



MD/EP 3204025 T2 2020.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3204025 (13) T2

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

C12N 1/20 (2006.01.01)

A61P 1/00 (2006.01.01)

A61P 11/06 (2006.01.01)

A61P 29/00 (2006.01.01)

A61P 19/02 (2006.01.01)

A61P 25/28 (2006.01.01)

A61P 35/00 (2006.01.01)

A61P 27/02 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2017 0058 (22) Data de depozit: 2016.06.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16731641.3, 2016.06.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3204025, 2019.09.11 (31) Numărul cererii prioritare: 201510469; 201520628; 201604566 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.15; 2015.11.23; 2016.03.17 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 02/2020, 2020.02.29 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 37/2019, 2019.09.11 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 09/2017, 2017.09.30
(71) Solicitant: 4D Pharma Research Limited, GB (72) Inventatori: GRANT George, GB; PATTERSON Angela Margaret, GB; MULDER Imke, GB; MCCLUSKEY Seanin, GB; RAFTIS Emma, GB (73) Titular: 4D Pharma Research Limited, GB (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compoziții care conțin tulpini bacteriene

(57) Rezumat:

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

2
Secvențe: 9
Revendicări: 12
Figuri: 73

MD/EP 3204025 T2 2020.02.29

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

1

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

2

Sequences: 9
Claims: 12
Fig.: 73

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

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

FUNDALUL INVENȚIEI

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

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

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

35 US 2014/147425 descrie compoziții probiotice și potențiale regimuri de tratament pentru infecția cu *C. difficile*.

CN 104546934 descrie utilizarea de *Parabacteroides merdae* pentru a trata bolile autoimune.

- 40 Zitomersky și colab. (2013); PLOS ONE; 8,6: e63686 descrie microbiomul intestinal al pacienților cu boală inflamatorie intestinală.

Kverka și colab. (2011); Clin Exp Immunol; 163, 2: 250-259 descrie efectele antiogenilor *Parabacteroides distasonis* în colita experimentală.

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

SUMARUL INVENȚIEI

- 50 Invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli inflamatorii sau autoimune selectată dintre scleroza multiplă, astmul sau artrita reumatoidă.

- Inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune. În special, inventatorii au dezvoltat noi terapii pentru tratarea și prevenirea bolilor și a afecțiunilor mediate de linia IL-17 sau Th17. În special, inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene din genul *Parabacteroides* pot fi eficiente în reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Parabacteroides distasonis* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv răspunsul inflamator Th17, la modele de astm de șoarece, artrită reumatoidă și scleroză multiplă. De asemenea, așa cum este descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Parabacteroides distasonis* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv a răspunsului inflamator Th17, la modelele de uveită la șoarece.
- 60

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

5 În anumite variante de realizare, divulgarea furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Parabacteroides*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a unei boli sau a unei afecțiuni selectate din grupul constând din: scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriazică sau artrita idiopatică juvenilă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondilo-artrita; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boli inflamatorii intestinale, cum ar fi boala Crohn sau colita ulcerosă; boala celiaca; astm, cum ar fi astmul alergic sau astm bronșic; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); cancerul, cum ar fi cancerul la sân, cancerul la colon, cancerul pulmonar sau cancerul ovarian; uveita; sclerită; vasculita; Boala Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor. Efectul indicat pentru tulpinile bacteriene din genul *Parabacteroides* asupra răspunsului inflamator Th17 poate oferi beneficii terapeutice în cazul bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 și linia Th17, cum ar fi cele enumerate mai sus.

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

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

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

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

55 În anumite variante de realizare, compozițiile divulgate aici sunt utilizate într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea unei boli sau afecțiuni mediate de IL-17 sau linia Th17. În special, compozițiile divulgate aici pot fi utilizate în reducerea producției de IL-17 sau în reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, a artritei reumatoide sau a sclerozei multiple, a

astmului, a artritei reumatoide, a sclerozei multiple, a uveitei sau a cancerului. De preferință, invenția furnizează compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizare în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea astmului, a artritei reumatoide sau a sclerozei multiple.

5 Divulgarea prevede, de asemenea, compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Parabacteroides distasonis*, pentru utilizarea în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea uveitei.

În anumite variante de realizare, compoziția este utilizată la un pacient cu niveluri IL-17 ridicate sau celule Th17. Efectul asupra răspunsului inflamator Th17 indicat pentru tulpinile de

10 *Parabacteroides* poate fi deosebit de benefic pentru acești pacienți.

Tulpina bacteriană din compoziție este *Parabacteroides distasonis*. Se pot utiliza și tulpini strans legate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu secvența 16S ARNr a unei tulpini bacteriene de *Parabacteroides distasonis*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este

15 identică cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 sau 9. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 9. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 9.

În anumite variante de realizare, compoziția invenției este destinată administrării orale. Administrarea orală a tulpinilor divulgate aici poate fi eficientă în tratarea afecțiunilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă

20 pentru pacienți și practicieni și permite transmiterea în și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului.

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

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

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

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

În dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă în terapie. Tulpina de *Parabacteroides distasonis* din invenție se dovedește a fi eficientă în tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul,

35 scleroza multiplă și uveita. Prin urmare, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții care cuprind astfel de celule sau culturi biologice pure de astfel de celule. Invenția oferă, de asemenea, o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pentru utilizare în terapie, în special pentru

40 bolile descrise aici.

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figura 1: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de celule de fluid BAL.

Figura 2: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de eozinofile în BALF.

45 **Figura 3:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de eozinofile în BALF.

Figura 4: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de macrofage în BALF.

Figura 5: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția macrofagelor în BALF.

Figura 6: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de neutrofile în BALF.

Figura 7: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de neutrofile în BALF.

50 **Figura 8:** Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Numărul total de limfocite în BALF.

Figura 9: Caz de astm indus de acarieni la șoareci - Proporția de limfocite în BALF.

Figura 10: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de celule fluid BAL.

Figura 11: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Număr total de eozinofile în BALF.

Figura 12: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de eozinofile în BALF.

55 **Figura 13:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de macrofage în BALF.

Figura 14: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de macrofage în BALF.

Figura 15: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de neutrofile în BALF.

Figura 16: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de neutrofile în BALF.

Figura 17: Caz de astm bronșic sever la șoareci - Numărul total de limfocite în BALF.

60 **Figura 18:** Caz de astm bronșic sever la șoareci - Proporția de limfocite în BALF.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din speciile *Parabacteroides distasonis*. Exemplele demonstrează că bacteriile din aceste specii sunt utile în tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17.

Exemple de specii de *Parabacteroides* dezvăluite aici includ *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Parabacteroides merdae* și *Parabacteroides johnsonii*. *Parabacteroides* se aseamănă cu *Bacteroides* și sunt Gram negative, anaeroabe obligatorii, care nu formează spori, nemotile și în formă de tijă, și de dimensiune 0,8-1,6x1,2-12 μ m. *Parabacteroides distasonis* este una din cele mai comune specii în excrementele umane. Tulpina de tip *P. distasonis* este JCM 5825^T (=CCUG 4941^T = DSM 20701^T = ATTC 8503^T). Numerele de înregistrare la GenBank/EMBL/DBJ pentru secvențele de gene ARNr 16S de tulpini *P. distasonis* JCM 5825T, JCM 13400, JCM13401, JCM13402, JCM13403 și JCM13404 și de tulpini *P. merdae* JCM9497T și JCM13405 sunt AB238922-AB238929, respectiv (dezvăluite aici ca SEQ. ID. Nos: 1-8). Exemple de tulpini sunt de asemenea descrise în [16].

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

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

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

Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare 42382 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente în tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor

mediate de IL-17 sau linia Th17. Un biotip este o tulpină strâns înrudită, care are caracteristici fiziologice și biochimice identice sau foarte similare.

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

În anumite cazuri, tulpina bacterială utilizată în invenție are un genom cu identitatea de
 15 secvență la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220. În cazurile preferate, tulpina bacterială utilizată în invenție are un genom cu cel puțin 90% identitate de secvență (de exemplu cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a cel puțin 60% (de exemplu cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220. De exemplu, tulpina
 20 bacteriană utilizată în invenție poate avea un genom de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO
 25 2016/203220, sau de cel puțin 90% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO
 30 2016/203220, sau de cel puțin 95% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 70% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SRQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 80% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 90% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220, sau de cel puțin 98% secvență de identitate la SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220 de-a lungul a 100% din SEQ ID NO:10 din WO 2016/203220.

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

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

55 Alte tulpini de *Parabacteroides* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipurile bacteriei depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pot fi identificate folosind orice metodă sau strategie adecvată, inclusiv analizele descrise în exemple. De exemplu, tulpinile utilizate în invenție pot fi identificate prin cultivarea în YCFA anaerobă și/sau administrarea bacteriilor la cazul de artrită indusă de colagen de tip II la șoarece și apoi evaluarea
 60 nivelurilor de citokine. În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere similare, tip metabolic și/sau antigene de suprafață cu bacteria depusă sub numărul de înregistrare NCIMB

42382 pot fi utile in invenție. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie imună comparabilă cu tulpina NCIMB 42382. În special, o tulpină de biotip va provoca efecte comparabile asupra modelelor de astm, artrită, scleroză multiplă și boala uveită și efecte comparabile asupra nivelurilor de citokine la efectele prezentate in exemple, care pot fi identificate folosind

5 protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în special a invenției este tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Acesta este exemplul de tulpină 755 testat în exemple și dovedit a fi eficient în tratarea bolii. Prin urmare, invenția furnizează o celulă, cum ar fi o celulă izolată, din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382.

10 Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă a tulpinei *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Invenția furnizează o cultură biologic pură a tulpinii *Parabacteroides distasonis* depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42382. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pentru utilizare in terapie, in special pentru bolile

15 descrise aici.

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

25 Referirile la celulele tulpinei de *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de

înregistrare NCIMB 42382, conțin orice celule care au aceleași caracteristici de siguranță și de eficiență terapeutică ca tulpinile depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, și astfel de celule sunt cuprinse in invenție.

30 In anumite variante de realizare preferate, tulpinile bacteriene in compozițiile conform invenției sunt viabile și capabile să colonizeze intestinul parțial sau total.

Utilizări terapeutice

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

40 Celulele Th17 sunt un subset de celule auxiliare T care produc, de exemplu, IL-17A, IL17-F, IL-21 și IL-22. Diferențierea celulelor Th17 și linia IL-17 poate fi determinată de IL-23. Aceste citokine și altele formează părți importante ale liniei Th17, care este o linie de semnalizare a inflamație confirmată, care contribuie și stă la baza unui număr de boli inflamatorii și autoimune (așa cum este descris, de exemplu, [19-24]). Bolile în care linia Th17 este activată sunt boli mediate de linia Th17. Bolile mediate de linia Th17 pot fi ameliorate sau atenuate prin suprimarea liniei Th17, care poate fi printr-o reducere a diferențierii celulelor Th17 sau o reducere a activității lor sau o reducere a nivelului de citokine a liniei Th17. Bolile mediate de linia Th17 pot fi caracterizate de niveluri crescute de citokine produse de celulele Th17, cum ar fi IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (revizuit in [25]). Bolile mediate de linia Th17 pot fi caracterizate prin exprimarea crescută a genelor asociate Th-17, cum ar fi Stat3 sau IL-23R. Bolile mediate de linia Th17 pot fi asociate cu niveluri crescute de celule Th17.

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

60 Exemple de boli și afecțiuni care pot fi mediate de IL-17 sau linia Th17 includ scleroza multiplă; artrita, cum ar fi artrita reumatoidă, osteoartrita, artrita psoriazică sau artrita idiopatică

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

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

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

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

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

Astm

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

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

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

În realizări suplimentare, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea astmului bronșic (sau a astmului non-eozinofil). Numărul ridicat de neutrofile este asociat cu astm

sever, care pot fi insensibile la tratamentul cu corticosteroizi. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea neutrofilelor pot fi utile în tratarea sau prevenirea astmului bronșic .

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

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

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

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

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

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

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

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

Artrita

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

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

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a umflării articulațiilor. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate la pacienții cu articulații umflate sau la pacienții identificați cu riscul de a avea articulații

umflate. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate într-o metodă de reducere a umflării articulațiilor în RA.

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

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

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

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

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

Scleroza multiplă

În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea sclerozei multiple. Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii la un caz de șoarece cu scleroză multiplă (cazul EAE) și, astfel, pot fi utile în tratamentul sau prevenirea sclerozei multiple. Scleroza multiplă este o afecțiune inflamatorie asociată cu deteriorarea tecilor de mielină ale neuronilor, în special la nivelul creierului și coloanei vertebrale. Scleroza multiplă este o boală cronică, care reduce capacitatea progresiv și care evoluează în episoade. Celulele IL-17 și Th17 pot avea un rol cheie în scleroza multiplă, de exemplu, deoarece nivelurile de IL-17 pot fi corelate cu leziunile sclerozei multiple, IL-17 poate perturba joncțiunile strânse ale celulelor endoteliale ale barierei cerebrale sanguine, iar celulele Th17 pot migra în sistemul nervos central și pot cauza pierderi neuronale [30,31]. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea sclerozei multiple.

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

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

Compozițiile invenției pot fi utile în gestionarea sau ameliorarea sclerozei multiple. Compozițiile invenției pot fi utile în special pentru reducerea simptomelor asociate cu scleroza

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

Uveita

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

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

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

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

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

Moduri de administrare

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

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

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

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

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

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

5 succes și eficacitatea este observată.

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

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

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

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

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

Compoziții

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

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

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

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

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

Compoziția poate fi formulată ca un probiotic.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 In anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde: o tulpină bacteriană a invenției; și un excipient acceptabil farmaceutic, purtător sau diluant; în care tulpina bacteriană este într-o cantitate suficientă pentru a trata sau a preveni o boală sau o afecțiune mediată de IL-17 sau linia Th17. In anumite variante de realizare preferate, boala sau starea respectivă este selectată din grupul constând din artrită reumatoidă, scleroză multiplă, psoriazis, boală inflamatorie a intestinului, boala Crohn, colită ulcerosă, boală celiacă, astm, astm alergic, astm bronșic, osteoartrită, artrită psoriazică, juvenil artrita idiopatică, neuromielită optică (boala lui Devic), spondilită anchilozantă, spondiloartrită, lupus eritematos sistemic, boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC), cancer, cancer la sân, cancer de colon, cancer la plămâni, cancer ovarian, uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, periodontită, rinită alergică, și respingere de alogrefă.

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

20 In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică de mai sus, in care compoziția este administrată într-o doză de 1 g, 3 g, 5 g sau 10 g.

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

25 In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, cuprinzând un purtător ales din grupul constând din lactoză, amidon, glucoză, metil celuloză, stearat de magneziu, manitol și sorbitol.

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

30 In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, cuprinzând un excipient selectat din grupul constând din amidon, gelatină, glucoză, lactoză anhidră, lactoză cu flux liber, beta-lactoză, îndulcitor de porumb, salcâm, tragacant, alginat de sodiu, carboximetilceluloză, polietilenglicol, oleat de sodiu, stearat de sodiu, stearat de magneziu, benzoat de sodiu, acetat de sodiu și clorură de sodiu.

35 In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, cuprinzand in plus cel puțin unul dintre conservanți, un antioxidant și un stabilizator.

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

40 In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, în care tulpina bacteriană menționată este liofilizată.

In anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, in care compoziția este păstrată într-un recipient sigilat la aproximativ 4°C sau aproximativ 25°C și recipientul este plasat într-o atmosferă cu 50% umiditate relativă, cel puțin 80% din tulpina bacteriană măsurată în unitățile formatoare de colonii, rămâne după o perioadă de cel puțin aproximativ: 1 lună, 3 luni, 6 luni, 1 an, 1,5 ani, 2 ani, 2,5 ani sau 3 ani.

Metode de cultură

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

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

Tulpini bacteriene pentru utilizare in compoziții de vaccin

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

În anumite astfel de realizări, compozițiile pot cuprinde un adjuvant pentru vaccin. În anumite variante de realizare, compozițiile sunt destinate administrării prin injecție, cum ar fi prin injecție subcutanată.

Generalități

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

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

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

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

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

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

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

EXEMPLE

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

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

Tulpina

45 **755: Parabacteroides distasonis**

Proiectul de studiu

Grupuri:

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

Numărul de șoareci pe grup = 5

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

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

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

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

Ziua 14 Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Numărul total de șoareci = 40.

Obiective și analiză

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

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

10 **Materiale și metode**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figurile 1-9.

- 55 Nu s-a observat niciun caz de morbiditate sau mortalitate la șoarecii tratați cu bacteriile sau vehiculul. Cele două controale, tratamentul vehiculului (control negativ) și tratamentul cu dexametazonă (control pozitiv) s-au comportat așa cum era de așteptat, cu eozinofilie afectată și neutrofilie notate în urma tratamentului cu dexametazonă.

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

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

Sumar

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

Tulpina**755: *Parabacteroides distasonis*****Proiectul de studiu**

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (pe cale orală).
 5. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 755 (pe cale orală).
 7. Grup de control pozitiv. Tratament anti-IL-17 (i.p.).
 8. Grup de control netratat.
 - 9: Șoareci sănătoși (linie de bază).
- Numărul șoarecilor pe grup (grupul 1-8) = 5
- Ziua 14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a vehiculului de control pe cale orală (grupul 1).
- Ziua 14 până în ziua 17: Administrarea zilnică a inoculului de bacterii terapeutice pe cale orală (grupul 2-6).
- Ziua 0: Sensibilizare cu HDM în CFA (s.c.) (grupul 1-8).
- Ziua 7: Sensibilizare cu HDM în CFA (s.c.) (grupul 1-8).
- Zilele 13, 15, 17: Administrarea anticorpului de neutralizare anti IL-17 per i.p. (Grupul 7).
- Zilele 14, 15, 16, 17: Administrare de HDM în 30ul PBS pe cale nazală (grupul 1-8).
- Ziua 18: Sacrificarea tuturor animalelor pentru analiză.

Obiective și analiză:

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

Material și metode.

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

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

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

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

Sensibilizare HDM. 50 μg de HDM (Număr de catalog: XPB70D3A25, Număr lot: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, SUA) din PBS a fost emulsionat în volum egal de adjuvant complet Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, SUA) și administrat subcutanat în

volum de 200 μ l, de două ori peste două săptămâni pe flancurile opuse. La o săptămână după a doua imunizare, șoarecii au fost aneșteziați cu injecție i.p. cu 9,75 mg xilasol și 48,75 mg ketasol pe kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Elveția) și apoi li s-a administrat intranasal 15 μ g de HDM în volum de 30 l PBS în 4 zile consecutive. Analiza a fost efectuată la o zi după administrarea finală.

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

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

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

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

Rezultate și analiză

20 Rezultatele experimentului sunt prezentate în Figurile 10-18.

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

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

Materiale și metode

Tulpina

755: *Parabacteroides distasonis*

30 **Culturi bacteriene**

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

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

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

Model de artrită indusă de collagen de tip II la șoarece

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

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

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

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

60 Modelul de artrită indusă de collagen (CIA) la șoarece este un model bine cunoscut de artrita reumatoidă la șoarece [66]. Imunizarea cu CII provoacă o patogeneză care include câteva caracteristici patologice importante ale artritei reumatoide, inclusiv hiperplazia sinovială, infiltrarea celulelor mononucleare și degradarea cartilajului. În mod semnificativ, dezvoltarea CIA

este mediată de celulele Th17 prin secreția de IL-17A [67]. Răspunsul imun care stă la baza modelului de artrită este îmbunătățit prin utilizarea adjuvantului Freund complet cu *Mycobacterium tuberculosis*.

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

Grupuri și doze de tratament

- 10 Toate grupurile au fost $n = 15$ ($n = 12$ pentru grupul principal de studiu și $n = 3$ pentru grupurile satelit)
Vehiculul utilizat pentru bioterapie a fost mediu de extract de drojdie-Casitone-Fatty Acids (YCFA).

	Grup	Doza	Administrare		Inducerea bolii
			Rută	Regim	
1	Vehicul	5 ml/kg	PO	BID: Ziua 14-Sfarșit	Ziua 0: Collagen/CFA, o dată, SC
3	Bioterapeutic #755	5 ml/kg			Ziua 21: Collagen/IFA, o dată, SC

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

15

Greutăți corporale

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

Observații clinice nespecifice

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

Observații clinice

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

Analiza proliferării celulare

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

Analiza citokinelor

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

Analiza microbiologică

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

Histopatologie

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

Tabelul 1: Sistemul de scoring histopatologic

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

Rezultate și analiză

5 **Supraviețuire și observații clinice ne-specifice**

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

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

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

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

Greutăți corporale

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

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

- 25 Datele privind greutatea corporală înregistrate începând cu ziua 0 până în ziua 28 și exprimate ca procent din greutatea inițială (ziua 0) au fost analizate prin ANOVA bidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple cu Ziua 0 în grupul Vehicul, apoi pentru comparație multiplă cu grupul tratat cu vehicul. Datele sunt prezentate în figura 20. Datele de la animale sacrificate înainte de sfârșitul programat al experimentului și de la animalele satelit au fost excluse din analize. Datele din ziua 28, ziua 35 și ziua 42 au fost analizate în continuare de
- 30 ANOVA în mod unidirecțional, urmată de post-testul lui Dunnett pentru comparații multiple cu grupul tratat cu vehicul.

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

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

Observații clinice

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

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

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

Analiza proliferării celulare

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

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

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

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

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

Niveluri de citokine în supernatanții unei culturi de țesut

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

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

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

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

Nivelele de supernatanți IFN- γ (Figura 23)

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

Nivelurile de supernatanți IL-17A (Figura 24)

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

Niveluri de supernatanți IL-10 (Figura 25)

Nivelurile de IL-10 în grupul tratat cu vehicul au fost de 13 pg/ml și 2,1 pg/ml pentru CII, respectiv de culturi de control a mediului. Pot fi așteptate niveluri mai mari de IL-10 (care este

o citokină antiinflamatorie) pentru grupul tratat cu vehicul, deoarece inflamația și inducerea pro-inflamatorie a citokinei ar putea fi însoțite de un mecanism de feedback antiinflamator.

Niveluri de supernatanți IL-6 (Figura 26)

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

Analiza microbiologică

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

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

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

Histopatologie

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

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

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

Sumar

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

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

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

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

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

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

60 **Materiale și metode**

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

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

Măsurarea nivelului de anticorpi în ser și lichid BAL

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

Izolarea analizei pulmonare și histologice

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

0 - normal

1 - infiltrări inflamatorii ușoare

2 - infiltrări inflamatorii moderate

- 20 3 - infiltrări inflamatorii importante

4 - infiltrări inflamatorii severe

5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

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

- 25 **Măsurarea mediatorilor inflamatori in țesutul pulmonar**

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

- 30 **Rezultate și analiză**

Rezultatele experimentelor sunt prezentate in Figurile 27-45.

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

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

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

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

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

Materiale și metode

- 60 **Eliminarea organelor in ziua 18.** Recoltarea lobului pulmonar stang in formol pentru analiza histologică ulterioară. Recoltarea lobilor plămânului drept (toți lobii rămași) și îndepărtarea

serului pentru înghețarea rapidă și analiza ulterioară. Lichidul BAL rămas a fost înghețat pentru analize ulterioare.

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

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

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

0 - normal

1 - infiltrări inflamatorii usoare

2 - infiltrări inflamatorii moderate

3 - infiltrări inflamatorii importante

4 - infiltrări inflamatorii severe

5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentelor sunt indicate în Figurile 46-63.

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

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

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

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

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

Sumar

Șoarecilor li s-au administrat compoziții care conțin tulpini bacteriene conform invenției, iar șoarecii au fost ulterior imunizați cu glicoproteină oligodendrocitară a mielinei pentru a li se induce encefalomielite autoimună experimentală (EAE). EAE este cel mai frecvent utilizat caz experimental pentru scleroza multiplă umană. S-a descoperit că compozițiile invenției au un efect izbitor asupra incidenței bolii și gravității bolii.

Tulpina

755: bacterii depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 43282

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (oral).

5. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 755 (oral).

9. Grup de control pozitiv. Tratament cu Dexametazonă (i.p.).

10. Grup de control netratat.

5 Numărul de șoareci pe grup = 10

Zilele 14 la ziua 27: Administrarea zilnică a vehiculului de control pe cale orală (grupul 1).

Zilele 14 până în ziua 27: Administrarea zilnică a inoculului bacterian terapeutic pe cale orală (grupul 5).

10 Zilele 0-28: administrarea Dexametazonei (de exemplu) de trei ori pe săptămână (grupul 9)

Ziua 0: MOG35-55 (glicoproteină oligodendrocitară a mielinei - 2mg/ml) și CFA (2mg/ml MTB) s-au amestecat 1: 1 rezultând soluții 1mg/ml. S-au injectat subcutanat 100 μ l de amestec peptidă-CFA în fiecare laba posterioară. Administrarea toxinei pertussice intraperitoneal (300ng).

15 Ziua 1: Administrarea toxinei de pertussis intraperitoneal (300ng).

Zilele 7-înainte: Măsurarea incidenței bolii și a greutății de trei ori pe săptămână.

Obiective și analiză

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

Monitorizare

În zilele indicate, șoarecii au fost cântăriți și observați pentru scorul activității bolii și incidența bolii.

25 Observații privind scorul activității bolii:

0 - Nu există modificări evidente ale funcției motrice în comparație cu șoarecii neimunizați.

0,5 - Varful cozii este bleg.

1,0 - Coadă bleagă.

1,5 - Coadă bleagă și laba posterioară slăbită.

30 2,0 - Coadă bleagă și laba posterioară slăbită.

SAU - Există semne evidente de înclinare a capului atunci când se observă mersul. Echilibrul este slab.

2,5 - Coadă bleagă și târârea labelor posterioare.

• SAU - Există o înclinare puternică a capului care face ca șoarecele să cadă ocazional.

35 3,0 - Coadă bleagă și paralizia completă a labelor posterioare.

3,5 - Coadă bleagă și paralizia completă a labelor posterioare.

În plus: șoarecele se mișcă în jurul cuștii, dar atunci când este așezat pe flanc, nu este în stare să se îndrepte.

Labelor posterioare sunt ținute împreună pe o parte a corpului.

40 4,0 - Coadă bleagă, paralizie totală a labei posterioare și paralizia parțială a labei anterioare.

• Șoarecele se mișcă minim în jurul cuștii, dar este alert și se hrănește

4,5 - Paralizie completă a labelor posterioare și paralizie parțială a labelor anterioare, nicio mișcare în jurul cuștii.

Șoarecele este eutanasiat imediat și scos din cușcă.

45 5,0 Șoarecele este eutanasiat din cauza paraliziei severe.

Atunci când un animal are un scor al bolii egal sau mai mare de 1, se consideră că are un scor pozitiv al incidenței bolii.

Rezultate

Rezultatele studiului sunt indicate în Figurile 70 și 71.

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

55

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

Sumar

Acest studiu a utilizat un caz de uveită indusă de proteina de legare la interfotoreceptor retinoid (IRBP) la șoarece pentru a testa efectele administrării bacteriene asupra uveitei. Uveita este o afecțiune care pune în pericol vederea rezultatului inflamației intraoculare și distrugerii

60

țesutului retinian. Această boală poate fi studiată la rozătoare într-un caz de uveoretinită autoimună experimentală (EAU) [68]. EAU este o afecțiune specifică organului în care celulele Th1/Th17 sunt direcționate către antigene retiniene și produc citokine care activează celulele mononucleare rezidente și care se infiltrează ducând la distrugerea țesutului. EAU poate fi indusă la șoareci prin administrarea cu antigene retiniene, inclusiv peptida proteică de legare la interfotoreceptor retinoid (IRBPp). Debutul bolii apare în mod normal în ziua 8-9 și maximele după zilele 14-15. Semnele bolii clinice pot fi monitorizate folosind imagini fundale endoscopice topice (TEFI).

Tulpina

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

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

Șoareci

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

Sumarul experimentului

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

Graficul administrării

Toate grupurile sunt n=12

Vehiculul pentru administrare orală este mediu YCFA.

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

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

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

40

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

Rezultate

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

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

50

Scoruri clinice: imagistica retiniană prin imagistică de fundal endoscopică topică (TEFI). Din ziua 1 până la sfârșitul experimentului, animalele sunt urmărite de două ori pe săptămână pentru semne clinice de uveită. Imaginile retiniene sunt capturate utilizând TEFI la animale neanesteziate, dar restrânse, după dilatarea pupilei folosind Tropicamidă 1%, apoi clorhidrat de fenilfrină 2,5%. Imaginile retiniene sunt evaluate folosind următorul sistem. Scorul maxim cumulat este de 20.

55

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

Rezultate

Rezultatele studiului sunt indicate în Figurile 72 și 73.

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

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

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

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

Exemplul 8 - Testarea stabilității

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

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

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcgggg ttagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc
121 aacttgccata tcagaggggg ataaccggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg
181 gatcccgcat gggaatatat gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt
241 aggcagttgg cggggtaacg gccaccaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag
301 gtccccaca ttgtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat
361 attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgctg gagggatgaa ggttctatgg
421 atcgtaaaoc tcttttataa gggaataaag tgcgggacgt gtcccgtttt gtatgtacct
481 tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcca gcagccggcg taatacggag gatccgagcg
541 ttatccggat ttattgggtt taaagggcgc gtaggcggcc ttttaagtca gcggtgaaag
601 tctgtggctc aaccatagaa ttgccgttga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag
661 gcggaatgcg tgggtgtagc gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag
721 gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta
781 gataccctgg tagtccacgc agtaaagcat gatcactagc tgtttgcatg acactgtaag
841 cggcacagcg aaagcgttaa gtgatccacc tggggagtag gccggcaacg gtgaaactca
901 aaggaattga cggggggccc cacaagcgga ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg
961 aggaacotta ccggggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat
1021 agccgtttgc gaggtgctgc atggttgcgc tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggcttaag
1081 tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt
1141 gggactgcca gcgtaagctg cgaggaaagg ggggatgacg tcaaatacgc acggccotta
1201 catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaag ggaggccacc tggcgacagg
1261 gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaacccga ctccgtgaag
1321 ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggcottgt
1381 acacaccggc cgtcaagcca tgggagccgg gggtacctga agtcgtaac cgaaaggatc
1441 ggcctagggt aaaactgggt actggggcta agtcgtaaca aggtaacc

```

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

5

```

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgacag ggtgagtaac gcgtatgcaa
121 cttacctatc agagggggat aaccggcgca aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
301 cccccacatt ggtactgaga caggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
361 tgggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgctgta gggatgaagg ttctatggat
421 ogtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcgtt
541 atccggatth attgggttta aagggtgcgt aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggggct tgagtatggt tgaggcaggc
661 ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatacgc agaaccocga ttgcgaaggc
721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga

```

781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac agtgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcggttaagt gatccacctg gggagtaacg cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggatgacgac aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

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

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac ccgcggcgga cggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggtaaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatggt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatcacgc agaaccoga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcggttaagt gatccacctg gggagtaacg cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt gatgctgagg actctggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgag aggaaggcgg ggatgacgac aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg atgccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgcg atcagccatg gcgcggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgccc tcaagccatg ggagccggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

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

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaagg
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggatcaatg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac actgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgccg atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

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

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa
 121 cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg
 181 ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag
 241 gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaagg
 301 cccccacatt ggtactgaga caccgaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat
 361 tggatcaatg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat
 421 cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta
 481 tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggtg atacggagga tccgagcgtt
 541 atccggattt attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc
 601 tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc
 661 ggaatgcgtg gtgtagcgtt gaaatgctta gatatacgc agaaccocga ttgcgaaggc
 721 agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga
 781 taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcaactagctg tttgcgatac attgtaagcg
 841 gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggt gaaactcaaa
 901 ggaattgacg ggggcccga caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag
 961 gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag
 1021 ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt
 1081 ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtg
 1141 gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggtgacgctc aaatcagcac ggcccttaca
 1201 tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aggccacctg gcgacaggga
 1261 gcgaatcccc aaaccacgct tcagttcgga tcggagtctg caaccgact ccgtgaagct
 1321 ggattcgcta gtaatcgccg atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg ggccctgtac
 1381 acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg
 1441 cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc

5

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

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

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

1 agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
 61 ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
 121 atgcaactta cctatcagag ggggtagacc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa
 181 caggggtccc gcatgggaat atttggttaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
 241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag
 301 gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtgag
 361 gaatattggt caatggccga gaggctgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
 421 atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgatgt
 481 accctatgaa taagcatcgg ctaactcgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgcg
 541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg
 601 aaagtttggt gctcaaccat aaaattgccc ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
 661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
 721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
 781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg
 841 taagctctac agcgaagcgg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa
 901 ctcaaggaa ttgacggggg ccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttogatgata
 961 cgcgaggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag
 1021 caatagcaga ttacgagggt ctgcatggtt gtctgcagct cgtgccgtga ggtgtcggct
 1081 taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttaact acagggtgaag ctgaggactc
 1141 tgggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
 1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
 1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
 1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc
 1381 ttgtacacac cggccgtcaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag
 1441 gatcgcccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

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

```

1  agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg
61  ggcagcatga ttgttagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt
121 atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa
181 caggggttcc gcatgggaat atttggttaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc
241 cattaggcag ttggcggggg aacggccac caaacgcagc atggataggg gttctgagag
301 gaaggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagtga
361 gaatattggt caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct
421 atggtttgta aacttctttt atagggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtagt
481 accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggaggatgog
541 agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggg ggtgatttaa gtcagcggg
601 aaagtttggt gctcaacatc aaaattgccc ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag
661 gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc
721 gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg
781 attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaaat
841 taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacggtgaaa
901 ctcaaaggaa ttgacggggg ccgcacaaag cggaggaaca tgtggtttta ttcatgata
961 cgcgaggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaacaa ctcttctag
1021 caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgcctga ggtgtcggct
1081 taagtgtccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc
1141 tggtagaact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc
1201 cttacatccg gggcgacaca cgtgttaca tggcatggac aaagggcagc tacctggcga
1261 caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt
1321 gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcatca gccatggcgc ggtgaatacg ttccggggcc
1381 ttgtacacac cgcccgtaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag
1441 gatcggtcta ggttaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc

```

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

```

AMCCGGGTGGCGACCGGGCGACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACTTGCCATCAGAGGGGGATAACCCGGCGAAAAGT
CGGACTAATACCGCATGAAGCAGGGATCCCGCATGGGAATATTGCTAAAGATTTCATCGCTGATAGATAGGCATGCG
TTCCATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAACCGACGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACA
TTGGTACTGAGACACGGACCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGTGAGCCTGAACC
AGCCAAGTCGCGTGAGGGATGAAGGTTCTATGGATCGTAAACCTCTTTTATAAGGGAATAAAGTGCGGGACGTGTCC
CGTTTTGTATGTACCTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATCCGAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTTTTAAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTGGCTCAACCATAG
AATTGCCGTTGAAACTGGGAGGCTTGACTATGTTTGAGGCAGGCGGAATGCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGAT
ATCAGCGAGAACCCCGATTGCGAAGGCAGCCTGCCAAGCCATTACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAA
CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATCACTAGCTGTTTGGGATACACTGTAAGCGGCACAGC
GAAAGCGTTAAGTGATCCACCTGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGTTTGAACGCATTCCGACMGAKGTGGAA
ACACATTTCTAGCAATAGCCATTTGCCAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCCGGCTTAAG
TGCCATAACGAGCGCAACCTTGCCACTAGTTACTAACAGGTAAAGCTGAGGACTCTGGTGGGACTGCCAGCGTAAG
CTGCGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACATCCGGGGCGACACAGTGTTTACAATGGCGTGG
ACAAAGGGAAGCCACCTGGCGACAGGGAGCGAATCCCCAAACCAGTCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACCCGAC
TCCGTGAAGCTGGATTTCGTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCG
CCCGTCAAGCCATGGGAGCCGGGGTACCTGAAGTCCGTAACCGCGAGGATCGGCCTAGGGTAAACTGGTGAAGTGG
GGCTAAGTCGTACGGG

```

SEQ ID NO:10 (tulpină 755 secvență genom) – vezi secvență electronică listată de WO 2016/203220.

REFERINȚE

- [1] Spor și colab. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- 5 [2] Eckburg și colab. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson și colab. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Macpherson și colab. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian și colab. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank și colab. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- 10 [7] Scanlan și colab. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang și colab. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- [9] Machiels și colab. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- 15 [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad și colab. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Sakamoto and Benno (2006) *Int J Syst Evol Microbiol.* 56(Pt 7):1599-605.
- 20 [17] Masco și colab. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
- [18] Srůtkova și colab. (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
- [19] Ye și colab. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [20] Fabro și colab. (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
- [21] Yin și colab. (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
- 25 [22] Cheluvappa și colab. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.
- [23] Schieck și colab. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
- [24] Balato și colab. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [25] Monteleone și colab. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [26] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
- 30 [27] Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [28] Yang și colab. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.
- [29] Koenders și colab. (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [30] Amedei și colab. (2012) *Int J MolSci.* 13(10):13438-60.
- [31] Shabgah și colab. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- 35 [32] Zhang (2015) *Inflammation.* Aug 23.
- [33] Sun și colab. (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
- [34] Mucientes și colab. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
- [35] Jawad și colab. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
- [36] Maya și colab. (2014) *J. Ophthalmology.* 310329
- 40 [37] Chi și colab. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
- [38] Chi și colab. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
- [39] Luger and Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143
- [46] Miyamoto-Shinohara și colab. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.
- [47] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols,* ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- 45 [48] Leslie și colab. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [49] Mitropoulou și colab. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [50] Kailasapathy și colab. (2002) *Cur Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [51] *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* Ediția a 2-a, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller
- 50 [52] *Remington's Pharmaceutical Sciences,* Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [53] *Handbook of Microbiological Media,* Ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [54] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- [55] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.
- 55 [56] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.* ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
- [57] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course,* (Ream și colab., eds., 1998, Academic Press).
- [58] *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- 60 [59] *Handbook of Experimental Immunology,* Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)

- [60] Sambrook și colab. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [61] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [62] Ausubel și colab. (ed) (2002) Short protocols în molecular biology, ediția a 5-a (Curent Protocols).
- [63] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [64] Curent Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel și colab., eds., 1987) Supplement 30
- [65] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- [66] Brand și colab. (2007) Nature Protocols. 2(5):1269-1275
- [67] Jiao și colab. (2014) Immunopathology and Infectious Diseases. 184(4):1085-93.
- [68] Caspi (2003) Cur Protoc Immunol. Chapter 15:Unit 15.6.

LISTARE SECVENȚE

- <110> 4D PHARMA RESEARCH LIMITED
- <120> COMPOZIȚII CARE CUPRIND TULPINI BACTERIALE
- <130> P065779WO
- <150> GB 1510469,8
- <151> 2015-06-15
- <150> GB 1520628,7
- <151> 2015-11-23
- <150> GB 1604566,8
- <151> 2016-03-17
- <160> 9
- <170> SeqWin2010, versiune 1.0
- <210> 1
- <211> 1488
- <212> DNA
- <213> Parabacteroides distasonis
- <400> 1

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcgggg tgtagcaata caccgccggc gaccggcgca cgggtgagta acgcgtatgc 120
aacttgcccta tcagaggggg ataaccgggc gaaagtcgga ctaataccgc atgaagcagg 180
gatcccgcat gggaatattt gctaaagatt catcgctgat agataggcat gcgttccatt 240
aggcagttgg cggggtaacg gccaccaaa ccgacgatgg ataggggttc tgagaggaag 300
gtccccaca ttggtactga gacacggacc aaactcctac gggaggcagc agtgaggaat 360
attggtcaat gggcgtaagc ctgaaccagc caagtcgcgt gagggatgaa ggttctatgg 420
atcgtaaac tcttttataa gggaataaag tcggggacgt gtcccgtttt gtatgtacct 480
tatgaataag gatcggctaa ctccgtgcc gcagccgcgg taatacggag gatccgagcg 540
ttatccggat ttattgggtt taaagggtgc gtaggcgcc ttttaagtca gcggtgaaag 600
tctgtggctc aaccatagaa ttgccgttga aactgggggg cttgagtatg tttgaggcag 660
gcggaatgcg tgggtgtagc gtgaaatgca tagatatcac gcagaacccc gattgcgaag 720
gcagcctgcc aagccattac tgacgctgat gcacgaaagc gtggggatca aacaggatta 780
gataccctgg tagtccacgc agtaaacgat gatcactagc tgtttgcgat aactgtaag 840
cggcacagcg aaagcgttaa gtgatccacc tggggagtag gccggcaacg gtgaaactca 900
aaggaattga cgggggcccg cacaagcgga ggaacatgtg gtttaattcg atgatacgcg 960
aggaacctta ccgggtttg aacgcattcg gaccgaggtg gaaacacctt ttctagcaat 1020
agccgtttgc gaggtgctgc atggttgcg tcagctcgtg ccgtgaggtg tcggtttaag 1080
tgccataacg agcgcaaccc ttgccactag ttactaacag gttaggctga ggactctggt 1140
gggactgcc gcgtaagctg cgaggaaggc ggggatgacg tcaaatacag acggccctta 1200
catccggggc gacacacgtg ttacaatggc gtggacaaag ggaggccacc tggcgacagg 1260
gagcgaatcc ccaaaccacg tctcagttcg gatcggagtc tgcaaccoga ctccgtgaag 1320
ctggattcgc tagtaatcgc gcatcagcca tggcgcggtg aatacgttcc cgggccttgt 1380
acacaccgcc cgtcaagcca tgggagccgg ggttacctga agtccgtaac cgaaaggatc 1440
ggcctagggt aaaactggtg actggggcta agtcgtaaca aggtaacc 1488

```

- <210> 2
- <211> 1486
- <212> ADN
- <213> Parabacteroides distasonis
- <400> 2

```

agagtttgat cctgggtcag gatgaacgct agcgacagggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacatt ggtactgaga cacggacca aactcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg cgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt 540
atccggattht attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac agtgaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa 900
ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcatttcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg aagccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcggg tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct 1320
ggattcgcga gtaatcgcc atcagccatg gcgcgggtga tacgttcccg ggcttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 3

<211> 1486

5 <212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 3

```

agagtttgat cctgggtcag gatgaacgct agcgacagggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac ccggcgcgga ccggcgcacg ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttgcctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacatt ggtactgaga cacggacca aactcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cctgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcggta atacggagga tccgagcggt 540
atccggattht attgggttta aagggtgctg aggcggcctt ttaagtcagc ggtgaaagtc 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctggggaggc tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac actgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtacgc cggcaacggg gaaactcaaa 900
ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgtggt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcatttcgga ccgaggtgga aacacctttt ctagcaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt gatgctgagg actctggtgg 1140
gactgccagc gtaagctgcg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg atgccacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcggg tcggagtctg caaccgcact ccgtgaagct 1320
ggattcgcga gtaatcgcc atcagccatg gcgcgggtga tacgttcccg ggcttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggctaag tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 4

<211> 1486

10 <212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 4

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

<210> 5

<211> 1486

5 <212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 5

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

10 <210> 6

<211> 1486

<212> ADN

<213> Parabacteroides distasonis

<400> 6

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcacag gtagcaatac cgggtggcga ccggcgcaag ggtgagtaac gcgtatgcaa 120
cttacctatc agagggggat aaccggcgga aagtcggact aataccgcat gaagcagggg 180
ccccgcatgg ggatatttgc taaagattca tcgctgatag ataggcatgc gttccattag 240
gcagttggcg gggtaacggc ccaccaaaacc gacgatggat aggggttctg agaggaaggt 300
ccccacattt ggtactgaga cacggaccaa actcctacgg gaggcagcag tgaggaatat 360
tggtcaatgg gcgtaagcct gaaccagcca agtcgcgtga gggatgaagg ttctatggat 420
cgtaaacctc ttttataagg gaataaagtg tgggacgtgt cccgttttgt atgtacctta 480
tgaataagga tcggctaact ccgtgccagc agccgcgcta atacggagga tccgagcggt 540
atccggattt attgggttta aagggtgcgt agccggcctt ttaagtcagc ggtgaaagt 600
tgtggctcaa ccatagaatt gccgttgaaa ctgggaggct tgagtatgtt tgaggcaggc 660
ggaatgcgtg gtgtagcggg gaaatgctta gatatcacgc agaaccocga ttgcgaaggc 720
agcctgccaa gccatgactg acgctgatgc acgaaagcgt ggggatcaaa caggattaga 780
taccctggta gtccacgcag taaacgatga tcactagctg tttgcgatac attgtaagcg 840
gcacagcgaa agcgttaagt gatccacctg gggagtagcgc cggcaacggg gaaactcaaa 900
ggaattgacg gggggccgca caagcggagg aacatgttgt ttaattcgat gatacgcgag 960
gaaccttacc cgggtttgaa cgcattcgga ccgaggtgga aacacctttt ctacgaatag 1020
ccgtttgcga ggtgctgcat ggttgtcgtc agctcgtgcc gtgaggtgtc ggcttaagt 1080
ccataacgag cgcaaccctt gccactagtt actaacaggt aaagctgagg actctgggtg 1140
gactgccagc gtaagctcgc aggaaggcgg ggtgacgtc aaatcagcac ggcccttaca 1200
tccggggcga cacacgtgtt acaatggcgt ggacaaaggg agggcacctg gcgacaggga 1260
gcgaatcccc aaaccacgtc tcagttcgga tcggagtctg caaccggact ccgtgaagct 1320
ggattcgcta gtaatcgcgc atcagccatg gcgcgggtgaa tacgttcccg ggcttgtac 1380
acaccgcccg tcaagccatg ggagccgggg gtacctgaag tccgtaaccg aaaggatcgg 1440
cctagggtaa aactggtgac tggggtctaa tcgtaacaag gtaacc 1486

```

<210> 7

<211> 1492

5 <212> ADN

<213> Parabacteroides merdae

<400> 7

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacaggc ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatagcc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
cagggggtccc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattaggcag ttggcggggt aacggccacg caaacggacg atggataggg gttctgagag 300
gaagggtcccc cacattggtg ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag 360
gaatattggg caatggccga gaggtgaac cagccaagtc gcgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgct 540
agcgttatcc ggatttattg ggtttaaagg gtgcgtaggt ggtgatttaa gtcagcggtg 600
aaagtttgtg gctcaaccat aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgcgggc aacgggtgaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttta ttcgatgata 960
cgcgagggaac cttaccgggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatgggt gtgcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagttacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
tggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtaa tcgcgcacat gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgtaaa gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag 1440
gatcgcccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

<210> 8

<211> 1492

10 <212> ADN

<213> Parabacteroides merdae

<400> 8

```

agagtttgat cctggctcag gatgaacgct agcgacagcg ttaacacatg caagtcgagg 60
ggcagcatga tttgtagcaa tacagattga tggcgaccgg cgcacgggtg agtaacgcgt 120
atgcaactta cctatcagag ggggatatagc cggcgaaagt cggattaata ccccataaaa 180
caggggttcc gcatgggaat atttgttaaa gattcatcgc tgatagatag gcatgcgttc 240
cattaggcag ttggcgggggt aacggccac caaaccgacg atggataggg gttctgagag 300
gaaggtcccc cacattggta ctgagacacg gaccaaactc ctacgggagg cagcagttag 360
gaatattggt caatggccga gaggctgaac cagccaagt cgtgaagga agaaggatct 420
atggtttgta aacttctttt ataggggaat aaagtggagg acgtgtcctt ttttgtatgt 480
accctatgaa taagcatcgg ctaactccgt gccagcagcc gcgtaatac ggaggatgag 540
agcgttatcc ggatttattg ggttttaaagg gtgcgtagggt ggtgatttaa gtcagcgggtg 600
aaagtttggt gctcaacatg aaaattgccg ttgaaactgg gttacttgag tgtgtttgag 660
gtaggcggaa tgcgtggtgt agcggtgaaa tgcatagata tcacgcagaa ctccgattgc 720
gaaggcagct tactaaacca taactgacac tgaagcacga aagcgtgggg atcaaacagg 780
attagatacc ctggtagtcc acgcagtaaa cgatgattac taggagtttg cgatacaatg 840
taagctctac agcgaaagcg ttaagtaatc cacctgggga gtacgccggc aacggtgaaa 900
ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggaggaaca tgtggtttaa ttcgatgata 960
cgcgaggaa cttaccggg tttgaacgta gtctgaccgg agtggaaca ctcttctag 1020
caatagcaga ttacgaggtg ctgcatggtt gtcgtcagct cgtgccgtga ggtgtcggct 1080
taagtgccat aacgagcgca acccttatca ctagtacta acaggtgaag ctgaggactc 1140
tggtgagact gccagcgtaa gctgtgagga aggtggggat gacgtcaaat cagcacggcc 1200
cttacatccg gggcgacaca cgtgttacia tggcatggac aaagggcagc tacctggcga 1260
caggatgcta atctccaaac catgtctcag ttcggatcgg agtctgcaac tcgactccgt 1320
gaagctggat tcgctagtta tcgcgcacga gccatggcgc ggtgaatacg ttcccgggcc 1380
ttgtacacac cgcccgctca gccatgggag ccgggggtac ctgaagtcgg taaccgcaag 1440
gatcggccta gggtaaaact ggtgactggg gctaagtcgt aacaaggtaa cc 1492

```

- 5 <210> 9
 <211> 1403
 <212> ADN
 <213> Parabacteroides distasonis
 <400> 9

```

amccgggtgg cgaccggcgc acgggtgagt aacgcgtatg caacttgcct atcagagggg 60
gataaccgg cgaaagtcgg actaataccg catgaagcag ggatcccgca tgggaatatt 120
tgctaaagat tcatcgctga tagataggca tgcgttccat taggcagttg gcgggtaaac 180
ggcccaccaa accgacgatg gataggggtt ctgagaggaa ggtccccac attggtactg 240
agacacggac caaactccta cgggaggcag cagttaggaa tattggtcaa tgggcgtgag 300
cctgaaccag ccaagtcgcg tgagggatga aggttctatg gatcgtaaac ctcttttata 360
agggataaaa gtgcgggacg tgtcccgttt tgtatgtacc ttatgaataa ggatcggtca 420
actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggatccgagc gttatccgga tttattgggt 480
ttaaagggtg cgtaggcggc cttttaagtc agcggtgaaa gtctgtggct caaccataga 540
attgccgttg aaactgggag gcttgagtat gtttgaggca ggcggaatgc gtggttagc 600
ggtgaaatgc atagatatca cgcagaacc cgaattgcga ggcagcctgc caagccatta 660
ctgacgctga tgcacgaaag cgtggggatc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg 720
cagtaaacga tgatcactag ctgtttgcga tacactgtaa gcggcacagc gaaagcgtta 780
agtgatccac ctggggagta cgccggcaac ggtgaaactc aaaggaattg acggggggcc 840
gcacaagcgg aggaacatgt ggtttaattc gatgatacgc gaggaacctt acccggttt 900
gaacgcattc ggacmgakgt ggaacacat tttctagcaa tagccatttg cgaggtgctg 960
catggttgct gtcagctcgt gccgtgaggt gtcggcttaa gtgccataac gagcgcaacc 1020
cttgccacta gttactaaca ggtaaagctg aggactctgg tgggactgcc agcgtaaagt 1080
gcgaggaagg cggggatgac gtcaaatac caccggccct acatccgggg cgacacacgt 1140
gttacaatgg cgtggacaaa ggaagccac ctggcgacag ggagcgaatc cccaaaccac 1200
gtctcagttc ggatcgaggt ctgcaacccg actccgtgaa gctggattcg ctagttaatc 1260
cgcatcagcc atggcgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc 1320
atgggagccg ggggtacctg aagtcctgaa ccgcgaggat cggcctaggg taaaactggt 1380
gactggggct aagtcgtacg ggg 1403

```

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- NAAMAH L. ZITOMERSKY ET AL: "Characterization of Adherent Bacteroidales from Intestinal Biopsies of Children and Young Adults with Inflammatory Bowel Disease", PLOS ONE, vol. 8, no. 6, 11 June 2013 (2013-06-11), page e63686, XP055295108, DOI: 10.1371/journal.pone.0063686
- CN-A- 104 546 934
- M. KVERKA ET AL: "Oral administration of Parabacteroides distasonis antigens attenuates experimental murine colitis through modulation of immunity and microbiota composition", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 163, no. 2, 19 February 2011 (2011-02-19), pages 250-259, XP055295102, GB ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04286.x
- US-A1- 2014 147 425

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din speciile *Parabacteroides distasonis*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli inflamatorii sau autoimune selectate dintre scleroză multiplă, astm sau artrită reumatoidă.

2. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului, cum ar fi astmul neutrofil sau astmul alergic, și în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a neutrofiliei sau eozinofiliei în tratamentul astmului.

3. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea artritei reumatoide, și în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a umflării articulațiilor în artrita reumatoidă.

4. Compoziția pentru utilizare conform revendicării 1, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea sclerozei multiple, și în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a incidenței bolii sau a severității bolii.

5. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările precedente, în care compoziția este pentru utilizare într-o metodă de reducere a producției de IL-17 sau de reducere a diferențierii celulelor Th17 în tratamentul sau prevenirea bolilor inflamatorii sau autoimune.

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

7. Compoziția pentru utilizare conform oricăreia din revendicările 1-6, în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16S care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6, sau 9, preferabil în care tulpina bacteriană are o secvență ARNr 16S care este cel puțin 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO:9, sau în care tulpina bacteriană are secvența ARNr 16S reprezentată de SEQ ID NO:9.

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

9. Un produs alimentar sau o compoziție pentru vaccinare care cuprinde compoziția conform oricăreia din revendicările anterioare, pentru utilizarea din oricare dintre revendicările anterioare.

10. O celulă sau o cultură pură biologic de tulpină *Parabacteroides distasonis*, depozitată sub numărul de înregistrare NCIMB 42382.

11. O compoziție care cuprinde celula din revendicarea 10, care cuprinde opțional un excipient sau purtător acceptabil farmaceutic.

12. O celulă din tulpina *Parabacteroides distasonis* depozitată sub numărul de înregistrare NCIMB 42382, pentru utilizare în terapie, în care opțional celula este pentru utilizare într-o metodă definită în oricare din revendicările 1-6.

FIG. 1
Număr total de celule

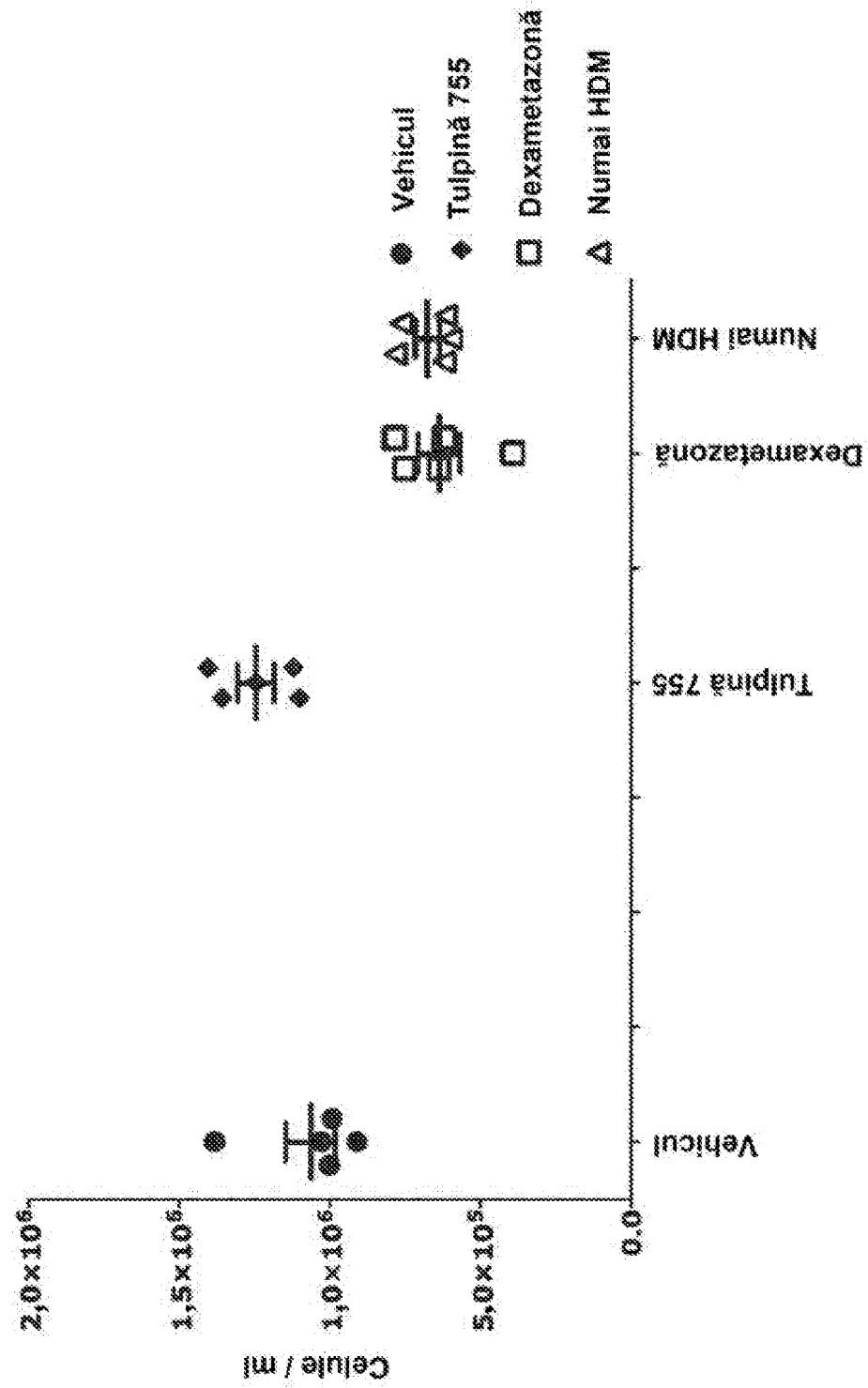


Figure 1 is a scatter plot showing the number of cells per ml for four groups: Vehicul, Tulpină 755, Dexameazonă, and Numai HDM. The Y-axis is labeled 'Celule / ml' and ranges from 0 to 1×10^6 . The X-axis shows the four groups. Data points are shown as individual dots with mean and standard deviation bars. The Vehicul group has the highest cell count, followed by Tulpină 755, Dexameazonă, and Numai HDM.

Group	Mean (approx.)	Standard Deviation (approx.)
Vehicul	3.5×10^5	0.5×10^5
Tulpină 755	7.5×10^5	0.5×10^5
Dexameazonă	1.5×10^5	0.2×10^5
Numai HDM	1.5×10^5	0.2×10^5

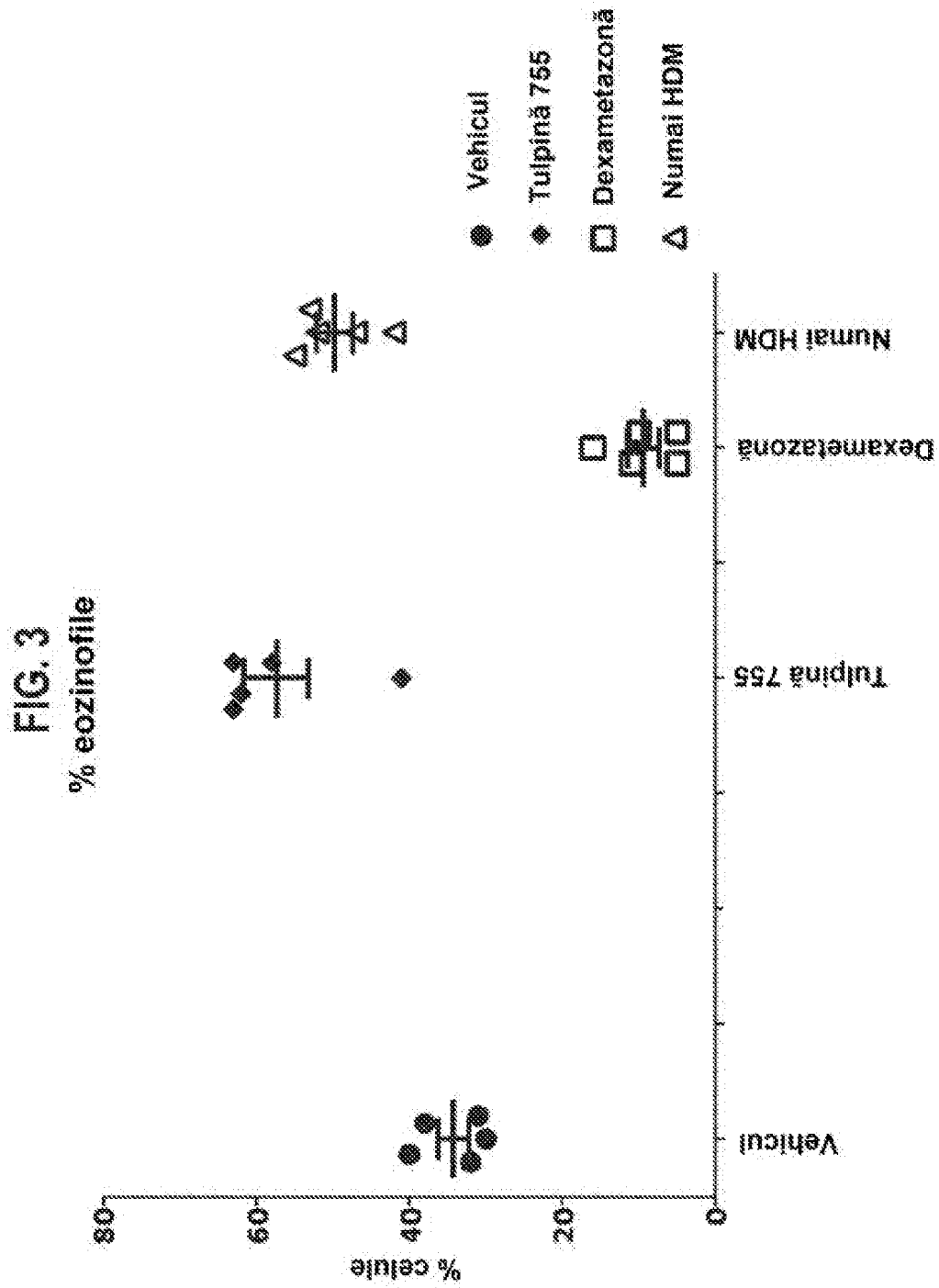


FIG. 4
Total macrophage

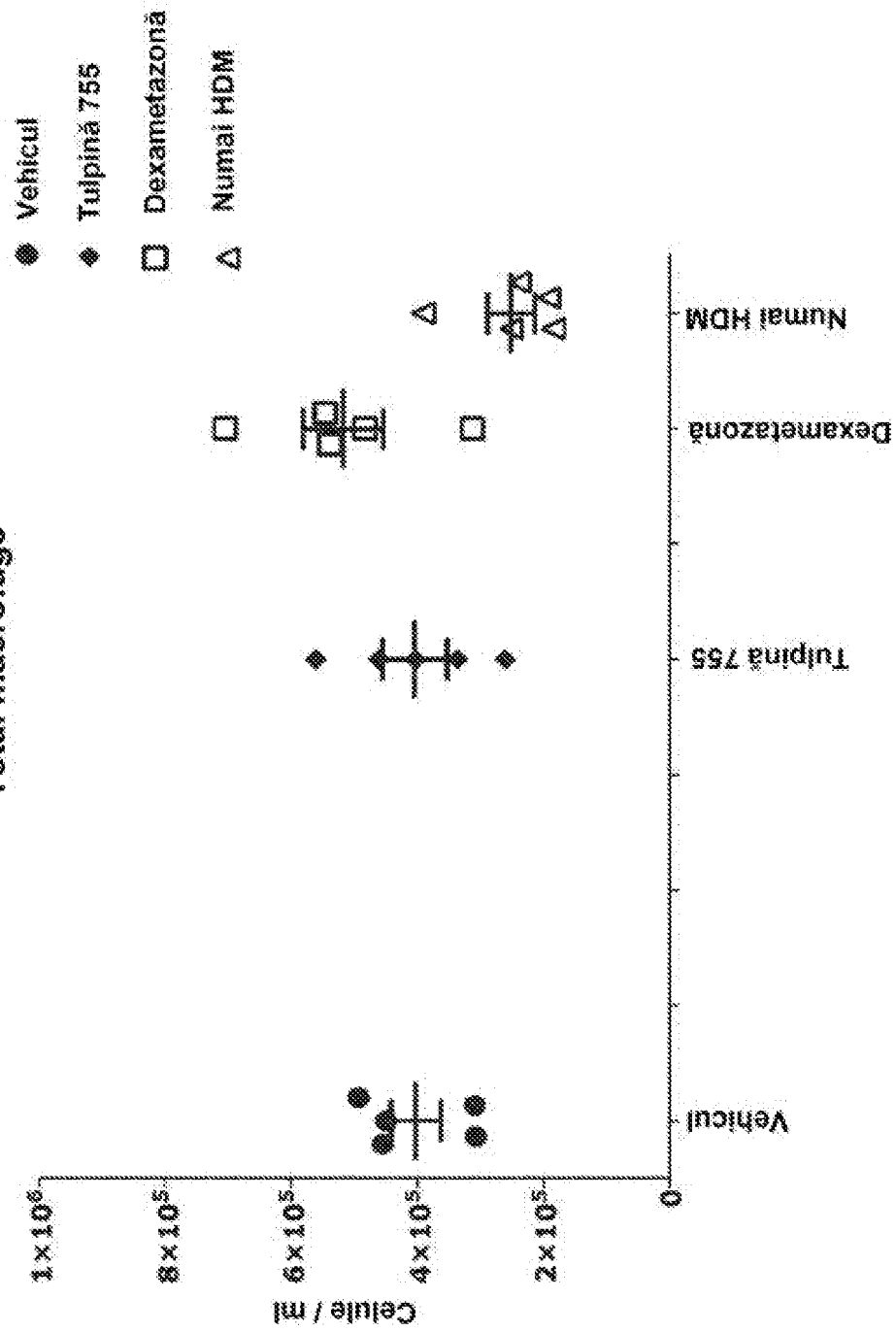
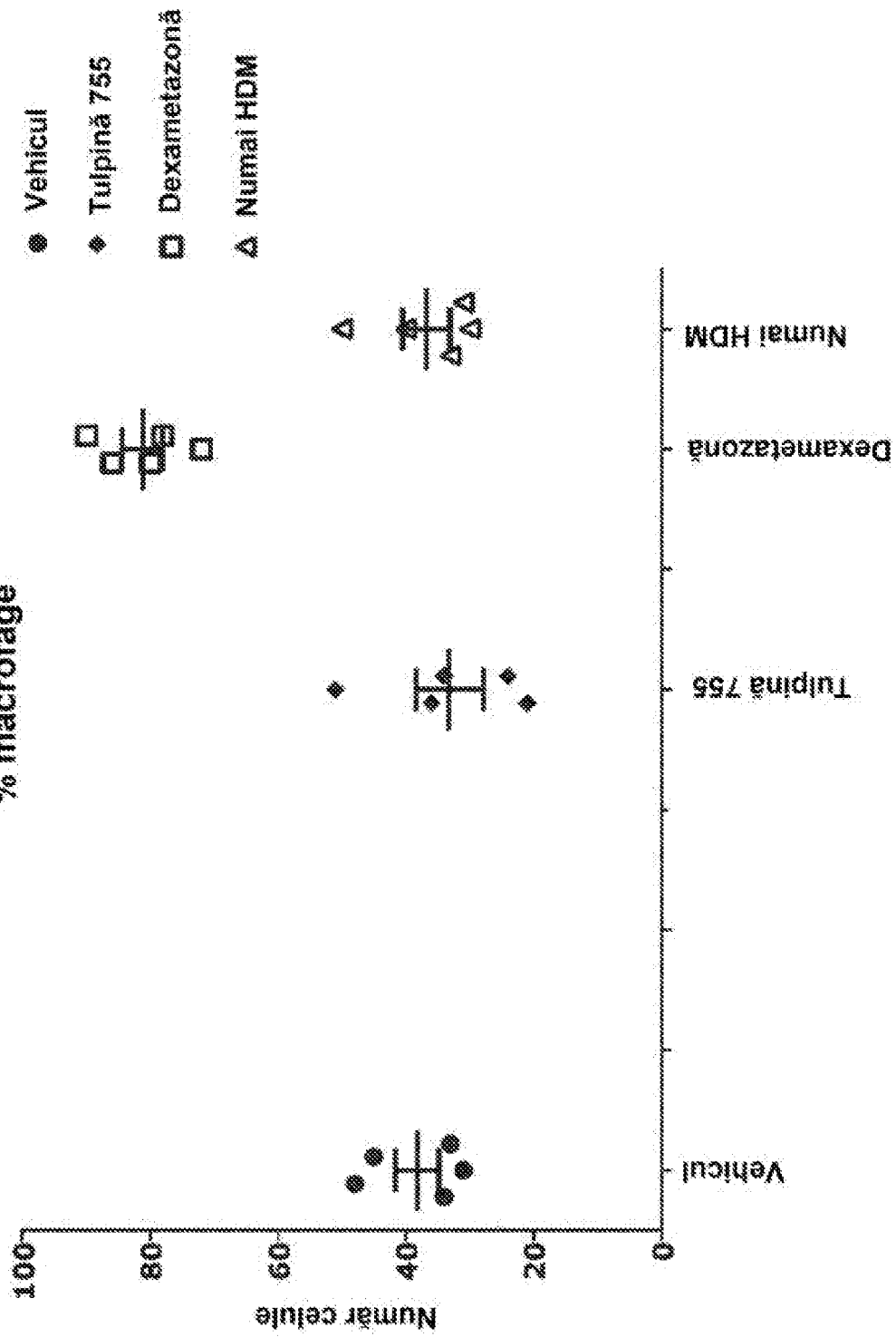
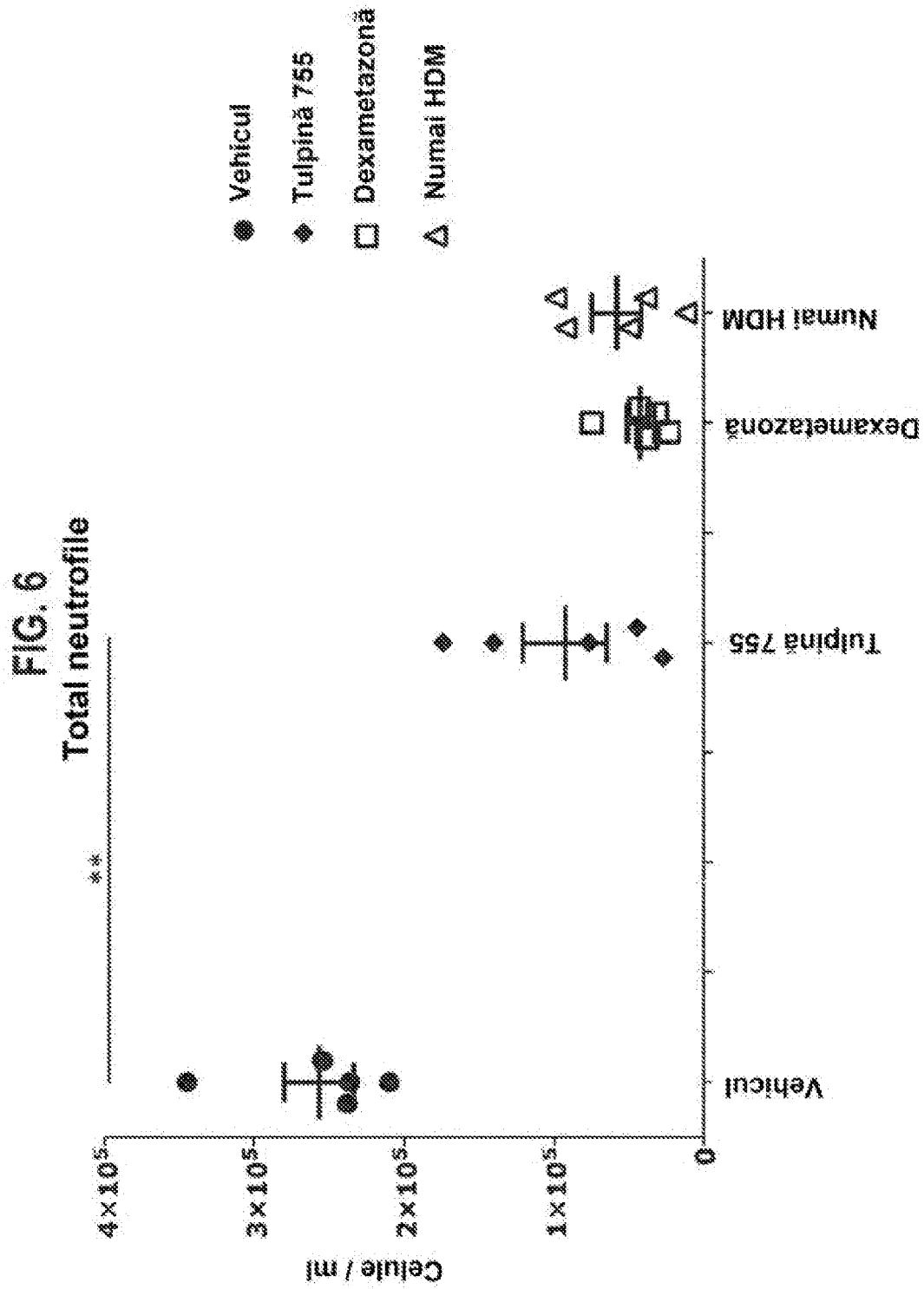


FIG. 5
% macrofage





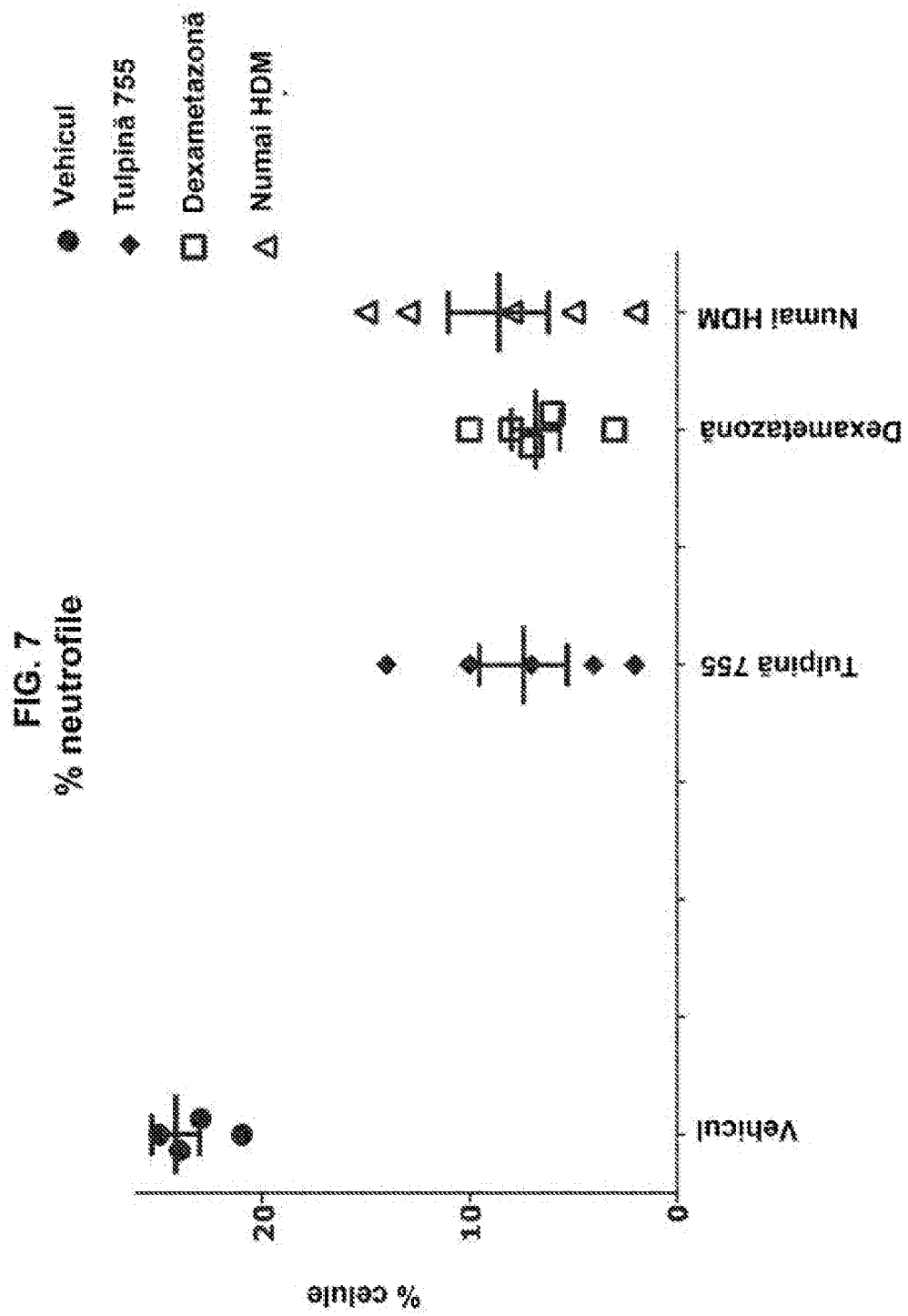
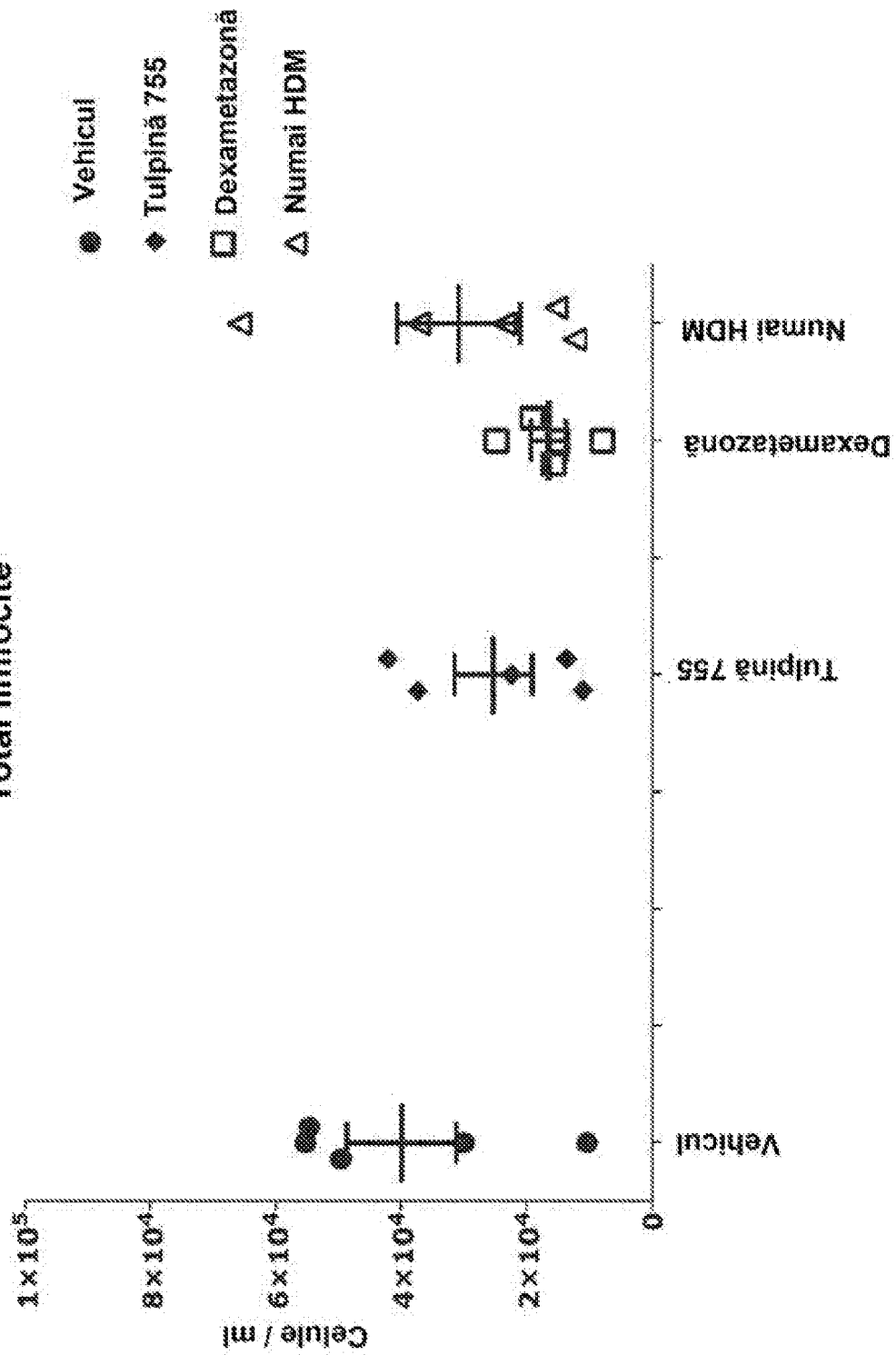


FIG. 8
Total limfocite



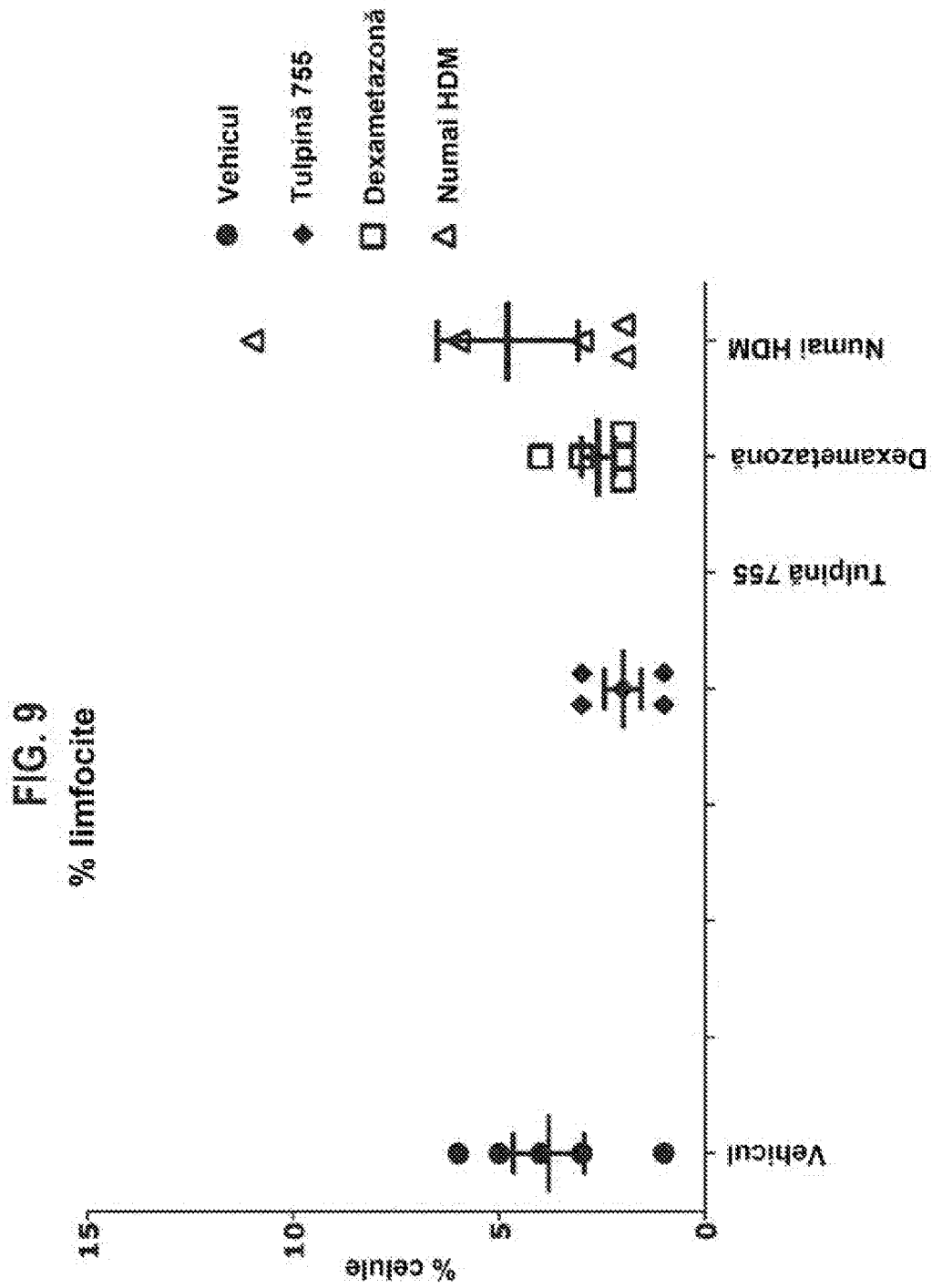


FIG. 10
Număr total de celule

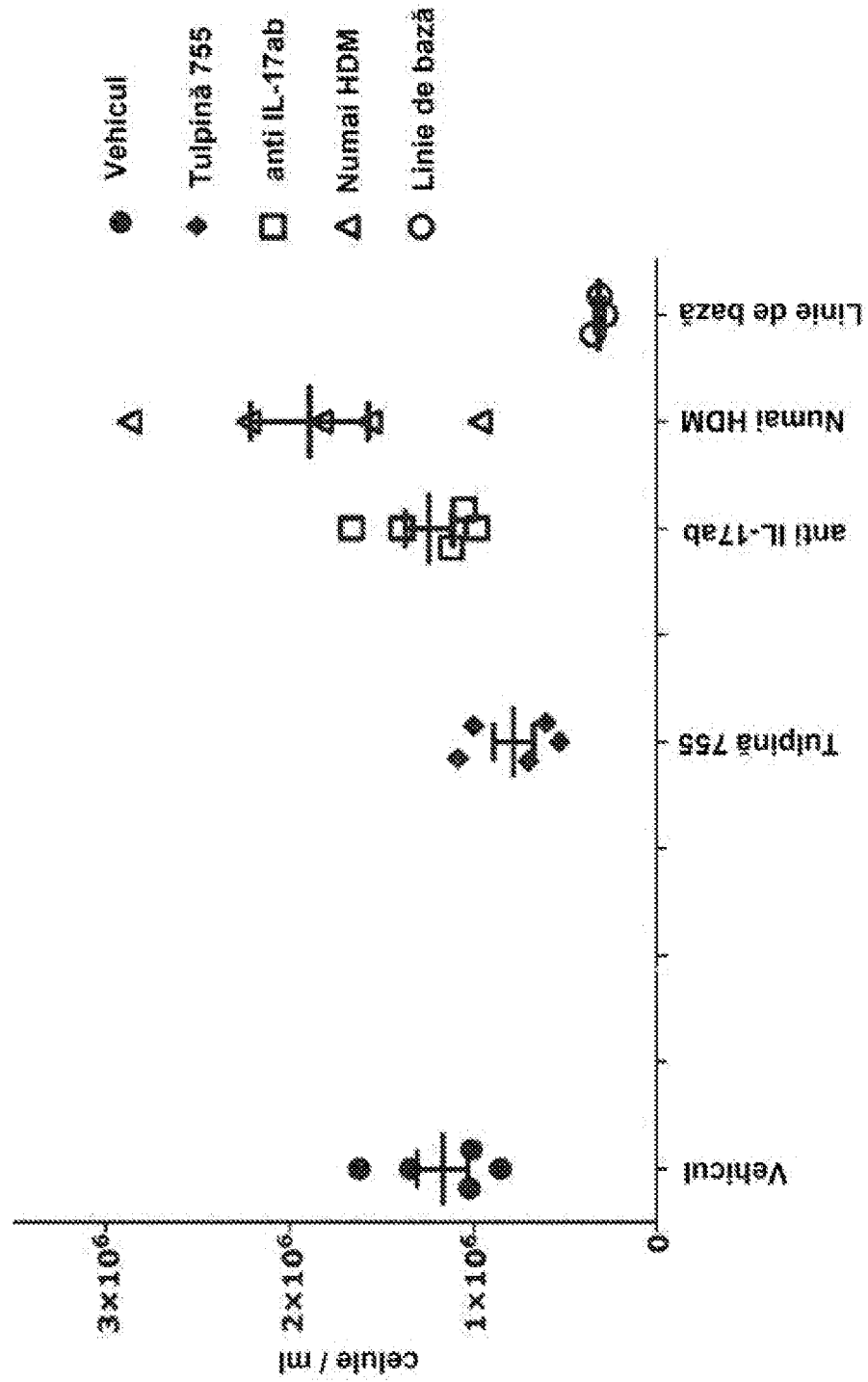
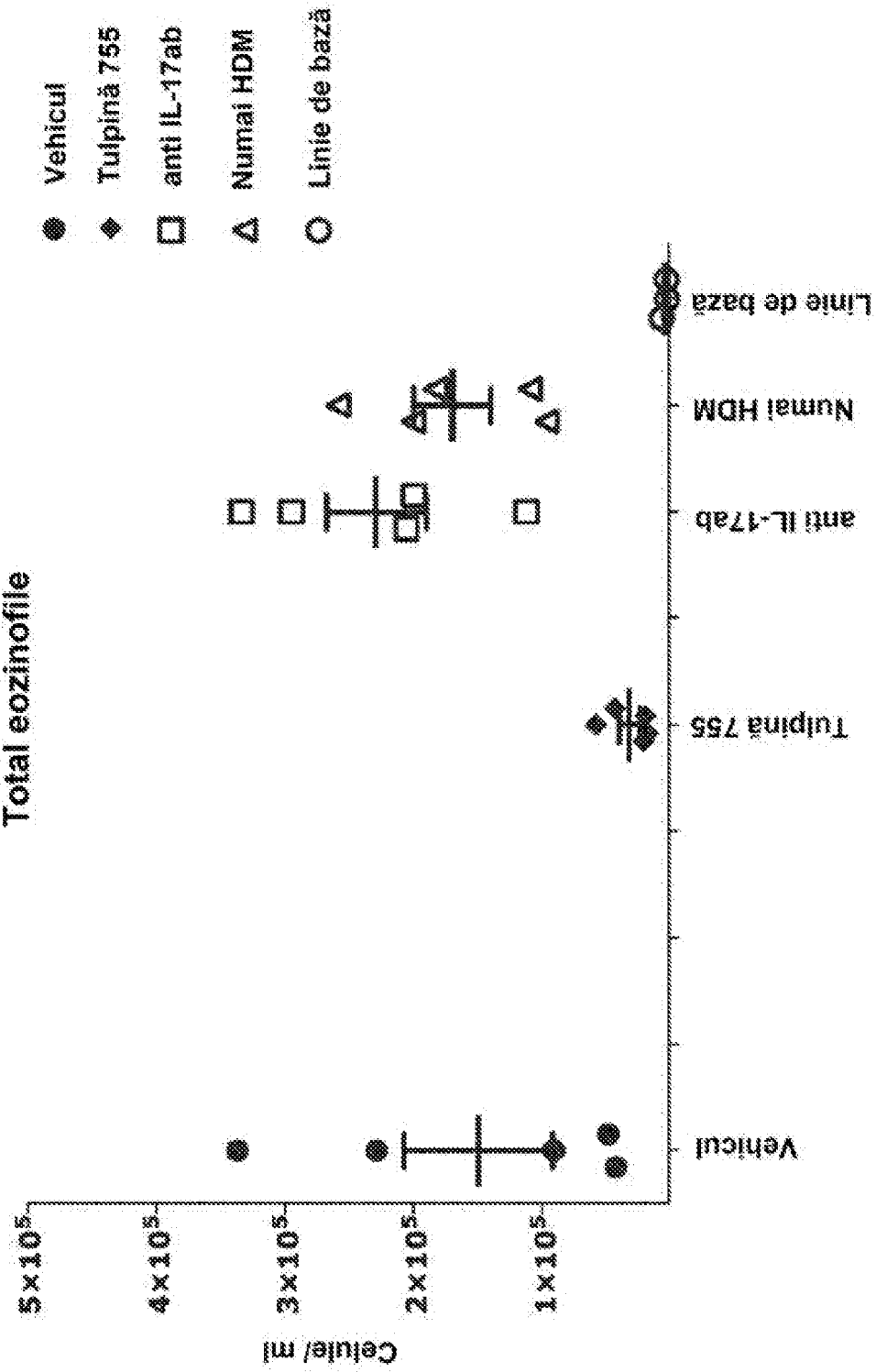
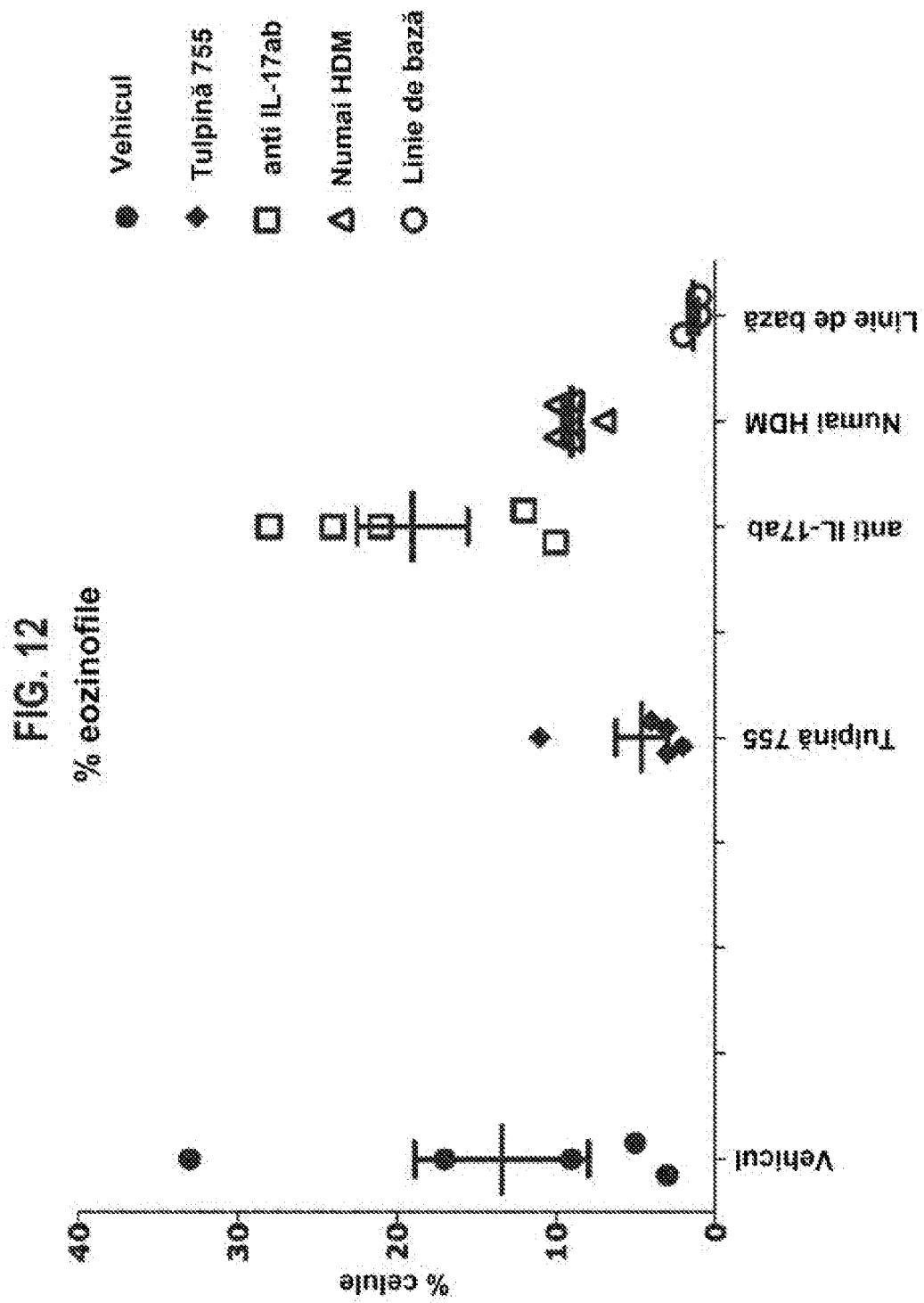
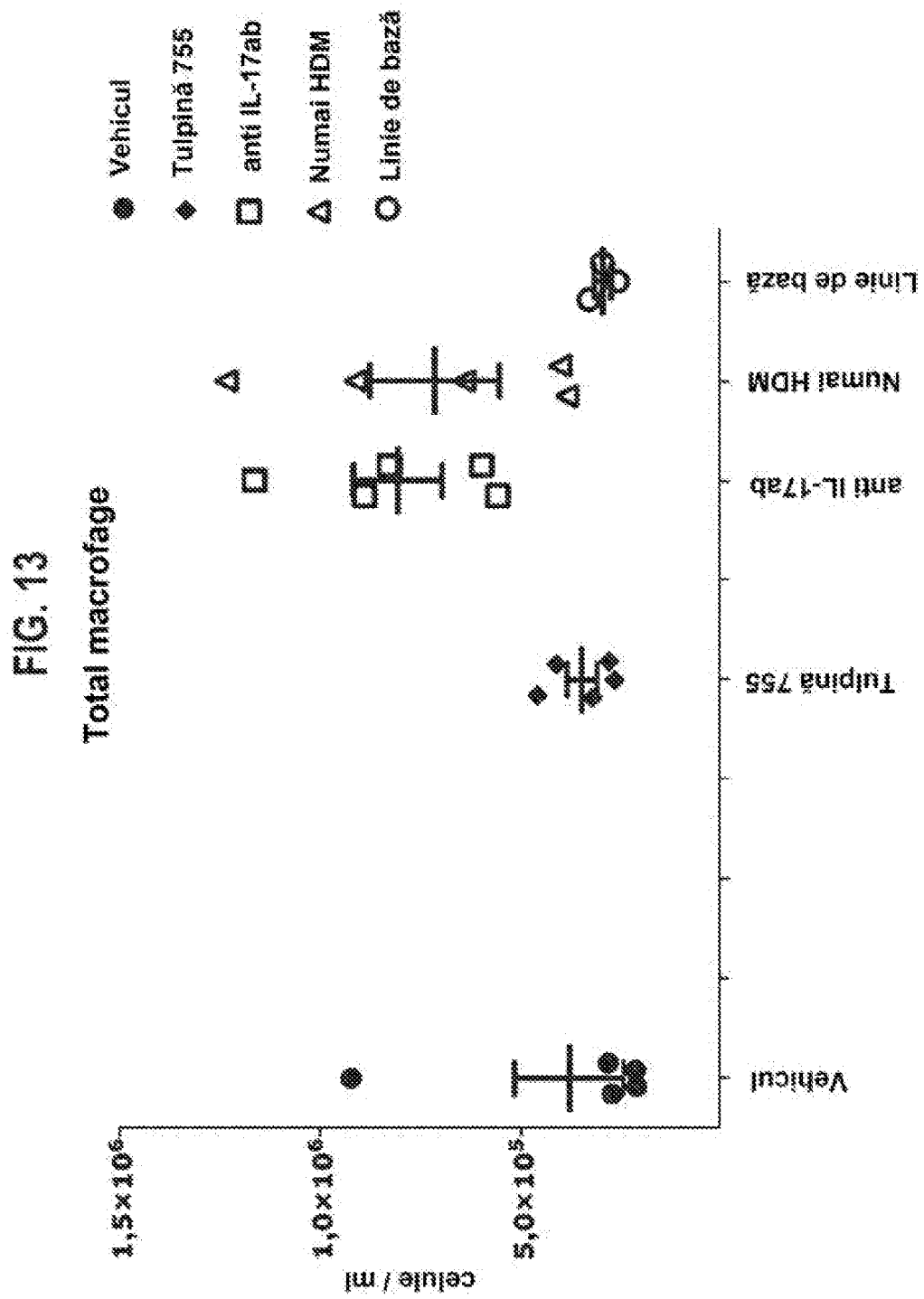


FIG. 11
Total eozinofile







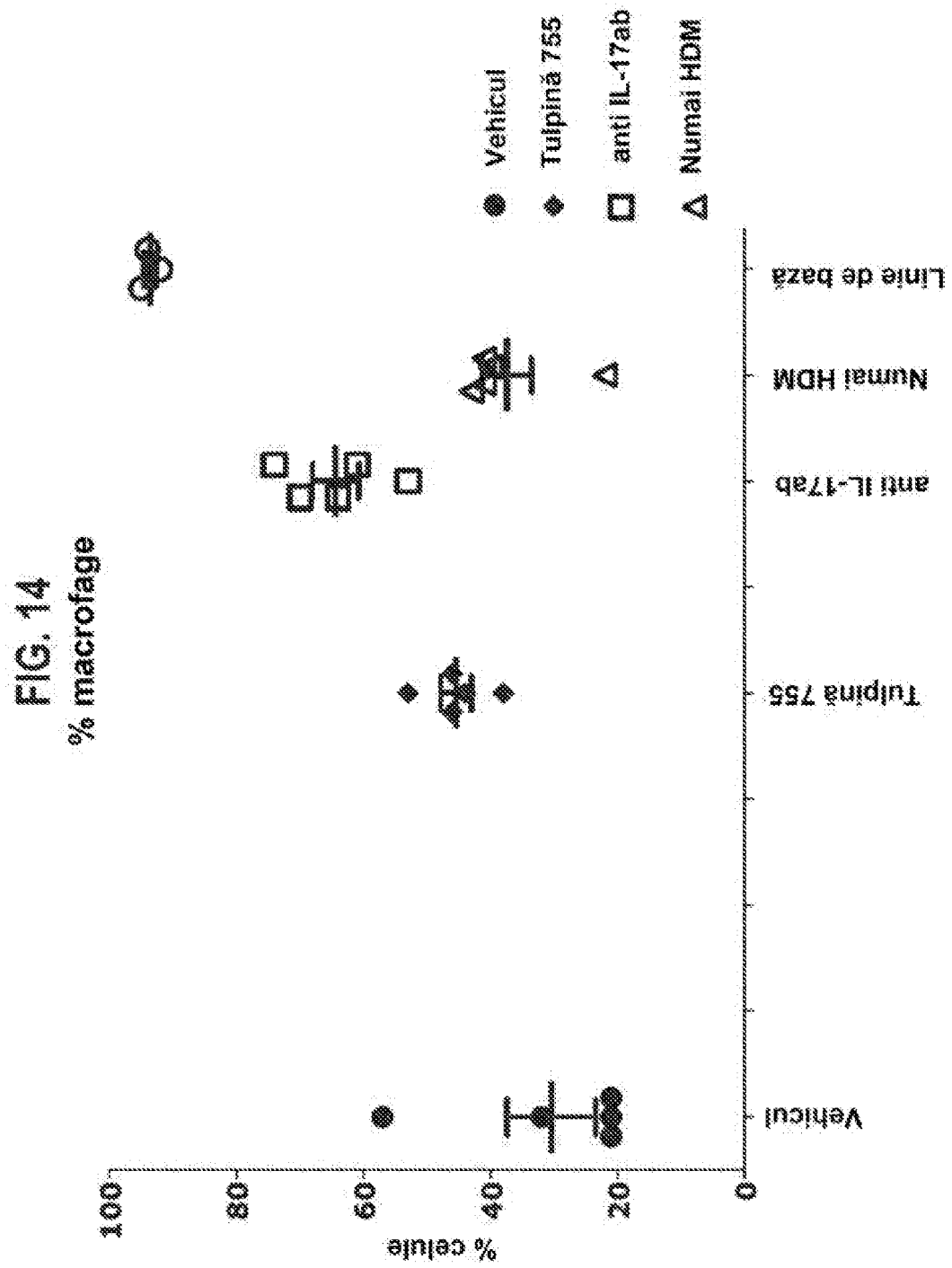


FIG. 15
Total neutrofile

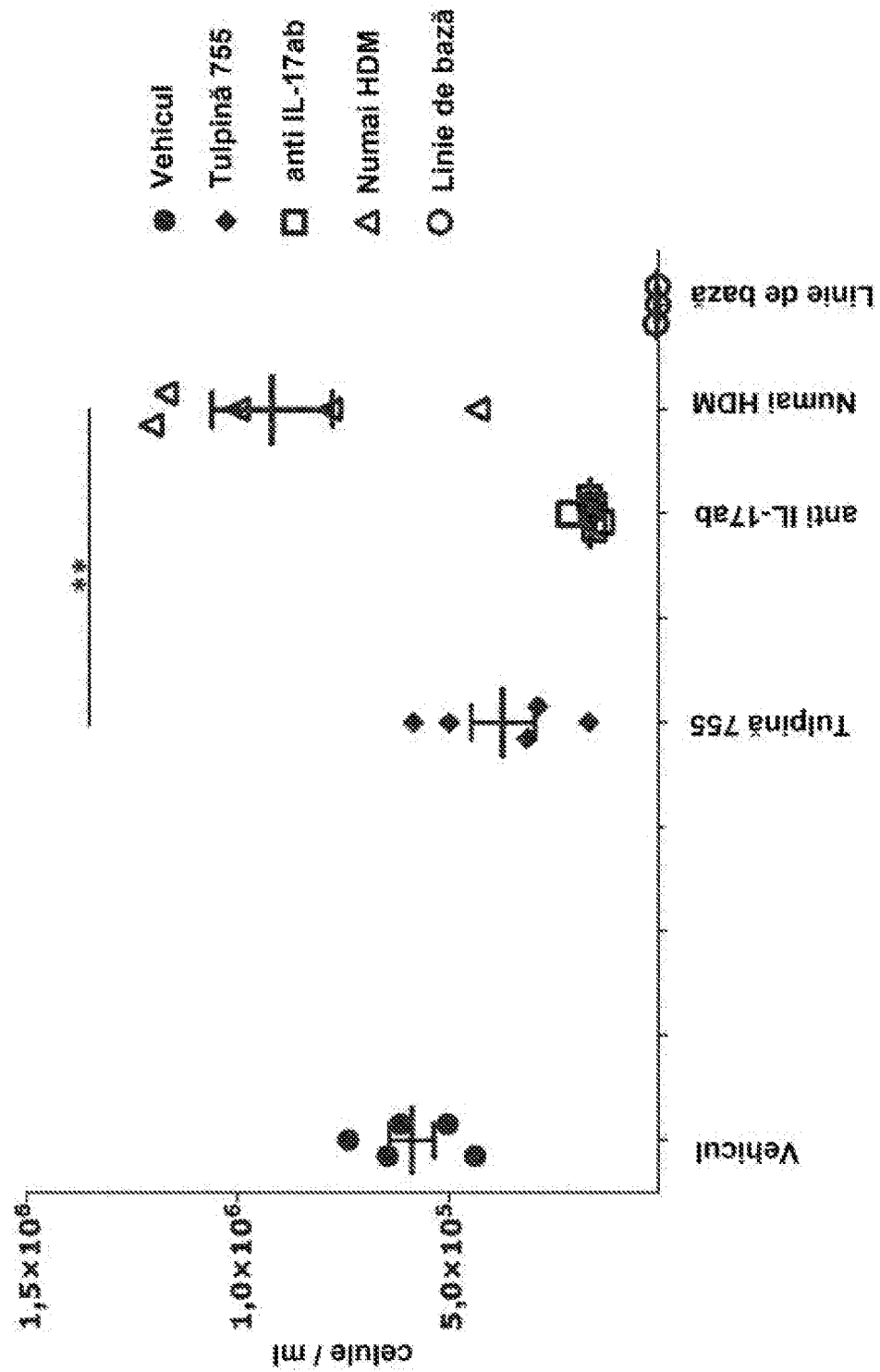


FIG. 16
% neutrofile

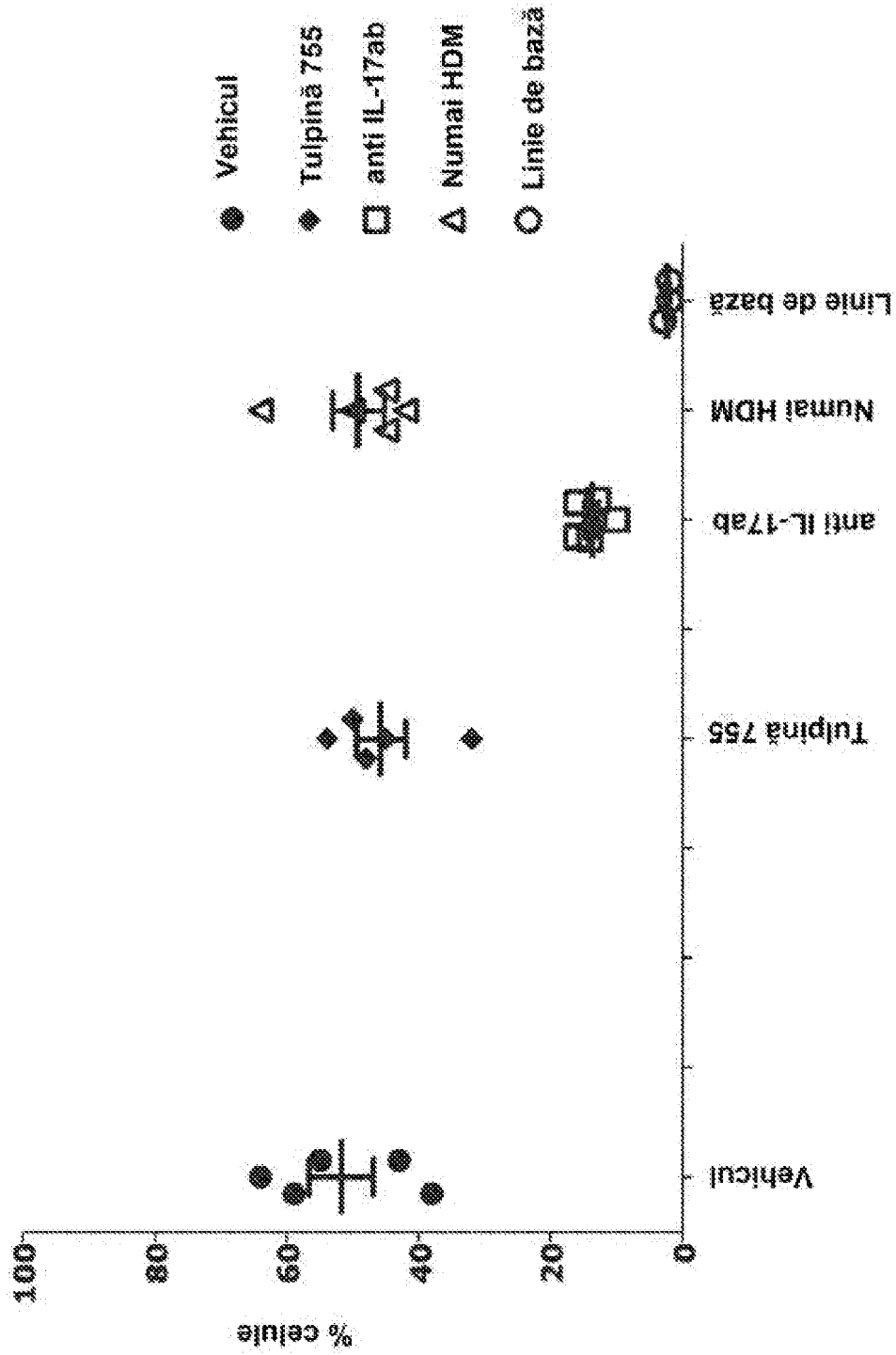


FIG. 17
Total limfocite

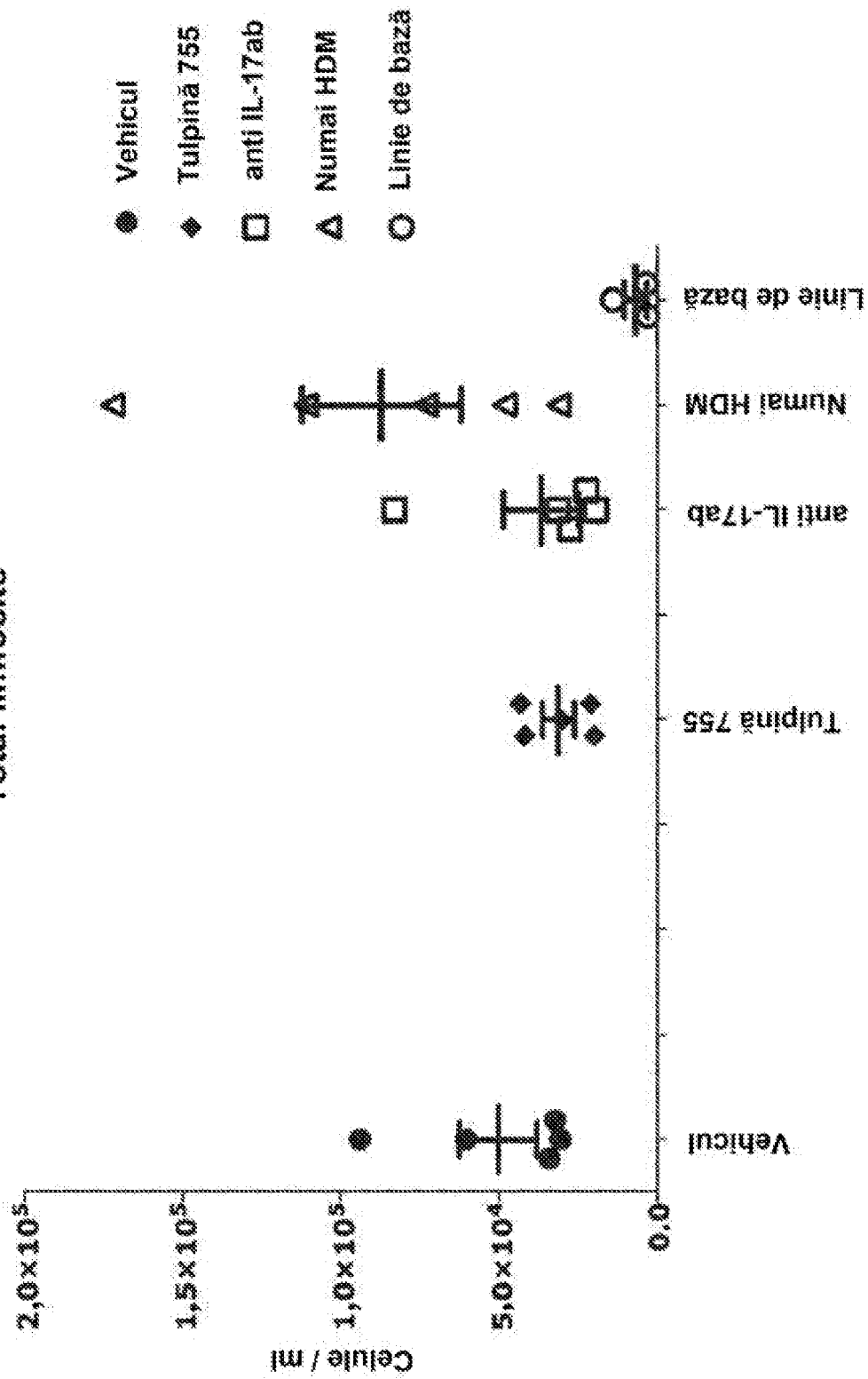


FIG. 18
% limfocite

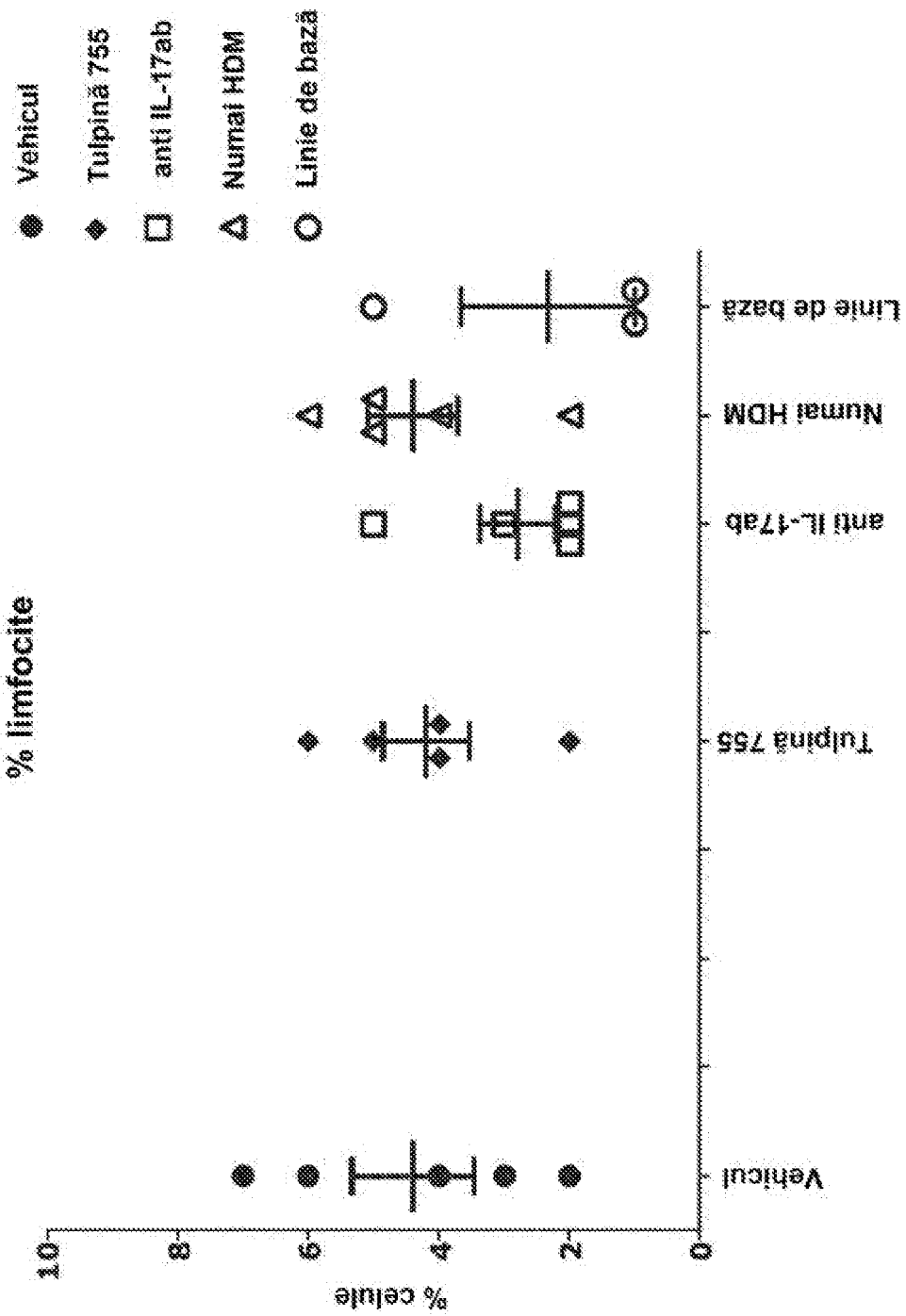


FIG. 19 Greutate corporală

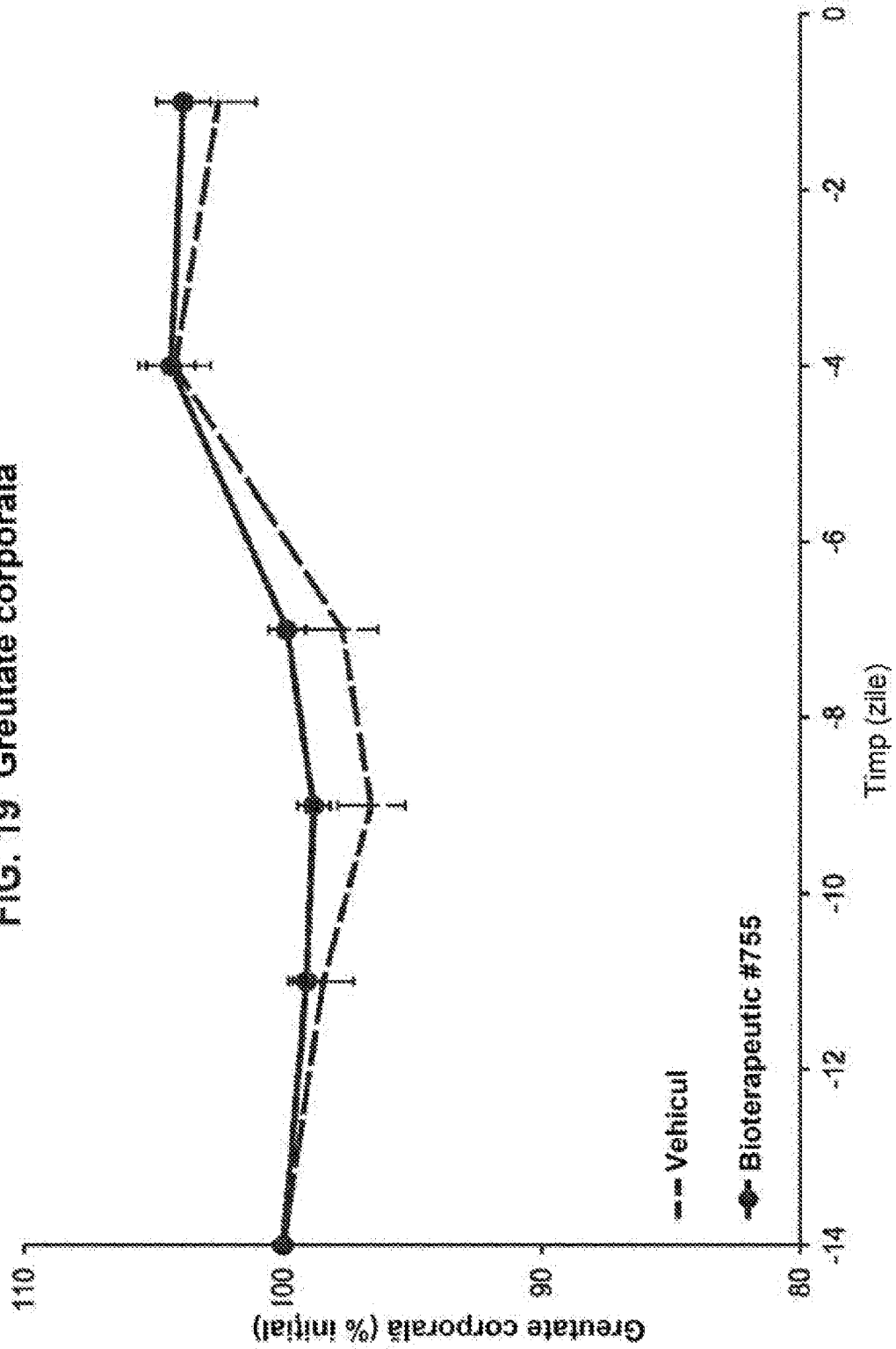
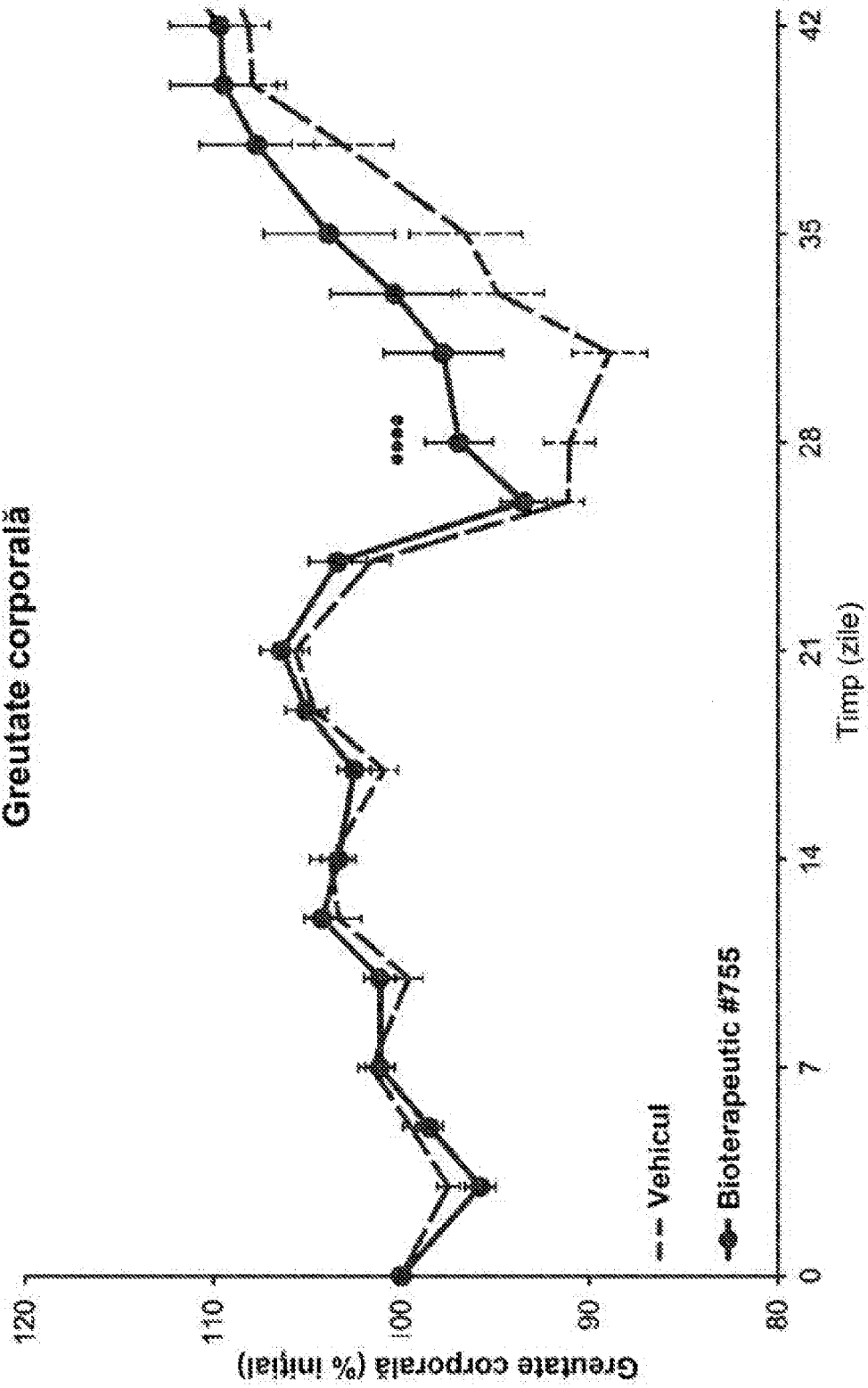


FIG. 20
Greutate corporală



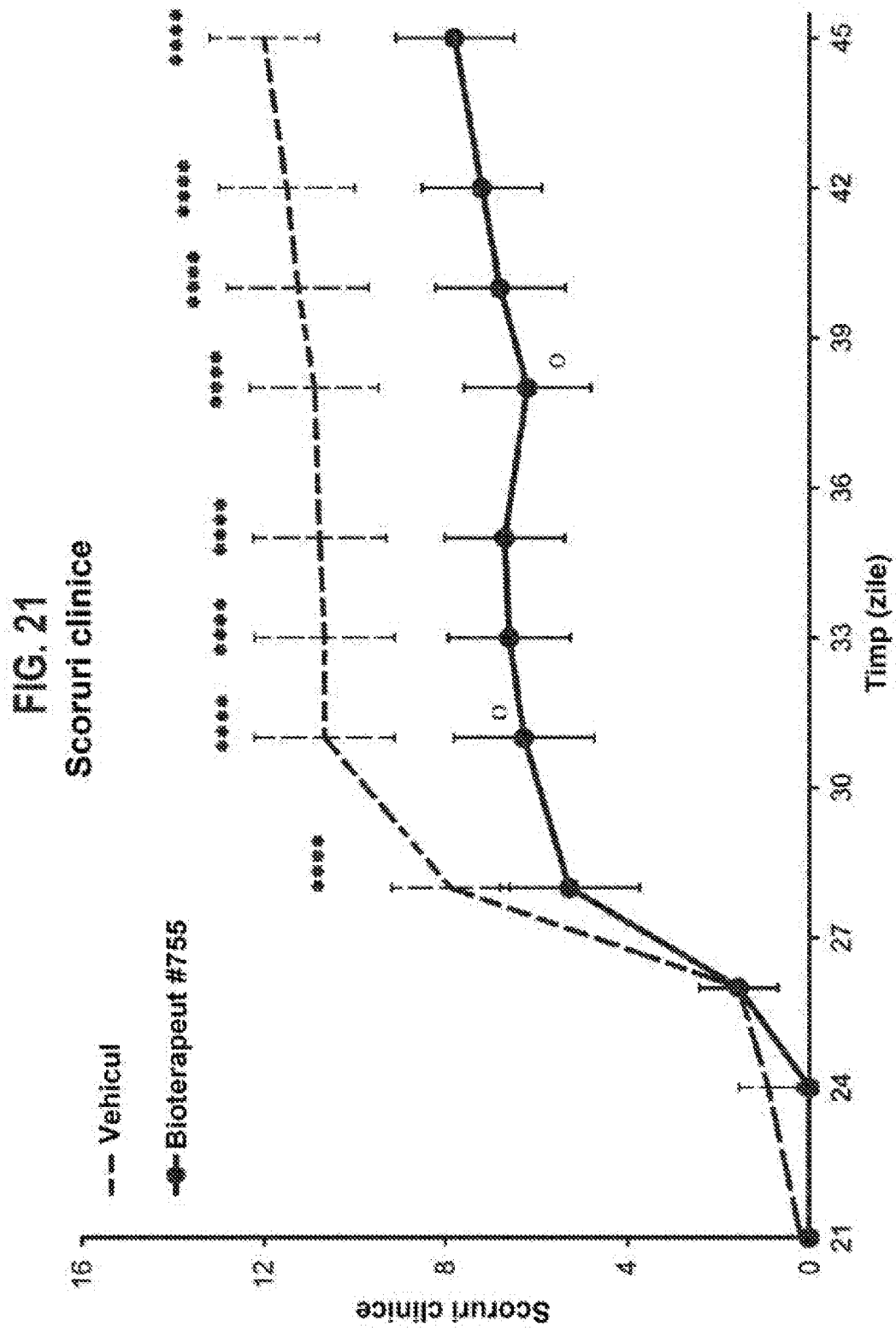


FIG. 23

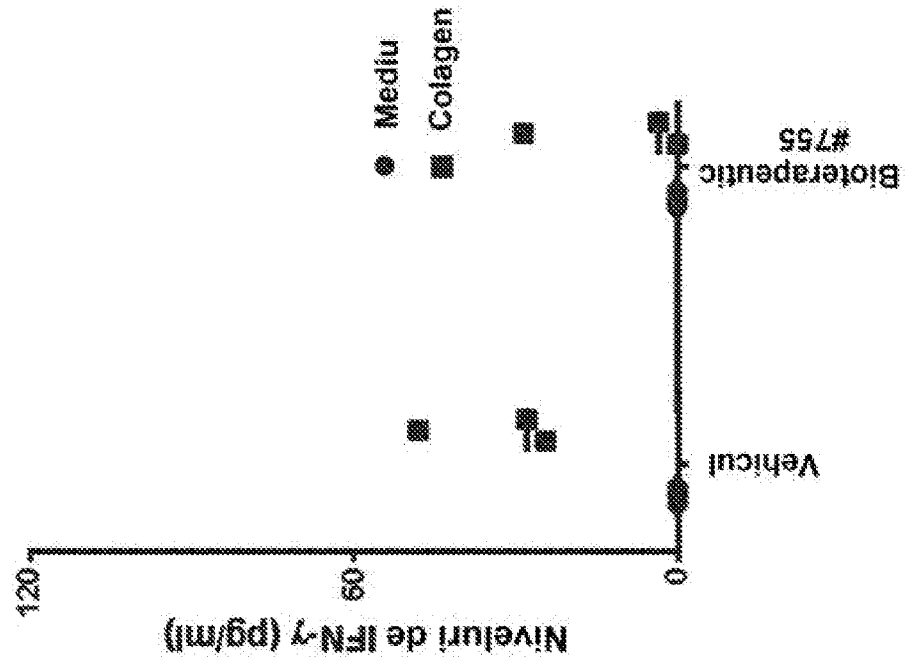
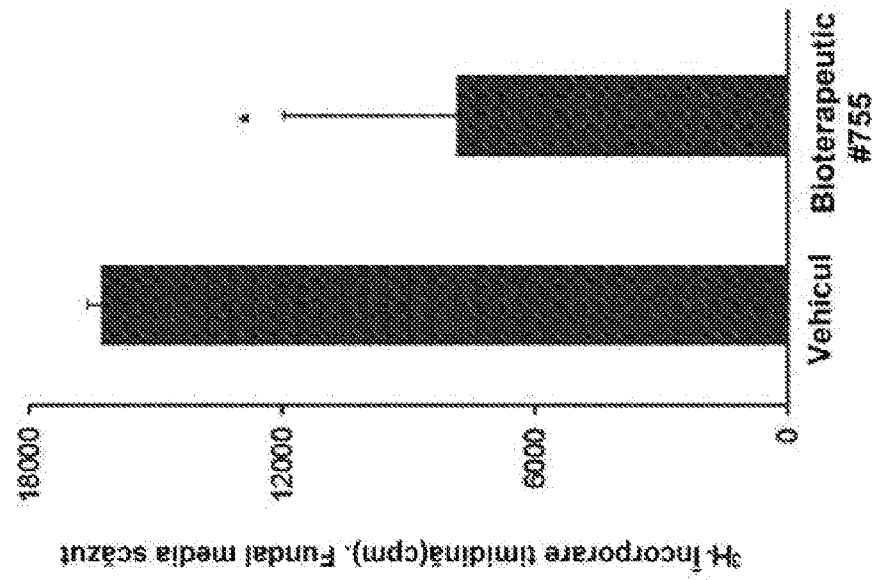
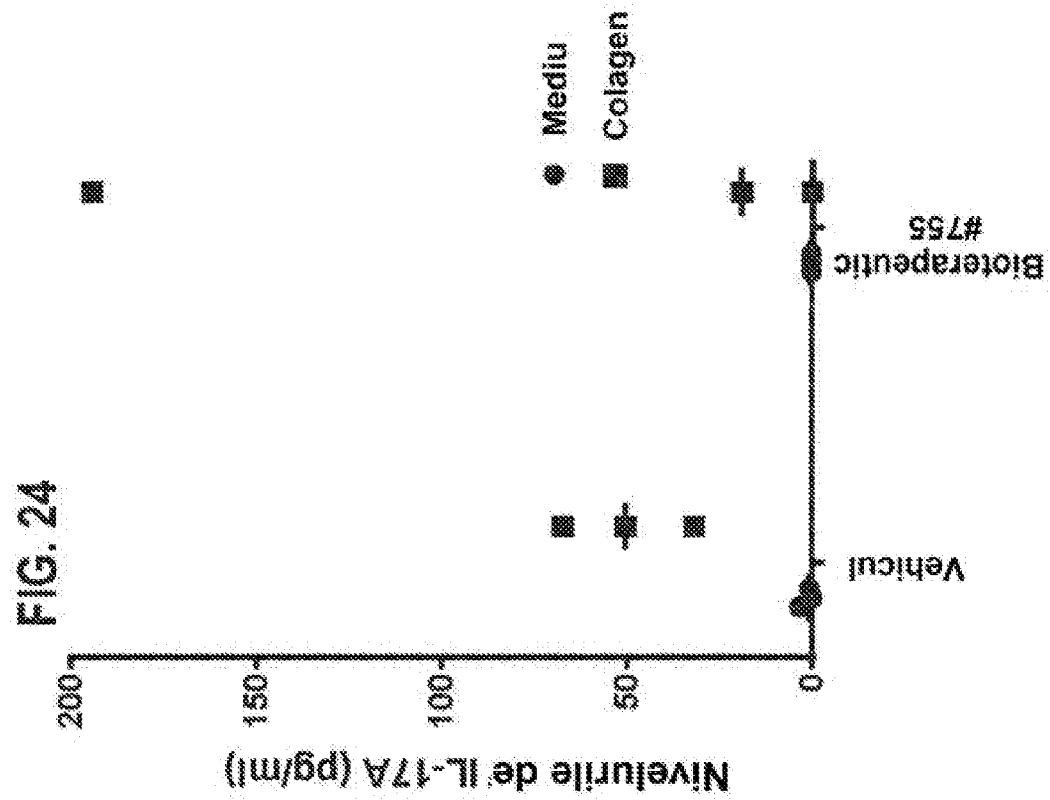
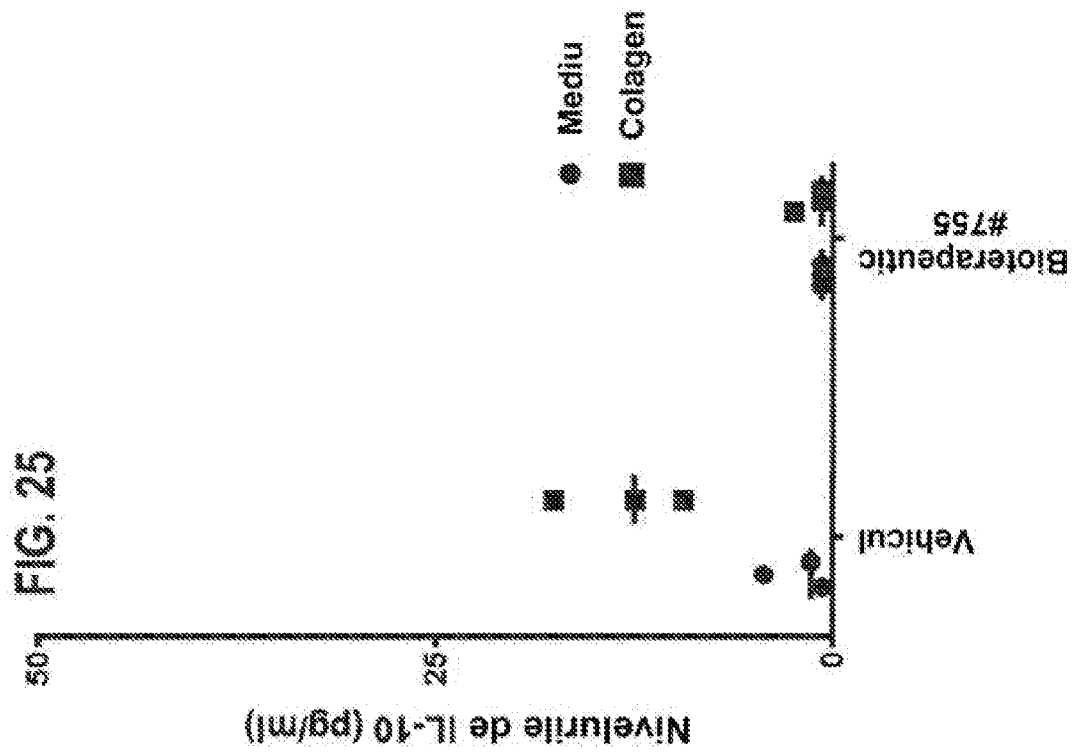


FIG. 22

Proliferarea splenocitelor la colagen II





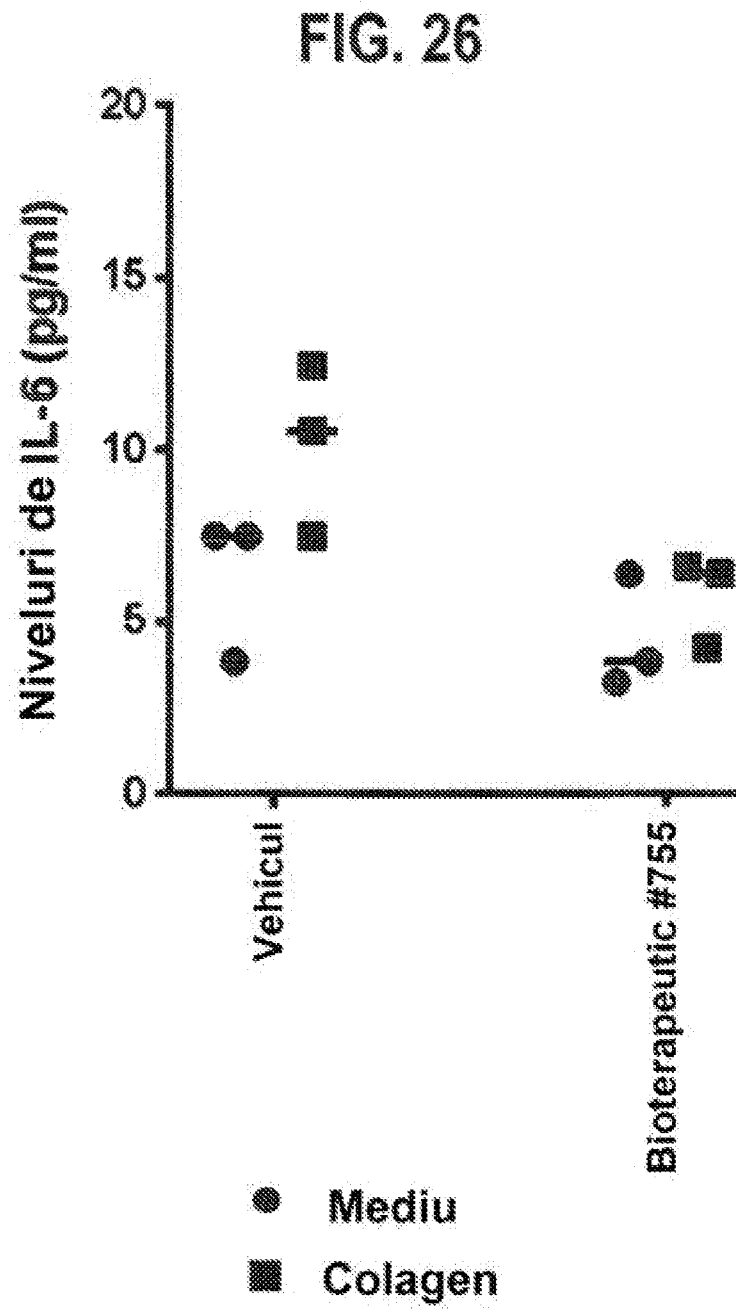
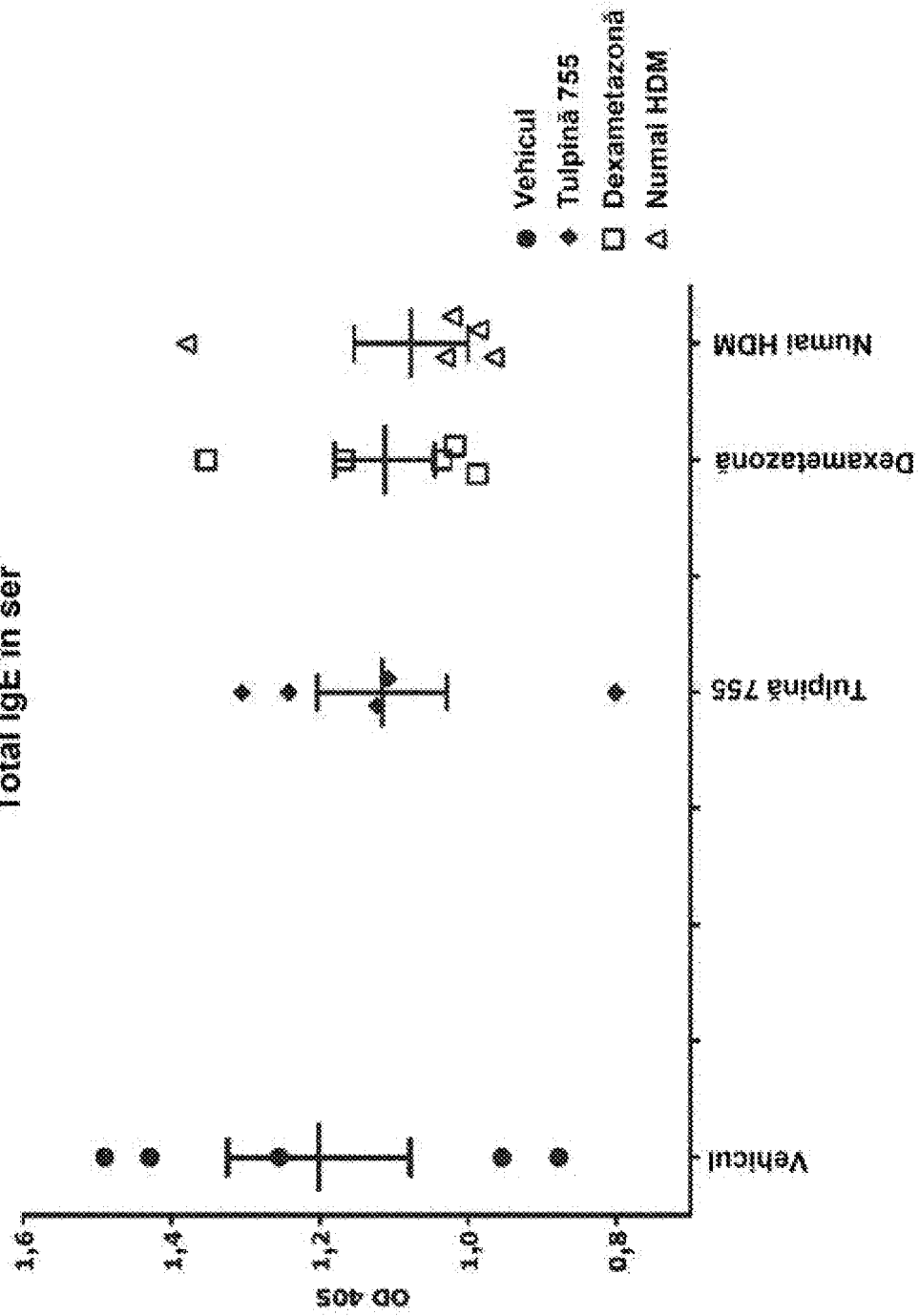
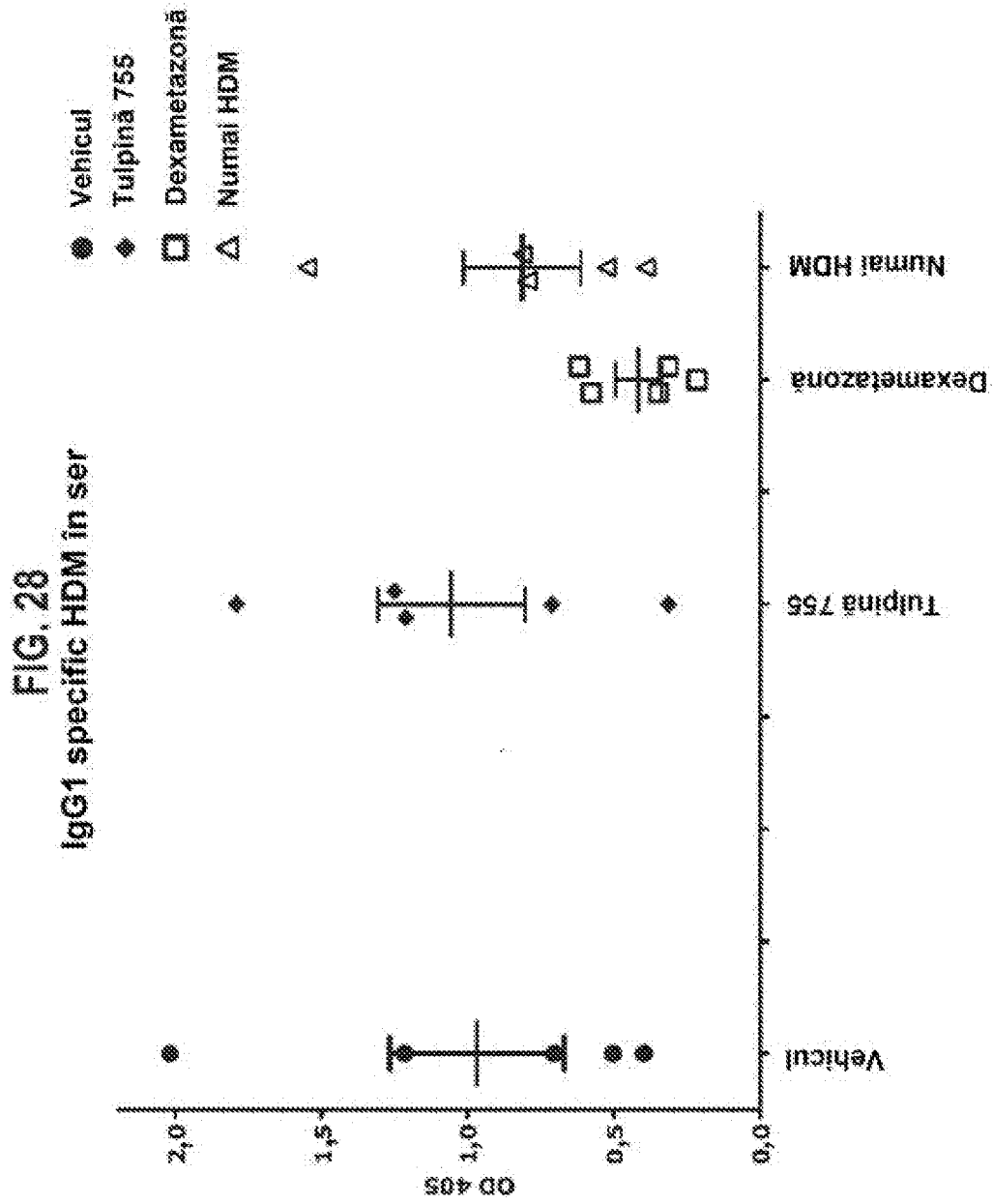
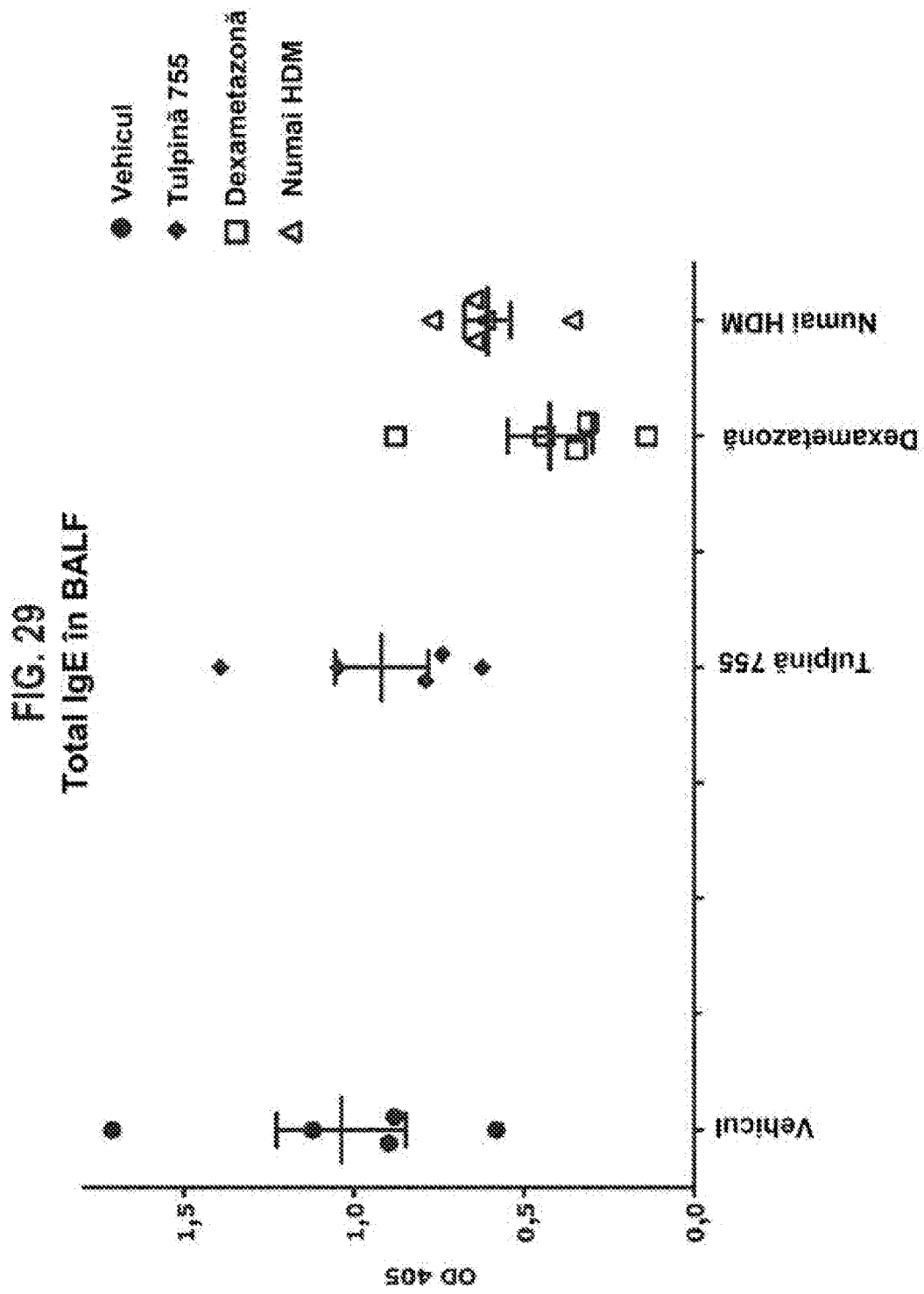


FIG. 27
Total IgE în ser







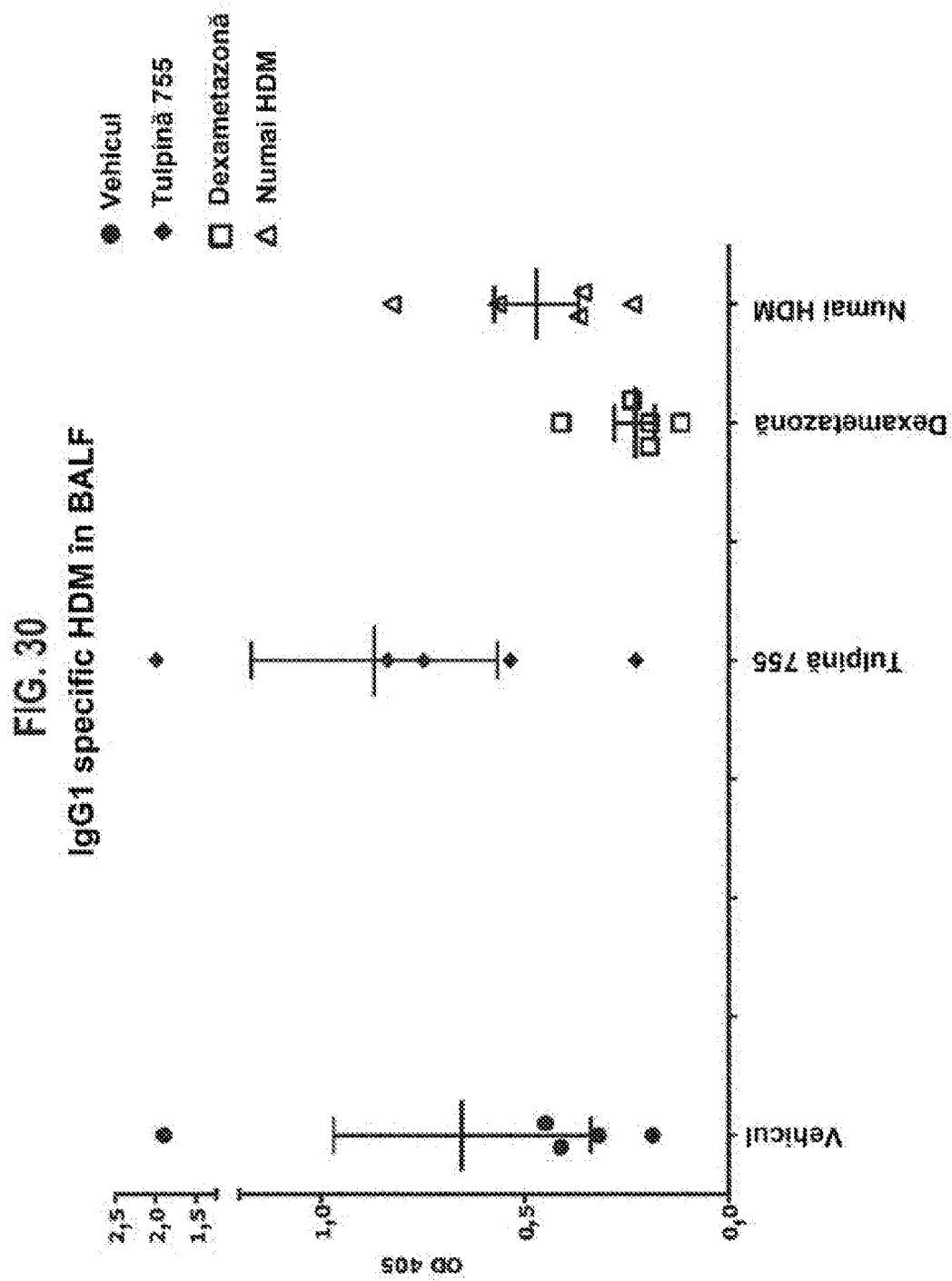


FIG. 31 Analiză histologică - scorurile medii de infiltrare peribronheolare

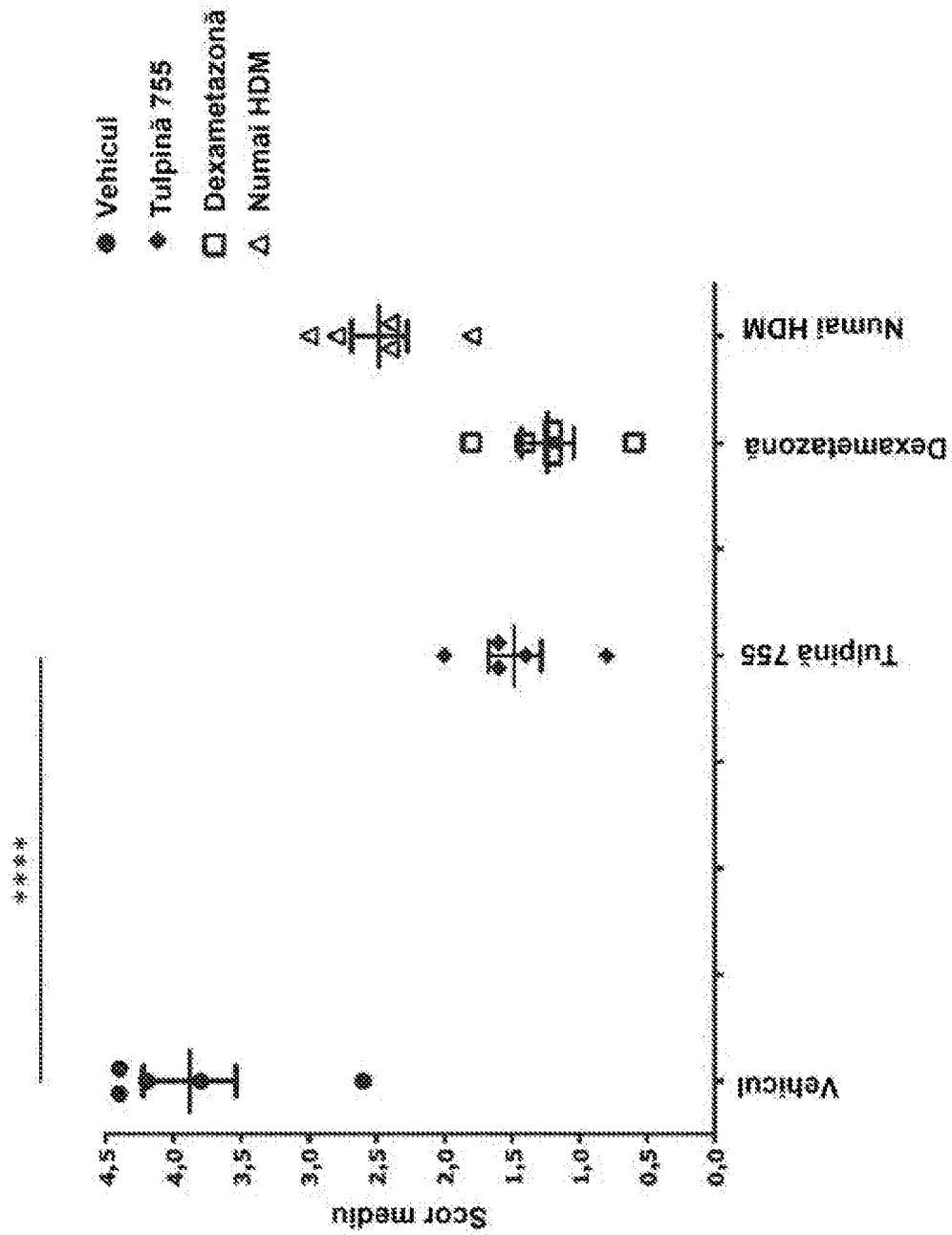
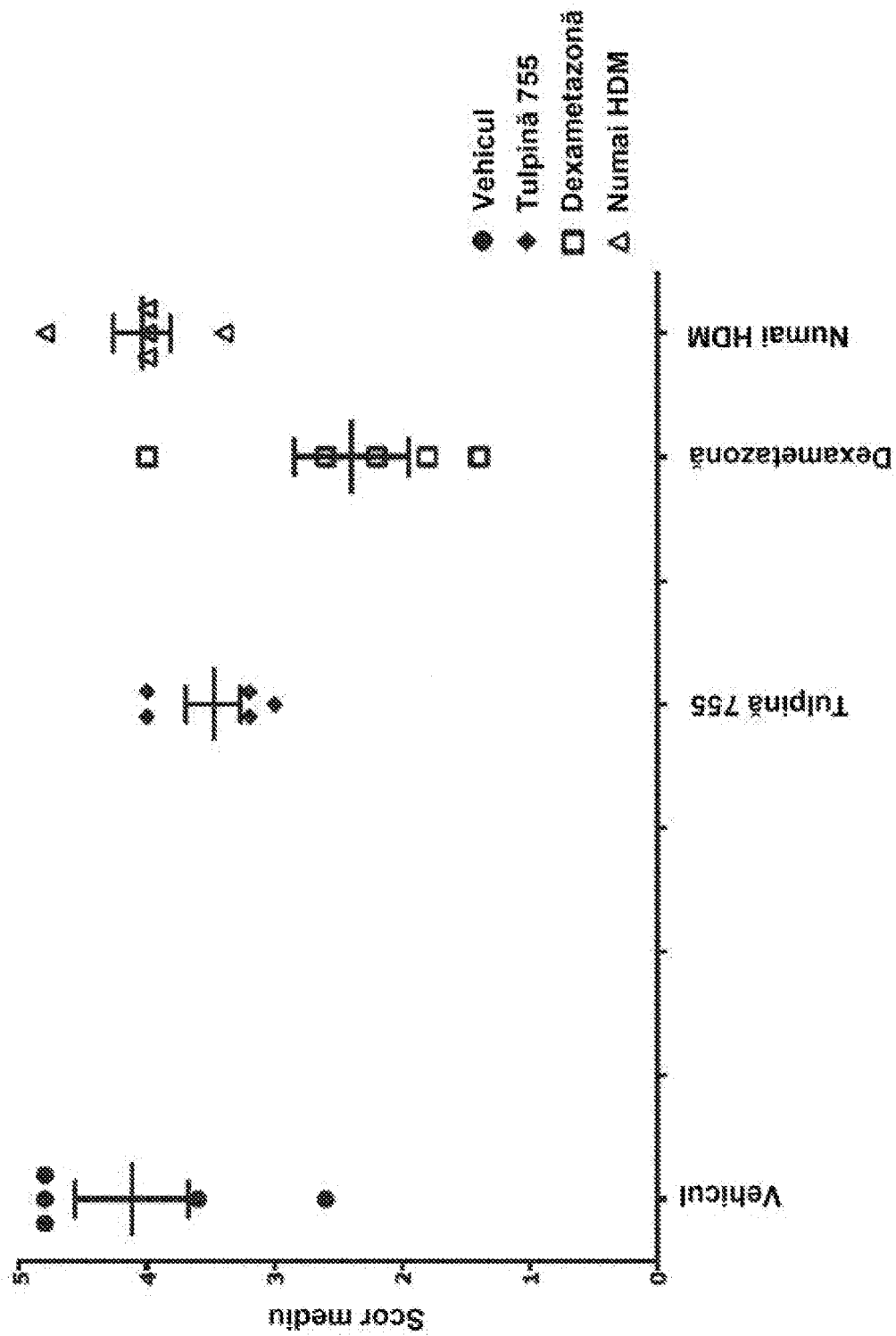


FIG. 32 Analiză histologică - scorurile medii ale infiltrărilor perivasculare



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

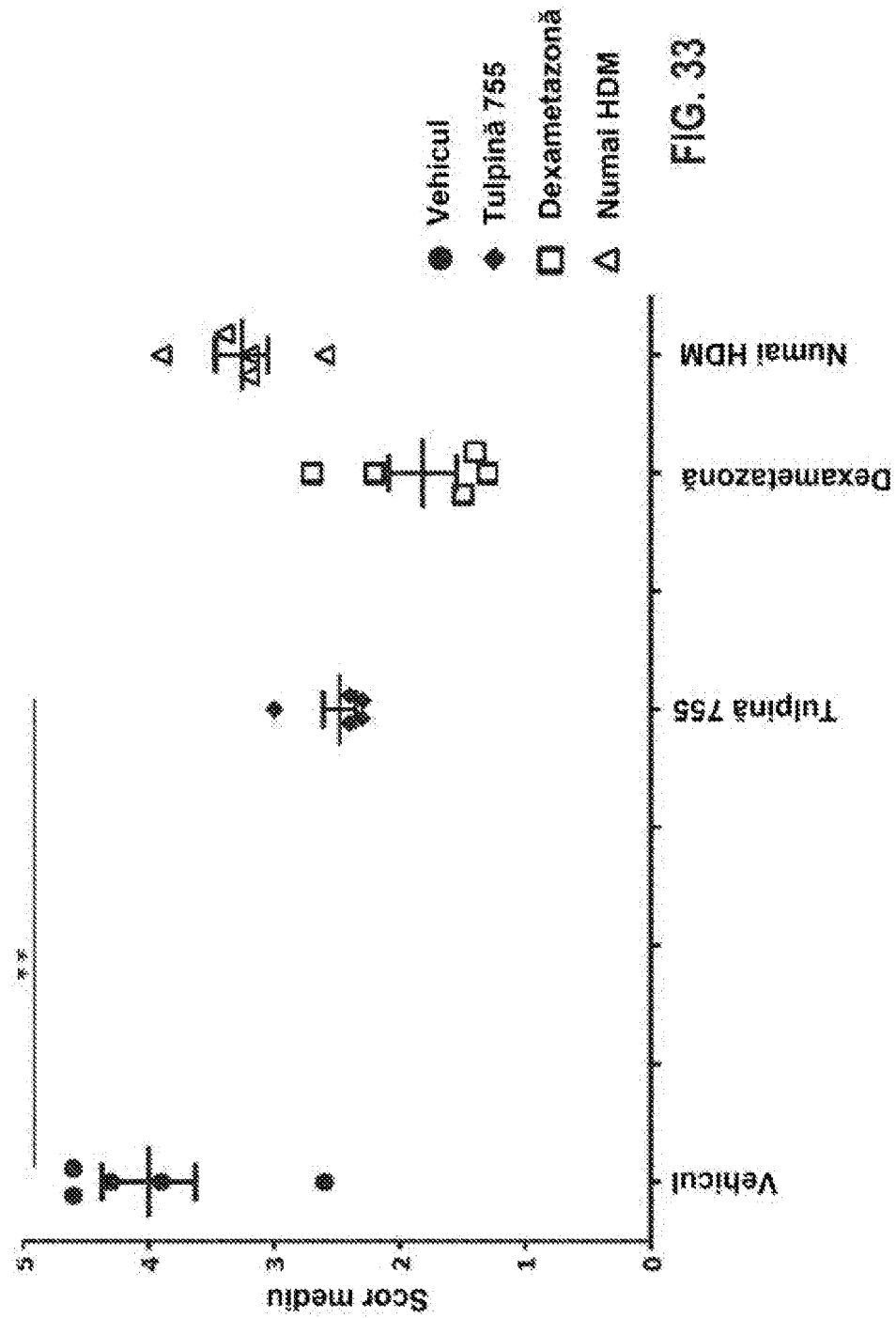


FIG. 33

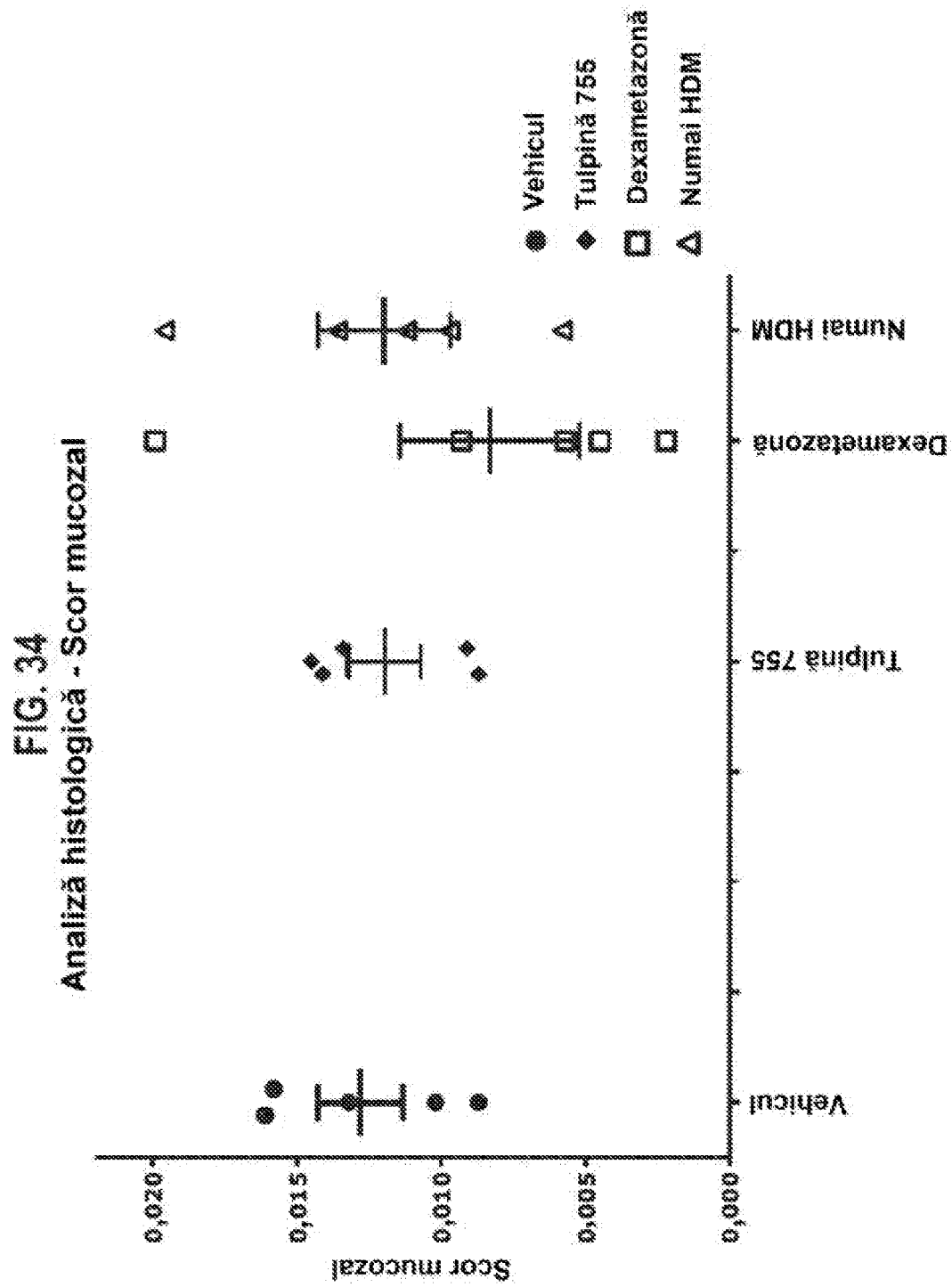
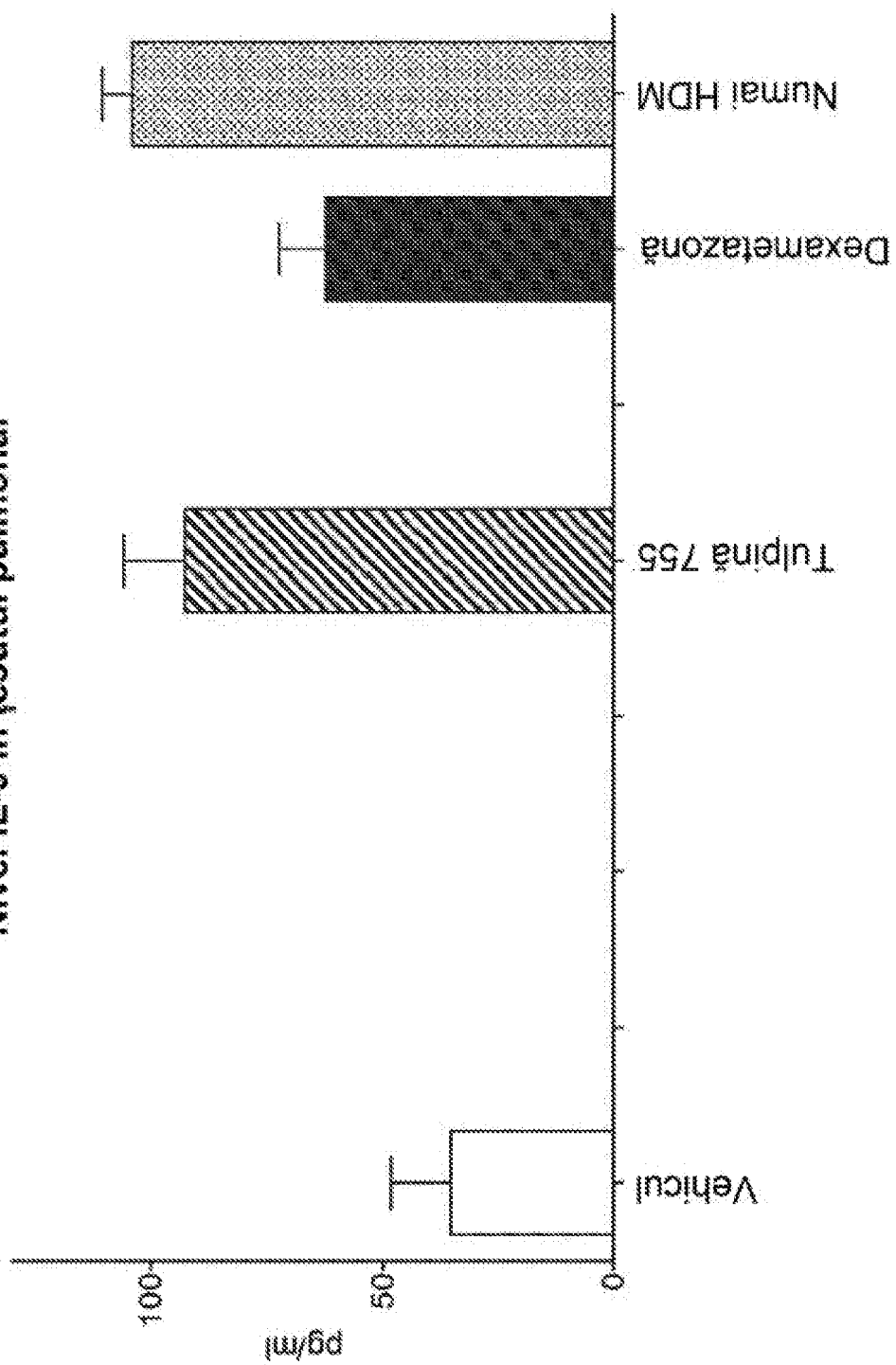


FIG. 35
Nivel IL-9 în țesutul pulmonar



75

FIG. 36
Nivel IL-1a în țesutul pulmonar

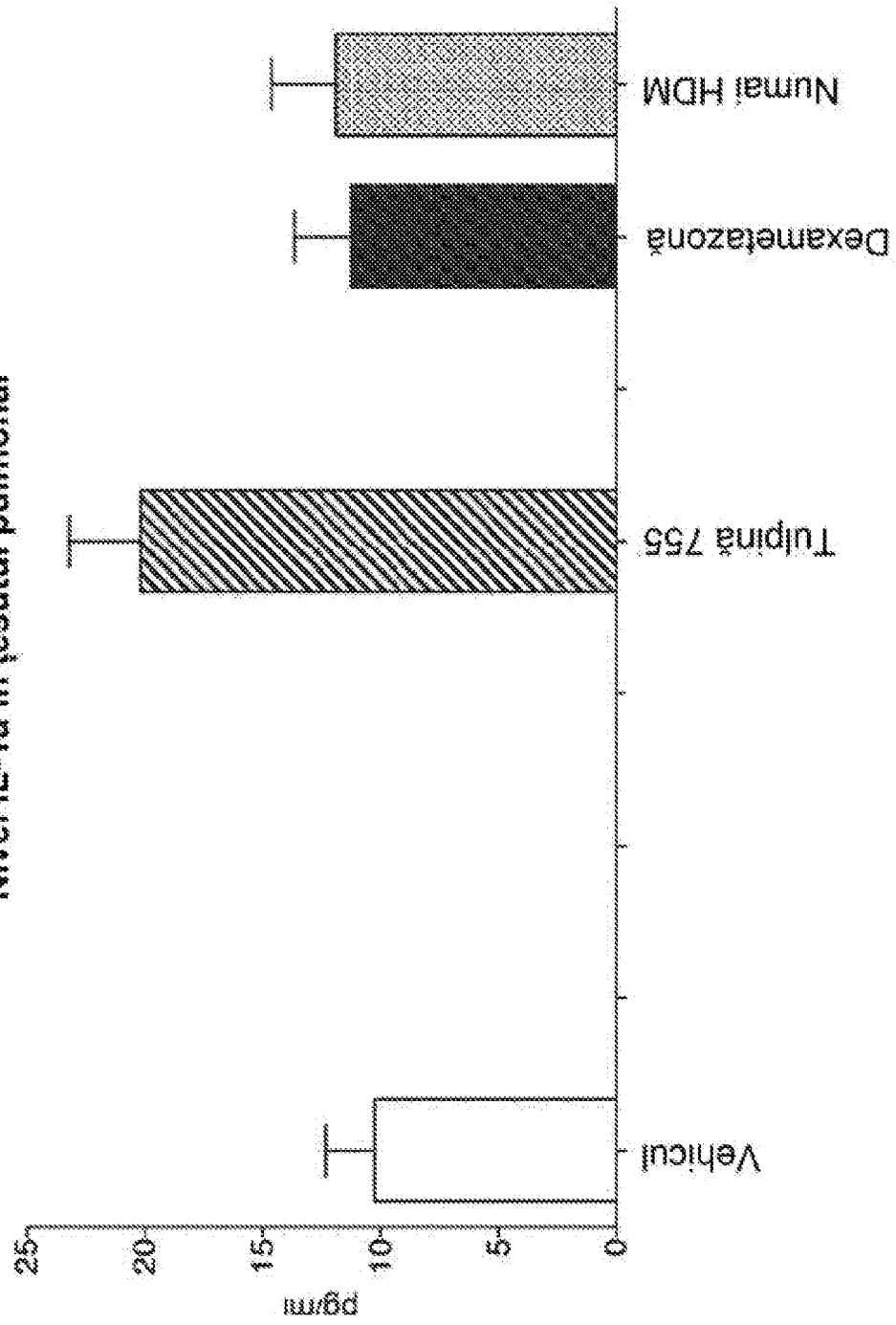


FIG. 37
Nivel IFNg în țesutul pulmonar

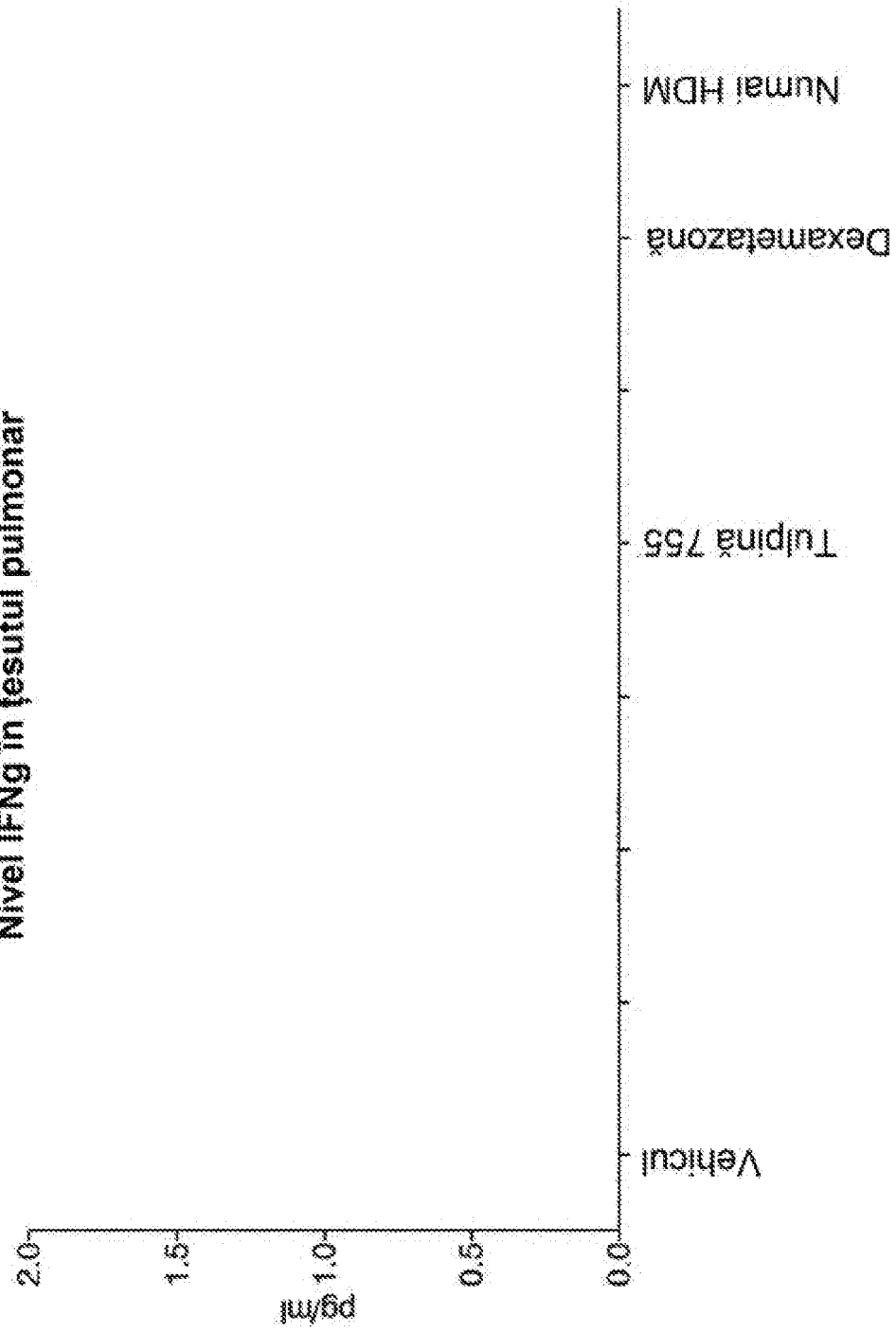


FIG. 38
Nivel IL-17A în țesutul pulmonar

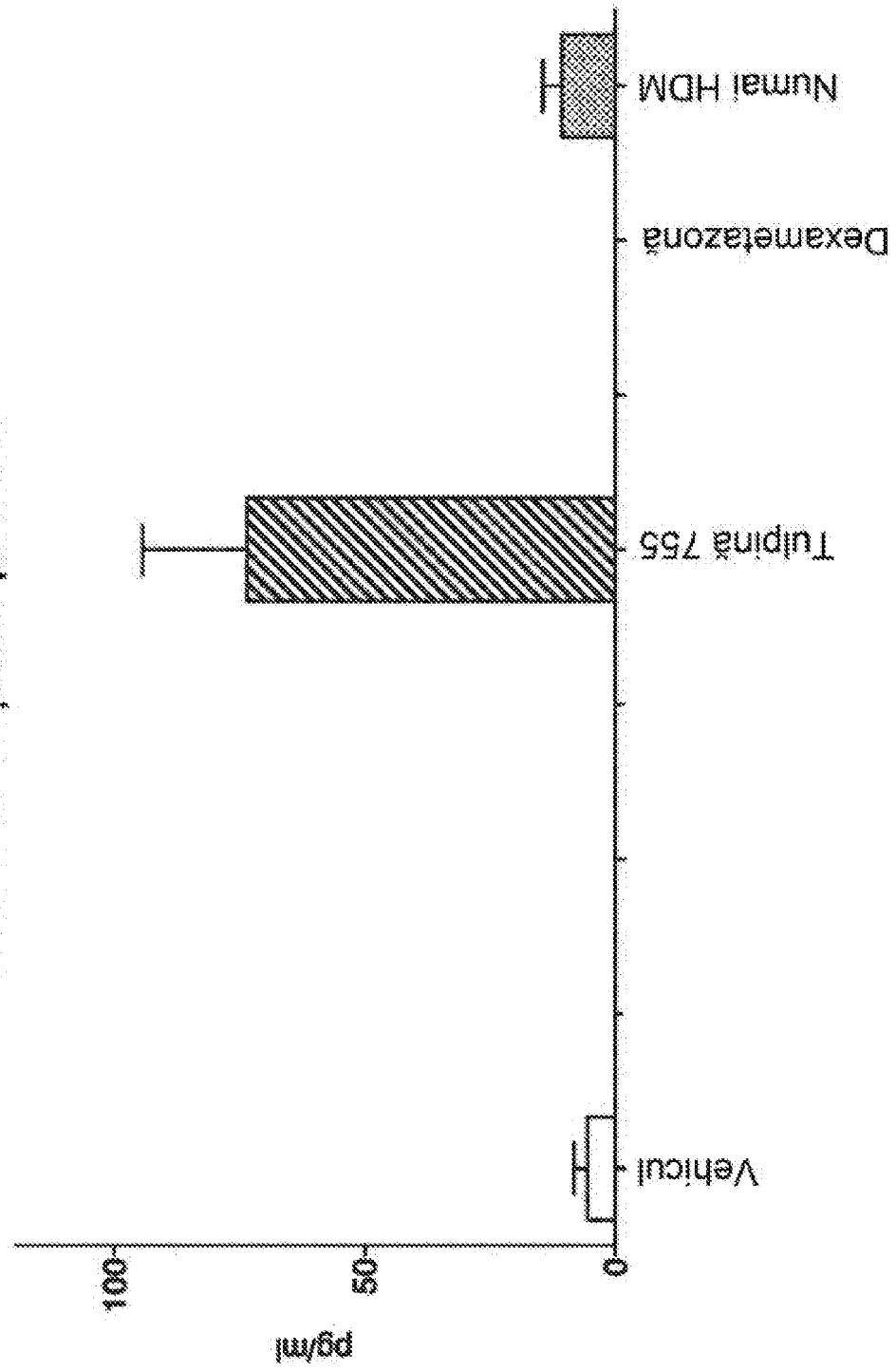


FIG. 39
Nivel IL-4 în țesutul pulmonar

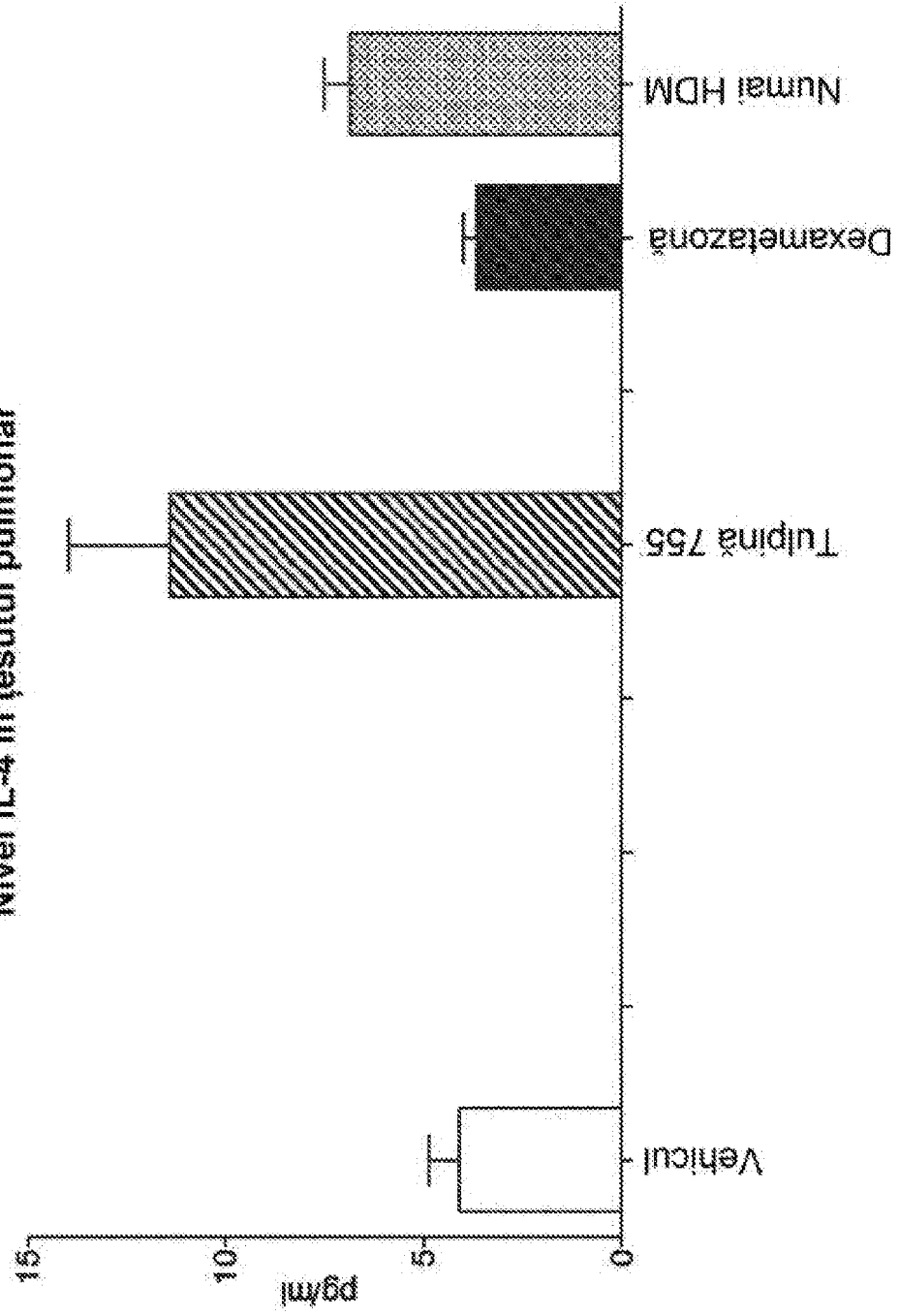


FIG. 40
Nivel IL-5 în țesutul muscular

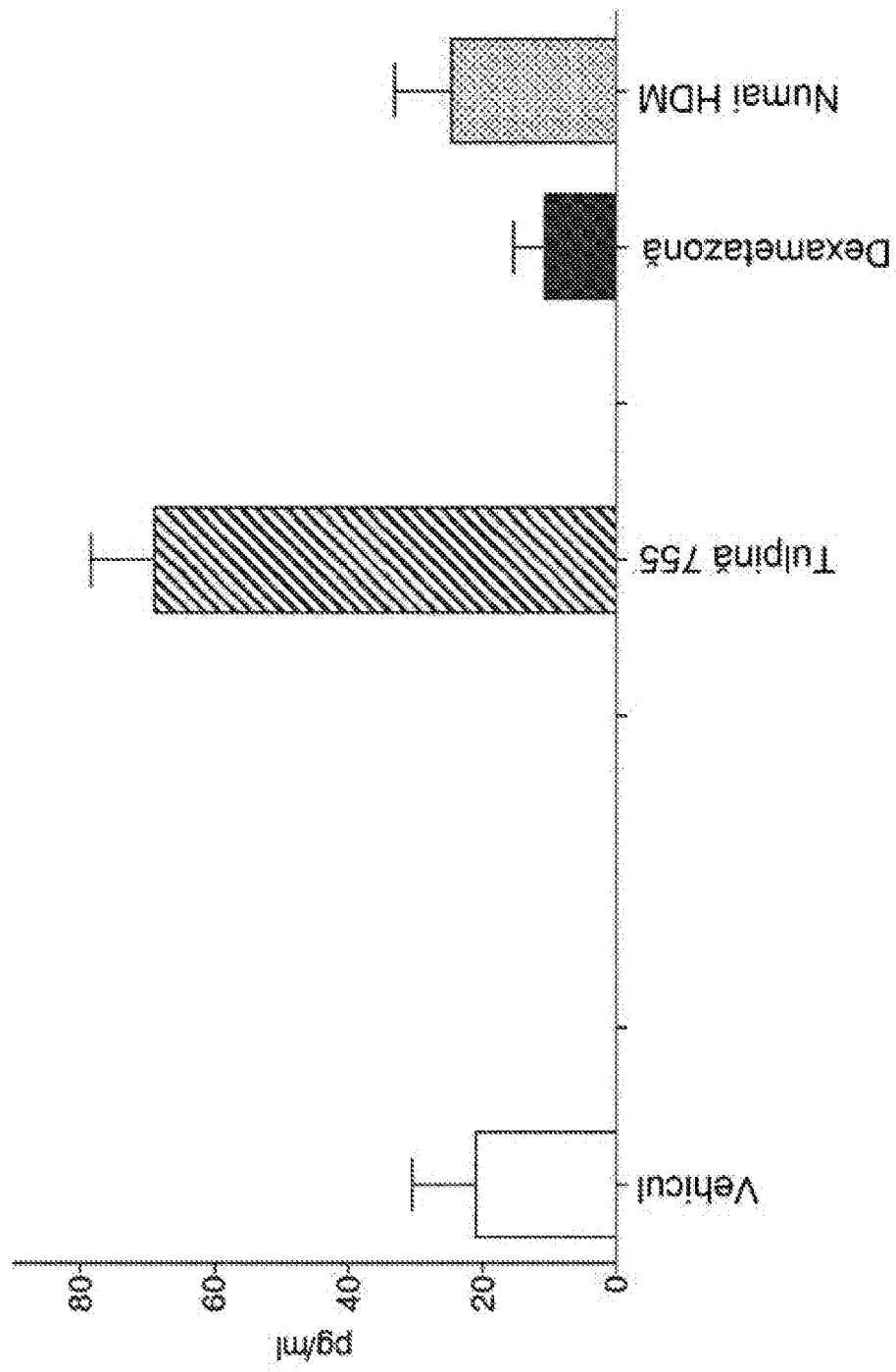


FIG. 41
Nivel IL-1b în țesutul muscular

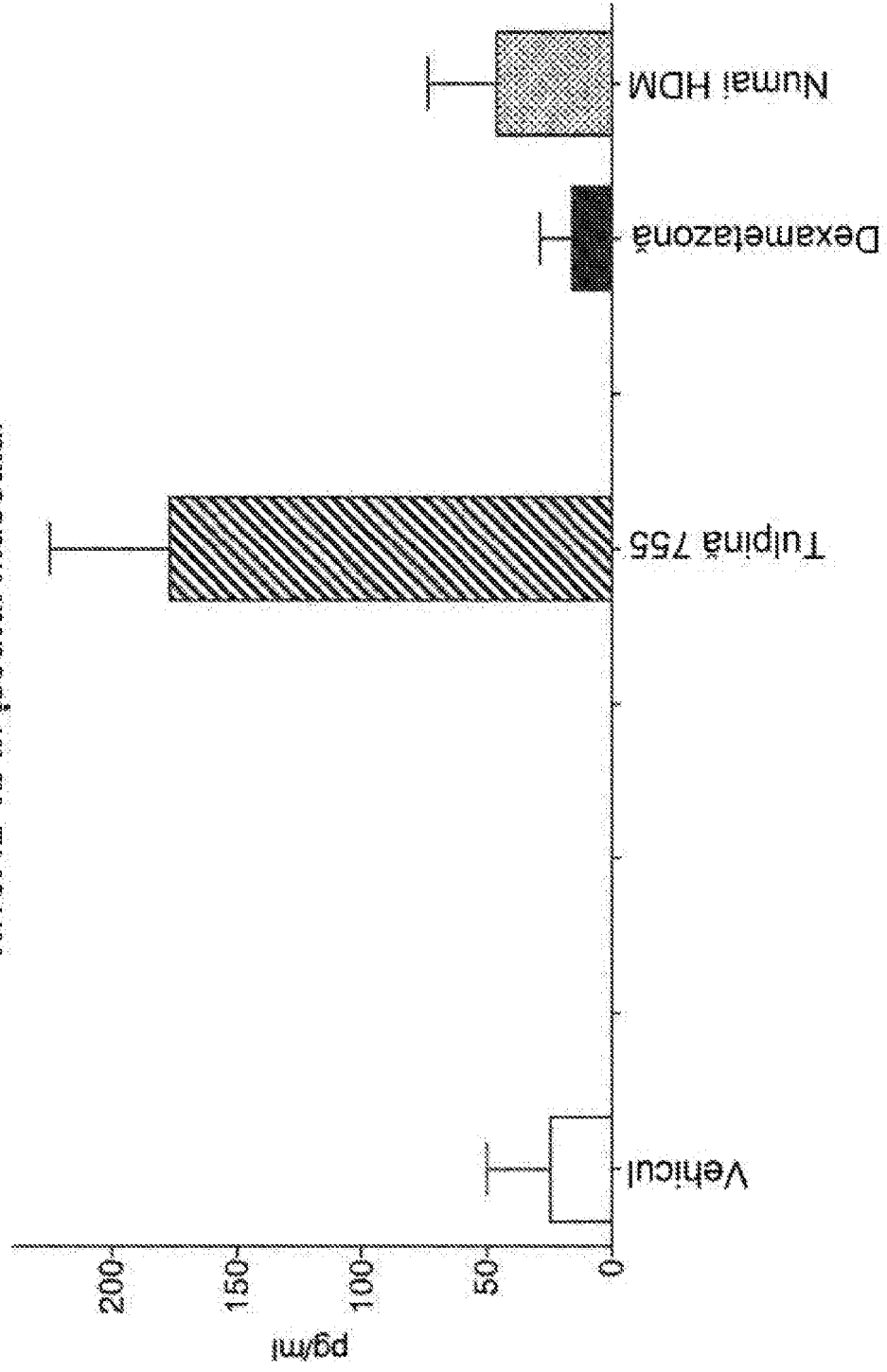


FIG. 42
Nivel RANTES în țesutul pulmonar

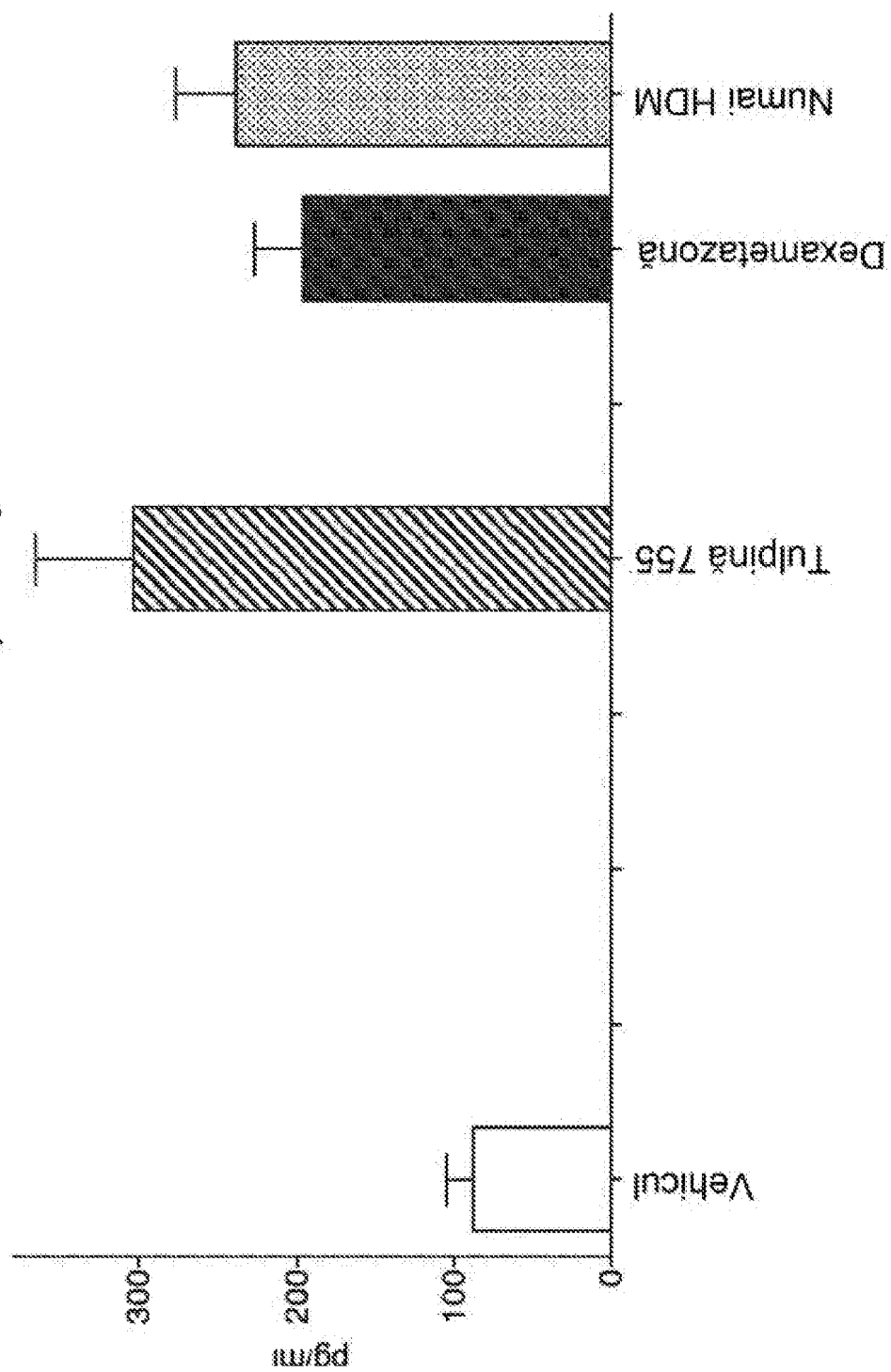


FIG. 43
Nivel MIP-1a în țesutul pulmonar

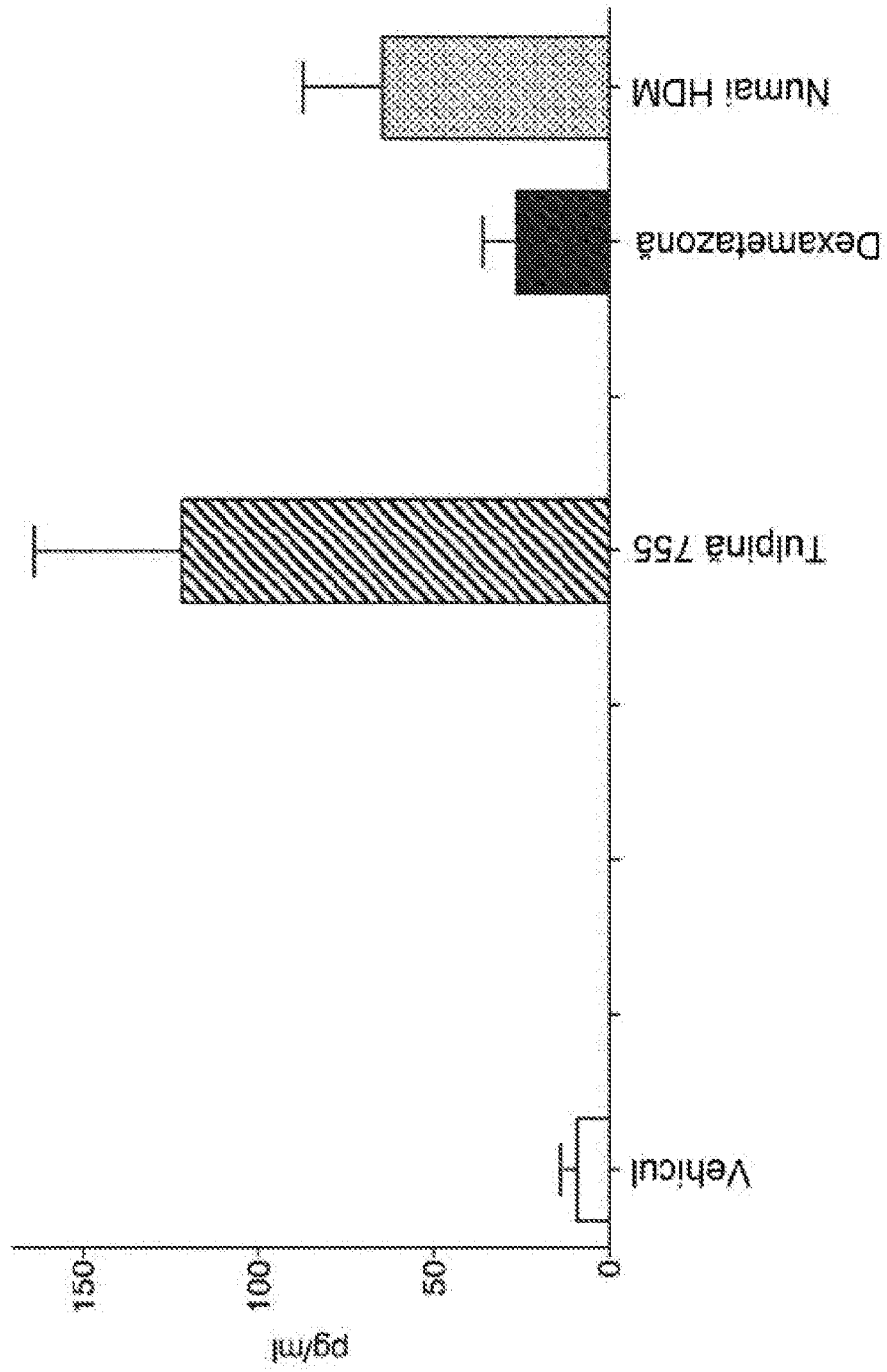


FIG. 44
Nivel KC în țesutul pulmonar

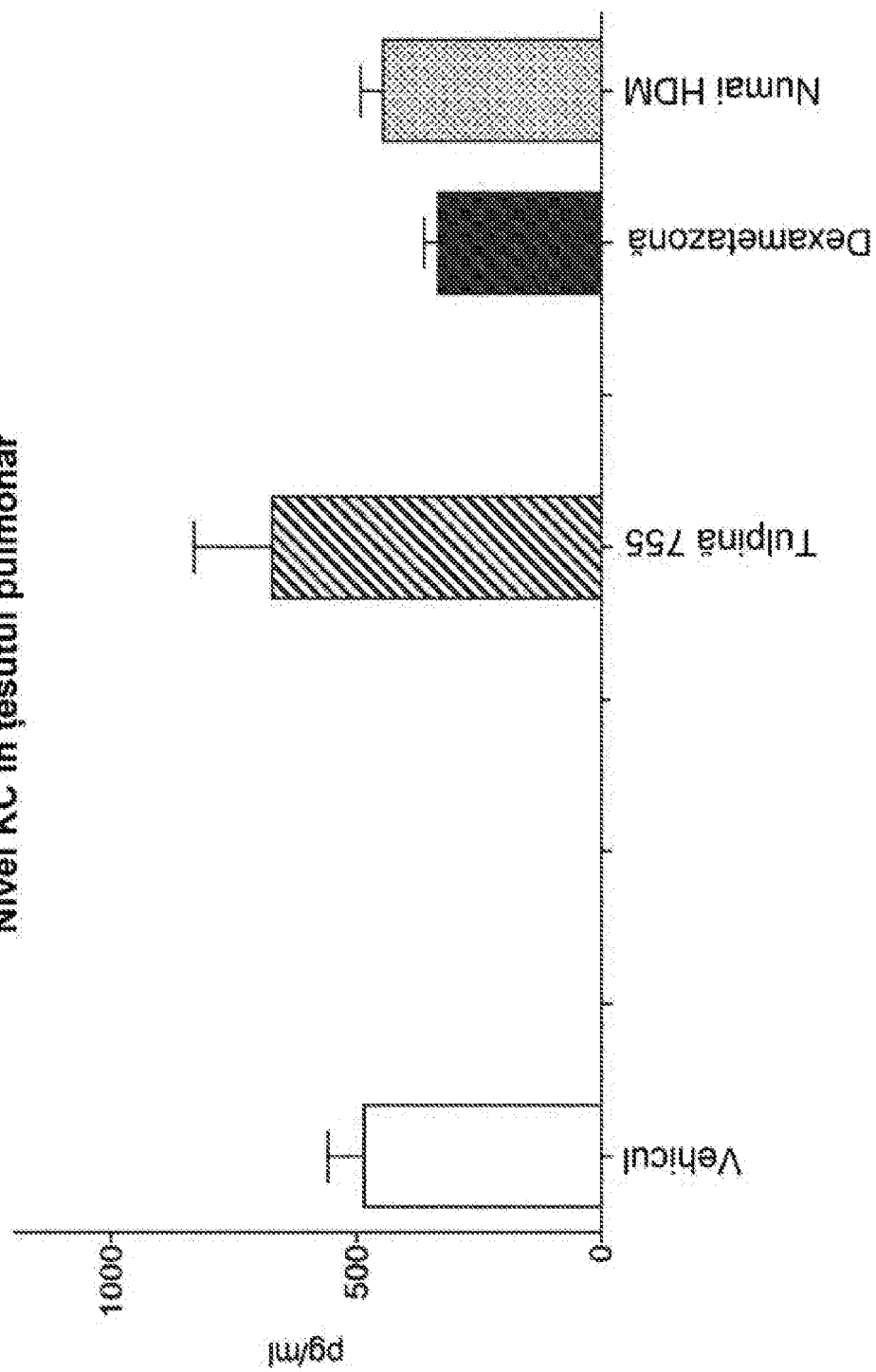


FIG. 45
Nivel MIP-2 în țesutul pulmonar

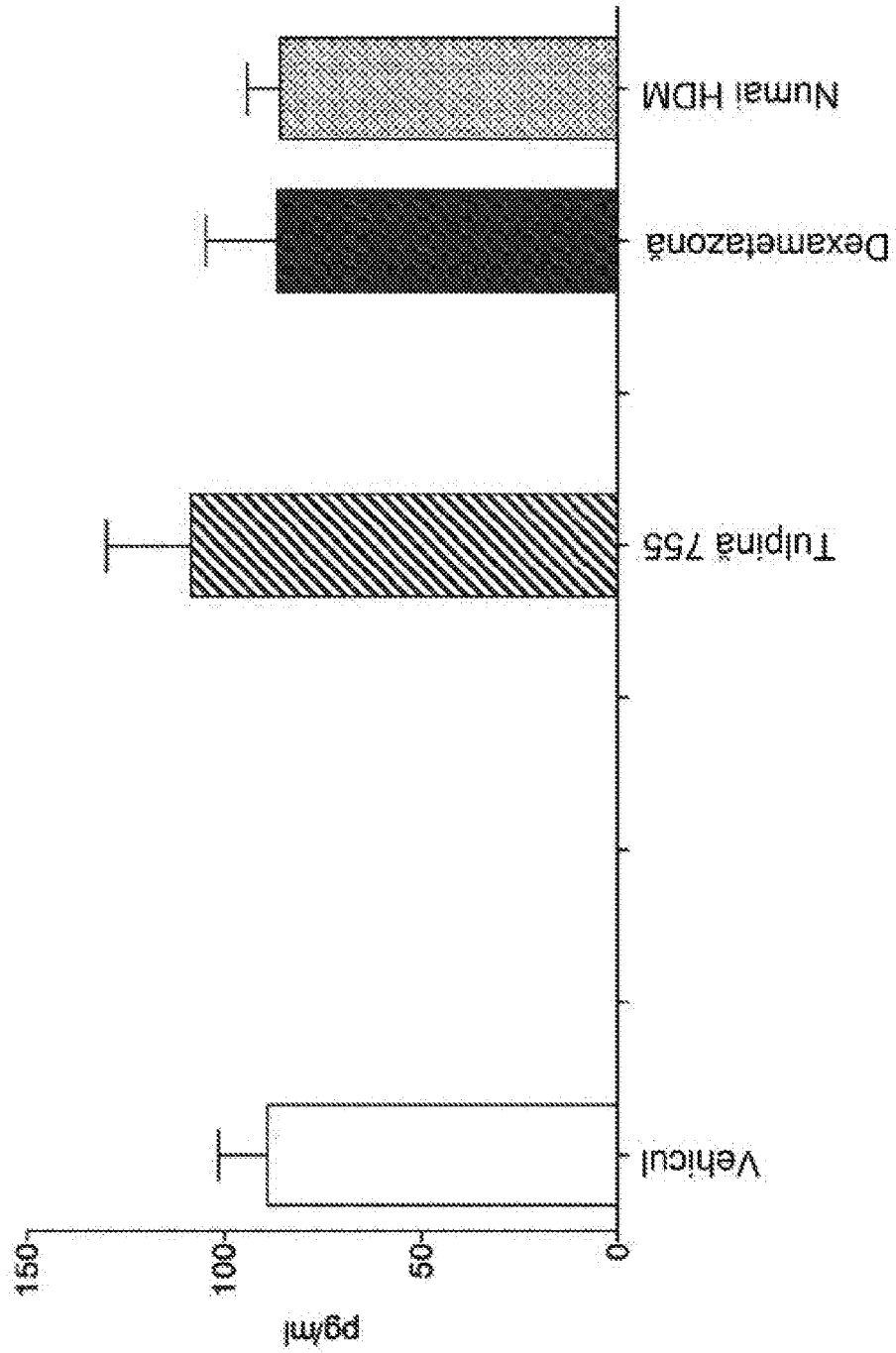
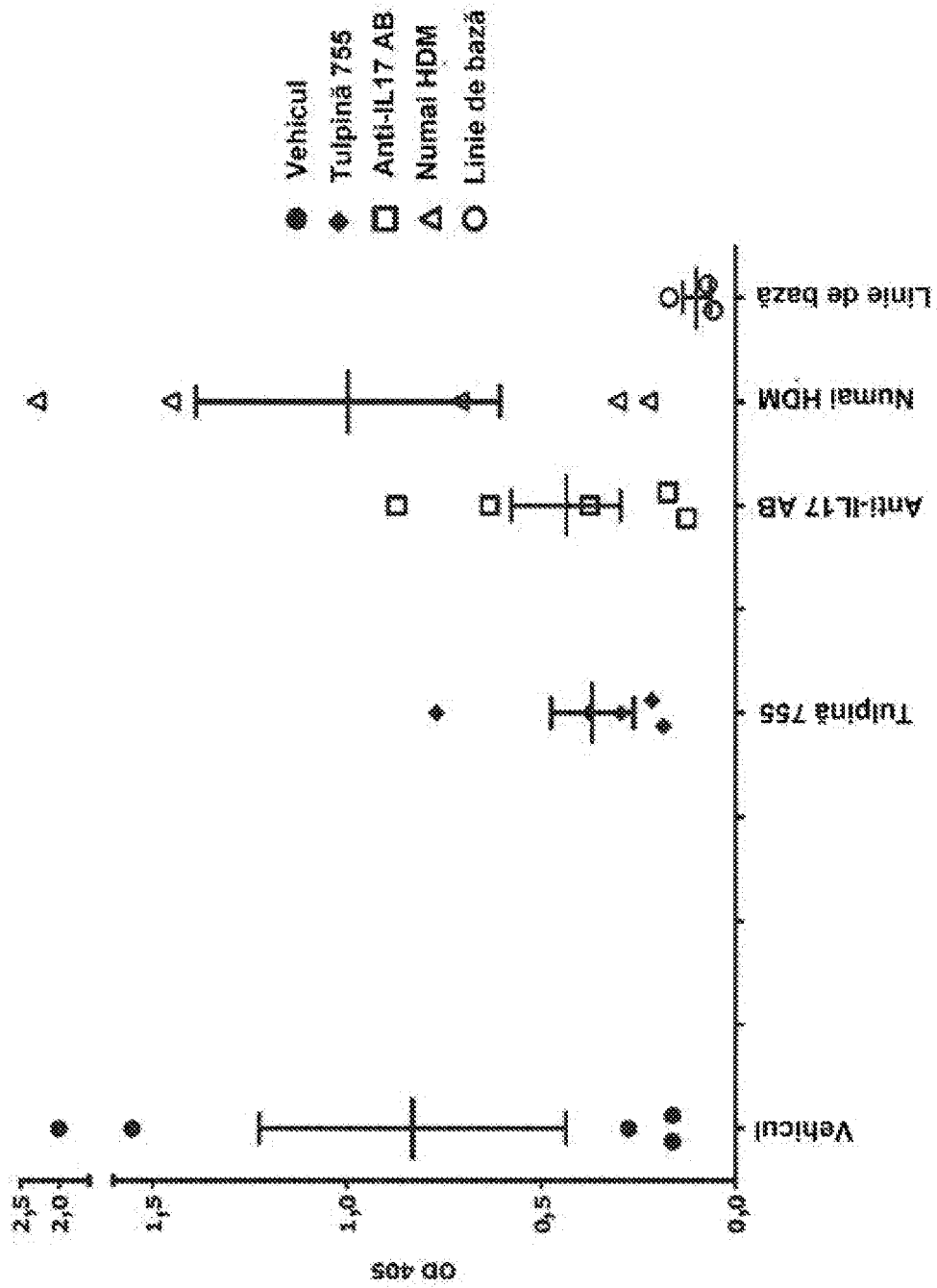
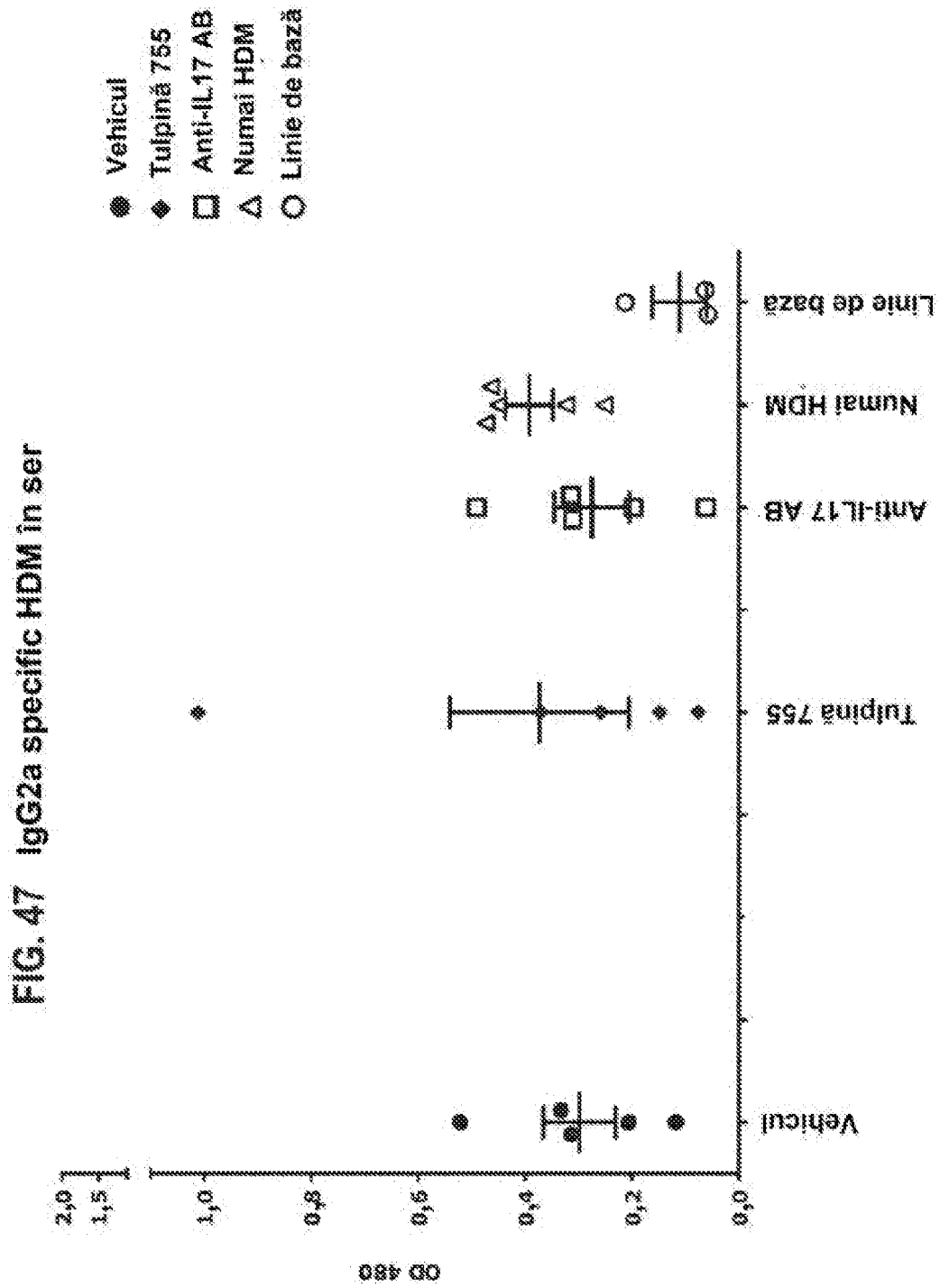


FIG. 46 IgG1 specific HDM in ser





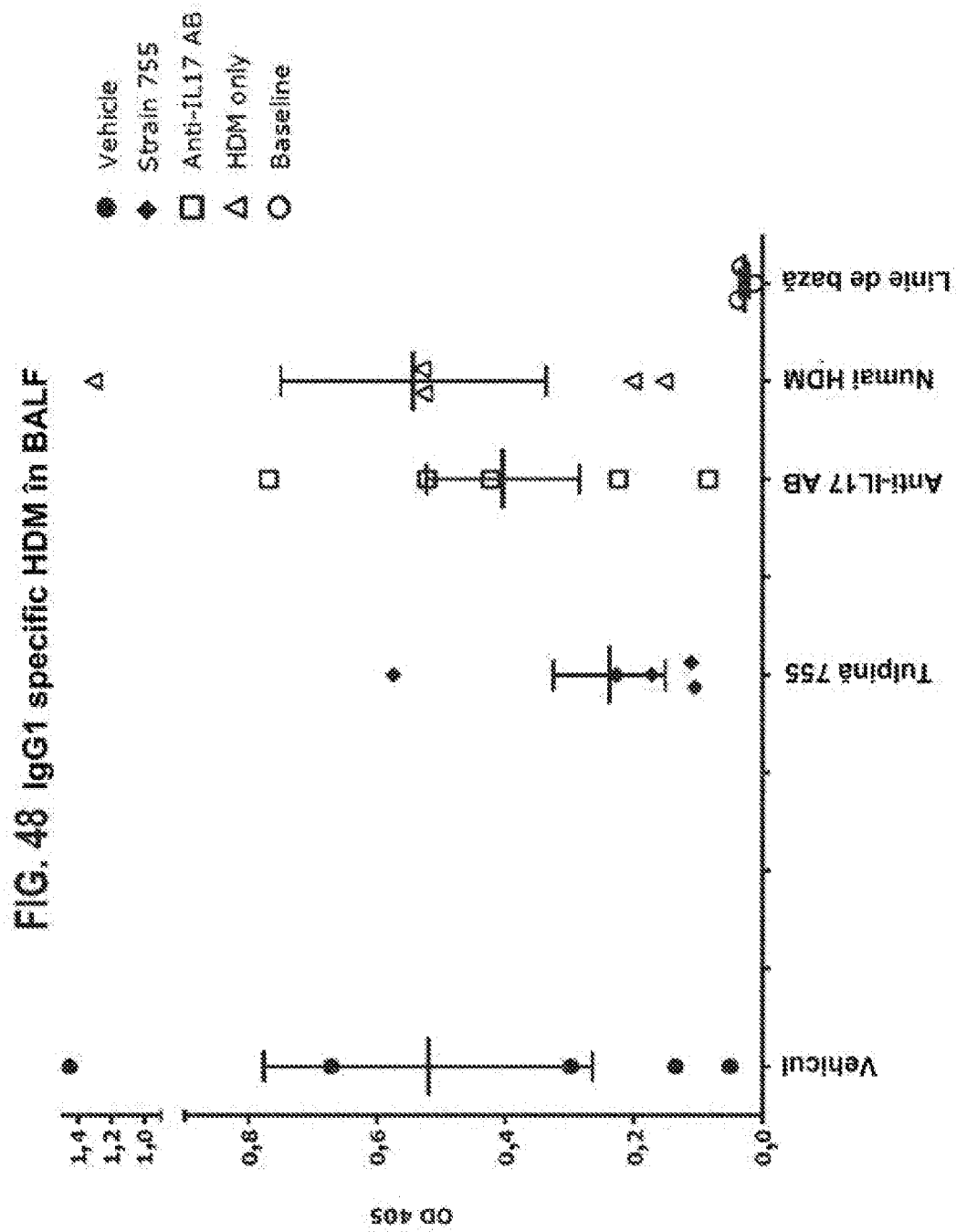


FIG. 49 IgG2a specific HDM in BALF

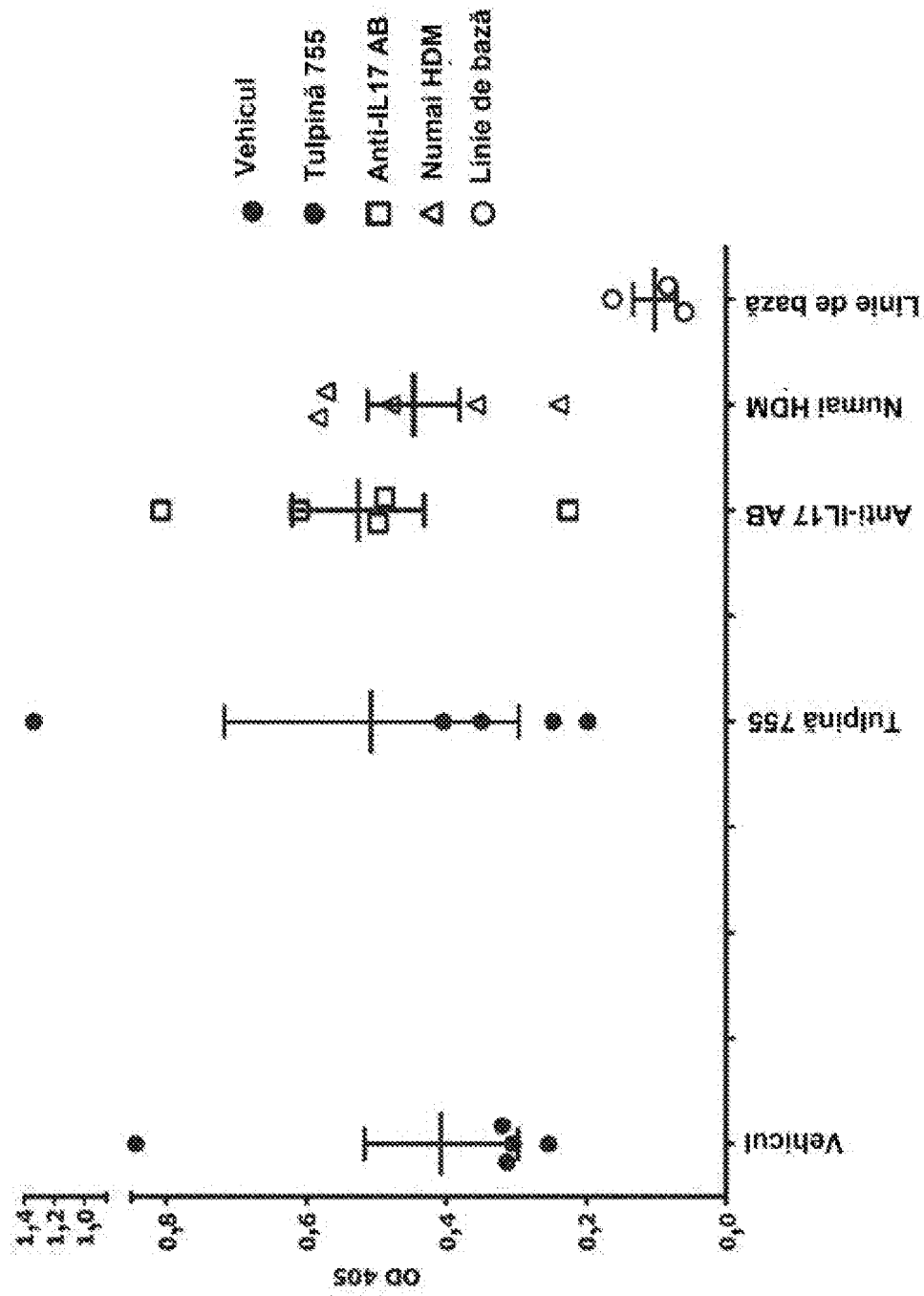


FIG. 50 Analiză histologică - Scorul mediu al infiltrărilor peribronheolare

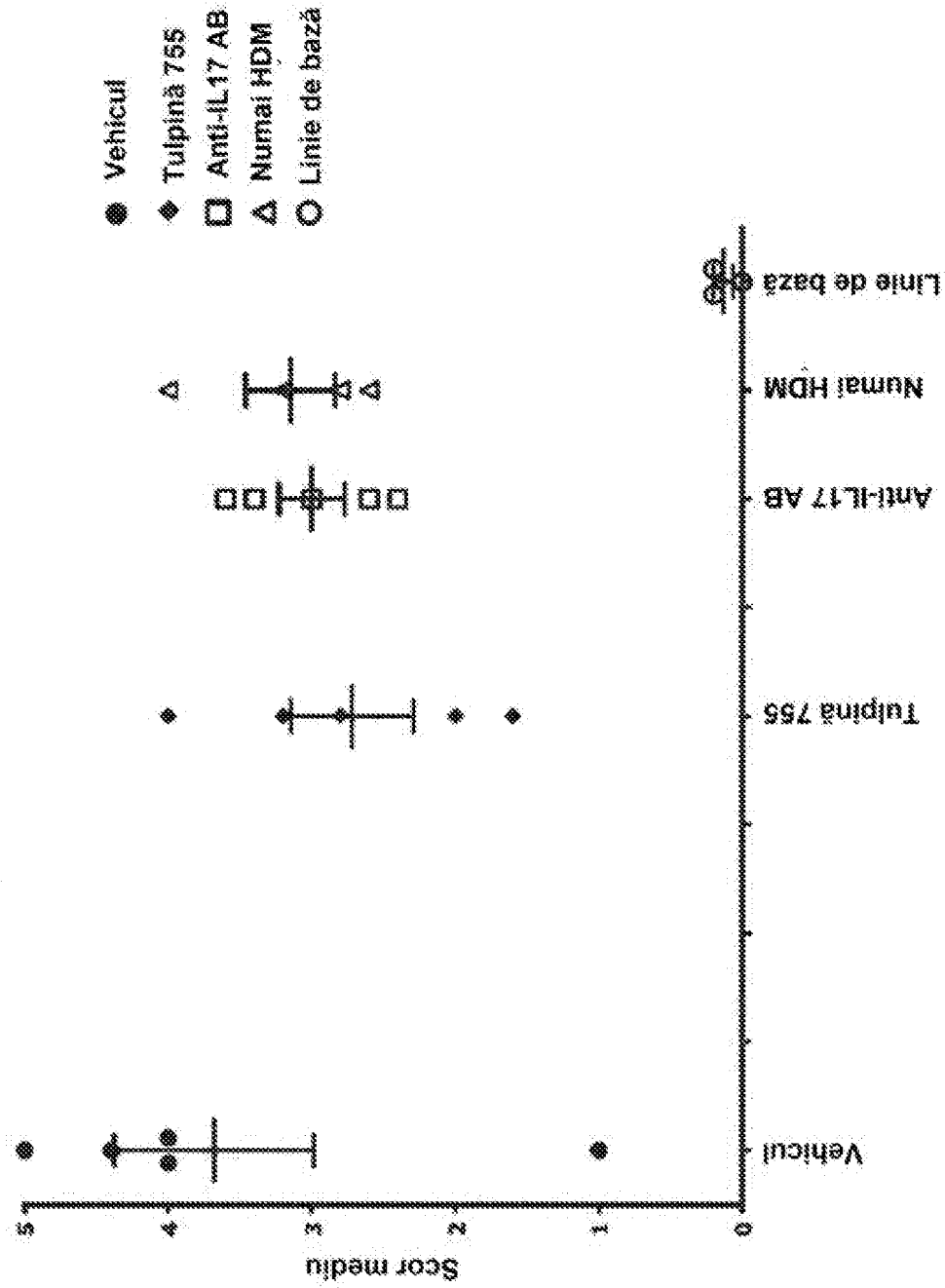


FIG. 51 Analiză histologică - Scor mediu al infiltrărilor perivasculare

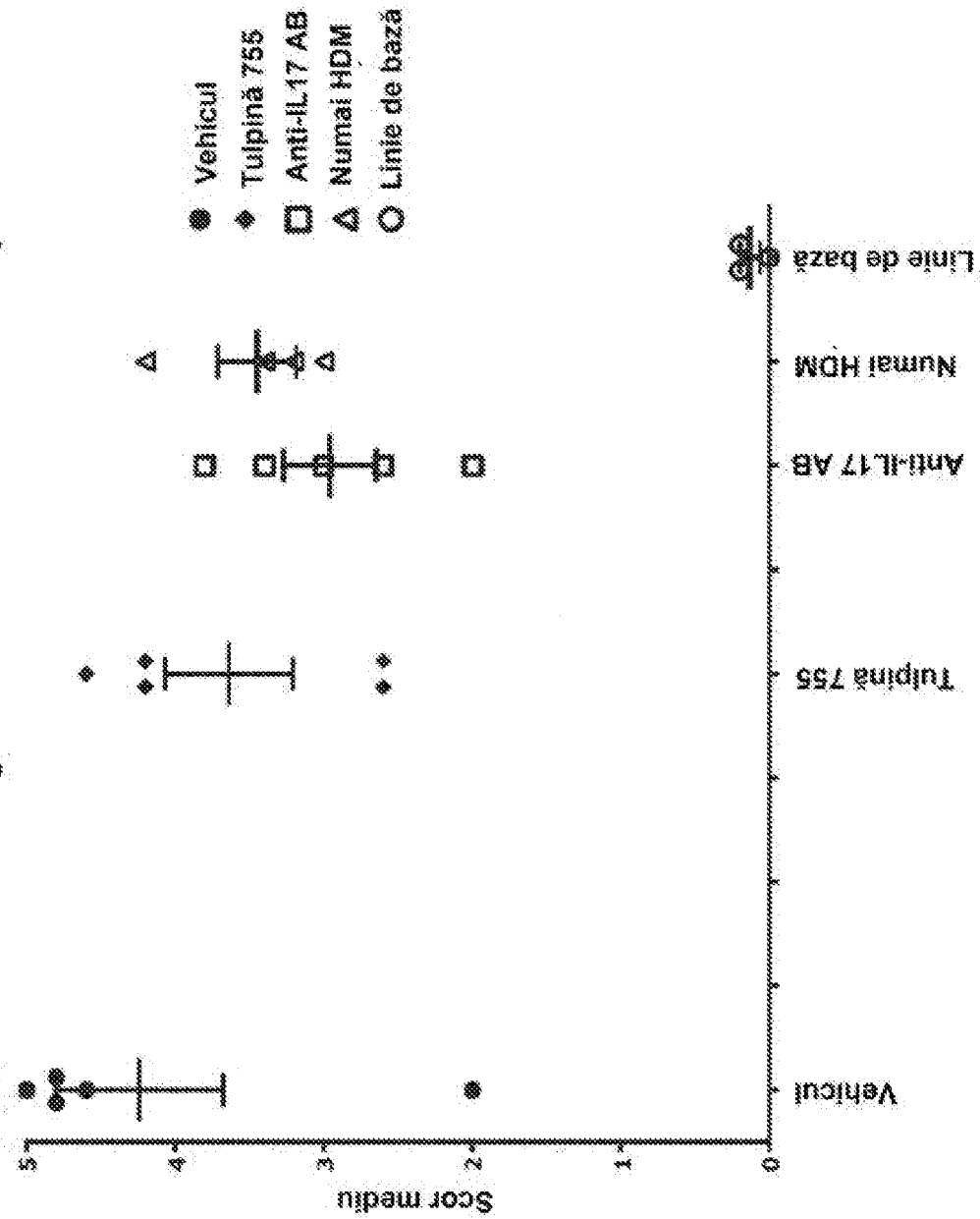


FIG. 52 Analiza histologică - Scor inflamator mediu (media scorurilor de infiltrare peribronheolare și perivasculară)

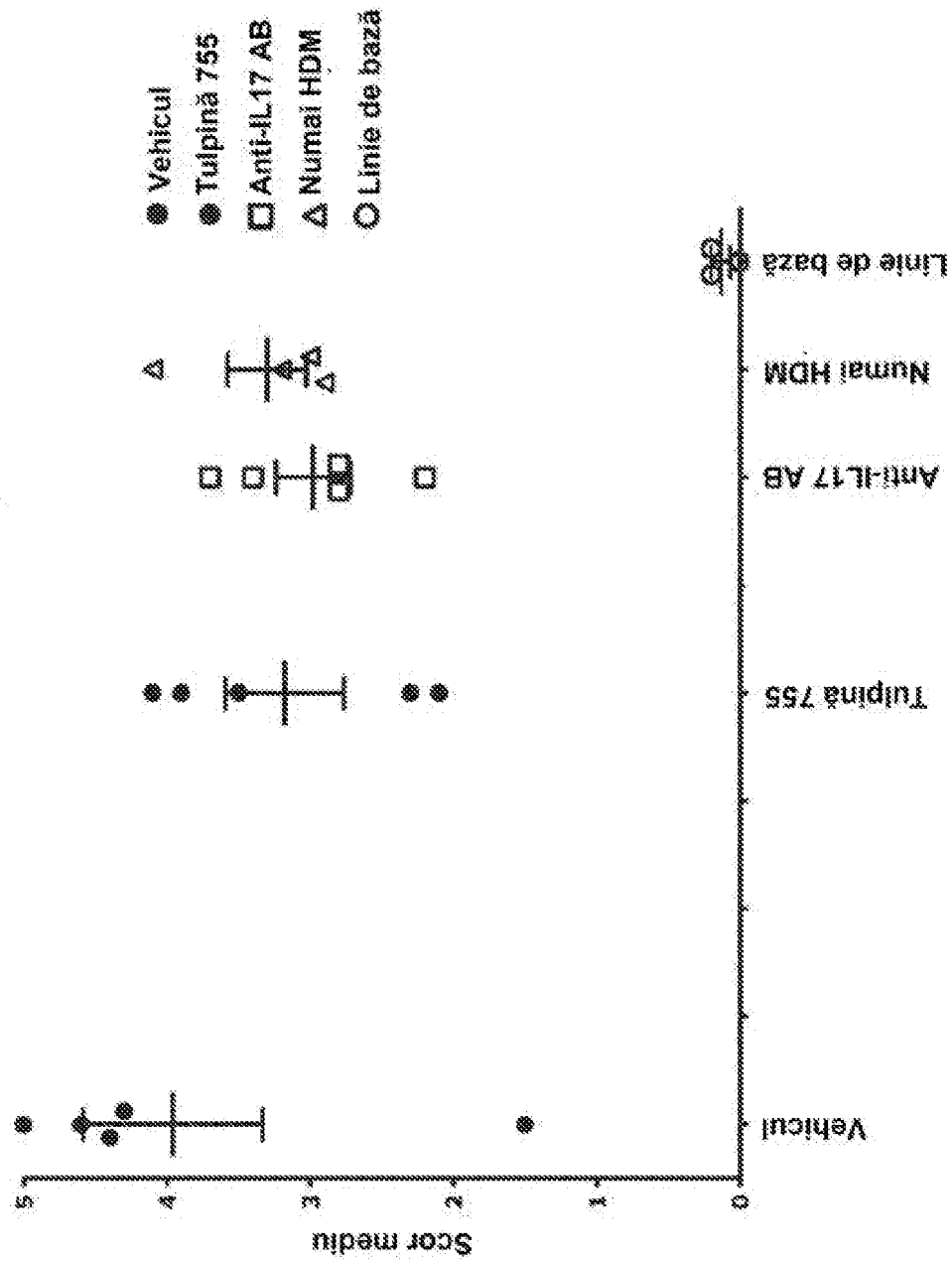


FIG. 53
Nivel TNFa în țesutul pulmonar

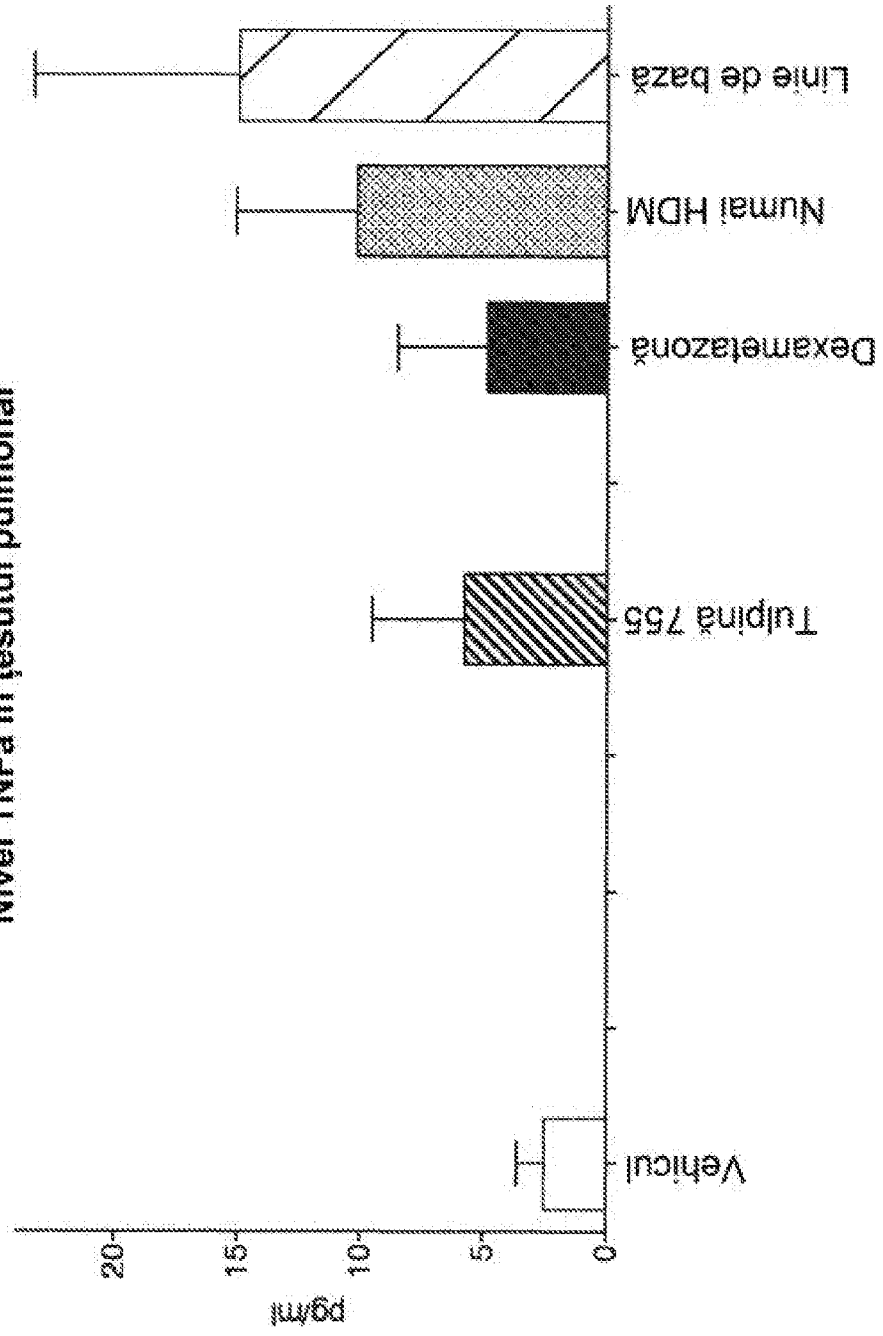


FIG. 54
Nivel IL-1a în țesutul pulmonar

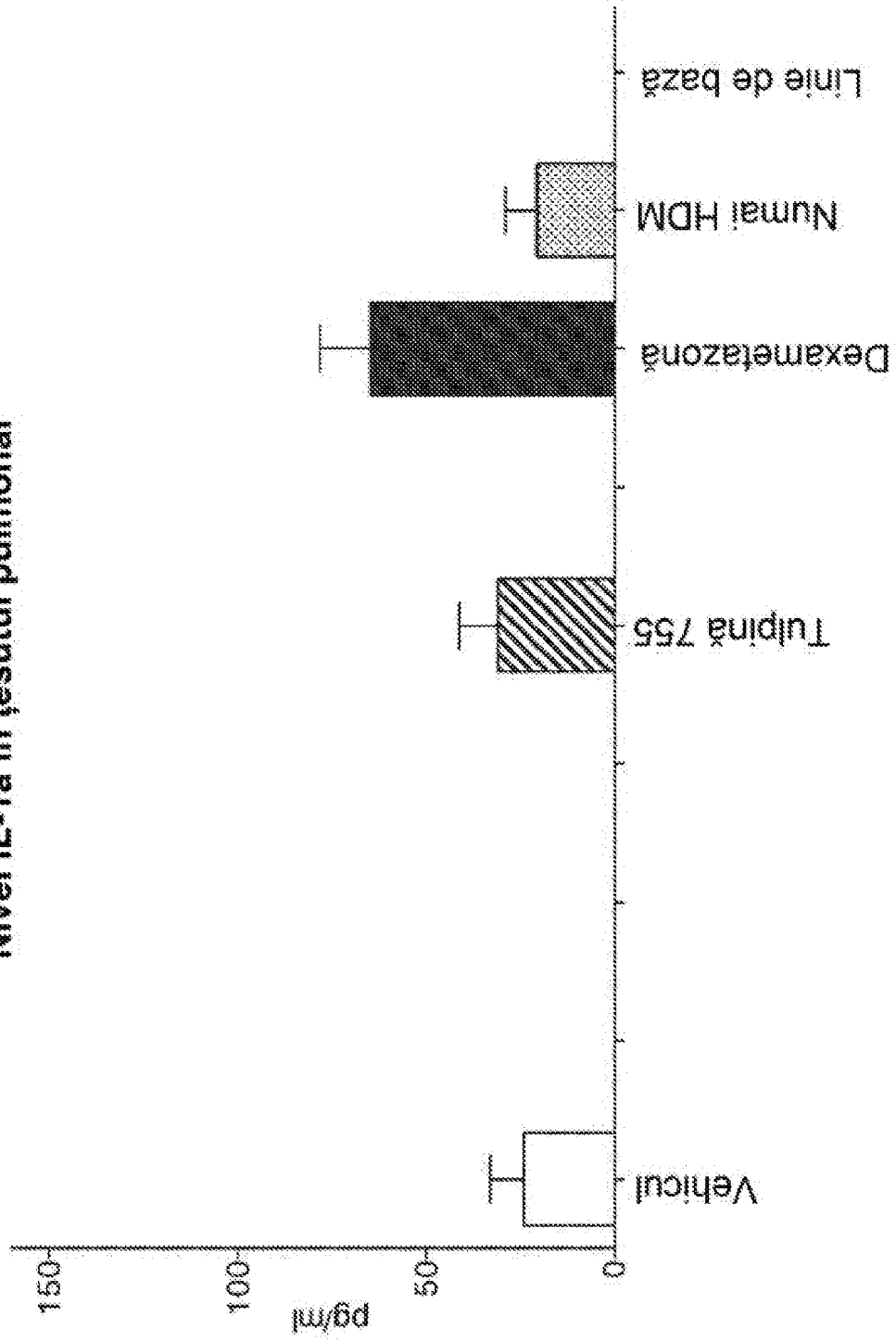


FIG. 55
Nivel IFNg în țesutul pulmonar

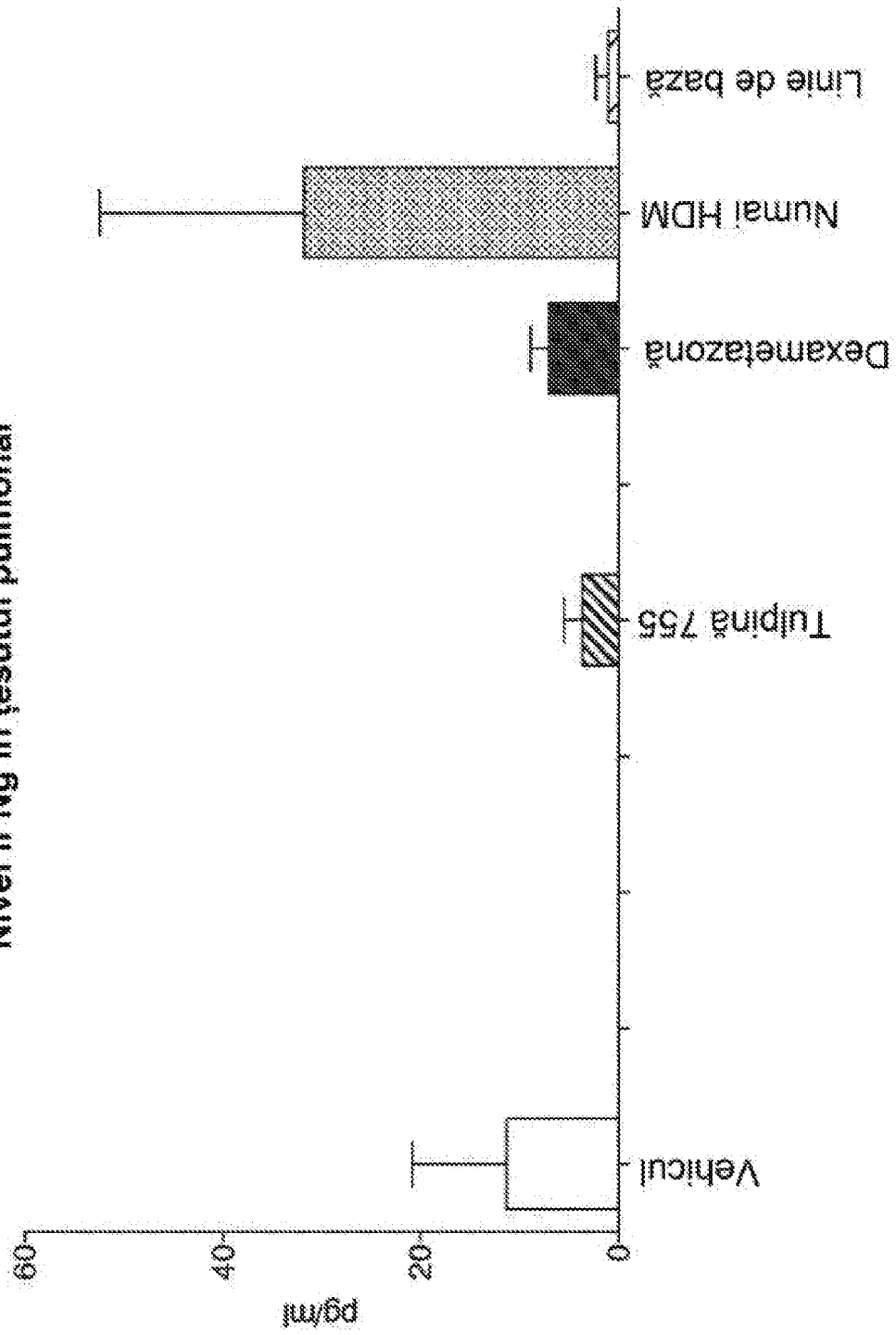


FIG. 56
Nivel IL-17F în țesutul pulmonar

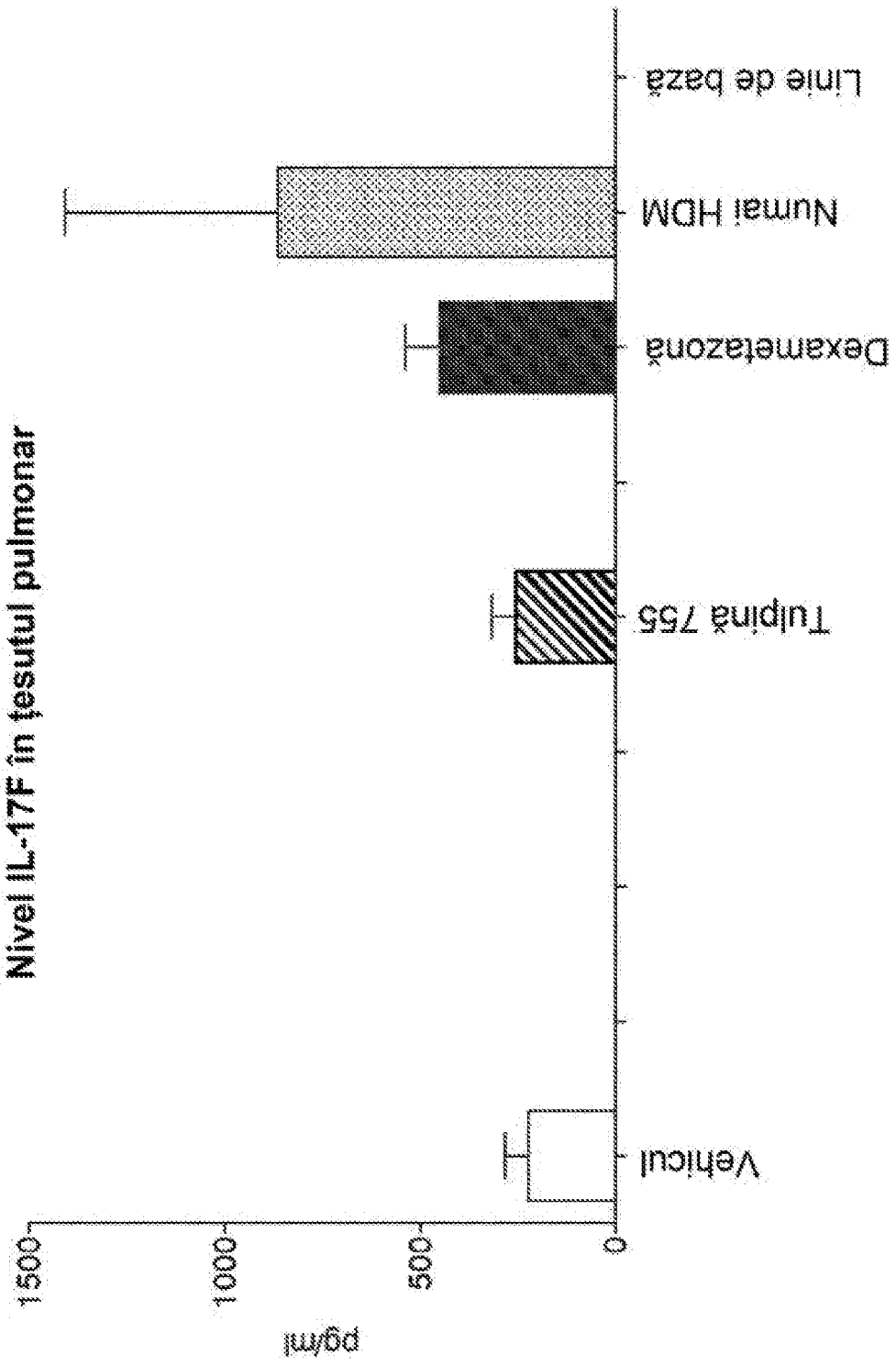


FIG. 57
Nivel IL-1b în țesutul pulmonar

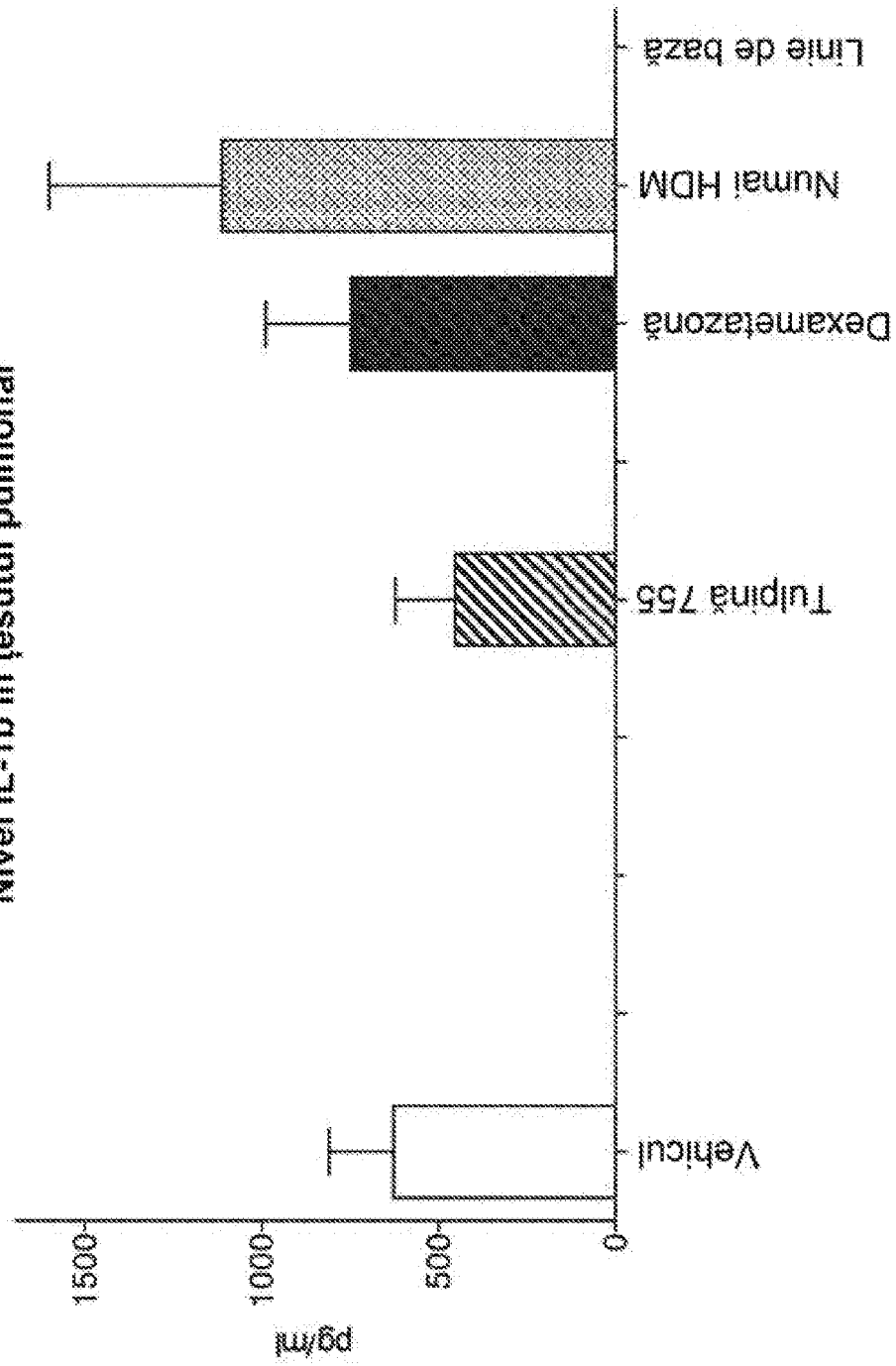


FIG. 58
Nivel RANTES în țesutul pulmonar

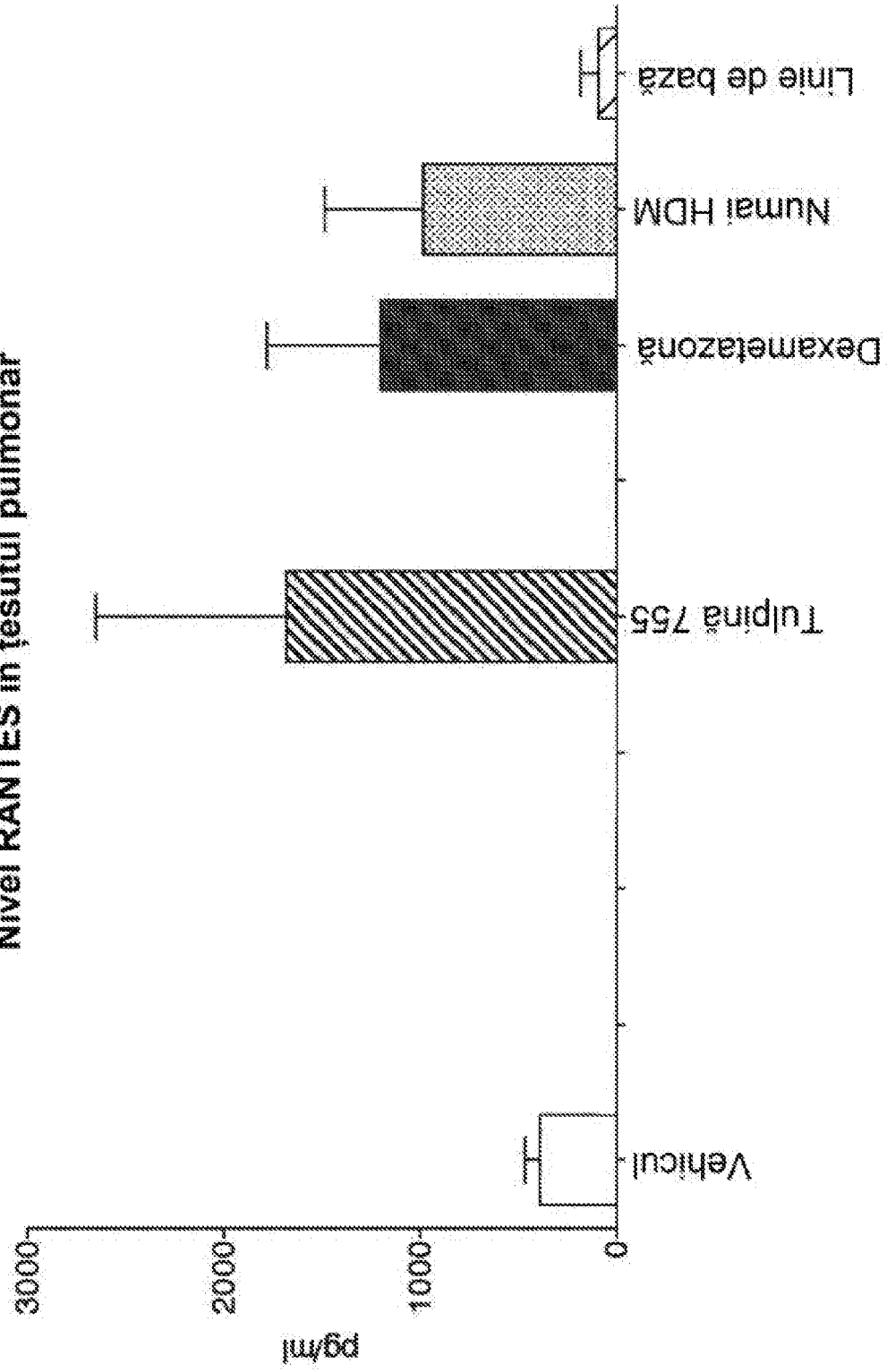


FIG. 59
Nivel MIP-2 în țesutul pulmonar

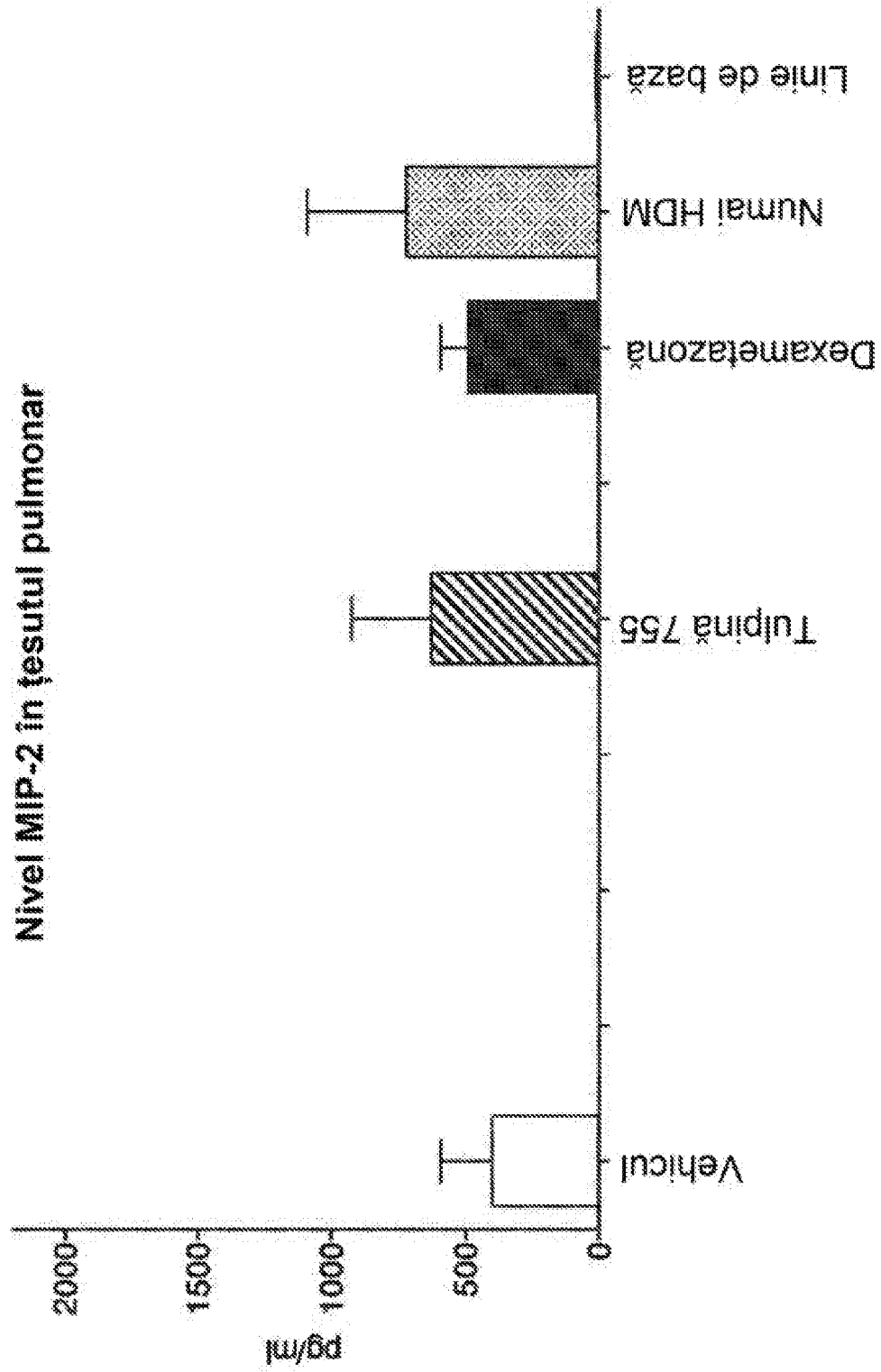


FIG. 60
Nivel KC în țesutul pulmonar

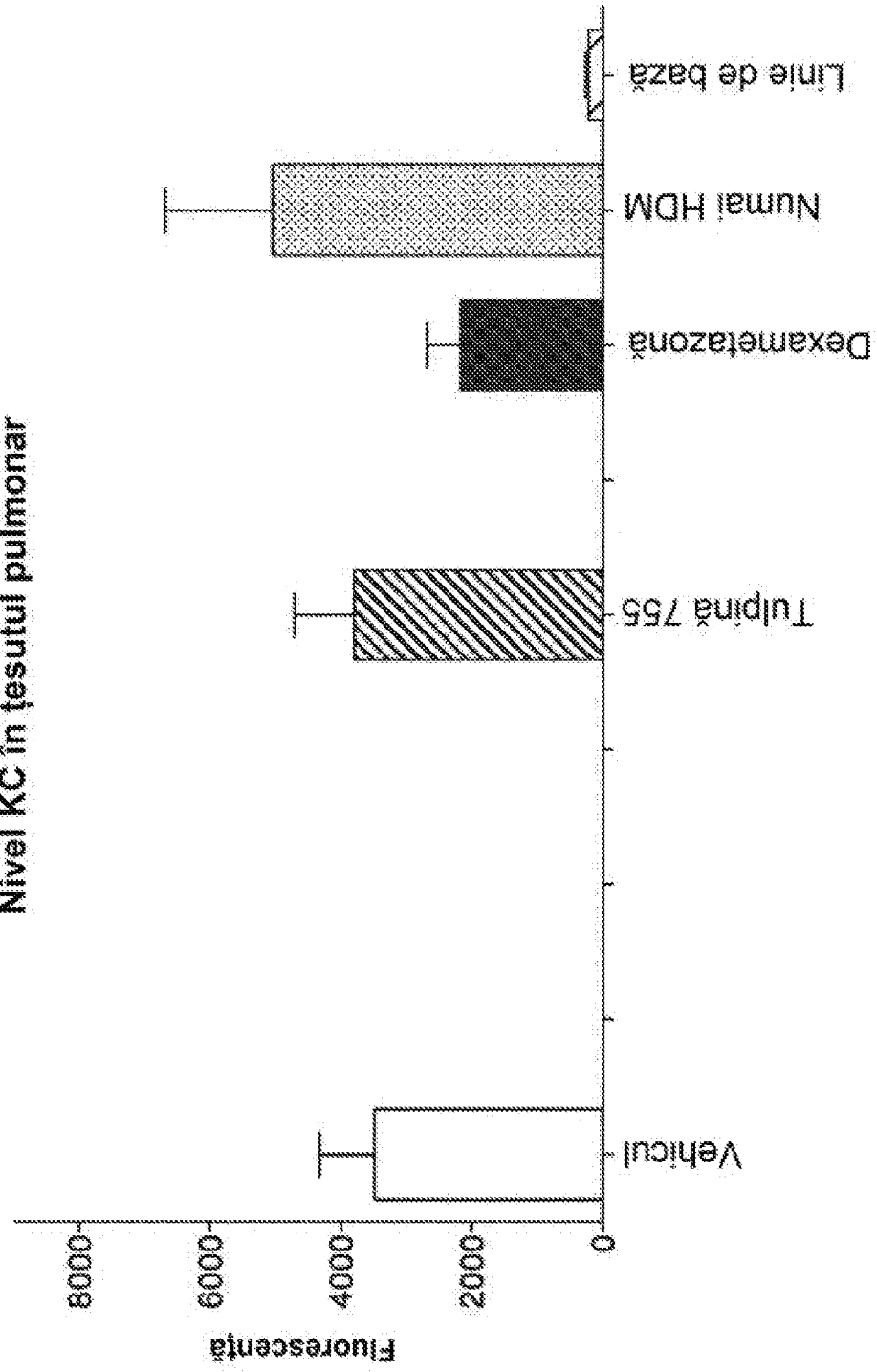


FIG. 61
Nivel IL-17 în țesutul pulmonar

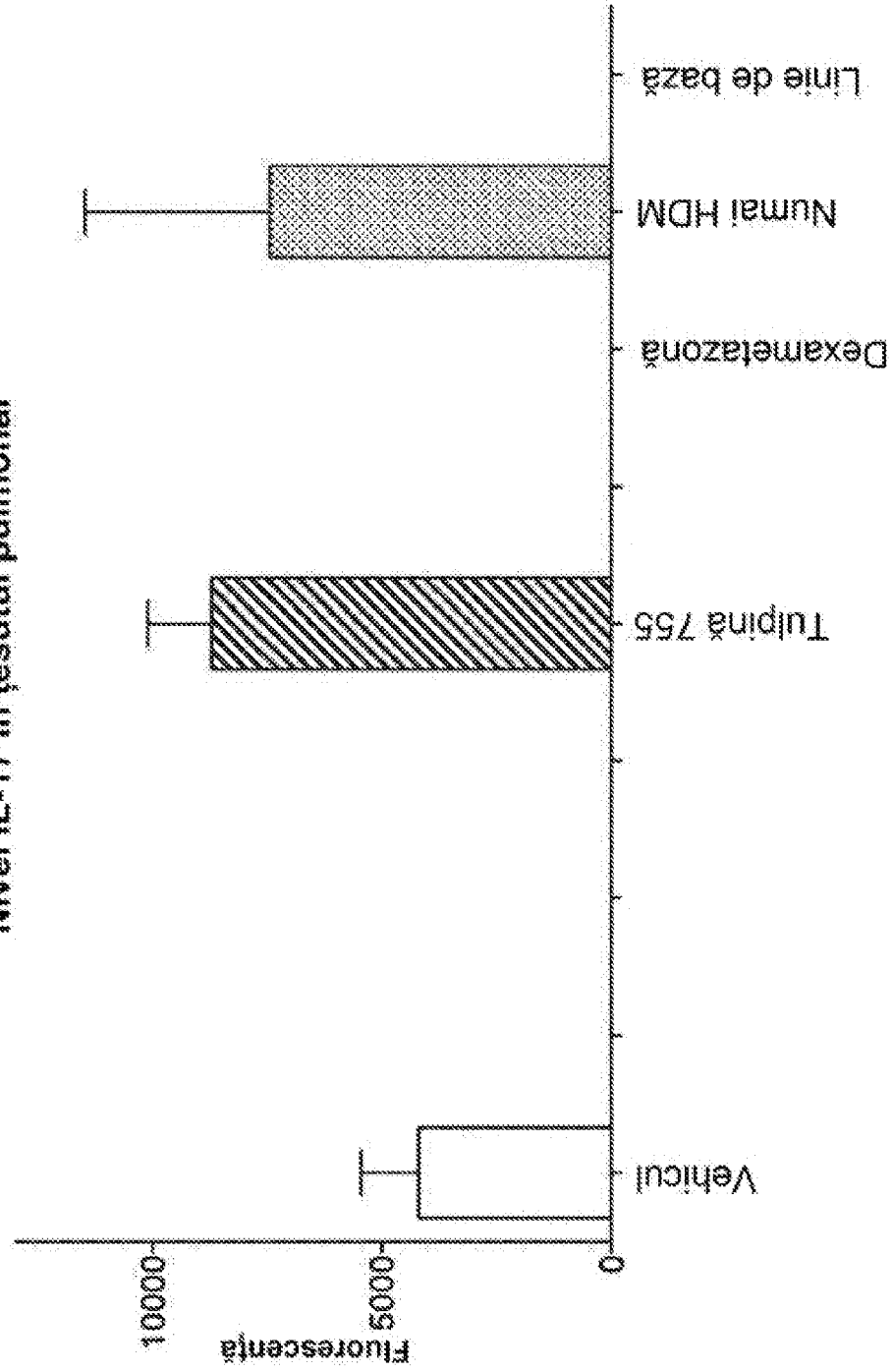


FIG. 62
Nivel MIP-1a în țesutul pulmonar

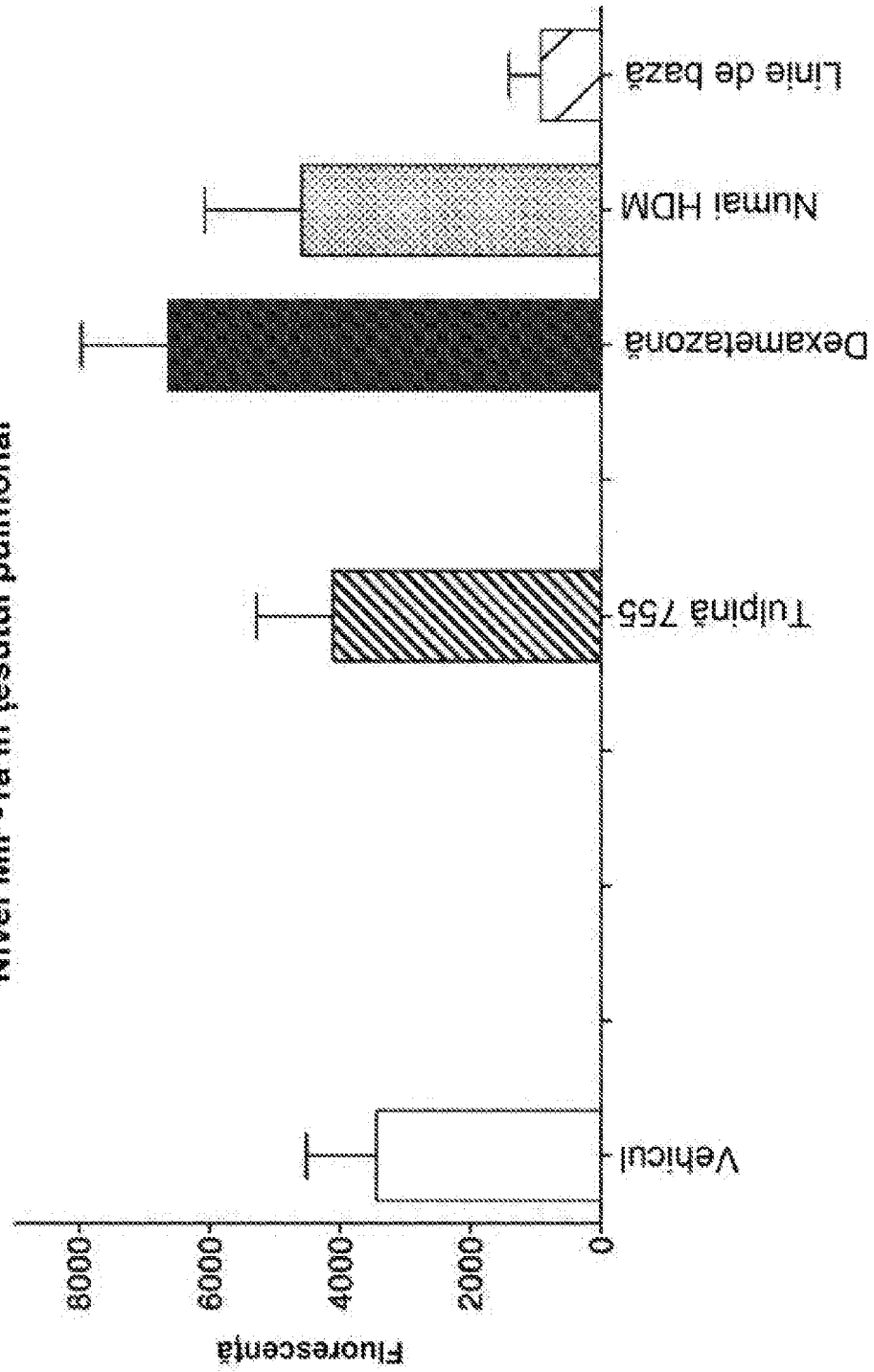


FIG. 63
Nivel IL-33 în țesutul pulmonar

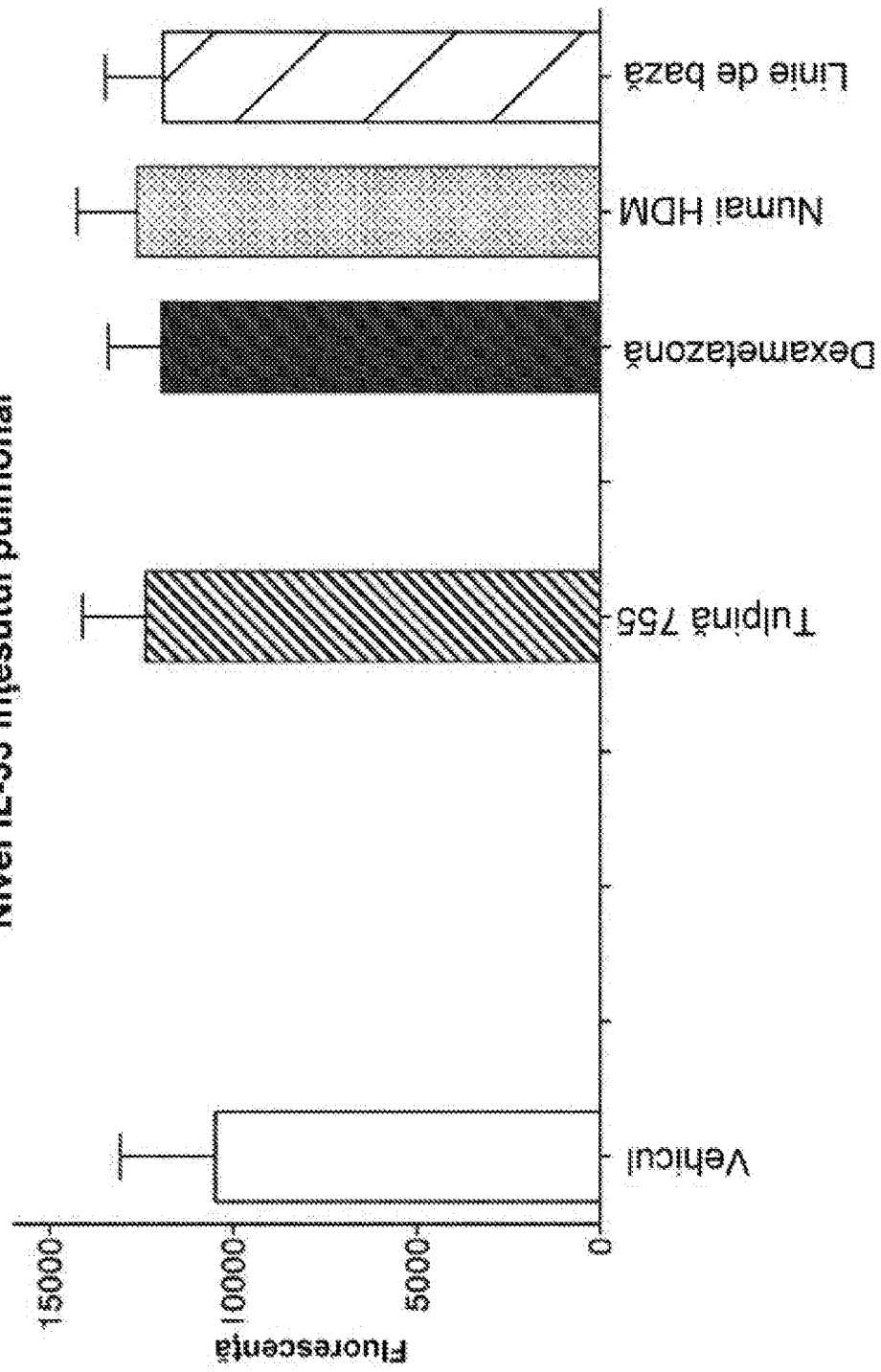
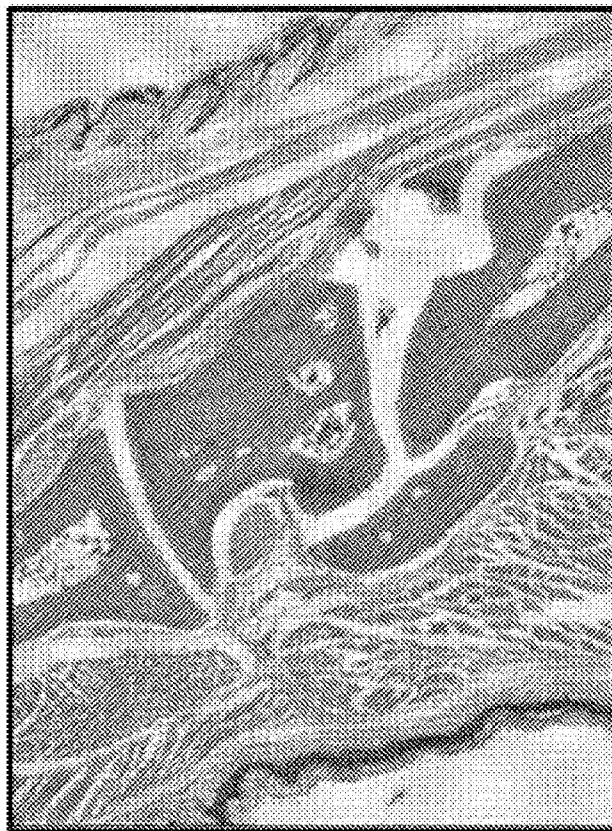
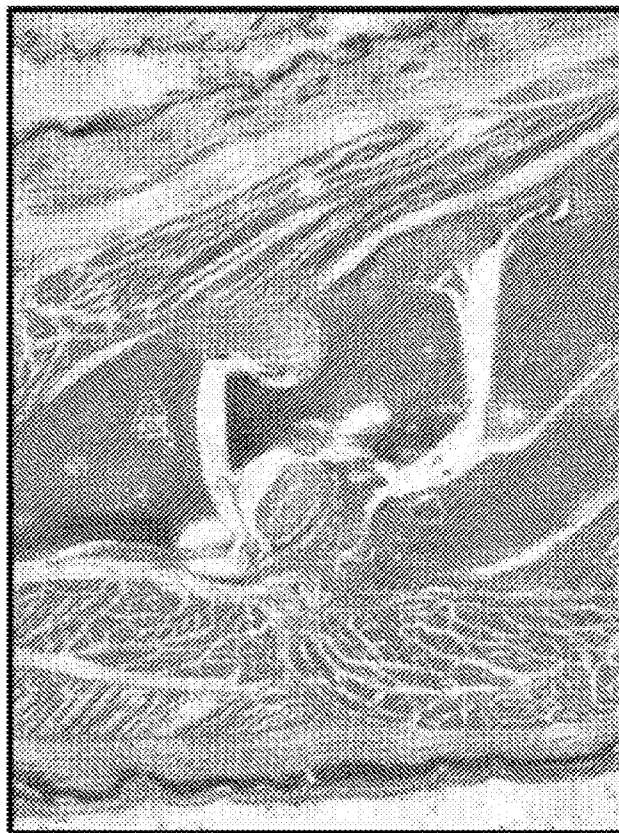


FIG. 64
Model vizual pentru scorul de histopatologie



Grad 0



Grad 1

FIG. 64 (cont.)



Grad 4



Grad 7



Grad 9

FIG. 64 (cont.)

FIG. 66
Histopatologie: scoruri cartilaje

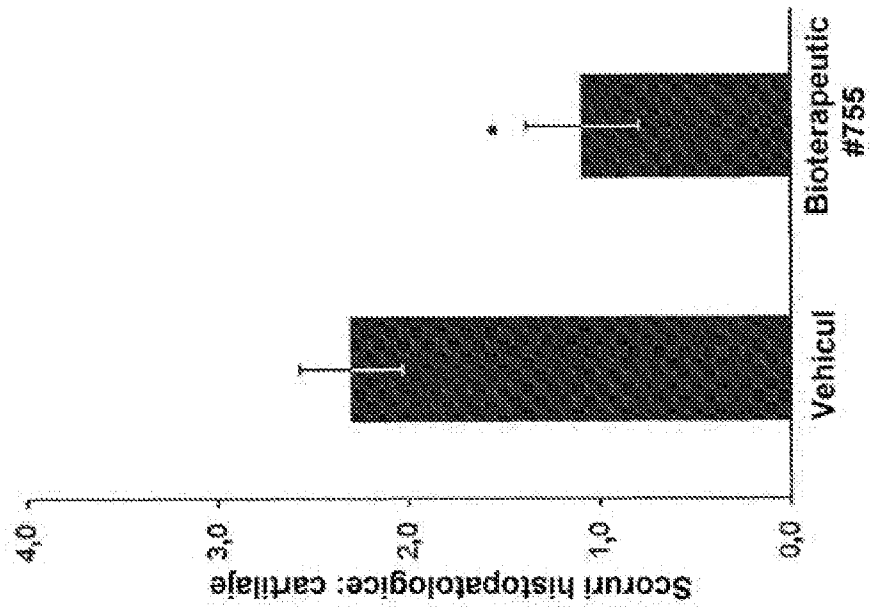


FIG. 65
Hisptopatologie: scoruri inflamații

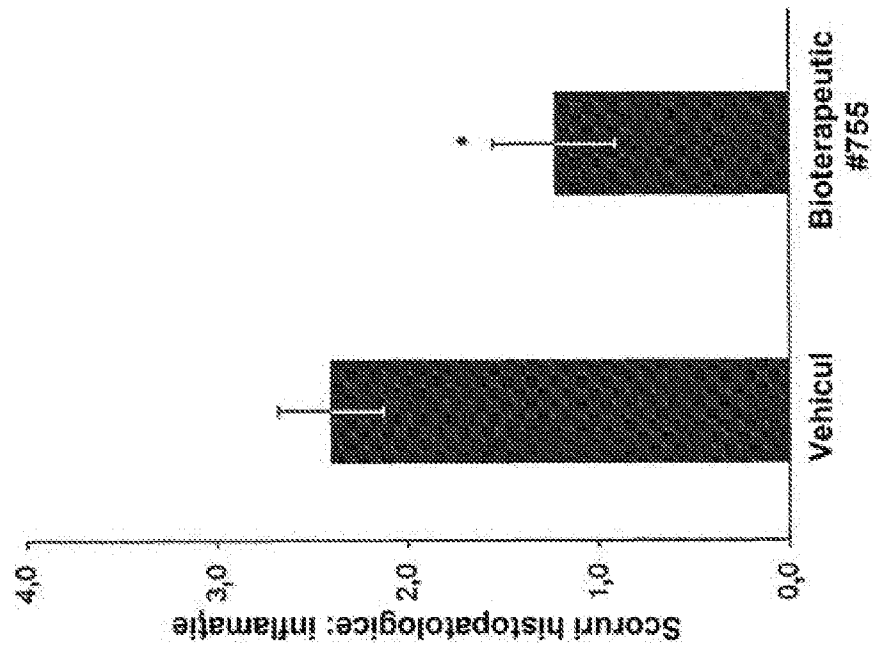


FIG. 68
Histopatologie: scoruri totale

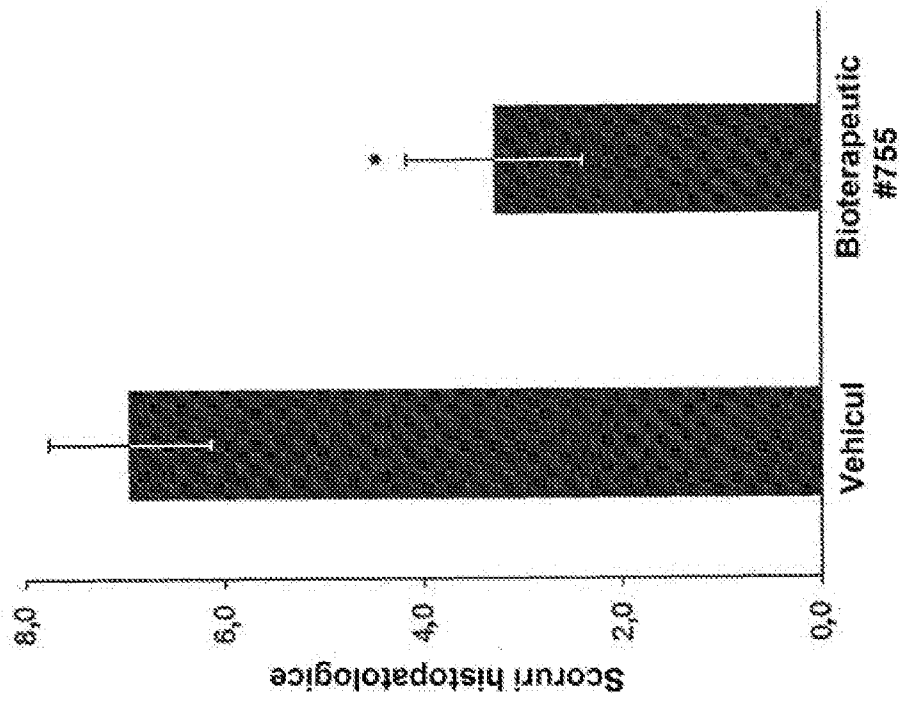


FIG. 67
Histopatologie: scoruri oase

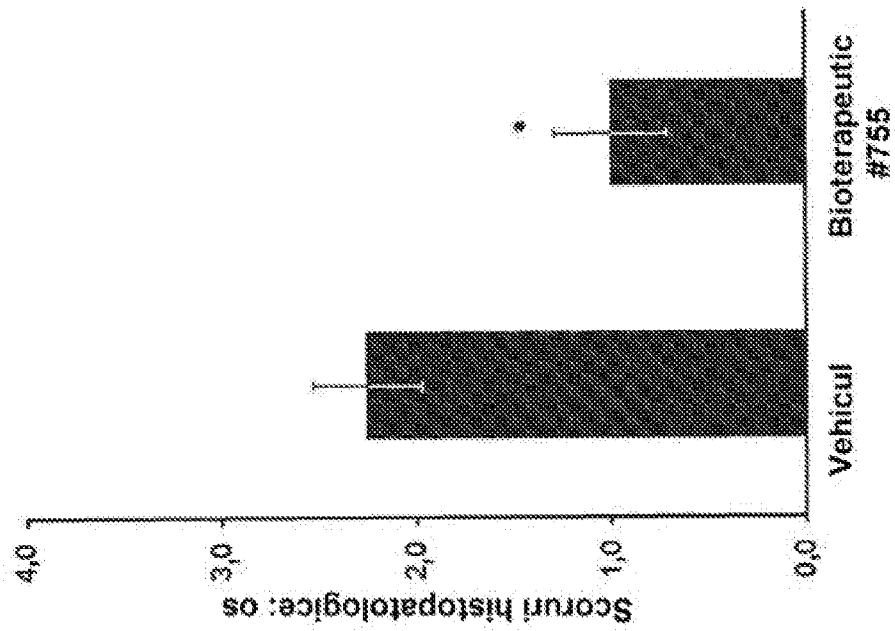


FIG. 69



Vehicle (#1.11R, Grad 9)



Tulpină #755 (#5.2L, Grad 0)

FIG. 70

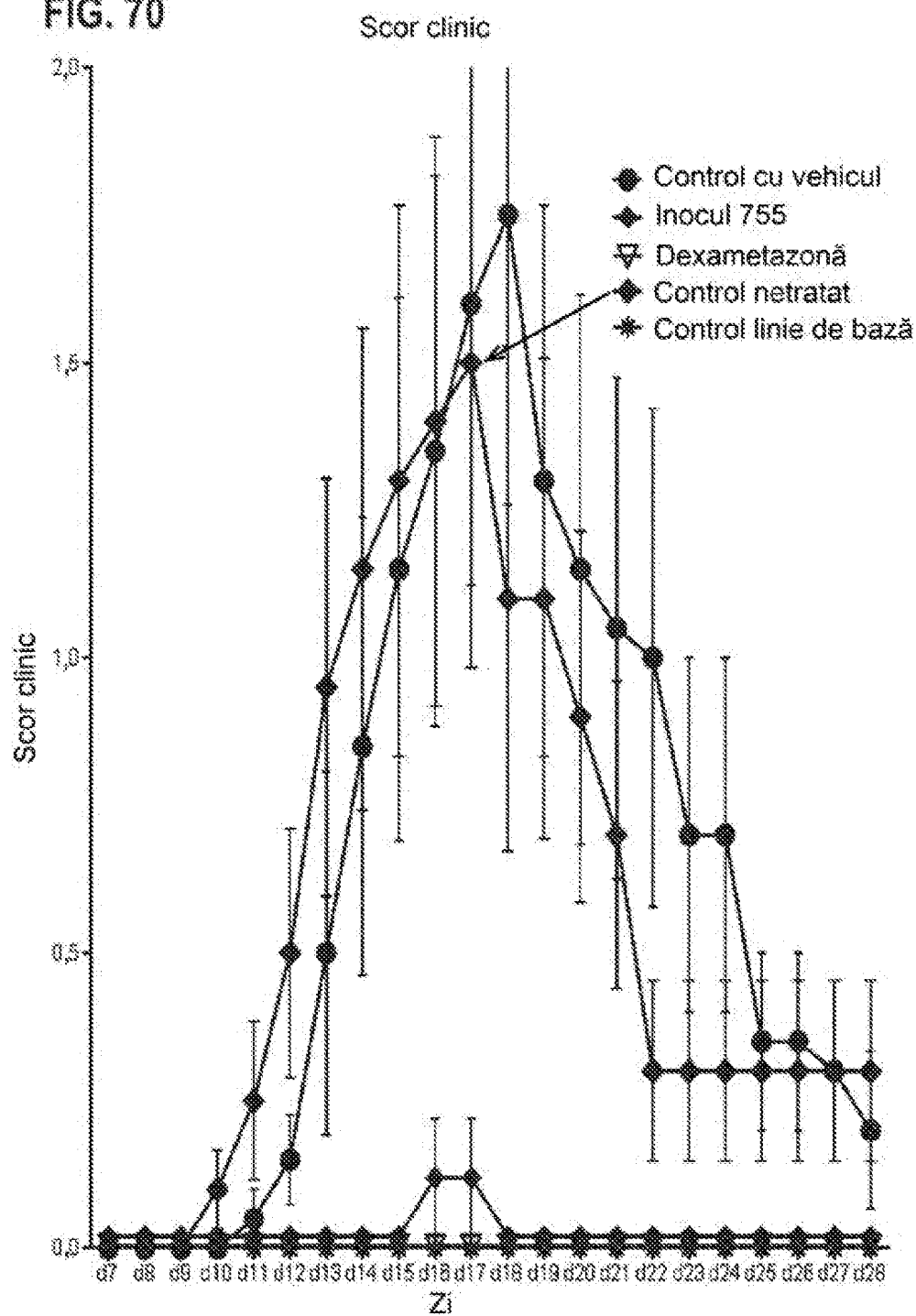


FIG. 71

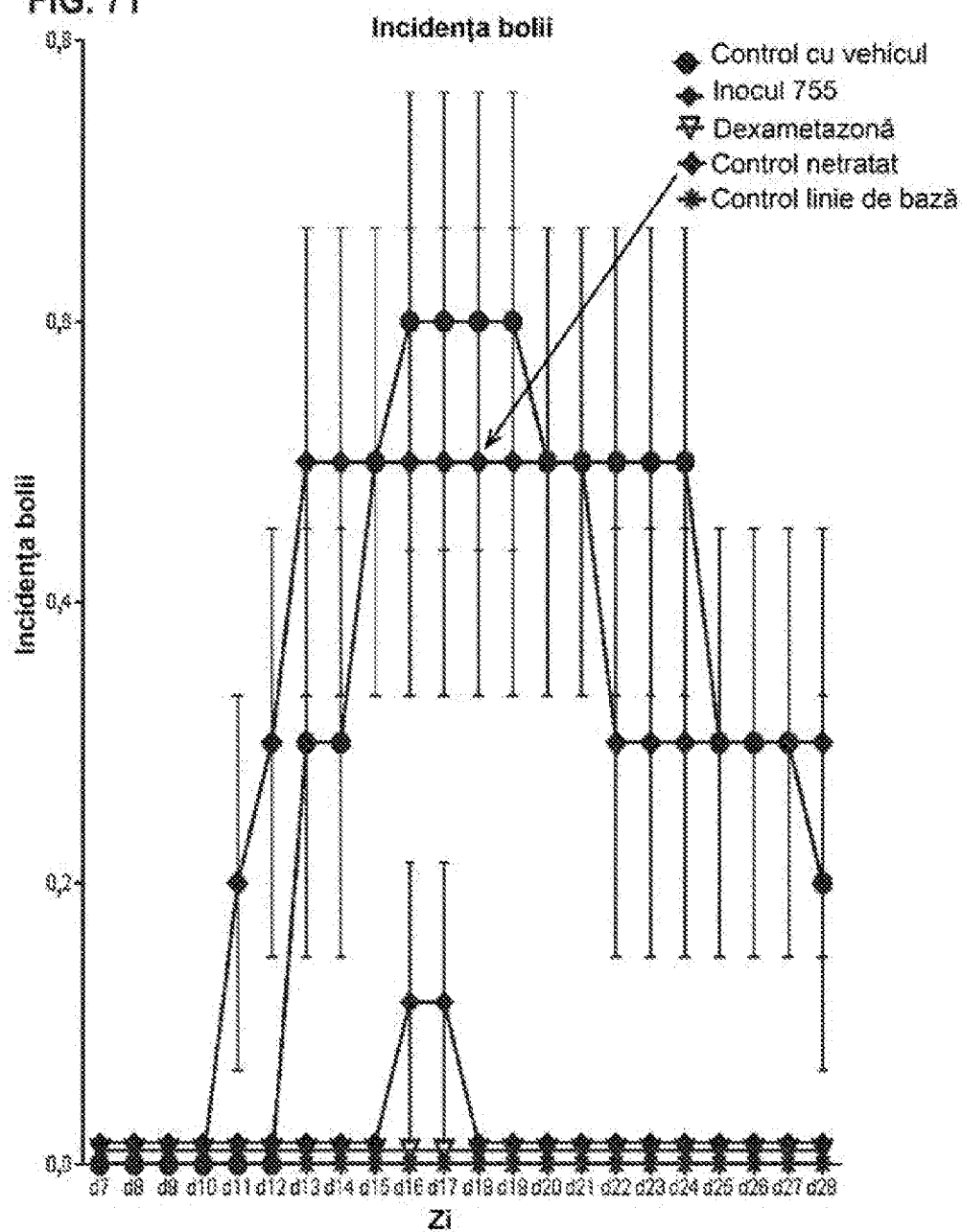


FIG. 72 Scoruri TEFI

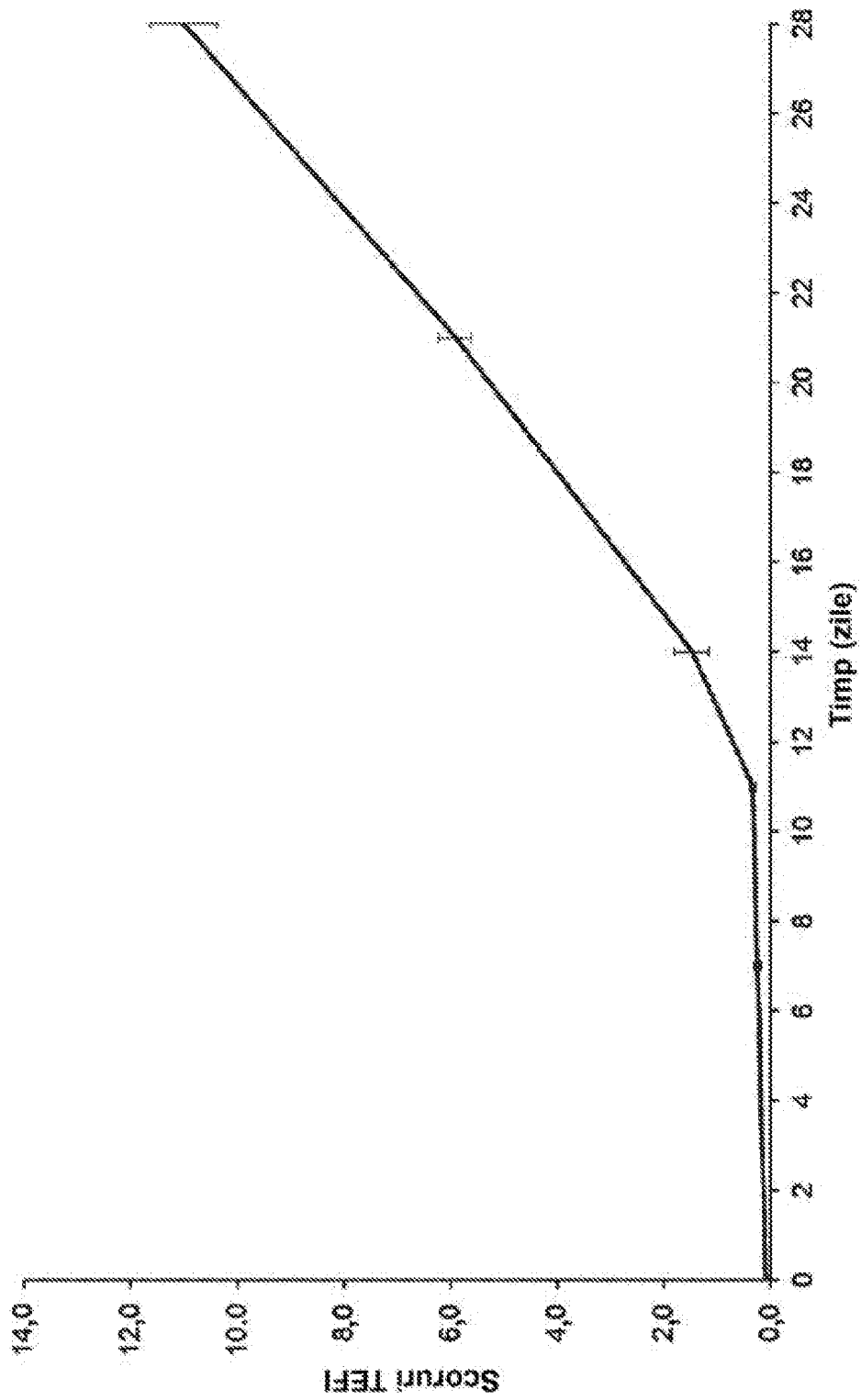


FIG. 73
Scoruri TEFI

