



MD/EP 3204024 T2 2019.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3204024 (13) T2

(51) Int. Cl.: **A61K 35/74** (2015.01.01)  
**C12N 1/20** (2006.01.01)  
**A61P 1/00** (2006.01.01)  
**A61P 11/06** (2006.01.01)  
**A61P 29/00** (2006.01.01)  
**A61P 19/02** (2006.01.01)  
**A61P 25/28** (2006.01.01)  
**A61P 35/00** (2006.01.01)  
**A61K 35/745** (2015.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Numărul de depozit: e 2017 0057</p> <p>(22) Data de depozit: 2016.06.15</p> <p>(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16731639.7, 2016.06.15</p> <p>(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3204024, 2019.07.24</p> <p>(31) Numărul cererii prioritare: 201510470; 201520510; 201603786</p> <p>(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.15; 2015.11.20; 2016.03.04</p> <p>(33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB</p> | <p>(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31</p> <p>(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 30/2019, 2019.07.24</p> <p>(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2017, 2017.09.30</p> |
| <p>(71) Solicitant: 4D Pharma Research Limited, GB</p> <p>(72) Inventatori: GRANT George, GB; PATTERSON Angela Margaret, GB; MULDER Imke, GB; MCCLUSKEY Seanin, GB; RAFTIS Emma, GB</p> <p>(73) Titular: 4D Pharma Research Limited, GB</p> <p>(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru</p>                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

(54) Compoziții care conțin tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

1  
Invenția furnizează compoziții care cuprind tulpini bacteriene pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune.

2  
Secvențe: 5  
Revendicări: 15  
Figuri: 73

MD/EP 3204024 T2 2019.12.31

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

1

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

Sequences: 5

Claims: 15

Fig.: 73

2

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)****DOMENIUL TEHNIC**

Această invenție se află în domeniul compozițiilor cuprinzând tulpini bacteriene izolate de tractul digestiv mamifer și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolilor.

**BAZELE INVENȚIEI**

Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar acesta este expus la o mare diversitate de microbi materni și din mediu imediat după naștere. După aceea, are loc o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori precum modul de administrare, mediul, dieta și genotipul gazdă, care au un impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în particular în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine asemănătoare celei a adulților [1]. Microbiota intestinului uman conține mai mult de 500–1000 de filotipuri diferite aparținând în esență a două diviziuni bacteriene majore, Bacteroidete și Firmicute [2]. Relațiile simbiotice de succes care decurg din colonizarea bacteriană a intestinului uman au dat o mare varietate de funcții metabolice, structurale, protectoare și alte funcții benefice. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură degradarea componentelor dietetice indigestibile, cu eliberarea de produse secundare care furnizează o sursă importantă de nutrimente pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată la animalele fără germeni care au un sistem imunitar afectat, care este reconstituit funcțional în urma introducerii bacteriilor comensale [3–5].

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

În recunoașterea efectului pozitiv potențial pe care anumite tulpini bacteriene îl pot avea asupra intestinului animal, diverse tulpini au fost propuse pentru utilizarea în tratamentul diferitelor boli (vezi, de exemplu, [10–13]). De asemenea, anumite tulpini, inclusiv mai ales tulpini de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*, au fost propuse pentru utilizare în tratarea diferitelor boli inflamatorii și autoimune care nu sunt legate direct de intestine (vezi [14] și [15] pentru discuții). Cu toate acestea, relația dintre diferitele boli și diferitele tulpini bacteriene și efectele precise ale tulpinilor bacteriene particulare asupra intestinului și la nivel sistemic și asupra oricăror tipuri de boli sunt slab caracterizate.

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

WO 2011/153226 descrie produse farmaceutice folosind constituenți celulari din diverse specii de *Bacteroides*.

US 2014/335131, CN 104546935, CN 103156888 și CN 104546942 descriu utilizarea *Bacteroides fragilis*, *thetaitaomicron*, *vulgatus* și *dorei* în terapie.

US 9011834 descrie prepararea unei populații de spori bacterieni tratați cu etanol.

**REZUMATUL INVENȚIEI**

Invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Bacteroides* având o secvență de 16s ARNr care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli inflamatorii sau autoimune.

Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune. În particular, inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. În particular, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Bacteroides* poate fi eficace pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Bacteroides coprocola* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv cea a răspunsului inflamator Th17, în modelele de astm, artrită reumatoidă și scleroză multiplă la șoarece.

Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini bacteriene din acest gen poate reduce nivelurile de citokine care fac parte din calea Th17, inclusiv IL-17, poate atenua răspunsul inflamator Th17 și poate oferi beneficii clinice în modelele de șoarece de boli inflamatorii și autoimune mediate de IL-17 și calea Th17.

În aplicații particulare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană a genului *Bacteroides* având o secvență de 16s ARNr care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO:

4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei condiții selectate din grupul constând din: scleroză multiplă; artrită, cum ar fi artrita reumatoidă, oasteoartrita, artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boală inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boală celiacă; astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boală pulmonară obstructivă cronică (COPD); uveită; sclerită; vasculită; boală Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și rejetul de alogrefă. Efectul indicat pentru tulpinile bacteriene din gen *Bacteroides* asupra răspunsului inflamator Th17 poate oferi beneficii terapeutice pentru boli și condiții mediate de către IL-17 și calea Th17, cum ar fi cele enumerate mai sus.

În aplicații preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Bacteroides* având o secvență de 16s ARNr care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofil sau astmul alergic. Inventatorii au identificat că aceste tratamente cu tulpini de *Bacteroides* pot reduce recrutarea de neutrofile și eozinofile în plămâni, ceea ce poate ajuta la tratarea sau prevenirea astmului. Mai departe, inventatorii au testat și au demonstrat eficacitatea tulpinilor de *Bacteroides* în modelele de astm la șoareci. În anumite aplicații, compoziția este utilizată într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului neutrofil sau a astmului eozinofil. Efectul prezentat de către compozițiile conform invenției asupra neutrofilelor și eozinofilelor înseamnă că acestea pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea sau prevenirea astmului neutrofil și a astmului eozinofil. Într-adevăr, în anumite aplicații, compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator neutrofil în tratamentul sau prevenirea astmului, sau compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator eozinofil în tratamentul sau prevenirea astmului. În aplicațiile preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Bacteroides coprocola*, pentru utilizarea în tratamentul astmului, în particular a astmului neutrofil.

În alte aplicații preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Bacteroides* având o secvență de 16s ARNr care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide. Inventatorii au găsit că acest tratament cu tulpini de *Bacteroides* poate oferi beneficii clinice într-un model de artrită reumatoidă la șoareci și poate reduce umflarea articulațiilor. În unele aplicații preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Bacteroides coprocola*, pentru utilizarea în tratamentul artritei reumatoide. Compozițiile folosind *Bacteroides coprocola* poate fi eficiente în particular pentru tratarea artritei reumatoide.

În alte aplicații preferate, invenția oferă o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Bacteroides*, având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a sclerozei multiple. Inventatorii au găsit că acest tratament cu tulpini de *Bacteroides* poate reduce incidența și severitatea bolii într-un model de șoarece cu scleroză multiplă. În unele aplicații preferate, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană a speciei *Bacteroides coprocola*, pentru utilizare în tratamentul sclerozei multiple. Compozițiile folosind *Bacteroides coprocola* pot fi eficiente în particular pentru tratarea sclerozei multiple.

În alte aplicații preferate, invenția oferă o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană a genului *Bacteroides* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a uveitei, cum ar fi uveita posterioară. În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Bacteroides coprocola*, pentru utilizare în tratamentul uveitei.

În anumite aplicații, compozițiile dezvăluite aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau a unei condiții mediate de către IL-17 sau de către calea Th17. În particular, compozițiile dezvăluite aici pot fi utilizate în reducerea producției de IL-17 sau în reducerea diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple. De preferință, dezvăluirea furnizează compoziții care cuprind o tulpină bacteriană din specia *Bacteroides coprocola*, pentru utilizare în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple, sau a astmului, artritei reumatoide, sclerozei multiple, uveitei sau cancerului. În anumite aplicații, compoziția este destinată utilizării într-un pacient cu niveluri crescute de IL-17 sau celule Th17. Efectul asupra răspunsului inflamator Th17 indicat pentru tulpinile de *Bacteroides* poate fi deosebit de benefic pentru astfel de pacienți.

În aplicațiile preferate ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Bacteroides coprocola*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 99%,

99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 4. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența de ARNm 16s reprezentată de SEQ ID NO: 4.

În aplicații preferate suplimentare ale dezvoltării, tulpina bacteriană din compoziție este de *Bacteroides thetaiotaomicron*. Se pot utiliza și tulpini strâns înrudite, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a tulpinii bacteriene de *Bacteroides thetaiotaomicron*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 5. De preferință, tulpina bacteriană dezvoltată aici are secvența de ARNm 16s reprezentată de SEQ ID NO: 5.

În alte aplicații preferate dezvoltate aici, tulpina bacteriană din compoziție este de *Bacteroides fragilis*. Se pot utiliza și tulpini strâns înrudite, cum ar fi tulpinile bacteriene care au un genom cu identitate de secvență cu CR626927.1.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției este destinată administrării orale. Administrarea orală a tulpinilor conform invenției poate fi eficientă pentru tratarea bolilor și a afecțiunilor mediate de calea IL-17 sau Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite livrarea către intestin și/sau colonizarea parțială sau totală a acestuia.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili din punct de vedere farmaceutic.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției cuprinde o tulpină bacteriană care a fost liofilizată. Liofilizarea este o tehnică eficientă și convenabilă pentru prepararea compozițiilor stabile care permit eliberarea bacteriilor.

În anumite aplicații, invenția furnizează un produs alimentar care cuprinde compoziția descrisă mai sus.

În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție de vaccin care cuprinde compoziția descrisă mai sus.

În dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă pentru terapie. S-a dovedit că tulpina conform invenției este eficientă pentru tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul și scleroza multiplă. Prin urmare, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții care cuprind astfel de celule sau culturi biologice pure ale unor astfel de celule. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408 pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise aici.

## SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

**Figura 1:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Numărul total de celule din fluidul BAL.

**Figura 2:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Numărul total de eozinofile din BALF.

**Figura 3:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Proporția de eozinofile în BALF.

**Figura 4:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Numărul total de macrofage din BALF.

**Figura 5:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Proporția de macrofage în BALF.

**Figura 6:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Numărul total de neutrofile din BALF.

**Figura 7:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Proporția de neutrofile în BALF.

**Figura 8:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Numărul total de limfocite din BALF.

**Figura 9:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Proporția de limfocite în BALF.

**Figura 10:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Număr total de celule din fluidul BAL.

**Figura 11:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de eozinofile din BALF.

**Figura 12:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de eozinofile în BALF.

**Figura 13:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de macrofage din BALF.

**Figura 14:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de macrofage în BALF.

**Figura 15:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de neutrofile din BALF.

**Figura 16:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de neutrofile în BALF.

**Figura 17:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Numărul total de limfocite din BALF.

**Figura 18:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Proporția de limfocite în BALF.

**Figura 19:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Masa corporală, zile între -14 și 0. Datele sunt prezentate ca procente medii  $\pm$  ESM din masa inițială (ziua -14). Semnificație statistică:  $\blacktriangle$   $p < 0,05$  și  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$   $p < 0,0001$  în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

**Figura 20:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Mase corporale, zilele 0 până la 42. Datele sunt prezentate ca procente medii  $\pm$  ESM din masa inițială (ziua 0).  $\blacktriangle$   $p < 0,05$ ,  $\blacklozenge$   $p < 0,05$ ,  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$   $p < 0,001$ ,  $\bullet\bullet\bullet\bullet$   $p < 0,0001$  în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

**Figura 21:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Scoruri clinice. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.  $\bullet\bullet\bullet\bullet$   $p < 0,0001$  în comparație cu ziua 21 din grupul tratat cu vehiculul.  $\blacklozenge$ ,  $O$   $p < 0,05$  în comparație cu grupul tratat cu vehiculul într-o anumită zi.

**Figura 22:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Răspunsul proliferativ al splenocitelor la colagenul II. Numere pe minut având mediul de fundal scăzut [stimulat de către CII – mediu de fundal] pe baza încorporării 3H-TdR. Toate datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.

**Figura 23:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IFN $\gamma$  în supernatanții culturii de țesuturi din grupul tratat cu vehicul. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

**Figura 24:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-17A în supernatanții culturii de țesuturi din grupul tratat cu vehicul. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

**Figura 25:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-10 în supernatanții culturii de țesuturi din grupul tratat cu vehicul. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

**Figura 26:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de IL-6 în supernatanții culturii de țesuturi din grupul tratat cu vehiculul. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

**Figura 27:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Niveluri de citokină în supernatanții culturii de țesuturi din grupul bioterapeutic # 675 tratat (grupul 4). Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.

**Figura 28:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – IgE totală în ser.

**Figura 29:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – IgG1 specifică HDM în ser.

**Figura 30:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – IgE totală în BALF.

**Figura 31:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – IgG1 specifică HDM în BALF.

**Figura 32:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare peribronchiolară.

**Figura 33:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare perivasculară.

**Figura 34:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Analiză histologică – Scorul inflamator mediu (Media atât a scorului infiltrației peribronchiolarului, cât și al celui al infiltrației perivascularului).

**Figura 35:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Analiză histologică – Scorul Mucusului.

**Figura 36:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-9 în țesutul pulmonar.

**Figura 37:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar.

**Figura 38:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IFN $\gamma$  în țesutul pulmonar.

**Figura 39:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar.

**Figura 40:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-4 în țesutul pulmonar.

**Figura 41:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-5 în țesutul pulmonar.

**Figura 42:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar.

**Figura 43:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul RANTES în țesutul pulmonar.

**Figura 44:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar.

**Figura 45:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul KC în țesutul pulmonar.

**Figura 46:** Model de astm indus de acarieni indus de praful casnic la șoareci – Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar.

**Figura 47:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG1 specifică HDM în ser.

**Figura 48:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG2a specifică HDM în ser.

5 **Figura 49:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG1 specifică HDM în BALF.

**Figura 50:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – IgG2a specifică HDM în BALF.

**Figura 51:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scor mediu de infiltrare peribronchiolară.

10 **Figura 52:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scorul mediu de infiltrare perivasculară.

**Figura 53:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Analiză histologică – Scor inflamator mediu (Media atât a scorului de infiltrare peribronchiolară cât și a scorului de infiltrare perivasculară).

**Figura 54:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul TNF $\alpha$  în țesutul pulmonar.

**Figura 55:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-1 $\alpha$  în țesutul pulmonar.

15 **Figura 56:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IFN $\gamma$  în țesutul pulmonar.

**Figura 57:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-17F în țesutul pulmonar.

**Figura 58:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar.

**Figura 59:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul RANTES în țesutul pulmonar.

**Figura 60:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar.

20 **Figura 61:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul KC în țesutul pulmonar.

**Figura 62:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar.

**Figura 63:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul MIP-1 $\alpha$  în țesutul pulmonar.

**Figura 64:** Model de astm neutrofil sever la șoareci – Nivelul IL-33 în țesutul pulmonar.

25 **Figura 65:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Șablon vizual pentru evaluarea de histopatologie. Imagini reprezentative prezentând scoruri compozite din articulațiile tarsale de șoarece într-un studiu de artrită indusă de collagen.

**Figura 66:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scoruri de inflamare. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM. \*\* p < 0,01 în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

30 **Figura 67:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scoruri de cartilaj din grupul tratat cu vehiculul. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.

**Figura 68:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scoruri osoase. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.

**Figura 69:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Scoruri totale. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.

35 **Figura 70:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Tulpină # 675. Datele sunt prezentate ca medie  $\pm$  ESM.

**Figura 71:** Model de artrită reumatoidă la șoareci – Histopatologie: Imagini reprezentative. ID-ul animalului (# n.n) și membrul (R pentru dreapta, L pentru stânga) sunt indicate între paranteze. Imaginea din stanga sus (vehicul): distrugerea extensivă a articulațiilor și oaselor cu inflamație și fibroză care se extinde până la țesuturile moi peri-articulare. Imagine inferioară (tulpina nr. 675): sinovită și bursită care se extinde focal la țesuturile peri-articulare, leziuni ușoare ale cartilajului articular și resturi intra-articulare, structura osoasă neafectată.

**Figura 72:** Model de scleroză multiplă la șoareci – Scorul clinic.

**Figura 73:** Model de scleroză multiplă la șoareci – Incidența bolii.

45 **DEZVĂLUIREA INVENȚIEI**

#### ***Tulpini bacteriene***

Compozițiile conform invenției cuprind o tulpină bacteriană a genului *Bacteroides* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4. Exemplele demonstrează că bacteriile din acest gen sunt utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Tulpinile bacteriene preferate sunt din specia *Bacteroides coprocola*.

50 Exemple de specii *Bacteroides* dezvăluite aici includ *Bacteroides massiliensis*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides thetaiotaomicron* și *Bacteroides caccae*. Un alt exemplu de specie *Bacteroides* dezvăluită aici sunt *Bacteroides fragilis*. *Bacteroides* este un gen de bacterii gram-negative, obligatoriu anaerobe. Speciile de *Bacteroides* sunt bacili care nu formează endospori și pot fi fie motili, fie nemotili, în funcție de specie. Speciile de *Bacteroides* constituie o porțiune substanțială din

flora gastrointestinală a mamiferelor și sunt esențiale pentru prelucrarea moleculelor complexe.

60 Celulele de *Bacteroides coprocola* din sange cultivate pe plăci de agar EG sunt strict anaerobe, care nu formează spori, nemotile și gram-negative. Tijele scurte sau celulele în formă de tijă au circa 0–8  $\mu$ m în lățime și lungime variabilă, în general în intervalul 1–4  $\mu$ m. Exemple de tulpini din speciile *Bacteroides coprocola* sunt descrise în [16]. Tulpina tip, M16<sup>T</sup> (= JCM 12979<sup>T</sup>= DSM 17136<sup>T</sup>), a fost

izolată din fecalele unui om sănătos. Două tulpini suplimentare [M11 (= JCM 12980) și M156 (= JCM 12981)] sunt incluse în această specie. Numerele de acces GenBank/EMBL/DBJ pentru secvențele genelor ARNr 16s ale acestor tulpini de *Bacteroides coprocola* sunt AB200223, AB200224 și AB200225 (dezvăluite aici ca SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 și SEQ ID NO: 3).

Bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42408 a fost testată în Exemple și este, de asemenea, menționată aici ca tulpina 675. O secvență ARNr 16s pentru tulpina 675 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 4. Tulpina 675 a fost depusă la autoritatea depozitară internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) la 13 mai 2015 ca „*Bacteroidales* 675” și a primit numărul de acces NCIMB 42408.

Genomul tulpinii 675 cuprinde un cromozom și o plasmidă. O secvență de cromozomi pentru tulpina 675 este furnizată în SEQ ID NO: 6 în lista de secvențe publicată în WO 2016/203217. O secvență plasmidică pentru tulpina 675 este furnizată în SEQ ID NO: 7 în lista de secvențe publicată în WO 2016/203217. Aceste secvențe au fost generate folosind platforma PacBio RS II.

Tulpinile bacteriene strâns legate de tulpina testată în Exemple sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 4. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența de ARNm 16s reprezentată de SEQ ID NO: 4.

O altă tulpină bacteriană preferată dezvăluită aici este tulpina de *Bacteroides thetaiotaomicron* depusă sub numărul de acces NCIMB 42341. Această tulpină a fost depusă la autoritatea depozitară internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) la 3 decembrie 2014.

Mai preferabil, tulpinile de *Bacteroides thetaiotaomicron* dezvăluite aici sunt tulpina de tip ATCC 29148 = CCUG 10774 = CIP 104206 = DSM 2079 = JCM 5827 = NCTC 10582 = VPI 5482 și tulpina WAL 2926 = ATCC 29741. O altă preferință de tulpină de *Bacteroides thetaiotaomicron* dezvăluită aici este tulpina descrisă în EP1448995. Numărul de acces pentru secvența ARNr-ului 16s al genei *Bacteroides thetaiotaomicron* tulpina WAL 2926 este M58763 (dezvăluită aici ca SEQ ID NO: 5).

În anumite cazuri, tulpina bacteriană dezvăluită aici are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu secvența de ARNr 16s a unei tulpini bacteriene de *Bacteroides thetaiotaomicron*. De preferință, tulpina bacteriană dezvăluită aici are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 5. Preferabil, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența de ARNm 16s reprezentată de SEQ ID NO: 5.

O tulpina preferată de *Bacteroides fragilis* dezvăluită aici este tulpina de tip ATCC 25285 = CCUG 4856 = CIP 77.16 = DSM 2151 = JCM 11019 = LMG 10263 = NCTC 9343. Numărul de acces pentru genomul complet al tulpinii de NCTC 9343 a *Bacteroides fragilis* este CR626927.1 (versiunea: CR626927.1 GI: 60491031).

În anumite cazuri, tulpina bacteriană dezvăluită aici are un genom cu identitate de secvență cu CR626927.1. În aplicații preferate, tulpina bacteriană dezvăluită aici are un genom cu cel puțin 90% identitate de secvență (de exemplu, cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) cu CR626927.1 pe cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din lungimea CR626927.1. De exemplu, tulpina bacteriană dezvăluită aici poate avea un genom cu cel puțin 90% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 70% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 90% identitate în secvență cu CR626927.1 pe 80% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 90% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 100% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 70% din lungimea CR626927.1 sau cel puțin 95% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 80% din lungimea CR626927.1 sau cel puțin 95% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 90% din lungimea CR626927.1 sau cel puțin 95% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 100% din lungimea CR626927.1 sau cel puțin 98% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 70% din lungimea CR626927.1 sau cel puțin 98% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 80% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 90% din lungimea CR626927.1, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu CR626927.1 pe 100% din lungimea CR626927.1.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217. În cazuri preferate, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență de cel puțin 90% (de exemplu, cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% secvență identitate) cu SEQ ID NO: 6 din WO



2016/203217 pentru cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217. De exemplu, tulpina bacteriană utilizată în invenție poate avea un cromozom cu identitate de secvență de cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 6 al WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 100% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 90% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 100% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 90% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 pe 100% din lungimea SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o plasmidă cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217. În cazuri preferate, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o plasmidă cu cel puțin 90% identitate de secvență (de exemplu, cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pentru o lungime de cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217. De exemplu, tulpina bacteriană utilizată în invenție poate avea o plasmidă cu identitate de secvență de cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 100% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 90% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 100% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 70% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 80% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 90% din lungimea SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217 pe 100% din SEQ ID NO: 7 din lungimea WO 2016/203217.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO 2016/203217 și o plasmidă cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 7 din WO 2016/203217.

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces 42408 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numerele de acces NCIMB 42341, ATCC 29148 sau ATCC 29741 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente pentru tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Un biotip este o tulpină înrudită strâns, care are aceleași caracteristici fiziologice și biochimice sau foarte similare.

Tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408 și care sunt adecvate pentru utilizarea în invenție pot fi identificate prin secvențializarea altor secvențe de nucleotide pentru o bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. De exemplu, substanțial întregul genom poate fi secvențializat și o tulpină de biotip pentru utilizare în invenție poate avea cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență pe cel puțin 80% din lungimea întregului genom (de exemplu, pe cel puțin 85 %, 90%, 95% sau 99% sau pe întregul genom). Alte secvențe adecvate pentru utilizarea în identificarea tulpinilor de biotipuri pot include

hsp60 sau secvențe repetitive, cum ar fi BOX, ERIC, (GTG)<sub>5</sub>, sau REP sau [17]. Tulpinile biotipului pot avea secvențe cu cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identitate de secvență cu secvența corespunzătoare a unei bacterii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408.

În mod alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate utilizând numărul de acces al depozitului NCIMB 42408 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiză PCR, de exemplu prin utilizarea polimorfismul de lungime amplificat prin fluorescență a fragmentului (FAFLP) și amprentare a elementului ADN repetitiv (rep)-PCR, sau profilarea proteinei, sau secvențializarea parțială a ADN-ului 16s sau 23s.

În anumite aplicații, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408 și care sunt adecvate pentru utilizarea în invenție sunt tulpini care furnizează același model ca o bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42408 atunci când sunt analizate prin analiza de restricție a ADN ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu atunci când se folosește enzima de restricție Sau3AI (pentru metode exemplare și discuții *vezi*, de exemplu, [18]). Alternativ, tulpinile de biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentație a carbohidraților ca o bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42408.

Alte tulpini de *Bacteroides* care sunt utile în compozițiile și metodele conform invenției, cum ar fi biotipurile unei bacterii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408, pot fi identificate folosind orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv analizele descrise în Exemple. De exemplu, tulpinile utilizate în invenție pot fi identificate prin cultivarea în YCFA anaerob și/sau administrarea bacteriilor la modelul de artrită indusă de collagen de tip II la șoareci și apoi evaluarea nivelurilor de citokine. În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere, tipuri metabolice și/sau antigeni de suprafață similari cu o bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42408 și sunt utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate de modulare imunitară comparabilă cu cea a tulpinii NCIMB 42408. În particular, o tulpină biotip va produce efecte comparabile asupra modelelor de boală astm, artrită și scleroză multiplă și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în particular a invenției este tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. Acesta este exemplul de tulpină 675 testată în exemple și demonstrată ca fiind eficientă pentru tratarea bolilor. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. Invenția furnizează, de asemenea, o cultură pură biologic din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408, pentru utilizare în terapie, în particular pentru bolile descrise aici.

Un derivat al tulpinii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al unei tulpini conform invenției poate fi modificat, de exemplu la nivel genetic, fără a reduce activitatea biologică. În particular, o tulpină derivată a invenției este activă terapeutic. O tulpină derivată va avea o activitate de modulare imunitară comparabilă cu tulpina NCIMB 42408 inițială. În particular, o tulpină derivată va declanșa efecte comparabile asupra modelelor de boală astm, artrită și scleroză multiplă și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple. Un derivat al tulpinii NCIMB 42408 va fi, în general, un biotip al tulpinii NCIMB 42408. Un derivat al NCIMB 42341 va fi, în general, un biotip al tulpinii NCIMB 42341.

Referirile la celulele tulpinii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpinile depuse sub numărul de acces NCIMB 42408, și astfel de celule sunt cuprinse în invenție. Referirile la celulele din tulpina *Bacteroides thetaiotaomicron* depusă sub numerele de acces NCIMB 42341, ATCC 29148 sau ATCC 29741 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpinile depuse sub numărul de acces NCIMB 42341, ATCC 29148 sau ATCC 29741.

În aplicațiile preferate, tulpinile bacteriene din compozițiile conform invenției sunt viabile și capabile să colonizeze parțial sau total intestinul.

#### Utilizări terapeutice

După cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene conform invenției sunt eficiente pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. În particular, tratamentul cu compoziții conform invenției obține o reducere a nivelurilor de IL-17A și a altor citokine ale căii Th17 și îmbunătățiri clinice ale modelelor animale ale condițiilor mediate de către IL-17 și calea Th17. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii și

autoimune și, în particular, a bolilor sau a condițiilor mediate de către IL-17. În particular, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru reducerea sau prevenirea dezvoltării răspunsului inflamator IL-17.

Celulele Th17 sunt un subset de celule T helper care produc, de exemplu, IL-17A, IL-17F, IL-21 și IL-22. Diferențierea celulelor Th17 și expresia IL-17 pot fi determinate de către IL-23. Aceste citokine și altele formează părți importante ale căii Th17, care este o cale de semnalizare inflamatorie bine stabilită, care contribuie și stă la baza unui număr de boli inflamatorii și autoimune (așa cum este descris, de exemplu, în [19–24]). Bolile în care calea Th17 este activată sunt boli mediate de către calea Th17. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi ameliorate sau ușurate prin reprimarea căii Th17, care se poate obține printr-o reducere a diferențierii celulelor Th17 sau o reducere a activității acestora sau o reducere a nivelului de citokine ale căii Th17. Bolile mediate de calea Th17 pot fi caracterizate de niveluri crescute de citokine produse de celulele Th17, cum ar fi IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (discutate în [25]). Bolile mediate de calea Th17 pot fi caracterizate prin exprimarea crescută a genelor asociate Th-17, cum ar fi Stat3 sau IL-23R. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi asociate cu niveluri crescute de celule Th17.

IL-17 este o citokină pro-inflamatorie care contribuie la patogeniza mai multor boli și condiții inflamatorii și autoimune. IL-17, așa cum este utilizat aici, se poate referi la orice membru al familiei IL-17, inclusiv IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E și IL-17F. Bolile și condițiile mediate de către IL-17 sunt caracterizate prin expresia ridicată a IL-17 și/sau prin acumularea sau prezența celulelor pozitive IL-17 într-un țesut afectat de boală sau condiție. În mod similar, bolile și condițiile mediate de către IL-17 sunt boli și condiții care sunt exacerbate de nivelurile ridicate de IL-17 sau o creștere a nivelurilor IL-17 și care sunt atenuate de nivelurile scăzute de IL-17 sau de o reducere a nivelurilor IL-17. Răspunsul inflamator IL-17 poate fi local sau sistemic.

Exemplele de boli și afecțiuni care pot fi mediate de către IL-17 sau calea Th17 includ scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriatcă sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielita optică (boala lui Devic); spondilita anchilozantă; spondiloartrita; psoriazisul; lupusul eritematos sistemic; boala inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boala celiacă; astmul, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boală pulmonară obstructivă cronică (COPD); uveita; sclerita; vasculita; boala Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizemul; parodontita; rinita alergică; și rețetul de alogrefă. În aplicații preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea uneia sau mai multora dintre aceste condiții sau boli. În aplicații preferate, aceste condiții sau boli sunt mediate de către IL-17 sau calea Th17.

În anumite cazuri, compozițiile dezvoltate aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune, în care respectivul tratament sau prevenire se realizează prin reducerea sau prevenirea creșterii răspunsului inflamator Th17. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea unui pacient cu o boală inflamatorie sau autoimună, în care pacientul are niveluri IL-17 crescute sau celule Th17 ridicate sau prezintă un răspuns inflamator Th17. În anumite aplicații, pacientul poate să fi fost diagnosticat cu o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică, sau compoziția conform invenției poate fi utilizată în prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune sau a unei condiții care se dezvoltă într-o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică. În anumite aplicații, boala sau starea poate să nu răspundă la tratamentul cu inhibitori de TNF- $\alpha$ . Aceste utilizări ale invenției pot fi aplicate oricăreia dintre bolile sau condițiile specifice enumerate în paragraful precedent.

IL-17 și calea Th17 sunt adesea asociate cu boli inflamatorii și autoimune cronice, astfel încât compozițiile conform invenției pot fi utile în particular pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau afecțiunilor cronice, așa cum sunt enumerate mai sus. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate la pacienții prezentând o boală cronică. În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în prevenirea dezvoltării bolii cronice.

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

În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IL-17, în particular a nivelurilor de IL-17A. În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției prevede o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$ , IL-8 sau IL-6. O astfel de reducere sau prevenire a nivelurilor crescute ale acestor citokine poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea bolilor și condițiilor inflamatorii și autoimune, în particular a celor mediate de către IL-17 sau calea Th17.

#### *Astmul*

În aplicații preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea astmului. Exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției obțin o reducere a recrutării de neutrofile și/sau eozinofile în căile respiratorii în urma sensibilizării și provocării cu extract de acarieni de praf domestic și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea astmului. Astmul este o boală cronică caracterizată prin inflamația și restricționarea căilor respiratorii. Inflamația în astm poate fi mediată de către IL-17 și/sau celulele Th17, astfel încât compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea astmului. Inflamația în astm poate fi mediată de eozinofile și/sau neutrofile.

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

În alte aplicații suplimentare, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea astmului neutrofil (sau a astmului ne-eozinofil). Numărul mare de neutrofile este asociat cu astmul sever care poate fi insensibil la tratamentul cu corticosteroizi. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea neutrofilelor pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului neutrofil.

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

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

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

În anumite aplicații, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară în astmul alergic sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare în tratamentul astmului alergic. În anumite aplicații, compozițiile reduc infiltrarea peribronhiolară și/sau perivasculară în astmul neutrofil sau sunt utilizate în reducerea infiltrării peribronhiolare și/sau perivasculară în tratamentul astmului alergic neutrofil.

În anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , RANTES, MIP-1 $\alpha$  sau IL-8.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate într-o metodă de tratare a astmului care duce la reducerea răspunsului inflamator eozinofil și/sau neutrofil. În anumite aplicații, pacientul care urmează să fie tratat are, sau a fost identificat anterior ca având valori crescute de neutrofile sau eozinofile, de exemplu, identificate prin prelevarea de sange sau analiza sputei. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării astmului la un nou-născut, atunci când sunt administrate nou-născutului sau unei femei însărcinate. Compozițiile pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării astmului la copii. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului cu debut la adulți. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru combaterea sau ameliorarea astmului. Compozițiile conform invenției pot fi utile în particular pentru reducerea simptomelor asociate astmului, care este agravat de alergenii, cum ar fi acarienii din praful domestic.

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

*Artrita*

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

In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru scăderea nivelurilor de IL-17 sau pentru prevenirea creșterii nivelurilor de IL-17 în tratamentul sau prevenirea RA. In anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de IL-17, în particular a nivelurilor IL-17A. In anumite aplicații, tratamentul cu compoziții conform invenției oferă o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IFN- $\gamma$  sau IL-6.

In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției are ca rezultat o reducere a umflării articulațiilor. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate la pacienții cu articulații umflate sau la pacienții identificați cu riscul de a avea articulații umflate. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate într-o metodă de reducere a umflării articulațiilor în RA.

In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției are ca rezultat o reducere a deteriorării cartilajelor sau a oaselor. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea deteriorării cartilajului sau a celei osoase în tratamentul RA. In anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacientului cu RA severă care prezintă risc de deteriorare a cartilajului sau osoasă.

Nivelurile crescute de IL-17 și numărul crescut de celule Th17 sunt asociate cu distrugerea cartilajelor și a oaselor în RA [27, 28]. IL-17 este cunoscută că activează distrugerea matricei în cartilaj și țesutul osos, și IL-17 are un efect inhibitor asupra producției matricei în condrocite și osteoblaste. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru prevenirea eroziunii osoase sau deteriorarea cartilajului în tratamentul RA. In anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacienților care prezintă eroziune osoasă sau leziuni ale cartilajelor sau pacienți identificați cu risc de eroziune osoasă sau deteriorare a cartilajelor.

TNF- $\alpha$  este, de asemenea, asociat cu RA, dar TNF- $\alpha$  nu este implicat în patogeniza etapelor târzii ale bolii. In schimb, IL-17 are un rol în toate etapele bolii cronice [29]. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea RA cronică sau RA în stadiu târziu, cum ar fi boala care include distrugerea articulară și pierderea cartilajului. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate tratării pacienților care au primit anterior o terapie anti-TNF- $\alpha$ . In anumite aplicații, pacienții care urmează a fi tratați nu răspund sau nu mai răspund la terapia anti-TNF- $\alpha$ .

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

Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru gestionarea sau atenuarea RA. Compozițiile conform invenției pot fi utile în particular pentru reducerea simptomelor asociate cu umflarea articulației sau distrugerea oaselor. Tratamentul sau prevenirea RA se po referi, de exemplu, la o ameliorare a gravității simptomelor sau la o reducere a frecvenței de exacerbări sau a gamei de declanșatori care reprezintă o problemă pentru pacient.

*Scleroza multiplă*

In aplicațiile preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple. Exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii la un model de șoarece cu scleroză multiplă (modelul EAE) și, astfel, pot fi utile în tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple. Scleroza multiplă este o tulburare inflamatorie asociată cu deteriorarea tecilor de mielină ale neuronilor, în particular la nivelul creierului și coloanei vertebrale. Scleroza multiplă este o boală cronică, care incapacitează progresiv și care evoluează în episoade. IL-17 și celulele Th17 pot avea un rol cheie în scleroza multiplă, de exemplu, deoarece nivelurile de IL-17 pot fi corelate cu leziunile sclerozei multiple, IL-17 poate

perturba joncțiunile strânse ale celulelor endoteliale ale barierei hematoencefalice, iar celulele Th17 pot migra în sistemul nervos central și cauzează pierderi neuronale [30, 31]. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea sclerozei multiple.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției are ca rezultat o reducere a incidenței bolii sau a gravității bolii. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici împiedică o scădere a funcției motoare sau duce la îmbunătățirea a funcției motoare. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea incidenței bolii sau a gravității bolii. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției previne o scădere a funcției motoare sau duce la îmbunătățirea funcției motoare. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării pentru prevenirea declinului funcției motoare sau pentru utilizarea în îmbunătățirea funcției motoare. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției împiedică dezvoltarea paraliziei. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru prevenirea paraliziei în tratamentul sclerozei multiple.

Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru modularea sistemului imunitar al unui pacient, astfel încât, în anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru prevenirea sclerozei multiple la un pacient care a fost identificat ca prezentând risc de scleroză multiplă sau care a fost diagnosticat cu scleroză multiplă de stadiu timpuriu sau scleroză multiplă „recurentă-remisivă”. Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării sclerozei. Într-adevăr, exemplele arată că administrarea compozițiilor descrise aici împiedică dezvoltarea bolii la mulți șoareci.

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

#### *Uveita*

În aplicații preferate, compozițiile conform invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei. Compozițiile conform invenției pot conduce la o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii la un model animal de uveită și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea uveitei. Uveita este inflamația uveei și poate conduce la distrugerea țesutului retinian. Se poate prezenta sub diferite forme anatomice (anterioară, intermediară, posterioară sau difuză) și poate rezulta din cauze diferite, dar înrudite, inclusiv tulburări autoimune sistemice. Calea IL-17 și Th17 este implicată central în uveită, astfel încât compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea uveitei. Referințele [38–45] descriu niveluri serice crescute de interleukină-17A la pacienții cu uveită, asocierea specifică a variantelor genetice IL17A cu panuveita, rolul citokinelor asociate cu Th17 în patogeniza uveitei autoimune experimentale, dezechilibrul dintre celulele Th17 și celulele T reglatoare în timpul uveitei autoimune monofazice experimentale, supra-reglarea IL-17A la pacienții cu uveită și bolile active Adamantiades-Behcet și Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), tratamentul uveitei neinfecțioase cu secukinumab (anti-anticorp IL-17A) și Th17 în ochii uveitici.

În anumite aplicații, uveita este uveită posterioară. Uveita posterioară se prezintă în primul rând cu inflamația retinei și coroidului, iar compozițiile conform invenției pot fi eficiente pentru reducerea inflamației și deteriorării retinei.

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

În anumite aplicații, compozițiile sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei asociate cu o boală non-infecțioasă sau autoimună, cum ar fi boala Behcet, boala Crohn, iridociclita heterocromică Fuchs, granulomatoza cu poliangiită, uveita asociată cu HLA-B27, artrita idiopatică minoră, sarcoidoza, spondiloartrita, oftalmia simpatică, nefrita tubulointerstițială și sindromul de uveită sau sindromul Vogt-Koyanagi-Harada. S-a dovedit că IL-17A este implicată în, de exemplu, în bolile Behcet și Vogt-Koyanagi-Harada.

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

**Moduri de administrare**

De preferință, compozițiile conform invenției trebuie administrate pe tractul gastrointestinal pentru a permite livrarea către intestin și/sau colonizarea parțială sau totală a acestuia cu tulpina bacteriană conform invenției. În general, compozițiile conform invenției sunt administrate oral, dar pot fi administrate pe cale rectală, intranasală sau pe căi bucale sau sublinguale.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției pot fi administrate sub formă de spumă, sub forma unui spray sau unui gel.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției pot fi administrate sub formă de supozitoare,, cum ar fi un supozitor rectal, de exemplu sub forma unui ulei de teobroma (unt de cacao), a unei grăsimi sintetice dure (de exemplu suppocire, witepsol), glicero–gelatină, polietilenglicol sau compoziție de glicerină de săpun.

În anumite aplicații, compoziția conform invenției este administrată tractului gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nazogastric, un tub orogastric, un tub gastric, un tub jejunostomic (tub J), o gastrostomie endoscopică percutanată (PEG) sau un port, cum ar fi un port de perete toracic care oferă acces la stomac, jejun și alte porturi de acces adecvate.

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

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

În anumite aplicații, compoziția conform invenției poate fi administrată la un animal însărcinat, de exemplu un mamifer, cum ar fi un om, pentru a preveni o boală inflamatorie sau autoimună la copilul ei *in utero* și/sau după ce s-a născut.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate la un pacient care a fost diagnosticat cu o boală sau afecțiune mediată de către IL-17 sau calea Th17, sau care a fost identificat ca fiind expus riscului unei boli sau a unei afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17. Compozițiile pot fi, de asemenea, administrate ca o măsură profilactică pentru a preveni dezvoltarea de boli sau afecțiuni mediate de către IL-17 sau calea Th17 la un pacient sănătos.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate unui pacient care a fost identificat ca având o microbiotă intestinală anormală. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau absentă cu *Bacteroides*, și în particular cu *Bacteroides coprocola*.

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

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

**Compoziții**

În general, compoziția conform invenției cuprinde bacterii. În aplicațiile preferate ale invenției, compoziția este pusă în formulă în formă liofilizată. De exemplu, compoziția conform invenției poate cuprinde granule sau capsule de gelatină, de exemplu capsule de gelatină dură, cuprinzând o tulpină bacteriană conform invenției.

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

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

În aplicațiile preferate, compoziția conform invenției este încapsulată pentru a permite livrarea tulpinii bacteriene către intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la livrarea la locația țintă, de exemplu, prin ruperea cu stimuli chimici sau fizici, cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificări ale pH-ului. Poate fi folosită orice metodă adecvată de încapsulare. Exemple de tehnici de încapsulare includ capturarea într-o matrice poroasă, atașare sau adsorbție pe suprafețe purtătoare solide, auto-agregarea prin floculare sau cu agenți de reticulare și izolarea mecanică în spatele unei membrane microporoase sau a unei microcapsule. Indicații privind încapsularea care pot fi utile pentru prepararea compozițiilor din invenție sunt disponibile, de exemplu, în referințele [49] și [50].

Compoziția poate fi administrată pe cale orală și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece *Bacteroides* sunt anaerobe. Alte ingrediente

(cum ar fi vitamina C, de exemplu), pot fi incluse cu rol de colectori de oxigen și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți livrarea și/sau colonizarea și supraviețuirea parțială sau totală *in vivo*. Alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată pe cale orală ca produs alimentar sau nutrițional, cum ar fi lactat fermentat pe bază de lapte sau zer sau ca produs farmaceutic.

5 Compoziția poate fi pusă în formulă ca un probiotic.

O compoziție conform invenției include o cantitate eficace terapeutică dintr-o tulpină bacteriană conform invenției. O cantitate eficace terapeutică dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficace terapeutică dintr-o tulpină bacteriană poate fi suficientă pentru a avea ca efect livrarea către intestinul pacientului și/sau

10 colonizarea parțială sau totală a acestuia.

O doză zilnică adecvată de bacterii, de exemplu pentru un om adult, poate fi de la circa  $1 \times 10^3$  până la circa  $1 \times 10^{11}$  unități care formează colonii (CFU); de exemplu, de la circa  $1 \times 10^7$  până la circa  $1 \times 10^{10}$  CFU; într-un alt exemplu de la circa  $1 \times 10^6$  până la circa  $1 \times 10^{10}$  CFU.

15 În anumite aplicații, compoziția conține tulpina bacteriană într-o cantitate de la circa  $1 \times 10^6$  până la circa  $1 \times 10^{11}$  CFU/g, în raport cu masa compoziției; de exemplu, de la circa  $1 \times 10^8$  până la circa  $1 \times 10^{10}$  CFU/g. Doza poate fi, de exemplu, de 1 g, 3 g, 5 g și 10 g.

De obicei, un probiotic, cum ar fi compoziția conform invenției, este combinat opțional cu cel puțin un compus prebiotic adecvat. Un compus prebiotic este de obicei un carbohidrat nedigerabil, cum ar fi un oligo- sau polizaharid sau un alcool din zahăr, care nu este degradat sau absorbit în tractul

20 digestiv superior. Prebioticele cunoscute includ produse comerciale, cum ar fi inulina și transgalactooligozaharidele.

În anumite aplicații, compoziția probiotică conform prezentei invenții include un compus prebiotic într-o cantitate de la circa 1 până la circa 30% din masă, în raport cu masa totală a compoziției (de exemplu, de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul

25 format din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan-oligozaharide (sau COS), beta-glucani, amidonuri modificate cu gumă arabică și rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre de salcam, carob, ovăz și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharide cu catenă scurtă (pentru simplitate, prezentate mai jos ca FOSs-c.c); respectivele FOSs-c nu sunt carbohidrați digerabili, în

30 general sunt obținute prin transformarea zahărului din sfeclă și includ o moleculă de zaharoză la care se leagă trei molecule de glucoză.

Compozițiile conform invenției pot cuprinde excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic. Exemple de astfel de excipienți potriviți pot fi găsiți în referința [51]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de

35 exemplu, în referința [52]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și altele asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanol, glicerol și apă. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi selectată în ceea ce privește calea de administrare prevăzută și practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca, sau în plus față de purtător, excipient sau diluant orice

40 liant sau lianți, lubrifiant (lubrifianti), agent (agenții) de suspendare, agent (agenți) de acoperire, agent (agenți) de solubilizare adecvați. Exemple de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale precum glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta-lactoză, îndulcitori de porumb, gumă naturală și sintetică, cum ar fi acacia, tragacant sau alginat de sodiu, carboximetil celuloză și polietilenglicol. Exemple de lubrifianti adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de

45 magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și altele asemenea. În compoziția farmaceutică pot fi furnizați conservanți, stabilizanți, coloranți și chiar aromatizanți. Exemple de conservanți includ benzoatul de sodiu, acidul sorbic și esterii acidului p-hidroxibenzoic. Pot fi de asemenea utilizați antioxidanți și agenți de punere în suspensie.

Compozițiile conform invenției pot fi puse în formulă ca un produs alimentar. De exemplu,

50 un produs alimentar poate oferi beneficii nutritive în plus față de efectul terapeutic al invenției, cum ar fi într-un supliment nutrițional. În mod similar, un produs alimentar poate fi pus în formulă pentru a îmbunătăți gustul compoziției invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru a fi consumată prin a fi mai asemănătoare cu un produs alimentar obișnuit, mai degrabă decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite aplicații, compoziția conform invenției este formulată ca un produs pe

55 bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” înseamnă orice produs lichid sau semisolid sau pe bază de lapte sau zer având un conținut diferit de grăsimi. Produsul pe bază de lapte poate fi, de exemplu, lapte de vacă, lapte de capră, lapte de oaie, lapte degresat, lapte integral, lapte recombinat din lapte praf și zer, fără nicio prelucrare, sau un produs procesat, cum ar fi iaurt, lapte bătut, caș, lapte acru, lapte integral acru, unt din lapte și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include



băuturi din lapte, precum băuturi din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru sugari sau pentru bebeluși; lapte aromatizat, înghețată; alimente care conțin lapte, cum ar fi dulciurile.

În anumite aplicații, compozițiile conform invenției conțin o tulpină sau specie bacteriană unică și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot cuprinde numai cantități de minimis sau cantități irelevante biologic ale altor tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial lipsită de alte specii de organisme.

Compozițiile pentru utilizare în conformitate cu invenția pot avea sau nu nevoie de aprobare de comercializare.

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

Compozițiile conform invenției pot cuprinde excipienți, diluanți sau purtători acceptabili farmaceutici.

În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata o tulburare atunci când este administrată unui subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este selectată din grupul constând din astm, astm alergic, astm neutrofil, osteoartrită, artrită psoriatică, artrită idiopatică juvenilă, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală celiacă, boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC), cancer, cancer mamar, cancer de colon, cancer pulmonar, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boală Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, parodontită, rinită alergică și rețet de alogrefă.

În anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând: o tulpină bacteriană conform invenției; și un excipient, purtător sau diluant acceptabil farmaceutic; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata sau a preveni o boală sau o condiție mediată de către IL-17 sau calea Th17. În aplicații preferate, boala sau condiția respectivă este selectată din grupul constând din artrită reumatoidă, scleroză multiplă, psoriazis, boală inflamatorie intestinală, boală Crohn, colită ulcerosă, boală celiacă, astm, astm alergic, astm neutrofil, osteoartrită, artrită psoriatică, artrită idiopatică juvenilă, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală pulmonară obstructivă cronică (COPD), cancer, cancer mamar, cancer de colon, cancer pulmonar, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, emfizem, parodontită, rinită alergică și rețet de alogrefă.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de circa  $1 \times 10^3$  până la circa  $1 \times 10^{11}$  unități formatoare de colonii pe gram în raport cu masa compoziției.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată într-o doză de 1 g, 3 g, 5 g sau 10 g.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care compoziția este administrată printr-o metodă selectată din grupul constând din calea orală, rectală, subcutanată, nazală, bucală și sublinguală.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un purtător selectat din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un diluant selectat din grupul constând din etanol, glicerol și apă.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu curgere liberă, beta-lactoză, îndulcitor din porumb, salcâm, tragacantă, alginat de sodiu, carboximetil celuloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând în plus cel puțin unul dintre un agent de conservare, un antioxidant și un stabilizator.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând un conservant selectat din grupul constând din benzoat de sodiu, acid sorbic și esteri ai acidului p-hidroxibenzoic.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care respectiva tulpină bacteriană este liofilizată.

În anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care atunci când compoziția este depozitată într-un container etanș la temperatura de aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă cu umiditate relativă de 50%, cel puțin 80% din tulpina bacteriană măsurată în unități formatoare de colonii, rămâne după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

**Metode de cultivare**

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

Tulpinile bacteriene ale genului *Bacteroides* pot fi cultivate folosind o metodă precum cea prezentată mai jos, care poate oferi o bună creștere și fiabilitate. Această metodă este utilă în particular pentru cultivarea tulpinilor speciei *Bacteroides coprocola*.

Tulpinile bacteriene ale genului *Bacteroides*, și în particular ale speciei *Bacteroides coprocola*, poate fi cultivat folosind un stoc lichid pentru a inocula placa (sau o cultură mai mare a lichidului), mai degrabă decât o colecție de resturi de stocuri congelate, care pot fi utilizate în general (vezi, de exemplu, referința [56]). Înființarea de colonii mature este fiabilă și rapidă, în cazul în care stocurile înghețate de tulpini de *Bacteroides* sunt dezghețate și utilizate ca cultură lichidă.

O metodă adecvată pentru cultivarea unei tulpini bacteriene din genul *Bacteroides*, poate cuprinde:

- (a) furnizarea unui stoc înghețat de tulpină bacteriană;
- (b) decongelarea stocului înghețat pentru a furniza un stoc lichid;
- (c) adăugarea stocului lichid la un mediu solid sau lichid; și
- (d) incubarea mediilor solide sau lichide pentru a furniza o cultură a tulpinii bacteriene.

Această metodă este utilă în particular pentru cultivarea tulpinilor bacteriene de *Bacteroides coprocola*.

Stocul înghețat poate fi un stoc în glicerol congelat. Mediul solid sau lichid poate fi mediu YCFA agar sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (la 100 ml, valori aproximative): casitonă (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g),  $\text{NaHCO}_3$  (0,4 g), cisteină (0,1 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,045 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,045 g),  $\text{NaCl}$  (0,09 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,09 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,009 g),  $\text{CaCl}_2$  (0,009 g), rezazurină (0,1 mg), hemină (1 mg), biotină (1 ?g), cobalamină (1 ?g), acid p-aminobenzoic (3 ?g), acid folic (5 ?g) și piridoxamină (15 ?g).

Incubarea în etapa (d) poate fi efectuată timp de cel puțin 36 de ore, cum ar fi 48 sau 72 de ore. Incubarea în etapa (d) poate fi realizată într-un mediu anaerob, cum ar fi o hotă anaerobă. Cultura furnizată în etapa (d) poate fi utilizată pentru a subcultiva o cultură mai mare a tulpinii bacteriene. O astfel de subcultură permite prepararea unor cantități mai mari de bacterii și poate fi utilă pentru furnizarea compozițiilor conform invenției la scară comercială.

Dezghețarea din etapa (b) poate fi efectuată la temperatura camerei sau prin încălzire manuală.

Cantitatea de stoc lichid adăugat în etapa (c) poate fi între 300 ?l și 5 ml, cum ar fi de 500 ?l. Stocul poate fi un stoc în 20% glicerol.

Metoda de mai sus poate fi utilizată pentru prepararea unei compoziții farmaceutice sau a unui produs alimentar, caz în care metoda poate cuprinde etape suplimentare de izolare a tulpinii bacteriene, opțional liofilizarea tulpinii bacteriene și combinarea tulpinii bacteriene cu unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic sau una sau mai multe substanțe alimentare. Această compoziție farmaceutică sau produs alimentar preparat prin metodă poate fi utilizată într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei condiții mediate de către IL-17 sau calea Th17.

O metodă exemplificativă de cultivare a tulpinilor bacteriene ale genului *Bacteroides*, și în particular a speciei *Bacteroides coprocola*, poate cuprinde:

1. 500 ?l de 20% glicerol stoc este placat pe agar YCFA.
2. Plăcile sunt lăsate în hotă anaerobă timp de 48/72 ore pentru a genera colonii mature.
3. Bacteriile sunt cultivate în volume de 10 ml, indiferent dacă acestea provin dintr-o singură colonie sau dintr-o subcultură lichidă de 1%.
4. Plăcile cu colonii se folosesc doar 2/3 zile după obținerea morfologiei de colonie matură.

**Tulpinile bacteriene pentru utilizare în compozițiile de vaccinuri**

Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene descrise aici sunt utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau stărilor mediate de către IL-17 sau calea Th17. Aceasta este probabil o consecință a efectului pe care tulpinile bacteriene conform invenției îl au asupra sistemului imunitar al gazdei. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi, de asemenea, utile pentru prevenirea bolilor sau stărilor mediate de către IL-17 sau calea Th17, atunci când sunt administrate ca compoziții de vaccin. În anumite astfel de aplicații, tulpinile bacteriene conform invenției pot fi omorâte, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de aplicații, compozițiile pot cuprinde un adjuvant al vaccinului. În anumite aplicații, compozițiile sunt pentru administrare prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

**Generalități**

Practica prezentei invenții va folosi, dacă nu se indică altfel, metode convenționale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie și farmacologie, în cadrul competențelor în domeniu. Asemenea tehnici sunt explicate pe deplin în literatură. *Vezi*, de exemplu, referințele [57] și [58–64], *etc.*

Termenul „cuprinzând” cuprinde „incluzând” precum și „constând”, de exemplu o compoziție „cuprinzând” X poate consta exclusiv din X sau poate include ceva suplimentar, de exemplu X + Y.

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

Cuvantul „substanțial” nu exclude „complet”, de exemplu, o compoziție care este „substanțial liberă” de Y poate fi complet liberă de Y. Atunci când este necesar, termenul „substanțial” poate fi omis din definiția invenției.

Referințele la o identitate procentuală de secvență între două secvențe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, procente de nucleotide sunt același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și procentul de omologie sau identitatea de secvență pot fi determinate utilizând programe cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [65]. O aliniere preferată este determinată de algoritmul de căutare a omologiilor Smith-Waterman, utilizând o căutare a golurilor afine cu o penalizare de deschidere a golului de 12 și o penalizare de extindere a distanței de 2, matricea BLOSUM 62. Algoritmul de căutare a omologiilor Smith-Waterman este dezvăluit în ref. [66].

Dacă nu se specifică altfel în mod specific, un procedeu sau o metodă care cuprinde numeroase etape poate cuprinde etape suplimentare la începutul sau la sfârșitul metodei sau poate cuprinde etape suplimentare intercalate. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau executate într-o ordine alternativă, dacă este cazul.

Sunt descrise aici diferite aplicații ale invenției. Se va avea în vedere că caracteristicile specificate în fiecare aplicație pot fi combinate cu alte caracteristici specificate, pentru a furniza alte aplicații. În particular, aplicațiile evidențiate aici ca fiind potrivite, tipice sau preferate pot fi combinate între ele (cu excepția cazului în care acestea se exclud reciproc).

**EXAMPLE*****Exemplul 1 – Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un model de astm indus de acarieni induși de praf de casă la șoareci Rezumat***

Șoarecilor li s-au administrat compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției și au fost apoi provocați cu extract de praf domestic (HDM) pentru a produce un răspuns inflamator alergic. Răspunsul inflamator la HDM include componente eozinofile și neutrofile, este mediat de către IL-17 și calea Th17 și este un model pentru astm. Mărimea și caracteristicile răspunsului inflamator expus de șoarecii tratați cu compozițiile conform invenției au fost comparate cu grupurile martor. S-a constatat că compozițiile conform invenției ameliorează răspunsul inflamator și reduc recrutarea eozinofilelor și neutrofilelor, indicând faptul că ele pot fi utile pentru tratarea condițiilor mediate de către IL-17 cum ar fi eozinofilia, neutrofilia și astmul.

**Tulpină**

675

**Designul studiului****Grupuri:**

1. Grup martor negativ. Tratament cu martor vehicul (pe cale orală).
4. Tratamentul cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 675 (pe cale orală).
7. Grup martor pozitiv. Tratament cu dexametazonă (i.p.).
8. Grup martor netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 5

Ziua –14 până în ziua 13: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).

Ziua –14 până în ziua 13: administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupurile 2–6).

Ziua 0, 2, 4, 7, 9, 11: administrarea a 15  $\mu$ g de HDM (extract de acarieni din praf domestic – Număr de catalog: XPB70D3A25, Lot nr.: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, ) într-un volum de 30  $\mu$ l PBS nazal (grupurile 1–8).

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

Ziua 14 Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Numărul total de șoareci = 40.

Obiective și analize

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

Celulele au fost izolate din lichidul BAL (de lavaj bronhoalveolar) și au fost numărate celulele diferențiate (200 de celule/eșantion).

Material și metode

**Șoareci.** Șoarecii BALB/c femele în vârstă de șapte săptămâni au fost achiziționați de la Charles River Laboratories și alocați în mod aleatoriu în cuști câte 5 șoareci per cușcă (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Switzerland Cage, tip: „The Sealsafe™ – cage IVC“. Număr produs: 1248L). Cuștile au fost marcate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și au fost aclimatizați în instalație timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua Studiului – 14) iar alimentele au fost disponibile *ad libitum*. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată în conformitate cu autorizația locală numărul 2283.1 (eliberată și aprobată de: Service de consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apă potabilă și hrană au fost disponibile *ad libitum* și s-au reîmprospătat o dată pe zi. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Regulamentele privind bunăstarea animalelor au fost respectate de către autoritățile oficiale ale Elveției în baza Ordonanței 455.163 a FVO (Federal Veterinary Office) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare pe animale.

**Cultivarea inoculului de bacterii.** Într-o stație de lucru sterilă, un crio-flacon de bacterii a fost dezghețat prin încălzire cu mâna înmănușată și 0,7 ml de conținut au fost injectați într-un tub Hungate (Cat Number, 1020471, Glasgeratebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), conținând 8 ml YCFA anaerob. Uzual au fost preparate două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la temperatura de 37°C timp de până la 24–26 de ore (tulpina 675).

Deoarece OD bacteriană a inoculumului de tulpină 675 a fost găsită ca fiind variabilă, au fost aplicate 3 abordări de cultivare în fiecare zi. 2 flacoane au fost cultivate așa cum s-a descris mai sus și un al treilea eșantion a fost cultivat utilizând o parte de 400 ?l din cultura din ziua anterioară pentru însămânțare. În 4 zile de tratament, a fost utilizată ultima abordare, datorită creșterii slabe din stocul înghețat. De remarcat că această abordare a condus la creșterea robustă a bacteriei 675 în toate ocaziile.

**Cultivarea matorului vehicul.** Un tub Hungate, care conține 8 ml de YCFA anaerob, a fost incubat (static) la temperatura de 37°C timp de 16 ore.

**Administrarea inoculului de bacterii sau matorului vehicul.** 400 ?l de inocul de bacterii de cultură sau de mator vehicul au fost administrate pe zi prin gavaj oral.

**Sensibilizarea intranasală.** Șoarecii au fost anesteziați prin injecție i.p. cu 9,75 mg xilazol și 48,75 mg ketazol per kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Elveția) și dozați cu 15 ?g de HDM (număr de catalog: XPB70D3A25, Lot nr.: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) într-un volum de 30 ?l PBS nazal.

**Prepararea și administrarea compusului mator pozitiv dexametazonă.** Sarea disodică de 21-fosfat de dexametazonă (Sigma-Aldrich, nr. de catalog D1159, Lot nr SLBD.1030V) a fost dizolvată în H<sub>2</sub>O și administrată animalelor într-o doză de 3 mg/kg într-un volum de 200 ?l oral, în zilele indicate în protocolul de studiu de mai sus.

**Procedura de terminare.** În ziua 14, animalele au fost sacrificate prin injecție i.p. cu pentobarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavajul bronhoalveolar (BAL) în 500 ?l de soluție salină.

**Măsurarea infiltrațiilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate din fluidul BAL și au fost numărate celulele diferențiate pe baza criteriilor standard morfologice și citochimice.

**Grafice și analize statistice.** Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism Version 6 și a fost aplicat un test ANOVA uni-direcțional. Rezultatele analizei statistice au fost furnizate cu tabelele de date individuale. Clasele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei (ESM).

Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 1–9.

Nu a fost observată nici o morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteria sau vehiculul. Cei doi matori, tratamentul cu vehicul (matorul negativ) și tratamentul cu dexametazonă (matorul pozitiv) s-au comportat așa cum era de așteptat, cu eozinofilia și neutrofilia afectate după tratamentul cu dexametazonă.

Cele mai importante rezultate ale acestui experiment sunt prezentate în Figurile 6 și 7, care prezintă numărul și procentul total de neutrofile detectate în lavajul bronhiolar ca urmare a provocării cu HDM. Tulpina 675 a redus neutrofilele totale și proporția de neutrofile în BAL față de matorul tratat numai cu vehicul.

**Exemplul 2 – Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un model de astm neutrofil sever la șoareci**  
**Rezumat**

Șoarecilor li s-au administrat compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției și au fost ulterior sensibilizați prin administrarea subcutanată a extractului de acarieni din praful domestic (HDM) și au fost provocați cu o administrare intranasală de HDM pentru a modela răspunsul inflamator al astmului neutrofil sever. Mărirea și caracteristicile răspunsului inflamator prezentat de către șoarecii tratați cu compozițiile conform invenției au fost comparate cu grupurile martor. S-a constatat că compozițiile conform invenției ameliorează răspunsul inflamator și, în special, reduc recrutarea neutrofilelor, într-o manieră comparabilă cu martorul pozitiv care cuprinde administrarea de anticorpi anti-IL-17. De aceea, datele indică faptul că compozițiile din invenție pot fi utile pentru tratarea condițiilor mediate de către IL-17 și Th17, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Tulpină

675

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratamentul cu controlul vehiculului (oral).

3. Tratamentul cu inocul de bacterii terapeutice tulpina 675 (oral).

7. Grup martor pozitiv. Tratament cu anti-IL-17 (i.p.).

8. Grup martor netratat.

9: Șoareci sănătoși (linie de referință).

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

Ziua –14 până în ziua 17: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).

Ziua –14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupurile 2–6).

Ziua 0: Sensibilizarea cu HDM în CFA (s.c.) (grupurile 1–8).

Ziua 7: Sensibilizarea cu HDM în CFA (s.c.) (grupurile 1–8).

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

Ziua 14, 15, 16, 17: Provocarea cu HDM în 30  $\mu$ l PBS nazal (grupul 1–8).

Ziua 18: Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Obiective și analize:

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

Materiale și metode

**Șoareci.** Șoarecii femele C57BL/6 în vârstă de șapte săptămâni au fost achiziționați de la Charles River Laboratories și au fost alocați aleatoriu în cuști, câte 5 șoareci per cușcă în total (cuști ventilate provenite de la Indulab AG, Gams, Switzerland Cage, tip: „The Sealsafe™ – cage IVC”. Număr produs: 1248L). Cuștile au fost marcate cu numărul studiului, numărul grupului și data de începere a experimentului. Șoarecii au fost monitorizați săptămânal și au fost aclimatizați în instalație timp de 7 zile înainte de începerea studiului (Ziua Studiului – 14). Animalele au avut vârsta de 8 săptămâni în Ziua Studiului – 14. Apa potabilă și alimentele au fost disponibile *ad libitum* și înlocuite zilnic. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Îngrijirea zilnică a animalelor a fost efectuată în conformitate cu autorizația locală numărul 2283.1 (eliberat și aprobat de: Service de consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Apă potabilă și hrană au fost disponibile *ad libitum* și s-au reîmprospătat o dată pe zi. A fost prezentă îmbogățirea cuștilor. Regulamentele privind bunăstarea animalelor au fost respectate de către autoritățile oficiale ale Elveției în baza Ordonanței 455.163 a FVO (Federal Veterinary Office) privind creșterea animalelor de laborator, producția de animale modificate genetic și metodele de experimentare pe animale.

**Cultivarea inoculului de bacterii.** Într-o stație de lucru sterilă, un crio-flacon de bacterii a fost dezghețat prin încălzire cu mâna înmănușată și 0,7 ml de conținut au fost injectați într-un tub Hungate (Cat Number, 1020471, Glasgeratebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Germania), conținând 8 ml YCFA anaerob. Uzual au fost preparate două tuburi pe tulpină. Tuburile Hungate au fost apoi incubate (static) la temperatura de 37°C timp de până la 24–26 de ore (tulpina 675).

Deoarece OD bacteriană a inoculumului de tulpină 675 a fost găsită ca fiind variabilă, au fost aplicate 3 abordări de cultivare în fiecare zi. 2 flacoane au fost cultivate așa cum s-a descris mai sus și un al treilea eșantion a fost cultivat utilizând o parte de 400  $\mu$ l din cultura din ziua anterioară pentru însămânțare. În 4 zile de tratament, a fost utilizată ultima abordare, datorită creșterii slabe din stocul înghețat. De remarcat că această abordare a condus la creșterea robustă a bacteriei 675 în toate ocaziile.

**Cultivarea martorului vehicul.** Un tub Hungate, care conține 8 ml de YCFA anaerob, a fost incubat (static) la temperatura de 37°C timp de 16 ore.

**Administrarea inoculului de bacterii sau vehiculului martor.** 400  $\mu$ l de inocul de bacterii de cultură sau de vehicul martor au fost administrate pe zi prin gavaj oral.

**Sensibilizare la HDM.** 50  $\mu$ g de HDM (număr de catalog: XPB70D3A25, număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) în PBS a fost emulsionat într-un volum egal de adjuvant complet Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, SUA) și administrat subcutanat într-un volum de 200  $\mu$ l, de două ori în două săptămâni pe flancurile opuse. La o săptămână după cea de-a doua imunizare, șoarecii au fost anesteziați prin injectare i.p. cu 9,75 mg xilazol și 48,75 mg ketazol per kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Elveția) și apoi s-au administrat provocări intranasale de 15  $\mu$ g de HDM într-un volum de 30  $\mu$ l PBS timp de 4 zile consecutiv. Analiza a fost efectuată la o zi după provocarea finală.

**Prepararea și administrarea martorului pozitiv — anticorpii de șoarece anti-IL-17 de șoarece.** Anticorpii neutralizant anti-IL-17 a fost obținut de la BioX Cell și a fost păstrat la temperatura de 4°C (clona 17F3, Cat # BE0173, BioX Cell) și administrat i.p. la o doză de 12,5 mg/kg în zilele indicate în protocolul de studiu de mai sus.

**Procedura de terminare.** În ziua 18, animalele au fost sacrificate prin injectare i.p. cu pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavajul bronhoalveolar (BAL) în 500  $\mu$ l de soluție salină.

**Măsurarea infiltrațiilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate din fluidul BAL și au fost numărate celulele diferențiate pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard.

**Grafice și analize statistice.** Toate graficele au fost generate cu Graphpad Prism Version 6 și a fost aplicat un test ANOVA uni-direcțional. Rezultatele analizei statistice au fost furnizate cu tabelele de date individuale. Clasele de eroare reprezintă eroarea standard a mediei (ESM).

#### Rezultate și analize

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figurile 10–18.

Nu a fost observată nici o morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteria sau vehiculul. Așa cum s-a arătat în Figurile 15 și 16, tulpina 675 a prezentat un efect puternic și a redus numărul total de nutrofile comparație cu martorii negativi. În plus, tulpina 675 a redus numerele de eozinofile față de martori, așa cum se arată în Figurile 11 și 12.

#### **Exemplul 3 – Eficacitatea inoculului bacterian pentru tratarea artritei la un model al artritei induse de collagenul de tip II la șoareci**

##### Materiale și metode

##### **Tulpină**

675

##### **Culturi bacteriene**

Culturile bacteriene au fost cultivate pentru administrare într-o stație de lucru anaerobă (Don Whitley Scientific) conform schemei de creștere de mai jos:

- L/Mi/V: Se transferă stocul de glicerol pe gheață și se mănjește o placă YCFA cu stocul de glicerol. Se folosește placa după cum urmează, timp de maximum 3 zile.
- Zilnic PM: Se alege o singură colonie din fiecare tulpină din culturile de plăci, se transferă în tubul aflat conținând 8 ml de YCFA peste noapte (ON1)
- AM: Se subcultivă 80  $\mu$ l (1%) ON1 în tub proaspăt de 8 ml (DC1). Se folosește cultura ON1 pentru gavajul oral AM.
- PM: Se utilizează cultura DC1 pentru gavajul oral PM.

Tulpina bacteriană # 675 a fost crescută folosind stocurile în glicerol.

Stocurile de glicerol au fost depozitate la temperatura de –80°C. De trei ori pe săptămână, stocurile în glicerol au fost dezghețate la temperatura camerei și plasate pe plăci YCFA. Cu fiecare ocazie a fost utilizată o nouă fracțiune de glicerol. Bacteriile au fost lăsate să crească pe o placă dată timp de până la 72 de ore.

Soluțiile care trebuie administrate animalelor au fost preparate de două ori pe zi, cu un interval de opt ore pentru tratamentele de dimineața (AM) și după-amiaza (PM). O colonie bacteriană a fost culeasă de pe placă și transferată într-un tub care conține mediu YCFA. Tulpina bacteriană #675 a fost lăsată să crească timp de 16 ore înainte de administrarea AM. Bacteriile au fost subcultivate la 1% în mediu YCFA pentru administrarea PM. Valorile OD au fost înregistrate pentru fiecare tulpină după preparatele de tratament de dimineață și de după-amiaza.

##### **Modelul artritei induse de collagenul de tip II la șoareci**

Șoareci masculi DBA/1 adulți au fost repartizați aleatoriu în grupuri experimentale și au fost lăsați să se aclimatizeze timp de două săptămâni. În ziua 0, animalelor li s-au administrat prin injectare subcutanată 100 microlitri dintr-o emulsie conținând 100 micrograme de collagen de tip II (CII) în

adjuvant Freund incomplet suplimentat cu 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. În ziua 21, animalelor li s-au administrat prin injecție subcutanată o emulsie de rapel conținând 100  $\mu$ g de collagen de tip II în adjuvant Freund incomplet.

Tratamentele au fost date în conformitate cu schema de administrare de mai jos. Din ziua – 14 până la sfârșitul experimentului în ziua 45, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost evaluate de trei ori pe săptămână pentru semnele clinice de artrită care includ umflarea labelor posterioare și a celor din față, articulațiilor radio-carpale (încheieturi) și articulațiilor tibio-tarsale (glezne).

În ziua 45, șoarecii au fost sacrificați și au fost prelevate probe de sange terminale pentru analiza citokinelor.

În Ziua –14, Ziua 0 și Ziua 45, probe de fecale au fost colectate pentru analiză microbiologică, înghețate imediat și stocate la temperatura de –80°C.

Modelul de artrită indusă de collagen (CIA) la șoareci este un model bine stabilit de șoareci pentru artrita reumatoidă [67]. Imunizarea cu CII provoacă o patogeneză care include câteva caracteristici patologice importante ale artritei reumatoide, incluzând hiperplazia sinovială, infiltrarea celulelor mononucleare și degradarea cartilajelor. În mod semnificativ, dezvoltarea CIA este mediată de către celulele Th17 prin secreția de IL-17A [68]. Răspunsul imunitar care stă la baza modelului de artrită este sporit prin utilizarea adjuvantului Freund suplimentat cu *Mycobacterium tuberculosis*.

În ziua 21, au fost recoltate splinele de la trei animale satelit din fiecare grup. Celulele au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau absența collagenului de tip II. Citokinele, incluzând TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 și IL-17, au fost cuantificate în supernatanții de cultură și în serul terminal de către Luminex. Proliferarea celulară a fost cuantificată folosind o metodă de încorporare a timidinei tritiate.

#### Grupuri de tratament și doze

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

Vehiculul utilizat pentru bioterapeutice a fost mediu cu extract de drojdie-casitonă-acizi grași (YCFA).

|   | Grup               | Doză    | Administrare |                                     | Iducerea bolii                    |
|---|--------------------|---------|--------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
|   |                    |         | Cale         | Regim                               |                                   |
| 1 | Vehicul            | 5 ml/kg | PO           | BID: Ziua –14 <sup>+</sup> –Sfârșit | Ziua 0: collagen/CFA, o dată, SC  |
| 4 | Bioterapeutic #675 | 5 ml/kg | PO           |                                     | Ziua 21: collagen/IFA, o dată, SC |

PO: gavaj oral, SC: injecție subcutanată, BID: de două ori pe zi, CFA: adjuvant complet Freund. <sup>+</sup> Cu excepția grupului 4, tratat din ziua 0

#### Mase corporale

Din ziua –14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Datele au fost reprezentate grafic ca (Medie  $\pm$  ESM).

#### Observații clinice nespecifice

Din ziua –14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost verificate zilnic pentru semne clinice nespecifice pentru a include postura anormală (cocoșată), starea anormală a pielii (piloerecția) și nivelurile de activitate anormală (activitate redusă sau crescută).

#### Observații clinice

Din ziua 21 până la sfârșitul experimentului în ziua 45, animalele au fost evaluate de trei ori pe săptămână pentru semnele clinice de artrită care includ umflarea labelor din spate și din față, articulațiilor radio-carpale (încheieturile labelor din față) și articulațiilor tibio-tarsale (glezne). Fiecare membru a fost evaluat utilizând următoarea scală: (0) normal, (1) umflare ușoară, (2) umflare blândă, (3) umflare moderată și (4) umflare severă. Un scor clinic a fost calculat prin adunarea scorurilor corespunzătoare fiecărui membru. Scorul clinic maxim posibil pentru un animal a fost (16). Animalele cu un scor egal cu (12) în două ocazii consecutive și animalele cu un scor mai mare decât (12) în orice moment au fost sacrificate. Datele au fost notate ca (Medie  $\pm$  ESM).

#### Analiza proliferării celulelor

În ziua 21, au fost sacrificate trei animale satelit pe grup și splinele au fost disecate. Celulele splenice au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau în absența collagenului de tip II. După 72 de ore, celulele au fost pulsate peste noapte în prezența timidinei tritiate. Proliferarea celulelor a fost cuantificată prin măsurarea încorporării timidinei. Datele au fost notate ca (Medie  $\pm$  ESM). Supernatanții au fost preluați și testați pentru prezența citokinelor-cheie.

**Analiza citokinelor**

Supernatanții din culturile de celule splenice au fost testați pentru a cuantifica TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 și IL-17 de către Luminex. Datele au fost notate ca (Medie  $\pm$  SEM).

**Analiza microbiologică**

În ziua -14, ziua 0 și ziua 45, probe de fecale au fost colectate de la fiecare animal, înghețate imediat și stocate la temperatura de -80°C. Cacumurile (inclusiv conținuturile) au fost înghețate imediat și depozitate la temperatura de -80°C. Un test de identificare bacteriană a fost efectuat zilnic prin placarea bacteriilor.

**Histopatologie**

La sfârșitul experimentului, labele posterioare au fost stocate în fixativ pentru țesut. Eșantioanele au fost transferate în soluție de decalcificare. Eșantioanele de țesut au fost prelucrate, secționate și colorate cu hematoxină și eozină. Secțiunile au fost evaluate de un histopatolog calificat, orbit față de designul experimental, pentru semnele de artrită, care includ inflamația, afectarea cartilajului articular și deteriorarea osului metafizar subiacent. A fost utilizat un sistem detaliat de evaluare (vezi mai jos). Datele au fost reprezentate grafic ca (Medie  $\pm$  ESM). Au fost furnizate date brute și analizate, precum și imagini reprezentative.

**Tabelul 1: Sistemul de evaluare histopatologică**

| Grad                                            | Descriere                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Inflamație</b>                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 0                                               | Articulație normală                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 1                                               | Hiperplazie sinovială simplă cu inflamație dominată de neutrofile. Număr scăzut de neutrofile și macrofage în spațiul comun.                                                                                                                                                                                                    |
| 2                                               | Hiperplazie sinovială cu inflamație moderată până la marcată, implicând atât neutrofile, cât și macrofage. Neutrofile și macrofage în spațiul articulațiilor; pot exista unele resturi de țesut necrotic.                                                                                                                       |
| 3                                               | Hiperplazia sinovială cu inflamație marcată implicând atât neutrofile, cât și macrofage. Pierderea mucoasei sinoviocitare. Inflamația se poate extinde de la sinoviu la țesutul înconjurător incluzând mușchiul. Numeroase neutrofile și macrofage în spațiul articular, împreună cu reziduuri semnificative de țesut necrotic. |
| <b>Articulația leziunilor cartilajului</b>      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 0                                               | Articulație normală                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 1                                               | Articulația cartilajului prezintă doar schimbări degenerative ușoare. Formarea timpurie a pannusului poate fi prezentă periferic.                                                                                                                                                                                               |
| 2                                               | Articulația cartilajului prezintă modificări degenerative moderate și pierderi focale. Formarea pannusului este prezentă focal.                                                                                                                                                                                                 |
| 3                                               | Distrugerea semnificativă și pierderea cartilajului articular cu formarea extinsă a pannusului.                                                                                                                                                                                                                                 |
| <b>Deteriorarea osului metafizar subiacente</b> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 0                                               | Articulație normală                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 1                                               | Nu există nicio modificare a osului metafizar subiacent.                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 2                                               | Poate exista necroză focală sau fibroză a osului metafizar.                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 3                                               | Perturbarea sau distrugerea osului metafizar. Inflamația extinsă, necroză sau fibroză care se extinde până la spațiul medular al metafizei.                                                                                                                                                                                     |

**Rezultate și analize****Supraviețuire și observații clinice nespecifice**

Unele animale au fost sacrificate înainte de sfârșitul programat al studiului, datorită severității semnelor clinice de artrită sau datorită severității observațiilor clinice nespecifice.

Un animal din grupul 1 a fost sacrificat (tratată cu vehicul, animalul a sosit de la furnizor cu un picior rupt).

Unsprezece animale au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice de artrită: cinci animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și șase animale din grupul 2 (tratate cu agentul bioterapeutic # 675).

Cinci animale au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice nespecifice, incluzând postura anormală (cocoșată), starea anormală a pielii (piloerecția), nivelurile anormale ale activității



(activitate redusă): trei animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și două animale din grupul 2 (tratate cu agentul bioterapeutic # 675).

#### **Mase corporale**

Datele privind masa corporală înregistrate din ziua -14 până în ziua 0 și exprimate ca procent din greutatea corporale inițiale (ziua -14) au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu ziua -14, apoi pentru comparație multiplă cu grupul tratat cu martor. Datele sunt prezentate în Figura 19. Datele obținute de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul planificat al experimentului au fost excluse din analize.

În comparație cu ziua -14, administrarea de două ori pe zi prin gavaj oral a determinat o pierdere semnificativă de masă corporală în grupul tratat cu vehicul în ziua -9 și ziua -7.

Masele corporale ale grupului 4 (netratat până în ziua 0, apoi tratat cu agentul bioterapeutic #675) au fost semnificativ mai mari decât cele ale grupului martor tratat cu vehicul din ziua -11 până în ziua -1 ( $p < 0,0001$  cu excepția zilei -4, când  $p < 0,05$ ).

Masele corporale măsurate între ziua -14 și ziua -1 în grupurile tratate cu agenți bioterapeutici nu au fost diferite de masele corporale măsurate în grupul tratat cu vehicul, în orice zi.

Masele corporale măsurate între ziua -14 și ziua -1 în grupurile tratate cu agent bioterapeutic nu s-au diferențiat de masa corporală măsurată în grupul tratat cu vehiculul în oricare zi dată.

Masele corporale înregistrate din ziua 0 până în ziua 28 și exprimate ca procent din masele corporale inițiale (ziua 0) au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu ziua 0 în grupul tratat cu vehicul apoi pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în Figura 20. Datele provenite de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul planificat al experimentului și de la animalele satelit au fost excluse din analize. Datele din ziua 28, ziua 35 și ziua 42 au fost analizate în continuare prin ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul.

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

Masele corporale, în comparație cu grupul tratat cu vehicul, au fost semnificativ mai mari în grupul 4 (tratată cu agentul bioterapeutic # 675) în ziua 3, ziua 5, ziua 10 ( $p < 0,05$ ) și în ziua 25 ( $p < 0,001$ ).

Analizând datele prin ANOVA unidirecțională, masele corporale au fost semnificativ mai mari în grupul 4 (tratată cu agentul bioterapeutic # 675) în comparație cu grupul tratat cu vehicul în ziua 28 ( $p < 0,01$ ). Nu a existat o diferență semnificativă între grupurile experimentale în ziua 35 sau în ziua 42.

#### **Observații clinice**

Datele scorului clinic au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-test Dunnett pentru comparații multiple între zile în grupul tratat cu vehicul, apoi pentru comparații multiple între grupurile experimentale și grupul tratat cu vehicul în fiecare zi. Datele sunt prezentate în Figura 21. Datele înregistrate de la animalele sacrificate înainte de sfârșitul experimentului au fost excluse din analiză. Atunci când animalele au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice de artrită, a fost raportat și utilizat în analizele statistice ultimul scor înregistrat pentru următoarele zile.

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

Agentul bioterapeutic #675 nu a redus scorurile clinice în comparație cu grupul tratat cu vehicul. Animalele din acest grup au fost imunizate la un moment de timp diferit în comparație cu alte grupuri experimentale, ceea ce poate explica scorurile clinice mai mari observate.

#### **Analiza proliferării celulare**

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

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

Pentru a testa răspunsul proliferativ în prezența colagenului II (CII), splenocitele au fost cultivate în prezența CII la 50  $\mu$ g/ml. Răspunsul proliferativ al splenocitelor la CII a fost analizat prin ANOVA bidirecțională, urmată de post-testul lui Sydak pentru comparații multiple între splenocitele nestimulate și cele stimulate cu CII și ANOVA unidirecțională urmată de post-testul lui Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat cu CII în diferite grupuri experimentale cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în Figura 22.

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

Proliferarea splenocitelor în grupurile tratate cu agentul bioterapeutic #675 a fost stabilită într-o zi diferită, așadar comparația cu grupul tratat cu vehicul nu a fost efectuată, chiar dacă a fost observată o reducere notabilă.

#### 5 Nivelurile de citokine din supernatanții de cultură tisulară

Nivelurile fiecărei citokine au fost măsurate în supernatanții de cultură tisulară derivați din culturi stimulate anti-CD3/CD28 prin analiză luminex. Acestea au prezentat răspunsuri robuste pentru toate citokinele măsurate (nivelurile medii în grupul tratat cu vehicul au fost după cum urmează: IL-4 = 6,406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10,987 pg/ml; IL-17A = 11,447 pg/ml; IFN- $\gamma$  = 15,581 pg/ml; TNF- $\alpha$  = 76 pg/ml).

Secțiunile următoare rezumă datele obținute din culturile stimulate de către colagenul II. Dacă este cazul, s-au efectuat analize statistice ale diferențelor dintre nivelurile de citokine din supernatanții splenocitelor nestimulate și stimulate cu CII folosind ANOVA bidirecțională urmate de post-testul Sidak pentru comparații multiple, și ANOVA unidirecțională, urmată de post-testul Dunnett pentru compararea răspunsului stimulat cu CII în grupurile tratate cu agenți bioterapeutici cu grupul tratat cu vehicul. Nu a existat o diferență semnificativă în nivelurile de citokine între grupuri în ambele cazuri. Acest lucru se datorează probabil dimensiunii mici a eșantionului utilizat ( $n = 3$ ).

Pentru a prezenta cu mai multă precizie distribuția datelor pentru citokine cu o răspândire substanțială a datelor, acestea sunt prezentate ca grafice împrăștiate.

Mediile grupurilor tratate cu IL-4 în supernatanții de cultură tisulară după stimularea cu CII au fost  $< 5$  pg/ml. Acestea nu sunt considerate semnificative din punct de vedere biologic și nu sunt incluse aici. Mediile grupurilor tratate cu TNF- $\alpha$  în supernatanții de cultură tisulară după stimularea cu colagen au fost sub limita de cuantizare.

#### Nivelurile în supernatanți ale IFN- $\gamma$ (Figura 23)

Împreună cu IL-17, IFN- $\gamma$  este citokina majoră care conduce boala în modelul CIA. Graficul împrăștiat din Figura 23 demonstrează nivelurile de IFN- $\gamma$  după stimularea cu CII, media grupului fiind mai mare pentru grupul tratat cu vehicul în comparație cu cel tratat cu agent bioterapeutic (vezi Figura 27).

#### 30 Nivelurile în supernatanți ale IL-17A (Figura 24)

Nivelurile de IL-17A au fost de 50 pg/ml în culturi stimulate cu CII pentru grupul tratat cu vehicul. Nivelurile acestei citokine păreau mai scăzute în grupul tratat cu agent bioterapeutic comparativ cu cel tratat cu vehicul (vezi Figura 27).

#### 35 Nivelurile în supernatanți ale IL-10 (Figura 25)

Nivelurile de IL-10 în grupul tratat cu vehicul au fost de 13 pg/ml și de 2,1 pg/ml pentru culturile stimulate cu CII, respectiv pentru culturile cu mediu martor. Niveluri mai ridicate de IL-10 (care este o citokină antiinflamatoare) pentru grupul tratat cu vehicul pot fi de așteptat deoarece inflamația și inducția citokinelor pro-inflamatorii pot fi însoțite de un mecanism de reacție antiinflamatorie.

#### 40 Nivelurile în supernatanți ale IL-6 (Figura 26)

Citokinele inflamatorii, cum ar fi IL-6 și TNF- $\alpha$ , nu sunt produse tipic la niveluri ridicate în culturi anti-CII. Cu toate acestea, nivelurile lor pot fi modificate ca urmare a modulației imunitare. Nivelurile de IL-6 în culturile stimulate cu CII au fost modeste, atingând 10 pg/ml. Deși au fost mai mari decât în culturile în mediu de control, aceste diferențe au fost prea mici pentru a oferi motive pentru efectuarea analizelor statistice.

#### 45 Supernatanți de cultură tisulară din grupul 4 – Agentul bioterapeutic # 675 (Figura 27)

Culturile de splenocite pentru acest grup au fost înființate într-o zi diferită și, prin urmare, sunt separate de grupul tratat cu vehiculul. Deși comparațiile directe ar putea să nu fie adecvate, se pare că tratamentul cu agent bioterapeutic # 675 a fost eficient la scăderea nivelurilor de IFN- $\gamma$ , IL-17A și IL-6.

#### 50 Analiza microbiologică

Creșterea bacteriană a fost confirmată prin măsurarea densității optice la 600 nm utilizând un spectrofotometru. Identitatea bacteriană a fost confirmată prin compararea imaginilor de pe placă cu imaginile de referință.

În urma metodei de preparare îmbunătățită a bacteriilor, s-au administrat în mod consistent doze mari de tulpină bacteriană din ziua -2 și ziua -3 (cu excepția tulpinii nr. 675 din ziua 0), după cum se indică prin valorile ridicate ale OD măsurate.

Eșantioanele de fecale au fost colectate și înghețate în ziua -14, ziua 0 și la terminarea studiului.

### Histopatologie

Rezultatele histopatologiei sunt prezentate în Figurile 66–71. Așa cum era de așteptat pentru acest model, variabilitatea intra-individuală și inter-individuală a fost observată în ceea ce privește prezența/absența artritei sau severitatea schimbării prezente.

Natura patologiei a fost așa cum era de așteptat pentru acest model, cu inflamația cronică activă mixtă a sinovium-ului și a burselor care se extinde pentru a implica țesuturile moi peri-articulare (mușchi, țesut adipos, collagen dermic). În articulațiile cele mai sever afectate a existat degenerarea și pierderea cartilajului articular cu resturile intraarticulare și inflamația și întreruperea structurii articulare și osoase prin fibroză și inflamație.

Incidența modificărilor histopatologice a fost: vehicul – 80% (16/20); agent bioterapeutic #675 – 83% (20/24). Tratatul cu agent bioterapeutic #675 a fost eficient pentru reducerea deteriorării histopatologice observate în articulațiile membrelor posterioare și reducerea scorurilor de inflamație a articulațiilor, scorurilor de deteriorare a cartilajului, scorurilor de deteriorare a osului și scorurilor histopatologice totale (vezi Figura 70), chiar dacă comparațiile statistice cu grupul tratat cu vehicul nu au fost efectuate.

### Rezumat

Scorurile clinice crescute au fost observate în ziua 28 după prima administrare de collagen de tip II, așa cum se aștepta în acest model al artritei la șoareci DBA/1. Agentul bioterapeutic #675 s-a dovedit a fi eficient în tratarea artritei în acest model. Animalele tratate cu agentul bioterapeutic #675 au fost imunizate la un moment de timp diferit în comparație cu grupul tratat cu vehicul, ceea ce poate explica scorurile clinice mai mari observate. Totuși, agentul bioterapeutic #675 a fost eficient pentru reducerea bolii patologice la nivelul articulațiilor, așa cum s-a demonstrat în analiza histopatologică.

Au fost observate răspunsuri de memorie proliferativă la collagenul II în culturile de splenocite din toate grupele experimentale. Analiza statistică nu a fost efectuată pe culturile de agent bioterapeutic #675, dat fiind că acestea au fost stabilite la un moment de timp diferit, dar a fost observat o reducere a răspunsului specific la collagen față de la martor.

Cele mai multe dintre citokinele testate ale celulelor T au prezentat creșteri detectabile între martorul stimulat de collagenul II și cel din grupul tratat cu vehicul. Aceste creșteri nu au fost atât de evidente în grupul tratat cu agenți bioterapeutici. Aceasta susține în linii mari răspunsurile de memorie proliferativă la collagenul II descris mai sus. Au existat dovezi de suprimare a axei Th1/Th17, care este răspunsul patogen în acest model și în RA umană. Corelarea nivelurilor reduse de citokine cu proliferarea redusă este sugestivă pentru modularea imunitară. Nu a existat nici o dovadă că această modulare a rezultat fie din niveluri crescute ale IL-4 asociate cu Th2, fie cu creșteri ale citokinei modulate imunitar, IL-10.

### *Exemplul 4 – Analiza ulterioară a efectului inoculării bacteriene în modelul astmului indus de acarienii din praful domestic la șoareci*

Șoarecii testați în Exemplul 1 au fost supuși analizei ulterioare pentru a caracteriza mai departe efectul compozițiilor conform invenției asupra răspunsului inflamator în astmul alergic.

#### Materiale și metode

**Prelevarea sangelui și prepararea serului în ziua 14.** Probele de sange de la animale au fost colectate prin puncție cardiacă. Serul a fost izolat din proba de sânge prin centrifugare timp de 5 minute la 14000 g și depozitat la temperatura de –20°C.

**Prelevarea organelor în ziua 14.** Colectarea lobului pulmonar stâng în formalină pentru analiza histologică ulterioară. Colectarea lobilor pulmonari drepti (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea instantanee și analiza ulterioară. Fluidul BAL rămas a fost înghețat pentru analiza ulterioară.

#### **Măsurarea nivelurilor de anticorpi în ser și în fluidul BAL**

Producția totală de anticorpi IgE și de IgG1 specifici acarianului de praf domestic (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin analiza ELISA.

#### **Izolarea plămânilor și analiza histologică**

Lobii pulmonari stângi au fost fixați în formalină, urmată de încorporarea în parafină, secționarea și colorarea cu hematoxilina și eozină și PAS. Evaluarea histologică ulterioară a fost efectuată în orb după cum urmează: cinci câmpuri aleatorii pentru fiecare probă au fost evaluate pentru inflamație (infiltrație peribronhială și infiltrație perivasculară) și producție de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost înregistrată cu următorul sistem de evaluare:

0 – normal

1 – infiltrate inflamatorii ușoare

2 – infiltrate inflamatorii moderate

3 – infiltrate inflamatorii marcate

4 – infiltrate inflamatorii severe

5 – infiltrate inflamatorii foarte severe

În fiecare câmp vizual, căile respiratorii au fost măsurate în dimensiune, și a fost cuantificat numărul celulelor mucus/?m.

5

#### **Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar**

Lobii pulmonari dreپți (toți lobii rămași) izolați pentru cuantificarea mediatorilor inflamatori au fost congelați instantaneu pentru măsurarea ulterioară a CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 și CCL5 prin analiză multiplex disponibilă comercial (Merck-Millipore). Analiza a fost efectuată în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

10

#### Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 28–46.

În sprijinul descoperirilor descrise în Exemplul 1, analiza infiltratelor celulare din țesutul pulmonar al șoarecilor tratați cu tulpina 675 a arătat o reducere notabilă și semnificativă din punct de vedere statistic a scorului mediu de inflamație (vezi Figurile 32 și 34).

15

Au fost analizate nivelurile anticorpilor în lichidul și serul BAL (vezi Figurile 28–31). Nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelurilor serice ale anticorpilor. Acest lucru poate reflecta o eșec în experiment, deoarece răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi de așteptat. De asemenea, nivelurile de anticorpi serice de referință ar fi putut masca orice modificare.

20

În mod similar, nu a fost observat niciun efect clar al tratamentului bacterian asupra nivelurilor de citokine în țesutul pulmonar (vezi Figurile 36–46). Din nou, acest lucru poate reflecta un eșec în experiment, deoarece răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi de așteptat. Este, de asemenea, posibil ca mecanismul de acțiune implicat să influențeze reacțiile anterioare ale citokinelor care nu au mai putut fi detectate în ziua 4 după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție separată trebuie acordată interpretării datelor referitoare la citokine în studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate poate fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru diferitele analize și, astfel, un lob de plămâni s-ar putea să nu fi fost pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob din alți șoareci datorită distribuției neuniforme a inflamației.

25

30

#### ***Exemplul 5 – Analiza ulterioară a efectului inoculării bacteriene în modelul astmului neutrofil sever la șoareci***

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

35

#### Materiale și metode

**Prelevarea organelor în ziua 18.** Colectarea lobului pulmonar stang in formalină pentru analiza histologică ulterioară. Colectarea lobilor pulmonari dreپți (toți lobii rămași) și îndepărtarea serului pentru înghețarea instantanee și analiza ulterioară. Fluidul BAL rămas a fost înghețat pentru analiza ulterioară.

40

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

45

**Măsurarea nivelurilor de anticorpi în ser și fluidul BAL (analiză ulterioară).** Producția de anticorpi IgG1 și IgG2a specifici acarienilor de praf domestic (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin analiză ELISA.

50

**Izolarea plămânilor și analiza histologică (analiză ulterioară).** Lobii pulmonari stangi au fost fixați în formalină, urmată de încorporarea în parafină, secționarea și colorarea cu hematoxilină și eozină și PAS. Evaluarea histologică ulterioară a fost efectuată în orb după cum urmează: Cinci campuri aleatorii pentru fiecare eșantion au fost evaluate pentru inflamație (infiltrație peribronhială și infiltrație perivasculară) și producție de mucus. Infiltrarea inflamatorie a fost înregistrată cu următorul sistem de evaluare:

55

0 – normal

1 – infiltrate inflamatorii ușoare

2 – infiltrate inflamatorii moderate

3 – infiltrate inflamatorii marcate

4 – infiltrate inflamatorii severe

60

5 – infiltrate inflamatorii foarte severe

#### Rezultate și analize

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 47–64.

Analiza ulterioară a nivelurilor de anticorpi a arătat că eficacitatea tulpinii bacteriene 671 a fost, de asemenea, reflectată în nivelurile reduse ale IgG1 specifice HDM în fluidul BAL și ser (vezi Figurile 47 și 49). Nu pot fi trase concluzii ferme privind efectul asupra nivelurilor de IgG2a. În general, datele din analiza anticorpului sugerează o reducere legată de un răspuns inflamator global redus, spre deosebire de un efect selectiv asupra comutării izotipului de anticorp.

Analiza histologică a sprijinit numărul diferențiat de celule din fluidul BAL, prezentând un infiltrat celular redus la șoarecii tratați cu tulpina 675 (vezi Figurile 51–53).

În ceea ce privește nivelurile de citokine, ca și în cazul Exemplului 4, răspândirea datelor și barele de eroare pentru fiecare tratament sunt mari, iar martorii pozitivi și negativi nu par să se fi comportat așa cum ar fi fost de așteptat în mod necesar. Este, de asemenea, posibil ca mecanismul de acțiune să influențeze răspunsurile anterioare ale citokinelor care nu mai pot fi detectate în ziua 4 după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție specială trebuie acordată interpretării datelor referitoare la citokine în studiul curent, datorită variabilității nivelurilor detectate. Această variabilitate poate fi explicată în parte prin faptul că țesutul pulmonar a fost separat pentru analizele diferite și, astfel, un lob de plămâni s-ar putea să nu fi fost pe deplin reprezentativ sau comparabil cu același lob din alți șoareci datorită distribuției neuniforme a inflamației. În ciuda acestei variabilități, s-a demonstrat un efect antiinflamator clar asupra nivelurilor citokinelor pentru tulpina 675, iar martorul pozitiv anticorp anti-IL-17 s-a comportat în general așa cum era de așteptat.

Cu dezavantajele de mai sus, datele din Figurile 56, 58, 59, 61 și 63 sugerează că tratamentul cu tulpinile bacteriene conform invenției și în special tulpina 751 poate realiza o reducere a nivelurilor de IL-1b, IFNg, RANTES, MIP-1a și KC (forma ortoloagă de șoarece a IL-8 umane), care poate indica un mecanism de acțiune legat de influențele asupra eliberării de chemokine (și astfel de recrutare a celulelor) de către celulele imunitare stromale sau înăscute. Aceste citokine fac parte din calea Th17. Luând împreună acest set de date, se poate trage concluzia clară că tulpina 675 a fost extrem de eficace pentru protejarea șoarecilor împotriva inflamației la acest model al astmului neutrofil sever la șoareci.

#### ***Exemplul 6 – Eficacitatea inoculării bacteriene la un model al sclerozei multiple la șoareci***

##### Rezumat

Șoarecilor li s-au administrat compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției și șoarecii au fost ulterior imunizați cu glicoproteină oligendendocitară de mielină pentru a induce encefalomielita autoimună experimentală (EAE). EAE este modelul experimental cel mai frecvent utilizat pentru scleroza multiplă la om. S-a constatat că compozițiile conform invenției au un efect izbitor asupra incidenței bolii și asupra severității bolii.

##### Tulpină

675: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42408

##### Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratamentul cu martor vehicul (pe cale orală).
3. Tratament cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 675 (pe cale orală).
9. Grup martor pozitiv. Tratament cu dexametazonă (i.p.).
10. Grup martor netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 10

Ziua –14 până în ziua 27: administrarea zilnică a martorului vehicul pe cale orală (grupul 1).

Ziua –14 până în ziua 27: administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupul 4).

Zile 0–28: administrarea dexametazonei (i.p.) de trei ori pe săptămână (grupul 9).

Ziua 0: MOG35–55 (glicoproteină oligendendocitară mielină – 2 mg/ml) și CFA (2 mg/ml MTB) au fost amestecate 1:1 rezultând soluții de 1 mg/ml. 100  $\mu$ l din amestecul peptidă-CFA au fost injectate subcutanat în fiecare picior posterior. Administrarea toxinei pertussis s-a făcut intraperitoneal (300 ng).

Ziua 1: administrarea intraperitoneală a toxinei pertussis (300 ng).

Ziua 7 – în continuare: măsurarea incidenței bolii și a greutății de trei ori pe săptămână.

##### Obiective și analize

Șoarecii au fost analizați pentru incidența bolii și severitatea bolii de trei ori pe săptămână. Evaluarea a fost efectuată în orb. Gravitatea bolii a fost evaluată utilizând un scor clinic cuprins între 0 și 5, cu 5 indicând un șoarece mort (vezi sistemul de evaluare clinic de mai jos).

Monitorizare

In zilele indicate, șoarecii au fost cântăriți și observați pentru evaluarea activității bolii și incidenței bolii.

- 5 Observații privind evaluarea activității bolii:  
0 – Nu au apărut modificări evidente ale funcției motorii în comparație cu șoarecii neimunizați.  
0,5 – Varful cozii este moale.  
1,0 – Coadă moale.  
1,5 – Coadă moale și inhibare a picioarelor din spate.
- 10 2,0 – Coadă moale și slăbiciunea picioarelor din spate; SAU – Există semne evidente de înclinare a capului cand se observă mersul pe jos. Echilibrul este slab.  
2,5 – Coadă moale și târârea picioarelor din spate; SAU – Există o înclinare puternică a capului care cauzează căderea ocazională a șoarecelui.  
3,0 – Coadă moale și paralizia completă a picioarelor din spate.
- 15 3,5 – Coadă moale și paralizia completă a picioarelor din spate. În plus: șoarecele se deplasează în jurul cuștii, dar atunci când este plasat pe partea sa, nu este în măsură să se orienteze. Picioarele din spate sunt împreună pe o parte a corpului.  
4,0 – Coadă moale, paralizie completă a picioarelor din spate și paralizia parțială a picioarelor din față. Șoarecele se mișcă minimal în jurul cuștii, dar pare alert și se hrănește.
- 20 4,5 – Paralizia completă a picioarelor din spate și parțială a celor din față, fără mișcare în jurul cuștii. Șoarecele este imediat eutanasiat și scos din cușcă.  
5,0 – Șoarecele este eutanasiat din cauza unei paralizii severe.

Când un animal are un scor de activitate al bolii egal sau mai mare de 1, se consideră că are un scor pozitiv referitor la incidența bolii.

25 Rezultate

Rezultatele studiului sunt prezentate în Figurile 72 și 73.

- Inducerea bolii în grupurile martor negative a avut succes, cu scoruri ridicate demonstrate de martorul vehicul și de martorul netratat. Efectul tratamentului cu tulpina 675 a fost izbitor și șoarecii tratați cu tulpina 675 au prezentat o incidență a bolii și o severitate a bolii reduse semnificativ.
- 30 Intr-adevăr, reducerea incidenței bolii și a severității bolii a fost comparabilă cu grupul martor pozitiv. Aceste date indică faptul că tulpina 675 poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea sclerozei multiple.

**Exemplul 7 – Testarea stabilității**

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

40

**Secvențe**

SEQ ID NO: 1 (*Bacteroides coprocola* gena pentru ARN 16S, secvență parțială, tulpină: M11 – AB200223)

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt
121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc ttctgaaaga aagattaata cctgatagta
181 tggtagagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc
241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctgcga tggatagggg ttctgagagg
301 aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg
361 aatattggtc aatgggagag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta
421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta cgtgtaggat tttgtatgta
481 ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gaggatgcga
541 gcgttatccg gattttattgg gtttaaaggg agcgagacg ggagattaag tcagttgtga
601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggg ttctttgagt gcagttgagg
661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag
721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga
781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctgttggc gatatactgt
841 cagcgcccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac
901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac
961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaaactt gtaagccgca
1021 aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgtc gtcagctcgt gccgtgaggt gtcggcttaa
1081 gtgccataac gagcgcaacc ctctgtgtca gttactaaca ggttaagctg agggctctgg
1141 ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatacg cacggccctt
1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggcgctac cgggcaacgg
1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaacccg actccacgaa
1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc cggggccttg
1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag
1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca aggtaaccaa g

```

SEQ ID NO: 2 (*Bacteroides coprocola* gena pentru ARN 16S, secvență parțială, tulpină: M16 – AB200224)

```

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

```

181 tggtagatt gcatgatggc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc  
 241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctgcga tggatagggg ttctgagagg  
 301 aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg  
 361 aatattggtc aatgggagag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta  
 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtttccta cgtgtaggat tttgtatgta  
 481 ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gaggatgcga  
 541 gcgttatccg gatttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga  
 601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggg ttccttgagt gcagttgagg  
 661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag  
 721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga  
 781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctgttggc gatatactgt  
 841 cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac  
 901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac  
 961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaactt gtaagccgca  
 1021 aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgc gtcagctcgt gccgtgagg gtcggcttaa  
 1081 gtgccataac gagcgcaacc ctctggtgca gttactaaca ggttaagctg agggctctgg  
 1141 ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatcag cacggccctt  
 1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggcgctac cggcaacgg  
 1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaaccgc actccacgaa  
 1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc cgggccttg  
 1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag  
 1441 cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtctaaca aggtaaccaa

SEQ ID NO: 3 (*Bacteroides coprocola* gena pentru ARN 16S, secvență parțială, tulpină: M158 – AB200225)

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggc ttaacacatg caagtcgagg  
 61 ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt  
 121 atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga aagattaata cctgatagta  
 181 tggtagatt gcatgatagc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc  
 241 attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctncga tggatagggg ttctgagagg  
 301 aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg  
 361 aatattggtc aatgggagag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaaggtccta  
 421 cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtatccta cgtgtaggat tttgtatgta  
 481 ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gaggatgcga  
 541 gcgttatccg gatttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga  
 601 aagtttgagg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggg ttccttgagt gcagttgagg  
 661 caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgag  
 721 aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga  
 781 ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctgttggc gatatactgt  
 841 cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac  
 901 tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac  
 961 gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaactt gtaagccgca  
 1021 aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgc gtcagctcgt gccgtgagg gtcggcttaa  
 1081 gtgccataac gagcgcaacc ctctggtgca gttactaaca ggttaagctg aggactctgg  
 1141 ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatcag cacggccctt



1201 acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggcagctac ccggcgacgg  
 1261 gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaaccgc actccacgaa  
 1321 gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg  
 1381 tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag  
 1441 cgccctaggg taaaaccggg aattggggct aagtcgtaac aaggtaacca a

**SEQ ID NO: 4 (secvență consens ARNr 16S pentru tulpina 675)**

GTCTGGCTCAKGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGAACTTAGCTTGCTAAGT  
 TTGATGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTCCCGCTTACTCAGGAATAGCCTTTTCGAAAGAAAG  
 ATTAATGCCTGATGGTATCTTAAGCACACATGTAATTAAGATTAAAGATTTATCGGTAAGCGATGGGGATGCGTTCC  
 ATTAGGTAGTAGGCGGGTAACGGCCACCTAGCCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGG  
 AACTGAGACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCGAGCCTGAACAGCC  
 AAGTAGCGTGAAGGATGAAGGTCTATGGATTGTAAACTTCTTTTATACGGGAATAAAGTGGTCCACGTGTGGGCCT  
 TTGCATGTACCGTATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATC  
 CGGATTTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGACGGGGGATTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTTCGGCTCAACCGTAAAATT  
 GCAGTTGATACTGGTTCCCTTGAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA  
 CGAAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCTAAGCTGTAAGTGCAGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGG  
 ATTAGATAACCTGGTAGTCCACACGTTAAACGATGGATACTCGTGTGGCGATATACTGTACGCGCCAAGCGAAA  
 GCATTAAGTATCCACCTGGGAGTACGCCGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGA  
 GGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTAAATTGCAGACGAATTACTTGGAAACAG  
 GTAAGCCGCAAGGCGTCTGTGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTGCGCTTAAGTGCCAT  
 AACGAGCGCAACCTCGTGGCCAGTTACTAGCAGGTAACGCTGAGGACTCTGGCCAGACTGCCATCGTAAGATGCGA  
 GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGAGGTACAGAA  
 GGCAGCTACCCGGCGACGGGATGCCAATCTCCAAAGCCTCTCTCAGTTTCGGACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACG  
 AAGCTGGATTTCGTAGTAATCGCGCATCAGCCACGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC  
 AAGCCATGAAAGCCGGGAGTACCTGAAGTGCGTAACCGCAAGGAGCGCCCTAGGGTAAAACCGGTAATTGGGGCTAA  
 GTCNTACGGG

**SEQ ID NO: 5 (*Bacteroides thetaiotaomicron* gena pentru ARN 16S, secvență parțială – M58763)**

1 cttntacaat gaagagtttg atcctggctc aggatnaacg ctagctacag gcttaacaca  
 61 tgcaagtcna ggggcagcat ttcagtttgc ttgcaaactg gagatggcga ccggcgacag  
 121 ggtgagtaac acgtatccaa cctgccgata actcggggat agcctttcga aagaaagatt  
 181 aatacccnat ggtataatca gaccgcatng tcttrttatt aaagaatttc ggttatcgat  
 241 ggggatgctg tccattaggg agttggtgag gtaacggctc acnnaacctt cgatggatag  
 301 gggttctgag aggaaggtcc cccacattgg aactgagaca cgggtccaaac tcctacggga  
 361 ggcagcagtg aggaatattg gtcaatgggc gcaggcctga accagccaag tagcgtgaag  
 421 gatgactgcc ctatgggttg taaacttctt ttatatggga ataaagtttt ccacgtgttg  
 481 aattttgtat gtaccatatg aataaggatc ggctaactcc gtgccagcag ccncgnat  
 541 acggagnatc cgagcggttat ccggttttat tgggttttaa gggagcgtag gtggacagtt  
 601 aagtcagttg tgaaagtttg cggctcaacc gtaaaattgc agttgatact ggctgtcttg  
 661 agtacagtag aggtgggagg aattcggtg gtacgggtga aatgcttaga tatcacgaag  
 721 aactccgatt gcgaaggcag ctactggac tgcaactgac actgatgctc gaaagtgttg  
 781 gtatcaaaca ggattagata ccctggtagt ccacacagta aacgatgaat actcgtgtt  
 841 tgcgatatac agtaagcggc caagcgaaag cattaagtat tccacctggg gagtacgccg  
 901 gcaacgggtga aactcaaagg aattgacggg ggccngcaca agcggaggaa catgtggttt  
 961 aattcgatga tacgcgagga accttaccgg ggcttaaatt gcatttgaat atattggaaa  
 1021 cagtatagcc gyaaggcaaa tgtgaaggtg ctgcatgggt gtcgtcagct cgtgccgtga  
 1081 ggtgtcggct taagtgccat aacgagcgca acccttatct ttagttacta acaggtcatg  
 1141 ctgaggactc tagagagact gccgtcgtaa gatgtgagga aggtggggat gacgtcaaat

1201 cagcacngcc cntacgtccg gggctacaca cgtgttaca tgggggggtac agaaggcagc  
 1261 tacctggtga caggatgcta atcccaaaag cctctctcag ttcggatcga agtctgcaac  
 1321 ccgacttcgt gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg  
 1381 ttcccgggcn ttgtacacac cgcccgtaa gccatgaaag ccgggggtac ctgaagtacg  
 1441 taaccgcaag gagcgctcta gggtaaaact ggtaattggg gc

SEQ ID NO: 6 (secvența cromozomului tulpinii 675) – vezi lista secvențelor electronice a WO 2016/203217.

SEQ ID NO: 7 (secvența plasmidică a tulpinii 675) – vezi lista secvențelor electronice a WO 2016/203217.

## REFERINȚE

- [1] Spor și colab. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9 (4): 279–90.
- [2] Eckburg și colab. (2005) *Science.* 10; 308 (5728): 1635–8.
- [3] Macpherson și colab. (2001) *Microbes Infect.* 3 (12): 1021–1035
- [4] Macpherson și colab. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59 (12): 2088–96.
- [5] Mazmanian și colab. (2005) *Cell* 15; 122 (1): 107–18.
- [6] Frank și colab. (2007) *PNAS* 104 (34): 13780–5.
- [7] Scanlan și colab. (2006) *J Clin Microbiol.* 44 (11): 3980–8.
- [8] Kang și colab. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16 (12): 2034–42.
- [9] Machiels și colab. (2013) *Gut.* 63 (8): 1275–1283.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin și Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2: S96–100.
- [15] Azad și colab. (2013) *BMJ.* 347: f6471.
- [16] Kitahara și colab. (2005) *IntJ Syst Evol Microbiol.* 55(Pentru 2): 2143–7
- [17] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology.* 26: 557–563.
- [18] Srůtková și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods.* 87 (1): 10–6.
- [19] Ye și colab. (2015) *PLoSOne.* 10 (1): e0117704.
- [20] Fabro și colab. (2015) *Immunobiology.* 220 (1): 124–35.
- [21] Yin și colab. (2014) *Immunogenetics.* 66 (3): 215–8.
- [22] Cheluvappa și colab. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175 (2): 316–22.
- [23] Schieck și colab. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133 (3): 888–91.
- [24] Balato și colab. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28 (8): 1016–1024.
- [25] Monteleone și colab. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc.* 6:256–259
- [27] Miossec și Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11 (10): 763–76.
- [28] Yang și colab. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35 (10): 493–500.
- [29] Koenders și colab. (2006) *J. Immunol.* 176: 6262 – 6269.
- [30] Amedei și colab. (2012) *Int J Mol Sci.* 13 (10): 13438–60.
- [31] Shabgah și colab. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31 (4): 256–61.
- [38] Zhang (2015) *Inflammation.* 23 august.
- [39] Sun și colab. (2015) *Citokine.* 74 (1): 76–80.
- [40] Mucientes și colab. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99 (4): 566–70.
- [41] Jawad și colab. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21 (6): 434–9.
- [42] Maya și colab. (2014) *J Ophthalmology.* 310329
- [43] Chi și colab. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119 (5): 1218–1224.
- [44] Chi și colab. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49 (7): 3058–3064.
- [45] Luger și Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30 (2): 134–143.
- [46] Miyamoto–Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9–24.
- [47] „Cryopreservation and Freeze-Drying Procols“, editori Day și McLellan, Humana Press.
- [48] Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- [49] Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [50] Kailasapathy și colab. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3 (2): 39–48.
- [51] „Handbook of Pharmaceutical Excipients“, ediția a doua, (1994), editată de A Wade și PJ Weller
- [52] „Remington's Pharmaceutical Sciences“, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro editor, 1985)
- [53] „Handbook of Microbiological Media“, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.

- [54] „Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry“ (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581: 247–61.
- 5 [56] „Creating Bacterial Glycerol Stocks for Long-term Storage of Plasmids“ Addgene – <https://www.addgene.org/plasmid-protocols/create-glycerol-stock/>
- [57] Gennaro (2000) „Remington: The Science and Practice of Pharmacy“, ediția a XX-a, ISBN: 0683306472.
- [58] „Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course“, (Ream și colab., editori, 1998, Academic Press).
- 10 [59] „Methods in Enzymology“ (S. Colowick și N. Kaplan, editori, Academic Press, Inc.)
- [60] „Handbook of Experimental Immunology“, Vol. I–IV (D. M. Weir și C. C. Blackwell, editori, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [61] Sambrook și colab. (2001) „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, ediția a III-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 15 [62] „Handbook of Surface and Colloidal Chemistry“ (Birdi, K.S. editor, CRC Press, 1997)
- [63] Ausubel și colab. (editori) (2002) „Short protocols in molecular biology“, ediția a V-a (Procoloale curente).
- [64] „PCR (Introduction in Biotechniques Series)“, ediția a doua, (Newton & Graham editori, 1997, Springer Verlag).
- 20 [65] „Current Protocols in Molecular Biology“ (F. M. Ausubel și colab., editori, 1987) Supliment 30.
- [66] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482–489.
- [67] Brand și colab. (2007) *Nature Protocols*, 2 (5): 1269–1275
- [68] Jiao și colab. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184 (4): 1085–93.

## LISTA DE SECVENȚE

<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED

<120> Compoziții care cuprind tulpini bacteriene

<130> P065778WO

<150> GB 1510470.6

<151> 2015-06-15

<150> GB 1520510.7

<151> 2015-11-20

<150> GB 1603786.3

<151> 2016-03-04

<160> 5

<170> SeqWin2010, versiunea 1.0

<210> 1

<211> 1491

<212> ADN

<213> Bacteroides coprocola

<400> 1

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| agagtttgat | cctggctcag | gatgaacgct | agctacaggc | ttaacacatg  | caagtcgagg | 60   |
| ggcagcatga | acttagcttg | ctaagtttga | tggcgaccgg | cgcacgggtg  | agtaacacgt | 120  |
| atccaacctt | ccgtttactc | agggatagcc | tttcgaaaga | aagattaata  | cctgatagta | 180  |
| tggtgagatt | gcatgatggc | accattaaag | atttattggg | aaacgatggg  | gatgcgttcc | 240  |
| attaggtagt | aggcggggta | acggcccacc | tagcctgcga | tggatagggg  | ttctgagagg | 300  |
| aaggtccccc | acattggaac | tgagacacgg | tccaaactcc | tacgggaggc  | agcagtgagg | 360  |
| aatattggtc | aatgggagag | agcctgaacc | agccaagtag | cgtgaaggat  | gaaggtccta | 420  |
| cggattgtaa | acttctttta | tacgggaata | aagtttccta | cgtgtaggat  | tttgtatgta | 480  |
| ccgtatgaat | aagcatcggc | taactccgtg | ccagcagccg | cggtaataacg | gaggatgcga | 540  |
| gcgttatccg | gatttatttg | gtttaaaggg | agcgcagacg | ggagattaag  | tcagttgtga | 600  |
| aagtttgagg | ctcaaccgta | aaattgcagt | tgatactggg | ttccttgagt  | gcagttgagg | 660  |
| caggcggaat | tcgtggtgta | gcggtgaaat | gcttagatat | cacgaagaac  | cccgattgcg | 720  |
| aaggcagctt | gctaaactgt | aactgacgtt | catgctcgaa | agtgtgggta  | tcaaacagga | 780  |
| ttagataccc | tggtagtcca | cacggtaaac | gatggatact | cgctggtggc  | gatatactgt | 840  |
| cagcggccaa | gcgaaagcat | taagtatccc | acctggggag | tacgccggca  | acggtgaaac | 900  |
| tcaaaggaat | tgacgggggc | ccgcacaagc | ggaggaacat | gtggtttaat  | tcgatgatac | 960  |
| gcgaggaacc | ttacccgggc | ttaaattgca | gacgaattac | gaggaaactt  | gtaagccgca | 1020 |
| aggcgtctgt | gaaggtgctg | catggttgct | gtcagctcgt | gccgtgaggt  | gtcggcttaa | 1080 |
| gtgccataac | gagcgcaacc | ctcgtggtca | gttactaaca | ggttaagctg  | agggctctgg | 1140 |
| ccagactgcc | atcgtaagat | gtgaggaagg | tggggatgac | gtcaaatacag | cacggccctt | 1200 |
| acgtccgggg | ctacacacgt | gttacaatgg | gaggtacaga | aggccgctac  | ccggcaacgg | 1260 |
| gatgccaatc | cccaaaacct | ctctcagttc | ggactggagt | ctgcaaccgg  | actccacgaa | 1320 |
| gctggattcg | ctagtaatcg | cgcatacggc | acggcgcggt | gaatacgttc  | ccgggccttg | 1380 |
| tacacaccgc | ccgtcaagcc | atgaaagccg | ggggtacctg | aagtgcgtaa  | ccgcaaggag | 1440 |
| cgccttaggg | taaaaccggt | aattggggct | aagtctaaca | aggtaaccaa  | g          | 1491 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1490

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Bacteroides coprocola

&lt;400&gt; 2

|            |            |            |            |             |            |      |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| agagtttgat | cctggctcag | gatgaacgct | agctacaggc | ttaacacatg  | caagtcgagg | 60   |
| ggcagcatga | acttagcttg | ctaagtttga | tggcgaccgg | cgcacgggtg  | agtaacacgt | 120  |
| atccaacctt | ccgtttactc | agggatagcc | tttcgaaaga | aagattaata  | cctgatagta | 180  |
| tggtgagatt | gcatgatggc | accattaaag | atttattggg | aaacgatggg  | gatgcgttcc | 240  |
| attaggtagt | aggcggggta | acggcccacc | tagcctgcga | tggatagggg  | ttctgagagg | 300  |
| aaggtccccc | acattggaac | tgagacacgg | tccaaactcc | tacgggaggc  | agcagtgagg | 360  |
| aatattggtc | aatgggagag | agcctgaacc | agccaagtag | cgtgaaggat  | gaaggtccta | 420  |
| cggattgtaa | acttctttta | tacgggaata | aagtttccta | cgtgtaggat  | tttgtatgta | 480  |
| ccgtatgaat | aagcatcggc | taactccgtg | ccagcagccg | cggtaataacg | gaggatgcga | 540  |
| gcgttatccg | gatttatttg | gtttaaaggg | agcgcagacg | ggagattaag  | tcagttgtga | 600  |
| aagtttgagg | ctcaaccgta | aaattgcagt | tgatactggg | ttccttgagt  | gcagttgagg | 660  |
| caggcggaat | tcgtggtgta | gcggtgaaat | gcttagatat | cacgaagaac  | cccgattgcg | 720  |
| aaggcagctt | gctaaactgt | aactgacgtt | catgctcgaa | agtgtgggta  | tcaaacagga | 780  |
| ttagataccc | tggtagtcca | cacggtaaac | gatggatact | cgctggtggc  | gatatactgt | 840  |
| cagcggccaa | gcgaaagcat | taagtatccc | acctggggag | tacgccggca  | acggtgaaac | 900  |
| tcaaaggaat | tgacgggggc | ccgcacaagc | ggaggaacat | gtggtttaat  | tcgatgatac | 960  |
| gcgaggaacc | ttacccgggc | ttaaattgca | gacgaattac | gaggaaactt  | gtaagccgca | 1020 |
| aggcgtctgt | gaaggtgctg | catggttgct | gtcagctcgt | gccgtgaggt  | gtcggcttaa | 1080 |
| gtgccataac | gagcgcaacc | ctcgtggtca | gttactaaca | ggttaagctg  | agggctctgg | 1140 |
| ccagactgcc | atcgtaagat | gtgaggaagg | tggggatgac | gtcaaatacag | cacggccctt | 1200 |
| acgtccgggg | ctacacacgt | gttacaatgg | gaggtacaga | aggccgctac  | ccggcaacgg | 1260 |
| gatgccaatc | cccaaaacct | ctctcagttc | ggactggagt | ctgcaaccgg  | actccacgaa | 1320 |
| gctggattcg | ctagtaatcg | cgcatacggc | acggcgcggt | gaatacgttc  | ccgggccttg | 1380 |
| tacacaccgc | ccgtcaagcc | atgaaagccg | ggggtacctg | aagtgcgtaa  | ccgcaaggag | 1440 |
| cgccttaggg | taaaaccggt | aattggggct | aagtctaaca | aggtaaccaa  |            | 1490 |

<210> 3  
 <211> 1491  
 <212> ADN  
 <213> Bacteroides coprocola

<400> 3

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agctacaggg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga acttagcttg ctaagtttga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacacgt 120
atccaacctt ccgtttactc agggatagcc tttcgaaaga aagattaata cctgatagta 180
tggtgagatt gcatgatagc accattaaag atttattggt aaacgatggg gatgcgttcc 240
attaggtagt aggcggggta acggcccacc tagcctncga tggatagggg ttctgagagg 300
aaggtccccc acattggaac tgagacacgg tccaaactcc tacgggaggc agcagtgagg 360
aatattgggtc aatgggcgag agcctgaacc agccaagtag cgtgaaggat gaagtccta 420
cggattgtaa acttctttta tacgggaata aagtatccta cgtgtaggat tttgtatgta 480
ccgtatgaat aagcatcggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gaggatgcga 540
gcgttatccg gattttattgg gtttaaaggg agcgcagacg ggagattaag tcagttgtga 600
aagtttgccg ctcaaccgta aaattgcagt tgatactggt ttccttgagt gcagttgagg 660
caggcggaat tcgtggtgta gcggtgaaat gcttagatat cacgaagaac cccgattgcg 720
aaggcagctt gctaaactgt aactgacgtt catgctcgaa agtgtgggta tcaaacagga 780
ttagataccc tggtagtcca cacggtaaac gatggatact cgctgttggc gatatactgt 840
cagcggccaa gcgaaagcat taagtatccc acctggggag tacgccggca acggtgaaac 900
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggaggaacat gtggtttaat tcgatgatac 960
gcgaggaacc ttaccggggc ttaaattgca gacgaattac gaggaaactt gtaagccgca 1020
aggcgtctgt gaaggtgctg catggttgtc gtcagctcgt gccgtgaggt gtcggcttaa 1080
gtgccataac gagcgcaacc ctctgtgtca gttactaaca ggttaagctg aggactctgg 1140
ccagactgcc atcgtaagat gtgaggaagg tggggatgac gtcaaatacag cacggccctt 1200
acgtccgggg ctacacacgt gttacaatgg gaggtacaga aggcagctac ccggcgacgg 1260
gatgccaatc cccaaaacct ctctcagttc ggactggagt ctgcaaccgg actccacgaa 1320
gctggattcg ctagtaatcg cgcacagcc acggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg 1380
tacacaccgc ccgtcaagcc atgaaagccg ggggtacctg aagtgcgtaa ccgcaaggag 1440
cgccctaggg taaaaccggt aattggggct aagtcgtaac aaghtaacca a 1491

```

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

<400> 4

```

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

```

|             |             |            |            |            |             |      |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| cacatgtaat  | taagattaaa  | gatttatcgg | taagcgatgg | ggatgcgttc | cattaggtag  | 240  |
| tagggcgggt  | aacggcccac  | ctagccgacg | atggataggg | gttctgagag | gaaggtcccc  | 300  |
| cacattggaa  | ctgagacacg  | gtccaaactc | ctacgggagg | cagcagttag | gaatattggt  | 360  |
| caatgggcgc  | gagcctgaac  | cagccaagta | gcgtgaagga | tgaaggctct | atggattgta  | 420  |
| aacttctttt  | atacgggaat  | aaagtgggtc | acgtgtgggc | ctttgcatgt | accgtatgaa  | 480  |
| taagcatcgg  | ctaactccgt  | gccagcagcc | gcggtaatat | ggaggatgcg | agcgttatcc  | 540  |
| ggattttattg | ggttttaaagg | gagcgcagac | gggggattaa | gtcagttgtg | aaagtttgctg | 600  |
| gctcaaccgt  | aaaattgcag  | ttgatactgg | ttcccttgag | tgcagttgag | gcaggcggaa  | 660  |
| ttcgtggtgt  | agcggtgaaa  | tgcatagata | tcacgaagaa | ccccgattgc | gaaggcagcc  | 720  |
| tgctaagctg  | taactgacgt  | tgaggctcga | aagtgtgggt | atcaaacagg | attagatacc  | 780  |
| ctggtagtcc  | acacggtaaa  | cgatggatac | tcgctgttgg | cgatatactg | tcagcggcca  | 840  |
| agcgaaagca  | ttaagtatcc  | cacctgggga | gtacgccggc | aacggtgaaa | ctcaaaggaa  | 900  |
| ttgacggggg  | cccgcacaa   | cggaggaaca | tgtggtttta | ttcgatgata | cgcgaggaac  | 960  |
| cttaccgggg  | cttaaatgtc  | agacgaatta | cttggaacaa | ggtaagccgc | aaggcgtctg  | 1020 |
| tgaagggtgct | gcatggttgt  | cgtcagctcg | tgccgtgagg | tgtcggctta | agtgccataa  | 1080 |
| cgagcgcaac  | cctcgtggcc  | agttactagc | aggtaacgct | gaggactctg | gccagactgc  | 1140 |
| catcgtaaga  | tgcgaggaag  | gtggggatga | cgtcaaatac | gcacggccct | tacgtccggg  | 1200 |
| gctacacacg  | tgttacaatg  | ggaggtacag | aaggcagcta | cccggcgacg | ggatgccaat  | 1260 |
| ctccaaagcc  | tctctcagtt  | cggactggag | tctgcaaccc | gactccacga | agctggattc  | 1320 |
| gctagtaatc  | gcgcatcagc  | cacggcgcgg | tgaatacggt | cccgggcctt | gtacacaccg  | 1380 |
| cccgtcaagc  | catgaaagcc  | gggagtacct | gaagtgcgta | accgcaagga | gcgccctagg  | 1440 |
| gtaaaaccgg  | taattggggc  | taagtcntac | gggg       |            |             | 1474 |

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1482

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Bacteroides thetaiotaomicron

&lt;400&gt; 5

|              |            |             |            |             |            |      |
|--------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| cttntacaat   | gaagagtttg | atcctggctc  | aggatnaacg | ctagctacag  | gcttaacaca | 60   |
| tgcaagttna   | ggggcagcat | ttcagtttgc  | ttgcaaactg | gagatggcga  | ccggcgcacg | 120  |
| ggtgagtaac   | acgtatccaa | cctgccgata  | actcggggat | agcctttcga  | aagaaagatt | 180  |
| aatacccnat   | ggtataatca | gaccgcatng  | tcttrttatt | aaagaatttc  | ggttatcgat | 240  |
| ggggatgcgt   | tccattaggc | agttggtgag  | gtaacggctc | acnnaacctt  | cgatggatag | 300  |
| gggttctgag   | aggaaggtcc | cccacattgg  | aactgagaca | cgggtccaaac | tcctacggga | 360  |
| ggcagcagtg   | aggaatattg | gtcaatgggc  | gcaggcctga | accagccaag  | tagcgtgaag | 420  |
| gatgactgcc   | ctatgggttg | taaacttctt  | ttatatggga | ataaaagttt  | ccacgtgtgg | 480  |
| aattttgtat   | gtaccatatg | aataaggatc  | ggctaactcc | gtgccagcag  | ccncgntnat | 540  |
| acggagnatc   | cgagcgttat | ccggatttat  | tgggttttaa | gggagcgtag  | gtggacagtt | 600  |
| aagtcagttg   | tgaaagtttg | cggctcaacc  | gtaaaattgc | agttgatact  | ggctgtcttg | 660  |
| agtagcgtag   | aggtgggcgg | aattcgtggt  | gtagcgggtg | aatgcttaga  | tatcacgaag | 720  |
| aactccgatt   | gcgaaggcag | ctcactggac  | tgcaactgac | actgatgctc  | gaaagtgtgg | 780  |
| gtatcaaaca   | ggattagata | ccctggtagt  | ccacacagta | aacgatgaat  | actcgtgttt | 840  |
| tgcatatatac  | agtaagcggc | caagcgaag   | cattaagtat | tccacctggg  | gagtacgccg | 900  |
| gcaacggtga   | aactcaaagg | aattgacggg  | ggccngcaca | agcggaggaa  | catgtggttt | 960  |
| aattcgatga   | tacgcgagga | accttaccgg  | ggcttaaatt | gcatttgaat  | atattggaaa | 1020 |
| cagtatatagcc | gyaaggcaaa | tgtgaagggtg | ctgcatgggt | gtcgtcagct  | cgtgccgtga | 1080 |
| ggtgtcggct   | taagtgccat | aacgagcgca  | acccttatct | ttagttacta  | acaggtcatg | 1140 |
| ctgaggactc   | tagagagact | gccgtcgtaa  | gatgtgagga | aggtggggat  | gacgtcaa   | 1200 |
| cagcacngcc   | cntacgtccg | gggctacaca  | cgtgttacaa | tgggggggtac | agaaggcagc | 1260 |
| tacctggtga   | caggatgcta | atcccaaaag  | cctctctcag | ttcggatcga  | agtctgcaac | 1320 |
| ccgacttcgt   | gaagctggat | tcgctagtaa  | tcgcgcacat | gccatggcgc  | ggtgaatacg | 1380 |
| ttcccgggcn   | ttgtacacac | cgcccgctca  | gccatgaaag | ccgggggtac  | ctgaagtacg | 1440 |
| taaccgcaag   | gagcgtccta | gggtaaaact  | ggtaattggg | gc          |            | 1482 |

**(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:**

- WO-A2-2011/153226
- CN-A- 103 156 888
- CN-A- 104 546 935
- CN-A- 104 546 942
- US-A1- 2014 335 131
- US-B1- 9 011 834

**(57) Revendicări:**

1. O compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană de gen *Bacteroides* având o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 4, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli inflamatorii sau autoimune.

2. Compoziția pentru utilizarea conform revendicării 1, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei condiții selectate din grupul constând din astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; artrită, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; scleroză multiplă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boală inflamatorie intestinală, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerasă; boală celiacă; boli pulmonare obstructive cronice (COPD); uveită; sclerită; vasculită; boală Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și rejet de alogrefă.

3. Compoziția pentru utilizarea conform revendicării 2, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofil sau astmul alergic, și în care compoziția este utilizată într-o metodă de reducere a neutrofiliei sau a eozinofiliei în tratamentul astmului.

4. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 2, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide și în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a umflării articulației în artrita reumatoidă.

5. Compoziția pentru utilizarea conform revendicării 2, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a sclerozei multiple, și în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a incidenței bolii sau a gravității bolii.

6. Compoziția pentru utilizarea conform revendicării 2, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a uveitei și în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere sau de prevenire a afectării retiniene în uveită.

7. Compoziția pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea bolii inflamatorii sau autoimune.

8. Compoziția pentru utilizarea oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este destinată utilizării la un pacient cu niveluri IL-17 ridicate sau celule Th17.

9. Compoziția pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care tulpina bacteriană este din specia *Bacteroides coprocola*.

10. Compoziția pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările 1–9, în care tulpina bacteriană are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 4 sau în care tulpina bacteriană are secvența ARN 16s. reprezentată de SEQ ID NO: 4.

11. Compoziție pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este pentru administrare orală, în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată.

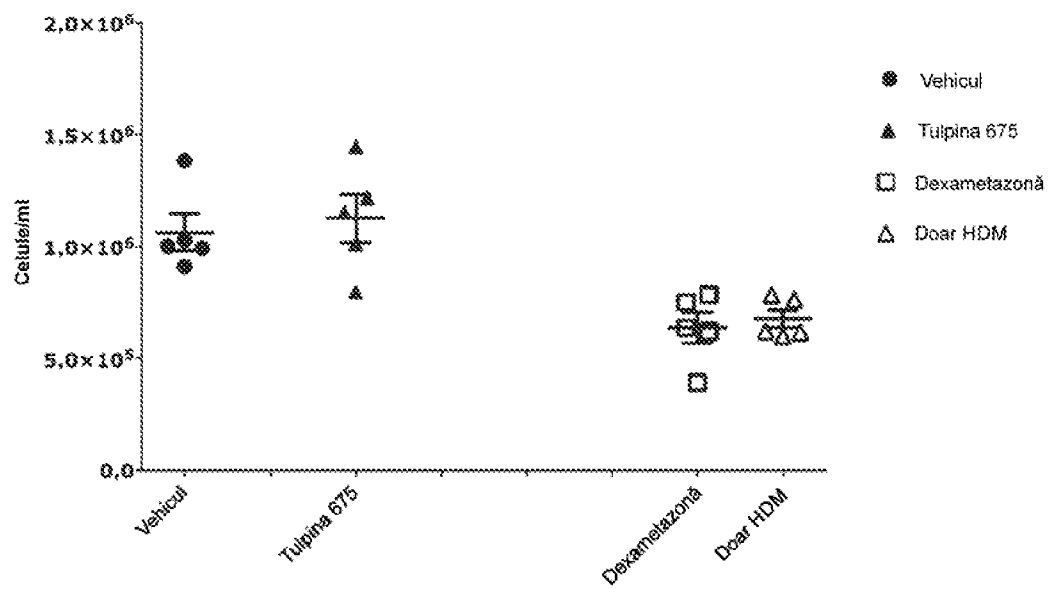
12. Un produs alimentar sau o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția conform oricărei revendicări precedente, pentru utilizarea conform oricărei revendicări precedente.

13. O cultură de celulă sau biologic pură a tulpinii depuse sub numărul de acces NCIMB 42408.

14. Compoziția cuprinzând celula conform revendicării 13, cuprinzând opțional un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic.

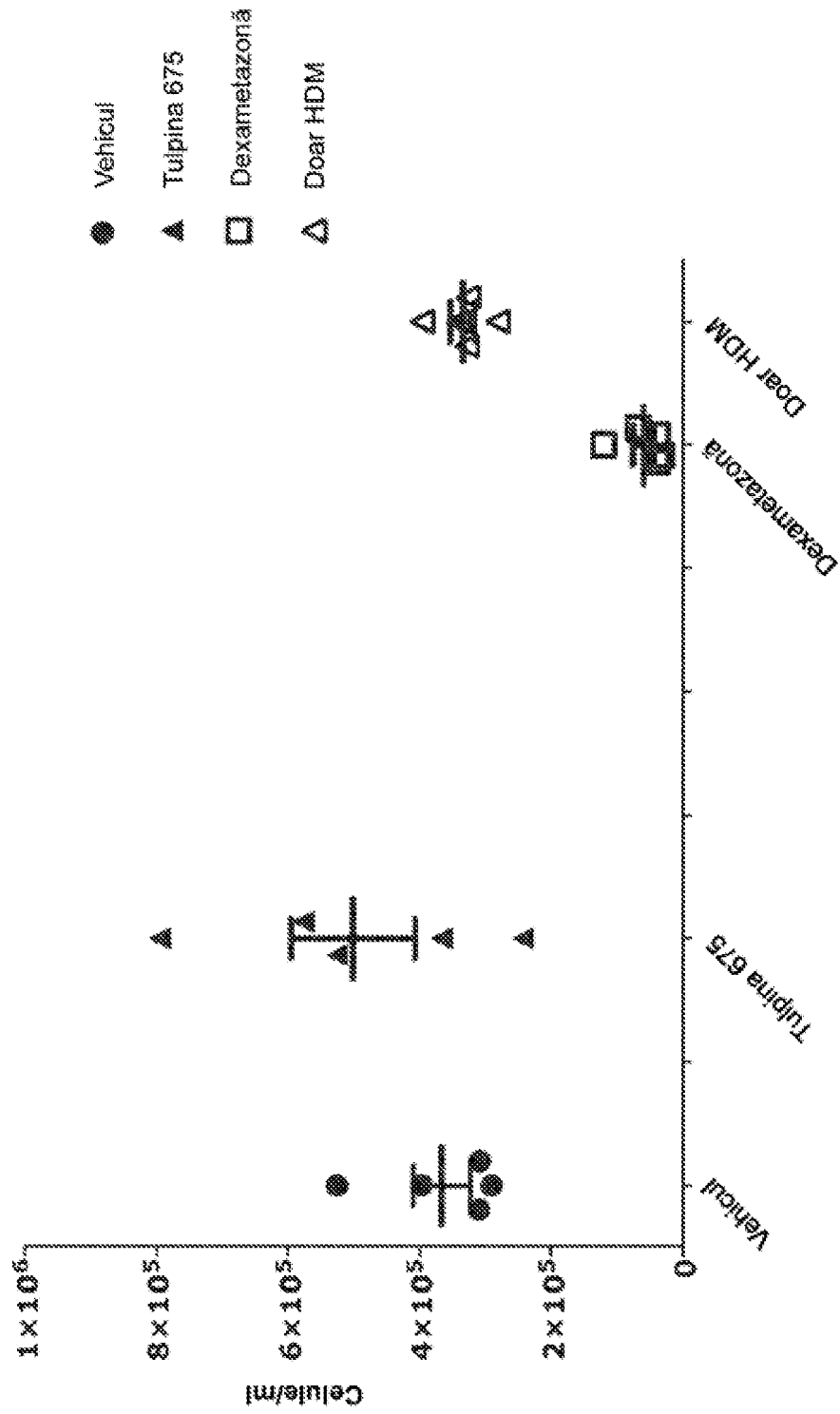
15. O celulă din tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42408 pentru utilizare în terapie, opțional în care celula este destinată utilizării într-o metodă definită în oricare dintre revendicările 1–8.

FIG. 1  
Număr total de celule

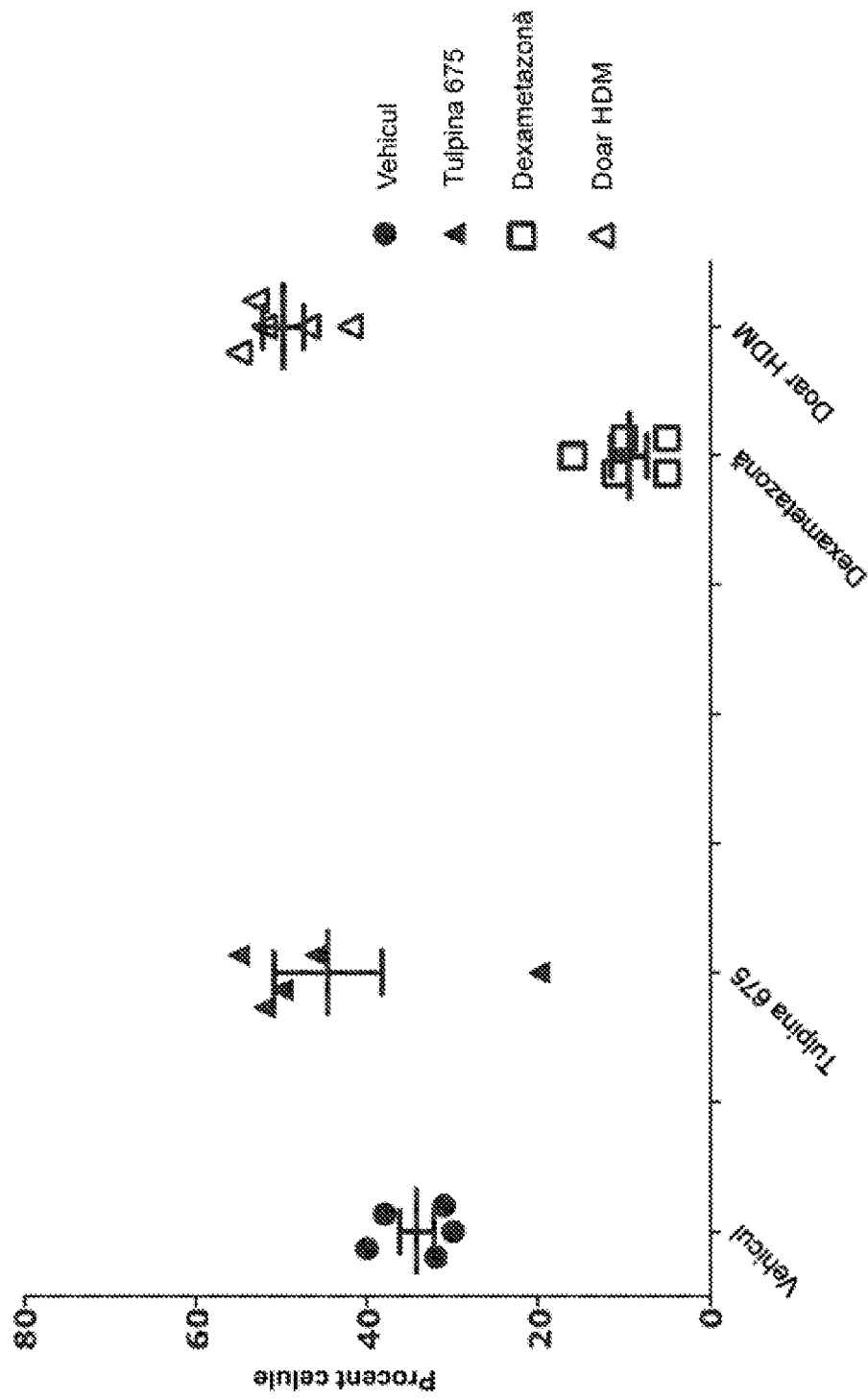




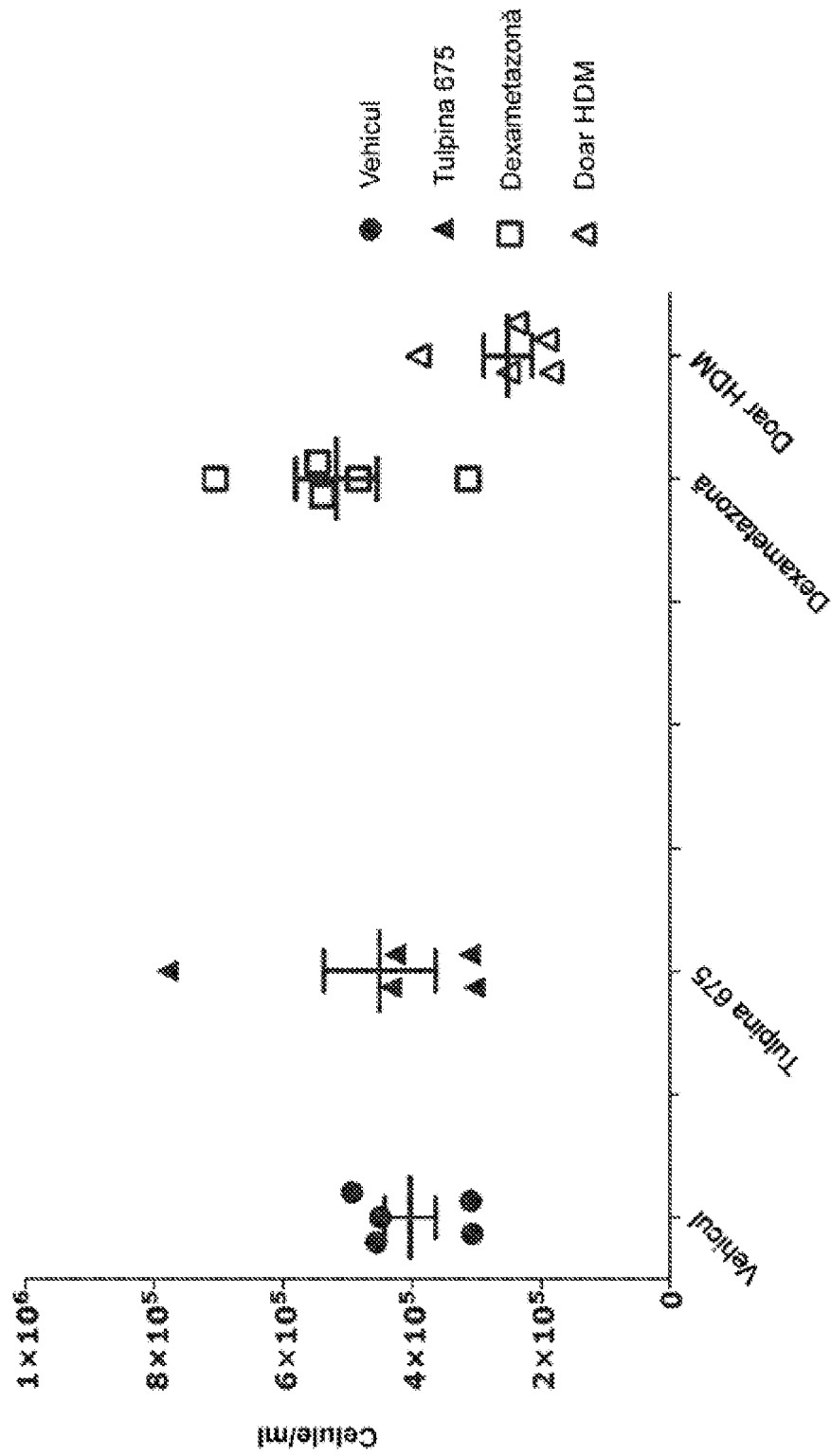
**FIG. 2**  
Total eozinofile



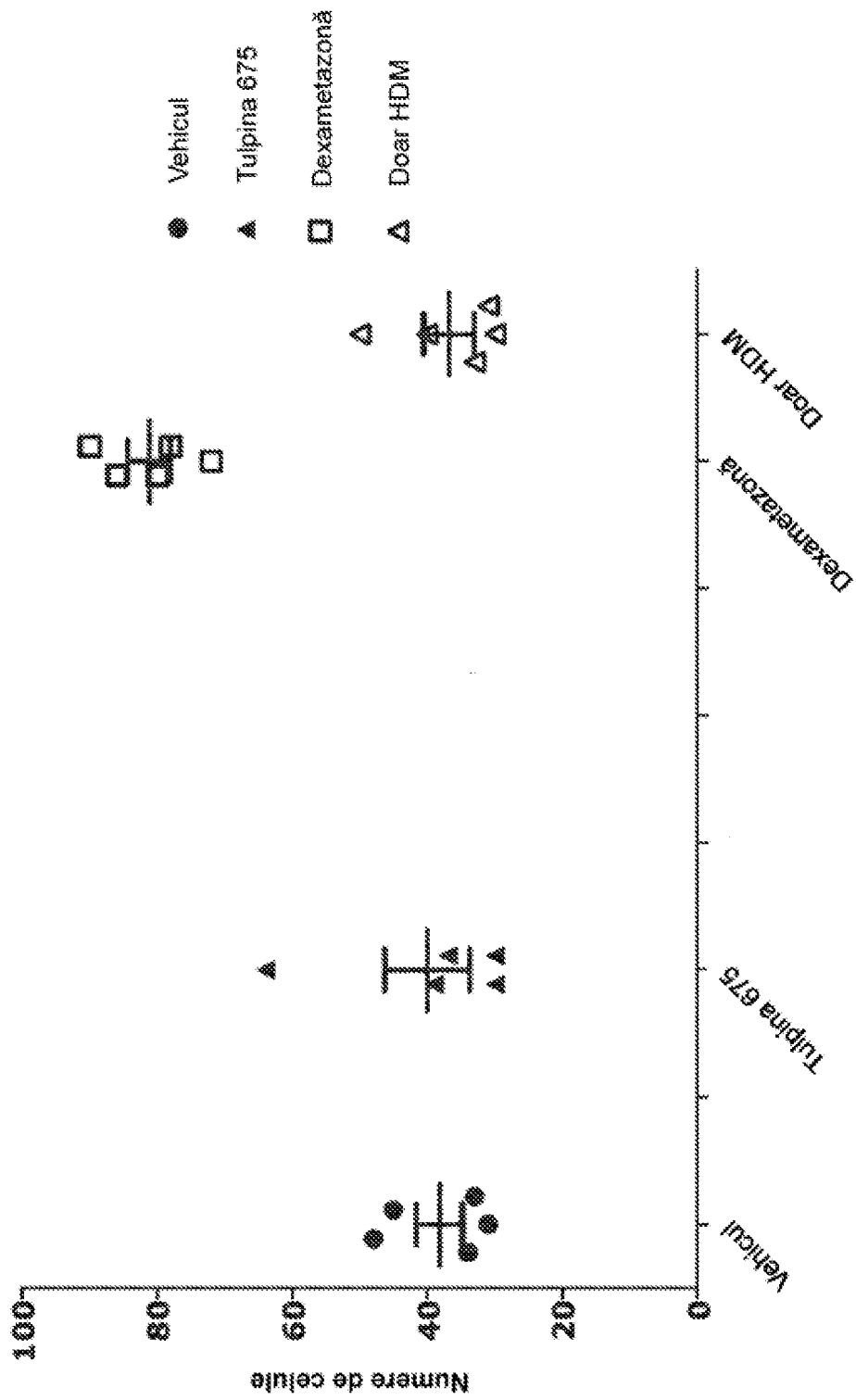
**FIG. 3**  
Percent eozonefile



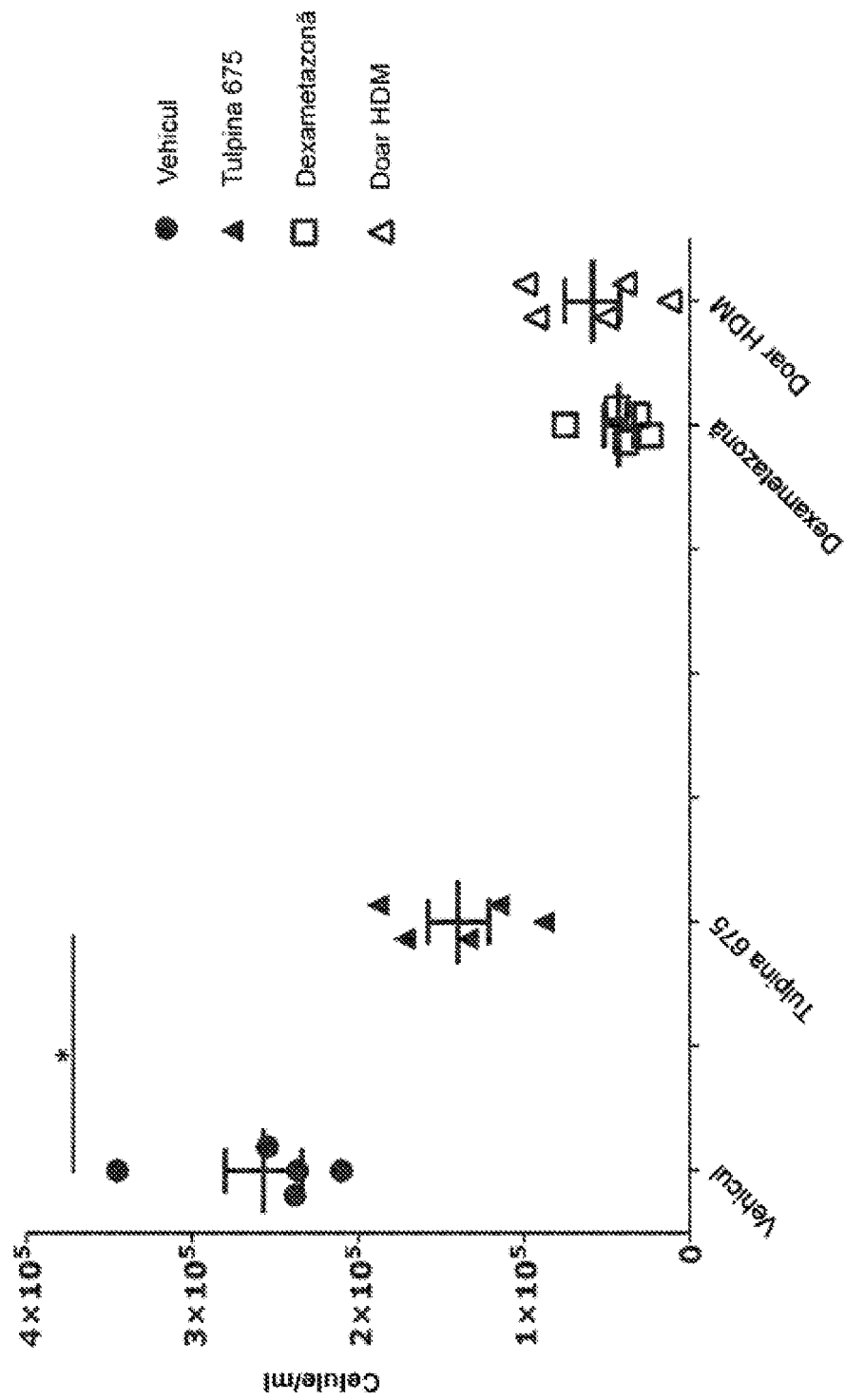
**FIG. 4**  
**Total macrofage**



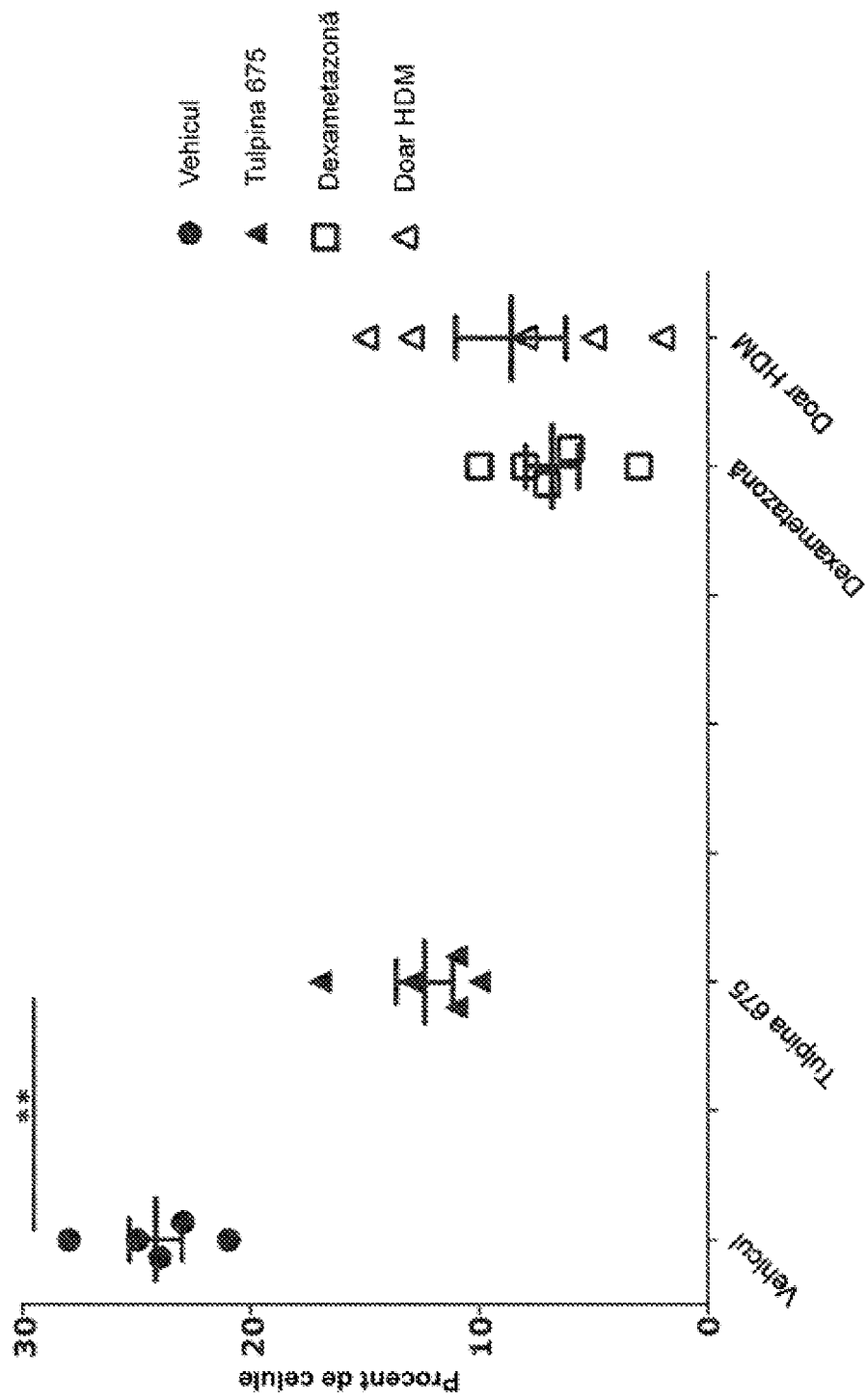
**FIG. 5**  
Procente de macrofage



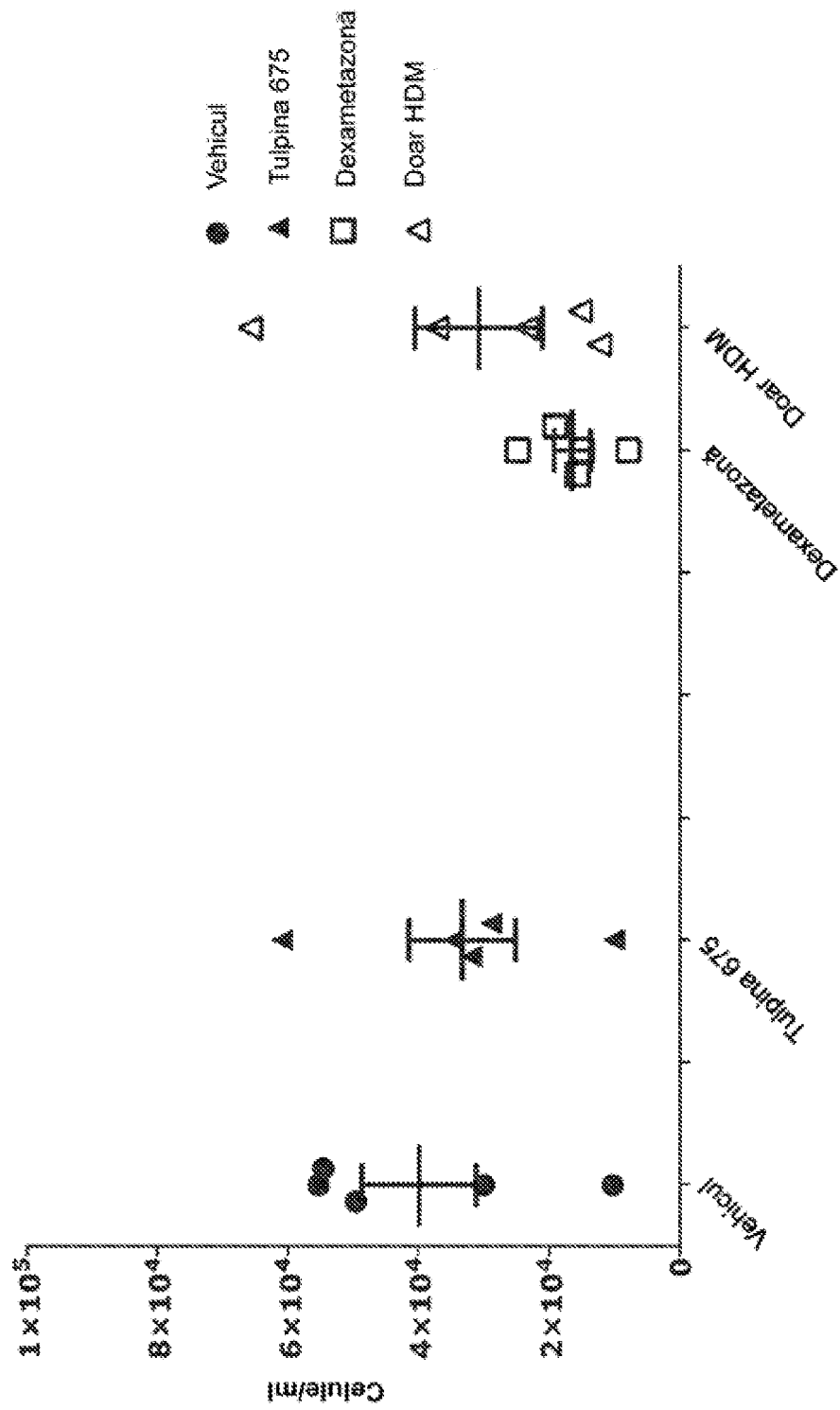
**FIG. 6**  
**Total neutrofile**



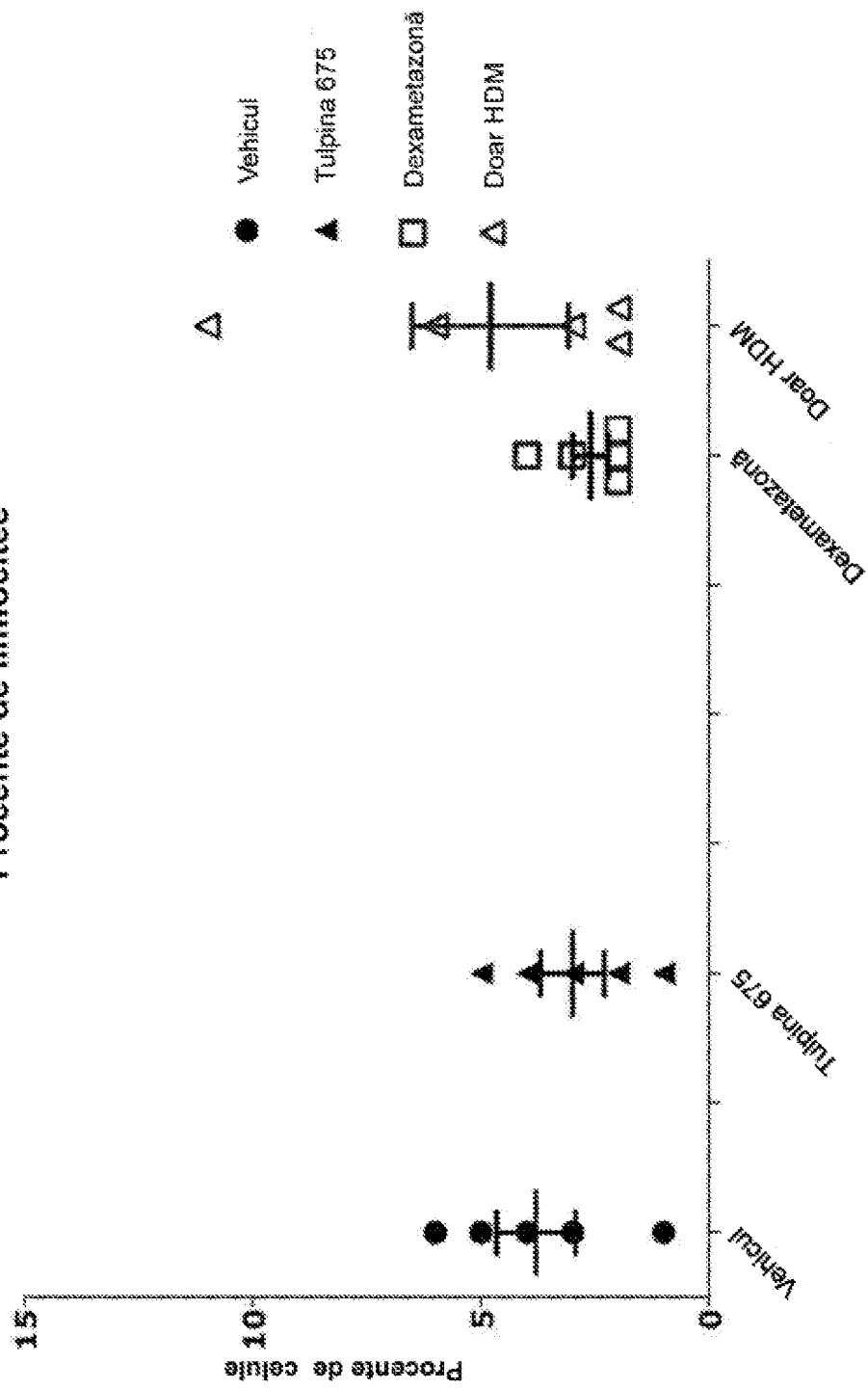
**FIG. 7**  
Procente de neutrofile



**FIG. 8**  
Total limfocite

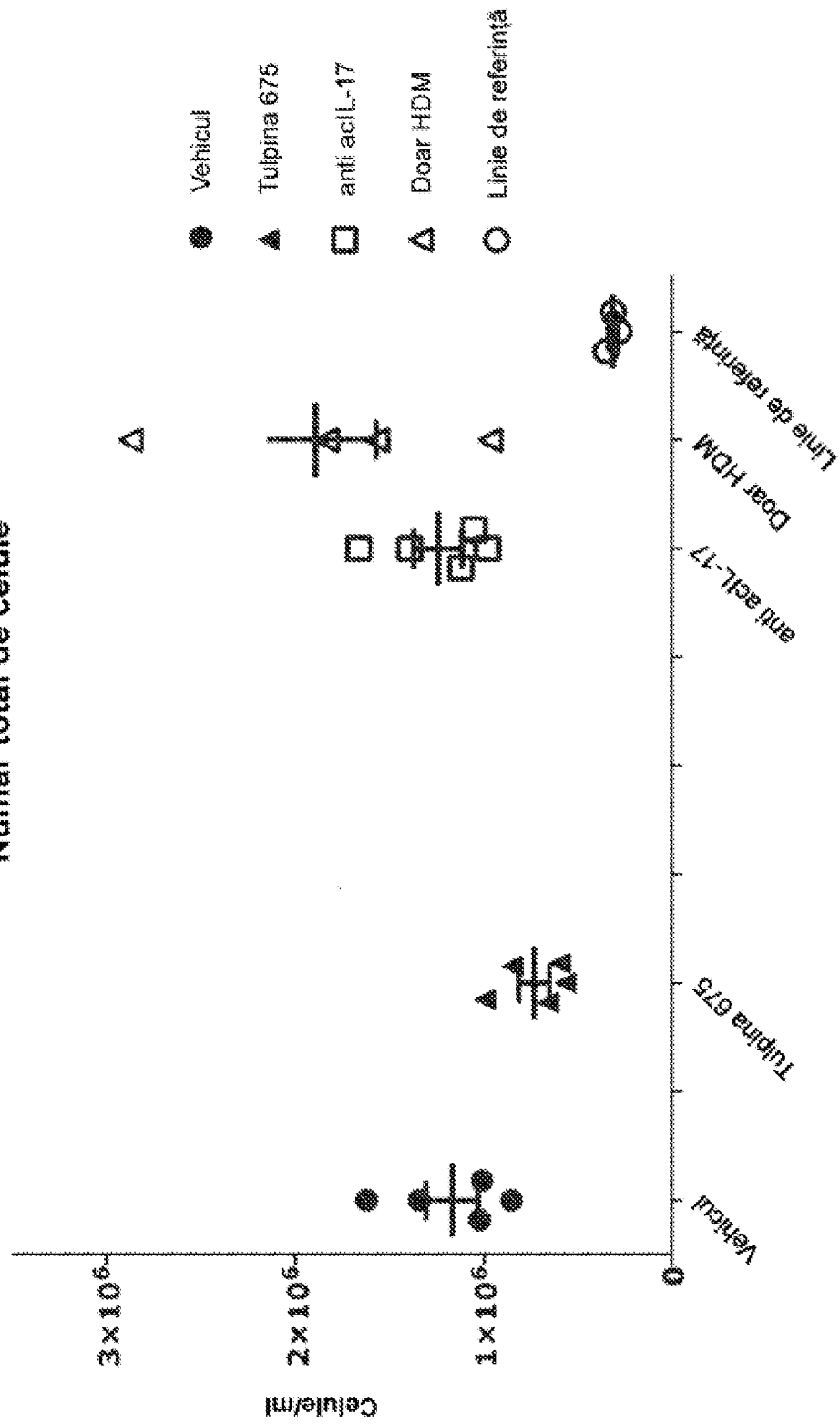


**FIG. 9**  
Procente de limfocitee

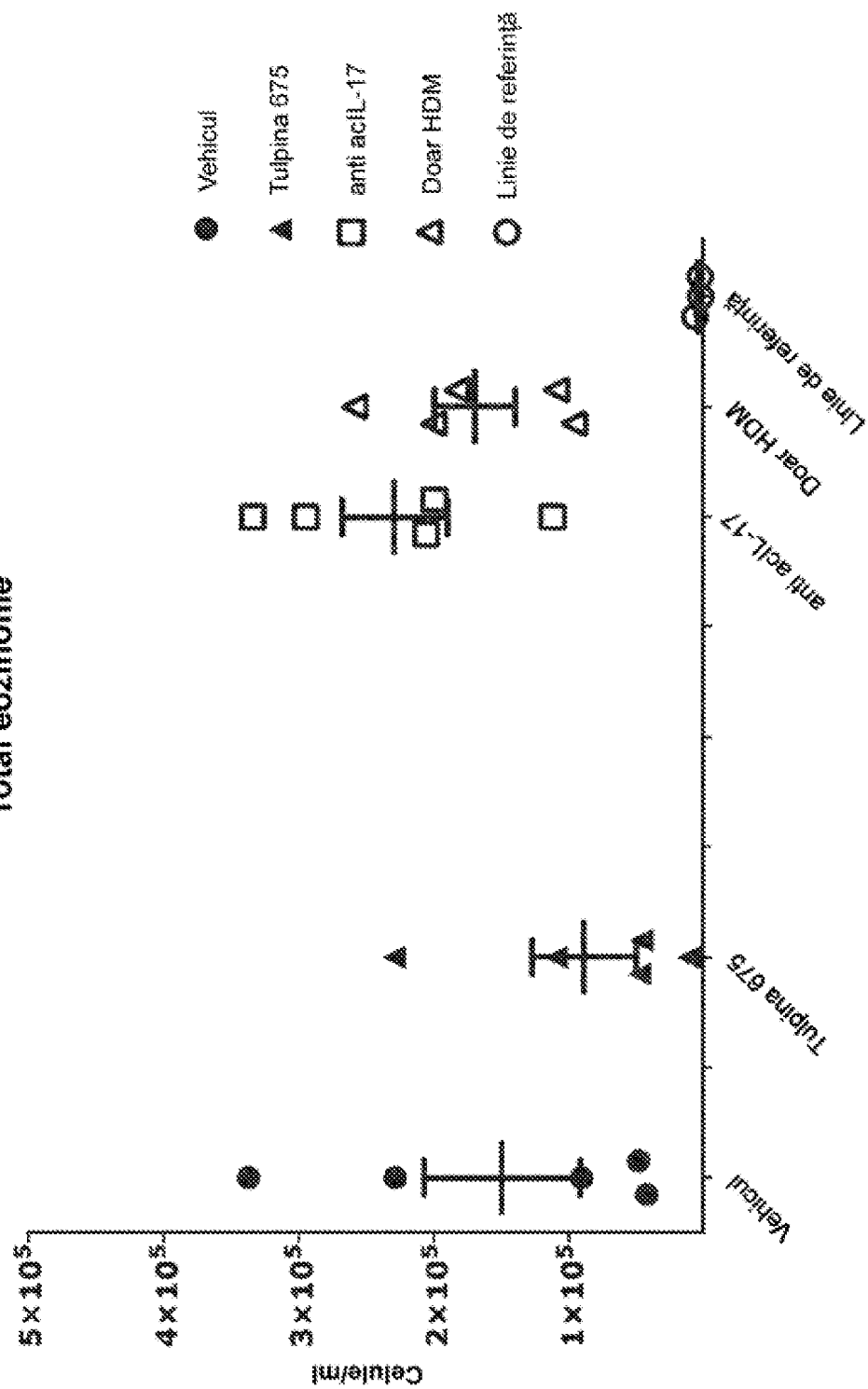




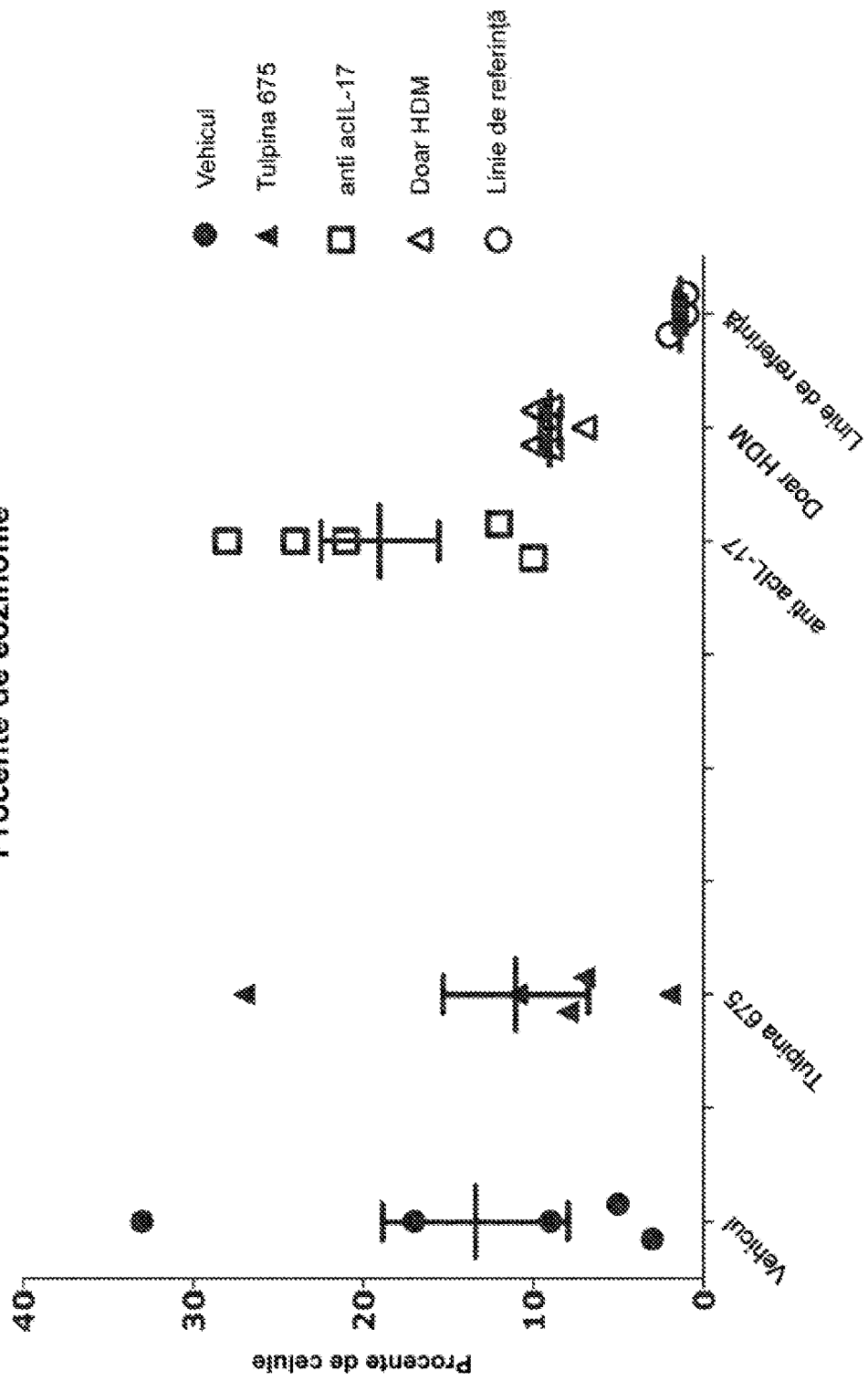
**FIG. 10**  
Număr total de celule



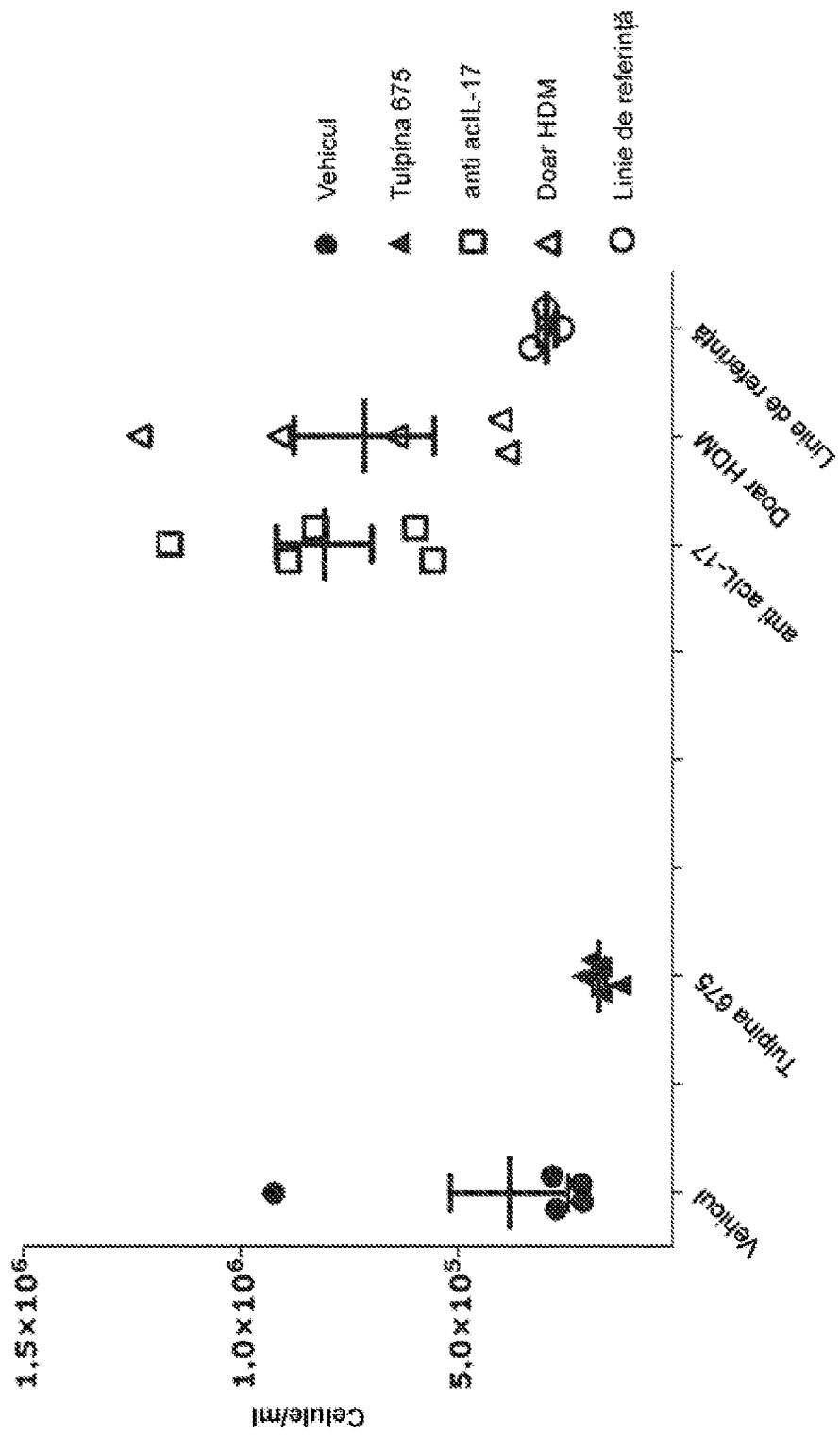
**FIG. 11**  
**Total eozinofile**



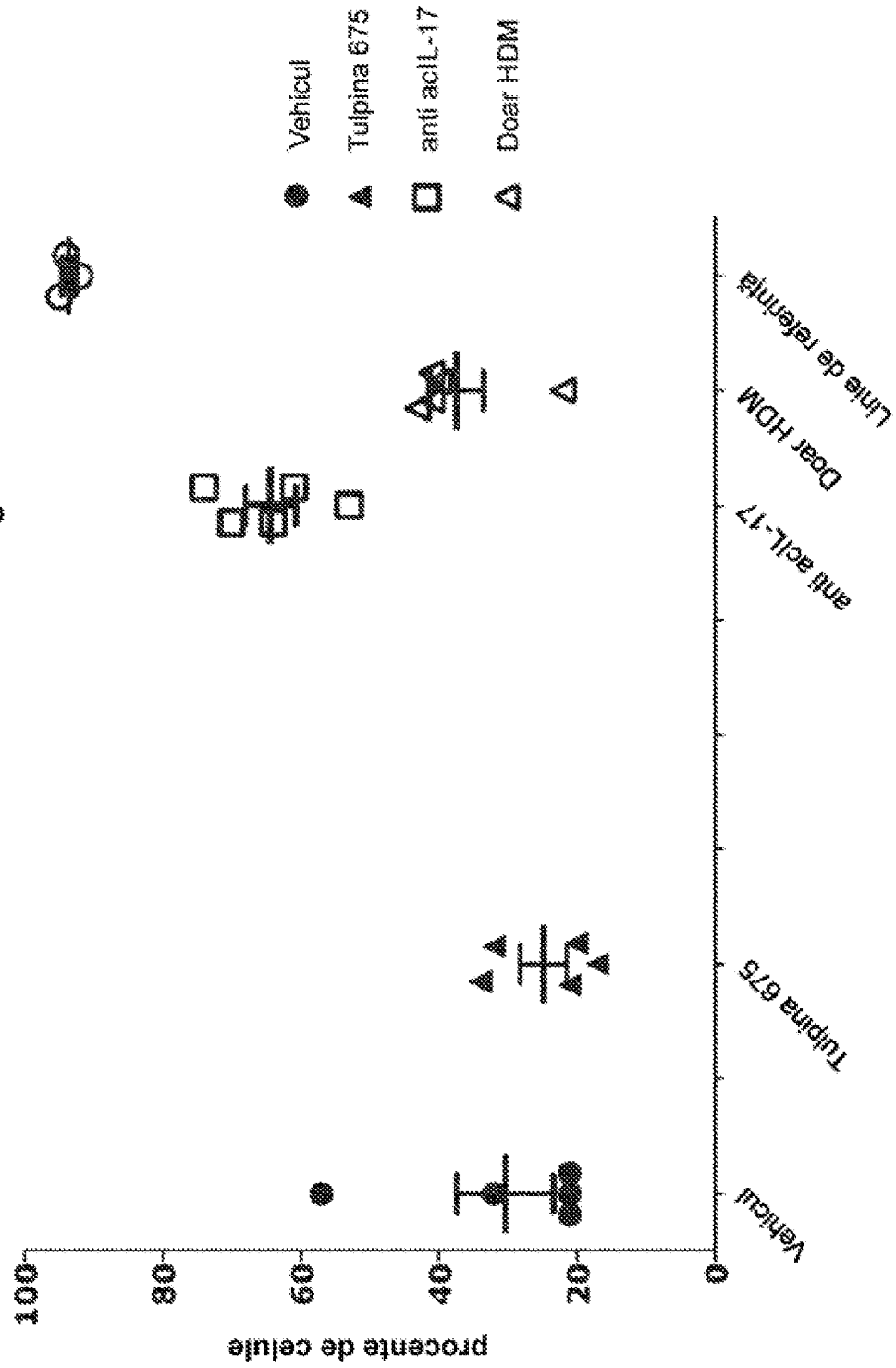
**FIG. 12**  
Procente de eozinofile



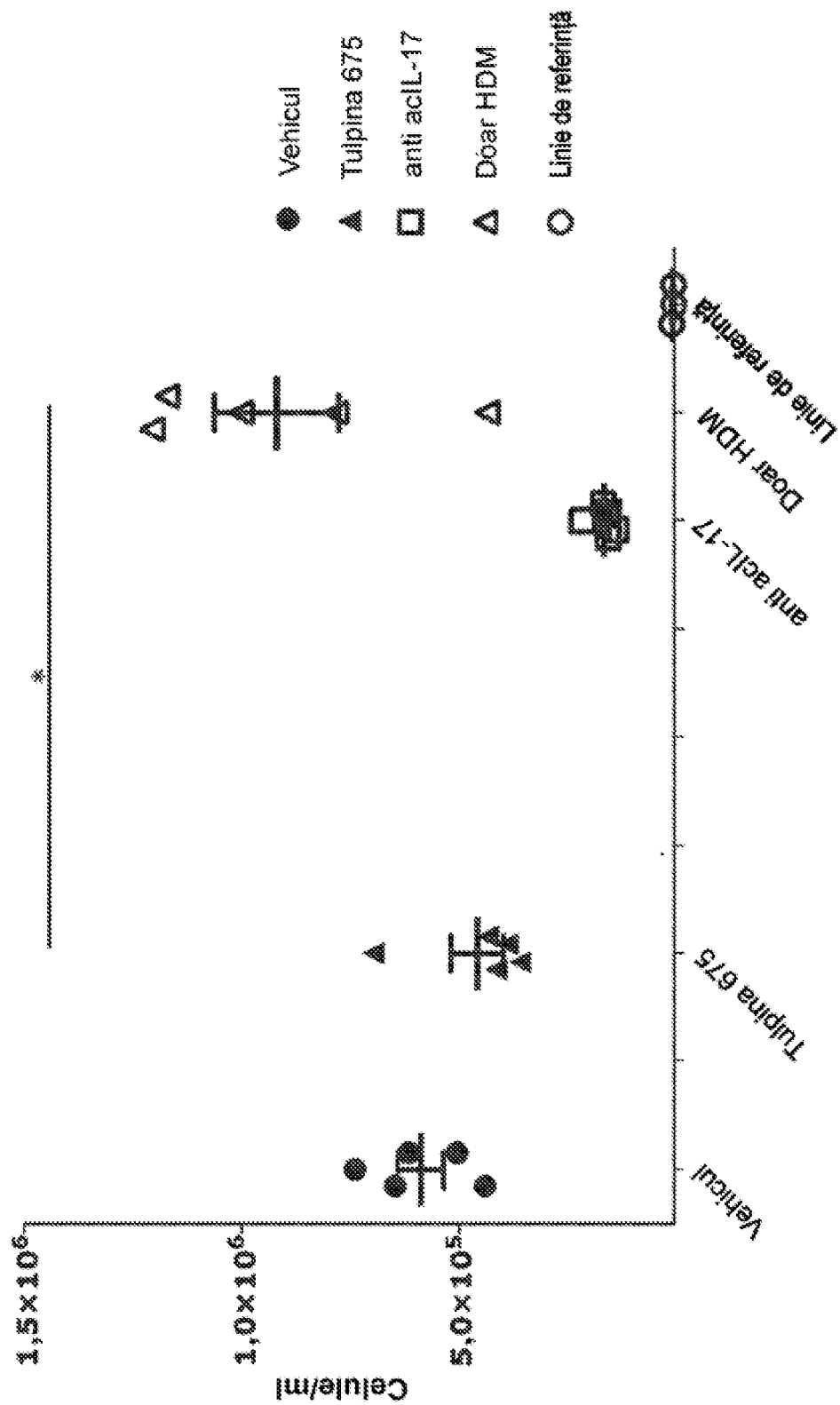
**FIG. 13**  
Total macrofage



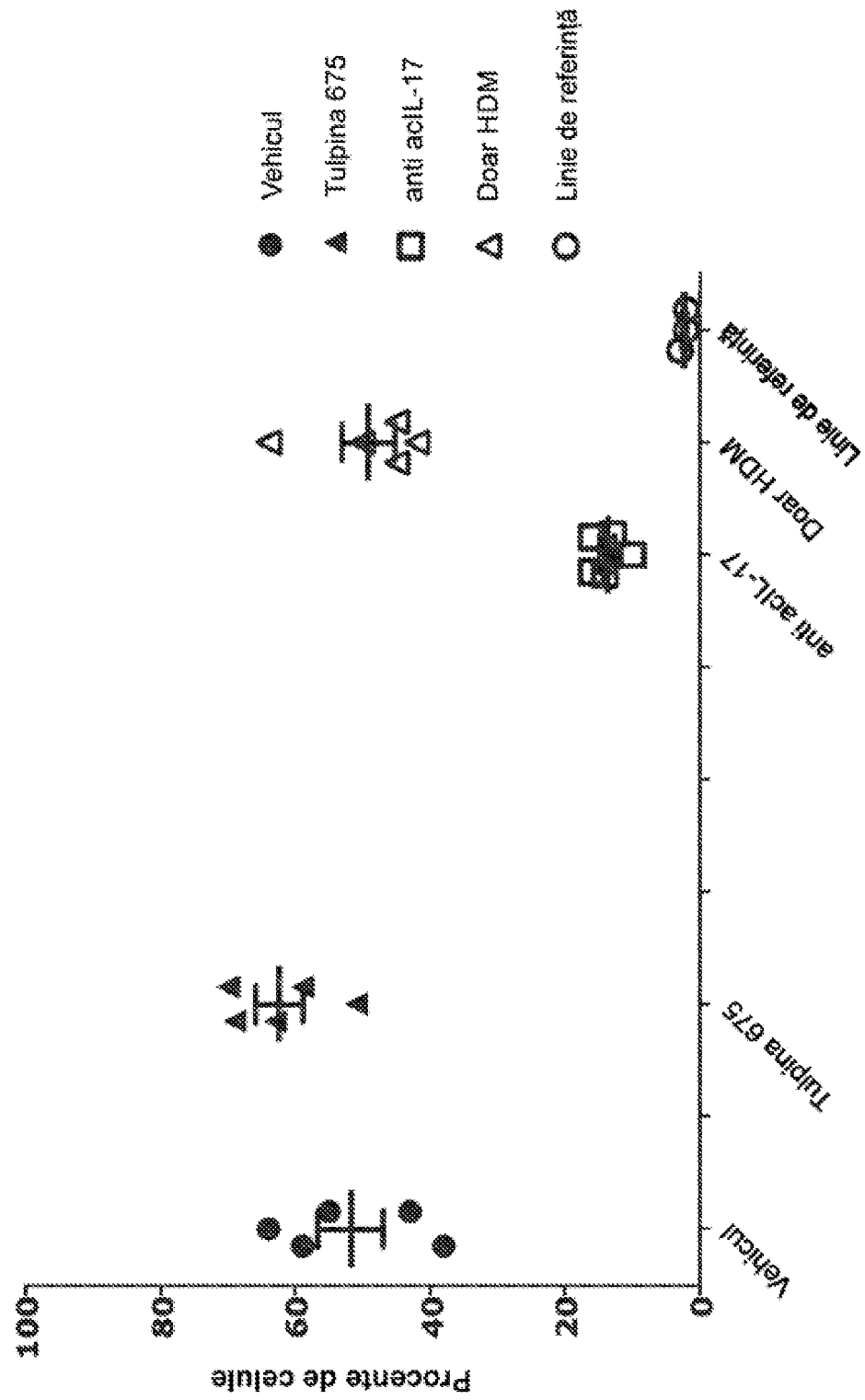
**FIG. 14**  
Procente de macrofage



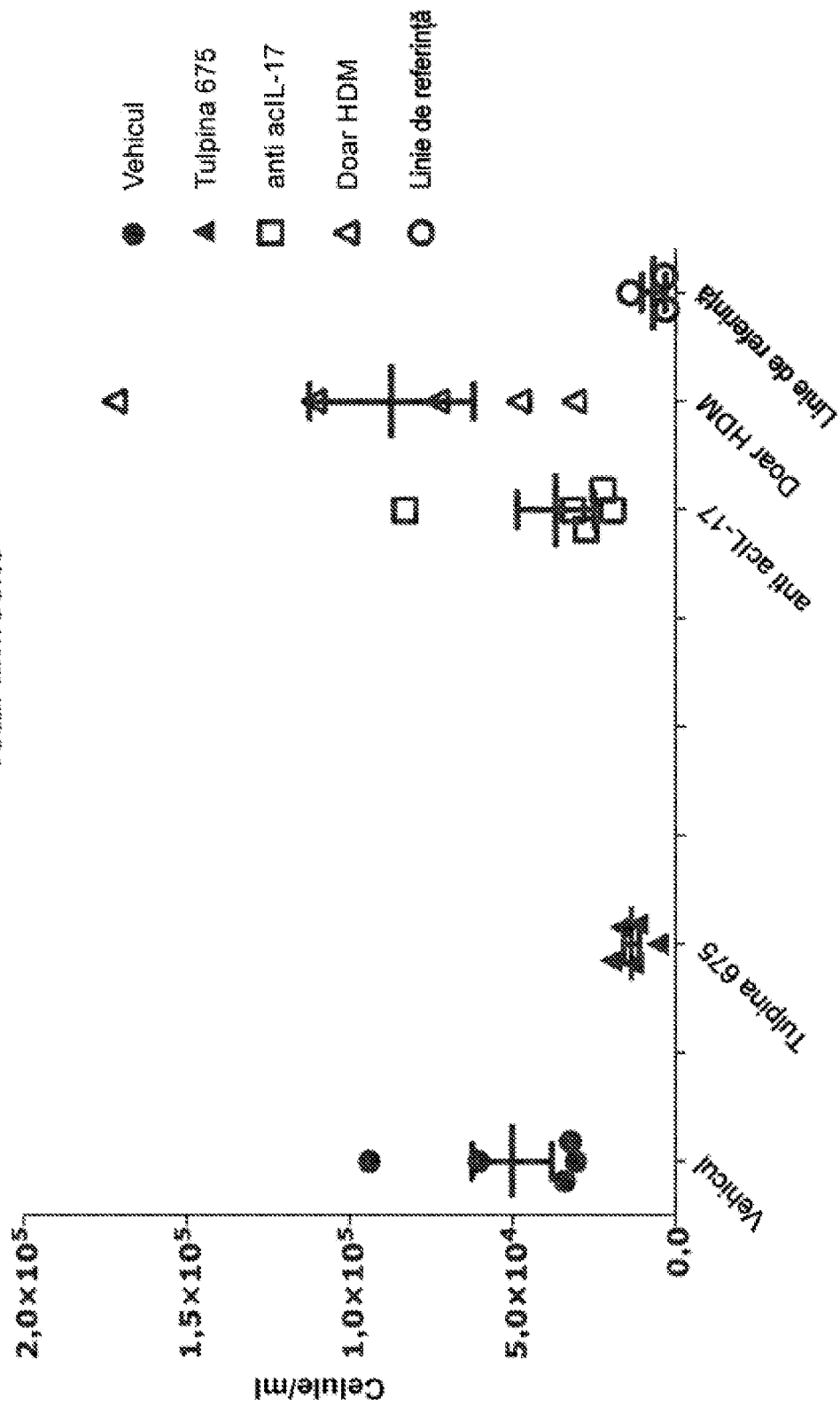
**FIG. 15**  
Total neutrofile



**FIG. 16**  
Procente de neutrofile

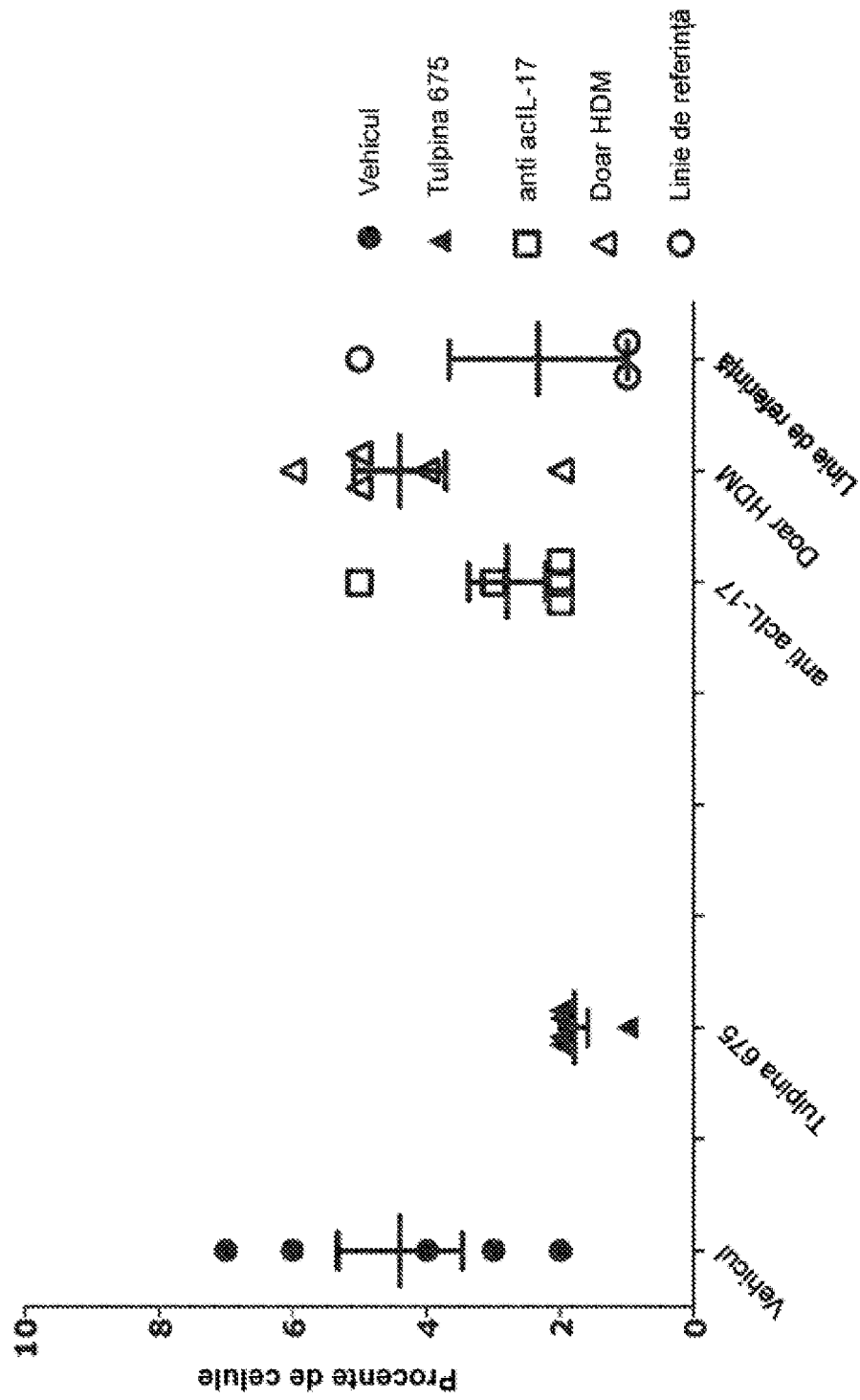


**FIG. 17**  
Total limfocite

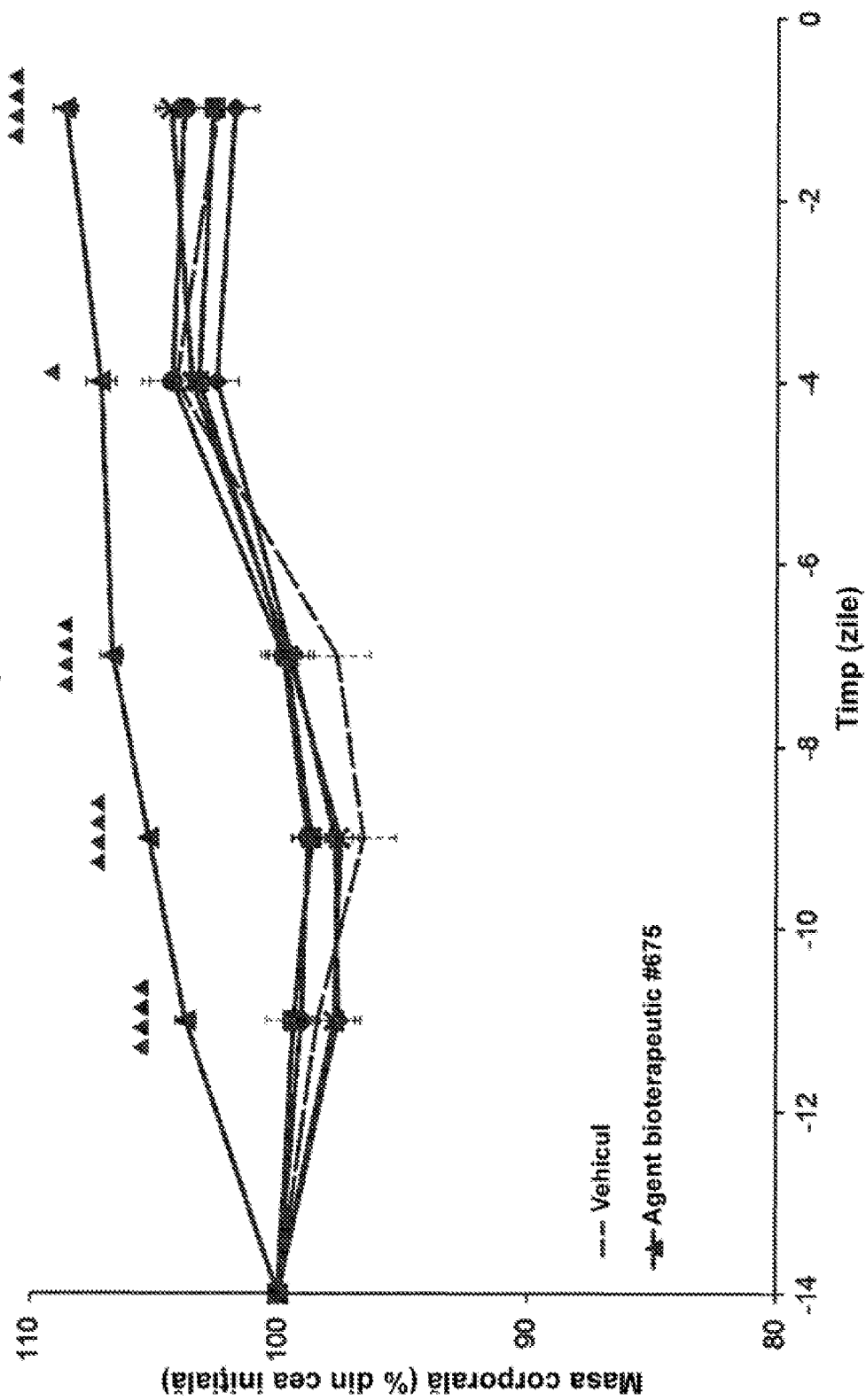




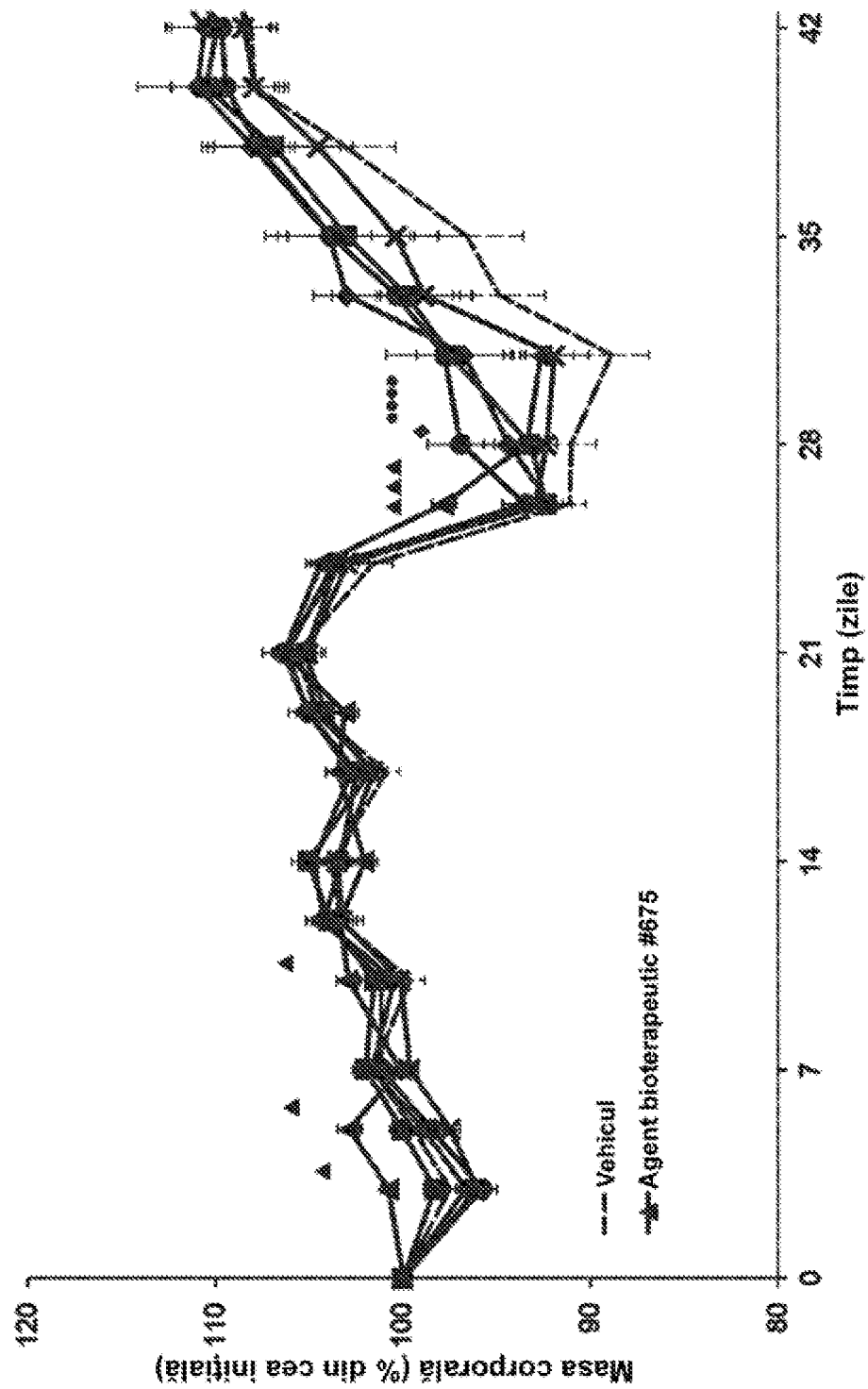
**FIG. 18**  
Procente de limfocite



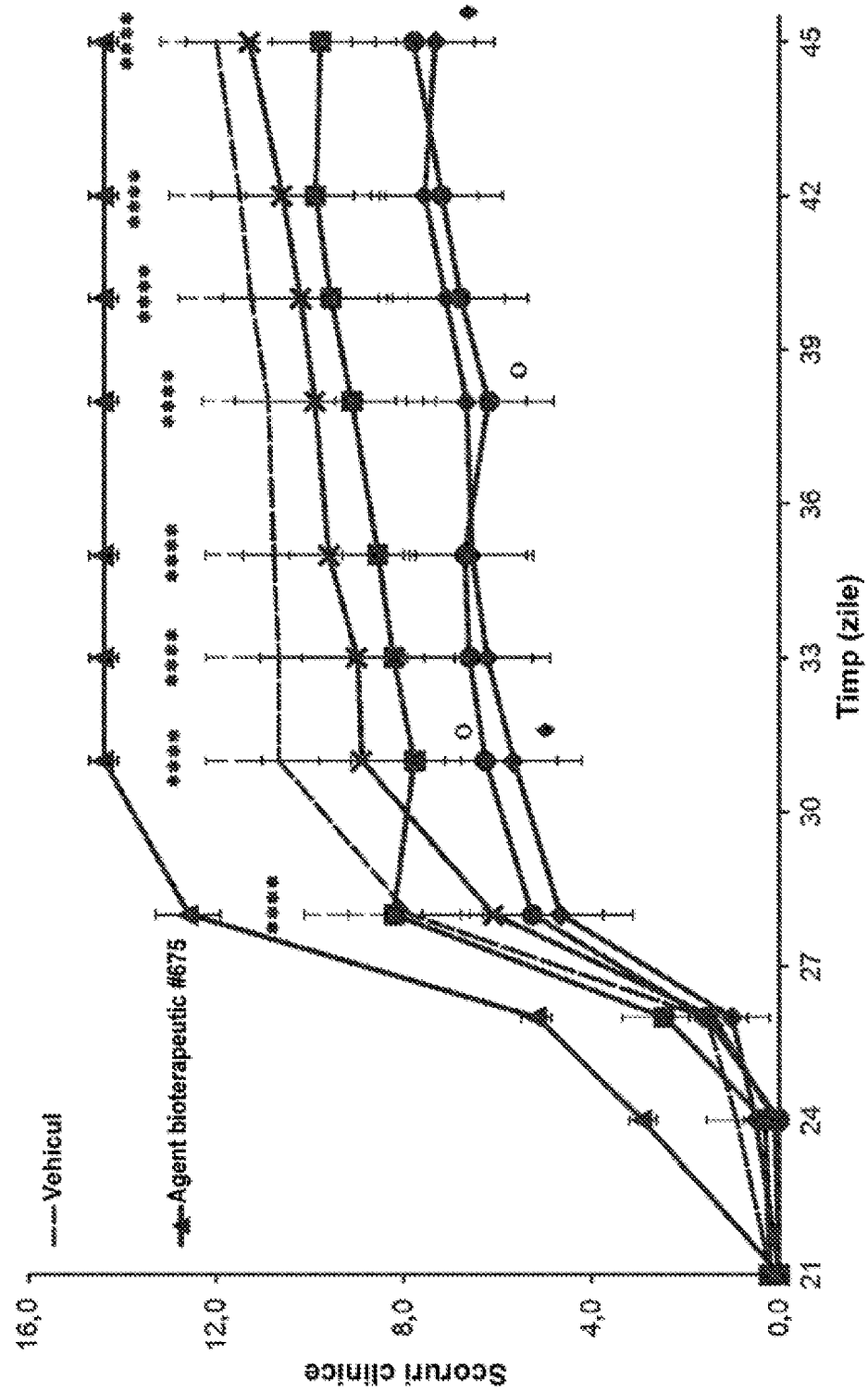
**FIG. 19**  
**Mase corporale**



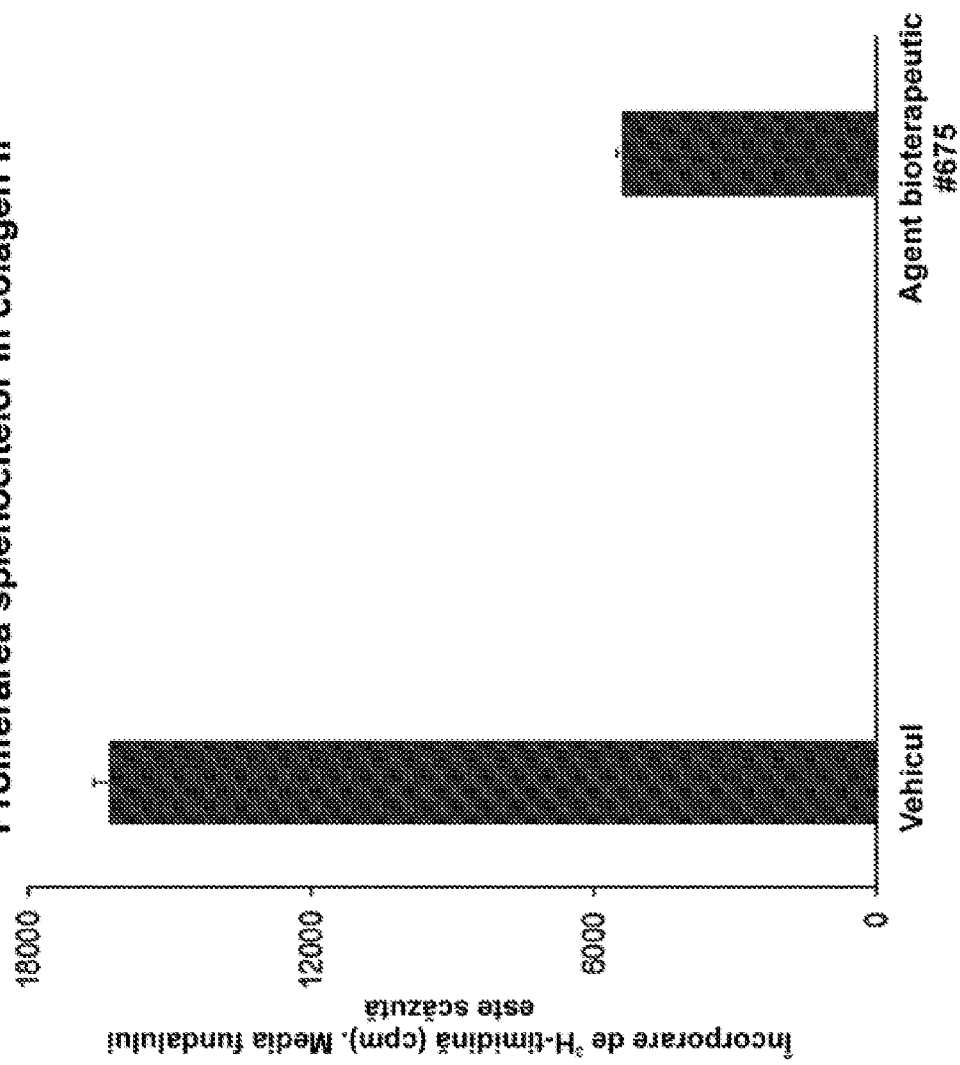
**FIG. 20**  
Mase corporale



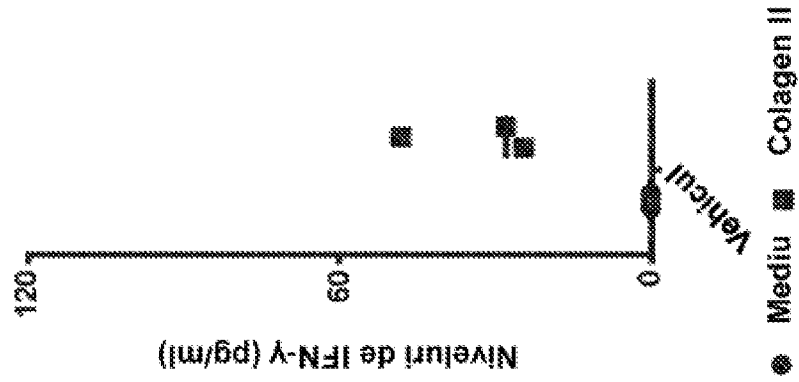
**FIG. 21**  
Scoruri clinice



**FIG. 22**  
**Proliferarea splenocitelor în colagen II**



**FIG. 23**



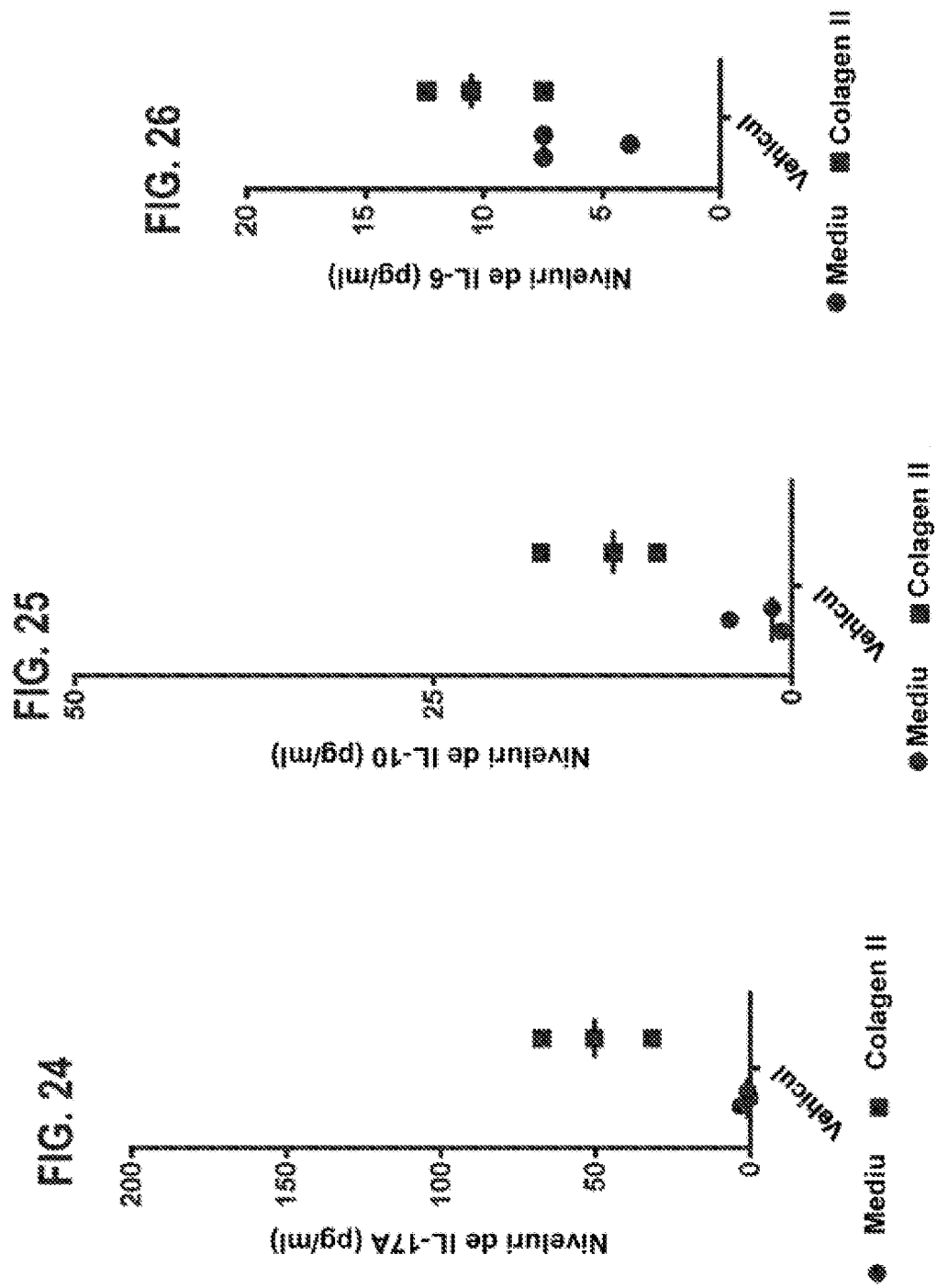
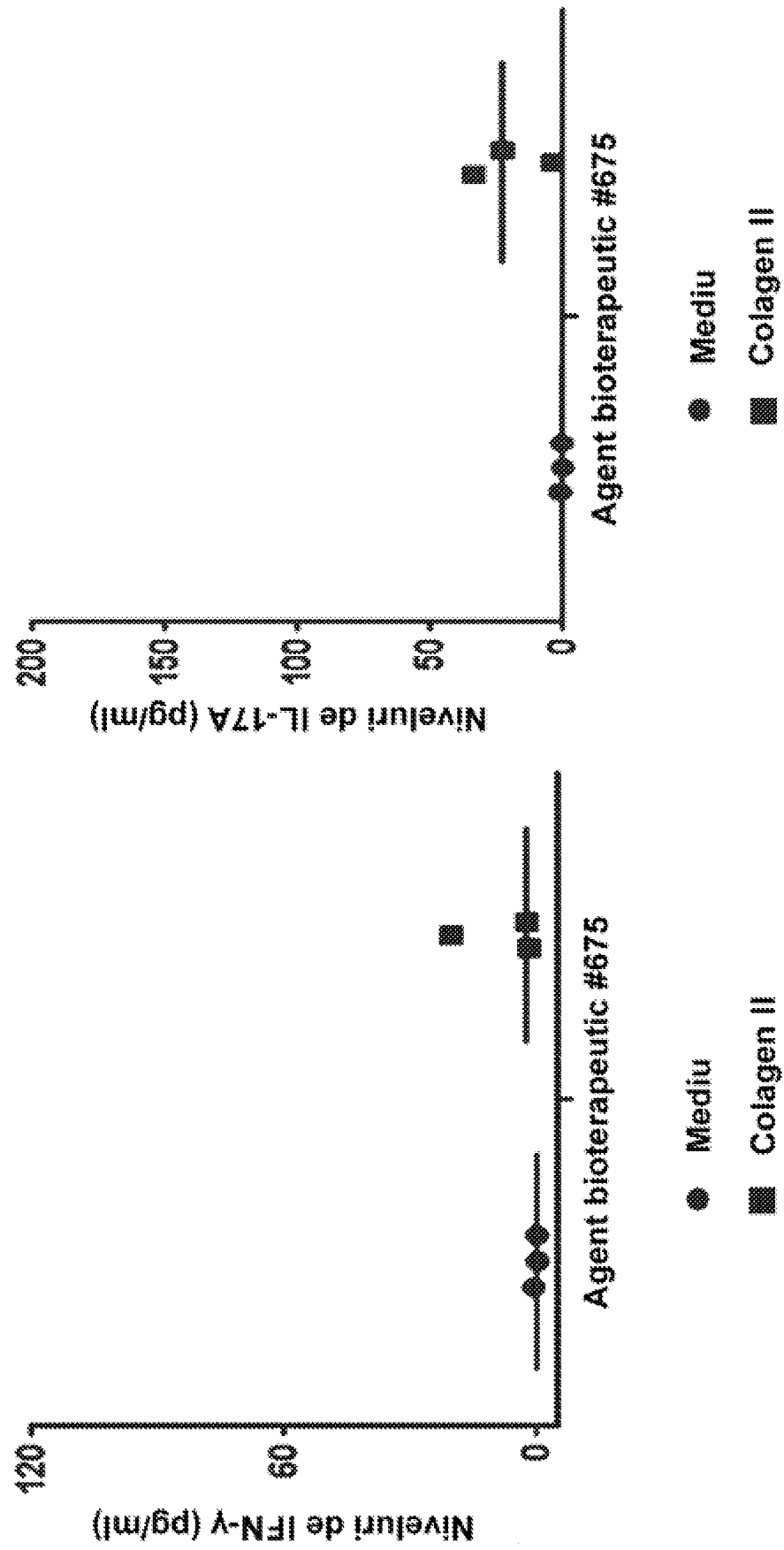


FIG. 27



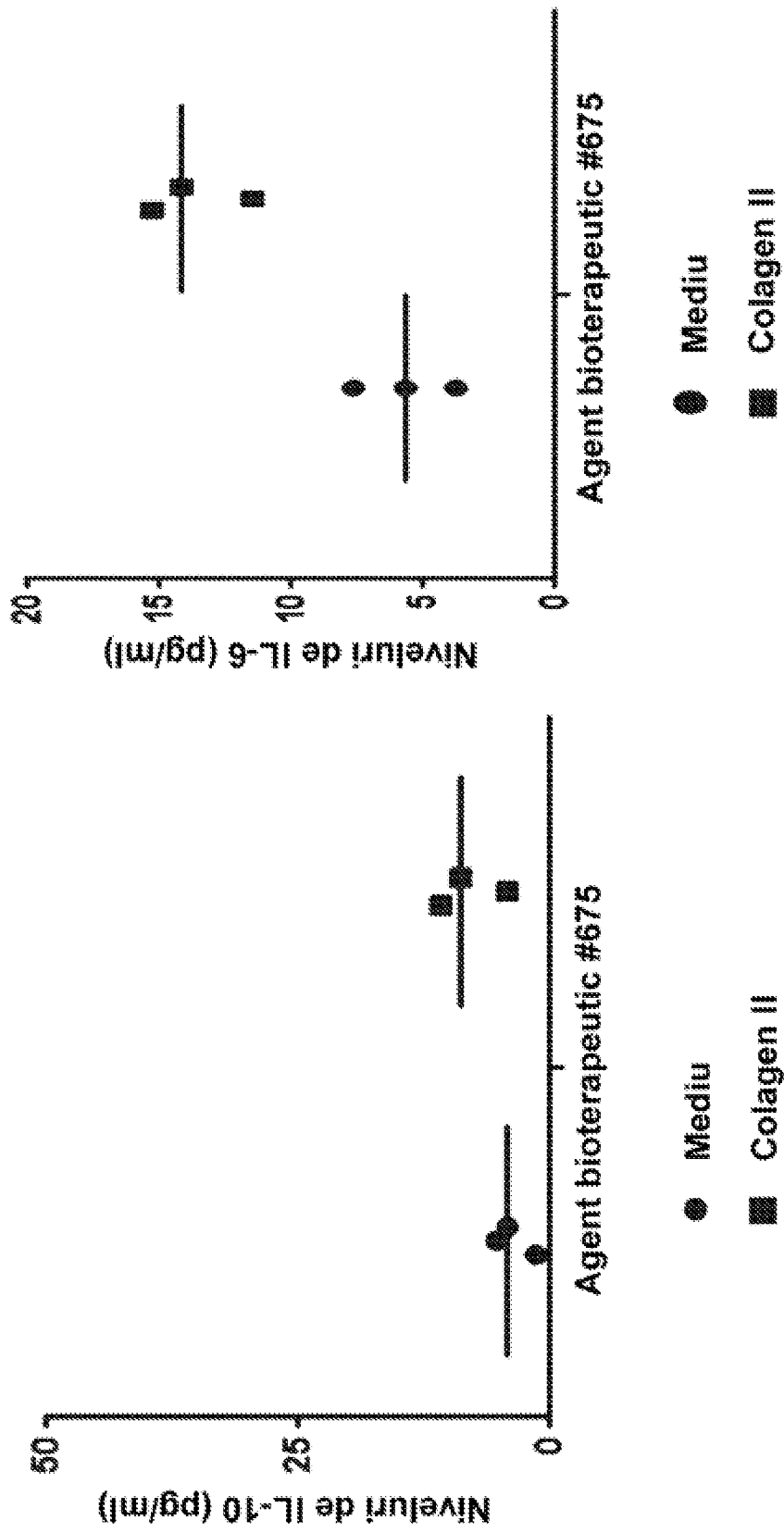


FIG. 27(cont.)



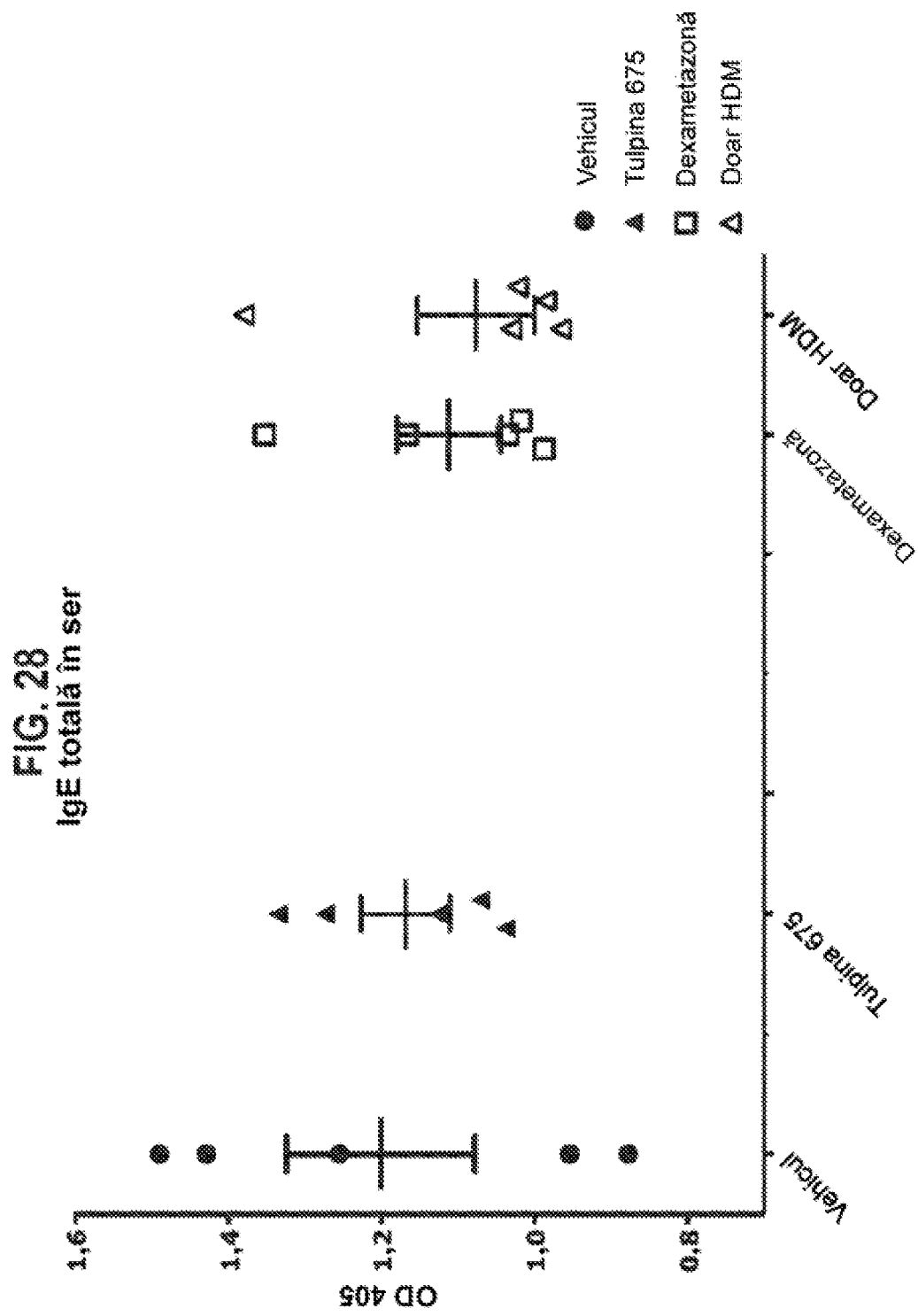
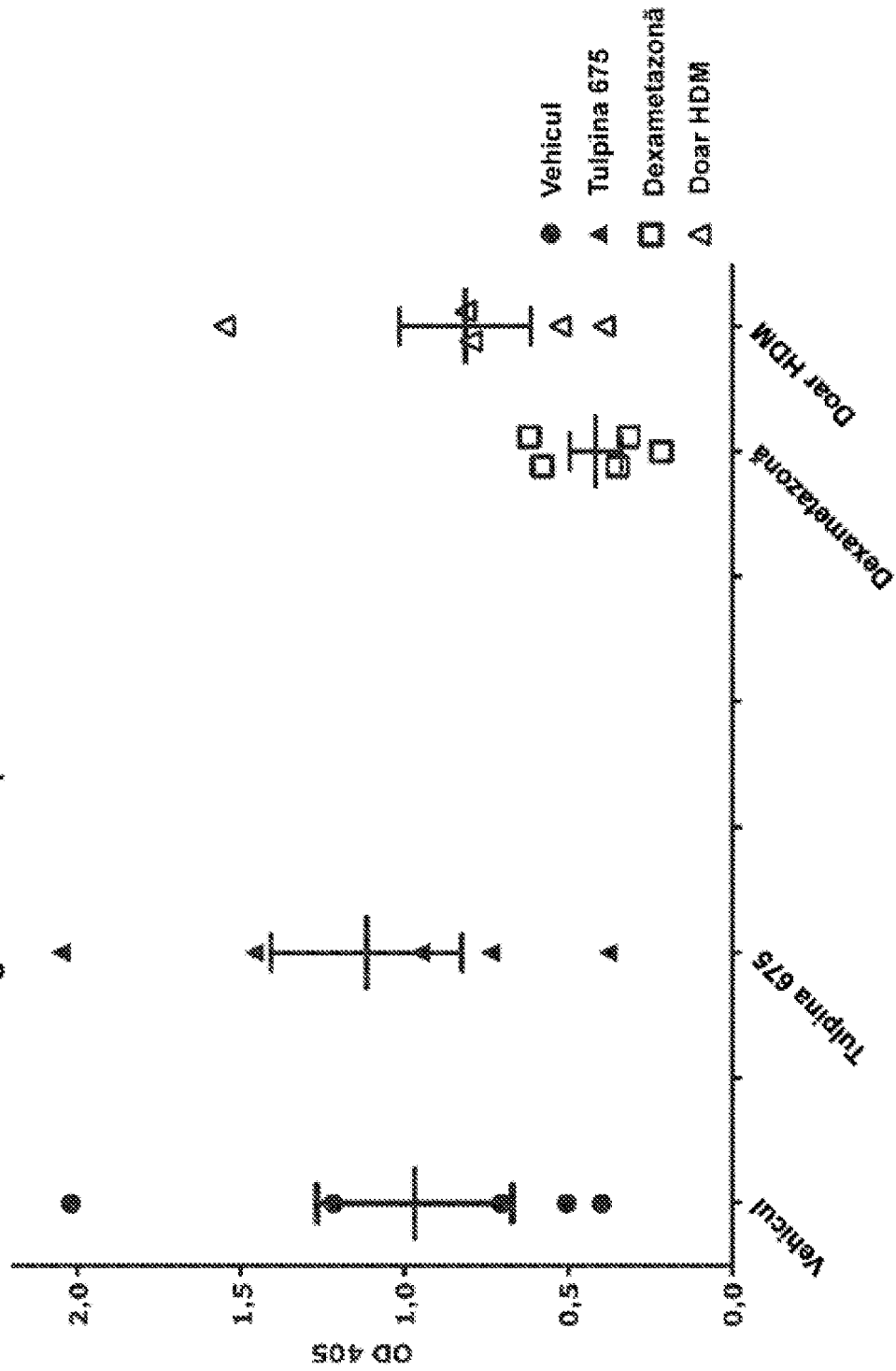
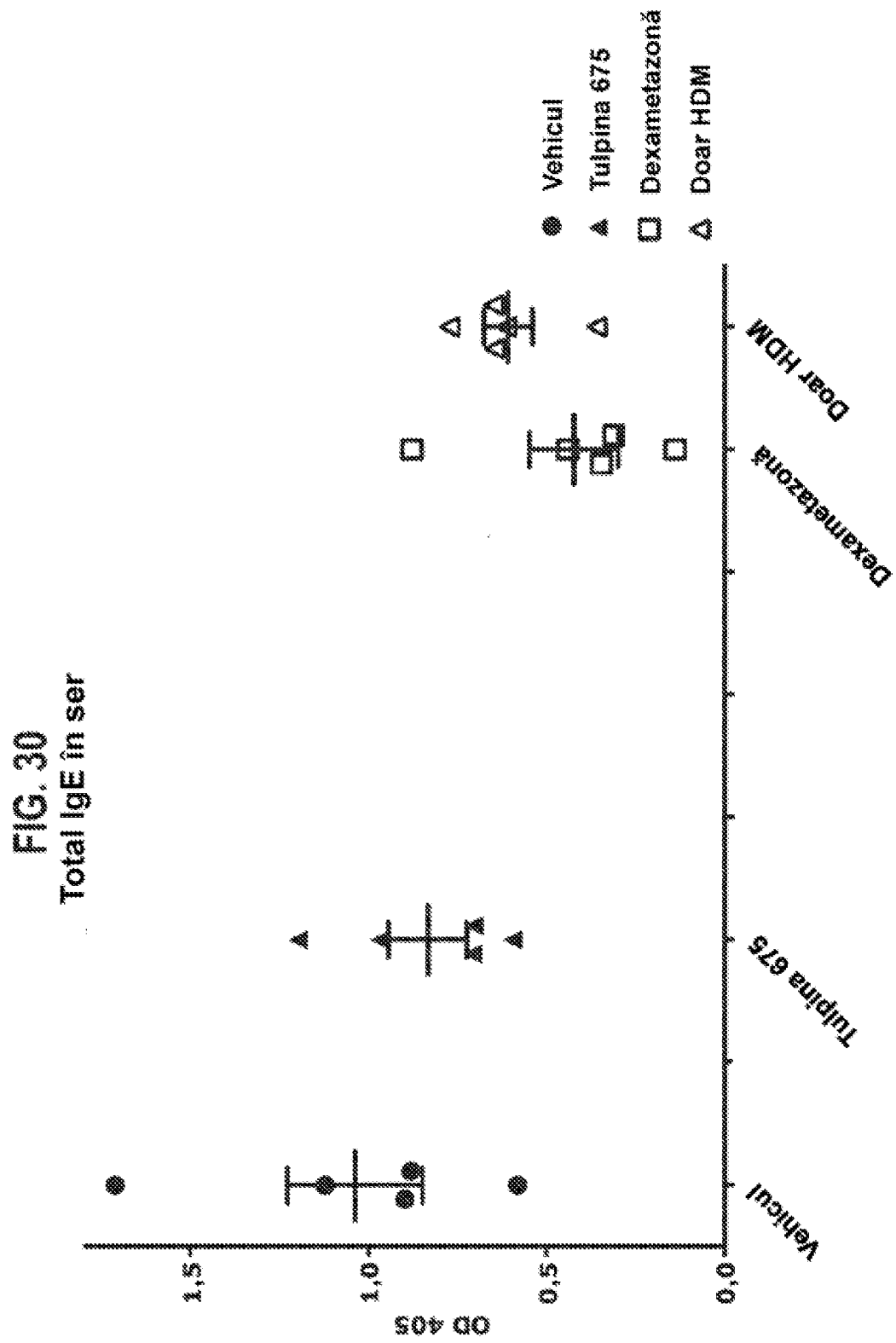


FIG. 29 IgG1 serică specifică HDM





**FIG. 31**  
IgG1 specific HDM in BALF

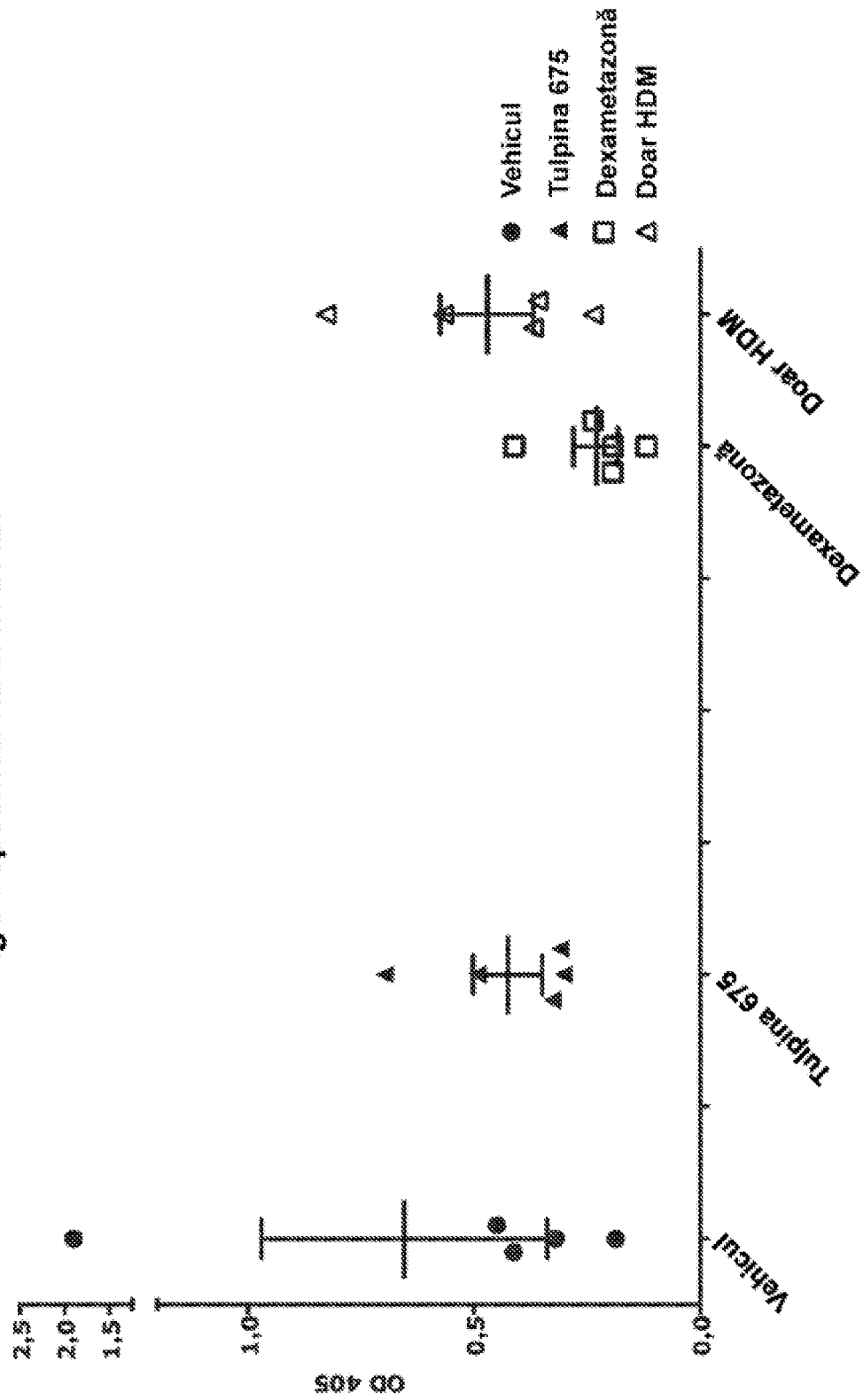


FIG. 32 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare peribronhiolară

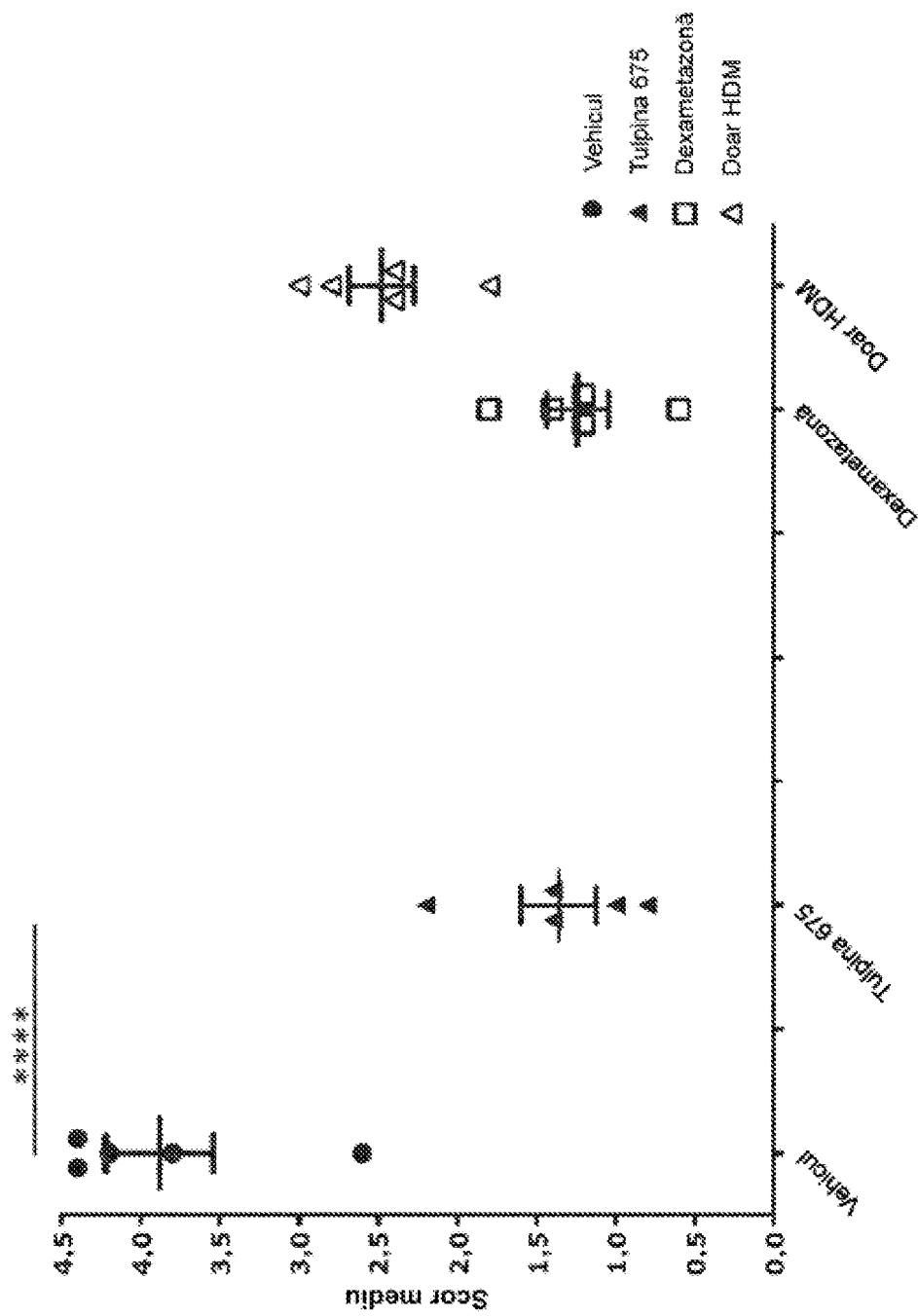
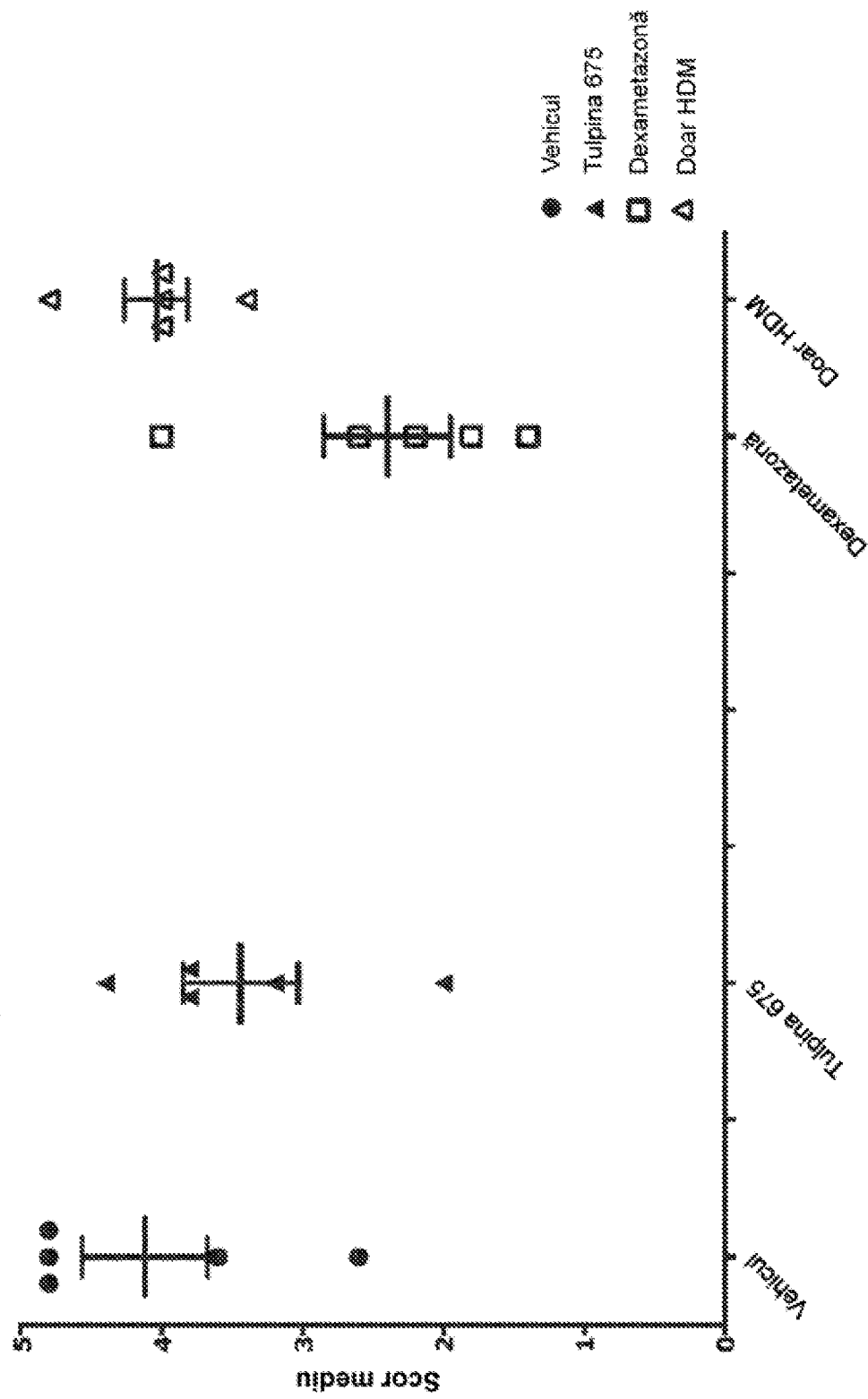
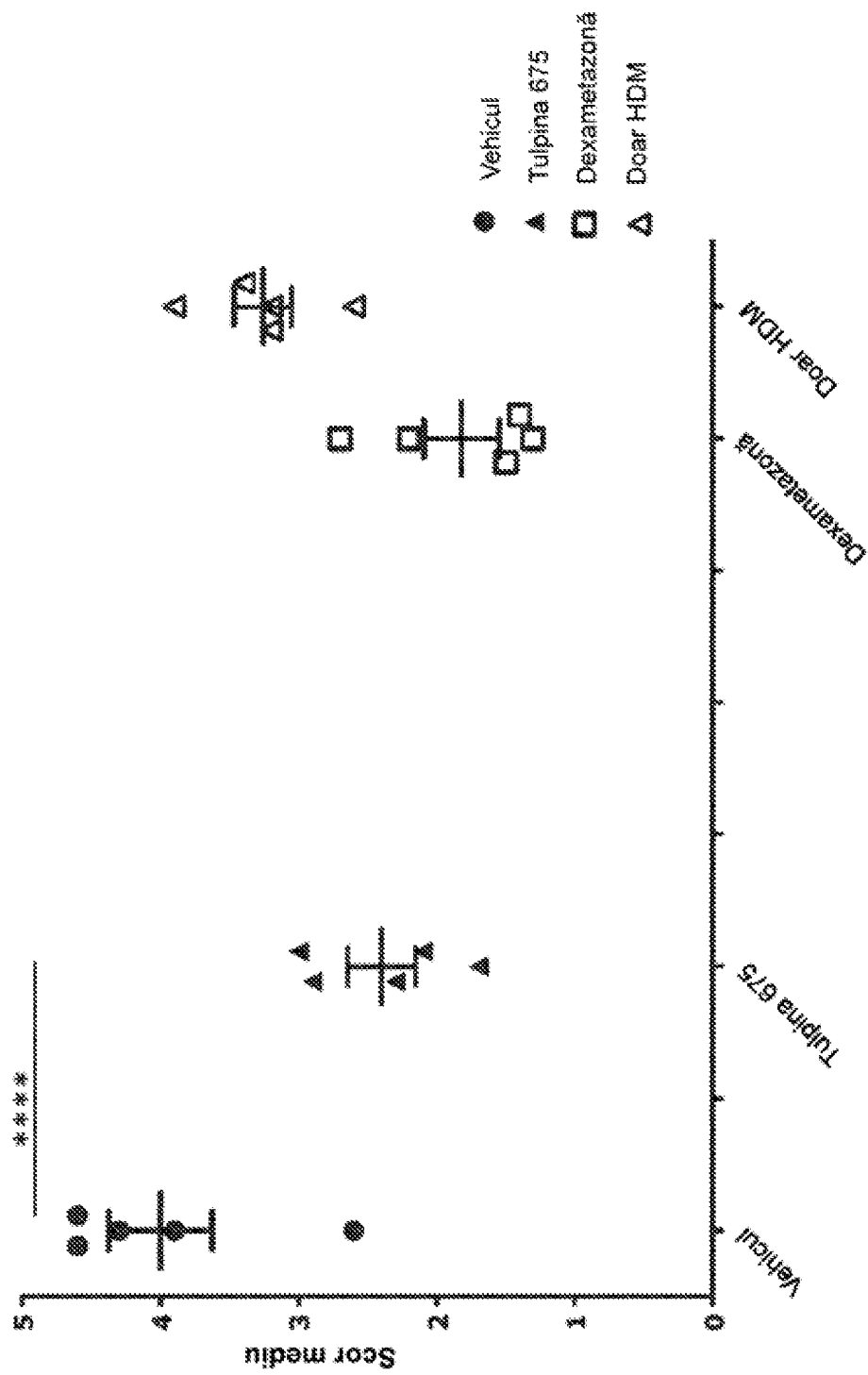


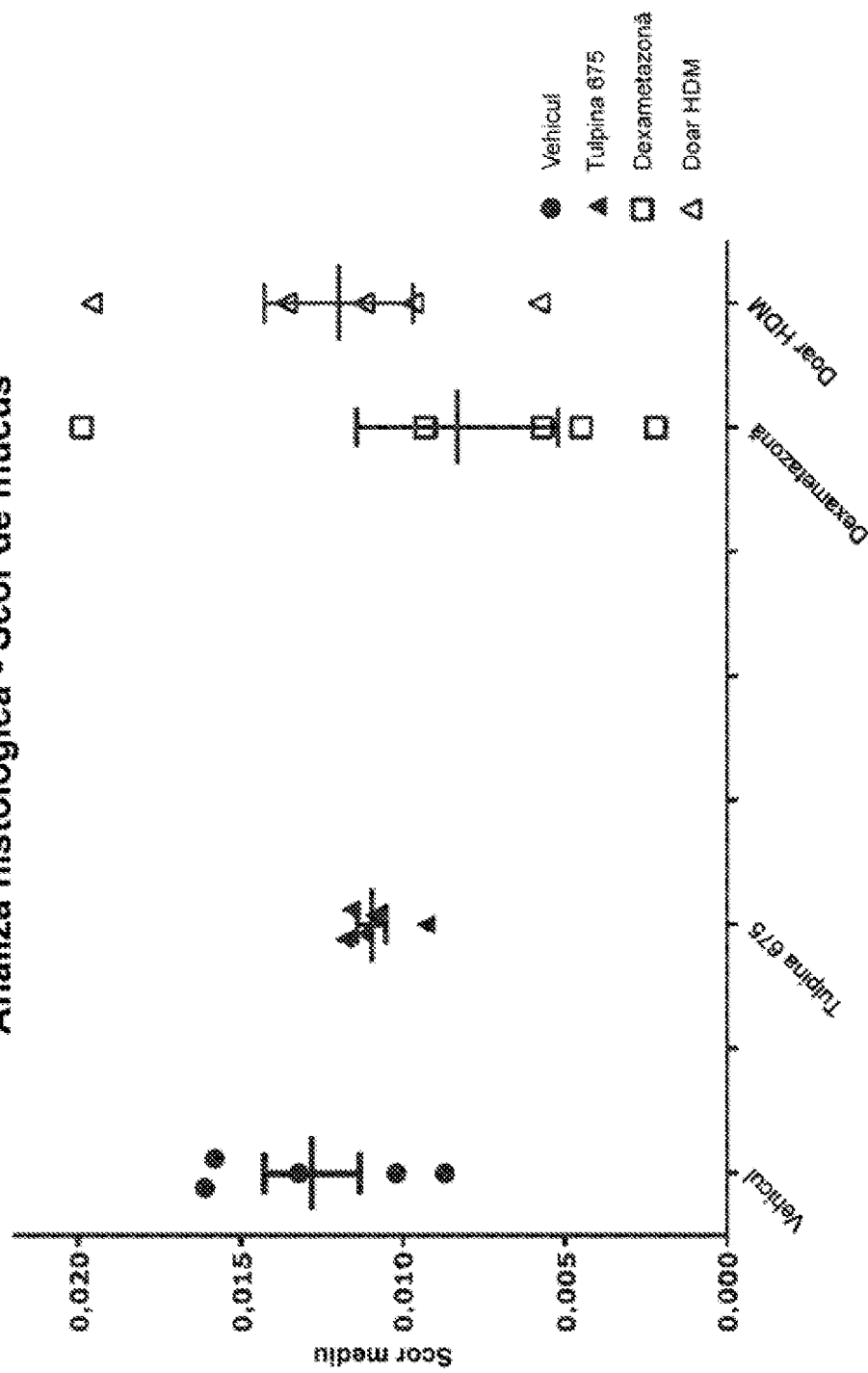
FIG. 33 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare perivasculară



**FIG. 34** Analiză histologică - Scor inflamator mediu (media celor doua scoruri de infiltrare peribronhiolară și perivasculară)

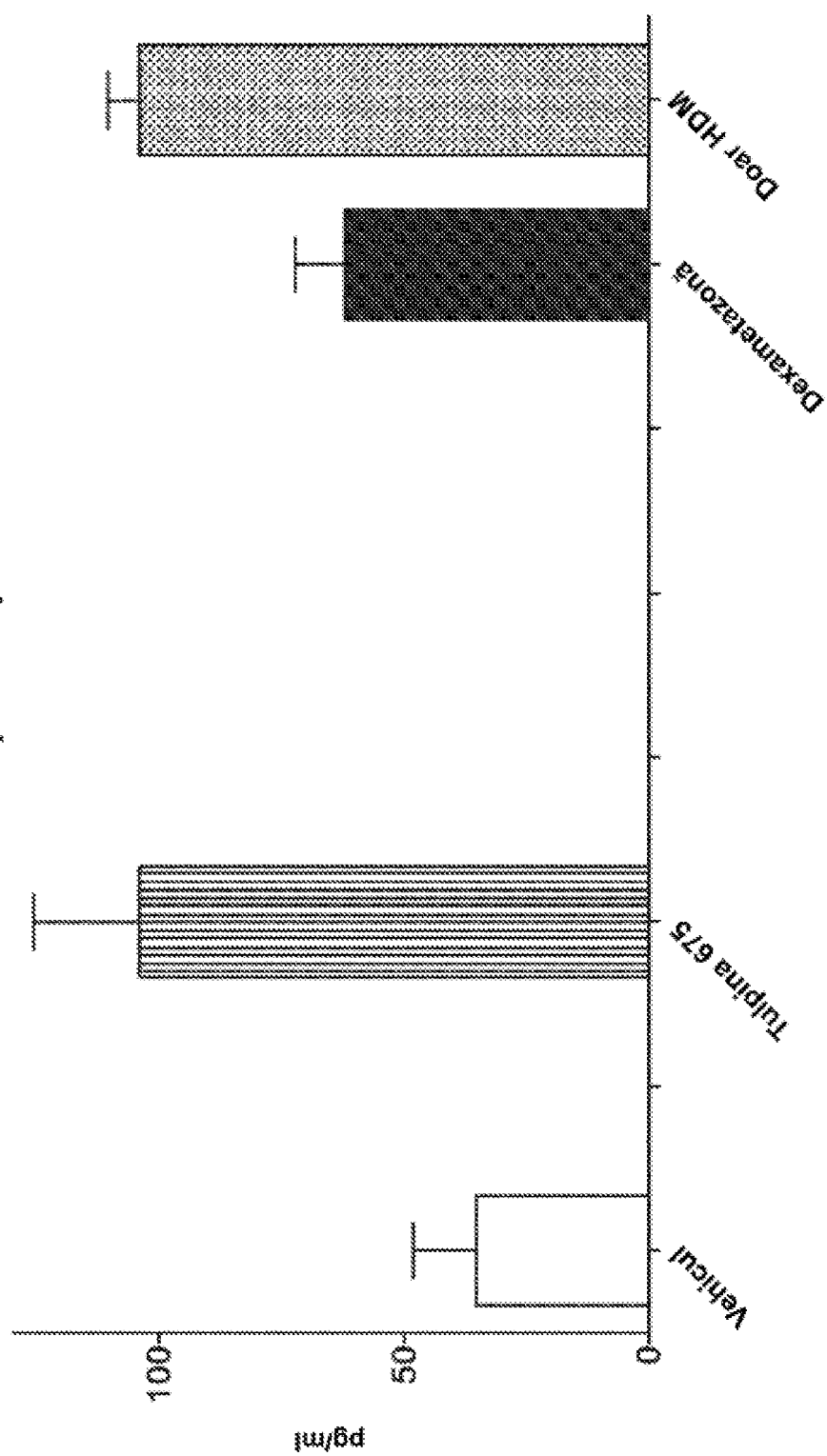


**FIG. 35**  
**Analiză histologică - Scor de mucus**

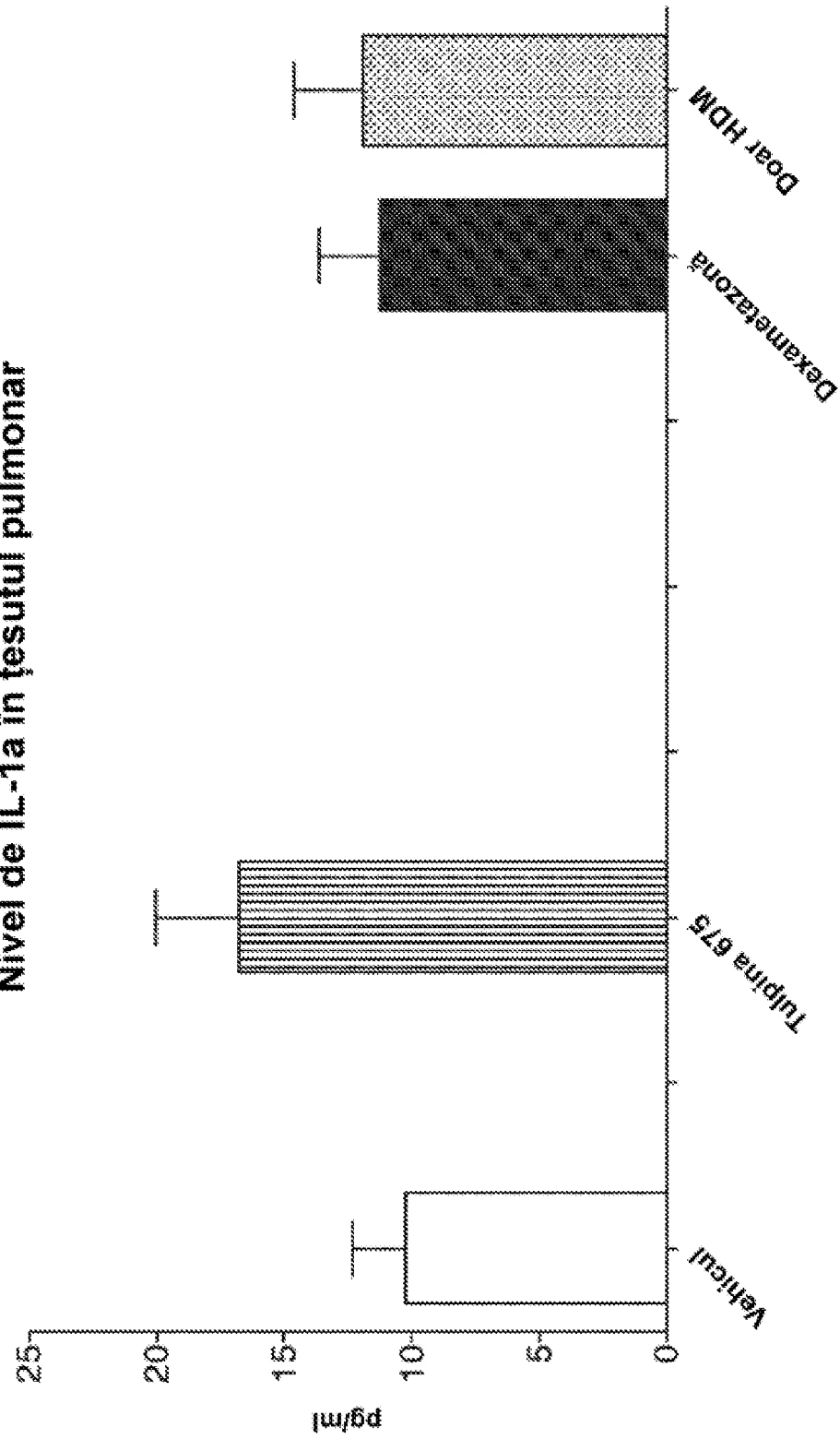




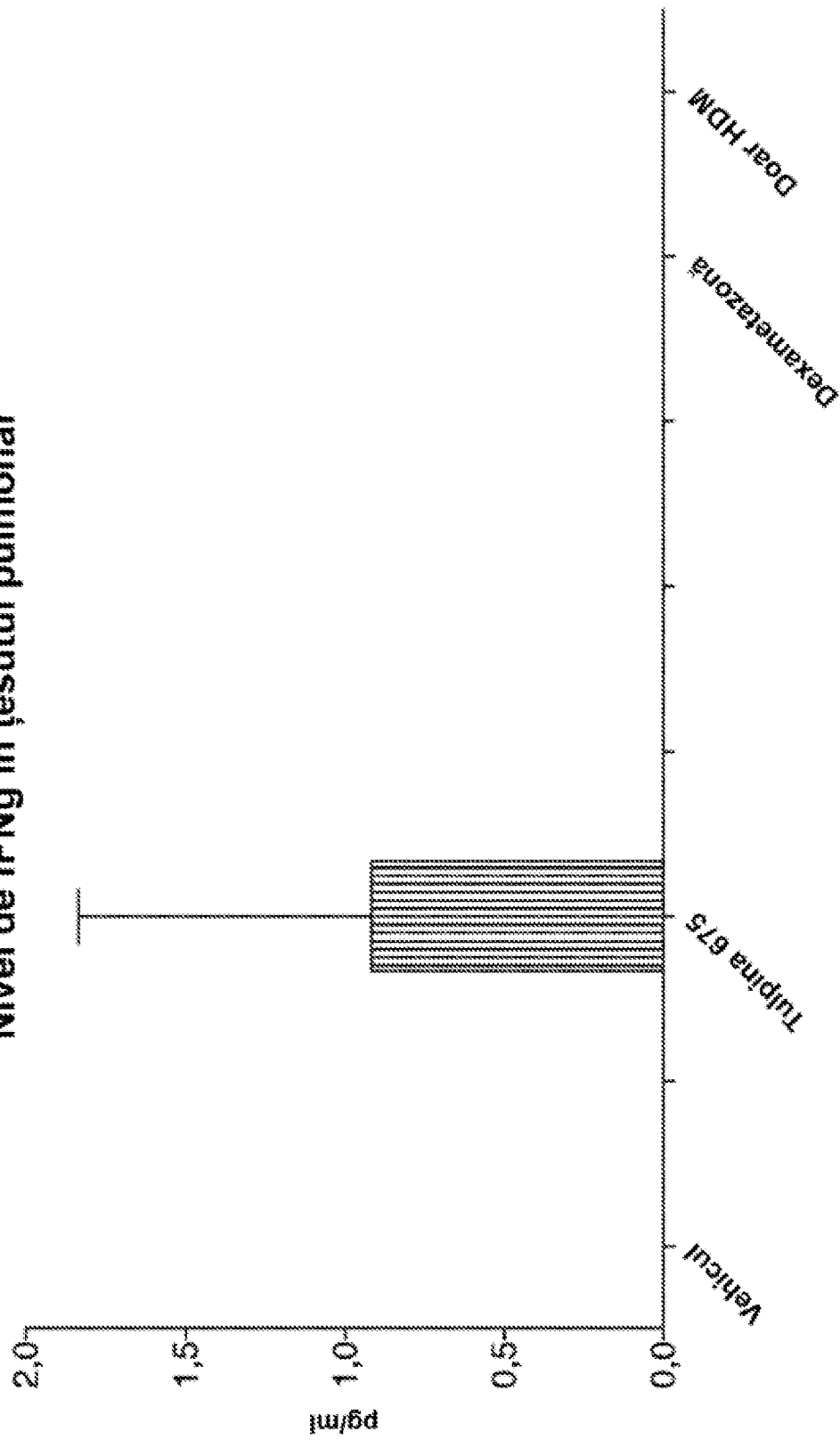
**FIG. 36**  
**Nivel de IL-9 în țesutul pulmonar**



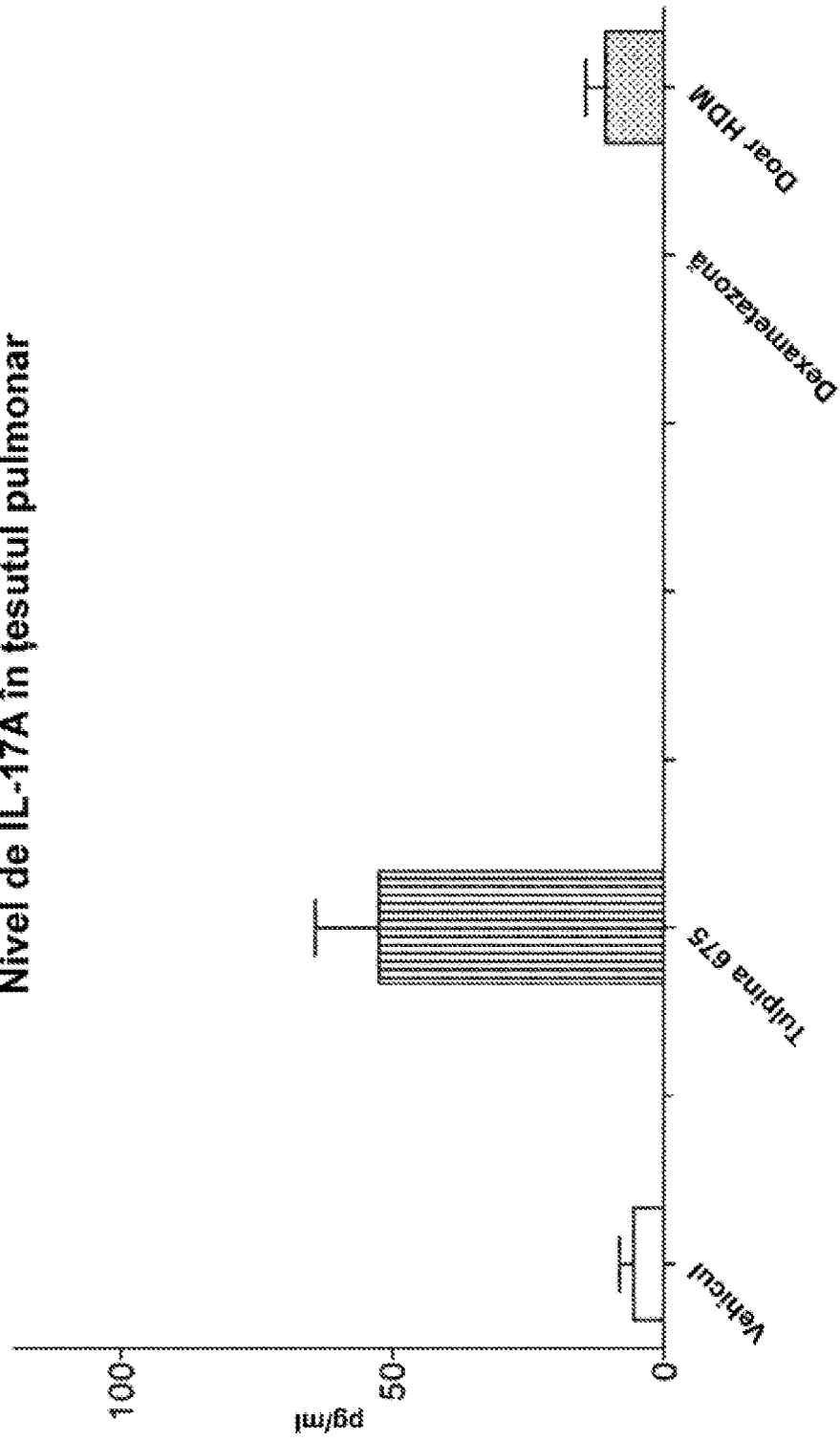
**FIG. 37**  
**Nivel de IL-1a în țesutul pulmonar**



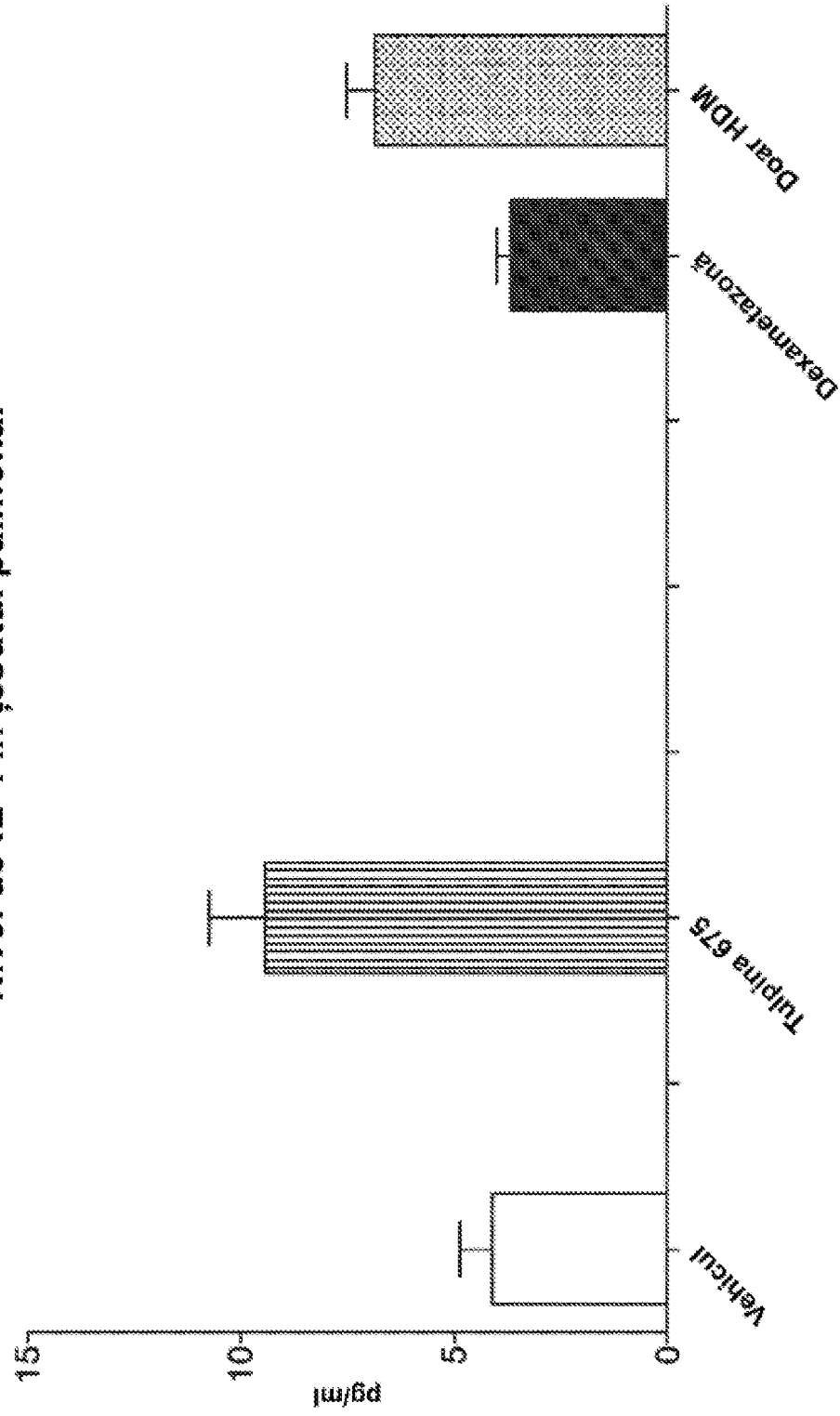
**FIG. 38**  
**Nivel de IFNg în țesutul pulmonar**



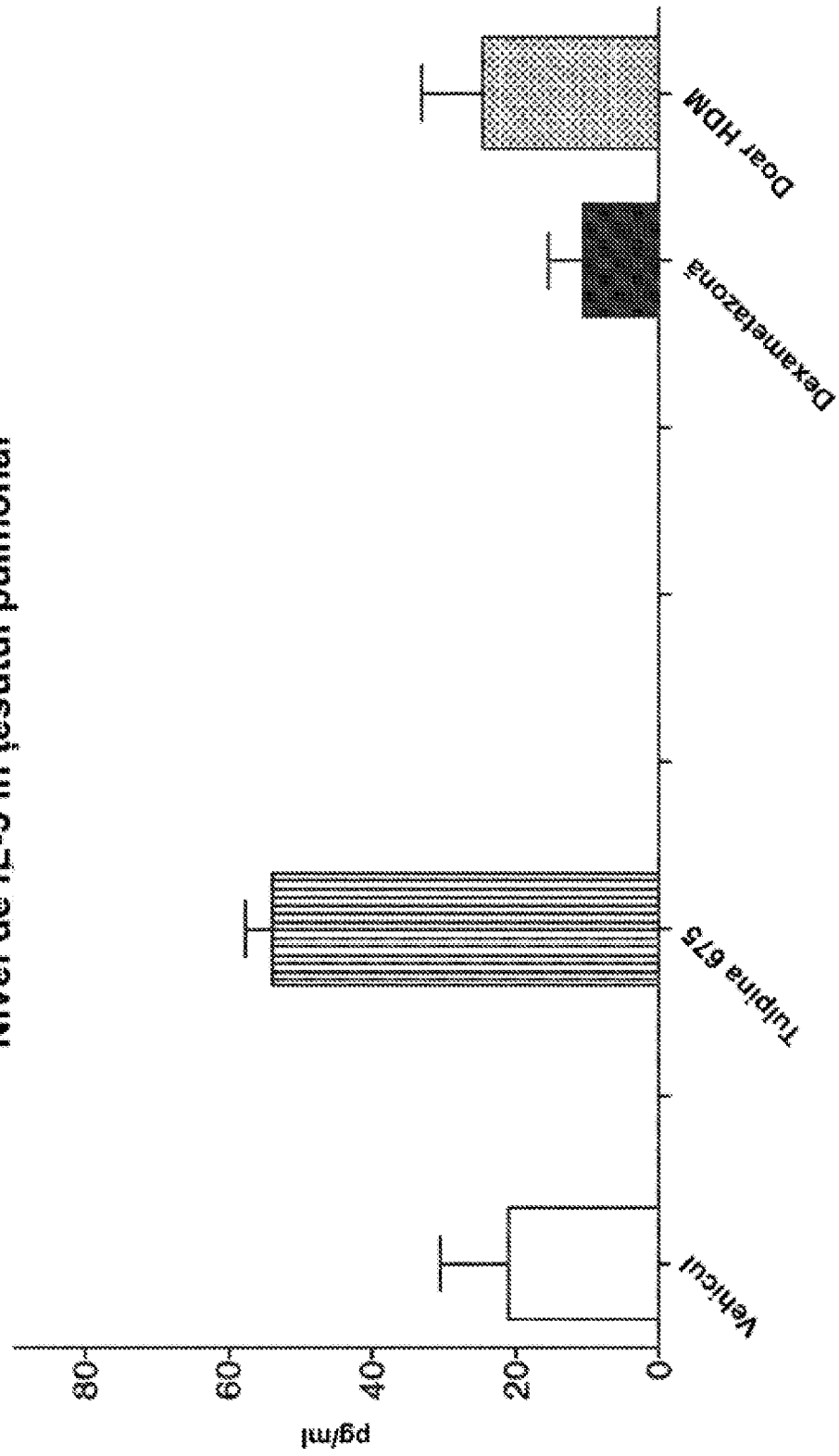
**FIG. 39**  
**Nivel de IL-17A în țesutul pulmonar**



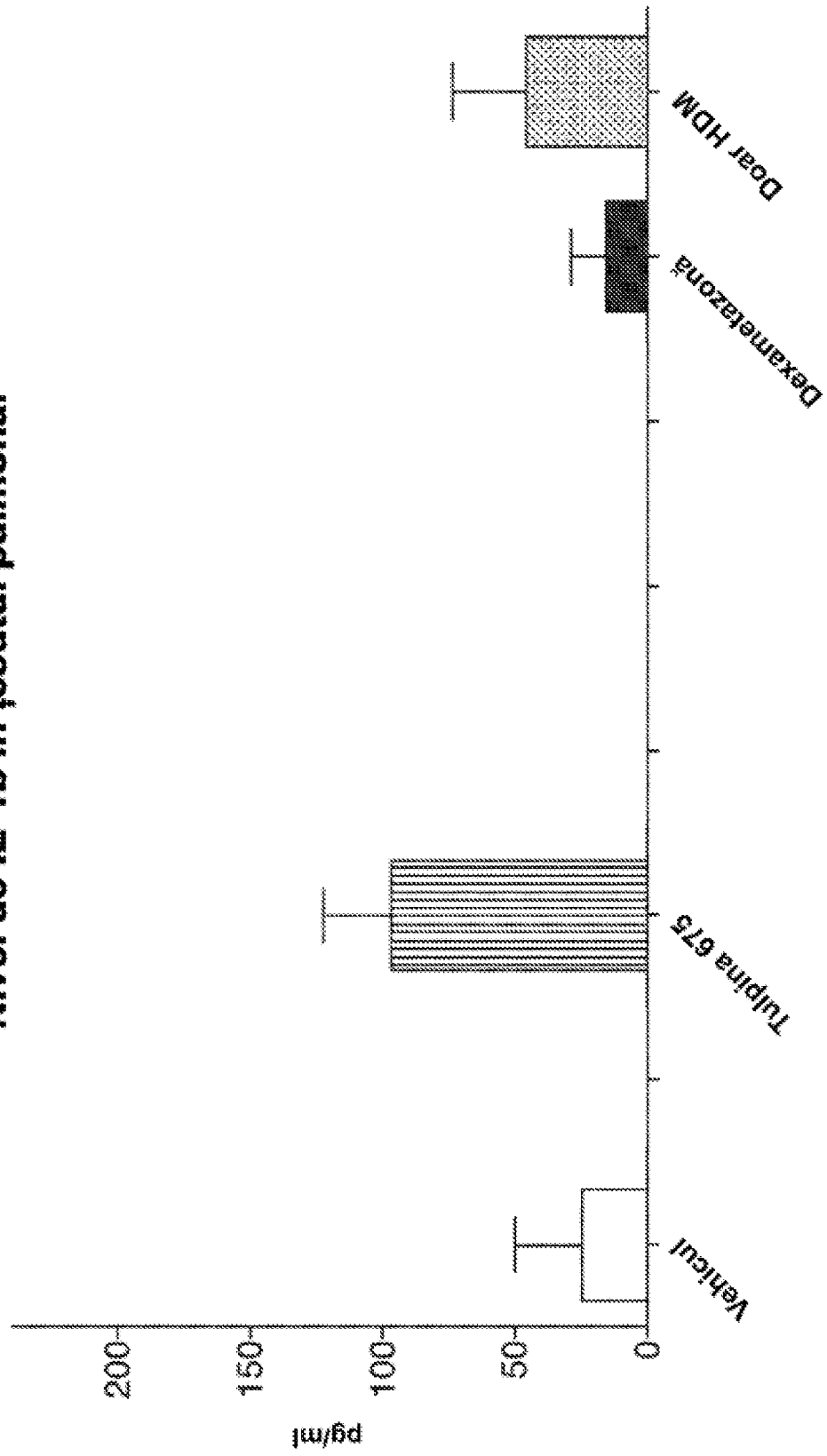
**FIG. 40**  
**Nivel de IL-4 în țesutul pulmonar**



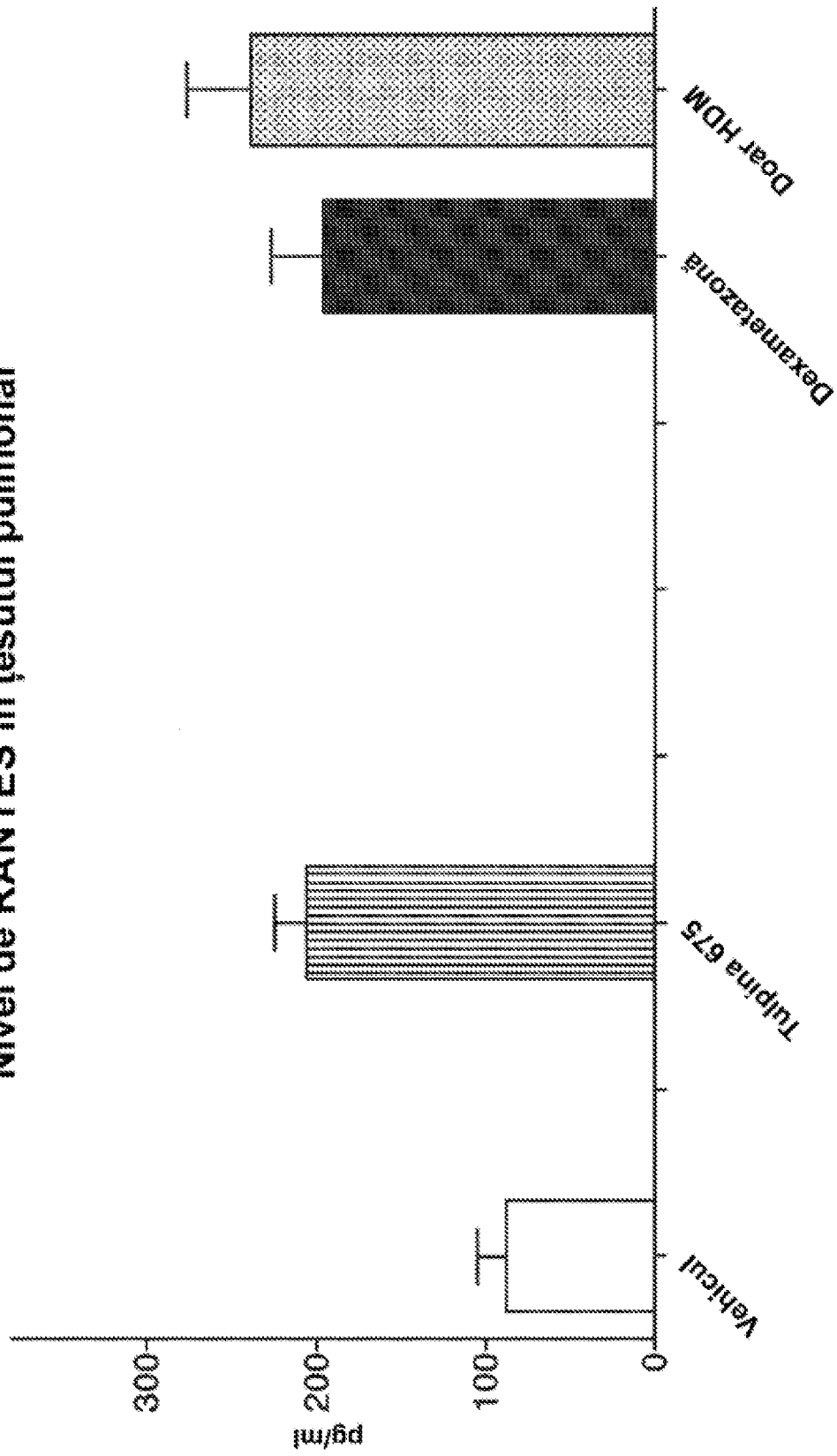
**FIG. 41**  
**Nivel de IL-5 în țesutul pulmonar**



**FIG. 42**  
**Nivel de IL-1b în țesutul pulmonar**

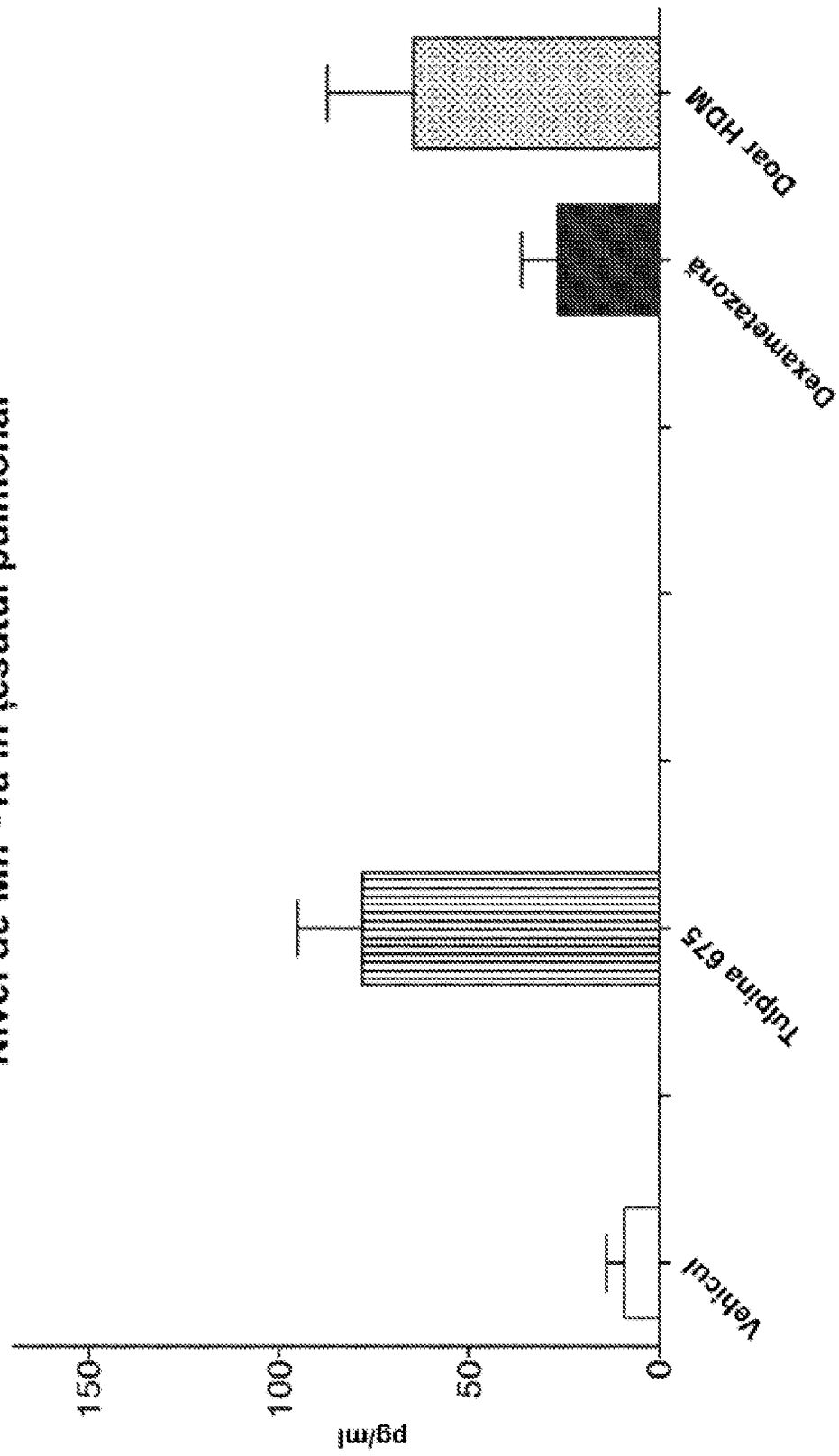


**FIG. 43**  
**Nivel de RANTES în țesutul pulmonar**

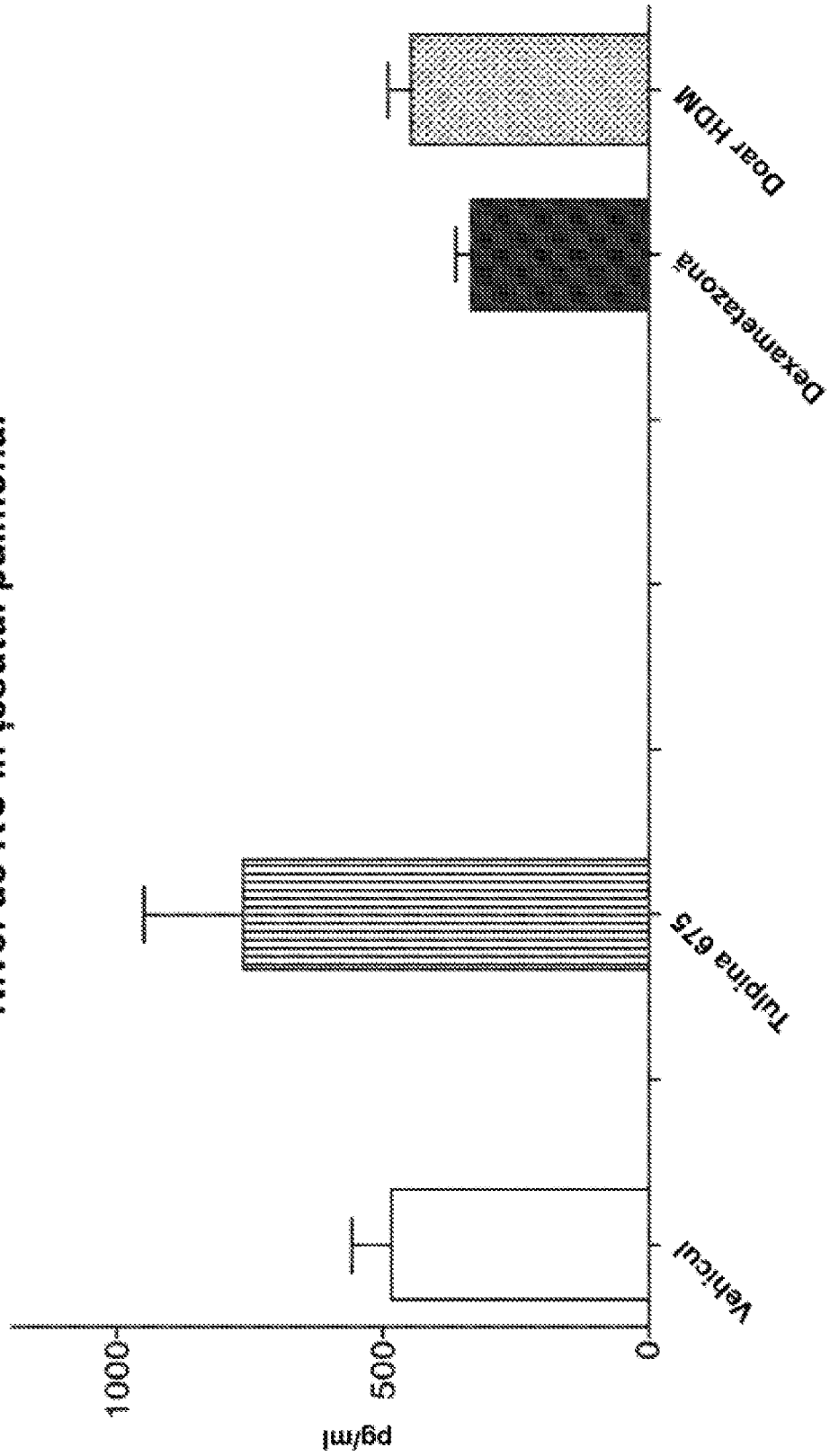




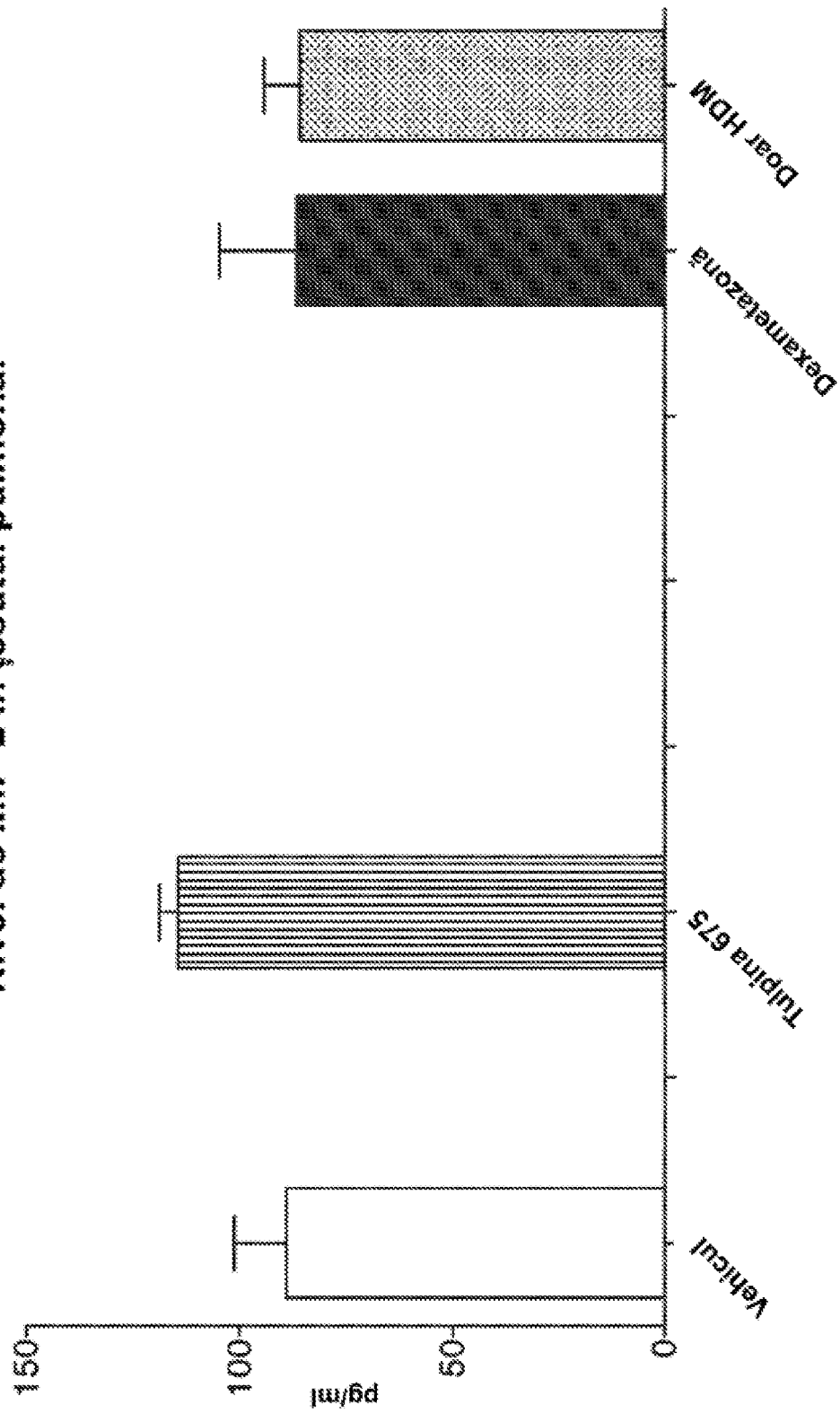
**FIG. 44**  
**Nivel de MIP-1a în țesutul pulmonar**



**FIG. 45**  
**Nivel de KC în țesutul pulmonar**



**FIG. 46**  
**Nivel de MIP-2 în țesutul pulmonar**



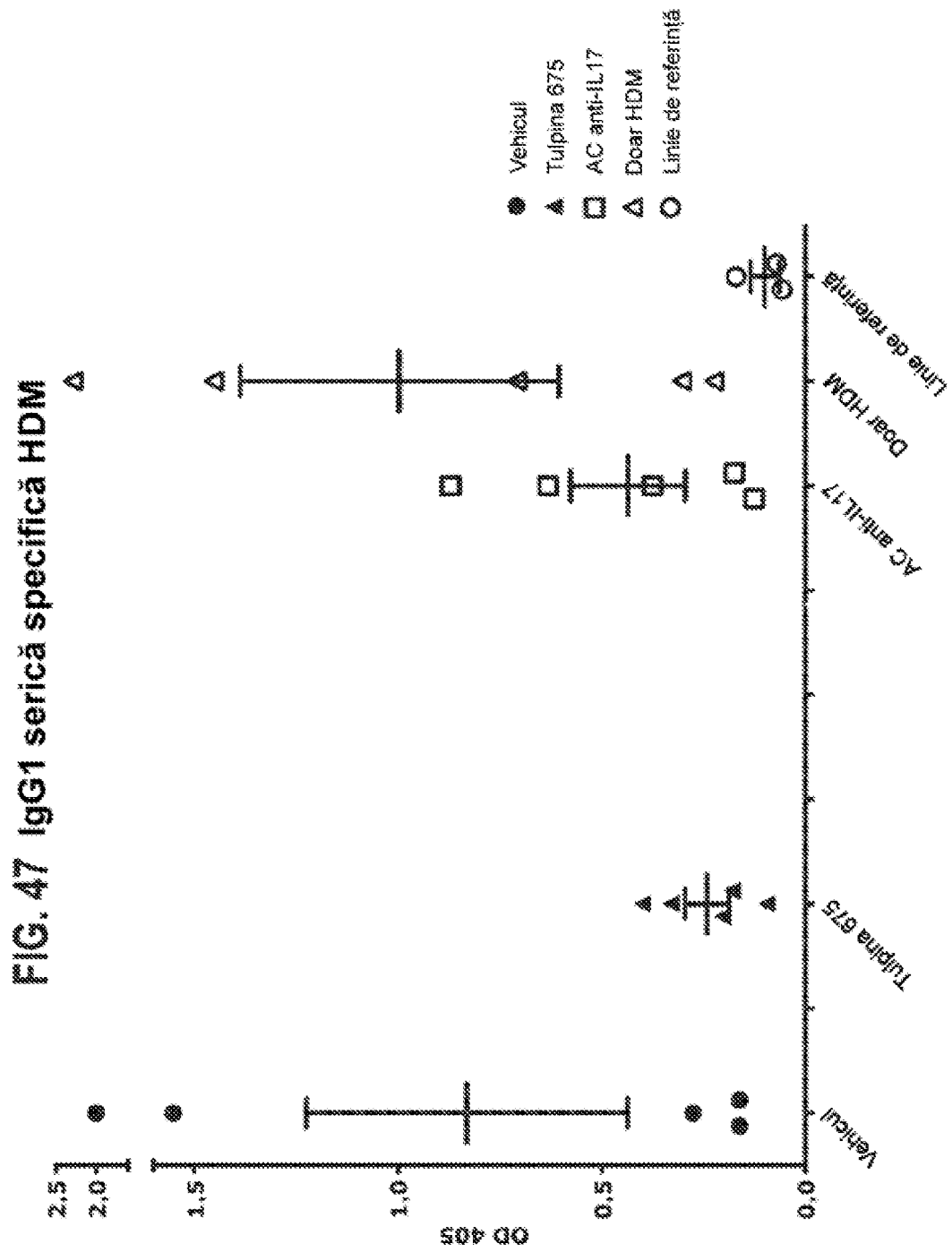


FIG. 48 IgG2a serică specifică HDM

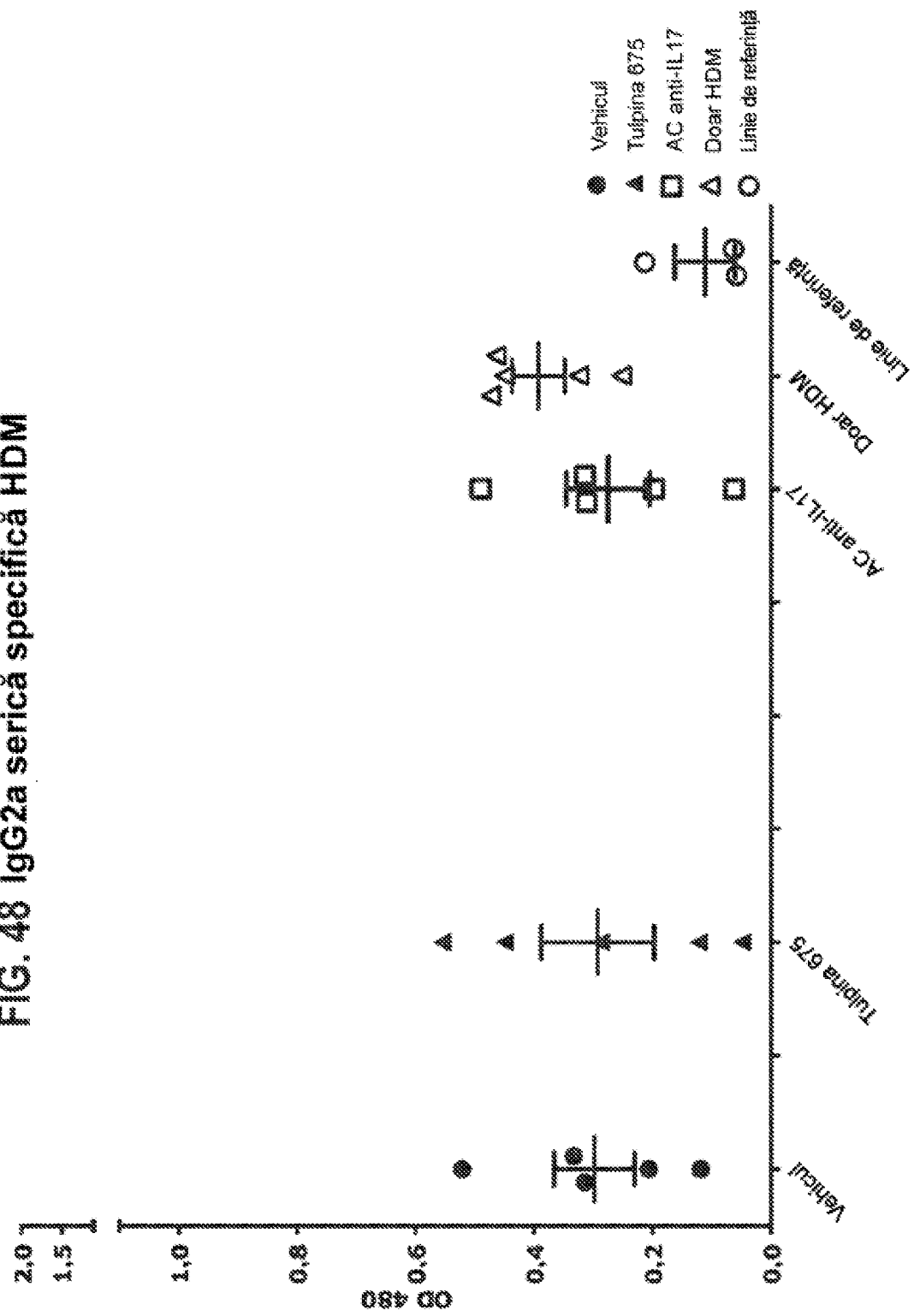
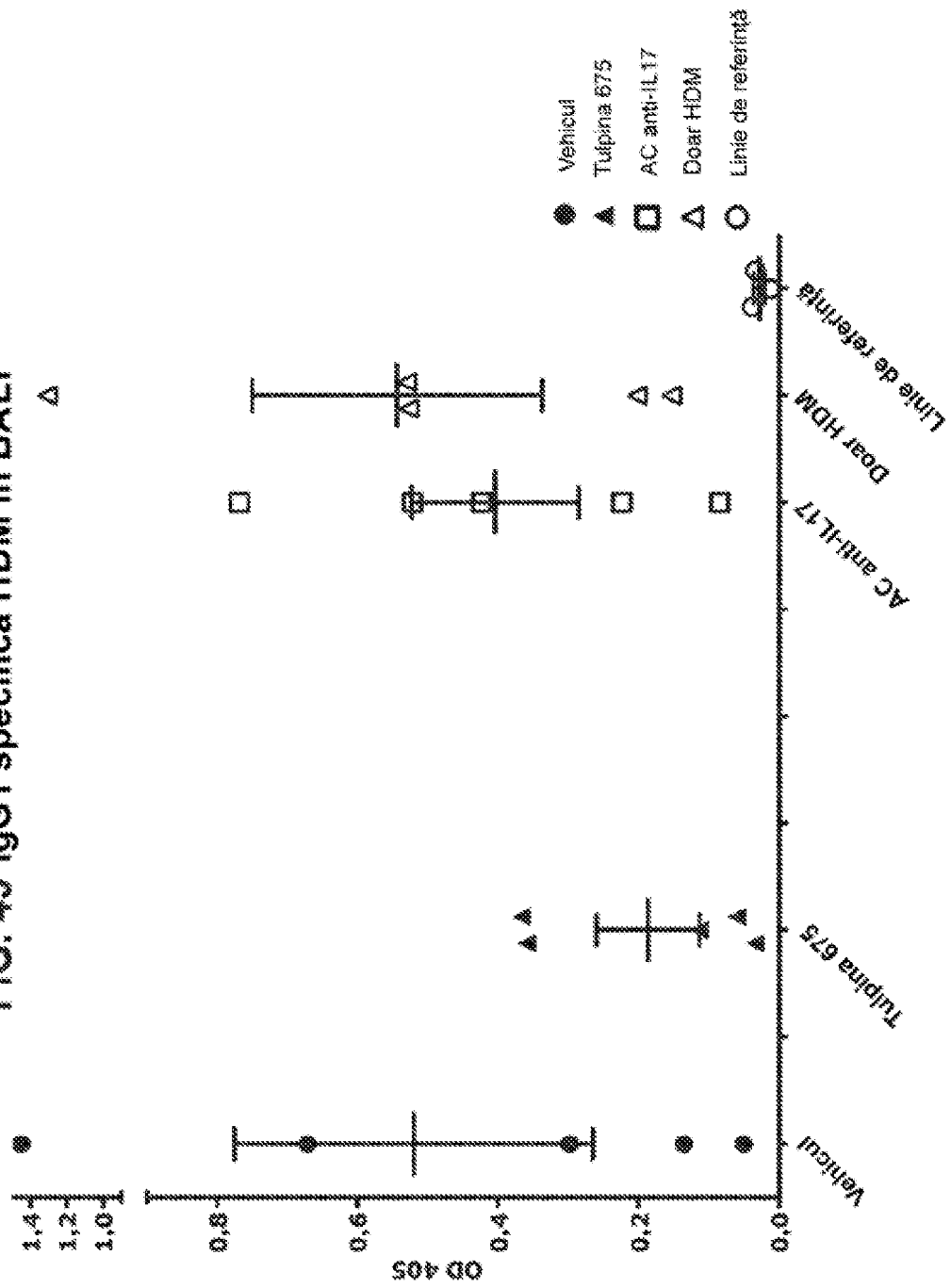


FIG. 49 IgG1 specifică HDM în BALF



**FIG. 50**  
IgG2a specifică HDM în BALF

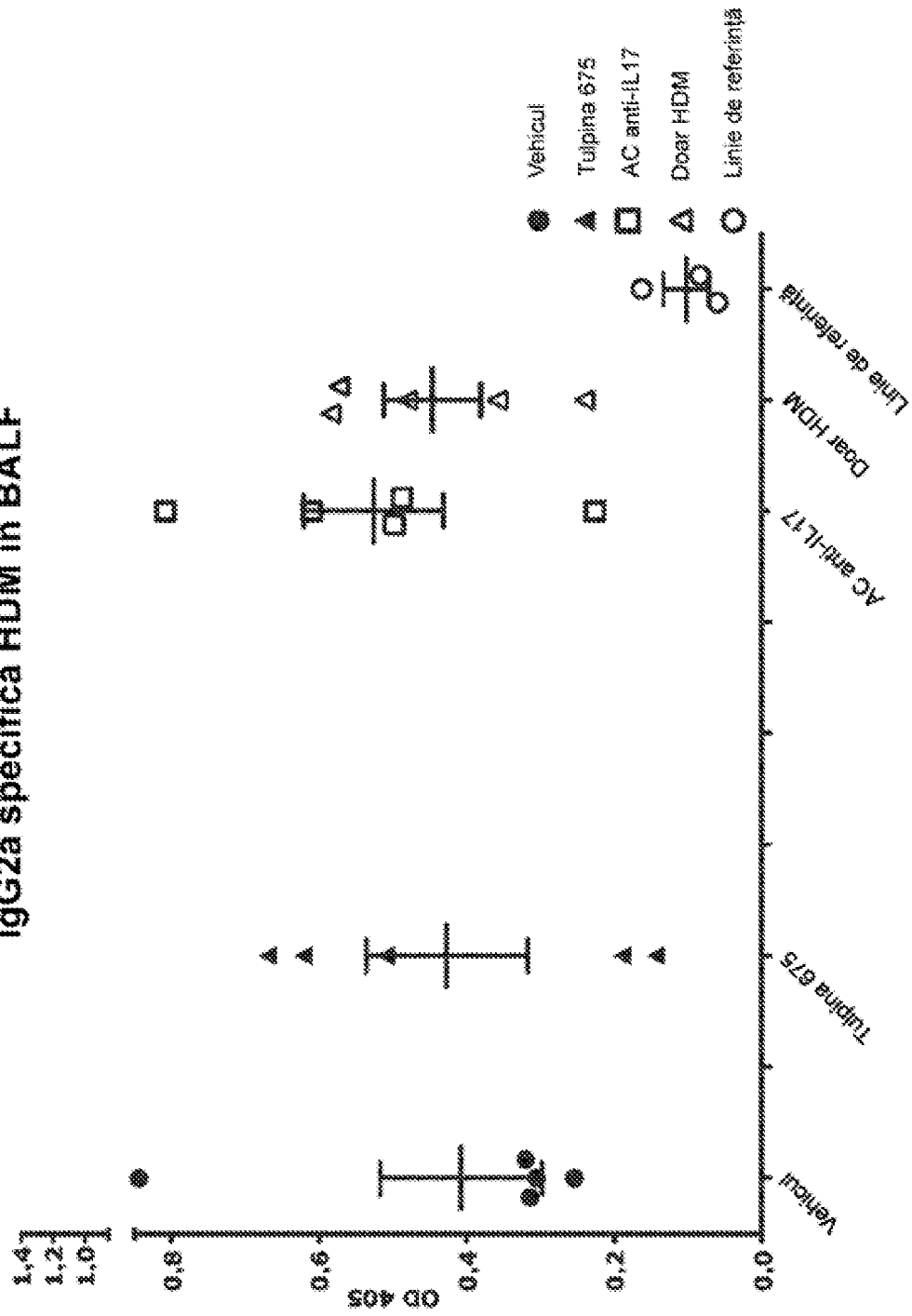


FIG. 51 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare peribronhiolară

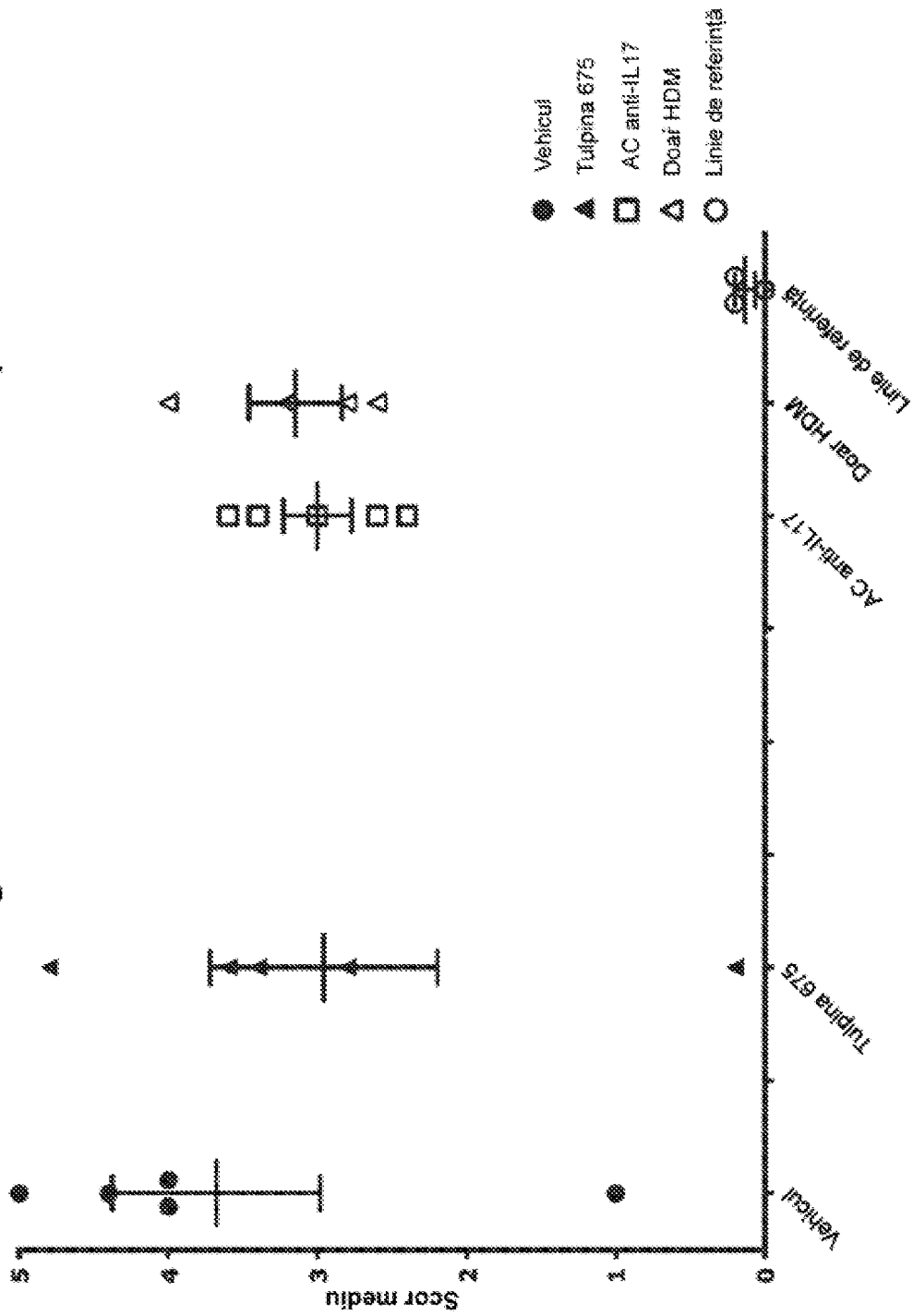
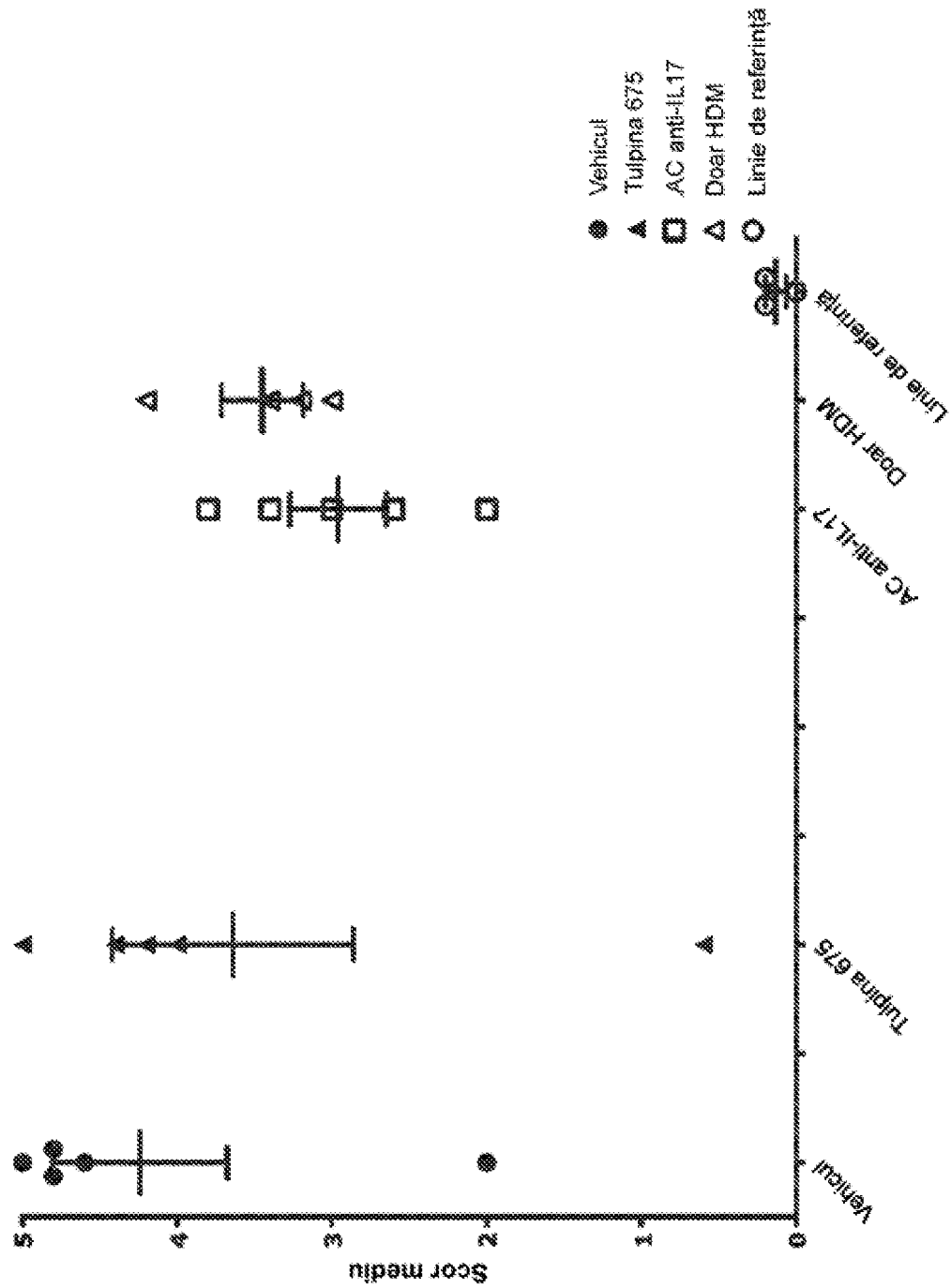
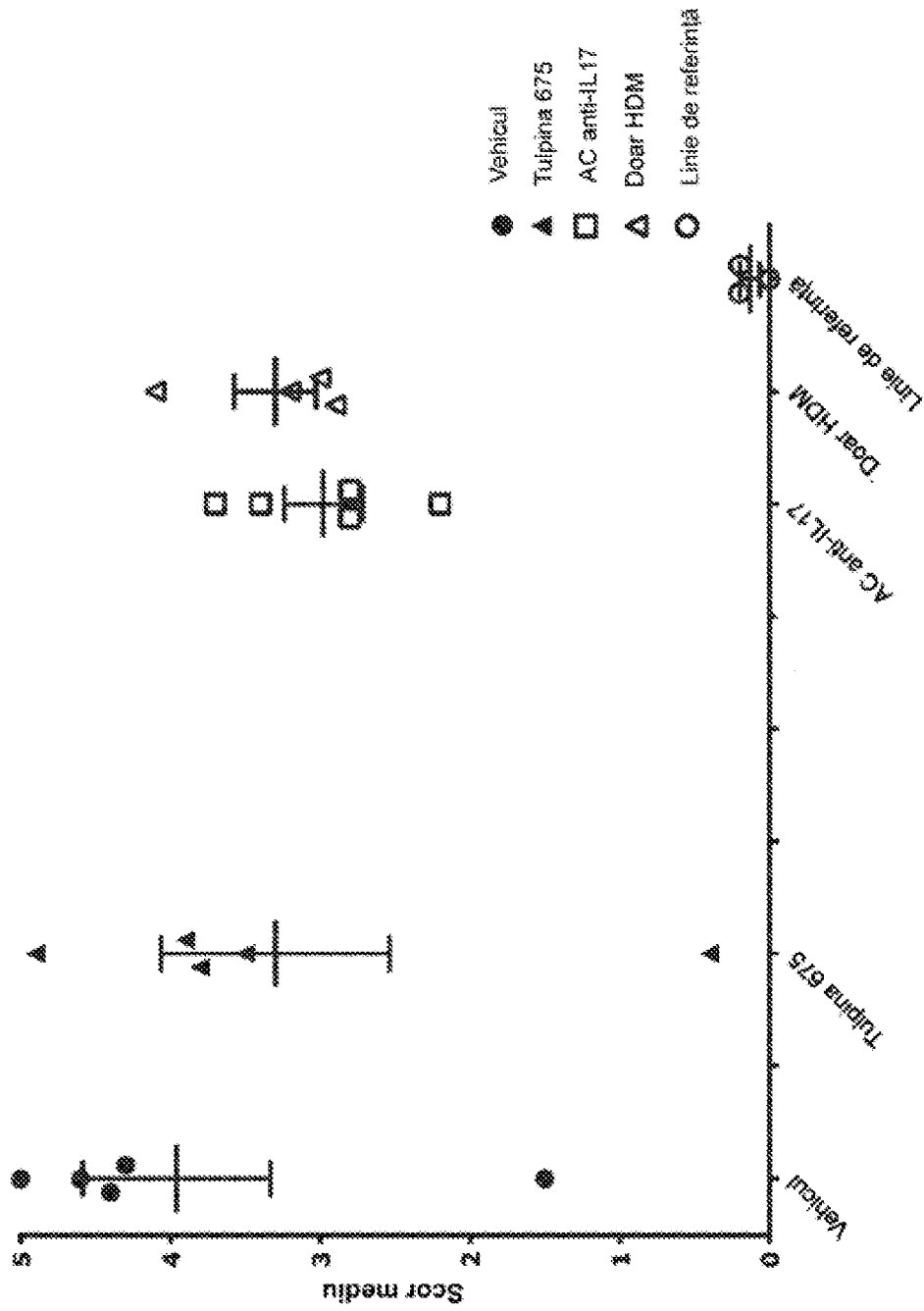




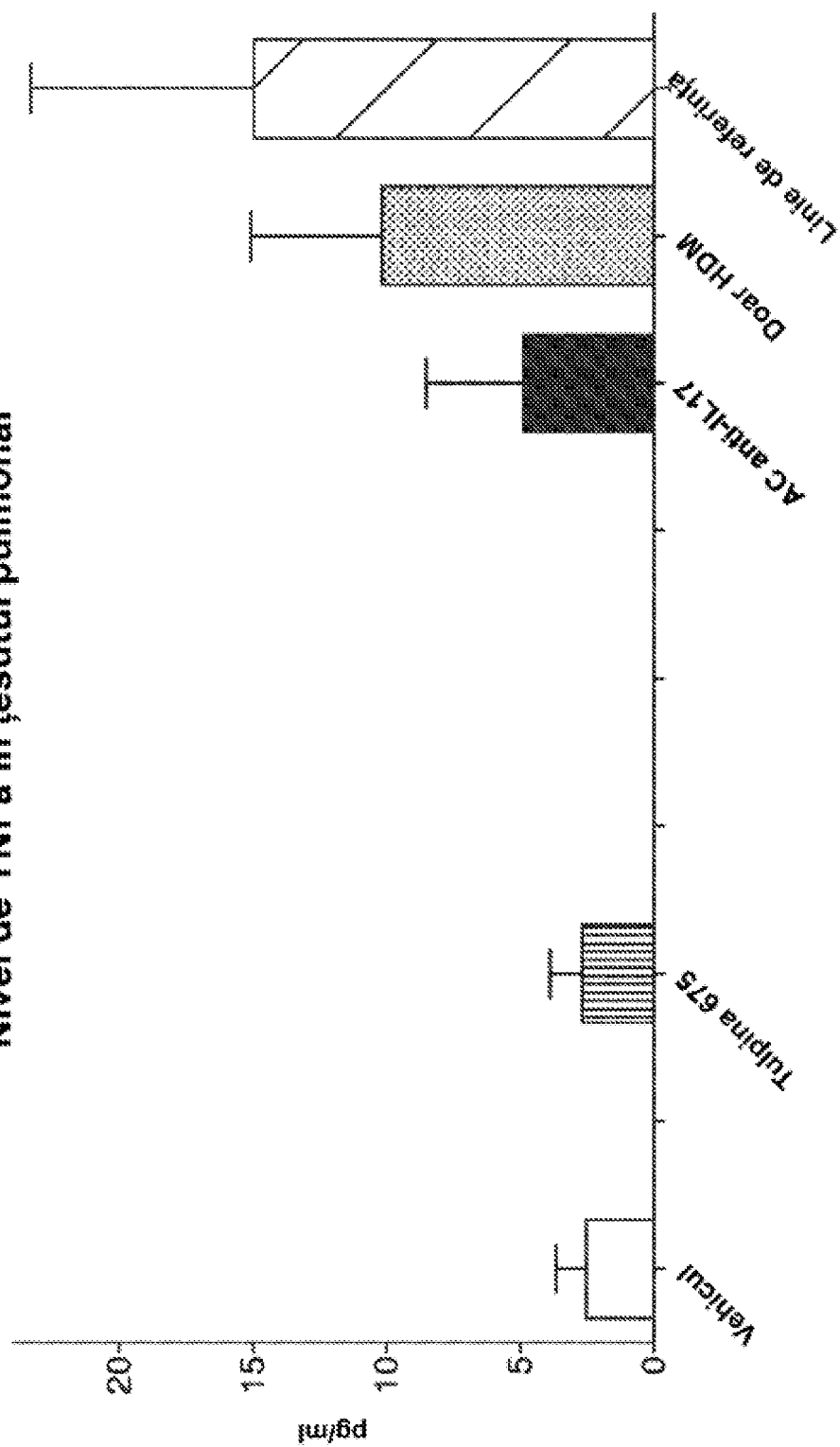
FIG. 52 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare perivasculară



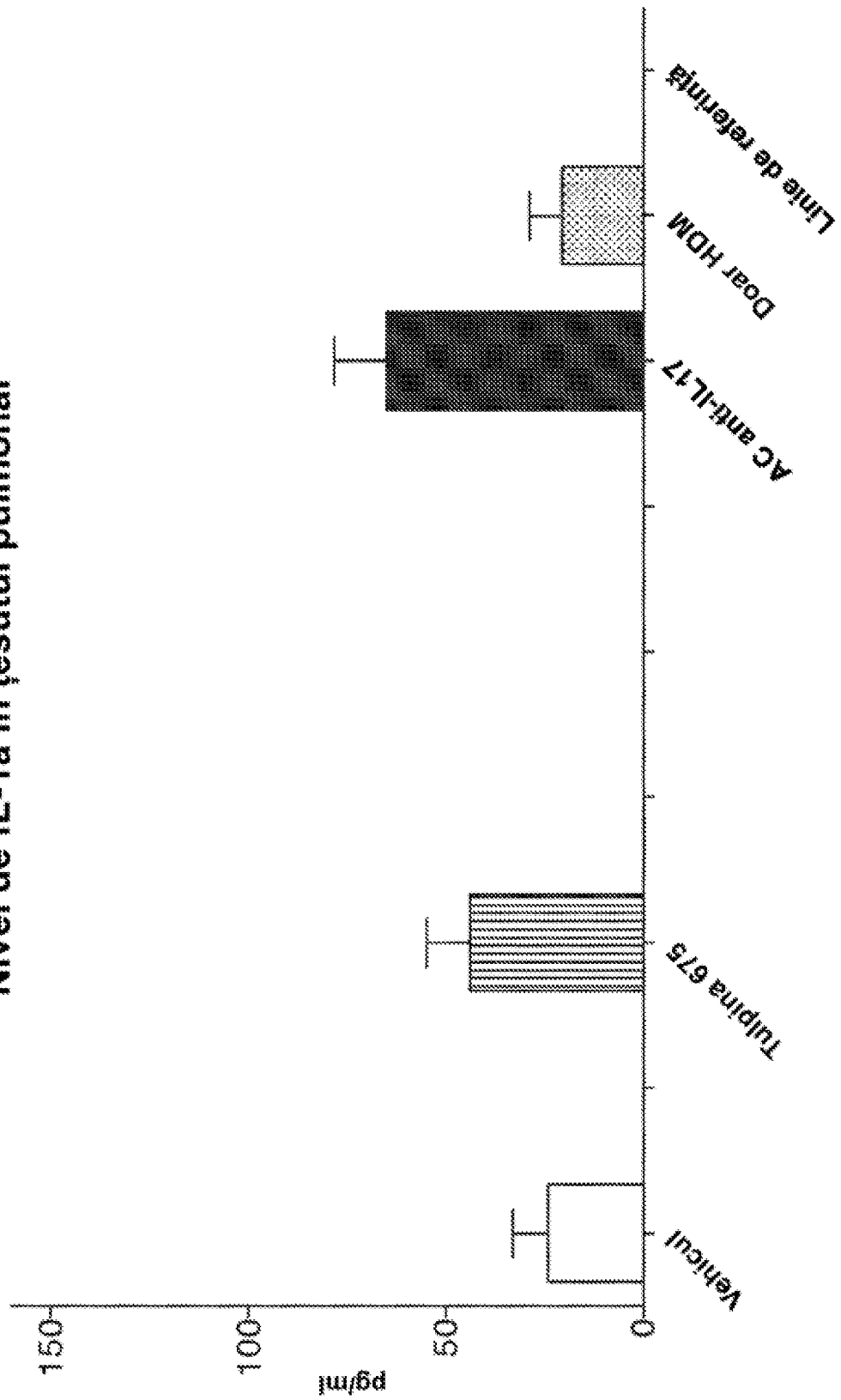
**FIG. 53** Analiză histologică - Scor inflamator mediu (media celor două scoruri de infiltrare peribronhiolară și perivasculară)



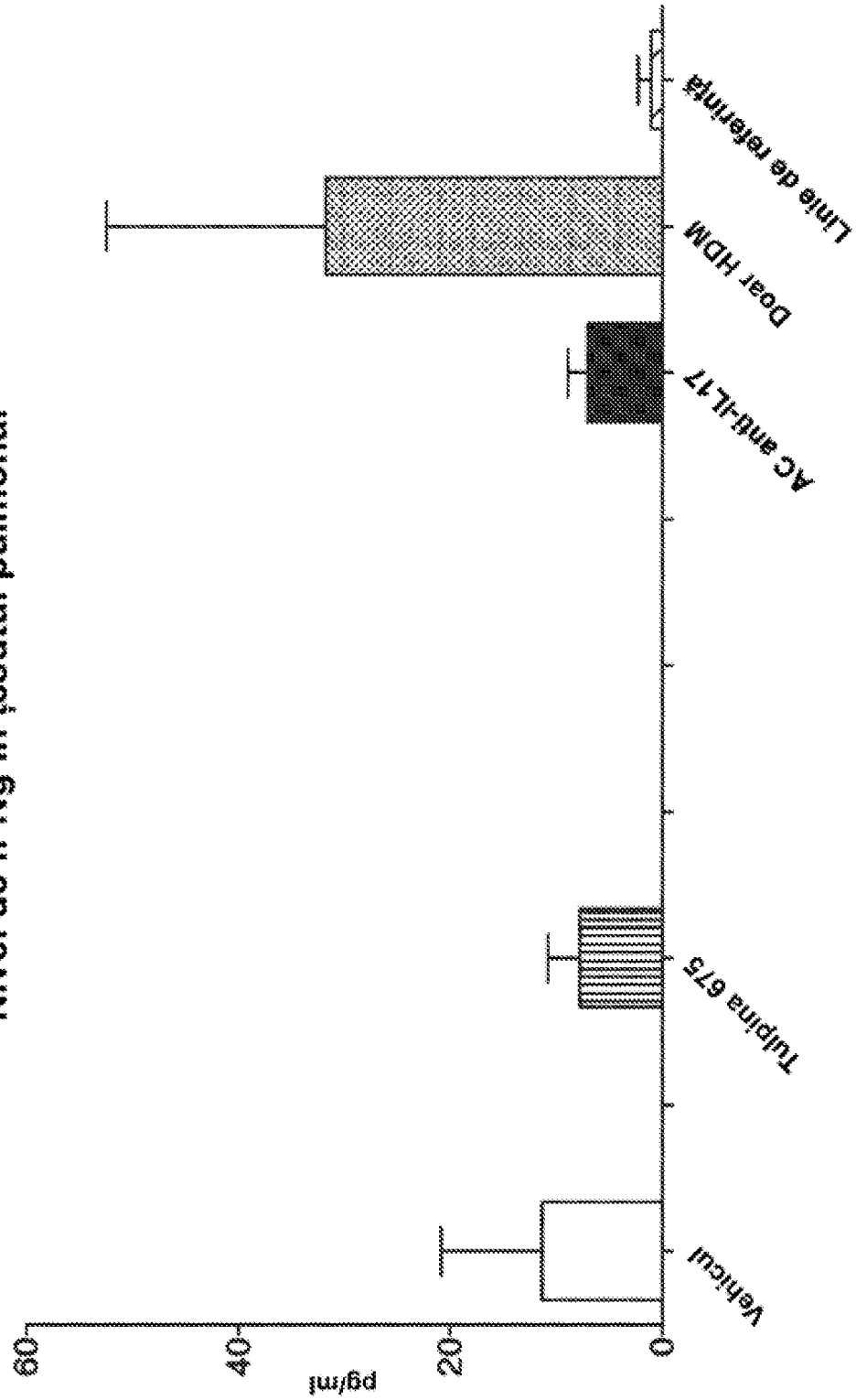
**FIG. 54**  
**Nivel de TNFa în țesutul pulmonar**



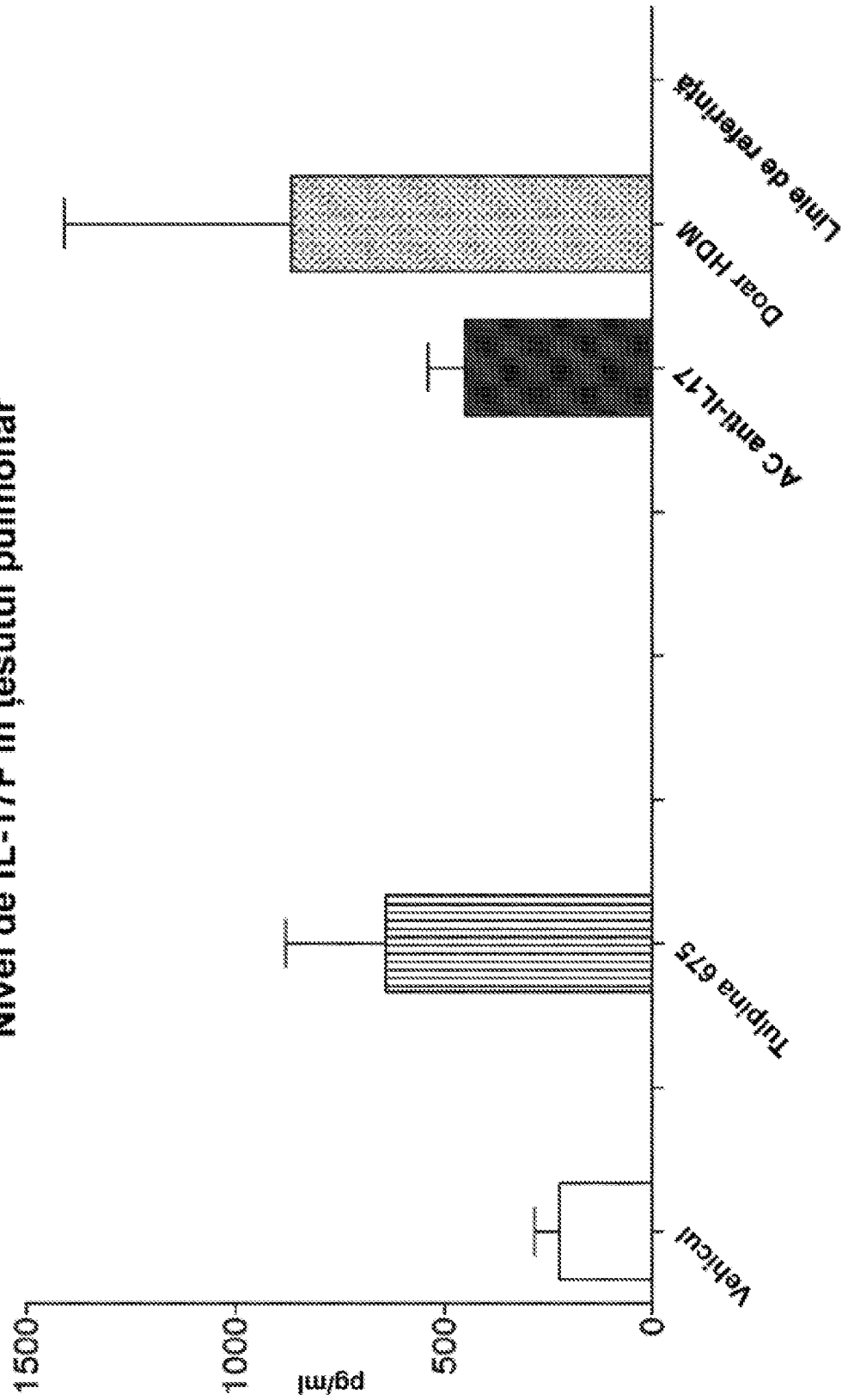
**FIG. 55**  
**Nivel de IL-1a în țesutul pulmonar**



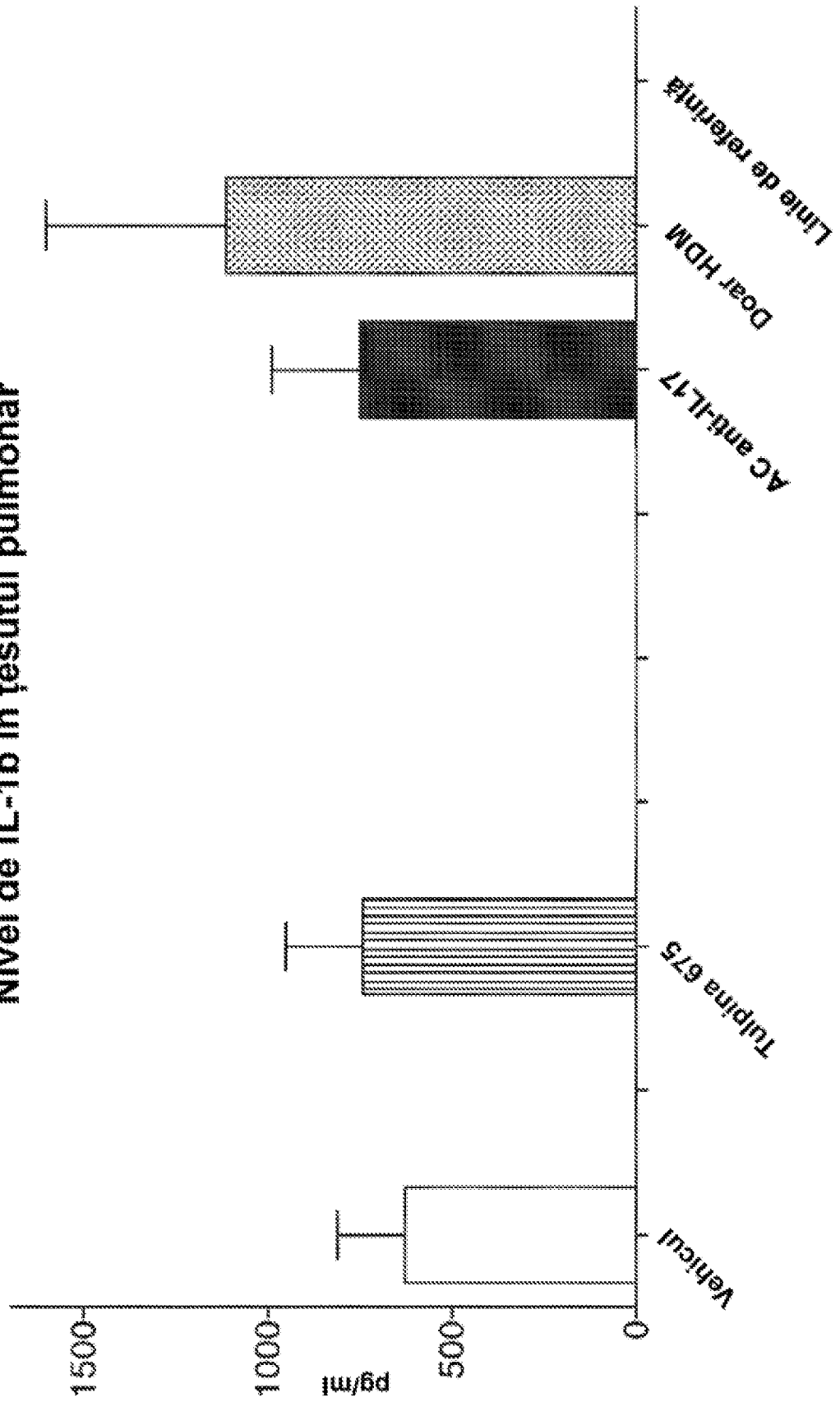
**FIG. 56**  
**Nivel de IFNg în țesutul pulmonar**



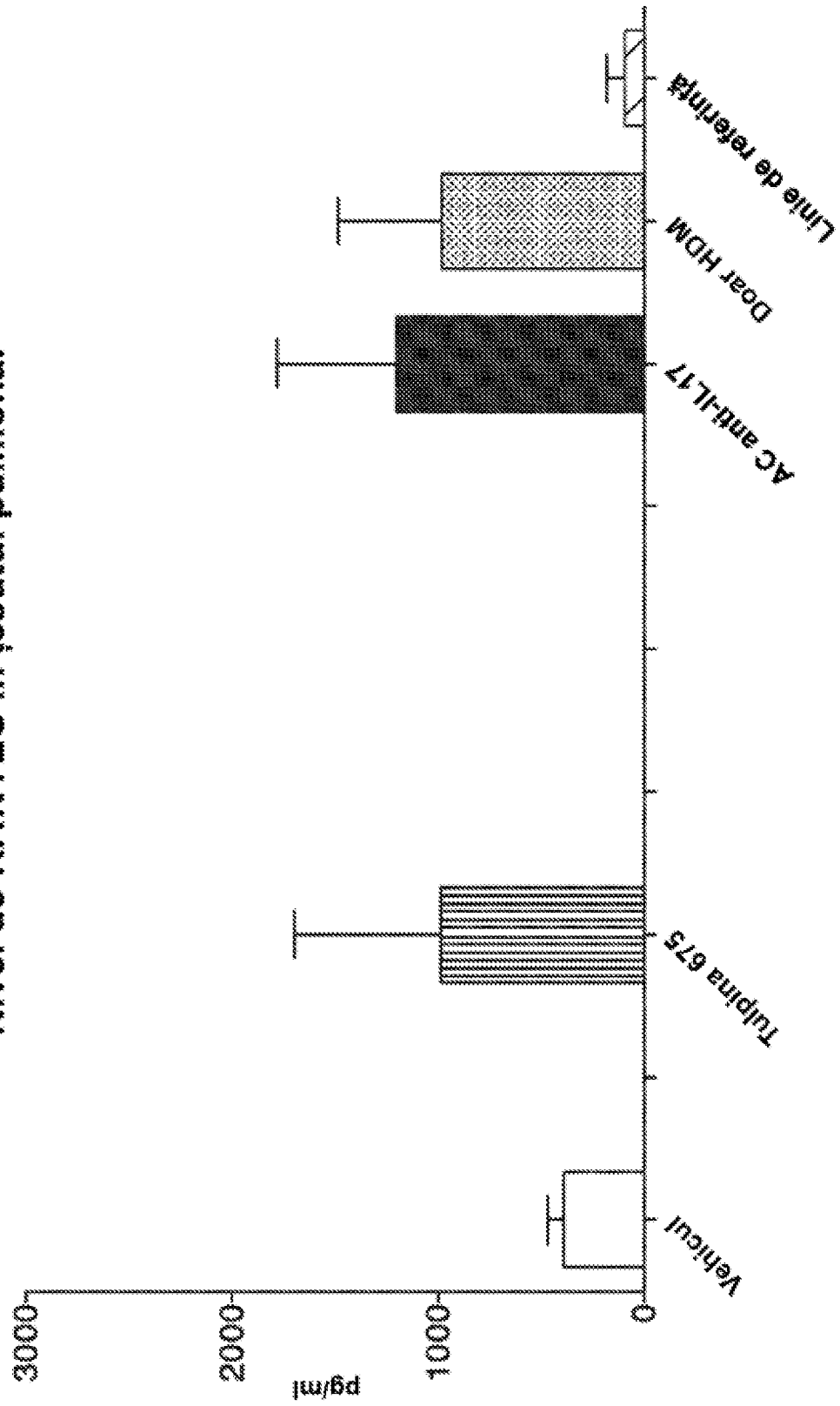
**FIG. 57**  
**Nivel de IL-17F în țesutul pulmonar**



**FIG. 58**  
**Nivel de IL-1b în țesutul pulmonar**

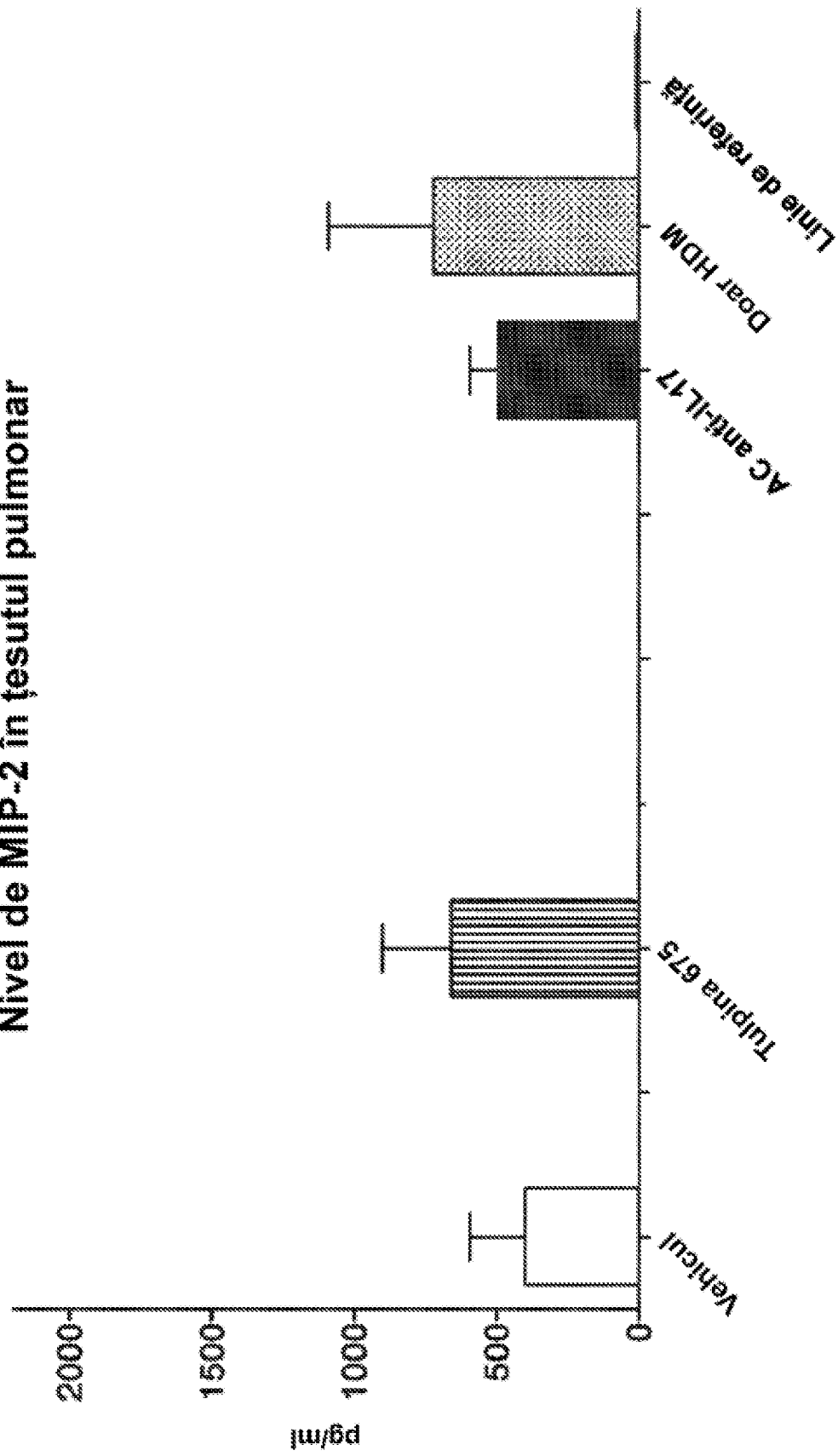


**FIG. 59**  
**Nivel de RANTES în țesutul pulmonar**

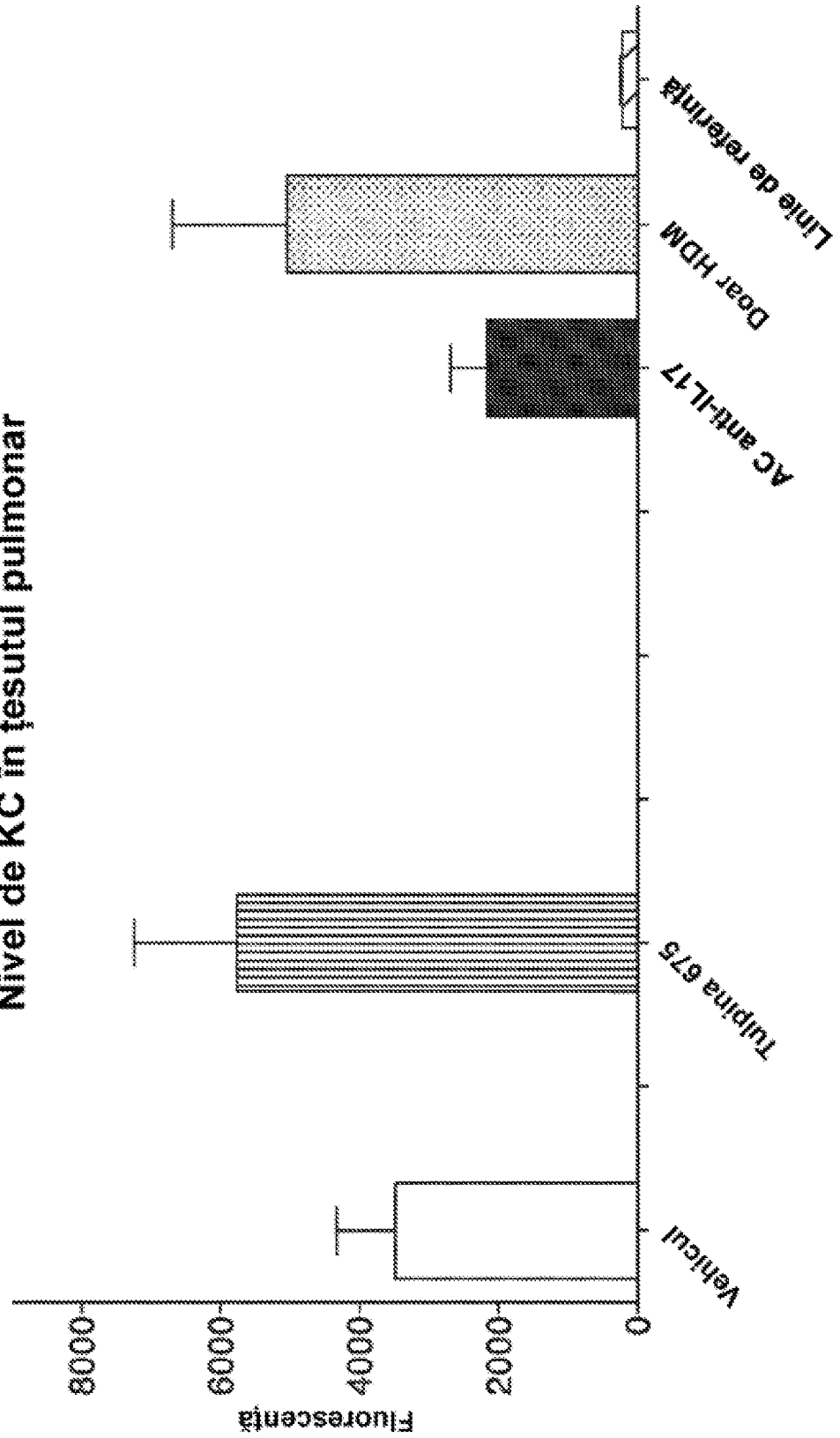




**FIG. 60**  
**Nivel de MIP-2 în țesutul pulmonar**



**FIG. 61**  
**Nivel de KC în țesutul pulmonar**



**FIG. 62**  
**Nivel de IL-17A în țesutul pulmonar**

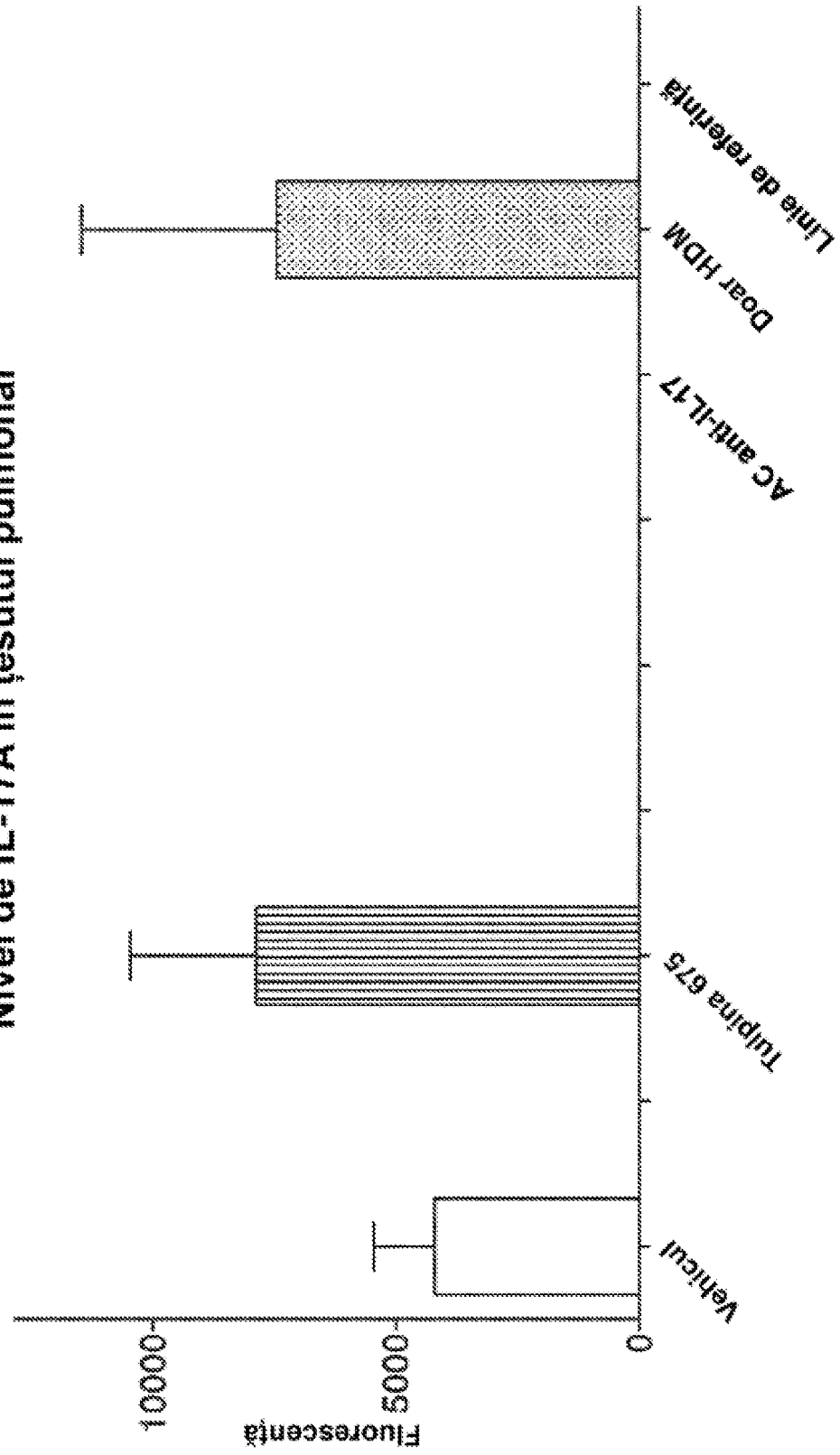
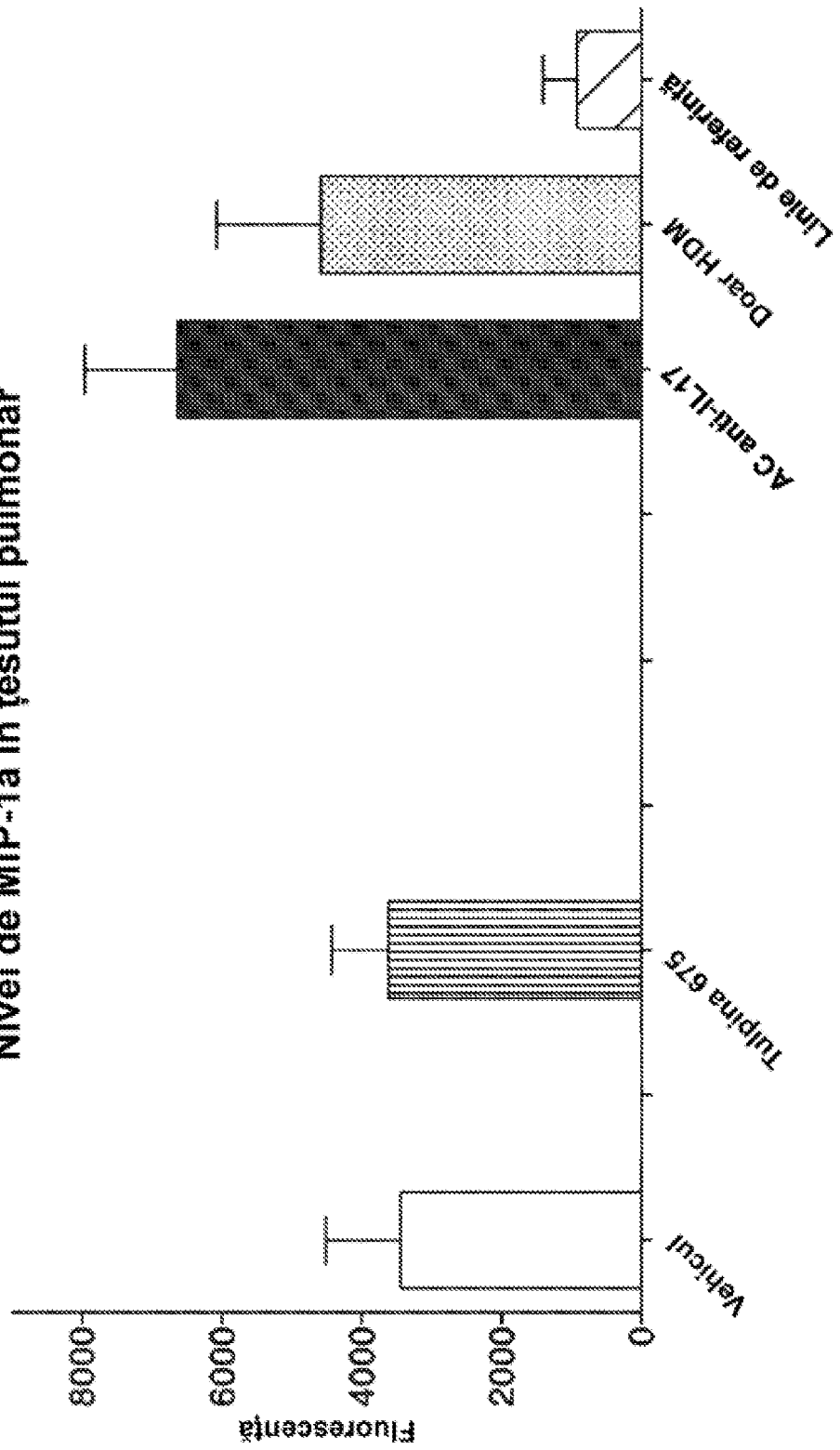
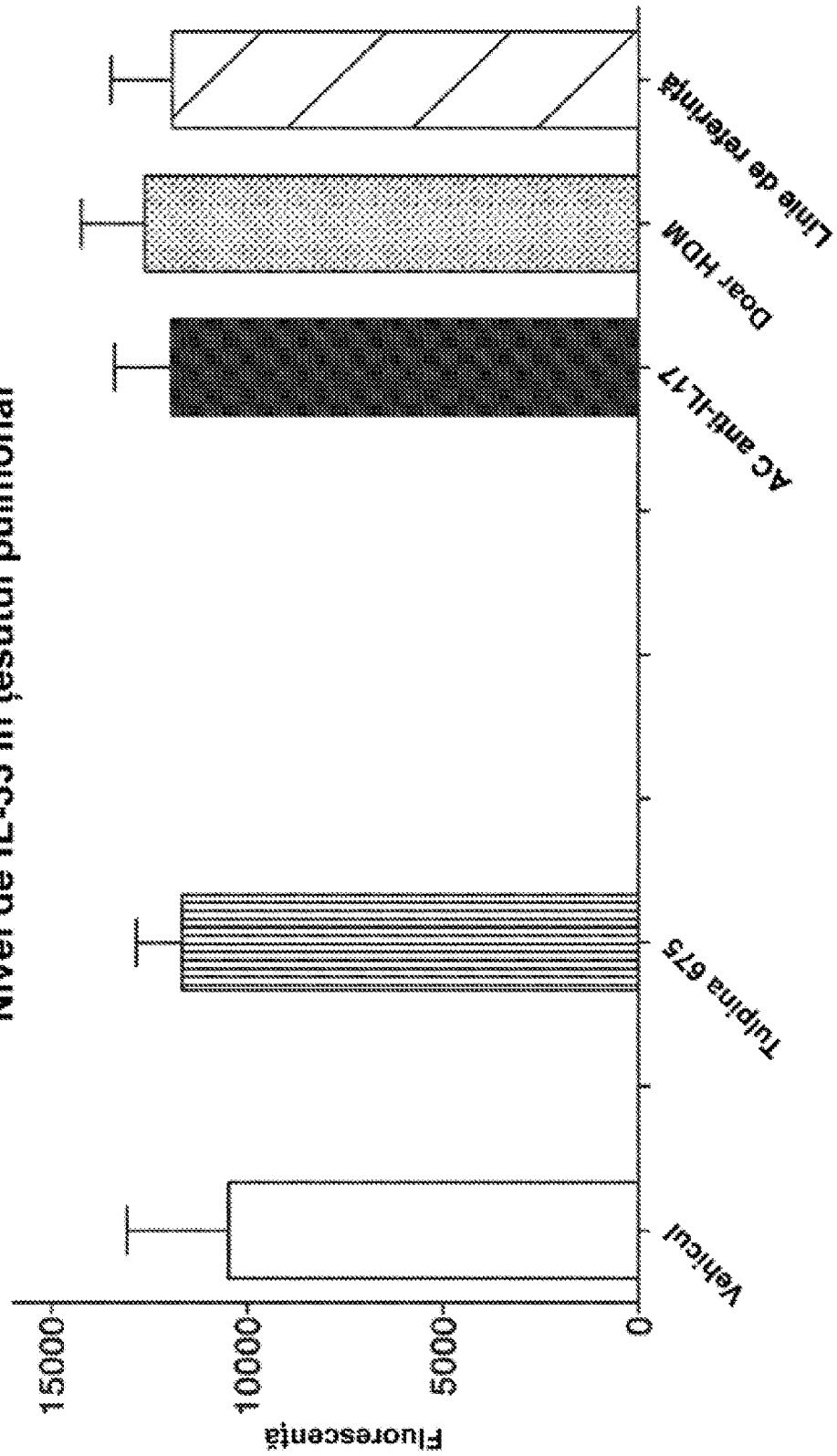


FIG. 63

Nivel de MIP-1a în țesutul pulmonar



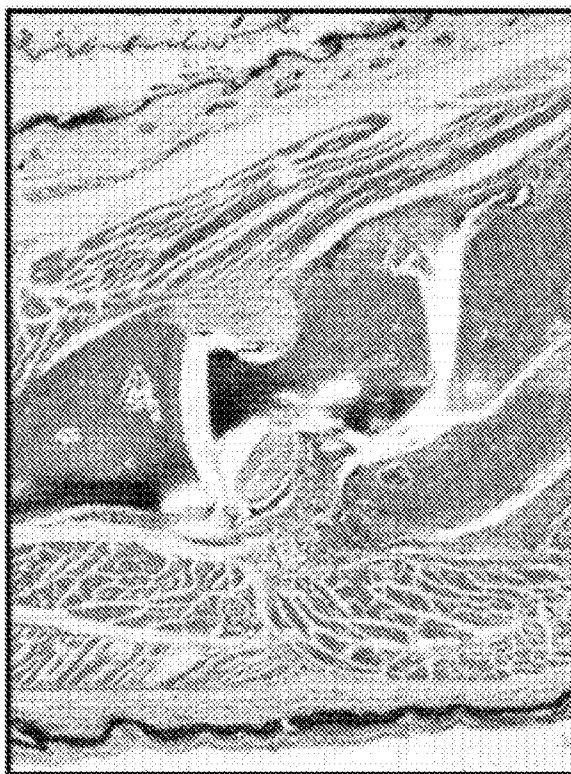
**FIG. 64**  
**Nivel de IL-33 în țesutul pulmonar**



**FIG. 65**  
Model vizual pentru evaluarea histopatologică

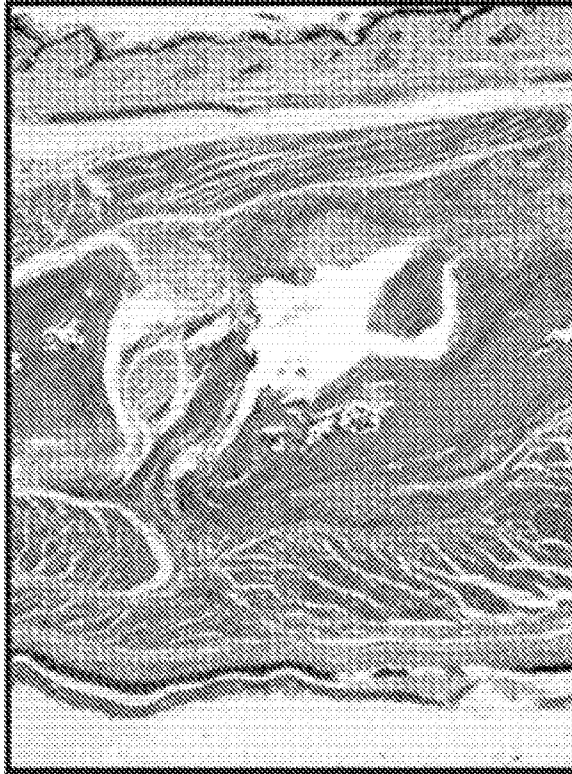


Gradul 0



Gradul 1

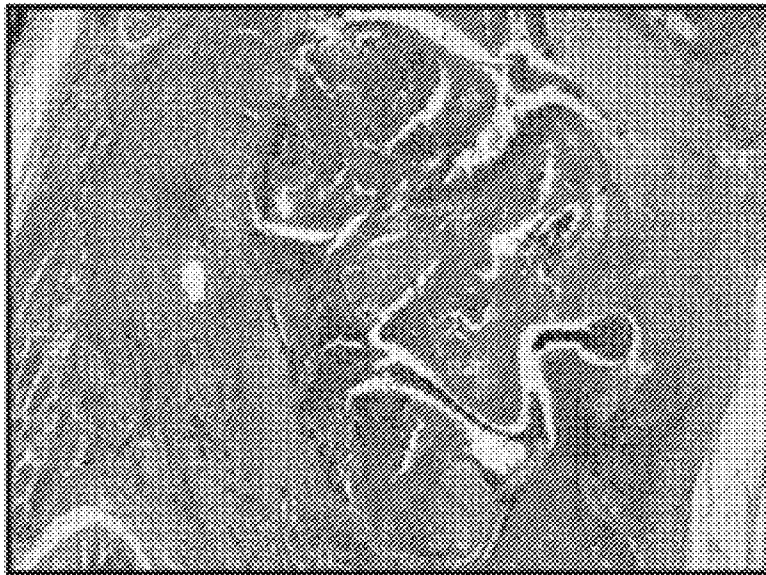
FIG. 65(cont.)



Gradul 4



Gradul 7



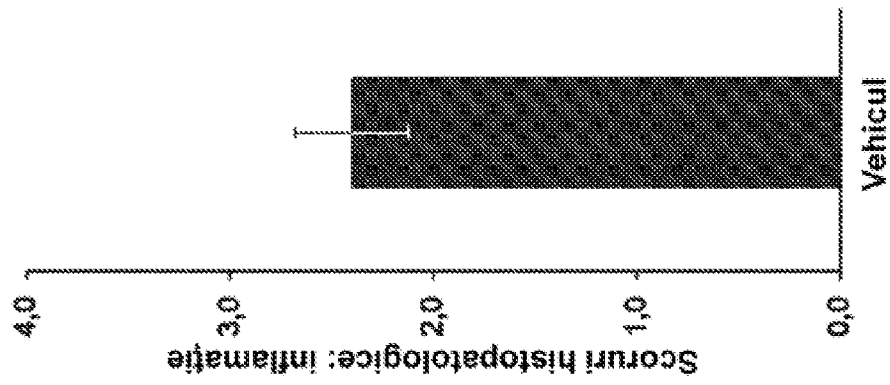
Gradul 9

**FIG. 65**(cont.)



**FIG. 66**

Histopatologie: Scoruri ale inflamației

**FIG. 67**

Histopatologie: Scoruri ale cartilajului

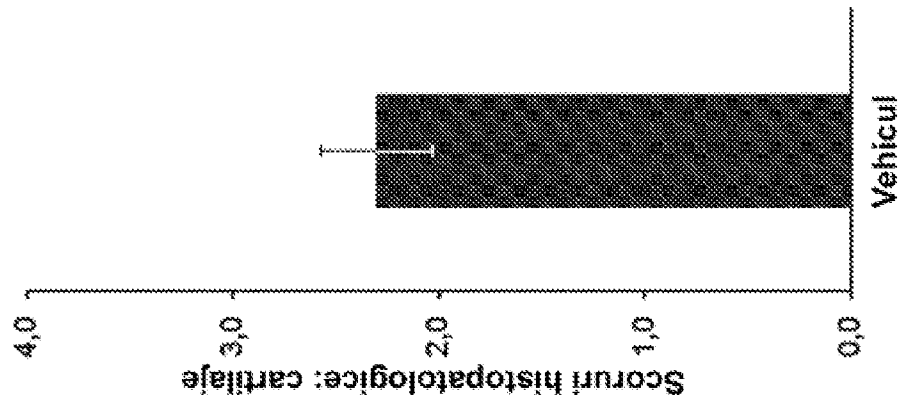


FIG. 68

Histopatologie: Scoruri ale oaselor

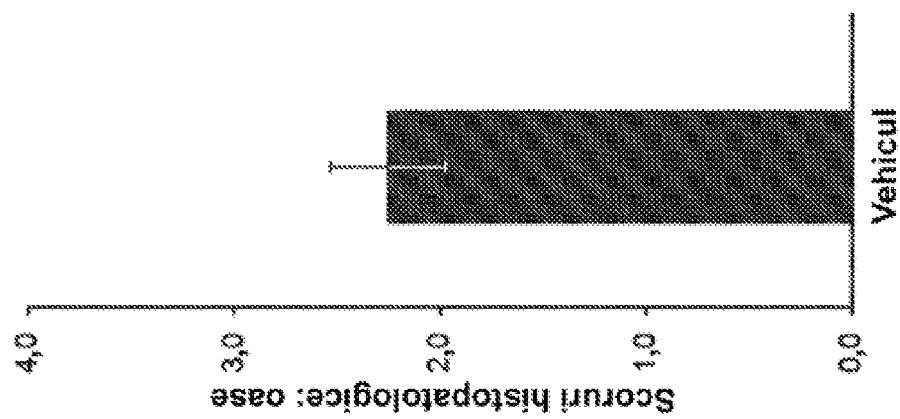
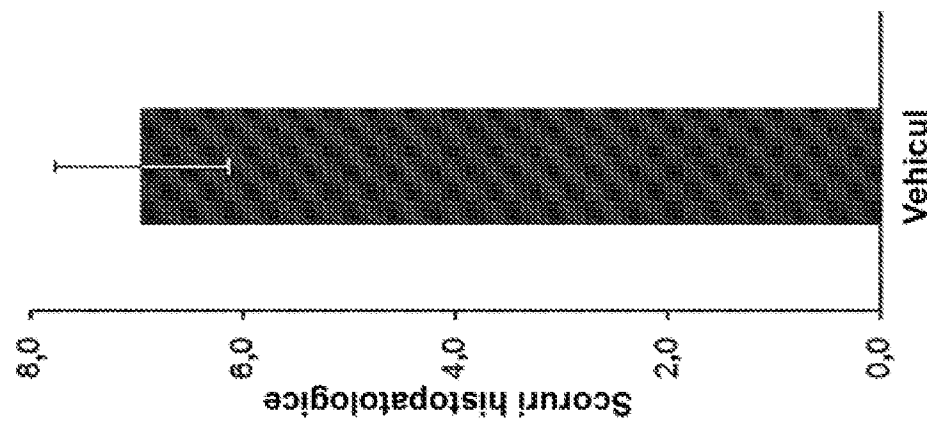
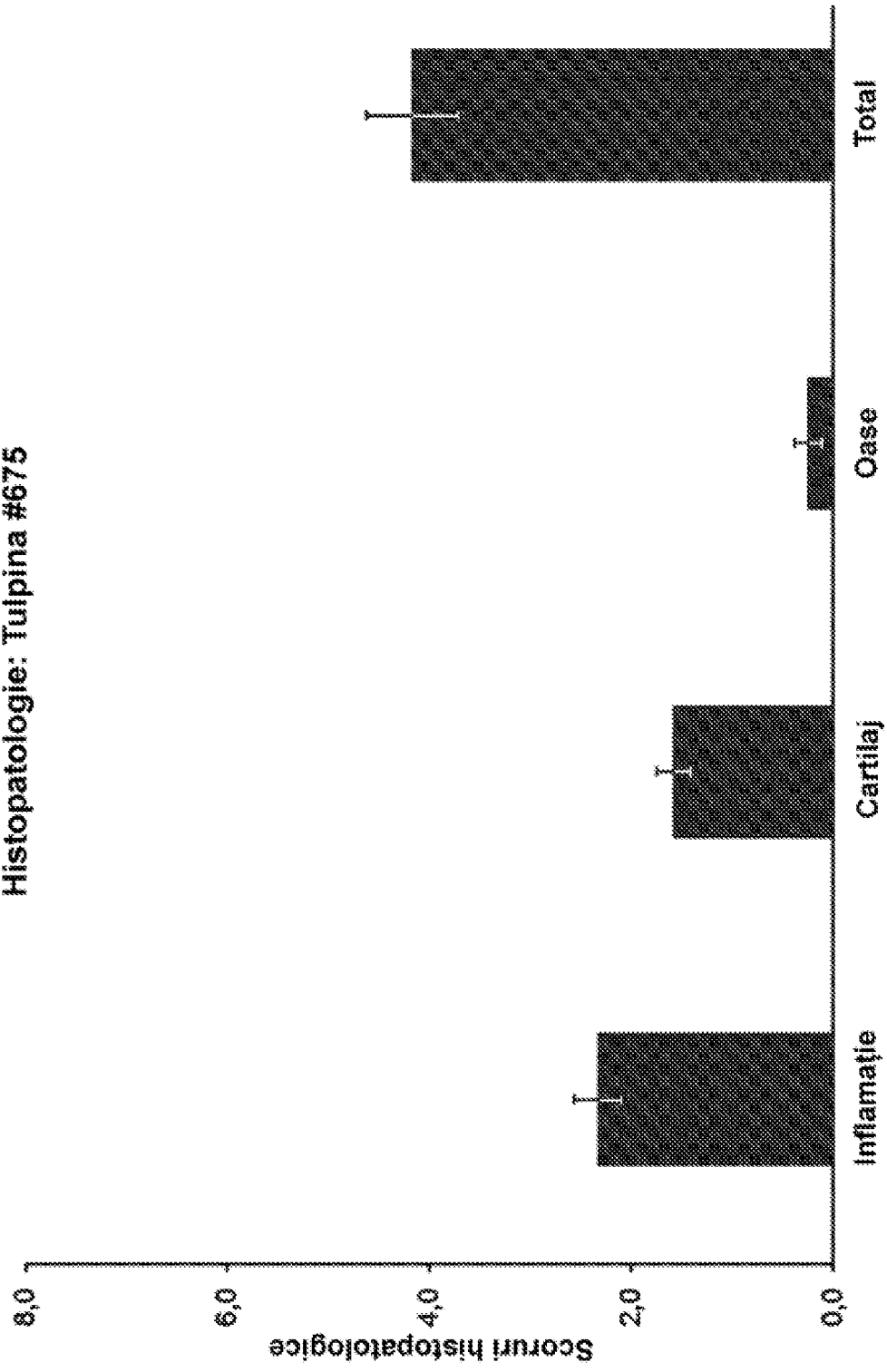


FIG. 69

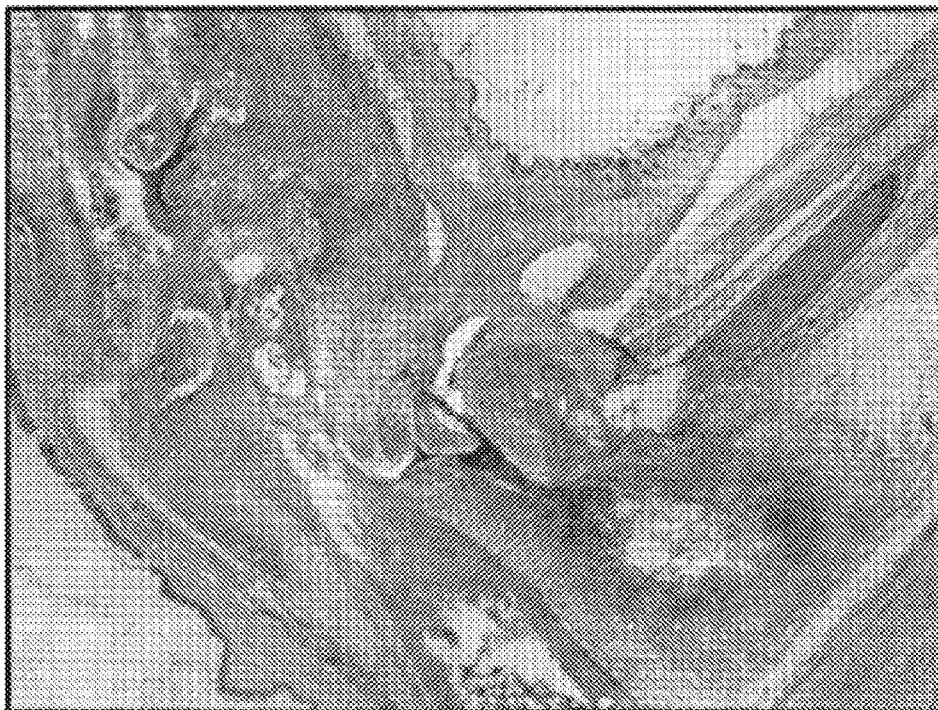
Histopatologie: Scoruri totale



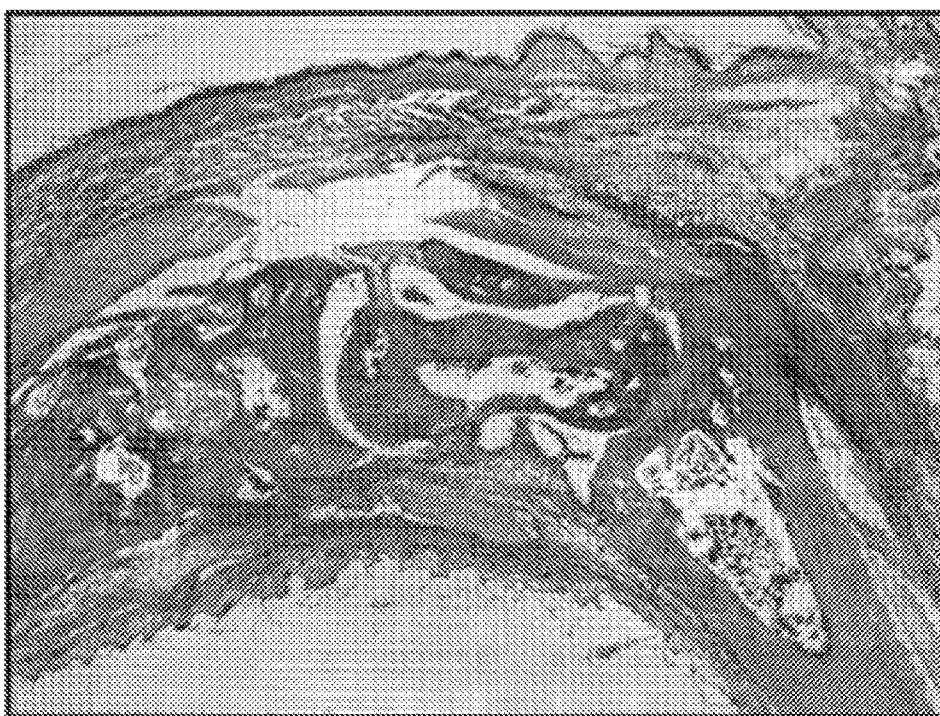
**FIG. 70**  
Histopatologie: Tulpina #675



**FIG. 71**



Vehicul (#1,11 R, Gradul 9)



Tulpina #675 (#4,9 L, Gradul 5)

FIG. 72

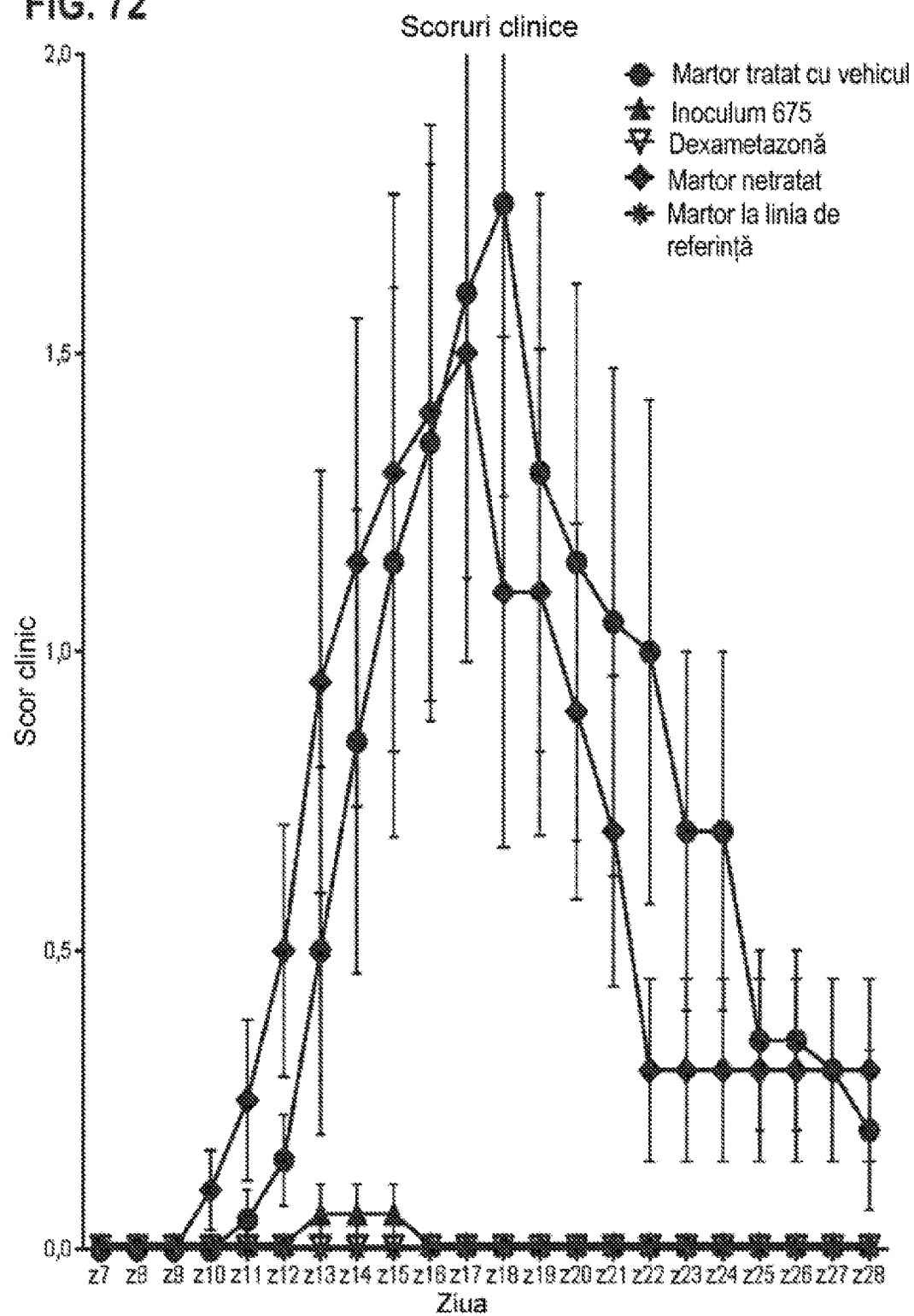


FIG. 73

