

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 753 779**

(51) Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 25/28** (2006.01)  
**A61K 35/745** (2015.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2016 PCT/GB2016/051770**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16203218**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2016 E 16731640 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3240554**

---

(54) Título: **Blautia stercosis y wexlerae para la utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes**

(30) Prioridad:

**15.06.2015 GB 201510466**  
**20.11.2015 GB 201520508**  
**19.04.2016 GB 201606810**

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

**14.04.2020**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

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

(74) Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**ES 2 753 779 T3**

---

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

## DESCRIPCIÓN

Blautia stercosis y wexlerae para la utilización en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes

## 5 CAMPO TÉCNICO

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

## 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

[0003] Los cambios dramáticos en la composición de la microbiota se han documentado en los trastornos gastrointestinales tales como enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Por ejemplo, los niveles de bacterias XIVa de clúster *Clostridium* se reducen en los pacientes EII, mientras que el número de *E. Coli* aumenta, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiontes y patobiontes en el intestino [6-9]. Curiosamente, esta disbiosis microbiana también se asocia con desequilibrios en las poblaciones de células efectoras T.

[0004] En reconocimiento del efecto positivo potencial que ciertas cepas bacterianas pueden tener en el intestino animal, varios se han propuesto las cepas para uso en el tratamiento de diversas enfermedades (véase, por ejemplo, [10-13]). Además, ciertas cepas, incluidas principalmente cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, se han propuesto para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes que no están directamente relacionadas con los intestinos (ver [14] y [15] para revisiones). Sin embargo, la relación entre diferentes enfermedades y diferentes cepas bacterianas, y los efectos precisos de cepas bacterianas particulares en el intestino y a nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades, están pobresamente caracterizados.

[0005] Existe un requisito en la técnica para nuevos métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. También hay un requisito para que los efectos potenciales de las bacterias intestinales se caractericen para que se puedan desarrollar nuevas terapias que usen bacterias intestinales.

## 45 RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0006] La presente invención se define por las reivindicaciones. Los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades inflamatorias y autoinmunes. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para tratar y prevenir enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser efectivas para reducir la respuesta inflamatoria Th17. Como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia stercoris* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de ratón de asma, artritis reumatoide y esclerosis múltiple. Además, como se describe en los ejemplos, la administración oral de composiciones que comprenden *Blautia wexlerae* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluida la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de uveítis en ratones. Por lo tanto, los inventores han identificado que dos cepas diferentes de diferentes especies del género *Blautia* pueden ser efectivas para tratar enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

[0007] Por lo tanto, en una primera realización, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por vía IL-17 o Th17. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas bacterianas de este género puede reducir los niveles de citocinas que forman parte de la vía Th17, incluida la IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria Th17 y puede proporcionar beneficios clínicos en modelos de ratón de enfermedades inflamatorias y autoinmunes mediadas por vía IL-17 o Th17.

[0008] En realizaciones particulares, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana

5 del género *Blautia*, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en: múltiple esclerosis; artritis, tal como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis rinitis alérgica; y rechazo de alioinjerto. El efecto mostrado para las cepas bacterianas del género *Blautia* en la respuesta inflamatoria Th17 puede proporcionar beneficios terapéuticos para enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17, como las mencionadas anteriormente.

10 [0009] En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para uso en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrofílica o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Blautia* puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han probado y demostrado la eficacia de las cepas de *Blautia* en modelos de asma en ratones. En ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de asma neutrófila o asma eosinofílica. El efecto mostrado para las composiciones de la invención sobre neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente eficaces para tratar o prevenir el asma neutrófilo y el asma eosinofílico. De hecho, en ciertas realizaciones, la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para usar en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris* para uso en el tratamiento del asma, y en particular asma eosinofílica o alérgica. Además, se ha demostrado que *Blautia stercoris* tiene un efecto particularmente pronunciado sobre los neutrófilos en los modelos de asma y el tratamiento con *Blautia stercoris* puede ser particularmente efectivo para tratar el asma neutrofílica. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae* para uso en el tratamiento del asma, y en particular asma eosinofílica o alérgica.

30 [0010] En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Blautia* puede proporcionar beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoide y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para usar en el tratamiento de la artritis reumatoide. Las composiciones que usan *Blautia stercoris* pueden ser particularmente efectivas para tratar la artritis reumatoide. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para usar en el tratamiento de la artritis reumatoide.

40 [0011] En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para uso en un método de tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Blautia* puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que usan *Blautia stercoris* pueden ser particularmente efectivas para tratar la esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para usar en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

50 [0012] En otras realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para uso en un método de tratamiento o prevención de uveítis, como uveítis posterior. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas de *Blautia* puede reducir la incidencia y la gravedad de la enfermedad en un modelo de uveítis en ratones y puede prevenir o reducir el daño retiniano. En realizaciones preferidas, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para usar en el tratamiento de la uveítis. Las composiciones que usan *Blautia wexlerae* pueden ser particularmente efectivas para tratar la uveítis. En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para usar en el tratamiento de la uveítis.

60 [0013] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por vía IL-17 o Th17. En particular, las composiciones de la invención pueden usarse para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de asma, artritis reumatoide o esclerosis múltiple, o asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, uveítis o cáncer. Preferiblemente, la invención proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para usar en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple. La invención también proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de la uveítis. La invención también

proporciona composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para uso en la reducción de la producción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención del asma, la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple o la uveítis.

- 5      [0014] En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17. El efecto sobre la respuesta inflamatoria Th17 que se muestra para las cepas de *Blautia* puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.
- 10     [0015] En realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Blautia stercoris*. También se pueden usar cepas estrechamente relacionadas, como las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idénticas a la secuencia de ARNr 16s de un cepa bacteriana de *Blautia stercoris*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2. Preferiblemente, la identidad de secuencia es a la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr de 16 segundos representada por la SEQ ID NO: 2.
- 15     [0016] En realizaciones preferidas de la invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Blautia wexlerae*. Cepas estrechamente relacionadas también pueden ser utilizadas, tales como cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*. Preferiblemente, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o 4. Preferiblemente, la identidad de secuencia es a SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 4.
- 20     [0017] En ciertas realizaciones, la composición de la invención es para administración oral. La administración oral de las cepas de la invención puede ser eficaz para tratar enfermedades y afecciones mediadas por la vía IL-17 o Th17. Además, la administración oral es conveniente para pacientes y profesionales y permite la entrega y/o colonización parcial o total del intestino.
- 25     [0018] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables excipientes o vehículos.
- 30     [0019] En ciertas realizaciones, la composición de la invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica efectiva y conveniente para preparar composiciones estables que permiten el suministro de bacterias.
- 35     [0020] En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto alimenticio que comprende la composición como se describe anteriormente.
- 40     [0021] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende la composición como se ha descrito anteriormente.
- 45     [0022] Además, la invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por IL-17 o la vía Th17, que comprende administrar una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*.
- 50     [0023] En el desarrollo de la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. Se ha demostrado que la cepa *Blautia stercoris* de la invención es eficaz para tratar las enfermedades descritas en el presente documento, tales como artritis, asma y esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células, o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en este documento. Al desarrollar la invención anterior, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana adicional que es particularmente útil para la terapia. Se ha demostrado que la cepa *Blautia wexlerae* de la invención es eficaz para tratar las enfermedades descritas en el presente documento, tales como la uveítis. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales células o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también proporciona una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 65     [0024]

- Figura 1:** modelo de ratón de polvo de la casa asma ácaro inducida - recuentos totales BAL de células de fluido.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

85 **Figura 18:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - proporción de linfocitos en BALF.

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

95 **Figura 20:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - pesos corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como porcentajes promedio de  $\pm$  SEM de los pesos corporales iniciales (Día 0). ♦  $p < 0.05$  en comparación con el grupo tratado con vehículo.

100 **Figura 21:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - puntajes clínicos. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  en comparación con el día 21 en el grupo tratado con vehículo. ♦  $p < 0.05$  en comparación con el grupo tratado con vehículo en un día determinado.

105 **Figura 22:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: respuesta proliferativa de esplenocitos al colágeno II. Los medios de fondo restados [estimulados por CII - medios de fondo] cuentan por minuto en función de la incorporación de 3H-TdR. Todos los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de vehículos.

110 **Figura 23:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IFN $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.

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

- 5 **Figura 25:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- 10 **Figura 26:** Modelo de ratón de artritis reumatoide: niveles de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores medios del grupo.
- 15 **Figura 27:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en suero.
- 20 **Figura 28:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en suero.
- 25 **Figura 29:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgE total en BALF.
- 30 **Figura 30:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - IgG1 específica de HDM en BALF.
- 35 **Figura 31:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros de polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación media de infiltración peribronquiolar.
- 40 **Figura 32:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje medio de infiltración perivascular
- 45 **Figura 33:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico – Puntaje medio inflamatorio (el promedio del puntaje de infiltración peribronquiolar y perivascular) **Figura 34:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntuación de moco
- 50 **Figura 35:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-9 en tejido pulmonar
- 55 **Figura 36:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-1a en el tejido pulmonar
- 60 **Figura 37:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IFNy en el tejido pulmonar
- 65 **Figura 38:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-17A en el tejido pulmonar
- 70 **Figura 39:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de IL-4 en tejido pulmonar
- 75 **Figura 40:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en tejido pulmonar
- 80 **Figura 41:** Modelo de ratón del asma inducida por ácaros del polvo doméstico: nivel de IL-1b en tejido pulmonar
- 85 **Figura 42:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico: nivel de RANTES en tejido pulmonar
- 90 **Figura 43:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico: nivel de MIP-1a en pulmón tejido
- 95 **Figura 44:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de KC en el tejido pulmonar
- 100 **Figura 45:** Modelo de ratón de asma inducida por ácaros del polvo doméstico - nivel de MIP-2 en tejido pulmonar
- 105 **Figura 46:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG1 específica a HDM en suero
- 110 **Figura 47:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG2a específica a HDM en suero
- 115 **Figura 48:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IgG1 específica a HDM en BALF

5

**Figura 49:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - HDM IgG2a específico en BALF

10

**Figura 50:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico – Puntaje de infiltraciòn peribronquiolar media

15

**Figura 51:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntaje de infiltración perivascular media

20

**Figura 52:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Análisis histológico - Puntaje inflamatorio promedio (Promedio de puntaje de infiltración peribronquiolar y perivascular)

**Figura 53:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de TNF $\alpha$  en tejido pulmonar

25

**Figura 54:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IL-1a en tejido pulmonar

**Figura 55:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - Nivel de IFN $\gamma$  en tejido pulmonar

30

**Figura 56:** Modelo de ratón de asma neutrofílica severa - IL-17F nivel en tejido pulmonar

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

35

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

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

40

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

45

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

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

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

50

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

55

**Figura 65:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes de inflamación. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*\* p <0,01 en comparación con el grupo tratado con vehículo.

60

**Figura 66:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes de cartílago. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*\*\* p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.

65

**Figura 67:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes óseos. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*\*\* p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.

70

**Figura 68:** Modelo de ratón de artritis reumatoide - Histopatología: puntajes totales. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM. \*\*\* p <0,001 en comparación con el grupo tratado con vehículo.

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

75

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

80

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

85

**Figura 72:** Modelo de ratón de uveítis: respuesta proliferativa de ganglios linfáticos al péptido IRBP. Los medios de fondo sustratados [péptido IRBP estimulado - medios de fondo] cuentan por minuto en función de la incorporación de 3H-timidina. Todos los datos se presentan como media + SEM (n = 3).

90

**Figura 73:** Modelo de ratón de uveítis: puntajes TEFI en el grupo de control. Los datos se presentan como media  $\pm$  SEM.

95

**Figura 74:** Modelo de uveítis en ratones: puntajes TEFI en el día 21. Los datos se presentan como media  $\pm$

SEM.

**Figura 75:** Ensayo inflamatorio inducido por LPS - niveles de IL-6

**Figura 76:** Ensayo inflamatorio inducido por LPS - niveles de TNFα

**Figura 77:** Ensayo inflamatorio inducido por LPS - nivel de maduración de Mo-DC

**Figura 78:** Ensayo inflamatorio inducido por ovoalbúmina - niveles de células CD4+

## 10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

### *Cepas bacterianas*

15 [0025] Las composiciones de la invención comprenden una cepa bacteriana del género *Blautia*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de este género son útiles para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17. Las cepas bacterianas preferidas son de la especie *Blautia*. Los ejemplos de cepas de *Blautia* para uso en la invención incluyen *Blautia stercoris* y *B. wexlerae*.

20 [0026] Las especies *Blautia* son bacterias no móviles positivas reactivas de Gram que pueden ser ya sea coccoides u ovales y todos son anaerobios obligados que producen ácido acético como el principal producto final de la fermentación de la glucosa [16]. *Blautia* puede aislarse del intestino humano, aunque *B. producta* se aisló de una muestra de septicemia. El número de adhesión GenBank de la secuencia del gen 16S ARNr de *Blautia stercoris* cepa GAM6-1<sup>T</sup> es HM626177 (descrito en la presente como SEQ ID NO: 1). Una cepa ejemplar de *Blautia stercoris* se describe en [17]. La cepa tipo de *Blautia wexlerae* es WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [18]. El número de acceso GenBank para la secuencia del gen 16S ARNr de *Blautia wexlerae* cepa WAL 14507 T es EF036467 (descrito en la presente como SEQ ID NO: 3). Esta cepa ejemplar de *Blautia wexlerae* se describe en [18].

30 [0027] La bacteria *Blautia stercoris* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 se probó en los ejemplos y también se denominó en este documento como la cepa 830. Una secuencia 16S ARNr para la cepa 830 que fue probada se proporciona en la SEQ ID NO: 2. La cepa 830 fue depositada ante la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por GT Biologics Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 12 de marzo de 2015 como "*Blautia stercoris* 830" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. posteriormente cambió su nombre a 4D Pharma Research Limited.

35 [0028] El genoma de la cepa 830 comprende un cromosoma y el plásmido. Se proporciona una secuencia cromosómica para la cepa 830 en SEQ ID NO: 5 en el listado de secuencias publicado con el documento WO2016/203218. Se proporciona una secuencia de plásmido para la cepa 830 en la SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/203218. Estas secuencias se generaron utilizando la plataforma PacBio RS II.

40 [0029] La bacteria *Blautia wexlerae* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42486 se probó en los ejemplos y también se denominó en este documento como cepa MRX008. En la SEQ ID NO: 4 se proporciona una secuencia de ARNr 16S para la cepa MRX008 que se probó. La cepa MRX008 fue depositada ante la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Edificio Ferguson, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. (Edificio de Innovación de Ciencias de la Vida, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 16 de noviembre de 2015 como "*Blautia/Ruminococcus*" y se le asignó el número de acceso NCIMB 42486.

50 [0030] También se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con las cepas ensayadas en los ejemplos sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una bacteria cepa de *Blautia stercoris*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene una secuencia de ARNr de 16 segundos que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2. Preferiblemente, la identidad de secuencia es la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr de 16 segundos representada por la SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa de bacteria de *Blautia wexlerae*. Preferiblemente, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene una secuencia de ARNr de 16 segundos que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o 4. Preferiblemente, la identidad de secuencia es la SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene la secuencia de ARNr de 16 segundos representada por la SEQ ID NO: 4.

60 [0031] En ciertos casos, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218. En los casos preferidos, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un cromosoma con al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de secuencia identidad) a SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en al menos 60% (por ejemplo, al menos

65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218. Por ejemplo, la cepa bacteriana para usar en la invención puede tener un cromosoma con al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 del documento WO2016/203218 en el 70% de la SEQ ID NO: 5 del documento WO2016/203218, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 a través del 80% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en 90% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en el 100% de la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en un 70% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en 80% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en 90% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 a través del 100% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en 80% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 98% de secuencia identidad con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en el 90% de SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 en 100% de SEQ ID NO: 5 del documento WO2016/203218.

**[0032]** En ciertos casos, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un plásmido con identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218. En casos preferidos, la cepa bacteriana para usar en la invención tiene un plásmido con al menos 90% de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de secuencia identidad) a SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en al menos 60% (por ejemplo, al menos 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%) de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218. Por ejemplo, la cepa bacteriana para usar en la invención puede tener un plásmido con al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/203218 en el 70% de la SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/203218, o al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 a través del 80% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 90% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 100% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 70% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 80% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 a través del 90% de la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 100% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 98% de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 70% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 80% de SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos el 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218 en 90% de la SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218, o al menos 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/203218 en el 100% de la SEQ ID NO: 6 del documento WO2016/203218.

**[0033]** En ciertos casos, la cepa bacteriana para uso en la invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 de WO2016/203218 y un plásmido con identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 de WO2016/203218.

**[0034]** Las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada bajo el número de acceso también se espera que 42381 sea eficaz para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17. También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso 42486 sean eficaces para tratar o prevenir enfermedades y afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o muy similares.

**[0035]** Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 y que son adecuadas para uso en la invención pueden identificarse por secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 o 42486. Por ejemplo, sustancialmente todo el genoma puede secuenciarse y una cepa de biotipo para usar en la invención puede tener al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia en al menos 80% de su totalidad genoma (por ejemplo, en al menos 85%, 90%, 95% o 99%, o en todo su genoma). Otras secuencias adecuadas para usar en la identificación de cepas de biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas como BOX, ERIC, (GTG)5, o REP o [19]. Cepas de biotipo pueden tener secuencias con al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada bajo número NCIMB 42381 o 42486.

**[0036]** Alternativamente, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 y que son adecuadas para su uso en la invención pueden identificarse utilizando el depósito del número de acceso NCIMB 42381 o el depósito del número de acceso NCIMB 42486, y análisis de fragmentos de restricción y/o análisis de PCR, por ejemplo, utilizando polimorfismo de longitud de fragmento amplificado fluoroscente (FAPFLP) y huellas dactilares repetitivas de elemento de ADN (rep)-PCR, o perfil de proteínas, o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s. En realizaciones preferidas, tales técnicas pueden usarse para identificar otras cepas *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

5 [0037] En ciertas realizaciones, cepas que son biotipos de una bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 y que son adecuadas para uso en la invención son cepas que proporcionan el mismo patrón como una bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 cuando analizado por análisis de restricción de

10 ADN ribosómico amplificado (ARDRA), por ejemplo cuando se usa la enzima de restricción Sau3AI (para ejemplos de métodos y orientación, ver, por ejemplo, [20]). Alternativamente, las cepas de biotipo se identifican como cepas que tienen los mismos patrones de carbohidratos de fermentación como una bacteria depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381 o 42486.

15 10 [0038] Otras cepas *Blautia* que son útiles en las composiciones y métodos de la invención, tales como biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486, puede identificarse utilizando cualquier método o estrategia apropiados, incluidos los ensayos descritos en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la invención pueden identificarse cultivando en YCFA anaeróbico y/o administrando las bacterias al modelo de ratón de artritis inducida por colágeno de tipo II y luego evaluando los niveles de citocinas. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígenos de superficie similares a una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 pueden ser útiles en la invención. Una cepa útil tendrá una actividad inmunomoduladora comparable a la cepa NCIMB 42381 o 42486. En particular, una cepa de biotipo provocará efectos comparables en los modelos de asma, artritis, esclerosis múltiple y enfermedad de la uveítis y efectos comparables en los niveles de citocinas a los efectos mostrados en los Ejemplos, que pueden identificarse utilizando los protocolos de cultivo y administración descritos en el Ejemplos.

20 15 [0039] Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa *Blautia stercoris* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42381. Esta es la cepa ejemplar 830 ensayada en los ejemplos y se muestra para ser eficaz para tratar la enfermedad. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, la invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381. La invención también proporciona una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381 para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

25 20 [0040] Una cepa particularmente preferida de la invención es la cepa *Blautia wexlerae* depositada bajo el número de acceso NCIMB 42486. Esta es la variedad MRX008 ejemplar probada en los ejemplos y se muestra para ser eficaz para el tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, la invención proporciona una célula, tal como una célula aislada, de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486. La invención también proporciona una composición que comprende una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486. La invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486. La invención también proporciona una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en este documento.

30 35 [0041] En realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la invención son viables y capaces de colonizar parcial o totalmente el intestino.

#### 40 45 **Usos terapéuticos**

50 [0042] Como se demuestra en los ejemplos, las composiciones bacterianas de la invención son eficaces para la reducción de la respuesta inflamatoria Th17. En particular, el tratamiento con composiciones de la invención logra una reducción en los niveles de IL-17A y otras citocinas de la ruta Th17, y mejoras clínicas en modelos animales de afecciones mediadas por IL-17 y la ruta Th17. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y en particular enfermedades o afecciones mediadas por IL-17. En particular, las composiciones de la invención pueden ser útiles para reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de IL-17.

55 [0043] Las células Th17 son un subconjunto de células T auxiliares que producen, por ejemplo, IL-17A, IL17-F, IL-21 e IL-22. La diferenciación de células Th17 y la expresión de IL-17 pueden ser conducidas por IL-23. Estas citocinas y otras forman partes importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria bien establecida que contribuye y subyace a una serie de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (como se describe, por ejemplo, [21-26]). Las enfermedades en las que se activa la ruta Th17 son enfermedades mediadas por la ruta Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden mejorarse o aliviarse reprimiendo la vía Th17, que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción en el nivel de las citocinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por el aumento de los niveles de citocinas producidas por las células Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revisado en [27]). Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden caracterizarse por una mayor expresión de genes relacionados con Th-17, como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden estar asociadas con mayores niveles de células Th17. IL-17 es una citocina proinflamatoria que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes. IL-17 como se usa en el presente documento puede referirse

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

10 [0044] Los ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden estar mediadas por IL-17 o la ruta Th17 incluyen esclerosis múltiple; artritis, tal como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC); uveítis escleritis vasculitis Enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención se usan para tratar o prevenir una o más de estas afecciones o enfermedades. En realizaciones preferidas adicionales, estas afecciones o enfermedades están mediadas por la vía IL-17 o Th17.

15 [0045] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método de reducción de IL-17 o la reducción de la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por vía IL-17 o Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en donde dicho tratamiento o prevención se logra al reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o autoinmune, en la que el paciente tiene niveles elevados de células IL-17 o Th17 elevadas o exhibe una respuesta inflamatoria Th17. En ciertas realizaciones, el paciente puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica, o la composición de la invención puede usarse para prevenir una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune que se convierta en una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmune crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección puede no responder al tratamiento con inhibidores de TNF- $\alpha$ . Estos usos de la invención pueden aplicarse a cualquiera de las enfermedades o afecciones específicas enumeradas en el párrafo anterior. IL-17 y la ruta Th17 a menudo se asocian con enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones crónicas como se enumeran anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en la prevención del desarrollo de enfermedades crónicas.

20 [0046] Las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades y condiciones mediadas por vía IL-17 o Th17 y para hacer frente a la respuesta inflamatoria Th17, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para tratar o prevenir la enfermedad crónica, tratar o prevenir enfermedades en pacientes que no han respondido a otras terapias (como el tratamiento con inhibidores de TNF- $\alpha$ ), y/o tratar o prevenir el daño 25 tisular y los síntomas asociados con las células IL-17 y Th17. Por ejemplo, se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibidor sobre la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos, por lo que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir la erosión ósea o dañar el cartílago.

30 [0047] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide 35 una elevación de los niveles IL-17, en particular, los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o IL-6. Dicha reducción o prevención de niveles elevados de estas citocinas puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular las mediadas por la vía IL-17 o Th17.

40 [0048] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide 45 una elevación en los niveles de células CD4+. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en el nivel de maduración de las células dendríticas, en particular de las células dendríticas derivadas de monocitos CD1a + CD14-. Tal reducción o prevención de niveles elevados de los niveles de células CD4+ o la reducción o prevención de elevación en el nivel de maduración de células 50 dendríticas puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunes, en particular las mediadas por la vía IL-17 o Th17.

#### Asma

55 [0049] En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención 60 del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en el reclutamiento de neutrófilos y/o eosinófilos en las vías respiratorias después de la sensibilización y el desafío con el extracto de ácaros del polvo doméstico, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención del asma. El asma es una enfermedad crónica caracterizada por inflamación y restricción de las vías respiratorias. La inflamación en el asma 65 puede estar mediada por células IL-17 y/o Th17, por lo que las composiciones de la invención pueden ser

particularmente efectivas para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede estar mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

- 5 [0050] En ciertas realizaciones, el asma es eosinofílica o asma alérgica. El asma eosinofílica y alérgica se caracteriza por un mayor número de eosinófilos en la sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y se asocia patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la respuesta a los corticosteroides [28]. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de eosinófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma eosinófila y alérgica.
- 10 [0051] En realizaciones adicionales, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención neutrofílica asma (o el asma no eosinofílica). Los altos números de neutrófilos se asocian con asma grave que puede ser insensible al tratamiento con corticosteroides. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de neutrófilos pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma neutrófilo.
- 15 [0052] El asma eosinofílica y neutrofílica no son condiciones y tratamientos mutuamente excluyentes que ayudan a abordar las respuestas de eosinófilos y neutrófilos pueden ser útiles para tratar el asma en general. Los niveles incrementados de IL-17 y la activación de la ruta Th17 están asociados con asma severa, por lo que las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma severa o para tratar el asma severa.
- 20 [0053] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en los métodos de reducción de una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención de asma, o para su uso en métodos para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma. Como se señaló anteriormente, los altos niveles de eosinófilos en el asma se asocian patológicamente con el engrosamiento de la zona de la membrana basal, por lo que la reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o la prevención del asma puede abordar específicamente esta característica de la enfermedad. Además, los neutrófilos elevados, ya sea en combinación con eosinófilos elevados o en su ausencia, se asocia con asma grave y estrechamiento crónico de las vías respiratorias. Por lo tanto, reducir la respuesta inflamatoria neutrofílica puede ser particularmente útil para tratar el asma grave.
- 25 [0054] En ciertas realizaciones, las composiciones de reducir la infiltración peribronquial en el asma alérgica, o son para uso en la reducción de la infiltración peribronquial en el tratamiento de asma alérgica. En ciertas realizaciones, las composiciones reducen la infiltración peribronquiolar y/o perivasculares en el asma neutrofílica, o se usan para reducir la infiltración peribronquiolar y/o perivasculares en el tratamiento del asma neutrófila alérgica.
- 30 [0055] En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o impide una elevación de niveles de TNF $\alpha$ .
- 35 [0056] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en un método para tratar el asma que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a tratar tiene, o se ha identificado previamente que tiene, niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, por ejemplo, según se identifica mediante muestreo de sangre o análisis de esputo.
- 40 [0057] Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo del asma en un recién nacido cuando se administra al neonato o a una mujer embarazada. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de asma en niños. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar o prevenir el asma de aparición en adultos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para controlar o aliviar el asma. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se agrava por los alérgenos, como los ácaros del polvo doméstico.
- 45 [0058] El tratamiento o la prevención del asma pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

#### Artritis

- 50 [0059] En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención artritis reumatoide (AR). Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en los signos clínicos de AR en un modelo de ratón, reducen el daño del cartílago y los huesos, y reducen la respuesta inflamatoria de IL-17, por lo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de REAL ACADEMIA DE BELLAS ARTES. La AR es un trastorno inflamatorio sistémico que afecta principalmente a las articulaciones. La AR está asociada con una respuesta inflamatoria que produce hinchazón de las articulaciones, hiperplasia sinovial y destrucción del cartílago y los huesos. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la AR, por ejemplo, porque IL-17 inhibe la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos y activa la producción y función de las metaloproteinasas de la matriz y porque la actividad de la enfermedad de AR está correlacionada con los niveles de IL-17 y los niveles de células Th-17 [29, 30], por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la AR.

- 5 [0060] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la reducción de niveles IL-17 o la prevención de la elevación de los niveles IL-17 en el tratamiento o la prevención de AR. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IL-17, en particular los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con composiciones de la invención proporciona una reducción o evita una elevación en los niveles de IFN- $\gamma$  o IL-6.
- 10 [0061] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en la hinchazón de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en pacientes con articulaciones inflamadas o pacientes identificados como en riesgo de tener articulaciones inflamadas. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para usar en un método para reducir la hinchazón articular en la AR.
- 15 [0062] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el cartílago daño o daño óseo. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención del cartílago o daño óseo en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con AR severa que están en riesgo de cartílago o daño óseo.
- 20 [0063] El aumento de los niveles de IL-17 y el número de células Th17 están asociados con la destrucción del cartílago y el hueso en la AR [29, 30]. Se sabe que IL-17 activa la destrucción de la matriz en el cartílago y el tejido óseo e IL-17 tiene un efecto inhibidor sobre la producción de matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención se usan para prevenir la erosión ósea o el daño del cartílago en el tratamiento de la AR. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que exhiben erosión ósea o daño del cartílago o pacientes identificados como en riesgo de erosión ósea o daño del cartílago.
- 25 [0064] El TNF- $\alpha$  también está asociado con la AR, pero el TNF- $\alpha$  no está involucrado en la patogénesis de las etapas posteriores de la enfermedad. Por el contrario, IL-17 tiene un papel en todas las etapas de la enfermedad crónica [31]. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para usar en el tratamiento de la AR crónica o la AR en etapa tardía, tal como una enfermedad que incluye la destrucción articular y la pérdida de cartílago. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para tratar pacientes que previamente han recibido terapia anti-TNF- $\alpha$ . En ciertas realizaciones, los pacientes a tratar no responden o ya no responden a la terapia anti-TNF- $\alpha$ .
- 30 [0065] Las composiciones de la invención pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de AR en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de AR, o que ha sido diagnosticado con AR en etapa temprana. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de AR.
- 35 [0066] Las composiciones de la invención pueden ser útiles para la gestión o el alivio de la AR. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la hinchazón articular o la destrucción ósea. El tratamiento o la prevención de la AR pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.
- 40 [0067] En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para su uso en el tratamiento o prevención múltiple esclerosis. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo de esclerosis múltiple en ratones (el modelo EAE), y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es un trastorno inflamatorio asociado con el daño a las vainas de mielina de las neuronas, particularmente en el cerebro y la columna vertebral. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, que incapacita progresivamente y evoluciona en episodios. Las células IL-17 y Th17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, por ejemplo, debido a que los niveles de IL-17 pueden correlacionarse con lesiones de esclerosis múltiple, IL-17 puede alterar las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y las células Th17 pueden migrar al sistema nervioso central y causar pérdida neuronal [32,33]. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.
- 45 *Esclerosis múltiple*
- 50 [0068] En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en la enfermedad de incidencia o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de la incidencia o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención evita una disminución de la función motora mejorada. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la prevención de una disminución en la función motora o para uso en la mejora de la función motora. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención previene el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la

prevención de la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

**[0069]** Las composiciones de la invención pueden ser útiles para modular el sistema inmune de un paciente, por lo que en ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para su uso en la prevención de la esclerosis múltiple en un paciente que ha sido identificado como en riesgo de esclerosis múltiple, o que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple en etapa temprana o esclerosis múltiple "recurrente-remitente". Las composiciones de la invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de esclerosis. De hecho, los ejemplos muestran que la administración de composiciones de la invención evitó el desarrollo de la enfermedad en muchos ratones.

**[0070]** Las composiciones de la invención pueden ser útiles para la gestión o el alivio de la esclerosis múltiple. Las composiciones de la invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El tratamiento o la prevención de la esclerosis múltiple pueden referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de exacerbaciones o el rango de desencadenantes que son un problema para el paciente.

#### Uveítis

**[0071]** En realizaciones preferidas, las composiciones de la invención son para uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención logran una reducción en la incidencia y gravedad de la enfermedad en un modelo animal de uveítis y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la uveítis. La uveítis es la inflamación de la úvea y puede provocar la destrucción del tejido retiniano. Puede presentarse en diferentes formas anatómicas (anterior, intermedia, posterior o difusa) y ser el resultado de causas diferentes, pero relacionadas, que incluyen trastornos autoinmunes sistémicos. La vía IL-17 o Th17 están centralmente involucradas en la uveítis, por lo que las composiciones de la invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar la uveítis. Las referencias [34-41] describen niveles séricos elevados de interleucina-17A en pacientes con uveítis, asociación específica de variantes genéticas de IL17A con panuveítis, el papel de las citocinas asociadas a Th17 en la patogénesis de la uveítis autoinmune experimental, el desequilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras durante la uveítis autoinmune experimental monofásica, la regulación positiva de IL-17A en pacientes con uveítis y enfermedades activas de Adamantiades-Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), el tratamiento de la uveítis no infecciosa con secukinumab (anticuerpo anti-IL-17A) y Th17 en ojos uveíticos.

**[0072]** En ciertas realizaciones, la uveítis es la uveítis posterior. La uveítis posterior se presenta principalmente con inflamación de la retina y la coroides y los ejemplos demuestran que las composiciones de la invención son efectivas para reducir la inflamación y el daño de la retina.

**[0073]** En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención resulta en una reducción en el daño en la retina. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención del daño retiniano en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con uveítis severa que están en riesgo de daño retiniano. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción o prevención de la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado una reducción en la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para uso en la reducción de la infiltración de tejido retiniano por células inflamatorias. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la invención da como resultado que se mantenga o mejore la visión. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención son para usar en mantener o mejorar la visión.

**[0074]** En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento o la prevención de la uveítis asociada con una enfermedad no infecciosa o autoinmune, tales como la enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, Fuchs iridociclitis heterocrómica, Granulomatosis de Wegener, HLA-B27 uveítis relacionada, la artritis idiopática juvenil, sarcoidosis, espondiloartritis, oftalmia simpática, nefritis tubulointersticial y síndrome de uveítis o síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. Se ha demostrado que IL-17A está involucrado, por ejemplo, en las enfermedades de Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada.

**[0075]** El tratamiento o prevención de la uveítis puede referirse, por ejemplo, a un alivio de la gravedad de los síntomas o una prevención de la recaída.

#### **Modos de administración**

**[0076]** Preferiblemente, las composiciones de la invención se administrarán al tracto gastrointestinal para permitir el suministro y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la invención. Generalmente, las composiciones de la invención se administran por vía oral, pero pueden administrarse por vía rectal, intranasal o por vía bucal o sublingual.

**[0077]** En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como una espuma, como un aerosol o un gel.

5 [0078] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en forma de aceite de teobroma (manteca de cacao), grasa dura sintética (p. ej., Supocire, witepsol), glicero-gelatina, polietilenglicol o composición de glicerina jabonosa.

10 [0079] En ciertas realizaciones, la composición de la invención se administra en el tracto gastrointestinal a través de un tubo, tal como un tubo nasogástrico, sonda orogástrica, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (tubo J), gastrostomía endoscópica percutánea (PEG), o un puerto, como un puerto de pared torácica que proporciona acceso al estómago, yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

15 [0080] Las composiciones de la invención pueden administrarse una vez, o se pueden administrar de forma secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención deben administrarse diariamente.

20 [0081] En ciertas realizaciones de la invención, el tratamiento según la invención está acompañado por la evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento puede repetirse si no se logra el suministro y/o la colonización parcial o total con la cepa de la invención de manera que no se observe la eficacia, o el tratamiento puede cesar si el suministro y/o la colonización parcial o total es exitosa y se observa la eficacia.

25 [0082] En ciertas realizaciones, la composición de la invención puede administrarse a un animal preñado, por ejemplo un mamífero tal como un ser humano con el fin de prevenir una enfermedad inflamatoria o autoinmune en desarrollo en su niño en el útero y/o después de su nacimiento.

30 [0083] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad o afección mediada por vía IL-17 o Th17, o que ha sido identificado como en riesgo de una enfermedad o condición mediada por vía IL-17 o Th17. Las composiciones también pueden administrarse como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de enfermedades o afecciones mediadas por vía IL-17 o Th17 en un paciente sano.

35 [0084] Las composiciones de la invención se pueden administrar a un paciente que ha sido identificado por tener una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener una colonización reducida o ausente por *Blautia*, y en particular *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

40 [0085] Las composiciones de la invención se pueden administrar como un producto alimenticio, como un suplemento nutricional.

45 [0086] Generalmente, las composiciones de la invención son para el tratamiento de los seres humanos, a pesar de que se pueden usar para tratar a los animales incluyendo mamíferos monogástricos tales como aves de corral, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la invención pueden ser útiles para mejorar el crecimiento y el rendimiento de los animales. Si se administra a animales, se puede usar sonda oral.

### **Composiciones**

50 [0087] Generalmente, la composición de la invención comprende bacterias. En realizaciones preferidas de la invención, la composición se formula en forma liofilizada. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprenden una cepa bacteriana de la invención.

55 [0088] Preferiblemente, la composición de la invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de bacterias es un procedimiento bien establecido y se dispone de orientación relevante en, por ejemplo, referencias [48-50].

60 [0089] Alternativamente, la composición de la invención puede comprender un cultivo bacteriano vivo activo.

65 [0090] En realizaciones preferidas, la composición de la invención está encapsulada para permitir la entrega de la bacteriana cepa al intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la entrega en la ubicación diana a través, por ejemplo, de la ruptura con estímulos químicos o físicos como la presión, la actividad enzimática o la desintegración física, que pueden desencadenarse por cambios en el pH. Se puede usar cualquier método de encapsulación apropiada. Las técnicas de encapsulación ejemplares incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en superficies de soporte sólidas, autoagregulación por floculación o con agentes de reticulación y contención mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La orientación sobre la encapsulación que puede ser útil para preparar composiciones de la invención está disponible, por ejemplo, en las referencias [51] y [52].

70 [0091] La composición se puede administrar por vía oral y puede estar en la forma de un comprimido, cápsula o polvo. Se prefieren los productos encapsulados porque *Blautia* son anaerobios. Se pueden incluir otros ingredientes (como la vitamina C, por ejemplo), como captadores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar el suministro y/o la

colonización parcial o total y la supervivencia *in vivo*. Alternativamente, la composición probiótica de la invención puede administrarse por vía oral como un producto alimenticio o nutricional, tal como leche o producto lácteo fermentado a base de suero, o como un producto farmacéutico.

5 [0092] La composición puede formularse como un probiótico.

10 [0093] Una composición de la invención incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa bacteriana de la invención. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso sobre un paciente. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana puede ser suficiente para dar lugar a la administración y/o colonización parcial o total del intestino del paciente.

15 [0094] Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para un ser humano adulto, puede ser de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias (CFU); por ejemplo, de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC; en otro ejemplo de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC.

20 [0095] En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  CFU/g, respecto al peso de la composición; por ejemplo, de aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC/g. La dosis puede ser, por ejemplo, 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

25 [0096] Típicamente, un probiótico, tal como la composición de la invención, se combina opcionalmente con al menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico suele ser un carbohidrato no digerible, como un oligo o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

30 [0097] En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 30% en peso, respecto a la composición de peso total, (por ejemplo de 5 a 20% en peso). Los carbohidratos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: fructo-oligosacáridos (o FOS), fructo-oligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalt-oligosacáridos, pectinas, xilo-oligosacáridos (o XOS), quitosano-oligosacáridos (o COS), beta-glucanos, goma de almendra modificada y almidones resistentes, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras cítricas. En un aspecto, los prebióticos son los fructo-oligosacáridos de cadena corta (por simplicidad mostrada a continuación como FOSs-c.c); dichos FOSs-c.c. no son carbohidratos digeribles, generalmente obtenidos por la conversión del azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la que se unen tres moléculas de glucosa.

35 [0098] Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Se pueden encontrar ejemplos de dichos excipientes adecuados en la referencia [53]. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [54]. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente se puede seleccionar con respecto a la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o además del vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante adecuado, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agente solubilizante. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y similares. Se pueden proporcionar conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

40 [0099] Las composiciones de la invención pueden formularse como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la invención, como en un suplemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede formularse para mejorar el sabor de la composición de la invención o para hacer que la composición sea más atractiva para el consumo al ser más similar a un producto alimenticio común, que a una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la invención se formula como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier producto a base de leche o suero líquido o semisólido que tiene un contenido variable de grasa. El producto a base de leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche desnatada, leche entera, leche recombinada a partir de leche en polvo y suero sin ningún procesamiento, o un producto procesado, como yogur, leche cuajada, cuajada, leche agria, leche entera agria, leche de mantequilla y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye las bebidas lácteas, como las bebidas de suero, las leches fermentadas, las leches condensadas, las leches infantiles o para bebés; leches aromatizadas, helados; alimentos que contienen leche, como dulces.

45 [0100] En ciertas realizaciones, las composiciones de la invención contienen una sola cepa o especie bacteriana y no

contienen ninguna otra cepa o especie bacteriana. Dichas composiciones pueden comprender solo cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de otras cepas o especies bacterianas. Dichas composiciones pueden ser un cultivo que esté sustancialmente libre de otras especies de organismos.

5 [0101] Las composiciones para uso de acuerdo con la invención pueden o no requerir la aprobación de comercialización.

10 [0102] En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada se reconstituye antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito aquí.

10 [0103] Las composiciones de la invención pueden comprender excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 [0104] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y en el que el trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 20 uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behcet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica y rechazo de aloinjertos.

25 [0105] En ciertas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la invención; y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad o afección mediada por vía IL-17 o Th17. En realizaciones preferidas, dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, 30 neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), uveitis, vasculitis, enfermedad de Behcet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica y rechazo de aloinjertos.

35 [0106] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la cantidad de la cepa bacteriana es de aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias por gramo con respecto al peso de la composición.

40 [0107] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la composición se administra a una dosis de 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

45 [0108] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que la composición se administra mediante un método seleccionado del grupo que consiste en oral, rectal, subcutáneo, nasal, bucal y sublingual.

50 [0109] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

55 [0110] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

60 [0111] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en almidón, gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta-lactosa, edulcorante de maíz, acacia, tragacanto, sodio alginato, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

65 [0112] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende además al menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizador.

65 [0113] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste en benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

65 [0114] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en donde se liofiliza dicha cepa bacteriana.

65 [0115] En ciertas realizaciones, la invención proporciona la composición farmacéutica anterior, en la que cuando la

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

- 5 **Métodos de cultivo**
- [0116] Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden cultivarse usando técnicas de microbiología estándar como se detalla, por ejemplo, en las referencias [55-57].
- 10 [0117] El medio sólido o líquido utilizado para el cultivo puede ser agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): casitona (1.0 g), extracto de levadura (0.25 g), NaHCO<sub>3</sub> (0.4 g), cisteína (0,1 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,045 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,045 g), NaCl (0,09 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,09 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,009 g), CaCl<sub>2</sub> (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), ácido *p*-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg) y piridoxamina (15 µg).

#### **Cepas bacterianas para usar en composiciones de vacunas**

- 20 [0118] Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la invención son útiles para tratar o prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la ruta Th17. Es probable que esto sea el resultado del efecto que las cepas bacterianas de la invención tienen sobre el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la invención también pueden ser útiles para prevenir enfermedades o afecciones mediadas por IL-17 o la ruta Th17, cuando se administran como composiciones de vacuna. En ciertas de tales realizaciones, las cepas bacterianas de la invención se pueden matar, inactivar o atenuar. En ciertas de tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para administración por inyección, tal como por inyección subcutánea.

#### **General**

- 30 [0119] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véanse, por ejemplo, las referencias [58] y [59-65], etc.

- 35 [0120] El término "que comprende" abarca "incluyendo" así como "que consiste de" por ejemplo. Una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

- [0121] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico *x* es opcional y significa, por ejemplo, *x*±10%.

- 40 [0122] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

- 45 [0123] Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar utilizando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en la sección 7.7,18 de la ref. [66] El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman determina una alineación preferida usando una búsqueda de espacio afín con una penalización de espacio abierto de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se describe en la ref. [67]

- 50 [0124] A menos que se indique específicamente, un proceso o método que comprende numerosos pasos puede comprender pasos adicionales al principio o al final del método, o puede comprender pasos intermedios adicionales. Además, los pasos se pueden combinar, omitir o realizar en un orden alternativo, si corresponde.

- 55 [0125] En este documento se describen diversas realizaciones de la invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas, para proporcionar realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas aquí como adecuadas, típicas o preferidas pueden combinarse entre sí (excepto cuando son mutuamente excluyentes).

#### **60 MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN**

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

- 65 [0126] Los ratones fueron administrados con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y fueron posteriormente desafiados con extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) para provocar una

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

Cepa

10 [0127] 830: *Blautia stercoris*

Diseño del estudio

15 [0128] Grupos:

- 15 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).  
 6. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 830 (por vía oral).  
 7. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).  
 8. Grupo de control no tratado.

20 Número de ratones por grupo = 5

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

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

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

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

30 Día 14 Sacrificio de todos los animales para su análisis.

Número total de ratones = 40.

Puntos finales y el análisis

35 [0129] En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) inmediatamente seguido de un lavado broncoalveolar (BAL).

40 [0130] Las células se aislaron del fluido BAL (lavado broncoalveolar) y se realizaron recuentos de células diferenciales (200 recuentos de células/muestras).

Material y Métodos

45 [0131] **Ratones.** Se compraron ratones BALB/Chembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas obtenidas de tipo Indulab AG, Gams, Switzerland Cage: "The SealsafeTM – IVC cage. Número de producto 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorearon semanalmente y se acclimataron a la instalación durante 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el día de estudio -14. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Estaba presente el enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal fueron observadas según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza bajo la ordenanza 455,163 de la FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

55 [0132] **Cultivo de inóculo bacteriano.** Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolo con una mano enguantada y se inyectaron ~ 0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (Número de cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de anaeróbico YCFA. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron luego (estáticos) a 37°C durante hasta 24-26 horas (para la cepa 830).

60 [0133] **Cultivo del control del vehículo.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.

65 [0134] **Administración de inóculo bacteriano o control de vehículo.** Se administraron 400 ul de inóculo de bacterias

cultivado o control de vehículo por día por sonda oral.

5 **[0135] Sensibilización intranasal.** Los ratones se anestesiaron mediante inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y se administraron con 15 µg de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) en un volumen de 30ul PBS por nasal.

10 **[0136] Preparación y administración del compuesto de control positivo Dexametasona.** Dexametasona sal disódica 21-fosfato (Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159, Lote Nº SLBD,1030V) se resolvió en H<sub>2</sub>O y se administró a los animales en una dosis de 3 mg/kg en un volumen de 200 ul por vía oral en los días indicados en el protocolo de estudio anterior.

15 **[0137] Procedimiento terminal.** El día 14 se sacrificaron los animales mediante inyección i.p. letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 117013 9A) seguido inmediatamente por lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

20 **[0138] Medición de infiltrados celulares en BAL.** Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos diferenciales de células en base a criterios morfológicos y citoquímicos estándar.

25 **[0139] Gráficos y análisis estadístico.** Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism Versión 6 y se aplicó un ANOVA unidireccional. Los resultados del análisis estadístico se proporcionaron con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

#### Resultados y análisis

30 **[0140]** Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 1-9.

35 **[0141]** No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Los dos controles, el tratamiento del vehículo (control negativo) y el tratamiento con dexametasona (control positivo) se comportaron como se esperaba, con eosinofilia y neutrofilia alteradas observadas después del tratamiento con dexametasona.

40 **[0142]** Los resultados más importantes de este experimento se muestran en las Figuras 6 y 7, que informan sobre el número total y el porcentaje de neutrófilos detectados en el lavado bronquiolar después del desafío con HDM. La administración de la cepa 830 dio como resultado una reducción en los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en BAL en relación con el control de solo vehículo.

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

#### Resumen

45 **[0143]** Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la invención y posteriormente se sensibilizaron con las administraciones subcutáneas de extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) y desafío con una administración intranasal de HDM para modelar la respuesta inflamatoria del asma neutrofílica severa. La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con las composiciones de la invención se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria, y en particular reducen el reclutamiento de neutrófilos, de una manera comparable al control positivo que comprende administraciones de anticuerpos anti-IL-17. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar afecciones mediadas por IL-17 y Th17 tales como neutrofilia y asma.

#### Cepa

50 **[0144]** 830: *Blautia stercoris*

#### Diseño del estudio

55 **[0145] Grupos:**

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).
6. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 830 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (i.p.).
8. Grupo de control no tratado.
- 9: Ratones sanos (línea de base).

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

- Día -14 al día 17: Administración diaria del control del vehículo por vía oral (Grupo 1).  
 Día -14 al día 17: Administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 2-6).  
 Día 0: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).  
 Día 7: Sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).  
 5 Día 13, 15, 17: Administración de anticuerpo neutralizante anti IL-17 por i.p. (Grupo 7).  
 Día 14, 15, 16, 17: Desafío con HDM en 30ul PBS por nasal (Grupo 1-8).  
 Día 18: Sacrificio de todos los animales para su análisis.

Criterios de valoración y análisis:

- 10 [0146] El día 14 los animales fueron sacrificados por inyección intraperitoneal letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 1170139A) seguido inmediatamente por un lavado broncoalveolar (BAL). Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos de células diferenciales (200 recuentos de células/muestras).

15 Material y métodos.

- 20 [0147] **Ratones.** Se compraron ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad de Charles River Laboratories y se asignaron aleatoriamente a jaulas con un total de 5 ratones por jaula (jaulas ventiladas del tipo Indulab AG, Gams, Switzerland: "The SealsafeTM – IVC cage. Número de producto 1248L). Las jaulas se etiquetaron con el número de estudio, el número de grupo y la fecha de inicio experimental. Los ratones se monitorearon semanalmente y se aclimataron a la instalación durante 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad el Día de estudio -14. Agua potable y alimentos disponibles a voluntad. Enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales se realizó según el número de licencia de autorización local 2283,1 (emitido y aprobado por: Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud). Agua potable y alimentos estaban disponibles ad libitum y se actualizaban una vez al día. El enriquecimiento de la jaula estaba presente. Las regulaciones de bienestar animal se observaron según lo dispuesto por las autoridades oficiales de Suiza en virtud de la ordenanza 455,163 del FVO (Oficina Veterinaria Federal) sobre cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

- 30 [0148] **Cultivo de inóculo bacteriano.** Dentro de una estación de trabajo estéril, se descongeló un criovial de bacterias calentándolo con una mano enguantada y se inyectaron ~ 0,7 ml de contenido en un tubo Hungate (Número de cat, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lengern, Alemania), que contenía 8 ml de anaeróbico YCFA. Por lo general, se prepararon dos tubos por cepa. Los tubos Hungate se incubaron luego (estáticos) a 37°C durante hasta 24-26 horas (para la cepa 830).

- 35 [0149] **Cultivo del control del vehículo.** Se incubó un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico (estático) a 37°C durante 16 h.

- 40 [0150] **Administración de inóculo bacteriano o control de vehículo.** Se administraron 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o control de vehículo por día por sonda oral.

- 45 [0151] **Sensibilización HDM.** Se emulsionaron 50 µg de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EE.UU.) En PBS en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, EE.UU.) y se administra por vía subcutánea en un volumen de 200 µl, dos veces durante dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones fueron anestesiados por inyección i.p. con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de ketasol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y luego se les administraron desafíos intranasales de 15 µg de HDM en un volumen de 30ul PBS en 4 días consecutivos. El análisis se realizó un día después del desafío final.

- 50 [0152] **Preparación y administración del compuesto de control positivo anti-anticuerpo IL-17 de ratón.** El anticuerpo neutralizante anti-IL-17 se obtuvo de Bio X Cell y se almacenó a 4°C (Clon 17F3, Cat. Número BE0173, Bio X Cell) y se administró por i.p. a una dosis de 12,5 mg/kg en los días indicados en el protocolo de estudio anterior.

- 55 [0153] **Procedimiento terminal.** El día 18, los animales se sacrificaron mediante inyección i.p. letal con pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 117013 9A) seguido inmediatamente por lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

- 60 [0154] **Medición de infiltrados celulares en BAL.** Las células se aislaron del fluido BAL y se realizaron recuentos diferenciales de células en base a criterios morfológicos y citoquímicos estándar. **Gráficos y análisis estadístico.** Todos los gráficos se generaron con Graphpad Prism Versión 6 y se aplicó un ANOVA unidireccional. Los resultados del análisis estadístico se proporcionan con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Resultados y análisis

- 65 [0155] Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 10-18.

[0156] No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con la bacteria o el vehículo. Como se muestra en las Figuras 11, 12, 15 y 16, ciertos ratones tratados con la cepa 830 exhibieron eosinofilia y neutrofilia reducidas.

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

Materiales y métodos

10 **Cepa**

[0157] 830: *Blautia stercoris*

15 **Cultivos bacterianos**

[0158] Se cultivaron cultivos bacterianos para la administración en una estación de trabajo anaeróbica (Don Whitley Scientific).

20 [0159] La cepa bacteriana nº 830 se cultivó usando reservas de glicerol. Las reservas de glicerol se almacenaron a -80°C. Tres veces por semana, las reservas de glicerol se descongelaron a temperatura ambiente y se tiñeron en placas YCFA. Se usó una nueva alícuota de glicerol en cada ocasión. Se permitió que las bacterias crecieran en una placa dada durante hasta 72 horas.

25 [0160] Las soluciones a administrar a los animales se prepararon dos veces al día con un intervalo de ocho horas para tratamientos de mañana (AM) y tarde (PM). Se recogió una colonia bacteriana de la placa rayada y se transfirió a un tubo que contenía medio YCFA. La cepa bacteriana nº 830 se dejó crecer durante 24 horas antes de las administraciones de AM. Las bacterias se subcultivaron al 1% en medios YCFA para administraciones de PM. Los valores de OD se registraron para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de mañana y tarde.

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

35 [0161] Los ratones DBA/1 machos adultos se asignaron aleatoriamente a grupos experimentales y se les permitió aclimatarse durante dos semanas. El día 0, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con 100 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de colágeno tipo II (CII) en adyuvante incompleto de Freund suplementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. El día 21, los animales se administraron mediante inyección subcutánea con una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante de Freund incompleto.

40 [0162] Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa de administración a continuación. Desde el día 14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se pesaron tres veces por semana. Desde el día 21 hasta el final del experimento, se calificó a los animales tres veces por semana para que los signos clínicos de artritis incluyeran hinchazón de las patas traseras y delanteras, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y las articulaciones tibio-tarsales (tobillo).

45 [0163] El día 45 se sacrificaron ratones y se tomaron muestras de sangre terminal para análisis de citocinas.

[0164] El día 14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales para análisis microbiológico, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C.

50 [0165] El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón bien establecido para la artritis reumatoide [68]. La inmunización con CII causa una patogénesis que incluye varias características patológicas importantes de la artritis reumatoide, incluida la hiperplasia sinovial, la infiltración de células mononucleares y la degradación del cartílago. Significativamente, el desarrollo de la CIA está mediado por células Th17 a través de la secreción de IL-17A [69]. La respuesta inmune subyacente al modelo de artritis se ve reforzada por el uso del adyuvante de Freund suplementado con *Mycobacterium tuberculosis*.

55 [0166] El día 21, se recogieron bazo de tres animales satélite en cada grupo. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Las citocinas, que incluyen TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-17, se cuantificaron en los sobrenadantes de cultivo y en suero terminal por Luminex. La proliferación celular se cuantificó usando un método de incorporación de timidina tritiatada.

**Grupos de tratamiento y dosis**

[0167] Todos los grupos fueron n = 15 (n = 12 para el grupo de estudio principal y n = 3 para grupos satélite)

60 [0168] El vehículo utilizado para la bioterapéutica fue medio de extracto de levadura-ácidos grasos de casitona

5 (YCFA).

5	10	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de enfermedad
				Ruta	Régimen	
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	Oferta: Día -14-Fin		Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC
3	Bioterapéutico nº 830	5 ml/kg				

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

### Pesos corporales

15 [0169] Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se pesaron tres veces por semana. Los datos fueron graficados (media  $\pm$  SEM).

### Observaciones clínicas no específicas

20 [0170] Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se verificaron diariamente para detectar signos clínicos no específicos que incluyan una postura anormal (encorvada), una condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (reducida o aumento de la actividad).

### Observaciones clínicas

25 [0171] Desde el día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales se puntuaron tres veces por semana para detectar signos clínicos de artritis que incluyan hinchazón de las patas traseras y frontales, las articulaciones radiocarpianas (muñeca) y articulaciones tibio-tarsales (tobillo). Cada miembro se puntuó utilizando la siguiente escala: (0) normal, (1) hinchazón leve, (2) hinchazón leve, (3) hinchazón moderada y (4) hinchazón severa. Se calculó una puntuación clínica sumando cada puntuación de extremidad. La puntuación clínica máxima posible para un animal fue (16). Los animales con un puntaje igual a (12) en dos ocasiones consecutivas y los animales con un puntaje mayor a (12) en cualquier ocasión fueron sacrificados. Los datos fueron graficados (media  $\pm$  SEM).

### Análisis de proliferación celular

35 [0172] El día 21, se sacrificaron tres animales satélites por grupo y se diseccionaron los bazo. Las células de bazo se cultivaron durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Después de 72 horas, las células se pulsaron durante la noche en presencia de timidina tritiada. La proliferación celular se cuantificó midiendo la incorporación de timidina. Los datos fueron graficados (media  $\pm$  SEM). Se tomaron los sobrenadantes y se evaluó la presencia de citocinas clave.

### Análisis de citoquinas

40 [0173] Los sobrenadantes terminales de los cultivos de células de bazo se probaron para cuantificar TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 e IL-17 por Luminex. Los datos fueron graficados (media  $\pm$  SEM).

### Análisis microbiológico

45 [0174] En el día -14, día 0 y día 45, se recogieron muestras fecales de cada animal, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80°C. Caeca (incluido el contenido) se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C. Una prueba de identificación bacteriana se realizó diariamente mediante el enchapado de la bacteria.

### Histopatología

50 [0175] Al final del experimento, las patas traseras se almacenaron en fijador de tejido. Las muestras se transfirieron a una solución de descalcificación. Las muestras de tejido se procesaron, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron calificadas por un histopatólogo calificado, ciego al diseño experimental, para que los signos de artritis incluyan inflamación, daño del cartílago articular y daño al hueso metafisario subyacente. Se utilizó un sistema de puntuación detallado (ver más abajo). Los datos fueron graficados (media  $\pm$  SEM). Se proporcionaron datos brutos y analizados, así como imágenes representativas.

60

65

**Tabla 1: Sistema de puntuación de histopatología**

5	Grado	Descripción
<b>Inflamación</b>		
10	0	Articulación normal
	1	Hiperplasia sinovial leve con inflamación dominada por neutrófilos. Bajos números de neutrófilos y macrófagos en el espacio articular.
15	2	Hiperplasia sinovial con inflamación moderada a marcada que involucra neutrófilos y macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio articular; pueden ser algunos restos de tejido necrótico.
	3	Hiperplasia sinovial con marcada inflamación que involucra neutrófilos y macrófagos. Pérdida de revestimiento de sinoviocitos. La inflamación puede extenderse desde la sinovial al tejido circundante, incluido el músculo. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio articular, junto con importantes restos de tejido necrótico.
<b>Daño del cartílago articular</b>		
20	0	Articulación normal
	1	El cartílago articular muestra solo un cambio degenerativo leve. La formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente.
	2	El cartílago articular muestra un cambio degenerativo moderado y pérdida focal. La formación de Pannus está presente focalmente.
	3	Interrupción significativa y pérdida de cartílago articular con formación extensa de pannus.
<b>Daño al hueso metafisario subyacente</b>		
25	0	Articulación normal
	1	Sin cambios en el hueso metafisario subyacente.
	2	Puede ser necrosis focal o fibrosis del hueso metafisario.
	3	Interrupción o colapso del hueso metafisario. Inflamación extensa, necrosis o fibrosis que se extiende hasta el espacio medular de la metáfisis.

**Resultados y análisis****Supervivencia y observaciones clínicas no específicas**

35 [0176] Algunos animales fueron sacrificados antes del final programado del estudio debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis o debido a la gravedad de las observaciones clínicas no específicas.

40 [0177] Un animal en el Grupo 1 (tratado con vehículo) fue sacrificado durante el período de pretratamiento (Día -14 a Día 0 - el animal llegó del proveedor con la pierna rota).

45 [0178] Siete animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis: cinco animales en el grupo 1 (con vehículo) y dos animales del grupo 3 (bioterapéutico nº 830-tratado).

50 [0179] Seis animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos no específicos incluyendo postura anormal (encorvada), condición del pelaje anormal (piloerección), los niveles de actividad anormales (reducción de la actividad): tres animales del Grupo 1 (tratado con vehículo) y tres animales en el Grupo 3 (bioterapéutico nº 830 tratado).

**Pesos corporales**

55 [0180] Los datos de peso corporal registrados desde el día -14 hasta el día 0 y expresados como un porcentaje de los pesos corporales iniciales (día -14) se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples con el día -14 y luego para comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 19. Datos de animales sacrificados antes del final programado del experimento fueron excluidos de los análisis.

60 [0181] En comparación con el día -14, las administraciones dos veces al día por sonda oral indujeron una pérdida de peso corporal significativa en el grupo tratado con vehículo el día -9 y el día -7 y en el grupo 3 (tratado con bioterapéutico nº 830) el día -11 y día -9.

65 [0182] Los datos de peso corporal registrados desde el día 0 hasta el día 28 y expresados como un porcentaje de los pesos corporales iniciales (día 0) se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples con el día 0 en el grupo de vehículos y luego para comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 20. Los datos de animales sacrificados antes del final programado del experimento y de los animales satélite se excluyeron de los análisis. Los datos del día 28, día 35 y día 42 se analizaron adicionalmente mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para

realizar comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo.

[0183] La aparición de signos clínicos de artritis se asoció con una pérdida de peso corporal significativa el día 26 y el día 28 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el día 0 en el grupo tratado con vehículo.

[0184] En comparación con el grupo tratado con vehículo, los pesos corporales fueron significativamente mayores en el Grupo 3 (bioterapéutico nº 830) tratado el día 28 ( $<0,005$ ).

#### Observaciones clínicas

[0185] Los datos de la puntuación clínica se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparaciones múltiples entre días en el grupo tratado con vehículo y luego para comparaciones múltiples entre grupos experimentales y el grupo tratado con vehículo cada día. Los datos se presentan en la Figura 21. Los datos registrados de animales sacrificados antes del final del experimento se excluyeron del análisis. Cuando los animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de artritis, se informó la última puntuación registrada para los días siguientes y se utilizó en los análisis estadísticos.

[0186] Se observó un aumento significativo de las puntuaciones clínicas en el grupo tratado con vehículo desde el día 28 hasta el día 45 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el día 21.

[0187] Bioterapéutico nº 830 indujo una reducción de las puntuaciones clínicas en comparación al grupo tratado con vehículo desde el día 28 hasta el día 45. La reducción fue estadísticamente significativa el día 31 y el día 45 ( $p < 0,05$ ).

#### Análisis de proliferación celular

[0188] Para validar el ensayo, se cultivaron esplenocitos en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 solubles (antiCD3/CD28) como estímulos de control positivo para confirmar el potencial proliferativo de las células.

[0189] Se observaron fuertes respuestas proliferativas a anti-CD3/CD28 en todos los grupos experimentales, mostrando que las células eran sanas, viables y capaces de responder a las señales de activación.

[0190] Para probar la respuesta proliferativa en presencia de colágeno II (CII), se cultivaron esplenocitos en presencia de CII a 50 µg/ml. La respuesta proliferativa de esplenocitos a CII se analizó mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Sydak para comparaciones múltiples entre esplenocitos no estimulados y estimulados por CII y ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparar la respuesta estimulada por CII en diferentes grupos experimentales con grupo tratado con vehículo. Los datos se presentan en la Figura 22.

[0191] CII induce un aumento muy significativo de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina (cpm) en comparación con los esplenocitos no estimulados en el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,0001$ ).

[0192] Los grupos tratados con bioterapéutico nº 830 demostraron niveles significativamente más bajos de proliferación de esplenocitos inducida por CII que el grupo tratado con vehículo.

#### Niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de tejidos

[0193] Los niveles de cada citocina se midieron en sobrenadantes de cultivo de tejidos derivados de cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 por análisis luminex. Estos mostraron respuestas robustas para todas las citocinas medidas (los niveles medios en el grupo de vehículos fueron los siguientes: IL-4 = 6.406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10.987 pg/ml; IL-17A = 11.447 pg/ml; IFN- $\gamma$  = 15.581 pg/ml; TNF- $\alpha$  = 76 pg/ml).

[0194] Las siguientes secciones resumen los datos obtenidos de los cultivos estimulados con Colágeno II. En su caso, los análisis estadísticos de las diferencias entre los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de esplenocitos no estimulados y estimulados con CII se realizaron utilizando ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Sidak para comparaciones múltiples, mientras que se utilizó ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada por CII en grupos tratados con bioterapia con el grupo tratado con vehículo. No hubo diferencias significativas en los niveles de citoquinas entre los grupos en ambos casos. Esto probablemente se deba al pequeño tamaño de muestra utilizado ( $n = 3$ ).

[0195] Con el fin de presentar con mayor precisión la distribución de los datos para las citocinas con una difusión sustancial de los datos, estos se presentan como gráficos de dispersión.

[0196] Las medias grupales de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo de tejidos después de la estimulación con CII fueron <5pg/ml. Estos no se consideran biológicamente significativos y no se incluyen aquí. Las medias grupales de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes del cultivo de tejidos después de la estimulación estaban por debajo del límite de cuantificación.

### Niveles de sobrenadante de IFN- $\gamma$ (Figura 23)

[0197] Junto con IL-17, IFN- $\gamma$  es la principal enfermedad de conducción de citocinas en el modelo de la CIA. El diagrama de dispersión en la Figura 23 demuestra los niveles de IFN- $\gamma$  después de la estimulación con CII, siendo la mediana del grupo más alta para el grupo tratado con vehículo en comparación con el bioterapéutico.

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

[0198] Los niveles de IL-17A fueron de 50 pg/ml en cultivos estimulados con CII para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de esta citocina parecían ser más bajos en el grupo bioterapéutico en comparación con el tratado con el vehículo.

### Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

[0199] Los niveles de IL-10 en el grupo tratado con vehículo fueron 13 pg/ml y 2,1 pg/ml para cultivos estimulados con CII y de control de medios, respectivamente. Pueden esperarse niveles más altos de IL-10 (que es una citocina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo porque la inflamación y la inducción de citocinas proinflamatorias podrían estar acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatorio.

### Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

[0200] Las citocinas inflamatorias tales como IL-6 y TNF- $\alpha$  no se producen típicamente a niveles altos en cultivos anti-CII. Sin embargo, sus niveles pueden verse alterados como resultado de la modulación inmune. Los niveles de IL-6 en cultivos estimulados con CII fueron modestos, alcanzando 10 pg/ml. Aunque mayor que en los cultivos de control de medios, estas diferencias fueron demasiado pequeñas para proporcionar una justificación para realizar análisis estadísticos.

### Análisis microbiológico

[0201] El crecimiento bacteriano se confirmó midiendo la densidad óptica a 600 nm usando un espectrofotómetro. La identidad bacteriana se confirmó comparando imágenes de placas rayadas con imágenes de referencia.

[0202] Siguiendo el método mejorado de preparación bacteriana, se administraron consistentemente altas dosis de cepa bacteriana del día -2 y del día -3 como lo indican los altos valores de OD medidos.

[0203] Se recogieron muestras fecales y se congelaron rápidamente el día 14, día 0 y al final.

### Histopatología

[0204] Los resultados de histopatología se muestran en las Figuras 65-69. Como se esperaba para este modelo, se observó variabilidad intraindividual e interindividual en términos de la presencia/ausencia de artritis o la gravedad del cambio presente.

[0205] La naturaleza de la patología fue la esperada para este modelo, con una extensa inflamación crónica activa de la membrana sinovial y la bolsa que se extiende para involucrar los tejidos blandos periarticulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico). En las articulaciones más severamente afectadas, hubo degeneración y pérdida de cartílago articular con restos intraarticulares e inflamación, y alteración de la estructura articular y ósea por fibrosis e inflamación.

[0206] La incidencia de los cambios histopatológicos fue: vehículo - 80% (16/20); Bioterapéutico nº 830 - 20% (4/20). El tratamiento con Bioterapéutico nº 830 redujo la incidencia de puntajes histopatológicos en las extremidades posteriores del ratón en comparación con el grupo tratado con vehículo (ver Figuras 65-68). Los puntajes de histopatología se analizaron mediante ANOVA unidireccional para datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) seguido de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples con el grupo tratado con vehículo.

[0207] Bioterapéutico nº 830 indujo una reducción significativa de los puntajes de inflamación articular observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,01$ ). Bioterapéutico nº 830 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño de cartílago observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,001$ ). Bioterapéutico nº 830 indujo una reducción significativa de los puntajes de daño óseo observados en histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,001$ ). Bioterapéutico nº 830 indujo una reducción significativa de las puntuaciones totales de histopatología en comparación con el grupo tratado con vehículo ( $p < 0,001$ ).

### Resumen

[0207] Se observaron puntuaciones clínicas aumentadas desde el día 28 después de la primera administración de colágeno tipo II, como se esperaba en este modelo de artritis en ratones DBA/1. Bioterapéutico nº 830 demostró ser

eficaz en el tratamiento de la artritis en este modelo. Bioterapéutico nº 830 fue efectivo para reducir la severidad de los puntajes clínicos y para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, como se demostró en el análisis histopatológico.

- 5 [0208] Respuestas proliferativas de memoria al colágeno II se observaron en cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. La respuesta específica de colágeno se redujo significativamente después del tratamiento con bioterapéutico nº 830 (Grupo 3).
- 10 [0209] La mayoría de las citocinas de células T probadas mostraron aumentos detectables entre los controles estimulados con Colágeno II y los medios en el grupo tratado con Vehículo. Estos aumentos no fueron tan obvios en el grupo tratado con bioterapia. Esto apoya ampliamente las respuestas de recuerdo proliferativo al Colágeno II descritas anteriormente.
- 15 [0210] Hubo evidencia de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patogénica en este modelo y en la AR humana. La correlación de niveles reducidos de citocinas con proliferación reducida sugiere una modulación inmune. No hubo evidencia de que esta modulación fuera resultado de niveles mejorados de IL-4 asociada a Th2 o de aumentos en la citocina inmunomoduladora, IL-10.

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

25 [0211] Los ratones probados en el Ejemplo 1 fueron sometidos a análisis adicionales para caracterizar aún más el efecto de las composiciones de la invención sobre la alergia respuesta inflamatoria al asma.

30 **Materiales y métodos**

[0212] **Extracción de sangre y preparación de suero en el día 14.** Se recogieron muestras de sangre de animales mediante punción cardíaca. El suero se aisló de la muestra de sangre mediante centrifugación durante 5 minutos a 14000 g y se almacenó a -20°C.

35 [0213] **Extracción de órganos el día 14.** Recolección del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación rápida y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló rápidamente para el análisis de seguimiento.

40 **Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL**

[0214] La producción de anticuerpos IgG1 específicos para IgE total y ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en BAL y suero mediante ensayo ELISA.

45 **Aislamiento de pulmón y análisis histológico**

[0215] Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y producción de moco. La infiltración inflamatoria se calificó con el siguiente sistema de clasificación:

- 50 0 – normal
- 55 1 - infiltrados inflamatorios leves
- 60 2 - infiltrados inflamatorios moderados
- 65 3 - infiltrados inflamatorios marcados
- 70 4 - infiltrados inflamatorios severos
- 75 5 - infiltrados inflamatorios muy severos

[0216] En cada campo de visión, las vías aéreas fueron medidas en tamaño y se cuantificaron los números de células mucosas/um.

80 **Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar**

[0217] Los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores

inflamatorios se congelaron rápidamente para la medición posterior de CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 y CCL5 por ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Resultados y análisis

[0218] Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 27-45.

10 [0219] En apoyo de los hallazgos descritos en el Ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido pulmonar de ratones tratados con la cepa 830 mostró una reducción notable y estadísticamente significativa en la puntuación media de inflamación (ver Figuras 31 y 33).

15 [0220] Se analizaron los niveles de anticuerpos en el fluido BAL y suero (ver Figuras 27-30). No se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de anticuerpos en suero. Esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaría. Además, los niveles basales de anticuerpos en suero podrían haber enmascarado cualquier cambio.

20 [0221] De manera similar, no se observó un efecto claro del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citoquinas en el tejido pulmonar (véanse las Figuras 35-45). Nuevamente, esto puede reflejar una falla en el experimento, porque la difusión de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaría. También es posible que el mecanismo de acción involucrado influya en las respuestas de citoquinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación.

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

[0222] Los ratones probados en el Ejemplo 2 se sometieron a análisis adicionales para caracterizar aún más el efecto de las composiciones de la invención sobre la respuesta neutrofílica asociada con asma severa

35 Materiales y métodos

[0223] **Extracción de órganos el día 18.** Recolección del lóbulo pulmonar izquierdo en formalina para el análisis histológico de seguimiento. Recolección de los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para congelación rápida y análisis de seguimiento. El fluido BAL restante se congeló rápidamente para el análisis de seguimiento.

40 [0224] **Medición de mediadores inflamatorios en tejido pulmonar (análisis de seguimiento).** Los lóbulos pulmonares derechos (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de mediadores inflamatorios se congelaron rápidamente para la medición posterior de IFNgamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 e IL-33 por ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 [0225] **Medición de los niveles de anticuerpos en suero y fluido BAL (análisis de seguimiento).** La producción de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para ácaros del polvo doméstico (HDM) se midió en el BAL y el suero mediante ensayo ELISA.

50 [0226] **Aislamiento de pulmón y análisis histológico (análisis de seguimiento).** Los lóbulos pulmonares izquierdos se fijaron en formalina seguido de incrustación en parafina, seccionamiento y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. La puntuación histológica posterior se realizó cegada de la siguiente manera: se puntuaron cinco campos de visión aleatorios por muestra para inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivasculares) y producción de moco. La infiltración inflamatoria se calificó con el siguiente sistema de clasificación:

60 0 – normal

60 1 - infiltrados inflamatorios leves

65 2 - infiltrados inflamatorios moderados

65 3 - infiltrados inflamatorios marcados

65 4 - infiltrados inflamatorios severos

5 - infiltrados inflamatorios muy severos

Resultados y análisis

5

**[0227]** Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 46-63.

10 **[0228]** En relación con los niveles de citoquinas, como para el Ejemplo 4, la propagación de datos y las barras de error para cada tratamiento son grandes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como se esperaría necesariamente. También es posible que el mecanismo de acción implique influir en respuestas de citocinas anteriores que ya no eran detectables en el día 4 después del desafío final de la vía aérea HDM. Se debe tener cuidado al interpretar los datos de citoquinas en el estudio actual, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad podría explicarse en parte por el hecho de que el tejido pulmonar se separó para los diferentes análisis y, por lo tanto, un lóbulo pulmonar podría no haber sido totalmente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. A pesar de esta variabilidad, se mostró un claro efecto antiinflamatorio sobre los niveles de citoquinas para la cepa 830, y el control positivo de Ab anti-IL-17 se comportó generalmente como se esperaba.

15 **[0229]** Con las advertencias anteriores, los datos en la Figura 53 sugieren que el tratamiento con la cepa 830 puede lograr una reducción en los niveles de TNF $\alpha$ , lo que puede ser indicativo de un mecanismo de acción relacionado con las influencias en la liberación de quimiocinas (y, por lo tanto, el reclutamiento de células) por células inmunes estromales o innatas. TNF $\alpha$  es parte de la vía Th17. Tomando este conjunto de datos juntos, se puede concluir que la cepa 830 tuvo un efecto beneficioso sobre el mecanismo de inflamación en este modelo de ratón de asma neutrofílica severa.

20

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

Resumen

25 **[0230]** Los ratones se administraron con composiciones que comprenden cepas bacterianas según la invención y los ratones se inmunizaron posteriormente con glucoproteína oligodendrocítica de mielina para inducir encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). EAE es el modelo experimental más utilizado para la esclerosis múltiple humana. Se encontró que las composiciones de la invención tienen un efecto sorprendente sobre la incidencia y la gravedad de la enfermedad.

30

Cepa

**[0231]** 830: bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 43281

35 **Diseño del estudio**

**[0232]** Grupos:

- 40 1. Grupo de control negativo. Tratamiento con control del vehículo (por vía oral).  
 45 5. Tratamiento con inóculo bacteriano terapéutico cepa 830 (por vía oral).  
 9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).  
 10. Grupo de control no tratado.

50 Número de ratones por grupo = 10

55 Días -14 a día 27: administración diaria del control del vehículo por vía oral (grupo 1).  
 Días -14 a día 27: administración diaria de inóculo terapéutico de bacterias por vía oral (Grupo 5).  
 Días 0-28: administración de Dexametasona (i.p.) tres veces por semana (Grupo 9)  
 Día 0: MOG35-55 (glucoproteína oligodendrocítica de mielina - 2 mg/ml) y CFA (MTB 2 mg/ml) se mezclaron 1:1 dando como resultado 1 mg/ml soluciones. Se inyectaron 100  $\mu$ l de la mezcla péptido-CFA por vía subcutánea en cada pata trasera. Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).  
 Día 1: Administración de toxina pertussis por vía intraperitoneal (300 ng).  
 Días 7 en adelante: medición de la incidencia y el peso de la enfermedad tres veces por semana.

60 **Criterios de valoración y análisis**

**[0233]** Se analizó la incidencia y la gravedad de la enfermedad en ratones tres veces por semana. La puntuación se realizó a ciegas. La gravedad de la enfermedad se evaluó utilizando una puntuación clínica que oscila entre 0 y 5, donde 5 indica un ratón muerto (ver el sistema de puntuación clínica a continuación).

65

Monitoreo

**[0234]** En los días indicados, se pesaron los ratones y se observó la puntuación de actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

5 **[0235]** Observaciones de puntuación de actividad de la enfermedad:

- 0 – No hay cambios obvios en la función motora en comparación con los ratones no inmunizados.
- 0,5 – La punta de la cola está floja.
- 1,0 – Cola coja.
- 10 1,5 – Cola coja e inhibición de la pata trasera.
- 2,0 – Cola coja y debilidad de las patas traseras
  - O - Hay signos obvios de inclinación de la cabeza cuando se observa la caminata. El balance es malo.
  - 2,5 – Cola coja y arrastrar las patas traseras.
  - O – hay una fuerte inclinación de la cabeza que ocasiona que el ratón se caiga ocasionalmente.
- 15 3,0 – Cola coja y completar la parálisis de las patas traseras.
- 3,5 – Cola coja y completar la parálisis de las patas traseras.
  - Además de: el ratón se mueve alrededor de la jaula, pero cuando se coloca de lado, no puede enderezarse.
  - Las patas traseras están juntas en un lado del cuerpo.
- 20 4,0 – Cola cojera, pata trasera completa y parálisis parcial de la pata delantera.
- El ratón se mueve mínimamente alrededor de la jaula, pero parece alerta y se alimenta
- 4,5 – Parálisis completa de la pata delantera trasera y parcial, sin movimiento alrededor de la jaula.
- El ratón se sacrifica inmediatamente y se retira de la jaula.
- 5,0 – El ratón se sacrifica debido a una parálisis severa.

25 **[0236]** Cuando un animal tiene una puntuación de actividad de la enfermedad igual o mayor de 1, se considera que tiene una puntuación de incidencia de enfermedad positiva.

#### Resultados

30 **[0237]** Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 70 y 71.

**[0238]** La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo fue exitosa con puntuaciones altas mostradas por el control del vehículo y el control no tratado. El efecto del tratamiento con la cepa 830 fue sorprendente y los ratones tratados con la cepa 830 exhibieron una incidencia y gravedad de la enfermedad notablemente reducidas. De hecho, la reducción en la incidencia y la gravedad de la enfermedad fue comparable al grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 830 puede ser útil para tratar o prevenir la esclerosis múltiple.

#### **Ejemplo 7 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de uveítis en ratones**

40 **Resumen**

**[0239]** Este estudio usó un modelo de ratón de uveítis inducida por proteína de unión a retinoide interfotorreceptor (IRBP) para probar los efectos de la administración bacteriana en la uveítis. La uveítis es una afección que pone en peligro la vista como resultado de la inflamación intraocular y la destrucción del tejido retiniano. Esta enfermedad puede estudiarse en roedores en un modelo de uveoretinitis autoinmune experimental (EAU) [70]. La EAU es un trastorno específico de un órgano en el que las células Th1/Th17 se dirigen hacia los antígenos de la retina y producen citocinas que activan las células mononucleares residentes e infiltrantes que conducen a la destrucción del tejido. La EAU se puede inducir en ratones mediante desafío con antígenos retinianos, incluido el péptido de proteína de unión a retinoide interfotorreceptor (IRBPP). El inicio de la enfermedad normalmente ocurre desde el día 8-9 y alcanza su punto máximo después de los días 14-15. Los signos de enfermedad clínica pueden controlarse mediante imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).

#### Presion

55 **[0240]** MRX008: *Blautia wexlerae*, bacterias depositadas con el número de acceso NCIMB 42486.

**[0241]** Se proporcionó bioterapéutico en reserva de glicerol. Se utilizaron medios de crecimiento microbiológicos (YCFA) para el cultivo del agente

60 **Ratones**

**[0242]** Los ratones fueron cepa C57BL/6 y tenían más de 6 semanas de edad al comienzo del estudio. Se utilizaron 72 ratones (+ 36 animales satélite). Animales no saludables fueron excluidos del estudio. Los animales se alojaron en condiciones específicas libres de patógenos (spf), en una sala de retención controlada termostáticamente ( $22 \pm 4^\circ\text{C}$ ). Se permitió que los animales se aclimataran en condiciones estándar de casa de animales durante un mínimo de una semana antes de su uso. El estado de salud de los animales se controló durante este período y se evaluó la idoneidad

de cada animal para uso experimental antes del inicio del estudio. Los ratones fueron alojados en grupos de hasta 10 animales por jaula durante la duración del estudio. La dieta de gránulos irradiada (dieta de laboratorio, dieta de roedores EU 22%, 5LF5) y agua estuvieron disponibles ad libitum durante los períodos de aclimatación y estudio. Es poco probable que algún componente de la dieta o el agua interfiera con el estudio.

5 [Esquema experimental](#)

10 [0243] Se asignaron aleatoriamente ratones adultos C57BL/6 a grupos experimentales y se les permitió aclimatarse durante una semana. Los tratamientos se administraron de acuerdo con el programa a continuación. El día 0, se administró a los animales una emulsión que contenía 200 µg de péptido de proteína de unión a retinoide interfotorreceptor 1-20 (IRBP p1-20) en adyuvante completo de Freund (CFA) suplementado con 2,5 mg/ml de *Mycobacterium Tuberculosis* H37 Ra mediante inyección subcutánea. También en el día 0, los animales fueron administrados con 1,5 µg de toxina de *Bordetella Pertussis* por inyección intraperitoneal. Desde el día 14, los animales se pesan tres veces por semana. Desde el día -1 hasta el final del experimento en el día 42, los animales se controlan dos veces por semana para detectar signos clínicos de uveítis utilizando imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).

15

[Programa de administración](#)

20 [0244] Todos los grupos son n = 12

[0245] El vehículo para la administración oral es medio YCFA.

[0246] Volumen de administración para la administración oral dos veces al día es de 5 ml/kg.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Ruta	Frecuencia	Inducción de enfermedad
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID	Día 0: IRBP/CFA, SC
2	MRX008	5 ml/kg		Día -14-Final	Día 0: PTx, IP

30 PO: administración oral, BID: dos veces al día, SC: inyección subcutánea, IP: inyección intraperitoneal, IRBP: proteína de unión al interfotorreceptor, CFA: adyuvante completo de Freund, PTx: toxina de Pertussis

35 [0247] También se probó un grupo de control positivo usando tratamiento con el fármaco ciclosporina A.

[Lecturas](#)

40 [0248] **Pesos corporales.** Desde el día 14, los animales se pesan tres veces por semana. Los animales con una pérdida de peso corporal igual o superior al 15% de su peso corporal inicial (Día 0) en dos ocasiones consecutivas son sacrificados.

45 [0249] **Observaciones clínicas no específicas.** Desde el día 14 hasta el final del experimento, los animales se controlan diariamente para detectar signos clínicos inespecíficos que incluyan postura anormal (encorvado), condición anormal del pelaje (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o aumentada).

50 [0250] **Puntuaciones clínicas: formación de imágenes de retina por imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).** Desde el día -1 hasta el final del experimento, los animales se puntuán dos veces por semana para detectar signos clínicos de uveítis. Las imágenes retinianas se capturan usando TEFI en animales no anestesiados pero restringidos después de la dilatación de la pupila usando Tropicamida al 1% y luego Clorhidrato de Fenilefrina al 2,5%. Las imágenes retinianas son puntuaciones usando el siguiente sistema. La puntuación acumulativa máxima es 20.

55

60

65

Puntuación	Inflamación de disco óptico	Vasos retinianos	Infiltración de tejido retiniano	Daño estructural
5	1 Mínimo	1-4 puños suaves	1-4 lesiones pequeñas o 1 lesión lineal	Lesiones o atrofia retinianas que involucran $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ del área retiniana
10	2 Templado	>4 manguitos suaves o 1-3 manguitos moderados	5-10 lesiones pequeñas o 2-3 lesiones lineales	Atrofia panretiniana con múltiples lesiones pequeñas (cicatrices) o $\leq 3$ lesiones lineales (cicatrices)
15	3 Moderar	>3 puños moderados	>10 lesiones pequeñas o >3 lesiones lineales	Atrofia panretiniana con >3 lesiones lineales o lesiones confluentes (cicatrices)
20	44 Grave	>1 puños severos	Lesión lineal confluente	Desprendimiento de retina con plegado
	55 No visible (blanqueamiento o desprendimiento grave)			

## Resultados

**[0251]** Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 72-74.

**[0252]** **Proliferación celular (animales satélite, día 21).** Se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes (DLN) y se aislaron células. Después de contar, las células se cultivaron durante 72 h en presencia o ausencia de péptido IRBP. Los sobrenadantes para el análisis de citocinas se eliminaron antes de pulsar con 3H-timidina. Luego, las células se cultivaron durante 18 h más antes de la recolección y la determinación de la proliferación mediante la incorporación de 3H-timidina usando un contador beta.

**[0253]** Los grupos mostraron proliferación celular al estímulo IRBP anterior al observado en los pocillos de control de medios (estos valores de fondo se restaron del resultado IRBP para proporcionar datos como  $\Delta\text{cpm}$ ). Ambos grupos dieron fuertes respuestas proliferativas a un estímulo de control positivo (anti-CD3/CD28) mostrando que las células en cultivo eran viables y capaces de proliferar (datos no mostrados).

**[0254]** Las respuestas proliferativas al péptido IRBP se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparar las respuestas estimuladas en el grupo experimental con el grupo control.

**[0255]** Las respuestas proliferativas al péptido IRBP en animales de control de la enfermedad fueron de la magnitud esperada para este modelo. El fármaco de control positivo, Ciclosporina A, redujo la proliferación, aunque esta reducción no alcanzó significación estadística (Figura 72).

**[0256]** Los grupos de tratamiento (incluyendo el vehículo solo) mostraron aumento de la proliferación significativamente no por encima de la observada en los animales de control.

**[0257]** Las respuestas proliferativas al péptido IRBP se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett para comparar las respuestas estimuladas en grupos de tratamiento con el grupo vehículo. No se observaron diferencias estadísticas.

**[0258]** **Puntuaciones clínicas: formación de imágenes de retina mediante imágenes de fondo endoscópico tópico (TEFI).** Los datos de las puntuaciones TEFI medidos en el grupo de control desde el día 0 hasta el día 21 se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos seguidos de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples entre días experimentales.

**[0259]** La administración de IRBP indujo un aumento significativo en las puntuaciones de TEFI medidas desde el día 14 ( $p < 0,01$ ) y el día 21 ( $p < 0,0001$ ) en comparación con el día 0 en el grupo de control (Figura 73).

**[0260]** Los datos de las puntuaciones de TEFI medidos en todos los grupos experimentales en el día 21 se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos seguidos de la prueba posterior de Dunn para comparaciones múltiples entre grupos experimentales.

**[0261]** En esta etapa del experimento, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales, pero las puntuaciones de TEFI fueron más bajas en el grupo tratado con MRX008 que en los grupos de control negativo. De hecho, las puntuaciones de TEFI fueron más bajas en el grupo tratado con MRX008 que en el grupo de control positivo tratado con ciclosporina A.

5 [0262] **Conclusiones.** Se observaron respuestas proliferativas al péptido IRBP en cultivos de ganglios linfáticos de todos los grupos experimentales, excluyendo animales ingenuos, lo que indica una inducción exitosa de la enfermedad. Las puntuaciones clínicas determinadas por TEFI aumentaron desde el día 14, como se esperaba en este modelo de uveítis inducida por IRBP. Para el día 21, las diferencias significativas entre los grupos experimentales aún no son visibles, pero se observó una reducción notable en la incidencia y gravedad de la enfermedad en el grupo tratado con MRX008, que fue una reducción mayor que la observada para el grupo de control positivo. En particular, estos datos indican que el tratamiento con la cepa MRX008 redujo el daño retiniano, la inflamación del disco óptico y/o la infiltración del tejido retiniano por las células inflamatorias (ver el sistema de puntuación de imágenes retinianas TEFI más arriba). Estos datos indican que la cepa MRX008 puede ser útil para tratar o prevenir la uveítis.

10 **Ejemplo 8 - Eficacia de los inóculos bacterianos de MKX006 en un modelo inflamatorio inducido por LPS - concentración reducida de citocinas**

15 Resumen

20 [0263] La cepa bacteriana MRX006 (830) se probó en un ensayo antiinflamatorio ( $n = 9$ ) para determinar su efecto sobre las concentraciones de citocina. La inflamación se indujo utilizando un desencadenante bien establecido de la respuesta inflamatoria, el lipopolisacárido (LPS). La magnitud y las características de la respuesta inflamatoria en los grupos tratados con MRX006 (830) se compararon con los grupos de control. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular, reducen la concentración de las citocinas IL-6 y TNF $\alpha$ . Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención tienen un fenotipo inflamatorio amplio y pueden ser útiles para tratar enfermedades inflamatorias, tales como neutrofilia y asma.

25 Resultados y análisis

30 [0264] Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 75 y 76.

35 [0265] Como se muestra en las Figuras 75 y 76, respectivamente, la administración de LPS provoca un aumento en los niveles de IL-6 y TNF $\alpha$ , como se esperaría después de la inducción de la inflamación. Es importante destacar que los niveles de estas citocinas se reducen significativamente en los grupos tratados con MRX006 (830). Por lo tanto, las composiciones de la invención reducen la concentración de citocinas inflamatorias y, por lo tanto, tienen un fenotipo antiinflamatorio amplio.

40 **Ejemplo 9 - Eficacia de inóculos bacterianos de MKX006 en un modelo inflamatorio inducido por LPS - maduración de células dendríticas derivadas por monocitos reducidos (Mo-DC)**

45 Resumen

50 [0266] La cepa bacteriana MRX006 (830) se probó en un ensayo antiinflamatorio que implica la detección del grado de maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DC). Estas células, particularmente las células CD1a+ CD14- como se usan en este ejemplo, están involucradas en la respuesta inflamatoria tras la maduración. La maduración de las células CD1a+ CD14- está indicada por su mayor expresión de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. Se encontró que las composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular, reducen la maduración de las células dendríticas asociadas con la respuesta inflamatoria (CD1a+ CD14-). Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades inflamatorias, tales como neutrofilia y asma.

55 Resultados y análisis

60 [0267] Los resultados del experimento se muestran en la Figura 77.

65 [0268] Como se muestra en la Figura 77, la administración de LPS provoca un aumento en la expresión de marcadores de maduración en los MoDC, como lo indica el cambio de la línea negra a la derecha del gráfico. Es importante destacar que el nivel de expresión de los marcadores de maduración se reduce en el grupo LPS tratado con MRX006 (como lo indica el desplazamiento de la línea de relleno negra a la izquierda). Para el grupo LPS + MRX006, el nivel de expresión de los marcadores inflamatorios CD80, CD83 y HLA-DR vuelve al nivel de expresión en el control no estimulado (línea discontinua). Además, el nivel de expresión de CD86 en el grupo LPS + MRX006 también se reduce considerablemente en comparación con el grupo LPS solo. Por lo tanto, las composiciones de la invención reducen el nivel de maduración de los MoDC asociados con la inflamación y, por lo tanto, tienen un fenotipo antiinflamatorio amplio.

70 **Ejemplo 10 - Eficacia de inóculos bacterianos en un modelo de ratón de modelo inflamatorio inducido por ovoalbúmina - división celular CD4+ reducida**

75 Resumen

5 [0269] La cepa bacteriana MRX006 (830) se probó en un ensayo inflamatorio adicional ( $n = 5$ ) que implica la detección del nivel de células CD4+. El aumento de los niveles de células CD4+ es un indicador de inflamación. Una de las razones de esto es que las células CD4+ están involucradas en las vías inflamatorias Th17 e IL-17. La inflamación se indujo utilizando un desencadenante bien establecido de la respuesta inflamatoria, ovoalbúmina. Se encontró que las 10 composiciones de la invención alivian la respuesta inflamatoria, y en particular reducen el número de células CD4+. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la invención pueden ser útiles para tratar enfermedades inflamatorias, tales como neutrofilia y asma.

#### Resultados y análisis

10 [0270] Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 78.

15 [0271] Como se muestra en la Figura 78, el número de células CD4+ en la población que experimenta tres o más divisiones celulares aumenta después del desafío con ovoalbúmina (como sería esperado ante una respuesta inflamatoria). Críticamente, el número de células sometidas a tres o más divisiones después del desafío con ovoalbúmina se reduce significativamente en los grupos tratados con MRX006. Por lo tanto, las composiciones de la invención reducen los niveles de células CD4+ y, por lo tanto, la invención puede ser útil para tratar enfermedades inflamatorias, como la neutrofilia y el asma.

20 **Ejemplo 11 - Ensayo de estabilidad**

25 [0272] Una composición descrita en este documento que contiene al menos una cepa bacteriana descrita en este documento se almacena en un recipiente sellado a 25°C o 4°C y el recipiente se coloca en una atmósfera que tiene 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 75%, 80%, 90% o 95% de humedad relativa. Despues de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, al menos 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la cepa bacteriana permanecerá medido en unidades formadoras de colonias determinadas por protocolos estándar.

#### Secuencias

30 [0273]

SEQ ID NO: 1 (*Blautia stercoris* cepa GAM6-1 16S gen de ARN ribosomal, secuencia parcial - HM626177)

```

35      1 tgcaagtcga gcbaagcgct tacgacagaaa cttcgaaaaa aagatgttaag ggactgagcg
       61 gcggacgggt gagtaacgcg tggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
      121 ggctgctaat accgcataag cgcacggat cgcatgatac agtgtgaaaaa actccggtgg
      181 tatgagatgg acccgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
      241 atcagtagcc ggcttgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gcccagactc
      301 ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggaa aaccctgtat cagcgcacg
      361 gcgtgaagga agaagtatct cggtatgtaa acttctatca gcagggaaaga aaatgacggt
      421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtagggggca
      481 agcgtttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgttagac ggaagagcaa gtctgtatgt
      541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag tgccggagag
      601 gtaagcggaa ttcttagtgtt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
      661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg agcaaacagg
      721 attagataacc ctggtagtcc acgcccgtaaa cgtatgatac taggtgttgg ggagcaaaagc
      781 tcttcgggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt cgcaagaatg
      841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgaa gcatgtggtt taattcgaag
      901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggAACCTTT
      961 ctttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt
     1021 gggtaagtc ccgcaacgag cgcaacccct atccctagta gccagcaggta gaagctggc
     1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgcacgtc aaatcatcat
     1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg aagcgagccc
     1201 gcgaggggaa gcaaataacgt cccagttcg actgcagtct gcaactcgcac
     1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtaa tacgttcccg
     1321 ggtcttgtac acaccgcccc tcacaccatg ggagttagta acgcccgaag tc

```

# ES 2 753 779 T3

SEQ ID NO: 2 (consenso 16S secuencia de ARNr para *Blautia stercoris* cepa 830)

5 TTTKGTCGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTGTAAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCTT  
CGGGGGAAAGATGTAAGGGACTGAGCGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGTAACCTGCCTCATACAGGGGATAACA  
GTTGAAACCGCTGCTAATACCGATAAGCGCACAGTATCGATGATACTAGTGTAAAAACTCCGGTGGTATGAGAT  
GGACCCCGCTGCTGATTAGCTAGTGGAGGGTAACGCCACCAAGGCACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA  
ACGCCACATTGGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGGGAAA  
10 CCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTGGTATGTAACCTTCTATCAGCAGGGAAAGAAAATGACGG  
TACCTGACTAAGAAGCCCCGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGTAGGGGCAAGCGTTATCCGGATT  
ACTGGGTGAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG  
AAACTGTTTTCTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA  
15 CACCACTGGCGAAGGCAGCTACTGGACGTTACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
ACCCGGTAGTCACGCCGTAACGATGAAACTAGGTGTTGGGAGCAAAGCTTCTCGGTGCCAGCAAACGCAA  
TAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGACCCGACAAGCGTGGAG  
CATGTGGTTATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTGACATCGATCTGACCGGTTGTAATGAAACCTT  
20 TCCTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAC  
CGAGCGCAACCCCTATCGTAGCCAGCAGGTAAGCTGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG  
AAGGCAGGGACGACGCTAAATCATCATGCCCTTATGATTGGCTACACACGTCGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG  
AAGCGAGCCCGCAGGGGGAGCAAATCCAAAATAACGTCGACTGAGCTGCAACTCGACTGCACGA  
25 AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGTCTGTACACACCGCCGTCAC  
ACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCCACCTAGGGAGGGAGCTGCCAGGGGATTGATAACTG  
GGGTGAAGTCTAGGGGGT

SEQ ID NO: 3 (cepa de *Blautia wexlerae* WAL 14507 16S gen de ARN ribosómico, secuencia parcial - EF036467)

30 1 caagtcaac gggattttt ttattgaaac ttccggcgat ttaatttaat tctagtggcg  
61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc  
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccgggtggat  
181 aagatggacc cgcgttggat tagcttggt gtggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc  
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attggactg agacacggcc cagactccta  
301 cgggaggcag cagtgggaa tattgcacaa tggggaaac cctgatgcag cgacgcccgc  
361 tgaaggaaga agtatctcg tatgtaaact tctatcagca gggaaatgatc tgacggtacc  
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgc gtaatacgtt gggggcaagc  
481 gttatccgaa tttactgggt gtaaaggag ctagacgggt gtggcaagtc ttagtggaaa  
541 ggcattggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttggatgc cggagggtt  
601 agcggattc ctatgttagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa  
661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttgc ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt  
721 agataccctg ttagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcacaaagcca  
781 ttcgggtccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacccggg agtacgttgc caagaatgaa  
841 actcaaagga attgacgggg acccgacaa gcggggagc atgtggttt attcgaagca  
901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgcacatc cgcctgaccg atccttaacc ggttccatcc  
961 ttcgggacag gcgagacagg tggtgcattt ttgtgcgt ctcgtgcgt gagatgttgg  
1021 gttaaatccc gcaacgcgcg caacccctat cctcgttgc cagcatat ggtggggact  
1081 ctggggagac tgccaggat aacccggg aaggcgaaa tgacgtcaaa tcatcatgcc  
1141 ccttgcatt tgggcacac acgtgttaca atggcgtaaa caaaggaaag cgagattgt  
1201 agatggagca aatccaaaaa ataacgtccc agttcgact gtagtctgc acccgactac  
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgccgat cagaatgccg cggtaatac gttcccggt  
1321 cttgtacaca cccggcgta caccatggg gtcagtaacg cccgaatca gtgaccta  
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

SEQ ID NO: 4 (consenso 16S secuencia de ARNr para la cepa *MRX008 de Blautia wexlerae*)

5 TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGGGACGGGTGAGTAACCGTGGTAACCTGCCTTAT  
 ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTAGTGTAAAAACTC  
 CGGTGGTATAAGATGGACCCCGTGGATTAGCTTGGTGGGTAACGGCCACCAAGGGACGATCCATAGCCG  
 GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTG  
 CACAATGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGTGAAGGAAGAAGTATCTGGTATGAAACTCTATCAGCAGG  
 10 GAAGATAGTGCAGGTACCTGACTAAGAAGCCCGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGCAAG  
 CGTTATCGGATTACTGGGTGAAAGGAGCGTAGACGGTGTGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGCTAACCT  
 GTGGACTGCATTGAAACTGTCATACTTGAGTGCAGGGTAAGCGGAATTCTAGTGTAGCGGTAAATGCG  
 TAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTACTGGACGGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG  
 15 GAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCAACGATGAATACTAGGTGTCNGGGAGCATGGCTT  
 TCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCCACCTGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC  
 GGGGACCCGACAAGCGGTGGCATGGTTAATTGAAGCAACGCAAGAACCTACCAAGTCTGACATCC  
 GCCTGACCGATCCTAACCGATCTTCCTCGGGACAGGCAGACAGGTGGTGCATGGTGTGTCAGCTCGT  
 20 TCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCACGAGCGAACCCCTATCCTAGTAGCCAGCATTAAGGTGGCACTC  
 TGGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTGGCT  
 ACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAGCGAGATCGTGGAGATGGAGCAAATCCAAAATAACGTCCA  
 25 GTTCCGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGAATCGCTAGTAATCGGGATCAGAATGCCCGTGA  
 ATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTACACCATGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAACT  
 GCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO: 5 (secuencia cromosómica de la cepa 830) - vea la lista electrónica de secuencias del documento WO2016/203218.

30 SEQ ID NO: 6 (secuencia del plásmido de la cepa 830) - ver el listado electrónico de secuencias del documento WO2016/203218

## REFERENCIAS

### 35 [0274]

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35.
- 40 [4] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- 45 [9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- 50 [14] Goldin y Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [17] Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [18] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 8):1896-902.
- 55 [19] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [20] Srutkova et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [21] Ye et al. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [22] Fabro et al. (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
- [23] Yin et al. (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
- 60 [24] Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.
- [25] Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
- [26] Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [27] Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [28] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
- 65 [29] Miossec y Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [30] Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.

- [31] Koenders et al. (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [32] Amedei et al. (2012) *Int J Mol Sci.* 13(10):13438-60.
- [33] Shabgah et al. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- 5 [34] Zhang (2015) *Inflammation.* Agosto 23.
- [35] Sun et al. (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
- [36] Mucientes et al. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
- [37] Jawad et al. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
- [38] Maya et al. (2014) *J. Ophthalmology.* 310329
- 10 [39] Chi et al. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
- [40] Chi et al. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
- [41] Luger y Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143.
- [42] Numasaki et al. (2003) *Blood.* 101:2620-2627.
- [43] Zhang et al. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 533-537.
- 15 [44] Karin (2006) *Nature.* 441: 431-436.
- [45] Faghih et al. (2013). *Iranian Journal of Immunology.* 10(4):193-204.
- [46] Numasaki et al. (2005) *J. Immunol.* 175: 6177-6189
- [47] Hammerich y Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol.* 7:297-306.
- [48] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 20 [49] Cryopreservation y Freeze-Drying Protocols, ed. by Day y McLellan, Humana Press.
- [50] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [51] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [52] Kailasapathy et al. (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- 25 [53] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2<sup>a</sup> Edición, (1994), Editado by A Wade y PJ Weller
- [54] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [55] Handbook of Microbiological Media, 4<sup>a</sup> Edición (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [56] Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [57] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- [58] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20<sup>a</sup> ediciòn, ISBN: 0683306472.
- 30 [59] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- [60] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [61] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [62] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ediciòn (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 35 [63] Handbook of Surface y Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [64] Ausubel et al. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5<sup>a</sup> ediciòn (Current Protocols).
- [65] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2<sup>a</sup> ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [66] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Suplemento 30
- 40 [67] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [68] Brand et al. (2007) *Nature Protocols.* 2(5):1269-1275
- [69] Jiao et al. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases.* 184(4):1085-93.
- [70] Caspi (2003) *Curr Protoc Immunol.* Capñitulo 15: Unidad 15.6

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*, para usar en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmune.

5 2. La composición para uso de la reivindicación 1, en donde la composición es para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en asma, tal como asma alérgica o asma neutrófila; artritis, tal como artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; esclerosis múltiple; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; enfermedad celíaca; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); uveítis escleritis vasculitis Enfermedad de Behcet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis rinitis alérgica; y rechazo de alijoíntero.

10 3. La composición para el uso de la reivindicación 2; en donde

15 (i) la composición es para usar en un método de tratamiento o prevención de asma, tal como asma neutrófila o asma alérgica, y en donde la composición es para usar en un método para reducir la neutrofilia o eosinofilia en el tratamiento del asma; o en donde

20 (ii) la composición es para usar en un método para tratar o prevenir la artritis reumatoide, y en donde la composición es para usar en un método para reducir la articulación hinchazón en la artritis reumatoide; o en donde

(iii) la composición es para usar en un método para tratar o prevenir la esclerosis múltiple, y la composición es para usar en un método para reducir la incidencia o gravedad de la enfermedad; o en donde

(iv) la composición es para usar en un método para tratar o prevenir la uveítis, y

25 la composición es para usar en un método para reducir o prevenir el daño retiniano en la uveítis.

30 4. La composición para uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición es para usar en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación de células Th17 en el tratamiento o prevención de la enfermedad inflamatoria o autoinmune.

35 5. La composición para uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición es para uso en un paciente con niveles elevados de IL-17 o células Th17.

40 6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5; en donde (a) la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia stercoris*; o en donde (b) la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 1 o 2; en donde según (b), preferiblemente la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 2, o la La cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO: 2.

45 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5; en donde (a) la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*; o en donde (b) la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 3 o 4; en donde de acuerdo con (b), preferiblemente la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,9% idéntica a la SEQ ID NO: 4, o la cepa bacteriana tiene la secuencia de ARNr 16s representada por SEQ ID NO: 4.

50 8. La composición para el uso de cualquier reivindicación precedente, en la que la composición es para administración oral; y/o en donde la composición comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables; y/o en donde la cepa bacteriana está liofilizada.

55 9. Un producto alimenticio o composición de vacuna que comprende la composición de cualquier reivindicación precedente, para el uso de cualquier reivindicación precedente.

60 10. Una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381; o una composición que comprende dicha célula, opcionalmente en la que la composición comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Un cultivo biológicamente puro de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381.

12. Una célula de la cepa *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, para su uso en terapia.

65 13. Una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486; o una composición

que comprende dicha célula, opcionalmente en la que la composición comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable

**14.** Un cultivo biológicamente puro de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486.

5

**15.** Una célula de la cepa *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486, para uso en terapia, opcionalmente en donde la célula es para uso en un método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

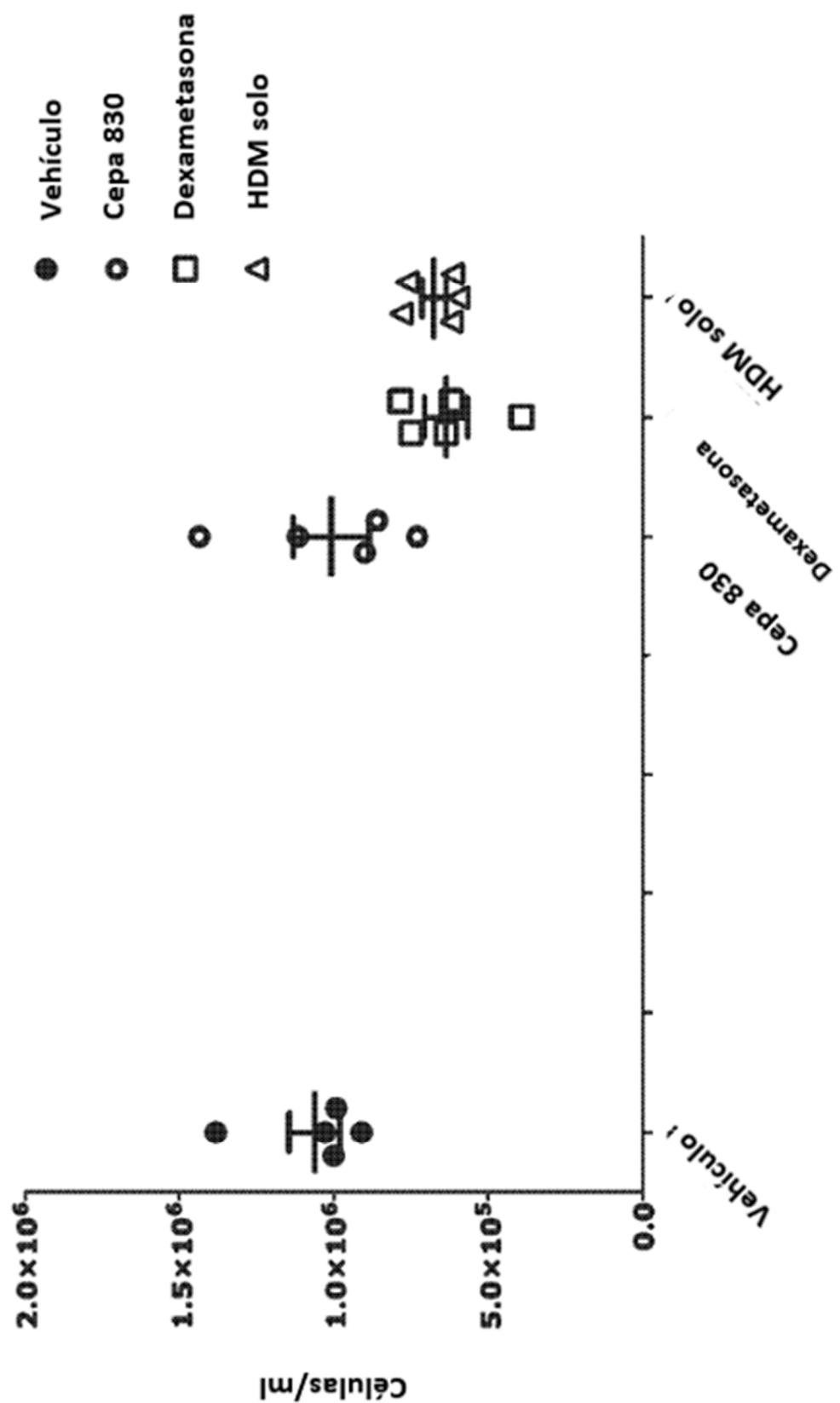
55

60

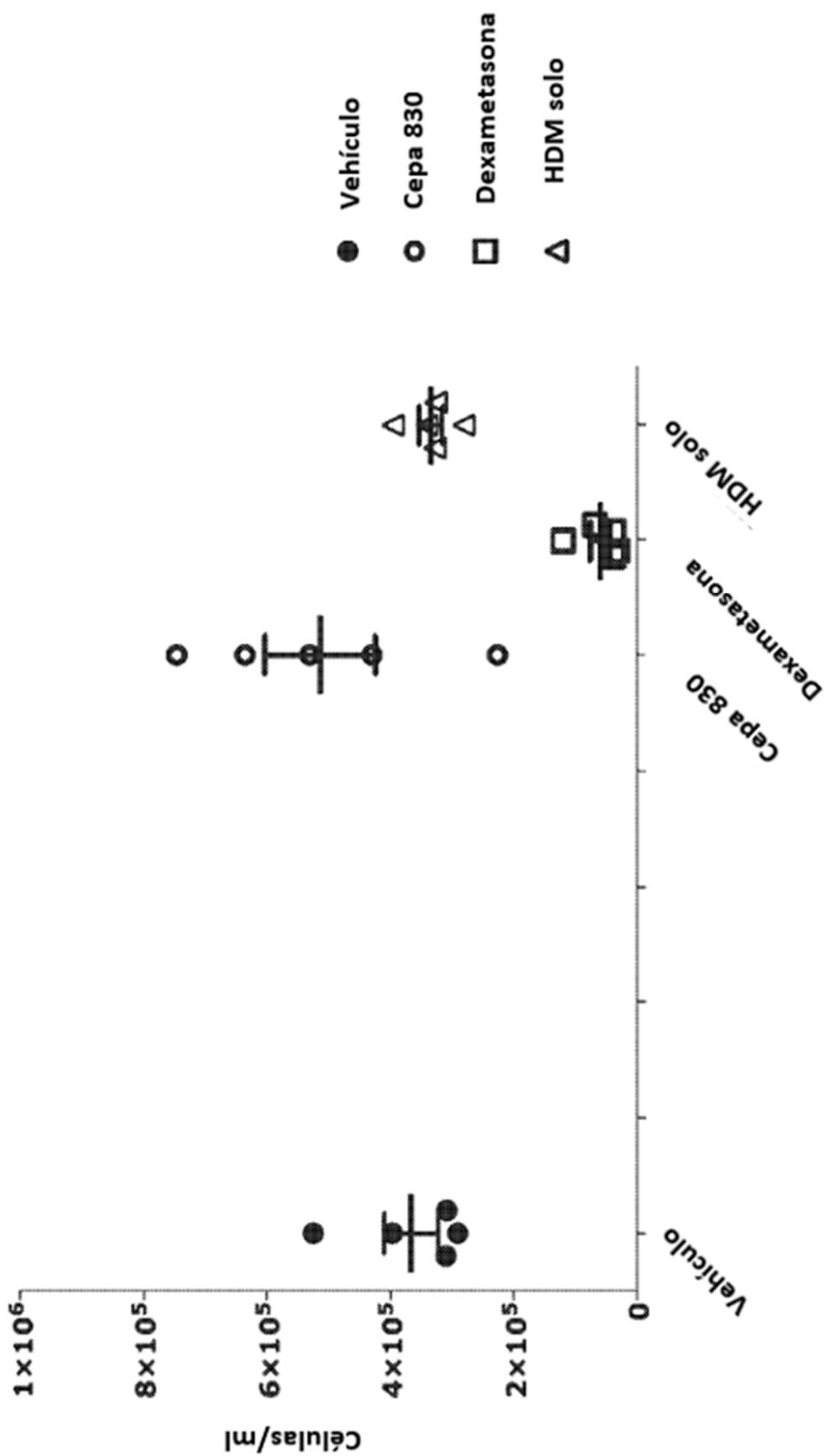
65

FIG. 1

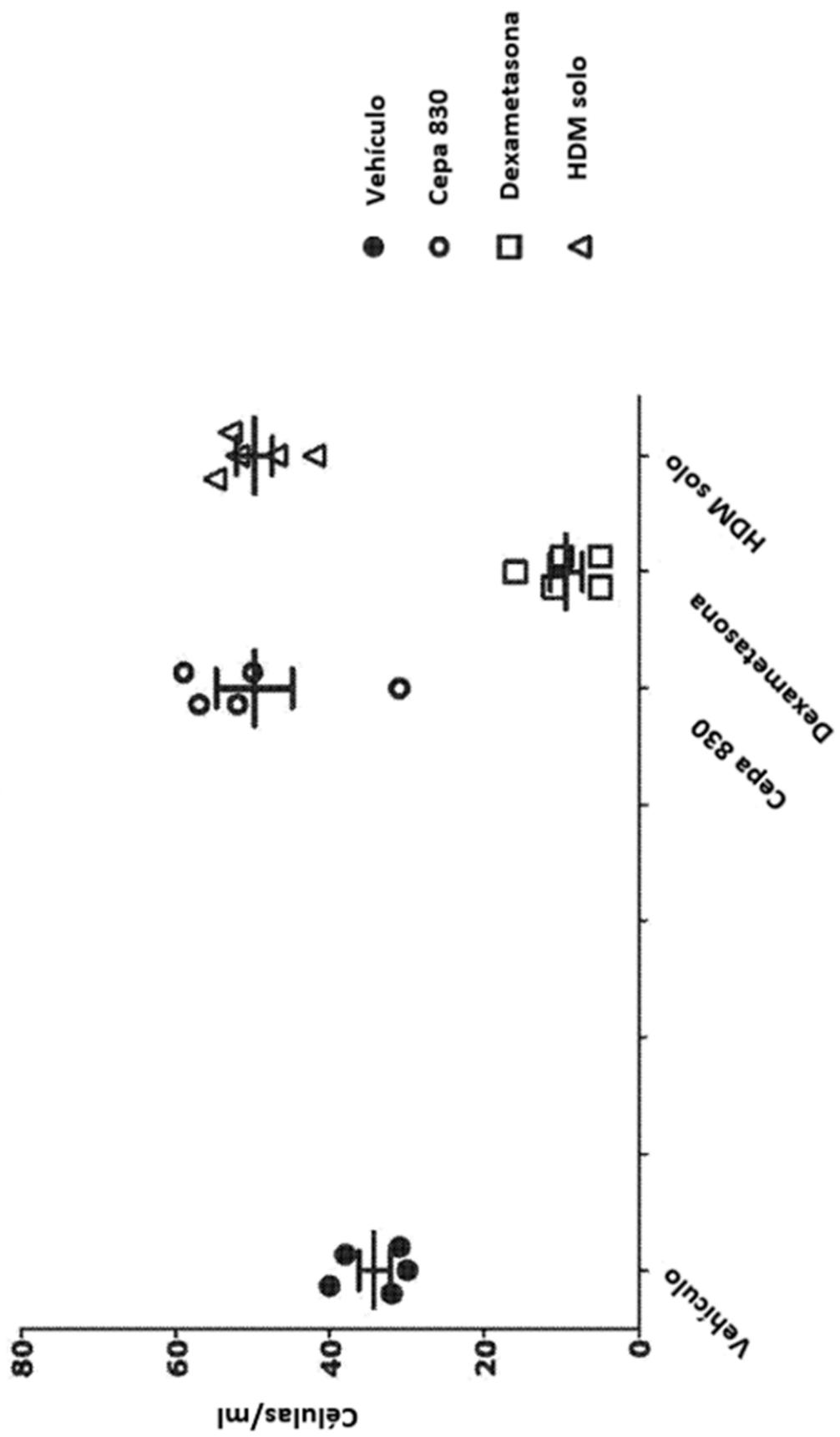
Recuento total de células



**FIG. 2**  
**Eosinófilos totales**



**FIG. 3**  
Eosinófilos %.



**FIG. 4**  
**Macrófagos totales**

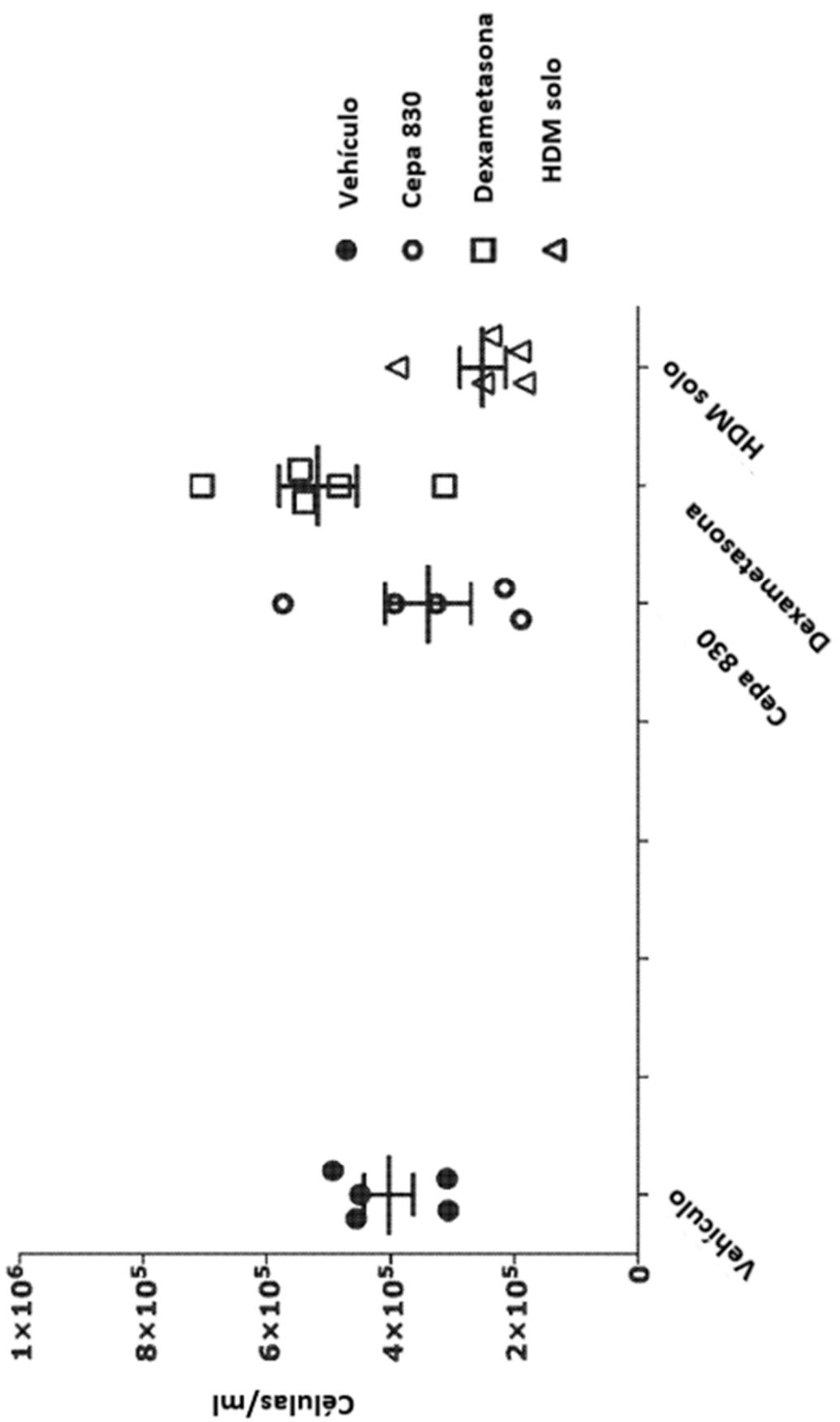
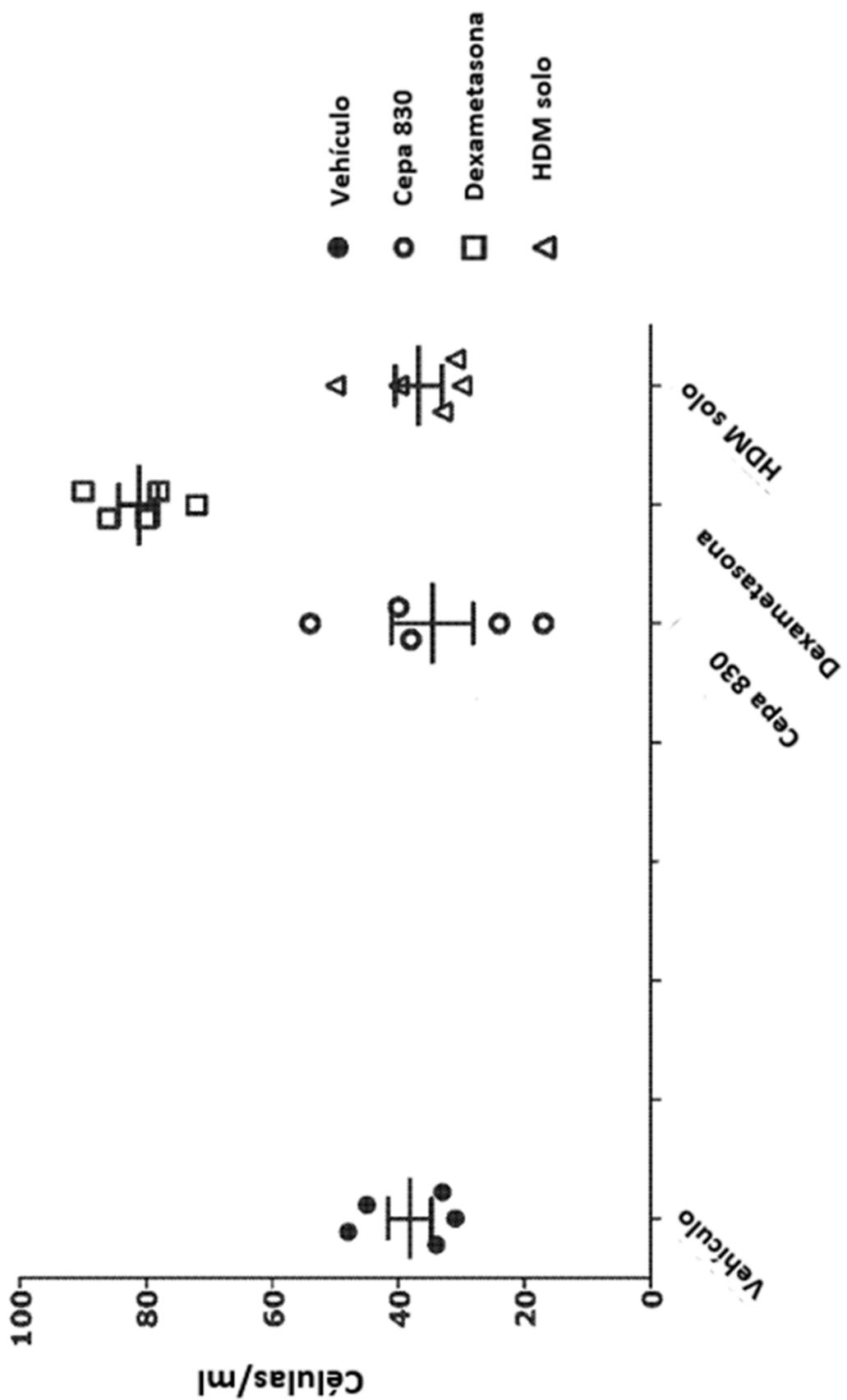


FIG. 5  
Macrófagos %.



**FIG. 6**  
Neutrófilos totales.

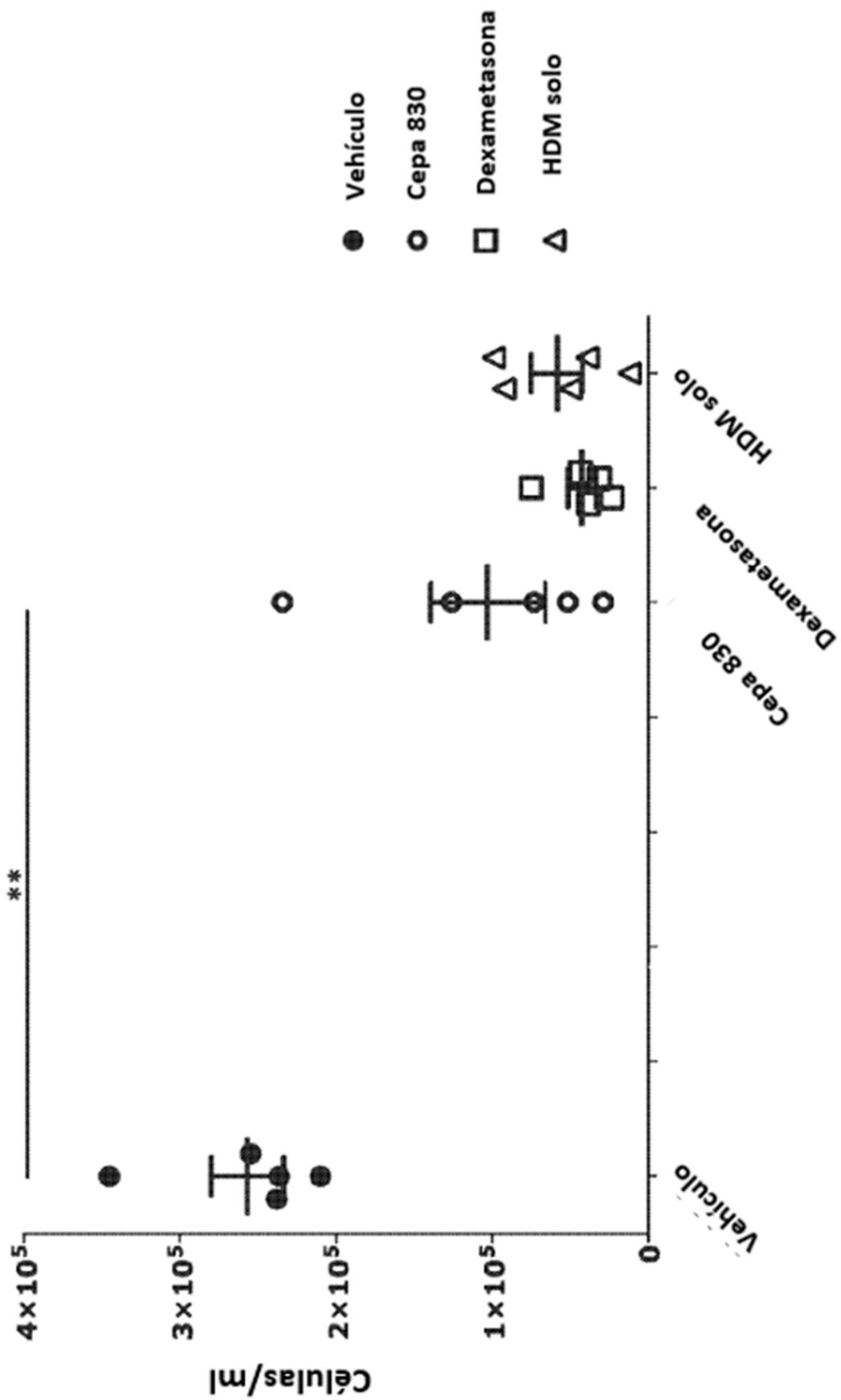


FIG. 7  
Neutrófilos %.

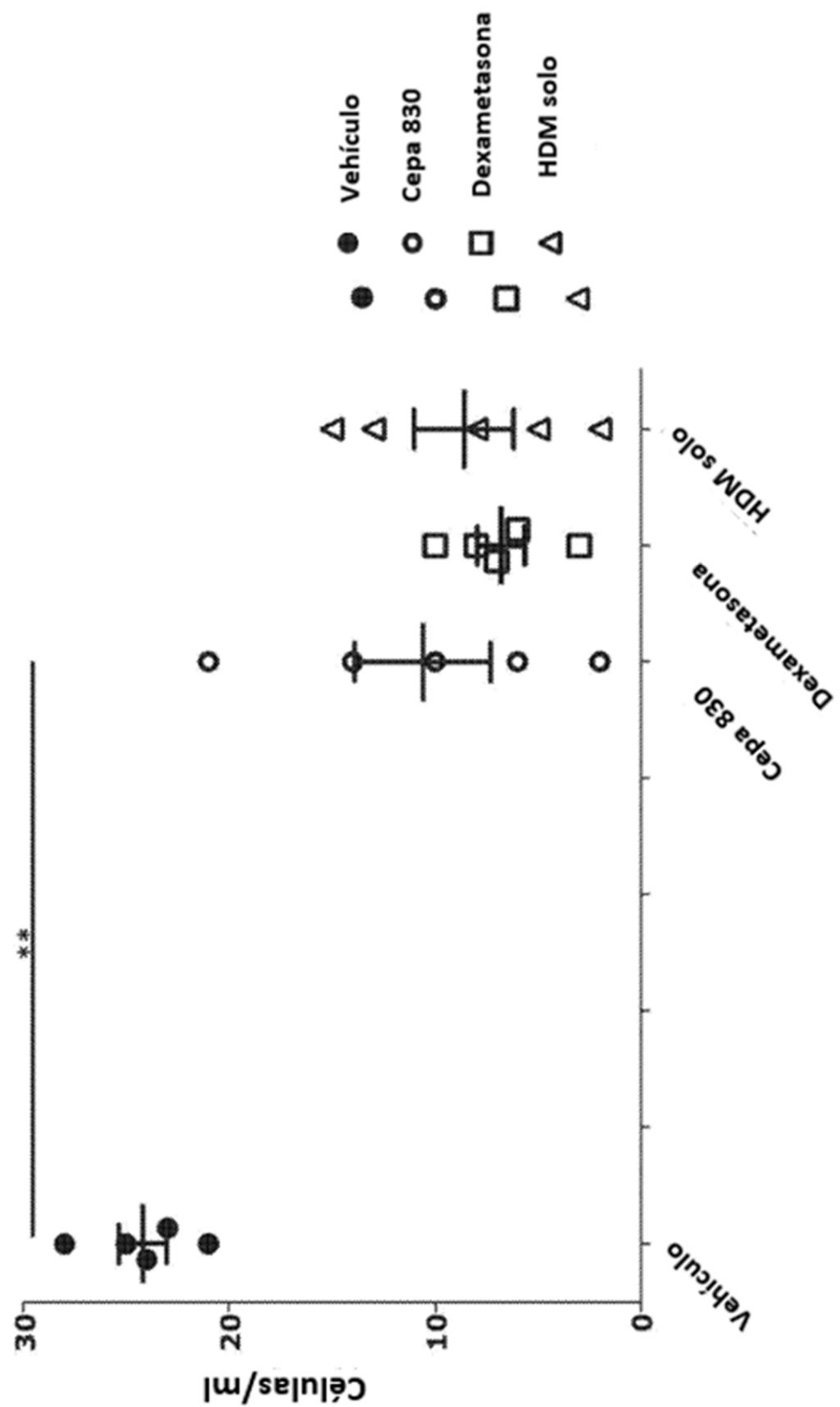


FIG. 8  
Linfocitos totales.

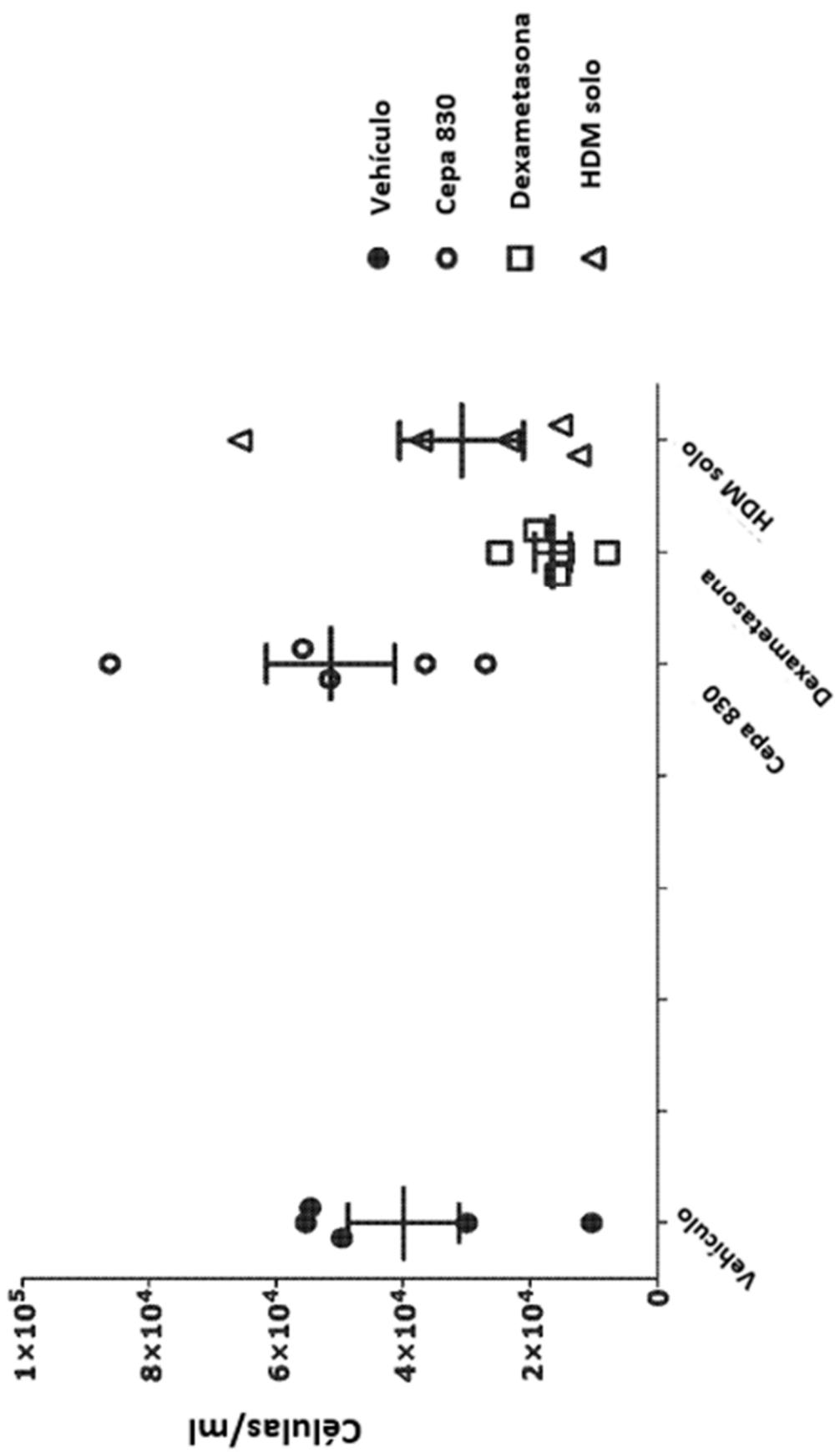
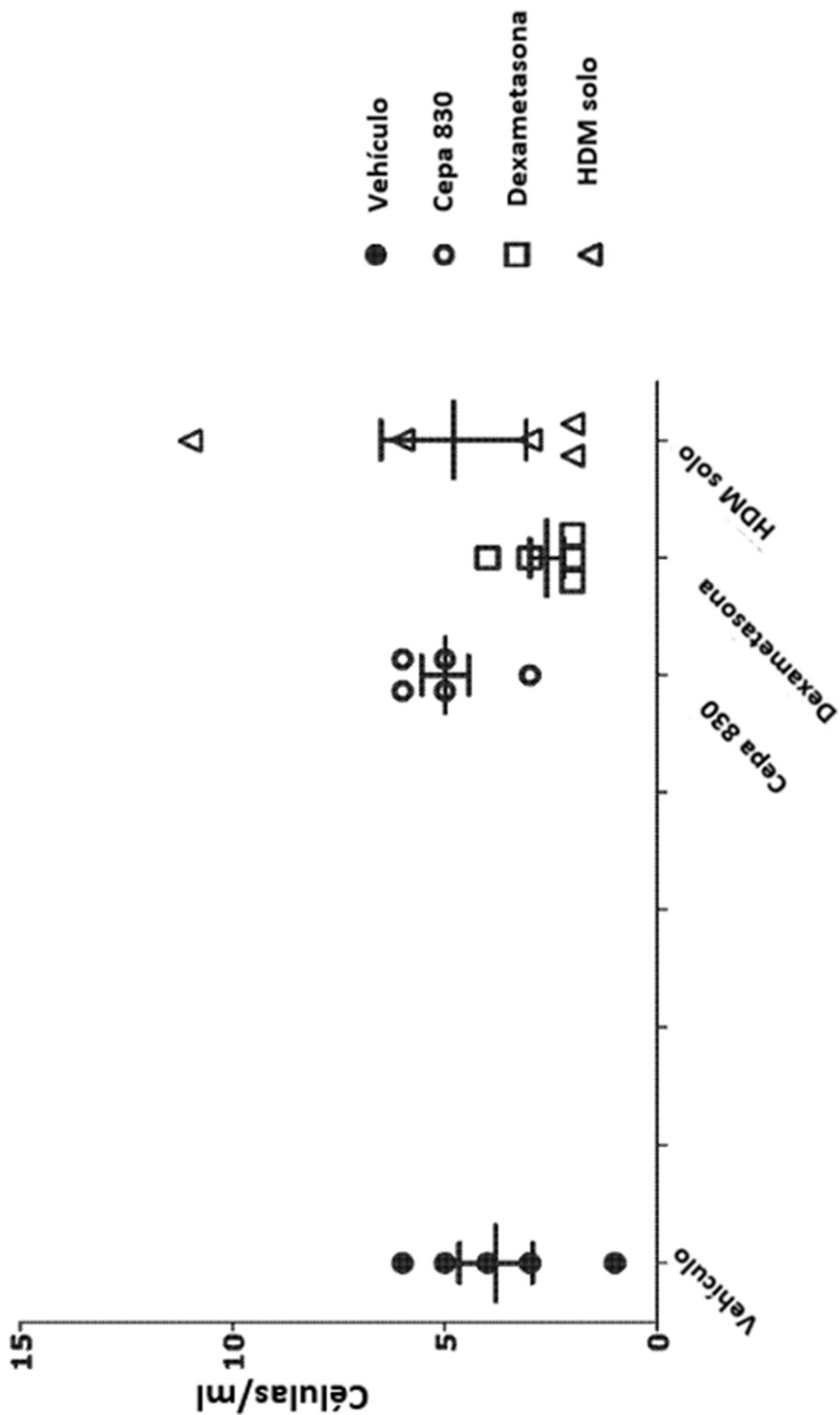
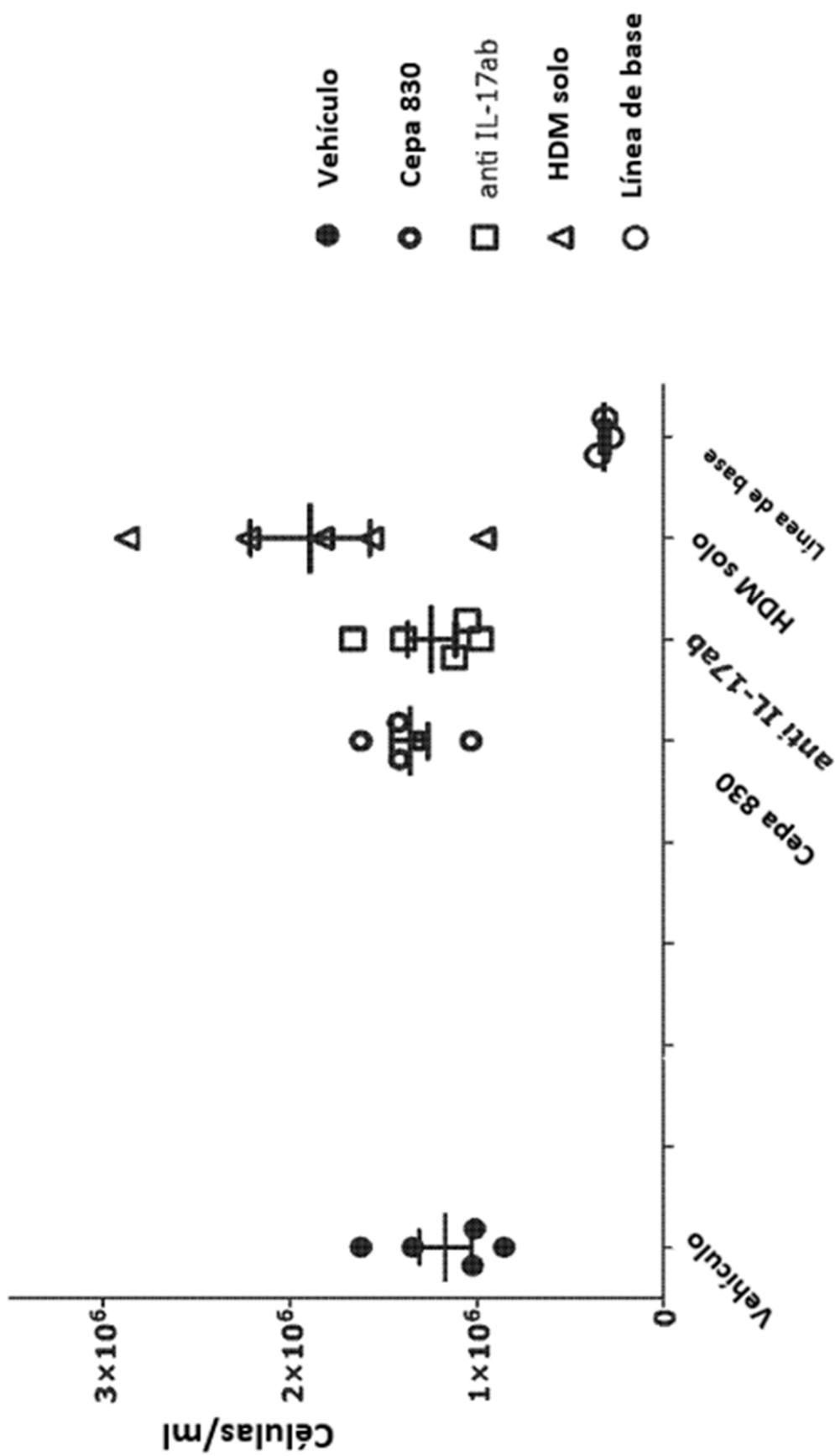


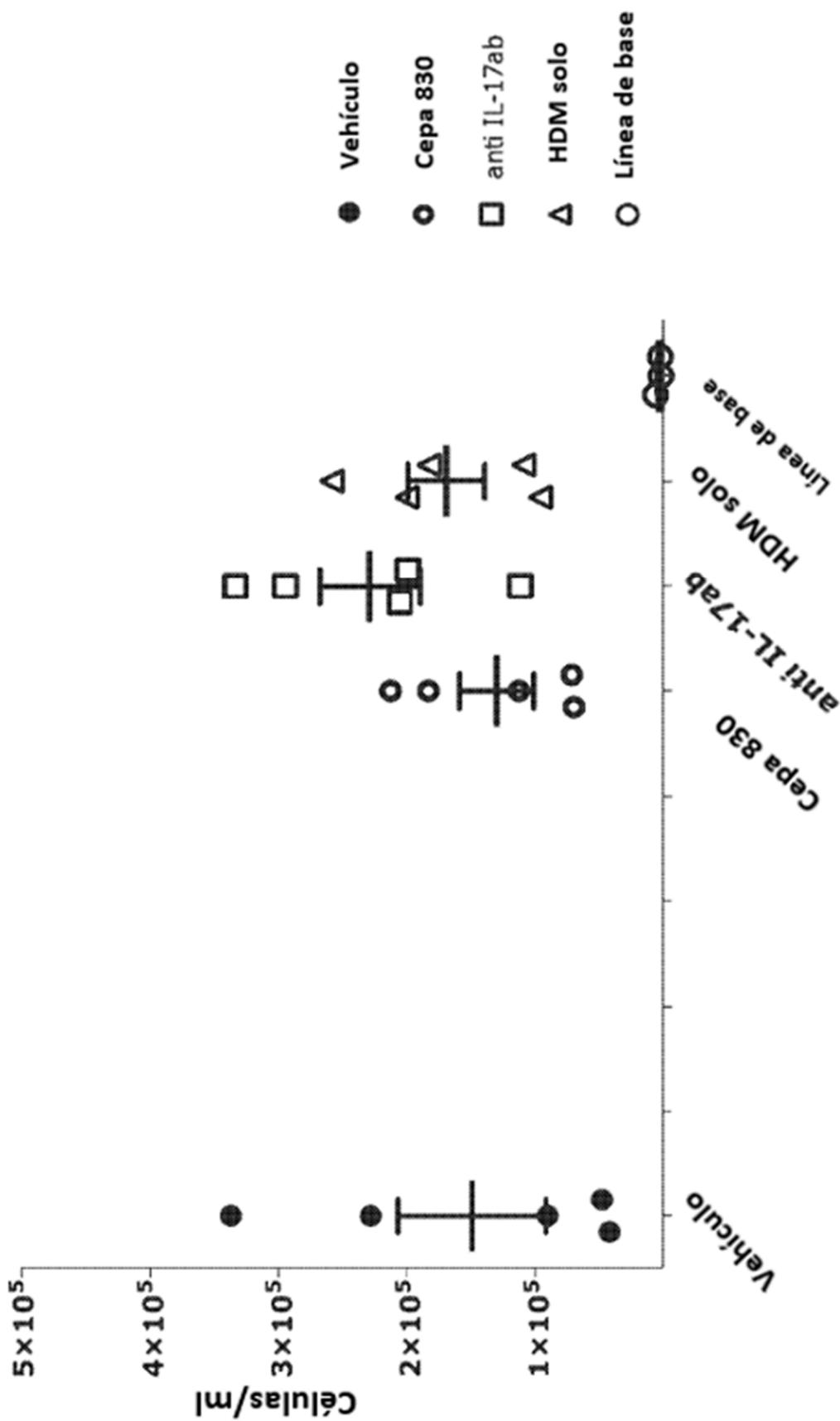
FIG. 9  
Linfocitos %.



**FIG. 10**  
Recuento total de células



**FIG. 11**  
**Eosinófilos totales**



**FIG. 12**  
**Eosinófilos %.**

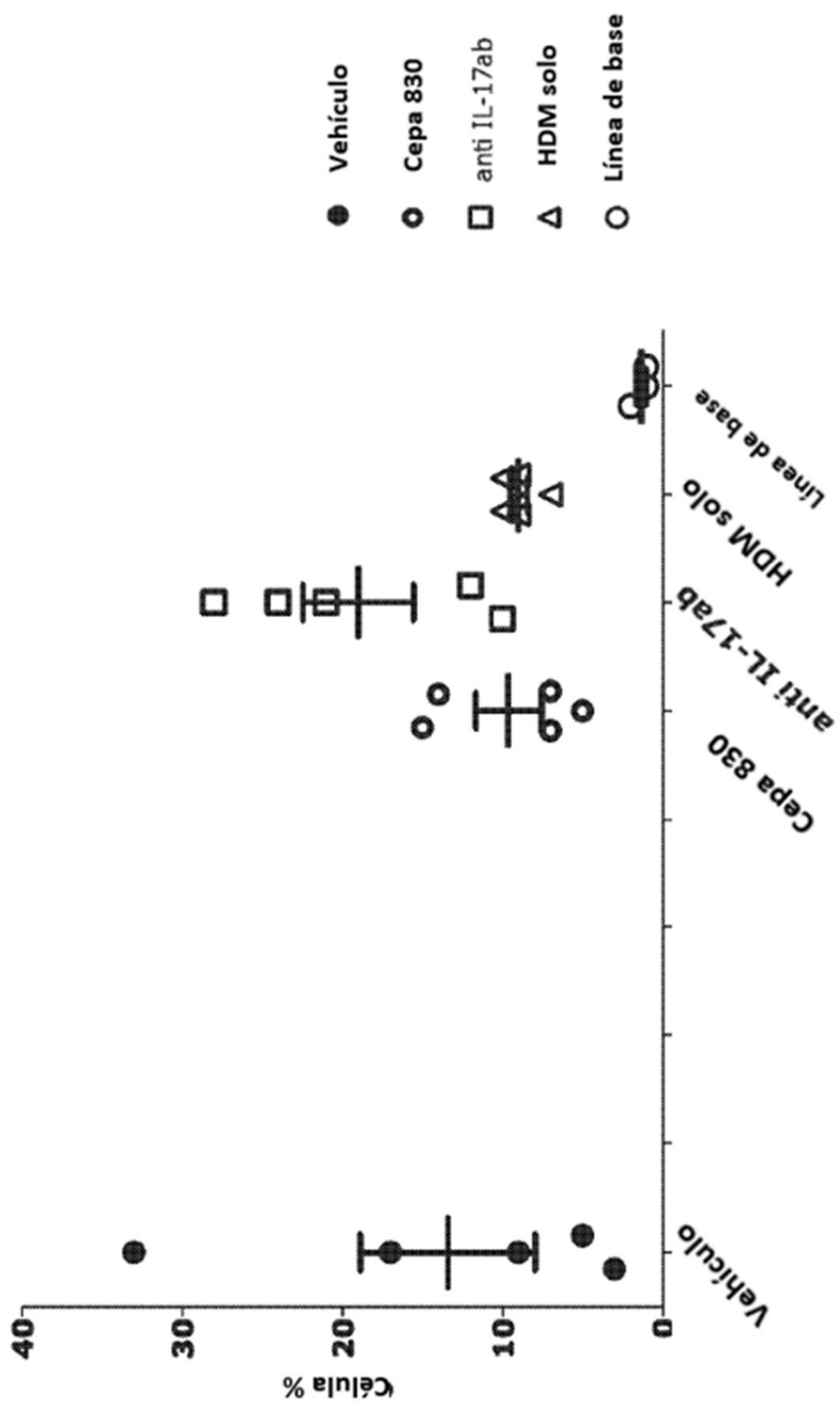


FIG. 13  
Macrófagos totales

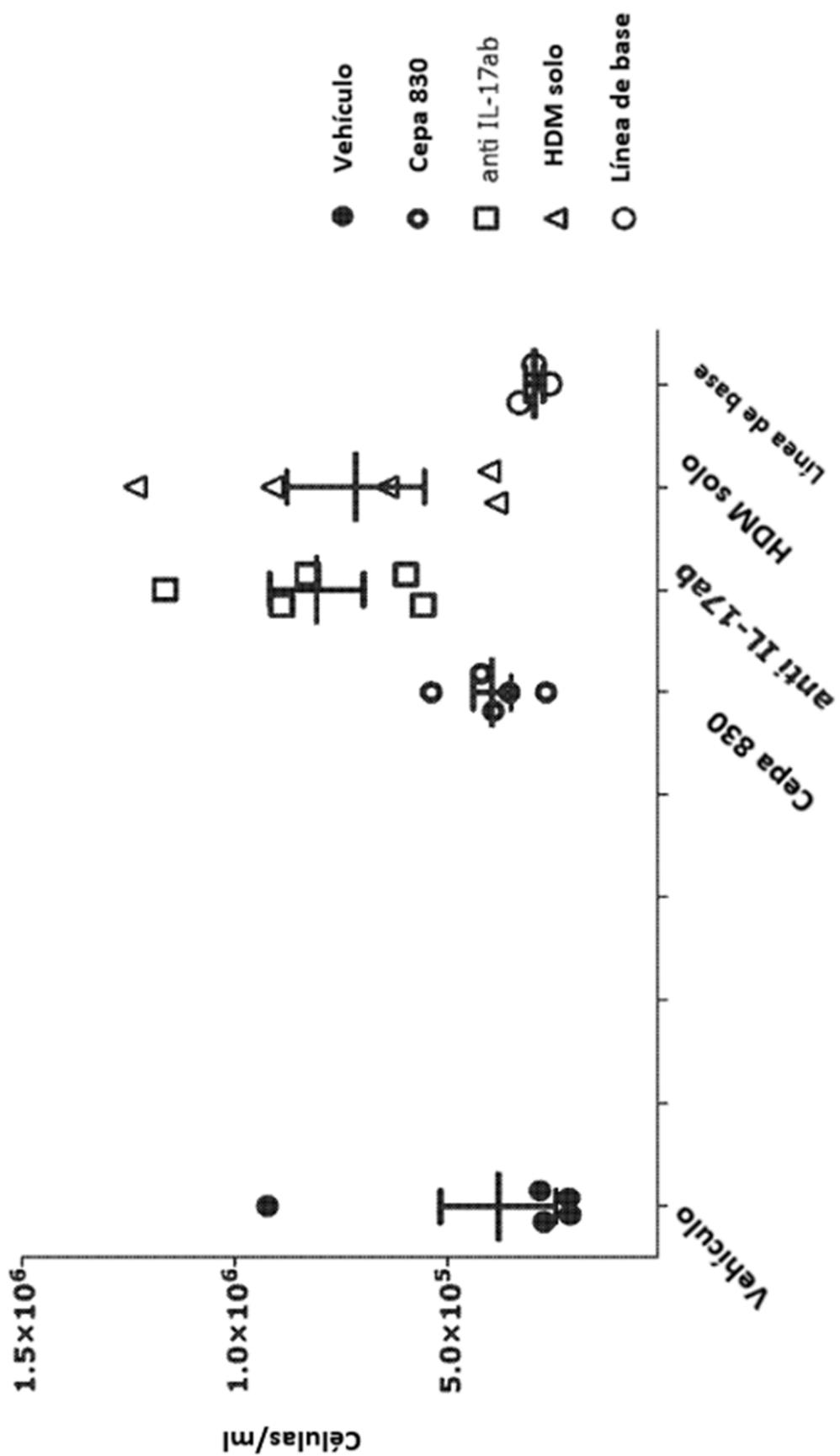


FIG. 14  
Macrófagos %.

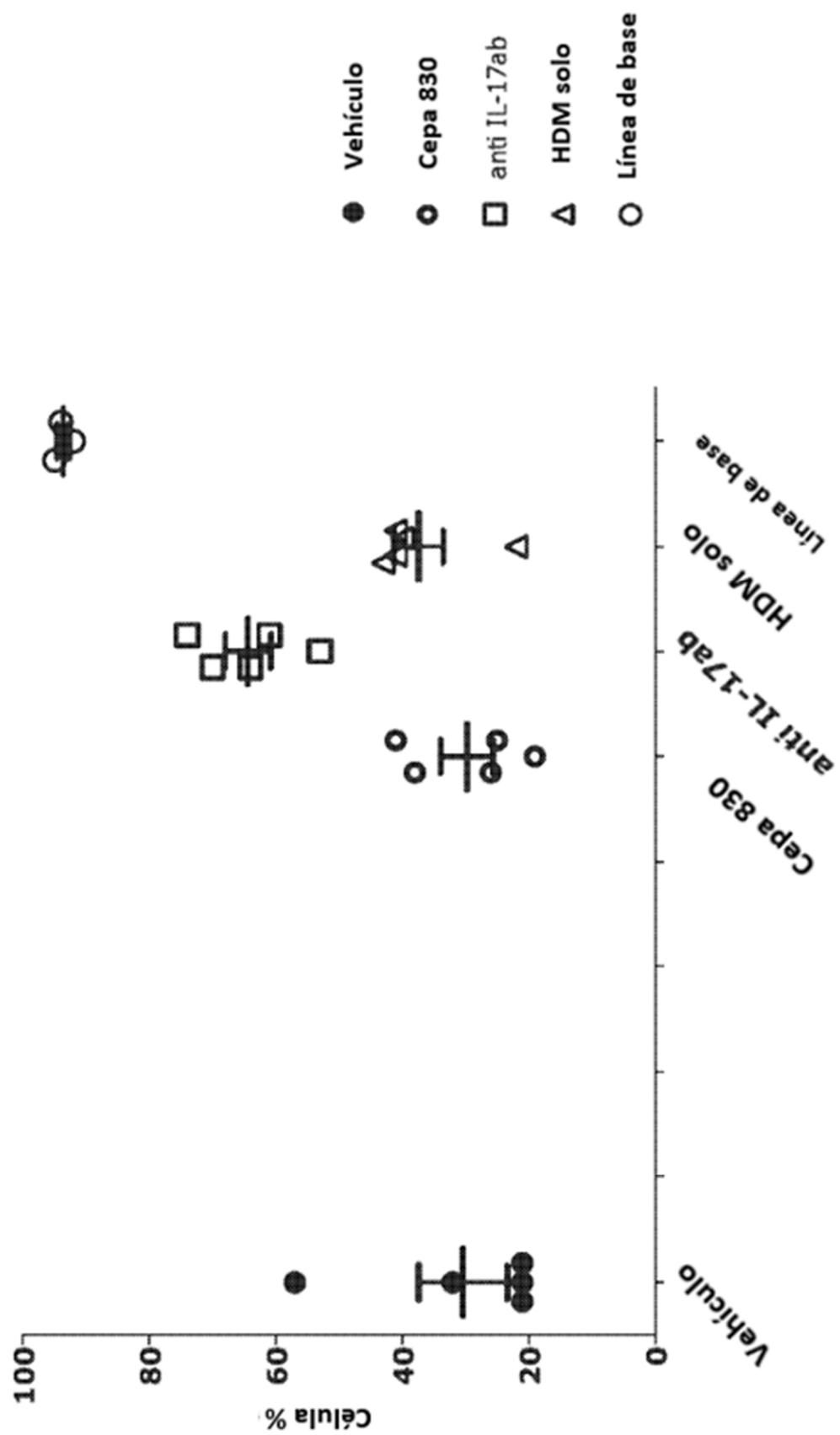


FIG. 15  
Neutrófilos totales.

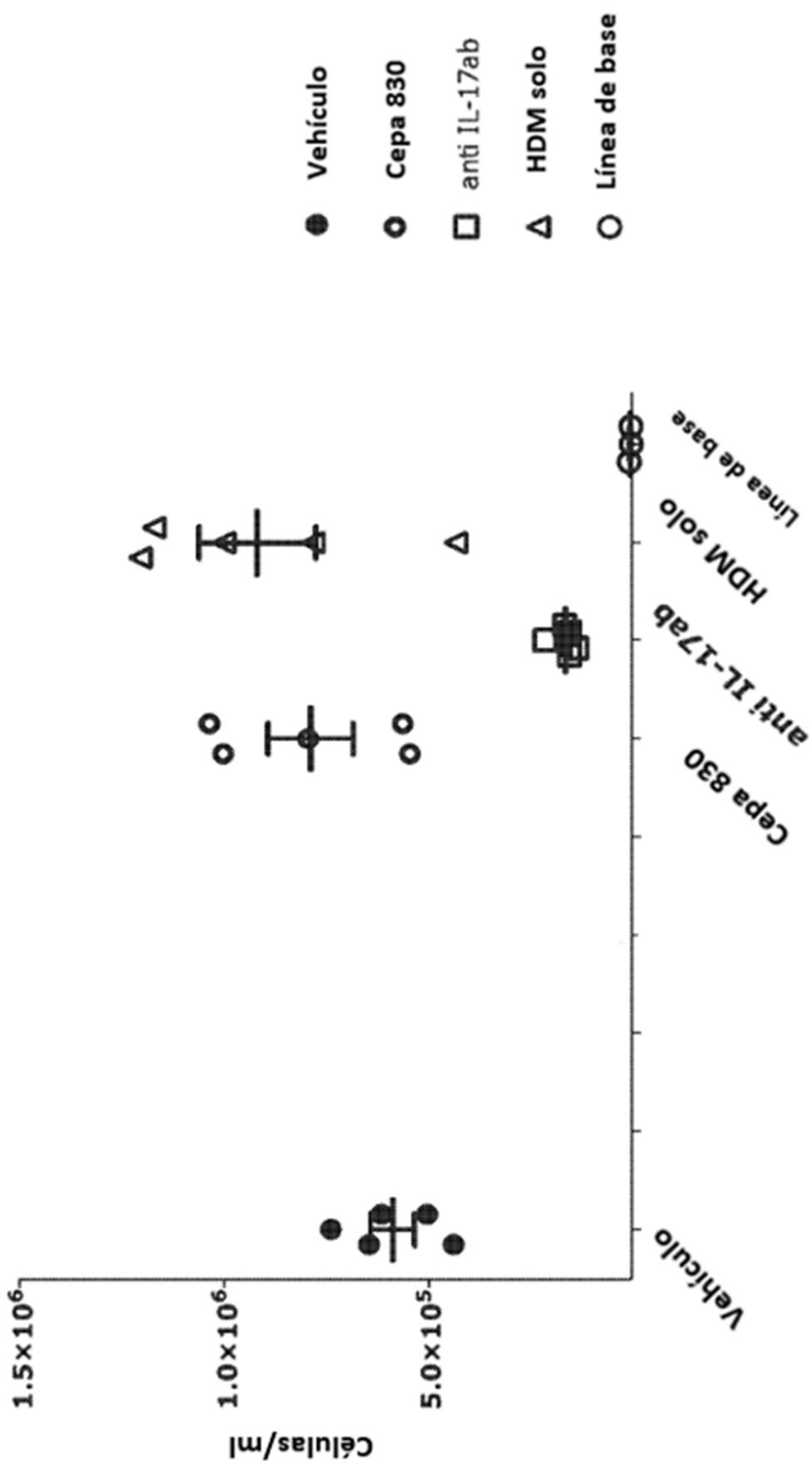


FIG. 16  
Neutrófilos %.

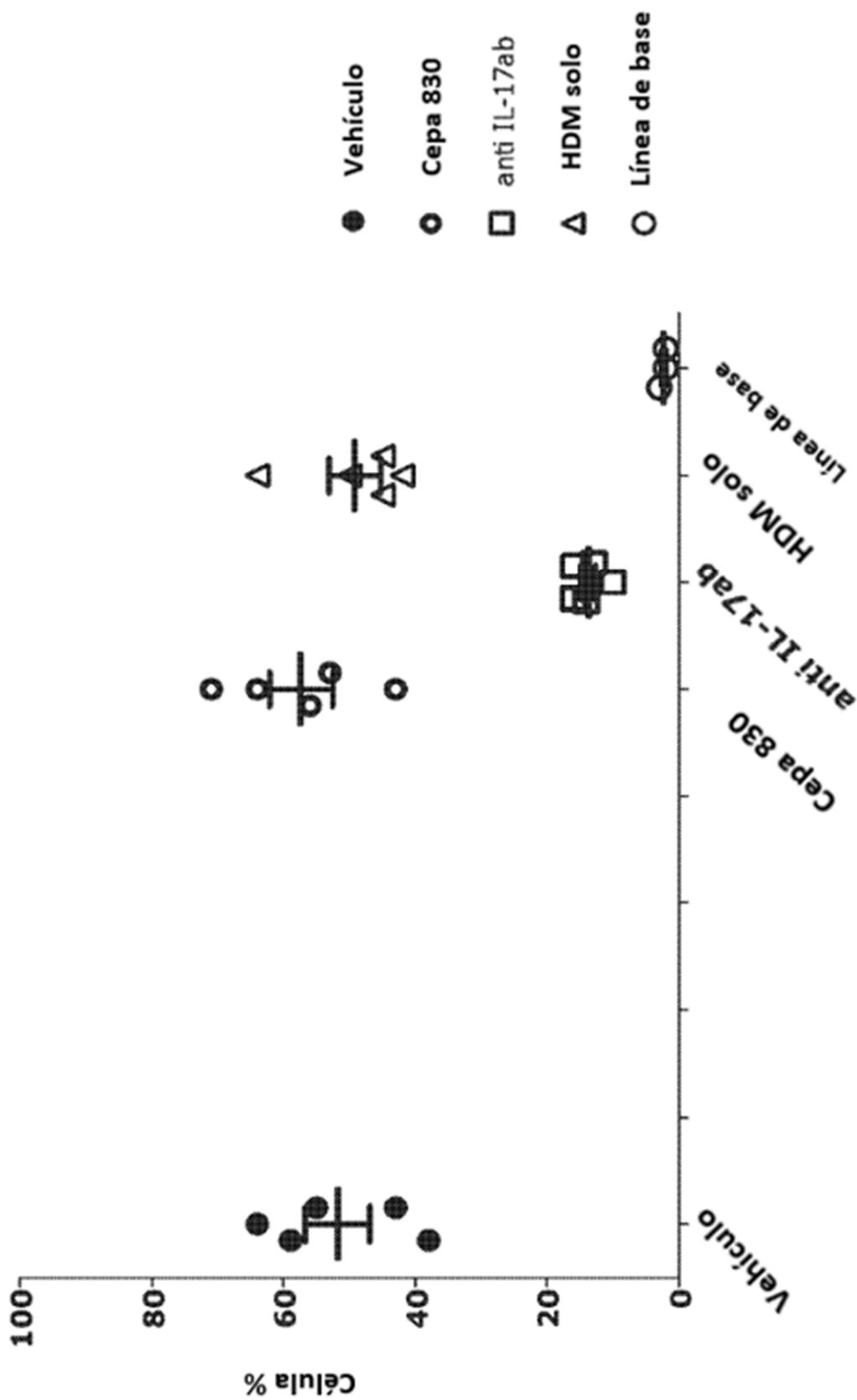


FIG. 17  
Linfocitos totales.

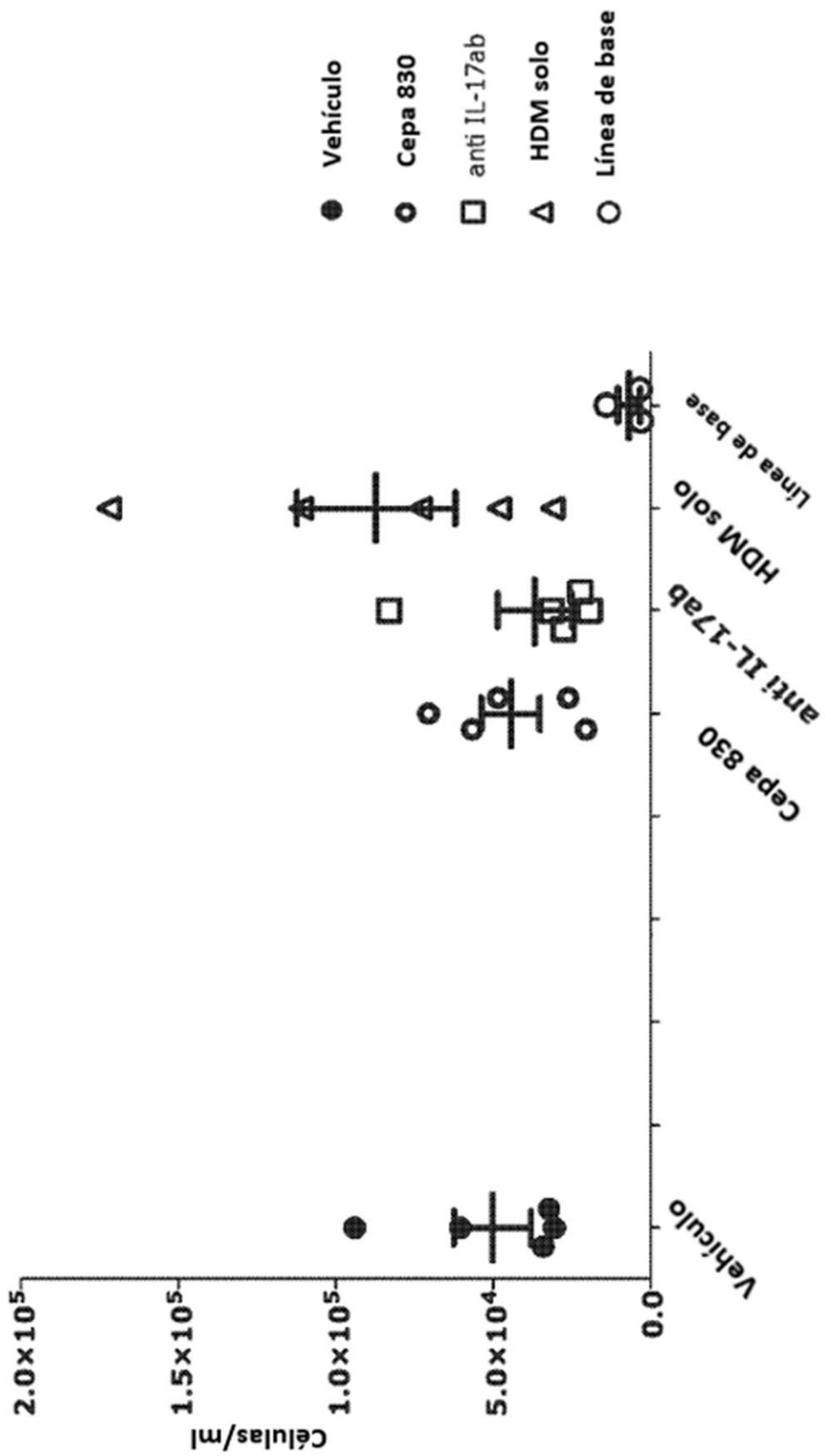
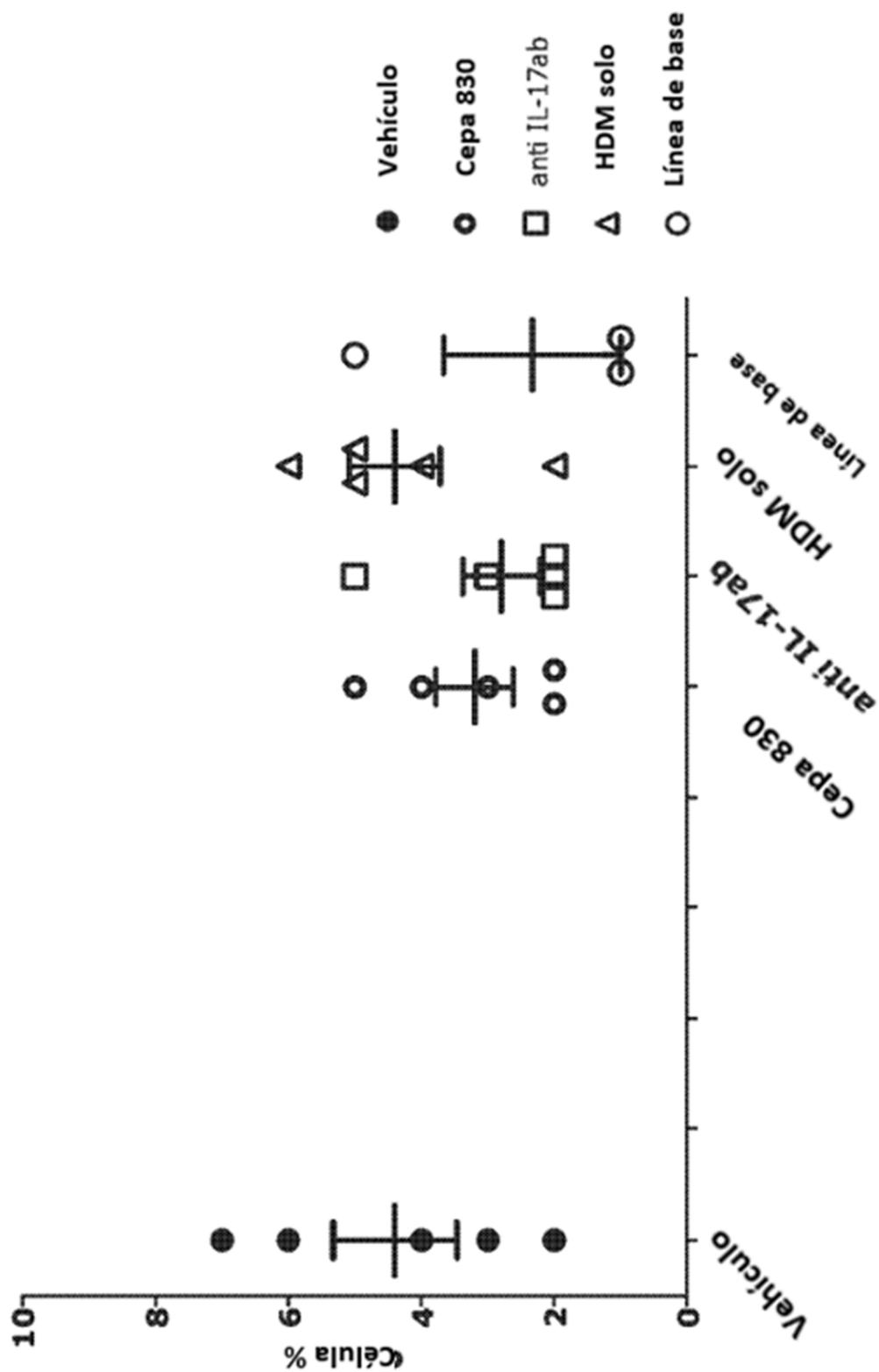
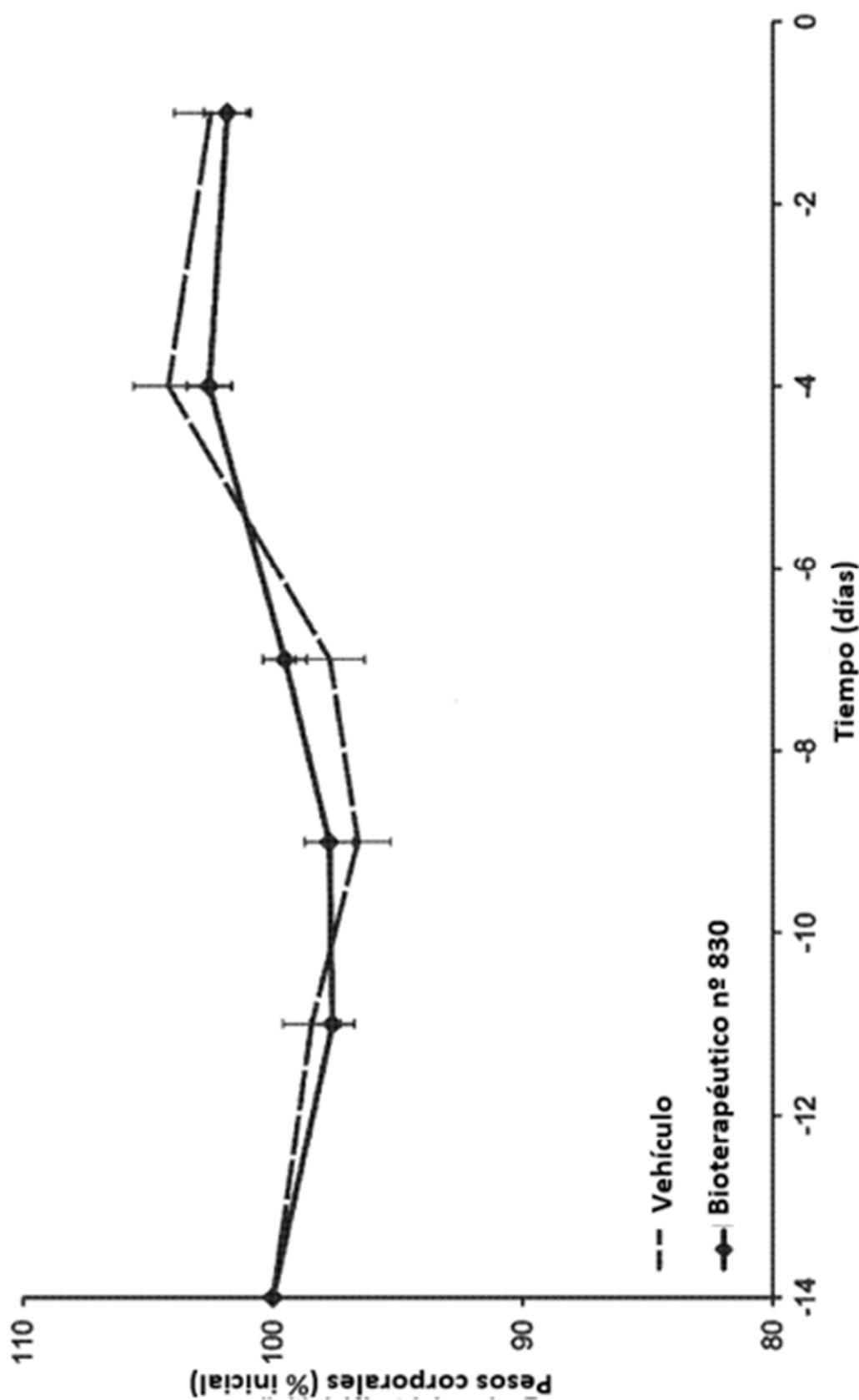


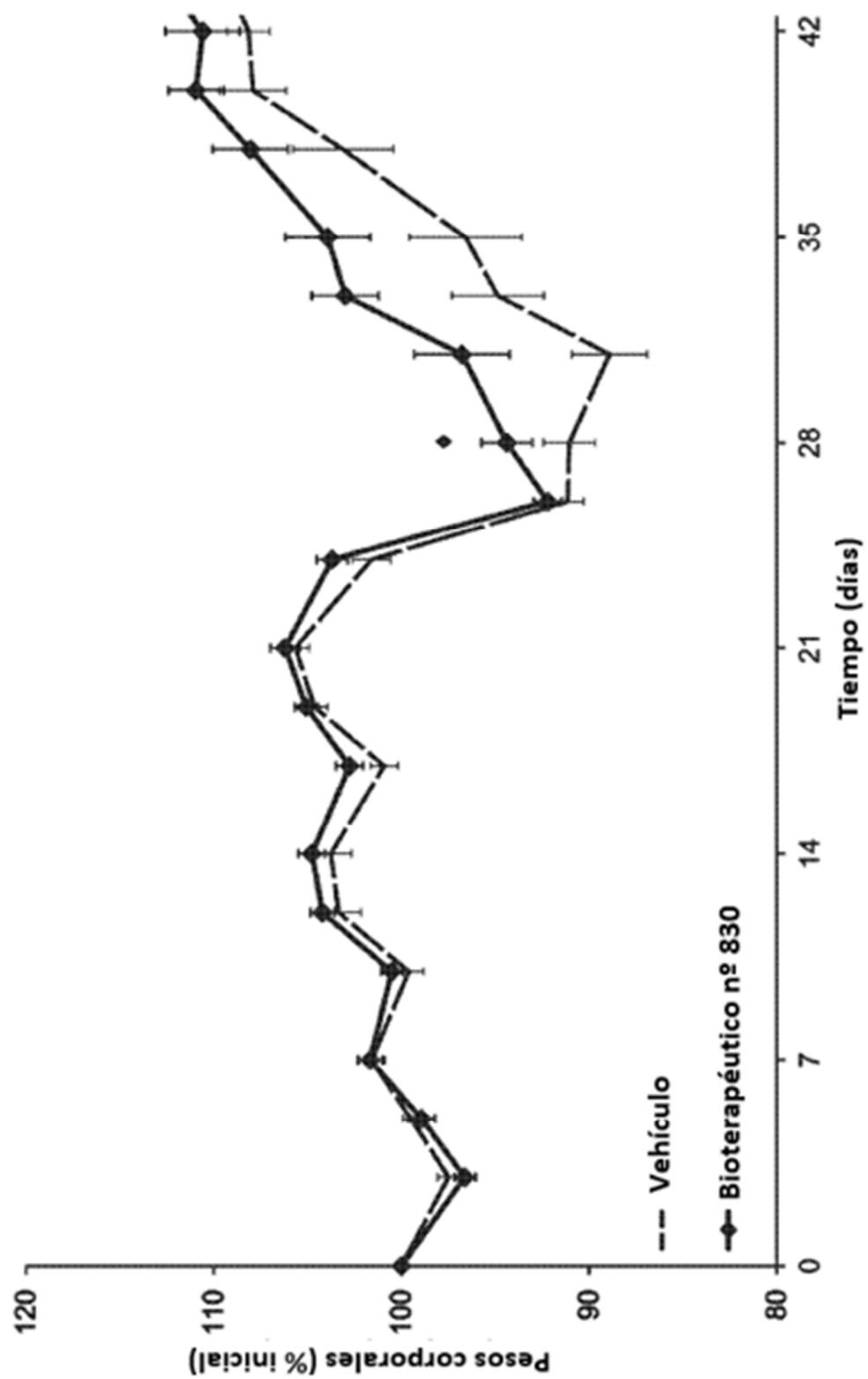
FIG. 18  
Linfocitos %.



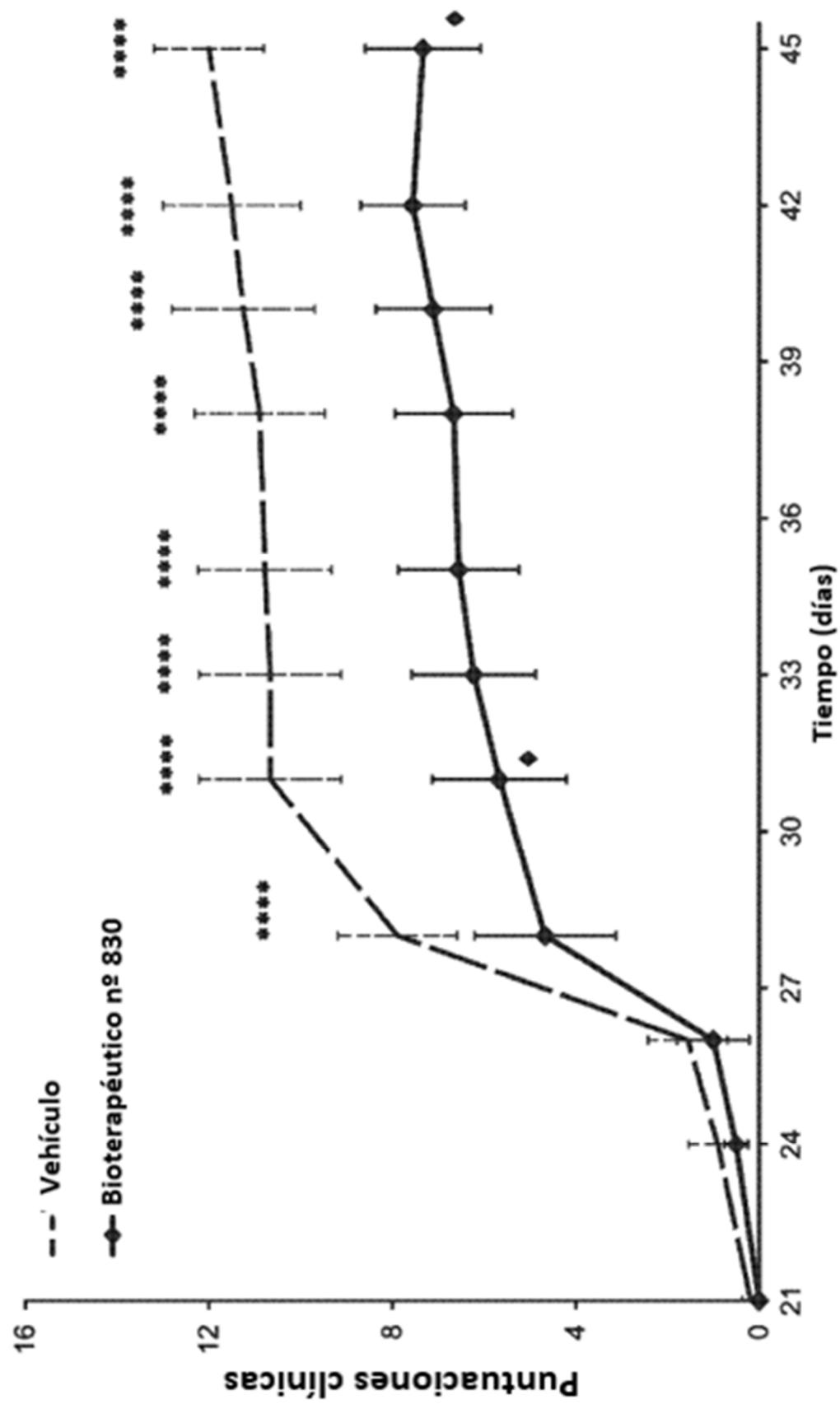
**FIG. 19**  
Pesos corporales



**FIG. 20**  
Pesos corporales



**FIG. 21**  
Puntuaciones clínicas



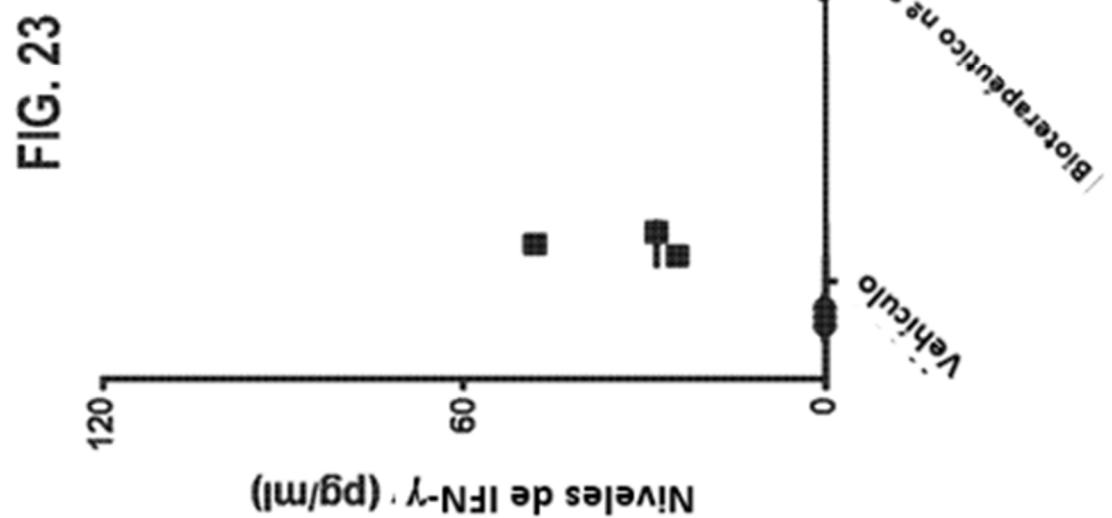
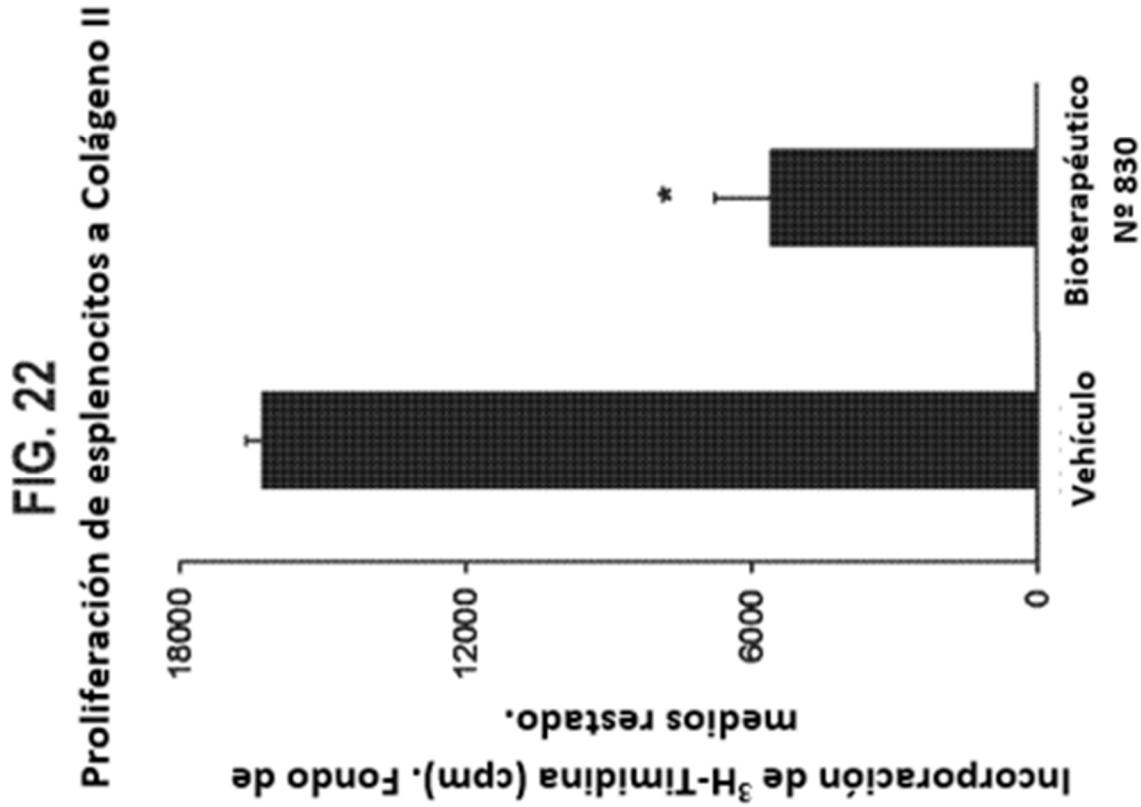


FIG. 24

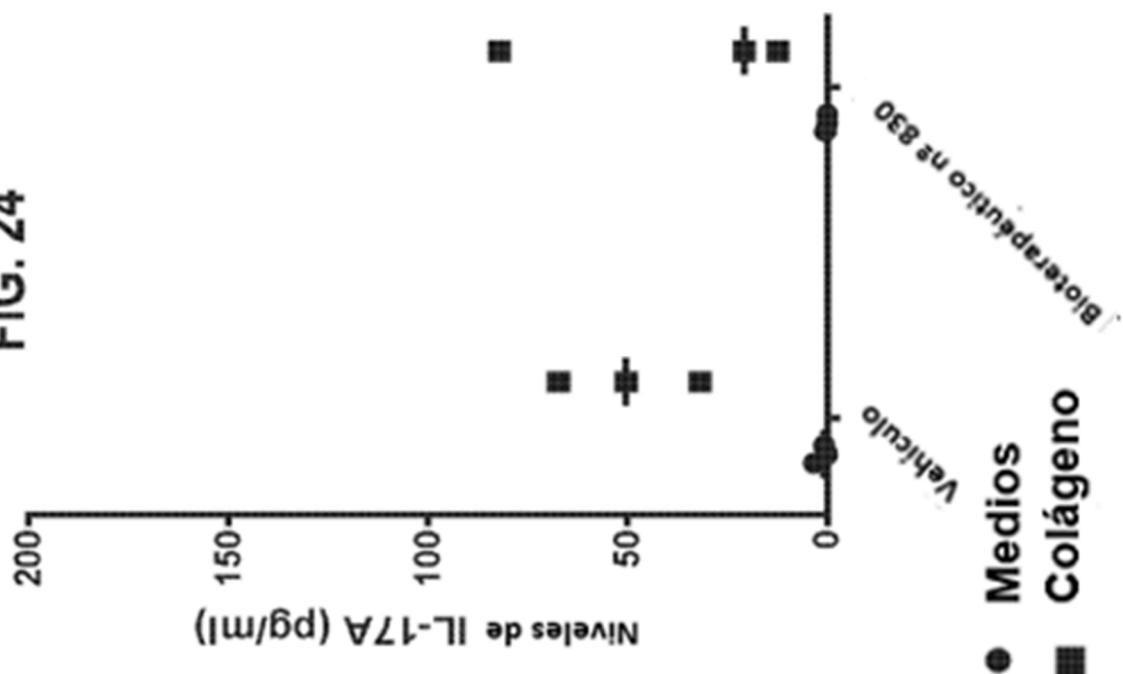


FIG. 25

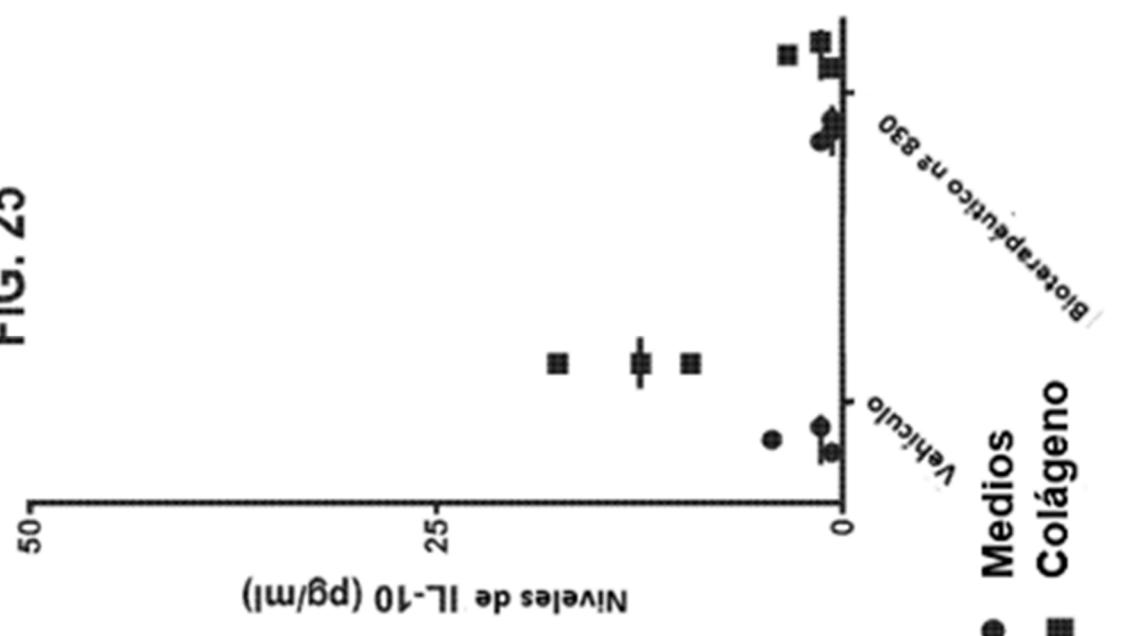


FIG. 26

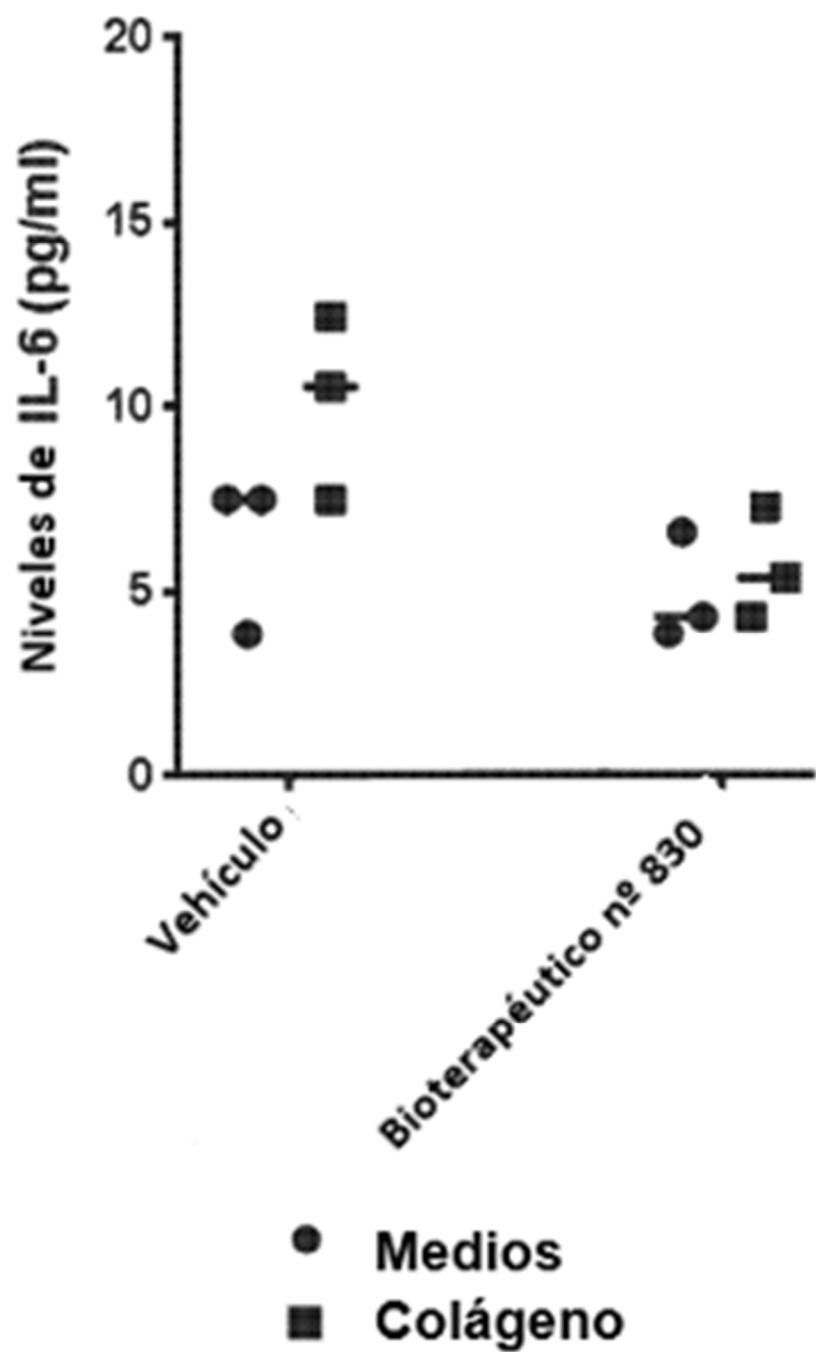


FIG. 27  
IgE Total en Suero

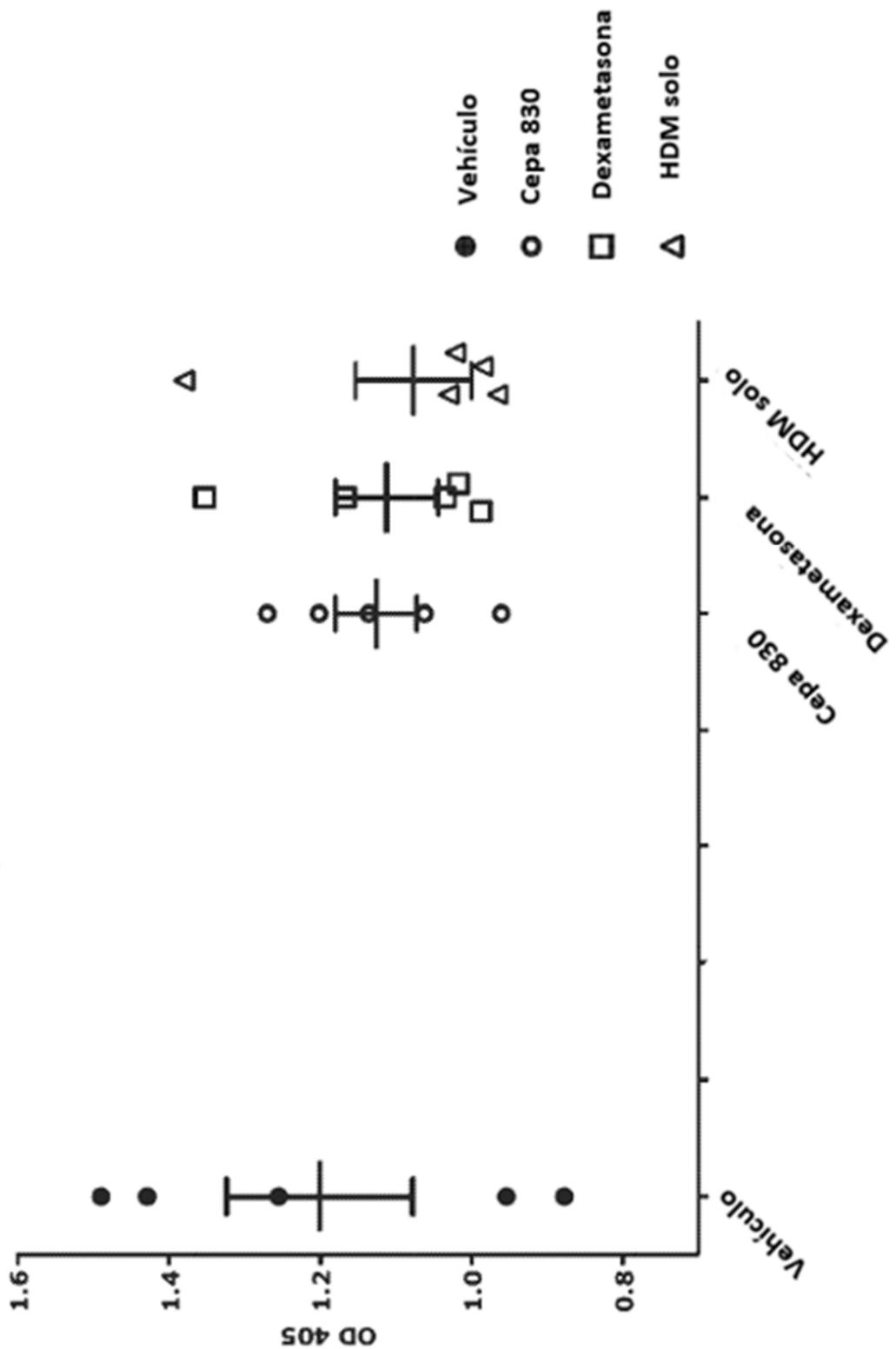


FIG. 28  
IgG1 específico a HDM en suero

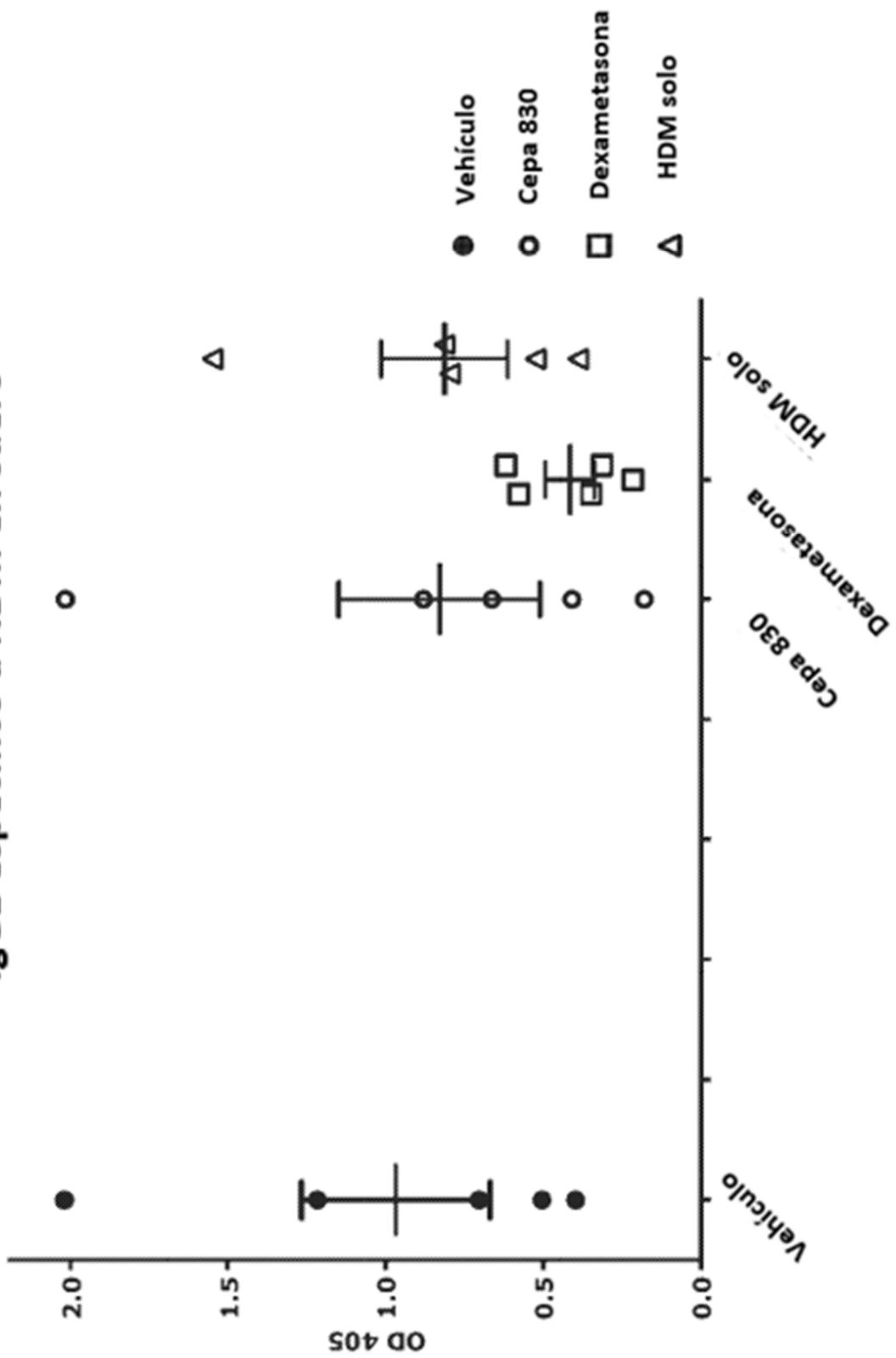


FIG. 29  
IgE total en BALF

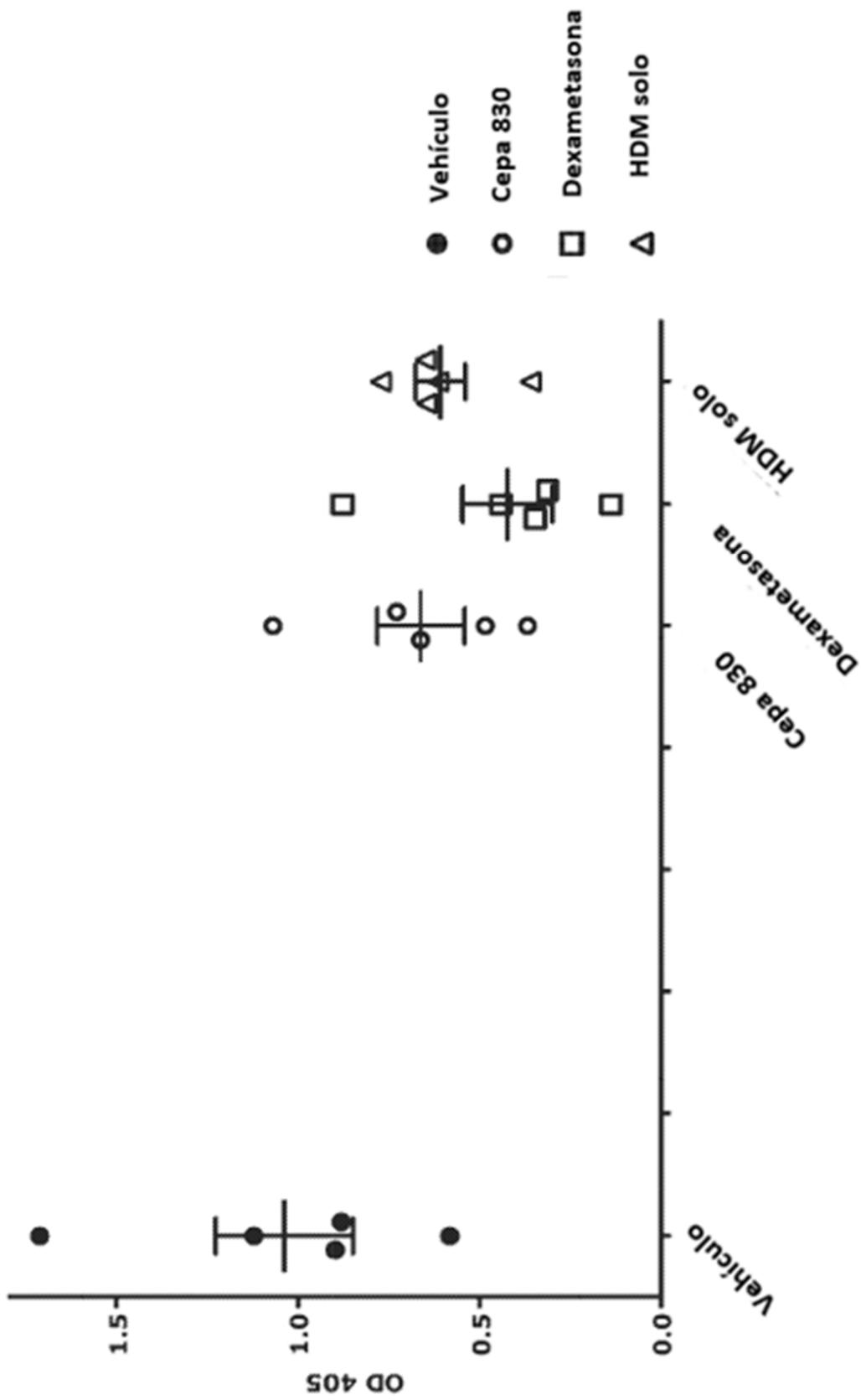
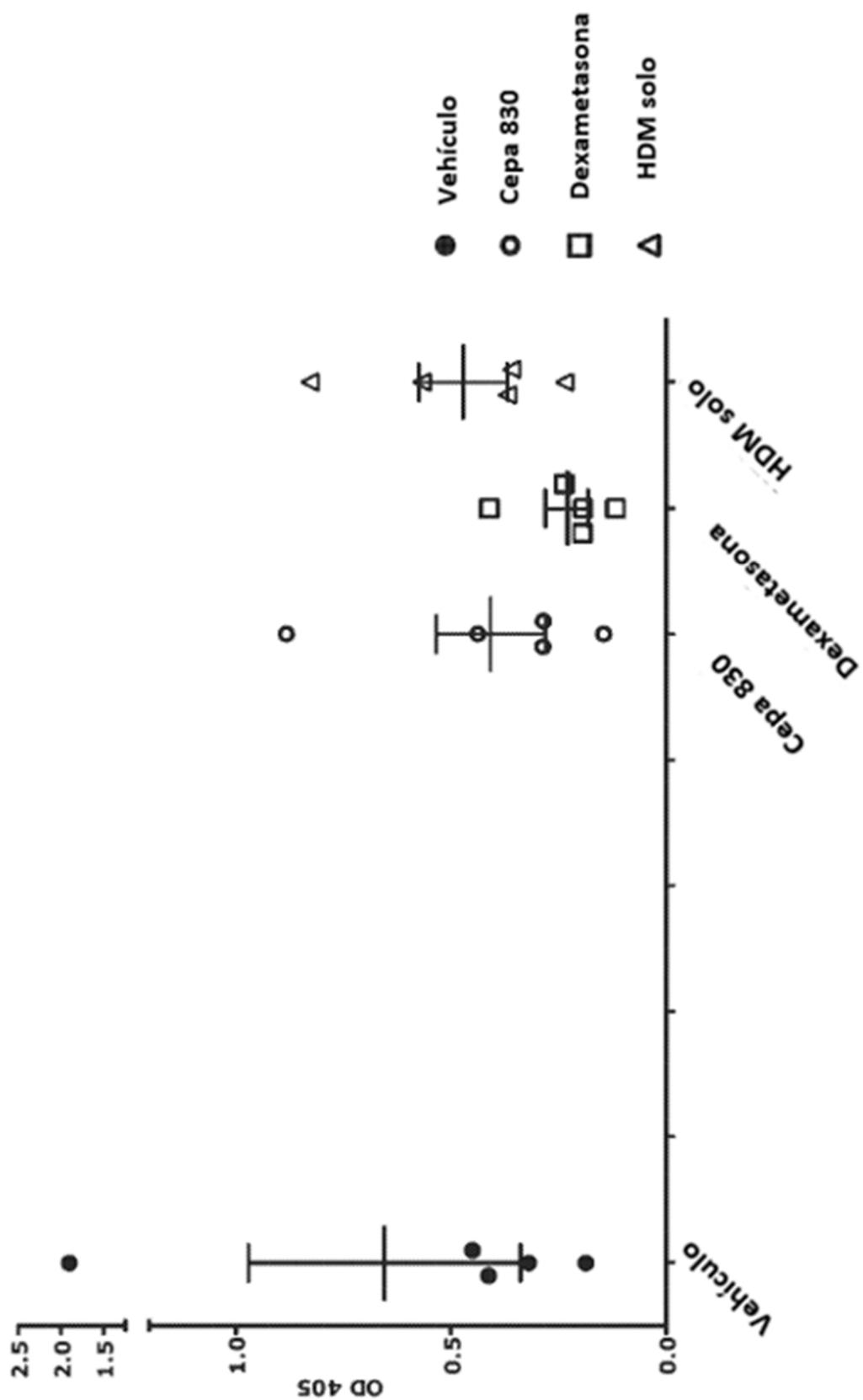


FIG. 30  
IgG1 específico a HDM en BALF



**FIG. 31** Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar

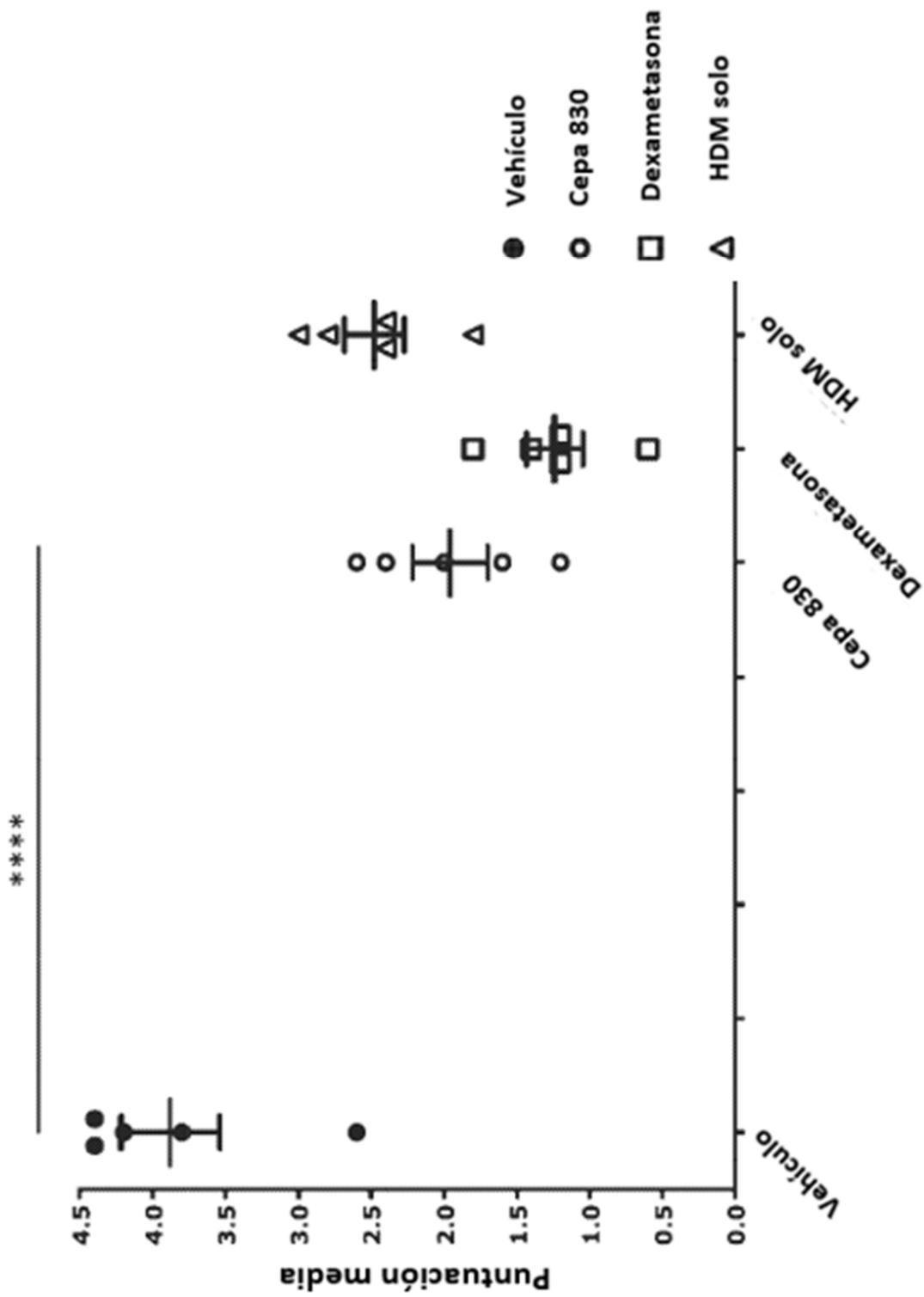
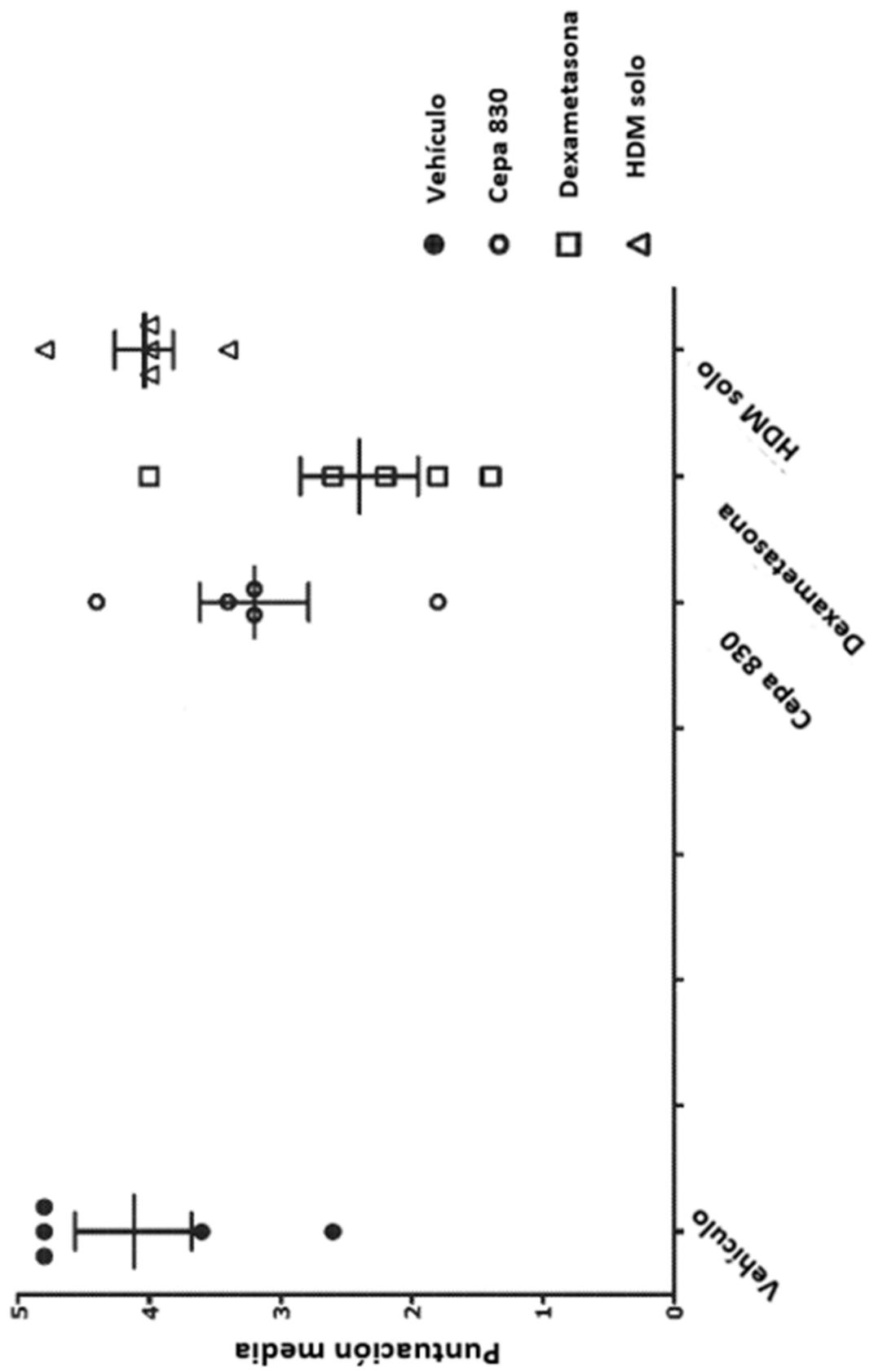


FIG. 32 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración perivascular



**FIG. 33 Análisis histológico – Puntuación media inflamatoria (promedio de las puntuaciones de infiltración peribronquiolar y perivascular**

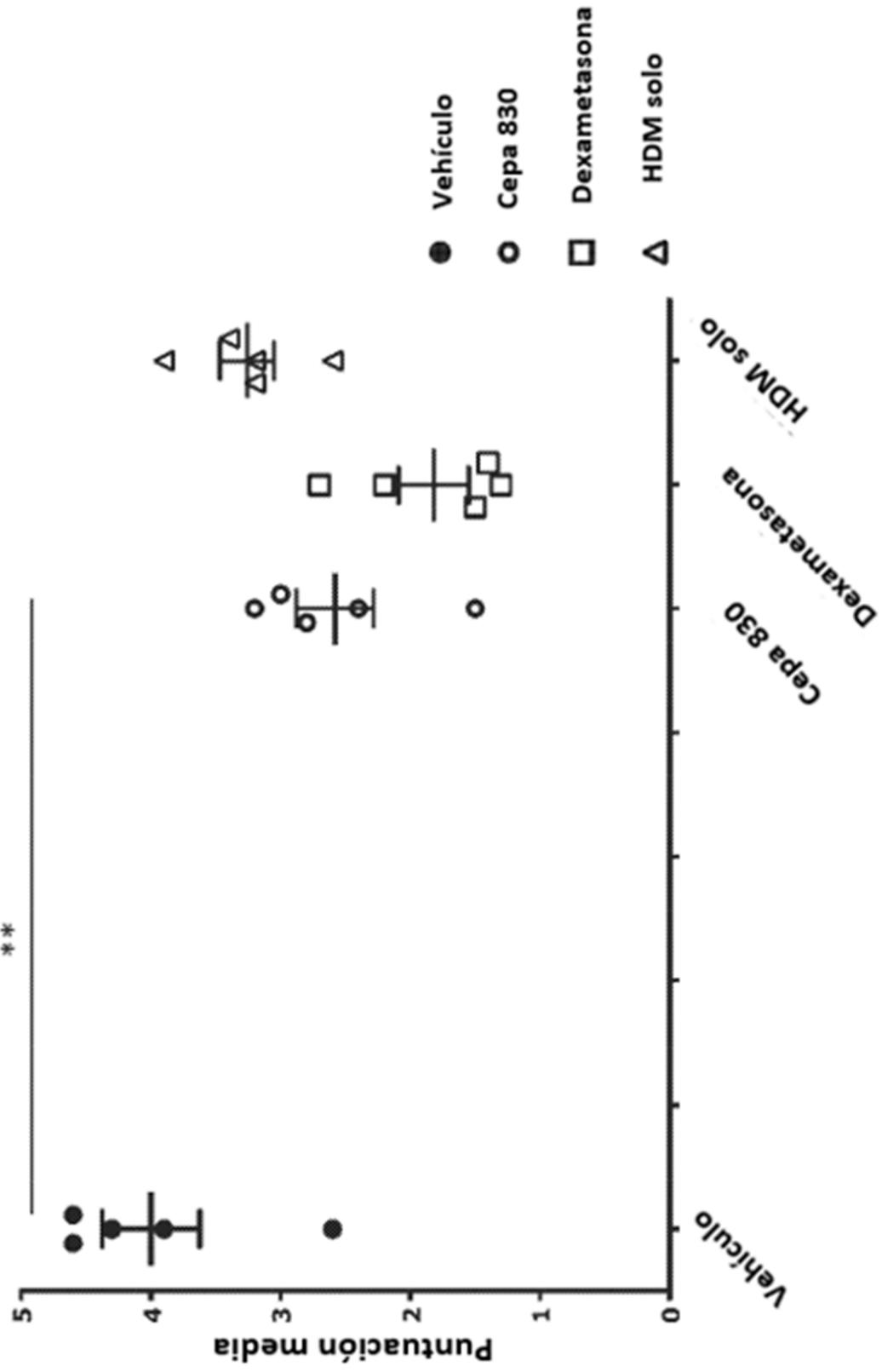
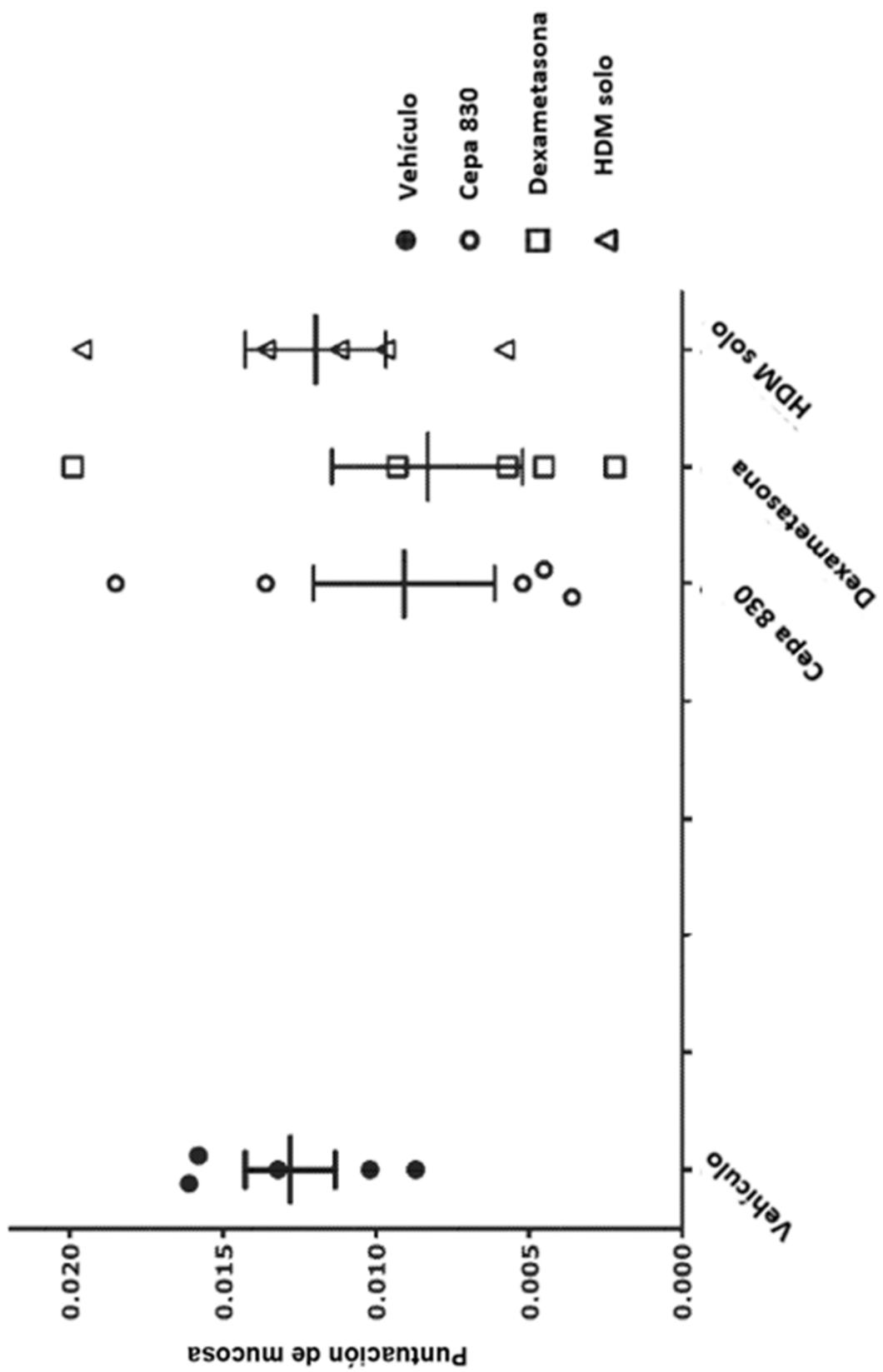


FIG. 34 Análisis histológico – Puntuación de mucosa



**FIG. 35**  
Nivel de IL-9 en tejido pulmonar

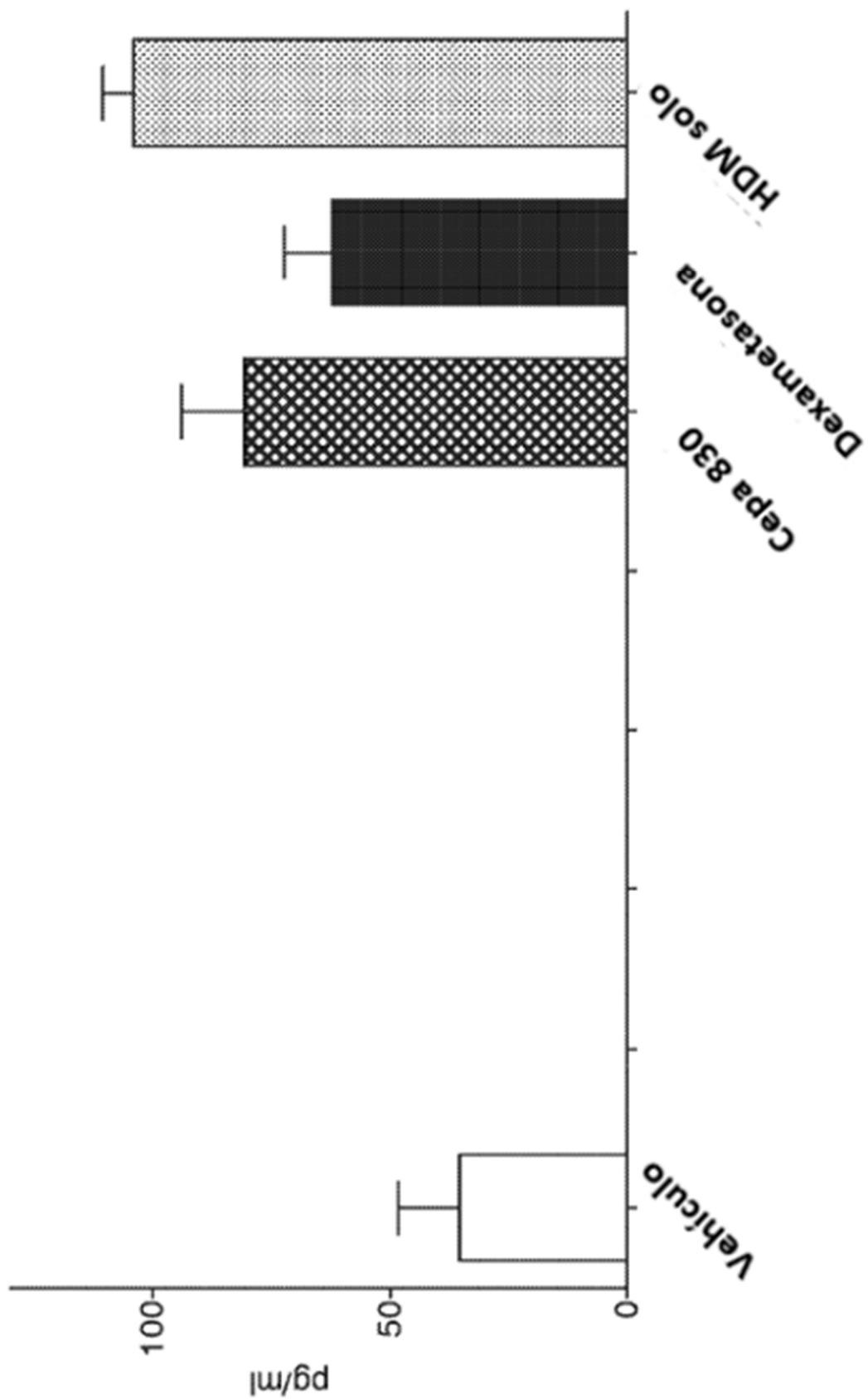
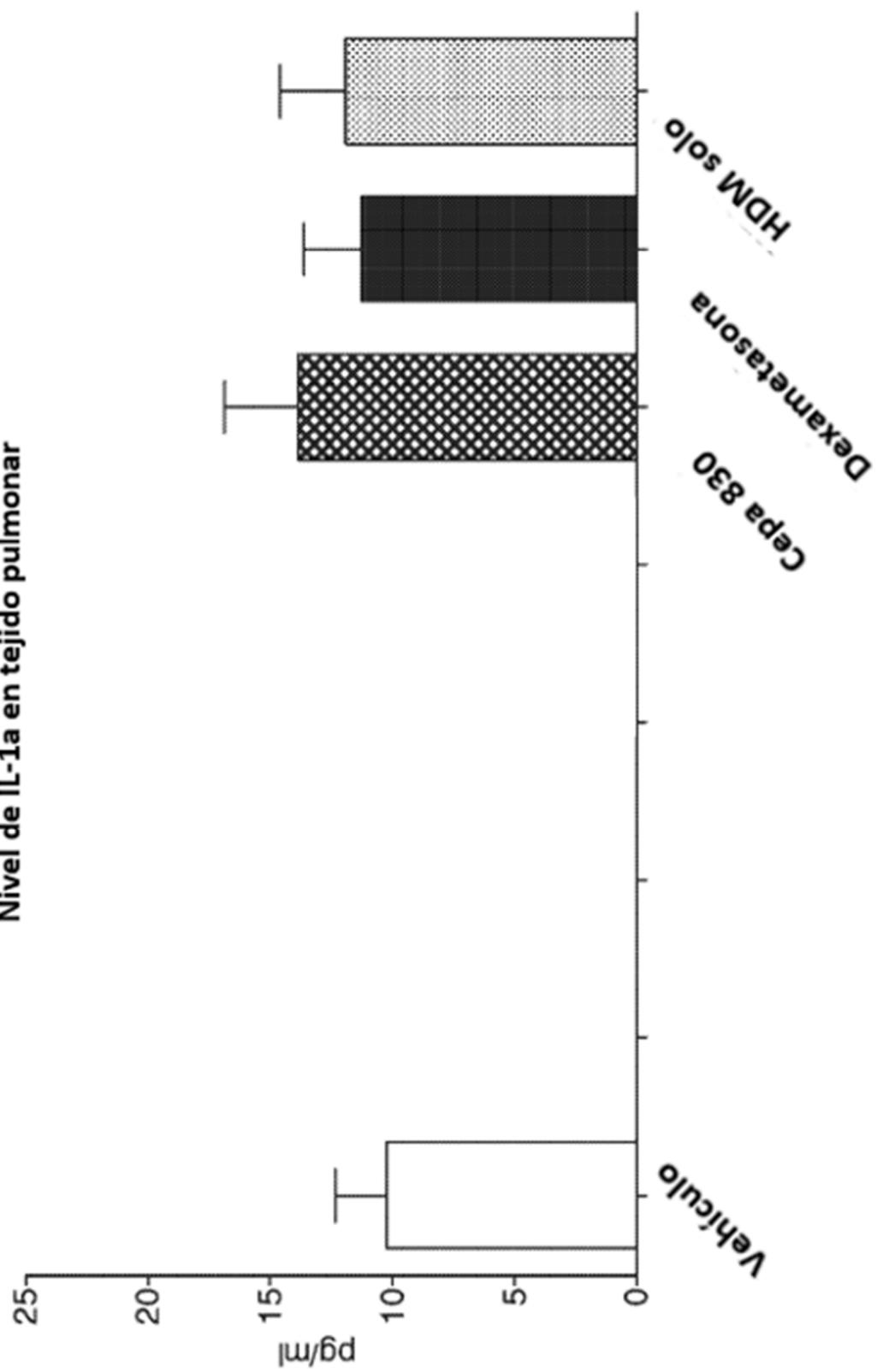


FIG. 36

Nivel de IL-1 $\alpha$  en tejido pulmonar

**FIG. 37**  
Nivel de IFNg en tejido pulmonar

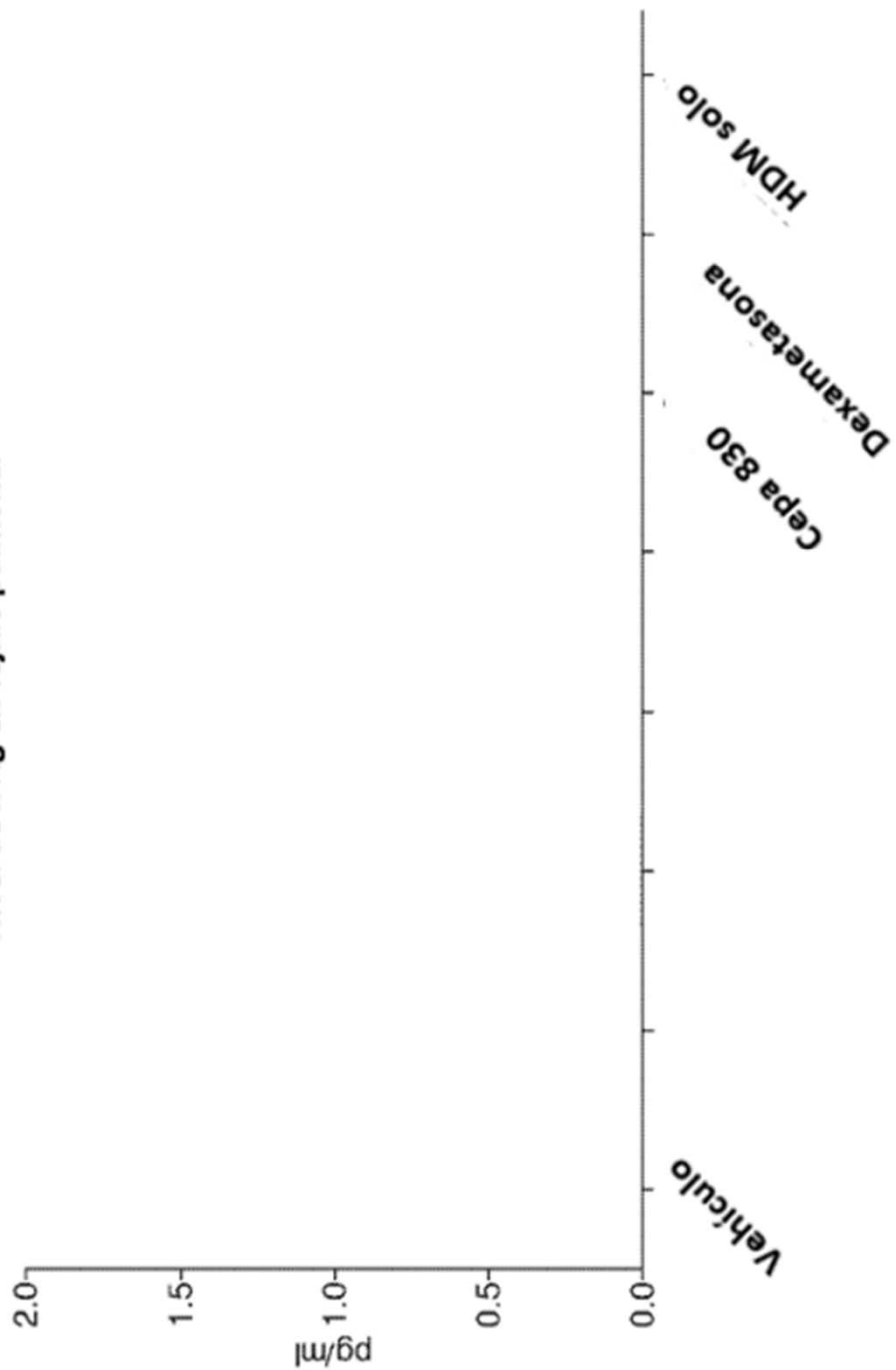


FIG. 38

Nivel de IL-17A en tejido pulmonar

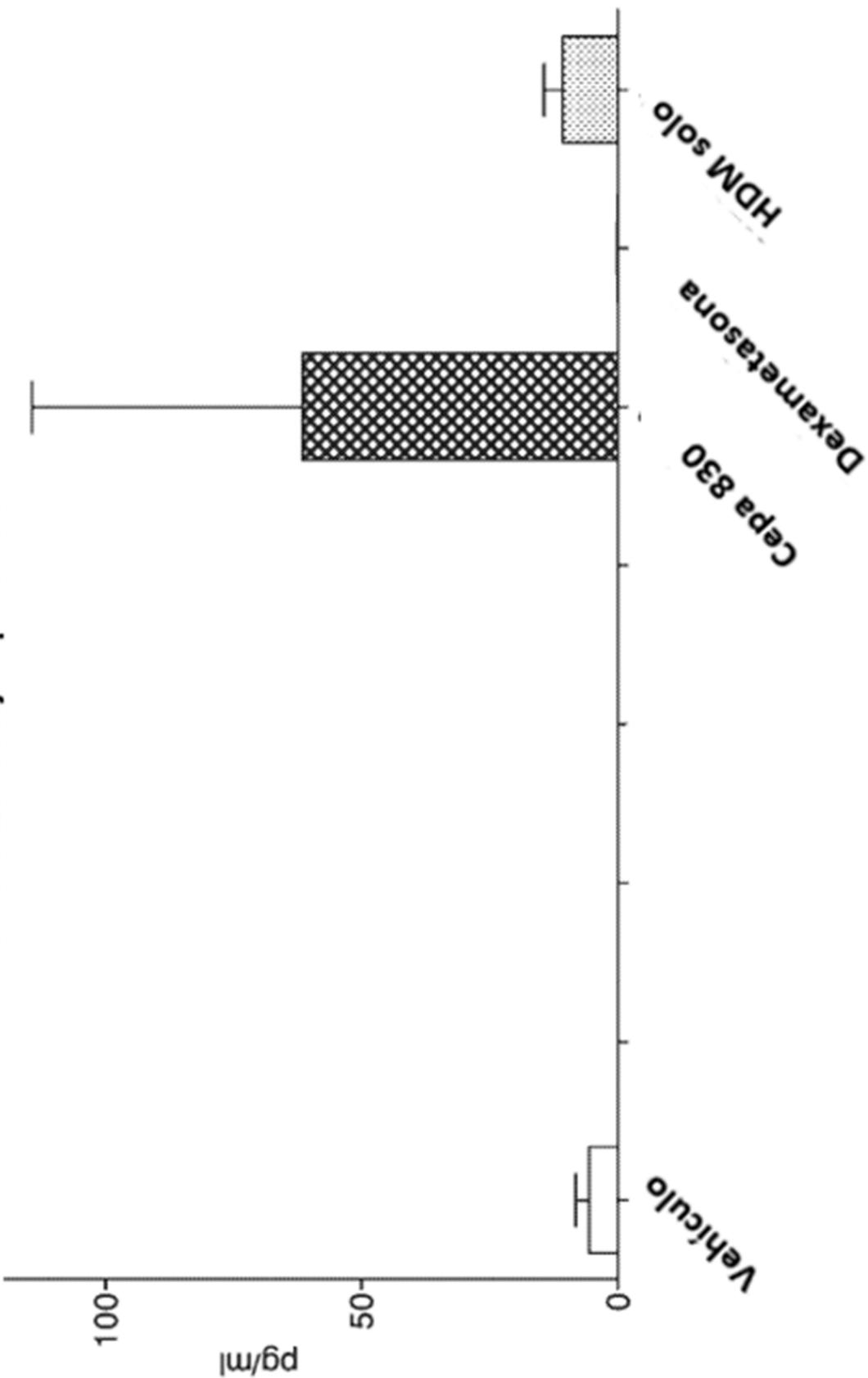


FIG. 39  
Nivel de IL-4 en tejido pulmonar

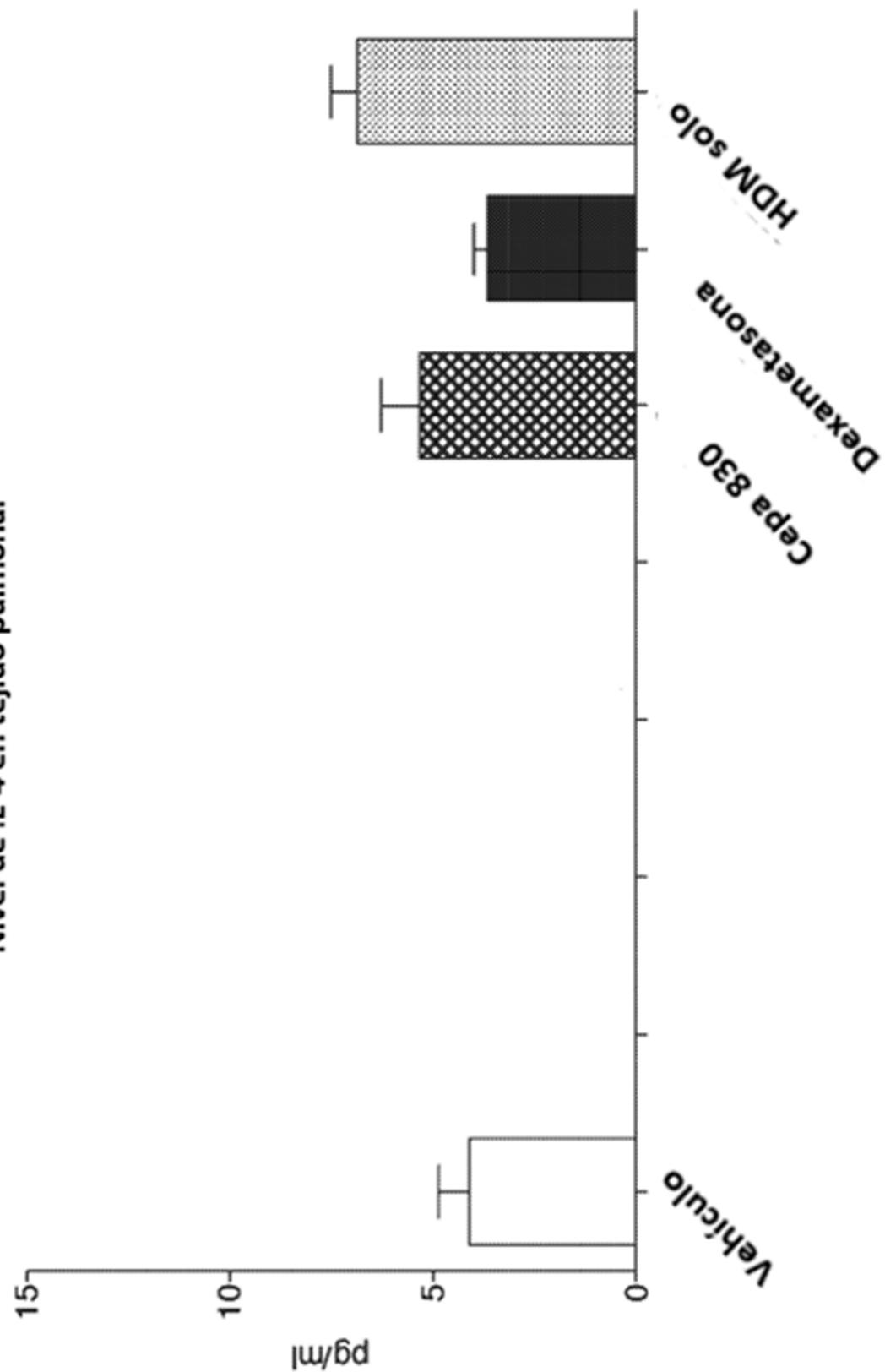


FIG. 40

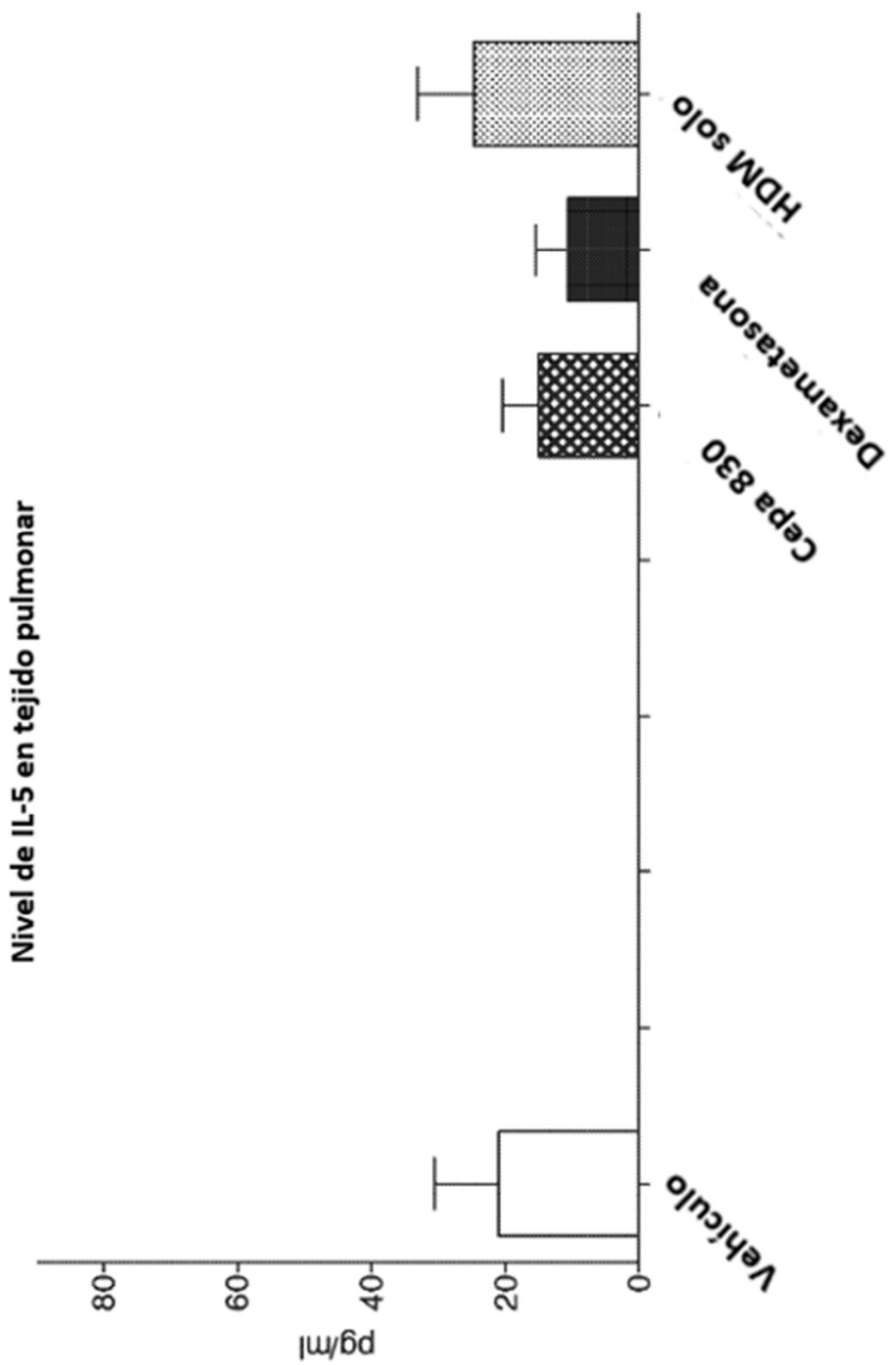


FIG. 41

Nivel de IL-1b en tejido pulmonar

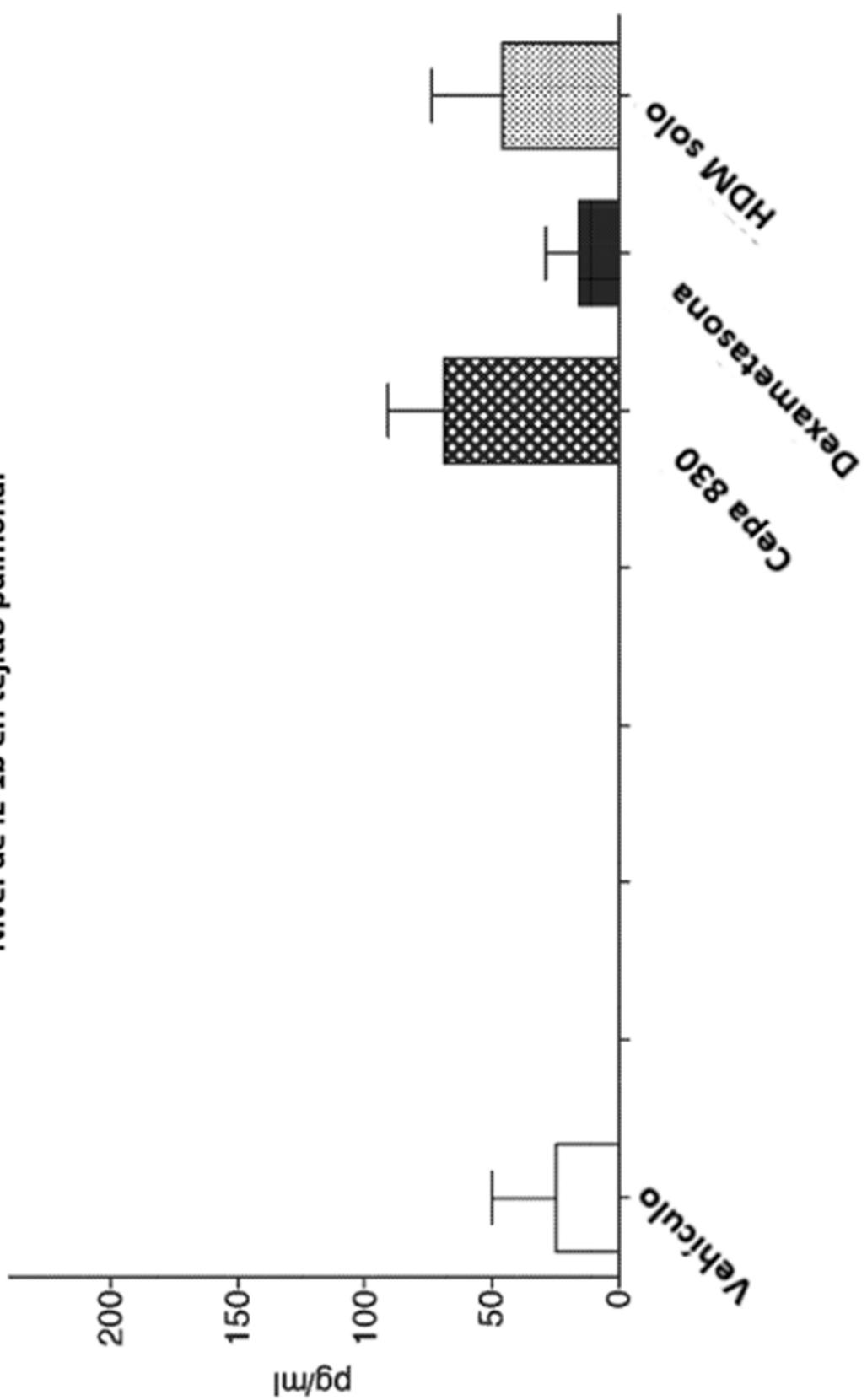


FIG. 42

Nivel de RANTES en tejido pulmonar

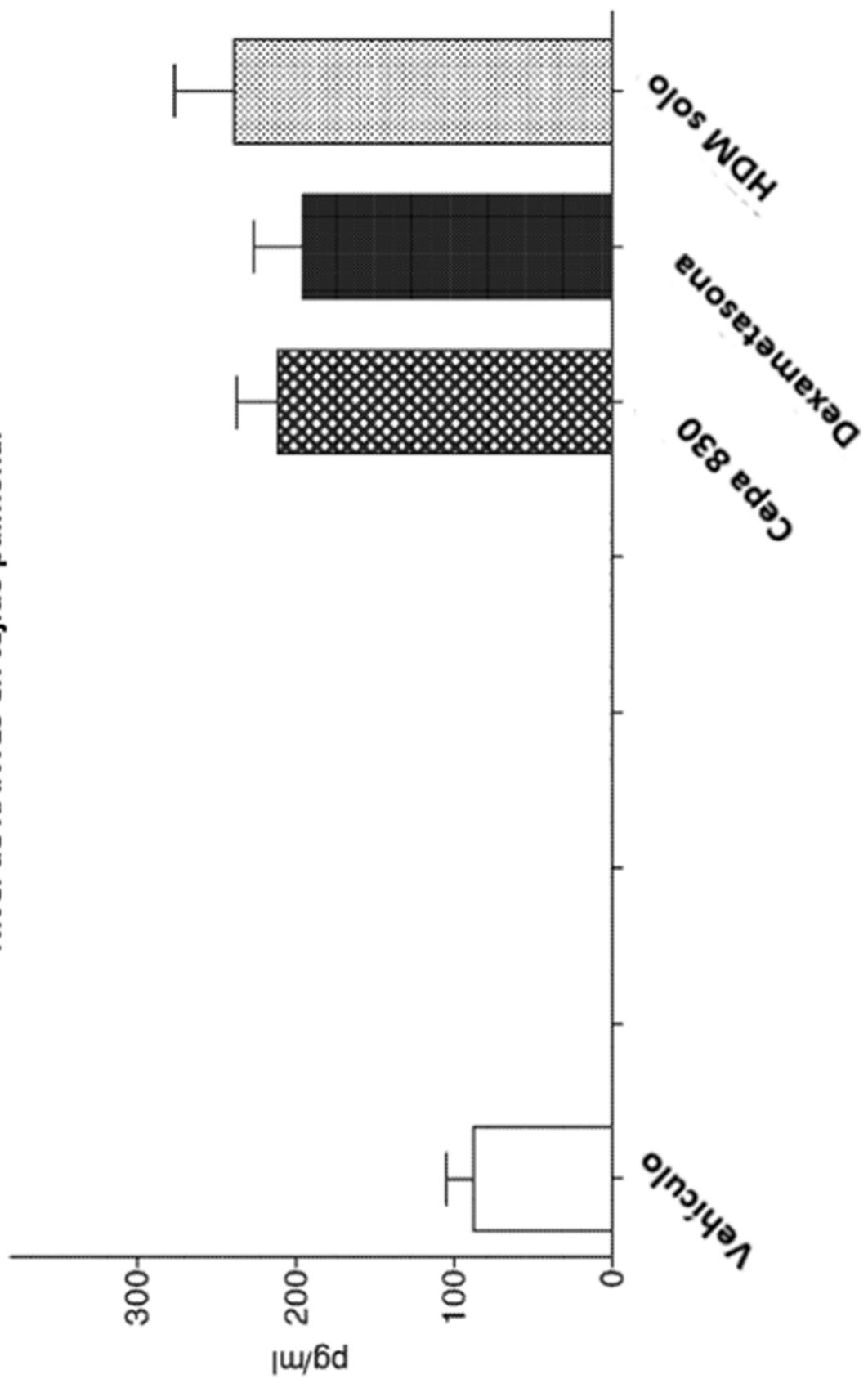
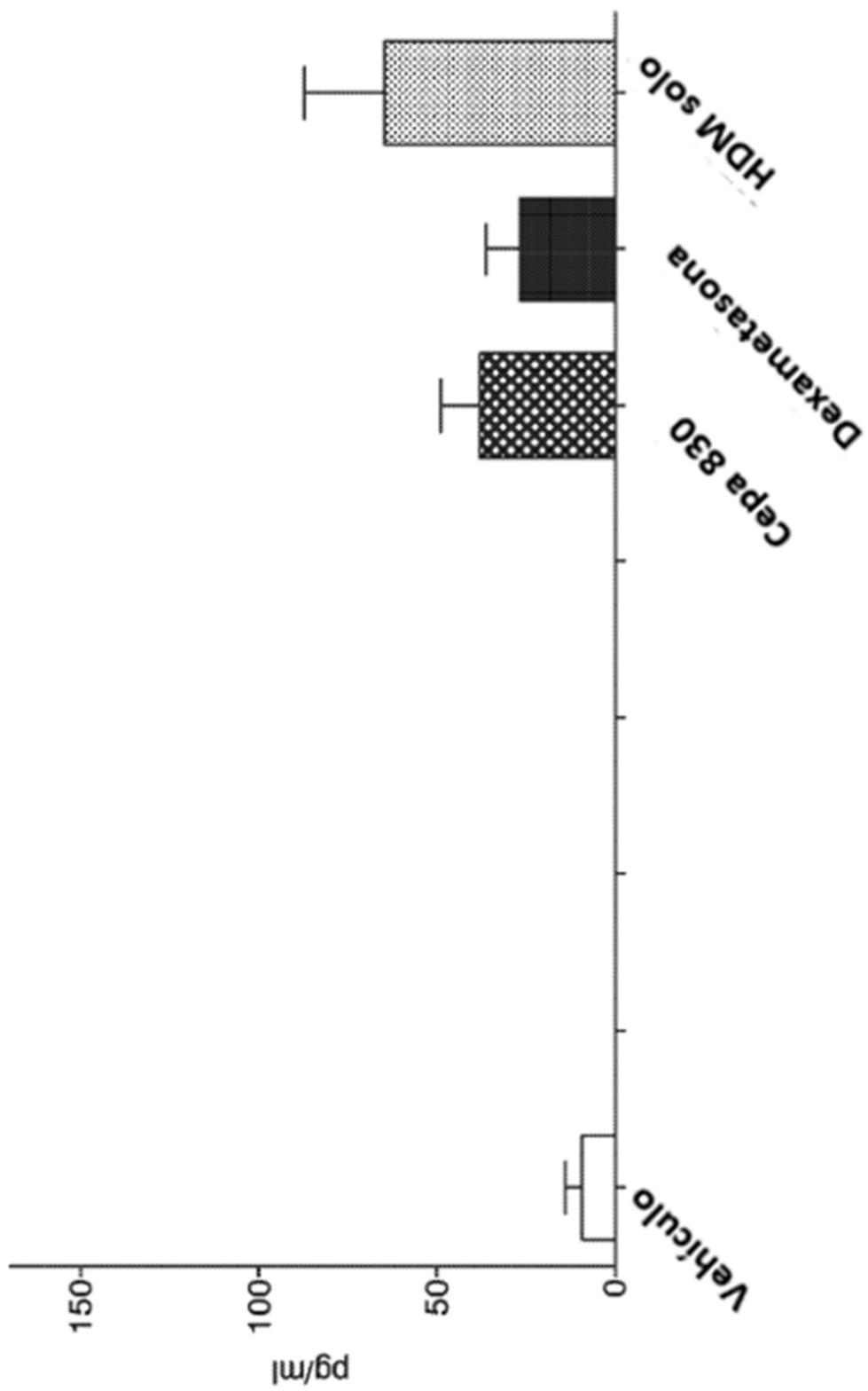


FIG. 43  
Nivel de MIP-1 $\alpha$  en tejido pulmonar



**FIG. 44**  
Nivel de KC en tejido pulmonar

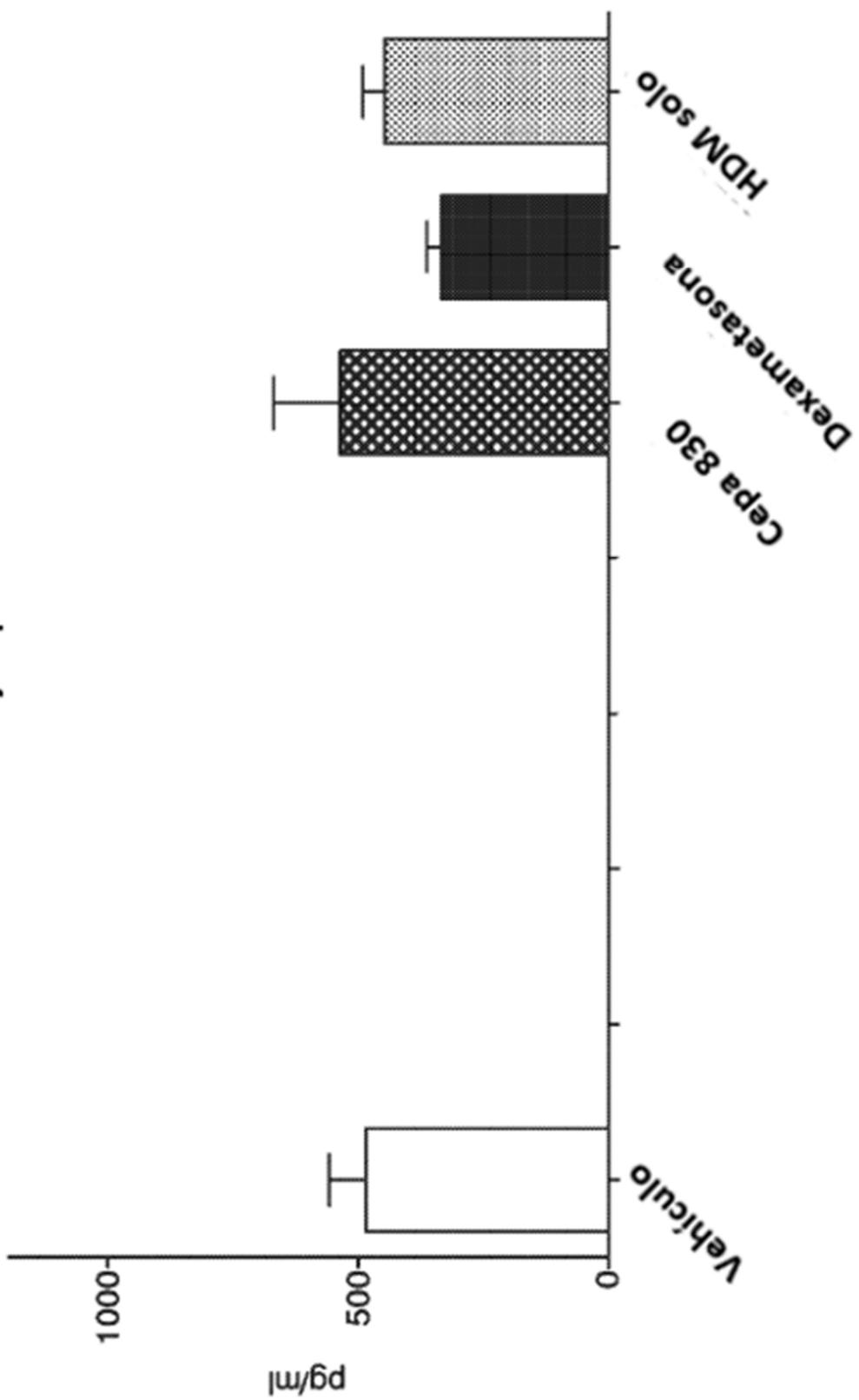


FIG. 45

Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar

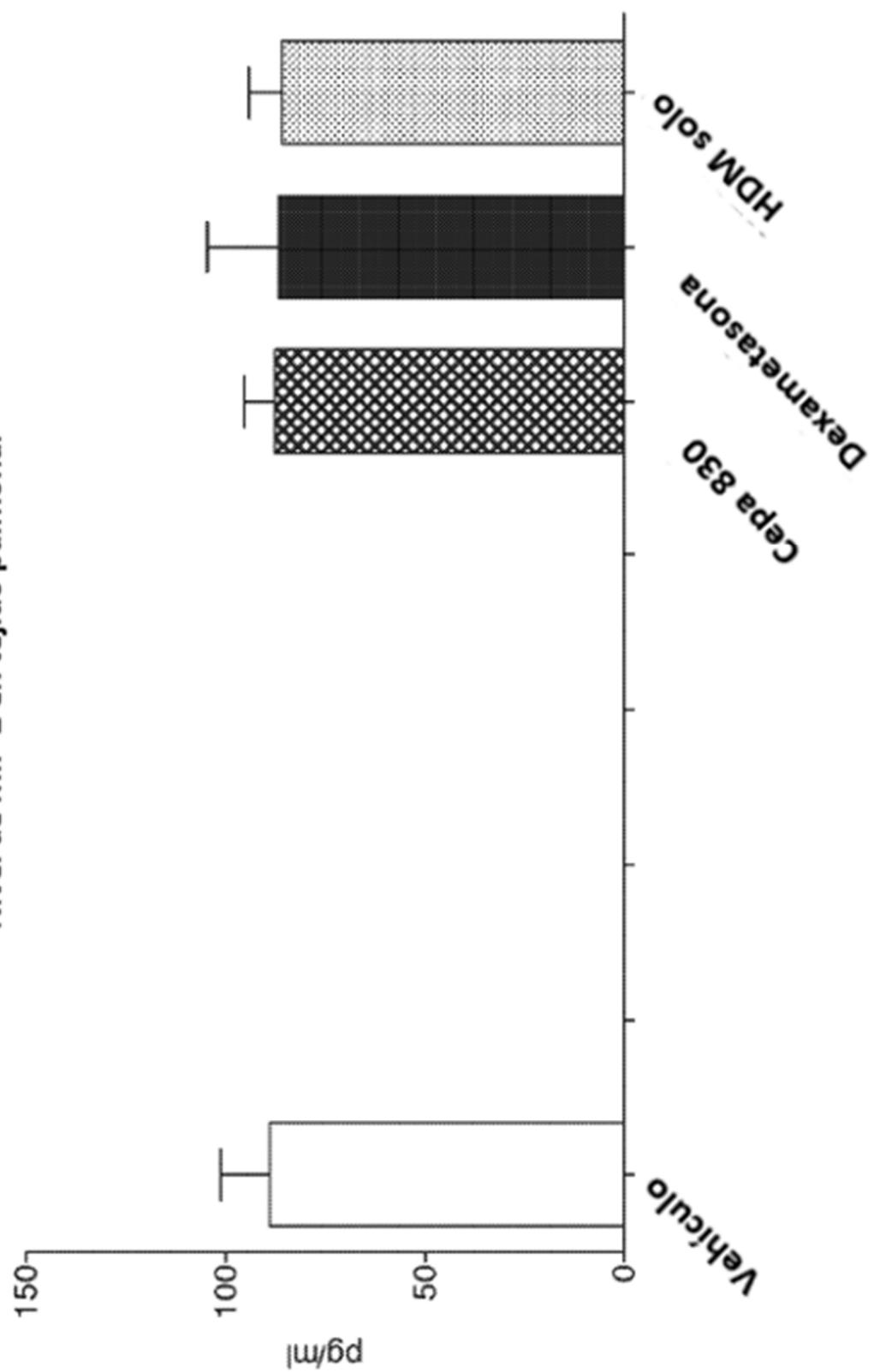
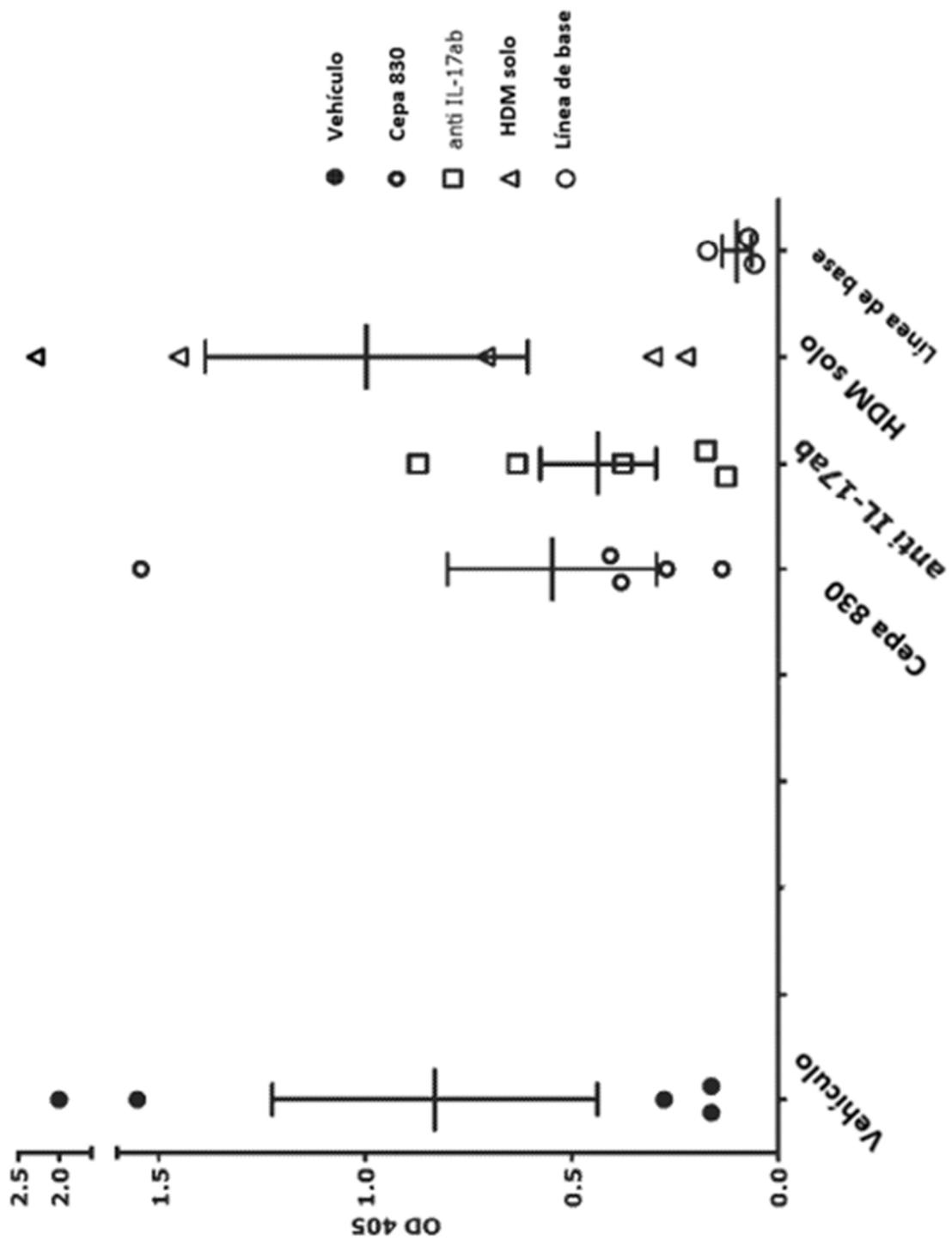


FIG. 46 IgG1 específico a HDM en suero



**FIG. 47** IgG2a específico a HDM en suero

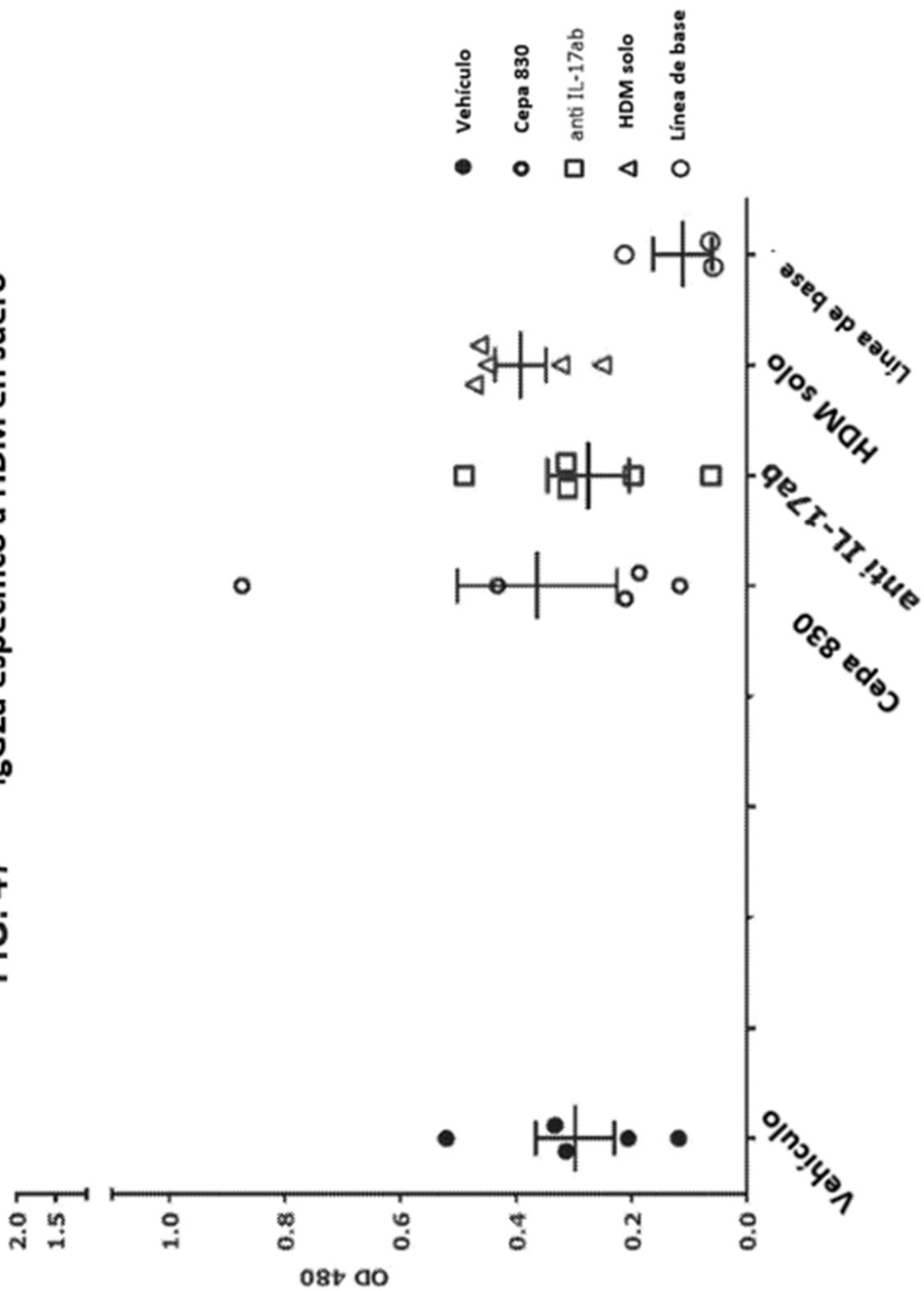


FIG. 48 IgG1 específico a HDM en BALF

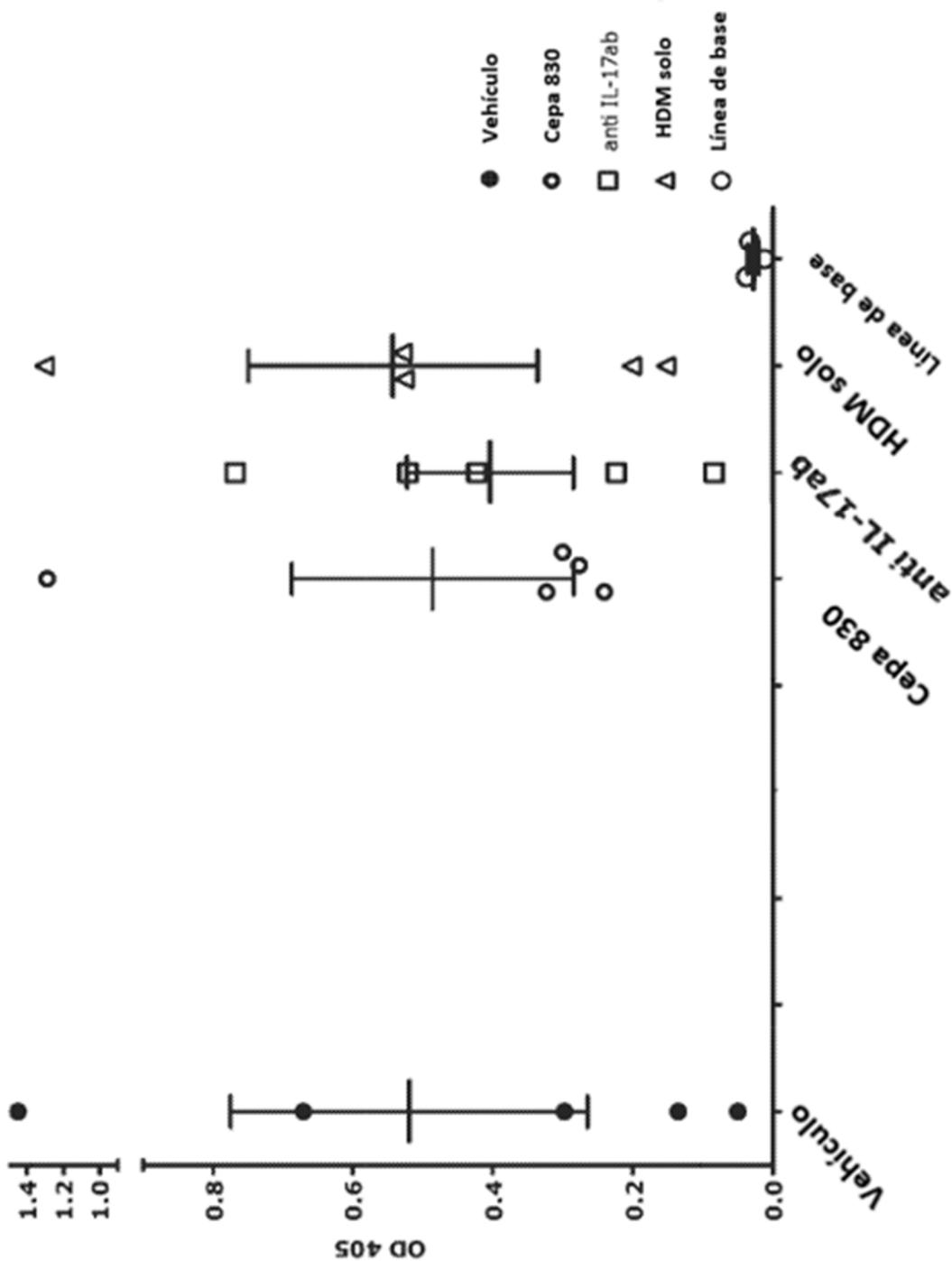


FIG. 49 IgG2a específico a HDM en BALF

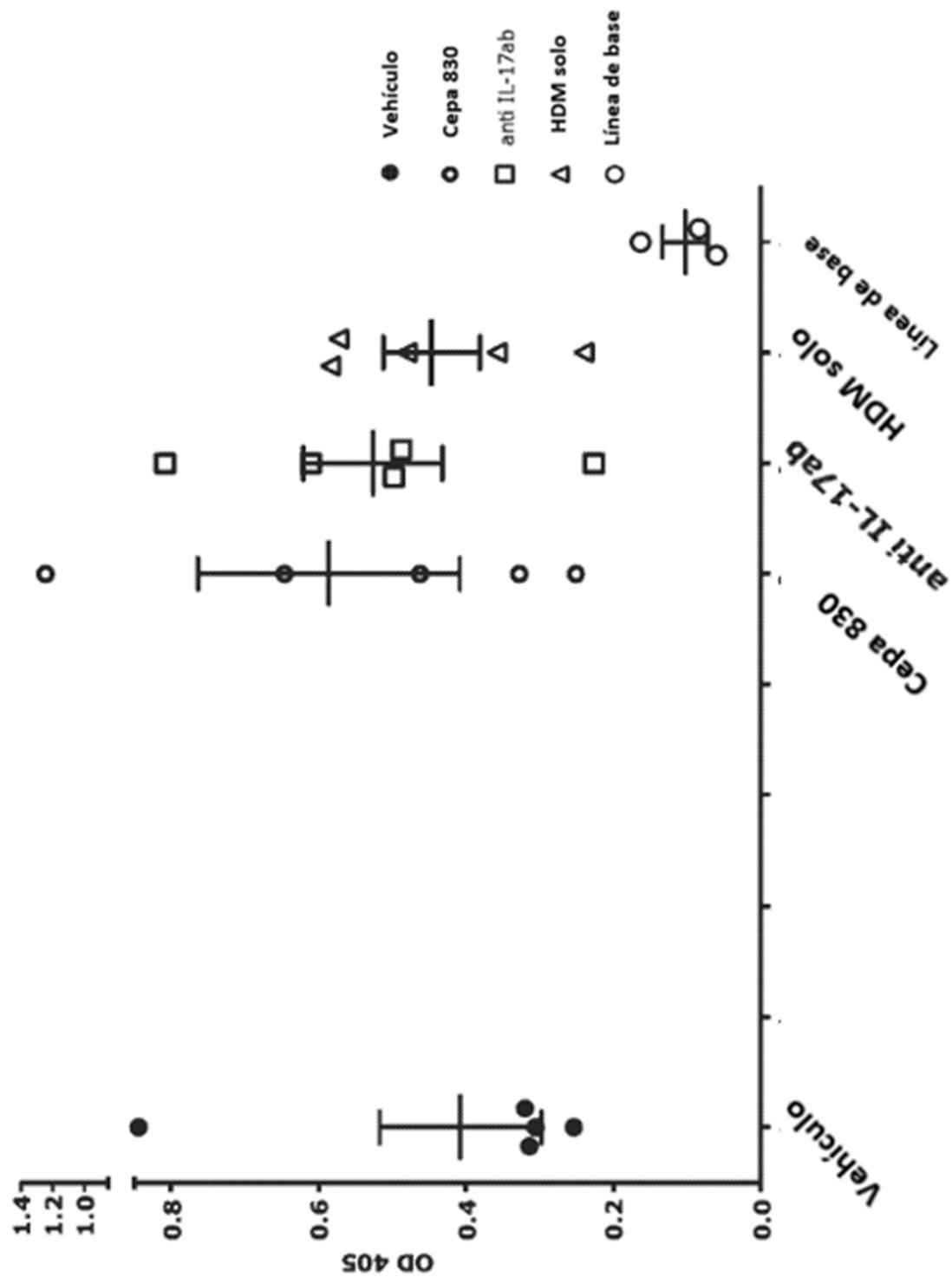


FIG. 50 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración peribronquiolar

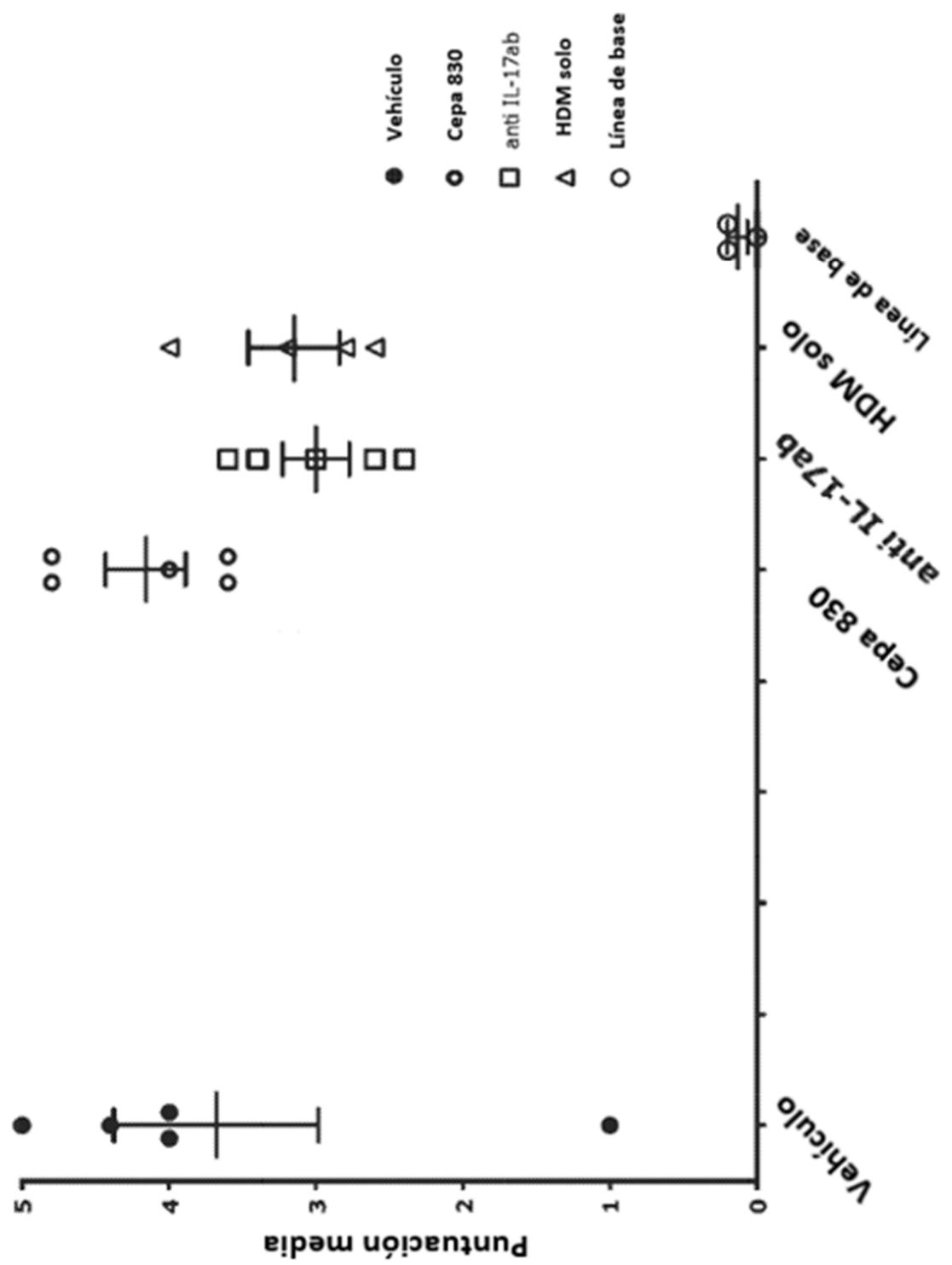
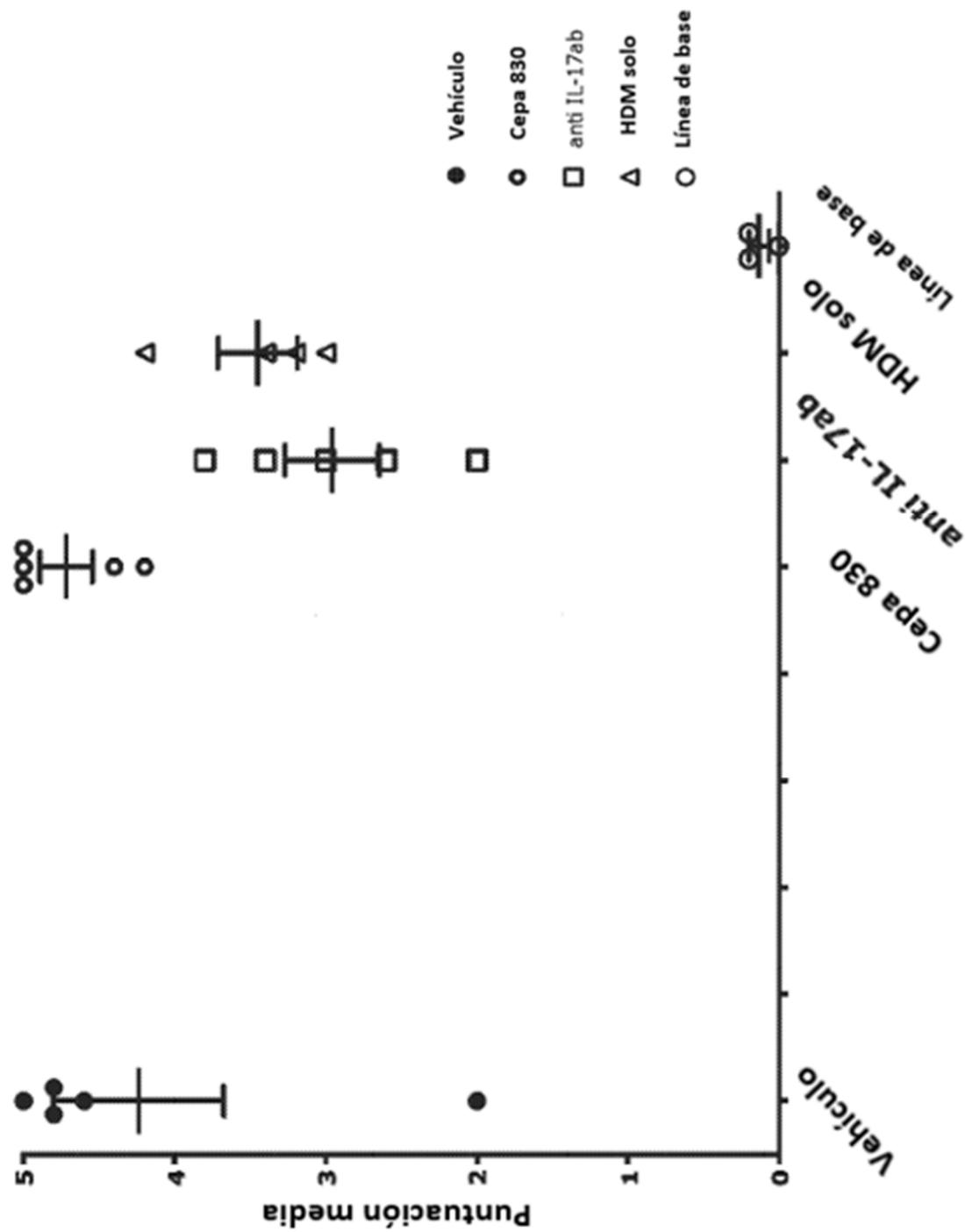


FIG. 51 Análisis histológico – Puntuación media de infiltración perivascular



**FIG. 52 Análisis histológico – Puntuación media inflamatoria (promedio de las puntuaciones de infiltración peribronquiolar y perivasculares**

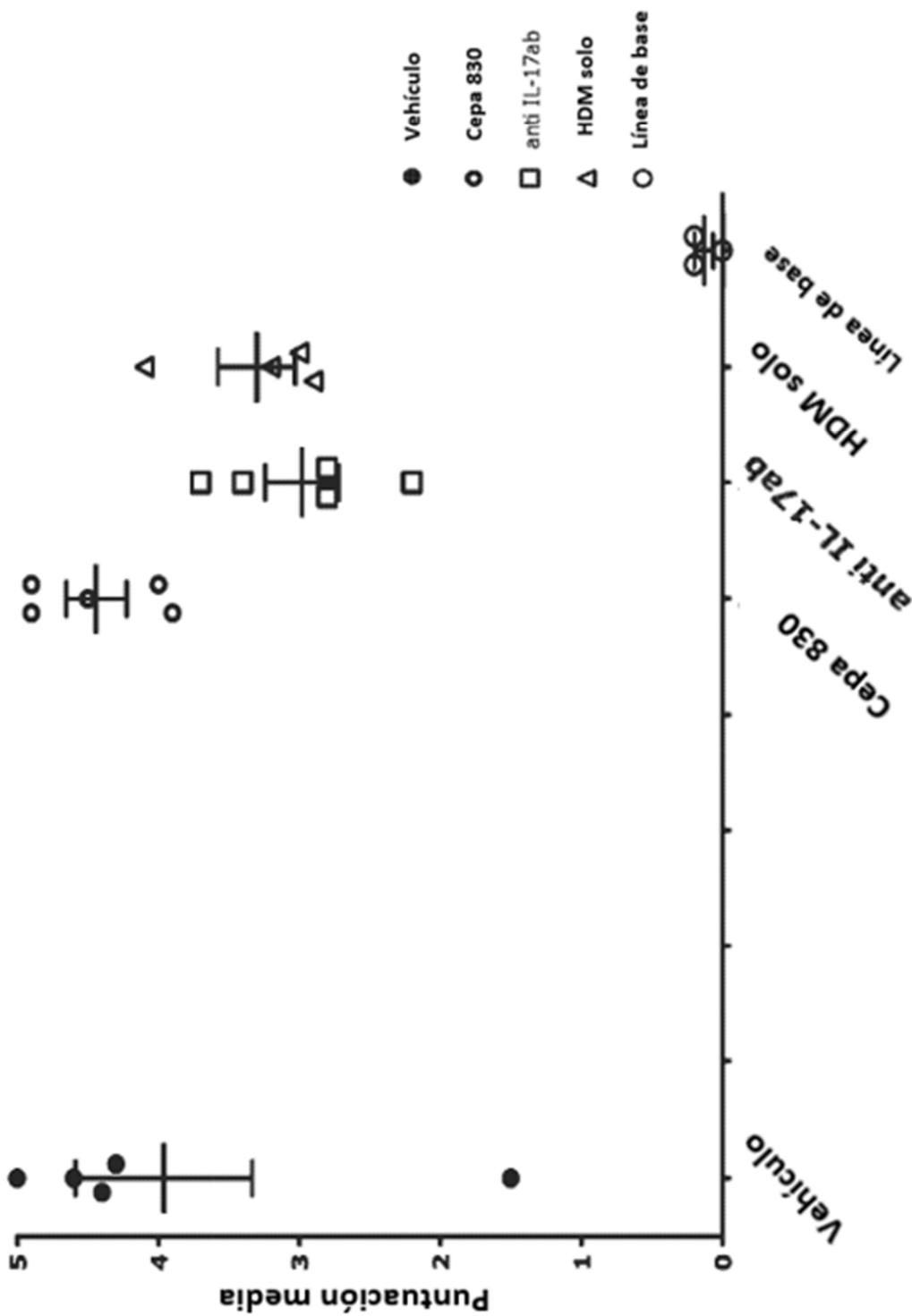


FIG. 53

Nivel de TNFa en tejido pulmonar

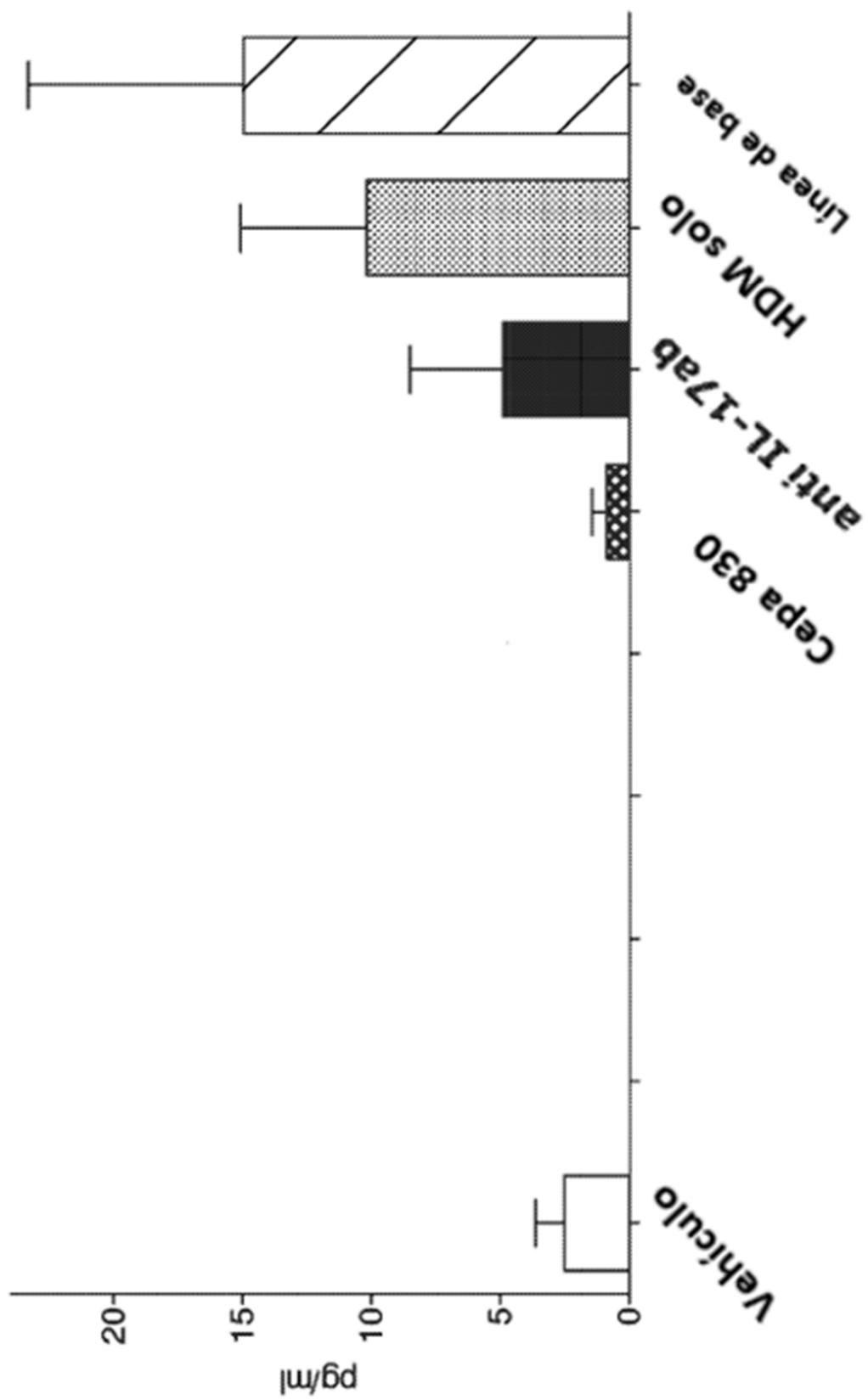
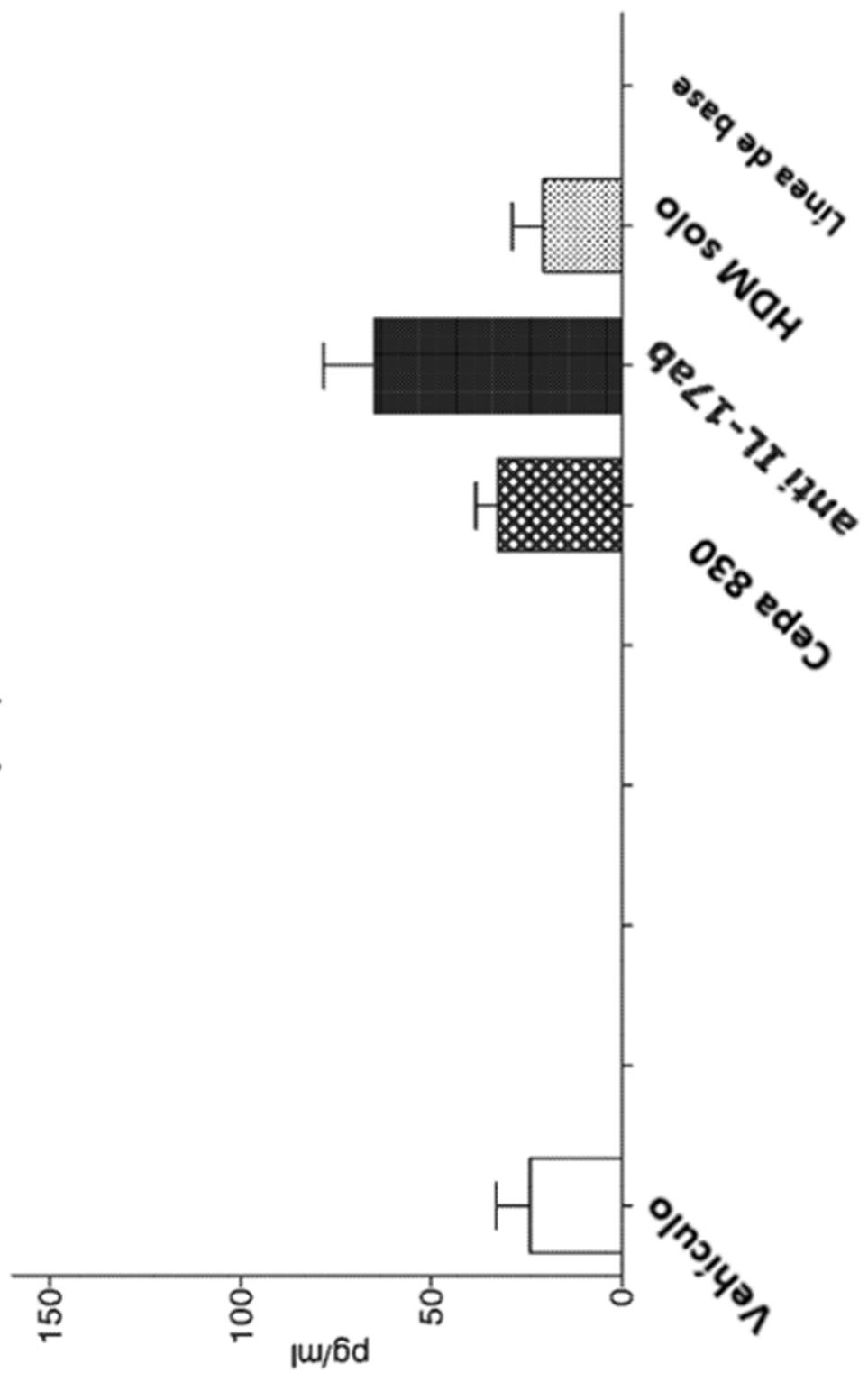
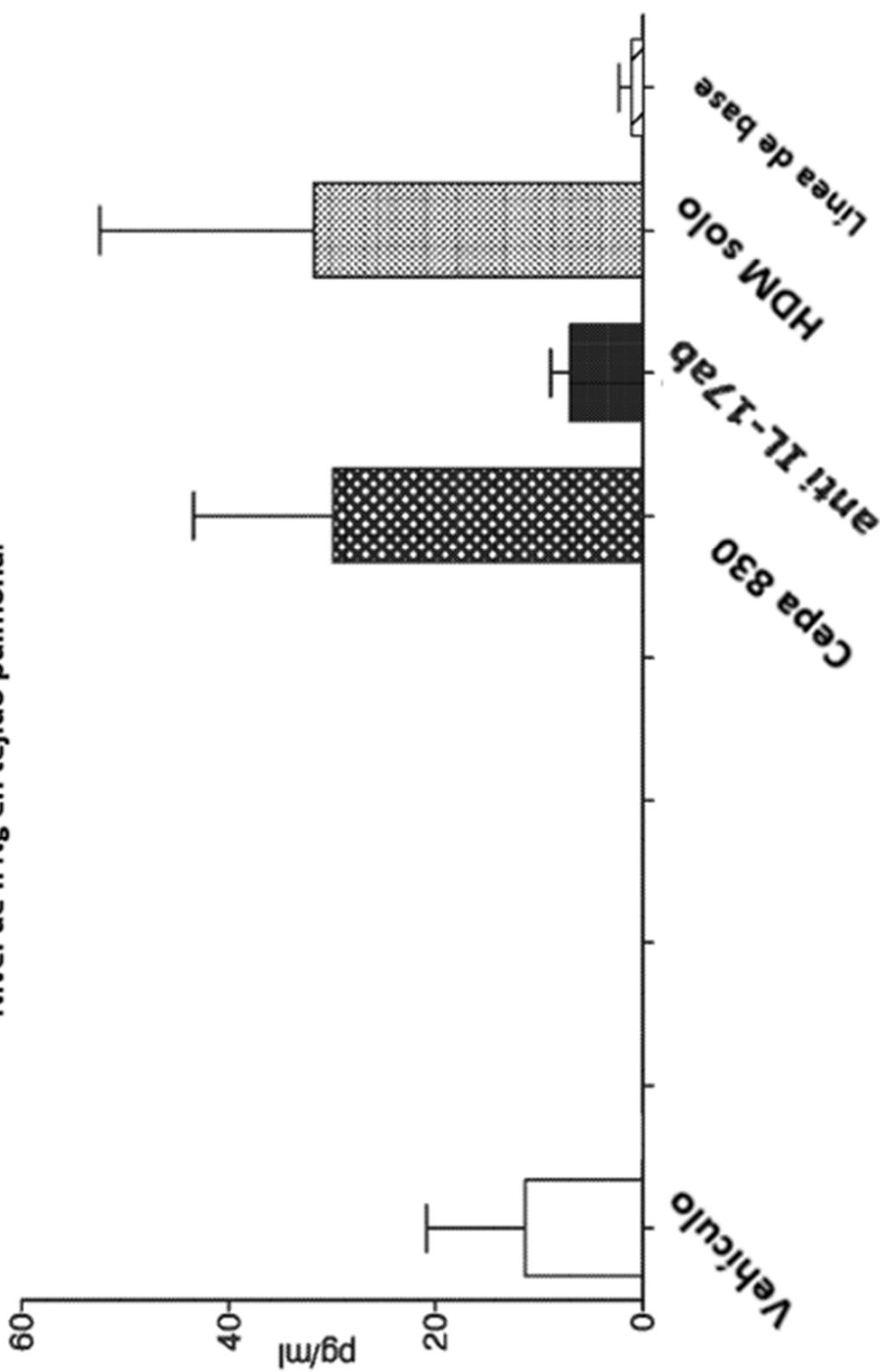


FIG. 54  
Nivel de IL-1a en tejido pulmonar



**FIG. 55**  
Nivel de IFNg en tejido pulmonar



**FIG. 56**  
Nivel de IL-17F en tejido pulmonar

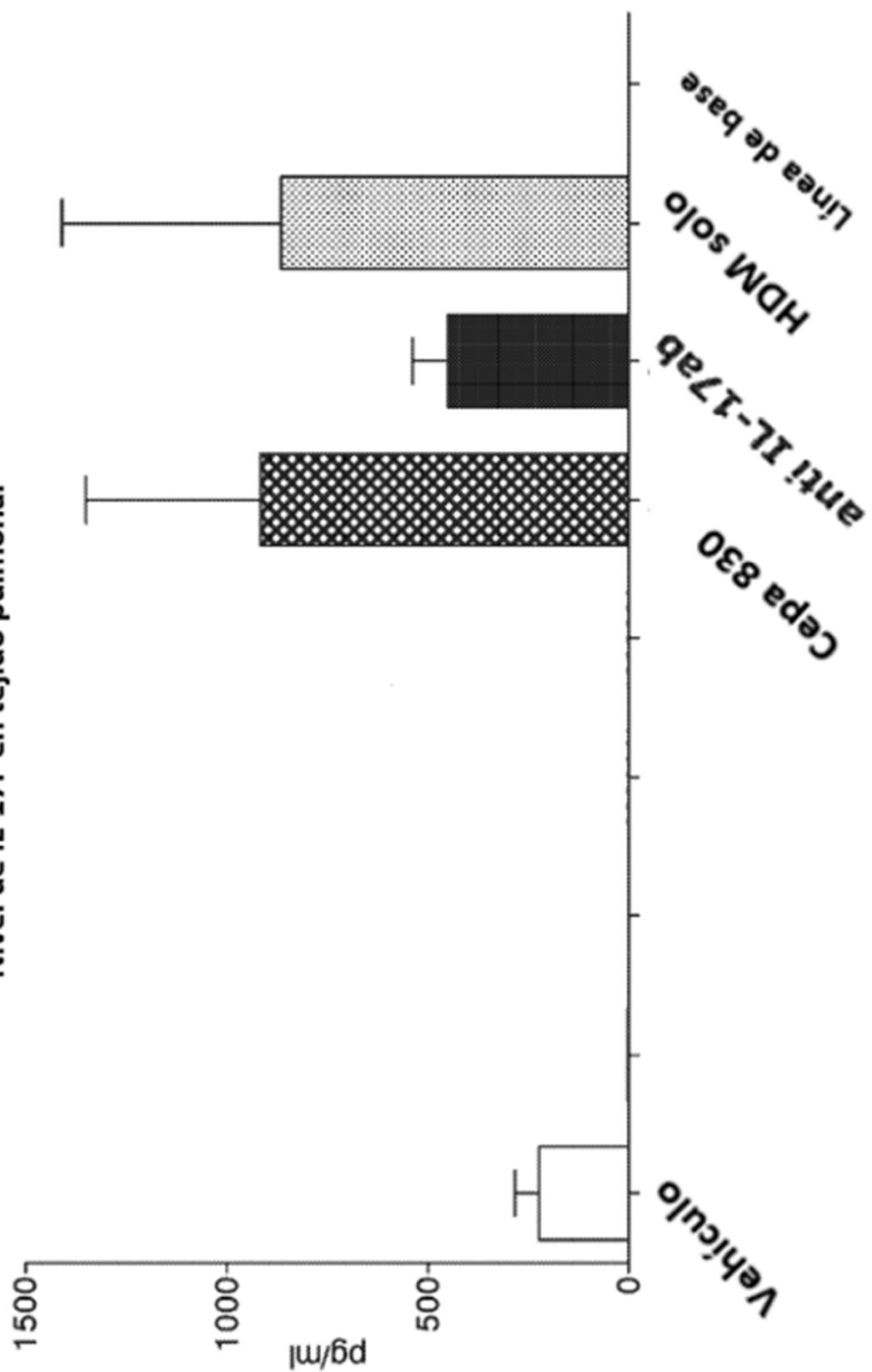


FIG. 57

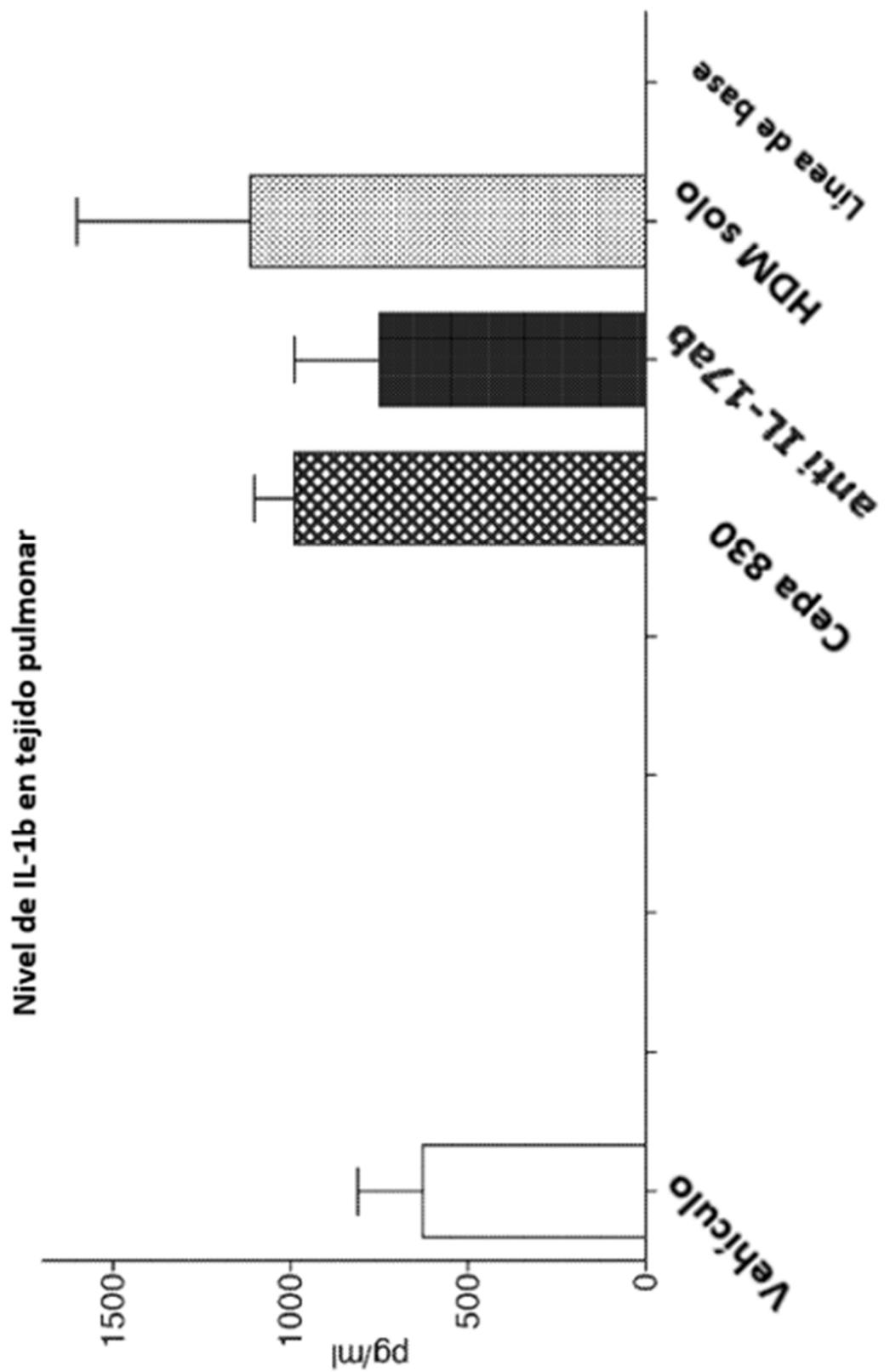


FIG. 58

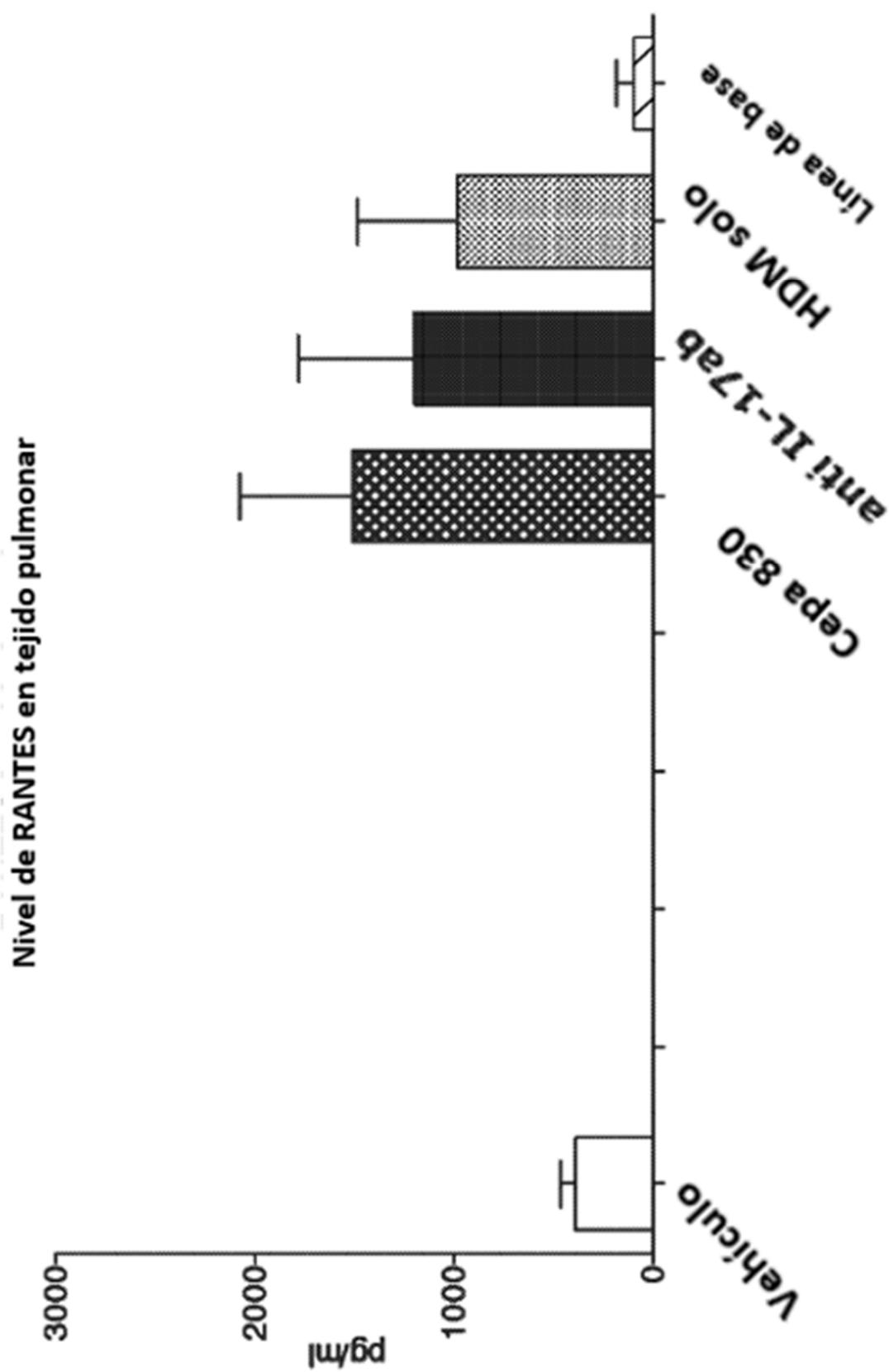
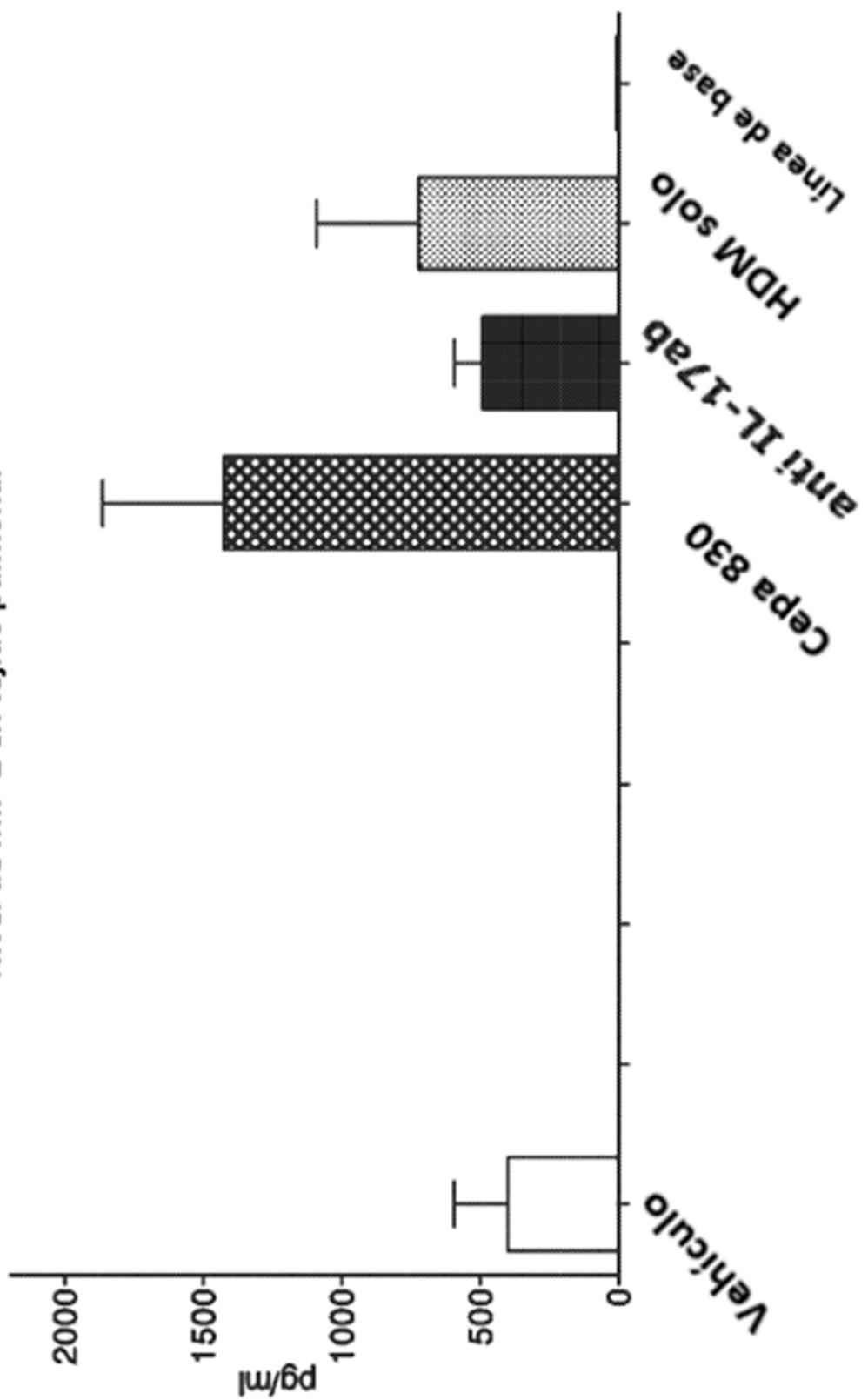
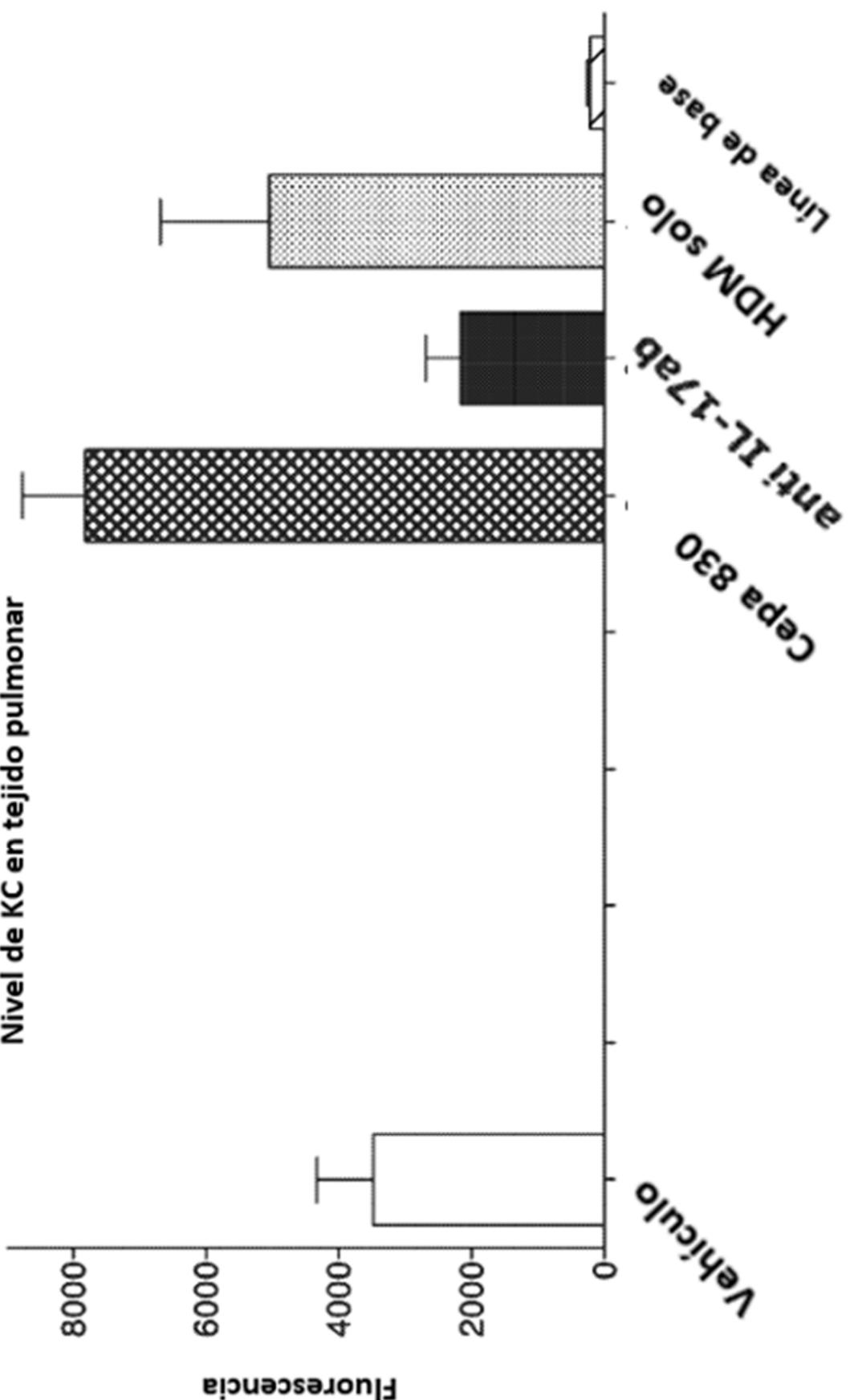


FIG. 59  
Nivel de MIP-2 en tejido pulmonar



**FIG. 60**  
Nivel de KC en tejido pulmonar



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

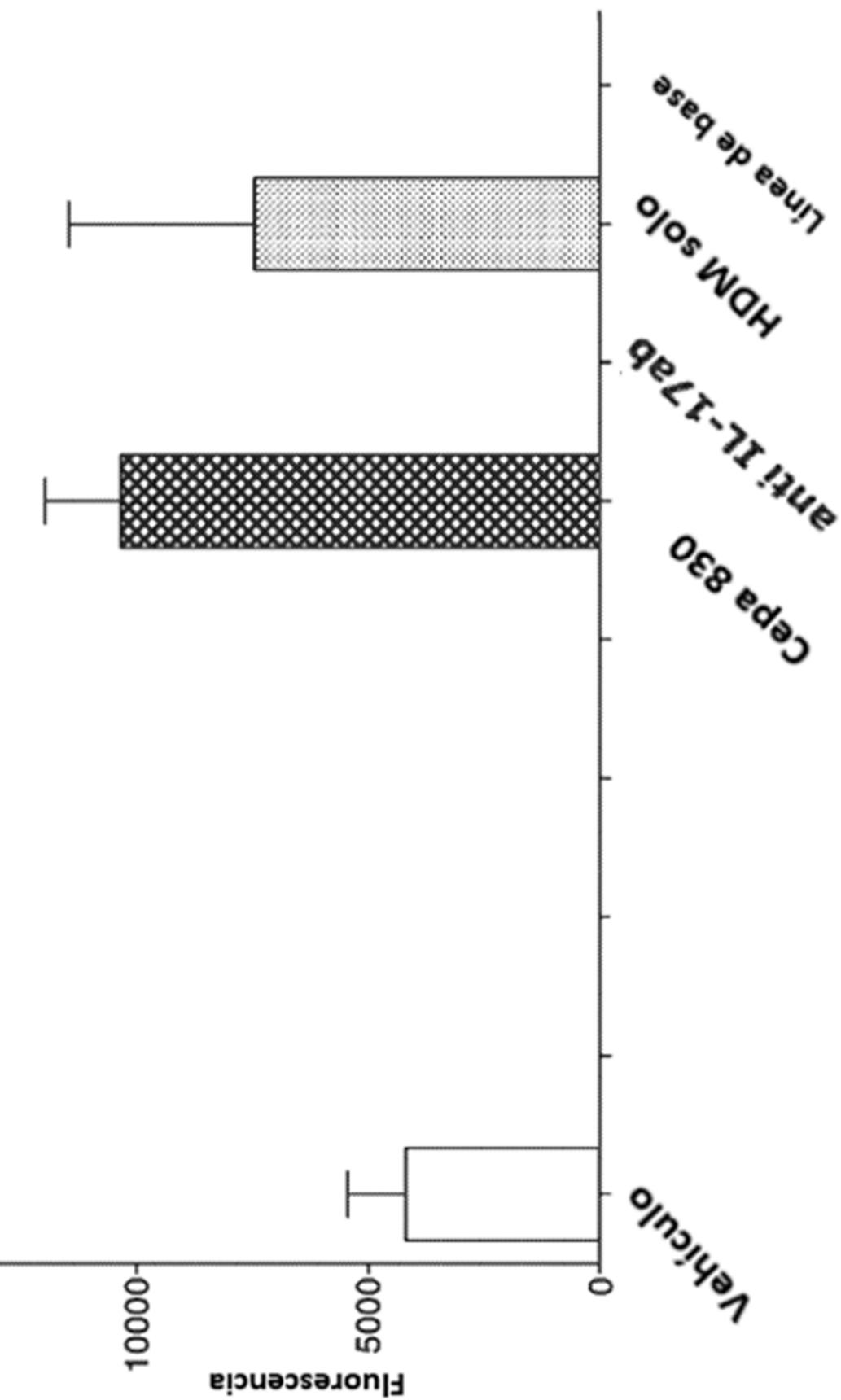


FIG. 62  
Nivel de MIP-1 $\alpha$  en tejido pulmonar

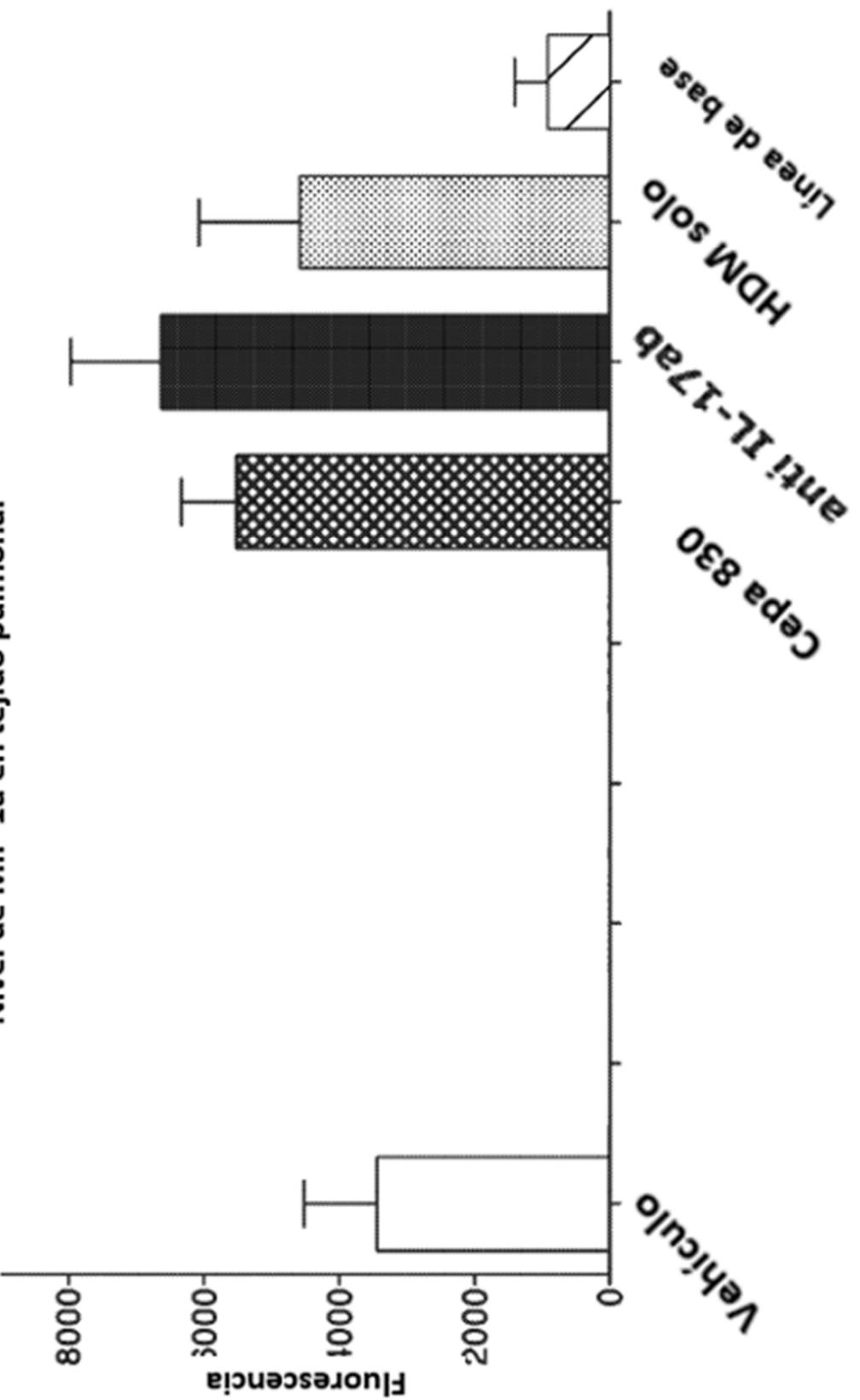
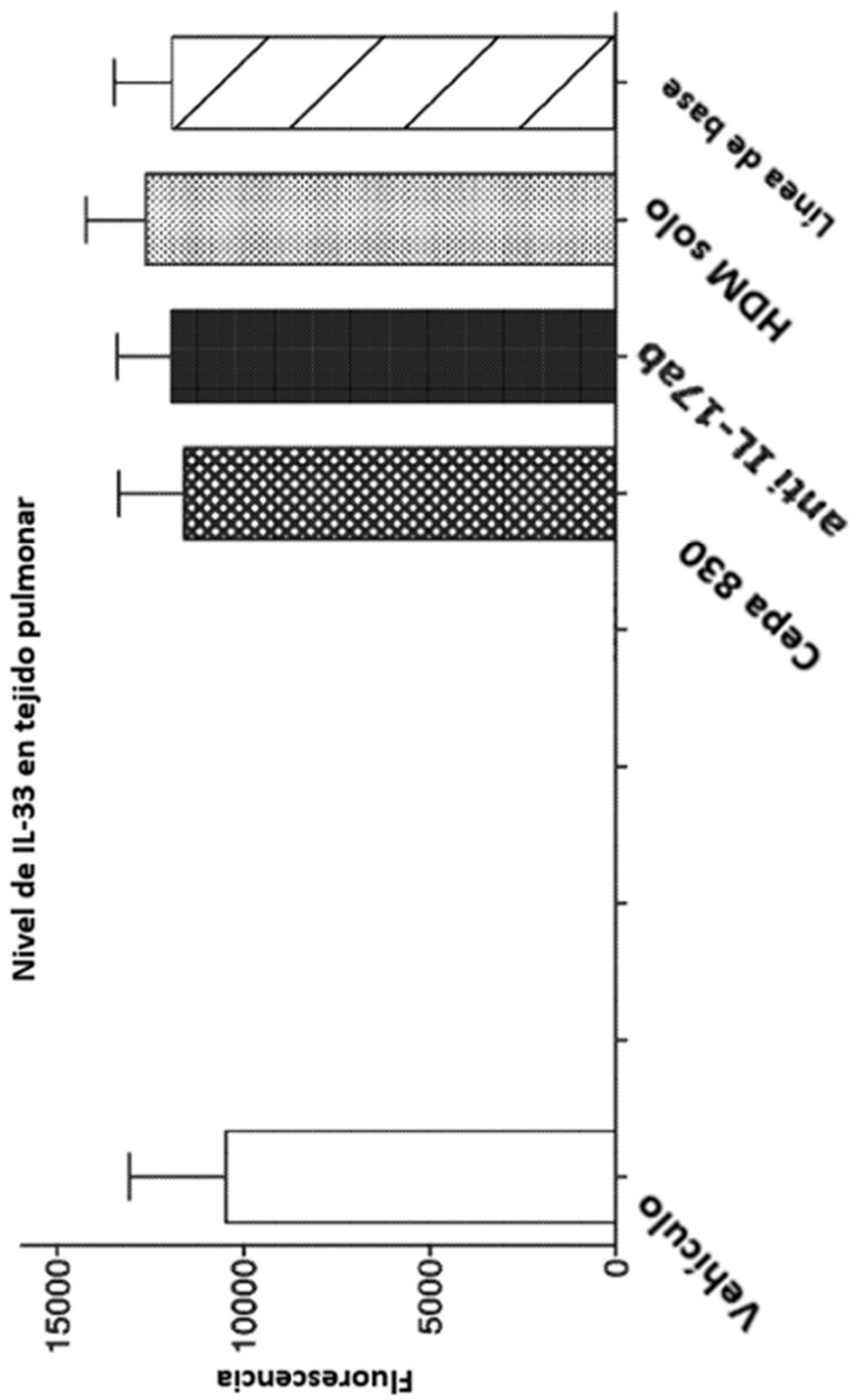


FIG. 63



**FIG. 64**

Plantilla visual para puntuación de histopatología

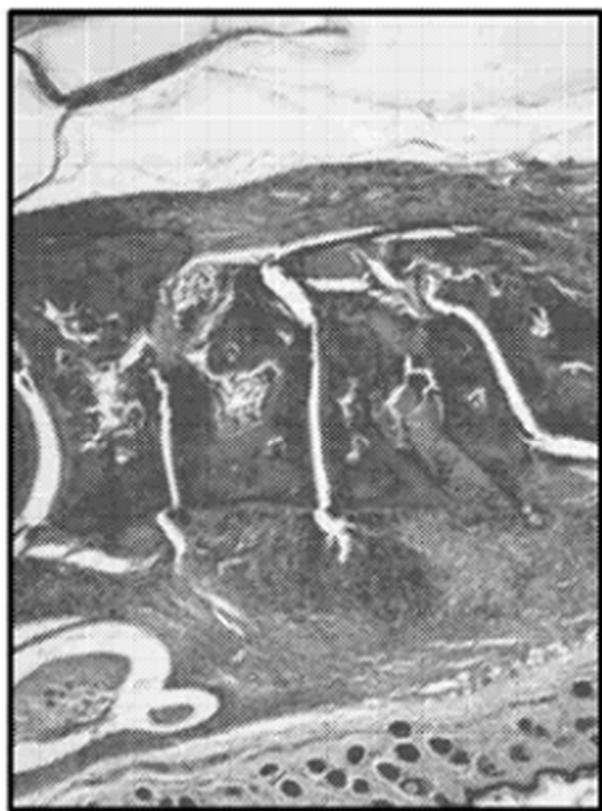


Grado 1



Grado 0

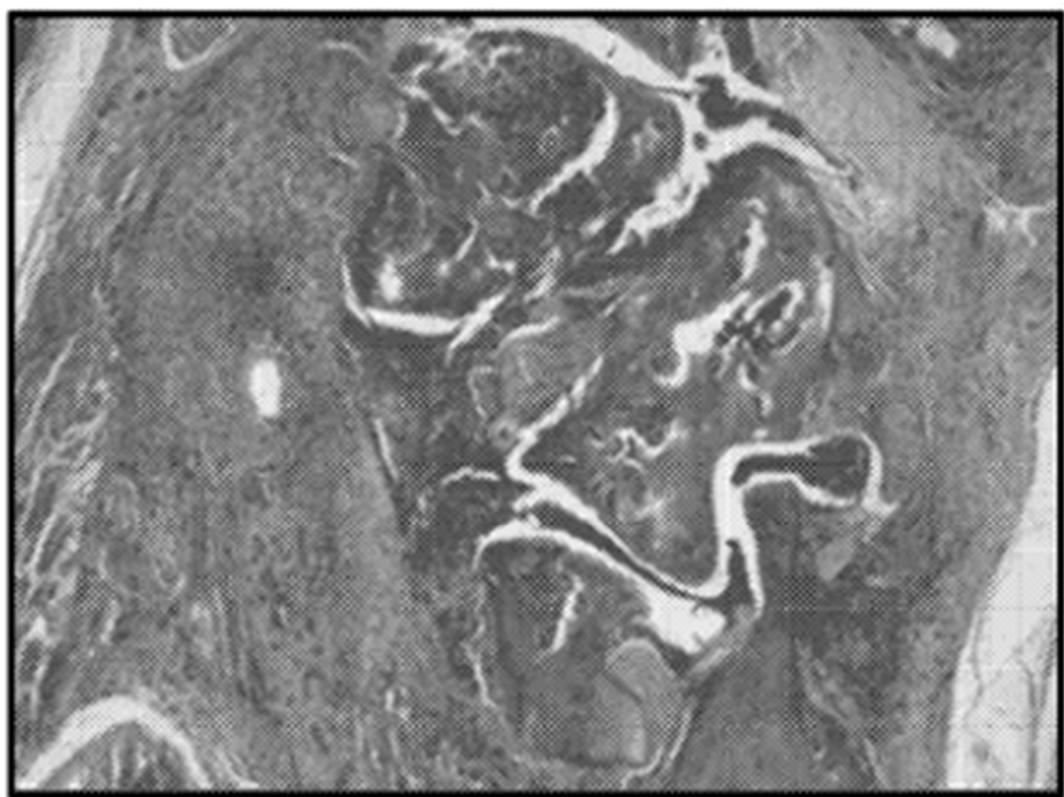
FIG. 64 (cont.)



Grado 7



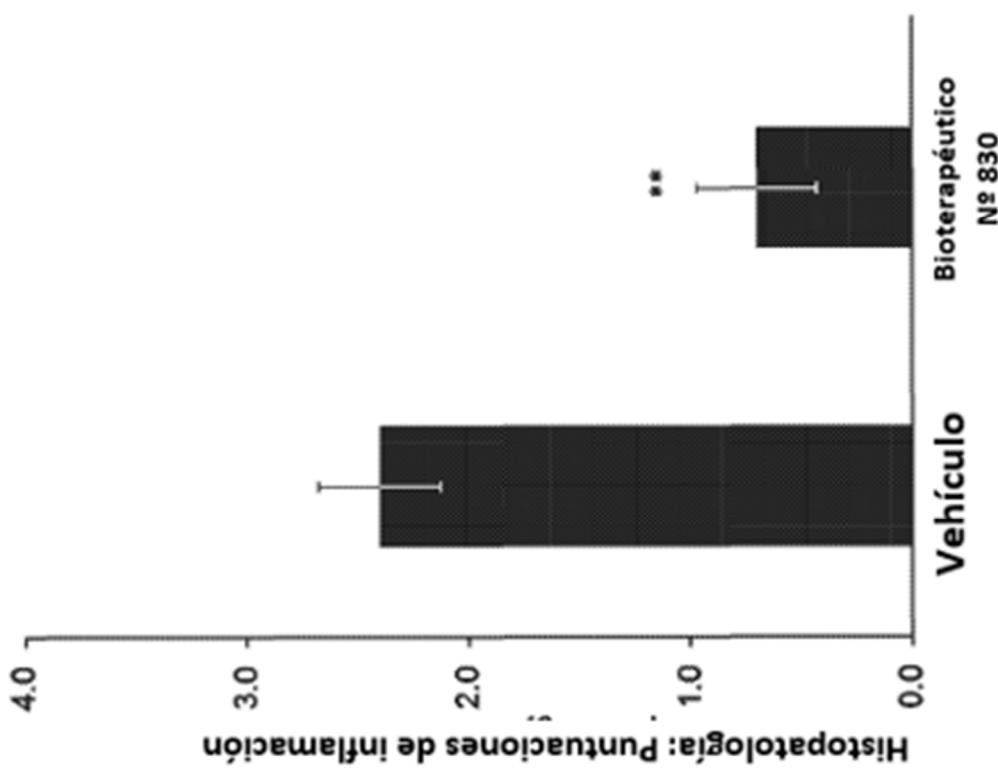
Grado 4



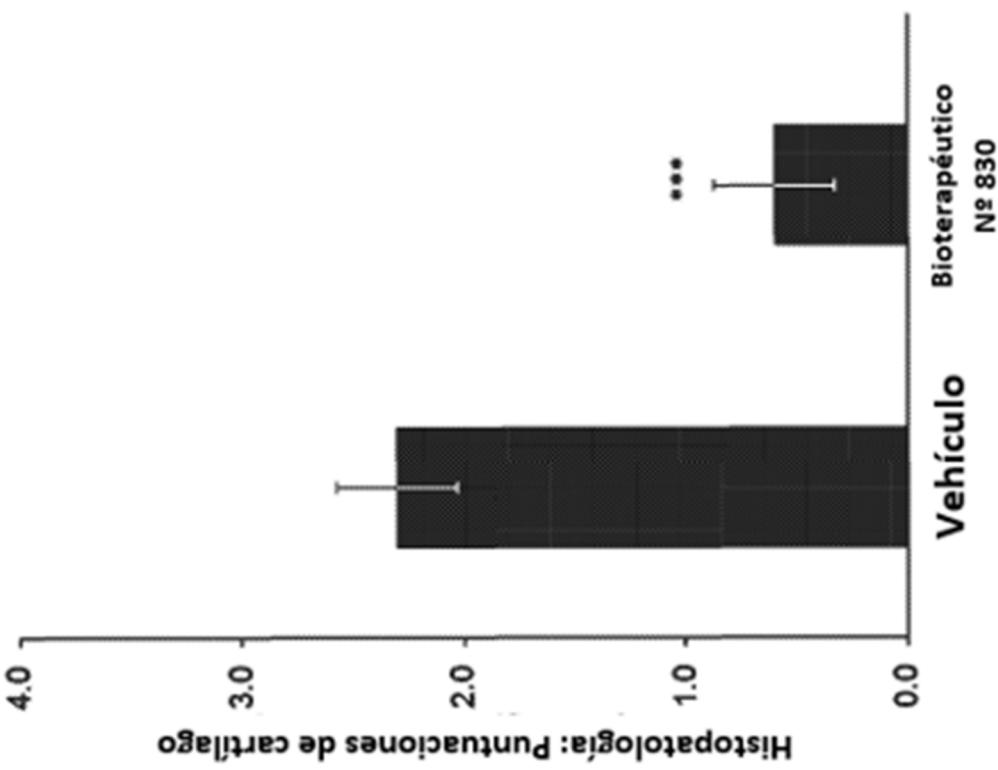
Grado 9

**FIG. 64 (cont.)**

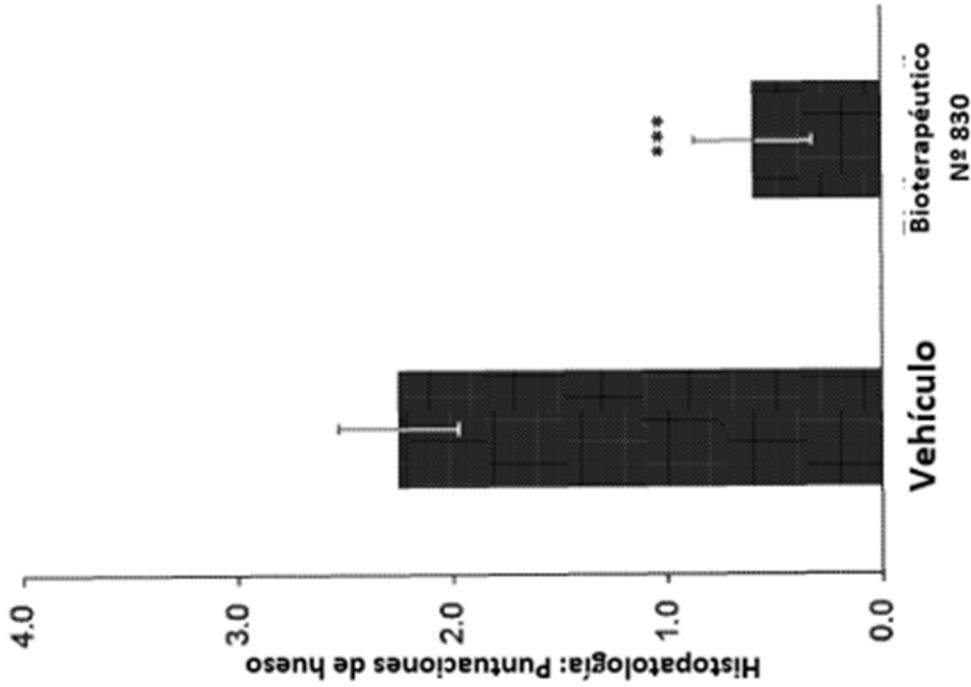
**FIG. 65**  
**Histopatología: Puntuaciones de inflamación**



**FIG. 66**  
**Histopatología: Puntuaciones de cartílago**



**FIG. 67**  
Histopatología: Puntuaciones de hueso



**FIG. 68**  
Histopatología: Puntuaciones totales

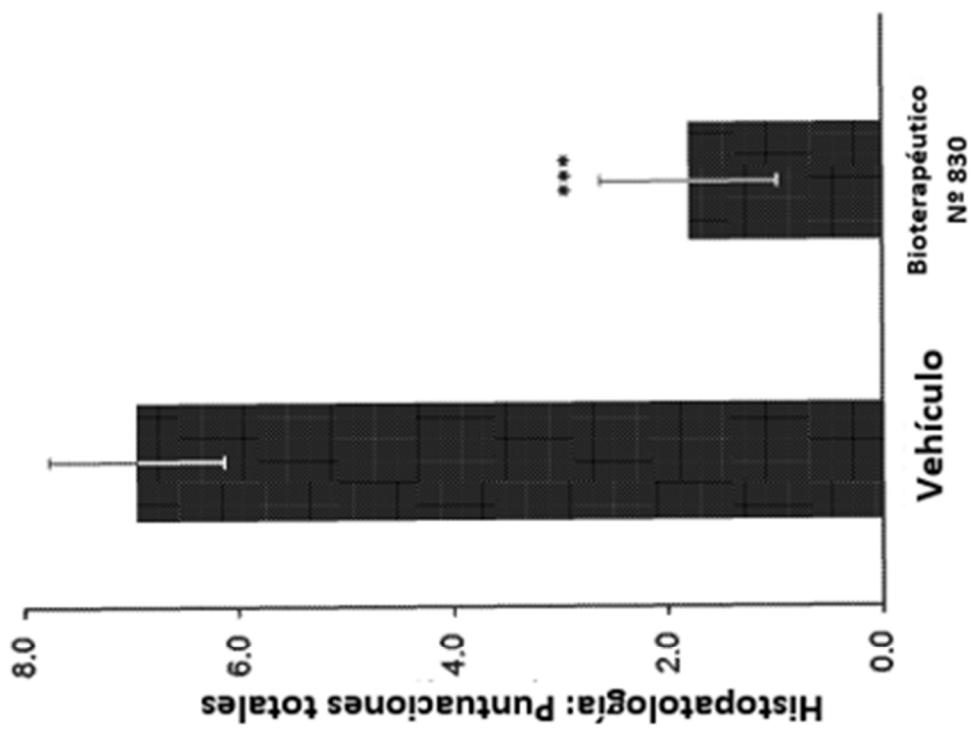
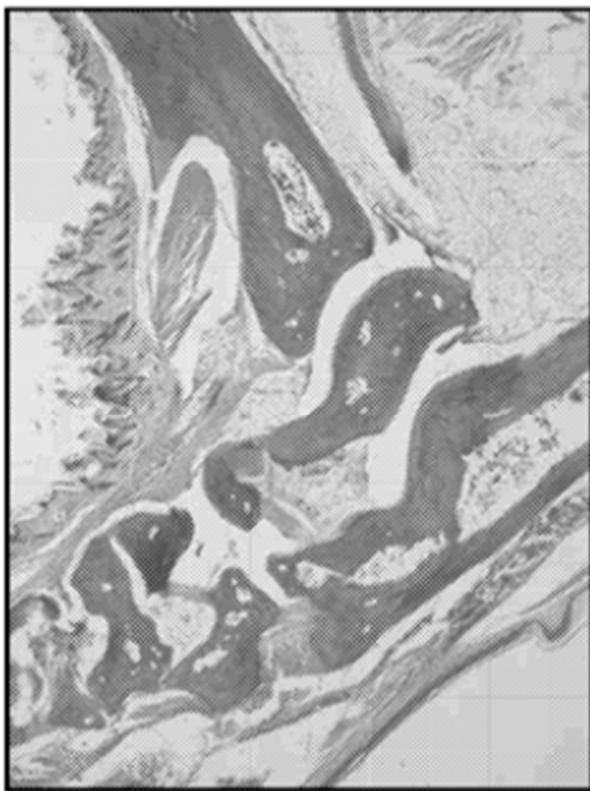
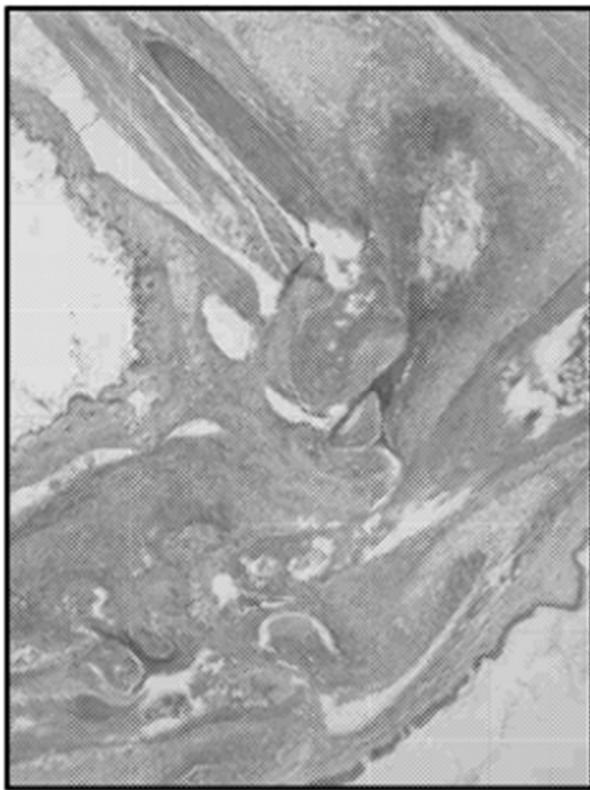


FIG. 69



Cepa nº 830 (nº3,2R, Grado 0)



Vehículo (nº1,1 1R, Grado 9)

FIG. 70

## Puntuación clínica

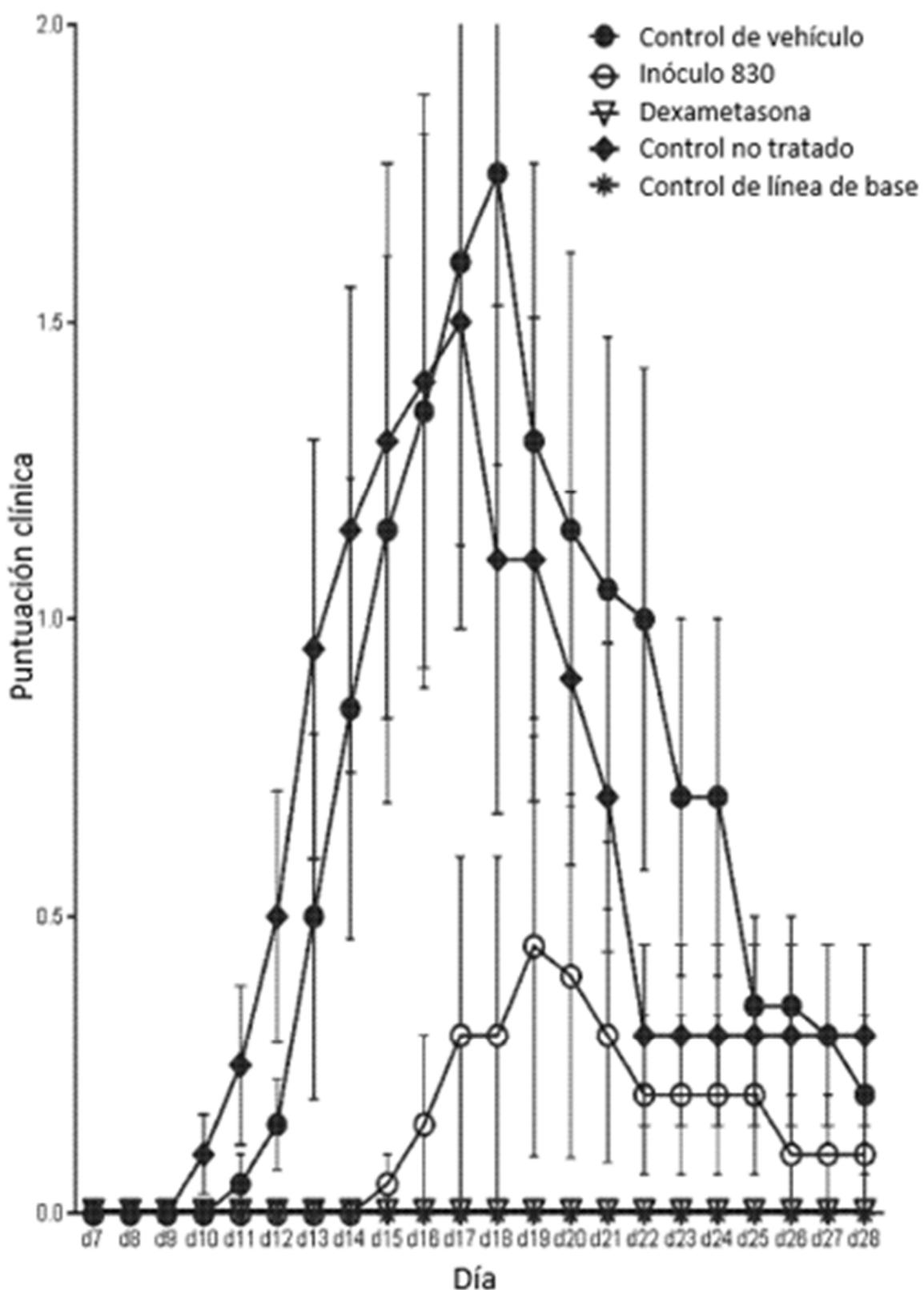
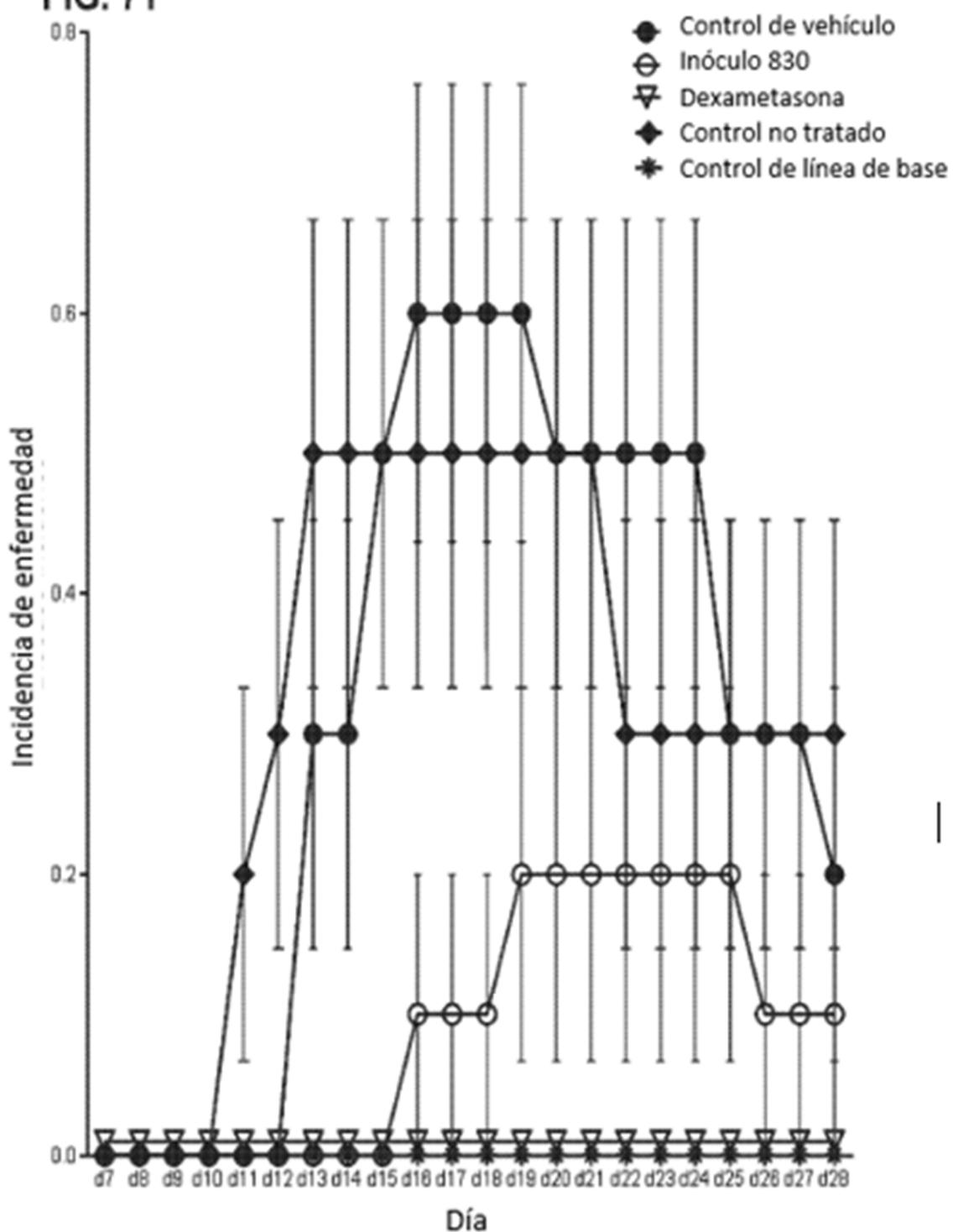


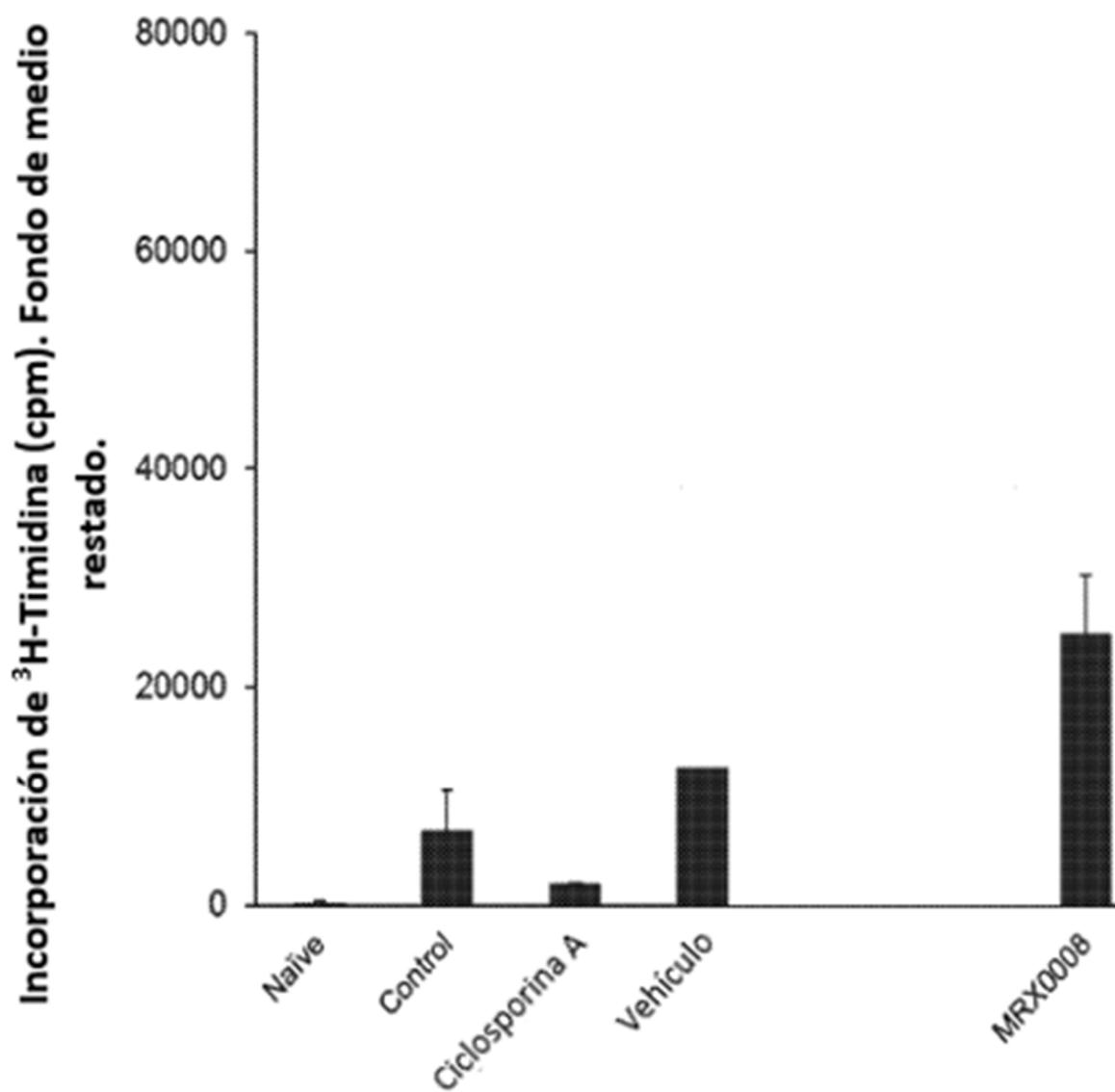
FIG. 71

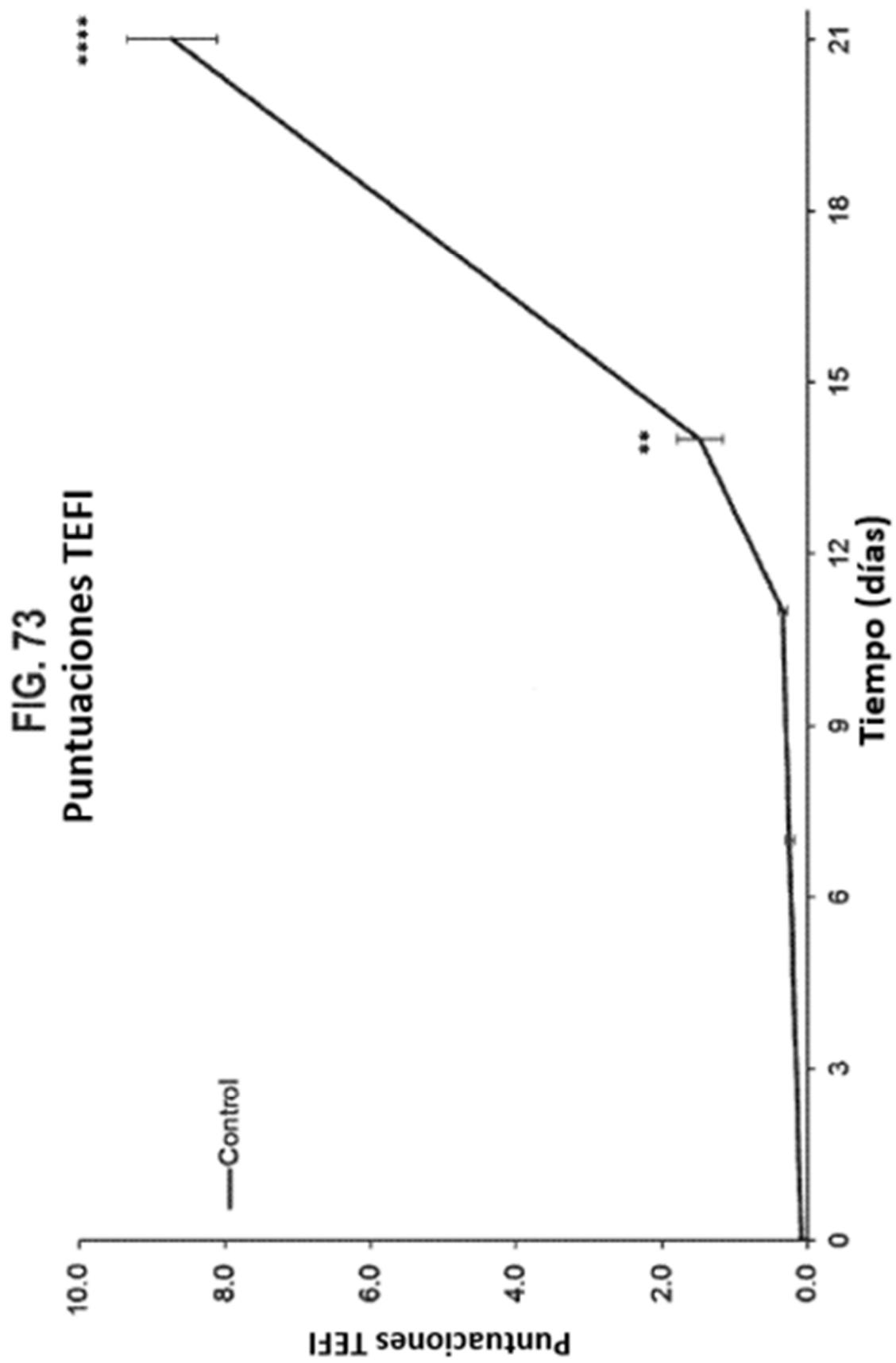
## Incidencia de enfermedad



**FIG. 72**

Respuestas proliferativas de ganglio linfático a IRBP, día 21





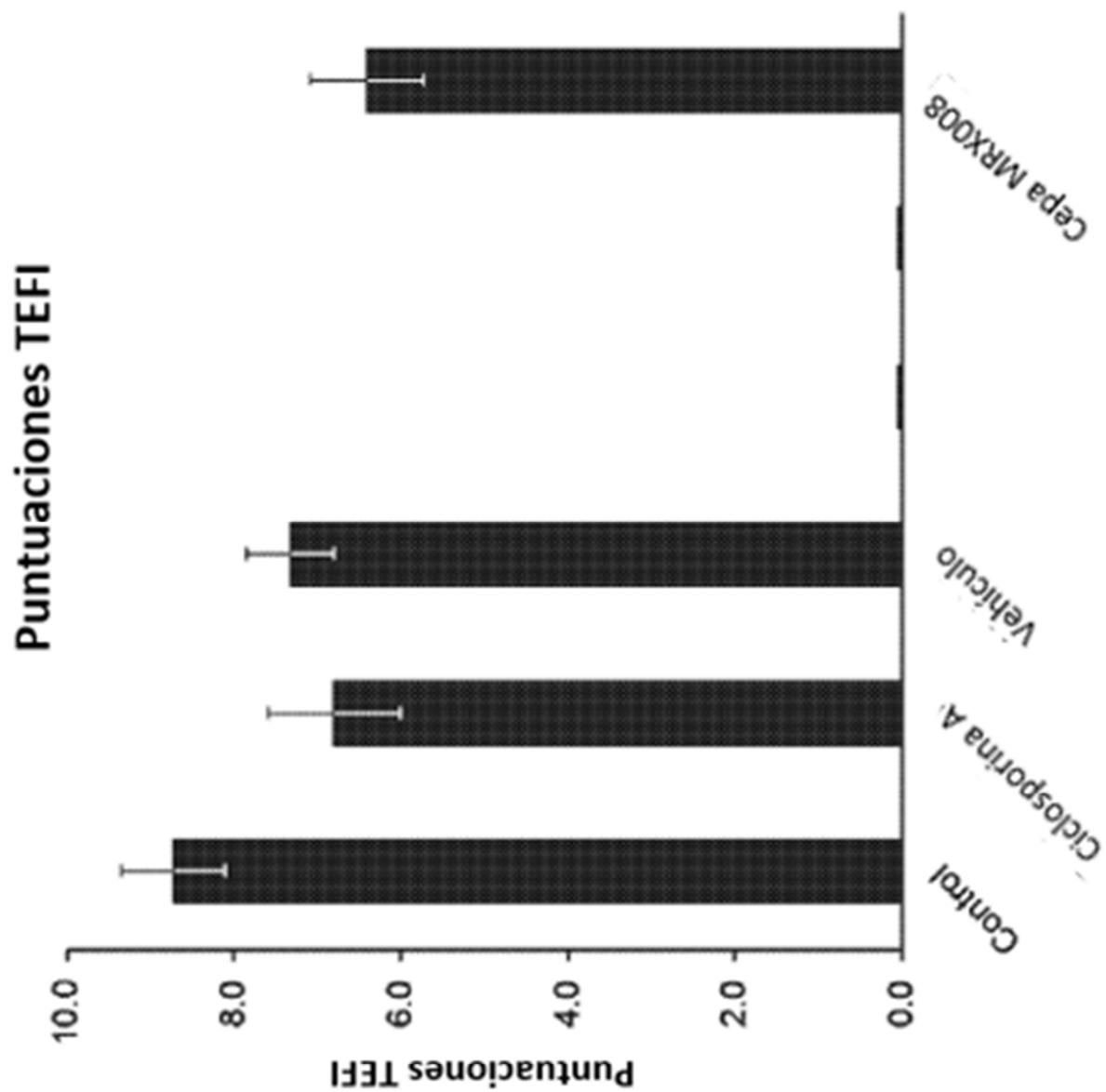


FIG. 74

FIG. 75

Concentración de IL-6

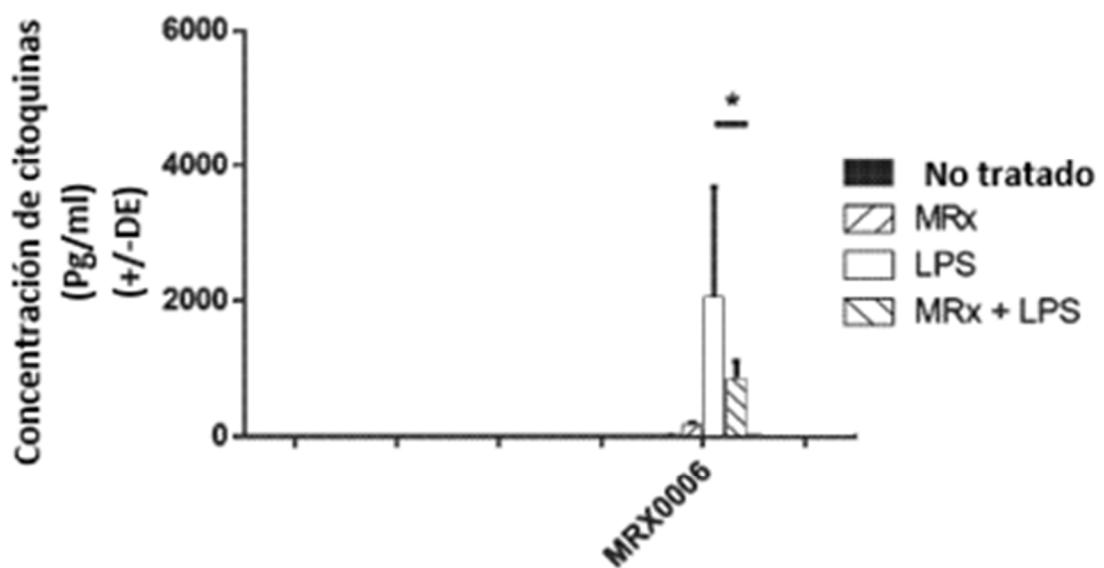
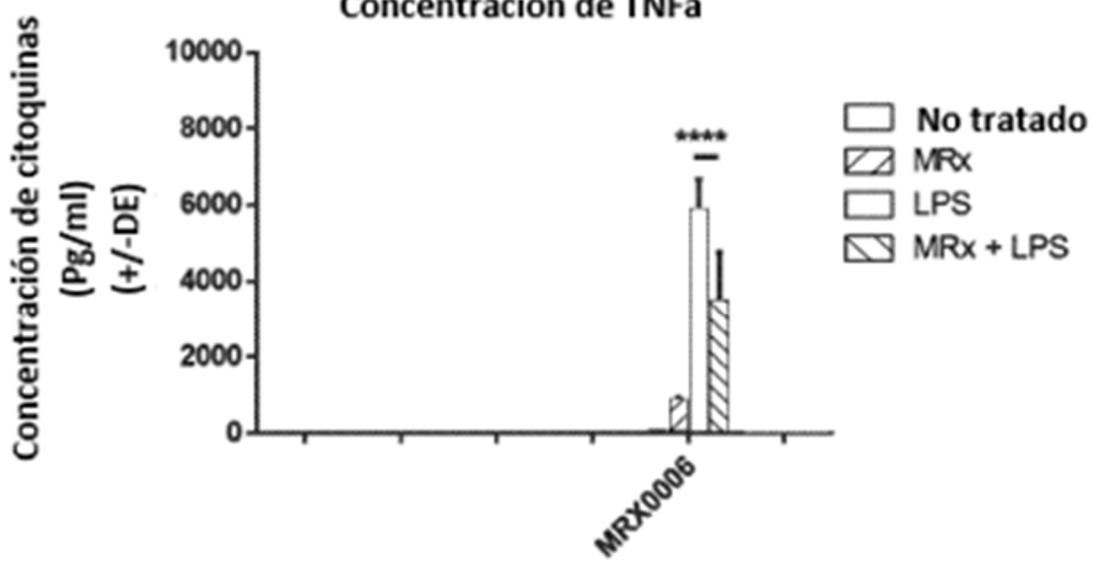
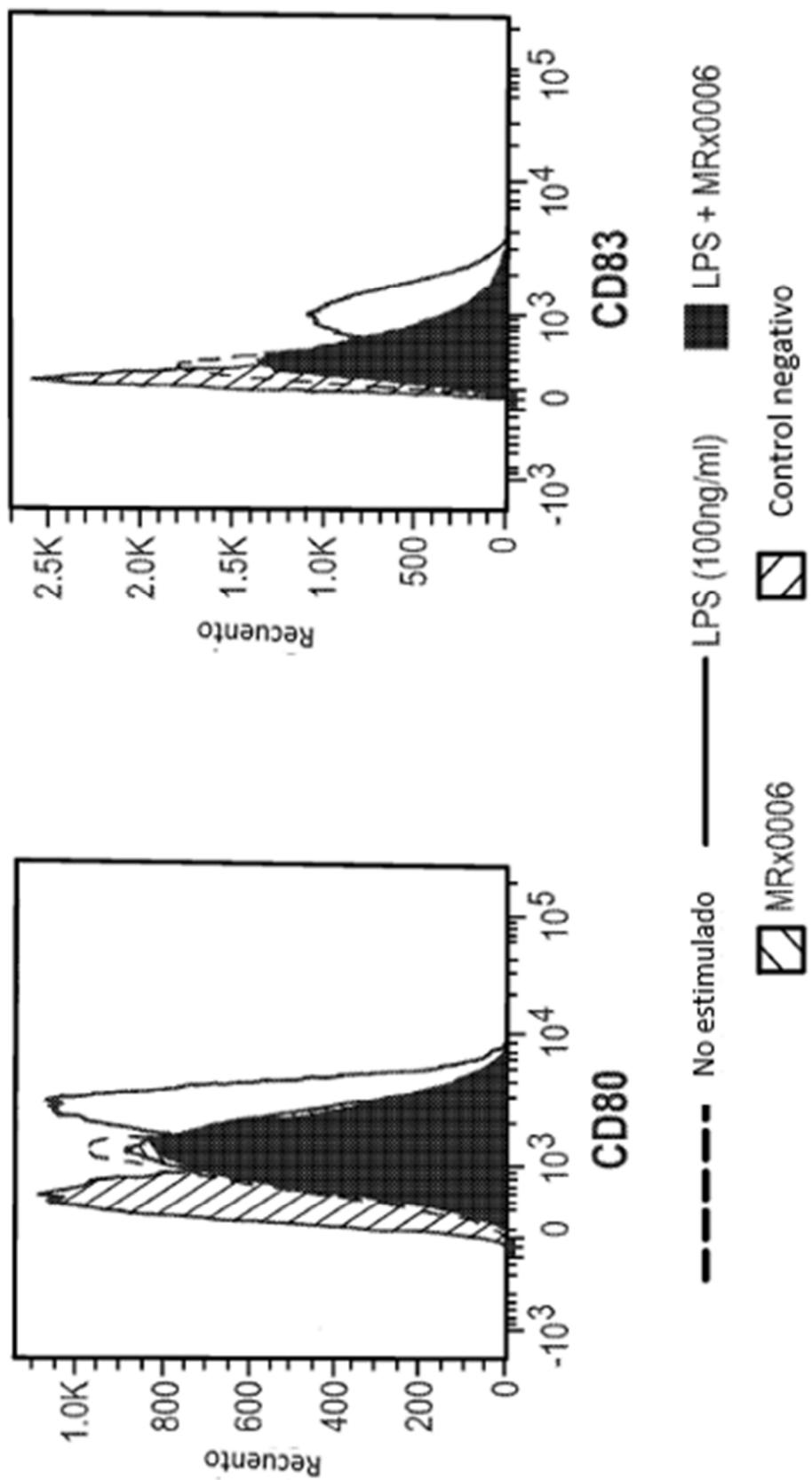


FIG. 76

Concentración de TNFa



**FIG. 77****Maduración de MoDC (cd1a+ CD14-)**

**FIG. 77 (cont.)**  
**Maduración de MoDC (cd1a+ CD14-)**

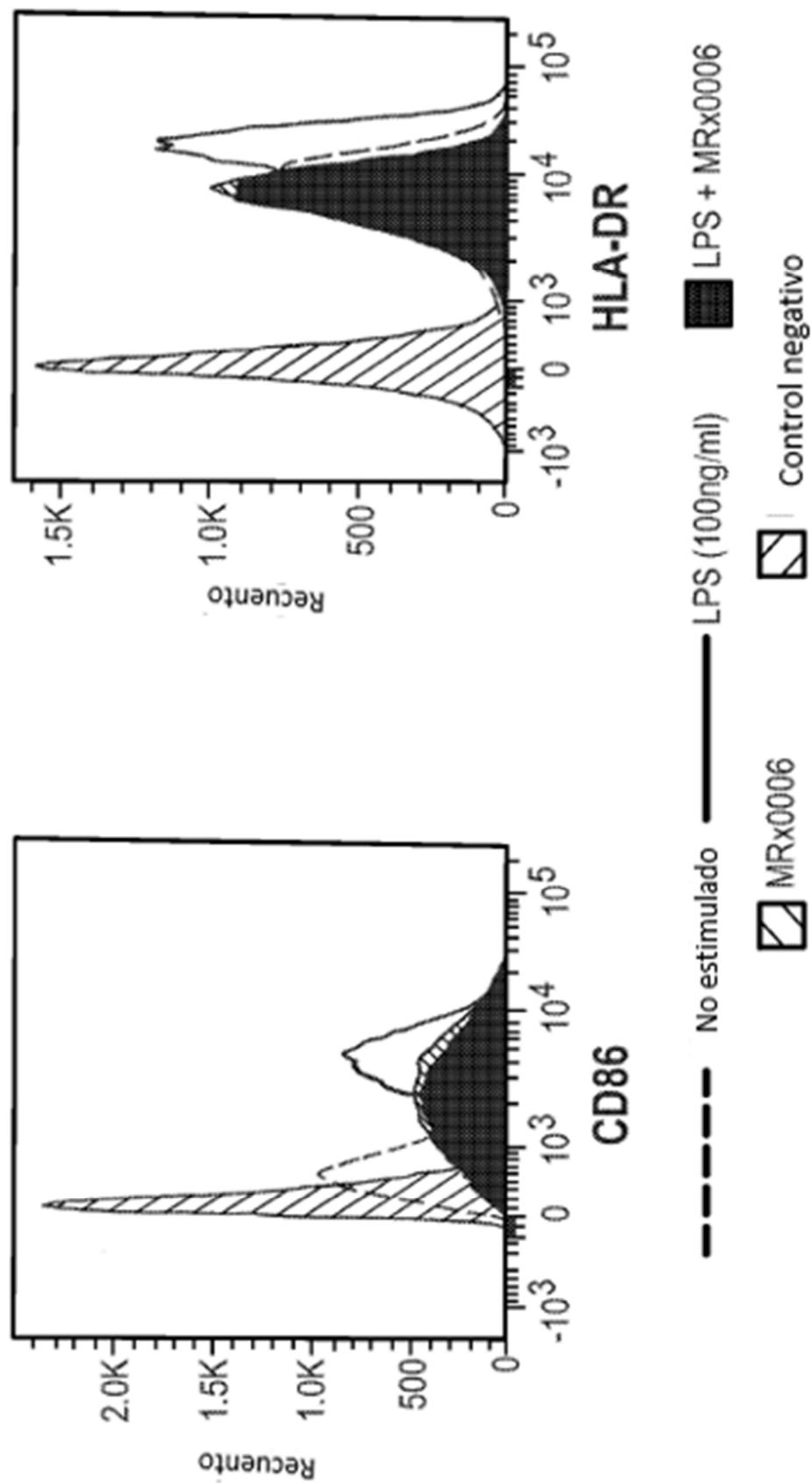


FIG. 78

