

COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN CEPAS BACTERIANAS

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se encuentra en el campo de las composiciones
5 que comprenden cepas bacterianas aisladas del tracto digestivo
de los mamíferos y el uso de tales composiciones en el tratamiento
de la enfermedad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se considera que el intestino humano es estéril *in utero*, pero
está expuesto a una gran variedad de microbios maternos y del medio
ambiente inmediatamente después del nacimiento. Posteriormente,
sucede un periodo dinámico de colonización y sucesión microbiana,
que está influenciado por factores tales como el modo de parto,
15 medio ambiente, dieta y genotipo del huésped, todos los cuales
tienen un impacto en la composición de la microbiota intestinal,
particularmente durante los primeros años de vida. Luego, la
microbiota se estabiliza y se vuelve como la de un adulto [1].
La microbiota intestinal humana contiene más de 500 a 1000
20 filotipos diferentes que pertenecen esencialmente a dos
divisiones bacterianas principales, la Bacteroidetes y la
Firmicutes [2]. Las relaciones simbióticas exitosas que surgen
de la colonización bacteriana de la víscera humana han producido
una amplia variedad de funciones metabólicas, estructurales,

protectoras así como otras funciones favorables. Las actividades metabólicas mejoradas de los intestinos colonizados aseguran que otros componentes de la dieta indigeribles sean degradados con liberación de subproductos que proveen una importante fuente de
5 nutrientes para el huésped. De manera similar, la importancia inmunológica de la microbiota intestinal es muy reconocida y está ejemplificada en los animales libres de gérmenes que tienen un sistema inmunitario deteriorado que es reconstituido funcionalmente después de la introducción de las bacterias
10 comensales [3-4].

Cambios drásticos en la composición de la microbiota han sido documentados en los trastornos gastrointestinales tal como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, los niveles de las bacterias del grupo
15 *Clostridium* XIVa son reducidos en los pacientes con IBD mientras que los números de *E. coli* se incrementan, lo que sugiere un cambio en el equilibrio de simbiosis y patosimbiosis dentro de los intestinos [5-6]. Resulta interesante que esta disbiosis microbiana está también asociada con desbalances en las
20 poblaciones de los linfocitos T efectores.

En reconocimiento del potencial efecto positivo que ciertas cepas bacterianas pueden tener en los intestinos animales, se han propuesto diversas cepas para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades (ver, por ejemplo, [7-8]). Igualmente, se han

propuesto ciertas cepas, que incluyen principalmente las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, para uso en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias que no están directamente relacionadas con los intestinos (ver [9] y [10] para comentarios). Sin embargo, está muy mal caracterizada la relación entre las diferentes enfermedades y las diferentes cepas bacterianas, así como también los efectos precisos de las cepas bacterianas particulares sobre los intestinos y a un nivel sistémico y en cualquier tipo particular de enfermedades.

Hay una necesidad en la técnica de nuevos métodos para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. Hay también una necesidad de caracterizar los posibles efectos de las bacterias intestinales de modo que se puedan desarrollar nuevas terapias que utilicen las bacterias intestinales.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento y prevención de las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias. En particular, los inventores han desarrollado nuevas terapias para el tratamiento y prevención de las enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. En particular, los inventores han identificado que las cepas bacterianas del género *Blautia* pueden ser efectivas para reducir

la respuesta inflamatoria de Th17. Tal como se describe en los ejemplos, la administración oral de las composiciones que comprenden *Blautia stercoris* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, incluso la respuesta inflamatoria de Th17, en modelos de ratones con asma, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple. De igual modo, tal como se describe en los ejemplos, la administración oral de las composiciones que comprenden *Blautia wexlerae* puede reducir la gravedad de la respuesta inflamatoria, que incluye la respuesta inflamatoria Th17, en modelos de ratones con uveítis. Por lo tanto, los inventores han identificado que dos cepas diferentes de especies diferentes en el género *Blautia* pueden ser efectivas para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias.

Por lo tanto, en una primera realización, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. Los inventores han identificado que el tratamiento con cepas bacterianas de este género puede reducir los niveles de citoquinas que son parte de la vía Th17, incluso IL-17, puede aliviar la respuesta inflamatoria de Th17 y puede proporcionar beneficios clínicos en los modelos de ratones con enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias mediadas por la IL-17 y la vía

Th17.

En realizaciones particulares, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección que se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis múltiple; artritis, tal como artritis reumatoidea, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés); cáncer, tal como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de ovarios; uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behçet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica y rechazo de aloinjerto. El efecto mostrado por las cepas bacterianas del género *Blautia* en la respuesta inflamatoria de Th17 puede proveer beneficios terapéuticos para las enfermedades y las afecciones mediadas por la IL-17 y la vía Th17, tales como las que se enumeran anteriormente.

En las realizaciones preferidas, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*,

para su uso en un método de tratamiento o prevención del asma, tal como asma neutrofílica o asma alérgica. Los inventores han identificado que el tratamiento con las cepas de *Blautia* puede reducir la incorporación de neutrófilos y eosinófilos en los pulmones, lo que puede ayudar a tratar o prevenir el asma. Además, los inventores han probado y demostrado la eficacia de las cepas de *Blautia* en modelos de ratones con asma. En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un método de tratamiento o prevención del asma neutrofílica o asma eosinofílica. El efecto mostrado por las composiciones de la presente invención en los neutrófilos y eosinófilos significa que pueden ser particularmente efectivas para el tratamiento o prevención del asma neutrofílica y el asma eosinofílica. En efecto, en ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma, o la composición es para su uso en un método para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma. En las realizaciones preferidas, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris* para su uso en el tratamiento del asma, y en particular el asma eosinofílica o alérgica. Igualmente, se muestra que *Blautia stercoris* tiene un efecto particularmente pronunciado en los neutrófilos en los modelos con asma y el tratamiento con

Blautia stercoris puede ser particularmente efectivo para tratar el asma neutrofílica. En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae* para su uso en el tratamiento del
5 asma, y en particular el asma eosinofílica o alérgica.

En realizaciones preferidas adicionales, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para tratar o prevenir la artritis reumatoide. Los inventores han identificado que el
10 tratamiento con las cepas de *Blautia* puede proveer beneficios clínicos en un modelo de ratón de artritis reumatoidea y puede reducir la inflamación de las articulaciones. En las realizaciones preferidas, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*,
15 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea. Las composiciones que usan *Blautia stercoris* pueden ser particularmente efectivas para el tratamiento de la artritis reumatoidea. En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la
20 especie *Blautia wexlerae*, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoidea.

En las realizaciones preferidas adicionales, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para tratar o prevenir

la esclerosis múltiple. Los inventores han identificado que el tratamiento con las cepas de *Blautia* puede reducir la incidencia de la enfermedad así como la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple. En las realizaciones preferidas, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple. Las composiciones que usan *Blautia stercoris* pueden ser particularmente efectivas para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

En las realizaciones preferidas adicionales, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para tratar o prevenir la uveítis, tal como la uveítis posterior. Los inventores han identificado que el tratamiento con las cepas de *Blautia* puede reducir la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de uveítis y puede prevenir o reducir el daño en la retina. En las realizaciones preferidas, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para su uso en el tratamiento de la uveítis. Las composiciones que usan *Blautia wexlerae* pueden ser particularmente efectivas para el tratamiento

de la uveítis. En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para su uso en el tratamiento de la uveítis.

- 5 En realizaciones preferidas adicionales, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*, para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, tal como cáncer de mama, pulmón o hígado. Las composiciones que comprenden una cepa bacteriana del género
- 10 *Blautia* pueden reducir el crecimiento tumoral en modelos de ratones con cáncer de mama, pulmón e hígado. En ciertas realizaciones, la composición es para su uso en un método para reducir el tamaño del tumor o prevenir el crecimiento tumoral en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la presente
- 15 invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para su uso en el tratamiento del cáncer. En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 20 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en un método para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación celular de Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. En particular, las composiciones de la

presente invención se pueden usar para reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación celular de Th17 en el tratamiento o prevención del asma, artritis reumatoidea o esclerosis múltiple, o de asma, artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, uveítis o

5 cáncer. De manera preferible, la presente invención provee composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para su uso en reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación celular de Th17 en el tratamiento o prevención del asma, artritis reumatoidea o esclerosis múltiple.

10 La presente invención también provee composiciones que comprenden una cepa bacteriana de la especie *Blautia stercoris*, para su uso en reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación celular de Th17 en el tratamiento o prevención de la uveítis. La presente invención también provee composiciones que comprenden

15 una cepa bacteriana de la especie *Blautia wexlerae*, para su uso en reducir la producción de IL-17 o reducir la diferenciación celular de Th17 en el tratamiento o prevención del asma, artritis reumatoidea o esclerosis múltiple o uveítis.

En ciertas realizaciones, la composición es para uso en un paciente

20 con elevados niveles de IL-17 o células Th17. El efecto en la respuesta inflamatoria de Th17 mostrado por las cepas de *Blautia* puede ser particularmente beneficioso para tales pacientes.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Blautia stercoris*. También se

pueden usar cepas estrechamente relacionadas, tales como las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia*
5 *stercoris*. De manera preferible, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:1 o 2. De manera preferible, la identidad de la secuencia es con la SEQ ID NO:2. De manera preferible, la cepa bacteriana para uso en la presente
10 invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:2.

En las realizaciones preferidas de la presente invención, la cepa bacteriana en la composición es de *Blautia wexlerae*. También se pueden usar cepas estrechamente relacionadas, tales como cepas
15 bacterianas que tienen una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*. De manera preferible, la cepa bacteriana tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98
20 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:3 o 4. De manera preferible, la identidad de la secuencia es con la SEQ ID NO:4. De manera preferible, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención es para administración oral. La administración oral de las cepas de la presente invención puede ser efectiva para tratar enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

5 También, la administración oral es conveniente para pacientes y médicos y permite la administración hacia y/o la colonización parcial o total del intestino.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención comprende uno o más excipientes o portadores farmacéuticamente
10 aceptables

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención comprende una cepa bacteriana que ha sido liofilizada. La liofilización es una técnica efectiva y conveniente para la preparación de composiciones estables que permiten la
15 administración de las bacterias.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee un producto alimenticio que comprende la composición tal como se describió anteriormente.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee una
20 composición de vacuna que comprende la composición tal como se describió anteriormente.

De manera adicional, la presente invención provee un método para tratar o prevenir una enfermedad o estado de salud mediado por la IL-17 o la vía Th17, que comprende la administración de una

composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia*.

En el desarrollo de la presente invención anteriormente mencionada, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana que es particularmente útil para la terapia. Se

5 muestra que la cepa de *Blautia stercoris* de la presente invención es efectiva para el tratamiento de las enfermedades descritas en el presente documento, tales como artritis, asma y esclerosis múltiple. Por lo tanto, en otro de los aspectos, la presente invención provee una célula de la cepa de *Blautia stercoris*
10 depositada con el número de acceso NCIMB 42381, o un derivado de esta. La invención también provee composiciones que comprenden tales células o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también provee una célula de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, o un
15 derivado de esta, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

En el desarrollo de la presente invención mencionada anteriormente, los inventores han identificado y caracterizado una cepa bacteriana adicional que es particularmente útil para
20 terapia. La cepa de *Blautia wexlerae* de la presente invención se muestra que es efectiva para tratar las enfermedades descritas en el presente documento, tal como la uveítis. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención provee una célula de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486,

o un derivado de esta. La invención también provee composiciones que comprenden dichas células o cultivos biológicamente puros de tales células. La invención también provee una célula de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486,
5 o un derivado de esta, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Conteo total de células en el fluido BAL.
10

La **Figura 2**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Conteo total de eosinófilos en BALF.

La **Figura 3**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Proporción de eosinófilos en BALF.

15 La **Figura 4**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Conteo total de macrófagos en BALF.

La **Figura 5**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Proporción de macrófagos en BALF.

20 La **Figura 6**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Conteo total de neutrófilos en BALF.

La **Figura 7**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Proporción de neutrófilos en el BALF.

La **Figura 8**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Conteo total de linfocitos en BALF.

La **Figura 9**: modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Proporción de linfocitos en BALF.

La **Figura 10**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Conteo total de células en el fluido BAL.

5 La **Figura 11**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Conteo total de eosinófilos en el BALF.

La **Figura 12**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Proporción de eosinófilos en el BALF.

La **Figura 13**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Conteo
10 total de macrófagos en el BALF.

La **Figura 14**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Proporción de macrófagos en el BALF.

La **Figura 15**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Conteo total de neutrófilos en el BALF.

15 La **Figura 16**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Proporción de neutrófilos en el BALF.

La **Figura 17**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Conteo total de linfocitos en el BALF.

La **Figura 18**: modelo de ratón de asma grave neutrofílica -
20 Proporción de linfocitos en el BALF.

La **Figura 19**: modelo de ratón de artritis reumatoidea - Pesos corporales, días -14 a 0. Los datos se presentan como porcentajes de la Media $\pm$ SEM [error estándar de la media] de los pesos corporales iniciales (Día -14).

La **Figura 20:** modelo de ratón de artritis reumatoidea - Pesos corporales, días 0 a 42. Los datos se presentan como porcentajes de la Media $\pm$ SEM de los pesos corporales iniciales (Día 0). ♦ $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

5 La **Figura 21:** modelo de ratón de artritis reumatoidea - Puntajes clínicos. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM. **** $p < 0,0001$ en comparación con el Día 21 en el grupo tratado con el vehículo. ♦ $p < 0,05$ en comparación con el grupo tratado con el vehículo en un día dado.

10 La **Figura 22:** modelo de ratón de artritis reumatoidea - Respuesta proliferativa de esplenocitos a Colágeno II. Conteo por minuto menos el antecedente del medio [estimulación por CII - antecedente del medio] por minuto en función de la incorporación de 3H-TdR. Todos los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ en
15 comparación con el grupo del vehículo.

La **Figura 23:** modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IFN γ en sobrenadantes del cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores de las medianas grupales.

La **Figura 24:** Modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles
20 de IL-17A en sobrenadantes del cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores de las medianas grupales.

La **Figura 25:** Modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IL-10 en sobrenadantes del cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores de las medianas grupales.

La **Figura 26:** Modelo de ratón de artritis reumatoidea - Niveles de IL-6 en sobrenadantes del cultivo de tejidos. Las líneas representan los valores de las medianas grupales.

La **Figura 27:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico -IgE total en suero

La **Figura 28:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - IgG1 específico de HDM en el suero

La **Figura 29:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico -IgE total en el BALF

10 La **Figura 30:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - IgG1 específico de HDM en BALF

La **Figura 31:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje promedio de infiltración peribronquial

15 La **Figura 32:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Análisis histológico - Puntaje promedio de infiltración perivascular

La **Figura 33:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Análisis Histológico - Puntaje de inflamación promedio (Promedio del puntaje de infiltración peribronquial y perivascular)

La **Figura 34:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Análisis Histológico - Puntaje de mucosidad

La **Figura 35:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del

polvo doméstico - Nivel de IL-9 en el tejido pulmonar

La **Figura 36:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1a en el tejido pulmonar

La **Figura 37:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IFN γ en el tejido pulmonar

La **Figura 38:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-17A en el tejido pulmonar

La **Figura 39:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-4 en el tejido pulmonar

10 La **Figura 40:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-5 en el tejido pulmonar

La **Figura 41:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de IL-1b en el tejido pulmonar

15 La **Figura 42:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de RANTES en el tejido pulmonar

La **Figura 43:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de MIP-1a en el tejido pulmonar

La **Figura 44:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de KC en el tejido pulmonar

20 La **Figura 45:** Modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico - Nivel de MIP-2 en el tejido pulmonar

La **Figura 46:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG1 específico de HDM en el suero

La **Figura 47:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG2a

específico de HDM en el suero

La **Figura 48:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG1 específico de HDM en el BALF

La **Figura 49:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - IgG2a
5 específico de HDM en el BALF

La **Figura 50:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Análisis histológico - Puntaje promedio de infiltración peribronquial

La **Figura 51:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Análisis histológico - Puntaje promedio de infiltración perivascular

10 La **Figura 52:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Análisis histológico - Puntaje de inflamación promedio (Promedio del Puntaje peribronquial y perivascular)

La **Figura 53:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de TNF α en el tejido pulmonar

15 La **Figura 54:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IL-1 α en el tejido pulmonar

La **Figura 55:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IFN γ en el tejido pulmonar

La **Figura 56:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
20 de IL-17F en el tejido pulmonar

La **Figura 57:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IL-1 β en el tejido pulmonar

La **Figura 58:** Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de RANTES en el tejido pulmonar

La **Figura 59**: Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de MIP-2 en el tejido pulmonar

La **Figura 60**: Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de KC en el tejido pulmonar

5 La **Figura 61**: Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de IL-17A en el tejido pulmonar

La **Figura 62**: Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel de MIP-1a en el tejido pulmonar

La **Figura 63**: Modelo de ratón de asma grave neutrofílica - Nivel
10 de IL-33 en el tejido pulmonar

La **Figura 64**: Modelo de ratón de artritis reumatoidea - Plantilla gráfica para el puntaje de histopatología. Imágenes representativas que muestran puntajes compuestos de las articulaciones del tarso de los ratones en un estudio de la
15 artritis inducida por colágeno.

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

20 La **Figura 66**: Modelo de ratón de artritis reumatoidea - Histopatología: Puntajes de cartílago. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

La **Figura 67**: Modelo de ratón de artritis reumatoidea -

Histopatología: Puntajes óseos. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

La **Figura 68**: Modelo de ratón de artritis reumatoidea -

5 Histopatología: Puntajes totales. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM. *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con el vehículo.

La **Figura 69**: Modelo de ratón de artritis reumatoidea -

Histopatología: ilustraciones representativas. ID Animal (#n.n)

10 y extremidad (R para la derecha, L para la izquierda) se indican entre paréntesis. Imagen de la izquierda (vehículo): destrucción extensa de la articulación y hueso con inflamación y fibrosis extendiéndose a los tejidos blandos periarticulares.

La **Figura 70**: Modelo de ratón de esclerosis múltiple - puntaje

15 clínico.

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

La **Figura 72**: Modelo de ratón de uveítis - Respuesta proliferativa

del ganglio linfático al péptido de IRBP. Conteo por minuto menos

20 el antecedente del medio [estimulado con péptido de IRBP - antecedente del medio] en función de la incorporación de timidina 3H. Todos los datos se presentan como la Media + SEM (n=3).

La **Figura 73**: Modelo de ratón de uveítis - Puntajes TEFI en el grupo de control. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM.

La **Figura 74:** Modelo de ratón de uveítis - Puntajes TEFI en el Día 21. Los datos se presentan como la Media $\pm$ SEM.

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

5 La **Figura 76:** Ensayo inflamatorio inducido por LPS - Niveles de TNF α

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

La **Figura 78:** Ensayo inflamatorio inducido por ovoalbúmina -
10 Niveles celulares de CD4+

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Cepas bacterianas

Las composiciones de la presente invención comprenden una cepa
15 bacteriana del género *Blautia*. Los ejemplos demuestran que las bacterias de este género son útiles para el tratamiento o prevención de las enfermedades y las afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. Las cepas bacterianas preferidas son de la especie *Blautia*.

20 Los ejemplos de cepas de *Blautia* para su uso en la presente invención incluyen *Blautia stercoris*, *B. faecis*, *B. coccoides*, *B. gluceracea*, *B. hansenii*, *B. hydrogenotrophica*, *B. luti*, *B. producta*, *B. schinkii* y *B. wexlerae*. Las especies *Blautia* son bacterias grampositivas, no móviles que pueden ser ya sea cocoides

u ovales y todas son anaerobios obligados que producen ácido acético como el principal producto final de la fermentación de la glucosa [11]. La *Blautia* puede ser aislada de los intestinos humanos, aunque *B. producta* se aisló de una muestra de septicemia.

5 El número de acceso GenBank para la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa GAM6-1^T de *Blautia stercoris* es HM626177 (descrita en el presente documento como la SEQ ID NO:1). Una cepa de *Blautia stercoris* de ejemplo se describe en [12]. La cepa tipo de *Blautia wexlerae* es WAL 14507 = ATCC BAA-1564 = DSM 19850 [13]. El número
10 de acceso GenBank para la secuencia del gen ARNr 16S de la cepa *Blautia wexlerae* WAL 14507 T es EF036467 (descrita en el presente documento como la SEQ ID NO:3). Esta cepa de *Blautia wexlerae* de ejemplo se describe en [13].

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

El genoma de la cepa 830 comprende un cromosoma y plásmido. Una secuencia de cromosoma para la cepa 830 se provee en la SEQ ID NO:5. Una secuencia de plásmido para la cepa 830 se provee en la SEQ ID NO:6. Estas secuencias se generaron usando la plataforma
5 PacBio RS II.

La bacteria *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486 fue probada en los ejemplos y también se hace referencia en el presente documento como la cepa MRX008. Una secuencia ARNr 16S para la cepa MRX008 que fue probada se provee
10 en la SEQ ID NO:4. La cepa MRX008 fue depositada con la autoridad depositaria internacional NCIMB, Ltd. (Ferguson Building, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia) por 4D Pharma Research Ltd. (Life Sciences Innovation Building, Aberdeen, AB25 2ZS, Escocia) el 16 de noviembre de 2015 como "*Blautia/Ruminococcus*" y se le asignó
15 el número de acceso NCIMB 42486.

Igualmente se espera que las cepas bacterianas estrechamente relacionadas con las cepas probadas en los ejemplos sean efectivas para el tratamiento o prevención de las enfermedades y las afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. En ciertas
20 realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia stercoris*. De manera preferible, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención

tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:1 o 2. De manera preferible, la identidad de la secuencia es con la SEQ ID NO:2. De manera preferible, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:2. En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la secuencia de ARNr 16s de una cepa bacteriana de *Blautia wexlerae*. De manera preferible, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene una secuencia de ARNr 16s que es por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO:3 o 4. De manera preferible, la identidad de la secuencia es con la SEQ ID NO:4. De manera preferible, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene la secuencia de ARNr 16s representada por la SEQ ID NO:4.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5. En las realizaciones preferidas, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención tiene un cromosoma con por lo menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo por lo menos 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) a la SEQ ID NO:5 a través de por lo menos 60 % (por ejemplo por lo menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 96 %,

97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de la SEQ ID NO:5. Por ejemplo, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención puede tener un cromosoma con por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 70 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 80 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 90 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 100 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 70 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 80 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 90 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 100 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 70 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 80 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 90 % de la SEQ ID NO:5, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 a través del 100 % de la SEQ ID NO:5.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención tiene un plásmido con identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6. En las realizaciones preferidas, la cepa

bacteriana para uso en la presente invención tiene un plásmido con por lo menos 90 % de identidad de secuencia (por ejemplo por lo menos 92 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia) a la SEQ ID NO:6 a través de por lo menos 60 % (por ejemplo por lo menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %) de la SEQ ID NO:6. Por ejemplo, la cepa bacteriana para su uso en la presente invención puede tener un plásmido con por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 70 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 80 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 90% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 90 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 90 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 100 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 70 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 80 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 90 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 95 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 100 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 70 % de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 98% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 80% de la SEQ ID NO:6, o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 90 % de la SEQ ID NO:6,

o por lo menos 98 % de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6 a través del 100 % de la SEQ ID NO:6.

En ciertas realizaciones, la cepa bacteriana para uso en la presente invención tiene un cromosoma con identidad de secuencia a la SEQ ID NO:5 y un plásmido con identidad de secuencia a la SEQ ID NO:6.

Se espera también que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso 42381 sean efectivas para el tratamiento o prevención de las enfermedades y las afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. También se espera que las cepas bacterianas que son biotipos de la bacteria depositada con el número de acceso 42486 sean efectivas para el tratamiento o prevención de las enfermedades y las afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17. Un biotipo es una cepa estrechamente relacionada que tiene las mismas características fisiológicas y bioquímicas o muy similares.

Las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 y que son idóneas para su uso en la presente invención pueden identificarse al determinar la secuenciación de otras secuencias de nucleótidos para una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486. Por ejemplo, sustancialmente todo el genoma puede ser secuenciado y una cepa biotipo para uso en la presente invención puede tener por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad

de secuencia a través de por lo menos 80 % de su genoma completo (por ejemplo a través de por lo menos 85 %, 90 %, 95 % o 99 %, o a través de su genoma completo). Otras secuencias adecuadas para uso en la identificación de las cepas biotipo pueden incluir hsp60 o secuencias repetitivas tales como BOX, ERIC, (GTG)₅, o REP o [14]. Las cepas biotipo pueden tener secuencias con por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486.

De manera alternativa, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 y que son adecuadas para uso en la presente invención pueden identificarse mediante el depósito con número de acceso NCIMB 42381 o el depósito con número de acceso NCIMB 42486, y el análisis de fragmentos de restricción y/o análisis PCR, por ejemplo mediante el uso de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados fluorescentes (FAFLP, por sus siglas en inglés) y huellas genéticas de PCR(rep) de elementos de ADN repetitivos, o análisis del perfil de proteínas, o secuenciación parcial de ADNr 16S o 23s. En las realizaciones preferidas, tales técnicas se pueden utilizar para identificar otras cepas de *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

En ciertas realizaciones, las cepas que son biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486

y que son adecuadas para uso en la presente invención son cepas que proveen el mismo patrón que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 cuando se analizan mediante el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés), por ejemplo cuando se utiliza una enzima de restricción Sau3AI (para una guía y métodos de ejemplo ver, por ejemplo, [15]). De manera alternativa, las cepas biotipo son identificadas como cepas que tienen los mismos patrones de fermentación de carbohidratos que una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486.

Otras cepas de *Blautia* que son útiles en las composiciones y métodos de la presente invención, tales como biotipos de una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486, pueden ser identificadas usando cualquier método o estrategia apropiados, incluso los ensayos que se describen en los ejemplos. Por ejemplo, las cepas para uso en la presente invención pueden ser identificadas mediante su cultivo en YCFA anaeróbico y/o al administrar las bacterias al modelo de ratón de artritis inducida por colágeno tipo II y luego evaluar los niveles de citoquina. En particular, las cepas bacterianas que tienen patrones de crecimiento, tipo metabólico y/o antígeno de superficie similares para una bacteria depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 pueden ser útiles en la presente invención. Una cepa útil tendrá actividad moduladora inmunitaria comparable con la cepa

NCIMB 42381 o 42486. En particular, una cepa biotipo provocará efectos comparables en los modelos con enfermedad de asma, artritis, esclerosis múltiple y uveítis y efectos comparables en los niveles de citoquina para los efectos que se muestran en los ejemplos, que pueden ser identificados usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los ejemplos.

Una cepa particularmente preferida de la presente invención es la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381. Esta es la cepa 830 de ejemplo probada en los ejemplos y que mostró ser efectiva para tratar la enfermedad. Por lo tanto, la presente invención provee una célula, tal como una célula aislada, de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, o un derivado de esta. La invención también provee una composición que comprende una célula de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, o un derivado de esta. La invención también provee un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381. La invención también provee una célula de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381, o un derivado de esta, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

Una cepa particularmente preferida de la presente invención es la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso

NCIMB 42486. Esta es la cepa MRX008 de ejemplo probada en los ejemplos y que mostró ser efectiva para tratar la enfermedad. Por lo tanto, la presente invención provee una célula, tal como una célula aislada, de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el

5 número de acceso NCIMB 42486, o un derivado de esta. La invención también provee una composición que comprende una célula de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486, o un derivado de esta. La invención también provee un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con

10 el número de acceso NCIMB 42486. La invención también provee una célula de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486, o un derivado de esta, para su uso en terapia, en particular para las enfermedades descritas en el presente documento.

15 Un derivado de la cepa depositada con el número de acceso NCIMB 42381 o 42486 puede ser una cepa hija (progenie) o una cepa cultivada (subclonada) de la original. Un derivado de una cepa de la presente invención puede ser modificado, por ejemplo al nivel genético, sin erradicar la actividad biológica. En particular,

20 una cepa derivada de la presente invención es terapéuticamente activa. Una cepa derivada tendrá actividad moduladora inmunitaria comparable a la cepa original NCIMB 42381 o 42486. En particular, una cepa derivada provocará efectos comparables en los modelos con enfermedades de asma, artritis, esclerosis múltiple e uveítis

y efectos comparables en los niveles de citoquina con los efectos mostrados en los ejemplos, que se pueden identificar usando los protocolos de cultivo y administración descritos en los ejemplos.

Un derivado de la cepa NCIMB 42381 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42381. Un derivado de la cepa NCIMB 42486 generalmente será un biotipo de la cepa NCIMB 42486.

Las referencias a las células de la cepa de *Blautia stercoris* depositada con el número de acceso NCIMB 42381 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42381, y tales células están comprendidas en la presente invención. Las referencias a las células de la cepa de *Blautia wexlerae* depositada con el número de acceso NCIMB 42486 abarcan cualquier célula que tenga las mismas características de seguridad y eficacia terapéutica que las cepas depositadas con el número de acceso NCIMB 42486, y tales células están comprendidas en la presente invención.

En las realizaciones preferidas, las cepas bacterianas en las composiciones de la presente invención son viables y capaces de colonizar de forma parcial o total el intestino.

Usos terapéuticos

Tal como se demostró en los ejemplos, las composiciones bacterianas de la presente invención son efectivas para reducir

la respuesta inflamatoria de Th17. En particular, el tratamiento con las composiciones de la presente invención logra una reducción en los niveles de IL-17A y otras citoquinas de la vía Th17, así como mejoras clínicas en modelos de animales con las afecciones
5 mediadas por la IL-17 y la vía Th17. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, y en particular las enfermedades o afecciones mediadas por la IL-17. En particular, las composiciones de la
10 presente invención pueden ser útiles para reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de la IL-17.

Las células Th17 son un subconjunto de las células T colaboradoras que producen, por ejemplo, IL-17A, IL17-F, IL-21 e IL-22. La diferenciación celular de Th17 y la expresión de IL-17 pueden ser
15 impulsadas por la IL-23. Estas citoquinas así como otras forman partes importantes de la vía Th17, que es una vía de señalización inflamatoria muy establecida que contribuye con y en la que subyace una variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias (tal como se describe en, por ejemplo, [16-17]). Las enfermedades
20 en donde la vía Th17 está activada son las enfermedades mediadas por la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden ser mitigadas o aliviadas mediante la represión de la vía Th17, lo que puede ser a través de una reducción en la diferenciación de las células Th17 o una reducción en su actividad o una reducción

en el nivel de las citoquinas de la vía Th17. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden ser caracterizadas por niveles incrementados de citoquinas producidas por las células Th17, tales como IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26, IL-9 (analizado en [18])). Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden ser caracterizadas por la expresión incrementada de los genes relacionados a Th-17, tal como Stat3 o IL-23R. Las enfermedades mediadas por la vía Th17 pueden ser asociadas con los niveles incrementados de las células Th17.

La IL-17 es una citoquina proinflamatoria que contribuye a la patogénesis de varias enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunitarias. La IL-17 tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a cualquier miembro de la familia IL-17, incluso IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, e IL-17F. Las enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 están caracterizadas por la alta expresión de IL-17 y/o la acumulación o la presencia de células IL-17 positivas en un tejido afectado por la enfermedad o afección. De manera similar, las enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 son enfermedades y afecciones que están exacerbadas por los elevados niveles de IL-17 o un incremento en los niveles de IL-17, y que se alivian mediante los bajos niveles de IL-17 o una reducción en los niveles de IL-17. La respuesta inflamatoria de IL-17 puede ser local o sistémica. Los ejemplos de las enfermedades y afecciones que pueden ser

mediadas por la IL-17 o la vía Th17 incluyen esclerosis múltiple; artritis, tal como artritis reumatoidea, osteoartritis, artritis psoriásica o artritis idiopática juvenil; neuromielitis óptica (enfermedad de Devic); espondilitis anquilosante; 5 espondiloartritis; psoriasis; lupus eritematoso sistémico; enfermedad inflamatoria intestinal, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa; enfermedad celíaca; asma, tal como asma alérgica o asma neutrofílica; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer de colon, 10 cáncer de pulmón o cáncer de ovarios; uveítis; escleritis; vasculitis; enfermedad de Behçet; aterosclerosis; dermatitis atópica; enfisema; periodontitis; rinitis alérgica; y rechazo de aloinjerto. En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención se utilizan para el tratamiento o 15 prevención de uno o más de estas afecciones o enfermedades. En realizaciones preferidas adicionales, estas afecciones o enfermedades son mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en un método para reducir la producción 20 de IL-17 o reducir la diferenciación celular Th17 en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, en donde dicho

tratamiento o prevención se logra al reducir o prevenir la elevación de la respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria, en donde el paciente tiene niveles de IL-17 elevados o células Th17 elevadas o presenta una respuesta inflamatoria de Th17. En ciertas realizaciones, el paciente puede haber sido diagnosticado con una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria crónica, o la composición de la presente invención puede ser para uso en la prevención de una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria que se desarrolla en una enfermedad o afección inflamatoria o autoinmunitaria crónica. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección puede no responder al tratamiento con inhibidores de TNF- α . Estos usos de la presente invención se pueden aplicar a cualquiera de las enfermedades o afecciones específicas que se mencionan en el párrafo anterior.

La vía IL-17 y Th17 son a menudo asociadas con las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias crónicas, de manera que las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones crónicas tal como se menciona anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en los pacientes con enfermedad crónica. En ciertas realizaciones, las

composiciones son para uso en la prevención del desarrollo de la enfermedad crónica.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para tratar las enfermedades y afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17 y para abordar la respuesta inflamatoria de Th17, de manera que las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento o prevención de la enfermedad crónica, tratamiento o prevención de la enfermedad en pacientes que no han respondido a otras terapias (tal como tratamiento con inhibidores de TNF- α), y/o tratamiento o prevención del daño a los tejidos y síntomas asociados con IL-17 y las células Th17. Por ejemplo, IL-17 es conocida por activar la destrucción de la matriz en el cartílago y tejido óseo y la IL-17 tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos, de manera que las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de la erosión ósea o daño a los cartílagos.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de IL-17, en particular los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de TNF α , IFN- γ o IL-6. Dicha reducción o prevención de los niveles elevados de estas citoquinas

puede ser útil para el tratamiento o prevención de las enfermedades y afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, en particular las mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones
5 de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de las células CD4+. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación del nivel de maduración de las células dendríticas, en particular de las
10 células dendríticas CD1a+ CD14- derivadas de monocitos. Dicha reducción o prevención de los niveles elevados de las células CD4+ o la reducción o prevención de la elevación en el nivel de maduración de las células dendríticas pueden ser útiles para el tratamiento o prevención de las enfermedades y afecciones
15 inflamatorias y autoinmunitarias y, en particular las mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

Asma

En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente
20 invención son para uso en el tratamiento o prevención del asma. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la presente invención alcanzan una reducción en la incorporación de neutrófilos y/o eosinófilos en las vías respiratorias posteriormente a la sensibilización y la provocación con extracto

de ácaros del polvo doméstico y de modo que pueden ser útiles en el tratamiento o prevención del asma. El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación y restricción de las vías respiratorias. La inflamación en el asma puede ser mediada por la IL-17 y/o las células Th17, y de este modo las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar el asma. La inflamación en el asma puede ser mediada por eosinófilos y/o neutrófilos.

En ciertas realizaciones, el asma es asma eosinofílica o alérgica. El asma eosinofílica y alérgica se caracterizan por el aumento de la cantidad de eosinófilos en la sangre periférica y en las secreciones de las vías respiratorias y están patológicamente asociadas con el espesamiento de la zona de la membrana basal y farmacológicamente por la capacidad de respuesta al corticoesteroide [19]. Las composiciones que reducen o inhiben la incorporación o activación de los eosinófilos pueden ser útiles para el tratamiento o prevención del asma eosinofílica y alérgica. En realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del asma neutrofílica (o asma no eosinofílica). Cantidades altas de neutrófilos están asociadas con asma grave que puede ser insensible al tratamiento con corticoesteroides. Las composiciones que reducen o inhiben el reclutamiento o activación de los neutrófilos pueden ser útiles para el tratamiento o

prevención del asma neutrofílica.

El asma eosinofílica y neutrofílica no son afecciones mutuamente excluyentes y los tratamientos que ayudan a abordar las respuestas de eosinófilos y neutrófilos pueden ser útiles para tratar el asma en general.

Los niveles incrementados de IL-17 y la activación de la vía Th17 están asociados con el asma grave, de modo que las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo del asma grave o para tratar el asma grave.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en los métodos para reducir una respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma, o para uso en los métodos para reducir una respuesta inflamatoria neutrofílica en el tratamiento o prevención del asma. Tal como se observó anteriormente, los altos niveles de eosinófilos en el asma están asociados patológicamente con el espesamiento de la zona de la membrana basal, de este modo la reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica en el tratamiento o prevención del asma puede ser capaz de tratar de manera específica esta característica de la enfermedad. De igual modo, los neutrófilos elevados, ya sea en combinación con eosinófilos elevados o en su ausencia, están asociados con asma grave y estrechamiento crónico de las vías respiratorias. Por lo tanto, reducir la respuesta inflamatoria neutrofílica puede ser particularmente útil para abordar el asma

grave.

En ciertas realizaciones, las composiciones reducen la infiltración peribronquial en el asma alérgica, o son para su uso en la reducción de la infiltración peribronquial en el tratamiento del asma alérgica. En ciertas realizaciones, las composiciones reducen la infiltración peribronquial y/o perivascular en el asma neutrofílica, o son para su uso en la reducción de la infiltración peribronquial y/o perivascular en el tratamiento del asma neutrofílica alérgica.

10 En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de $TNF\alpha$.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para su uso en un método de tratamiento del asma que resulta en una reducción de la respuesta inflamatoria eosinofílica y/o neutrofílica. En ciertas realizaciones, el paciente a ser tratado tiene, o se identificó que tenía, niveles elevados de neutrófilos o eosinófilos, por ejemplo tal como se identifica a través del muestreo de la sangre o análisis del esputo.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo del asma en un recién nacido cuando son administradas al recién nacido, o a una mujer embarazada. Las composiciones pueden ser útiles para prevenir el desarrollo del

asma en los niños. Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento o prevención del asma en adultos. Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para controlar o aliviar el asma. Las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con el asma que se ve agravada por los alérgenos, tales como los ácaros del polvo doméstico.

El tratamiento o prevención del asma puede referirse a, por ejemplo, un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o la amplitud de los factores desencadenantes que son un problema para el paciente.

Artritis

En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención de la artritis reumatoidea (RA, por sus siglas en inglés). Los ejemplos demuestran que las composiciones de la presente invención logran una reducción de los signos clínicos de la RA en un modelo de ratón, reducen el daño óseo y a los cartílagos, y reducen la respuesta inflamatoria de IL-17, y de este modo pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la RA. La RA es un trastorno inflamatorio sistémico que afecta principalmente las articulaciones. La RA está asociada con una respuesta inflamatoria que resulta en la hinchazón de las articulaciones, hiperplasia

sinovial, y la destrucción del cartílago y hueso. La IL-17 y las células Th17 pueden tener un papel clave en la RA, por ejemplo, porque la IL-17 inhibe la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos y activa la producción y función de metaloproteinasas de la matriz y porque la actividad de la enfermedad RA está correlacionada con los niveles de IL-17 y la cantidad de células Th-17 [20,21], de modo que las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar la RA.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en disminuir los niveles de IL-17 o prevenir la elevación de los niveles de IL-17 en el tratamiento o prevención de la RA. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de IL-17, en particular los niveles de IL-17A. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención provee una reducción o previene una elevación de los niveles de IFN- γ o IL-6.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción en la hinchazón de las articulaciones. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en pacientes con articulaciones inflamadas o pacientes identificados en riesgo de tener las articulaciones inflamadas. En ciertas realizaciones,

las composiciones de la presente invención son para uso en un método para reducir la inflamación de las articulaciones en la RA.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción del daño óseo o a los cartílagos. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en reducir o prevenir el daño óseo o de los cartílagos en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes con RA grave que están en riesgo de daño óseo o del cartílago.

Los niveles de IL-17 así como las cantidades de células Th17 incrementados se asocian con la destrucción del hueso y del cartílago en la RA [20,21]. La IL-17 es conocida por activar la destrucción de la matriz en el tejido óseo y del cartílago y la IL-17 tiene un efecto inhibitor en la producción de la matriz en condrocitos y osteoblastos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la prevención de la erosión ósea o daño a los cartílagos en el tratamiento de la RA. En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento de pacientes que presentan erosión ósea o daño a los cartílagos o pacientes identificados en riesgo de erosión ósea o daño a los cartílagos. El TNF- α está también asociado con la RA, pero TNF- α no está

implicado en la patogénesis de las últimas etapas de la enfermedad.

Por el contrario, la IL-17 tiene un papel a través de todas las etapas de la enfermedad crónica [22]. Por lo tanto, en ciertas

realizaciones las composiciones de la presente invención son para

5 uso en el tratamiento de la RA crónica o RA en etapa avanzada,

como una enfermedad que incluya la destrucción de las articulaciones y la pérdida del cartílago. En ciertas

realizaciones, las composiciones de la presente invención son para tratar pacientes que previamente han recibido terapia anti-TNF- α .

10 En ciertas realizaciones, los pacientes a ser tratados no responden o ya no responden a la terapia anti-TNF- α .

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para modular el sistema inmunitario de un paciente, de modo que en ciertas realizaciones las composiciones de la presente invención

15 son para uso en la prevención de la RA en un paciente que ha sido identificado en riesgo de RA, o que ha sido diagnosticado con RA en fase inicial. Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de la RA.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para

20 el control o alivio de la RA. Las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la inflamación de las articulaciones o destrucción del hueso. El tratamiento o prevención de la RA puede referirse a, por ejemplo, un alivio de la gravedad de los síntomas

o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o la amplitud de los factores desencadenantes que son un problema para el paciente.

5 Esclerosis múltiple

En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la presente invención alcanzan una reducción en la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple (el modelo EAE), y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple. La esclerosis múltiple es un trastorno inflamatorio asociado con el daño a los recubrimientos de mielina de las neuronas, particularmente en el cerebro y la columna vertebral. La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica, que es progresivamente incapacitante y que se desarrolla en episodios. La IL-17 y las células Th17 pueden tener un papel clave en la esclerosis múltiple, por ejemplo porque los niveles de IL-17 pueden correlacionarse con las lesiones de la esclerosis múltiple, IL-17 puede romper las uniones estrechas de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, y las células Th17 pueden migrar hacia el sistema nervioso central y producir pérdida neuronal [23,24]. Por lo tanto, las composiciones de la presente

invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar la esclerosis múltiple.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción en la incidencia de la enfermedad o gravedad de la enfermedad. En ciertas
5 realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en reducir la incidencia de la enfermedad o gravedad de la enfermedad. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención previene un deterioro de la función motriz o resulta en una función motriz mejorada. En
10 ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en prevenir un deterioro de la función motriz o para uso en mejorar la función motriz. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención previene el desarrollo de parálisis. En ciertas realizaciones,
15 las composiciones de la presente invención son para uso en prevenir la parálisis en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para modular el sistema inmunitario de un paciente, de modo que en
20 ciertas realizaciones las composiciones de la presente invención son para uso en prevenir la esclerosis múltiple en un paciente que se ha identificado en riesgo de esclerosis múltiple, o que ha sido diagnosticado con esclerosis múltiple en fase inicial o esclerosis múltiple "recurrente-remitente". Las composiciones de

la presente invención pueden ser útiles para prevenir el desarrollo de la esclerosis. En efecto, los ejemplos muestran que la administración de las composiciones de la presente invención previno el desarrollo de la enfermedad en muchos ratones.

5 Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para controlar o aliviar la esclerosis múltiple. Las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente útiles para reducir los síntomas asociados con la esclerosis múltiple. El tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple puede referirse
10 a, por ejemplo, un alivio de la gravedad de los síntomas o una reducción en la frecuencia de las exacerbaciones o la amplitud de los factores desencadenantes que son un problema para el paciente.

15 Uveítis

En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención de la uveítis. Los ejemplos demuestran que las composiciones de la presente invención alcanzan una reducción en la incidencia de la
20 enfermedad y la gravedad de la enfermedad en un modelo animal con uveítis y de este modo pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la uveítis. La uveítis es la inflamación de la úvea y puede resultar en la destrucción del tejido de la retina. Puede presentarse en diferentes formas anatómicas (anterior,

intermedia, posterior o difusa) y resulta de diferentes causas, pero relacionadas, que incluyen trastornos autoinmunitarios sistémicos. La IL-17 y la vía Th17 están de forma centralizada implicadas en la uveítis, por lo tanto las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente efectivas para prevenir o tratar la uveítis. Las referencias [25-26] describen niveles elevados de la interleucina-17A en el suero en los pacientes con uveítis, la asociación específica de las variantes genéticas de IL17A con panuveítis, el papel de las citoquinas asociadas a Th17 en la patogénesis de la uveítis autoinmunitaria experimental, el desequilibrio entre las células Th17 y las células T reguladoras durante la uveítis autoinmunitaria experimental monofásica, la regulación por aumento de la IL-17A en pacientes con uveítis y las enfermedades de Adamantiades-Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) activas, el tratamiento de la uveítis no infecciosa con secukinumab (anticuerpo anti-IL-17A), y Th17 en ojos con uveítis.

En ciertas realizaciones, la uveítis es uveítis posterior. La uveítis posterior se presenta principalmente con inflamación de la retina y corioidea y los ejemplos demuestran que las composiciones de la presente invención son efectivas para reducir la inflamación y el daño a la retina.

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción en el daño a

la retina. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la reducción o prevención del daño a la retina en el tratamiento de la uveítis. En ciertas realizaciones, las composiciones son para su uso en el tratamiento

5 de los pacientes con uveítis grave que están en riesgo de daño a la retina. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción en la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en reducir

10 o prevenir la inflamación del disco óptico. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción de la inflamación del tejido de la retina por las células inflamatorias. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para

15 uso en reducir la inflamación del tejido de la retina por las células inflamatorias. En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en el mantenimiento o mejora de la visión. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en mantener

20 o mejorar la visión.

En ciertas realizaciones, las composiciones son para uso en el tratamiento o prevención de la uveítis asociada con una enfermedad no infecciosa o autoinmunitaria, tal como la enfermedad de Behçet, enfermedad de Crohn, iridociclitis heterocrómica de Fuchs,

granulomatosis con poliangeítis, uveítis relacionada con HLA-B27, artritis idiopática juvenil, sarcoidosis, espondiloartritis, oftalmia simpática, nefritis tubulointersticial y síndrome de uveítis o síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada. Se ha demostrado que la IL-17A está involucrada en, por ejemplo, las enfermedades de Behçet y Vogt-Koyanagi-Harada.

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

Cáncer

En las realizaciones preferidas, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer.

La IL-17 y la vía Th17 tienen papeles fundamentales en el desarrollo y progresión del cáncer y por lo tanto las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento o prevención del cáncer.

Aunque los papeles de la IL-17 y las células Th17 en el cáncer no se comprenden totalmente, se conocen numerosos efectos protumor de la IL-17 y las células Th17. Por ejemplo, las células Th17 y la IL-17 pueden estimular la angiogénesis, incrementar la proliferación y supervivencia de las células tumorales y activar los factores de transcripción de estimulación tumoral [27-28].

En ciertas realizaciones, el tratamiento con las composiciones de la presente invención resulta en una reducción del tamaño del tumor o una reducción en el crecimiento tumoral. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para
5 uso en reducir el tamaño del tumor o reducir el crecimiento tumoral. Las composiciones de la presente invención pueden ser efectivas para reducir el tamaño o el crecimiento del tumor. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en pacientes con tumores sólidos. En ciertas
10 realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en reducir o prevenir la angiogénesis en el tratamiento del cáncer. La IL-17 y las células Th17 tienen papeles fundamentales en la angiogénesis. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la prevención de la
15 metástasis.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer de mama. Las composiciones de la presente invención pueden ser efectivas para tratar el cáncer de mama, y la IL-17 y las células
20 Th17 tienen papeles importantes en el cáncer de mama [29]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la reducción del tamaño del tumor, reducción del crecimiento tumoral, o reducción de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de mama. En las realizaciones preferidas,

el cáncer es carcinoma mamario. En las realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama en la etapa IV.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer de pulmón. Las composiciones de la presente invención pueden ser efectivas para tratar el cáncer de pulmón, y la IL-17 y las células Th17 tienen papeles fundamentales en el cáncer de pulmón [30]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la reducción del tamaño del tumor, reducción del crecimiento tumoral, o reducción de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de pulmón. En las realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de pulmón.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer de hígado. Las composiciones de la presente invención pueden ser efectivas para tratar el cáncer de hígado, y la IL-17 y las células Th17 tienen papeles fundamentales en el cáncer de hígado [31]. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en la reducción del tamaño del tumor, reducción del crecimiento tumoral, o reducción de la angiogénesis en el tratamiento del cáncer de hígado. En las realizaciones preferidas, el cáncer es hepatoma (carcinoma hepatocelular).

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del

carcinoma. Las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente efectivas para tratar el carcinoma. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención del cáncer no inmunógeno. Las composiciones de la presente invención pueden ser efectivas para tratar el cáncer no inmunógeno.

En realizaciones adicionales, las composiciones de la presente invención son para uso en el tratamiento o prevención de la leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, carcinoma de célula basal, cáncer de conducto biliar, cáncer de vejiga, tumor óseo, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer esofágico, sarcoma de Ewing, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST, por sus siglas en

inglés), tumor de células germinales, glioma, vía visual y del hipotálamo infantil, linfoma de Hodgkin, melanoma, carcinoma de las células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de las células renales, cáncer de laringe, leucemias, linfomas, 5 mesotelioma, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer bucofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer faríngeo, adenoma pituitario, neoplasia de la célula plasmática, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, sarcoma, cáncer 10 testicular, cáncer de tiroides o cáncer uterino.

Las composiciones de la presente invención pueden ser particularmente efectivas cuando se utilizan en combinación con agentes terapéuticos adicionales. Los efectos inmunomoduladores de las composiciones de la presente invención pueden ser efectivos 15 cuando se combinan con más agentes anticancerígenos directos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición que comprende una cepa bacteriana del género *Blautia* y un agente anticancerígeno. En las realizaciones preferidas, el agente anticancerígeno es un inhibidor del punto 20 de control inmunitario, una inmunoterapia dirigida con anticuerpos, una terapia con células CAR-T, un virus oncolítico o un fármaco citostático. En las realizaciones preferidas, la composición comprende un agente anticancerígeno seleccionado del grupo que consiste en: Yervoy (ipilimumab, BMS); Keytruda

(pembrolizumab, Merck); Opdivo (nivolumab, BMS); MEDI4736 (AZ/MedImmune); MPDL3280A (Roche/Genentech); Tremelimumab (AZ/MedImmune); CT-011 (pidilizumab, CureTech); BMS-986015 (lirilumab, BMS); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MSB-0010718C (Merck);

5 PF-05082566 (Pfizer); MEDI6469 (AZ/MedImmune); BMS-986016 (BMS); BMS-663513 (urelumab, BMS); IMP321 (Prima Biomed); LAG525 (Novartis); ARGX-110 (arGEN-X); PF-05082466 (Pfizer); CDX-1127 (varlilumab; CellDex Therapeutics); TRX-518 (GITR Inc.); MK-4166 (Merck); JTX-2011 (Jounce Therapeutics); ARGX-115 (arGEN-X);

10 NLG-9189 (indoximod, NewLink Genetics); INCB024360 (Incyte); IPH2201 (Innate Immunotherapeutics/AZ); NLG-919 (NewLink Genetics); anti-VISTA (JnJ); Epcadostat (INCB24360, Incyte); F001287 (Flexus/BMS); CP 870893 (Universidad de Pensilvania); MGA271 (Macrogenix); Emactuzumab (Roche/Genentech);

15 Galunisertib (Eli Lilly); Ulocuplumab (BMS); BKT140/BL8040 (Biokine Therapeutics); Bavituximab (Peregrine Pharmaceuticals); CC 90002 (Celgene); 852A (Pfizer); VTX-2337 (VentiRx Pharmaceuticals); IMO-2055 (Hybridon, Idera Pharmaceuticals); LY2157299 (Eli Lilly); EW-7197 (Universidad de

20 Mujeres Ewha, Corea); Vemurafenib (Plexxikon); Dabrafenib (Genentech/GSK); BMS-777607 (BMS); BLZ945 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre); Unituxin (dinutuximab, United Therapeutics Corporation); Blincyto (blinatumomab, Amgen); Cyramza (ramucirumab, Eli Lilly); Gazyva (obinutuzumab,

Roche/Biogen); Kadcyła (ado-trastuzumab emtansine,
 Roche/Genentech); Perjeta (pertuzumab, Roche/Genentech);
 Adcetris (brentuximab vedotin, Takeda/Millennium); Arzerra
 (ofatumumab, GSK); Vectibix (panitumumab, Amgen); Avastin
 5 (bevacizumab, Roche/Genentech); Erbitux (cetuximab, BMS/Merck);
 Bexxar (tositumomab-I131, GSK); Zevalin (ibritumomab tiuxetan,
 Biogen); Campath (alemtuzumab, Bayer); Mylotarg (gemtuzumab
 ozogamicin, Pfizer); Herceptin (trastuzumab, Roche/Genentech);
 Rituxan (rituximab, Genentech/Biogen); volociximab (Abbvie);
 10 Enavatuzumab (Abbvie); ABT-414 (Abbvie); Elotuzumab
 (Abbvie/BMS); ALX-0141 (Ablynx); Ozaralizumab (Ablynx);
 Actimab-C (Actinium); Actimab-P (Actinium); Milatuzumab-dox
 (Actinium); Emab-SN-38 (Actinium); Naptumonmab estafenatox
 (Active Biotech); AFM13 (Affimed); AFM11 (Affimed); AGS-16C3F
 15 (Agensys); AGS-16M8F (Agensys); AGS-22ME (Agensys); AGS-15ME
 (Agensys); GS-67E (Agensys); ALXN6000 (samalizumab, Alexion);
 ALT-836 (Altor Bioscience); ALT-801 (Altor Bioscience); ALT-803
 (Altor Bioscience); AMG780 (Amgen); AMG 228 (Amgen); AMG820
 (Amgen); AMG172 (Amgen); AMG595 (Amgen); AMG110 (Amgen); AMG232
 20 (adecatumumab, Amgen); AMG211 (Amgen/MedImmune); BAY20-10112
 (Amgen/Bayer); Rilotumumab (Amgen); Denosumab (Amgen); AMP-514
 (Amgen); MEDI575 (AZ/MedImmune); MEDI3617 (AZ/MedImmune);
 MEDI6383 (AZ/MedImmune); MEDI551 (AZ/MedImmune); Moxetumomab
 pasudotox (AZ/MedImmune); MEDI565 (AZ/MedImmune); MEDI0639

(AZ/MedImmune); MEDI0680 (AZ/MedImmune); MEDI562
 (AZ/MedImmune); AV-380 (AVEO); AV203 (AVEO); AV299 (AVEO);
 BAY79-4620 (Bayer); Anetumab ravtansine (Bayer); vantictumab
 (Bayer); BAY94-9343 (Bayer); Sibrotuzumab (Boehringer
 5 Ingleheim); BI-836845 (Boehringer Ingleheim); B-701 (BioClin);
 BIIB015 (Biogen); Obinutuzumab (Biogen/Genentech); BI-505
 (Bioinvent); BI-1206 (Bioinvent); TB-403 (Bioinvent); BT-062
 (Biotest) BIL-010t (Biosceptre); MDX-1203 (BMS); MDX-1204 (BMS);
 Necitumumab (BMS); CAN-4 (Cantargia AB); CDX-011 (Celldex);
 10 CDX1401 (Celldex); CDX301 (Celldex); U3-1565 (Daiichi Sankyo);
 patritumab (Daiichi Sankyo); tigatuzumab (Daiichi Sankyo);
 nimotuzumab (Daiichi Sankyo); DS-8895 (Daiichi Sankyo); DS-8873
 (Daiichi Sankyo); DS-5573 (Daiichi Sankyo); MORab-004 (Eisai);
 MORab-009 (Eisai); MORab-003 (Eisai); MORab-066 (Eisai);
 15 LY3012207 (Eli Lilly); LY2875358 (Eli Lilly); LY2812176 (Eli
 Lilly); LY3012217 (Eli Lilly); LY2495655 (Eli Lilly); LY3012212
 (Eli Lilly); LY3012211 (Eli Lilly); LY3009806 (Eli Lilly);
 cixutumumab (Eli Lilly); Flanvotumab (Eli Lilly); IMC-TR1 (Eli
 Lilly); Ramucirumab (Eli Lilly); Tabalumab (Eli Lilly);
 20 Zanolimumab (Emergent Biosolution); FG-3019 (FibroGen); FPA008
 (Five Prime Therapeutics); FP-1039 (Five Prime Therapeutics);
 FPA144 (Five Prime Therapeutics); catumaxomab (Fresenius
 Biotech); IMAB362 (Ganymed); IMAB027 (Ganymed); HuMax-CD74
 (Genmab); HuMax-TFADC (Genmab); GS-5745 (Gilead); GS-6624

(Gilead); OMP-21M18 (demcizumab, GSK); mapatumumab (GSK);
 IMGN289 (ImmunoGen); IMGN901 (ImmunoGen); IMGN853 (ImmunoGen);
 IMGN529 (ImmunoGen); IMMU-130 (Immunomedics); milatuzumab-dox
 (Immunomedics); IMMU-115 (Immunomedics); IMMU-132
 5 (Immunomedics); IMMU-106 (Immunomedics); IMMU-102
 (Immunomedics); Epratuzumab (Immunomedics); Clivatuzumab
 (Immunomedics); IPH41 (Innate Immunotherapeutics); Daratumumab
 (Janssen/Genmab); CNTO-95 (Intetumumab, Janssen); CNTO-328
 (siltuximab, Janssen); KB004 (KaloBios); mogamulizumab (Kyowa
 10 Hakko Kirrin); KW-2871 (ecromeximab, Life Science); Sonepcizumab
 (Lpath); Margetuximab (Macrogenics); Enoblituzumab
 (Macrogenics); MGD006 (Macrogenics); MGF007 (Macrogenics);
 MK-0646 (dalotuzumab, Merck); MK-3475 (Merck); Sym004
 (Symphogen/Merck Serono); DI17E6 (Merck Serono); MOR208
 15 (Morphosys); MOR202 (Morphosys); Xmab5574 (Morphosys); BPC-1C
 (ensituximab, Precision Biologics); TAS266 (Novartis); LFA102
 (Novartis); BHQ880 (Novartis/Morphosys); QGE031 (Novartis);
 HCD122 (lucatumumab, Novartis); LJM716 (Novartis); AT355
 (Novartis); OMP-21M18 (Demcizumab, OncoMed); OMP52M51
 20 (Oncomed/GSK); OMP-59R5 (Oncomed/GSK); vantictumab
 (Oncomed/Bayer); CMC-544 (inotuzumab ozogamicin, Pfizer);
 PF-03446962 (Pfizer); PF-04856884 (Pfizer); PSMA-ADC
 (Progenics); REGN1400 (Regeneron); REGN910 (nesvacumab,
 Regeneron/Sanofi); REGN421 (enoticumab, Regeneron/Sanofi);

RG7221, RG7356, RG7155, RG7444, RG7116, RG7458, RG7598, RG7599,
 RG7600, RG7636, RG7450, RG7593, RG7596, DCDS3410A, RG7414
 (parsatuzumab), RG7160 (imgatuzumab), RG7159 (obintuzumab),
 RG7686, RG3638 (onartuzumab), RG7597 (Roche/Genentech);
 5 SAR307746 (Sanofi); SAR566658 (Sanofi); SAR650984 (Sanofi);
 SAR153192 (Sanofi); SAR3419 (Sanofi); SAR256212 (Sanofi),
 SGN-LIV1A (lintuzumab, Seattle Genetics); SGN-CD33A (Seattle
 Genetics); SGN-75 (vorsetuzumab mafodotin, Seattle Genetics);
 SGN-19A (Seattle Genetics) SGN-CD70A (Seattle Genetics);
 10 SEA-CD40 (Seattle Genetics); ibritumomab tiuxetan (Spectrum);
 MLN0264 (Takeda); ganitumab (Takeda/Amgen); CEP-37250 (Teva);
 TB-403 (Thrombogenic); VB4-845 (Viventia); Xmab2512 (Xencor);
 Xmab5574 (Xencor); nimotuzumab (YM Biosciences); Carlumab
 (Janssen); NY-ESO TCR (Adaptimmune); MAGE-A-10 TCR
 15 (Adaptimmune); CTL019 (Novartis); JCAR015 (Juno Therapeutics);
 KTE-C19 CAR (Kite Pharma); UCART19 (Cellestis); BPX-401 (Bellicum
 Pharmaceuticals); BPX-601 (Bellicum Pharmaceuticals); ATTK20
 (Unum Therapeutics); CAR-NKG2D (Celyad); Onyx-015 (Onyx
 Pharmaceuticals); H101 (Shanghai Sunwaybio); DNX-2401 (DNATRIX);
 20 VCN-01 (VCN Biosciences); Colo-Ad1 (PsiOxus Therapeutics);
 ProstAtak (Advantagene); Oncos-102 (Oncos Therapeutics); CG0070
 (Cold Genesys); Pexa-vac (JX-594, Jennerex Biotherapeutics);
 GL-ONC1 (Genelux); T-VEC (Amgen); G207 (Medigene); HF10 (Takara
 Bio); SEPREHVIR (HSV1716, Virttu Biologics); OrienX010

(OrienGene Biotechnology); Reolysin (Oncolytics Biotech); SVV-001 (Neotropix); Cacatak (CVA21, Viralytics); Alimta (Eli Lilly), cisplatino, oxaliplatino, irinotecán, ácido folínico, metotrexato, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, Zykadia
 5 (Novartis), Tafenlar (GSK), Xalkori (Pfizer), Iressa (AZ), Gilotrif (Boehringer Ingelheim), Tarceva (Astellas Pharma), Halaven (Eisai Pharma), Veliparib (Abbvie), AZD9291 (AZ), Alectinib (Chugai), LDK378 (Novartis), Genetespib (Synta Pharma), Tergenpumatucel-L (NewLink Genetics), GV1001
 10 (Kael-GemVax), Tivantinib (ArQule); Cytosan (BMS); Oncovin (Eli Lilly); Adriamycin (Pfizer); Gemzar (Eli Lilly); Xeloda (Roche); Ixempra (BMS); Abraxane (Celgene); Trelstar (Debiopharm); Taxotere (Sanofi); Nexavar (Bayer); IMMU-132 (Immunomedics); E7449 (Eisai); Thermodox (Celsion); Cometriq (Exellxis); Lonsurf
 15 (Taiho Pharmaceuticals); Camptosar (Pfizer); UFT (Taiho Pharmaceuticals); y TS-1 (Taiho Pharmaceuticals).

Modos de administración

De manera preferible, las composiciones de la presente invención
 20 se administrarán al tracto gastrointestinal con el fin de permitir la administración hacia y/o la colonización parcial o total del intestino con la cepa bacteriana de la presente invención. Generalmente, las composiciones de la presente invención son administradas por vía oral, pero pueden ser administradas por vía

rectal, intranasal o vía bucal o vías sublinguales.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas como una espuma, como un aerosol o un gel.

5 En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas como un supositorio, tal como un supositorio rectal, por ejemplo en la forma de un aceite de teobroma (mantequilla de cacao), grasa endurecida sintética (por ejemplo suppcire, witepsol), glicerogelatina, 10 polietilenglicol, o composición de jabón de glicerina.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención es administrada al tracto gastrointestinal mediante una tubo, tal como un tubo nanogástrico, tubo orogástrico, tubo gástrico, tubo de yeyunostomía (sonda J), gastrostomía endoscópica percutánea 15 (PEG, por sus siglas en inglés), o un puerto, tal como un puerto de la pared torácica que provee acceso al estómago, al yeyuno y otros puertos de acceso adecuados.

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas una vez, o pueden ser administradas de manera 20 secuencial como parte de un régimen de tratamiento. En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención se administrarán diariamente.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el tratamiento de acuerdo con la presente invención está acompañado de la

evaluación de la microbiota intestinal del paciente. El tratamiento se puede repetir si no se logra la administración y/o la colonización parcial o total con la cepa de la presente invención de manera que no se observa eficacia, o el tratamiento
5 puede ser suspendido si la administración y/o colonización parcial o total es exitosa y se observa eficacia.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención puede ser administrada a un animal preñado, por ejemplo un mamífero tal como un humano con el fin de prevenir el desarrollo de una
10 enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria en su hijo *in utero* y/o después de que nazca.

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas a un paciente que ha sido diagnosticado con una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17, o que
15 ha sido identificado en riesgo de una enfermedad o afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. Las composiciones también pueden ser administradas como una medida profiláctica para prevenir el desarrollo de enfermedades o afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17 en un paciente sano.

20 Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas a un paciente que se ha identificado con una microbiota intestinal anormal. Por ejemplo, el paciente puede tener colonización reducida o ausente de *Blautia*, y en particular *Blautia stercoris* o *Blautia wexlerae*.

Las composiciones de la presente invención pueden ser administradas como un producto alimenticio, tal como un suplemento nutricional.

Generalmente, las composiciones de la presente invención son para el tratamiento de humanos, aunque también se pueden utilizar para tratar animales, que incluyen mamíferos monogástricos tales como aves, cerdos, gatos, perros, caballos o conejos. Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para estimular el desarrollo y desempeño de los animales. Si se administran a los animales, se puede utilizar la alimentación por sonda (gavaje).

Composiciones

En general, la composición de la presente invención comprende bacterias. En las realizaciones preferidas de la presente invención, la composición está formulada en forma liofilizada. Por ejemplo, la composición de la presente invención puede comprender gránulos o cápsulas de gelatina, por ejemplo cápsulas de gelatina dura, que comprenden una cepa bacteriana de la presente invención.

De manera preferible, la composición de la presente invención comprende bacterias liofilizadas. La liofilización de las bacterias es un procedimiento bien establecido y la guía relacionada está disponible, por ejemplo, en las referencias [32-33].

De manera alternativa, la composición de la presente invención puede comprender un cultivo bacteriano activo, vivo.

En las realizaciones preferidas, la composición de la presente invención está encapsulada para permitir la administración de la
5 cepa bacteriana en el intestino. La encapsulación protege la composición de la degradación hasta la administración en la ubicación objetivo a través de, por ejemplo, la ruptura de estímulos químicos o físicos tales como presión, actividad enzimática o desintegración física, que puede ser desencadenada
10 por los cambios en el pH. Se puede utilizar cualquier método de encapsulación apropiado. Las técnicas de encapsulación de ejemplo incluyen atrapamiento dentro de una matriz porosa, unión o adsorción en las superficies del portador sólido, autoagregación mediante floculación o con agentes de reticulación, y contención
15 mecánica detrás de una membrana microporosa o una microcápsula. La guía sobre encapsulación que puede ser útil para preparar las composiciones de la presente invención está disponible, por ejemplo, en las referencias [34] y [35].

La composición puede ser administrada por vía oral y puede estar
20 en forma de una tableta, cápsula o polvo. Los productos encapsulados son preferidos porque *Blautia* son anaerobios. Otros ingredientes (tal como vitamina C, por ejemplo) pueden ser incluidos como depuradores de oxígeno y sustratos prebióticos para mejorar la administración y/o colonización parcial o total así

como la supervivencia *in vivo*. De manera alternativa, la composición probiótica de la presente invención puede ser administrada oralmente como un producto alimenticio o nutricional, tal como leche o productos lácteos fermentados a base de suero o como un producto farmacéutico.

La composición puede formularse como un probiótico.

Una composición de la presente invención incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana de la presente invención. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana es suficiente para ejercer un efecto beneficioso en un paciente. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa bacteriana puede ser suficiente para resultar en la administración hacia y/o colonización parcial o total del intestino del paciente. Una dosis diaria adecuada de las bacterias, por ejemplo para un humano adulto, puede ser desde aproximadamente 1×10^3 hasta aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés); por ejemplo, desde aproximadamente 1×10^7 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU; en otros ejemplos desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU.

En ciertas realizaciones, la composición contiene la cepa bacteriana en una cantidad desde aproximadamente 1×10^6 hasta aproximadamente 1×10^{11} CFU/g, con respecto al peso de la composición; por ejemplo, desde aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 1×10^{10} CFU/g. La dosis puede ser, por ejemplo,

1 g, 3 g, 5 g, y 10 g.

Por lo general, un probiótico, tal como la composición de la presente invención, es opcionalmente combinado con por lo menos un compuesto prebiótico adecuado. Un compuesto prebiótico es usualmente un carbohidrato no digerible tal como un oligo- o polisacárido, o un alcohol de azúcar, que no es degradado o absorbido en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos incluyen productos comerciales tales como inulina y transgalacto-oligosacáridos.

En ciertas realizaciones, la composición probiótica de la presente invención incluye un compuesto prebiótico en una cantidad desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30 % en peso, con respecto al peso total de la composición, (por ejemplo desde 5 hasta 20 % en peso). Los carbohidratos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: fructooligosacáridos (o FOS, por sus siglas en inglés), fructooligosacáridos de cadena corta, inulina, isomalto-oligosacáridos, pectinas, xilooligosacáridos (o XOS), quitoooligosacáridos (o COS), betaglucanos, almidones resistentes y modificados con goma arábica, polidextrosa, D-tagatosa, fibras de acacia, algarroba, avena y fibras cítricas. En uno de los aspectos, los prebióticos son los fructooligosacáridos de cadena corta (por simplicidad se muestran en el presente documento más adelante como FOSs-c.c); dichos FOSs-c.c. no son carbohidratos digeribles, generalmente se obtienen mediante la conversión del

azúcar de remolacha e incluyen una molécula de sacarosa a la cual están unidas tres moléculas de glucosa.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. Los

5 ejemplos de tales excipientes adecuados se pueden encontrar en la referencia [36]. Los portadores o diluyentes aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en la referencia [37]. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa,

10 metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol, y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen etanol, glicerol y agua. La elección del portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía de administración proyectada y a la práctica farmacéutica estándar.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como, o en adición a, el portador, excipiente o diluyente cualquier aglutinante/s, lubricante/s, agente/s de suspensión, agente/s de recubrimiento, agente/s solubilizante adecuados. Los ejemplos de aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina,

20 azúcares naturales tales como glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, betalactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas, tales como arábica, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa y polietilenglicol. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen oleato de sodio, estearato de

sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes saborizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes
5 incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas como un producto alimenticio. Por ejemplo, un producto alimenticio
10 puede proporcionar un beneficio nutricional además del efecto terapéutico de la presente invención, tal como en un suplemento nutricional. De manera similar, un producto alimenticio puede ser formulado para realzar el sabor de la composición de la presente invención o para hacer la composición más atractiva para su consumo
15 siendo más similar a un artículo alimenticio común, en lugar de una composición farmacéutica. En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención es formulada como un producto a base de leche. El término "producto a base de leche" significa cualquier líquido o producto a base de suero de leche o leche
20 semisólida que tiene un contenido graso variable. El producto a base de leche puede ser, por ejemplo, leche de vaca, leche de cabra, leche de oveja, leche descremada, leche entera, leche recombinada de leche en polvo y suero de leche sin ningún procesamiento, o un producto procesado, tal como yogur, leche cuajada, cuajada,

leche agria, leche entera agria, suero de manteca y otros productos de leche agria. Otro grupo importante incluye bebidas lácteas, tales como bebidas de suero de leche, leches fermentadas, leches condensadas, leche maternizada o para infantes; leches
5 saborizadas, helado; alimentos que contienen leche tales como dulces.

En ciertas realizaciones, las composiciones de la presente invención contienen una única cepa bacteriana o especie y no contienen ninguna otra cepa bacteriana o especie. Tales
10 composiciones pueden comprender solamente cantidades mínimas o biológicamente irrelevantes de otras cepas bacterianas o especies. Tales composiciones pueden ser un cultivo que está sustancialmente libre de otra especie de organismo.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la presente invención
15 pueden o no requerir aprobación comercial.

En algunos casos, la cepa bacteriana liofilizada es reconstituida antes de la administración. En algunos casos, la reconstitución es mediante el uso de un diluyente descrito en el presente documento.

20 Las composiciones de la presente invención pueden comprender excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de

la presente invención; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar un trastorno cuando se administra a un sujeto que lo necesita; y en donde el trastorno

5 se selecciona del grupo que consiste en asma, asma alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva

10 crónica (COPD), cáncer, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behçet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica y rechazo de aloinjerto.

15 En ciertas realizaciones, la presente invención provee una composición farmacéutica que comprende: una cepa bacteriana de la presente invención; y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable; en donde la cepa bacteriana está en una cantidad suficiente para tratar o prevenir una enfermedad o

20 afección mediada por la IL-17 o la vía Th17. En las realizaciones preferidas, dicha enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoidea, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad celíaca, asma, asma

alérgica, asma neutrofílica, osteoartritis, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil, neuromielitis óptica (enfermedad de Devic), espondilitis anquilosante, espondiloartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cáncer, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, 5 cáncer de ovario, uveítis, escleritis, vasculitis, enfermedad de Behçet, aterosclerosis, dermatitis atópica, enfisema, periodontitis, rinitis alérgica, y rechazo de aloinjerto.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la 10 composición farmacéutica mencionada anteriormente, en donde la cantidad de la cepa bacteriana es desde aproximadamente 1×10^3 hasta aproximadamente 1×10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo con respecto a un peso de la composición.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la 15 composición farmacéutica mencionada anteriormente, en donde la composición es administrada a una dosis de 1 g, 3 g, 5 g o 10 g.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, en donde la composición es administrada mediante un método que se selecciona 20 del grupo que consiste en administración oral, rectal, subcutánea, nasal, bucal y sublingual.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, que comprende un portador seleccionado del grupo que consiste de lactosa,

almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol y sorbitol.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, que comprende
5 un diluyente seleccionado del grupo que consiste en etanol, glicerol y agua.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, que comprende un excipiente seleccionado del grupo que consiste en almidón,
10 gelatina, glucosa, lactosa anhidra, lactosa de flujo libre, beta lactosa, edulcorante de maíz, acacia, tragacanto, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio y cloruro de sodio.

15 En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, que además comprende por lo menos uno de un conservante, un antioxidante y un estabilizante.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la
20 composición farmacéutica mencionada anteriormente, que comprende un conservante seleccionado del grupo que consiste en benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, en donde

dicha cepa bacteriana es liofilizada.

En ciertas realizaciones, la presente invención provee la composición farmacéutica mencionada anteriormente, en donde cuando la composición es almacenada en un recipiente sellado a
5 aproximadamente 4 °C o aproximadamente 25 °C y el recipiente es colocado en una atmósfera que tiene 50 % de humedad relativa, por lo menos 80 % de la cepa bacteriana medida en unidades formadoras de colonias permanece después de un período de por lo menos aproximadamente: 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años,
10 2,5 años o 3 años.

Métodos de cultivo

Las cepas bacterianas para uso en la presente invención pueden ser cultivadas usando las técnicas de microbiología estándares
15 tal como se detalla, por ejemplo, en las referencias [38-39]. El medio sólido o líquido utilizado para el cultivo puede ser agar YCFA o medio YCFA. El medio YCFA puede incluir (por 100 ml, valores aproximados): casitona (1,0 g), extracto de levadura (0,25 g), NaHCO₃ (0,4 g), cisteína (0,1 g), K₂HPO₄ (0,045 g), KH₂PO₄ (0,045
20 g), NaCl (0,09 g), (NH₄)₂SO₄ (0,09 g), MgSO₄ 7H₂O (0,009 g), CaCl₂ (0,009 g), resazurina (0,1 mg), hemina (1 mg), biotina (1 µg), cobalamina (1 µg), ácido p-aminobenzoico (3 µg), ácido fólico (5 µg), y piridoxamina (15 µg).

Cepas bacterianas para uso en composiciones de vacunas

Los inventores han identificado que las cepas bacterianas de la presente invención son útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17.

5 Esto es probable que sea resultado del efecto que las cepas bacterianas de la presente invención tienen en el sistema inmunitario del huésped. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención pueden también ser útiles para prevenir las enfermedades o afecciones mediadas por la IL-17 o la vía Th17,
10 cuando son administradas como composiciones de vacunas. En tales realizaciones, las cepas bacterianas de la presente invención pueden ser destruidas, inactivadas o atenuadas. En tales realizaciones, las composiciones pueden comprender un adyuvante de vacuna. En ciertas realizaciones, las composiciones son para
15 la administración mediante inyección, tal como por inyección subcutánea.

Generalidades

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se
20 indique lo contrario, métodos de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología convencionales, de la técnica. Tales técnicas son explicadas completamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, las referencias [40] y [41-42], etc.

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como también "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

- 5 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la
10 palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la presente invención.

Las referencias a un porcentaje de identidad de la secuencia entre dos secuencias de nucleótidos significan que, cuando están alineadas, dicho porcentaje de nucleótidos es el mismo al comparar
15 las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o identidad de la secuencia pueden determinarse usando los programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los que se describen en la sección 7.7.18 de la referencia [43]. Una alineación preferida es determinada por medio del algoritmo de
20 búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda afín de huecos con una penalización de la apertura de huecos de 12 y una penalización por extensión de huecos de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se describe en la referencia [44].

A menos que se indique lo contrario, un proceso o método que comprende numerosas etapas puede comprender etapas adicionales al inicio o al final del método, o puede comprender etapas intermedias adicionales. De igual modo, las etapas pueden ser combinadas, omitidas o realizadas en un orden alternativo, si
5 corresponde.

En el presente documento se describen diversas realizaciones de la presente invención. Se apreciará que las características especificadas en cada realización pueden ser combinadas con otras
10 características especificadas, a fin de proveer realizaciones adicionales. En particular, las realizaciones resaltadas en el presente documento como adecuadas, típicas o preferidas pueden ser combinadas entre sí (excepto cuando sean mutuamente excluyentes).

15

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de ratón de asma inducida por los ácaros del polvo doméstico

20 Resumen

Los ratones fueron administrados con las composiciones que comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la presente invención y fueron posteriormente provocados con extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM, por sus siglas en inglés) para provocar una

respuesta alérgica inflamatoria. La respuesta inflamatoria a HDM incluye componentes eosinofílicos y neutrofílicos, es mediada por la vía IL-17 y Th17, y es un modelo para el asma. La magnitud y características de la respuesta inflamatoria exhibida por los ratones tratados con las composiciones de la presente invención fueron comparadas con los grupos de control. Se descubrió que las composiciones de la presente invención alivian la respuesta inflamatoria, y reducen el reclutamiento de los eosinófilos y neutrófilos, lo que indica que pueden ser útiles para el tratamiento de las afecciones mediadas por la IL-17 y Th17 tal como eosinofilia, neutrofilia y asma.

Cepa

830: *Blautia stercoris*

15

Diseño del estudio

Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con vehículo de control (por vía oral).
- 20 6. Tratamiento con inóculo de bacteria terapéutica cepa 830 (por vía oral).
7. Grupo de control positivo. Tratamiento con Dexametasona (intraperitoneal).
8. Grupo de control sin tratar.

Cantidad de ratones por grupo = 5

Día -14 a día 13: administración diaria del vehículo de control por vía oral (Grupo 1).

5 Día -14 a día 13: administración diaria del inóculo de bacteria terapéutica por vía oral (Grupo 2-6).

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

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

Día 14: sacrificio de todos los animales para análisis.

15 Cantidad total de ratones = 40.

Criterios de valoración y análisis

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

Las células fueron aisladas del fluido del BAL (lavado broncoalveolar) y se llevaron a cabo conteos diferenciales de células (200 conteos de células/muestras).

Material y Métodos

Ratones. Los ratones BALB/c hembras de 7 semanas de edad fueron adquiridos de Charles River Laboratories y colocados en forma aleatoria en jaulas con un total de 5 ratones por jaula (hau-
5 ventiladas de Indulab AG, Gams, Suiza, tipo de jaula: jaula Sealsafe™ - IVC. Número de producto 1248L). Las jaulas fueron etiquetadas con el número de estudio, número de grupo y fecha de inicio del experimento. Los ratones fueron monitoreados
10 semanalmente y aclimatados a las instalaciones por 7 días antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales tenían 8 semanas de edad en el Día de Estudio -14. El agua potable y el alimento estuvieron disponibles *ad libitum*. Estuvo presente el enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales
15 fue llevado a cabo de acuerdo con la licencia de autorización local número 2283.1 (otorgada y aprobada por: *Service de la consommation et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud*). El agua potable y el alimento estuvieron disponibles *ad libitum* y renovados una vez al día. Estuvo presente el enriquecimiento de la jaula. Se
20 cumplieron las regulaciones de protección de los animales como indican las autoridades oficiales de Suiza conforme a la ordenanza 455.163 de la FVO (Oficina Veterinaria Oficial) acerca de la cría de animales de laboratorio, producción de animales genéticamente modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo del inóculo de bacterias. En una estación de trabajo estéril, un criovial de bacterias fue descongelado al calentarlo en una mano enguantada y ~0,7 ml del contenido fue inyectado en un tubo Hungate (número de catálogo, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Por lo general fueron preparados dos tubos por cepa. Luego, los tubos Hungate fueron incubados (estáticos) a 37 °C durante un período de hasta 24-26 horas (para la cepa 830).

10

Cultivo del vehículo de control. Un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico fue incubado (estático) a 37 °C durante 16 h.

15 **Administración del inóculo de bacterias o vehículo de control.** 400 ul de inóculo de bacterias cultivadas o vehículo de control fueron administrados por día vía alimentación por sonda oral.

Sensibilización intranasal. Los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con 9,75 mg xilasol y 48,75 mg cetazol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y administrados con 15 ug de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EUA) en un volumen de 30 ul de PBS por vía nasal.

20

Preparación y administración del compuesto de control positivo

de dexametasona. La sal de 21-fosfato disódico de dexametasona (Sigma-Aldrich, número de catálogo D1159, lote n.º SLBD.1030V)

5 fue disuelta en H₂O y administrada a los animales en una dosis de 3 mg/kg en un volumen de 200 ul por vía oral en los días indicados en el protocolo de estudio mencionado en líneas previas.

Procedimiento terminal. En el día 14 los animales fueron

10 sacrificados mediante inyección letal intraperitoneal con pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, número de catálogo: 1170139A) inmediatamente seguido por lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

15 **Medición de infiltrados celulares en BAL.** Las células fueron aisladas del fluido de BAL y se llevaron a cabo conteos diferenciales de células sobre la base de criterios morfológicos y citoquímicos estándares.

20 **Gráficos y análisis estadístico.** Todos los gráficos fueron generados con Graphpad Prism Version 6 y una ANOVA unidireccional fue aplicada. Los resultados del análisis estadístico se proporcionaron con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM, por sus

siglas en inglés).

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 1
5 a 9.

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con las bacterias o el vehículo. Los dos controles, el tratamiento con el vehículo (control negativo) y el tratamiento con la dexametasona (control positivo) se comportaron tal como era
10 esperado, observándose una eosinofilia y neutrofilia disminuidas a continuación del tratamiento con la dexametasona.

Los resultados más importantes de este experimento se presentan en las Figuras 6 y 7, que informan la cantidad total y el porcentaje de neutrófilos detectado en el lavado bronquiolar después del
15 estímulo con HDM. La administración de la cepa 830 resultó en una reducción de los neutrófilos totales y la proporción de neutrófilos en el BAL en relación con el vehículo de control solo.

Ejemplo 2 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de 20 ratón de asma neutrofílica grave

Resumen

Los ratones fueron administrados con las composiciones que comprenden las cepas bacterianas de acuerdo con la presente invención y fueron posteriormente sensibilizados con

administraciones subcutáneas de extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) y provocados con una administración intranasal de HDM con el fin de modelar la respuesta inflamatoria del asma neutrofílica grave. La magnitud y características de la respuesta inflamatoria presentada por los ratones tratados con las composiciones de la presente invención fueron comparadas con los grupos de control. Se descubrió que las composiciones de la presente invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular, reducen el reclutamiento de neutrófilos, en una manera comparable al control positivo que comprende administraciones de anticuerpos anti-IL-17. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de las afecciones mediadas por la IL-17 y Th17, como neutrofilia y asma.

Cepa

830: *Blautia stercoris*

Diseño del estudio

20 Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con vehículo de control (por vía oral).

6. Tratamiento con inóculo de bacteria terapéutica cepa 830 (por vía oral).

7. Grupo de control positivo. Tratamiento anti-IL-17 (intraperitoneal).
8. Grupo de control sin tratar.
- 9: Ratones saludables (línea de referencia).
- 5 Cantidad de ratones por grupo (Grupo 1-8) = 5

Día -14 a día 17: administración diaria del vehículo de control por vía oral (Grupo 1).

- Día -14 a día 17: administración diaria del inóculo de bacteria terapéutica por vía oral (Grupo 2-6).
- 10

Día 0: sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).

Día 7: sensibilización con HDM en CFA (s.c.) (Grupo 1-8).

Día 13, 15, 17: administración de anticuerpo neutralizante anti IL-17 intraperitoneal (Grupo 7).

- 15 Día 14, 15, 16, 17: provocación con HDM en 30 μ l de PBS por vía nasal (Grupo 1-8).

Día 18: sacrificio de todos los animales para análisis.

Criterios de valoración y análisis:

- 20 En el día 14 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentobarbitol (Streuli Pharma AG, Uznach, número de catálogo: 1170139A) inmediatamente seguido por un lavado broncoalveolar (BAL). Las células fueron aisladas del fluido de BAL y se llevaron a cabo conteos diferenciales de células

(200 conteos de células/muestras).

Material y Métodos.

Ratones. Los ratones C57BL/6 hembra de 7 semanas de edad fueron
5 adquiridos de Charles River Laboratories y colocados en forma
aleatoria en jaulas, con un total de 5 ratones por jaula (jaulas
ventiladas de Indulab AG, Gams, Suiza, tipo de jaula: jaulas
Sealsafe™ - IVC. Número de producto 1248L). Las jaulas fueron
etiquetadas con el número de estudio, número de grupo y fecha de
10 inicio del experimento. Los ratones fueron monitoreados
semanalmente y aclimatados a las instalaciones durante 7 días
antes del inicio del estudio (Día de estudio -14). Los animales
tenían 8 semanas de edad en el Día de estudio -14. El agua potable
y el alimento estuvieron disponibles *ad libitum*. Estuvo presente
15 el enriquecimiento de la jaula. El cuidado diario de los animales
fue llevado a cabo de acuerdo con la licencia de autorización local
número 2283.1 (otorgada y aprobada por: *Service de la consommation
et des affaires vétérinaires du Canton de Vaud*). El agua potable
y el alimento estuvieron disponibles *ad libitum* y renovados una
20 vez al día. Estuvo presente el enriquecimiento de la jaula. Se
cumplieron las regulaciones de protección de los animales como
indican las autoridades oficiales de Suiza conforme a la ordenanza
455.163 de la FVO (Oficina Veterinaria Oficial) sobre la cría de
animales de laboratorio, producción de animales genéticamente

modificados y métodos de experimentación animal.

Cultivo del inóculo de bacterias. En una estación de trabajo estéril, un criovial de bacterias fue descongelado al calentar en una mano enguantada y ~0,7 ml del contenido fue inyectado en un tubo Hungate (número de catálogo, 1020471, Glasgerätebau Ochs, Bovenden-Lenglern, Alemania), que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico. Por lo general fueron preparados dos tubos por cepa. Luego, los tubos Hungate fueron incubados (estáticos) a 37 °C durante un período de hasta 24-26 horas (para la cepa 830).

Cultivo del vehículo de control. Un tubo Hungate que contenía 8 ml de YCFA anaeróbico fue incubado (estático) a 37 °C durante 16 h.

Administración de inóculo de bacterias o vehículo de control. 400 μ l de inóculo de bacterias cultivadas o vehículo de control fueron administrados por día vía alimentación por sonda oral.

Sensibilización con HDM. 50 μ g de HDM (número de catálogo: XPB70D3A25, número de lote: 231897, Greer Laboratories, Lenoir, NC, EUA) en PBS fue emulsificado en un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA Chondrex Inc. Washington, EUA) y administrado por vía subcutánea en un volumen de 200 μ l, dos veces durante dos semanas en flancos opuestos. Una semana después de

la segunda inmunización, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con 9,75 mg de xilasol y 48,75 mg de cetazol por kg (Dr. E. Graeub AG, Berna, Suiza) y luego se provocaron intranasales con 15 µg de HDM en un volumen de 30 ul de PBS en 4 días consecutivos. El análisis fue llevado a cabo un día después de la provocación final.

Preparación y administración del compuesto de control positivo anticuerpo antiratón IL-17. El anticuerpo neutralizante anti-IL-17 se obtuvo de Bio X Cell y fue almacenado a 4 °C (clón 17F3, número de catálogo BE0173, Bio X Cell) y administrado intraperitonealmente a una dosis de 12,5 m/kg en los días indicados en el protocolo de estudio mencionado anteriormente.

Procedimiento terminal. En el día 18 los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal letal con pentabarbital (Streuli Pharma AG, Uznach, catálogo: 1170139A) inmediatamente seguido por lavado broncoalveolar (BAL) en 500 ul de solución salina.

20

Medición de infiltrados celulares en el BAL. Las células fueron aisladas del fluido de BAL y se llevaron a cabo conteos diferenciales de células sobre la base de los criterios morfológicos y citoquímicos estándares.

Gráficos y análisis estadístico. Todos los gráficos fueron generados con Graphpad Prism Version 6 y una ANOVA unidireccional fue aplicada. Los resultados del análisis estadístico se proporcionan con las tablas de datos individuales. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

Resultados y análisis

Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 10 a 18.

No se observó morbilidad ni mortalidad en los ratones tratados con las bacterias o el vehículo. Tal como se muestra en las Figuras 11, 12, 15 y 16, ciertos ratones tratados con la cepa 830 presentaron eosinofilia y neutrofilia reducidas.

15

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

20 Materiales y métodos

Cepa

830: *Blautia stercoris*

Cultivos de bacterias

Los cultivos de bacterias fueron desarrollados para la administración en una estación de trabajo anaeróbica (Don Whitley Scientific).

La cepa bacteriana n.º 830 fue desarrollada utilizando caldos de glicerol. Los caldos de glicerol fueron almacenados a -80 °C. Tres veces por semana, los caldos de glicerol fueron descongelados a temperatura ambiente y sembradas por estrías sobre placas YCFA. Una nueva alícuota de glicerol fue utilizada en cada ocasión. Las bacterias fueron dejadas desarrollar en una placa determinada durante un período de hasta 72 horas.

Las soluciones a administrarse a los animales fueron preparadas dos veces al día con un intervalo de ocho horas para los tratamientos de la mañana (AM) y de la tarde (PM). Una colonia bacteriana fue recogida de la placa por estrías y transferida a un tubo que contenía medio YCFA. Se permitió que la cepa bacteriana n.º 830 creciera durante 24 horas antes de las administraciones de la mañana. Las bacterias fueron subcultivadas a 1 % en medio YCFA para las administraciones de la tarde. Los valores de OD fueron registrados para cada cepa después de las preparaciones de tratamiento de la mañana y de la tarde.

Modelo de ratón de artritis inducida por el colágeno tipo II

Los ratones DBA/1 machos adultos fueron colocados en forma aleatoria en los grupos experimentales y se permitió que se

aclimataran durante dos semanas. En el día 0, los animales fueron administrados mediante inyección subcutánea con 100 microlitros de una emulsión que contenía 100 microgramos de colágeno tipo II (CII) en adyuvante incompleto de Freund con suplemento de 4 m/ml
5 de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. En el día 21, los animales fueron administrados mediante inyección subcutánea con una emulsión de refuerzo que contenía 100 µg de colágeno tipo II en adyuvante incompleto de Freund.

Los tratamientos fueron administrados de acuerdo con el programa
10 de administración a continuación. Desde el Día -14 hasta el final del experimento en el día 45, los animales fueron pesados tres veces por semana. Desde el Día 21 hasta el final del experimento, los animales fueron puntuados tres veces por semana en cuanto a los signos clínicos de la artritis, que incluyen la inflamación
15 de las patas posteriores y delanteras, articulaciones radio-carpiana (carpo) y articulaciones tibio-tarsianas (tarso). En el día 45 los ratones fueron sacrificados y se tomaron muestras de sangre terminal para el análisis de citoquinas.

En el día -14, Día 0 y Día 45, se recolectaron muestras fecales
20 para análisis microbiológico, inmediatamente congeladas de manera instantánea y almacenadas a -80 °C.

El modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de ratón muy establecido para la artritis reumatoidea [45]. La inmunización con CII produce una patogénesis que incluye

importantes características patológicas graves de artritis reumatoidea, que incluyen hiperplasia sinovial, infiltración por células mononucleares y degradación del cartílago. De manera significativa, el desarrollo de CIA es mediado por las células Th17 a través de la secreción de IL-17A [46]. La respuesta inmunitaria que subyace en el modelo de artritis es mejorada por medio del uso del adyuvante de Freund con suplemento de *Mycobacterium tuberculosis*.

En el día 21, los bazos fueron recolectados de tres animales satélite en cada grupo. Las células fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia de colágeno tipo II. Las citoquinas, que incluyen TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17, fueron cuantificadas en los sobrenadantes del cultivo y en el suero terminal mediante Luminex. La proliferación celular fue cuantificada utilizando un método de incorporación de timidina tritiada.

Grupos de tratamiento y dosificaciones

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

El vehículo utilizado para el agente bioterapéutico fue el medio con extracto de levadura-casitona-ácidos grasos (YCFA, por sus siglas en inglés).

	Grupo	Dosis	Administración		Inducción de la enfermedad
			Vía	Régimen	
1	Vehículo	5 ml/kg	PO	BID: Día -14-Final	Día 0: Colágeno/CFA, una vez, SC
3	Bioterapéutico n.º 830	5 ml/kg			Día 21: Colágeno/IFA, una vez, SC

PO: alimentación por sonda oral, SC: inyección subcutánea, BID: dos veces a día, CFA: adyuvante completo de Freund.

Pesos corporales

- 5 Desde el Día -14 hasta el final del experimento, los animales fueron pesados tres veces por semana. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

Observaciones clínicas no específicas

- 10 Desde el Día -14 hasta el final del experimento, los animales fueron revisados diariamente por signos clínicos no específicos que incluyen postura anormal (encorvada), condición del pelaje anormal (piloerección) y niveles anormales de actividad (actividad reducida o incrementada).

15

Observaciones clínicas

Desde el Día 21 hasta el final del experimento en el día 45, los animales fueron puntuados tres veces por semana en cuanto a los signos clínicos de la artritis que incluyen inflamación de las patas posteriores y delanteras, articulaciones radio-carpiana (carpo) y articulaciones tibio-tarsiana (tarso). Cada extremidad fue puntuada utilizando la siguiente escala: (0) normal, (1) inflamación sutil, (2) inflamación leve, (3) inflamación moderada y (4) inflamación grave. Se calculó un puntaje mediante la adición del puntaje de cada extremidad. El puntaje máximo posible para un animal fue de (16). Los animales con un puntaje igual a (12) en dos ocasiones consecutivas y los animales con un puntaje mayor que (12) en cualquier ocasión fueron sacrificados. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

15 **Análisis de la proliferación celular**

En el día 21, tres animales satélite por grupo fueron sacrificados y los bazos fueron disecados. Las células del bazo fueron cultivadas durante 72 horas en presencia o ausencia del colágeno tipo II. Después de 72 horas, las células fueron pulsadas durante la noche en presencia de timidina tritiada. La proliferación celular fue cuantificada mediante la medición de la incorporación de timidina. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM). Los sobrenadantes fueron tomados y analizados en cuanto a la presencia de citoquinas clave.

Análisis de citoquinas

Los sobrenadantes terminales de los cultivos de las células del bazo fueron analizados con el fin de cuantificar TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17 mediante Luminex. Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM).

Análisis microbiológico

En el día -14, Día 0 y Día 45, las muestras fecales fueron recolectadas de cada animal, inmediatamente congeladas de manera instantánea, y almacenadas a -80 °C. El ciego (incluso contenido) fue inmediatamente congelado de manera instantánea y almacenado a -80 °C. Una prueba de identificación bacteriana fue llevada a cabo diariamente mediante la siembra en placas de las bacterias.

15

Histopatología

Al final del experimento, las patas posteriores fueron almacenadas en un fijador de tejidos. Las muestras fueron transferidas a una solución de descalcificación. Las muestras de tejido fueron procesadas, seccionadas y teñidas con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron puntuadas por un histopatólogo calificado, ignorante del diseño experimental, por los signos de la artritis que incluyen inflamación, daño al cartílago articular y daño al hueso metafisario subyacente. Un sistema de puntaje detallado fue

utilizado (ver a continuación). Los datos fueron graficados (Media $\pm$ SEM). Los datos sin procesar y analizados fueron provistos así como también las fotografías representativas.

5 **Tabla 1: Sistema de puntaje de histopatología**

Grado	Descripción
Inflamación	
0	Articulación normal
1	Hiperplasia sinovial leve con inflamación dominada por neutrófilos. Baja cantidad de neutrófilos y macrófagos en el espacio articular.
2	Hiperplasia sinovial con inflamación de moderada a marcada que implica tanto neutrófilos como macrófagos. Neutrófilos y macrófagos en el espacio articular; puede haber restos de tejido necrótico.
3	Hiperplasia sinovial con marcada inflamación que implica tanto neutrófilos como macrófagos. Pérdida de recubrimiento sinovial. La inflamación puede extenderse desde la sinovia hasta el tejido circundante, incluso el músculo. Numerosos neutrófilos y macrófagos en el espacio articular, junto con significativos restos de tejido necrótico.
Daño al cartílago articular	

0	Articulación normal
1	El cartílago articular muestra solamente un leve cambio degenerativo. La formación temprana de pannus puede estar presente periféricamente.
2	El cartílago articular muestra un moderado cambio degenerativo y pérdida focal. La formación de pannus está presente focalmente.
3	Significativa disrupción y pérdida de cartílago articular con extensa formación de pannus.

Daño al hueso metafisario subyacente

0	Articulación normal
1	Sin cambio en el hueso metafisario subyacente.
2	Puede haber necrosis focal o fibrosis de hueso metafisario.
3	Disrupción o colapso del hueso metafisario. Extensa inflamación, necrosis o fibrosis que se extiende hasta el espacio medular de la metáfisis.

Resultados y análisis

Supervivencia y observaciones clínicas no específicas

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

Un animal en el Grupo 1 (tratados con vehículo) fue sacrificado durante el periodo de pre-tratamiento (Día -14 a día 0 - el animal arribó del proveedor con extremidad fracturada).

Siete animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los
5 signos clínicos de la artritis: cinco animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y dos animales en el Grupo 3 (tratados con agente bioterapéutico n.º 830).

Seis animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos no específicos que incluyen postura anormal
10 (encorvada), condición del pelaje anormal (piloerección), niveles anormales de actividad (reducida actividad): tres animales en el Grupo 1 (tratados con vehículo) y tres animales en el Grupo 3 (tratados con agente bioterapéutico n.º 830).

15 **Pesos corporales**

Los datos del peso corporal registrados desde el Día -14 hasta el Día 0 y expresados como porcentaje de los pesos corporales
iniciales (Día -14) fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para múltiples
20 comparaciones con el día -14 luego para la comparación múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos son presentados en la Figura 19. Los datos de los animales sacrificados antes del final programado del experimento fueron excluidos de los análisis. Cuando se compara con el Día -14, las administraciones dos veces

al día mediante alimentación por sonda oral indujo una significativa pérdida de peso corporal en el grupo tratado con vehículo en el Día -9 y Día -7 y en el Grupo 3 (tratados con el agente bioterapéutico n.º 830) en el Día -11 y Día -9.

5 Los datos del peso corporal registrados desde el Día 0 hasta el Día 28 y expresados como porcentaje de los pesos corporales iniciales (Día 0) fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para múltiples comparaciones con el Día 0 en el grupo de vehículo luego para la comparación
10 múltiple con el grupo tratado con vehículo. Los datos son presentados en la Figura 20. Los datos de los animales sacrificados antes del final programado del experimento y de los animales satélite fueron excluidos de los análisis. Los datos del Día 28, Día 35 y Día 42 fueron adicionalmente analizados mediante ANOVA
15 unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para múltiples comparaciones para el grupo tratado con vehículo.

El inicio de los signos clínicos de la artritis fue asociado con una significativa pérdida de peso corporal en el Día 26 y Día 28 ($p < 0,0001$) cuando se compara con el Día 0 en el grupo tratado
20 con vehículo.

Cuando se compara con el grupo tratado con vehículo, los pesos corporales fueron significativamente más elevados en el Grupo 3 (agente bioterapéutico n.º 830) tratado en el Día 28 ($< 0,005$).

Observaciones clínicas

Los datos del puntaje clínico fueron analizados mediante ANOVA bidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para múltiples comparaciones entre días en el grupo tratado con vehículo luego para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales y el grupo tratado con vehículo cada día. Los datos son presentados en la Figura 21. Los datos registrados de los animales sacrificados antes del final del experimento fueron excluidos de los análisis. Cuando los animales fueron sacrificados debido a la gravedad de los signos clínicos de la artritis, el último puntaje registrado fue reportado para los siguientes días y utilizado en el análisis estadístico.

Un significativo incremento de las puntuajes clínicos fue observado en el grupo tratado con vehículo desde el Día 28 hasta el Día 45 ($p < 0,0001$) cuando se compara con el Día 21.

El agente bioterapéutico n.º 830 indujo una reducción de los puntuajes clínicos cuando se compara con el grupo tratado con vehículo desde el Día 28 hasta el Día 45. La reducción fue estadísticamente significativa en el día 31 y Día 45 ($p < 0,05$).

20

Análisis de la proliferación celular

Para validar el ensayo, los esplenocitos fueron cultivados en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 solubles (anti-CD3/CD28) como estímulos de control positivo para confirmar el potencial

proliferativo de las células.

Las fuertes respuestas proliferativas al anti-CD3/CD28 fueron observadas en todos los grupos experimentales, mostrando que las células eran saludables, viables y capaces de responder a las
5 señales de activación.

Para probar la respuesta proliferativa en presencia del Colágeno II (CII), los esplenocitos fueron cultivados en presencia de CII a 50 µg/ml. La respuesta proliferativa de los esplenocitos al CII fue analizada mediante ANOVA bidireccional seguido por la
10 postprueba de Sydak para múltiples comparaciones entre esplenocitos no estimulados y estimulados con CII y ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para la comparación de la respuesta estimulada con CII en diferentes grupos experimentales con el grupo tratado con vehículo. Los datos
15 son presentados en la Figura 22.

El CII indujo un aumento altamente significativo de la incorporación de ³H- timidina (cpm) cuando se compara con los esplenocitos no estimulados en el grupo tratado con vehículo ($p < 0,0001$).

20 Los grupos tratados con el agente bioterapéutico n.º 830 demostraron significativamente menores niveles de proliferación de esplenocitos inducida por CII que el grupo tratado con vehículo.

Niveles de citoquina en los sobrenadantes del cultivo de tejido

Los niveles de cada citoquina fueron medidos en los sobrenadantes del cultivo de tejido derivado de cultivos estimulados de anti-CD3/CD28 mediante análisis con Luminex. Estos mostraron respuestas sólidas para todas las citoquinas medidas (niveles promedio en el grupo con vehículo fueron los siguientes: IL-4 = 6,406 pg/ml; IL-6 = 306 pg/ml; IL-10 = 10 987 pg/ml; IL-17A = 11 447 pg/ml; IFN- γ = 15 581 pg/ml; TNF- α = 76 pg/ml).

Las siguientes secciones resumen los datos obtenidos de los cultivos estimulados con Colágeno II. Cuando sea aplicable, el análisis estadístico de las diferencias entre los niveles de citoquina en los sobrenadantes de los esplenocitos no estimulados y estimulados con CII fue llevado a cabo utilizando ANOVA bidireccional seguido por la postprueba de Sydak para múltiples comparaciones, mientras que la ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett fue utilizada para la comparación de la respuesta estimulada con CII en los grupos tratados con el agente bioterapéutico con el grupo tratado con vehículo. No hubo diferencia significativa en los niveles de citoquina entre los grupos en ambos casos. Esto es posiblemente debido al pequeño tamaño de la muestra utilizada (n=3).

Con el fin de presentar de manera más precisa la distribución de los datos para las citoquinas con sustancial dispersión de los datos, estos son presentados como gráficos de dispersión.

Los promedios de los grupos de IL-4 en los sobrenadantes del

cultivo de tejido después de la estimulación con CII fueron < 5 pg/ml. Estos no se consideran significativos desde el punto de vista biológico y no se incluyen aquí. Los promedios de los grupos de TNF- α en los sobrenadantes del cultivo de tejido después de la estimulación con colágeno estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

Niveles de sobrenadante de IFN- γ (Figura 23)

Junto con la IL-17, el IFN- γ es la principal citoquina que origina enfermedades en el modelo CIA. El gráfico de dispersión en la Figura 23 demuestra los niveles de IFN- γ después de la estimulación con CII, con una mediana grupal siendo más elevada para el grupo tratado con vehículo en comparación con el agente bioterapéutico.

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

Los niveles de IL-17A fueron de 50 pg/ml en los cultivos estimulados con CII para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de esta citoquina parecieron ser menores en el grupo de agente bioterapéutico en comparación con el tratado con vehículo.

20

Niveles de sobrenadante de IL-10 (Figura 25)

Los niveles de IL-10 en el Grupo tratado con vehículo fueron de 13 pg/ml y 2,1 pg/ml para los estimulados con CII, y los cultivos con medio de control, respectivamente. Se pueden esperar niveles

más elevados de IL-10 (que es una citoquina antiinflamatoria) para el grupo tratado con vehículo debido a que la inflamación y la inducción de la citoquina pro-inflamatoria pueden ser acompañadas por un mecanismo de retroalimentación antiinflamatorio.

5

Niveles de sobrenadante de IL-6 (Figura 26)

Las citoquinas inflamatorias tal como IL-6 y TNF- α no son por lo general producidas a elevados niveles en los cultivos anti-CII. Sin embargo, sus niveles pueden ser alterados como resultado de la modulación inmunitaria. Los niveles de IL-6 en los cultivos estimulados con CII fueron modestos, alcanzando 10 pg/ml. Aunque más elevados que en los cultivos con medio de control, estas diferencias fueron muy pequeñas para proveer fundamento para llevar a cabo el análisis estadístico.

15

Análisis microbiológico

El desarrollo bacteriano fue confirmado mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro. La identidad bacteriana fue confirmada mediante la comparación de las fotografías de las placas por estrías con las fotografías de referencia.

20

A continuación del método mejorado de preparación bacteriana, dosis sistemáticamente elevadas de la cepa bacteriana fueron administradas desde el Día -2 y Día -3 tal como se indica mediante

los elevados valores OD medidos.

Las muestras fecales fueron recolectadas y congeladas de manera instantánea en el Día -14, Día 0 y al término.

5 **Histopatología**

Los resultados de la histopatología se muestran en las Figuras 65 a 69. Conforme se espera para este modelo, la variabilidad intraindividual e interindividual fue observada en términos de la presencia/ausencia de la artritis o la gravedad del cambio
10 presente.

La naturaleza de la patología fue conforme se espera para este modelo, con una extensa inflamación mixta crónica - activa de la sinovia y bolsa que se extiende hasta implicar los tejidos blandos periarticulares (músculo, tejido adiposo, colágeno dérmico). En
15 las articulaciones más gravemente afectadas hubo degeneración del cartílago articular y pérdida con restos intraarticulares e inflamación y disrupción de la articulación y estructura ósea por fibrosis e inflamación.

La incidencia de los cambios histopatológicos fue: vehículo - 80
20 % (16/20); agente bioterapéutico n.º 830 - 20 % (4/20). El tratamiento con el agente bioterapéutico n.º 830 redujo la incidencia de los puntajes histopatológicos en las extremidades posteriores de los ratones cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (ver las Figuras 65 a 68). Los puntajes

histopatológicos fueron analizados mediante ANOVA unidireccional para los datos no paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis) seguido por la postprueba de Dunn para múltiples comparaciones con el grupo tratado con vehículo. El agente bioterapéutico n.º 830 indujo una significativa reducción de los puntajes de inflamación de la articulación observados en la histopatología cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,01$). El agente bioterapéutico n.º 830 indujo una significativa reducción de los puntajes de daño al cartílago observados en la histopatología cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). El agente bioterapéutico n.º 830 indujo una significativa reducción de los puntajes de daño óseo observados en la histopatología cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$). El agente bioterapéutico n.º 830 indujo una significativa reducción del total de los puntajes histopatológicos cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ($p < 0,001$).

Resumen

Se observaron puntajes clínicos incrementados desde el Día 28 después de la primera administración de colágeno tipo II, conforme se espera en este modelo de artritis en ratones DBA/1. El agente bioterapéutico n.º 830 mostró que es efectivo en el tratamiento

de la artritis en este modelo. El agente bioterapéutico n.º 830 fue efectivo para reducir la gravedad de los puntajes clínicos y para reducir la enfermedad patológica en las articulaciones, tal como se demuestra en el análisis histopatológico.

- 5 Las respuestas de la memoria inmunológica proliferativa al Colágeno II fueron apreciadas en los cultivos de esplenocitos de todos los grupos experimentales. La respuesta específica al colágeno fue significativamente reducida a continuación del tratamiento con el agente bioterapéutico n.º 830 (Grupo 3).
- 10 La mayor parte de las citoquinas de células T probadas mostraron incrementos detectables entre el medio de control y estimulado con Colágeno II en el grupo tratado con vehículo. Estos incrementos no fueron tan obvios en el grupo tratado con el bioterapéutico. Esto respalda ampliamente las respuestas de la memoria
- 15 inmunológica proliferativa al Colágeno II que se describe anteriormente.

Hubo pruebas de supresión del eje Th1/Th17, que es la respuesta patogénica en este modelo y en la RA humana. La correlación de niveles reducidos de citoquinas con una proliferación reducida

20 parece un indicio de modulación inmunitaria. No hubo pruebas de que esta modulación resultara ya sea de niveles mejorados de IL-4 asociados con Th2 o con incrementos en la citoquina que tiene modulación inmunitaria, la IL-10.

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

Los ratones analizados en el ejemplo 1 fueron sometidos a un
5 análisis adicional para caracterizar adicionalmente el efecto de
las composiciones de la presente invención sobre la respuesta
inflamatoria del asma alérgica.

Materiales y métodos

10 **Extracción de sangre y preparación del suero en el día 14.** Las
muestras de sangre de los animales fueron recolectadas a través
de punción cardíaca. El suero fue aislado de la muestra de sangre
mediante centrifugación durante 5 min a 14 000 g y almacenadas
a -20 °C.

15

Extracción de órganos en el día 14. Recolección del lóbulo
izquierdo del pulmón en formalina para análisis histológico
posterior. Recolección de los lóbulos derechos del pulmón (todos
los lóbulos restantes) y extracción del suero para el
20 congelamiento instantáneo y posterior análisis. El fluido de BAL
remanente fue congelado instantáneamente para posterior
análisis.

Medición de los niveles de anticuerpo en el suero y fluido BAL

La producción de anticuerpo IgE total e IgG1 específico de los ácaros del polvo doméstico (HDM) fue medida en el BAL y suero por medio de un ensayo ELISA.

5 **Aislamiento del pulmón y análisis histológico**

Los lóbulos izquierdos del pulmón fueron fijados en formalina seguido por incrustamiento en parafina, seccionamiento, y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. El puntaje histológico posterior fue llevado a cabo a ciegas de la siguiente manera: Cinco
10 campos de visión aleatorios por muestra fueron puntuados para la inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y la producción de mucosidad. La infiltración inflamatoria fue puntuada con el siguiente sistema de calificación:

15 0 - normal

1 - infiltrados inflamatorios leves

2 - infiltrados inflamatorios moderados

3 - infiltrados inflamatorios marcados

4 - infiltrados inflamatorios graves

20 5 - infiltrados inflamatorios muy graves

En cada campo de visión, las vías respiratorias fueron medidas en tamaño y se cuantificaron/um las cantidad de las células de mucosidad.

Medición de mediadores inflamatorios en el tejido del pulmón

Los lóbulos del pulmón derecho (todos los lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de los mediadores inflamatorios fueron congelados instantáneamente para la medición posterior de
5 CCL11, IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17A, CXCL1, CCL3, CXCL2 y CCL5 mediante un ensayo multiplex disponible comercialmente (Merck-Millipore). El análisis fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 27 a 45.

Como fundamento de los hallazgos que se describen en el ejemplo 1, el análisis de los infiltrados celulares en el tejido del pulmón
15 de los ratones tratados con la cepa 830 mostraron una notable y estadísticamente significativa reducción en el puntaje promedio de la inflamación (ver las Figuras 31 y 33).

Los niveles de anticuerpo en el fluido de BAL y el suero fueron analizados (ver las Figuras 27 a 30). No se observó ningún efecto
20 evidente del tratamiento bacteriano sobre los niveles de anticuerpo en el suero. Esto puede reflejar una falla en el experimento, debido a que la dispersión de los datos de y las barras de error para cada tratamiento es importante, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como podría

esperarse. También, los niveles de anticuerpo en el suero de línea de referencia podrían haber ocultado cualquier cambio.

De manera similar, ningún efecto evidente del tratamiento bacteriano sobre los niveles de citoquina en el tejido del pulmón

5 fue observado (ver las Figuras 35 a 45). De nuevo, esto puede reflejar una falla en el experimento, debido a que la dispersión de los datos y las barras de error para cada tratamiento son importantes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como podría esperarse. También es posible que
10 el mecanismo de acción implicado influya en respuestas tempranas de la citoquina que no fueron ya detectables en el día 4 posterior a la provocación final de las vías respiratorias con HDM. Se debe tomar algún cuidado cuando se interpretan los datos de la citoquina en el presente estudio, debido a la variabilidad en los niveles
15 detectados. Esta variabilidad puede explicarse en parte por el hecho de que el tejido del pulmón fue separado para los diferentes análisis, y de esta manera un lóbulo de pulmón puede no haber sido completamente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación.

20

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

Los ratones probados en el ejemplo 2 fueron sometidos a análisis adicional para caracterizar adicionalmente el efecto de las

composiciones de la presente invención sobre la respuesta neutrofílica asociada con el asma grave.

Material es y métodos

5 **Extracción de órganos en el día 18.** Recolección del lóbulo izquierdo del pulmón en formalina para el análisis histológico de seguimiento continuo. Recolección de los lóbulos derechos del pulmón (todos los lóbulos restantes) y extracción del suero para el congelamiento instantáneo y posterior análisis. El fluido
10 remanente del BAL fue congelado instantáneamente para posterior análisis.

Medición de los mediadores inflamatorios en el tejido del pulmón (posterior análisis). Los lóbulos del pulmón derecho (todos los
15 lóbulos restantes) aislados para la cuantificación de los mediadores inflamatorios fueron congelados instantáneamente para la medición posterior de IFN-gamma, IL-1 alfa, IL-1 beta, CXCL1, CCL3, CXCL2, CCL5, IL-17A, TNF-alfa, IL-17F, IL-23 e IL-33 mediante un ensayo multiplex comercialmente disponible
20 (Merck-Millipore). El análisis fue llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Medición de los niveles de anticuerpo en el suero y fluido de BAL (posterior análisis). La producción anticuerpo IgG1 e IgG2a

específicos de los ácaros del polvo doméstico (HDM) fue medida en el BAL y suero mediante ensayo ELISA.

Aislamiento de pulmón y análisis histológico (posterior

5 **análisis)**. Los lóbulos izquierdos del pulmón fueron fijados en formalina seguido por el incrustramiento en parafina, seccionamiento, y tinción con hematoxilina y eosina y PAS. El puntaje histológico posterior fue llevado a cabo a ciegas de la siguiente manera: cinco campos de visión aleatorios por muestra
10 fueron puntuados para la inflamación (infiltración peribronquial e infiltración perivascular) y la producción de mucosidad. La infiltración inflamatoria fue puntuada con el siguiente sistema de calificación:

0 - normal

15 1 - infiltrados inflamatorios leves

2 - infiltrados inflamatorios moderados

3 - infiltrados inflamatorios marcados

4 - infiltrados inflamatorios graves

5 - infiltrados inflamatorios muy graves

20

Resultados y análisis

Los resultados de los experimentos se muestran en las Figuras 46 a 63.

En relación con los niveles de citoquina, como para el ejemplo

4, la dispersión de los datos y las barras de error para cada tratamiento son importantes, y los controles positivos y negativos no parecen haberse comportado como necesariamente podría esperarse. También es posible que el mecanismo de acción implique la influencia de respuestas tempranas de la citoquina que no fueron ya detectables en el día 4 posterior a la provocación final de las vías respiratorias con HDM. Se debe prestar atención cuando se interpretan los datos de la citoquina en el presente estudio, debido a la variabilidad en los niveles detectados. Esta variabilidad puede explicarse en parte por el hecho de que el tejido del pulmón fue separado para los diferentes análisis, y de esta manera un lóbulo de pulmón puede no haber sido completamente representativo o comparable al mismo lóbulo en otros ratones debido a la distribución irregular de la inflamación. Sin tomar en cuenta esta variabilidad, se mostró un evidente efecto antiinflamatorio sobre los niveles de citoquina para la cepa 830 y el control positivo anti-IL-17 Ab en general se comportó tal como era esperado.

Con las advertencias mencionadas anteriormente, los datos en la Figura 53 sugieren que el tratamiento con la cepa 830 puede lograr una reducción en los niveles de $TNF\alpha$, que puede indicar un mecanismo de acción relacionado con la influencia sobre la liberación de quimioquina (y de esta manera la incorporación de las células) por medio de las células inmunes estromales o innatas.

TNF α es parte de la vía Th17. Tomando este conjunto de datos, se puede concluir que la cepa 830 tuvo un efecto beneficioso sobre el mecanismo de inflamación en este modelo de ratón de asma neutrofílica grave.

5

Ejemplo 6 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de ratón de esclerosis múltiple

Resumen

Los ratones fueron administrados con las composiciones que
 10 comprenden cepas bacterianas de acuerdo con la presente invención
 y los ratones fueron posteriormente inmunizados con glicoproteína
 de la mielina de los oligodendrocitos para inducir la
 encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es el
 modelo experimental más comúnmente utilizado para la esclerosis
 15 múltiple humana. Se descubrió que las composiciones de la presente
 invención tienen un notable efecto sobre la incidencia de la
 enfermedad así como la gravedad de la enfermedad.

Cepa

20 830: bacteria depositada con número de acceso NCIMB 43281

Diseño del estudio

Grupos:

1. Grupo de control negativo. Tratamiento con vehículo de control

(por vía oral).

5. Tratamiento con inóculo de bacteria terapéutica cepa 830 (por vía oral).

9. Grupo de control positivo. Tratamiento con dexametasona (i.p.).

5 10. Grupo de control sin tratar.

Cantidad de ratones por grupo = 10

Días -14 a día 27: administración diaria del vehículo de control por vía oral (Grupo 1).

10 Días -14 a día 27: administración diaria del inóculo de bacteria terapéutica por vía oral (Grupo 5).

Días 0-28: administración de dexametasona (intraperitoneal) tres veces a la semana (Grupo 9)

15 Día 0: se mezcló MOG35-55 (glicoproteína de la mielina de los oligodendrocitos - 2 mg/ml) y CFA (2 mg/ml de MTB) 1:1 lo que resultó en soluciones de 1 mg/ml. 100 µl de la mezcla péptido-CFA fue inyectada por vía subcutánea en cada pata posterior. Administración de la toxina pertussis intraperitonealmente (300 ng).

20 Día 1: administración de la toxina pertussis intraperitonealmente (300 ng).

Días 7- en adelante: medición de incidencia de la enfermedad y peso tres veces a la semana.

Criterios de valoración y análisis

Los ratones fueron analizados por la incidencia de la enfermedad y gravedad de la enfermedad tres veces a la semana. El puntaje fue llevado a cabo a ciegas. La gravedad de la enfermedad fue evaluada utilizando un puntaje clínico en el rango desde 0 hasta 5, con 5 indicando un ratón muerto (ver sistema de puntaje clínico a continuación).

Monitoreo

10 En los días indicados los ratones fueron pesados y observados por puntaje de actividad de la enfermedad y la incidencia de la enfermedad.

Observaciones sobre el puntaje de actividad de la enfermedad:

0 - Sin cambios obvios en la función motora en
15 comparación con los ratones no inmunizados.

0,5 - Punta de la cola está flácida.

1,0 - Cola inmóvil.

1,5 - Cola inmóvil e inhibición de las patas posteriores.

2,0 - Cola inmóvil y debilidad de las patas posteriores.

20 0 - Existen signos obvios de inclinación de la cabeza cuando se observa el andar. El equilibrio es escaso.

2,5 - Cola inmóvil y arrastre de las patas posteriores.

0 - Existe una fuerte inclinación de la cabeza que hace que el ratón ocasionalmente se tropiece.

3,0 - Cola inmóvil y parálisis completa de las patas posteriores.

3,5 - Cola inmóvil y parálisis completa de las patas posteriores.

5 Además: el ratón se mueve alrededor de la jaula, pero cuando se coloca sobre su costado, es incapaz de enderezarse por sí mismo. Patas posteriores están juntas en un costado del cuerpo.

4,0 - Cola inmóvil, parálisis completa de las patas posteriores y parcial de las patas delanteras.

10 Ratón se mueve alrededor de la jaula pero luce alerta y se alimenta.

4,5 - Parálisis completa de las patas posteriores y parcial de las patas delanteras, sin movimiento alrededor de la jaula. El ratón es inmediatamente sometido a eutanasia y removido de la

15 jaula.

5,0 - El ratón es sometido a eutanasia debido a grave parálisis.

Cuando un animal tiene un puntaje de actividad igual o mayor de la enfermedad que 1, se considera que tiene un puntaje positivo

20 de la incidencia de la enfermedad.

Resultados

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 70 y 71.

La inducción de la enfermedad en los grupos de control negativo

fue exitosa con puntajes elevados mostrados por el vehículo de control y el control no tratado. El efecto del tratamiento con la cepa 830 fue notable y los ratones tratados con la cepa 830 exhibieron una incidencia notablemente reducida de la enfermedad y de la gravedad de la enfermedad. En realidad, la reducción en la incidencia de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad fue comparable con el grupo de control positivo. Estos datos indican que la cepa 830 puede ser útil para el tratamiento o prevención de la esclerosis múltiple.

10

Ejemplo 7 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de ratón de uveítis

Resumen

Este estudio utilizó un modelo de ratón de uveítis inducida por proteína que se enlaza al interfotorreceptor retinoide (IRBP, por sus siglas en inglés) para probar los efectos de la administración bacteriana sobre la uveítis. La uveítis es un problema de salud con riesgo de pérdida de la visión que resulta de la inflamación intraocular y la destrucción del tejido de la retina. Esta enfermedad puede estudiarse en roedores en un modelo con uveoretinitis experimental autoinmune (EAU, por sus siglas en inglés) [47]. La EAU es un trastorno específico de un órgano en donde las células Th1/Th17 son dirigidas hacia los antígenos retinales y producen citoquinas que activan las células

mononucleares residentes e infiltrantes lo que conduce a la destrucción del tejido. La EAU puede ser inducida en ratones mediante la provocación con antígenos retinales que incluyen el péptido de la proteína que se enlaza al interfotorreceptor retinoide (IRBPp, por sus siglas en inglés). El inicio de la enfermedad normalmente se produce desde el Día 8-9 y se maximiza después de los Días 14-15. Los signos de la enfermedad clínica pueden ser monitoreados utilizando imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI, por sus siglas en inglés).

10

Cepa

MRX008: *Blautia wexlerae*, bacteria depositada con número de acceso NCIMB 42486.

El agente bioterapéutico fue provisto en caldo de glicerol. El medio de desarrollo microbiológico (YCFA) fue utilizado para el cultivo del agente.

Ratones

Los ratones fueron de la cepa C57BL/6 y tenían 6 semanas de edad al comienzo del estudio. Se utilizaron 72 ratones (+ 36 animales satélite). Los animales no saludables fueron excluidos del estudio. Los animales fueron alojados en condiciones libres de patógenos específicos (spf, por sus siglas en inglés), en una sala de preparación monitoreada con control termostático (22 ± 4 °C).

Se permitió que los animales se aclimataran en condiciones de alojamiento estándares para animales para un mínimo de una semana antes del uso. El estado de salud de los animales fue monitoreado a través de todo este período y el grado de adecuación de cada animal para el uso experimental fue evaluado antes de iniciar el estudio. Los ratones fueron alojados en grupos de hasta 10 animales por jaula por la duración del estudio. La dieta de pellets irradiados (Lab diet, EU Rodent diet 22 %, 5LF5) y el agua estuvieron disponibles *ad libitum* a través de todos los periodos de aclimatación y estudio. Es improbable que algún constituyente de la dieta o el agua hayan interferido con el estudio.

Esquema experimental

Los ratones adultos hembra C57BL/6 fueron colocados en forma aleatoria en los grupos experimentales y se permitió que se aclimataran durante una semana. Los tratamientos fueron administrados de acuerdo con el programa a continuación. En el Día 0, los animales fueron administrados con una emulsión que contenía 200 µg de péptido de la proteína que se enlaza al interfotorreceptor retinoide 1-20 (IRBP p1-20) en adyuvante completo de Freund (CFA) con suplemento de 2,5 m/ml de *Mycobacterium Tuberculosis* H37 Ra mediante inyección subcutánea. También en el Día 0, los animales fueron administrados con 1,5 µg de *Bordetella Pertussis* mediante inyección intraperitoneal.

A partir del Día -14, los animales son pesados tres veces por semana. Desde el Día -1 hasta el final del experimento en el día 42, los animales son monitoreados dos veces por semana en cuanto a los signos clínicos de uveítis utilizando imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI).

Programa de administración

Todos los grupos son n=12.

El vehículo para la administración oral es medio YCFA.

El volumen de administración para la administración oral dos veces al día es de 5 ml/kg.

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

PO: administración oral, BID: dos veces al día, SC: inyección subcutánea, IP: inyección intraperitoneal, IRBP: proteína que se enlaza al interfotorreceptor, CFA: adyuvante completo de Freund, PTx: Toxina pertussis

Un grupo de control positivo fue también analizado utilizando el

tratamiento con el fármaco ciclosporina A.

Indicadores

Pesos corporales. A partir del Día -14, los animales son pesados
5 tres veces por semana. Los animales con una pérdida de peso
corporal igual a o mayor de 15 % de su peso corporal inicial (Día
0) en dos ocasiones consecutivas son sacrificados.

Observaciones clínicas no específicas. A partir del Día -14 hasta
10 el final del experimento, los animales son revisados diariamente
en cuanto a sus signos clínicos no específicos que incluyen postura
anormal (encorvada), condición del pelaje anormal (piloerección)
y niveles anormales de actividad (actividad reducida o
incrementada).

15

**Puntajes clínicos: formación de imagen de retina mediante
imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI).** A partir del Día
-1 hasta el final del experimento, los animales son puntuados dos
veces por semana en cuanto a los signos clínicos de uveítis. Las
20 imágenes de retina son capturadas utilizando TEFI en animales no
anestesiados pero restringidos luego de la dilatación de la pupila
utilizando Tropicamida al 1 % luego clorhidrato de fenilefrina
al 2,5%. Las imágenes de retina son puntuadas utilizando el
siguiente sistema. El puntaje máximo acumulativo es 20.

Puntuaje	Inflamaci3n del disco 3ptico	Vasos Retinales	Infiltraci3n del Tejido Retinal	Daño Estructural
1	M3nima	1-4 engrosamient os leves	1-4 pequeas lesiones o 1 lesi3n lineal	Lesiones retinales o atrofia que implica $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ del 3rea retinal
2	Leve	>4 engrosamient os leves o 1-3 engrosamient os moderados	5-10 pequeas lesiones o 2-3 lesiones lineales	Atrofia panretinal con m3ltiples pequeas lesiones (cicatrices) o ≤ 3 lesiones lineales (cicatrices)
3	Moderada	>3 engrosamient os moderados	>10 pequeas lesiones o >3 lesiones	Atrofia panretinal con >3 lesiones lineales o

			lineales	lesiones confluentes (cicatrices)
4	Grave	>1 engrosamient os graves	Lesión lineal confluente	Desprendimien to retinal con pliegue
5	No visible (manchas blancas o desprendimiento grave)			

Resultados

Los resultados del estudio se muestran en las Figuras 72 a 74.

- 5 **Proliferación celular (animales satélite, día 21)**. Los ganglios linfáticos de drenaje (DLN, por sus siglas en inglés) fueron removidos y las células fueron aisladas. Después del conteo, las células fueron cultivadas durante 72 h en presencia o ausencia del péptido IRBP. Los sobrenadantes para el análisis de las
- 10 citoquinas fueron removidos antes de la pulsación con 3H-Timidina. Las células fueron luego cultivadas durante 18 h adicionales antes de recolectar y determinar la proliferación mediante la incorporación de 3H-timidina utilizando un betacontador.
- Los grupos mostraron proliferación celular al estímulo de IRBP
- 15 anterior que la apreciada en los antecedentes del medio de control (estos valores de antecedentes fueron sustraídos del resultado IRBP para proveer datos como Δcpm). Ambos grupos dieron fuertes

respuestas proliferativas a un estímulo de control positivo (anti-CD3/CD28), mostrando que las células en el cultivo fueron viables y capaces de proliferar (datos no mostrados).

Las respuestas proliferativas al péptido IRBP fueron analizadas
5 mediante ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para la comparación de las respuestas estimuladas en el grupo experimental con el grupo de control.

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

Los grupos de tratamiento (que incluyen el vehículo solo) no mostraron proliferación significativamente incrementada por
15 encima de la observada en los animales de control.

Las respuestas proliferativas al péptido IRBP fueron analizadas mediante ANOVA unidireccional seguido por la postprueba de Dunnett para la comparación de las respuestas estimuladas en los grupos de tratamiento con el grupo de vehículo. No se observaron
20 diferencias estadísticas.

Puntajes clínicos: formación de imagen de retina mediante imagenología fundal endoscópica tópica (TEFI). Los datos de los puntajes TEFI medidos en el grupo de control desde el Día 0 hasta

el Día 21 fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos seguido por la postprueba de Dunn para múltiples comparaciones entre los días experimentales.

La administración de IRBP indujo un incremento significativo en los puntajes TEFI medidos desde el Día 14 ($p < 0,01$) y en el día 21 ($p < 0,0001$) cuando se compara con el día 0 en el grupo de control (Figura 73).

Los datos de los puntajes TEFI medidos en todos los grupos experimentales en el día 21 fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos seguido por la postprueba de Dunn para múltiples comparaciones entre los grupos experimentales.

En esta etapa en el experimento, no hubo diferencia significativa entre los grupos experimentales, pero los puntajes TEFI fueron menores en el grupo tratado con MRX008 que en los grupos de control negativo. De hecho, los puntajes TEFI fueron menores en el grupo tratado con MRX008 que en el control positivo, grupo tratado con ciclosporina A.

Conclusiones. Las respuestas proliferativas al péptido IRBP se observaron en los cultivos de ganglio linfático de todos los grupos experimentales, excluyendo los animales sin tratamiento previo, lo que indica la exitosa inducción de la enfermedad. Los puntajes clínicos determinados mediante TEFI aumentaron desde el Día 14,

conforme se espera en este modelo con uveítis inducida por IRBP. En el Día 21, las diferencias significativas entre los grupos experimentales no son aún visibles, pero se observó una notable reducción en la incidencia de la enfermedad y en la gravedad de la enfermedad en el grupo tratado con MRX008, que fue una mayor reducción que la observada para el grupo de control positivo. En particular, estos datos indican que el tratamiento con la cepa MRX008 redujo el daño a la retina, la inflamación del disco óptico y/o la infiltración del tejido de la retina por parte de las células inflamatorias (ver el sistema de puntaje TEFI de imagen de retina mencionado anteriormente). Estos datos indican que la cepa MRX008 puede ser útil para el tratamiento o prevención de la uveítis.

Ejemplo 8 - Eficacia de los inóculos bacterianos de MRX006 en un modelo inflamatorio inducido por LPS - concentración reducida de citoquina

Resumen

La cepa bacteriana MRX006 (830) fue analizada en un ensayo antiinflamatorio (n=9) para determinar su efecto sobre las concentraciones de citoquina. La inflamación fue inducida utilizando un desencadenante de la respuesta inflamatoria muy establecido, lipopolisacárido (LPS). La magnitud y características de la respuesta inflamatoria en los grupos tratados con MRX006 (830) fueron comparadas con los grupos de

control. Se descubrió que las composiciones de la presente invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular, reducen la concentración de las citoquinas IL-6 y TNF α . Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la presente invención tienen un amplio fenotipo inflamatorio y pueden ser
5 útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tal como neutrofilia y asma.

Resultados y análisis

10 Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 75 y 76.

Tal como se muestra en las Figuras 75 y 76, respectivamente, la administración de LPS produce un incremento de los niveles de IL-6 y TNF α , como podría esperarse después de la inducción de la
15 inflamación. Es muy importante el hecho de que los niveles de estas citoquinas son significativamente reducidos en los grupos tratados con MRX006 (830). Por lo tanto, las composiciones de la presente invención reducen la concentración de las citoquinas inflamatorias y por consiguiente tienen un amplio fenotipo
20 antiinflamatorio.

Ejemplo 9 - Eficacia de los inóculos bacterianos de MRX006 en un modelo inflamatorio inducido por LPS - maduración reducida de las células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DC)

Resumen

La cepa bacteriana MRX006 (830) fue analizada en un ensayo antiinflamatorio que implica la detección de la extensión de la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DC). Estas células, particularmente las células CD1a+ CD14- conforme se utilizan en este ejemplo, están implicadas en la respuesta inflamatoria luego de la maduración. La maduración de las células CD1a+ CD14- es indicada por su expresión aumentada de CD80, CD83, CD86 y HLA-DR. Se descubrió que las composiciones de la presente invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular, reducen la maduración de las células dendríticas asociadas con la respuesta inflamatoria (CD1a+ CD14-). Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tal como neutrofilia y asma.

Resultados y análisis

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 77. Tal como se muestra en la Figura 77, la administración de LPS produce un aumento en la expresión de los marcadores de la maduración en las MoDC, tal como se indica mediante el desplazamiento de la línea de color negro hacia la derecha del gráfico. Es muy importante el hecho de que el nivel de expresión de los marcadores de la maduración se reduce en el grupo LPS tratado

con MRX006 (tal como se indica mediante el desplazamiento de la línea completa de color negro hacia la izquierda). Para el grupo de LPS+MRX006, el nivel de expresión de los marcadores inflamatorios CD80, CD83 y HLA-DR retorna al nivel de expresión en el control no estimulado (línea punteada). Además, el nivel de expresión de CD86 en el grupo de LPS+MRX006 es también reducido en gran medida en comparación con el LPS grupo solo. De esta manera, las composiciones de la presente invención reducen el nivel de maduración de las MoDC asociadas con la inflamación y, por lo tanto, tienen un amplio fenotipo antiinflamatorio.

Ejemplo 10 - Eficacia de los inóculos bacterianos en un modelo de ratón del modelo inflamatorio inducidos por ovoalbúmina - división reducida de las células CD4+

15 Resumen

La cepa bacteriana MRX006 (830) fue analizada en un ensayo inflamatorio adicional (n=5) que implica la detección del nivel de células CD4+. Los niveles aumentados de las células CD4+ son un indicador de la inflamación. Una de las razones para esto es que las células CD4+ están implicadas en las vías inflamatorias Th17 e IL-17. La inflamación fue inducida utilizando un desencadenante muy establecido de la respuesta inflamatoria, la ovoalbúmina. Se descubrió que las composiciones de la presente invención alivian la respuesta inflamatoria y, en particular,

reducen la cantidad de células CD4+. Por lo tanto, los datos indican que las composiciones de la presente invención pueden ser útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tal como neutrofilia y asma.

5

Resultados y análisis

Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 78. Tal como se muestra en la Figura 78, la cantidad de células CD4+ en la población que experimenta tres o más divisiones de las células aumenta después de estímulo con ovoalbúmina (como podría esperarse luego de una respuesta inflamatoria). Críticamente, la cantidad de células que experimenta tres o más divisiones después del estímulo con ovoalbúmina se reduce significativamente en los grupos tratados con MRX006. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención reducen los niveles de células CD4+ y, de esta manera, la presente invención puede ser útil para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, tal como neutrofilia y asma.

20 ***Ejemplo 11 - Pruebas de estabilidad***

Una composición que se describe en el presente documento que contiene por lo menos una cepa bacteriana que se describe en el presente documento es almacenada en un recipiente sellado a 25 °C o 4 °C y el recipiente es colocado en una atmósfera que tiene

30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 % de humedad relativa. Después de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años, por lo menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la cepa bacteriana permanecerá tal como se mide en unidades formadoras de colonias determinadas mediante los protocolos estándares.

Secuencias

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

```

1  tgcaagtcga  gcgaagcgct  tacgacagaa  ccttcggggg  aagatgtaag
   ggactgagcg
61  gcggacgggt  gagtaacgcg  tgggtaacct  gcctcataca  gggggataac
   agttggaac
15 121  ggctgctaataccgcataag  cgcacggtat  cgcatagatac  agtgtgaaaa
   actccggtgg
   181  tatgagatgg  accgcgtct  gattagctag  ttggaggggt  aacggccac
   caaggcgacg
   241  atcagtagcc  ggcctgagag  ggtgaacggc  cacattggga  ctgagacacg
20  gcccagactc
   301  ctacgggagg  cagcagtggg  gaatattgca  caatggggga  aaccctgatg
   cagcgacgcc
   361  gcgtgaagga  agaagtatct  cggtatgtaa  acttctatca  gcagggaaga
   aatgacggt

```

421 acctgactaa gaagccccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggttaatac
 gtagggggca
 481 agcgttatcc ggatttactg ggtgtaaagg gagcgtagac ggaagagcaa
 gtctgatgtg
 5 541 aaaggctggg gcttaacccc aggactgcat tggaaactgt ttttcttgag
 tgccggagag
 601 gtaagcggaa ttcctagtgt agcggtgaaa tgcgtagata ttaggaggaa
 caccagtggc
 661 gaaggcggct tactggacgg taactgacgt tgaggctcga aagcgtgggg
 10 agcaaacagg
 721 attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatac taggtggttg
 ggagcaaagc
 781 tcttcggtgc cgcagcaaac gcaataagta ttccacctgg ggagtacgtt
 cgcaagaatg
 15 841 aaactcaaag gaattgacgg ggacccgcac aagcggtgga gcatgtggtt
 taattcgaag
 901 caacgcgaag aaccttacca agtcttgaca tcgatctgac cggttcgtaa
 tggaaccttt
 961 ccttcgggac agagaagaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc
 20 gtgagatgtt
 1021 gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccct atcctcagta gccagcaggt
 gaagctgggc
 1081 actctgtgga gactgccagg gataacctgg aggaaggcgg ggacgacgtc
 aaatcatcat

1141 gccccttatg atttgggcta cacacgtgct acaatggcgt aaacaaaggg
aagcgagccc

1201 gcgaggggga gcaaatecca aaaataacgt cccagttcgg actgcagtct
gcaactcgac

5 1261 tgcacgaagc tggaatcgct agtaatcgcg aatcagaatg tcgcggtgaa
tacgttccccg

1321 ggtcttgtac acaccgccccg tcacaccatg ggagtcagta acgcccgaag tc

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

TTTKGTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCG
CTTACGACAGAACCTTCGGGGGAAGATGTAAGGGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGC
GTGGGTAACCTGCCTCATAACAGGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAAG
CGCACAGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCGCGTCTG

15 ATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGG
TGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGT
ATGTAAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTA

20 AAGGGAGCGTAGACGGAAGAGCAAGTCTGATGTGAAAGGCTGGGGCTTAACCCAGGACTG
CATTGGAACTGTTTTTCTTGAGTGCCGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACG
TTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
CGATGAATACTAGGTGTTGGGGAGCAAAGCTCTTCGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTAT

TCCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAA
 GCGGTGGAGCATGTGGTTTATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCGA
 TCTGACCGGTTCGTAATGGAACCTTTCCTTCGGGACAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTG
 TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCGTC
 5 AGTAGCCAGCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGAGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGG
 CGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGC
 GTAAACAAAGGGAAGCGAGCCCGCGAGGGGGAGCAAATCCCAAAAATAACGTCCCAGTTTCG
 GACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATG
 TCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAA
 10 CGCCCGAAGTCAGTGACCCAACCTTAGGGAGGGAGCTGCCGAAGGCGGGATTGATAACTGG
 GGTGAAGTCTAGGGGGT

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

15 1 caagtcgaac ggggaattant ttattgaaac ttcggtcgat ttaatttaat
 tctagtggcg
 61 gacgggtgag taacgcgtgg gtaacctgcc ttatacaggg ggataacagt
 cagaaatggc
 121 tgctaatacc gcataagcgc acagagctgc atggctcagt gtgaaaaact
 20 ccggtggtat
 181 aagatggacc cgcgttgat tagcttggtg gtggggtaac ggcccaccaa
 ggcgacgatac
 241 catagccggc ctgagagggt gaacggccac attgggactg agacacggcc
 cagactccta

301 cgaggagcag cagtggggaa tattgcacaa tgggggaaac cctgatgcag
 cgacgccgcg
 361 tgaaggaaga agtatctcgg tatgtaaact tctatcagca gggaagatag
 tgacggtacc
 5 421 tgactaagaa gccccggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta
 gggggcaagc
 481 gttatccgga tttactgggt gtaaaggag cgtagacggt gtggcaagtc
 tgatgtgaaa
 541 ggcattgggt caacctgtgg actgcattgg aaactgtcat acttgagtgc
 10 cggaggggta
 601 agcgggaattc ctagtgtagc ggtgaaatgc gtagatatta ggaggaacac
 cagtggcgaa
 661 ggcggcttac tggacggtaa ctgacgttga ggctcgaaag cgtggggagc
 aaacaggatt
 15 721 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgaataacta ggtgtcgggt
 ggcaaagcca
 781 ttcggtgccg tcgcaaacgc agtaagtatt ccacctgggg agtacgttcg
 caagaatgaa
 841 actcaaagga attgacgggg acccgacaaa gcggtggagc atgtggttta
 20 attcgaagca
 901 acgcgaagaa ccttaccaag tcttgacatc cgctgaccg atccttaacc
 ggatctttcc
 961 ttcgggacag gcgagacagg tggatgcattg ttgtcgtcag ctcgtgtcgt
 gagatgttgg

1021 gttaagtccc gcaacgagcg caaccctat cctcagtagc cagcatttaa
 ggtgggcact
 1081 ctgggggagac tgccagggat aacctggagg aaggcgggga tgacgtcaaa
 tcatcatgcc
 5 1141 ccttatgatt tgggctacac acgtgctaca atggcgtaaa caaaggggaag
 cgagattgtg
 1201 agatggagca aatcccaaaa ataacgtccc agttcggact gtagtctgca
 acccgactac
 1261 acgaagctgg aatcgctagt aatcgcggat cagaatgccg cggatgaatac
 10 gttcccgggt
 1321 cttgtacaca ccgcccgtca caccatggga gtcagtaacg cccgaagtca
 gtgacctaac
 1381 tgcaaagaag gagctgccga aggcgggacc gatgactggg gtgaagtcgt
 aacaaggt

15

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

TTCATTGAGACTTCGGTGGATTTAGATTCTATTTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
 GGGTAACCTGCCTTATACAGGGGGATAACAGTCAGAAATGGCTGCTAATACCGCATAAGCG
 20 CACAGAGCTGCATGGCTCAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATAAGATGGACCCGCGTTGGAT
 TAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGGCCTGAGAGGGTG
 AACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
 TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGAAGTATCTCGGTAT
 GTAAACTTCTATCAGCAGGGAAGATAGTGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTA

CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAA
GGGAGCGTAGACGGTGTGGCAAGTCTGATGTGAAAGGCATGGGCTCAACCTGTGGACTGCA
TTGGAAACTGTCATACTTGAGTGCCGGAGGGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGGTAACTGACGTT
5 GAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGAATACTAGGTGTCNGGGGAGCATGGCTCTTCGGTGCCGTCGCAAACGCAGTAAGTATT
CCACCTGGGGAGTACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGTCTTGACATCCG
CCTGACCGATCCTTAACCGGATCTTTCCTTCGGGACAGGCGAGACAGGTGGTGATGGTTG
10 TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTC
AGTAGCCAGCATTTAAGGTGGGCACTCTGGGGAGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGC
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCG
TAAACAAAGGGAAGCGAGATCGTGAGATGGAGCAAATCCCCAAAATAACGTCCCAGTTCGG
ACTGTAGTCTGCAACCCGACTACACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGC
15 CGCGGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCAGTAAC
GCCCCGAAGTCAGTGACCTAACTGCAAAGAAGGAGCTGCCGAA

SEQ ID NO:5 (cepa 830 secuencia de cromosomas) - ver listado electrónico de secuencias.

20

SEQ ID NO:6 (cepa 830 secuencia de plásmidos) - ver listado electrónico de secuencias.

REFERENCIAS:

- [1] Spor et ál. (2011) *Nat Rev Microbiol.* 9(4):279-90.
- [2] Eckburg et ál. (2005) *Science.* 10;308(5728):1635-8.
- [3] Macpherson et ál. (2001) *Microbes Infect.* 3(12):1021-35
- [4] Mazmanian et ál. (2005) *Cell* 15;122(1):107-18.
- [5] Frank et ál. (2007) *PNAS* 104(34):13780-5.
- [6] Machiels et ál. (2013) *Gut.* 63(8):1275-83.
- [7] WO 2013/050792
- [8] WO 2014/167338
- [9] Goldin y Gorbach (2008) *Clin Infect Dis.* 46 Suppl 2:S96-100.
- [10] Azad et ál. (2013) *BMJ.* 347:f6471.
- [11] Liu et ál. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1896-1902.
- [12] Park et ál. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol.* 62(Pt 4):776-9.
- [13] Liu et ál. (2008) *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 8):1896-902.
- [14] Masco et ál. (2003) *Systematic and Applied Microbiology,* 26:557-563.
- [15] Srůtková et ál. (2011) *J. Microbiol. Methods,* 87(1):10-6.
- [16] Ye et ál. (2015) *PLoS One.* 10(1):e0117704.
- [17] Balato et ál. (2014) *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(8):1016-24.
- [18] Monteleone et ál. (2011) *BMC Medicine.* 2011, 9:122.
- [19] Fahy (2009) *Proc Am Thorac Soc* 6.256-259
- [20] Miossec y Kolls (2012) *Nat Rev Drug Discov.* 11(10):763-76.
- [21] Yang et ál. (2014) *Trends Pharmacol Sci.* 35(10):493-500.

-
- [22] Koenders *et ál.* (2006) *J. Immunol.* 176:6262-6269.
- [23] Amedei *et ál.* (2012) *Int J Mol Sci.* 13(10):13438-60.
- [24] Shabgah *et ál.* (2014) *Postepy. Dermatol. Alergol.* 31(4):256-61.
- [25] Zhang (2015) *Inflammation.* Aug 23.
- [26] Luger y Caspi (2008) *Semin. Immunopathol.* 30(2): 134-143.
- [27] Numasaki *et ál.* (2003) *Blood.* 101:2620-2627.
- [28] Karin (2006) *Nature.* 441: 431-436.
- [29] Faghih *et ál.* (2013). *Iranian Journal of Immunology.* 10(4):193-204.
- [30] Numasaki *et ál.* (2005) *J. Immunol.* 175: 6177-6189
- [31] Hammerich y Tacke (2014) *Clin Exp Gastroenterol.* 7:297-306.
- [32] Miyamoto-Shinohara *et ál.* (2008) *J. Gen. Appl. Microbiol.,* 54, 9-24.
- [33] Leslie *et ál.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3592-3597.
- [34] Mitropoulou *et ál.* (2013) *J Nutr Metab.* (2013) 716861.
- [35] Kailasapathy *et ál.* (2002) *Curr Issues Intest Microbiol.* 3(2):39-48.
- [36] Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2da Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller
- [37] Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)
- [38] *Handbook of Microbiological Media, Cuarta Edición* (2010) Ronald Atlas, CRC Press.
- [39] Strobel (2009) *Methods Mol Biol.* 581:247-61.

-
- [⁴⁰] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20ma edición, ISBN: 0683306472.
- [⁴¹] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream et ál., eds., 1998, Academic Press).
- [⁴²] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2da ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [43] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et ál., eds., 1987) Suplemento 30
- [44] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [45] Brand et ál. (2007) *Nature Protocols*. 2(5):1269-1275
- [46] Jiao et ál. (2014) *Immunopathology and Infectious Diseases*. 184(4):1085-93.
- [47] Caspi (2003) *Curr Protoc Immunol*. Capítulo 15: Unidad 15.6.