



MD/EP 3240554 T2 2020.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3240554 (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)
A61K 35/745 (2015.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2017 0262 (22) Data de depozit: 2016.06.15 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16731640.5, 2016.06.15 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3240554, 2019.07.31 (31) Numărul cererii prioritare: 201510466; 201520508; 201606810 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.06.15; 2015.11.20; 2016.04.19 (33) Țara cererii prioritare: GB; GB; GB	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 01/2020, 2020.01.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 31/2019, 2019.07.31 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 01/2018, 2018.01.31
(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) **Blautia stercosis și wexlerae pentru utilizare în tratarea bolilor inflamatorii și autoimune**

(57) Rezumat:

1

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

2

Secvențe: 6
Revendicări: 15
Figuri: 78

MD/EP 3240554 T2 2020.01.31

(54) *Blautia stercosis* and *wexlerae* for use in treating inflammatory and autoimmune diseases

(57) Abstract:

1
The invention provides compositions comprising bacterial strains for treating and preventing inflammatory and autoimmune diseases.

2
Sequences: 6
Claims: 15
Fig.: 78

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].

- 20 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.

- 25 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 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

- 40 Prezenta invenție este definită în revendicări. 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 *Blautia* pot fi eficiente în reducerea răspunsului inflamator Th17. Așa cum s-a descris în exemple, administrarea orală a compozițiilor cuprinzând *Blautia stercoris* 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 *Blautia wexlerae* poate reduce severitatea răspunsului inflamator, inclusiv a răspunsului inflamator Th17, la modelele de uveită la șoarece. Prin urmare, inventatorii au identificat că două tulpini diferite de specii diferite din genul *Blautia* pot fi eficiente în tratarea bolilor inflamatorii și autoimune.

- 50 Prin urmare, într-o primă variantă de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizarea într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei condiții mediate de IL-17 sau linia Th17. 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.

- 55 În anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, 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 ulcerasă; boala celiaca; astm, cum ar fi astmul alergic sau astm bronșic; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); uveita; sclerită; vasculita; Boala Behcet; ateroscleroza; dermatita atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor. Efectul indicat pentru tulpinile bacteriene din genul *Blautia* 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.

În variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, 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 *Blautia* 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 *Blautia* 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 *Blautia stercoris* pentru utilizarea în tratamentul astmului, în special a astmului eozinofilic sau alergic. De asemenea, se arată că *Blautia stercoris* are un efect deosebit de pronunțat asupra neutrofilelor în cazurile de astm, iar tratamentul cu *Blautia stercoris* poate fi deosebit de eficient în tratarea astmului bronșic. În anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae* pentru utilizarea în tratamentul astmului, în special a astmului eozinofilic sau alergic.

În alte variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini *Blautia* 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 *Blautia stercoris*, destinată utilizării în tratamentul artritei reumatoide. Compozițiile care utilizează *Blautia stercoris* pot fi deosebit de eficiente în tratarea artritei reumatoide. În anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae*, destinată utilizării în tratamentul artritei reumatoide.

În alte variante de realizare preferate, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, pentru utilizare într-o metodă de tratare sau de prevenire a sclerozei multiple. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Blautia* 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 *Blautia stercoris*, destinată utilizării în tratamentul sclerozei multiple. Compozițiile care utilizează *Blautia stercoris* pot fi deosebit de eficiente în tratarea sclerozei multiple. În anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae*, destinată utilizării în tratamentul sclerozei multiple.

În alte variante preferate de realizare, invenția furnizează o compoziție cuprinzând o tulpină bacteriană din genul *Blautia*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau prevenire a uveitei, cum ar fi uveita posterioară. Inventatorii au identificat că tratamentul cu tulpini de *Blautia* 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, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae*, destinată utilizării în tratamentul uveitei. Compozițiile folosind *Blautia wexlerae* pot fi deosebit de eficace în tratarea uveitei. În anumite variante de realizare, invenția furnizează o compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din specia *Blautia stercoris*, destinată utilizării în tratamentul uveitei.

În anumite variante de realizare, compozițiile invenției 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 invenției 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 *Blautia stercoris*, 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. Invenția prevede, de asemenea, compoziții cuprinzând o tulpină bacteriană din specia *Blautia stercoris*, pentru utilizarea în reducerea producției de IL-17 sau reducerea diferențierii de celule Th17 în tratamentul sau prevenirea uveitei. Invenția prevede, de asemenea, compoziții care conțin o tulpină bacteriană din specia *Blautia wexlerae*, 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 sau a 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 *Blautia* poate fi deosebit de benefic pentru acești pacienți.

În variante preferate de realizare ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia stercoris*. Se pot utiliza și tulpini strâns legate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu secvența 16S ARNr a unei tulpini bacteriene de *Blautia stercoris*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu SEQ ID NO: 1 sau 2. 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: 2.

În variante preferate de realizare ale invenției, tulpina bacteriană din compoziție este de *Blautia wexlerae*. Se pot utiliza și tulpini strâns legate, cum ar fi tulpinile bacteriene care au o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu secvența 16S ARNr a unei tulpini bacteriene de *Blautia wexlerae*. De preferință, tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este identică cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% cu SEQ ID NO: 3 sau 4. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 4. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 4.

În anumite variante de realizare, compoziția invenției este destinată administrării orale. Administrarea orală a tulpinilor din invenție poate fi eficientă în tratarea afecțiunilor și afecțiunilor mediate de calea IL-17 sau Th17. De asemenea, administrarea orală este convenabilă 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 plus, invenția oferă o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei afecțiuni mediate de IL-17 sau linia Th17, cuprinzând administrarea unei compoziții care cuprinde o tulpină bacteriană din genul *Blautia*.

În dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană care este deosebit de utilă în terapie. Tulpina de *Blautia stercoris* din invenție se dovedește a fi eficientă în tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi artrita, astmul și scleroza multiplă. Prin urmare, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă din tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381. 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 *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381, pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici. În dezvoltarea invenției de mai sus, inventatorii au identificat și caracterizat o tulpină bacteriană suplimentară care este deosebit de utilă pentru terapie. Tulpina *Blautia wexlerae* din invenție se dovedește a fi eficientă în tratarea bolilor descrise aici, cum ar fi uveita. Prin urmare, într-un alt aspect, invenția furnizează o celulă din tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486. Invenția furnizează, de asemenea, compoziții care cuprind astfel de celule sau culturi biologice pure ale unor astfel de celule. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486, pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

SCURTA 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.
5 **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.
10 **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.
15 **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.
20 **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 <0,05 în comparație cu grupul tratat cu vehicul.
25 **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. ♦ 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 <0,05 comparativ cu grupul de vehicule.
30 **Figura 23:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IFN γ în supernatanții culturii de țesuturi. Liniile reprezintă valori mediane ale grupului.
35 **Figura 24:** Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-17A în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valorii medii ale grupului.
Figura 25: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-10 în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valorii medii ale grupului.
Figura 26: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Niveluri de IL-6 în supernatanții de cultura de țesut. Liniile reprezintă valorii medii ale grupului.
40 **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
45 **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
50 (Media scorului de infiltrare peribronhiolară, cat 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
55 **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
60 **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 - HDM specific IgG1 în ser
Figura 47: Caz de astm bronșic sever la șoareci - HDM specific IgG2a în ser
Figura 48: Caz de astm bronșic sever la șoareci - HDM specific IgG1 în BALF
Figura 49: Caz de astm bronșic sever la șoareci - HDM specific IgG2a 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 perivascular 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-1 α 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-1 α 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 collagen.
Figura 65: Caz de artrită reumatoidă la șoareci - Histopatologie: Scoruri de inflamare. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM. ** p <0,01 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 <0,001 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 <0,001 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 <0,001 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 stanga) 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 - Răspuns proliferativ al ganglionilor la peptida IRBP. Mediul de fund scăzut [IRBP peptide stimulated - background media] conține pe minut pe baza incorporării 3 H-timidinei. Toate datele sunt prezentate ca medie + SEM (n = 3).
Figura 73: Caz de uveită la șoareci - Scoruri TEFI în grupul de control. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM.
Figura 74: Caz de uveită la șoareci - Scoruri TEFI în ziua 21. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ SEM.
Figura 75: Test inflamator indus de LPS – niveluri de IL-6
Figura 76: Test inflamator indus de LPS – niveluri de TNF α
Figura 77: Test inflamator indus de LPS – nivelul de maturare Mo-DC
Figura 78: Test inflamator indus de ovalbumină - niveluri de celule CD4+

DIVULGAREA INVENȚIEI

Tulpini bacteriene

- Compozițiile invenției cuprind o tulpină bacteriană din genul *Blautia*. Exemplele demonstrează că bacteriile din acest gen sunt utile în tratarea sau prevenirea bolilor și afecțiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Tulpinile bacteriene preferate sunt din specia *Blautia*. Exemple de tulpini de *Blautia* utilizate în invenție includ *Blautia stercoris* și *B. wexlerae*.

- Speciile *Blautia* sunt bacterii nemotile pozitive cu reacție Gram, care pot fi fie cocoide, fie ovale și toate sunt anaerobe obligatorii care produc acid acetic ca principal produs final al fermentației glucozei [16]. *Blautia* poate fi izolată din intestinul uman, deși *B. producta* a fost

izolată dintr-un eșantion de septicemie. Numărul de înregistrare GenBank pentru secvența genei 16S ARNr a tulpinei *Blautia stercoris* GAM6-1^T este HM626177 (dezvăluit aici sub denumirea de SEQ ID NO: 1). O tulpină exemplară de *Blautia stercoris* este descrisă în [17]. Tulpina de tip *Blautia wexlerae* este WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [18]. Numărul de înregistrare GenBank pentru secvența genei ARN 16S a tulpinii *Blautia wexlerae* WAL 14507 T este EF036467 (dezvăluită aici ca SEQ ID NO: 3). Această tulpină exemplară de *Blautia wexlerae* este descrisă în [18].

Bacteria *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 a fost testată în exemple și este, de asemenea, menționată aici sub formă de tulpină 830. O secvență 16S ARNr pentru tulpina 830 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 2. Tulpina 830 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 „*Blautia stercoris* 830” și a primit numărul de înregistrare NCIMB 42381. GT Biologics Ltd. și-a schimbat ulterior numele în 4D Pharma Research Limited.

Genomul tulpinii 830 cuprinde un cromozom și o plasmidă. O secvență de cromozomi pentru tulpina 830 este furnizată în SEQ ID NO: 5 în lista de secvențe publicată cu WO2016/203218. O secvență plasmidică pentru tulpina 830 este furnizată în SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218. Aceste secvențe au fost generate folosind platforma PacBio RS II.

Bacteria *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486 a fost testată în exemple și este de asemenea menționată aici sub formă de tulpină MRX008. O secvență 16S ARNr pentru tulpina MRX008 care a fost testată este furnizată în SEQ ID NO: 4. Tulpina MRX008 a fost depusă la autoritatea depozitară internațională NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Scoția) de către 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Scoția) la 16 noiembrie 2015 sub denumirea de „*Blautia/Ruminococcus*” și a primit numărul de înregistrare NCIMB 42486.

Tulpinile bacteriene strans legate de tulpinile testate 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 *Blautia stercoris*. De preferință, 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 SEQ ID NO: 1 sau 2. 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: 2. 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 *Blautia wexlerae*. De preferință, 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 SEQ ID NO: 3 sau 4. De preferință, identitatea secvenței este cu SEQ ID NO: 4. De preferință, tulpina bacteriană utilizată în invenție are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 4.

În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218. În cazuri preferate, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență de cel puțin 90% (de exemplu, cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pentru cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218. De exemplu, tulpina bacteriană utilizată în invenție poate avea un cromozom cu identitate de secvență de cel puțin 90% cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, peste 70% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 90 % identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 la 80% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 90% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 100% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 sau cel puțin 95% identitate în secvență cu SEQ ID NO : 5 din WO2016/203218 peste 70% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 sau identitate de secvență de cel puțin 95% cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 peste 80% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 95% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 100% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate de secvență SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 la 70% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 80% din SEQ

ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 pentru 100% din SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218.

5 In anumite cazuri, tulpina bacteriană pentru utilizare în invenția de față are o plasmidă cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218. În cazuri preferate, tulpina bacteriană utilizată în invenție are o plasmidă cu cel puțin 90% identitate de secvență (de exemplu, cel puțin 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100% identitate de secvență) cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pentru cel puțin 60% (de exemplu, cel puțin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 10 95%, 96%, 97%, 98%, 99% sau 100%) din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218. De exemplu, tulpina bacteriană utilizată în invenție poate avea o plasmidă cu cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, peste 70% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 90 % identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 la 80% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 sau cel puțin 90% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 sau cel puțin 90% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 100% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 sau cel puțin 95% identitate în secvență cu SEQ ID NO : 6 din WO2016/203218 la 70% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 80% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 95% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 95% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 100% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate de secvență pentru S EQ ID NR: 6 din WO2016/203218 la 70% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 80% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 pe 90% din SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218, sau cel puțin 98% identitate în secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218 peste 100% din ID-ul SEQ NR: 6 din WO2016/203218.

30 În anumite cazuri, tulpina bacteriană utilizată în invenție are un cromozom cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 5 din WO2016/203218 și o plasmidă cu identitate de secvență cu SEQ ID NO: 6 din WO2016/203218.

35 Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare 42381 sunt de asemenea de așteptat să fie eficiente în tratarea sau prevenirea bolilor și a condițiilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Tulpinile bacteriene care sunt biotipuri ale bacteriei depuse sub numărul de înregistrare 42486 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.

40 Tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate prin secvențierea altor secvențe de nucleotide pentru o bacterie depusă sub numărul de autorizare NCIMB 42381 sau 42486. 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 45 în identificarea tulpinilor de biotipuri pot include hsp60 sau secvențe repetitive, cum ar fi BOX, ERIC, (GTG) 5, sau REP sau [19]. 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 unei bacterii depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486.

50 În mod alternativ, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție pot fi identificate folosind numărul de accesare depozit NCIMB 42381 sau numărul de înregistrare depozit NCIMB 42486 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 55 ADNr 16S sau 23s. În anumite variante de realizare preferate, astfel de tehnici pot fi utilizate pentru a identifica alte tulpini de *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

60 În anumite variante de realizare, tulpinile care sunt biotipuri ale unei bacterii depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486 și care sunt adecvate pentru utilizare în invenție sunt tulpini care furnizează același model ca o bacterie depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486 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 o bacterie depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486.

Alte tulpini de *Blautia* care sunt utile în compozițiile și metodele invenției, cum ar fi biotipurile unei bacterii depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486, 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 nivelurilor de citokine. În particular, tulpinile bacteriene care au modele de creștere similare, tip metabolic și/sau antigene de suprafață cu o bacterie depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 sau 42486 pot fi utile în invenție. O tulpină utilă va avea o activitate modulatorie imună comparabilă cu tulpina NCIMB 42381 sau 42486. 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 în exemple, care pot fi identificate folosind protocoalele de cultivare și administrare descrise în Exemple.

O tulpină preferată în special a invenției este tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381. Acesta este exemplul de tulpină 830 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 *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381, Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă din tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381. Invenția de asemenea furnizează o cultură biologic pură a tulpinii de *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381 pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

O tulpină preferată în special a invenției este tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486. Acesta este exemplul tulpinei MRX008 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 *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486. Invenția furnizează, de asemenea, o compoziție care cuprinde o celulă a tulpinei *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486. Invenția furnizează o cultură biologic pură a tulpinii *Blautia wexlerae* depuse sub numărul de înregistrare NCIMB 42486. Invenția furnizează, de asemenea, o celulă din tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486, pentru utilizare în terapie, în special pentru bolile descrise aici.

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

Utilizări terapeutice

Așa cum s-a demonstrat în 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 invenției pot fi utile în tratarea sau prevenirea bolilor inflamatorii și autoimune și, în special, în boli sau afecțiuni mediate de IL-17. În particular, compozițiile invenției pot fi utile în reducerea sau prevenirea creșterii răspunsului inflamator IL-17.

Celulele Th17 sunt un subset de celule auxiliare T care produc, de exemplu, IL-17A, IL-17F, 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 inflamației confirmată, care contribuie și stă la baza unui număr de boli inflamatorii și autoimune (așa cum este descris, de exemplu, [21-26]). 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 în [27]). 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. 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 într-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.

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 ulcerosă; boala celiacă; astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul bronșic; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); uveita; sclerită; vasculită; Boala Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor. În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției 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 invenției 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 invenției 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 invenției 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 invenției 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 invenției pot fi aplicate oricăreia 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 invenției 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 invenției 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 invenției 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 invenției 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 , IFN- γ 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.

În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile conform invenției asigură o reducere sau previne o creștere a nivelului de celule CD4+. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelului de maturizare a celulelor dendritice, în special a celulelor dendritice derivate de monocite CD14+ CD14-. O astfel de reducere sau prevenire a nivelurilor crescute ale nivelului celulelor CD4+ sau reducerea sau prevenirea creșterii nivelului de maturizare a celulelor dendritice poate fi utilă pentru 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.

5 În anumite variante de realizare, astmul este astm eozinofil sau alergic. Astmul eozinofil și alergic se caracterizează printr-un număr crescut de eozinofile în sangele periferic și în secrețiile căilor respiratorii și este asociat patologic cu îngroșarea zonei membranei subsolului și farmacologic prin reacția la corticosteroizi [28]. Compozițiile care reduc sau inhibă recrutarea sau activarea eozinofilelor pot fi utile în tratarea sau prevenirea astmului eozinofil și alergic.

10 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.

15 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.

20 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.

30 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.

35 În anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției asigură o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor de TNFα.

40 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.

45 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

50 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 [29,30], astfel încât compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea RA.

In 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. In 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. In anumite variante de realizare, tratamentul cu compoziții conform invenției oferă o reducere sau împiedică o creștere a nivelurilor IFN- γ sau IL-6.

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

In anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a deteriorării cartilajelor sau a oaselor. In anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea cartilajului sau a deteriorării osoase în tratamentul RA. In 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 [29,30]. 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. In 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. In schimb, IL-17 are un rol în toate etapele bolii cronice [31]. Prin urmare, In 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 . In 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

In 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 [32,33]. Prin urmare, compozițiile invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea sclerozei multiple.

In 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.

5 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.

10 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

15 În anumite variante de realizare preferate, compozițiile invenției sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei. Exemplele demonstrează că compozițiile invenției obțin o reducere a incidenței bolii și a gravității bolii într-un caz de uveită la animal și astfel pot fi utile în tratamentul sau prevenirea uveitei. Uveita este inflamația uveei și poate duce la distrugerea 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 invenției pot fi deosebit de eficiente în prevenirea sau tratarea uveitei. Referințele [34-41] descriu niveluri serice crescute de interleukină-17A la pacienții cu uveită, asocierea specifică a variantelor genetice 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, 20 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.

30 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 invenției sunt eficiente în reducerea inflamației și afectării retinei.

In anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a leziunilor retiniene. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea leziunilor retiniene în tratamentul uveitei. În anumite 35 variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea pacienților cu uveită severă care prezintă riscul de deteriorare a retinei. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a inflamației discului optic. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru reducerea sau prevenirea inflamației discului optic. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat o reducere a 40 infiltrării țesutului retinian de către celule inflamatorii. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate în reducerea infiltrării țesutului retinian de către celulele inflamatorii. În anumite variante de realizare, tratamentul cu compozițiile invenției are ca rezultat menținerea sau îmbunătățirea vederii. În anumite variante de realizare, compozițiile invenției sunt utilizate pentru menținerea sau îmbunătățirea vederii.

45 În anumite variante de realizare, compozițiile sunt utilizate în tratarea sau prevenirea uveitei asociate cu o boală non-infecțioasă sau autoimună, cum ar fi boala Behcet, boala Crohn, iridociclita heterocromică Fuchs, granulomatoza cu 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 este implicată în, de 50 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

55 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.

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

60 În 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, supocire, witepsol), glicero-gelatină, polietilenglicol sau compoziție de glicerină de săpun.

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 jejunostomie (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.

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 administrate 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 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.

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.

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 *Blautia*, în special *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*.

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

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, caini, 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

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 [48-50].

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 [51] și [52].

Compoziția poate fi administrată oral și poate fi sub formă de tabletă, capsulă sau pulbere. Produsele încapsulate sunt preferate, deoarece *Blautia* 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.

O compoziție a invenției include o cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană a invenției. O cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină bacteriană este suficientă pentru a exercita un efect benefic asupra unui pacient. O cantitate eficientă terapeutică dintr-o tulpină

bacteriană poate fi suficientă pentru a duce la administrarea și/sau colonizarea parțială sau totală a intestinului pacientului.

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
5 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.

În anumite variante de realizare, compoziția conține tulpina bacteriană într-o cantitate de aproximativ 1×10^6 până la 1×10^{11} UFC/g, cu privire la greutatea compoziției; de exemplu, de la aproximativ 1×10^8 până la aproximativ 1×10^{10} UFC/g. Doza poate fi, de exemplu, 1 g, 3g,
10 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
15 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 greutății (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 salcâm, 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
20 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 [53]. Purtătorii sau diluanții acceptabili pentru utilizare terapeutică sunt bine cunoscute în domeniul farmaceutic și sunt descrise, de exemplu, în referință [54]. 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 (lianti) adecvat (adecvați), lubrifiant (lubrifianți), agent (agenți) de suspendare,
35 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
45 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,
50 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.
60

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.

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

10 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), uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, parodontită, rinită alergică și respingerea alogrefei.

15 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 sau a preveni o boală sau o afecțiune mediată de IL-17 sau linia Th17. În 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), uveită, sclerită, vasculită, boala Behcet, ateroscleroză, dermatită atopică, emfizem, periodontită, rinită alergică, și respingere de alogrefă.

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

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

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

35 În 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.

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

40 În 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.

45 În anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, cuprinzând în plus cel puțin unul dintre conservanți, un antioxidant și un stabilizator.

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

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

55 În anumite variante de realizare, invenția furnizează compoziția farmaceutică menționată mai sus, în 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 în prezenta invenție pot fi cultivate folosind tehnici standard de microbiologie, așa cum sunt detaliate, de exemplu, în referințe [55-57].

60 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),

(NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄ · 7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (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), şi piridoxamină (15 µg).

Tulpini bacteriene pentru utilizare în compuşii de vaccin

- 5 Inventatorii au identificat că tulpinile bacteriene ale invenţiei sunt utile în tratarea sau prevenirea bolilor sau afecţiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17. Acesta este probabil rezultatul efectului pe care tulpinile bacteriene din invenţie îl au asupra sistemului imunitar gazdă. Prin urmare, compoziţiile invenţiei pot fi de asemenea utile în prevenirea bolilor sau afecţiunilor mediate de IL-17 sau linia Th17, atunci când sunt administrate sub formă de compoziţii de vaccin.
- 10 În anumite astfel de realizări, tulpinile bacteriene ale invenţiei pot fi ucise, inactivate sau atenuate. În anumite astfel de realizări, compoziţiile pot cuprinde un adjuvant pentru vaccin. În anumite variante de realizare, compoziţiile sunt destinate administrării prin injecţie, cum ar fi prin injecţie subcutanată.

15 ***Generalităţi***

Practica prezentei invenţii va utiliza, dacă nu se indică altfel, metode convenţionale de chimie, biochimie, biologie moleculară, imunologie şi farmacologie, în baza abilităţii din domeniu. Astfel de tehnici sunt explicate pe deplin în literatura de specialitate. A se vedea, de exemplu, referinţele [58] şi [59-65], *etc.*

- 20 Termenul „cuprinzând” cuprinde „inclusiv”, precum şi „alcătuit”, de ex. o compoziţie „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 opţional şi înseamnă, de exemplu, $x \pm 10\%$.

- 25 Cuvantul „substanţial” nu exclude „complet” de ex. o compoziţie care este „substanţial liberă” de Y poate fi complet lipsită de Y. Când este necesar, cuvântul „substanţial” poate fi omis din definiţia invenţiei.

- Referirile la o identitate de secvenţă procentuală între două secvenţe de nucleotide înseamnă că, atunci când sunt aliniate, acel procent de nucleotide este acelaşi în compararea celor două secvenţe. Această aliniere şi procentul de omologie sau identitate de secvenţă pot fi determinate folosind programe software cunoscute în domeniu, de exemplu cele descrise în secţiunea 7.7.18 din ref. [66]. O aliniere preferată este determinată de algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman folosind o căutare a diferenţei afine cu o penalitate deschisă de diferenţă de 12 şi o pedeapsă de extensie a golului de 2, matricea BLOSUM din 62. Algoritmul de căutare a omologiei Smith-Waterman este dezvăluit în ref. [67].

- 35 Cu excepţia cazului în care se specifică în mod special, un proces sau o metodă care cuprinde numeroase etape poate cuprinde paşi suplimentari la începutul sau sfârşitul metodei sau poate cuprinde paşi suplimentari de intervenţie. De asemenea, etapele pot fi combinate, omise sau efectuate într-o ordine alternativă, dacă este cazul.

- Prezentele variante de realizare ale invenţiei 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 evidenţiate aici ca fiind adecvate, tipice sau preferate pot fi combinate între ele (cu excepţia cazurilor în care acestea se exclud reciproc).

MODURI DE REALIZARE A INVENŢIEI

- 45 ***Exemplul 1- Eficacitatea inoculilor bacterieni într-un caz de astm indus de acarieni la şoarecele***

Sumar

- Şoarecilor li s-au administrat compoziţii care conţin tulpini bacteriene conform invenţiei şi au fost ulterior trataţi cu extract de acarieni de praf (HDM) pentru a provoca un răspuns inflamator alergic. Răspunsul inflamator la HDM include componente eozinofile şi neutrofile, este mediat de IL-17 şi linia Th17 şi este un caz de astm. Mărimea şi caracteristicile răspunsului inflamator al şoarecilor trataţi cu compoziţii ale invenţiei au fost comparate cu grupele de control. S-a constatat că compoziţiile invenţiei atenuează răspunsul inflamator şi reduc recrutarea eozinofilelor şi neutrofilelor, indicând că pot fi utile în tratarea afecţiunilor mediate de IL-17 şi Th17, cum ar fi eozinofilie, neutrofilie şi astm.

- 55 ***Tulpina***

830: *Blautia stercoris*

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (oral).
- 60 6. Tratamentul cu tulpina de inoculum a bacteriilor terapeutice 830 (oral).
7. Grup de control pozitiv. Tratament cu Dexametazonă (i.p.).

8. Grup de control netratat.

Numărul de șoareci pe grup = 5

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

5 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).

10 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

15 În 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).

Materiale și metode

20 **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.

35 **Cultivarea inoculilor bacterieni.** În cadrul unei stații de lucru sterile, s-a deghețat un flacon de bacterii încălzindu-se în mână cu mânășă și injectat 0,7 ml de conținut într-un tub Hungate (Numărul 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 până la 24-26 ore (pentru tulpina 830).

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

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

45 **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.

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 200ul pe cale orală în zilele indicate în studiu pentru protocolul de mai sus.

50 **Procedura de incheiere.** În ziua a 14 animalele au fost sacrificate printr-o injecție letală i.p. injecție cu pentobarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 117013 9A) urmată imediat de lavaj bronhoalveolar (BAL) în 500 ul de soluție salină.

55 **Măsurarea infiltrărilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate de lichidul BAL și numărări de celule diferențiale s-au efectuat pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard.

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).

60 **Rezultate și analiză**

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figurile 1-9.

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.

- 5 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 830 a dus la o reducere 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

10 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 intranazal HDM, pentru a constata răspunsul inflamator al astmului bronșic sever. Mărimea 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 neutrofilelor, 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.

20 Tulpina

830: *Blautia stercoris*

Proiectul de studiu

Grupuri:

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehiculul de control (pe cale orală).
 25 6. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 830 (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
 30 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).
 35 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:

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

Material și metode.

- 45 **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.

- 60 **Cultivarea inoculilor bacterieni.** În cadrul unei stații de lucru sterile, s-a dezghețat un flacon de bacterii prin încălzire în mâna cu mânușă și s-au injectat 0,7 ml de conținut într-un tub Hungate (Numărul 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 până la 24-26 ore (pentru tulpina 830).

Cultivarea vehiculului de control. S-a incubat un tub Hungat 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.

5 **Sensibilizare HDM.** 50 pg 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 ul, de două ori peste două săptămâni pe flancurile opuse. La o săptămână după a

10 doua imunizare, șoarecii au fost anesteziați cu injecție i.p. cu 9,75 mg xilasol și 48,75 mg ketasol pe kg (Dr. E. Graeb AG, Berna, Elveția) și apoi li s-a administrat intranasal 15 pg de HDM în volum de 30 l PBS în 4 zile consecutive. Analiza a fost efectuată la o zi după administrarea finală.

15 **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.

Procedura de incheiere. În ziua a 18 animalele au fost sacrificate prin injecție letală i.p. cu pentobarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, Cat: 117013 9A) urmată imediat de lavaj bronhoalveolar (BAL) în 500 ul de soluție salină.

20 **Măsurarea infiltrărilor celulare în BAL.** Celulele au fost izolate de fluidul BAL și numărări de celule diferențiale au fost efectuate pe baza criteriilor morfologice și citochimice standard. 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).

25 Rezultate și analiză

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 11, 12, 15 și 16, anumiți șoareci tratați cu tulpină 830 au prezentat eozinofilie redusă și neutrofilie.

30 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

830: *Blautia stercoris*

35 **Culturi bacteriene**

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

40 Tulpina bacteriană # 830 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.

45 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 # 830 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

50 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 pg de collagen de tip II în adjuvant Freund incomplet.

55 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 (incheietura mainii) și articulații tibio-tarsale (gleznă).

60 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.

Modelul de artrită indusă de collagen (CIA) la șoarece este un model bine cunoscut de artrita reumatoidă la șoarece [68]. 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 [69]. Răspunsul imun care stă la baza modelului de artrită este îmbunătățit prin utilizarea adjuvantului Freund complet cu *Mycobacterium tuberculosis*.

În 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

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-Sfârșit	Ziua 0: Collagen/CFA, o dată, SC
3 Bioterapeutic #830	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.

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

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

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

În 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 încorporării timidinei. Datele au fost înregistrate (medie $\pm$ SEM). Supernatanții au fost recoltați și testați pentru prezența citokinelor cheie.

Analiza citokinelor

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

În 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

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,

neinforma 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.

5

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.

10 **Rezultate și analiză****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.

Un animal din grupul 1 (tratată cu vehicul) a fost sacrificat în perioada de pre-tratament (ziua 14 până în ziua 0 - animalul sosit de la furnizor cu piciorul rupt).

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 # 830).

Șase animale au fost sacrificate din cauza gravității semnelor clinice nespecifice incluzând postura anormală (cocoșat), starea anormală a stratului (piloerecție), niveluri de activitate anormale (activitate redusă): trei animale din grupul 1 (tratate cu vehicul) și trei animale în grupul 3 (tratate bioterapeutic # 830).

Greutăți corporale

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 grupul 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 și în grupul 3 (tratată cu bioterapeutic # 830) în ziua 11 și în ziua 9.

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

ANOVA in 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.

- 5 In comparație cu grupul tratat cu vehicul, greutatea corpului a fost semnificativ mai mare în grupul 3 (bioterapeutică # 830) tratat în ziua 28 ($< 0,005$).

Observații clinice

- 10 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.

- 15 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.

Bioterapeutică # 830 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 45 ($p < 0,05$).

- 20 **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.

- 25 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.

- 30 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 Sidak 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 ($p < 0,0001$).

- 35 Grupurile tratate cu bioterapeutic # 830 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

- 40 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).

- 45 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 ($n=3$).

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

- 55 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-a în supernatanții culturii de țesut după stimularea cu collagen au fost sub limita de cuantificare.

60

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)

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

Niveluri de supernatanți IL-10 (Figura 25)

- 10 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)

- 15 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

- 20 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.

- 25 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.

- 30 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.

- 35 Incidența modificărilor histopatologice a fost: vehicul - 80% (16/20); Bioterapeutic # 830 - 20% (4/20). 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 # 830 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de inflamație articulară observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,01$). Bioterapeutic # 830 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de deteriorare a cartilajelor observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,001$). Bioterapeutic # 830 a indus o reducere semnificativă a scorurilor de afectare osoasă observate în histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,001$). Bioterapeutic # 830 a indus o reducere semnificativă a scorurilor totale de histopatologie în comparație cu grupul tratat cu vehicul ($p < 0,001$).

Sumar

- 50 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 # 830 este eficient în tratarea artritei în acest caz. Bioterapeutic # 830 a fost eficient în reducerea severității scorurilor clinice și în reducerea bolii patologice la nivelul articulațiilor, așa cum s-a demonstrat în analiza histopatologică.

- 55 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 # 830 (grupul 3).

- 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.

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.

5 ***Exemplul 4 - Analiză suplimentară a efectului inoculilor bacterieni la cazul de astm indus de acarieni 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.

10 **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.

15 **Eliminarea organelor în ziua 14.** Recoltarea lobului pulmonar stâng în formalină 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

20 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

25 Lobii plămânului stang au fost fixați în formalină urmată de înglobarea în parafină, secționare și colorare cu hematoxilină și eozină și PAS. Scorurile histologice ulterioare au fost efectuate în 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

30 1 - infiltrări inflamatorii ușoare

2 - infiltrări inflamatorii moderate

3 - infiltrări inflamatorii importante

4 - infiltrări inflamatorii severe

5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

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

Măsurarea mediatorilor inflamatori în țesutul pulmonar

40 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.

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentelor sunt prezentate în Figurile 27-45.

45 În sprijinul descoperirilor descrise în Exemplul 1, analiza infiltrațiilor celulare din țesutul pulmonar al șoarecilor tratați cu tulpina 830 a arătat o reducere notabilă și statistic semnificativă a scorului mediu al inflamației (vezi Figurile 31 și 33).

50 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.

55 În 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 în 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

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

Materiale și metode

10 **Eliminarea organelor în ziua 18.** Recoltarea lobului pulmonar stâng în formalină 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.

15 **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.

20 **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.

25 **Izolarea analizei pulmonare și histologice (analiza ulterioară).** Lobii plămânului stâng au fost puși în formalină 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

30 3 - infiltrări inflamatorii importante

4 - infiltrări inflamatorii severe

5 - infiltrări inflamatorii foarte severe

Rezultate și analiză

35 Rezultatele experimentelor sunt indicate în Figurile 46-63.

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 830, iar controlul pozitiv anti-IL-17 Ab s-a comportat în general așa cum era de așteptat.

45 Cu avizele de mai sus, datele din figura 53 sugerează că tratamentul cu tulpina 830 poate atinge o reducere a nivelurilor de TNF α , 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. TNF α face parte din linia Th17. Luând împreună acest set de date, se poate concluziona că tulpina 830 a avut un efect benefic asupra mecanismului de inflamație în acest caz de astm bronșic sever la șoarece.

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

Sumar

55 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 encefalomielita 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

60 830: bacterii depozitate sub numărul de înregistrare NCIMB 43281

Proiectul de studiu**Grupuri:**

1. Grup de control negativ. Tratamentul cu vehicul de control (oral).
5. Tratamentul cu tulpina de inocul bacterian terapeutic 830 (oral).
- 5 9. Grup de control pozitiv. Tratament cu Dexametazonă (i.p.).
10. Grup de control netratat.
- 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
- 10 (grupul 5).
- Zilele 0-28: administrarea Dexametazonei (de exemplu) de trei ori pe săptămână (grupul 9)
- Ziua 0: MOG35-55 (glicoproteină oligodendrocitărilor 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

- 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.

Observații privind scorul activității bolii:

- 25 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.
- 2.0 - Coadă bleagă și laba posterioară slăbită.
- 30 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.
- 3.0 - Coadă bleagă și paralizie completă a labelor posterioare.
- 35 3.5 - Coadă bleagă și paralizie 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.
- 4.0 - Coadă bleagă, paralizie totală a labei posterioare și paralizie parțială a labei anterioare.
- 40 - 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.
- 5.0 Șoarecele este eutanasiat din cauza paraliziei severe.
- 45 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.

- 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 830 a fost izbitor, iar șoarecii tratați cu tulpina 830 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 830 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 retinoid interfotoreceptor (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 țesutului retinian. Această boală poate fi studiată la rozătoare într-un caz de uveoretinită autoimună experimentală (EAU) [70]. 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 retinoid interfotoreceptor (IRBP). 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

MRX008: *Blautia wexlerae*, bacterie înregistrată sub numărul de înregistrare NCIMB 42486.

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 pg de proteină de legare la retinoid interfotoreceptor 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	MRX008	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

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 (cocosat), stare anormală a stratului (piloerecție) și niveluri de activitate anormale (activitate redusă sau crescută).

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.

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 72-74.

- 5 **Proliferare celulară (animale satelit, ziua 21).** Nodulii limfatici de scurgere (DLN) au fost îndepărtați și celulele au fost izolate. După numărare, celulele au fost cultivate timp de 72 de ore în prezența sau absența peptidei IRBP. Supernatanții pentru analiza citokinei au fost îndepărtate înainte de pulsarea cu ^3H -timidină. Celulele au fost apoi cultivate timp de 18 ore înainte de recoltare și determinarea proliferării prin incorporarea de ^3H -timidină folosind un contor beta.
- 10 Grupurile au arătat proliferarea celulară la stimulul IRBP peste cel văzut în godeurile de control ale mediilor (aceste valori de fundal au fost scăzute din rezultatul IRBP pentru a furniza date sub formă de Δcpm). Ambele grupuri au dat răspunsuri puternice proliferative la un stimul pozitiv de control (anti-CD3/CD28) care arată că celulele din cultură erau viabile și capabile să prolifereze (datele neindicate).
- 15 Răspunsurile proliferative la peptida IRBP au fost analizate prin ANOVA unidirecțional urmată de post-testul Dunnett pentru compararea răspunsurilor stimulate din grupul experimental cu grupul martor.
- Răspunsurile proliferative la peptida IRBP la animalele de combatere a bolii au fost de mărimea scontată pentru acest caz. Medicamentul de control pozitiv, Ciclosporina A, a redus proliferarea, deși această reducere nu a atins semnificația statistică (Figura 72).
- 20 Grupurile de tratament (inclusiv vehiculul singur) au arătat o proliferare nesemnificativă peste cea observată la animalele de control.
- Răspunsurile proliferative la peptida IRBP au fost analizate prin ANOVA unidirecțional urmat de Dunnett post-test pentru compararea răspunsurilor stimulate în grupele de tratament cu grupul de vehicule. Nu au fost observate diferențe statistice.
- 25 **Scoruri clinice: imagistica retiniană prin imagistică fundală endoscopică topică (TEFI).** Datele scorurilor TEFI măsurate în grupul de control din ziua 0 până în ziua 21 au fost analizate prin testul Kruskal-Wallis pentru datele non-parametrice urmate de post-testul lui Dunn pentru comparații multiple între zilele experimentale.
- 30 Administrarea IRBP a indus o creștere semnificativă a scorurilor TEFI măsurate începând cu ziua 14 ($p < 0,01$) și în ziua 21 ($p < 0,0001$) în comparație cu ziua 0 în grupul Control (Figura 73).
- Datele scorurilor TEFI măsurate în toate grupele experimentale în ziua 21 au fost analizate prin testul Kruskal-Wallis pentru datele non-parametrice urmate de post-test Dunn pentru comparații multiple între grupurile experimentale.
- 35 În această etapă a experimentului, nu a existat o diferență semnificativă între grupurile experimentale, dar scorurile TEFI au fost mai mici în grupul tratat MRX008 decât în grupurile de control negative. Într-adevăr, scorurile TEFI au fost mai mici în grupul tratat cu MRX008 decât în grupul tratat cu ciclosporină martor pozitiv.
- 40 **Concluzii.** Răspunsurile proliferative la peptida IRBP au fost observate în culturile ganglionare ale tuturor grupurilor experimentale, cu excepția animalelor naive, care indică succesul inducerii bolii. 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 21, nu sunt încă vizibile diferențe semnificative între grupurile experimentale, dar a fost observată o reducere izbitoare a incidenței bolii și a gravității bolii în grupul tratat cu MRX008, care a fost o reducere mai mare decât a fost observată pentru grupul de control pozitiv. În special, aceste date indică faptul că tratamentul cu tulpina MRX008 a redus deteriorarea retinei, inflamația discului optic și/sau infiltrarea țesutului retinian de către celulele inflamatorii (a se vedea sistemul de evaluare a
- 45

imaginii retiniene TEFI de mai sus). Aceste date indică faptul că tulpina MRX008 poate fi utilă în tratarea sau prevenirea uveitei.

Exemplul 8 - Eficacitatea inoculilor bacterieni de MKX006 într-un caz de inflamație indus de LPS - concentrație redusă de citokină

Sumar

Tulpina bacteriană MRX006 (830) a fost supusa unui test antiinflamator (n = 9) pentru a determina efectul asupra concentrațiilor de citokine. Inflamația a fost indusă folosind un declanșator bine stabilit al răspunsului inflamator, lipopolizaharida (LPS). Mărimea și caracteristicile răspunsului inflamator în grupurile tratate cu MRX006 (830) au fost comparate cu grupele de control. S-a constatat că compozițiile invenției ameliorează răspunsul inflamator și, în special, reduc concentrația citokinelor IL-6 și TNFα. Astfel, datele indică faptul că compozițiile invenției au un fenotip inflamatoriu larg și pot fi utile în tratarea bolilor inflamatorii, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figurile 75 și 76.

După cum se arată în Figurile 75, respectiv 76, administrarea de LPS determină o creștere a nivelurilor de IL-6 și TNFα, așa cum este de așteptat după inducerea inflamației. Este important să se reducă semnificativ nivelurile acestor citokine la grupurile tratate cu MRX006 (830). Prin urmare, compozițiile invenției reduc concentrația de citokine inflamatorii și, prin urmare, au un fenotip antiinflamator larg.

Exemplul 9 - Eficacitatea inoculilor bacterieni ale MKX006 într-un caz de inflamație indus de LPS - maturizare redusă a celulelor dendritice derivate de monocite (Mo-DC)

Sumar

Tulpina bacteriană MRX006 (830) a fost supusa unui test antiinflamator care implică detectarea gradului de maturare a celulelor dendritice derivate de monocite (Mo-DCs). Aceste celule, în special celulele CD1a+ CD14-, utilizate în acest exemplu, sunt implicate în răspunsul inflamator la maturizare. Maturizarea celulelor CD1a+ CD14- este indicată prin exprimarea crescută a CD80, CD83, CD86 și HLA-DR. S-a descoperit că compozițiile invenției atenuează răspunsul inflamator și, în special, reduc maturarea celulelor dendritice asociate cu răspunsul inflamator (CD1a+ CD14-). De aceea, datele indică faptul că compozițiile invenției pot fi utile în tratarea bolilor inflamatorii, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figura 77.

Așa cum se arată în figura 77, administrarea de LPS determină o creștere a expresiei markerilor de maturizare pe MoDCs, așa cum este indicat de trecerea liniei negre în dreapta graficului. Este important să se reducă nivelul de exprimare a markerilor de maturizare în grupul LPS tratat cu MRX006 (așa cum este indicat prin trecerea liniei negre pline în stânga). Pentru grupul LPS + MRX006, nivelul de exprimare al markerilor inflamatori CD80, CD83 și HLA-DR revine la nivelul de exprimare în controlul nestimulat (linie punctată). În plus, nivelul de exprimare al CD86 în grupul LPS + MRX006 este, de asemenea, redus foarte mult în comparație cu grupul LPS singur. Astfel, compozițiile conform invenției reduc nivelul de maturare a CMD asociate cu inflamația și, prin urmare, au un fenotip antiinflamatoriu larg.

Exemplul 10 - Eficacitatea inoculilor bacterieni la un caz de inflamație indusă de ovalbumină - diviziune redusă a celulelor CD4+ la șoarece

Sumar

Tulpina bacteriană MRX006 (830) a fost supusă unei analize a inflamației suplimentare (n = 5) care implică detectarea nivelului de celule CD4+. Creșterea nivelului de celule CD4+ este un indicator al inflamației. Unul dintre motivele acestui fapt este că celulele CD4+ sunt implicate în căile inflamatorii Th17 și IL-17. Inflamarea a fost indusă folosind un declanșator bine stabilit al răspunsului inflamator, ovalbumină. S-a descoperit că compozițiile invenției atenuează răspunsul inflamator și, în special, reduce numărul de celule CD4+. De aceea, datele indică faptul că compozițiile invenției pot fi utile în tratarea bolilor inflamatorii, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Rezultate și analiză

Rezultatele experimentului sunt indicate în Figura 78.

După cum se arată în figura 78, numărul de celule CD4+ din populația care suferă trei sau mai multe diviziuni celulare este crescut după administrarea de ovalbumină (așa cum se aștepta la un răspuns inflamator). În mod critic, numărul de celule care suferă trei sau mai multe divizii după administrarea cu ovalbumină este redus semnificativ la grupurile tratate cu MRX006. Prin urmare, compozițiile invenției reduc nivelul celulelor CD4+ și astfel, invenția poate fi utilă pentru tratarea bolilor inflamatorii, cum ar fi neutrofilia și astmul.

Exemplul 11 - 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.

Secvențe

- 10 SEQ ID NO:1 (Tulpina *Blautia stercoris* GAM6-1 gena ribosomală 16S ARN, secvența parțială - HM626177)

```

1  tgcaagtcga gcgaagcgct tacgacagaa ccttcggggg aagatgtaag ggactgagcg
61  gcggacgggt gagtaacgag tgggtaacct gcctcataca gggggataac agttggaaac
121 ggctgctaata accgcataag cgcacggtat cgcattgatac agtgtgaaaa actccggttg
181 tatgagatgg acccgcgctct gattagctag ttggaggggt aacggccac caaggcgacg
241 atcagtagcc ggctgagag ggtgaacggc cacattggga ctgagacacg gccagactc
301 ctacgggagg cagcagtggt gaatatgtca caatggggga aacctgatg cagcgacgcc
361 gcgtgaagga agaagtatct cggatgttaa acttctatca gcagggaaga aaatgacggt
421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac gtagggggca
481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa gtctgatgtg
541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt tttcttgag tgccggagag
601 gtaagcgga ttctagtgt agcgggtgaa tgcgtagata ttaggaggaa caccagtggc
661 gaaggcggt tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtggg agcaaacagg
721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtgttg ggagcaaagc
781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgt cgcaagaatg
841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcgtgga gcatgtggt taattcgaag
901 caacgcgaag aacctacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa tggaaccttt
961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggtgtgctc agctcgtgc gtgagatgtt
1021 ggggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccct atctcagta gccagcaggt gaagctgggc
1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc aaatcatcat
1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaagg aagcgagccc
1201 gcgaggggga gcaaatccca aaaataacgt ccagttcgg actgcagtct gcaactcgac
1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa tacgttcccc
1321 ggtcttgtac acaccgcccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

```

SEQ ID NO:2 (secvența consens 16S ARNr pentru tulpina *Blautia stercoris* 830)

```

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTAAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCGCTTACGACAGAACCCT
CGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCTCATACAGGGGGATAACA
GTTGGAACCGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGAT
GGACCCGCGCTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAA
CCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAATGACGG
TACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTT
ACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTGCATTGG
AAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGACGAAACGCAA
TAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTTATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGATCTGACCGGTTCTGAATGGAACCTT
TCCTTGGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCTATCGTCAGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACCTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGG
AAGCGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGG
AAGCGAGCCCCGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCAGTTCGGAAGTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGA
AGCTGGAATCGTAGTAATCGCAATCAGAATGTGCGGGTGAATACGTTCCGGGTCTGTACACACCGCCGCTCAC
ACCATGGGAGTCACTAACGCCGAAGTCAGTGACCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTG
GGGTGAAGTCTAGGGGGT

```

SEQ ID NO:3 (Tulpina *Blautia wexlerae* WAL 14507 gena ribosomală 16S ARN, secvență parțială - EF036467)

```

1 caagtcgaac gggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat tctagtggcg
61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt cagaaatggc
121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact ccggtggtat
181 aagatggacc cgcgttgat tagcttggtg gtggggtaac ggccaccaaa ggcgacgac
241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc cagactccta
301 cgggaggcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag cgacgccgcg
361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaaact tctatcagca gggaagatag tgacggtacc
421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta gggggcaagc
481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc tgatgtgaaa
541 ggcatgggct caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc cggaggggta
601 agcgaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac cagtggcgaa
661 ggcggttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc aaacaggatt
721 agataccctg gtagtcacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt ggcaaagcca
781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg caagaatgaa
841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
901 acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc cgcctgaccg atccttaacc ggatctttcc
961 ttcgggacag gcgagacagg tgggtgcattg ttgtcgtcag ctggtgtcgt gagatgttgg
1021 gttaaagtccc gcaacgagcg caacccctat cctcagtagc cagcatttaa ggtgggcact
1081 ctggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc
1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaagggag cgagattgtg
1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca acccgactac
1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggt cagaatgccg cggatgaatac gttccgggt
1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca gtgacctaac
1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt aacaaggt

```

SEQ ID NO:4 (secvență consens 16S ARNr pentru tulpina *Blautia wexlerae* MRX008)

```

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGTAACCTGCCTTAT
ACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCGCACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTC
CGGTGGTATAAGATGGACCCGCTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCG
GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
CACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTATGTAACCTCTATCAGCAGG
GAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAG
5 CGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCT
GTGGACTGCATTGGAACCTGCATACCTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGATATTAGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCNNGGGGAGCATGGCTCT
TCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATTCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGCTTGACATCC
GCCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTCAGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCATC
TGGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCA
GTTCCGACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCCGGTGA
ATACGTTCCCGGCTCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAACGCCGAAGTCAGTGACCTAACT
GCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

```

SEQ ID NO:5 (secvență cromozomială tulpina 830) – vezi listarea electronică a secvenței in WO2016/203218.

10 SEQ ID NO:6 (secvență plasmidei tulpina 830) – vezi listarea electronică a secvenței in WO2016/203218.

REFERINTE

- [1] Spor et al. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et al. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson et al. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- 5 [4] Macpherson et al. (2002) *Cell Mol Life Sci.* 59(12):2088-96.
- [5] Mazmanian et al. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [6] Frank et al. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [7] Scanlan et al. (2006) *J Clin Microbiol.* 44(11):3980-8.
- [8] Kang et al. (2010) *Inflamm Bowel Dis.* 16(12):2034-42.
- 10 [9] Machiels et al. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [10] WO 2013/050792
- [11] WO 03/046580
- [12] WO 2013/008039
- [13] WO 2014/167338
- 15 [14] Goldin and Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [15] Azad et al. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [16] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [17] Park et al. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [18] Liu et al. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 8):1896-902.
- 20 [19] Masco et al. (2003) *Systematic and Applied Microbiology*, 26:557-563.
- [20] Srůtkova et al. (2011) *J. Microbiol. Methods*, 87(1):10-6.
- [21] Ye et al. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [22] Fabro et al. (2015) *Immunobiology.* 220(1):124-35.
- [23] Yin et al. (2014) *Immunogenetics.* 66(3):215-8.
- 25 [24] Cheluvappa et al. (2014) *Clin Exp Immunol.* 175(2):316-22.
- [25] Schieck et al. (2014) *J Allergy Clin Immunol.* 133(3):888-91.
- [26] Balato et al. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [27] Monteleone et al. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [28] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
- 30 [29] Miossec and Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [30] Yang et al. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.
- [31] Koenders et al. (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [32] Amedei et al. (2012) *Int J Mol Sci.* 13(10):13438-60.
- [33] Shabgah et al. (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- 35 [34] Zhang (2015) *Inflammation.* Aug 23.
- [35] Sun et al. (2015) *Cytokine.* 74(1):76-80.
- [36] Mucientes et al. (2015) *Br J Ophthalmol.* 99(4):566-70.
- [37] Jawad et al. (2013) *Ocul Immunol Inflamm.* 21(6):434-9.
- [38] Maya et al. (2014) *J. Ophthalmology.* 310329
- 40 [39] Chi et al. (2007) *J. Allergy and Clinical Immunology.* 119(5):1218-1224.
- [40] Chi et al. (2008) *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 49(7): 3058-3064.
- [41] Luger and Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143
- [42] Numasaki et al. (2003) *Blood.* 101:2620-2627.
- [43] Zhang et al. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374: 533-537.
- 45 [44] Karin (2006) *Nature.* 441: 431-436.
- [45] Faghih et al. (2013). *Iranian Journal of Immunology.* 10(4):193-204.
- [46] Numasaki et al. (2005) *J. Immunol.* 175: 6177-6189
- [47] Hammerich and Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol.* 7:297-306.
- [48] Miyamoto-Shinohara et al. (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 9-24.
- 50 [49] *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, ed. by Day and McLellan, Humana Press.
- [50] Leslie et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [51] Mitropoulou et al. (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [52] Kailasapathy et al. (2002) *Cur Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [53] *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Ediția a 2-a, (1994), Edited by A Wade and PJ
- 55 Weller
- [54] *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [55] *Handbook of Microbiological Media*, Ediția a patra (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [56] *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* (1996) Jennie C. Hunter-Cevera, Academic Press
- 60 [57] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.

- [58] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. ediția a 20-a, ISBN: 0683306472.
- [59] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press).
- 5 [60] Methods in Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [61] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [62] Sambrook et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ediția a 3-a (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 10 [63] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [64] Ausubel et al. (ed) (2002) Short protocols în molecular biology, ediția a 5-a (Curent Protocols).
- [65] PCR (Introduction to Biotechniques Series), ed. a 2-a (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- 15 [66] Curent Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel et al., eds., 1987) Supplement 30
- [67] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.
- [68] Brand et al. (2007) Nature Protocols. 2(5):1269-1275
- [69] Jiao et al. (2014) Immunopathology and Infectious Diseases. 184(4):1085-93.
- [70] Caspi (2003) Cur Protoc Immunol. Chapter 15:Unit 15.6.

(56) Referințe bibliografice citate in raportul de documentare:

- WO-A2-2014/121298
- WO-A2-2014/201037
- US-A1- 2003 147 858
- US-A1- 2014 199 281
- US-A1- 2014 341 921

(57) Revendicări:

1. O compoziție care cuprinde o tulpină bacteriană din speciile *Blautia stercoris* sau *Blautia wexlerae*, destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli inflamatorii sau autoimune.

2. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 1, în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de tratare sau de prevenire a unei boli sau a unei afecțiuni selectate din grupul format din astm, cum ar fi astmul alergic sau astmul bronșic; artrită, cum ar fi artrită reumatoidă, osteoartrită, artrită psoriazică sau artrită idiopatică juvenilă; scleroză multiplă; neuromielită optică (boala lui Devic); spondilită anchilozantă; spondiloartrită; psoriazis; lupus eritematos sistemic; boală inflamatorie a intestinului, cum ar fi boală Crohn sau colită ulcerosă; boală celiacă; boală pulmonară obstructivă cronică (BPOC); uveită; sclerită; vasculită; Boală Behcet; ateroscleroză; dermatită atopică; emfizem; parodontită; rinită alergică; și respingerea alogrefelor.

3. Compoziție pentru utilizarea conform revendicării 2; unde

(i) compoziția se folosește într-o metodă de tratare sau de prevenire a astmului, cum ar fi astmul bronșic sau astmul alergic și în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a neutrofiliei sau a eozinofiliei în tratamentul astmului; sau în care

(ii) compoziția se utilizează într-o metodă de tratare sau de prevenire a artritei reumatoide și în care compoziția este destinată utilizării într-o metodă de reducere a umflării articulației în artrita reumatoidă; sau în care

(iii) compoziția se utilizează într-o metodă de tratare sau de prevenire a sclerozei multiple, iar compoziția este utilizată într-o metodă de reducere a incidenței bolii sau a gravității bolii; sau în care

(iv) compoziția se utilizează într-o metodă de tratare sau de prevenire a uveitei și compoziția se folosește într-o metodă de reducere sau de prevenire a deteriorării retinei în uveită.

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

5. Compoziție pentru utilizarea din oricare dintre revendicările precedente, în care compoziția este destinată utilizării la un pacient cu niveluri ridicate de IL-17 sau celule Th17.

6. Compoziția pentru utilizarea din oricare dintre revendicările 1-5; în care (a) tulpina bacteriană 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 *Blautia stercoris*; sau în care (b) tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 1 sau 2; în care conform (b), de preferință tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 2 sau tulpina bacteriană are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 2.

7. Compoziția pentru utilizarea oricăreia dintre revendicările 1-5; în care (a) tulpina bacteriană 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 *Blautia wexlerae*; sau în care (b) tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 3 sau 4; în care în conformitate cu (b), de preferință tulpina bacteriană are o secvență 16S ARNr care este cel puțin 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% sau 99,9% identică cu SEQ ID NO: 4 sau tulpina bacteriană are secvența 16S ARNr reprezentată de SEQ ID NO: 4.

8. Compoziție pentru utilizarea oricăreia dintre revendicările precedente, în care compoziția este destinată administrării orale; și/sau în care compoziția cuprinde unul sau mai mulți excipienți sau purtători acceptabili farmaceutici; și/sau în care tulpina bacteriană este liofilizată.

9. Produs alimentar sau compoziție de vaccin cuprinzând compoziția din oricare revendicare precedentă, pentru utilizarea din oricare revendicare precedentă.

10. O celulă din tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381; sau o compoziție care cuprinde respectiva celulă, opțional în care compoziția cuprinde un purtător sau un excipient acceptabil farmaceutic.

11. O cultură biologic pură a tulpinii *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381.

12. O celulă din tulpina *Blautia stercoris* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42381, pentru utilizare în terapie.

13. O celulă din tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486; sau o compoziție care cuprinde respectiva celulă, opțional în care compoziția cuprinde un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic.

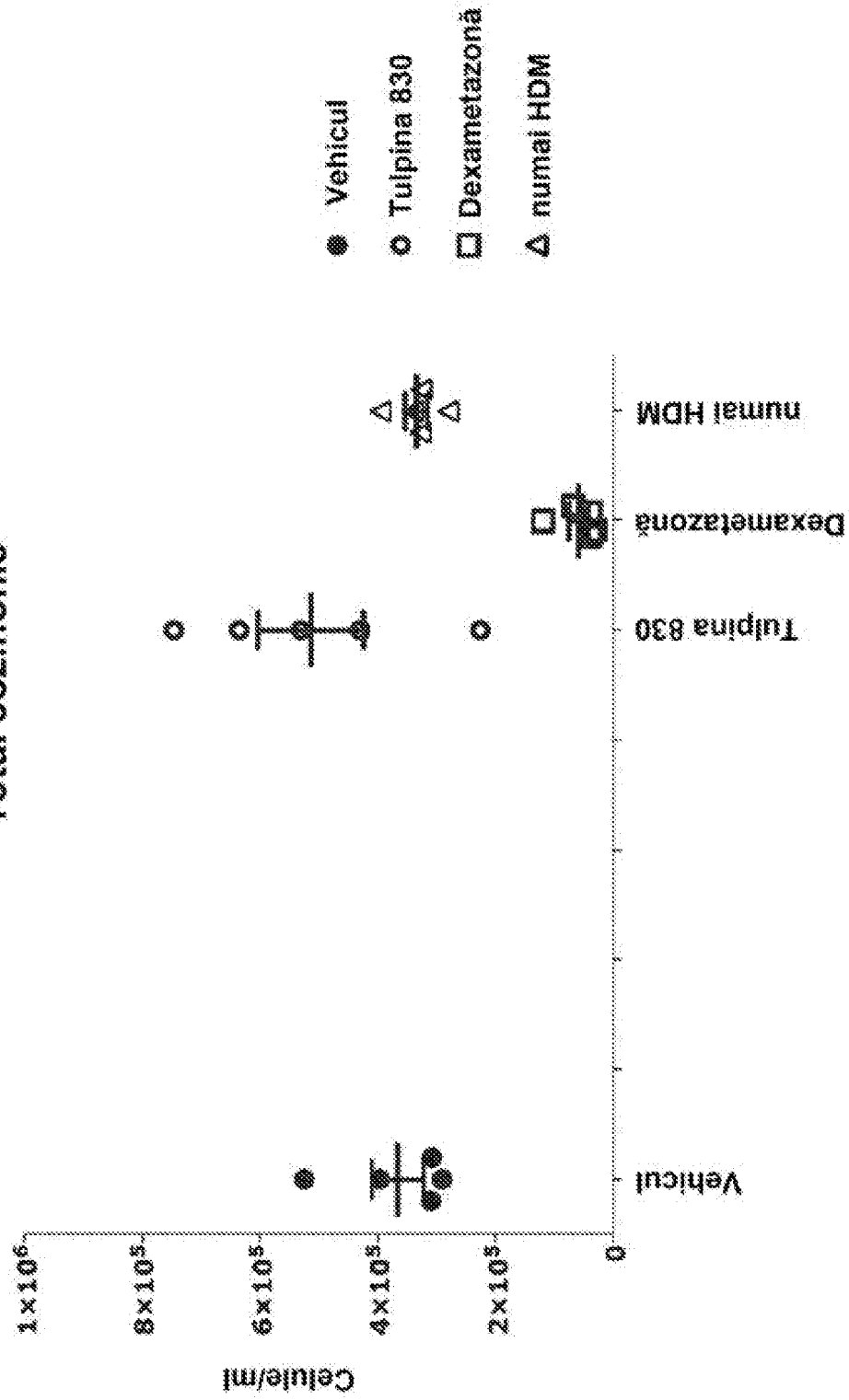
14. O cultură biologic pură a tulpinii *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486.

15. O celulă din tulpina *Blautia wexlerae* depusă sub numărul de înregistrare NCIMB 42486, pentru utilizare în terapie, opțional în care celula este destinată utilizării într-o metodă definită în oricare dintre revendicările 1-5.

Scatter plot showing the number of cells per ml (Celule/ml) for four groups: Vehicul, Tulpă 830, Dexametazonă, and numai HDM. The y-axis ranges from 0.0 to 2.0×10^6 . The Vehicul group shows the highest cell count, followed by Tulpă 830, Dexametazonă, and numai HDM. Error bars are included for each group.

Group	Cell Count (Celule/ml)
Vehicul	1.0×10^6
Tulpă 830	1.0×10^6
Dexametazonă	0.6×10^6
numai HDM	0.6×10^6

FIG. 2
Total eozinofile



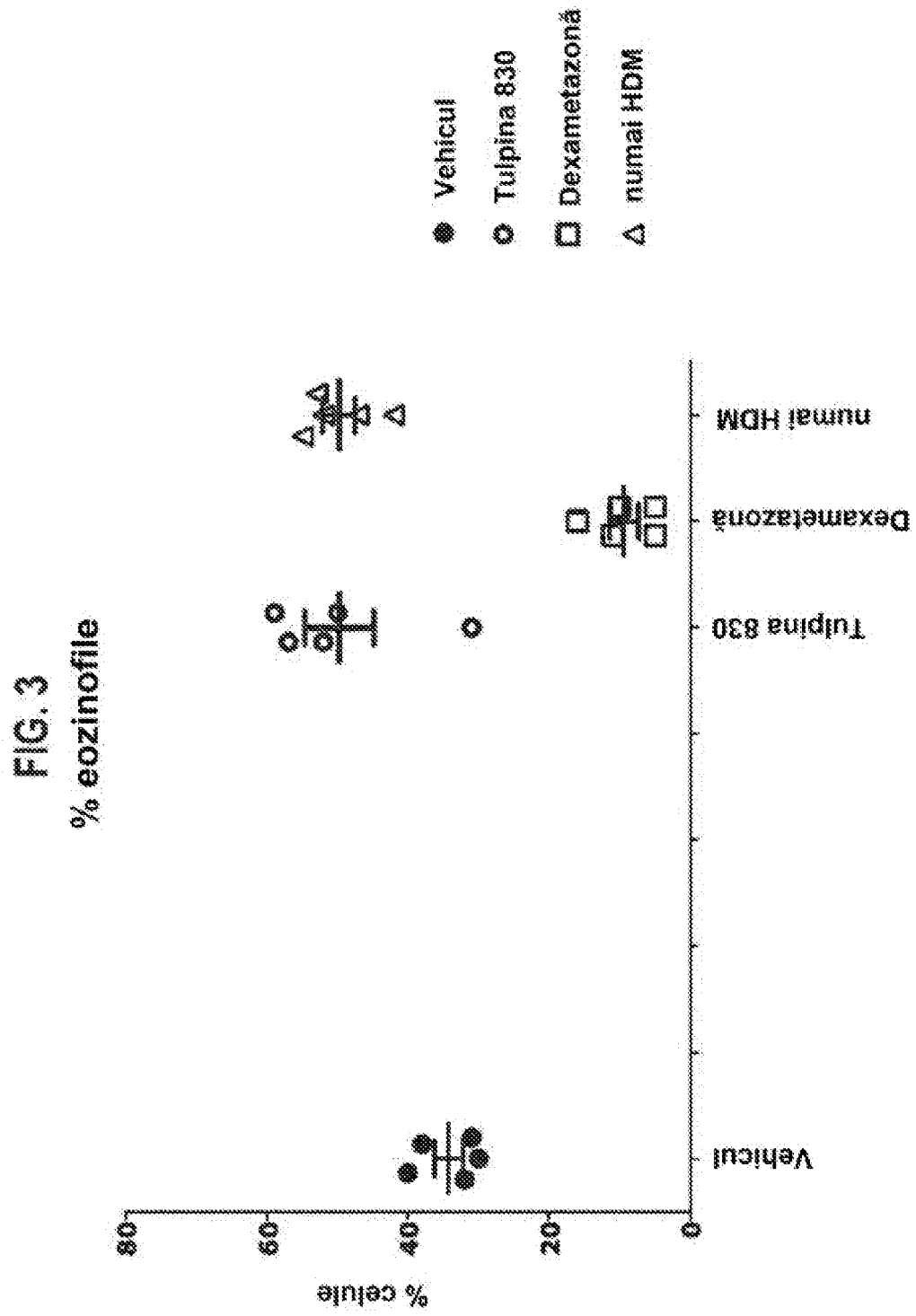


FIG. 4
Total macrofage

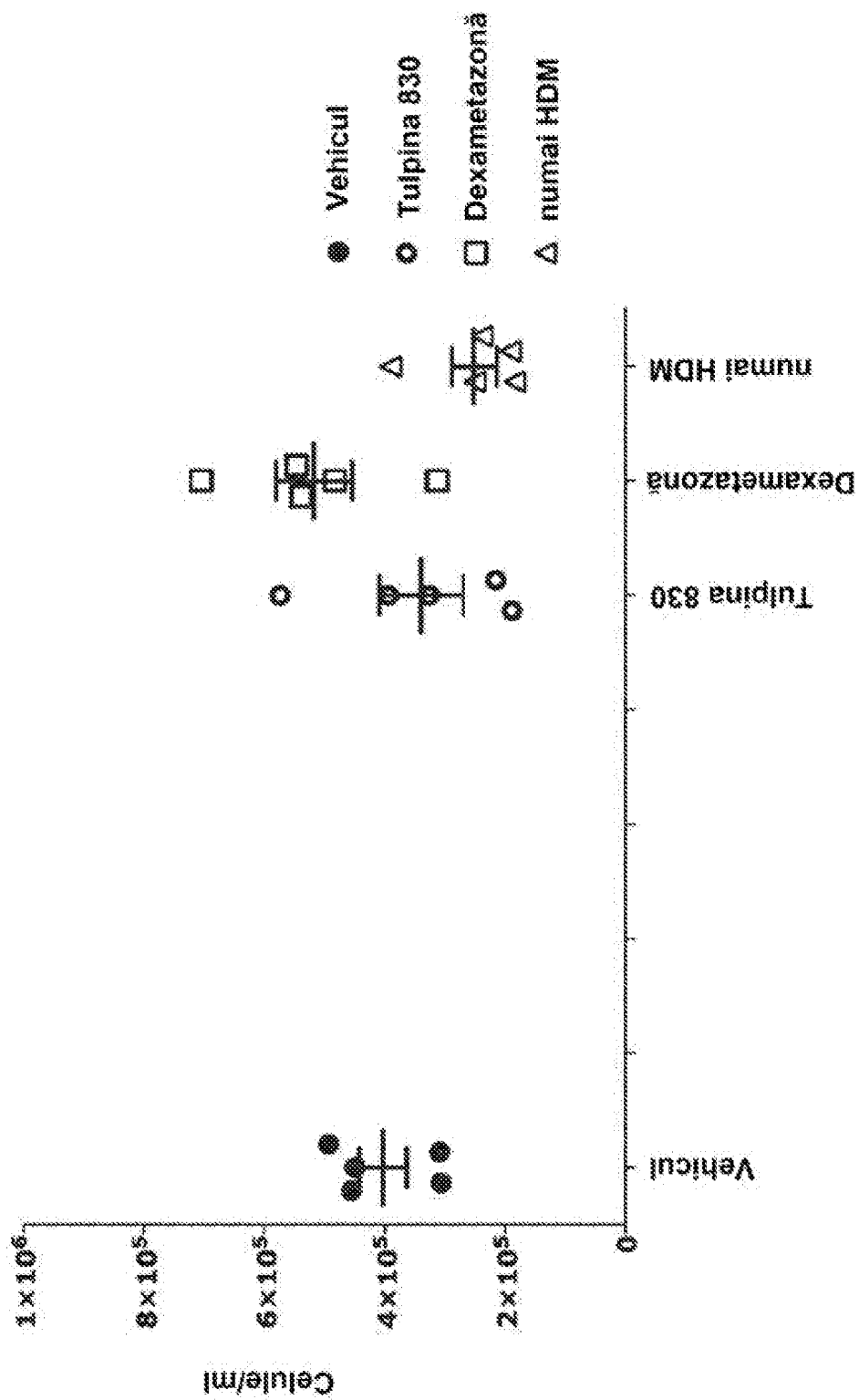
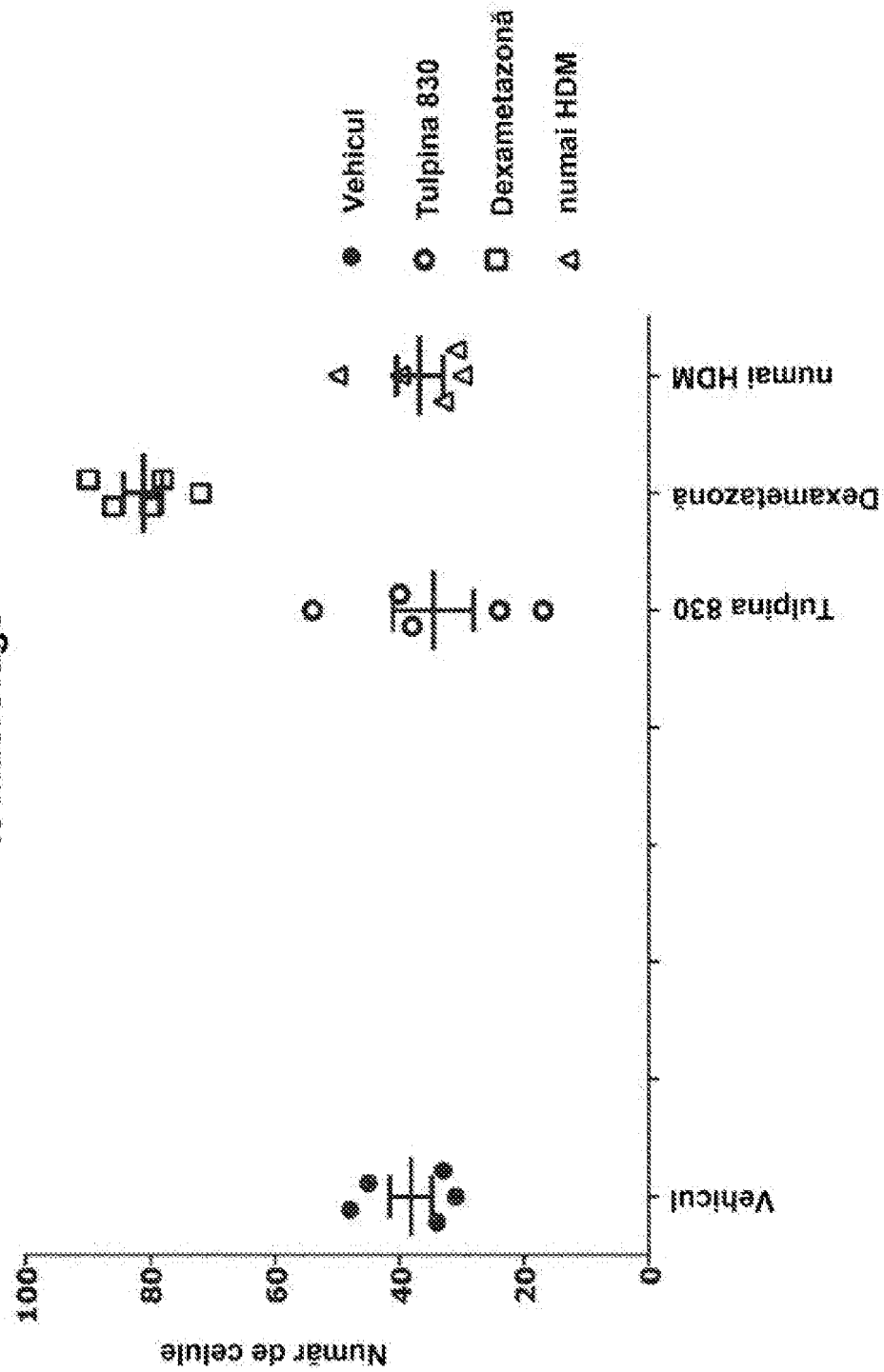
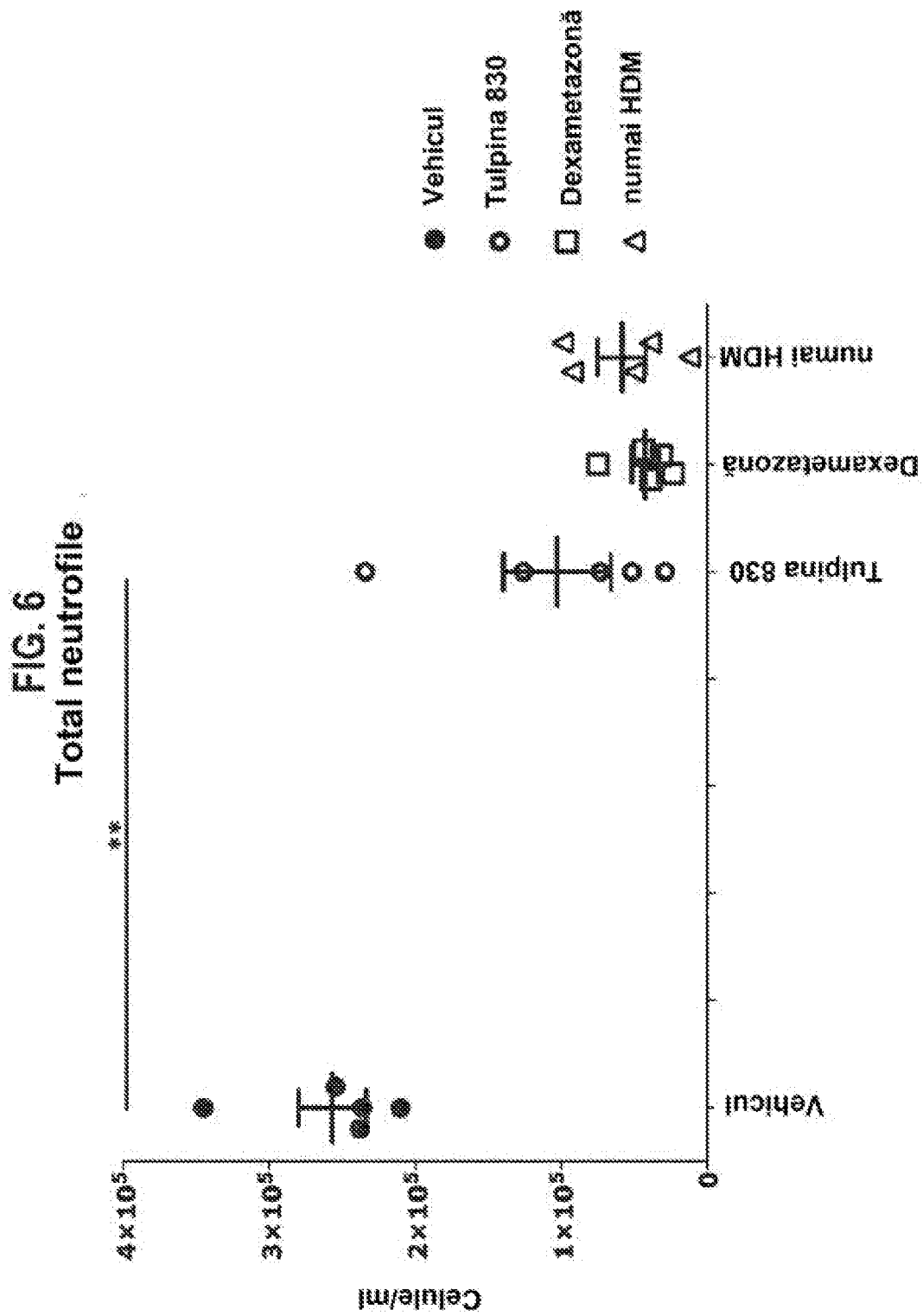


FIG. 5
% macrofage





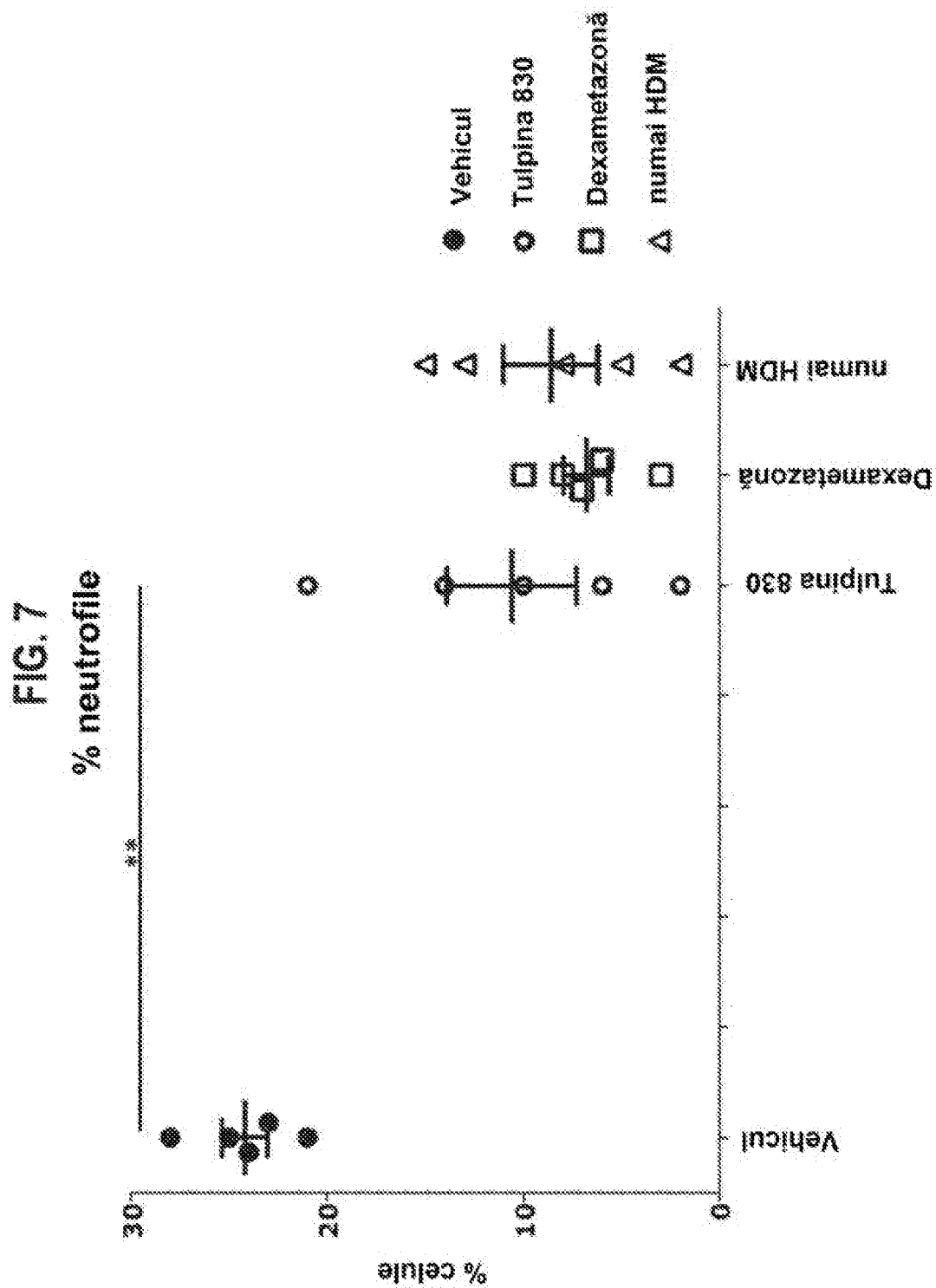
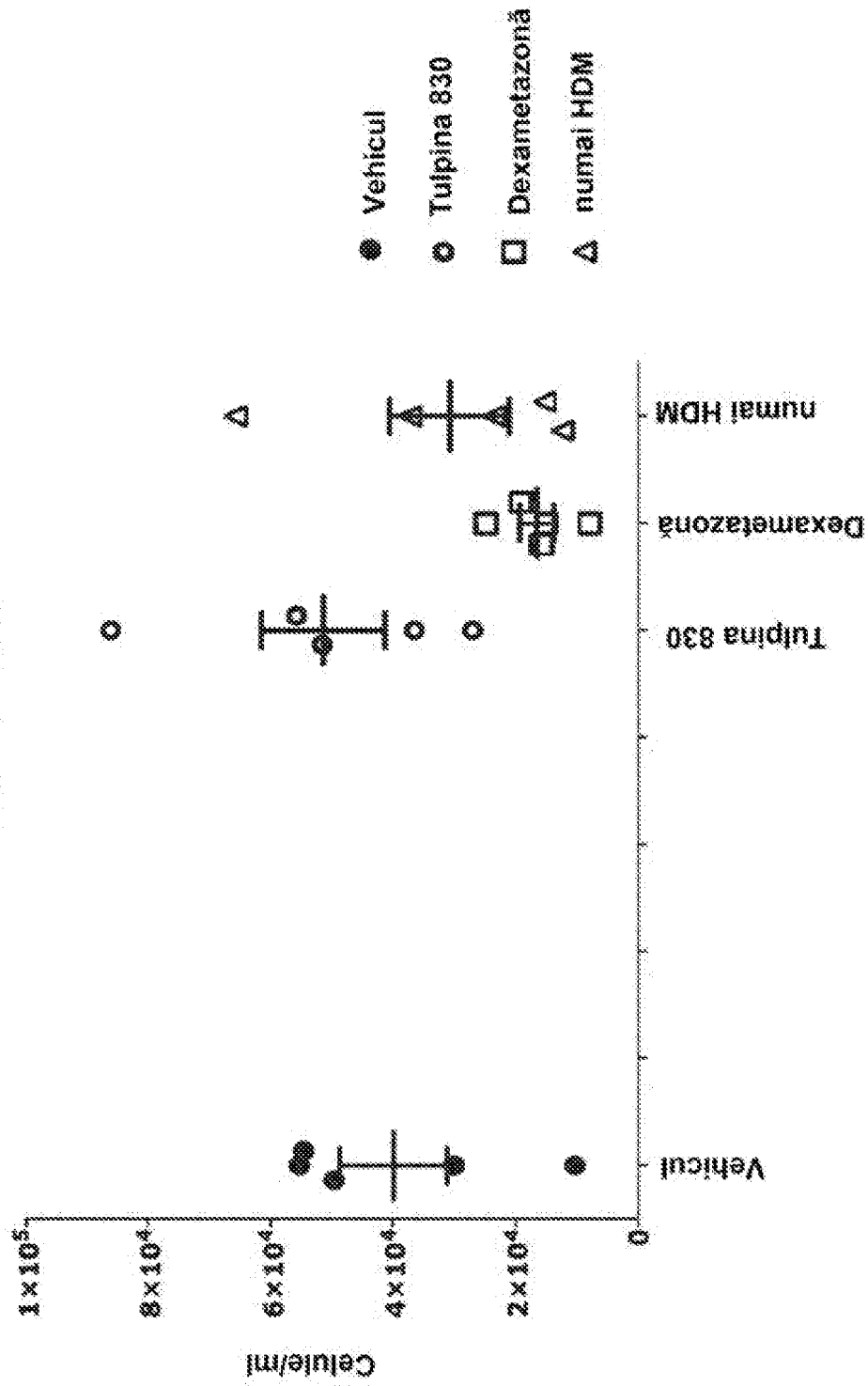


FIG. 8
Total limfocite



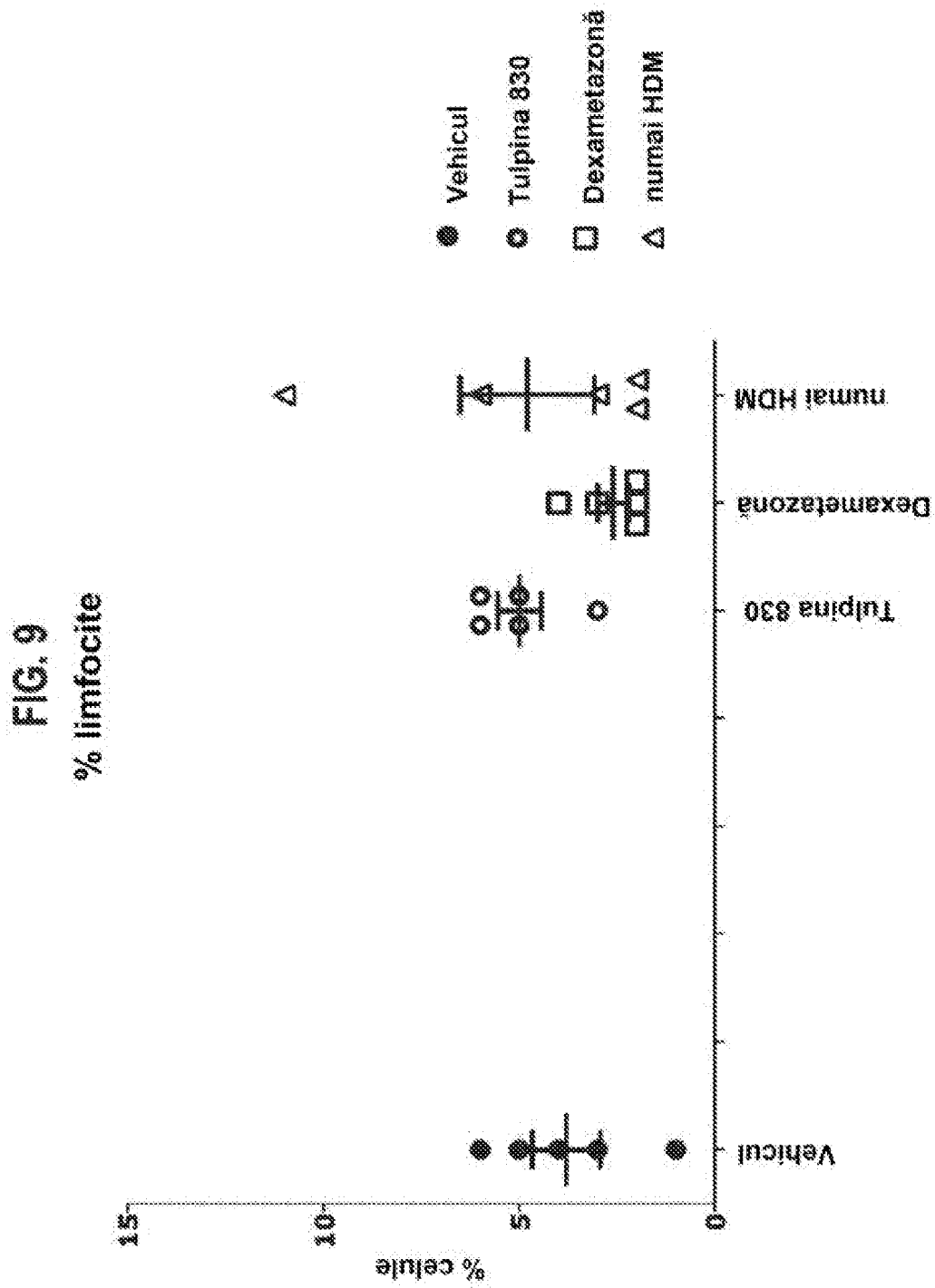


FIG. 10
Număr total de celule

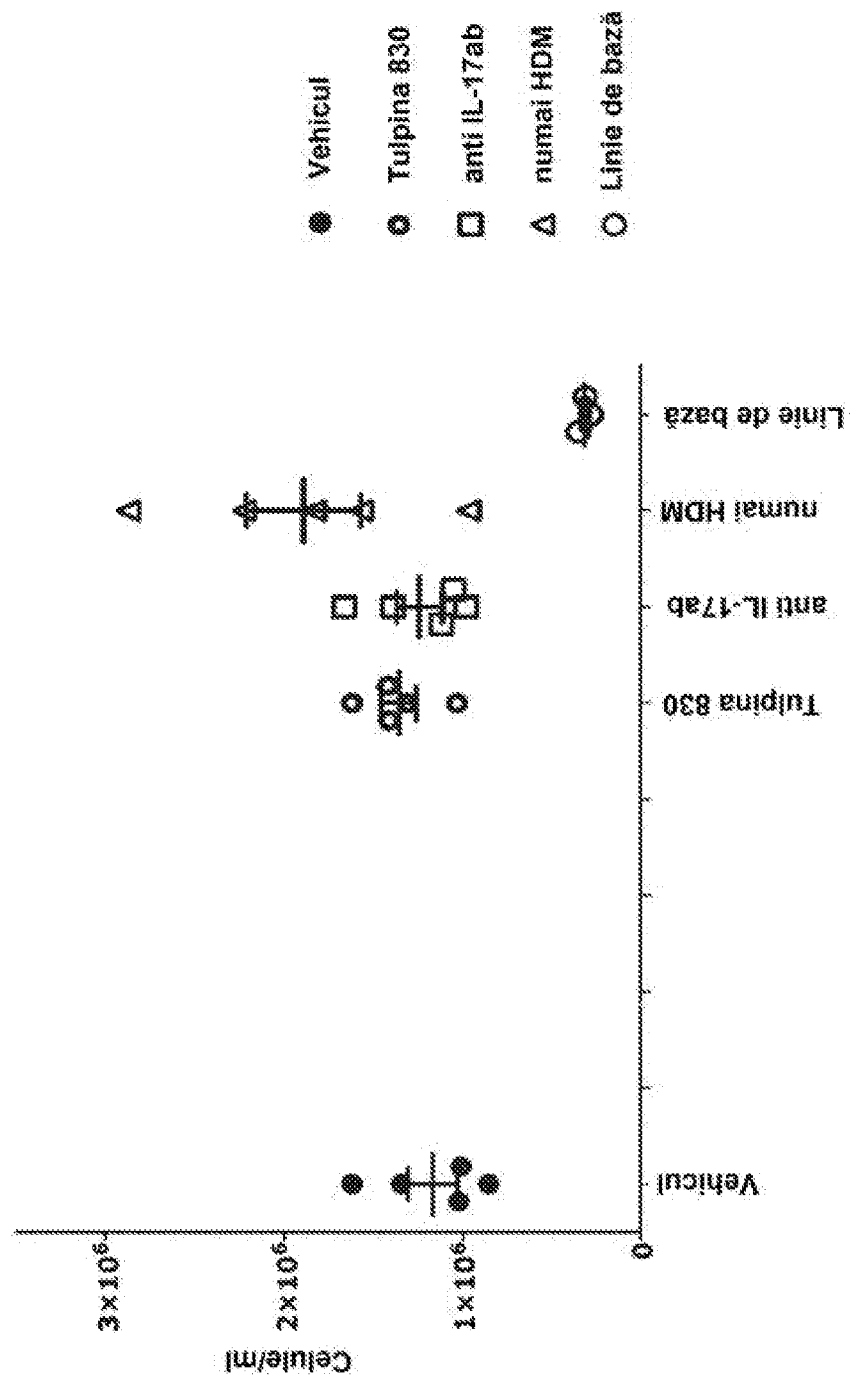


FIG. 11
Total eozinofile

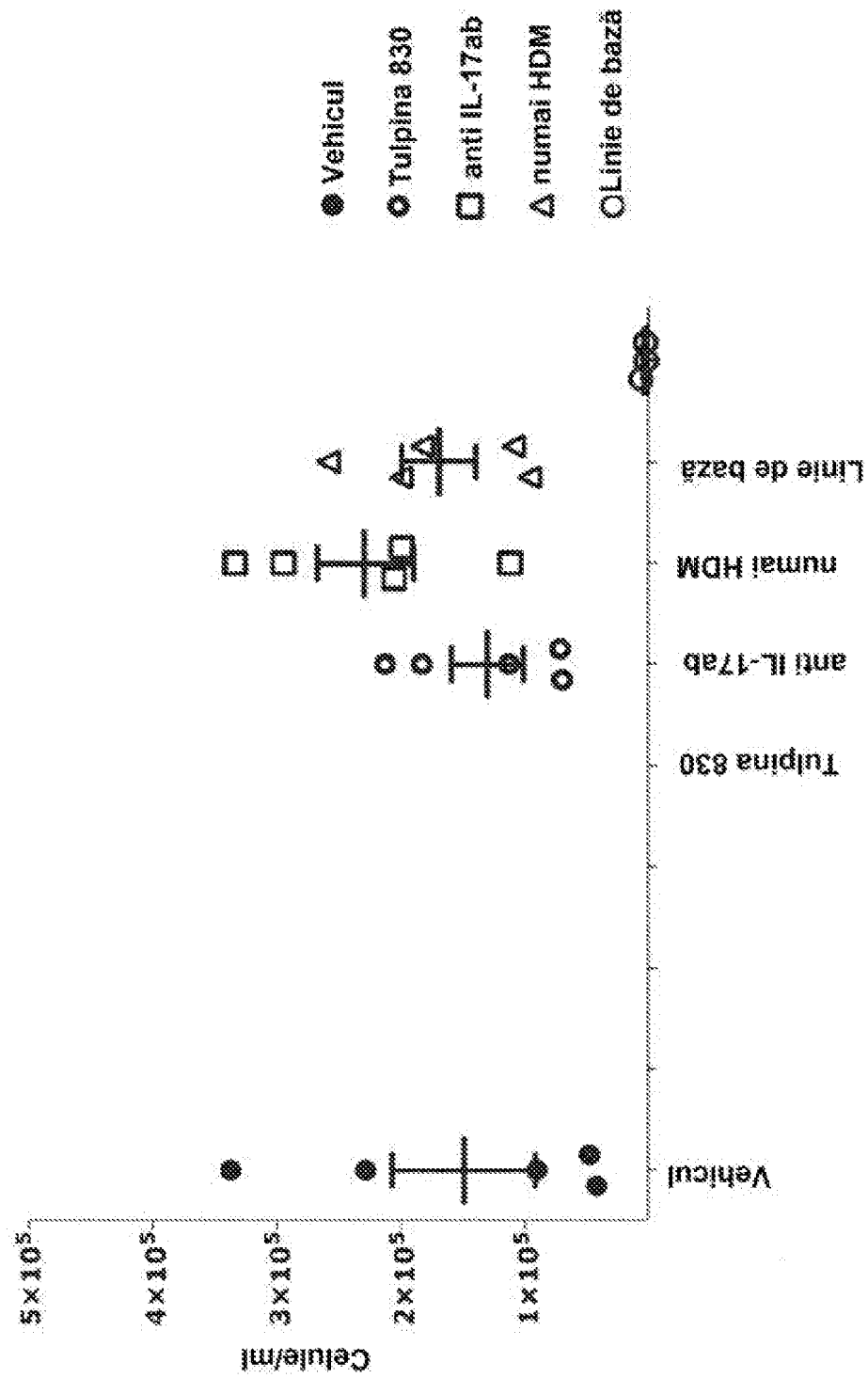


FIG. 12

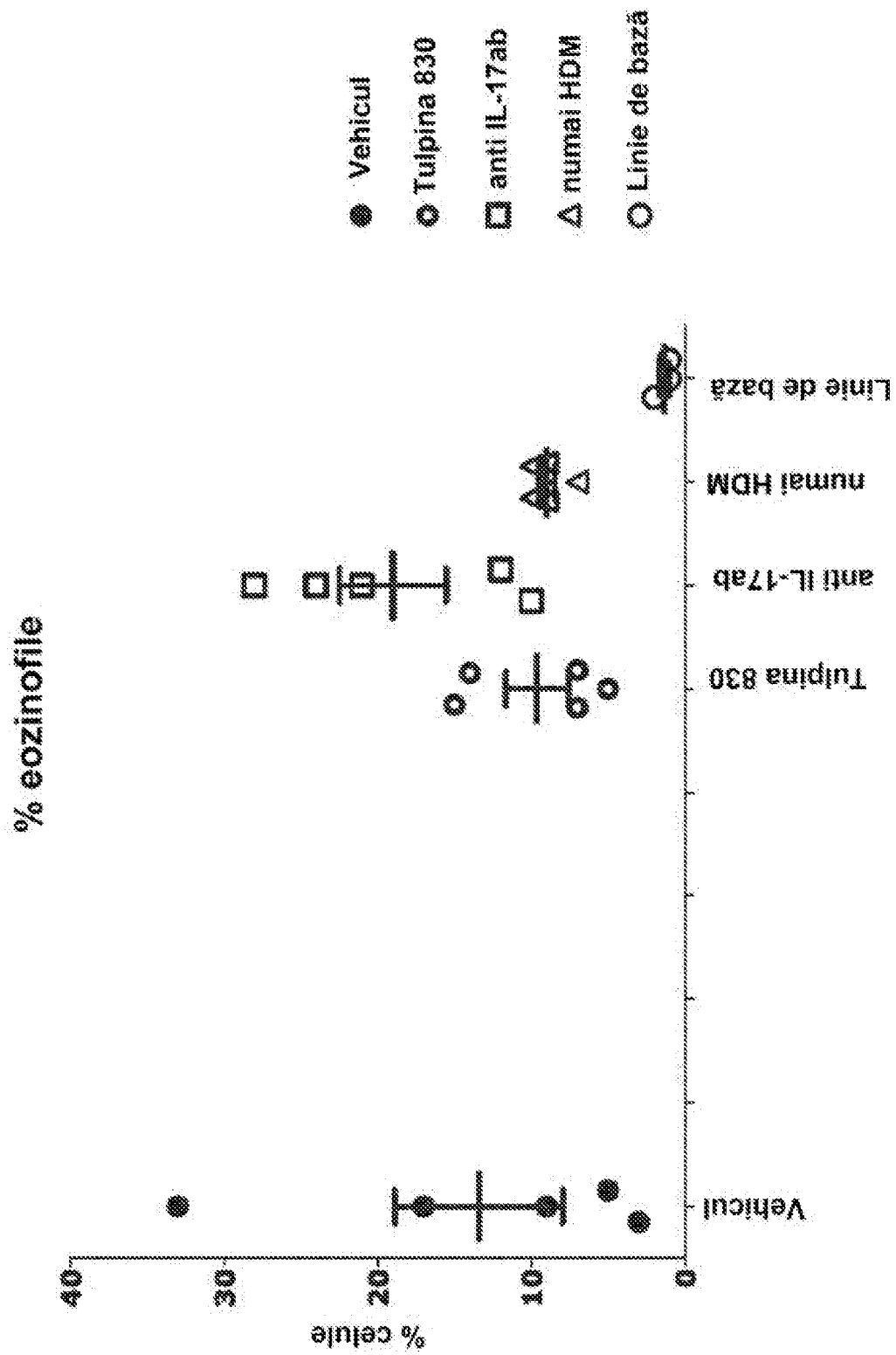


FIG. 13
Total macrofage

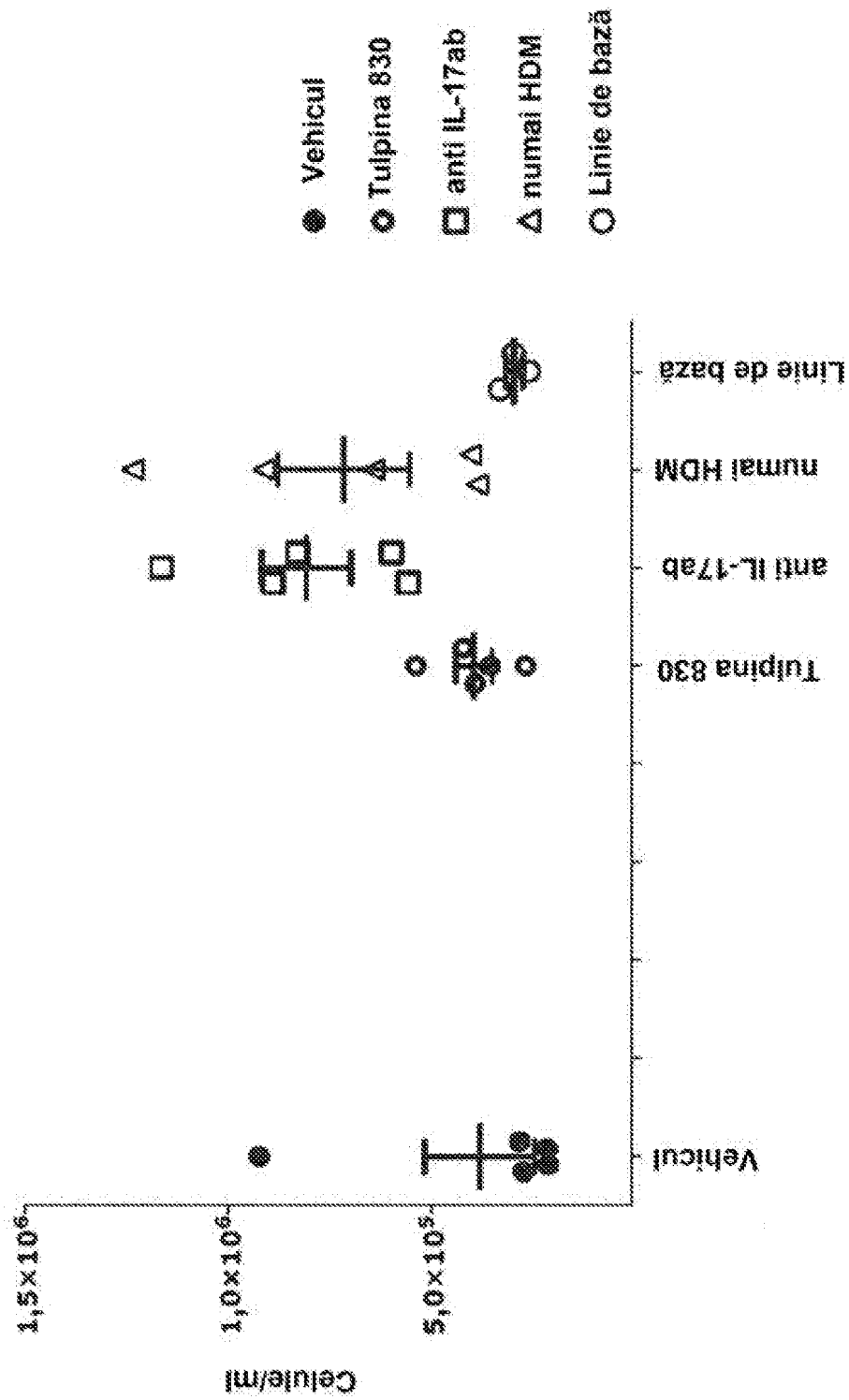


FIG. 14
% macrofage

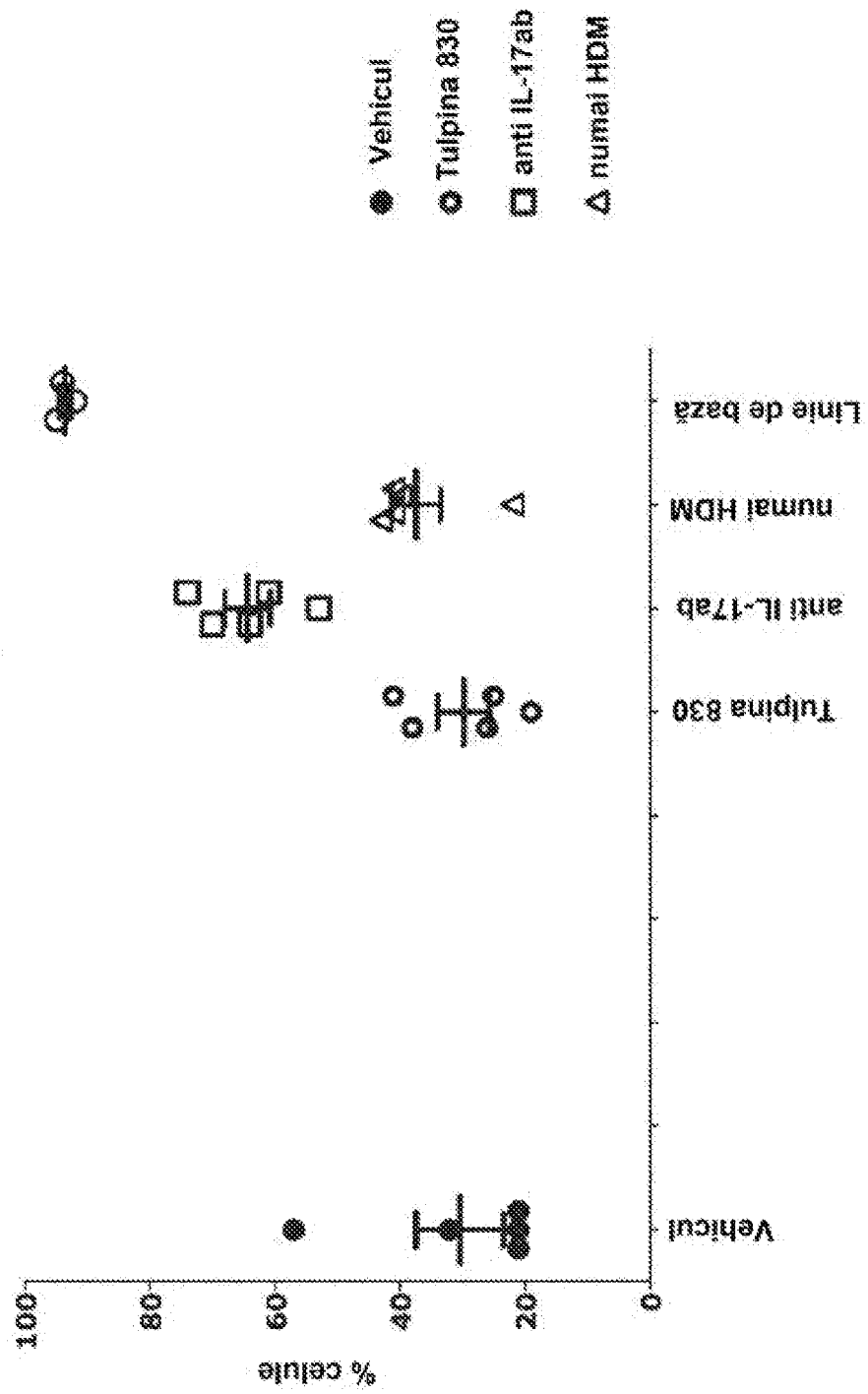


FIG. 15
Total neutrofile

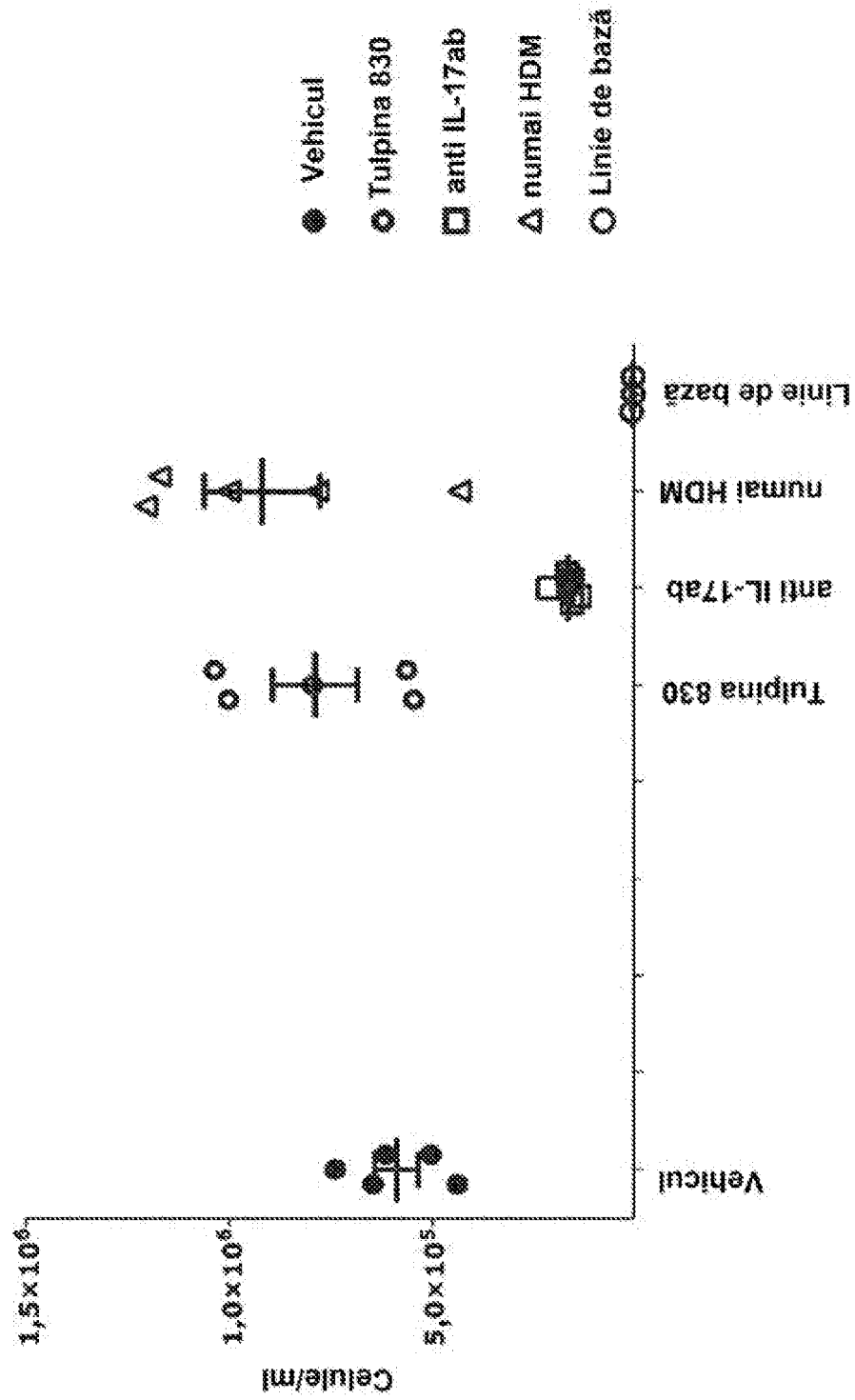


FIG. 16
% neutrofile

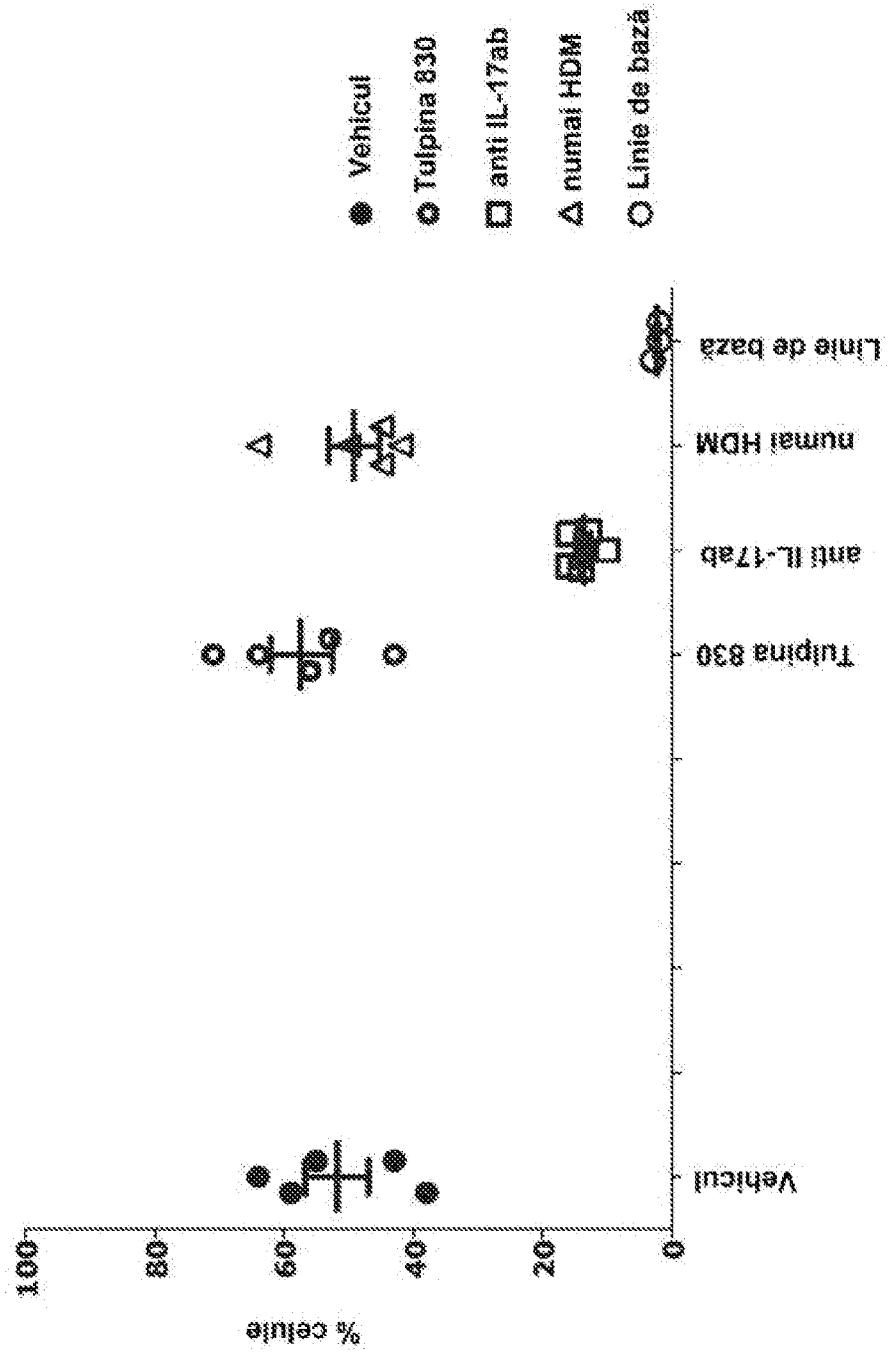


FIG. 17
Total limfocite

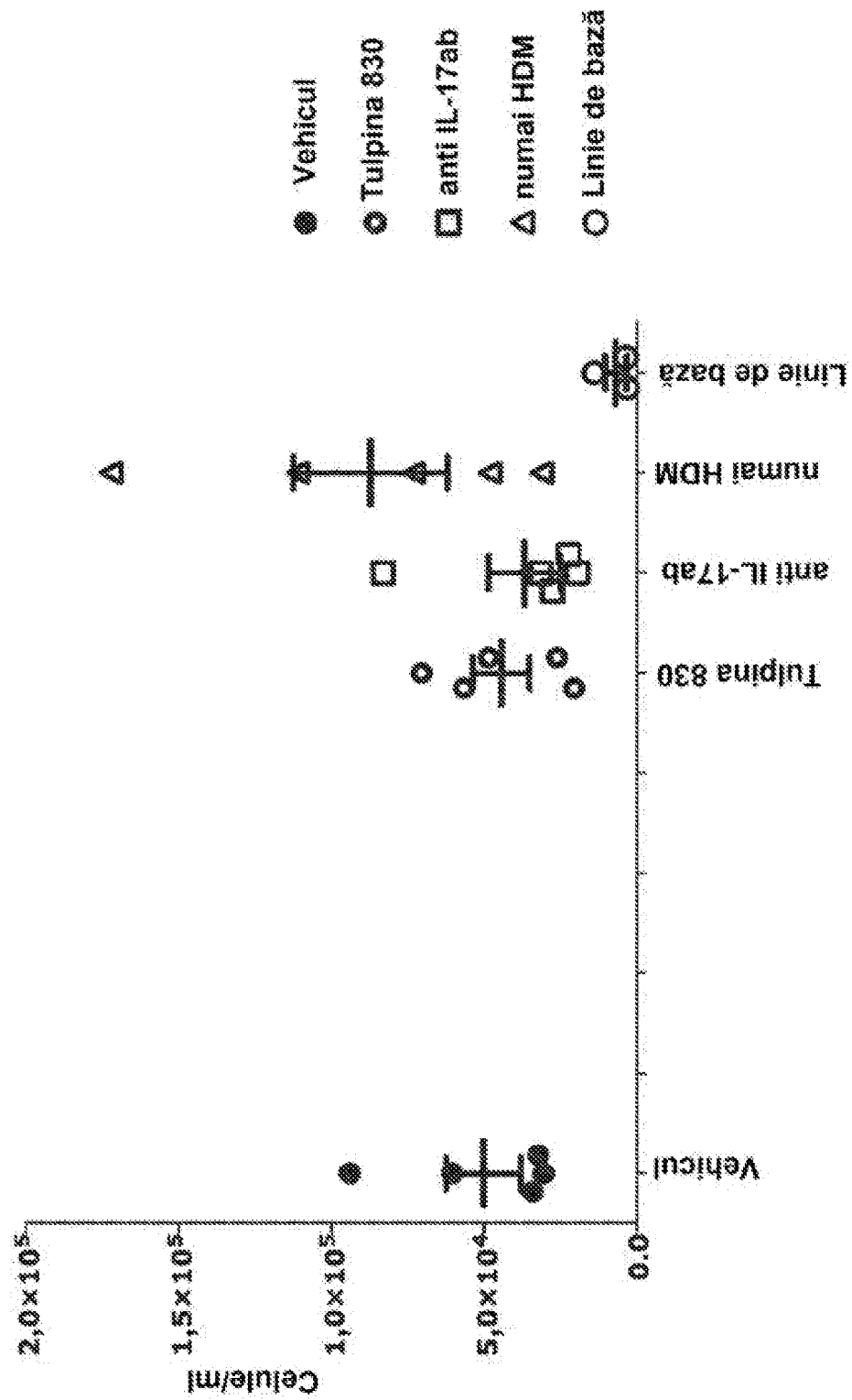


FIG. 18
% limfocite

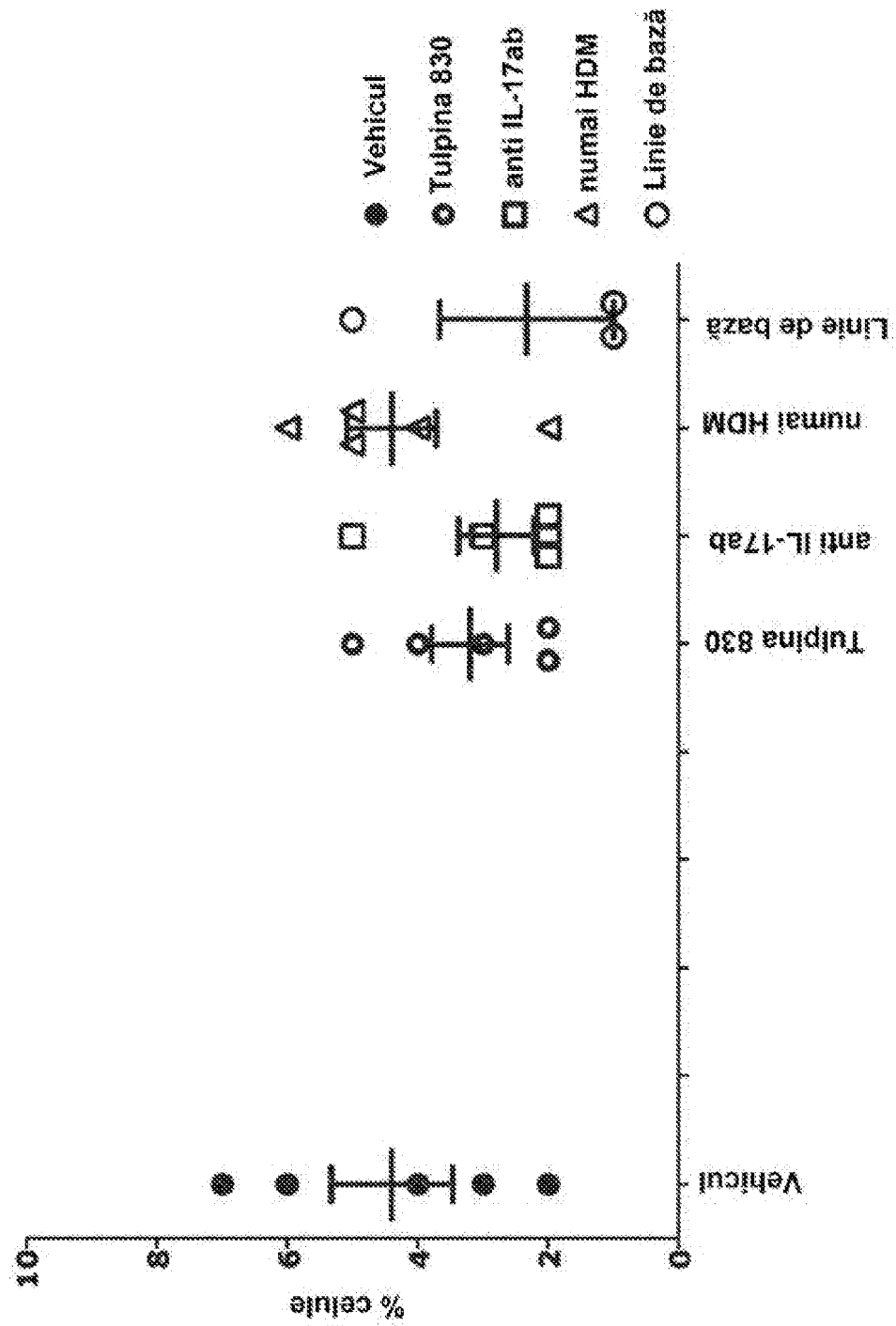


FIG. 19
Greutăți corporale

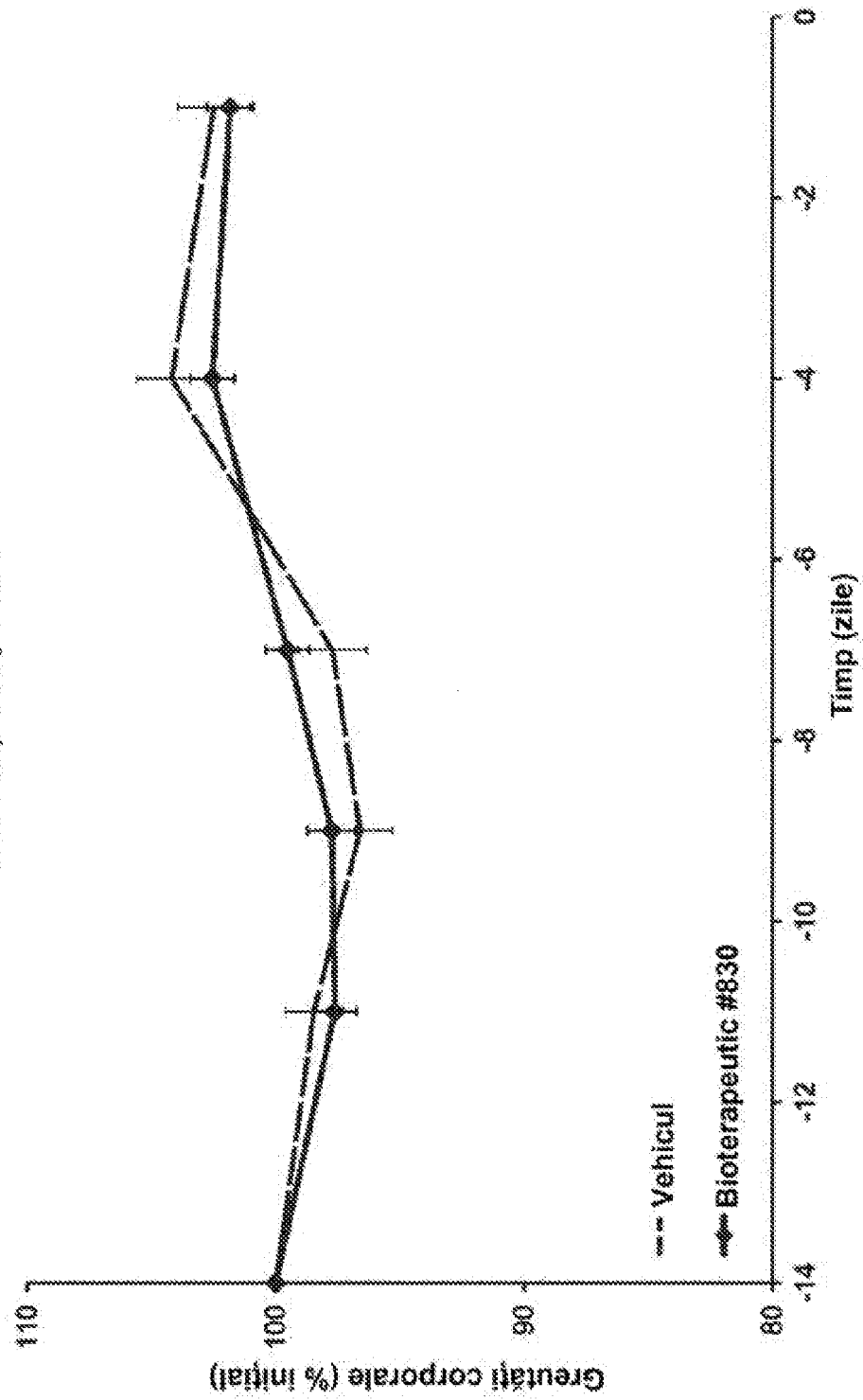


FIG. 20
Greutăți corporale

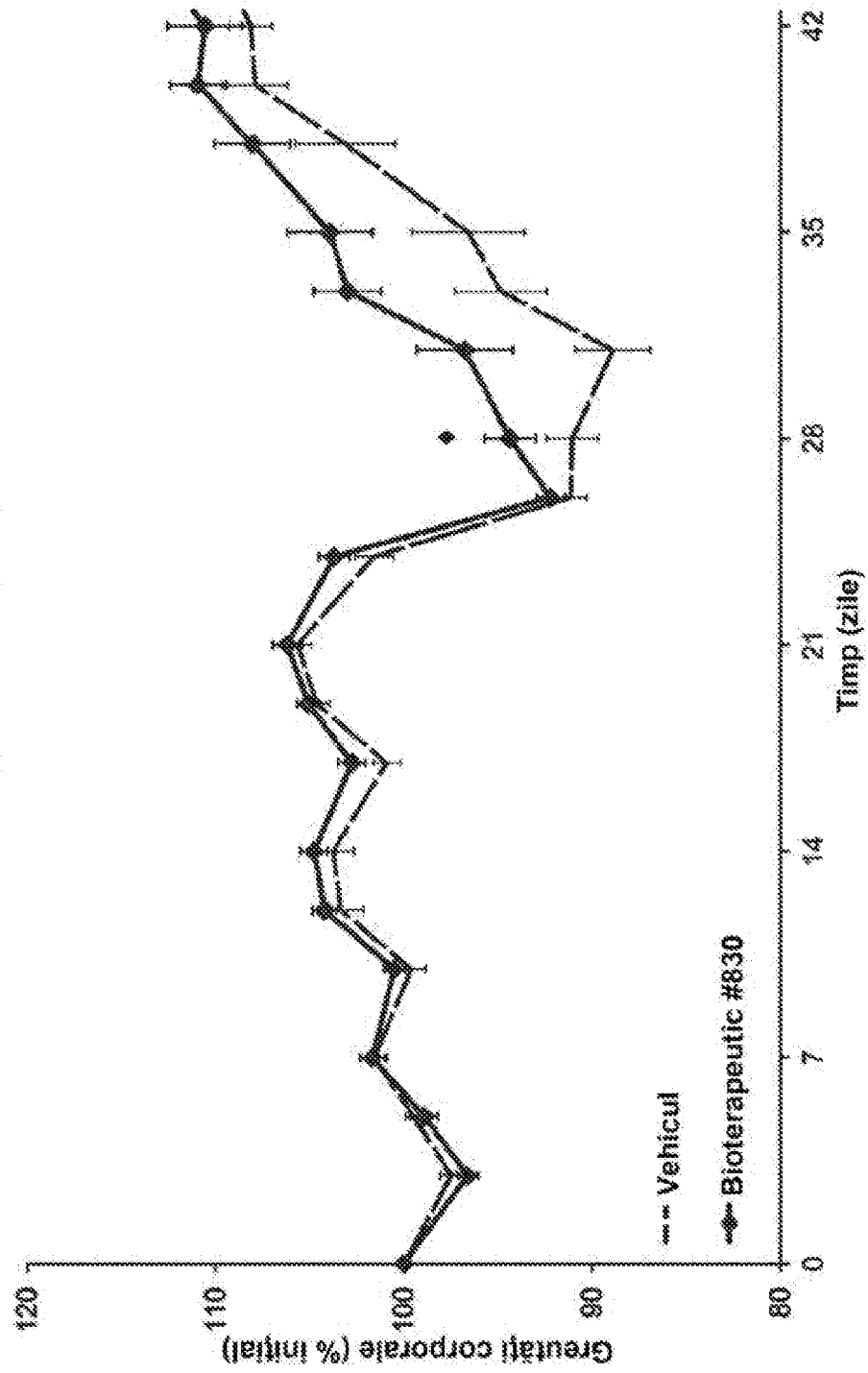
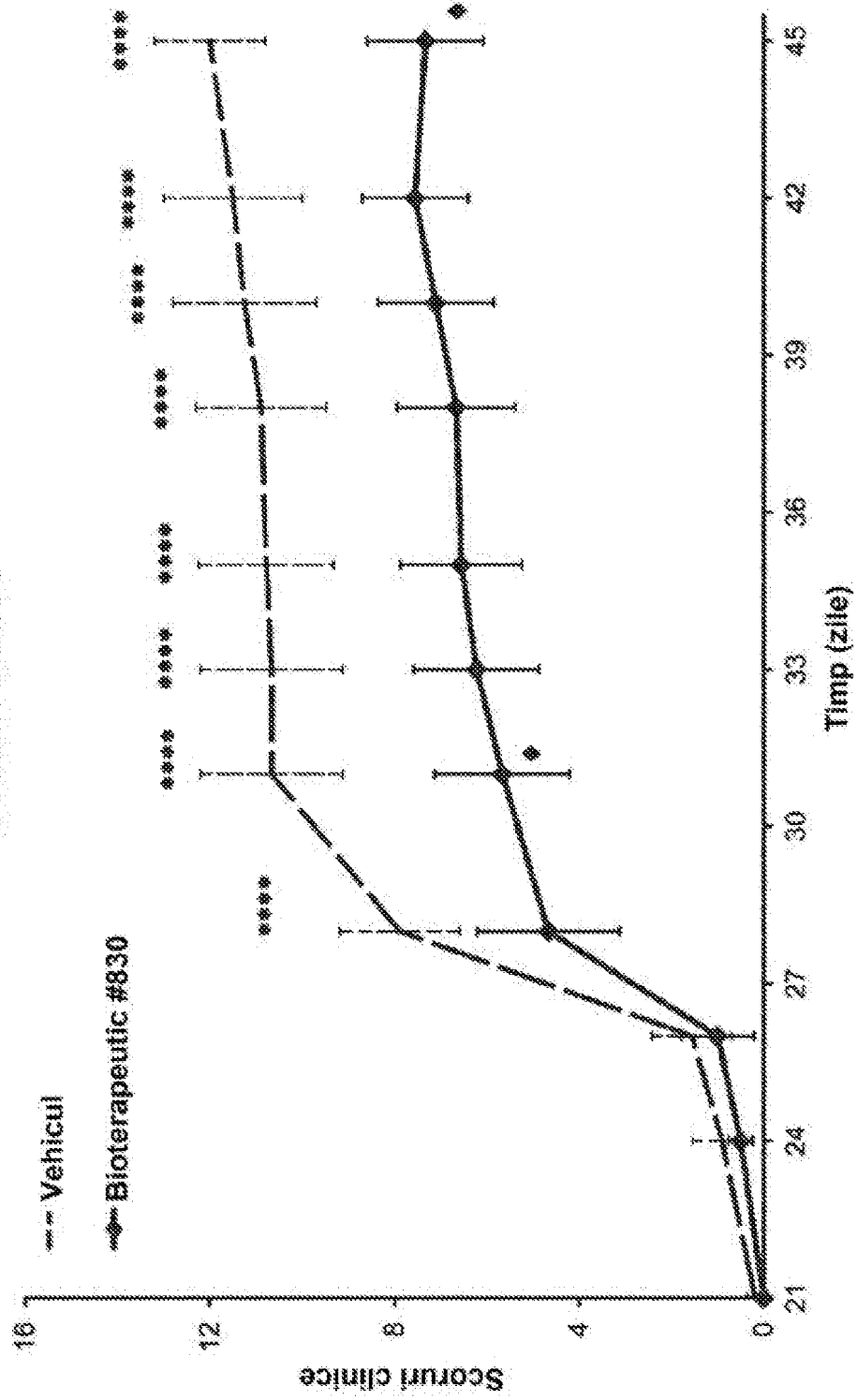


FIG. 21
Scoruri clinice



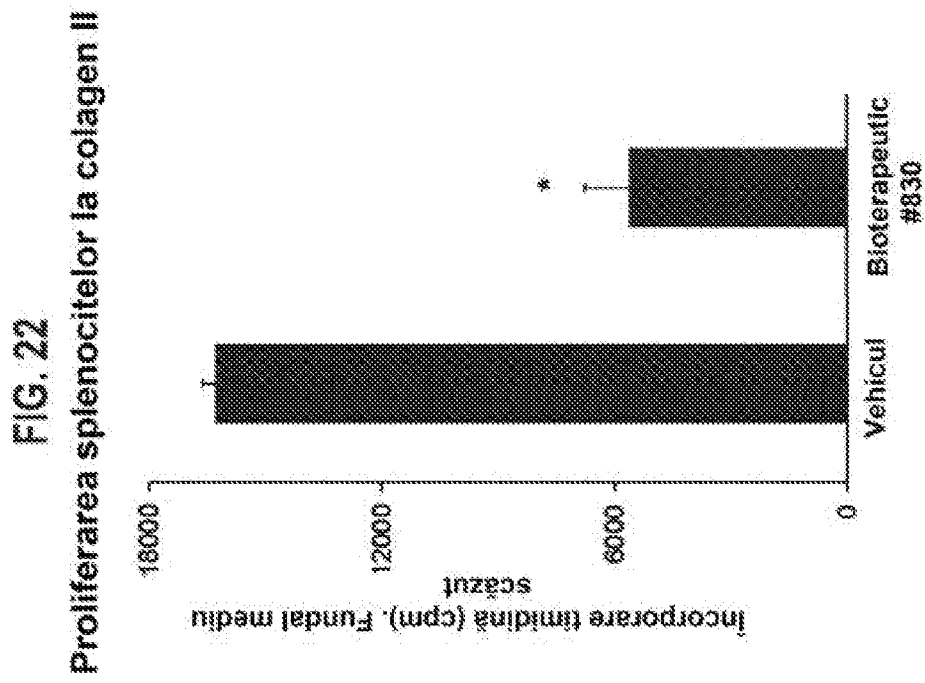
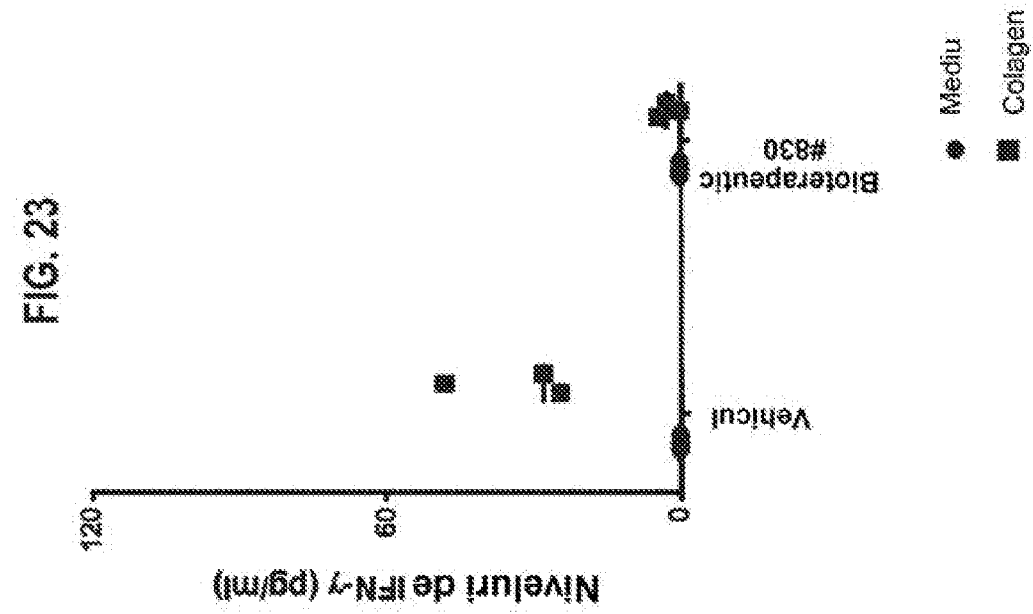


FIG. 25

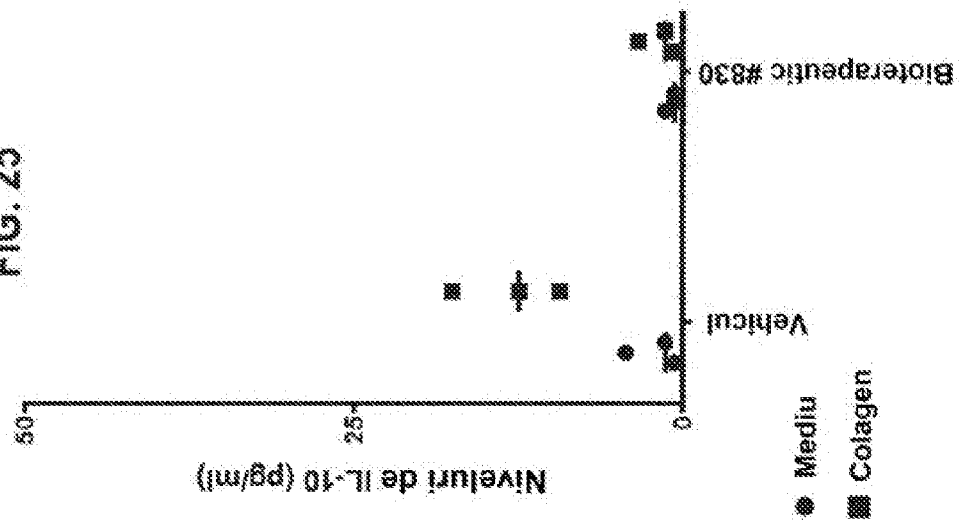


FIG. 24

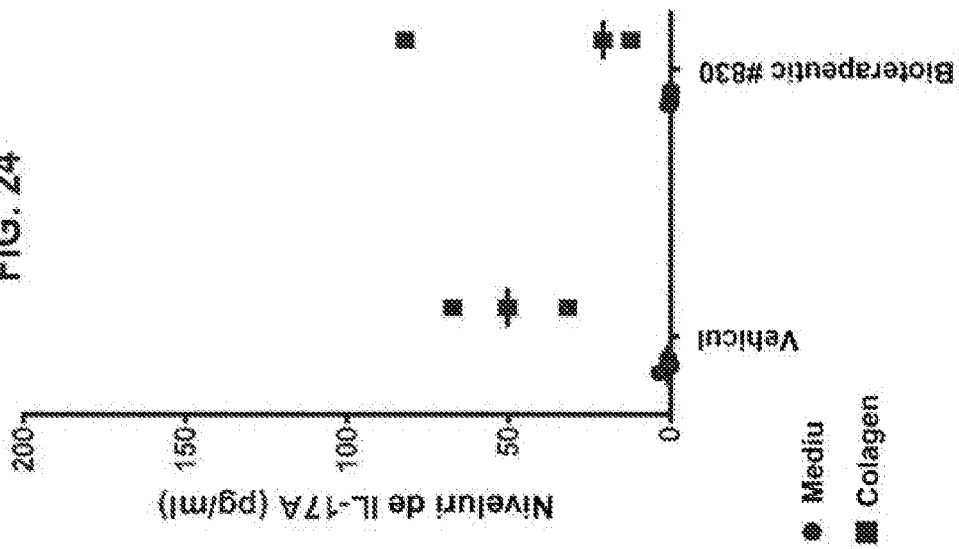


FIG. 26

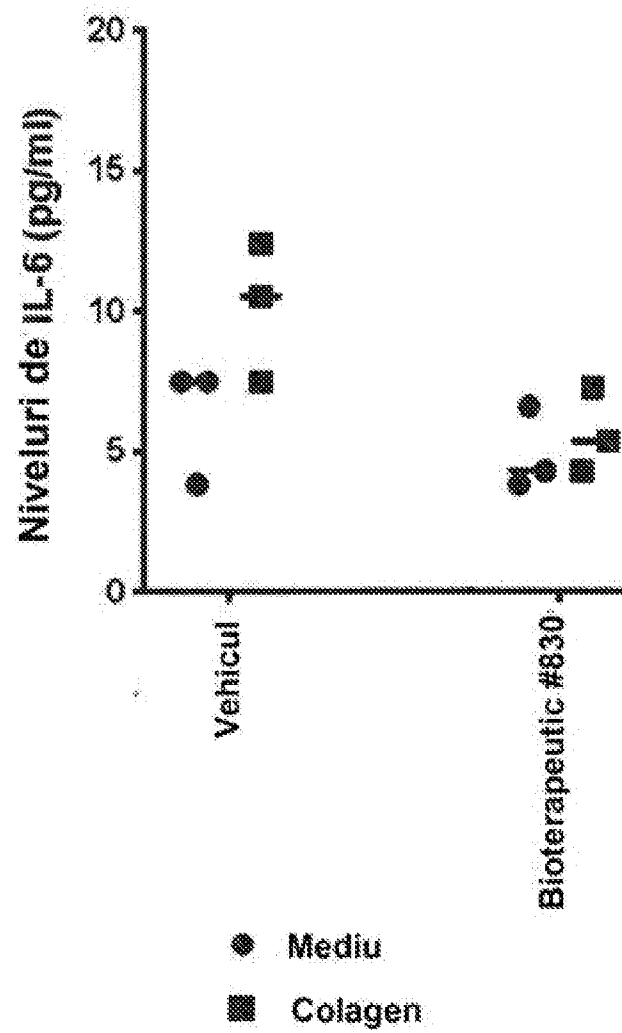


FIG. 27
Total IgE in ser

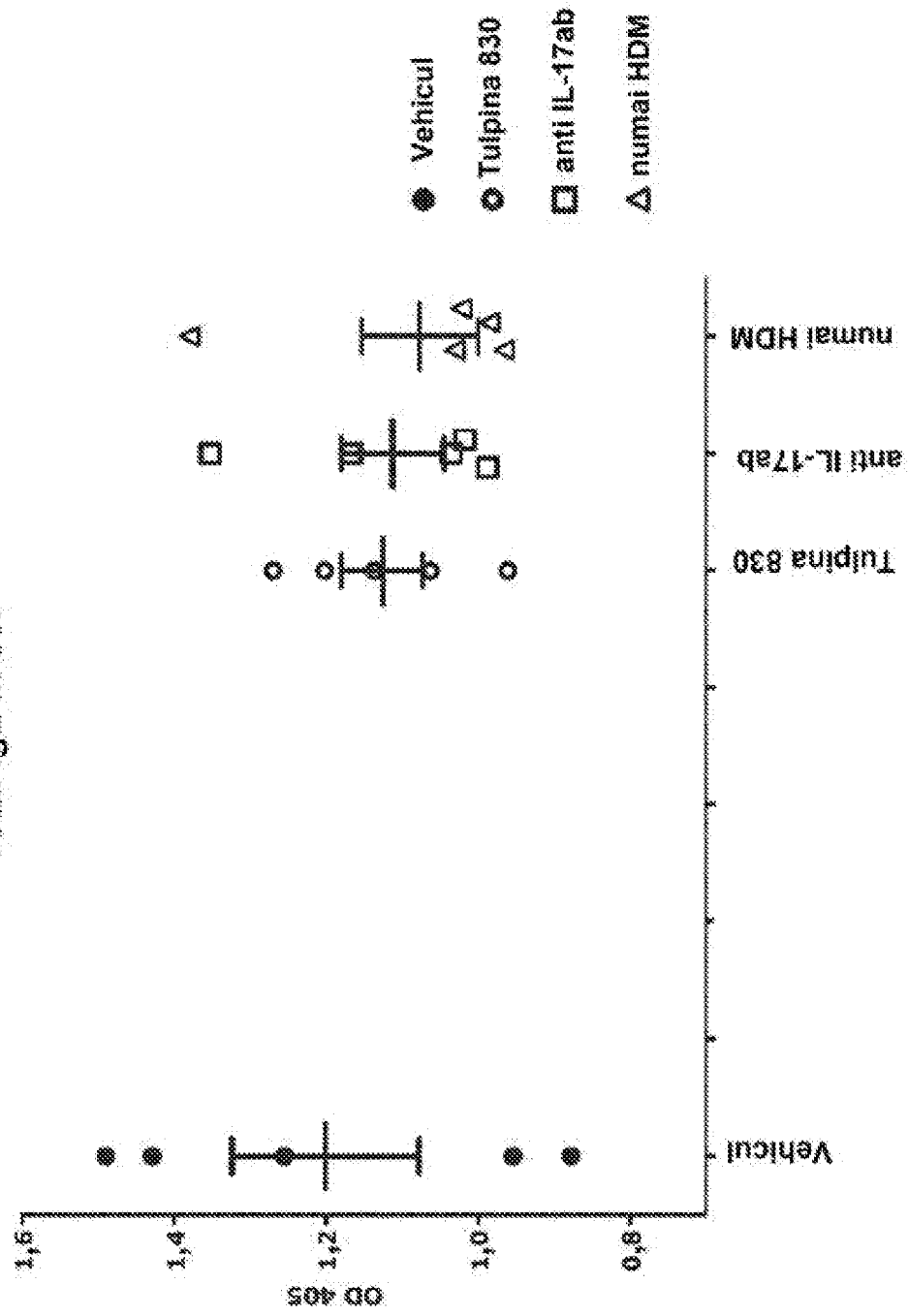


FIG. 28
IgG1 specific HDM in ser

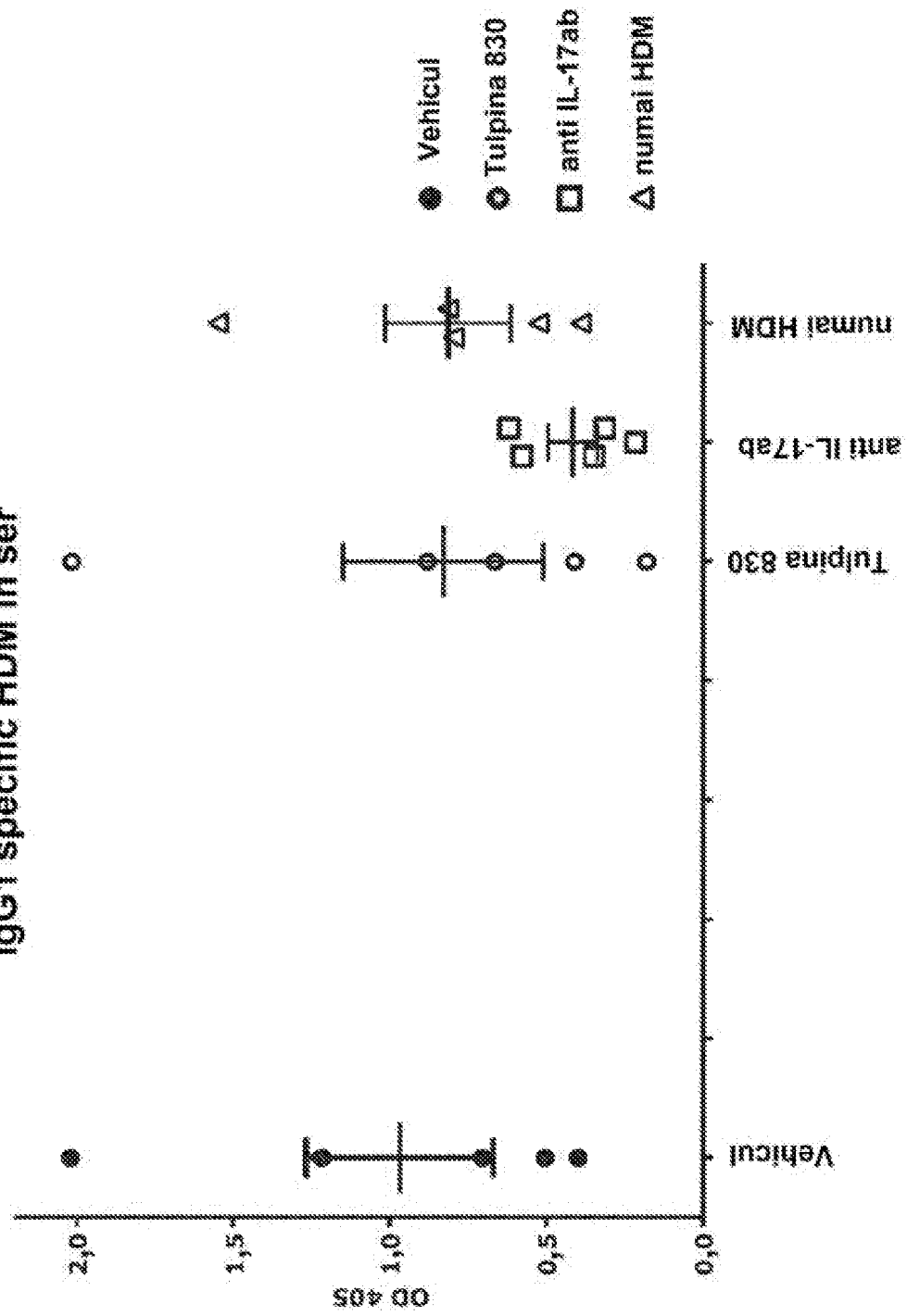


FIG. 29
Total IgE in BALF

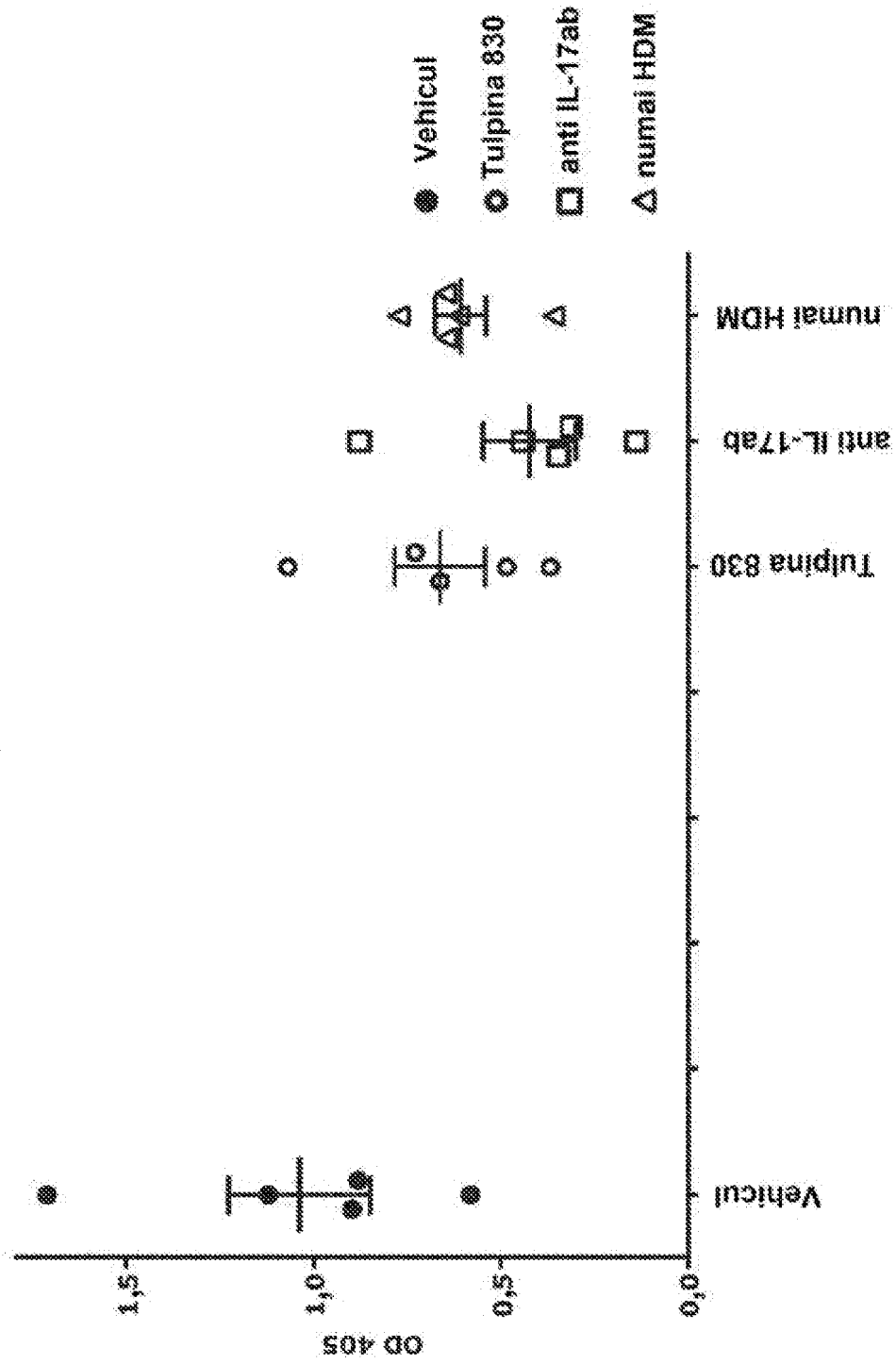


FIG. 30
IgG1 specific HDM in BALF

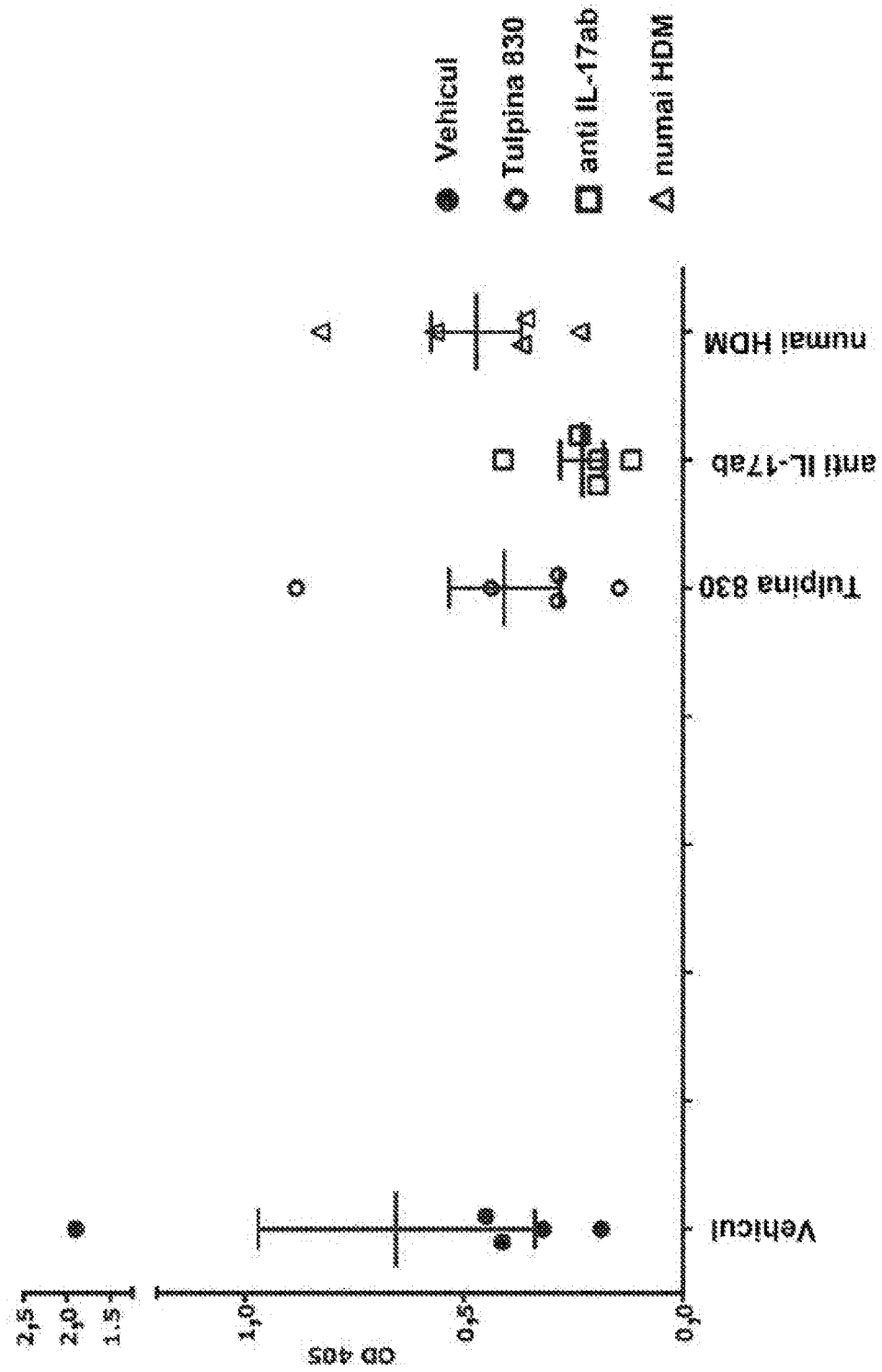


FIG. 31 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare peribronheolară

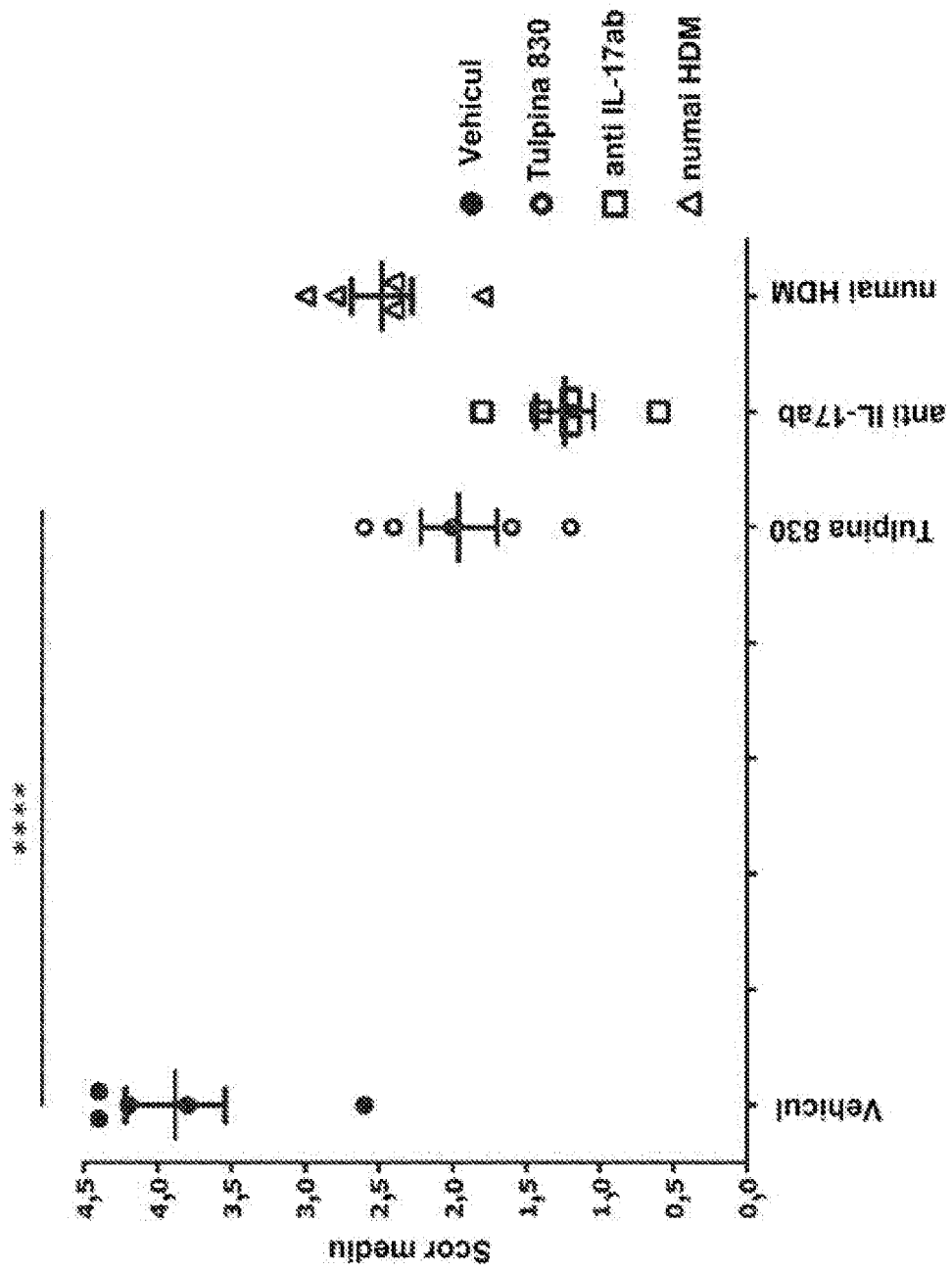


FIG. 32 Analiză histologică - Scor de infiltrare perivasculară

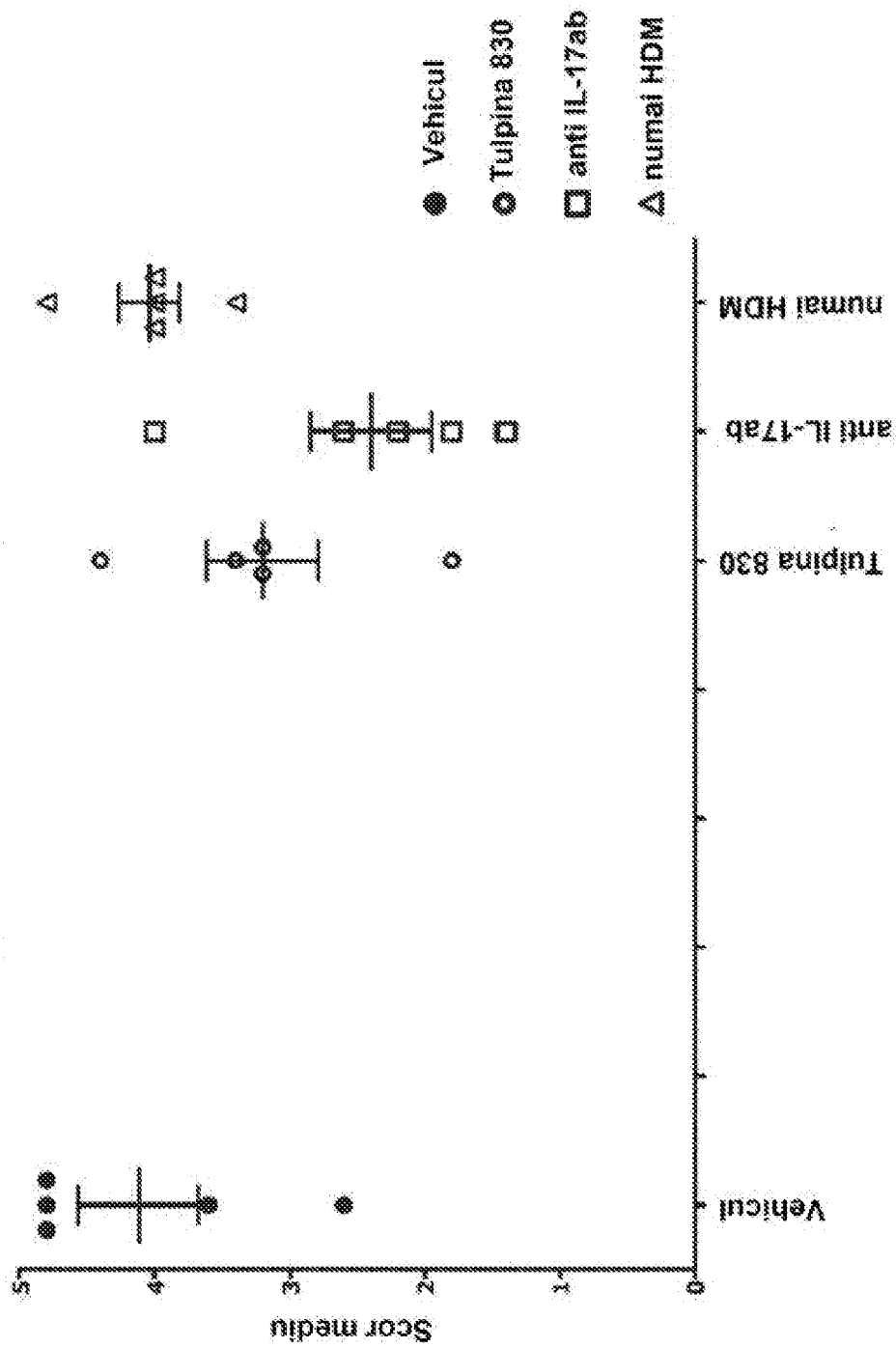


FIG. 33 Analiză histologică - Scor mediu inflamator (media ambelor scoruri de infiltrare, peribronheolar și perivascular)

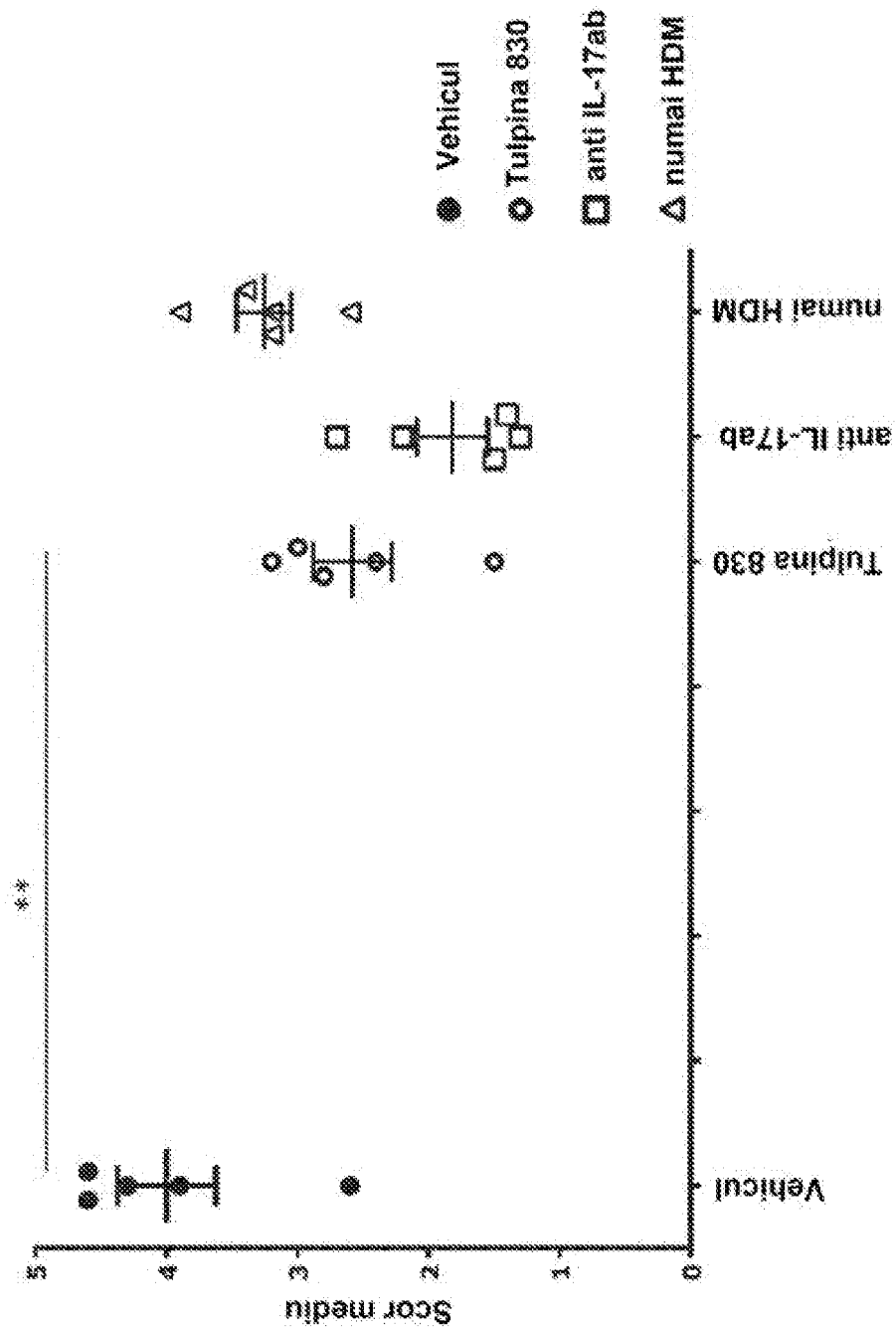


FIG. 34 Analiză histologică - scor mucozal

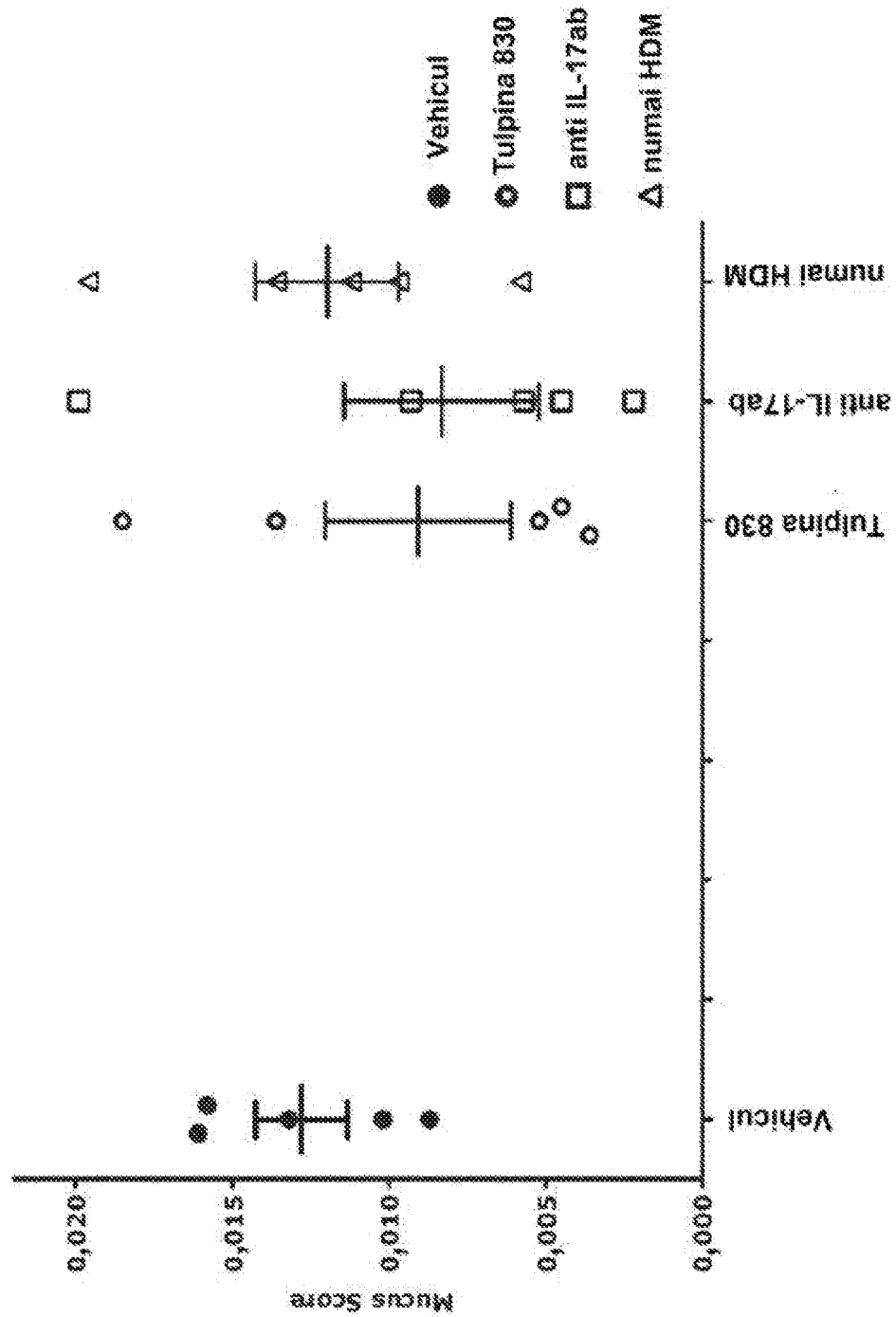


FIG. 35
Nivelul IL-9 în țesutul pulmonar

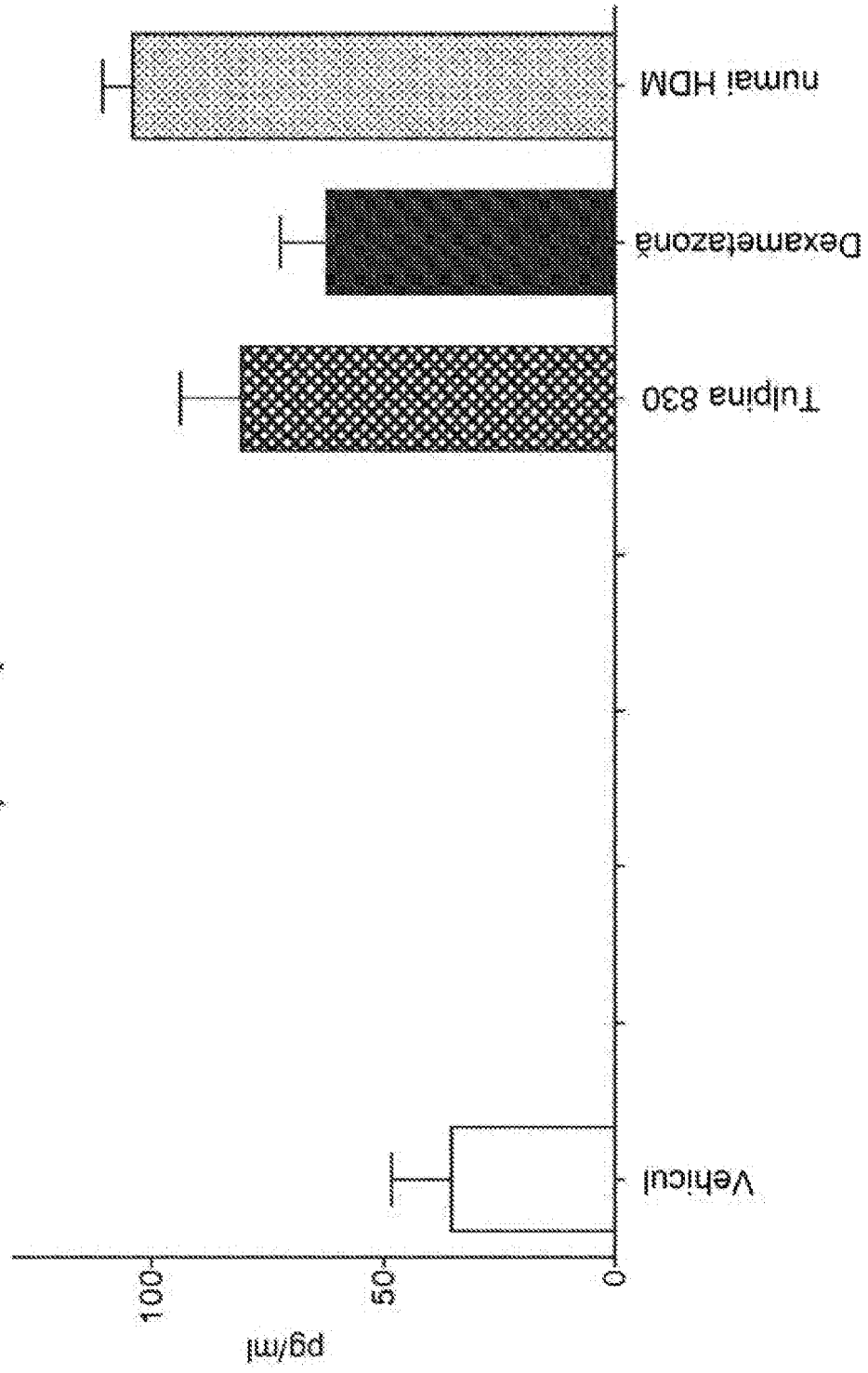


FIG. 36
Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar

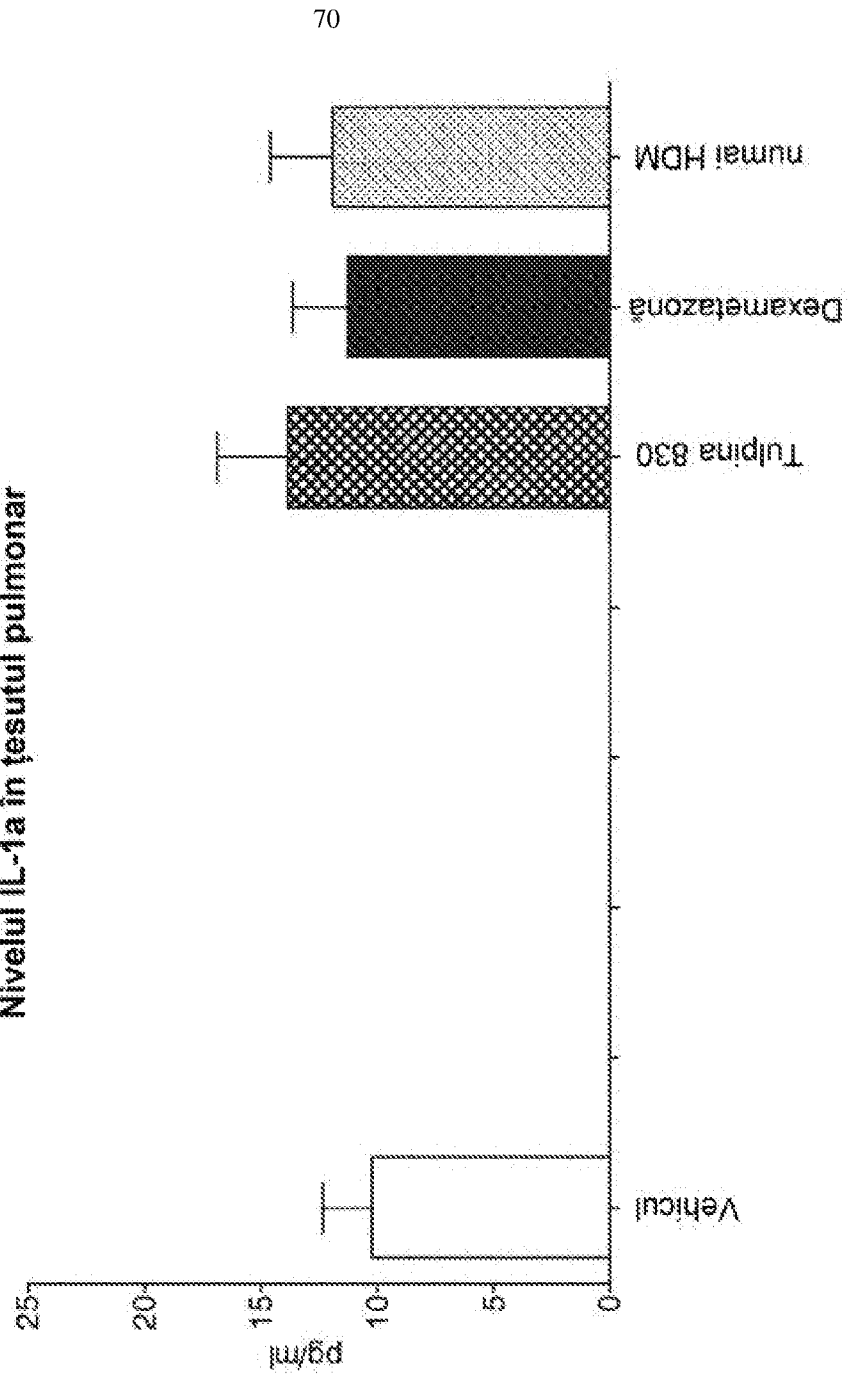


FIG. 37
Nivelul IFHg în țesutul pulmonar

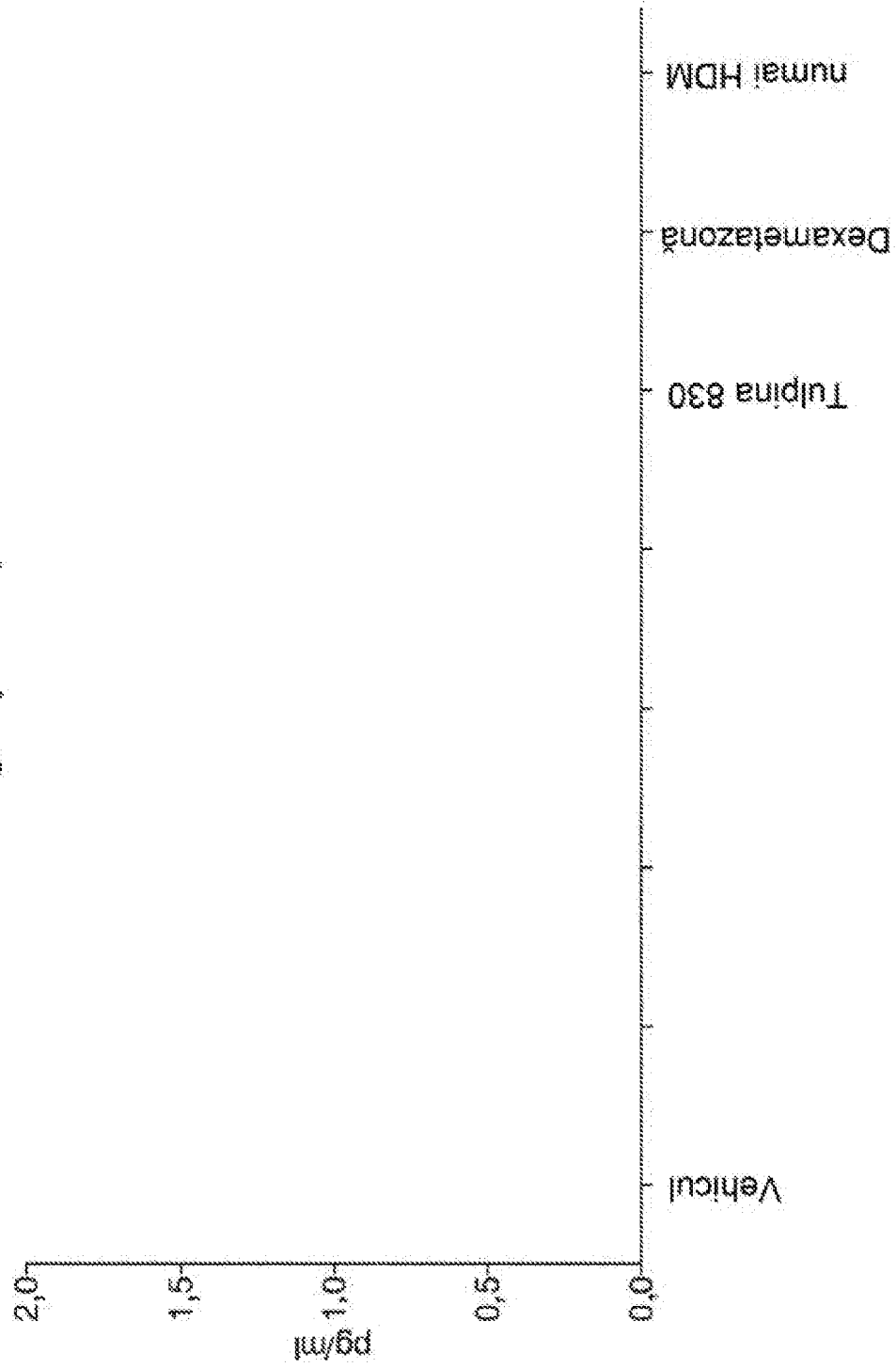


FIG. 38
Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar

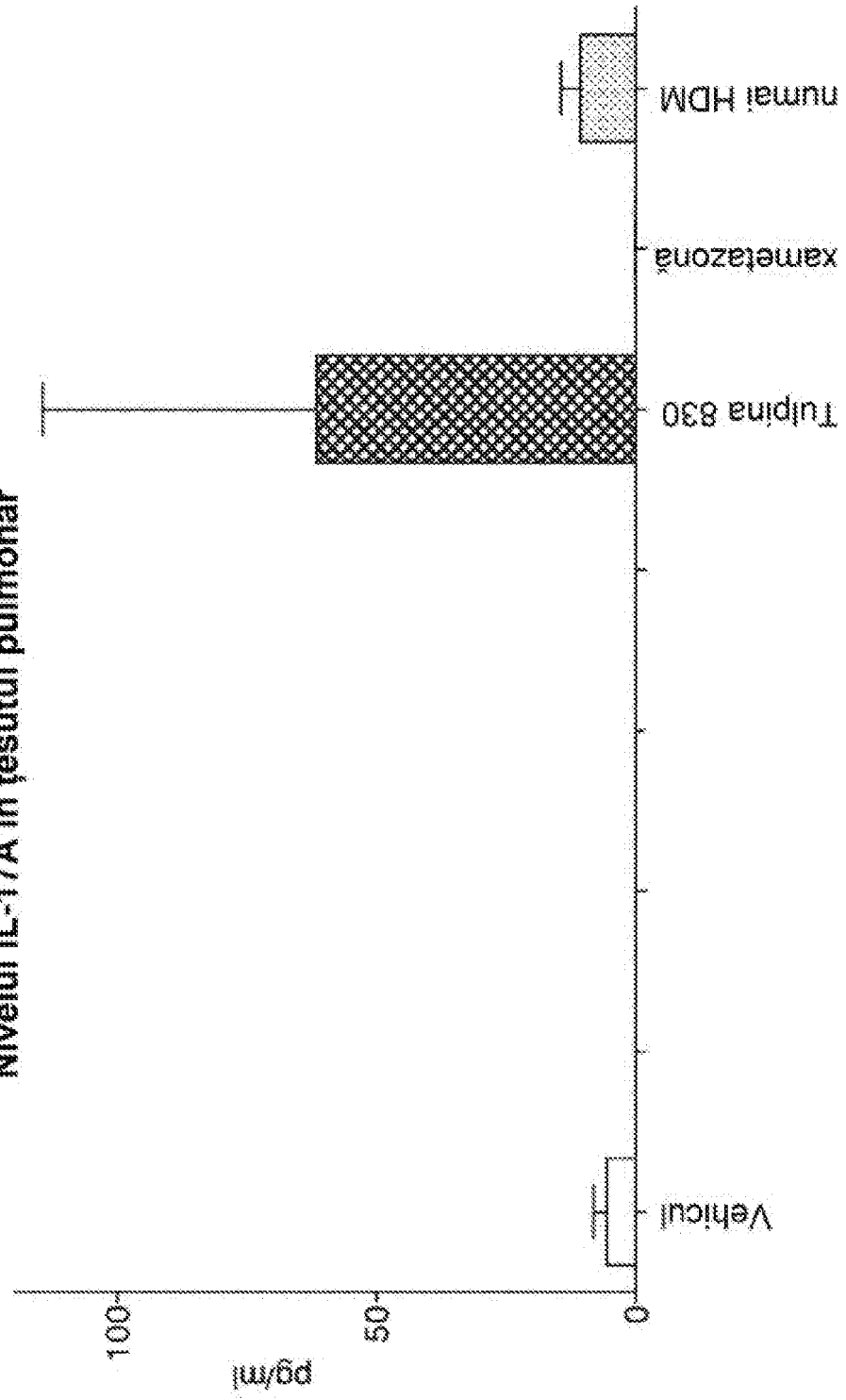


FIG. 39
Nivelul IL-4 în țesutul pulmonar

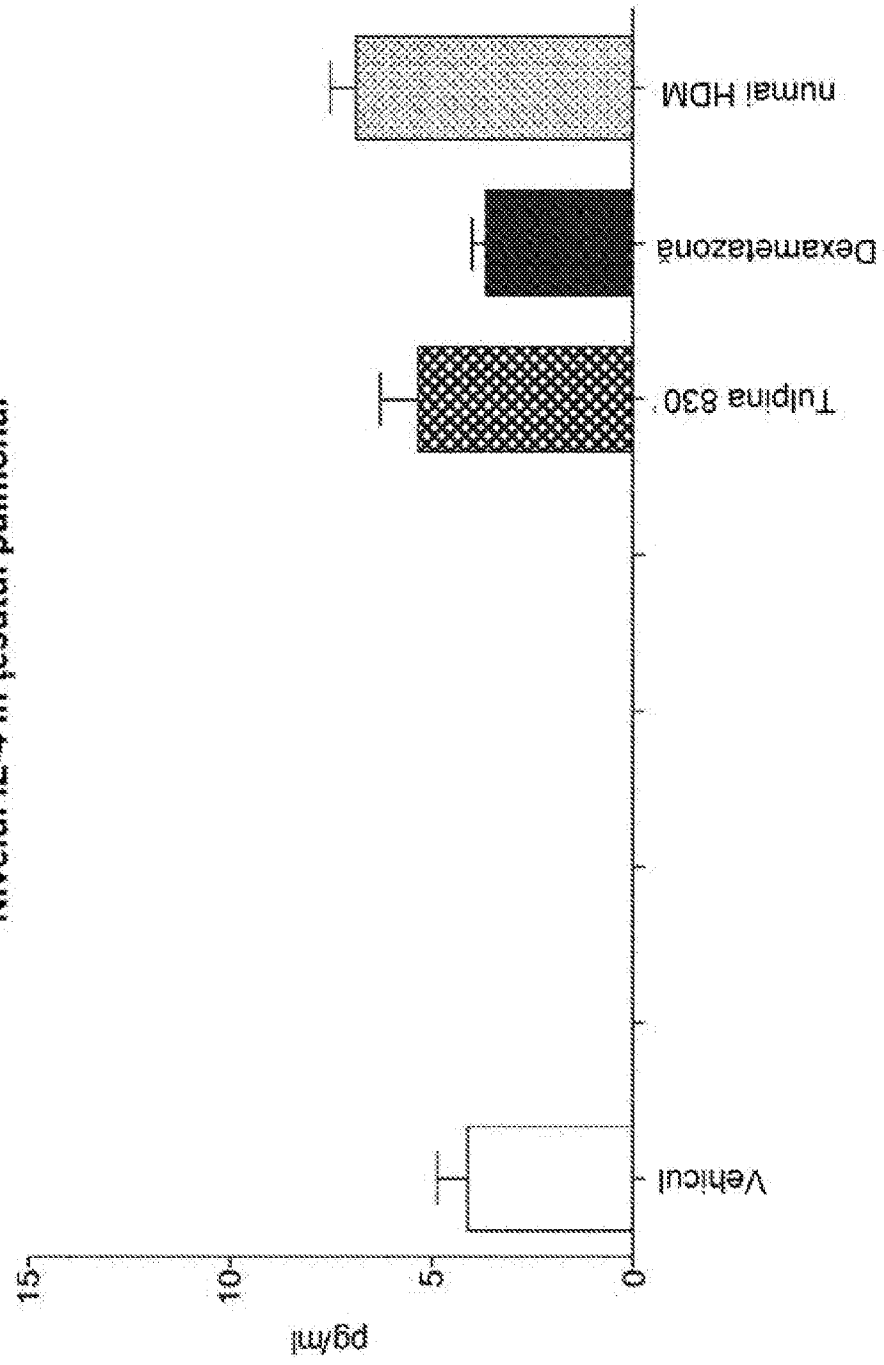


FIG. 40
Nivelul IL-5 în țesutul pulmonar

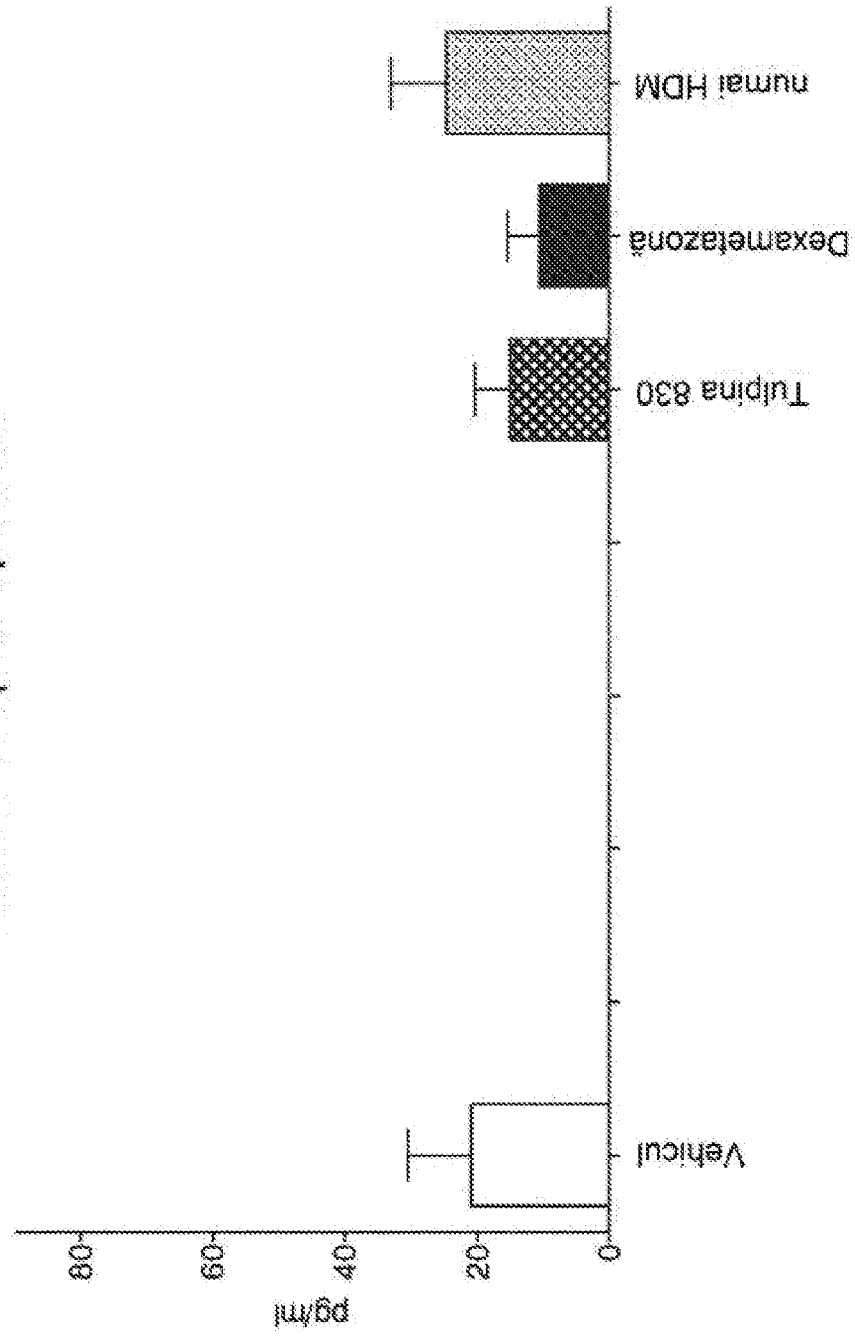
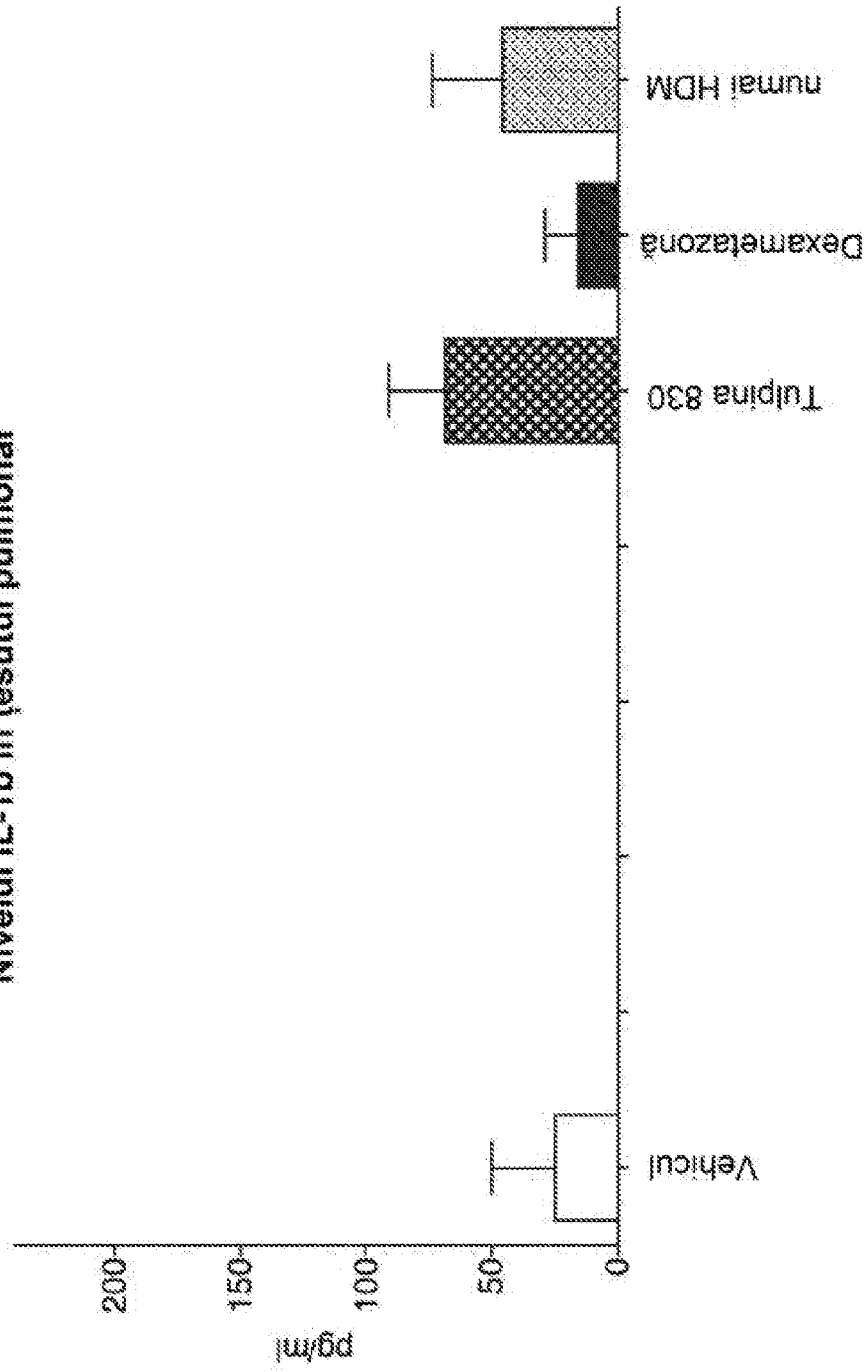


FIG. 41
Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar



76

FIG. 42
Nivelul RANTES în țesutul pulmonar

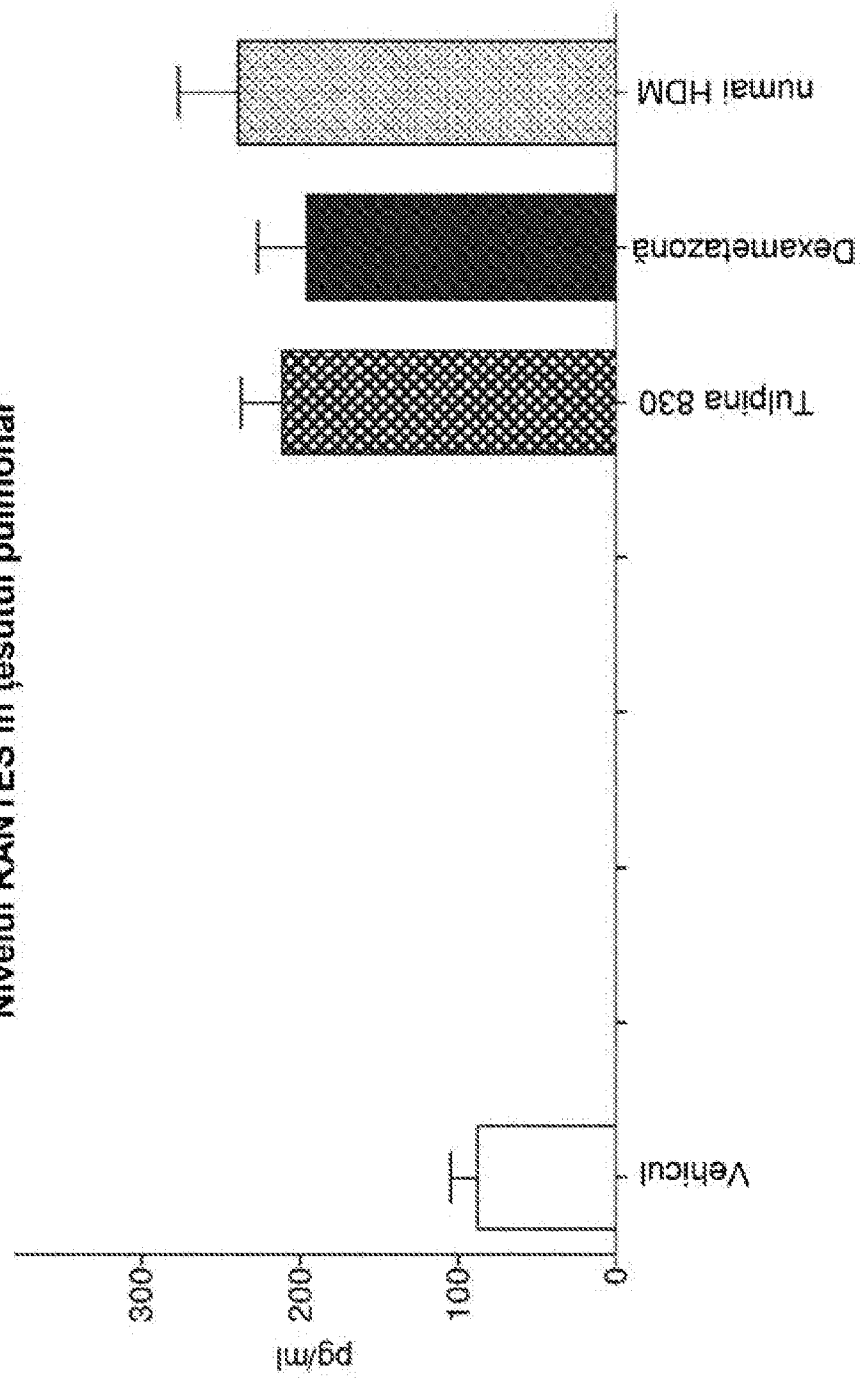


FIG. 43
Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar

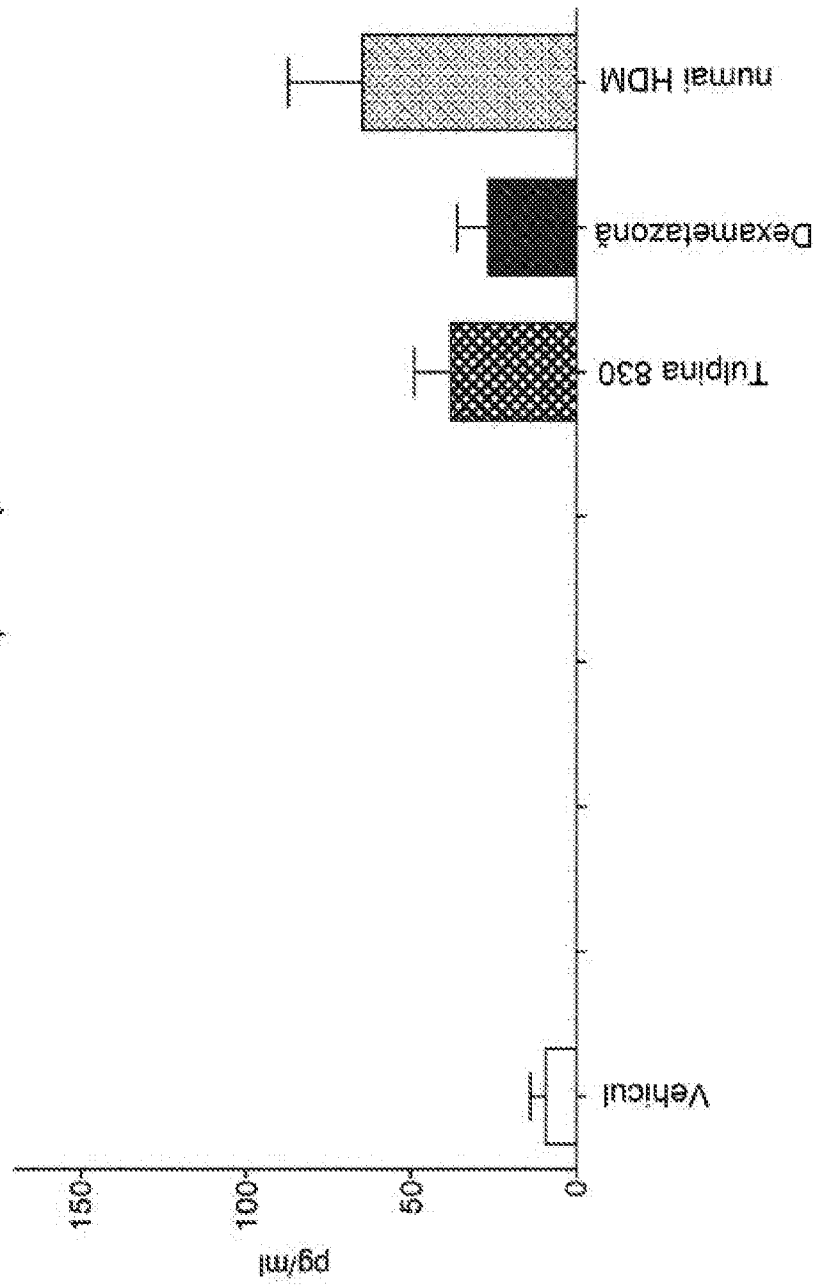


FIG. 44
Nivelul KC în țesutul pulmonar

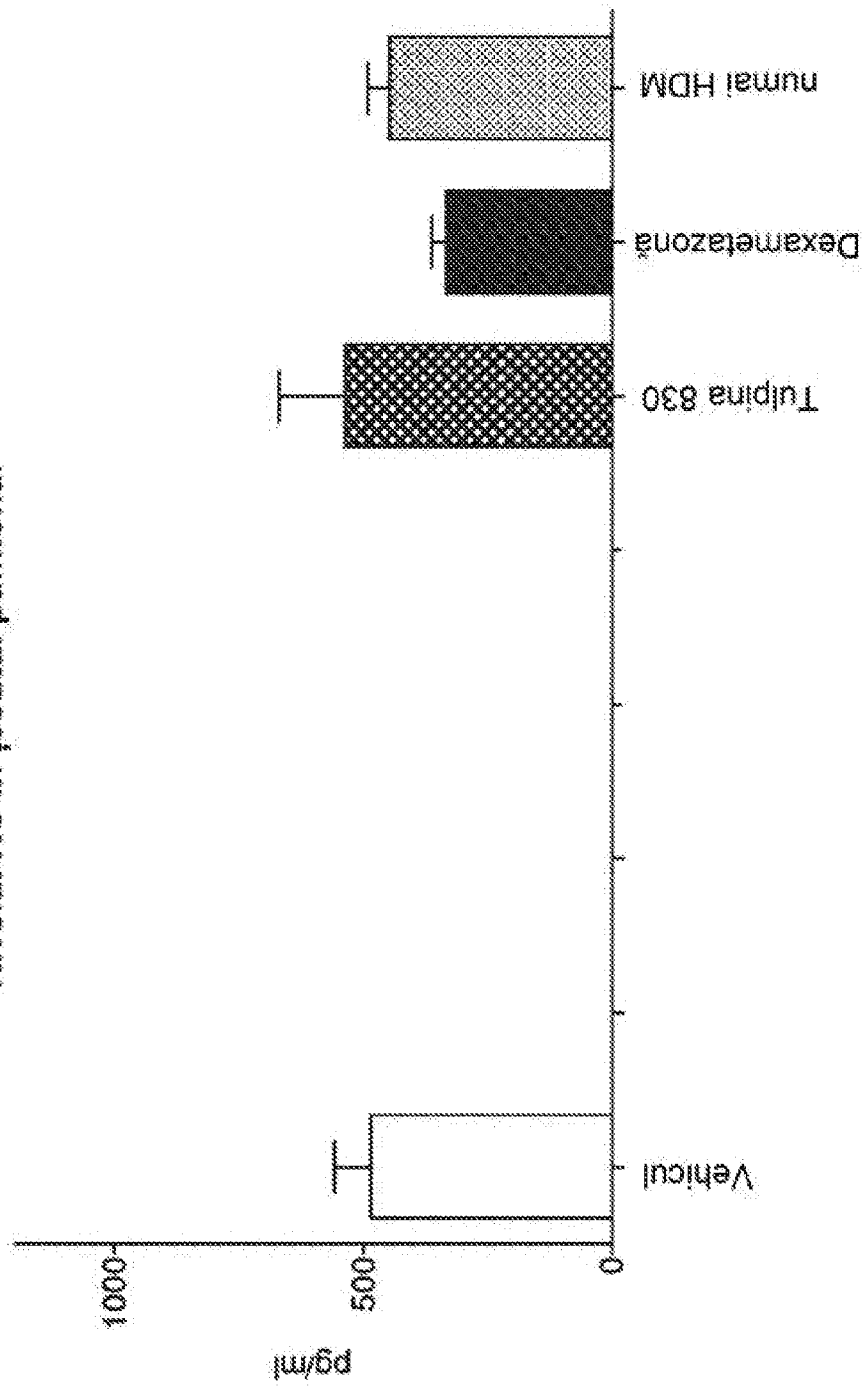
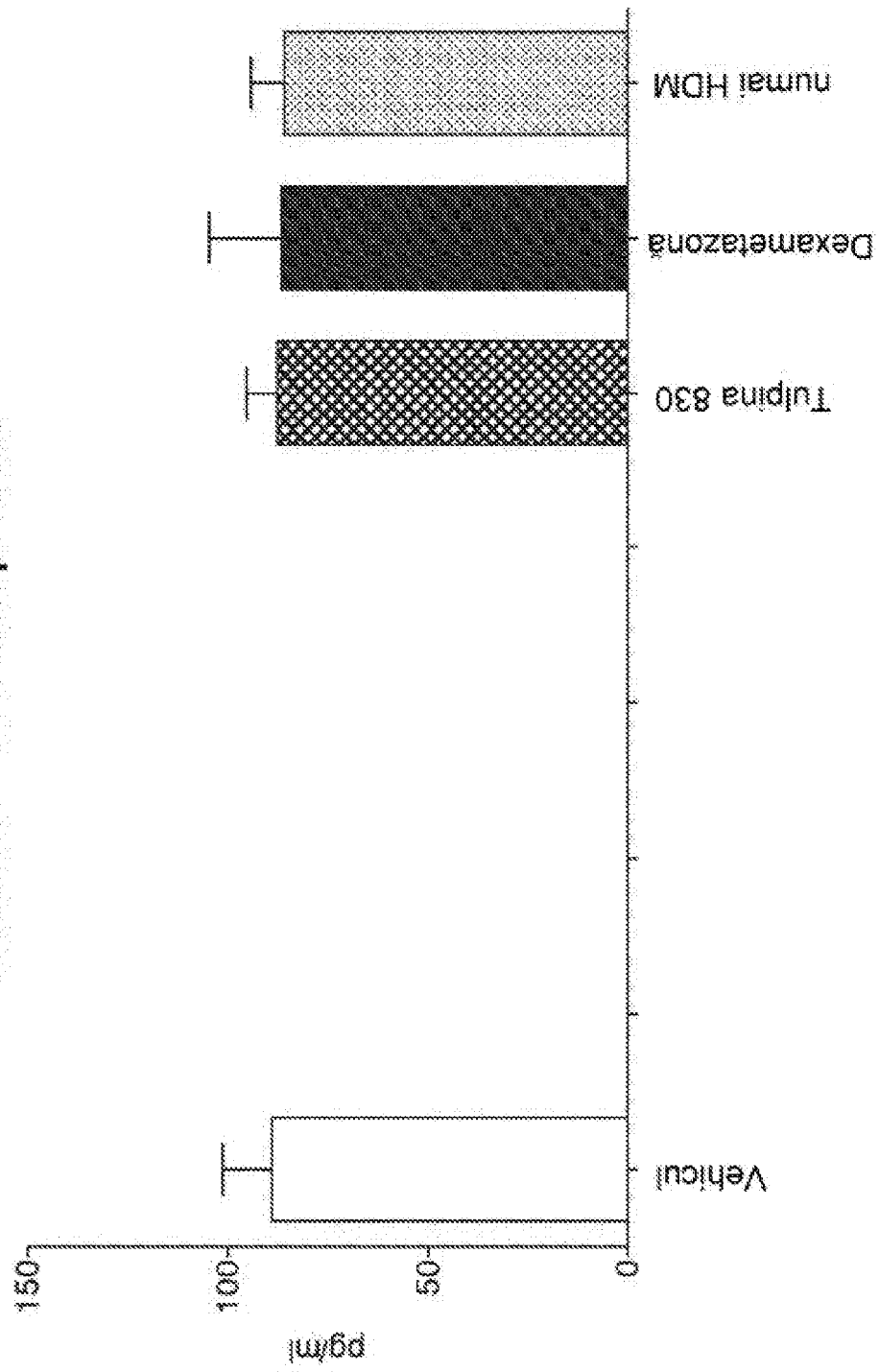


FIG. 45
Nivelul MIP-2 în tesutul pulmonar



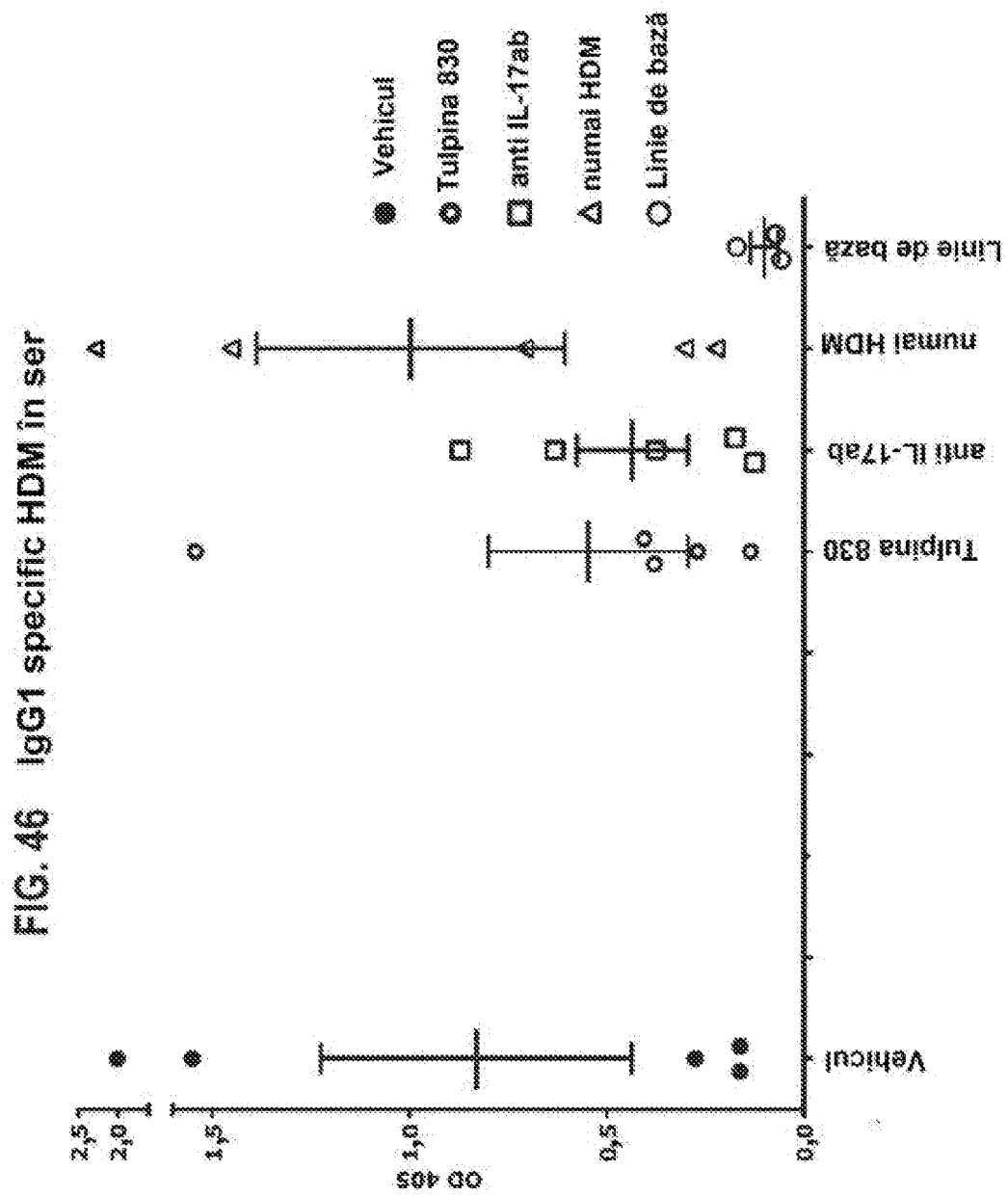


FIG. 47 IgG2 specific HDM in ser

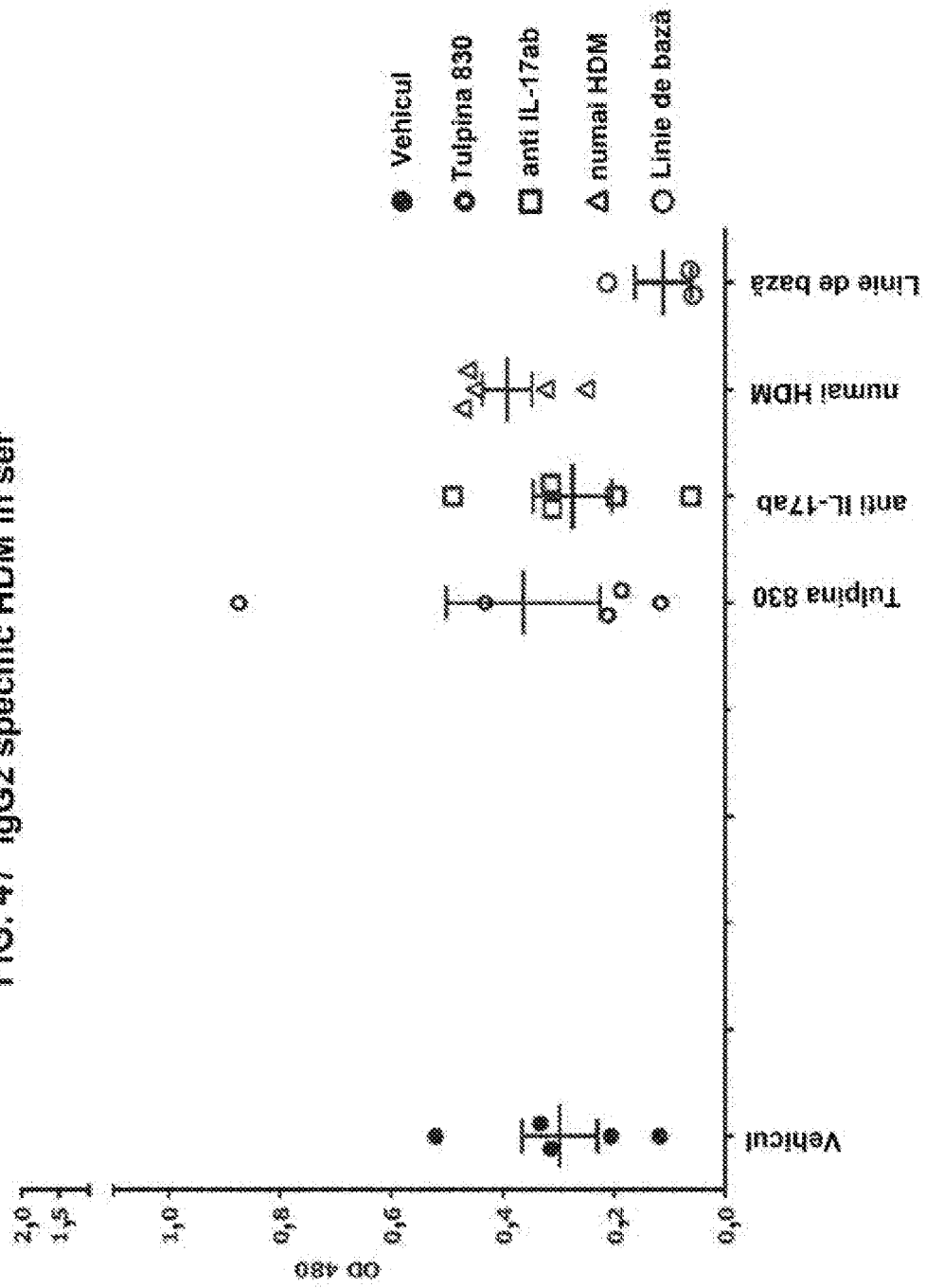


FIG. 48 IgG1 specific HDM in BALF

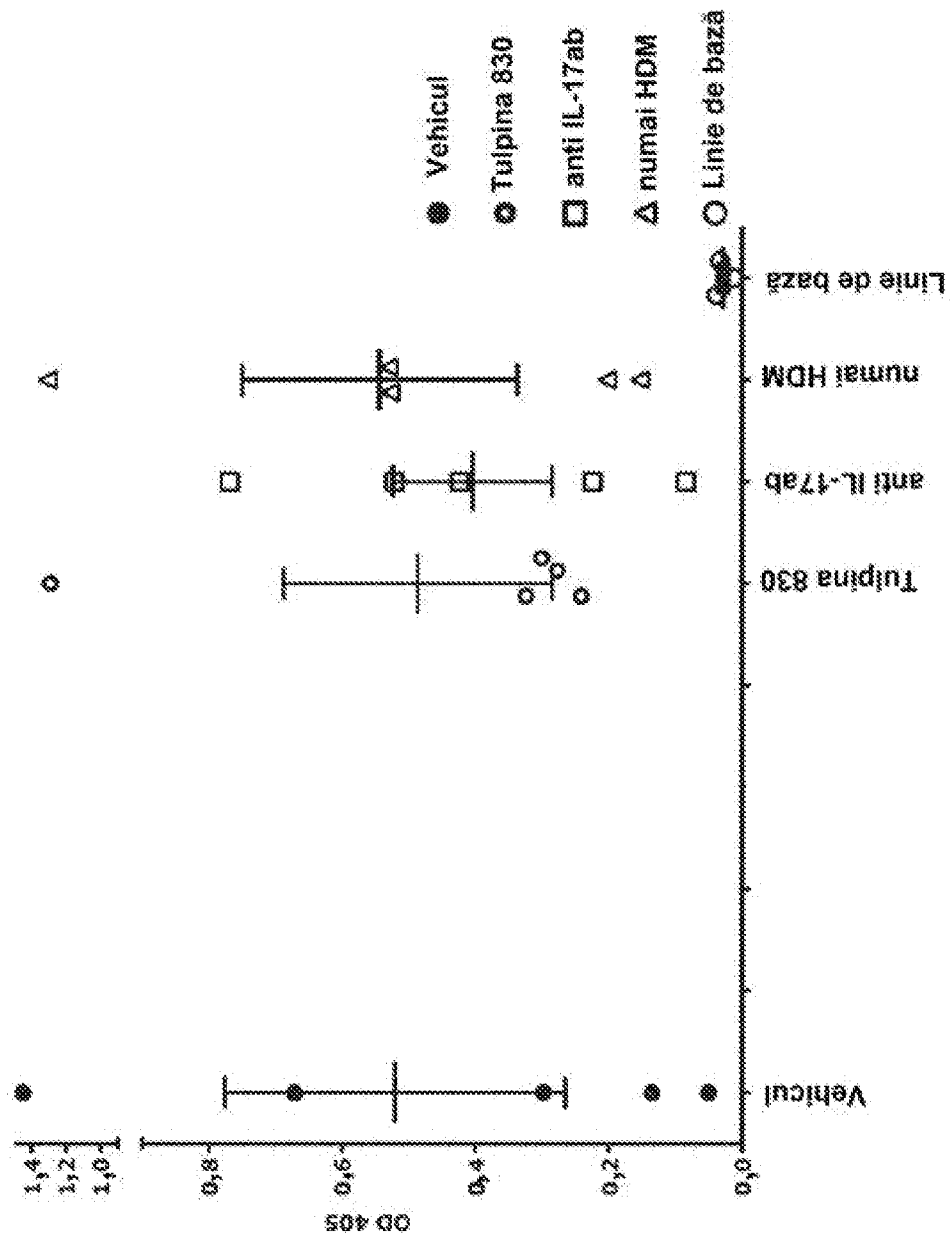


FIG. 49 IgG2a specific HDM in BALF

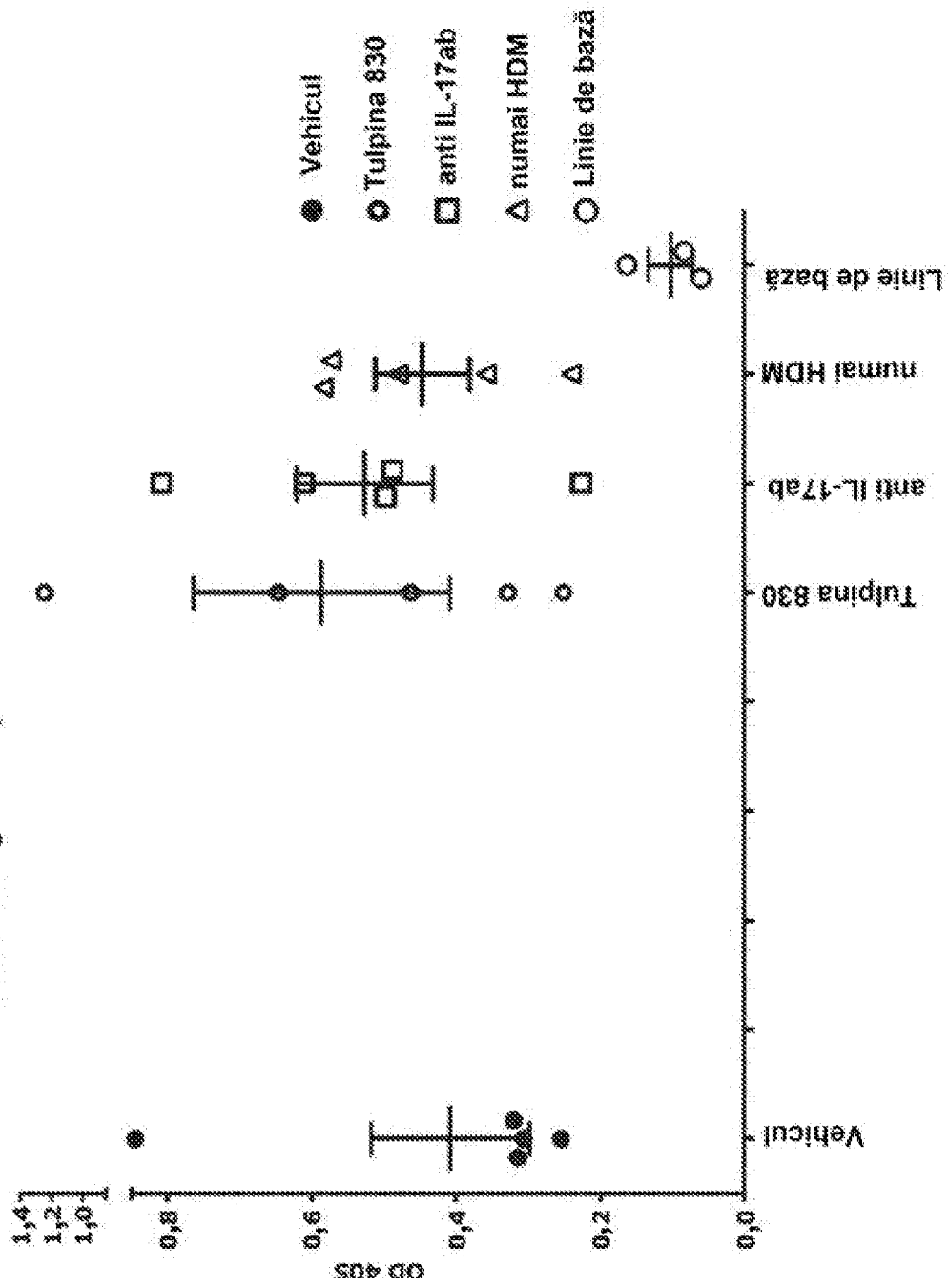


FIG. 50 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare peribronheolară

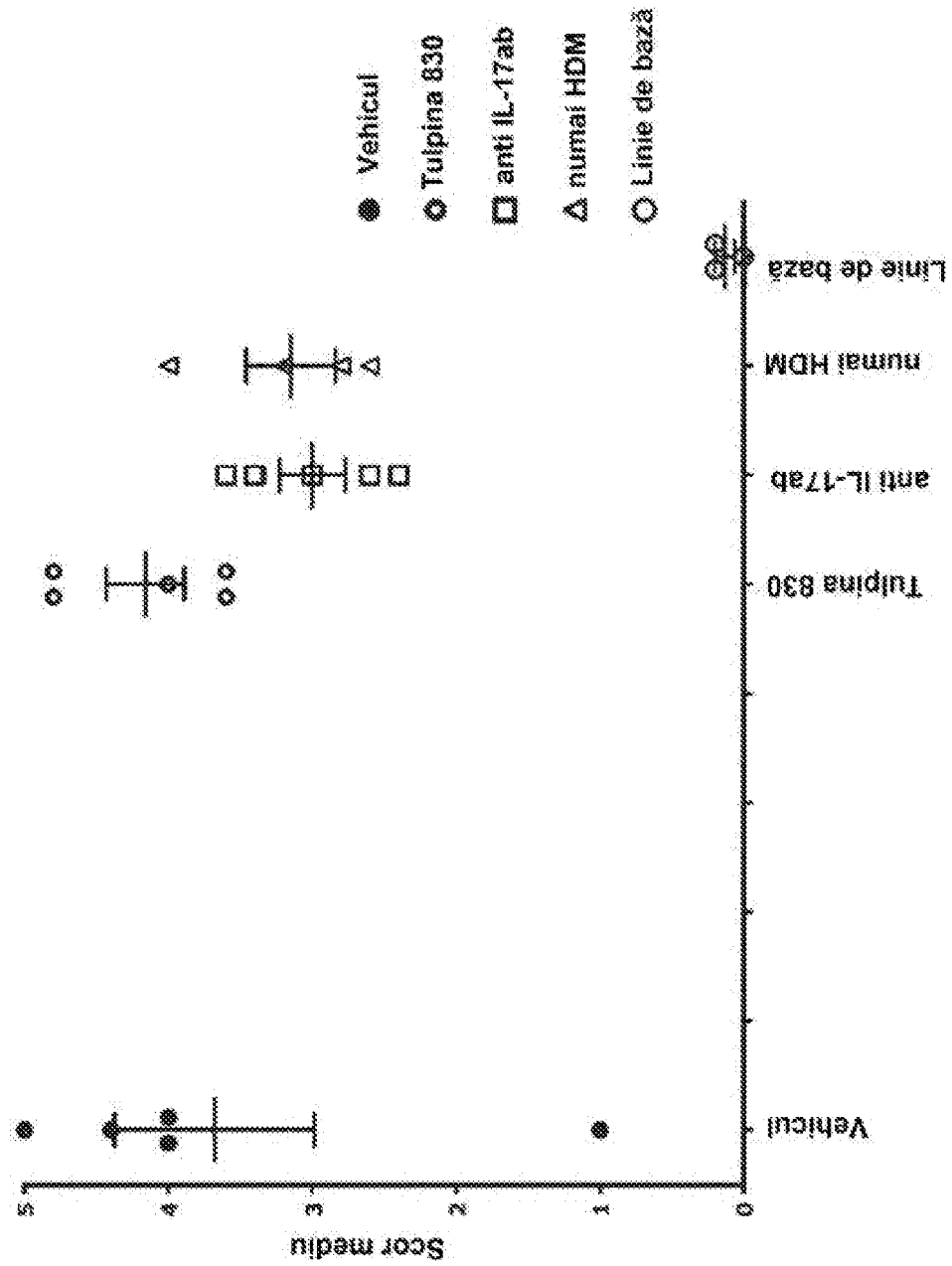


FIG. 51 Analiză histologică - Scor mediu de infiltrare perivasculară

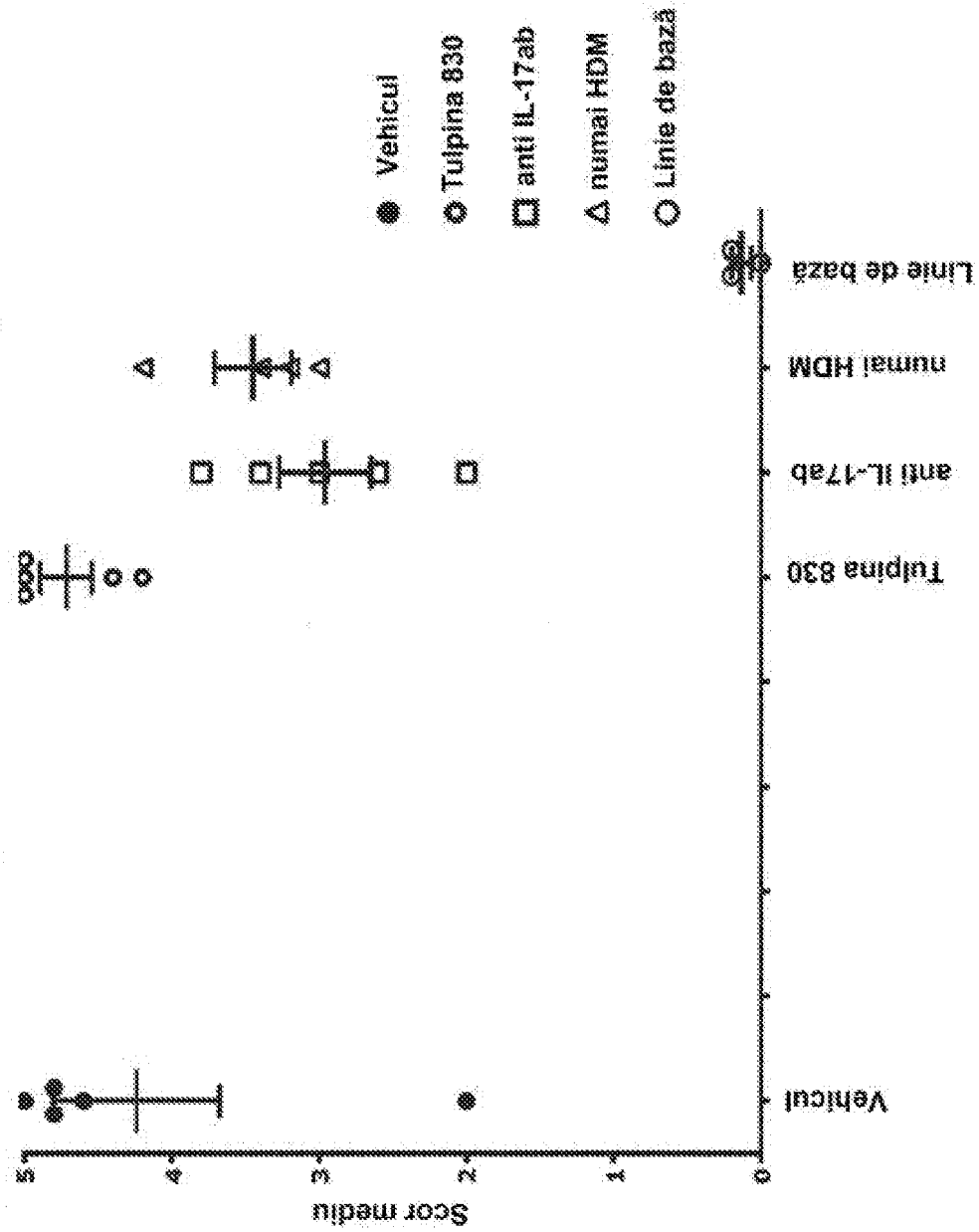


FIG. 52 Analiză histologică - Scor inflamatoriu mediu (media ambelor scoruri de infiltrare peribronheolară și perivasculară)

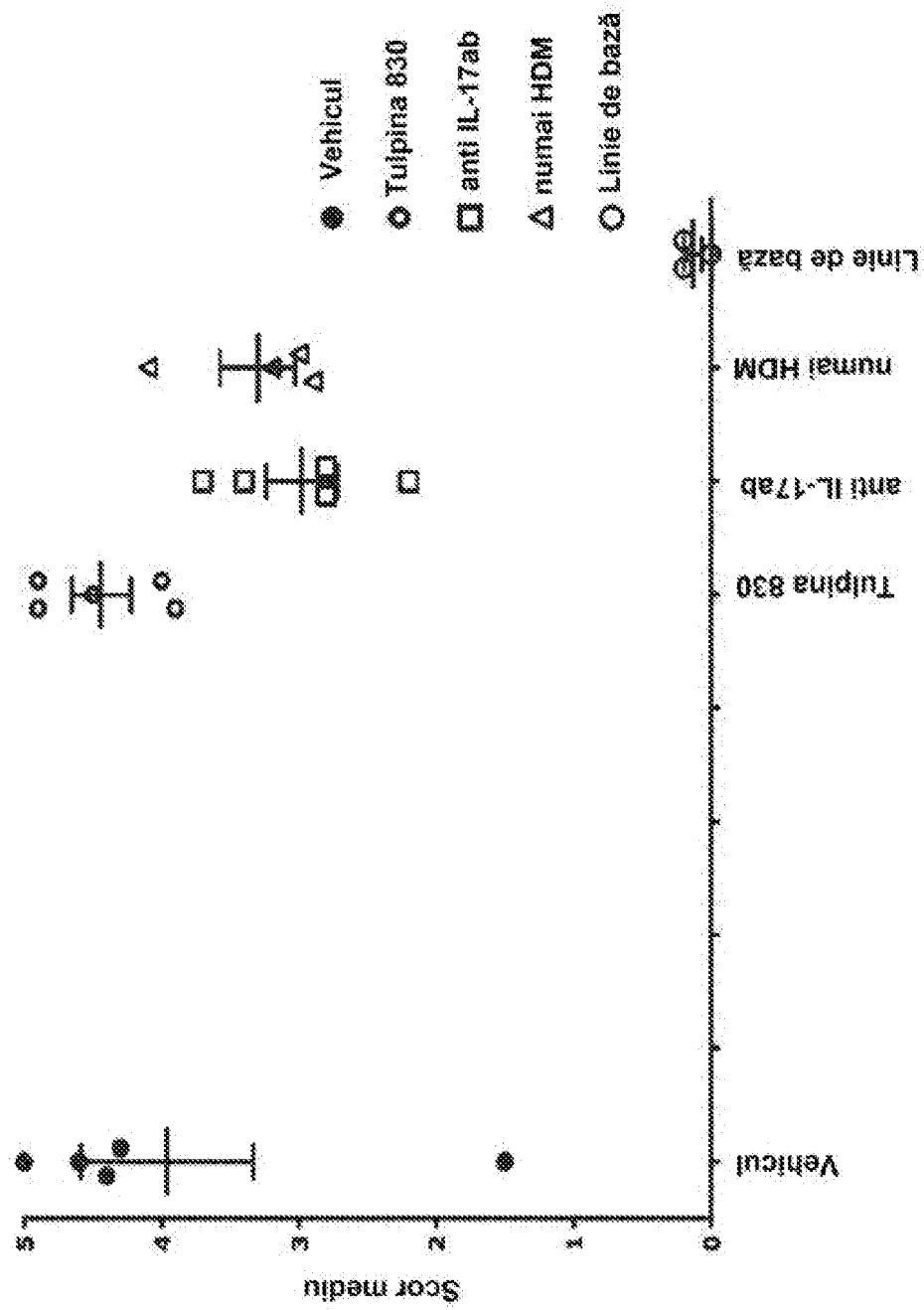


FIG. 53
Nivelul TNFa în țesutul pulmonar

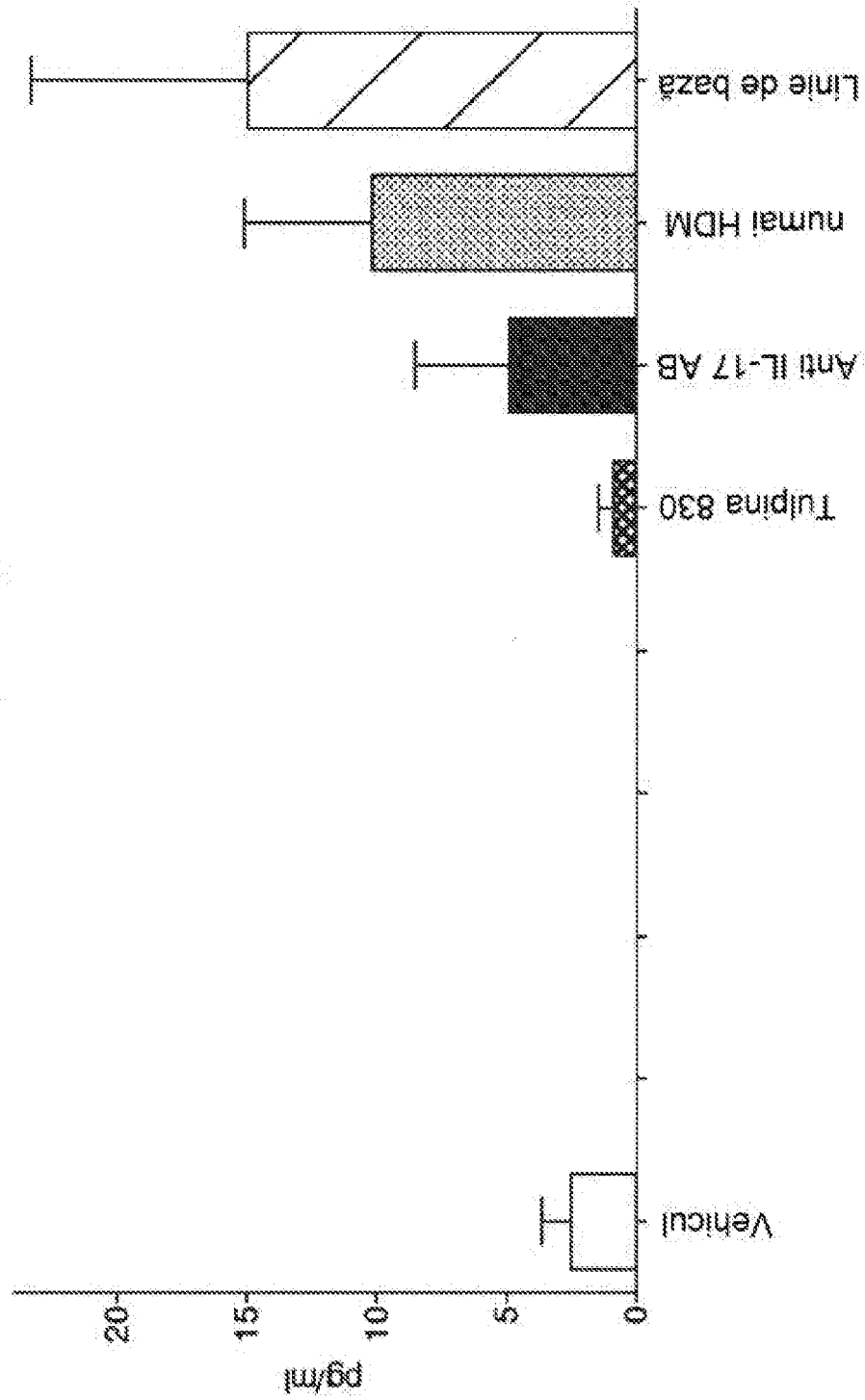


FIG. 54
Nivelul IL-1a în țesutul pulmonar

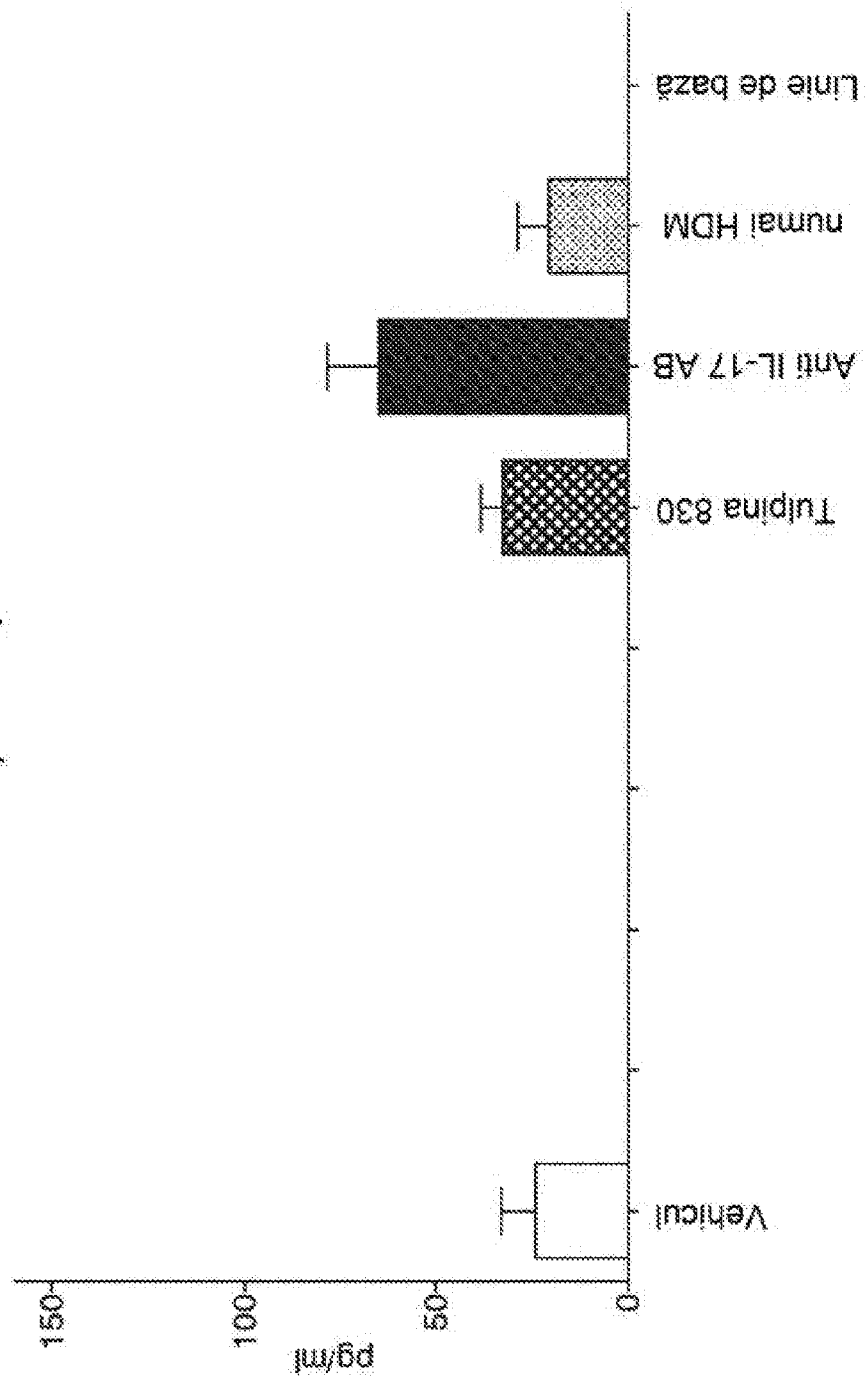


FIG. 55
Nivelul IFNg în țesutul pulmonar

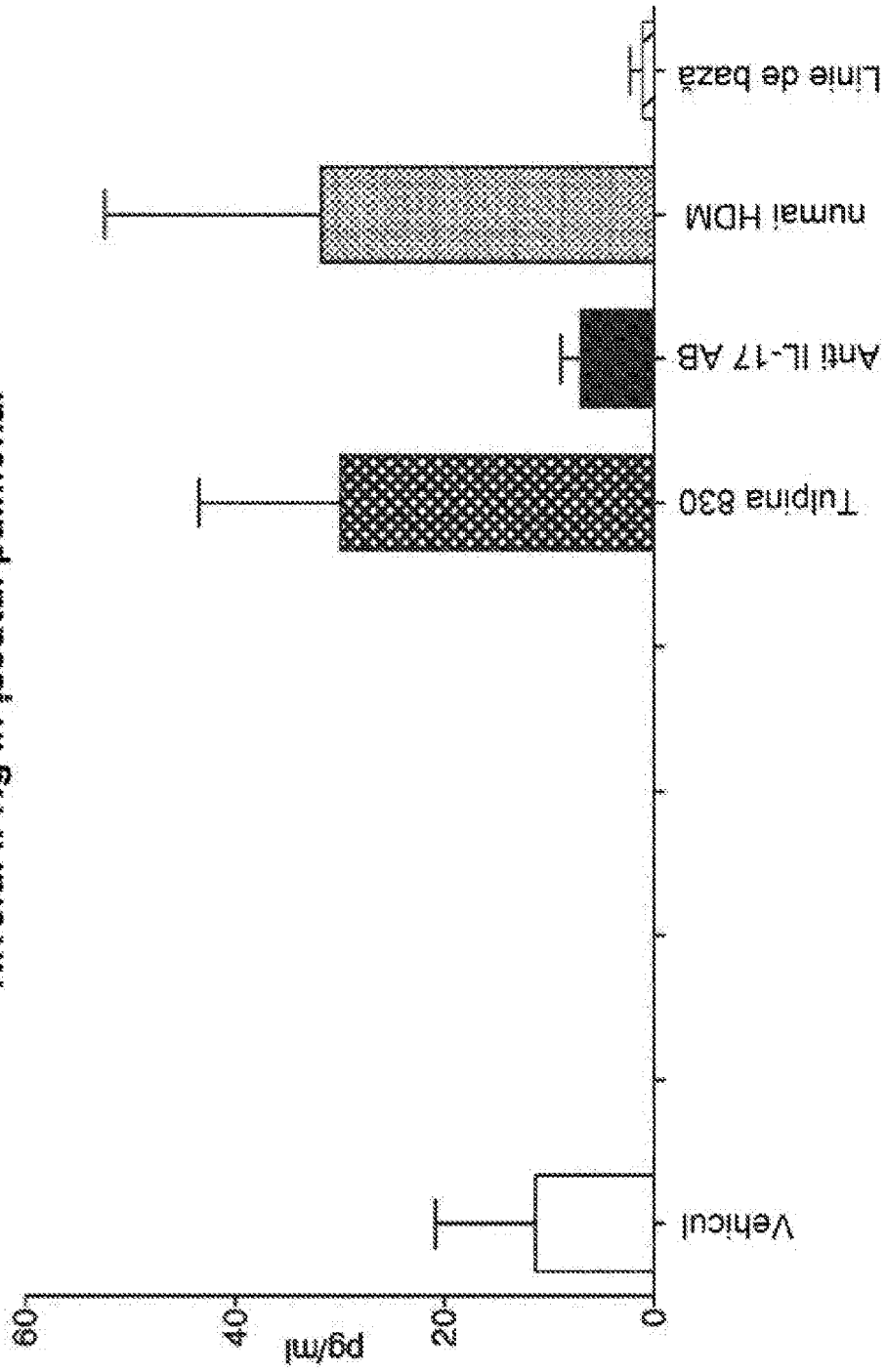


FIG. 56
Nivelul IL-17F în țesutul pulmonar

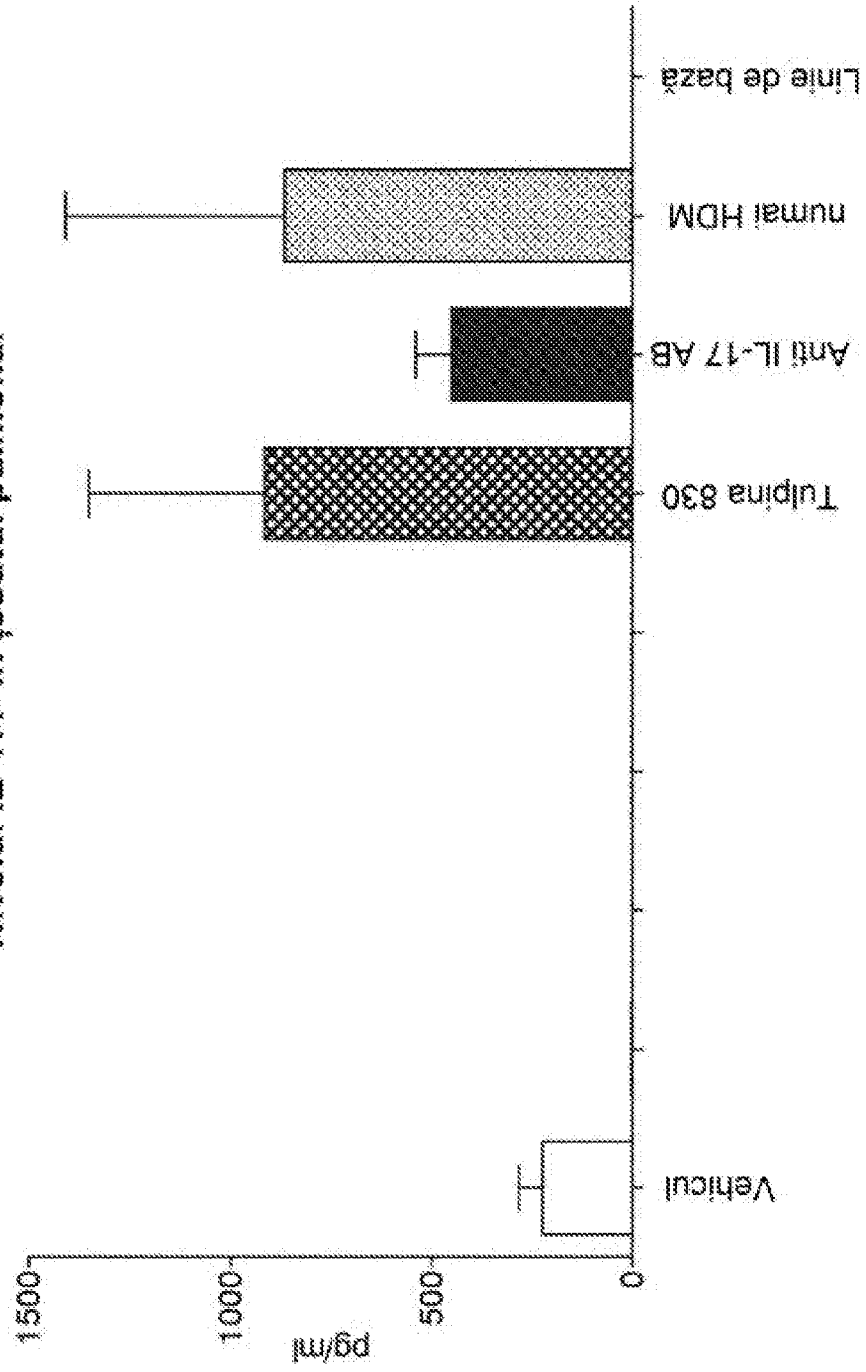


FIG. 57
Nivelul IL-1b în țesutul pulmonar

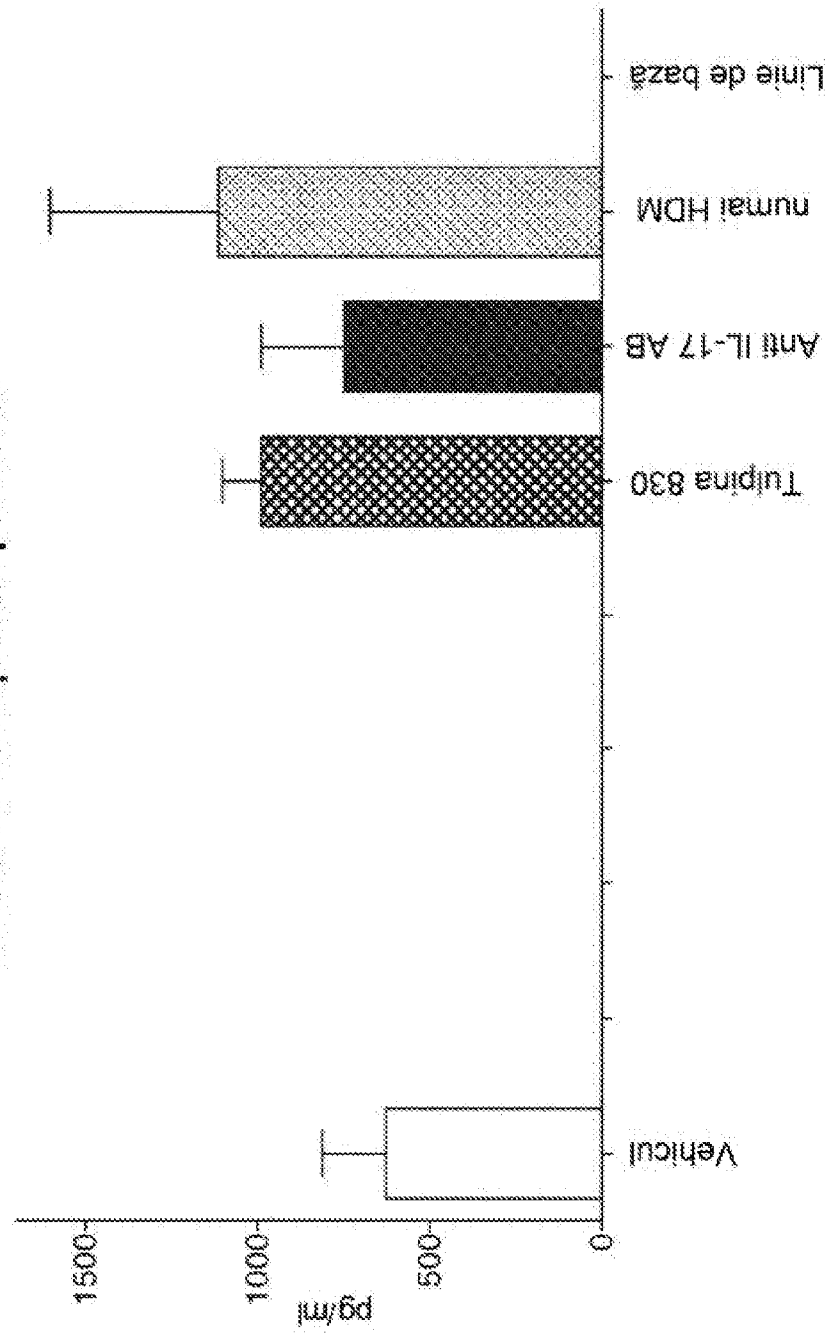


FIG. 58
Nivelul RANTES în țesutul pulmonar

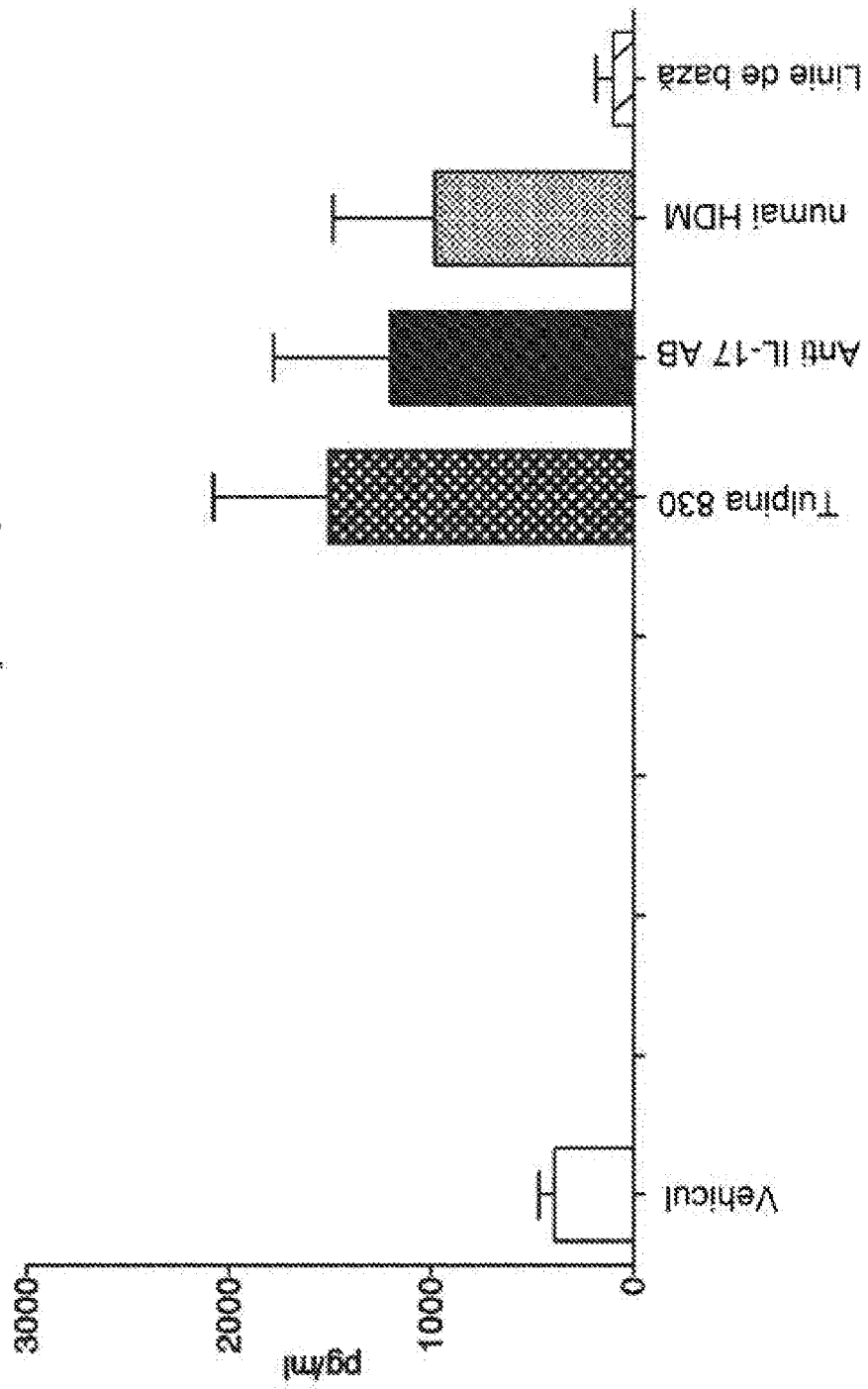


FIG. 59
Nivelul MIP-2 în țesutul pulmonar

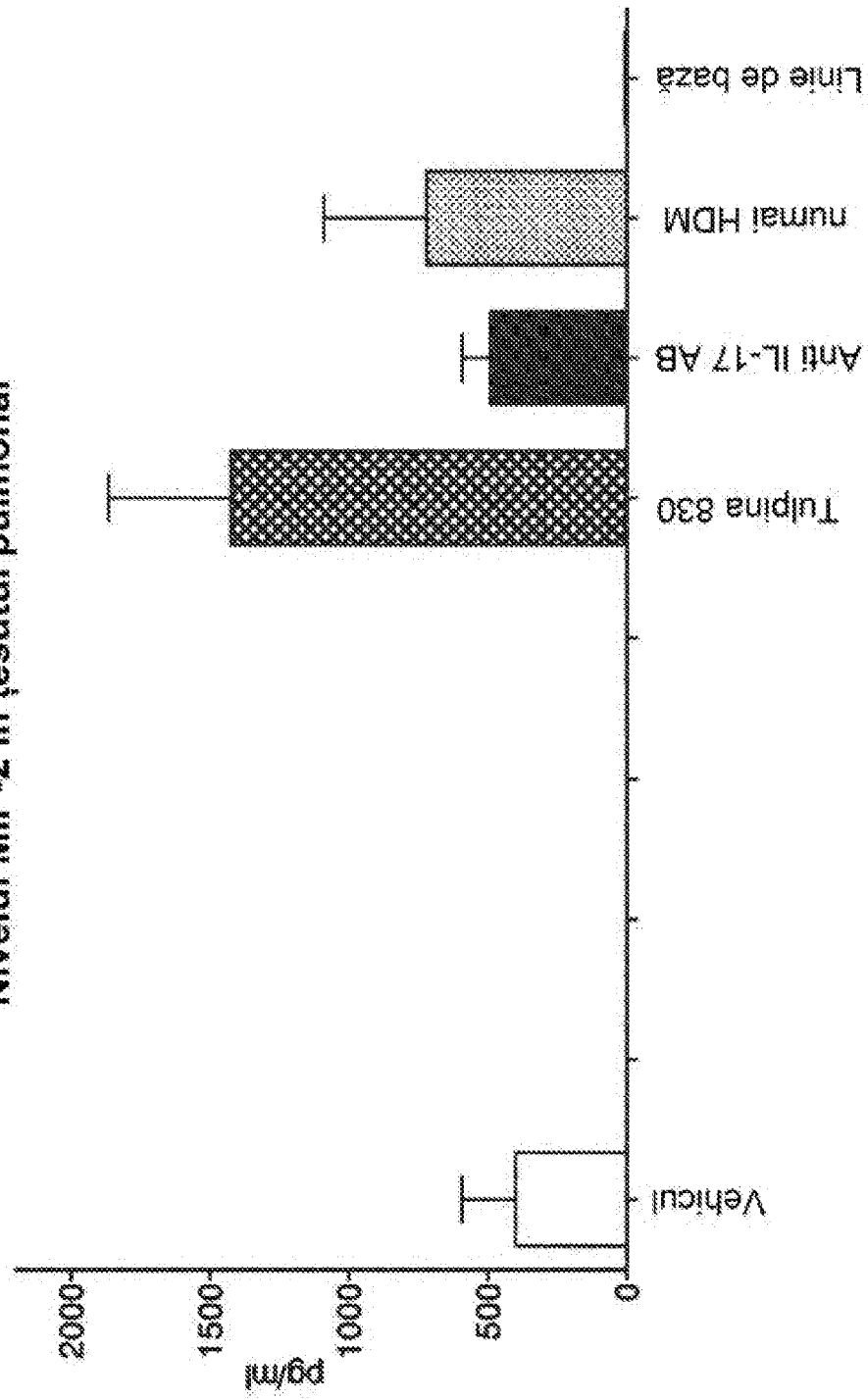


FIG. 60
Nivel KC în țesutul pulmonar

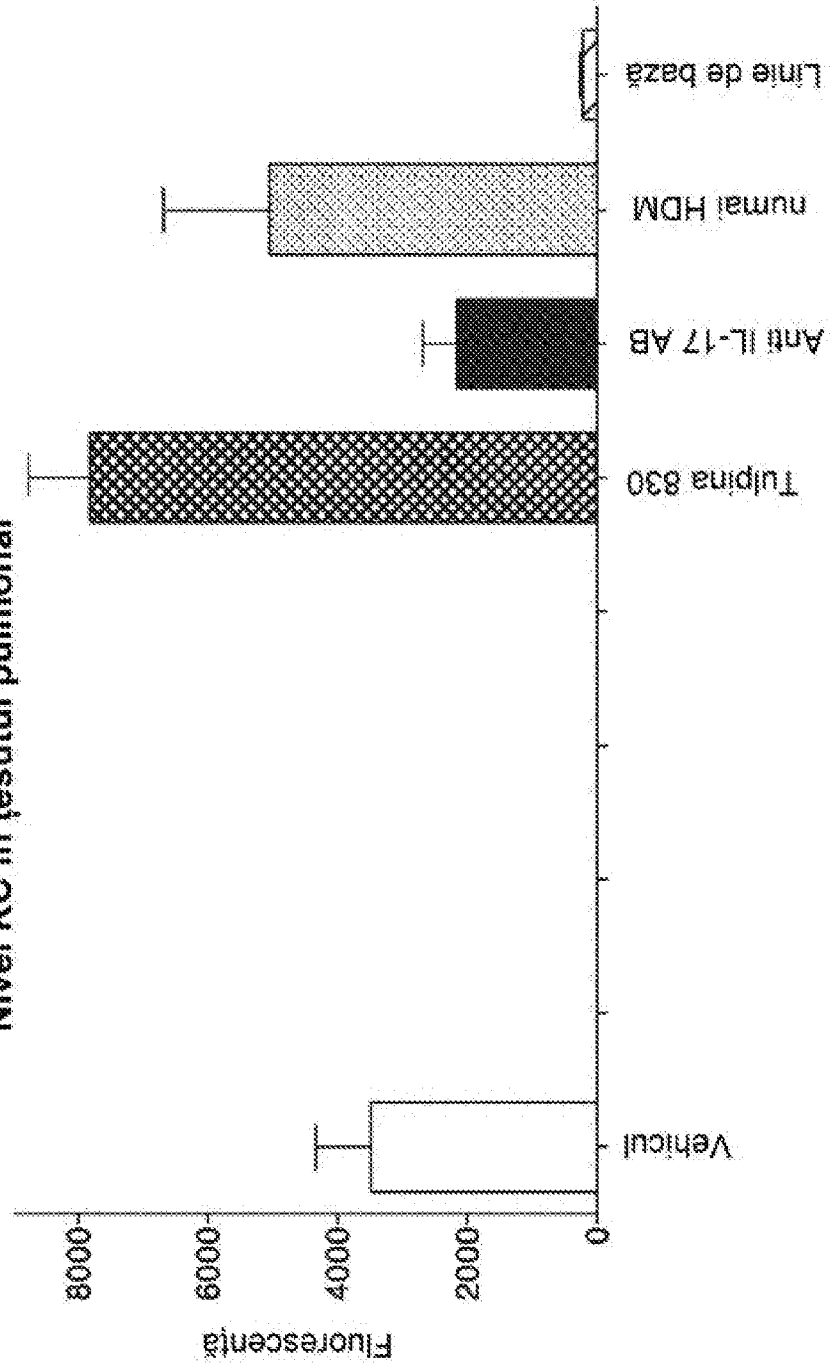


FIG. 61
Nivelul IL-17A în țesutul pulmonar

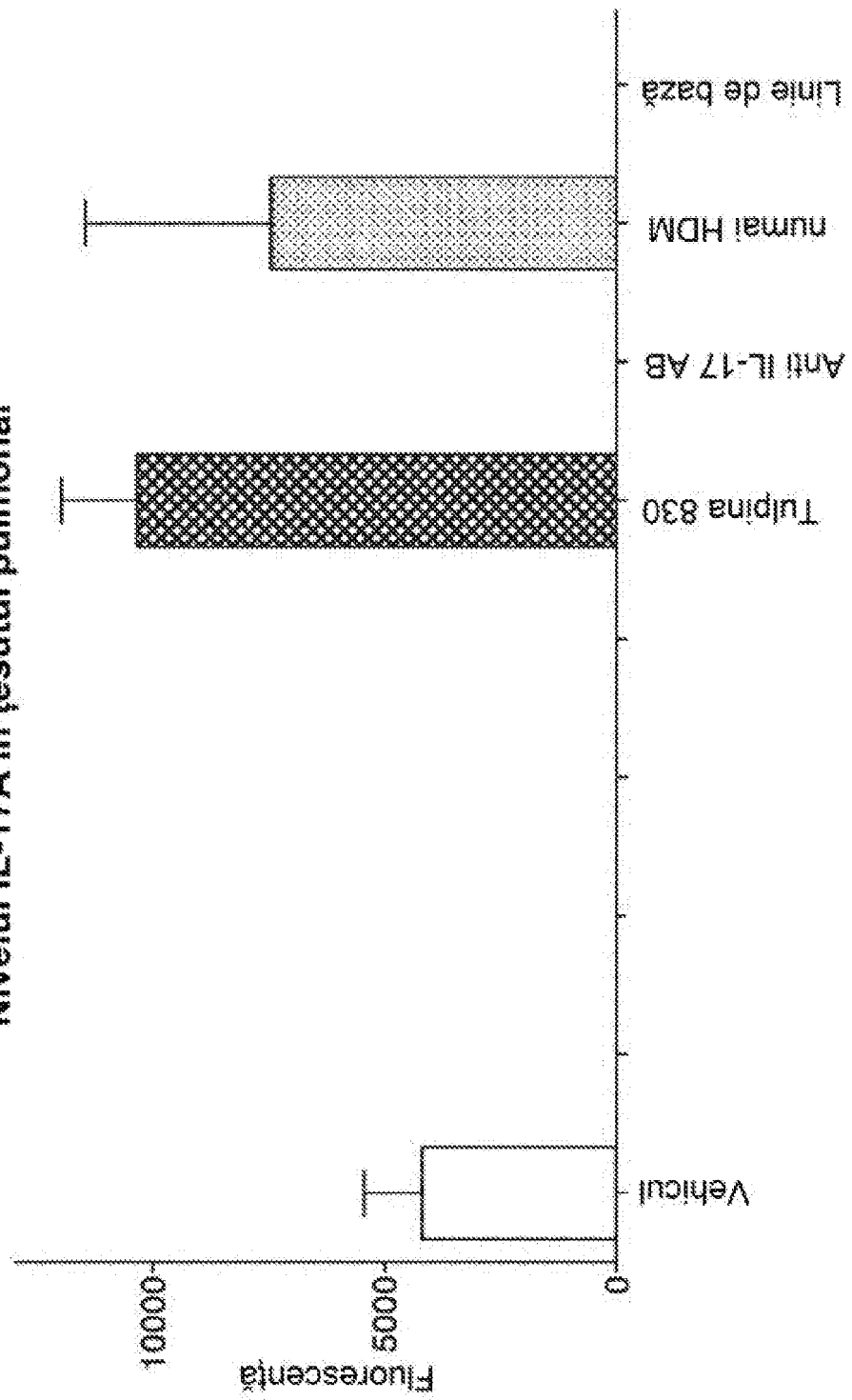


FIG. 62
Nivelul MIP-1a în țesutul pulmonar

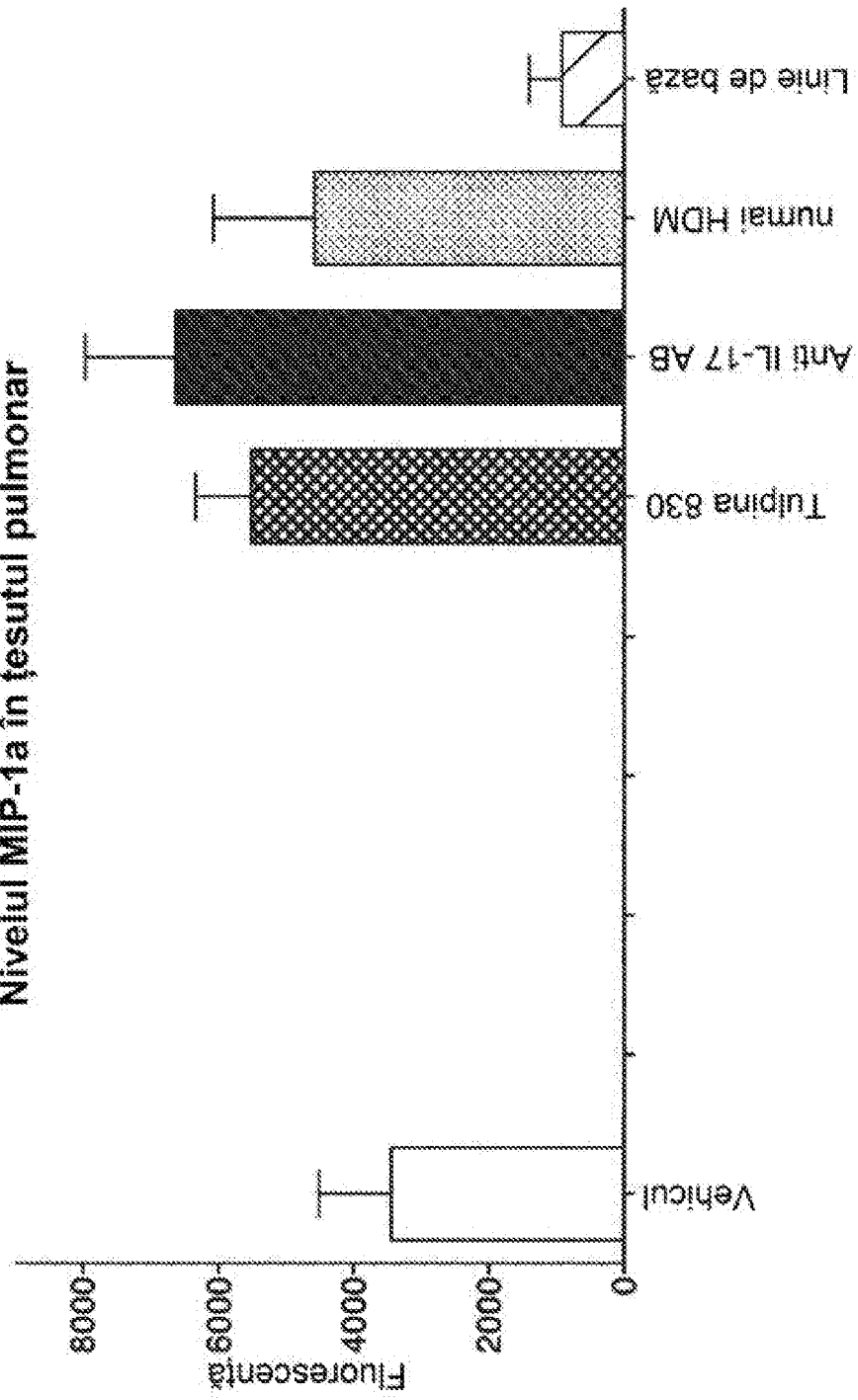


FIG. 63
Nivelul IL-33 în țesutul pulmonar

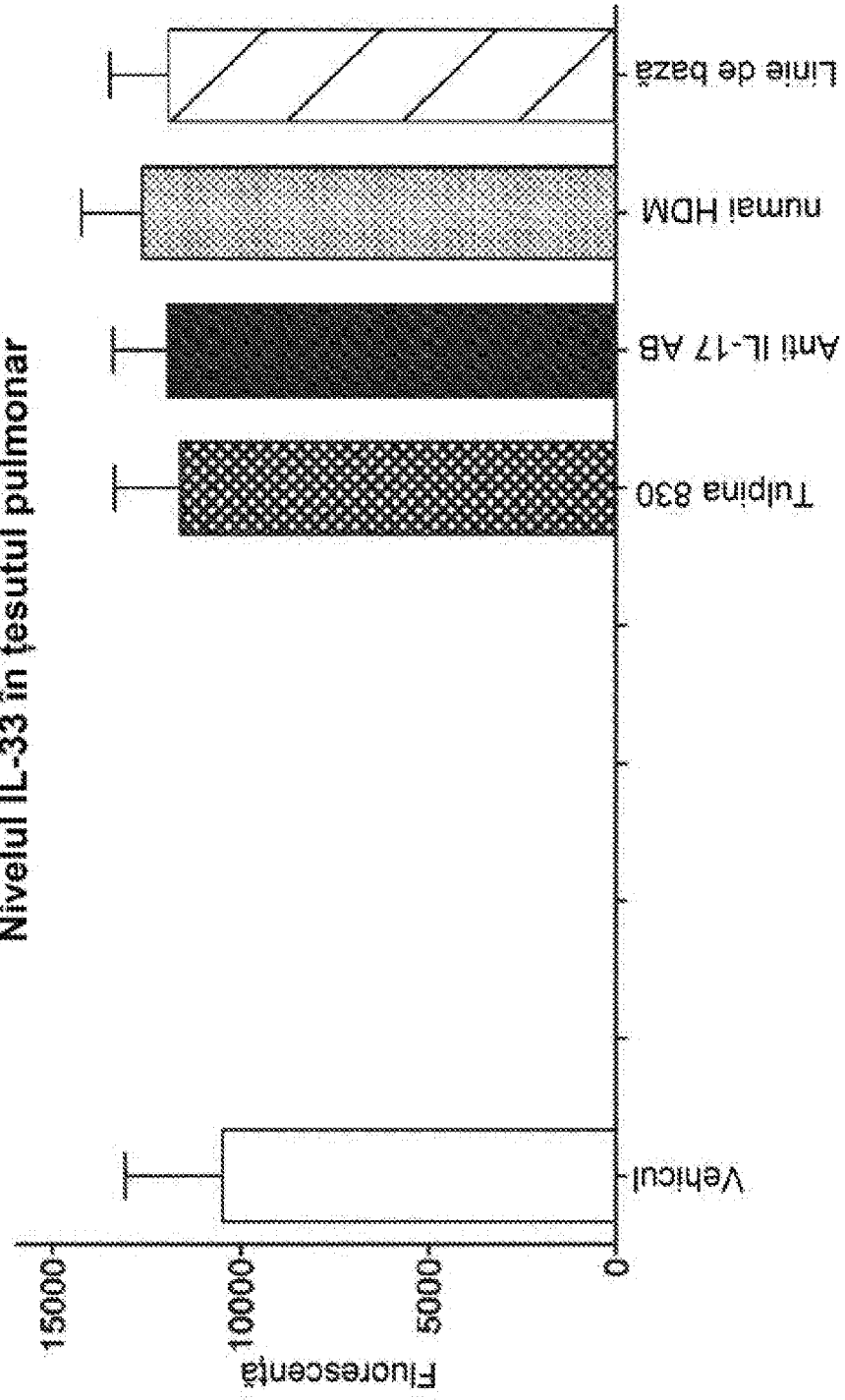
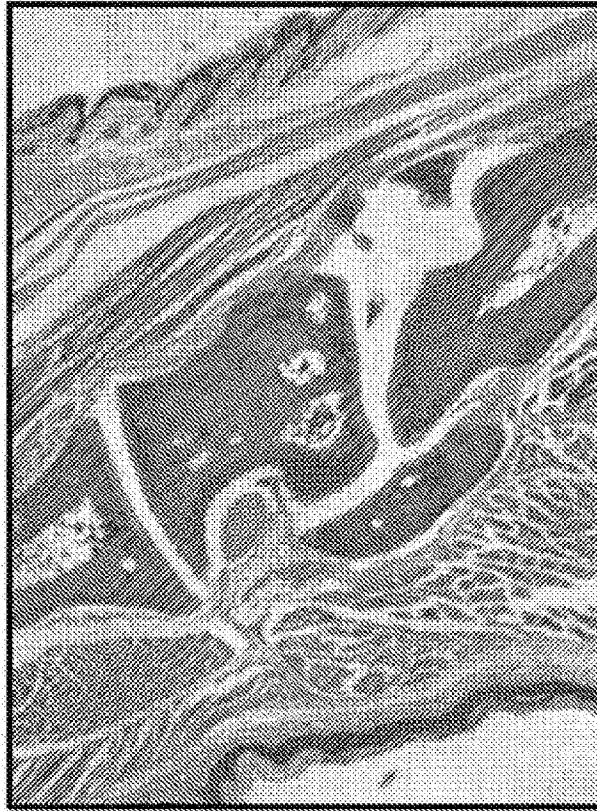
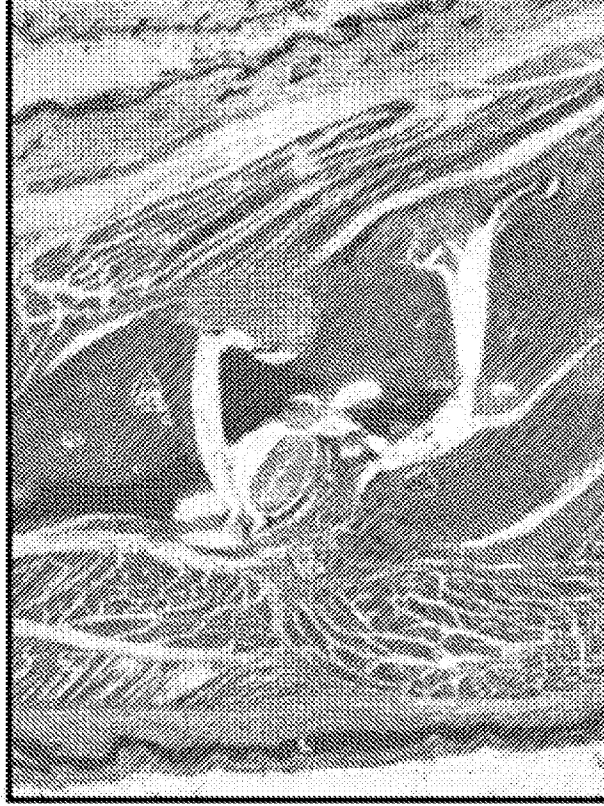


FIG. 64
Șablon vizual pentru scorul histopatologic



Grad 0

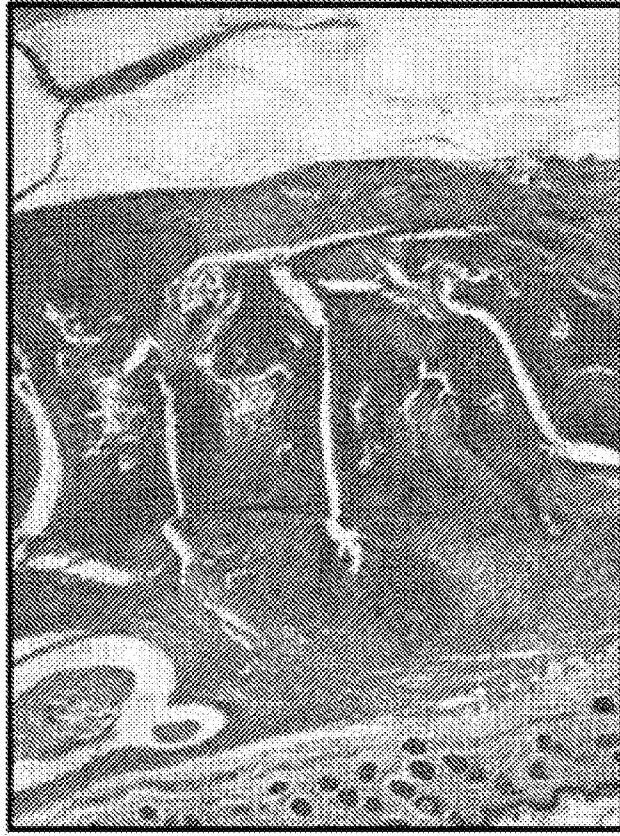


Grad 1

FIG. 64 (cont.)



Grad 4



Grad 7



Grad 9

FIG. 64(cont.)

FIG. 66

Histopatologie: scoruri de cartilaj

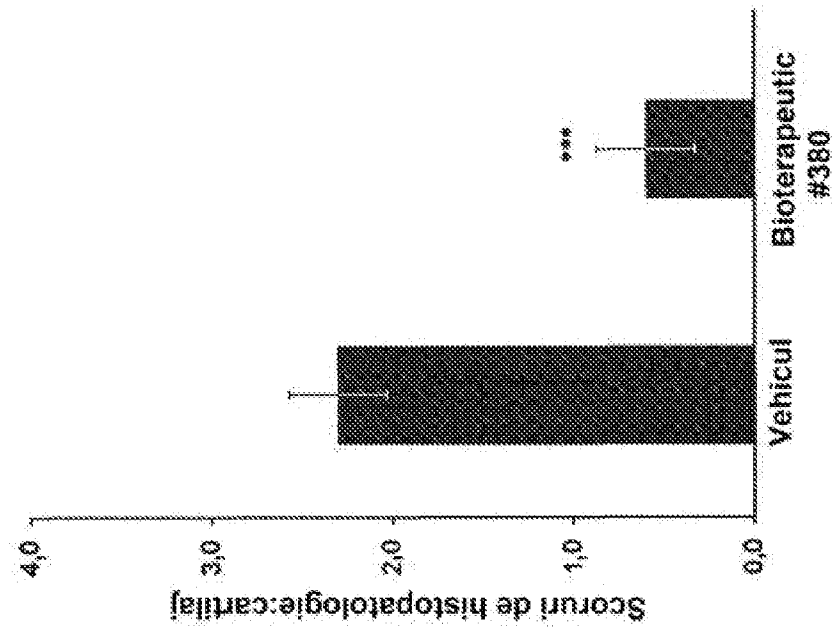


FIG. 65

Histopatologie: scoruri de inflamare

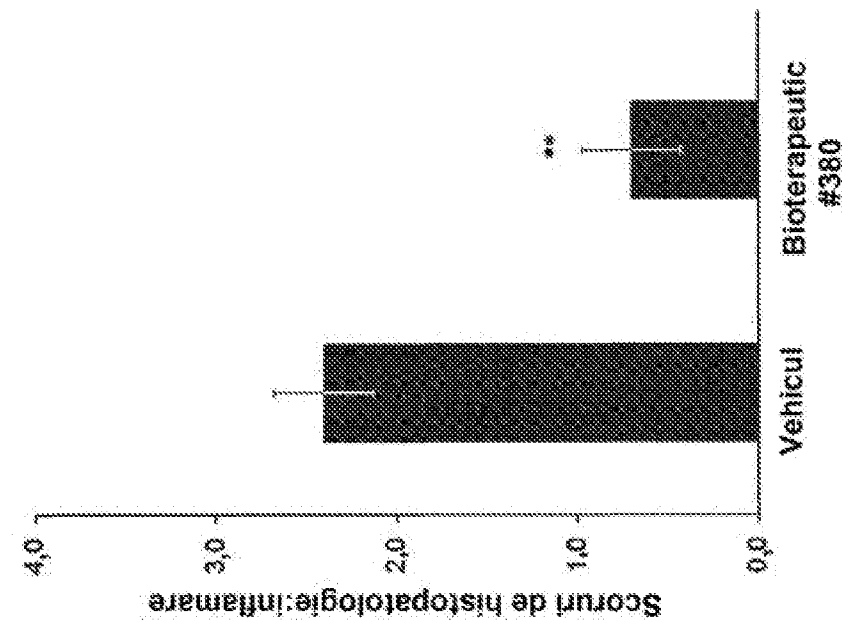


FIG. 67

Histopatologie: scoruri pentru oase

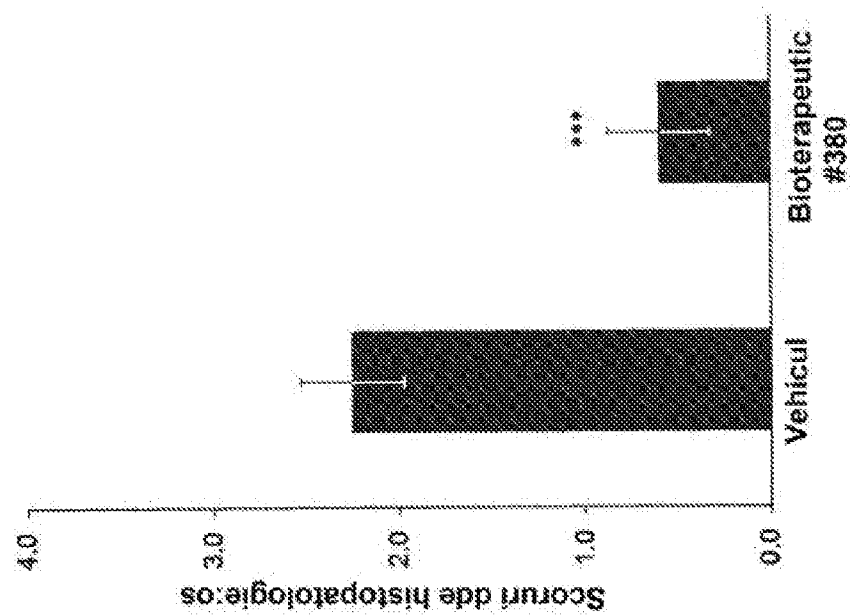


FIG. 68

Histopatologie: scoruri totale

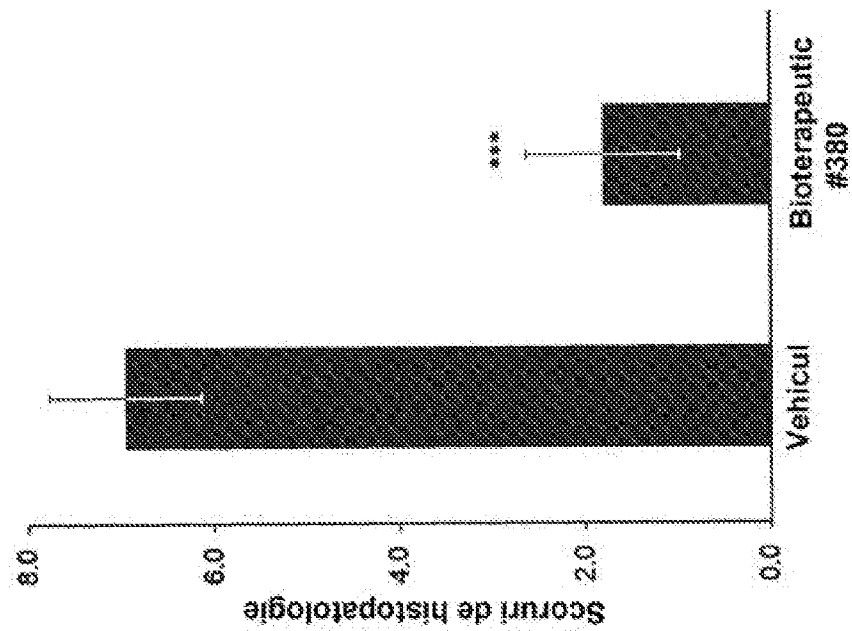


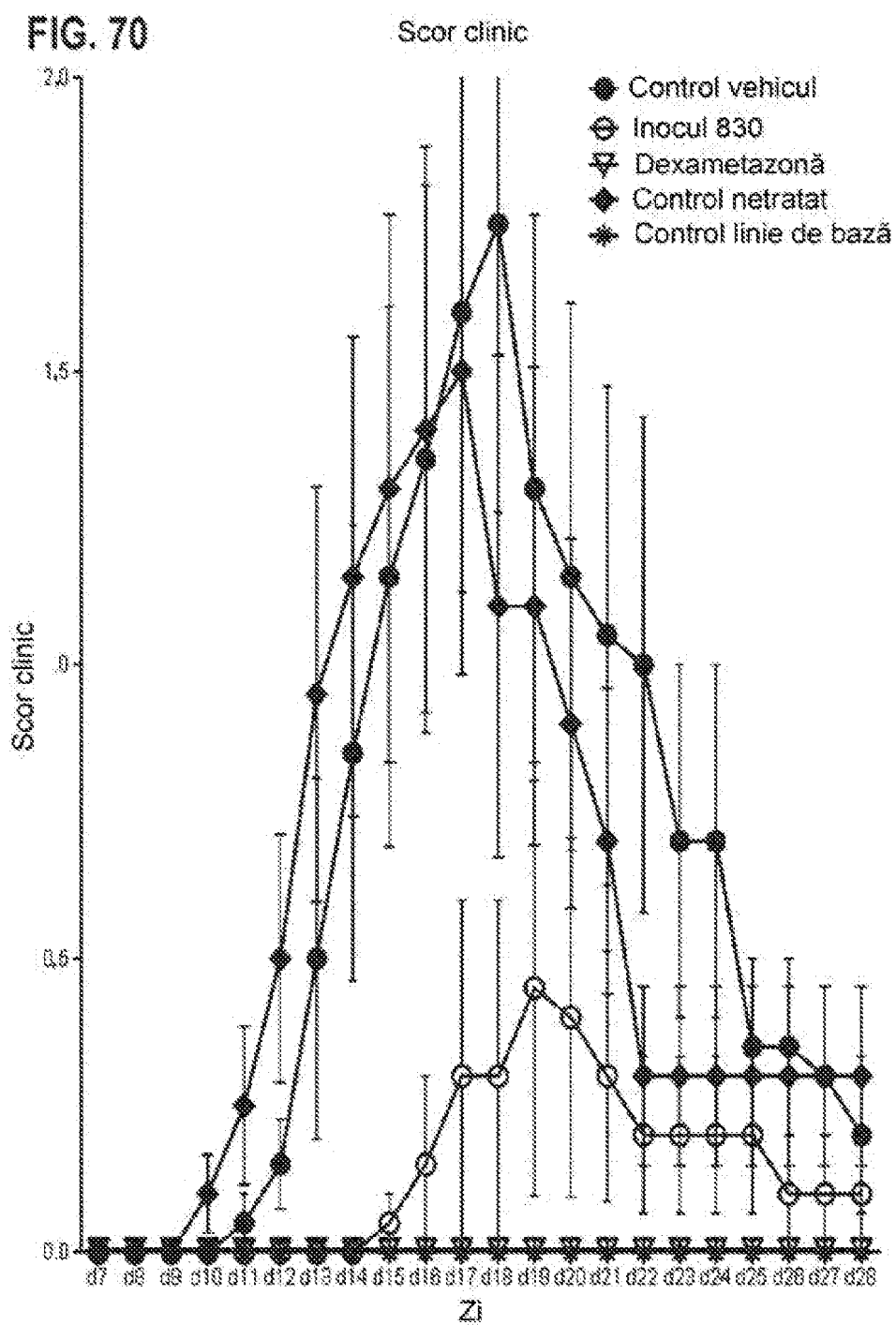
FIG. 69



Vehicul (#1.1 1R, Grad 9)



Tulpină #380 (#3.2R, Grad 0)



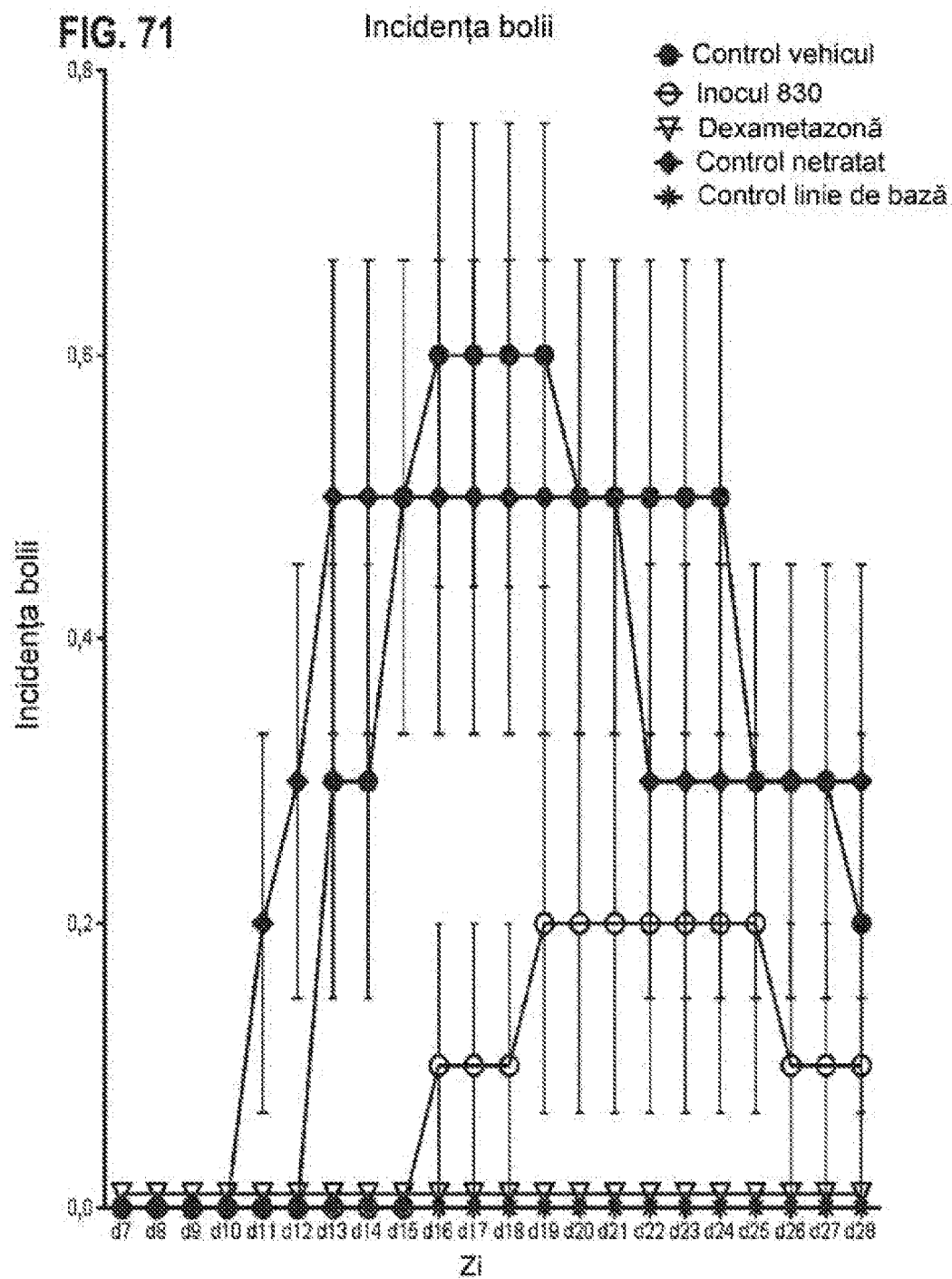
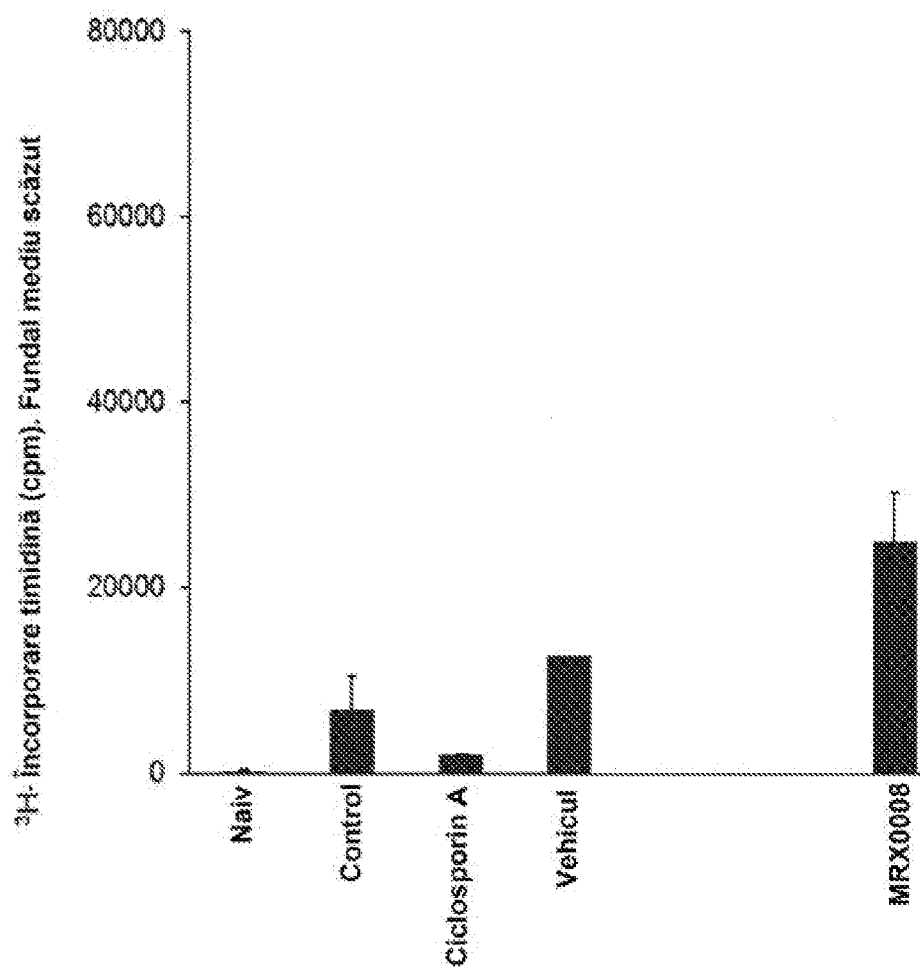
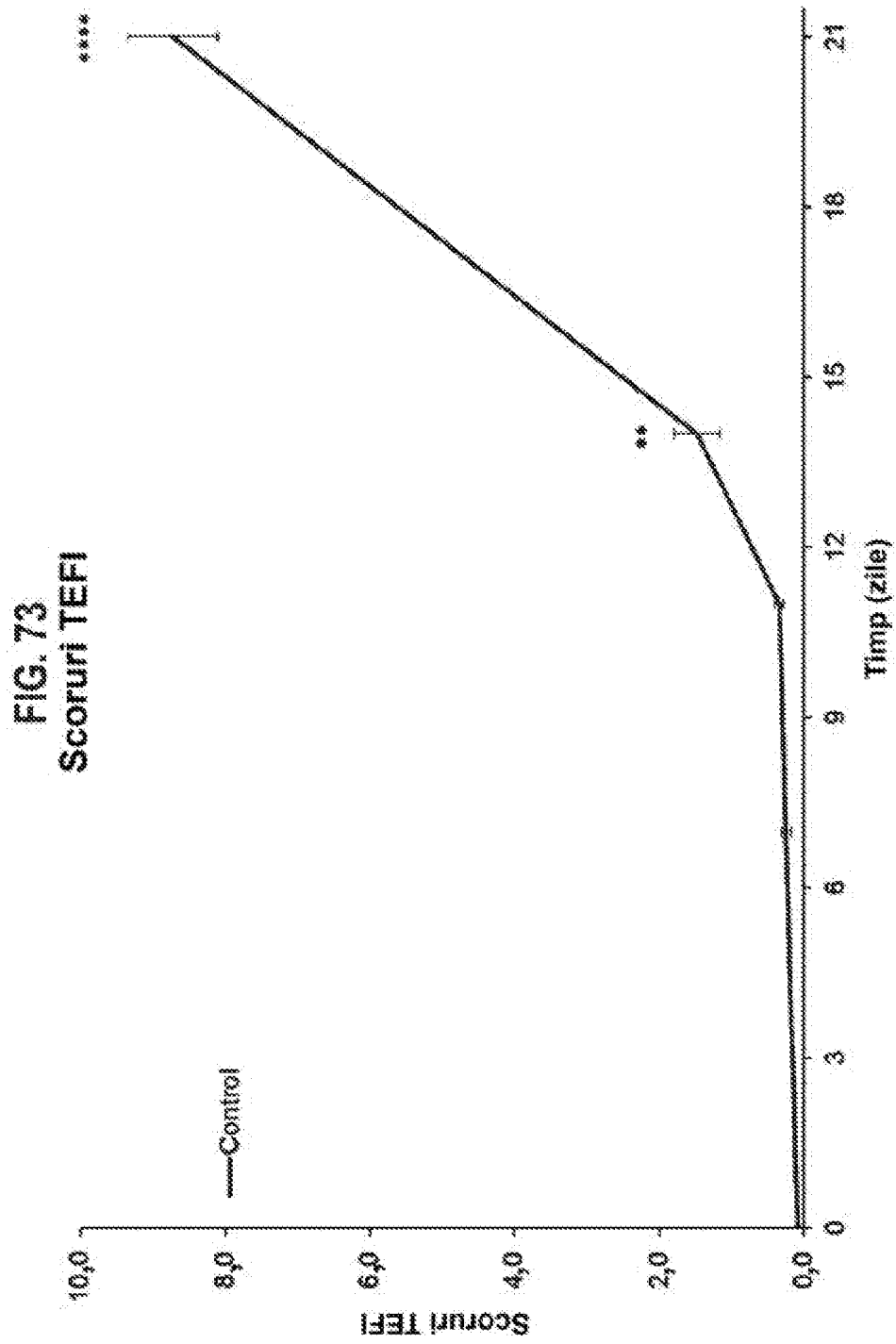


FIG. 72

Răspunsurile proliferative ale nodului limfatic la IRBP, ziua 21





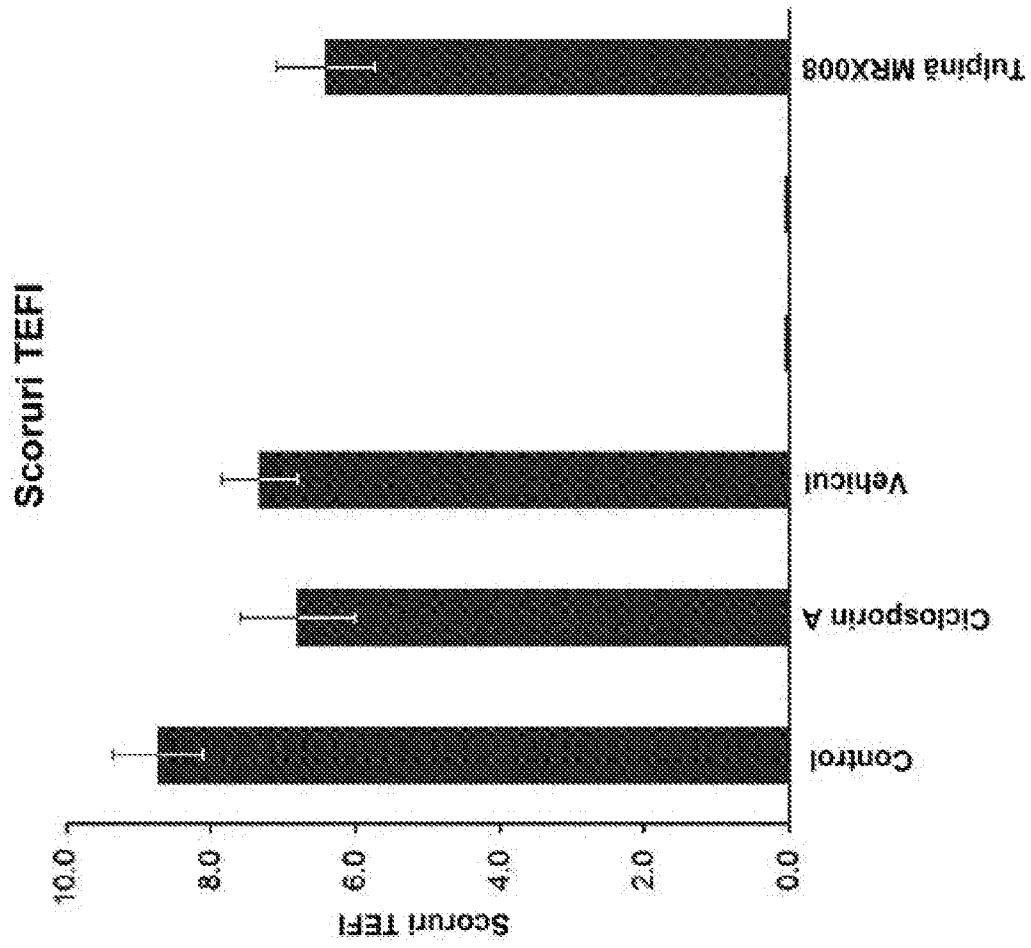


FIG. 74

FIG. 75

Concentrație IL-6

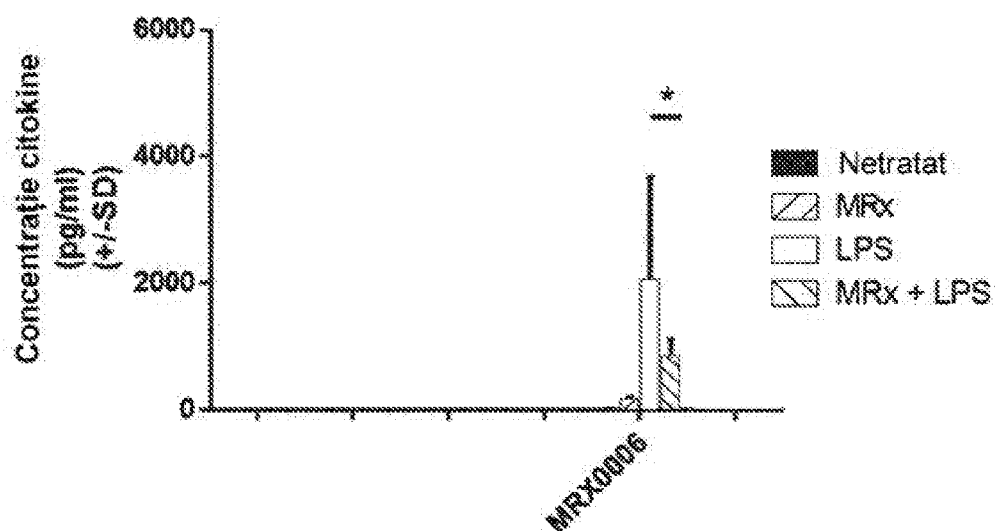


FIG. 76

Concentrație TNFa

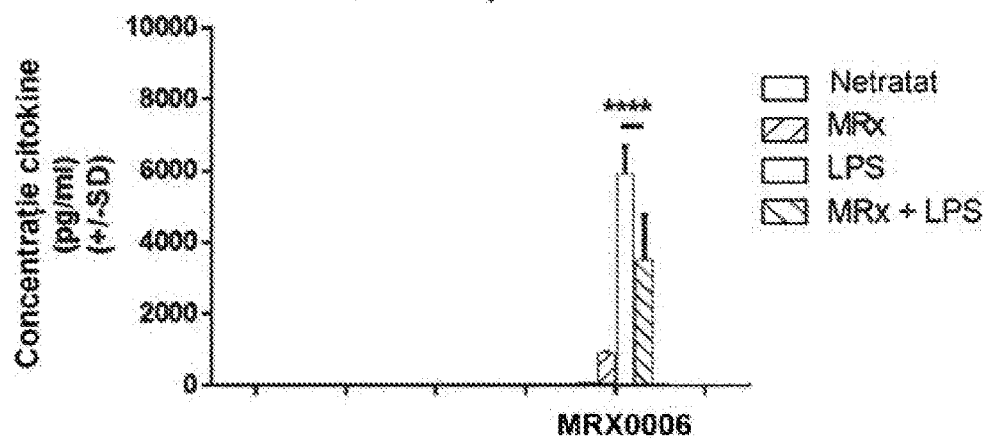


FIG. 77
Maturație MoDC (Cd1a+CD14-)

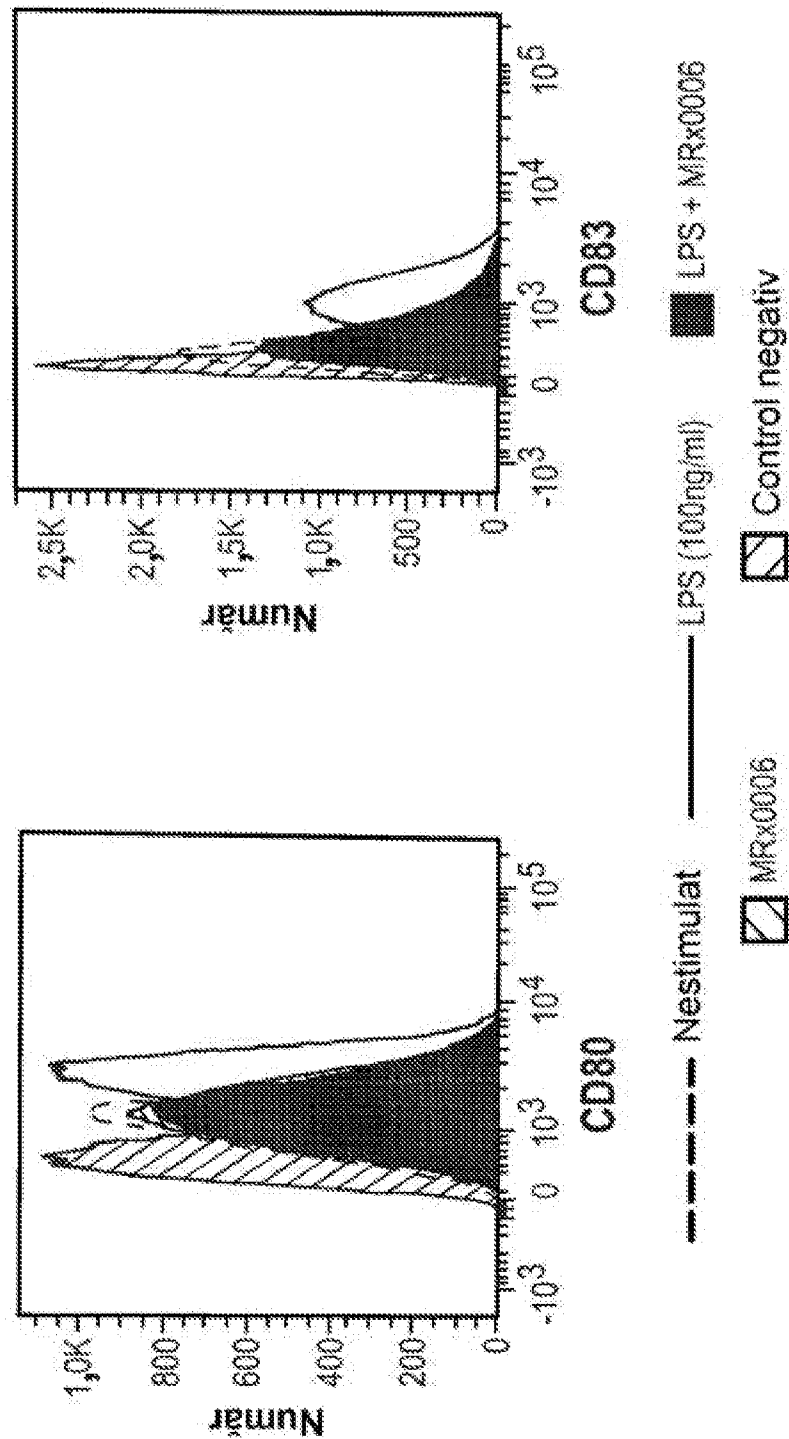


FIG. 77 (cont.)
Maturație MoDC (Cd1a+CD14-)

