

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 863 913**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016** **E 18167277 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2021** **EP 3369425**

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

30 Prioridad:

15.06.2015 GB 201510469
23.11.2015 GB 201520628
17.03.2016 GB 201604566

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 863 913 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden cepas bacterianas

5 **Campo técnico**

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

10 **Antecedentes de la invención**

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

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

En reconocimiento del efecto positivo potencial que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino animal, varias cepas han sido propuestas para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, p. ej., [10-13]). Además, ciertas cepas, incluidas principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han propuesto para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes que no están directamente relacionadas con los intestinos (ver [14] y [15] para revisiones). Sin embargo, la relación entre diferentes enfermedades y diferentes cepas bacterianas, y los efectos precisos de cepas bacterianas particulares en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están pobremente caracterizados.

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

45 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Parabacteroides* pueden ser efectivas para reducir la respuesta inflamatoria Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Parabacteroides distasonis* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de ratón de asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple. Además, como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Parabacteroides distasonis* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de uveítis en ratones.

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

En realizaciones particulares, la presente descripción proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o condición seleccionada del grupo que consiste en: esclerosis múltiple; artritis, tal como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante;

espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovario; uveítis escleritis vasculitis Enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. El efecto mostrado para las cepas bacterianas del género *Parabacteroides* en la respuesta inflamatoria Th17 puede proporcionar beneficios terapéuticos para enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 y la vía Th17, como las enumeradas anteriormente.

En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de las especies *Parabacteroides distasonis*, para uso en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrofílica o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Parabacteroides* puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han probado y demostrado la eficacia de las cepas de *Parabacteroides* en modelos de asma en ratones. En ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de asma neutrofílica o asma eosinofílica. El efecto mostrado para las composiciones de la invención sobre neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente eficaces para tratar o prevenir el asma neutrofílica y el asma eosinofílica. De hecho, en ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis* para uso en el tratamiento del asma, y en particular el asma neutrofílica. Se ha demostrado que *Parabacteroides distasonis* tiene un efecto particularmente pronunciado sobre los neutrófilos en los modelos de asma y el tratamiento con *Parabacteroides distasonis* puede ser particularmente efectivo para tratar el asma neutrofílica.

En realizaciones preferidas adicionales, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Parabacteroides* puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoide y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para usar en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las composiciones que usan *Parabacteroides distasonis* pueden ser particularmente efectivas para tratar la artritis reumatoide.

En otras realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Parabacteroides* puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que usan *Parabacteroides distasonis* pueden ser particularmente efectivas para tratar la esclerosis múltiple.

En realizaciones adicionales preferidas, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*, para uso en un método de tratamiento o prevención de uveítis, como uveítis posterior. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Parabacteroides* puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de uveítis en ratones y puede prevenir o reducir el daño retiniano. En realizaciones preferidas, la descripción proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para usar en el tratamiento de la uveítis.

En realizaciones preferidas adicionales, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*, para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, como cáncer de mama, pulmón o hígado. Las composiciones que comprenden una cepa bacteriana del género *Parabacteroides* pueden reducir el crecimiento tumoral en modelos de ratón de mama, pulmón o hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un método para reducir el tamaño tumoral o prevenir el crecimiento tumoral en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para usar en el tratamiento del cáncer.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17. En particular, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de asma, artritis reumatoide o esclerosis múltiple, o asma, esclerosis múltiple o uveítis. Preferiblemente, la invención proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para usar en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. La divulgación también proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de la uveítis.

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

De acuerdo con la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Parabacteroides distasonis*. También se pueden usar cepas estrechamente relacionadas, como las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idénticas a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Parabacteroides distasonis*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 9. Preferiblemente, la secuencia la identidad es la SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 9.

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

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

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

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

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

Adicionalmente, la invención proporciona el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía de Th17, que comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*.

Al desarrollar la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. La cepa de *Parabacteroides distasonis* de la invención se muestra eficaz para tratar las enfermedades descritas en el presente documento, tales como artritis, asma, esclerosis múltiple y uveítis. Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona una célula de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382, o un derivado de la misma. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382 para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 10: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - recuento total de células de líquido BAL.

Figura 11: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - recuento total de eosinófilos en BALF.

Figura 12: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - proporción de eosinófilos en BALF.

Figura 13: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa: recuento total de macrófagos en BALF.

Figura 14: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - proporción de macrófagos en BALF.

Figura 15: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - recuento total de neutrófilos en BALF.

Figura 16: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - proporción de neutrófilos en BALF.

Figura 17: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - recuento total de linfocitos en BALF.

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

Figura 19: Modelo de ratón de artritis reumatoide - pesos corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como porcentajes promedio de \pm SEM de los pesos corporales iniciales (Día -14).

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

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

Figura 22: Modelo de ratón de artritis reumatoide: respuesta proliferativa de esplenocitos al colágeno II. Los medios de fondo restados[estimulados por CII - medios de fondo] cuentan por minuto en función de la incorporación de 3H-TdR. Todos los datos se presentan como \pm SEM media. *** p < 0,001 en comparación con el grupo de vehículos.

Figura 23: Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IFN γ en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.

Figura 24: Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IL-17A en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.

Figura 25: Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.

Figura 26: Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.

Figura 27: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en suero

Figura 28: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en suero

Figura 29: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en BALF

Figura 30: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en BALF

Figura 31: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar

	Figura 32: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico – Puntuación media de infiltración perivascular
5	Figura 33: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración (el promedio de puntaje de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)
10	Figura 34: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación de moco
	Figura 35: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en tejido pulmonar
15	Figura 36: Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel IL-1 en tejido pulmonar
	Figura 37: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IFN γ en tejido pulmonar
20	Figura 38: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de IL-17A en tejido pulmonar
	Figura 39: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de IL-4 en tejido pulmonar
25	Figura 40: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en tejido pulmonar
	Figura 41: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de IL-1b en tejido pulmonar
30	Figura 42: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de RANTES en tejido pulmonar
	Figura 43: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar
35	Figura 44: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel KC en tejido pulmonar
	Figura 45: Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Nivel MIP-2 en tejido pulmonar
40	Figura 46: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG1 específica de HDM en suero
	Figura 47: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG2a específica de HDM en suero
45	Figura 48: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG1 específica de HDM en BALF
	Figura 49: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG2a específica de HDM en BALF
50	Figura 50: modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntuación de infiltración media peribronquiolar
	Figura 51: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntuación de infiltración media perivascular
55	Figura 52: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntuación de infiltración media (Promedio de puntuación de infiltración peribronquiolar y perivascular)
	Figura 53: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de TNF α en tejido pulmonar
60	Figura 54: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-1a en tejido de pulmón
	Figura 55: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IFN γ en tejido de pulmón
65	Figura 56: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

Figura 57: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

Figura 58: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de RANTES en tejido pulmonar

Figura 59: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

Figura 60: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de KC en tejido pulmonar

Figura 61: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

Figura 62: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

Figura 63: Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-33 en tejido pulmonar

Figura 64: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Plantilla visual para la puntuación de histopatología. Imágenes representativas que muestran puntajes compuestos de las articulaciones tarsales del ratón en un estudio de artritis inducida por colágeno.

Figura 65: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes de inflamación. Los datos se presentan como \pm SEM media. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 66: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes de cartílago. Los datos se presentan como \pm SEM media. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 67: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes óseos. Los datos se presentan como \pm SEM media. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 68: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes totales. Los datos se presentan como \pm SEM media. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con vehículo.

Figura 69: Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: imágenes representativas. La identificación del animal (#nn) y la extremidad (R para la derecha, L para la izquierda) se indican entre paréntesis. Imagen izquierda (vehículo): destrucción extensa de articulaciones y huesos con inflamación y fibrosis que se extienden a los tejidos blandos periarticulares.

Figura 70: Modelo de ratón de esclerosis múltiple: puntuación clínica.

Figura 71: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - incidencia de enfermedad.

Figura 72: Modelo de ratón de uveítis: puntajes TEFI en el grupo de control. Los datos se presentan como \pm SEM media.

Figura 73: Modelo de ratón de uveítis: puntajes TEFI en el día 28. Los datos se presentan como \pm SEM media.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

Las composiciones de la divulgación comprenden una cepa bacteriana del género *Parabacteroides*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de este género son útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Las cepas bacterianas para su uso en la invención son de la especie *Parabacteroides distasonis*.

Ejemplos de especies *Parabacteroides* para su uso en la divulgación incluyen *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* y *Parabacteroides johnsonii*. Los *Parabacteroides* parecen a los *Bacteroides* y son Gram-negativas, anaeróbicas obligadamente, no formadoras de esporas, no móviles y en forma de barra, y 0,8-1,6 X 1,2-12 μ m de tamaño. *Parabacteroides distasonis* es una de las especies más comunes en las heces humanas. La cepa tipo de *P. distasonis* es JCM 5825^T (= CCUG 4941^T = DSM 20701^T = ATCC 8503^T). Los números de acceso GenBank/EMBL/DDBJ para las secuencias del gen 16S ARNr de cepas de *P. distasonis* JCM 5825T, JCM 13400, JCM 13401, JCM 13402, JCM 13403 y JCM 13404 y las cepas de *P. merdae* JCM 9497T y JCM 13405 son AB238922-AB238929, respectivamente (descritas aquí como SEQ ID NOs: 1-8). Las cepas ejemplares también se describen en[16].

La bacteria *Parabacteroides distasonis* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382 fue probada en

los ejemplos y también se denomina en este documento como la cepa 755 o MRX005. Se proporciona una secuencia de ARNr 16S para la cepa 755 que se probó en SEQ ID NO: 9. La cepa 755 fue depositada ante la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Edificio Ferguson, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, AB25 2ZS, Escocia) el 12 de marzo de 2015 como "*Parabacteroides sp* 755" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42382. GT Biologics Ltd. posteriormente cambió su nombre a 4D Pharma Research Limited.

Una secuencia del genoma de la cepa 755 se proporciona en SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220. Esta secuencia se generó utilizando la plataforma PacBio RS II.

Las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con la cepa probada en los ejemplos también se espera que sean eficaces para el tratamiento o la prevención de enfermedades y condiciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Parabacteroides distasonis*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene una secuencia de ARNr de 16 segundos que es al menos 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 9. Preferiblemente, la identidad de secuencia es SEQ ID NO: 9. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 9.

Las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso también se espera que 42,382 para ser eficaz para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 o la vía Th17. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o muy similares.

Las cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse por secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382. Por ejemplo, sustancialmente la totalidad del genoma puede secuenciarse y una cepa de biotipo para usar en la invención puede tener al menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en al menos 80% de su genoma completo (p. ej., en al menos 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Otras secuencias adecuadas para su uso en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)_s, o REP o [17]. Cepas Biotipo pueden tener secuencias con al menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un genoma con identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220. En los casos preferidos, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un genoma con al menos 90% de identidad de secuencia (p. ej., al menos 92%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia) a la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en al menos 60% (p. ej., al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220. Por ejemplo, la cepa bacteriana para usar en la invención puede tener un genoma con al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220 en el 70% de la SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220, o con al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 a través del 80% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 90% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en 100% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en 70% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en 80% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en 90% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en el 100% de la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o en al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 a través del 70% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 80% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220 en 90% de SEQ ID NO: 10 de WO 2016/203220, o al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220 en el 100% de la SEQ ID NO: 10 del documento WO 2016/203220.

Alternativamente, las cepas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42382 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse usando el análisis de fragmentos de restricción y depósito del número de acceso NCIMB 42382 y/o análisis de PCR, por ejemplo mediante el uso de un polimorfismo fluorescente amplificado de longitud de fragmento (FAFLP) y el elemento repetitivo de ADN (rep)-huellas dactilares de PCR, o perfil de proteínas, o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s. En realizaciones preferidas, tales técnicas pueden usarse para identificar otras cepas de *Parabacteroides distasonis*.

En ciertas realizaciones, cepas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón que la bacteria

depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382 cuando se analizaron por análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para ejemplos de métodos y orientación, ver, p. ej.,[18]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos como la bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382.

Otras cepas *Parabacteroides* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como biotipos de las bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 42382, puede identificarse utilizando cualquier método o estrategia apropiados, incluidos los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la invención pueden identificarse cultivando en YCFA anaeróbico y/o administrando las bacterias al modelo de ratón de artritis inducida por colágeno de tipo II y luego evaluando los niveles de citocinas. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie similares a la bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42382 pueden ser útiles en la invención. Una cepa útil tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42382. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad de la uveítis y efectos comparables en los niveles de citocinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos.

Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada bajo el número de adhesión NCIMB 42382. Esta es la cepa ejemplar 755 ensayada en los ejemplos y se muestra para ser eficaz para el tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382, o un derivado de la misma. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382. La invención también proporciona una célula de la cepa de *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382 para usar en terapia, en particular para las enfermedades descritas aquí.

Un derivado de la cepa depositada bajo el número de acceso NCIMB 42382 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonó) de la original. Un derivado de una cepa de la descripción puede modificarse, por ejemplo a nivel genético, sin eliminar la actividad biológica. En particular, una cepa derivada de la divulgación es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42382 original. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad de la uveítis y efectos comparables en los niveles de citocinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en los Ejemplos. Un derivado de la cepa NCIMB 42382 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42382.

Las referencias a células de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositadas con el número de acceso NCIMB 42382 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42382, y tales células están abarcadas por la invención.

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

Usos terapéuticos

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

Las células Th17 son un subconjunto de células T auxiliares que producen, p. ej., IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. La diferenciación de células Th17 y la expresión de IL-17 pueden ser conducidas por IL-23. Estas citocinas y otras forman partes importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye y subyace a una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (como se describe, p. ej.,[19-24]). Las enfermedades en las que se activa la ruta Th17 son enfermedades mediadas por la ruta Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden mejorarse o aliviarse reprimiendo la vía Th17, que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción en el nivel de las citocinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por el aumento de los niveles de citocinas producidas por las células Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisado en[25]) Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por una mayor expresión de genes relacionados con Th-17, como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden estar asociadas con mayores niveles de células Th17. La IL-17 es una citocina proinflamatoria que contribuye a la patogénesis de varias

enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes. IL-17 como se usa en el presente documento puede referirse a cualquier miembro de la familia IL-17, incluidos IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Las enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 se caracterizan por una alta expresión de IL-17 y/o la acumulación o presencia de células positivas para IL-17 en un tejido afectado por la enfermedad o afección. De manera similar, las enfermedades y afecciones mediadas por IL-17 son enfermedades y afecciones que se ven exacerbadas por los altos niveles de IL-17 o un aumento en los niveles de IL-17, y que se alivian con bajos niveles de IL-17 o una reducción en los niveles de IL-17. La respuesta inflamatoria de IL-17 puede ser local o sistémica.

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

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

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

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

En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o previene una elevación en niveles de IL-17, en particular, los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IFN- γ , IL-1 β o IL-6. Dicha reducción o prevención de niveles elevados de estas citocinas puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular las mediadas por IL-17 o la vía Th17.

Asma

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en el reclutamiento de neutrófilos y/o eosinófilos en las vías respiratorias después de la sensibilización y el desafío con el extracto de ácaros del polvo doméstico, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención del asma.

El asma es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación y restricción de las vías respiratorias. La inflamación en el asma puede estar mediada por células IL-17 y/o Th17, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede estar mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

En ciertas realizaciones, el asma es eosinofílica o asma alérgica. El asma eosinofílica y alérgica se caracteriza por un mayor número de eosinófilos en la sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y se asocia patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la respuesta a los corticosteroides [26]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de eosinófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinofílica y alérgica.

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

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

El aumento de los niveles de IL-17 y la activación de la vía Th17 se asocian con asma grave, por lo que las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma grave o para tratar el asma grave.

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

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

En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o previene una elevación en niveles de IL-1b o IFN γ .

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

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

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

Artritis

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

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

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

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el cartílago dañado o daño óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención del cartílago o daño óseo en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con RA severa que están en riesgo de cartílago o daño óseo.

El aumento de los niveles de IL-17 y el número de células Th17 están asociados con la destrucción del cartílago y el hueso en la RA [27,28]. Se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que exhiben erosión ósea o daño del cartílago o pacientes identificados como en riesgo de erosión ósea o daño del cartílago.

El TNF- α también está asociado con la RA, pero el TNF- α no está involucrado en la patogénesis de las etapas posteriores de la enfermedad. En contraste, IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [29]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para usar en el tratamiento de la RA crónica o la RA en etapa tardía, tal como una enfermedad que incluye la destrucción articular y la pérdida de cartílago. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para tratar pacientes que previamente han recibido terapia anti-TNF- α . En ciertas realizaciones, los pacientes a tratar no responden o ya no responden a la terapia anti-TNF- α .

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

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

Esclerosis múltiple

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de múltiples esclerosis. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple en ratones (el modelo EAE), y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es un trastorno inflamatorio asociado con el daño a las vainas de mielina de las neuronas, particularmente en el cerebro y la columna vertebral. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, que incapacita progresivamente y evoluciona en episodios. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, p. ej., debido a que los niveles de IL-17 pueden correlacionarse con lesiones de esclerosis múltiple, IL-17 puede alterar las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y las células Th17 pueden migrar hacia el centro sistema nervioso y causar pérdida neuronal [30,31]. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

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

de la invención son para uso en la prevención de la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

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

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

Uveítis

En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo animal de uveítis y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la uveítis. La uveítis es la inflamación de la úvea y puede provocar la destrucción del tejido retiniano. Puede presentarse en diferentes formas anatómicas (anterior, intermedia, posterior o difusa) y ser el resultado de causas diferentes, pero relacionadas, que incluyen trastornos autoinmunes sistémicos. IL-17 y la vía Th17 están implicadas centralmente en la uveítis, por lo que las composiciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la uveítis. Las referencias [32-39] describen niveles séricos elevados de interleucina-17A en pacientes con uveítis, asociación específica de variantes genéticas de IL17A con panuveítis, el papel de las citocinas asociadas a Th17 en la patogénesis de la uveítis autoinmune experimental, el desequilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras durante la uveítis autoinmune experimental monofásica, la regulación positiva de IL-17A en pacientes con uveítis y enfermedades activas de Adamantiades-Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), el tratamiento de la uveítis no infecciosa con secukinumab (anticuerpo anti-IL-17A) y Th17 en ojos uveíticos.

En ciertas realizaciones, la uveítis es la uveítis posterior. La uveítis posterior se presenta principalmente con inflamación de la retina y la coroides y los ejemplos demuestran que las composiciones descritas en el presente documento son eficaces para reducir la inflamación y el daño de la retina.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en el daño de la retina. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas aquí son para uso en la reducción o prevención del daño retiniano en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con uveítis severa que están en riesgo de daño retiniano. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas aquí son para uso en la reducción o prevención de la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado una reducción en la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para reducir la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones descritas en el presente documento da como resultado que se mantenga o mejore la visión. En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el mantenimiento o la mejora de la visión.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en el tratamiento o la prevención de uveítis asociada con una enfermedad no infecciosa o autoinmune, tales como la enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, Fuchs iridociclitis heterocrómica, Granulomatosis de Wegener, HLA-B27 uveítis relacionada, artritis idiopática juvenil, sarcoidosis, espondiloartritis, oftalmia simpática, nefritis tubulointersticial y síndrome de uveítis o síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. Se ha demostrado que IL-17A está involucrado, p. ej., en las enfermedades de Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada.

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

Modos de administración

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

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

5 En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en forma de aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (p. ej., Supocire, witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol o composición de glicerina jabonosa.

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

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

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

25 En ciertas realizaciones, la composición de la invención se puede administrar a un animal preñado, por ejemplo un mamífero tal como un ser humano con el fin de prevenir una enfermedad inflamatoria o autoinmune en desarrollo en su hijo en el útero y/o después de su nacimiento.

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

35 Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado por tener una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener una colonización reducida o ausente por *Parabacteroides*, y en particular *Parabacteroides distasonis*.

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

40 En general, las composiciones de la invención son para el tratamiento de humanos, aunque pueden usarse para tratar animales que incluyen mamíferos monogástricos tales como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede usar sonda oral.

45 **Composiciones**

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

Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y se dispone de orientación relevante en, p. ej., referencias [46-48].

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

60 En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la entrega de la bacteriana cepa al intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la entrega en la ubicación diana a través, p. ej., de la ruptura con estímulos químicos o físicos como la presión, la actividad enzimática o la desintegración física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de soporte sólidas, autoagregulación por floculación o con agentes de reticulación y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La orientación sobre la encapsulación que puede ser útil para preparar composiciones de la invención está disponible, p. ej., en las referencias [49] y [50].

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

La composición puede formularse como un probiótico.

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

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

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

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

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

Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Se pueden encontrar ejemplos de tales excipientes adecuados en la referencia [51]. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, p. ej., en la referencia [52]. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente se puede seleccionar con respecto a la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante adecuado, lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s). Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, como en un suplemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer que la composición sea más atractiva para el consumo al ser más similar a un producto alimenticio común, que a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier producto a base de leche o suero líquido o semisólido que tiene un contenido variable de grasa. El producto a base de leche puede ser, p. ej., leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada a partir de leche en polvo y suero sin ningún procesamiento, o un producto procesado, como yogur, leche

cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como las bebidas de suero, las leches fermentadas, las leches condensadas, las leches infantiles o para bebés; leches aromatizadas, helados; alimentos que contienen leche, como dulces.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

65

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

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

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

Métodos de cultivo

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

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

Cepas bacterianas para usar en composiciones de vacunas

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

General

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, p. ej., las referencias [56] y [57-63], etc.

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

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

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", p. ej., una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

50 Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando están alineadas, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, p. ej., los descritos en la sección 7,7,18 de la ref. [64]. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman determina una alineación preferida usando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio abierto de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología SmithWaterman se describe en la ref. [65].

60 A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosos pasos puede comprender pasos adicionales al principio o al final del método, o puede comprender pasos intermedios adicionales. Además, los pasos se pueden combinar, omitir o realizar en un orden alternativo, si corresponde.

65 En este documento se describen diversas realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas aquí como adecuadas, típicas o preferidas pueden

combinarse entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

EJEMPLOS

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

Resumen

10 Los ratones fueron administrados con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y fueron posteriormente desafiados con extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) para elicit

15 respuesta inflamatoria alérgica. La respuesta inflamatoria a HDM incluye componentes eosinofílicos y neutrofílicos, está mediada por IL-17 y la vía Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con las composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria y reducen el reclutamiento de eosinófilos y neutrófilos, lo que indica que pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 y Th17 tales como eosinofilia, neutrofilia y asma.

Cepa

20 755: *Parabacteroides distasonis*

Diseño del estudio

25 Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).
5. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 755 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).
- 30 8. Grupo de control no tratado. Número de ratones por grupo = 5

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

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

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

40 Día 0, 2, 4, 7, 9, 11 Administración de dexametasona (i.p., 3 mg/kg, Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159) (Grupo 7).

Día 14 Sacrificio de todos los animales para su análisis.

45 Número total de ratones = 40.

Puntos finales y análisis

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

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

55 Material y Métodos

Ratones. Se compraron ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas obtenidas de Indulab AG, Gams, Suiza Tipo de jaula: "The Sealsafe™ – IVC Cage. Número de producto 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorearon semanalmente y se aclimataron a la instalación durante 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el día de estudio -14. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Servicio de Consumo y Asuntos Veterinarios del Cantón de Vaud). Agua potable y alimentos estaban

disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal fueron observadas según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza bajo la ordenanza 455,163 de la FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo de inóculo bacteriano. Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolas con una mano enguantada y se inyectaron ~0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (Número de Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaerobio. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos de Hungate se incubaron luego (estática) a 37°C durante 16 h (para la cepa 755).

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

Administración de inóculo bacteriano o control de vehículos. Se administraron 400 µl de inóculo de bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

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

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

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

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

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

Resultados y análisis

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

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

Los resultados más importantes de este experimento se muestran en las Figuras 6 y 7, que informan sobre el número total y el porcentaje de neutrófilos detectados en el lavado bronquiolar después del desafío con HDM. La administración de la cepa 755 dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en BAL en relación con el control de solo vehículo.

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

Resumen

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

Cepa

755: *Parabacteroides distasonis*

5 Diseño del estudio

Grupos:

- 10 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).
5. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 755 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (i.p.).
8. Grupo de control no tratado.
9: Ratones sanos (línea de base).

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

Día -14 al día 17: Administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).

20 Día -14 al día 17: administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 2-6).

Día 0: Sensibilización con HDM en CFA (sc) (Grupo 1-8).

Día 7: Sensibilización con HDM en CFA (sc) (Grupo 1-8).

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

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

30 Día 18: Sacrificio de todos los animales para su análisis.

Criterios de valoración y análisis:

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

Material y métodos.

40 Ratones. Se compraron ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas de Indulab AG, Gams, Suiza Tipo de jaula: "The Sealsafe™ - Cage IVC. Número de producto 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorearon semanalmente y se aclimataron a la instalación durante 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el Día de estudio -14. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Enriquecimiento de la jaula.
45 El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Servicio de Consumo y Asuntos Veterinarios del Cantón de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se observaron según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455,163 del FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de
50 animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo de inóculo bacteriano. Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolo con una mano enguantada y se inyectaron ~ 0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (número de Cat., 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lengler, Alemania), que contenía 8 ml de anaerobio. YCFA Por
55 lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos de Hungate se incubaron luego (estática) a 37°C durante 16 H(para la cepa 755).

Cultivo del control del vehículo. Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.
60

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

Sensibilización HDM. Se emulsionaron 50 µg de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) En PBS en un volumen igual de adyuvante completo de Freund
65

(CFA Chondrex Inc. Washington, EE.UU.) y se administra por vía subcutánea en un volumen de 200 µl, dos veces durante dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones fueron anestesiados por inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Suiza) y luego se les administraron desafíos intranasales de 15 µg de HDM en un volumen de 30 µl PBS en 4 días consecutivos. El análisis se realizó un día después del desafío final.

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

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

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

Gráficos y análisis estadístico. Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism Versión 6 y se aplicó un ANOVA unidireccional. Los resultados del análisis estadístico se proporcionan con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Resultados y análisis

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

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la cepa 755 fue altamente eficaz para aliviar la magnitud de la respuesta inflamatoria neutrófila. En adición, la cepa 755 reduce el número de eosinófilos respecto a los controles, como se muestra en las Figuras 11 y 12.

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

Materiales y métodos

Cepa

755: *Parabacteroides distasonis*

Cultivos bacterianos

Se cultivaron cultivos bacterianos para su administración en una estación de trabajo anaeróbico (Don Whitley Scientific).

La cepa bacteriana nº 755 se cultivó usando reservas de glicerol. Las reservas de glicerol se almacenaron a -80°C. Tres veces por semana, las reservas de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se tiñeron en placas YCFA. Se usó una nueva alícuota de glicerol en cada ocasión. Se permitió que las bacterias crecieran en una placa dada durante hasta 72 horas.

Las soluciones a administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas para tratamientos de mañana (AM) y tarde (PM). Se recogió una colonia bacteriana de la placa rayada y se transfirió a un tubo que contenía medio YCFA. La cepa bacteriana nº 755 se dejó crecer durante 24 horas antes de las administraciones de AM. Las bacterias se subcultivaron al 1% en medios YCFA para administraciones de PM. Los valores de OD se registraron para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de mañana y tarde.

Modelo de ratón de artritis inducida por colágeno de tipo II

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

Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa de administración a continuación. Desde el

día 14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se pesaron tres veces por semana. Desde el día 21 hasta el final del experimento, se calificó a los animales tres veces por semana para que los signos clínicos de artritis incluyeran hinchazón de las patas traseras y delanteras, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y las articulaciones tibio-tarsales (tobillo).

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

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

El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón bien establecido para la artritis reumatoide [66]. La inmunización con CII causa una patogénesis que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoide, que incluye hiperplasia sinovial, infiltración de células mononucleares y degradación del cartílago. Significativamente, el desarrollo de la CIA está mediado por células Th17 a través de la secreción de IL-17A [67]. La respuesta inmune subyacente en el modelo de artritis se ve reforzada por el uso del adyuvante de Freund complementado con *Mycobacterium tuberculosis*.

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

Grupos de tratamiento y dosis

Todos los grupos fueron n = 15 (n = 12 para el grupo de estudio principal y n = 3 para grupos satélite). El vehículo utilizado para la bioterapéutica fue medio de extracto de levadura-ácidos grasos de casitona (YCFA).

	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de enfermedad
			Ruta	Régimen	
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID: Día-14-Extremo	Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC
5	Bioterapéutico 755	5 ml/kg			Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC

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

Pesos corporales

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

Observaciones clínicas no específicas

Desde el día -14 hasta el final del experimento, los animales se verificaron diariamente para detectar signos clínicos no específicos para incluir una postura anormal (encorvada), una condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

Observaciones clínicas

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

Análisis de proliferación celular

El día 21, se sacrificaron tres animales satélite por grupo y se diseccionaron los bazo. Las células de bazo se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Después de 72 horas, las células se pulsaron durante la noche en presencia de timidina tritiada. La proliferación celular se cuantificó midiendo la incorporación de timidina. Los datos fueron graficados (\pm SEM media). Se tomaron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de citocinas clave.

Análisis de citocinas

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

Análisis microbiológico

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

Histopatología

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

Tabla 1: Sistema de puntuación de histopatología

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

Resultados y análisis

Supervivencia y observaciones clínicas no específicas

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

Tres animales fueron sacrificados o encontrados muertos durante el período de pretratamiento (Día -14 al Día 0): un animal en el Grupo 1 (tratado con vehículo, el animal llegó del proveedor con una pierna rota y fue sacrificado) y dos animales en Grupo 5 (bioterapéutico tratado con 755).

Siete animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis: cinco animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y dos animales en el Grupo 5 (tratados con bioterapéutico nº 755).

Tres animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos inespecíficos que incluyen postura anormal (encorvada), condición de pelaje anormal (piloerección), niveles de actividad anormales (actividad reducida).

Pesos corporales

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

Cuando se compara con el día -14, administraciones dos veces diarias por sonda oral induce una pérdida de peso corporal significativa en el grupo tratado con vehículo en el día -9 y el día -7.

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

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

Cuando se comparó con el grupo tratado con vehículo, los pesos corporales fueron significativamente mayores en el Grupo 5 (tratamiento bioterapéutico n° 755) el día 28 ($< 0,0001$).

Observaciones clínicas

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

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

Bioterapéutico n° 755 indujo una reducción de las puntuaciones clínicas en comparación al grupo tratado con vehículo desde el día 28 hasta el día 45. La reducción fue estadísticamente significativa el día 31 y el día 38 ($p < 0,05$).

Análisis de proliferación celular

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

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

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

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

Los grupos tratados con Bioterapéutico n° 755 demostraron niveles significativamente más bajos de proliferación de esplenocitos inducida por CII que el grupo tratado con vehículo.

Niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de tejidos

Los niveles de cada citocina se midieron en sobrenadantes de cultivo de tejidos derivados de cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 por análisis luminex. Estos mostraron respuestas robustas para todas las citocinas medidas (los niveles medios en el grupo de vehículos fueron los siguientes: IL-4 = 6.406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-

10 = 10.987 pg/ml; IL-17A = 11.447 pg/ml; IFN- γ = 15.581 pg/ml; TNF- α = 76 pg/ml).

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

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

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

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (Figura 23)

Junto con IL-17, IFN- γ es la principal enfermedad que conduce a las citocinas en el modelo de la CIA. El diagrama de dispersión en la Figura 23 demuestra los niveles de IFN- γ después de la estimulación con CII, siendo la mediana del grupo más alto para el grupo tratado con vehículo en comparación con el bioterapéutico.

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

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

Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

Los niveles de IL-10 en el grupo tratado con vehículo fueron 13 pg/ml y 2,1 pg/ml para cultivos estimulados con CII y de control de medios, respectivamente. Pueden esperarse niveles más altos de IL-10 (que es una citocina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo porque la inflamación y la inducción de citocinas proinflamatorias podrían estar acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatoria.

Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

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

Análisis microbiológico

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

Siguiendo el método mejorado de preparación bacteriana, se administraron consistentemente altas dosis de cepa bacteriana del día -2 y del día -3 como lo indican los altos valores de OD medidos.

Se recogieron muestras fecales y se congelaron rápidamente el día -14, día 0 y al finalizar.

Histopatología

Los resultados de histopatología se muestran en las Figuras 65-69. Como se esperaba para este modelo, se observó variabilidad intraindividual e interindividual en términos de la presencia/ausencia de artritis o la gravedad del cambio presente.

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

La incidencia de cambios histopatológicos fue: vehículo - 80% (16/20); Bioterapéutico nº 755 - 41% (9/22). El tratamiento con Bioterapéutico nº 755 redujo la incidencia de puntajes histopatológicos en las extremidades posteriores del ratón en comparación con el grupo tratado con vehículo (ver Figuras 65-68). Los puntajes de histopatología se analizaron mediante ANOVA unidireccional para datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) seguido de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo. Bioterapéutico nº 755 indujo una reducción significativa de los puntajes de inflamación articular observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$). Bioterapéutico nº 755 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño de cartílago observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$). Bioterapéutico nº 755 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño óseo observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$). Bioterapéutico nº 755 indujo una reducción significativa de los puntajes de histopatología total en comparación con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$).

Resumen

Se observaron puntuaciones clínicas aumentadas desde el día 28 después de la primera administración de colágeno tipo II, como se esperaba en este modelo de artritis en ratones DBA/1. Bioterapéutico nº 755 demostró ser eficaz en el tratamiento de la artritis en este modelo. Bioterapéutico nº 755 fue efectivo para reducir la severidad de los puntajes clínicos y para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se demostró en el análisis histopatológico.

Se observaron respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. La respuesta específica de colágeno se redujo significativamente después del tratamiento con Bioterapéutico nº 755 (Grupo 5).

La mayoría de las citocinas de células T probadas mostraron incrementos detectables entre los controles estimulados con Colágeno II y los medios en el grupo tratado con Vehículo. Estos aumentos no fueron tan obvios en el grupo tratado con bioterapia. Esto apoya ampliamente las respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II descritas anteriormente.

Hubo evidencia de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patogénica en este modelo y en la RA humana. La correlación de niveles reducidos de citocinas con proliferación reducida sugiere una modulación inmune. No hubo evidencia de que esta modulación fuera resultado de niveles mejorados de IL-4 asociada a TH2 de aumentos en la citocina inmunomoduladora, IL-10.

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

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

Materiales y métodos

Extracción de sangre y preparación de suero en el día 14. Se recogieron muestras de sangre de animales mediante punción cardíaca. El suero se aisló de la muestra de sangre mediante centrifugación durante 5 minutos a 14000 g y se almacenó a -20°C.

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

Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL

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

Aislamiento del análisis pulmonar e histológico

Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y producción de moco. La infiltración inflamatoria se calificó con el siguiente sistema de clasificación:

0 – normal

1 - infiltrados inflamatorios leves

2 - infiltrados inflamatorios moderados

3 - infiltrados inflamatorios marcados

4 - infiltrados inflamatorios severos

5 - infiltrados inflamatorios muy severos

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

Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar

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

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 27-45.

En apoyo de los hallazgos descritos en el Ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de ratones tratados con la cepa 755 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en la puntuación media de inflamación (ver Figuras 31 y 33).

Se analizaron los niveles de anticuerpos en el fluido BAL y el suero (ver Figuras 27-30). No se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de anticuerpos en suero. Esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. Además, los niveles basales de anticuerpos en suero podrían haber enmascarado cualquier cambio.

De forma similar, no se observó ningún efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citocinas en el tejido pulmonar (véanse las Figuras 35-45). Nuevamente, esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaba. También es posible que el mecanismo de acción involucrado influya en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación.

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

Los ratones probados en el Ejemplo 2 fueron sometidos a análisis adicionales para caracterizar aún más el efecto de las composiciones de la invención sobre la respuesta neutrofílica asociada con asma severa.

Materiales y métodos

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

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

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

Aislamiento de pulmón y análisis histológico (análisis de seguimiento). Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y producción de moco. La infiltración inflamatoria se calificó con el siguiente sistema de clasificación:

0 – normal

1 - infiltrados inflamatorios leves

2 - infiltrados inflamatorios moderados

3 - infiltrados inflamatorios marcados

4 - infiltrados inflamatorios severos

5 - infiltrados inflamatorios muy graves

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 46-63.

Un análisis adicional de los niveles de anticuerpos reveló que la eficacia de la cepa bacteriana 755 también se reflejó en niveles reducidos de IgG1 específica de HDM en el fluido y suero BAL (ver Figuras 46 y 48). No se pueden extraer conclusiones firmes con respecto a un efecto sobre los niveles de IgG2a. En general, los datos del análisis de anticuerpos sugieren una reducción relacionada con una respuesta inflamatoria global reducida, en oposición a un efecto selectivo sobre el cambio de isotipo de anticuerpo.

El análisis histológico apoyó los recuentos diferenciales de células del fluido BAL, mostrando un infiltrado celular reducido en ratones tratados con la cepa 755 (ver Figuras 50-52).

En relación con los niveles de citoquinas, como para el Ejemplo 4, la propagación de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como necesariamente se esperaría. También es posible que el mecanismo de acción implique influir en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se demostró un claro efecto antiinflamatorio sobre los niveles de citoquinas para la cepa 755, y el control positivo anti-IL-17 Ab se comportó generalmente como se esperaba.

Con las advertencias anteriores, los datos en las Figuras 55 y 57 sugieren que el tratamiento con la cepa 755 puede lograr una reducción en los niveles de IL-1b e IFN γ , lo que puede ser indicativo de un mecanismo de acción relacionado con las influencias en la liberación de quimiocina. (y por lo tanto reclutamiento de células) por las células inmunes estromales o innatas. Estas citoquinas son parte de la vía Th17. Tomando este conjunto de datos juntos, se puede llegar a una conclusión clara de que la cepa 755 fue altamente efectiva para proteger a los ratones contra la inflamación en este modelo de ratón con asma neutrofílica severa.

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

Resumen

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

Cepa

755: bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 43282

Diseño del estudio

5 Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).

5. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 755 (por vía oral).

9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).

10 10. Grupo de control no tratado.

Número de ratones por grupo = 10

Días -14 a día 27: administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).

15 Días -14 a día 27: administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 5).

Días 0-28: administración de Dexametasona (i.p.) tres veces por semana (Grupo 9).

20 Día 0: MOG35-55 (glucoproteína oligodendrocítica de mielina - 2mg/ml) y CFA (MTB 2mg/ml) se mezclaron 1:1 dando como resultado soluciones de 1 mg/ml. Se inyectaron 100 µl de la mezcla péptido-CFA por vía subcutánea en cada pata trasera. Administración de la toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

Día 1: Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).

25 Días 7 en adelante: medición de la incidencia y el peso de la enfermedad tres veces por semana.

Puntos finales y análisis

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

Monitoreo

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

40 Observaciones de puntuación de actividad de la enfermedad:

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

0,5 - La punta de la cola está floja.

1,0 - Cola cojera.

45 1,5 - Inhibición de la cola y la pata trasera.

2,0 - Cola cojera y debilidad de las patas traseras.

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

2,5 - Cola cojera y arrastrar las patas traseras.

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

3,0 - Cola cojera y parálisis completa de las patas traseras.

3,5 - Cola cojera y completar la parálisis de las patas traseras. Además de: el ratón se mueve alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no puede enderezarse. Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo.

55 4,0 - Cola cojera, pata trasera completa y parálisis parcial de la pata delantera.

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

60 4,5 - Parálisis completa de la pata delantera y parcial, sin movimiento alrededor de la jaula. El ratón se sacrifica inmediatamente y se retira de la jaula.

5,0 El ratón se sacrifica debido a una parálisis severa.

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

Resultados

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 70 y 71.

La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo fue exitosa con puntajes altos mostrados por el control del vehículo y el control sin tratar. El efecto del tratamiento con la cepa 755 fue sorprendente y los ratones tratados con la cepa 755 exhibieron una incidencia y gravedad de la enfermedad notablemente reducidas. De hecho, la reducción en la incidencia y la gravedad de la enfermedad fue comparable al grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 755 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

Ejemplo 7 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de uveítis en ratonesResumen

Este estudio usó un modelo de ratón de uveítis inducida por (IRBP) de proteína de unión a retinoide interfotorreceptor para probar los efectos de la administración bacteriana en la uveítis. La uveítis es una afección que pone en peligro la vista como resultado de la inflamación intraocular y la destrucción del tejido retiniano. Esta enfermedad puede estudiarse en roedores en un modelo de uveoretinitis autoinmune experimental (EAU) [68]. La EAU es un trastorno específico de un órgano en donde las células Th1/Th17 se dirigen hacia los antígenos de la retina y producen citocinas que activan las células mononucleares residentes e infiltrantes que conducen a la destrucción del tejido. La EAU se puede inducir en ratones mediante desafío con antígenos retinianos, incluido el péptido de proteína de unión a retinoide interfotorreceptor (IRBPp). El inicio de la enfermedad normalmente ocurre desde el día 8-9 y alcanza su punto máximo después de los días 14-15. Los signos de enfermedad clínica pueden controlarse mediante imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).

Cepa

MRX005: *Parabacteroides distasonis*, bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 42382.

Se proporcionó bioterapéutico en reserva de glicerol. Se utilizaron medios de crecimiento microbiológicos (YCFA) para el cultivo del agente.

Ratones

Los ratones eran cepa C57BL/6 y tenían más de \pm semanas de edad al comienzo del estudio. Se utilizaron 72 ratones (+ 36 animales satélite). Animales no saludables fueron excluidos del estudio. Los animales se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos (spf), en una sala de retención controlada termostáticamente ($22 \pm 4^\circ\text{C}$). Se permitió que los animales se aclimataran en condiciones estándar de casa de animales durante un mínimo de una semana antes de su uso. El estado de salud de los animales se controló durante este período y se evaluó la idoneidad de cada animal para uso experimental antes del inicio del estudio. Los ratones fueron alojados en grupos de hasta 10 animales por jaula durante la duración del estudio. La dieta de gránulos irradiada (dieta de laboratorio, dieta de roedores de la UE 22%, 5LF5) y agua estuvieron disponibles ad libitum durante los períodos de aclimatación y estudio. Es poco probable que algún componente de la dieta o el agua interfiera con el estudio.

Esquema experimental

Se asignaron aleatoriamente ratones hembra C57BL/6 adultos a grupos experimentales y se les permitió aclimatarse durante una semana. Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa a continuación. El día 0, se administró a los animales una emulsión que contenía 200 μg de péptido de proteína de unión a retinoide interfotorreceptor 1-20 (IRBP p1-20) en adyuvante completo de Freund (CFA) suplementado con 2,5 mg/ml de *Mycobacterium Tuberculosis* H37 Ra mediante inyección subcutánea. También en el día 0, los animales fueron administrados con 1,5 μg de toxina de *Bordetella Pertussis* por inyección intraperitoneal. Desde el día 14, los animales se pesan tres veces por semana. Desde el día -1 hasta el final del experimento en el día 42, los animales se controlan dos veces por semana para detectar signos clínicos de uveítis utilizando imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).

Programa de administración

Todos los grupos son $n = 12$

El vehículo para la administración oral es medio YCFA.

Volumen de administración para la administración oral diaria dos veces es 5 ml/kg.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Ruta	Frecuencia	Inducción de enfermedad
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID	Día 0: IRBP/CFA, SC
2	MRX005	5 ml/kg		Día -14-Extremo	Día 0: PTx, IP

PO: administración oral, BID: dos veces al día, SC: inyección subcutánea, IP: inyección intraperitoneal, IRBP: proteína de unión al receptor interfo, CFA: adyuvante completo de Freund, PTx: toxina para la tos ferina

También se probó un grupo de control positivo usando tratamiento con el fármaco ciclosporina A.

Lecturas

Pesos corporales. Desde el día 14, los animales se pesan tres veces por semana. Los animales con una pérdida de peso corporal igual o superior al 15% de su peso corporal inicial (Día 0) en dos ocasiones consecutivas son sacrificados.

Observaciones clínicas no específicas. Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se controlan diariamente para detectar signos clínicos inespecíficos que incluyan postura anormal (encorvada), condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

Puntuaciones clínicas: Formación de imágenes de retina mediante imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI). Desde el día -1 hasta el final del experimento, los animales se puntúan dos veces por semana para detectar signos clínicos de uveítis. Las imágenes retinianas se capturan usando TEFI en animales no anestesiados pero restringidos después de la dilatación de la pupila usando Tropicamida al 1% y luego Clorhidrato de Fenilefrina al 2,5%. Las imágenes retinianas son puntuadas usando el siguiente sistema. El puntaje máximo acumulado es 20.

Puntuación	Inflamación de disco óptico	Vasos retinianos	Infiltración de tejido retiniano	Daño estructural
1	Mínimo	1-4 puños suaves	1-4 lesiones pequeñas o 1 lesión lineal	Lesiones o atrofia retinianas que involucran 1/4 a 3/4 del área retiniana
2	Suave	> 4 puños leves o 1-3 puños moderados	5-10 lesiones pequeñas o 2-3 lesiones lineales	Atrofia panretiniana con múltiples lesiones pequeñas (cicatrices) o ≤ 3 lesiones lineales (cicatrices)
3	Moderado	> 3 puños moderados	> 10 lesiones pequeñas o > 3 lesiones lineales	Atrofia panretiniana con > 3 lesiones lineales o lesiones confluentes (cicatrices)
4	Grave	> 1 puños severos	Lesión lineal confluyente	Desprendimiento de retina con plegado
5	No visible (blanqueamiento o desprendimiento grave)			

Resultados

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

Puntuaciones clínicas: Imagen de retina por imagen de fondo endoscópico tópico (TEFI). Los datos de los puntajes TEFI medidos en el grupo de control desde el día 0 hasta el día 28 se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos seguidos de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples entre días experimentales. La administración de IRBP indujo un aumento significativo en las puntuaciones de TEFI medidas desde el día 14 ($p < 0,01$) y el día 28 ($p < 0,0001$) en comparación con el día 0 en el grupo de control (Figura 72).

Las puntuaciones de TEFI medidas en los grupos experimentales el día 28 se analizaron usando un ANOVA unidireccional. Como se esperaba, se observó una disminución significativa en los puntajes en el grupo de control positivo de ciclosporina A. También hubo una disminución estadísticamente significativa en las puntuaciones para el grupo tratado con MRX005 ($p < 0,01$), en relación con el control negativo (Figura 73).

Conclusiones. Las puntuaciones clínicas determinadas por TEFI aumentaron desde el día 14, como se esperaba en este modelo de uveítis inducida por IRB. Para el día 28, se observó una reducción notable y

estadísticamente significativa en la incidencia y gravedad de la enfermedad en el grupo tratado con MRX005, que fue comparable a la observada para el grupo de control positivo. En particular, estos datos indican que el tratamiento con la cepa MRX005 redujo el daño retiniano, la inflamación del disco óptico y/o la infiltración del tejido retiniano por las células inflamatorias (ver el sistema de puntuación de imágenes retinianas TEFI más arriba). Estos datos indican que la cepa MRX005 puede ser útil para tratar o prevenir la uveítis.

Ejemplo 8 - Prueba de estabilidad

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

Secuencias

SEQ ID NO: 1 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 5825 - AB238922)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcgggg tgtagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc
121 aacttgccata tcagaggggg ataaccggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
181 gatcccgcat gggaatat tctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt
241 aggcagttgg cggggtaacg gccacacaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
301 gtccccacaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat
361 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgcgt gagggatgaa ggttctatgg
421 atcgtaaacc tcttttataa ggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct
481 tatgaataag gatcggtata ctccgtgcca gcagccgcgg taatacggag gatccgagcg
541 ttatccggat ttattgggtt taaagggtgc gtaggcggcc ttttaagtca gcggtgaaag
601 tctgtggctc aaccatagaa ttgccgttga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag
661 gcggaatgcg tgggtgtagcg gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag
721 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta
781 gataccctgg tagtccacgc agtaaacgat gatcactagc tgtttgcatg acactgtaag
841 cggcacagcg aaagcggtta gtgatccacc tggggagtac gccggcaacg gtgaaactca
901 aaggaattga cgggggcccg cacaagcgga ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg
961 aggaacctta cccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat
1021 agccgtttgc gaggtgctgc atggttgctg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
1081 tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt
1141 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaaggc ggggatgacg tcaaatacag acggccctta
1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaaag ggaggccacc tggcgacagg
1261 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcgagtc tgcaaccgca ctccgtgaag
1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt
1381 acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg gggtacctga agtccgtaac cgaaaggatc
1441 ggcctagggg aaaactgggt actggggcta agtcgtaaca aggtaacc

```

SEQ ID NO: 2 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13400 - AB238923)

ES 2 863 913 T3

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 5 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 10 301 ccccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 15 541 atccggattht attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaat ctggggggct tgagtatgtt tgaggcaggg
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccccgga ttgcgaaggc
 20 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga

781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac agtghtaagcg
 25 841 gcacagcgaa agcgtaagt gatccacctg gggagtagcg cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggg ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 30 1021 ccgtttgca ggtgctgcat ggttgctgct agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacagggg
 35 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caacccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccc ggccttgtag
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 40 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 3 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13401 - AB238924)

45

ES 2 863 913 T3

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
   61 ggcagcacag gtagcaatac ccgccggcga cggcgccacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
5 121 cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
   181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
   241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
10 301 cccccacatt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
   361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
   421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
   481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
15 541 atccggattht attgggttta aagggtgcgt agggggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
   601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggg
   661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgga ttgcgaaggc
20 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
   781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg
   841 gcacagcgaa agcgtaaagt gatccacctg gggagtagc cggcaacggt gaaactcaaa
   901 ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
25 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
  1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagtg
  1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggat gatgctgagg actctggtgg
30 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
   1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaagg atgccacctg gcgacagggg
   1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
   1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag
35 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
   1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

```

SEQ ID NO: 4 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13402 - AB238925)

ES 2 863 913 T3

1 agagtttgat 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 cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggatcaatg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcagggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcca ggtgctgcat ggttgctgct agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
 1081 ccataacgag cgcaacctt gccactagtt actaacaggg aaagctgagg actctggtgg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtggt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacagggg
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgta
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggttaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

SEQ ID NO: 5 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13403 - AB238926)

1 agagtttgat 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 cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggatcaatg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcagggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgccga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga

ES 2 863 913 T3

5 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac attgtaagcg
841 gcacagcgaa agcgtaaagt gatccacctg gggagtagcg cggcaacggg gaaactcaaa
901 ggaattgacg ggggcccgcg caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
10 1021 ccgtttgca ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt aaagctgagg actctggtgg
1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca
1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
15 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag
1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

20 SEQ ID NO: 6 (gen *Parabacteroides distasonis* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13404 - AB238927)

25 1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
30 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
301 cccccacatt ggtactgaga cacggacca actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagt tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
35 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggt atacggagga tccgagcgtt
541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
40 661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccgga ttgcgaaggc
721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac attgtaagcg
841 gcacagcgaa agcgtaaagt gatccacctg gggagtagcg cggcaacggg gaaactcaaa
45 901 ggaattgacg ggggcccgcg caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
1021 ccgtttgca ggtgctgcat ggttgctgctc agctcgtgcc gtgaggtgct ggcttaagtg
50 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacagggt aaagctgagg actctggtgg
1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgct aaatcagcac ggcccttaca
1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
55 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag
1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

60 SEQ ID NO: 7 (gen *Parabacteroides merdae* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 9497 - AB238928)

65

ES 2 863 913 T3

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 5 121 atgcaactta cctatcagag ggggtagacc cggcgaaagt cggattaata cccataaaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaacgcagc atggataggg gttctgagag
 10 301 gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag
 361 gaatattggg caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatag ggaggatgcg
 15 541 agcgttatcc ggattttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcgggtg
 601 aaagtttggt gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 20 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa
 25 901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtctgcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acagggtgaag ctgaggactc
 30 1141 tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 35 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttccggggcc
 1381 ttgtacacac cggcgtcaa gccatgggag cgggggttac ctgaagtccg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

40 SEQ ID NO: 8 (gen *Parabacteroides merdae* para 16S ribosomal ARN, secuencia parcial, cepa: JCM 13405 - AB238929)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 45 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggtagacc cggcgaaagt cggattaata cccataaaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 50 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaacgcagc atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag
 361 gaatattggg caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt
 55 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatag ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggattttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcgggtg
 601 aaagtttggt gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 60 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg

65

781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacgggtgaaa
 901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttta ttcgatgata
 961 cgcgaggaac cttacccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccttctag
 1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acagggtgaag ctgaggactc
 1141 tggtagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttataa tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tgcactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
 1381 ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag cgggggttac ctgaagtccg taaccgcaag
 1441 gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

SEQ ID NO: 9 (secuencia 16S ARNr consenso para cepa 755 *Parabacteroides distasonis*)

AMCCGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCTATCAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAAGT
 CGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGCTAAAGATTTCATCGCTGATAGATAGGCATGCG
 TTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACA
 TTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACC
 AGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCGGGACGTGTCC
 CGTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGT
 TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCCTTTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAG
 AATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGAGTATGTTTGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
 ATCAGCGGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATCACTAGCTGTTTGCGATACACTGTAAGCGGCACAGC
 GAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAG
 CGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGTTTGAACGCATTTCGGACMGAKGTGGAA
 ACACATTTTCTAGCAATAGCCATTTGCGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTGCGCTTAAG
 TGCCATAACGAGCGCAACCCCTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGCGTAAG
 CTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACATCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGTGG
 ACAAGGGAAGCCACCTGGCGACAGGGAGCGAATCCCAACACAGTCTCAGTTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
 TCCGTGAAGCTGGATTTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
 CCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGGTACCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAACTGGTGACTGG
 GGCTAAGTCGTACGGG

SEQ ID NO: 10 (secuencia del genoma de la cepa 755): consulte la lista electrónica de secuencias.

REFERENCIAS

- [1] Spor et al. (2011) Nat Rev Microbiol. 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et al. (2005) Science. 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson et al. (2001) Microbes Infect. 3(12):1021-35
- [4] Macpherson et al. (2002) Cell Mol Life Sci. 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian et al. (2005) Cell 15;122(1):107-18.
- [6] Frank et al. (2007) PNAS 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan et al. (2006) J Clin Microbiol. 44(11):3980-8.
- [8] Kang et al. (2010) Inflamm Bowel Dis. 16(12):2034-42.
- [9] Machiels et al. (2013) Gut. 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin y Gorbach (2008) Clin Infect Dis. 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad et al. (2013) BMJ. 347:f6471.
- [16] Sakamoto y Benno (2006) Int J Syst Evol Microbiol. 56(Pt 7):1599-605.
- [17] Masco et al. (2003) Systematic and Applied Microbiology, 26:557-563.
- [18] Srutková et al. (2011) J. Microbiol. Methods, 87(1):10-6.
- [19] Ye et al. (2015) PLoS One. 10(1):e0117704.
- [20] Fabro et al. (2015) Immunobiology. 220(1):124-35.

- [21] Yin et al. (2014) *Immunogenetics*. 66(3):215-8.
 [22] Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol*. 175(2):316-22.
 [23] Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol*. 133(3):888-91.
 [24] Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 28(8):1016-24.
 [25] Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine*. 2011, 9:122.
 [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6:256-259
 [27] Miossec y Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov*. 11(10):763-76.
 [28] Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sci*. 35(10):493-500.
 [29] Koenders et al. (2006) *J. Immunol*. 176:6262-6269.
 [30] Amedei et al. (2012) *Int J MolSci*. 13(10):13438-60.
 [31] Shabgah et al. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol*. 31(4):256-61.
 [32] Zhang (2015) *Inflammation*. Aug 23.
 [33] Sun et al. (2015) *Cytokine*. 74(1):76-80.
 [34] Mucientes et al. (2015) *Br J Ophthalmol*. 99(4):566-70.
 [35] Jawad et al. (2013) *Ocul Immunol Inflamm*. 21(6):434-9.
 [36] Maya et al. (2014) *J. Ophthalmology*. 310329
 [37] Chi et al. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology*. 119(5):1218-1224.
 [38] Chi et al. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 49(7): 3058-3064.
 [39] Luger y Caspi (2008) *Semin. Immunopathol*. 30(2): 134-143.
 [46] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
 [47] Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
 [48] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol*. 61, 3592-3597.
 [49] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab*. (2013) 716861.
 [50] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol*. 3(2):39-48.
 [51] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2ª Edición, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
 [52] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
 [53] *Handbook of Microbiological Media*, 4ª Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
 [54] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
 [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol*. 581:247-61.
 [56] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 [57] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et al., eds., 1998, 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 et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 [61] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [62] Ausubel et al. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5ª edición (Current Protocols).
 [63] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [64] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
 [65] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math*. 2: 482-489.
 [66] Brand et al. (2007) *Nature Protocols*. 2(5):1269-1275
 [67] Jiao et al. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184(4):1085-93.
 [68] Caspi (2003) *Curr Protoc Immunol*. Chapter 15:Unit 15.6

LISTA DE SECUENCIAS

<110 > 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120 > COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS DE BACTERIAS

<130 > P072554EP

<150 > GB 1510469,8
 <151 > 2015-06-15

<150 > GB 1520628,7
 <151 > 2015-11-23

<150 > GB 1604566,8
 <151 > 2016-03-17

<160 > 9

ES 2 863 913 T3

<170 > SeqWin2010, versión 1,0

<210 > 1

<211 > 1488

5 <212 > ADN

<213 > Parabacteroides distasonis

<400 > 1

10	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcgggg	tgtagcaata	caccgccggc	gaccggcgca	cgggtgagta	acgcgtatgc	120
	aacttgcccta	tcagaggggg	ataacccggc	gaaagtcgga	ctaataccgc	atgaagcagg	180
	gatcccgcac	gggaatat	gctaaagatt	catcgctgat	agataggcat	gcgttccatt	240
15	aggcagttgg	cggggtaacg	gccacacaaa	ccgacgatgg	ataggggttc	tgagaggaag	300
	gtccccaca	ttggtactga	gacacggacc	aaactcctac	gggaggcagc	agtgaggaat	360
	attggtcaat	gggcgtaagc	ctgaaccagc	caagtcgcgt	gagggatgaa	ggttctatgg	420
	atcgtaaacc	tcttttataa	gggaataaag	tgccggacgt	gtcccgtttt	gtatgtacct	480
20	tatgaataag	gatcggctaa	ctccgtgcca	gcagccgcgg	taatacggag	gatccgagcg	540
	ttatccggat	ttattgggtt	taaaggggtg	gtaggcgcc	ttttaagtca	gcggtgaaag	600
	tctgtggctc	aaccatagaa	ttgccgttga	aactgggggg	cttgagtatg	tttgaggcag	660
	gcggaatgcg	tgggtgtagcg	gtgaaatgca	tagatatcac	gcagaacccc	gattgcgaag	720
	gcagcctgcc	aagccattac	tgacgctgat	gcacgaaagc	gtggggatca	aacaggatta	780
25	gataccctgg	tagtccacgc	agtaaacgat	gatcactagc	tgtttgcat	acactgtaag	840
	cggcacagcg	aaagcgtaa	gtgatccacc	tggggagtac	gccggcaacg	gtgaaactca	900
	aaggaattga	cggggggccc	cacaagcgga	ggaacatgtg	gtttaattcg	atgatacgcg	960
	aggaacctta	cccgggtttg	aacgcattcg	gaccgaggtg	gaaacacctt	ttctagcaat	1020
	agccgtttgc	gaggtgctgc	atggttgcg	tcagctcgtg	ccgtgaggtg	tcggcttaag	1080
30	tgccataacg	agcgcaaccc	ttgccactag	ttactaacag	gttaggctga	ggactctggt	1140
	gggactgcca	gcgtaagctg	cgaggaaggc	ggggatgacg	tcaaatcagc	acggccctta	1200
	catccggggc	gacacacgtg	ttacaatggc	gtggacaaa	ggaggccacc	tgccgacagg	1260
	gagcgaatcc	ccaaaccacg	tctcagttcg	gatcggagtc	tgcaaccgga	ctccgtgaag	1320
35	ctggattcgc	tagtaatcgc	gcacagcca	tggcgcggtg	aatacgttcc	cgggccttgt	1380
	acacaccgcc	cgtcaagcca	tgggagccgg	gggtacctga	agtccgtaac	cgaagagatc	1440
	ggcctaggg	aaaactggtg	actggggcta	agtcgtaaca	aggttaacc		1488

<210 > 2

40 <211 > 1486

<212 > ADN

<213 > Parabacteroides distasonis

<400 > 2

45

ES 2 863 913 T3

	agagtttgat	cctgggtcag	gatgaacgct	agcgacagggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgccag	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
	cttacctatc	agagggggat	aacccggcga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
5	ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
	gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
	ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
	tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
10	cgtaaacctc	ttttataagg	gaataaagtg	cgggacgtgt	cctgttttgt	atgtacctta	480
	tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacggagga	tccgagcggt	540
	atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
	tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctggggggct	tgagtatgtt	tgaggcaggg	660
15	ggaatgcgtg	gtgtagcggg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaacccccg	ttgcgaaggc	720
	agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
	taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	agtgtaagcg	840
	gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
	ggaattgacg	ggggcccgcg	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
20	gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcatctcga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
	ccgtttgcga	ggtgctgcgt	ggttgctcgc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
	ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	aaagctgagg	actctggtgg	1140
	gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
	tccggggcga	cacacgtggt	acaatggcgt	ggacaaaggg	aagccacctg	gcgacagggg	1260
25	gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcggg	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
	ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcggtgaa	tacgttcccc	ggccttgtag	1380
	acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
	cctagggttaa	aactggtgac	tgggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486
30	<210 > 3						
	<211 > 1486						
	<212 > ADN						
	<213 > Parabacteroides distasonis						
35	<400 > 3						
	agagtttgat	cctgggtcag	gatgaacgct	agcgacagggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcacag	gtagcaatac	ccggccggcga	ccggcgccag	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
	cttgccctatc	agagggggat	aacccggcga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
40	ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
	gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
	ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
	tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
	cgtaaacctc	ttttataagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cctgttttgt	atgtacctta	480
45	tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacggagga	tccgagcggt	540
	atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
	tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctggggaggct	tgagtatgtt	tgaggcaggg	660
	ggaatgcgtg	gtgtagcggg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaacccccg	ttgcgaaggc	720
50	agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
	taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	actgtaagcg	840
	gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
	ggaattgacg	ggggcccgcg	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
	gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcatctcga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
55	ccgtttgcga	ggtgctgcgt	ggttgctcgc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
	ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	gatgctgagg	actctggtgg	1140
	gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
	tccggggcga	cacacgtggt	acaatggcgt	ggacaaaggg	atgccacctg	gcgacagggg	1260
	gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcggg	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
60	ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcggtgaa	tacgttcccc	ggccttgtag	1380
	acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
	cctagggttaa	aactggtgac	tgggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

65

ES 2 863 913 T3

<210 > 4
 <211 > 1486
 <212 > ADN
 <213 > Parabacteroides distasonis

5

<400 > 4

	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacagggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
10	ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgcacg	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
	cttacctatc	agagggggat	aacccggcga	aagtcggact	aataccgcac	gaagcagggg	180

15	ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatag	ataggcatgc	gttccattag	240
	gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
	ccccacatt	ggtactgaga	cacggaccaa	actcctacgg	gaggcagcag	tgaggaatat	360
	tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
	cgtaaacctc	ttttataagg	gaataaagtg	cgggacgtgt	cccgttttgt	atgtacctta	480
	tgaataagga	tcggctaact	ccgtgcccagc	agccgcggta	atacggagga	tccgagcggt	540
20	atccggattt	attgggttta	aagggtgcgt	aggcggcctt	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
	tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatgtt	tgaggcaggc	660
	ggaatgcgtg	gtgtagcggg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaaccccga	ttgcgaaggc	720
	agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
25	taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	actgtaagcg	840
	gcacagcgaa	agcgttaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
	ggaattgacg	ggggcccgca	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
	gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
	ccgtttgcga	ggtgctgcat	ggttgtcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
30	ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacaggt	aaagctgagg	actctggtgg	1140
	gactgcccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
	tccggggcga	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaaggg	aggccacctg	gcgacagggg	1260
	gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
	ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcggtgaa	tacgttcccc	ggccttgtag	1380
35	acaccgcccg	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
	cctagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

<210 > 5
 <211 > 1486
 <212 > ADN
 <213 > Parabacteroides distasonis

40

<400 > 5

45

ES 2 863 913 T3

	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgcacg	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
5	cttacctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
	ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatat	atagggcatgc	gttccattag	240
	gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
	ccccacatt	ggtactgaga	cacggacca	actcctacgg	gagggcagcag	tgaggaatat	360
	tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
10	cgtaaaccctc	ttttataagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cccgttttgt	atgtacctta	480
	tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacggagga	tccgagcggt	540
	atccggattt	attgggttta	aaggggtgct	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
	tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatgtt	tgaggcaggc	660
	ggaatgcgtg	gtgtagcgg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaaccccgga	ttgcgaaggc	720
15	agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
	taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	attgtaagcg	840
	gcacagcgaa	agcgtaaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
	ggaattgacg	ggggcccgcga	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
20	gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
	ccgtttgcca	ggtgctgcat	ggttgctcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
	ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacagg	aaagctgagg	actctggtgg	1140
	gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
	tccggggcga	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaagg	aggccacctg	gcgacagggg	1260
25	gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
	ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcgggtgaa	tacgttcccc	ggccttgtac	1380
	acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
	cctagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486
30	<210 > 6						
	<211 > 1486						
	<212 > ADN						
	<213 > Parabacteroides distasonis						
35	<400 > 6						
	agagtttgat	cctggctcag	gatgaacgct	agcgacaggc	ttaacacatg	caagtcgagg	60
	ggcagcacag	gtagcaatac	cgggtggcga	ccggcgcacg	ggtgagtaac	gcgtatgcaa	120
40							
	cttacctatc	agagggggat	aaccggcgga	aagtcggact	aataccgcat	gaagcagggg	180
	ccccgcatgg	ggatatttgc	taaagattca	tcgctgatat	atagggcatgc	gttccattag	240
	gcagttggcg	gggtaacggc	ccaccaaacc	gacgatggat	aggggttctg	agaggaaggt	300
45	ccccacatt	ggtactgaga	cacggacca	actcctacgg	gagggcagcag	tgaggaatat	360
	tggtcaatgg	gcgtaagcct	gaaccagcca	agtcgcgtga	gggatgaagg	ttctatggat	420
	cgtaaaccctc	ttttataagg	gaataaagtg	tgggacgtgt	cccgttttgt	atgtacctta	480
	tgaataagga	tcggctaact	ccgtgccagc	agccgcggta	atacggagga	tccgagcggt	540
	atccggattt	attgggttta	aaggggtgct	agggcgccct	ttaagtcagc	ggtgaaagtc	600
50	tgtggctcaa	ccatagaatt	gccgttgaaa	ctgggaggct	tgagtatgtt	tgaggcaggc	660
	ggaatgcgtg	gtgtagcgg	gaaatgctta	gatatcacgc	agaaccccgga	ttgcgaaggc	720
	agcctgccaa	gccatgactg	acgctgatgc	acgaaagcgt	ggggatcaaa	caggattaga	780
	taccctggta	gtccacgcag	taaacgatga	tcactagctg	tttgcgatac	attgtaagcg	840
	gcacagcgaa	agcgtaaagt	gatccacctg	gggagtacgc	cggcaacggg	gaaactcaaa	900
55	ggaattgacg	ggggcccgcga	caagcggagg	aacatgtggt	ttaattcgat	gatacgcgag	960
	gaaccttacc	cgggtttgaa	cgcattcgga	ccgaggtgga	aacacctttt	ctagcaatag	1020
	ccgtttgcca	ggtgctgcat	ggttgctcgtc	agctcgtgcc	gtgaggtgtc	ggcttaagtg	1080
	ccataacgag	cgcaaccctt	gccactagtt	actaacagg	aaagctgagg	actctggtgg	1140
60	gactgccagc	gtaagctgcg	aggaaggcgg	ggatgacgtc	aaatcagcac	ggcccttaca	1200
	tccggggcga	cacacgtgtt	acaatggcgt	ggacaaagg	aggccacctg	gcgacagggg	1260
	gcgaatcccc	aaaccacgtc	tcagttcgga	tcggagtctg	caacccgact	ccgtgaagct	1320
	ggattcgcta	gtaatcgcg	atcagccatg	gcgcgggtgaa	tacgttcccc	ggccttgtac	1380
	acaccgccc	tcaagccatg	ggagccgggg	gtacctgaag	tccgtaaccg	aaaggatcgg	1440
65	cctagggtaa	aactggtgac	tggggctaag	tcgtaacaag	gtaacc		1486

ES 2 863 913 T3

<210 > 7
 <211 > 1492
 5 <212 > ADN
 <213 > Parabacteroides merdae

<400 > 7

```

10      agagttttgat cctgggctcag gatgaacgct agcgacagggc ttaacacatg caagtcgagg 60
      ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgacacgggtg agtaacgcgt 120
      atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
      cagggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
15      cattagggcag ttggcgggggt aacggcccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag 300
      gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag 360
      gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct 420
      atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
      accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggaatac ggaggatgag 540
20      agcgttatcc ggattttattg ggttttaaagg gtgcgtagggt ggtgatttaa gtcagcgggtg 600
      aaagttttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
      gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
      gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
      attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
25      taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa 900
      ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata 960
      cgcgaggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctccctctag 1020
      caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
      taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
30      tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc 1200
      cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
      caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
      gaagctggat tcgctagttaa tcgcgcacga gccatggcgc ggtgaatacg ttcgggggcc 1380
35      ttgtacacac cgcccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtccg taaccgcaag 1440
      gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492
  
```

<210 > 8
 <211 > 1492
 40 <212 > ADN
 <213 > Parabacteroides merdae

<400 > 8

```

45      agagttttgat cctgggctcag gatgaacgct agcgacagggc ttaacacatg caagtcgagg 60
  
```

ES 2 863 913 T3

5	ggcagcatga	tttgtagcaa	tacagattga	tggcgaccgg	cgcacgggtg	agtaacgcgt	120
	atgcaactta	cctatcagag	ggggatagcc	cggcgaaaagt	cggattaata	ccccataaaa	180
	caggggttcc	gcatgggaat	atttgttaaa	gattcatcgc	tgatagatag	gcatgcgttc	240
	cattaggcag	ttggcggggt	aacggcccac	caaaccgacg	atggataggg	gttctgagag	300
	gaaggtcccc	cacattggta	ctgagacacg	gaccaaactc	ctacgggagg	cagcagtgag	360
10	gaatattggt	caatggccga	gaggctgaac	cagccaagtc	gcgtgaagga	agaaggatct	420
	atggtttgta	aacttctttt	atagggaat	aaagtggagg	acgtgtcctt	ttttgtatgt	480
	accctatgaa	taagcatcgg	ctaactccgt	gccagcagcc	gcgtaatac	ggaggatgcg	540
	agcgttatcc	ggattttattg	ggtttaaagg	gtgcgtaggt	ggtgatttaa	gtcagcgggtg	600
	aaagtttggt	gctcaaccat	aaaattgccg	ttgaaactgg	gttacttgag	tgtgtttgag	660
15	gtaggcggaa	tgcgtggtgt	agcggtgaaa	tgcatagata	tcacgcagaa	ctccgattgc	720
	gaaggcagct	tactaaacca	taactgacac	tgaagcacga	aagcgtgggg	atcaaacagg	780
	attagatacc	ctggtagtcc	acgcagtaaa	cgatgattac	taggagtttg	cgatacaatg	840
	taagctctac	agcgaagcgg	ttaagtaatc	cacctgggga	gtacgccggc	aacggtgaaa	900
	ctcaaaggaa	ttgacggggg	ccgcacaaag	cggagggaaca	tgtggtttaa	ttcgatgata	960
20	cgcgaggaac	cttaccgggg	tttgaacgta	gtctgaccgg	agtggaaaca	ctccttctag	1020
	caatagcaga	ttacgaggtg	ctgcatggtt	gtcgtcagct	cgtgccgtga	ggtgtcggct	1080
	taagtgccat	aacgagcgca	acccttatca	ctagttacta	acaggtgaag	ctgaggactc	1140
	tggtagact	gccagcgtaa	gctgtgagga	aggtggggat	gacgtcaaat	cagcacggcc	1200
25	cttacatccg	gggcgacaca	cgtgttacia	tggcatggac	aaagggcagc	tacctggcga	1260
	caggatgcta	atctccaaac	catgtctcag	ttcggatcgg	agtctgcaac	tcgactccgt	1320
	gaagctggat	tcgctagtaa	tcgcgcacat	gccatggcgc	ggtgaatacg	ttcccgggcc	1380
	ttgtacacac	cgcccgtaa	gccatgggag	ccgggggtac	ctgaagtccg	taaccgcaag	1440
	gatcggccta	gggtaaaact	ggtgactggg	gctaagtcgt	aacaaggtaa	cc	1492
30	<210 > 9						
	<211 > 1403						
	<212 > ADN						
	<213 > Parabacteroides distasonis						
35	<400 > 9						
40	amccgggtgg	cgaccggcgc	acgggtgagt	aacgcgtatg	caacttgcct	atcagagggg	60
	gataaaccgg	cgaaagtcgg	actaataccg	catgaagcag	ggatcccgc	tgggaatatt	120
	tgctaaagat	tcacgcgtga	tagataggca	tgcgttccat	taggcagttg	gcggggtaac	180
	ggcccaccaa	accgacgatg	gataggggtt	ctgagaggaa	ggtccccac	attggtagtg	240
	agacacggac	caaactccta	cgggaggcag	cagtgaaggaa	tattggtcaa	tgggcgtgag	300
45	cctgaaccag	ccaagtcgcg	tgagggatga	aggttctatg	gatcgtaaac	ctcttttata	360
	agggaaataa	gtgcgggacg	tgtcccgttt	tgtatgtacc	ttatgaataa	ggatcggcta	420
	actccgtgcc	agcagccgcg	gtaatacggg	ggatccgagc	gttatccgga	tttattgggt	480
	ttaaaggggtg	cgtaggcggc	cttttaagtc	agcggtgaaa	gtctgtggct	caaccataga	540
	attgccgttg	aaactgggag	gcttgagtat	gtttgaggca	ggcggaatgc	gtggtgtagc	600
50	ggtgaaatgc	atagatatca	cgcagaaccc	cgattgcgaa	ggcagcctgc	caagccatta	660
	ctgacgctga	tgcacgaaag	cgtggggatc	aaacaggatt	agataccctg	gtagtccacg	720
	cagtaaacga	tgatcactag	ctgtttgcga	tacactgtaa	gcggcacagc	gaaagcgtaa	780
	agtgatccac	ctggggagta	cgccggcaac	ggtgaaactc	aaaggaattg	acggggggcc	840
	gcacaagcgg	aggaacatgt	ggttttaattc	gatgatacgc	gaggaacctt	acccgggttt	900
55	gaacgcattc	ggacmgakgt	ggaaacacat	tttctagcaa	tagccatttg	cgaggtgctg	960
	catggttgtc	gtcagctcgt	gccgtgaggt	gtcggcttaa	gtgccataac	gtgcgcaacc	1020
	cttgccacta	gttactaaca	ggtaaagctg	aggactctgg	tgggactgcc	agcgtaaact	1080
	gcgaggaagg	cggggatgac	gtcaaatacag	cacggccctt	acatccgggg	cgacacacgt	1140
60	gttacaatgg	cgtggacaaa	gggaagccac	ctggcgacag	ggagcgaatc	cccaaaccac	1200
	gtctcagttc	ggatcggagt	ctgcaacccg	actccgtgaa	gctggattcg	ctagtaatcg	1260
	cgcacagccc	atggcgcggt	gaatacgttc	ccgggccttg	tacacaccgc	ccgtcaagcc	1320
	atgggagccg	ggggtacctg	aagtccgtaa	ccgcgaggat	cggcctaggg	taaaactggt	1380
	gactggggct	aagtcgtacg	ggg				1403
65							

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Parabacteroides distasonis*, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria, en donde el método comprende la administración de la composición al tracto gastrointestinal.
2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad inflamatoria no es enfermedad inflamatoria intestinal.
- 10 3. La composición para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la composición es para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste de asma; artritis; esclerosis múltiple; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondiloartritis anquilosante; espondiloartritis; soriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjertos.
- 15 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en donde la composición se para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria seleccionada del grupo que consiste de asma, artritis, esclerosis múltiple y uveítis.
- 20 5. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir el asma, como el asma neutrofílica o el asma alérgica, opcionalmente en donde la composición es para su uso en un método para reducir la neutrofilia o la eosinofilia en el tratamiento del asma.
- 25 6. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir la artritis reumatoide, opcionalmente en donde la composición es para su uso en un método para reducir la inflamación de las articulaciones en la artritis reumatoide.
- 30 7. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir la esclerosis múltiple, opcionalmente en donde la composición es para su uso en un método para reducir la incidencia de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad.
- 35 8. La composición para el uso de la reivindicación 4, en donde la composición es para su uso en un método para tratar o prevenir en donde la enfermedad inflamatoria es uveítis, opcionalmente en donde la composición es para su uso en un método para reducir o prevenir el daño retiniano en la uveítis.
- 40 9. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para su uso en un paciente con niveles elevados de células IL-17 o Th17, y/o en donde la composición es para su uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o la prevención de la enfermedad inflamatoria.
- 45 10. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 9, preferiblemente en donde la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 9, más preferiblemente en donde la cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 9, más preferiblemente en donde la cepa bacteriana es de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382.
- 50 11. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la composición es para administración oral y/o en donde la composición comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables y/o en donde la cepa bacteriana está liofilizada.
- 55 12. La composición para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el método comprende la administración de la composición al tracto gastrointestinal por vía oral; a través de un tubo, como un tubo nasogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo en J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG); o un puerto, como un puerto de la pared torácica; preferiblemente en donde el método comprende la administración de la composición al tracto gastrointestinal por vía oral.
- 60 13. Un producto alimenticio o una composición de vacuna que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1, o 7-12, para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, o 7-12.
- 65 14. Una composición que comprende una cepa bacteriana de *Parabacteroides distasonis* que tiene una secuencia de ARNr 16s por lo menos un 99,5% idéntica a la SEQ ID NO: 9, para su uso en terapia, en donde la terapia comprende la administración de la composición al tracto gastrointestinal.

15. La composición de la reivindicación 14, en donde la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s por lo menos un 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 9, preferiblemente en donde la cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 9, más preferiblemente en donde la cepa es de la cepa *Parabacteroides distasonis* depositada con el número de acceso NCIMB 42382.

5 16. La composición de la reivindicación 14 o 15, en donde la composición es para administración oral, y/o en donde la composición comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables, y/o en donde la cepa bacteriana está liofilizada; opcionalmente en donde la composición es para su uso en un método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, o 7-9.

10

FIG. 1

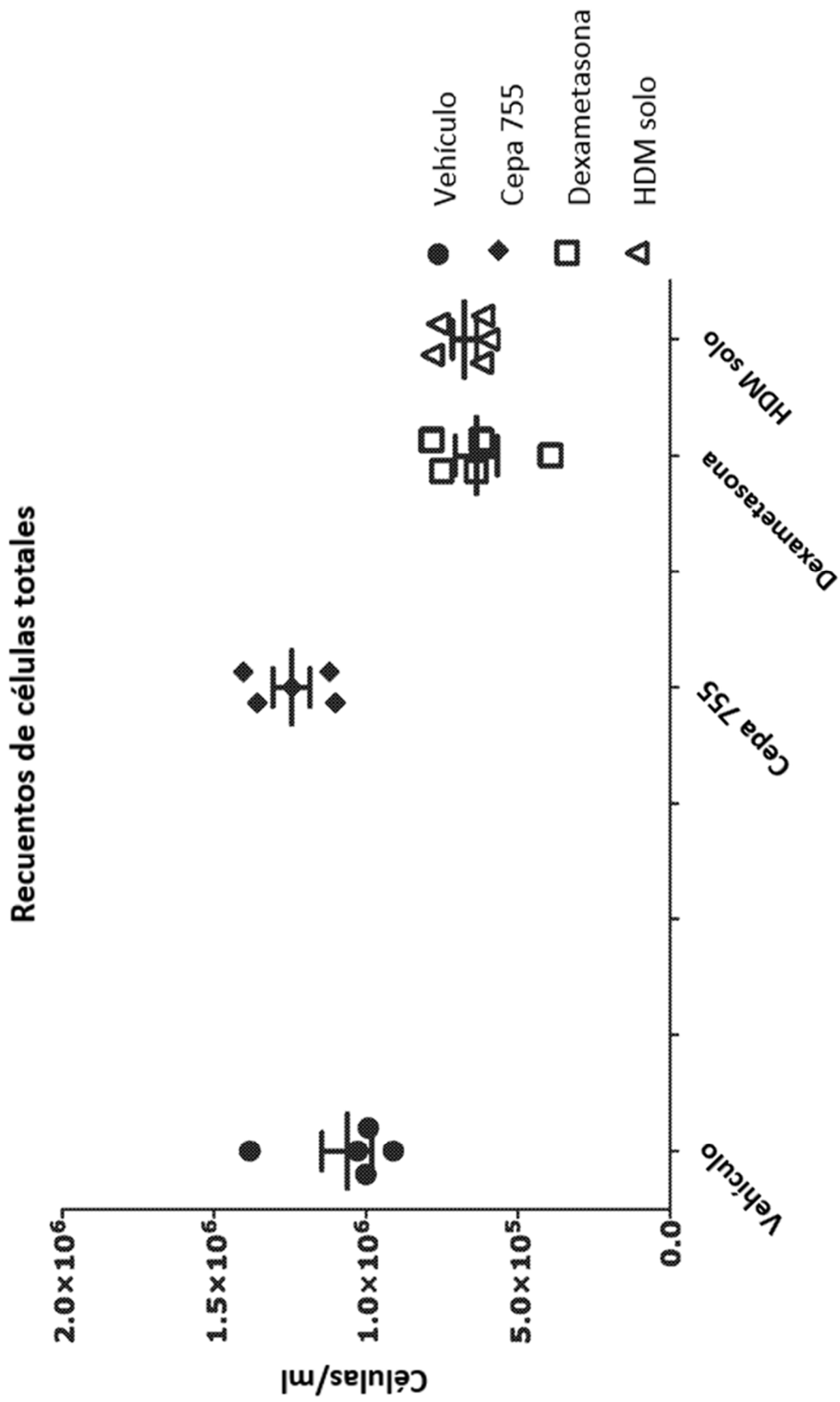
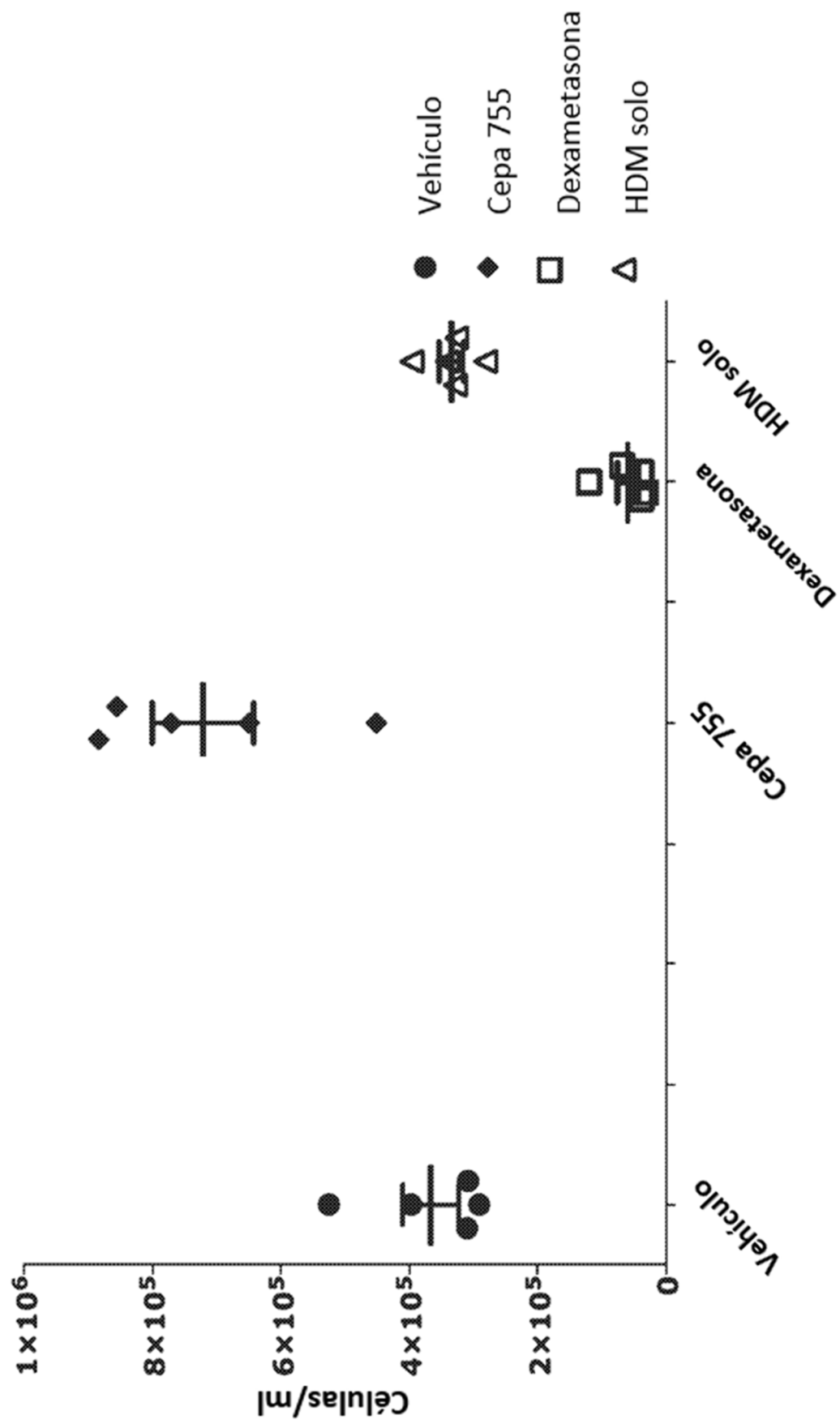


FIG. 2
Eosinófilos totales



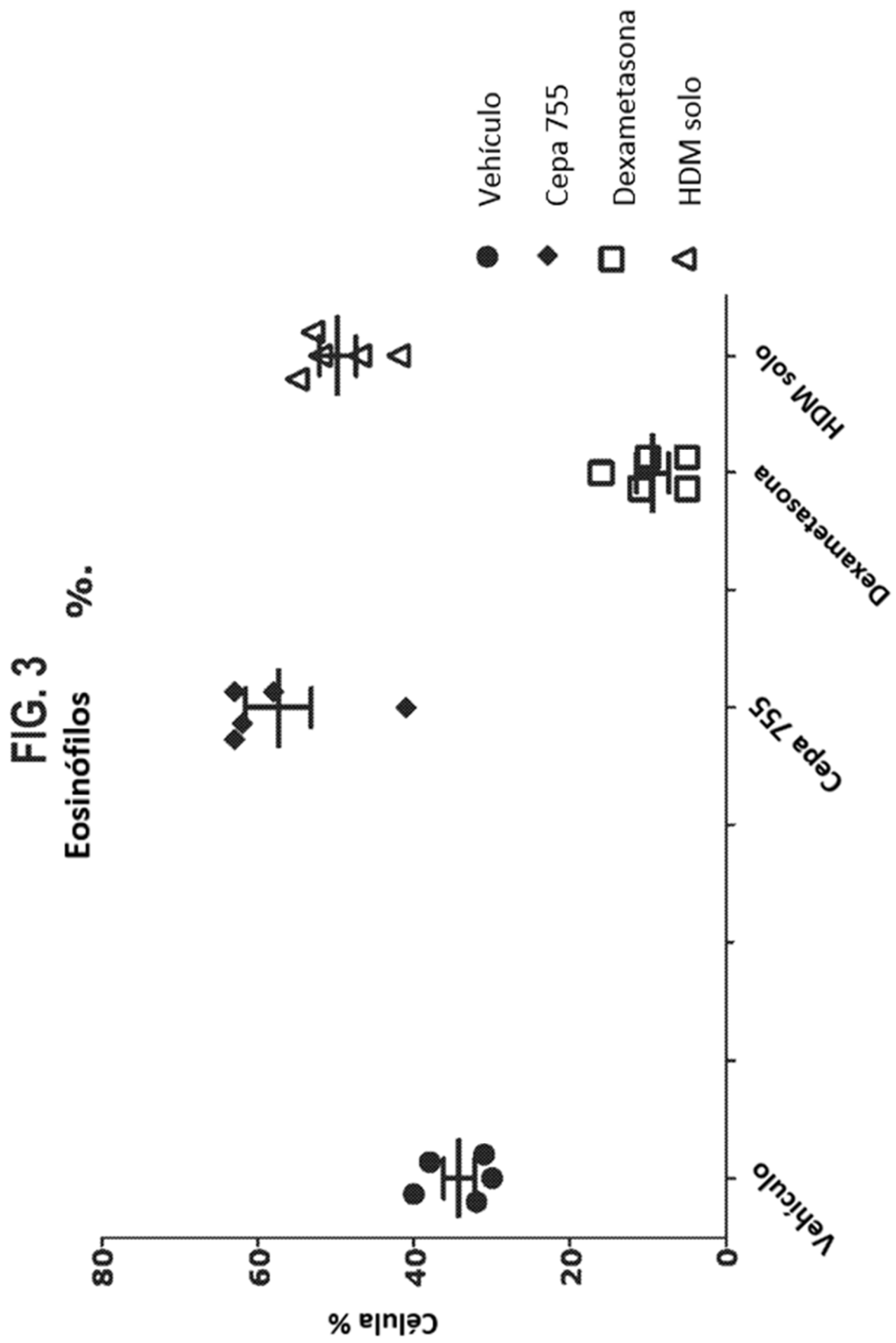
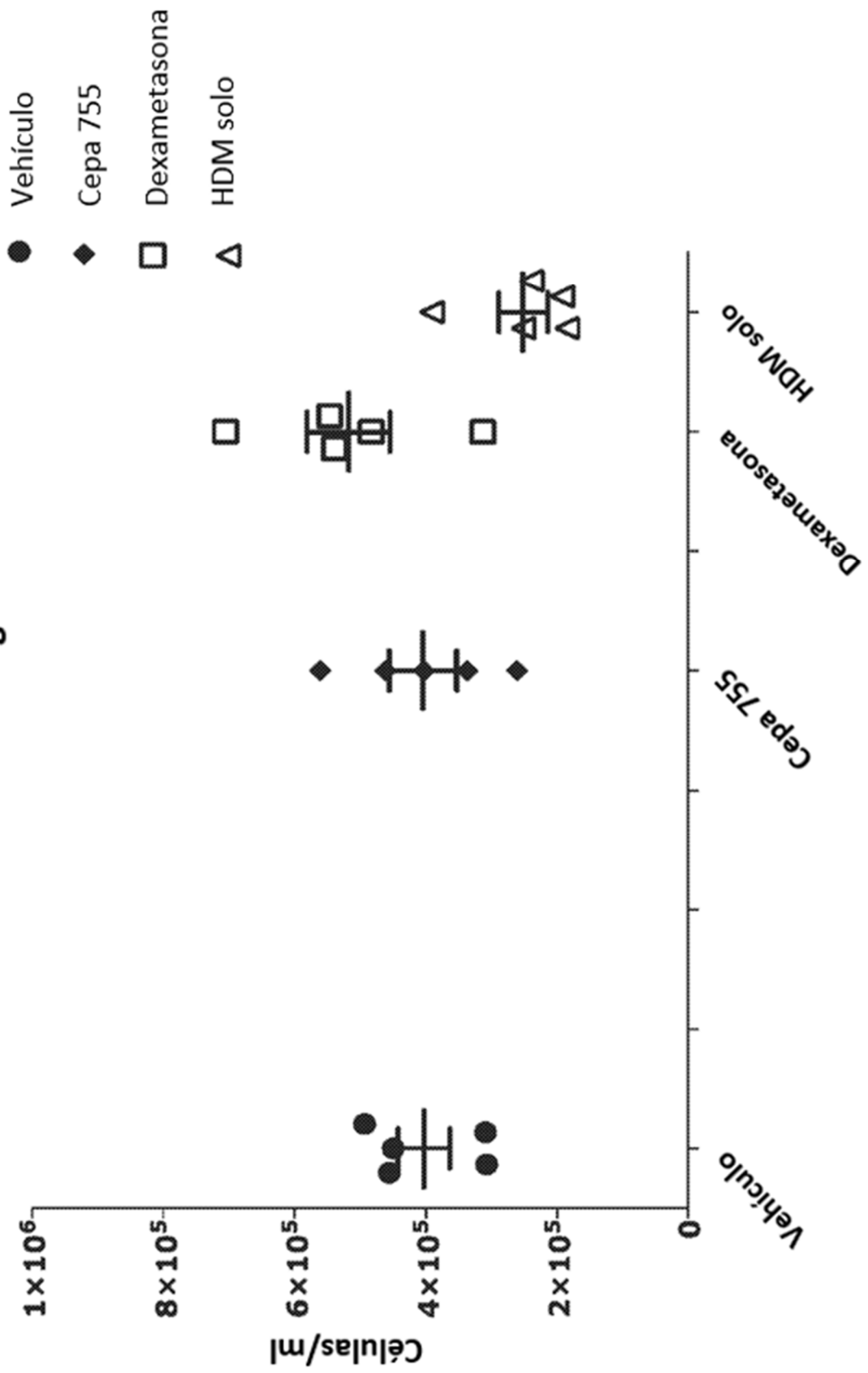
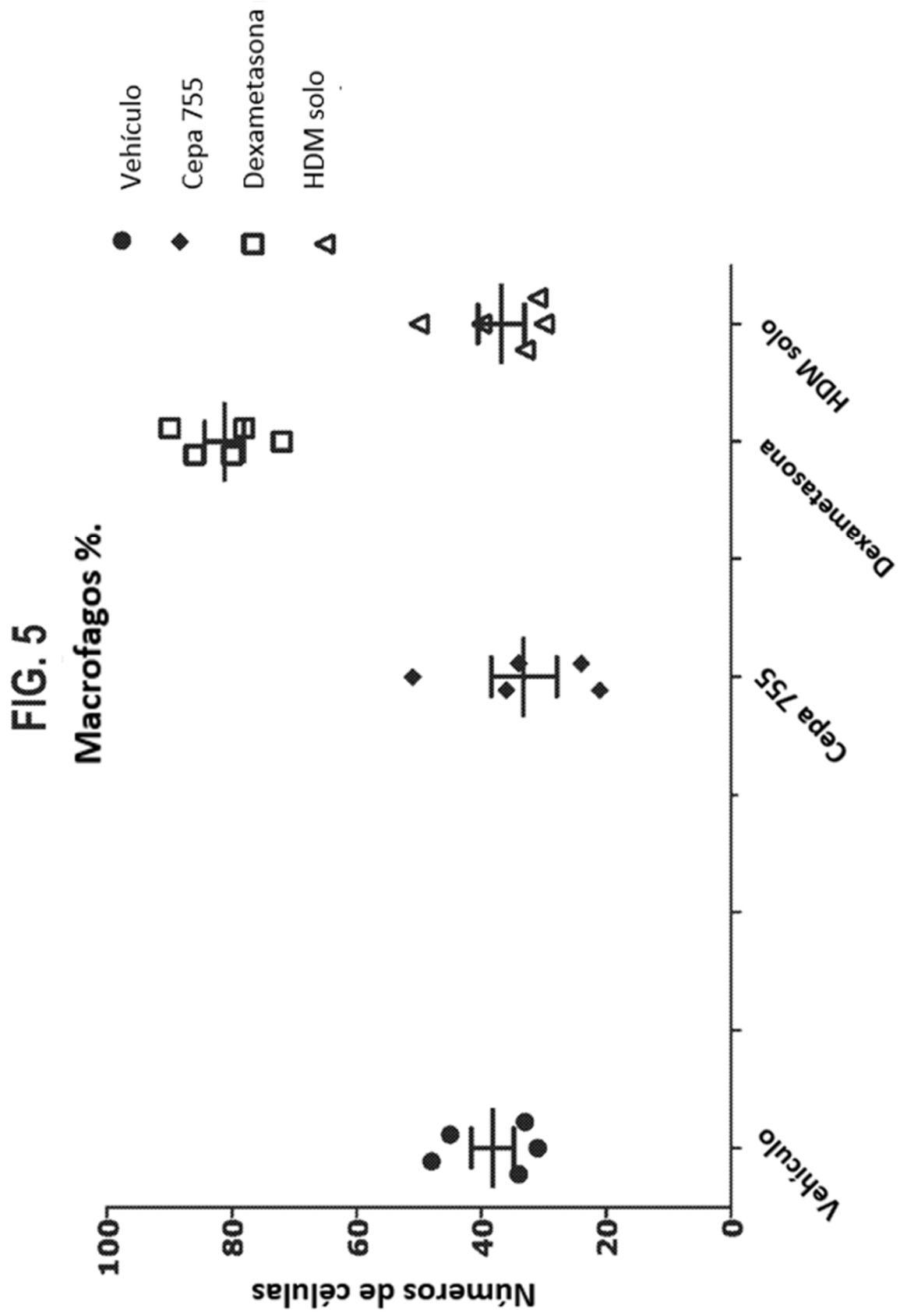


FIG. 4
Macrofagos totales





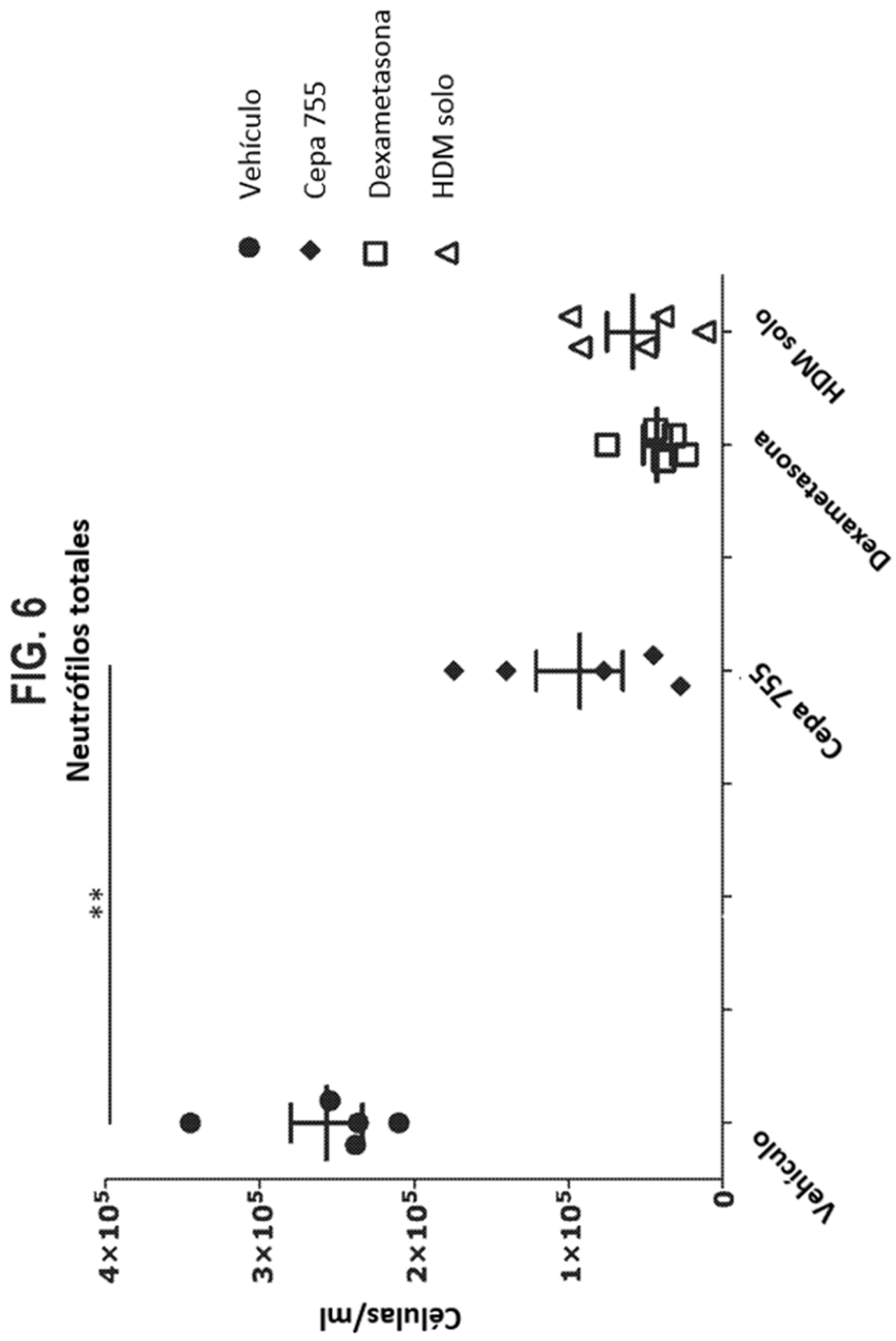


FIG. 7
Neutrófilos %.

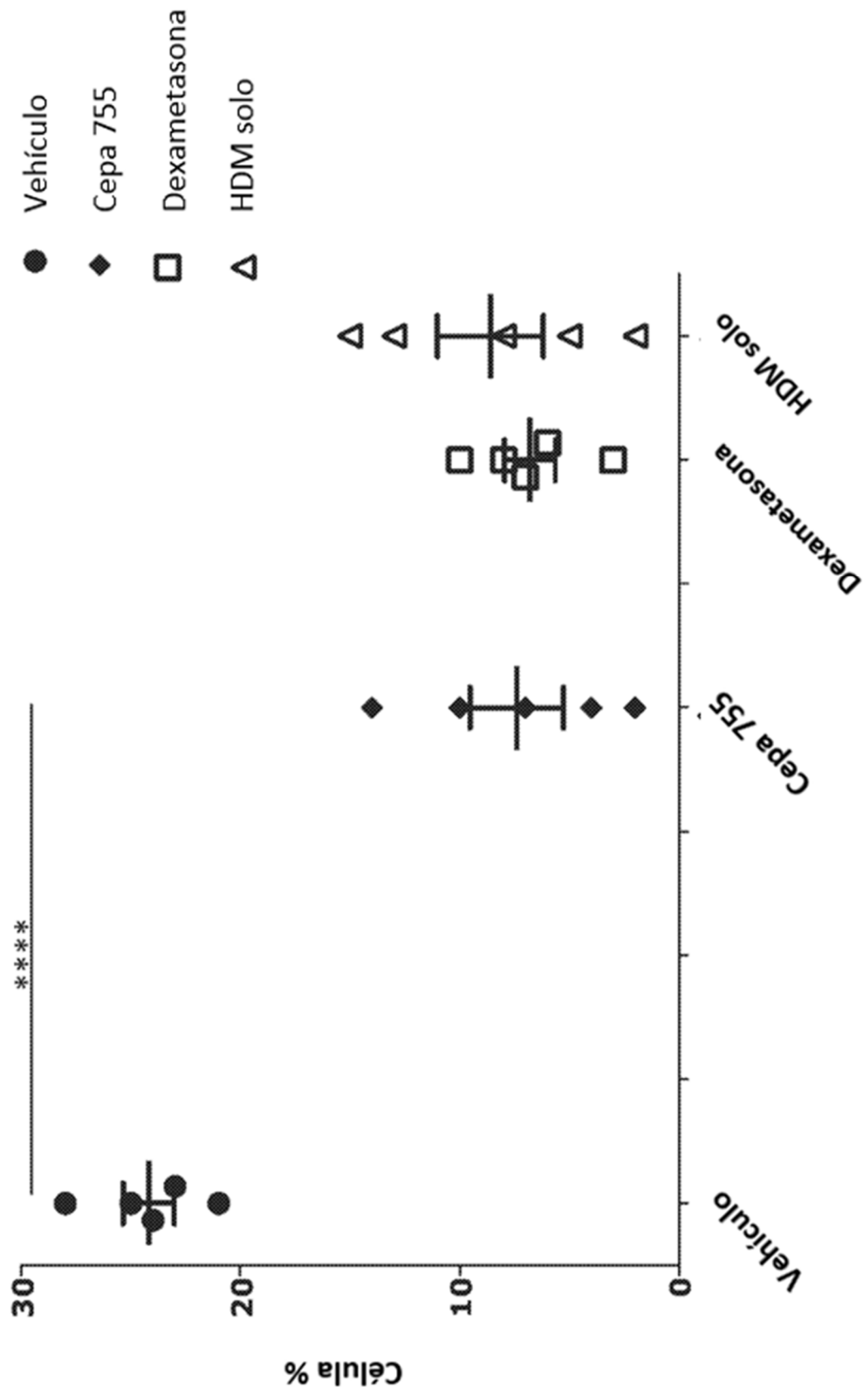
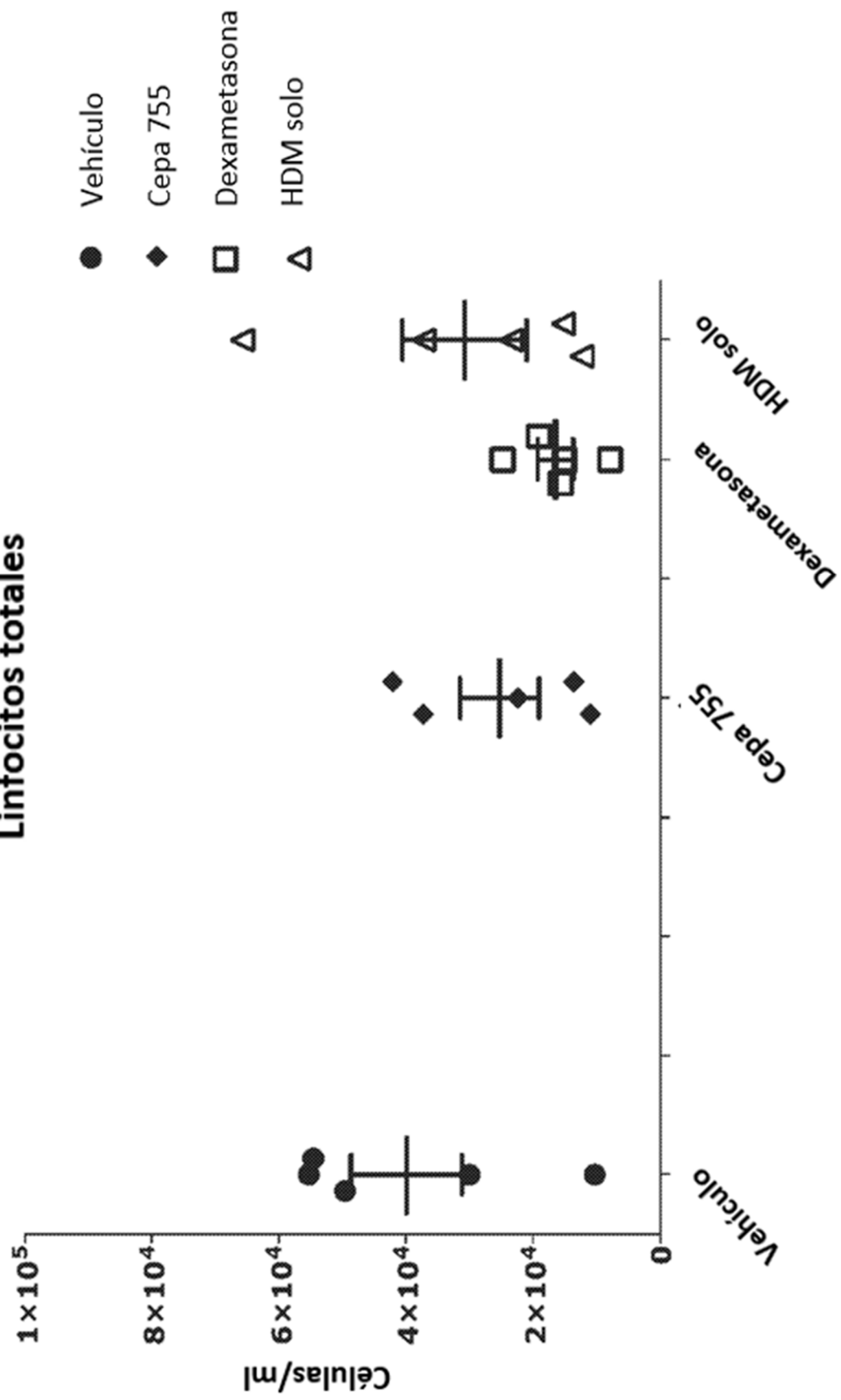


FIG. 8
Linfocitos totales



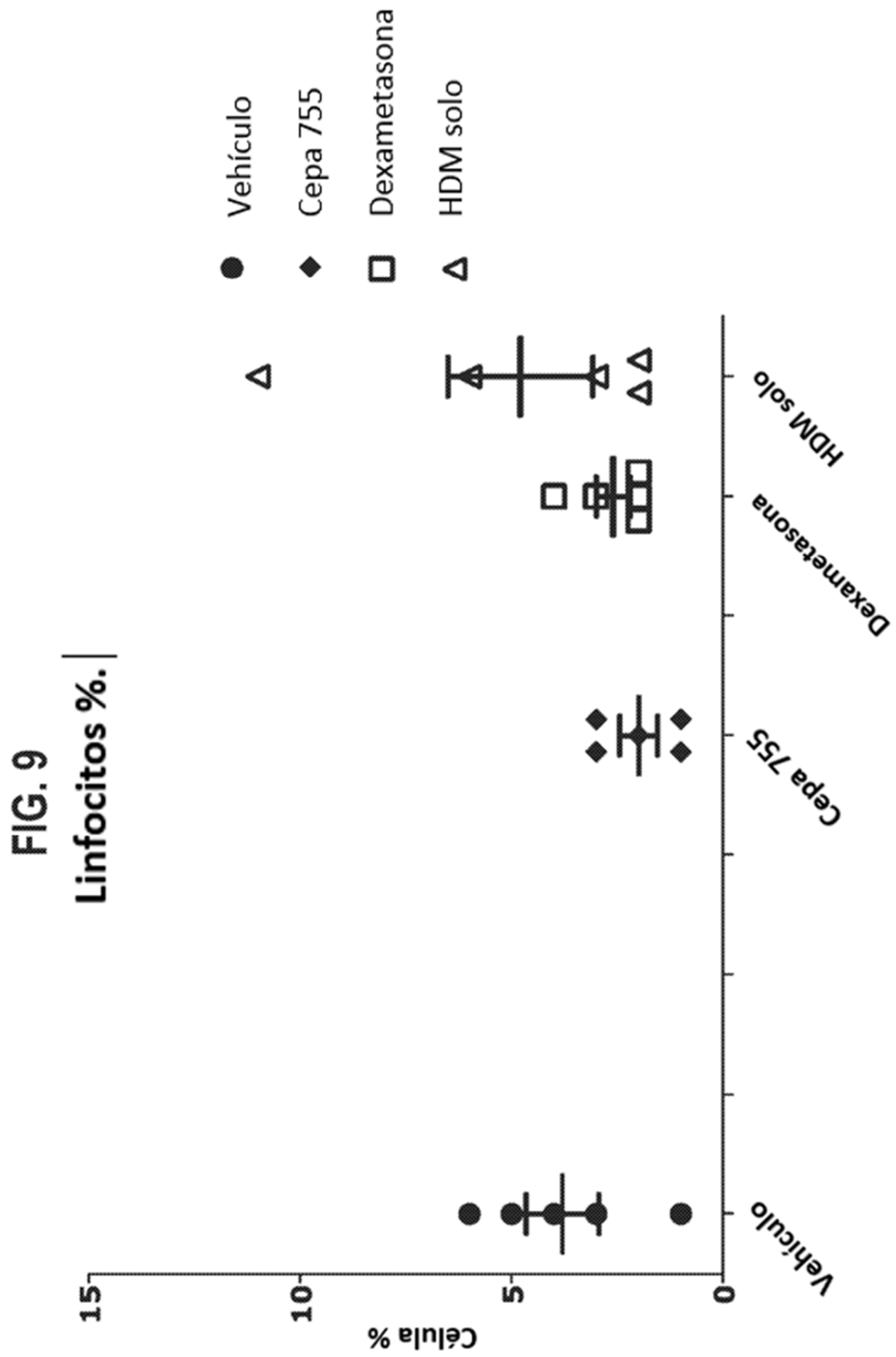


FIG. 10

Recuentos totales de células

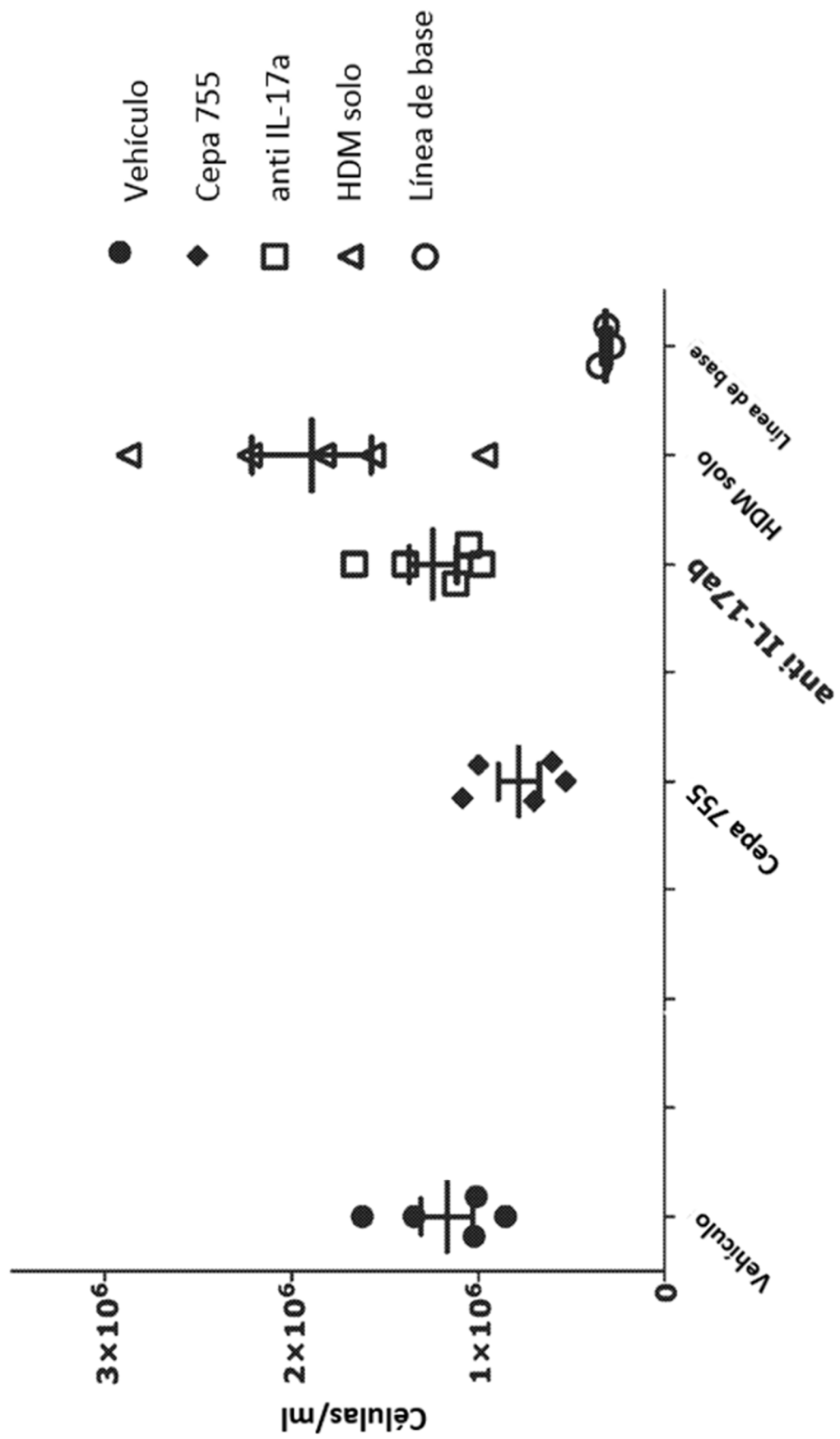
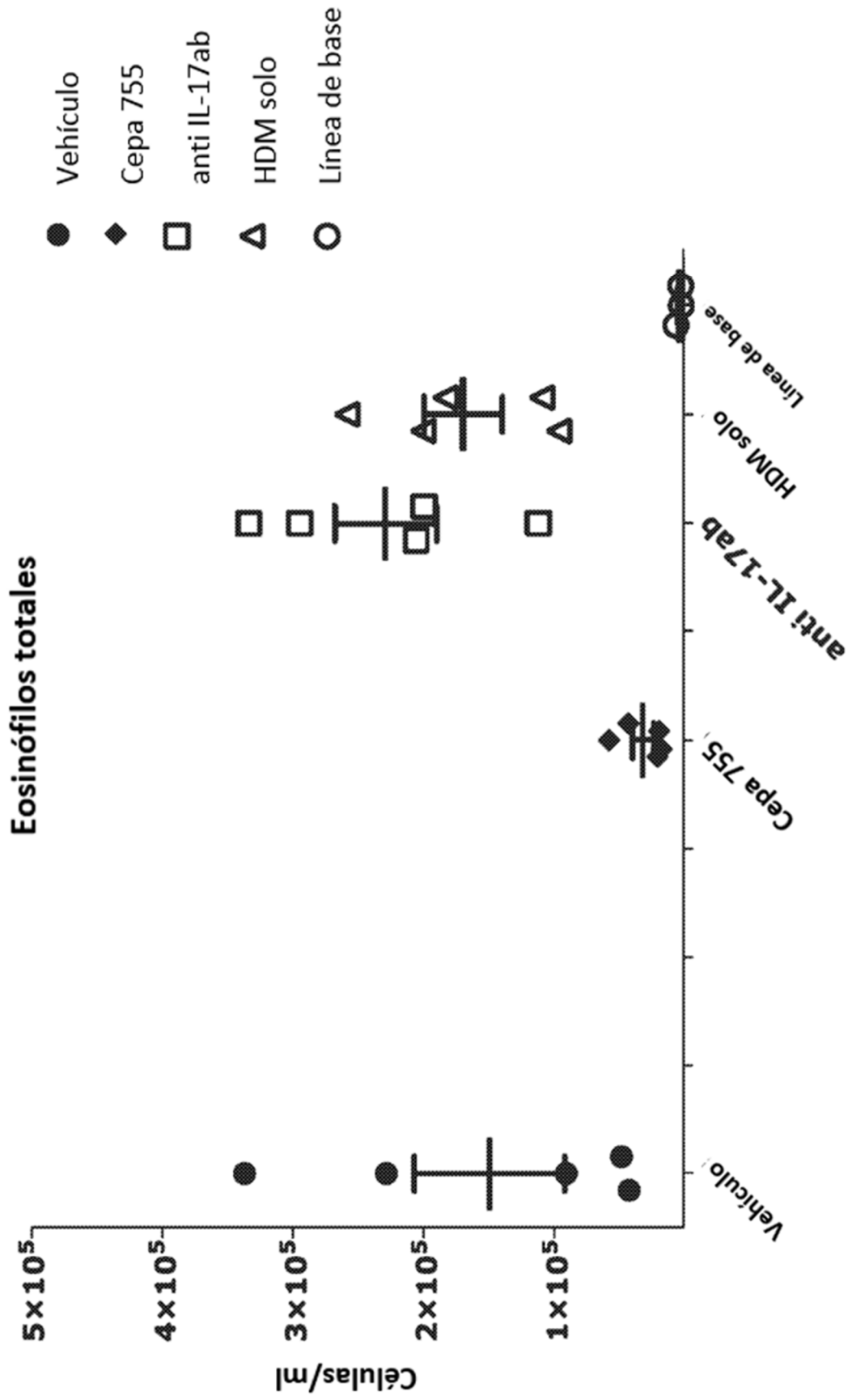


FIG. 11



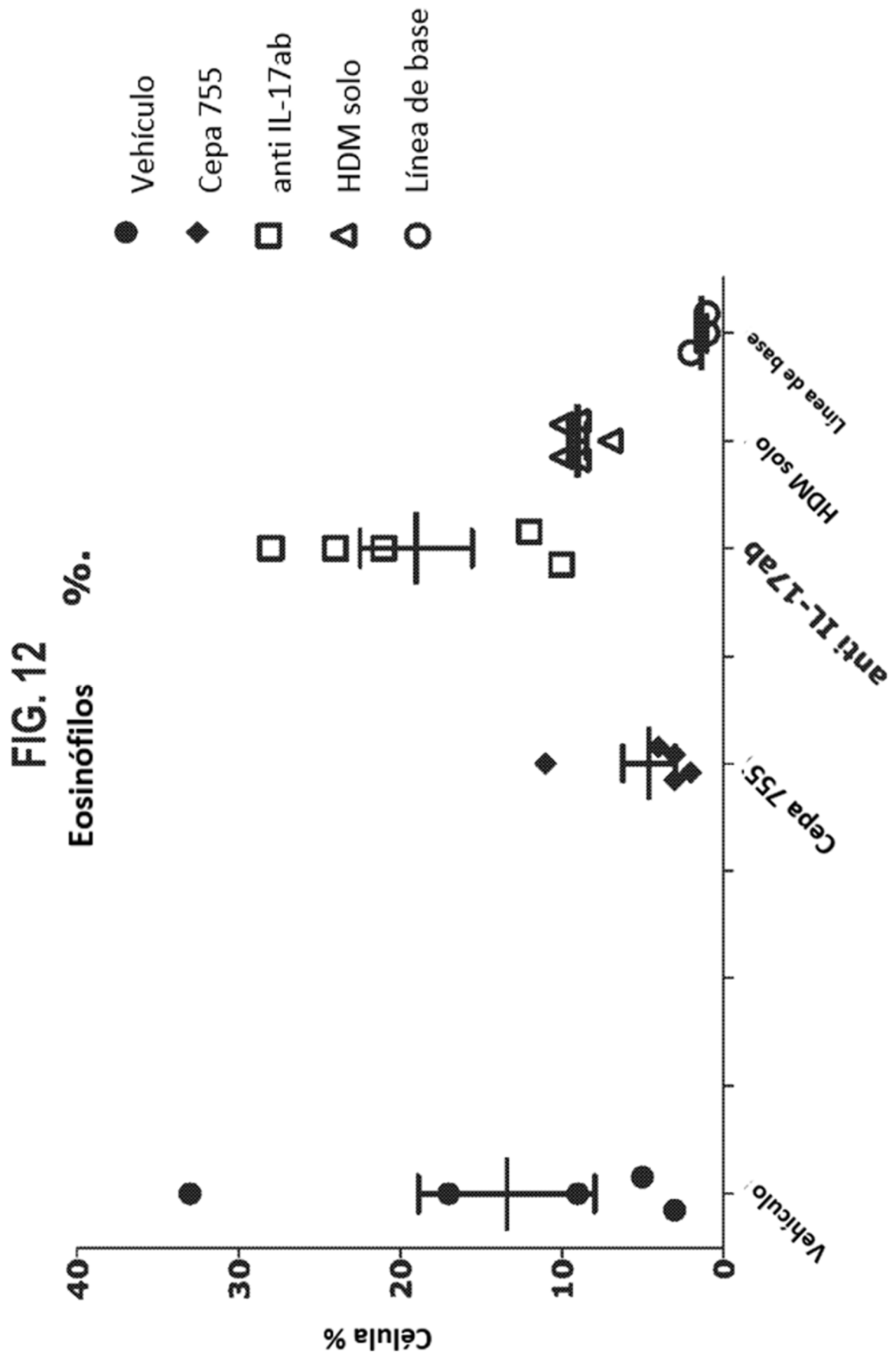


FIG. 13

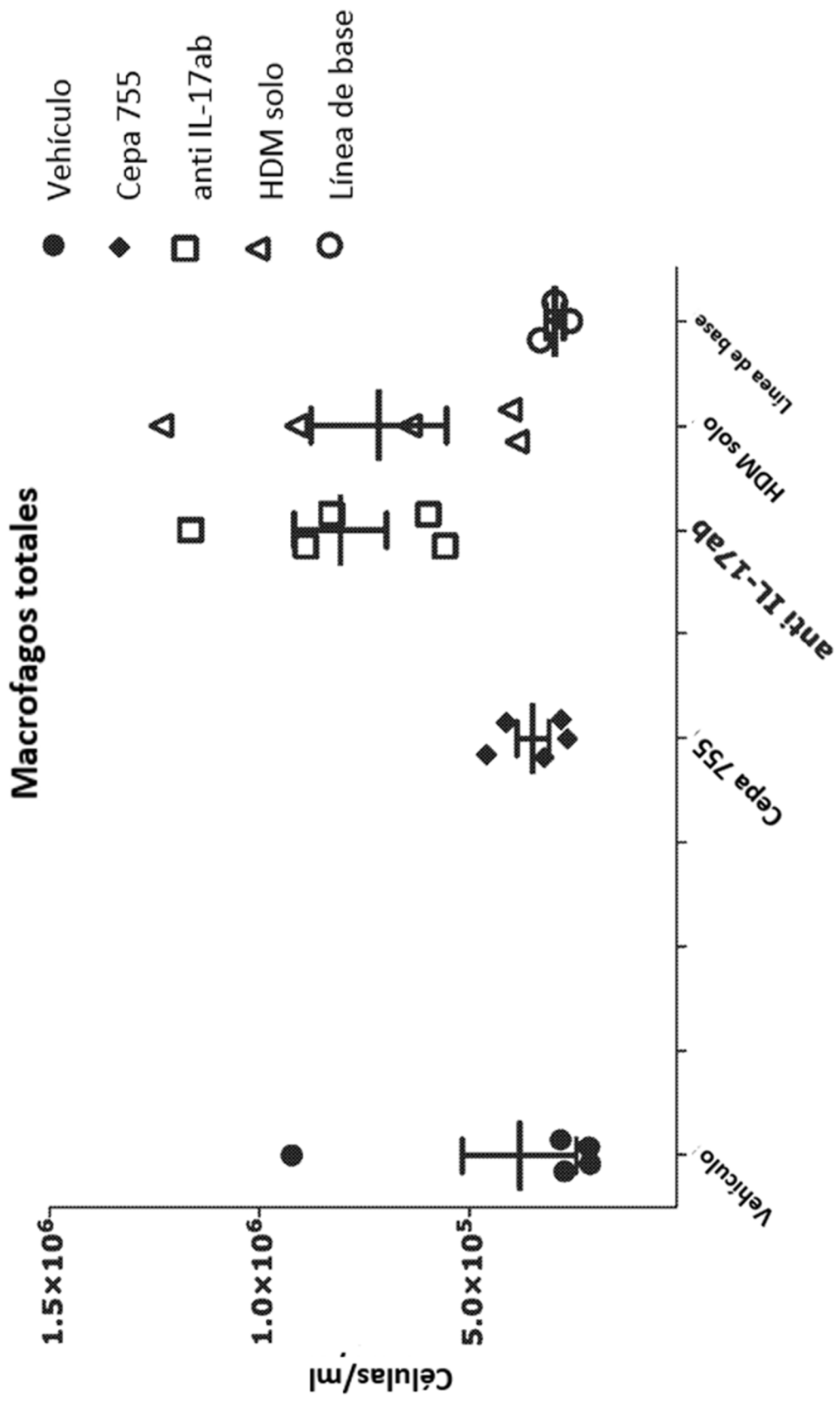


FIG. 14
Macrofagos %.

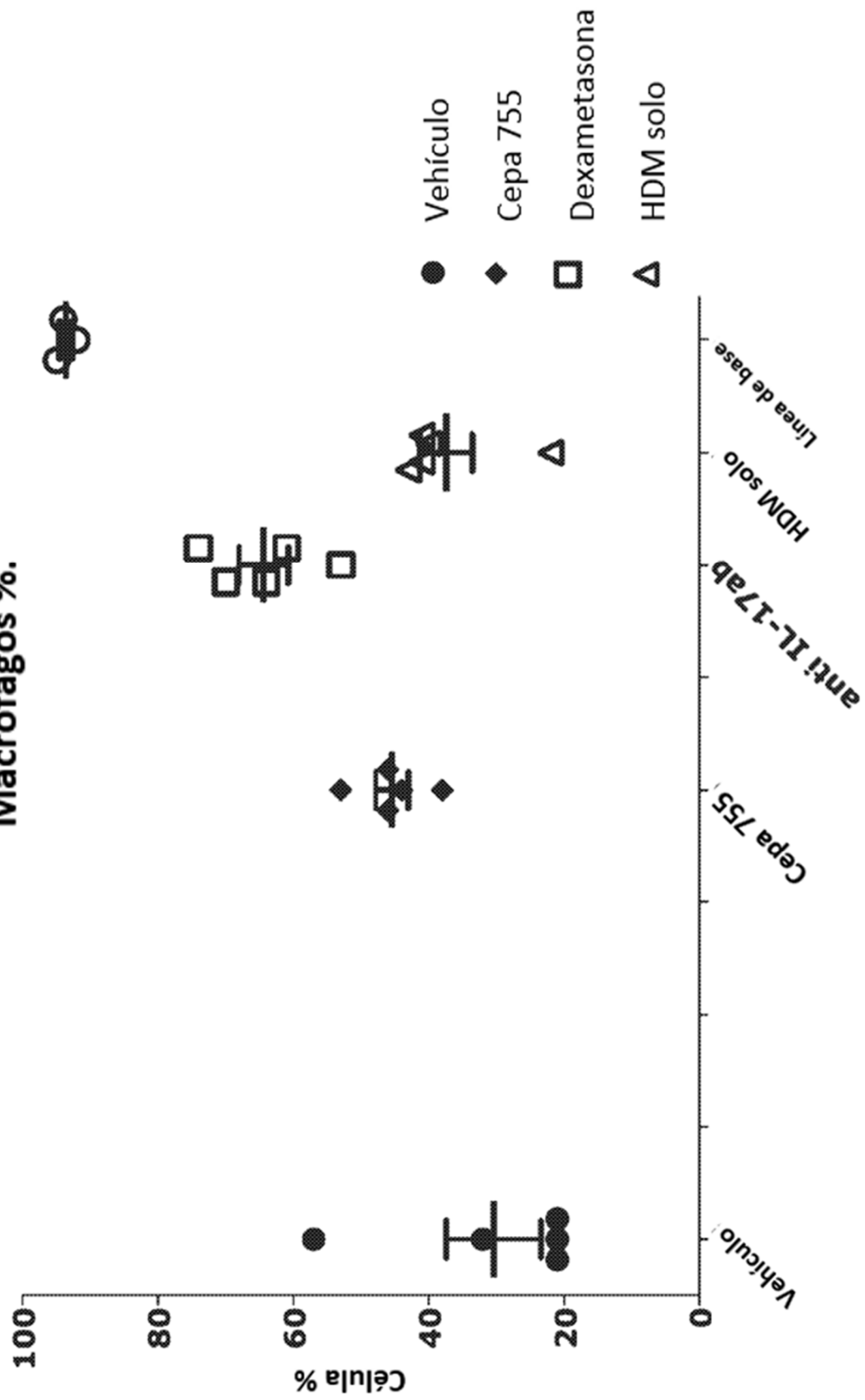


FIG. 15

Neutrófilos totales

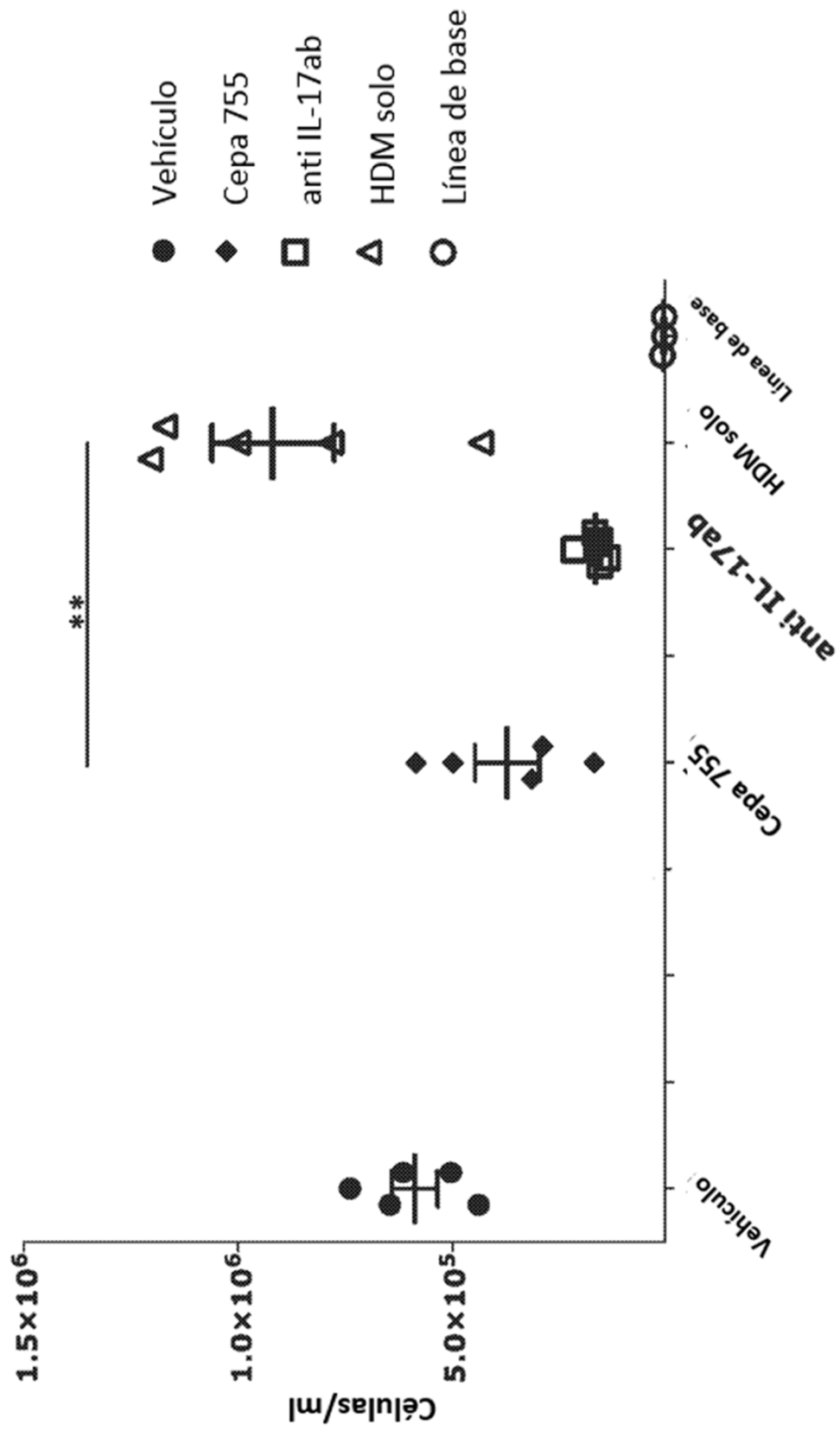


FIG. 16
Neutrófilos %.

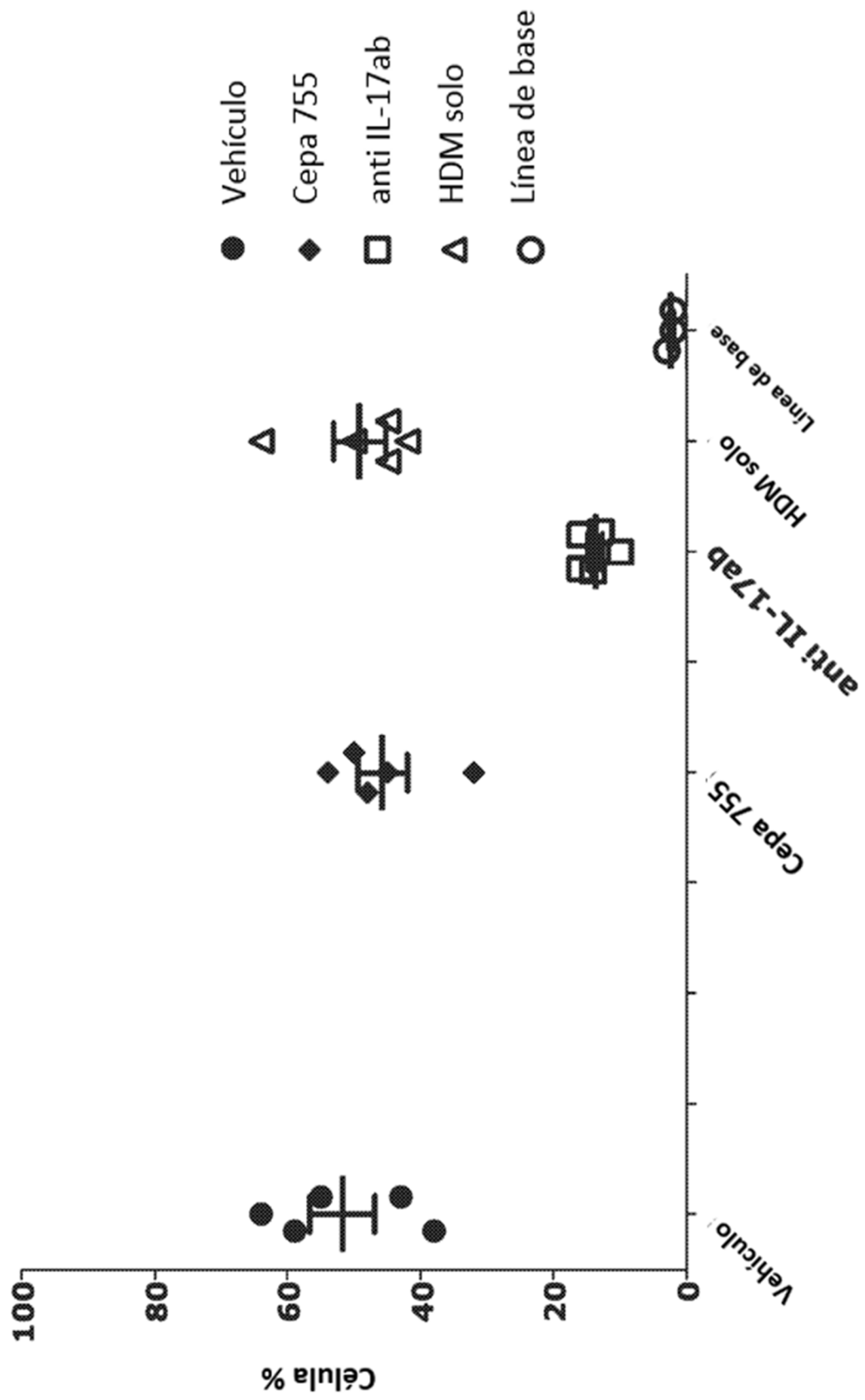
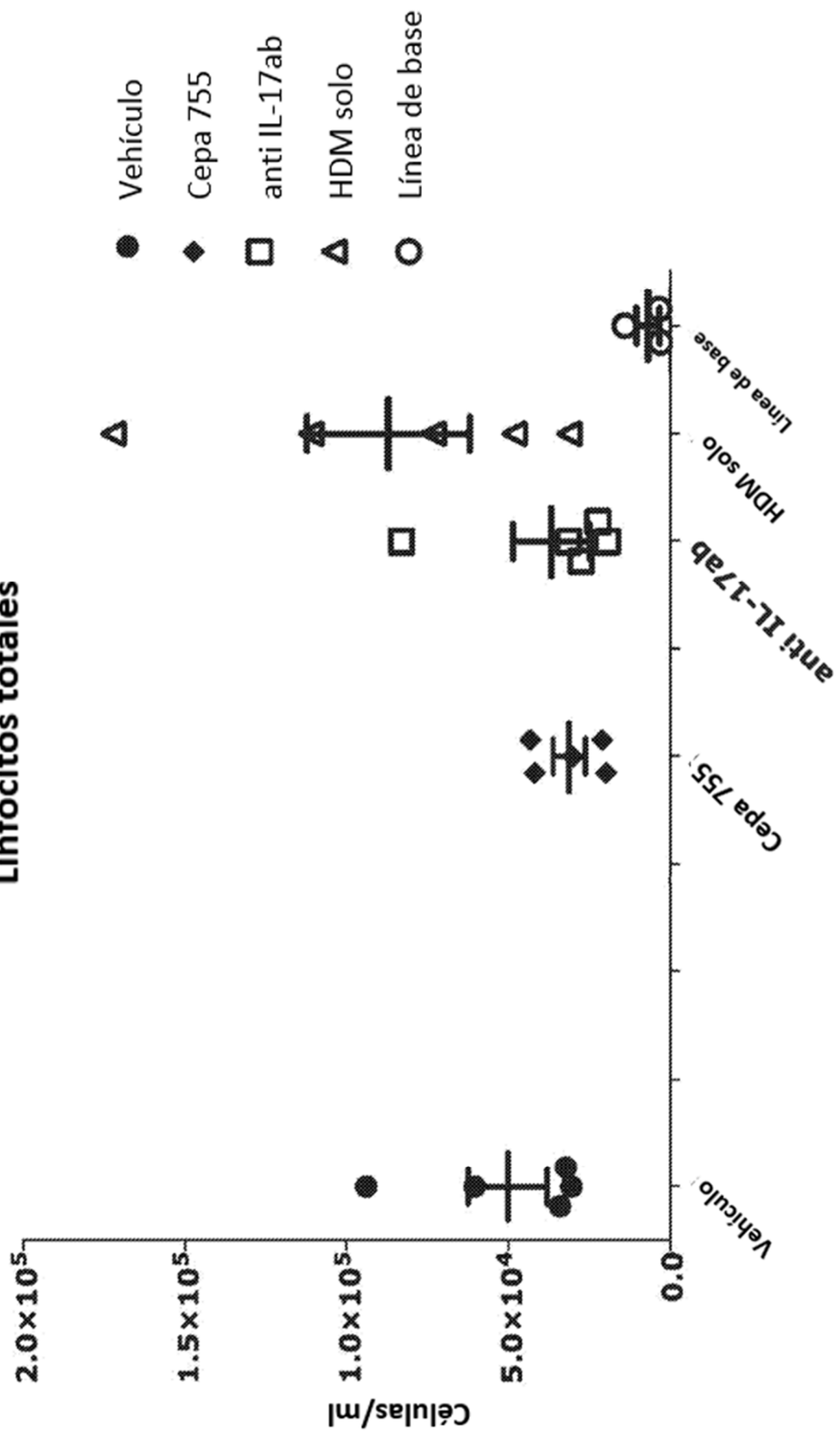


FIG. 17
Linfocitos totales



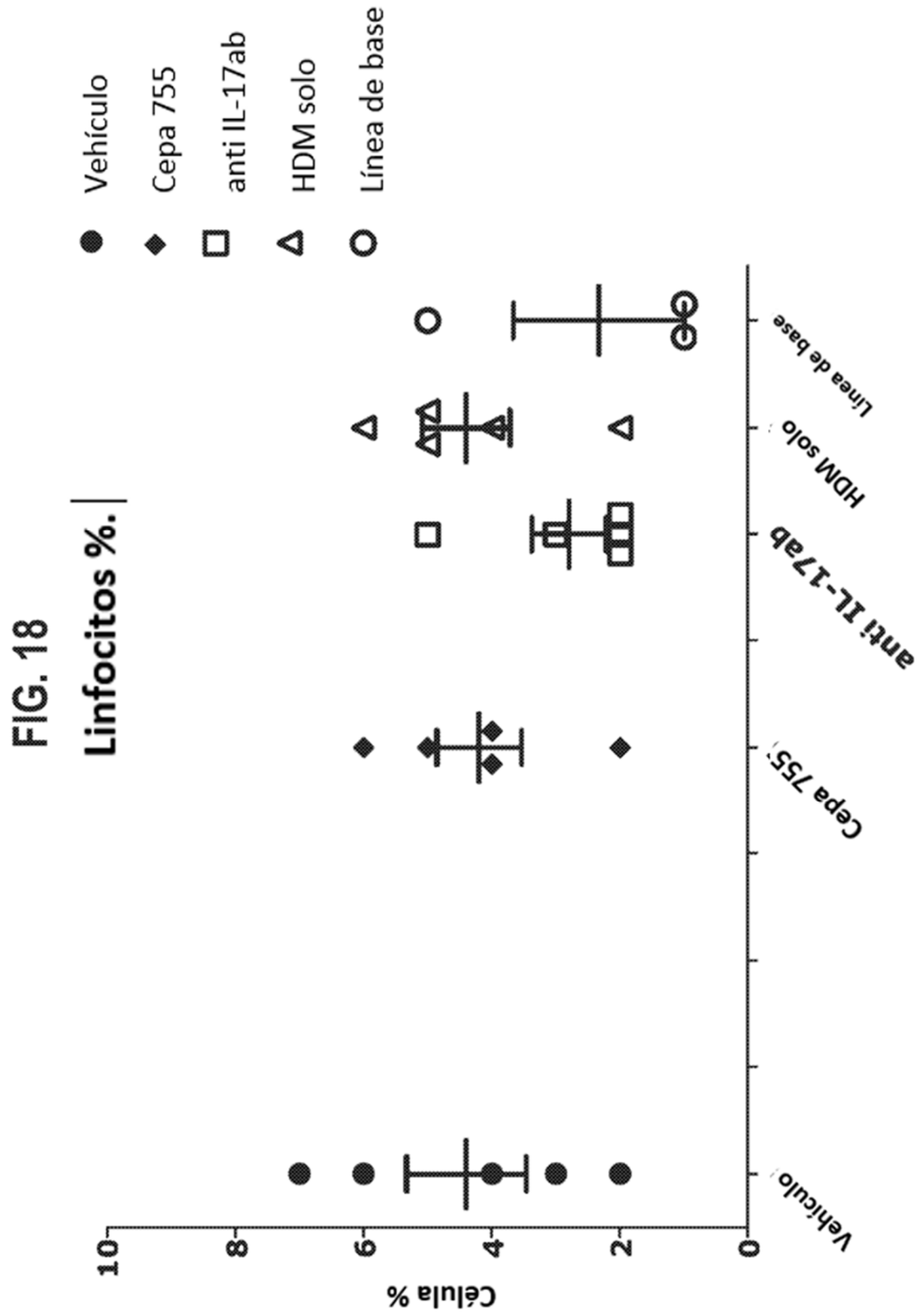


FIG. 19 Pesos corporales

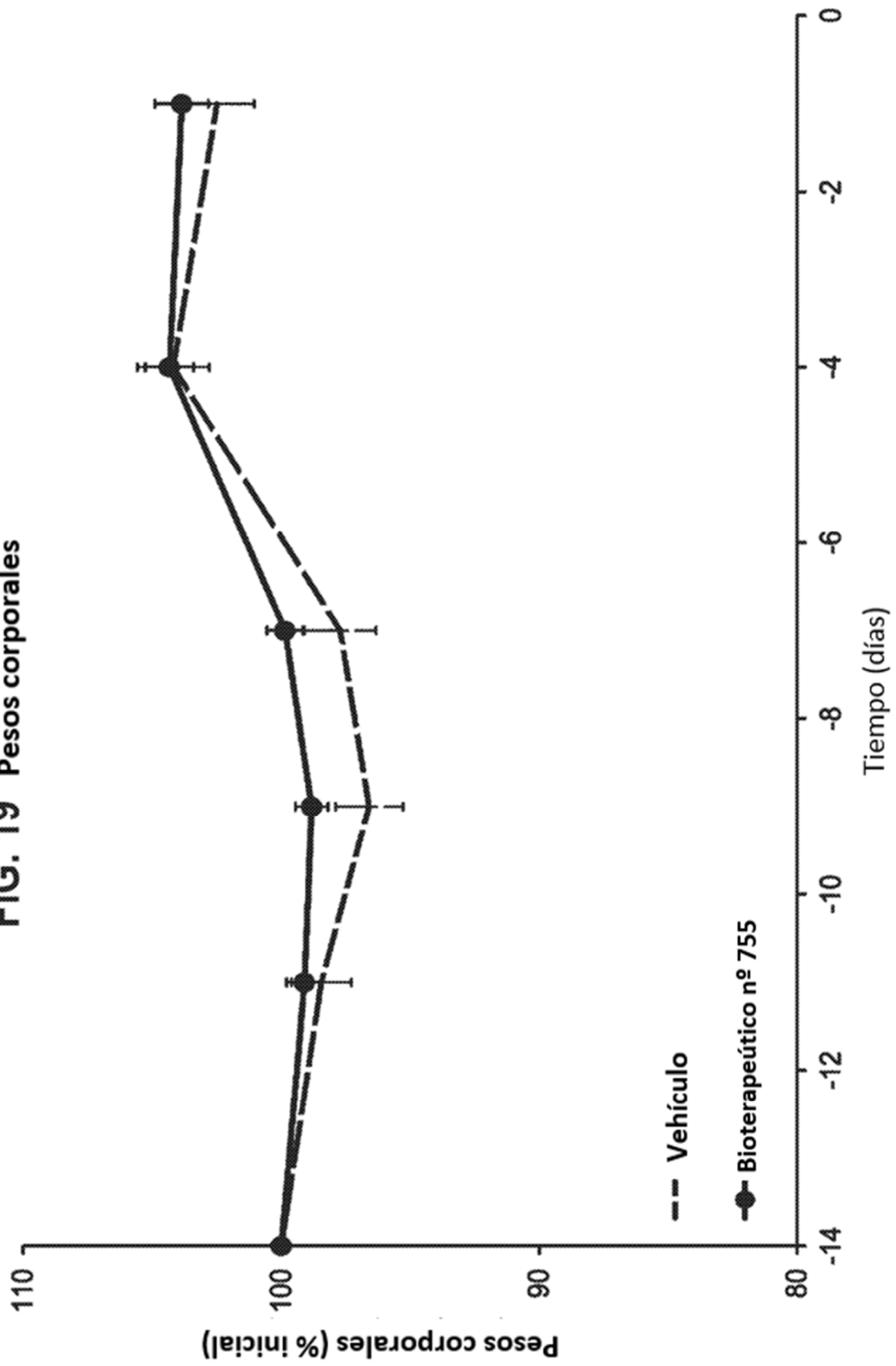


FIG. 20
Pesos corporales

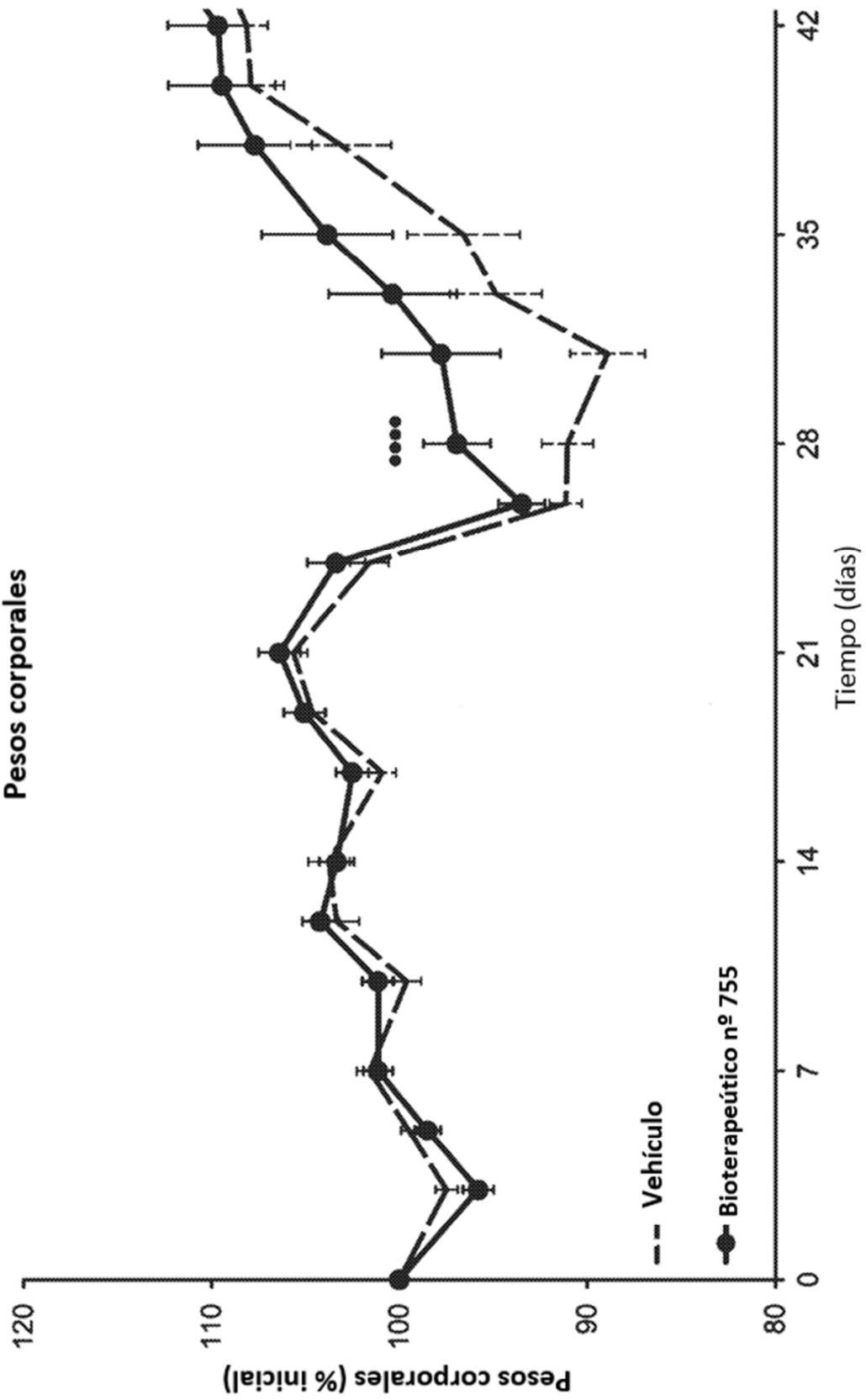


FIG. 21

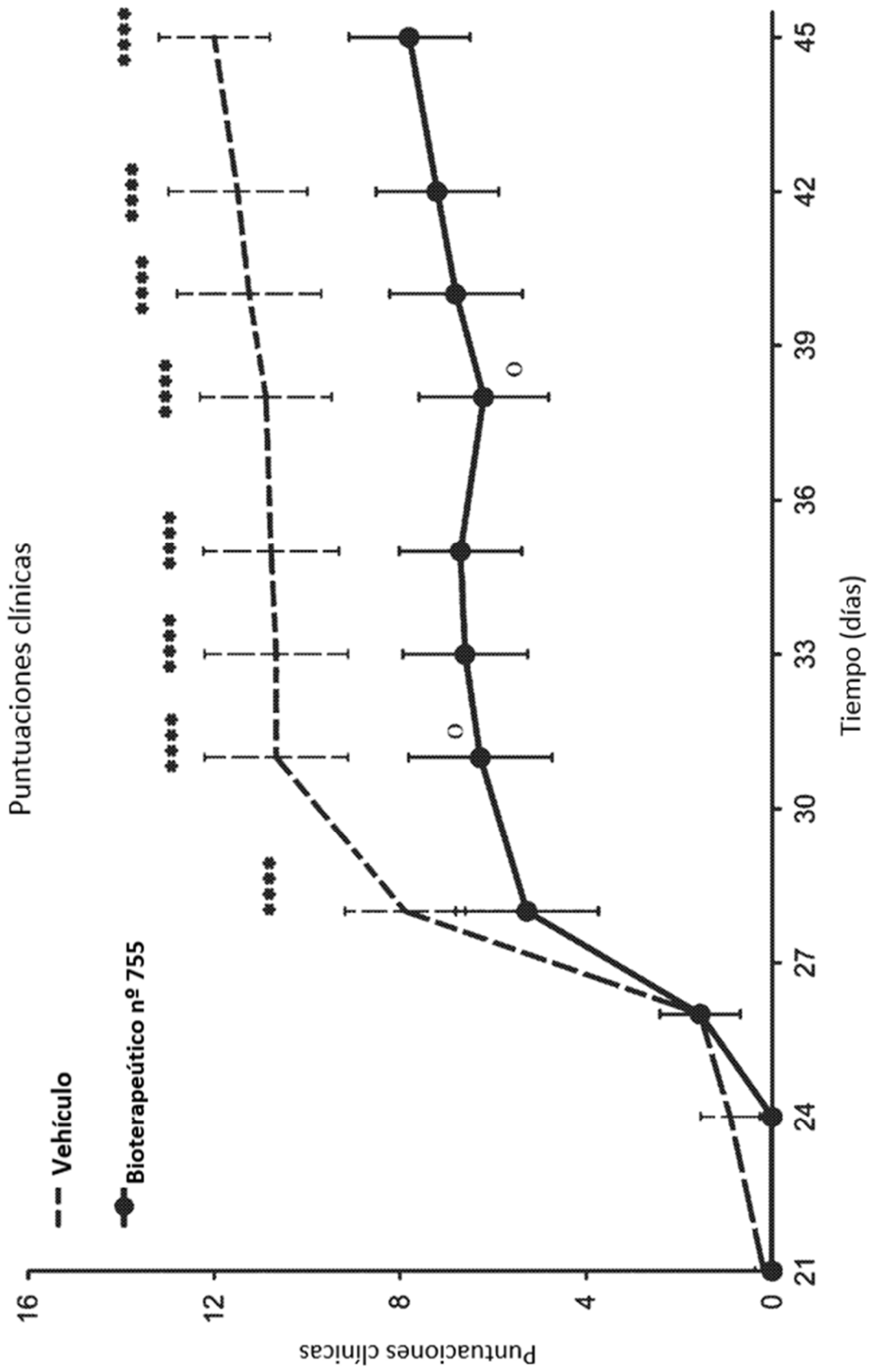


FIG. 23

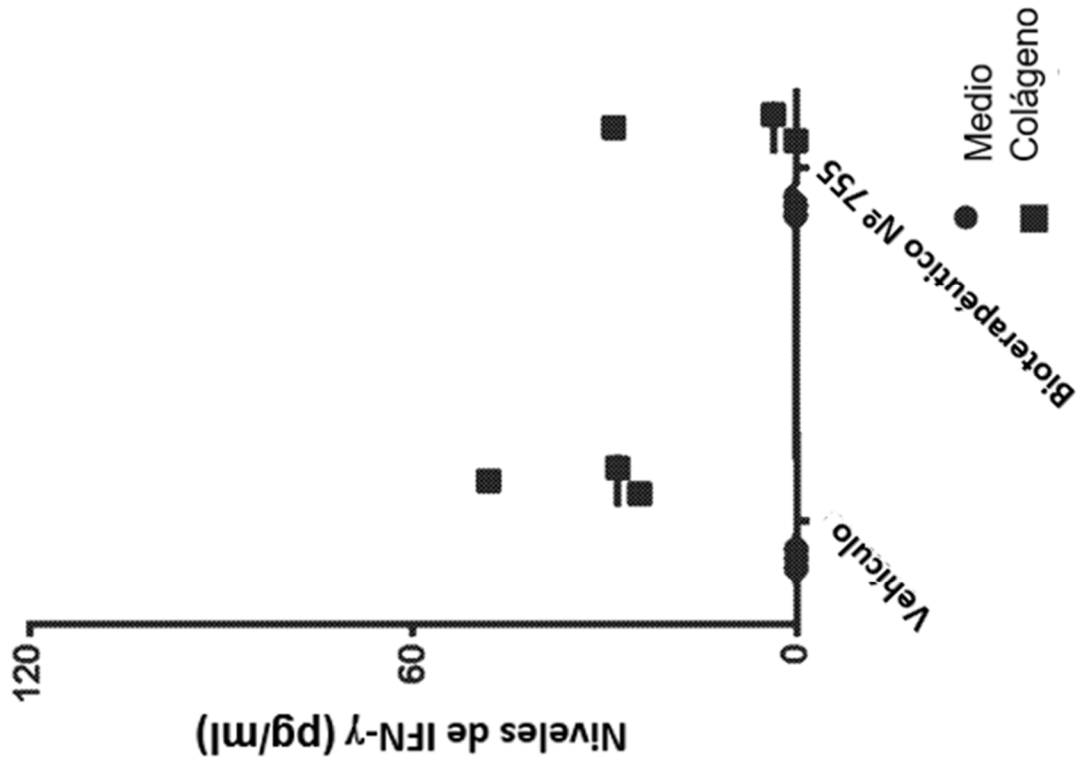
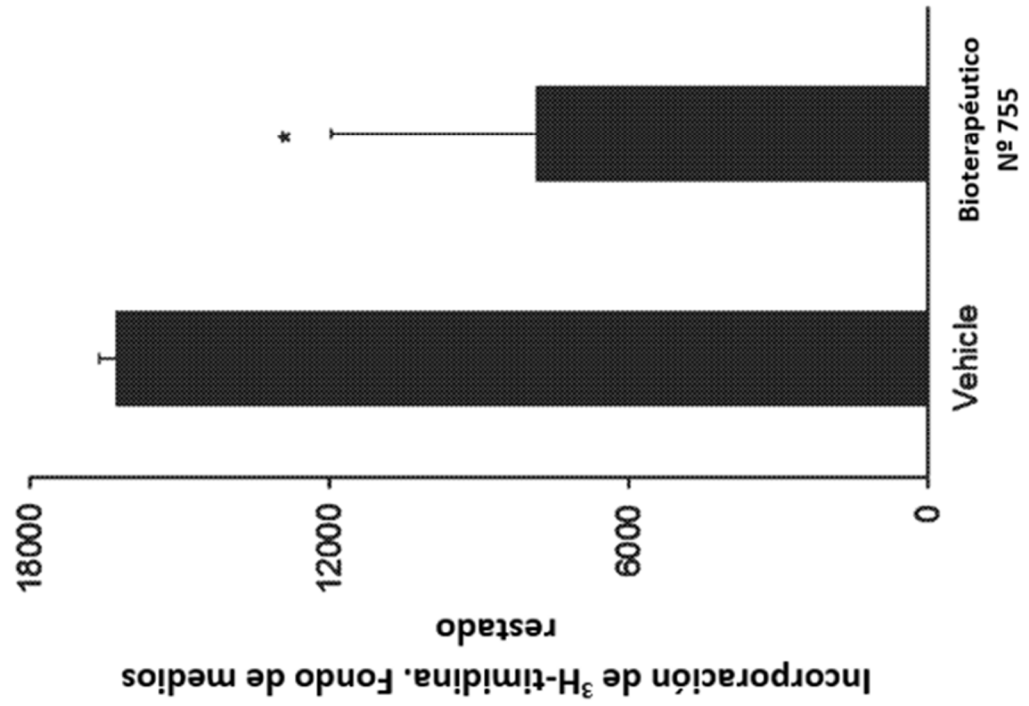
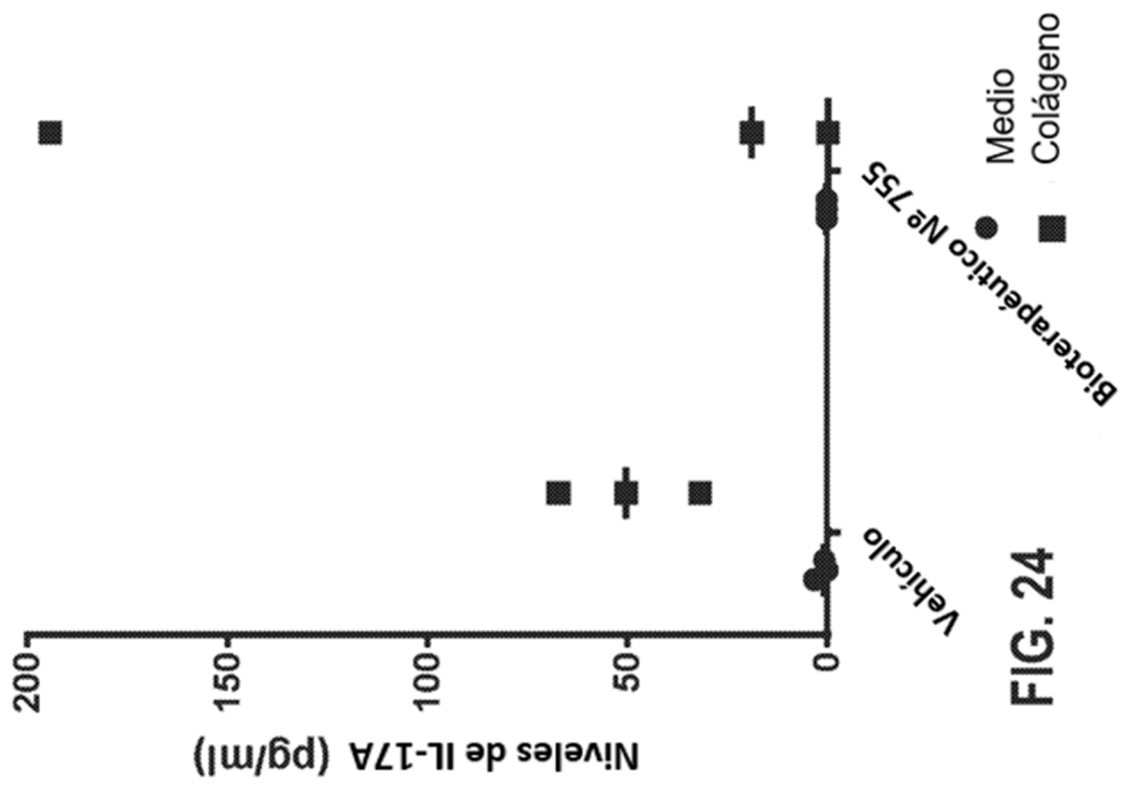
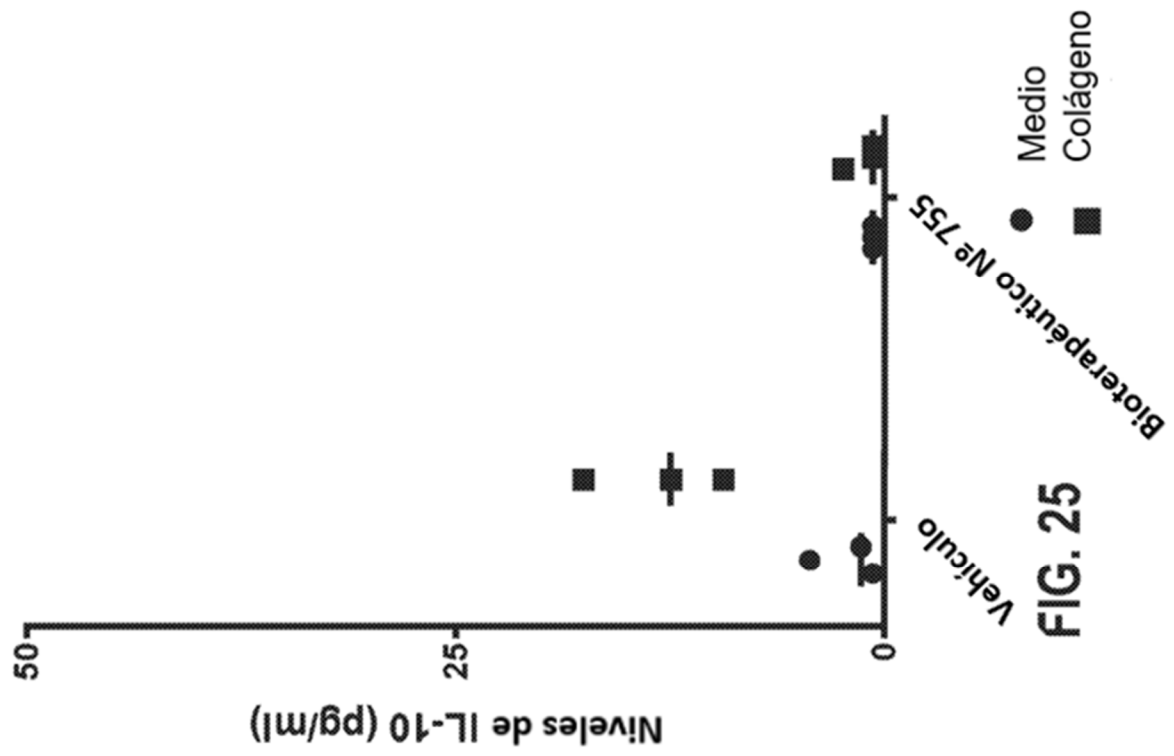


FIG. 22

Proliferación de esplenocitos a colágeno II





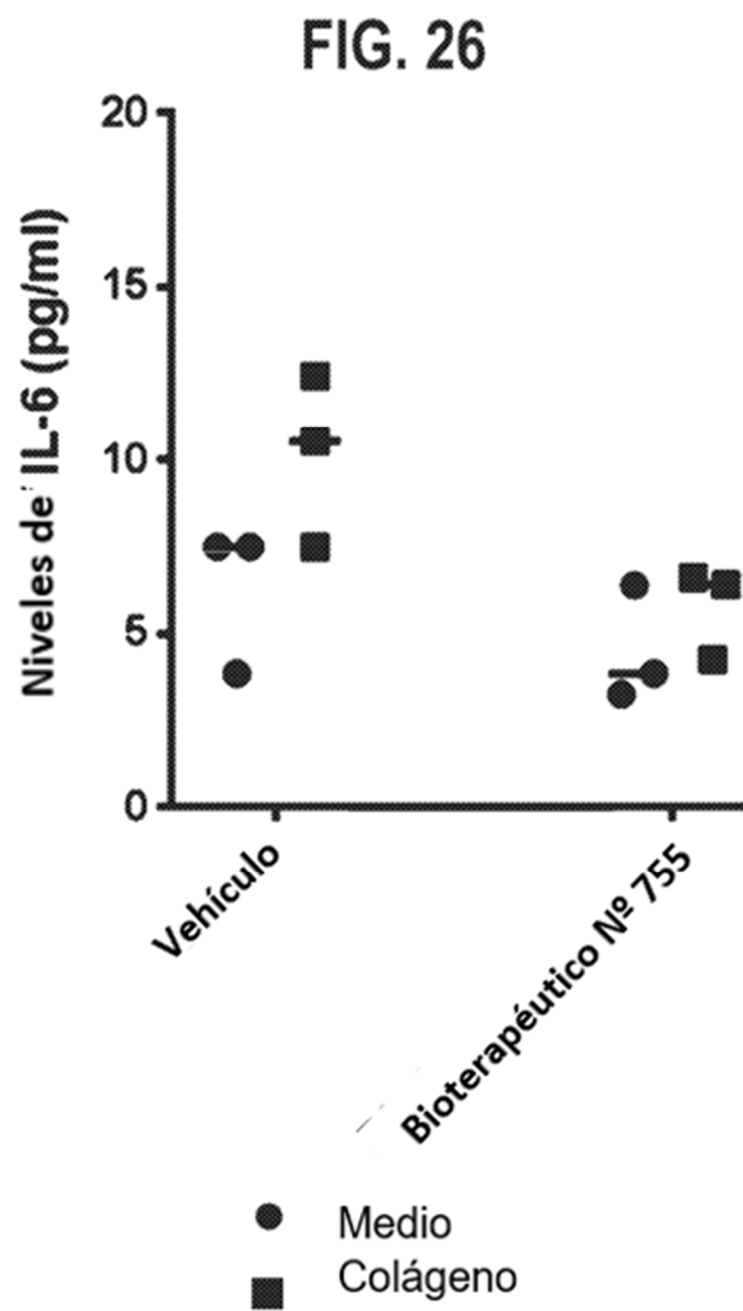


FIG. 27
IgE total en Suero

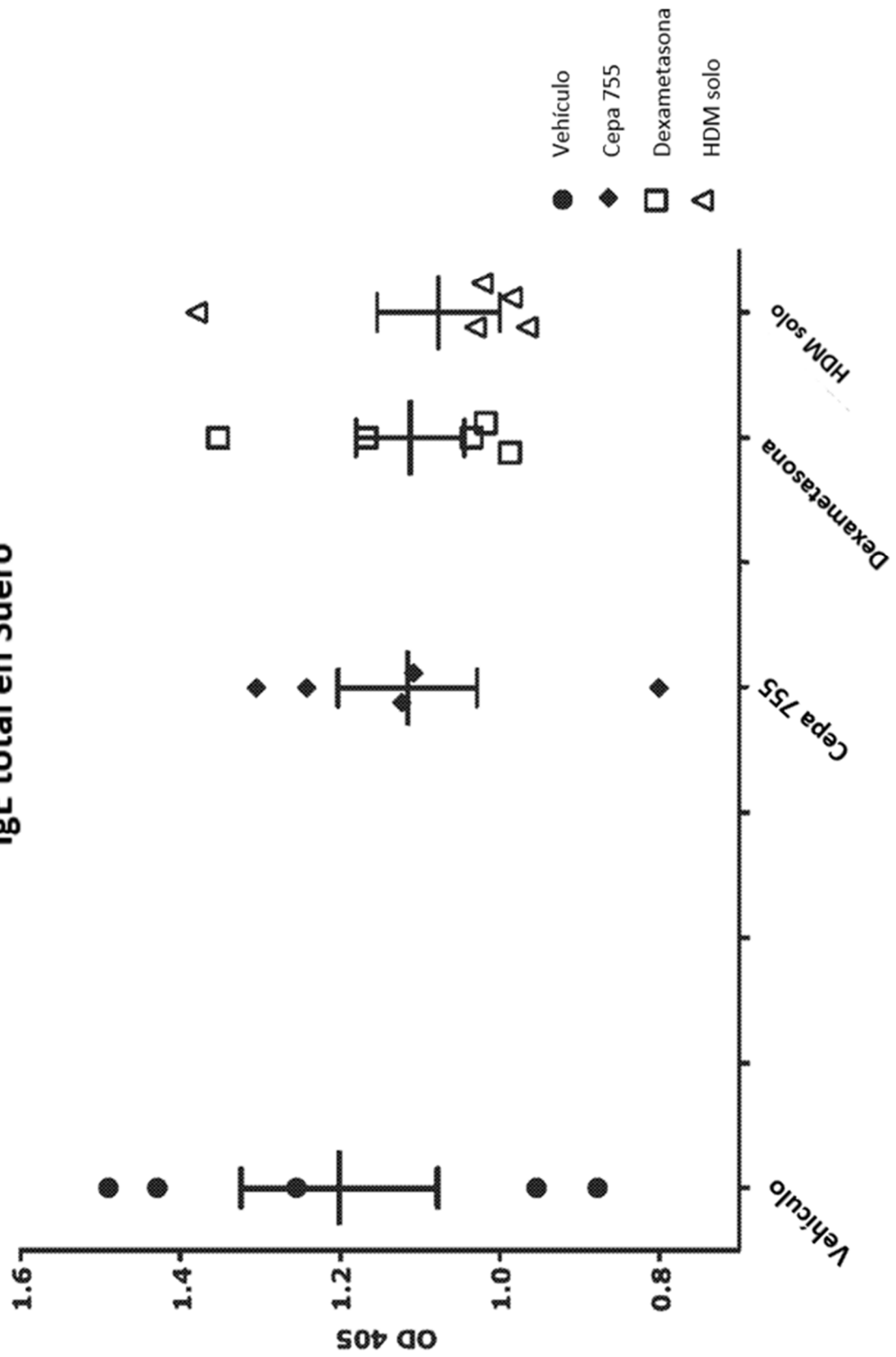


FIG. 28
IgG1 específico a HDM en suero

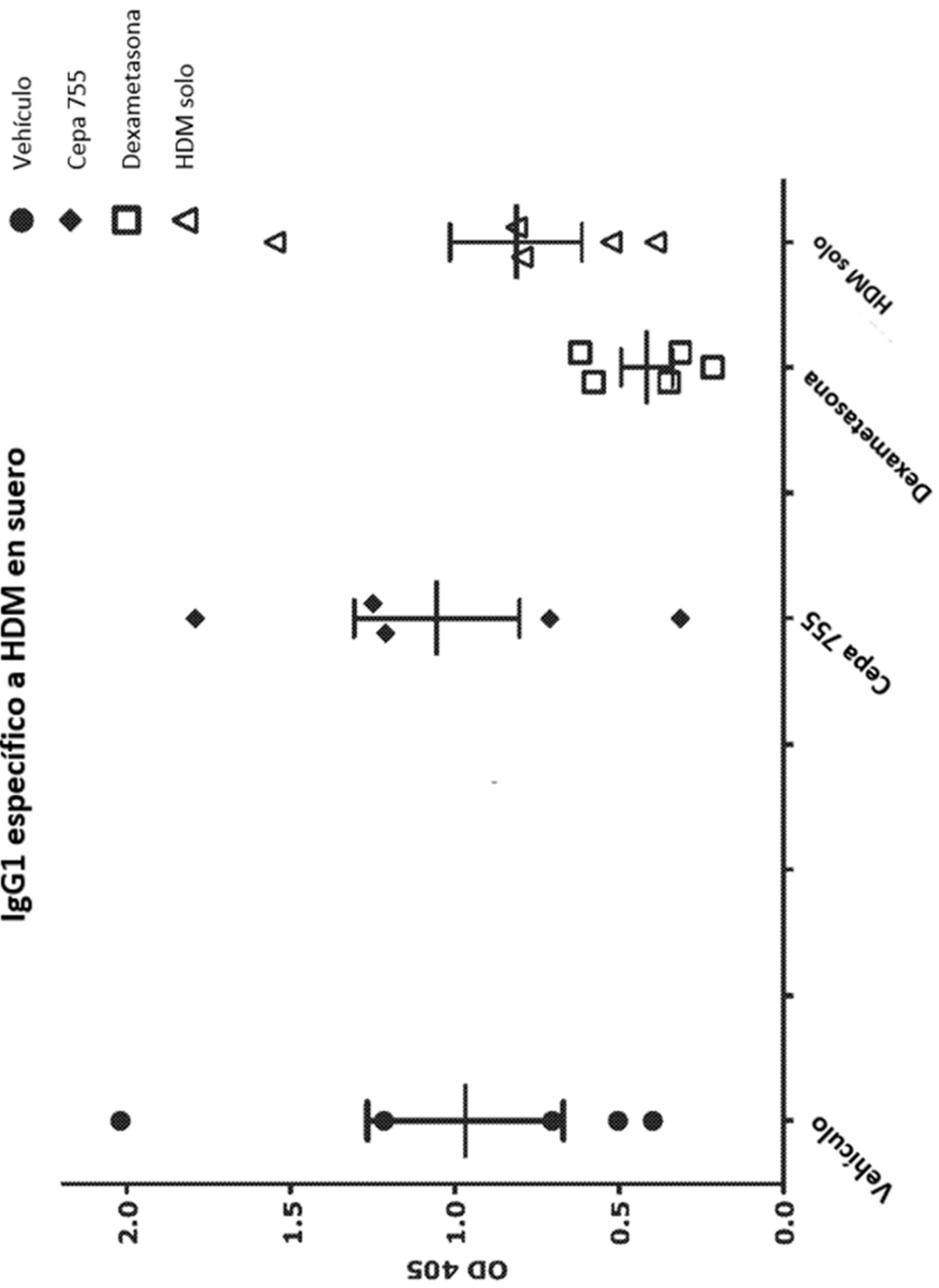


FIG. 29
IgE total en BALF

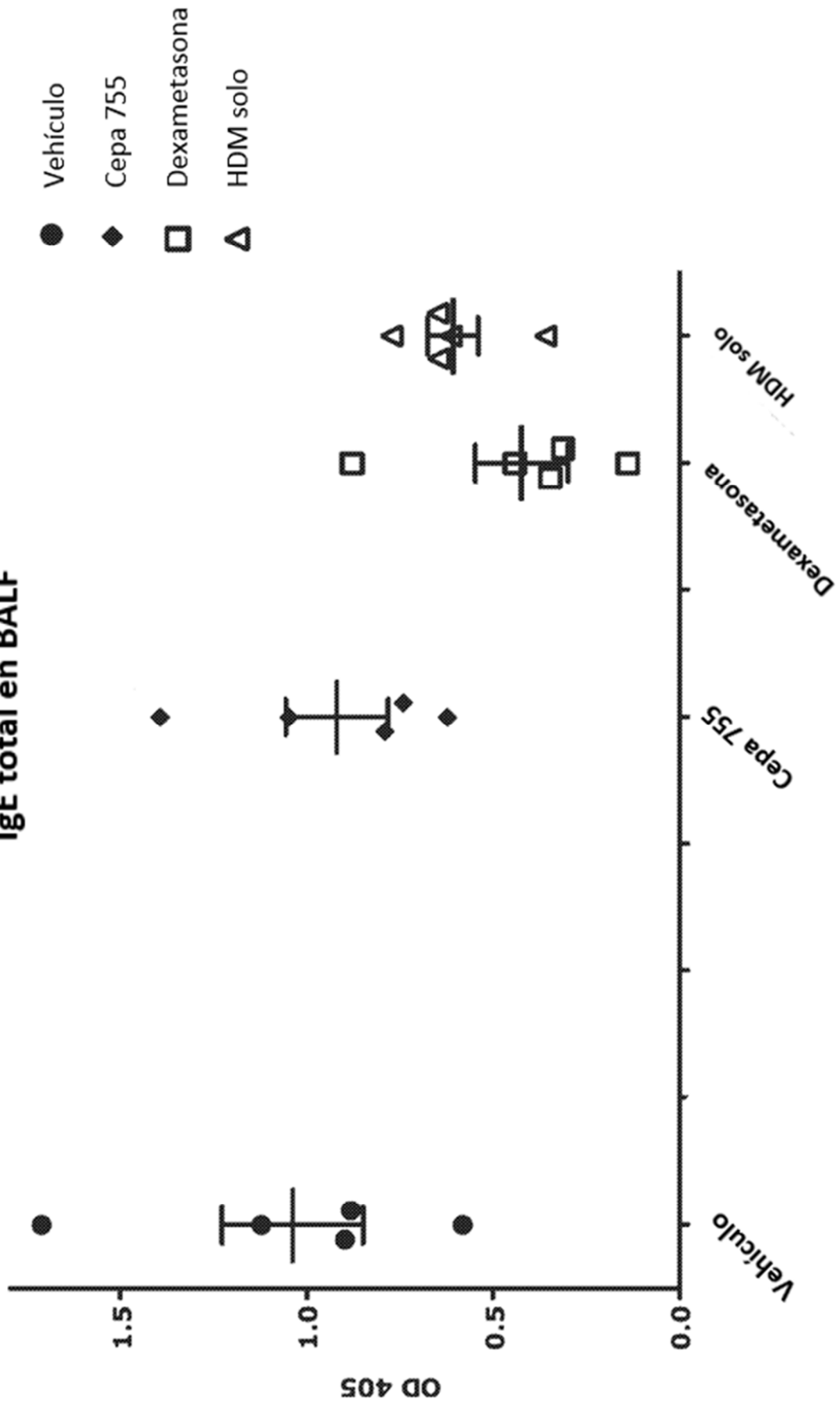


FIG. 30
IgG1 específico a HDM en BALF

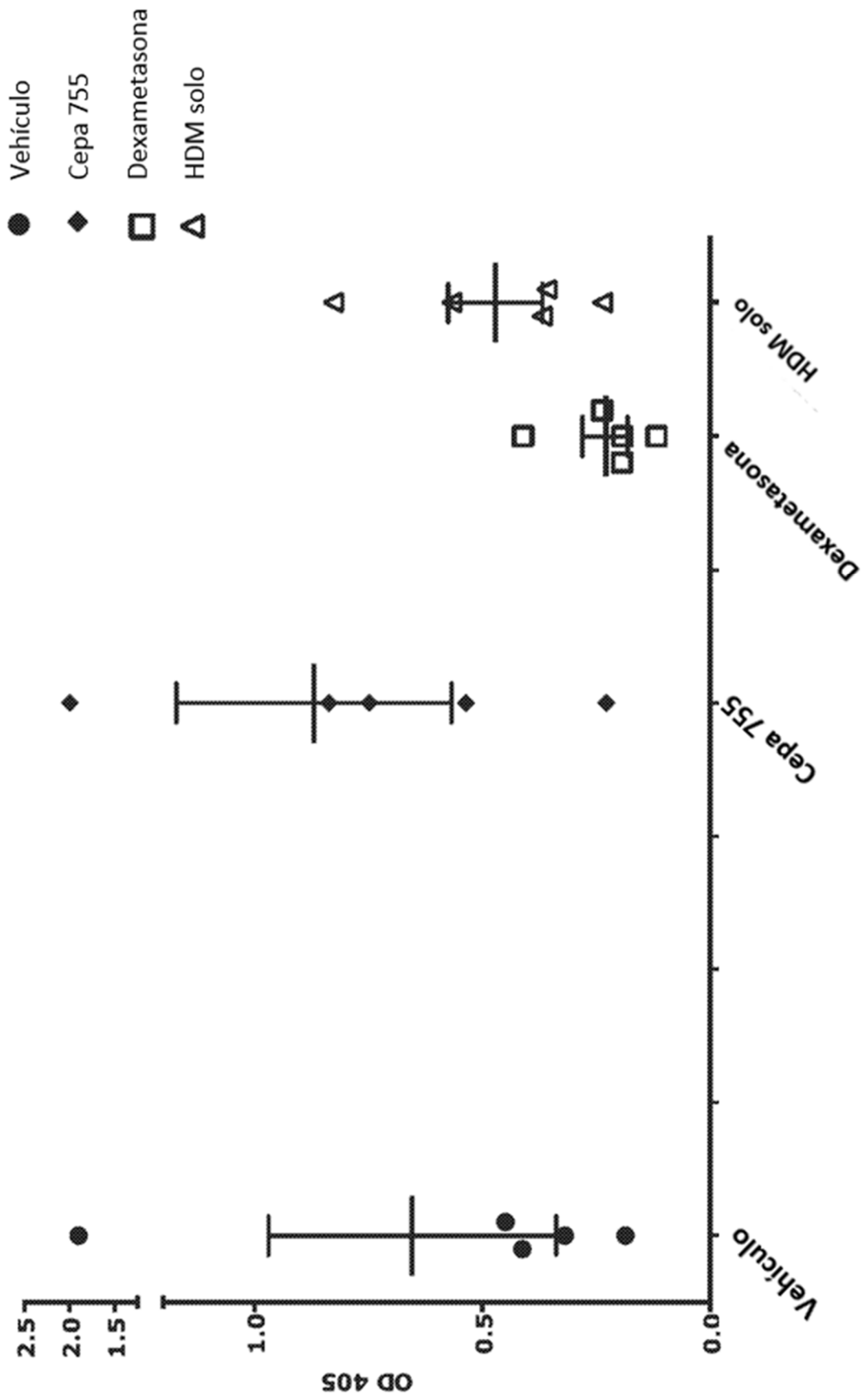


FIG. 31 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar

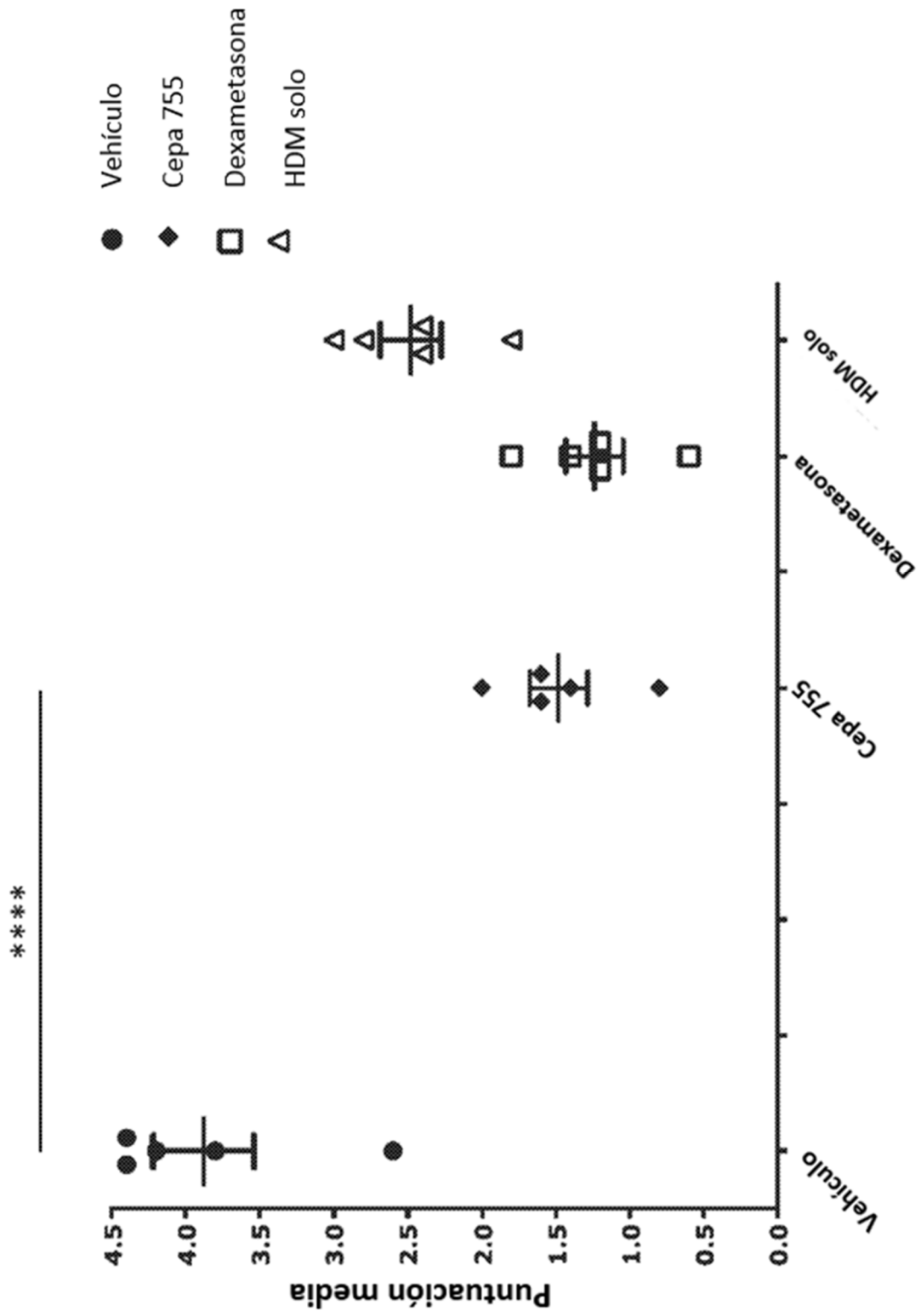
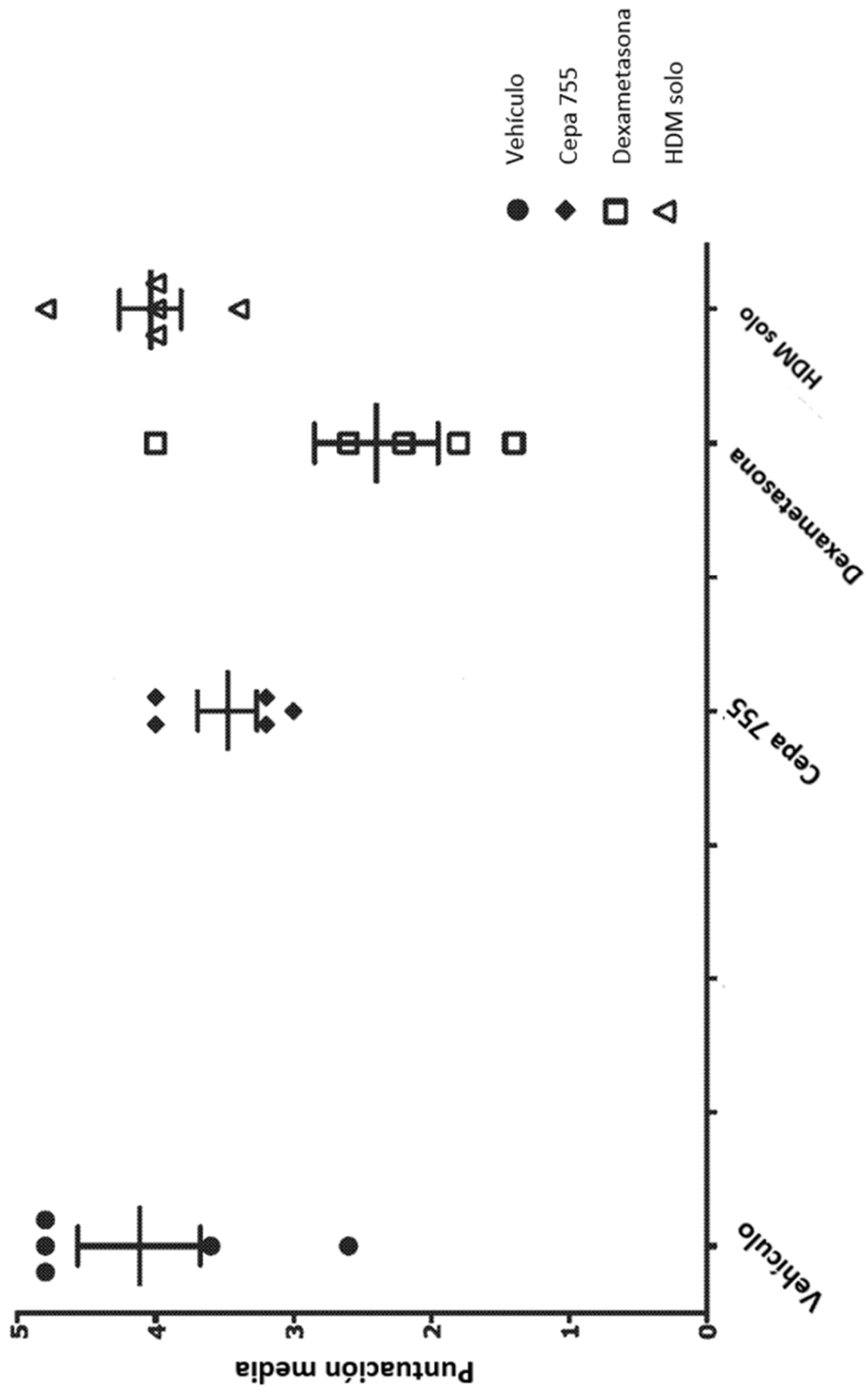


FIG. 32 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración perivascular



Análisis histológico – Puntuación media inflamatoria (media de puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)

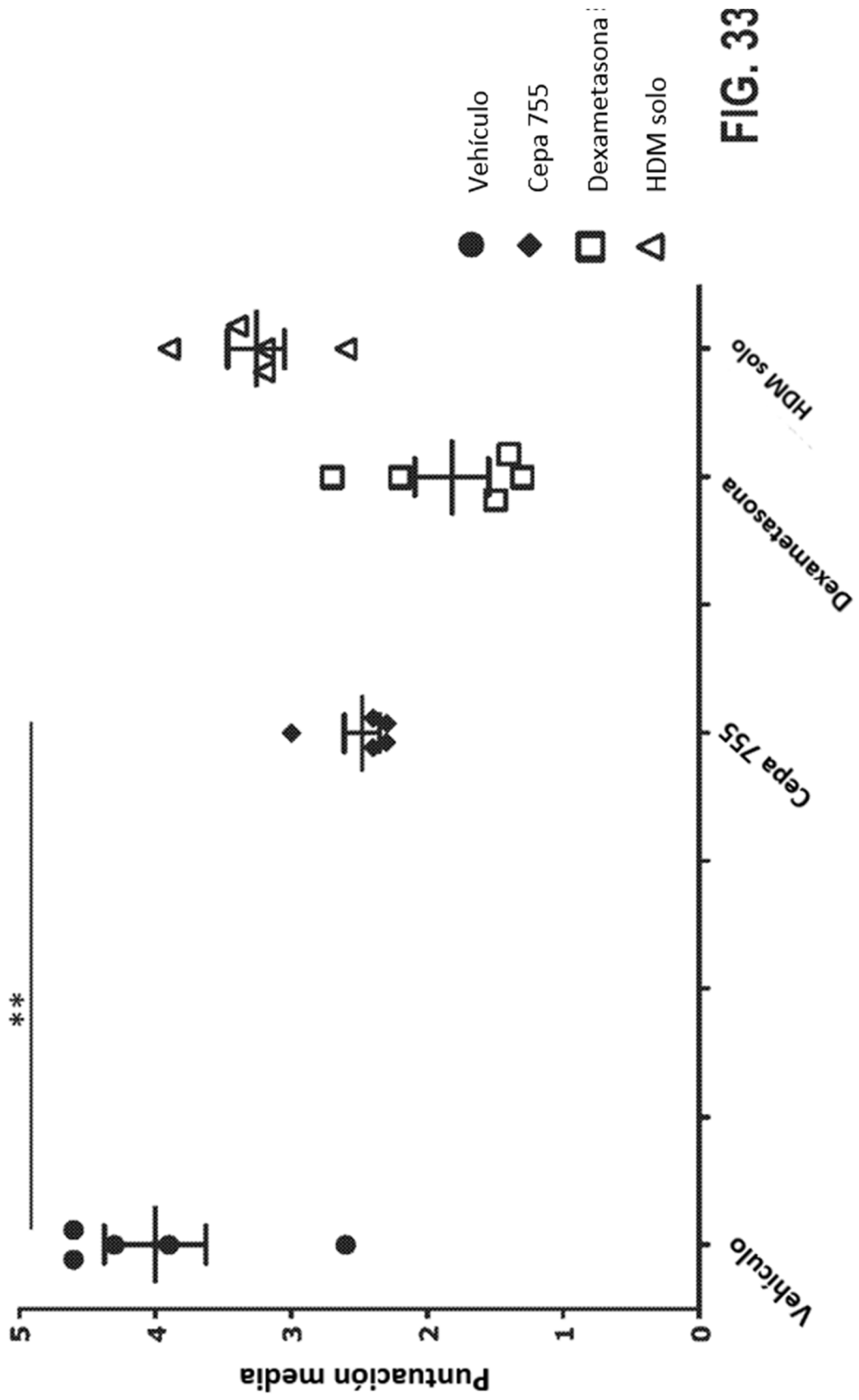


FIG. 33

FIG. 34

Análisis histológico – Puntuación de moco

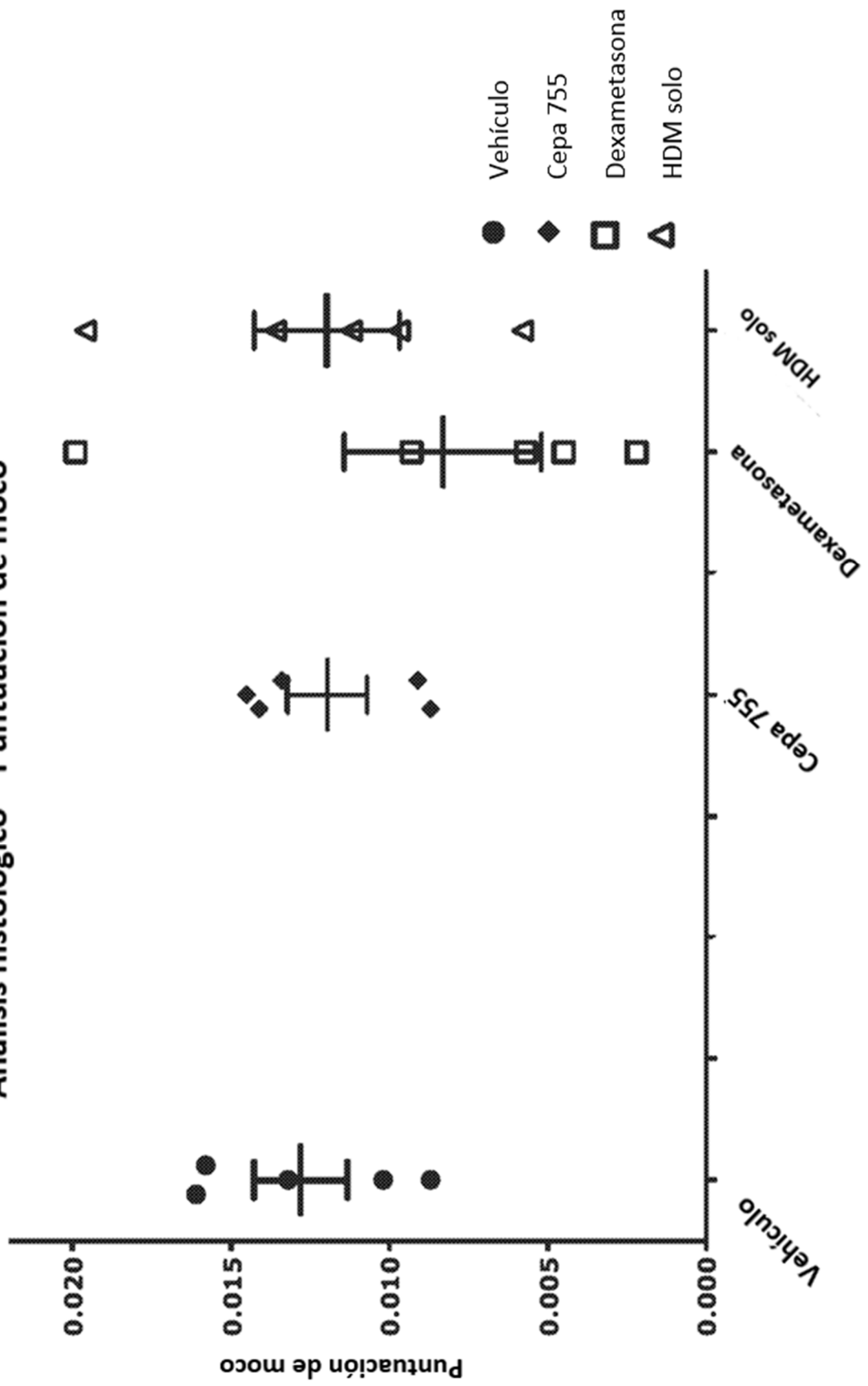


FIG. 35

Nivel de IL-9 en tejido pulmonar

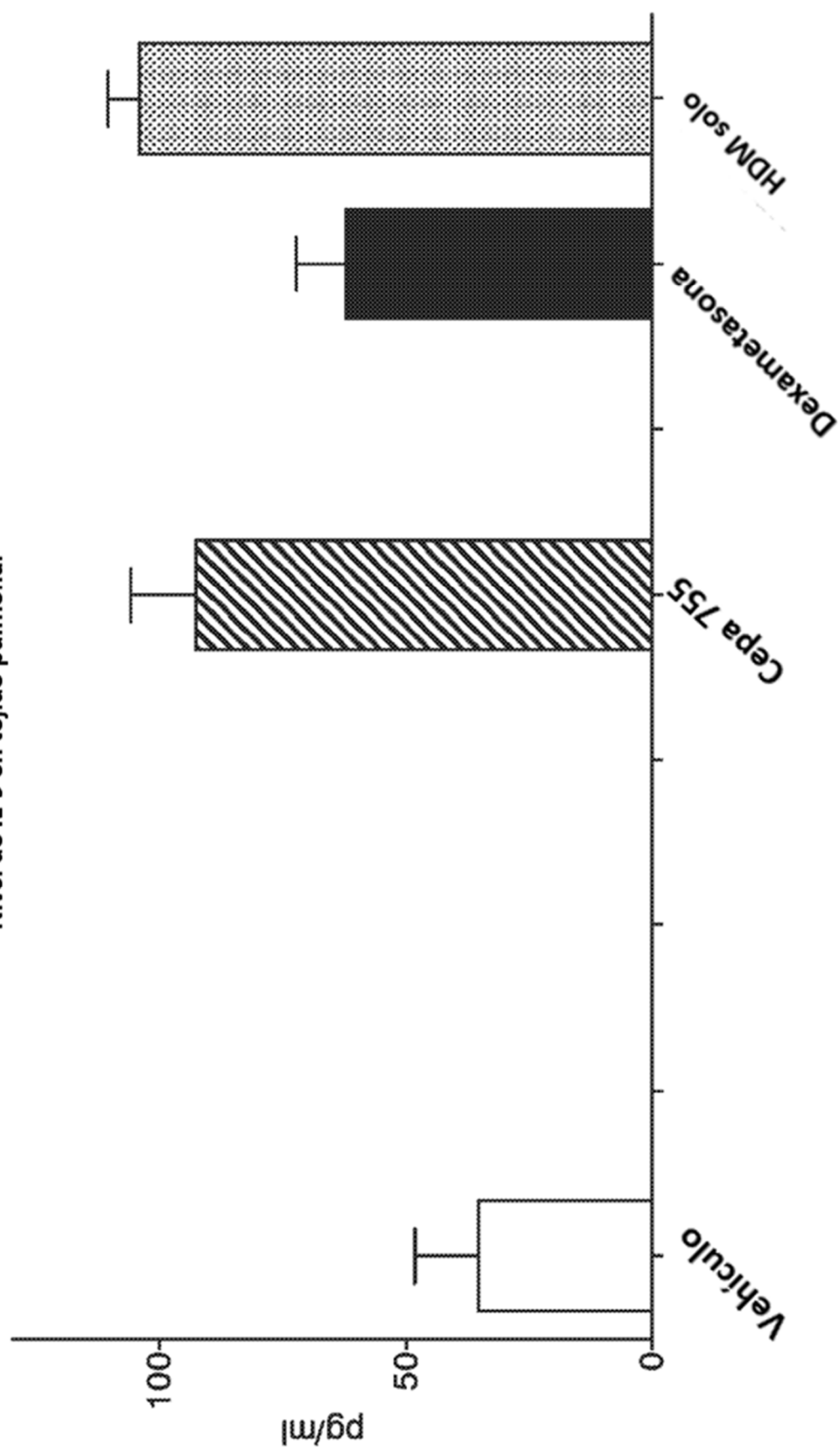


FIG. 36
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

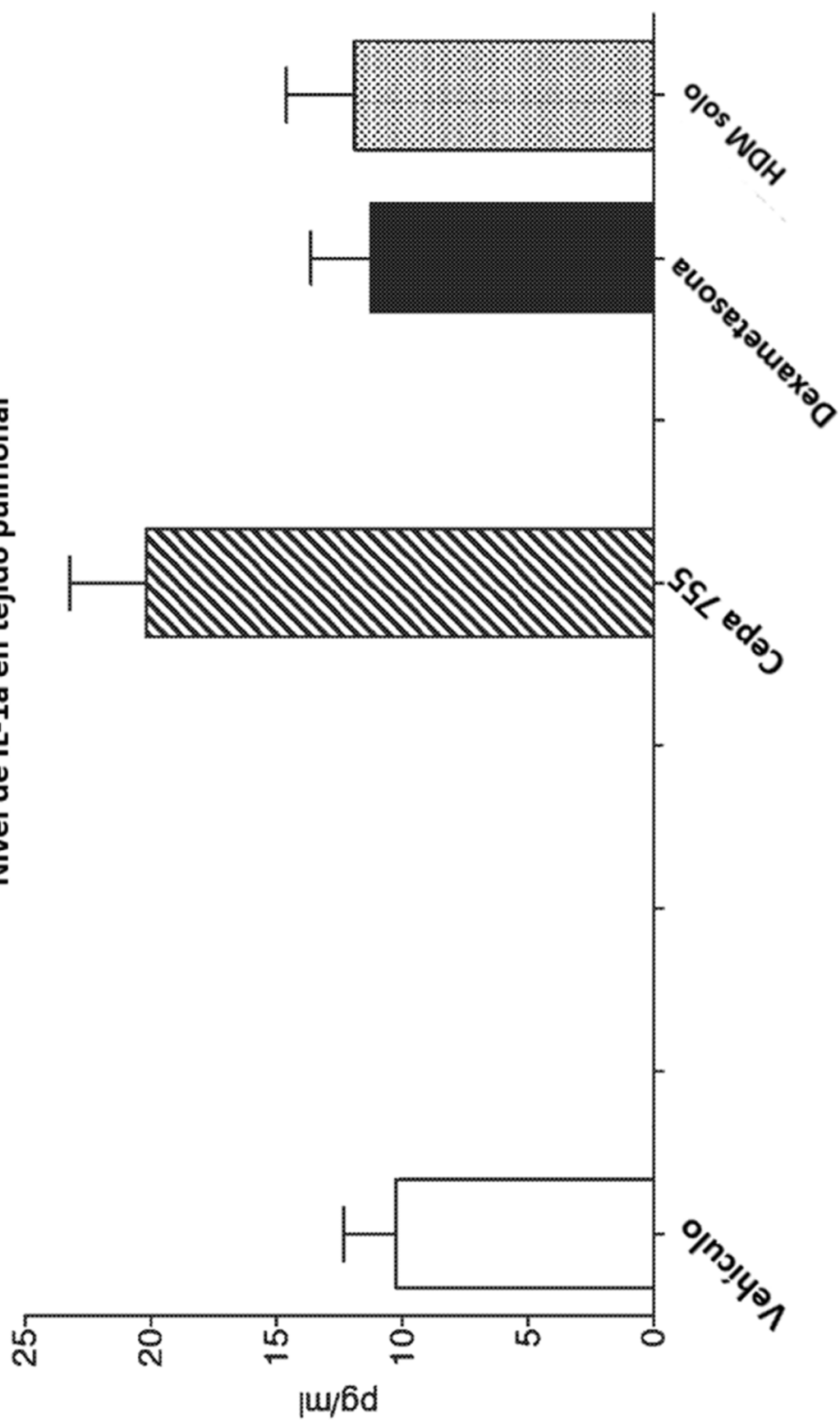


FIG. 37

Nivel de ILNg en tejido pulmonar

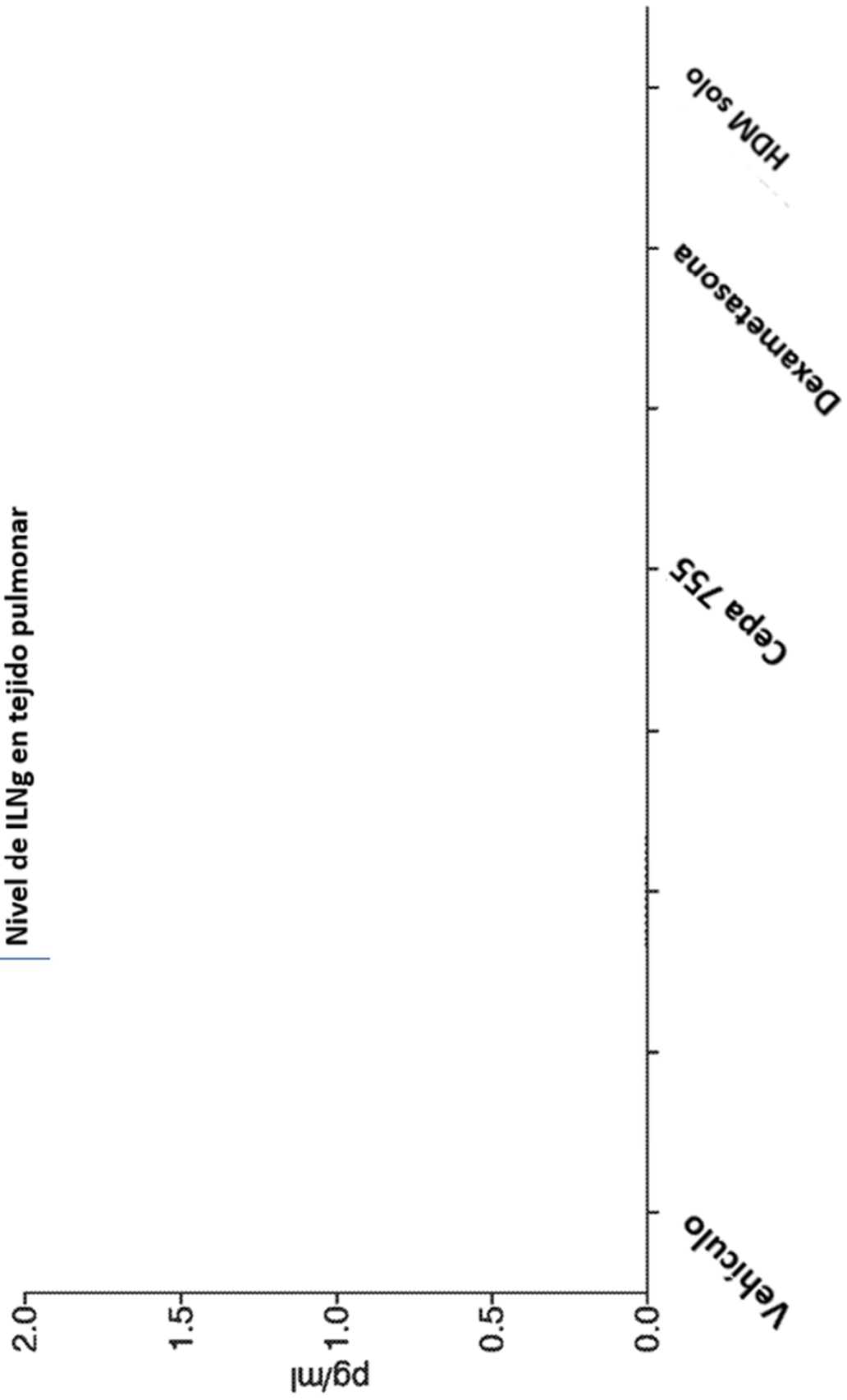


FIG. 38

Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

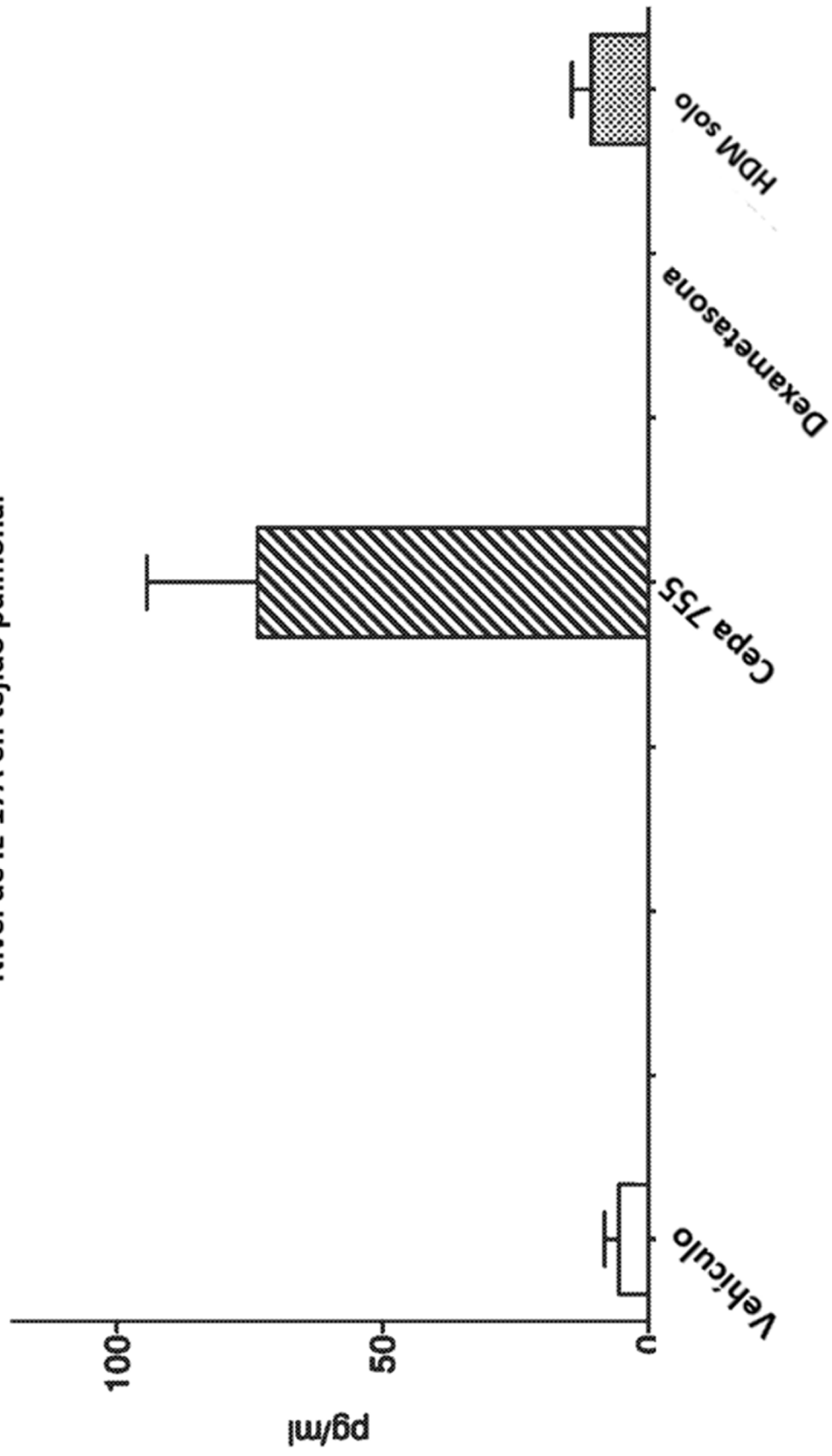


FIG. 39

Nivel de IL-4 en tejido pulmonar

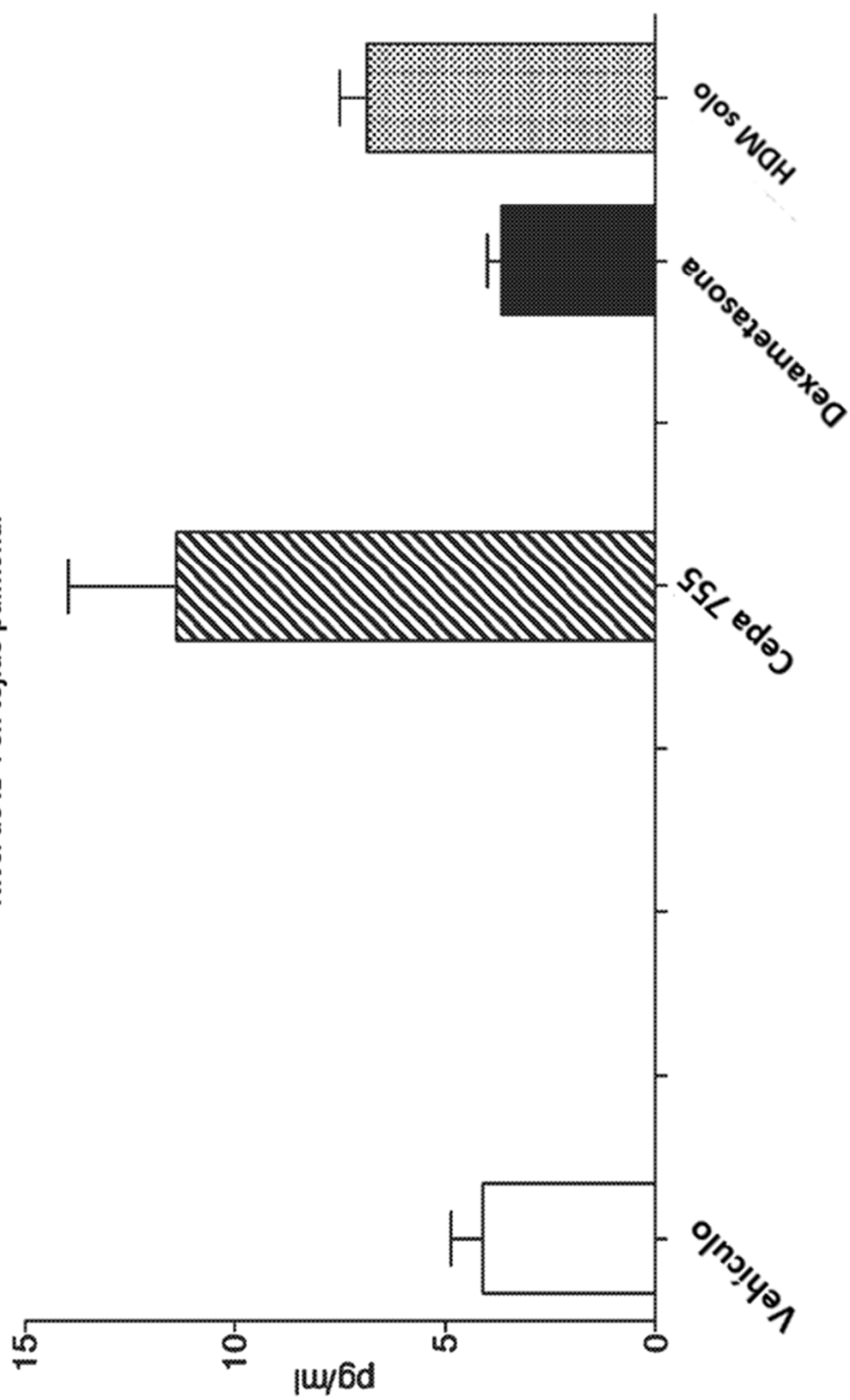


FIG. 40

Nivel de IL-5 en tejido pulmonar

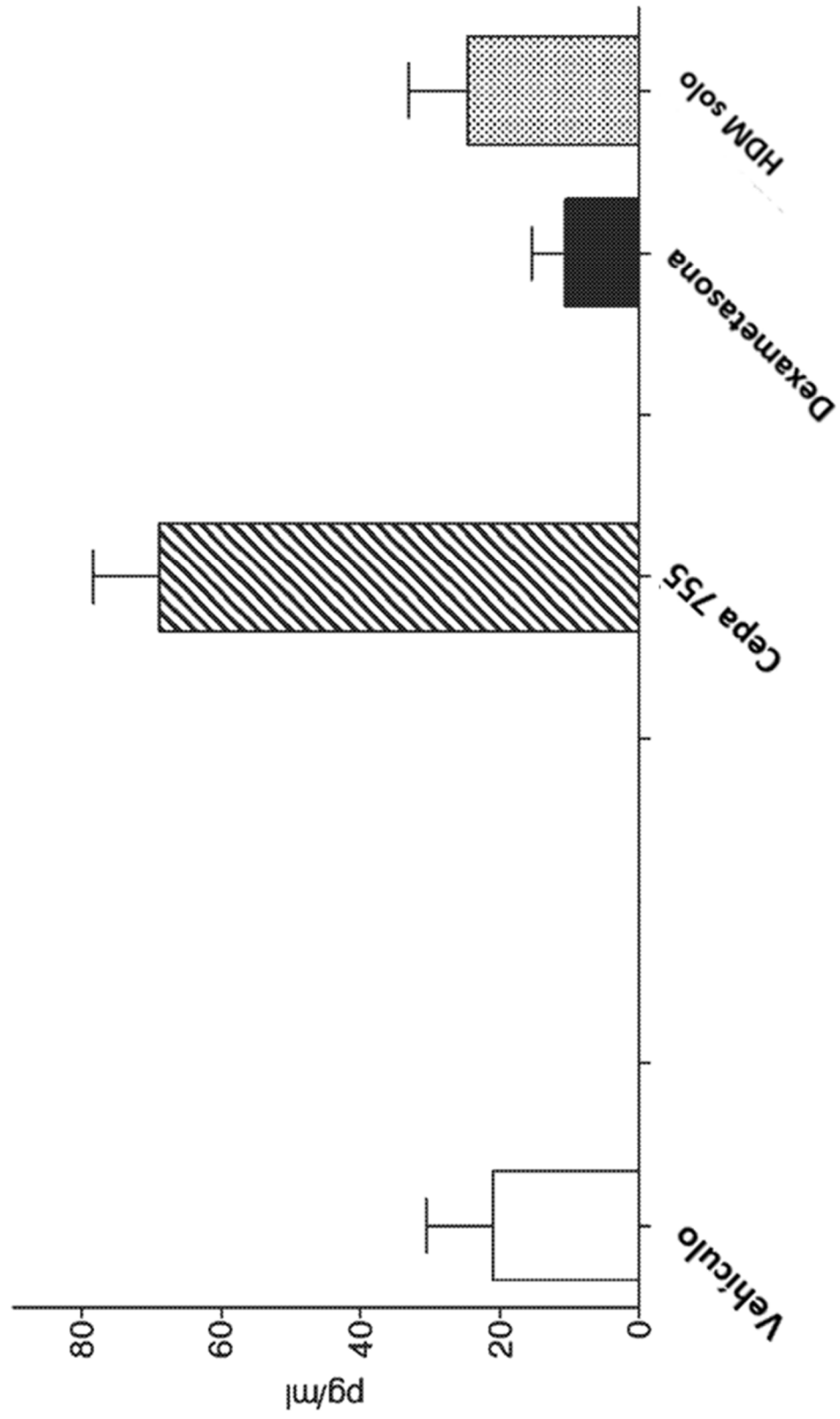


FIG. 41

Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

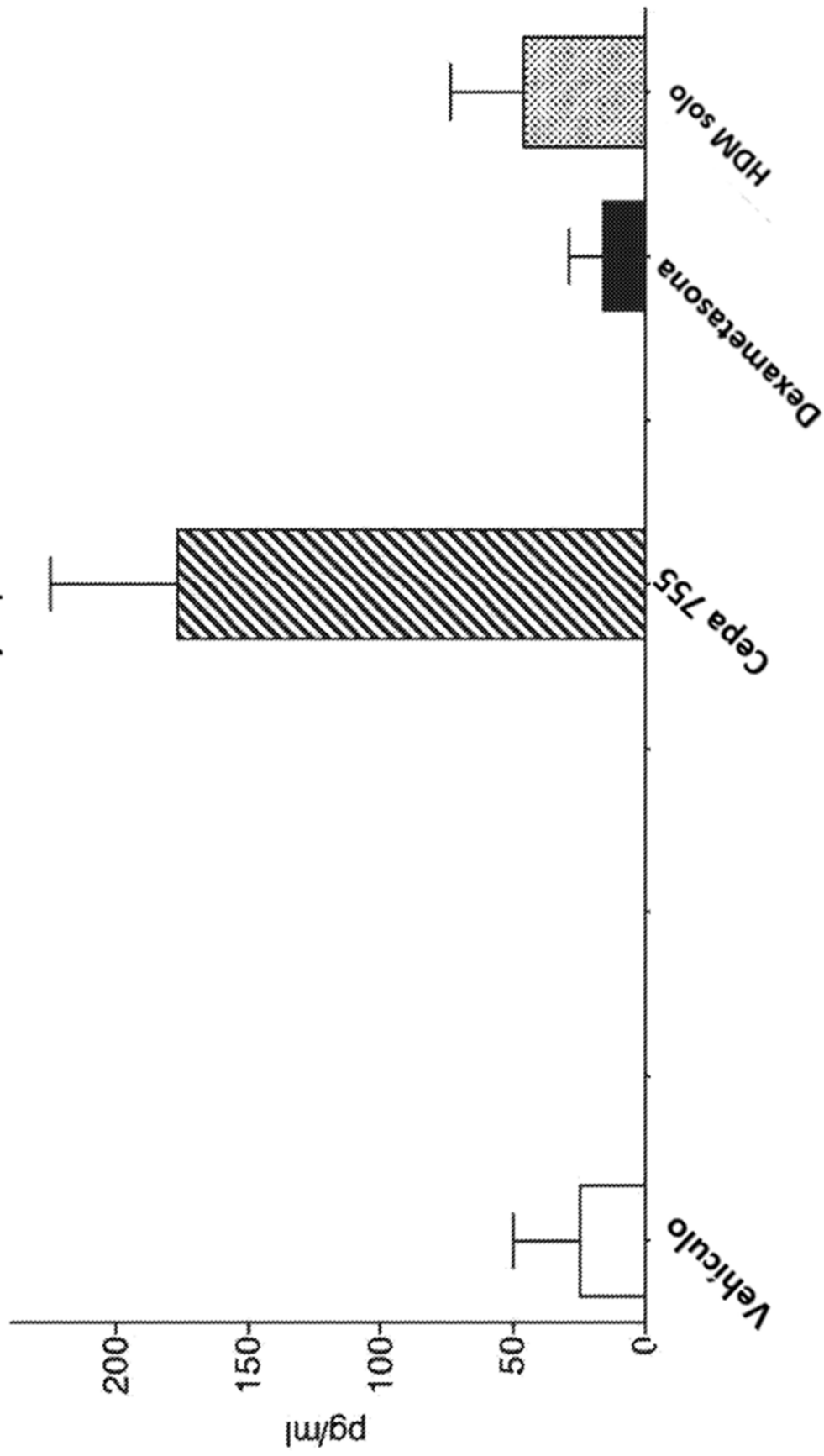


FIG. 42
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

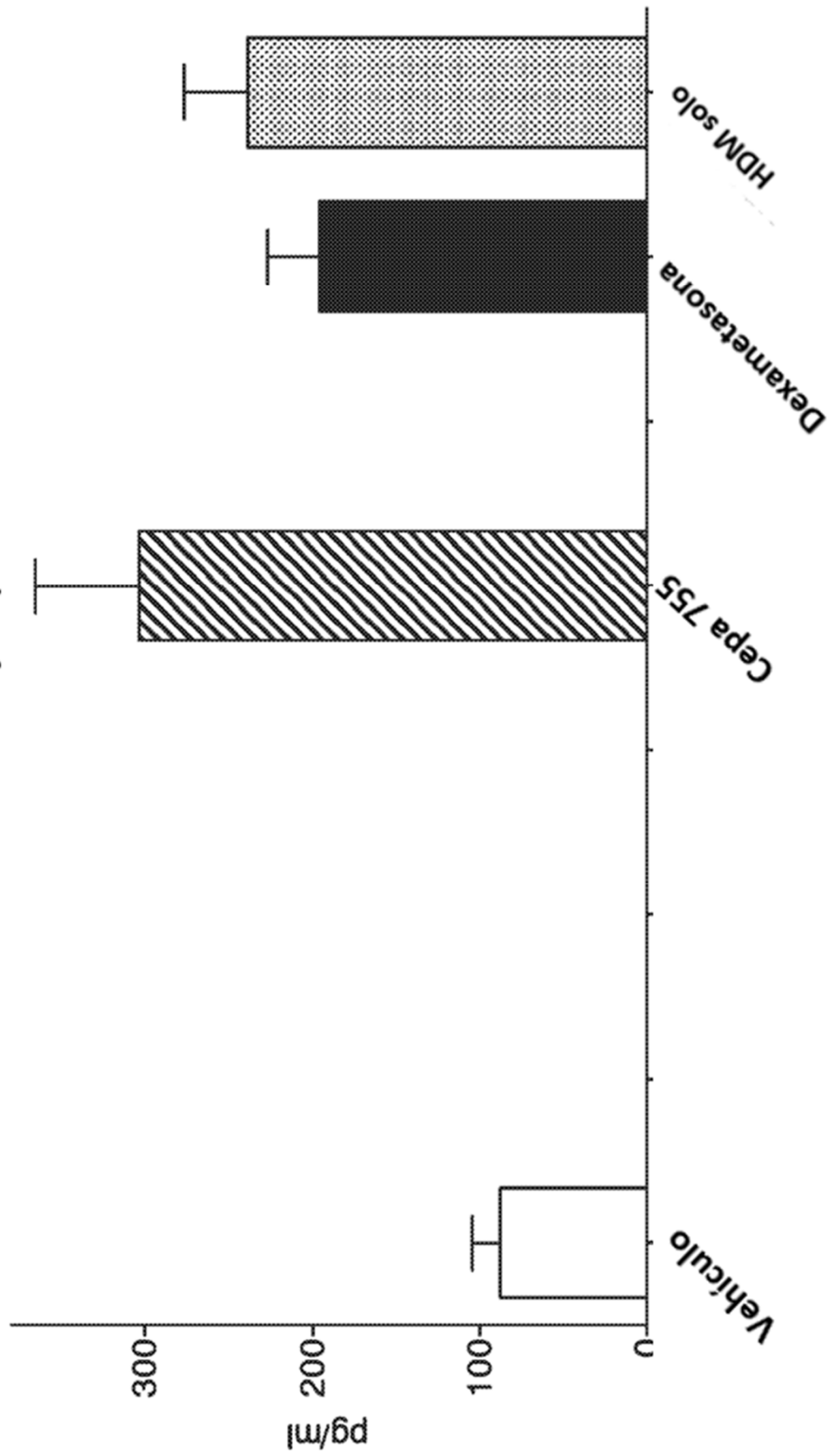


FIG. 43
Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

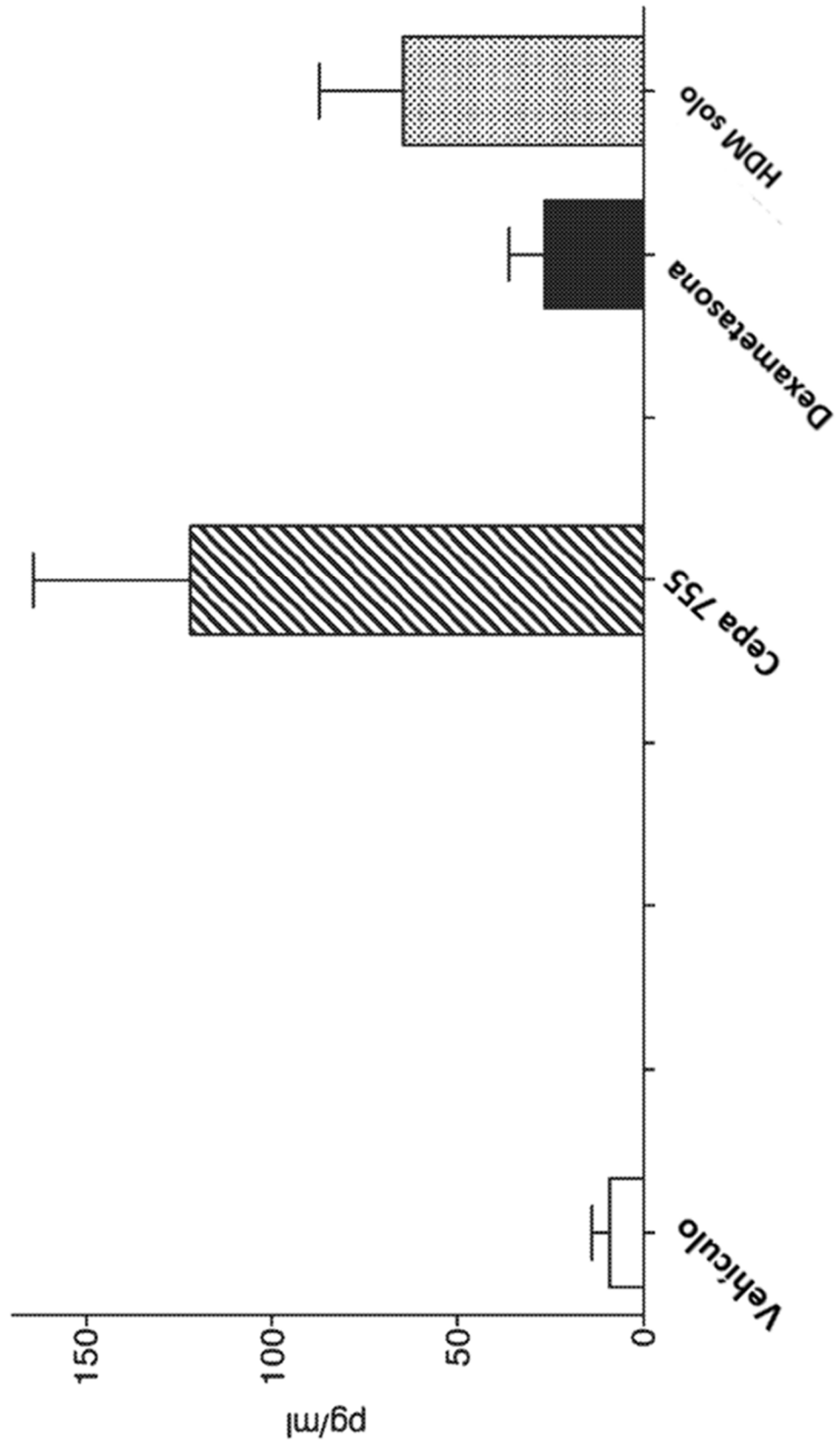


FIG. 44

Nivel de KC en tejido pulmonar

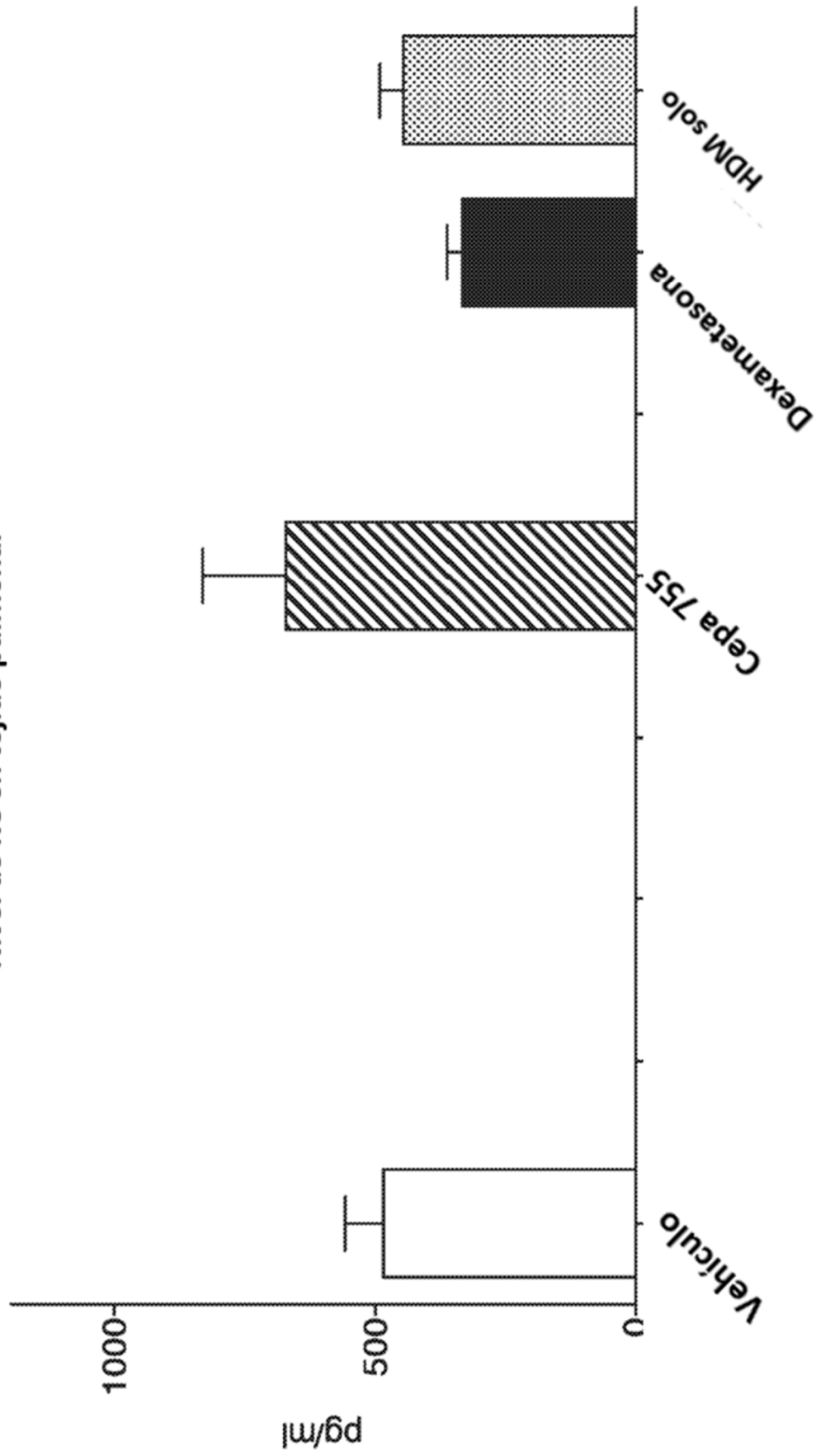


FIG. 45
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

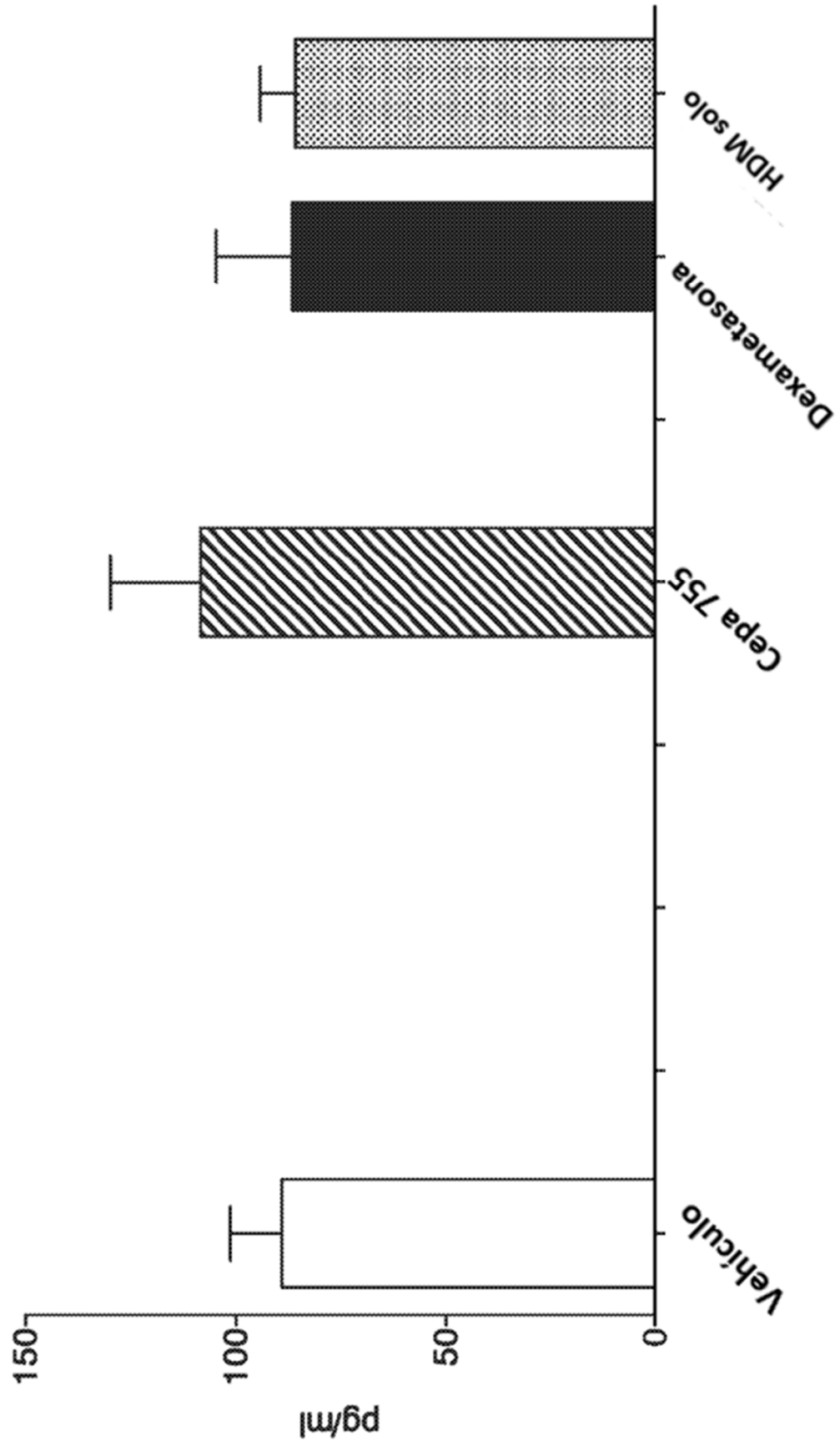
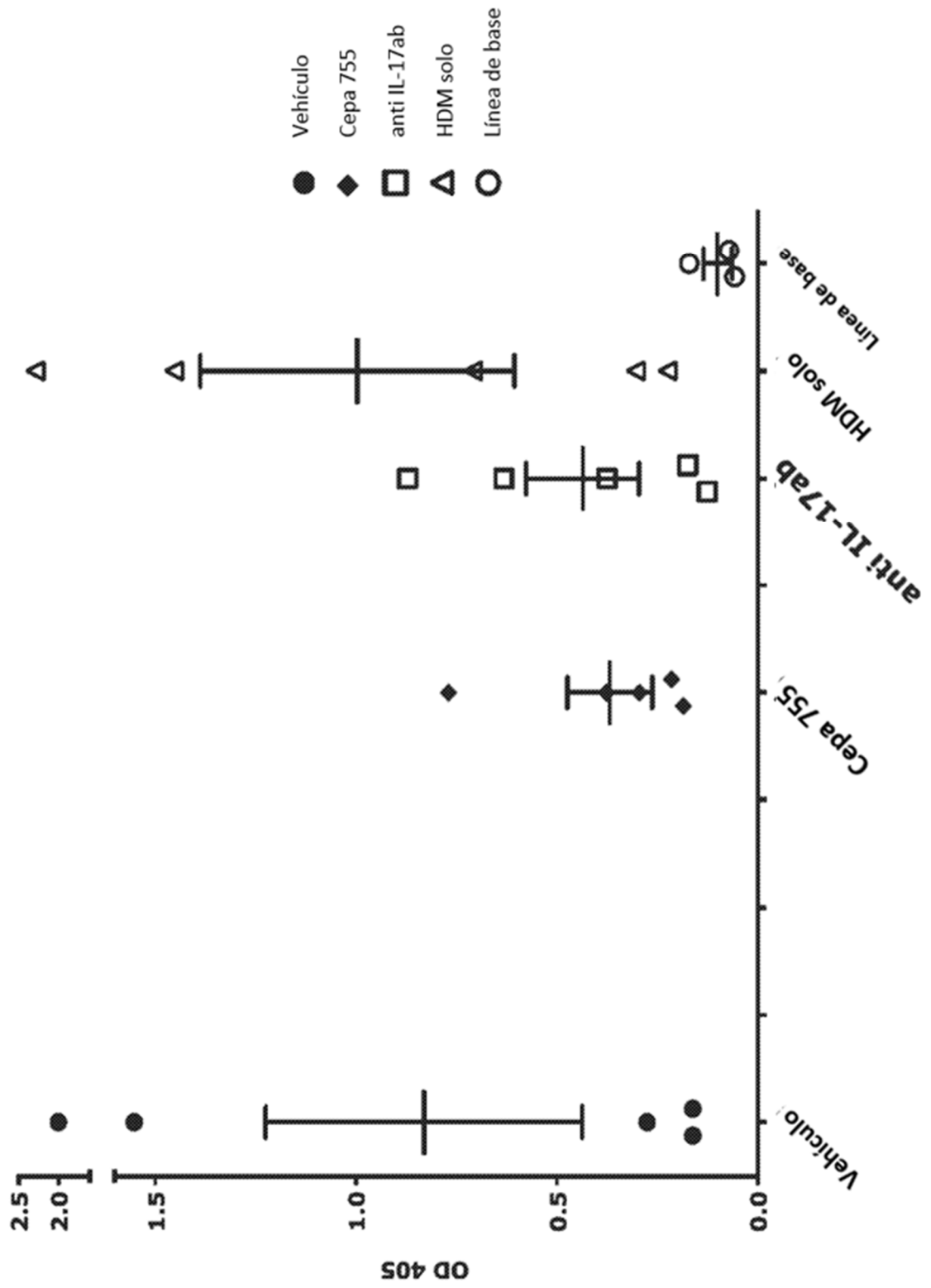


FIG. 46 IgG1 específico a HDM en suero



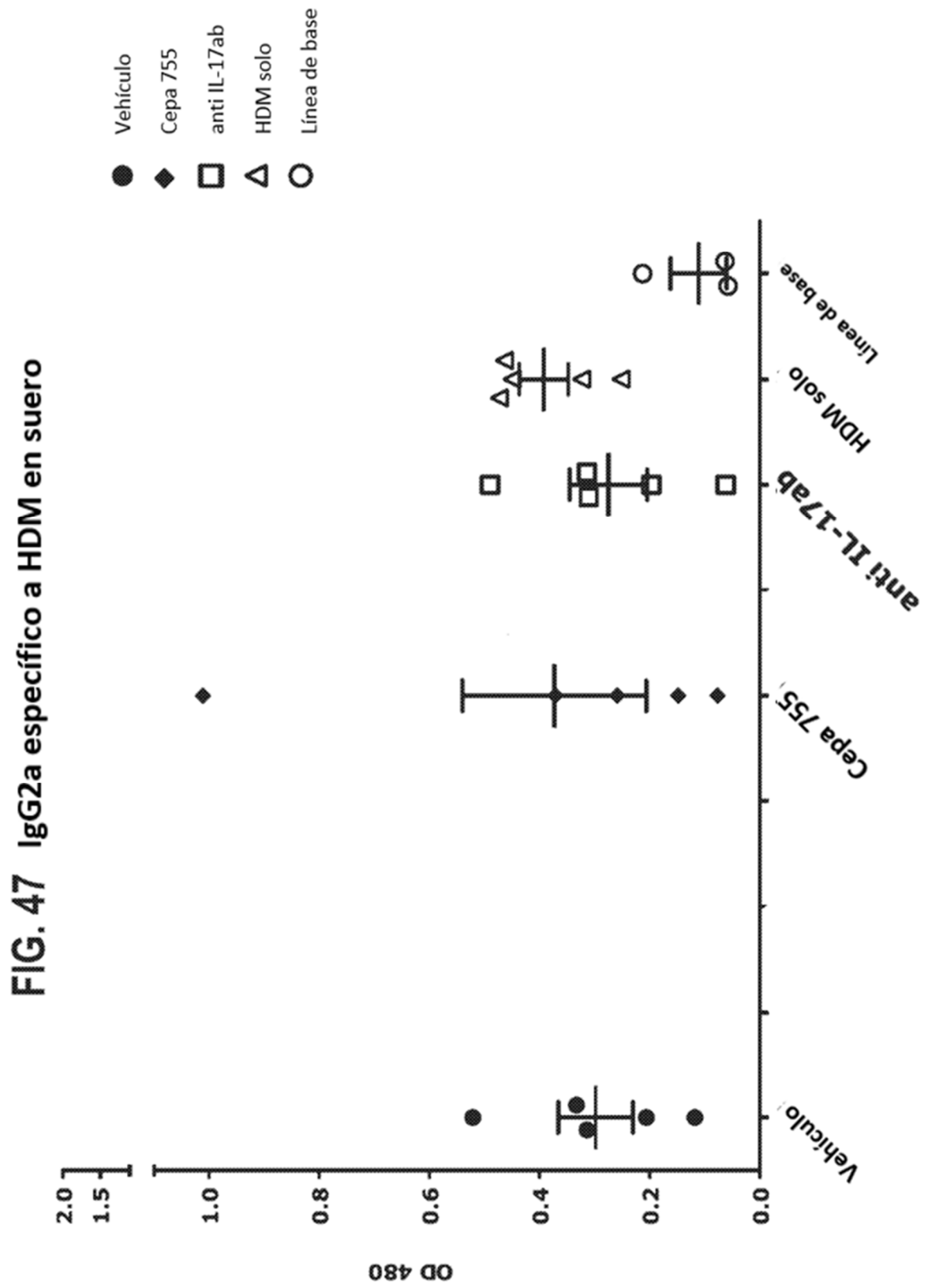


FIG. 48 IgG1 específico a HDM en BALF

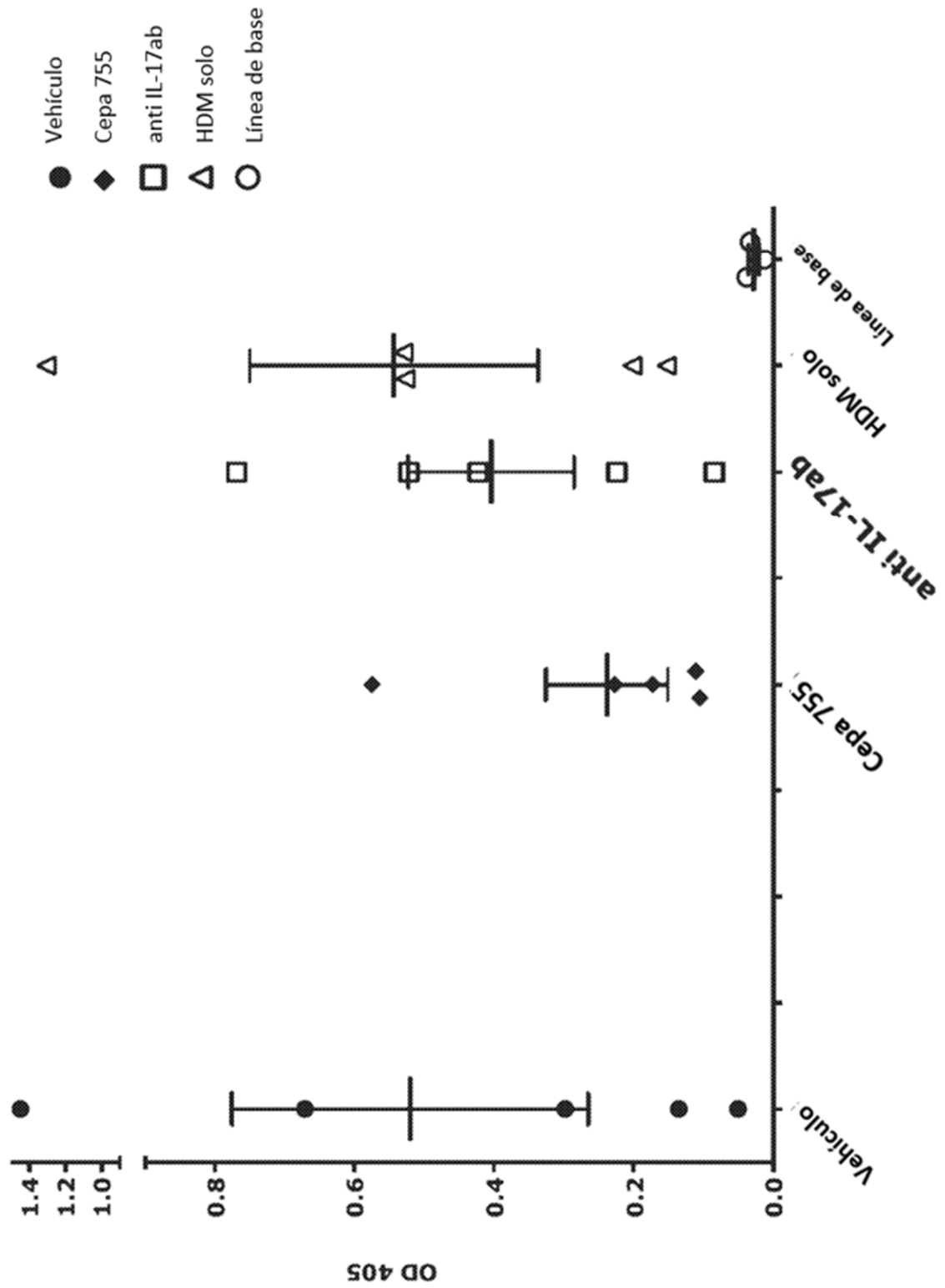


FIG. 49 IgG2a específico a HDM en BALF

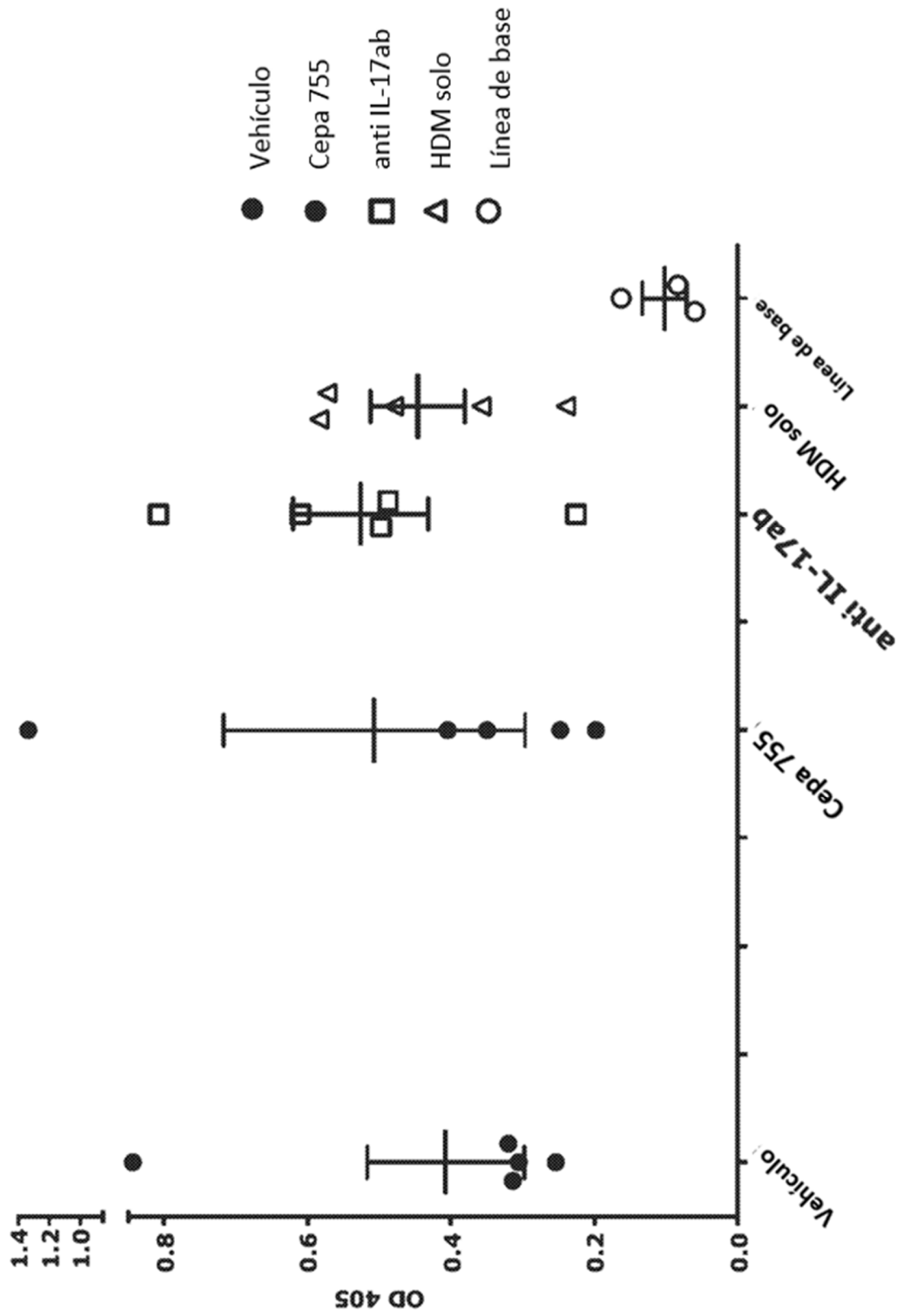
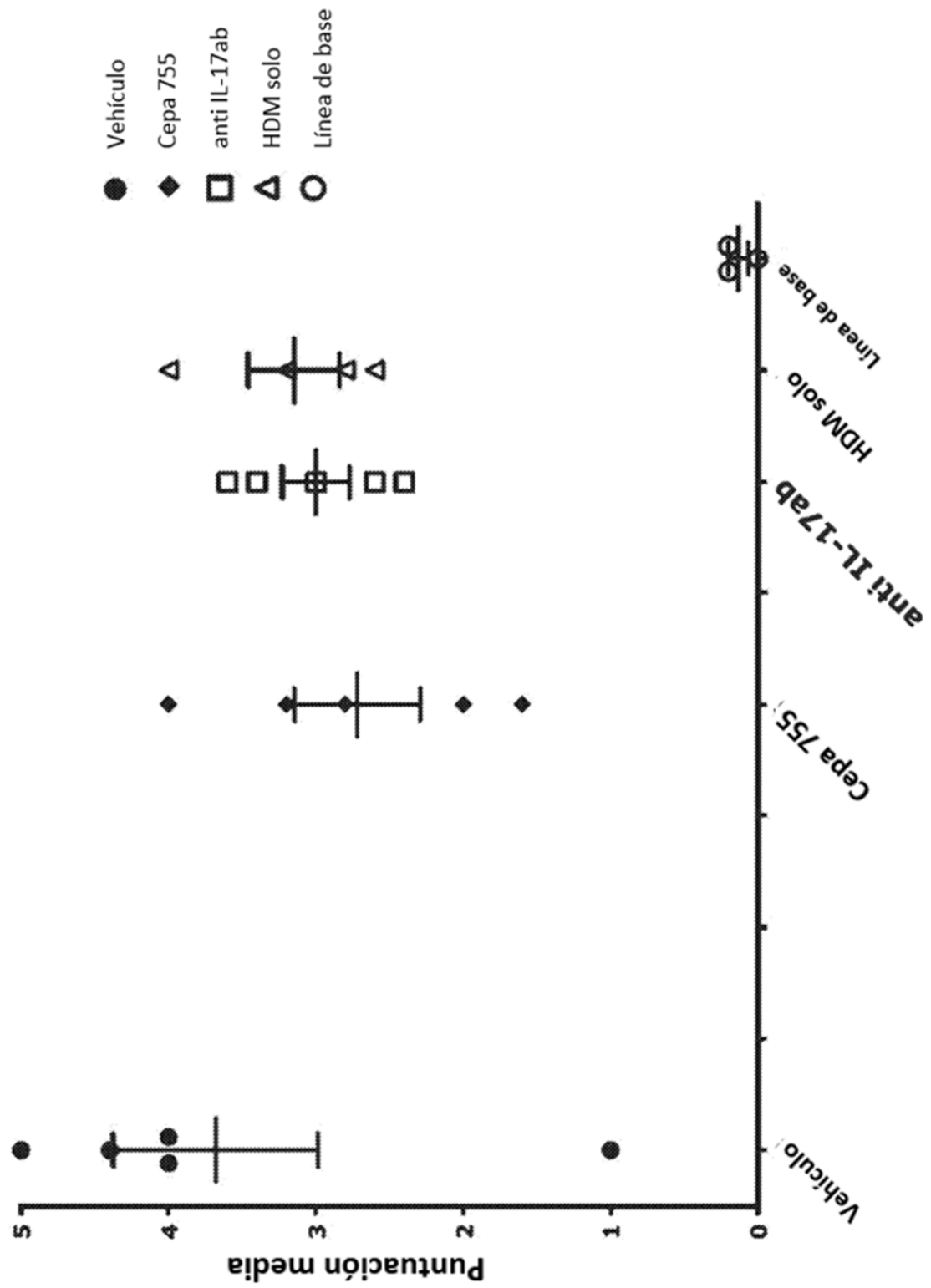


FIG. 50 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar



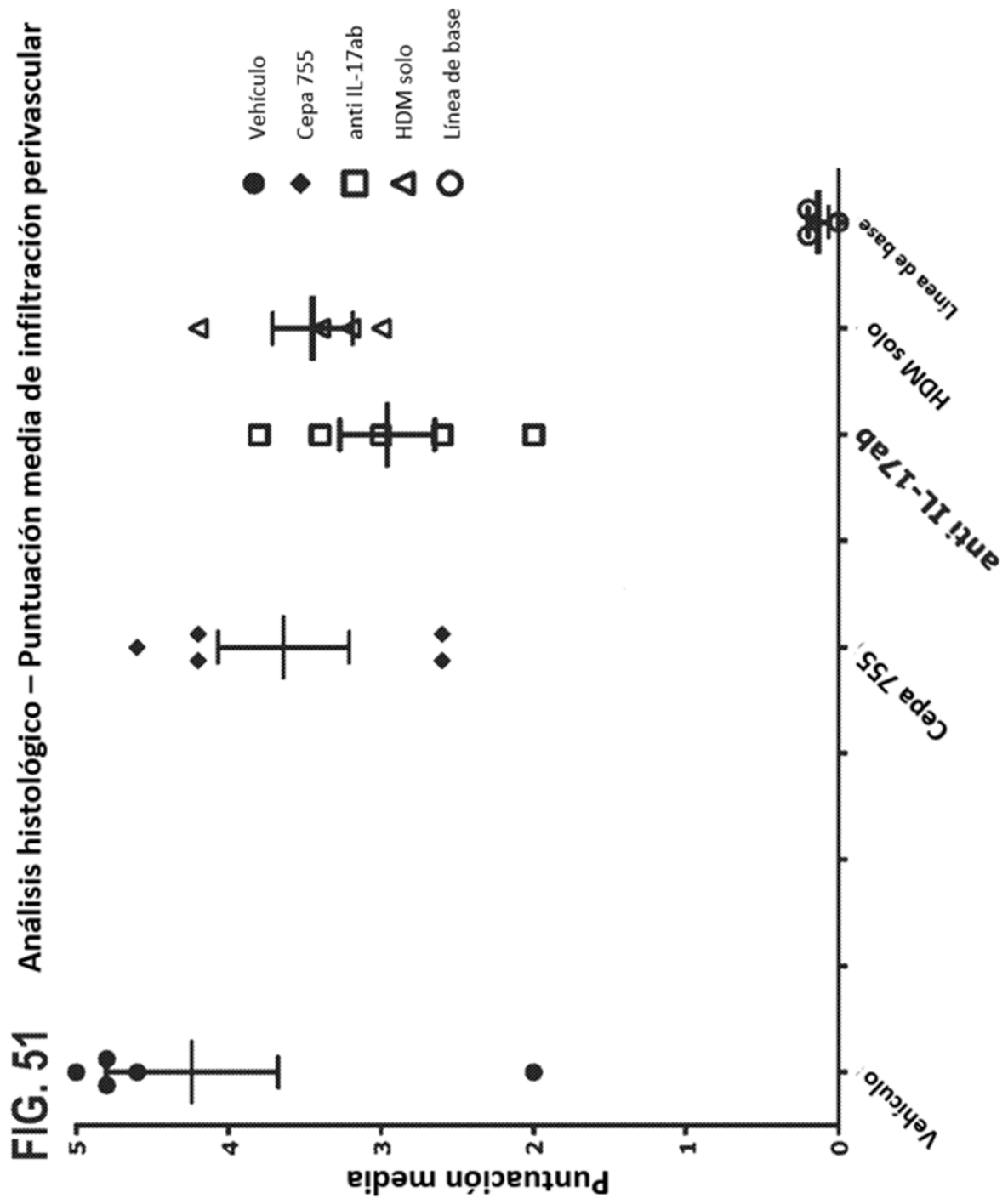


FIG. 52 Análisis histológico – Puntuación media inflamatoria (media de puntuación de infiltración tanto peribronquiolar como perivascular)

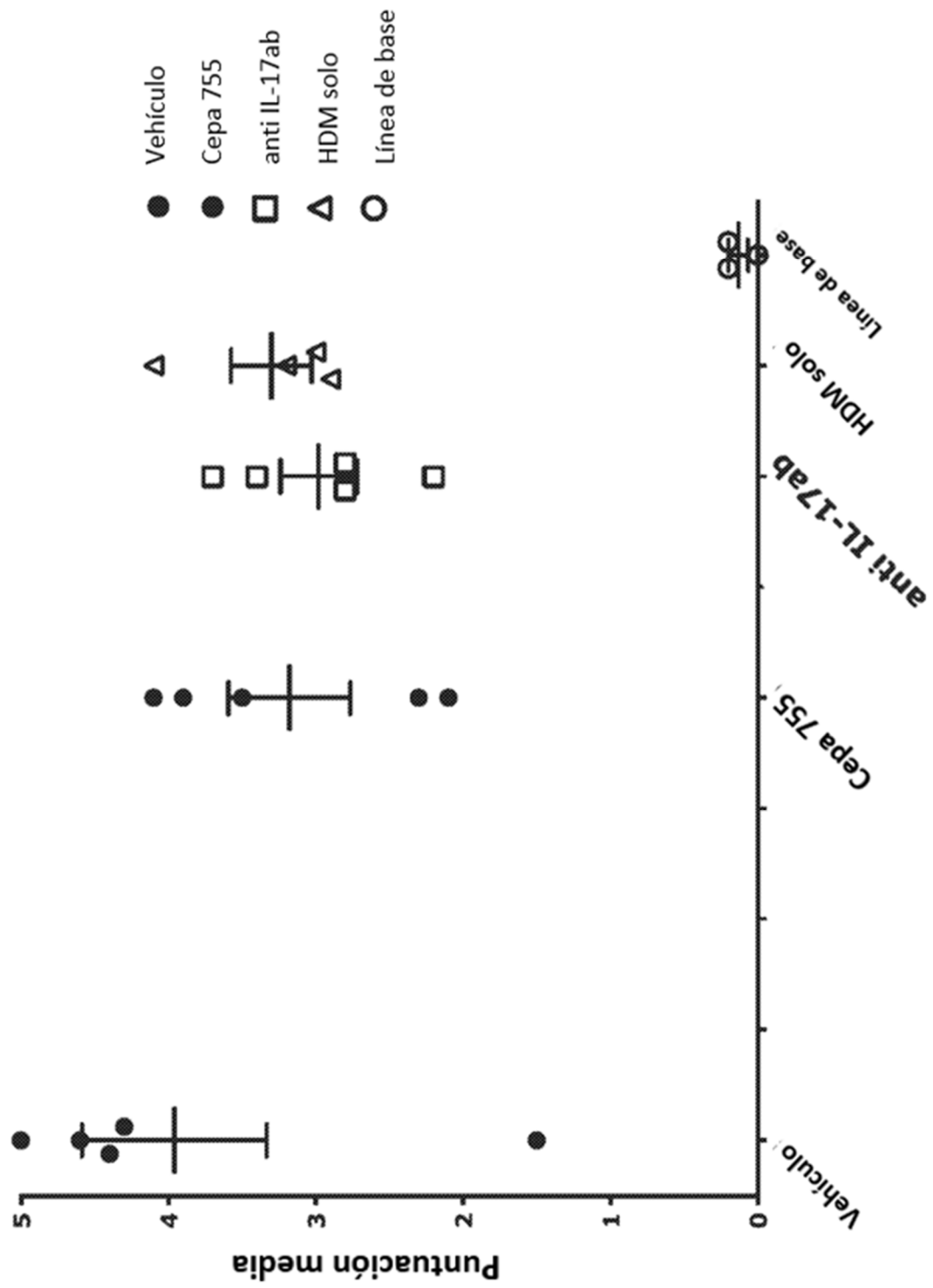


FIG. 53
Nivel de TNFa en tejido pulmonar

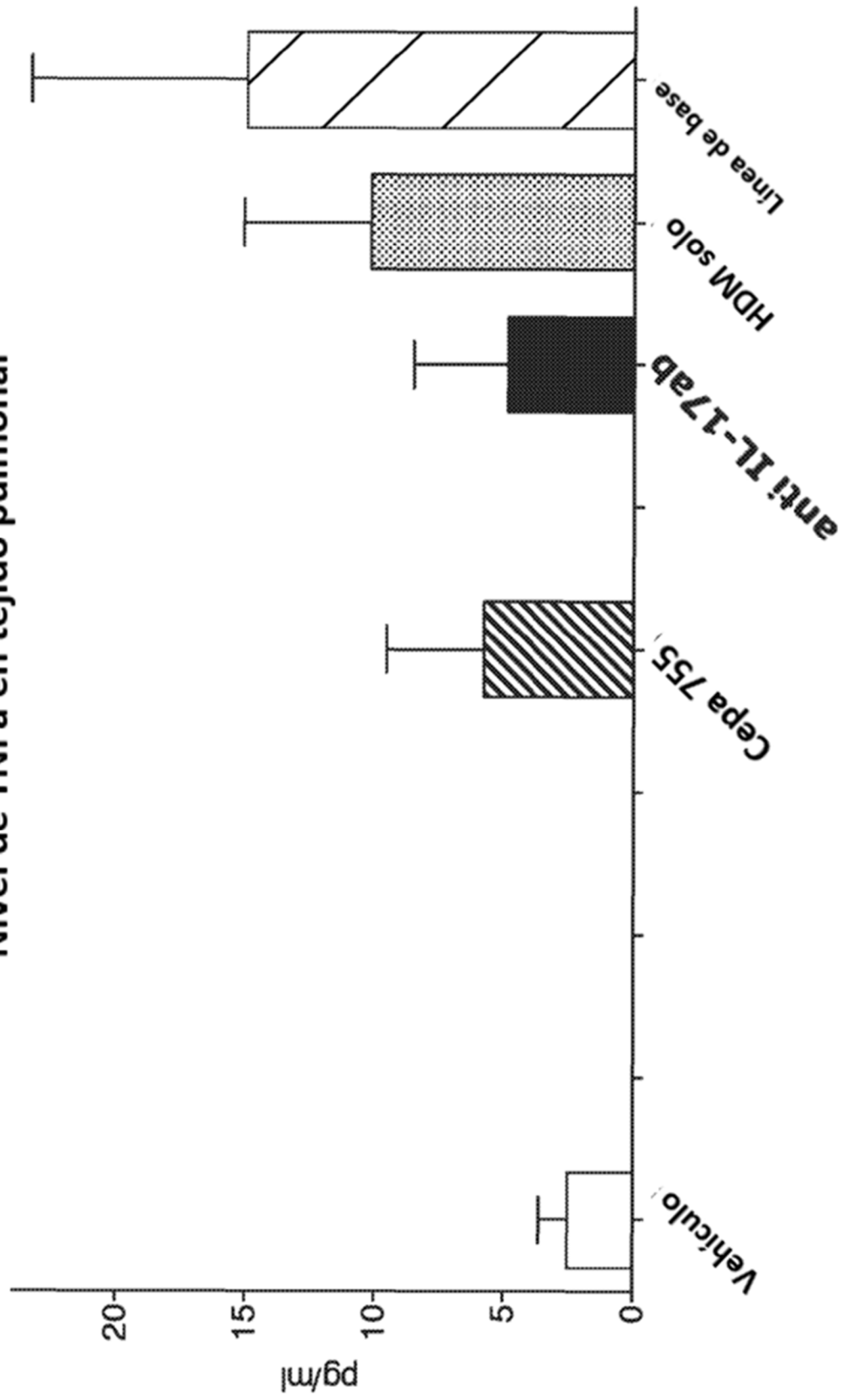


FIG. 54
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

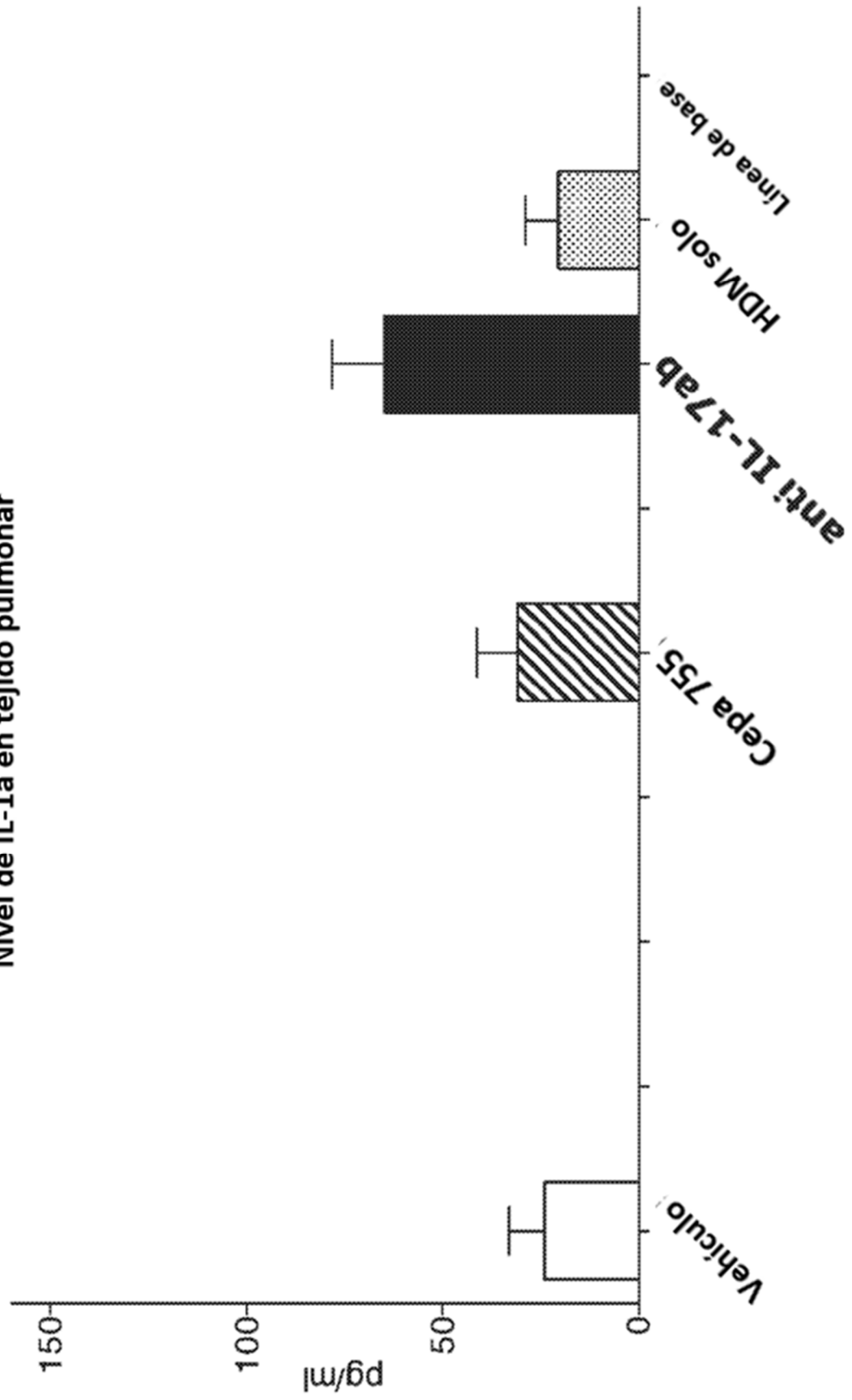


FIG. 55
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

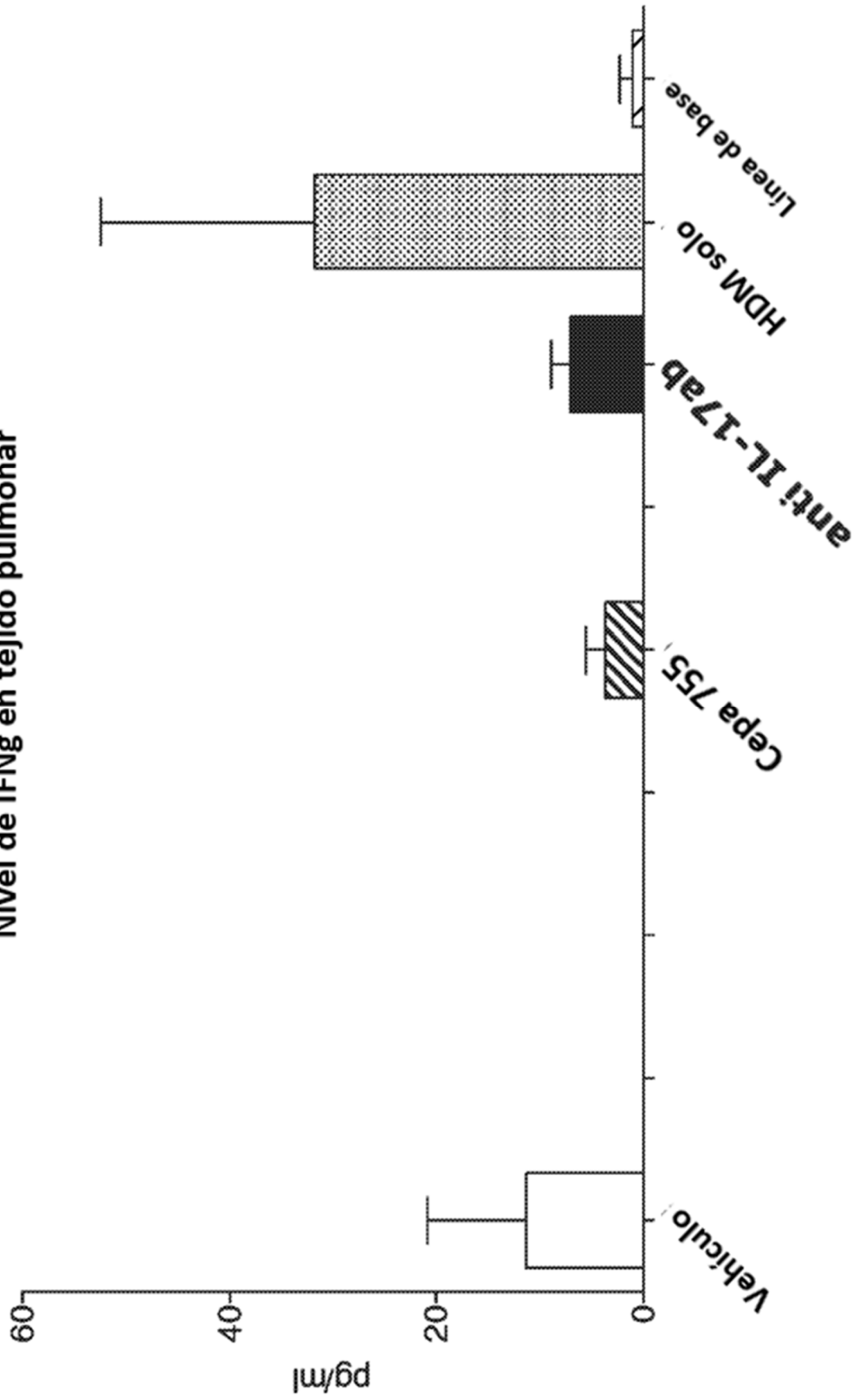


FIG. 56

Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

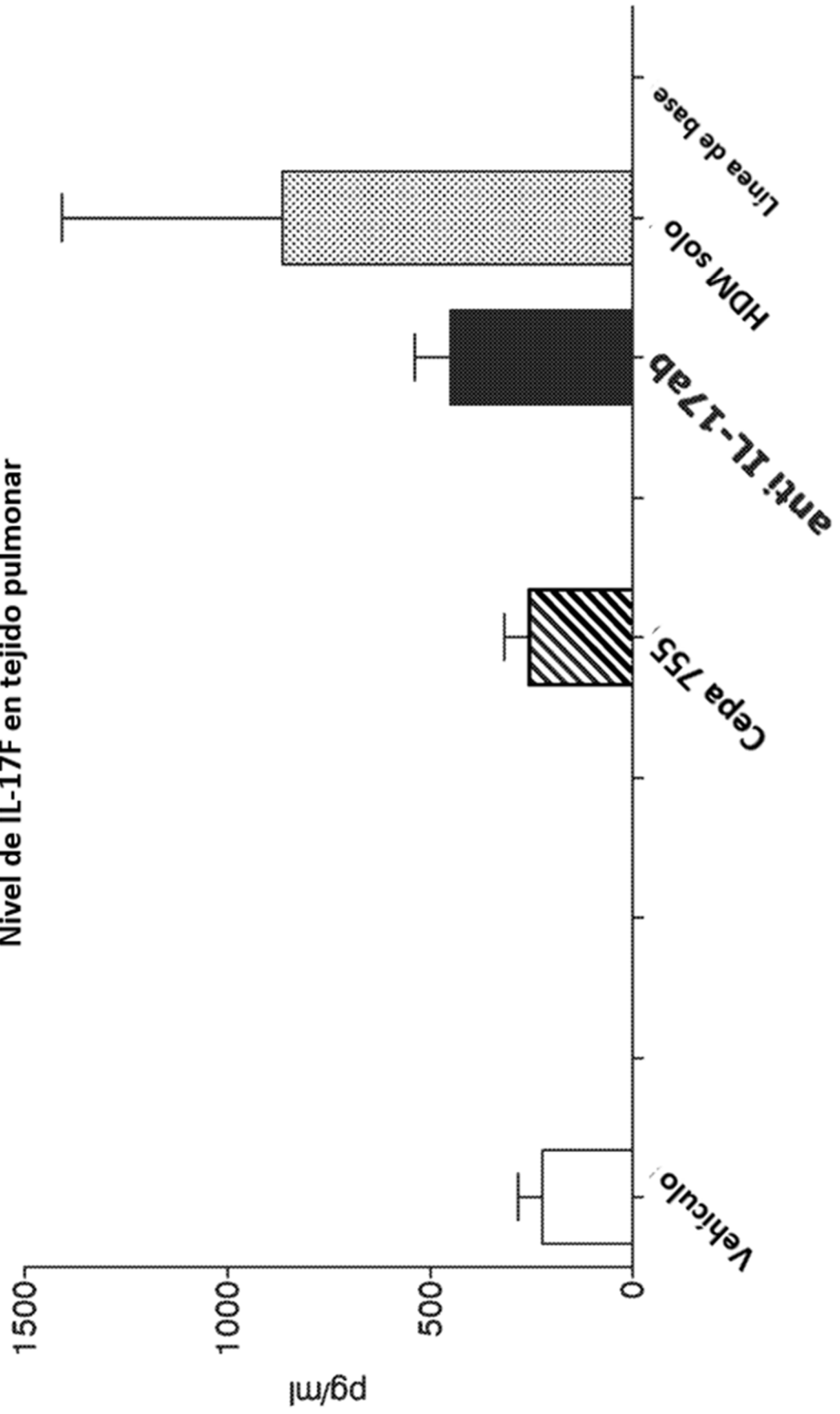


FIG. 57

Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

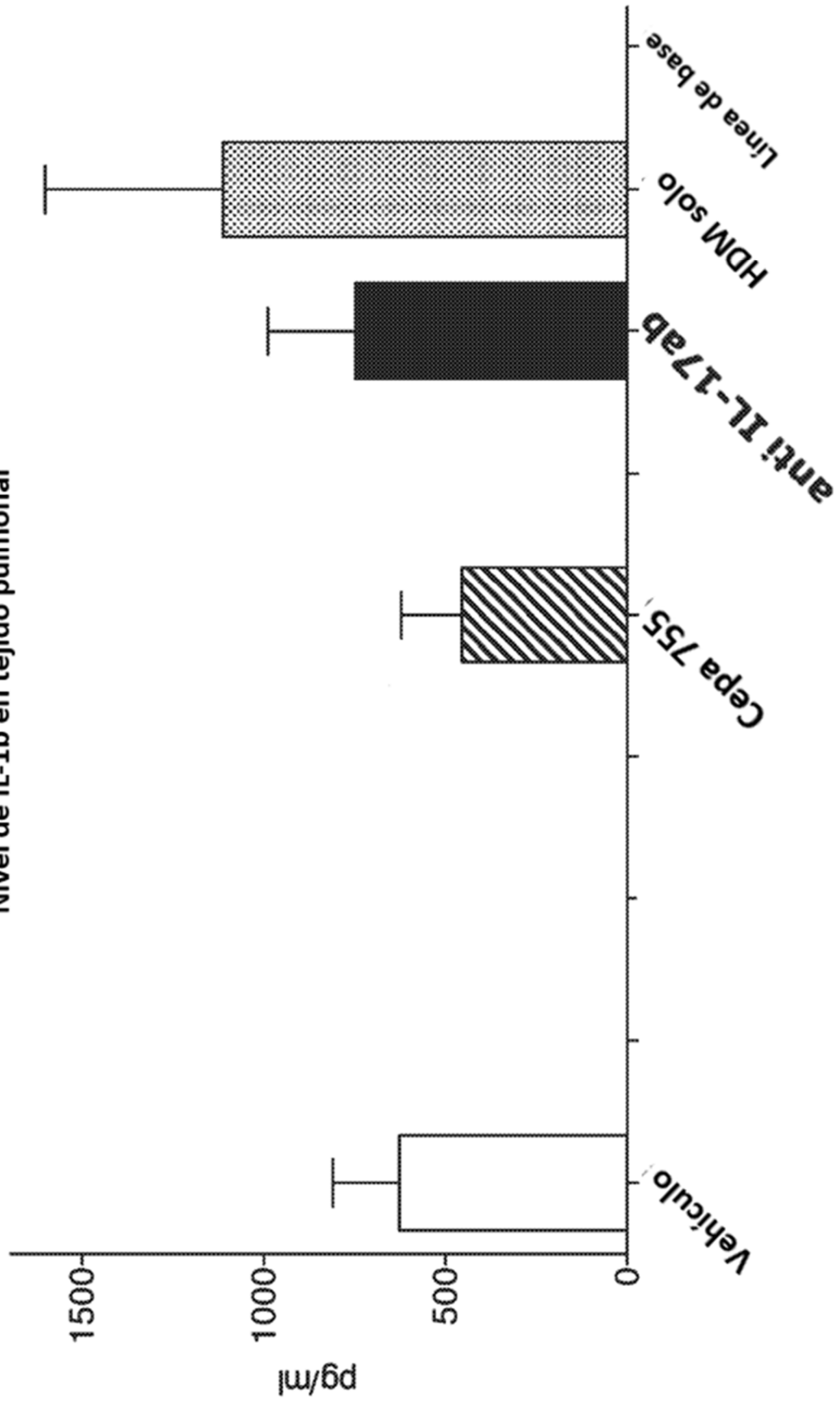


FIG. 58
Nivel de RANTES en tejido pulmonar

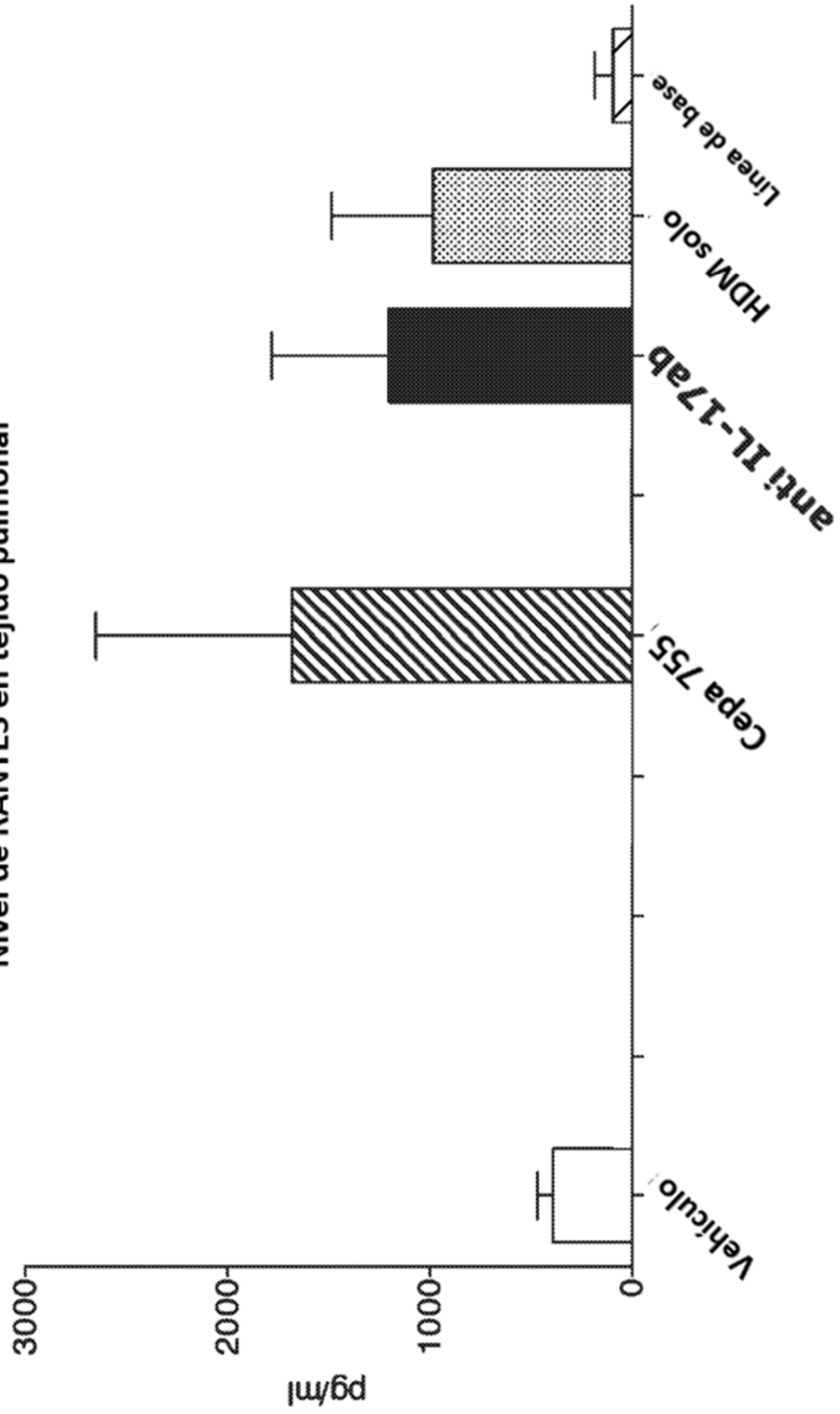


FIG. 59

Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

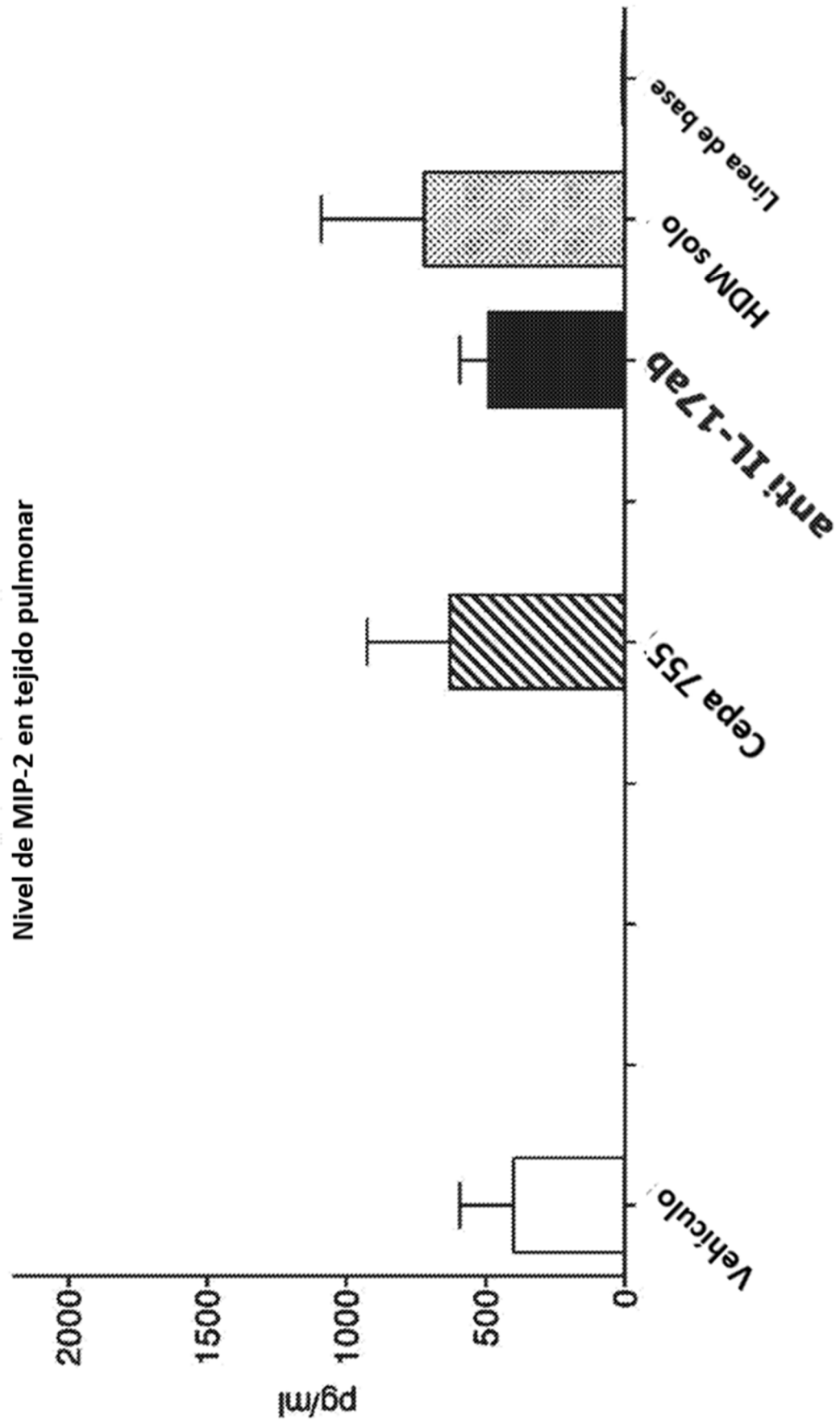


FIG. 60
Nivel de KC en tejido pulmonar

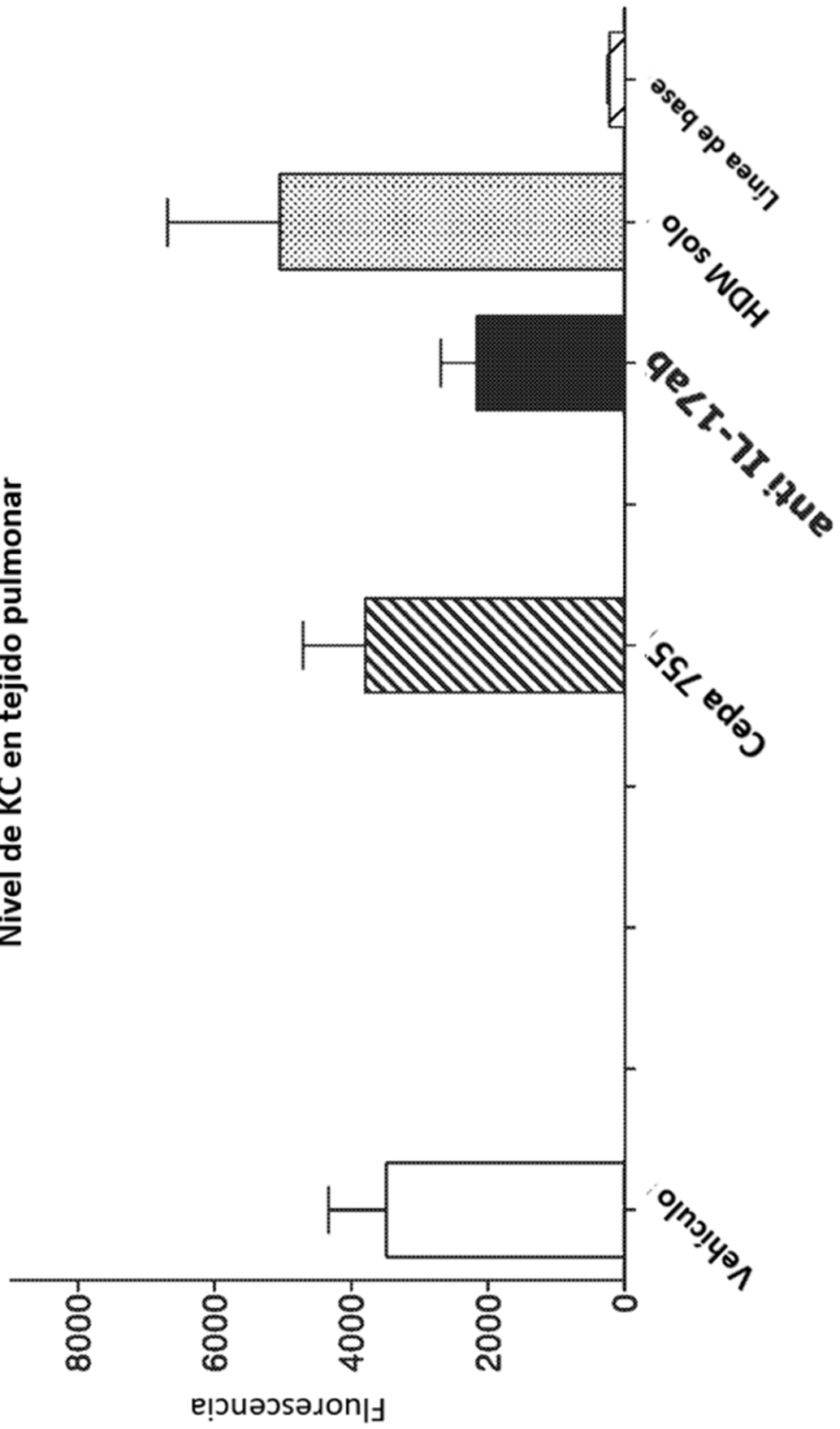


FIG. 61
Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

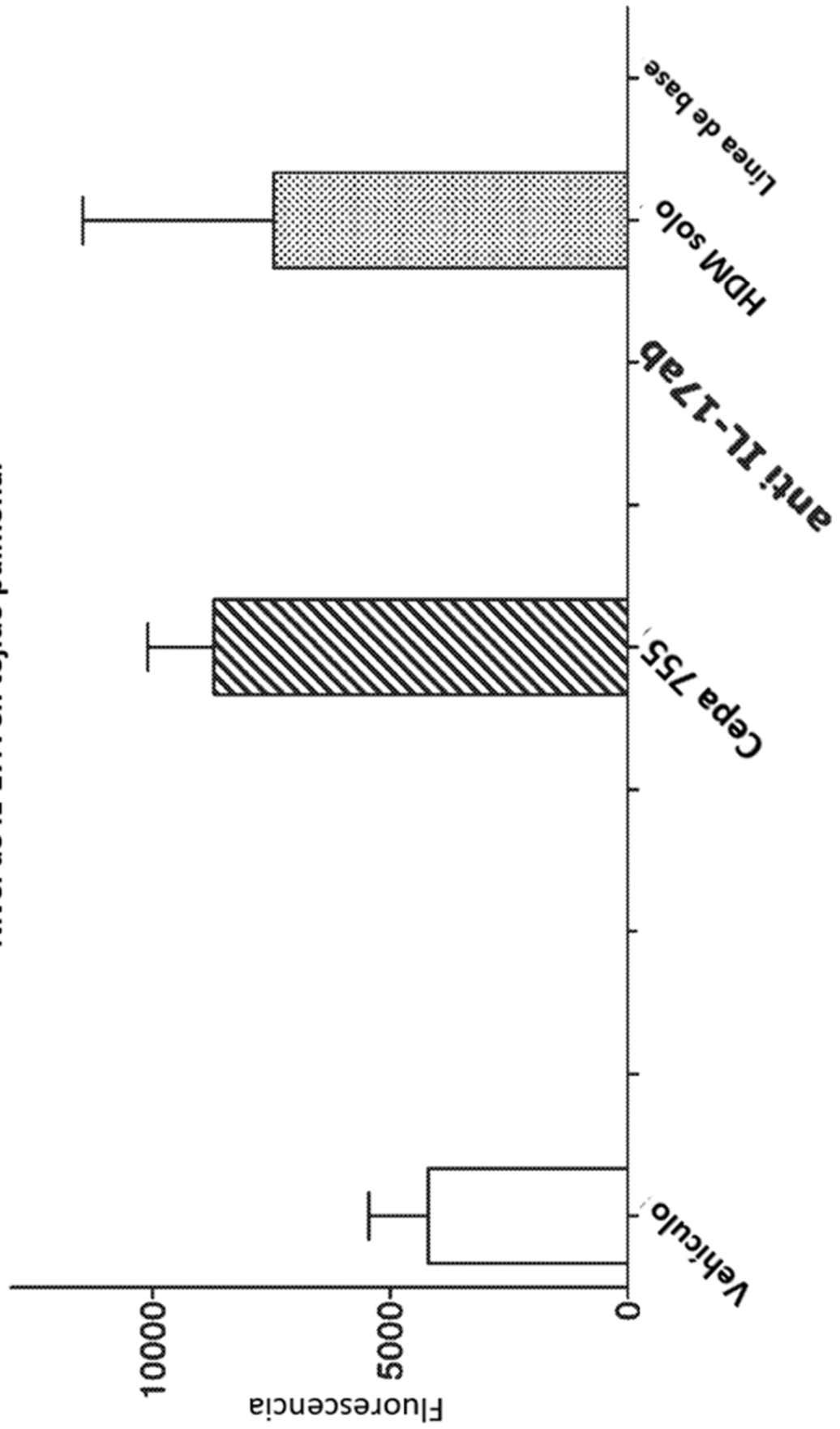


FIG. 62

Nivel de MIP-1a en tejido pulmonar

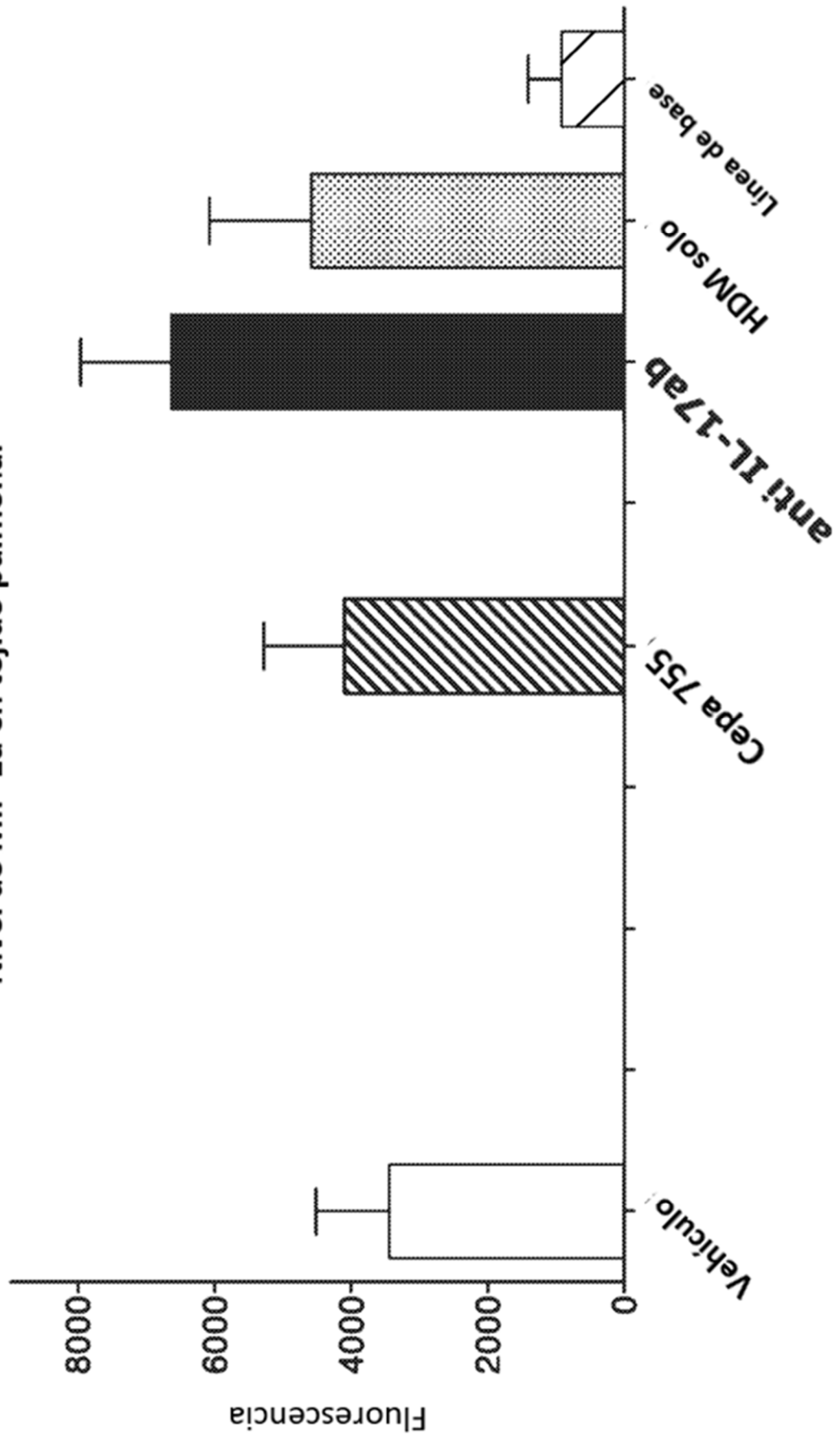


FIG. 63
Nivel de IL-33 en tejido pulmonar

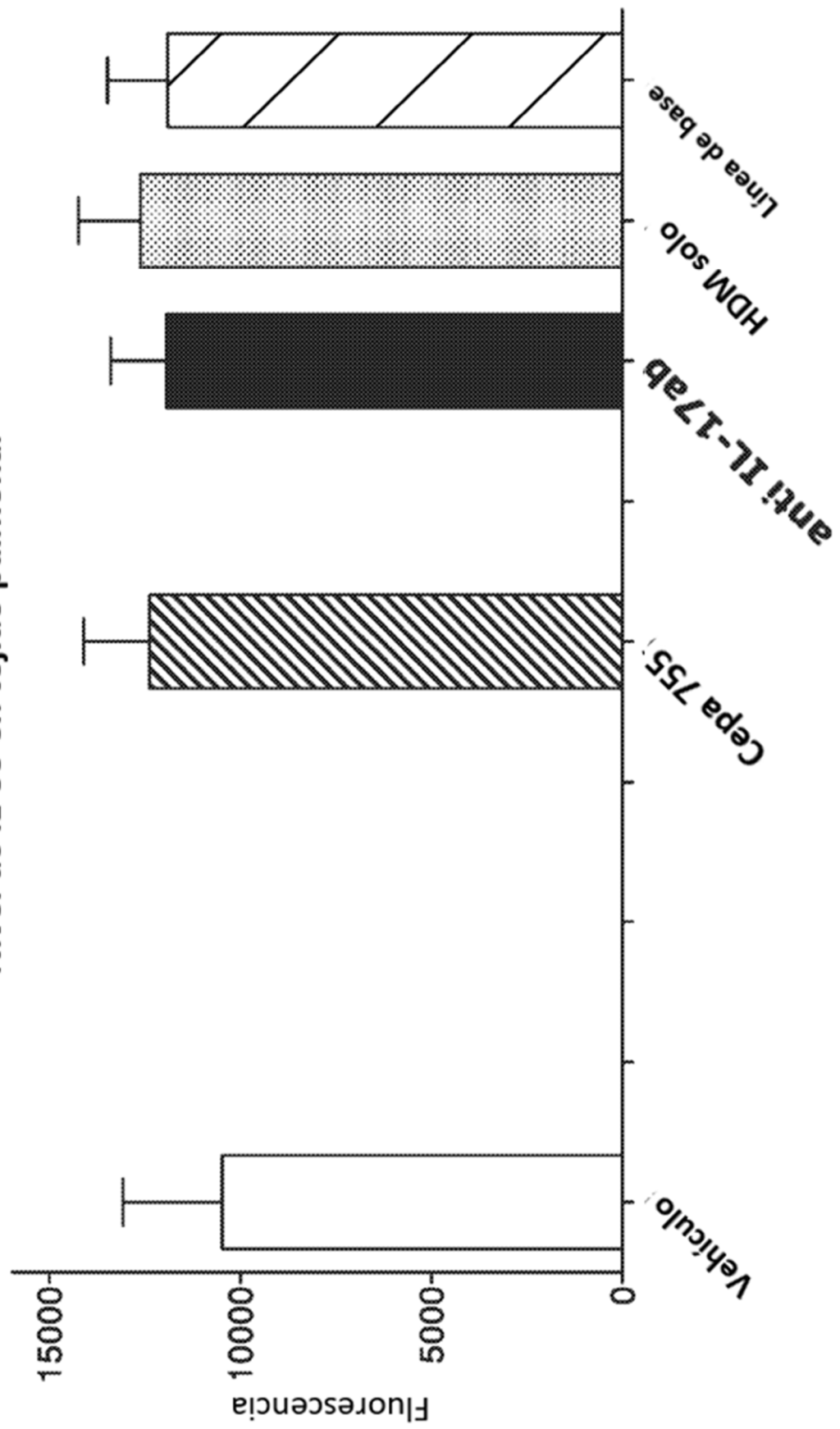
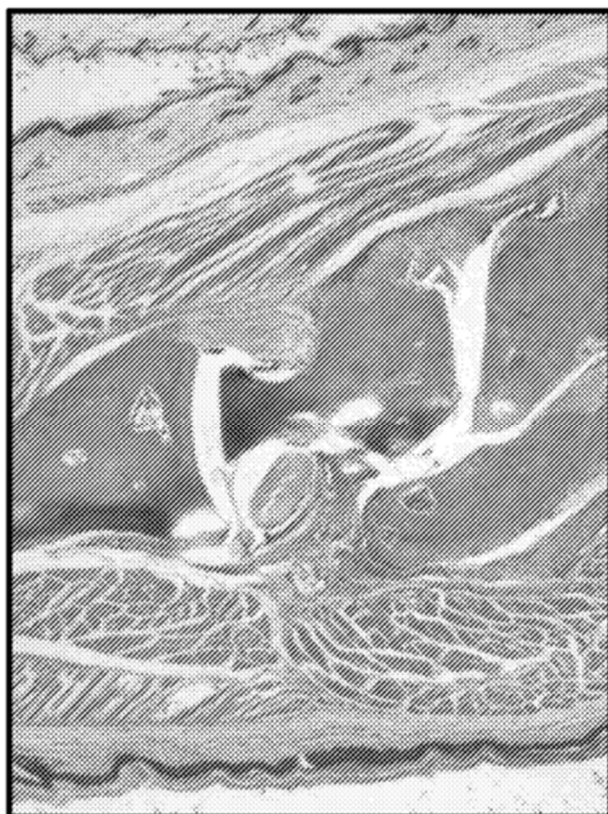


FIG. 64

Plantilla visual para la puntuación de histopatología



Grado 0

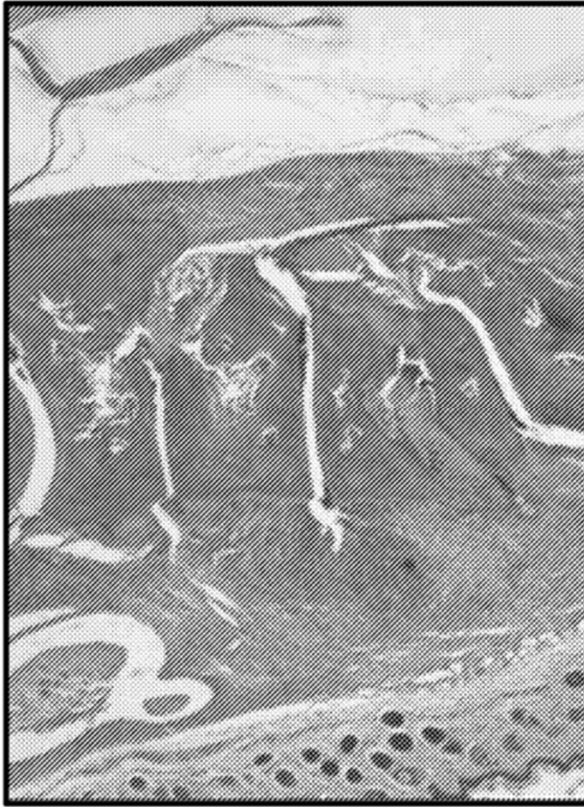


Grado 1

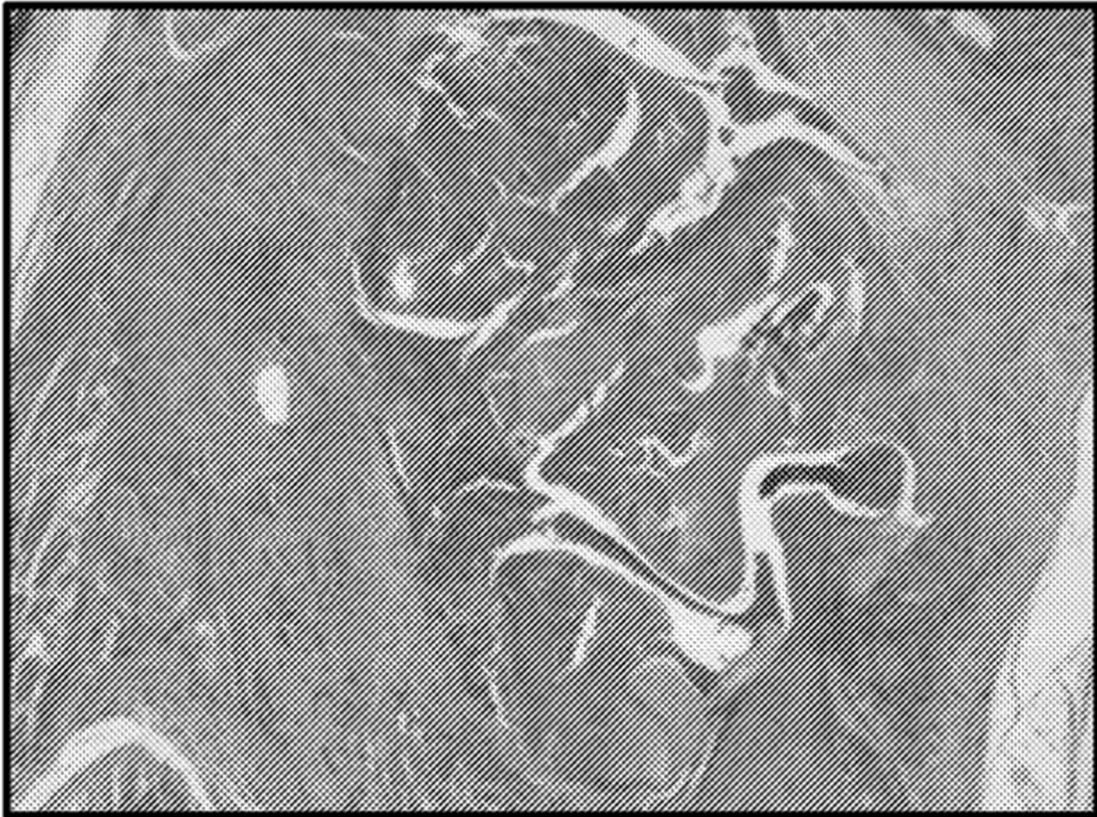
FIG. 64(cont.)



Grado 4



Grado 7



Grado 9

FIG. 64(cont.)

FIG. 65

Puntuaciones de histopatología: inflamación

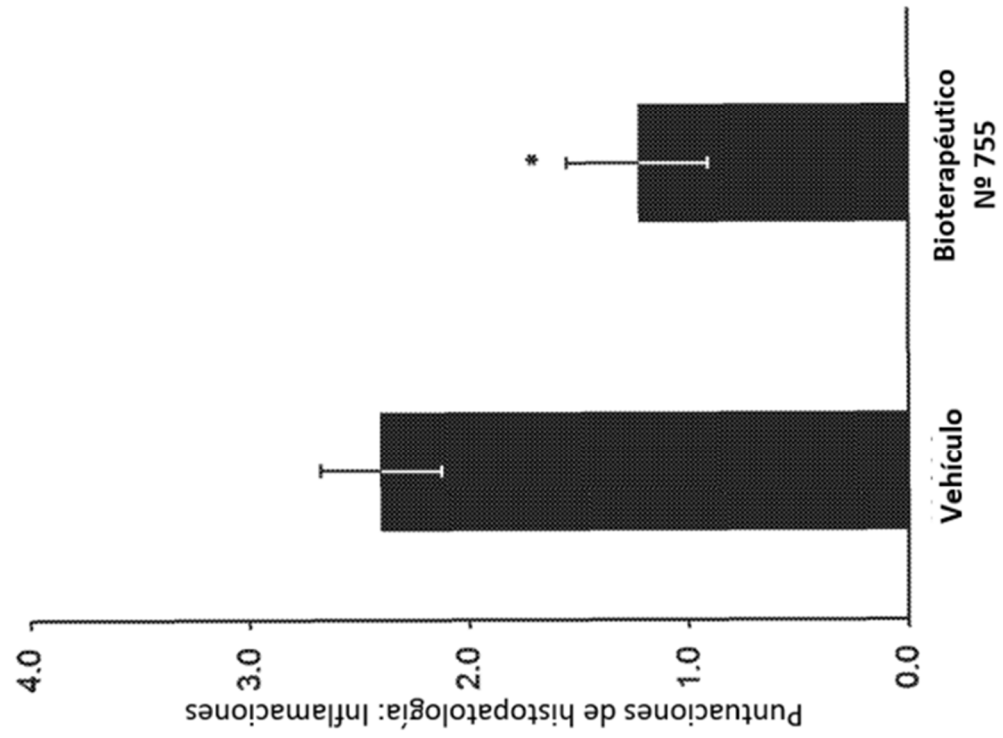


FIG. 66

Puntuaciones de histopatología: cartílago

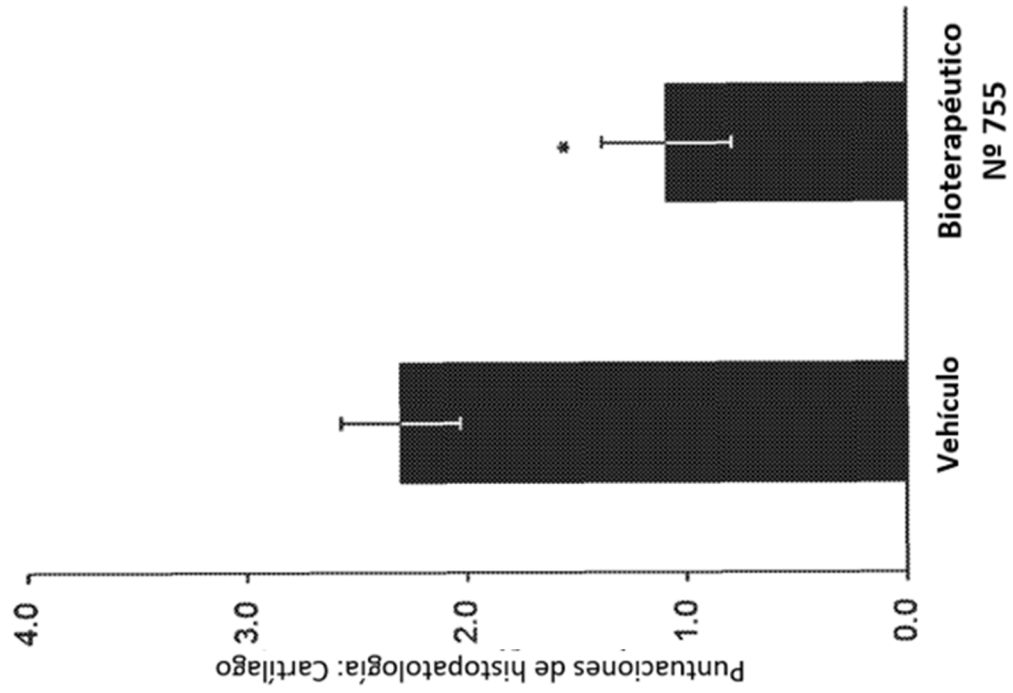


FIG. 67

Puntuaciones de histopatología: hueso

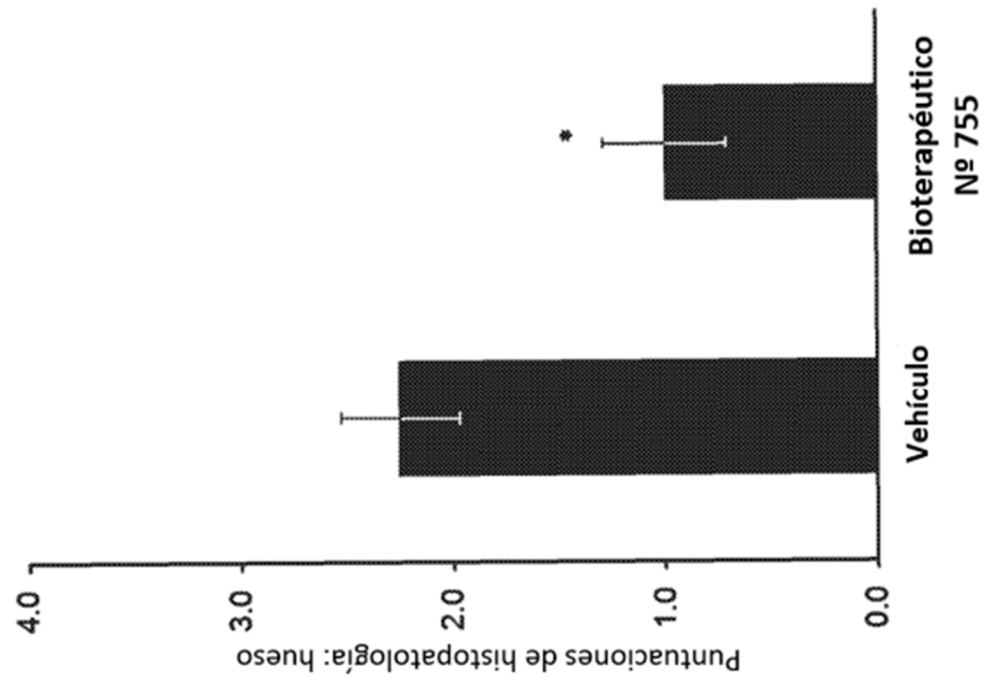


FIG. 68

Histopatología: Puntuaciones totales

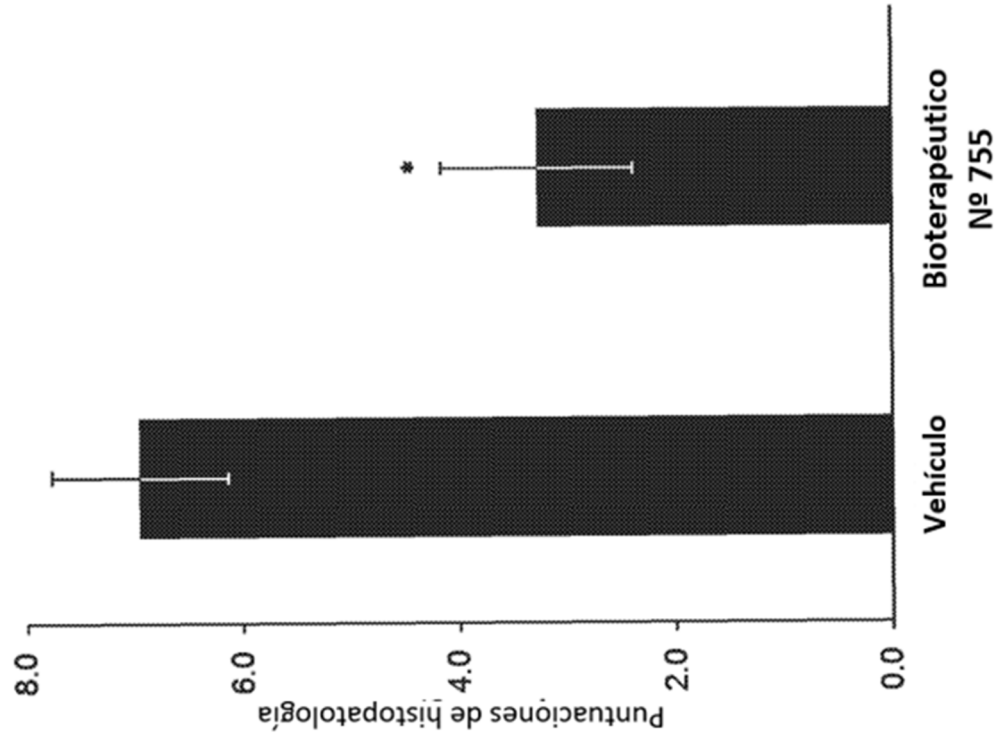
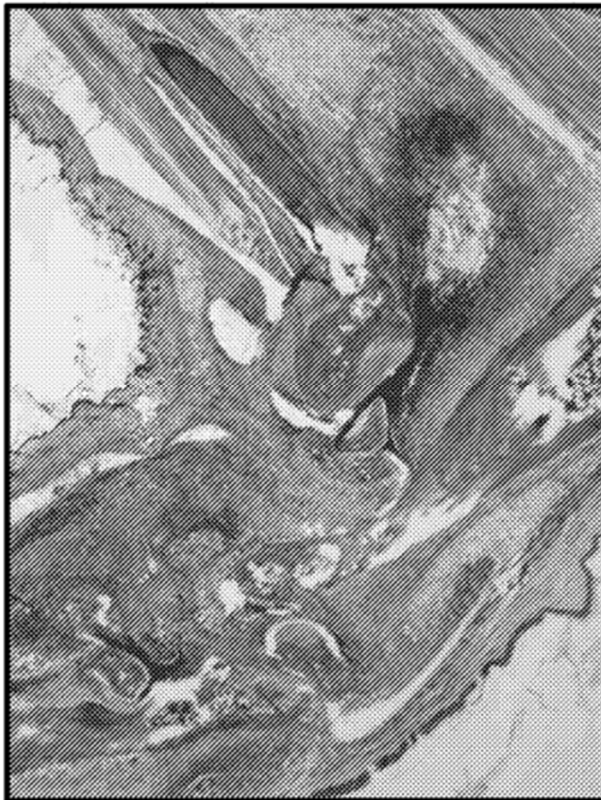
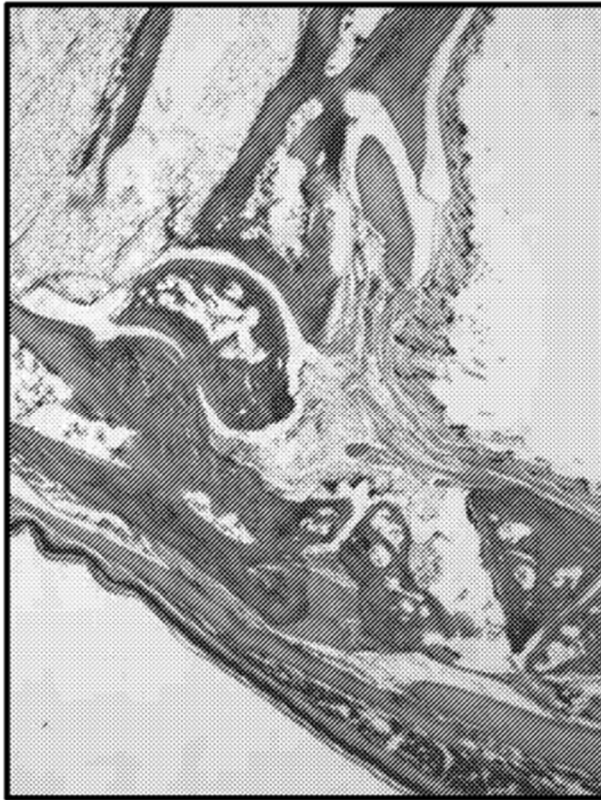


FIG. 69



Vehículo (#1.11R, Grado 9)



Cepa Nº 755 (#5.2L, Grado 0)

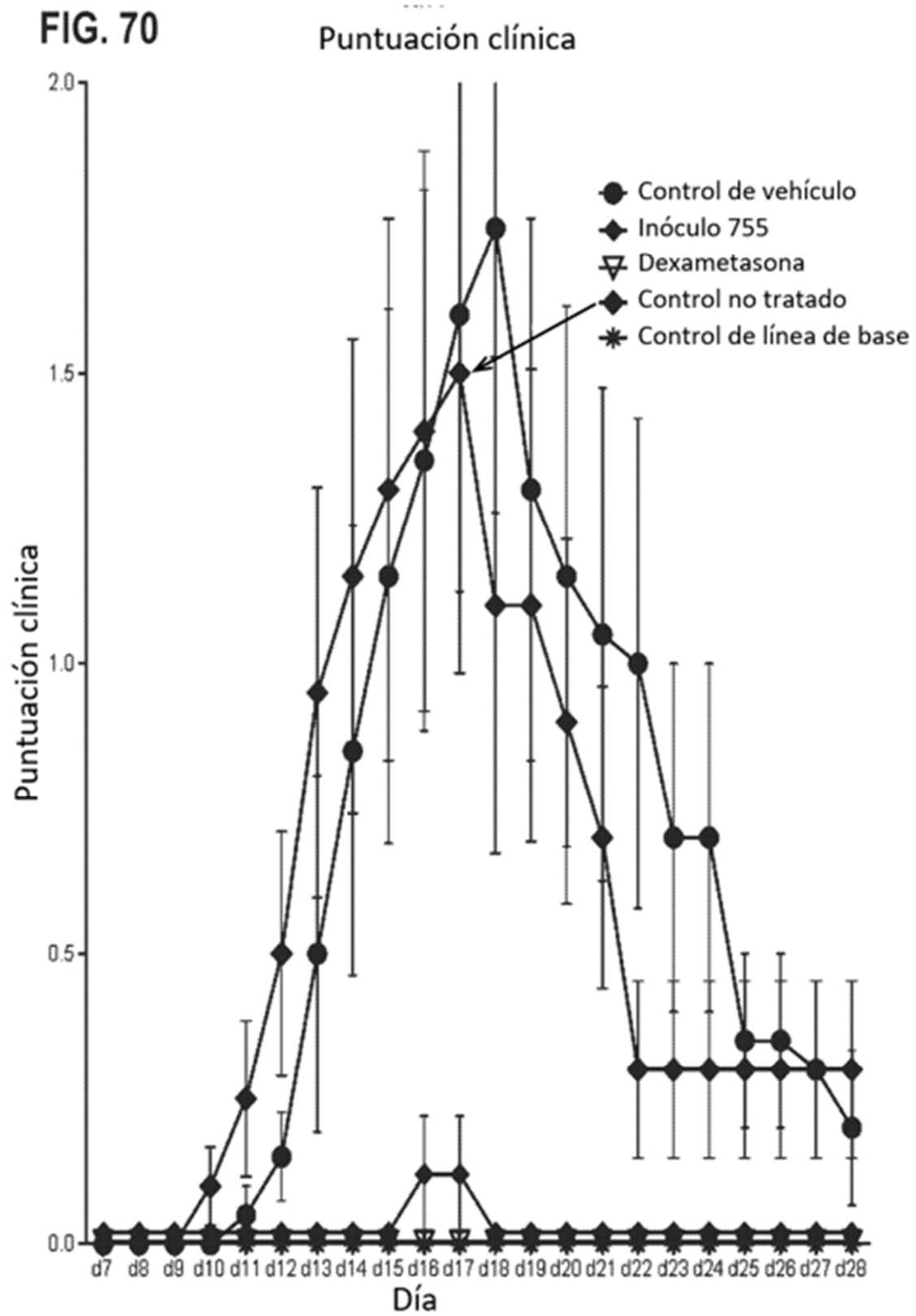


FIG. 71

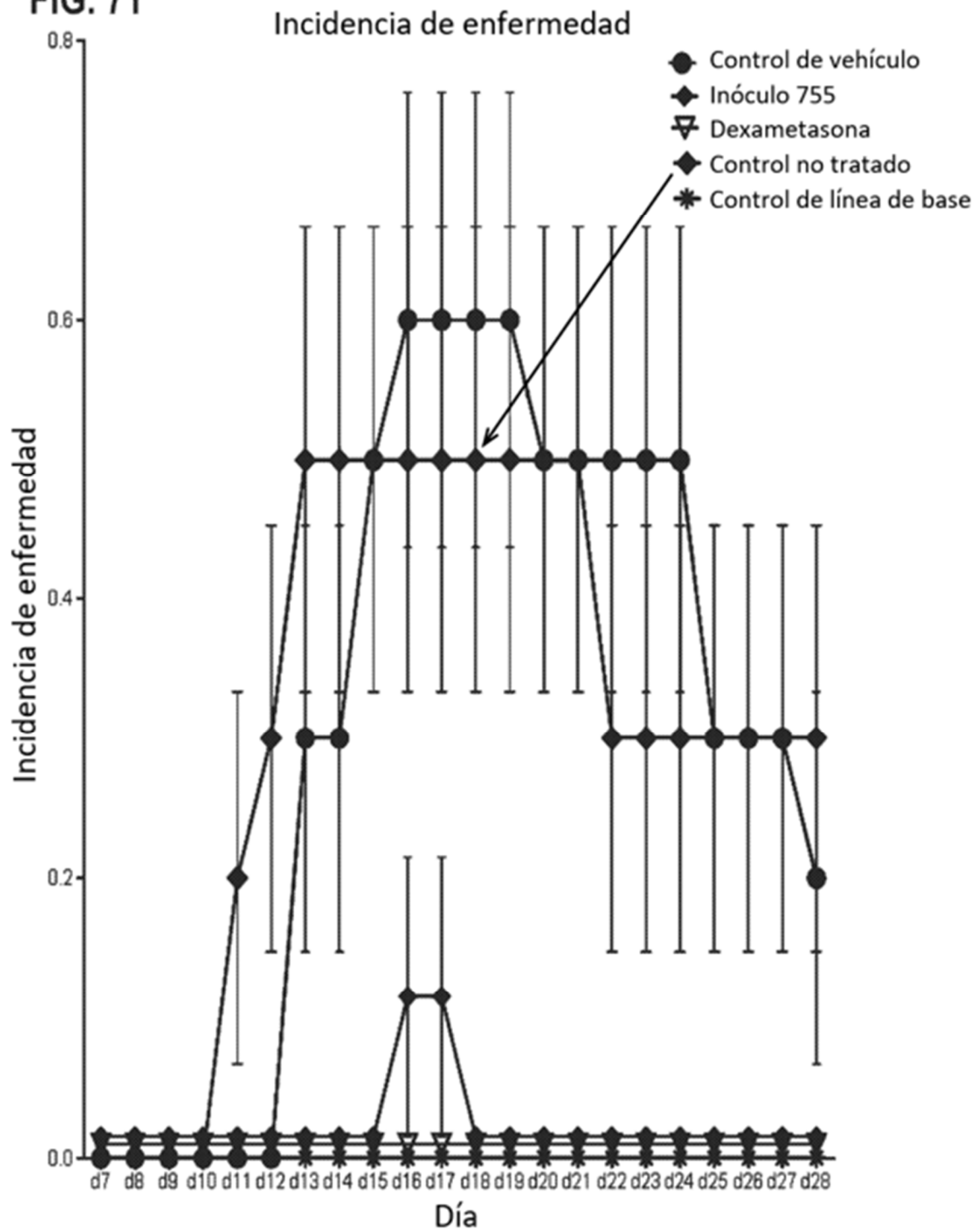


FIG. 72 Puntuaciones de TEFI

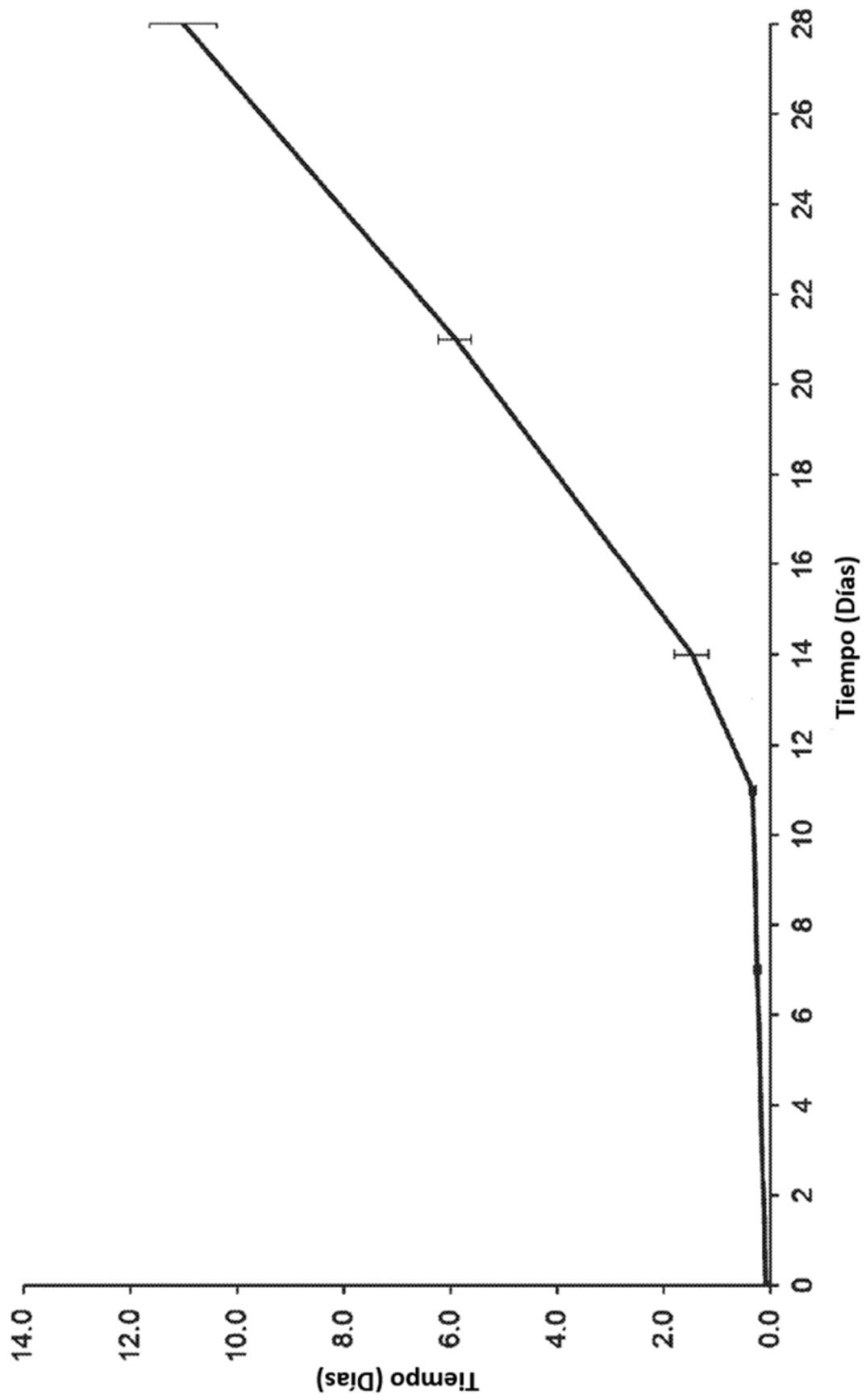


FIG. 73

Puntuaciones de TEFI

