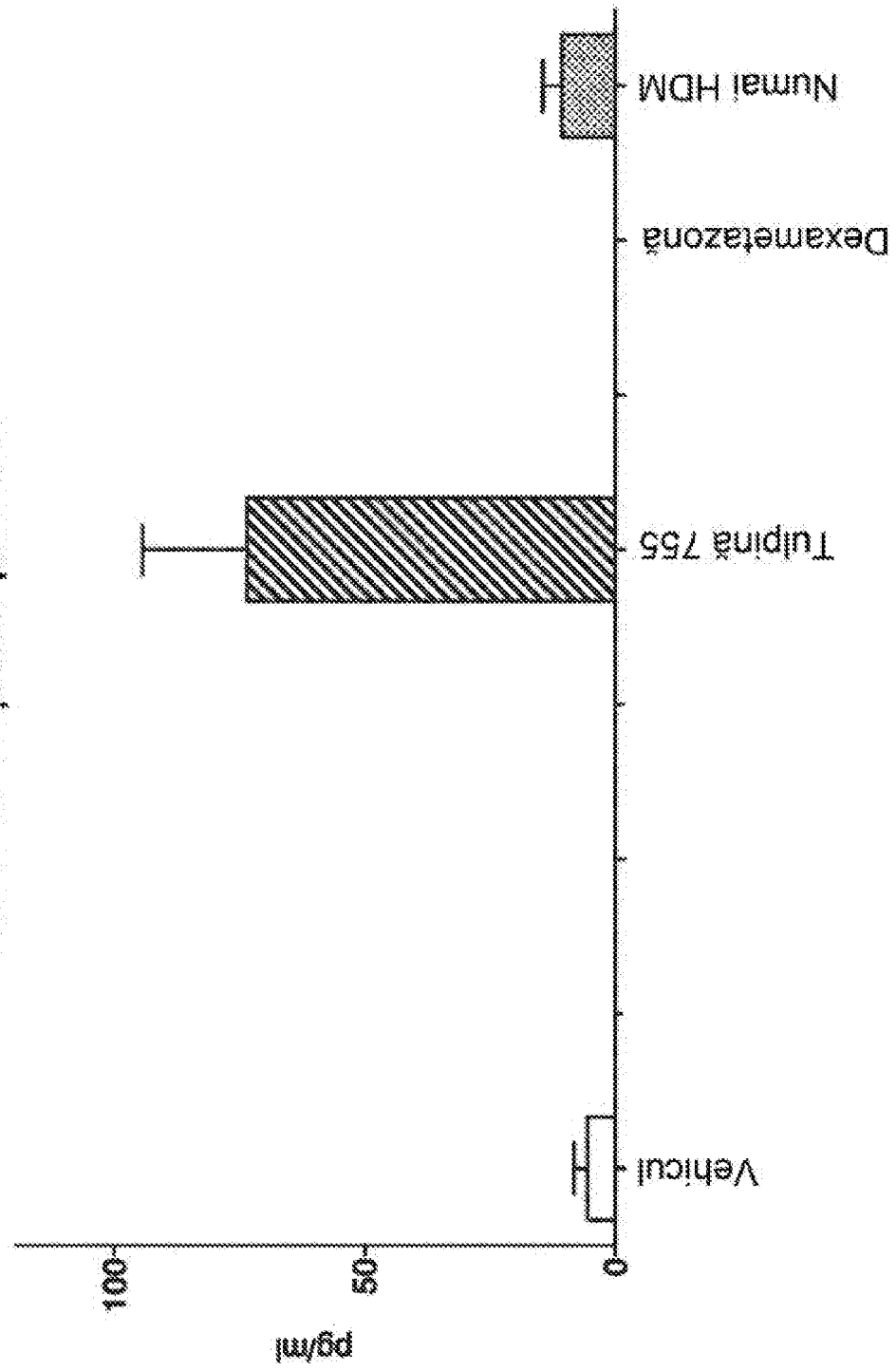


FIG. 38
Nivel IL-17A în țesutul pulmonar



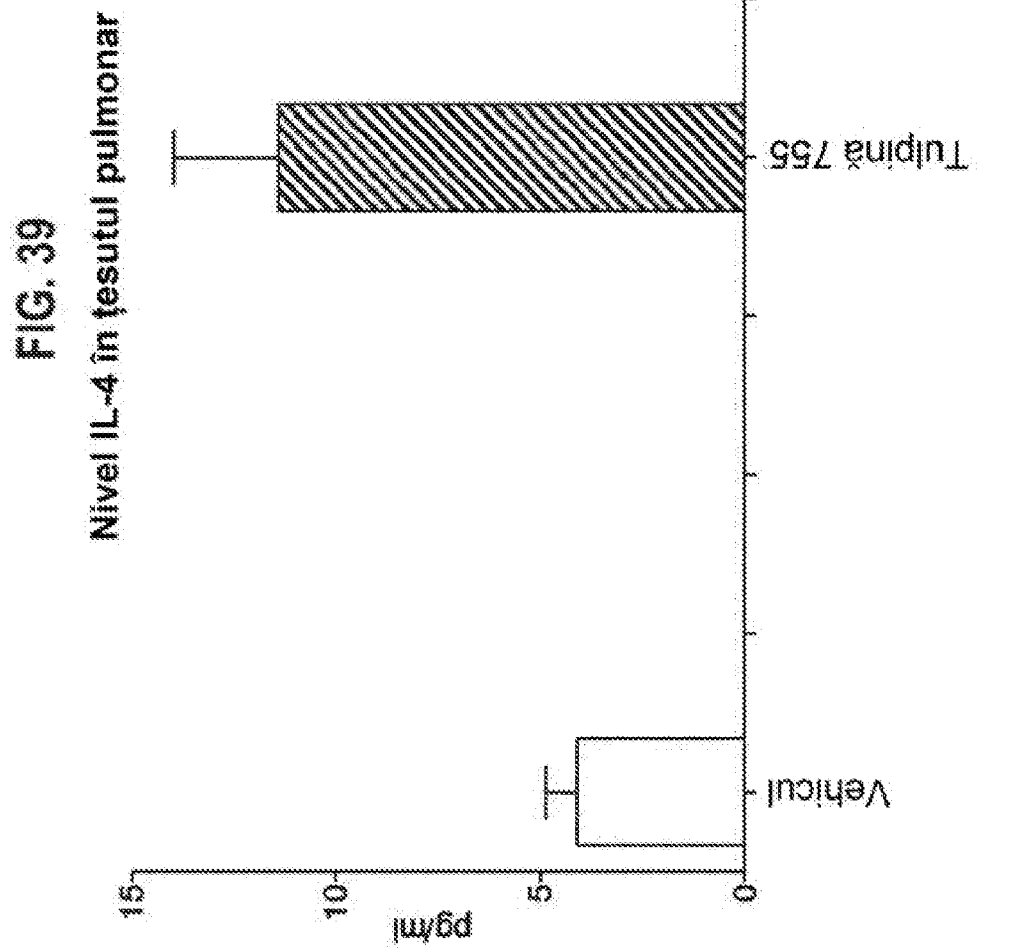


FIG. 40
Nivel IL-5 în țesutul muscular

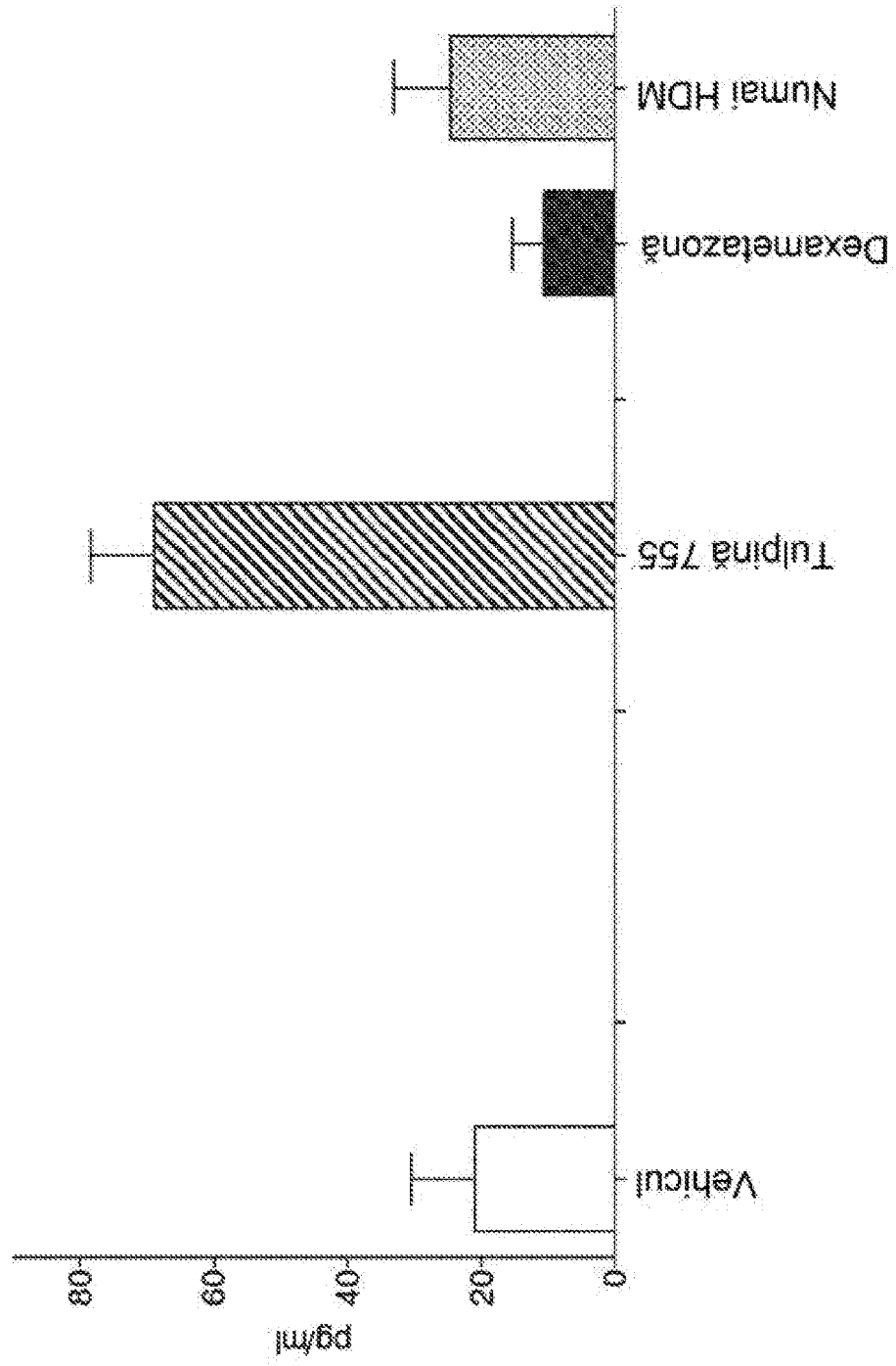


FIG. 41
Nivel IL-1b în țesutul muscular

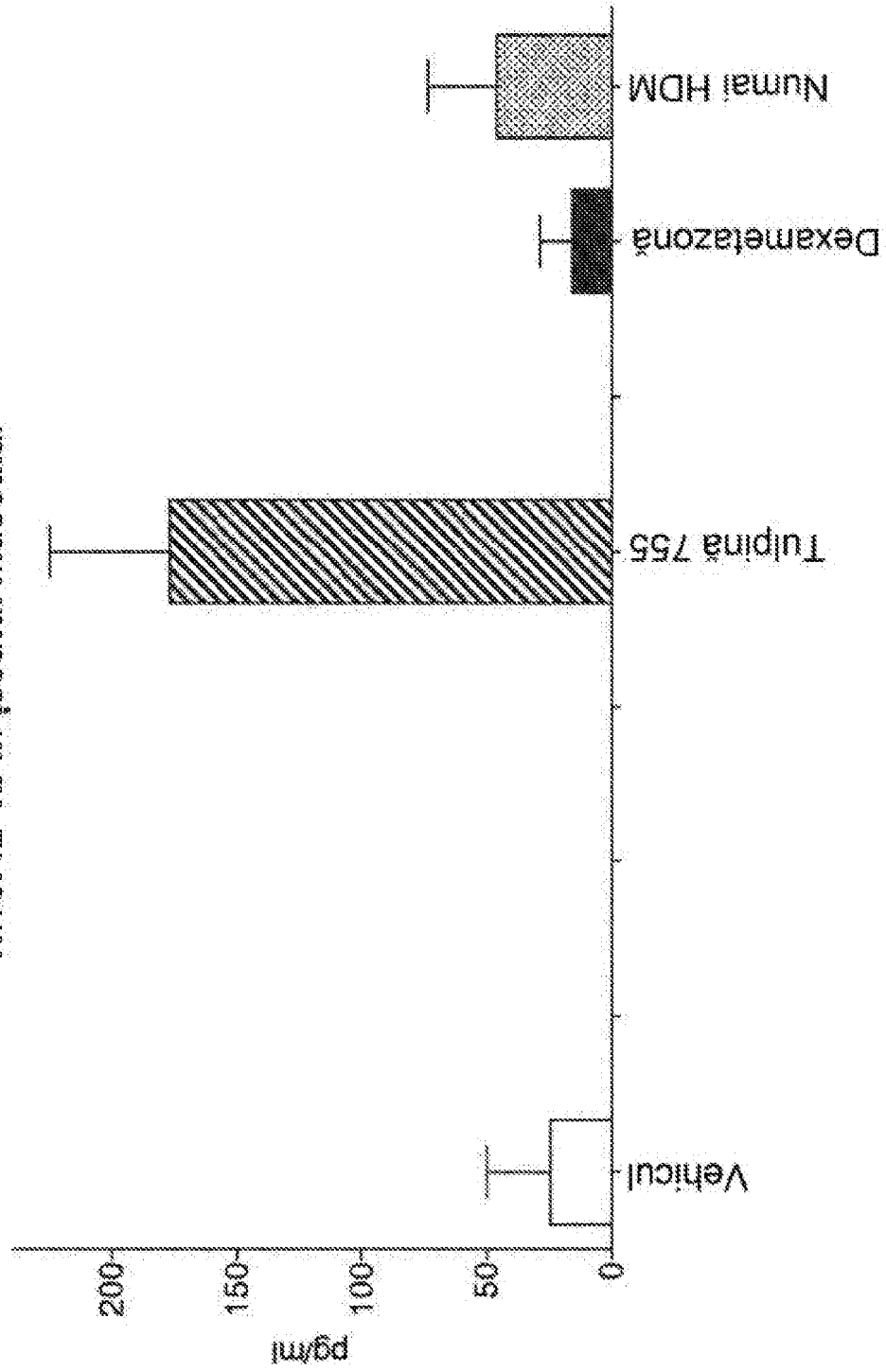


FIG. 42
Nivel RANTES în țesutul pulmonar

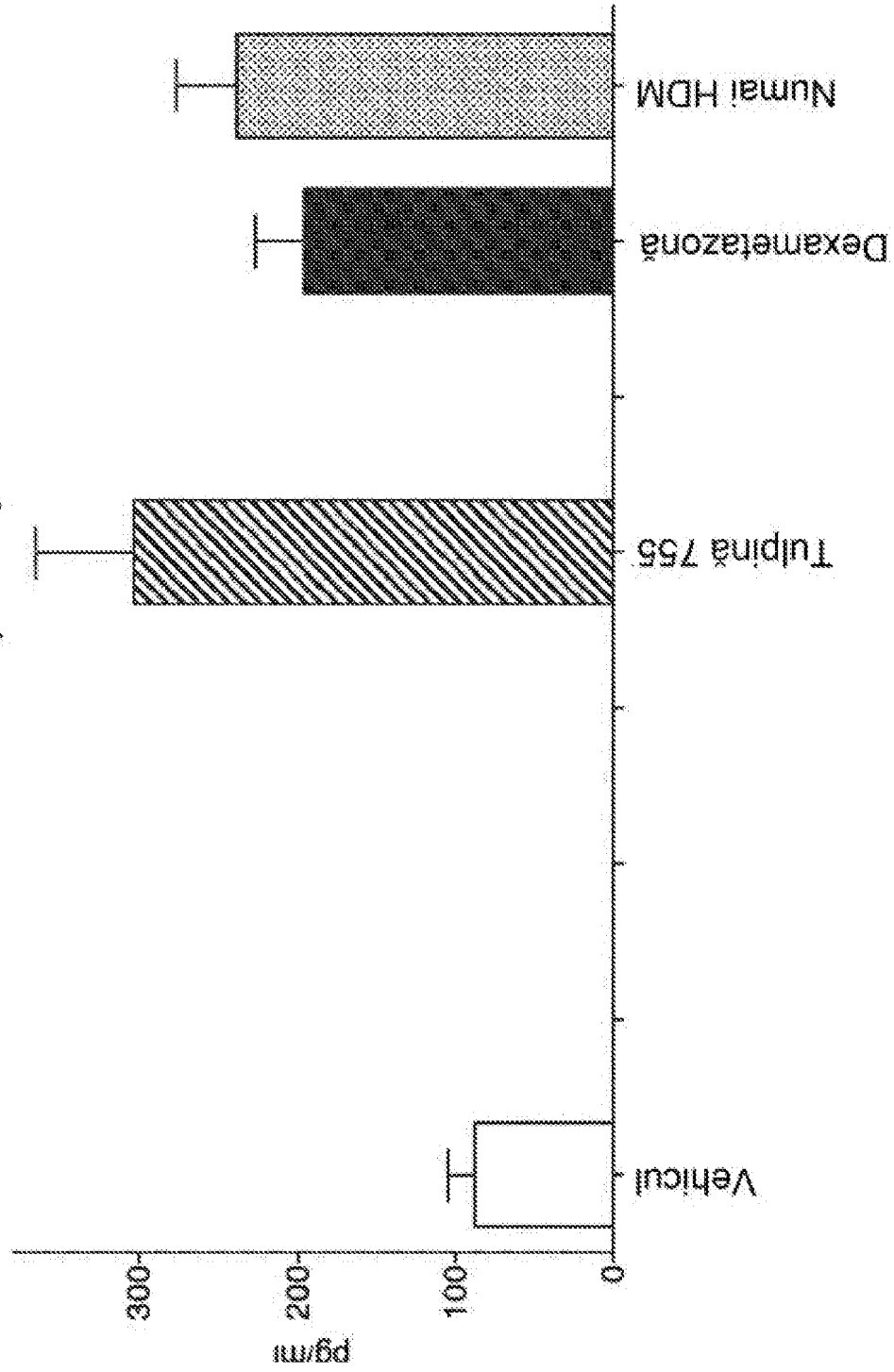


FIG. 43
Nivel MIP-1a în țesutul pulmonar

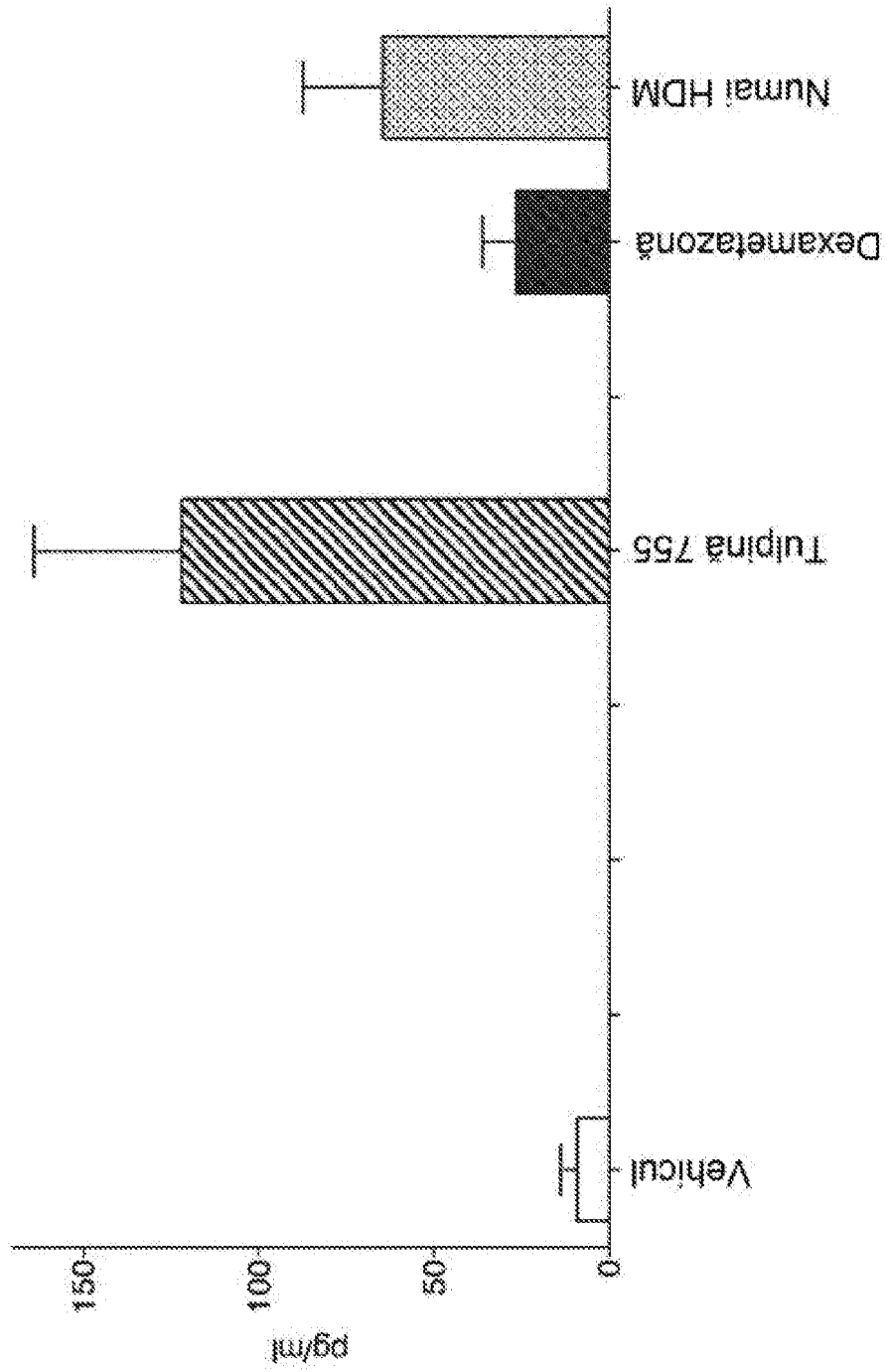


FIG. 44
Nivel KC în țesutul pulmonar

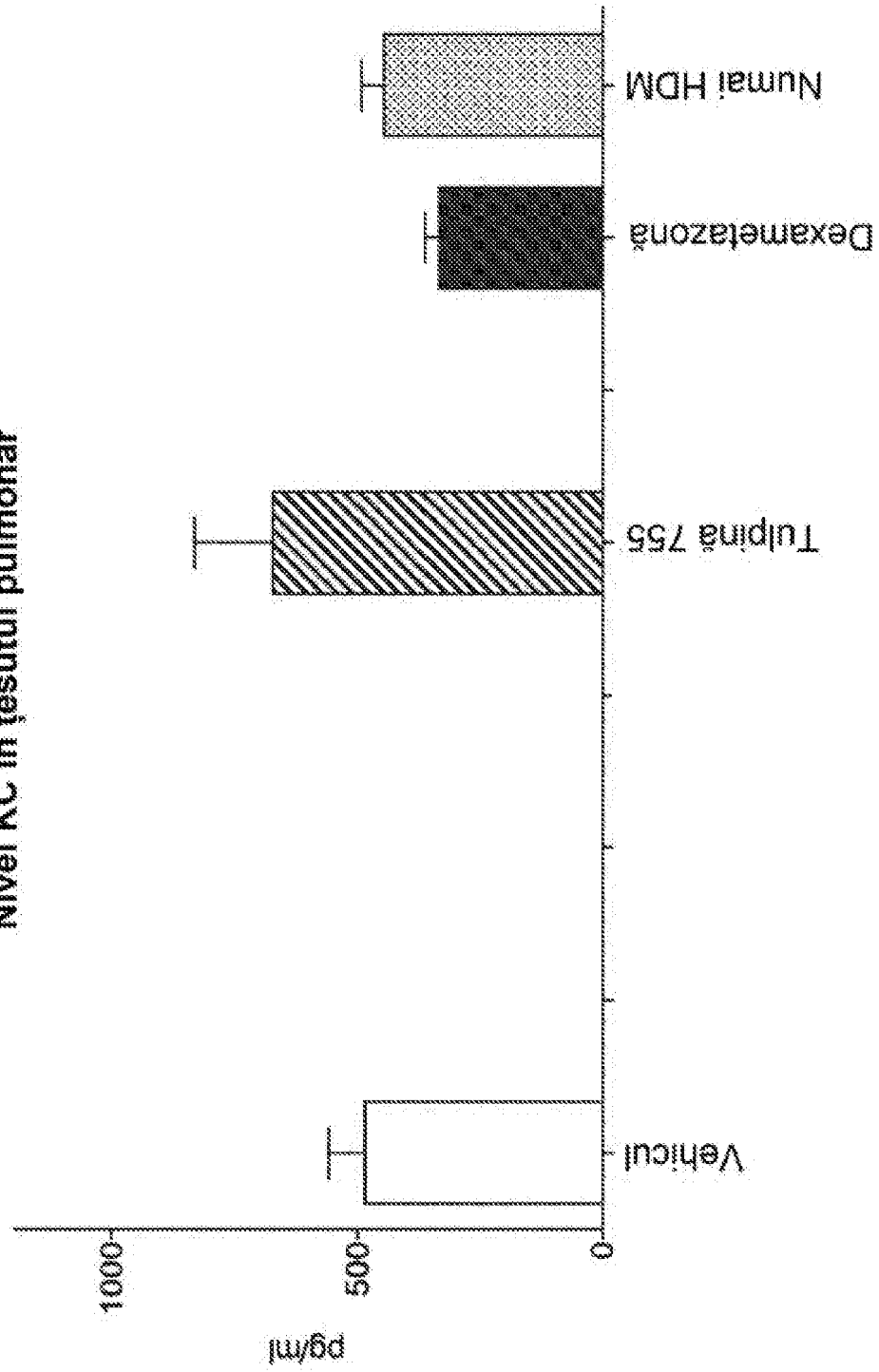


FIG. 45
Nivel MIP-2 în țesutul pulmonar

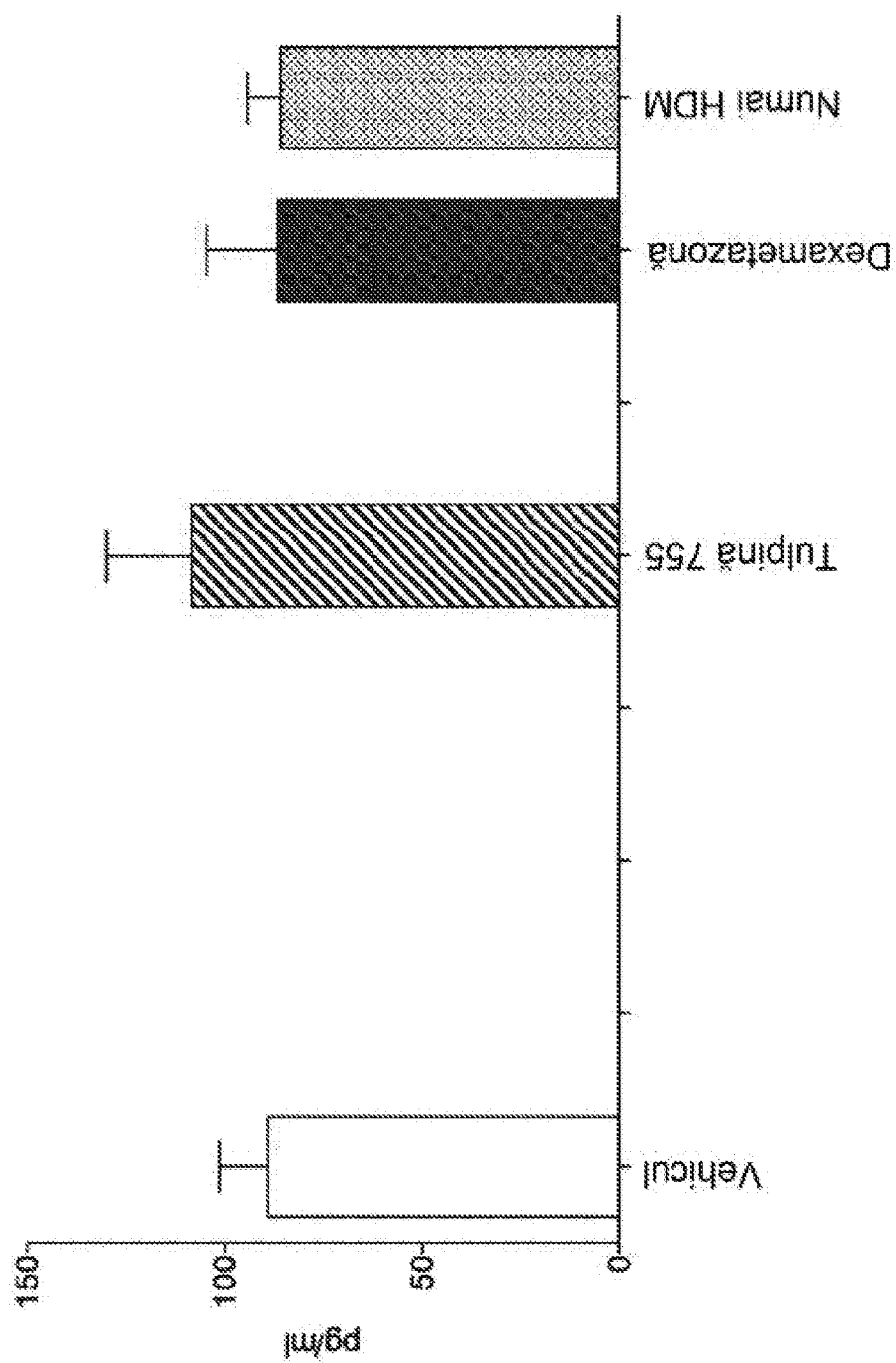
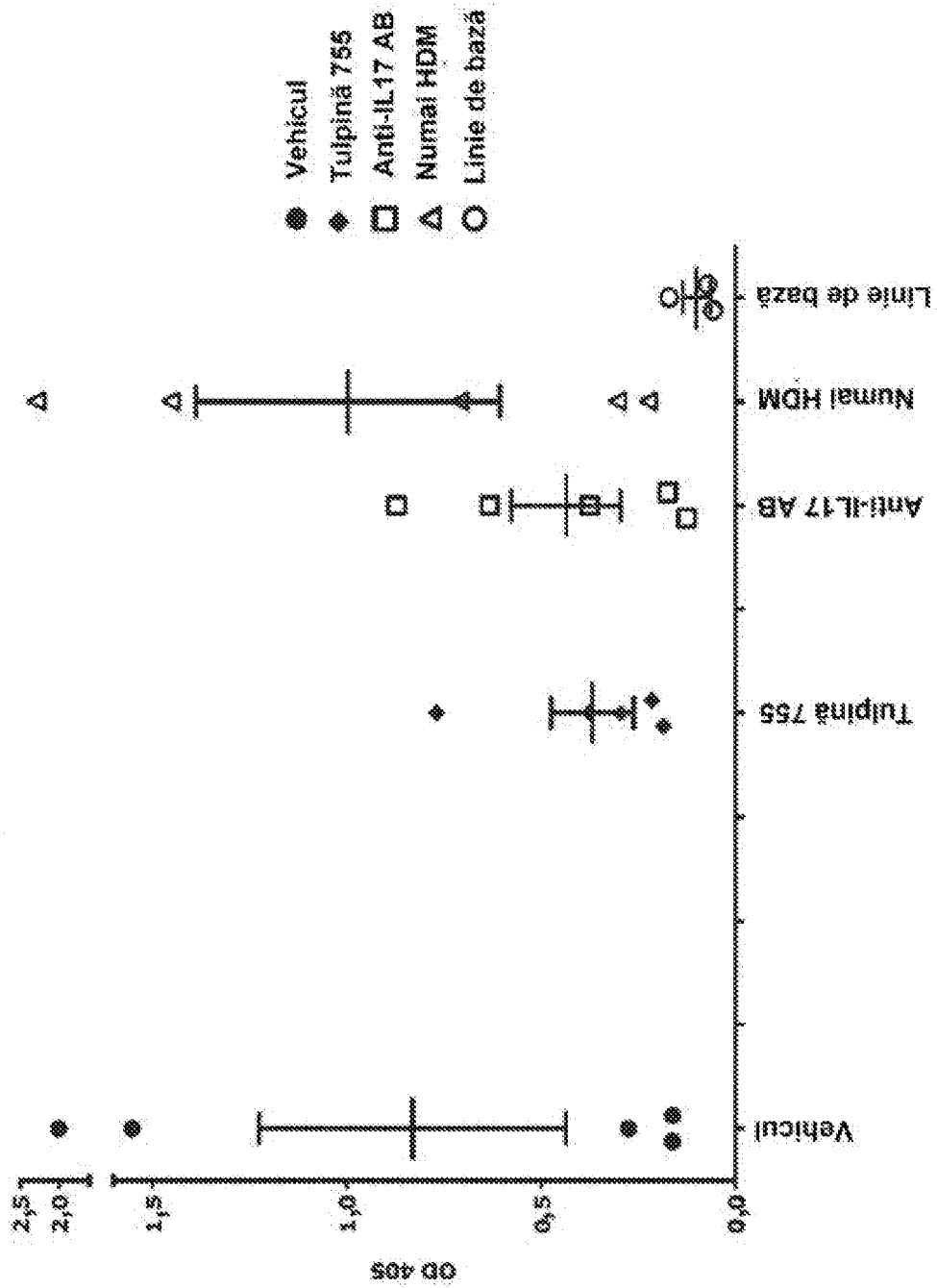
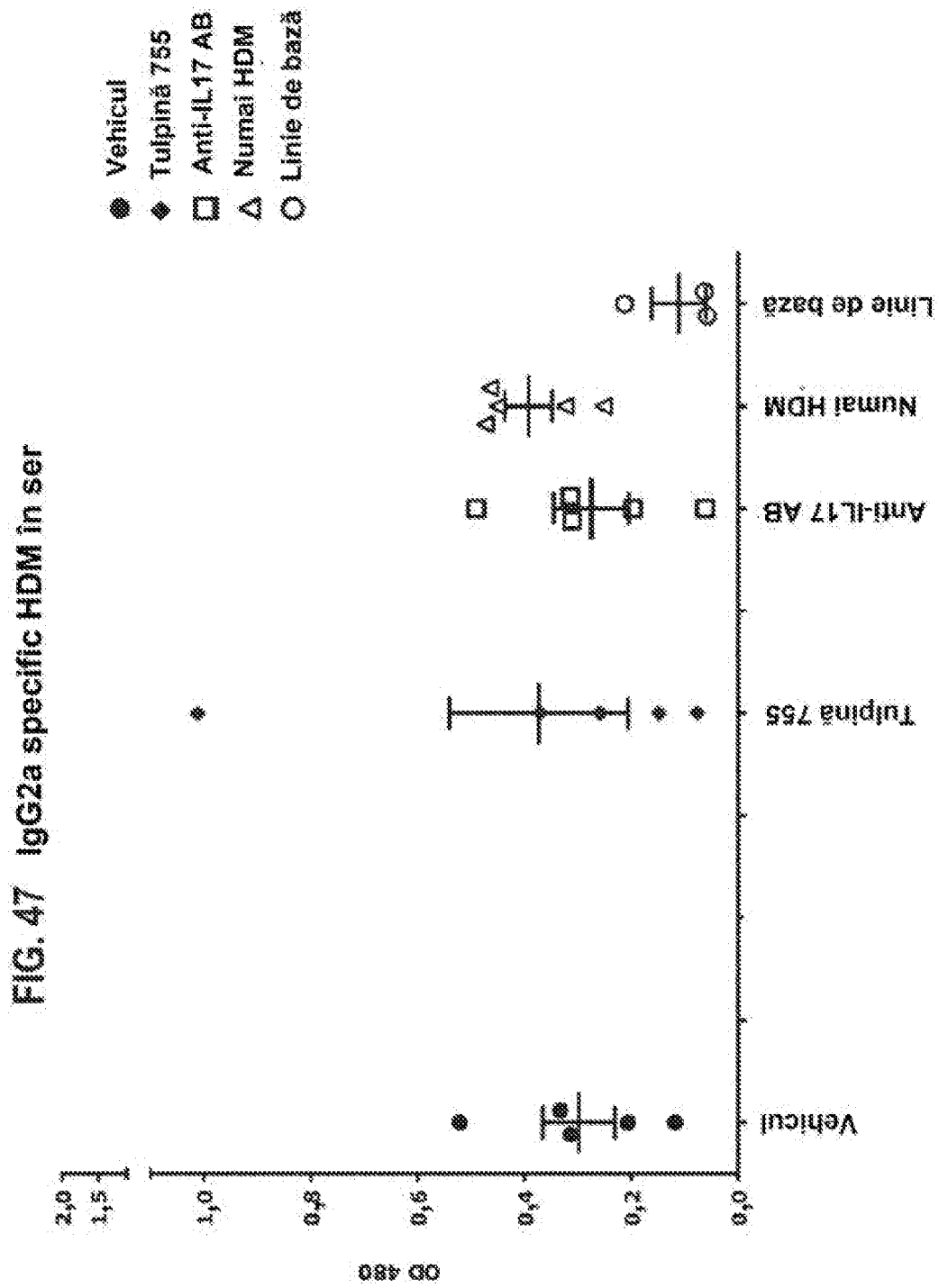


FIG. 46 IgG1 specific HDM in ser





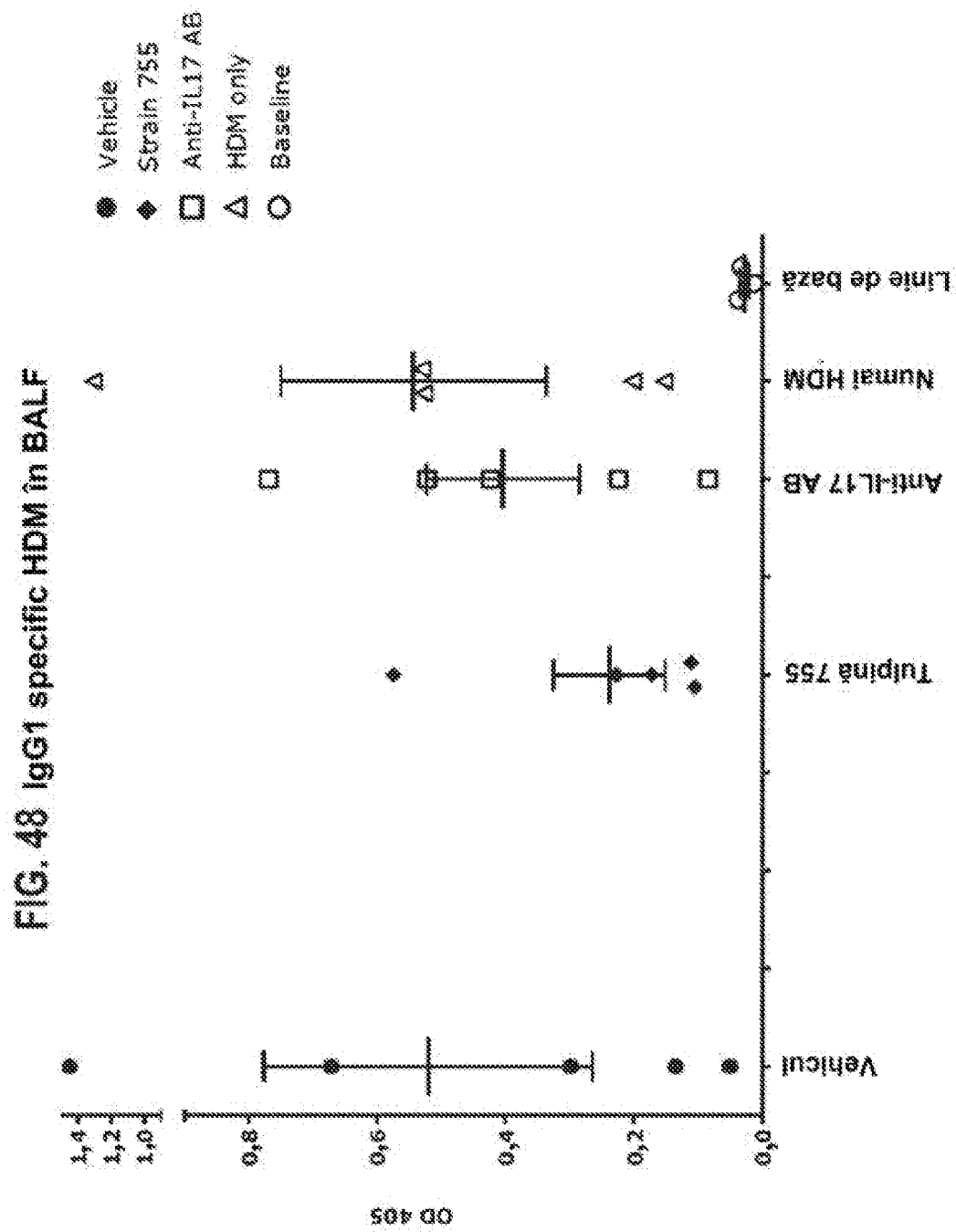


FIG. 49 IgG2a specific HDM in BALF

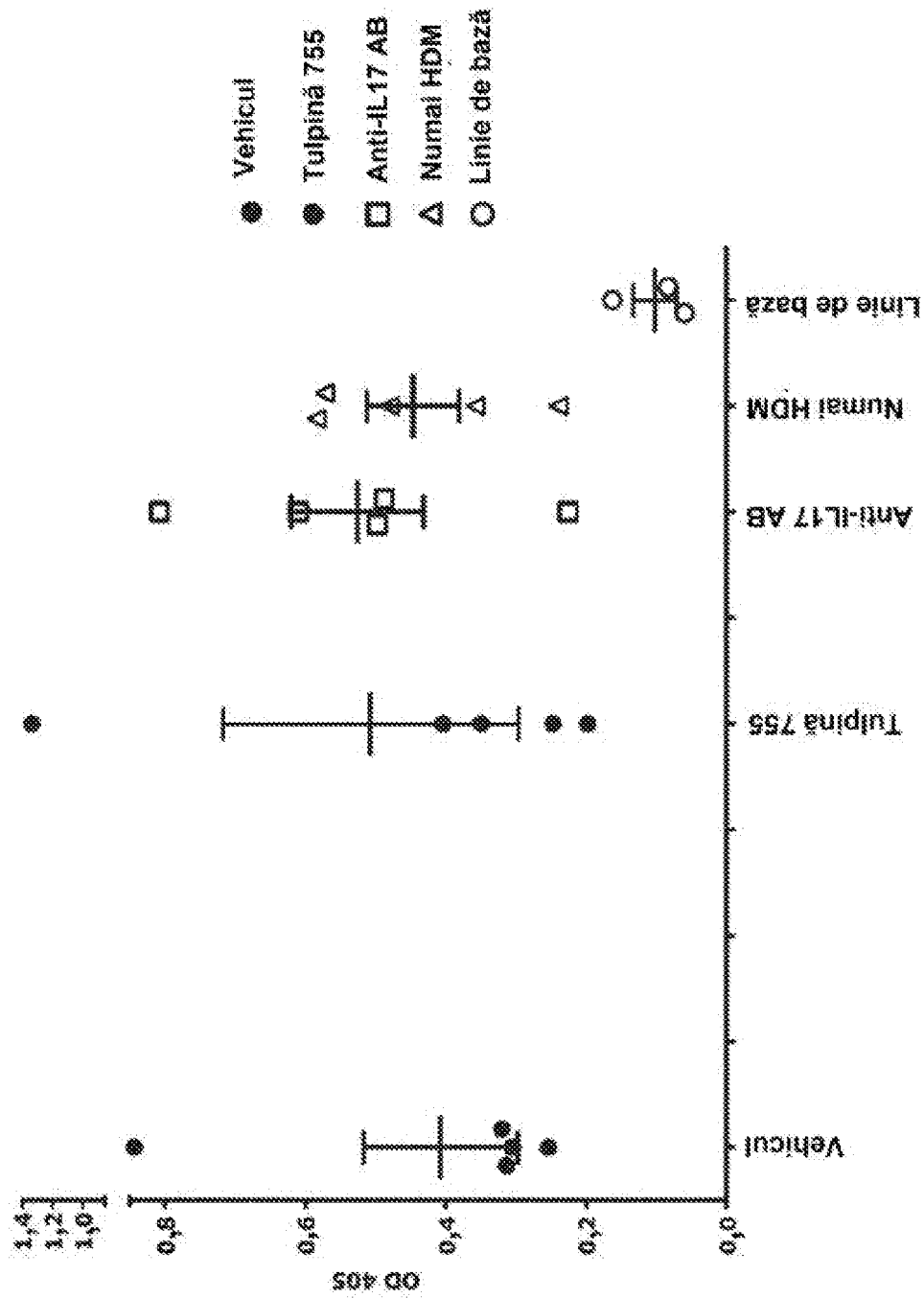


FIG. 50 Analiză histologică - Scorul mediu al infiltrărilor peribronheolare

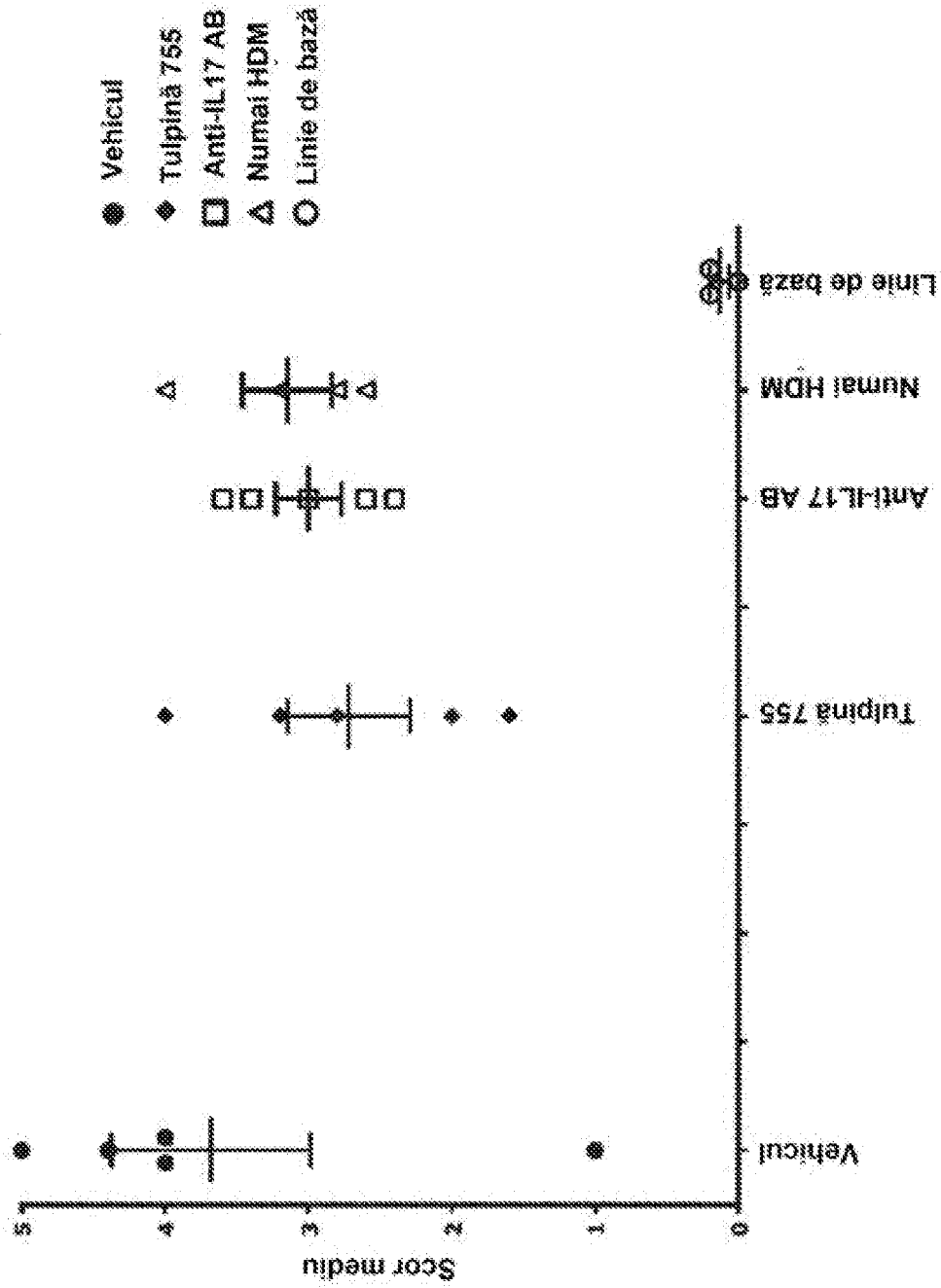


FIG. 51 Analiză histologică - Scor mediu al infiltrărilor perivascularare

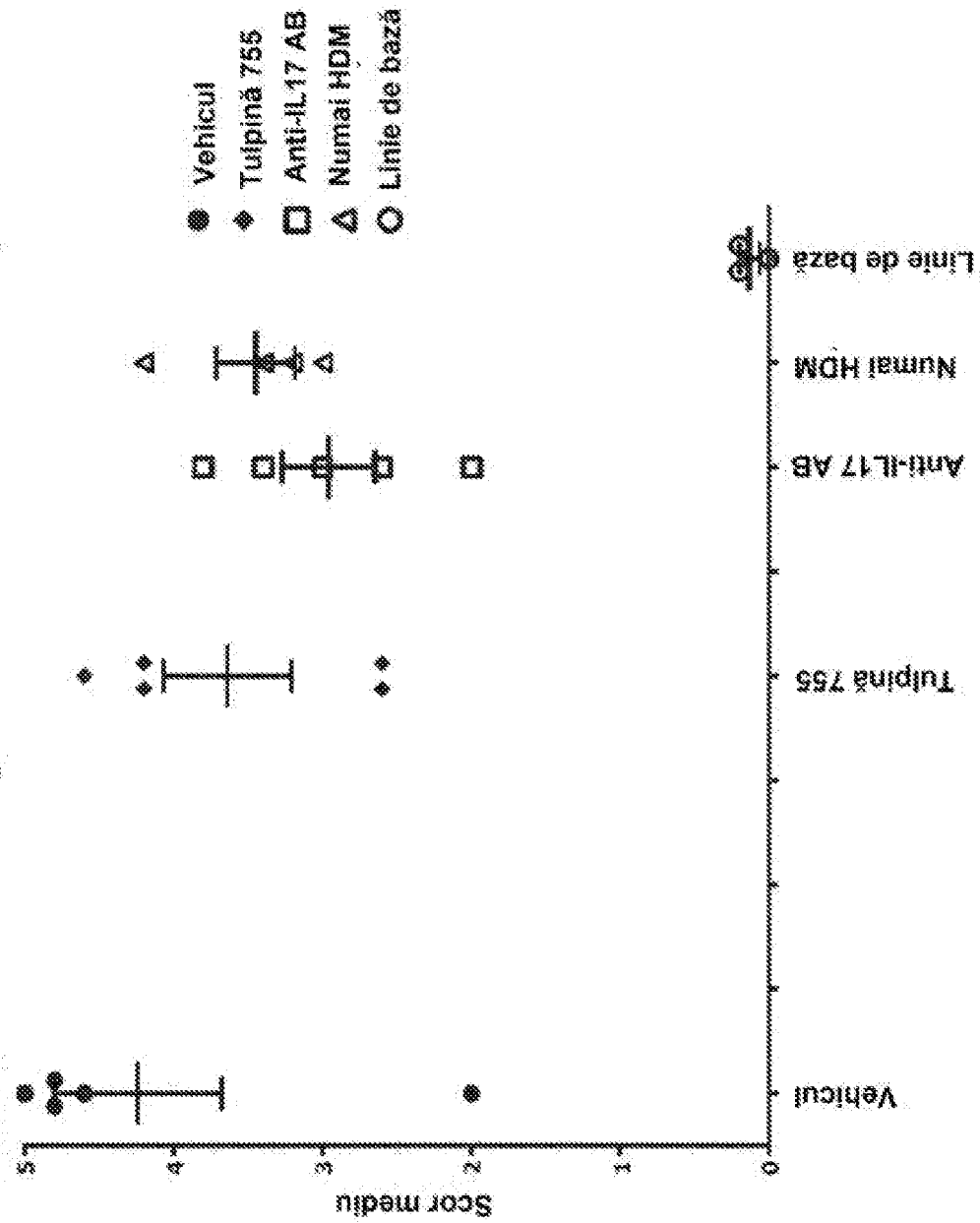


FIG. 52 Analiza histologică - Scor inflamator mediu (media scorurilor de infiltrare peribronheolare și perivasculară)

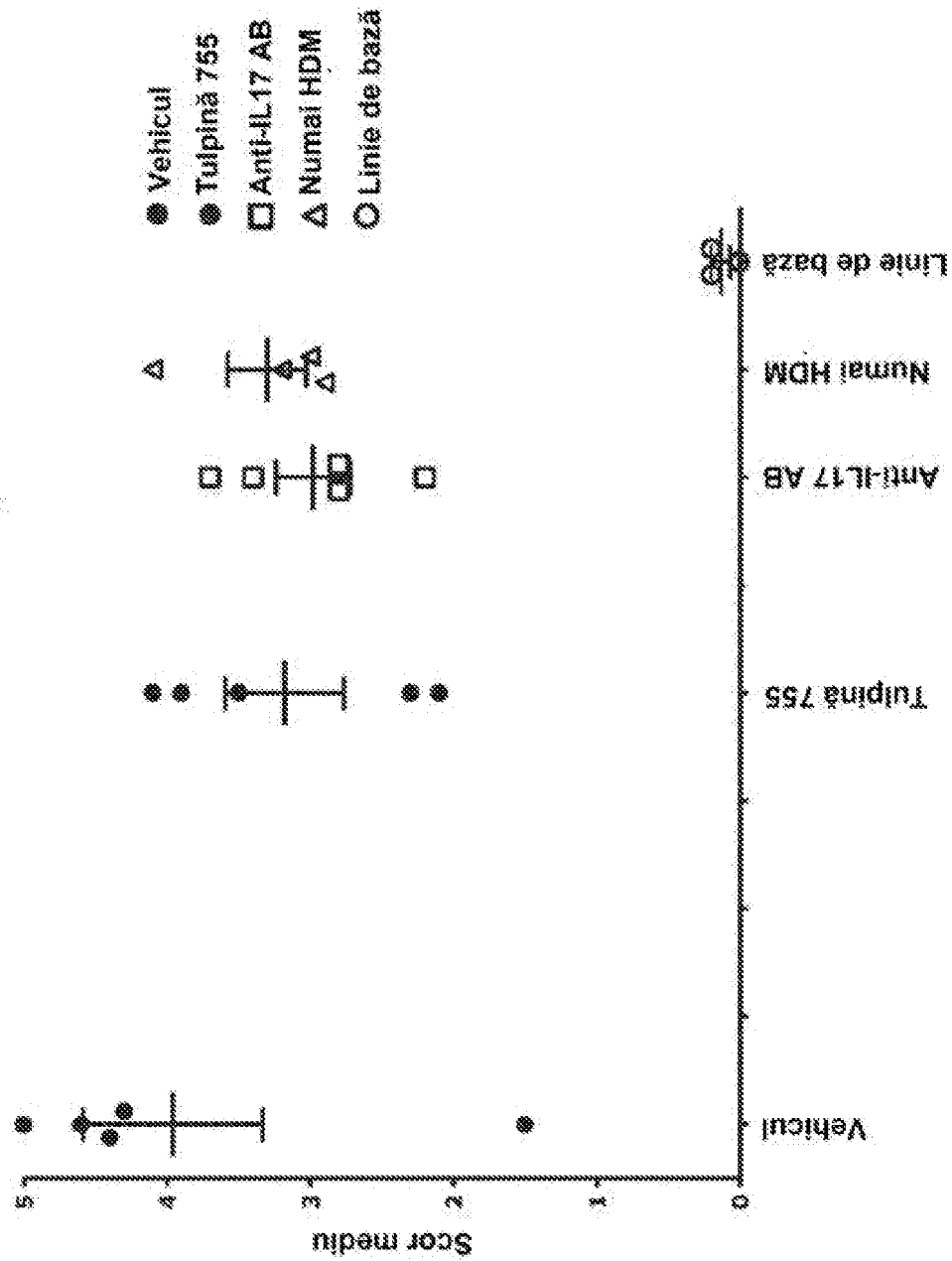


FIG. 53
Nivel TNFa în țesutul pulmonar

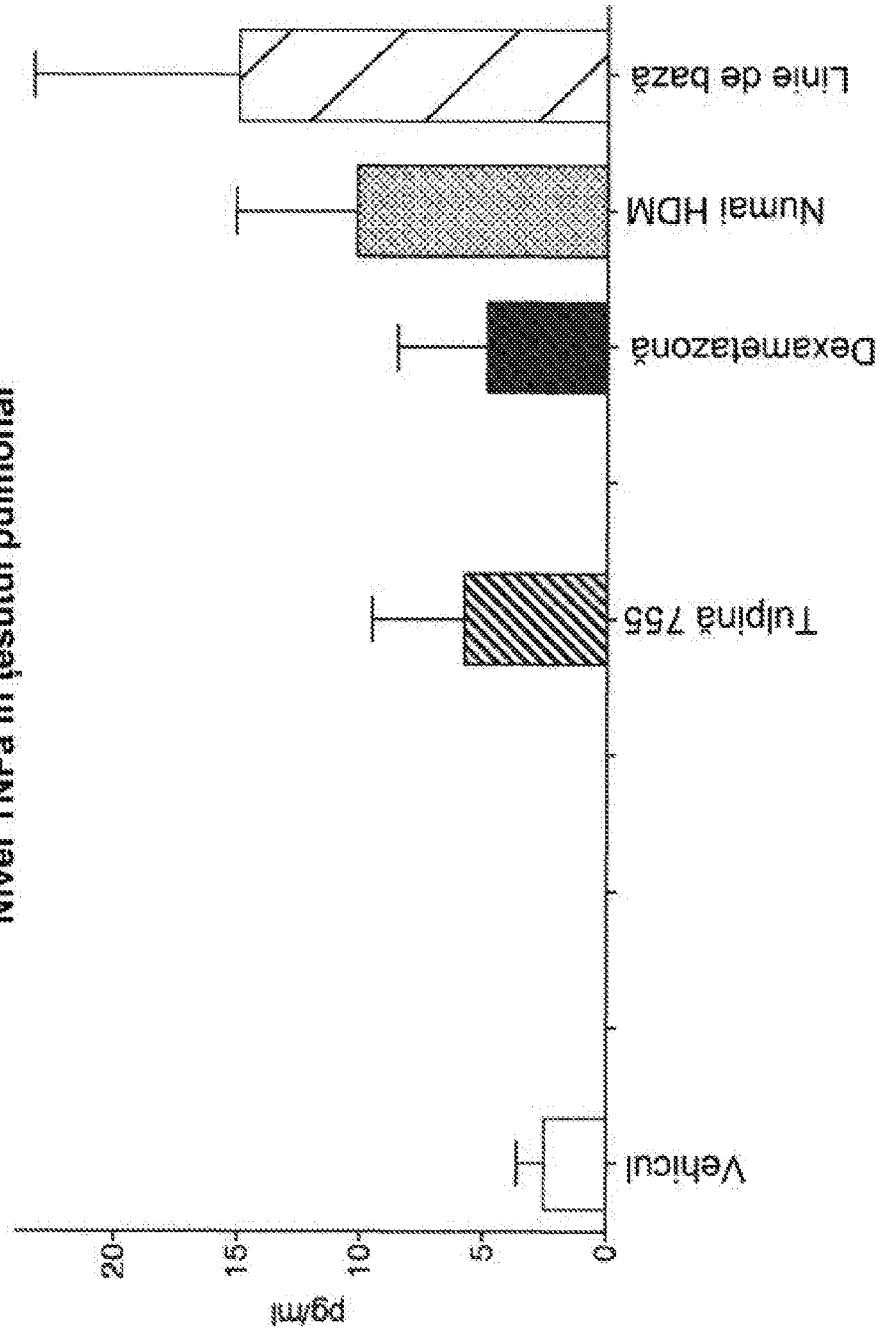


FIG. 54
Nivel IL-1a în țesutul pulmonar

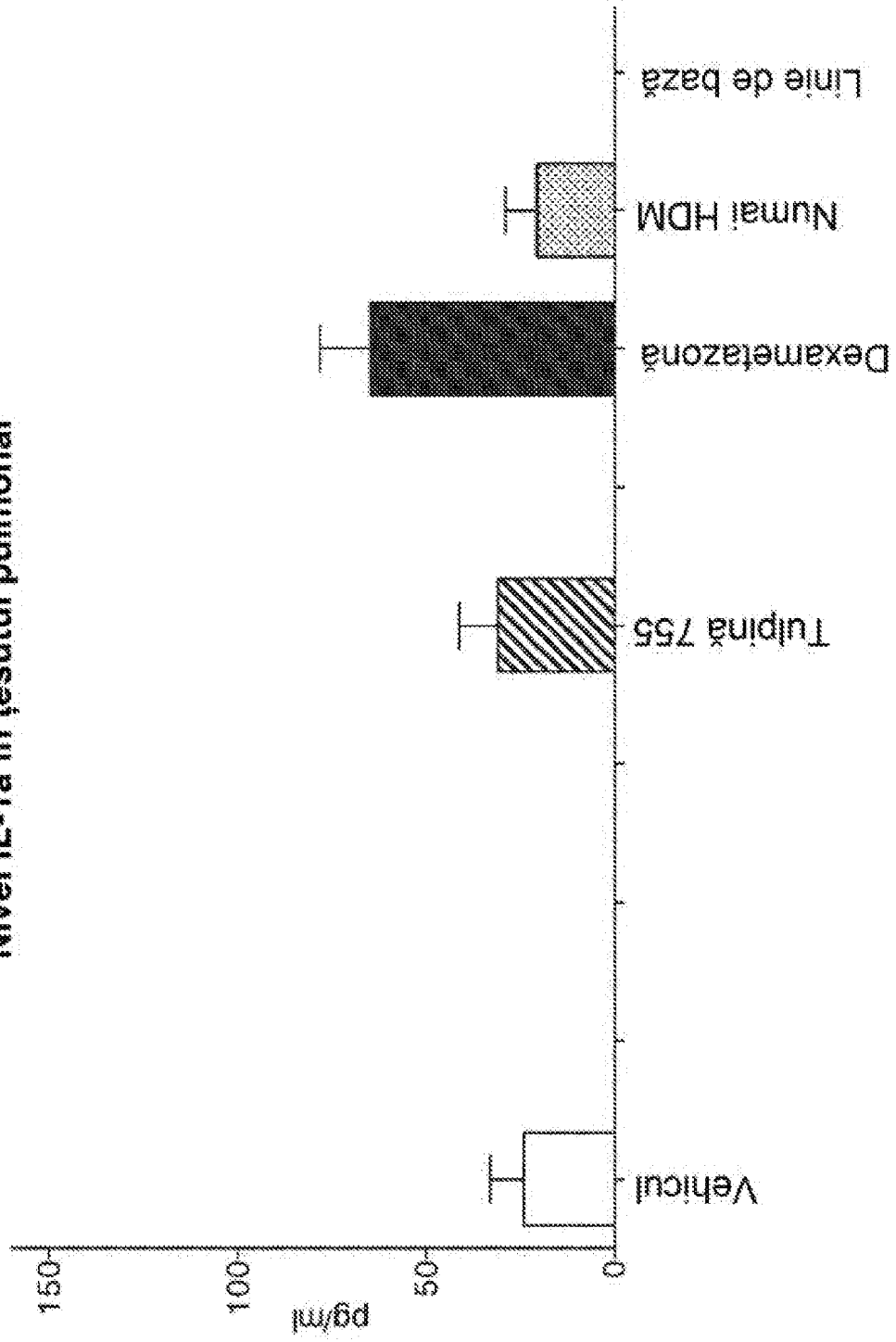


FIG. 55
Nivel IFNg în țesutul pulmonar

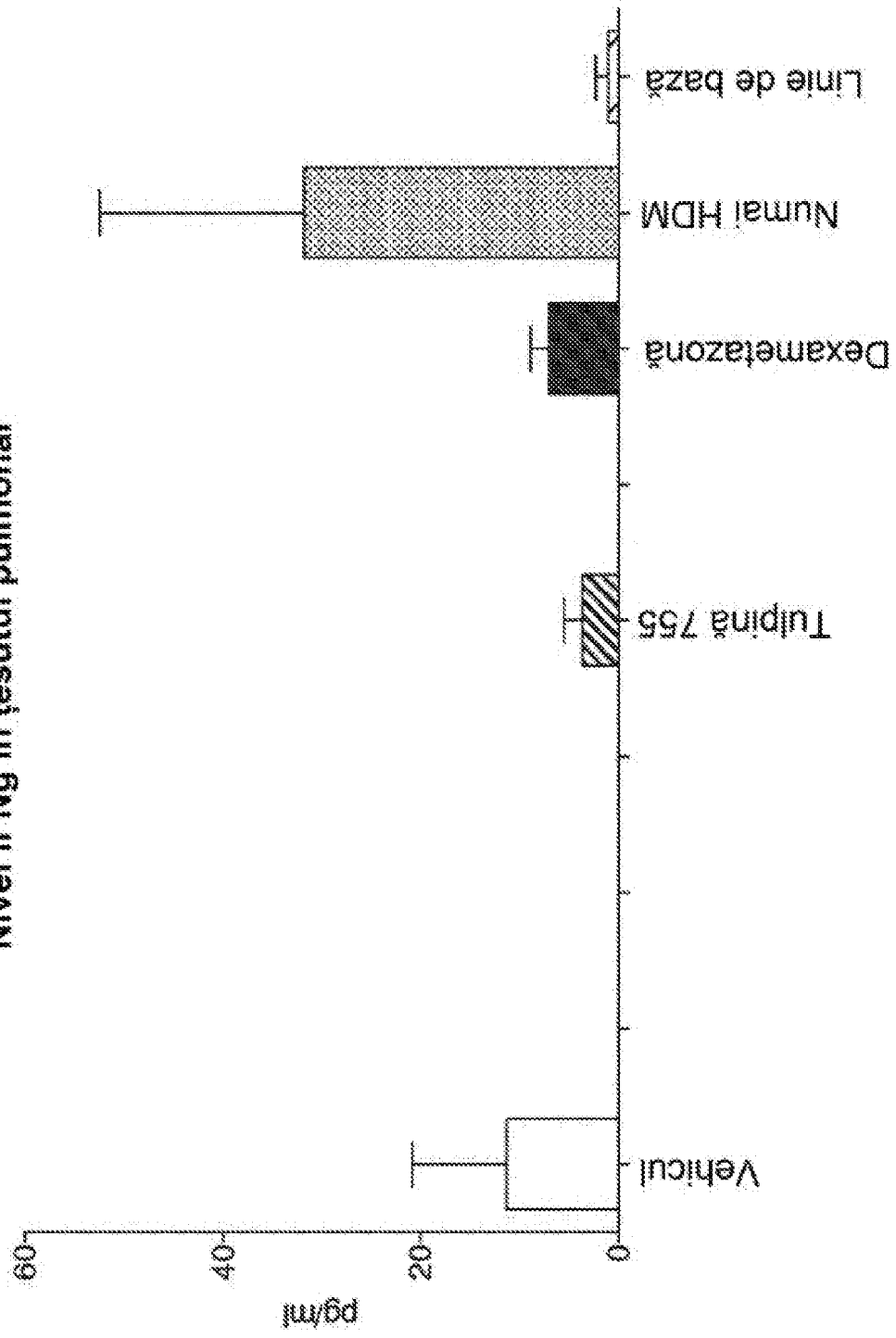


FIG. 56
Nivel IL-17F în țesutul pulmonar

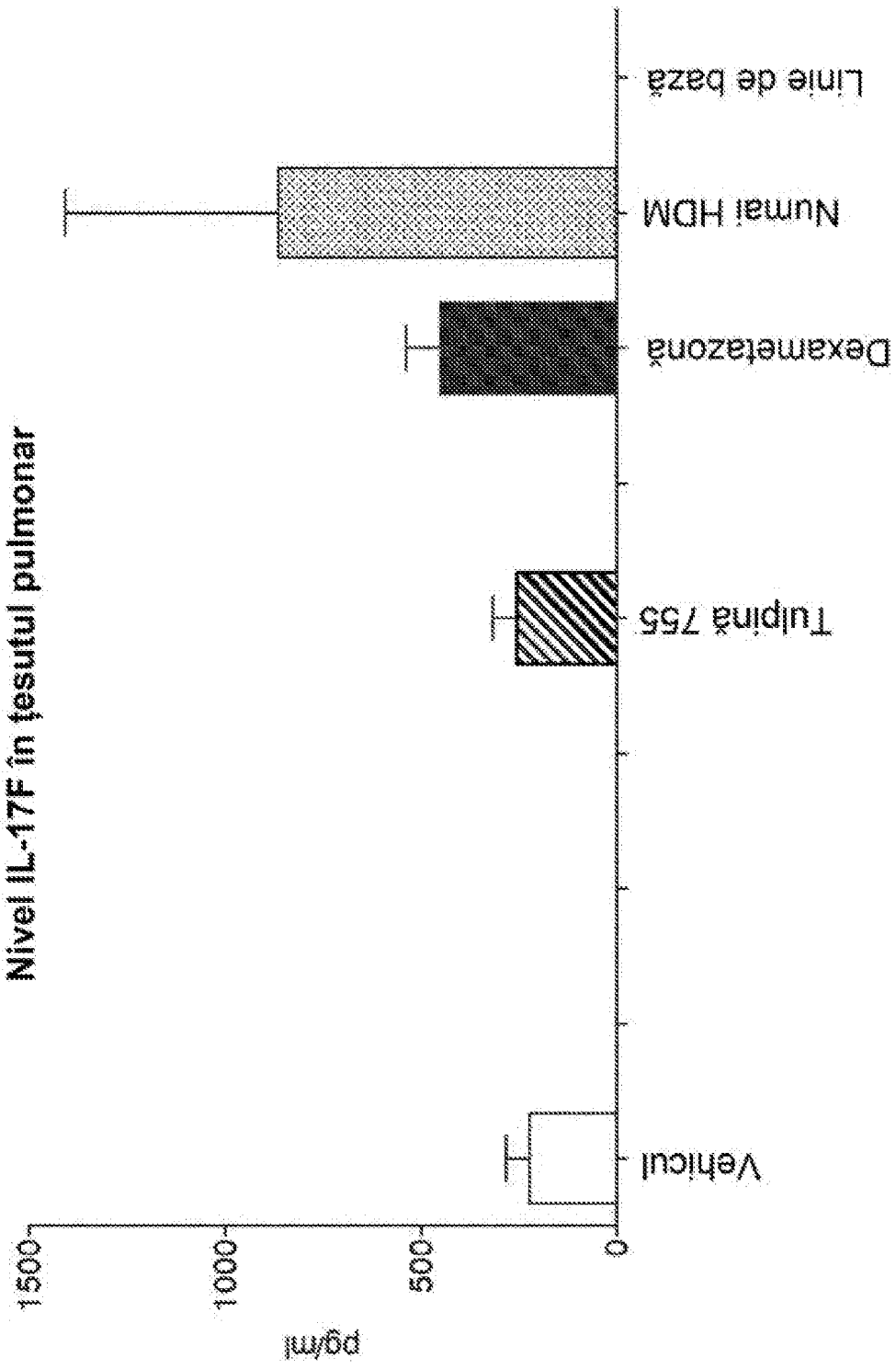


FIG. 57
Nivel IL-1b în țesutul pulmonar

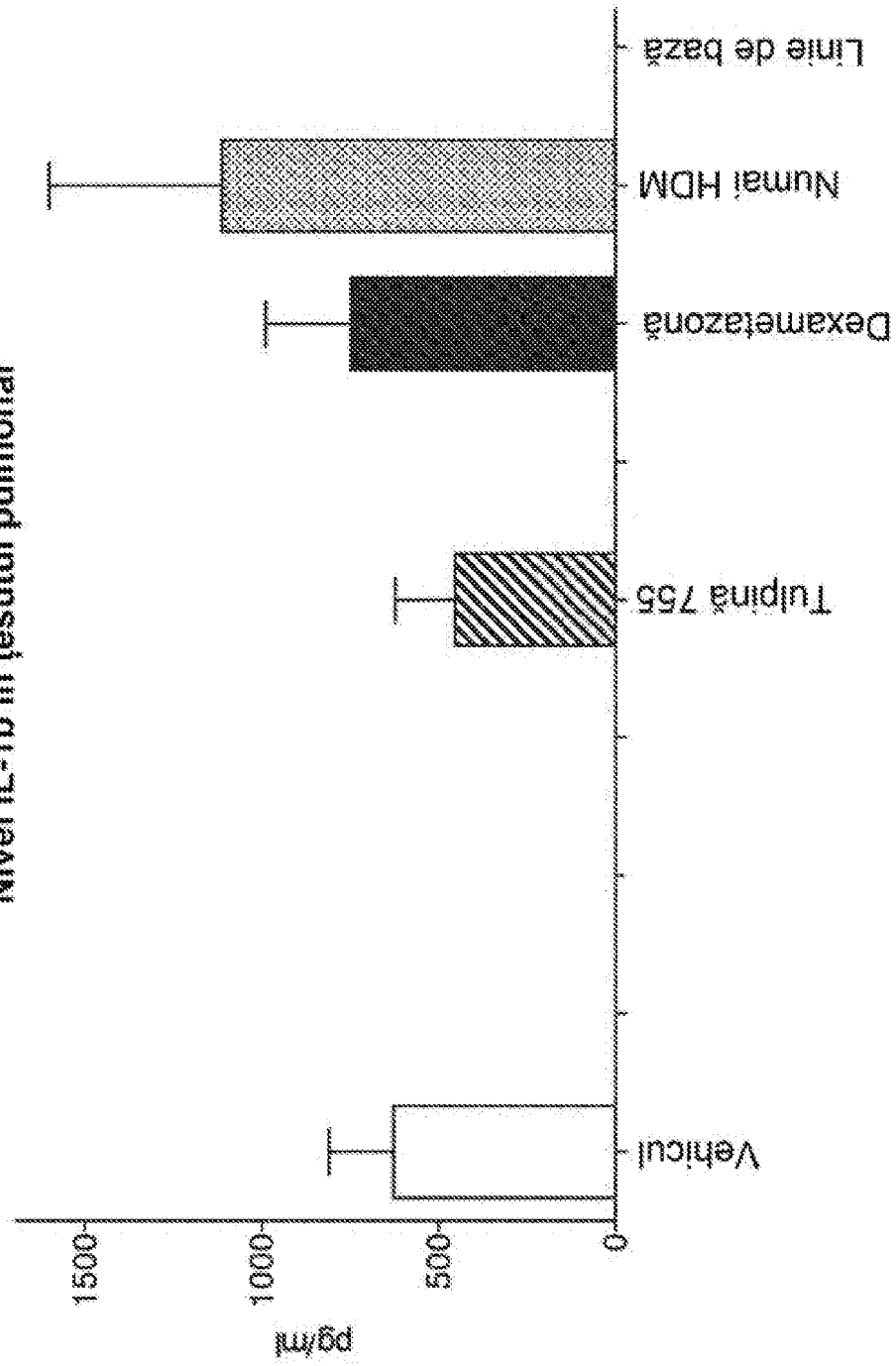


FIG. 58
Nivel RANTES în țesutul pulmonar

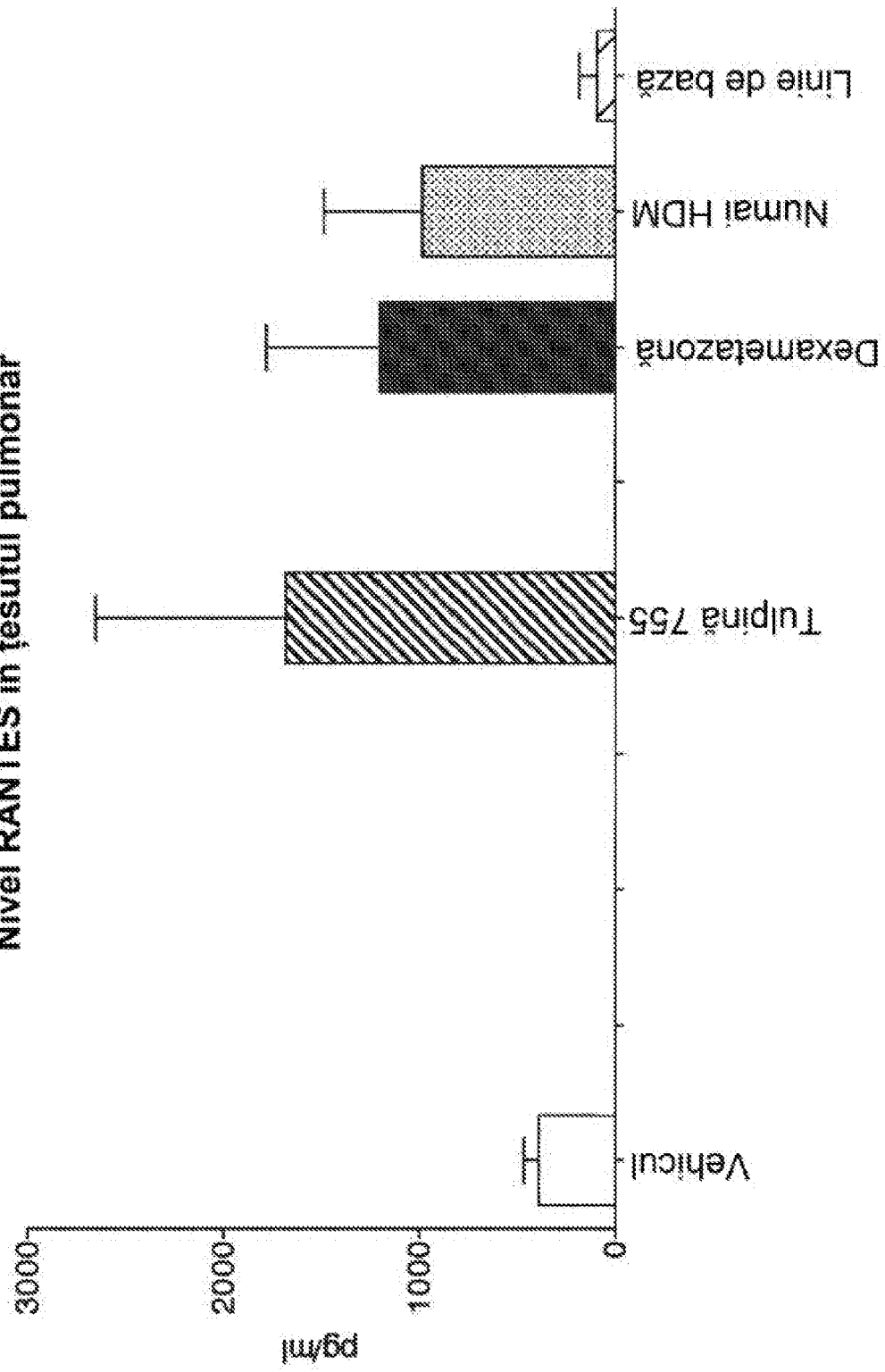


FIG. 59
Nivel MIP-2 în țesutul pulmonar

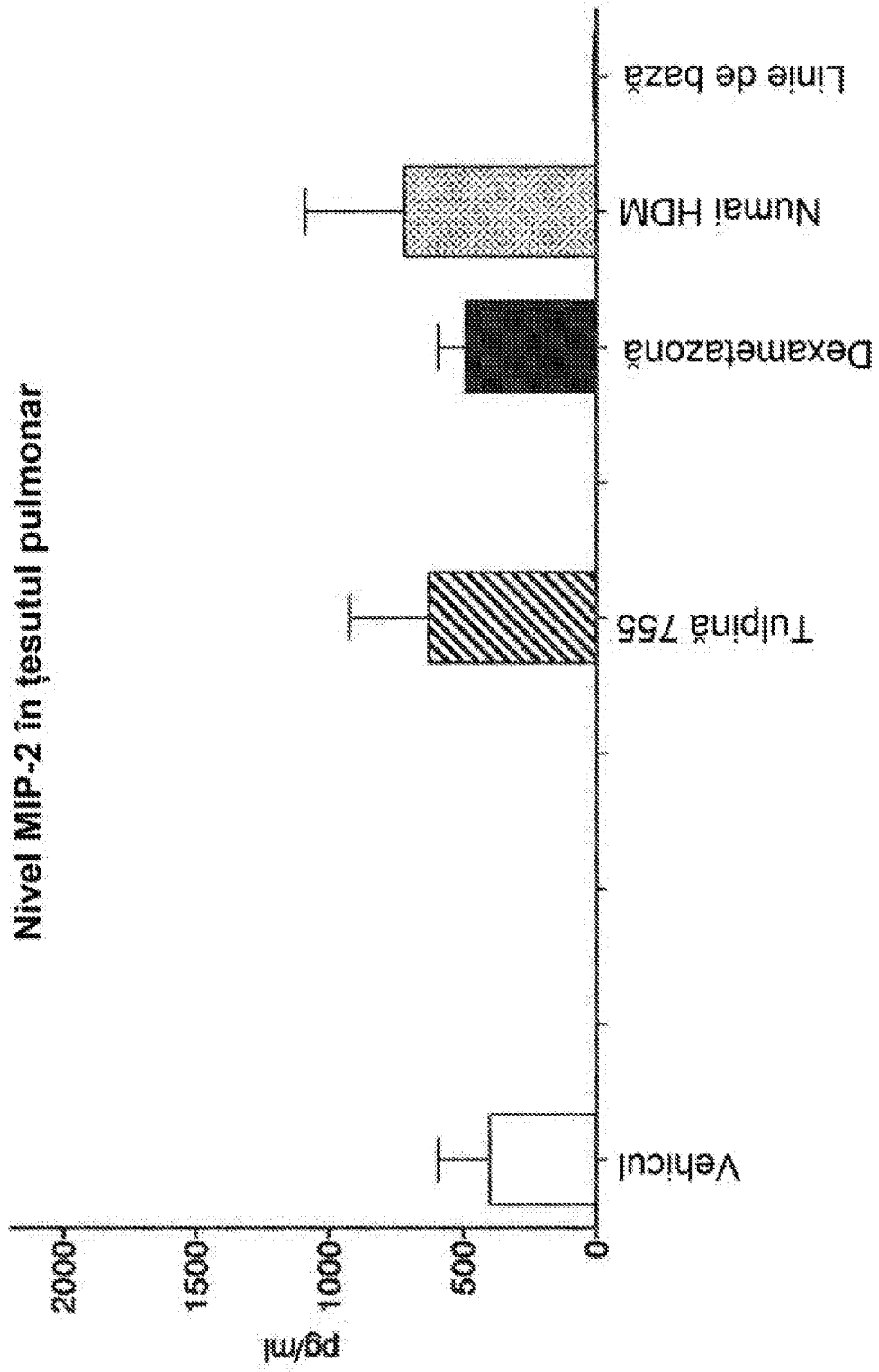


FIG. 60
Nivel KC în țesutul pulmonar

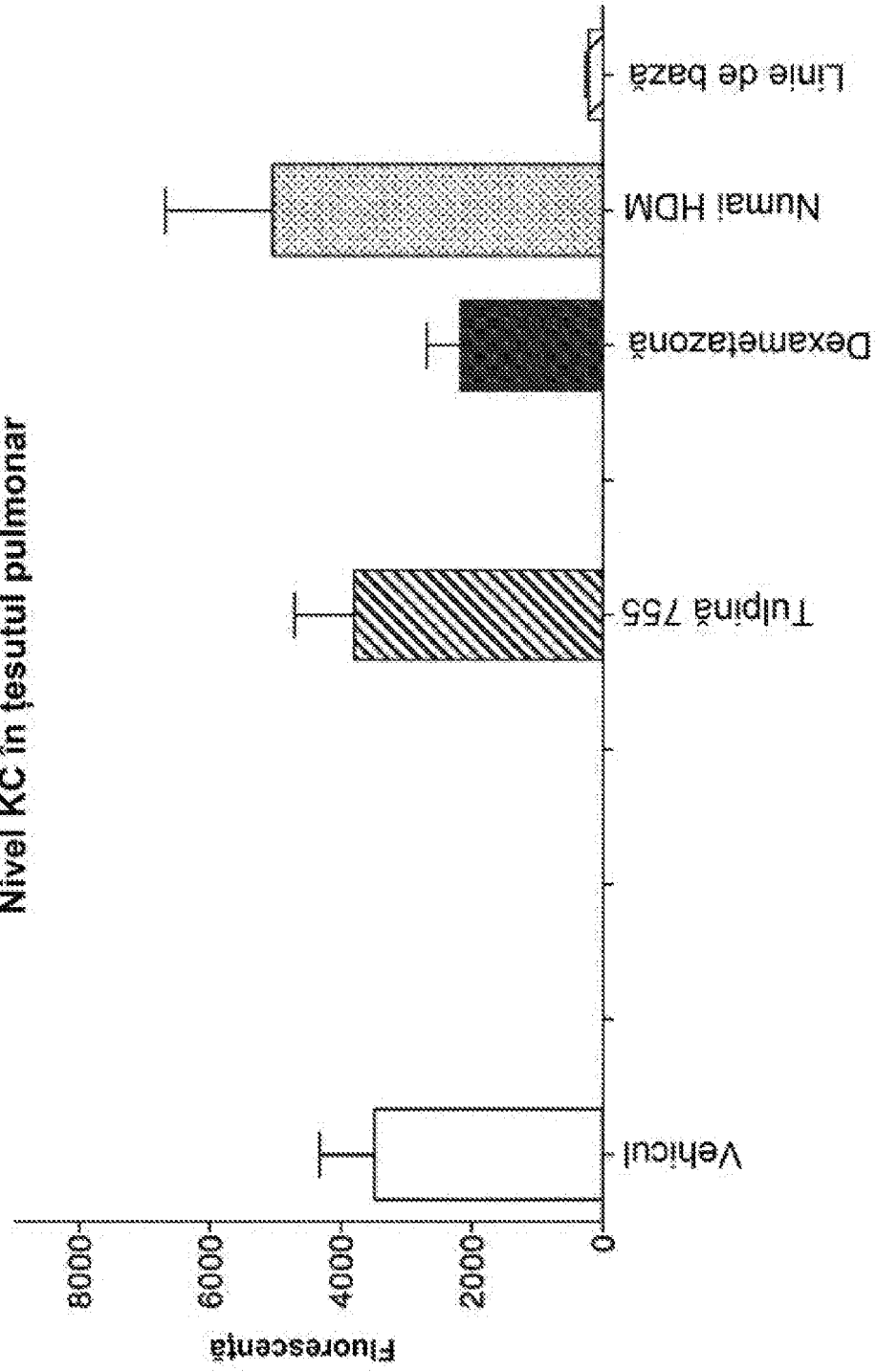


FIG. 61
Nivel IL-17 în țesutul pulmonar

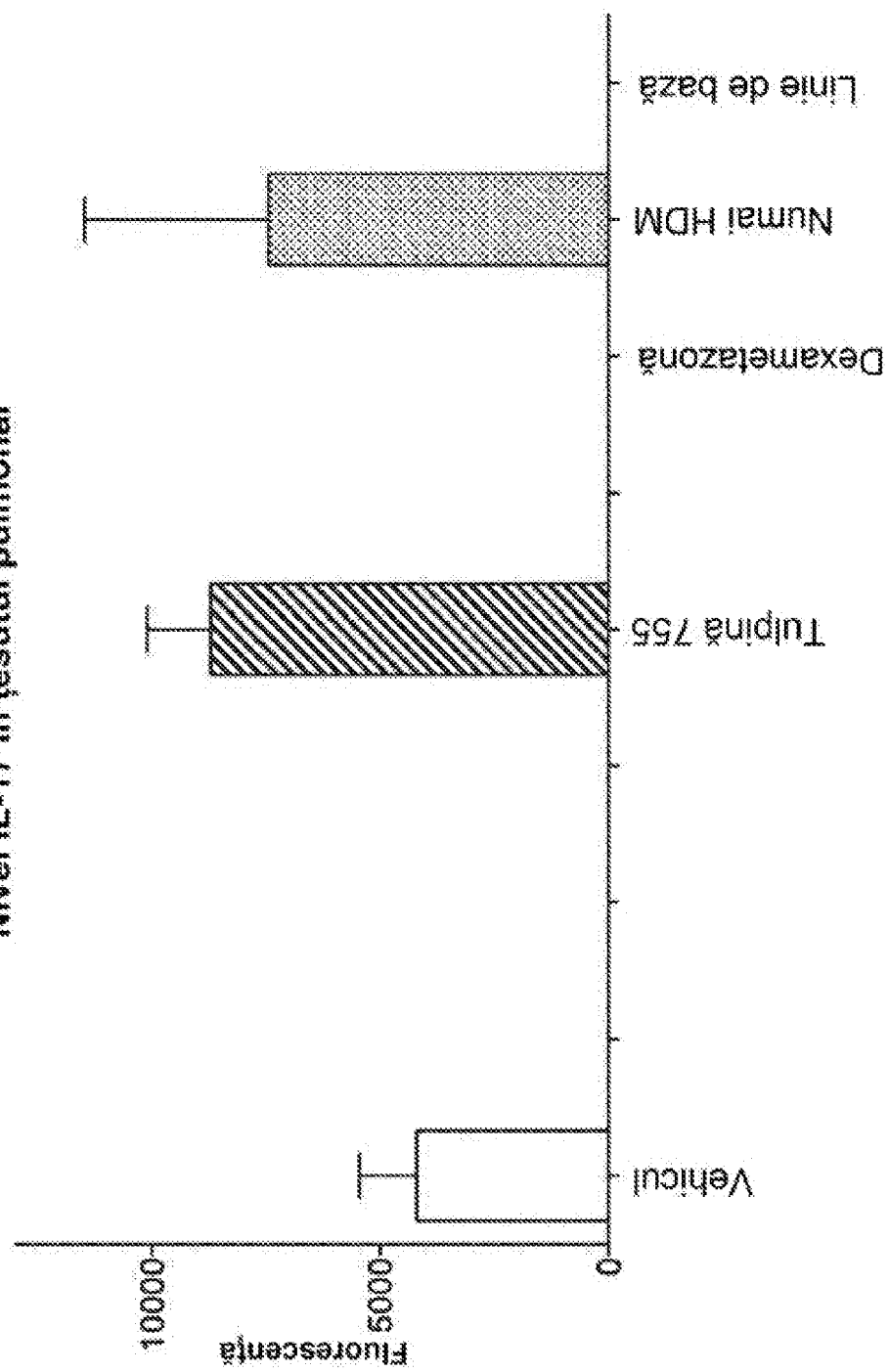


FIG. 62
Nivel MIP-1a în țesutul pulmonar

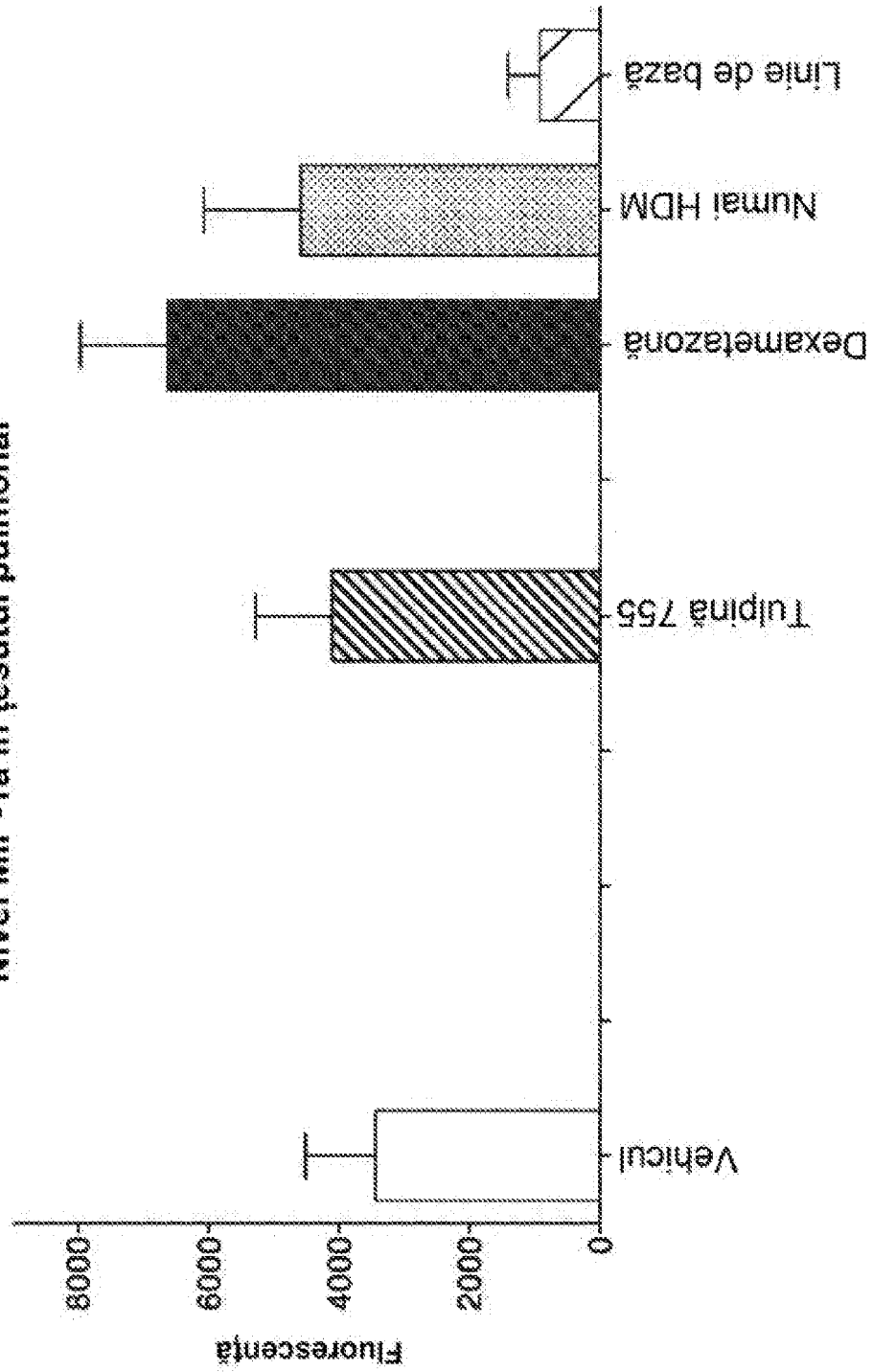


FIG. 63
Nivel IL-33 în țesutul pulmonar

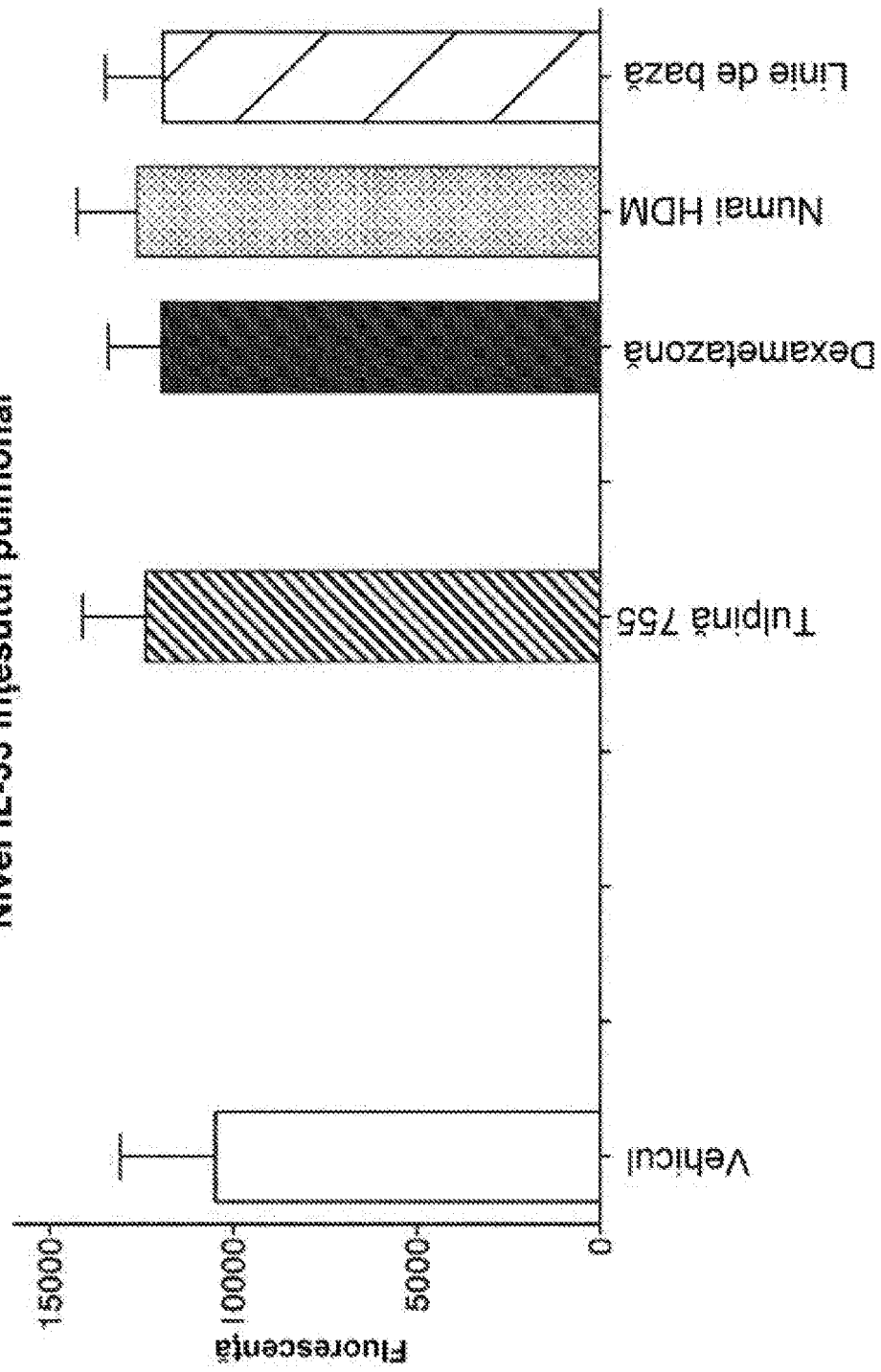
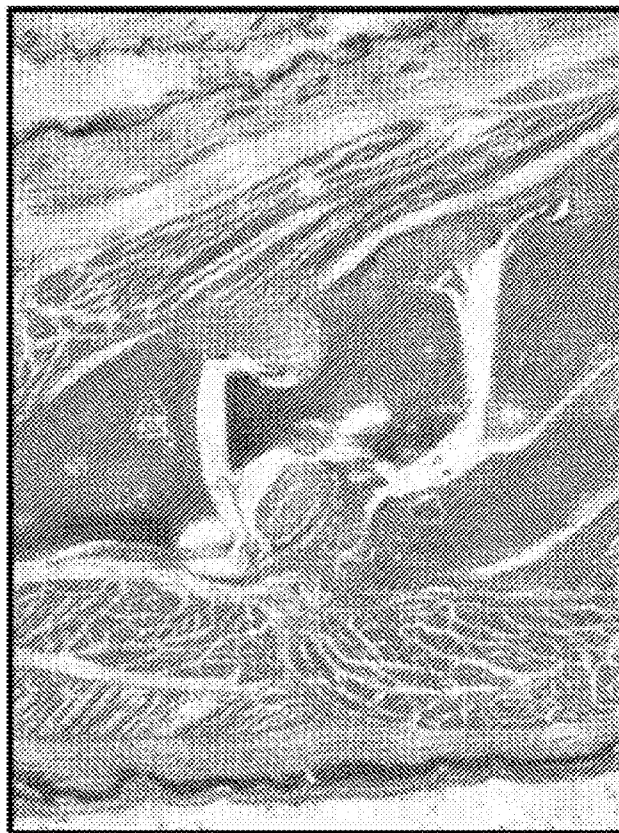


FIG. 64
Model vizual pentru scorul de histopatologie



Grad 0

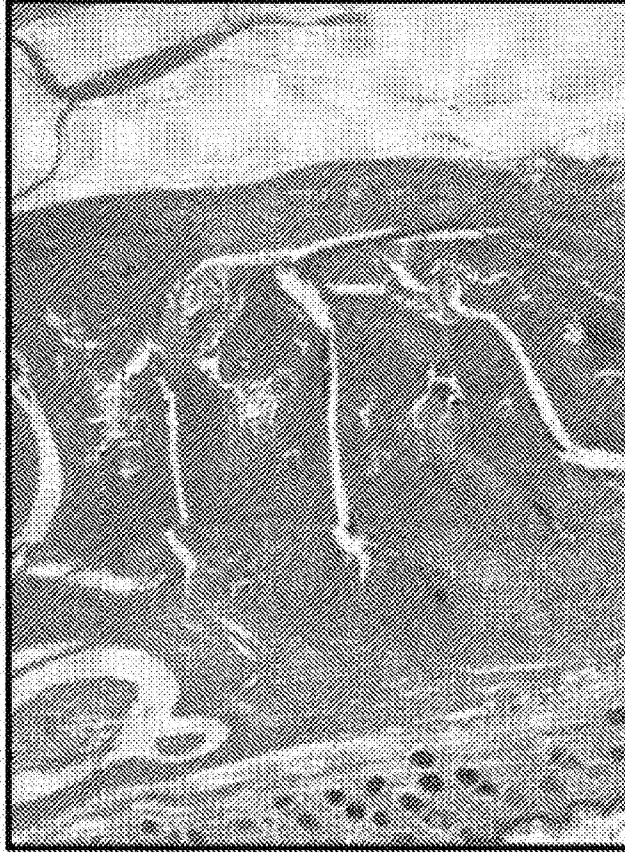


Grad 1

FIG. 64 (cont.)



Grad 4



Grad 7



Grad 9

FIG. 64 (cont.)

FIG. 66
Histopatologie: scoruri cartilaje

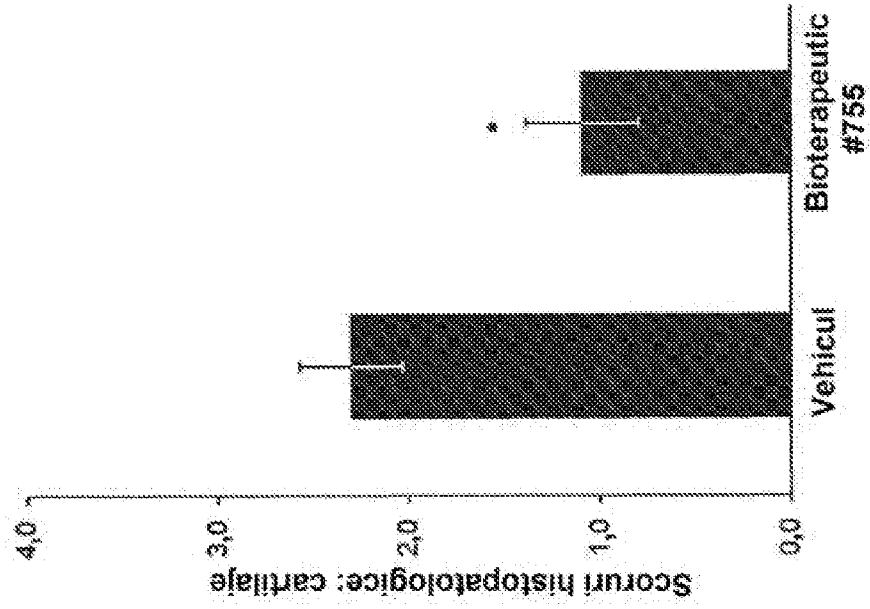


FIG. 65
Hisptopatologie: scoruri inflamații

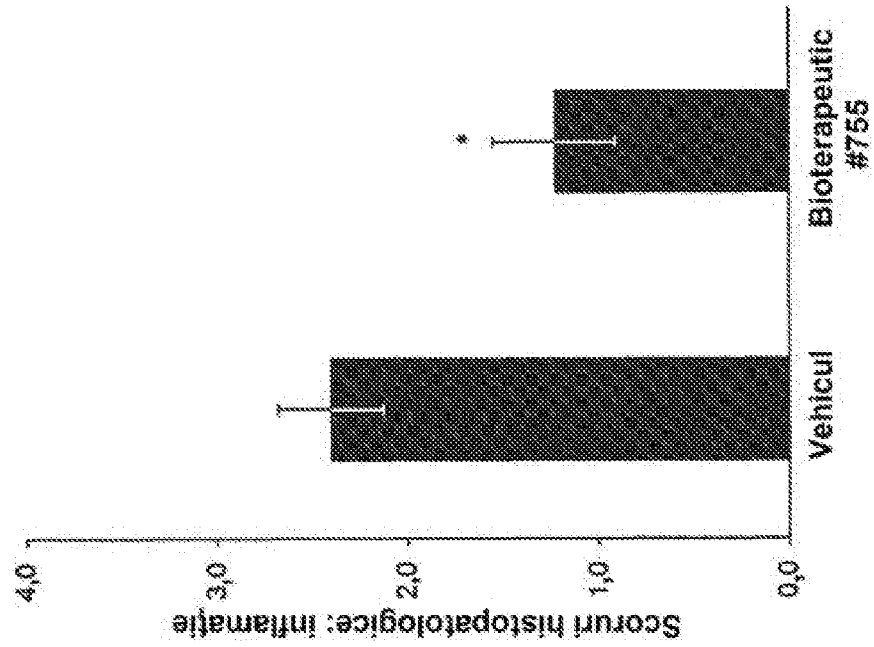


FIG. 68
Histopatologie: scoruri totale

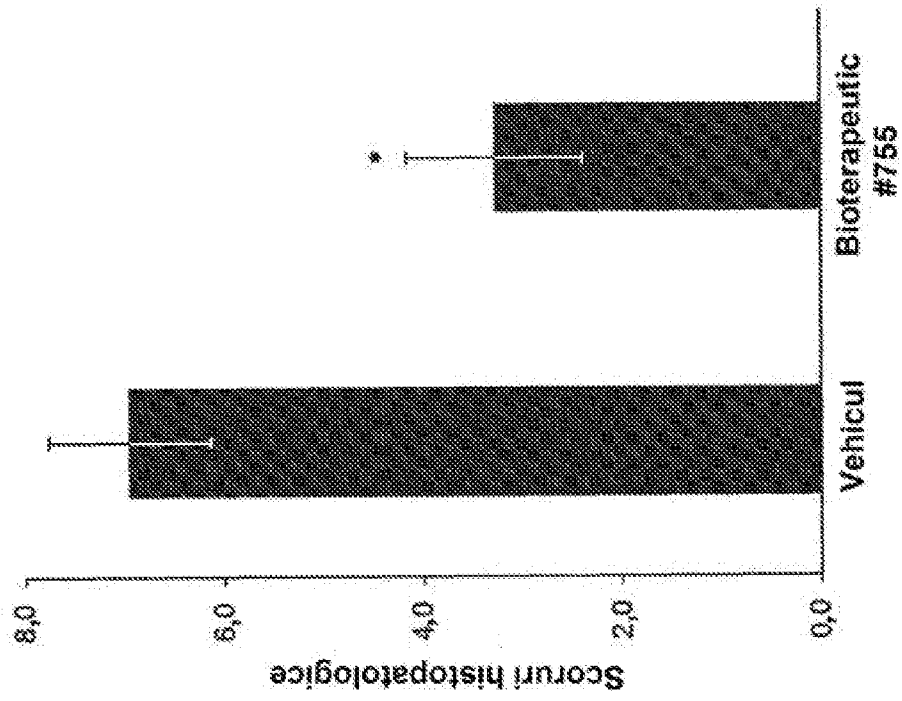


FIG. 67
Histopatologie: scoruri oase

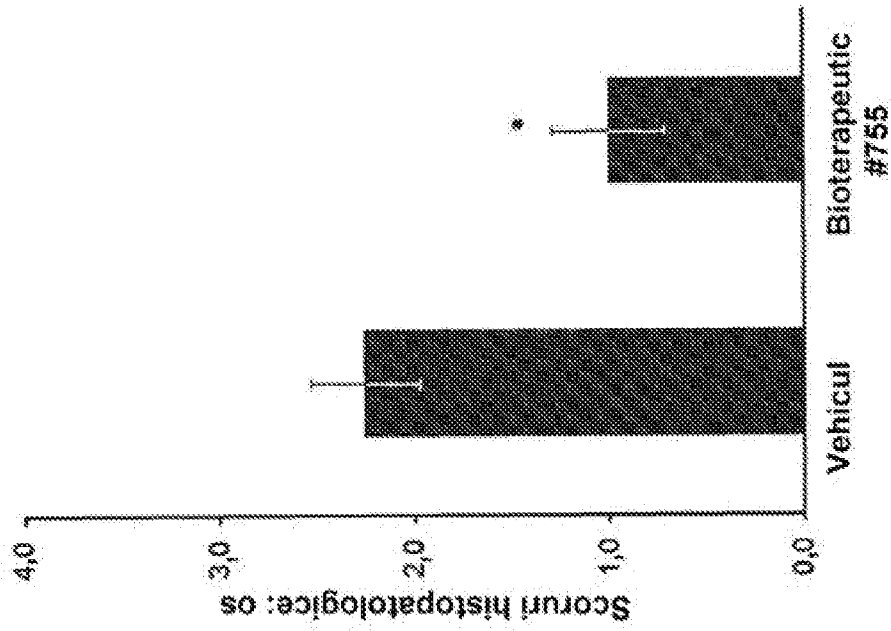


FIG. 69



Vehicle (#1.11R, Grad 9)



Tulpină #755 (#5.2L, Grad 0)

FIG. 70

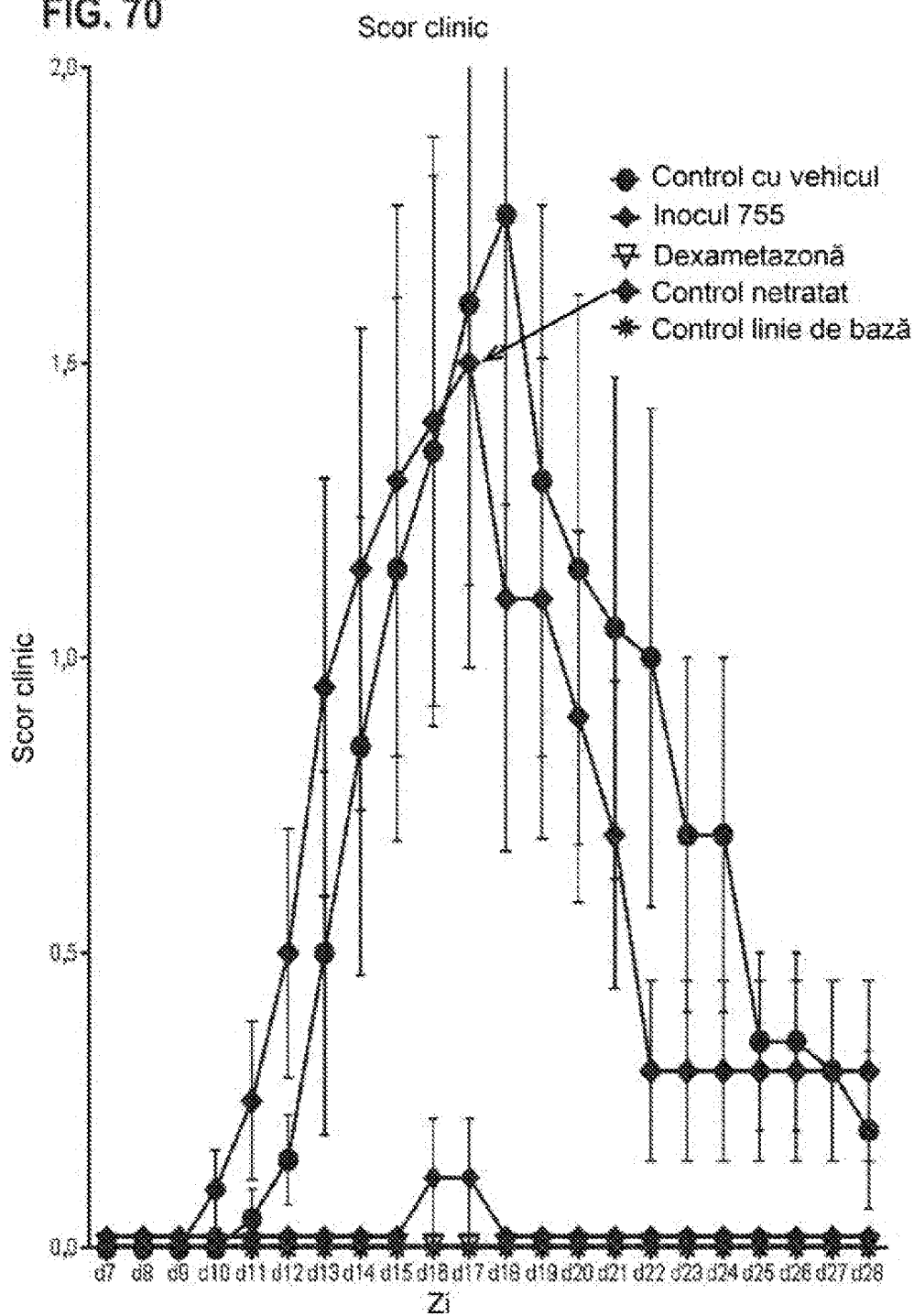


FIG. 71

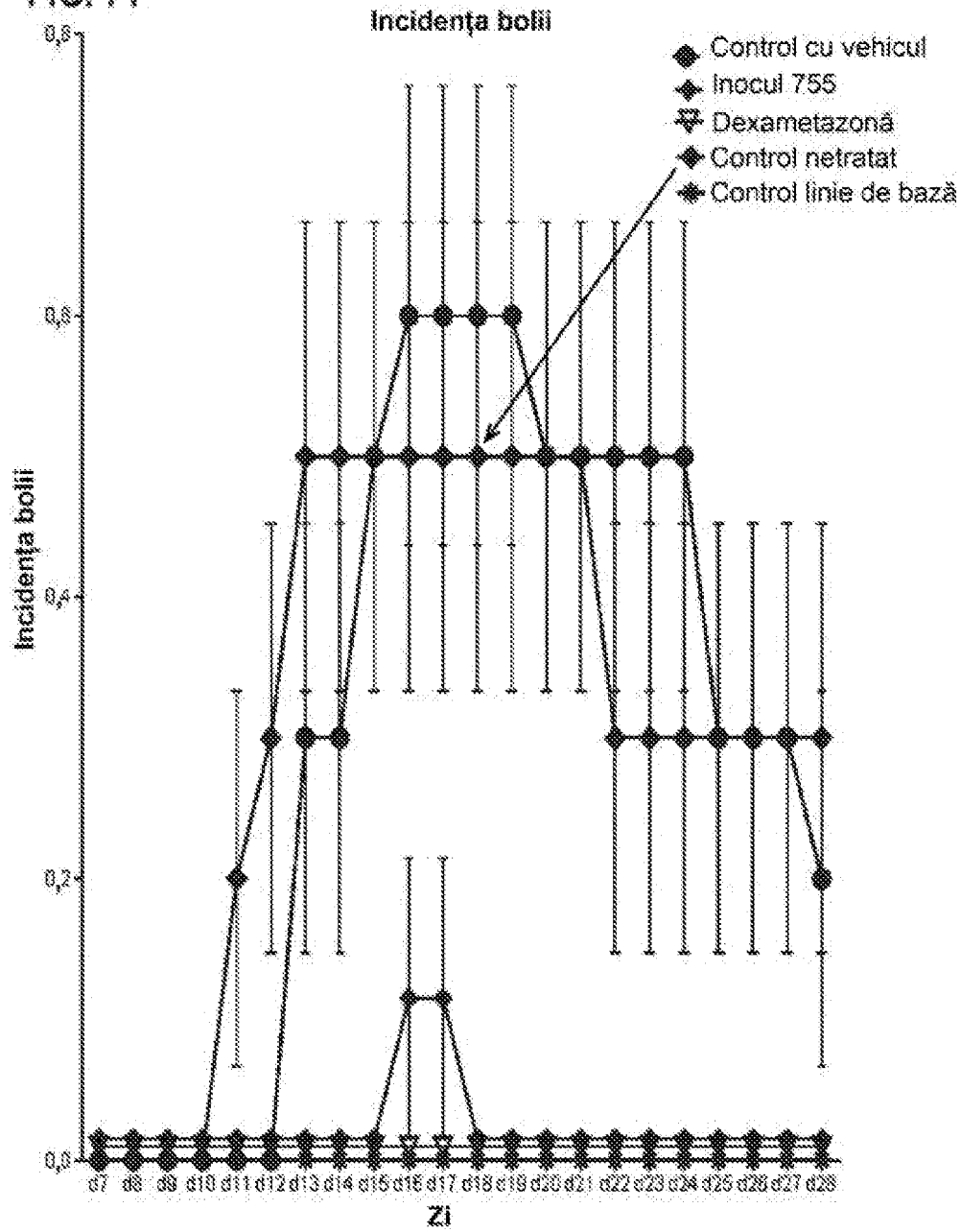


FIG. 72 Scoruri TEFI

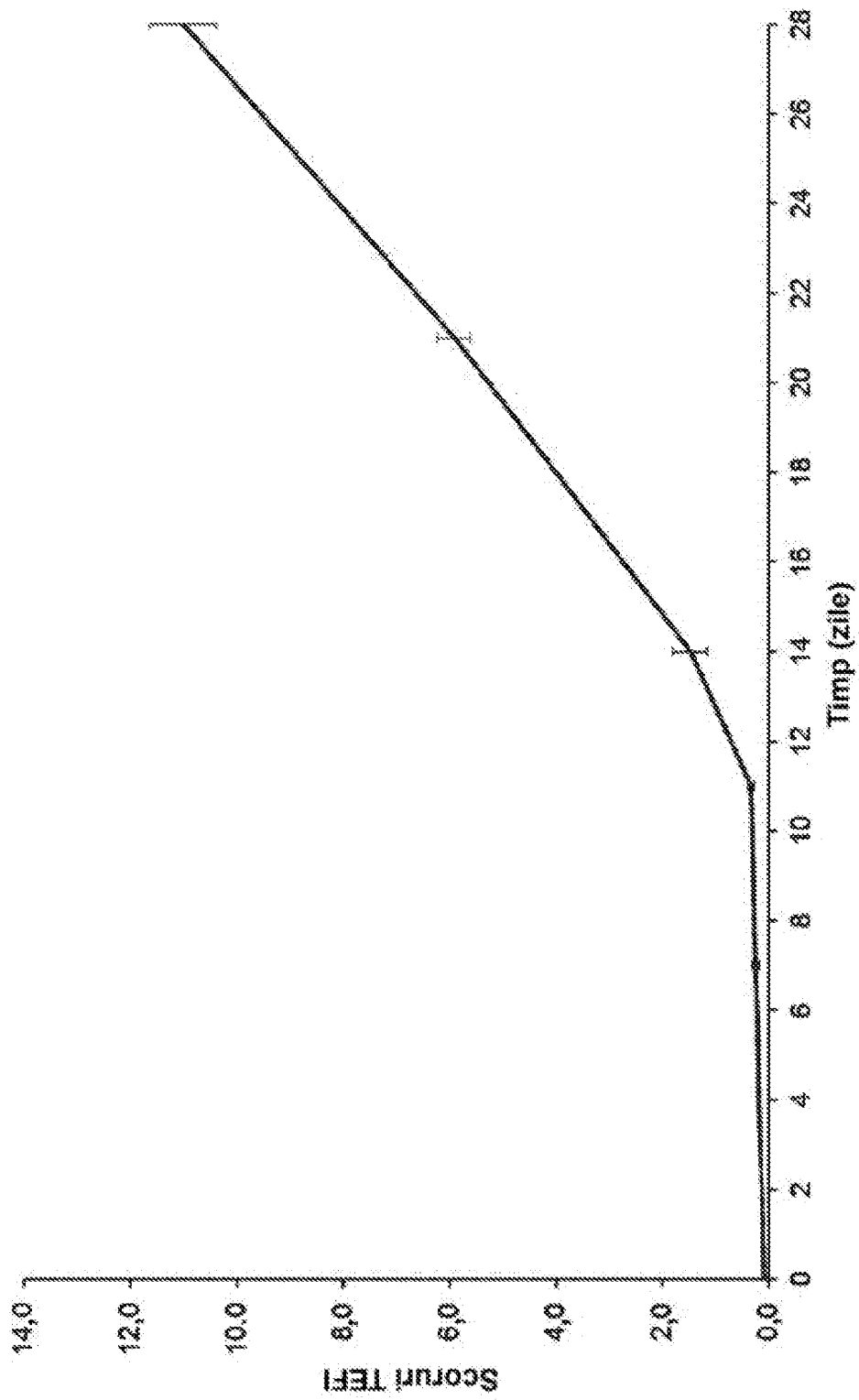


FIG. 73
Scoruri TEFI

