



MD/EP 3206700 T2 2019.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3206700 (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

(21) Numărul de depozit: e 2017 0061 (22) Data de depozit: 2016.06.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16731268.5, 2016.06.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3206700, 2019.06.05 (31) Numărul cererii prioritare: 201510467; 201520501 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.15; 2015.11.20 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 23/2019, 2019.06.05 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2017, 2017.09.30
(71) Solicitant: 4D Pharma Research Limited, GB (72) Inventatori: GRANT George, GB; PATTERSON Angela Margaret, GB; MULDER Imke, GB; MCCLUSKEY Seanin, GB; RAFTIS Emma, GB (73) Titular: 4D Pharma Research Limited, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții conținând tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

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

2
Secvențe: 1
Revendicări: 10
Figuri: 81

MD/EP 3206700 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: 1

Claims: 10

Fig.: 81

2

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

- 5 Această invenție se referă la compoziții conținând tulpini bacteriene izolate din tractul digestiv al mamiferelor și utilizarea unor astfel de compoziții în tratamentul bolii.

BAZELE INVENȚIEI

- 10 Se crede că intestinul uman este steril *in utero*, dar este expus la o mare varietate de microbi materni și de mediu imediat după naștere. Apoi, apare o perioadă dinamică de colonizare și succesiune microbiană, care este influențată de factori precum modul de administrare, mediul, dieta și genotipul gazdei, toate acestea având impact asupra compoziției microbiotei intestinale, în special în timpul vieții timpurii. Ulterior, microbiota se stabilizează și devine similară adulților [1]. Microbiota intestinală umană conține mai mult de 500–1000 de filozofi diferiți aparținând în principal două diviziuni bacteriene majore, Bacteroidetes și Firmicutes [2]. Relațiile de succes simbiotice care decurg din colonizarea bacteriană a intestinului uman au conferit o mare varietate de funcții metabolice, structurale, de protecție și alte beneficii. Activitățile metabolice îmbunătățite ale intestinului colonizat asigură faptul că, în caz contrar, componentele dietetice nedigerabile sunt degradate prin eliberarea de subproduse care asigură o sursă importantă de nutrienți pentru gazdă. În mod similar, importanța imunologică a microbiotei intestinale este bine recunoscută și este exemplificată în cazul animalelor fără germeni care au un sistem imunitar afectat care este reconstituit funcțional după introducerea bacteriilor comensale [3–5].

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

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

- 35 KR 2010 0129168 descrie tulpinile bacteriene izolate din materiile fecale de la sugari care pot produce acid linoleic conjugat.

- WO 2015/012936 descrie o formulă probiotică și efectele acesteia asupra creșterii carcinomului hepatocelular.

- 40 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 poată fi dezvoltate noi terapii care utilizează bacterii intestinale.

REZUMATUL INVENȚIEI

- 45 Invenția furnizează o compoziție cuprinzând o bacterie viabilă depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau o bacterie viabilă care are o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului.

- 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 stărilor mediate de IL-17 sau calea Th17. În particular, inventatorii au identificat o nouă tulpină bacteriană care este eficientă pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum se descrie în exemple, administrarea orală a compozițiilor care conțin bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate reduce severitatea răspunsului inflamator, incluzând răspunsul inflamator Th17, în modelele de șoarece ale astmului, artritei reumatoide și sclerozei multiple. Așa cum se descrie de asemenea în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate reduce dimensiunea tumorii în modelele de șoarece ale cancerului care pot fi asociate cu răspunsul inflamator Th17.

Inventatorii au identificat că tratamentul cu astfel de tulpini bacteriene poate reduce nivelurile de citokine care fac parte din calea Th17, incluzând IL-17, poate ameliora răspunsul

inflamator Th17 și poate oferi beneficii clinice în modelele de șoareci ale bolilor inflamatorii și autoimmune mediate de către IL-17 și calea Th17.

5 În aplicații particulare, dezvoltarea oferă o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau condiții selectate din grupul constând din: scleroză multiplă; artrită, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriatică sau artrita juvenilă idiopatică; neuromielită optică (boala Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus eritematos sistemic; bolile inflamatorii ale intestinului, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boală celiacă; astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); cancer, cum ar fi cancerul mamar, cancerul de colon, cancerul pulmonar sau cancerul ovarian; uveită; sclerită; vasculită; boala lui Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și rejet de alogrefă. Efectul prezentat pentru bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 asupra răspunsului inflamator Th17 poate oferi beneficii terapeutice pentru bolile și stările mediate de către IL-17 și calea Th17, cum ar fi cele enumerate mai sus.

15 Descrierea furnizează o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofil sau astmul alergic. Inventatorii au identificat faptul că tratamentul cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate reduce recrutarea neutrofilelor și a eozinofilelor în plămâni, ceea ce poate ajuta la tratarea sau prevenirea astmului. Mai mult, inventatorii au testat și demonstrat eficacitatea bacteriei depozitate sub numărul de acces NCIMB 42380 în modelele de șoareci ale astmului. În anumite aplicații, compoziția descrisă aici este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a astmului neutrofil sau a astmului eozinofilic. Efectul prezentat pentru compozițiile descrise aici asupra neutrofilelor și eozinofilelor înseamnă că ele pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea sau prevenirea astmului neutrofil și a astmului eozinofil. Într-adevăr, în anumite aplicații, compoziția descrisă aici este utilizată într-o metodă de reducere a răspunsului inflamator neutrofil în tratamentul sau prevenirea astmului sau compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a unui răspuns inflamator eozinofilic în tratamentul sau prevenirea astmului. In anumite aplicații, dezvoltarea oferă o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare în tratamentul astmului. În aplicațiile preferate în mod special, dezvoltarea furnizează o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380, pentru utilizare în tratamentul astmului, în special a astmului neutrofil. Bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 se dovedește a avea un efect deosebit de pronunțat asupra neutrofilelor în modelele de astm și tratamentul cu această bacterie poate fi deosebit de eficient pentru tratarea astmului neutrofil.

35 În alte aplicații preferate, dezvoltarea furnizează o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a artritei reumatoide. Inventatorii au identificat faptul că tratamentul cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate oferi beneficii clinice într-un model de șoareci al artritei reumatoide și poate reduce umflarea articulațiilor. În aplicațiile preferate, descrierea furnizează o compoziție care cuprinde bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare în tratamentul artritei reumatoide. Compozițiile care utilizează bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea artritei reumatoide.

45 În alte aplicații preferate, descrierea furnizează o compoziție cuprinzând bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a sclerozei multiple. Inventatorii au identificat faptul că tratamentul cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate reduce incidența bolii și severitatea bolii într-un model de șoareci al sclerozei multiple. În aplicațiile preferate, descrierea furnizează o compoziție cuprinzând bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare în tratamentul sclerozei multiple. Compozițiile care utilizează bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 pot fi deosebit de eficiente pentru tratarea sclerozei multiple.

55 Așa cum s-a menționat mai sus, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o bacterie viabilă depozitată sub numărul de acces NCIMB 42380 sau o bacterie viabilă care are o secvență ARNr 16s care este identică cel puțin 98% cu SEQ ID NO: 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului, cum ar fi cancerul mamar, de plămâni sau ficat. Inventatorii au identificat faptul că tratamentul cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate reduce creșterea tumorilor în modelele de șoareci, plămân și ficat. În anumite aplicații, compoziția

este destinată utilizării într-o metodă de reducere a mărimii tumorii sau de prevenire a creșterii tumorii în tratamentul cancerului.

In anumite aplicații, compozițiile din descriere sunt pentru utilizare într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulei Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau stări mediate de către IL-17 sau de calea Th17. In particular, compozițiile din descriere pot fi utilizate pentru reducerea producției de IL-17 sau pentru reducerea diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple sau a astmului, artritei reumatoide, sclerozei multiple, cancerului sau uveitei. De preferință, descrierea furnizează compoziții care cuprind bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia, pentru utilizare în reducerea producției IL-17 sau reducerea diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, artritei reumatoide sau sclerozei multiple. Descoperirea oferă, de asemenea, compoziții care cuprind bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip a acesteia, pentru utilizare în reducerea producției IL-17 sau reducerea diferențierii celulei Th17 în tratamentul sau prevenirea cancerului.

In anumite aplicații, compoziția este destinată utilizării la un pacient cu niveluri ridicate de IL-17 sau celule Th17. Efectul asupra răspunsului inflamator Th17 prezentat pentru bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate fi deosebit de benefic pentru astfel de pacienți.

In aplicațiile preferate ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este bacteria depozitată sub numărul de acces NCIMB 42380. Se pot folosi de asemenea și tulpini bacteriene biotipice, cum ar fi tulpini bacteriene care au o secvență de ARNr 16s care este cel puțin 98%, 99% 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are secvența ARNr 16s reprezentată prin SEQ ID NO: 1.

In anumite aplicații, compoziția invenției este pentru administrare orală. Administrarea orală a tulpinilor descrise aici poate fi eficace pentru tratarea bolilor și a condițiilor mediate de IL-17 sau Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă pentru pacienți și practicieni și permite administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

In anumite aplicații, compoziția conform invenției cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic.

In 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 permite eliberarea de bacterii.

In anumite aplicații, invenția furnizează un produs alimentar cuprinzând compoziția așa cum s-a descris mai sus.

In anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție de vaccin cuprinzând compoziția așa cum s-a descris mai sus.

In dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă pentru terapie. Bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 este dovedită ca fiind eficace pentru tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul și scleroza multiplă. De aceea, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții cuprinzând astfel de celule sau culturi biologice pure ale unor astfel de celule. Invenția furnizează de asemenea o celulă a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici. Bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 este, de asemenea, dovedită a fi eficace pentru tratarea cancerului.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — numărul total al celulelor BAL.

Figura 2: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — numărul total de eozinofile în BALF.

Figura 3: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — proporția eozinofilelor în BALF.

Figura 4: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — numărul total de macrofage în BALF.

Figura 5: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — proporția de macrofage în BALF.

Figura 6: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — numărul total de neutrofile în BALF.

Figura 7: Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — proporția de neutrofile în BALF.

- Figura 8:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — numărul total de limfocite în BALF.
- Figura 9:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — proporția de limfocite în BALF.
- 5 **Figura 10:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — numărul total al celulelor BAL.
- Figura 11:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — numărul total de eozinofile în BALF.
- 10 **Figura 12:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — proporția de eozinofile în BALF.
- Figura 13:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — numărul total de macrofage în BALF.
- Figura 14:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — proporția de macrofage în BALF.
- 15 **Figura 15:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — numărul total de neutrofile în BALF.
- Figura 16:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — ponderea neutrofilelor în BALF.
- 20 **Figura 17:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — numărul total de limfocite în BALF.
- Figura 18:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — proporția de limfocite în BALF.
- Figura 19:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — greutate corporală, zilele -14 până la 0. Datele sunt prezentate ca procente medii $\pm$ ESM din greutatea corporală inițială (ziua -14). Semnificația statistică: $\blacktriangle$ $p < 0,05$ și $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,0001$ atunci când este comparată cu grupul tratat cu vehicul.
- 25 **Figura 20:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — greutate corporală, zilele 0 până la 42. Datele sunt prezentate ca procente medii $\pm$ ESM din greutatea corporală inițială (Ziua 0). $\blacktriangle$ $p < 0,05$, $\blacklozenge$ $p < 0,05$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$ $p < 0,001$, $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0,0001$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.
- 30 **Figura 21:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — scoruri clinice. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. **** $p < 0,0001$ în comparație cu ziua 21 în grupul tratat cu vehicul. $\blacklozenge$, O $p < 0,05$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul într-o anumită zi.
- Figura 22:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — răspunsul proliferativ al splenocitelor la colagenul II. Suprafața media a fost scăzută [CII-stimulat –medie de fundal], numărătoare pe minut, pe baza încorporării 3H-TdR. Toate datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. ** $p < 0,01$ comparativ cu grupul tratat cu vehicul.
- 35 **Figura 23:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — nivelurile de IFN γ în supernatanții de cultură tisulară. Linile reprezintă valorile mediane ale grupului.
- Figura 24:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — nivelurile de IL-17A în supernatanții de cultură tisulară. Linile reprezintă valorile mediane ale grupului.
- 40 **Figura 25:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — nivelurile de IL-10 în supernatanții de cultură tisulară. Linile reprezintă valorile mediane ale grupului.
- Figura 26:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — nivelurile de IL-6 în supernatanții de cultură tisulară. Linile reprezintă valorile mediane ale grupului.
- 45 **Figura 27:** Sistemul de notare al histopatologiei.
- Figura 28:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — IgE serică totală.
- Figura 29:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — IgG1 serică specifică HDM
- 50 **Figura 30:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — IgE totală în BALF
- Figura 31:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — IgG1 serică specifică HDM în BALF
- 55 **Figura 32:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — analiză histologică — scorul mediu al infiltrării peribronhiolare.
- Figura 33:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — analiză histologică — scorul mediu al infiltrării perivascularare.
- Figura 34:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — analiză histologică — scorul mediu inflamator (media ambelor scoruri de infiltrare peribronhiolară și perivasculară).
- 60

- Figura 35:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — analiză histologică — scorul mucusului.
- Figura 36:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-9 în țesutul pulmonar.
- 5 **Figura 37:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-1a în țesutul pulmonar.
- Figura 38:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IFN γ în țesutul pulmonar.
- 10 **Figura 39:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-17A în țesutul pulmonar.
- Figura 40:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-4 în țesutul pulmonar.
- Figura 41:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-5 în țesutul pulmonar.
- 15 **Figura 42:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul IL-1b în țesutul pulmonar.
- Figura 43:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul RANTES în țesutul pulmonar.
- Figura 44:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul MIP-1a din țesutul pulmonar.
- 20 **Figura 45:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul KC în țesutul pulmonar.
- Figura 46:** Modelul de șoarece pentru astmul indus de acarieni din praful de casă — nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar.
- 25 **Figura 47:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — IgG1 serică specifică HDM.
- Figura 48:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — IgG2a serică specifică HDM.
- Figura 49:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — IgG1 specifică HDM în BALF.
- 30 **Figura 50:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — IgG2a specifică HDM în BALF.
- Figura 51:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — analiză histologică – scorul mediu al infiltrării peribronhiolare.
- Figura 52:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — analiză histologică – scorul mediu al infiltrării perivascularare.
- 35 **Figura 53:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — analiză histologică – scorul mediu inflamator (media ambelor scoruri de infiltrare peribronhiolară și perivasculară).
- Figura 54:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul TNF α în țesutul pulmonar.
- 40 **Figura 55:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IL-1a în țesutul pulmonar.
- Figura 56:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IFN γ în țesutul pulmonar.
- Figura 57:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IL-17F în țesutul pulmonar.
- 45 **Figura 58:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IL-1b în țesutul pulmonar.
- Figura 59:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul RANTES în țesutul pulmonar.
- Figura 60:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar.
- 50 **Figura 61:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul KC în țesutul pulmonar.
- Figura 62:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IL-17A în țesutul pulmonar.
- 55 **Figura 63:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar.
- Figura 64:** Modelul de șoarece pentru astmul sever cu neutrofile — nivelul IL-33 în țesutul pulmonar.
- 60 **Figura 65:** Modelul modelul vizual pentru scorurile histopatologice. Imagini reprezentative care prezintă scoruri compuse din articulațiile tarsiale ale șoarecelui într-un studiu de artrită indusă cu colagen.

Figura 66: Modelul de șoarece al artritei reumatoide — histopatologie: scorurile inflamației. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. ** $p < 0,01$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 67: Modelul de șoarece al artritei reumatoide — histopatologie: scorurile cartilajelor. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. *** $p < 0,001$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

5 **Figura 68:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — histopatologie: scorurile osoase. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. *** $p < 0,001$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

Figura 69: Modelul de șoarece al artritei reumatoide — histopatologie: scorurile totale. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ ESM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ în comparație cu grupul tratat cu vehicul.

10 **Figura 70:** Modelul de șoarece al artritei reumatoide — histopatologie: imagini reprezentative. ID-ul animalului (#n.n) și membrul (R pentru cel drept, L pentru cel stâng) sunt indicate între paranteze. Imaginea din stânga sus (vehicul): distrugerea extensivă a articulațiilor și a osului cu inflamație și fibroză, care se extinde până la țesuturile moi peri-articulare.

Figura 71: Modelul de șoarece al sclerozei multiple — scor clinic.

15 **Figura 72:** Modelul de șoarece al sclerozei multiple — incidența bolii.

Figura 73: Modelul de șoarece al cancerului mamar — volumul tumorii.

Figura 74: Modelul de șoarece al cancerului pulmonar — volumul tumorii.

Figura 75: Modelul de șoarece al cancerului hepatic — greutatea ficatului.

Figura 76: Atașarea tulpinilor tip de MRX004 și *B. breve* de celulele umane.

20 **Figura 77:** Test de producție de exopolizaharide.

Figura 78: Producția de exopolizaharide legate și eliberate de către MRX004.

Figura 79: Atașarea MRX004 la celulele Caco-2.

Figura 80: Profil rapid ID 32 A al MRX004 singur (A) și în comparație cu *B. breve* (B). Alb = reacție negativă (fără schimbare de culoare), hașurare descrescătoare = reacție intermediară pozitivă (schimbare de culoare slabă) și negru = reacție pozitivă (schimbare de culoare corespunzătoare puternică).

25 **Figura 81:** Analiza API® 50 CH a MRX004. Hașurare crescătoare = reacție negativă (fără schimbare de culoare), hașurare descrescătoare = reacție pozitivă intermediară (modificare slabă a culorii), negru = reacție pozitivă (schimbare de culoare corespunzătoare puternică) și alb = reacție îndoielnică (schimbare neașteptată a culorii).

30 DESCRIEREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile conform invenției cuprind o bacterie viabilă depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau o bacterie viabilă care are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 1. Exemplele demonstrează că astfel de bacterii sunt utile pentru tratarea sau prevenind bolile și afecțiunile mediate de către IL-17 sau de către calea Th17. Exemplele demonstrează de asemenea că astfel de bacterii sunt utile pentru tratarea sau prevenirea cancerului. Tulpina bacteriană preferată este bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380.

40 Bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 a fost testată în Exemple și este de asemenea menționată aici ca tulpina 751 sau MRX004. O secvență parțială ARNr 16S pentru tulpina 751 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 1. Tulpina 751 a fost depusă la autoritatea internațională de depozitare NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către GT Biologics Ltd. (Life Sciences Building Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) la data de 12 martie 2015, numărul NCIMB 42380. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

O secvență genomică pentru tulpina 751 este furnizată în SEQ ID NO: 2 în lista de secvențe publicată împreună cu WO 2016/203223.

Este, de asemenea, de așteptat ca tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 să fie eficace pentru tratarea sau prevenirea bolilor și stărilor mediate de către IL-17 sau de către calea Th17. Este, de asemenea, de așteptat ca tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depozitate sub numărul de acces NCIMB 42380 să fie eficace pentru tratarea sau prevenirea cancerului. Un biotip este o tulpină strâns asociată, care are aceleași caracteristici fiziologice sau biochimice similare sau foarte asemănătoare.

55 În anumite aplicații, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1. De preferință, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are secvența ARNr 16s reprezentată prin SEQ ID NO: 1.

În mod alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 și cele descrise aici pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotide pentru bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380. De exemplu, genomul întreg poate fi secvențializat și o tulpină de biotip descrise aici poate avea identitate de secvență de cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% în cel puțin 80% din întregul său genom (de exemplu în

cel puțin 85%, 90%, 95% sau 99% sau din întregul său genomă). Alte secvențe adecvate pentru utilizarea în identificarea tulpinilor de biotip pot include secvențe hsp60 sau repetitive cum ar fi BOX, ERIC, (GTG) sau REP sau [16]. Tulpinile de biotip pot avea secvențe având o identitate de secvență de cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% față de secvența corespunzătoare a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un genom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223. În cazul preferat, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un genom cu identitate de secvență de cel puțin 90% (de exemplu cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate) cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe 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: 2 din WO 2016/203223. De exemplu, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție poate avea un genom cu identitate de secvență de cel puțin 90% față de SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 70% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 80% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 90% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime de 100% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 70% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 80% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 90% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime de 100% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau identitate de secvență de cel puțin 98% față de SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 70% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau identitate de secvență de cel puțin 98% față de SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 80% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau identitate de secvență de cel puțin 98% față de SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime mai mare de 90% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223, sau identitate de secvență de cel puțin 98% față de SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223 pe o lungime de 100% din SEQ ID NO: 2 din WO 2016/203223.

În mod alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depozitate sub numărul de acces NCIMB 42380 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate utilizând numărul de înregistrare NCIMB 42380 și analiza fragmentului de restricție și/sau analiza PCR, de exemplu utilizând polimorfismul lungimii fragmentelor fluorescente amplificate (FAFLP) și amprentarea repetitivă (rep)-PCR a elementului de ADN, sau profilarea proteinelor sau secvențierea parțială a ADN-ului 16S sau 23S. În aplicațiile preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica tulpini de aceeași specie ca bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380.

În anumite aplicații, tulpinile care sunt biotipuri ale bacteriei depozitate sub numărul de acces NCIMB 42380 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpinile care furnizează același model ca bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 atunci când sunt analizate prin analiză de restricție a ADN-ului ribozomal amplificat (ARDRA), de exemplu atunci când se utilizează enzime de restricție Sau3AI (pentru metodele exemplificative și indicații *vedi*, de exemplu, [17]). În mod alternativ, tulpinile de biotip sunt identificate ca tulpini care au aceleași modele de fermentație a carbohidraților ca bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380.

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 și care sunt utile în compozițiile și metodele conform invenției pot fi identificate utilizând orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv testele descrise în exemple. De exemplu, biotipurile pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin cultivarea anaerobă în YCFA și/sau prin administrarea bacteriilor la modelul de șoarece al artritei induse de collagen de tip II și apoi evaluarea nivelurilor de citokină. În particular, tulpinile bacteriene care au tipare de creștere similare, tip metabolic și/sau antigeni de suprafață la bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 pot fi utile în invenție. O tulpină de biotip va avea activitate modulatorie imunitară comparabilă cu tulpina NCIMB 42380. În particular, o tulpină de biotip va determina efecte comparabile asupra modelelor de astm, artrită, scleroză multiplă și boli de cancer și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine cu efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea protocoalelor de cultură și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în mod special conform invenției este bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380. Aceasta este tulpina exemplară 751 testată în exemple și arătată a fi eficace pentru tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, a

bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380. Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție cuprinzând o celulă a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380. Invenția furnizează, de asemenea, o cultură biologic pură de bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42380. Invenția furnizează de asemenea o celulă a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB

5 42380 pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

Un derivat al bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 poate fi o tulpină fiică (descendentă) sau o tulpină cultivată (subclonată) din original. Un derivat al unei tulpini conform descrierii poate fi modificat, de exemplu, la nivel genetic, fără a elimina activitatea biologică. În particular, o tulpină derivată conform descrierii este activă din punct de vedere

10 terapeutic. O tulpină derivată va avea activitate modulatorie imunitară comparabilă cu cea a tulpinii NCIMB 42380. În particular, o tulpină derivată va provoca efecte comparabile asupra modelelor de astm, artrită, scleroză multiplă și boli de cancer și aceleași efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine față de efectele prezentate în Exemple, care pot fi identificate prin utilizarea proto-

15 coalelor de cultură și administrare descrise în Exemplele. Un derivat al tulpinii NCIMB 42380 va fi, în general, un biotip al tulpinii NCIMB 42380.

Referințele la celulele bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380 cuprind orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și eficacitate terapeutică ca tulpina depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 și astfel de celule sunt cuprinse în invenție.

Tulpinile bacteriene din compozițiile conform invenției sunt viabile și capabile să

20 colonizeze parțial sau total intestinul.

În anumite aplicații, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o aderență scăzută la celulele epiteliale intestinale umane, în special la celulele Caco-2. Într-o aplicație preferată, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție are o aderență scăzută la celulele epiteliale intestinale umane, în special la celulele Caco-2, în YCFA comparativ cu *Bifidobacteria*, în special *B. breve*. În

25 anumite aplicații, tulpina bacteriană utilizată în invenție prezintă aderență mai mică de 1% din cultura totală, de preferință mai mică de 0,5% sau mai mică de 0,3%, atunci când este testată în condițiile descrise în Exemplul 12.

În anumite aplicații, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenție produce exopolizaharide, de exemplu în care exopolizaharidele sunt legate la suprafața extracelulară a tulpinii bacteriene. În anumite aplicații, producerea de exopolizaharide legate mărește aderența tulpinii bacteriene pentru utilizare în invenție la mucus sau la suprafața celulelor epiteliale, de exemplu celulele epiteliale intestinale umane. Într-o aplicație preferată, tulpina bacteriană utilizată în invenție produce mai multe exopolizaharide de suprafață legate în comparație cu *Bifidobacteria*,

30 în special *B. breve*.

Într-o aplicație preferată, tulpina bacteriană utilizată în invenție are atât aderență scăzută la celulele epiteliale intestinale umane, în special celule Caco-2, în YCFA comparativ cu *Bifidobacteria*, în special *B. breve* (cum ar fi aderența a mai puțin de 1% din cultura totală, cum ar fi, de preferință, mai puțin de 0,5% sau mai mică de 0,3%, atunci când este testată în condițiile descrise în Exemplul 12) și produce mai multe exopolizaharide de suprafață legate, comparativ cu

35 *Bifidobacteria*, în special *B. breve*.

În anumite aplicații preferate, tulpina bacteriană utilizată în invenție este capabilă să fermenteze polizaharida rafinoză, de exemplu atunci când este cultivată într-un mediu de suspensie adecvat (cum ar fi mediul de suspensie API) la temperatura de 37°C timp de 4 ore.

În anumite aplicații, tulpina bacteriană utilizată în invenție are capacitate redusă de a

45 ferma α -glucozidază și/sau β -glucozidază comparativ cu *Bifidobacteria*, în special *B. breve*, de exemplu atunci când sunt cultivate într-un mediu de suspensie adecvat (cum ar fi mediul de suspensie API) la temperatura de 37°C timp de 4 ore.

În anumite aplicații, tulpina bacteriană dezvăluită aici cuprinde una sau mai multe dintre genele enumerate în Tabelul 1, cum ar fi 5, 10, 20, 50 sau toate genele din Tabelul 1. În anumite

50 aplicații, tulpina bacteriană descrisă aici cuprinde una sau mai multe dintre genele enumerate în Tabelul 1 care sunt evidențiate cu sublinieri simple, cum ar fi componenta transmembranară BL0694 a modulului de energizare a transportorului ECF prezis și/sau componenta ATPază duplicată BL0693 a modulului de energizare a transportorului ECF prezis. În anumite aplicații, tulpina bacteriană dezvăluită aici cuprinde una sau mai multe dintre genele enumerate în Tabelul 1

55 care sunt evidențiate cu sublinieri duble și cu caractere îngroșate cum ar fi 1, 2, 3, 4 sau 5 selectate dintre: glucozidază maltodextrină (EC 3.2.1.20), galactozidază presupusă, celuloză sintetază (formatoare de UDP) (EC 2.4.1.12), chitinază (EC 3.2.1.14) și caseta senzorială/proteina din familia GGDEF. În anumite aplicații, tulpina bacteriană dezvăluită aici cuprinde una sau mai multe

60 gene enumerate în Tabelul 1 care sunt evidențiate cu caractere înclinate, cum ar fi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 sau 9 gene selectate dintre: subunitatea PfaA a sintezei acidului gras polinesaturat omega-3,

sintaza poliketidei de tip I, glicozil hidrolaza presupusă având o funcție necunoscută (DUF1680), componenta ATPază BioM a modulului de energizare a transportorului ECF de biotină, familia E1-E2 de ATPază transportatoare de cationi, proteina permează RbsC a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1), proteina RbsA cu legare la ATP a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1), oligoribonucleaza 3'-spre-5' (orn), proteina membranară asociată cu proteina Actinobacillus (1944168).

In aplicațiile preferate, tulpina bacteriană dezvoltată aici cuprinde una sau mai multe (cum ar fi 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 sau toate) gene selectate dintre: sintaza acidului 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexen-1-carboxilic (EC 2.2.1.9); oligoribonuclează 3'-spre-5' (orn); alfa-galactozidază (EC 3.2.1.22); componenta ATPază a modulului general de energizare a transportatorilor ECF; componenta ATPază STY3233 a modulului de energizare a transportatorilor ECF reglat cu queuoizină; helicază ADN dependentă de ADP (EC 3.6.1.-); beta-glucozidază (EC 3.2.1.21); sintaza celulozică (formatoare de UDP) (EC 2.4.1.12); chitinază (EC 3.2.1.14); COG1309: regulator al transcripției; D-alanil-D-alanină carboxipeptidază (EC 3.4.16.4); componenta ATPază duplicată BL0693 a modulului de energizare a transportorului ECF prezumtiv; fructokinază (EC 2.7.1.4); GlcP simporter H⁺ al glucozei/manozei; glicoziltransferază (EC 2.4.1.-); sintaza GMP [hidrolizarea glutaminei] (EC 6.3.5.2); zahar kinază ipotetică în cluster cu indigoidina sintază indA, familia PfkB de kinaze; nucleozidă hidrolază preferând inozina-uridina (EC 3.2.2.1); proteină ribozomală LSU L31p @ proteină ribozomală LSU L31p, independentă de zinc; maltodextrină glucosidază (EC 3.2.1.20); proteină membranară, asociată cu proteina Actinobacillus (1944168); precursorul murein transglicozilazei D legat de membrană (EC 3.2.1.-); metiltransferază (EC 2.1.1.-); butanol dehidrogenază A dependent de NADH (EC 1.1.1.-); fosfoglicolat fosfatază (EC 3.1.3.18); fosforibozilantranilat izomerază (EC 5.3.1.24); glicozil hidrolaza prezumtivă având o funcție necunoscută (DUF1680); polizaharidă permează de translocare conținând ramnoză; ribokinază (EC 2.7.1.15); proteina RbsA cu legare la ATP a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1), proteina RbsA cu legare la ATP a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1), permează RbsD cu afinitate mare a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1); proteina RbsB cu legare la riboză periplasmatică a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1); proteina permează RbsC a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1); proteina permează RbsC a sistemului de transport al ribozei ABC (TC 3.A.1.2.1); sorbitol dehidrogenază (EC 1.1.1.14); proteină ribozomală SSU S14p (S29e) @ proteină ribozomală SSU S14p (S29e), independentă de zinc; componenta specifică substratului STY3230 a transportorului ECF reglat cu queuoizină; zaharoză-6-fosfat hidrolază (EC 3.2.1. B3); proteina TagH cu legare la ATP de export a acidului telchoic (EC 3.6.3.40); componentă transmembranară BL0694 a modulului de energizare a transportorului ECF prezumtiv; componentă transmembranară STY3231 a modulului de energizare a transportorului ECF reglat de către queuoizină; regulator de răspuns cu două componente colocalizat cu transportatorul HrtAB; sistemul de modificare-restricție de tip I, subunitatea ADN-metiltransferază M (EC 2.1.1.72); sistemul de modificare-restricție de tip I, subunitatea de restricție R (EC 2.1.21.3); sistemul de modificare-restricție de tip I, subunitatea de specificitate S (EC 3.1.21.3); sistemul de modificare-restricție de tip I, subunitatea de specificitate S (EC 3.1.21.3); xilitol dehidrogenază (EC 1.1.1.9); și proteina XylF cu legare la xiloza periplasmatică, a transportorului de xiloză ABC. În aplicațiile preferate, tulpina bacteriană dezvoltată aici cuprinde una sau mai multe (cum ar fi 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 sau toate) gene care sunt enumerate în propoziția precedentă și care nu sunt evidențiate în Tabelul 1.

Utilizări terapeutice

Așa cum s-a demonstrat în exemple, compozițiile bacteriene conform invenției sunt eficiente pentru reducerea răspunsului inflamator Th17. În particular, tratamentul cu compozițiile din invenție realizează o reducere a nivelurilor de IL-17A și a altor citokine ale căii Th17 și îmbunătățiri clinice în modelele animale ale stărilor mediate de către IL-17 și calea Th17. Prin urmare, compozițiile descrise aici pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune și, în particular, a bolilor sau stărilor mediate de către IL-17. În particular, compozițiile descrise aici pot fi utile pentru reducerea sau prevenirea creșterii 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 celulei Th17 și expresia IL-17 pot fi conduse de către IL-23. Aceste citokine și altele formează părți importante ale căii Th17, care este o cale bine stabilită de semnalizare inflamatorie care contribuie și stă la baza unei serii de boli inflamatorii și autoimune (așa cum se descrie, de exemplu, în [18-23]). Bolile în care se activează calea Th17 sunt bolile mediate de către calea Th17. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi ameliorate sau atenuate prin reprimarea căii Th17, care se poate realiza prin reducerea diferențierii celulelor Th17 sau o reducere a activității lor sau o reducere a nivelului de citokine din căile Th17. Bolile mediate de

către 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 [24]). Bolile mediate de către calea Th17 pot fi caracterizate prin creșterea expresiei genelor legate de Th-17, cum ar fi Stat3 sau IL-23R. Bolile mediate de către calea Th17 pot fi asociate cu niveluri crescute de celule Th17.

5 IL-17 este o citokină proinflamatoare care contribuie la patogeniza mai multor boli și condiții inflamatorii și autoimune. IL-17, așa cum este utilizat acest termen aici, se poate referi la orice membru al familiei IL-17, incluzând IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E și IL-17F. Bolile și condițiile mediate de către IL-17 sunt caracterizate de o expresie ridicată a IL-17 și/sau de
10 acumularea sau prezența de celule 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 niveluri ridicate de IL-17 sau de o creștere a nivelurilor de IL-17 și care sunt atenuate de nivelurile scăzute de IL-17 sau de o reducere a nivelurilor de IL-17. Răspunsul inflamator IL-17 poate fi local sau sistemic.

Exemple de boli și condiții care pot fi mediate de către IL-17 sau de calea Th17 includ
15 scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriazică sau artrita juvenilă idiopatică; neuromielita optică (boala Devic); spondilita anchilozantă; spondiloartrita; psoriazisul; lupusul eritematos sistemic; bolile inflamatorii ale intestinului, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boala celiacă; astmul, cum ar fi astmul alergic sau astmul neutrofil; boala pulmonară obstructivă cronică (BPOC); cancerul, cum ar fi cancerul mamar, cancerul de colon,
20 cancerul pulmonar sau cancerul ovarian; uveita; sclerita; vasculita; boala lui Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizemul; parodontita; rinita alergică; și rețetul de alogrefă. În aplicațiile preferate, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea uneia sau mai multora dintre aceste condiții sau boli. În alte aplicații preferate ale dezvăluirii, aceste stări sau boli sunt mediate de către IL-17 sau de calea Th17.

25 În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de către IL-17 sau de calea Th17. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea unei boli inflamatorii sau autoimune, în care respectivul tratament sau respectiva prevenire este obținută prin reducerea sau
30 prevenirea creșterii răspunsului inflamator Th17. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării în tratarea unui pacient având o boală inflamatorie sau autoimună, în care pacientul prezintă niveluri ridicate de IL-17 sau un număr crescut de celule Th17 sau prezintă un răspuns inflamator Th17. În anumite aplicații, pacientul poate fi diagnosticat cu o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică, sau compoziția descrisă aici poate fi utilizată pentru
35 prevenirea unei boli sau condiții inflamatorii sau autoimune care se dezvoltă într-o boală sau condiție inflamatorie sau autoimună cronică. În anumite aplicații, boala sau condiția poate să nu răspundă la tratamentul cu inhibitori ai TNF- α . Aceste utilizări ale compoziției descrise aici pot fi aplicate la oricare dintre bolile sau condițiile specifice enumerate în paragraful precedent.

IL-17 și calea Th17 sunt deseori asociate cu boli cronice inflamatorii și autoimune, astfel
40 încât compozițiile descrise aici pot fi în mod special utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor sau condițiilor cronice așa cum sunt enumerate mai sus. În anumite aplicații, compozițiile sunt destinate utilizării la pacienții cu boală cronică. În anumite aplicații, compozițiile sunt pentru utilizare în prevenirea dezvoltării bolii cronice.

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru tratarea bolilor și condițiilor mediate de
45 către IL-17 sau calea Th17 și pentru abordarea răspunsului inflamator Th17, astfel încât compozițiile descrise aici pot fi în mod special utile pentru tratarea sau prevenirea bolilor cronice, tratarea sau prevenirea bolilor la pacienți care nu au răspuns la alte terapii (cum ar fi tratamentul cu inhibitori ai TNF- α) și/sau la tratarea sau prevenirea leziunilor tisulare și a simptomelor asociate cu celulele IL-17 și Th17. De exemplu, IL-17 este cunoscută pentru că activează distrugerea
50 matricei în cartilaj și țesutul osos și IL-17 are un efect inhibitor asupra producției matricei în condrocite și osteoblaste, astfel încât compozițiile descrise aici pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea eroziunii osoase sau a deteriorării cartilajului.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției asigură o reducere sau
55 prevenire a creșterii nivelurilor de IL-17, în special nivelurilor de IL-17A. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile din invenție asigură o reducere sau previne creșterea nivelurilor IFN- γ , IL-1 β , RANTES, MIP-1a, IL-8 sau IL-6. O astfel de reducere sau prevenire a nivelurilor ridicate 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.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției furnizează un bloc de atașare la celulele umane sau invazie a acestora, de exemplu, celule epiteliale umane, de către celule patogene, de exemplu *E coli* și/sau *S. enteritidis*.

5 În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției reduce sau împiedică, de exemplu, legarea celulelor patogene *E coli* și/sau *S. enteritidis*, la celule epiteliale umane, de exemplu celule epiteliale intestinale umane.

10 În anumite aplicații, producerea și eliberarea de exopolizaharide de către tulpinile bacteriene ale compozițiilor conform invenției pot avea efecte protectoare împotriva speciilor patogene, de exemplu *E coli* și/sau *S. enteritidis*. În anumite aplicații, producerea și eliberarea de exopolizaharide de către tulpinile bacteriene ale compozițiilor din invenție pot media efectul bacteriilor asupra căii IL-17 sau Th17 și pot influența răspunsul imunitar al gazdei. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru producerea de exopolizaharide în tratamentul bolilor inflamatorii și autoimune și în particular a bolilor sau condițiilor mediate de către IL-17.

15 În anumite aplicații, aderența scăzută la celulele epiteliale intestinale umane, în particular celulele Caco-2, a tulpinilor bacteriene ale compozițiilor conform invenției poate crește efectul benefic al compozițiilor din invenție pe calea IL-17 sau Th17 și asupra bolilor mediate de către IL-17 sau calea Th17.

20 În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției asigură fermentarea crescută a rafinozei în intestin. Exemplele demonstrează că tulpinile bacteriene ale compozițiilor conform invenției fermentează rafinoza polizaharidică, iar fermentația rafinozei poate conferi efecte asupra gazdei, cum ar fi creșterea butirului de cecal și proliferarea gastrointestinală crescută. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru creșterea fermentării rafinozei în intestin în tratamentul bolilor inflamatorii și autoimune și în particular al bolilor sau condițiilor mediate de către IL-17.

Astmul

30 În aplicațiile preferate, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea astmului. Exemplele demonstrează că compozițiile descrise aici realizează o reducere a recrutării neutrofilelor și/sau a eozinofilelor în căile respiratorii după sensibilizare și provocare cu extract de acarieni de praf domestic și astfel pot fi utili în tratamentul sau prevenirea astmului. Astmul este o boală cronică caracterizată prin inflamarea și restricția căilor respiratorii. Inflamația în astm poate fi mediată de către IL-17 și/sau celulele Th17 și astfel compozițiile descrise aici pot fi deosebit de eficiente pentru prevenirea sau tratarea astmului. Inflamația în astm poate fi mediată de către eozinofile și/sau neutrofile.

35 În anumite aplicații, astmul este astm bronșic eozinofilic sau alergic. Astmul eozinofilic și alergic se caracterizează prin creșterea numărului de eozinofile din sângele periferic și în secrețiile căilor respiratorii și este asociat patologic cu îngroșarea zonei de membrană de bază și farmacologic cu răspunsul la corticosteroizi [25]. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea eozinofilelor pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului eozinofilic și alergic.

40 În aplicații de realizare suplimentare, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea astmului neutrofil (sau a astmului non-eozinofil). Numerele mari de neutrofile sunt asociate 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.

45 Astmul eozinofil și neutrofil nu sunt condiții care se exclud reciproc, iar tratamentele care ajută la abordarea oricăruia dintre răspunsurilor eozinofile și neutrofile pot fi utile pentru tratarea astmului în general.

50 Nivelurile crescute ale IL-17 și activarea căii Th17 sunt asociate cu astmul sever, astfel încât compozițiile descrise aici pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării astmului sever sau pentru tratarea astmului sever.

55 În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate în metodele care reduc un răspuns inflamator eozinofil în tratamentul sau prevenirea astmului sau în metodele care reduc un răspuns inflamator neutrofil în tratamentul sau prevenirea astmului. Așa cum s-a menționat mai sus, nivelurile ridicate de eozinofile în astm sunt asociate patologic cu îngroșarea zonei membranelor bazale, reducând astfel răspunsul inflamator eozinofilic în tratamentul sau prevenirea astmului pot 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 acestora, sunt asociate cu astm bronșic sever și îngustare cronică a căilor respiratorii. Prin urmare, reducerea răspunsului inflamator neutrofil poate fi deosebit de utilă pentru abordarea astmului sever.

60 În anumite aplicații, compozițiile descrise aici reduc infiltrarea peribronhiolară în astmul alergic sau sunt utilizate pentru reducerea infiltrației peribronhiolară în tratamentul astmului

alergic. In anumite aplicații, compozițiile descrise aici reduc infiltrarea peribronhiolară și/sau perivasculară în astmul neutrofil sau sunt utilizate pentru reducerea infiltrației peribronhiolare și/sau perivasculară în tratamentul astmului neutrofilic alergic.

5 In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici asigură o reducere sau previne o creștere a nivelurilor IL-1 β , IFN γ , RANTES, MIP-1 α sau IL-8.

10 In anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării într-o metodă de tratare a astmului care are ca rezultat o reducere a răspunsului inflamator eozinofil și/sau neutrofil. In anumite aplicații, pacientul care urmează să fie tratat are sau a fost identificat în prealabil ca având niveluri crescute de neutrofile sau eozinofile, identificate de exemplu prin analiza sangelui sau a sputei.

15 Compozițiile descrise aici 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 descrise aici pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea astmului cu debut la adulți. Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru administrarea sau ameliorarea astmului. Compozițiile descrise aici pot fi în mod particular utile pentru reducerea simptomelor asociate cu astmul care este agravat de alergeni, cum ar fi acarienii din praful domestic.

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

25 In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici asigură o reducere a concentrațiilor de fenilalanină și/sau histidină, de exemplu în intestine sau în plasmă. Exemplele demonstrează că tulpinile bacteriene din compozițiile descrise aici au testat pozitiv pentru fermentarea aminoacizilor, incluzând fenilalanina și histidina și concentrațiile plasmatice crescute ale fenilalaninei și histidinei au fost raportate ca fiind asociate cu efecte adverse în astm. In anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru reducerea concentrațiilor plasmatice de fenilalanină și/sau histidină în tratamentul astmului și în particular în tratamentul producției de histamină sau hiper-reactivității căilor respiratorii asociate cu astmul.

30 In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici asigură o reducere a concentrațiilor de galactoză și/sau fructoză, de exemplu în intestine. Exemplele demonstrează că tulpinile bacteriene ale compozițiilor conform invenției fermentează substraturile de carbohidrați incluzând galactoză și fructoză, iar galactoză α -1,3-galactoză derivată din surse de carne este un alergen cunoscut și un agent cauzator de anafilaxie, și nivelurile de consum de fructoză din dietă sunt corelate cu creșterea severității astmului. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt
35 utilizate pentru reducerea concentrațiilor de galactoză și/sau fructoză în tratamentul astmului și în special în tratamentul astmului sever.

Artrita

40 In aplicațiile preferate, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea artritei reumatoide (RA). Exemplele demonstrează că compozițiile descrise aici realizează o reducere a semnelor clinice ale RA la un model de șoarece, reduc deteriorarea cartilajului și a osului și reduc răspunsul inflamator IL-17 și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea RA. RA este o afecțiune sistemică inflamatorie care afectează în primul rând articulațiile. RA este asociată cu un răspuns inflamator care determină umflarea articulațiilor, hiperplazia sinovială și distrugerea cartilajului și a osului. 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
45 activează producția și funcția de metaloproteinaze matrice și deoarece activitatea bolii RA este corelată cu nivelurile IL-17 și numărul de celule Th17 [26,27], deci compozițiile descrise aici pot fi deosebit de eficace pentru prevenirea sau tratarea RA.

50 In anumite aplicații, compozițiile descrise aici 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 compozițiile descrise aici asigură o reducere sau previne o creștere a nivelurilor de IL-17, în special a nivelurilor de IL-17A. In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici asigură o reducere sau previne o creștere a nivelurilor IFN- γ sau IL-6.

55 In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici conduce la o reducere a umflării articulațiilor. In anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării la pacienții cu articulații umflate sau la pacienții identificați ca având riscul de a avea articulații umflate. In anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării într-o metodă de reducere a umflăturilor articulare în RA.

60 In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici conduce la o reducere a deteriorării cartilajului sau a deteriorării osoase. In anumite aplicații, compozițiile descrise aici

sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea deteriorării cartilajului sau a oaselor în tratamentul RA. În anumite aplicații, compozițiile sunt destinate utilizării în tratarea pacienților cu RA severă care prezintă riscul de deteriorare a cartilajelor sau oaselor.

5 Nivelurile crescute ale IL-17 și numărul celulelor Th17 sunt asociate cu distrugerea cartilajului și a osului în RA [26, 27]. IL-17 este cunoscută pentru că activează distrugerea matricei de cartilaj și țesut osos și IL-17 are un efect inhibitor asupra producției de matrice în condrocite și osteoblaste. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru prevenirea eroziunii osoase sau a deteriorării cartilajelor în tratamentul RA. În anumite aplicații, compozițiile sunt destinate utilizării în tratarea pacienților care prezintă eroziune osoasă sau
10 deteriorare a cartilajului sau pacienți identificați ca fiind expuși riscului de eroziune osoasă sau deteriorare a cartilajului.

TNF- α este de asemenea asociat cu RA, dar TNF- α nu este implicat în patogeniza stadiilor ulterioare ale bolii. Dimpotrivă, IL-17 are un rol în toate stadiile bolilor cronice [28]. Prin urmare, în anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în tratarea RA cronice sau RA în stadiu tardiv, cum ar fi boala care include distrugerea articulațiilor și pierderea cartilajului. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt pentru tratarea pacienților care au primit anterior terapie anti-TNF- α . În anumite aplicații, pacienții care urmează a fi tratați nu
15 răspund sau nu mai răspund la terapia anti-TNF- α .

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru modularea sistemului imunitar al pacientului, astfel încât, în anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în prevenirea RA la un pacient care a fost identificat ca având risc de RA sau care a fost diagnosticat cu RA în stadiu incipient. Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru prevenirea dezvoltării RA.

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru administrarea sau ameliorarea RA. Compozițiile descrise aici pot fi utile în mod particular pentru reducerea simptomelor asociate cu umflarea articulațiilor sau distrugerea oaselor. Tratamentul sau prevenirea RA se poate referi, de exemplu, la ameliorarea severității simptomelor sau la reducerea frecvenței exacerbărilor sau a gamei de declanșatoare care reprezintă o problemă pentru pacient.

Scleroza multiplă

În aplicațiile preferate, compozițiile descrise aici sunt pentru utilizare în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple. Exemplele demonstrează că compozițiile descrise aici realizează o reducere a incidenței și a severității bolii într-un model de șoarece al sclerozei multiple (modelul EAE) și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple. Scleroza multiplă este o afecțiune inflamatorie asociată cu deteriorarea tecilor de mielină ale neuronilor, în special în creier și coloana vertebrală. Scleroza multiplă este o boală cronică, care este incapacitantă progresiv și
35 care evoluează în episoade. IL-17 și celulele Th17 pot avea un rol-cheie în scleroza multiplă, de exemplu deoarece nivelurile IL-17 se pot corela cu leziunile sclerozei multiple, IL-17 poate perturba legăturile strânse ale celulelor endoteliale cu bariera hematoencefalică și celulele Th17 pot migra în centrul sistemul nervos și provoca pierderea de neuroni [29, 30]. Prin urmare, compozițiile descrise aici pot fi deosebit de eficace pentru prevenirea sau tratarea sclerozei multiple.

În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici conduce la o reducere a incidenței sau a severității bolii. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru reducerea incidenței sau a severității bolii. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici împiedică o scădere a funcției motoare sau duce la îmbunătățirea a funcției motoare.
45 În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt utilizate pentru a preveni o scădere a funcției motoare sau pentru a fi utilizate în îmbunătățirea funcției motoare. În anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile descrise aici împiedică dezvoltarea paraliziei. În anumite aplicații, compozițiile descrise aici sunt destinate utilizării pentru prevenirea paraliziei în tratamentul sclerozei multiple.

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru modularea sistemului imunitar al pacientului, astfel încât, în anumite realizări, 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
50 bolii la mulți șoareci.

Compozițiile descrise aici pot fi utile pentru administrarea sau ameliorarea sclerozei multiple. Compozițiile descrise aici pot fi utile în mod particular pentru reducerea simptomelor asociate cu scleroza multiplă. Tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple se poate referi, de exemplu, la atenuarea severității simptomelor sau la reducerea frecvenței exacerbărilor sau a gamei de declanșatoare care reprezintă o problemă pentru pacient.
60

Tratarea cancerului

Compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea cancerului. Exemplele demonstrează că administrarea compozițiilor conform invenției poate duce

5

la o reducere a creșterii tumorii într-un număr de modele de tumori.

In anumite aplicații, tratamentul cu compozițiile conform invenției are ca rezultat o reducere a mărimii tumorii sau o reducere a creșterii tumorii. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea mărimii tumorii sau pentru reducerea creșterii tumorii. Exemplele demonstrează că compozițiile din invenție pot fi eficiente pentru reducerea mărimii tumorii sau a creșterii tumorii. În anumite aplicații, compozițiile din invenție sunt destinate utilizării la pacienții cu tumori solide. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea angiogenezei în tratamentul cancerului. IL-17 și celulele Th17 au roluri centrale în angiogeneză. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizare în prevenirea metastazelor.

10

15

In anumite aplicații, compozițiile din invenție sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea cancerului mamar. Exemplele demonstrează că compozițiile din invenție pot fi eficiente pentru tratarea cancerului mamar. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea mărimii tumorii, reducerea creșterii tumorale sau reducerea angiogenezei in tratamentul cancerului mamar. In aplicațiile preferate, cancerul este carcinom mamar. In aplicațiile preferate, cancerul este cancer mamar aflat în stadiul IV.

20

In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea cancerului pulmonar. Exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției pot fi eficiente pentru tratarea cancerului pulmonar. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea mărimii tumorii, reducerea creșterii tumorii sau reducerea angiogenezei in tratamentul cancerului pulmonar. In aplicațiile preferate, cancerul este carcinom pulmonar.

25

In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru tratarea sau prevenirea cancerului hepatic. Exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției pot fi eficiente pentru tratarea cancerului hepatic. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru reducerea mărimii tumorii, reducerea creșterii tumorii sau reducerea angiogenezei în tratamentul cancerului hepatic. În realizările preferate, cancerul este hepatom (carcinom hepatocelular).

30

In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea carcinomului. Exemplele demonstrează că compozițiile din invenție pot fi eficiente pentru tratarea a numeroase tipuri de carcinom. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea cancerului non-imunogen. Exemplele demonstrează că compozițiile din invenție pot fi eficiente pentru tratarea cancerelor non-imunogene.

35

IL-17 și calea Th17 au roluri centrale în dezvoltarea și progresul cancerului și, deși rolurile IL-17 și al celulelor Th17 în cancer nu sunt pe deplin înțelese, sunt cunoscute numeroase efecte pro-tumorale ale IL-17 și celulelor Th17. De exemplu, celulele Th17 și IL-17 pot promova angiogeneza, cresc proliferarea și supraviețuirea celulelor tumorale și pot activa factorii de transcripție care promovează tumorile [39–41]. Prin urmare, compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea sau prevenirea cancerului. Mai mult, exemplele demonstrează că compozițiile conform invenției sunt eficiente pentru reducerea volumului tumorii în cancerul mamar, pulmonar și hepatic, iar IL-17 și celulele Th17 au roluri importante în aceste tipuri specifice de cancer [42–44].

40

45

Efectele terapeutice ale compozițiilor conform invenției asupra cancerului pot fi mediate de un mecanism pro-inflamator. Inflamația poate avea un efect de supresie a cancerului [45], iar citokinele proinflamatorii, cum ar fi TNF α , sunt investigate ca terapii împotriva cancerului [46]. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru tratarea cancerului printr-un mecanism similar. De exemplu, compozițiile din invenție pot provoca un răspuns de tip IFN γ . IFN γ este un factor puternic de activare a macrofagilor care poate stimula activitatea tumoricidă [47], iar CXCL9 și CXCL10, de exemplu, au și efecte anti-cancer [48–50]. Prin urmare, in anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru promovarea inflamației în tratamentul cancerului. In aplicațiile preferate, compozițiile conform invenției sunt pentru utilizare în promovarea inflamației Th1 în tratamentul cancerului. Celulele Th1 produc IFN γ și au efecte puternice împotriva cancerului [45]. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea unui cancer în stadiu incipient, cum ar fi un cancer care nu a metastazat sau un cancer in stadiul 0 sau 1. Promovarea inflamației poate fi mai eficace împotriva cancerelor de stadiu incipient [45]. In anumite aplicații, compozițiile conform invenției sunt utilizate pentru a promova inflamația pentru a spori efectul unui al doilea agent anti-cancer.

50

55

60

In alte aplicații, compozițiile conform invenției sunt destinate utilizării în tratarea sau prevenirea leucemiei limfoblastice acute (ALL), leucemiei mieloide acute, carcinomului adrenocortical, carcinomului bazocelular, cancerului ductului biliar, cancerului vezical, tumorii osoase, osteosarcomului/histiocitomului fibros malign, gliomului cerebral, tumorii cerebrale, astrocitomului cerebelar/gliomului malign, ependimomului, meduloblastomului, tumorilor neuroectodermice primitive supratentoriale, cancerului mamar, adenoamelor/carcinoizilor bronșici, limfomului Burkitt, tumorilor carcinoide, cancerului cervical, leucemiei limfocitare cronice, leucemiei mielogene cronice, leucemiei mieloproliferative cronice, cancerului de colon, limfomului cu celule T cutanate, cancerului endometrial, ependimomului, cancerului esofagian, sarcomului Ewing, melanomului intraocular, retinoblastomului, cancerului vezicii biliare, cancerului gastric, tumorii carcinoide gastrointestinale, tumorii stromale gastrointestinale (GIST), tumorii celulelor germinative, gliomului, cancerului hipotalamic și al căii vizuale din copilărie, limfomului Hodgkin, melanomului, carcinomului celulelor insule, sarcomului Kaposi, cancerului celulelor renale, cancerului laringian, leucemiilor, limfoamelor, mezoteliomelor, neuroblastomelor, limfomului non-Hodgkin, cancerului orofaringian, osteosarcomului, cancerului ovarian, cancerului pancreatic, cancerului paratiroidian, cancerului faringian, adenomului pituitar, neoplaziei celulelor plasmactice, cancerului de prostată, carcinomului celulelor renale, retinoblastomului, sarcomului, cancerului testicular, cancerului tiroidian sau cancerului uterin.

Compozițiile conform invenției pot fi deosebit de eficace atunci când sunt utilizate în combinație cu alți agenți terapeutici. Efectul imunomodulator al compozițiilor conform invenției poate fi eficace atunci când este combinat cu agenți anti-cancer mai direcți. De aceea, în anumite aplicații, invenția furnizează o compoziție cuprinzând bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau un biotip al acesteia și un agent anti-cancer. În aplicațiile preferate, agentul anti-cancer este un inhibitor al punctului de verificare imunitară, o imunoterapie cu anticorpi direcționați, o terapie cu celule CAR-T, un virus oncolitic sau un medicament citostatic. În aplicațiile preferate, compoziția cuprinde un agent anti-cancer selectat din grupul constând din: Yervoy (ipilimumab, BMS); Keytruda (pembrolizumab, Merck); Opdivo (nivolumab, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Tremelimumab (AZ/MedImmune); CT-011 (pidilizumab, CureTech); BMS-986015 (lirilumab, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck); PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (varlilumab, CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X); NLG-9189 (indoximod, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-VISTA (JnJ); Epcadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (University of Pennsylvania); MGA271 (Macrogenix); Emactuzumab (Roche/Genentech); Galunisertib (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Bavixumab (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Ewha Women's University, Korea); Vemurafenib (Plexxikon); Dabrafenib (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre); Unituxin (dinutuximab, United Therapeutics Corporation); Blincyto (blinatumomab, Amgen); Cyramza (ramucirumab, Eli Lilly); Gazyva (obinutuzumab, Roche/Biogen); Kadcyla (ado-trastuzumab emtansină, Roche/Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche/Genentech); Adcetris (brentuximab vedotin, Takeda/Millennium); Arzerra (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastin (bevacizumab, Roche/Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS/ Merck); Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalin (ibritumomab tiuxetan, Biogen); Campath (alemtuzumab, Bayer); Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin, Pfizer); Herceptin (trastuzumab, Roche/Genentech); Rituxan (rituximab, Genentech/Biogen); volociximab (Abbvie); Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Elotuzumab (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Ozaralizumab (Ablynx); Actimab-C (Actinium); Actimab-P (Actinium); Milatuzumabdox (Actinium); Emab-SN-38 (Actinium); Naptumomab estafenatox (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (samalizumab, Alexion); ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232 (adecatumumab, Amgen); AMG211 (Amgen/ MedImmune); BAY20-10112 (Amgen/Bayer); Rilotumumab (Amgen); Denosumab (Amgen); AMP-514 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/Med Immune); MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639 (AZ/MedImmune);

MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO); BAY79-4620 (Bayer); Anetumab ravtansinā (Bayer); vantictumab (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Sibrotuzumab (Boehringer Ingelheim); BI-836845 (Boehringer Ingelheim); B-701 (BioClin); BIIB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen/Genentech); BI-505 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS); Necitumumab (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex); CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo); patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo); nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai); MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai); LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212v (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly); cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli Lilly); Ramucirumab (Eli Lilly); Tabalumab (Eli Lilly); Zanolimumab (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics); FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624 (Gilead); OMP-21M18 (demcizumab, GSK); mapatumumab (GSK); IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen); IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); milatuzumabdox (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102 (Immunomedics); Epratuzumab (Immunomedics); Clivatuzumab (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Daratumumab (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328 (siltuximab, Janssen); KB004 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa Hakko Kirrin); KW-2871 (ecromeximab, Life Science); Sonepizumab (Lpath); Margetuximab (Macrogenics); Enoblituzumab (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics); MK-0646 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); X Mab5574 (Morphosys); BPC-1C (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis); HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); vantictumab (Oncomed/Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicin, Pfizer); PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab, Regeneron/Sanofi); REGN421 (enoticumab, Regeneron/Sanofi); RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599, RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414 (parsatuzumab), RG7160 (imgatuzumab), RG7159 (obintuzumab), RG7686, RG3638 (onartuzumab), RG7597 (Roche/Genentech); SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi); SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi), SGN-LIV1A (linituzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics); SGN-19A (Seattle Genetics); SGN-CD70A (Seattle Genetics); SEA-CD40 (Seattle Genetics); ibritumomab tiuxetan (Spectrum); MLN0264 (Takeda); ganitumab (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva); TB-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); X Mab2512 (Xencor); X Mab5574 (Xencor); nimotuzumab (YM Biosciences); Carlumab (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics); KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellectis); BPX-401 (Bellicum Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTC20 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNATRIX); VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-AdL (PsiOxus Therapeutics); ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics); GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010 (OrienGene Biotechnology); Reolysin (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatin, oxaliplatin, irinotecan, folinic acid, methotrexate, cyclophosphamide, 5-fluorouracil, Zykadia (Novartis), Tafenlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehringer Ingelheim), Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespib (Synta Pharma), Tergentpumatucel-L (NewLink Genetics), GV1001 (Kael-GemVax), Tivantinib (ArQule); Cytosan (BMS); Oncovin (Eli Lilly); Adriamycin (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion);

Cometriq (Exellxis); Lonsurf (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); și TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

Moduri de administrare

De preferință, compozițiile conform invenției urmează să fie administrate în tractul gastrointestinal pentru a permite eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului cu tulpina bacteriană conform invenției. În general, compozițiile conform invenției sunt administrate pe cale orală, dar pot fi administrate rectal, intranazal sau pe căi bucale sau sublinguale.

In anumite aplicații, compozițiile din invenție pot fi administrate ca o spumă, ca un spray sau ca un gel.

In 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 supocire, witepsol), glicero-polietilen glicol sau compoziție de glicerină de săpun.

In anumite aplicații, compoziția conform invenției este administrată tractului gastrointestinal printr-un tub, cum ar fi un tub nasogastric, tub orogastric, tub gastric, tubul jejunostomic (tub J), gastrostomie endoscopică percutanată (PEG), sau ca 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 dată sau pot fi administrate secvențial ca parte a unui regim de tratament. În anumite aplicații, compozițiile conform invenției trebuie să fie administrate zilnic.

In anumite aplicații ale invenției, tratamentul conform invenției este însoțit de evaluarea microbiotei intestinale a pacientului. Tratamentul poate fi repetat dacă nu se realizează administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală cu tulpina conform invenției, astfel încât nu se observă eficacitate, sau tratamentul poate fi încetat dacă succesiunea și/sau colonizarea parțială sau totală este de succes și se observă eficacitate.

In anumite aplicații, compoziția conform invenției poate fi administrată la un animal gestant, de exemplu un mamifer cum ar fi un om, pentru a preveni o boală inflamatorie sau autoimună care se dezvoltă în copilul său *in utero* și/sau după ce s-a născut.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate unui pacient care a fost diagnosticat cu o boală sau o afecțiune mediată de către IL-17 sau calea Th17 sau care a fost identificat ca prezentând riscul unei boli sau stări 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 stări mediate de IL-17 sau calea Th17 la un pacient sănătos.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate la un pacient care a fost identificat ca având o microbiotă anormală în intestin. De exemplu, pacientul poate avea o colonizare redusă sau lipsă cu bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380.

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

In general, compozițiile conform invenției sunt pentru tratamentul oamenilor, deși pot fi utilizate pentru tratamentul animalelor, inclusiv al mamiferelor monogastrice cum ar fi păsările de curte, porcii, pisicile, cainii, caii sau iepurii. Compozițiile conform invenției pot fi utile pentru îmbunătățirea creșterii și performanței animalelor. Dacă se administrează la animale, se poate utiliza gavajul oral.

Compoziții

In 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 tare, cuprinzând o tulpină bacteriană conform invenției.

De preferință, compoziția din invenție cuprinde bacterii liofilizate. Liofilizarea bacteriilor este o procedură bine stabilită și există indicații relevante, de exemplu, în referințele [51–53].

In mod alternativ, compoziția din invenție poate cuprinde o cultură bacteriană activă, vie.

In aplicațiile preferate, compoziția conform invenției este încapsulată pentru a permite eliberarea tulpinii bacteriene în intestin. Încapsularea protejează compoziția de degradare până la livrarea la locul țintă, de exemplu, prin ruperea cu stimuli chimici sau fizici, cum ar fi presiunea, activitatea enzimatică sau dezintegrarea fizică, care poate fi declanșată de modificările pH-ului. Se poate utiliza 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 floclare 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 [54] și [55].

Compoziția poate fi administrată pe cale orală și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate deoarece bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 poate fi una anaerobă. Alte ingrediente (cum ar fi vitamina C, de exemplu) pot fi incluse ca agenți de captare a oxigenului și substraturi prebiotice pentru a îmbunătăți eliberarea și/sau colonizarea parțială sau totală și supraviețuirea *in vivo*. In mod alternativ, compoziția probiotică a invenției poate fi administrată pe cale orală ca produs alimentar sau nutrițional, cum ar fi un produs lactat fermentat pe bază de lapte sau pe bază de zer, sau ca produs farmaceutic.

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 duce la livrarea către intestinul pacientului și/sau colonizarea parțială sau totală a acestuia.

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

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

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

În anumite aplicații, compoziția probiotică conform prezentei invenției include un compus prebiotic într-o cantitate de la aproximativ 1 până la aproximativ 30% din masă, față de masa totală a compoziției (de exemplu, de la 5 până la 20% din masă). Carbohidrații pot fi selectați din grupul constând din: fructo-oligozaharide (sau FOS), fructo-oligozaharide cu catenă scurtă, inulină, izomalt-oligozaharide, pectine, xilo-oligozaharide (sau XOS), chitosan, beta-glucani, amidonuri modificate cu gumă arabică și rezistente, polidextroză, D-tagatoză, fibre de salcâm, carob, ovăz și fibre de citrice. Într-un aspect, prebioticele sunt fructo-oligozaharidele cu catenă scurtă (pentru simplitate, prezentate mai jos în continuare ca FOSc-s); respectivele FOSc-s nu sunt carbohidrați digerabili, în 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 adecvați pot fi găsiți în referința [56]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscuți în domeniul farmaceutic și sunt descriși, de exemplu, în referință [57]. Exemple de purtători adecvați includ lactoză, amidon, glucoză, metilceluloză, stearat de magneziu, manitol, sorbitol și alții asemenea. Exemple de diluanți adecvați includ etanolul, glicerolul și apa. Alegerea purtătorului farmaceutic, a excipientului sau a diluantului poate fi făcută în funcție de calea de administrare dorită și de practica farmaceutică standard. Compozițiile farmaceutice pot cuprinde ca sau în plus față de purtător, excipient sau diluant orice liant adecvat, lubrifiant (lubrifianți), agent (agenții) de suspendare, agent (agenți) de acoperire, agent (agenți) de solubilizare. Exemplele de lianți adecvați includ amidon, gelatină, zaharuri naturale cum ar fi glucoza, lactoza anhidră, lactoza cu curgere liberă, beta-lactoza, îndulcitorii din porumb, gumă naturală și sintetică, cum ar fi cea de salcâm, tragacantă, sau alginat de sodiu, carboximetilceluloză și polietilenglicol. Exemplele de lubrifianți adecvați includ oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu, clorură de sodiu și alții asemenea. În compoziția farmaceutică pot fi furnizați agenți conservanți, stabilizatori, coloranți și chiar aromatizanți. Exemplele de conservanți includ benzoatul de sodiu, acidul sorbic și esterii acidului p-hidroxibenzoic. De asemenea, pot fi utilizați antioxidanți și agenți de punere în suspensie.

Compozițiile conform invenției pot fi puse în formulă ca un produs alimentar. De exemplu, un produs alimentar poate oferi beneficii nutriționale 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 spori gustul compoziției conform invenției sau pentru a face compoziția mai atractivă pentru a fi consumată prin faptul că este mai asemănătoare cu un produs alimentar comun decât cu o compoziție farmaceutică. În anumite aplicații, compoziția din invenție este pusă în

formulă ca un produs pe bază de lapte. Termenul „produs pe bază de lapte” înseamnă orice produs lichid sau semi-solid pe bază de lapte sau de zer având un conținut de grăsimi diferit. 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 prelucrare sau un produs prelucrat cum ar fi iaurtul, laptele încheșat, laptele bătut, laptele acru, untul din lapte și alte produse din lapte acru. Un alt grup important include băuturi din lapte, cum ar fi băuturi din zer, lapte fermentat, lapte condensat, lapte pentru sugari sau bebeluși; lapte aromatizat, înghețată; alimente care conțin lapte, cum ar fi dulciuri.

10 In anumite aplicații, compozițiile conform invenției conțin o singură tulpină sau specie bacteriană și nu conțin alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot cuprinde numai cantități minime sau biologice irelevante de alte tulpini sau specii bacteriene. Astfel de compoziții pot fi o cultură care este substanțial lipsită de alte specii de organism.

Compozițiile pentru utilizare în conformitate cu invenția pot sau nu necesita aprobarea de comercializare.

15 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.

20 In 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 la un subiect care are nevoie de aceasta; și în care tulburarea este selectată din grupul constând din astm bronșic, astm alergic, astm neutrofil, osteoartrită, artrită psoriatică, artrită juvenilă idiopatică, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală celiacă, boală pulmonară obstructivă cronică (BOPC), cancer, cancer mamar, cancer de colon, cancer pulmonar, cancer ovarian, uveită, sclerită, boala lui Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, parodontită, rinită alergică și rețet de alogefă.

25 In 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 tratarea sau prevenirea unei boli sau condiții mediate de către IL-17 sau de către calea Th17. În aplicațiile preferate, boala sau condiția menționată este selectată din grupul constând din artrita reumatoidă, scleroza multiplă, psoriazisul, boala inflamatorie a intestinului, boala Crohn, colita ulcerosă, boala celiacă, astmul, astmul alergic, astmul neutrofil, osteoartrita, artrita psoriatică, artrita juvenilă idiopatică, neuromielita optică (boala lui Devic), spondilita anchilozantă, spondiloartrita, lupusul eritematos sistemic, boala pulmonară obstructivă cronică (BOPC), cancerul, cancerul mamar, cancerul de colon, cancerul pulmonar, cancerul ovarian, uveita, sclerita, boala lui Behcet, ateroscleroza, dermatita atopică, emfizemul, parodontita, rinita alergică și rețet de alogefă.

30 In anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, în care cantitatea de tulpină bacteriană este de aproximativ 1×10^3 până la aproximativ 1×10^{11} unități formatoare de colonii pe gram în raport cu masa compoziției.

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

35 In 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.

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

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

In 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.

55 In anumite aplicații, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, cuprinzând în plus cel puțin 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.

5 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 pentru utilizare în prezenta invenție pot fi cultivate utilizând tehnici de microbiologie standard, așa cum este detaliat, de exemplu, în referințele [58–60].

Mediul solid sau lichid utilizat pentru cultură poate fi agar YCFA sau mediu YCFA. Mediul YCFA poate include (pentru 100 ml, valori aproximative): Casiton (1,0 g), extract de drojdie (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteină (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄·7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurină (0,1 mg), hemin (1 mg), biotină (1 ?g), cobalamină (1 ?g), acid β-aminobenzoic (3 ?g), acid folic (5 ?g) și piridoxamină (15 ?g).

20 **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 descrise aici 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 ale invenției pot fi omorate, 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 [61] și [62–68], etc.

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

40 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, procentul de nucleotide este același în compararea celor două secvențe. Această aliniere și procentul de omologie sau identitate de secvență pot fi determinate utilizând programe cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secțiunea 7.7.18 din ref. [69]. 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. [70].

50 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.

55 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). **EXEMPLE**

60 **Exemplul 1 – Eficacitatea inoculului bacterian la un model de șoarece al astmului indus de acarieni**

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

751: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42380

Designul studiuluiGrupuri:

1. Grup martor negativ. Tratament cu martor vehicul (pe cale orală).
4. Tratamentul cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 751 (pe cale orală).
7. Grup martor pozitiv. Tratament cu dexametazonă (i.p.).
8. Grupul 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 ?g de HDM (extract de acarieni din praf de casă – Număr de catalog: XPB70D3A25, Lot nr.: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, 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 pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de un lavaj bronhoalveolar (BAL).

Celulele au fost izolate din lichidul BAL (de nlavaj bronhoalveolar) și au fost numărate celulelor 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 (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-Lengler, 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 16 ore (tulpina 751).

Cultivarea martorului vehicul. Un tub gros, 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 martorului vehicul. 400 ?l de inocul de bacterii de cultură sau de martor vehicul au fost administrate pe zi prin gavaj oral.

Sensibilizarea intranasală. Șoarecii au fost aneșteziați prin injecție i.p. cu 9,75 mg xilazol și 48,75 mg ketasol 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 μ l PBS nazal.

Prepararea și administrarea compusului martor pozitiv dexametazonă. Sarea disodică de 21-fosfat de dexametazonă (Sigma-Aldrich, nr. de catalog D1159, Lot nr SLBD.1030V) a fost dizolvată în H₂O și administrată animalelor într-o doză de 3 mg/kg într-un volum de 200 μ 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 pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) urmată imediat de lavajul bronhoalveolar (BAL) în 500 μ 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 ANOVA uni-direcțională. 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 martori, tratamentul cu vehicul (martorul negativ) și tratamentul cu dexametazonă (martorul 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 751 a redus neutrofilele totale și proporția de neutrofile în BAL față de martorul numai vehicul.

Exemplul 2 – Eficacitatea inoculării bacteriene la un model de șoarece al astmului neutrofil sever

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 de casă (HDM) și au fost provocați cu o administrare intranasală de HDM pentru a modela răspunsul inflamator al astmului neutrofil sever. Mărimea 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 controlul 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

751: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42380

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratament cu martor vehicul (pe cale orală).

4. Tratamentul cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 751 (pe cale orală).

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

8. Grupul martor netratat.

9. Șoareci sănătoși (linie de referință)

Numărul de șoareci 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 (grupul 2–6).

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

Ziua 7: Sensibilizarea cu HDM în CFA (s.c.) (grupul 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 μ 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 pentobarbital (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).

Material 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 (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 (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-Lengler, 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 16 ore (tulpina 751).

Cultivarea matorului vehicul. Un tub gros, 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 mator vehicul. 400 ?l de inocul de bacterii de cultură sau de control vehicul au fost administrate pe zi pe gavaj oral.

Sensibilizare la HDM. 50 ?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, USA) și administrat subcutanat într-un volum de 200 ?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 intranazale de 15 ?g de HDM într-un volum de 30 ?l PBS timp de 4 zile consecutiv. Analiza a fost efectuată la o zi după provocarea finală.

Prepararea și administrarea matorului 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 ?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 ANOVA uni-direcțională. 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 751 a fost foarte eficientă în ameliorarea magnitudinii răspunsului inflamator neutrofil. Într-adevăr, tratamentul cu tulpina 751 a demonstrat rezultate comparabile cu tratamentul cu anticorpi anti-IL-17. În plus, tulpina 751 a redus numerele de eozinofile față de matori, așa cum se arată în Figurile 11 și 12.

Exemplul 3 – Eficacitatea inoculului bacterian pentru tratarea artritei la un model de șoarece al artritei induse de collagenul de tip IIMateriale și metode**Tulpină**

751: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42380

Culturi bacteriene

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

Tulpina bacteriană # 751 a fost crescută utilizând stocuri de glicerol. Stocurile de glicerol au fost depozitate la temperatura de -80°C . De trei ori pe săptămână, stocurile de glicerol s-au dezghețat la temperatura camerei și s-au plasat pe plăcile YCFA. O fracție nouă de glicerol a fost folosită pentru fiecare ocazie. 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-amiază (PM). O colonie bacteriană a fost culeasă de pe placă și transferată într-un tub care conține mediu YCFA. Tulpina bacteriană # 751 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-amiază.

Modelul de șoarece al artritei induse de colagenul de tip II

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 injecție subcutanată 100 microlitri dintr-o emulsie conținând 100 micrograme de colagen 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 μg de colagen 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 (incheieturi) și articulațiilor tibio-tarsale (glezne).

În ziua 45, șoarecii au fost sacrificați și au fost prelevate probe de sânge 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 șoarece al artritei induse de colagen (CIA) este un model bine stabilit de șoarece pentru artrita reumatoidă [71]. 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 [72]. Răspunsul imun 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 colagenului de tip II. Citokinele, incluzând TNF- α , IL-6, IFN- γ , 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 incorporare 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-Sfarșit	Ziua 0: colagen/CFA, o dată, SC
2	Bioterapeutic #751	5 ml/kg	PO	BID: Ziua -14-Sfarșit	Ziua 21: colagen/IFA, o dată, SC
PO: gavaj oral, SC: injecție subcutanată, BID: de două ori pe zi, CFA: adjuvant complet Freund.					

Mase corporale

Din ziua -14 până la sfârșitul experimentului, animalele au fost cântărite de trei ori pe săptămână. Datele au fost notate 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 semne 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 colagenului 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 testate pentru a cuantifica TNF- α , IL-6, IFN- γ , 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, labelle 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 notate ca (Medie $\pm$ ESM). Au fost furnizate date brute și analizate, precum și imagini reprezentative.

Tabelul 1: Sistemul de evaluare histopatologică

Grad Descriere	
Inflamație	
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 neutrofilele, cât și a macrofagelor. Pierderea mucoasei sinoviocitare. Inflamația se poate extinde de la sinoviu la țesutul înconjurător incluzând mușchiul. Numeroase neutrofile și macrofage în spațiul articulațiilor, împreună cu reziduuri semnificative de țesut necrotic.
Articulația leziunilor cartilajului	
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.
Deteriorarea osului metafizar subiacente	
0	Articulație normală
1	Nu există nicio modificare a osului metafizar subiacent.
2	Poate fi necroza focală sau fibroza osului metafizar.

Grad Descriere**Inflamație**

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 programării, datorită severității semnelor clinice de artrită sau datorită severității observațiilor clinice nespecifice.

5 Trei animale au fost sacrificate sau găsite moarte sau sacrificate în timpul perioadei de pre-tratament (ziua -14 până în ziua 0): un animal din grupul 1 (tratată cu vehicul, animalul a sosit de la furnizor cu un picior rupt și a fost sacrificat) și două animale din grupul 2 (tratamentul bioterapeutic #751, posibilă dozare pulmonară în prima zi înainte de tratament și semne clinice post-doză în a doua zi de pre-tratament).

10 Opt animale au fost sacrificate din cauza severității semnelor clinice de artrită: cinci animale din grupa 1 (tratate cu vehicul) și trei animale din grupul 2 (tratate cu agentul bioterapeutic # 751).

15 Patru 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 grupa 1 (tratate cu vehicul) și un animal în grupul 2 (tratată cu agentul bioterapeutic #751).

Mase corporale

20 Datele privind masa corporală înregistrate din ziua -14 până în ziua 0 și exprimate ca procent din greutatea corporală inițială (ziua -14) au fost analizate prin ANOVA bidirecțională urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu ziua -14, apoi pentru comparații multiple 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.

25 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 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.

30 Datele privind greutatea corporală înregistrate din ziua 0 până în ziua 28 și exprimate ca procent din greutatea corporală inițială (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 cu o singură cale, urmată de post-testul Dunnett pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul.

35 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.

40 Nu a existat o diferență semnificativă între grupurile experimentale în ziua 35 sau ziua 42.

Observații clinice

45 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.

50 Agentul bioterapeutic #751 a indus o reducere a scorurilor clinice în comparație cu grupul tratat cu vehicul din ziua 31 până în ziua 45, deși diferența nu a fost semnificativă.

Analiza proliferării celulare

55 Pentru a valida analiza, splenocitele au fost cultivate în prezența anti-CD3 și anti-CD28 solubili (anti-CD3/CD28) ca stimuli de control 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 collagenului II (CII), splenocitele au fost cultivate în prezența CII la 50 μ g/ml. Răspunsul proliferativ al splenocitei la CII a fost analizat prin ANOVA bidirecțională, urmată de post-testul lui Sydak pentru comparații multiple între splenocitele nestimulate și 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 ($p < 0,0001$).

Grupurile tratate cu agentul bioterapeutic #751 au prezentat niveluri semnificativ mai scăzute de proliferare a splenocitelor indusă de către CII decât grupul tratat cu vehicul.

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- γ = 15,581 pg/ml; TNF- α = 76 pg/ml).

Secțiunile următoare rezumă datele obținute din culturile stimulate de către collagenul 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 bidirecționale 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- α în supernatanții de cultură tisulară după stimularea cu collagen au fost sub limita de cuantizare.

Nivelurile în supernatanți ale IFN- γ (Figura 23)

Împreună cu IL-17, IFN- γ este citokina majoră care conduce boala în modelul CIA. Graficul împrăștiat din Figura 23 demonstrează nivelurile de IFN- γ după stimularea cu CII, media grupului fiind mai mare pentru grupul tratat cu vehicul în comparație cu cel tratat cu agent bioterapeutic. Rezultatul extras din același grup de subiecți 2 este responsabil pentru media mai mare în acest grup pentru IFN- γ și IL-10.

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.

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.

Nivelurile în supernatanți ale IL-6 (Figura 26)

Citokinele inflamatorii, cum ar fi IL-6 și TNF- α , 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 culturi 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.

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, după cum se indică prin valorile ridicate ale OD măsurate.

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

Histopatologie

Rezultatele histopatologiei sunt prezentate în Figurile 66–70. 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.

10 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.

15 Incidența modificărilor histopatologice a fost: vehicul – 80% (16/20); agent bioterapeutic #751 – 45% (9/20). Tratatamentul cu agent bioterapeutic #751 a redus incidența scorurilor histopatologice la nivelul membrelor posterioare ale șoarecelui în comparație cu grupul tratat cu vehicul (vezi Figurile 66–69). Istoricul histopatologic a fost analizat prin ANOVA unidirecțională pentru date non-parametrice (testul Kruskal-Wallis) urmat de post-testul Dunn pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul. Agentul bioterapeutic #751 a indus o reducere semnificativă a scorurilor inflamației articulare observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,01$). Agentul bioterapeutic #751 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de distrugere a cartilajului observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,001$). Agentul bioterapeutic #751 a indus o reducere semnificativă a scorurilor leziunilor osoase observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,001$). Agentul bioterapeutic #751 a indus o reducere semnificativă a scorurilor histopatologice totale în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,01$).

Rezumat

30 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 #751 s-a dovedit a fi eficient în tratarea artritei în acest model și agentul bioterapeutic #751 a fost eficient pentru reducerea severității scorurilor clinice. Agentul bioterapeutic #751 a fost, de asemenea, eficient pentru reducerea bolii patologice la nivelul articulațiilor, așa cum s-a demonstrat în analiza histopatologică.

35 Au fost observate răspunsuri de memorie proliferativă la collagenul II în culturile de splenocite din toate grupele experimentale. Răspunsul specific la collagen a fost semnificativ redus după tratamentul cu agent bioterapeutic #751 (grupul 2).

40 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.

45 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 imunității. 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 de șoarece al astmului indus de acarienii din praful domestic

50 Șoarecii testați în Exemplul 1 au fost supuși unor analize suplimentare pentru a caracteriza în continuare efectul compozițiilor conform invenției asupra răspunsului inflamator în astmul alergic.

Materiale și metode

55 **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 sange prin centrifugare timp de 5 minute la 14000 g și depozitat la temperatura de -20°C.

60 **Prelevarea organelor în ziua 14.** Colectarea lobului pulmonar stang in 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 IgE și de anticorpi IgG1 specifici acarianului de praf domestic (HDM) a fost măsurată în BAL și ser prin analiza ELISA.

Izolarea analizelor pulmonare și histologice

5 Lobii pulmonari stângi au fost fixați în formalină, urmată de încorporarea în parafină, secționarea și colorarea cu hematoxină 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:

10 0 – normal

1 – infiltrate inflamatorii ușoare

2 – infiltrate inflamatorii moderate

3 – infiltrate inflamatorii marcate

4 – infiltrate inflamatorii severe

15 5 – infiltrate inflamatorii foarte severe

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

Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar

20 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.

Rezultate și analize

25 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 751 a arătat o reducere notabilă și semnificativă din punct de vedere statistic a scorului mediu de inflamație (vezi Figurile 32 și 34).

30 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

35 orice modificare.

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 a IV-a după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție deosebită 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,

Exemplul 5 – Analiza ulterioară a efectului inoculării bacteriene în modelul de șoarece al astmului neutrofil sever

50 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.

Materiale și metode

55 **Prelevarea organelor în ziua 18.** Colectarea lobului pulmonar stâng în 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.

60 **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.

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.

Izolarea analizelor pulmonare și histologice (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 câmpuri 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:

0 – normal

1 – infiltrate inflamatorii ușoare

2 – infiltrate inflamatorii moderate

3 – infiltrate inflamatorii marcate

4 – infiltrate inflamatorii severe

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 751 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 751 (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 a IV-a după provocarea finală cu HDM a căilor respiratorii. O atenție deosebită 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 751, 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 innăscute. Aceste citokine fac parte din calea Th17. Luând împreună acest set de date, se poate trage concluzia clară că tulpina 751 a fost extrem de eficace pentru protejarea șoarecilor împotriva inflamației la acest model de șoarece al astmului neutrofil sever.

Exemplul 6 – Eficacitatea inoculării bacteriene la un model de șoarece al sclerozei multiple

Rezumat

Șoarecilor li s-au administrat compoziții cuprinzând tulpini bacteriene conform invenției și șoarecii au fost ulterior imunizați cu glicoproteină oligendendrocitară 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

751: bacterie depusă sub numărul de acces NCIMB 42380

Designul studiului

Grupuri:

1. Grup martor negativ. Tratamentul cu martor vehicul (pe cale orală).

4. Tratament cu tulpina inoculului bacterian terapeutic 751 (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 matorului vehicul pe cale orală (grupul 1).

5 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).

10 Ziua 0: MOG35-55 (glicoproteină oligendocitară mielină - 2 mg/ml) și CFA (2 mg/ml MTB) au fost amestecate 1:1 rezultând soluții de 1 mg/ml. 100 μ 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

15 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

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

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.

25 1,5 - Coadă moale și inhibare a picioarelor din spate.

2,0 - Coadă moale și slăbiciunea picioarelor din spate; SAU - Există semne evidente de înclinare a capului când 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.

30 3,0 - Coadă moale și paralizia completă a picioarelor din spate.

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.

35 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.

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.

40 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.

Rezultate

Rezultatele studiului sunt prezentate în Figurile 71 și 72.

45 Inducerea bolii în grupurile de control negative a avut succes, cu scoruri ridicate demonstrate de matorul vehicul și de matorul netratat. Efectul tratamentului cu tulpina 751 a fost izbitor și șoarecii tratați cu tulpina 751 au prezentat o incidență semnificativă asupra bolii și severității bolii. Într-adevăr, reducerea incidenței bolii și a severității bolii a fost comparabilă cu grupul martor pozitiv. Aceste date indică faptul că tulpina 751 poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea sclerozei multiple.

Exemplul 7 - Eficacitatea inoculării bacteriene în modelele de șoarece ale cancerului

Rezumat

50 Acest studiu a testat eficacitatea compozițiilor care conțin tulpini bacteriene conform invenției în patru modele tumorale.

Materiale

Substanță testată - Tulpina bacteriană # MRX004 (tulpina 751).

55 **Substanța de referință** - Anticorpul anti-CTLA-4 (clona: 9H10, catalog: BE0131, izotip: IgG1 de hamster sirian, Bioxcell).

Vehicule substanțelor de test și de referință - Mediu de cultură bacterian (mediu de extract de drojdie, Casitone, acizi grași (YCFA)). În fiecare zi de injectare la șoareci, anticorpul a fost diluat cu PBS (ref: BE14-516F, Lonza, Franța).

Dozele de tratament – Bacterii: 2×10^8 în 200 μ l. A-CTLA-4 a fost injectat la 10 mg/kg/injecție. Anti-CTLA-4 a fost administrat la un volum de doză de 10 ml/kg/ administrare (adică pentru un șoarece care cântărește 20 g, se vor administra 200 μ l de substanță de test) în funcție de greutatea corporală cea mai recentă a șoarecilor.

5 **Căi de administrare** – Inoculul bacterian a fost administrat prin gavaj oral (per os, PO) prin intermediul unei canule. Canulele au fost decontaminate zilnic. Anti-CTLA-4 a fost injectat în cavitatea peritoneală a șoarecilor (intraperitoneal, IP).

Condițiile de cultivare a tulpinilor bacteriene – Condițiile de cultură pentru tulpina bacteriană au fost după cum urmează:

- 10
- Se pipetează 10 ml de YCFA (din sticlele de laborator cu 10 ml de preparat E&O) în tuburi Hungate
 - Se sigilează tuburile și se spală cu CO₂ utilizând un sistem de introducere și evacuare a seringilor
 - Se autoclavează tuburile Hungate

15

 - După răcire, se inoculează tuburile Hungate cu 1 ml din stocurile de glicerol
 - Se pun tuburile într-un incubator static la temperatura de 37°C timp de circa 16 ore.
 - În ziua următoare, se ia 1 ml din această subcultură și se inoculează 10 ml de YCFA (tuburi Hungate preîncălzite spălate, toate în duplicat)
 - Se plasează într-un incubator static la temperatura de 37°C timp de 5 până la 6 ore

20

Linia celulară de cancer și condițiile de cultură

Liniile celulare utilizate au fost detaliate în tabelul de mai jos:

Linie celulară	Tip	Varietate de șoarece	Origine
EMT-6	Carcinom mamar	BALB/c	ATCC
LL/2 (LLC1)	Carcinom pulmonar	C57BL/6	ATCC CRL1642
Hepa1-6	Carcinom hepatocelular	C57BL/6	IPSEN INNOVATION

25 Linia celulară EMT-6 a fost stabilită dintr-un carcinom mamar transplantat murin care a apărut într-un șoarece BALB/cCRGL după implantarea unui nodul alveolar mamar hiperplazic [73].

Linia celulară LL/2 (LLC1) a fost stabilită din plămânul unui șoarece C57BL care poartă o tumoră care rezultă din implantarea unui carcinom pulmonar Lewis primar [74].

30 Linia celulară Hepa 1-6 este un derivat al hepatomului de șoarece BW7756 care a apărut într-un șoarece C57/L [75].

Condiții de cultură celulară – Toate liniile celulare au fost crescute ca monostrat la temperatura de 37°C într-o atmosferă umidificată (5% CO₂, aer 95%). Mediul de cultură și suplimentele sunt indicate în tabelul de mai jos:

Linie celulară	Mediu de cultură	Supliment
EMT6	RPMI 1640 conținând 2 mM L-glutamină (ref: BE12-702F, Lonza)	10% ser fetal bovin (ref: # 3302, Lonza)
LL/2 (LLC1)	RPMI 1640 conținând 2 mM L-glutamină (ref: BE12-702F, Lonza)	10% ser fetal bovin (ref: # 3302, Lonza)
Hepa1-6	DMEM (ref: 11960-044, Gibco)	10% ser fetal bovin (ref: # 3302, Lonza)
		2mM L-glutamină
		penicilină-streptomicină (Sigma G-6784)

35 Pentru utilizare experimentală, celulele tumorale aderente au fost detașate din balonul de cultură printr-un tratament de 5 minute cu tripsină-versene (ref: BE17-161E, Lonza), în mediu Hanks fără calciu sau magneziu (ref: BE10-543F, Lonza) neutralizată prin adăugarea unui mediu de cultură complet. Celulele au fost numărate într-un hemocitometru și viabilitatea lor va fi evaluată prin analiză de excludere cu albastru de tripan 0,25%.

40

Utilizarea animalelor

Șoareci femele sănătoși Balb/C (BALB/cByJ), de greutate și vârstă împerecheate, au fost obținuți de la CHARLES RIVER (L'Arbresles) pentru modelul experimental EMT6.

Șoarecii femele sănătoși C57BL/6 (C57BL16J), de greutate și vârstă împerecheate, femele au fost obținuți de la CHARLES RIVER (L'Arbresles) pentru modelele experimentale LL/2 (LLC1) și Hepa 1-6.

- 5 Animalele au fost menținute în starea de sănătate SPF în conformitate cu indicațiile FELASA și au fost urmate procedurile de adăpostire și experimentare pe animale în conformitate cu Regulamentele franceze și europene și Ghidul pentru îngrijirea și utilizarea animalelor de laborator [76, 77]. Animalele au fost păstrate în încăperi de locuit în condiții de mediu controlate: Temperatură: $22 \pm 2^\circ\text{C}$, Umiditate $55 \pm 10\%$, Fotoperioadă (12 ore de lumină/12 ore de întuneric), aer filtrat HEPA, 15 schimburi de aer pe oră fără recirculare. Incintele pentru animale au fost
- 10 prevăzute cu spațiu steril și adecvat cu material de așternut, alimente și apă, îmbogățire socială și de mediu (găzduire în grup) după cum se descrie: colivii de 900 cm^2 (ref: green, Tecniplast) în rafturi ventilate, așternut Epicea (SAFE), dietă iradiată de 10 kGy (A04-10, SAFE).

Design experimental și tratamente

Activitate antitumorală, modelul EMT6

- 15 Schema de tratament – începutul primei administrări a fost considerat Z0. În Z0, șoarecii neintegrați au fost randomizați în funcție de greutatea lor individuală în grupuri de 9/8 utilizând programul Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Franța). În Z0, șoarecii au primit vehicul (mediu de cultură) sau tulpină bacteriană. În Z14, toți șoarecii au fost încorporați cu celule tumorale EMT-6 așa cum se descrie mai jos. În Z24, șoarecii din grupul martor pozitiv au primit
- 20 tratamente cu anticorpi anti-CTLA-4.

Schema de tratament este rezumată în tabelul de mai jos:

Grup	Nr. de animale	Tratament	Doză	Cale	Program de tratament
1	8	Netratate	–	–	–
2	8	Vehicul (mediu)	–	PO	Q1D×42
3	9	Tulpina bacteriană # 1 (MRX004)	2×10^8 bacterii	PO	Q1D×42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TW×2

Monitorizarea animalelor a fost efectuată așa cum se descrie mai jos.

- 25 Inducerea tumorilor EMT6 la animale – În Z14, tumorile au fost induse prin injectare subcutanată de 1×10^6 celulele EMT-6 în $200\text{ }\mu\text{l}$ RPMI 1640 în flancul drept al șoarecilor.

Eutanasia – Fiecare șoarece a fost eutanasiat când a atins un obiectiv uman așa cum se descrie mai jos sau după maximum 6 săptămâni de la începerea dozării.

Activitate antitumorală, modelul LL/2 (LLC1)

- 30 Schema de tratament – începutul primei administrări a fost considerat Z0. În Z0, șoarecii neintegrați au fost randomizați în funcție de greutatea individuală a acestora în 7 grupuri de 9/8 folosind programul Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Franța). În Z0, șoarecii vor primi vehicul (mediu de cultură) sau tulpină bacteriană. În Z14, toți șoarecii au fost încorporați cu celule tumorale LL/2 așa cum se descrie mai jos. În Z27, șoarecii din grupul martor pozitiv au primit
- 35 tratamente cu anticorpi anti-CTLA-4.

Schema de tratament este rezumată în tabelul de mai jos:

Grup	Nr. de animale	Tratament	Doză	Cale	Program de tratament
1	8	Netratate	–	–	–
2	9	Vehicul (mediu)	–	PO	Q1D×42
3	9	Tulpina bacteriană # 1 (MRX004)	2×10^8 bacterii	PO	Q1D×42
4	8	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TW×2

Monitorizarea animalelor a fost efectuată așa cum se descrie mai jos.

- 40 Inducerea tumorilor LL/2 (LLC1) la animale – În Z14, tumorile au fost induse prin injectare subcutanată de 1×10^6 LL/2 (LLC1) în $200\text{ }\mu\text{l}$ RPMI 1640 în flancul drept al șoarecilor.

Eutanasia – Fiecare șoarece a fost eutanasiat când a atins un obiectiv uman așa cum se descrie mai jos sau după maximum 6 săptămâni de la începerea dozării.

Activitate antitumorală, model Hepa 1-6

- 45 Schema de tratament – începutul primei administrări a fost considerat Z0. În Z0, șoarecii neintegrați au fost randomizați în funcție de greutatea individuală a acestora în 7 grupuri de 9 utilizand programul Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Franța). În Z0, șoarecii au primit vehicul (mediu de cultură) sau tulpină bacteriană. În Z14, toți șoarecii au fost încorporați cu celule

tumorale Hepa 1-6 așa cum se descrie mai jos. În Z16, șoarecii din grupul martor pozitiv au primit tratamente cu anticorpi anti-CTLA-4.

Schema de tratament este rezumată în tabelul de mai jos:

Grup	Nr. de animale	Tratament	Doză	Cale	Program de tratament
1	9	Netratate	–	–	–
2	9	Vehicul (mediu)	–	PO	Q1D×42
4	9	Tulpina bacteriană # 2 (MRX004)	2×10^8 bacterii	PO	Q1D×42
7	9	Anti-CTLA4	10 mg/kg	IP	TW×2

5 Monitorizarea animalelor a fost efectuată așa cum se descrie mai jos.

Inducerea ortotopică a celulelor tumorale Hepa 1-6 la animale prin injecție intrasplinală – În Z14, un milion (1×10^6) de celule tumorale Hepa 1-6 în 50 μ l de mediu RPMI 1640 au fost transplante prin injecție intrasplinală la șoareci. Pe scurt, a fost făcută o mică incizie a flancului subcostal stâng și splina a fost exteriorizată. Splina a fost expusă pe un tampon de tifon steril și a fost injectată sub control vizual cu suspensia celulară cu un ac de calibrul 27. După inocularea celulară, splina a fost excizată.

Eutanasia – Fiecare șoarece a fost eutanasiat când a atins un punct final uman așa cum se descrie în secțiunea de mai jos sau după un maxim de 6 săptămâni după începerea dozării.

15 Evaluarea încărcării tumorale la eutanasiu – La momentul terminării, ficatul a fost colectat și cântărit.

Monitorizarea animalelor

Monitorizare clinică – Lungimea și lățimea tumorii au fost măsurate de două ori pe săptămână cu calibre, iar volumul tumorii a fost estimat prin această formulă [78]:

$$20 \quad \text{Volumul tumorii} = \frac{\text{lățime}^2 \times \text{lungime}}{2}$$

25 Obiective umane [79]: Semne de durere, suferință sau stres: postura de durere, mască de față de durere, comportament; Tumora care depășește 10% din greutatea corporală normală, dar care nu depășește 2000 mm³; Tumorile care interferează cu ambulația sau cu nutriția; Tumorile cu ulceratii sau eroziunea țesuturilor; % pierdere din masa corporală rămasă timp de 3 zile consecutive; Starea slabă a corpului, emaciare, cașexie, deshidratare; Lipsa prelungită de răspunsuri voluntare la stimuli externi; Respirație rapidă, anemie, sângerare semnificativă; Semne neurologice: mers în cerc, convulsii, paralizie; Scăderea susținută a temperaturii corpului; Distensie abdominală.

Anestezie – Anestezia cu izofluran gazos a fost utilizată pentru toate procedurile: chirurgie sau inoculare tumorală, injecții i.v., colectarea de sânge. Anestezia cu ketamină și xilazină au fost utilizate pentru procedura chirurgicală stereotaxie.

35 Analgezie – Protocolul analgezic carprofen sau multimodal carprofen/buprenorfină au fost adaptate la severitatea procedurii chirurgicale. A fost asigurată îngrijire non-farmacologică pentru toate procedurile dureroase. În plus, a fost furnizată asistență farmacologică care nu interferează cu studiile (tratament topic) la recomandarea medicului veterinar participant.

40 Eutanasiu – Eutanasiu animalelor a fost efectuată prin supra-dozare cu anestezie cu gaz (izofluran) urmată de dislocare cervicală, sau prin exsanguinare.

Rezultate

Activitate antitumorală, modelul EMT6

45 Rezultatele sunt prezentate în figura 73. Tratamentul cu tulpina bacteriană conform invenției a condus la o reducere clară a volumului tumorii relativ la ambii martori negativi. Martorul pozitiv a condus, de asemenea, la o reducere a volumului tumorii, așa cum ar fi de așteptat.

Activitate antitumorală, modelul LL/2 (LLC1)

50 Rezultatele sunt prezentate în figura 74. Martorul negativ și pozitiv nu apar așa cum ar fi de așteptat, deoarece volumul tumorii a fost mai mare la șoarecii tratați cu martorul pozitiv decât în grupurile martor negativ. Cu toate acestea, volumul tumorii la șoarecii tratați cu tulpina bacteriană conform invenției a fost comparabil cu grupul martor pozitiv, care este în concordanță cu un efect terapeutic util.

Activitate antitumorală, modelul Hepa 1-6

Rezultatele sunt prezentate în Figura 75. Martorul negativ netratat nu apare așa cum ar fi de așteptat, deoarece greutatea ficatului a fost mai mică în acest grup decât în celelalte grupuri. Totuși, martorul negativ tratat cu vehicul și grupurile martor pozitiv apar așa cum este de așteptat, deoarece șoarecii tratați cu vehicul în monoterapie au avut ficăți mai mari decât șoarecii tratați cu anticorpi anti-CTLA4, reflectând o sarcină mai mare în grupul martor negativ tratat cu vehicul. Tratamentul cu tulpina bacteriană conform invenției a condus la o reducere clară a masei ficatului (și, prin urmare, a încărcării tumorale) față de șoarecii din grupul martor negativ, tratați cu vehicul.

Aceste date indică faptul că tulpina 751/MRX004 poate fi utilă pentru tratarea sau prevenirea cancerului și, în special, pentru reducerea volumului tumorii în cancerele mamare, pulmonare și hepatice.

Exemplul 8 – Atașarea la celulele umane în mediu YCFA

Rezumat

Nivelul de legare a tulpinii 751 și a unui număr de tulpini de *Bifidobacterium breve* la celulele umane au fost determinate la 3 puncte de timp distincte în mediul YCFA. Bacteriile atașate la celulele umane au fost repuse în suspensie în mediu și apoi a fost analizată densitatea optică a mediului – cu cât densitatea optică este mai mare, cu atât este mai mare numărul de celule bacteriene și astfel, cu atât este mai mare nivelul de legare a celulelor bacteriene la celulele umane. S-a descoperit că tulpina 751 prezintă o atașare redusă la celulele umane în comparație cu tulpinile de referință de *Bifidobacterium breve*.

Rezultate și analize

Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figura 76.

După cum se arată în figura 76, tulpinile de *Bifidobacterium breve* prezintă un nivel ridicat de atașament la celulele umane în toate momentele de timp. Pe de altă parte, tulpina 751 are un nivel drastic redus de atașare la celulele umane. Prin urmare, aderența scăzută la celulele umane din tulpina 751 poate crește efectul benefic al compozițiilor din invenție asupra IL-17 sau căii Th17 și asupra bolilor mediate de către IL-17 sau calea Th17.

Exemplul 9 – Analiza de detecție a producției de exopolizaharide

Rezumat

Nivelul producției de exopolizaharidă (EPS) de către tulpina bacteriană conform invenției (751) și un număr de tulpini de *Bifidobacterium breve* au fost analizate la temperatura de 37°C timp de 48 de ore și la temperatura de 30°C timp de 72 de ore. EPS-urile sunt polizaharide produse de anumite bacterii care se leagă de suprafața exterioară a celulei bacteriene. Nivelul EPS-urilor de pe suprafața bacteriilor poate fi determinat folosind un test cu roșu de Congo care se leagă de polizaharide. O intensitate mai mare a absorbției roșului de Congo indică o concentrație mai mare de EPS pe suprafața bacteriilor. S-a descoperit că tulpina bacteriană conform invenției produce și leagă mai multe EPS-uri decât tulpinile de *Bifidobacterium breve*.

Rezultate și analize

Rezultatele acestui experiment sunt prezentate în Figura 77.

Așa cum se arată în Figura 77, tulpina bacteriană conform invenției a prezentat o absorbție mai mare a roșului de Congo decât tulpinile de *Bifidobacterium breve* la ambele temperaturi și puncte de timp. Prin urmare, tulpina conform invenției prezintă o producție mai mare de EPS și un nivel mai mare de EPS-uri legate extracelular. Deoarece EPS-urile permit bacteriilor să se lege de mucus și celulele epiteliale, tulpina bacteriană a invenției poate fi utilă pentru a concura cu celulele patogene pentru situsuri de legare pe celule epiteliale și în membranele mucoase. Astfel, tulpina bacteriană a invenției poate fi utilă pentru modularea microbiomului și pentru tratarea unui număr de boli asociate cu microbiomul.

Exemplul 10 – Testarea stabilității

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

Exemplul 11 – Analiza producției de exopolizaharidă legată și eliberată de MRX004

Pentru extracția EPS, MRX004 a fost cultivată în 10 ml de YCFA până când a atins faza exponențială târzie, când celulele bacteriene au fost separate de supernatanți prin centrifugare. Celulele au fost spălate o dată cu PBS pentru a îndepărta orice mediu de cultură rămas. EPS izolate sau eliberate (EPS-R) au fost precipitate din supernatanții de cultură prin tratare cu etanol 100% rece pe gheață (peste noapte la temperatura de 4°C cu agitare ușoară). Pentru a extrage EPS (EPS-B) capsular sau legat, celulele au fost incubate cu EDTA 0,05 M (peste noapte la 4°C cu agitare

ușoară) și supernatanții din acest tratament au fost colectați și apoi tratați cu 100% etanol răcit cu gheață (peste noapte la temperatura de 4°C cu agitare ușoară) pentru a precipita EPS-B. EPS-B și EPS-R precipitate au fost peletate prin centrifugare și au fost lăsate să se usuce pentru scurt timp într-o hota laminară înainte de a fi repuse în suspensie în suficientă apă sterilă Ultrapure pentru a obține o soluție uniformă. Pentru purificarea suplimentară a eșantioanelor, acestea au fost dializate împotriva apei Ultrapure sterile la un raport de 1:100 timp de 48 ore cu 3 modificări de tampon. EPS-B și EPS-R au fost cuantificate folosind metoda acidului fenol-sulfuric utilizând glucoza ca standard. Folosind această analiză, s-a găsit că MRX004 produce o cantitate mai mare de EPS-R (115 ?g) decât EPS-B (17 ?g) (Figura 78).

10 **Exemplul 12 – Testul de atașare al MRX004 la celulele Caco-2**

Atașarea MRX004 la celulele gazdă a fost analizată utilizând un test *in vitro* de co-cultură cu celule epiteliale intestinale Caco-2. Celulele Caco-2 au fost însemănțate la o densitate de 1×10^6 . Bacteriile au fost cultivate în 10 ml YCFA până când au atins faza exponențială târzie, cand au fost peletizate, spălate de două ori cu PBS și repuse în suspensie în mediu de cultură celulară fără antibiotice. Densitatea bacteriană a fost ajustată pentru a obține o multiplicitate aproximativă de infecție (MOI) de 10:1 (care a fost confirmată prin placare pe agar YCFA utilizând protocolul standard WASP) și MRX004 a fost co-incubat cu celulele Caco-2 în condiții anaerobe la temperatura de 37°C timp de 2 ore. Mediul a fost apoi îndepărtat și bacteriile nelegate au fost îndepărtate prin spălarea celulelor Caco-2 de trei ori cu PBS. Celulele Caco-2 legate de celulele bacteriene au fost lizate și îndepărtate din vas utilizând tratamentul cu 0,1% Triton X-100 și un volum de 50 ?l de lizat diluat a fost placat în agar YCFA folosind WASP. Atașamentul a fost calculat prin numărarea numărului de bacterii recuperate din lizat și exprimându-le ca procent din bacteriile totale. S-a constatat că MRX004 prezintă aderență scăzută (0,3% din cultura totală) la celulele Caco-2 (Figura 79).

25 **Exemplul 13 – Caracterizarea activității enzimatică**

Sistemul de testare a indicelui de profil analitic (API®) constă din benzi care conțin teste biochimice miniaturizate care testează activitatea enzimatică în speciile bacteriene. MRX004 (tulpina 751, bacteria depusă sub numărul de acces NCIMB 42380) a fost caracterizată utilizând două sisteme de testare API: Rapid ID 32A – acest sistem este proiectat special pentru specii anaerobe și cuprinde teste pentru metabolismul carbohidraților, aminoacizilor și nitraților, precum și de activitate pentru fosfataza alcalină; și API® 50 CH – acest sistem testează fermentarea a 49 surse de carbohidrați și poate fi utilizat împreună cu API® CHL Medium pentru analiza speciilor anaerobe.

Testarea Rapid ID 32A a fost efectuată pe colonii bacteriene conform instrucțiunilor producătorului. Pe scurt, bacteriile au fost cultivate pe agar YCFA timp de 24 de ore la temperatura de 37°C într-o stație de lucru anaerobă. Coloniile au fost îndepărtate de pe plăci utilizând o buclă sterilă de 5 ?l de inoculare și au fost repuse în suspensie într-o fiolă de 2 ml de API® Suspension Medium până când a fost obținută o densitate aproximativ echivalentă cu cea a standardului McFarland nr. 4. Cincizeci și cinci de microlitri de suspensie bacteriană au fost adăugați la fiecare alveolă pe o bandă Rapid ID 32A, iar testul de urează a fost suprapus cu două picături de ulei mineral. Benzi au fost acoperite cu un capac din plastic și incubate aerobice la temperatura de 37°C timp de 4 ore, după care s-a dezvoltat randul de jos de alveole utilizând reactivii următori: NIT: câte 1 picătură din fiecare dintre NIT1 și NIT2; IND: 1 picătură de reactiv James; toate alveolele rămase: 1 picătură de reactiv FastBlue. Benzile au fost incubate la temperatura camerei timp de 5 minute, după care a fost înregistrată culoarea fiecărei alveole și i s-a atribuit o valoare negativă, intermediară pozitivă sau pozitivă.

Rezultatele analizei Rapid ID 32A sunt prezentate în Figura 80. MRX004 a testat pozitiv pentru fermentarea mai multor surse de carbohidrați, și anume α -galactozidază și β -galactozidază, α -glucozidază și β -glucozidază, α -arabinoză, manoză și rafinoză precum și aminoacizii arginină, prolină, fenilalanină, leucină, tirozină, glicină și histidină. Interesant, au fost raportate roluri pentru unii dintre acești aminoacizi în astm. De exemplu, concentrațiile plasmatice crescute de fenilalanină și histidină au fost raportate ca fiind asociate cu efecte adverse în astm, incluzând inflamația crescută, producția de histamină și hipersensibilitatea căilor respiratorii. În plus, metabolismul argininei este implicat în patogeneza astmului bronșic, dat fiind că s-au raportat niveluri crescute ale metabolitului argininei L-ornitină la pacienții pediatrici și administrarea de arginină a atenuat inflamația într-un model de astm *in vivo*. Pe baza acestor rapoarte, este posibil ca metabolismul aminoacidului prin MRX004 să fie implicat în efectele anti-astm ale acestei tulpini.

S-a efectuat o analiză comparativă Rapid ID 32A între MRX004 și patru tulpini de tipuri de *B. breve*, care sunt notate în Figura 80B ca Bif Ref 1 (DSM 20091), Bif Ref 2 (DSM 20213),

Bif Ref 6 (JCM 7017) și Bif Ref 7 (UCC2003). Această analiză a demonstrat că MRX004 a fost singura tulpină testată pentru fermentarea polizaharidei rafinoză, care poate fi semnificativă, deoarece rafinoza este implicată în producerea de componente bacteriene cum ar fi exopolizaharidele, iar fermentația de rafinoză poate conferi, de asemenea, efecte asupra gazdei, cum ar fi un butirat cecal crescut, proliferarea gastrointestinală crescută și pierderea în greutate.

API® 50 CH a fost efectuată pentru a examina în continuare metabolismul carbohidraților, asupra MRX004. Conform instrucțiunilor producătorului, bacteriile au fost cultivate în bulion de 10 ml YCFA timp de 16–18 ore la temperatura de 37°C într-o stație de lucru anaerobă. Această cultură a fost diluată în 10 ml mediu API® CHL astfel încât să se obțină o densitate aproximativ echivalentă cu standardul McFarland nr. 2 și 110 ?l din acest amestec au fost utilizate pentru inocularea fiecărei alveole de pe un set de benzi de test API® 50 CH. Benzile de test au fost incubate într-o cutie de incubație umidificată la temperatura de 37°C într-o stație de lucru anaerobă timp de 48 de ore, după care a fost înregistrată culoarea fiecărei alveole și i s-a atribuit o valoare negativă, intermediară pozitivă, pozitivă sau incertă.

Folosind API® 50, MRX004 a testat pozitiv pentru utilizarea următoarelor surse de carbohidrați: amidon, amigdalina, arbutină, celobioză, esculină, galactoză, gentiobioză, glucoză, glicogen, fructoză, fucoză, lactoză, maltoză, manoză, manitol, melibioză, melezitoză, metil α -D-glucopiranozidă, N-acetilglucozamină, riboză, zaharoză, salicină, sorbitol, trehaloză, turanoză și xilitol. Aceste rezultate s-au corelat cu cele obținute pentru testarea Rapid ID 32A prin faptul că MRX004 a demonstrat fermentarea galactozei, a glucozei, a manozei și a rafinozei în ambele sisteme de test. Interesant este faptul că unele substraturi de carbohidrați MRX004, și anume galactoză și fructoză, pot fi implicate în mecanismul de acțiune al acestei tulpini, pe baza efectelor raportate în literatură. Galactoză α -1,3-galactoză derivată din surse de carne este un alergen cunoscut și un agent cauzator de anafilaxie, iar nivelurile de consum ale fructozei dietetice sunt corelate cu severitatea crescută a astmului. Luate împreună, aceste două seturi de date API pentru MRX004 sugerează că metabolizarea acestei tulpini poate juca un rol în efectele sale anti-astm.

Exemplul 14 – Analiza genomului

O comparație a conținutului de genom al tulpinii MRX004 și a tulpinilor de referință de *B. breve*, 1, 2, 6 și 7 a fost efectuată utilizând blastn ca parte a suitei de programe BLAST + 2.3.0. Un scor limită de valoare E de $10E-5$ a fost utilizat pe parcursul analizei.

Au fost identificate 333 de gene (Tabelul 1) care sunt prezente în genomul tulpinii MRX004, dar sunt absente din tulpinile *B. breve* de referință 1 (DSM 20091), 2 (DSM 20213), 6 (JCM 7017) și 7 (UCC2003). Multe dintre genele enumerate în Tabelul 1 sunt frecvent observate ca fiind hipervariabile printre tulpinile de *B. breve* [80]. Așa cum era de așteptat, regiunile de variabilitate includ genele care codează proteinele implicate în metabolismul și transportul carbohidraților, genele asociate bacteriofagilor, elementele mobile, precum și 173 de gene care sunt prezise ca codând proteine sau gene cu funcție necunoscută.

Genele care sunt prezente în MRX004 dar absente de la tulpinile de referință *B. breve* 1, 2, 6 și 7 sunt enumerate în Tabelul 1. Genele care nu sunt evidențiate lipsesc în mai mult de una din cele patru tulpini de referință. Numărul mare de gene care sunt prezente în MRX004 dar nu sunt prezente în numeroase tulpini de referință *B. breve* sugerează că MRX004 este distinct de și/sau distins de aceste tulpini de *B. breve*. Genele evidențiate cu sublinieri simple sunt prezente în MRX004 dar absente în tulpina de referință *B. breve* 1. Genele evidențiate cu sublinieri duble și cu caractere aldine sunt prezente în MRX004 dar absente în tulpina de referință *B. breve* 2. Genele evidențiate cu italice sunt prezente în MRX004 dar absente în tulpina de referință *B. breve* 6. Pentru analiza blastnică s-a folosit un scor maxim de decuplare a valorii E de $10E-5$.

Tabelul 1

4DBb_0021c	Transportorul ABC pentru zaharuri multiple, proteină care se leagă la substrat
4DBb_0023	Probabil regulator transcripțional tip LacI
4DBb_0024	Zaharoză-6-fosfat hidrolază (EC 3.2.1.B3)
4DBb_0026c	Maltodextrină glucozidază (EC 3.2.1.20)
4DBb_0036c	Proteină ipotetică
4DBb_0038c	Proteină de reglare a operonului MSM (metabolism al zaharurilor multiple)
4DBb_0119c	Proteină ipotetică
4DBb_0120c	Proteină ipotetică
<i>4DBb_0187</i>	<i>Proteină ipotetică</i>
<i>4DBb_0188</i>	<i>Proteină ipotetică</i>
4DBb_0203c	Proteină de diviziune celulară FtsL
4DBb_0204c	Proteină ipotetică

4DBb_0205c	Proteină ipotetică
4DBb_0206c	Regulator transcripțional, familia HxlR
4DBb_0207	NADH-flavin reductaza legată de Rrf2
4DBb_0208	Proteina asociată cu RecG a helicazei ADN dependentă de ATP
4DBb_0209c	Proteină ipotetică
4DBb_0210	<i>Transportator prezumtiv</i>
4DBb_0211	<i>Omega-3 subunitatea acizilor grași polinesaturați, PfaA</i>
4DBb_0212	<i>Polichetidă sintaza de tip I</i>
4DBb_0213c	Proteină ipotetică
4DBb_0214c	Proteină ipotetică
4DBb_0215	Proteină ipotetică
4DBb_0216c	Proteină ipotetică conservată
4DBb_0218c	Proteină ipotetică
4DBb_0219c	ADN-citozin metiltransferază
4DBb_0220c	Proteină ipotetică
4DBb_0221c	Proteină ipotetică
4DBb_0222c	Proteină ipotetică
4DBb_0223c	<i>integrază</i>
4DBb_0256	<i>Proteină ipotetică</i>
4DBb_0257c	Regulator de transcripție de tip LacI
4DBb_0258	<i>Glicozil hidrolază prezumtivă având funcție necunoscută (DUF1680)</i>
4DBb_0284	Regulator transcripțional, familia AraC
4DBb_0285	Sistemul de transport ABC N-acetil-D-glucozamină, proteina care se leagă la zahar
4DBb_0286	Transportator ABC permează al zaharului
4DBb_0287	ABC Sistemul de transport N-acetil-D-glucozamină, proteina permează 2
4DBb_0288	Alfa-galactozidaza (EC 3.2.1.22)
4DBb_0329c	<i>Componenta ATPazei BioM a modului de energizare a transportatorului ECF al biotinei</i>
4DBb_0330	Moderatorul major al superfamiliei MFS_1
4DBb_0368	GMP sintetaza [care hidrolizează glutamina] (EC 6.3.5.2)
4DBb_0369c	Proteina profag gp29 similară mu
4DBb_0410	Galactozidază prezumtivă
4DBb_0419	Proteină ipotetică
4DBb_0421	Glicoziltransferază SypP
4DBb_0422	Proteina biosintezei polizaharidei capsulare
4DBb_0423	Proteină ipotetică
4DBb_0424	Glicoziltransferază
4DBb_0425	Proteina membranară implicată în exportul de antigen O, acizi lipoteichoici ai acidului teichoic
4DBb_0426	Glicoziltransferază (EC 2.4.1.-)
4DBb_0427	Sintaza acidului 2-succinil-5-enolpiruvil-6-hidroxi-3-ciclohexen-1-carboxilic (EC 2.2.1.9)
4DBb_0428	Proteină ipotetică
4DBb_0429	Proteină element mobil
4DBb_0430	Proteină ipotetică
4DBb_0431c	Proteină ipotetică
4DBb_0432c	Proteină element mobil
4DBb_0433c	Proteină ipotetică
4DBb_0434c	Proteină ipotetică
4DBb_0435	Proteină ipotetică
4DBb_0436	Proteină ipotetică
4DBb_0437c	Proteină ipotetică
4DBb_0438c	Proteină element mobil
4DBb_0439c	Proteină ipotetică
4DBb_0440c	<i>Proteină element mobil</i>
4DBb_0518c	<i>Proteină domeniu PIN</i>

4DBb_0519c	Proteină ipotetică
4DBb_0555c	Proteină ipotetică
4DBb_0556c	Proteină ipotetică
4DBb_0557c	Proteină ribozomală LSU L31p @ proteină ribozomală LSU L31p, independentă de zinc
4DBb_0558c	Proteină ribozomală SSU S14p (S29e) @ proteină ribozomală SSU S14p (S29e), independentă de zinc
4DBb_0559c	Proteină ribozomală LSU L33p @ proteină ribozomală LSU L33p, independentă de zinc
4DBb_0560c	Proteină ipotetică
4DBb_0561	Proteină ipotetică
4DBb_0613c	Sintetază celulozică (formatoare UDP) (EC 2.4.1.12)
4DBb_0614	Chitinază (EC 3.2.1.14)
4DBb_0615	Casetă senzorială/proteină din familie GGDEF
4DBb_0660	Proteină element mobil
4DBb_0662	Proteină element mobil
4DBb_0663c	Neuraminidază NanP
4DBb_0664	Proteină ipotetică
4DBb_0665	Proteină ipotetică
4DBb_0666	Proteină element mobil
4DBb_0667	Proteină element mobil
4DBb_0668	Proteină element mobil
4DBb_0718	Proteină prezumtivă reglatoare a biotinei (familia GntR)
4DBb_0719	Proteină ipotetică
4DBb_0720	Proteină ipotetică
4DBb_0778	Proteină ipotetică
4DBb_0789c	Proteină element mobil
4DBb_0790c	Proteină element mobil
4DBb_0837c	Proteină membranară integrată posibil conservată
4DBb_0840	Proteină de eflux al macrolidelor
4DBb_0866	ATPază transportatoare de cationi, familia E1-E2
4DBb_0867	Proteină ipotetică
4DBb_0872	Proteină ipotetică
4DBb_0879c	Regulator transcripțional, familii Cro/CI
4DBb_0880c	Proteină membranară integrată
4DBb_0946	Transportator MFS general de substrat
4DBb_0947c	Proteina membranară prezumtivă
4DBb_0948c	Proteine element mobil
4DBb_0952c	Proteină ipotetică
4DBb_0953	Proteină ipotetică
4DBb_0954c	Proteină ipotetică
4DBb_0955c	Proteină ipotetică
4DBb_0956c	Permeaze prevăzute
4DBb_0957	Proteină ipotetică conservată îndeaproape
4DBb_0958c	Proteină ipotetică conservată
4DBb_0986c	Proteină ipotetică
4DBb_0987c	<u>Componenta ATPază duplicată BL0693 a modului de energizare a transportorului ECF prezumtiv</u>
4DBb_0988c	<u>Componenta transmembranară BL0694 a modului de energizare a transportorului ECF prezumtiv</u>
4DBb_1009c	Holină de bacteriofag
4DBb_1010c	Precursorul transglicozilazei D murine litice legat de membrană (EC 3.2.1.-)
4DBb_1011c	Proteină ipotetică
4DBb_1012	Proteină ipotetică
4DBb_1013c	Proteină ipotetică
4DBb_1014c	Proteină ipotetică
4DBb_1015c	Proteină ipotetică

4DBb_1016c	Proteină ipotetică
4DBb_1017c	Proteină de coadă a bacteriofagului
4DBb_1018c	Proteină care măsoară lungimea cozii bacteriofagului
4DBb_1019c	Proteină ipotetică
4DBb_1020c	Proteină ipotetică
4DBb_1021c	Proteină ipotetică
4DBb_1022c	Proteină ipotetică
4DBb_1023c	Proteină ipotetică
4DBb_1024c	Proteină ipotetică
4DBb_1025c	Proteină ipotetică
4DBb_1026c	Proteină ipotetică
4DBb_1027c	Proteină ipotetică
4DBb_1028c	Proteină ipotetică
4DBb_1029c	Proteină ipotetică
4DBb_1030c	Proteina de bacteriofag
4DBb_1031c	Terminază a bacteriofagului, subunitatea mare # Pham2
4DBb_1032c	Terminază a bacteriofagului, subunitatea mare
4DBb_1033c	Proteină ipotetică
4DBb_1034	Proteină ipotetică
4DBb_1035	Proteină ipotetică
4DBb_1036c	FIG00424913: proteină ipotetică
4DBb_1037c	Proteină ipotetică
4DBb_1038c	Proteină ipotetică
4DBb_1039c	Proteină ipotetică
4DBb_1040c	Proteină ipotetică
4DBb_1041c	Proteină ipotetică
4DBb_1042c	Proteină ipotetică
4DBb_1043c	Proteină ipotetică
4DBb_1044c	Proteină ipotetică
4DBb_1045c	Proteină ipotetică
4DBb_1046c	Proteină ipotetică
4DBb_1047c	Proteină de separare a cromozomilor (plasmidei) ParB
4DBb_1048c	Proteină ipotetică
4DBb_1049c	Proteină ipotetică
4DBb_1050c	Proteină de legare a AND-ului monocatenar
4DBb_1051c	Proteină ipotetică
4DBb_1052c	Proteină ipotetică
4DBb_1053c	Proteină ipotetică
4DBb_1054c	Proteină ipotetică
4DBb_1055c	Proteină ipotetică
4DBb_1056	Proteină ipotetică
4DBb_1057c	Proteină ipotetică
4DBb_1058c	Proteină ipotetică
4DBb_1059	Proteină ipotetică
4DBb_1060	Proteină ipotetică
4DBb_1061	Proteină ipotetică
4DBb_1062c	Proteină ipotetică
4DBb_1063c	Proteină ipotetică
4DBb_1064	Integraza de bacteriofagi prezumtivă
4DBb_1113	Permeazele superfamiliei de facilitatori majori
4DBb_1142	Proteină ipotetică
4DBb_1143c	Proteină ipotetică
4DBb_1172	Integraza
4DBb_1173c	Proteină ipotetică
4DBb_1174c	Proteină ipotetică conservată îndeaproape
4DBb_1175	Proteină ipotetică
4DBb_1176c	Proteină ipotetică

4DBb_1177	Transportator ABC, proteină de legare la ATP
4DBb_1178	Proteină ipotetică
4DBb_1179	Proteină ipotetică
4DBb_1180	Proteină ipotetică
4DBb_1181	Proteină ipotetică
4DBb_1182	Kinază senzorială de sistem cu două componente
4DBb_1183	Proteină ipotetică
4DBb_1203c	Proteină regulatoare, LacI
4DBb_1204c	FIG. 01131316: proteină ipotetică
4DBb_1205c	Permează sistem de transport
4DBb_1206c	Sistemul de transport ABC al oligozaharidei rhamnoză preconizat, componenta permează 2
4DBb_1207c	Proteină de legare a solutului extracelular, familia 1
4DBb_1212c	Proteină ipotetică
4DBb_1213c	Proteină ipotetică
4DBb_1214	Proteină element mobil
4DBb_1215	Proteină element mobil
4DBb_1219	Proteină ipotetică
4DBb_1220c	Proteinele ipotetice,
4DBb_1221c	Proteină cu funcție necunoscută din familia DUF262
4DBb_1222c	Proteină ipotetică
4DBb_1223	Proteină ipotetică
4DBb_1224	Proteină element mobil
4DBb_1234c	Sistem de transport de zahăr tip ABC, componenta periplasmică
4DBb_1235	Proteină ipotetică
4DBb_1328c	Integrază de bacteriofag prezumtivă
4DBb_1329	Proteină ipotetică
4DBb_1330	Proteină ipotetică
4DBb_1331c	Proteină ipotetică
4DBb_1332	Proteină ipotetică
4DBb_1333	Proteină ipotetică
4DBb_1334	Proteină ipotetică
4DBb_1335c	Proteină ipotetică
4DBb_1336c	Regulator negativ al expresiei beta-lactamazei
4DBb_1337c	Proteină ipotetică
4DBb_1338c	Proteină ipotetică
4DBb_1339c	Proteină ipotetică
4DBb_1340c	Proteină ipotetică
4DBb_1341c	Proteină ipotetică
4DBb_1342c	Proteină ipotetică
4DBb_1343c	Proteină ipotetică
4DBb_1344	Proteină ipotetică
4DBb_1345c	Proteină a fibrei de coadă a bacteriofagilor
4DBb_1346c	Proteină ipotetică
4DBb_1347c	Proteină coadă minoră a bacteriofagilor
4DBb_1348c	Proteină ipotetică
4DBb_1349c	Proteină ipotetică
4DBb_1350c	Proteină de bacteriofag
4DBb_1351c	Proteină de bacteriofag
4DBb_1352c	Proteină de bacteriofag
4DBb_1353c	Proteină de bacteriofag
4DBb_1354c	Proteină ipotetică
4DBb_1355c	Proteină ipotetică
4DBb_1356c	Proteină capsidă majoră de bacteriofag fagă # Fam0025 # Pham164
4DBb_1357c	Protează prohead de bacteriofag prezumtivă
4DBb_1358c	Proteină portal de bacteriofag
4DBb_1359c	gp2, terminază

4DBb_1360c	Proteină ipotetică
4DBb_1361c	Proteină ipotetică
4DBb_1362c	Proteină ipotetică
4DBb_1363c	Proteină ipotetică
4DBb_1364c	Proteină ipotetică
4DBb_1365c	Proteină ipotetică
4DBb_1366c	Proteină ipotetică
4DBb_1367c	Proteină ipotetică
4DBb_1368c	Proteină ipotetică
4DBb_1369c	Proteină ipotetică
4DBb_1370c	Proteină ipotetică
4DBb_1371c	Proteină ipotetică
4DBb_1372c	Proteină de legare a AND-ului monocatenar
4DBb_1373c	Proteină ipotetică
4DBb_1374c	Proteină de reparare a AND-ului recombinant RecT (asociată cu profagul)
4DBb_1375c	Proteină asociată cu bacteriofagul
4DBb_1376c	Proteină ipotetică
4DBb_1377c	Proteină ipotetică
4DBb_1378c	Proteină ipotetică
4DBb_1379c	Proteină ipotetică
4DBb_1380c	Metiltransferază (EC 2.1.1.-)
4DBb_1381c	Proteină ipotetică
4DBb_1382c	Proteină ipotetică
4DBb_1383c	Proteină ipotetică
4DBb_1384	Proteină ipotetică
4DBb_1385	Proteină ipotetică
4DBb_1386	Proteină ipotetică
4DBb_1387	Proteină ipotetică
4DBb_1388	Proteină ipotetică
4DBb_1456	Zaharoză permează, superfamilia facilitatorului major
4DBb_1486c	Esterază/lipază
4DBb_1487c	Glucoză/manoză: H ⁺ simporter GlcP
4DBb_1488c	Regulator de răspuns cu două componente <i>yesN</i>
4DBB_1533c	Proteină ipotetică
4DBb_1534c	Proteină ipotetică
4DBb_1535c	Sistem de modificare-restricție de tip I, subunitatea de restricție R (EC 3.1.21.3)
4DBb_1536c	Helicază ADN dependentă de ATP <i>recG</i> (EC 3.6.1.-)
4DBb_1537c	Sistem de modificare-restricție de tip I, subunitatea de specificitate S (EC 3.1.21.3)
4DBb_1538c	Sistem de modificare-restricție de tip I, subunitatea M a ADN-metiltransferazei (EC 2.1.1.72)
4DBb_1539c	Proteină ipotetică
4DBb_1540	Sistem de modificare-restricție de tip I, subunitatea de specificitate S (EC 3.1.21.3)
4DBb_1541	Integrază
4DBb_1542c	Sistem de modificare-restricție de tip I, subunitatea de specificitate S (EC 3.1.21.3)
4DBb_1545c	Sistem de transport ABC al ribozei, permează de înaltă afinitate RbsD (TC 3.A.1.2.1)
4DBb_1546c	Sistem de transport ABC al ribozei, proteina de legare a ribozei periplasmice RbsB (TC 3.A. 1.2.1)
<i>4DBB_1547c</i>	<i>Sistem de transport ABC al ribozei, proteina permează RbsC (TC 3.A.1.2.1)</i>
<i>4DBB_1548c</i>	<i>Sistem de transport ABC al ribozei, proteină RbsA care leagă ATP-ul (TC 3.A.1.2.1)</i>
<i>4DBB_1550c</i>	<i>Proteină ipotetică</i>
<i>4DBB_1551</i>	<i>Proteină ipotetică</i>
<i>4DBB_1552c</i>	<i>Regulatorul de transcripție de tip LacI</i>

4DBb_1553c	Similară cu proteina rezistenței la tetraciclină
4DBb_1554c	Ribokinază (EC 2.7.1.15)
4DBb_1555c	Butanol dehidrogenază A dependentă de NADH (EC 1.1.1.–)
4DBb_1556c	Fosfoglicolat fosfatază (EC 3.1.3.18)
4DBb_1557c	Nucleozida hidrolază preferând inozin-uridina (EC 3.2.2.1)
4DBb_1558c	Fructokinază (EC 2.7.1.4)
4DBb_1559c	Fosforibozilantranilat izomerază (EC 5.3.1.24)
4DBb_1560c	Componenta ATPase STY3233 a modulului de energizare a transportorului ECF reglat cu queuozină
4DBb_1561c	Componenta ATPase a modulului general de energizare a transportatorilor ECF
4DBb_1562c	Componenta transmembranară STY3231 a modulului de energizare a transportorului ECF reglat cu queuozină
4DBb_1563c	Componenta specifică substratului STY3230 a transportorului ECF reglat cu queuozină
4DBb_1564	Zahar kinază ipotetică în cluster cu familia de kinaze indigoidină sintază indA, PfkB
4DBb_1569	Regulator transcripțional, familia TetR
4DBb_1570c	Esterază/lipază
4DBb_1571c	Proteină ipotetică
4DBb_1572c	Proteină ipotetică
4DBb_1573	COG1309: Regulator transcripțional
4DBb_1574c	Proteină ipotetică
4DBb_1578c	Proteină purtătoare de melibioză
4DBb_1579c	Proteină ipotetică
4DBb_1580c	Regulator transcripțional, familia TetR
4DBb_1581	Proteină ipotetică
4DBb_1582	Regulator de răspuns cu două componente colocalizat cu transportorul HrtAB
4DBb_1583	Proteină ipotetică
4DBb_1584c	Proteină ipotetică
4DBb_1585	Histidinkinază senzorială
4DBb_1586	Proteina C ATPază de transport al Mg(2+)
4DBb_1587	Regulator transcripțional, familia AbrB
4DBb_1588	Proteină ipotetică
4DBb_1620c	<i>Oligoribonuclează 3'-la-5' (orn)</i>
4DBb_1769c	Activator transcripțional MltR
4DBb_1770c	Xilitol dehidrogenază (EC 1.1.1.9)
4DBb_1771c	
4DBb_1773c	Proteină din familia glioxalază
4DBb_1774c	Transportator de ribitol/xilitol/arabitol, superfamilia MFS
4DBb_1775c	Sorbitol dehidrogenază (EC 1.1.1.14)
4DBb_1926c	<i>Proteina membranară, legată de proteina Actinobacillus (1944)168)</i>
4DBb_1928c	Glicozil transferază, proteina din familia grupei 2
4DBb_1929c	Proteină de legare ATP de export al acidului teichoic TagH (EC 3.6.3.40)
4DBb_1930c	Permează de translocare a polizaharidelor conținând ramnoză
4DBb_1934c	<i>Proteină ipotetică</i>
4DBb_1935	<i>Glicoziltransferază posibilă</i>
4DBb_1936c	Proteina din familia ancorei suprafaței peretelui celular
4DBb_1937c	D-alanil-D-alanină carboxipeptidază (EC 3.4.16.4)
4DBb_1965	Proteină ipotetică
4DBb_2010c	Proteină element mobil
4DBb_2011	Regulator de transcripție, familia LacI
4DBb_2012	Transportator ABC de xiloză, proteina XylF care leagă xiloza periplasmică
4DBb_2013	Sistem de transport ABC al ribozei, proteina RbsA care se leagă la ATP (TC 3.A.1.2.1)
4DBb_2014	Sistem de transport ABC al ribozei, proteina permează RbsC (TC 3.A.1.2.1)
4DBb_2015	Proteină ipotetică
4DBb_2016	Proteină element mobil

4DBb_2028c	Beta–glucozidază (EC 3.2.1.21)
------------	--------------------------------

Secvențe

- 5 SEQ ID NO: 1 (secvența consensuală 16S rRNA pentru tulpina 751)
 GGGACAGGCTCAGGATGAACGCCGGCGCGTGTCTTAACACATGCAAGTGAACGGGATCCATCGGGCTTTGCCT
 GGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGCGTGACCGACCTGCCCCATGCACCGGAATAGCTCCTGGAAACG
 GGTGGTAATGCCGGATGCTCCATCACACCGCATGGTGTGTGGGAAAGCCTTTGCGGCATGGGATGGGGTCGCG
 TCCTATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCC
 ACATTGGGACTGAGATACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
 TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGGAGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACCTTT
 GTGTTGAGTGTACCTTTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGC
 GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTCGTGCGGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC
 GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTGTAACGGTGGAAT
 GTGTAGATATCGGGAAGAACAACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCG
 TGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCC
 ACGGGTTCGGTGTGCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACCTCAAAGA
 AATTGACGGGGGCGCCACAAAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCT
 TGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTCGTCGTC
 AGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTGTG
 CCGGGAACCTACGGGGGACCGCCGGGGTTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATATGCCCTTA
 CGTCCAGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGCGCGAGCTGGAGCGGATCCCTGA
 AAACCGGTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCTAGTAATCGCGAATCAG
 CAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGATACACACCGCCGTCAGTCAATGAAAGTGGGCAGCACCCGAA
 GCCGGTGGCCTAACCCCTGCGGGAGGGAGCCKC
 SEQ ID NO: 2 (secvența genomului tulpinii 751) – vezi lista electronică a secvențelor din WO
 2016/203223

10 **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
 15 [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.
 20 [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
 25 [14] Goldin și Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2: S96–100.
 [15] Azad și colab. (2013) *BMJ.* 347: f6471.
 [16] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 557–563.
 [17] Srůtková și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87 (1): 10–6.
 [18] Ye și colab. (2015) *PLoSOne.* 10 (1): e0117704.
 30 [19] Fabro și colab. (2015) *Immunobiology.* 220 (1): 124–35.
 [20] Yin și colab. (2014) *Immunogenetics.* 66 (3): 215–8.
 [21] Cheluvappa și colab. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175 (2): 316–22.
 [22] Schieck și colab. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133 (3): 888–91.
 [23] Balato și colab. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28 (8): 1016–1024.
 35 [24] Monteleone și colab. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
 [25] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc.* 6:256–259
 [26] Miossec și Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11 (10): 763–76.
 [27] Yang și colab. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35 (10): 493–500.
 [28] Koenders și colab. (2006) *J. Immunol.* 176: 6262 – 6269.
 40 [29] Amedei și colab. (2012) *Int J Mol Sci.* 13 (10): 13438–60.
 [30] Shabgah și colab. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31 (4): 256–61.

- [39] Numasaki și colab. (2003) *Blood*. 101: 2620–2627.
- [40] Zhang și colab. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 533–537.
- [41] Karin (2006) *Nature*. 441: 431–436.
- [42] Faghieh și colab. (2013). *Iranian Journal of Immunology*. 10 (4): 193–204.
- 5 [43] Numasaki și colab. (2005) *J. Immunol.* 175: 6177–6189
- [44] Hammerich și Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol.* 7: 297–306.
- [45] Haabeth și colab. (2012) *Oncoimmunology* 1 (1): 1146–1152.
- [46] Lejeune și colab. (2006) *Cancer Immun.* 6: 6
- [47] Pace și colab. (1983) *PNAS*. 80: 8782–6.
- 10 [48] Sgadari și colab. (1996) *PNAS*. 93: 13791–6.
- [49] Arenberg și colab. (1996) *J. Exp. Med.* 184: 981–92.
- [50] Sgadari și colab. (1997) *Blood*. 89: 2635–43.
- [51] Miyamoto–Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9–24.
- [52] „Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols“, editată de către Day și McLellan, Humana
- 15 Press.
- [53] Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592–3597.
- [54] Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [55] Kailasapathy și colab. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3 (2): 39–48.
- [56] „Handbook of Pharmaceutical Excipients“, ediția a doua, (1994), editată de A Wade și PJ
- 20 Weller
- [57] „Remington's Pharmaceutical Sciences“, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro editor, 1985)
- [58] „Handbook of Microbiological Media“, ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [59] „Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry“ (1996) Jennie C. Hunter-Cevera,
- Academic Press
- 25 [60] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581: 247–61.
- [61] Gennaro (2000) „Remington: The Science and Practice of Pharmacy“, ediția a XX-a, ISBN: 0683306472.
- [62] „Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course“, (Ream și colab., editori,
- 1998, Academic Press).
- 30 [63] „Methods In Enzymology“ (S. Colowick și N. Kaplan, editori, Academic Press, Inc.)
- [64] „Handbook of Immunology Experimental“, Vol. I–IV (D. M. Weir și C. C. Blackwell, editori,
- 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [65] Sambrook și colab. (2001) „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, ediția a III-a (Cold
- Spring Harbor Laboratory Press).
- 35 [66] „Handbook of Surface and Colloidal Chemistry“ (Birdi, K.S. editor, CRC Press, 1997)
- [67] Ausubel și colab. (editori) (2002) „Short protocols in molecular biology“, ediția a V-a
- (Protocoale curente).
- [68] „PCR (Introduction in Biotechniques Series)“, (Newton & Graham editori, 1997, Springer
- Verlag)
- 40 [69] „Current Protocols in Molecular Biology“ (F. M. Ausubel și colab., editori, 1987) Supliment
- 30
- [70] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482–489.
- [71] Brand și colab. (2007) *Nature Protocols*, 2 (5): 1269–1275
- [72] Jiao și colab. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184 (4): 1085–93.
- 45 [73] Rockwell și colab., (1972) *J Natl Cancer Inst.* 49: 735–49.
- [74] Bertram și Janik (1980) *Cancer Lett.* 11: 63–73.
- [75] Darlington (1987) *Meth Enzymol.* 151: 19–38.
- [76] „Principe d'ethique de l'experimentation animale“, Directiva nr. 2010/63 CEE 22 septembrie
- 2010, decret nr. 2013-118 1 februarie 2013.
- 50 [77] „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“, ediția a opta. The National Academies
- Press; 2011
- [78] Simpson-Herren și Lloyd (1970) *Cancer Chemother Rep.* 54: 143–74.
- [79] Workman și colab. (2010) *Br. J. Cancer.* 102: 1555–1577.
- [80] Bottacini și colab. (2014) *BMC Genomics*. 15: 170, DOI: 10.1186/1471-2164-15-170, PMID:
- 55 24581150

LISTA DE SECVENȚE

5	<110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED					
	<120> COMPOZIȚII CONȚINÂND TULPINI BACTERIENE					
	<130> P066263WO					
10	<150> GB 1510467.2					
	<151> 2015-06-15					
	<150> GB 1520501.6					
	<151> 2015-11-20					
15	<160> 1					
	<170> SeqWin2010, versiunea 1.0					
20	<210> 1					
	<211> 1439					
	<212> ADN					
	<213> Necunoscut					
25	<220>					
	<223> secvența de consens 16S rRNA a consensului 751					
	<400> 1					
30	gggacaggct	caggatgaac	gccggcggcg	tgcttaaacac	atgcaagtcg	aacgggatcc 60
	atcgggcttt	gcctggtggt	gagagtggcg	aacgggtgag	taatgcgtga	ccgacctgcc 120
	ccatgcaccg	gaatagctcc	tggaaacggg	tggtaatgcc	ggatgctcca	tcacaccgca 180
	tggtgtgttg	ggaaagcctt	tgcggcatgg	gatggggctcg	cgtcctatca	gcttgatggc 240
	ggggtaacgg	cccaccatgg	cttcgacggg	tagccggcct	gagagggcga	ccggccacat 300
	tgggactgag	atacggccca	gactcctacg	ggaggcagca	gtggggaata	ttgcacaatg 360
	ggcgcaagcc	tgatgcagcg	acgccgcgtg	agggatggag	gccttcgggt	tgtaaaccctc 420
	ttttgttagg	gagcaaggca	ctttgtgttg	agtgtacctt	togaataagc	accggctaac 480
	tacgtgccag	cagccgcggt	aatacgtagg	gtgcaagcgt	tatccggaat	tattgggcgt 540
	aaagggtcgc	taggcggttc	gtcgcgtccg	gtgtgaaagt	ccatcgctta	acggtggatc 600
	cgcgccgggt	acgggcgggc	ttgagtgcgg	taggggagac	tgggaattccc	ggtgtaacgg 660
	tggaatgtgt	agatatcggg	aagaacacca	atggcgaagg	caggtctctg	ggccgttact 720
	gacgctgagg	agcgaaagcg	tggggagcga	acaggattag	ataccctggg	agtccacgcc 780
	gtaaacgggtg	gatgctggat	gtggggcccg	ttccacgggt	tccgtgtcgg	agctaacgcg 840
	ttaagcatcc	cgcctgggga	gtacggccgc	aaggctaaaa	ctcaaagaaa	ttgacggggg 900
	cccgacacaag	cggcggagca	tgcggattaa	ttcgatgcaa	cgcgaagaac	cttacctggg 960
	cttgacatgt	tcccgcacgat	cccagagatg	gggtttccct	tcggggcggg	ttcacagggtg 1020
	gtgcatggtc	gtcgtcagct	cgtgtcgtga	gatgttgggt	taagtcccgc	aacgagcgca 1080
	accctcgccc	cgtgttgcca	gcggattgtg	ccgggaactc	acgggggacc	gccggggtta 1140
	actcggagga	aggtggggat	gacgtcagat	catcatgccc	cttacgtcca	gggcttcacg 1200
	catgctacaa	tggccggtac	aacgggatgc	gacagcgcg	gctggagcgg	atccctgaaa 1260
	accggtctca	gttcggatcg	cagtctgcaa	ctcgactgcg	tgaaggcggg	gtcgctagta 1320
	atcgcgaaatc	agcaacgtcg	cggatgaatgc	gttcccgggc	cttgtaacaca	ccgcccgcca 1380
	agtcatagaaa	gtgggcagca	cccgaagccg	gtggcctaac	ccctgcggga	gggagccckc 1439

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- BIN ZHENG ET AL: "Bifidobacterium breve Attenuates Murine Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis and Increases Regulatory T Cell Responses", PLOS ONE, vol. 9, no. 5, 2 May 2014 (2014-05-02), page e95441, XP055294968, DOI: 10.1371/journal.pone.0095441
- WO-A1-2009/072889
- WO-A1-2011/110918
- WO-A1-2011/149335
- WO-A1-2015/021936
- KR-A- 20100 128 168
- US-A1- 2010 284 973

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde o bacterie viabilă depusă sub numărul de acces NCIMB 42380 sau o bacterie viabilă care are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 98% identică cu SEQ ID NO: 1, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a cancerului pulmonar, a cancerului mamar sau a cancerului hepatic și în care compoziția este utilizată într-o metodă de reducere a mărimii tumorii, prevenirea metastazei sau prevenirea angiogenezei.

3. Compoziția pentru utilizare 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 celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea cancerului.

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

5. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările 1–4, în care bacteria are o secvență ARNr 16s care este cel puțin 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1.

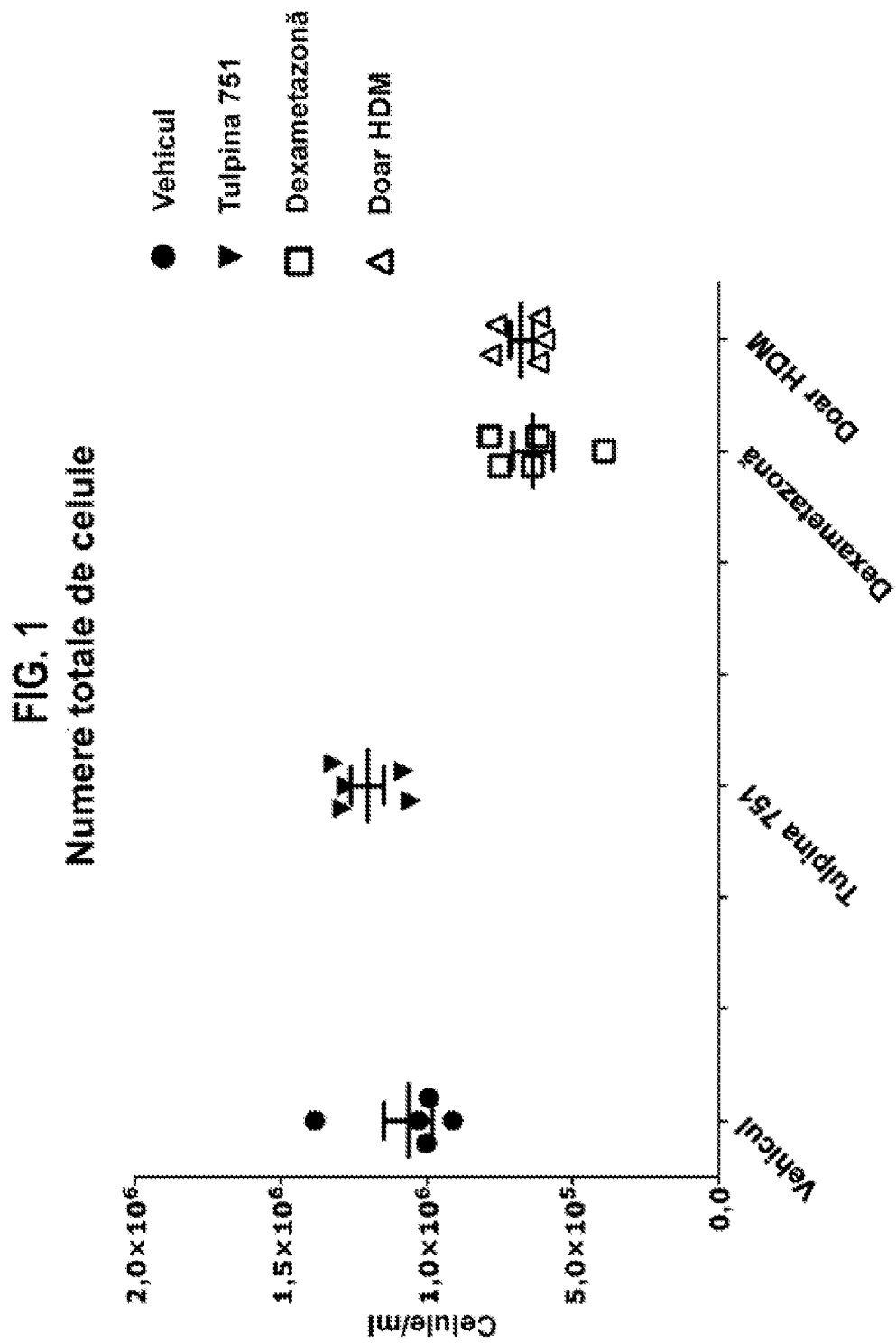
6. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este pentru administrare orală, în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutic și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată.

7. Un produs alimentar sau o compoziție de vaccin care cuprinde compoziția conform oricăreia dintre revendicările precedente, pentru utilizarea conform oricăreia dintre revendicările precedente.

8. O celulă sau o cultură biologică pură a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380.

9. O compoziție cuprinzând celula conform revendicării 8, care cuprinde opțional un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic.

10. O celulă a bacteriei depuse sub numărul de acces NCIMB 42380, pentru utilizare în terapie, opțional în care celula este destinată utilizării într-o metodă definită în oricare dintre revendicările 1–4.



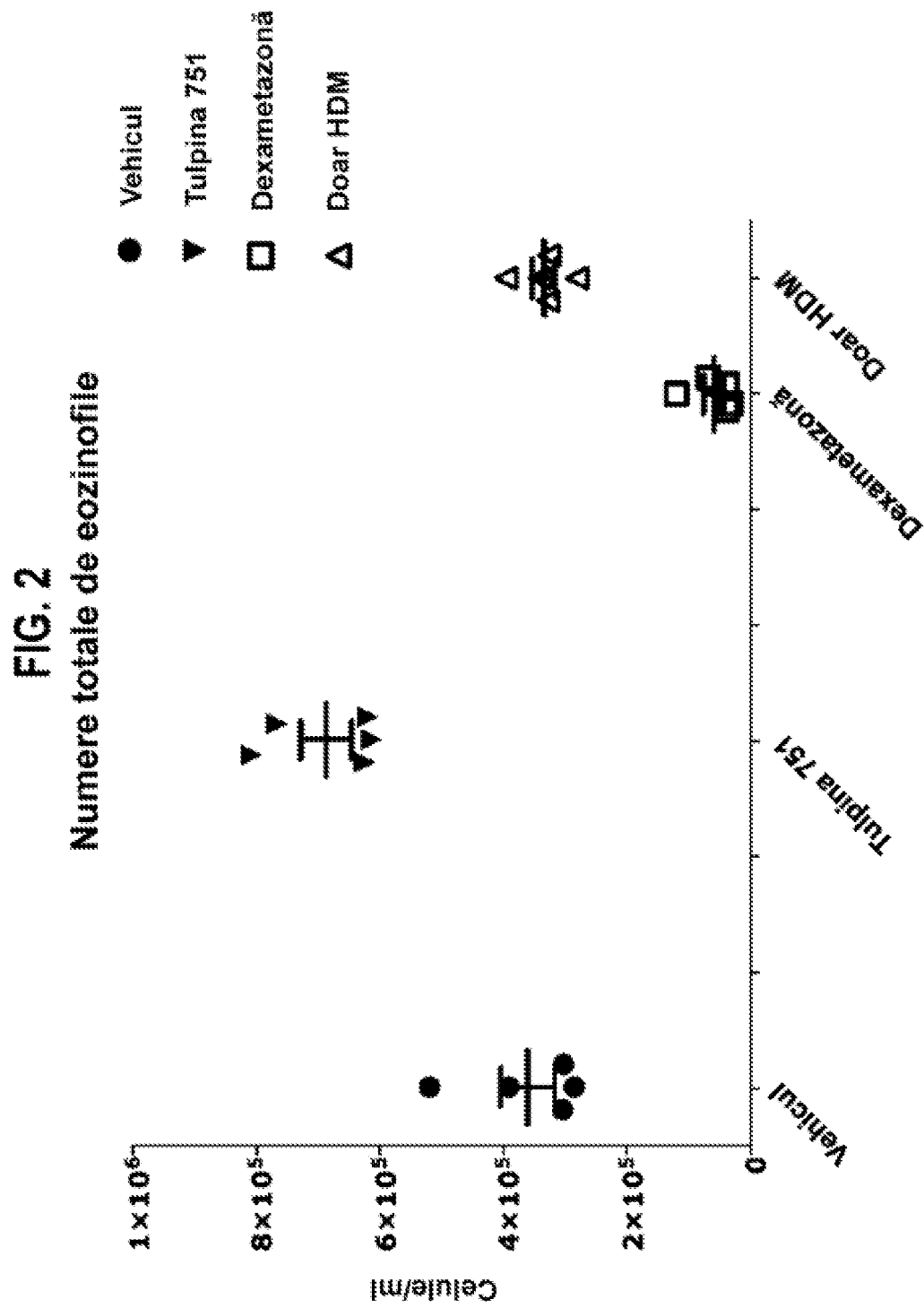


FIG. 3
Procente de eozinofile

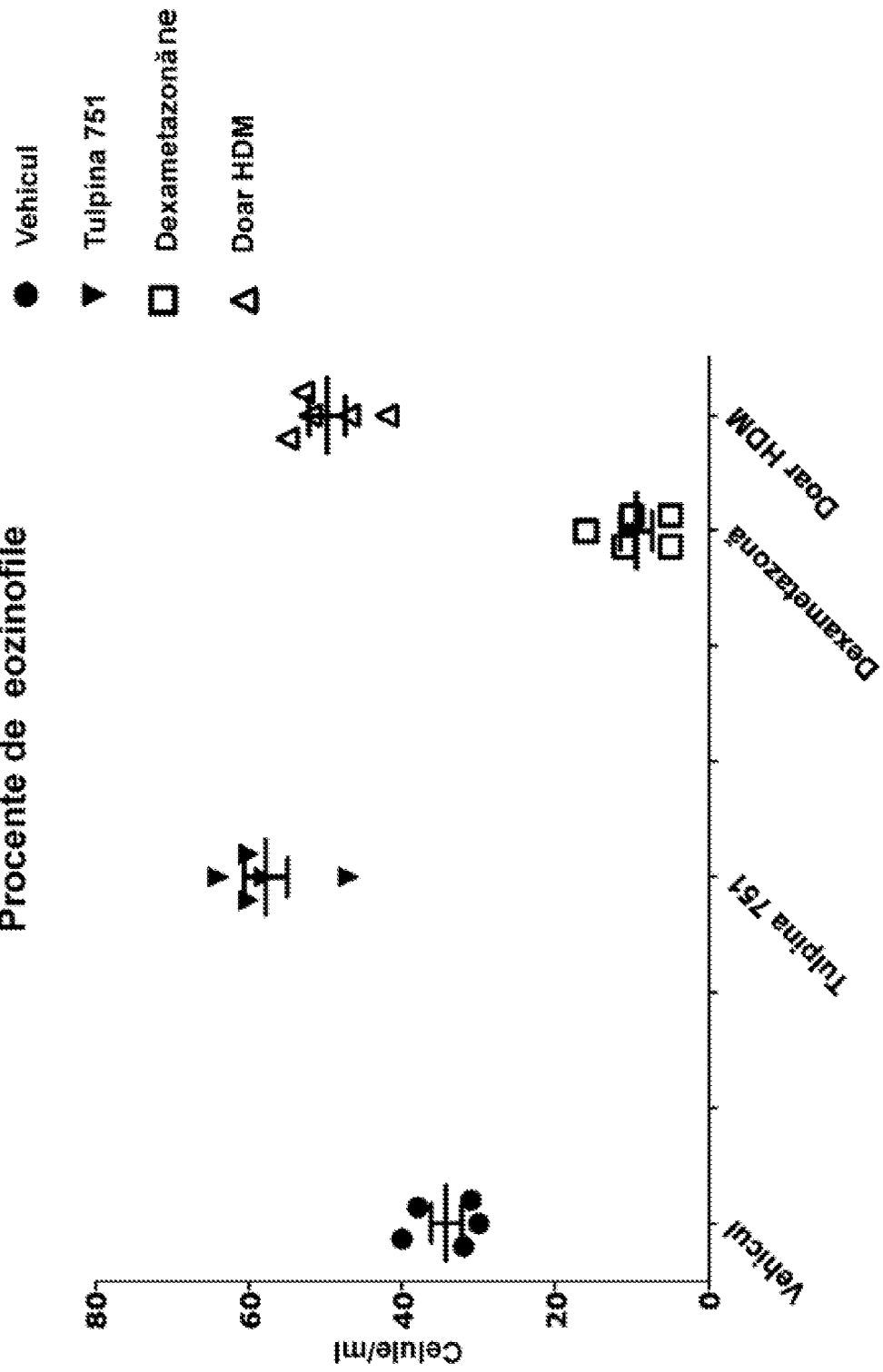
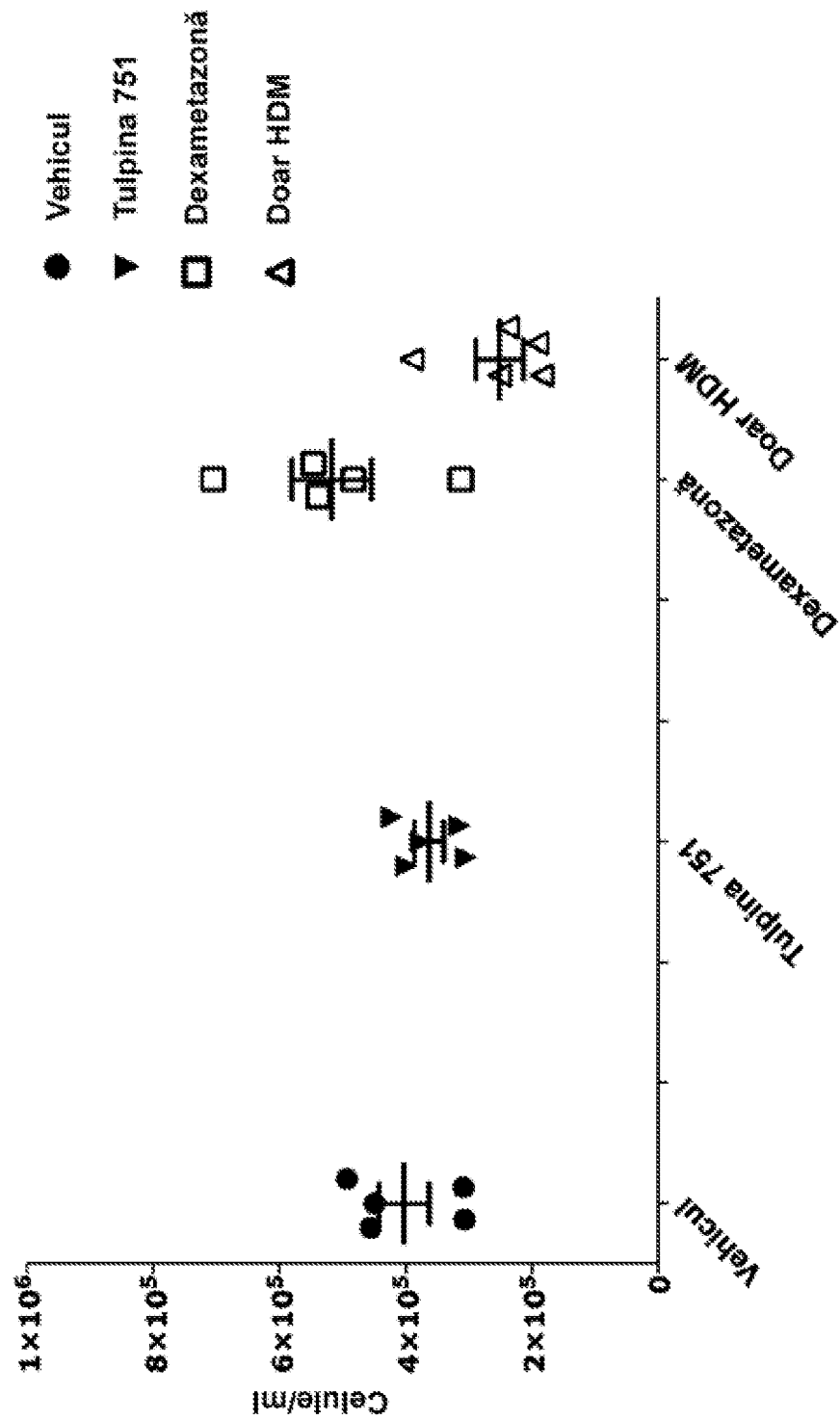
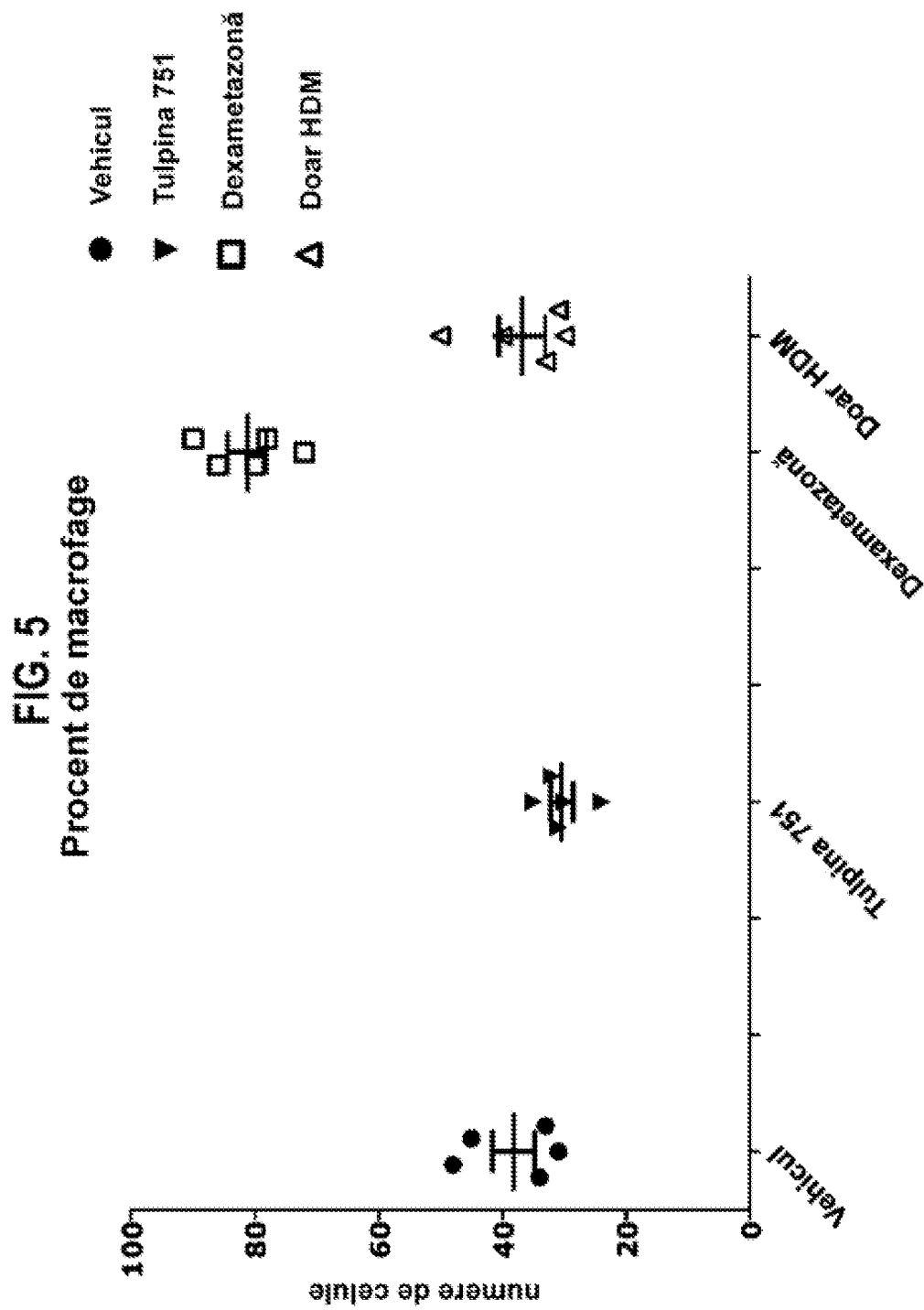
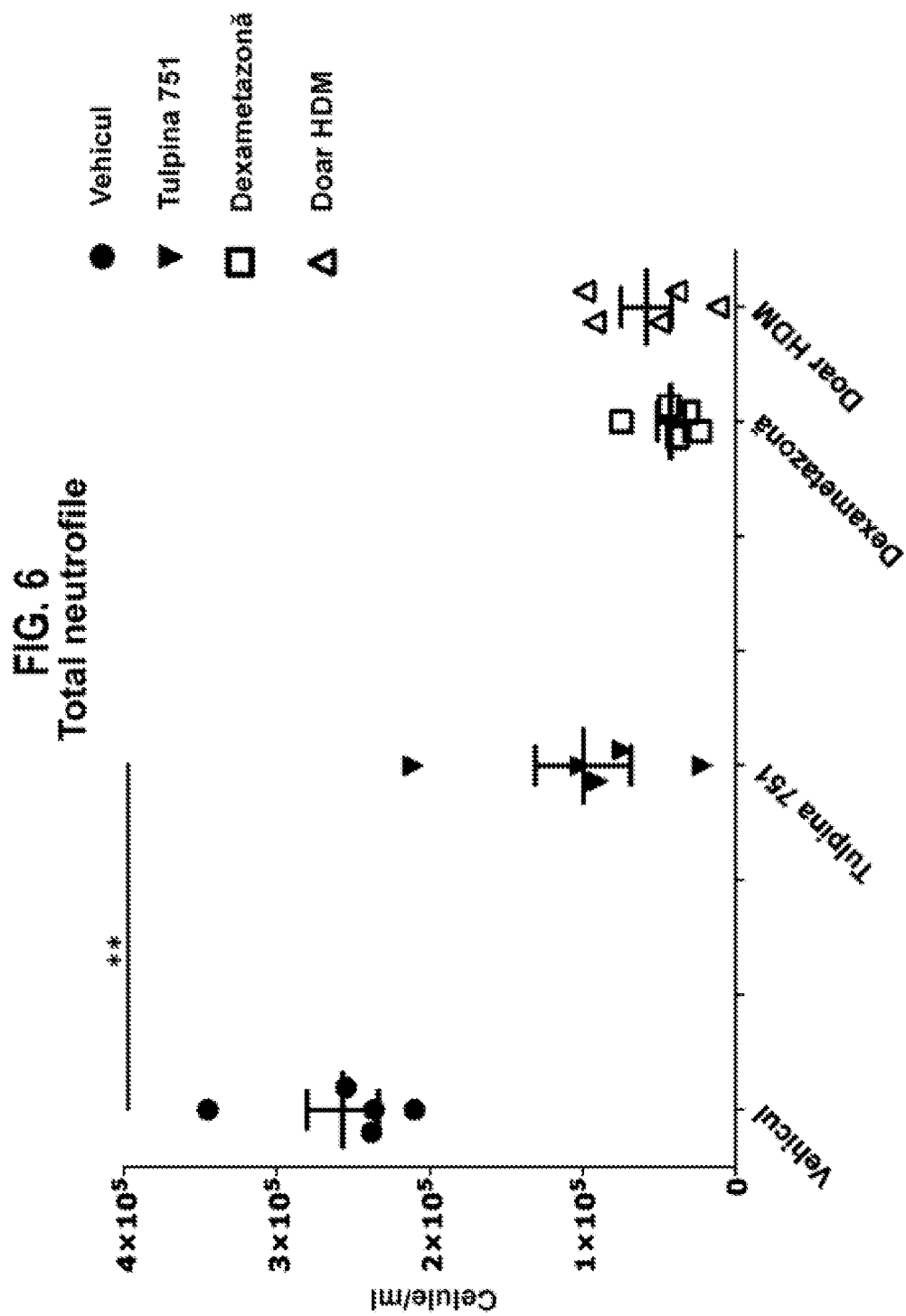
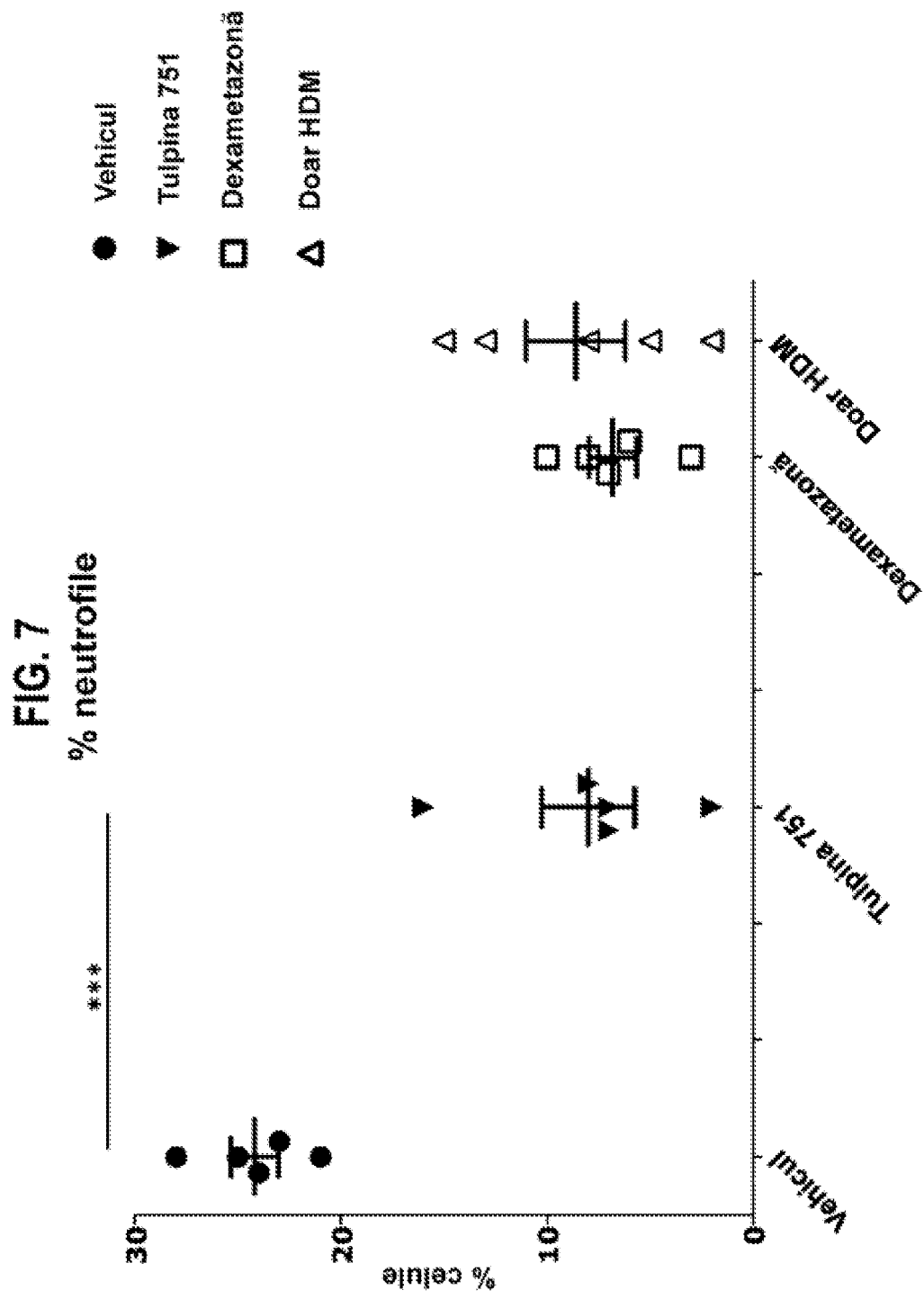


FIG. 4
Numere totale de macrofage









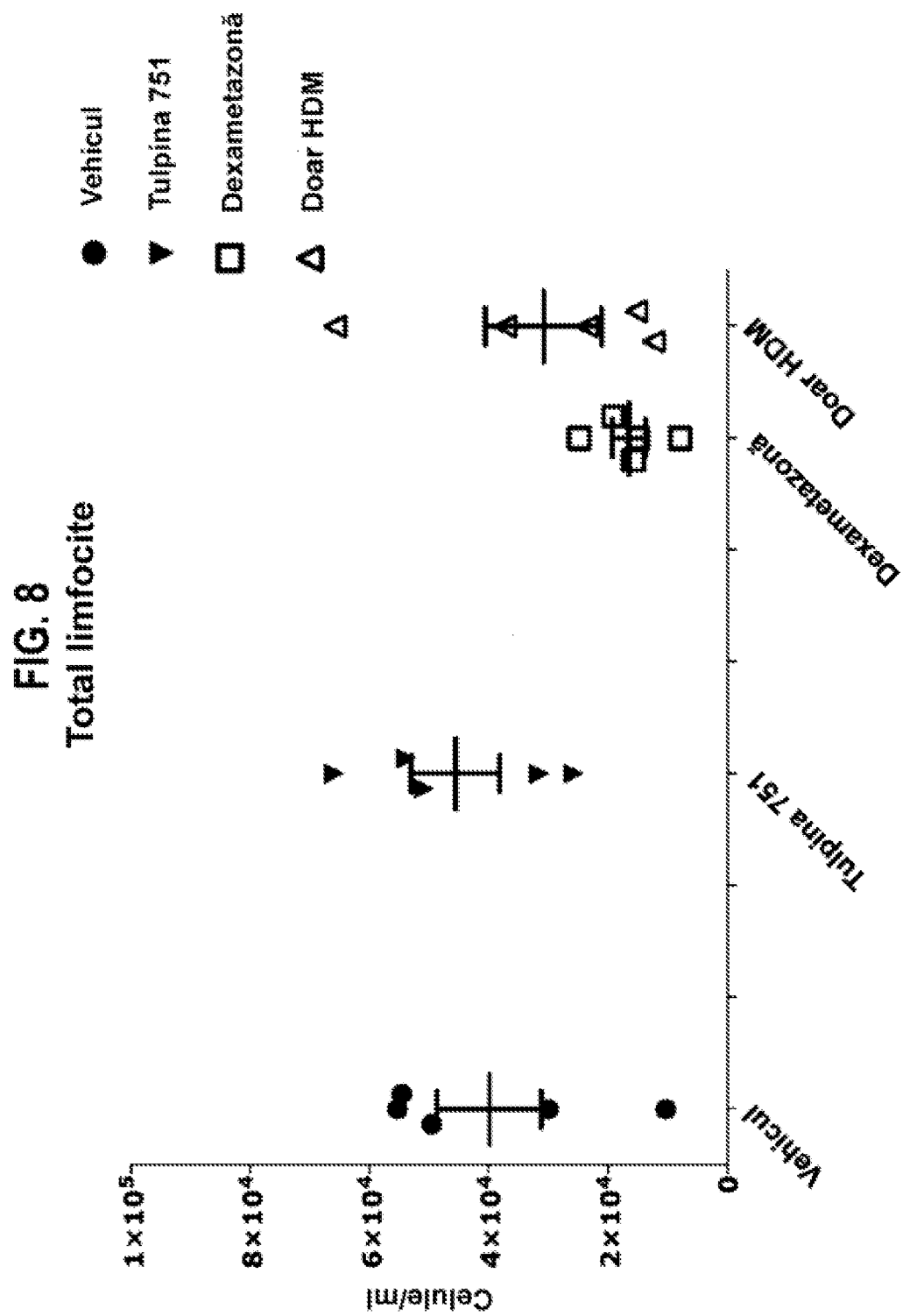
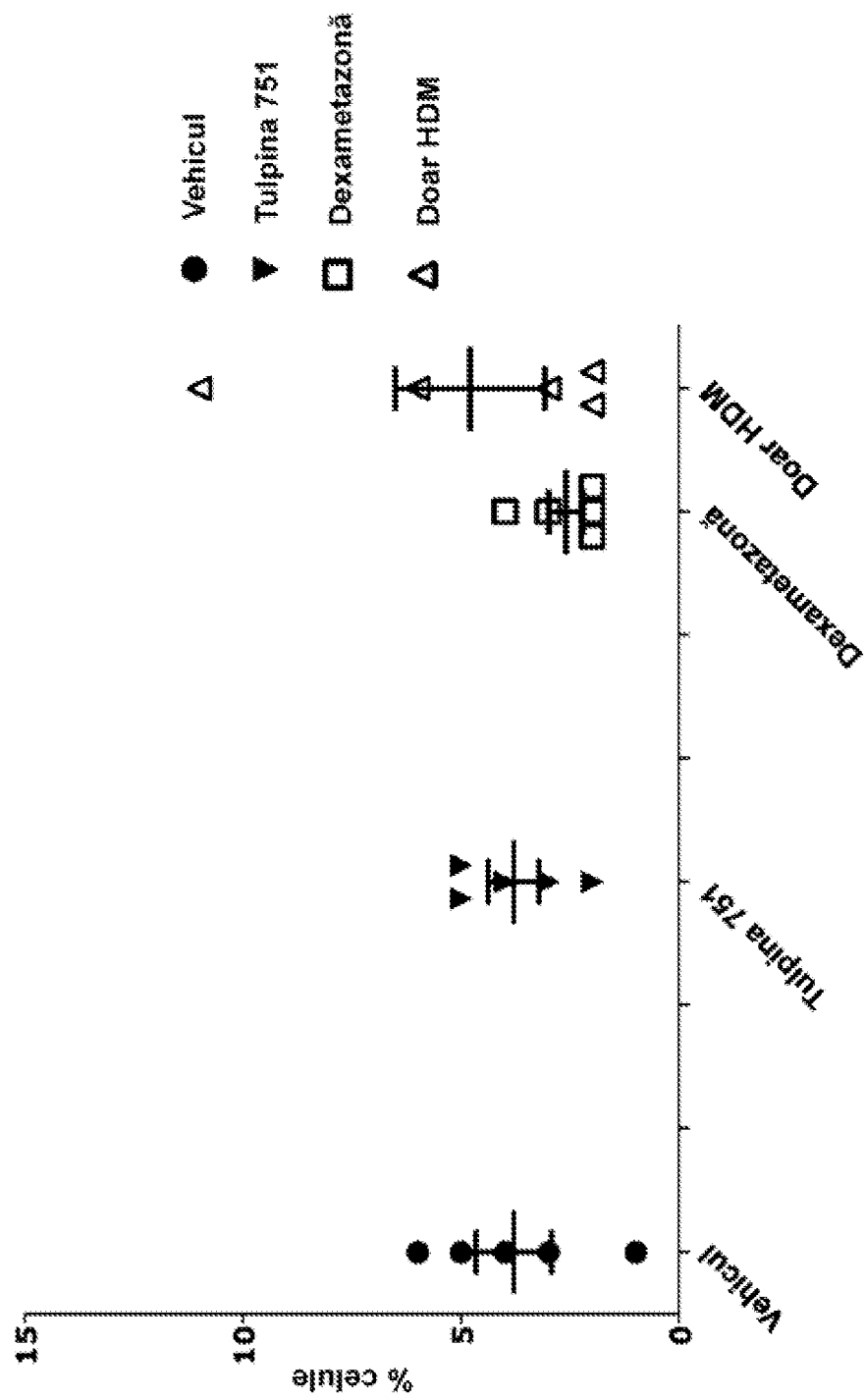


FIG. 9
% limfocite



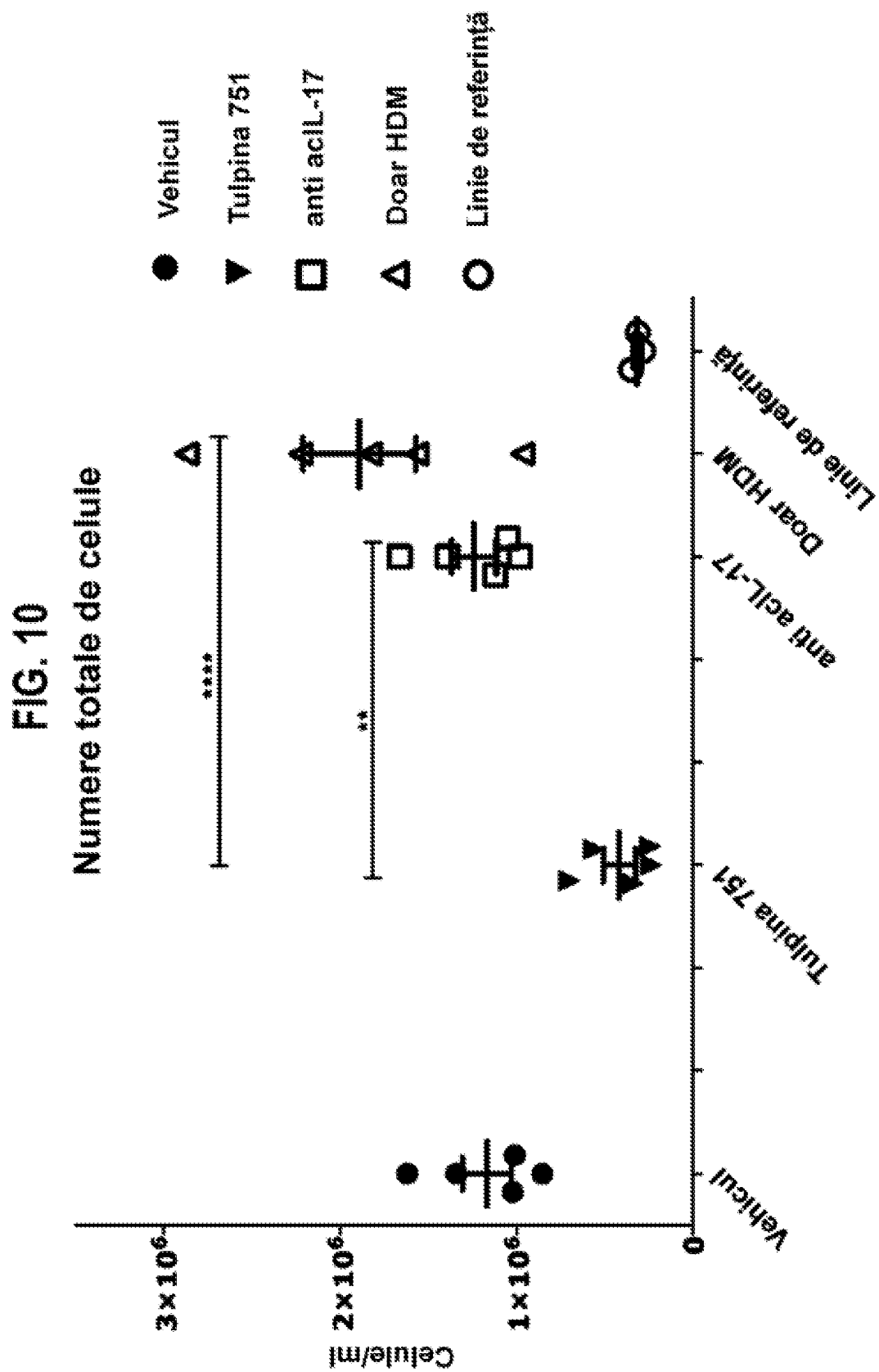


FIG. 11
Total eozinofile

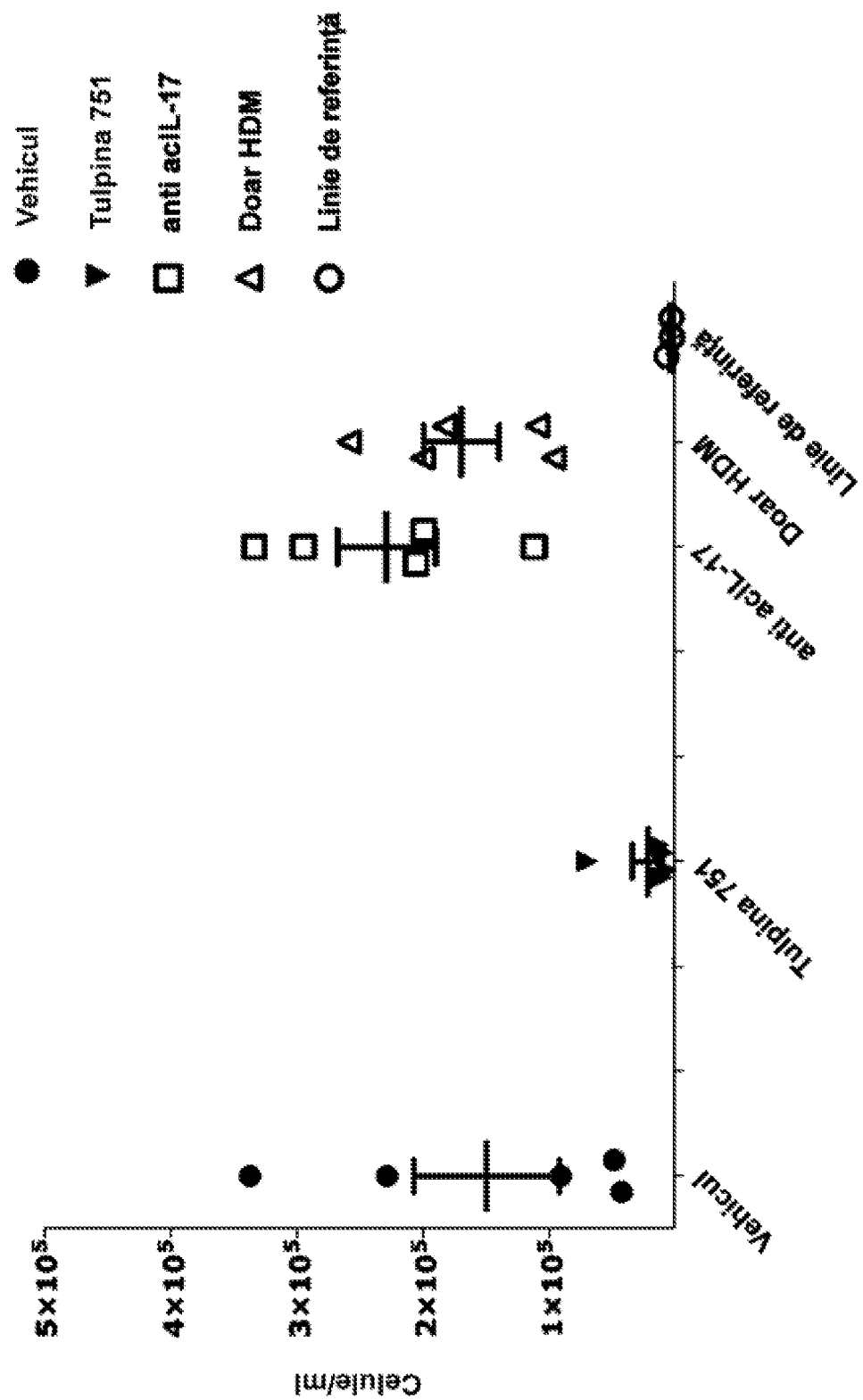
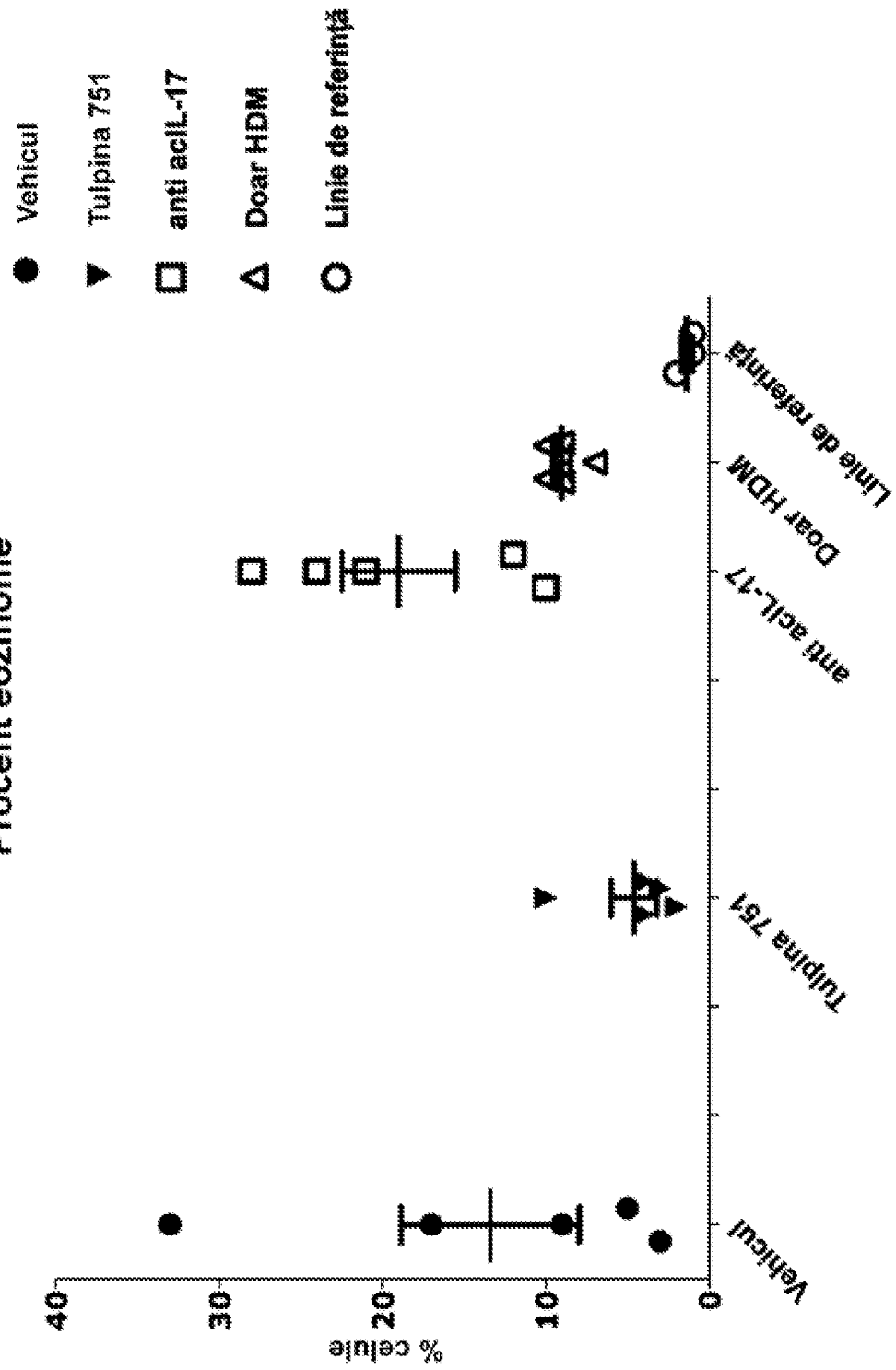


FIG. 12
Procent eozinofile



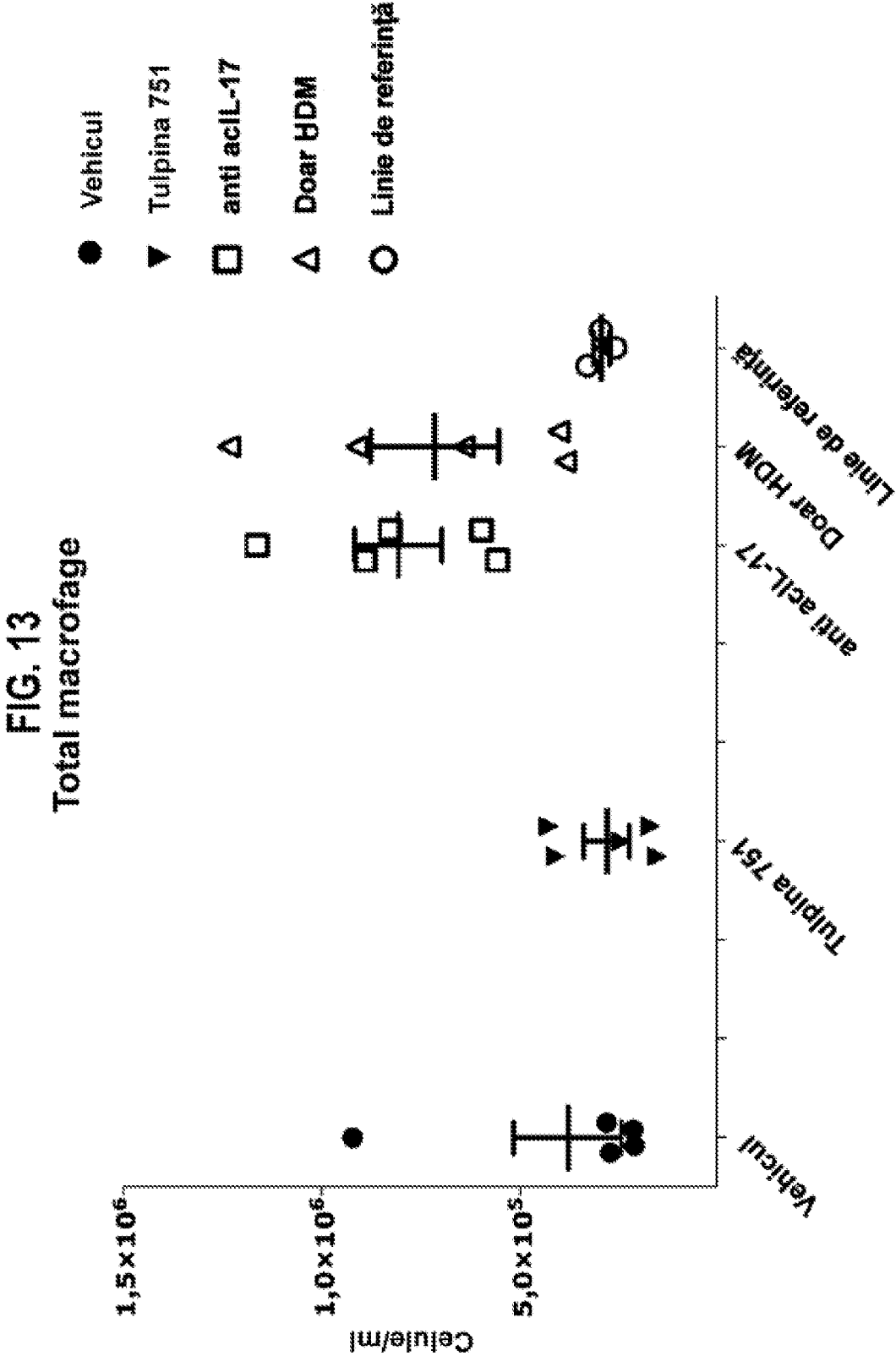


FIG. 14
Percent macrofage

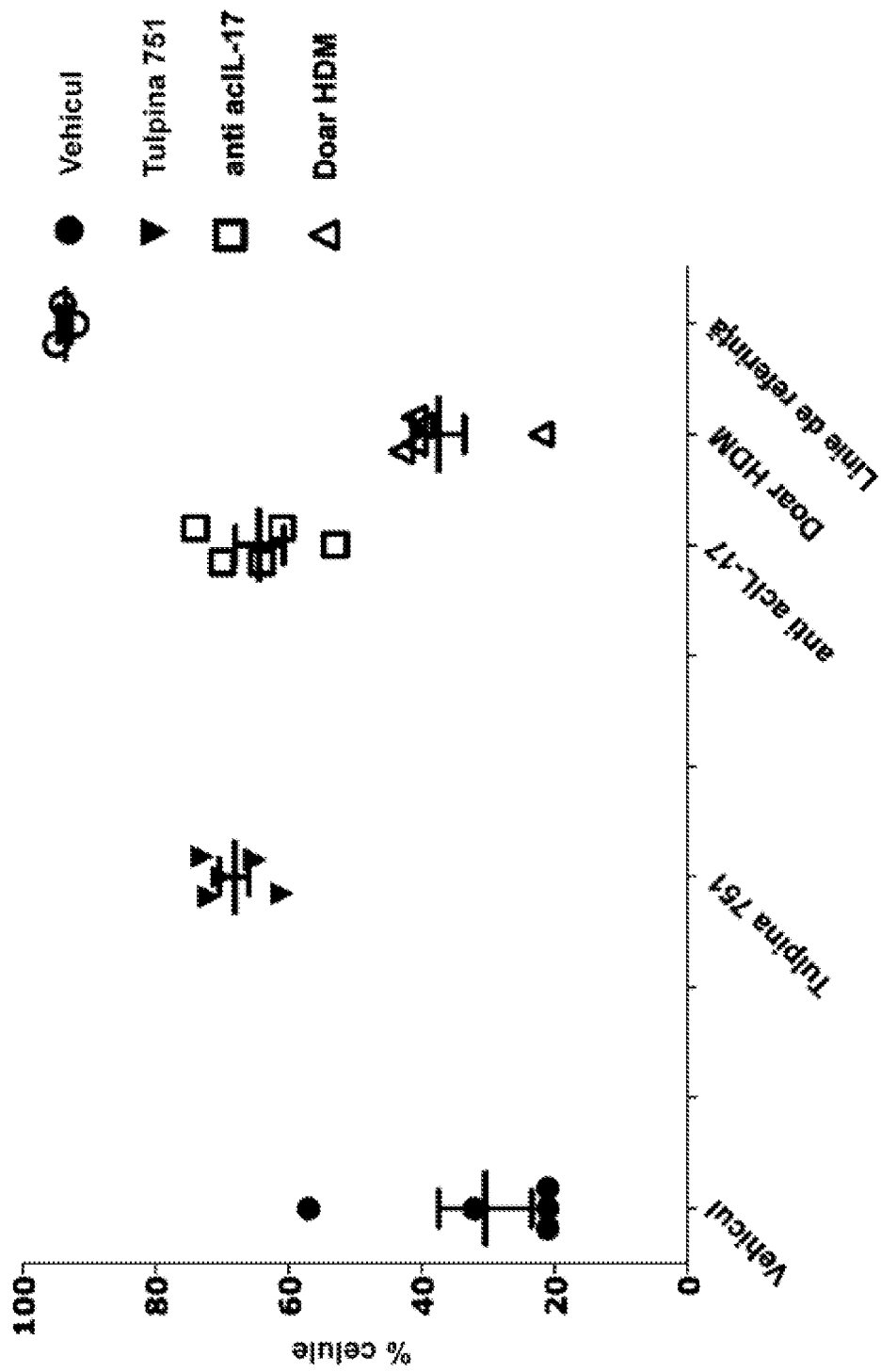


FIG. 15
Total neutrofile

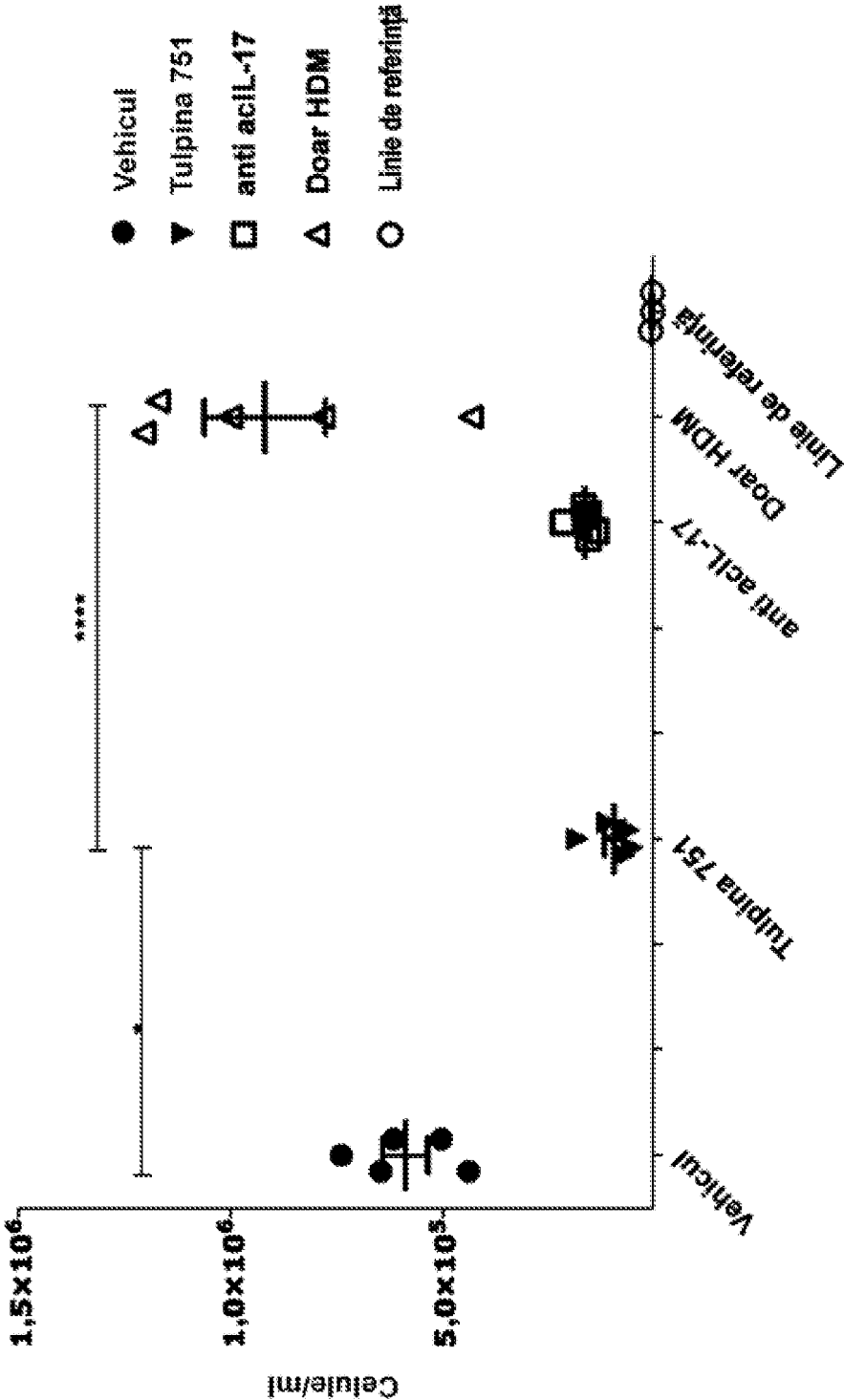


FIG. 16
Procent neutrofile

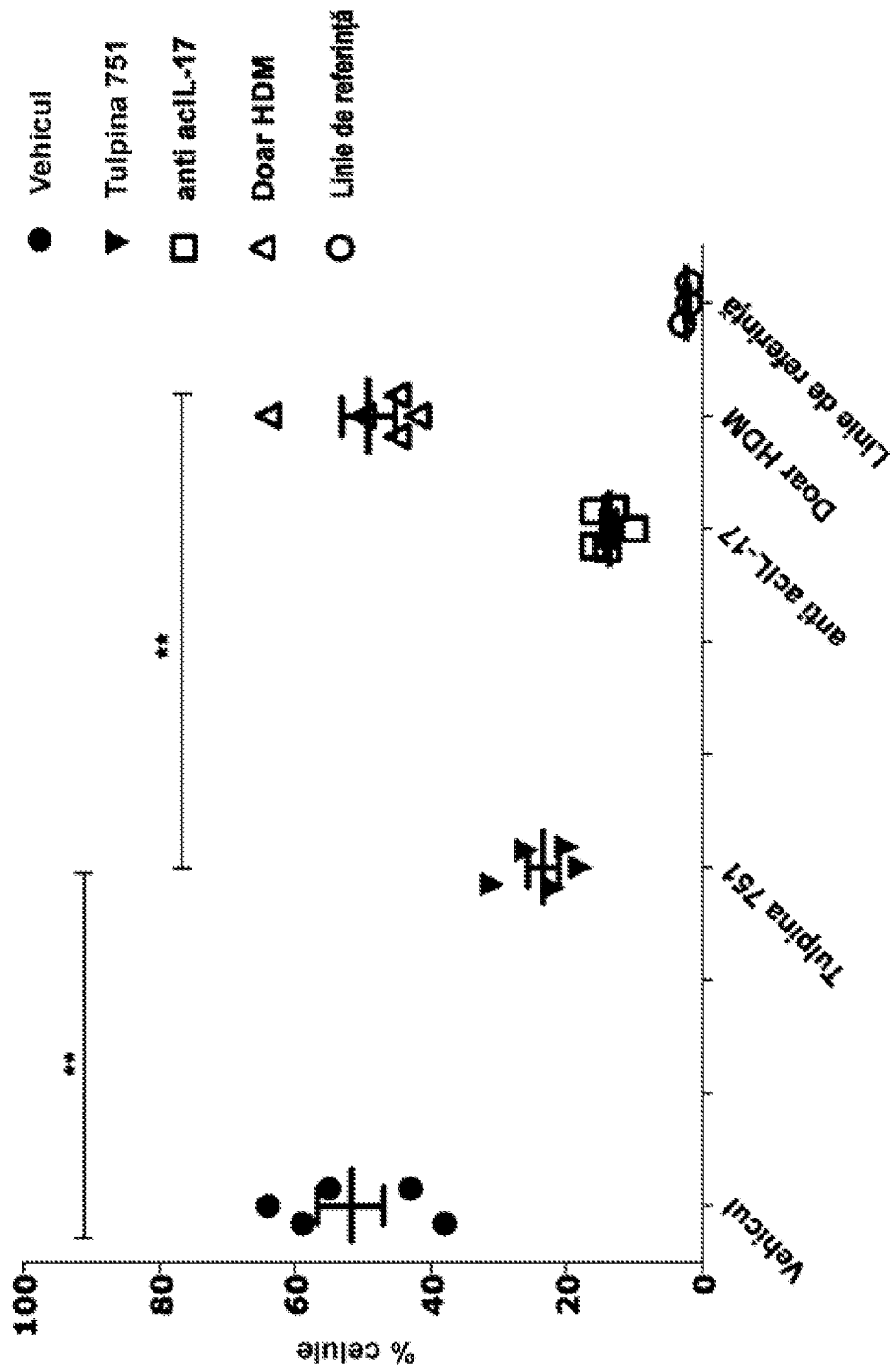


FIG. 17
Total limfocite

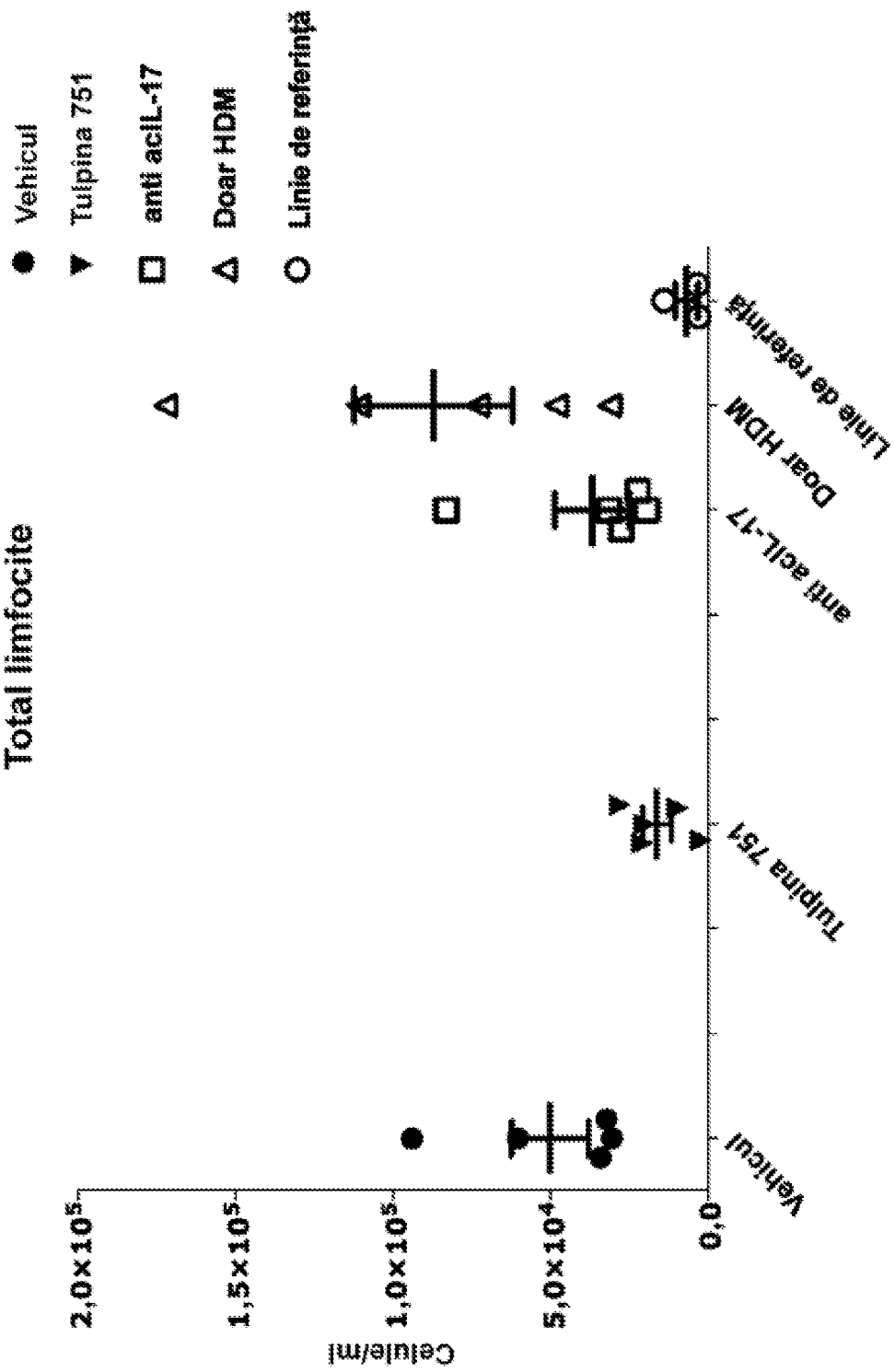


FIG. 18
Procent limfocite

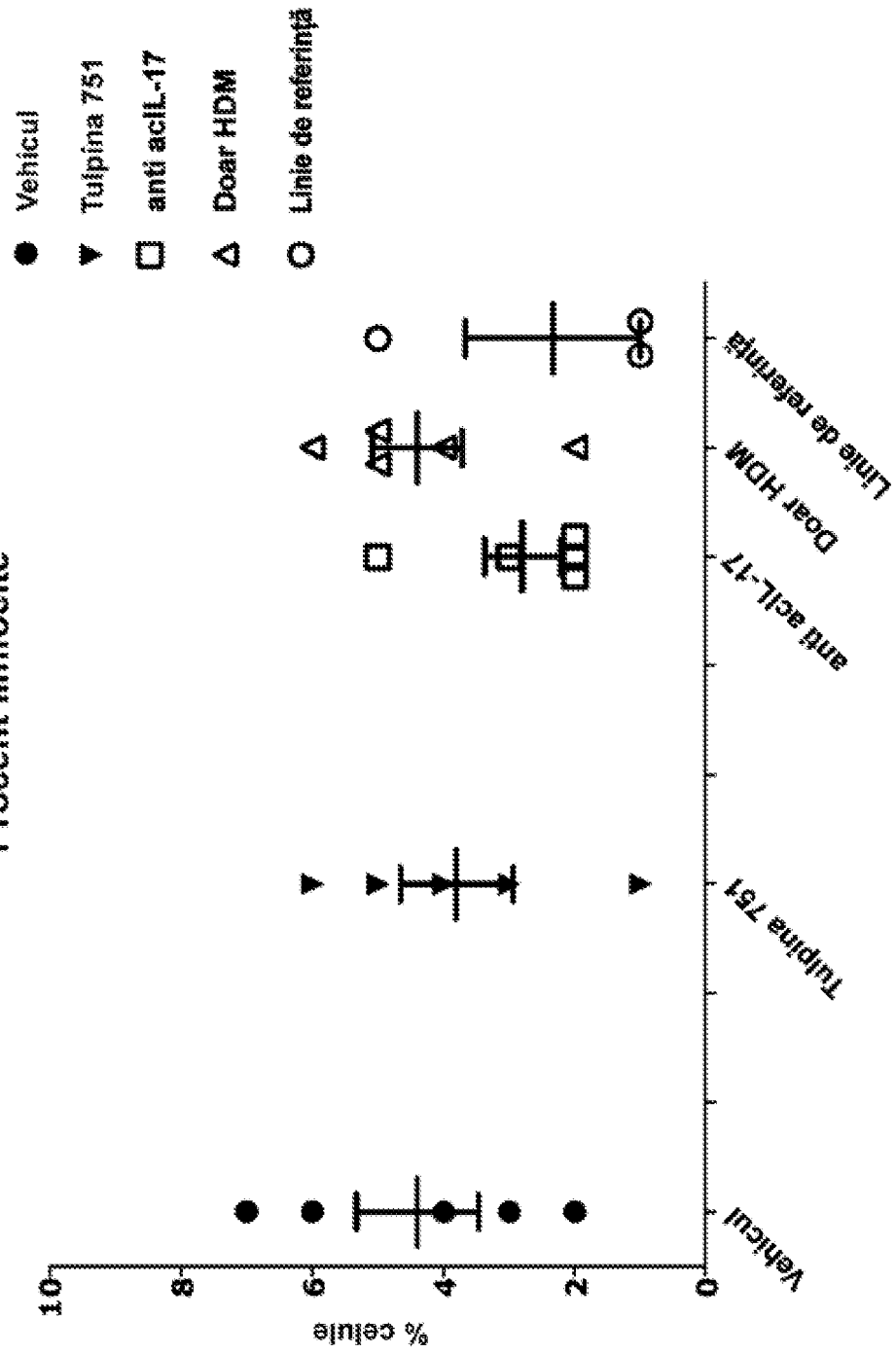


FIG. 19
Mase corporale

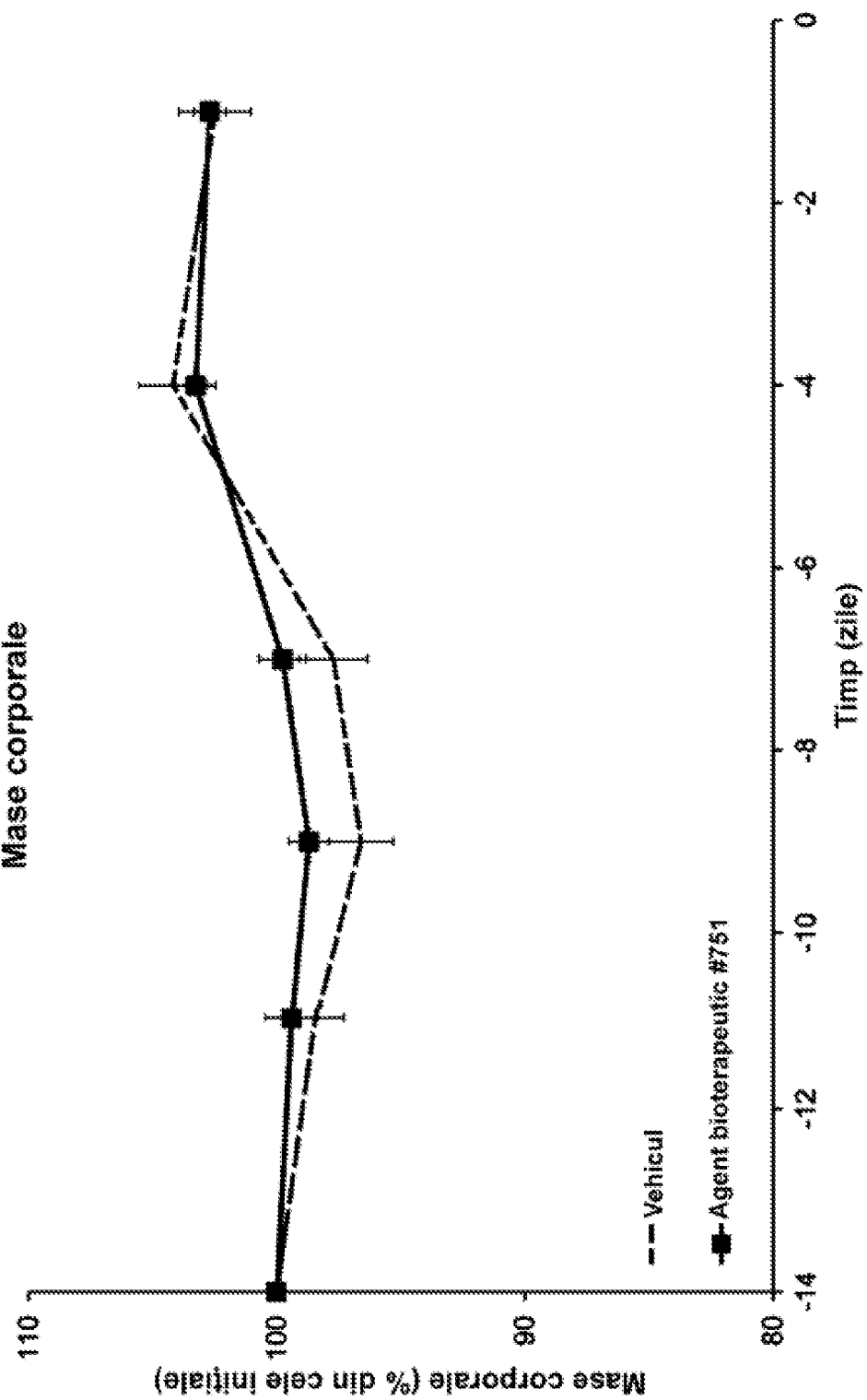


FIG. 20
Mase corporale

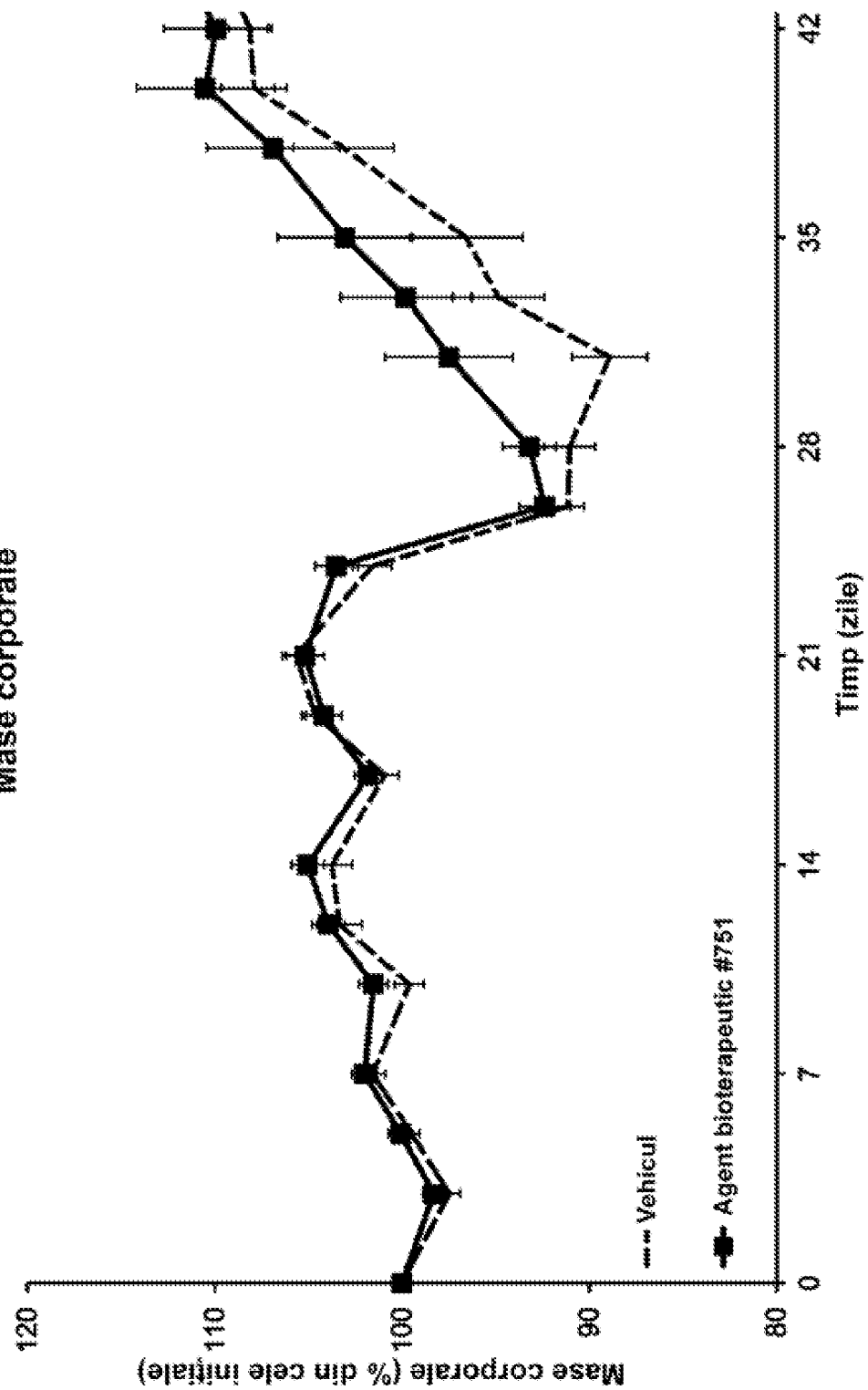


FIG. 21
Scoruri clinice

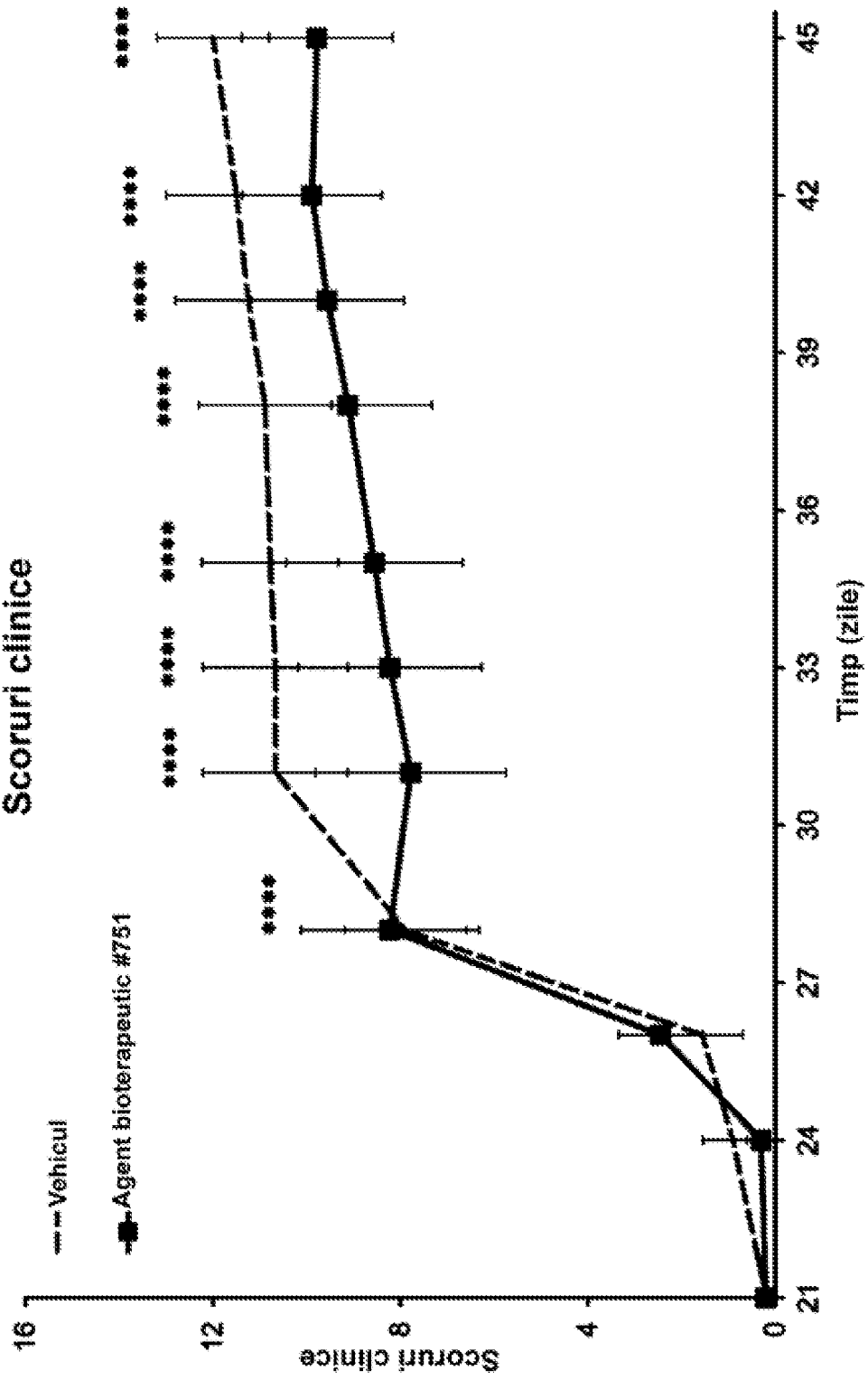


FIG. 23

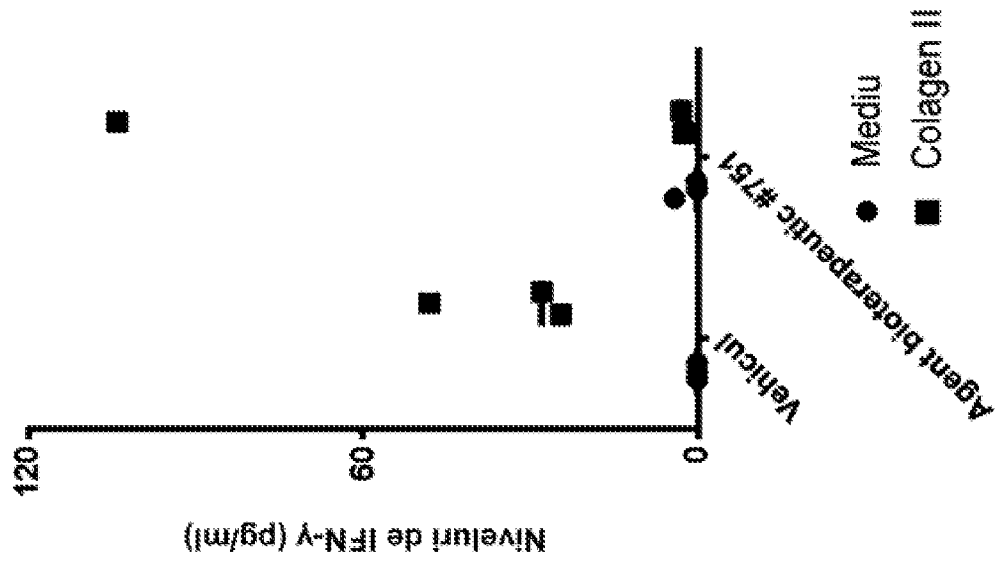
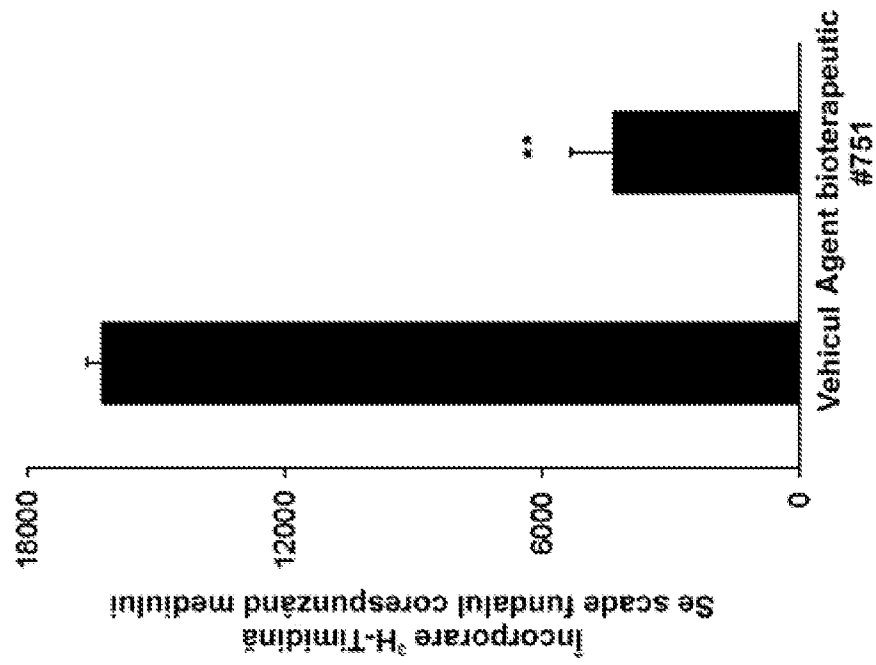


FIG. 22
Proliferarea splenocitelor cu Colagen II



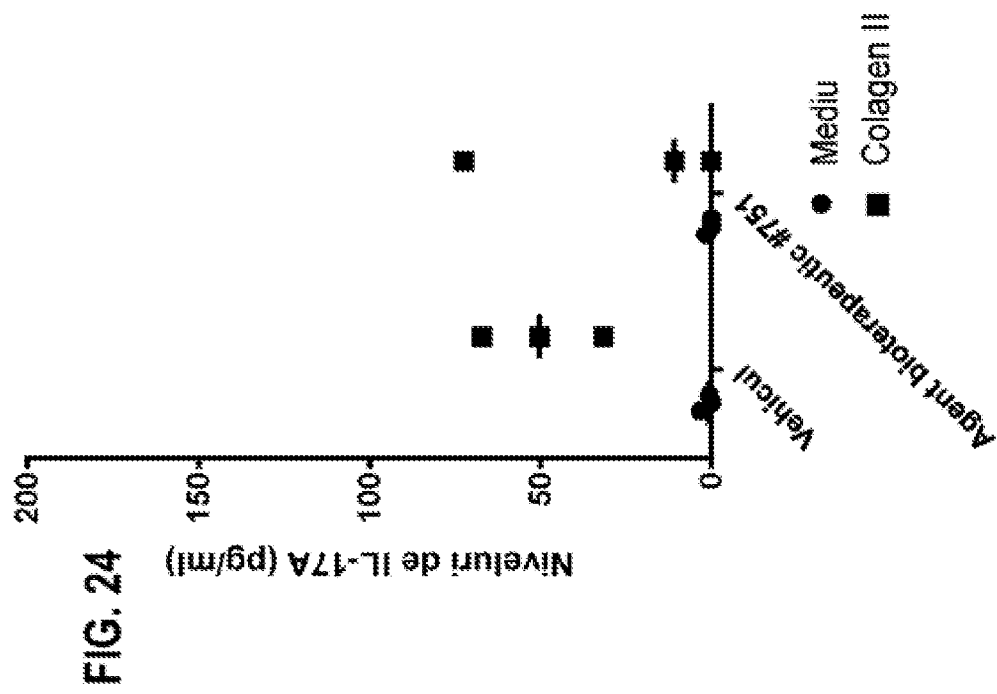
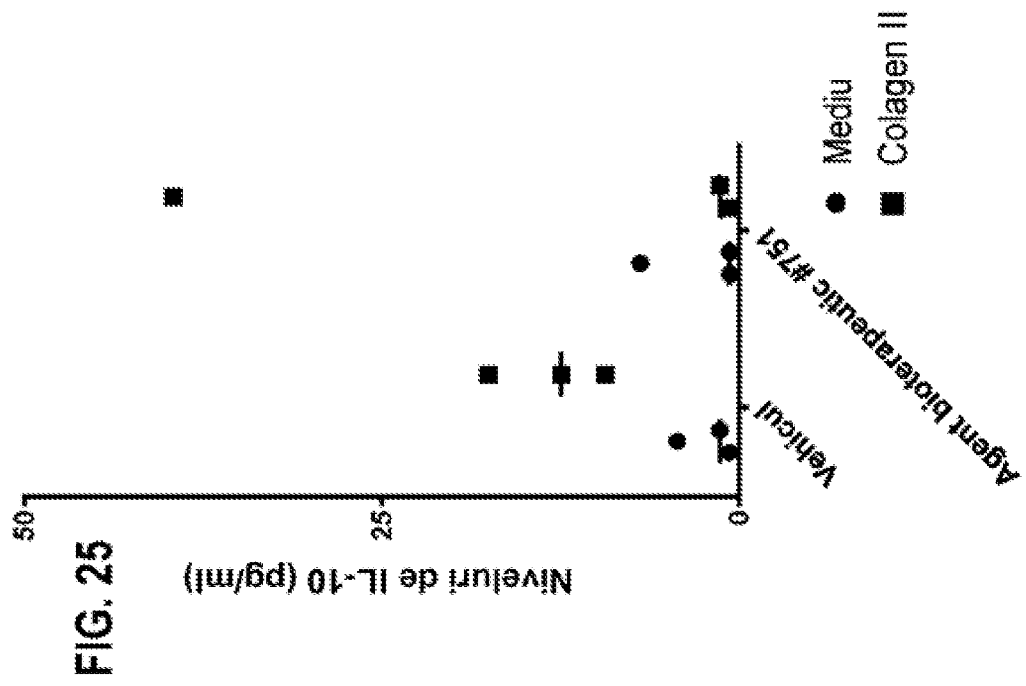


FIG. 26

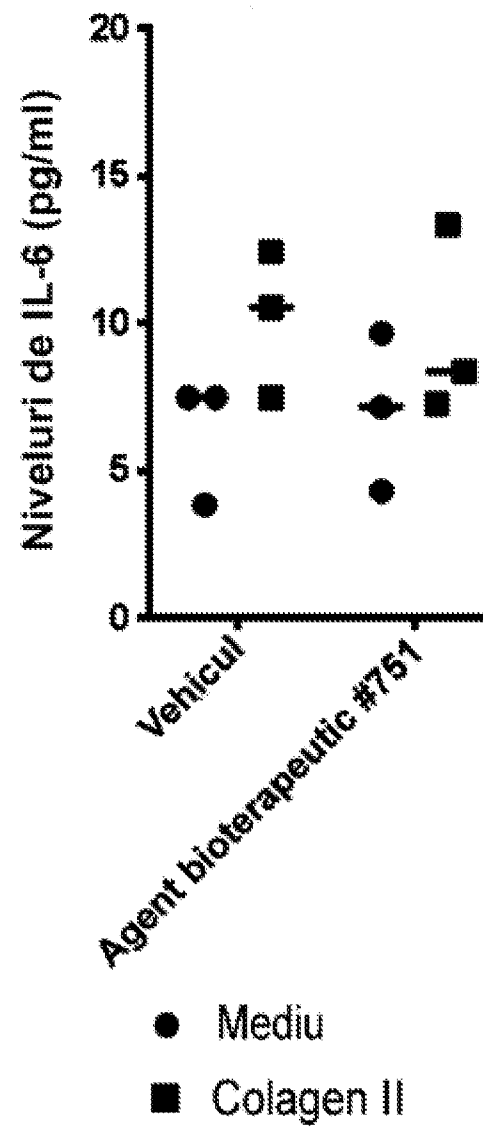
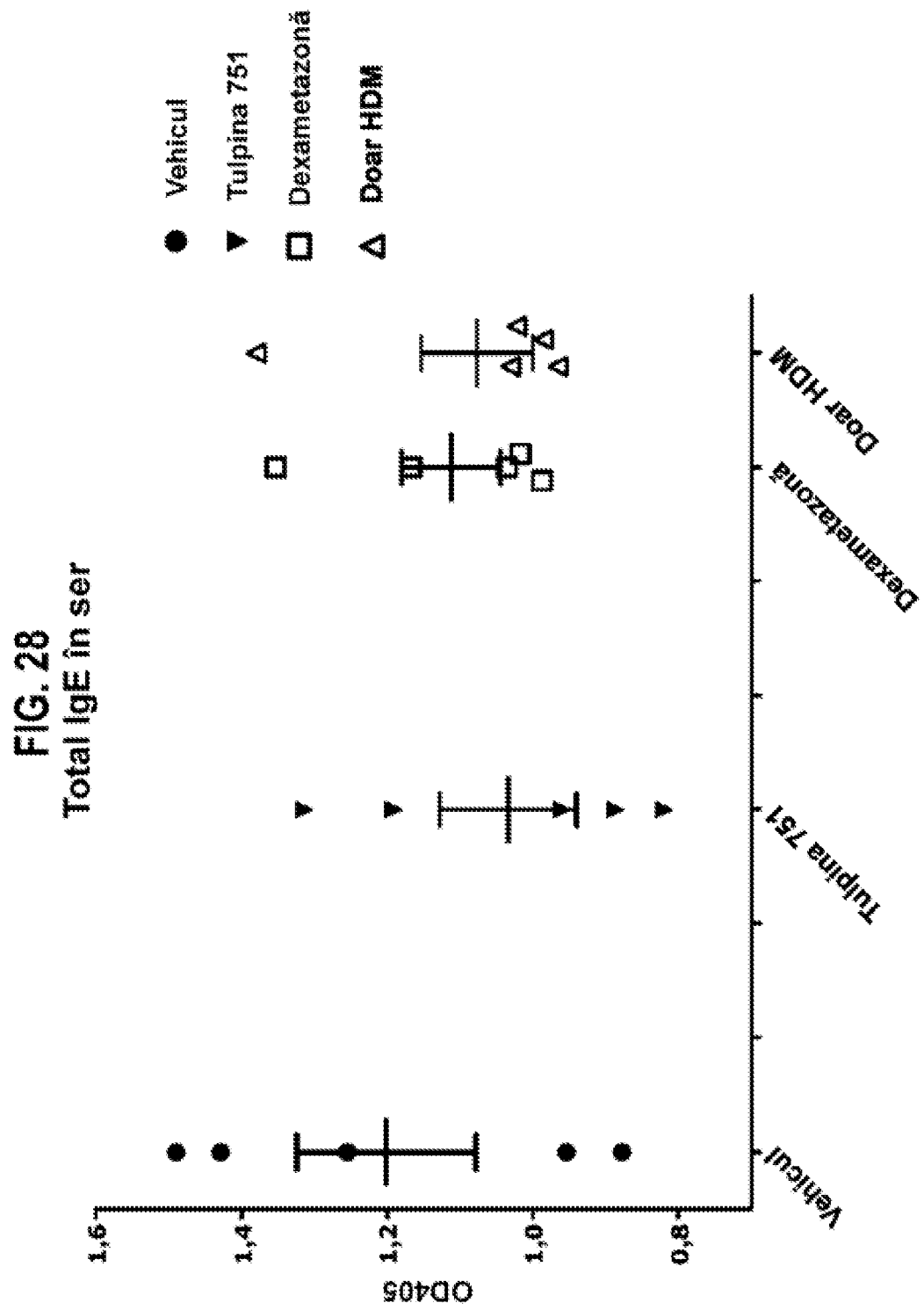
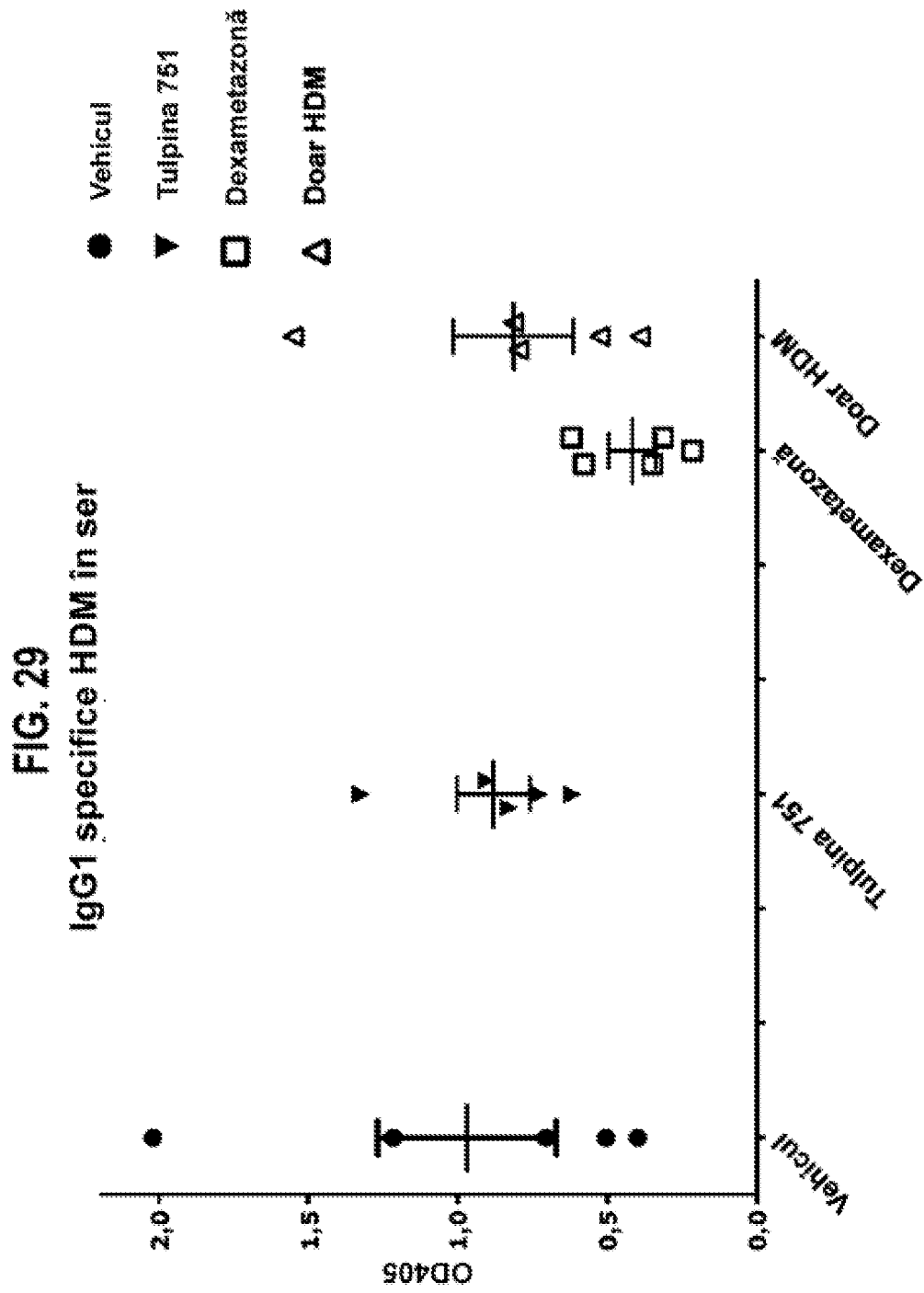


FIG 27

Sistem de evaluare histopatologică

Grad	Descriere
Informație	
0	Articulație normală.
1	Hiperplazie sinovială ușoară cu inflamație dominată de neutrofile. Numere mici de neutrofile și macrofage în spațiul articular.
2	Hiperplazie sinovială moderată cu inflamație marcată implicând atât neutrofile cât și macrofage. Neutrofile și macrofage în spațiul articular; pot exista unele deșeuri tisulare necrotice.
3	Hiperplazie sinovială cu inflamație marcată implicând atât neutrofile cât și macrofage. Pierderi ale căptușelii de sinoviocite. Inflamația se poate extinde de la sinovium către țesutul înconjurător, incluzând mușchiul. Numeroase neutrofile și macrofage în spațiul articular, împreună cu deșeuri tisulare necrotice semnificative.
Distrugerea cartilajului articular	
0	Articulație normală.
1	Cartilajul articular prezintă o ușoară schimbare degenerativă. Formarea timpurie de pannus poate fi prezentă periferic.
2	Cartilajul articular prezintă schimbare degenerativă moderată și pierdere focală. Formarea de pannus este prezentă focal.
3	Întrerupere și pierdere semnificativă a cartilajului.
Distrugerea osului metafizeal de bază	
0	Articulație normală.
1	Fără schimbare a osului metafizeal.
2	Poate exista necroză focală sau fibroză a osului metafizeal.
3	Întrerupere sau colaps al osului metafizeal. Inflamație, necroză sau fibroză extensive care se extind în spațiul medular al metafizei.





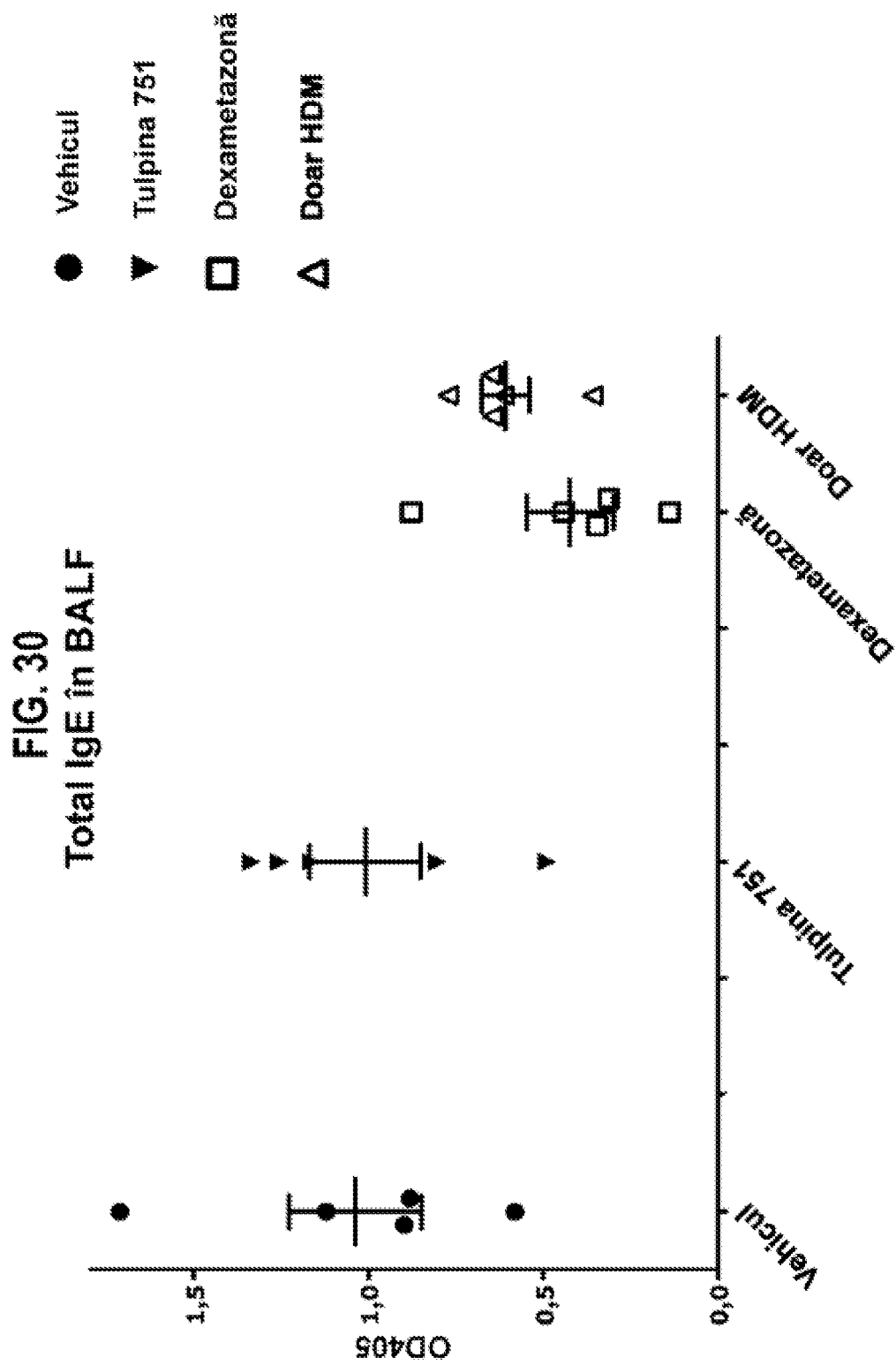


FIG. 31
IgG1 specifică HDM în BALF

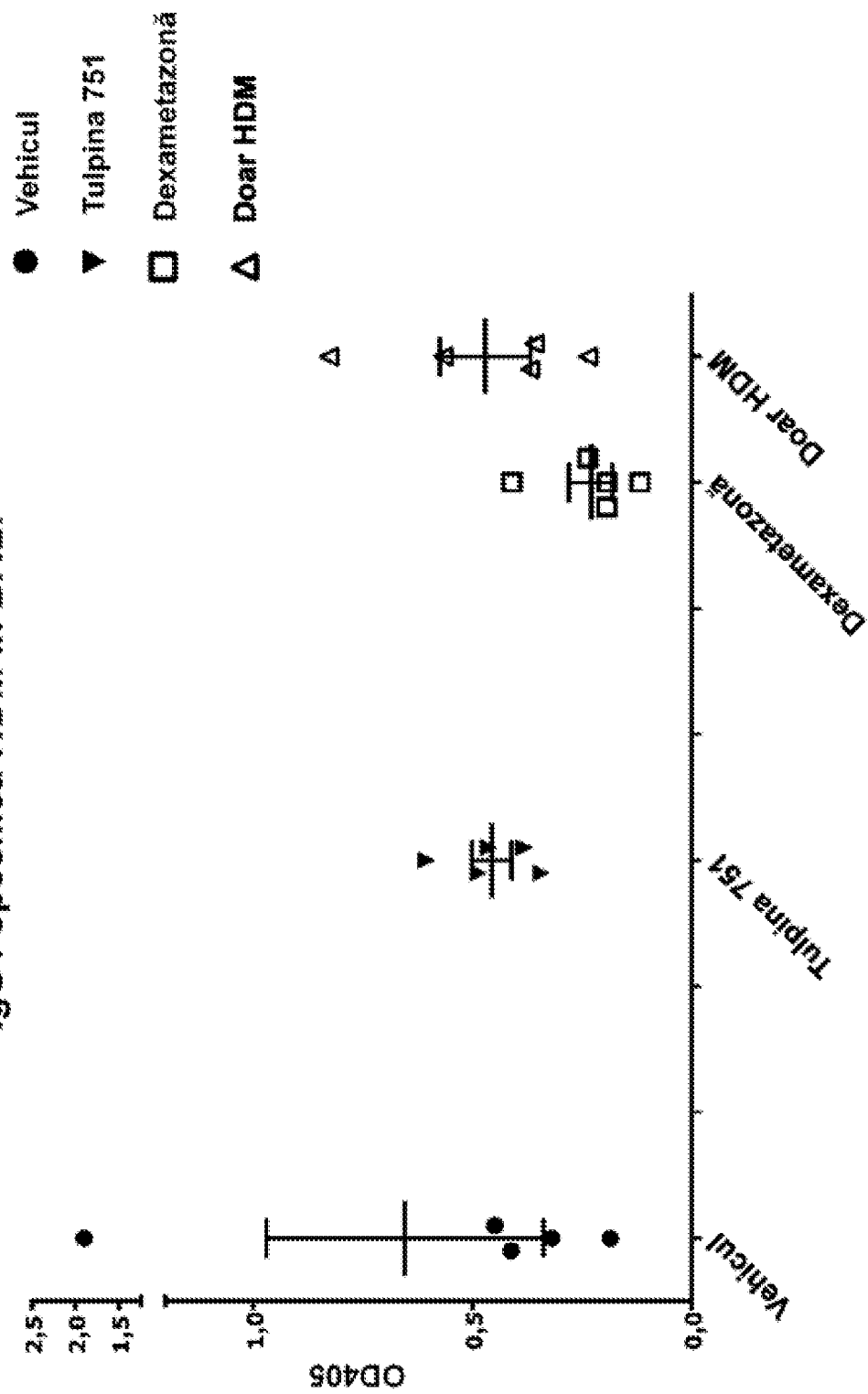


FIG. 32 Analiza histologică - scor mediu de infiltrație peribrohiară

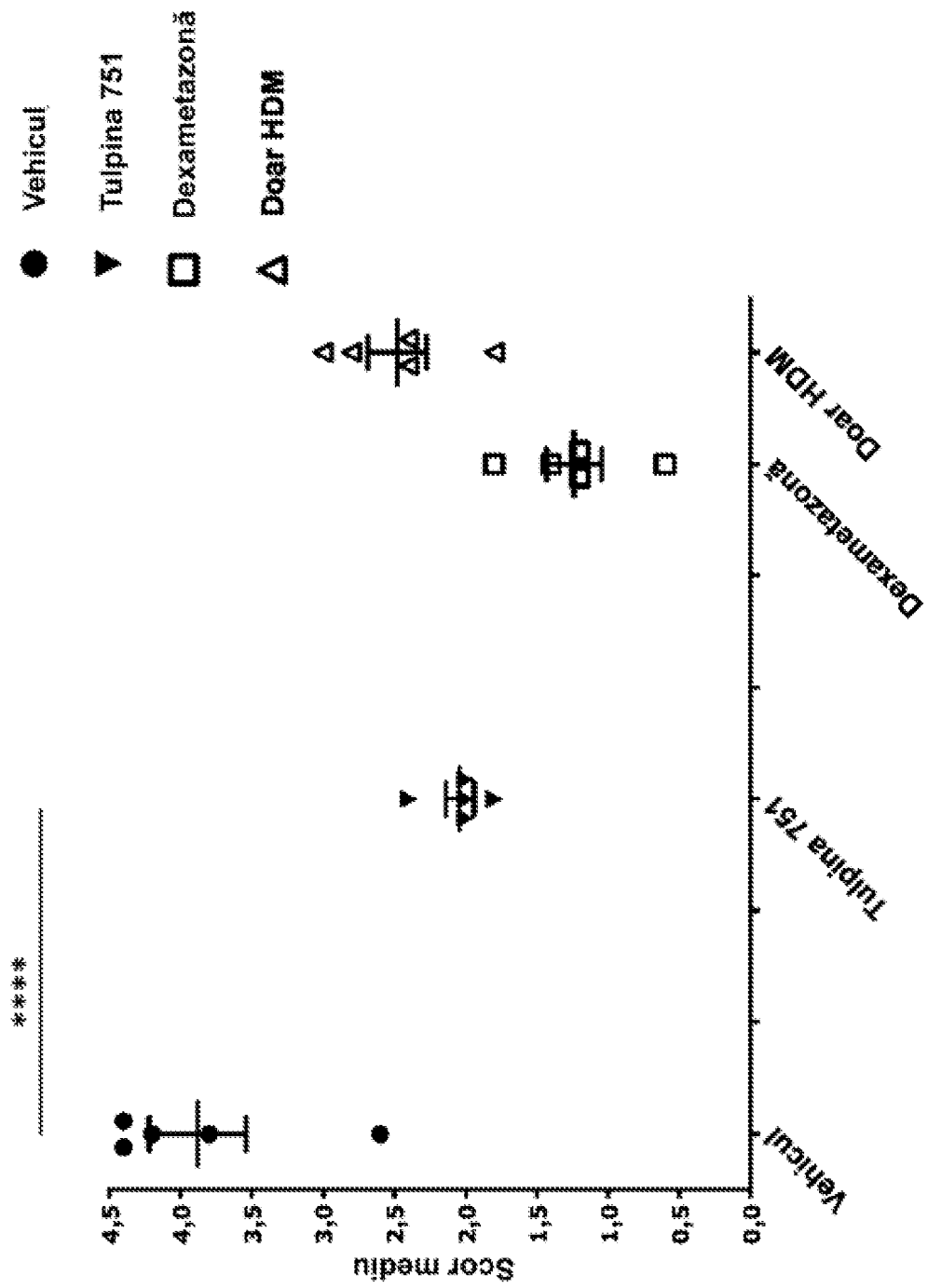


FIG. 33

Analiza histologică - scor mediu de infiltrație perivasculară

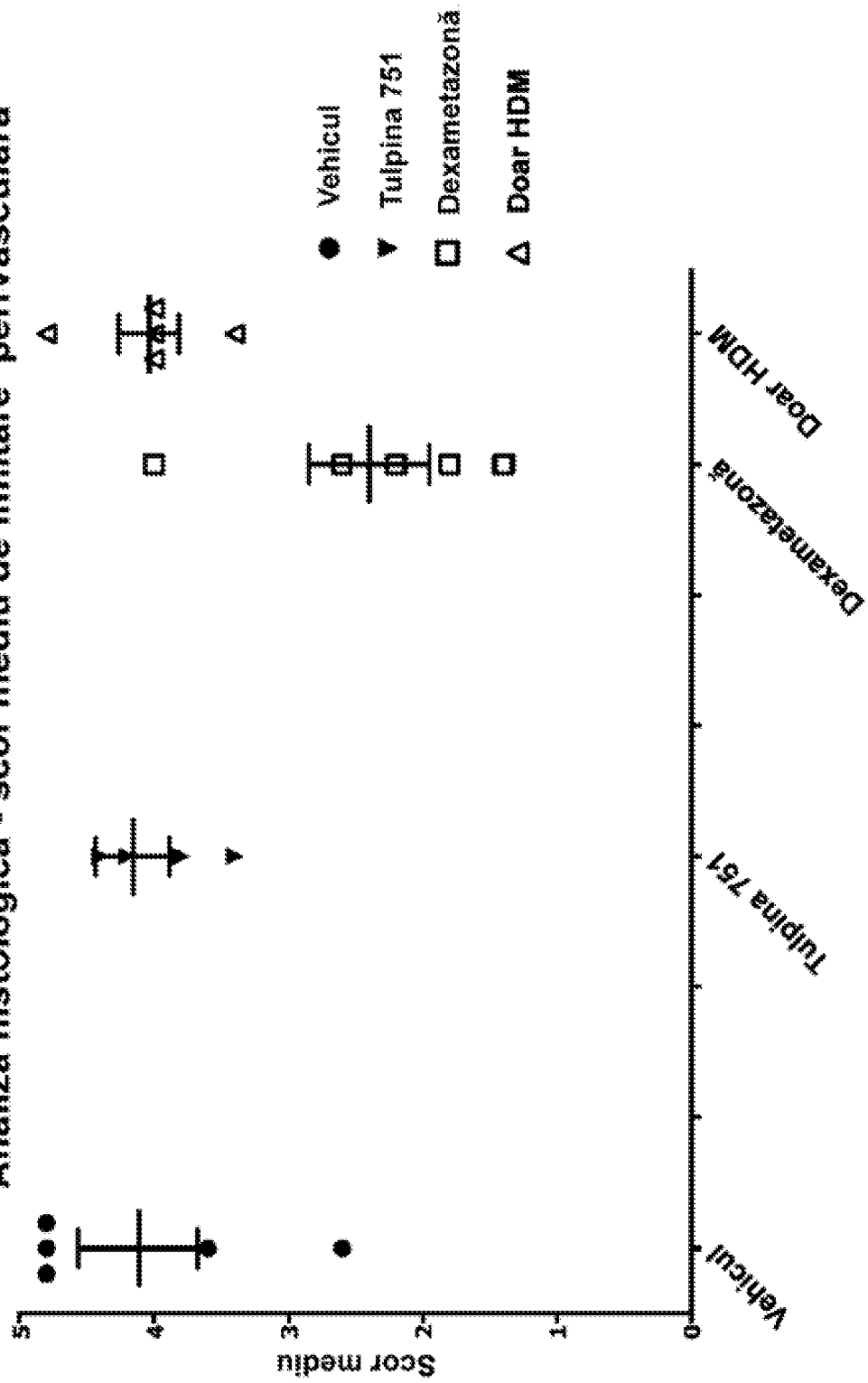
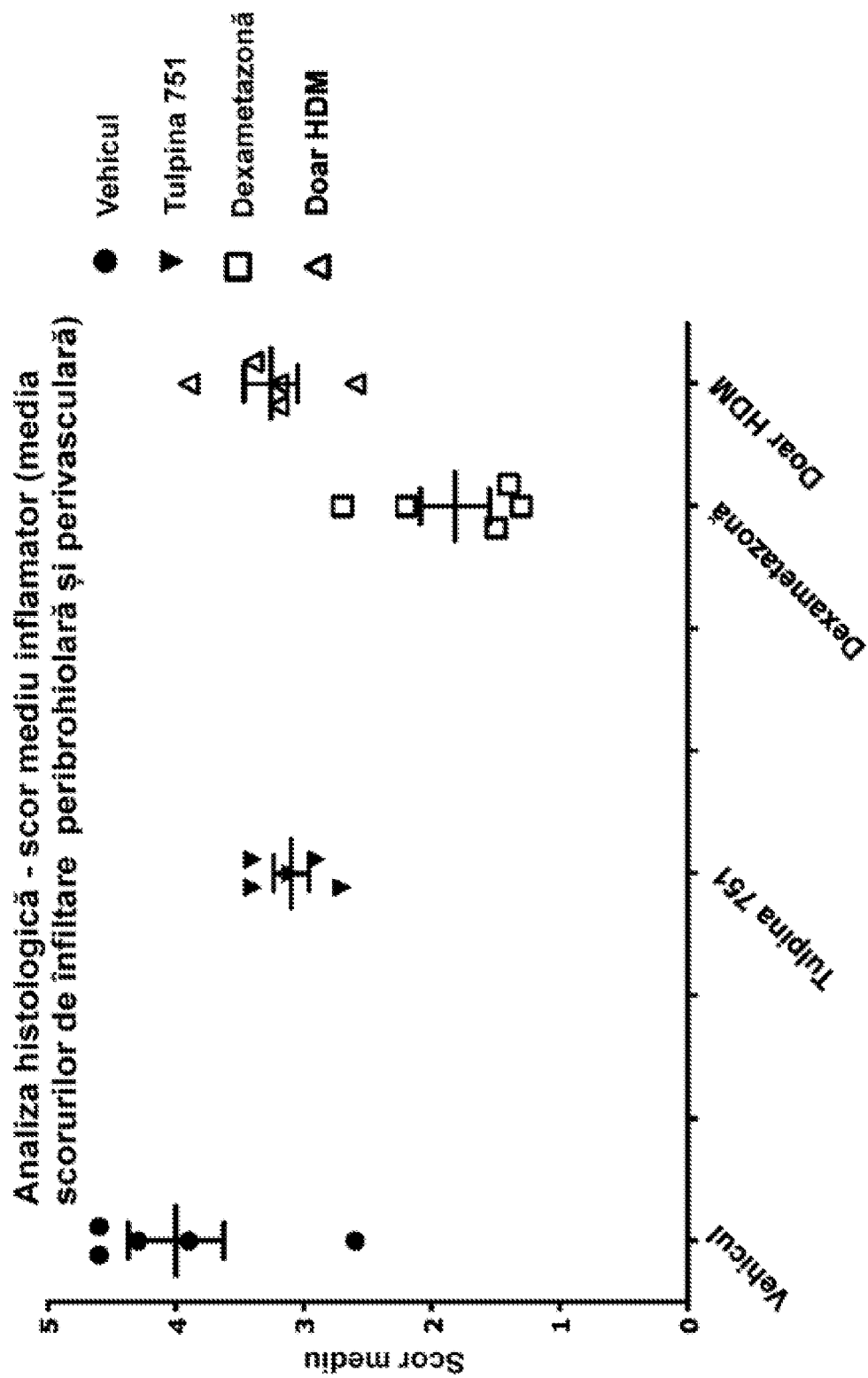


FIG. 34



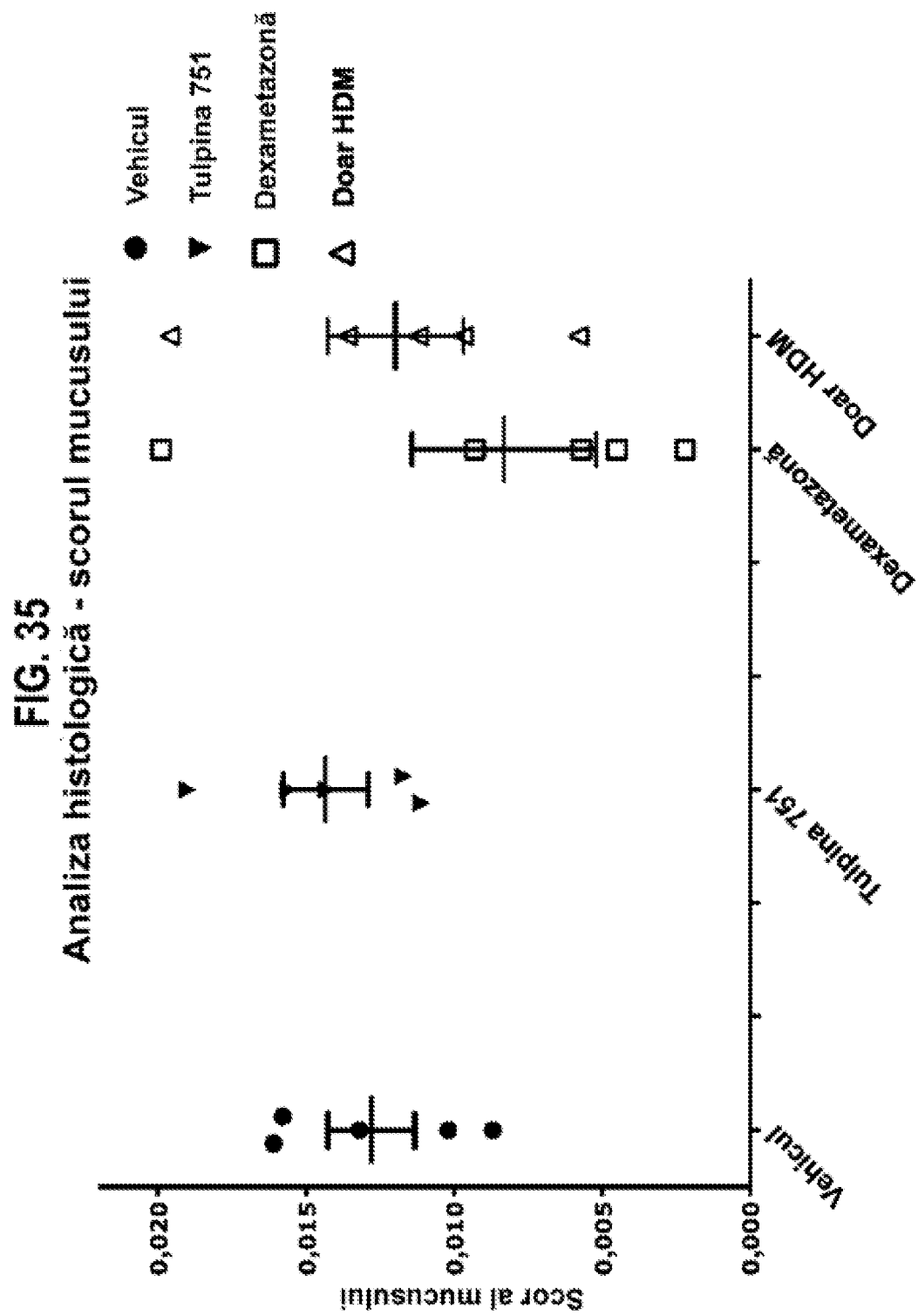


FIG. 36
Nivelul IL-9 în țesutul pulmonar

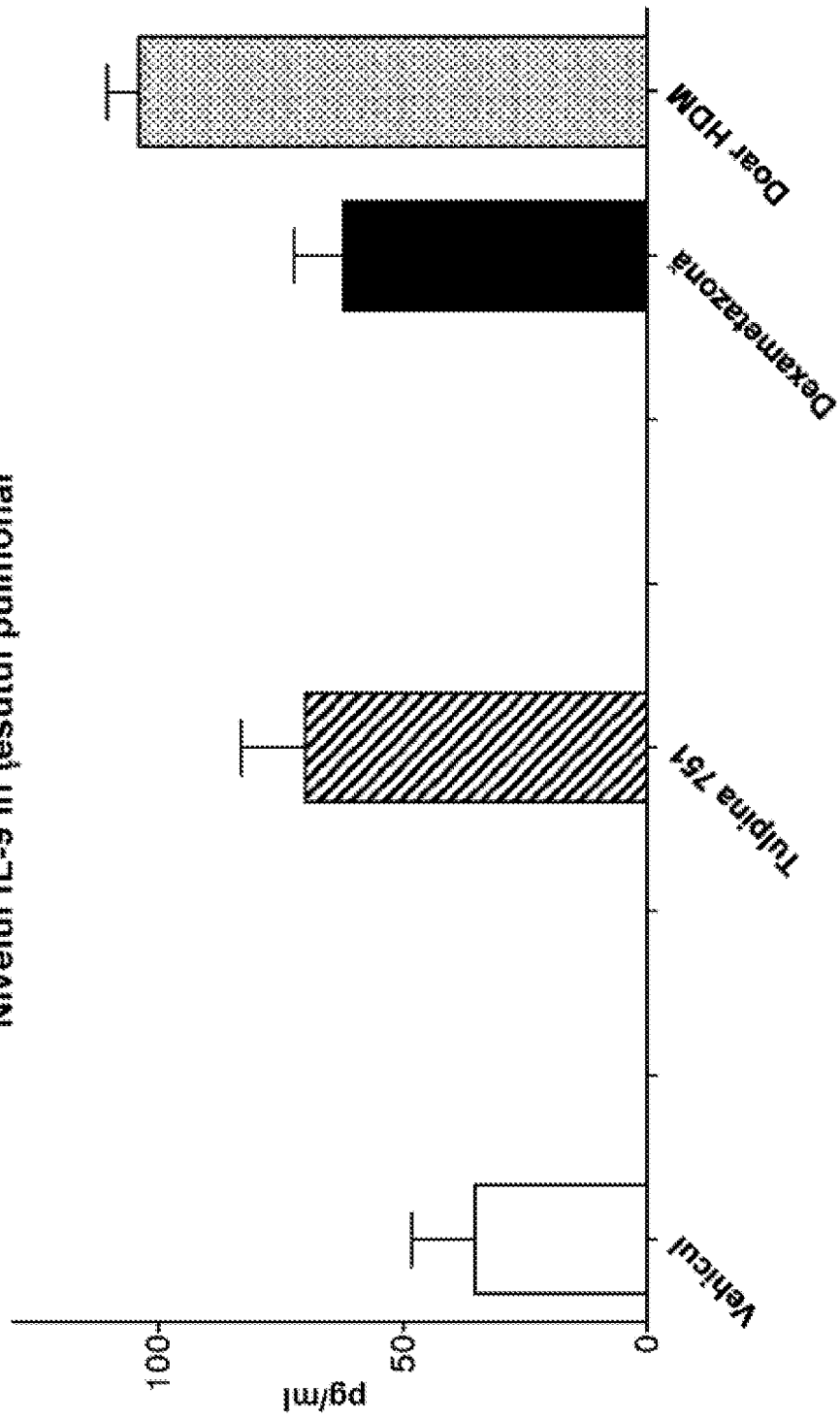


FIG. 37
Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar

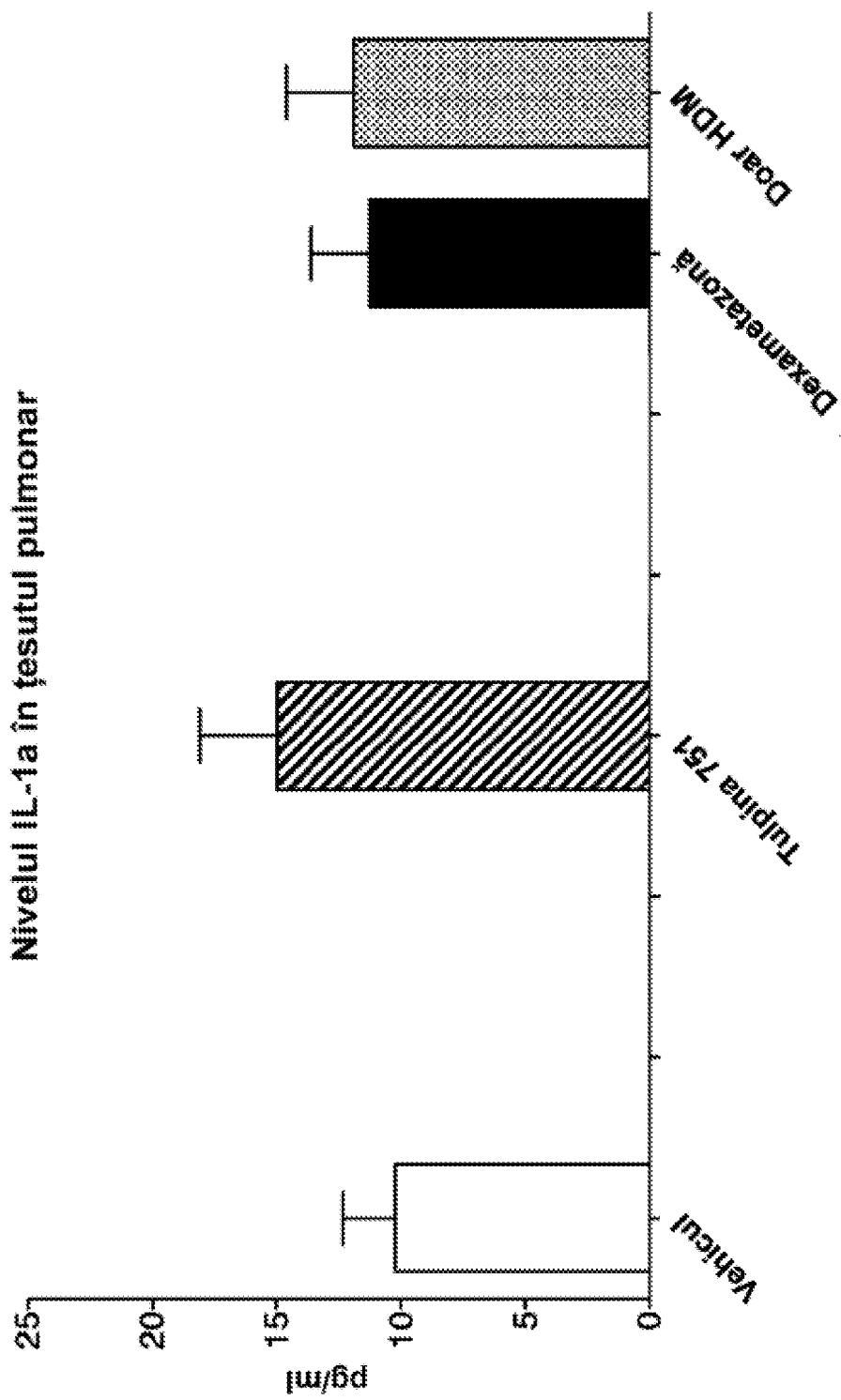


FIG. 38
Nivelul IFNg în țesutul pulmonar

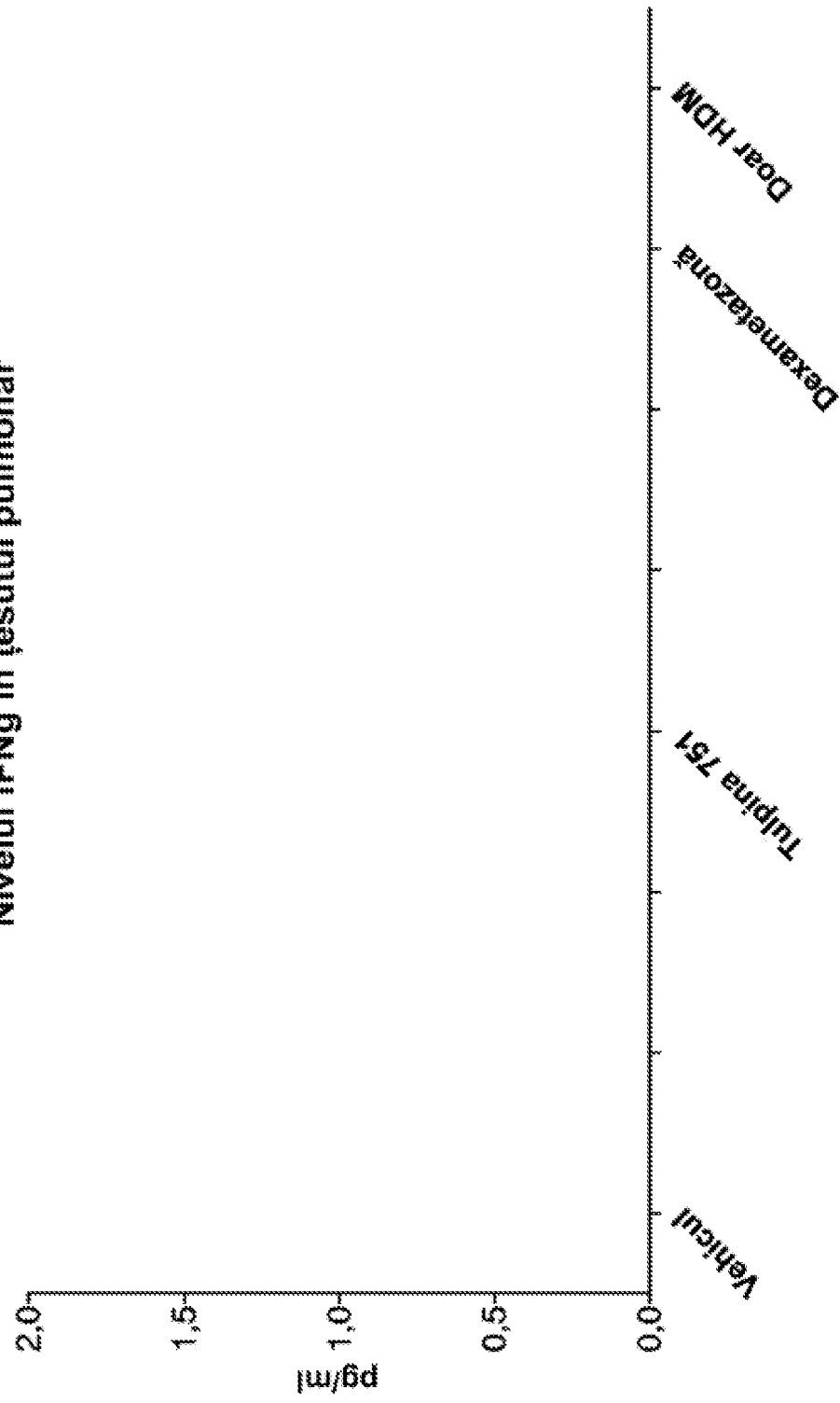


FIG. 39
Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar

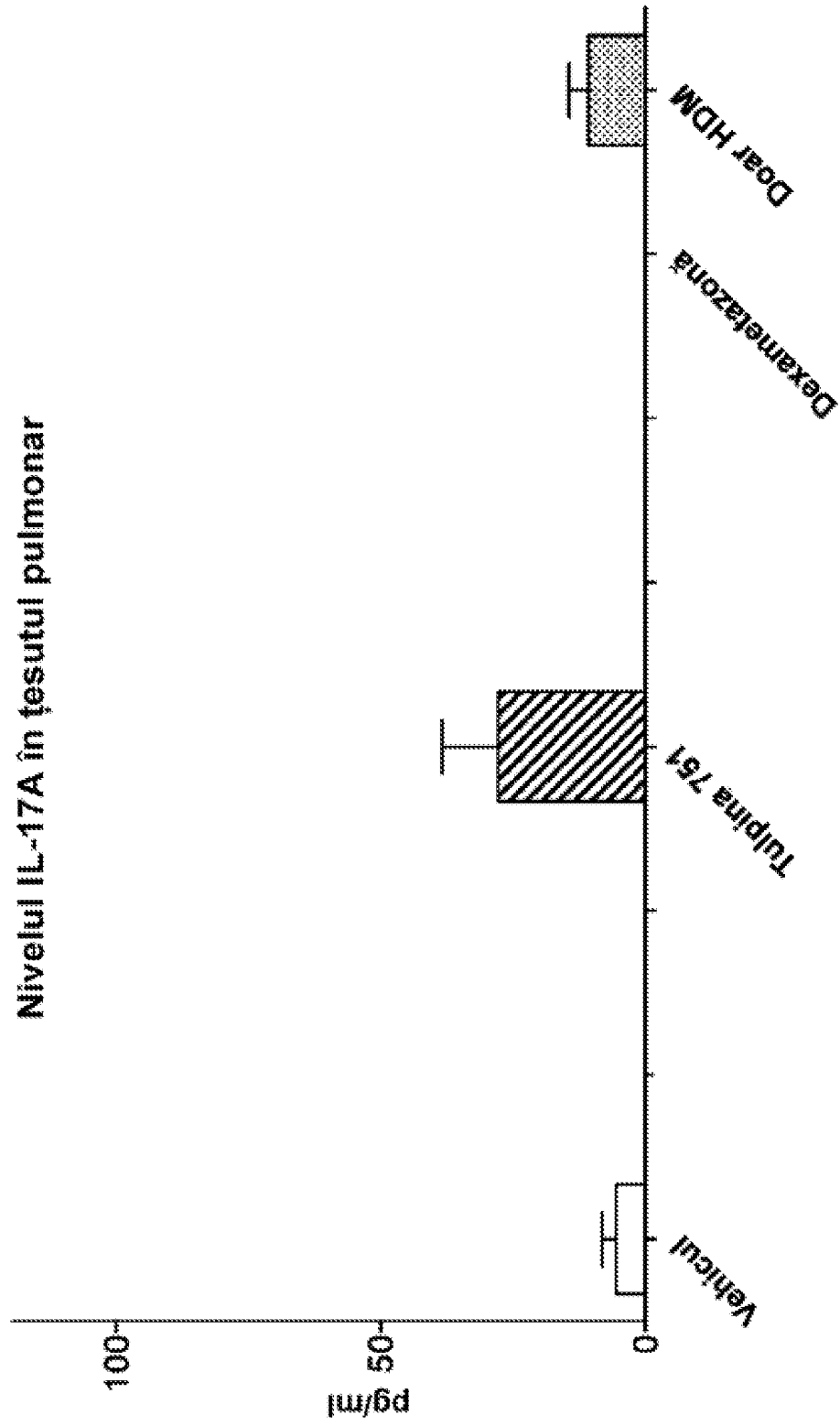


FIG. 40
Nivelul IL-4 în țesutul pulmonar

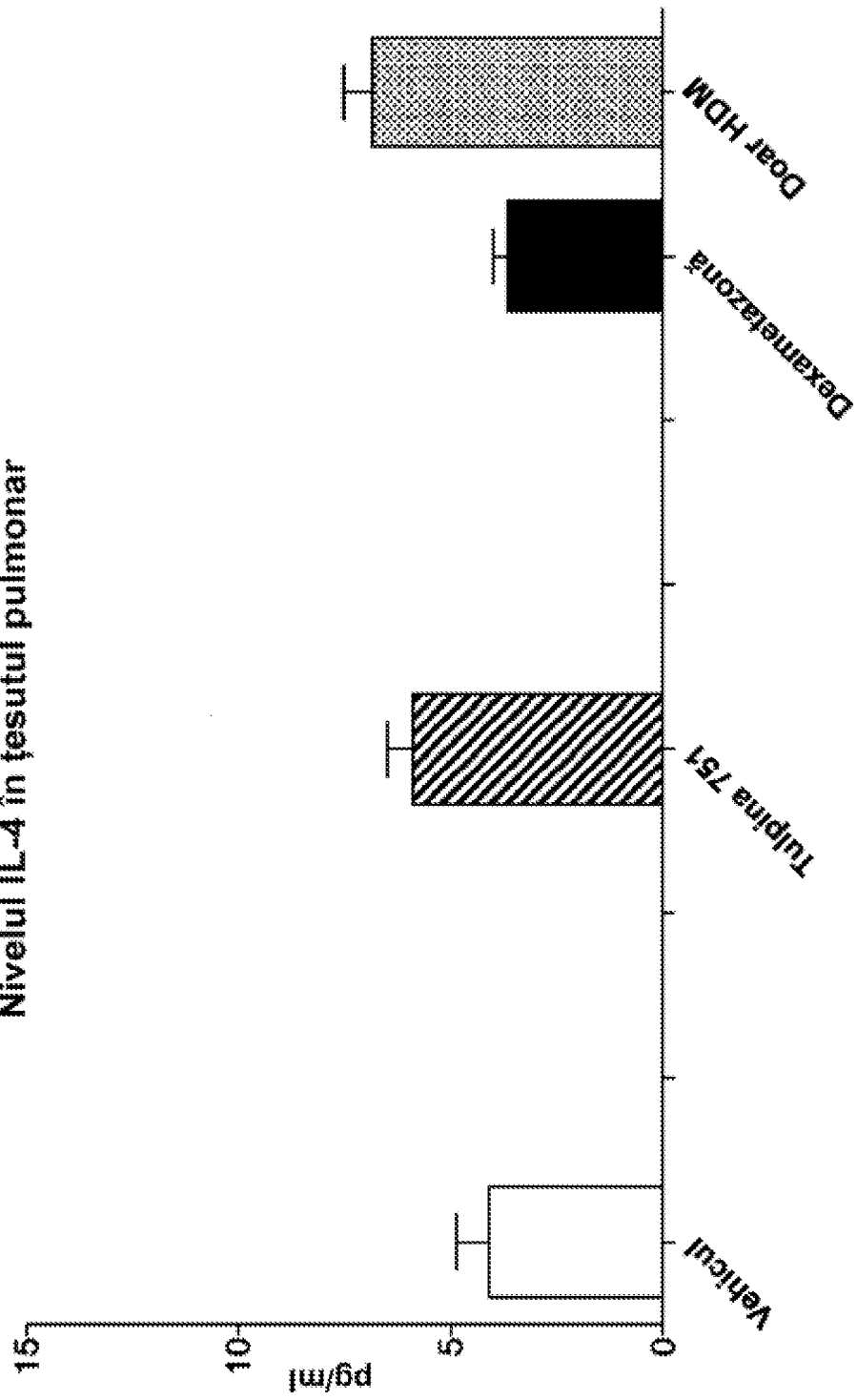


FIG. 41
Nivelul IL-5 în țesutul pulmonar

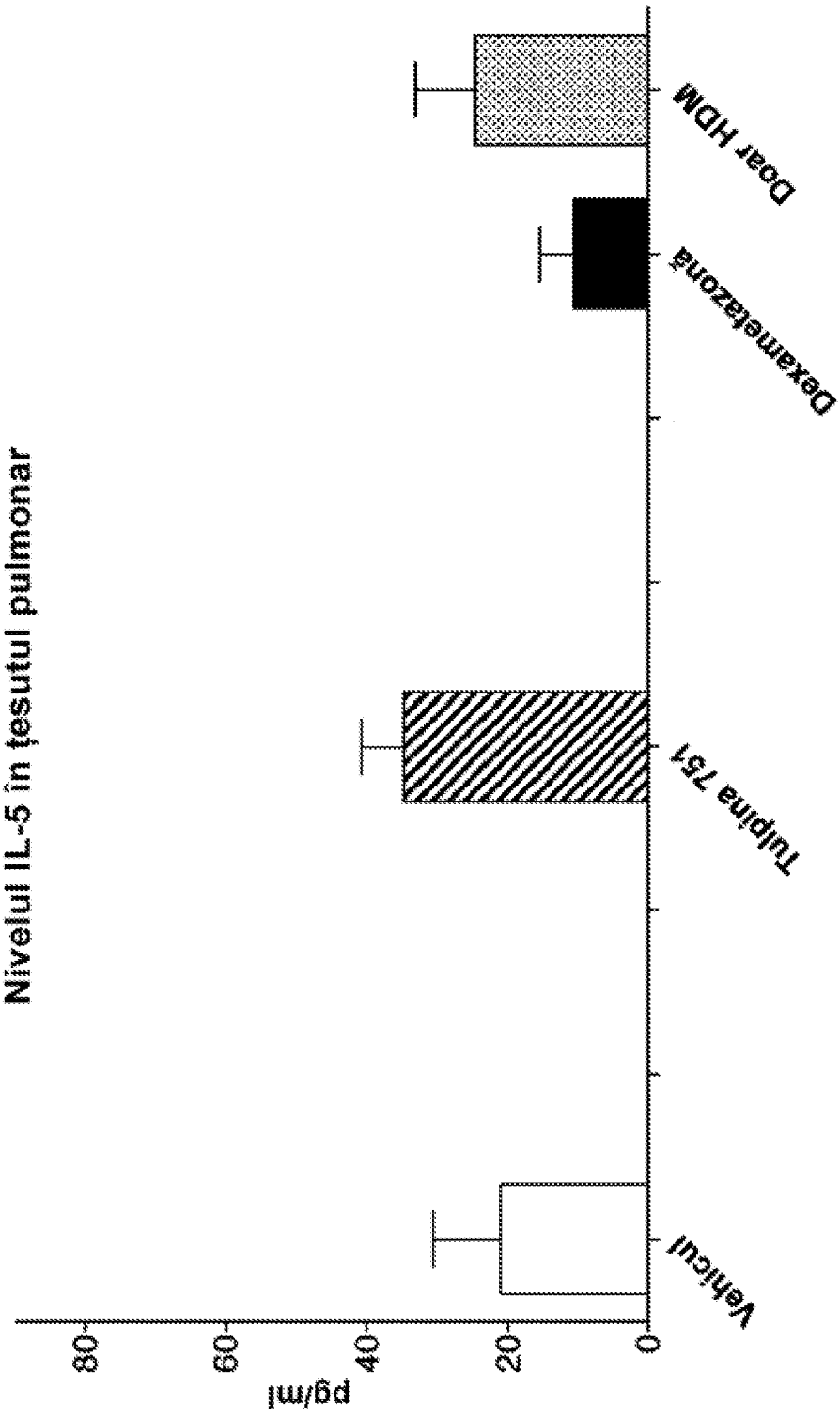


FIG. 42
Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar

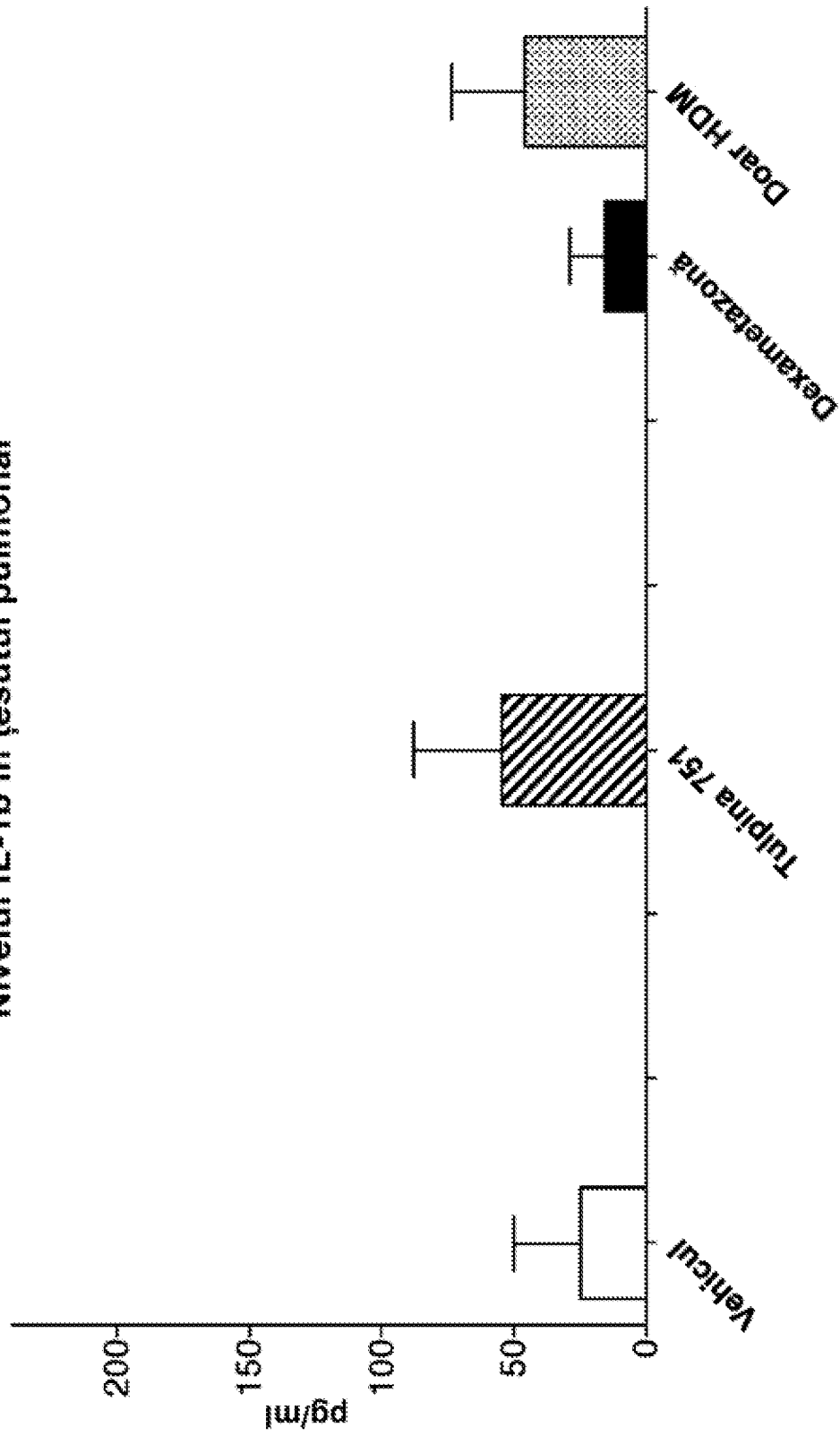


FIG. 43
Nivelul RANTES în țesutul pulmonar

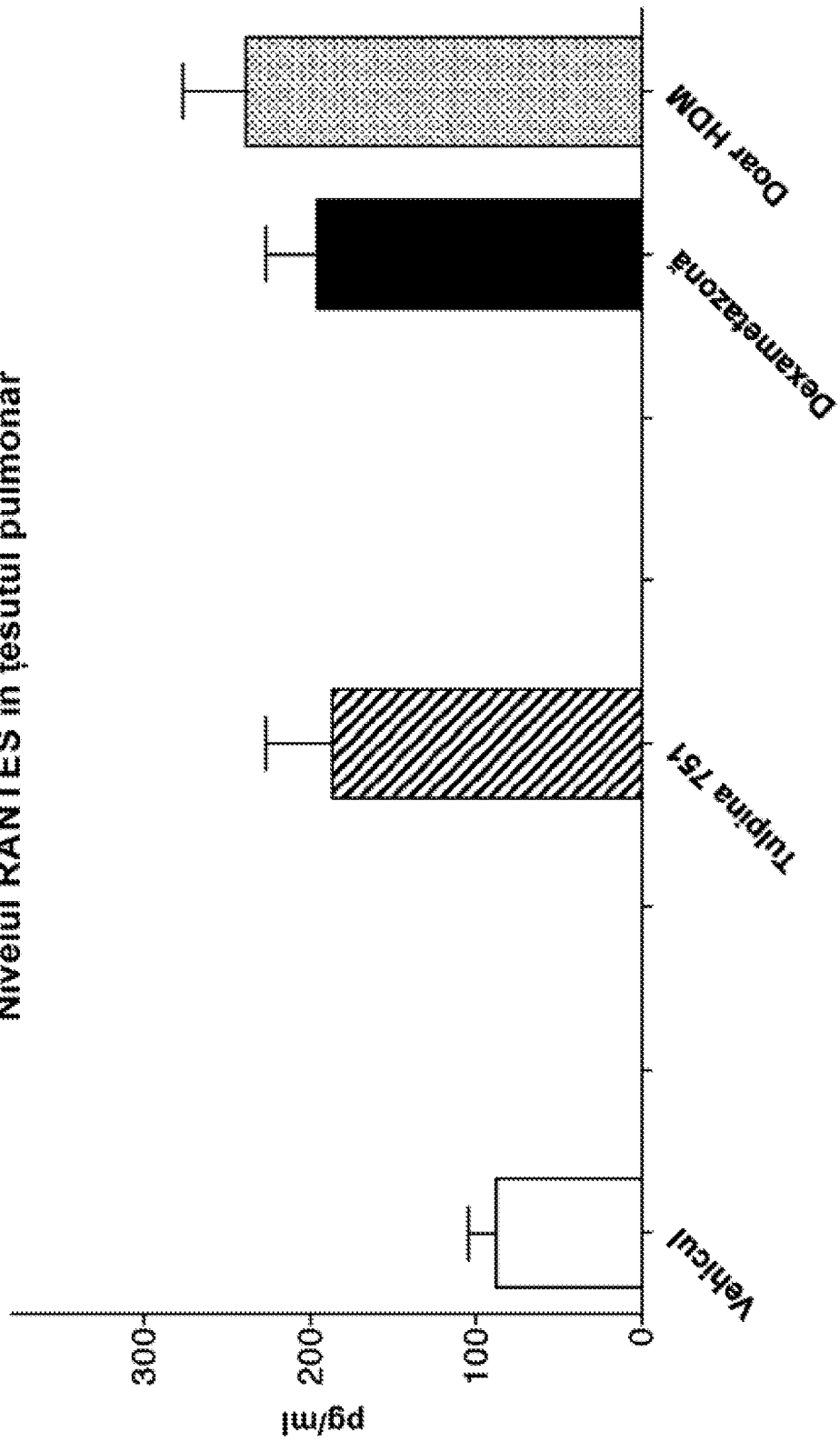


FIG. 44
Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar

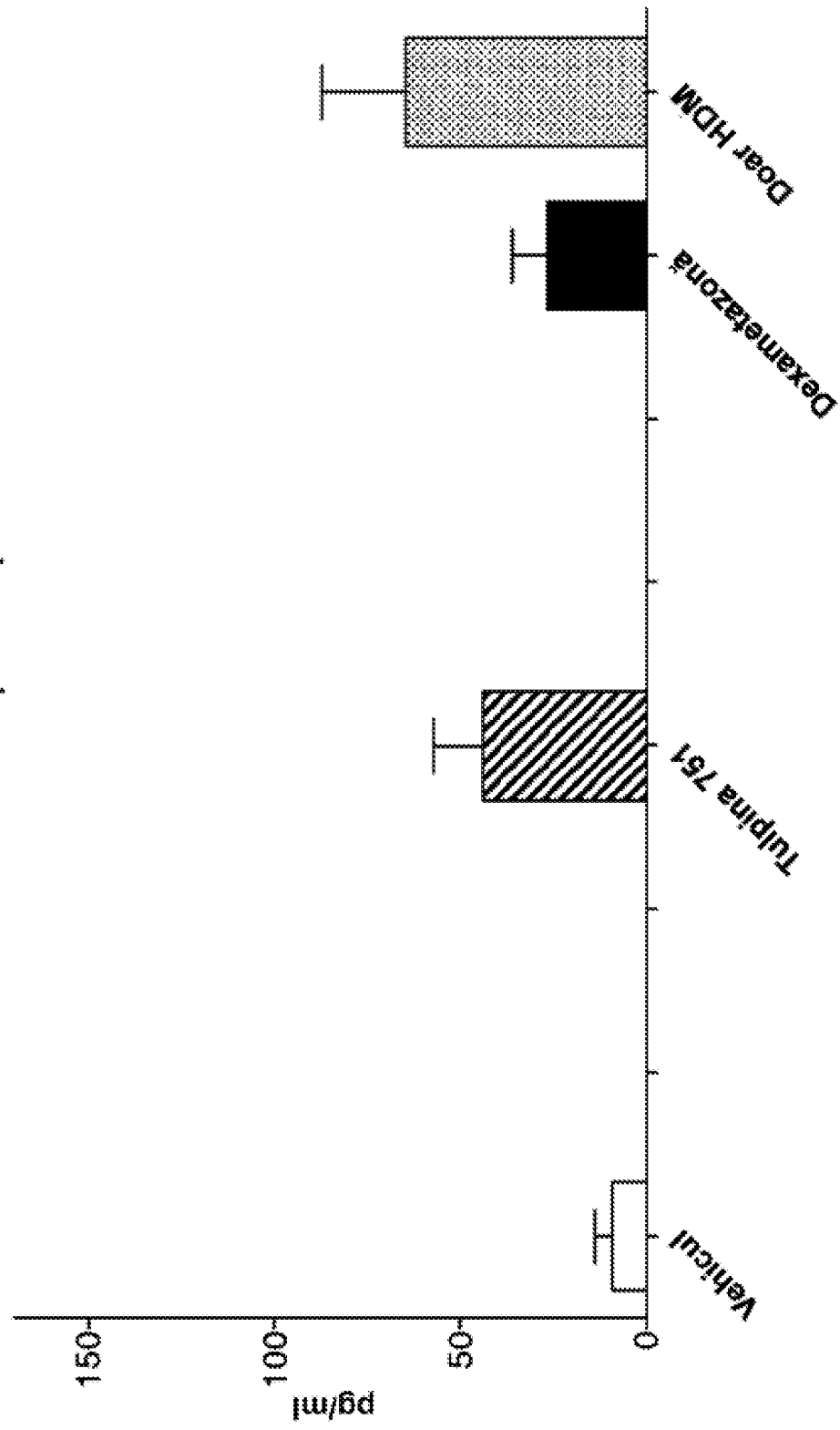


FIG. 45
Nivelul KC în țesutul pulmonar

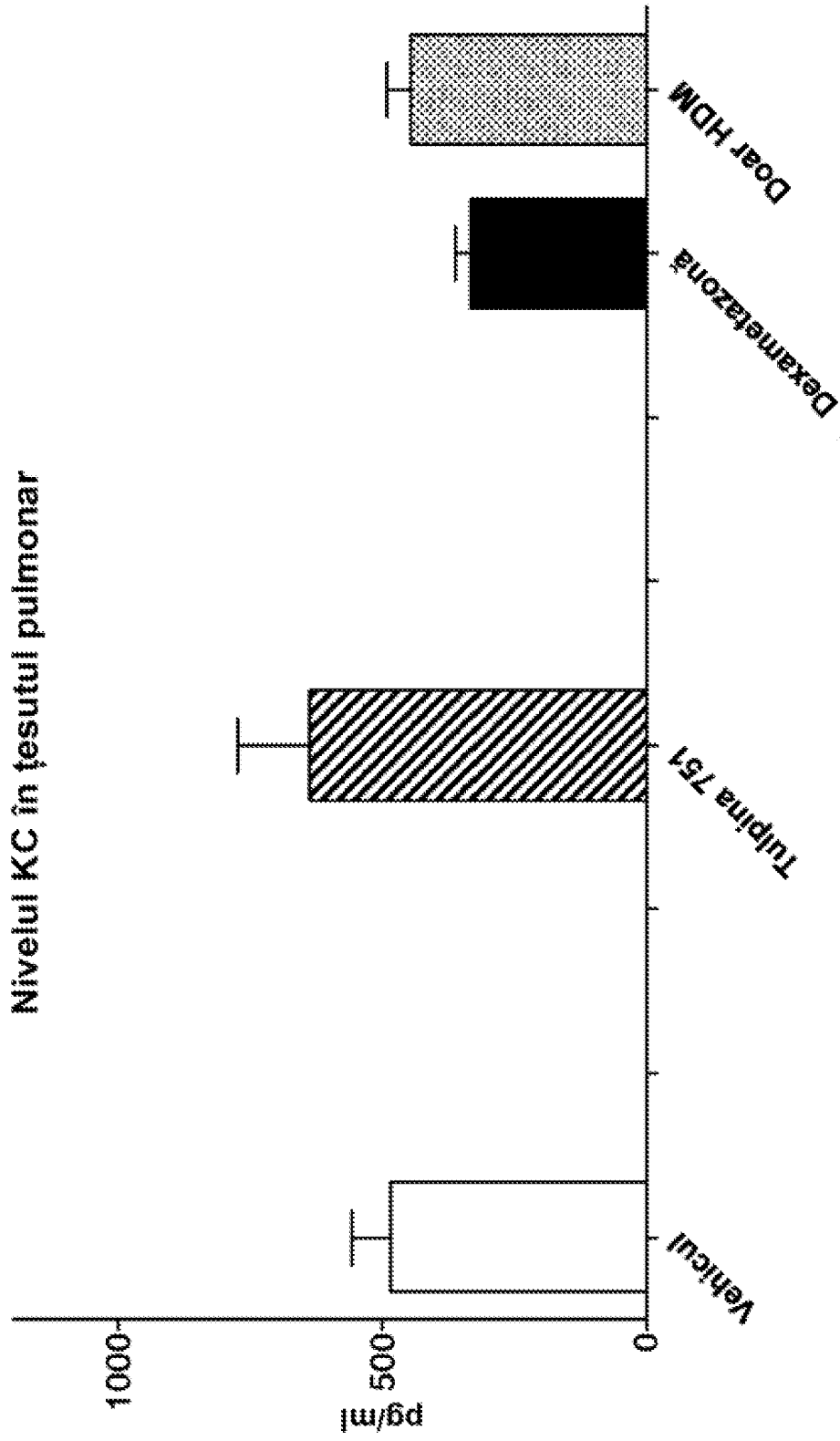
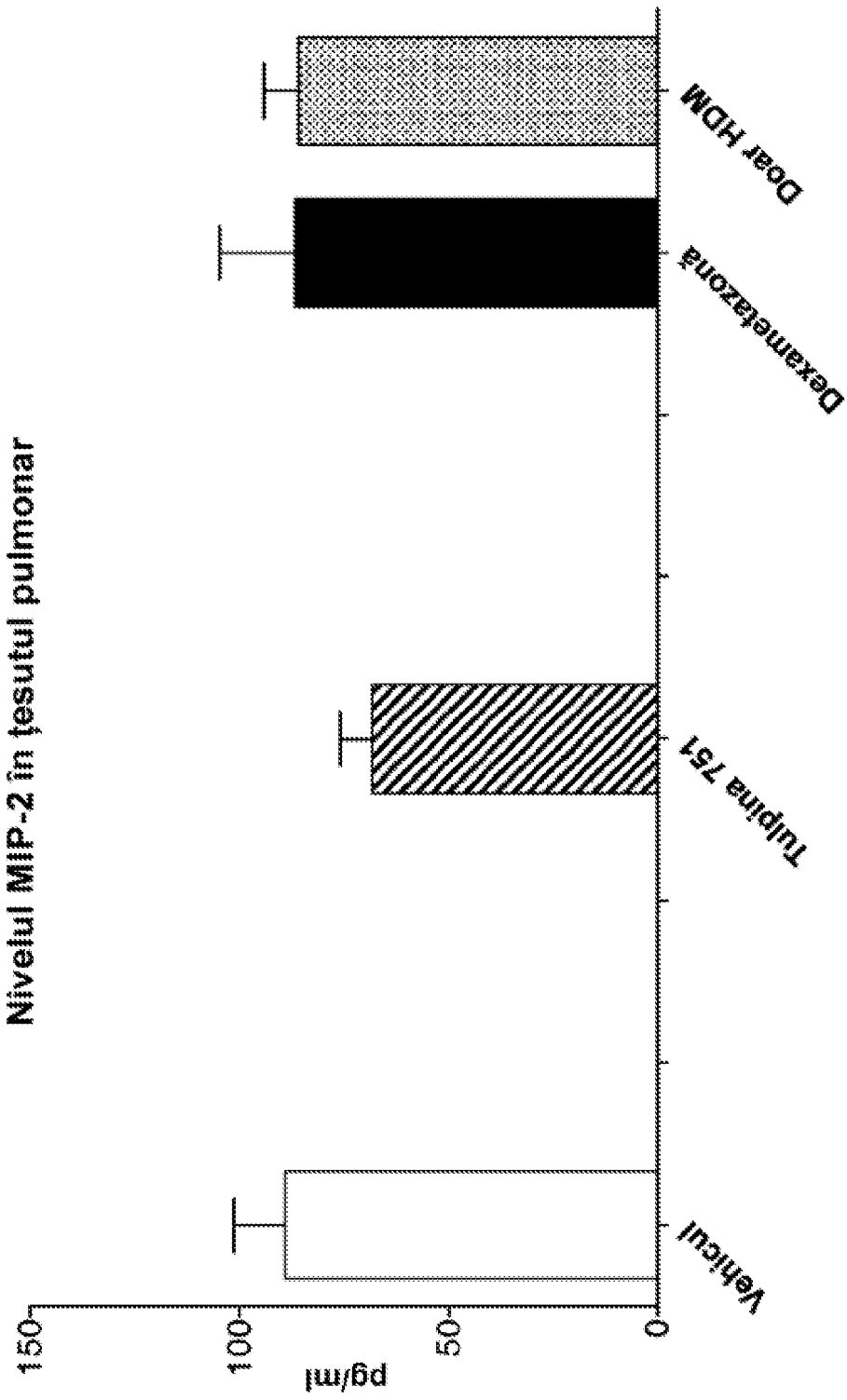


FIG. 46
Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar



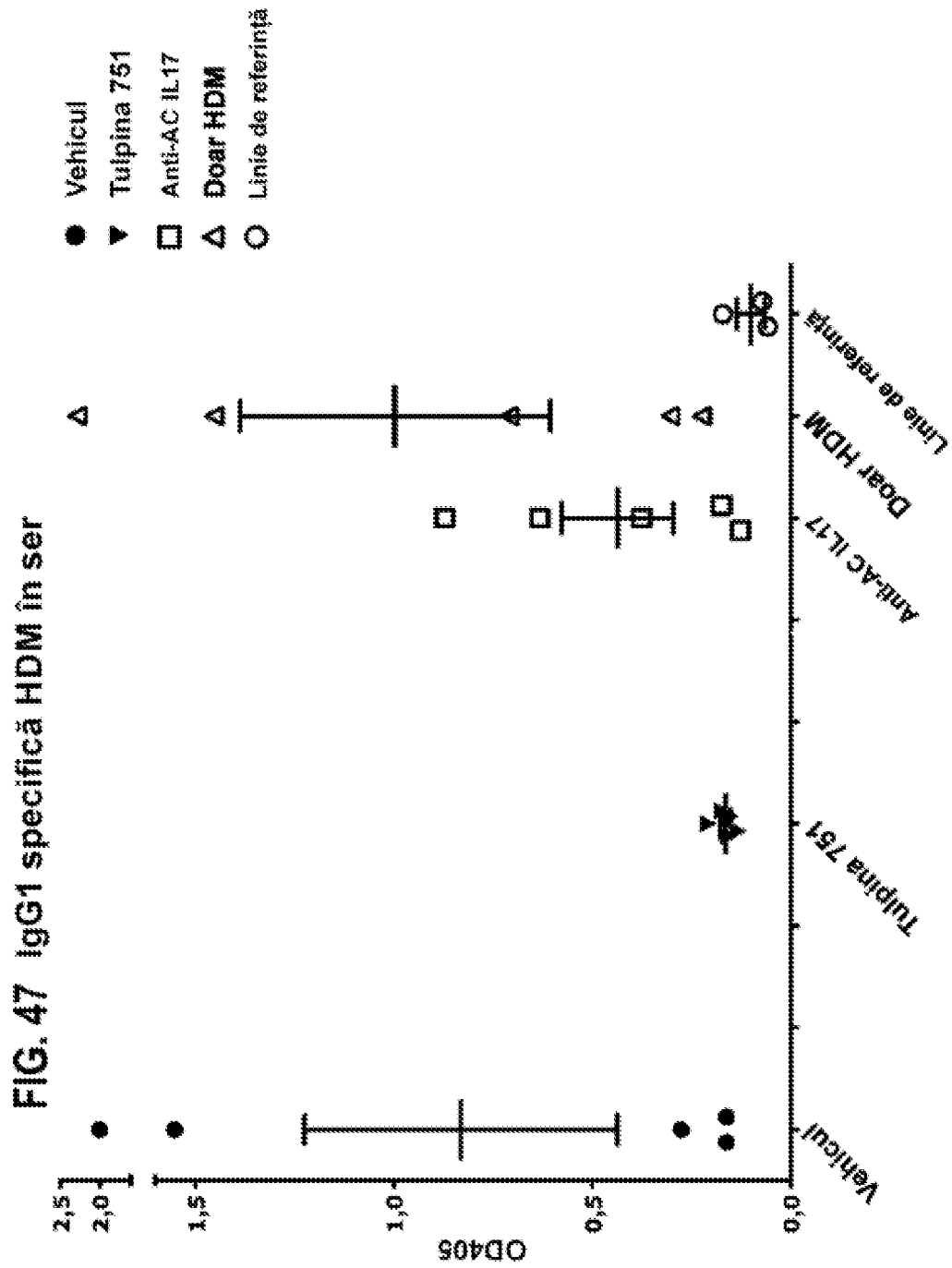


FIG. 48 IgG2a specifică HDM în ser

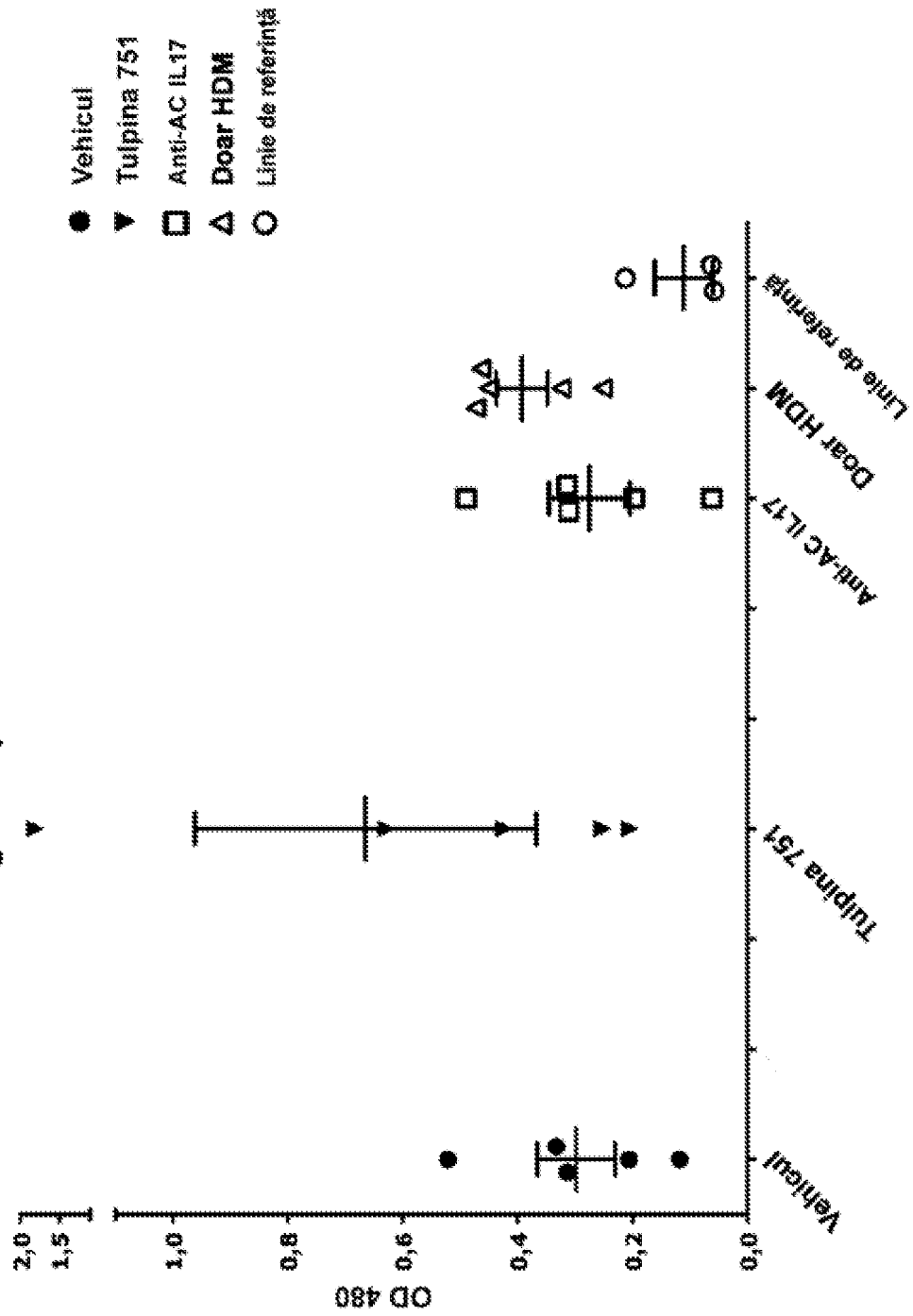
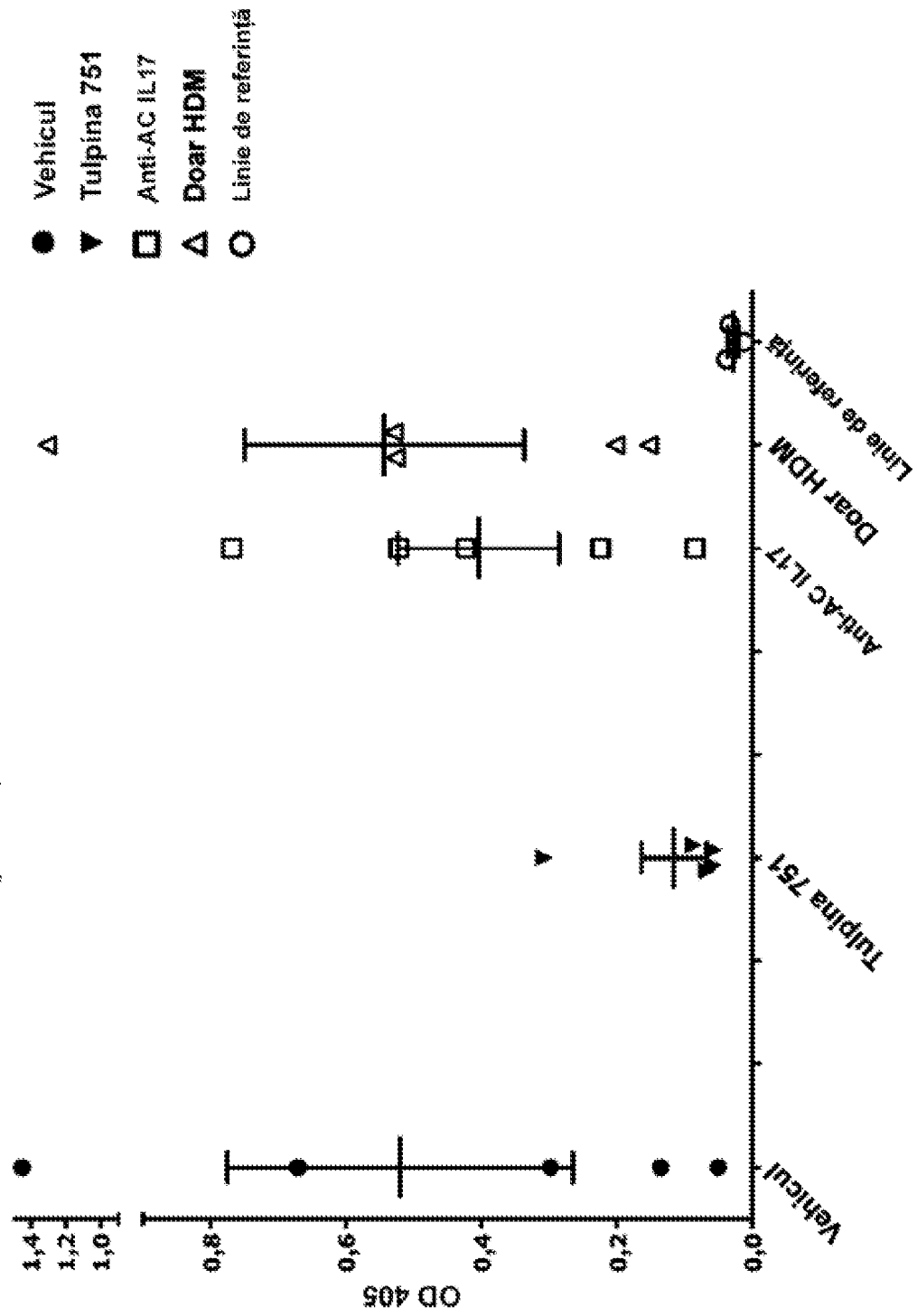


FIG. 49 IgG1 specifică HDM în BALF



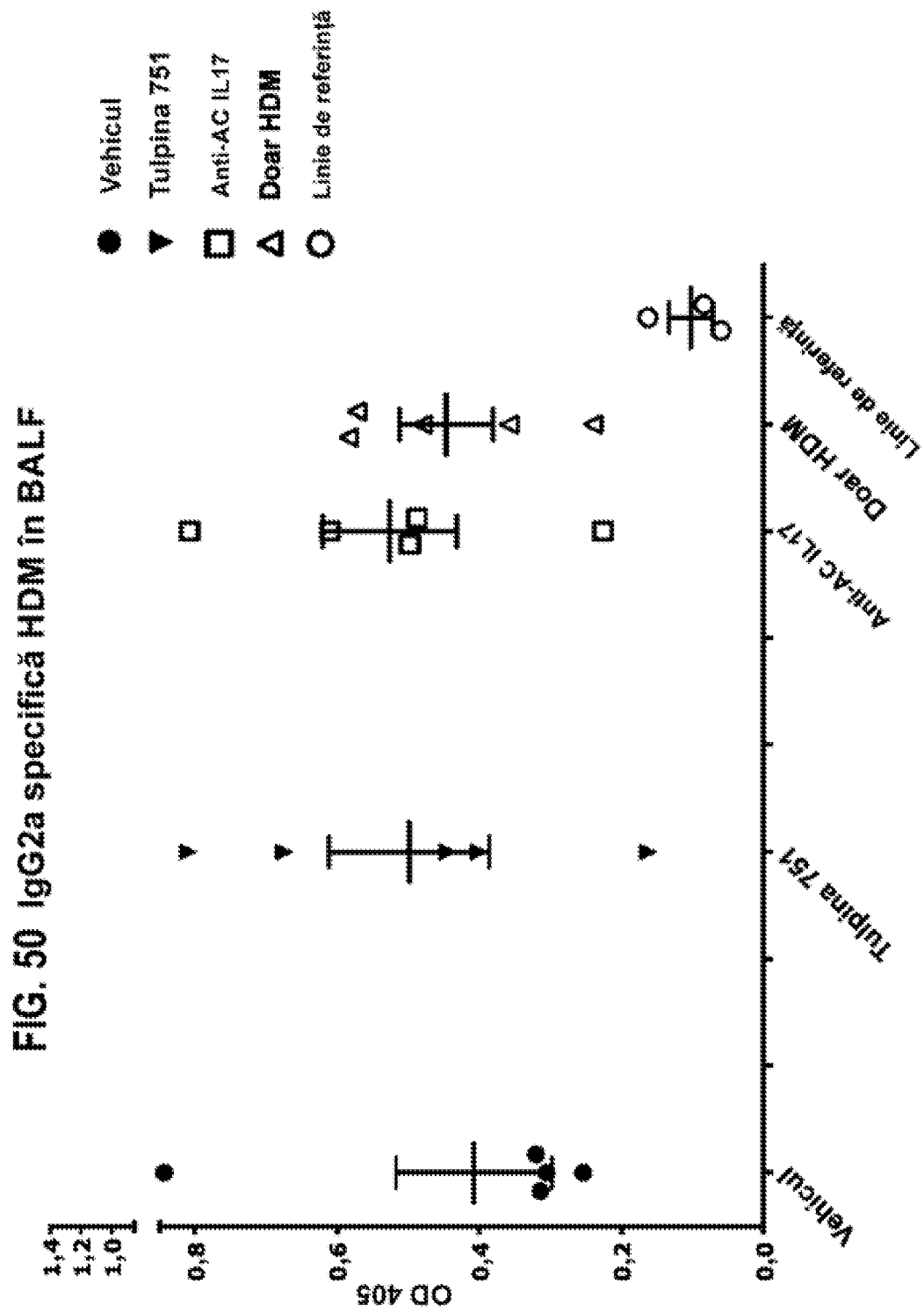


FIG. 51 Analiza histologică - scor mediu de infiltrare peribronhiolară

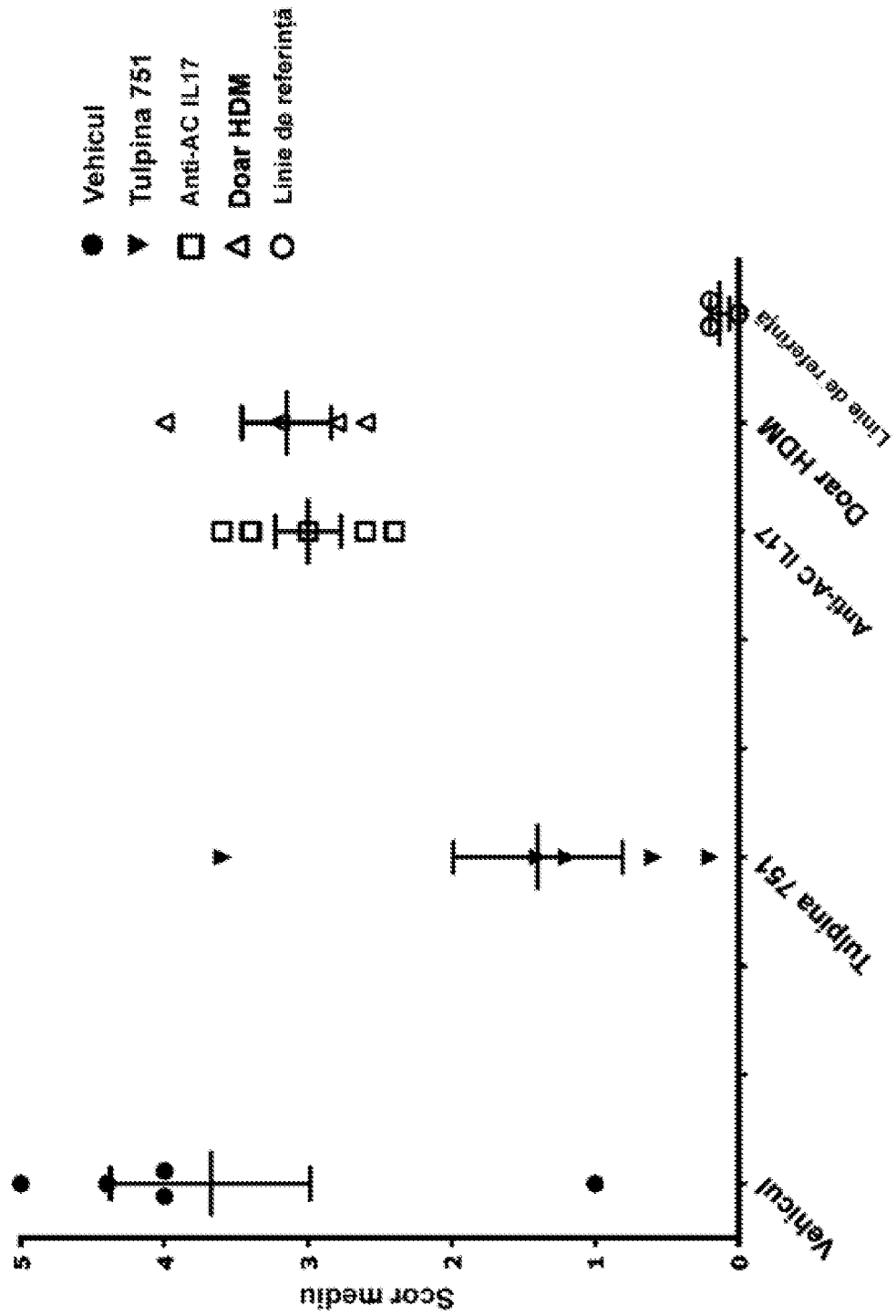


FIG. 52 Analiza histologică - scor mediu de infiltrare perivasculară

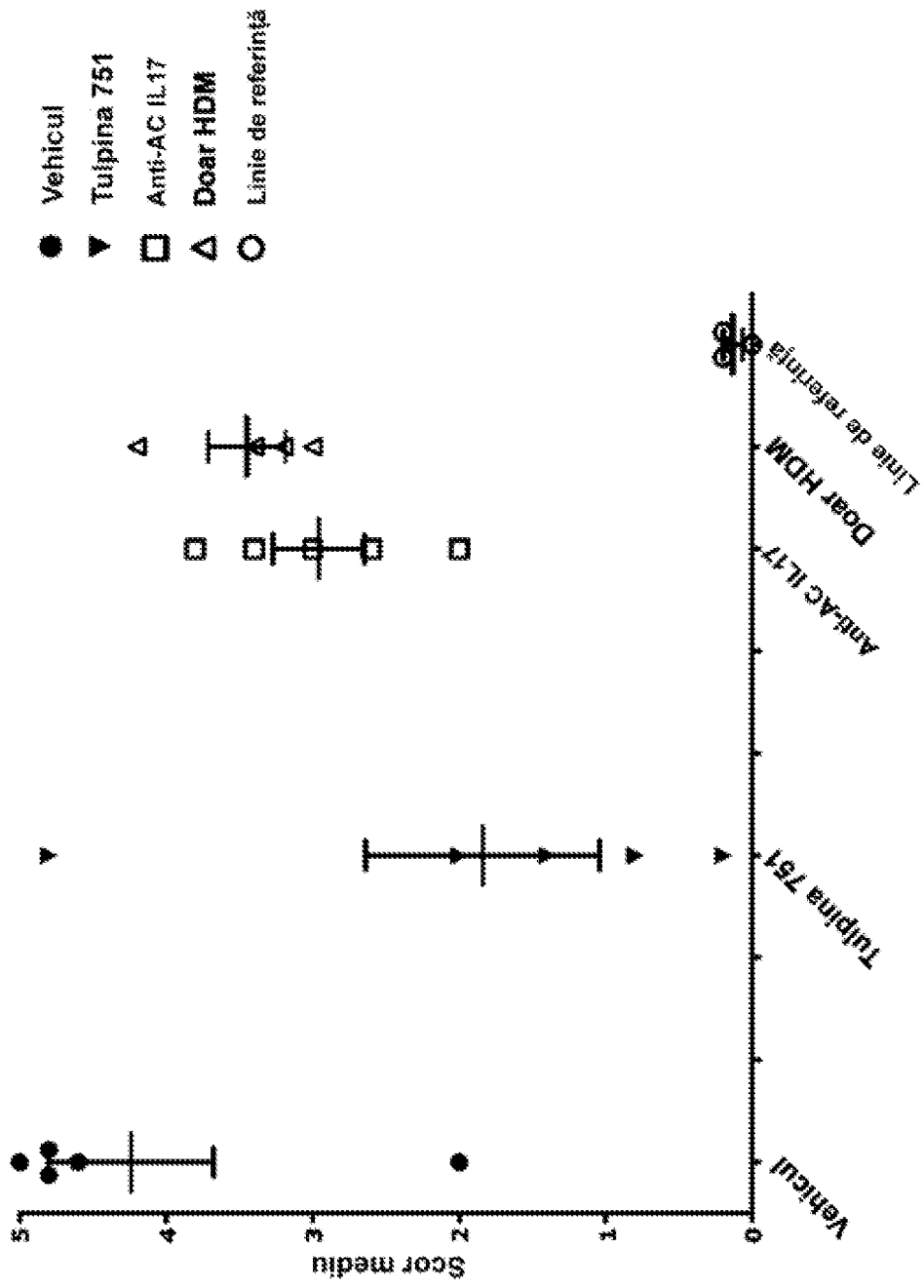


FIG. 53 Analiza histologică - scor mediu inflamator (media scorurilor de infiltrare peribronhiolară și perivasculară)

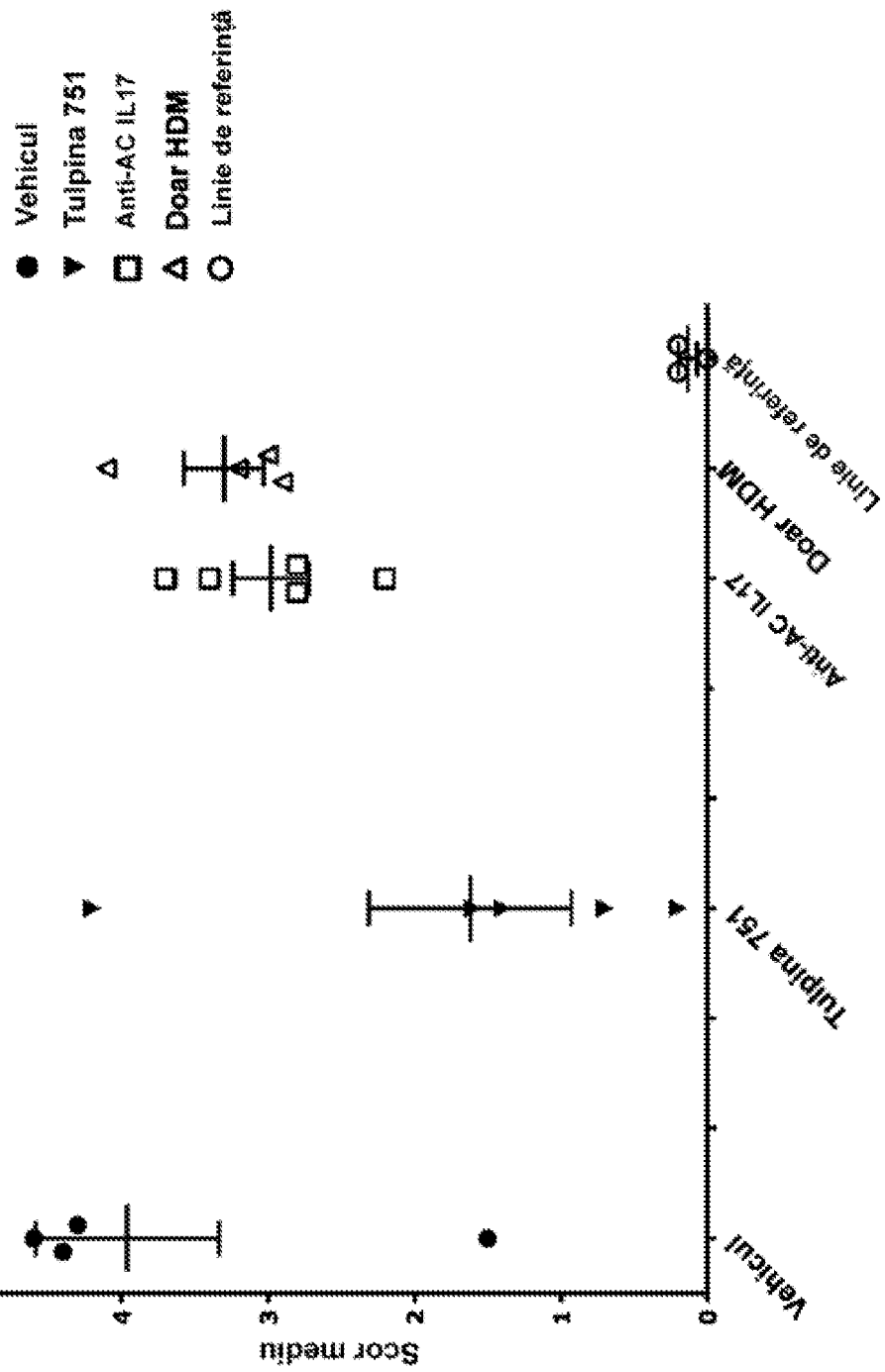


FIG. 54
Nivelul TNFa în țesutul pulmonar

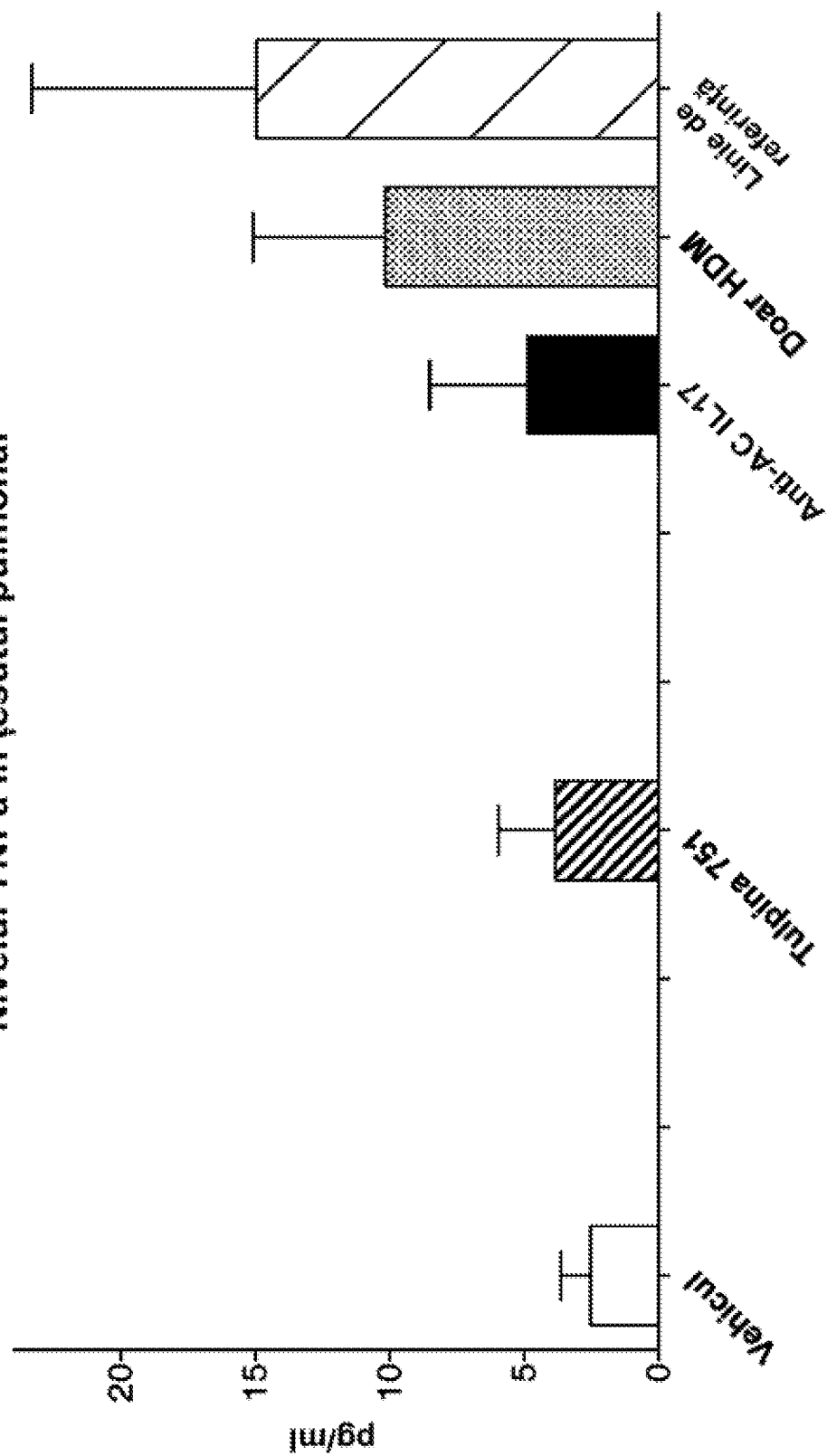


FIG. 55
Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar

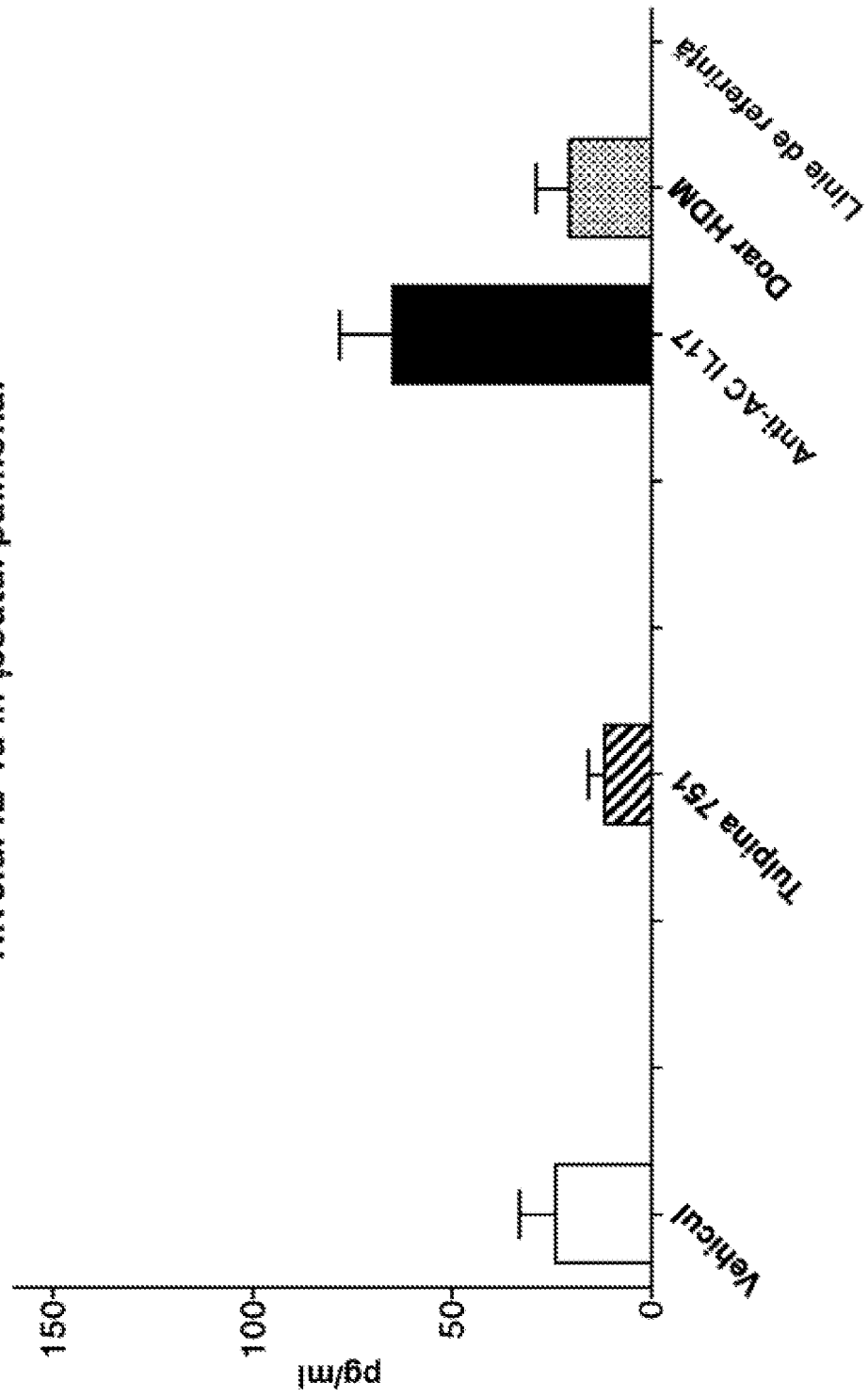


FIG. 56
Nivelul IFNg în țesutul pulmonar

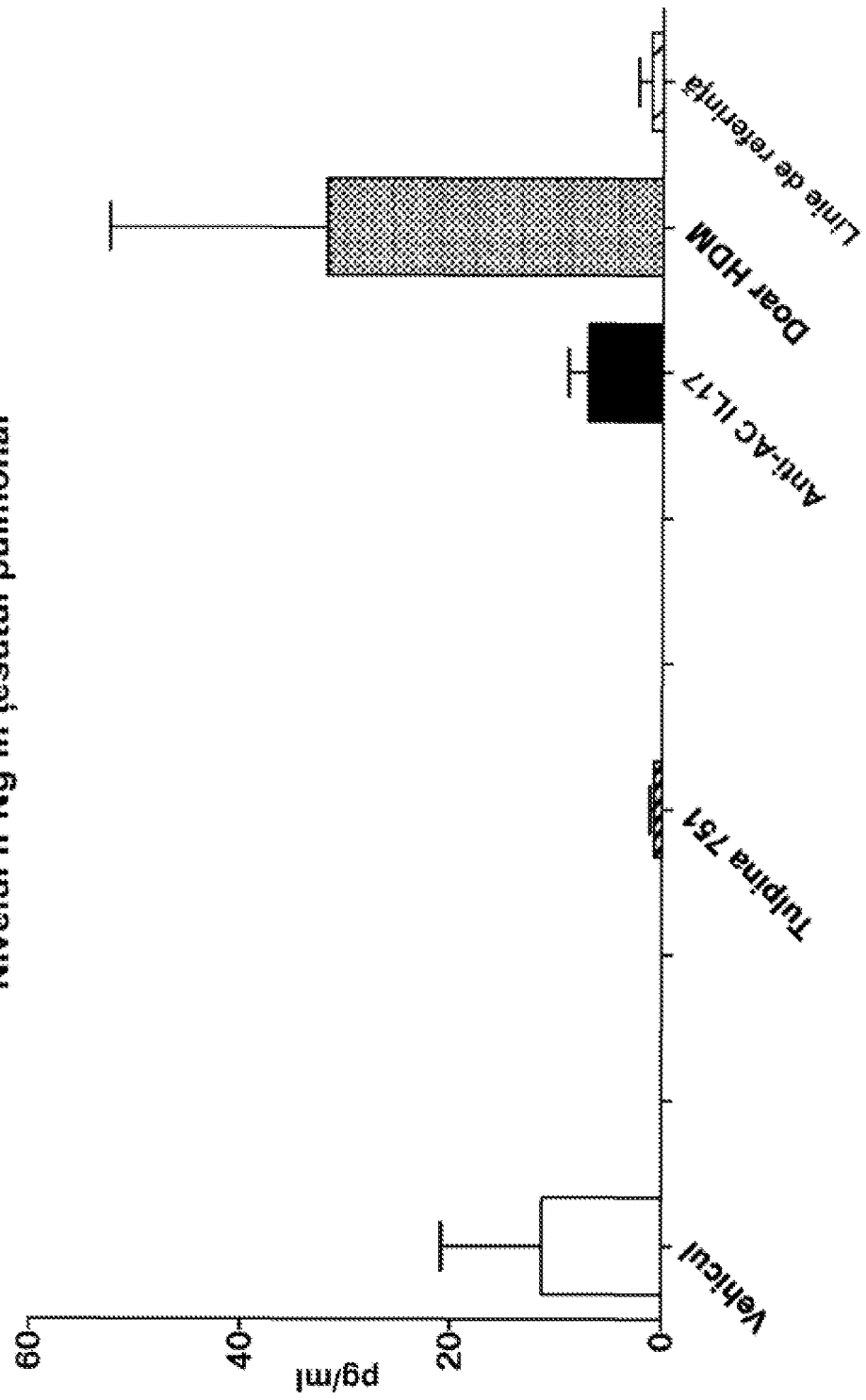


FIG. 57
Nivelul IL-17F în țesutul pulmonar

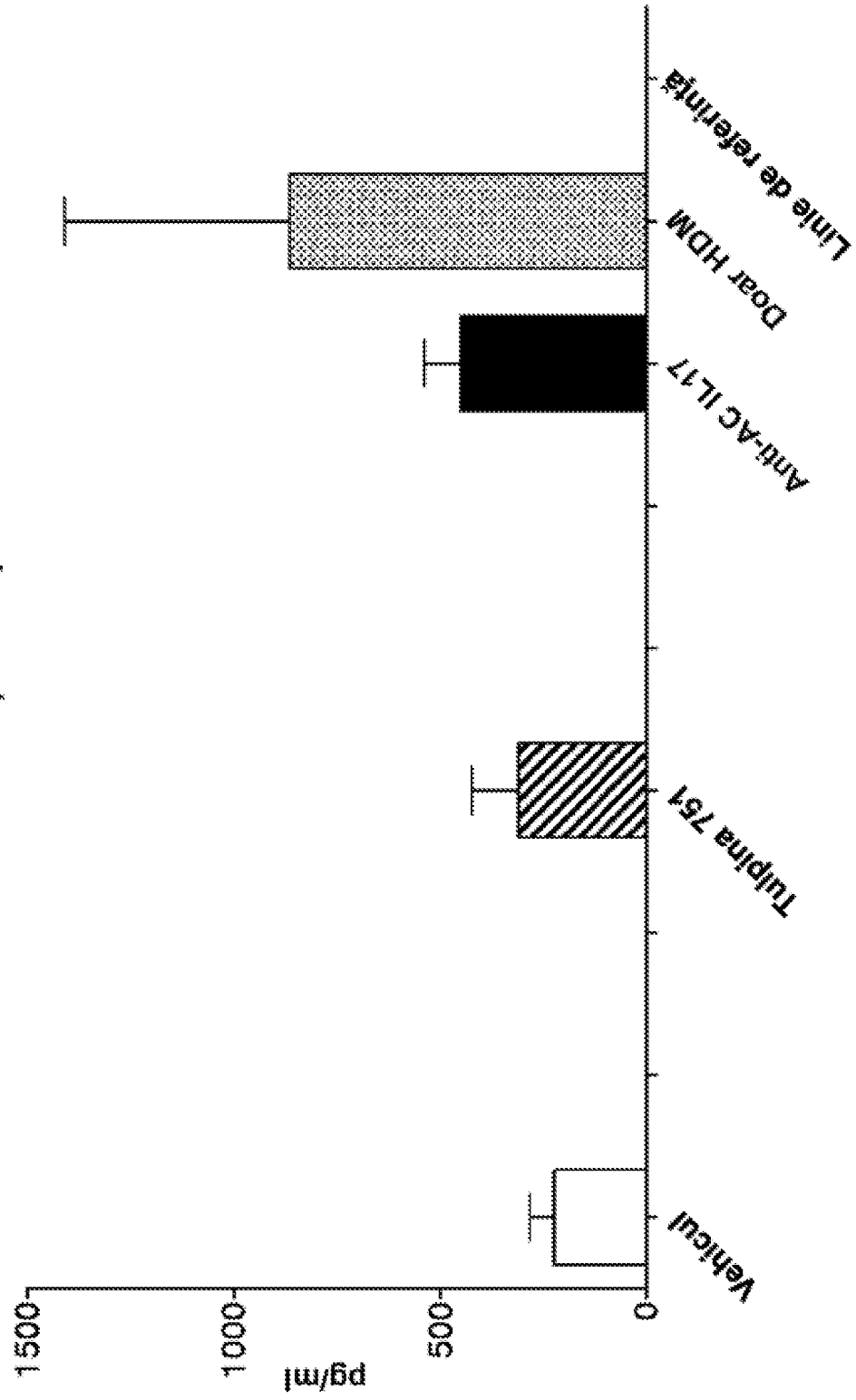


FIG. 58
Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar

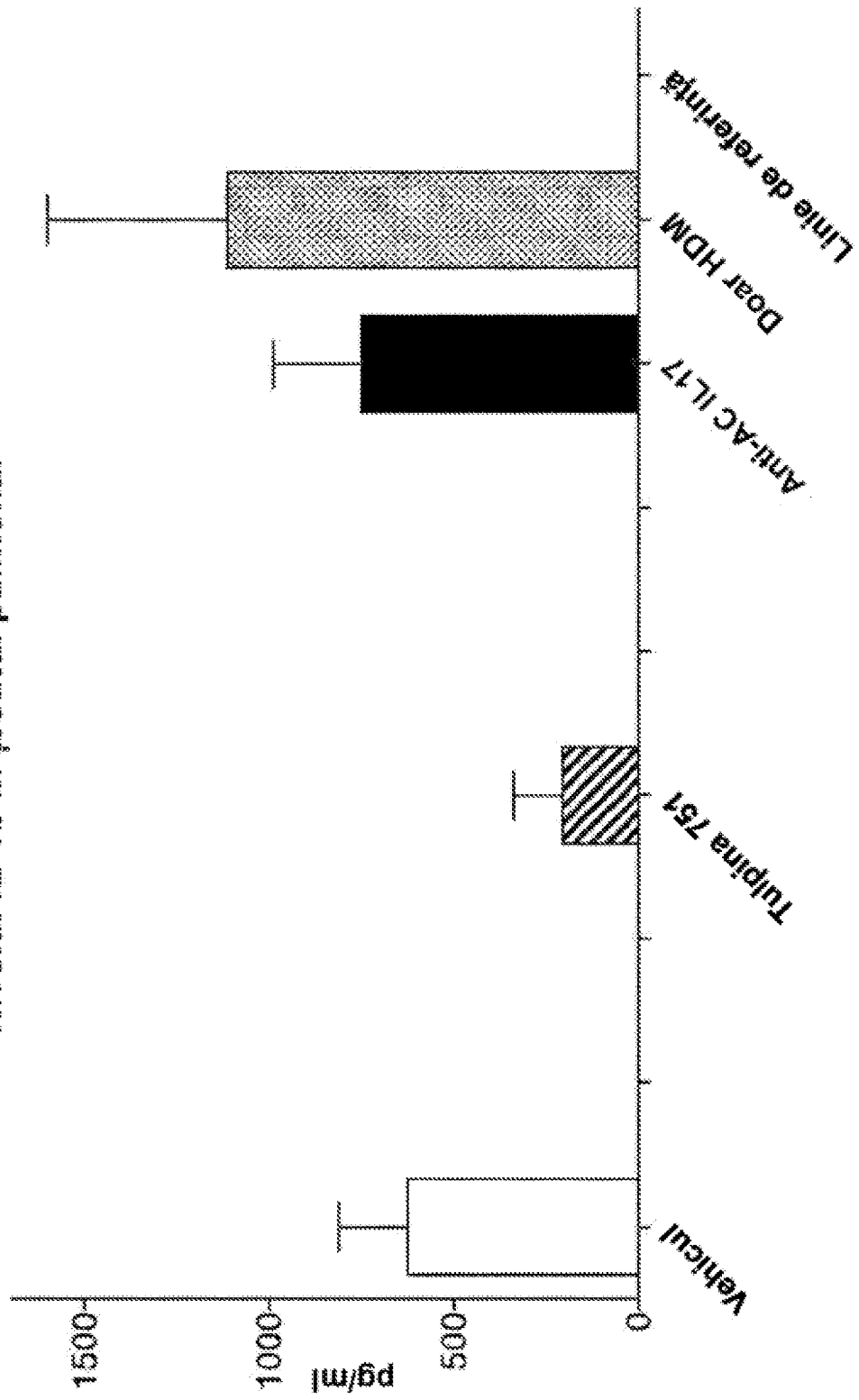


FIG. 59
Nivelul RANTES în țesutul pulmonar

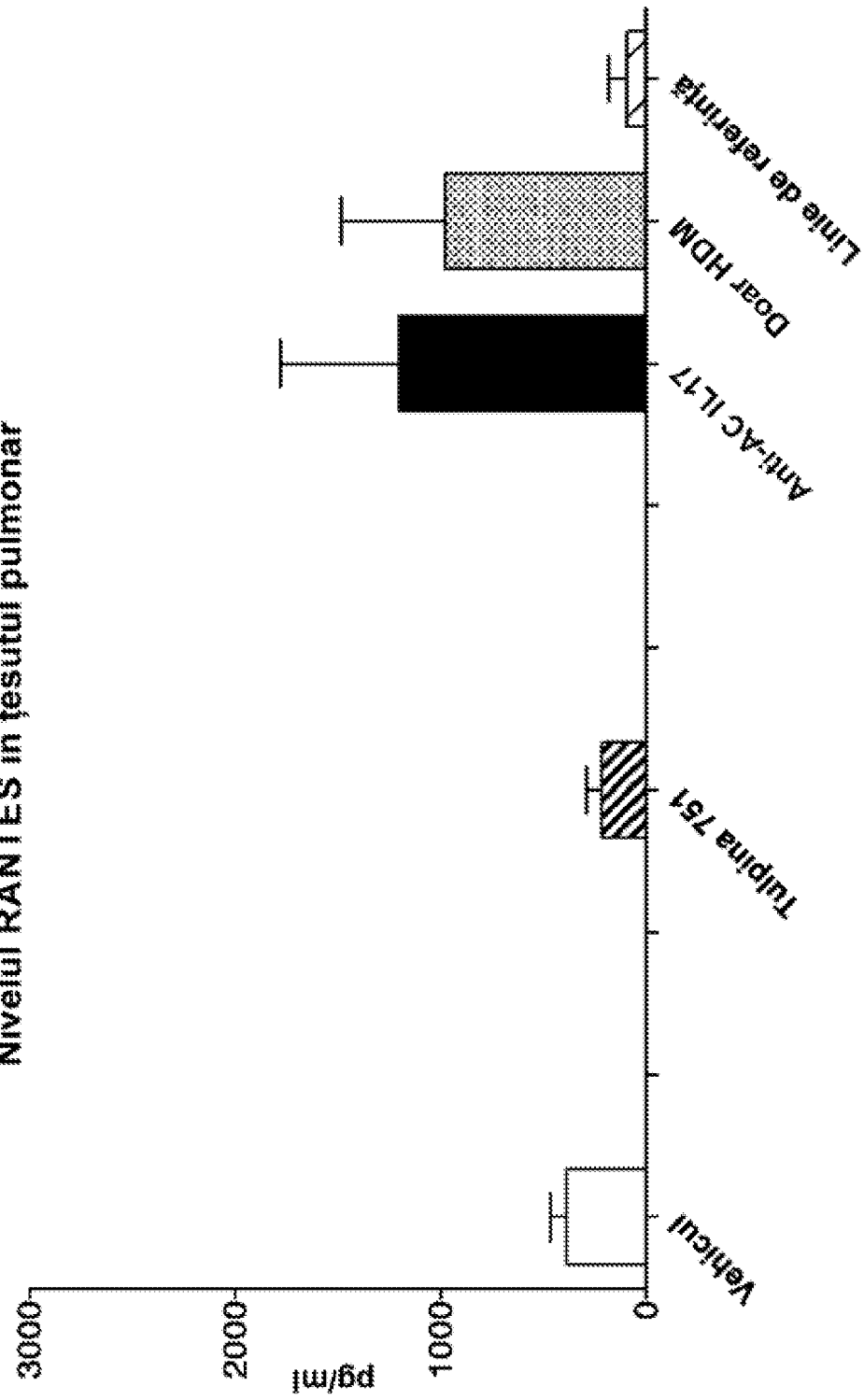


FIG. 60
Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar

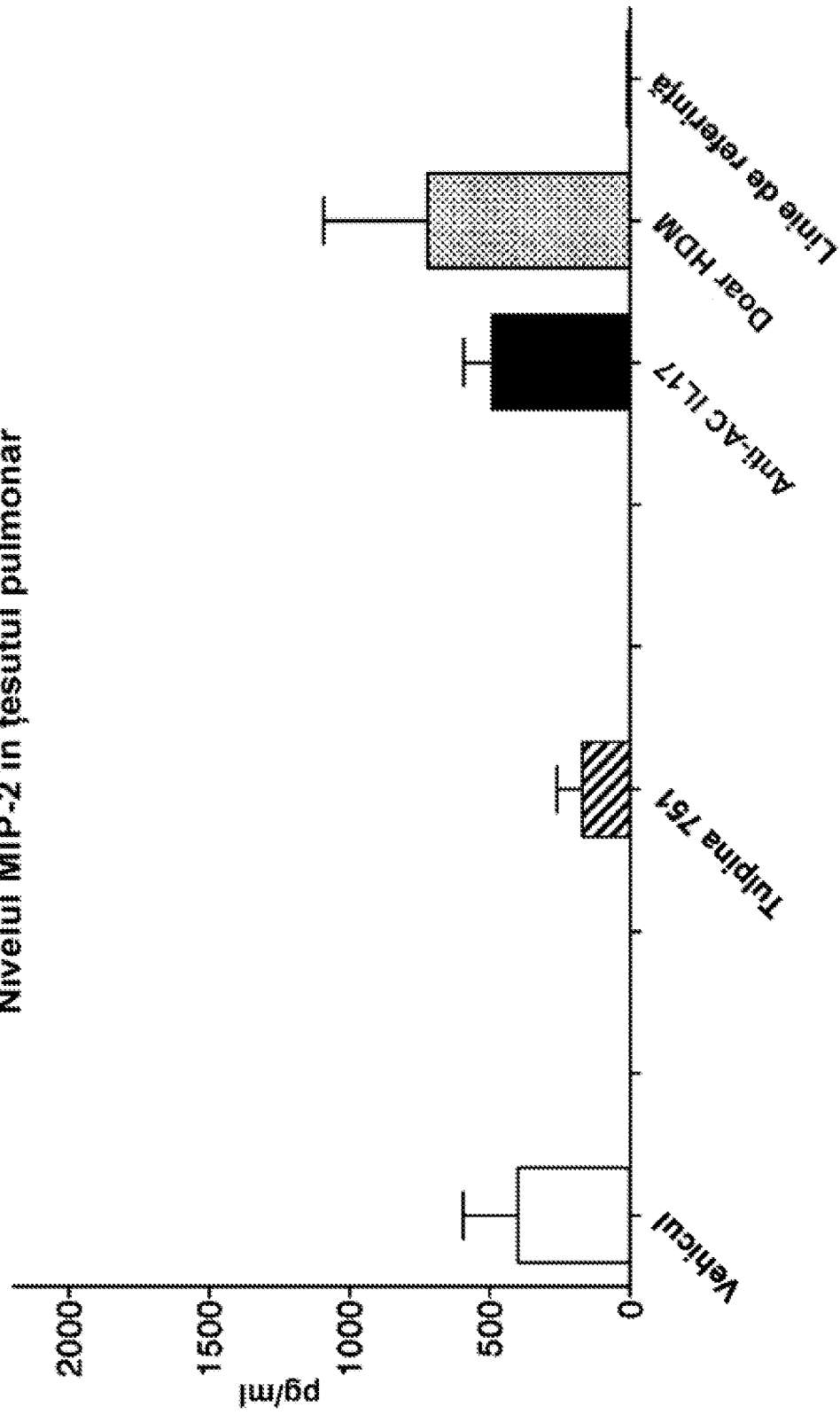


FIG. 61
Nivelul KC în țesutul pulmonar

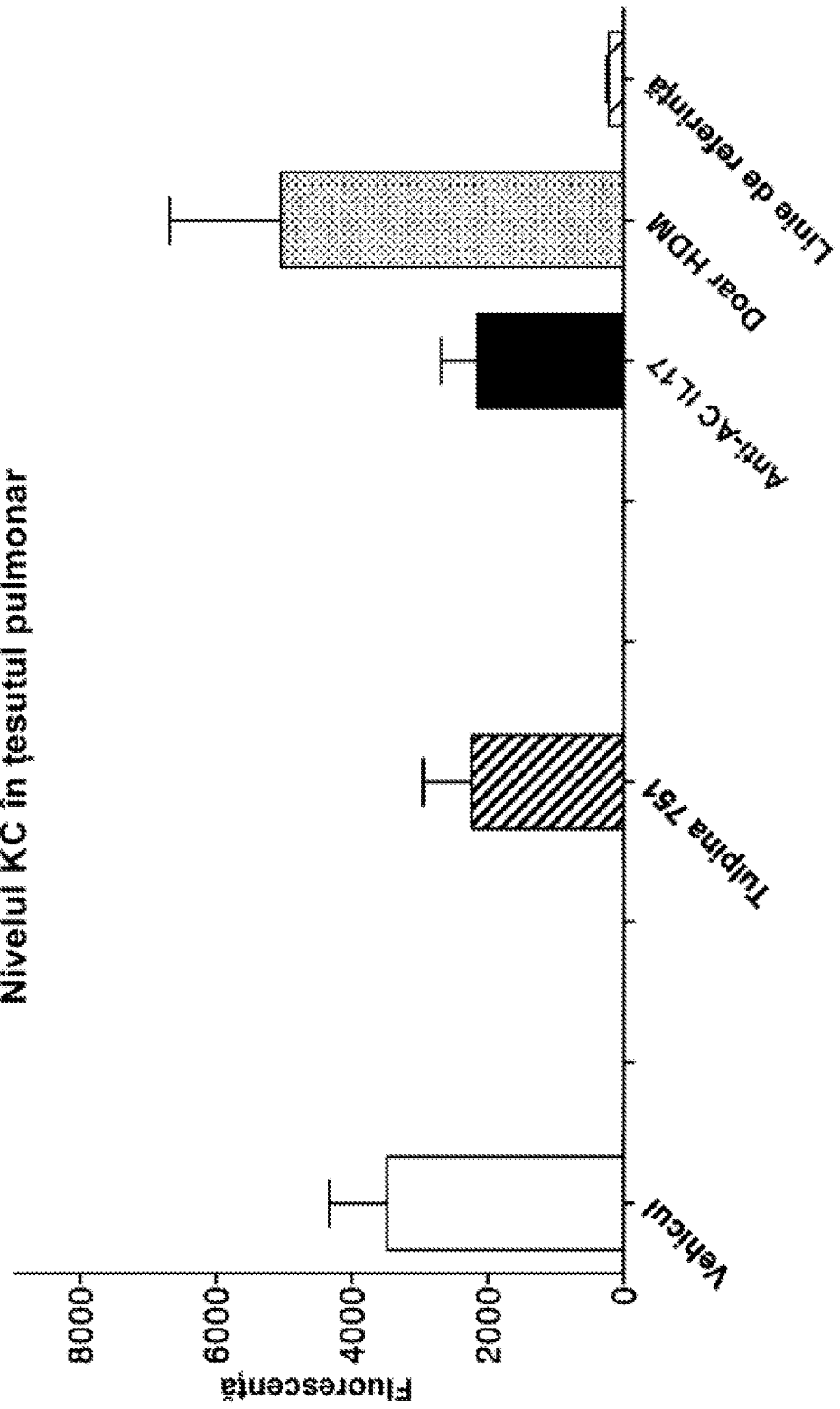


FIG. 62
Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar

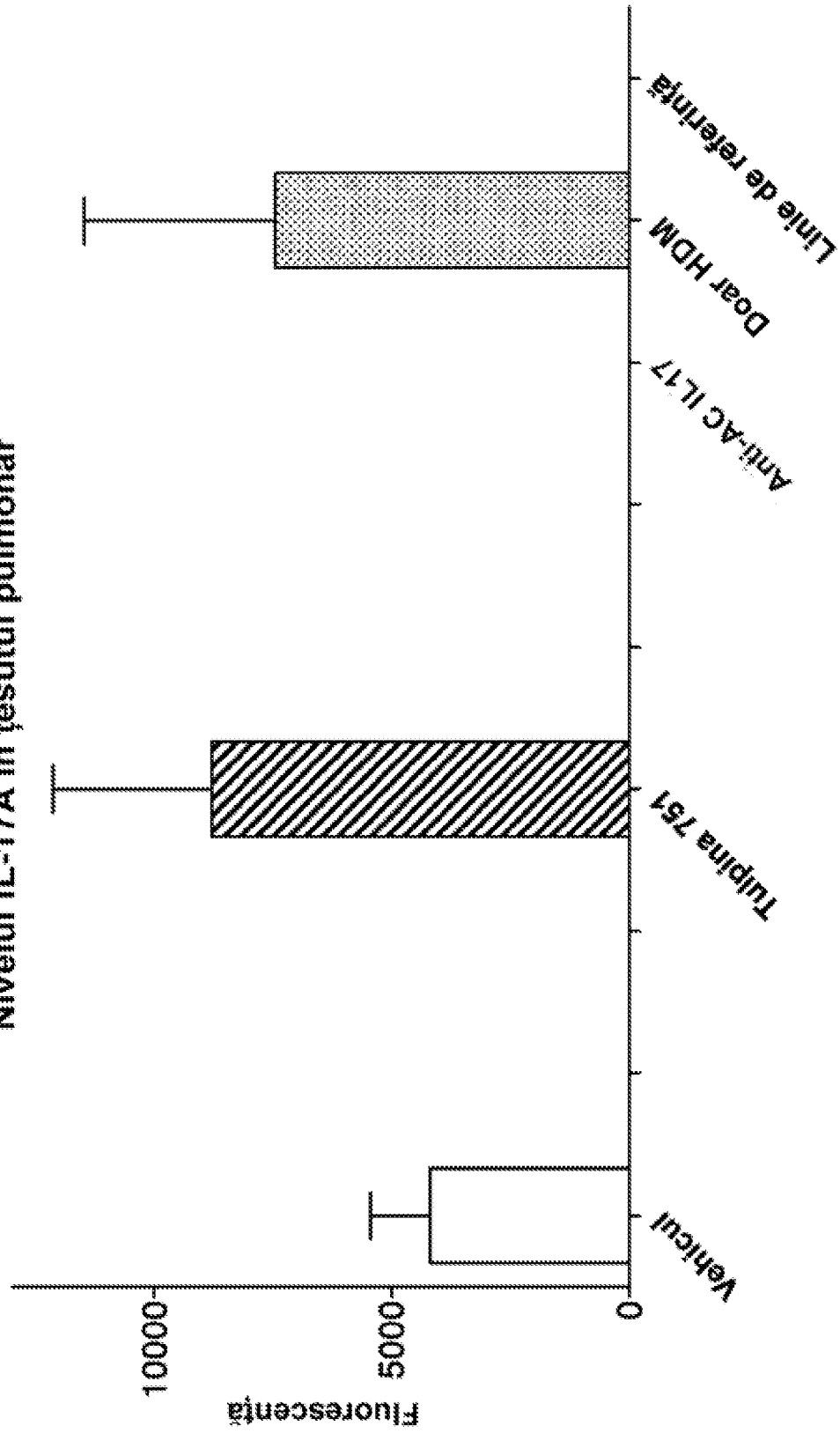
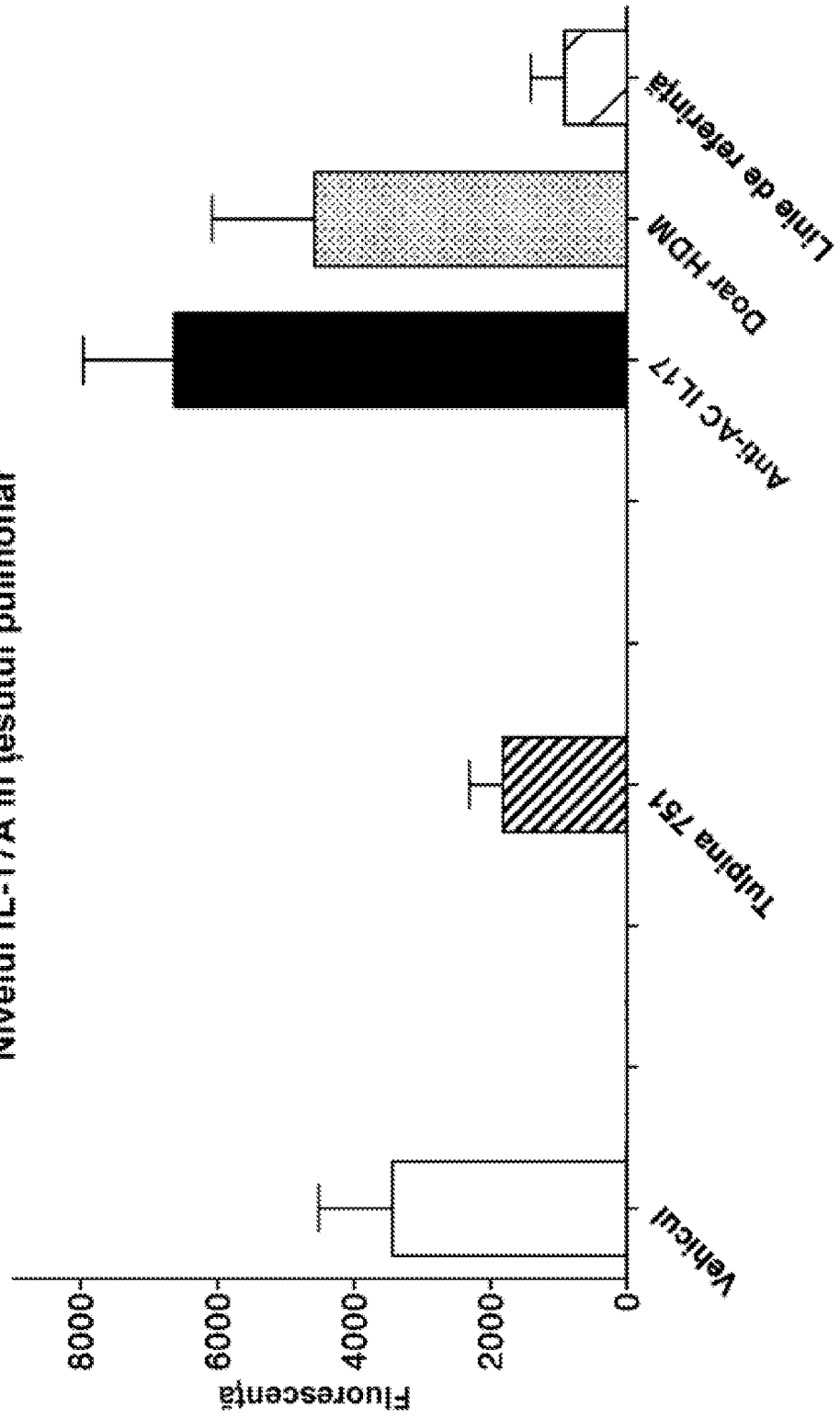


FIG. 63**Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar**

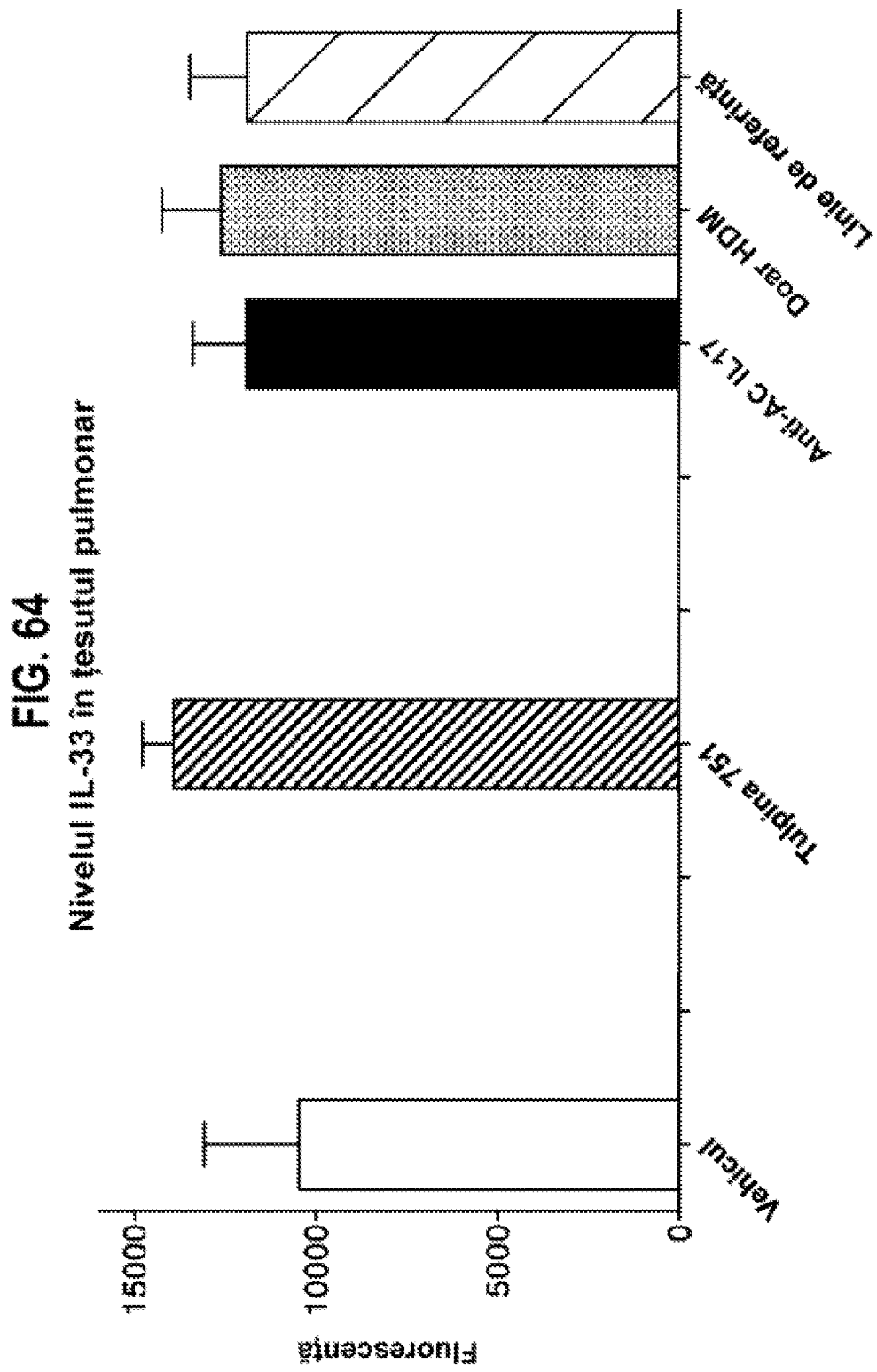
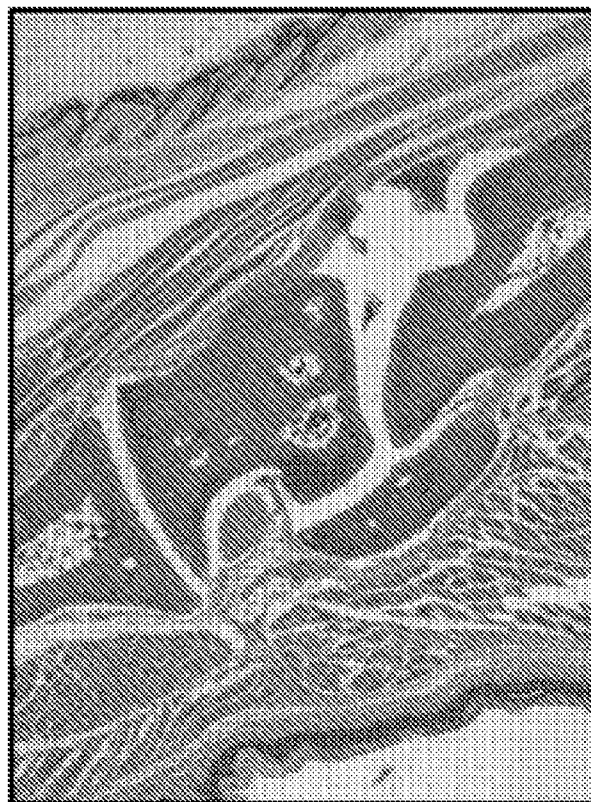
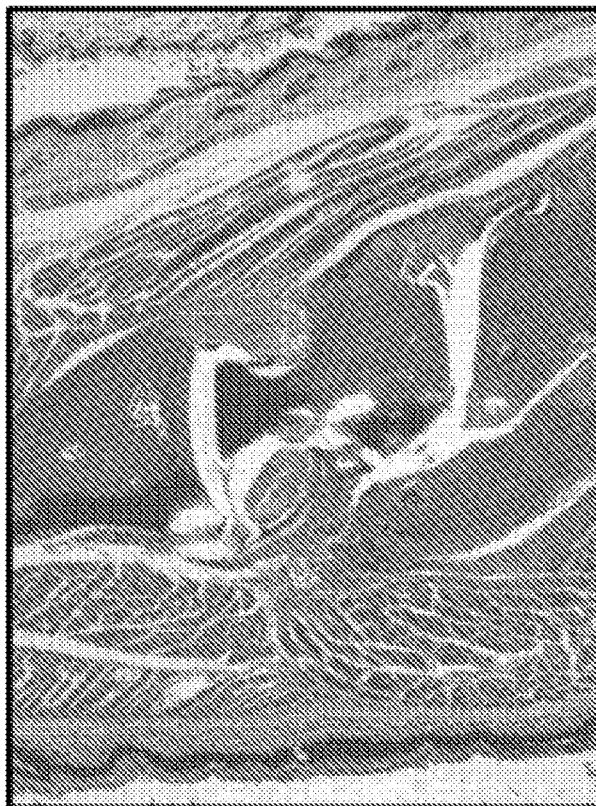


FIG. 65
Model vizual pentru evaluarea histopatologică

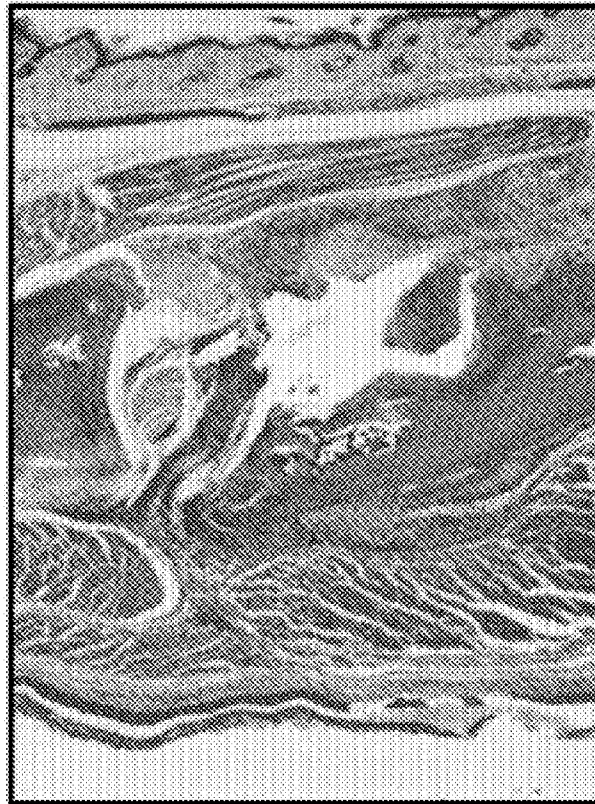


Gradul 0



Gradul 1

FIG. 65 (cont.)



Gradul 4



Gradul 7



Gradul 9

FIG. 65 (cont.)

FIG. 67

Histopatologie: scoruri ale cartilajului

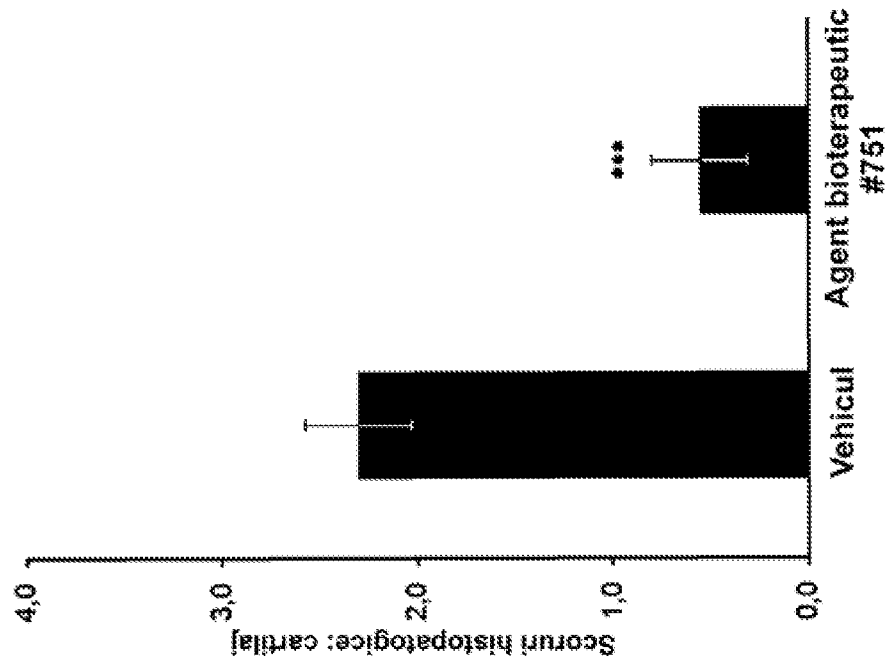


FIG. 66

Histopatologie: scoruri ale inflamației

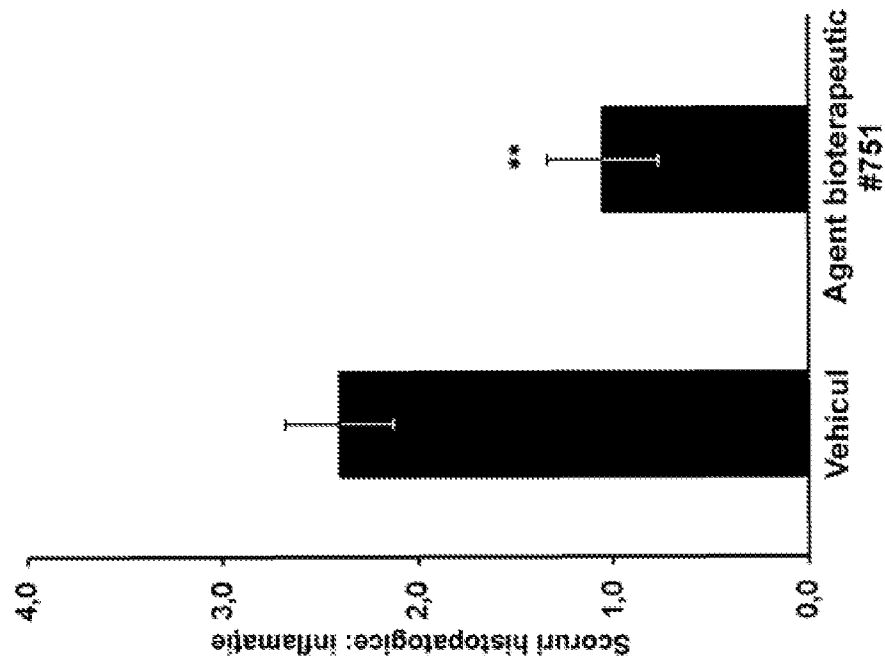


FIG. 68

Histopatologie: scoruri ale oaselor

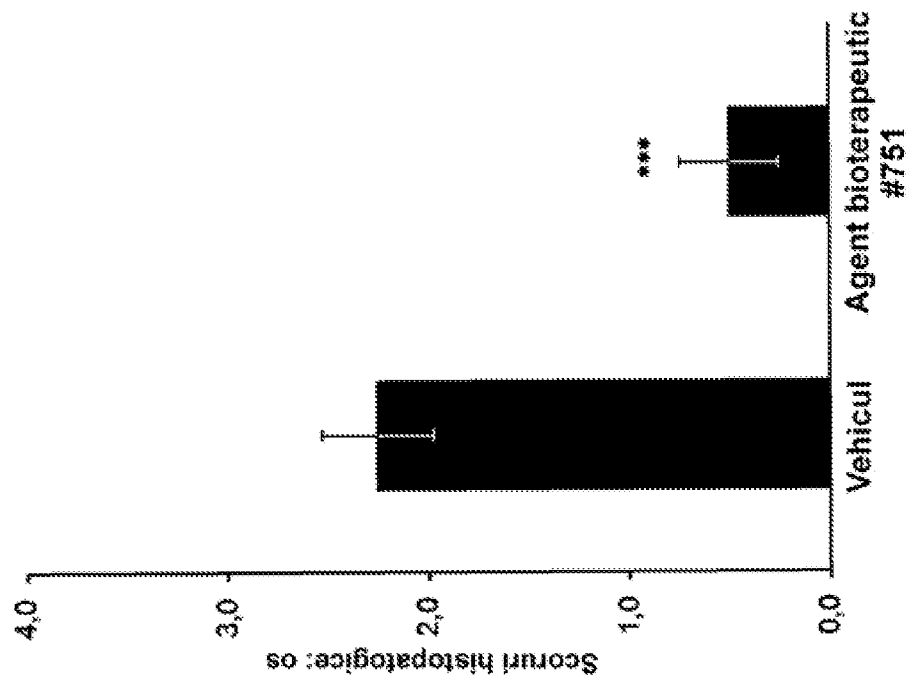


FIG. 69

Histopatologie: scoruri totale

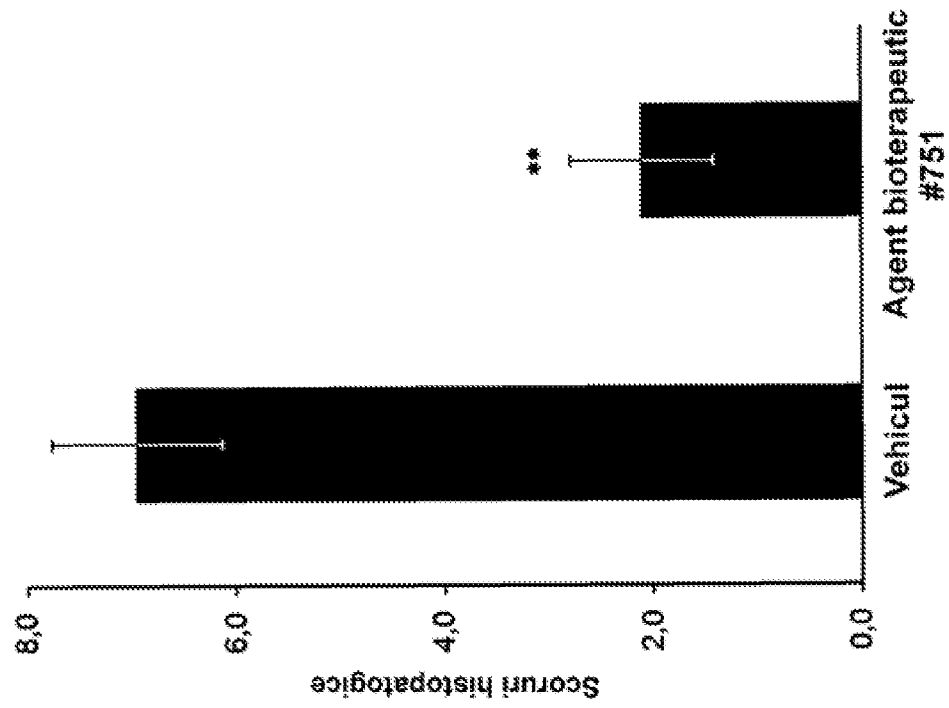


FIG. 70

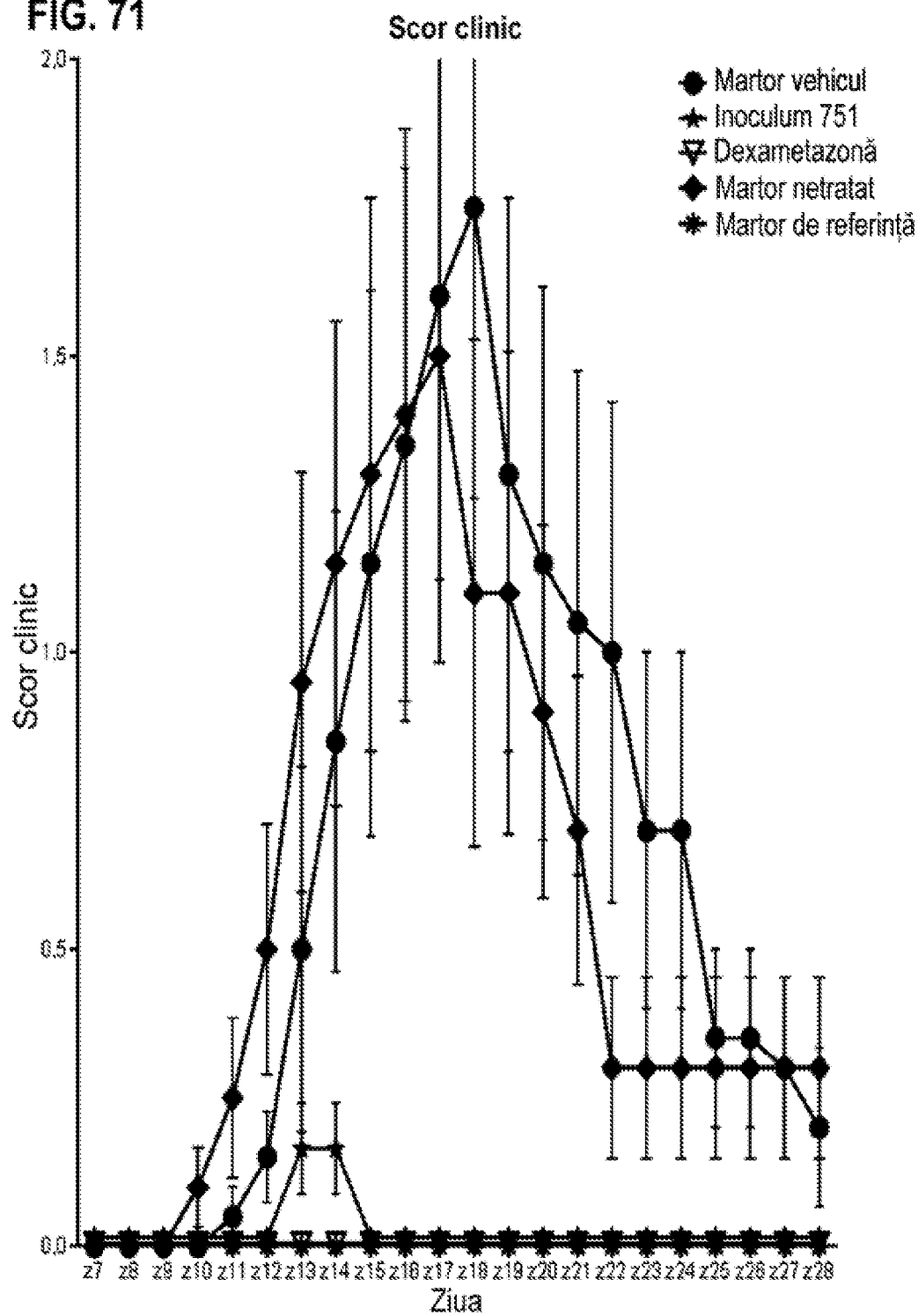


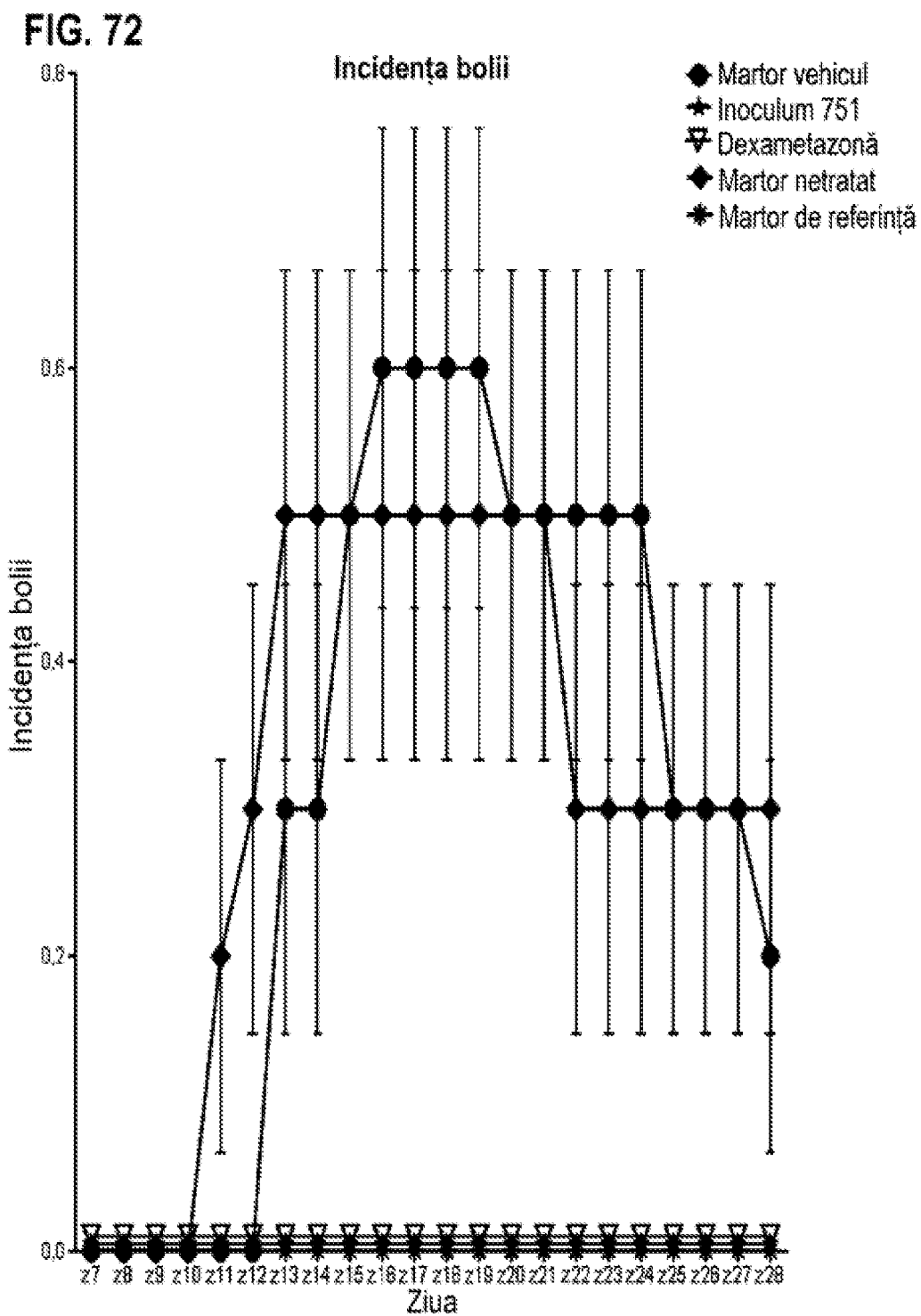
Vehicle (#1, 1 1R, Gradul 9)



Tulpina #751 (#2,R, Gradul 0)

FIG. 71





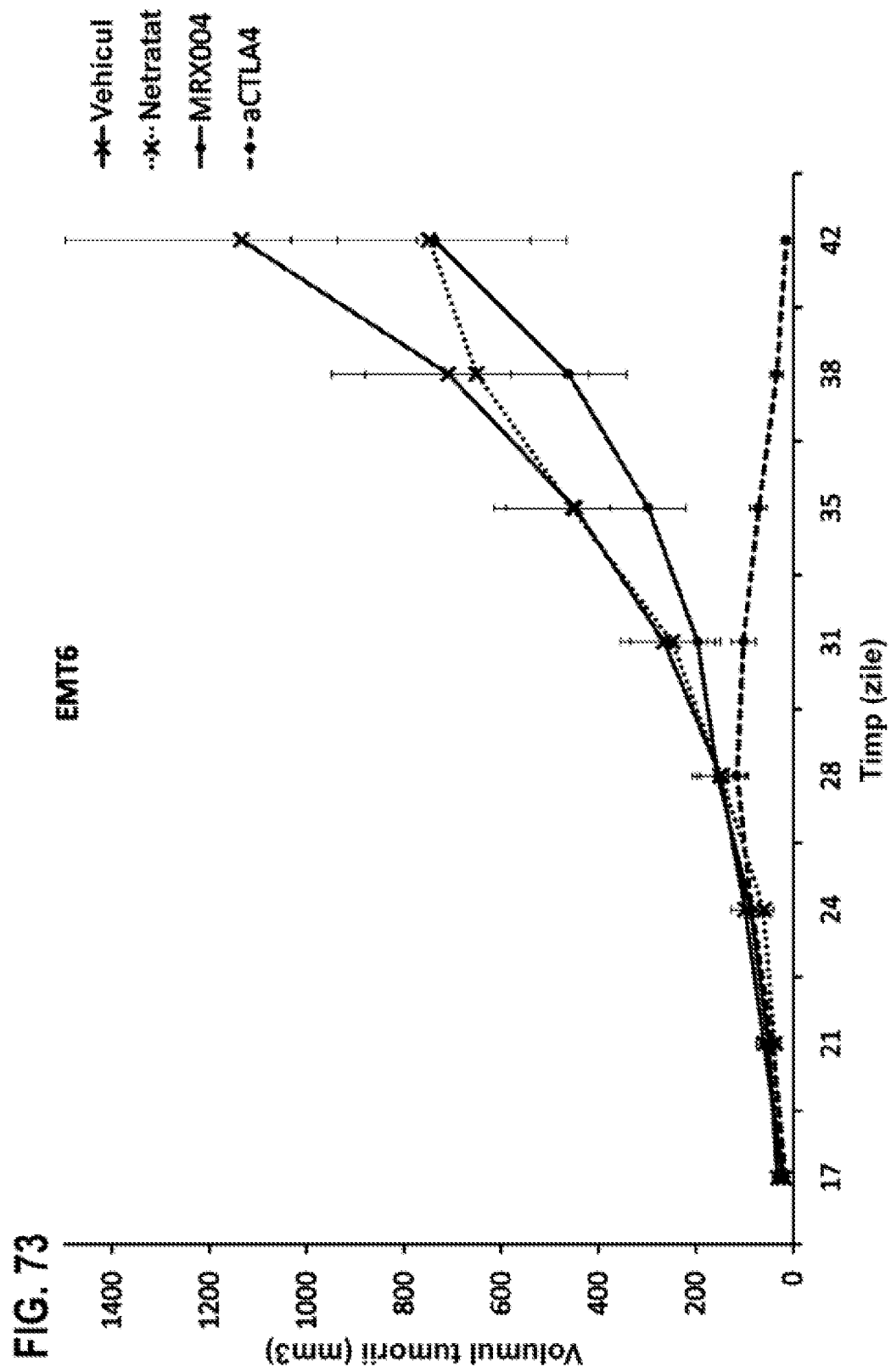


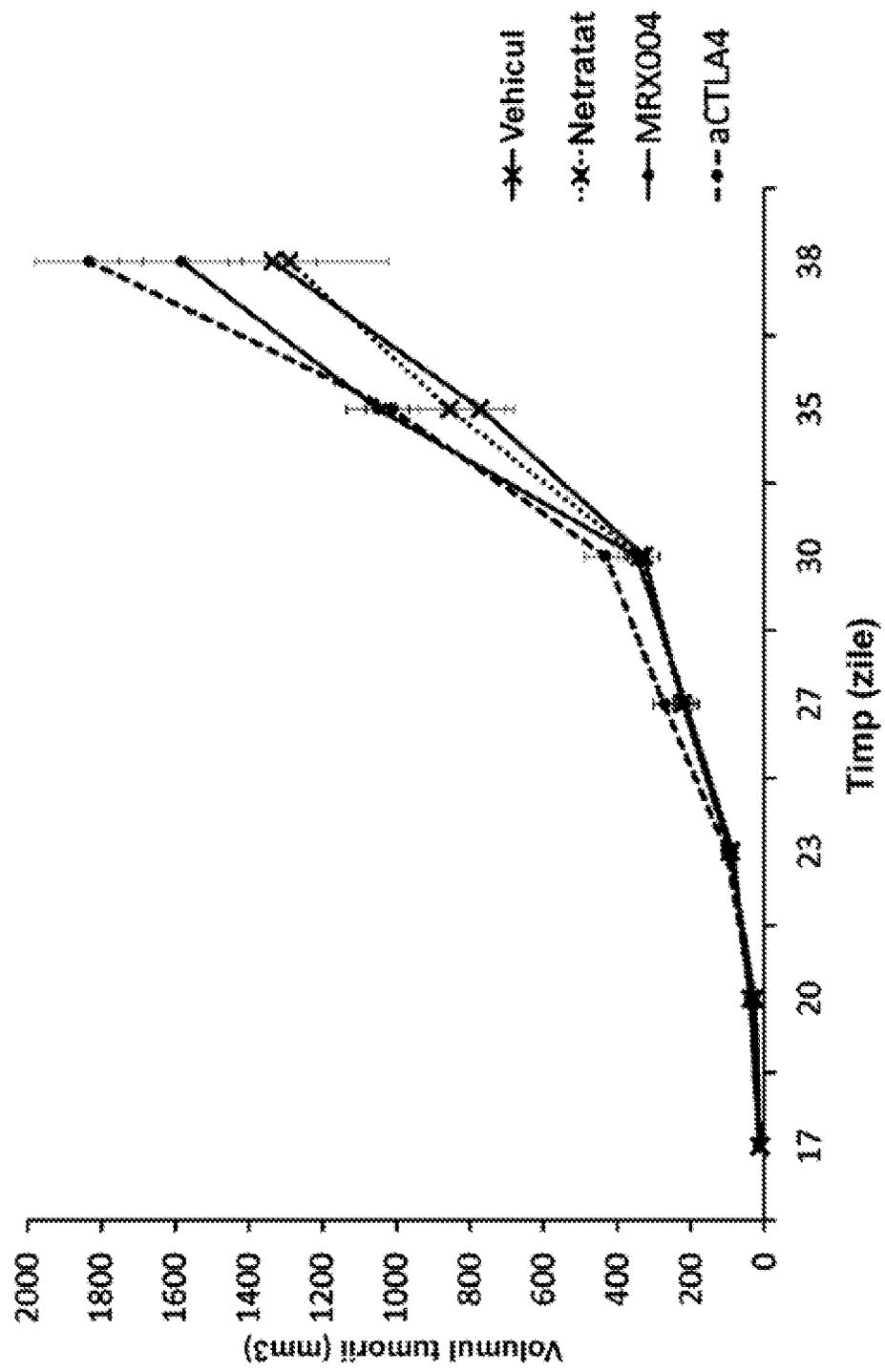
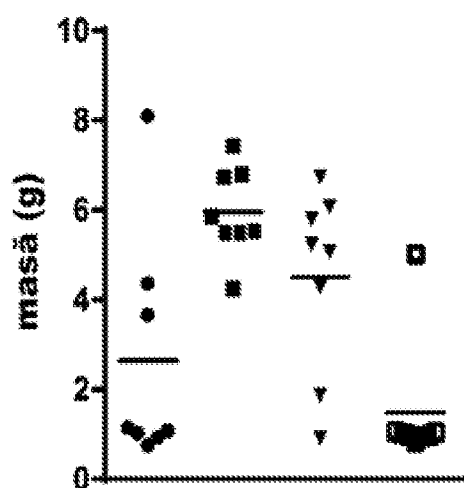
FIG. 74
LLC

FIG. 75**Masa ficatului la eutanasié (g)**

- G1 Netratat
- G2 Vehicul (mediu) PO Q1Dx42
- ▼ G4 Tulpină bacteriană #2 (MRX004) 2x10e8bacterii PO Q1Dx42
- G7 Anti-CTLA4 10 mg/kg IP TWx2

FIG. 76 Atașarea la celulele umane
Atașarea în YCFA (2 replicări biologice, normalizate)

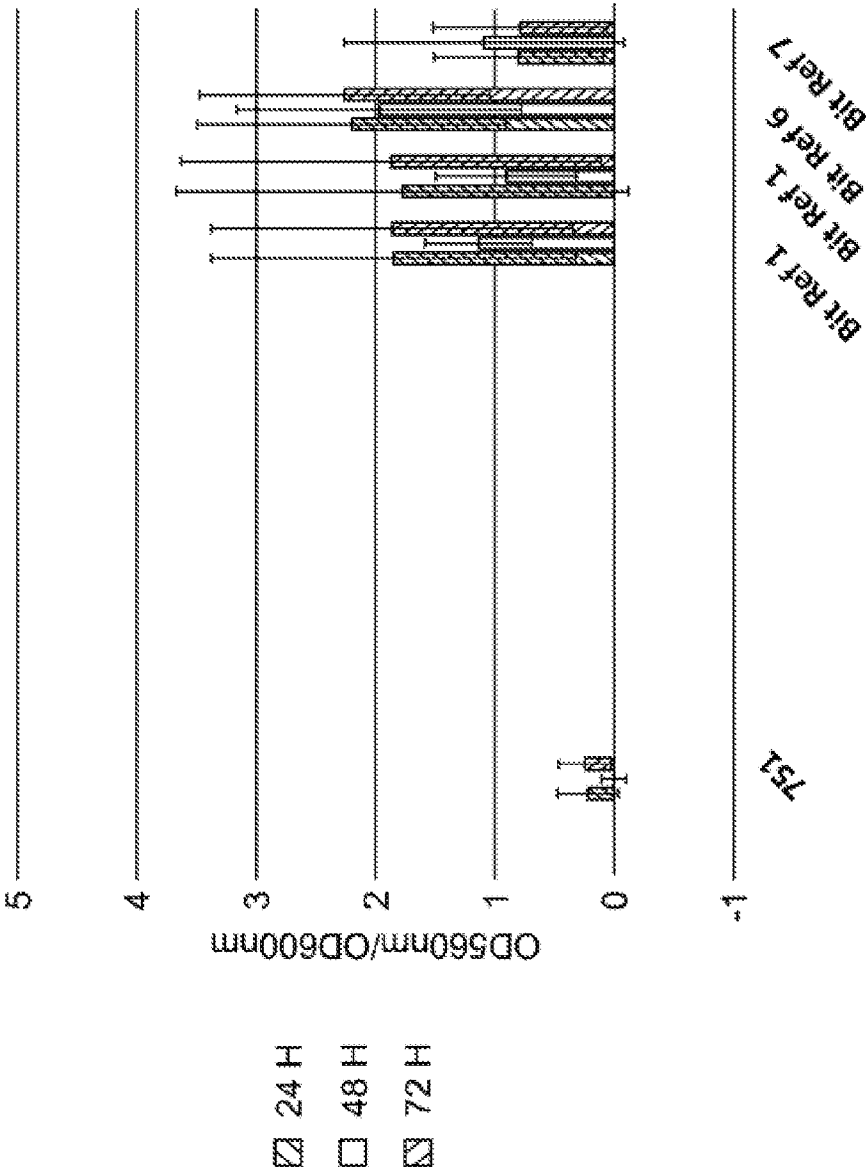
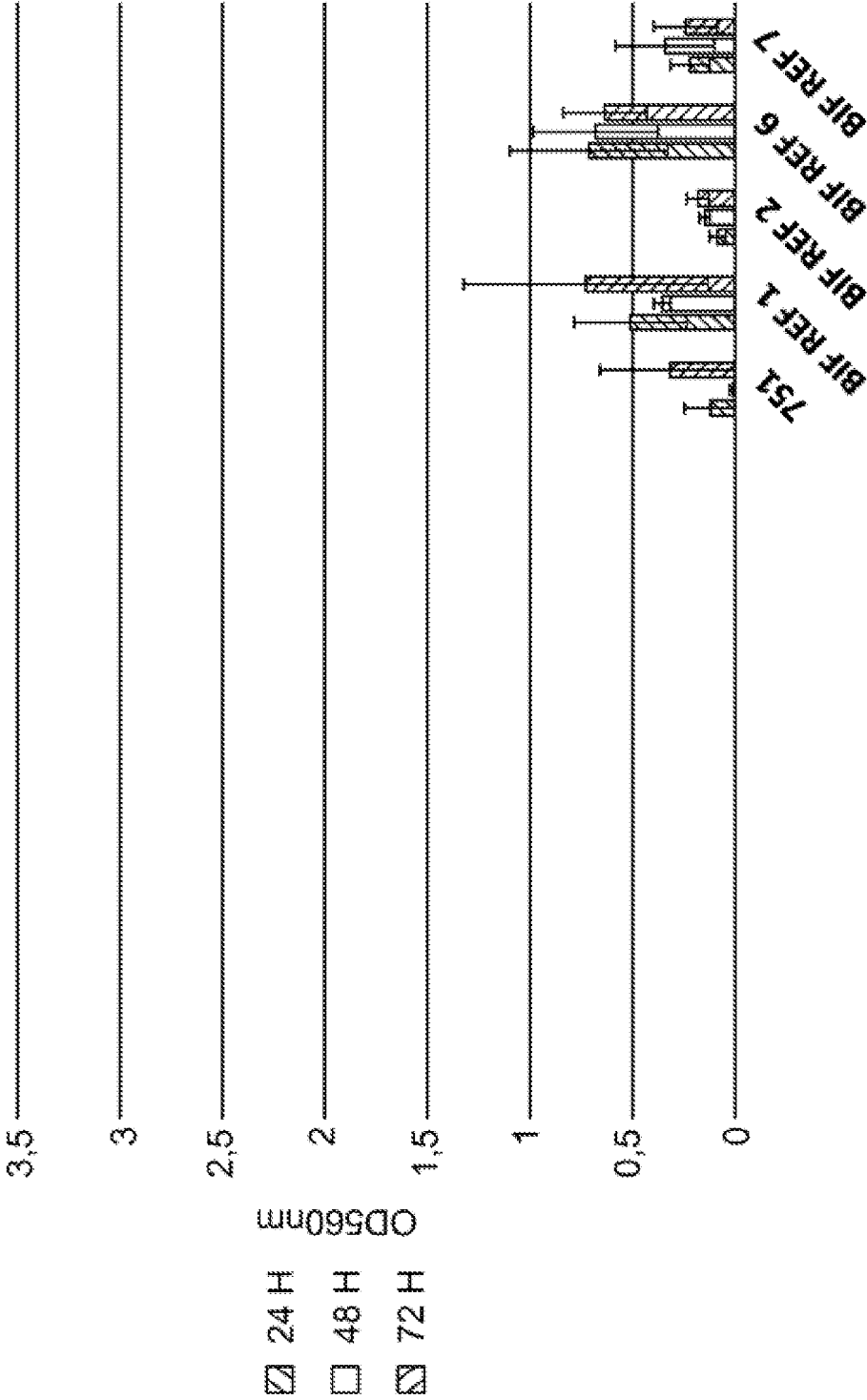


FIG. 76 (cont.) Atașarea la celulele umane
Atașarea în YCFA (2 replicări biologice, normalizate)



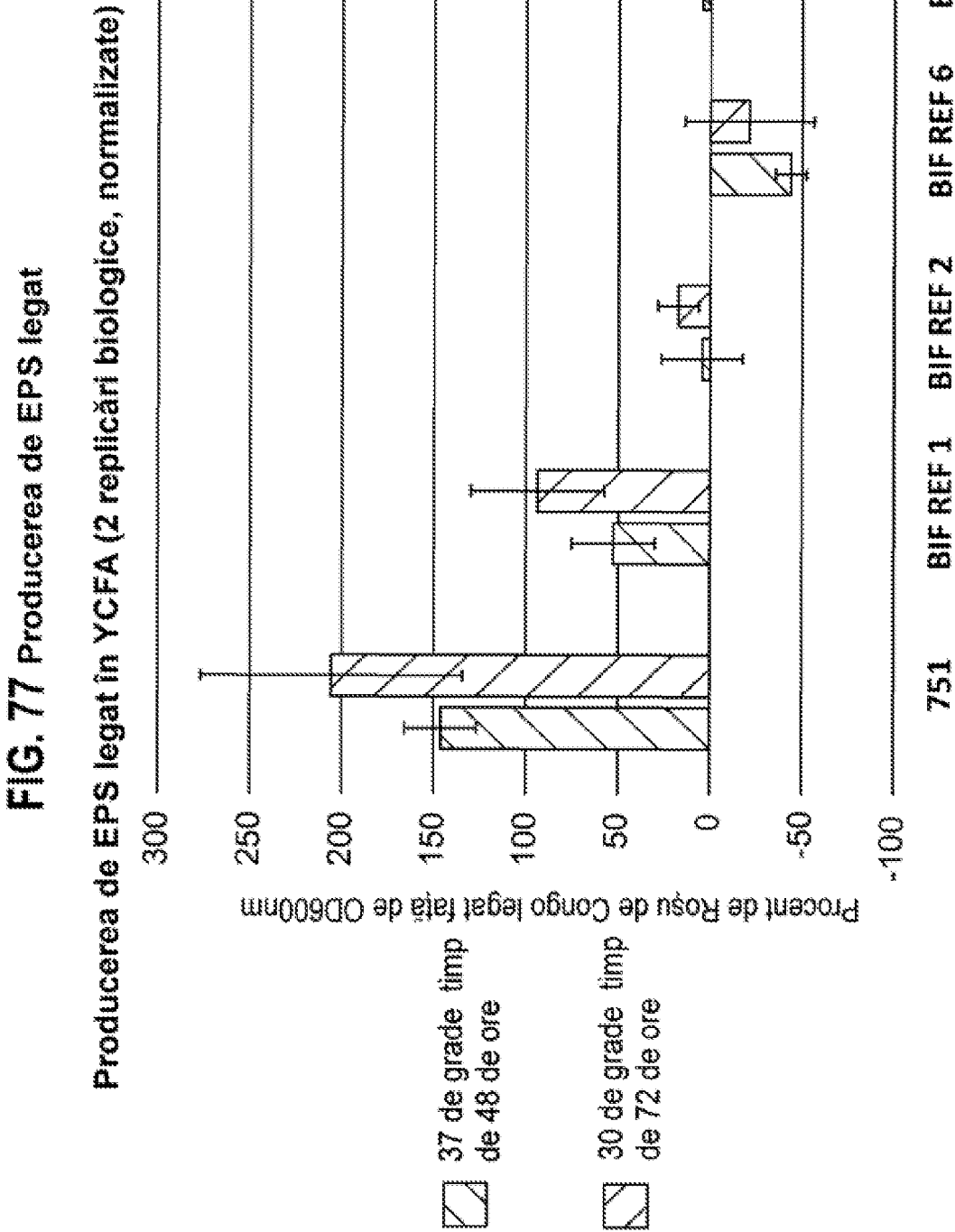


FIG. 77 (cont.) Producerea de EPS legat
Producerea de EPS legat în YCFA (2 replicări biologice, normalizate)

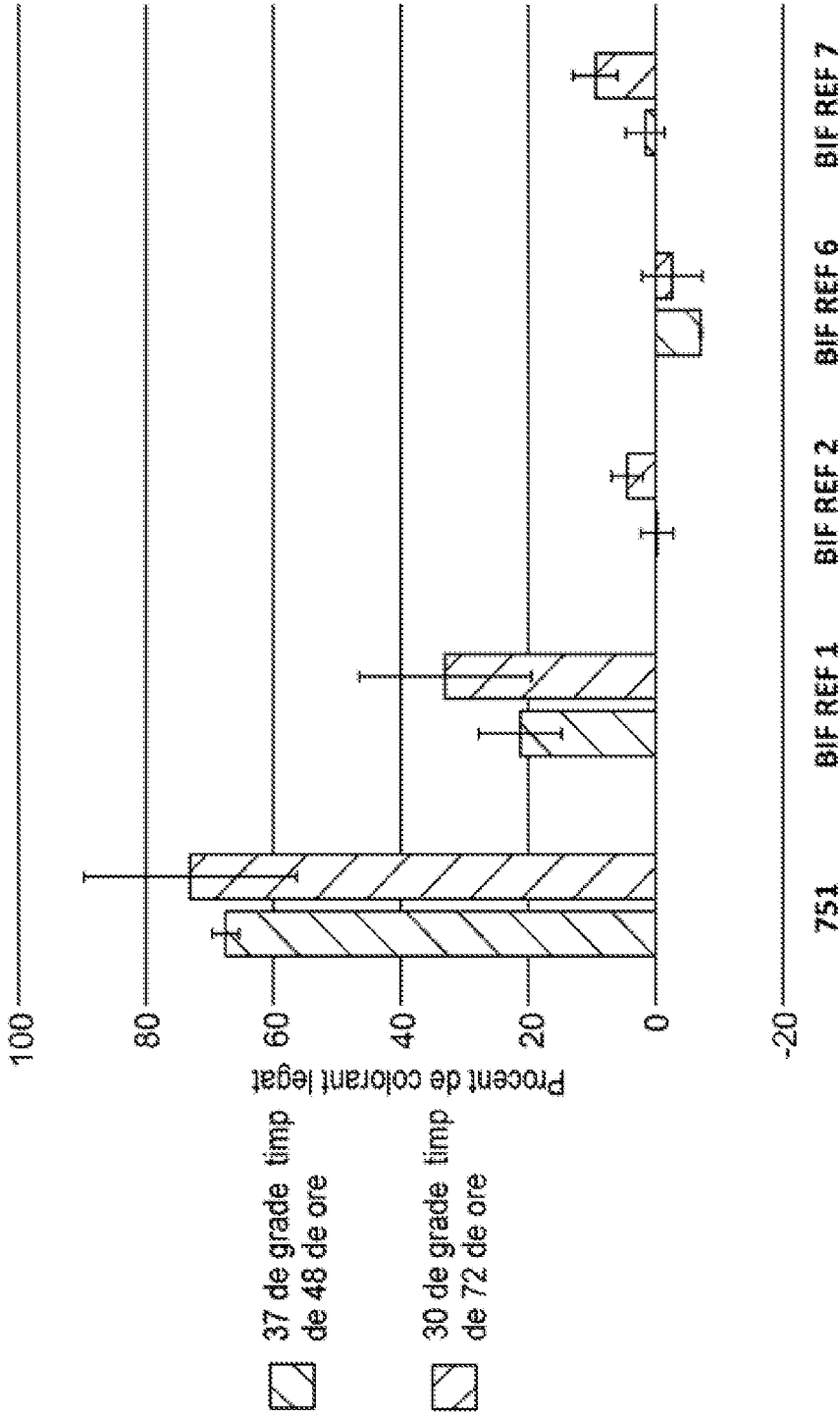


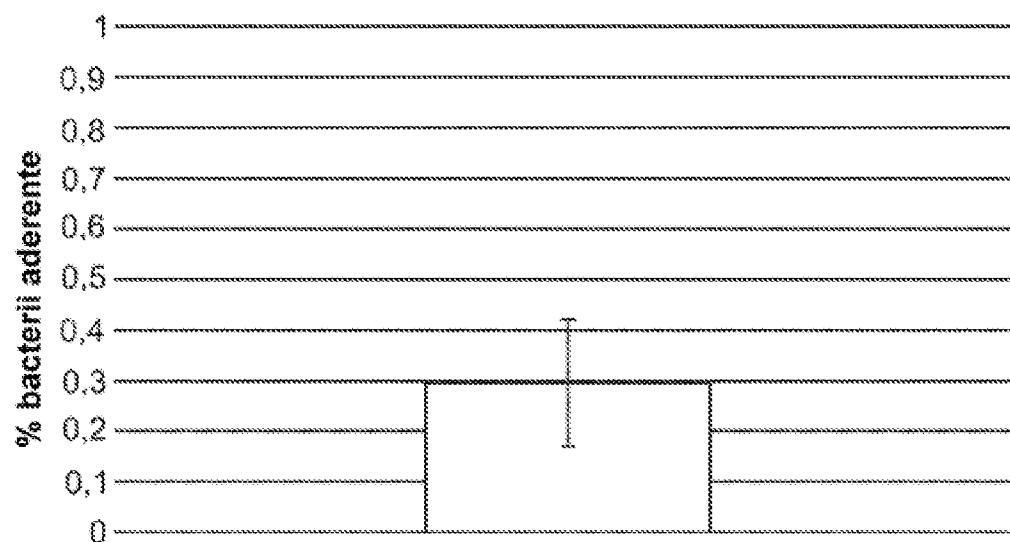
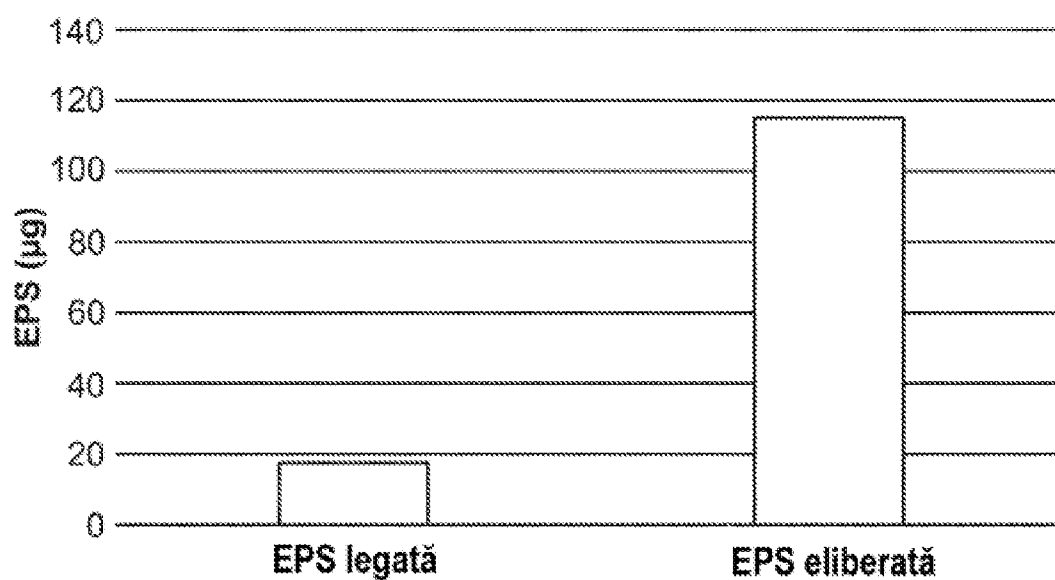
FIG. 79 Atașarea MRX004 la celulele Caco-2**FIG. 78** Producerea de exopolizaharidă legată și eliberată de către MRX004

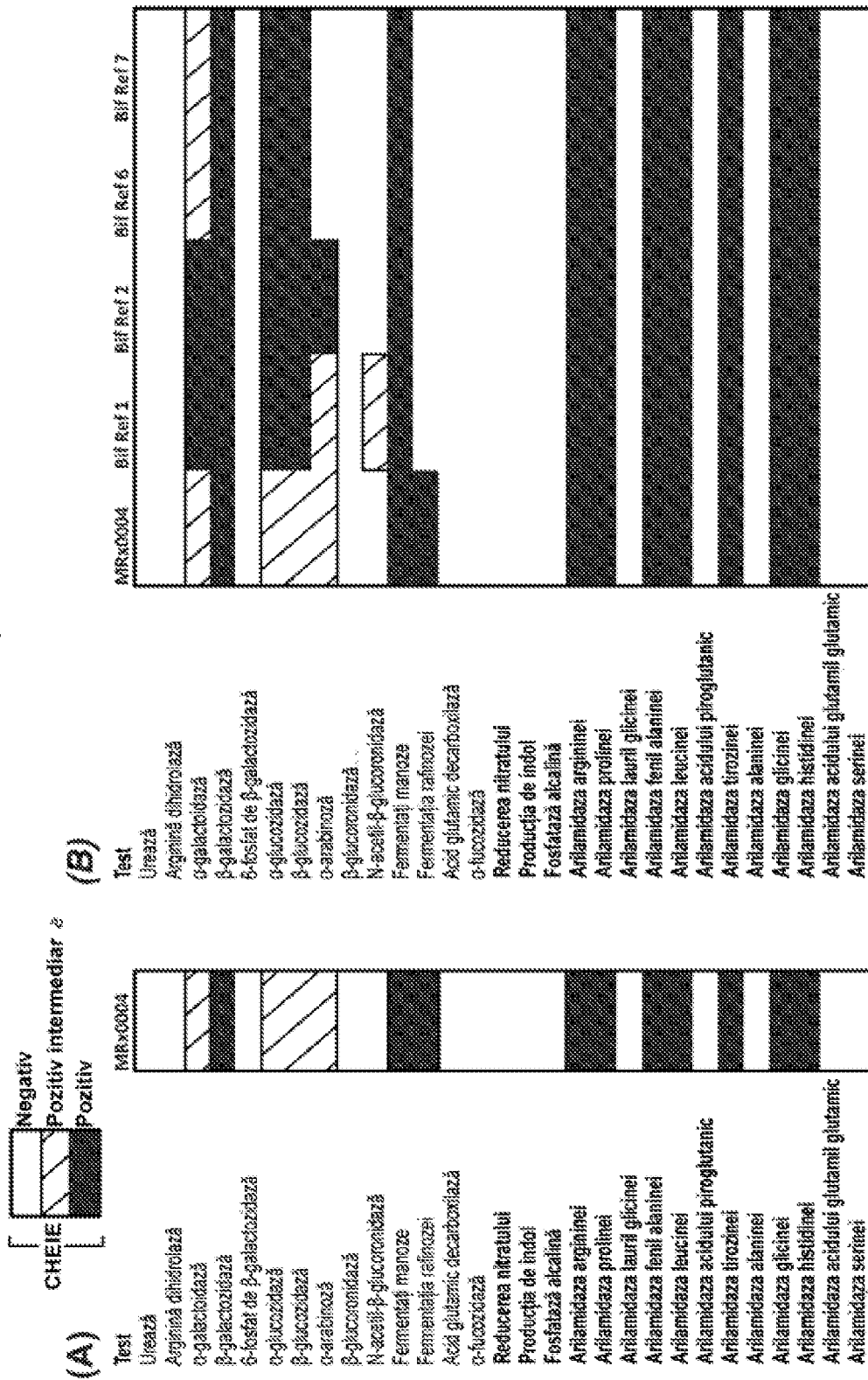
FIG. 80 Profilul ID 32 A rapid al MRX004 față de tulpini de tip *Bifidobacterium breve*

FIG. 81 Analiza API® pe 50 de canale a MRX004

